

(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2009-529878

(P2009-529878A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B063
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A61K 39/00 H	4C085
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2009-500454 (P2009-500454)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月13日 (2007. 3. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月7日 (2008. 11. 7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/006405  
 (87) 国際公開番号 W02007/106523  
 (87) 国際公開日 平成19年9月20日 (2007. 9. 20)  
 (31) 優先権主張番号 60/781, 882  
 (32) 優先日 平成18年3月13日 (2006. 3. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/781, 901  
 (32) 優先日 平成18年3月13日 (2006. 3. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505060347  
 ベリデックス・エルエルシー  
 Veridex, LLC  
 アメリカ合衆国、08869 ニュージャ  
 ージー州、ラリタン、ユーエス・ハイウエ  
 イ・202・ノース 1001  
 33 Technology Drive  
 , Warren, NJ 07059, U.  
 S. A.  
 (74) 代理人 100088605  
 弁理士 加藤 公延  
 (74) 代理人 100101890  
 弁理士 押野 宏  
 (74) 代理人 100098268  
 弁理士 永田 豊

最終頁に続く

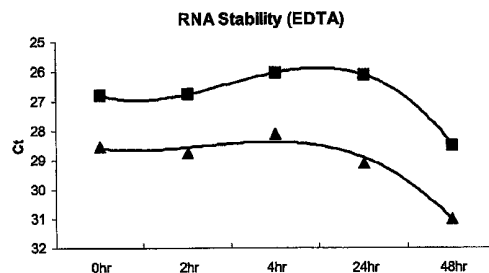
(54) 【発明の名称】 原発細胞の増殖

(57) 【要約】

【課題】本発明は、生物標本から入手された、目的の細胞を増殖する方法を提供する。

【解決手段】その方法は、(a)十分な細胞の生存力を維持する条件下で細胞を濃縮することと、(b)細胞の生存力、増加、および完全性を可能にするのに効果的な条件下で、細胞を増殖することと、によるものである。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

指標に特異的な細胞の存在について生物標本を分析するための方法において、

( a ) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

( b ) 前記細胞から核酸および / またはタンパク質を単離する工程と、

( c ) 前記指標に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および / またはタンパク質を分析する工程と、  
を含む、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 の方法において、

前記生物標本が、尿、血液、血清、血漿、リンパ液、痰、精液、唾液、涙、胸水、肺水、気管支洗浄、滑液、腹水、腹水貯留、羊水、骨髄、骨髄穿刺液、脳脊髄液、組織可溶化液、もしくは、組織破砕物、または、細胞ペレットから選択される、方法。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 の方法において、

前記指標が、がん、遺伝性の遺伝的素因のリスクアセスメント、CTCのようながん細胞の原発組織の同定、遺伝疾患における突然変異の同定、病状（病期分類）、予後、診断、観察、治療に対する反応、（薬理的な）治療選択、（ウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌による）感染、化学療法感受性、薬剤感受性、転移能、もしくは、遺伝疾患における突然変異の同定である、方法。

20

## 【請求項 4】

請求項 1 の方法において、

前記細胞が、抗体 / 磁気分離、蛍光活性化細胞分類（FACs）、ろ過、もしくは、手動により濃縮される、方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 の方法において、

手動による前記濃縮が、前立腺マッサージによるものである、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 の方法において、

前記核酸が、核、ミトコンドリア（ホモプラスミー、ヘテロプラスミー）、ウイルス、細菌、真菌、もしくは、マイコプラズマのものである、方法。

30

## 【請求項 7】

請求項 6 の方法において、

前記核酸が、DNA、またはRNAである、方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 の方法において、

前記分析が、DNA分析である、方法。

## 【請求項 9】

請求項 8 の方法において、

前記DNA分析が、遺伝的構成を検出するための、メチル化 - 脱メチル化、核型分析、倍数関係（異数性、倍数性）、（ゲル法または分光光度法で評価される）DNAの完全性、転座、突然変異、遺伝子融合、活性化 - 不活性化、一塩基多型（SNPs）、コピー数、もしくは、全ゲノム増幅に関連する、方法。

40

## 【請求項 10】

請求項 8 の方法において、

前記分析が、RNA分析である、方法。

## 【請求項 11】

請求項 10 の方法において、

前記RNA分析が、qRT-PCR、miRNA、もしくは、転写後修飾に関連する、方法。

## 【請求項 12】

50

請求項 8 の方法において、  
前記分析が、タンパク質分析である、方法。

【請求項 13】

請求項 12 の方法において、  
前記タンパク質分析が、抗体検出、翻訳後修飾、もしくは、ターンオーバーに関連する、方法。

【請求項 14】

請求項 13 の方法において、  
前記タンパク質が、細胞表面マーカーである、方法。

【請求項 15】

請求項 14 の方法において、  
前記細胞表面マーカーが、上皮、内皮、ウイルス、もしくは、細胞型のものである、方法。

【請求項 16】

請求項 1 の方法において、  
前記バイオマーカーの存在が、ウイルス/細菌による感染、傷害、もしくは、抗原発現に関連する、方法。

【請求項 17】

請求項 16 の方法において、  
前記抗原が、細胞を分離するために用いられる、方法。

【請求項 18】

請求項 1 の方法において、  
前記分析が、濃縮された前記細胞の分子プロファイルを得るために用いられる、方法。

【請求項 19】

生物標本由来の細胞の転移能を決定する方法において、  
(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、  
(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、  
(c) 転移能に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および/またはタンパク質を分析する工程と、  
を含む、方法。

【請求項 20】

生物標本由来の細胞から遺伝疾患における突然変異を同定する方法において、  
(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、  
(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、  
(c) 遺伝疾患に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および/またはタンパク質を分析する工程と、  
を含む、方法。

【請求項 21】

生物標本由来の細胞に由来する遺伝子材料を保存する方法において、

- (a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、  
(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、  
(c) 前記核酸および/またはタンパク質を保存する工程と、  
を含む、方法。

【請求項 22】

腫瘍細胞ワクチンを製造する方法において、

- (a) 生物標本を入手する工程と、  
(b) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、  
(c) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、  
(d) 前記ワクチンを処方するために、前記核酸および/またはタンパク質を用いる工程と、

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 2 3】

組成物において、  
請求項 1 の方法によって得られた前記核酸および / またはタンパク質、  
を含む、組成物。

【請求項 2 4】

組成物において、  
配列番号 1 ~ 9 4 から選択されるオリゴヌクレオチド、  
を含む、組成物。

【請求項 2 5】

キットにおいて、  
請求項 1 の方法を実行するための、バイオマーカー検出剤、  
を含む、キット。

【請求項 2 6】

物品において、  
請求項 1 の方法を実行するための、バイオマーカー検出剤、  
を含む、物品。

【発明の詳細な説明】

【開示の内容】

【0001】

〔発明の背景〕

転移は、原発腫瘍があると診断された患者における主な死亡原因である。がん転移は、細胞が原発腫瘍から脱落し、末梢血流またはリンパ排液を通じて身体の離れた部分に伝播する場合に生じる。転移性乳がんを治療した患者では、末梢血の中にCTCが存在していることが、無進行生存の減少および全生存の減少と関連していることが示されてきた。機械力または個体の免疫反応が、血流に入った多くのこれら腫瘍細胞を殺すのだが、腫瘍細胞の何割かは生存し、分析されることが知られている。全血中の、これらの希少上皮細胞の存在、それらの列挙、それらの特徴づけ(characterization)は、価値のある診断上、および臨床上の情報を提供しうる。全固形腫瘍のうちのおよそ70~80%が上皮細胞から生じるが、循環中にそれらは通常見られない。末梢血中の循環上皮細胞のmRNAについての包括的な分析が、腫瘍量の予後および治療の効果に対して、価値のある情報を提供するかもしれない。例えば、Her-2 receptorは、乳がん患者の30%のみでしか過剰発現しないのだが、このことは、ハーセプチン(Herceptin)がすべての患者に対して効果的でない治療だろうということを示唆している。このように、CTCの分子プロファイリングにより、CTCの特徴づけが改善されるだろうし、究極的には、より効果的な、個別の新規治療戦略が開発されるだろう。

【0002】

全生存率、および改善された生活の質をもたらすがんの効果的な治療のために、がんとその転移状態を早期に検出することが重要である。転移は、一次組織から脱落した腫瘍細胞が、末梢血を通じて異なる組織に到達し、広がる結果生じる。この脱落した腫瘍細胞を、しばしば循環腫瘍細胞(circulating tumor cells)(CTC)と呼ぶ。CellSearch(商標)法(CellSearch<sup>TM</sup> technology)により検出されるような、血中におけるこれらのCTCの存在は、生存率の減少と関連していることが示されており、がんの進行(転移)について予測可能な「マーカー」として役立っている。薬理ゲノミクス研究(pharmacogenomic studies)(例えば、化学療法感受性)のために、これらのCTCを潜在的に用いることができる。その上、CTCに対して、分子プロファイリング研究を実行することができ、そのことにより更に、転移能/進行の、根底にあるメカニズム、予後、および、治療的有用性でさえも、よりよく理解することができるようになるだろう。課題は数倍ある:すなわち、CTC由来の核酸の質の回復、非常に限定された量でのそれらの入手可能性、現存の解析の感度制限、CTCについての現存のマーカーセットの適用/検証である。更に、発現プロファイルが

10

20

30

40

50

結果に干渉するかもしれない白血球による収集したCTCの汚染のため、分子プロファイリングによって、必ずしも正確な結果がもたらされないかもしれない。CTCを試験管内で育つように適応させることにより、結果的に、十分なレベルまで細胞が増殖され、上記の課題が緩和されるかもしれない。このように増殖した細胞を、異なる細胞集団のクローン性を評価すること、特性 (signatures) を発見すること、このような特性を用いて解析を開発すること、蛍光原位ハイブリッド形成 (fluorescent in situ hybridization) (FISH)、および、免疫組織化学 (immuno-histochemistry) (IHC) を含む、さまざまな適用のために用いることができる。

#### 【0003】

生存率を劇的に高め、生活の質を改善するがんの効果的な治療のために、がんとその転移状態を早期に検出することが重要である。転移は、一次組織から脱落した腫瘍細胞が、末梢血を通じて異なる組織に到達し、広がる結果生じる。この脱落した腫瘍細胞を、しばしば循環腫瘍細胞 (CTC) と呼ぶ。CellSearch (商標) 法により検出されるような、血中におけるこれらのCTCの存在は、生存率の減少と関連していることが示されており、よって、がんの進行 (転移) について予測可能な「マーカー」として役立っている。薬理ゲノミクス研究 (例えば、化学療法感受性) のために、これらのCTCを潜在的に用いることができる。

#### 【0004】

がんにおける遺伝子発現は、遺伝子変異または後成的変異のいずれかを通じて阻害されることがあり、それらは遺伝子発現の遺伝的状态を変化させる。ヒトゲノムの主な後成的修飾は、CpGジヌクレオチドのコンテキスト内のシトシン残基のメチル化である。DNAメチル化は、腫瘍性病変または前腫瘍性病変から、血清、尿、または、痰の中に放出された細胞において容易に検出されるかもしれないため、診断的見地から興味深い。そして、治療的見地からは、後成的に抑制された遺伝子が、DNAメチル化および/またはヒストン脱アセチル化酵素の抑制因子によって、再活性化されるかもしれないため興味深い。

#### 【0005】

現在、GeneChip (登録商標) 解析と定量逆転写PCRの両方による発現プロファイリングを利用した、CTCの分子特徴づけを伴う研究が開示されつつある。本研究で用いた標本は、100個を超えるCTCを有した。これは、初期のスクリーニングで一般に見られるもの (10個未満のCTC) よりもかなり高いものである。少量のDNA収集CTC (small amount DNA captured CTCs) (5個未満の細胞) から、十分な標的DNAを入手するよう前増幅 (ネステッドPCR) を実行するために、定量マルチプレックスメチル化特異的PCR (Quantitative Multiplex Methylation Specific PCR) (QMSP) 法を探索する。

