

(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2004-504129
(P2004-504129A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
BO3C 1/00	BO3C 1/00	B
BO3C 1/02	BO3C 1/02	Z
BO3C 1/30	BO3C 1/30	Z
GO1N 33/53	GO1N 33/53	D
GO1N 33/53	GO1N 33/53	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-512651 (P2002-512651)	(71) 出願人	399012963
(86) (22) 出願日	平成12年7月14日 (2000. 7. 14)		イムニベスト・コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月14日 (2003. 1. 14)		IMMUNIVEST CORPORAT ION
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/019171		アメリカ合衆国19899デラウェア州
(87) 国際公開番号	W02002/006790		ウィルミントン、ピー・オー・ボックス8
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002. 1. 24)		985、ノース・マーケット・ストリート
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, C U, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S I, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100106231 弁理士 矢野 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性ナノ粒子の制御された凝集による増大した分離効率

(57) 【要約】

本発明は、生物学的試料のバイオアフィニティー分離および診断試験の分野に関する。より詳しくは、本発明は、磁性分離アッセイおよび、未制御であれば、単離された部分の視覚化を妨害するであろう内在性磁性粒子凝集因子を制御するための富化手順に用いることができる組成物および方法を提供する。可逆的凝集因子を構築し合成する方法も提供し、得られた組成物は、そのように単離された物質の観察を容易にしつつ、同時に稀少な生物学的物質の回収を促進する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コロイド状磁性粒子の凝集が低減された当該磁性粒子によって、生物学的試料から標的生体部分を単離する方法であって、

(a) 該標的生体部分と共に非標的生体部分および内因性凝集因子を含有している疑いのある生物学的標本を入手し；

(b) 該生物学的標本を該標本中に存在するいずれの内因性凝集因子をも不活性化するのに有効な試薬に接触させ；

(c) 該標本と、該標的生体部分上に存在する少なくとも1の特性決定因子に対して結合アフィニティーを有する生体特異的リガンドに連結されたコロイド状磁性粒子との混合物を含む免疫磁性懸濁液を調製し；次いで、

(d) 該免疫磁性懸濁液を磁場に付して、標的生体部分 - 富化フラクションを得ることを特徴とする該方法。

【請求項 2】

さらに、

(e) 該標的生体部分を該富化フラクションから精製し；次いで、

(f) 当該精製された標的生体部分を分析するステップを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

さらに、

(e) 該標的生体部分富化フラクションに該標的生体部分上の少なくとも1のさらなる特性決定因子に対して結合アフィニティーを有する少なくとも1の生体特異的試薬を添加し；

(f) 該標的生体部分を磁場中で分離して、未結合生体特異的試薬を該富化フラクションから除去するステップを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

さらに、

(g) 当該分離された標的生体部分を精製し；次いで、

(h) 当該精製された標的生体部分を分析するステップを含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

さらに、

(g) 非細胞排除剤を当該分離された標的生体部分に添加して、該試料中に存在する非核形成部分の排除を可能にし；

(h) 該標的生体部分を精製し；次いで、

(i) 当該精製された標的生体部分を分析するステップを含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

該標的生体部分が、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、母性循環中の胎児細胞、ウイルス粒子、細菌細胞、白血球、心筋細胞、上皮細胞、内皮細胞、タンパク質、ホルモン、DNA および RNA よりなる群から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

該標的生体部分が、多重パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザー走査サイトメトリー、明視野基礎イメージ解析、キャピラリー容量測定、手動細胞分析および自動細胞分析よりなる群から選択される手法により分析される請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

当該凝集阻害剤が、還元剤、動物血清タンパク質、免疫複合体、炭化水素、キレート剤、非コンジュゲイテッドフェロ流体 (an unconjugated ferrofluid)、およびジアミノブタンよりなるものから選択される少なくとも1である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該凝集阻害剤が、スルホン酸メルカプトエタン [MES]、スルホン酸メルカプトプロパン [MPS] およびジチオトレイトール [DTT] よりなる群から選択される還元剤であ

る請求項 5 記載の方法。

【請求項 10】

該生体特異的リガンドがモノクローナル抗体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

該生体特異的リガンドが上皮細胞接着分子に対するアフィニティーを有するモノクローナル抗体である請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

コロイド状磁性粒子の凝集が制御された当該磁性粒子によって、生物学的試料から標的生体部分を単離する方法であって、

(a) 該標的生体部分と共に非標的生体部分および内因性凝集因子を含有している疑いのある生物学的標本を入手し；

(b) 該生物学的標本を該標本中に存在するいずれの内因性凝集因子をも不活性化するのに有効な試薬に接触させ；

(c) 該標本と、該標的生体部分上に存在する少なくとも 1 の特性決定因子に対して結合アフィニティーを有する生体特異的リガンドに連結されたコロイド状磁性粒子との混合物を含む免疫磁性懸濁液を調製し、該磁性粒子は特異的結合ペアのうち一方のメンバーを含む第 1 の外因性凝集促進因子にさらに連結され；

(d) 第 2 の外因性凝集促進因子を該免疫磁性懸濁液に添加して、該粒子の凝集を増大させ、該第 2 の凝集促進因子は該特異的結合ペアのうち他方のメンバーを含み；次いで、

(e) 該免疫磁性懸濁液を磁場に付して、標的生体部分 - 富化フラクションを得ることを特徴とする該方法。

【請求項 13】

さらに、

(f) 該免疫磁性懸濁液に該標的生体部分上の少なくとも 1 のさらなる特性決定因子に対して結合アフィニティーを有する少なくとも 1 の生体特異的試薬を添加し；

(g) 該標的生体部分を磁場中で分離して、未結合生体特異的試薬を除去し；

(h) 非細胞排除剤を当該分離された標的生体部分に添加して、該試料中に存在する非核形成部分の排除を可能にし；

(i) 該標的生体部分を精製し；次いで、

(j) 当該分離精製された標的生体部分を分析するステップを含む請求項 12 記載の方法

【請求項 14】

さらに、当該精製された標的生体部分 - 富化フラクションを調べて、該特異的結合ペアの第 1 および第 2 のメンバーが介在する凝集の度合を決定することを含む請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】

該特異的結合ペアの一方または他方のメンバーを該精製された生体部分フラクションに添加して、該試料の凝集を反転させ、これにより、該標的生体部分の分析を容易にする請求項 12 記載の方法。

【請求項 16】

該特異的結合ペアが、ビオチン - ストレプトアビジン、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、プロテイン A - 抗体 Fc、およびアビジン - ビオチン、ビオチン・アナログ - ストレプトアビジン、ビオチン・アナログ - アビジン、デスチオビオチン - ストレプトアビジン、デスチオビオチン - アビジン、イミノビオチン - ストレプトアビジン、およびイミノビオチン - アビジンよりなる群から選択される請求項 12 記載の方法。

【請求項 17】

該生体特異的リガンドがモノクローナル抗体である請求項 12 記載の方法。

【請求項 18】

該生体特異的リガンドが上皮細胞接着分子に対するアフィニティーを有するモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体である請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

当該少なくとも 1 の生体特異的試薬が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、検出可能に標識された抗体、抗体フラグメント、および一本鎖抗体よりなる群から選択される請求項 12 記載の方法。

【請求項 20】

該標的の生体部分が、多重パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザー走査サイトメトリー、明視野基礎イメージ解析、キャピラリー容量測定、手動細胞分析および自動細胞分析よりなる群から選択される手法により分析される請求項 12 記載の方法。

10

【請求項 21】

該免疫磁性懸濁液を 30 分間未満インキュベートする請求項 12 記載の方法。

【請求項 22】

該試料の精製を 6.3 k ガウス / cm 未満の磁場勾配中で行う請求項 12 記載の方法。

【請求項 23】

該免疫磁性懸濁液中のコロイド状磁性粒子濃度がミリリッターあたり 10 μ g 未満である請求項 12 記載の方法。

【請求項 24】

コロイド状磁性粒子の凝集が制御された当該磁性粒子によって、生物学的試料から低抗原密度腫瘍細胞を単離する方法であって、

20

(a) 該腫瘍細胞と共に非腫瘍細胞および内因性凝集因子を含有している疑いのある生物学的標本を入手し；

(b) 該標本と、該腫瘍細胞上に存在する少なくとも 1 の特性決定因子に対して結合アフィニティーを有する生体特異的リガンドに連結されたコロイド状磁性粒子との混合物を含む免疫磁性懸濁液を調製し、該磁性粒子は特異的結合ペアのうち一方のメンバーを含む第 1 の外因性凝集促進因子にさらに連結され、該因子は特異的結合ペアの一方のメンバーを含み；

(c) 第 2 の外因性凝集促進因子を該免疫磁性懸濁液に添加して、該粒子の凝集を増大させ、該第 2 の凝集促進因子は該特異的結合ペアのうち他方のメンバーを含み；次いで、

(d) 該試料を磁場中で精製して、腫瘍細胞 - 富化フラクションを得ることを特徴とする該方法。

30

【請求項 25】

さらに、

(e) 該フラクションに、該腫瘍細胞上の少なくとも 1 のさらなる特性決定因子に対してアフィニティーを有する少なくとも 1 の生体特異的試薬を添加し；

(f) 該腫瘍細胞を磁場中で分離して、未結合生体特異的試薬を除去し；

(g) 非細胞排除剤を当該分離された細胞に添加して、該試料中に存在する非核形成部分の排除を可能にし；次いで、

(h) 該分離された細胞を分析して、腫瘍細胞数および型のうち少なくとも 1 を評価するステップを含む請求項 24 記載の方法。

40

【請求項 26】

該特異的結合ペアのメンバーを該分離された細胞に添加して、該試料の凝集を反転させ、これにより、該細胞の分析を容易にする請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

該特異的結合ペアが、ビオチン - ストレプトアビジン、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、プロテイン A - 抗体 Fc、およびアビジン - ビオチン、ビオチン・アナログ - アビジン、デスチオビオチン - ストレプトアビジン、デスチオビオチン - アビジン、イミノビオチン - ストレプトアビジン、およびイミノビオチン - アビジンよりなる群から選択される請求項 24 記載の方法。

50

【請求項 28】

該生体特異的リガンドがモノクローナル抗体である請求項 24 記載の方法。

【請求項 29】

該生体特異的リガンドが上皮細胞接着分子に対するアフィニティーを有するモノクローナル抗体である請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

当該少なくとも 1 の生体特異的試薬が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、検出可能に標識された抗体、抗体フラグメント、および一本鎖抗体よりなる群から選択される請求項 25 記載の方法。

【請求項 31】

該腫瘍細胞が、多重パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザ走査サイトメトリー、明視野基礎イメージ解析、キャピラリー容量測定、手動細胞分析および自動細胞分析よりなる群から選択される手法により分析される請求項 25 記載の方法。

【請求項 32】

該生物学的試料を凝集阻害剤で予備処理して、該免疫磁性懸濁液を調製する前に、該試料中に存在する内因性凝集因子を不活性化する請求項 24 記載の方法。

【請求項 33】

当該精製された腫瘍細胞 - 富化フラクションを調べて、該特異的結合ペアの第 1 および第 2 のメンバーが介在する凝集の度合を決定することを含む請求項 25 記載の方法。

【請求項 34】

生物学的物質からの標的生体部分の単離のための該物質のプロセッシングにおいて、コロイド状磁性粒子の内因性凝集を阻害するためのキットであって、

(a) 磁性コア物質、タンパク質ベースコーティング物質、および該標的生体部分の第 1 の特性決定因子に特異的に結合する抗体を含む被覆磁性ナノ粒子、該抗体は、直接的または間接的に、該ベースコーティング物質に連結され；

(b) 該標的生体部分の第 2 の特性決定因子に対して結合特異性を有する少なくとも 1 の抗体；

(c) 内因性凝集阻害因子；および

(d) 非核形成細胞を分析から排除するための非細胞排除剤を含む該キット。

【請求項 35】

コロイド状磁性粒子の凝集が制御された生物学的試料から低抗原密度腫瘍細胞を単離するためのキットであって、

(a) 内因性凝集因子を不活性化するのに有効な試薬；

(b) 磁性コア物質、タンパク質ベースコーティング物質、および該標的生体部分の第 1 の特性決定因子に特異的に結合する抗体を含む被覆磁性ナノ粒子、該抗体は、直接的または間接的に、該ベースコーティング物質に連結され；該磁性粒子は第 1 の外因性凝集促進因子にさらに連結され、該因子は特異的結合ペアの一方のメンバーを含み；

(c) 該腫瘍細胞の第 2 の特性決定因子に対して結合特異性を有する少なくとも 1 の抗体；

(d) 第 2 の外因性凝集促進因子、該第 2 の凝集因子は該特異的結合ペアの他方のメンバーを含み；および

(e) 非核形成細胞を分析から排除するための非細胞排除剤を含む該キット。

【請求項 36】

該特異的結合ペアが、ビオチン - ストレプトアビジン、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、プロテイン A - 抗体 Fc、およびアビジン - ビオチン、ビオチン・アナログ - アビジン、デスチオビオチン - ストレプトアビジン、デスチオビオチン - アビジン、イミノビオチン - ストレプトアビジン、およびイミノビオチン - アビジンよりなる群から選択される請求項 35 記載のキット。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

さらに、該外因性凝集因子の効果を反転する試薬を含む請求項35記載のキット。

【請求項38】

内因性凝集因子を阻害するのに有効な試薬が、還元剤、動物血清タンパク質、免疫複合体、炭化水素、キレート剤、非コンジュゲートドフェロ流体(an un conjugated ferrofluid)、およびジアミノプタンよりなる群から選択される少なくとも1である請求項35記載のキット。

【請求項39】

該内因性凝集因子阻害試薬が、スルホン酸メルカプトエタン[MES]、スルホン酸メルカプトプロパン[MPs]およびジチオトレイトール[DTT]よりなる群から選択される還元剤である請求項38記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、生物学的試料のバイオアフィニティー分離および診断試験の分野に関する。より詳しくは、本発明は、磁性分離アッセイおよび、未制御であれば、単離された部分の視覚化を妨害するであろう内在性磁性粒子凝集因子を制御するための富化手順に用いることができる組成物および方法を提供する。可逆的凝集因子を構築し合成する方法も提供し、得られた組成物は、そのように単離された物質の観察を容易にしつつ、同時に稀少な生物学的物質の回収を促進する。

【0002】

20

発明の背景

この発明に関連する分野の現状をより完全に記載するために、いくつかの刊行物をこの出願においてカッコ書きで番号で参照される。これらの刊行物の各々の開示は、出典明示して本明細書に含まれるものとみなされる。

多くの研究室および臨床手順は生体特異的アフィニティー反応を採用する。普通、そのような反応は、生物学的試料の診断試験において、または幅広い標的物質、特に、細胞、ウイルス、タンパク質、核酸等のごとき生物学的部分の分離に用いられる。様々な方法が上記標的物質の分析または分離に利用可能であり、対象の物質と該標的物質に特異的に結合するもう一つの物質との間のコンプレックス形成に基づく。未結合物質からのコンプレックスの分離を重力的に、例えば、標的物質に連結された微細分割された粒子もしくはビーズの沈降によって、または、その代わりに、遠心によって達成することができる。所望すれば、そのような粒子またはビーズを磁性にして、結合/自由分離ステップを容易にすることができる。磁性粒子は、免疫および他の生体特異的アフィニティー反応におけるそれらの使用で、当該分野でよく知られている。例えば、米国特許第4,554,088号および「イムノアッセイズ・フォウ・クリニカル・ケミストリー(Immunoassay for Clinical Chemistry)」、1983年、pp.147-062、ハンター(Hunter)ら編、チャーチル・リビングストン、エジンバラ]を参照せよ。一般に、磁性または重力分離を容易にするいずれの物質もこの目的に採用することができる。しかしながら、過去20年間、そのような分離を行うのに優れた磁性体は多くのアプリケーションにおいて、その使用を導いてきた。

30

40

【0003】

一般に、磁性粒子は2つの広いカテゴリーに分けられる。第1のカテゴリーは、永久的に磁化可能な粒子、すなわち強磁性体を含む。第2のカテゴリーは、磁場に付されたときのみバルク磁気挙動を示す粒子を含む。後者は磁気応答粒子という。時に、磁気応答挙動を示す物質は超常磁性体と説明される。しかしながら、バルク強磁性特性を示す物質、例えば、磁性酸化鉄は、直径約30nm以下の結晶にされたときのみ、超常磁性として特徴付けることができる。対照的に、より大きな結晶の強磁性物質は、磁場に曝された後も永久磁性特性を保持し、その後、強力な粒子-粒子相互作用のため、凝集する傾向にある。

【0004】

磁性粒子は、大(1.5ないし約50ミクロン)、小(0.7~1.5ミクロン)、およ

50

びコロイド状またはナノ粒子 (< 200 nm) に分類し得る。後者は、フェロ流体 (ferrofluid) またはフェロ流体様 (ferrofluid-like) と呼ばれ、典型的なフェロ流体の特性の多くを有する [リベルティ (Liberti) ら、pp. 777-790、イー・ペリツェッティ (E. Pelizzetti) 編、「ファイン・パーティクルズ・サイエンス・アンド・テクノロジー (Fine Particles Science and Technology)」、1996年、クルウアー・アカデミー・パブリッシャーズ (Kluwer Acad. Publishers)、オランダ]。

【0005】

小磁性粒子は生体特異的アフィニティー反応に関与する分析に非常に有用である。なぜならば、それらは簡便に生体機能ポリマー (例えば、タンパク質) で被覆され、非常に高い表面積を与え、適当な反応キネティクスを提供するからである。0.7~1.5ミクロンの範囲にある磁性粒子は、例として、米国特許第3,970,518; 4,018,886; 4,230,685; 4,267,234; 4,452,773; 4,554,088; および4,659,678号を含む特許文献に記載されている。これらの粒子のうちあるものは免疫学的試薬の有用な固相支持体であると開示されている。

10

【0006】

上記の小磁性粒子に加えて、およそ1.5~50ミクロのサイズの範囲にある大磁性粒子の分類があり、これらも超常磁性挙動を有する。そのような物質の典型はユーゲルスタット (Ugelstad) [米国特許第4,654,267号] によって発明され、ダイナル (Dyнал) (ノルウェー国、オスロ) によって製造されるものである。ユーゲルスタット法は、膨潤が引き起こされ、膨潤した粒子中にマグネタイトの結晶が取り込まれたポリマー粒子の合成に関する。同一サイズ範囲にある他の物質は、分散された磁性結晶の存在下で粒子を合成することによって調製される。これはポリマーマトリクスへのマグネタイト結晶の閉込めをもたらし、かくして、得られた物質を磁性にする。どちらの場合も、得られた粒子は超常磁性挙動を有し、それは、磁場を取り去ると簡単に分散する能力から明らかにされた。磁性コロイドまたはナノ粒子とは異なり、これらの物質は、小磁性粒子と同様に、粒子あたりの磁性物質の量により、単純な実験用磁性体で容易に分離される。かくして、分離は数100ガウス/cm程度の低さから約1.5キロガウス/cmまでの勾配で実行される。一方、コロイド状磁性粒子 (およそ200 nm未満) は、それらの拡散エネルギー、粒子あたりの小さな磁気質量およびストークス摩擦のため、実質的により高い磁性勾配を要する。オーエン (Owen) らの米国特許第4,795,698号は、ポリマー被覆コロイド状超常磁性粒子に関する。そのような粒子は、生体機能ポリマーの存在下での磁性種の沈殿によって製造される。得られた粒子の構造は、本明細書においてシングル・ショット粒子というが、5~10 nmの直径を有する1以上の強磁性体結晶が50 nmのオーダーの直径を有するポリマー本体に取り込まれているミクロ凝塊であることが見出されている。得られた粒子は、数ヶ月間ほどの観察期間の間、水性懸濁液中で維持されるはっきりとした傾向が示される。モルデイ (Molday) の米国特許第4,452,773号は、特性においてオーエンらに記載されたものと同様の物質を記載し、非常に高濃度のデキストランの存在下、 Fe^{+2} / Fe^{+3} から塩基添加によりマグネタイトおよび他の酸化鉄を形成することによって製造する。そのように製造された物質はコロイド特性を有し、細胞分離に非常に有用であることが証明されている。この技術は、ミルテニイ・バイオテック (Miltényi Biotech)、ドイツ国、ベルギッシュグランドバッチによって商業化されている。

20

30

40

【0007】

超常磁性コロイド状粒子を製造するもう一つの方法は、米国特許第5,597,531号に記載されている。オーエンらの特許に記載された粒子と対照的に、これら後者の粒子は、例えば、音波エネルギーによって、約25~120 nmのサイズの範囲にある擬安定結晶クラスターに分散された予備形成超常磁性結晶上に生体機能ポリマーを直接被覆することによって製造する。得られた粒子は、本明細書において、ダイレクト・コーティド (D

50

C) 粒子というが、全サイズが同一であるオーエンらまたはモルデイのナノ粒子よりも著しく大きな磁気モーメントを示し、約6kガウス/cmより大きな磁気勾配中で効率的に分離し得る。

【0008】

磁場を流体媒体に印加して、強磁性体を該流体媒体から分離する磁気分離技術が知られている。対照的に、コロイド状超常磁性粒子が懸濁液中で維持される傾向はそれらの比較的弱い磁気応答性とあいまって、そのような粒子をそれらが懸濁している流体媒体から分離するのに高勾配磁気分離(HGMS)技術の使用を必要とする。HGMSシステムにおいて、磁場勾配、すなわち、空間微分係数は懸濁している粒子の挙動に、所定の点にての磁場の強度によって発揮されるよりも強い影響を与える。高勾配磁気分離は、真核細胞、原核細胞、ウイルス、核酸、タンパク質、および炭化水素を含む広い種類の磁気標識生物学的物質を分離するのに有用である。今まで知られている方法では、抗体、抗体フラグメント、特異的結合タンパク質(例えば、プロテインA、ストレプトアビジン)、レクチン等のごとき、受容体の特異的に認識し結合することができる物質上に少なくとも1の特性決定因子が存在するという条件付きで、生物学的物質はHGMSによって分離可能であった。HGMSシステムは2つの広いカテゴリーに分類し得る。当該1のカテゴリーは、分離チャンパーまたはベッセルに対して完全に外部に配置された磁気回路を採用する磁気分離システムを含む。そのような外部セパレータ(または開放場勾配セパレータ)の例は米国特許第5,186,827号に記載される。この'827号特許に記載された具体例のいくつかにおいて、不可欠な磁場勾配は、永久磁石を非磁性容器の周囲に配し、磁石の極のようなものを場に対向する配置になるようにすることによって生成する。そのようなシステムで得られる試験媒体内の磁場勾配の程度は該磁石の強度および磁石間の間隔によって制限される。それゆえ、外部勾配システムにより得られる勾配は有限である。共係属出願第60/098,021において、半径方向勾配を最大化する手段および新規ベッセル設計により分離効率を最大化する方法が開示される。

10

20

【0009】

もう一つのタイプのHGMSセパレータは、(1)印加された磁場を増強し;および(2)該試験媒体内に磁場勾配を生じさせるために、試験媒体内に配置された強磁性収集構造(ferromagnetic collection structure)を使用する。以前開示された内部HGMSシステムは、磁石に隣接して配置されたカラム内部に充填された微細スチールウールまたはガーゼを含む。印加磁場はスチールワイヤーの付近に集約され、懸濁している磁性粒子が該ワイヤー表面に向かって引きつけられ、付着されるようにする。そのようなワイヤー上に生じた勾配はワイヤー直径に反比例し、一方、磁性「リーチ」は直径と共に減少する。それゆえ、非常に高い勾配を発生し得る。

