

(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2004-519202  
(P2004-519202A)**

(43) 公表日 **平成16年7月2日(2004.7.2)**

|                            |                   |                 |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I               | テーマコード (参考)     |
| <b>C 1 2 N 5/06</b>        | C 1 2 N 5/00      | 2 G O 4 5       |
| <b>C 1 2 N 15/02</b>       | C 1 2 P 21/08     | 4 B O 2 4       |
| <b>C 1 2 P 21/08</b>       | C 1 2 Q 1/02      | 4 B O 6 3       |
| <b>C 1 2 Q 1/02</b>        | G O 1 N 33/53     | 4 B O 6 4       |
| <b>G O 1 N 33/53</b>       | G O 1 N 33/574    | 4 B O 6 5       |
|                            | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 43 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2000-612437 (P2000-612437) | (71) 出願人 | 501399315<br>ナイール パドマナバン ピー<br>アメリカ合衆国、メリーランド州、エリコ<br>ット シティ、ヘムロック コーン ウェ<br>イ 4 5 2 0 |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年4月4日 (2000.4.4)         | (74) 代理人 | 100060715<br>弁理士 松原 伸之   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成13年10月12日 (2001.10.12)     | (74) 代理人 | 100070116<br>弁理士 村木 清司   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2000/008799            | (74) 代理人 | 100112209<br>弁理士 中山 健一   |
| (87) 国際公開番号   | W02000/063358                | (74) 代理人 | 100095304<br>弁理士 橋本 千賀子  |
| (87) 国際公開日    | 平成12年10月26日 (2000.10.26)     | (74) 代理人 | 100103643<br>弁理士 松嶋 さやか  |
| (31) 優先権主張番号  | 09/292, 358                  |          |  |
| (32) 優先日      | 平成11年4月15日 (1999.4.15)       |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | 09/539, 080                  |          |  |
| (32) 優先日      | 平成12年3月30日 (2000.3.30)       |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸直腸癌および他の胃腸病態の非観血的検出

(57) 【要約】

通常周囲温度で、生存した、生物学的に実質的に純粋な剥脱糞便大腸細胞を単離する方法を記載する。ある胃腸容態を示す糞便中免疫細胞および炎症細胞、および、大腸直腸癌を検出する非観血的方法を示す。大腸細胞を単離するための輸送および懸濁培地の組成を詳述する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

通常周囲温度で単離した生存し生物学的に実質的に純粋な剥脱糞便大腸細胞。

## 【請求項 2】

特定な胃腸容態を示すマーカーを有する、請求項 1 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 3】

新生物性転化を示すマーカーを有する、請求項 2 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 4】

免疫機能不全を示すマーカーを有する、請求項 2 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 5】

非新生物胃腸病態を示す異常を示す、請求項 2 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 6】

リンパ腫起源の上皮または非上皮細胞である、請求項 1 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 7】

キメラ免疫グロブリン I g C を発現している請求項 1 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 8】

I g A および C F c のみを発現している請求項 1 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 9】

C F c のみを発現している請求項 1 に記載の大腸細胞。

## 【請求項 10】

糞便サンプルを集めるための輸送培地であって、

( a ) 糞便物中に存在するプロテアーゼを封鎖するに十分な量の物質；

( b ) 糞便物中に存在する粘液を破壊するに十分な量の粘液溶解剤；および

( c ) 糞便物中の細菌活性を阻害するに十分な量の殺細菌剤を含む、前記輸送培地。

## 【請求項 11】

プロテアーゼを封鎖するための前記物質は、血漿タンパク質、ゲル形成ポリマーおよび合成レジンからなる群から選択する、請求項 10 に記載の輸送培地。

## 【請求項 12】

前記血漿タンパク質は、ウシ血清アルブミン、卵アルブミンまたはヒト血清アルブミンである、請求項 11 に記載の輸送培地。

## 【請求項 13】

粘液溶解剤は、N - アセチルシステイン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、カプサイシン、ジチオトレイトール、グアイアコールおよびグアイフェネシンからなる群から選択する、請求項 12 に記載の輸送培地。

## 【請求項 14】

殺細菌剤は、チメロサル、抗生物質、アジ化ナトリウム、グリシルリジン酸およびグリシルレチン酸 ( & ) からなる群から選択する、請求項 13 に記載の輸送培地。

## 【請求項 15】

重炭酸ナトリウム：350 ~ 500 mg；ウシ血清アルブミン：2.5 ~ 15 g；グアイフェネシン：2.5 ~ 5.0 g；グリシルリジン酸：2.0 ~ 4.0 g；および P u c k 食塩水 G：500 ml を含む溶液である、請求項 14 に記載の輸送培地。

## 【請求項 16】

グリシルリジン酸を欠き、それによって前記輸送培地は分散または懸濁液培地に変換される、請求項 15 に記載の輸送培地。

## 【請求項 17】

通常周囲温度で、生物学的に実質的に純粋な剥脱糞便大腸細胞を単離する方法であって、

( a ) 通常周囲温度で維持した輸送培地中に糞便サンプルを集め；

( b ) 懸濁培地で希釈した前記輸送培地に、糞便サンプルを分散し；

( c ) ( b ) 段階の希釈輸送培地に存在する細胞を沈降させて、より重い密度の培地上に、細胞懸濁液を重層することにより、不純物から細胞を単離し；

10

20

30

40

50

(d) (c) 段階の細胞を、前記のより重い培地との境界で細胞のバンドが形成され、より重い培地およびペレット内に細胞画分が形成される影響にかけ；次いで

(e) 前記細胞バンドから、および、より重い培地およびペレットから、生物学的に実質的に純粋な大腸細胞を回収する段階を含む、前記方法。

【請求項 18】

前記のより重い培地は、約 1.033 から約 1.25 の範囲の密度である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記のより重い培地の密度は 1.25 である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

大腸直腸癌を検出する方法であって、

(a) 生物学的に実質的に純粋な大腸細胞を得；次いで

(b) 前記大腸細胞を、癌を決定するマーカーの存在を検出する試薬と反応させる段階を含み、ここで前記大腸細胞と前記試薬の陽性反応の発生は癌の存在を示す、前記方法。

【請求項 21】

前記試薬は、蛍光標識抗体または発色産物を産生する植物レクチンである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

胃腸管の粘膜性免疫を決定する方法であって、胃腸管粘膜免疫を決定したい被検者から回収した糞便中免疫細胞数を、正常被検者から回収した糞便中免疫細胞数と比較する段階を含み、正常値からの統計学的に有意な逸脱は免疫機能不全レベルを示す、前記方法。

【請求項 23】

胃腸管病態を診断する方法であって、胃腸管病態が疑われる被検者の糞便サンプル中の免疫細胞の存在を決定する段階を含み、免疫細胞の存在は胃腸管病態を示す、前記方法。

【請求項 24】

免疫細胞の存在は、細胞を、CD45 または COX-2 に対する抗体と反応させることにより決定し、前記抗体と結合する細胞は免疫細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

抗原特異的モノクローナル抗体を産生する方法であって、抗原特異的糞便中免疫細胞を、標準的なハイブリドーマ技法においてクローンとして使用し、抗原特異的モノクローナル抗体を回収する段階を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

これは、1999年4月15日に提出された、係属中の米国特許出願第09/292,358号の一部継続出願である。

【0002】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、大腸直腸癌および他の胃腸疾患の早期の非観血的検出を可能とする、単離大腸細胞に関する。より特定すると、本発明は、小糞便サンプルから得られた、単離され、生物学的に実質的に純粋で生存した糞便中免疫細胞およびリンパ腫起源の非上皮細胞に関する。本発明は、さらに、通常周囲温度で糞便サンプルから生大腸細胞を単離するための輸送培地および分散または懸濁培地の提供、および、本発明の単離大腸細胞を使用して大腸直腸および他の胃腸病態を検出する方法に関する。また、単離した大腸細胞により、他の異常容態、症状、疾患、または病理容態の研究および決定が可能となる。

【0003】

(従来技術)

ヒトの一般的な胃腸悪性疾患は、大腸直腸癌である。大腸直腸癌は、米国の男性および女性の全ての癌関連死の約14%を占めると推定され、その発症率は高くなり続けている (Boringら、CA Cancer J. Clin. 1994; 44: 7~26)。早

期検出は、他の悪性疾患の処置でも同じであるように、この癌の成功裡の処置にも重要な因子である。

【0004】

大腸および大腸直腸腫瘍の検出のスクリーニングアプローチは、現在、(a)糞便潜血検査(FOB T)、(b)S字結腸鏡検査、(c)バリウム注腸二重造影法、および(d)結腸鏡検査の使用に基づく。これらのスクリーニング検査の中で、大腸直腸腫瘍からの可能性の比較的高い出血に基づく、FOB Tのみが、非観血的で、簡単で、比較的安価である。しかし、FOB Tの頻繁な偽陽性および偽陰性結果により、その特異性および感度はかなり限定される。他の手順は高価で観血的である。従って、簡単で、非観血的で、信頼でき、安価な、結腸直腸癌、胃腸(GI)管疾患および他の病理容態の検出法を提供することが明らかに必要である。

10

【0005】

大腸細胞は、被検者の胃腸管の直前の過去の代謝病歴の状況を提供する、重要な情報マーカー分子源を示す。さらに、かかる細胞は、内視鏡検査を含む観血的手順を使用した大腸生検による限定的なサンプリングとは対照的に、非観血的な方法での、大腸の全長に沿った大腸粘膜の状態を反映する統計学的に大きなサンプリングフレーム由来の細胞個体群を示す。

【0006】

大腸細胞は、ある変化または形質転換を受け、前癌および癌状態を含む大腸病態を示す、ある生物学的または化学的マーカーを有する。それ故、大腸細胞は、胃腸管の新生物プロセスの開始および他の病態生理学的変化の価値ある早期の指示物質として役立つ。遺伝子および表面タンパク質の僅かな変化は、かかる新生物マーカーの例である。特に、Ki67、細胞表面糖タンパク質CD44および腫瘍関連抗原19~9およびレクチン結合は、胃腸管の新生物性転化の特異的バイオマーカーである。また、単離大腸細胞中のDNAの量と腫瘍の存在の間に強い関連がある。なぜなら、急速に分裂している細胞は、より多くのDNAを含むからである。また、大腸腺腫ポリープおよび癌の発達は、発癌遺伝子(ki-ras)の活性化、腫瘍抑制遺伝子(p53およびAPC)の失活、およびDNAミスマッチ修復遺伝子の変化を含む、多段階プロセスであることはよく認識されている。

20

【0007】

これまで、剥脱大腸細胞は、それらが糞便中に流されると、分解すると、一般に、本発明が属する分野で理解され、理由は、これらの細胞は、大気に曝露されるとすぐに分解し始めるからである。糞便中に含まれる酵素、粘液および細菌は、大腸細胞を分解するプロセスに寄与する。新しく集めた糞便サンプルを-20以下の温度まで冷凍することが、例えば、米国特許第5,094,956号、第5,380,647号および第5,455,160号に、細胞成分は考えず、化学的構成成分を保存するためのみに記載されている。従って、これらの手順は、細胞完全性を保持せず、他の不純物質を含まない無傷の生細胞を単離するには適用できない。

