



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

混合細胞集団中の希少細胞を検出し、数え上げる方法であって、前記集団中の前記希少細胞の存在が病態を示しており、前記方法が、

a) 被験者から生体試料を得ることであって、前記試料が、前記希少細胞を含有すると考えられる混合細胞集団を含む、ことと、

b) 前記生体試料が、他のサンプル構成成分を実質的に除外して、前記希少細胞と特異的に反応する多特異性リガンドに結合される磁性粒子と混合される、免疫磁性サンプルを調製することと、

c) 前記免疫磁性サンプルを、前記希少細胞を標識する少なくとも 1 種の多特異性試薬と接触させることと、

d) 前記標識化希少細胞を解析し、前記免疫磁性サンプル中の任意の希少細胞の存在及び数を決定することであって、前記サンプル中に存在する希少細胞数が多いほど前記病態の重症度が高い、ことと、を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記免疫磁性サンプルを調製することと、前記免疫磁性サンプルを少なくとも 1 種の多特異性試薬と接触させることとの間の中間工程として、前記免疫磁性サンプルが磁場に曝されて、前記免疫磁性サンプルとして希少細胞濃縮化細胞懸濁液を生じる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記希少細胞濃縮化細胞懸濁液を含有する前記免疫磁性サンプルの量を少なくする、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化希少細胞含有画分と非標識画分に分離する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記磁性粒子がコロイド状であり、前記免疫磁性サンプルを磁場勾配に曝すことにより分離が行われる、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記希少細胞が、内皮細胞、母体循環中胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、及びウイルス感染細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

混合細胞集団中の癌細胞を検出し、数え上げる方法であって、

a) 被験者から生体試料を得ることであって、前記試料が、前記癌細胞を含有すると考えられる混合細胞集団を含む、ことと、

b) 前記生体試料が、他のサンプル構成成分を実質的に除外して、前記癌細胞と特異的に反応する多特異性リガンドに結合される磁性粒子と混合される、免疫磁性サンプルを調製することと、

c) 前記免疫磁性サンプルを、前記癌細胞を標識する少なくとも 1 種の多特異性試薬と接触させることと、

d) 前記標識化癌細胞を解析し、前記免疫磁性サンプル中の任意の癌細胞の存在及び数を判定することであって、前記サンプル中に存在する癌細胞数が多いほど前記癌の重症度が高い、ことと、を含む、方法。

**【請求項 8】**

前記磁性粒子がコロイド状であり、解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化癌細胞含有画分と非標識画分に分離する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記コロイド状磁性粒子と前記少なくとも 1 種の多特異性試薬が連続して前記生体試料と混合され、中間工程として、前記免疫磁性サンプルが磁場に曝されて、前記免疫磁性サンプルとして癌細胞濃縮化細胞懸濁液を生じる、請求項 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 10】

解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化癌細胞含有画分と非標識画分に分離する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記標識化癌細胞含有画分が、多パラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡法、レーザー走査サイトメトリー、明視野に基づく画像解析、キャピラリー容積測定法、スペクトル画像解析、手動細胞解析、及び自動細胞解析からなる群から選択される方法によって解析される、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

循環希少細胞の存在について患者サンプルをスクリーニングするための検査キットであって、

a) 磁性コア材料と、タンパク質ベースコーティング材料と、2種以上の抗体と、を含む、コーティングされた磁性ナノ粒子であって、各抗体が特異的に前記希少細胞の特徴決定因子に結合し、前記抗体が前記ベースコーティング材料に直接的又は間接的に結合されている、コーティングされた磁性ナノ粒子と、

b) 前記希少細胞の第2の特徴決定因子に対する結合特異性を有する少なくとも1種の抗体と、

c) 前記希少細胞以外のサンプル構成成分を解析から除外するための細胞特異的染料と、を含む、キット。

## 【請求項 13】

非標的細胞に対する結合親和性を有する抗体と、生物学的緩衝液と、透過化緩衝液と、手順書と、任意に情報シートと、を更に含む、請求項 12 に記載のキット。

## 【請求項 14】

前記希少細胞が、内皮細胞、母体循環中胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、及びウイルス感染細胞からなる群から選択される、請求項 12 に記載のキット。

## 【請求項 15】

循環腫瘍細胞の存在について患者サンプルをスクリーニングするためのキットであって、

a) 磁性コア材料と、タンパク質ベースコーティング材料と、前記ベースコーティング材料に直接的又は間接的に結合されている様々な種類の上皮細胞特異的抗体と、を含む、コーティングされた磁性ナノ粒子と、

b) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する少なくとも1種の抗体と、

c) 前記腫瘍細胞以外のサンプル構成成分を解析から除外するための細胞特異的染料と、を含む、キット。

## 【請求項 16】

非腫瘍細胞に対する結合親和性を有する抗体と、生物学的緩衝液と、透過化緩衝液と、手順書と、任意に情報シートと、を更に含む、請求項 15 に記載のキット。

## 【請求項 17】

癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、乳癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、MUC-1、エストロゲン、プロゲステロンレセプター、カテプシンD、p53、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、上皮成長因子、上皮成長因子レセプター、BRCA1、BRCA2、CA27.29、CA15.5、前立腺特異的抗原、プラスミノゲン活性化因子阻害剤、及びHer2-neuからなる決定因子群から選択される、乳癌について患者をスクリーニングするための請求項 15 に記載のキット。

## 【請求項 18】

癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、前立腺癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、前立腺特異的抗原、前立腺酸性ホスファターゼ、チモシンb-15、p53、HPC1基礎前立腺遺伝子、クレアチンキナーゼ、及び前立腺特異的膜抗原からなる決定因子群から選択される、前立腺癌について患者をス

10

20

30

40

50

クリーニングするための請求項 15 に記載のキット。

【請求項 19】

癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも 1 種の抗体が、結腸癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、癌胎児性抗原、Cタンパク質、APC 遺伝子、p53、及びマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-9) からなる決定因子群から選択される、結腸癌について患者をスクリーニングするための請求項 15 に記載のキット。

【請求項 20】

癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも 1 種の抗体が、膀胱癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、核マトリックスタンパク質 (NMP22)、Bard 膀胱腫瘍抗原 (BTA)、及びフィブリン分解産物 (FDP) からなる決定因子群から選択される、膀胱癌の患者をスクリーニングするための請求項 15 に記載のキット。

10

【請求項 21】

前記少なくとも 1 種の抗体が、異なる癌細胞特徴決定因子に対する結合特異性をそれぞれが有する抗体のパネルを含む、請求項 15 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

20

本出願は、その全体の内容が参照として本明細書に組み込まれる、2010年10月14日出願の、米国特許仮出願第 61/393,036 号の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、腫瘍学及び診断検査の分野に関する。本発明は、癌スクリーニング、病期分類、化学療法の治療反応性、癌再発のモニタリングなどに有用である。より具体的には、本発明は、腫瘍細胞、又は生体サンプルから単離されたその他希少細胞の解析及び算出を容易にする試薬、方法、及び検査キットを提供する。

【背景技術】

【0003】

30

転移性乳癌、前立腺癌、及び結腸癌患者の循環腫瘍細胞 (CTC) を、Cell Search CTC アッセイを用いて数え上げることにより、患者生存率が予測され、治療反応性のモニタリングが可能である。また CTC は、様々な分子マーカーの特性を示す場合があり、患者における動的な腫瘍生物学研究の手段として提唱されている。しかしながら、膵臓癌患者の CTC 検出に関する研究は少なく、予備的研究において、本来のアッセイ構成では、これら細胞の検出に最適ではない恐れがあることが示唆された (米国特許第 7,332,288 号参照、参照として組み込まれる)。本来の Cell Search CTC アッセイでは、常磁性ナノ粒子に結合された抗 EpCAM (EpCAM フェロフルード) を用いて CTC を捕捉する。EpCAM フェロフルードによって捕捉された CTC を、フィリコエリトリンに結合された抗サイトケラチン抗体 (CK8、18、及び 19) で

40

【0004】

乳癌、前立腺癌、又は結腸直腸癌とは異なる腫瘍抗原を発現し得る異なる癌の細胞という問題に加え、原発性腫瘍の細胞不均一性について述べる文献が増えている。最近の進歩では、腫瘍前駆細胞 (TPC) が、癌の一部の化学療法後の再発理由を説明するのに非常に重要であり得ることが示されている。これら TPC は、多くの従来治療に対して強い抵抗性を示し、将来的に腫瘍の再成立が可能である。最近の文献では、転移プロセスにおいて重要な役割を果たし得る上皮間葉移行細胞 (EMT) も同定されている。TPC 及び EMT の両方とも、CTC とは異なる抗原を発現すると考えられている。CTC の捕捉は単一の捕捉抗原に限られているため、CTC の捕捉は CTC 上の EpCAM 発現に依存する