30

【0010】

内部勾配システムの一つの主たる欠点は、スチールウール、ガーゼ材料、スチールマイクロビーズ等が、交差するワイヤー付近または交差するワイヤー間の隙間における毛細管現象によって、試験媒体の非磁性成分が捕捉されることである。様々な被覆手順がそのような内部勾配カラムに対して適用されているが[米国特許第5,693,539;4,375,407号]、そのようなシステムの大きな表面積は、依然として、吸収による回収問題を生じる。それゆえ、内部勾配システムは、特に、非常に低い頻度の捕捉部分の回収が分離の最終目的であるときは、望ましくない。さらに、これらのシステムは自動化が困難で、コストがかかる。

40

【0011】

一方、細胞分離に外部勾配を用いるHGMSアプローチは多数の利便性を提供する。まず、試験管、遠心管のごとき単純な実験チューブまたは、血液採取に用いるバキュテイナー(vacuainers)を採用し得る。外部勾配が分離された細胞が効率的に一層化できるようなものである場合、四極子/六極子デバイス[米国特許第5,186,827号]または[米国特許第5,466,574号]に記載された対向双極子配置の場合のように、細胞の洗浄またはその後の操作が容易である。さらに、チューブまたは同様の容器

50

からの細胞の回収が単純および効率的なプロセスである。特に高勾配カラムからの回収と比較するとき真実である。そのような分離ベッセルは原試料の体積を減じる能力であるもう一つの特徴も提供する。例えば、特定のヒト血液細胞サブセット（例えば、磁気標識CD34+細胞）を粘度を下げるためにバッファーで20%希釈した血液から単離するならば、15mlのコニカル試験管を適当な四極子磁気デバイスにおける分離用ベッセルとして用いることができる。

【0012】

未結合細胞を除去するための適当な洗浄および/または分離および再懸濁後、CD34+細胞を200 μ lの体積に非常に効率的に再懸濁し得る。これは、例えば、15mlのコニカル試験管中12mlの溶液（血液、フェロ流体および希釈バッファー）から出発して、分離を行い、「上清」およびその後の洗浄「上清」を廃棄し、次いで、回収した細胞を3mlの適当な細胞バッファーに再懸濁させることによって達成し得る。次いで、第2の分離を行い、（標識/染色反応を行うのに必要であるとき）それはさらなる分離/洗浄ステップを含むことができ、最後に単離された細胞は200 μ lの最終体積に容易に再懸濁させる。この連続様式で体積を減少させ、再懸濁にボルテックスミキサーを用いることによって、再懸濁体積より上方のチューブに付着した細胞を減少した体積中に回収する。適当に処理されたベッセル中で注意し、かつ、急速に行った場合、細胞回収は非常に効率的で、70~90%の間の範囲である。

【0013】

磁気分離を行い得る効率ならびに磁気標識細胞の回収率および純度は多くの因子に依存するであろう。これらは、分離される細胞数、当該細胞の受容体密度、細胞あたりの磁気負荷、当該磁性物質の非特異的結合（NSB）、用いる技術、ベッセルの性質、ベッセル表面の性質、該媒体の粘度および用いる磁気分離装置のごとき点を含む。システムの非特異的結合のレベルが実質的に一定であれば、普通はそうであり、当該標的母集団は純度を減少させる。例として、0.2%NSBのシステムは、母集団の80%を回収し、それは原混合物中0.25%であって、50%の純度を有する。一方、初期母集団が1.0%であれば、純度は80%であろう。事実は明らかでないが、標的細胞の母集団が小さいほど、磁気標識し、回収するのがより困難である。さらに、標識および回収率は用いる磁性粒子の性質に明らかに依存する。例えば、細胞をダイナルビーズのごとき大きな磁性粒子と共にインキュベートする場合、該ビーズが大きすぎて拡散しない傾向にあるので、当該系を混合することによって生じる衝突により標識する。かくして、細胞が1細胞/ml血液またはそれより低い頻度にて母集団に存在すれば、非常に早期ガンにおける腫瘍細胞のように、標的細胞を標識する確率は該系に添加する磁性粒子の数および混合する時間の長さに関連するであろう。そのような粒子と共に、細胞を相当な時間混合することは有害なので、粒子濃度をできるだけ増大することが必要となる。しかしながら、該系に添加し得る磁性粒子の量には限界があり、そこでは、他の血液細胞と混合されている稀少細胞を含む系と、分離により大量の磁性粒子と共に混合されている稀少細胞を含む系とを置換し得、その場合、対象の細胞を数え、それらを調査する能力は顕著には向上しない。

【0014】

稀少頻度（1~50細胞/ml血液）の細胞を単離するのに大量の磁性粒子を使用するにはもう一つの欠点がある。大きな磁性粒子は非常に簡単な設計の外部勾配の使用および比較的低い磁気勾配を許容するという事実にもかかわらず、大きな粒子は細胞の周りをカゴ状に取り囲む傾向にあって、それらを「見る」こと、すなわち分析することを困難にする。それゆえ、該粒子を分析前に解放すべきであり、しばしば他の問題を生じる粒子を解放すべきである。

【0015】

理論上、コロイド状磁性粒子は、高勾配磁気分離と共に用いて、対象の細胞サブセット細胞を真核細胞の混合母集団から分離するのに、特に、対象のサブセットが母集団全体のほんのわずかな部分しか含まないならば、選択される方法である。適切な磁気負荷により、十分な力が細胞上で発揮され、適度に希釈された全血程度の粘度の媒体中でさえその単離

10

20

30

40

50

を容易にする。上記したように、約200ナノメートル未満のコロイド状磁性物質はブラウン運動を行い、稀少細胞に衝突して、磁気標識するそれらの能力を著しく促進する。これは米国特許第5,541,072号に例示され、そこでは、非常に効率的な腫瘍細胞除去実験の結果が記載され、100nm磁性粒子(フェロ流体)を採用する。ただ、重要なことは、上記のサイズ範囲以下のコロイド状物質は一般に細胞の観察を妨げない。そのようにして回収された細胞は、最小限の前方散乱効果でフローサイトメトリーによって、または視覚もしくは蛍光技術を採用する顕微鏡観察によって、調査し得る。それらの拡散特性のため、そのような物質は、大磁性粒子とは対照的に、血液中の腫瘍細胞のごとき稀少な生物学的部分を容易に「発見」して、磁気標識する。

【0016】

しかしながら、上記した理由から、選択された装置設計である外部場勾配システムにおける細胞分離のためのフェロ流体様物質の使用で生じた明らかな問題がある。ミルテニイ・バイオテックによって製造されたものごとき、オーエンらの物質またはモルデイのナノ粒子の直接モノクローナル抗体コンジュゲートは、米国特許第5,186,827号に記載された四極子または六極子磁気装置のごとき、最善の利用可能な外部磁気勾配デバイスを採用する細胞分離における使用には十分な磁気モーメントを有していない。適度希釈された全血における分離に使用する場合、それらはさらに効果が少ない。実質的により高い磁性である、米国特許第5,698,271号に記載されたものと同様の物質を用いれば、より有望な結果が得られる。モデルスパイキング実験において、SKBR3細胞(乳房腫瘍系統)は、高EpCAM(上皮細胞-接着分子)決定因子密度を有し、非常に低いスパイキング密度(1~5細胞/ml血液)でさえも、抗EpCAMMAbフェロ流体の直接コンジュゲートを持つ全血から効率的に分離される。一方、PC3細胞(前立腺腫瘍系統)は、低抗原密度を有し、著しく低い効率でしか分離されない。これらの低密度受容体細胞への不適当な磁気負荷の結果であるというのがもっとらしい。

【0017】

上記の議論から、稀少事象を含む分離にとって、または非常に低い密度の受容体を持つ細胞にとって、コロイド状磁性物質および大きな磁性粒子の双方の有益な特性(例えば、それぞれ、拡散ベース標識および大きな磁気モーメント)を合わせた磁気分離システムを提供することに利点があるであろう。分離プロセスを磁性コロイドまたはナノ粒子から開始することを想定でき、それらは、それらのブラウン運動により、稀少数の細胞または非常に低い密度の受容体を持つ細胞を素早く発見して、標識するであろう。いったんその標識が達成されれば、当該ナノ粒子の磁気モーメントを大きな磁性粒子のものと同等の値に転換することが望ましい。そのようにして、磁気標識された部分をもっと大きな粒子に用いるような勾配場、例えば、単一外部場勾配セパレータ中で、分離し得るであろう。非常に低い密度の受容体細胞の場合、高勾配外部場セパレータ中でさえも十分に回収されず、そのような原理の使用は明らかに分離効率を増大させる。分離後、分析されるかまたはある生物学的目的に、細胞が用いられるアプリケーションにおいて、当該標識された部分の磁気モーメントをその元のコロイド磁気標識密度のものに戻せることも非常に望ましい。このアプローチは過度の磁性物質からの分離を許容し、その後の分析または使用を容易にするであろう。

【0018】

リベルティらの米国特許第5,466,574号は、細胞上への磁性物質の「負荷」に関する前記の特徴のいくつかを有する系を記載する。細胞がまず(ビオチン化の有無で)特異的モノクローナル抗体で標識され、引き続き、ヤギ抗-マウスフェロ流体またはストレプトアビジン-フェロ流体で(それぞれ)磁気標識した場合、分離は過剰モノクローナル抗体の存在下で促進された。フェロ流体のこの「洗浄なし」促進手順を作り出す独特の能力は、溶液中の遊離フェロ流体のフェロ流体-結合標的細胞への免疫化学的架橋によるものである。今度は、細胞上のモノクローナル抗体に結合するフェロ流体は、遊離モノクローナル抗体を介して溶液中の遊離フェロ流体に結合する。これはモノクローナル抗体標識細胞決定因子から「成長」したモノクローナル抗体/フェロ流体の免疫化学的クラスター

10

20

30

40

50

を生じる（鎖化（*chaining*）という）。かくして、磁性コロイドは「人工的」に細胞上に負荷され、それらをより磁性にし、より分離し易くする。現象は免疫化学の規則に従い、高過剰のモノクローナル抗体が鎖化（モノクローナル過剰ゾーン）の減少および分離効率の損失をもたらすということが分った。同様に、高レベルのフェロ流体も鎖化（フェロ流体過剰ゾーン）を減少させる。鎖化は、骨髄または末梢血「移植」において望ましくない細胞、例えば、腫瘍細胞を取り除くのにも有用であることが分っている。この方法によって、非常に高レベルの磁性物質（顕微鏡で観察すると、細胞周囲の視覚的な褐色の縁）を標識細胞上に負荷して、たったの8～12kガウス/cm勾配の高勾配場で非常に効率的な分離を生じ得る。一方、「単量体」フェロ流体で標識された細胞は同一の勾配でより低い効率で分離されることが分った。

10

【0019】

稀少細胞を全血から分離するために鎖化を使用する試みにおいて、いくつもの問題に遭遇する。まず、スパイクド細胞（*spiked cells*）は、実際効率的に回収されるが、それらはフェロ流体で密に被覆（鎖化）されそれらを分析する能力は著しく減少する。それゆえ、このアプローチは、確信的に選択された細胞（*positively selected cells*）を顕微鏡またはフローサイトメトリーにより観測すべきアプリケーションに関して理想的ではない。さらに、鎖化は非特異的結合を促進するらしい。要するに、鎖化のレベルが、分離促進、単離された細胞の非遮蔽観察、および許容されるレベルの非特異的結合を同時に引き起こす鎖化ベースアッセイを設計するのは極度に困難である。鎖化反応は、免疫化学的ストイキオメトリーを要求するので、制御は困難である。例えば、ほとんどの（>99%）添加モノクローナル抗体（またはタグ化リガンド（*tagging ligand*））は、当該抗体のアフィニティーにかかわらず、常に溶液中で遊離している。それゆえ、一般的に、（鎖化により最善の分離が発生する）免疫化学的当量を達成するのに要されるフェロ流体の量は、特に、選択された細胞が観察されおよび/またはさらに研究される場合、所望よりも多くの鎖化をもたらす。鎖化はモノクローナル抗体の標識およびフェロ流体の添加を同時に減少することによって減少させ得るが、これは分離効率の犠牲を生じる。分離を促進するために鎖化を使用することのもう一つの欠点は、ある実践的な方法において、逆鎖化ができないことである。鎖化を反転でき、非特異的結合における同時増加が減少すれば、現象は磁性物質の所望の「負荷」を可能にする実行可能なアプローチを提供するであろう。この方法のもう一つの不利な点はツーステップ反応が必要なことである。すなわち、第1ステップで標的の一次モノクローナル抗体との反応に続いて、第2ステップで一次モノクローナル抗体に特異的なフェロ流体との繰返しである。このアプローチは一次抗体を直接フェロ流体にコンジュゲートするアッセイには使えない。

20

30

【0020】

リベルティらの米国特許第5,108,933号は、外部場磁気セパレータを採用する免疫アッセイにおいてオーエンらまたはモルデイによって記載されたもののごとき弱い磁性コロイド状物質を開示する。そのような物質は、そこでは、凝塊化可能で、再懸濁可能なコロイド状磁性物質であると説明され、それらは外部磁場システム、例えば、当時商業的に入手可能なもの（チバ・コーニング（*Ciba Corning*）、マサチューセッツ州、ウォルポール；セロノ・ダイアグノスティクス（*Serono Diagnostics*）、マサチューセッツ州ノールウェル）において実質的に非摂動を維持する。対照的に、上記のように、'531特許に開示された方法によって作製された物質は、実質的により磁性であり、それらのセパレータで分離する。'933特許において、コロイドを凝塊に転換する手段が開示され、上記のセパレータにおいてそれらを分離可能にする。かくして、そのような物質を免疫アッセイの結合/遊離分離ステップを実行するのに用い得るであろう。'933には、凝塊反応を反転させることの必要性またはその方法についての言及はない。

40

【0021】

天然に産生するフェロ流体凝集因子の以前または近年の発見に鑑み、本発明は、稀少標的

50

生体部分の単離および免疫化学的キャラクタリゼーション中に外因性因子によってフェロ流体の凝集を制御する組成物および方法についての必要性を認識した。そのような組成物および方法を用いて、そのように単離された生体部分の分析および観察を容易にすることを有利することができる。さらに、本発明は実質的にほとんど磁性のない物質の使用ならびにより低い磁気勾配を使用する可能性も許容する。固定勾配の場合、本発明は、さもなければ捕捉するのに不十分な磁気標識しか有さないであろう部分の捕捉または単離を提供する。

【0022】

発明の概要

本発明によれば、外因性凝集因子によって強磁性ナノ粒子の凝集を制御するための方法、組成物およびキットが提供される。フェロ流体凝集は、しばしば、単離された標的のその後の観察中に問題を発生する。本発明の方法は、観察者が凝集のレベルを制御できるようにすることによって、単離された生体部分の視覚化を容易にする。この方法は標的生体部分を含む疑いのある生物学的標本を入手することを特徴とする。次に、該標本を該標的生体部分の1の特性決定因子に対するアフィニティーを有する生体特異的リガンドに連結されたコロイド状磁性粒子と混合することによって、免疫磁性懸濁液を調製する。その後、この免疫磁性懸濁液を磁場に付して、標的生体部分富化フラクションを得る。所望により、次いで、該フラクションを調査して、そのように単離された標的生体部分の特徴を決定する。フェロ流体凝集の阻害は、細胞表面上のフェロ流体の凝集体が除外されるので、その後の細胞分析を容易にする。そのような凝集体の不存在は、例えば、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光顕微鏡観察を含むいくつかのタイプの分析にとって重要である。

【0023】

本明細書で提供される試薬は外因性凝集因子を十分に阻害し、または除去する。この因子除外または阻害ステップは、分離および富化のためにフェロ流体を生物学的標本に添加する前または同時に行うことができる。

【0024】

本発明の方法を用いて単離された標的生体部分をさらに特性決定するために、この方法は、所望により、該標的生体部分富化フラクションに当該標的生体部分上の少なくとも1のさらなる特性決定因子を認識し、効率的に標識する少なくとも1の生体特異的試薬を添加するステップを含む。次いで、標識された標的生体部分を磁場中で分離して、未結合生体特異的試薬を除去する。非細胞排除剤を分離された生体部分に添加して、当該試料中に存在する非核形成成分の排除を可能にする。該標的生体部分の精製後、種々の異なる分析プラットフォームを用いる分析の準備が整う。標的生体部分は、限定されないが、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、母性循環中の胎児細胞、ウイルス粒子、細菌細胞、白血球、心筋細胞、上皮細胞、内皮細胞、タンパク質、ホルモン、DNAおよびRNAを含む。標的生体部分は、多重パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザ走査サイトメトリー、明視野基礎イメージ解析、キャピラリー容量測定、手動細胞分析および自動細胞分析よりなる群から選択される手法によって分析することができる。本発明の方法に使用するのに適した凝集阻害剤は、限定されないが、還元剤、動物血清タンパク質、免疫複合体、炭化水素、キレート剤、非コンジュゲイティドフェロ流体 (an un conjugated ferrofluid)、およびジアミノプタンを含む。内因性凝集因子がIgMクラスのものであって、フェロ流体に反応性である場合、好ましい凝集阻害剤は、スルホン酸メルカプトエタン [MES]、スルホン酸メルカプトプロパン [MPS] およびジチオトレイトール [DTT] のとき還元剤である。特に好ましい具体例において、該生体特異的リガンドは上皮細胞接着分子に対するアフィニティーを有するモノクローナル抗体である。

【0025】

本発明の代替的で好ましい具体例において、標的生体部分を磁性ナノ粒子の凝集を制御することによって生物学的試料から単離する方法が提供される。この方法は、該標的生体部

分を含有している疑いのある生物学的標本を入手し、該生物学的標本を存在するいずれの内因性凝集因子をも不活性化するのに有効な試薬に接触させることを伴なう。次いで、該標本と、該標的生体部分上に存在する少なくとも1の特性決定因子に対して結合アフィニティを有する生体特異的リガンドに連結されたコロイド状磁性粒子との混合物を含む免疫磁性懸濁液を調製し、該磁性粒子は特異的結合ペアのうち一方のメンバーを含む第1の外因性凝集促進因子にさらに連結されている。次いで、第2の多価外因性凝集促進因子を該免疫磁性懸濁液に添加して、該粒子の凝集を増大させ、該第2の凝集促進因子は該特異的結合ペアのうち他方のメンバーを含み、それは該磁気標識標的生体部分に可逆的に結合する。次いで、該試料を磁場に付して、標的生体部分 - 富化フラクションを得る。この好ましい具体例は、制御された可逆的な様式でフェロ流体を標的部分上で凝集させることが実質的に向上した単離効率をもたらすという事実を利用する。 10

【0026】

さらなる具体例において、上記の方法は、さらに、該標的生体部分上の少なくとも1のさらなる特性決定因子を認識し標識する少なくとも1の生体特異的試薬を添加するステップを含む。次いで、そのように標識された標的生体部分を磁場中で分離して、未結合生体特異的試薬を除去する。非細胞排除剤を該分離された標的生体部分に添加して、該試料中に存在する非核形成部分の排除を可能にする。次いで、該標的生体部分を精製し、さらに分析する。外因性凝集因子が介在する凝集を反転するために、該特異的結合ペアを当該精製された生体部分に過剰に添加して、細胞上のフェロ流体の凝集を減じることができ、これによって、例えば、顕微鏡で細胞の観察を容易にする。この目的のための適当な特異的結合ペアは、限定されないが、ビオチン - ストレプトアビジン、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、プロテイン A - 抗体 Fc、アビジン - ビオチン、ビオチン・アナログ - ストレプトアビジン、ビオチン・アナログ - アビジン、デスチオビオチン - ストレプトアビジン、デスチオビオチン - アビジン、イミノビオチン - ストレプトアビジン、およびイミノビオチン - アビジンを含む。好ましくは、該生体特異的リガンドは上皮細胞接着分子に対するアフィニティを有するモノクローナル抗体である。代表的な生体特異的試薬は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、検出可能に標識された抗体、抗体フラグメント、および一本鎖抗体を含む。単離された標的生体部分は、多重パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザ走査サイトメトリー、明視野基礎イメージ解析、キャピラリー容量測定、 20
30
手動細胞分析および自動細胞分析よりなる群から選択される手法によって分析することができる。

【0027】

本発明によれば、試料中のフェロ流体の凝集を制御することは、例えば、ある特定の部分の分離の効率を増大させるといった前記したいくつかの予期せぬ利益を有する。外因性凝集促進因子の添加が磁気負荷を増加させ、その結果、分離効率を増大しつつ、当該標的部分を単離するのに必要なフェロ流体の量を減少させる。増加した磁気負荷はインキュベーション時間の減少も可能にし、最適でない (s u b - o p t i m a l) 磁場の存在下での標的生体部分の単離を容易にする。

【0028】

本発明のさらなる具体例において、本明細書に記載された方法の実施を容易にするキットを提供する。標的生体部分を単離するためのキットは、(i) 磁性コア物質、タンパク質ベースコーティング物質、および該標的生体部分の第1の特性決定因子に特異的に結合する抗体を含む被覆磁性ナノ粒子、該抗体は、直接的または間接的に、該ベースコーティング物質に連結され；(i i) 該標的生体部分の第2の特性決定因子に対して結合特異性を有する少なくとも1の抗体；(i i i) 内因性凝集阻害因子；および(i v) 非核形成細胞を分析から排除するための非細胞排除剤を含む。 40

【0029】

本発明により、低抗原密度腫瘍細胞を生物学的試料から単離するのに必要とされるものであろう、ある種の生物学的部分の単離効率を向上するためのキットも提供する。このキッ 50

トは、磁性ナノ粒子の制御された可逆的な凝集を用いて、そのような向上を達成する。そのようなキットは、(i) 内因性凝集因子を不活性化するのに有効な試薬；(i i) 磁性コア物質、タンパク質ベースコーティング物質、および該標的生体部分の第 1 の特性決定因子に特異的に結合する抗体を含む被覆磁性ナノ粒子、該抗体は、直接的または間接的に、該ベースコーティング物質に連結され；該磁性粒子は第 1 の外因性凝集促進因子にさらに連結され、該因子は特異的結合ペアの一方のメンバーを含み；(i i i) 該腫瘍細胞の第 2 の特性決定因子に対して結合特異性を有する少なくとも 1 の抗体；(i v) 第 2 の外因性凝集促進因子、該第 2 の凝集因子は該特異的結合ペアの他方のメンバーを含み；および(v) 当該腫瘍細胞以外の非核形成試料成分を分析から排除するための非細胞排除剤を含む。所望により、このキットは当該内因性凝集因子を反転する試薬を含むことができる。そのようなキットに有用な特異的結合ペアは、限定されないが、ビオチン - ストレプトアビジン、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、プロテイン A - 抗体 F c、およびアビジン - ビオチン、ビオチン・アナログ - アビジン、デスチオビオチン - ストレプトアビジン、デスチオビオチン - アビジン、イミノビオチン - ストレプトアビジン、およびイミノビオチン - アビジンを含む。内因性凝集因子を不活性化するのに有効な試薬は、還元剤、動物血清タンパク質、免疫複合体、炭化水素、キレート剤、非コンジュゲートドフェロ流体 (a n u n c o n j u g a t e d f e r r o f l u i d)、およびジアミノプタンを含む。

【 0 0 3 0 】

本発明の方法、組成物およびキットは磁性ナノ粒子の凝集を制御し、かくして、生物学的標本からの稀少な生物学的物質または細胞の単離、視覚化、およびキャラクタリゼーションを容易にする。