30

【0008】

DuttaおよびNair(Gastroenterology、114:1333~1335、1998)は、生大腸細胞の単離を達成するために、Albaughら(Int.J.Cancer、52:347~350、1992)およびIyengarら(FASEB J.5:2856~2859、1991)を参照する。Albaughらは、輸送培地、および、Iyengarらの昔の研究に基づいて糞便サンプルから大腸細胞を得る手順を記載した。しかし、従来技術の輸送培地は、脂肪酸を含まないBSAに加えて抗生物質の添加された食塩水溶液からなるAlbaughらの培地と同じように、本発明の輸送培地とは異なる。別の言葉で言えば、従来技術の輸送培地は、少なくとも1つの基準の点で欠け、すなわち、本発明に記載の輸送培地の処方に絶対必要な粘液溶解剤を有さない点で欠けていた。

40

【0009】

50

さらに、Albaughらのシステムでは、回収後の糞便サンプルは、水中での冷却を保たなければならず、さらに処理するために実験室に輸送されるが、僅か約1時間しか水中に保存できなかった。これに対し、本発明のシステムは、水中での冷却を必要とせず、通常周囲温度で所望の結果を達成し、これは、本発明の重要な特徴である。さらに、Albaughらは、その細胞は80%を超える生存率を有していたが、食細胞および他の細胞の存在を除外できなかったと記述する。実際、Iyengarらの図3および4により、得られた細胞調製物はかなり不純であることが明らかに示される。従って、IyengarらおよびAlbaughらの手順は、生大腸細胞を提供し得るが、それらは、実質的に純粋な大腸細胞を得る目的には適していない。要約すると、これまで、小さな糞便塊から通常周囲大気条件で単離された、特定の細胞型の生存し生物学的に実質的に純粋なサンプルを得ることは不可能であった。

10

【0010】

(発明の要約)

それ故、本発明の目的は、通常周囲温度で単離された、生存し生物学的に実質的に純粋な剥脱糞便大腸細胞を提供することである。

【0011】

本発明のさらなる目的は、生存し、単離された、糞便中免疫細胞を提供することである。

【0012】

本発明の追加の目的は、リンパ腫または非リンパ腫系統の、生存し、単離された、免疫細胞を提供することである。

20

【0013】

本発明のさらなる目的は、通常周囲温度で生存剥脱糞便大腸細胞を単離するための、輸送培地、および、分散または懸濁培地を提供することである。

【0014】

本発明のさらなる目的は、本発明の教示に従って通常周囲温度で単離された剥脱糞便大腸細胞を使用して、大腸直腸癌を含む胃腸疾患を検出する非観血的方法を提供することである。

【0015】

本発明の様々な他の目的および利点は、本発明の詳細な説明から、および、図面の簡単な説明から明らかとなる。

30

【0016】

前記のおよび他の目的、態様および利点は、図面を参照すると、よりよく理解されよう。

【0017】

(発明の詳細な説明)

本発明の様々な目的および利点は、通常大気条件および周囲温度で糞便サンプルから単離された所望の細胞型の生存均一大腸細胞を得ることにより達成される。

【0018】

特記しない限り、本明細書に使用した全ての専門的および科学的用語は、本発明が属する分野の普通程度の技術的理解力を有する者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載したものに類似または等価な任意の方法および物質を、本発明の実施または試験に使用できるが、本明細書に記載した方法および物質が好ましい。特記しない限り、本明細書で使用または考えられる技術は、当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には公知の標準的な方法である。物質、方法および実施例は、単に例示的なものであり、限定的なものではない。

40

【0019】

本明細書に使用した「実質的に純粋」なる語は、産物は、フローサイトメトリーまたは本明細書に記載の手順により決定したところ、96%以上の純度、通常98%~99%の純度をもって、均一または単一の型に統一され、物質の妨害または他の型の細胞の混入がない。

【0020】

50

これまで、糞便物中の剥脱大腸細胞の遭遇する問題は、これらの細胞が、糞便物中のタンパク質分解酵素、微生物叢、粘液等の存在に因り、通常大気条件に曝露されるとすぐに、分解されることであった。従って、糞便物からの通常周囲温度での無傷生大腸細胞の単離を妨げる全てのこのような因子または要素の作用を阻害するシステムを発明しなければならなかった。これは、本発明により、2つの異なる培地を処方することにより達成される：(1) 輸送培地、および(2) 分散または懸濁培地。輸送培地は、酵素失活量の酵素捕捉剤またはプロテアーゼ封鎖剤、細菌活性を阻害するに十分な量の殺細菌剤または静細菌剤、および、糞便物に含まれる粘液を破壊する粘液溶解量の物質を含む、生理食塩水からなる。

【0021】

様々な酵素捕捉剤、静細菌剤および粘液溶解剤が、当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には思い付き、本発明の目的を妨害しない任意の適切な物質を、本発明の教義に従って輸送培地の処方に使用し得る。

【0022】

酵素捕捉剤の中で好ましいものには、タンパク質分解活性阻害剤および動物タンパク質がある。適切なタンパク質分解活性阻害剤の例は、PMSF、ペプスタチンA、ベスタチンおよびキモスタチンを含む。酵素活性を阻害または失活する試薬は、ホルムアルデヒド、金属キレート剤、重金属イオン、あるアミノ酸、例えばチロシンおよびフェニルアラニン、および高濃度の亜鉛または無機ホスフェートを含む。動物タンパク質の中で適切なものには、ウサギ(RSA)、ヤギ(GSA)、ヒツジ(SHA)、ウマ(ESA)、ウシ(BSA)およびヒト(HSA)起源の血清アルブミンを含む、非免疫性の水溶性化合物であるものがある。後のアッセイ手順を妨害しない、あるポリアミノ酸も、酵素失活剤として使用し得る。かかるポリアミノ酸の適切な例は、ポリ-L-リジン、ポリ-L-プロリン、ポリ-L-チロシン等である。

【0023】

静細菌剤の適切な例は、アジ化ナトリウム、安息香酸ナトリウム、抗生物質(例えばペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB、ゲンタマイシン、ポリミキシンB等)、グリシルリジン酸、グリシルレチン酸(& )、その適切な誘導体等である。好ましい殺細菌剤は、チメロサル(シグマケミカル社)であり、好ましい静細菌剤はグリシルリジン酸である。

【0024】

粘液溶解剤の適切な例は、グアイフェネシン、グアイアコール、ヨウ化カリウム、-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、カプサイシン、グリシルリジン等である。好ましい粘液溶解剤はグアイフェネシン(シグマケミカル社)である。

【0025】

Puck食塩水Gは、好ましい生理食塩水溶液源である。

【0026】

好ましい輸送培地は以下のように調製する。

【0027】

|          |           |
|----------|-----------|
| Puck食塩水G | 500ml     |
| 重炭酸ナトリウム | 350~500mg |
| BSA      | 2.5~15g   |
| グアイフェネシン | 2.5~5g    |
| グリシルリジン酸 | 2~4g      |

分散または懸濁培地は、分散または懸濁培地の調製時には削除される、例えばグリシルリチン酸などの殺細菌剤/静細菌剤に関して、輸送培地とは異なる。

【0028】

通常周囲温度で実質的に純粋な大腸細胞を単離する手順

ここで図1を参照すると、小さな糞便サンプル10(約0.5~1.0g)を、輸送培地およびいくつかのガラスピース12を含むチューブ11に入れ、その後、チューブに栓で

10

20

30

40

50

封をする。次いで、糞便サンプル10を、培地12に、例えばボルテックスにより十分に分散し、その後、チューブ11の内容物を、メッシュふるい(約300 $\mu$ mの孔サイズ)を通してろ過し、新しいチューブ13(50mlのポリプロピレンまたは類似の円錐遠心チューブ)に入れ、約1.033から約1.25の範囲の密度を有する重い培地14を下に敷き、プレーキをオフにして卓上遠心機で約200 $\times$ gで約10分間遠心分離する。

**【0029】**

大腸細胞は、重いクッション中に、および、チューブの底にペレットとして蓄積し、重い培地14と、上のより軽い懸濁液18の間の界面で、より軽い細胞(少量成分)のバンド17を除去した後に、プラスチック移動ピペット15を用いて吸引することにより回収する。細胞を重い培地から回収し、ペレットを、新しい50mlの遠心チューブ19に入れ、約40mlの懸濁培地20で希釈する。次いで、かくして得られた細胞の懸濁液を、約900 $\times$ gで約10分間遠心分離し、その後、透明な上清を廃棄し、遠心チューブの底に残っている細胞ペレット21を、約1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)に再懸濁する。より軽い細胞のバンド(少量成分)17を、第二の新しい50mlの遠心チューブ22に入れ、重いクッションおよびペレットからの細胞について記載したように洗浄する。実質的に生物学的に純粋な単離剥脱生大腸細胞を含む、細胞ペレット21を回収し、適切な塩溶液(例えばPBS)に分散し、45 $\mu$ mのふるいフィルターを通してろ過する。

10

**【0030】**

単離大腸細胞の生存率を決定するために、一部のペレット21を、PBS/BSA培地26(1ml/gの糞便サンプル)に分散する。次いで、懸濁液の1/10希釈液を、トリパンプルーの存在下で血球測定計で計測する。当業者には公知のように、トリパンプルーを取込まない細胞は、生存していると考えられ、計測し、細胞収率を決定する。

20

**【0031】**

チューブまたはバイアルは、プラスチック、ポリスチレン、ポリプロピレン等を含む任意の適切な物質からなり得る。

**【0032】**

本発明の発明的態様は、単離手順中およびその後、通常周囲温度において、糞便サンプルに見られる剥脱大腸細胞の生存を共に可能とする、輸送培地、および、分散または懸濁培地の処方である。別の言葉で言えば、本発明により、全単離プロセス中に、約22から約25の範囲の通常周囲温度で、冷凍または凍結することなく、小さな糞便物質サンプル(例えば0.5~1.0g)からの、無傷で生存している剥脱大腸細胞の単離が可能となる。約800万から1000万個の生大腸細胞を、本発明の技術に従って、1gの糞便サンプルから得ることができる。

30

**【0033】**

本発明の懸濁培地に通常周囲温度で維持する場合、単離大腸細胞は、より長期間、生存したままで保存できる。表1は、保存時間および温度条件の関数としての、細胞収率および生存率を示す。

**【0034】**

勿論、単離段階において、別の技術で代替できる。例えば、輸送培地12中の糞便サンプルの懸濁液を、ふるい(149 $\mu$ m、105 $\mu$ mおよび52 $\mu$ m)を通してろ過してもよい。また、分散培地中のペレットを、高密度パーコール勾配上に穏やかに重層でき、遠心分離して、細胞を勾配の上部から回収できる。かかる修飾は、当分野で一般的であり、本発明の範囲内に含まれる。

