

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507997

(P2005-507997A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/574

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/553

F I

GO 1 N 33/574 Z N A D

C 1 2 Q 1/68 A

GO 1 N 33/53 M

GO 1 N 33/553

GO 1 N 37/00 1 O 2

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 159 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-538395 (P2003-538395)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月28日 (2002.10.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月26日 (2004.4.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/034570
 (87) 国際公開番号 W02003/035895
 (87) 国際公開日 平成15年5月1日 (2003.5.1)
 (31) 優先権主張番号 60/330, 669
 (32) 優先日 平成13年10月26日 (2001.10.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/369, 945
 (32) 優先日 平成14年4月4日 (2002.4.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 399012963
 イムニベスト・コーポレイション
 IMMUNIVEST CORPORAT
 I O N
 アメリカ合衆国19899デラウェア州
 ウィルミントン、ピー・オー・ボックス8
 985、ノース・マーケット・ストリート
 1105番、スウィート1300
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106231
 弁理士 矢野 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 同一試料についての包括的核酸および形態学的特徴のマルチパラメーター分析

(57) 【要約】

血液中で見出される稀な細胞および稀な転写体からのmRNAライブラリーの遺伝子特異的起点増幅用の方法を利用する高度に感度の良好なアッセイが開示される。該アッセイは、免疫磁気豊富化を介して単離された1ないし10の細胞で見出される稀なmRNA(10コピー/細胞)の検出を可能とする。該アッセイは、多重PCRに対する改良であり、血液中の循環カルシノーマ細胞についての稀なコーディング配列の十分な検出を可能とする。該方法は、組織または体液から単離された細胞のプロファイリングで有用であり、循環腫瘍細胞の初期段階検出および分類を含めた多様なカルシノーマの臨床診断に対する付属物として働く。慣用的またはマイクロアレイ様式いずれかでの細胞の核酸および蛋白質のプロフィールのモニタリングは、ステージング、療法に対する応答のモニタリング、緩解の確認、および後退の検出を含めた治療的介入の確認を容易とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 癌を有すると疑われるテスト対象の血液から、上皮を起源とする癌細胞を包含すると疑われる混合細胞集団を含む試料を得；
- b. 該試料を、他の試料成分を実質的に除外するまで、該癌細胞に特異的に結合する免疫磁性粒子と混ぜ合わせ；
- c. 磁性粒子 - 結合の癌細胞内で豊富化された、分離された細胞画分を生成するために、試料 - 免疫磁性粒子混合物を高勾配磁場に付し；次いで
- d. 該癌細胞の存在、癌を示す該試料内の該癌細胞の存在の該豊富化された画分をアッセイする

10

ことを含むことを特徴とする、テスト対象における病気の重症度を診断する方法

【請求項 2】

該テスト対象における循環癌細胞の存在を評価する請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該テスト対象の癌根絶手順への応答が、循環する癌細胞の該存在によって評価される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該テスト対象が、前立腺癌、乳癌、大腸癌 APUD系細胞種 (apudoma)、分離腫、鰓腫、悪性カルチノイド症候群、カルチノイド心疾患、癌、例えば、ウォーカー癌、基底細胞癌、基底有棘細胞癌、ブラウン - ピアス (Brown-Pearce) 癌、腺管癌、エールリヒ腫瘍、上皮内癌、クレブス 2、メルケル細胞癌、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、スキルス癌、細気管支癌、気管支原性肺癌、扁平上皮細胞癌および移行細胞細網内皮症、黒色腫、軟骨芽細胞腫、軟骨腫、軟骨肉腫、繊維腫、繊維肉腫、巨細胞腫、組織球腫、脂肪腫、脂肪肉腫、中皮腫、粘液腫、粘液肉腫、骨腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、滑膜腫、腺線維腫、腺リンパ腫、癌肉腫、脊索腫、間葉腫、中腎種、筋肉腫、エナメル上皮腫、セメント質腫、歯牙腫、奇形腫、絨毛腫、腺癌、腺腫、胆管腫、胆脂種、円柱腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、顆粒膜細胞腫、卵巢男性胚腫、肝臓癌、汗腺腫、島細胞腫、ライディッヒ細胞腫、乳頭腫、セルトリ細胞腫、卵胞膜細胞腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、筋原細胞腫、筋腫、筋肉腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、脳室上衣腫、節神経腫、神経膠腫、髓芽細胞腫、髓膜腫、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経症上皮腫、神経繊維腫、神経腫、傍神経節腫、非クロム親和性傍神経節腫、アンチオ角化腫 (antiokeratoma)、硬化性血管腫、血管腫症、グロームス血管腫、血管内皮腫、血管腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、松果体腫、癌肉腫、軟骨肉腫、葉状嚢肉腫、繊維肉腫、血管肉腫、平滑筋肉腫、白血肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、筋肉腫、粘液肉腫、卵巢癌、横紋筋肉腫、肉腫 (カポジ肉腫および肥満細胞肉腫)、新生物 (例えば、骨、消化器系、肝臓、脾臓、脳下垂体、睾丸、眼窩、頭頸部、中枢神経系、聴覚、骨盤、呼吸管および泌尿生殖器)、神経繊維腫症および子宮頸部形成異常よりなる群から選択される癌であると診断される請求項 1 記載の方法。

20

30

【請求項 5】

該癌細胞の存在につき、

40

- a. 該癌細胞から細胞質生体分子を放出し；
- b. 該細胞質生体分子を単離し；次いで
- c. 該細胞質生体分子を分析する

ことからなる該豊富化画分を該分析する請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該流体試料を得ることが細胞分画による請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

該放出が浸透化剤の添加により達成される請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

該浸透化剤が洗剤、界面活性剤、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 7 記

50

載の方法。

【請求項 9】

該浸透化剤がサポニン、Immunipermおよびその組合せよりなる群から選択される請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

該浸透化剤がImmunipermである請求項 4 記載の方法。

【請求項 11】

該流体試料を得ることが試料を細胞安定化剤で処理することを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

該安定化剤がアルデヒド、尿素、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 11 10 記載の方法。

【請求項 13】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

該安定化剤がジアルデヒドである請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

該ジアルデヒドがグルタルアルデヒド、グリオキサル、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

該安定化剤がCyto-chexTM、StabilocyteTM、およびTransfixTMよりなる群から選択される請求項 11 記載の方法。

20

【請求項 17】

該細胞質生体分子の放出が該安定化剤への曝露によって形成されるマクロ分子複合体を包含する請求項 11 記載の方法。

【請求項 18】

該細胞からの該細胞質生体分子の該放出が酵素消化と共に起こる請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

該酵素消化がプロテイナーゼ、求核試薬、およびその組合せからなる群を介して起こる請求項 18 記載の方法。

30

【請求項 20】

該プロテイナーゼがプロテイナーゼ K 消化、V8 プロテイナーゼ消化、プロナーゼ消化、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

該求核試薬が、リン酸系緩衝液、トリス系緩衝液、酢酸ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

該細胞質生体分子が蛋白質である請求項 5 記載の方法。

【請求項 23】

該蛋白質の該単離が化学的抽出、電気泳動法、クロマトグラフィー、免疫分離、およびアフィニティー技術よりなる群から選択される請求項 22 記載の方法。

40

【請求項 24】

該細胞質生体分子が核酸である請求項 5 記載の方法。

【請求項 25】

該核酸が、細胞質 RNA、核およびミトコンドリアの RNA、核およびミトコンドリアの DNA、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

該核酸が細胞質 mRNA である請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

該核酸の該単離が、RNA または DNA 化学的抽出、電気泳動法、クロマトグラフィー、

50

免疫分離、およびアフィニティー技術よりなる群から選択される請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 8】

該核酸の該単離がオリゴ (d T) に加えられた磁性ビーズでの捕獲による請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 9】

該標的細胞を、該流体試料を得た後に、該細胞質生体分子による以外の表現型の発現につき評価する請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 0】

該表現型発現が、形態学的な検査、細胞成分染色、免疫分析、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

該分析が、マルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡法、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースの画像解析 (bright field base image anaysis)、毛細管容積測定 (capillary volumetry)、スペクトル画像解析、マニュアル細胞分析および自動化細胞分析よりなる群から選択されるプロセスによることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 2】

該細胞質生体分子の該分析が機能的プロテオミックスによる請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 3】

該機能的プロテオミックスが、蛋白質発現プロフィール、ウェスタンブロット、アミノ酸配列分析、電気泳動法、2 - D 電気泳動法、質量分析、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー核磁気共鳴、赤外、原子吸光、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

該細胞質生体分子の該分析が機能的ゲノミックスによる請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 5】

該機能的ゲノミックスが m R N A プロフィール分析、蛋白質発現プロフィール分析、ポリメラーゼ鎖反応、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列分析、マイクロアレイ上の遺伝子発現、電気泳動法、2 - D 電気泳動法、質量分光測定、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー核磁気共鳴、赤外、および原子吸光よりなる群から選択される請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

少なくとも 2 つの遺伝子マーカーの存在についての該細胞質 R N A の該分析が多重遺伝子 R T - P C R による請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

該遺伝子マーカーが該癌細胞の起源組織を同定する請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 8】

該遺伝子マーカーが既知の癌を診断する請求項 5 記載の方法。

【請求項 3 9】

該遺伝子マーカーが乳癌、前立腺癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌、腎臓癌、および膀胱癌よりなる群から選択される癌を規定する請求項 5 記載の方法。

【請求項 4 0】

該遺伝子マーカーが、M G B 1、M G B 2、P I P、C E A、P S A、P S M A、h K 2、A R、D D 3、H e r - / N e u、B C L 2、E G F R、T S、D P Y D、I G F 2、E R、P R、c y p 1 9、T E R T、一般的上皮組織特異的遺伝子、C K 1 9、C K 8、C K 2 0、E p C A M、M U C 1、トポイソメラーゼ、u P A、u P A R、M M P、一般的白血細胞特異的 m R N A、アルファ - 1 - グロビン、C D 1 6、C D 4 5、および C D 3 1 よりなる群から選択される癌を規定する請求項 5 記載の方法。

【請求項 4 1】

該遺伝子マーカーについての該細胞質 R N A の該分析が、

10

20

30

40

50

- a . その全てが 5 ' 末端で普遍的プライマー伸長を有する遺伝子特異的プライマーの少なくとも 1 組で該遺伝子マーカーを逆転写し、
 - b . 該遺伝子特異的プライマーを除去し、
 - c . 遺伝子特異的アンプリコンを P C R 増幅において該普遍的プライマー伸長で増幅し、次いで、
 - d . 該遺伝子特異的アンプリコンを同定する；
- ことを含むことを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 4 2】

該遺伝子特異的プライマーの該除去が、分子サイズ排除、固体支持体選択性付着、一本鎖特異的 D N a s e よりなる群を用い、ウラシル-N-グリコシラーゼを、デオキシウリジンで合成された D N A オリゴヌクレオチドプライマーで取り込んで達成される請求項 4 1 記載の方法。

10

【請求項 4 3】

該遺伝子特異的プライマーの該除去が、デオキシウリジンで合成された D N A オリゴヌクレオチドプライマーのウラシル-N-グリコシラーゼ処理で達成される請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 4】

該ウラシル-N-グリコシラーゼ処理後に D N a s e - フリー R N a s e の取込みを行う請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

該遺伝子特異的プライマーが、高プライマー-標的アニーリング特異性の条件下で用いられる請求項 4 1 記載の方法。

20

【請求項 4 6】

該高プライマー-標的アニーリング特異性が、天然組換え細胞修復メカニズムからの蛋白質で達成される請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

該高プライマー-標的アニーリング特異性が r e c A で達成される請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

該遺伝子特異的アンプリコンの該同定が、サイズベースの分析系におけるそのユニークな R f 値による請求項 4 1 記載の方法。

30

【請求項 4 9】

該サイズベースの分析系が P A G E、アガロースゲル電気泳動、キャピラリーゲル電気泳動、S E L D I、M A L D I、および c D N A アレイよりなる群から選択される請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 0】

該分析が、

- a . 直線状の増幅によって抽出された該核酸をブレ増幅し、ここに、該ブレ増幅の結果、a R N A の形態の全てのライブラリー転写体が少なくとも 1 0 0 0 倍増加し；
 - b . 1 0 0 0 までの独立して選択された注目する遺伝子についてのみ該 a R N A から第二ストランドを合成し；次いで
 - c . アレイ分析、電気泳動、およびその組合せよりなる群を用いて増幅された生成物を認識する；
- こと含む請求項 5 記載の方法。

40

【請求項 5 1】

該ブレ増幅が、S P 6 R N A ポリメラーゼプロモーター、T 3 R N A ポリメラーゼプロモーター、および T 7 R N A ポリメラーゼプロモーターよりなる群による請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

該ブレ増幅がランダムプライマーを使用して R N A ポリメラーゼを用いることによる請求

50

項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 3】

該第二ストランドの該合成が高プライマー - 標的アニーリング特異性の条件下で行われる請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 4】

該高プライマー - 標的アニーリング特異性が、天然組換え細胞修復メカニズムからの蛋白質によって達成される請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

該高プライマー - 標的アニーリング特異性が r e c A で達成される請求項 5 0 記載の方法。

10

【請求項 5 6】

該認識が D N a s e - フリー R N a s e での前処理による請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 7】

該前処理が、フェノール抽出、シリカ結合、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

該認識が全ての二本鎖生成物の増幅による請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 9】

該認識が、アレイ分析、電気泳動、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 5 0 記載の方法。

20

【請求項 6 0】

a . 該粒子が癌細胞に特異的に結合する免疫磁性粒子；

b . 細胞浸透化剤；

c . 細胞安定化剤；

d . 核酸放出剤；

e . 核酸増幅剤；

f . 二本鎖生成物につき選択する精製剤；

g . 二本鎖生成物の確認を可能にするヌクレオチド特異的検出剤；および

h . 請求項 1 記載の方法を用いるためのプロトコル

を含む循環癌細胞の存在につき患者試料をスクリーニングするためのテストキット。

30

【請求項 6 1】

さらに該癌細胞に対して結合特異性を有する免疫磁性粒子を含む請求項 6 0 記載のキット。

【請求項 6 2】

該細胞浸透化剤がサポニン、洗剤、界面活性剤、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 6 0 記載のキット。

【請求項 6 3】

該浸透化剤が Immuniperm である請求項 6 0 記載のキット。

【請求項 6 4】

該安定化剤がアルデヒド、ジアルデヒド、尿素、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 6 0 記載のキット。

40

【請求項 6 5】

該安定化剤が Cyto-chexTM、StabilocyteTM、および TransfixTM よりなる群から選択される請求項 6 0 記載のキット。

【請求項 6 6】

該放出剤がプロテイナーゼ、求核試薬、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 6 0 記載のキット。

【請求項 6 7】

該プロテイナーゼがプロテイナーゼ K、V 8 プロテイナーゼ、プロナーゼ、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 6 6 記載のキット。

50

【請求項 68】

該求核試薬が、リン酸系緩衝剤、トリス系緩衝剤、酢酸ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、およびその組合せよりなる群から選択される請求項 66 記載のキット。

【請求項 69】

該精製剤が該核酸に対して結合特異性を有する免疫磁性粒子である請求項 60 記載のキット。

【請求項 70】

該精製剤が、RNA または DNA 化学的抽出剤、電気泳動剤、クロマトグラフィー剤、免疫分離剤およびヌクレオチド親和性剤よりなる群から選択される請求項 60 記載のキット。

10

【請求項 71】

該増幅剤が、SP6 RNA ポリメラーゼ/プロモーター、T3 RNA ポリメラーゼ/プロモーター、および T7 RNA ポリメラーゼ/プロモーターよりなる群から選択され、該増幅剤が核酸含量を 1000 倍増加させる請求項 60 記載のキット。

【請求項 72】

該増幅剤が RNA ポリメラーゼ/ランダムプライマーであり、該増幅剤が核酸含量を 1000 倍増加させる請求項 60 記載のキット。

【請求項 73】

該増幅剤が、高プライマー - 標的アニーリング特異性を有するポリメラーゼ/プライマーである請求項 60 記載のキット。

20

【請求項 74】

該精製剤が DNase - フリー RNase である請求項 60 記載のキット。

【請求項 75】

該精製剤がフェノール抽出剤およびシリカ結合剤よりなる群からのものである請求項 60 記載のキット。

【請求項 76】

該ヌクレオチド特異的検出剤が、二本 - 鎖ヌクレオチド増幅剤、アレイ検出剤、および電気泳動剤よりなる群から選択される請求項 60 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、米国仮出願番号：60/369,945 (2002 年 4 月 4 日出願) および 60/330,669 (2002 年 10 月 26 日出願) および PCT/US02/26867 (2002 年 8 月 23 日出願) に対して合衆国第 35 法典第 119 条 (e) の下に優先権を主張する。

30

【0002】

発明の背景

発明の分野

本発明は、一般に、腫瘍学および診断テストの分野で有用なサイトゾル生体分子の遺伝子特異的増幅、分析およびプロファイリングに関する。本発明は、化学療法処置または癌再発のための癌スクリーニング、選択およびモニタリングのごとき分野で特に有用である。さらに詳しくは、本発明は、計数および形態学的イメージ分析のために細胞完全性を同時に維持しつつ、腫瘍細胞からの mRNA および DNA、または生物学的試料からの他の稀な細胞の包括的分析を容易にするための方法、装置およびキットを提供する。これを達成するために、本発明は、引き続いてのまたは平行してのマルチパラメーターフローサイトメトリー、イメージ、および免疫細胞化学分析のために細胞の形態学的および抗原性特徴を依然として維持しつつ、放出された核酸の発現プロフィールを測定するための浸透化試薬によって、腫瘍細胞のごとき細胞から放出可能な可溶性サイトゾル生体分子の分析を可能とする方法も提供する (米国特許第 6,365,362 号参照)。また、本発明は、アルデヒドおよびアルデヒド - 尿素誘導体系固定剤からの安定化された試料を用いる同包括的分析を可能とする方法を提供する。

40

50

【0003】

関連技術の記載

いずれの与えられた細胞も、そのゲノムに存在する遺伝子の合計数のうち一部のみを発現するであろう。発現される遺伝子の合計数の一部が、発生および分化、ホメオスタシス、細胞周期調節、老化、アポトーシスなどのとき細胞の機能の態様を決定する。遺伝子発現の改変は、正常な細胞の発生および癌のとき病気状態の出現を決定する。特異的遺伝子の発現は、いずれかの与えられた細胞の性質に対して顕著な効果を有するであろう。従って、本発明によって提供されるものごとき遺伝子発現を分析する方法は、基本的な分子生物学の研究および腫瘍生物学において重要である。特異的な遺伝子、特に稀な遺伝子の同定は、これらの発現レベルを反映する種々の病気についての診断、予後および治療に対する鍵を提供することができる (Levskyら、Single-Cell Gene Expression Profiling, Science, 297: 836-840 (2002))。

10

【0004】

種々の遺伝子発現は、細胞における遺伝子発現を評価する通常に用いられる方法である。特に、cDNAマイクロアレイ分析は、健康なおよび病気の個体からの細胞または器官から得られたcDNA標的配列のレベルを比較する。次いで、これらの標的を、膜の上に固定化されたプローブ断片の組にハイブリダイズさせる。次いで、得られたハイブリダイゼーションパターンの差を検出し、二つの源の遺伝子発現の差に関連付ける (米国特許第6,383,749号)。この手法は、数十万の遺伝子 - 特異的プローブの遅いかつ時間のかかる分析を必要とする。加えて、標的配列における標的およびプローブと第二の構造との間の非相補的標的配列の非特異的結合の間の相互作用のごとき事象の比較は、信号ノイズ比の減衰をもたらすハイブリダイゼーションに干渉し得る。

20

【0005】

遺伝子特異的プライマー組が、種々の発現のアッセイにおいて記載されている (米国特許第5,994,076号および米国特許第特許第6,352,829号)。ここに、遺伝子特異的プライマー組を用いて、複雑なライブラリー中のmRNAライブラリーサブセットを特異的に増幅させ、全ライブラリー標識増幅と比較した場合に、cDNAアレイシグナルの改良が達成された。このタイプの分析の焦点は、遺伝子発見リサーチの一部としての試料アレイ発現プロフィールを比較するものであり、診断用途を持つ実践的な細胞RNA分析のための方法の開発を比較するものではなかった。

30

【0006】

よって、遺伝子特異的プライマー組を用いて、mRNAライブラリーからのmRNAの特異的サブセットを選択的に増幅させたが、定量的および定性的分析双方を含む診断療法のための稀な細胞検出で特に適用できる増幅プロセスにおいて信号ノイズ比を低下させる明らかな必要性が存在する。

【0007】

今日、一般に、治療的介入に対する必要性の評価において初期検出システムを、患者の血液中の循環腫瘍細胞の存在が提供すると予測される。循環癌腫細胞の正確な計数を可能とするかなり感度の良いアッセイは、末梢血液腫瘍細胞負荷が病気状態と関連することを示している (Terstappenら Peripheral Blood Tumor Cell Load Reflects the Clinical Activity of the Disease in Patients with Carcinoma of the Breast International J. of Oncology, 17:573-578, 2000)。

40

【0008】

加えて、細胞のタイプおよび起源の分類は、治療に対するより包括的な基本方針を提供するであろう。散在性の大きなB細胞リンパ腫 (DLBCL) のときいくつかの癌に対する緊急治療は、臨床的予後と関連する二つの異なる病気のタイプに基づく (Rosenwaldら、Use of Molecular Profiling to Predict Survival After Chemotherapy after Diffuse Large-B Cell Lymphoma, New England Journal of Medicine, 346: 1937-1947, (2002))。DLBCLにおいて、胚中心B-細胞に由来する腫瘍は化学療法に対して感受性であり、より高い

50

生存のチャンスを有するが、活性化されたB細胞からのものは治療するのがより困難な傾向にある。かくして、これらの細胞のサブタイプは腫瘍細胞の起源に依存する。

【0009】

これらのサブタイプの層化は、腫瘍の起源細胞に依存する。サブタイプの差は単一遺伝子の分析によって決定することができるのは少ない場合であるが、遺伝子の組合せの全アレイはより決定的である。遺伝子発現レベルのマイクロアレイ分析を通じての遺伝子発現パターンのチャートリングは、リンパ腫、急性白血病、乳癌、肺癌および肝臓癌のごとき他の病気における腫瘍特性の望ましいインジケーターであろう。しかしながら、これを採用するためには、診断用途のための遺伝子情報は、現存の技術水準の技術においては固有のかなりの信号ノイズ比の分解を必要とする。

10

【0010】

かくして、特に、そのような方法が速いハイブリダイゼーション、相補的プローブに対する標的の高度に特異的な結合、および実質的に改良された信号ノイズ比を供する場合、遺伝子発現を分析するための新しい方法の開発に対して大きな興味を持たれる。加えて、これらの方法は、遺伝子発現を評価する場合にさらなる重要性を有する。というのは、それは、癌および病気に関連する状態に関係するからである（ここに出典明示してその双方を本明細書の一部とみなす米国出願10/079,939および米国出願09/904,472参照）。

【0011】

発明の概要

20

本発明は、前記した先行技術の不利を克服する、循環する稀な細胞から単離された増幅mRNAにおける遺伝子発現を評価するための方法、装置およびキットを提供する（図1参照）。本発明は、構造的細胞完全性または表現型特徴を維持しつつ、単一標的細胞または細胞集団からの可溶性または放出可能な細胞質生体分子を単離する方法を提供する。従って、細胞は新鮮であるか、または安定化されたものであり、かつ架橋剤で固定化され、ポア-形成性浸透組成物と接触させ、次いで、核酸を回収する。安定化された細胞からのRNA（PCT/US02/26867）は、増幅および引き続いての定性的および定量的PCR分析のための、または普遍的プライマーPCR増幅と融合させた、およびそれが続く逆転写（RT）プライマーの遺伝子特異的サブセットを介する定量的分析のために、プロテイナーゼおよび求核性逆行薬剤の組合せを介して回収される。かくして、本発明の1つの焦点は、浸透化に先立って細胞を安定化させ、固定し、次いで、同安定化された細胞から核酸を放出させることによって、細胞質生体分子分析および表現型細胞分析双方のための細胞を調製する。

30

【0012】

また、本発明は、細胞または細胞集団を浸透化組成物と接触させ、核および/またはミトコンドリアDNA、全RNA、mRNA、可溶性蛋白質、および他の標的物質のごとき1以上の構成要素につき放出されたおよび/または放出されていない画分を別々に分析することによって、標的細胞内の核および/またはミトコンドリアDNA、RNA、蛋白質および他の可溶性成分を分離することにも指向される（米国出願60/330,669）。

【0013】

本発明は、細胞（類）を浸透化組成物と接触させ、次いで、正常な細胞を形質転換細胞から区別するための遺伝子型および表現型細胞特徴に由来する特徴を含む機能的細胞プロフィールを生じさせる細胞質生体分子および表面生体分子を別々に分析することによって、同一細胞（類）または細胞集団から細胞質生体分子および膜または表面生体分子双方を分析することを一体化させる。

40

【0014】

本発明の単離および稀な細胞分析を組合わせて、稀な細胞から獲得されたmRNAを包括的にプロファイリングすることを可能とする方法および試薬が供される。例えば、循環腫瘍細胞（CTC）を規定する細胞の集団は、癌患者の末梢血液および骨髄で見出される稀な細胞のタイプであろう。mRNAは本発明で記載した細胞調製物を介して得られるが、当該分野で通常用いられるいずれのプロトコルを取込むこともできる。

50

【0015】

注目する細胞を含む試料からのmRNAの単離および精製の後、低いmRNAコピー数を伴う極端に稀な細胞事象の検出は、T7 RNAポリメラーゼ(T7RNAP)ベースのプレ-増幅手法を用いまたは用いることなく遺伝子特異的RT-PCRパネルを介して達成される(米国出願60/369,945)。プレ-増幅は、Eberwine aRNA方法(Van Gelderら, 1990)の修飾法を用いる全mRNAライブラリーの直線的増幅によって完了される。好ましい具体例において、アンチセンスmRNAライブラリー(aRNA)ライブラリープレ増幅の創製の結果、フェロ流体豊富化循環細胞から単離された元のmRNAに存在する全てのメッセージが少なくとも1000倍増加する。次いで、遺伝子特異的プライマーを用いて、注目する遺伝子パネルのみを増幅する。これらのプライマーは、循環腫瘍細胞のような既知の稀な事象を示す転写体を増幅するように設計される。標的配列の数は、稀な事象を示すいくつかの特徴との相関を可能とするのに必要な2のように少なく、または多くすることができる。これは、別々の個体反応として、または単一反応バイアル内で起こり得る。引き続いての分析により標的配列の少なくとも定性的評価がなされ、限定されるものではないが、本発明者らがここに遺伝子特異的起点(GSP)アレイおよび/またはGSP組-RT(普遍的PCR)として呈する2つのタイプの多重遺伝子分析方法のうちの1つのごとき方法で達成される。

10

【0016】

普遍的PCRは、mRNAライブラリープレ増幅の有りまたは無しにて単一反応試験管中で試料回収mRNAからの多重遺伝子分析を達成する。遺伝子の1つのパネルのみを一度に分析するのを可能とするプレ増幅はない。プレ増幅は1000までの異なる反応における単一試料を分析する利点を付け加え、かくして、遺伝子の多くの異なるパネルを異なる時点で問うことができる。他の方法を利用することもできるが、普遍的PCRカクテルパネルの分析は、アレイまたはキャピラリーゲル電気泳動(CGE)によって達成される。従って、該システムは、cDNAマイクロアレイフォーマットで測定した場合に、1ないし数千の別々のmRNAタイプの同時定性および定量測定を可能とする。

20

【0017】

かくして、本発明は、プレ浸透化組成物、架橋後のRNA回収、表面に共有結合したオリゴ(dT)プローブでの磁性マイクロスフィア、および小さなまたは大きなマイクロアレイ、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)、HPLC、電気泳動および他の分析プラットフォームを用いる包括的RNA分析の捕獲および分析用の他の遺伝子特異的磁性マイクロスフィア-結合プローブを含めたいくつかまたは全ての必要な試薬を含むプロトコルおよびキットに指向される前記単離およびプロファイリング分析の組合せを含む。

30

【0018】

好ましい具体例の詳細な記載

これまでの議論で示されたごとく、癌診断のより包括的かつ実践的形態は、細胞内および細胞外膜抗原の分析ならびに今日までに相互に排除するプロセスであった同一細胞または異なる細胞集団における細胞RNA含有量およびDNA含有量の分析を含まなければならない(US 6,365,362)。この排除性は、細胞質生体分子を単離する方法と共に、細胞完全性を維持する主要目的を有する、構造的細胞内抗原を分析するプレ-分析細胞調製方法の基本的不適合性によるものであった。あるいは、プレ-分析細胞調製もまた、可溶性細胞内成分を放出するための細胞をホモゲナイズする主要目的を有する、可溶性細胞質RNA、全細胞RNA、全細胞DNA、および/または蛋白質に制限された。特に、伝統的な表現型特徴付けは、パラホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド等のごとき架橋剤への細胞の曝露を介して達成される細胞構造の固定を必要とした。これらの厳しい細胞固定条件は、同時に、望ましくない共有結合架橋および/または単離されたRNA腫の断片化を引き起こす。同様の細胞内DNA-蛋白質架橋が最近報告されている(QuieveynおよびZhitkovick, Loss of DNA-Protein Crosslinks from Formaldehyde-Exposed Cells Occurs Through Spontaneous Hydrolysis and an Active Repair Process Linked to Proteasome Function, Carcinogenesis, 21:1573-1580(2000)。いわゆる非-ホルム

40

50

アルデヒドまたは非 - パラホルムアルデヒド固定剤（例えば、Cyto-ChexTM Streck Labs, Omaha, NE）は、ホルムアルデヒド - 尿素誘導体ドナー化合物を含む細胞 - 安定化添加剤である。それは、同時係属出願（ここに引用して一体化させるPCT/US02/26867）に開示された出荷または貯蔵の間に血液中の循環腫瘍細胞用の保存剤として用いられる。しかしながら、本発明者らによって行われた研究は、痕跡レベルの遊離ホルムアルデヒドを含むにすぎないCyto-ChexTMさえ、ホルムアルデヒドをゆっくりと放出するようであり、これは細胞内RNAを細胞内蛋白質に架橋させることができる。そのような架橋は本明細書の方法によって十分に逆行させて、包括的なRNA分析を可能とした。従って、細胞RNAおよびDNA分析は、未固定新鮮細胞、慣用的には、架橋しない、またはその架橋が細胞からのmRNA放出の間に逆行させることができる試薬で保存される細胞で調製されるRNA laterTM（Ambion）は商業的に入手可能なRNA安定化溶液であり、これはRNAを安定化させるが、同一試料について免疫原性、免疫化学またはイメージ分析を可能とせず、血液では効果的ではない。PreAnalytiXは血液RNA安定化剤を供するが、全RNA単離のみに基づく伝統的なホモゲナイゼーション以外を可能としないVacutainerTM試験管中のカオトロピック剤であるグアニジンイソチオシアネート溶液（GITC）溶液以外ではない。

10

20

30

40

50

【0019】

一般に、固定された細胞から回収されたmRNAは定量的ではなく、ひどく劣化しているか、または断片化されており、ほぼ200塩基の高度に可変な平均サイズに対して10倍も多いほぼ1750塩基の平均サイズを持つ無傷RNAのサイズを低下させ、よく理解されていない多くの複雑な化学的修飾を含む。しかしながら、固定剤由来RNAの正味の効果はひどく信頼を危うくするmRNA分析である（Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, (2002)）。定量的ではなく定性的ではあるが、長さが100塩基対未満のアンプリコンのために設計された逆転写酵素ポリメラーゼ鎖反応（RT-PCR）分析と組合わせた退屈な非定量的mRNAサルベージ技術は限定された値を示す（US 5,346,994）。さらに、固定された細胞のこの限定されたRNA分析は表現型分析に従わなければならない。かくして、伝統的なRNA単離技術は、細胞の構造を破壊し、かつさらに細胞DNAおよびRNA集団を混ぜ合わせることで分析を複雑とする完全な細胞溶解またはホモゲナイゼーションを必要とするので、二つのプロセスは同一細胞試料に対して順次に行うことができない（Maniatisら, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press (1989)）。従前の報告は、組織におけるRNA回収の方法を改良する必要性を示している（Godfreyら, Quantitative mRNA Expression Analysis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using 5' Nuclease Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J. of Molecular Diagnostics, 2:84-91(2000)）。血液からの回収可能で定量的な高品質全長無傷の全およびmRNAを安定化させ、かくして、包括的な分割を可能とするホルムアルデヒドおよび尿素系固定剤の適用は本発明の1つの態様の基礎である。

【0020】

かなり予期せぬことに、浸透化剤として用いるサポニンは、高度に選択的かつ効果的であって、細胞内細胞質RNAおよび他の生体分子のための剤を放出させ、それにより、細胞の溶解またはホモゲナイゼーションの必要性を軽減することが判明した。選択されたRNA放出剤としてのサポニンのこの新規な使用は、本発明の特に有利な構成要素である。サポニンのごとき界面活性剤は、伝統的には細胞膜を浸透化させ、細胞の完全性を維持しつつ染色試薬の取り込みを可能とすることによって、細胞内抗原の発現を調べるために用いられてきた。例えば、蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーション（FISH）による、または核染料DAPIでの核中のDNAのごとき細胞内構成要素の染色における、あるいは特異的標識抗体でのサイトケラチンの免疫染色における染色体または遺伝子の分析は、非常に重要な役割を演じている。細胞質細胞内蛋白質RNAまたはDNAの放出は、一般に、トリトンX-100のごときより強い界面活性剤での細胞の可溶化または完全な溶解によってなされる。しかしながら、サポニンは以前には、同一検体における、RNAを含む可溶性細胞内抗原の発現、および個々の細胞または細胞集団の表現型分けの双方を調べるのに用いられてきた。従って、順次の表現型分析ならびに同一細胞検体の細胞質における無傷RNAおよび可溶性蛋白

質の分析を可能とする方法がかなり望ましく、それは本発明の主題である。

【0021】

従って、本発明は、生物学的試料中に見出される全ての細胞、特に標的化細胞の迅速かつ効果的なRNAプロファイリングのための有利な方法、装置およびキットを提供する。本発明は、表現型および遺伝子型双方の別々の分析を可能とする方法を提供する。表現型は、抗体抗原蛋白質および質量分析プロファイリング方法および同一細胞または細胞集団からの無傷細胞質RNAの包括的な分析を介して問われ、かつプロファイルされる。同一のゲノムおよびミトコンドリアDNAの遺伝子型分けは、当業者が利用できるいずれかの手段によって別々にプロファイルすることができる。mRNAライブラリーの増幅と同様に、各ゲノムおよびミトコンドリアライブラリーをあらかじめ増幅することができ、多数のアッセイを多重置換増幅（MDA）による臨床的感度の喪失なくして行うことを可能とし、該技術は第一の効果的な全ゲノム増幅方法を可能とする。MDAは数個の細胞から限定されないDNAを生じさせる迅速な信頼性のある方法である。

10

【0022】

本明細書中に記載する発明は、細胞表面抗原、細胞質内抗原およびいずれかのタイプのRNAのごとき細胞表現型、および遺伝子型を単離し、それを特徴付けるのに効果的に用いることができる。表現型および遺伝子型分析は共に正確に同一の試料に対して順次に行うことができる。例えば、細胞表面分析およびRNA収穫の後に、残存する無傷の核およびミトコンドリアを、S1ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ保護、RT-PCR、SAGE、DD-RT-PCR、マイクロアレイcDNAハイブリダイゼーション、ISH、FISH、SNP、全てのRNAおよび全てのゲノムベースのPCR技術およびいずれかの蛋白質分析系のごとき全ての標準的RNA（mtRNA、hRNA）、DNAおよび蛋白質ベースの分析によって下流分析することができる。

20

【0023】

このタイプの細胞分析の多くの適用のうちの1つは、癌の診断におけるものである。多くの臨床家は、癌は、その初期の段階に封じ込めた場合、器官、特異的病気であると信じている。該病気は、それが現在利用できる方法を用いて最初に検出される時点までに全身的となる。従って、循環系における腫瘍細胞の存在を示唆する証拠は、前立腺特異的抗原のマモグラフィまたは測定のごとき他のテストと組合わせて置換え、または機能する最初のライン検出メカニズムであろう。これらの細胞に対する特異的マーカーを介しての細胞表現型（蛋白質およびRNA）および表現型を分析することによって、そのような細胞の器官起源、例えば、乳房、前立腺、結腸、肺、卵巣、または非造血器官の癌を容易に決定することができる。蛋白質、RNAおよびゲノムを分析することができ、特に腫瘍の臨床的兆候が得られない状況において、特異的腫瘍の存在ならびに起源の器官を同定することが可能であろう。これらのプロフィールは細胞の機能を規定するので、それは、いずれのほとんどの適当な療法タイプおよびコースが癌細胞検出で用いられるべきかを示す。さらに、手術後外科処置または他の成功した療法に関する循環腫瘍細胞の検出可能な証拠がない場合のモニタリングにおいて、さらなる治療が必要か否かをさらなる臨床的実験から決定することができるであろう。

30

【0024】

より包括的かつ初期の診断を提供するために、本発明の1つの具体例は、細胞または細胞の集団から細胞質生体分子を単離し、該細胞または複数細胞を浸透化化合物と接触させ、引き続いての表現型および形態学的分析のために細胞完全性を維持しつつ、細胞から注目する細胞質生体分子を単離する方法を含む。

40

【0025】

本発明における標的化され稀な事象とは、少なくとも部分的に、公知の稀な事象を示すいずれかの生体物質の発現をいう。従って、ホルモン、蛋白質、ペプチド、レクチン、オリゴヌクレオチド、薬物、化学物質、（RNAおよび/またはDNAのごとき）核酸分子、および細胞、アポトーシス体、細胞デブリス、核、ミトコンドリア、ウィルス、細菌などのごとき生物の部分は本発明の具体例に含まれるであろう。

【0026】

50

流体試料は、限定されるものではないが、細胞 - 含有体液、末梢血液、骨髓、尿、唾液、痰、組織ホモゲネート、精液、およびヒト対象から得ることができる稀な細胞のいずれかの他の源を含む。

【0027】

「細胞質生体分子」は、限定されるものではないが、細胞の細胞質区画に位置する蛋白質、ポリペプチド、糖蛋白質、オリゴ糖、脂質、電解質、RNA、DNA等のごとき注目する細胞標的分子を含む。細胞を浸透化化合物と接触させ、引き続いて細胞分離を行うと、細胞質生体分子は下流分析のために上澄みに存在する。全ての可溶性細胞質生体分子、例えば、膜ポアを横切ることができる全細胞質RNAライブラリーまたは標的構成要素を単離し、分析することができる。好ましい具体例において、焦点は、例えば、CTCにおいて、癌の診断および治療の管理において注目する腫瘍形成性トランスフォーメーションのインジケータとしての転写されたmRNAおよび翻訳された蛋白質の分析に対するものである。

10

【0028】

「膜生体分子」は、限定されるものではないが、外側細胞膜、核膜、ミトコンドリアおよび他の細胞オルガネラ膜を含めた、細胞膜と会合した、または細胞膜に埋もれた注目するいずれの細胞外、膜内または細胞内ドメイン分子も含む。本発明の浸透化化合物での浸透化に際し、標的膜生体分子は、通常は膜から可溶化されずまたは除去されず、すなわち膜生体分子は浸透化細胞と会合したままである。膜生体分子は、限定されるものではないが、外側膜の外部または細胞外表面に露出したもの、ならびに外側膜の内部表面に存在するもの、および核ミトコンドリアおよび全ての他の細胞内オルガネラ膜と会合した蛋白質を含めた、細胞膜に会合した蛋白質、糖蛋白質、脂質、炭水化物、核酸およびその組合せを含む。また、膜生体分子は細胞骨格蛋白質も含む。

20

【0029】

「表現型」または「表現型分け」とは、細胞の生命および死滅の全ての態様を構築し、それを制御するための内部に暗号化された遺伝可能な指令を貯蔵するDNAのごとき細胞内遺伝子物質を同定するプロセスをいう。「表現型」または「表現型分け」は、観察可能な外向き構造エレメントおよびその生産に基づいて細胞を分類することと定義される（すなわち、中間的RNAを含む）。これらは、トポロジー、形態学および他の表面特性を含み、その全ては、本発明の方法に取込まれる内部に暗号化された遺伝子型情報に由来する。対照的に、細胞の構造および完全性は、少なくとも、通常は、カオトロピック塩処理の間の全ての細胞構造の崩壊および/または機械的な細胞ホモゲナイゼーションによって、NP-40の存在下における核およびミトコンドリアを除く全ての細胞構造の完全な溶解を含む慣用的RNA単離技術の間に維持されない。

30

【0030】

細胞構造を参照する形態学的または形態学は、組織化学試薬での染色または抗体のごとき検出可能に標識された結合パートナーとの相互作用を可能とする細胞内もしくは表面のマーカーまたはエピトープを含めた、細胞および核のトポロジーおよび表面特徴に関して、慣用的に規定して用いられる。加えて、形態学は：核内のクロマチン分布の定量的測定と定義される「モルフォメトリー」の全分野を含む。

【0031】

用語ゲノミックおよびプロテオミックは、慣用的に定義されるごとく用いられる。「機能的」は、より広くゲノミックおよびプロテオミック双方を含む「機能的セロミック」、ならびに限定されるものではないが炭水化物についての「グルコノミック」および細胞脂質についての「リポドミック」を含めた他の標的カテゴリーのごとき、細胞の経験的に検出可能な生物学的特徴または特性についての形容詞として本明細書中では用いられる。得られた細胞特徴は、形質転換された細胞からの正常細胞の区別を可能とするプロフィールを提供する。

40

【0032】

「接触させる」は、化合物または試薬を細胞に直接的にまたは間接的に物理的に近接させることをいう。細胞および/または化合物はいずれかの数の緩衝液、塩、溶液などに存在

50

することができる。接触させるは、例えば、試薬溶液を、細胞と接触させるために、試験管、マイクロタイタープレート、マイクロアレイ、細胞培養フラスコ等に入れることを含む。マイクロタイタープレートおよびマイクロアレイ様式は、さらに、限定されるものではないが、核酸および蛋白質を含めた多数の細胞標的化合物または構成要素を同時に分析するための多重アッセイを可能とする。

【0033】

「浸透化化合物、試薬または組成物」は、引き続いての表現型分析を浸透化細胞で行うことができるように十分な膜、細胞質および核構造を維持しつつ、脂質 - コレステロール二層を含む、細胞膜中に小さなポアを形成するいずれの試薬も意味する。例えば、サポニンは、細胞膜構成要素と複合体化し、それにより、細胞壁または膜中に約 8 nm サイズの多数の膜貫通ポアを形成し、かくして、酵素、蛋白質、糖蛋白質、グロブリン、電解質等のごとき小さな可溶性サイトゾル構成要素の外向き拡散、および電解質のごとき細胞外試薬成分とも内部平衡化を可能とする公知の「ポア - 形成性」化合物である。

【0034】

「免疫磁性ビーズ」は、細胞上の表面マーカーまたはエピトープに対する実質的に選択的な親和性を持つ共有結合した結合試薬（例えば、抗体）を有し、それにより、高勾配磁気分離システム（AGMS）で生じたごとき磁場に曝露された場合に、磁氣的に標識された細胞の選択的捕獲を達成する磁氣的に標識されたナノ粒子またはマイクロ粒子である。方法、試薬および装置に対して本明細書中で用いる他の用語は慣用的に定義されたものであり、当業者に公知のものである。