【 0 0 3 1 】

図面の簡単な説明

図 1 A ~ 1 H は、高レベルの内因性凝集因子を持つ血液ドナー採取された試料を低レベルの内因性凝集因子を持つものと比較して顕微鏡観察されたものを描写する一連のマイクログラフである。乳ガン細胞を全血にスパイクし、E P C A M コロイド状磁性粒子を用いて選択し、懸濁状態で染色する。図 1 A、透過光のみ、低凝集；図 1 B、透過光のみ、高凝集；図 1 C、ヘキスト核染色で染色された細胞、低凝集；図 1 D、ヘキスト核染色で染色された細胞、高凝集；図 1 E、上皮細胞マーカーサイトケラチン・アレクサ 4 8 8 (A l e x a 4 8 8) で染色された細胞、低凝集；図 1 F、上皮細胞マーカーサイトケラチン・アレクサ 4 8 8 (A l e x a 4 8 8) で染色された細胞、高凝集；図 1 G、フィコエリスリンにコンジュゲートした腫瘍細胞マーカー e r b 2 で染色した細胞、低凝集；図 1 H、フィコエリスリンにコンジュゲートした腫瘍細胞マーカー e r b 2 で染色した細胞、高凝集。

【 0 0 3 2 】

発明の詳細な記載

本明細書で用いられる「標的生体部分」なる用語は、生物学的または医学的対象の幅広い物質をいう。例えば、ホルモン、タンパク質、ペプチド、レクチン、オリゴヌクレオチド、薬物、化学物質、核酸分子(例えば、RNA および/または DNA) および、細胞、ウイルス、細菌等の生体粒子を含む生物学的起源の微粒子分析物を含む。本発明の好ましい具体例において、母性循環中の胎児細胞または循環ガン細胞のごとき稀少細胞が、本発明の方法、組成物およびキットを用いて、非標的細胞および/または他の生体部分から効率的に単離することができる。「生物学的標本」なる用語は、限定されないが、ヒト対象から得ることが可能な、細胞含有体液、末梢血、組織ホモジネート、乳頭吸引物 (n i p p l e a s p i r a t i o n) および他の稀少細胞の起源を含む。代表的な組織ホモジネートは、乳ガン患者の徴候リンパ節から得ることが可能であろう。前記標的生体部分のいずれかに関して用いられるとき、「決定因子」なる用語は、生体特異的リガンドまたは生体特異的試薬によって特異的に結合され、特異的結合物質に対する選択的結合に参与し、それを荷う標的生体部分のその部分をいい、その存在は選択的結合が生じるために必要

である。基礎的用語において、決定因子は特異的結合ペア反応において受容体によって認識される標的生体部分上の分子接触領域である。本明細書で用いられる「特異的結合ペア」なる用語は、抗原 - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、アゴニスト - アンタゴニスト、レクチン - 炭化水素、核酸 (RNA または DNA) 加水分解配列、Fc 受容体またはマウス IgG - プロテイン A、アビジン - ビオチン、ストレプトアビジン - ビオチンおよびウイルス - 受容体相互作用を含む。様々な他の決定因子 - 特異的結合物質の組み合わせは、本発明の方法の実施に使用することが意図され、そのようなものは当業者にとって明白であろう。本明細書で用いられる「抗体」なる用語は、免疫グロブリン、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、免疫反応性免疫グロブリンフラグメント、および一本鎖抗体を含む。ペプチド、オリゴヌクレオチドまたはそれらの組み合わせも本発明の使用に意図され、それらは、慣習的に生成される抗体と同様の特異性で決定因子を特異的に認識する。「検出可能な標識」なる用語が本明細書で用いられ、直接的かまたは間接的かのいずれかで、物理的または化学的手段によるその検出または測定が当該試験試料中の標的

生体部分の存在を示すいずれの物質をもいう。有用な検出可能標識の代表例は、限定されないが、以下の：光吸収、蛍光、反射率、光散乱、りん光または発光特性に基づき直接的または間接的に検出可能な分子またはイオン；それらの放射能特性によって検出可能な分子またはイオン；それらの核磁気共鳴または常磁性特性によって検出可能な分子またはイオンを含む。光吸収または蛍光に基づき間接的に検出可能な分子の群の中には、例として、例えば、非光吸収性から光吸収性分子へ、または非蛍光性から蛍光性分子へ転換する適切な基質を生じる種々の酵素が含まれる。核酸ダイまたは他のレポータ分子は、本明細書で

、時に、非細胞排除剤といい、標的

生体部分および、無傷の核形成細胞のごときある種

の非標的

生体部分の双方を同定することができるが、それを当該試料に添加して、フローサイトメトリー、顕微鏡観察、または他の分析プラットフォームによる分析前に、いずれの残存非核形成細胞または他の潜在的な阻害性試料成分をも排除することを可能にする。非細胞排除剤は DNA、RNA、タンパク質または脂質と反応することができ、得られた信号量は細胞に対して得られるものの典型であるか、または得られた像が、細胞および核の膜、核ならびにミトコンドリアのごとき細胞の典型的な特徴を明らかにする。

10

20

【0033】

本明細書でフェロ流体濃度、磁場強度、またはインキュベーション時間を説明するのに用いられる「最適 (optimal)」なる用語は、標準未修正のアッセイ、分離、単離または富化に用いる条件をいう。

30

本明細書でフェロ流体濃度、磁場強度、またはインキュベーション時間を説明するのに用いられる「最適でない (sub-optimal)」なる用語は、アッセイ、分離、単離または富化に用いる条件をいい、最適条件下で得られる結果と比較して、劣った結果を生じる。

【0034】

本明細書で用いられる「フェロ流体」なる用語は、懸濁状態の磁性ナノ粒子をいう。フェロ流体および磁性ナノ粒子なる用語は、本明細書において交換可能で用いられる。内因性フェロ流体凝集因子は試験対象から単離された試料に存在するものである。外因性凝集因子は本明細書で挙げられたものであって、調査員によって所望するように添加および/または反転されるものである。

40

【0035】

本発明に使用するのに好ましい磁性粒子はコロイドとして振る舞い、超常磁性の粒子である。コロイドは、そのサイズ、すなわち、200 nm より小さいことで特徴付けられ、すなわち、分析を阻害しないサイズのものである。超常磁性粒子は、それらが磁場勾配に付されたときにのみ磁性になり、永久的には磁性にならない。コロイド状超常磁性粒子は延長された時間水性溶液から分離も静置もされない。これらの粒子は酸化鉄の単一結晶または、物理的に吸着されたかまたは共有結合したかのいずれかの分子によって取り囲まれたそのような結晶の凝塊のいずれかよりなる。上記の特性を有するコロイド状磁性粒子は米国特許第 4,795,698; 5,512,332 および 5,597,531 号に記載さ

50

れたようにして調製し得る。モノクローナル抗体は、細胞の特異的サブセットを認識し、磁性粒子にコンジュゲートしたものが本発明の使用に好ましい。

【0036】

稀少細胞単離の研究過程において、ある種の患者の血液中に存在し、磁性ナノ粒子の凝集を引き起こす因子が発見された。さらに、この促進凝集効果は容易に反転可能のようである。かくして、低受容体密度の稀少細胞は、より多くのフェロ流体を「負荷」することによって、対象の稀少細胞の特性決定因子に特異的に結合するものよりもより効率的に、適度に希釈された全血から外部場四極子または六極子セパレータ中で単離し得る。単離された細胞を顕微鏡観察によって調べると、フェロ流体クラスターが細胞膜に存在している。促進効果の反転が該クラスターを解凝集し、当該細胞の微視的分析を容易にする。この内因性促進効果は、見掛け上正常なドナー血液試料の約90%において様々なレベルで存在する。アッセイ条件を操作することによって、得られたフェロ流体クラスターは対象の細胞を損傷することなく消滅させ得る。かくして、本発明は、内因性フェロ流体凝集因子の効果を排除する方法および、所望する場合、フェロ流体の凝集を制御し反転させることが可能な剤を構築する手段を提供する。これは、稀少細胞ならびに、ウイルスおよび細菌のごとき他の生物学的部分の効果的、かつ、有効な単離、およびその後の分析を許容する。

10

【0037】

血液に見出される内因性フェロ流体凝集物質は、米国特許第5,597,531号に記載されるように、以下の特徴を有する：(1)それは血漿または血清中に存在する；(2)それはミリモラー濃度のジチオトレイトールに対して感受性である；および(3)それは、被覆されたフェロ流体の直接上にある(*on direct coated ferrofluid*)「裸」の結晶性領域と反応する。対照実験は、当該因子はフェリチン、トランスフェリン、フィブリノゲン、C1q、ヒト抗マウスまたは抗BSA抗体ではないことを明らかにした。該凝集物質はIgGサブクラスのものでもない。なぜならば、IgG-喪失血漿も該フェロ流体の凝集を引き起こすからである。フェロ流体凝集はフェロ流体または血清の濃度に相関するようである。いずれかの成分の濃度への凝集依存性は、沈降素曲線で観察されるものに類似し、上記の観察に基づき、該物質はIgMであると仮定した。これは該IgGを免疫アフィニティー精製で該血漿試料から除去することによって結論的に証明された。得られたIgM喪失血漿はフェロ流体凝集を引き起こさなかった。

20

【0038】

同一血漿試料をBSAアフィニティー媒体全体に吸収させた対照実験は、フェロ流体凝集を示した。さらなる研究は、該凝集因子と共にフェロ流体を含有する大量の血清の吸収は少量の全IgMを除去したのみであること、および精製されたヒトIgMがフェロ流体凝集を生じることを論証した。これらの観察ならびに吸収された凝集因子および吸収/脱吸収物質で凝集を引き起こす能力の同定研究は、これらの実験における凝集因子は、実際に高度特異的IgMであるという結論を導く。タンパク質で不完全に被覆されたマグネタイト結晶またはせっけんで部分的に被覆されたマグネタイト結晶を除き、該フェロ流体を形成するのに用いられたいずれの成分による凝集を阻害することに対する無能力に基づき、該IgMによって認識されるエピトープはマグネタイト結晶性表面上に存在すると確信される。この特異的IgMの役割は知られていないが、それは相当な部分のヒト母集団中に様々なレベルで存在する。この抗体は鉄代謝においてある役割を演じている可能性がある。

30

40

【0039】

内因性促進因子を操作する方法は本明細書に記載され、それは意味あるやり方で単離された細胞の患者対患者比較を許容する。内因性凝集促進因子は患者母集団において変動するので、腫瘍細胞、母性血液中の胎児細胞またはウイルス感染細胞である稀少循環細胞を分離する標準手順を創るのは困難である。共係属出願(第09/248,388号)に記載された最近の発見は、循環細胞数の規模は乳ガン患者の全身腫瘍組織量および疾病段階に直接関係することを論証した。同様に、全身ウイルス組織量はHIV感染の予後において相当なものであると示されている。そのような部分の正確な定量の必要がさらに一層重要

50

になってきている。本明細書に記載された方法は、臨床設定において有利に用いることができる試験キットによって簡便に実施される。

【0040】

ドナー血清中でこのフェロ流体凝集因子（FFAF）の存在が発見されたことで、注意深い研究は、モノクローナル抗体コンジュゲートドフェロ流体を用いて、その存在がスパイクド低密度腫瘍細胞の回収率を著しく向上することを確認した。これらの研究において、FFAFを含有する血液を1細胞/2mlのレベルにてスパイクされた細胞は70%以上の効率で規定通りに回収される。対照的に、FFAFが存在しないドナー血液において、回収の効率はおよそ15~25%に低下する。これらの実験から、以下の観察がなされた：

1. 低密度受容体細胞は、しばしば、高密度受容体よりも低い効率で単離され；
2. 分離効率は低密度受容体細胞に関してかなり変動し、この変動は当該血液ドナーに依存し；
3. 異なるドナーの血液からのフェロ流体/磁気単離後、いずれの細胞タイプ（高いまたは低い密度の特性決定因子細胞）を顕微鏡観察で調査したとき、フェロ流体は患者試料の約90%が凝集し；
4. 回収された腫瘍細胞はそれらの表面上に様々な程度の視覚的なフェロ流体凝集を有する。

しかも、当該凝集物質はDTTに対して感受性であるので、回収された細胞は、観察前にフェロ流体の凝集の減少によって、形態上の特性に関する顕微鏡観察によって容易に視覚化し得る。

【0041】

細胞回収を促進する、FFAFの現象と鎖化（米国特許第5,466,574号を参照せよ）を比較すると、いくつかの興味深い結論を導き出し得る。多くの個人における場合のように、FFAFが過度に低い濃度で血液中に存在するとき、低密度受容体スパイクド細胞（例えば、1~5細胞/ml血液）の優れた回収が得られる。回収された細胞の品質は、それらの表面上の磁性物質のレベルにより評価すると、形態学的調査またはさらなる操作に非常に適したものである。FFAFが高い濃度であるとき、回収は優れているが、細胞上の凝塊がそれらの観察を妨害するので、回収された細胞の品質は許容できない。それゆえ、鎖化の成分、すなわち、濃度によって限定されるモノクローナル抗体-フェロ流体「鎖」とは異なり、非常に効果的な細胞分離に導き得るFFAFのレベルがあり、かくして、効率的に研究し得る細胞の単離された母集団を提供する。本発明のある具体例において、当該試料中の内因性FFAFは最初不活性化され、調査員により本明細書に記載された組成物を添加することによって、凝集を制御し得るようにする。このようにして、凝集は、所望するように促進または阻害し得る。

【0042】

FFAFおよびいずれの同様の物質は稀少細胞を単離するアッセイにおいて評価されるべきである。そのような因子を制御して、全ての患者に対して信頼して機能する試験を開発すべきである。例えば、多くの個人が抗げっ歯類抗体または炭化水素のごとき成分に対する抗体を有しており、それらはいくつかの磁性ナノ粒子の表面上に見出すことができるであろう。血液中に通常存在する他の潜在的な凝集物質は、Clq、リユーマチ因子、および血栓タンパク質を含む。そのような反応は、それらを標本-標本間で一定にするように制御するか、または完全に排除するかのいずれかである。抗げっ歯類抗体の場合、それらの凝集効果を阻害するようにげっ歯類タンパク質を当該系に添加することによって、これを達成する。この添加は、免疫アッセイ系にそのような成分を添加することとは全く異なる。後者の場合、一般に、げっ歯類抗体は単離を促進するが、それらは、捕捉した抗体を標識抗体とサンドイッチ型反応で連結するので擬陽性を増加する傾向にある。対照的に、本発明の方法で用いられるさらなる抗体は低密度受容体細胞の回収を促進する。かくして、ある場合、凝集因子は擬陽性を自然に上昇し得、別の場合、当該標的生体部分の単離を容易にする。

10

20

30

40

50

【0043】

そのような因子を競争的に阻害することに加えて、それらを無能化するか、または溶液から吸収することができ、あるいは、そのような因子が結合する磁性コロイド上の決定因子を除去することができる。マウスまたは他の動物の血清タンパク質、免疫コプレックス、炭化水素、補体を含む、種々の活性化システムを阻害するキレート剤、およびジアミノブタンのごとき、C1qと反応した抗体との相互作用を特異的に阻害する化合物のごとき、最適量の添加物を含有する特別のバッファーを調製することによって、FFAF活性を阻害することができる。FFAFがIgMの場合、還元剤が、細胞を標識するのに用いたリガンドに影響することなく、効果的にFFAFを無能化する。かくして、そのような因子は化学的または酵素的に選択的無能化し得る。適切な物質、例えば、非コンジュゲートドフェロ流体での吸収は、該試料中の凝集因子を別の経路で除去する。

10

【0044】

凝集(aggregator)の量を患者-患者間で一定にして、常に同一レベルの促進因子を有するようにすることも可能であろう。これは様々な方法で達成することができる。例えば、全ての内因性因子を全患者試料において同一レベルに減少することができる。しかしながら、これは困難で非現実的解決のようである。代わりに、二段階プロセスを用いることができる。第1段階として、全ての内因性FFAFを該フェロ流体のその標的への特異的リガンド結合またはその後の細胞分析に影響することなく無能化する。第2段階は、制御された凝集反応を伴う。二種のリガンドにコンジュゲートされたコロイド状磁性物質を用いて、上記ツーステッププロセスを実施することができる。モノクローナル抗体のごときのリガンドは細胞表面決定因子に向けられ、効率的に細胞を標識するであろう。二番目のリガンドはいずれの血液成分とも反応しないが、第1リガンドとの結合後に添加されるであろう多価成分に対して結合アフィニティを有する。かくして、さらなる磁性コロイドはすでに細胞に結合しているコロイドに結合し、それによって、FFAFが行うのと丁度同じように、それらの磁気負荷を促進する。同様に、第2リガンドの反応とその多価成分との反応が可逆的であれば、好ましい。第2反応の正しい成分およびそれらの濃度を選択することによって、フェロ流体と凝集因子とを同時に添加することが可能になる。

20

【0045】

したがって、フェロ流体の凝集の制御を容易にし、それによって、稀少産生生物学的部分の回収を促進するFFAFが提供される。理想的凝集因子は可逆的凝集効果を媒介するものである。凝集の反転は磁性ナノ粒子クラスターを排除し、単離された細胞の視覚化を容易にする。本発明の因子は上記した理想的磁性粒子条件と同様のやり方で、すなわち、標的に結合しているコロイド状ナノ粒子をそのプロセスを容易に反転させる能力を持つ大きな粒子に転換することによって、作動する。ほとんどの正常ドナーの血液中に存在し、低密度受容体稀少細胞の単離効率を促進する内因性因子の同定および調査を本明細書に記載する。

30

【0046】

好ましいFFAFは、フェロ流体磁性粒子上の決定因子を認識する特異的多価物質を含み、それによって、該粒子を架橋する。この因子は血漿中に天然に産生されるか、または外部から添加された試薬であろう。いくつかのタイプの外因性試薬がこの目的に適し、限定されないが、IgG、二量体IgG、IgM、ストレプトアビジン、アビジン、プロテインA、プロテインG、二量体または四量体のポリ-Aもしくはポリ-T、または特異的オリゴヌクレオチド配列を含む。第2リガンドはフェロ流体上に導入し得、FFAFによって認識され得る。ハプテン、ビオチン、ビオチン・アナログ(イミノビオチン、デスチオビオチン)、ヒツジIgG、ヤギIgG、ラットIgG、ポリ-Aまたはポリ-T、またはオリゴヌクレオチドのごとき、選択することができるいくつかのタイプの第2リガンドがある。FFAF-第2リガンド相互作用は、可逆的または不可逆的のいずれかであってよいが、可逆的相互作用が好ましい。還元剤、過剰なハプテン、過剰なハプテン・アナログ、過剰な第2試薬の・アナログ、塩濃度の変化、pHの変化または温度の変化のごとき

40

50

F F A F - 第2リガンド相互作用を反転するのに用いることができるいくつかの試薬がある。

【0047】

アッセイまたは分離を最適条件下で行うとき、当該標的細胞のパーセント回収率は最大限である。しかしながら、外因性凝集が誘発されたとき、条件を修正することができるのは明らかである。高密度表面受容体標的細胞の場合、最大回収率に必要なフェロ流体の量は外因性凝集なしにかなり高く、利用可能な結合部位の全てを飽和することによって、各標的が磁氣的に反応性であることを保証する。本発明のひとつの利益は、利用可能な結合部位の全てを飽和する必要がないので、分離に必要な総フェロ流体が少ないことである。これは、外因性凝集因子が介在する磁性粒子の架橋を形成し、結合部位あたりの磁気量を増加させる能力によるものである。細胞あたりに多くの単一磁性粒子の使用によって細胞を磁気応答性にする、すなわち、一つの粒子が一つの細胞表面抗原に結合する代わりに、複数の粒子の凝集体を単一抗原に結合し得、最適に捕捉された細胞と同じ磁力を維持するであろう。今や、各粒子は細胞表面抗原または別の粒子に結合する能力を有する。言い換えれば、少ない総フェロ流体しか用いないのにもかかわらず、各標的細胞は同一の磁気応答性を有し、得られた分離効率は最適条件下で得られたものに匹敵する。最適には、試料1mlあたり10 μ gのフェロ流体を用いる。この濃度は本発明によれば、10倍減少させることができる。

10

【0048】

必要なフェロ流体の量を減少させることに加えて、磁力ならびにインキュベーション時間を減少させ得る。本発明の凝集体は非凝集分離における個々の磁性粒子よりも大きいので、より低い磁場強度でも当該凝集体を移動し得る。外因性凝集を進行させて、小さな磁性粒子から一次的、かつ、可逆的大磁性粒子を生成する。実際に、大きな粒子の利益は、分離に弱い磁場を用いる能力を含み、本発明に適用し得る。典型的に用いられる四極子磁気セパレータは容器表面にて6.3kガウス/cmの磁場勾配を維持する。双極子のごとき磁気配列は該容器表面にてほぼ半分の磁場強度を有し、本発明の方法を実行するのに用いることができる。

20

【0049】

非凝集系において、有効分離のため細胞あたりの磁性粒子数を増加させるために、より長いインキュベーション時間が必要である。この系において、一つの磁性粒子は一つの細胞表面抗原に結合する。しかしながら、外因性-誘発凝集系において、当該誘発された凝集体により、抗原あたり複数の粒子を生じることによって、細胞あたり同数の粒子を達成し得る。これはインキュベーション時間を短縮することを可能にする。なぜならば、全ての利用可能な結合部位が磁性粒子に結合する必要がないからである。この第2の結合ペアメンバを添加することによって、今や、該粒子は遊離細胞表面抗原にのみ結合できる代わりに、他の粒子に結合し得る。したがって、上で説明したように、結合部位は、最適条件と同じ磁気応答性を有するために飽和される必要がなく、これはインキュベーション時間の減少を許容する。磁気インキュベーションの最短時間は30分間である。本発明を用いれば、これらの時間を3倍にまで減少させることができる。しかしながら、フェロ流体濃度を低下させ、インキュベーション時間を短縮することを両方同時にすることを意図しない。これらのステップの変形を互いに独立して用いて、標的生体部分の最大回収率を維持する。

30

40

【0050】

外因性フェロ流体凝集因子により認識された第2リガンドを、標準カップリング化学によって、上記モノクローナル抗体に加えてフェロ流体にカップリングする。第2リガンドはハプテンもしくはビオチン・アナログのごとき小分子または抗体もしくは特異的タンパク質のごとき大分子またはポリペプチドもしくはポリオリゴヌクレオチドのごときポリマーであってよい。デスチオビオチンのごときビオチン・アナログが本発明の第2リガンドとして磁性粒子にコンジュゲートするのに好ましい。なぜならば、低めのアフィニティー(ストレプトアビジンにつき $K_a = 10^6 M^{-1}$ 、天然ビオチン($K_a = 10^{15} M^{-1}$))

50

に比較して)を示すからである。ストレプトアビジンとデスチオビオチンとの間の相互作用は過剰ビオチンの添加により簡単に崩壊し得る。デスチオビオチンとアビジンとの組み合わせは当該標的物質から磁性粒子または不溶相を除去するのに用いられてきた(PCT/US94/10124および米国特許第5,332,679号)。本発明において、その組み合わせは磁性粒子を凝集させ、解凝集させるためにのみ用い、磁性粒子を標的物質から除去するためには用いない。