40

**【0035】**

勿論、適切である場合いつでも、基準または基線を、通常、疾患に罹患していない被検者から得られた大腸細胞を使用して確立し、よって、疾患または病理学的容態の疑われる被検者から得られた大腸細胞を用いて、比較、診断または評価試験を実施できることが理解される。

**【0036】**

50

本発明の非観血的に得られた大腸細胞の重要で有利な特徴は、これらの単離大腸細胞が、胃腸管の病態に特徴的なマーカーまたは形質転換を有し、それ故、それらは、胃腸管病態の診断的および予測的指示物質として役立つことが発見された。

#### 【0037】

##### 糞便中免疫細胞

糞便から単離された大腸細胞は、全大腸の解剖学および病態生理学的容態を真に示すものであることが発見されたので、他の用途の中でもとりわけ、これらの細胞はまた、粘膜免疫のモニタリングも可能とする。胃腸管の粘膜は、免疫グロブリンにより媒介される免疫学的防御の発生の主要な部位である。本明細書で糞便中免疫細胞と称する、機能的に別個の細胞群を、本発明の方法により得られた剥脱細胞から、同定および単離できることが発見された。糞便中免疫細胞は、I g GおよびI g Aの両方に対する抗体により認識される、キメラ免疫グロブリンとして定義される、本明細書でI g Cと称される、特異的免疫グロブリンを発現する上で独特である。さらに、糞便中免疫細胞は、クローン性で、抗原特異的であり、F c受容体および免疫グロブリンA ( I g A ) の存在により特徴づけられる。

10

#### 【0038】

I g GおよびI g A抗体に対する糞便中免疫細胞の親和性から、糞便中免疫細胞を単離するための数個のアプローチが、当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には思い付くだろう。例えば、糞便、大腸パージまたは洗浄から、または、手術および部検標本から得られた細胞の混合物からの、糞便中免疫細胞の選択的単離は、抗I g Gまたは特異的抗I g Cモノクローナル抗体を使用して達成できる。間接的免疫接着アプローチは、これらの細胞が、抗I g Gまたは特異的抗I g C抗体で覆膜されたペトリ皿に接着できるパニング技術を使用する。糞便中免疫細胞の捕獲剤としての抗I g G抗体の使用は、純粋なI g G発現モノ特異的(すなわち、I g Aの共発現を欠く)大腸細胞は、通常条件下では検出されないという、本発明による発見に基づく。所望の型のモノクローナル抗体の調製は、当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には公知であり、慣用的に得られる。

20

#### 【0039】

実質的に純粋な糞便中免疫細胞を得る別のアプローチは、蛍光色素コンジュゲート抗I g Gまたは抗I g Cを使用した蛍光活性化細胞選別(FACS)技術の使用である。1つの実施形態において、大腸細胞を、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)標識I g Gと共にインキュベートし、過剰の試薬を洗浄して除去し、蛍光でタグした糞便中免疫細胞を、蛍光活性化細胞選別機で選別する。

30

#### 【0040】

別の実施形態において、I g GまたはI g Cに対するモノクローナル抗体を、当業者に公知のアガロースビーズ、ガラスビーズ、ポリスチレンビーズ、中空繊維、磁気ビーズ、プラスチック組織培養皿等の固体マトリックスに共有結合的にまたは非共有結合的に付着させる。抗体を覆膜した支持体に付着した細胞は、機械的、磁氣的または任意の他の適切な手段により懸濁液からマトリックスを単に分離することにより、細胞懸濁液から分離される。当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には公知であるように、糞便中免疫細胞を、リンカーを介して抗I g Gまたは抗I g Cで覆膜された組織培養フラスコの表面に結合でき、フラスコ中で大腸細胞懸濁液をインキュベートした後、非結合非糞便中免疫細胞をデカントして除去する。次いで、結合した糞便中免疫細胞を、搔爬により、またはリンカーの適切な酵素的切断により回収する。ビーズマトリックス(例えばセファロース)に結合したリンカーは市販で入手できる(例えばファルマシア)。

40

#### 【0041】

二色免疫蛍光フローサイトメトリーを使用して、糞便中免疫細胞の数または個体群を決定する。大腸細胞を、抗I g G FITC(緑蛍光)および抗I g A PE(フィコエリトリン、赤蛍光)と共にインキュベートする。細胞を緩衝液で洗浄して、過剰の抗体を除去した後、次いで、細胞をフローサイトメーターで解析して、単一の蛍光(緑または赤)を有する細胞、および二重蛍光(緑および赤の両方)を有する細胞を計測する。二重蛍光を

50

有する細胞は、キメラ I g C 糞便中免疫細胞であり、赤蛍光を有する細胞は、I g A 分泌大腸上皮細胞である。正常被検者からの大半の大腸調製物には、抗 I g G F I T C のみを認識する、測定可能な数の細胞はない。別の言葉で言えば、I g G のみを有する大腸細胞は稀であり、存在する場合、異常な粘膜または全身免疫機能不全に関連し得る。

#### 【0042】

フローサイトメトリーによる免疫蛍光標識細胞の解析は、少なくとも3つの型の大腸細胞の存在を明らかにした。他の F c 受容体から糞便中免疫細胞の F c 受容体を区別するために、糞便中免疫細胞の F c 受容体は、C F c 受容体と本明細書では称する。表2は、これらの細胞に見られる I g C、C F c および I g A のいくつかの代表的な正規分布を示す。正常値からの逸脱は、免疫系に關与する疾患プロセスを示すだろう。図3は、一般的に検出された少なくとも3つの型の大腸細胞の図解である：「A」は、各分子2の2つの抗体結合部位により示される数個の独特なキメラ免疫グロブリン I g C および数個の C F c 受容体3を有する糞便中免疫細胞を示す。「B」は、「A」に類似した大腸細胞を示すが、数個の C F c 受容体3と共に、数個の I g A 免疫グロブリン分子5を有する。「C」は、「A」および「B」に類似した大腸細胞を示すが、免疫グロブリンを全く有さず、C F c 受容体のみを有する。

10

#### 【0043】

上記した糞便中免疫細胞、I g A を有する大腸細胞および C F C 受容体を有する大腸細胞は、胃腸管の免疫監視に、および、全生物の全身体液性免疫の維持に別個の役割を有する。これらの細胞は不可欠な機能を実施する：( i ) 微生物叢による大腸でのコロニー形成における平衡を維持する；( i i ) それらはクローン性であり、多能性細胞個体群を含み、各々が、食事または生物学的起源の、可溶性または粒子状の、単一抗原を認識する；( i i i ) それらは、腸関連リンパ組織に抗原提示細胞として作用し得る；( i v ) それらは、病原体（例えば、ロタウイルス、赤痢菌、ポリオ、腸内寄生虫、マイコバクテリア等）による侵襲を検出するための守衛であり得る；および( v ) その非存在は、医原性起源の免疫学的不応答、または、先天的免疫グロブリン欠損の状態を表し得る。糞便中免疫細胞を含む、これらの大腸細胞は、抗原特異的であるので、それらは、発癌物質、発癌遺伝子 D N A、E B V、S V - 4 0 等を用いた形質転換により不死化して、当分野の普通程度の技術的理解力を有する者には公知のハイブリドーマ技術により選択抗原に特異的な抗体分泌細胞系を産生できる。

20

30

#### 【0044】

以下の実施例は、本発明の同定または単離した大腸細胞の特定の有用性を示す。これらの実施例は、単に説明的なものでありいずれにしても限定的なものではない。

#### 【0045】

##### 実施例 - 1

本発明に記載の手順により正常被検者から単離された大腸細胞は、実質的に全ての炎症細胞を含まない。潰瘍性大腸炎およびクローン病などの、炎症性腸疾患（I B D）では、かなりの数の炎症細胞が、大腸粘膜表面に移動し、上皮細胞と共に剥脱される。

#### 【0046】

輸送培地に懸濁した、I B D 患者から集めた1から2gのアリコートの糞便を、約150 m l の懸濁培地と共にストマッカー中でホモジナイズした。懸濁液のアリコート（30 m l）を、10 m l のヒストパック1077（密度1.077）を用いて下に敷き、室温で200 x g で30分間、プレーキをオフにして遠心分離した。懸濁水とヒストパック1077の間の界面を回収し、3回遠心分離の繰返しにより洗浄する。このプロセスで、炎症細胞が、通常の大腸細胞の完全体に加えて回収される。

40

#### 【0047】

細胞混合物中の炎症細胞を、抗 C D 4 5 / F I T C （緑蛍光）でタグし、陽性細胞をフローサイトメーターで計測する。白血球共通抗原としても知られる C D 4 5 （ c l u s t e r o f d i f f e r e n t i a t i o n ）は、リンパ腫細胞の系統特異的マーカーであり、炎症細胞上に存在する。さらに、炎症の第二マーカーである抗 C O X - 2 / P E （

50

赤蛍光)も、炎症細胞の検出に使用し得る。大腸上皮細胞は、CD45について陰性であるので、単離物中のCD45陽性細胞数は、IBD中の炎症プロセスの重度の直接的な指標である。CD45およびCOX-2の両方に陽性の細胞のモニタリングは、処置の経過中の疾患の進行を追跡するための、極めて有用な非観血的手順である。

【0048】

#### 実施例2

##### 粘膜免疫の状態の評価

細胞を、免疫無防備状態の腸を有することが疑われる被検者から上記のように得られる。細胞のアリコート(約110K)を、PBS緩衝液に懸濁し、37で約45分間、蛍光標識抗体の以下の組合せの1つと共にインキュベートする:抗IgG FITC(緑)抗IgA PE(赤)、および抗IgC FITC+抗IgA PE。アイソタイプ対照抗体を有する細胞を含む平行チューブも、非特異的結合抗体を説明するために維持する。直接的免疫蛍光アッセイを実施して、様々な大腸細胞のセットに対する抗体の結合を測定する。糞便中免疫細胞(IgCを発現)またはIgAを有する細胞の数の有意な減少は、免疫不全に診断的に重要である。表2は、正常被検者で得られた数値を列挙する。正常値からのあらゆる逸脱は、免疫機能不全を示す。直接および間接的免疫蛍光アッセイは、巨大分子のレポーター、例えばサイトカイン、シグナル伝達中間体、成長因子等の評価に同じように実施できることを注記すべきである。

10

【0049】

#### 実施例3

##### 大腸癌関連バイオマーカーの発現

細胞を、大腸癌または大腸癌前駆体(ポリープ)を有することが疑われる患者から上記のように得る。この技術の1つの実施形態において、細胞を、CD44またはその分子変異体、例えば、CD44V3、CD44V6およびCD44V10の発現について、間接的免疫蛍光アッセイにかけ;CD44またはその分子変異体の存在は、大腸癌の診断となる。

20

【0050】

#### 実施例4

非観血的に得られる体細胞源として、本発明の大腸細胞は、表現型並びに遺伝子型を示す。従って、それらは、例えば薬理学的および環境的物質に対する応答を決定するための生物学的巨大分子(例えばDNA、RNA、タンパク質等)のDNA分類および調査並びに多剤耐性の評価に有用である。これらの単離された細胞はまた、当業者が容易に思い付く様々な他の方法にも有用である。