【0035】

起源の組織、診断、予後、治療標的特徴付けおよびモニタリングを同定するための好ましい遺伝子発現標的（mRNAおよび蛋白質）は、限定されるものではないが、マノグロビン 1（MGB1）、マノグロビン 2（MGB2）、プロラクチン誘導性蛋白質（PIP）、カルシノ胚抗原（CEA）、前立腺特異的抗原（PSA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、腺カリクレイン 2（hK2）、アンドロゲン受容体（AR）、プロスタシン、ヘスピン（HPN）、DD3、Her-2/Neu、BCL2、表皮成長因子受容体（EGFR）、チロシンキナーゼ - タイプ受容体（HER2）、チミジル酸シンターゼ（TS）、血管内皮成長因子（VEGF）、膵臓ムチン（Muc1）、グアニリルシクラーゼ c（GC-C）、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（PIK3CG）、プロテインキナーゼ B ガンマ（AKT）、切除修復蛋白質（ERCC1）、アルファ - 1 グロビン（F6）、マクロファージ阻害性サイトカイン - 1（G6）、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（DPYD）、インスリン成長因子受容体（IGF2）、エストロゲン受容体アルファおよびベータ（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、アロマターゼ（cyp19）、テコメラーゼ（TERT）、一般的上皮組織特異的遺伝子、サイトケラチン 19（CK19）、サイトケラチン 5（CK5）、サイトケラチン 8（CK8）、サイトケラチン 10（CK10）、サイトケラチン 20（CK20）、上皮細胞接着因子（EpCAM）、ムチン 1 を含めたムチン（MUC1）、トポイソメラーゼ、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター（Upa）、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター受容体（Upar）、マトリックスメタロプロテインナーゼ（MMP）、一般的白血球細胞特異的 mRNA、アルファ - 1 - グロビン、CD16、CD45 および CD31 のごときマーカーを発現する感受性または抵抗性遺伝子を検出しモニタリングする目的で、乳房、前立腺、肺、結腸、卵巣、腎臓、膀胱の癌に由来する細胞を含む。このリストは、種々の起源、タイプおよび病気からの細胞を区別するために組立てることができる mRNA - 特異的遺伝子のアレイの一般的多様性を説明することを意図し、包括的であることを意図しない。

【0036】

安定化、放出および回収

（その双方をここに引用して一体化させる）共通に譲渡された米国特許第 6,365,362 号および米国特許出願シリアル番号 10/079,939 の以前に開示された発明の方法を用い、少なくとも 2,500 ないし約 10,000 倍の程度まで、白血球に対して循環上皮細胞を豊富化させることができる。血液中の循環上皮細胞の免疫磁気選択に続いて、本発明で具体化されたヌクレオチド分析を行う。該豊富化は、本発明の具体例で用い

10

20

30

40

50

られる細胞の特異的集団を選択するための当該分野で知られた多くの方法のうちの1つの例にすぎない。

【0037】

これらの細胞から無傷の細胞質全RNAおよびnRNAを放出し、それにより、それらを単離し、精製する方法は、予期せぬことに、かつ驚くべきことに、染色および免疫染色に先立って、細胞のサポニンでの慣用的浸透化の間に見出され、それにより、正確に同一の細胞、細胞の集団または検体についての細胞質RNAおよび細胞内抗原表現型分けおよびDNA遺伝子型分け双方の順序または並行した分析を可能とする。

【0038】

浸透化は、3つのタイプの一般的界面活性剤または洗剤：サポニンのようなボア形成試薬またはQS-21のごときサポニン、エスシン、ジギチオニン、カルデノライドなどのうちの1つを用いてこの基準下で達成することができる。これらの剤の全ては、膜の多孔度を増加させ、小さな可溶性細胞内構成要素を放出する。もう1つの群の剤は界面活性剤である。これらの剤は、溶解なくして膜に浸透するための比較的高い親水性-親油性バランスを有する。より低い親水性-親油性バランスを持つたのより溶解性の界面活性剤は、RNAを放出するであろうが、膜を可溶化させる傾向がある。これらは、限定されるものではないが、(商業的にはTween 20、40または80として知られた)ポリオキシエチレンソルビタン、ノニルフェノキシポリエトキシエタノール(NP-40)など、t-オクチルフェノキシエトキシエタノールまたはSDSを含む。

10

【0039】

細胞質RNA(およびmtRNAおよびhnRNAのごとき他のRNA)、細胞表面ならびに可溶性細胞内抗原、ミトコンドリアのごとき細胞オルガネアおよび残りの指標化核の引き続いての分析はすべて標準的なRNA、DNAおよび蛋白質ベースの分析術によって下流分析することができる。これらは、全てのタイプのプロフィール分析用のcDNA、RNAおよび蛋白質マイクロアレイ、質量分析、蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーション(FISH)、単一ヌクレオチド多形(SNP)、PCRのごときすべてゲノムベースの増幅技術、マイクロサテライト分析、制限断片長多形(RFLP、ALFP)、SAGE、DDRT-PCRを含む。

20

【0040】

そのような分析は、各々についての少なくとも1ないし10のRNA分子およびいずれかのRNA配列タイプについて行うことができるが、好ましくは、臨床的設定において病気状態のインジケータとしての細胞翻訳または転写プロフィールにおいて微妙な改変の検出を可能とする数千ないし数百万までのコピーの標的について行うことができる。蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、オリゴグリコシドなどのごとき放出可能なおよび放出可能でない細胞構成要素の他の機能的細胞プロフィールは、同様に、慣用的なマイクロアレイ、HPLC、抗分解の2D電気泳動法を含めた電気泳動法、または抗体アレイプロファイリングにより2つの画分を分析することによって生じさせることができる。

30

【0041】

本発明の浸透化化合物は限定されるものではないが、容易に水に分散して、球状ミセルを形成する脂肪酸および1以上の炭水化物に連結したコレステロール-様アグリコンまたはゲニン(いずれの炭水化物部位も保有しないトリテルペンまたはステロイド)から構築されたクラスの天然産物であるサポニン、ボア形成における活性種を含む。これらのおよび他の前記命名の適当なボア形成剤、ポリオキシエチレンソルビタン(Tween 20、40または80として商業的に公知)、ノニルフェノキシポリエトキシエタノール(NP-40)、およびt-オクチルフェノキシエトキシエタノールは、細胞構成要素の望ましくない可溶化および膜溶解を最小化させるには、十分に低い濃度で用いなければならない高HLB(親水性-親油性バランス)を有する。浸透化化合物の濃度範囲は、約10%サポニゲンを含むサポニンを用いる場合、約0.01ないし0.5%(w/v)である。好ましい浸透化化合物はサポニンである(Sigmaカタログ番号S-7900)。例えば、サポニゲンとして約20ないし25%純度のサポニン(Sigma S-4521)およびA

40

50

quila Biopharmaceuticals, Framingham, MAから入手可能な約99%純度の高度に精製されたサポニンQS-21のごとき、他の源からのより高い純度のサポニンを用いることもできる。他の使用可能な化合物は、ともにセイヨウトチノキに由来するアルファ-エスシンおよびベータ-エスシン(Sigma E-1378)浸透化化合物は、例えば、アジ化ナトリウム、Proclina 300(Rohm & Haas, Philadelphia, PAなど)のごとき抗微生物剤も含む、リン酸緩衝化溶液のごとき組成物中に存在させることができる。もう1つの好ましい浸透化剤は、ImmunipermTMであり、これは、それ自体が細胞質RNAの約50%(細胞中の全RNAの85%)を放出し、核またはミトコンドリアヌクレオチド当量に対して影響しない。固定された細胞における全細胞RNAおよび全DNAの残りの50%SDS、10
プロテアーゼ、ホルムアルデヒドスカベンジング剤、を含む放出性カクテルで放出させることができ、その組成物は、本発明の1つの具体例を構成する。個々のカクテル構成要素の正確な作用態様は知られていないが、SDSは、構造的細胞内蛋白質に架橋した細胞内RNAおよびDNAを可溶化し、それにより、より効果的な蛋白質分解およびホルムアルデヒド架橋核酸の放出を可能とするように働くと考えられる。限定されるものではないが、ヒドロキシルアミン、カルボキシメチルアミン、ヒドラジン、アセドヒドラシドおよび他のヒドラシドなどまたはヒドラジン誘導体、トリスのごときアミンによって例示される新規なホルムアルデヒドスカベンジング試薬は、放出される核酸の量および「質」を増加させることが判明し、ここに、質は増大した増幅速度および収率によって測定される。Immunipermおよび放出性カクテルで放出された2つの画分は、個々に分析することができる20
か、あるいは分析に先立ってプールすることができる。

【0042】

従って、細胞ヌクレオチドを放出することができる、ホルムアルデヒドスカベンジャーが添加されたまたは添加されていないいずれの界面活性剤またはプロテアーゼ(またはその組み合わせ)も、同時分析のための必要な形態を保存し、維持し、これは本発明の範囲内に含まれるであろう。

【0043】

かなり細胞RNAを断片化する傾向がある現在の細胞固定およびRNAサルベージプロトコルとは異なり、本発明は、細胞の完全性を維持しつつ、細胞膜に浸透するサポニンのごとき浸透化剤で処理した細胞からの無傷の細胞質全RNAおよびmRNAの90%を超えての抽出および単離を可能とする。mRNA単離は、免疫磁気細胞豊富化および免疫蛍光細胞標識手法にも適合する。T7、SP6またはT3プロモーター、フローサイトメトリー、マイクロアレイおよびCell Spotter^R(共にImmunicon Corp, PAによって製造された)またはCellTracksシステムを使用するRNAポリメラーゼプロモーターベースの直線的増幅方法のような細胞分析指針によって同定され特徴付けられた細胞の包括的RNA発現プロファイル分析を用いて、発現プロファイルを直接的に有効化し、それを補い、それを拡大し、ならびにそれから得られた情報を増強することができる。30

【0044】

特定の固定剤に限定するつもりはないが、浸透化細胞を架橋剤で処理して、前記したごとく、形態、および抗原、ヌクレオチドの完全性を維持する。Cyto-ChexTM、StabilCyteTMおよびTRANSfixTMは、血液検体中の血液細胞を長時間安定化させるにおいて有用性を示している3つの商業的に入手可能な安定化剤の例である。これらの安定化剤は、(主に、収縮を最小化することによって)細胞のサイズを維持し、フローサイトメトリーによって主として測定されるごとく細胞表面の抗原を保持するように最適化される。意図された適用は、一般に、直接的分析を含み、試料の広範な操作または特定の細胞集団の豊富化を必要としない。対照的に、本発明で単離され検出された循環腫瘍細胞、または他の稀な標的細胞は、非常に低い頻度で存在する病理学的に異常なまたは稀な細胞と定義され、かくして、検出に先立って実質的に豊富化を必要とする。40

【0045】

Cyto-ChexTM安定化剤は細胞安定化剤として、および、本発明の適用で証明されたごとく50

、細胞内蛋白質とマクロ分子複合体の形成をもたらす細胞内RNAのアルデヒド放出性固定剤として用いることができる。本発明者らは、予期せぬことに、好ましくはCytochexTMのごときホルムアルデヒドドナーでの固定化は、引き続いての試料プロセッシングの間にRNAを保持し、それを保護するのに必須であること、および十分に機能的なRNAの全部のまたは最適な放出は前記した放出カクテルと組合わせてサポニンを必要とすることを見出した。

【0046】

理想的な「安定化剤」または「保存剤」（本明細書においては、相互交換的に用いる）は、いずれにせよ、標的細胞の単離、検出および計数、および非標的細胞からのその区別を妨げる、生物学的検体中における干渉性凝集体および/または細胞デブリスの形成を最小化しつつ、生物学的検体に存在する注目する標的細胞を迅速に保存することができる組成物と定義される。換言すれば、抗凝固剤と組合わせた場合、安定化剤は抗凝固剤の性能に悪影響すべきでない。逆に、抗凝固剤は安定化剤の性能に干渉すべきでない。加えて、開示された安定化剤は固定という第3の機能も果たし、それにより、浸透化細胞を安定化させ、ここに、表現「浸透化された」または「浸透化」および「固定する」、「固定された」または「固定」は細胞生物学において慣用的に定義されている通りに用いられる。本明細書中における安定化剤の記載は、細胞生物学における当業者に容易に明らかな適当な濃度または量にてこれら剤を用いることを意味し、ここに、該濃度または量は損傷を引き起こすことなく標的細胞を安定化するのに効果的なものである。稀な細胞を保存する目的での本発明の組成物、方法および装置を用いる者は、それらをこれらの同一稀な細胞を損傷させまたは破壊するようには用いず、従って、適当な濃度または量を固有に選択するであろう。例えば、ホルムアルデヒドドナーであるイミダゾリジニル尿素は、当該検体の容量の0.1ないし10%、より好ましくは0.5ないし5%、最も好ましくは約1ないし3%の好ましい濃度にて効果的であることが判明している。ポリエチレングリコールのごときさらなる剤もまた、約0.1%ないし5%の好ましい濃度で添加した場合に、細胞を安定化させるにおいて効果的であると判明している。PCT/US02/26867にそのような剤の使用が記載されており、ここに引用して一体化させる。

10

20

【0047】

本発明の驚くべき態様は、マクロ分子複合体の一部としての細胞内RNAは増幅可能に、かつほとんど定量的な収率にて、細胞安定化剤および固定剤で既に処理した細胞から回収することができる。架橋されたRNAの十分な放出は、溶解性洗剤およびホルムアルデヒドスカベンジャーの存在下で酵素消化と組合わせたサポニンを必要とする。例えば、Cyto-ChexTM処理細胞のプロテイナーゼK、V8プロテイナーゼ、プロテイナーゼ消化の結果、完全な回収、または全長の包括的に分析可能なRNAが得られる。本発明で開示したホルムアルデヒドスカベンジャーの存在は、さらにRNA回収を改良することが見出された。

30

【0048】

本発明の具体例において、循環癌細胞または胎児細胞のごとき標的細胞は、他の非標的細胞からそれを効果的に単離し、それらの核酸を精製し、次いで、マイクロアレイ分析のために注目する標的（類）を増幅することによってアッセイすることができる。

【0049】

かくして、細胞質生体分子の単離は、まず、遠心または免疫磁気ビーズ豊富化を介して浸透化化合物から浸透化された細胞を分離することによって達成される。次いで、細胞質生体分子は上澄みに存在する。細胞質生体分子の単離は、磁性ビーズで捕獲することによって達成することができる。例えば、もし細胞質生体分子がmRNAであれば、磁性ビーズまたは非磁性支持体に付着させたオリゴ（dT）を用いて、遠心と共に、またはそれなくして、細胞からmRNAを捕獲し、それにより、分離することができる。もし細胞質生体分子が蛋白質であれば、特定の蛋白質に結合することができる抗体を用いることができ、ここに、該抗体は磁性ビーズまたは非磁性支持体に付着させることができる。標準蛋白質およびRNA化学抽出、電気泳動、クロマトグラフィー、免疫分離およびアフィニティー技術のごとき他の分離技術は当業者によく知られている。細胞および生体分子を分離するための

40

50

免疫磁気豊富化試薬およびデバイスは、限定されるものではないが、Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, Pa)、Dynal (New Hyde Park, NY) および Miltenyi Biotech Inc. (Aurum, CA) を含めたいくつかの製造業者から入手できる。該細胞は細菌細胞のごとき原核生物、または哺乳動物細胞のごとき真核生物とすることができ、それらはヒト起源が最も好ましい。好ましい具体例において、細胞はカルシノーマまたは腫瘍細胞である。好ましい注目するカルシノーマは、限定されるものではないが、乳房、前立腺、肺、結腸、および卵巣組織に由来し、例えば、血液および骨髄中の循環腫瘍細胞として、組織片または体液中に見出されるものを含む。

【0050】

各々、核酸または蛋白質の分析のための機能的ゲノミックスまたは機能的プロテオミックスいずれかと集合的に定義され、正確に同一試料に対する順次の細胞質および/または全細胞生体分子分析および膜生体分子分析のために細胞を調製する方法が開示される。前記したごとく、そのような分析は、以前には、本発明の方法に先立っては同一細胞（部位）では可能ではなかった。細胞を浸透化化合物と接触させて、構造的な生体分子および膜生体分子を改変することなく、前記したごとく、細胞質生体分子を放出させる。

10

【0051】

かくして、本発明においてここに開示するごとく、細胞を浸透化化合物と接触させ、安定化させ、細胞質生体分子を前記したごとく回収した後に、細胞試料からの細胞質生体分子を分析し、同一細胞試料からの膜生体分子を分析する方法が提供される。細胞質生体分子は関連する生体分子と共に、または順次に単離し、分析することができる。

20

【0052】

また、本発明は、サイトゾルまたは全細胞RNA、特にmRNAを単離するための試薬およびキットを提供する。該キットは、浸透化化合物、および、例えば、種々の長さのオリゴ(dT)または遺伝子-特異的配列またはランダム(縮重)オリゴヌクレオチドのごとき、RNAの単離および検出用のRNA抽出試薬またはハイブリダイゼーションプローブを含むことができる。該キットは、膜生体分子に結合する抗体のごとき、細胞に会合した蛋白質に結合する抗体を含むこともできる。抗体およびプローブは酵素により標識し、蛍光標識し、または放射性標識して、検出を行うことができる。抗体およびプローブは、例えば、磁性ビーズなどに付着させて、分離を容易とすることができる。

30

【0053】

分析

細胞質生体分子分析は、細胞の細胞質から単離され、生体分子を含むいずれのタイプの分析またはアッセイも含む。細胞質生体分子分析は、さらに、限定されるものではないが、mRNAプロファイリング、蛋白質発現プロファイリング、逆転写酵素ポリメラーゼ鎖反応、ノーザンブロッティング、ウェスタンブロッティング、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列分析、遺伝子発現SAGEの系列的分析、競合的ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)、電気泳動、2-D電気泳動、MALDIまたはSELDIによる質量分析、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、核磁気共鳴、赤外、原子吸光などを含めるがそれらに限定されない機能的ゲノミックス発現プロファイリングを含む。ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルにおける配列分析は、蛋白質、DNA/cDNA、またはmRNA配列中の突然変異の存在を示し、それを同定することができる。例えば、元の遺伝子または蛋白質のプロファイリング分析は、形質転換したまたは腫瘍細胞におけるオンコジンの存在を示すことができる。適当な癌療法の後の引き続いての分析は、緩解の間により低い腫瘍負荷を示すことができ、またはオンコジンのさらなる突然変異および薬物-耐性またはより攻撃的な腫瘍細胞の出現の結果としての後退を示す。

40

【0054】

膜生体分子分析は、細胞内の細胞膜に結合した、またはそれに会合した生体分子、すなわち、細胞外および細胞内生体分子またはマーカーを含むいずれのタイプの分析またはアッセイも含む。適当な分析方法は、限定されるものではないが、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着検定法、形態学的染色、細胞ソーティングなどを含む。浸透化細胞は、例

50

えば、特定の検出可能な蛋白質の発現に基づいて、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) 技術によってソーティングすることができる。細胞ソーティング技術は当業者によく知られており、例えば、癌の診断において検出可能に標識された細胞を簡単にカウントするのに用いられてきた。また、浸透化細胞は、特定の蛋白質、例えば、CD4 または CD8 細胞の発現に基づいて分類することができる。また、膜生体分子分析は、下流膜画分について行い、続いて、限定されるものではないが蛋白質発現プロファイリングを含めた分析を行うこともできる。ウェスタンブロッティング、アミノ酸配列分析、質量分析、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、核磁気共鳴、赤外、原子吸光、表面プラズマ共鳴 (SPR) および膜構成要素の分析に適したいずれかの他の技術。

【0055】

機能的ゲノム分析またはアッセイは、浸透化細胞内に保持された遺伝物質について行うことができる。例えば、ゲノム DNA、核 (h n RNA)、ミトコンドリア (m t RNA) および細胞の浸透化に際して細胞内に結合したままである、または固定したままであるオルガネラによって保有されるいずれかの他の RNA または DNA も評価することができる。かくして、細胞質生体分子についての前記したタイプの分析は、限定されるものではないが、イン・サイチュハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ鎖反応、差ディスプレイ PCR、任意起点 PCR、マイクロサテライト分析、単一ヌクレオチド多形 (SNT)、競合的ゲノミックハイブリダイゼーション (CGH)、制限断片長多形分析、核およびミトコンドリア転写体ラン・オンアッセイ、イン・ビトロ蛋白質、翻訳アッセイを含めた方法またはアッセイを用いてゲノム DNA、h n RNA および m t RNA について行うことができる。しかしながら、ゲノム DNA、核 h n RNA および m t RNA を得るためには、浸透化細胞を本発明の放出カクテルに曝露し、完全に溶解させ、または当業者によく知られた慣用的手段によってさらに分画しなければならない。安定化された細胞では、プロテイナーゼおよび求核試薬の組合せを用いて、注目する核酸を含むマクロ分子複合体を逆行させ、除去し、RNA および DNA 核酸成分を遊離させることができる。さらに、浸透化に際して保持された細胞オルガネラを、引き続いて、さらに分画し、例えば、ミトコンドリアなどの代謝機能的アッセイのために単離することができる。従って、本発明のもう 1 つの具体例は、サイトゾル RNA から核またはミトコンドリア遺伝物質を分離する方法を提供する。核またはミトコンドリア遺伝物質およびサイトゾル RNA を含有する細胞を、前記したごとく、浸透化化合物と接触させる。核またはミトコンドリア遺伝物質は、例えば、引き続いての適当な細胞下分画および分画された細胞物質の完全な細胞 / オルガネラ溶解によって単離することができる。得られたオルガネラ特異的構成要素 (DNA、RNA、蛋白質、脂質、炭水化物など) を、ホモゲネートから抽出するか、または単離し、分析することができる。また、単離は、前記したごとく、オルガネラ - 特異的免疫磁性ビーズを用いて達成することもできる。

【0056】

いくつかの重要な実践的自動化の利点は、本発明から生じる。例えば、浸透化溶液を細胞から除去した後、mRNA を、自動化下流操作およびマイクロアレイに似た包括的分析に理想的には適するオリゴ (dT) - 磁気ビーズで捕獲することができる。加えて、蛋白質および mRNA プロフィール双方を生じさせ、かくして、時間および試薬の要件を減少させるためには、現在の mRNA 分析ではほんの少しの変化が必要なのに過ぎない。さらに、核およびミトコンドリアにおける対応する無傷細胞ゲノム DNA は依然として浸透化細胞に含まれており、それに接近可能であって、FISH、SNP、SAGE、DD-PCR、PCR、RFLP、RT-PCR、CGH、cDNA マイクロアレイ、質量分析および蛋白質アレイのごとき DNA、RNA および蛋白質についての慣用的方法によって下流分析することができる。例えば、大きなマイクロアレイでの、DNA、RNA、蛋白質、脂質、炭水化物および (前駆体、代謝産物およびその補因子) の同時複数成分分析戦略は、かくして、いずれの真核生物細胞、組織試料または体液にも広く適用することができる。複数細胞構成要素による、または多重化 (例えばマイクロアレイ) 分析と組合わせたこのタイプの細胞発現プロファイリングは、薬物候補の高 - スループットスクリーニングないし病気の診断および管理の範囲の技術においてエッジ切断目的である。

10

20

30

40

50

【0057】

また、本発明は、サイトゾルまたは全細胞RNA、特にmRNAを単離するための試薬およびキットも提供する。該キットは、浸透化化合物、および、例えば、種々の長さのオリゴdTまたは遺伝子-特異的配列またはランダム(縮重)オリゴヌクレオチドのごとき、RNAの単離および検出用のRNA抽出試薬またはハイブリダイゼーションプローブを含むことができる。または、該キットは、膜生体分子に結合する抗体のごとき、細胞に会合した蛋白質に結合する抗体を含むこともできる。抗体およびプローブは酵素を標識し、蛍光標識し、または放射性標識して検出を行うことができる。また、抗体およびプローブを、例えば、磁気ビーズなどに付着させて、分離を促進することもできる。

【0058】

従って、無傷ライブラリーを、上皮細胞の存在を同定し、および/またはそれらの上皮細胞の起源の組織の存在を確認することに関与するいずれかのメッセージの存在につき問いかける。この目的では、試料に存在するmRNAの全ては、注目する各特定の遺伝子につき分析しなければならない、各々は、他のものと同じの感度/選択性を持ち、かつ一度に注目するmRNAを見る能力を持つ。

【0059】

これまでの基準では、マイクロアレイによる全体的に遺伝子発現分析は稀な事象に対しては感度不良であったろう。特に、試料における信号対ノイズ比は、現実的ではなく、いずれかの与えられた豊富化試料において白血球細胞免疫磁気キャリアオーバー汚染のごとき問題のため低かった。例えば、免疫磁気選択による細胞の特定の標的集団で豊富化された流体試料において、潜在的に、1ないし10細胞の標的集団に関して運び去られたほぼ10,000白血球細胞であろう。標的細胞(類)は、注目する稀な事象を発現しつつあり、白血球細胞で見出されるヌクレオチドによってマスクされるであろう。極端に稀なコピーレベルの標的mRNAとカップリングさせた過剰な白血球細胞由来バックグラウンドRNAノイズの結果、検出することができない潜在的シグナルがもたらされる。

【0060】

該問題を回避するために、全RNA(または精製されたmRNA)は、SP6、T3またはT7 RNAポリメラーゼプロモーター-ベースのイン・ピット直線的プレ-増幅方法いずれかを使用することによってプレ-増幅される。典型的な例はT7 RNAポリメラーゼ(T7RNAP)、プロモーター(T7RNAPP)および酵素増幅システムであるが、当業者に明白なシステムによっていずれの同等システムを置換えることもできる。全てのメッセージの直線的プレ-増幅は、少なくとも1000倍だけ元のmRNAライブラリー表示を増加させ、RNA集団内の個々にmRNA配列の相対的豊富さは最小限しか見られない。また、同一のプレ-増幅プロセスは、転写体増幅、直線的増幅、またはイン・ピット増幅としても知られている。従って、それは、本発明の具体例の1つの具体的特徴である全mRNAライブラリーの1000倍直線的プレ-増幅である。一本鎖mRNAを、T7プロモーター含有オリゴヌクレオチドのオリゴ(dT)部分においてポリAテイル領域においてアニールする。RNAポリメラーゼは、全mRNAライブラリーのアンチセンスコピー(aRNA)を生じさせる。かくして、一般に、全ライブラリーにおいてポリAテイルを有するmRNAのコピーの数が少なくとも1000倍増加し、いずれかの特定のmRNA配列タイプの感度がそれに伴って1000倍増加する。

【0061】

例えば、第一のストランドRTプライマーおよび引き続いてのT7RNAP増幅プライマーとして利用されるT7プロモーターオリゴヌクレオチドプライマーは、以下の塩基配列の順序：

【0062】

【化1】

(5'-

TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG(T)₂₁-

3')

10

20

30

40

50

【0063】

を有する5' T7 RNAポリメラーゼプロモーター配列を含む3' オリゴ(dT部分)を有する67の塩基よりなる。プレ・増幅反応は逆転写反応、続いて、ランダム起点DNAポリメラーゼ依存性第二ストランド合成および最後のT7RNAPとの一晚のインキュベーションによって完了する。引き続いて、全反応ミックスの一部をPCR反応分析で用い、それは、注目する適切に設計された遺伝子特異的プライマー(GSP)と共に特異的単一バンドアンプリコンまたは選択されたいずれかの他の適切なRNA分析を生じさせる。

【0064】

遺伝子特異的プライマーの設計および合成は、増幅すべき特定の標的配列に依存し、いずれかの公知の当該分野で受け入れられた手段によって設計することができることは当業者に認識されよう。例えば、遺伝子特異的プライマーは、NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST[®](基本的局所的整列サーチツール)ソフトウェアおよびGenBankヒトcDNA配列データベースを用いて設計される。プライマーは約55 ないし65 のアニーリング温度に対して最適化され、複雑なmRNAライブラリーからDNA-フリー、RT-PCR依存性単一バンドのみを生じることが示されており、これは、特定のmRNAに対して陽性であることが公知である。複雑なmRNAライブラリーは、しばしば、正常および癌性ヒト組織ならびにイン・ビトロ細胞系から抽出される。設計されたプライマーは、所望の標的配列特異的PCRバンドを生じ、これは全てアガロースゲルで電気泳動に付して、既知の標準と設計・予測分子量と比較する。ゲル分析ソフトウェアで決定されたRf値を用いて計算を完了する。アンプリコン配列は直接的配列決定、プロットプロービング、制限構想マッピング等によってさらに配列を確認することができる。

10

20

【0065】

前記したごとくcDNAアレイ分析で固有の信号対ノイズ(S/N)制限を回避するために、RNAポリメラーゼプロモーター・駆動直線的増幅戦略の新規な修飾を開発した。あるいは、単一反応試験管中でのcDNAの多重遺伝子・特異的逆転写の普遍的PCR増幅に基づく単一試験管の多重遺伝子RT-PCR分析システムは、バックグラウンドノイズを実質的に低下させる。これらの2つの信号対ノイズ比の改良は、本発明で具体化された特異的構成要素である。

【0066】

プレ・増幅されたライブラリーの第二ストランド合成は、選択された領域内のみである、単一試料についての注目する1ないし1000の独立した領域を含み、依然として、元のライブラリーからの100%感度を維持する。第二ストランド合成は、注目する遺伝子のみの選択的増幅によって完了する。従って、遺伝子特異的プライマー(GSP)は、注目する領域のみを含むように第二ストランド合成について設計される。該領域は、限定されるものではないが、前立腺抗原(PSA)、PSM、CK19、EpCAM、AR、HPN、F6、マノグロビンおよび/または全てのサイトケラチンを含むであろう。GSPは、そのテイル端部に普遍的プライマーを組み込むように設計される。

30

【0067】

第一ストランド合成を遺伝子特異的プライマーの組で行う先行技術とは対照的に、本発明の新規な態様の一部は、CAPスイッチTMオリゴヌクレオチドの使用なくして、第二ストランド合成のみのための遺伝子特異的プライマーの使用である(米国特許第6,352,829号)。先行技術は、遺伝子特異的プライマーは、CAPスイッチオリゴヌクレオチドを含むその5'末端に任意のアンカー配列を組み込むように設計することを教示する。従って、ここに開示する本発明では驚くべきことに、プライマーの普遍的部分はCAPスイッチ部位を含まない。

40

【0068】

遺伝子特異的プライマーの長さは、典型的には、約15ないし30ヌクレオチドの範囲であり、他方、普遍的プライマー部分は、典型的には、長さは約15である。

【0069】

T7増幅アンチセンスRNA(aRNA)ライブラリーの小さな部分の逆転写は、当該分野で知られたサイクリング条件を用いて行われる。全てのRT-PCR結果は、当該分野で知られた手法

50

に従い、臭化エチジウムを含有する 2 % アガロースゲルでまず分析する。

【 0 0 7 0 】

増幅された aRNA ライブラリーの選択された部分の増幅の後、次いで、アレイフォーマット、または当該分野で知られたいずれかの電気泳動フォーマットで分析される。

【 0 0 7 1 】

前記したプレ増幅後の第二ストランドの増幅に加えて、普遍的 PCR 多重遺伝子増幅を単一試験管で行い、同時第二ストランド合成のために、対向 (P2) の適当な組を組合わせて同時逆転写構造のための遺伝子特異的プライマー (P1) の組を取込むことができる。一緒になって、それらは双方 (アルファおよびベータ) 末端を規定し、注目する GSP 多重遺伝子パネルと等しい遺伝子特異的アンプリコンの完全な組を形成する。遺伝子特異的第一および第二ストランド双方の合成のための GSP1 および GSP2 プライミングを、当業者に知られている、適当な酵素にて、かつ高プライマー - 標的アニーリング特異性の条件下で行う。適当なプライマー特異性を達成することに対するさらなるレベルおよびアプローチは recA のごとき天然組換え細胞修復メカニズムからの蛋白質を用いて達成することができる。イン・ビトロでのこれらの修復系の適当な適用は、優れた、絶対的でさえある、プライマー鋳型の形成の特異性を可能とするであろう。鋳型の基準は mRNA、または mRNA : cDNA ヘテロデュプレックス、または二本鎖デュプレックス cDNA いずれかである。さらに、本出願に記載するとき、細胞の天然修復メカニズムを利用する革新的アイデアは、稀な細胞事象についての cDNA アレイ分析を可能とするシグナルからノイズへのシフティングのための GSP-RT サブセットにつき後記するもののごとき他の遺伝子特異的プライマー方法に向けて適用することができる。PCR プライマーのいずれか 1 つの GSP 多重遺伝子パネルにおける各 P1 および P2 プライマーは、すべての遺伝子特異的 P1 および P2 に共通する 5' 末端の普遍的プライマー配列 (または丁度 P1 および全ての P2 に共通する別々の普遍的配列) を含む。第二ストランド合成の全ての GSP1 および 2 を所望の二本鎖アンプリコンパネルの組から除去して、下流プロセスに対するその非特異的インパクトを排除した後、不都合な副反応および競合的反応を制御するためには、Sephadex および Centricon 等によって供給される分子サイズベースの排除、クロマトグラフィー、固体支持体選択的付着、チミジン (T) の代わりにデオキシウリジン (U) で合成される DNA オリゴヌクレオチドプライマーと組み合わせてウラシル - N - グリコシラーゼ (UNG) のごとき一本鎖特異的 DNase (Mung Bean, S1 等) プライマー配列特異的戦略のような多くの戦略が当業者に可能である。別法として、cDNA オリゴプライマーハイブリッドを DNA - ウラシルの代わりに用いることができ、同様に、DNase - フリー RNase 処理を介して第一および / または第二ストランド合成の後に排除することができる。UNG 分解の PCR 一体化の容易性と組み合わせた、DNA - プライマーを含むウラシルの容易な入手可能性は、望ましくない複雑なプライマー相互作用を排除する効果的な方法を供する。この UNG 分解戦略は、選択された PCR アニーリング温度下でアニーリングすることができるかなり小さなオリゴを生じるであろう。UNG 処理に続き、cDNA 鋳型混合物は、おそらく高複雑性 RNA によって引き起こされた全ての望ましくない副反応を排除するための DNase - フリー RNase での処理から利益を受けるであろう。(全ての RNA を排除するための任意の RNase 処理での) UNG 処理に続き、残存する唯一の核酸を第一および相補的な第二ストランドとハイブリダイズさせ、デュプレックスを形成させ、これは、試料の試料可能な PCR 鋳型を構成する。次に、後の PCR のために普遍的プライマー (1 または 2 MAX) を含む非 - UMP を添加する。正味の効果は、単一試験管中での定量的 RT-PCR 多重遺伝子同時増幅および引き続いての分析を可能とする、1 または 2 の PCR 適合高効率プライマーとともに mRNA (または DNA マイナス RT) の捕獲である。プライマーは普遍的であるので、それらは正確に同一の効率にて各 GSP アンプリコンを起点とし、混乱する多重 GSP プライマー性能の問題を排除する。アンプリコンのパネルまたは組と共に各 GSP 規定アンプリコンは異なる所定の断片サイズを有することができ、各 GSP 配列が、垂直および水平 PAGE およびアガロースゲル電気泳動、キャピラリーゲル電気泳動、SELDI、MALDI、cDNA アレイ等のごときサイズベースの分析系においてそのユニークな Rf 値によって分解し、同定することを可能とする。かくして、迅速な多重遺伝子 RNA/DNA パネルを迅速に適用して、診断的

10

20

30

40

50

療法およびモニタリング適用の多様な組につき非常に多数の試料に問うことができる。この方法は、mRNAライブラリープレ増幅と共に、またはそれなくして、単一反応試験管中でのmRNAの個々の試料からの多重遺伝子分析を達成する。1つの試料において1つのアッセイでただ1つの遺伝子のパネルを分析するのを可能とするプレ増幅はない。プレ増幅は、1000までの異なるアッセイにおいて単一試料を分析する利点を付け加え、かくして、遺伝子の多くの異なるパネルを、1つの試料につき異なる時点で問いかけることができる。いずれかの特定の方法に限定されるものではないが、cDNAアレイまたはキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) による普遍的PCRパネルの分析は好ましい方法である。

【0072】

かくして、先行技術の慣用的技術から本発明を区別する臨界的特徴は、稀な標的mRNA種の選択的増幅による信号対ノイズの改良であり、この方法を、現存の多種多様なmRNA分析から新規な開発とする。公知の多種多様な分析系、例えば、多重RT-PCRは、信号対ノイズを実質的に変化させるが、重要な多重系を設計し、最適化する挑戦は、それらを、反応容器中で2を超える標的サブセットにつき一般的に非現実的とした。

【0073】

また、本発明は、代表的な転写体を選択し、検出すべき標的配列 (類) の全組を1つの反応バイアル中で増幅するために高信号対ノイズ改良を利用する。

【0074】

かくして、本発明は、以下の具体的な使用に限定されず、代表的な遺伝子特異的プライマーの組 (類) を用いて、公知の病気状態で見出される標的遺伝子サブセット (類) を生じさせることができる。代表的な組は、注目する病気状態を示す少なくとも2つの異なる標的遺伝子を含む。各反応バイアルでは、遺伝子特異的プライマーの組の数は病気状態および該病気状態を規定する既知の特徴によって決定される。

【0075】

開示された発明の実施を例示し、診断技術に対する本発明のインパクトを証明するために、以下の実施例を掲げる。これらの実施例は本発明の範囲を限定する意図のものではない。加えて、本書類において引用し、または記載した各特許、特許出願および刊行物の開示は、引用してその全体を一体化させる。これらの実施例を通じて、分子クローニング反応、および他の標準的組換え分子生物学技術はManiatisら, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press(1989) (以下、「Maniatisら」)、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Wiley, 2002に記載されている方法に従い、特記する以外は、商業的に入手可能な試薬を用いて行った。

【0076】

実施例 1

細胞質RNAの単離

0.05% サポニンおよび0.1% アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝化溶液であるImmuniPermで浸透化させたフェロ流体で選択した未固定細胞から得られた上澄みは、細胞の細胞質に存在する細胞の全RNAの80%を超えて含有することが判明した。この上澄みから単離されたRNAは、天然および変性アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色で判断して、分解の証拠を示さなかった。フェロ流体で選択した細胞の細胞内染色の後に通常は捨てるこの上澄みは、予期せぬことに、完全なまたは分解していない全長形態でRNAを含み、かくして、形態学的分析でも用いた同一細胞のmRNAプロフィールを供することが判明した。図2は、1分未満で全RNA放出が起こり、細胞質全RNAの約95%が容易かつ再現性良く単離されることを示すこれらの知見を示す。

【0077】

劇的に対照的に、慣用的プロセス、すなわち、商業的に入手可能なフェノールベースのRNA溶解緩衝液Trizol[®] Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, カタログ番号10296) による単離を用いて乳癌細胞系SKBR3の細胞から単離されたRNAは完全に溶解し、全細胞構造がホモゲナイズされ、それにより、ゲノムおよびミトコンドリアDNA、および細胞質、ミトコンドリアおよび核RNAが遊離された。EpCAMフェロ流体で選択されたImmuniPer

10

20

30

40

50

m (サボニン) 処理 S K B R 3 細胞からの細胞ペレットの調査 (詳細な手法については実施例に参照) は、同一数の非浸透化全細胞から予測されるすべての細胞全 R N A のほぼ 15 ないし 20 % を占めるゲノムおよびミトコンドリア D N A および核およびミトコンドリアほぼ 100 % の存在を示した。予測される細胞質 R N A の約 95 % が、I m m u n i p e r m 上澄み層から無傷で回収された。

【0078】

図3に示すごとく乳癌細胞系 S K B R 3 の約 250,000 細胞を含む二連試験管をまず免疫磁氣的に豊富化させ、ついで、I m m u n i p e r m (+ I P) の不存在下 (P B S のみ) および存在下にて、室温で15分間インキュベートとした。ついで、目に見える浸透化細胞ペレットとして800 x g R C F にて5分間遠心することによって、I m m u n i p e r m 処理浸透化細胞を分離した。全ての細胞質可溶性成分を含む I m m u n i p e r m 上澄み画分を第2の試験管に移した。全未処理細胞から単離した全 R N A、I m m u n i p e r m 処理浸透化細胞ペレット、および I m m u n i p e r m 処理細胞上澄み画分を、R N e a s y^R (Q i a g e n I n c., V a l e n c i a, C A) シリカ結合方法を用いて単離した。ついで、これらの全 R N A 画分を B N A S E 処理して痕跡量の D N A を除去した。D N a s e d 処理した R N A の分光測定定量により、全細胞 (= 100 %) について平均 20 ピコグラムの全 R N A / 細胞、ペレット画分からの 4 ピコグラムの全 R N A / 浸透化細胞 (20 %)、上澄み画分からの 16 ピコグラムの全 R N A / 細胞 (80 %) が得られた。これらの3つの D N a s e 処理全 R N A 画分から 2.5×10^4 細胞当量のマスを、図3に示すごとく、ホルムアミド変性し、1 % アガロースゲルを通して電気泳動に付し、続いて、臭化エチジウムで染色した。アガロースゲルデンシトメトリーによる定量は分光学的回収値と合致した。また、図3におけるゲルのイメージは、r R N A が全長であり、18 S r R N A バンドと共に移動する 2 K B S S R N A マーカーと比較して、4.4 q b s s R N A 共移動 28 S r R N A バンドの相対的比率によって証明されるごとく高い完全性を有することを示す。一般に、ほぼ2の18 s R N A に対する 28 S r R N A の観察された相対比は、図4に示すごとくこのゲルをノーザンプロッティングし、それをオリゴ (d T) でプローブすることによってさらに示されるごとく m R N A 一体性の良好な表示である。核から寄与された全 R N A のパーセントについての文献値は15ないし25 % の範囲内である。かくして、20 % R N A を含む I m m u n i p e r m^R 処理細胞画分は公表された核寄与と合致する。

10

20

30

【0079】

結論として、I m m u n i p e r m ベースの浸透化は、予期せぬことに、I m m u n i p e r m 処理未固定細胞の上澄みで容易に回収できるサイトゾル全 R N A のほぼ 100 % にて核および細胞質全 R N A の完全な分離を供した。さらに、全 R N A の核画分は、驚くべきことに、I m m u n i p e r m 処理の後に得られた浸透化細胞構造において依然として無傷であることが判明した。

【0080】

ポリ - A テイルハイブリダイゼーションを用い、2つの I m m u n i p e r m^R 細胞画分に由来する R N A の m R N A 部分を、図3に示すゲルからの変性 R N A の正に荷電したナイロンフィルターへのノーザンプロット移動によって全細胞に対して評価した。オリゴ (b T) 25 - 量体プローブを 32 P ポリヌクレオチドキナーゼで標識し、ついで、ノーザンプロットにハイブリダイズさせた。ポリ - A テイルを含む一本鎖 R N A サイズラダーを、m R N A 集団の相対的定量的サイジングのために分子量バンディングラダーの形成を可能とするマーカーとして用いた。図4におけるオリゴ (d T) ハイブリダイゼーションの結果は、3つの試料の間で m R N A ライブラリーにつきサイズ範囲の有意な差が観察されないことを示す。

40

【0081】

全細胞 m R N A からの全 m R N A - プロテッド領域 (すなわち、全 d T ハイブリッドシグナル) の比較定量的ホスホルイメージ分析は、I m m u n i p e r m 処理浸透化細胞ペレット核画分) + I m m u n i p e r m - 由来サイトゾル画分からの全合計とほとんど同

50

一であった。さらに、ホスホルイメーシングによって浸透して、dT-プローブシグナルからのmRNAの細胞画分パーセンテージは、アガロースゲルイメーシングのデンシトメトリ分析から測定した28S/18SrRNAパーゼテージと同一である。これらのデータは、Immuniperm-由来サイトゾル全RNAおよびそのmRNA成分はともに定量的に単離され、高い完全性を呈し、かつ全長であることを証明する。Immuniperm-由来mRNAの放出は、転写体のサイズによって制限される。というのは、サイトゾルmRNAのほぼ100%がImmuniperm上澄みから検索可能であって、rRNA28S/18Sの一体性はmRNA一体性の十分な保持を示すからである。

【0082】

図4に示したノーザンブロットをストリップし、核特異的前駆体rRNAプローブで再度プローブした。図5は、細胞のImmuniperm処理が核およびサイトゾルの全RNA集団の完全な分離を達成すること示す。かくして、核膜構造は、Immuniperm処理の間に依然として無傷であり、核はすべてのその可溶性成分を保持する。

【0083】

図3におけるノーザンブロットをストリップし、ミトコンドリア-特異的12SrRNAで再度プローブした。図6に示す結果は、細胞のImmuniperm処理がミトコンドリアおよびサイトゾルRNA集団の完全な分離を達成することを証明する。かくして、ミトコンドリア膜構造は、Immuniperm処理の間は依然として無傷である。