#### 【0006】

##### 〔発明の概要〕

本発明は、疾患再発試験についてのCellSearch (商標) プラットフォームのためのサポートを提供する一方で、末梢血内の循環腫瘍細胞 (CTC) のサンプルを加工し、かつそれらの遺伝子発現プロファイルを評価するための方法、装置、およびキットを提供する。CellSearch (商標) プロファイルキット (CellSearch™ Profile Kit) は、CellSearch (登録商標) 前処理システム (AutoPrep System) と組み合わせて、全血中で上皮由来のCTCを単離することを意図している。CellSearch (商標) プロファイルキットには、強磁性流体 (ferrofluid) に基づく収集試薬が含まれ、その試薬は、CTCを収集するための上皮細胞接着分子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule) (EpcAM) 抗原を標的とした抗体でコートされたポリマー層によって囲まれた磁気コア (magnetic core) を有するナノ粒子から成る。CellTracks (商標) 前処理システム (CellTracks™ AutoPrep System) は、正確に試薬を分注し、磁氣的インキュベーション工程のタイミングを図ることによって、加工を自動化し、かつ標準化する。それは、様々ながんにおける重要な研究のために、再現性よく、かつ有効にCTCを単離するための進歩した道具を、科学者に提案する。大多数の白血球、およびその他の血液成分を濃縮されたサンプルから枯渇し、それによって、バックグラウンドを最小にする。RT-PCRとマルチプレックスRT-PCRとを含んでいる、確立した分子生物学の技術

10

20

30

40

50

を用いて、分析を更に実行する。分子特徴づけ解析は、CTC濃縮の後に用いるよう意図される分子診断解析である。以前に乳がんが診断され、かつ乳がんを治療された患者において、循環細胞が実際に乳房由来であることを確認するために、この解析には、上皮マーカーと原発組織マーカーの両方が組み込まれる。

【0007】

〔発明の詳細な説明〕

バイオマーカーは、指示されたマーカー核酸/タンパク質の兆候である。核酸には、核、ミトコンドリア [ ホモプラスミー (homeoplasmy)、ヘテロプラスミー (heteroplasmy) ]、ウイルス、細菌、真菌、マイコプラズマなどのものを含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものでありうる。この兆候は、直接的もしくは間接的でありうるし、生理学的パラメーターを仮定すると、かつ、内部対照、ブラシーボ、正常組織、もしくは、他のがんと比較して、遺伝子のより高い発現、もしくは、より低い発現を測定しうる。バイオマーカーには、限定されないが、核酸およびタンパク質 (より高い発現およびより低い発現、直接および間接ともに) が含まれる。バイオマーカーとして核酸を用いることには、DNA増幅、欠失、挿入、重複、RNA、マイクロRNA (miRNA)、ヘテロ接合性欠失 (loss of heterozygosity) (LOH)、一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms) [ SNPs; Brookes (1999) 参照 ]、直接またはゲノム増幅時のコピー数多型 (copy number polymorphisms) (CNPs)、マイクロサテライトDNA、DNA低メチル化、もしくは、DNA高度メチル化のような後成的変化、および、FISHを測定することを含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意の方法が含まれうる。バイオマーカーとしてタンパク質を用いることには、量、活性、修飾 (例えば、グリコシル化、リン酸化、ADPリボシル化、ユビキチン化等)、もしくは、免疫組織化学 (IHC) およびターンオーバーを測定することを含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意の方法が含まれる。他のバイオマーカーには、イメージング、分子プロファイリング、細胞計数、およびアポトーシスマーカーが含まれる。

10

20

【0008】

「原発組織 (tissue of origin)」で言及される「起源 (Origin)」は、特定の医療環境に応じて、組織型 (肺、結腸等)、または組織学型 (腺がん、扁平上皮がん等) のいずれかを意味し、それは、本分野の当業者によって理解されるだろう。

【0009】

マーカー遺伝子は、配列番号によって指定された配列を含む場合、その配列に対応する。遺伝子断片またはフラグメントは、参照配列またはその相補配列の一部を、その遺伝子の配列であると識別できるほど十分に含む場合、このような遺伝子の配列に対応する。遺伝子発現産物は、そのRNA、mRNA、もしくは、cDNAが、このような配列を有する組成物 (例えば、プローブ) とハイブリダイズする場合、または、ペプチドもしくはタンパク質ならば、このようなmRNAによりコードされる場合、このような配列に対応する。遺伝子発現産物の断片またはフラグメントは、参照遺伝子発現産物またはその相補物の一部を、その遺伝子の配列または遺伝子発現産物であると識別できるほど十分に含む場合、このような遺伝子の配列または遺伝子発現産物に対応する。

30

【0010】

本明細書で説明し、特許請求の範囲に記載した発明の方法、組成物、物品、およびキットには、1個以上のマーカー遺伝子が含まれる。「マーカー」または「マーカー遺伝子」は、より高い発現またはより低い発現が指標または組織型と関連している任意の遺伝子と対応する遺伝子および遺伝子発現産物をいうために本明細書を通じて用いられる。

40

【0011】

遺伝子発現プロファイルを確立するための好ましい方法には、タンパク質またはペプチドをコードしうる遺伝子によって産生されるRNA量を決定することが含まれる。これは、逆転写PCR (reverse transcriptase PCR) (RT-PCR)、競合RT-PCR、リアルタイムRT-PCR、ディファレンシャルディスプレイRT-PCR、ノザンプロット分析、および、他の関連する試験によって達成される。個別のPCR反応を用いて、これらの技術を実施することが可能であるが、mRNAから生成される相補的DNA (complementary DNA) (cDNA) または相補的RNA (co

50

plementary RNA) (cRNA) を増幅し、マイクロアレイによってそれを分析することが最も良い。多くの異なるアレイ配置、および、それらを製造する方法が、本分野の当業者に既知であり、例えば、米国特許第5445934号、同第5532128号、同第5556752号、同第5242974号、同第5384261号、同第5405783号、同第5412087号、同第5424186号、同第5429807号、同第5436327号、同第5472672号、同第5527681号、同第5529756号、同第5545531号、同第5554501号、同第5561071号、同第5571639号、同第5593839号、同第5599695号、同第5624711号、同第5658734号、および同第5700637号で説明されている。

#### 【0012】

マイクロアレイ法は、何千もの遺伝子の定常状態のmRNAレベルを同時に測定することを可能にし、それによって、制御されていない細胞増殖の開始、停止、もしくは、調節といった効果を同定するための強力なツールを提示する。2つのマイクロアレイ法が現在広く用いられている。1つ目はcDNAアレイであり、2つ目はオリゴヌクレオチドアレイである。これらのチップ構成には差異が存在するが、本質的にすべての下流データ分析および出力は、同じものである。これらの分析の産物は、一般的に、サンプル由来のcDNA配列を検出するために用いられる標識プローブから受信されるシグナルの強度を測定することであり、そのプローブは、マイクロアレイ上の既知の位置で核酸配列にハイブリダイズする。一般的に、シグナルの強度は、サンプル細胞で発現するcDNA、したがって、mRNAの量と比例する。多くのこのような技術が利用可能であり有用である。遺伝子発現を決定するための好ましい方法は、米国特許第6271002号、同第6218122号、同第6218114号、および同第6004755号に見られる。

#### 【0013】

発現レベルの分析は、このようなシグナル強度を比較することによって実施される。このことは、対照サンプルでの遺伝子の発現強度に対する、試験サンプルでの遺伝子の発現強度についての比率行列を生成することによりなされるのが最も良い。例えば、罹患組織由来の遺伝子発現強度を、同じ種類の良性組織または正常組織から生成される発現強度と比較することができる。これらの発現強度の比率は、試験サンプルと対照サンプルとの間の遺伝子発現が、倍数的に異なること (fold-change) を示す。

#### 【0014】

選択は統計的検定に基づきうる。この統計的検定は、ランク付けされたリストを作り出し、そのランク付けされたリストは、腫瘍の起源の元々の部位に関係する因子間で、各遺伝子が異なる発現をすることについての有意性の証拠に関係する。このような検定の例には、ANOVAおよびクラスカル・ウォリスが含まれる。カットオフまでのこのような重みの総計を、他のクラスよりも1つのクラスに有利になるように証拠の優越として解釈するように設計されたモデルにおいて、そのランキングを、重み付けとして用いることができる。また、文献に記載されたような従来 of 証拠を、その重み付けを調整するために用いてもよい。

#### 【0015】

好ましい実施態様は、安定な対照セットを同定し、このセットをすべてのサンプルにわたってゼロ分散に設定することによって、各測定を正規化することである。この対照セットは、解析における系統誤差に影響されるが、この誤差と独立に変化することが知られていない任意の単一の内因性転写産物、もしくは、内因性転写産物のセットとして定義される。すべてのマーカーは、対照セットの任意の記述的統計値 (例えば、平均値もしくは中央値) に対するゼロ分散、または、直接測定に対するゼロ分散を生むサンプル特異的な因子によって調整される。あるいは、統計誤差にのみ関係する対照の分散の前提が真ではないが、正規化が実行されると、結果的な分類誤差がより小さくなる場合、対照セットはなお、前述したように用いられるだろう。非内因性スパイクコントロールも役立つが、好ましくない。

#### 【0016】

遺伝子発現プロファイルは、多くの方法で表示されうる。最も一般的なものは、生の蛍光強度もしくは比率行列を、縦軸が試験サンプルを、横軸が遺伝子を示す図形的な系統樹

10

20

30

40

50

に配置することである。よく似た発現プロファイルを有する遺伝子が互いに近位にあるように、データを配置する。各遺伝子の発現率は、色により視覚化される。例えば、1より低い発現率 [ ダウンレギュレーション (down-regulation) ] は、スペクトルの青の部分に現れ、1より高い発現率 [ アップレギュレーション (up-regulation) ] は、スペクトルの赤の部分に現れる。市販のコンピュータソフトウェアプログラムが、このようなデータを表示するために利用でき、それらには「GeneSpring」(Silicon Genetics, Inc.)、ならびに「Discovery」および「Infer」(Partek, Inc.)が含まれる。

#### 【0017】

遺伝子発現を決定するためにタンパク質レベルを測定する場合、結果的に適当な特異度および感度をもたらすならば、本分野で既知の任意の方法が適している。例えば、タンパク質レベルは、タンパク質に特異的な抗体または抗体フラグメントに結合し、抗体結合タンパク質の量を測定することによって、測定することができる。検出を容易にするために、放射性試薬、蛍光試薬、もしくは、他の検出可能な試薬で、抗体を標識することができる。検出方法には、限定されないが、酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay) (ELISA)、および免疫プロット法が含まれる。

10

#### 【0018】

本発明の方法で用いる調節された遺伝子については、実施例で説明する。異なった形で発現する遺伝子は、特定の起源のがんを有する患者では、異なる起源のがんを有する者に対して、アップレギュレーションされるか、またはダウンレギュレーションされるかのいずれかである。アップレギュレーション、およびダウンレギュレーションは、いくつかの基準に比較して (測定に用いられた系におけるノイズの寄与を超える) 検出可能な差異が、遺伝子の発現量において見られることを意味する相対的な用語である。この場合、基準をアルゴリズムに基づいて決定する。したがって、異常細胞 (diseased cell) における目的遺伝子は、同じ測定方法を用いた基準レベルと比較して、アップレギュレーションされるか、またはダウンレギュレーションされるかのいずれかである。このような状況において、異常な (diseased) とは、細胞の制御されない増殖とともに起こるような、身体機能の適切な作動を中断する、すなわち、阻害するか、または阻害する可能性がある身体の状態変化をいう。個人の遺伝型または表現型のいくつかの観点が疾患の存在と一致する場合、人はその疾患に罹っていると診断される。しかしながら、診断または予後を実施するという行為には、再発可能性、治療の種類、および治療観察を決定するといった疾患 / 状態に関する課題の決定も含まれてもよい。治療観察では、遺伝子発現プロファイルが正常組織とより矛盾のないパターンに変化したかどうか、または変化しつつあるかどうかを決定するために、時間をかけて遺伝子発現を比較することで、所与の一連の治療の効果について臨床判断がなされる。