【0051】

本発明に用いる反応容器はガラス製またはプラスチック製のいずれかでよいが、プラスチックチューブが好ましい。チューブの底部は丸いか円錐の形であってよい。異なる長さまたは径のチューブを用いて、異なる体積の試料を処理することができる。例えば、いくつかの場合、50mlコニカル管を用いて、20ml以上の血液を処理することができる。本発明の一つの具体例において、12×75mmポリスチレンチューブまたは15mlコニカルチューブを用いる。磁性粒子でインキュベーションする間に用いる反応容器と磁気分離の間に用いる容器とは同一である必要はない。1のタイプをインキュベーション用に、別のタイプを磁気分離用に、2つの異なるタイプの容器を用いることができる。しかしながら、両方の場合に一つの容器のみを用いるのが好ましい。磁気分離容器はチューブまたはフロースルーチャンバーまたはある別のデバイスであってよい。

【0052】

本発明を実施するのに用いる試験媒体はいずれの液体または標的物質を含有する溶液であってもよく、好ましくは血液である。該反応容器内の試験試料は標的物質に特異的な抗体にコンジュゲートされたフェロ流体およびFFAFに特異的な第2リガンドと共にインキュベートすることができる。なお、外因性FFAFは、フェロ流体と同時にまたはフェロ流体が標的物質に結合した後に該試験試料に添加する。所望により、天然に産生する凝集因子を阻害または無能化する試薬をフェロ流体と同時にまたはフェロ流体の添加の前に添加することができる。最適インキュベーション時間後、磁気標識標的を磁気セパレータ中で残りの試験媒体から分離する。磁気セパレータおよび分離時間は試験媒体および反応容器に基づいて選択される。米国特許第5,186,827号に記載されたものごとき、高勾配磁気分離装置を用いるのが好ましい。未収集液体を吸引した後、収集した細胞を、細胞内染色のため細胞の透過性をあげるために、等張バッファーまたは透過性化溶液に懸濁させる。磁気標識細胞を磁氣的に再分離して、透過性化試薬を除去する。標識物質での染色のため、収集した細胞を少量の細胞バッファーに再懸濁させる。バッファー量は100~300 μ lであろう。所望により、該細胞バッファーは、上記のごとき解凝集試薬、例えば、ビオチンを含有することができる。ビオチンの最終濃度は1~5mMであってよい。抗体染色のためのまたは解凝集試薬でのフェロ流体の解凝集のためのインキュベーション時間は10~60分間であってよく、好ましくは15分間である。抗体での最適な染色またはフェロ流体の解凝集の後、過剰な試薬を別の磁気分離によって除去することができる。未収集液体を吸引した後、収集した細胞を少量の等張バッファーに再懸濁させる。このバッファーの量は100~500 μ lであってよい。フェロ流体標識細胞をさらにプロセスするか、またはフローサイトメトリーもしくは顕微鏡観察によって分析することができる。

【0053】

抗体にコンジュゲートされた磁性粒子のみを上記に記載してきたが、他のタイプのコンジュゲートされた磁性粒子が本発明の使用に意図される。抗体以外のタンパク質に対してコンジュゲートされた磁性粒子を用いることができる。例えば、抗体-ビオチンコンジュゲートで標識された標的細胞に結合するストレプトアビジン・コンジュゲート磁性粒子を用いることができる。標的細胞の標識後、遠心を用いる洗浄工程によって、過剰な抗体-ビオチンを除去することができる。次いで、抗体-ビオチンで標識された標的細胞を、細胞の磁気標識のためにストレプトアビジンフェロ流体と共にインキュベートする。いずれかのポリマーまたはタンパク質(凝集因子)にコンジュゲートされたデスチオビオチンを当該試験媒体に添加して、フェロ流体を凝集させる。磁性粒子と共に同時に、または該

磁性粒子が該標的細胞に結合した後に、凝集因子を添加することができる。ポリマーまたはタンパク質あたりのデスチオビオチンの数は凝集体フェロ流体に対して1を超えるべきである。好ましくは、ウシ血清アルブミン(BSA)にコンジュゲートされたデスチオビオチンを用いることができる。BSAに対するデスチオビオチンの数は2~10であろう。そのようなデスチオビオチン/タンパク質コンジュゲートを以下に記載するように合成することができる。

【0054】

本明細書には、主に血液からの腫瘍細胞選択を参照して、本発明を説明しているが、本発明は腫瘍細胞選択に限定されない。CD34、CD4および胎児細胞のごとき、血液、ロイコフォレシス(leukophoresis)または骨髄中に存在する他の細胞タイプを選択することができる。それらの細胞上の抗原決定因子は低いし高であろう。より一般的には、本発明は、その効果的単離のために磁気促進が必要ないずれの細胞の単離に対して向けられる。

10

以下の実施例は、本発明の様々な具体例を例示するために与えられる。これらの実施例は、本発明の範疇を限定する意図は全くない。

【0055】

実施例 I

以下のデータは、血液試料中にスパイクされた低および高密度受容体腫瘍細胞の回収に対する本発明のFFAFの効果为例示する。代表的なFFAFは、ほとんどのドナーの血液試料中に存在する特異的IgMであると同定されている。ジスルフィド結合を切断するジチオトレイトール(DTT)およびスルホン酸メルカプトエタン(MES)のごとき、還元剤は五量体IgMをその単量体形態に転換することによって、血液中でのフェロ流体凝集を阻害した。DTTは本発明の使用のためには好ましい試薬ではない。なぜならば、高い濃度であれば、細胞モルホロジーを変化させ、標的細胞および白血球に対して毒性だからである。

20

【0056】

この実施例に、フェロ流体凝集および、スパイクド血液からの高および低抗原密度の両方の腫瘍細胞の腫瘍細胞回収率に対するMESの効果に記載する。この研究に用いられたプロトコルは以下である。血液(2ml)を12×75mmポリスチレンチューブに入れ、1mlのイムニコン(Immunicon)希釈-洗浄バッファーを添加して、該血液を希釈する。次に、約1000SKBR3またはPC3細胞を含有する100μlの細胞バッファー(1%BSAおよび50mMEDTA入り等張7mMリン酸塩、pH7.4)を添加した。(150μlを超えずに)体積を増加させてMEAを血液試料に添加して、異なる濃度の還元剤を得る。混合した後、EpCAMMAb(GA73.3;50μl)コンジュゲートドフェロ流体磁性粒子を該試料に添加する。磁性粒子の最終濃度は5μg/mlであった。該血液試料をよく混合し、室温にて15分間インキュベートする。インキュベーション後、該血液試料を含有するチューブを四極子磁気分離装置に入れた。磁気分離を10分間行った。上清を吸引し、該チューブを該磁気装置から取り出した。磁氣的に収集された細胞を1mlの希釈-洗浄バッファーに再懸濁させ、次いで、四極子磁気分離装置中で5分間再分離した。上清を廃棄し、該四極子装置から取り出した後、標的細胞を150μlの希釈洗浄バッファー中に再懸濁させた。この試料の一部(5μl)を顕微鏡スライド上にスポットした。次いで、デジタルカメラが取り付けられた顕微鏡を用いて、該回収された細胞の写真を撮影した。

30

40

【0057】

残りの試料をフローサイトメトリー分析に付して、以下の手順を用いて、腫瘍細胞の回収率を評価した。腫瘍細胞(Neu24.7)に特異的なフィコエリスリン(PE)-コンジュゲートドMAb(5μl)および5μlのペリジニン-クロロフィルタンパク質(PerCP)-コンジュゲートドCD45モノクローナル抗体を該試料に添加し、次いで、それを15分間インキュベートした。インキュベーション後、1mlの希釈-洗浄バッファーを添加し、磁気分離を行って、過剰な染色抗体を除去した。磁氣的に収集された

50

細胞を500 μ lの希釈・洗浄バッファーに再懸濁させた。核酸ダイ(10 μ l)および5 μ lの3mMサイズの蛍光ビーズ(5000)をこの試料に添加した。次いで、FL1を感度限界として用いてFACSCaliburフローサイトメータ(ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)社)で、該試料を分析した。フローサイトメータで獲得された蛍光ビーズの画分を用いて、フローサイトメトリーによって分析された試料の量を決定し、その結果、an un conjugated ferrofluid 腫瘍細胞の回収率の計算を容易にする。

【0058】

【表1】

MES濃度 (mM)	腫瘍細胞回収率 (%)	
	SKBR3	PC3
0	77	46
20	80	50
50	80	31
75	82	27
100	70	17

10

20

【0059】

顕微鏡で見ると、MESの不存在下で、最終試料は遊離フェロ流体凝集体および腫瘍細胞上のフェロ流体凝集体が示された。MES濃度を増加すると、フェロ流体凝集体が減少し、高濃度のMESでは、凝集体は観察されなかった。次いで、これらの視覚結果をフローサイトメトリーによって測定された腫瘍細胞回収率と比較した。MESの添加はSKBR3細胞(高抗原密度)の回収率に余り効果がなかったが、顕微鏡観察は、それが溶液中および細胞表面上のフェロ流体凝集を減少させていることを明らかにした。対照的に、MESはPC3細胞(低抗原密度)の回収率には著しい効果があった。MESの濃度が約0から100mMに増加すると、回収率は47%から17%に減少した。増加する濃度のMESの存在下、PC3細胞の回収率におけるこの減少は、フェロ流体凝集の阻害によるものであり、細胞へのMESのいずれの副作用によるものではない。なぜならば、MESは溶血試料から得られた同一のスパイクドPC3細胞の回収率を減少させないからである。溶血は、赤血球を塩化アンモニウムで溶菌し、次いで、洗浄ステップで血漿および塩化アンモニウムを除去することによって得る。溶血試料は白血球(白色細胞(white cells))のみを含有し、一方、全血は赤血球および血漿も含有する。溶血ではフェロ流体凝集は観察されない。しかも、MESは細胞モルホロジーにもあまり影響しない。これらのデータは、低抗原密度細胞は高抗原密度細胞よりも低い効率で単離され、フェロ流体凝集の阻害は低抗原密度細胞の単離に劇的に影響することを示す。洗浄された血液(血漿を除去した血液細胞)を用いたときも、フェロ流体凝集は観察されなかった。したがって、洗浄された血液試料を凝集なしの対照として用いた。全血と丁度同じように、SKBR3細胞の回収率は洗浄された血液で減少しなかった。一方、PC3細胞の回収率は、洗浄された血液を用いたとき、著しく減少した(2ないし5倍)。このデータは、フェロ流体凝集はSKBR3細胞の回収率には全く効果がないが、PC3細胞の回収率には大きな効果を有することを示している。

30

40

【0060】

要約すれば、様々なレベルの多くの患者の血液中に存在する血漿成分(IgM)での腫瘍特異的フェロ流体の凝集は低抗原密度細胞の回収率に著しい効果を有する。そのような細

50

胞の回収率はフェロ流体凝集の程度に影響され、凝集の増加に伴って増大する。フェロ流体凝集は、当該細胞の磁気負荷を増加させることによって低抗原密度細胞の回収率を増大する。フェロ流体凝集は凝集させる因子、すなわち、凝集剤の濃度に依存して、一の血液ドナーと他のドナーと変動し得る。結果として、腫瘍細胞の回収率は、同数の循環腫瘍細胞を保持していても、人と人との間で変動する。同一人物からの血液中に存在する凝集剤も時間によって変動し得、かくして、フェロ流体凝集の程度および腫瘍細胞の回収率は変動する。この変化を防止する最善策は、天然に産生するフェロ粒子凝集因子を防止することである。しかしながら、これは腫瘍細胞単離および検出の効率の低下をもたらす。これらの状況下で腫瘍細胞の回収率を増大させる一つの手段は、弱磁気標識細胞を効率的に引っ張って、それらの回収率を増大させ得るより高い磁気勾配で、磁気装置を改良することである。腫瘍細胞の回収率を増大する別の策は外部試薬で天然フェロ粒子凝集を真似ることである。この試薬は、フェロ流体を認識し得る特異的多価試薬であって、血液およびフェロ流体に添加し得る。該特異的試薬はIgMと同様であるが制御された反応下で、フェロ流体を凝集させる。制御された凝集には2つの利点がある：(1)回収された腫瘍細胞のパーセンテージが増加し、(2)回収された腫瘍細胞のパーセンテージは、試料が同数の腫瘍細胞を有するとき、患者間で変動しない。

10

【0061】

実施例 I I

制御された凝集のためのデスチオビオチン/EpCAM MA bの調製

ベースフェロ流体を米国特許第5,698,271号に記載されたように生成する。上皮細胞付着分子(EpCAM)に対するモノクローナル抗体を、米国特許出願第09/248,388号で用いたように、標準カップリング化学によってベース物質にコンジュゲートさせた。次いで、EpCAM MA bフェロ流体を20 mM HEPES、pH 7.5に再懸濁させて、N-ヒドロキシスクシンイミド-DL-デスチオビオチン(NHS-デスチオビオチン)(シグマ(Sigma)社、カタログ番号H-2134)を用いてデスチオビオチンにコンジュゲートした。NHS-デスチオビオチンの母液をDMSO中1 mg/mlにて作製する。NHS-デスチオビオチン(19 μg)を1 mgのEpCAM MA bフェロ流体に添加し、室温にて2時間インキュベートした。高勾配磁石を用いて、1 mg/ml BSA、0.05% ProClin 300を含有する20 mM HEPES、pH 7.5で3回洗浄することによって、未反応NHS-デスチオビオチンを除去する。最終洗浄後、デスチオビオチン/EpCAM MA bフェロ流体をイムニコンフェロ流体保存バッファーに再懸濁させ、0.2 μmシリンジフィルターを通して濾過した。

20

30

【0062】

実施例 I I I

デスチオビオチン/EpCAMフェロ流体とストレプトアビジンとの凝集によるスパイクド血液からの低抗原密度PC3腫瘍細胞の回収率の増大化

この実施例において、低EpCAM抗原密度を有する前立腺ガン細胞(PC3)を正常血にスパイクし、そのスパイクド細胞の回収率を評価するモデル系として用いた。50 μlのバッファー(1% BSAおよび50 mM EDTA入りの等張7 mM リン酸塩、pH 7.4)中の既知数のPC3細胞(~5000)を12 x 75 mmポリスチレンチューブ中の血漿なし1 mlの正常血にスパイクした。血漿なし血液をこれらの実験に用いて、標的細胞の選択における血漿成分のいずれの妨害をも防止し、血液の遠心によりそれを調製した。500 μlのイムニコン希釈洗浄バッファーおよび15 μlのストレプトアビジンをPBS中で異なる濃度にて、該血液試料のアリコートに添加した。該試料を混合した後、実施例1からのデスチオビオチン/EpCAM MA bフェロ流体(25 μl)を該試料に添加し、よく混合し、室温にて15分間インキュベートした。フェロ流体の最終濃度は5 μg/mlであった。インキュベーション後、該血液試料を含有するチューブを10分間四極子磁気セパレータに入れ、磁気標識細胞を収集した。未収集試料を吸引し、該チューブを該磁気セパレータから取り出した。磁氣的に収集された細胞を750 μlの希釈-洗浄バッファーに再懸濁させて、磁気セパレータ中で5分間再分離した。未収集試料を再び

40

50

廃棄し、該チューブを該磁気セパレータから取り出した後、当該収集した細胞を150 μ lの希釈 - 洗浄バッファーに再懸濁させた。

【0063】

次いで、該試料を抗体で染色して、以下のようにしてフローサイトメトリーによって腫瘍細胞の回収率を決定した。腫瘍細胞 (Neu 24.7) に特異的な5 μ lのフィコエリスリン (PE) - コンジュゲートドMAbおよび5 μ lのペリジニクロロフィルタンパク質 (PerCP) - コンジュゲートドCD45 MAbを該試料に添加し、15分間インキュベートした。インキュベーション後、1 mlの希釈 - 洗浄バッファーを添加し、磁気分離を5分間行って、過剰な染色抗体を除去した。磁氣的に収集された細胞を500 μ lの希釈 - 洗浄バッファーに再懸濁させた。核酸ダイ (10 μ l) および5 mlの3 μ M蛍光ビーズ (5000) をこの試料に添加した。次いで、FL1を感度限界として用いてFACSCaliburフローサイトメータ (ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson) 社) で、該試料を分析した。フローサイトメータで獲得された蛍光ビーズの画分を用いて、フローサイトメトリーによって分析された試料の量を決定し、次いで、それを用いて、スパイクド腫瘍細胞の回収率を計算した。腫瘍細胞のパーセント回収率を以下の表に示す。

10

【0064】

【表2】

凝集剤ストレプトアビジンの濃度 (μ g/l)	腫瘍細胞 (PC3) %回収率
0.0	1.4
0.2	6.0
0.5	7.4
2.0	8.0
5.0	7.5

20

30

【0065】

フローサイトメトリー分析後に残った試料を2つの部分に分割した。PBS中の母液からのビオチンを該試料の1の部分に添加して最終濃度2 mMにし、室温にて15分間インキュベートしてストレプトアビジン - 介在フェロ流体凝集体を解凝集した。これらの試料 (5 μ l) を顕微鏡スライドスライド上にスポットし、デジタルカメラが取り付けられた顕微鏡を用いて、該回収された細胞の写真を撮影した。データは、凝集剤 (ストレプトアビジン) の濃度が増加すれば、腫瘍細胞 (PC3) の回収率が著しく増大し、2 μ g/l濃度のストレプトアビジンにて最大に達することを示唆する。これらの結果は、顕微鏡で観察された溶液中の遊離フェロ流体凝集体および細胞上のフェロ流体凝集体に相関した。0 μ g/lのストレプトアビジンにてフェロ流体凝集体はなく、ストレプトアビジンの濃度が増大するとフェロ流体凝集体が増加した。ストレプトアビジンは、異なるフェロ流体粒子上のデスチオビオチンにストレプトアビジンが多価結合することによって、フェロ流体の凝集を引き起こす。これらのフェロ流体凝集体の全ては、過剰なビオチンの添加によって、可逆的に解凝集された。過剰ビオチンによるフェロ流体のこの解凝集の原理は、ストレプトアビジンに対して、ビオチンがデスチオビオチンよりも高いアフィニティーを有しているため、ストレプトアビジンからデスチオビオチンへの置換によるものである。

40

【0066】

実施例 IV

50

デスチオビオチン / E p C A M M A b フェロ流体の凝集の有無での血液からのスパイク
ド低および高密度の E p C A M 抗原密度細胞の回収

乳ガン細胞 (S K B R 3) は P C 3 細胞と比較して約 7 倍高い E p C A M 抗原密度を有し、この実施例の高抗原密度腫瘍細胞のモデルとして選ばれた。細胞バッファー中の既知数の S K B R 3 または P C 3 細胞を別々に 1 2 x 7 5 m m チューブ中、1 m l の血漿なし血液中にスパイクした。フェロ流体希釈 - 洗浄バッファー (5 0 0 μ l) およびストレプトアビジンを含有する 1 5 μ l の P B S を該試料に添加した。該試料を混合した後、2 5 μ l のデスチオビオチン / E p C A M M A b フェロ流体を添加し、当該血液試料をよく混合し、1 5 分間インキュベートした。インキュベーション後、該チューブを 1 0 分間四極子磁気セパレータに置いて、標識された細胞を磁氣的に収集した。磁氣的に分離された細胞は、実施例 I I に記載されたように、腫瘍細胞の回収率につきフルオロメトリーによって、細胞の観察につき顕微鏡によって分析した。

10

【 0 0 6 7 】

【表 3】

凝集剤ストレプトア ビジン濃度 (μ g / m l)	P C 3 細胞 回収率 (%)	S K B R 3 細胞 回収率 (%)
0	2 3	9 1
2	7 7	9 8

20

【 0 0 6 8 】

データは、フェロ流体凝集剤ストレプトアビジンを血液試料に添加しなかった場合、低および高抗原密度細胞の間で腫瘍細胞回収率における有意差を明らかにした。顕微鏡観察でも、ストレプトアビジンなしでは溶液中または細胞上にフェロ流体凝集体はなかった。血液試料にストレプトアビジンを添加すると、溶液中および細胞上のフェロ流体凝集体の増加に比例して、低抗原密度 P C 3 細胞の回収率を増大した。一方、血液試料中に存在するストレプトアビジン有無で、高抗原密度 S L B R 3 細胞の回収率にはほんの少しの差異しかなかった。S K B R 3 細胞上には十分なフェロ流体粒子があり、フェロ流体凝集がなくても、それらを効率的に収集し、それらの全てを回収した。溶液中および細胞上のフェロ流体凝集体は当該試料への過剰なビオチンの添加によって完全に解凝集された。低抗原密度細胞の場合、細胞上に十分なフェロ流体粒子がなく、磁気方法によって効率的に収集されなかった。ストレプトアビジンによるフェロ流体凝集はこれらの細胞上の粒子数を増加させて、収集を容易にし、効率的により高い回収率を得た。フェロ流体の凝集は、低抗原密度細胞の回収率を高抗原密度細胞で得られるものの近くまで増大したことも特記に値する。言い換えれば、可逆的フェロ流体凝集剤の血液試料への添加により、低および高抗原密度腫瘍細胞の回収率に有意差はなかった。

30

40

【 0 0 6 9 】

実施例 V

内因性凝集因子によるフェロ流体の凝集の阻害および外因性凝集因子による制御されたフェロ流体凝集の生成

この実施例において、全ての内因性フェロ流体凝集因子の阻害および外因性凝集因子の添加による制御されたフェロ流体凝集の生成の方法を提供する。試料中に存在する内因性フェロ流体凝集は、様々なインヒビターを試料に添加することによって阻害し得る。これらのインヒビターは異なる内因性凝集因子に作用し、それらが、架橋するかまたはフェロ流体に結合するかのいずれかにより凝集を引き起こすことを防止する。阻害は、試料間のフェロ流体凝集におけるいずれの変化をも除外する。内因性凝集因子は、様々な濃度にて、

50

様々な試料中に存在するからである。一旦、内因性因子 - フェロ流体凝集が防止されれば、標的の回収を効率的に促進し得る外因性凝集因子の添加によって、フェロ流体凝集を促進し得る。内因性凝集は全ての試料で一貫して制御し得、それは容易に反転し得る。

【0070】

フェロ流体を血液試料に添加する前に、インヒビターを含有するバッファーと共に血液試料を予備インキュベートして、内因性フェロ流体凝集因子を阻害する。抗体連結フェロ流体は、抗体に加えてウシ血清アルブミンおよびストレプトアビジンをフェロ流体粒子の表面に含有する。したがって、可能性のあるフェロ流体凝集因子は、(結晶表面に特異的な) IgM、ヒト - 抗 - マウス抗体 (HAMMA)、ヒト - 抗 - ウシ血清アルブミン抗体 (HABAA)、ヒト - 抗 - ストレプトアビジン等であり得る。上記凝集因子のいずれかが血漿中に存在すれば、それらはフェロ流体を認識し、それに結合し、フェロ流体を凝集させる。ある患者の血漿試料がHAMMAおよびHABAAをその中に有することはすでに知られている。明らかに、フェロ流体を製造するのに用いられるいずれの他の成分も凝集の標的であり得、相応に取り扱われる必要がある。

10

【0071】

該インヒビターのうちの一つは100mMにてのスルホン酸メルカプトエタンのごとき還元剤であり得、それは、細胞を標識するのに用いられるリガンドに影響することなく、IgM - 誘発凝集を無能化する。該還元剤は単一の試薬として血液中に添加し得、または、血液収集管に入れ得るであろう。2つめのインヒビターはウシ血清アルブミンであり得、それは10mg/mlにてバッファーに含ませ得、いずれのHABAAをも中和する。3つめのインヒビターは非特異的マウス抗体、特に、当該フェロ流体上の抗体に適合する適当なアイソタイプであり得る。これは0.5~5mg/mlの濃度にてバッファーに含ませて、最も過酷なHAMMAでさえ中和する。4つめのインヒビターはストレプトアビジンであり得、バッファーに含ませて、必要であれば、血漿中に存在するいずれの抗 - ストレプトアビジン抗体を中和する。しかしながら、今日まで、血漿中の抗 - ストレプトアビジン抗体の存在に関しては何ら情報がない。