【0084】

図3ないし6においてイメージを生じさせるために用いた同一の全RNAストック溶液をさらに用いて、同等質量および特異的活性の³²P-標識第一ストランドcDNAライブラリーを生じさせた。これらの3つの標識した第1ストランドライブラリープローブをハイブリダイズさせて図7に示すごとく、別々であるが同一に調製されたcDNAアレイドットブロットを得た。ここでは、目的は、各イメージングフィルタについて、各cDNAハイブリッドシグナルパターンの相対的割合を比較することによって、各Immuniperm由来細胞画分において表されるmRNAの相対的豊富さを評価することであった。鋳型についてのランダムに選択されたcDNA遺伝子アレイの同一性を図7に示す。ドットの最も上の列は、略語23kd=23キロダルソントンパク質、a-tub=アルファチューブリン、b-act=ベータアクチン、b2mic=ベータ-2-ミクログロブリン、phos=ホスホリパーゼセA2によって命名されるハウスキーピング遺伝子の組である。第2の列はf6=アルファ=1-、グロビン、CD16=クラスター決定基16、CD12、CD38、CD45およびCD31として命名される。底側部の列は、d6=マクロファージ阻害サイトカイン1、CK8=サイトケラチン8、CK18=サイトケラチン18、CK19=サイトケラチン19、EpCam=上皮細胞接着分子、uPA=ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーターによって命名される一般的な上皮特異的遺伝子よりなる。各画分の定性的および定量的ホスホルイメーシングの比較は、アレイでの遺伝子の相対的豊富さの有意な差は示さなかった。興味深いことには、これらのデータは、全細胞からの相対的豊富さが、そのサイトゾル画分とおおまかに等しく、該画分は今度はその核画分と等しく、ここに、全RNA質量は、核における約20%からサイトゾルにおける約80%まで変化することができることを示す。このcDNAアレイにおける転写体の各長さは、1ないし5kbまで変化し、再度、Immuniperm処理細胞からの放出mRNAにおいてサイズの偏りがみられないというノーザンブロットの知見を補強する。図7における同一の相対的表示パターンは、予期せぬことに、Immuniperm-由来RNAが、伝統的な方法に由来する全細胞mRNAと、第1ストランド合成につき、同程度に効果的な逆転写酵素鋳型であることを示す。

【0085】

総じてのこれらのデータは、Immuniperm-由来サイトゾルRNAが、実質的には全てのサイトゾル全RNAの実質的に>95%であり、すなわち、全長である全ホモゲナイズ細胞における全ての細胞の全RNAの質量のほぼ80%を生じ、およびそれは伝統的なフェノールおよびシリカ抽出方法によって単離された全RNAと逆転写の同一効率を有するという予期せぬ

10

20

30

40

50

知見を示す。かくして、Immuniperm - 由来サイトゾル全RNAおよびそれに伴う異種核RNA成分が、伝統的な全細胞高品質RNA単離方法と比較した場合に、全ての慣用的な下流RNA分析方法において同等に効果的な鑄型である。

【0086】

図8は、約770のPC-3細胞をImmunipermで処理することによって得られたサイトゾルRNAのゲルイメージを示す。該データは、より少ない細胞数からのImmuniperm - 由来サイトゾルmRNAが、図3、4、5、6および7に示されるごとく、RNAの同一割合を与えることを示す。従って、サイトゾルRNAのImmuniperm - 媒介細胞放出は細胞数依存性ではない。

【0087】

10

実施例2

末梢血液からの循環腫瘍細胞の単離

末梢血液からの循環腫瘍細胞の単離、続いてのフローサイトメトリーによる細胞分析およびRT-PCRによる遺伝子発現分析は以下のごとく行うことができる：EDTA-抗凝固処理した血液(7.5 ml)を15 ml コニカル試験管に移し、6.5 ml のSystem緩衝液(0.05% アジ化ナトリウムを含有するPBS、カタログ番号7001、Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PA)を添加する。該試験管を確実に蓋をし、数回逆転させることによって混合する。血液 - 緩衝液混合物を室温にて800 × g で十分間遠心する。パフィーコーティングした層を乱さないように注意して吸引することによって、上澄みを注意深く取り出す。いくらかの上澄みは試験管に残すことができる。吸引した上澄みは捨てることのできる。AB緩衝液(可逆的凝集試薬としてのストレプトアビジンを含有するSystem緩衝液、Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PA)を10 ml の最終容量まで試験管に添加する。試験管に蓋をし、数回逆転することによって混合する。VU/デスチオビオチンEpCAMフェロ流体粒子(ストレプトアビジンとのビオチン - 可逆的凝集用のデスチオビオチンにコンジュゲートした抗 - EpCAMモノクローナル抗体にカップリングした免疫磁気ナノ粒子(Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PA)を、バイアルを数回温和に逆転させることによって再懸濁させる。AB緩衝液中の試料に100 μl のVU/デスチオビオチンEpCAMフェロ流体を添加し、数回逆転させることによって試験管を混合した。発泡を避けるために震盪は避けるべきである。試験管をただちにQMS17(カタログ番号AS017, Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PA)磁気セパレーターに挿入し、十分間放置する。試験管をセパレーターから取り出し、試験管を数回逆転させることによってその内容物を再懸濁させる。試験管をQMS17磁気セパレーターに再度挿入し、十分間放置する。試験管をセパレーターから取り出し、試験管を数回逆転させることによってその内容物を再懸濁させる。蓋を取り除き、試験管をQMS17セパレーターにさらに20分間入れる。試験管の内部にQMS17を入れ、パストゥールピペットを用いて細胞 - 緩衝液混合物を注意深く吸引し、吸引した上澄みを捨てる。その後直ちに、試験管をセパレーターから取り出し、3 ml のSystem緩衝液を加える。磁気により収集した細胞を軽く撹拌することによって再懸濁させる。頂部近くの細胞が洗浄されるように撹拌する間に、液体は試験管中を上昇する。蓋を外した試験管を再度QMS17セパレーターに10分間入れ、上澄みをパストゥールピペットで吸引する。吸引した上澄みを捨てる。

20

30

40

【0088】

やはりRNase阻害剤(RNase OUT, カタログ番号10777019, Invitrogen Rockville, MD)を含有する200 μl のImmuniperm/RNase阻害剤(浸透化試薬、Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA)中で撹拌することによって、磁気により収集した細胞を再懸濁させる。全ての細胞が洗浄されるように撹拌する間に、液体が試験管中を上昇する。25 μl 容量中のモノクローナル抗 - サイトケラチン抗体(C11-PE, 0.25 μg)(R-フィコエリスリンにコンジュゲートしたサイトケラチン4.5.6.8.10.13.18を認識する抗体のカクテル)のごとき抗体、および10 μl のCD45 PERCP(汎抗 - 白血球マーカー「カタログ番号347464、Becton Dickinson San Jose, CA)またはいずれかの他の適当な抗体を添加し、撹拌によって混合する。15分間のインキュベーションの後、試験管の

50

底を軽くたたくことによって、試料を温和に攪拌する。試験管を5分間でQMS17に戻す。上澄みを軽く吸引し、Immuniperm-RNA画分を適当に標識された試験管に移す。

【0089】

実施例3

末梢血液からの循環腫瘍細胞の細胞分析

実施例2からの細胞を20 μ lのCellFix(脱凝集試薬としてのビオチンおよび細胞保存成分を含有するPBSベースの緩衝液, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA)に再懸濁させ、5分間インキュベートする。試料を12 \times 75 mmフロー試験管に移し、300 μ lのPDSと合わせ、続いて、核酸色素チオフラビンT(Sigma番号T3516, 10 μ l)および約10 μ lの蛍光ビーズ(10,000ビーズ; Flow-Set Fluorospheres, カタログ番号6607007 Coulter Miami, FL)を添加する。攪拌することによって試料を混合する。好ましくは、蛍光ビーズ試験管を、ビーズをピペットにより添加する前に攪拌することによって混合する。次いで、試料をフローサイトメトリーで分析する。

【0090】

実施例4

末梢血液からの循環腫瘍細胞の遺伝子発現分析

磁気オリゴ(dT)標識ビーズ(Dynabeads R mRNA DirectR Micro Kit, Dynal, Prod.番号610.210, New Hyde Park, NY)を用いて、ポリ(A)+mRNAを単離する。別法として、シリカ結合、ポリマー結合、Trizol R試薬(Gibco DRI カタログ番号10296)のようなより伝統的なフェノール抽出のごとき当業者に知られた適当ないずれかの他の手段を用いることによって全RNAを単離することもできる。DNase1(Zibco DRL)のごときDNase酵素での処理によってゲノミックDNAを排除する。2:1の10 \times DNase1(1U/:1)、1:1のRNase阻害剤(クローン化)、5:1のdH₂O、および10:1のRNAまたは対照(2501 ngのゲノミックDNA)よりなる酵素ミックスを調製する。該酵素ミックスを37で20分間インキュベートする。磁気オリゴ(dT)標識ビーズまたはTrizolR単離によってDNase処理したRNAを再度精製し、10:1 RNase-フリー水に再懸濁させる。2%アガロースゲルで対照ゲノミックDNA(+/- DNase処理)を泳動し、臭化エチジウム染色することによって、DNase酵素の活性を確認する。

【0091】

rTth(Thermos thermophilis) RT-PCRを用い、特異的mRNA配列を増幅することができる。10:1の5 \times EZ緩衝液1.5:1のmATP、1.5:1のdCTP、1.5:1のdGTP、1.25:1のdUTP、5:1のMn++(25 mM)、2:1のrTth(2.5 U/:1)、0.5:1のUNG(1 U/:1)、12.25:1のdH₂O、2.25:1のセンスプライマー、および2.25:1のアンチセンスプライマーよりなるマスターミックスを、特異的mRNA種の逆転写のために調製することができる。10:1のDNase処理RNAを含有し、10:1のH₂Oを含有する対応する陰性対照試験管に対応する同一試験管に、40:1容量のマスターミックスを添加する。PCRサーモサイクリングは以下のごとく40サイクルにつき行う: 2分間の50 (プレPCR)、30分間の62 / 65 (プレ-PCR)、1分間の95 (プレ-PCR)、15秒間の94 (PCR)、30秒間の62 / 65 (PCR)、および7分間の62 / 65 (ポスト-PCR)。サーモサイクリングが完了した後、試料試験管を直ちに2分間-20 ブロックに入れる。完了の後、試料試験管を、ゲル分析を行うまで4 ブロックに入れる。20:1の容量を2%アガロースゲルで泳動させ、臭化エチジウム染色する。特異的mRNA転写体の定性的および定量的遺伝子発現測定は予測される分子量におけるアンプリコンの存在につき、UVトランスイリュミネーターおよびアルファイメージャーを用いてゲルイメージの調査によって行う。

【0092】

本明細書中に記載したのに加え、本発明の種々の変形はこれまでの記載から当業者に明らかであろう。そのような修飾もまた添付の請求の範囲の範囲内は入ることを意図する。

【0093】

実施例5

末梢血液中の循環腫瘍細胞からの蛋白質の単離および分析

0.05%サポニンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝化溶液であるImmunipermで浸透化させた約100万のフェロ流体-選択SKBR3細胞から得られた上澄みは、実施例1で分析された核酸成分に加え、細胞の細胞質に存在する放出された可溶性サイトゾル蛋白質も含有する。かくして、細胞の表面中または表面上に残存するこの上澄み溶液および不溶性蛋白質中の可溶性蛋白質は、全蛋白質発現プロファイルまたは細胞のプロテオミックスプロファイルならびに細胞形態を決定する手段を供する。

【0094】

まず、Immuniperm処理により細胞質から遊離された全サイトゾル可溶性蛋白質の画分を、細胞からの全サイトゾル蛋白質放出のための好ましい試薬である界面活性剤であるNP-40で処理された二連細胞調製物から遊離された蛋白質の全量に対して決定する。双方の処理された細胞集団は、分光測定LowryおよびBradford方法のごとき慣用的方法による全可溶性蛋白質の測定に先立ち、遠心または磁気分離を介して膜デブリスから遊離させる。

10

【0095】

第2に、2つの試料調製物のアリコットを4ないし20%グラジエントSDSポリアクリルアミドゲルでの電気泳動に付して、(a)Immuniperm-由来サイトゾル蛋白質についての分子量カットオフを決定し、(b)2つの調製物においてバンド当たりの蛋白質の蛋白質バンディングパターンおよび相対量を比較する。

【0096】

第3に、2D電気泳動によってアリコットをさらに分析し、慣用的に染色するか、または検出可能に標識して、同定可能で同定されていない成分の定性的および定量的スポットパターンに基づいて、2つの画分における蛋白質のサイズおよび等電点についての「フィンガープリント」情報を得る。得られた情報は、正常および形質転換細胞の集団のサイトゾルおよび全蛋白質区画における相対的および絶対的蛋白質発現パターンのプロテオミックス発現プロファイルを生じる。

20

【0097】

実施例6

稀な細胞事象および稀な転写体のcDNAアレイ分析のごとき固有の信号対ノイズ(S/N)制限を伴う診断フォーマットを可能とするmRNAライブラリーサブセットの遺伝子特異的起点(GSP)RNAポリメラーゼベースの増幅

30

【0098】

RNA単離の後、いくつかのRNA分析方法を適用することができる。伝統的なRT-PCRまたはより望ましい定量的バージョンを適用することができるが、それらは、一般に、個々の試料の貧弱な使用と考えられる。というのは、これらの試料は非常に少量の出発物質しか生じないからである。その結果、臨床的感度は多重遺伝子分析と妥協する。かくして、増幅されていないmRNA/cDNAライブラリーを、臨床(および最大技術)感度と妥協することなく1つの遺伝子のみにつき一回分析できるに過ぎない。個々の試料はほとんどできないが、いくつかのより高いスループット方法を開発した。

【0099】

ここに、我々は、全てただ1つの反応試験管におけるマイクロアレイフォーマットにおけるごとき高スループットフォーマットを介して同時に(2ないし1000の)複数遺伝子の発現レベルを測定できるのが大いに望ましいことを示す。これは、作業量を有意に低下させることなく、かつ感度の喪失なくして達成される。稀な細胞事象およびそれらの稀なmRNA試料についての単一試験管cDNAマイクロアレイ分析に対する重要な障害は、出発mRNA試料におけるその固有の不都合なS/N比率である。

40

【0100】

放射性標識cDNAアレイでは、これらの制限は、(a)1つの特異的公知の標的を、(b)S/N比率のバックグラウンドフィルター(固体支持体)ノイズ成分を増加させることなく、一度にナイロンフィルターアレイシステムにハイブリダイズさせることができる最大量の標識された非特異的(バックグラウンドノイズ)標的(20ng = 2×10^{-11} ライブラ

50

リーのランダムに標識された標的分子)にスパイクした場合の、溶液相で検出可能な標的コピー数(ほぼ 5×10^5)のより低い制限に由来する。

【0101】

免疫磁氣的に豊富化された試料では、有意なバックグラウンドノイズmRNAは、豊富化プロセスの間に不可避的に行われるWBCの存在のためである。1つの解決は、所定の遺伝子のサブセットのみを選択する第二ラウンドのRNAポリメラーゼ増幅(RNAPA)を行うことによって、稀な細胞からの所望の稀なmRNAに好都合なようにS/N比率を1000倍までシフトすることである。

【0102】

このGSPサブセットRNAPA選択プロセスを低下させて、臨床試料(ほぼ5000WBC中10 ng全RNA)/CTC(ほぼ50CTC中0.5 ng全RNA)で見出される典型的なWBC mRNAコピー数の比率を反映するモデル形を用いてこの実施例で行う。50CTCよりなるこの出発試料ストックの当量アリコットにおいて、リアルタイム定量RT-PCRによる数を、表1に示すごとく、前立腺特異的抗原(PSA=2650)、前立腺特異的膜抗原(PSM=1750)、アンドロゲン受容体(AR=100)および上皮細胞接着分子(EpCAM=1163)における全ての検出可能なmRNAについて決定した。非特異的バックグラウンドノイズに比例する出発WBC mRNA全コピー数はほぼ 10^8 ないし 10^9 であった。この特定の例では、出発全RNA/mRNAを、まず、リアルタイム定量RT-PCRによって測定して、全てのmRNA種をほぼ同等に比例的に増加させた1ラウンドの増幅に付した(表1)。引き続き、第一ラウンドの増幅されたaRNAの25 ngアリコットを第二ラウンドのGSPサブセットRNAPAに付し、後記するごとく、4 GSP標的の信号対ノイズをシフトさせた(表1)。

【0103】

第二ラウンドのGSP RNAPAにおいて、鍵となる選択工程は、単一RT反応中に起こり、そのうち遺伝子特異的RTプライマーは含まれる所定のmRNAライブラリーサブセットについてのみの第一ストランドを同時に形成する。本実施例においては、GSP RPプライマーのサブセットは、前記した4つのmRNA(PSA、PSM、AR、EpCAM)についてのものであった。GSP-RT選択的第一ストランド合成に続いて、適当なDNAポリメラーゼおよびオリゴ(dT)プライマー担持7 RNAPプロモーターを用いて、相補的第二ストランドを合成し、かくして、二本鎖DNA鋳型T7RNAPの選択的サブセットを得た。

【0104】

かくして、RNAPA可能化鋳型の所望のサブセットは、GSPの第一および第二のストランド合成を介して選択されたものである。この時点において、第二ストランド反応ミックスをDNase-フリーRNaseのカクテルに曝露することによって、全ての残りのRNAを分解させる。別法として、いずれの残存する一本鎖RNA、およびdT依存的第二ストランド合成の間に形成されたいずれの外来性(非-ポリU/ポリA依存性)一本鎖dDNAも、マングビーンヌクレアーゼのごとき一本鎖特異的ヌクレアーゼによって排除することもできる。次いで、フェノール抽出および/またはシリカ結合によって、二本鎖cDNA鋳型サブセットを精製する。RNAPAレディー鋳型の選択された組を一晩RNAP増幅させて、WBC mRNA由来ノイズを表すF6(アルファ1グロビン配列)のごとき他の可能な鋳型よりもS/Nシフティングにおいて注目する4つのみの遺伝子のほぼ1000倍増加が得られる。表1は、F6がWBCでかなり豊富であって、上皮細胞で検出できないこの系で見出されたアルファ1グロビン配列と定義される、引き続きのGSP-第二ラウンドS/Nシフティングを含めたプロセスを通じて注目するこれらの4つの遺伝子についてのリアルタイム定量的RT-PCRの結果を示す。これらの結果は、選択されたGSP標的の4つが平均を844倍増加させ、他方、非標的F6WBCノイズが5.9倍増加させたに過ぎないことを明瞭に示す。かくして、増加GSP標的シグナルをF6WBCノイズで割ると、各GSP標的についての最終的な信号対ノイズ改良が得られた。前記したマングビーンヌクレアーゼおよびGSP-RTプライマー配列の選択/最適化のような修飾を使用することによって、さらなる改良が期待されるであろうことを認識するのが重要である。

【0105】

【表 1】

遺伝子	tRNA 出発 コピー数	第一ラウンドの aRNA後の 全コピー数	GSP第二 ラウンド後の 全コピー数	第一:第二	GSP S/N (F6)
PSA	2650	2.10×10^7	3.00×10^{10}	1238	210
PSM	1750	7.80×10^6	4.03×10^9	517	87
AR	100	64200	2.90×10^7	458	78
EpCAM	375	5.20×10^6	6.05×10^9	1163	197
F6	NA	1.40×10^{10}	8.30×10^{10}	5.9	1

10

【0106】

実施例 7

固定された試料からの細胞RNAのプロテイナーゼおよび求核試薬ベースの回収により、下流RT依存性分析で高品質のRNA鋳型が得られる。

【0107】

驚くべきことに、アルデヒドおよび尿素ベースの安定化剤または固定剤に曝露された試料では、Cyto-ChexTMおよび他のホルムアルデヒドおよびホルムアルデヒド - 尿素誘導体系固定剤は、マッチした非固定対照と比較した場合、全血で見出される全ての細胞において全長全RNA、mRNAおよび他の核酸のほぼ100%を安定化させる。マクロ分子複合剤として安定化された無傷RNAはそのRNA化学的特徴を変化させ、フェノール抽出、シリカ結合およびオリゴ(dT)ハイブリダイゼーションのごとき、現在の伝統的な細胞溶解およびカオトロピック塩ベースのRNA単離方法によって影響されない。

20

【0108】

これらのマクロ分子複合体(共有結合および非共有結合双方)を解離させ、酵素消化および/または化学的求核試薬インキュベーションの組合せを介して逆行させる。その結果、核酸が遊離され、十分に無傷の元のDNAおよびRNAライブラリーのほぼ100%の単離が可能となる。これらの固定剤 - 由来RNAライブラリーは、第一ストランドcDNAの逆転写酵素(RT)依存性形成のための高品質鋳型を提供する。

30

【0109】

包括的下流分析のために、または全およびmRNAライブラリーの一般的な機能的可能化のために、これらの固定剤回収RNAを、本出願で記載したaRNAプレ増幅または普遍的RNA方法と組み合わせる。

【0110】

図9は、他のアルデヒドベースの固定剤のようにCyto-ChexTMが振舞うことを示す。24時間の固定剤曝露に際して、1%未満のmRNAおよび比例しない量の18S-rRNAは回収可能である(ほぼ10%)。極端なカオトロピック塩変性化学を適用した場合でさえ(すなわち、GITCおよびフェノール、シリカまたは(dT)ハイブリダイゼーション、BRLのTrizol Reagent, QiagenのRNAミニシリカ結合およびDynaのDynabeads mRNA直接的オリゴ(dT)ポリ(A)+キット)、回収は極端に低い。

40

【0111】

驚くべきことに、核酸を含む他のマクロ分子に共有結合した蛋白質およびポリペプチドの大部分を除去するプロテイナーゼKのごときプロテイナーゼおよびトリス塩基のような求核試薬での処理により、十分に無傷な状態で元の全RNAおよびnRNAの90%を超える回収を可能とする十分な核酸の化学的特性を回復した。図9に見出される全RNAの質量正規化アリコットに由来するaRNAの25gアリコット(図12A)を、CK19およびEpCAM双方についての定量的なRT-PCR比較実験に付した。この比較は、非

50

固定RNAに対する固定剤由来RNAからの3.8および3.9倍低いコピー数を示した。これは、RT-PCR分析について最大RT鋳型活性の少なくとも約25%を回復するための現在のプロテイナーゼK処理として理解される。この固定-回収系を介する最大RT-鋳型活性の25%の回復は、異なるオペレーターが、非固定適合サンプルに対して定量的RT-PCRを介して特異的RNA（アルファグロビン）につき、同一手法を行い、パーコール由来白血球細胞を分析する場合に再現性がある。

【0112】

さらに、ここで用いるTransfixTM処方は、単位容量血液当たりパラホルムアルデヒド固定剤の0.1%最終濃度を達成することが知られている。

【0113】

Cyto-ChexTM曝露RNAの喪失および回収挙動はTransfixTMおよび後に示す他のアルデヒドと同一であるので、Cyto-ChexTMおよびStadilcyteTMの処方で見出されるホルムアルデヒド尿素誘導体成分のホルムアルデヒドドナー成分が、核酸の蛋白質への共有結合を担うらしい。

【0114】

生物学的系（すなわち、蛋白質および核酸）で見出される多数のマクロ分子求核試薬の存在下でのホルムアルデヒド-尿素誘導体は、これらの誘導体の解離速度の増加に導く。解離は、生物学的求核試薬複合体、おそらくは、共有結合に導くRNAに特異的に会合した調節蛋白質に近接して起こる。次いで、これらの結合および解離を除去し、引き続いてのプロテイナーゼおよびより強い求核試薬処理によって逆行させる。公知の架橋剤であるTransfixTMは、24時間安定化された連結細胞からの全長高完全性mRNAライブラリーを生じるという事実は全てのアルデヒド系安定化剤が同様な高品質の核酸を生じるであろう。かくして、保存および回収後に核酸の再現可能な収率が得られる。

【0115】

全RNAおよびそれらの対応するmRNAライブラリーの90ないし100%の分析は、以下の図10A、図10Bおよび図10Cに示すごとく、これらおよびほとんどの他のアルデヒドおよび/または尿素誘導体固定剤で可能である。加えて、これらのタイプの固定された核酸のほとんどは、図11に示すごとく60のごとき高温で加熱されたプロテイナーゼおよび求核試薬カクテルの組合せを介して回収することができる。

【0116】

これらの結果は、高温での1時間の緩衝液単独中の固定RNAの加熱が、mRNAライブラリーの一部を生じること示す。この高温回収効果は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織RNA検索ですでに示されているが、全血においてはこの結果がどこにも報告されていない。さらに、本出願で回収されたmRNAライブラリーの質および量は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織RNA検索を用いるこれらの報告では得られていない。

【0117】

他の求核試薬（トリス、酢酸ヒドラジドおよびヒドロキシアミン）を用いて回収されたものとmRNAライブラリーを比較すると、各求核試薬についてのmRNA転写体サイズ分布の割合は、試料のいずれもRNA分解を示すにもかかわらず異なっている。これは、異なるタイプのmRNA配列が特異的求核試薬およびインキュベーション条件によって検索可能であることを示唆する（すなわち、異なるタイプのホルムアルデヒド修飾は逆行される）。また、用いた種々の酵素は、異なる回収割合を示す（図11、ゲル底部）。

【0118】

異なる固定剤逆行剤は、異なる割合のmRNAライブラリーを生じるという観察と組合わせて、プロテイナーゼK消化単独が最大RT-鋳型活性の25%を回復するという事実は、求核試薬および酵素の組合せを使用することによる有意に改良された回収が可能であることを強く支持する。

【0119】

特に、比較的非侵入的末梢血液モデルを用いて癌についてのmRNA診断適用の可能性を証明するため、図12Aは、室温での24時間Cyto-ChexTMでの安定化後に7

10

20

30

40

50

．5 m l 末梢血液への三連の10および20 S K B R 3細胞スパイクで単離された全 R N A / m R N A の単一 T 7 R N A T プレ増幅からの m R N A からの得られた相対的質および量を示す。次いで、これらの連の各々を、免疫磁氣的に豊富化させ、それから、細胞溶解物をプロテイナーゼ逆行条件で処理し、続いてシリカ結合全 R N A 単離で処理した。a R N A の正規化された当量を、特異的遺伝子 C K 1 9 および EpCAM についての定量的 R T - P C R 反応で用いた。結果は図 1 2 B および図 1 2 C に示す。図 1 2 B および 1 2 C から分かるように、C K 1 9 によって測定された全てのスパイクはドナー - 適合三連（スパイクなし対照）に対して強く陽性であった。同様に、EpCAMは、このドナーの三連のスパイクなし対照で観察された異所性の（内因性）および極端に低いレベルの発現にもかかわらず、全てのスパイクについて同一の100%の陽性スコアを有する。事実、R T - P C R によるこの低いレベルのEpCAM m R N A 検出は、この配列で通常観察され、偽陽性 P C R 汚染によるものではない。

10

【0120】

図 1 2 D および 1 2 E は、三つの異なるアルデヒド系固定剤である C y t o - C h e x^{T M}、Stabilocyte^{T M} および Transfix^{T M} から得られた変化する m R N A R T - 鋳型の品質を示す。示したごとく、T r a n s f i x^{T M} は m R N A 鋳型を生じ、これは、C y t o - C h e x^{T M} または S t a b i l c y t e^{T M} いずれかよりもかなり低い R T 品質のものである。さらに、これらのデータをスパイクされた細胞の数に対して正規化し、正確に同一フラスコの S K B R 3 細胞における時刻 = 0 での修飾されていない細胞と比較すると、固定された - 対 - 非固定 C K 1 9 および EpCAM m R N A の間の差は4倍に過ぎない（19は示していない R N A データを導いた）。これは、ここにプロテイナーゼ K 回収単独および a R N A 増幅と組合わせた24時間の安定化プロセスにより、R T について可能な鋳型の質の25%を生じたことを意味すると解釈される。さらに、100%未満の R T 質についての理由は、プロテイナーゼ K 単独は除去できないアルデヒド修飾によるものらしい。かくして、プロテイナーゼおよび求核試薬カクテルの組合せは、これらの実験で証明されるごとく、これらの鋳型の R T - 質を25%を超えて有意に改良するであろう。同様な条件下での関連文献と比較すると、ホルマリン固定パラホルムアルデヒド包埋組織に由来する R T R N A 鋳型質の同一パラメーターを評価する研究は、非固定化組織に対して R T - 鋳型質の13ないし60倍低下を示す（G O D F R E Y ら、Quantitative mRNA Expression Analysis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using 5' Nuclease Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J. of Molecular Diagnostics, 2:84-91(2000)）。結果として、4倍の低下は先行技術よりも優れた有意な改良を提供する。

20

30

【0121】

図 1 2 A、1 2 B、1 2 C、1 2 D、および 1 2 E は、最もありそうには癌細胞である循環上皮細胞の血液 R N A 試料の保存および包括的分析についての再現性のある生成物の有力な手法を確認する。高レベルの m R N A 保存は、少なくとも50の m R N A 分子 / 細胞内のその細胞に存在する（すなわち、50コピー / 試料のみ）いずれかの m R N A についての7.5 m l の血液にスパイクされた単一細胞の存在を検出できる定量的分析に適用できる。

40

【0122】

まとめると、全血中の共有結合固定の速度およびタイプは固定剤のタイプに従って変化する。同様に、共有結合固定剤の逆行または回収の速度およびタイプは、用いるプロテイナーゼおよび求核試薬のタイプまたは組合せに従って変化するであろう。固定の速度は、注目する m R N A の半減期が固定の速度よりも速い適用のための臨界的論点であろう。順方向固定および逆方向回収反応（プロセス）の双方は、R N A のさらに高い質および量を生じるように最適化することができる。しかしながら、安定化され、回収された R N A の現在の質および量は血液中ではいずれの以前に調べていたものよりも優れていることがここに証明される。

【0123】

50

実施例 8

新鮮な非固定血液におけるCTCからのmRNAの豊富化および分析

ヒト血液を、進行したホルモン難治性前立腺癌（HRPC）を持つ9人の患者および13人の健康なボランティアから単離し、循環上皮細胞に対して特異的な遺伝子発現mRNAについて評価した。

【0124】

患者

進行したホルモン難治性前立腺癌（HRPC）を持つ9人の患者、および13人の健康なボランティア、7名の男性（年齢は24ないし73歳の範囲、平均45歳）、および6名の女性（年齢は27歳ないし61歳の範囲、平均39歳）の血液を10mlのEDTA VACUTAINERTM試験管（Becton-Dickinson, NJ）に吸い取った。9人のHRPC患者のうち、2人の患者は5つのある期間にわたる血液試料を有し、一人の患者は4つの試料を有し、3人の患者は2つの試料を有し、3人の患者が1つの試料を有して、複数時点であった。患者の年齢の範囲は60ないし81歳（平均74歳）であり、彼らの初期の診断は実験に先立って2ないし10年であった。タキソール/エストラムスチンおよび/またはルプロンでの治療を受けつつあった3人の患者からの系列的試料を調製し、ある期間にわたる系列として分析した。患者および健康なボランティアは、認可された研究実験下での同意を署名して通知した。

【0125】

標的細胞の単離

血液試料を室温に維持し、特に示さない限り収集から2ないし3時間以内に処理した。15mlの血液を7.5mlのアリコットに分け、内径17mmのディスポーザブル試験管（Fisher Scientific）に移し、800gにて10分間遠心した。ウシ血清アルブミン（BSA）を含むリン酸緩衝化生理食塩水（PDS）を加えて、10mlの容量とし、試料を逆転することによって混合した。上皮細胞接着分子（EpCAN）を認識するMab VU-1D9は、上皮細胞起源の組織と広く反応性であり、磁性ナノ粒子（フェロ流体、Immunicon, Huntingdon Valley, PA）にカップリングする。

【0126】

EpCAM-陽性細胞の磁氣的負荷を増加させ、かつ細胞表面でのEpCAM密度の差による捕獲効率の変動性を減少させるために、共にここに引用して一体化させる出願番号09/351,515および09/702,188デスチオビオチンをEpCAM-標識磁性ナノ粒子にカップリングさせ、CA-EpCAMを形成させる。ついで、CA-EpCAMフェロ流体およびストレプトアビジンを含む緩衝液を試料に添加して細胞の磁気標識の増加を達成する。引き続き、CA-EpCAMフェロ流体上のデスチオビオチンをビオチンで置き換え、これを、後記する浸透化緩衝液に含ませる。それにより、CA-EpCAMフェロ流体粒子の間の架橋を逆行させる。試料を直ちに、10分間、四極磁気セパレーター（QMS17, Immunicon）に入れた。10分後、試験管をセパレーターから取り出し、5回反転し、さらに10分間磁気セパレーターに戻した。この工程をさらに1回反復し、試験管を20分間セパレーターに戻した。分離の後、上澄みを吸引し、捨てた。試験管を磁気セパレーターから取り出し、ウシ血清アルブミン（BSA）を含む3mlのリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で再懸濁させ、容器の壁から画分を収集した。

【0127】

各試料からの2つの7.5mlアリコットを別々に処理した。1つのアリコットを調製し、フローサイトメトリーによって分析し（実施例12）、他のアリコットからのRNAを記載したごとく分析した。

【0128】

ヌクレオチドの精製および増幅

好ましい具体例において本発明を利用する1つの方法は、まずヌクレオチド試料を精製することである。ここに、全RNAまたはmRNAを豊富化された細胞集団から単離する。単離は、mRNAを無傷に維持し、かつ分解を妨げることができる当該分野で公知のいず

10

20

30

40

50

れの手段によって達成することもできる。例えば、二連血液試料からの豊富化された循環腫瘍細胞を100 μ lのTRIzol試薬(BRL)または100 μ lのRNA抽出緩衝液(ZYMO Research)に溶解させ、攪拌-ホモゲナイズした試料をRNAを用いるまで-80で貯蔵した。ホモゲネートを用いて製造業者の指示に従って全RNAを単離した。簡単に述べると、全RNAをDNase Iで処理した。DNase 活性は、DNase 処理の後に、臭化エチジウムゲルで検出可能なゲノミックDNAを生じないことが確認された。DNase 処理したRNAを、反復したTRIzol単離手法で洗浄した。得られた全RNAの1/10を、全RNAの質量およびサイズ標準に添って1%アガロースゲルでの電気泳動に付し、ついで、ノーザンブロットし、等モルのリボソーム18Sおよび28Sオリゴの混合物とハイブリダイズさせた。得られたハイブリッドブロットを32Pで標識し、ホスホルイメージし(Packard Cyclone)、分析して、RNAの完全性および質量を決定した。ついで、各試料からの残存する全RNA質量値(90%)を、その試料の7.5ml血液ドナー当量の全RNAと命名し、その1.5%がmRNAであると計算された。

10

【0129】

実施例9

免疫磁気選択後における患者でのフローサイトメトリー分析

ヒト血液から採取した白血球のフローサイトメトリー分析は、循環上皮細胞における遺伝子発現について評価した。ついで、単離された細胞を記載されたごとく調製し、それにモノクローナル抗体(Mab)-フルオロクロームコンジュゲートを飽和条件で添加した。ビオチン(Immunicon Corporation)を含有する200 μ lの浸透化緩衝液に再懸濁させた。該モノクローナル抗体は、サイトケラチン4、6、8、10、13および18(Immunicon)を認識するフィコエリスリン(PE)コンジュゲート抗-サイトケラチンモノクローナル抗体(Mab C11)で、ペリジニクロロフィルタンパク質(PerCP)-標識抗-CD45(Hle-1, BDIS, San Jose, CA)よりなるものであった。Mabと共に細胞を15分間インキュベートした後、2mlの細胞緩衝液(PBS, 1%BSA, 50mM EDTA)を添加し、細胞懸濁液を10分間で磁氣的に分離した。分離されなかった懸濁液を捨てた後、それにProcount System TMで用いる核酸色素を添加した0.5mlのPBSに収集された細胞を再懸濁させた(Procount, BDIS)。加えて、10,000蛍光カウンティングビーズを懸濁液に添加して、分析された試料の容量を確認した。(Flow-Set Fluorospheres, Coulter, Miami FL)。

20

30

【0130】

488nmのアルゴンイオンレーザー(DDIS)を備えた、FACSCaliburフローサイトメーターで試料を分析した。核酸色素の蛍光での閾値を用い、データ獲得はCellQuestTM(BDIS)で行った。8000のビーズまたは試料の80%を分析した後、該獲得を停止した。マルチパラメーターデータ分析は、リストモードデータで行った(Paint-A-GateTM, BDIS)。分析の基準は、順方向光散乱によって規定されるサイズ、直角方向光散乱によって規定される粒度を含んだ。PerCP-標識抗-CD45 Mabでの染色と組み合わせた、核酸染色およびPE-標識汎抗サイトケラチンMab C11(CA4, 5, 6, 8, 10, 13および18)での陽性染色を、差分CTC/WBC蛍光染色および分析で用いた。CTCは、CD45染色の不存在とカップリングさせた、核酸色素およびサイトケラチン抗体の存在によって同定した。各試料について、上皮細胞に典型的な領域に存在する事象の数に1.25を掛けて、フローサイトメトリーによって分析されない試料容量を説明した。

40

【0131】

健康な非癌ドナーの試料においては、免疫磁気選択から運び去られた白血球は655ないし5,565の範囲であった(メジアン4,350,平均1,759)。HRPC患者の試料においては、運び去られた白血球は813ないし92,000の範囲であった(メジ

50

アン4, 350, 平均1, 350)。健康な非癌対照群(7名の男性および6名の女性)からの血液試料はCTCを示さず、他方、HRPCからの血液試料は7.5mlの血液中

で4ないし283のCTC範囲を示した。

【0132】

実施例10

増幅されたライブラリーからのmRNA転写体の定量

まず、各々が免疫磁氣的に豊富化された7.5mlの血液試料容量から単離された全RNA質量を定量することによって、mRNA/aRNA質量の正規化を決定した。これは、各試料の全RNAの10%をノーザンブロッティングし、続いて28Sプラス18S放射性標識オリゴプローブをハイブリダイゼーションし、および平行して既知の全RNA質量細胞系標準にて行うことによって達成された。これに続き、ホスホイメージ定量を行った。(Cyclone, Packard Instruments)。得られた全RNA質量は、1ドナー試料当量のmRNA = 1ドナー試料当量のaRNA;

10

$[(\text{全RNA質量}) \times (1.5\% \text{ mRNA})] / 3 * = 1 \text{ ドナー試料当量のaRNA}$ で、*RNAライブラリーの平均分子量は未増幅mRNAの分子量よりも3倍低いことが判明した。

【0133】

0, 1, 2, 3および4の相対的遺伝子発現レベルは、既知のコピー数のCN19イン・ピボ転写RNA構築体(CK19-cRNA)標準を含む未知ベースの増幅された産物のアガロースゲル速度曲線バンドの強度に帰属された。このCK19-CRNA標準は、CK19野生型mRNA配列の最も3'側の800の塩基を含んだ。1000倍動的範囲をカバーした標準CK19-cRNA曲線は、各々が、パーコール-由来WDCから単離した2ng全RNAにスパイクされた20,000; 2,000; 200; 100; 50; 25; および12.5コピーにおいて三連で行った。40サイクル行った標準速度直線は、13ないし2000コピーのCK19-CRNA転写体の間のRNAコピー数に対する直線上シグナル応答プロットバンドの強度を示した[図13Aおよび図13B参照]。外部標準曲線は、三連で分析したいずれの標準についても27%最大CVを有した。多変数遺伝子分析ではCK19外部標準曲線に対して比較を行い、相対的遺伝子発現レベル0ないし4を割り当てた:

20

0 - 非 - 検出可能

1 - ほぼ25ないし50コピーのCK19

30

2 - ほぼ250ないし500コピーのCK19

3 - ほぼ2,500ないし5,000コピーのCK19、および

4 - 25,000を超えるコピーのCK19。

【0134】

図13Bは、標準曲線上のCK19-cRNAの近似コピー数に対応する典型的なバンディング強度を示し、これを用いて相対的遺伝子発現レベル1ないし4を割り当てた。

【0135】

CTC計数および遺伝子転写体発現プロファイルは、13人の健康なドナーおよび9人のHRPC患者のEp-CAMの免疫磁氣的に豊富化した血液試料からの23の異なるPCR増幅産物を用いて決定した。マイクロアレイは、免疫磁気豊富化プロセスの間に非特異的に運び去られたWBCに由来する信号対ノイズ不適合性のため、これらのタイプの試料を分析するのに効果的ではなかった。これらの試料におけるWBCキャリアオーバーノイズに対するCTC特異的信号の比率は、103ないし104WBC当たり1ないし1000CTCの範囲である。これらのマイクロアレイの制限は、各免疫磁氣的に豊富化された血液試料からの全mRNAライブラリーの90%を用いて10,000倍浸透化工程を取込み、続いて、アレイの代わりに多重遺伝子RT-PCR分析を行うことによって克服した。この革新は、各7.5ml血液試料で行うべき数100の個々のPCR反応のための十分な出発物質を提供する。かくして、各CTC mRNAライブラリーの各mRNAメンバーについてアッセイ感度または臨床感度に妥協することなく、個々の患者のCTC多変数RT-PCRプロファイル分析を行うことが可能となる。

40

【0136】

30

前記した容量正規化手法の後、各試料からの残存する90%全RNAは、前記した67塩基オリゴ(dT)プライマーを用いるのではなく、SMART PCR cDNA合成キットを用いて逆転写(RT)した。反応を42℃にて90分間インキュベートした。Advantage cDNA PCR キット(Clontech)を用い、全10μl RTを50μlのPCR反応に移し、PE-9600および熱サイクリングプログラム; 1分間の95℃、10サイクルの15秒間の95℃、1秒間の65℃、6分間の68℃、続いての72℃の20分間を用い、P1-SMARTプライマーおよびP2-T7 18塩基プライマーでのPCRに付した:

(5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATT-3')。

全PCR反応容量をSephadex G-50 Quick Spin (TE)カラム(Roche Diagnostics)に付加し、製造業者の指示に従って溶出物を得た。

10

【0137】

溶出物を、60℃にて、Vacufuge (Eppendorf)でほぼ30分間真空濃縮して3μlとした。aRNAの代表的なライブラリーを生じたRNAポリメラーゼ転写体増幅反応は、20μl容量にて、製造業者の指示に従い、AmpliScribeキット(Epicenter Technologies)を用いて組み立て、37℃にて6ないし12時間インキュベートした。Trizol単離手法を反復し、さらにRNA転写反応物を洗浄した。

【0138】

RNAサイズ標準、RNA質量標準、各試料からの転写反応産物の1/10を65℃にて15分間ホルムアミド変性し、2%アガロースゲルに負荷し、5ボルト/CNにて15分間泳動させ、AlphaImagerTM(Alpha Innotech Corp.)を用いるゲルイメージングシステムに従って、SYBR GoldTM(Molecular Probes)で1時間ポスト染色した。各転写体ライブラリーの質量を測定した。

20

【0139】

遺伝子特異的プライマーは記載したごとく設計した。全てのプライマー組は各特異的遺伝子標的の最も3'側の500塩基対内(平均344bp、長さが226ないし513bpの範囲)の特異的遺伝子標的cDNAを増幅するように設計した。ゲノミックDNAの増幅を回避するために、すべてのRNA試料を記載されているごとくにDnaseで処理した。表1は、相対的RT-PCRによって分析された各アンプリコンについてのプライマー対を示す。順方向プライマーP1は、各々のプライマー対において上側配列として示す。逆方向プライマーは下側配列である。全ての配列は5'側から3'側に向けて表す。