20

30

#### 【0019】

遺伝子はグループ分けされ、グループにおける遺伝子セットについて得られた情報が、臨床上関連のある判断 (例えば、診断、予後、もしくは、治療選択) をなすための重要な基礎を提供する。これらの遺伝子セットは、本発明のポートフォリオを作り出す。最も診断的なマーカーと同様に、正しい医療判断をなすために十分な最少の数のマーカーを用いることがしばしば望まれる。このことは、時間と資源の非生産的な使用を予防するだけでなく、更なる分析の間の、治療における遅延を予防する。

40

#### 【0020】

遺伝子発現ポートフォリオを確立する1つの方法は、株式ポートフォリオを確立する際に広く用いられる平均分散アルゴリズムのような、最適化アルゴリズムを使用することによるものである。この方法は、米国特許出願公開第20030194734号に詳細に説明されている。本質的に、その方法は、入力セット (set of inputs) (金融上の適用においては株式、本願においては強度により測定されるような発現) の確立を要求する。その入力は、リターンの変動を最小化する一方で、それを用いることで受けるリターン (例えば、生成されるシグナル) を最適化するだろうものである。多くの商用ソフトウェアプログラムが、このような作業を実施するために利用できる。本明細書全体にわたって「Wagner Softw

50

are」と呼ばれる「Wagner Associates Mean-Variance Optimization Application」が、好まれる。有効フロンティアを決定するために、このソフトウェアは、「Wagner Associates Mean-Variance Optimization Library」からの関数を用い、そして、マーコウィッツの意味 (Markowitz sense) における最適ポートフォリオが好まれる。Markowitz (1952) 参照。このタイプのソフトウェアを用いるには、ソフトウェアを意図された金融分析の目的で用いる場合に、株式収益およびリスク測定が用いられる方法において入力として処理されうるように、マイクロアレイデータを変換することが必要となる。

#### 【0021】

また、ポートフォリオを選択するプロセスには、ヒューリスティックなルール (heuristic rules) の適用が含まれうる。好ましくは、このようなルールを、生物学に基づいて、そして、臨床上の結果を生むために用いられる技術への理解に基づいて、考案する。より好ましくは、それらを最適化法からの出力に適用する。例えば、ポートフォリオ選択の平均分散法は、がん患者において異なった形で発現する多くの遺伝子についてのマイクロアレイデータに適用されうる。その方法からの出力は、異常組織と同様に末梢血でも発現するいくつかの遺伝子を含みうる最適化された遺伝子セットであるだろう。もし試験方法で用いられるサンプルが末梢血から入手され、がんの症例で異なった形で発現する特定の遺伝子が、末梢血でも異なった形で発現しうるならば、ヒューリスティックなルールを適用しうる。そのヒューリスティックなルールにおいて、ポートフォリオは、末梢血で異なった形で発現するものを除いた有効フロンティアから選択される。もちろん、そのルールは、例えば、データの前置選中にもそのルールを適用することによって有効フロンティア形成に先立って、適用されうる。

#### 【0022】

適用されうる他のヒューリスティックなルールは、問題になっている生物学と必ずしも関連する必要はない。例えば、所定の割合のポートフォリオのみが、特定の遺伝子もしくは遺伝子群によって表されることができるというルールを適用しうる。市販のソフトウェア (例えば、Wagner Software) は、容易にこれらのタイプのヒューリスティクスに適応する。このことは、例えば、確度および精度とは別の因子 (例えば、期待されるライセンス料) が、1つ以上の遺伝子を含むことの望ましさに影響を与える場合に有用でありうる。

#### 【0023】

また、本発明の遺伝子発現プロファイルを、がんの診断、予後、もしくは、治療観察において有用な、他の非遺伝的診断法とあわせて用いることができる。例えば、いくつかの状況では、上記の遺伝子発現に基づいた方法の診断力を、例えば、血清タンパク質マーカー [ 例えば、がん抗原 (Cancer Antigen) 27.29 (「CA 27.29」) ] のような従来マーカーからのデータと組み合わせることが有用である。このようなマーカーの範囲は、CA27.29 のような分析対象を含んで存在する。このような1つの方法では、血液を治療患者から定期的に採取し、その後上記の血清マーカーのうち1つについて酵素免疫測定を受けさせる。マーカーの濃度が腫瘍の再発、または、治療の失敗を示唆する場合、遺伝子発現分析に適しているサンプル原料を採用する。疑わしい塊が存在する場合、細針吸引 (FNA) を採用し、その後、塊から採取された細胞の遺伝子発現プロファイルを、上記のように分析する。あるいは、組織サンプルを、以前に腫瘍が除去された組織の近傍の領域から採取してもよい。このアプローチは、他の試験があいまいな結果を生じる場合に特に有用である。

#### 【0024】

本発明は、指標に特異的な細胞の存在について生物標本を分析するための方法であって、

- (a) 標本由来の細胞を濃縮すること、
  - (b) その細胞から核酸および/またはタンパク質を単離すること、ならびに、
  - (c) 指標に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、核酸および/またはタンパク質を分析すること、
- による方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0025】

生物標本は、限定されないが、尿、血液、血清、血漿、リンパ液、痰、精液、唾液、涙、胸水、肺水、気管支洗浄、滑液、腹水、腹水貯留、羊水、骨髄、骨髄穿刺液、脳脊髄液、組織可溶化液もしくは組織破砕物、または、細胞ペレットを含む、本分野で既知の任意のものでありうる。例えば、米国特許出願公開第20030219842号を参照のこと。

## 【0026】

指標は、がん、遺伝性の遺伝的素因のリスクアセスメント、CTCのようながん細胞の原発組織の同定（米国特許出願第60/887,625号参照）、遺伝疾患における突然変異の同定、病状（病期分類）、予後、診断、観察、治療に対する反応、（薬理的な）治療選択、（ウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌による）感染、化学療法感受性（米国特許第7112415号参照）、薬剤感受性、転移能、もしくは、遺伝疾患における突然変異の同定を含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものを含みうる。

10

## 【0027】

細胞濃縮は、抗体/磁気分離（Immunicon, Multenyi, Dynal）（米国特許第6602422号、同第5200048号参照）、蛍光活性化細胞分類（fluorescence activated cell sorting）（FACs）（米国特許第7018804号参照）、ろ過、もしくは、手動によるものを含みうるがこれらに限定されない、本分野で既知の任意の方法によりうる。手動による濃縮は、例えば、前立腺マッサージによるものでありうる。Goessl他、（2001）Urol 58:335-338参照。

## 【0028】

核酸は、核、ミトコンドリア（ホモプラスミー、ヘテロプラスミー）、ウイルス、細菌、真菌、もしくは、マイコプラズマのものを含みうるがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものでありうる。

20

## 【0029】

核酸とタンパク質とを単離する方法は、本分野で周知のものである。例えば、米国特許第6992182号、RNA [www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html](http://www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html)、および米国特許出願公開第20070054287号を参照のこと。

## 【0030】

DNA分析は、遺伝的構成を検出するための、メチル化 - 脱メチル化、核型分析、倍数関係（異数性、倍数性）、（ゲル法または分光光度法で評価される）DNAの完全性、転座、突然変異、遺伝子融合、活性化 - 不活性化、一塩基多型（SNPs）、コピー数、もしくは、全ゲノム増幅を含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものでありうる。RNA分析には、qRT-PCR、miRNA、もしくは、転写後修飾を含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものが含まれる。タンパク質分析には、抗体検出、翻訳後修飾、もしくは、ターンオーバーを含むがこれらに限定されない、本分野で既知の任意のものが含まれる。タンパク質は、細胞表面マーカーであってよく、好ましくは、上皮、内皮、ウイルス、もしくは、細胞型のものでありうる。バイオマーカーは、ウイルス/細菌による感染、傷害、もしくは、抗原発現に関連しうる。

30

## 【0031】

特許請求の範囲に記載された発明は、例えば、細胞から核酸および/またはタンパク質を単離すること、ならびに、転移能に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、核酸および/またはタンパク質を分析することによって、生物標本由来の細胞の転移能を決定するために用いられうる。

40

## 【0032】

特許請求の範囲に記載された発明の細胞は、例えば、細胞から核酸および/またはタンパク質を単離すること、ならびに、遺伝疾患に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、核酸および/またはタンパク質を分析することによって、生物標本由来の遺伝疾患細胞における突然変異を同定するために用いられうる。

## 【0033】

特許請求の範囲に記載された発明の細胞は、例えば、細胞物質およびその構成部分（例えば、核酸および/またはタンパク質）を入手し保存するために用いられうる。構成部分

50

は、例えば、腫瘍細胞ワクチンを作るため、または免疫細胞治療において用いられうる。米国特許出願公開第20060093612号、同第20050249711号参照。

【0034】

本発明にしたがって作られるキットには、遺伝子発現プロファイルを決定するためのフォーマット化された解析が含まれる。これらには、バイオマーカーを解析する試薬、使用説明書、媒体のような、解析を実施するために必要とされる材料のすべて、または、一部が含まれうる。

【0035】

本発明の物品には、疾患を治療し、診断し、予後し、さもなければ、評価するために有用な遺伝子発現プロファイルの説明が含まれる。これらのプロファイルの説明は、コンピュータで読み取り可能な媒体（磁氣的、光学的、同様の媒体）のような、機械によって自動的に読むことができる媒体へ変換される。物品には、このような媒体で遺伝子発現プロファイルの評価するための使用説明書も含まれうる。例えば、物品は、上記の遺伝子ポートフォリオについての遺伝子発現プロファイルを比較するためのコンピュータの使用説明書を有するCD-ROMを備えてもよい。物品はまた、デジタル的に記録された遺伝子発現プロファイルを有してもよく、それらを患者サンプルからの遺伝子発現データと比較してもよい。あるいは、プロファイルを異なる表現フォーマットで記録することができる。図形的な記録はこのような1つのフォーマットである。例えば、上記のPartek, Inc.からの「DISCOVERY」および「INFER」ソフトウェアに組み込まれているような、クラスタリングアルゴリズム(clustering algorithms)は、このようなデータの視覚化に、最も良く役立つ。 10 20

【0036】

本発明にしたがった異なる種類の製造物品は、遺伝子発現プロファイルを明らかにするために用いられる媒体、または、フォーマット化された解析である。これらは、例えば、マイクロアレイを含むことができ、そのマイクロアレイにおいて、相補配列またはプローブは、マトリックスに貼り付けられる。そのマトリックスには、目的の遺伝子を示す配列が結合して、それらの存在の読み取り可能な決定因子を生成する。あるいは、本発明による物品を、がんを検出するための目的の遺伝子の発現レベルを示すハイブリダイゼーション、増幅、シグナル生成を実施するための試薬キットへと作り上げることができる。

【0037】

本発明は、末梢血のバックグラウンドにおける単一の循環乳房腫瘍細胞を検出するように特徴づけられる特異的マーカーポートフォリオを定める。分子特徴づけマルチプレックス解析ポートフォリオ(molecular characterization multiplex assay portfolio)を、QRT-PCRマルチプレックス解析として用いるために最適化した。ここで、分子特徴づけマルチプレックスには、2つの原発組織マーカー、1つの上皮マーカー、およびハウスキーピングマーカーが含まれる。分子特徴づけマルチプレックス解析のために、Smartcycler IIで、QRT-PCRを実行するだろう。分子特徴づけシングレックス解析ポートフォリオ(molecular characterization singlex assay portfolio)を、QRT-PCR解析として用いるために最適化した。ここで、各マーカーを単一反応中で実行し、3つのがん状態マーカー、1つの上皮マーカー、およびハウスキーピングマーカーを利用する。RPAマルチプレックス解析とは異なり、Applied Biosystems (ABI) 7900HTで、分子特徴づけシングレックス解析を実行するだろうし、384ウェルプレートプラットフォームとして用いるだろう。分子特徴づけマルチプレックス解析ポートフォリオおよびシングレックス解析ポートフォリオは、単一の循環上皮細胞を正確に検出し、臨床医が再発を予測することを可能にする。分子特徴づけマルチプレックス解析には、Thermus thermophilus (TTH) DNAポリメラーゼを利用する。これは、単一反応中で、逆転写連鎖反応とポリメラーゼ連鎖反応をともに実行できるためである。一方、分子特徴づけシングレックス解析には、Applied Biosystems一段階マスターミックス(Applied Biosystems One-Step Master Mix)を利用する。それは、逆転写のためにMMLVを、PCRのためにTaqポリメラーゼを組み入れた、2つの酵素反応(two enzyme reaction)である。ゲノムDNAが効率的に増幅せず検出されないようにエキソン-イント 30 40 50