50

。CTC上のEpCAMは生物学的にあまり理解されておらず、EpCAM抗原が、CTCの一部で下方制御されている又はネガティブである可能性がある。そのような場合には、CTCはEpCAMフェロフルードで捕捉されず、アッセイにおいてCTCゼロの結果が得られる。別の可能性としては、アッセイで用いられるサイトケラチンマーカーの欠如のため、捕捉されたCTCが検出されないことである。結果として、現行技術によって多くのCTCがうまく捕捉され、検出されるが、現行のアッセイで用いられるマーカーを発現できないために検出されないCTCが、癌患者の血中に存在する可能性がある。更に、TPC及びEMTが血中を循環し、検出できるかどうかは不明である。しかしながら、現行の捕捉検出技術が1種の抗原又は抗原クラスを標的とすることに限定されていることが、現行技術でTPC又はEMTが検出されそうもないことを意味する。

10

**【0005】**

上記に基づくと、特に癌初期において、続発性腫瘍の成立に先だって、循環中のこれら細胞の同定方法が非常に望ましいことは明らかである。多くの検査法及び臨床診断法では、生体サンプルから希少細胞を単離するために、生物特異的親和性反応を利用している。このような反応は、診断検査、又は様々な標的物質、特に生物学的物質、例えば、細胞、タンパク質、細菌、ウイルス、核酸配列などの分離に一般的に使用される。

**【0006】**

対象とする物質と、上記標的物質が特異的に結合する別の物質との間の複合体形成に基づき、標的物質を分析又は分離する様々な方法が存在する。非結合物質からの複合体の分離は、例えば、標的物質に結合している超微粒子状粒子、つまりビーズを沈殿させる、又は別の方法としては遠心分離することにより、重力的に達成できる。必要に応じて、このような粒子、つまりビーズを磁性にして、結合/遊離分離工程を容易にする場合がある。磁性粒子は、免疫的及びその他生物特異的親和性反応において利用されるように、当該技術分野において周知である。例えば、米国特許第4,554,088号、及びImmunoassays for Clinical Chemistry, pp. 147~162, Hunter et al. eds., Churchill Livingstone, Edinburgh (1983)を参照されたい。一般には、磁気又は重力分離を容易にする任意の物質がこの目的で利用できる。しかしながら、磁気分離手段が最適な方法であることが明らかになっている。

20

**【0007】**

磁性粒子は、寸法に基づいて、大(1.5~約50マイクロメートル)、小(0.7~1.5マイクロメートル)、又はコロイド状(<200nm)(ナノ粒子とも呼ばれる)に分類できる。後者の物質は、フェロフルード又はフェロフルード様物質としても知られ、古典的なフェロフルードの性質の多くを有し、本明細書においてはコロイド状超常磁性粒子と称する場合もある。

30

**【0008】**

上記の種類の小磁性粒子は、生物特異的親和性反応などの解析に非常に有用であり、生体機能性ポリマー(例えば、タンパク質)でうまく覆われると、非常に大きい表面積をもたらして、適度な反応速度が得られる。0.7~1.5マイクロメートルの範囲の磁性粒子は、例として、米国特許第3,970,518号、同第4,018,886号、同第4,230,685号、同第4,267,234号、同第4,452,773号、同第4,554,088号、及び同第4,659,678号などの特許文献に記載されている。これらの粒子のうち、免疫学的試薬の有用な固体担体となる特定のものが開示される。

40

**【0009】**

上述の小磁性粒子と同様に、大磁性粒子(>1.5マイクロメートル~約50マイクロメートル)も超常磁性挙動を示す場合がある。このような物質のうち典型的であるのは、Ugelstadによって米国特許第4,654,267号に記載され、Dyna1(Oslo, Norway)が製造するものである。Ugelstad法は、膨潤の要因となるポリマー粒子の合成を含み、膨潤した粒子に磁鉄鉱結晶が埋め込まれる。分散した磁鉄鉱結晶の存在下でポリマー粒子を合成することにより、同様の寸法範囲のその他物質が調製

50

される。この結果、ポリマーマトリックス中に磁鉄鉱結晶が閉じ込められ、そうして得られた物質を磁性とする。どちらの場合も、得られる粒子は超常磁性挙動を有し、磁場を除くと容易に分散する能力が見られる。先に言及し、より詳細に以下で説明する磁性コロイド、つまり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、粒子当たりの磁性物質の質量のせいで、単に実験室内の磁気によって容易に分離される。したがって、分離は、数百ガウス/cm程度から最大約1.5キロガウス/cmの勾配において行われる。一方、コロイド状磁性粒子(約200nm未満)は、その拡散エネルギー、粒子当たり磁気質量の小ささ、及びストークス抵抗によって、実質的により高い磁場勾配を必要とする。

#### 【0010】

米国特許第4,795,698号(Owenら)は、ポリマー存在下で、 $Fe^{+2}/Fe^{+3}$ 塩から磁鉄鉱を形成することにより製造される、ポリマーコーティングされたコロイド状超常磁性粒子に関する。米国特許第4,452,773号(Molday)は、Owenらによる特許で説明されるものに特性が類似する物質について記載しており、非常に高濃度のデキストラン存在下で、塩基添加によって $Fe^{+2}/Fe^{+3}$ から磁鉄鉱及びその他酸化鉄を形成することにより製造される。両手順によって得られた粒子は、数か月もの観察期間において、水性懸濁液から沈殿されない傾向をかなり示す。そのように製造された物質は、コロイド状特性を有し、細胞分離に非常に有用であると判明している。Moldayの技術は、Miltenyi Biotec(Bergisch Gladbach, Germany)及びTerry Thomas(Vancouver, Canada)によって商品化されている。

10

20

#### 【0011】

超常磁性コロイド状粒子の製造における別の方法は、米国特許第5,597,531号に記載される。Owenら又はMoldayの特許に記載される粒子とは対照的に、この後者の粒子は、25~120nmの範囲の準安定結晶クラスタ中に強力な音響エネルギーによって分散されている、予め形成された超常磁性結晶上に生体機能性ポリマーを直接コーティングすることにより製造される。本明細書で直接コーティング粒子と称する得られた粒子は、Molday又はOwenらによって記載されるものなどの同一の全体寸法を有するコロイド状粒子よりも、極めて大きい磁気モーメントを呈する。

#### 【0012】

磁気分離技術は周知であり、液状媒質から強磁性体を分離するために、磁場が液状媒質に印加される。対照的に、コロイド状超常磁性粒子の懸濁液中に留まる傾向、及びその比較的弱い磁気応答性によって、懸濁されている非磁性液状媒質からこのような粒子を分離するためには、高勾配磁気分離(HGMS)技術の使用を要する。HGMSシステムでは、磁場の勾配、すなわち空間導関数は、ある時点における場の強度によって及ぼされるものよりも、懸濁された粒子の挙動に大きく影響を及ぼす。

30

#### 【0013】

HGMSシステムは大きく2つのカテゴリーに分けることができる。このようなカテゴリーの1つとして、完全に分離チャンバ又は容器の外部の位置にある磁気回路を用いる、磁気分離システムが挙げられる。このような外部分離器の例は、米国特許第5,186,827号(Libertiら)に記載されている。この特許に記載される実施形態の一部では、磁石の同一極の磁場が対立する配置になるように、非磁性容器の周囲に永久磁石を置くことによって、必要とされる磁場勾配が生じる。このようなシステムで得ることができる検査媒質内の磁場勾配の程度は、磁石の強度、及び磁石間の分離距離によって制限される。したがって、外部勾配システムで得ることができる勾配には有限の限界がある。

40

#### 【0014】

別のHGMS分離器のタイプでは、1)印加磁場を増強し、2)検査媒質内に磁場勾配を生じさせるための、検査媒質内に配置される強磁性集団構造を利用する。内部HGMSシステムの周知のタイプの1つでは、微細スチールウール又は金網が、磁石に隣接して位置するカラム内に充填される。印加磁場はスチールワイヤ付近で濃縮され、懸濁された磁

50

性粒子が、ワイヤ表面に向かって引き寄せられ、付着する。このワイヤ上で生じる勾配は、磁性部分が直径の増加とともに減少するように、ワイヤの直径に反比例する。したがって、非常に高い勾配を生じることができる。