30

【0051】

本明細書に提供した指針、説明および実施例から、本発明の様々な代替の実施形態、修飾または操作を、当業者は思い付き、これらは、本出願の精神および概観および添付の特許請求の範囲内に含まれることは明らかである。

【0052】

【表 1】

細胞収率に対する保存の効果

| 保存時間  | 条件 | 細胞収率 % | 生存率 % |
|-------|----|--------|-------|
| 1～6時間 | 周囲 | 100    | 85+   |
| 3日間   | 周囲 | 135    | 85+   |
| 3日間   | 4℃ | 70.2   | 85+   |
| 8日間   | 周囲 | 97.5   | 80+   |
| 8日間   | 4℃ | 142    | 75+   |

10

【表 2】

IgC、IgAおよびCFcを有する大腸細胞の分布

| 被検者番号  | IgC  | CFc 受容体 | IgA  |
|--------|------|---------|------|
| 308-S1 | 18.5 | 90.3    | 46.5 |
| 308-S2 | 20.8 | 87.8    | 42.0 |
| 318-S1 | 12.2 | 86.9    | 47.7 |
| 318-S2 | 26.5 | 91.2    | 37.7 |
| 319-S1 | 27.5 | 88.9    | 44.0 |
| 319-S2 | 32.9 | 90.9    | 30.0 |
| 325-S1 | 20.2 | 88.9    | 40.0 |
| 325-S2 | 16.8 | 82.2    | 24.0 |

20

注記：数は、対応する分子を有する全細胞の%を示す。これらの結果は、本出願に記載の技術により単離された免疫蛍光で標識された大腸細胞のフローサイトメトリー解析により得られた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、小さな糞便物質のサンプルから通常周囲温度で生存剥脱大腸細胞を単離するプロセスの図解である。

30

## 【図 2】

図 2 は、96%以上の純度を示す、本発明に記載の単離大腸細胞のフローサイトメトリーのヒストグラムデータを示す。

## 【図 3】

図 3 は、その免疫グロブリン特徴に基づいて同定した大腸細胞のクラスの図解である。



## 【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|  |  |    |  |
|--|--|----|--|
| (51) International Patent Classification <sup>7</sup> :<br>C12N 15/00, 5/00, 5/02  |  | A1 | (11) International Publication Number: <b>WO 00/63358</b>  |
|  |  |    | (43) International Publication Date: 26 October 2000 (26.10.00)  |
| (21) International Application Number: PCT/US00/08799  |  |    | (81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, 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, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| (22) International Filing Date: 4 April 2000 (04.04.00)  |  |    |  |
| (30) Priority Data:<br>09/292,358 15 April 1999 (15.04.99) US<br>Not furnished 30 March 2000 (30.03.00) US   |  |    |  |
| (71)(72) Applicant and Inventor: NAIR, Padmanabhan, P.<br>[US/US]: 4520 Hemlock Cone Way, Ellicott City, MD 21042 (US).  |  |    |  |
| (74) Agent: CHESSER, Wilburn, L.; Jones Jain, L.L.P., Suite 800,<br>1990 M Street, N.W., Washington, DC 20036 (US).  |  |    | <p><b>Published</b></p> <p><i>With international search report.</i></p> <p><i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i></p>   |
| (54) Title: NONINVASIVE DETECTION OF COLORECTAL CANCER AND OTHER GASTROINTESTINAL PATHOLOGY  |  |    |  |
| (57) Abstract  |  |    |  |
| <p>A method for isolating viable, biologically substantially pure exfoliated fecal colonocytes at normal ambient temperature is described. Immunocopytes and inflammatory cells indicative of certain gastrointestinal conditions and a noninvasive method for detecting colorectal cancer are set forth. Composition of transport and suspension media for isolation of colonocytes are detailed.</p> |  |    |  |

*FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY*

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

|    |                          |    |                                       |    |   |    |                          |
|----|--------------------------|----|---------------------------------------|----|---|----|--------------------------|
| AL | Albania                  | ES | Spain                                 | LS | Lesotho                                   | SI | Slovenia                 |
| AM | Armenia                  | FI | Finland                               | LT | Lithuania                                 | SK | Slovakia                 |
| AT | Austria                  | FR | France                                | LU | Luxembourg                                | SN | Senegal                  |
| AU | Australia                | GA | Gabon                                 | LV | Latvia                                    | SS | Swaziland                |
| AZ | Azerbaijan               | GB | United Kingdom                        | MC | Monaco                                    | TD | Chad                     |
| BA | Bosnia and Herzegovina   | GE | Georgia                               | MD | Republic of Moldova                       | TG | Togo                     |
| BB | Barbados                 | GH | Ghana                                 | MG | Madagascar                                | TJ | Tajikistan               |
| BE | Belgium                  | GN | Guinea                                | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan             |
| BF | Burkina Faso             | GR | Greece                                | ML | Mali                                      | TR | Turkey                   |
| BG | Bulgaria                 | HU | Hungary                               | MN | Mongolia                                  | TT | Trinidad and Tobago      |
| BJ | Benin                    | IE | Ireland                               | MR | Mauritania                                | UA | Ukraine                  |
| BR | Brazil                   | IL | Israel                                | MW | Malawi                                    | UG | Uganda                   |
| BY | Belarus                  | IS | Iceland                               | MX | Mexico                                    | US | United States of America |
| CA | Canada                   | IT | Italy                                 | NE | Niger                                     | UZ | Uzbekistan               |
| CF | Central African Republic | JP | Japan                                 | NL | Netherlands                               | VN | Viet Nam                 |
| CG | Congo                    | KE | Kenya                                 | NO | Norway                                    | YU | Yugoslavia               |
| CH | Switzerland              | KG | Kyrgyzstan                            | NZ | New Zealand                               | ZW | Zimbabwe                 |
| CI | Côte d'Ivoire            | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland                                    |    |                          |
| CM | Cameroon                 | KR | Republic of Korea                     | PT | Portugal                                  |    |                          |
| CN | China                    | KZ | Kazakhstan                            | RO | Romania                                   |    |                          |
| CU | Cuba                     | LC | Saint Lucia                           | RU | Russian Federation                        |    |                          |
| CZ | Czech Republic           | LI | Liechtenstein                         | SD | Sudan                                     |    |                          |
| DE | Germany                  | LK | Sri Lanka                             | SE | Sweden                                    |    |                          |
| DK | Denmark                  | LR | Liberia                               | SG | Singapore                                 |    |                          |
| EE | Estonia                  |    |                                       |    |   |    |                          |

WO 00/63358

PCT/US00/08799

NONINVASIVE DETECTION OF COLORECTAL CANCER  
AND OTHER GASTROINTESTINAL PATHOLOGY

5 This is continuation-in-part of pending U.S. application Ser. No. 09/292,358  
filed April 15, 1999.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

10 The present invention is related to isolated colonocytes enabling early  
noninvasive detection of colorectal cancer and other gastrointestinal diseases. More  
particularly, the present invention is related to isolated, biologically substantially pure  
and viable immunoprecipitates and nonepithelial cells of lymphoid origin obtained from  
15 a small fecal sample. The invention is further related to providing a transport medium  
and a dispersion or suspension medium for isolating viable colonocytes from a fecal  
sample at normal ambient temperature and a method for detecting colorectal and other  
gastrointestinal pathology employing the isolated colonocytes of the present invention.  
The isolated colonocytes also allow the study and determination of other anomalous  
20 conditions, symptoms, disorders or pathological conditions.

PRIOR ART

25 A common gastrointestinal malignancy in humans is colorectal cancer. It has  
been estimated that colorectal cancer accounts for approximately 14% of all cancer-  
related deaths in men and women in the United States and its incidence continues to be  
high (Boring et al, CA Cancer J. Clin. 1994; 44:7-26). Early detection is a critical factor  
in successful treatment of this cancer, as it is in the treatment of other malignancies.

Screening approaches to detection of colon and colorectal tumors are presently  
based on the use of (a) fecal occult blood test (FOBT), (b) flexible sigmoidoscopy, (c)  
double contrast barium enema, and (d) colonoscopy. Among these screening tests only

WO 00/63358

PCT/US00/08799

2

FOBT, which is based on a relatively high probability of bleeding from colorectal tumors, is noninvasive, simple and relatively inexpensive. However, frequent false positive and false negative results of the FOBT considerably limit its specificity and sensitivity. Other procedures are expensive and invasive. Hence, there is a clear need  
5 for providing a simple, noninvasive, reliable and inexpensive method for detecting colorectal cancer, gastrointestinal (GI) tract diseases and other pathological conditions.

Colonocytes represent an important source of informational marker molecules that provide a picture of the immediate past metabolic history of the GI tract of a subject. In addition, such cells are representative of the cell population from a statistically large  
10 sampling frame reflecting the state of the colonic mucosa along the entire length of the colon in a non-invasive manner, in contrast to a limited sampling by colonic biopsy using an invasive procedure involving endoscopy.

Colonocytes undergo certain changes or transformations and carry certain biological or chemical markers indicative of colonic pathologies including precancerous  
15 and cancerous conditions. Therefore, the colonocytes could serve as a valuable early indicator of the onset of neoplastic processes and other pathophysiological changes in the GI tract. Subtle changes in the genes and surface proteins are examples of such neoplastic markers. In particular, Ki67, the cell surface glycoprotein CD44 and tumor-associated antigens 19-9 and lectin binding are specific biomarkers of neoplastic  
20 transformation in the GI tract. There is also a strong correlation between the amount of DNA in isolated colonic cells and the presence of tumors, because rapidly dividing cells contain more DNA. It is also well recognized that the development of colonic adenomatous polyps and cancer is a multistep process involving activation of oncogenes (ki-ras), inactivation of tumor-suppressor genes (p53 and APC), and alterations in the  
25 DNA mismatch repair genes.

Heretofore, it was generally understood in the art to which this invention belongs that exfoliated colonic cells are destroyed once they are shed into the stools, the reason being that these cells start breaking down as soon as they are exposed to the atmosphere. The enzymes, mucus and the bacteria contained in the stool contribute to the process of

destroying the colonic cells. Chilling the freshly collected stool sample to the temperature below  $-20^{\circ}\text{C}$  has been described, for example, in U.S. patents #5,094,956, #5,380,647 and #5,455,160 only for preserving the chemical constituents, without regard to the cellular components. Thus, these procedures do not retain cellular integrity and are not applicable for isolating intact, viable cells free of other impurities.

Dutta and Nair (*Gastroenterology*, 114:1333-1335, 1998) refer to Albaugh et al (*Int. J. Cancer*, 52:347-350, 1992) and Iyengar et al (*FASEB J.* 5: 2856-2859, 1991) for accomplishing isolation of viable colonic cells. Albaugh et al described a transport medium and a procedure to obtain colonocytes from a stool sample based on earlier work of Iyengar et al. However, the transport medium of the prior art is different from the transport medium of the present invention in as much as Albaugh et al's medium consisted of a saline solution to which antibiotics were added in addition to fatty acid free BSA. In other words, the prior art transport medium was deficient at least in one criterion, i.e., in not having a mucolytic agent which is an absolute necessity for the formulation of the transport medium in accordance with the present invention.