ロンジャンクションを組み込むことにより、解析設計はRNAに特異的なものである。

【0038】

本発明は、CTCを収集し、試験管内で培養するための方法を示す。実験と結果を、以下に説明する。

【0039】

本発明のいくつかの新規な態様がある。第一に、本発明は、循環上皮細胞を濃縮するために、マルチプレックスqRTPCR解析とCellSearch法とを組み合わせた最初の証明である。濃縮後のRNAを単離するために開発された新規な方法と、qRTPCR解析におけるRNAの使用について、詳細な説明を提供する。第二に、本発明は、細胞自体の代替物として用いられる。すなわち、非常に少ない数の循環細胞しか見られない臨床上的設定では、または、(損傷した細胞が、CellSearch列挙アルゴリズムにより認識されないために)無傷な循環細胞が非常にわずかにしか見られない状況では、qRTPCR解析を使用することによって、循環腫瘍細胞の、より感度の高い列挙を提供するだろう。というのは、無傷な循環腫瘍細胞および損傷した循環腫瘍細胞の両方から、RNAが単離されるだろうためである。その結果、検出の感度が高められ、高感度のqRTPCR解析は更に感度を高めることができる。鍵となる本発明の最後の態様は、定量マルチプレックス解析を用いることにより、循環腫瘍細胞が単離された患者における予後的な情報を生成するために、2個以上の遺伝子に基づくアルゴリズムを生成することができるかもしれないことである。重要なことに、分子情報は、循環上皮細胞の列挙と組み合わせられた場合、追加の予後情報または新しい予後情報を提供するかもしれない。

10

20

【0040】

第一の実施態様では、分子特徴づけシングレックス解析は、定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)(QRT-PCR)に基づく。ここで、個別の反応中で、各マーカーを実行する。本発明は、3つの原発組織マーカー、循環腫瘍細胞が乳がん由来して存在することを確認するための1つの上皮マーカー、サンプルの質を検証するための対照マーカーを用いることについて説明する。各マーカーの特異的なプライマー/プローブの組み合わせは、結果的に乳がん患者における再発を予測するために高い特異度と感度の分析を生ずるように設計される。特異的マーカーのためのこれらのプライマー/プローブの組み合わせは、末梢血のバックグラウンドにおける単一の循環乳房腫瘍細胞を検出するために、Applied Biosystems (ABI) 7900HTプラットフォームに対して最適化される。この解析の結果は、CellSearch(商標)CTC列挙キット(CellSearch™ CTC Kit enumeration kit)と並行して用いることができ、それゆえ、その結果は、臨床医と患者の両方にとって、再発を予測するために有益であることを示す。

30

【0041】

第二の実施態様では、分子特徴づけ乳がんマルチプレックス解析もまた、QRT-PCRに基づいている。しかしながら、上記のシングレックス解析と対照的に、単一反応中で、より高い割合の検出を可能にする3つの診断マーカーにより、患者サンプルを分析する。本発明は、2つの原発組織マーカー、循環腫瘍細胞が乳がん由来して存在することを確認するための1つの上皮マーカー、およびサンプルの質を検証するための対照マーカーを用いることを説明する。各マーカーについての特異的なプライマー/プローブの組み合わせは、結果的に高い感度を生ずる一方、末梢血白血球(peripheral blood leukocytes)(PBL)のバックグラウンドで非常に特異的であるように設計される。末梢血7.5mL中に混入した5個未満のSKBR3細胞を検出する、この解析の能力によって、これらの適用の実現可能性が示される。特異的なマーカーについてのこれらのプライマー/プローブの組み合わせを、Smartcycler IIプラットフォームに対して最適化する。この解析の結果は、循環乳房腫瘍細胞を検出するための方法を提示する。その方法は、現在利用可能な方法と比較した場合に、その解析感度、および4個の遺伝子を同時に使用することのために、他に類のないものである。CellSearch(商標)CTC列挙キットと組み合わせ、この解析を商業的に使用可能とすることを意図している。

40

50

## 【 0 0 4 2 】

第三の実施態様では、分子特徴づけ解析は、循環前立腺細胞の特徴づけのためのqRT-PCRに基づいている。この実施例において、非常に感度の高いマルチプレックス解析には、1つの上皮マーカー（CK19）、1つの前立腺原発組織マーカー（PSA、kallikrein 3としても知られている）、および1つの対照遺伝子（PBGD）が組み込まれている。また、前立腺細胞を非常に高い感度で検出するために、この解析を用いることができる。

## 【 0 0 4 3 】

本発明は、血液由来のCTCを培養する方法を提供する。プロセスには、CellSearch（商標）法と、それに関連したCellTracks（登録商標）前処理システムおよびCellSearch（商標）プロファイルキットとを用いることを伴う。これらの増殖した細胞を、薬理ゲノミクス研究で用いることができ、分子プロファイリング研究に用いるために十分量で核酸を抽出するためにも用いることができる。最後に、CTC列挙結果と組み合わせて、確認ツールとしても、この解析を用いることができる。

10

## 【 0 0 4 4 】

本発明は、亜硫酸水素ナトリウム転換の後に、5個未満の細胞等量（本研究では、3個の細胞）由来のDNAにおけるメチル化マーカーを検出するための方法を提供する。プロセスには、標的領域の前増幅と、その後のマルチプレックスQMSPとを伴う。本発明の新規な態様がいくつかある。第一に、本発明は、（ネステッドPCRを伴う）マルチプレックスQMSP解析およびその伸張物を、循環腫瘍細胞（CTC）を濃縮するCellSearch（商標）法に組み合わせた最初の証明である。第二に、QMSP解析は、いくつかの分子マーカーに関する有用な情報を提供することができ、それゆえ、CellSearch（商標）法と組み合わせた場合に、QMSP解析を、より感度が高いものとする。第三に、マルチプレックスQMSP解析は、複数の腫瘍細胞（例えば、前立腺がんおよび乳がん）を検出するための、新しい予後方法を提供することができるかもしれない。最後に、この解析は、CTCの列挙結果と組み合わせて、確認ツールとしても用いられうる。

20

## 【 0 0 4 5 】

本発明は、メチル化特異的マーカーポートフォリオを規定する。そのポートフォリオは、亜硫酸水素ナトリウム転換後、末梢血白血球（PBL）のバックグラウンド（10,000個～100,000個のPBLに相当）における、20pg未満のDNA（3個の循環腫瘍細胞に相当）を検出するように特徴づけられるものである。現在、分子特徴づけマルチプレックスには、1個のDNAメチル化特異的マーカーと、ハウスキーピングマーカーとが含まれる（近いうちに、2個の追加のDNAメチル化特異的マーカーを加えるだろう）。ゲノムDNAは、ZymoResearchキット（ZymoResearch Kit）を用いて亜硫酸水素ナトリウム転換および精製にさらされる。サーモサイクラー（thermocycler）で、ネステッドプライマーセット（外側プライマー）を用いて標的領域を前増幅することを実行するだろう。その後のQMSP反応において、Cepheid製のSmartcycler（登録商標）、または同等のプラットフォームで、スコピオンプローブ（Scorpion probe）設計とともに内側プライマーを用いることにより、蛍光シグナルを生成するだろう。

30

## 【 0 0 4 6 】

【表 1】

表 I: PCR プライマー配列

外側プライマー	配列	配列番号
GSTP1_332_U18	TCGGGGATTTTAGGGCGT	1
GSTP1_513_L21	ACGAAAACACTACGACGACGAAA	2
Actin_309_U24	GATATAAGGTTAGGGATAGGATAG	3
Actin_501_L22	AACCAATAAAACCTACTCCTCC	4
内側スコーピオン プローブ/プライマー		
GSTP1_Fam_Sc_1112_L15	FAMCGCACGGCGAACTCCCGCCGACGTGCG BHQ- HEG-TGTAGCGGTTCGTCCGGGTTG	5 6
GSTPi_1151_L22	5' GCCCCAATACTAAATCACGACG 3'	
Actin_Q670_Sc_382_L15	Q670-CCGCGCATCACCACCCACACGCGCGG- BHQ2-HEG- GGAGTATATAGTTGGGGAAAGTTTG	7
Actin_425_L27	5' AACACACAATAACAAACACAAATTCAC 3'	8

10

【 0 0 4 7 】

実験設定:

1回目のPCR(前増幅)反応試薬処方およびサイクリング条件は、以下のとおりである。

20

【表 2】

表 II: 前増幅 PCR のための試薬

反応バッファー (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Tris (pH 8.8) MgCl <sub>2</sub> β-メルカプトエタノール	最終濃度 16.6 mM 67 mM 6.7 mM 10 mM
Taq 酵素/Ab ミックス Taq ポリメラーゼ TP6-25 抗体	5 U/μL 0.65 mg/mL
外側プライマーミックス GSTP1 Actin	0.25 μM 0.15 μM
dNTP ミックス	1.25 mM

30

【表 3】

表 III: 前増幅のためのサイクリング条件

温度(°C)	時間	サイクル数
94	2分	1
92	20秒	20-25
55	30秒	
70	30秒	
70	5分	1

40

【 0 0 4 8 】

上記の1回目のPCR産物の6~10%を、精製することなく、2回目のPCRのための新しいチューブへと移し、以下の試薬(表IV)を加えて、表Vのサイクリング条件にさらすだろう。

50

## 【 0 0 4 9 】

2回目のPCR反応試薬処方およびサイクリング条件は、以下のとおりである。

## 【表 4】

表 IV : 2 回目の PCR のための試薬

反応バッファー (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Tris (pH 8.8) MgCl <sub>2</sub> β -メルカプトエタノール	最終濃度 16.6 mM 67 mM 6.7 mM 10 mM
Taq 酵素 / Ab ミックス Taq ポリメラーゼ TP6-25 抗体	5 U / μL 0.65 mg / mL
内側スコーピオンプローブ / プライマー GSTP1 Actin	0.5 μM 0.3 μM
dNTP ミックス	1.25 mM

10

## 【表 5】

表 V : 2 回目の PCR のためのサイクリング条件

温度(°C)	時間	サイクル数
95	60 秒	1
95	30 秒	40
55	30 秒	
72	5 分	1

20

## 【 0 0 5 0 】

本研究では、以下のDNAサンプルを用いた。末梢血白血球 (PBL) 由来の混入DNA (100ng または500ng) のバックグラウンドにおける、CpGenomeユニバーサルメチル化DNA (CpGenome Universal methylated DNA) (CpG M)、前立腺腺がんDNA (Prostate Adenocarcinoma DNA) (PC)、もしくは、前立腺正常DNA (Prostate Normal DNA) (PN)。亜硫酸水素ナトリウム転換後、QMSP反応を実行した。以下の実施例は、本発明を例示するものであるが、限定するものではない。

30

## 【 0 0 5 1 】

## 〔実施例 1〕

白血球RNAのバックグラウンド中に混入した連続希釈乳房RNA (Serially Diluted Breast RNA) の遺伝子発現分析

分子特徴づけシングレックス解析ポートフォリオからの解析には、ゲノムDNAの増幅を除外する、ジャンクション特異的PCRプローブが含まれる。このサンプルのために試験したプライマーと二重標識した加水分解プローブ配列とを以下に示す。