20

【0072】

上記バッファーおよび還元剤での血液の予備処理は全ての内因性凝集因子を中和するのに15~30分間であり得る。全ての内因性業種因子を中和した後、外因性フェロ流体凝集因子を試料に添加し、引き続き、フェロ流体を添加する。該フェロ流体は標的に特異的な抗体ならびに当該内因性凝集因子に特異的な別のリガンドに連結される。フェロ流体での標的細胞の最適な標識および外因性凝集因子で誘発されたフェロ流体の凝集後、該試料を磁気分離に付して、標的を富化する。全ての非標的を除去した後、磁気標識標的および遊離フェロ流体を少量のバッファーに再懸濁させる。細胞のごとき磁気標識された標的は透過性化されて、細胞内部抗原を染色する。次いで、フローサイトメトリーまたは蛍光法または明視野顕微鏡観察を含む所望される分析法に依存して、様々な染色試薬と共に該試料をインキュベートする。最適インキュベーション時間後、過剰な染色試薬を磁気分離に用いる洗浄ステップによって除去する。次いで、磁気標識細胞を少量のバッファーに再懸濁させる。最終試料は遊離フェロ流体凝集体および標的細胞上に凝集体を含有する。該最終試料をさらなる処理せずにフローサイトメトリー分析に用い得る。なぜならば、細胞表面上のフェロ流体凝集は分析を妨害しないからである。しかしながら、細胞表面上のフェロ流体凝集は顕微鏡観察分析を妨害する。そのような場合、外因性介在 - フェロ流体凝集を反転すべきである。これは、内因性凝集因子に結合する解凝集因子を含有するバッファーに、該最終試料を再懸濁させることによって達成される。該解凝集因子は全てのフェロ流体凝集体を解凝集させて、細胞を観察し、分析するのを容易にする。これらの方法は効率的な標的回収およびモルホロジー研究のための視覚化を許容する。

30

40

【0073】

いくつかの特許および係属中の米国特許出願は本明細書に言及される。これらの特許および特許出願の各々の全開示は出典明示して、本明細書の一部とみなされる。

【0074】

50

本発明の特定の好ましい具体例が記載され、上で詳しく説明されてきたが、本明細書をそれらのような具体例に限定する意図はない。特許請求の範囲に記載されたように、本発明の範疇および精神から逸脱することなく、それらに様々な修飾を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A ~ H】高レベルの内因性凝集因子を持つ血液ドナー採取された試料を低レベルの内因性凝集因子を持つものと比較して顕微鏡観察されたものを描写する一連のマイクログラフ。

【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06790 A1

- (51) International Patent Classification: **G01N 1/00**,
1/28, 1/38, 21/00, 21/01, 21/17, 21/25, 21/29, 21/41,
21/62, 21/63, 21/64, 21/75, 33/53, 33/531, 33/532, 33/533,
33/536, 33/537, 33/539, 33/542, 33/563, 33/574, 33/577
- (21) International Application Number: PCT/US00/19171
- (22) International Filing Date: 14 July 2000 (14.07.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNIVEST CORPORATION [US], 1310 Masson Mill II, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **LIBERTI, Paul, A.** [US], 1505 Grasshopper Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US); **RAO, Galla, Chandra** [IN], 6 Heritage Boulevard, Princeton, NJ 08540 (US); **TERSTAPPEN, Leon, W., M.** [NL], 1354 Old Ford Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).
- (74) Agents: **RIGAUT, Kathleen, D.**, et al.; Dann, Dorfman, Herrell and Schilman, Suite 720, 1601 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search 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.



WO 02/06790 A1

(54) Title: INCREASED SEPARATION EFFICIENCY VIA CONTROLLED AGGREGATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES

(57) Abstract: Compositions and methods are disclosed which enhance the microscopic observation and analysis of biological entities such as cells, bacteria and viruses by eliminating interfering magnetic clusters created by naturally occurring aggregators of colloidal magnetic particles. Additionally means for significantly enhancing the magnetic isolation of low antigen density target cells from biological samples are disclosed.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

INCREASED SEPARATION EFFICIENCY VIA CONTROLLED
AGGREGATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES

Paul A. Liberti

Galla Chandra Rao

5

Leon WMM Terstappen

FIELD OF THE INVENTION

10 This invention relates to the fields of bioaffinity
separations and diagnostic testing of biological
samples. More specifically, the invention provides
compositions and methods which, may be used in magnetic
separation assays and enrichment procedures for
controlling endogenous magnetic particle aggregation
15 factors which, if uncontrolled, would obscure
visualization of isolated entities. Also provided are
methods for constructing and synthesizing reversible
aggregation factors and the resulting compositions which
simultaneously enhance recovery of rare biological
20 substances while facilitating observation of substances
so isolated.

BACKGROUND OF THE INVENTION

25 Several publications are referenced in this
application by numerals in parentheses in order to more
fully describe the state of the art to which this
invention pertains. The disclosure of each of these
publications is incorporated by reference herein.

30 Many laboratory and clinical procedures employ bio-
specific affinity reactions. Such reactions are
commonly utilized in diagnostic testing of biological
samples, or for the separation of a wide range of target
substances, especially biological entities such as cell,
viruses, proteins, nucleic acids and the like.
35 Various methods are available for analyzing or

WO 02/06790

PCT/US00/19171

separating the above-mentioned target substances based upon complex formation between the substance of interest and another substance to which the target substance specifically binds. Separation of complexes from unbound material may be accomplished gravitationally, e.g. by settling, or, alternatively, by centrifugation of finely divided particles or beads coupled to the target substance. If desired, such particles or beads may be made magnetic to facilitate the bound/free separation step. Magnetic particles are well known in the art, as is their use in immune and other bio-specific affinity reactions. See, for example, US Patent No. 4,554,088 and Immunoassays for Clinical Chemistry, pp. 147-162, Hunter et al. eds., Churchill Livingstone, Edinburgh (1983). Generally, any material which facilitates magnetic or gravitational separation may be employed for this purpose. However, in the past 20 years the superiority of magnetics for performing such separations has led to its use in many applications.

Magnetic particles generally fall into two broad categories. The first category includes particles that are permanently magnetizable, or ferromagnetic. The second category comprises particles that demonstrate bulk magnetic behavior only when subjected to a magnetic field. The latter are referred to as magnetically responsive particles. Materials displaying magnetically responsive behavior are sometimes described as superparamagnetic. However, materials exhibiting bulk ferromagnetic properties, e.g., magnetic iron oxide, may be characterized as superparamagnetic only when provided in crystals of about 30nm or less in diameter. Larger crystals of ferromagnetic materials, by contrast, retain permanent magnet characteristics after exposure to a magnetic field and tend to aggregate thereafter due to

WO 02/06790

PCT/US00/19171

strong particle-particle interactions.

Magnetic particles can be classified as large (1.5 to about 50 microns), small (0.7-1.5 microns), and colloidal or nanoparticles (<200nm). The latter are also called ferrofluids or ferrofluid-like and have many of the properties of classical ferrofluids. Liberti et al pp 777-790, E. Pelizzetti (ed) "Fine Particles Science and Technology" Kluwer Acad. Publishers, Netherlands, 1996.

Small magnetic particles are quite useful in analyses involving bio-specific affinity reactions, as they are conveniently coated with bifunctional polymers (e.g., proteins), provide very high surface areas and give reasonable reaction kinetics. Magnetic particles ranging from 0.7-1.5 microns have been described in the patent literature, including, by way of example, US Patent Nos. 3,970,518; 4,018,886; 4,230,685; 4,267,234; 4,452,773; 4,554,088; and 4,659,678. Certain of these particles are disclosed to be useful solid supports for immunologic reagents.

In addition to the small magnetic particles mentioned above, there are a class of large magnetic particles ranging in size from approximately 1.5-50 microns, which also have superparamagnetic behavior. Typical of such materials are those invented by Ugelstad (US Patent No. 4,654,267) and manufactured by Dynal, (Oslo, Norway). The Ugelstad process involves the synthesis of polymer particles which are caused to swell and magnetite crystals are embedded in the swelled particles. Other materials in the same size range are prepared by synthesizing the particle in the presence of dispersed magnetite crystals. This results in the trapping of magnetite crystals in a polymer matrix, thus making the resultant materials magnetic. In both cases, the resultant particles have superparamagnetic behavior,

WO 02/06790

PCT/US00/19171

which is manifested by the ability to disperse readily upon removal of the magnetic field. Unlike magnetic colloids or nanoparticles, these materials, as well as small magnetic particles, are readily separated with simple laboratory magnetics because of the mass of magnetic material per particle. Thus, separations are effected in gradients from as low as a few hundred gauss/cm on up to about 1.5 kilogauss/cm. Colloidal magnetic particles, (below approximately 200nm), on the other hand, require substantially higher magnetic gradients because of their diffusion energy, small magnetic mass per particle and Stokes drag.

US Patent No. 4,795,698 to Owen et al. relates to polymer-coated, colloidal, superparamagnetic particles. Such particles are manufactured by precipitation of a magnetic species in the presence of a biofunctional polymer. The structure of the resulting particles, referred to herein as single-shot particles, has been found to be a micro-agglomerate in which one or more ferromagnetic crystallites having a diameter of 5-10nm are embedded within a polymer body having a diameter on the order of 50nm. The resulting particles exhibit an appreciable tendency to remain in aqueous suspension for observation periods as long as several months. US Patent No. 4,452,773 to Molday describes a material similar in properties to those described in Owen et al., which is produced by forming magnetite and other iron oxides from Fe^{+2}/Fe^{+3} via base addition in the presence of very high concentrations of dextran. Materials so produced have colloidal properties and have proved to be very useful in cell separation. This technology has been commercialized by Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.

Another method for producing superparamagnetic colloidal particles is described in US Patent No.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

5,597,531. In contrast to the particles described in the Owen et al. patent, these latter particles are produced by directly coating a biofunctional polymer onto pre-formed superparamagnetic crystals which have been dispersed, e.g., by sonic energy into quasi-stable crystalline clusters ranging in size from about 25-120nm. The resulting particles, referred to herein as direct coated (DC) particles, exhibit a significantly larger magnetic moment than Owen et al. or Molday nanoparticles of the same overall size and can be separated effectively in magnetic gradients greater than about 5kGauss/cm.

Magnetic separation techniques are known wherein a magnetic field is applied to a fluid medium in order to separate ferromagnetic bodies from the fluid medium. In contrast, the tendency of colloidal superparamagnetic particles to remain in suspension, in conjunction with their relatively weak magnetic responsiveness, requires the use of high-gradient magnetic separation (HGMS) techniques in order to separate such particles from a fluid medium in which they are suspended. In HGMS systems, the gradient of the magnetic field, i.e., the spatial derivative, exerts a greater influence upon the behavior of the suspended particles than is exerted by the strength of the field at a given point. High gradient magnetic separation is useful for separating a wide variety of magnetically labeled biological materials, including eukaryotic and prokaryotic cells, viruses, nucleic acids, proteins, and carbohydrates. In methods known heretofore, biological material has been separable by HGMS, provided at least one characteristic determinant is present on the material, which is capable of being specifically recognized and bound to a receptor, such as an antibody, antibody fragment, specific binding protein (e.g.,

WO 02/06790

PCT/US00/19171

protein A, streptavidin), lectin, and the like.
HGMS systems can be divided into two broad categories.
One such category includes magnetic separation systems
which employ a magnetic circuit that is entirely
5 situated externally to a separation chamber or vessel.
Examples of such external separators (or open field
gradient separators) are described in US Patent No.
5,186,827. In several of the embodiments described in
the '827 patent, the requisite magnetic field gradient
10 is produced by positioning permanent magnets around the
periphery of a non-magnetic container such that the like
poles of the magnets are in a field-opposing
configuration. The extent of the magnetic field
gradient within the test medium obtainable in such a
15 system is limited by the strength of the magnets and the
separation distance between the magnets. Hence, there
exists a finite limit to gradients that can be obtained
with external gradient systems. In a co-pending
Application No. 60/098,021, means for maximizing radial
20 gradients and methods for maximizing separation
efficiency via novel vessel designs are disclosed.

Another type of HGMS separator utilizes a
ferromagnetic collection structure that is disposed
within the test medium in order to: (1) intensify an
25 applied magnetic field; and (2) produce a magnetic field
gradient within the test medium. Previously disclosed
internal HGMS systems comprise fine steel wool or gauze
packed within a column that is situated adjacent to a
magnet. The applied magnetic field is concentrated in
30 the vicinity of the steel wires so that suspended
magnetic particles will be attracted toward, and adhere
to, the surfaces of the wires. The gradient produced on
such wires is inversely proportional to the wire
diameter whereas the magnetic "reach" decreases with
35 diameter. Hence, very high gradients can be generated.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

One major drawback of internal gradient systems is that the use of steel wool, gauze material, steel microbeads or the like, may entrap non-magnetic components of the test medium by capillary action in the vicinity of intersecting wires or within interstices between intersecting wires. Various coating procedures have been applied to such internal gradient columns (US Patent Nos. 5,693,539; 4,375,407), however, the large surface area in such systems still creates recovery problems due to absorption. Hence, internal gradient systems are not desirable, particularly when recovery of very low frequency captured entities is the goal of the separation. Further, these systems make automation difficult and costly.

On the other hand, HGMS approaches using external gradients for cell separation provide a number of conveniences. Firstly, simple laboratory tubes such as test tubes, centrifuge tubes or even vacutainers (used for blood collection) can be employed. When external gradients are of the kind in which separated cells are effectively monolayered, as is the case with quadrupole/hexapole devices (US Patent No. 5,186,827) or the opposing dipole arrangement described in US Patent No. 5,466,574, washing of cells or subsequent manipulations are facilitated. Further, recoveries of cells from tubes or similar containers is a simple and efficient process. This is particularly the case when compared to recoveries from high gradient columns. Such separation vessels also provide another important feature which is the ability to reduce volume of the original sample. For example, if a particular human blood cell subset, (e.g. magnetically labeled CD 34+ cells), is isolated from blood diluted 20% with buffer to reduce viscosity, a 15ml conical test tube may be employed as the separation vessel in an appropriate

WO 02/06790

PCT/US00/19171

quadrupole magnetic device. After appropriate washes and/or separations and resuspensions to remove non-bound cells, CD34+ cells can very effectively be resuspended in a volume of 200 μ l. This can be accomplished, for example, by starting with 12ml of solution (blood, ferrofluid and dilution buffer) in a 15ml conical test tube, performing a separation, discarding the "supernatant" and subsequent wash "supernatants" and resuspending the recovered cells in 3ml of appropriate cell buffer. A second separation is then performed which may include additional separation/wash steps (as might be necessary for doing labeling/staining reactions) and finally the isolated cells are easily resuspended in a final volume of 200 μ l. By reducing volume in this sequential fashion, and employing a vortex mixer for resuspension, cells adhered to the tube above the resuspension volume are recovered into the reduced volume. When done carefully and rapidly in appropriately treated vessels, cell recovery is quite efficient, ranging between 70-90%.

The efficiency with which magnetic separations can be done and the recovery and purity of magnetically labeled cells will depend on many factors. These include such considerations as the number of cells being separated, the receptor density of such cells, the magnetic load per cell, the non-specific binding (NSB) of the magnetic material, the technique employed, the nature of the vessel, the nature of the vessel surface, the viscosity of the medium and the magnetic separation device employed. If the level of non-specific binding of a system is substantially constant, as is usually the case, then as the target population decreases so does the purity. As an example, a system with 0.2% NSB that recovers 80% of a population which is at 0.25% in the original mixture will have a purity of 50%. Whereas if

WO 02/06790

PCT/US00/19171

the initial population were at 1.0%, the purity would be 80%. Not as obvious is the fact that the smaller the population of a targeted cell, the more difficult it will be to magnetically label and to recover.

5 Furthermore, labeling and recovery will markedly depend on the nature of magnetic particle employed. For example, when cells are incubated with large magnetic particles, such as Dymal beads, the cells are labeled through collisions created by mixing of the system as
10 the beads tend to be too large to diffuse. Thus, if a cell were present in a population at a frequency of 1 cell/ml of blood or even less, as could be the case for tumor cells in very early cancers, then the probability of labeling target cells will be related to the numbers
15 of magnetic particles added to the system and the length of time of mixing. Since mixing of cells with such particles for substantial periods of time will be deleterious, it becomes necessary to increase particle concentration as much as possible. There is, however, a
20 limit to the quantity of magnetic particle that can be added to the system, in that one can substitute a system comprising a rare cell mixed in with other blood cells with one comprising a rare cell mixed in with large quantities of magnetic particles upon separation, in
25 which case the ability to enumerate the cells of interest or to examine them is not markedly improved.

There is another drawback to the use of large particles to isolate cells having rare frequencies (1-50
30 cells/ml of blood). Despite the fact that large magnetic particles allow the use of external gradients of very simple design and relatively low magnetic gradient, large particles tend to cluster around cells in a cage-like fashion making them difficult to "see" or to analyze. Hence, the particles must be released
35 before analysis, and releasing the particles often

WO 02/06790

PCT/US00/19171

introduces other complications.

In theory, colloidal magnetic particles, used in conjunction with high gradient magnetic separation, should be the method of choice for separating a cell subset of interest from a mixed population of eukaryotic cells, particularly if the subset of interest comprises only a small fraction of the entire population. With appropriate magnetic loading, sufficient force is exerted on a cell, facilitating its isolation even in a media as viscous as moderately diluted whole blood. As noted, colloidal magnetic materials below about 200 nanometers will exhibit Brownian motion which markedly enhances their ability to collide with and magnetically label rare cells. This is demonstrated in US Patent No. 5,541,072, where results of very efficient tumor cell purging experiments are described employing 100nm colloidal magnetic particles (ferrofluids). Just as importantly, colloidal materials at or below the size range noted do not generally interfere with viewing of cells. Cells so retrieved can be examined by flow cytometry with minimal forward scattering effects or by microscopy employing visible or fluorescent techniques. Because of their diffusive properties, such materials, in contrast to large magnetic particles, readily "find" and magnetically label rare biological entities such as tumor cells in blood.

There is, however, a significant problem which arises in the use of ferrofluid-like materials for cell separation in external field gradient systems which, for reasons given above, is the device design of choice. Direct monoclonal antibody conjugates of Owen *et al.* materials or Molday nanoparticles, such as those produced by Miltenyi Biotec, do not have sufficient magnetic moment for use in cell selection employing the best available external magnetic gradient devices, such

WO 02/06790

PCT/US00/19171

as the quadrupole or hexapole magnetic devices described
in US Patent No. 5,186,827. When used for separations
in moderately diluted whole blood, they are even less
effective. Using similar materials, which are
5 substantially more magnetic, as described in US Patent
No. 5,698,271, more promising results have been
obtained. In model spiking experiments, it has been
found that SKBR3 cells (breast tumor line), which have a
high EPCAM (epithelial cell-adhesion molecule)
10 determinant density, are efficiently separated from
whole blood with direct conjugates of anti EPCAM MAb
ferrofluids even at very low spiking densities (1-
5cells/ml blood). On the other hand, PC3 cells (a
prostate tumor line) which have low antigen density are
15 separated at significantly lower efficiency. Most
likely this is a consequence of inadequate magnetic
loading onto these low density receptor cells.

From the foregoing discussion, it would be
advantageous to provide a magnetic separation system
20 which combines the beneficial properties of both
colloidal magnetic materials and large magnetic
particles (e.g., diffusion based labeling and large
magnetic moment, respectively) for separations involving
rare events or for cells with very low density
25 receptors. One could envision starting a separation
process with a magnetic colloidal or nanoparticle which,
due to their Brownian motion, would rapidly find and
label cells in rare numbers or cells with very low
density receptors. Once that labeling is achieved, it
30 would be desirable to convert the magnetic moment of the
nanoparticle to a value similar to that of a large
magnetic particle. In that way, magnetically labeled
entities could be separated in the kinds of gradient
fields used for larger particles, e.g., a simple
35 external field gradient separator. In the case of very

WO 02/06790

PCT/US00/19171

low density receptor cells, which are recovered inefficiently even in high gradient external field separators, use of such a principle would clearly increase the efficiency of separation. In applications where cells are to be analyzed or used for some biological purpose following separation, it would also be very desirable to be able to convert the magnetic moment of the labeled entity back to that of its original colloidal magnetic labeling density. This approach would permit separation from excessive magnetic material, which would facilitate subsequent analysis or use.

US Patent No. 5,466,574 to Liberti et al., describes a system which has some of the foregoing features regarding "loading on" of magnetic materials onto cells. It was discovered that when cells were first labeled with specific monoclonal antibodies (with or without biotinylation) followed by magnetic labeling with goat anti-mouse ferrofluid or with streptavidin-ferrofluid (respectively), separation was enhanced in the presence of excess monoclonal antibody. The unique ability of ferrofluids to create this "no wash" enhancing procedure is due to immunochemical crosslinking of free ferrofluid in solution to ferrofluid-bound target cells. Ferrofluid bound to monoclonal antibody on cells, in turn, binds to free ferrofluid in solution via free monoclonal antibody. This results in immunochemical clusters of monoclonal antibody/ferrofluid "growing" off of monoclonal antibody labeled cell determinants (referred to as chaining). Thus, magnetic colloid is "artificially" loaded onto cells making them more magnetic and easier to separate. The phenomenon was found to obey immunochemical rules, in that a high excess of monoclonal antibody resulted in a decrease in chaining (monoclonal excess zone) and a

WO 02/06790

PCT/US00/19171

loss of separation efficiency. Similarly high levels of ferrofluid also reduced chaining (ferrofluid excess zone). Chaining has been found to be useful for purging unwanted cells, e.g. tumor cells, in bone marrow or peripheral blood "grafts." By this method, very high levels of magnetic material (visible brown rims around cells, as observed via microscopy) can be loaded onto target cells giving rise to very efficient separation in high gradient fields of only 8-12kGauss/cm gradients. On the other hand, cells labeled with "monomeric" ferrofluid were found to separate less efficiently in the same gradient.

In attempts to use chaining for isolating rare cells from whole blood, several problems have been encountered. First, although spiked cells are, indeed, efficiently recovered, they are so densely covered with ferrofluid (chaining) that the ability to analyze them is markedly reduced. Hence this approach is not ideal for applications wherein the positively selected cells are to be observed via microscopy or flow cytometry. Additionally, chaining seems to promote non-specific binding. In summary, designing a chaining-based assay where the level of chaining simultaneously gives rise to separation enhancement, non-obstructed viewing of the isolated cells and acceptable levels of non-specific binding is extraordinarily difficult. The chaining reaction is difficult to control because it requires immunochemical stoichiometry. For example, most (>99%) of the added monoclonal antibody (or tagging ligand) will always be free in solution regardless of the affinity of the antibodies. Hence, the amount of ferrofluid required to achieve immunochemical equivalence (where the best separations take place via chaining) generally leads to more chaining than is desired, particularly in the case where the selected

WO 02/06790

PCT/US00/19171

cell is to be viewed and/or further studied. Chaining can be lessened by concurrent decreases in labeling monoclonal antibody and added ferrofluid, however this results in a sacrifice of separation efficiency.

5 Another drawback to the use of chaining to enhance separation is the inability to, in some practical manner, reverse chaining. If chaining could be reversed and the concomitant increase in non-specific binding decreased, the phenomenon would provide a viable

10 approach to enabling the desired "loading on" of magnetic material. Another disadvantage of this method is that a two step reaction is required, i.e., reaction of targets with primary monoclonal antibody in a first step followed by repetition with ferrofluid specific for primary monoclonal antibody in the second step. This

15 approach cannot be used in assays where primary antibody is directly conjugated to ferrofluid.