30

【0140】

【表2】

表1: プライマー対

遺伝子	GenBank 受入番号	3' 末端 からの P1 距離	選択されたプライマー対の配列	アンプリ コンの長さ	
アルファ1- グロビン	V00491	580	AAGACCTACTTCCCGCACTT TATTTGGAGGTCAGCACGGT	451	
AR	NM_000044	513	ATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGAT CAGGAACATGTTTCATGACAGACTGT	207	10
BCL2	XM_008738	440	GCAAGAGTGACAGTGGATTGCAT CTAATGGTGGCCAACTGGAGACT	330	
CK05	NM_000424	353	AGTCACTGCCTTCCAAGTGCAGCAA GGAAACCTGAAGGCTGATTTGAAGCAG	212	
CK08	M34225	429	GTGGTTTGAGCTCGGCCTATGG CCAGTGCTACCCTGCATAGCG	275	
CK10	NM_000421	305	GACGGTAGAGTTCTTTCATCTACGGTTG GGAAACCACAAAACACCTTGTAGACACC	196	
CK18	NM_000224	331	ACCTTGAGTCAGAGCTGGCACAGA GCTTCTGCTGGCTTAATGCCTCAG	275	20
CK19	NM_002276	320	CATATCCAGGCGCTGATCAGCG CAAAGGACAGCAGAAGCCCCAG	228	
DD3	AF103908	2160	GTAAGCCTGGGATGTGAAGCAAAGG GAACCCTAAAGTGGCTCACAAGAGTG	260	
EGFR	NM_005228	265	CCTGTAACCTGACTGGTTAACAGCAG GGCTCTGACTGATCTGGGAGTCA	200	
EpCam	M33011	432	GAGATGCATAGGGAACTCAATGC ACGATGGAGTCCAAGTTCTGGAT	275	
ER-a	NM_000125	382	AGCAGGTGCCTGAGACACAGA TCGAGCATCCCGCTGGATTCTT	328	30
ER-b	NM_001437	323	GGAAGCTGGCTCACTTGCTGAA GAAGCACGTGGGCATTGAGCAT	232	
Her2Neu	M11730	426	TCGTTGGAAGAGGAACAGCACTG AGCCTGGATACTGACACCATTGC	266	

【表 3】

HK2	XM_008996	334	CACACCATGCAGGATGACAT	190	
			GCATTCCACAAGGTTCTCAG		
MDR1	AF016535	263	AGTGTCCAGGCTGGAACAAAG	215	
			CTCCACTTGATGATGTCTCTCAC		
MGB1	XM_006409	408	CTCCCAGCACTGCTACGCAGGC	340	
			GACATAAGAAAGAGAAGGTGTGGT		
MGB2	NM_002407	420	CTCCTCCTGCACTGCTATGCAGAT	264	
			ACACCAAATGCTGTCTGCTACACTGTATGCA		
Mic1	AF019770	352	CTACAATCCCATGGTGCTCA	289	10
			ACACAGTTCCATCAGACCAG		
MMP2	NM_004530	332	ACTGCTGGCTGCCTTAGAACCTT	216	
			GAGAAGAGACTCGGTAGGGACAT		
MMP9	NM_004994	327	CGTCTTCCAGTACCGAGAGAAAG	215	
			TGTATCCGGCAAACCTGGCTCCTT		
MRP	L05628	328	GGTGATCGTCTTGGACAAAGGAG	300	
			TCTTCACAGCCAGTTCAGGCAG		
MUC1	J05582	361	AACGGTGGCAGCAGCCTCTCTTA	238	
			GCTTCCACACACTGAGAAGTGTCCG		
NKX3A	NM_006167	284	GGAAGTTCAGCCATCAGAAGTAC	246	20
			GGTATGGGTAGTAAGGATAG		
p53	AF307851	334	CTGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCT	243	
			GTGGGGTGAAAATGCAGATGTGC		
PIP	J03460	226	CAGAACTGTGCAAATTGCAGCCGTC	201	
			AGACCACAGCAGAAATTCCAGCCAAG		
PSA	M26663	236	TGAAGCACTGAGCAGAAGCTGGA	236	
			GAGGGTTGTCTGGAGGACTTCAA		
PSGR	AF311306	425	ACACCGCTTTGGAAACAGCCTTCATC	281	
			GTACTGATGTGCTTATGGGCAACTGG		30
PSM	M99487	459	AGTTCAGTGAGAGACTCCAGGAC	286	
			CTGCACTGTGAAGGCTGCAACAT		
TERT	NM_003219	347	AGCACACCTGCCGTCTTCACTT	234	
			GGCACACCTTTGGTCACTCCAA		
Timp1	NM_003254	302	CCAAGACCTACACTGTTGGCTGT	240	
			ACTGTGCAGGCTTCAGTTCCACT		
Timp2	NM_003255	325	TGGGCTGCGAGTGCAAGATCAC	219	
			CTGCTTATGGGTCCTCGATGTC		
Topo2a	NM_001067	356	GCCATCCACTTCTGATGATTCTG	244	40
			ACCAGTCTTGGGCTTGGTAAGA		
Topo2b	NM_001068	366	AAGCCCAAGAGAGCCCCAAAAC	279	
			TGGCAGAGAAGGTGGCTCAGTA		
TROP2	X77753	334	TGTTGCTACTCTGGTGTGTCCCAAG	245	
			CTGGGATTCAAAGGAGGTACAGCTC		
uPA	NM_002658	387	TGGGCTGTGAGTGTAAGTGTGAG	285	
			CACCCAGTGAGGATTGGATGAAC		

【 0 1 4 1 】

逆転写 (RT) は、製造業者の指示に従い、ランダム 9 量体 50 mg、1 µl の SuperscriptTM (BR 50

L)を用いて、25ナノグラムのT7ブレ増幅aRNAライブラリーで行った。RTは25にて10分間、37にて10分間、42にて20分間、50にて60分間インキュベートした。aRNAの試料当たり10ドナー当量(50ないし1300pg)を、1単位の白金taq(BRL)を含有する各引き続いての50μlのPCR反応で用いた。PE-9600サーモサイクラーを用いる熱サイクリングプログラム: 1分間の95および31、35および40サイクルの1秒間の95、1秒間の65、1分間の72; 続いての72での20分間; の間の31, 35および40サイクルにおいて15μlをアリコットすることによって、個々のPCR曲線を各単一PCR反応試験管から作成した。各PCRバッチ内の各アンプリコンは細胞系cDNA増幅陽性対照、cDNA試料を除いて全ての成分を含有したマスター混合PCR試薬陰性対照を含んだ。BRL低質量分子量およびAlphaeaseTMソフトウェアバージョン5.04でのスポットデンストメトリー分析と平行して、全てのRT-PCRの結果は、臭化エチジウムを含む2%アガロースゲルで分析した。

10

【0142】

遺伝子概観目標は、最高の臨床感度および上皮細胞を検出するための感度にて、CTCにおいてmRNA発現プロファイルを同定することであった。また、WBCで見出された遺伝子発現レベルを健康なドナーの豊富化から評価した。遺伝子候補の選択は広い上皮特異的発現レベルを示した公知の文献データに基づくものであった。WBCにおいて陰性であった候補の同定は、3つの基本的な組織学的レベル、上皮起源(図14a)、腫瘍/器官の起源(図14b)および腫瘍治療標的特徴付け(図14c)に対するカテゴリー化/特徴付けCTCプロファイリングを可能とするであろう。

20

【0143】

RT-PCRプロファイリングは図14A、14Bおよび14Cにおけるアンプリコン組に従って、全ての試料で行った。図14Aは、上皮マーカーCK19がHRPC試料についての本発明のシステムで100%特異的であることを示し、ここに、18/23(78%)に比較して、0/13健康ドナーはCK19陽性であった。HRPC患者試料は、CK19陰性のスコアであった、またおよびTROP2は100%特異的である。しかしながら1/13(4%) 2/23(9%)のそれらの貧弱な感度は、各々、それらの使用を正当化するのに十分なプロファイル値を与えることができない。100%特異的ではない遺伝子のうち(EpCAM)、Muc-1およびMIC-1)、WCバックグラウンド閾値をレベル1および2の間で適用することができ、それを超えては、1を超える患者由来のシグナルは真の陽性であると考えられることができる。遺伝子のこの組での細胞上皮感度、CK19, EpCAM、およびMuc-1感度の組合せについてプロファイリングを行う場合、23/23(100%)患者試料は上皮-陽性のスコアであった、すべての血液試料はフェロ流体豊富化プロセスからの低い非特異的結合のため、WBCのキャリアーを生じるので、WBC特異的遺伝子(F16=アルファグロビン遺伝子)を、RNAプロセッシングおよび増幅用の総じてのシステム陽性対照として使用した。すべての36の試料はレベル4を超える得点であった(図14A参照)。

30

【0144】

実施例11

40

ブレ増幅のより低い制限感度における再現性の評価

修飾されたT17転写体ブレプロセッシング増幅手法の再現可能なより低い制限感度性能を評価するために、臨床RNA試料で行うすべての操作を組み込んでモデルシステムを構築した。乳癌および前立腺癌細胞系SKBR3およびLNCaPからの全RNA(American Type Culture Collection, Manassas, VA)を製造業者の指示に従ってTrizol試薬(Life Technologies Inc.)を用いて単離した。第一ストランド合成の系列希釈を2、0.2、0.02 SKBR-3細胞当量に対応させて作成する前に、各希釈をパーコール-由来WBCからの2mgからの全RNAにスパイクした。RT-PCR外部CK19標準曲線の決定は、SKBR-3希釈曲線と平行して行い、その結果、SKBR-3細胞当量当たり存

50

在する約 1,000 野生型 C K 1 9 m R N A コピーがもたらされた。C K 1 9 特徴付け S K B R - 3 希釈曲線を 2 つのタイプの特異的転写体の 1 つとして用いて、この T 7 - ベースの m R N A ライブラリー増幅システムの全プロセスのより低い制限感度および再現性をモデル化した。第 2 の転写体が、外因性ラムダ D N A ベースの構築体 (Walker Biotech Publication) であり、1.2 kb ポリ A (30) 転写体を生じる。S K B R - 3 細胞でスパイクされた W B C についての曲線を、2000、200 および 20 の C K 1 9 m R N A コピーレベルの各々にて三連でアッセイした。ラムダ曲線は、500、50 および 5 のコピーレベルにてパーコール由来 W B C からの 2 ng 全 R N A に三連でスパイクした。最後の分析において、再現可能な R T - P C R 増幅は 50 コピーよりより大きなレベル (N = 12) から達成され、ここに、個々の試料は全 T 7 - 転写体プレ増幅を通じて行い、その各々の結果、測定可能な信号が得られた。さらに、いずれか 1 つの配列の 50 m R N A 転写体のみで出発し、検出のこの下限は、すべての 6 つの配列タイプ (P S A、P S M、A R、H P N、C K 1 9 および E p C A M) を a R N A および定量的 (R T - P C R 分析に先立って既知のコピーレベルまで系列的に希釈する引き続いての細胞系スパイクモデルで再現された (実施例 6))。 10

【0145】

R T - P C R の後、分子量およびスポットデンストメトリーゲル分析を、31、35 および 40 サイクルの動的曲線からのアリコットについて Alpha l m a g e r で行った。19.25% の C V は、12 のスパイクレベルの 11 から計算した (92%)。200 コピー試料のうちのただ一つ (8%) が予測されるよりも 14 倍低い同一性を有したが、この試料は依然として定量的に検出可能であって、レベル 1 として割り当てられた。 20

【0146】

別々の実験において、相対的 m R N A 豊富さに対する本発明の T 7 プレ増幅方法の効果は、同定可能に調製された非 - 増幅ライブラリーとの比較によってモデル化した。1000 細胞当量の W B C 全 R N A (2 ng) にスパイクされた 15 細胞当量の前立腺癌細胞系 L N C a p + 15 細胞当量の乳癌細胞系 S K B R - 3 で出発した場合、N = 8 遺伝子 (P C A、P S M、M G B 1、M G B 2、P I P、C K 8、C K 1 9、および E p C A M) についてのバンド強度比率の有意な差は検出されず、続いて、図 13 C に示すごとく、T 7 プレ増幅方法および引き続いての多重遺伝子 R T - P C R 動的曲線分析を行った。各バッチで平行して行った c D N A 鋳型陰性増幅制御は、これらの実験の間に検出可能な信号を示さなかった。 30

【0147】

本発明の修飾された T 7 方法の 1 ラウンドを用いて全 R N A ライブラリーを比例して増幅し、元の m R N A 質量の 10,000 倍を超える平均増加でもって a R N A ライブラリーが得られた。これは、測定された全 R N A 質量の 1,5% の元の m R N A レベル評価に基づく。転写体増幅プロセスの結果、600 塩基のメジウム転写体長さのライブラリーが得られ、これは、550 ないし 800 塩基の間の範囲であり、各ライブラリー内の個々の転写体のサイズは 300 ないし 3000 塩基の範囲であった。個々の a R N A ライブラリーは R T につきランダム起点とされ、それから、10 ドナー当量の a R N A / c D N A を用いて個々の P C R 反応の多重遺伝子パネルを行った。 40

【0148】

健康な非 - 癌試料における運び去られた W B C からの全 R N A の量は 0.8 ないし 11.12 ng の範囲であった (平均 3.5 ng)。H R P C 患者試料からの全 R N A の量は 0.8 ないし 35.12 ng の範囲であった (平均 7.2 ng)。全ての全 R N A 試料は、引き続いて、出発の全 R N A 値に直接比例した質量の a R N A ライブラリーを生じた。

【0149】

各試料の全 R N A の 10% のノーザンプロットを、既知質量の細胞系標準からの全 R N A と平行して 28 S + 18 S 放射性標識オリゴプローブとハイブリダイズさせ、続いて、量および質の測定のためにホスホイメージを行った。質は、18 S を超える 28 S の量の比率によって評価し、ここに、S K B R - 3 細胞系標準は豊富化された試料については平均 50

して1.55であり(1.50ないし1.64の範囲)、13人の健康なドナーは平均して1.36であり(1.66ないし1.60の範囲)、HRPCは平均して1.10であった(0.57ないし1.80の範囲)。

【0150】

加えて、本発明者らは、HRPC患者からのフェロ流体豊富化CTC/WBC試料の80%は、予測されるよりも6倍低い全RNA質量を有することを観察した(1.5ないし15倍の範囲)。これらの予測はWBC平均全RNA質量=細胞当たり2pgおよび平均上皮細胞全RNA質量=細胞当たり20pgに基づくものであった。これは、特に、治療の間において、個体の診断および治療状態を評価するのに有意義であろう。

【0151】

実施例12

組織特異的遺伝子を用いるCTC腫瘍起源組織の確認および患者特異的治療プロファイルの特徴付け

36試料をN=8アンプリコンでさらにプロファイルして、循環上皮腫瘍細胞の起源器官の同定のために最適な特異性および感度発現プロファイルを決定した。前立腺特異的同定では、我々は、PSA、PSM、HK2、HPN、PSGR、DD3、MGB1およびMGB2を評価した(図14B参照)。これらのアンプリコンのいずれも、一つのHepsin(Hpn)を持つかけ離れた女性3名を除いてWBC群からのいずれの信号も示さなかった。図14Bに示すごとく、PSAは20/23(89%)試料の陽性得点にてこの前立腺群でもっとも感度がよく、続いて、PSM 17/23(74%)、HPM 13/23(57%)、HK2 7/23(30%)、PSGR 2/23(9%)、およびDD3 1/23(4%)であった。予期せぬことに、「乳房特異的」遺伝子、ママグロビン1および2は、共に健康なドナー集団ではなく前立腺において強い信号レベル陽性MBG1 1/23(4%)およびMBG2 2/23(9%)の得点であった。二つの最大感度のマーカーPSAおよびPSMを合わせると、20/23(87%)の感度を生じる。HPNを加えると、感度は21/23(91%)まで増加する。HepsinおよびPSMは二つのマーカーであり、これは、治療戦略において中枢的である。というのは、それら共に組織特異的であって、膜貫通特異的細胞標的送達戦略だからである。

【0152】

CTC RNAプロファイリングに基づく潜在的治療プロファイルの個々の患者の特徴付けを行い、結果を図14Cに示す。ここに、この試料の組における個々の特異性得点はAR、NKX3A、EGFRおよびERが全て100%であったことを示した。MDR1、MRP、およびTopo2aは、全て、WBC群からの有意なバックグラウンド信号を被った。HRPC CTCを検出するためのARの感度は16/23(70%)であり、続いて、NKX3A 4/23(17%)、Topo2a 5/23(22%)、MDR1 5/23(22%)、EGFR 4/23(17%)、およびER 1/23(4%)であった。予期せぬことに、MDRおよびMRPはこれらの二つの群を層化のには見えなかった。

【0153】

一定期間にわたる試料は三人の患者からの18ないし26週のコースの上に描かれた。一人の患者はルプロン単独で処置し、二人の患者はタキサン/エストラムスチンと組み合わせたルプロンで処置した。系列的試料は、治療感度/抵抗性関連遺伝子の発現の変化を示し、他方、その他の試料は未変化であった。図15A、15B、および15Cに示すごとく、これらの変化はCTCおよび白血球カウントからは独立していた。0、5、10および18週において吸い取った4つの一定期間にわたる試料を有した、ルプロン単独で処置した患者では、MDR1は検出可能ではなく(図15A)およびARは比較的一定のままであったが、Hepsinは変動した。図15Bおよび15Cは、さらに、TX/ES処置の間における健康ドナーに対するMDR1 mRNAレベルの終始一貫した低下を示した。HRPCの発生において中枢的な役割を果たすAR発現レベルは、図15Bに示すごとく、TX/ES処置の間に完全に排除された。対照的に、図15Cは治療の同様な間に

10

20

30

40

50

比較的影響されない A R を示した。図 1 5 B および 1 5 C における双方の患者の T X / E S 処置の間に、完全な排除に対する未処置についての高発現レベルからの H e p s i n m R N A で劇的な変化が検出された。

【 0 1 5 4 】

実施例 1 3

C T C - 補充データを供する同一試料からの血漿 - 由来 (非 - C T C) R N A での病気状態のプロファイリング

これまで、血液試料から豊富化された C T C に由来する m R N A を分析するための方法が記載されている。この方法の重要な工程は、T7 プレ - 増幅工程であり、これは、1000 までの異なる個々の遺伝子特異的 R T - P C R 反応での転写体の数コピーの分析を可能とする。代表的な m R N A ライブラリーの T7 プレ - 増幅は、制限された試料 m R N A 質量の主な制限を効果的に除去する。この同一プレ - 増幅は非 - C T C R N A に適用することができる。事実、与えられた血液試料には R N A の多数の源があり、これらの非 - C T C R N A 転写体のいくつかは価値ある情報を提供するであろう。

10

【 0 1 5 5 】

C T C 存在の確認および腫瘍起源組織の決定、ならびに病気メカニズムの包括的特徴付けは、フェロ流体豊富化プロセスの間に得られた血漿血液画分に由来する R N A を用いて達成することができる。好ましくは、これには、豊富化された C T C についての前記実験で記載した T7 プレ - 増幅プロセスをカップリングさせる。フェロ流体豊富化プロセスは最初に、各試料の血漿画分を分離する。典型的には、この画分は C T C が豊富化されれば捨てられていた。

20

【 0 1 5 6 】

しかしながら、血漿 - および血清 - 由来 m R N A および D N A は最近、文献において、価値ある癌発現 (表現型) および遺伝子型 (D N A 分析) のデータを供することが示されている。血漿 - 由来 m R N A および D N A は、下流分析のための伝統的な分子生物学的方法によって単離される。m R N A は血漿から容易に入手でき、かつ価値ある R T - P C R データを供することが証明されているので、これらの同一 R N A 転写体は、本明細書中に記載された修飾された T7 増幅手法を用いてより包括的にプロファイルすることができる。かくして、C T C - 独立および / または C T C - 相補的 m R N A 発現プロファイルは、各試料の血漿 - 由来画分からの R N A を用いることによって C T C についての同一プロファイリング手法で得ることができる。

30

【 0 1 5 7 】

さらに、T7 ベースの発現プロファイリングアプローチは前記した豊富化プロセスに適用することができ、C T C - 枯渇画分の分析を可能とすることは、W B C 発現プロファイルの寄与を区別するのに有用であり、これは、豊富化の間に非特異的に行われ、寄与は C T C - 特異的プロファイルを形成する。これは、異なるパターンの比較および引き続いての引き算によって達成することができ、分析の間に C T C を正しく同定するためのさらなるメカニズムを提供する。加えて、C T C - 枯渇プロファイルは、それ自体、特定の療法に対する応答および感度について価値ある患者 - 特異的情報を提供するであろう。

40

【 0 1 5 8 】

本発明が関連する技術分野の当業者には、本発明が明細書中に開示した好ましい具体例の記載および議論に制限されず、以下の請求の範囲によってのみ定義される本発明の精神および範囲を逸脱することなく、手法の多くの修飾および変形を達成することができるのを認識するであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 9 】

【図 1】図 1 は、単一試料についてのマルチパラメーター分析での本出願で記載した発明によって可能となる種々の可能性およびオプションを示すフローチャートを示す。表現型および遺伝子型分析は固定されたまたは固定されていない細胞で得られる。

【図 2】図 2 は、全 R N A を T r i z o l + ペレット塗料共沈殿を介して得られた上澄み

50

から単離する前に、種々の回数 *Immuniperm* - 処理した約 1600 の SKBR3 乳癌細胞の SYBR Gold 染色後の 2% アガロースゲル電気泳動によって分析された変性全 RNA の逆イメージ (ネガティブ) を示す。

【図 3】図 3 は、全細胞、細胞ベレット画分からの *Immuniperm* (サポニン) 浸透化細胞、および *Immuniperm*^R - 浸透化 SKBR3 乳癌細胞の上澄み画分からの細胞を含む臭化エチジウムで染色した 1% 変性全 RNA アガロースゲルを示す。

【図 4】図 4 は、ポリヌクレオチドキナーゼ処理^{3 2} P - 標識オリゴ (dT) (25 量体) プローブによってハイブリダイズさせた図 3 に示したゲルのノーザンプロットのホスホリメージを示す。放射性信号は、全細胞、および図 3 に示したゲルからの二つの *Immuniperm*^R - 処理細胞画分に由来する全 RNA の全てのポリ (A) + mRNA 転写体に対応する。 10

【図 5】図 5 は、標識されたオリゴ (dT) プローブの慣用的解離および除去を介してストリップされ、核 - 特異的前駆対 rRNA プローブで再度プローブした図 4 からのノーザンプロットを示す。

【図 6】図 6 は、ストリップされ、かつミトコンドリア - 特異的 12S rRNA プローブで再度プローブされた図 5 からのノーザンプロットを示す。

【図 7】図 7 は、図 3 においてゲルイメージを対応する mRNA を第一ストランドオリゴ (dT) (起点 cDNA 合成の間にアルファ - ^{3 2} P - ヌクレオチド標識した場合の cDNA アレイドットプロットハイブリダイゼーションパターン) の比較を示す。ついで、標識された第一ストランド DNA をハイブリダイゼーションとして用いた。パターン比較は、mRNA の同一相対的豊富さがすべての RNA 細胞画分で存在することを示す。 20

【図 8】図 8 は各々 *Immuniperm* で約 770 の PC-3 細胞を含有する多重アリコットを別々に処理した後に得られた、定量的および定性的な相対的サイトゾル全 RNA のゲルイメージを示す。

【図 9】図 9 は、CytocHex^{T M} および他のアルデヒドベースの固定剤、続いての酵素消化を用いる、全 RNA ライブラリーの 90 ないし 100% の保存、回収および RNA 完全性分析を示す。この実験では、CytocHex^{T M}、Stabilcyc^{T M} および Transfix^{T M} である 3 つの異なる固定剤なくしての (リン酸緩衝化生理食塩水、PBS) およびそれを用いた、双方の対照レーンにおける、新たに吸い取った 7.5 ml の末梢血液 (EDTA Vacutainer 試験管) に最初にスパイクされた 300,000 SKBR3 細胞系の細胞の一部を質量が正規化した。混合の後、これらを室温にて (20 ないし 25 で) インキュベートした。しかる後、VU-1D9 (EpCAM) - フェロ流体免疫磁気選択を用い、SKBR3 細胞を血液から豊富化させた。各処理からの豊富化された細胞を 3 つの等しいアリコットに分け、プロテイナーゼ K (「ポスト」で示したレーン) で処理し、プロテイナーゼ K 消化なくして処理した (即時の RNA 単離では「pre」で示したレーン、および、ポストに対する細胞のみを意味する「No」で示されるレーンには、プロテイナーゼ K 成分が添加されず、全ての他の操作はポストに等しい)。得られた正規化された RNA 単離は、1% 変性アガロースで分離し、SYBR Gold で検出し、アルファイメージャーデンシトメトリーでイメージし、ついで、ノーザンプロットし、最後に、オリゴ (dT) プローブして、各回収された全 RNA および mRNA ライブラリー相対的質および量を示す。 30 40

【図 10 A - B】図 10 A および図 10 B は、1、2 および 4 時間にわたる CytocHex^{T M}、Stabilcyc^{T M}、Transfix^{T M}、パラホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサール固定の相対的速度を示す。この実験では、CytocHex^{T M}、Stabilcyc^{T M}、Transfix^{T M}、パラホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、グリオキサール経時的相対速度を 1、2 および 4 時間において評価した。図 9 に記載したのと同じの方法によって、7.5 ml の血液の試料を単一ドナーから調製した。唯一の差は、それらを選択し、1、2 および 4 時間の最終点で RNA 単離のために処理したことである。得られた正規化 RNA 単離を 1% 変性アガロースで分離し、SYBR Gold で染色し、アルファイ 50

メージャーデンシトメトリーでイメージし、ついでノーザンブロットし、最後のオリゴ(dT)プローブして回収された各全RNAおよびmRNAライブラリーの相対的質および量を示す。

【図10C】図10Cは、15、30および45分にわたるCyto-ChexTM対パラホルムアルデヒドの相対的固定速度を示す。この実験においては、固定Cyto-Chex対パラホルムアルデヒドの経時的相対速度は15、30、および45分に評価した。図9に記載したのと同じの方法によって、7.5mlの血液の試料を単一ドナーから調製した。唯一の差は、それらを15、30、45分の最終点で選択したことである。相対的mRNAライブラリーの質および量を示すオリゴ(dT)プローブドブロットのホスホイメーキング定量は：ホルムアルデヒド=パラホルムアルデヒド(～4倍)>TransfixTM(～2倍)>StabilcyteTM(～1.5倍)>Cyto-ChexTM(～1倍)=グルタルアルデヒドの相対速度を示し、グリオキサールはランク付けするのにはあまりにも遅い。得られた正規化RNA単離を1%変性アガロースで分離し、SYBR Goldで染色し、アルファイメージーデンシトメトリーでイメージし、ついで、ノーザンブロットし、最後にオリゴ(dT)プローブして、回収された各全RNAおよびmRNAライブラリーの相対的質および量を示す。

【図11】図11は、Cyto-ChexTM保存からのRNA回収の質および量に対する求核試薬および酵素の変動に対する効果を示す。これは、改良された配列分析で組み合わされた処置で用いる場合、質が同様であることを指示する。得られた正規化RNA単離を1%変性アガロースで分離し、SYBR Goldで染色し、アルファイメージーデンシトメトリーでイメージし、ノーザンブロットし、最後にdTプローブして、回収された各全RNAおよびmRNAライブラリーの相対的質および量を示す。

【図12A】図12Aは、プロテイナーゼ回収およびaRNAプレ増幅と共にCyto-ChexTM安定化血液における10SKBR3細胞/7.5ml血液からの特異的mRNAの検出によって示された診断適用の可能性を示す。診断適用の可能性は、ここでは、7.5ml末梢血液にスパイクされた三連10または20SKBR3細胞からの特異的mRNAの感度のよいかつ再現性のある検出によって証明される。スパイクされた血液を直ちにCyto-Chexで安定化して、細胞RNAを安定化させた。室温(20ないし25)にて1日インキュベーターでインキュベートした後、VU-1D9(EpCAM)-フェロ球体免疫磁気選択を用いて安定化された細胞を選択的に豊富化した。豊富化につ

づき、シリカ結合RNA単離、続いてのaRNAプレ増幅および遺伝子特異的定量的RT-PCRがCK19およびEpCAMについて実行できるように、プロテイナーゼK消化を行ってRNAを遊離させた。

【図12B-C】図12Bおよび図12Cは、SKBR細胞スパイクフェロ流体選択およびCytoChexTM処理、続いてのプロテイナーゼ逆行からのCK19およびEpCAMの各Q-PCRを示す。この実験は、定量的なRT-PCR分析の結果を示し、これは、グラフ化する前に元の全RNA質量に対して正規化した。かくして、示された値は、aRNA増幅に先立って元のRNA単離に含まれた元のmRNA集団と同等である。

【図12D-E】図12Dおよび図12Eは、細胞安定性試薬で処理したSKDRに由来するRNAについてのCD19およびEpCAMでの各Q-PCRを示す。これらの実験は、図9のCyto-ChexTM、StabilcyteTMおよびTransfixTMに示された3つの異なる固定剤に由来するRNAを示す。これらのプロテイナーゼK回収RNA試料を、各々、図12Bおよび12Cに示されたaRNAプレ増幅および遺伝子特異的定量的CK19およびEpCAMについてのRT-PCRの同一mRNA鋳型分析に付した。これらのここに示されたデータを双方の全RNA質量に対して正規化し、これは本実験においてaRNA質量収率に等しい。かくして、この固定剤由来の相対的RNAの量および質の比較は双方のaRNA(図12A)および、続いてのここに示される定量的RT-PCR双方の尺度である。これらの比較は、共に、プロテイナーゼK方法のみを用いてRNAを回収した後における、各固定剤独立性RNA鋳型の質の尺度である。

【図13A】図13Aは、CK19-cRNA転写体の最も3'側の800塩基配列を含

むCK19 - cRNA標準RT - PCR増幅効率を示す。200、100、50、25、12、5コピーを含むCK19 - cRNA標準の系列2倍希釈、それから3連の血液細胞が27%の変動の最大係数で得られる2ngのCK19陰性全RNAにスパイクした。標準偏差のバーを示す。1未満のコピーに対するcRNAの希釈および鋳型なし対照は検出可能な信号を生じなかった。

【図13B】図13Bはアガロースゲル電気泳動後における相対的RT - PCR遺伝子発現レベルを示す。各々、パネル1、パネル2、パネル3およびパネル4において25コピー、250コピー、2,500コピーおよび25000コピーのレベルにて、白血球細胞からの全RNAにCK19RNAをスパイクした。

【図13C】図13Cは、増幅されていないおよびT7プロモーター - ベースの増幅されたmRNA転写体の同一mRNAライブラリーにおいて相対的表示を比較する。相対的豊富さは、RT - PCR動的曲線方法を用い、8つの異なるmRNA転写体(PSA、PSM、MGB1、MGB2、CK8、CK19、PIP、EpCAM)を調べることによって評価した。

【図14A】図14Aは、循環上皮細胞遺伝子の概観のバラツキプロット棒グラフを示す。それらの細胞表面でEpCAM抗原を発現する細胞につき、ヒト血液を免疫磁氣的に豊富化し、試料をまずaRNAプレ増幅し、ついで25ngを逆転写した。ついで、遺伝子の選択された群についてのRT - PCRの後アリコットをアガロースゲル電気泳動によって分析した。13人の健康なドナー(7名の男性、6名の女性)を測定した各遺伝子につきN欄として命名し、循環腫瘍細胞(CTC)を含有する9つの系列的にサンプリングしたHPRC患者をフローサイトメトリーによって測定し、測定された各遺伝子につきP欄として命名する。各欄における水平線は、それを越えて真の陽性がカウントされる閾値を示す。

【図14B】図14Bは、図14Aに記載したのと同じの方法を介する前立腺腫瘍の起源器官状態を示す遺伝子の概観を示す。

【図14C】図14cは図14Aに記載したのと同じの方法を介する治療標的状態の存在を示す概観を示す。

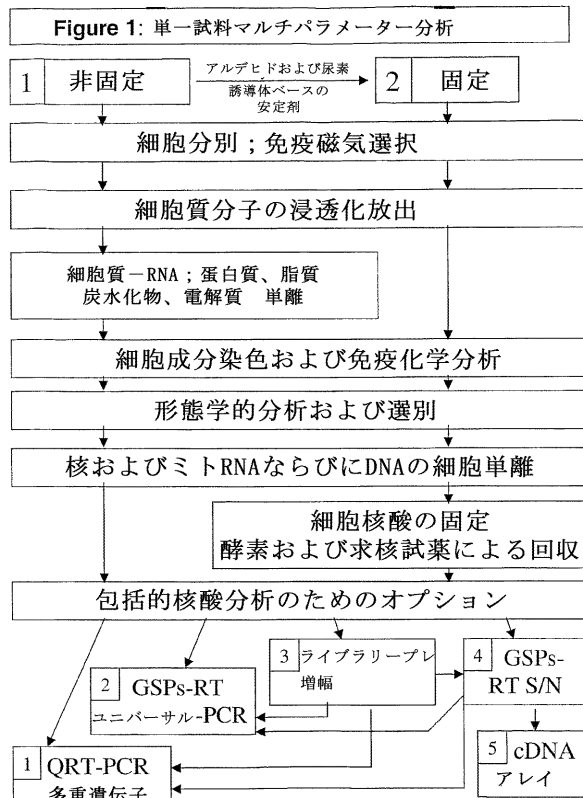
【図15A - C】図15A、15Bおよび15Cは、新しい系の化学療法前、中および後におけるCTCおよびRT - PCR多重遺伝子分析の個々のHPRC患者の一定期間にわたるモニタリングを示す。X - 軸は週で表したサンプリング時間を示す。左の軸は塗りつぶした丸の記号でCTCを示す。右のY - 軸は、アンドロゲン受容体についての塗りつぶしていない四角、Hepsin(HPN)についての塗りつぶしていない丸および多薬物抵抗性(MDR1)についての塗りつぶしていない三角形の対応する記号で相対的mRNA発現を示す。図15Bに示すごとく、相対的mRNAレベルは、ルプロン単独の治療コースの間を示し、二人の患者は、図15Bおよび図15CにおいてX - 軸上の垂直矢印の記号のタキソテルおよびエストラムスチン化学療法(Tx - Ex)の用量の投与と組み合わせたルプロンで治療される。頂部の棒線は、長期間ホルモン切除治療が行われつつあったことを示す。

10

20

30

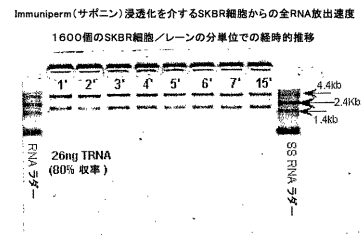
【 図 1 】



注意：全工程はオプションであり、連続的の組合せで試行できる。

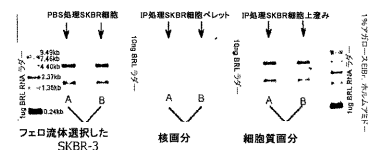
【 図 2 】

Figure 2



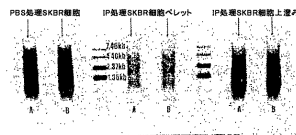
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4



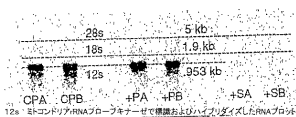
【 図 5 】

Figure 5



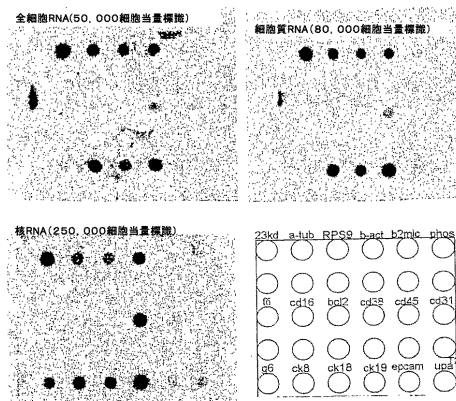
【 図 6 】

Figure 6



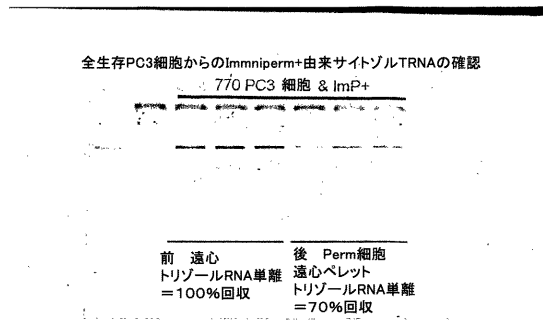
【 図 7 】

Figure 7



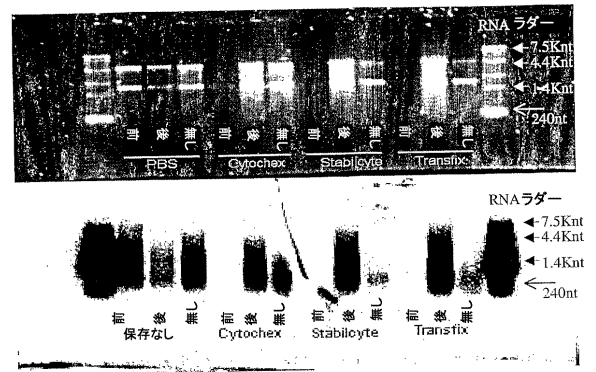
【 図 8 】

Figure 8



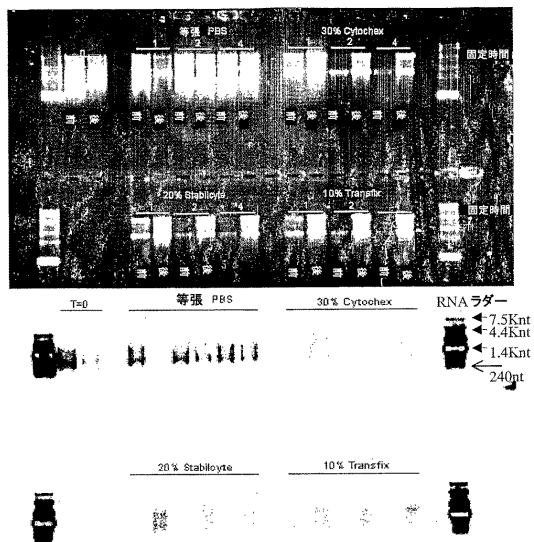
【 図 9 】

Figure 9



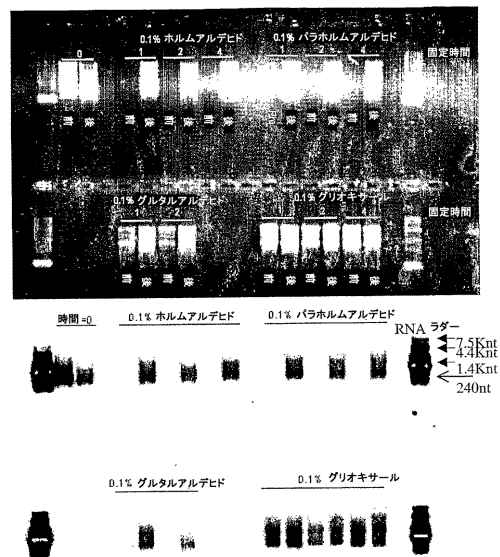
【 図 10 A 】

Figure 10A

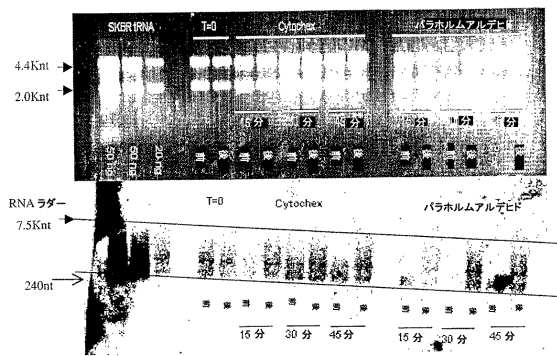


【 図 10 B 】

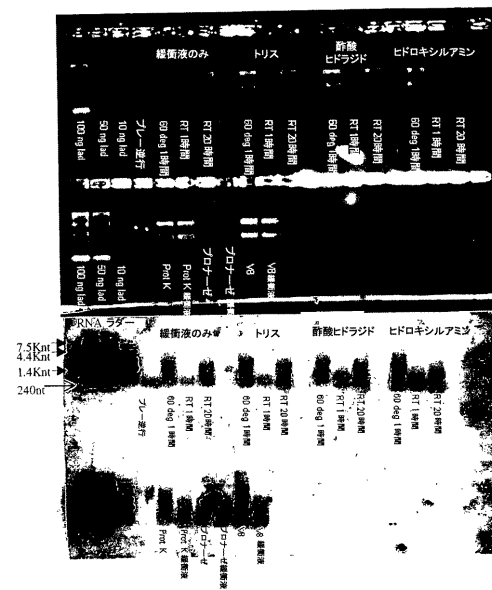
Figure 10B



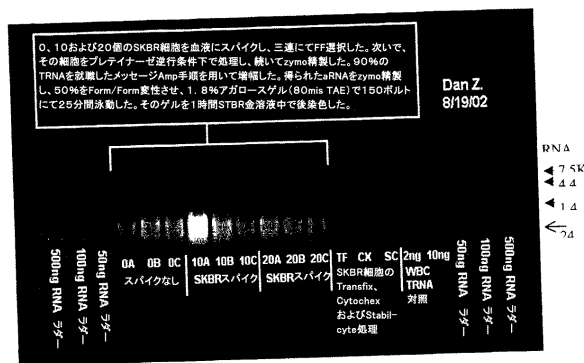
【図 10 C】
Figure 10C



【図 11】
Figure 11

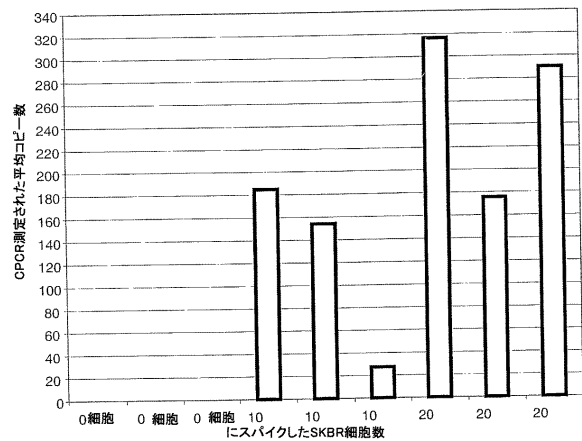


【図 12 A】
Figure 12A



【図 12 B】
Figure 12B

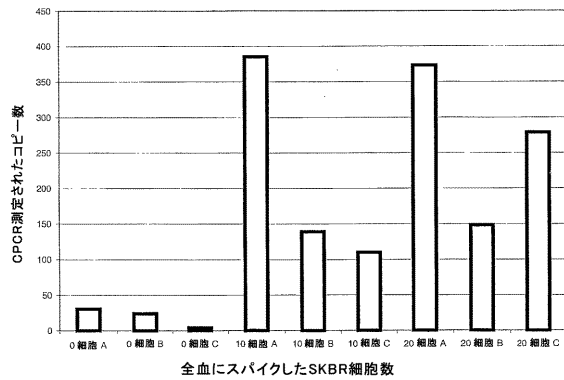
SKBR細胞スパイク、FF選択、Cytohex処理、プロテイナーゼ逆行からのCK19-QPCR



【図 1 2 C】

Figure 12C

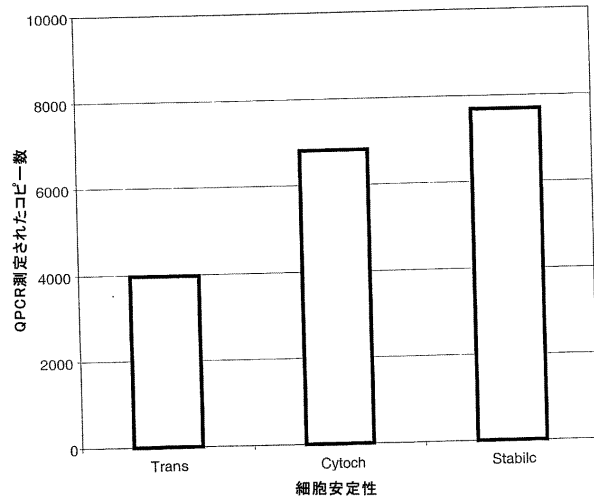
SKBR細胞スパイク、FF選択、Cytochex処理、プロテイナーゼ逆行からのEpCAM-QPCR