40

【表 6】

RPA シングレックス解析		
解析	配列	配列番号
B305D-RPAU22	AATGGCCAAAGCACTGCTCTTA	9
B305D-RPAL21	ACTTGCTGTTTTTGCTCATGT	10
B305D-RPAFAMP30	FAM-ATCGAATCAAAAACAAGCATGGCCTCACA-BHQ1-TT	11
CK19-RPAU22	CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT	12
CK19-RPAL20	TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC	13
CK19-RPAFAMP24	FAM-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT-BHQ1-TT	14
PBGD-RPAU22	CCACACACAGCCTACTTTCCAA	15
PBGD-RPAL21	TACCCACGCGAATCACTCTCA	16
PBGD-RPAP27FAM	FAM-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ1-TT	17
MG-RPAU21	AGTTGCTGATGGTCCTCATGC	18
MG-RPAL24	CACTTGTGGATTGATTGTCTTGGA	19
MG-RPAP23FAM	FAM-CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA-BHQ1-TT	20
P1B289U21	GAGTACGTGGGCCTGTCTGCA	21
P1B360L21	TTGCACTCCTTGGGGGTGACA	22
P1B311FAMP25	FAM-ACCAGTGTGCCGTGCCAGCCAAGGA-BHQ1-TT	23

10

## 【 0 0 5 2 】

20

各シングレックス反応を、以下のサイクリング条件と以下のような試薬処方とを用いて、Applied Biosystems 7900HTで実行した。

【表 7】

サイクリング条件
48°C x 30 分
95°C x 10 分
以下を 40 サイクル
95°C、15 秒
60°C、1 分

30

【表 8】

試薬	最終濃度	X1 (10 $\mu$ L)
RT-PCR マスターミックス	1x	5.00
Multiscribe 酵素	.25 U/ $\mu$ L	0.25
プライマー/プローブミックス	0.6 Mm/0.25 $\mu$ M	1.00
サンプル		3.75
合計		10.00

40

## 【 0 0 5 3 】

乳がん細胞株SKBR3およびMCF7のRNA単離の後、1~400個の細胞等量(cell equivalents) (CE)を示すように、全RNAを連続希釈した。その後、連続希釈したRNAを、50,000CEに相当するバックグラウンド白血球全RNA中に混入した。定量リアルタイムPCRを適用し、本発明をサポートする最適な解析の結果を以下に示す。

【表 9】

解析	細胞株	RNA 連続 20ng	希釈 2ng	混入 0.2ng	20ng PBL 0.02ng	ゲノム DNA 200ng	白血球 20ng	NT 水
B305D-RP A	MCF7	23.64	27.64	31.36	35.84	40.00	38.40	40.00
	SKBR3	24.65	28.78	33.37	36.65			
CK-19-RP A	MCF7	16.95	20.97	25.33	29.66	40.00	34.19	40.00
	SKBR3	17.54	21.18	25.47	29.64			
P1B-RPA	MCF7	22.69	26.38	30.64	34.50	40.00	39.09	40.00
	SKBR3	25.18	28.87	32.78	36.59			
PBGD-RP A	MCF7	22.73	26.57	30.55	34.73	40.00	25.54	40.00
	SKBR3	23.59	27.03	31.01	35.49			
MG-RPA	MCF7	31.91	36.58	40.00	39.02	40.00	40.00	40.00
	SKBR3	23.07	27.34	31.34	35.58			

10

【 0 0 5 4 】

〔 実施例 2 〕

代替マーカーの遺伝子発現分析または解析

20

試験した追加の設計には、ゲノムDNAの増幅を除外する、ジャンクション特異的PCRプロンプが含まれる。このサンプルのために試験したプライマーと二重標識した加水分解プロンプ配列とを以下に示す。

【表 1 0】

RPA マルチプレックス解析		
解析	配列	配列 番号
PIP82U20	CTCCTGGTTCTCTGCCTGCA	24
PIP155L24	GACGTACTGACTTGGGAATGTCAA	25
PIP116P28	FAM-AAGCTCAGGACAACACTCGGAAGATCAT-BHQ1-TT	26
P1B284U22	CTGAGGAGTACGTGGGCCTGTC	27
P1B360L21	TTGCACTCCTTGGGGGTGACA	28
P1B308FAMP25	FAM-CAAACCAGTGTGCCGTGCCAGCCAA-BHQ1-TT	29
PIP-INT-U	GCTTGGTGGTTAAACTTACC	30
PIP-INT-L	TGAACAGTTCTGTTGGTGTA	31
PIP-304-P27-FAM	FAM-CTGCCTGCCTATGTGACGACAATCCGG-BHQ1-TT	32
HPRT (BHQ)-496F	TGACACTGGCAAAACAATGCA	33
HPRT (BHQ)-589R	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	34
HPRT (BHQ)-519T	FAM-CTTTGCTTTCTTGGTCAGGCAGTATAATCCA-BHQ1-TT	35
B305D-CC4-U	AAAAACAAGCATGGCCTAC	36
B305D-CC4-L	CAGCAAGTTGAGAGCAGTCCT	37
B305D-923-P29-FAM	FAM-CATGAGCAAAAACAGCAAGTCGTGAAATT-BHQ1-TT	38
PDEF1024U20	CGCCCACCTGGACATCTGGA	39
PDEF1087L23	CACTGGTTCGAGGCACAGTAGTGA	40
PDEF1045P25FAM	FAM-GTCAGCGGCCTGGATGAAAGAGCGG-BHQ1-TT	41

30

40

【 0 0 5 5 】

サンプルを準備し、転写産物を実施例 1 で説明したものと同一方法で増幅した。本発明

50

をサポートする、これらの代替的な解析の結果を、以下に示す。実施例 1 におけるマーカーの性能と比較した場合、以下の結果は、不良な性能を有する解析を示している。その不良な性能は、大部分が、マーカーの特異度および/または感度の欠如、そして、不良なプライマーまたはプローブの設計の一因となった。

【表 1 1】

解析	細胞株	RNA 連続 20ng	希釈 2ng	混入 20ng 0.2ng	PBL 0.02ng	白血球 20ng	NT 水
PDEF-10 24	MCF7	24.90	28.99	33.09	36.49	33.10	40.00
	SKBR3	22.85	26.72	30.89	35.57		
B305D-C C	MCF7	28.78	31.89	35.68	39.60	40.00	40.00
	SKBR3	31.04	34.85	38.91	40.00		
P1B284	MCF7	22.04	25.68	29.87	34.63	34.58	40.00
	SKBR3	24.58	28.29	32.42	36.04		
HPRT496	MCF7	23.93	27.38	31.58	35.12	26.98	40.00
	SKBR3	25.13	29.07	33.30	36.95		
PIP82	MCF7	35.77	40.00	40.00	40.00	38.75	40.00
	SKBR3	27.88	31.48	35.67	38.49		
PIPINT	MCF7	35.22	40.00	38.51	40.00	36.72	40.00
	SKBR3	26.66	30.63	34.73	39.34		

10

20

【 0 0 5 6 】

〔 実施例 3 〕

濃縮したSKBR3細胞およびMCF7細胞のQRT-PCR解析

分子特徴づけ解析は、CellSearch法の細胞収集部分を、分子検出解析と組み合わせるだろう。無傷な細胞と、CellSearch解析では一般的に陽性と呼ばれない細胞フラグメントとの両方において、マーカー発現を検出することのできる分子検出法を利用することによって、CellSearch解析の感度が改良されるかもしれない。EDTA抗凝血性血液チューブに引き込まれた健康な提供者血液中に混入させた、免疫磁氣的に (immuno-magnetically) 濃縮したSKBR3細胞およびMCF7細胞を用いたRNAの単離が、以下のとおり実行された。

30

【表 1 2】

解析	細胞株	25 CTC (0.5ng)	12.5 CTC (0.25ng)	1.25 CTC (0.025ng)	0 CTC (白血球バックグラウンド)	PC 1000 CTC (20ng)	NC
B305D-RPA	SKBR3	33.75	36.40	37.59	40.00	26.34	40.00
	MCF7	35.17	36.72	37.66	40.00	26.11	40.00
CK19-RPA	SKBR3	24.76	27.56	30.00	40.00	19.20	40.00
	MCF7	27.00	28.39	30.98	32.49	18.33	40.00
MG-RPA	SKBR3	29.84	35.51	36.06	40.00	24.58	40.00
	MCF7	39.19	38.42	35.87	35.70	24.42	40.00
P1B-RPA	SKBR3	30.73	33.30	34.22	40.00	26.54	40.00
	MCF7	35.84	35.61	40.00	37.40	26.75	40.00
PBGD-RPA	SKBR3	27.42	27.10	28.99	32.01	25.81	40.00
	MCF7	30.79	33.04	33.00	30.59	25.76	40.00

40

【 0 0 5 7 】

健康な提供者血液7.5mLから濃縮した場合の5個未満のSKBR3細胞における、特異的なmRNA転写産物の感度と、再現性のある検出とにより、分子特徴づけシングレックス解析の実現可能性を示している。

【 0 0 5 8 】

50

## 〔実施例 4〕

白血球RNAのバックグラウンド中に混入した連続希釈乳房RNAの分子特徴づけマルチプレックス解析

RPAマルチプレックス解析ポートフォリオからの解析には、ゲノムDNAの増幅を除外する、ジャンクション特異的PCRプローブが含まれる。このサンプルのために試験したプライマーと二重標識した加水分解プローブ配列とを以下に示す。

【表 1 3】

RPA マルチプレックス		
解析	配列	配列番号
B305D-RPAU22	AATGGCCAAAGCACTGCTCTTA	42
B305D-RPAL21	ACTTGCTGTTTTTGCTCATGT	43
B305D-RPATRP30	TR-ATCGAATCAAAAAACAAGCATGGCCTCACA-BHQ2-TT	44
CK19-RPAU22	CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT	45
CK19-RPAL20	TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC	46
CK19-RPACY3P24	CY3-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT-BHQ2-TT	47
PBGD-RPAU22	CCACACACAGCCTACTTTCCAA	48
PBGD-RPAL21	TACCCACGCGAATCACTCTCA	49
PBGD-RPACY5P27	CY5-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ2-TT	50
MG-RPAU21	AGTTGCTGATGGTCCTCATGC	51
MG-RPAL24	CACTTGTGGATTGATTGTCTTGGA	52
MG-RPAP23FAM	FAM-CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA-BHQ1-TT	53

10

20

## 【 0 0 5 9 】

各マルチプレックス反応を、以下のサイクリング条件と以下のような試薬処方とを用いて、Smartcycler IIで実行した。

【表 1 4】

サイクリング条件
95°C × 3 秒
59°C × 12 分
70°C × 90 秒
以下を 40 サイクル
95°C、20 秒
62°C、30 秒

30

【表 15】

試薬	最終濃度	X1 (25ul)
<b>2.5x BLN 酵素ミックス</b> <i>Tth</i> ポリメラーゼ 0.13mg/mL TP6-25AB	1x 6.5U 0.052 mg/mL	10
<b>2.5 x ベースBLNマスターミックス</b> 7.5 mM MnSo4 3.125 mM MgCl 0.5 mM dNTP	1x 3mM 1.25mM 0.2mM	9
<b>25X プライマーミックス</b> 11.25 uM F & R / 5uM P MG 11.25 uM F & R / 5uM P Ck19 11.25 uM F & R / 5uM P B305D 7.5 uM F & R / 5uM P PBGD	1x 0.45/0.2uM 0.45/0.2uM 0.45/0.2uM 0.3/0.2uM	1
375mM (NH4)2SO4	15mM	1
サンプル		5
合計		25

10

## 【0060】

SKBR3乳がん細胞株のRNA単離の後、1~125細胞等量(CE)を示すように、全RNAを連続希釈した。その後、連続希釈したRNAを、50,000CEに相当するバックグラウンド白血球全RNA中に混入した。定量リアルタイムPCRを適用し、本発明をサポートする結果を以下に示す。