US Patent No. 5,108,933 to Liberti et al. discloses the use of weakly magnetic colloidal materials such as those described by Owen et al. or Molday in immunoassays

20 employing external field magnetic separators. Such materials are described therein as agglomerable and resuspendable colloidal magnetic materials which remain substantially undisturbed in an external magnetic field system, for example, those commercially available at

25 that time (Ciba Corning, Wampole, Mass.; Serono Diagnostics, Norwell, Mass.). By contrast, materials made by the process disclosed in the '531 patent being substantially more magnetic, as noted above, will

30 separate in those separators. In the '933 patent means for converting the colloid to an agglomerate are disclosed so as to make them separable in those separators. Thus, such materials could be used for performing the bound/free separation step of

35 immunoassays. There is no mention in '933 for the need

WO 02/06790

PCT/US00/19171

of, or methods for reversing agglomeration reactions.

In light of the foregoing and recent discoveries of naturally occurring ferrofluid aggregation factors, the present inventors have recognized the need for compositions and methods for controlling aggregation of ferrofluid by endogenous factors during the isolation and immunochemical characterization of rare target bioentities. Such compositions and methods may be used to advantage to facilitate analysis and observation of bioentities so isolated. Further, this invention also permits the use of substantially less magnetic reagent as well as the opportunity to use lower magnetic gradients. In the case of a fixed gradient, the invention provides for the capture or isolation of entities which might have otherwise had insufficient magnetic labeling to be captured.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, methods, compositions and kits are provided for controlling the aggregation of ferromagnetic nanoparticles by endogenous aggregation factors. Ferrofluid aggregation often presents problems during subsequent viewing of the isolated targets. The methods of the invention facilitate visualization of the isolated bioentities by allowing the investigator to control the level of aggregation. In one embodiment of the invention, a method is provided for inhibiting the aggregation of magnetic nanoparticles on the surface of isolated target entities. The method comprises obtaining a biological specimen suspected of containing a target bioentity. Next, immunomagnetic suspensions are prepared by mixing the specimen with colloidal, magnetic particles coupled to a biospecific ligand having affinity for at least one characteristic determinant of the target bioentity. The

WO 02/06790

PCT/US00/19171

immunomagnetic suspension is thereafter subjected to a magnetic field to obtain target bioentity enriched fractions. Optionally, the fractions are then examined to determine the characteristics of the target bioentity so isolated. Inhibition of ferrofluid aggregation facilitates subsequent analysis of cells as aggregates of ferrofluid on the cell surface are eliminated. The absence of such aggregates is important for several types of analyses including, for example, flow cytometry and immunofluorescence microscopy.

The reagents provided herein efficiently inhibit or remove endogenous aggregation factors. The factor removal or inhibition step may be performed before or simultaneously with the addition of ferrofluid to the biological specimen for separation and enrichment.

To further characterize target bioentities isolated using the methods of the invention, the method optionally includes the steps of adding to the target bioentity enriched fraction at least one biospecific reagent which recognizes and effectively labels at least one additional characteristic determinant on said target bioentity. The labeled target bioentities are then separated in a magnetic field to remove unbound biospecific reagents. A non-cell exclusion agent is added to the separated bioentities to allow exclusion of non-nucleated components present in the sample. After purifying the target bioentity, it is then ready for analysis using a variety of different analysis platforms. Target bioentities include, without limitation, tumor cells, virally infected cells, fetal cells in maternal circulation, virus particles, bacterial cells, white blood cells, myocardial cells, epithelial cells, endothelial cells, proteins, hormones, DNA, and RNA. Target bioentities may be analyzed by a process selected from the group consisting of

WO 02/06790

PCT/US00/19171

5 multiparameter flow cytometry, immunofluorescent
microscopy, laser scanning cytometry, bright field base
image analysis, capillary volumetry, manual cell
analysis and automated cell analysis. Aggregation
10 inhibiting agents suitable for use in the methods of the
present invention, include, but are not limited to
reducing agents, animal serum proteins, immune-
complexes, carbohydrates, chelating agent, unconjugated
ferrofluid, and diamino butane. In the case where the
15 endogenous aggregation factor is of the IgM class and
reactive with ferrofluids, preferred aggregation
inhibiting agents are reducing agents, such as Mercapto
ethane sulfonic acid [MES], Mercapto Propane Sulfonic
acid [MPS] and dithiothreitol [DTT]. In a particularly
20 preferred embodiment, the biospecific ligand is a
monoclonal antibody having affinity for an epithelial
cell adhesion molecule.

In an alternative and preferred embodiment of the
invention, a method is provided for isolating target
25 bioentities from a biological sample by controlling
aggregation of magnetic nanoparticles. The method
entails obtaining a biological specimen suspected of
containing said target bioentity and contacting the
biological specimen with a reagent effective to
30 inactivate any endogenous aggregating factors present.
Immunomagnetic suspensions are then prepared wherein the
specimen is mixed with colloidal, magnetic particles
coupled to a biospecific ligand having affinity for at
least one antigen present on the target bioentity, the
35 magnetic particles being further coupled to a first
exogenous aggregation enhancing factor which comprises a
first member of a specific binding pair. A second
multivalent exogenous aggregation enhancing factor is
then added to the immunomagnetic suspension to increase
aggregation of the particles, the second aggregating

WO 02/06790

PCT/US00/19171

enhancing factor comprising the second member of the specific binding pair, which reversibly binds to the magnetically labeled target bioentity. The sample is then subjected to a magnetic field to obtain a target bioentity enriched fraction. This preferred embodiment takes advantage of the fact that aggregating ferrofluid onto target entities in a controlled and reversible fashion results in substantially improved isolation efficiency.

10 In a further embodiment, the above described method further comprises the steps of adding at least one biospecific reagent which recognizes and labels at least one additional characteristic determinant on said target bioentity. The target bioentity so labeled is then separated in a magnetic field to remove unbound biospecific reagent. A non-cell exclusion agent is added to the separated bioentities to allow exclusion of non-nucleated components present in the sample. The target bioentity is then purified and further analyzed.

20 In order to reverse the aggregation mediated by the exogenous aggregation factors, a member of the specific binding pair may be added in excess to the purified bioentity to reduce ferrofluid aggregation on the surface of cells, thereby facilitating viewing of the cells, e.g. in a microscope. Suitable specific binding pairs for this purpose include, without limitation, biotin-streptavidin, antigen-antibody, receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist, lectin-carbohydrate, Protein A-antibody Fc, avidin-biotin, biotin analog-streptavidin, biotin analog-avidin, desthiobiotin-streptavidin, desthiobiotin-avidin, iminobiotin-streptavidin, and iminobiotin-avidin. Preferably, the biospecific ligand is a monoclonal antibody having affinity for epithelial cell adhesion molecule. Exemplary biospecific reagents include

35

WO 02/06790

PCT/US00/19171

monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, detectably
labeled antibodies, antibody fragments, and single chain
antibodies. Isolated target bioentities may be analyzed
by a process selected from the group consisting of
5 multiparameter flow cytometry, immunofluorescent
microscopy, laser scanning cytometry, bright field base
image analysis, capillary volumetry, manual cell
analysis and automated cell analysis.

In accordance with the present invention,
10 controlling aggregation of ferrofluid in a sample has
several unexpected benefits previously noted, e.g.
increasing efficiency of separation of some particular
entity. It has been discovered that addition of an
exogenous aggregation enhancing factor gives rise to
15 increased magnetic loading, resulting in increased
separation efficiency while reducing the amount of
ferrofluid required to isolate the target bioentity.
The increased magnetic loading also allows for reduced
incubation periods and facilitates isolation of the
20 target bioentity in the presence of a suboptimal
magnetic field.

In an additional embodiment of the present
invention a kit is provided which facilitates the
practice of the methods described herein. An exemplary
25 kit for isolating target bioentities includes i) coated
magnetic nanoparticles comprising a magnetic core
material, a protein base coating material, and an
antibody that binds specifically to a first
characteristic determinant of said target bioentity,
said antibody being coupled, directly or indirectly, to
30 said base coating material; ii) at least one antibody
having binding specificity for a second characteristic
determinant of said rare biological substance; iii) an
aggregation inhibiting factor; and iv) a non-cell
35 exclusion agent for excluding non-nucleated sample

WO 02/06790

PCT/US00/19171

components other than said target bioentity from analysis.

A kit for improving the isolation efficiency of certain biological entities, such as might be required for isolating low antigen density tumor cells from a biological sample, is also provided in accordance with the present invention. This kit utilizes controlled and reversible aggregation of magnetic nanoparticles to achieve such improvement. Such a kit includes i) a reagent effective to inactivate endogenous aggregating factors; ii) coated magnetic nanoparticles comprising a magnetic core material, a protein base coating material, and an antibody that binds specifically to a first characteristic determinant of said tumor cell, the antibody being coupled, directly or indirectly, to the base coating material; the magnetic particles being further coupled to a first exogenous aggregation enhancing factor, the factor comprising one member of a specific binding pair; iii) at least one antibody having binding specificity for a second characteristic determinant of said tumor cell; iv) a second exogenous aggregation enhancing factor, the second aggregation enhancing factor comprising the second member of the specific binding pair; and v) a non-cell exclusion agent for excluding non-nucleated sample components other than the tumor cells from analysis. The kit may optionally include a reagent for reversing the exogenous aggregation factor. Specific binding pairs useful in such a kit, include without limitation, biotin-streptavidin, antigen-antibody, receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist, lectin-carbohydrate, Protein A-antibody Fc, and avidin-biotin, biotin analog-avidin, desthiobiotin-streptavidin, desthiobiotin-avidin, iminobiotin-streptavidin, and iminobiotin-avidin. Reagents effective to inactivate

WO 02/06790

PCT/US00/19171

endogenous aggregating factors include reducing agents, animal serum proteins, immune-complexes, carbohydrates, chelating agent, unconjugated ferrofluid, and diamino butane.

5 The methods, compositions and kits of the invention provide the means for controlling the aggregation of magnetic nanoparticles, thus facilitating the isolation, visualization and characterization of rare biological substances or cells from biological specimens.

10

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

15 Figures 1A-1H are a series of micrographs depicting what is observed in a microscope in samples derived from blood donors with high levels of endogenous aggregating factors versus those with low levels of endogenous aggregation factors. Breast cancer cells were spiked into whole blood and selected using EPCAM colloidal magnetic particles and stained in suspension. Fig. 1A, 20 transmitted light only, low aggregation; Fig. 1B, transmitted light only, high aggregation; Fig. 1C, cells stained with Hoechst nuclear stain, low aggregation; Fig. 1D, cells stained with Hoechst 25 nuclear stain, high aggregation; Fig. 1E, cells stained with the epithelial cell marker cytokeratin Alexa 488, low aggregation; Fig. 1F, cells stained with the epithelial cell marker cytokeratin Alexa 488, high aggregation; Fig. 1G, cells stained with tumor cell 30 receptor marker erb2-conjugated to phycoerythrin, low aggregation; Fig. 1H, cells stained with tumor cell receptor marker erb2-conjugated to phycoerythrin, high aggregation.

35

WO 02/06790

PCT/US00/19171

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The term "target bioentities" as used herein refers to a wide variety of materials of biological or medical interest. Examples include hormones, proteins, peptides, lectins, oligonucleotides, drugs, chemical substances, nucleic acid molecules, (e.g., RNA and/or DNA) and particulate analytes of biological origin, which include bioparticles such as cells, viruses, bacteria and the like. In a preferred embodiment of the invention, rare cells, such as fetal cells in maternal circulation, or circulating cancer cells may be efficiently isolated from non-target cells and/or other bioentities, using the compositions, methods and kits of the present invention. The term "biological specimen" includes, without limitation, cell-containing bodily fluids, peripheral blood, tissue homogenates, nipple aspirates, and any other source of rare cells that is obtainable from a human subject. An exemplary tissue homogenate may be obtained from the sentinel node in a breast cancer patient. The term "determinant", when used in reference to any of the foregoing target bioentities, may be specifically bound by a biospecific ligand or a biospecific reagent, and refers to that portion of the target bioentity involved in, and responsible for, selective binding to a specific binding substance, the presence of which is required for selective binding to occur. In fundamental terms, determinants are molecular contact regions on target bioentities that are recognized by receptors in specific binding pair reactions. The term "specific binding pair" as used herein includes antigen-antibody, receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist, lectin-carbohydrate, nucleic acid (RNA or DNA) hybridizing sequences, Fc receptor or mouse IgG-protein A, avidin-biotin, streptavidin-biotin and virus-receptor

WO 02/06790

PCT/US00/19171

interactions. Various other determinant-specific binding substance combinations are contemplated for use in practicing the methods of this invention, such as will be apparent to those skilled in the art. The term "antibody" as used herein, includes immunoglobulins, 5 monoclonal or polyclonal antibodies, immunoreactive immunoglobulin fragments, and single chain antibodies. Also contemplated for use in the invention are peptides, oligonucleotides or a combination thereof which 10 specifically recognize determinants with specificity similar to traditionally generated antibodies. The term "detectable label" is used to herein to refer to any substance whose detection or measurement, either 15 directly or indirectly, by physical or chemical means, is indicative of the presence of the target bioentity in the test sample. Representative examples of useful detectable labels, include, but are not limited to the following: molecules or ions directly or indirectly 20 detectable based on light absorbance, fluorescence, reflectance, light scatter, phosphorescence, or luminescence properties; molecules or ions detectable by their radioactive properties; molecules or ions detectable by their nuclear magnetic resonance or 25 paramagnetic properties. Included among the group of molecules indirectly detectable based on light absorbance or fluorescence, for example, are various enzymes which cause appropriate substrates to convert, e.g., from non-light absorbing to light absorbing 30 molecules, or from non-fluorescent to fluorescent molecules. A nucleic acid dye or other reporter molecule, sometimes referred to herein as a non-cell exclusion agent, which is capable of identifying both target bioentities and certain non-target bioentities, such as intact nucleated cells, is added to the sample 35 to allow exclusion of any residual non-nucleated cells

WO 02/06790

PCT/US00/19171

or other potentially interfering sample components prior to analysis by flowcytometry, microscopy, or other analytical platforms. Non-cell exclusion agents may be reactive with DNA, RNA, protein, or lipids such that the amount of signal obtained is typical of that obtained for cells or the image obtained reveals typical features of a cell, such as cell and nuclear membranes, nucleus, and mitochondria.

The term "optimal" used herein describing ferrofluid concentration, magnetic field strength, or incubation time refers to the conditions used in a standard, unmodified assay, separation, isolation, or enrichment.

The term "sub-optimal" used herein describing ferrofluid concentration, magnetic field strength, or incubation time refers to the conditions used in an assay, separation, isolation, or enrichment which would produce inferior results, as compared to results obtainable under optimal conditions.

The term "ferrofluid" as used herein refers to magnetic nanoparticles in suspension. The terms ferrofluid and magnetic nanoparticles are used interchangeably herein.

Endogenous ferrofluid aggregation factors are those present in a sample isolated from a test subject. Exogenous aggregation factors are those provided herein which are added and/or reversed as desired by the investigator.

The preferred magnetic particles for use in this invention are particles that behave as colloids and are superparamagnetic. The colloids are characterized by their size, i.e., smaller than 200nm or of a size which doesn't interfere with the analysis. The superparamagnetic particles become magnetic only when they are subjected to a magnetic field gradient and do

WO 02/06790

PCT/US00/19171

not become permanently magnetic. The colloidal superparamagnetic particles do not separate or settle from aqueous solution for extended periods of time. These particles are composed of either single crystals of iron oxides or agglomerates of such crystals surrounded by molecules either physically adsorbed or covalently attached. The colloidal magnetic particles with the above characteristics can be prepared as described in US Patent Nos. 4,795,698; 5,512,332 and 5,597,531. A monoclonal antibody, which recognizes a specific subset of cells, conjugated to magnetic particles is preferred for use in this invention.

In the course of studies on rare cell isolation, a factor present in the blood of certain patients was discovered which effectuates aggregation of magnetic nanoparticles. Further, this enhanced aggregation effect appears to be readily reversible. Thus, rare cells having low receptor densities can be isolated more efficiently from moderately diluted whole blood in external field quadrupole or hexapole separators by "loading on" more ferrofluid than that which is specifically bound to a characteristic determinant of the rare cell of interest. When isolated cells are examined by microscopy, ferrofluid clusters are present on the cell membrane. Reversal of the enhancing effect deaggregates the clusters, facilitating microscopic analysis of the cells. This endogenous enhancing effect exists in varying levels in about 90% of apparently normal donor blood samples. By manipulating assay conditions, the resultant ferrofluid clusters can be dispersed without damaging the cells of interest. Thus, the present invention provides methods for eliminating the effects of endogenous ferrofluid aggregation factors and where desirable, means for constructing agents capable of controlled and reversible aggregation of

WO 02/06790

PCT/US00/19171

ferrofluid. This permits effective and efficient isolation and enrichment and subsequent analysis of rare cells, and other biological entities such as viruses and bacteria.

5 The endogenous ferrofluid aggregating substance found in blood has the following characteristics: (1) it is present in plasma or serum; (2) it is sensitive to millimolar concentrations of dithiothreitol; and (3) it reacts with "bare" crystalline regions on direct coated
10 ferrofluid, as described in US Patent 5,597,531. Control experiments revealed that the factor is not ferritin, transferrin, fibrinogen, C1q, human anti-mouse or anti-BSA antibodies. The aggregating substance is also not of the IgG subclass since IgG-depleted plasma
15 also caused aggregation of the ferrofluid. Ferrofluid aggregation appears to be correlatable with ferrofluid or serum concentration. The dependency of aggregation on concentration of either component is similar to that observed with precipitin curves and based on the
20 observations noted above, it was postulated that the substance is an IgM. This was conclusively proven by removing the IgM from the plasma samples via immunaffinity purification. The resulting IgM depleted plasma did not effectuate ferrofluid aggregation.

25 Control experiments, where the same plasma samples were absorbed through a BSA affinity media, did show ferrofluid aggregation. Further study demonstrated that extensive adsorption of sera containing the aggregating factor with ferrofluids only removed a small amount of
30 the total IgM and that purified human IgM causes ferrofluid aggregation. These observations along with identity studies of adsorbed aggregating factor and the ability to cause aggregation with adsorbed/desorbed material led to the conclusion that the aggregation
35 factor in these experiments is, indeed, a highly

WO 02/06790

PCT/US00/19171

specific IgM. Based on the inability to inhibit aggregation by any component used in forming the ferrofluid except for magnetite crystals poorly coated with protein or magnetite crystals partially coated with detergent, it is believed that the epitope recognized by the IgM is present on the magnetite crystalline surface. The role of this specific IgM is not known but it is present in a significant portion of the human population and at varying levels. It is possible that this antibody plays some role in iron metabolism.

Methods of manipulating endogenous enhancing factors are described herein which permit patient-to-patient comparison of isolated cells in a meaningful manner. Because the endogenous aggregation enhancing factor concentration varies in patient populations, it is difficult to create a standard procedure for separating rare circulating cells, be they tumor cells, fetal cells in maternal blood or virally infected cells. Recent discoveries in a co-pending application (No. 09/248,388) have demonstrated that the magnitude of the number of circulating cells is directly related to tumor burden and stage of disease in breast cancer patients. Similarly, viral burden has been shown to be of significance in the prognosis of HIV infection. The need for accurate quantitation of such entities is becoming ever more important. The methods disclosed herein are conveniently practiced by means of test kits which may be used to advantage in the clinical setting.

Having discovered the presence of this ferrofluid aggregation factor (FFAF) in donor sera, careful studies confirmed that its presence markedly improves the retrieval of spiked low density receptor tumor cells using monoclonal antibody conjugated ferrofluid. In these studies, cells spiked at levels of 1cell/2mls of blood containing FFAF are routinely retrieved at greater

WO 02/06790

PCT/US00/19171

than 70% efficiency. In contrast, in donor blood where FFAP is absent, efficiency of retrieval is reduced to approximately 15-25%. From those experiments, the following observations were made:

- 5 1. low density receptor cells are often isolated less efficiently than cells with high density receptors;
2. separation efficiency varies considerably for low density receptor cells and this variation is dependent on the blood donor;
- 10 3. when either cell type (high or low density characteristic determinant cells) was examined via microscopy following ferrofluid/magnetic isolation from the blood of different donors, ferrofluid was aggregated in about 90% of patient samples; and
- 15 4. tumor cells retrieved had differing degrees of visible ferrofluid aggregated on their surfaces.

Moreover, since the aggregation material is sensitive to DTT, retrieved cells can be readily visualized by microscopy for morphological characteristics by reduction of the ferrofluid aggregates prior to observation.

In comparing the phenomena of FFAP and chaining (see US Patent No. 5,466,574) to enhance cell recoveries, some interesting conclusions can be drawn. When FFAP is present in blood in exceedingly low concentrations, as is the case in many individuals, excellent recoveries of low density receptor spiked cells are obtained, e.g., 1-5 cells/ml blood. The quality of the recovered cells, as assessed by the level of magnetic material on their surfaces is quite suitable for morphological examination or further manipulation. When FFAP is in high concentrations, recoveries are also excellent but the quality of the recovered cells is not acceptable as the agglomerates on the cells obscures their viewing. Hence, unlike the components of

WO 02/06790

PCT/US00/19171

chaining, i.e. monoclonal antibody-ferrofluid "chains", which are limited by concentration, there is a level of PFAF which can lead to very effective cell separation, thus providing an isolated population of cells which can be studied effectively. In certain embodiments of the invention, endogenous PFAF's in the samples are inactivated at the outset so that aggregation can be controlled by the investigator by adding the compositions described herein. In this way, aggregation can be enhanced or inhibited as desired.

PFAF and any similar substances must be evaluated in assays to isolate rare cells. Such factors must be controlled in order to develop a test which functions reliably for every patient. For example, many individuals have anti-rodent antibodies, or antibodies to components, such as carbohydrates, which might be found on the surface of some magnetic nanoparticles. Other potential aggregating substances normally present in blood include C1q, rheumatoid factor, and blood clotting proteins. Such reactions must either be controlled, so as to make them constant from specimen to specimen, or be eliminated altogether. In the case of anti-rodent antibodies, this can be accomplished by adding rodent proteins to the system so as to inhibit their aggregating effects. This addition is quite different from adding such components to immunoassay systems. In the latter case, anti-rodent antibodies generally enhance isolation but also tend to increase false positives as they link captured antibody with labeling antibody in sandwich-type reactions. In contrast, additional antibodies used in the methods of the present invention enhance the recovery of low density receptor cells. Thus, in one case aggregating factors can artificially elevate false positives, and in another facilitate isolation of the target bicentricity.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

Besides competitively inhibiting such factors, they may be disabled or adsorbed from solution, or the determinant on the magnetic colloid to which such factors bind may be eliminated. FFAF activity may be inhibited by formulating a special buffer that contains optimal amounts of additives such as mouse and other animal serum proteins, immune-complexes, carbohydrates, chelating agents which inhibit various activation systems, including complement, and compounds which specifically inhibit the interaction of C1q with reacted antibody, such as diamino butane. In the case where FFAF is an IgM, reducing agents effectively disable the FFAF without affecting the ligands used for labeling cells. Thus, such factors could be selectively disabled chemically or enzymatically. Adsorption with appropriate materials, e.g., unconjugated ferrofluid, provides another route for removing aggregating factors from the sample.