#### 【0015】

内部勾配システムの欠点の1つは、スチールウール、金網材料、又はスチールマイクロビーズを用いると、交差ワイヤ付近、又は交差ワイヤ間の隙間内への毛管現象によって、検査媒質の非磁性成分が捕捉される恐れがあることである。そのような内部勾配カラムには、種々コーティング処置が施されている（例えば、米国特許第5,693,539号（Miltenyi）及び同第4,375,407号（Kronick）を参照）が、このシステムでは表面積が広く、依然として吸着による回収率の懸念を生む。したがって、特に、非常に低い頻度で捕捉される物質の回収が分離の目的であるとき、内部勾配システムは望ましくない。更に、自動化が困難で、かつコスト高になる。Owenら及びMoldayにより説明される物質は両方とも、このような高勾配カラムの使用を要する。

10

#### 【0016】

対照的に、細胞分離に外部勾配を用いるHGMS法は、多くの利便性をもたらす。第1に、試験管、遠心管、又は更にはパキュテイナー（採血に用いられる）などの簡単な実験室用容器が使用できる。外部勾配が細胞単層を生じるものであるとき、上記米国特許第5,186,827号の四極/六極装置、又は米国特許第5,466,574号（Libertiら）に記載される対立する双極子構成と同様に、細胞の洗浄、又はその後の操作が容易である。更に、試験管又は類似容器からの細胞の回収は、簡便かつ効率的なプロセスである。これは、高勾配カラムからの回収に比較すると顕著である。このような分離容器により、サンプル量を少なくできるという、別の重要な特徴ももたらされる。例えば、特定のヒト血液細胞サブセット（例えば、磁気標識されたCD<sub>34</sub><sup>+</sup>細胞）を、緩衝液で50%に希釈して粘度を低下させた10mLの血液サンプルから単離する場合、15mL容の円錐形試験管を、適当な四極磁気装置での分離容器として用いてもよい。15mLの溶液から始め、最初の分離を行い、回収された細胞を3mLに再懸濁する。次に2回目の洗浄/分離を行い、単離された細胞を最終量である200 $\mu$ Lに再懸濁する。洗浄及び/又は分離、並びに再懸濁して、非結合細胞を除去した後、CD<sub>34</sub><sup>+</sup>細胞を効率的に200 $\mu$ Lの量に再懸濁できる。これらの分離器に最適化されている直接コーティングフェロフルードを用いて適切に処理された容器内で慎重に実施されたとき、細胞の回収は非常に効率的であり、抗原濃度に応じて40~90%の範囲である。上述の癌検査などに必要とされる程度の感度に達するためには、このような技術及び試薬が不可欠である。

20

30

#### 【0017】

磁気分離を実施できる効率、並びに磁気標識された細胞の回収率及び純度は、多くの要因によって決定される。これらとして、分離される細胞数、その細胞のレセプター密度、細胞当たり磁気装荷、磁性物質の非特異的結合（NSB）、用いた手技、容器の性質、容器表面の性質、媒質の粘度、及び使用した磁気分離装置などの点が挙げられる。通常の場合のように、ある系の非特異的結合の程度が実質的に一定である場合、標的集団が減ると、純度も落ちる。例として、元の混合物の0.25%である集団の80%が回収される、NSBが0.8%の系では、純度は25%である。一方、初期集団が0.01%（10<sup>6</sup>個のバスタンダー細胞中1個の標的細胞）であり、かつNSBが0.001%であった場合、純度は8%となる。純度が上がると、解析がより容易に、かつより良好になる。したがって、意味のある希少細胞解析を行うには、極めて低い非特異的結合が必要であることが明らかである。

40

#### 【0018】

標的化細胞集団が小さいと、磁気標識及び回収が困難になることはあまり知られていない。更に、標識化及び回収率は、用いる磁性粒子の性質に顕著に左右される。例えば、細胞をDyna1ビーズなどの大磁性粒子とインキュベートすると、効率的に拡散するにはビーズが大きすぎるため、この系の混合によって生じる衝突によって細胞が標識される。したがって、非常に初期の癌における腫瘍細胞の場合のように、ある細胞が、血液1mL

50

当たり1個の細胞、又はそれ以下の頻度で集団中に存在する場合、標的細胞の標識率は、系に加えられた磁性粒子の数、及び混合時間の長さに関連する。細胞をそのような粒子と長時間混合することは有害であるため、粒子濃度をできるだけ高めることが必要になる。しかしながら、分離の際、大量の磁性粒子に混入されている希少細胞の代わりに別の血液細胞に混入されている希少細胞を用いるとき、添加できる磁性粒子の量には限界がある。この後者の条件では、対象とする細胞を数え上げる、又はこれらを検査する能力は著しく改善されない。

#### 【0019】

希少頻度の細胞(血液1ml当たり1~50個の細胞)を単離するために大粒子を使用することには、別の欠点がある。大磁性粒子は、非常に簡便な設計の外部勾配、及び比較的低い磁場勾配の使用を可能にするにもかかわらず、大粒子は、細胞周囲にかご様にクラスタ形成し、細胞の観察又は解析を困難にする傾向がある。したがって、磁性粒子は解析前に標的細胞から遊離されなくてはならず、粒子の遊離により、明らかに別の問題がもたらされる。

10

#### 【0020】

上記に基づくと、高磁性低非特異的結合のコロイド状磁性粒子を用いる外部磁場装置による高勾配磁気分離は、特に対象とするサブセットが含まれるが、全集団のごく一部である場合、対象とする細胞サブセットを真核細胞の混合集団から分離するために選択される方法である。このような物質は、その拡散特性から、血中腫瘍細胞などの希少な現象を容易に見つけ出し、磁気標識する。このような分離は一般に、特定の対象とする細胞サブセットに特有の細胞表面抗原の同定に依存し、腫瘍細胞の場合、適当なモノクローナル抗体結合フェロフルードが標的にできる腫瘍抗原であり得る。あるいは、血液サンプル検査のとき、上皮細胞などの細胞種上の決定因子は、通常は血中で検出されないが、適当なレセプターを提供できる。

20

#### 【0021】

適当な磁気装荷が得られる場合、このような分離にコロイド状磁性物質を使用する別のよい理由がある。適当な装荷により、適度に希釈された全血と同程度の粘稠性の媒質中であっても単離できるように、細胞に十分な磁力が加えられる。述べたように、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、希少細胞との衝突能、及び希少細胞の磁気標識能が極めて増強されている。これは米国特許第5,541,072号で実証されており、ここでは、100nmの平均直径を有するコロイド状磁性粒子又はフェロフルードを用いる、非常に効率的な腫瘍細胞除去実験の結果が記載されている。同様に重要なことには、この寸法範囲、又はそれ未満の粒径を有するコロイド状物質は、一般に細胞検査の邪魔をしない。そのように抽出された細胞は、フローサイトメトリー、レーザー走査顕微鏡法、又は可視法若しくは蛍光法を用いる顕微鏡法によって検査できる。

30

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0022】

本発明は、生体サンプルの腫瘍細胞だけではなく、希少細胞、又はその他生物学的物質をも性質決定するための、迅速かつ効率的なスクリーニング方法を提供する。本発明の方法は、対象物質の効率的な濃縮を可能にする高感度解析手法を提供する。解析に先立って、かなりの量の細胞片及びその他干渉物質を除去すると同時に、標的生物学的物質を確実に濃縮するこの2段階法により、この方法以外では実用的ではないサンプルサイズの検査が可能になる。本明細書に記載される方法は、独自の方法で、免疫磁気濃縮の要素を、多パラメーターフローサイトメトリー分析、顕微鏡的分析、及び免疫細胞化学的解析と組み合わせる。密度勾配遠心分離若しくはパニング、又は適当な標識化による標的細胞密度の変更などの他の濃縮手段も利用してよい。好ましい実施形態によると、本発明の方法により、癌病期分類、モニタリング、及びスクリーニングに対する全血アッセイが可能になる。本来高感度であるアッセイにより、残存病変の検出を容易にし、それによって癌再発のモニタリングを可能にする。

40

50

## 【0023】

本発明は、異なる抗体を同一のフェロフルードへ結合する方法を含む。この方法は、フェロフルードを、このフェロフルードが結合する抗原に対して、二重特異性、三重特異性、又は多特異性にする効果を有する。同一のフェロフルード上に存在する多重抗体は、互いに妨害、ないしは別の方法で干渉しないと思われる。このようなフェロフルードには、2種類以上の細胞に特異的に結合できるという非常に好ましい効果があり、EpCAM発現が低いものの、別の腫瘍マーカーを高度に発現しているCTCを捕捉できるようになる。