Furthermore, in Albaugh et al's system the stool sample after collection had to be kept cool in ice while being transported to the laboratory for further processing and could be preserved in ice only for about an hour. In contrast, the system of the present invention does not require cooling in ice and achieves desirable results at the normal ambient temperature which is an important feature of the present invention. Moreover, Albaugh et al state that although their cells had a viability in excess of 80%, the presence of phagocytes and other cells could not be ruled out. Indeed, Figs. 3 and 4 of Iyengar et al clearly show that the cellular preparations obtained were considerably impure. Thus, the procedures of Iyengar et al and Albaugh et al may provide viable colonocytes, but they are inadequate for the purpose of obtaining substantially pure colonocytes. In summary, heretofore it has not been possible to obtain a viable, biologically substantially pure sample of a particular cell type isolated at normal ambient atmospheric conditions from a small fecal mass.

WO 00/63358

PCT/US00/08799

4

SUMMARY OF INVENTION

It is, therefore, an object of the present invention to provide viable, biologically substantially pure exfoliated fecal colonocytes isolated at normal ambient temperature.

5 It is a further object of the present invention to provide viable, isolated, immunocoprocytes.

It is an additional object of the present invention to provide viable, isolated, inflammatory cells of lymphoid or non-lymphoid lineage.

10 It is a further object of the present invention to provide a transport medium and a dispersion or suspension medium for isolating viable exfoliated fecal colonocytes at normal ambient temperature.

A further object of the present invention is to provide a noninvasive method for detecting gastrointestinal disorders including colorectal cancer, employing the exfoliated fecal colonocytes isolated at normal ambient temperature in accordance with the teachings of the present invention.

15 Various other objects and advantages of the present invention will become evident from the detailed description of the invention and from the brief description of the drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20 The foregoing and other objects, aspects and advantages will be better understood with reference to the drawings in which:

Fig. 1 is a schematic presentation of the process of isolating viable exfoliated colonocytes at normal ambient temperature from a small sample of fecal material;

25 Fig. 2 presents histogram data from flow cytometry of isolated colonocytes in accordance with the present invention showing a purity greater than 96%; and

Fig. 3 is a diagrammatic representation of classes of colonic cells identified based on their immunoglobulin characteristics.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Various objects and advantages of the present invention are achieved by obtaining viable, homogeneous colonocytes of desired cell types isolated from a fecal sample at normal atmospheric conditions and ambient temperature.

5 It should be understood that unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the methods and materials described herein are preferred. Unless  
10 mentioned otherwise, the techniques employed or contemplated herein are standard methodologies well known to one of ordinary skill in the art. The materials, methods and examples are only exemplary and not limiting.

The term "substantially pure" as used herein means that the product is homogeneous or uniformly of a single type with greater than 96% purity, usually 98%-  
15 99% pure, as determined by flow cytometry or by the procedures described herein and is without material interference or contamination of other types of cells.

Heretofore, the problem encountered with exfoliated colonocytes in fecal matter was that these cells got destroyed as soon as exposed to the normal atmospheric conditions due to the presence in the fecal matter of proteolytic enzymes, microflora, mucus and the like. Hence, a system had to be devised to inhibit the action of all those  
20 factors or elements which prevented the isolation of intact, living colonocytes at normal ambient temperature from fecal matter. This is achieved by the present invention by formulating two different media: (1) a transport medium, and (2) a dispersion or suspension medium. The transport medium is made of physiological saline solution containing an enzyme inactivating amount of an enzyme trapping or protease  
25 sequestering agent, a sufficient amount of a bacteriocidal or bacteriostatic agent to inhibit bacterial activity, and a mucolytic amount of an agent that destroys mucus contained in fecal matter.

WO 00/63358

PCT/US00/08799

6

Various enzyme trapping, bacteriostatic and mucolytic agents will be suggested to one of ordinary skill in the art and any suitable agents that do not interfere with the objects of the present invention could be used in the formulation of the transport medium in accordance with the teachings of the present invention.

5 Preferred among enzyme trapping agents are proteolytic activity inhibitors and animal proteins. Examples of suitable proteolytic activity inhibitors include PMSF, pepstatin A, bestatin and chymostatin. The reagents that inhibit or deactivate enzymatic activity include formaldehyde, metal chelating agents, heavy metal ions, certain amino acids such as tyrosine and phenylalanine, and high concentrations of zinc or inorganic phosphates. Suitable among animal proteins are those that are non-immune, water soluble compounds including serum albumins of rabbit (RSA), goat (GSA), sheep (SHA), horse (ESA), bovine (BSA) and human (HSA) origin. Certain polyamino acids that do not interfere with a later assay procedure could also be used as enzyme deactivating agents. Suitable examples of such polyamino acids are poly-L-lysine, poly-L-proline, poly-L-tyrosine and the like.

Suitable examples of bacteriostatic agents are sodium azide, sodium benzoate, antibiotics (such as penicillin, streptomycin, amphotericin B, gentamicin, polymyxin B and the Like), glycyrrhizic acid, glycyrrhetinic acid ( $\alpha$  &  $\beta$ ), suitable derivatives thereof, and the like. A preferred bacteriocidal agent is Thimerosal (Sigma Chemical Co.) and a preferred bacteriostatic agent is glycyrrhizic acid.

20 Suitable examples of mucolytic agents are guaifenesin, guaiacol, potassium iodide,  $\beta$ -mercaptoethanol, dithiothreitol, capsaicin, glycyrrhizin and the like. A preferred mucolytic agent is guaifenesin (Sigma Chemical Co.).

Puck's Saline G is a preferred source of physiological saline solution.

25 A preferred transport medium is prepared as follows:

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| Puck's Saline G    | 500 ml         |
| Sodium Bicarbonate | 350 to 500 mgs |
| BSA                | 2.5 to 15 gms  |
| Guaifenesin        | 2.5 to 5 gms   |

WO 00/63358

PCT/US00/08799

7

Glycyrrhizic acid                      2 to 4 gms

The dispersion or suspension medium differs from the transport medium with respect to bacteriocidal/ bacteriostatic agent, e.g., glycyrrhizic acid, which is omitted when preparing the dispersion or suspension medium.

PROCEDURE FOR ISOLATING SUBSTANTIALLY PURE COLONOCYTES AT NORMAL AMBIENT TEMPERATURE:

Referring now to Fig. 1, a small stool sample 10 (about 0.5 -1.0 gm) is placed into a tube 11 containing a transport medium and a few glass beads 12, after which the tube is closed with a stopper. The stool sample 10 is then thoroughly dispersed in medium 12, for example by vortexing, after which the contents of tube 11 are filtered through a mesh screen (about 300  $\mu$ m pore size) into a new tube 13 (a 50 ml polypropylene or similar conical centrifuge tube) and underlaid with a heavy medium 14 having a density in the range of about 1.033 to about 1.25 and centrifuged at about 200 X g for about 10 minutes in a table top centrifuge with the brakes off.

The colonic cells accumulate in the heavy cushion and at the bottom of the tube as a pellet, and are recovered by sucking out with a plastic transfer pipette 15 after removing a band of lighter cells (minor component) 17 at the interface between the heavy medium 14 and the lighter suspension above 18. The cells recovered from the heavy medium and pellet are placed in a new 50 ml centrifuge tube 19 and diluted with about 40 ml of the suspension medium 20. The suspension of cells thus obtained is then centrifuged at about 900 X g for about 10 minutes after which the clear supernatant is discarded and the cell pellet 21 remaining at the bottom of the centrifuge tube is resuspended in phosphate buffered saline (PBS) containing about 1% bovine serum albumin (BSA). The band of lighter cells (minor component) 17 is placed in a second fresh 50 ml centrifuge tube 22 and washed as described for the cells from the heavy cushion and pellet. The cell pellet 21, comprising substantially biologically pure isolated

exfoliated viable colonocytes, is recovered and dispersed in a suitable salt solution (e.g., PBS) and filtered through a 45  $\mu$ m screen filter.

For determining the viability of the isolated colonocytes, a portion of the pellet 21 is dispersed in PBS/BSA medium 26 (1 ml/gm of stool sample). Then, a 1/10  
5 dilution of the suspension is counted in a hemocytometer in the presence of trypan blue. As is well known to a skilled artisan, the cells that do not take up trypan blue are considered to be viable and counted to determine the cell yield.

The tube or vial may be made of any suitable material including plastics, polystyrene, polypropylene and the like.

10 It is important to note that an inventive aspect of the present invention is the formulation of a transport medium and a dispersion or suspension medium which together allow the exfoliated colonocytes found in the fecal sample to remain viable at the normal ambient temperature during and after the isolation procedure. In other words, the invention enables isolation of intact, living exfoliated colonocytes from a  
15 small sample (e.g. 0.5 – 1.0 gm) of fecal material without chilling or freezing, at normal ambient temperature ranging from about 22° C to about 25° C during the entire isolation process. About 8 to 10 million living colonic cells can be obtained from one gram of the stool sample in accordance with the techniques of the present invention.

When maintained at the normal ambient temperature in the suspension medium  
20 of the present invention, the isolated colonocytes can be viably preserved for extended periods. Table 1 shows cell yields and viability as a function of storage time and temperature conditions.

Of course, alternate techniques could be substituted in the isolation steps. For example, the suspension of the stool sample in the transport medium 12 may be filtered  
25 through screens (149 micrometers, 105 micrometers and 52 micrometers). Also, the pellet in the dispersion medium can be gently overlaid on higher density Percoll gradients and centrifuged so that the cells can be recovered from the top of the gradient. Such modifications are common in the art and are included within the purview of this invention.

WO 00/63358

PCT/US00/08799

9

It is understood, of course, that whenever appropriate a reference or base line would be usually established using colonocytes obtained from disease-free subjects so that a comparative, diagnostic or evaluation study could be made with colonocytes obtained from a subject suspected of a disease or pathological condition.

5 It was discovered that an important and advantageous feature of the non-invasively obtained colonocytes of the present invention is that these isolated colonic cells carry markers or transformations characteristic of the pathology of the GI tract and, therefore, they can serve as diagnostic and predictor indicators of the GI tract pathology.

#### 10 IMMUNOCOPROCYTES

Since the colonic cells isolated from stools were discovered to be true representative of the anatomical and pathophysiological condition of the entire colon, among other utilities these cells also allow monitoring of mucosal immunity. The mucosa of the GI tract is a major site for the elaboration of immunological defenses mediated by immunoglobulins. It was discovered that a functionally distinctive group of cells, designated herein as immunocoprocytes, can be identified and isolated from the exfoliated cells obtained by the methodologies of the present invention. Immunocoprocytes are unique in expressing a specific immunoglobulin designated herein as IgC which is defined as a chimeric immunoglobulin that is recognized by antibodies both to IgG and IgA. Furthermore, immunocoprocytes are clonal, antigen-specific and characterized by the presence of Fc receptors and immunoglobulin A (Ig A).