It may also be possible to make the amount of aggregator constant from patient to patient so as to always have identical levels of enhancement. This may be accomplished in different ways. For example, all endogenous factors may be reduced to the same level in all patient samples. However this seems a difficult and impractical solution. As an alternative, a two step process may be employed where, as a first step, all endogenous FPAF's are disabled without affecting specific ligand binding of the ferrofluid to its target or subsequent cell analysis. The second step entails a controlled aggregation reaction. Colloidal magnetic materials conjugated to two kinds of ligands may be used to practice the two step method described above. One ligand, such as monoclonal antibody would be directed to cell surface determinants and effectively labels cells. The secondary ligand would have no reactivity with any

WO 02/06790

PCT/US00/19171

component of blood yet have binding affinity for a multivalent component which would be added following binding of the primary ligand. Thus, additional magnetic colloid would bind to colloid already bound to cells, thereby enhancing their magnetic load just as FFAP does. Similarly, it would be preferable if the reaction of the secondary ligand and its multivalent component were reversible. By selecting the right components of the secondary reactions and their concentrations, it should be possible to add ferrofluid and the aggregation factor simultaneously.

Therefore, FFAPs are provided which facilitate controlled aggregation of ferrofluids, thereby enhancing recoveries of rarely occurring biological entities. The ideal aggregating factor is one which mediates a reversible aggregating effect. Reversal of aggregation eliminates magnetic nanoparticle clusters so as to facilitate visualization of isolated cells. The factors of the invention operate in a manner similar to the ideal magnetic particle conditions described above i.e., by converting colloid nanoparticles which are bound to target into large particles with the added ability to readily reverse that process. The identification and elucidation of an endogenous factor present in the blood of most normal donors which enhances the efficiency of isolation of low density receptor rare cells is described herein.

Preferable FFAPs include specific multivalent substances which recognize determinant(s) on ferrofluid magnetic particles thereby crosslinking the particles. This factor may naturally occur in plasma or may be an exogenously added reagent. Several types of exogenous reagents are suitable for this purpose and include, but are not limited to, IgG, dimeric IgG, IgM, Streptavidin, Avidin, Protein A, Protein G, dimeric or tetrameric

WO 02/06790

PCT/US00/19171

poly-A or poly-T, or specific oligonucleotide sequences. The secondary ligand can be introduced onto ferrofluid and is recognized by FFAP. There are several types of secondary ligands which may be selected such as haptens, 5 biotin, biotin analogues (iminobiotin, desthiobiotin), sheep IgG, goat IgG, rat IgG, poly-A or poly-T or oligonucleotide. FFAP-secondary ligand interaction may be either reversible or irreversible but a reversible interaction is preferred. There are several reagents 10 which may be used to reverse FFAP-secondary ligand interaction such as reducing agents, excess of haptens, excess of hapten analogues, excess of analogues of the secondary reagent, change of salt concentration, change of pH or change of temperature.

15 When an assay or separation is performed under optimal conditions, the percent recovery of the target cells is maximized. However, the ability to modify the conditions is apparent when exogenous aggregation is induced. In the case of high density surface receptor 20 target cells, the amount of ferrofluid needed for maximum recovery is quite high without exogenous aggregation, to ensure that each target is magnetically responsive by saturating all the available binding sites. One benefit of this invention is that less total 25 ferrofluid is needed for separation, as it does not need to saturate all the available binding sites. This is due to the ability to form crosslinks of magnetic particles, mediated by the exogenous aggregation factor and increase the magnetic mass per binding site. 30 Instead of rendering cells magnetically responsive by the use of many single magnetic particles per cell, i.e. one particle binds one cell surface antigen, the aggregates of multiple particles can bind the single antigen and will maintain the same magnetic force as 35 optimally captured cells. Each particle now has the

WO 02/06790

PCT/US00/19171

capability to bind a cell surface antigen or another particle. In other words, even though less total ferrofluid is used, each target cell will have the same magnetic responsiveness, and the resulting separation efficiency will be comparable to that obtained under optimal conditions. Optimally, 10 μg of ferrofluid is used per 1 ml of sample. This concentration may be reduced 10-fold in accordance with the present invention.

10 In addition to reducing the amount of ferrofluid needed, the magnetic strength as well as the incubation time can be reduced. Because the aggregates of the invention are larger than individual magnetic particles in a non-aggregating separation, a lesser magnetic field strength can still move the aggregates. Promoting exogenous aggregation creates temporary and reversible large magnetic particles from small magnetic particles. Indeed, the benefits of large particles, including the ability to use weak magnetic fields for separation, can be applied to the present invention. The quadrupole magnetic separators typically used maintain a field gradient strength of 6.3kGauss/cm at the vessel surface. Magnetic arrangements, such as dipoles, which have almost half the magnetic field strength at the vessel surface may be utilized in practicing the methods of the present invention.

25 In the non-aggregating system, longer incubation times are required to increase the number of magnetic particles per cell for effective separation. In this system, one magnetic particle will bind one cell surface antigen. However, in an exogenously-induced aggregation system, the same number of particles per cell can be achieved by causing multiple particles per antigen, via the induced aggregates. This allows the incubation time to be shortened because not all of the available binding

WO 02/06790

PCT/US00/19171

sites will need to be bound to magnetic particles. By adding this second binding pair member, the particles now can bind to other particles, instead of only being capable of binding to free cell surface antigens.

5 Therefore, as explained above, the binding sites do not need to be saturated to have the same magnetic responsiveness as optimal conditions, which allows the reduction of incubation time. The minimum time for magnetic incubations is 30 minutes. Using the present
10 invention, these times may be reduced up to 3-fold. However, it is not intended that both ferrofluid concentration be reduced and incubation time be shortened simultaneously. Variations of these steps should be exploited independently of one another in
15 order to maintain maximal recovery of target bioentities.

A secondary ligand which is recognized by an exogenous ferrofluid aggregation factor will be coupled to ferrofluid in addition to the above monoclonal
20 antibody by standard coupling chemistry. The secondary ligand may be a small molecule such as hapten or biotin analogue or a big molecule such as an antibody or a specific protein or a polymer such as polypeptides or polyoligonucleotides. A biotin analogue such as
25 desthiobiotin is preferred for conjugation to magnetic particles as a secondary ligand in this invention as it exhibits a lower affinity ($K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$ for streptavidin, as compared to native biotin ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$). The interaction between streptavidin and desthiobiotin can
30 be easily disrupted by the addition of excess biotin. The combination of desthiobiotin and avidin has been used to remove magnetic particles or insoluble phase from the target substances (PCT/US94/10124 and US Patent No. 5,332,679). In this invention, that combination is
35 used only to aggregate and disaggregate magnetic

WO 02/06790

PCT/US00/19171

particles and not to remove magnetic particles from the target substance.

The reaction vessel for use in this invention may be either glass or plastic, however, plastic tubes are preferred. The bottom of the tube may be round or conical in shape. Tubes with different lengths or diameters may be used to process different volumes of samples. For example, in some instances a 50ml conical tube may be used to process 20ml of blood or more. In one embodiment of this invention, a 12x75mm polystyrene tube or 15ml conical tube is used. The reaction vessel used during incubation with magnetic particles and the vessel used during magnetic separation does not necessarily need to be the same. Two different types of vessels may be used, one type for incubation and another type for magnetic separation. However, it is preferred to use only one vessel in both cases. The magnetic separation vessel may be a tube or a flow-through chamber or some other device.

The test medium used in practicing the present invention may be any liquid or solution which contains the target substance and is preferably blood. A test sample in the reaction vessel is incubated with a ferrofluid conjugated to antibodies specific for a target substance and a secondary ligand specific for FPAF. Additionally, an exogenous FPAF is added simultaneously with ferrofluid to the test sample or after binding of ferrofluid to target substance. Optionally, a reagent which inhibits or disables naturally occurring aggregating factor may be added simultaneously with ferrofluid, or added prior to ferrofluid addition. After an optimum incubation time, magnetically labeled targets are separated from the rest of the test medium in a magnetic separator. The magnetic separator and separation time are selected

WO 02/06790

PCT/US00/19171

based upon test medium and reaction vessel. It is preferred to use high-gradient magnetic separation devices such as those described in US Patent No. 5,186,827. After aspirating the uncollected liquid, the collected cells may be resuspended in an isotonic buffer or permeabilizing solution to permeabilize cells for intracellular staining. The magnetically labeled cells are re-separated magnetically to remove permeabilizing reagents. The collected cells are resuspended in a small volume of cell buffer for staining with labeling substances. The volume of the buffer may be from 100-300 μ l. Optionally the cell buffer may contain staining antibodies. Additionally, the cell buffer may contain a disaggregating reagent as described above, e.g., biotin. The final concentration of biotin may be from 1- 5mM. The incubation time for antibody staining or for ferrofluid disaggregation with disaggregating reagent may be from 10-60 minutes and is preferably 15 minutes. After optimum staining with antibodies or disaggregation of ferrofluid, excess reagents may be removed from cells by another magnetic separation. After aspirating the uncollected liquid, the collected cells are resuspended in a small volume of isotonic buffer. The volume of this buffer may be from 100-500 μ l. The ferrofluid labeled cells may be further processed or analyzed by flowcytometry or microscopy.

While magnetic particles conjugated to antibody only have been described above, other types of conjugated magnetic particles are contemplated for use in the present invention. Magnetic particles conjugated to proteins other than antibodies may be used. For example, streptavidin conjugated magnetic particles may be used to bind target cells which are labeled with antibody-biotin conjugates. Following labeling of target cells, excess unbound antibody-biotin may be

WO 02/06790

PCT/US00/19171

removed by a wash step using a centrifuge. The target cells labeled with antibody-biotin are then incubated with streptavidin ferrofluid for magnetic labeling of cells. Desthiobiotin conjugated to any polymer or protein (aggregating factor) will be added to the test medium to aggregate ferrofluid. Aggregating factor may be added simultaneously with magnetic particles or after the magnetic particles bind the target cells. The number of desthiobiotins per polymer or protein should be more than one to aggregate ferrofluid. Preferably desthiobiotin conjugated to bovine serum albumin (BSA) may be used. The number of desthiobiotins on BSA may be 2-10. Such desthiobiotin/protein conjugates may be synthesized as set forth hereinbelow.

Although the present invention is described herein primarily with reference to tumor cell selection from blood, the invention is not limited to tumor cell selection. Other cell types present in blood, leukophoresis or bone marrow, such as CD34, CD4, and fetal cells may be selected. The antigenic determinants on those cells may be low to high. More generally, the invention applies to the isolation of any cell which requires magnetic enhancement for its efficient isolation.

The following examples are provided to illustrate various embodiments of the invention. These examples are not intended to limit the scope of the invention in any way.

EXAMPLE I

The following data illustrate the effects of the FFAF of the present invention on the recovery of low and high density receptor tumor cells spiked into blood samples. An exemplary FFAF has been identified as a specific IgM present in the blood samples of most

WO 02/06790

PCT/US00/19171

donors. Reducing agents such as dithiothreitol (DTT) and mercaptoethane sulfonic acid (MES) which cleave disulfide linkages, prevented ferrofluid aggregation in blood by converting pentameric IgM to its monomeric form. DTT is not a preferred reagent for use in the methods of the present invention, as high concentrations alter cellular morphology, and are toxic to target cells and leukocytes.

In this example, the effect of MES on ferrofluid aggregation and tumor cell recovery of both high and low antigen density tumor cells from spiked blood is described. The protocol used for this study was as follows. Blood (2ml) was placed in a 12x75mm polystyrene tube and 1ml of Immunicon dilution-wash buffer was added to dilute the blood. Next, 100 μ l of cell buffer (isotonic 7mM phosphate, pH 7.4 with 1% BSA and 50mM EDTA) containing approximately 1000 SKBR3 or PC3 cells was added. Increasing volumes of MES (not exceeding 150 μ l) were added to the blood samples to obtain different concentrations of reducing agent. After mixing, EpCAM MAb (GA73.3; 50 μ l) conjugated ferrofluid magnetic particles were added to the sample. The final concentration of magnetic particles was 5 μ g/ml. The blood sample was mixed well and incubated for 15 minutes at room temperature. After the incubation, the tube containing the blood sample was placed in a quadrupole magnetic separation device. Magnetic separation was performed for 10 minutes. The supernatant was aspirated and the tube was removed from the magnetic device. The magnetically collected cells were resuspended in 1ml of dilution-wash buffer and re-separated in a quadrupole magnetic separation device for 5 minutes. The supernatant was discarded and after removal from the quadrupole device, the target cells were resuspended in 150 μ l of dilution wash buffer. A

WO 02/06790

PCT/US00/19171

portion of this sample (5 μ l) was spotted on a microscope slide. The recovered cells were then photographed using a microscope with a digital camera attached to it.

5 The remaining sample was subjected to flowcytometry analysis to assess the recovery of tumor cells using the following procedure. Phycoerythrin (PE)-conjugated MAb (5 μ l) specific for tumor cells (Neu 24.7) and 5 μ l of peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD45
10 monoclonal antibody were added to the sample which was then incubated for 15 minutes. After the incubation, 1ml of dilution-wash buffer was added and a magnetic separation was performed in order to remove excess staining antibodies. The magnetically collected cells
15 were resuspended in 500 μ l of dilution-wash buffer. Nucleic acid dye (10 μ l) and 5 μ l of 3mM sized fluorescent beads (5000) were added to this sample. The sample was then analyzed on a FACSCalibur flowcytometer (Becton Dickinson) using FL1 as threshold. The fraction
20 of the fluorescent beads acquired in the flowcytometer was used to determine the amount of sample analyzed by flowcytometry which, in turn, facilitates calculation of the recovery of spiked tumor cells.

Concentration of MES (mM)	Recovery of tumor cells (%)	
	SKER3	PC3
0	77	46
20	80	50
50	80	31
25	82	27
100	70	17

25
30
35
40 When viewed by microscopy, the final sample showed free ferrofluid aggregates and ferrofluid aggregates on tumor cells in the absence of MES. As the concentration

WO 02/06790

PCT/US00/19171

of MES was increased, ferrofluid aggregates decreased and no aggregates were seen at higher concentrations of MES. These visual results were then compared with tumor cell recovery as measured by flowcytometry. The addition
5 of MES had no significant effect on recovery of SKBR3 cells (high antigen density) although microscopy revealed that it decreased ferrofluid aggregation in solution and on cell surfaces. In contrast, MES had a significant effect on the recovery of PC3 cells (low
10 antigen density). As the concentration of MES was increased from 0-100mM, recovery was decreased from 47% to 17%. This decrease in recovery of PC3 cells in the presence of increasing concentrations of MES was due to inhibition of ferrofluid aggregation and not due to any side effects of MES on cells, as MES did not decrease
15 the recovery of same spiked PC3 cells from lysed blood samples. Lysed blood is obtained by lysing red blood cells with ammonium chloride followed by wash step which removes plasma and ammonium chloride. Lysed blood
20 samples contain only leukocytes (white cells) whereas whole blood also contains erythrocytes and plasma. No ferrofluid aggregation is observed with lysed blood. Moreover, MES has no significant effect on cell morphology. These data show that low antigen density
25 cells were isolated less efficiently than high antigen density cells and inhibition of ferrofluid aggregation dramatically affects the isolation of low antigen density cells. Ferrofluid aggregation was also not observed when washed blood (blood cells with plasma
30 removed) samples were utilized. Therefore, washed blood samples were used as a control for no aggregation. Just as with whole blood, the recovery of SKBR3 cells was not decreased with washed blood. PC3 cell recovery on the other hand was decreased significantly (2 to 5-fold)
35 when washed blood was used. This data clearly shows that

WO 02/06790

PCT/US00/19171

ferrofluid aggregation does not have any effect on SKBR3 cells recovery but has a major effect on PC3 cells recovery.

In summary, aggregation of tumor specific
5 ferrofluid with the plasma component (IgM) present in blood of many patients at varying levels has a significant effect on recovery of low antigen density cells. Recovery of such cells is affected by the extent of ferrofluid aggregation and increases with
10 increasing aggregation. Ferrofluid aggregation increases the recovery of low antigen density cells by increasing magnetic load on the cells. Ferrofluid aggregation can vary from one blood donor to another depending upon the concentration of the aggregating factor or aggregator. As a result, the recovery of
15 tumor cells will vary from person to person even though they may possess the same number of circulating tumor cells. It is also possible that the concentration of the aggregator present in the blood from the same person can vary with time thus altering the extent of
20 ferrofluid aggregation and recovery of tumor cells. The best way to prevent this variation is to prevent naturally occurring ferrofluid aggregation. However, this gives rise to a decrease in the efficiency of tumor cells isolation and detection. One means to increase
25 tumor cell recovery under these circumstances will be to improve the magnetic device with a higher gradient which can pull weakly magnetic labeled cells effectively and increase their recovery. The other way to increase the recovery of tumor cells will be to mimic natural
30 ferrofluid aggregation with an exogenous reagent. This reagent can be a specific multivalent reagent which can recognize ferrofluid and can be added to the blood and ferrofluid. The specific reagent will aggregate
35 ferrofluid similarly to IgM but under a controlled

WO 02/06790

PCT/US00/19171

reaction. Controlled aggregation will have two advantages: (1) the percentage of tumor cells recovered will increase; and (2) the percentage of tumor cells recovered will not vary from patient to patient and will not vary with time from the same patient when the samples have the same number of tumor cells.

EXAMPLE II

Preparation of desthiobiotin/EpCAM MAb ferrofluid for controlled aggregation.

A base ferrofluid was made as described in US Patent No. 5,698,271. Monoclonal antibody to the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) was conjugated to base material by standard coupling chemistry, as used in US Patent Application No. 09/248,388. EpCAM MAb ferrofluid was then resuspended in 20mM HEPES, pH 7.5 for conjugation to desthiobiotin using N-hydroxysuccinimide-DL-desthiobiotin (NHS-desthiobiotin) (Sigma, Cat.# H-2134). A stock solution of NHS-desthiobiotin was made in DMSO at 1mg/ml. NHS-desthiobiotin (19 μ g) was added to 1mg of EpCAM MAb ferrofluid and incubated at room temperature for 2 hours. Unreacted NHS-desthiobiotin was removed by washing 3 times with 20mM HEPES, pH 7.5 containing 1mg/ml BSA, 0.05% ProClin 300 using a high gradient magnet. After the final wash, desthiobiotin/EpCAM MAb ferrofluid was resuspended in Immunicon ferrofluid storage buffer and filtered through a 0.2 μ m syringe filter.

EXAMPLE III

Increase of recovery of low antigen density PC3 tumor cells from spiked blood by aggregation of desthiobiotin/EpCAM ferrofluid with Streptavidin.

In this example, prostate carcinoma cells (PC3)

WO 02/06790

PCT/US00/19171

which have a low EpCAM antigen density were spiked into normal blood and used as a model system to assess recovery of those spiked cells. A known number of PC3 cells (~5000) in 50 μ l of buffer (isotonic 7mM phosphate, pH 7.4 with 1% BSA and 50mM EDTA) were spiked into 1ml of normal blood without plasma in a 12x75mm polystyrene tube. Blood without plasma was used in these experiments to prevent any interference of plasma components in the selection of target cells and it was prepared by centrifugation of blood. 500 μ l of Immunicon dilution-wash buffer and 15 μ l of streptavidin at different concentrations in PBS were added to aliquots of the blood sample. After mixing the sample, desthiobiotin/EpCAM MAb ferrofluid (25 μ l) from Example 1 was added to the sample, mixed well and incubated at room temperature for 15 minutes. The final concentration of ferrofluid was 5 μ g/ml. After the incubation, the tube containing the blood sample was placed in a quadrupole magnetic separator for 10 minutes for collection of magnetically labeled cells. The uncollected sample was aspirated and the tube was removed from the magnetic separator. The magnetically collected cells were resuspended in 750 μ l of dilution-wash buffer and re-separated in a magnetic separator for 5 minutes. The uncollected sample was discarded again and the collected cells were resuspended in 150 μ l of dilution-wash buffer after removal of the tube from the magnetic separator.

The sample was then stained with antibodies to determine the recovery of tumor cells by flowcytometry as follows. 5 μ l of phycoerythrin (PE)-conjugated MAb specific for tumor cells (Neu 24.7) and 5 μ l of peridinin chlorophyll protein (PerCP) -conjugated CD45 MAb were added to the sample and incubated for 15 minutes. After the incubation, 1ml of dilution-wash

WO 02/06790

PCT/US00/19171

buffer was added and a magnetic separation was performed for 5 minutes in order to remove excess staining antibodies. The magnetically collected cells were resuspended in 500 μ l of dilution-wash buffer. Nucleic acid dye (10 μ l) and 5 μ l of 3 μ M fluorescent beads (S000) were added to this sample. The sample was then analyzed on a FACSCalibur flowcytometer (Becton Dickinson) using FL1 as threshold. The fraction of the fluorescent beads acquired in the flowcytometer was used to determine the amount of sample analyzed by flowcytometry which was then used to calculate the recovery of spiked tumor cells. The percent recovery of tumor cells are shown in the following Table.

Concentration of Aggregator, Streptavidin (μ g/ml)	Tumor Cells (PC3) % recovery
0.0	14
0.2	60
0.5	74
2.0	80
5.0	75

The samples which were left after the flowcytometry analysis were divided into two parts. Biotin from a stock solution in PBS was added to one part of the sample to final concentration of 2mM and incubated at room temperature for 15 minutes to disaggregate streptavidin-mediated ferrofluid aggregates. These samples (5 μ l) were spotted on a microscope slide and photographs of the recovered cells were taken using a microscope with a digital camera attached to it. The data indicate that the recovery of tumor cells (PC3) was increased significantly as the concentration of aggregator (streptavidin) was increased, reaching a maximum at a 2 μ g/ml concentration of streptavidin. These results were correlated to free ferrofluid aggregates in solution and ferrofluid aggregates on

WO 02/06790

PCT/US00/19171

cells as observed with microscopy. There were no ferrofluid aggregates at 0 $\mu\text{g/ml}$ of streptavidin and ferrofluid aggregates were increased as the concentration of streptavidin was increased.

5 Streptavidin causes aggregation of ferrofluid by multivalent binding of streptavidin to desthiobiotin on different ferrofluid particles. All these ferrofluid aggregates were reversibly disaggregated by the addition of excess biotin. The principle of this disaggregation

10 of ferrofluid by excess biotin was due to displacement of desthiobiotin from streptavidin as biotin has a higher affinity than desthiobiotin for streptavidin.

EXAMPLE IV

15 Recovery of spiked low and high EpCAM antigen density cells from blood with and without aggregation of desthiobiotin/EpCAM MAb ferrofluid.