20

【表 16】

解析	細胞株	20ng PBL に混入した RNA 連続希釈物				白血球 20ng	NT 水
		2.5ng	0.5ng	0.1ng	0.02ng		
<b>MG-RPA</b>	SKBR3	26.45	28.55	31.00	32.80	0.00	40.00
<b>CK19-RPA</b>	SKBR3	17.54	23.95	26.25	28.55	37.35	40.00
<b>B305D-RPA</b>	SKBR3	24.65	29.25	30.70	34.25	39.55	40.00
<b>PBGD-RPA</b>	SKBR3	27.90	28.40	29.15	28.85	29.10	40.00

30

## 【0061】

## 〔実施例 5〕

## 濃縮したSKBR3細胞のRPAマルチプレックスQRT-PCR分析

分子特徴づけマルチプレックス解析は、CellSearch法の細胞収集部分を、分子検出解析と組み合わせるだろう。無傷な細胞と、CellSearch解析では一般的に陽性と呼ばれない細胞フラグメントとの両方において、マーカー発現を検出することのできる分子検出法を利用することによって、CellSearch解析の感度が改良されるかもしれない。EDTA抗凝血性血液チューブに引き込まれた健康な提供者血液中に混入させた、免疫磁氣的に濃縮した、CK19のみを転写するSKBR3細胞を用いたRNAの単離が、以下のとおり実行された。すべての反応間で患者サンプルを分割しなければならない、分子特徴づけシングルプレックス解析と対照的に、分子特徴づけマルチプレックス解析は、その使用者が、単一反応中で、全体のサンプルの分子プロファイル进行分析することを可能にすることにより、向上された感度を提供する。

40

【表 17】

解析	細胞株	500 CTC (10ng)	50 CTC (1ng)	5 CTC (0.1ng)	0 CTC (白血球)	NC
CK19-RPA	SKBR3	26.60	29.10	36.30	40.00	40.00
PBGD-RPA	SKBR3	28.80	30.80	33.20	36.05	40.00

【0062】

〔実施例6〕

濃縮したSKBR3細胞のRNA安定性分析

細胞内RNAのRNA安定性を、48時間の時間経過にわたる分子特徴づけマルチプレックス解析を用いたQRT-PCRを通じて評価した。7.5mLの健康な提供者血液の複数のチューブの中に、200個のSKBR3細胞を混入した。各時点の終わりで、CellSearch法の細胞収集部分とCell Searchプロファイルキットとを用いて、サンプルを加工した。RNA単離の後、サンプルを分析し、結果を以下の表および図1に示す。

10

【表 18】

解析	細胞株	0時間 NTC	0時間	2時間	4時間	24時間	48時間
CK19-RPA	SKBR3	0.00	26.80	26.75	26.05	26.10	28.50
PBGD-RPA	SKBR3	30.90	28.55	28.75	28.10	29.10	31.00

20

【0063】

本発明は、疾患再発試験のためのCellSearchプラットフォームに対してサポートを提供する一方で、末梢血内の循環腫瘍細胞（CTC）をサンプル加工し、かつそれらの遺伝子発現プロファイルを評価するための方法、装置、およびキットを提供する。実施例は、従来のシングルプレックスRT-PCR解析よりも利点が高められた新規なマルチプレックス解析を用いて、末梢血のバックグラウンドにおいて単一の循環腫瘍細胞を検出する能力を示している。

【0064】

〔実施例7〕

前立腺がん循環細胞

前立腺RNAを、白血球由来のRNA中に混入し、Cepheid Smartcycler IIのマルチプレックス解析で試験した。代表的なデータを以下および図2に示す。

30

【表 19】

平均 Ct 値

前立腺 RNA (pg)	PBGD w/PBL	KLK3 w/PBL	CK19 w/PBL
2500	29.2	23.7	27.9
500	29.1	26.4	29.9
100	29.3	27.9	31.8
20	29.9	30.3	34.5
0 (20 ng PBL RNAのみ)	28.8	40.0	36.7

40

【0065】

〔実施例7A〕

乳がんRPAネステッドQRT-PCRマルチプレックス解析を用いた遺伝子発現分析の高まった感度

1ラウンドのリアルタイム逆転写PCR（RT-PCR）検出は、概して一貫性がない。なぜならば、循環腫瘍細胞から抽出したRNAの濃度が、しばしば非常に低いためである。ネステッドプライマーを用いた2ラウンドのQRT-PCRは、低品質か、もしくは質の悪い標的、または、希少なメッセージとともに特別に作用する解析の特異度および感度をともに高める。この方法には、最初により大きな鋳型核酸分子、続いて増幅した鋳型分子中に含まれる標

50

的核酸配列を増幅するために用いられる、2対のプライマーが組み込まれる。このように、2ラウンドのQRT-PCRを採用することにより、乳がんRPA分子コンパニオン解析(breast RPA molecular companion assay)についての感度と特異度がともに高まっている。図3参照。

【表20】

RPA ネステッドプライマー	
解析	配列
B305D1223U25	TAATGTTGCTGGAACATGGCACTGA
B305D1448L26	TCTTCCATATCTATCCAGCGCATTTA
CK19 901U21	AGATGAGCAGGTCCGAGGTTA
CK19 1094L23	CCTGATTCTGCCGCTCACTATCA
PBGD107U21	GGACCTTAGCGGCACCCACAC
PBGD240L22	CTGTCCGTCTGTATGCGAGCAA
MG39U20	CACCGACAGCAGCAGCCTCA
MG148L24	CACTTGTGGATTGATTGTCTTGA

10

【0066】

ネステッドマルチプレックス増幅反応を、以下のサイクリング条件と以下のような試薬処方とを用いて、Smartcycler IIで実行した。上記で説明したように、以下の実施例では、白血球全RNAのバックグラウンドの中に混入した連続希釈SKBR3 RNAを用いた。

【表21】

試薬	最終濃度	X1 (25 $\mu$ l)
BLN 酵素ミックス Tth ポリメラーゼ TP6-25 AB	1X 6.5U 0.052 mg/ml	2.5
2.5x BLNマスターミックス 7.5 mM MnSO4 3.125mM MgCl 0.5mM dNTP	1X 3mM 1.25mM 0.2mM	10
25X プライマーミックス 5 uM F&R MG 11.25 uM F&R Ck19 11.25 uM F&R B305D 7.5 uM F&R PBGD 375mM (NH4)2SO4	1X 0.2uM 0.45uM 0.45uM 0.5uM 15mM	1
サンプル		10.5
全体		25

20

30

【表22】

温度	時間
95℃	3秒
59℃	12分
70℃	90秒
15サイクル	
95℃	20秒
62℃	30秒

40

【0067】

1回目のラウンドの増幅後、チューブを回転させ、3 $\mu$ L分量を1回目のチューブから汲み出し、以下のプライマー、プローブ、および試薬を含んでいる2回目のチューブ中へ放出した。

50

【表 2 3】

RPA マルチプレックス解析	
解析	配列
B305D-RPAU22	AATGGCCAAAGCACTGCTCTTA
B305D-RPAL21	ACTTGCTGTTTTTGCTCATGT
B305D-RPATRP30	TR-ATCGAATCAAAAAACAAGCATGGCCTCACA-BHQ2-TT
CK19-RPAU22	CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT
CK19-RPAL20	TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC
CK19-RPACY3P24	CY3-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT-BHQ2-TT
PBGD-RPAU22	CCACACACAGCCTACTTTCCAA
PBGD-RPAL21	TACCCACGCGAATCACTCTCA
PBGD-RPACY5P27	CY5-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ2-TT
MG-RPAU21	AGTTGCTGATGGTCCTCATGC
MG-RPAL24	CACTTGTGGATTGATTGTCTTGGA
MG-RPAP23FAM	FAM-CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA-BHQ1-TT

10

【0068】

以下のパラメーターを用いて、定量リアルタイムPCRを適用し、本発明をサポートする結果を以下に示す。

【表 2 4】

温度	時間
95℃	3 秒
59℃	12 分
70℃	90 秒
40 サイクル	
95℃	20 秒
62℃	30 秒

20

【0069】

〔実施例 8〕

濃縮したSKBR3細胞の2ラウンド乳がんRPAネステッドQRT-PCR分析

30

【表 2 5】

試薬	最終濃度	X1 (25 $\mu$ l)
BLN 酵素ミックス	1X	2.5
Tth ポリメラーゼ	6.5U	
TP6-25 AB	0.052 mg/ml	
2.5x BLN マスターミックス	1X	10
7.5 mM MnSO <sub>4</sub>	3mM	
3.125mM MgCl	1.25mM	
0.5mM dNTP	0.2mM	
25X プライマーミックス	1X	1
5 $\mu$ M F & R / 2.5 $\mu$ M P MG	0.2/0.1 $\mu$ M	
11.25 $\mu$ M F & R / 5 $\mu$ M P Ck19	0.45/0.2 $\mu$ M	
11.25 $\mu$ M F & R / 5 $\mu$ M P B305D	0.45/0.2 $\mu$ M	
7.5 $\mu$ M F & R / 5 $\mu$ M P PBGD	0.3/0.2 $\mu$ M	
375mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15mM	1
サンプル		10.5
合計		25

40

【表 2 6】

2 ラウンド RT-PCR				
サンプル	MG	CK19	B305D	PBGD
2000pg	14.40	19.05	20.80	19.15
200pg	18.30	23.85	24.45	21.85
20pg	19.95	26.25	26.10	22.00
白血球	34.90	35.75	28.55	21.85
NT	40.00	38.10	38.20	40.00

## 【 0 0 7 0 】

10

無傷な細胞と、CellSearch CTC解析では一般的に陽性と呼ばれない細胞フラグメントとの両方において、マーカー発現を検出することができる分子検出法を改良するために、乳がんRPAネステッドQRT-PCRマルチプレックス解析を、CellSearch濃縮と組み合わせて用いるだろう。EDTA抗凝血性血液チューブに引き込まれた健康な提供者血液中に混入させた、免疫磁氣的に濃縮したSKBR3細胞を用いたRNAの単離が、以下のとおり実行された。感度および特異度が低い1ラウンドのRPA QRT-PCR解析と対照的に、2ラウンドの乳がんRPAネステッドQRT-PCRは、その使用者が、ほぼ単一コピーの感度を有することを可能にすることにより、向上した感度および特異度を提供する。

【表 2 7】

20

混入した乳がん RPA				
サンプルID	SKBR3	MG	B305D	PBGD
1	無細胞	0.00	39.10	23.20
2	無細胞	37.60	36.60	24.20
3	5個の細胞	26.00	27.20	22.80
4	5個の細胞	25.40	29.30	25.80
5	50個の細胞	37.40	29.70	22.50
6	50個の細胞	23.70	28.20	22.20
7	500個の細胞	18.60	24.30	20.30
8	500個の細胞	21.60	25.50	22.30
10	PC: 2ng	20.00	26.30	24.10
11	NT	35.30	0.00	37.50

30

## 【 0 0 7 1 】

## 〔 実施例 9 〕

前立腺がんMCAネステッドQRT-PCRマルチプレックス解析を用いた遺伝子発現分析の高まった感度

循環前立腺腫瘍細胞における希少配列を増幅するよう設計されたPCR反応における改良された感度および特異度の必要性が、本発明において取り組まれる。乳がんRPAネステッドQRT-PCRマルチプレックス解析で利用する技術は、前立腺がんネステッドQRT-PCR分子コンパニオン解析(molecular companion assay) (MCA) を作り出すことと重複している。

【表 2 8】

40

前立腺がん MCA ネステッドプライマー	
解析	配列
KLK3;189U20	TGCGGCGGTGTTCTGGTGCA
KLK3;294L24	GACCTGAAATACCTGGCCTGTGTC
CK19 901U21	AGATGAGCAGGTCCGAGGTTA
CK19 1094L23	CCTGATTCTGCCGCTCACTATCA
PBGD107U21	GGACCTTAGCGGCACCCACAC
PBGD240L22	CTGTCCGTCTGTATGCGAGCAA