25 Given the affinity of immunocoprocytes to IgG and IgA antibodies, several approaches to isolate the immunocoprocytes would be suggested to one of ordinary skill in the art. For example, selective isolation of immunocoprocytes from a mixture of cells obtained from stools, colonic purges or washings, or from surgical and autopsy specimens can be achieved using anti-IgG or a specific anti-IgC monoclonal antibody. The indirect immune adherence approach utilizes a panning technique to allow these cells to adhere to petri dishes coated with anti-IgG or specific anti-IgC antibodies. The

WO 00/63358

PCT/US00/08799

10

5 use of anti-IgG antibody as a capture agent for immunocoprocytes is based on the discovery in accordance with the present invention that pure IgG expressing mono-specific (viz., lacking co-expression of IgA) colonic cells are not detected under normal conditions. Preparation of desired types of monoclonal antibodies are well known to one of ordinary skill in the art and are routinely obtained.

10 Another approach to obtaining substantially pure immunocoprocytes is the use of fluorescence-activated cell sorting (FACS) technique employing fluorochrome-conjugated anti-IgG or Anti-IgC. In one embodiment, colonic cells are incubated with FITC (fluorescein isothiocyanate) labeled IgG, the excess reagent is washed off and the fluorescently-tagged immunocoprocytes are sorted in a fluorescence-activated cell sorter.

15 In another embodiment, monoclonal antibodies to IgG or IgC is covalently or non-covalently attached to a solid matrix, such as agarose beads, glass beads, polystyrene beads, hollow fiber, magnetic beads, plastic tissue culture dishes and the like well known to a skilled artisan. Cells that adhere to the antibody coated support are separated from the cell suspension by simply separating the matrix from the suspension by mechanical, magnetic or any other suitable means. As it would be known to one of ordinary skill in the art, the immunocoprocytes can also be bound to the surface of tissue culture flasks coated with anti-IgG or anti-IgC through a linker and after incubating the  
20 colonic cell suspension in the flasks, unbound non-immunocoprocytes are decanted off. Bound immunocoprocytes are then recovered by scraping or by appropriate enzymatic cleavage of the linker. Linkers bound to bead matrices (e.g., sepharose) are commercially available (e.g. Pharmacia).

25 Two-color immunofluorescent flow cytometry is used to determine the number or population of the immunocoprocytes. Colonocytes are incubated with anti-IgG FITC (green fluorescence) and anti-IgA PE (phycoerythrin, red fluorescence). After washing the cells with a buffer to remove the excess antibodies, the cells are then analyzed in a flow cytometer to count the cells with single fluorescence (green or red) and those cells with double fluorescence (both green and red). Cells with double fluorescence are the

WO 00/63358

PCT/US00/08799

11

chimeric IgC immunocoprocytes, while cells with the red fluorescence are IgA secreting colonic epithelial cells. In most colonic preparations from normal subjects, there is no measurable number of cells recognizing only anti-IgG FITC. In other words, colonocytes bearing only IgG are rare and may be associated with abnormal mucosal or systemic immune dysfunction when they are present.

Analyses of immunofluorescently labeled cells by flow cytometry have revealed the existence of at least three types of colonocytes. To distinguish the Fc receptor of immunocoprocytes from other Fc receptors, the Fc receptor of immunocoprocytes has been designated herein as CFc receptor. Table 2 shows some representative normal distribution of IgC, CFc and IgA found in these cells. A deviation from the normal values would indicate a disease process involving the immune system. Figure 3 is a diagrammatic representation of at least three types of colonocytes generally detected: "A" shows immunocoprocytes with several unique chimeric immunoglobulin IgC represented by two antibody binding sites on each molecule 2 and several CFc receptors 3. "B" shows colonocytes similar to "A", but with several IgA immunoglobulin molecules 5 along with several CFc receptors 3. "C" shows colonocytes similar to "A" and "B", but with no immunoglobulin and only CFc receptors.

Immunocoprocytes, IgA bearing colonocytes and CFC receptor bearing colonocytes described above have distinct roles in immune surveillance of the GI tract and in maintaining systemic humoral immunity of the total organism. These cells perform vital functions: (i) maintaining a balance in the colonization of the colon by microflora; (ii) they are clonal and contain a population of pluripotent cells each one recognizing a single antigen, soluble or particulate, of dietary or biological origin; (iii) they may act as antigen presenting cells to gut-associated lymphoid tissue; (iv) they can be sentinels for detecting invasion by pathogens (e.g., rotavirus, shigella, polio, intestinal parasites, mycobacteria and the like); and (v) their absence can signify a state of immunologic anergy of iatrogenic origin or congenital immunoglobulin deficiencies. Because these colonocytes including the immunocoprocytes, are antigen-specific, they can be immortalized by transformation with carcinogens, oncogene DNA, EBV, SV-40

and the like, to produce antibody-secreting cell lines specific for the selected antigen by hybridoma technology well known to one of ordinary skill in the art.

The following examples illustrate specific utilities of the identified or isolated colonocytes of the present invention. These examples are only illustrative and not  
5 limiting in any manner.

#### EXAMPLE - 1

Colonic cells isolated from normal subjects by the procedures described in the present invention are substantially free of any inflammatory cells. In inflammatory  
10 bowel disease (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, a significant number of inflammatory cells are mobilized to the surface of the colonic mucosa and are exfoliated along with cells of the epithelium.

One to two gram aliquots of stool collected from IBD patients, suspended in the transport medium are homogenized in a Stomacher with about 150 ml of suspension  
15 medium. Aliquots (30 ml) of the suspension are underlaid with 10 ml of Histopaque 1077 (density of 1.077) and centrifuged at room temperature at 200 X g for 30 minutes with the brakes off. The interface between the aqueous suspension and the Histopaque 1077 is recovered and washed three times by repeated centrifugation. In this process, inflammatory cells are recovered in addition to the normal complement of colonic cells.

The inflammatory cells in the mixture of cells are tagged with anti-CD45/FITC  
20 (green fluorescence) and the positive cells are counted in a flow cytometer. CD45 (cluster of differentiation) also known as leucocyte common antigen, is a lineage-specific marker for lymphoid cells and are present on inflammatory cells. In addition a second marker of inflammation, anti-COX-2/PE (red fluorescence) may also be  
25 employed to detect inflammatory cells. Since colonic epithelial cells are negative for CD45, the number of CD45 positive cells in an isolate is a direct measure of the severity of the inflammatory process in IBD. Monitoring of cells positive for both CD45 and COX-2 is an extremely useful non-invasive procedure for following the progression of the disease during the course of treatment.

EXAMPLE - 2

## ASSESSMENT OF STATUS OF MUCOSAL IMMUNITY:

5 Cells are obtained as described above from subjects who are suspected of having  
an immunocompromised gut. Aliquots of cells (about 110K) are suspended in PBS  
buffer and incubated at 37° C for about 45 minutes with one of the following  
combinations of fluorescently labeled antibodies: anti-IgG FITC (green) anti-IgA PE  
(red), and anti-IgC FITC + anti IgA PE. A parallel tube containing cells with an isotype  
10 control antibody is also maintained to account for nonspecific binding antibody. Direct  
immunofluorescence assays are conducted to measure the binding of antibodies to  
different sets of colonic cells. A significant decrease in number of immunoprococytes  
(expressing IgC) or IgA bearing cells is of diagnostic significance for immune  
deficiency. Table 2 lists values obtained for normal subjects. Any deviation from the  
15 normal values would be indicative of immune dysfunction. It should be noted that direct  
and indirect immunofluorescence assays can be similarly carried out for the assessment  
of a repertoire of macromolecules, such as cytokines, signal transduction intermediates,  
growth factors and the like.

EXAMPLE - 3

## 20 EXPRESSION OF COLON CANCER-ASSOCIATED BIOMARKERS:

Cells are obtained as described above from patients suspected of having colon  
cancer or precursors of colon cancer (polyps). In one embodiment of this technique,  
cells are subjected to indirect immunofluorescence assay for the expression of CD44 or  
its molecular variants, e.g., CD44V3, CD44V6 and CD44V10; the presence of CD44 or  
25 its molecular variants being diagnostic of colon cancer.

EXAMPLE - 4

As a source of somatic cells obtainable non-invasively, the colonocytes of the  
present invention are representative of the phenotype as well as genotype. Thus, they

are useful in DNA typing and examination of biological macromolecules (such as DNA, RNA, protein and the like) for determining responses, for example, to pharmacologic and environmental agents and assessment of multi-drug resistance. These isolated cells are also useful in various other ways easily suggested to a skilled artisan.

5 It should be apparent that given the guidance, illustrations and examples provided herein, various alternate embodiments, modifications or manipulations of the present invention would be suggested to a skilled artisan and these are included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims.

WO 00/63358

PCT/US00/08799

15

Table 1. Effect of Storage on Cell Yields

| Storage Time | Conditions | Cell Yield<br>% | Viability<br>% |
|--------------|------------|-----------------|----------------|
| 1 - 6 Hrs    | Ambient    | 100             | 85+            |
| 3 days       | Ambient    | 135             | 85+            |
| 3 days       | 4°C        | 70.2            | 85+            |
| 8 days       | Ambient    | 97.5            | 80+            |
| 8 days       | 4°C        | 142             | 75+            |

Table 2. Distribution of IgC, IgA and CFc bearing colonic cells

| Subject Code | IgC  | CFc Receptor | IgA  |
|--------------|------|--------------|------|
| 308-S1       | 18.5 | 90.3         | 46.5 |
| 308-S2       | 20.8 | 87.8         | 42.0 |
| 318-S1       | 12.2 | 86.9         | 47.7 |
| 318-S2       | 26.5 | 91.2         | 37.7 |
| 319-S1       | 27.5 | 88.9         | 44.0 |
| 319-S2       | 32.9 | 90.9         | 30.0 |
| 325-S1       | 20.2 | 88.9         | 40.0 |
| 325-S2       | 16.8 | 82.2         | 24.0 |

Note: The numbers represent the % of total cells that carry the corresponding molecule. These results were obtained by flow cytometric analysis of immunofluorescently labelled colonic cells isolated by the technology described in this application.

CLAIMS

Having thus described our invention, what we claim as new and desire to secure by Letters Patent is as follows:

- 1           1.   Viable, biologically substantially pure exfoliated fecal colonocytes  
2           isolated at normal ambient temperature.
  
- 1           2.   The colonocytes of claim 1 bearing a marker  
2           indicative of specific gastrointestinal condition.
  
- 1           3.   The colonocytes of claim 2 bearing a marker indicative of neoplastic  
2           transformation.
  
- 1           4.   The colonocytes of claim 2 bearing a marker indicative of immune  
2           dysfunction.
  
- 1           5.   The colonocytes of claim 2 showing abnormality indicative of non-  
2           neoplastic gastrointestinal pathology.
  
- 1           6.   The colonocytes of claim 1 being epithelial or nonepithelial cells of  
2           lymphoid origin.
  
- 1           7.   The colonocytes of claim 1 expressing a chimeric immunoglobulin  
2           IgC.
  