## 【0024】

本発明の一実施形態では、対象とする希少細胞を含有すると考えられる混合細胞集団を含む生体試料が、患者から採取される。次に、生体試料を、(i)他のサンプル構成成分を実質的に除外して、希少細胞決定因子、又は血液細胞で見出されるものとは異なる決定因子種と特異的に反応する生体特異的リガンドに結合される磁性粒子、及び(ii)希少細胞を標識する少なくとも1種の生体特異的試薬、と混合することにより、免疫磁性サンプルを調製する。得られる免疫磁性サンプルを、非標識画分と、試料中に存在する場合、対象とする希少細胞を含む標識化磁性画分とにサンプルを分離するのに有効な磁場に曝す。続いて、そのように単離された細胞集団を解析し、希少細胞の存在とその数を判定する。好ましい実施形態では、この方法で用いる粒子は、コロイド状ナノ粒子である。

## 【0025】

本発明は、膵臓癌患者のCTC検出の改善を可能にする。抗EpCAMのみの試薬の代わりに、多特異性捕捉試薬及び検出試薬を用いると、CTC上の異なる抗原を認識する数種の他の抗体と共に、対照として用いた、これに限定されないが、例えば、抗EpCAMなどの多特異性試薬を用いて、患者血液中に以前は検出されなかった循環癌細胞が検出される。捕捉試薬が数種の抗原を認識するとき、これを多特異性捕捉試薬と称する。その結果、CTCの捕捉はEpCAM抗原のみに依存されず、捕捉用に選択された別の抗原がCTC上に存在する場合、CTCがEpCAM抗原を発現していなくても捕捉される。適切な抗体の特異的検出混合物の使用の他に、十分な結合能を有し、非特異的結合が低く、かつ抗体の交差遮断がない多特異性フェロフルードの産生能により、種々CTC全体を捕捉できるようになる。本発明では、単一の抗体の代わりにCTC特異的抗体混合物が捕捉用フェロフルードに結合され、単一標的依存性のCTC捕捉を最小限に抑える。更に、検出用の追加抗体を用いて、更に広範囲の抗原を対象として含む。本発明は、循環腫瘍細胞の分野について論じているが、別の形態の血中希少細胞解析が考慮される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0026】

【図1A】4種の細胞株の染色強度を、細胞表面上の標的抗原発現に関して示す。全抗体を2 $\mu$ g/mLで検査した(n=2)。

【図1B】標的抗原発現について、4種の細胞株集団の平均陽性割合を示す。

【図2A】4種の細胞株の染色強度を、細胞内標的抗原発現に関して示す。

【図2B】標的抗原発現について、4種の細胞株集団の平均陽性割合を示す。

【図3A】様々なキット構成による添加したCAPAN1腫瘍細胞の回収率を示す。

【図3B】様々なキット構成による添加したBxPC3腫瘍細胞の回収率を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0027】

好ましい実施形態によると、本発明は、多特異性フェロフルードを用いる、生体サンプルからの希少標的生物学的物質の迅速かつ効率的単離を目的とした組成物、方法、及びキットを提供する。記載される方法を効果的に用いて、血液サンプル中に存在する腫瘍細胞を単離し、性質決定でき、一方でそれと同時に非特異的結合細胞の選択を最小限に抑えることができる。

## 【0028】

本明細書に記載のように多重捕捉試薬及び検出試薬を用いると、以前使われていた単一

10

20

30

40

50

標的分子より、希少細胞アッセイが更に改善される。この改変により、限定されないが、例えば、臍臓CTCなどの希少細胞の捕捉及び検出が改善される。加えて、間葉系マーカー（n-カドヘリン）などの非上皮系マーカーを上皮系マーカーと共に用いて、上皮腫瘍細胞及び間葉腫瘍細胞の両方を捕捉できる。本発明により、CTCと異なる腫瘍細胞集団といった、異なる希少細胞集団の同時検出が可能になる。

#### 【0029】

本明細書で用いるとき、用語「標的生物学的物質」は、生物学的又は医学的対象となる広範な物質を指す。例として、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及び/又はDNA）、及び細胞、ウイルス、細菌などといった生体粒子を含む、生体起源の粒子状検体が挙げられる。本発明の好ましい実施形態では、本発明の組成物、方法、及びキットを用いて、母体循環中の胎児細胞又は循環癌細胞などの希少細胞を、非標的細胞及び/又はその他生物学的物質から効率的に単離できる。用語「生体試料」は、被験者から入手可能な細胞含有体液、末梢血、組織ホモジネート、乳頭吸引液、及びその他任意の希少細胞源を含むが、これに限定されない。代表的な組織ホモジネートは、乳癌患者のセンチネルリンパ節から得ることができる。用語「決定因子」は、任意の上記標的生物学的物質に関して用いられるとき、生体特異的リガンド又は生体特異的試薬によって特異的に結合され得る、特異的結合物質への選択的結合に参与し、その原因である標的生物学的物質のその部分を指し、選択的結合が生じるにはその存在が必要である。基礎的用語では、決定因子は、特異的結合対反応において、レセプターによって認識される標的生物学的物質上の分子接触領域である。本明細書で用いるとき、用語「特異的結合対」として、抗原-抗体、レセプター-ホルモン、レセプター-リガンド、アゴニスト-アンタゴニスト、レクチン-炭水化物、核酸（RNA又はDNA）ハイブリッド形成配列、Fcレセプター又はマウス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、及びウイルス-レセプター相互作用が挙げられる。本発明の方法の実施において用いられる、当業者には明らかであるような、種々のその他決定因子-特異的結合物質の組み合わせが想到される。本明細書で用いるとき、用語「抗体」として、免疫グロブリン、モノクローナル抗体又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、及び単鎖抗体が挙げられる。本発明の使用に更に想到されるのは、従来の方法で産生された抗体と同様の特異性で決定因子を特異的に認識する、ペプチド、オリゴヌクレオチド、又はこれらの組み合わせである。用語「検出可能な標識」は、本明細書において、物理的又は化学的手段による、直接的又は間接的いずれかでの検出又は測定が、検査サンプル中の標的生物学的物質の存在を示す、任意の物質を指す。有用な検出可能な標識の代表例として、光吸収、蛍光、反射率、光散乱、リン光、又はルミネッセンス特性に基づいて直接的又は間接的に検出可能な分子又はイオン、その放射活性によって検出可能な分子又はイオン、その核磁気共鳴性又は常磁性によって検出可能な分子又はイオンが挙げられるが、これらに限定されない。光吸収又は蛍光に基づいて間接的に検出可能な分子群に含まれるものは、例えば、適当な基質を、例えば非光吸収性分子から光吸収性分子へ、又は非蛍光分子から蛍光分子へ変換させる種々酵素である。語句「実質的に除外して」は、生体特異的リガンド又は生体特異的試薬と、その対応する標的決定因子との間の結合反応の特異性を指す。生体特異的リガンド及び試薬は、標的決定因子に対する特異的結合活性を有するが、他のサンプル構成成分に対する非特異的結合も低い程度で示す場合がある。本明細書で用いるとき、用語「早期癌」は、臓器限定であると臨床的に判定されている癌を指す。また、乳癌患者に対するマンモグラフィ、又は肺癌患者に対するレントゲン検査などの従来の方法で検出するには小さすぎる腫瘍も含まれる。本明細書で用いるとき、用語「濃縮」は、生体サンプルからの単核球の濃縮を指す。出発物質として末梢血が用いられる場合では、濃縮の程度を評価するとき、赤血球を数えない。本発明の実施に用いるのに好ましい磁性粒子は、コロイドとして挙動する粒子である。このような粒子は、通常は約200ナノメートル（nm）（0.20マイクロメートル）未満であるマイクロメートル未満の粒径、及び長時間にわたる溶液からの重力分離安定性を特徴とする。多くのその他利点に加え、この寸法範囲により、細胞解

