

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5025724号
(P5025724)

(45) 発行日 平成24年9月12日 (2012.9.12)

(24) 登録日 平成24年6月29日 (2012.6.29)

(51) Int.Cl.	F 1	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	

請求項の数 5 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-506738 (P2009-506738)	(73) 特許権者	504397480
(86) (22) 出願日	平成19年4月18日 (2007.4.18)		ウェルスタット バイオロジクス コーポ レーション
(65) 公表番号	特表2009-534667 (P2009-534667A)		アメリカ合衆国 メリーランド 2087 8, ゲイサーズバーグ, クロッパー ロード 930
(43) 公表日	平成21年9月24日 (2009.9.24)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/066857		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02007/121465	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成19年10月25日 (2007.10.25)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成22年3月10日 (2010.3.10)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/745,016		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成18年4月18日 (2006.4.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環腫瘍性細胞からのタンパク質の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液試料中の癌細胞由来のタンパク質をアッセイする方法であって、該血液試料から該癌細胞を濃縮し、その後、該濃縮された癌細胞に対して、該濃縮された癌細胞由来の該タンパク質を検出できるイムノアッセイを行う工程を含み、

該タンパク質が上皮成長因子受容体であり、

該癌細胞は、以下：

(i) 該癌細胞に選択的に結合することができる免疫磁性ビーズに該血液を接触させること；

(i i) 遠心分離；

(i i i) 赤血球細胞の溶解；および

(i v) ろ過

からなる群より選択される技術を用いて濃縮されたものであり、

該イムノアッセイが、検出に電気化学発光を用い、そして血液 1 ミリリットルあたり 30 個の癌細胞から該タンパク質を定量可能に検出できるか、または 64 ピコグラムの該タンパク質を検出できることにより定義される感度を有し、そして

該イムノアッセイが、該血液試料中の該癌細胞に存在する該タンパク質の分子数に比例するシグナルを生じる、

方法。

【請求項 2】

血液試料中の癌細胞からタンパク質の発現を検出する方法であって、該血液試料から該癌細胞を単離し、その後、該単離された癌細胞から抽出物を作製し、その後、該抽出物に対して、該タンパク質を検出できるイムノアッセイを行う工程を含み、陽性のイムノアッセイの結果が該癌細胞中の該タンパク質の存在を示し、

該タンパク質が上皮成長因子受容体であり、

該癌細胞は、以下：

(i) 該癌細胞に選択的に結合することができる免疫磁性ビーズに該血液を接触させること；

(i i) 遠心分離；

(i i i) 赤血球細胞の溶解；および

(i v) ろ過

からなる群より選択される技術を用いて濃縮されたものであり、

該イムノアッセイが、検出に電気化学発光を用い；そして

該イムノアッセイが、血液 1 ミリリットルあたり 30 個の癌細胞から該タンパク質を検出できるか、または 64 ピコグラムの該タンパク質を検出できることにより定義される感度を有する、

方法。

【請求項 3】

前記イムノアッセイが、血液 1 ミリリットルあたり 10 個の癌細胞から前記タンパク質を検出できる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記イムノアッセイが、血液 1 ミリリットルあたり 3 個の癌細胞から前記タンパク質を検出できる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記イムノアッセイが、4 ピコグラムの前記タンパク質を検出できる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、個別化癌療法の分野における進歩を可能にする感度が高いイムノアッセイを得る、重要かついまだに対処されていない医療上の必要性を扱うものである。癌のための個別化医療の一般的な概念は、最近の総説の主題である（非特許文献 1；非特許文献 2；非特許文献 3）。癌のための個別化医療のアプローチは、療法の最善の方向を決定するために、患者の腫瘍中のタンパク質または遺伝子を特徴付けることである。例えば、タンパク質または mRNA レベルでのある遺伝子または遺伝子パターンの発現により、種々のクラスの抗癌剤に対する感受性または耐性を予測することができる。患者の腫瘍での発現に基づいて、療法について薬剤を選択し、またはその特定の患者における薬剤の使用を却下することができる。表 1 は、その過剰発現がある癌薬剤の耐性または感受性のいずれかに関連するタンパク質のいくつかを列挙するものである。

【0002】

表 1 . その過剰発現がある薬剤の耐性または感受性に関連するタンパク質。

【0003】

10

20

30

40

【表1】

タンパク質	タンパク質のクラス	種々の薬剤の耐性または感受性の予測
EGFR	チロシンキナーゼ活性を有する膜受容体	EGFRの過剰発現により、セツキシマブ、パニツムマブのような抗EGFR薬剤に対する応答が予測される
ERCC1	酵素(ヌクレオチド除去修復経路のメンバー)	ERCC1の過剰発現により、白金薬剤(例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン)に対する耐性が予測される [Reed(2005年; Clin Cancer Res11巻:6100~6102頁); Lordら(2002年, Clin Cancer Res8巻:2286~91頁); Metzgerら, 1998年, J Clin Oncol16巻:309~316頁; Shirotaら(2001年, J Clin Oncol19巻:4298~4304頁)]
リボヌクレオチド還元酵素サブユニットM1 (RRM1)	酵素	RRM1の過剰発現により、ゲムシタピンに対する耐性が予測される[Bergman AMら, 2005年 Clin Cancer Res65巻:9510~6頁]
チミジル酸合成酵素 (TS)	酵素	TSの過剰発現により、5-FUに対する耐性が予測される; TSの高発現により、ラルチレキセドへの応答がないことが予測される[Farrugiaら(2003年, Clin Cancer Res9巻:792~801頁)]
β -チューブリン(クラスIII)	構造	β -チューブリン(クラスIII)の過剰発現により、タキサンに対する耐性が予測される[Mozzettiら(2005年, Clin Cancer Res11巻:298~305頁)]; β -チューブリン(クラスIII)の過剰発現により、ピンカアルカロイドに対する耐性が予測される[Severら, 2005年, Clin Cancer Res11巻:5481~6頁]