- 1           8.   The colonocytes of claim 1 expressing only IgA and CFC.
  
- 1           9.   The colonocytes of claim 1 expressing only CFC.

- 1 10. A transport medium for collecting a fecal sample, comprising:  
2 (a) a sufficient amount of an agent to sequester  
3 proteases present in fecal matter;  
4 (b) a sufficient amount of a mucolytic agent to destroy mucus  
5 present in fecal matter; and  
6 (c) a sufficient amount of a bacteriocidal agent to inhibit bacterial  
7 activity in fecal matter.
- 1 11. The transport medium of claim 10, wherein said agent for sequestering  
2 proteases is selected from the group consisting of plasma proteins, gel  
3 forming polymers and synthetic resins.
- 1 12. The transport medium of claim 11, wherein said plasma proteins are  
2 bovine serum albumin, egg albumin or human serum albumin.
- 1 13. The transport medium of claim 12, wherein the mucolytic agent is  
2 selected from the group consisting of N-acetyl cysteine,  $\beta$ -  
3 mercaptoethanol, capsaicin, dithiothreitol, guaiacol and guaifenesin.
- 1 14. The transport medium of claim 13, wherein the bacteriocidal agent is  
2 selected from the group consisting of thimerosal, antibiotics, sodium  
3 azide, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid ( $\alpha$  &  $\beta$ ).
- 1 15. The transport medium of claim 14 being a solution, comprising:  
2 sodium bicarbonate: 350-500 mg;  
3 bovine serum albumin: 2.5-15 gm;  
4 Guaifenesin 2.5-5.0 gms;  
5 Glycyrrhizic acid 2.0-4.0 gms; and  
6 Puck's Saline G: 500 ml.

- 1 16. The transport medium of claim 15 being devoid of glycyrrhizic acid,  
2 thereby said transport medium transforming into a dispersion or  
3 suspension medium.
- 1 17. A method for isolating biologically substantially pure exfoliated fecal  
2 colonocytes at normal ambient temperature, comprising the steps of:  
3 (a) collecting a fecal sample in a transport medium maintained  
4 at normal ambient temperature;  
5 (b) dispersing the fecal sample in said transport medium diluted  
6 with a suspension medium;  
7 (c) sedimenting cells present in the diluted transport medium of  
8 step (b) to isolate the cells from impurities by layering the  
9 cell suspension over a medium of heavier density;  
10 (d) subjecting the cells in step (c) to an influence resulting in  
11 the formation of a cellular band at a boundary with said  
12 heavier medium and forming cellular fractions within the  
13 heavier medium and pellet; then  
14 (e) recovering biologically substantially pure colonocytes from  
15 said cellular band and from the heavier medium and the  
16 pellet.
- 1 18. The method of claim 17, wherein said heavier medium is of density  
2 ranging from about 1.033 to about 1.25.
- 1 19. The method of claim 18, wherein said heavier medium is of density 1.25.
- 1 20. A method for detecting colorectal cancer, comprising the steps of:  
2 (a) obtaining biologically substantially pure colonocytes; then

- 3 (b) reacting said colonocytes with a reagent to detect the  
4 presence of a marker determinative of cancer, occurrence of  
5 a positive reaction of said colonocytes with said reagent  
6 being indicative of the presence of cancer.
- 1 21. The method of claim 20, wherein said reagent is fluorescently labeled  
2 antibodies or plant lectins that generate a colored product.
- 1 22. A method for determining mucosal immunity of GI tract, comprising the  
2 step of comparing the number of immunocoprocytes recovered from a  
3 subject whose GI tract mucosal immunity is to be determined, with the  
4 number of immunocoprocytes recovered from a normal subject, a  
5 statistically significant deviation from normal value being indicative of  
6 the level of immune dysfunction.
- 1 23. A method for diagnosing GI tract pathology, comprising the step of  
2 determining the presence of inflammatory cells in a stool sample of a  
3 subject suspected of GI tract pathology, the presence of inflammatory  
4 cells being indicative of GI tract pathology.
- 1 24. The method of claim 23, wherein the presence of inflammatory cells is  
2 determined by reacting the cells with antibodies to CD45 or COX-2, the  
3 cells that bind with said antibodies being inflammatory cells.
- 1 25. A method of producing antigen-specific monoclonal antibodies,  
2 comprising the step of employing antigen-specific immunocoprocytes as a  
3 clone in a standard hybridoma technique and recovering antigenspecific  
4 monoclonal antibodies.

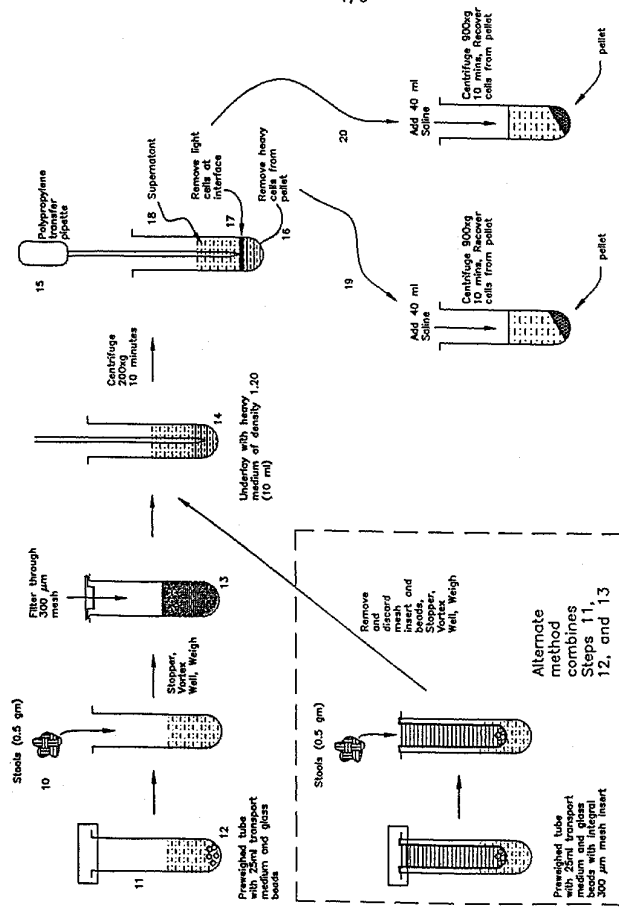
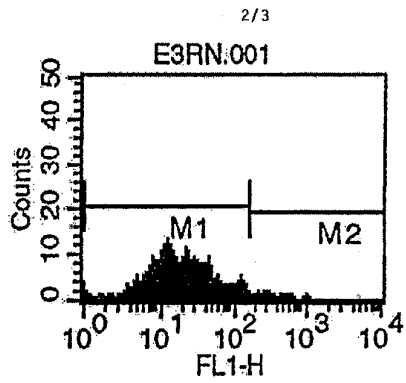


Fig. 1 Schematic representation of the steps in the isolation of viable, substantially pure colonocytes.

WO 00/63358

PCT/US00/08799

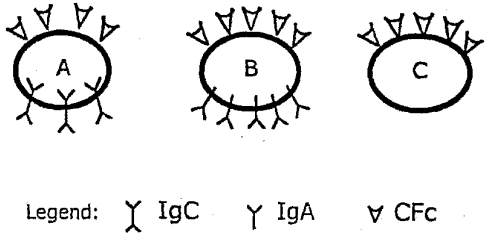


Histogram Statistics

File: E3RN.001                      Log Data Units: Linear Values  
Sample ID: colonic cells            Patient ID:  
Tube:                                    Panel:  
Acquisition Date: 8-Dec-98        Gate: G3  
Gated Events: 1469                  Total Events: 10000  
X Parameter: FL1-H (Log)

| Marker | Left | Right | Events | % Gated | % Total | Mean   | Geo Mean | CV     | Median | Peak Ch |
|--------|------|-------|--------|---------|---------|--------|----------|--------|--------|---------|
| All    | 1    | 9910  | 1469   | 100.00  | 14.69   | 38.30  | 20.00    | 179.56 | 18.11  | 11      |
| M1     | 1    | 165   | 1418   | 96.53   | 14.18   | 26.09  | 18.15    | 97.70  | 17.00  | 11      |
| M2     | 165  | 9910  | 52     | 3.54    | 0.52    | 317.38 | 293.10   | 45.83  | 278.81 | 198     |

Fig. 2 Histogram data from flow cytometry of isolated colonocytes in accordance with the procedure of the present invention showing a purity of 96.5%. The numbers in the abscissa represent the size distribution of the cells. The numbers in the ordinate represent cell counts. M1 represents the single peak detected by the flow cytometer and M2 indicates the residual impurity.



**Fig. 3 Diagrammatic representation of classes of immunocoprocytes identified on the basis of their immunoglobulin characteristics. A: Immunocoprocytes coexpressing chimeric IgC and Cfc receptors. B: Immunocoprocytes coexpressing IgA and Cfc receptors. C: Immunocoprocytes expressing only Cfc receptors.**

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年6月16日(2001.6.16)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

糞便物から通常周囲温度で単離された生存し無傷の剥脱大腸細胞であって、前記大腸細胞は、均一で、96%以上純粋であり、糞便物1gあたり、8百万個以上の大腸細胞の収率である、前記大腸細胞。

## 【請求項6】

上皮または非上皮細胞である、請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項2】

特定な胃腸容態を示すマーカーを有する、請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項3】

新生物性転化を示すマーカーを有する、請求項2に記載の大腸細胞。

## 【請求項4】

免疫機能不全を示すマーカーを有する、請求項2に記載の大腸細胞。

## 【請求項5】

非新生物胃腸病態を示す異常を示す、請求項2に記載の大腸細胞。

## 【請求項6】

上皮または非上皮細胞である、請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項7】

キメラ免疫グロブリンIgCを発現している請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項8】

IgAおよびCfcのみを発現している請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項9】

Cfcのみを発現している請求項1に記載の大腸細胞。

## 【請求項10】

糞便サンプルを集めるための輸送培地であって、

(a) 糞便物中に存在するプロテアーゼを封鎖するに十分な量の物質；

(b) 糞便物中に存在する粘液を破壊するに十分な量の粘液溶解剤；および

(c) 糞便物中の細菌活性を阻害するに十分な量の殺細菌剤を含む、前記輸送培地。

## 【請求項11】

プロテアーゼを封鎖するための前記物質は、血漿タンパク質、ゲル形成ポリマーおよび合成レジンからなる群から選択する、請求項10に記載の輸送培地。

## 【請求項12】

前記血漿タンパク質は、ウシ血清アルブミン、卵アルブミンまたはヒト血清アルブミンである、請求項11に記載の輸送培地。

## 【請求項13】

粘液溶解剤は、N-アセチルシステイン、 $\alpha$ -メルカプトエタノール、カプサイシン、ジチオトレイトール、グアイアコールおよびグアイフェネシンからなる群から選択する、請求項12に記載の輸送培地。