10

20

30

40

50

析に一般的に用いられる解析手法に対して本質的に不可視にする。90～150nmの範囲内で、70～90%の磁気質量を有する粒子は、本発明での使用が想到される。好適な磁性粒子は、磁性コアに結合、例えば、物理的吸収又は共有結合され、安定的なコロイド状特性を付与する分子によって取り囲まれる、超常磁性物質の結晶性コアからなる。コーティング材料は、サンプル中にある生体高分子と磁性コアとの間の非特異的相互作用を阻止するのに有効な量で、好ましくは適用されなくてはならない。このような生体高分子として、非標的細胞の表面上のシアル酸残基、レクチン、糖タンパク質、及びその他膜構成成分を挙げることができる。加えて、この材料は、磁気質量/ナノ粒子を可能な限り多く含有しなくてはならない。コアを含む磁性結晶の寸法は十分に小さく、完全な磁区を含有しない。ナノ粒子の寸法は十分に小さく、ブラウンエネルギーが磁気モーメントを超える程である。結果として、N極、S極の整列、及び続くこれらコロイド状磁性粒子の相互引力/反発力は、適度に強い磁場であっても起こらないように見え、溶液安定性に寄与している。最後に、磁性粒子は、高磁場勾配外部分離器で分離可能であるべきである。この特徴が、サンプルの取り扱いを容易にし、強磁性ビーズ又はスチールウールが含まれたより複雑な内部勾配カラムに対して、経済的利点をもたらす。上記特性を有する磁性粒子は、米国特許第4,795,698号、同第5,597,531号、及び同第5,698,271号に記載されるベース材料を修飾することにより調製できる。これらベース材料からの調製を以下に記載する。

10

#### 【0030】

注目すべきは、多くの異なる細胞解析プラットフォームを用いて、濃縮サンプルの同定及び算出ができることである。このような解析プラットフォームの例は、米国特許出願第08/931,067号、及び同第08/867,009号にそれぞれ記載される、細胞の手動観測のための磁性細胞固定装置であるCell Spotterシステム、及び、自動光走査磁性細胞固定装置であるCell Tracksシステムである。手動又は自動定量的及び定性的細胞解析における対応する装置及び方法を開示して、上記両米国特許出願は、参考として本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0031】

その他解析プラットフォームとして、レーザー走査サイトメトリー(Compucyte)、明視野に基づく画像解析(Chromavision)、及びキャピラリー容積測定法(Biometric imaging)が挙げられる。

30

#### 【0032】

本発明の方法及び組成物を用いる血中循環上皮細胞の算出は、血液からの上皮細胞の免疫磁性選択(濃縮)と、続く多パラメータフローサイトメトリーによるサンプル解析により達成される。免疫磁性サンプル調製は、サンプル量を減らし、標的(上皮)細胞の $10^4$ 倍濃縮を得るために重要である。2つの光散乱、及び3つの蛍光パラメータのリストモード獲得によってもたらされる多次元空間中の唯一の位置に標的細胞が配置されるように、多パラメータフローサイトメトリーによる解析に用いる試薬を最適化する。これらには、1)白血球を同定する全白血球抗原、CD45に対する抗体(非腫瘍細胞)、残りの赤血球、血小板、及びその他非有核現象を除外させる細胞種特異的、つまり核酸染料、及び3)生体特異的試薬、又はサイトケラチンに対する抗体、又は免疫磁性的細胞選択に用いられるものとは異なるEpCAMエピトープに特異性を有する抗体が挙げられる。

40

#### 【0033】

捕捉標的:

捕捉に用いる抗体は、組織培養腫瘍細胞による初期検査に基づいて選択した。発現量は分化状態に応じて変化するため、様々な分化状態を代表する細胞株標本を選択することを戦略とした。データは、ほとんどの原発部位細胞株の分化が乏しく、一方、腹水及び転移由来細胞株の分化は中程度から高度に分化されていることを示唆した。したがって、分化状態に基づいて、BxPC3(中程度)、Panc-1(低度)、CAPAN-1(高度)、及びCAPAN-2(高度)腫瘍細胞を抗体評価のために選択した。EpCAM、Mucin1、メソテリン、クロードイン-4、EGFR1、及びCEACAM6を、捕捉

50

抗原の標的と決定した。フローサイトメトリー解析戦略を用いて、抗原発現量及び陽性細胞集団数の割合を測定した。試験に用いた全ての抗体は一次抗体であり、蛍光染料に結合した抗マウス二次抗体を用いて染色をモニタリングした。図1(A)は、発現量を示す様々なマーカーによる細胞の染色強度を示す。図1(B)は、マーカーに対する陽性細胞の割合を示す。

#### 【0034】

図1のデータは、スクリーニングした全ての標的が、それぞれ様々な発現量で細胞株上に存在し、その発現量は検査した全ての細胞株で一貫していないことを示す。このデータは、抗原発現は細胞株によって異なることを示唆し、組織培養腫瘍細胞と同様に、CTCにおいても抗原が変わり得ることを示す。解析により、EpCAM、クロードイン-4、EGFR1、及びある程度のMucin-1は、全細胞株にわたって普遍的に発現していることが明らかになった。抗原は、平均して細胞集団の65%~100%で発現していた。したがって、広範な腫瘍細胞を対象として含む多重捕捉標的の使用が、効果的な捕捉に重要である。更に、これらのマーカーは腫瘍細胞に特異的でなければならず、白血球に存在してはならない。候補となる捕捉抗体を、白血球を用いて検査した。顆粒球に非常によく見られ、単球でそれより低い程度で見られるCECAM6以外のほとんどのマーカーが、白血球において低レベルで発現している。この結果により、このアッセイにおける捕捉標的としてのCECAM6の使用が除外されるであろう。上記データに基づくと、EpCAM、Mucin1、メソテリン、クロードイン-4、及びEGFR抗原は、腫瘍細胞の捕捉に対する良好な標的である。

10

20

#### 【0035】

##### 検出標的：

腫瘍細胞の検出に関して、種々マーカーに対する抗体を検査した。検査したマーカーは、サイトケラチン7、8、17、18、19、及びc-Srcであった。これらマーカーを、フローサイトメトリーによって2µg/mLの濃度で、4種の細胞株全てについて検査した。図2(A)及び図2(B)にこれらの結果をまとめる。サイトケラチンファミリーは、全細胞株で普遍的に発現していた(集団の79%~100%が、少なくとも1種の標的に対して陽性であった)。c-Srcファミリーも、検査した全ての細胞株において様々な発現量で発現していた(陽性集団66%~100%)。全体的に、全てのサイトケラチン抗体が、同等の染色パターン及び結果を有して同じように良好に効果を表した。検出試薬として用いたFITC結合二次抗体が原因であると考えられるが、R&D Systemsのc-Srcは、結合が弱く、あまり光らないと思われる。しかしながら、抗サイトケラチン17及び抗c-Srcは、白血球(単球及び顆粒球)で陽性であった。このデータに基づき、サイトケラチン7、8、18、及び19を選択して混合検出抗体として用いた。

30

#### 【0036】

##### 捕捉標的のフェロフルードへの結合：

脾臓組織培養腫瘍細胞株における初期評価に基づき、抗EpCAM、抗EGFR1、抗Muc1、及び抗クロードイン4を捕捉用を選択した。最大3種の抗体を、Veridex LLCによる結合化学反応を用いていくつかの組み合わせでフェロフルードに結合したが、その組み合わせは以下のとおりである。

40

A．抗EpCAM/EGFR1/Muc1多特異性フェロフルード

B．抗EpCAM/EGFR1/クロードイン4多特異性フェロフルード

C．抗EpCAM/Muc1/クロードイン4多特異性フェロフルード

抗EpCAM抗体は全ての組み合わせで用いた。

#### 【0037】

##### 検出標的のフィリコエリトリン(PE)への結合：

抗サイトケラチン(サイトケラチン8及び18を認識するC11抗体)、抗サイトケラチン7、抗サイトケラチン18、及び抗サイトケラチン19を、Veridex LLCの標準的結合化学反応を用いてPEに結合した。PEに結合した全てのサイトケラチン抗体

50

を抗CD45 - APCと組み合わせて、混合染色試薬を作製した。

【0038】

濃縮腫瘍細胞集団の解析方法が本発明の使用目的によって決まることは、当業者に認識されるであろう。例えば、癌スクリーニング又は疾患再発モニタリングでは、以下に記載するように、循環上皮細胞数は非常に低くなり得る。この場合、顕微鏡法をベースとした解析が最も正確であることがわかるであろう。このような検査には、形態学的検査、既知の腫瘍マーカー及び又は癌遺伝子の同定も含まれ得る。あるいは、循環上皮細胞数が、正常集団で観察されたものよりはるかに高い病態では、このような細胞を数え上げる解析方法で十分であろう。本明細書に記載される方法による患者状態の判定は、正常集団中に存在する循環希少細胞数の統計的平均に基づいてなされる。早期癌患者及び高悪性度の転移性癌患者における循環上皮細胞数は、本明細書に記載のように統計的に決定することもできる。