## 【 0 0 7 2 】

ネステッドマルチプレックス増幅反応を、以下のサイクリング条件と以下のような試薬

50

処方とを用いて、Smartcycler IIで実行した。上記で説明したように、以下の実施例では、白血球全RNAのバックグラウンドの中に混入した連続希釈LNCAP RNAを用いた。

【表 2 9】

試薬	最終濃度	X1 (25 $\mu$ L)
BLN酵素ミックス Tthポリメラーゼ TP6-25 AB	1X 6.5U 0.052 mg/mL	2.5
2.5x BLNマスターミックス 7.5 mM MnSO4 3.125mM MgCl 0.5mM dNTP	1X 3mM 1.25mM 0.2mM	10
25Xプライマーミックス 2.5 $\mu$ M F & R KLK3 11.25 $\mu$ M F & R Ck19 7.5 $\mu$ M F & R PBGD 375mM (NH4)2SO4	1X 0.1 $\mu$ M 0.45 $\mu$ M 0.3 $\mu$ M 15mM	1    1
サンプル		10.5
合計		25

10

【表 3 0】

温度	時間
95 $^{\circ}$ C	3 秒
59 $^{\circ}$ C	12 分
70 $^{\circ}$ C	90 秒
15 サイクル	
95 $^{\circ}$ C	20 秒
62 $^{\circ}$ C	30 秒

20

【0073】

1回目のラウンドの増幅後、チューブを回転させ、3 $\mu$ L分量を1回目のチューブから汲み出し、以下のプライマー、プローブ、および試薬を含んでいる2回目のチューブ中へ放出した。

30

【表 3 1】

前立腺がん MCA マルチプレックス解析	
解析	配列
KLK3;209U19	CCCCAGTGGGTCCTCACA
KLK3;269L22	AGGATGAAACAAGCTGTGCCGA
KLK3;242P26FAM	FAM-CAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGG-BHQ1-TT
CK19-RPAU22	CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT
CK19-RPAL20	TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC
CK19-RPAFAMP24	FAM-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCCTT-BHQ1-TT
PBGD-RPAU22	CCACACACAGCCTACTTTCCAA
PBGD-RPAL21	TACCCACGCGAATCACTCTCA
PBGD-RPAP27FAM	FAM-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ1-TT

40

【0074】

以下のパラメーターを用いて、定量リアルタイムPCRを適用し、本発明をサポートする結果を以下に示す。

【表 3 2】

温度	時間
95℃	3 秒
59℃	12 分
70℃	90 秒
<b>40 サイクル</b>	
95℃	20 秒
58℃	30 秒

【表 3 3】

試薬	最終濃度	X1 (25μl)
<b>BLN</b> 酵素ミックス	1X	2.5
Tth ポリメラーゼ	6.5U	
TP6-25 AB	0.052 mg/mL	
<b>2.5x BLN</b> マスターミックス	1X	10
7.5 mM MnSO4	3mM	
3.125mM MgCl	1.25mM	
0.5mM dNTP	0.2mM	
<b>25X</b> プライマーミックス	1X	1
2.5 uM F & R / 2.5 uM P KLK3	0.1/0.1uM	
11.25 uM F & R / 5uM P Ck19	0.45/0.2uM	
7.5 uM F & R / 5uM P PBGD	0.3/0.2uM	
375mM (NH4)2SO4	15mM	1
サンプル		10.5
合計		25

【表 3 4】

2 ラウンド RT-PCR			
サンプル	KLK3	CK19	PBGD
20000pg	9.80	16.20	20.10
200pg	17.50	23.35	21.60
20pg	20.10	25.30	21.80
白血球	28.50	0.00	20.20
NT	0.00	38.90	0.00

【 0 0 7 5 】

〔実施例 1 0〕

濃縮したLNCAP細胞の前立腺がんMCAマルチプレックスQRT-PCR分析

無傷な細胞と、CellSearch CTC解析では一般的に陽性と呼ばれない細胞フラグメントとの両方において、マーカー発現を検出することができる分子検出法を改良するために、前立腺がんMCAネステッドQRT-PCRマルチプレックス解析を、CellSearch濃縮と組み合わせて用いるだろう。EDTA抗凝血性血液チューブに引き込まれた健康な提供者血液中に混入させた、免疫磁氣的に濃縮したLNCAP細胞を用いたRNAの単離が、以下のとおり実行された。感度および特異度が低い1ラウンドの前立腺がんQRT-PCR解析と対照的に、2ラウンドの前立腺がんMCAネステッドQRT-PCRは、その使用者が、ほぼ単一コピーの感度を有することを可能にすることにより、向上した感度および特異度を提供する。

【 0 0 7 6 】

〔実施例 1 1〕

CellSearch (商標) システムによる収集が後に続くSKBR3の混入

表Iに示すように、提供者血液 [ 保存剤としてEDTAを含む、紫のふたの (purple top) Vacutainer (登録商標) ] 7.5mL中に、SKBR3細胞を1,000個混入した。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 I. 提供者血液への SKBR3 細胞株の混入

サンプル番号	提供者	状態	バーコード番号
1	1	1,000 個の SKBR3 細胞を混入	V22166
2	1	1,000 個の SKBR3 細胞を混入	V22167
3	1	混入しない	V22168
4	1	混入しない	V22169
5	2	1,000 個の SKBR3 細胞を混入	V22170
6	2	1,000 個の SKBR3 細胞を混入	V22171

10

## 【 0 0 7 8 】

CellSearch (商標) プロファイルキットとCellTracks (登録商標) 前処理システムとを用いて、免疫磁気ビーズを結合したEpCAMによって、CTCを収集した。収集したCTCを含むチューブをシステムから取り除き、Magcelllect (登録商標) 磁石の中に置いて10分間インキュベーションした。上澄みを、まだMagcelllect (登録商標) の中で、チューブにより取り除いた。ペレットをリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline) (PBS) 200 μL に懸濁した。10%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum) (FBS) を含む完全イーグル最小必須培地をウェル当たり1.0mL 含んでいる48ウェルプレートへと、細胞懸濁液を入れた。細胞を、成長している間14日間まで定性的に評価し、観察結果を表IIに要約した。培養期間の終わり(5日、14日)で、細胞をPBSで2回洗浄し、RLTバッファ( Qiagen )を用いて、ウェル中で直接、可溶化した。可溶化物由来の全RNAを、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて、単離した。これらのRNAサンプルは、全体的な遺伝子発現を含む更なる分析のために用いられるだろう。

20

## 【 0 0 7 9 】

&lt; 結果 &gt;

- ・CellTracks (登録商標) 前処理システムを用いて収集されたCTCは、親細胞に比較して倍加率が減少していることが観察されるが、生存可能であるように見える
- ・白血球は培養2日以内に死に絶え、CTCの成長には干渉しない
- ・CTCは、期待されるとおり、対照親細胞よりもゆっくりではあるが、分裂が見られた
- ・CTCについての成長の倍加時間は、親細胞と比較して、約2倍より大きかった
- ・成長特性(質、生存力)の差異が、2つの複製産物間で観察され、提供者血液由来の起こりうる効果が示唆された

30

## 【 0 0 8 0 】

【表 3 6】

表 II: 定性的結果

提供者	1日	3日	4日	5日	6日	7日	10日	12日	14日
#1	++++	++++	++++	+++	++	++	+		
#2	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++
対照	++++++	++++++	++++++	++++++	++++++	++++++	++++++	++++++	++++++

40

CellTracks (登録商標) 前処理を経験した細胞を植えたウェルは、決して対照ウェルと同様の密度ではなかった。

## 【 0 0 8 1 】

〔実施例 1 2〕

100ngまたは500ng PBL DNA中に混入したCpG M DNAの変動量

(25サイクルの前増幅PCRと、10%の希釈PCR産物の使用量を、2回目のPCRに移した。)

直接または前増幅した鋳型DNA (CpG M) のCt値を、以下の表および図4に示す。

【表 3 7】

前増幅 (ネステッド PCR)			非前増幅 (直接 PCR)		
PBL-100ng	Ct値		PBL-100ng	Ct値	
CpG M (pg)	Actin	GSTP1	CpG M (pg)	Actin	GSTP1
5000	16.6	15.5	5000	27.6	28.0
500	16.2	18.8	500	27.8	31.7
50	15.8	21.5	50	27.7	34.7
0	5.3	0.0	0	27.5	0.0
PBL-500ng			PBL-500ng		
5000	14.4	16.2	5000	25.3	28.7
500	13.8	18.7	500	26.1	32.3
50	14.0	22.1	50	25.3	34.5
0	3.2	0.0	0	25.4	0.0

10

【 0 0 8 2 】

〔実施例 1 3〕

PBL 500ng (70,000細胞に相当) に混入したPC DNAおよびPN DNA

(2回目のPCRにおける、結果として得られる産物の6%の使用が後に続く、20サイクルの前増幅PCR)

【 0 0 8 3 】

【表 3 8】

表 VII : 直接または前増幅した鋳型 DNA (前立腺腺がんまたは正常) の Ct 値

20

PC (pg)	前立腺細胞相当数	Actin (Ct)	GSTP1 (Ct)
189	27	12.5	22.6
63	9	12.5	24.7
21	3	12.3	36.0
7	1	12.5	0.0
PN			
63	9	12.0	0.0
PBLのみ	0	12.1	0.0
陰性 (DNA なし)	0	0.0	0.0

30

【 0 0 8 4 】

&lt; 結果 &gt;

PBL 100ngまたは500ng (それぞれ、10,000個または70,000個の細胞に相当) のバックグラウンド中のCpG M DNA 50pg (7個の細胞に相当) を、前増幅あり、または、前増幅なしでQMSPを用いて検出した。良好な線形反応曲線が、前増幅および直接増幅反応双方について、生成された。初期の研究では、前立腺腺がん由来のDNA 20pg未満 (3個の循環腫瘍細胞に相当) が、メチル化GSTP1領域に特異的なシグナルを生成し、70,000個のPBL細胞のバックグラウンド中でも検出された。一方、正常前立腺 (PN) DNA、または、血液 (PBL) DNAからは検出可能なシグナルが全く観察されず、そのことは、メチル化GSTP1の不存在を示唆していた。2.5 × 10<sup>4</sup> コピーのバックグラウンド中1コピー (500ngの非メチル化DNAにおける20pgのメチル化DNA) の検出についてのネステッドQMSP感度が観察される。明らかな非特異的産物はネステッドQMSP法では全く検出されず、最終PCRフラグメントの正しい大きさがゲル上で観察された (データ不図示)。検出感度を高め、3個未満の細胞のCt値を減少するために、更なる解析最適化実験が進行中である。

40

【 0 0 8 5 】

〔実施例 1 4〕

提供者血液中に前立腺腺がん細胞株 (LnCAPとDU145) を混入することによる血液中の循環腫瘍細胞 (CTC) に対する解析の実用性の証明

提供者血液7.5mLに、培養した前立腺腫瘍細胞株 (LnCAPとDU145) を30個、100個、300個、500個、混ぜた後、プロファイルキットを用いたCellSearch (商標) プラットフォー

50

△のCellTracks (商標) 前処理システムによってCTCを収集した。Qiagenマイクロカラム (Qiagen microcolumns) を用いて、これらの細胞由来のデオキシリボ核酸を単離し、亜硫酸水素転換反応にさらした。最後の工程由来の修飾DNAを、表III (22サイクル) および表Vの条件を用いて、2ラウンドのq-MSP反応において用いた。実験結果を表VIIIおよび表IXに示す。

【表39】

表 VIII : CTC (混入細胞、LnCAP) の Ct 値

GSTP1 LnCAP 細胞数	R2 に移された 10% の R1		R2 に移された 0.2% の R1	
	Ct	rfu	Ct	rfu
0 (非混入)	0.0	-51	0.0	-14
30	20.2	789	24.2	724
100	19.1	751	23.2	693
300	17.3	734	21.3	688
Actin	26.6-28.8	130-160	31.4-33.4	130-170