【図 1 2 D】

Figure 12D

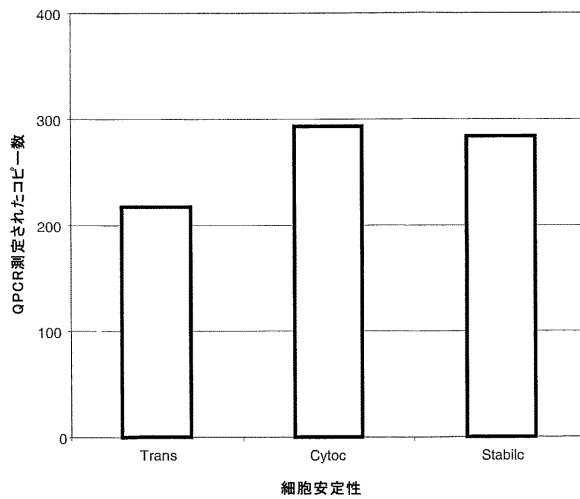
細胞安定性試験で処理したSKBR細胞から由来のaRNAに関するCK19-QPCR



【図 1 2 E】

Figure 12E

細胞安定性試験で処理したSKBR細胞から由来のaRNAに関するEpCAM-QPCR



【図 1 3 A】

Figure 13A

RT-PCR標準曲線再現性

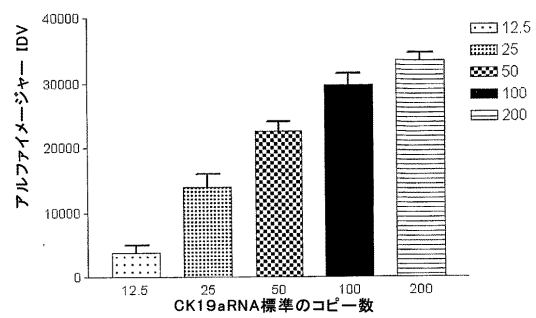


Figure 13B

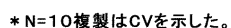


Figure 13C

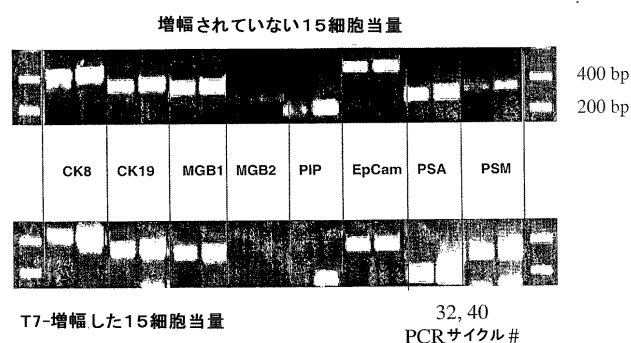


Figure 14A

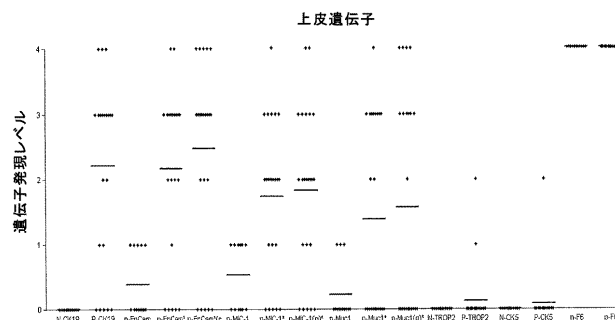


Figure 14B

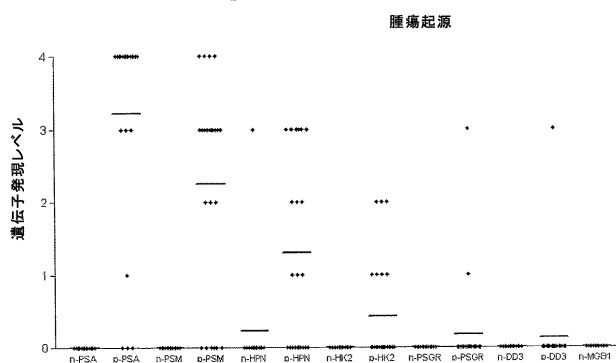


Figure 15A

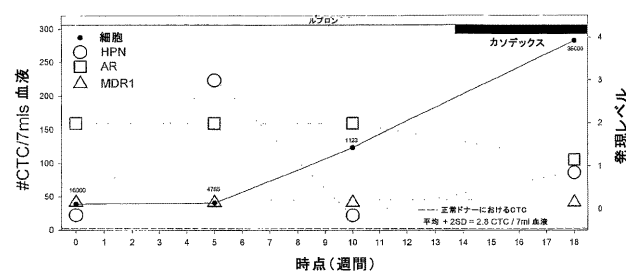


Figure 14C

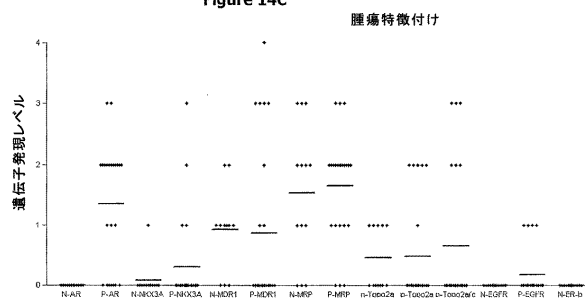


Figure 15B

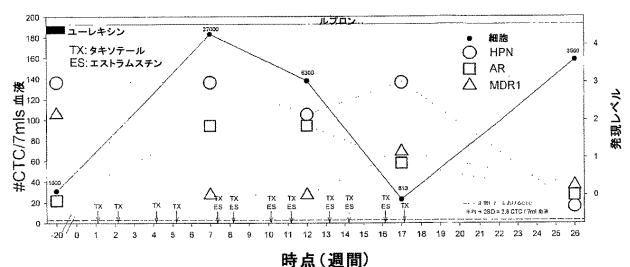
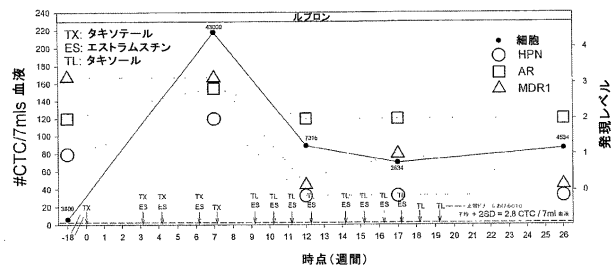


Figure 15C



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035895 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
(21) International Application Number: PCT/US02/34570
(22) International Filing Date: 28 October 2002 (28.10.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/330,669 26 October 2001 (26.10.2001) US
60/369,945 4 April 2002 (04.04.2002) US
(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNIVEST CORPORATION [US/US]; 1105 North Market Street, Suite 1300, P.O. Box 8985, Wilmington, DE 19899 (US).
(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): O'HARA, Shawa, Mark [US/US]; 1519 Isaacs Court, Ambler, PA 19002 (US); ZWEITZIG, Daniel [US/US]; 675 E. Street Road, Apt. 1407, Warminster, PA 18974 (US); FOULK, Brad [US/US]; 306 Brooke Road, Royersford, PA 19468 (US).

- (74) Agents: ACETO, Joseph et al.; Immunicon Corporation, 3401 Masons Mill Road, Suite 100, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).

WO 03/035895 A2

- (54) Title: MULTIPARAMETER ANALYSIS OF COMPREHENSIVE NUCLEIC ACIDS AND MORPHOLOGICAL FEATURES ON THE SAME SAMPLE

- (57) Abstract: A highly sensitive assay is disclosed which utilizes a method for gene specific primed amplification of mRNA libraries from rare cells and rare transcripts found in blood. The assay allows detection of rare, mRNA (10 copies/cell) found in 1 to 10 cells isolated through immunomagnetic enrichment. The assay is an improvement over multiplex PCR and allows efficient detection of rare coding sequences for circulating carcinoma cells in the blood. The methods are useful in profiling of cells isolated from tissues or body fluids and serves as an adjunct to clinical diagnosis of diverse carcinomas including early stage detection and classification of circulating tumor cells. Monitoring of nucleic acid and protein profiles of cells either in conventional or microarray formats, facilitates management of therapeutic intervention including staging, monitoring response to therapy, confirmation of remission and detection of regression.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Title: Multiparameter analysis of comprehensive nucleic acids and morphological features on the same sample.

This application claims priority under 35 U.S.C. §119(e) to U.S. Provisional Applications, No: 60/369,945 (filed April 4, 2002) and 60/330,669 (filed October 26, 2002), and PCT/US02/26867 (filed August 23, 2002).

Background of the Invention

Field of the Invention

This invention relates generally to gene specific amplification, analysis and profiling of cytosolic biomolecules useful in the fields of oncology and diagnostic testing. The invention is particularly useful in such fields as cancer screening, selecting and monitoring for chemotherapy treatment, or cancer recurrence. More specifically, the present invention provides methods, apparatus, and kits to facilitate comprehensive analysis of mRNA and DNA from tumor cells, or other rare cells from biological samples while simultaneously maintaining cell integrity for enumeration and morphological image analysis. To accomplish this, the invention also provides methods that permit the analysis of soluble cytosolic biomolecules releasable from a cell, such as a tumor cell, by means of permeabilizing reagents for determining expression profiles of the released nucleic acids, while still maintaining the morphological and antigenic characteristics of cells for subsequent or parallel multiparameter flowcytometric, image, and immunocytochemical analyses (see US 6,365,362). The invention also provides methods that enable the same comprehensive analyses using stabilized samples from aldehyde and aldehyde-urea derivative based fixatives.

Description of Related Art

Any given cell will express only a fraction of the total number of genes present in its genome. A portion of the total number of genes that are expressed determine aspects of cell function such as development and differentiation, homeostasis, cell cycle regulation, aging, apoptosis, etc. Alterations in gene expression decide the course of normal cell development

WO 03/035895

PCT/US02/34570

and the appearance of disease states, such as cancer. The expression of specific genes will have a profound effect on the nature of any given cell. Accordingly, the methods of analyzing gene expression, as such as those provided by the present invention, are important in basic molecular biological research and in tumor biology. Identification of specific genes, especially rare genes, can provide a key to diagnosis, prognosis and treatment for a variety of diseases that reflect these expression levels (Levsky, et al., Single-Cell Gene Expression Profiling, *Science*, 297:836-840, (2002)).

Differential gene expression is a commonly used method of assessing gene expression in a cell. In particular, cDNA microarray analysis compares cDNA target sequence levels obtained from cells or organs from healthy and diseased individuals. These targets are then hybridized to a set of probe fragments immobilized on a membrane. Differences in the resultant hybridization pattern are then detected and related to differences in gene expression of the two sources (US 6,383,749). This procedure requires slow and time-consuming analysis of several hundred thousand gene-specific probes. In addition, competing events such as interactions between non-complementary target sequences nonspecific binding between target and probe and secondary structures in target sequences may interfere with hybridization resulting in a decline in the signal-to-noise.

Gene specific primer sets have been described in assaying differential expression (US 5,994,076 and US 6,352,829). Here, gene specific primer sets were used to specifically amplify mRNA library subsets in complex libraries achieving a cDNA array signal improvement when compared to whole library labeling amplification. The focus of this type of analysis was to compare sample array expression profiles as part of gene discovery research, not development of methods for practical cellular RNA analysis with utility in diagnostics.

Hence while gene specific primer sets have been used to selectively amplify a specific subset of mRNA from an mRNA library, there exists a clear need to reduce the signal-to-noise ratio in an amplification process which is especially applicable in rare cell detection for diagnostic therapy to encompass both quantitative and qualitative analysis.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

It is now generally accepted that the presence of circulating tumor cells (CTC) in a patient's blood provides an early detection system in assessing the need for therapeutic intervention. Highly sensitive assays to allow accurate enumeration of circulating carcinoma cells have shown that the peripheral blood tumor cell load correlate with disease state (Terstappen et al., Peripheral Blood Tumor Cell Load Reflects the Clinical Activity of the Disease in Patients with Carcinoma of the Breast, *International J. of Oncology*, 17:573-578, 2000).

Additionally, classification of cell type and origin would provide a more comprehensive platform for treatment. Emerging treatment for several cancers such as Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is based upon two different disease types correlating to a clinical prognosis (Rosenwald, et al., Use of Molecular Profiling to Predict Survival After Chemotherapy after Diffuse Large-B Cell Lymphoma, *New England Journal of Medicine*, 346:1937-1947, (2002)). In DLBCL, tumors originating from the germinal center B-cells are sensitive to chemotherapy and have a much higher chance of survival, while those from activated B cells tend to be more difficult to treat. These cell subtypes are thus dependent on the origin of the tumor cell.

Stratification of these subtypes is dependent upon the tumor's cell of origin. While in a few cases differences in subtypes can be determined by analysis of a single gene, entire arrays of combinations of genes are more determinative. Charting gene expression patterns through microarray analysis of gene expression levels would be a desirable indicator of tumor properties in other diseases such as lymphomas, acute leukemia, breast cancer, lung cancer and liver cancer. However, to adapt this genetic information for diagnostic use requires resolution of inherent significant signal-to-noise issues in present state-of-the-art technology.

Thus, there is great interest in the development of new methods for analyzing gene expression, especially where such methods provide for fast hybridization, highly specific binding of targets to complementary probes, and substantially improved signal-to-noise ratios. In addition, these methods have additional importance when assessing gene expression as it relates to cancer

WO 03/035895

PCT/US02/34570

and disease related states (see US App. 10/079,939 and US App. 09/904,472 both of which are fully incorporated by reference herein).

Summary of the Invention

The present invention provided methods, apparatus, and kits for assessing gene expression in amplified mRNA isolated from circulating rare cells (see Figure 1) which overcome the disadvantages of the prior art techniques which are described above. The present invention provides methods of isolating soluble or releasable cytoplasmic biomolecules from a single target cell or a cell population while maintaining structural cell integrity or phenotypic characteristics. Accordingly, cell(s) are either fresh or stabilized and fixed with a cross-linking agent, contacted with a pore-forming permeabilization composition, and the nucleic acids recovered. RNA from stabilized cells (PCT/US02/26867) is recovered via combinations of proteinase and nucleophiles reversal agents either for amplification and subsequent qualitative and quantitative PCR analysis or for quantitative analysis via gene specific subsets of reverse transcription (RT) primers fused with and followed by universal primer PCR amplification. Thus, one focus of the present invention prepares the cells for both cytoplasmic biomolecule analysis and phenotypic cell analysis by stabilizing and fixing cells prior to permeabilization and then releasing nucleic acids from the same stabilized cells.

The present invention is also directed to separating nuclear and/or mitochondrial DNA, RNA, proteins and other soluble components within a targeted cell by contacting a cell or cell population with a permeabilization composition and separately analyzing the released and/or unreleased fraction for one or more constituents such as the nuclear and/or mitochondrial DNA, total RNA, mRNA, soluble proteins, and other target substances (US App. 60/330,669).

The present invention incorporates the analysis of both cytoplasmic biomolecules and membrane or surface biomolecules from the same cell(s) or cell population by contacting the cell(s) with a permeabilization composition and separately analyzing the cytoplasmic biomolecules and the surface biomolecules to generate functional cell profiles encompassing characteristics

WO 03/035895

PCT/US02/34570

derived from genotypic and phenotypic cell characteristics for differentiating normal from transformed cells.

The isolation and rare cell analysis of the present invention are combined to provide the methods and reagents enabling comprehensive profiling mRNA acquired from rare cells. For example, those populations of cells defining circulating tumor cells (CTC) would be a type of rare cell found in peripheral blood and bone marrow of cancer patients. The mRNA is obtained through the cell preparation described in the present invention, but could also incorporate any protocol commonly used in the art.

After isolation and purification of mRNA from a sample containing the cells of interest, detection of extremely rare cell events with low mRNA copy numbers is achieved through gene specific RT-PCR panels with or without T7 RNA polymerase (T7RNAP) based pre-amplification procedure (US App 60/369,945). Pre-amplification is completed by linear amplification of the entire mRNA library using modifications of the Eberwine aRNA method (Van Gelder et al. 1990). In a preferred embodiment, generation of an anti-sense mRNA library (aRNA) library preamplification results in at least a thousand-fold increase of all messages present in the original mRNA isolated from ferrofluid enriched circulating cells. Gene specific primers are then used to amplify only the gene panel of interest. These primers are designed to amplify transcripts indicative of known rare events like circulating tumor cells. The number of target sequences can be as small as two or as large as necessary to allow correlation with some indicative characteristic of the rare event. This can occur as separate individual reactions or within a single reaction vial. Subsequent analysis yields at least a qualitative assessment of the target sequences and is achieved with methods such as, but not limited to, one of two types of multigene analysis methods we present here as gene specific primed (GSP) arrays and/or GSP sets-RT (universal PCR).

Universal PCR achieves multigene analysis from sample recovered mRNA in a single reaction tube with or without mRNA library preamplification. No preamplification allows only one panel of genes to be analyzed at one time. Preamplification adds the advantage of analyzing a single sample in up to 1000 different reactions, thus many different panels of genes can be

WO 03/035895

PCT/US02/34570

interrogated at different times. While it will be noted that other methods are available, analysis of universal PCR cocktail panels is accomplished by array or capillary gel electrophoresis (CGE). The system allows, therefore, for both a quantitative and qualitative determination of 1 to thousands of separate mRNA types simultaneously when measured in cDNA microarray format.

Thus, the present invention includes a combination of the above mentioned isolation and profiling analysis directed to protocols and kits comprising some or all necessary reagents including a permeabilization composition, RNA recovery after cross-linking, magnetic microspheres with oligo(dT) probes covalently bound to the surface, and other gene specific magnetic microsphere-bound probes for capture and analysis of comprehensive RNA analysis using a small or large microarray, capillary gel electrophoresis (CGE), HPLC, electrophoresis and other analytical platforms.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows a flowchart depicting the variety of capabilities and options enabled by the inventions described in this application for multiparameter analysis on a single sample. Phenotypic and genotypic analysis is obtained on fixed or non-fixed cells.

Figure 2 shows the reverse image (negative) of denatured total RNA analyzed by 2% agarose gel electrophoresis after SYBR Gold staining of about 1600 SKBR3 breast cancer cells that were Immuniperm-treated for various times before total RNA was isolated from the resultant supernatant via Trizol plus pellet paint co-precipitate.

Figure 3 shows a 1% denaturing total RNA agarose gel stained with ethidium bromide comprising whole cells, Immuniperm (saponin)-permeabilized cells from the cell pellet fraction, and cells from the supernatant fraction of Immuniperm®-permeabilized SKBR3 breast cancer cells.

Figure 4 shows a phosphor image of a Northern blot of the gel shown in Figure 3 hybridized by a polynucleotide kinase treated ³²P-labeled oligo(dT)

WO 03/035895

PCT/US02/34570

(25 mer) probe. The radioactive signals correspond to all the poly(A)⁺ mRNA transcripts of the total RNA which was derived from whole cells and the two Immuniperm® treated cell fractions from the gel shown in Figure 3.

Figure 5 shows a Northern blot from Figure 4 stripped through conventional dissociation and removal of the labeled oligo(dT) probe and re-probed with a nuclear-specific precursor rRNA probe.

Figure 6 shows the Northern blot, from Figure 5, that was stripped and re-probed with mitochondrial-specific 12s rRNA probe.

Figure 7 shows a cDNA array dot blot hybridization pattern comparison when the corresponding mRNA, used to generate the gel images in Figure 3, is alpha-³²P-nucleotide labeled during first strand oligo(dT) primed cDNA synthesis. Labeled first strand cDNA was then used as the hybridization probe. Pattern comparison shows the same relative abundance of mRNA exists in all three RNA cell fractions.

Figure 8 shows the gel image of the relative cytosolic total RNA, both quantitatively and qualitatively, obtained after separately treating multiple aliquots containing about 770 PC-3 cells each with Immuniperm®.

Figure 9 shows the preservation, recovery and RNA integrity analysis of 90-100% of the total RNA library using CytoChex™ and other aldehyde based fixatives followed by enzyme digestion. In this experiment, mass normalized portions of 300,000 SKBR3 cell line cells which were first spiked into freshly drawn 7.5ml peripheral blood (EDTA Vacutainer tube) in both control lanes without (phosphate buffered saline, PBS) and with three different fixatives being Cyto-Chex™, Stabilocyte™ and Transtix™. After mixing these were allowed to incubate at room temperature (20-25°C) for 24 hours. After which the SKBR3 cells were enriched from the blood using VU-1D9 (EpCAM)-ferrofluid immunomagnetic selection. The enriched cells from each treatment were split into 3 equal aliquots and treated with proteinase K (lane labeled "Post") or without proteinase K digestion (lanes labeled "Pre" for immediate

WO 03/035895

PCT/US02/34570

RNA isolation, and, lane labeled "No" meaning the only difference to Post is that No proteinase K component was added and all other manipulations are equal to Post). The resultant normalized RNA isolations were separated with a 1% denaturing agarose, stained with SYBR Gold, alpha imager densitometry imaged and then Northern Blotted and finally oligo(dT) probed to show relative quality and quantity of respective total RNA and mRNA libraries recovered.

Figure 10A & 10B shows relative rate of Cyto-Chex™, Stabilocyte™, Transfix™, paraformaldehyde, formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal fixation over a 1, 2, and 4 hour time course. . In this experiment, the relative-rate time course of Cyto-Chex™, Stabilocyte™, Transfix™, paraformaldehyde, formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal fixation were evaluated at 1, 2, and 4 hours. Samples of 7.5 ml of blood were prepared from a single donor by the same method as described in Figure 9. The only difference is that they were selected and processed for RNA isolation at 1, 2, and 4 hour time end points. The resultant normalized RNA isolations were separated with a 1% denaturing agarose, stained with SYBR Gold, alpha imager densitometry imaged and then Northern Blotted and finally oligo(dT) probed to show relative quality and quantity of respective total RNA and mRNA libraries recovered.

Figure 10C shows relative rate of fixation of Cyto-Chex™ vs. paraformaldehyde over a 15, 30, and 45 min time course. In this experiment, the relative-rate time course of fixation Cyto-Chex vs. paraformaldehyde were evaluated at 15, 30, and 45 min. Samples of 7.5 ml of blood were prepared from a single donor by the same method as described in Figure 9. The only difference is that they were selected at 15, 30, and 45 min time end points. Phosphorimaging quantitation of the oligo(dT) probed blots showing relative mRNA library quality and quantity showed the relative rate of: Formaldehyde = Paraformaldehyde (~4 fold) > Transfix™ (~2 fold) > Stabilocyte™ (~1.5 fold) > Cyto-Chex™ (~1x) = glutaraldehyde and glyoxal too slow to rank. The resultant normalized RNA isolations were separated with a 1% denaturing agarose, stained with SYBR Gold, alpha imager densitometry imaged and

WO 03/035895

PCT/US02/34570

then Northern Blotted and finally oligo(dT) probed to show relative quality and quantity of respective total RNA and mRNA libraries recovered.

Figure 11 shows the effects of variations on nucleophile and enzyme on the quality and quantity of RNA recovery from Cyto-Chex™ preservation supporting that when used in combined treatments for improved sequence analysis quality is likely. The resultant normalized RNA isolations were separated with a 1% denaturing agarose, stained with SYBR Gold, alpha imager densitometry imaged and then Northern Blotted and finally dT probed to show relative quality and quantity of respective total RNA and mRNA libraries recovered.

Figure 12A shows the feasibility of diagnostic applications demonstrated by detection of specific mRNA From 10 SKBR3 cells/7.5ml Blood in 24hr Cyto-Chex™ stabilized blood with proteinase recovery and aRNA preamplification. Feasibility of diagnostic applications are here demonstrated by sensitive and reproducible detection of specific mRNA from triplicate 10 or 20 SKBR3 cells spiked into 7.5ml peripheral blood. The spiked blood was stabilized immediately treated with Cyto-Chex to stabilize the cellular RNA. After incubating for one day at room temperature (20-25C) the stabilized cells were selectively enriched using VU-1D9 (EpCam)-Ferro Fluid Immunomagnetic selection. Enrichment was followed by proteinase K digestion to liberate the RNA so that silica binding RNA isolation followed by aRNA preamplification and gene specific quantitative RT-PCR could be performed for CK19 and EpCAM.

Figure 12B and 12C shows CK19 and EpCAM respective Q-PCR from SKBR Cell Spike, ferrofluid selection, and CytoChex™ treatment, followed by proteinase reversal. This experiment shows the results of the quantitative RT-PCR analysis, which was normalized to original total RNA mass prior to graphing. Thus, the values shown are equivalent to the original mRNA population contained in the original RNA isolation prior to aRNA amplification.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Figure 12D and 12E shows CD19 and EpCAM respective Q-PCR on aRNA derived from SKBR cells treated with cell stability reagents. These experiments show the RNA derived from the three different fixatives, which were shown in Figure 9 Cyto-Chex™, Stabilcyte™ and Transfix™. These proteinase K recovered RNA samples were also here subjected to the same mRNA template analysis of aRNA preamplification and gene specific quantitative RT-PCR for CK19 and EpCAM as shown in Figures 12B and 12C respectively. These data shown here are normalized to both total RNA mass, which is equal to the aRNA mass yield in this experiment. Thus this fixative derived relative RNA quantity and quality comparison is a measure of both aRNA (Figure 12A) and followed by the quantitative RT-PCR shown here. Both of these comparisons are a measure of the respective fixative dependent RT template quality after the RNA was recovered using only the proteinase K method.

Figure 13A shows RT-PCR amplification efficiency of a CK19-cRNA standard containing the 3'-most 800 base sequence of the CK19 mRNA transcript. Serial two-fold dilutions of the CK19-cRNA standard containing 200, 100, 50, 25, 12,5 copies were spiked into 2 ng of CK19 negative total RNA from white blood cells in triplicate resulting in a maximum coefficient of variation of 27%. Standard deviation bars are shown. Dilutions of cRNA to less than one copy and no template controls did not produce detectable signals.

Figure 13B shows the relative RT-PCR gene expression levels after agarose gel electrophoresis. CK19 cRNA was spiked into total RNA from white blood cells at levels of 25 copies, 250 copies, 2,500 copies and 25,000 copies in panel 1, panel 2, panel 3, and panel 4, respectively.

Figure 13C compares the relative representation in the same mRNA library of unamplified and T7 promoter-based amplified mRNA transcripts. Relative abundance was assessed by examining 8 different mRNA transcripts (PSA, PSM, MGB1, MGB2, CK8, CK19, PIP, EpCam) using the RT-PCR kinetic curve method.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Figure 14A shows scatter plot bar graphs of a survey of genes indicating the presence of circulating epithelial cells. Human blood, immunomagnetically enriched for cells expressing the EpCAM antigen on their cell surface, the samples were first aRNA preamplified and then 25ng were reverse transcribed. Aliquots were then analyzed by agarose gel electrophoresis after RT-PCR on a select group of genes. 13 healthy donors (7 male, 6 female) are designated as the N column for each gene measured and 9 serially sampled HRPC patients containing circulating tumor cells (CTC) were determined by flowcytometry and are designated as the P column for each gene measured. Horizontal lines in each column indicate threshold values above which true positives were counted.

Figure 14B depicts a survey of genes indicating prostate tumor organ of origin status via the same methods as described in 14A.

Figure 14C depicts a survey of genes indicating the presence of therapeutic target status via the same methods as described in 14A.

Figure 15A, 15B, and 15C show individual HRPC patient longitudinal monitoring of CTC and RT-PCR multigene analysis before, during, and after new line chemotherapy. The x-axis shows sampling time in weeks, the left y-axis shows the CTC level with the solid circle symbol. The right y-axis shows the relative mRNA expression levels with corresponding symbols of open-square for Androgen Receptor (AR), open circle for Hepsin (HPN) and open triangle for multidrug resistance (MDR1). Relative mRNA levels are illustrated here during treatment courses of Lupron alone as shown Figure 15A, and 2 patients being treated with Lupron combined with administration of doses of Taxotere and Estramustine chemotherapy symbolized by the vertical arrows on the x-axis (Tx/Ex) in Figure 15B and Figure 15C. Bars on top indicate long term hormonal ablation treatment was on going.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Detailed Description of the Preferred Embodiments

As has been indicated in the foregoing discussion, a more comprehensive and practical form of cancer diagnosis must also include analysis of intra- and extra-cellular membrane antigens as well as analysis of cellular RNA content and DNA content in the same cell or cell population, which up to now have been mutually exclusive processes (US 6,365,362). This exclusivity was due to the basic incompatibility of pre-analytical cell preparation methods for analyzing structural intracellular antigens, having the major objective to maintain cell integrity, with methods of isolating cytoplasmic biomolecules. Alternatively, pre-analytical cell preparation could also be limited to soluble cytoplasmic RNA, total cellular RNA, total cellular DNA, and/or proteins, having the major objective to homogenize cells in order to release soluble intracellular components (US 6,329,179). In particular, traditional phenotypic characterizations required fixation of cell structures achieved through exposure of cells to a cross-linking agent, such as paraformaldehyde, formaldehyde, glutaraldehyde, etc. These harsh cell fixation conditions simultaneously cause undesirable covalent crosslinking and/or fragmentation of all the isolatable RNA species. Similar intracellular DNA-protein cross-links have recently been reported (Quievryn and Zhitkovick, Loss of DNA-Protein Crosslinks from Formaldehyde-Exposed Cells Occurs Through Spontaneous Hydrolysis and an Active Repair Process Linked to Proteosome Function, *Carcinogenesis*, 21:1573-1580 (2000)). So-called non-formaldehyde or non-paraformaldehyde fixatives (e.g., Cyto-Chex™ Streck Labs, Omaha, NE) are cell-stabilizing additives containing formaldehyde-urea derivative donor compounds. It is used as a preservative for circulating tumor cells in blood during shipment or storage as disclosed in a co-pending application (PCT/US02/26867 incorporated by reference herein). However, the studies conducted by the present inventors have shown that even Cyto-Chex™, which contains only trace levels of free formaldehyde, apparently slowly releases formaldehyde that can cross-link intracellular RNA to intracellular proteins. Such cross-links were fully reversed by the methods of this invention to allow comprehensive RNA analysis. Cellular RNA and DNA analysis are therefore conventionally prepared on unfixed fresh cells or cells that are

WO 03/035895

PCT/US02/34570

preserved with reagents that do not cross-link or of which the cross-linking can be reversed during the mRNA release from the cells. RNeasyTM (Qiagen) is commercially available RNA stabilization solution, which stabilizes RNA but does not allow immunomagnetic, immunochemistry or image analysis on the same sample and is not effective for blood. PreAnalytiX offers a blood RNA stabilizer but is nothing more than the chaotropic agent guanidine isothiocyanate solution (GITC) solution in a VacutainerTM tube enabling nothing more than traditional homogenization based solely on total RNA isolation.

In general, mRNA recovered from fixed cells is not quantitative and is severely degraded or fragmented reducing the size of intact RNA with an average size of approximately 1750 bases as much as ten-fold to a highly variable average size of approximately 200 bases, and contains many complex chemical modifications, which are not well understood. However, the net effect of fixative derived RNA is severely compromised mRNA analysis (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, (2002)). Tedious non-quantitative mRNA salvage techniques combined with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis designed for amplicons of less than 100 base pairs in length show limited value, albeit in a qualitative not quantitative manner (US 5,346,994). Further, this limited RNA analysis of fixed cells must follow phenotypic analysis. Thus, the two processes cannot be run sequentially on the same cell sample, because traditional RNA isolation techniques require complete cell lysis or homogenization, destroying cell structure and further complicating analysis by intermingling the cellular DNA and RNA populations (Maniatis et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989)). Previous reports have shown a need for improving methods of RNA recovery in tissue (Godfrey, et al., Quantitative mRNA Expression Analysis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using 5' Nuclease Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *J. of Molecular Diagnostics*, 2:84-91 (2000)). Applications of formaldehyde and urea based fixatives that stabilize recoverable quantitative, high quality full-length intact total and mRNA

WO 03/035895

PCT/US02/34570

libraries from blood and thus enabling comprehensive analysis are the basis of one aspect of this invention.

Quite unexpectedly, saponin, used as a permeabilizing agent, was found to be a highly selective and efficient releasing agent for intracellular cytoplasmic RNA and other biomolecules, thereby obviating the need for cell lysis or homogenization. This novel use of saponin as the RNA releasing agent of choice is a particularly advantageous component of the present invention. Surfactants such as saponin have traditionally been used to examine the expression of intracellular antigens by permeabilization of the cell membrane allowing for incorporation of staining reagents while maintaining cell integrity. For instance, analysis of chromosomes or genes by fluorescence in situ hybridization (FISH), or in staining of intracellular constituents, such as DNA in nuclei, with the nuclear stain, DAPI, or in immunostaining of cytokeratins with specific labeled antibodies play a critical role. Release of cytoplasmic intracellular proteins RNA or DNA generally is done by solubilization or complete lysis of the cells with stronger surfactants, such as Triton X-100. Saponin, however, has heretofore not been used to study both expression of soluble intracellular antigens including RNA and phenotyping of individual cells or cell populations in the same specimen. Accordingly, methods allowing sequential phenotypic analysis as well as analysis of intact RNA and soluble proteins in the cytoplasm of the same cell specimen are highly desired and are the subject of this invention.

Accordingly, the present invention provides advantageous methods, apparatus, and kits for the rapid and efficient RNA profiling of all cells and especially targeted cells found in biological samples. The present invention provides methods for allowing separate analysis of both phenotype and genotype. Phenotype is interrogated and profiled via antibody antigen protein and mass spectrometry profiling methods and comprehensive analysis of intact cytoplasmic RNA from the same cell or cell population. Genotyping of the sample genomic and mitochondrial DNA can be separately profiled by any means available to those skilled in the art. Similar to the amplification of the mRNA library, the respective genomic and mitochondrial libraries can be preamplified enabling numerous assays to be performed without loss of clinical sensitivity due to Multiple Displacement Amplification (MDA)

WO 03/035895

PCT/US02/34570

technology enables the first effective whole genome amplification method. MDA is a rapid, reliable method of generating unlimited DNA from a few cells.

The invention described herein may be used effectively to isolate and characterize cell phenotype, such as cell surface antigens, intra-cytoplasmic antigens and any type of RNA, and genotype. Both phenotypic and genotypic analysis can be performed sequentially on the exact same sample. For example after cell surface analysis and RNA harvesting, the remaining intact nuclei and mitochondria can be analyzed downstream by all standard RNA (mt RNA, hRNA), DNA and protein based analysis techniques such as S1 nuclease, ribonuclease protection, RT-PCR, SAGE, DD-RT-PCR, microarray cDNA hybridization, ISH, FISH, SNP, all RNA and all genomic-based PCR techniques and any protein analysis systems.

One of the many applications of this type of cell analysis is in cancer diagnostics. Many clinicians believe that cancer is an organ specific disease when confined to its early stages. The disease becomes systemic by the time it is first detected using methods currently available. Accordingly, evidence to suggest the presence of tumor cells in the circulation would provide a first line detection mechanism that could either replace, or function in conjunction with other tests such as mammography or measurements of prostate specific antigen. By analyzing cellular phenotype (protein and RNA) and genotype through specific markers for these cells, the organ origin of such cells may readily be determined, e.g., breast, prostate, colon, lung, ovarian or other non-hematopoietic cancers. Thus in situations where protein, RNA, and genome can be analyzed, especially where no clinical signs of a tumor are available, it will be possible to identify the presence of a specific tumor as well as the organ of origin. As these profiles define cell function, they also indicate what the most appropriate therapy type and course should be when used in cancer cell detection. Further in monitoring cases where there is no detectable evidence of circulating tumor cells as with post operative surgery or other successful therapies, it may be possible to determine from a further clinical study whether further treatment is necessary.

In order to provide for a more comprehensive and early diagnosis, one embodiment of the invention includes the methods for isolating cytoplasmic biomolecules from a cell or population of cells, contacting the cell or cells with

WO 03/035895

PCT/US02/34570

a permeabilization compound, and isolating the cytoplasmic biomolecule of interest from the cell while maintaining cell integrity for subsequent phenotypic and morphological analysis.

The targeted rare event in this invention refers to the expression of any biomaterial indicative, at least in part, to a known rare event. Accordingly, hormones, proteins, peptides, lectins, oligonucleotides, drugs, chemical substances, nucleic acid molecules (such as RNA and/or DNA) and bioparticles such as cells, apoptotic bodies, cell debris, nuclei, mitochondria, viruses, bacteria, and the like would be included in the embodiment of this invention.

The fluid sample includes, without limitation, cell-containing bodily fluids, peripheral blood, bone marrow, urine, saliva, sputum, semen, tissue homogenates, nipple aspirates, and any other source of rare cells that is obtainable from a human subject.

"Cytoplasmic biomolecules" includes cellular target molecules of interest such as, but not limited to, protein, polypeptides, glycoprotein, oligosaccharide, lipids, electrolytes, RNA, DNA and the like, that is located in the cytoplasmic compartment of a cell. Upon contacting a cell with a permeabilization compound and subsequent cell separation, the cytoplasmic biomolecules are present in the supernatant for downstream analysis. All soluble cytoplasmic biomolecules, for example, the entire cytoplasmic RNA library or target components capable of traversing the membrane pores can be isolated and analyzed. In a preferred embodiment, the focus is on the analysis of transcribed mRNA and translated proteins, for example in CTC, as indicators of oncogenic transformations of interest in the management of cancer diagnosis and therapy.

"Membrane biomolecules" includes any extracellular, intra-membrane, or intracellular domain molecule of interest that is associated with or imbedded in the cell membranes including, but not limited to, the outer cell membrane, nuclear membrane, mitochondrial and other cellular organelle membranes. Upon permeabilization with a permeabilization compound of this invention, the targeted membrane biomolecules are normally not solubilized or removed from the membrane, i.e. the membrane biomolecules remain associated with the permeabilized cell. Membrane biomolecules include, but are not limited

WO 03/035895

PCT/US02/34570

to, proteins, glycoproteins, lipids, carbohydrates, nucleic acids and combinations thereof, that are associated with the cellular membrane, including those exposed on the external or extracellular surface of the outer membrane as well as those that are present on the internal surface of the outer membrane, and those proteins associated with the nuclear, mitochondrial and all other intracellular organelle membranes. Membrane biomolecules also include cytoskeletal proteins.

"Genotype" or "genotyping" refers to the process of identifying intracellular genetic materials, such as DNA, that store internally coded inheritable instructions for constructing and controlling all aspects of cell life and death. "Phenotype" or "phenotyping" is defined as classifying a cell on the basis of observable outward structural elements and the production thereof (i.e. including the intermediate RNA). These include topology, morphology and other surface characteristics, all of which result from internally coded genotypic information which are incorporated into the methods of the present invention. In contrast, cell structure and integrity are not maintained during conventional RNA isolation techniques involving complete lysis of, at least, all cell structures except for nuclei and mitochondria in the presence of NP-40, usually by disintegration of all cell structures during chaotropic salt treatment and/or mechanical cellular homogenization.

Morphologic or morphology in reference to cell structure is used as customarily defined, pertaining to cell and nuclear topology and surface characteristics including intracellular or surface markers or epitopes permitting staining with histochemical reagents or interaction with detectably labeled binding partners such as antibodies. In addition morphology shall include the entire field of "morphometry" defined as: quantitative measure of chromatin distribution within the nucleus.

The terms genomic and proteomic are used as conventionally defined. "Functional" is herein used as an adjective for an empirically detectable biological characteristic or property of a cell such as "functional cellomic" which more broadly encompasses both genomic and proteomic as well as other target categories including, but not limited to, "glyconomic" for carbohydrates and "lipidomic" for cellular lipids. The resultant cell

WO 03/035895

PCT/US02/34570

characteristics provide profiles permitting differentiation of normal from transformed cells.

"Contacting" means bringing together, either directly or indirectly, a compound or reagent into physical proximity of a cell. The cell and/or compounds can be present in any number of buffers, salts, solutions, etc. Contacting includes, for example, placing the reagent solution into a tube, microtiter plate, microarray, cell culture flask, or the like, for containing the cell(s). The microtiter plate and microarray formats further permit multiplexed assays for simultaneously analyzing a multiplicity of cellular target compounds or components including, but not limited to, nucleic acids and proteins.

"Permeabilization compound, reagent, or composition" means any reagent that forms small pores in the cell membranes, comprising the lipid-cholesterol bilayer, while maintaining sufficient membrane, cytoplasmic and nuclear structure such that subsequent phenotypic analysis can be carried out on the permeabilized cell(s). For example, saponin is a known "pore-forming" compound that complexes with cell membrane components thereby forming numerous trans-membrane pores of about 8 nm size in the cell wall or membrane, thus allowing outward diffusion of small soluble cytosolic constituents, such as enzymes, proteins, glycoproteins, globulins, electrolytes, and the like, and internal equilibration with extracellular reagent components, such as electrolytes.

"Immunomagnetic beads" are magnetically labeled nanoparticles or microparticles also having covalently attached binding reagents (e.g. antibodies) with substantially selective affinity for surface markers or epitopes on cells, thereby achieving selective capture of magnetically labeled cells when exposed to a magnetic field such as generated in high gradient magnetic separation system (HGMS). Other terms used herein for methodologies, reagents and instruments are as conventionally defined and known to persons skilled in the art.

Preferred gene expression targets (mRNA and protein) for identifying tissue of origin, diagnosis, prognosis, therapy target characterization and monitoring include but are not limited to cells derived from cancers of the breast, prostate, lung, colon, ovary, kidney, bladder, and the like for the purpose of detection and monitoring of sensitive or resistant genes expressing

WO 03/035895

PCT/US02/34570

markers such as mammoglobin 1 (MGB1), mammoglobin 2 (MGB2), Prolactin inducible protein (PIP), carcinoembryonic antigen (CEA), prostate specific antigen (PSA), prostate specific membrane antigen (PSMA), glandular kallikrein 2 (hK2), androgen receptor (AR), prostasin, Hesperin (HPN), DD3, Her-2/Neu, BCL2, epidermal growth factor receptor (EGFR), tyrosine kinase-type receptor (HER2), thymidylate synthetase (TS), vascular endothelial growth factor VEGF, pancreatic mucin (Muc1), guanylyl cyclase c (GC-C), phosphatidylinositol 3 kinase (PIK3CG), protein kinase B gamma (AKT), excision repair protein (ERCC1), alpha-1 globin (F6), macrophage inhibitory cytokin-1 (G6), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD), insulin growth factor receptor (IGF2) estrogen receptors alpha and beta (ER), progesterone receptor (PR), aromatase (cyp19), Telomerase (TERT), general epithelial tissue specific genes, cytokeratin 19 (CK19), cytokeratin 5 (CK5), cytokeratin 8 (CK8), cytokeratin 10 (CK10), cytokeratin 20 (CK20), epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), mucins including mucin 1 (MUC1), topoisomerases, urokinase plasminogen activator (uPA), urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), matrix metalloproteinases (MMP), general white blood cell specific mRNA, alpha-1-globin, CD16, CD45, and CD31, and the like. This list is intended to illustrate the general diversity of arrays of mRNA-specific genes that could be assembled to differentiate cells from diverse origins, types and diseases, and is not intended to be comprehensive.

Stabilization, Release, and Recovery

Using the method of a previously disclosed invention, commonly assigned herewith, US Patent No. 6,365,362 and US App. Serial No.10/079,939 (both of which are incorporated by reference herein), circulating epithelial cells can be enriched relative to leukocytes to the extent of at least 2,500 fold to around 10,000 fold. Immunomagnetic selection of circulating epithelial cells in blood is followed by a nucleotide analysis embodied in this invention. The enrichment is only one example of many methods known in the art for selecting specific populations of cells to be used in the embodiment of this invention.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

A method of releasing intact cytoplasmic total RNA and mRNA from these cells, thereby isolating and purifying them, was unexpectedly and surprisingly discovered during conventional permeabilization of cells with saponin prior to staining and immunostaining, thereby enabling sequential or parallel analysis of both cytoplasmic RNA and intracellular antigen phenotyping and DNA genotyping on the exact same cell, population of cells, or specimen.