10

【0039】

上述のように、キットは、試薬、装置、及び全血から腫瘍細胞を濃縮する方法をはじめとする。キットは、6つの因子又は指標物質を評価する、血液サンプル中乳癌細胞を検査するための試薬を含有するであろう。解析プラットフォームは、レポーター分子のDAPI、CY2、CY3、CY3.5、CY5、及びCY5.5が、適当な励起フィルター及び発光フィルターによって識別されるように、構成される必要がある。本実施例における解析プラットフォームでは、水銀アークランプ、及び使用した検出標識の波長を評価するための適当なフィルターセットを備えた、蛍光顕微鏡を用いる。本方法では、全てのマーカーを一度に導入する。

20

【0040】

本発明は、Cell Search Epithelial Cell Kit (Veri Index, LLC)を改良する。多特異性フェロフルードと混合検出試薬の組み合わせの一部が本発明に含まれ、種々キット構成をもたらす。主な改良点は、捕捉及び検出試薬構成成分中に組み込まれる。様々なキット構成は以下のとおりである。

- 1 - キット#1対照としてのCell Search Epithelial Cell Kit: 捕捉用EpCAM; 検出用C11 (CK8、18)及びCK19。
- 2 - キット#2多重捕捉かつ混合検出: 捕捉用EpCAM/EGFR/Muc-1 (E29); 検出用C11 (CK8、18) + CK19 + CD7 + CD18。
- 3 - キット#3多重捕捉かつ混合検出: 捕捉用EpCAM/EGFR/クロードイン4; 検出用C11 (CK8、18) + CK19 + CK7 + CK18。
- 4 - 多重捕捉かつ混合検出: 捕捉用EpCAM/Muc-1 (E29)/クロードイン4; 検出用C11 (CK8、18) + CK19 + CK7 + CK18。

30

【0041】

様々なキット構成の評価

上記キット構成について、組織培養膵臓腫瘍細胞を添加した正常血液サンプルについてまず評価し、その性能を確認した。膵臓腫瘍細胞 (BxPC3及びCAPAN-1細胞株)を7.5mLのCell Saveドナー血液に添加した (n=2)。このサンプルをCell Tracks Auto Prepで処理し、Cell Tracks Analyzer IIで解析した。

40

【0042】

改善キットによる添加したCapan-1細胞の回収率は、標準的Epithelial Cell Kitと同様 (約60%)であったが、BxPC3細胞の回収率 (約90%)は、2種類の改善キットにおいて一貫して高かった (図3a及び3b)。

【0043】

4種のキット構成を、健康なドナー及び転移性膵臓癌患者の血液サンプルを用いて評価した。この評価による結果を表1及び2に示す。予備データにより、標準的Epithelial Cell Kit 1と比較して、全種類の改善キットを用いた臨床サンプルでCTCの回収率が高かったことが示された (表1)。改善キットを用いて、健康ドナー

50

サンプルからCTCは検出されなかった(表2)。

【表1】

表1:

| 試料ID | CTC  |      |      |      |
|------|------|------|------|------|
|      | キット1 | キット2 | キット3 | キット4 |
| S-2  | 0    | 3    | 2    | 0    |
| S-3  | 1    | 1    | 1    | 2    |
| S-4  | 0    | 1    | 1    | 0    |
| S-5  | 0    | 0    | 0    | 2    |
| S-6  | 2    | 5    | 2    | 1    |
| S-7  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| S-8  | 0    | 1    | 1    | 1    |
| S-9  | 2    | 8    | 15   | 6    |

10

【表2】

表2:

| 試料ID | CTC  |      |      |      |
|------|------|------|------|------|
|      | キット1 | キット2 | キット3 | キット4 |
| 476  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 481  | 0    | 1    | 0    | 0    |
| 482  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 483  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 490  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 492  | 1    | 0    | 0    | 0    |

20

【0044】

本発明の組成物、方法、及びキットを用いて検出できる様々な種類の癌の例として、アブドーマ、分離腫、鰓腫、悪性カルチノイド症候群、カルチノイド心疾患、癌腫、例えば、ウォーカー、基底細胞、基底有棘細胞、ブラウン・ピアース、腺管、エールリッヒ癌、上皮内、クレブス2、メルケル細胞、粘液性、非小細胞肺、燕麦細胞、乳頭、スキルス、細気管支、気管支原性、扁平上皮細胞及び移行上皮細胞、細網内皮症、黒色腫、軟骨芽細胞腫、軟骨腫、軟骨肉腫、線維腫、線維肉腫、巨細胞腫、組織球腫、脂肪腫、脂肪肉腫、中皮腫、粘液腫、粘液肉腫、骨腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、滑膜腫、腺線維腫、腺リンパ腫、癌肉腫、脊索腫、間葉細胞腫、中腎腫、筋肉腫、エナメル上皮腫、セメント質腫、歯牙腫、奇形腫、絨毛性(throphoblastic)腫瘍、腺癌、腺腫、胆管腫、真珠腫、円柱腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、顆粒膜細胞腫、半陰陽性卵巣腫瘍、肝細胞腫、汗腺腫、腓島細胞腫、間細胞腫、乳頭腫、セルトリ細胞腫、莢膜細胞腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、筋芽細胞腫、筋腫、筋肉腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、上衣腫、神経節腫、神経膠腫、髓芽腫、髓膜腫、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経上皮腫、神経線維腫、神経腫、傍神経節腫、非クロム親和性傍神経節腫、被角血管腫(antiokeratoma)、硬化性血管腫、血管腫症、グロムス血管腫、血管内皮腫、血管腫、血管外皮腫、血管肉腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、松果体腫、癌肉腫、軟骨肉腫、葉状嚢胞肉腫、線維肉腫、血管肉腫、平滑筋肉腫、白血肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、筋肉腫、粘液肉腫、卵巣癌、横紋筋肉腫、肉腫(カポジ及び肥満細胞)、新生物(例えば、骨、消化器系、結腸直腸、肝臓、膵臓、下垂体、精巣、眼窩、頭部及び頸部、中枢神経系、聴覚、骨盤、気道、及び泌尿生殖器)、神経線維腫症、並びに子宮頸部異形成が挙げられる。

30

40

【0045】

本発明は、循環上皮細胞だけの検出に限定されない。内皮細胞は、心筋梗塞を有する患

50

者血液中に観察されている。上皮細胞と同様に、内皮細胞、心筋細胞、及びウイルス感染細胞は、入手可能なモノクローナル抗体で認識される細胞種特異的決定因子を有する。したがって、本発明の方法及びキットを、このような循環内皮細胞の検出に適応できる。更に本発明により、感染症患者の末梢血中の細菌細胞負荷量を検出でき、また、本発明の組成物、方法、及びキットを用いてこれら患者を評価することもできる。

【0046】

幾つかの学術論文、米国特許及び米国特許出願を上記に引用した。上記の各引用文献の主題を、その全体が本明細書に記載されているものとまったく同様に本明細書に援用するものである。

【0047】

本発明の好ましい実施形態の特定のもは、上記の記述で具体的に例示されているが、本発明がこれらの実施形態に限定されることを意図するものではない。本発明には本発明の趣旨を逸脱することなく様々な改変を行うことが可能であり、本発明の完全な範囲は以下の特許請求の範囲において定義されるものである。

【0048】

〔実施の態様〕

(1) 混合細胞集団中の希少細胞を検出し、数え上げる方法であって、前記集団中の前記希少細胞の存在が病態を示しており、前記方法が、

a) 被験者から生体試料を得ることであって、前記試料が、前記希少細胞を含有すると考えられる混合細胞集団を含む、ことと、

b) 前記生体試料が、他のサンプル構成成分を実質的に除外して、前記希少細胞と特異的に反応する多特異性リガンドに結合される磁性粒子と混合される、免疫磁性サンプルを調製することと、

c) 前記免疫磁性サンプルを、前記希少細胞を標識する少なくとも1種の多特異性試薬と接触させることと、

d) 前記標識化希少細胞を解析し、前記免疫磁性サンプル中の任意の希少細胞の存在及び数を決定することであって、前記サンプル中に存在する希少細胞数が多いほど前記病態の重症度が高い、ことと、を含む、方法。