10

【0086】

1.5~1.7Ctの30個の細胞を除く、重複反応の差異は、0.7Ctよりも小さかった。

【表40】

20

一次方程式	$Y = -1.0x + 22.83$ $R^2 = 0.98$	$Y = -1.95x + 26.73$ $R^2 = 0.99$

【0087】

【表41】

表 IX : CTC (混入細胞、DU145) の Ct 値

GSTP1				
DU145 細胞数	10% R1		50% R1	
0 (非混入)	0	0	0	0
20	0	0	0	0
100	0	0	0	0
300	0	0	0	0
500	27.6	199	20.6	142
500個の細胞対照 (CASなし)	22.6	389	-	-
Actin (0~500個の細胞)	31.0-32.1	65-135	30.1-31.5	90-125

30

【0088】

これらの結果は、前立腺がん患者からのCTCに、q-MSPをうまく適用することができることを明確に示している。

【0089】

〔実施の態様〕

(1) 指標に特異的な細胞の存在について生物標本を分析するための方法において、

(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、

(c) 前記指標に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および/またはタンパク質を分析する工程と、

40

を含む、方法。

(2) 実施態様1の方法において、

前記生物標本が、尿、血液、血清、血漿、リンパ液、痰、精液、唾液、涙、胸水、肺水、気管支洗浄液、滑液、腹水、腹水貯留、羊水、骨髄、骨髄穿刺液、脳脊髄液、組織可溶化液、もしくは、組織破砕物、または、細胞ペレットから選択される、方法。

(3) 実施態様1の方法において、

前記指標が、がん、遺伝性の遺伝的素因のリスクアセスメント、CTCのようながん細胞の原発組織の同定、遺伝疾患における突然変異の同定、病状(病期分類)、予後、診断、観察、治療に対する反応、(薬理的な)治療選択、(ウイルス、細菌、マイコプラズマ、真菌による)感染、化学療法感受性、薬剤感受性、転移能、もしくは、遺伝疾患における突然変異の同定である、方法。

10

(4) 実施態様1の方法において、

前記細胞が、抗体/磁気分離、蛍光活性化細胞分類(FACs)、ろ過、もしくは、手動により濃縮される、方法。

(5) 実施態様4の方法において、

手動による前記濃縮が、前立腺マッサージによるものである、方法。

【0090】

(6) 実施態様1の方法において、

前記核酸が、核、ミトコンドリア(ホモプラスミー、ヘテロプラスミー)、ウイルス、細菌、真菌、もしくは、マイコプラズマのものである、方法。

20

(7) 実施態様6の方法において、

前記核酸が、DNA、またはRNAである、方法。

(8) 実施態様1の方法において、

前記分析が、DNA分析である、方法。

(9) 実施態様8の方法において、

前記DNA分析が、遺伝的構成を検出するための、メチル化-脱メチル化、核型分析、倍数関係(異数性、倍数性)、(ゲル法または分光光度法で評価される)DNAの完全性、転座、突然変異、遺伝子融合、活性化-不活性化、一塩基多型(SNPs)、コピー数、もしくは、全ゲノム増幅に関連する、方法。

(10) 実施態様8の方法において、

前記分析が、RNA分析である、方法。

30

【0091】

(11) 実施態様10の方法において、

前記RNA分析が、qRT-PCR、miRNA、もしくは、転写後修飾に関連する、方法。

(12) 実施態様8の方法において、

前記分析が、タンパク質分析である、方法。

(13) 実施態様12の方法において、

前記タンパク質分析が、抗体検出、翻訳後修飾、もしくは、ターンオーバーに関連する、方法。

40

(14) 実施態様13の方法において、

前記タンパク質が、細胞表面マーカーである、方法。

(15) 実施態様14の方法において、

前記細胞表面マーカーが、上皮、内皮、ウイルス、もしくは、細胞型のものである、方法。

【0092】

(16) 実施態様1の方法において、

前記バイオマーカーの存在が、ウイルス/細菌による感染、傷害、もしくは、抗原発現に関連する、方法。

(17) 実施態様16の方法において、

前記抗原が、細胞を分離するために用いられる、方法。

50

(18) 実施態様1の方法において、  
前記分析が、濃縮された前記細胞の分子プロファイルを得るために用いられる、方法。

(19) 生物標本由来の細胞の転移能を決定する方法において、

(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、

(c) 転移能に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および/またはタンパク質を分析する工程と、  
を含む、方法。

(20) 生物標本由来の細胞から遺伝疾患における突然変異を同定する方法において、

(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、

(c) 遺伝疾患に特異的なバイオマーカーの存在、発現レベル、もしくは、状態を決定するために、前記核酸および/またはタンパク質を分析する工程と、  
を含む、方法。

10

#### 【0093】

(21) 生物標本由来の細胞に由来する遺伝子材料を保存する方法において、

(a) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

(b) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、

(c) 前記核酸および/またはタンパク質を保存する工程と、

を含む、方法。

20

(22) 腫瘍細胞ワクチンを製造する方法において、

(a) 生物標本を入手する工程と、

(b) 前記標本由来の細胞を濃縮する工程と、

(c) 前記細胞から核酸および/またはタンパク質を単離する工程と、

(d) 前記ワクチンを処方するために、前記核酸および/またはタンパク質を用いる工程と、  
を含む、方法。

(23) 組成物において、

実施態様1の方法によって得られた前記核酸および/またはタンパク質、  
を含む、組成物。

30

(24) 組成物において、

配列番号1~94から選択されるオリゴヌクレオチド、  
を含む、組成物。

(25) キットにおいて、

実施態様1の方法を実行するための、バイオマーカー検出剤、  
を含む、キット。

#### 【0094】

(26) 物品において、

実施態様1の方法を実行するための、バイオマーカー検出剤、  
を含む、物品。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0095】

【図1】経時的なRNA安定性を示したグラフである。

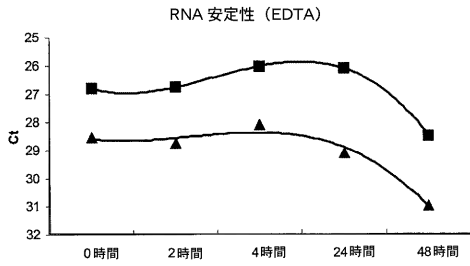
【図2】循環腫瘍細胞から入手された前立腺特異的mRNAを示したグラフである。

【図3】循環腫瘍細胞から入手された前立腺特異的mRNAを示したグラフである。

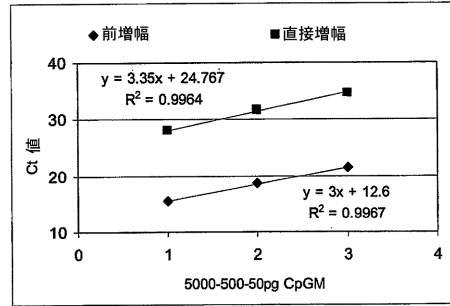
【図4A】100ng PBL DNAへの混入の結果である。

【図4B】500ng PBL DNAへの混入の結果である。

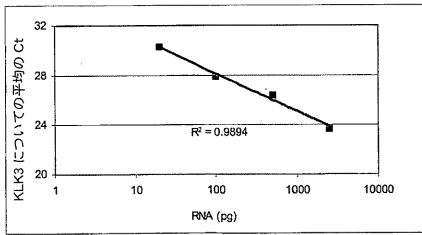
【 図 1 】



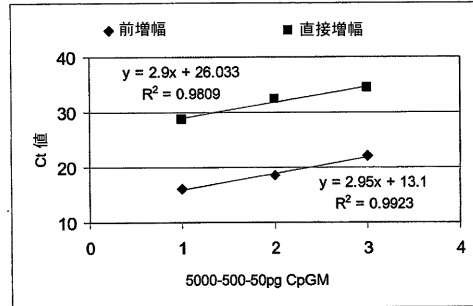
【 図 4 A 】



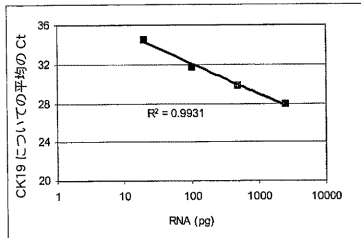
【 図 2 】



【 図 4 B 】




【 図 3 】



【 配列表 】

2009529878000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/06405
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: C12Q 1/68(2006.01);C12N 15/85(2006.01)  USPC: 435/6,325 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 325  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: EMBASE BIOSIS CAPLUS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	VERFAILLIE, CM. et al. BCR/ABL-Negative Primitive Progenitors Suitable for Transplantation Can Be Selected From the Marrow of Most Early-Chronic Phase But Not Accelerated-Phase Chronic Myelogenous Leukemia Patients. Blood. 1996, Vol 87, No.11, pages 4770-4779.	1-4, 6, 7, 10, 18, 19, 21, 23 ----- 5, 8, 9, 11-17, 20, 22, 24, 25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 21 July 2008 (21.07.2008)		Date of mailing of the international search report <b>07 AUG 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer CELINE X. QIAN Telephone No. 571-272-1600 

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100130384

弁理士 大島 孝文

(74)代理人 100157288

弁理士 藤田 千恵

(72)発明者 チョウダリー・ドンダパティ

アメリカ合衆国、08550 ニュージャージー州、プリンストン・ジャンクション、プライオリ  
ー・ロード 7

(72)発明者 スケルトン・ジョアン

アメリカ合衆国、08807 ニュージャージー州、ブリッジウォーター、レイナード・ロード  
219

(72)発明者 バーネット・クリスティン・エイ

アメリカ合衆国、08876 ニュージャージー州、サマービル、ピショップ・プレイス 7

(72)発明者 マズムダー・アビジット

アメリカ合衆国、07970 ニュージャージー州、バスキン・リッジ、カーライル・ロード 3  
5

(72)発明者 バーデン・ジョナサン・エフ

アメリカ合衆国、08807 ニュージャージー州、ブリッジウォーター、プロコウ・コート 2  
04

(72)発明者 チョイ・チャン・エイチ

アメリカ合衆国、08854 ニュージャージー州、ピスカタウェイ、ロイヤル・ドライブ 53  
、ナンバー202

(72)発明者 カーティン・キャサリン・エム

アメリカ合衆国、07204 ニュージャージー州、ロゼル・パーク、イースト・クレイ・アベニ  
ュー 464

(72)発明者 ワン・ハイイン

アメリカ合衆国、08807 ニュージャージー州、ブリッジウォーター、アレクシス・コート  
4

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA12

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ05 QQ08 QQ42 QQ52

QQ79 QR32 QR35 QR48 QR55 QR59 QR62 QS25 QS32 QX01

4C085 AA03 BB01 CC21

专利名称(译)	原代细胞增殖		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009529878A</a>	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2009500454	申请日	2007-03-13
[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	チョウダリー・ドンダパティ スケルトン・ジョアン バーネット・クリスティン・エイ マズムダー・アビジット バーデン・ジョナサン・エフ チョイ・チャン・エイチ カーティン・キャサリン・エム ワン・ハイイン		
发明人	チョウダリー・ドンダパティ スケルトン・ジョアン バーネット・クリスティン・エイ マズムダー・アビジット バーデン・ジョナサン・エフ チョイ・チャン・エイチ カーティン・キャサリン・エム ワン・ハイイン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/154 C12Q2600/16 C12Q2600/178		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A A61K39/00.H G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ05 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC21		
代理人(译)	忍野浩 永田豊 藤田千絵		
优先权	60/781882 2006-03-13 US 60/781901 2006-03-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种生长从生物样本中获得的感兴趣细胞的方法。该方法包括 (a) 在维持足够细胞活力的条件下浓缩细胞和 (b) 影响细胞活力，增加和完整性。并在特定条件下培养细胞。背景技术

### RNA Stability (EDTA)