Permeabilization can be accomplished under this criteria using 1 of 3 types of general surfactants or detergents: pore forming reagents, like saponin, or saponin fractions such as QS-21, escins, digitonin, cardenolides, etc. All of these agents increase membrane porosity and release small soluble intracellular components. Another group of agents are surfactants. These agents have a relatively high hydrophilic-lipophilic balance to permeate the membrane without lysis. Other, more lytic surfactants with a lower hydrophilic-lipophilic balance, would release RNA, but tend to solubilize the membrane. These include, but not limited to, polyoxyethylene sorbitans (commercially known as Tween 20, 40, or 80), nonylphenoxy polyethoxy ethanol (NP-40), and the like, t-octyl phenoxy ethoxy ethanol, or SDS.

Subsequent analysis of cytoplasmic RNA (and other RNA such as mtRNA and hnRNA), cell surface as well as soluble intracellular antigens, cell organelles such as mitochondria and the remaining indexed nuclei can then be analyzed downstream by all standard RNA, DNA, and protein based analysis techniques. These include all types of cDNA, RNA and protein microarrays for profile analyses, mass spectrometry, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), single nucleotide polymorphism (SNP), all genomic-based amplification techniques such as PCR and the like, microsatellite analysis, restriction fragment length polymorphism (RFLP, ALFP), SAGE, DD-RT-PCR, and the like.

Such analyses can be conducted on as few as 1-10 RNA molecules for each and any RNA sequence type, but preferably on tens of thousands up to millions copies of targets to enable detection of subtle alterations in cellular translation or transcription profiles as indicators of disease states in a clinical setting. Other functional cell profiles of releasable and non-releasable cellular

WO 03/035895

PCT/US02/34570

components, such as proteins, glycoproteins, lipoproteins, oligoglycosides and the like, can similarly be generated by analyzing the two fractions by conventional microarray, HPLC, electrophoretic methods including the high-resolution 2D electrophoresis method, or antibody array profiling.

Permeabilization compounds of this invention include, but are not limited to, saponins, a class of natural products constructed of cholesterol-like aglycones or genins (triterpenes or steroids not bearing any carbohydrate moieties) linked to fatty acids and one or more carbohydrates, which disperse readily in water to form globular micelles, the active species in pore formation. These and the other above named suitable pore formers, polyoxyethylene sorbitans (commercially known as Tween 20, 40, or 80), nonylphenoxy polyethoxy ethanol (NP-40), and t-octyl phenoxy ethoxy ethanol, have a high HLB (hydrophilic-lipophilic balance) numbers which must be used at sufficiently low concentrations to minimize undesirable solubilization of cellular components and membrane lysis. The concentration range of the permeabilization compound is about 0.01-0.5% (w/v) when using saponin containing about 10% sapogenins. A preferred permeabilization compound is saponin (Sigma Catalog Number S-7900). Saponins from other sources and of higher purities may also be used, for example, saponin of about 20-25% purity as sapogenin (Sigma S-4521) and a highly purified saponin, QS-21, of about 99% purity available from Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA. Other usable compound are alpha-escin and beta-escin (Sigma E-1378), both derived from horse chestnuts. The permeabilization compound may be present in a composition, such as phosphate buffered solution, that also comprises antimicrobial agents such as, for example, sodium azide, Proclin 300 (Rohm&Haas, Philadelphia, PA), and the like. Another preferred permeabilizing agent is Immuniperm™, which by itself releases about 50% of the cytoplasmic RNA (85% of all RNA in the cell) with no affect on the nuclear or mitochondrial nucleotide pools. The remaining 50% of the total cellular RNA and all DNA in fixed cells can be released with a releasing cocktail comprising SDS, protease, and a formaldehyde scavenging agent, which composition constitutes one embodiment of this invention. While the exact mode of action of the individual cocktail components is unknown, it is

WO 03/035895

PCT/US02/34570

speculated that the SDS serves to solubilize intracellular RNA and DNA crosslinked to structural intracellular proteins thereby enabling more efficient proteolysis and release of formaldehyde cross-linked nucleic acids. The novel formaldehyde scavenging reagents, exemplified by, but not limited to, hydroxylamine, carboxymethoxylamine, hydrazine, acethydrazide and other hydrazides, or hydrazine derivatives, and amines such as tris, were found to increase the amount and "quality" of the released nucleic acids, where quality is measured by increased amplification rates and yields. The two fractions released with Immuniperm and the releasing cocktail can be individually analyzed or pooled prior to analysis.

Accordingly, any surfactant or protease (or combination thereof) with or without added formaldehyde scavenger, capable of releasing cellular nucleotide stores and maintain a suitable morphology for concurrent analysis, would be included within the scope of the present invention.

Unlike current cellular fixation and RNA salvage protocols that tend to significantly fragment cellular RNA, the present invention enables extraction and isolation of greater than 90% of the intact cytoplasmic total RNA and mRNA from cells treated with a permeabilization agent, such as saponin, that permeabilizes the cell membrane while maintaining cell integrity. The mRNA isolation is also compatible with immunomagnetic cell enrichment and immunofluorescent cell labeling procedures. Comprehensive RNA expression profile analysis of cells identified and characterized by cell analysis platforms such as RNA polymerase promoters based linear amplification methods employing T7, SP6, or T3 promoters, flowcytometry, microarrays and in Cell Spotter® or CellTracks systems (both manufactured by Immunicon Corp, PA) can be used to directly validate, complement and expand the expression profiles and enhance the information obtained therefrom.

While not limited to a particular fixative, permeabilized cells are treated with a cross-linking agent to maintain morphological, antigen and nucleotide integrity as stated above. Cyto-Chex™, StabiCyte™ and TRANSfix™ are examples of three commercially available stabilizers that have shown utility in stabilizing blood cells in blood specimens for extended time periods. These stabilizers are optimized to maintain cell size (mainly by minimizing shrinking)

WO 03/035895

PCT/US02/34570

and to preserve antigens on cell surfaces, primarily as determined by flowcytometry. The intended applications generally involve direct analyses and do not require extensive manipulation of the sample or enrichment of particular cell populations. In contrast, the circulating tumor cells, or other rare target cells, isolated and detected in this invention, comprise and are defined as pathological abnormal or rare cells present at very low frequencies, thus requiring substantial enrichment prior to detection.

Cyto-Chex™ stabilizer can be used as a cell stabilizer and, as proven in application of the present invention, an aldehyde releasing fixative of intracellular RNA resulting in the formation of macromolecular complexes with intracellular proteins. We unexpectedly found that fixation, preferably with a formaldehyde donor such as Cytochex™, was essential for retaining and protecting RNA during subsequent sample processing, and that total or optimal release of fully functional RNA required saponin in combination with the above-cited release cocktail.

The ideal "stabilizer" or "preservative" (herein used interchangeably) is defined as a composition capable of rapidly preserving target cells of interest present in a biological specimen, while minimizing the formation of interfering aggregates and/or cellular debris in the biological specimen, which in any way could impede the isolation, detection, and enumeration of targets cells, and their differentiation from non-target cells. In other words, when combined with an anti-coagulating agent, a stabilizing agent should not counteract the anti-coagulating agent's performance. Conversely, the anti-coagulating agent should not interfere with the performance of the stabilizing agent. Additionally, the disclosed stabilizers also serve a third function of fixing, and thereby stabilizing, permeabilized cells, wherein the expressions "permeabilized" or "permeabilization" and "fixing", "fixed" or "fixation" are used as conventionally defined in cell biology. The description of stabilizing agents herein implies using these agents at appropriate concentrations or amounts, which would be readily apparent to one skilled in cell biology, where the concentration or amount is effective to stabilize the target cells without causing damage. One using the compositions, methods, and apparatus of this invention for the purpose of preserving rare cells would obviously not use

WO 03/035895

PCT/US02/34570

them in ways to damage or destroy these same rare cells, and would therefore inherently select appropriate concentrations or amounts. For example, the formaldehyde donor imidazolidinyl urea has been found to be effective at a preferred concentration of 0.1-10%, more preferably at 0.5-5% and most preferably at about 1-3% of the volume of said specimen. An additional agent, such as polyethylene glycol has also been found to be effective in stabilizing cells, when added at a preferred concentration of about 0.1%-5%. The use of such agents is described in PCT/US02/26867, and is incorporated by reference herein.

A surprising aspect of the present invention is that intracellular RNA as part of the macromolecular complex can be recovered amplifiable and in nearly quantitative yields from cells previously treated with a cell stabilizer and fixative. Full release of cross-linked RNA requires saponin in combination with enzymatic digestion in the presence of a lytic detergent and a formaldehyde scavenger. For example, proteinase K, V8 proteinase, pronase digestion of Cyto-Chex™ treated cells results in complete recovery or full-length comprehensively analyzable RNA. The presence of a formaldehyde scavenger as disclosed in the present invention was found to further improve RNA recoveries.

In the embodiments of the present invention, target cells such as circulating cancer cells or fetal cells can be assayed by efficiently isolating them from other non-target cells, purifying their nucleic acids, and then amplifying the target(s) of interest for microarray analysis.

Thus, isolation of cytoplasmic biomolecules is achieved by first separating the permeabilized cell from the permeabilization compound through centrifugation or immunomagnetic bead enrichment. The cytoplasmic biomolecule mixture is then present in the supernatant. Isolation of cytoplasmic biomolecules can be achieved by capture with magnetic beads. For example if the cytoplasmic biomolecules are mRNA, oligo(dT) affixed to magnetic beads or nonmagnetic supports can be used to capture and thereby separate the mRNA from the cells with or without centrifugation. If the cytoplasmic biomolecules are proteins, antibodies that are able to bind to the particular protein can be used, wherein the antibodies can be affixed to

WO 03/035895

PCT/US02/34570

magnetic beads or nonmagnetic supports. Other isolation techniques are well known to the skilled artisan such as standard protein and RNA chemical extractions, electrophoresis, chromatography, immunoseparations and affinity techniques. Immunomagnetic enrichment reagents and devices for separating cells and biomolecules are available from several manufactures including but not limited to Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, PA), Dynal (New Hyde Park, NY) and Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA). The cells can be prokaryotic, such as bacterial cells, or eukaryotic, such as mammalian cells, and are most preferable of human origin. In the preferred embodiments, the cells are carcinoma or tumor cells. Carcinomas of preferred interest include, but are not limited to, those derived from breast, prostate, lung, colon, and ovarian tissues, and the like, as found in tissue sections or in body fluids, for example, as circulating tumor cells in blood and bone marrow.

Methods are disclosed for preparing a cell for cytoplasmic and or whole cell biomolecule analysis and membrane biomolecule analysis sequentially on the exact same sample, collectively defined as either functional genomics or functional proteomics for analyses of nucleic acids or proteins, respectively. As stated above, such analyses have not heretofore been possible on the same cell(s) prior to the methods of this invention. The cells are contacted with a permeabilization compound to release cytoplasmic biomolecules, as described above, without altering structural biomolecules and membrane biomolecules.

Thus as disclosed herein in the present invention, the methods of analyzing a cytoplasmic biomolecule from a cell sample and analyzing a membrane biomolecule from the same cell sample are provided after the cells are contacted with a permeabilization compound, stabilized, and a cytoplasmic biomolecule recovered as described above. A cytoplasmic biomolecule can be isolated and analyzed concurrently or consecutively with an associated biomolecule.

This invention also provides reagents and kits for isolating cytosolic or whole cellular RNA, in particular, mRNA. The kits may include a permeabilization compound and RNA extraction reagents or hybridization probes for RNA isolation and detection, such as for example, oligo(dT) or gene-specific sequences or random (degenerate) oligonucleotides of various

WO 03/035895

PCT/US02/34570

lengths. The kits can also include antibodies that bind to proteins associated with cells, such as antibodies that bind to membrane biomolecules. The antibodies and probes can be enzymatically labeled, fluorescently labeled, or radiolabeled to allow detection. The antibodies and probes can also be attached to, for example, magnetic beads or the like, to facilitate separation.

Analysis

Cytoplasmic biomolecule analysis includes any type of analysis or assay that involves a biomolecule isolated from the cytoplasm of a cell. Cytoplasmic biomolecule analysis further includes, but is not limited to, functional genomic expression profiling including, but not limited to, mRNA profiling, protein expression profiling, reverse transcriptase polymerase chain reaction, Northern blotting, Western blotting, nucleotide or amino acid sequence analysis, serial analysis of gene expression SAGE, competitive genomic hybridization (CGH), electrophoresis, 2-D electrophoresis, mass spectrometry by MALDI or SELDI, gas chromatography, liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, infrared, atomic adsorption, and the like. Sequence analysis, at the nucleotide or amino acid level, can indicate and identify the presence of a mutation in a protein, DNA/cDNA, or mRNA sequence. For example, an original gene or protein profile analysis may indicate the presence of an oncogene in a transformed or tumor cell. Subsequent analysis after appropriate cancer therapy may show lower tumor burdens during remission or indicate regression as a result of further mutations of the oncogene and emergence of drug-resistant or more aggressive tumor cells.

Membrane biomolecule analysis includes any type of analysis or assay that involves a biomolecule bound to or associated with a cellular membrane within a cell, i.e. extra-cellular and intracellular biomolecules or markers. Appropriate analytical methods include, but are not limited to, flowcytometry, enzyme-linked immunosorbant assay, morphological staining, cell sorting, and the like. Permeabilized cells can be sorted by, for example, fluorescence activated cell sorting (FACS) techniques based upon the expression of a particular detectable protein. Cell sorting techniques are well known to the skilled artisan and have been used to simply count detectably labeled cells, for example, in cancer diagnosis. Permeabilized cells can also be classified

WO 03/035895

PCT/US02/34570

on the basis of expression of a particular protein, e.g. CD4 or CD8 cells. Membrane biomolecule analysis can also be done on downstream membrane fractions followed by analysis, including, but not limited to protein expression profiling. Western blotting, amino acid sequence analysis, mass spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, infrared, atomic adsorption, surface plasma resonance (SPR) and any other technique suitable for analysis of membrane components.

Functional genomic analyses or assays can be performed on the genetic material that is retained within a permeabilized cell. For example, genomic DNA, nuclear (hnRNA), mitochondrial (mtRNA) and any other RNA or DNA harbored by an organelle that remains bound or fixed within the cell upon permeabilization of a cell can be assessed. Thus, the types of analyses described above for cytoplasmic biomolecules can be performed for genomic DNA, hnRNA, and mtRNA using methods or assays including, but not limited to, *in situ* hybridization, polymerase chain reaction, differential display PCR, arbitrarily primed PCR, microsatellite analysis, single nucleotide polymorphisms (SNP), competitive genomic hybridization (CGH), restriction fragment length polymorphism analysis, nuclear and mitochondrial transcript run-on assays, and *in vitro* protein translation assays. To obtain genomic DNA, nuclear hnRNA, and mtRNA, however, the permeabilized cells must either be exposed to the releasing cocktail of the present invention, completely lysed, or further fractionated by conventional means well known to the skilled artisan. For stabilized cells, combinations of proteinase and nucleophiles can be used to reverse and remove macromolecular complexes containing the nucleic acids of interest, liberating RNA and DNA nucleic acid components. Furthermore, cell organelles retained upon permeabilization can be subsequently further fractionated and isolated for metabolic functional assays of, for instance, mitochondria and the like.

Accordingly, another embodiment of the present invention provides methods of separating nuclear or mitochondrial genetic material from cytosolic RNA. Cells containing the nuclear or mitochondrial genetic material and cytosolic RNA are contacted with a permeabilization compound, as described above. Nuclear or mitochondrial genetic material can be isolated by, for example, subsequent appropriate sub-cellular fractionation and complete

WO 03/035895

PCT/US02/34570

cell/organelle lysis of the fractionated cellular material. The resultant organelle specific components (DNA, RNA, proteins, lipids, carbohydrates, etc.) can be extracted or isolated from the homogenate and analyzed. Separation can also be accomplished using organelle-specific immunomagnetic beads, as described above.

Several important practical automation advantages accrue from the present invention. For example after the permeabilization solution has been removed from the cells, the mRNA can be captured with oligo(dT)-magnetic beads that are ideally suited for automated downstream manipulation and comprehensive analysis similar to microarrays. In addition only minor changes are required in the current mRNA analysis protocols to generate both protein and mRNA profiles thus reducing the time and reagent requirements. Further, the corresponding intact cellular genomic DNA in the nuclei and mitochondria is still contained and accessible in the permeabilized cells and can be analyzed downstream by conventional methods for DNA, RNA and protein such as FISH, SNP, SAGE, DD-PCR, PCR, RFLP, RT-PCR, CGH, cDNA microarrays, mass spectrometry and protein arrays, etc. Simultaneous multicomponent analysis strategies of DNA, RNA, protein, lipid, carbohydrate, and (precursors, metabolites, and co-factors thereof), for example, on large microarrays can thus be broadly applied to any eukaryotic cell, tissue sample or body fluid. This type of cell expression profiling by means of multicellular component or combined with multiplexed (e.g. microarray) analyses is a cutting edge objective in technologies ranging from high-throughput screening of drug candidates to disease diagnosis and management.

This invention also provides reagents and kits for isolating cytosolic or whole cellular RNA, in particular, mRNA. The kits may include a permeabilization compound and RNA extraction reagents or hybridization probes for RNA isolation and detection, such as for example, oligo dT or gene-specific sequences or random (degenerate) oligonucleotides of various lengths. The kits can also include antibodies that bind to proteins associated with cells, such as antibodies that bind to membrane biomolecules. The antibodies and probes can be enzymatically labeled, fluorescently labeled, or

WO 03/035895

PCT/US02/34570

radiolabeled to allow detection. The antibodies and probes can also be attached to, for example, magnetic beads or the like, to facilitate separation.

The intact library is then interrogated for the presence of any messages involved in identifying the presence of epithelial cells and/or confirming the presence of the tissue of origin of those epithelial cells. To this end, all of the mRNA present in the sample must be analyzed for each particular gene of interest, each with the same sensitivity/selectivity as the other and with the ability to look at all the mRNA of interest at one time.

Under preceding criteria, global gene expression analysis by microarray would be insensitive to rare events. In particular, the signal-to-noise ratio in the sample would be impracticably low because of such problems as the white blood cell immunomagnetic carryover contamination in any given enriched sample. For example in a fluid sample enriched for a particular target population of cells by immunomagnetic selection, there potentially could be approximately 10,000 white blood cells carried over with a target population of 1 to 10 cells. The target cell(s) is expressing the rare event of interest, and would be masked by the nucleotides found in the white blood cells. The excessive white blood cell derived background RNA noise coupled with the extremely rare copy level of the target mRNA results in a potential signal that may not be detected.

To circumvent the problem, total RNA (or purified mRNA) is pre-amplified by employing either a SP6, T3, or T7 RNA polymerase promoter-based *in vitro* linear pre-amplification method. A typical example is T7 RNA polymerase (T7RNAP), promoter (T7RNAPP) and enzyme amplification system, but any equivalent system can be substituted by systems obvious to those skilled in the art. The linear pre-amplification of all messages increases the original mRNA library representation at least 1000 fold with minimal distortion of relative abundance of individual mRNA sequences within the RNA population. The same pre-amplification process may also be known as transcript amplification, linear amplification, or *in vitro* amplification. Accordingly, it is the 1000 fold linear pre-amplification of the entire mRNA library that is one specific feature of the embodiment of this invention. The single stranded mRNA is annealed in the polyA tail region at the oligo(dT) portion of the T7 promoter containing oligonucleotide. The RNA polymerase

WO 03/035895

PCT/US02/34570

creates antisense copies of the entire mRNA library (aRNA). Thus in general, there is at least a 1000 fold increase in the number of copies of mRNA having polyA tails in the entire library, and an associated 1000 fold increase in sensitivity of any particular mRNA sequence type.

For example, the T7 promoter oligonucleotide primer, utilized as the first strand RT primer and a subsequent T7RNAP amplification primer, is composed of 67 bases having a 3'oligo(dT) portion containing a 5' T7 RNA polymerase promoter sequence having the following base pair order:

(5'-
TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG(T)₂₁-
3')

The pre-amplification reaction is completed by a reverse transcription reaction followed by randomly primed DNA polymerase dependant second strand synthesis and finally an overnight incubation with T7RNAP. Subsequently, a portion of this entire reaction mix is used in a PCR reaction analysis, which generates a specific single band amplicon with the appropriately designed gene specific primers (GSP's) of interest or any other appropriate RNA analysis method of choice.

It will be recognized by those skilled in the art that the design and synthesis of gene specific primers will depend upon the particular target sequence to be amplified and can be designed by any means known and accepted in the art. For example, gene specific primers are designed using the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) software and GenBank human cDNA sequence database. The primers are optimized for annealing temperatures at about 55°C to 65°C and shown to produce only DNA-free, RT-PCR dependant single bands from complex mRNA libraries, which are known to be positive for particular mRNA. The complex mRNA libraries are often extracted from normal and cancerous human tissues as well as *in vitro* cell lines. The designed primers produce desired target sequence specific PCR bands that are all electrophoresed on agarose gels in order to compare design-predicted

WO 03/035895

PCT/US02/34570

molecular weights with known standards. Calculations are completed using R_f values determined on gel analysis software. The amplicon sequences can be further sequence verified by direct sequencing, blot probing, restriction enzyme mapping, etc.

In order to circumvent the signal-to-noise (S/N) limitation inherent in cDNA array analysis as described above, a novel modification of an RNA polymerase promoter-driven linear amplification strategy was developed. Alternatively, a single tube, multigene RT-PCR analysis system based on universal PCR amplification of multigene-specific reverse transcription of cDNA in a single reaction tube substantially reduces background noise. These two signal-to-noise improvements are specific components embodied in the present invention.

Second strand synthesis of the pre-amplified library is only within selected regions and could include from 1 to 1000 independent regions of interest for a single sample and still maintain the 100% sensitivity from the original library. Second strand synthesis is completed by selective amplification of only those genes of interest. Therefore, gene specific primers (GSP) are designed for second strand synthesis to include only the regions of interest. The regions would include for example, but not limited to, prostate specific antigen (PSA), PSM, CK19, EpCam, AR, HPN, F6, mamoglobin, and/or all the cytokeratins. GSP are designed to incorporate a universal primer on their tail end.

In contrast to prior art where the first strand synthesis is carried out with the set of gene specific primers, part of the novel aspect of this invention is the use of the gene specific primers for only the second strand synthesis without the use of CAPswitch.TM. oligonucleotide, (U.S. Pat. No. 6,352,829). Prior art teaches that the gene specific primers are designed to incorporate an arbitrary anchor sequence at their 5'ends which includes the CAPswitch oligonucleotide. So surprisingly with the invention herein disclosed, a universal portion of the primers does not include the CAPswitch moiety.

The length of the gene specific primers will typically range from about 15 to 30 nucleotides, while the universal primer portion will typically be about 15 in length.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Reverse transcription of a small portion of the T7 amplified antisense RNA (aRNA) library is performed using cycling conditions known in the art. All RT-PCR results are initially analyzed on 2% agarose gel containing ethidium bromide again according to procedures known in the art.

After amplification of selected portions of the amplified aRNA library, the product is then analyzed in an array format or by any electrophoresis format known in the art.

In addition to the amplification of the second strands after preamplification as described above, a universal PCR multigene amplification can be accomplished in a single tube, incorporating a set of gene specific primers (P1) for simultaneous reverse transcriptase in conjunction with the appropriate set of opposing primers (P2) for simultaneous second strand synthesis. Together, they define both (alpha and beta) termini and form a complete set of gene specific amplicons equaling a GSP multigene panel of interest. The GSP1 and GSP2 priming for both gene specific first and second strand syntheses are conducted with the appropriate enzymes and under conditions of high primer-target annealing specificity, which are known to those skilled in the art. Additional levels and approaches to achieving the appropriate primer specificity can be achieved by using proteins from natural recombination cellular repair mechanisms such as recA. Appropriate application of these repair systems *in vitro* will enable superior, even absolute, primer template specificity of formation. The template criteria is either mRNA, or mRNA:cDNA heteroduplex, or double stranded duplex cDNA. Furthermore, the innovative idea of utilizing a cell's natural repair mechanisms, as described in the present application, can be applied toward other gene specific primer methods such as the one described below for GSPs-RT subsets for signal to noise shifting enabling cDNA array analysis on rare cell events. Each P1 and P2 primer in any one GSP multigene panel set of PCR primer contains a universal primer sequence at the 5' terminus which is common to all gene specific P1's and P2's (or just P1's and a separate universal sequence which is common to all P2's). In order to control unfavorable side and competitive reactions after second strand synthesis all GSP 1 and 2 are to be removed from the desired double stranded cDNA amplicon panel set to eliminate their non-specific

WO 03/035895

PCT/US02/34570

impact on down stream processes. Many strategies are possible to those skilled in the art such as molecular size based exclusion offered by Sephadex and Centricon etc, chromatography, solid support selective attachment, single strand specific DNase (Mung Bean, S1, etc.) primer sequence specific strategies such as Uracil-N-Glycosylase (UNG) in combination with DNA oligonucleotide primers that are synthesized with deoxyUridine (U) in place of Thymidine (T). Alternatively, RNA-DNA oligo-primer hybrids could be used in place of DNA-Uracil and similarly be eliminated after first and/or second strand synthesis via DNase-free RNase treatment. The ready availability of Uracil containing DNA-primers combined with the ease of PCR integration of UNG degradation offers an efficient method of eliminating undesirable complex primer interactions. This UNG degradation strategy will produce oligos much smaller than are capable of annealing under chosen PCR annealing temperatures. Following UNG treatment, the cDNA template mixture might also benefit from treatments with DNase-free RNases to eliminate all undesirable side reactions, possibly caused by high complexity RNA. Following UNG treatment (with an optional RNase treatment to eliminate all RNA) the only nucleic acids remaining are hybridized 1st and complimentary 2nd strands forming dsDNA duplexes, which now constitute the sample's available PCR templates. Next, non-UMP containing universal primers (1 or 2 max) are added for the follow-up PCR. The net effect is the capturing of any desired set of mRNA (or DNA minus the RT) sequences with one or 2 PCR compatible high efficiency primers enabling quantitative RT-PCR multigene simultaneous amplification and subsequent analysis in a single tube. Since the primers are universal, they prime each GSP amplicon with the exact same efficiency, eliminating the confounding multiplex GSP primer performance problems. Each GSP defined amplicon with a panel or set of amplicons can have a different predetermined fragment size enabling each GSP sequence to be resolved and identified by its unique Rf value in size-based analysis systems such as vertical and horizontal PAGE and agarose gel electrophoresis, capillary gel electrophoresis, SELDI, MALDI, cDNA arrays, etc. Thus, rapid multigene RNA/DNA panels can be rapidly applied to interrogate large numbers of samples for a diverse set of diagnostic therapeutic and monitoring applications. This method achieves

WO 03/035895

PCT/US02/34570

multigene analysis from individual samples of mRNA in a single reaction tube with or without mRNA library preamplification. No preamplification allows only one panel of genes to be analyzed with one assay in one sample. Preamplification adds the advantage of analyzing a single sample in up to 1000 different assays, thus many different panels of genes can be interrogated at different times on one sample. While not limited to any specific method, analysis of the universal PCR panels by cDNA array or capillary gel electrophoresis (CGE) is a preferred methodology.

Thus a critical feature differentiating the present invention from conventional technologies of the prior art is the improvement in signal to noise by selective amplification of rare target mRNA species, making this method a novel development over existing multivariate mRNA analysis. Known multivariate analysis systems, for example multiplex RT-PCR, can substantially change signal to noise, however the challenges of designing and optimizing meaningful multiplex systems has rendered them generally impractical especially for more than two target subsets in a reaction vessel.

This invention also utilizes the high signal to noise improvement to select representative transcripts, and amplifies in one reaction vial the entire set of target sequence(s) to be detected.

Thus while the invention is not limited to the following specific use, a set(s) of representative gene specific primers can be used to generate target gene subset(s) found in known disease states. The representative set is will include at least two different target genes that are indicative of the disease state of interest. For each reaction vial, the number of sets of gene specific primers will be determined by the disease state and the known characteristics that would define the disease state.

The following examples are provided to exemplify the practicality of the disclosed invention and to demonstrate the impact of the invention on diagnostic technology. These examples are not intended to limit the scope of the invention. In addition, the disclosures of each patent, patent application, and publication cited or described in this document are incorporated herein by reference in the entirety. Throughout these examples, molecular cloning reactions, and other standard recombinant molecular biology techniques,

WO 03/035895

PCT/US02/34570

were carried out according to methods described in Maniatis et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) (hereinafter, "Maniatis et al."), and Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, 2002, using commercially available reagents, except where otherwise noted.

EXAMPLE 1

ISOLATION OF CYTOPLASMIC RNA

The supernatant obtained from ferrofluid selected unfixed cells that are permeabilized with Immuniperm, a phosphate buffered solution containing 0.05% saponin and 0.1% sodium azide was found to contain greater than 80% of the cellular total RNA residing in the cytoplasm of the cells. The RNA isolated from this supernatant showed no evidence of degradation as judged by native and denaturing agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. This supernatant solution, which is normally discarded after intracellular staining of the ferrofluid selected cells, was unexpectedly found to contain the RNA in an intact or undegraded full-length form thus providing an mRNA profile of the same cells that were also used for morphologic analysis. Figure 2 illustrates these findings showing that total RNA release occurs in less than one minute and that about 95% of the cytoplasmic total RNA can be readily and reproducibly isolated.

In dramatic contrast, the RNA isolated from cells of the breast cancer cell line SKBR3 using the conventional process, i.e. isolation by a commercially available phenol based RNA lysis buffer Trizol® Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, Cat # 10296), completely lyses and homogenizes the entire cellular structures, thereby also resulting in the liberation of the genomic and mitochondrial DNA, and the cytoplasmic, mitochondrial and nuclear RNA. Examination of the cell pellet from Immuniperm (saponin) treated SKBR3 cells selected with an EpCAM ferrofluid (see Example 2 for a detailed procedure) showed the presence of nearly 100% of the genomic and mitochondrial DNAs, and the nuclear and mitochondrial RNA which amounts to approximately 15-20% of all the cellular total RNA expected from the same number of non-permeabilized whole cells. About 95% of expected

WO 03/035895

PCT/US02/34570

cytoplasmic RNA was recovered intact from the Immuniperm supernatant layer.

As shown in Figure 3, duplicate tubes containing about 250,000 cells of the breast cancer cell line SKBR3 were first immunomagnetically enriched and then incubated in the absence (PBS only) and presence of Immuniperm (+IP) for 15 minutes at room temperature. The Immuniperm treated permeabilized cells were then separated by centrifugation for 5 minutes at 800x g RCF as a visible permeabilized cell pellet. The Immuniperm supernatant fraction containing all the cytoplasmic soluble components was transferred to a second tube. Total RNA isolated from whole untreated cells, the Immuniperm treated permeabilized cell pellets, and the Immuniperm treated cell supernatant fractions were isolated using the RNeasy® (Qiagen Inc., Valencia, CA) silica binding method. These total RNA fractions were then DNase treated to remove trace amounts of DNA. Spectrophotometric quantitation of the DNase RNA fractions yielded an average of 20 picograms of total RNA/cell for whole cells (=100%), 4 picograms of total RNA/permeabilized cell from the pellet fraction (20%), and 16 picograms of total RNA/cell from the supernatant fraction (80%). From these three, DNase total RNA fractions, 2.5×10^4 cell equivalents of mass were then formamide-denatured and electrophoresed through a 1% agarose gel followed by staining with ethidium bromide, as shown in Figure 3. Quantitation by agarose gel densitometry agreed with the spectrophotometric recovery values. The gel images in Figure 3 also show that the rRNA are full-length and have high integrity as evidenced by the relative ratios of the 4.4 kb ssRNA co-migrating 28S rRNA bands compared to the 2 kb ssRNA marker co-migrating with the 18S rRNA bands. In general, the observed relative ratios of 28S rRNA to 18S rRNA of approximately 2 are an excellent indication of mRNA integrity as was further demonstrated by Northern blotting this gel and probing it with oligo(dT) as shown in Figure 4. Literature values for the percent of total RNA contributed from the nucleus range from 15 to 25%. The Immuniperm® treated cell fractions containing 20% RNA are thus consistent with the published nuclear contribution.

In conclusion, Immuniperm-based permeabilization was unexpectedly shown to provide complete separation of nuclear and cytoplasmic total RNA

WO 03/035895

PCT/US02/34570

with nearly 100% of the cytosolic total RNA readily recoverable in the supernatants of the Immuniperm treated unfixed cells. Furthermore, the nuclear fraction of total RNA surprisingly was found to remain intact in the resultant permeabilized cell structure following Immuniperm treatment.

Using poly-A tail hybridization, mRNA portions of the RNA derived from the two Immuniperm® cell fractions were evaluated against whole cells by Northern blot transfer of the denatured RNA from the gel shown in Figure 3 to a positively charged nylon filter. Oligo(dT) 25-mer probe was labeled with ³²P and polynucleotide kinase then hybridized to the Northern blot. Single-stranded RNA size ladders containing poly-A tails were used as markers enabling the formation of a molecular weight banding ladder for relative qualitative sizing of mRNA populations. The oligo(dT) hybridization results in Figure 4 shows that no significant differences in size ranges were observed for the mRNA libraries between the three samples.

Comparative quantitative phosphor image analyses of the entire mRNA-blotted regions (i.e. the entire dT hybrid signals) from whole cell mRNA libraries were nearly identical to the sum totals from the Immuniperm treated permeabilized cell pellets (nuclear fraction) plus the Immuniperm-derived cytosolic fractions. Furthermore, the cell fraction percentages of mRNA from the dT-probe signals, determined by phosphorimaging, are identical to the 28S/18S rRNA percentages determined from the agarose gel image densitometry analyses. These data demonstrate that both the Immuniperm-derived cytosolic total RNA and its mRNA component are quantitatively isolated, exhibit high integrity, and are full-length. The release of Immuniperm-derived mRNA is not limited by transcript size since nearly 100% of the cytosolic mRNA is retrievable from the Immuniperm supernatant, and the integrity of rRNA 28S/18S is indicative of full retention of mRNA integrity.

The Northern blot shown in Figure 4 was stripped and re-probed with nuclear specific precursor rRNA probe. Figure 5 shows that Immuniperm treatment of cells achieves a complete separation of nuclear and cytosolic total RNA populations. Thus, the nuclear membrane structure remains intact during the Immuniperm treatment and the nucleus retains all its soluble components.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

The Northern blot in Figure 5 was stripped and re-probed with a mitochondrion-specific 12s rRNA probe. The results, shown in Figure 6, demonstrate that Immuniperm treatment of the cells achieves complete separation of mitochondrial and cytosolic RNA populations. Thus, the mitochondrial membrane structures remain intact during the Immuniperm treatment.

The same total RNA stocks solutions, which were used to generate the images in Figures 3-6, were further used to generate ³²P-labeled first strand cDNA libraries of equal masses and specific activities. These three labeled first strand library probes were hybridized to obtain separate but identically prepared cDNA array dot blots as shown in Figure 7. Here the objective was to evaluate the mRNA relative abundances represented in each Immuniperm derived cell fraction by comparing the relative proportions of each cDNA hybrid signal pattern for each imaging filter. The randomly selected cDNA gene array identities on the template are shown in Figure 7. The uppermost row of dots are a set of housekeeping genes designated by the abbreviations 23 kd = 23 kilodalton protein, a-tub = alpha tubulin, b-act = beta actin, b2mic = beta-2-microglobulin, phos = phospholipase A2. The second row is designated as f6 = alpha-1-globin, CD16 = cluster determinant 16, CD12, CD38, CD45, and CD31. The bottom row consists of general epithelial specific genes designated by g6 = macrophage inhibitory cytokine 1, CK8 = cytokeratin 8, CK18 = cytokeratin 18, CK19 = cytokeratin 19, EpCam = epithelial cell adhesion molecule, uPA = urokinase plasminogen activator. Qualitative and quantitative phosphorimaging comparisons of each fraction showed no significant differences in the relative abundances of the genes on the array. Interestingly, these data shown that the relative mRNA abundance from whole cells is roughly equal to its cytosolic fraction, which in turn equals its nuclear fraction, where total RNA mass can vary from about 20% in the nucleus to about 80% in the cytosol. The respective lengths of the transcripts in this cDNA array varies from 1 to 5 kb, again reinforcing the Northern blot finding that no size bias is seen in the release mRNA from Immuniperm treated cells. The identical relative representation patterns in Figure 7 also unexpectedly demonstrate that the Immuniperm®-derived mRNA is as

WO 03/035895

PCT/US02/34570

effective a reverse transcriptase template for first strand synthesis as the whole cell mRNA derived by traditional methods.

Overall these data show the unexpected findings that Immuniperm-derived cytosolic RNA yields approximately 80% of the mass of all the cellular total RNA in the entire homogenized cell which is essentially > 95% of all cytosolic total RNA, that it is full length, and that it has the same efficiency of reverse transcription as total RNA isolated by traditional phenol and silica extraction methods. Thus, Immuniperm-derived cytosolic total RNA and its accompanying heteronuclear RNA components are equally effective templates in all conventional downstream RNA analysis methods when compared to the traditional whole cell high-quality RNA isolation methods.

Figure 8 shows the gel image of the cytosolic RNA obtained by treating about 770 PC-3 cells with Immuniperm. The data show that Immuniperm-derived cytosolic mRNA from lower cell numbers give the same proportions of RNA as were demonstrated in Figures 3, 4, 5, 6, and 7. Therefore, Immuniperm-mediated cell release of cytosolic RNA is not cell number dependent.

EXAMPLE 2

ISOLATION OF CIRCULATING TUMOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

Isolation of circulating tumor cells from peripheral blood followed by cell analysis by flowcytometry and gene expression analysis by RT-PCR can be performed as follows: EDTA-anticoagulated blood (7.5 ml) is transferred into a 15 ml conical tube and 6.5 ml of System Buffer (PBS also containing 0.05% sodium azide, Cat #7001, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) is added. The tube is securely capped and mixed by inverting several times. The blood-buffer mixture is centrifuged at 800x g for 10 minutes at room temperature. The supernatant is carefully removed by aspiration taking care not to disturb the buffy coat layer. Some supernatant can be left in the tube. The aspirated supernatant can be discarded. AB Buffer (System Buffer containing streptavidin as a reversible aggregation reagent, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) is added to the tube to a final volume of 10 ml. The

WO 03/035895

PCT/US02/34570

tube is capped and mixed by inverting several times. VU/desthiobiotin EpCAM ferrofluid particles (Immunomagnetic nanoparticles coupled to anti-EpCAM monoclonal antibody also conjugated to desthiobiotin for biotin-reversible aggregation with streptavidin, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) are resuspended by gently inverting the vial several times. To the sample in the AB buffer is added 100 ul of VU/desthiobiotin EpCAM ferrofluid and the tube mixed by inverting several times. Shaking should be avoided to avoid foaming. The tube is immediately inserted into the QMS17 (Cat. # AS017, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) magnetic separator and let stand for 10 minutes. The tube is removed from the separator and its contents resuspended by inverting the tube several times. The tube is inserted into the QMS17 magnetic separator again and let stand for 10 minutes. The tube is removed from the separator and its contents resuspended by inverting the tube several times. The cap is removed and the tube is placed in the QMS17 separator for an additional 20 minutes. With the tube inside the QMS17, the cell-buffer mixture is carefully aspirated using a Pasteur pipette and the aspirated supernatant is discarded. Immediately thereafter, the tube is removed from the separator and 3 ml of System Buffer is added. The magnetically collected cells are resuspended by brief vortexing. The liquid should rise up the tube during vortexing so that cells near the top are washed down. The uncapped tube is again placed in the QMS17 separator for 10 minutes and the supernatant is aspirated with a Pasteur pipette. The aspirated supernatant is discarded. The magnetically collected cells are resuspended by vortexing in 200 ul of Immuniperm/RNase inhibitor (Permeabilization reagent, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) also containing RNase inhibitor, RNase OUT, Cat. # 10777019, Invitrogen, Rockville, MD). The liquid should rise up the tube during vortexing so that all cells are washed down. Antibodies such as, for example, monoclonal anti-cytokeratin antibody (C11-PE, 0.25 ug) (cocktail of antibodies recognizing cytokeratins 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 conjugated to R-Phycoerythrin; Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) in a 25 ul volume and 10 ul of CD45 PerCP (Pan anti-leukocyte marker, Cat. # 347464, Becton Dickinson, San Jose, CA) or any other suitable antibodies can be added and mixed by vortexing. After 15 minutes of incubation, the sample is gently agitated by lightly tapping the

WO 03/035895

PCT/US02/34570

bottom of the tube. The tube is returned to the QMS17 for 5 minutes. The supernatant is gently aspirated and the Immuniperm-RNA fraction transferred to an appropriately labeled tube.

EXAMPLE 3

CELL ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

The cells from Example 2 are resuspended in 200 μ l of CellFix (PBS based buffer containing biotin as a de-aggregation reagent and cell preservative components, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) and incubated for 5 minutes. The sample is transferred to a 12 x 75 mm flow tube and 300 μ l of PBS are combined, followed by the addition of the nucleic acid dye thioflavin T (Sigma # T3516, 10 μ l) and about 10 μ l of fluorescent beads (10,000 beads; Flow-Set Fluorospheres, Cat. # 6607007 Coulter, Miami, FL). The sample is mixed by vortexing. Preferably, the fluorescent beads tube is mixed by vortexing before pipetting the beads. The sample is then analyzed on a flowcytometer.

EXAMPLE 4

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

The poly(A)⁺ mRNA is isolated using magnetic oligo(dT) labeled beads (Dynabeads[®] mRNA Direct[®] Micro Kit, Dynal, Prod. # 610.21, New Hyde Park, NY). Alternatively, total RNA can be isolated by using any other appropriate means to those skilled in the art such as silica binding, polymer binding, and more traditional phenol extractions like Trizol[®] Reagent (GibcoBRL, Cat # 10296). Genomic DNA is eliminated by treatment with DNase enzyme such as DNase I (GibcoBRL). An enzyme mix composed of 2:1 of 10x DNase I (1 U/:1), 1:1 of RNase inhibitor (cloned), 5:1 of dH₂O, and 10:1 of RNA or control (250ng Genomic DNA) is prepared. The enzyme mix is incubated at 37°C for 20 minutes. The DNased RNA is re-purified by magnetic oligo(dT) labeled beads or Trizol[®] isolation and resuspended in

WO 03/035895

PCT/US02/34570

10:1 RNase-free water. The activity of DNase enzyme is confirmed by running the control genomic DNA (+/- DNase treatment) on a 2% agarose gel with ethidium bromide staining.

Specific mRNA sequences can be amplified using rTth (*Thermophilus thermophilus*) RT-PCR. A master mix composed of 10:1 of 5x EZ Buffer, 1.5:1 of dATP, 1.5:1 of dCTP, 1.5:1 of dGTP, 1.25:1 of dUTP, 5:1 of Mn++ (25 mM), 2:1 of rTth (2.5 U/1), 0.5:1 of UNG (1U/1), 12.25:1 of dH₂O, 2.25:1 of sense primer, and 2.25:1 of anti-sense primer can be prepared for reverse transcription of specific mRNA species. A 40:1 volume of Master Mix is added to the sample tube containing 10:1 of DNased RNA and corresponding negative control tubes containing 10:1 of H₂O. PCR thermocycling is carried out for 40 cycles as follows: 50°C for 2 minutes (pre-PCR), 62°/65°C for 30 minutes (pre-PCR), 95°C for 1 minute (pre-PCR), 94°C for 15 seconds (PCR), 62°/65°C for 30 seconds (PCR), and 62°/65°C for 7 minutes (post-PCR). After the thermocycling is completed, the sample tube is immediately placed in a -20°C block for 2 minutes. After completion, the sample tube is placed in a 4°C block until gel analysis will be performed. A volume of 20:1 is run on a 2% agarose gel with ethidium bromide staining. Qualitative and quantitative gene expression measurements of specific mRNA transcripts are made by examination of the gel image using a UV transilluminator and an alpha imager for the presence of the amplicon at the expected molecular weight.

Various modifications of the invention, in addition to those described herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing descriptions. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims.