(2) 前記免疫磁性サンプルを調製することと、前記免疫磁性サンプルを少なくとも1種の多特異性試薬と接触させることとの間の中間工程として、前記免疫磁性サンプルが磁場に曝されて、前記免疫磁性サンプルとして希少細胞濃縮化細胞懸濁液を生じる、実施態様1に記載の方法。

(3) 前記希少細胞濃縮化細胞懸濁液を含有する前記免疫磁性サンプルの量を少なくする、実施態様2に記載の方法。

(4) 解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化希少細胞含有画分と非標識画分に分離する、実施態様1に記載の方法。

(5) 前記磁性粒子がコロイド状であり、前記免疫磁性サンプルを磁場勾配 (magnetic gradient field) に曝すことにより分離が行われる、実施態様4に記載の方法。

【0049】

(6) 前記希少細胞が、内皮細胞、母体循環中胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、及びウイルス感染細胞からなる群から選択される、実施態様1に記載の方法。

(7) 混合細胞集団中の癌細胞を検出し、数え上げる方法であって、

a) 被験者から生体試料を得ることであって、前記試料が、前記癌細胞を含有すると考えられる混合細胞集団を含む、ことと、

b) 前記生体試料が、他のサンプル構成成分を実質的に除外して、前記癌細胞と特異的に反応する多特異性リガンドに結合される磁性粒子と混合される、免疫磁性サンプルを調製することと、

c) 前記免疫磁性サンプルを、前記癌細胞を標識する少なくとも1種の多特異性試薬と接触させることと、

d) 前記標識化癌細胞を解析し、前記免疫磁性サンプル中の任意の癌細胞の存在及び数

10

20

30

40

50

を判定することであって、前記サンプル中に存在する癌細胞数が多いほど前記癌の重症度が高い、ことと、を含む、方法。

(8) 前記磁性粒子がコロイド状であり、解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化癌細胞含有画分と非標識画分に分離する、実施態様7に記載の方法。

(9) 前記コロイド状磁性粒子と前記少なくとも1種の多特異性試薬が連続して前記生体試料と混合され、中間工程として、前記免疫磁性サンプルが磁場に曝されて、前記免疫磁性サンプルとして癌細胞濃縮化細胞懸濁液を生じる、実施態様7に記載の方法。

(10) 解析前に、前記免疫磁性サンプルを標識化癌細胞含有画分と非標識画分に分離する、実施態様9に記載の方法。

#### 【0050】

(11) 前記標識化癌細胞含有画分が、多パラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡法、レーザー走査サイトメトリー、明視野に基づく画像解析(bright field base image analysis)、キャピラリー容積測定法、スペクトル画像解析、手動細胞解析、及び自動細胞解析からなる群から選択される方法によって解析される、実施態様10に記載の方法。

(12) 循環希少細胞の存在について患者サンプルをスクリーニングするための検査キットであって、

a) 磁性コア材料と、タンパク質ベースコーティング材料と、2種以上の抗体と、を含む、コーティングされた磁性ナノ粒子であって、各抗体が特異的に前記希少細胞の特徴決定因子に結合し、前記抗体が前記ベースコーティング材料に直接的又は間接的に結合されている、コーティングされた磁性ナノ粒子と、

b) 前記希少細胞の第2の特徴決定因子に対する結合特異性を有する少なくとも1種の抗体と、

c) 前記希少細胞以外のサンプル構成成分を解析から除外するための細胞特異的染料と、を含む、キット。

(13) 非標的細胞に対する結合親和性を有する抗体と、生物学的緩衝液と、透過化緩衝液と、手順書と、任意に情報シートと、を更に含む、実施態様12に記載のキット。

(14) 前記希少細胞が、内皮細胞、母体循環中胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、及びウイルス感染細胞からなる群から選択される、実施態様12に記載のキット。

(15) 循環腫瘍細胞の存在について患者サンプルをスクリーニングするためのキットであって、

a) 磁性コア材料と、タンパク質ベースコーティング材料と、前記ベースコーティング材料に直接的又は間接的に結合されている様々な種類の上皮細胞特異的抗体と、を含む、コーティングされた磁性ナノ粒子と、

b) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する少なくとも1種の抗体と、

c) 前記腫瘍細胞以外のサンプル構成成分を解析から除外するための細胞特異的染料と、を含む、キット。

#### 【0051】

(16) 非腫瘍細胞に対する結合親和性を有する抗体と、生物学的緩衝液と、透過化緩衝液と、手順書と、任意に情報シートと、を更に含む、実施態様15に記載のキット。

(17) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、乳癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、MUC-1、エストロゲン、プロゲステロンレセプター、カテプシンD、p53、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、上皮成長因子、上皮成長因子レセプター、BRCA1、BRCA2、CA27.29、CA15.5、前立腺特異的抗原、プラスミノゲン活性化因子阻害剤、及びHer2-neuからなる決定因子群から選択される、乳癌について患者をスクリーニングするための実施態様15に記載のキット。

(18) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、前立腺癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、前立腺特異的抗原、前立腺酸性ホスファターゼ、チモシンb-15、p53、HPC1基礎前立腺遺伝子、クレアチンキ

10

20

30

40

50

ナーゼ、及び前立腺特異的膜抗原からなる決定因子群から選択される、前立腺癌について患者をスクリーニングするための実施態様15に記載のキット。

(19) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、結腸癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、癌胎児性抗原、Cタンパク質、APC遺伝子、p53、及びマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-9)からなる決定因子群から選択される、結腸癌について患者をスクリーニングするための実施態様15に記載のキット。

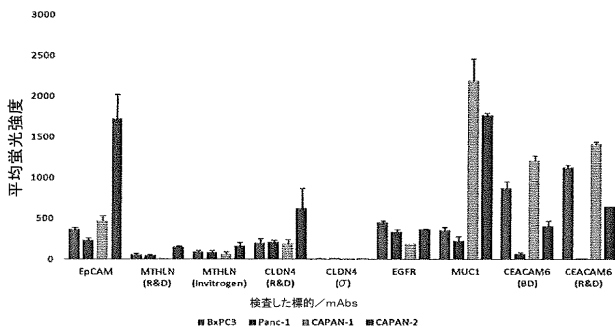
(20) 癌細胞決定因子に対する結合特異性を有する前記少なくとも1種の抗体が、膀胱癌細胞決定因子に特異的に結合し、前記決定因子が、核マトリックスタンパク質(NMP22)、Bard膀胱腫瘍抗原(BTA)、及びフィブリン分解産物(FDP)からなる決定因子群から選択される、膀胱癌の患者をスクリーニングするための実施態様15に記載のキット。