Breast carcinoma cells (SKBR3) have about 7-times higher EpCAM antigen density compared to PC3 cells and were chosen as the model high antigen density tumor

20 cells for this example. A known number of SKBR3 or PC3 cells in cell buffer were spiked into 1ml of blood without plasma separately in a 12x75mm tube. Ferrofluid dilution-wash buffer (500 μl) and 15 μl of PBS

25 containing streptavidin were added to the sample. After mixing the sample, 25 μl of desthiobiotin/EpCAM MAb ferrofluid was added and the blood sample mixed well and incubated for 15 minutes. After incubation, the tube was placed in a quadrupole magnetic separator for 10

30 minutes to collect magnetically labeled cells. The magnetically isolated cells were analyzed for recovery of tumor cells by flowcytometry and for observation of cells by microscopy as described in Example II.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

5

Concentration of aggregator, Streptavidin ($\mu\text{g/ml}$)	PC3 cells recovery (%)	SKBR3 cells recovery (%)
0	23	91
2	77	98

10 The data reveal a significant difference in recovery of tumor cells between low and high antigen density cells when the ferrofluid aggregator, streptavidin, was not added to the blood sample. There were also no ferrofluid aggregates in solution or on cell surfaces without streptavidin as observed with microscopy. Addition of streptavidin to the blood

15 sample increased the recovery of low antigen density PC3 cells significantly (3-fold) with a commensurate increase of ferrofluid aggregation in solution and on the cells. On the other hand, there was only a small difference in recovery of high antigen density SKBR3

20 cells with and without streptavidin present in the blood sample. There were enough ferrofluid particles on SKBR3 cells even without ferrofluid aggregation to collect them effectively and to recover all of them. Ferrofluid aggregates in solution and on cells were completely

25 disaggregated by the addition of excess biotin to the sample. In the case of low antigen density cells, there were not enough ferrofluid particles on cells to be collected effectively by magnetic methods. Ferrofluid aggregation by streptavidin increased the number of

30 particles on these cells facilitating collection, effectively resulting higher recovery. It is also noteworthy that aggregation of ferrofluid increased the recovery of low antigen density cells close to that obtained with the high antigen density cells. In other

35 words, there was no significant difference in recovery

WO 02/06790

PCT/US00/19171

of low and high antigen density tumor cells upon addition of reversible ferrofluid aggregator to the blood sample.

5

EXAMPLE V

Inhibition of ferrofluid aggregation by endogenous aggregation factors and creation of controlled ferrofluid aggregation with an exogenous aggregation factor.

10

In this example, a method is provided to inhibit all endogenous ferrofluid aggregation factors and to create controlled ferrofluid aggregation by addition of an exogenous aggregation factor. The endogenous ferrofluid aggregation factors present in the sample can be inhibited by adding a variety of inhibitors to the sample. These inhibitors will act on different endogenous aggregation factors and prevent them from either crosslinking or binding to ferrofluid to cause aggregation. Inhibition will eliminate any variations in ferrofluid aggregation from sample to sample as endogenous aggregation factors are present at different concentrations in different samples. Once endogenous factor-ferrofluid aggregation is prevented, ferrofluid aggregation can be promoted by adding an exogenous aggregation factor which can enhance the recovery of targets efficiently. The exogenous aggregation can be controlled consistently with all the samples and it can be readily reversed.

15

20

25

30

The blood sample is preincubated with a buffer containing inhibitors to inhibit endogenous ferrofluid aggregation factors before ferrofluid is added to the blood. The antibody coupled ferrofluid contains bovine serum albumin and streptavidin on the surface of ferrofluid particles in addition to antibody. Therefore,

WO 02/06790

PCT/US00/19171

the possible ferrofluid aggregation factors can be IgM (specific for crystal surface), human-anti-mouse antibody (HAMA), human-anti-bovine serum albumin antibody (HABAA), human-anti-streptavidin etc. If any
5 of the above aggregation factors are present in plasma, they will recognize and bind to ferrofluid and cause ferrofluid to aggregate. It is already known that some patient plasma samples have HAMA and HABAA present therein. Clearly, any other components used to
10 manufacture ferrofluids could also be targets for aggregation and would need to be dealt with accordingly.

One of the inhibitors can be a reducing agent, such as mercaptoethane sulfonic acid at 100mM, which can
15 disable IgM-induced aggregation without affecting the ligands used for labeling cells. The reducing agent can be added as a single reagent to the blood or could be placed in a blood collection tube. The second inhibitor can be bovine serum albumin, which can be included in
20 the buffer at 10mg/ml, and will neutralize any HABAA. The third inhibitor can be nonspecific mouse antibody, in particular, the appropriate isotype which matches the antibody on the ferrofluid. This can be included in the
25 buffer at a concentration of 0.5-5mg/ml to neutralize even the most severe HAMA. The fourth inhibitor can be Streptavidin to be included in the buffer, if necessary, to neutralize any anti-streptavidin antibody present in plasma. However, there is no any information regarding
30 the existence of anti-streptavidin antibody in plasma at this date.

The pre-treatment of blood with the above buffer and reducing agent can be from 15-30minutes to
neutralize all endogenous aggregation factors. After all endogenous aggregation factors are neutralized, an
35 exogenous ferrofluid aggregation factor is added to the

WO 02/06790

PCT/US00/19171

sample, followed by ferrofluid. The ferrofluid is coupled to an antibody specific for targets, as well as to another ligand specific for the exogenous aggregation factor. After optimum labeling of target cells with ferrofluid and induced aggregation of ferrofluid with exogenous aggregation factor, the sample is subjected to magnetic separation to enrich targets. After removing all non-targets, magnetically-labeled targets and free ferrofluid are resuspended in a small volume of buffer. The magnetically-labeled targets, such as cells, can be permeabilized to stain intracellular antigens. The sample is then incubated with different staining reagents depending upon the desired analysis method, including flow cytometry or fluorescent or bright field microscopy. After optimum incubation time, the excess staining reagents are removed by wash step using magnetic separation. The magnetically-labeled cells are then resuspended in a small volume of buffer. The final sample contains free ferrofluid aggregates and aggregates on target cells. The final sample without any further treatment can be used for flowcytometry analysis, as ferrofluid aggregation on cell surface does not interfere with the analysis. However, ferrofluid aggregation on cell surface interferes with microscopy analysis. In such cases, exogenous mediated-ferrofluid aggregation should be reversed. This can be achieved by resuspending the final sample in a buffer containing a disaggregation factor which binds to exogenous aggregation factor. The disaggregation factor disaggregates all ferrofluid aggregates, leaving cells easy to view and analyze. These methods permit effective target recovery and visualization for morphology studies.

Several patents and pending U.S. patent applications are referred to in the present

WO 02/06790

PCT/US00/19171

specification. The entire disclosures of each of these patents and patent applications are incorporated by reference herein.

5 While certain of the preferred embodiments of the present invention have been described and specifically exemplified above, it is not intended that the invention be limited to such embodiments. Various modifications may be made thereto without departing from the scope and spirit of the invention, as set forth in the claims.

10

WO 02/06790

PCT/US00/19171

What is claimed is:

1. A method for isolating a target bioentity from a biological sample by means of colloidal magnetic particles with reduced aggregation of said magnetic particles, comprising:
- 5
- a) obtaining a biological specimen suspected of containing said target bioentity together with non-target bioentities and endogenous aggregating factors;
- 10
- b) contacting said biological specimen with a reagent effective to inactivate any endogenous aggregating factors present in said specimen;
- c) preparing an immunomagnetic suspension comprising a mixture of said specimen and colloidal, magnetic particles coupled to a biospecific ligand having binding affinity for at least one characteristic determinant present on said target bioentity; and
- 15
- d) subjecting said immunomagnetic suspension to a magnetic field to obtain a target bioentity-enriched fraction.
- 20
2. A method as claimed in claim 1, further comprising the steps of
- e) purifying said target bioentity from said enriched fraction; and
- 25
- f) analyzing said purified target bioentity.
3. A method as claimed in claim 1, further comprising the steps of:
- 30
- e) adding to said target bioentity enriched fraction at least one biospecific reagent which has binding affinity for at least one additional characteristic determinant on said target bioentity;
- f) separating said target bioentity in a

WO 02/06790

PCT/US00/19171

magnetic field to remove unbound biospecific reagent from said enriched fraction.

4. A method as claimed in claim 3, further comprising the steps of:

5 g) purifying said separated target bioentity; and

and

h) analyzing said purified target bioentity.

10

5. A method as claimed in claim 3, further comprising the steps of:

g) adding a non-cell exclusion agent to said separated target bioentities to allow exclusion of non-nucleated entities present in the sample;

15 h) purifying said target bioentity; and

i) analyzing said purified target bioentities.

20

6. A method as claimed in claim 1, wherein said target bioentity is selected from the group consisting of tumor cells, virally infected cells, fetal cells in maternal circulation, virus particles, bacterial cells, white blood cells, myocardial cells, epithelial cells, endothelial cells, proteins, hormones,

25 DNA, and RNA.

7. A method as claimed in claim 2, wherein said target bioentities are analyzed by a process selected from the group consisting of multiparameter

30 flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, manual cell analysis and automated cell analysis.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

8. A method as claimed in claim 1, said aggregation inhibiting agent being at least one selected from those consisting of a reducing agent, an animal serum protein, an immune-complex, a carbohydrate, a chelating agent, an unconjugated ferrofluid, and diamino butane.

9. A method as claimed in claim 5, wherein said aggregation inhibiting agent is a reducing agent selected from the group consisting of mercapto ethane sulfonic acid [MES], mercapto propane sulfonic acid [MPS] and dithiothreitol [DTT].

10. A method as claimed in claim 1, wherein said biospecific ligand is a monoclonal antibody.

11. A method as claimed in claim 9, wherein said biospecific ligand is a monoclonal antibody having affinity for epithelial cell adhesion molecule.

12. A method for isolating target bioentities from a biological sample by means of colloidal magnetic particles with controlled aggregation of said magnetic particles, comprising:

- a) obtaining a biological specimen suspected of containing said target bioentities together with non-target bioentities and endogenous aggregating factors;
- b) contacting said biological specimen with a reagent effective to inactivate any endogenous aggregating factors present in said specimen;
- c) preparing an immunomagnetic suspension comprising a mixture of colloidal, magnetic particles coupled to a biospecific ligand having affinity for at least one characteristic determinant present on said

WO 02/06790

PCT/US00/19171

target bioentity, said magnetic particles being further coupled to a first exogenous aggregation enhancing factor which comprises one member of a specific binding pair;

5 d) adding a second exogenous aggregation enhancing factor to said immunomagnetic suspension to increase aggregation of said particles, said second aggregating enhancing factor comprising the other member of said specific binding pair; and

10 e) subjecting said sample to a magnetic field to obtain a target bioentity-enriched fraction.

13. A method as claimed in claim 12, further comprising the steps of:

15 f) adding to said immunomagnetic suspension at least one biospecific reagent having binding affinity for at least one additional characteristic determinant on said target bioentity;

20 g) separating said target bioentities in a magnetic field to remove unbound biospecific reagent; and

h) adding a non-cell exclusion agent to said separated bioentities to allow exclusion of non-nucleated entities present in the sample;

25 i) purifying said target bioentities; and

j) analyzing said separated and purified target bioentities.

14. A method as claimed in claim 12, further comprising examining said purified target bioentity-enriched fraction to determine the degree of aggregation mediated by said first and second members of said specific binding pair.

WO 02/06790

PCT/US00/19171

15 15. A method as claimed in claim 12, wherein
one or the other member of said specific binding pair is
added to said purified bioentity fraction to reverse
aggregation of said sample, thereby facilitating
analysis of said target bioentities.

10 16. A method as claimed in claim 12, wherein
said specific binding pair is selected from the group
consisting of biotin-streptavidin, antigen-antibody,
receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist,
lectin-carbohydrate, Protein A-antibody Fc, and avidin-
biotin, biotin analog-streptavidin, biotin analog-
avidin, desthiobiotin-streptavidin, desthiobiotin-
avidin, iminobiotin-streptavidin, and iminobiotin-
avidin.

15 17. A method as claimed in claim 12, wherein
said biospecific ligand is a monoclonal antibody.

20 18. A method as claimed in claim 17, wherein
said biospecific ligand is an antibody having affinity
for epithelial cell adhesion molecule.

25 19. A method as claimed in claim 12 wherein
said at least one biospecific reagent is selected from
the group of consisting of monoclonal antibodies,
polyclonal antibodies, detectably labeled antibodies,
antibody fragments, and single chain antibodies.

30 20. A method as claimed in claim 12 wherein
said target bioentities are analyzed by a process
selected from the group consisting of multiparameter
flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser
scanning cytometry, bright field base image analysis,

WO 02/06790

PCT/US00/19171

capillary volumetry, manual cell analysis and automated cell analysis.

21. A method as claimed in claim 12, wherein
5 said immunomagnetic suspension is incubated for less than 30 minutes.

22. A method as claimed in claim 12, wherein
10 said purification of said sample is performed in a magnetic field gradient of less than 6.3 kGauss/cm.

23. A method as claimed in claim 12, wherein
15 said colloidal magnetic particle concentration in said immunomagnetic suspension is less than 10 μg per milliliter.

24. A method for isolating low antigen
density tumor cells from a biological sample by means of
colloidal magnetic particles with controlled aggregation
20 of said magnetic particles, comprising:

a) obtaining a biological specimen suspected
of containing said tumor cells together with non-tumor
cells and endogenous aggregating factors;

b) preparing an immunomagnetic suspension
25 comprising a mixture of said specimen and colloidal, magnetic particles coupled to a biospecific ligand having binding affinity for at least one characteristic determinant present on said tumor cell, said magnetic particles being further coupled to a first exogenous aggregation enhancing factor, said factor comprising one
30 member of a specific binding pair;

c) adding a second exogenous aggregating
enhancing factor to said immunomagnetic suspension to
increase aggregation of said particles, said second

WO 02/06790

PCT/US00/19171

aggregating enhancing factor comprising the other member of said specific binding pair; and

d) purifying said sample in a magnetic field to obtain a tumor cell-enriched fraction.

5

25. A method as claimed in claim 24, further comprising the steps of:

e) adding to said fraction, at least one biospecific reagent having binding affinity for at least one additional characteristic determinant on said tumor cell;

f) separating said tumor cells in a magnetic field to remove unbound biospecific reagent;

g) adding a non-cell exclusion agent to said separated cells to allow exclusion of non-nucleated entities present in the sample; and

h) analyzing said separated tumor cells to assess at least one of tumor cell number and type.

20

26. A method as claimed in claim 25, wherein a member of said specific binding pair is added to the separated cells to reverse aggregation of said sample, thereby facilitating analysis of said cells.

25

27. A method as claimed in claim 24, wherein said specific binding pair is selected from the group consisting of biotin-streptavidin, antigen-antibody, receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist, lectin-carbohydrate, Protein A-antibody Fc, and avidin-biotin, biotin analog-avidin, desthiobiotin-streptavidin, desthiobiotin-avidin, iminobiotin-streptavidin, and iminobiotin-avidin.

30

WO 02/06790

PCT/US00/19171

28. A method as claimed in claim 24, wherein said biospecific ligand is a monoclonal antibody.

5 29. A method as claimed in claim 28, wherein said biospecific ligand is an antibody having binding affinity for epithelial cell adhesion molecule.

10 30. A method as claimed in claim 25, wherein said at least one biospecific reagent is selected from the group of consisting of monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, detectably labeled antibodies, antibody fragments and single chain antibodies.

15 31. A method as claimed in claim 25 wherein said tumor cells are analyzed by a process selected from the group consisting of multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, manual cell analysis and automated cell analysis.

20 32. A method as claimed in claim 24 wherein said biological sample is pretreated with an aggregation inhibiting agent to inactivate endogenous aggregation factors present in the sample prior to the preparation of said immunomagnetic suspension.

25 33. A method as claimed in claim 25, wherein said purified tumor cell-enriched fraction is examined to determine the degree of aggregation mediated by said first and second members of said specific binding pair.

30 34. A kit for inhibiting endogenous aggregation of colloidal magnetic particles in processing of biological material for isolation of

WO 02/06790

PCT/US00/19171

target bioentities from such materials, comprising:

a) coated magnetic nanoparticles comprising a magnetic core material, a protein base coating material, and an antibody that binds specifically to a first characteristic determinant of said target bioentity, said antibody being coupled, directly or indirectly, to said base coating material;

b) at least one antibody having binding specificity for a second characteristic determinant of said target bioentity;

c) an endogenous aggregation inhibiting factor; and

d) a non-cell exclusion agent for excluding non-nucleated cells from analysis.

35. A kit for isolating low antigen density tumor cells from a biological sample with controlled aggregation of colloidal magnetic particles, comprising:

a) a reagent effective to inactivate endogenous aggregating factors;

b) coated magnetic nanoparticles comprising a magnetic core material, a protein base coating material, and an antibody that binds specifically to a first characteristic determinant of said tumor cell, said antibody being coupled, directly or indirectly, to said base coating material; said magnetic particles being further coupled to a first exogenous aggregation enhancing factor, said factor comprising one member of a specific binding pair;

c) at least one antibody having binding specificity for a second characteristic determinant of said tumor cell;

d) a second exogenous aggregation enhancing factor, said second aggregation factor comprising the

WO 02/06790

PCT/US00/19171

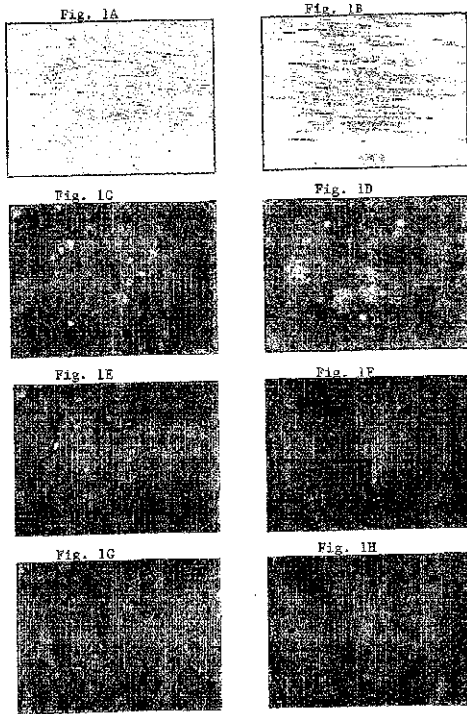
other member of said specific binding pair; and
e) a non-cell excluding agent for excluding
non-nucleated cells from analysis.

5 36. A kit as claimed in claim 35, wherein said
specific binding pair is selected from the group
consisting of biotin-streptavidin, antigen-antibody,
receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist,
10 lactin-carbohydrate, Protein A-antibody Fc, and avidin-
biotin, biotin analog-avidin, desthiobiotin-
streptavidin, desthiobiotin-avidin, iminobiotin-
streptavidin, and iminobiotin-avidin.

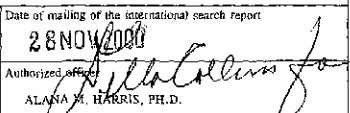
15 37. A kit as claimed in claim 35, said kit further
comprising a reagent for reversing the effect of said
exogenous aggregation factor.

20 38. A kit as claimed in claim 35, said reagent
effective to inhibit endogenous aggregation factor being
at least one selected from the group consisting of a
reducing agent, an animal serum protein, an immune-
complexes, a carbohydrate, a chelating agent, an
unconjugated ferrofluid, and diamino butane.

25 39. A method as claimed in claim 38, wherein said
said endogenous aggregation factor inhibiting reagent is
a reducing agent selected from the group of agents
consisting of mercapto ethane sulfonic acid [MES],
30 mercapto Propane Sulfonic acid [MPS] and dithiothreitol
[DTT].



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19171
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 436/501, 536, 539, 164, 166, 172, 174; 434/4, 5, 7.1, 7.21, 7.23 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. : 436/501, 536, 539, 164, 166, 172, 174; 434/4, 5, 7.1, 7.21, 7.23 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Fluka Chemika-BioChemika catalog (1993/94) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, WPIDS, JICST-EPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 91/02083 A1 (IMMUNICON CORPORATION) 21 FEBRUARY 1991, whole document.	1-4, 7, 8, 10, 12- 20 ----- 5, 9, 11, 21-39N
X --- Y	GB 2 152,664 A (SERONO DIAGNOSTICS LIMITED) 07 August 1985 (7-8-85), see entire document.	1-4, 6, 7, 10 and 34 ----- 5, 8, 9, 11
Y	FLUKA CHEMIKA-BIOCHEMIKA 1993/94	8, 9, 38 and 39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	* ¹ 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.	
* ² Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* ³ 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	
* ³ Earlier document published on or after the international filing date	* ⁴ 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	
* ⁴ 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)	* ⁵ 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	
* ⁵ Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* ⁶ Document member of the same patent family	
* ⁶ Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
08 NOVEMBER 2000	28 NOV 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PGT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized official  ALANA M. HARRIS, PH.D. Telephone No. (703) 305-6000	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19171
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---P Y	US 6,013,532 A (LIBERTI ET AL) 11 JANUARY 2000 (11/1/00), see entire document.	1-4, 6, 7, 10, 12-20 ----- 5, 8, 9, 11, 21-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19171
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. : because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Please See Extra Sheet.		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US00/19171
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: <i>IPC (7):</i></p>	
<p><i>G01N 1/00, 1/28, 1/38, 21/00, 21/01, 21/17, 21/25, 21/29, 21/41, 21/62, 21/63, 21/64, 21/75, 33/53, 33/531, 33/532, 33/533, 33/536, 33/537, 33/539, 33/542, 33/563, 33/574, 33/577</i></p>	
<p>BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING This ISA found multiple inventions as follows:</p>	
<p>This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.</p>	
<p>Group I, claims 1-11 and 34, drawn to a method for isolating a target bioentity from a biological sample by means of colloidal magnetic particles with reduced aggregation of said magnetic particles, comprising contacting said biological specimen with a reagent and a kit comprising said reagent.</p>	
<p>Group II, claims 12-23, drawn to a method for isolating target bioentities from a biological sample by means of colloidal magnetic particles with controlled aggregation of said magnetic particles comprising contacting said biological specimen with a reagent and adding a second exogenous aggregation enhancing factor.</p>	
<p>Group III, claims 24-33, drawn to a method for isolating low antigen density tumor cells from a biological sample.</p>	
<p>Group IV, claims 35-39, drawn to a kit for isolating low antigen density tumor cells from a biological sample.</p>	
<p>The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:</p>	
<p>The inventions of Group I and IV are different products, structurally and functionally. Furthermore, the product kits are made by different methods and have different uses.</p>	
<p>The inventions of Groups I-III are different methods which differ in objectives, steps, parameters and the reagents used.</p>	

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 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/577	A

(72)発明者 ポール・エイ・リバーティ
 アメリカ合衆国19006ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、グラスホッパー・ロード1
 503番

(72)発明者 ガラ・チャンドラ・ラオ
 アメリカ合衆国08540ニュージャージー州プリンストン、ヘリティッジ・ブルバード6番

(72)発明者 レオン・ウェー・エム・エム・テルスタッペン
 アメリカ合衆国19006ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロー
 ド1354番

专利名称(译)	由于磁性纳米颗粒的受控聚集，提高了分离效率		
公开(公告)号	JP2004504129A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002512651	申请日	2000-07-14
申请(专利权)人(译)	Imunibesuto公司		
[标]发明人	ポールエイリバーティ ガラチャンドララオ レオンウェーエムエムテルスタッペン		
发明人	ポール・エイ・リバーティ ガラ・チャンドラ・ラオ レオン・ウェー・エム・エム・テルスタッペン		
IPC分类号	G01N33/53 B03C1/00 B03C1/02 B03C1/30 C12N15/10 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/57492 C12N15/1013 G01N33/54326		
FI分类号	B03C1/00.B B03C1/02.Z B03C1/30.Z G01N33/53.D G01N33/53.F G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/543.541.A G01N33/566 G01N33/577.A		
代理人(译)	矢野正树		
其他公开文献	JP4663957B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及生物样品的生物亲和分离和诊断测试领域。更具体地，本发明提供一种磁分离测定，并且如果不加以控制，富集过程中可用于控制内源性的磁性粒子聚集因素将与隔离部分的可视化干扰在没有溶剂的情况下。还提供了构建和合成可逆聚集因子的方法，其中所得组合物有助于观察所分离的材料，同时促进稀有生物材料的回收。

【表2】

凝集剤ストレプトアビジンの濃度 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	腫瘍細胞 (PC3) %回収率
0.0	14
0.2	60
0.5	74
2.0	80
5.0	75