EXAMPLE 5

ISOLATION AND ANALYSIS OF PROTEINS FROM CIRCULATING TUMOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD

The supernatant obtained from about one million ferrofluid-selected SKBR3 cells that have been permeabilized with Immuniperm, a phosphate buffered solution containing 0.05% saponin and 0.1% sodium azide, also contains, in addition to the nucleic acid components analyzed in Examples 1

WO 03/035895

PCT/US02/34570

to 4, released soluble cytosolic proteins residing in the cytoplasm of the cells. The soluble proteins in this supernatant solution and the insoluble proteins remaining in or on the surface of the cells thus provide a means for determining the total protein expression profile or proteomics profile of the cells as well as the cellular morphology.

Firstly, the fraction of total cytosolic soluble protein liberated from the cytoplasm due to Immuniperm treatment is determined relative to the total amount of protein liberated from a duplicate cell preparations treated with NP-40, a surfactant that is the preferred reagent for total cytosol protein release from cells. Both treated cell preparations are freed from membrane debris via centrifugation or magnetic separation prior to determination of total soluble proteins by conventional methods, such as the spectrophotometric Lowry and Bradford methods.

Secondly, aliquots of the two sample preparations are electrophoresed in a 4 to 20% gradient SDS polyacrylamide gel to (a) determine the molecular weight cut-off for Immuniperm-derived cytosolic proteins and (b) compare the protein banding patterns and relative quantities of protein per band in the two preparations.

Thirdly, aliquots are further analyzed by 2D electrophoresis and conventionally stained or detectably labeled to provide "fingerprint" information on sizes and isoelectric points of the proteins in the two fractions based on the qualitative and quantitative spot patterns of identifiable and unidentified components. The derived information generates proteomic expression profiles of the relative and absolute protein expression patterns in the cytosolic and total protein compartments of normal and transformed cell populations.

EXAMPLE 6

Gene Specifically Primed (GSP) RNA Polymerase Based Amplification of mRNA Library Subsets Enabling Diagnostic Formats With Inherent Signal-to-Noise (S/N) Limitations such as cDNA Array Analysis of Rare Cell Events and Rare Transcripts

WO 03/035895

PCT/US02/34570

After RNA isolation, several RNA analysis methods can be applied. Traditional RT-PCR or the more desirable quantitative versions can be applied however they are generally considered a poor use of individual samples as these samples yield very small amounts of starting material. As a consequence, clinical sensitivity is compromised for multigene analysis. Thus, unamplified mRNA/cDNA libraries can only be analyzed one time for only one gene without compromising clinical (and maximum technical) sensitivity. With individual samples being scarce, several higher throughput methods were developed.

Here, we show that it is highly desirable to be able to measure the expression level of multiple genes (from 2 up to 1000s) simultaneously via high throughput formats such as in a micorarray format all from only one reaction tube. This is accomplished without reducing the workload significantly and loss of sensitivity. A significant obstacle to single tube cDNA micorarray analysis for rare cell event and their rare mRNA samples is their inherent unfavorable S/N ratio in the starting mRNA sample.

For radiolabeled cDNA arrays, these limits originate from (a) the lower limit of the target copy number detectable in the solution phase (approximately 5×10^5) when one specific known target is spiked into the (b) maximum amount of labeled non-specific (background noise) targets ($20\text{ng} = 2 \times 10^{11}$ library of randomly labeled target molecules) that can be hybridized to a nylon filter array system at one time without increasing the background filter (solid support) noise component of the S/N ratio.

For Immunomagnetically enriched samples, significant background noise mRNA is due to the presence of WBC's which are unavoidably carried over during the enrichment process. One solution is to shift the S/N ratio up to 1000 fold in favor of the desired rare mRNA from the rare cells by performing a second round of RNA polymerase amplification (RNAPA) selecting only a subset of predetermined genes.

This GSP subset RNAPA selection process is reduced to practice in this example using a model system that reflects typical WBC mRNA copy number ratios found in clinical samples (10ng total RNA in approximately 5000 WBC) / CTC (0.5ng total RNA in approximately 50 CTC). In an equivalent aliquot of this starting sample stock composed of 50 CTC, the

WO 03/035895

PCT/US02/34570

number by real-time quantitative RT-PCR was determined for all detectable mRNA in prostate specific antigen (PSA = 2650), prostate specific membrane antigen (PSM = 1750), androgen receptor (AR = 100) and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM = 1163) as shown on Table 1. The starting WBC mRNA total copy number proportional to the non-specific background noise was approximately 10^8 to 10^9 . For this particular example, the starting total RNA/mRNA was subjected first to one round of amplification which increased proportionately all the mRNA species approximately equal as determined by real-time quantitative RT-PCR (Table 1). Subsequently, a 25ng aliquot of the first round amplified aRNA was subjected to a second round of GSP subset RNAPA, shifting the signal-to-noise of the 4 GSP targets as described below (Table 1).

In the second round GSP RNAPA, a key selection step occurs during the single RT reaction forming simultaneous first strands only for a predetermined mRNA library subset of which the gene specific RT primers are included. In this example, the subset of GSP RT primers were for the above 4 mRNA (PSA, PSM, AR, EpCAM). GSP-RT selective first strand synthesis is followed by synthesis of the complementary second strand using the appropriate DNA polymerase and oligo(dT) primer bearing a T7RNAP promoter, thus creating a selective set of double stranded DNA templates T7RNAP ready.

Thus, the desired subsets of RNAPA enabled templates have been selected via GSP first and second strand synthesis. At this point, all remaining RNA is degraded by exposing the second strand reaction mix with a cocktail of DNase-Free RNases. Alternatively, any remaining single stranded RNA and any extraneous (non-poly U/ poly A dependent) single stranded cDNA which was formed during dT dependent second strand synthesis can be eliminated by single-strand-specific nucleases such as Mung Bean Nuclease. Then, double-stranded cDNA template subsets are purified by phenol extraction and/or silica binding. The selected set of RNAPA ready templates are RNAP amplified overnight to yield an approximately 1000 fold increase of only 4 genes of interest in S/N shifting over the other possible templates such as the F6 (alpha 1 globin sequence) which represents WBC mRNA derived noise. Table 1 shows the results of real-time quantitative RT-

WO 03/035895

PCT/US02/34570

PCR for these 4 genes of interest throughout the process including subsequent GSP-second round S/N shifting where F6 is defined as alpha 1 globin sequence found in this system to be highly abundant in WBC and not detectable in epithelial cells. These results clearly show that four of the GSP targets selected increased an average of 844-fold while the non-targeted F6 WBC noise only increased 5.9 fold. Thus when dividing the increase GSP target signal by the F6 WBC noise, the final signal to noise improvement for each GSP target was derived. It is important to note that further improvements would be expected by employing modifications such as Mung Bean Nuclease and GSP-RT primer sequence selection/optimization as mentioned above.

Gene	tRNA starting copy no.	Total copy no. after 1 st round aRNA	Total copy no. after GSP 2 nd round	1 st :2 nd	GSP S/N (F6)
PSA	2650	2.10×10^7	3.00×10^{10}	1238	210
PSM	1750	7.80×10^6	4.03×10^9	517	87
AR	100	64200	2.90×10^7	458	78
EpCAM	375	5.20×10^6	6.05×10^9	1163	197
F6	NA	1.40×10^{10}	8.30×10^{10}	5.9	1

EXAMPLE 7

Proteinase and Nucleophile Based Recovery of Cellular RNA From Fixed Samples Yields High Quality RNA Template For Down Stream RT Dependent Analysis

Surprisingly for samples exposed to aldehyde and urea based stabilizers or fixatives, Cyto-Chex™ and other formaldehyde and formaldehyde-urea derivative based fixatives stabilize approximately 100% of full-length total RNA, mRNA and other nucleic acids in all cells found in whole blood when compared to matched non-fixed controls. Intact RNA, stabilized

WO 03/035895

PCT/US02/34570

as macromolecular complex, changes its RNA chemical characteristics and is unaffected by current traditional cell lysis and chaotropic salt based RNA isolation methods such as phenol extraction, silica binding and oligo(dT) hybridization.

These macromolecular complexes (both covalent and noncovalent) are dissociated and reversed through combinations of enzymatic digestion and/or chemical nucleophile agent incubations. Consequently, nucleic acids are liberated, enabling isolation of nearly 100% of original DNA and RNA libraries fully intact. These fixative-derived RNA libraries provide high quality templates for reverse transcriptase (RT) dependant formation of first strand cDNA.

These fixative recovered RNA are combined with an aRNA preamplification or universal PCR methods described in the present application for comprehensive analysis down stream or for general functional enablement of total and mRNA library.

Figure 9 demonstrates that Cyto-Chex™ performs like other aldehyde based fixatives. Upon fixative exposure for 24 hours, less than 1% of the mRNA and a disproportionate amount of 18S-rRNA are recoverable (approximately 10%). Even when extreme chaotropic salt denaturation chemistries are applied (i.e. GITC and Phenol, silica or (dT) hybridization, BRL's Trizol Reagent, Qiagen's RNA mini silica binding and Dynal's Dynabeads mRNA Direct oligo (dT) poly (A)⁺ kits) recovery is extremely low.

Surprisingly, treatments with proteinases, such as proteinase K, and nucleophiles like Tris base, which removes the majority of proteins and polypeptides covalently linked to other macromolecules including nucleic acids, restored sufficient nucleic acid chemistry properties to enable recovery of greater than 90% of the original total RNA and mRNA in a fully intact state. A 25ng aliquot of aRNA (Figure 12A), derived from a mass normalized aliquot of the total RNA found in Figure 9, was subjected to quantitative RT-PCR comparative analysis for both CK 19 and EpCAM. This comparison showed a 3.8 and 3.9 fold lower copy number from fixative derived RNA relative to non-fixed RNA. This is understood as the current proteinase K treatment for restoring at least 25 % of the maximal RT-template activity for RT-PCR analysis.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

The restoration of 25% of the maximal RT-template activity via this fixation-recovery system is reproducible when different operators conduct the same procedure and analyze Percoll derived white blood cells for specific mRNA (alpha globin) via quantitative RT-PCR relative to non-fixed matched samples.

Furthermore, it is known that the Transfix™ formulation used here achieves a 0.1% final concentration of paraformaldehyde fixative per unit volume blood.

Since the loss and recovery behavior of Cyto-Chex™ exposed RNA is identical to Transfix™ and other aldehydes shown below it is highly likely that the formaldehyde donor component of the formaldehyde urea derivative components found in the formula of Cyto-Chex™ and Stabilocyte™ are responsible for the covalent linkages of nucleic acids to protein.

Formaldehyde-urea derivatives in the presence of numerous macromolecular nucleophiles found in biological systems (i.e. proteins and nucleic acids) leads to an increase in the rate of dissociation of these derivatives.

Dissociation occurs in close proximity to biological nucleophile complexes, possibly regulatory proteins specifically associated with RNA that leads to covalent linkages. These linkages and associations are then removed and reversed by subsequent proteinase and stronger nucleophile treatment. The fact that a known cross-linking agent, Transfix™ yields full-length high integrity mRNA libraries from 24hr stabilized whole blood cells demonstrates that all aldehyde based stabilizers will yield nucleic acids of similar high quality. Thus resulting in a reproducible yield of nucleic acids after preservation and recovery.

Analysis of 90-100% of the total RNA and their corresponding mRNA libraries are possible with these and most other aldehyde and/or urea derivative fixatives as is further shown in Figures 10A, 10B and 10C below. In addition, most of these types of fixed nucleic acids can be recovered via combinations of proteinase and nucleophile cocktails heated at high temperatures such as 60°C as shown in Figure 11.

These results show that heating the fixed RNA in buffers alone at high temperatures for one hour yields a portion of the mRNA library. This high temperature recovery effect has been previously shown for formalin fixed,

WO 03/035895

PCT/US02/34570

paraffin embedded tissue RNA retrieval, however nowhere has this result been reported in whole blood. Furthermore, the quality and quantity of the mRNA library recovered in the present application has not been obtained even those reports using formalin fixed, paraffin embedded tissue RNA retrieval.

Comparing this mRNA library to those recovered using the other nucleophiles (Tris, acetic hydrazide and hydroxylamine), mRNA transcript size distribution proportions for each nucleophile are different even though none of the samples shows RNA degradation. This suggests that different types of mRNA sequences are retrievable (i.e. different types of formaldehyde modifications are reversed) by specific nucleophiles and incubation conditions. The various enzymes used also show different proportions recovered (Figure 11, bottom of gel).

The fact that proteinase K digestion alone restores 25% of maximum RT-template activity combined with the observation that different fixative reversal agents yield different proportions of mRNA libraries strongly supports the notion that significantly improved recoveries by employing combinations of nucleophiles and enzymes are tangible.

To demonstrate the feasibility of mRNA diagnostic applications for cancer in particular using relatively non-invasive peripheral blood model, Figure 12A shows the resultant relative quality and quantity of aRNA from a single T7RNAP preamplification of the total RNA/mRNA isolated in triplicate of 10 and 20 SKBR3 cell spikes into 7.5ml peripheral blood after stabilization with Cyto-Chex™ for 24 hours at room temperature. Each of these replicates was then immunomagnetically enriched from which the cell lysate was treated with proteinase reversal conditions and followed by silica binding total RNA isolation. Normalized equivalents of aRNA were used in quantitative RT-PCR reactions for two specific genes, CK19 and EpCAM. The results of which are shown in Figures 12B and 12C. As can be seen from Figures 12B and 12C, all spikes, as measured by CK19, were strongly positive relative to the donor-matched triplicate (no-spike controls). Similarly, EpCAM has the same 100% positive score for all spikes in spite of the ectopic (endogenous) and extremely low level of expression seen in this donor's triplicate no-spike controls. In fact, this low level of EpCAM mRNA detection by RT-PCR is

WO 03/035895

PCT/US02/34570

commonly seen for this sequence and is not due to false positive PCR contamination.

Figures 12D and 12E shows the varying mRNA RT-template quality that is derived from the three different aldehyde based fixatives, Cyto-Chex™, Stabilcyte™ and Transfix™. As shown, Transfix™ yields an mRNA template, which might be of a slightly lower RT quality than either Cyto-Chex™ or Stabilcyte™. Furthermore when these data are normalized to the number of spiked cells and compared to unmodified cells at time = 0 in the exact same flask of SKBR3 cells, the difference between fixed verses non-fixed CK19 and EpCAM mRNA is only 4 fold (Figure 9 derived RNA data not shown). This is interpreted to mean that the 24-hour stabilization process here combined with proteinase K recovery alone and aRNA amplification yielded 25% of the possible template quality for RT. Further, the reason for lower than 100% RT quality is likely due to aldehyde modification, which proteinase K alone cannot remove. Thus, combinations of proteinase and nucleophile cocktails will significantly improve the RT-quality of these templates beyond 25% as demonstrated in these experiments. For comparison with the relevant literature under similar conditions, studies evaluating the same parameters of RT RNA template quality derived from formalin fixed paraformaldehyde embedded tissues show a 13 to 60-fold reduction in RT-template quality relative to non-fixed tissues (Godfrey, et al., Quantitative mRNA Expression Analysis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using 5' Nuclease Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J. of Molecular Diagnostics, 2:84-91 (2000)). Consequently, the 4-fold reduction provides a significant improvement over prior art.

Figures 12A, 12B, 12C, 12D, and 12E confirm a reproducible, product viable, procedure for blood RNA sample preservation and comprehensive analysis of circulating epithelial cells, which are most likely cancer cells. The high level of mRNA preservation is amenable to qualitative analysis that can detect the presence of single cell spiked into 7.5ml of blood for any mRNA that exists in that cell within at least 50 mRNA molecules/cell (i.e. only 50 copies / sample).

In summary the rates and types of covalent fixations in whole blood vary according to the type of fixative. Likewise, the rates and types of

WO 03/035895

PCT/US02/34570

covalent fixative reversal or recovery will vary according to the type or combination of proteinases and nucleophiles used. The rate of fixation will be a critical issue for applications where the half-lives of mRNAs of interest are faster than the rate of fixation. Both the forward fixation and the reversal recovery reactions (processes) can be optimized further yielding yet higher quality and quantity of RNA. However, the current quality and quantity of the RNA stabilized and recovered is demonstrated here in blood to be far superior to anything previously shown.

EXAMPLE 8

ENRICHMENT AND ANALYSIS OF mRNA FROM CTC IN FRESH NON-FIXED BLOOD

Human blood was isolated from 9 patients with advanced hormone refractory prostate cancer (HRPC) and 13 healthy volunteers and assessed for gene expression mRNA specific to circulating epithelial cells.

Patients

Blood was drawn into 10 ml EDTA Vacutainer™ tubes (Becton-Dickinson, NJ) of 9 patients with advanced hormone refractory prostate cancer (HRPC) and 13 healthy volunteers, 7 male (age ranging from 24 to 73, mean 45), and 6 female (age ranging from 27 to 61, mean 39). Of the 9 HRPC patients, 2 patients had 5 longitudinal blood samples, 1 had 4 samples, 3 had 2 samples, and 3 were 1 sample time points. Patients' age range was 60-81 years (mean 74), and their initial diagnosis was 2-10 years prior to the study. Serial samples from three patients who were undergoing treatment with taxol/estramustine and/or Lupron were prepared and analyzed as a longitudinal series. Patients and healthy volunteers signed an informed consent under an approved research study.

Target Cell Isolation

Blood samples were kept at room temperature and processed within 2-3 hours after collection unless otherwise indicated. 15 ml of blood were divided into 7.5 ml aliquots and transferred to disposable tubes with an internal

WO 03/035895

PCT/US02/34570

diameter of 17 mm (Fisher Scientific) and centrifuged at 800 g for 10 min with the brake off. Phosphate buffered saline (PBS) with bovine serum albumin (BSA) was added to bring the volume up to 10 ml and the sample was mixed by inversion. The Mab VU-1D9 recognizing the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is broadly reactive with tissue of epithelial cell origin and coupled to magnetic nanoparticles (ferrofluids, Immunicon, Huntingdon Valley, PA).

To increase the magnetic loading of the EpCAM-positive cells and decrease the variability in capture efficiency due to differences in the EpCAM density on the cell surface, desthiobiotin are coupled to EpCAM-labeled magnetic nanoparticles to form CA-EpCAM, as described in Applications #09/351,515 and #09/702,188, both of which are incorporated by reference herein. CA-EpCAM ferrofluid and a buffer containing streptavidin are then added to the sample to achieve this increase in the magnetic labeling of the cells. Desthiobiotin on the CA-EpCAM ferrofluid is subsequently displaced by biotin, which is contained in the permeabilization buffer described below. Thereby reversing the cross linking between the CA-EpCAM ferrofluid particles. The sample was immediately placed in a quadrupole magnetic separator for 10 min (QMS17, Immunicon). After 10 min, the tube was removed from the separator, inverted 5 times, and returned to the magnetic separator for an additional 10 min. This step was repeated once more and the tubes were returned to the separator for 20 min. After separation, the supernatant was aspirated and discarded. The tube was removed from the magnetic separator, resuspended with 3 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing bovine serum albumin (BSA), and the fraction collected from the walls of the vessel.

Two 7.5 ml aliquots from each sample were processed separately. One aliquot was prepared and analyzed by flowcytometry (EXAMPLE 12), and the RNA from the other aliquot was analyzed as described.

Nucleotide Purification and Amplification

One manner to utilize the invention in the preferred embodiment is to first purify the nucleotide sample. Here, total RNA or mRNA is isolated from the enriched cell population. Isolation can be accomplished by any means known in the art that is able to keep the mRNA intact and prevent degradation. For

WO 03/035895

PCT/US02/34570

example, the enriched circulating tumor cells from duplicate blood samples were lysed in 100 μ l of Trizol reagent (BRL) or 100 μ l of RNA Extraction Buffer (ZYMO Research) and the vortex-homogenized sample was stored at -80°C until RNA was used. Homogenates were used to isolate total RNA according to manufacturers' instructions. Briefly, total RNA was treated with DNase I. DNase activity was verified to produce no ethidium bromide gel detectable genomic DNA after DNase treatment. DNased RNA was cleaned with repeated Trizol isolation procedure. One tenth of the resultant total RNA was electrophoresed on a 1% agarose gel along total RNA mass and size standards, and then Northern blotted, hybridized with an equimolar mixture of ribosomal 18S and 28S oligos. The resultant hybrid blot was labeled with ^{32}P , phosphor imaged (Packard Cyclone) and analyzed to determine RNA integrity and mass. The remaining total RNA mass values (90%) from each sample were then designated as that sample's 7.5 ml blood donor equivalent of total RNA, 1.5% of which was calculated to be mRNA.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

EXAMPLE 9**FLOWCYTOMETRIC ANALYSIS IN PATIENTS AFTER IMMUNOMAGNETIC SELECTION**

Flowcytometric analysis of leukocytes taken from human blood was assessed for gene expression in circulating epithelial cells. Isolated cells were prepared as described then resuspended in 200 μ l permeabilization buffer containing biotin (Immunicon Corporation) to which monoclonal antibody (Mab)-fluorochrome conjugates were added at saturating conditions. The monoclonal antibodies consisted of a Phycoerythrin (PE) conjugated anti-cytokeratin monoclonal antibody (Mab C11) recognizing cytokeratins 4,6,8,10,13, and 18 (Immunicon) and peridinin chlorophyll protein (PerCP)-labeled anti-CD45 (Hle-1, BDIS, San Jose, CA). After incubating the cells with the Mab for 15 min, 2 ml of cell buffer (PBS, 1%BSA, 50 mM EDTA) was added and the cell suspension was magnetically separated for 10 min. After discarding the non-separated suspension, the collected cells were resuspended in 0.5 ml of PBS to which the nucleic acid dye used in Procount System™ was added (Procount, BDIS). In addition, 10,000 fluorescent counting beads were added to the suspension to verify the analyzed sample volume (Flow-Set Fluorospheres, Coulter, Miami, FL)

Samples were analyzed on a FACSCalibur flowcytometer equipped with a 488 nm Argon ion laser (BDIS). Data acquisition was performed with CellQuest™ (BDIS) using a threshold on the fluorescence of the nucleic acid dye. The acquisition was halted after 8000 beads or 80% of the sample was analyzed. Multiparameter data analysis was performed on the listmode data (Paint-A-Gate™, BDIS). Analysis criteria included size defined by forward light scatter, granularity defined by orthogonal light scatter. Positive staining with a nucleic acid stain and the PE-labeled Pan anticytokeratin Mab C11 (CK4, 5, 6, 8, 10, 13, and 18) combined with staining with the PerCP-labeled anti-CD45 Mab was used for differential CTC/WBC fluorescent staining and analysis. CTC's were identified by the presence of nucleic acid dye and cytokeratin antigens, coupled with the absence of CD45 staining. For each sample, the number of events present in the region, typical for epithelial cells,

WO 03/035895

PCT/US02/34570

was multiplied by 1.25 to account for the sample volume not analyzed by flowcytometry.

In healthy, non-cancer donor samples, the leukocytes carried over from the immunomagnetic selection ranged from 655 to 5,560 (median 4,350; mean 1,759). In HRPC patient samples, the leukocytes carried-over ranged from 813 to 92,000 (median 4,350; mean 12,300). Blood samples from healthy, non-cancer control group, 7 male and 6 female, showed no CTC whereas in the blood samples from HRPC showed a CTC range of 4-283 in 7.5 ml of blood.

EXAMPLE 10

QUANTITATION OF mRNA TRANSCRIPT FROM THE AMPLIFIED LIBRARY

Normalization of mRNA/aRNA mass was determined by first quantitating the total RNA mass isolated from each immunomagnetically enriched 7.5 ml blood sample volume. This was accomplished by Northern blotting 10% of each sample's total RNA, followed by 28S plus 18S radiolabeled oligo probe hybridization, and in parallel with known total RNA mass cell line standards. This was followed by phosphorimage quantitation (Cyclone, Packard Instruments). Resultant total RNA masses were defined as 1 Donor Sample Equivalent of mRNA = 1 Donor Sample Equivalent of aRNA:

$$[(\text{total RNA mass}) \times (1.5\% \text{ mRNA})]/3^* = 1 \text{ Donor Sample Equivalent aRNA}$$

* (Average molecular weight of aRNA libraries was found to be 3-fold lower than the unamplified mRNA molecular weight)

Relative gene expression levels of 0, 1, 2, 3, and 4 were assigned to unknowns based the amplified product's agarose gel kinetics curve band intensity containing the CK19 *in vitro* transcribed RNA construct (CK19-cRNA) standard of known copy numbers. This CK19-cRNA standard contained the 3'-most 800 bases of CK19 wild type mRNA sequence. Standard CK19-cRNA curves covered a 1000 fold dynamic range were run in triplicates at 20,000; 2,000; 200; 100; 50; 25; and 12.5 copies each spiked into 2 ng total RNA isolated from Percoll-derived WBC. Standard kinetics curves run for 40 cycles showed linear signal response plotting band intensity against RNA

WO 03/035895

PCT/US02/34570

copy number between 13-200 copies CK19-cRNA transcript [see Figure 13A and 13B]. The external standard curve had a maximum CV of 27% for any standard analyzed in triplicate. For multivariate gene analysis, comparisons were made to CK19 external standard curves and relative gene expression levels 0 - 4 were assigned:

0 – non-detectable

1 – approximately 25-50 copies CK19,

2 – approximately 250-500 copies CK19,

3 – approximately 2,500-5,000 copies CK19, and

4 – greater than 25,000 copies CK19.

Figure 13B shows typical banding intensities that correspond to the approximate copy number of CK19 cRNA on the standard curve, and were used to assign relative gene expression levels 1-4.

The CTC enumeration and gene transcript expression profiles were determined using 23 different PCR amplification products from Ep-CAM immunomagnetically enriched blood samples of 13 healthy donors and 9 HRPC patients. Microarrays were not effective for analyzing these types of samples due to the signal to noise incompatibility derived from the WBC which are nonspecifically carried over during the immunomagnetic enrichment process. The ratio of CTC specific signal to WBC carry-over noise in these samples ranges from 1 to 1000 CTC per 10^3 to 10^4 WBC. These microarray limitations were overcome by incorporating a 10,000 fold preamplification step using 90% of the entire mRNA library from each immunomagnetically enriched blood sample, followed by multigene RT-PCR analysis in place of the arrays. This innovation provides enough starting material for several hundred individual PCR reactions to be performed with each 7.5 ml blood sample. Thus, one is enabled to perform individual patient CTC multivariate RT-PCR profile analysis without compromising assay sensitivity or clinical sensitivity for each mRNA member of each CTC mRNA library.

After the volume normalization procedure described above, the remaining 90% total RNA from each sample was reverse transcribed (RT) using a SMART PCR cDNA synthesis kit, but using the 67 base oligo(dT) primer described above. The reaction was incubated at 42°C for 90 min. The entire 10 ul RT was transferred into a 50 ul PCR reaction using the Advantage

WO 03/035895

PCT/US02/34570

cDNA PCR kit (Clontech) and subject to PCR with the P1-SMART primer and P2-T7 18 base primer:

(5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATT-3')

using a PE-9600 and thermal cycling program; 95°C for 1 min., 10 cycles of 95°C for 15 sec., 65°C for 1 sec., 68°C for 6 min.; followed by 20 min at 72°C.

The entire PCR reaction volume was loaded on a Sephadex G-50 Quick Spin (TE) column (Roche Diagnostics) and the eluate was generated according to the manufacturer's instructions.

The eluate was vacuum concentrated to 3 ul on a Vacufuge (Eppendorf) at 60°C for approximately 30 min. T7 RNA polymerase transcript amplification reactions that produced representative libraries of aRNA were assembled using AmpliScribe kit (Epicenter Technologies) according to manufacturer's instructions in a 20 ul volume and incubated at 37°C for 6-12 hours. Repeating the Trizol isolation procedure further cleaned up the RNA transcription reaction.

RNA size standards, RNA mass standards, and one tenth of the transcription reaction products from each sample were formamide denatured at 65°C for 15 min., loaded on 2% agarose gel, run for 15 min at 5 volts/cm, and post-stained with SYBR Gold™ (Molecular Probes) for one hour prior to gel image densitometry using Alphamager™ (Alpha Innotech Corp.). The mass of each transcript library was determined.

Gene specific primers were designed as describe. All primer sets were designed to amplify specific gene target cDNA within the 3'-most 500 bases (averaging 344 bp and ranging 226-513 bp long) of each specific gene target. To avoid amplification of genomic DNA, all RNA samples were treated as described wit Dnase. Table 1 shows the primer pairs for each amplicon analyzed by relative RT-PCR. Forward primer P1 is shown as the upper sequence in the respective primer pair. Reverse primer is the lower sequence. All sequences are written 5'→3'.

Table 1: Primer Pairs

Gene	GenBank accession no.	P1 distance from 3' end	Sequence of selected primer pair	Length of Amplicon
Alpha 1-	V00491	580	AAGACCTACTTCCCGCACTT	451

WO 03/035895

PCT/US02/34570

globin			TATTTGGAGGTCAGCACGGT	
AR	NM_000044	513	ATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGAT	207
			CAGGAACATGTTTCATGACAGACTGT	
BCL2	XM_008738	440	GCAAGAGTGACAGTGGATTGCAT	330
			CTAATGGTGGCCAACTGGAGACT	
CK05	NM_000424	353	AGTCACTGCCTTCCAAGTGCAGCAA	212
			GGAACCTGAAGGCTGATTTGAAGCAG	
CK08	M34225	429	GTGGTTTGAGCTCGGCCTATGG	275
			CCAGTGCTACCCCTGCATAGCG	
CK10	NM_000421	305	GACGGTAGAGTTCTTTCATCTACGGTTG	196
			GGAACCCACAAAACACCTTGTAACACC	
CK18	NM_000224	331	ACCTTGAGTCAGAGCTGGCACAGA	275
			GCTTCTGCTGGCTTAATGCCTCAG	
CK19	NM_002276	320	CATATCCAGGCGCTGATCAGCG	228
			CAAAGGACAGCAGAAGCCCCAG	
DD3	AF103908	2160	GTAAGCCTGGGATGTGAAGCAAAGG	260
			GAACCCCTAAAGTGGCTCACAAAGAGTG	
EGFR	NM_005228	265	CCTGTAACCTGACTGGTTAACAGCAG	200
			GGCTCTGACTGATCTGGGAGTCA	
EpCam	M33011	432	GAGATGCATAGGGAACCTCAATGC	275
			ACGATGGAGTCCAAGTTCTGGAT	
ER-a	NM_000125	382	AGCAGGTGCCTGAGACACAGA	328
			TCGAGCATCCCGCTGGATTCTT	
ER-b	NM_001437	323	GGAAGCTGGCTCATTGCTGAA	232
			GAAGCACGTGGGCATTGAGCAT	
Her2Neu	M11730	426	TCGTTGGAAGGGAACAGCACTG	266
			AGCCTGGATACTGACACCATTGC	
HK2	XM_008996	334	CACACCATGCAGGATGACAT	190
			GCATTCCACAAGTTCTCAG	
MDR1	AF016535	263	AGTGTCAGGCTGGAACAAAG	215
			CTCCACTTGATGATGTCTCTCAC	
MGB1	XM_006409	408	CTCCCAGCACTGCTACGCAGGC	340
			GACATAAGAAAGAGAAGGTGTGGT	
MGB2	NM_002407	420	CTCCTCCTGCACTGCTATGCAGAT	264
			ACACCAAATGCTGTCTGTAACCTGTATGCA	
Mic1	AF019770	352	CTACAATCCCATGGTGCTCA	289
			ACACAGTTCCATCAGACCAG	
MMP2	NM_004530	332	ACTGCTGGCTGCCTTAGAACCTT	216
			GAGAAGAGACTCGGTAGGGACAT	
MMP9	NM_004994	327	CGTCTTCCAGTACCGAGAGAAAG	215
			TGTATCCGGCAAACCTGGCTCCTT	
MRP	L05628	328	GGTGATCGTCTTGGACAAAGGAG	300

WO 03/035895

PCT/US02/34570

			TCTTCACAGCCAGTTCCAGGCAG	
MUC1	J05582	361	AACGGTGGCAGCAGCCTCTCTTA	238
			GCTTCACACACTGAGAAGTGCCG	
NKX3A	NM_006167	284	GGAAGTTCAGCCATCAGAAGTAC	246
			GGTATGGGTAGTAAGGATAG	
p53	AF307851	334	CTGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCT	243
			GTGGGGTGAAAAATGCAGATGTGC	
PIP	J03460	226	CAGAACTGTGCAAATTGCAGCCGTC	201
			AGACCACAGCAGAAATTCAGCCAAG	
PSA	M26663	236	TGAAGCACTGAGCAGAAGCTGGA	236
			GAGGGTTGTCTGGAGGACTTCAA	
PSGR	AF311306	425	ACACCGCTTTGGAAACAGCCTTCATC	281
			GTACTGATGTGCTTATGGGCAACTGG	
PSM	M99487	459	AGTTCAGTGAGAGACTCCAGGAC	286
			CTGCACTGTGAAGGCTGCAACAT	
TERT	NM_003219	347	AGCACACCTGCCGTCTTCACTT	234
			GGCACACCTTTGGTCACTCCAA	
Timp1	NM_003254	302	CCAAGACCTACACTGTTGGCTGT	240
			ACTGTGCAGGCTTCAGTTCCACT	
Timp2	NM_003255	325	TGGGCTGCGAGTGCAAGATCAC	219
			CTGCTTATGGGTCTCGATGTC	
Topo2a	NM_001067	356	GCCATCCACTTCTGATGATTCTG	244
			ACCACTCTTGGGCTTGGTAAGA	
Topo2b	NM_001068	366	AAGCCCAAGAGAGCCCCAAAAC	279
			TGGCAGAGAAGGTGGCTCAGTA	
TROP2	X77753	334	TGTTGCTACTGTGGTGTCCCAAG	245
			CTGGGATTCAAAGGAGGTACAGCTC	
uPA	NM_002658	387	TGGGCTGTGAGTGAAGTGTGAG	285
			CACCCAGTGAGGATTGGATGAAC	

Reverse transcription (RT) was performed on 25 nanograms of the T7 preamplified aRNA library using random 9 mer 50 ng, 1 ul Superscript™ (BRL) according to manufacturer's instructions. The RT was incubated at 25°C for 10 min, 37°C for 10 min, 42°C for 20 min, 50°C for 60 min. Ten donor equivalents per sample of aRNA (ranging 50-1300 pg) were used in each subsequent 50 ul PCR reaction containing 1 unit of platinum taq (BRL). Individual PCR curves were generated from each single PCR reaction tube by aliquoting 15 ul at 31, 35, and 40 cycles during the thermal cycling program: 95°C for 1 min, and 31,35, and 40 cycles of 95°C for 1 sec, 65°C for 1 sec,

WO 03/035895

PCT/US02/34570

72°C for 1 min; followed by 20 min at 72°C using PE-9600 thermocycler (or thermocycler??). Each amplicon within each PCR batch included a cell line cDNA amplification positive control, and a master mixed PCR reagent amplification negative control that contained all components except for the cDNA sample. All RT-PCR results were analyzed on a 2% agarose gel containing ethidium bromide in parallel with BRL low mass molecular weight and spot densitometry analysis with AlphaEase™ software version 5.04.

The gene survey goal was to identify mRNA expression profiles in CTC with the highest clinical specificity and sensitivity for detecting epithelial cells. First, gene expression levels found in the WBC was evaluated from enrichment of healthy donors. The selection of gene candidates was based on known literature data that showed broad epithelial specific expression levels. Identification of candidates that were negative in WBC would enable CTC profiling for categorizations/characterization on three basic histological levels, epithelial origin (Figure 14A), tumor/organ of origin (Figure 14B), and tumor therapeutic target characterization (Figure 14C).

RT-PCR profiling was conducted on all samples according to the amplicon sets in Figure 14A, 14B, and 14C. Figure 14A shows epithelial marker CK19 is 100% specific in the system of the present invention for HRPC samples, where 0/13 healthy donors were CK19 positive compared to 18/23 (78%). HRPC patient samples scored CK19 positive. CD5 and TROP2 are also 100% specific. However, their poor sensitivity of 1/23 (4%) and 2/23 (9%) respectively may not add sufficient profile value to justify their use. Of the genes that are not 100% specific (EpCAM, Muc-1, and MIC-1), a WBC background threshold can be applied between levels 1 and 2, above which all patient derived signals greater than one can be considered true positives. When profiling for maximum epithelial sensitivity with this set of genes, the combination of CK19, EpCAM, and Muc-1 sensitivity, 23/23 (100%) patient samples scored epithelial-positive. Since all blood samples yield a carry-over of WBC due to a low non-specific binding from the ferrofluid enrichment process, a WBC specific gene (F6=alpha 1-globin gene) was employed as the overall system positive control for RNA processing and amplification. All 36 samples scored greater than level 4 (see Figure 14A).

EXAMPLE 11**ASSESSING THE REPRODUCIBILITY IN THE LOWER LIMIT SENSITIVITY OF PREAMPLIFICATION**

To evaluate the reproducible lower limit sensitivity performance of the modified T7 transcript preprocessing amplification procedure, a model system was constructed incorporating all the manipulations performed on the clinical RNA samples. Total RNA from breast and prostate cancer cell lines SKBR-3 and LNCaP (America Type Culture Collection, Manassas, VA) were isolated using Trizol reagent (Life Technologies Inc.) according to manufacturer's instructions. Before first strand synthesis serial dilutions were made corresponding to 2, 0.2, 0.02 SKBR-3 cell equivalents, each dilution was spiked into 2 ng of total RNA from Percoll-derived WBC. RT-PCR external CK19 standard curve determination was run in parallel with SKBR-3 dilution curve, resulting in about 1,000 wild type CK19 mRNA copies present per SKBR-3 cell equivalent. The CK19 characterized SKBR-3 dilution curve was used as one of two types of specific transcripts to model the lower limit sensitivity and reproducibility of the total process of this T7-based mRNA library amplification system. The second transcript was an exogenous Lambda DNA based construct (Walker Biotech Publication) producing a 1.2 kb polyA(30) transcript. The curve for WBC's spiked with SKBR-3 cells was assayed in triplicate at each of the 2000, 200 and 20 CK19 mRNA copy levels. Lambda curves were spiked in triplicate into 2 ng total RNA from Percoll-derived WBC at the 500, 50, and 5 copy levels. In the final analysis, reproducible RT-PCR amplification was achieved from the 50 copy and greater levels (N=12) where individual samples were run through the entire T7-transcript preamplification each of which resulted in measurable signals. Furthermore, this lower limit of detection, starting with only 50 mRNA transcripts of any one sequence, was reproduced in a subsequent cell line spike model where all six sequence types (PSA, PSM, AR, HPN CK19 and EpCam) were serially diluted to known copy levels prior to aRNA and quantitative RT-PCR analysis (Example 6).

After RT-PCR, molecular weight and spot densitometry gel analysis was performed with an Alphamager on aliquots from the 31, 35, and 40 cycle

WO 03/035895

PCT/US02/34570

kinetics curves. A CV of 19.25% was calculated from 11 of the 12 spike levels (92%). Only one of the 200 copy samples (8%) had an intensity of 14 fold less than expected, but this sample was still qualitatively detectable, and was assigned as a level 1.

In a separate study, the effect of the T7 preamplification method of the present invention on relative mRNA abundance was modeled by comparison to identically prepared non-amplified libraries. No significant differences in band intensity ratios for N=8 genes (PSA, PSM, MGB1, MGB2, PIP, CK8, CK19, and EpCAM) were detected when starting with 15 cell equivalents of prostate cancer cell line LNCaP plus 15 cell equivalents of breast cancer cell line SKBR-3 spiked into 1000 cell equivalents of WBC total RNA (2 ng) followed by the T7 preamplification method and subsequent multigene RT-PCR kinetic curve analyses, as shown in Figure 13C. cDNA template negative amplification controls run in parallel with each batch showed no detectable signals during these studies.

Total RNA libraries were proportionately amplified using one round of the modified T7 method of the present invention yielding aRNA libraries with an average increase above the original mRNA mass of 10,000 fold. This is based on the original mRNA level estimation of 1.5% of the determined total RNA mass. The transcript amplification process resulted in libraries with a medium transcript length of 600 bases, which range between 550-800 bases. Individual transcript sizes within each library ranged from 300-3000 bases. Individual aRNA libraries were randomly primed for RT, from which a multigene panel of individual PCR reactions was performed using 10 donor equivalents of aRNA/cDNA.

Total RNA quantities from carried-over WBC's in healthy non-cancer samples ranged from 0.8-11.12 ng (mean 3.5 ng). Total RNA quantities from HRPC patient samples ranged from 0.8-35.12 ng (mean 7.2 ng). All total RNA samples subsequently produced aRNA libraries of masses directly proportional to the starting total RNA values.

A Northern blot of 10% of each sample's total RNA was hybridized with 28S plus 18S radiolabeled oligo probes in parallel with a known mass of total RNA from cell line standards which was followed by phosphorimage for quantity and quality determinations. Quality was assessed by ratio of 28S

WO 03/035895

PCT/US02/34570

over 18S quantities where SKBR-3 cell line standard was averaged 1.55 (range 1.50-1.64), for the enriched samples, 13 healthy donors averaged 1.36 (range 1.16-1.60), HRPC averaged of 1.10 (ranged 0.57-1.80).

In addition, we observed that 80% of ferrofluid enriched CTC/WBC samples from HRPC patients had 6x less total RNA mass than expected (ranging 1.5 to 15 fold). These expectations were based on the WBC average total RNA mass = 2 pg per cell and the average epithelial cell total RNA mass = 20 pg per cell. This may be meaningful in assessing diagnostic and therapeutic status of individuals, especially during the course of treatments.

EXAMPLE 12**VERIFICATION OF CTC TUMOR TISSUE OF ORIGIN AND PATIENT SPECIFIC THERAPEUTIC PROFILE CHARACTERIZATION USING TISSUE SPECIFIC GENES**

The 36 samples were further profiled with N=8 amplicons to determine the optimum specificity and sensitivity expression profile for identification of a circulating epithelial tumor cell's organ of origin. For prostate specific identification we evaluated PSA, PSM, HK2, HPN, PSGR, DD3, MGB1 and MGB2 (see Figure 14B). None of these amplicons showed any signal from the WBC group except for one outlier female #3 with Hepsin (HPN). As shown in Figure 14B, PSA is the most sensitive for this prostate group with 20/23 (89%) samples scoring positive, followed by PSM 17/23 (74%), HPM 13/23 (57%), HK2 7/23 (30%), PSGR 2/23 (9%), and DD3 1/23 (4%). Unexpectedly, both "breast specific" genes, mamaglobin 1 and 2, scored strong signal level positives MBG1 1/23 (4%) and MBG2 2/23 (9%) in the prostate, but not in the healthy donor population. Combining the two and highest sensitivity markers PSA and PSM yields a sensitivity of 20/23 (87%). With the addition of HPN, the sensitivity increases to 21/23 (91%). Hepsin and PSM are two markers, which are also central to therapeutic strategies since they are both tissue specific and transmembrane enabling specific cell targeted delivery strategies.

Individual patient characterizations of potential therapeutic profile base on CTC RNA profiling was conducted and the results are show in Figure 14C. Here individual specificity scores in this sample set showed AR, NKX3A, EGFR, and ER were all 100%. MDR1, MRP, and Topo2a all suffered from significant background signals from the WBC group. The sensitivity of AR for detecting HRPC CTC was 16/23 (70%) followed by NKX3A 4/23 (17%), Topo2a 5/23 (22%), MDR1 5/23 (22%), EGFR 4/23 (17%), and ER 1/23 (4%). Unexpectedly, MDR and MRP did not appear useful in stratifying these two groups.

Longitudinal samples were drawn over the course of 18-26 weeks from three patients. One patient was treated with Lupron alone and two with

WO 03/035895

PCT/US02/34570

Lupron combined with Taxane/Estramustine. Serial samples showed changes in the expression of therapeutic sensitivity/resistance associated genes, whereas others remained unchanged. These changes were independent of CTC and leukocyte counts, as shown in Figure 15A, 15B, and 15C. For the patient treated with Lupron alone, which had 4 longitudinal samples drawn at 0, 5, 10, and 18 weeks, MDR1 was not detectable (Figure 15A), and AR remained relatively constant while Hsp90 fluctuated. Figure 15B and 15C further showed a consistent reduction of MDR1 mRNA levels relative to healthy donors during the course of TX/ES treatment. AR expression levels, which play a central role in the development of HRPc, were completely eliminated during TX/ES treatment as shown in Figure 15B. In contrast, Figure 15C showed AR relatively unaffected during a similar course of treatment. A dramatic change was detected in Hsp90 mRNA from high expression levels for untreated to complete elimination during the TX/ES treatment of both patients in Figure 15B and 15C.