【0052】

(21) 前記少なくとも1種の抗体が、異なる癌細胞特徴決定因子に対する結合特異性をそれぞれが有する抗体のパネルを含む、実施態様15に記載のキット。

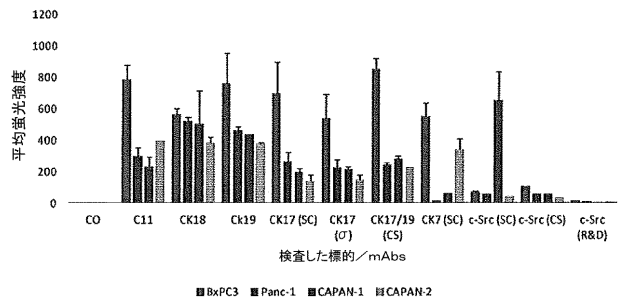
【図1A】

種々捕捉標的による膵臓腫瘍細胞株の染色



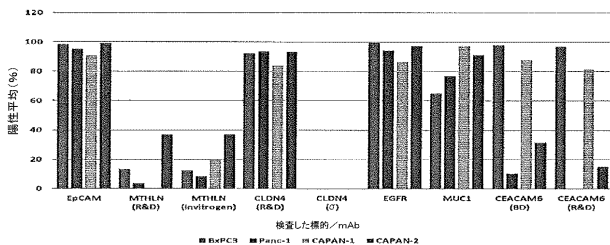
【図2A】

種々検出標的による膵臓腫瘍細胞株の染色



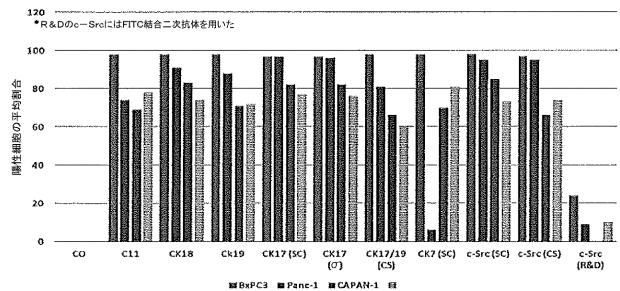
【図1B】

種々捕捉標的に陽性である細胞の平均割合



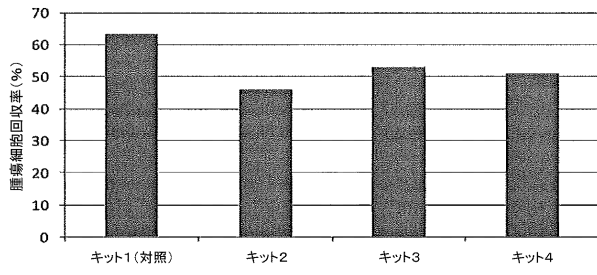
【図2B】

検出標的に陽性である細胞の平均割合



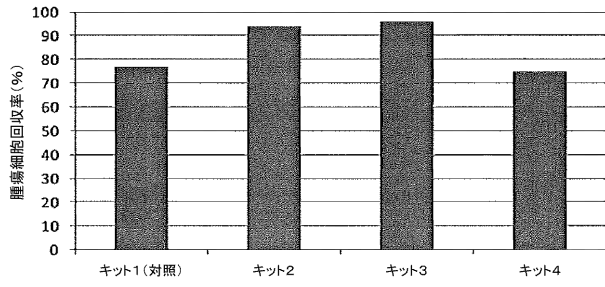
【 図 3 A 】

**CAPAN 1細胞**



【 図 3 B 】

**BxPC3細胞**



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2011/056100 |
|---|

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. G01N33/543 G01N33/574<br>ADD.  |   |  |
|---|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N  |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                              |
| Y   | WO 99/41613 A1 (IMMUNIVEST CORP [US]; UNIV TEXAS [US]; TERSTAPPEN LEON W M M [US]; RAO) 19 August 1999 (1999-08-19) claims 1-83   | 1-21   |
| Y   | -----<br>A. T. Myklebust ET AL: "Effective removal of SCLC cells from human bone marrow. Use of four monoclonal antibodies and immunomagnetic beads",<br>Br. J. Cancer, Vol. 67,<br>1 January 1993 (1993-01-01), pages<br>1331-1336, XP55016529,<br>Retrieved from the Internet:<br>URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1968529/pdf/brjcancer00208-0171.pdf<br>[retrieved on 2012-01-16]<br>the whole document<br>table II<br>-----<br>-/-- | 1-21   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |  |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search   |   | Date of mailing of the international search report |
| 16 January 2012   |   | 25/01/2012   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Authorized officer<br><br>Offermann, Stefanie      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2011/056100 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y  | WO 2009/005536 A2 (3M INNOVATIVE<br>PROPERTIES CO [US]; MACH PATRICK A [US];<br>DASARATHA SRIDH)<br>8 January 2009 (2009-01-08)<br>examples I-1-3; tables I-4, I-5<br>----- | 1-21                  |
| Y  | WO 2007/121464 A2 (WELLSTAT BIOLOGICS CORP<br>[US]; LORENCE ROBERT M [US])<br>25 October 2007 (2007-10-25)<br>page 7, paragraph 4<br>-----                                  | 1-21                  |
| Y  | US 5 145 784 A (COX DANIEL E [US] ET AL)<br>8 September 1992 (1992-09-08)<br>column 6 - column 7<br>-----   | 1-21                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/056100

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |            |            |               |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|------------|---------------|
| WO 9941613                             | A1               | 19-08-1999              | AU 760560 B2     | 15-05-2003 |            |               |
|  |                  |                         | AU 2763699 A     | 30-08-1999 |            |               |
|  |                  |                         | BR 9907852 A     | 24-10-2000 |            |               |
|  |                  |                         | CA 2320418 A1    | 19-08-1999 |            |               |
|  |                  |                         | EP 1062515 A1    | 27-12-2000 |            |               |
|  |                  |                         | IL 137802 A      | 01-08-2006 |            |               |
|  |                  |                         | JP 3834326 B2    | 18-10-2006 |            |               |
|  |                  |                         | JP 2002503814 A  | 05-02-2002 |            |               |
|  |                  |                         | JP 2005010177 A  | 13-01-2005 |            |               |
|  |                  |                         | JP 2006208399 A  | 10-08-2006 |            |               |
|  |                  |                         | WO 9941613 A1    | 19-08-1999 |            |               |
|  |                  |                         | -----            |            |            |               |
|  |                  |                         | WO 2009005536    | A2         | 08-01-2009 | EP 2089533 A2 |
| JP 2010510526 A                        | 02-04-2010       |                         |                  |            |            |               |
| TW 200827447 A                         | 01-07-2008       |                         |                  |            |            |               |
| US 2010129837 A1                       | 27-05-2010       |                         |                  |            |            |               |
| WO 2009005536 A2                       | 08-01-2009       |                         |                  |            |            |               |
| -----                                  |                  |                         |                  |            |            |               |
| WO 2007121464                          | A2               | 25-10-2007              | AT 475884 T      | 15-08-2010 |            |               |
|  |                  |                         | CA 2646497 A1    | 25-10-2007 |            |               |
|  |                  |                         | EP 2008103 A2    | 31-12-2008 |            |               |
|  |                  |                         | HK 1123358 A1    | 19-11-2010 |            |               |
|  |                  |                         | JP 2009534666 A  | 24-09-2009 |            |               |
|  |                  |                         | US 2009170129 A1 | 02-07-2009 |            |               |
|  |                  |                         | WO 2007121464 A2 | 25-10-2007 |            |               |
| -----                                  |                  |                         |                  |            |            |               |
| US 5145784                             | A                | 08-09-1992              | NONE             |            |            |               |
| -----                                  |                  |                         |                  |            |            |               |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ラオ・ガーラ・チャンドラ

アメリカ合衆国、 0 8 5 5 0 ニュージャージー州、プリンストン・ジャンクション、ハヴァーフォード・ロード 9

(72)発明者 コネリー・マーク・カール

アメリカ合衆国、 1 8 9 0 1 ペンシルベニア州、ドイルズタウン、ノッティンガム・ウェイ 4 7 7 0

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 使用多特异性捕获试剂和混合检测试剂检测胰腺患者的循环肿瘤细胞的方法和试剂盒     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2013539868A</a>             | 公开(公告)日 | 2013-10-28 |
| 申请号            | JP2013533996                              | 申请日     | 2011-10-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 维里德克斯有限责任公司                               |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 贝里指数有限责任公司                                |         |            |
| [标]发明人         | ラオガーラチャンドラ<br>コネリーマークカール                  |         |            |
| 发明人            | ラオ・ガーラ・チャンドラ<br>コネリー・マーク・カール              |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/57492 G01N33/54333                 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.Y G01N33/543.541.A G01N33/574.D |         |            |
| 优先权            | 61/393036 2010-10-14 US                   |         |            |
| 其他公开文献         | JP5960146B2                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                 |         |            |

摘要(译)

公开了一种灵敏的测定法，其结合多参数流式细胞术或图像细胞计数检测，计算和表征血癌细胞。本发明涉及将不同的抗体结合到相同的铁磁流体上。这具有使铁磁流体对于由该铁磁流体结合的抗原多特异性的作用。存在于相同铁磁流体上的多种抗体似乎不会相互干扰或以其他方式干扰。这种铁磁流体具有非常有利的效果，它可以特异性结合两种或多种细胞。该测定对于捕获具有低EpCAM表达但高度表达其他肿瘤标志物的CTC特别有用，因此该测定可用于癌细胞的生物学表征和轻松分期。

Figure 1 (A)

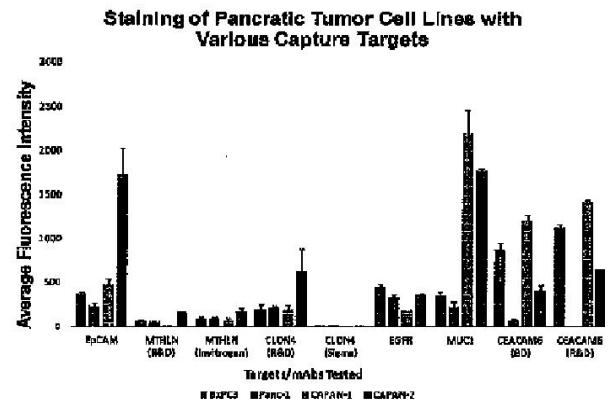


Figure 1 (B)