## 【請求項14】

殺細菌剤は、チメロサル、抗生物質、アジ化ナトリウム、グリシルリジン酸およびグリシルレチン酸( )からなる群から選択する、請求項13に記載の輸送培地。

## 【請求項15】

重炭酸ナトリウム：350～500mg；ウシ血清アルブミン：2.5～15g；グアイ

フェネシン：2.5～5.0 g；グリシルリジン酸：2.0～4.0 g；およびP u c k食塩水G：500 mlを含む溶液である、請求項14に記載の輸送培地。

【請求項16】

グリシルリジン酸を欠き、それによって前記輸送培地は分散または懸濁液培地に変換される、請求項15に記載の輸送培地。

【請求項17】

通常周囲温度で、生物学的に実質的に純粋な剥脱糞便大腸細胞を単離する方法であって、

- (a) 通常周囲温度で維持した輸送培地中に糞便サンプルを集め；
- (b) 懸濁培地で希釈した前記輸送培地に、糞便サンプルを分散し；
- (c) (b)段階の希釈輸送培地に存在する細胞を沈降させて、より重い密度の培地上に、細胞懸濁液を重層することにより、不純物から細胞を単離し；
- (d) (c)段階の細胞を、前記のより重い培地との境界で細胞のバンドが形成され、より重い培地およびペレット内に細胞画分が形成される影響にかけ；次いで
- (e) 前記細胞バンドから、および、より重い培地およびペレットから、生物学的に実質的に純粋な大腸細胞を回収する段階を含む、前記方法。

【請求項18】

前記のより重い培地は、約1.033から約1.25の範囲の密度である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記のより重い培地の密度は1.25である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

大腸直腸癌を検出する方法であって、

- (a) 生物学的に実質的に純粋な大腸細胞を得；次いで
- (b) 前記大腸細胞を、癌を決定するマーカーの存在を検出する試薬と反応させる段階を含み、ここで前記大腸細胞と前記試薬の陽性反応の発生は癌の存在を示す、前記方法。

【請求項21】

前記試薬は、蛍光標識抗体または発色産物を産生する植物レクチンである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

胃腸管の粘膜性免疫を決定する方法であって、胃腸管粘膜免疫を決定したい被検者から回収した糞便中免疫細胞数を、正常被検者から回収した糞便中免疫細胞数と比較する段階を含み、正常値からの統計学的に有意な逸脱は免疫機能不全レベルを示す、前記方法。

【請求項23】

胃腸管病態を診断する方法であって、胃腸管病態が疑われる被検者の糞便サンプル中の免疫細胞の存在を決定する段階を含み、免疫細胞の存在は胃腸管病態を示す、前記方法。

【請求項24】

免疫細胞の存在は、細胞を、CD45またはCOX-2に対する抗体と反応させることにより決定し、前記抗体と結合する細胞は免疫細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

抗原特異的モノクローナル抗体を産生する方法であって、抗原特異的糞便中免疫細胞を、標準的なハイブリドーマ技法においてクローンとして使用し、抗原特異的モノクローナル抗体を回収する段階を含む、前記方法。

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International application No.<br>PCT/US00/08799                                      |
|---|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : C12N 15/00, 5/00, 5/02<br>US CL : 435/172.2, 325, 803, 804<br>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>U.S. : 435/172.2, 325, 803, 804<br><br>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)<br>AGRICOLA, BIOSIS, BIOTECHABS, BIOTECHDS, CANCERLIT, CAPLUS, CONFSCI, DDFU, DRUGU, EMBASE, LIFESCI, MEDLINE, SCISEARCH, TOXLIT<br>search terms: colonocytes, isolate, purify, fecal, feces   |   |  |
| <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   | DUTTA et al. Noninvasive detection of Colorectal Cancer by Molecular Tools: Coming of Age. Gastroenterology. June 1998, Vol. 114, No. 6, pages 1333-1335, see especially page 1333, col. 1, and page 1334 col. 1.   | 1, 2-6, 20-21  |
| X   | ALBAUGH et al. Isolation of Exfoliated Colonic Epithelial Cells, A Novel, Non-Invasive Approach to the Study of Cellular Markers. Int. J. Cancer. 1992, Vol. 52, pages 347-350, see especially abstract and Materials and Methods, page 347, cols. 1 and 2. | 1-6, 17-21   |
| <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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document 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>"A" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>17 JULY 2000   |   | Date of mailing of the international search report<br>15 AUG 2000                    |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20231<br>Facsimile No. (703) 305-3230   |   | Authorized officer<br>SUSAN UNGAR <i>Susan Ungar</i><br>Telephone No. (703) 508-0196 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                           |   | International application No.<br>PCT/US00/08799 |
|---|---|---|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                           |
| X   | IYENGAR et al. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. FASEB J. October 1991, Vol. 5, pages 2856-2859, see especially Abstract and Materials and Methods section, page 2856, col. 2 and page 2857, col. 1. | 1, 17-19  |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  | International application No.<br>PCT/US00/08799  |
|--|--|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>   |  |
| 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.:<br>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:   |  |
| 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:<br>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.:<br>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).  |  |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>   |  |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  |  |
| Please See Extra Sheet.  |  |
| 1. <input 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 checked="" 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.:<br>1-9 and 17-21 |  |
| 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/US00/08799**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING**

This ISA found multiple inventions as follows:

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.

- Group I, claim(s) 1-9 and 17-21, drawn to a method of making and using fecal colonyocytes.
- Group II, claim(s) 10-16, drawn to a transport medium.
- Group III, claim(s) 22, drawn to a method for determining mucosal immunity.
- Group IV, claim(s) 23-24, drawn to a method of diagnosing GI tract pathology.
- Group V, claim(s) 25, drawn to a method of producing antibodies.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species are as follows:

- Group Ia drawn to colonyocytes expressing chimeric IgC, claim 7.
- Group Ib drawn to colonyocytes expressing only IgA and CFC, claim 8
- Group Ic drawn to colonyocytes expressing only CFC, claim 9
- Group IIa drawn to an agent for sequestering proteases, plasma proteins, claim 11.
- Group IIb drawn to an agent for sequestering proteases, gel forming polymers, claim 11.
- Group IIc drawn to an agent for sequestering proteases, synthetic resins, claim 11.
- Group IId drawn to a mucolytic agent, N-acetyl cysteine, claim 13.
- Group IIe drawn to a mucolytic agent, beta mercaptoethanol, claim 13.
- Group IIIf drawn to a mucolytic agent, capsaicin, claim 13.
- Group IIg drawn to a mucolytic agent, dithiothreitol, claim 13.
- Group IIh drawn to a mucolytic agent, guaiacol, claim 13.
- Group IIi drawn to a mucolytic agent, guaifenesin, claim 13.
- Group IIj drawn to a bacteriocidal agent, thimerosal, claim 14.
- Group IIk drawn to a bacteriocidal agent, antibiotics, claim 14.
- Group IIl drawn to a bacteriocidal agent, sodium azide, claim 14.
- Group IIm drawn to a bacteriocidal agent, glycyrrhizic acid, claim 14.

The inventions listed as Groups I-VI 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:

An application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. If multiple products, processes of manufacture or uses are claimed, the first invention of the category first mentioned in the claims of the application will be considered as the main invention in the claims, see PCT article 17(3) (a) and 1.476 (c), 37 C.F.R. 1.475(d). Group I will be the main invention. After that, all other products and methods will be broken out as separate groups (see 37 CFR 1.475(d)).

Group I is drawn to a product, a method of making that product and a method of using that product and therefore have unity of invention.  
Groups III-V are drawn to different methods of using said product.

The species listed above do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Each of the agents claimed are used in materially distinct methods which differ at least in objectives, method steps, reagents and/or dosages and/or schedules used, response variables, and criteria for success.

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| G 0 1 N 33/574            | G 0 1 N 33/574 | D          |
| G 0 1 N 33/577            | G 0 1 N 33/577 | B          |
| G 0 1 N 33/58             | G 0 1 N 33/58  | Z          |
|                           | C 1 2 N 15/00  | C          |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, 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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, 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

(72) 発明者 ナイール パドマナバン ピー

アメリカ合衆国、メリーランド州、エリコット シティ、ヘムロック コーン ウェイ 4 5 2 0

Fターム(参考) 2G045 AA25 BA13 BB03 BB19 BB41 CB01 CB04 DA44 FA01 FB03  
 FB12 GC22 HA06  
 4B024 AA12 BA44 GA04 HA15  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QR48 QR51 QR52 QR68 QR69 QS12  
 QS33 QX02  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 DA14  
 4B065 AA93X AB02 AC14 BB03 BB04 BB12 BB19 BB37 BD50 CA46

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 无创检测结肠直肠癌和其他胃肠道疾病   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004519202A</a>   | 公开(公告)日 | 2004-07-02 |
| 申请号            | JP2000612437  | 申请日     | 2000-04-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 娜曼鱼帕德玛纳坎珂   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 奈尔Padomanaban副本   |         |            |
| [标]发明人         | ナイールパドマナバンピー  |         |            |
| 发明人            | ナイールパドマナバンピー  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 A61B10/00 C07K16/00 C07K16/40 C12N1/04 C12N5/00 C12N5/02 C12N5/071 C12N5/09 C12N15/00 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68 C12N5/06   |         |            |
| FI分类号          | C12N5/00.E C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/574.B G01N33/574.D G01N33/577.B G01N33/58.Z C12N15/00.C  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB19 2G045/BB41 2G045/CB01 2G045/CB04 2G045/DA44 2G045/FA01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC22 2G045/HA06 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/GA04 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR52 4B063/QR68 4B063/QR69 4B063/QS12 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA93X 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BB03 4B065/BB04 4B065/BB12 4B065/BB19 4B065/BB37 4B065/BD50 4B065/CA46 |         |            |
| 代理人(译)         | 松原信行<br>中山健一  |         |            |
| 优先权            | 09/292358 1999-04-15 US<br>09/539080 2000-03-30 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

|       |     |    |      |     |
|-------|-----|----|------|-----|
| 摘要(译) | 8日間 | 周囲 | 97.5 | 80+ |
|       | 8日間 | 4℃ | 142  | 75+ |

描述了通常在环境温度下分离活的，生物学上实质上纯的去角质化粪便结肠细胞的方法。显示了表现出某些胃肠病症的粪便免疫细胞和炎性细胞以及检测结肠直肠癌的非侵入性方法。详细介绍了分离大肠细胞的运输和悬浮介质。

【表2】

IgC、IgAおよびCFcを有する大腸細胞の分布

| 被検者番号  | IgC  | CFc 受容体 | IgA  |
|--------|------|---------|------|
| 308-S1 | 18.5 | 90.3    | 46.5 |
| 308-S2 | 20.8 | 87.8    | 42.0 |
| 318-S1 | 12.2 | 86.9    | 47.7 |
| 318-S2 | 26.5 | 91.2    | 37.7 |
| 319-S1 | 27.5 | 88.9    | 44.0 |
| 319-S2 | 32.9 | 90.9    | 30.0 |
| 325-S1 | 20.2 | 88.9    | 40.0 |
| 325-S2 | 16.8 | 82.2    | 24.0 |

注記：数は、対応する分子を有する全細胞の%を示す。これらの結果は、本出願