EXAMPLE 13

PROFILING DISEASE STATUS WITH PLASMA-DERIVED (NON-CTC) RNA FROM THE SAME SAMPLE PROVIDING CTC-COMPLEMENTARY DATA

Heretofore, methods have been described for analyzing mRNA derived from CTC that are enriched from blood samples. An important step of this method is the T7 pre-amplification step, which allows the analysis of just a few copies of the transcript with up to 1000 different individual gene specific RT-PCR reactions. T7 pre-amplification of representative mRNA libraries effectively removes the major restriction of limited sample mRNA mass. This same pre-amplification can be applied to non-CTC RNA. Indeed, there are numerous sources of RNA in a given blood sample, and some of these non-CTC RNA transcripts will provide valuable information.

Confirmation of CTC presence and determination of tumor tissue of origin, as well as comprehensive characterization of disease mechanisms can be achieved using RNA derived from the plasma blood fraction obtained during the ferrofluid enrichment process. Preferably, this would be coupled with the T7 pre-amplification process described in the above examples for enriched

WO 03/035895

PCT/US02/34570

CTC. The ferrofluid enrichment process initially separates out the blood plasma fraction of each sample. Typically, this fraction has been discarded as the CTC are enriched.

However, plasma- and serum- derived mRNA and DNA have recently been shown in the literature to provide valuable cancer expression (phenotype) and genotype (DNA analysis) data. Plasma-derived mRNA and DNA are isolated by traditional molecular biology methods for downstream analysis. Since mRNA is readily available from plasma, and has been demonstrated to provide valuable RT-PCR data, these same RNA transcripts can be more comprehensively profiled using the modified T7 amplification procedure describe herein. Thus, CTC-independent and/or CTC-complimentary mRNA expression profiles can be generated with the same profiling procedures for CTC by using the RNA from the plasma-derived fraction of each sample.

Furthermore, the T7 based expression profiling approach can be applied to the above described enrichment process, allowing analysis of the CTC-depleted fraction can be useful for differentiating the contributions of the WBC expression profile, which is non-specifically carried over during enrichment, and the contributions form the CTC-specific profile. This can be accomplished by differential pattern comparison and subsequent subtractions, providing an additional mechanism for correctly identifying CTC during analysis. In addition, the CTC-depleted profiles themselves will provide valuable patient-specific information regarding response and sensitivities to particular therapies.

It will be appreciated to those skilled in the art to which this invention relates that the invention is not limited to the descriptions and discussion of preferred embodiments disclosed herein, but that many modifications and variations of the procedures specifically described herein can be accomplished without departing from the spirit and scope of the invention, which is defined solely by the following claims.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

What is claimed is:

1. A method of diagnosing the severity of a disease in a test subject, which method comprises:
 - a. obtaining from the blood of a test subject suspected of having cancer, a sample comprising a mixed cell population suspected of containing cancer cells of epithelial origin;
 - b. mixing said sample with immunomagnetic particles which bind specifically to said cancer cells, to the substantial exclusion of other sample components;
 - c. subjecting the sample-immunomagnetic particle mixture to a high gradient magnetic field to produce a separated cell fraction enriched in magnetic particle-bound cancer cells; and
 - d. assaying said enriched fraction for the presence of said cancer cells, the presence of said cancer cells in said sample indicative of cancer.
2. The method as claimed in claim 1, wherein said test subject is for assessment of a presence of circulating cancer cells.
3. The method as claimed in claim 1, wherein said test subject response to cancer eradication procedures is assessed by said presence of circulating cancer cells.
4. The method as claimed in claim 1, wherein said test subject has been diagnosed with a cancer selected from the group consisting of prostate cancer, breast cancer, colon cancer, apudoma, choristoma, branchioma, malignant carcinoid syndrome, carcinoid heart disease, carcinoma e.g., Walker, basal cell, basosquamous, Brown-Pearce, ductal, Ehrlich tumor, in situ, Krebs 2, merkel cell, mucinous, non-small cell lung, oat cell, papillary, scirrhous, bronchiolar, bronchogenic squamous cell, and transitional cell reticuloendotheliosis, melanoma, chondroblastoma, chondroma, chondrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, giant cell tumors, histiocytoma, lipoma, liposarcoma,

WO 03/035895

PCT/US02/34570

mesothelioma, myxoma, myxosarcoma, osteoma, osteosarcoma, Ewing's sarcoma, synovioma, adenofibroma, adenolymphoma, carcinosarcoma, chordoma, mesenchymoma, mesonephroma, myosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, trophoblastic tumor, adenocarcinoma, adenoma, cholangioma, cholesteatoma, cylindroma, cystadenocarcinoma, cystadenoma, granulose cell tumor, gynandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, islet cell tumor, leydig cell tumor, papilloma, sertoli cell tumor, theca cell tumor, leiomyoma, leiomyosarcoma, myoblastoma, myoma, myosarcoma, rhabdomyoma, rhabdomyosarcoma, ependymoma, ganglioneuroma, glioma, medulloblastoma, meningioma, neurilemmoma, neuroblastoma, neuroepithelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma, nonchromaffin, anti-keratoma, angioma sclerosing, angiomatosis, glomangioma, hemangioendothelioma, hemangioma, hemangiopericytoma, hemangiosarcoma, lymphangioma, lymphangiomyoma, lymphangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, chondrosarcoma, cystosarcoma, phyllodes, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomyosarcoma, leukosarcoma, liposarcoma, lymphangiosarcoma, myosarcoma, myxosarcoma, ovarian carcinoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma (Kaposi's, and mast-cell), neoplasms (e.g., bone, digestive system, liver, pancreatic, pituitary, testicular, orbital, head and neck, central nervous system, acoustic, pelvic, respiratory tract, and urogenital), neurobromatosis, and cervical dysplasia.

5. The method as claimed in claim 1, wherein said assaying said enriched fraction for the presence of said cancer cells comprises:
 - a. releasing cytoplasmic biomolecules from said cancer cells;
 - b. isolating said cytoplasmic biomolecules; and
 - c. analyzing said cytoplasmic biomolecules.
6. The method as claimed in claim 1, wherein said obtaining said fluid sample is by cell fractionation.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

7. The method according to claim 5, wherein said releasing is accomplished by an addition of a permeabilizing agent.
8. The method according to claim 7, wherein said permeabilizing agent is selected from the group consisting of a detergent, surfactant, and combinations thereof.
9. The method according to claim 7, wherein said permeabilizing agent is selected from the group consisting of saponin, Immuniperm, and combinations thereof.
10. The method according to claim 7, wherein said permeabilizing agent is Immuniperm.
11. The method according to claim 1, wherein said obtaining said fluid sample is by treatment with cell stabilizing agent.
12. The method according to claim 11, wherein said stabilizing agent is selected from the group consisting of aldehydes, urea, and combinations thereof.
13. The method according to claim 12, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of formaldehyde, paraformaldehyde, and combinations thereof.
14. The method according to claim 11, wherein said stabilizing agent is a dialdehyde.
15. The method according to claim 14, wherein said dialdehyde is selected from the group consisting of glutaraldehyde, glyoxal, and combinations thereof.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

16. The method according to claim 11, wherein said stabilizing agent is selected from the group consisting of Cyto-chex™, Stabilocyte™, and Transfix™.
17. The method according to claim 11, wherein said releasing of said cytoplasmic biomolecules involves macromolecular complexes formed by exposure to said stabilizing agent.
18. The method according to claim 17, wherein said releasing said cytoplasmic biomolecules from said cells occurs with enzymatic digestion.
19. The method according to claim 18, wherein said enzymatic digestion occurs through a group consisting of proteinases, nucleophiles, and combinations thereof.
20. The method according to claim 19, wherein said proteinases are selected from the group consisting of proteinase K digestion, V8 proteinase digestion, pronase digestion, and combinations thereof.
21. The method according to claim 19, wherein said nucleophiles are selected from the group consisting of phosphate-based buffers, tris-based buffers, acetic hydrazide, hydroxylamine, and combinations thereof.
22. The method according to claim 5, wherein said cytoplasmic biomolecules are proteins.
23. The method according to claim 22, wherein said isolating said proteins is selected from the group consisting of chemical extractions, electrophoresis, chromatography, immunoseparations and affinity techniques.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

24. The method according to claim 5, wherein said cytoplasmic biomolecules are nucleic acids.

25. The method according to claim 24, wherein said nucleic acids are selected from the group consisting of cytoplasmic RNA, nuclear and mitochondrial RNA, nuclear and mitochondrial DNA, and combinations thereof.

26. The method according to claim 24, wherein said nucleic acids are cytoplasmic mRNA.

27. The method according to claim 24, wherein said isolating of said nucleic acids is selected from the group consisting of RNA or DNA chemical extractions, electrophoresis, chromatography, immunoseparations and affinity techniques.

28. The method according to claim 24, wherein said isolating of said nucleic acids is by capture with magnetic beads affixed to oligo(dT).

29. The method according to claim 5, wherein said target cells are assessed for phenotypic expression other than with said cytoplasmic biomolecules after said obtaining said fluid sample.

30. The method according to claim 29, wherein said phenotypic expression is selected from the group consisting of morphological examining, cell component staining, immunoanalyzing, and combinations thereof.

31. The method according to claim 1, wherein said assaying is by a process selected from the group consisting of multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

32.The method according to claim 5, wherein said analysis of said cytoplasmic biomolecules is by functional proteomics.

33.The method according to claim 32, wherein said functional proteomics is selected from the group consisting of protein expression profile, Western blot, amino acid sequence analysis, electrophoresis, 2-D electrophoresis, mass spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography nuclear magnetic resonance, infrared, atomic adsorption, and combinations thereof.

34.The method according to claim 5, wherein said analyzing said cytoplasmic biomolecules is by functional genomics.

35.The method according to claim 34, wherein said functional genomics is selected from the group consisting of mRNA profile analysis, protein expression profile analysis, polymerase chain reaction, Northern blot, Western blot, Nucleotide or amino acid sequence analysis, gene expression on a microarray, electrophoresis, 2-D electrophoresis, mass spectrometry, gas chromatography, liquid chromatography nuclear magnetic resonance, infrared, and atomic adsorption.

36.The method according to claim 5, wherein said analyzing said cytoplasmic RNA for the presence of at least two genetic markers is by multigene RT-PCR.

37.The method according to claim 5, wherein said genetic markers identify a tissue of origin of said cancer cells.

38.The method according to claim 5, wherein said genetic markers diagnose known cancers.

39.The method according to claim 5, wherein said genetic markers define cancers selected from the group consisting of breast, prostate, lung, colon, ovary, kidney, and bladder.

40. The method according to claim 5, wherein said genetic markers define cancers selected from the group consisting of MGB1, MGB2, PIP, CEA, PSA, PSMA, hK2, AR, DD3, Her-/Neu, BCL2, EGFR, TS, DPYD, IGF2, ER, PR, cyp19, TERT, general epithelial tissue specific genes, CK19, CK8, CK20, EpCAM, MUC1, topoisomerases, uPA, uPAR, MMP, general white blood cell specific mRNA, alpha-1-globin, CD16, CD45, and CD31.

41. The method according to claim 5, wherein said analyzing said cytoplasmic RNA for said genetic markers comprises:

- a. reverse transcribing said genetic markers with at least one set of gene specific primers all of which have a universal primer extension on the 5' terminus;
- b. removing said gene specific primers;
- c. amplifying a gene specific amplicon with said universal primer extensions in a PCR amplification; and
- d. identifying said gene specific amplicon.

42. The method according to claim 41, wherein said removing of said gene specific primers is accomplished using a group consisting of molecular size exclusion, solid support selective attachment, single strand specific DNase, and incorporating uracil-N-glycosylase with DNA oligonucleotide primers synthesized with deoxyUridine.

43. The method according to claim 41, wherein said removing of said gene specific primers is accomplished with uracil-N-glycosylase treatment of DNA oligonucleotide primers synthesized with deoxyUridine.

44. The method according to claim 43, wherein said uracil-N-glycosylase treatment is followed by incorporation of DNase-free RNases.

45. The method according to claim 41, wherein said gene specific primers are used under conditions of high primer-target annealing specificity.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

46. The method according to claim 45, wherein said high primer-target annealing specificity is achieved with proteins from natural recombination cellular repair mechanisms.

47. The method according to claim 46, wherein said high primer-target annealing specificity is achieved with recA.

48. The method according to claim 41, wherein said identifying said gene specific amplicon is by its unique Rf value in size-based analysis systems.

49. The method according to claim 49, wherein said size-based analysis systems are selected from the group consisting of PAGE, agarose gel electrophoresis, capillary gel electrophoresis, SELDI, MALDI, and cDNA arrays.

50. The method according to claim 5, wherein said analyzing comprises:

- a. preamplifying said nucleic acids extracted by linear amplification wherein said preamplifying results in at least 1000 fold increase in all library transcripts in the form of aRNA;
- b. synthesizing a second strand from said aRNA only for up to 1000 independent selected genes of interest; and
- c. recognizing an amplified product using a group consisting of array analysis, electrophoresis, and combinations thereof.

51. The method according to claim 50, wherein said preamplifying is by a group consisting of SP6 RNA polymerase promoter, T3 RNA polymerase promoter, and T7 RNA polymerase promoter.

52. The method according to claim 50, wherein said preamplifying is with RNA polymerase using random primers.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

53.The method according to claim 50, wherein said synthesizing of said second strand is under conditions of high primer-target annealing specificity.

54.The method according to claim 53, wherein said high primer-target annealing specificity is achieved with proteins from natural recombination cellular repair mechanisms.

55.The method according to claim 54, wherein said high primer-target annealing specificity is achieved with recA.

56.The method according to claim 50, wherein said recognizing is by pretreatment with DNase-free RNases.

57.The method according to claim 56, wherein said pretreatment is selected from the group consisting of phenol extraction, silica binding, and combinations thereof.

58.The method according to claim 50, wherein said recognizing is by amplification of all double-stranded products.

59. The method according to claim 50, wherein said recognizing is selected from the group consisting of array analysis, electrophoresis, and combinations thereof.

60. A test kit for screening a patient sample for the presence of circulating cancer cells comprising:

- a. immunomagnetic particles, wherein said particles bind specifically to cancer cells;
- b. cell permeabilizing agents;
- c. cell stabilizing agents;
- d. nucleic acid releasing agents;
- e. nucleic acid amplification agents;

WO 03/035895

PCT/US02/34570

- f. purifying agents wherein said purifying agents select for double-stranded products;
- g. nucleotide specific detecting agents wherein said detecting agents enable confirmation of double-stranded products; and
- h. a protocol for using the method of claim 1.

61. The kit as claimed in claim 60, wherein said kit further containing immunomagnetic particles having binding specificity for said cancer cells.

62. The kit as claimed in claim 60, wherein said cell permeabilizing agent is selected from the group consisting of saponin, detergents, surfactants and combinations thereof.

63. The kit as claimed in claim 60, wherein said permeabilizing agent is Immuniperm.

64. The kit as claimed in claim 60, wherein said stabilizing agent is selected from the group consisting of aldehydes, dialdehydes, urea and combinations thereof.

65. The kit as claimed in claim 60, wherein said stabilizing agent is selected from the group consisting of Cyto-chex™, Stabilocyte™, and Transfix™.

66. The kit as claimed in claim 60, wherein said releasing agent is selected from the group consisting of proteinases, nucleophiles, and combinations thereof.

67. The kit as claimed in claim 66, wherein said proteinase is selected from the group consisting of proteinase K, V8 proteinase, pronase, and combinations thereof.

WO 03/035895

PCT/US02/34570

68. The kit as claimed in claim 66, wherein said nucleophile is selected from the group consisting of phosphate-based buffers, tris-based buffers, acetic hydrazide, hydroxylamine, and combinations thereof.

69. The kit as claimed in claim 60, wherein said purifying agents are immunomagnetic particles having binding specificity for said nucleic acids.

70. The kit as claimed in claim 60, wherein said purifying agents are selected from the group consisting of RNA or DNA chemical extracting agents, electrophoresis agents, chromatography agents, immunoseparation agents and nucleotide affinity agents.

71. The kit as claimed in claim 60, wherein said amplifying agents are selected from the group consisting of SP6 RNA polymerase/promoter, T3 RNA polymerase/promoter, and T7 RNA polymerase/promoter, said amplifying agent increases the nucleic acid content 1000 fold.

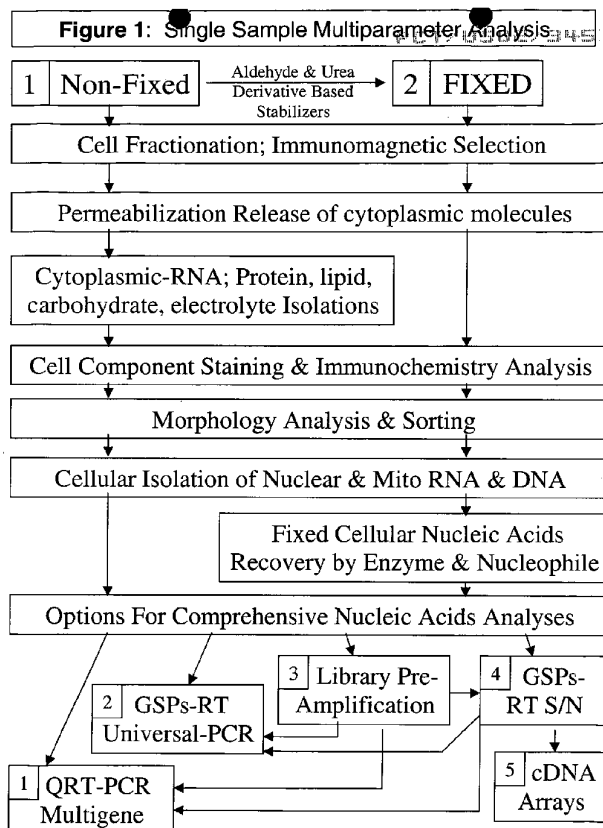
72. The kit as claimed in claim 60, wherein said amplifying agent is RNA polymerase/random primers, said amplifying agent increases the nucleic acid content 1000 fold.

73. The kit as claimed in claim 60, wherein said amplifying agents are polymerase/primers with high primer-target annealing specificity.

74. The kit as claimed in claim 60, wherein said purifying agents are DNase-free Rnases.

75. The kit as claimed in claim 60, wherein said purifying agents are selected from the group consisting of phenol extraction agents and silica binding agents.

76. The kit as claimed in claim 60, wherein said nucleotide specific detecting agents are selected from the group consisting of double-



Note: all steps are optional and can be run in sequential combinations.

WO 03/035895

2/27

PCT/US02/34570

Figure 2

Kinetics of Total RNA Release from SKBR Cells via
Immuniperm (Saponin) Permeabilization

Time Course in Minutes of 1600 SKBR cells/lane

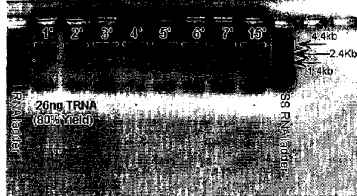


Figure 3

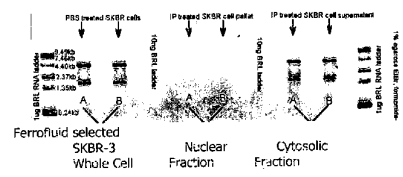
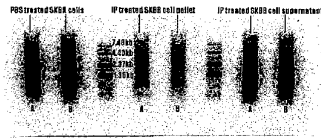


Figure 4

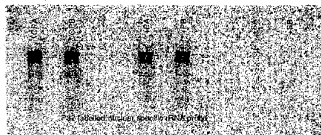


WO 03/035895

5/27

PCT/US02/34570

Figure 5

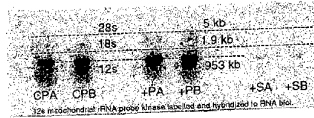


WO 03/035895

6/27

PCT/US02/34570

Figure 6

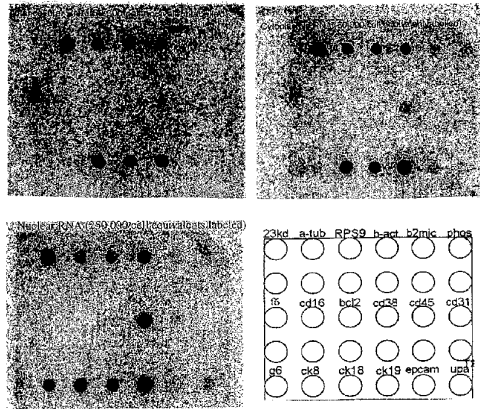


WO 03/035895

7/27

PCT/US02/34570

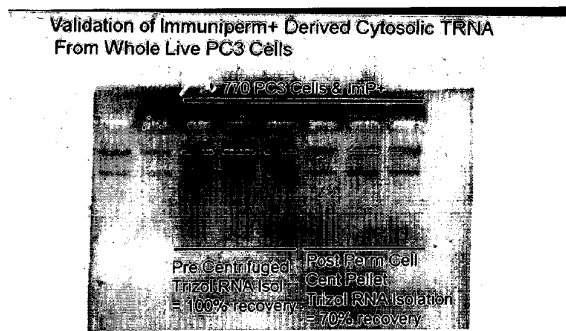
Figure 7



WO 03/035895

8/27

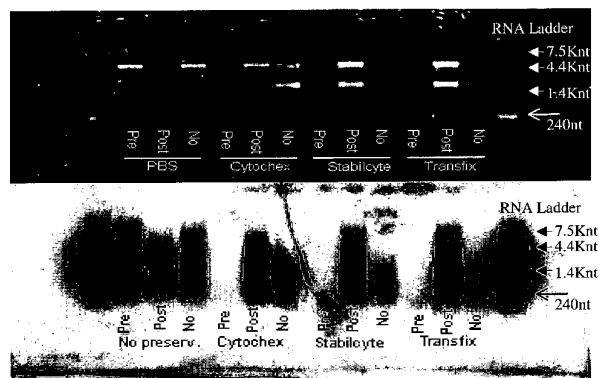
PCT/US02/34570

Figure 8

WO 03/035895

9/27

PCT/US02/34570

Figure 9

WO 03/035895

10/27

PCT/US02/34570

Figure 10A

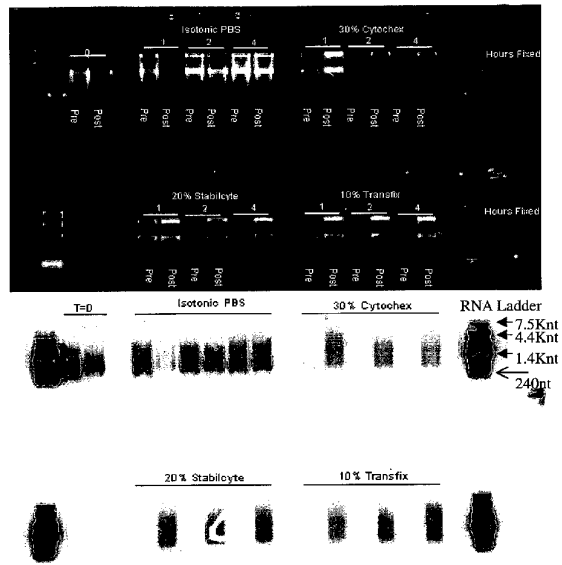
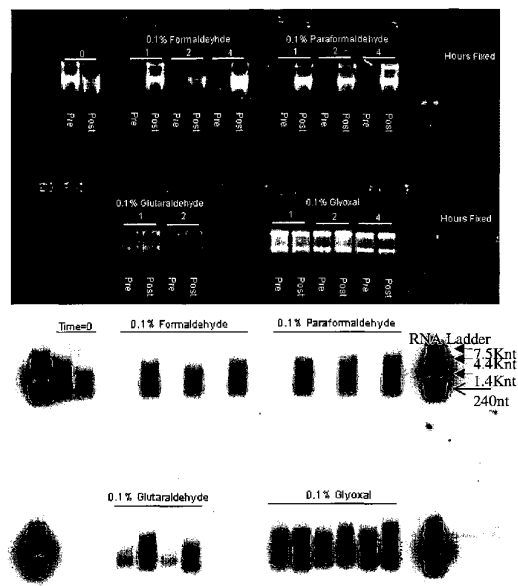


Figure 10B



WO 03/035895

12/27

PCT/US02/34570

Figure 10C

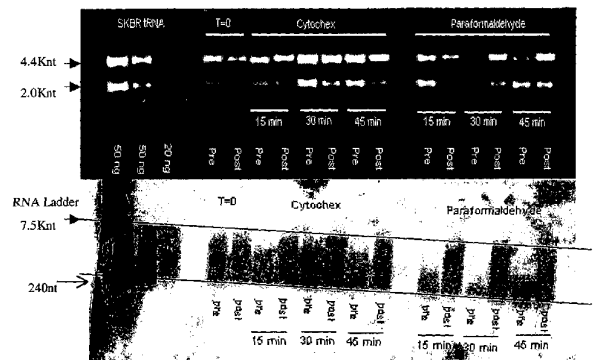


Figure 11

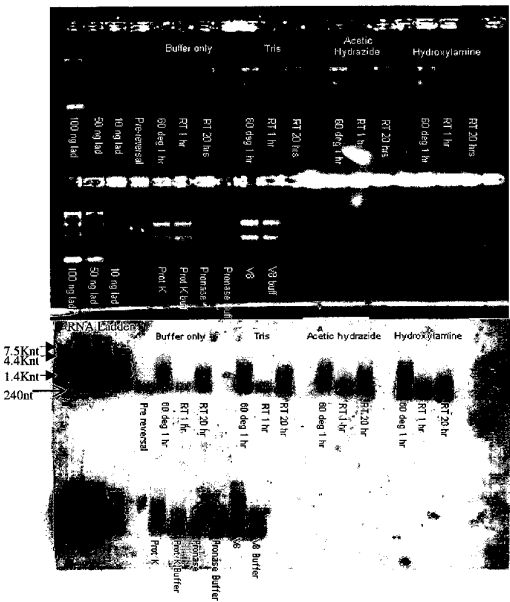


Figure 12A

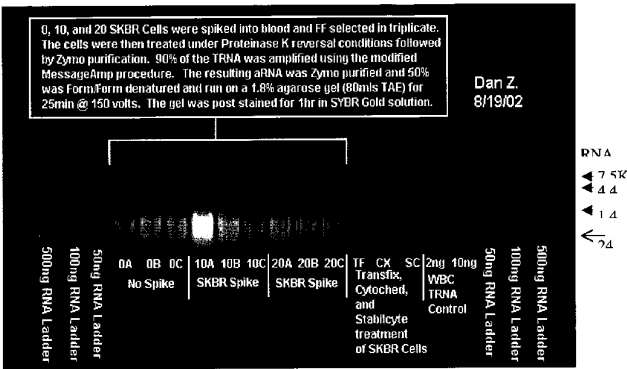
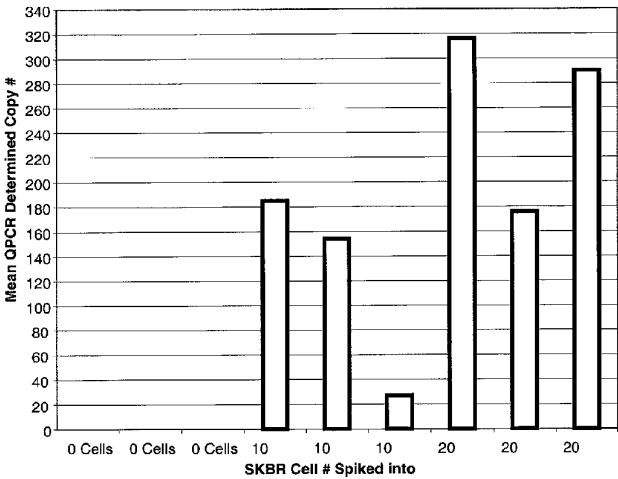


Figure 12B

CK19-QPCR from SKBR Cell Spike, FF Selection, Cytochex Treatment, Proteinase Reversal



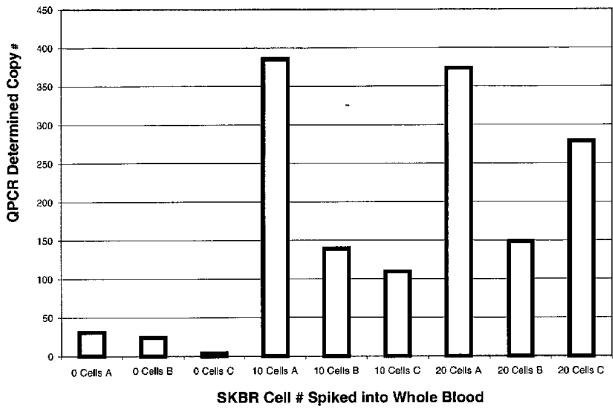
WO 03/035895

16/27

PCT/US02/34570

Figure 12C

EpCAM-QPCR from SKBR Cell Spike, FF Selection, Cytochex Treatment, Proteinase Reversal



WO 03/035895

17/27

PCT/US02/34570

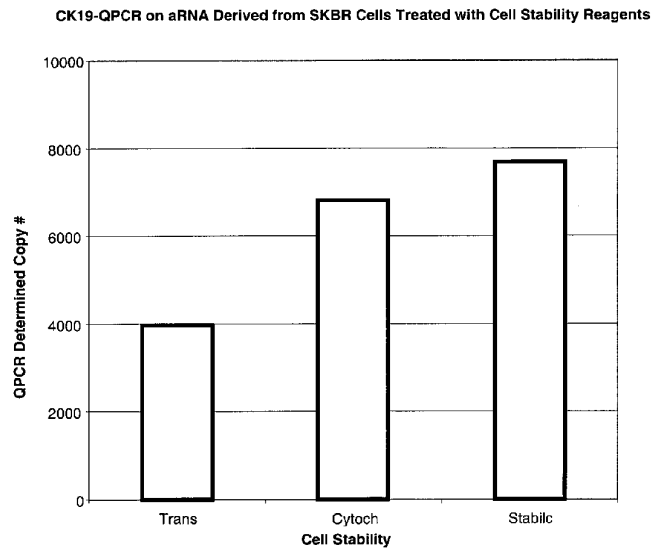
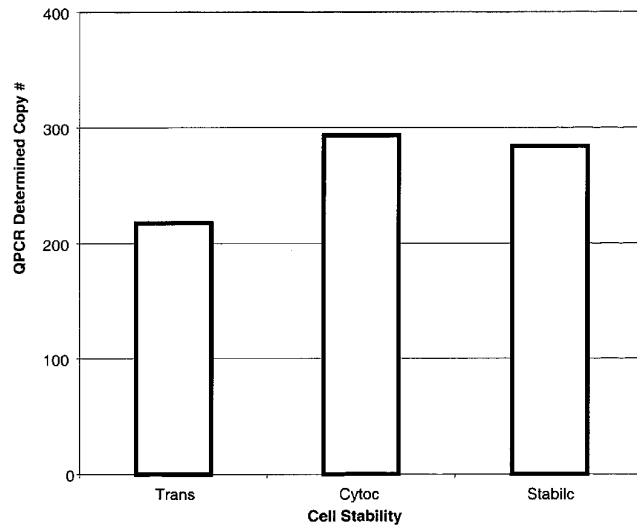
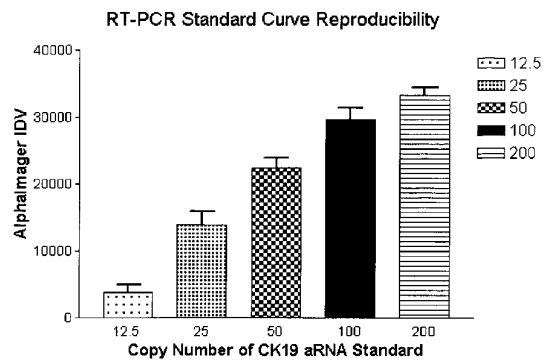
Figure 12D

Figure 12E**EpCAM-QPCR on aRNA Derived from SKBR Cells Treated with Cell Stability Reagents**

WO 03/035895

19/27

PCT/US02/34570

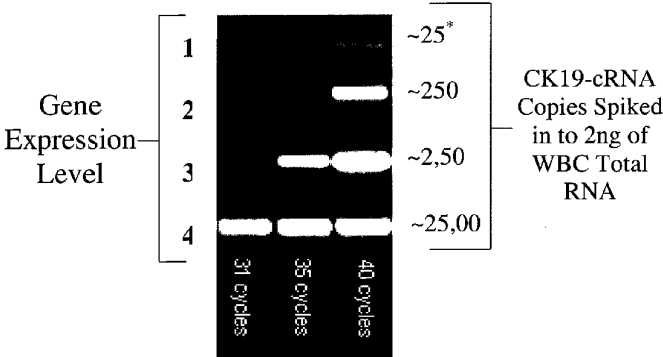
Figure 13A

WO 03/035895

20/27

PCT/US02/34570

Figure 13B



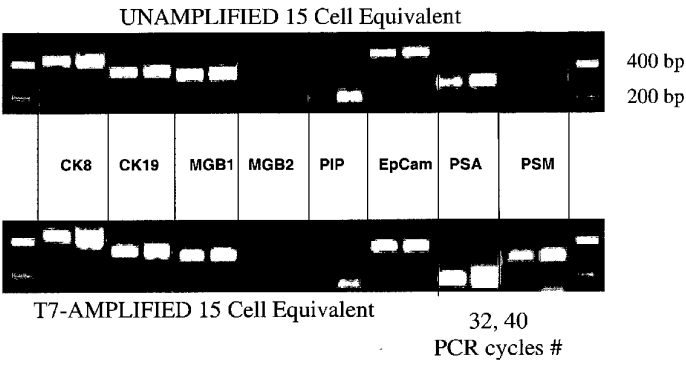
* N=10 replicates showed a CV

WO 03/035895

21/27

PCT/US02/34570

Figure 13C



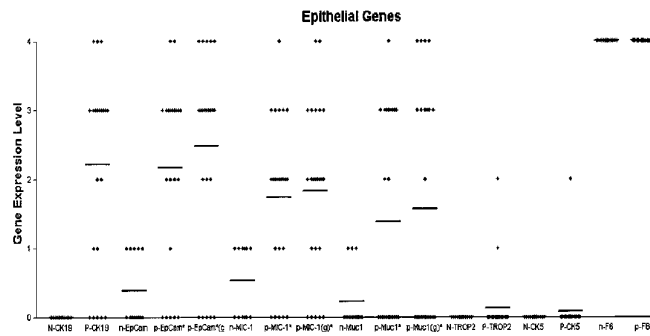
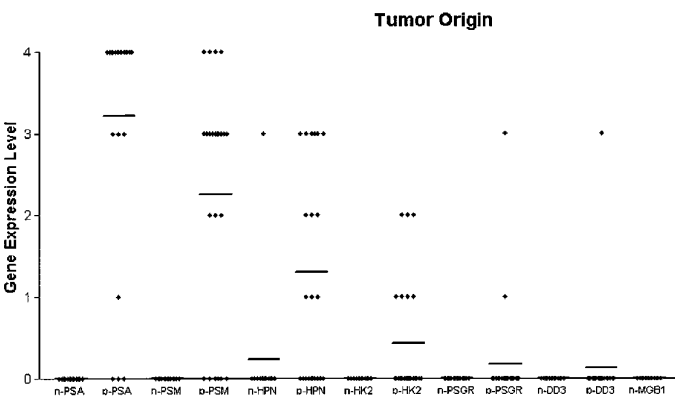


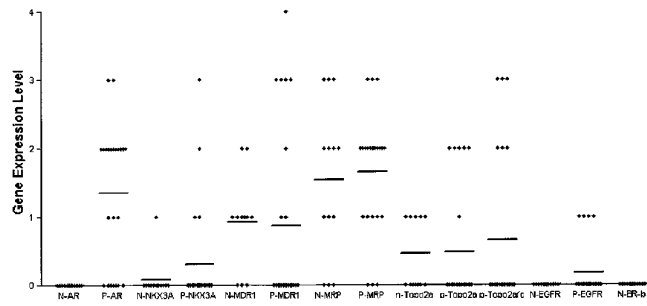
Figure 14B



WO 03/035895

24/27

PCT/US02/34570

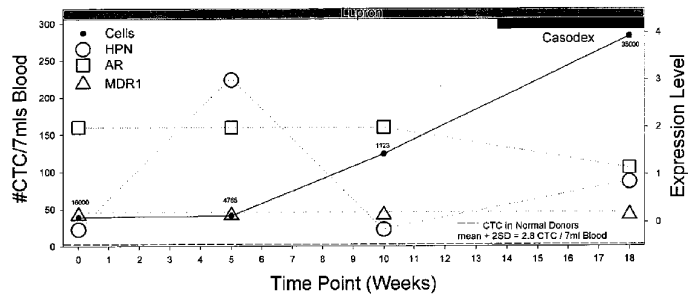
Figure 14C**Tumor Characterization**

WO 03/035895

25/27

PCT/US02/34570

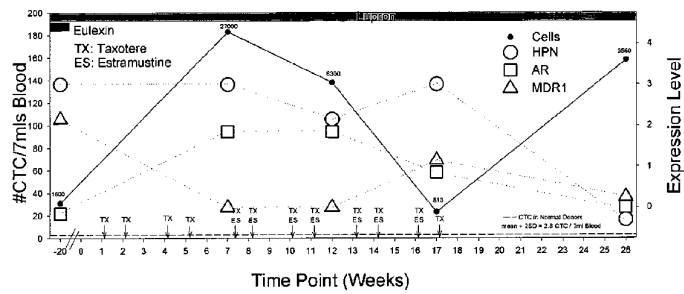
Figure 15A



WO 03/035895

26/27

PCT/US02/34570

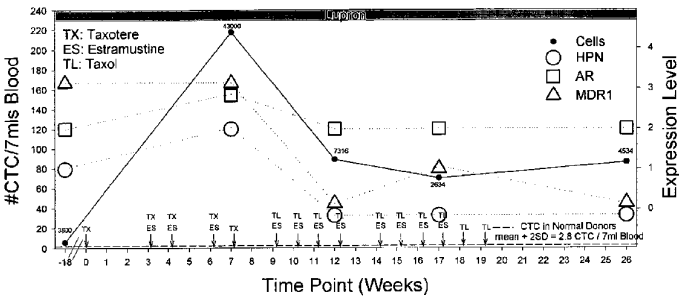
Figure 15B

WO 03/035895

27/27

PCT/US02/34570

Figure 15C



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/035895 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/00, 1/68,
G01N 33/53, C07H 21/04, C07K 16/00

(21) International Application Number:
PCT/US2002/034570

(22) International Filing Date: 28 October 2002 (28.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/330,669 26 October 2001 (26.10.2001) US
60/569,945 4 April 2002 (04.04.2002) US

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*): IMMUNIVEST CORPORATION [US/US]; 1105 North Market Street, Suite 1300, P.O. Box 8985, Wilmington, DE 19809 (US).

Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (*Rule 4.17(iv)*) for US only

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): O'HARA, Shawn, Mark [US/US]; 1519 Isaacs Court, Ambler, PA 19002 (US); ZWETZIG, Daniel [US/US]; 675 E. Street Road, Apt. 1407, Warminster, PA 18974 (US); FOULK, Brad [US/US]; 306 Brooke Road, Royersford, PA 19468 (US).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
8 January 2004

(74) Agents: ACETO, Joseph et al.; Immunicon Corporation, 3401 Masons Mill Road, Suite 100, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MULTIPARAMETER ANALYSIS OF COMPREHENSIVE NUCLEIC ACIDS AND MORPHOLOGICAL FEATURES ON THE SAME SAMPLE

(57) Abstract: A highly sensitive assay is disclosed which utilizes a method for gene specific primed amplification of mRNA libraries from rare cells and rare transcripts found in blood. The assay allows detection of rare, mRNA (10 copies/cell) found in 1 to 10 cells isolated through immunomagnetic enrichment. The assay is an improvement over multiplex PCR and allows efficient detection of rare coding sequences for circulating carcinoma cells in the blood. The methods are useful in profiling of cells isolated from tissues or body fluids and serves as an adjunct to clinical diagnosis of diverse carcinomas including early stage detection and classification of circulating tumor cells. Monitoring of nucleic acid and protein profiles of cells either in conventional or microarray formats, facilitates management of therapeutic intervention including staging, monitoring response to therapy, confirmation of remission and detection of regression.

WO 2003/035895 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/34570										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00, 68; G01N 33/53; C07H 21/04; C07K 16/00 US CL : 435/4, 6, 7.1; 536/24.31; 24.33; 530/991.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 6, 7.1; 536/24.31, 24.33; 530/991.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, Bioss, Scisearch, Lifesci, Biotechds, Caplus, PCTfull, USPATfull, Europatfull on STN.												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,882,864 (AN et al) 16 March 1999, see entire document.</td> <td>1-76</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,156,515 (AN et al) 05 December 2000, see entire document.</td> <td>1-76</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,882,864 (AN et al) 16 March 1999, see entire document.	1-76	Y	US 6,156,515 (AN et al) 05 December 2000, see entire document.	1-76	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	US 5,882,864 (AN et al) 16 March 1999, see entire document.	1-76										
Y	US 6,156,515 (AN et al) 05 December 2000, see entire document.	1-76										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 22 September 2003 (22.09.2003)		Date of mailing of the international search report 17 NOV 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Anthony Caputo <i>Harmon D. Canella</i> Telephone No. 703-308-0196										

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ショーン・マーク・オハラ
アメリカ合衆国 1 9 0 0 2 ペンシルベニア州アンブラー、アイザックス・コート 1 5 1 9 番

(72)発明者 ダニエル・ズウェイツィグ
アメリカ合衆国 1 8 9 7 4 ペンシルベニア州ウォーミンスター、アパートメント 1 4 0 7、イース
ト・ストリート・ロード 6 7 5 番

(72)発明者 ブラッド・フォーク
アメリカ合衆国 1 9 4 6 8 ペンシルベニア州ロイヤーズフォード、ブルック・ロード 3 0 6 番

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA12 HA12
4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QQ91 QR08 QR32 QR42
QR48 QR55 QR62 QS16 QS17 QS25 QS32 QX01

专利名称(译)	对同一样品的一般核酸和形态特征的多参数分析		
公开(公告)号	JP2005507997A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003538395	申请日	2002-10-28
申请(专利权)人(译)	Imunibesuto公司		
[标]发明人	ショーンマークオハラ ダニエルズウェイティグ ブラッドフォーク		
发明人	ショーン・マーク・オハラ ダニエル・ズウェイティグ ブラッド・フォーク		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/574 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/57488 A01N1/00 C12Q1/6806 C12Q2600/158 G01N33/54326 G01N2550/00		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.D C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/553 G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS17 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01		
代理人(译)	田中，三夫 矢野正树		
优先权	60/330669 2001-10-26 US 60/369945 2002-04-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了利用从稀有细胞和血液中发现的稀有转录物的mRNA文库进行基因特异性起源扩增的方法的高灵敏度测定法。该测定允许检测在通过免疫磁性富集分离的1至10个细胞中发现的稀有mRNA (10个拷贝/细胞)。该测定法是对多重PCR的改进，允许检测血液中循环癌细胞的稀有编码序列。该方法是在从组织或体液中分离的细胞的分析是有用的，作为用于临床诊断各种癌症，包括早期阶段检测和循环肿瘤细胞的分类的修饰语。以常规或微阵列方式监测细胞核酸和蛋白质谱有助于确认治疗干预，包括分期，监测对治疗的反应，确认缓解和检测消退。

遺伝子	tRNA 出発 コピー数	第一ラウンドの mRNA後の 全コピー数	GSP第二 ラウンド後の 全コピー数	第一:第二	GSP S/N (F6)
PSA	2650	2.10×10^7	3.00×10^{10}	1238	210
PSM	1750	7.80×10^6	4.03×10^9	517	87
AR	100	64200	2.90×10^7	458	78
EpCAM	375	5.20×10^6	6.05×10^9	1163	197
F6	NA	1.40×10^{10}	8.30×10^{10}	5.9	1