10

20

30

40

この分野における進歩に対する主要な障害は、このようなタンパク質の過剰発現を決定する簡便で迅速、かつ客観的なアッセイが存在していないことである。本発明は、この問題を扱う。

【0004】

患者の腫瘍組織中のタンパク質の発現をアッセイする1つのアプローチは、ホルマリン固定腫瘍組織の免疫組織化学的(IHC)染色を用いることである。しかし、Mannら(2005年, J Clin Oncol22巻:5148~54頁)により指摘されるように、このようなアプローチは時間がかかり、組織がどのように処理されたかによって紛らわしい結果をししばしば与える。「Back to the Drawing Board on Immunohistochemistry and Predictiv

50

e Markers」という表題の論文の中で、Henson, D. E. (2005年、J Natl Cancer Inst 97巻: 1796~7頁)は、多くの変数(検体の貯蔵、固定の期間、固定剤の種類および組織の処理条件)およびそれらのそれぞれに関連する問題がある中では、IHC試験を適切に制御するのは困難であり、全ての実験室にとって、「[これらの制御を]受容して維持するのは、実現困難である」ことを示している。

【非特許文献1】Zoon KC、2004年、Toxicology Pathol. 32巻(補遺1): 1~2頁

【非特許文献2】MacGregor JT、2004年、Toxicology Pathol. 32巻(補遺1): 99~105頁

【非特許文献3】Carr KMら、2004年Hum Genomics 1巻: 134~40頁

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、血液試料から癌細胞を濃縮し、その後、濃縮された癌細胞に対して、濃縮された癌細胞からタンパク質を検出できるイムノアッセイを行う工程を含む、血液試料中の癌細胞由来のタンパク質をアッセイする方法を提供する。イムノアッセイは、血液1ミリリットルあたり100個の癌細胞からタンパク質を検出できる。あるいは、イムノアッセイは、160ピコグラムのタンパク質を検出できる。タンパク質は、上皮成長因子受容体(リン酸化されたEGFRを含む)、除去修復交差相補群1、リボヌクレオチド還元酵素サブユニットM1、チミジル酸合成酵素、および α -チューブリンからなる群より選択される。イムノアッセイは、血液試料中の癌細胞に存在するタンパク質の分子数に比例するシグナルを生じる。

【0006】

本発明は、血液試料から癌細胞を単離し、その後、単離された癌細胞から抽出物を作製し、その後、その抽出物に対して、タンパク質を検出できるイムノアッセイを行う工程を含み、陽性のイムノアッセイの結果が癌細胞中のタンパク質の存在を示す、血液試料中の癌細胞からタンパク質の発現を検出する方法であって、そのタンパク質が上皮成長因子受容体であり、イムノアッセイが血液1ミリリットルあたり100個の癌細胞からタンパク質を検出できる方法を提供する。あるいは、イムノアッセイは、160ピコグラムのタンパク質を検出できる。

【0007】

本発明は、上記の方法により、EGFRを過剰発現していると同定された患者に抗癌剤を投与する工程を含む、抗EGFR薬剤での処置から利益を得る可能性がある癌患者を処置する方法を提供する。

【0008】

記載される検出およびアッセイの方法は、簡便で、迅速、かつ客観的である。簡便：本発明で概説されるアプローチは、生検材料を必要としない。患者の血液試料を、循環している腫瘍細胞中のあるタンパク質の発現について、直接分析できる。迅速：IHCに比較して、本発明のイムノアッセイは、組織片を回収し、その組織片を脱パラフィン処理し、スライドを切断し、染色を行って解釈する必要が回避される。代わりに、迅速なイムノアッセイを用いる。客観的：本発明のイムノアッセイを用いると、IHCのような主観的な評点が回避される。

本発明の好ましい実施形態によれば、例えば以下の方法などが提供される：

(項目1)

血液試料中の癌細胞由来のタンパク質をアッセイする方法であって、該血液試料から該癌細胞を濃縮し、その後、該濃縮された癌細胞に対して、該濃縮された癌細胞由来の該タンパク質を検出できるイムノアッセイを行う工程を含み、

該イムノアッセイが、血液1ミリリットルあたり100個の癌細胞から該タンパク質を

10

20

30

40

50

検出できるか、または160ピコグラムの該タンパク質を検出できることにより定義される感度を有し、

該タンパク質が、上皮成長因子受容体、除去修復交差相補群1、リボヌクレオチド還元酵素サブユニットM1、チミジル酸合成酵素、および - チューブリンからなる群より選択され、

該免疫アッセイが、該血液試料中の該癌細胞に存在する該タンパク質の分子数に比例するシグナルを生じる、

方法。

(項目2)

血液試料中の癌細胞からタンパク質の発現を検出する方法であって、該血液試料から該癌細胞を単離し、その後、該単離された癌細胞から抽出物を作製し、その後、該抽出物に対して、該タンパク質を検出できる免疫アッセイを行う工程を含み、陽性の免疫アッセイの結果が該癌細胞中の該タンパク質の存在を示し、

該タンパク質が上皮成長因子受容体であり、

該免疫アッセイが、血液1ミリリットルあたり100個の癌細胞から該タンパク質を検出できるか、または160ピコグラムの該タンパク質を検出できることにより定義される感度を有する、

方法。

(項目3)

前記免疫アッセイが、血液1ミリリットルあたり30個の癌細胞から前記タンパク質を検出できる、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記免疫アッセイが、血液1ミリリットルあたり10個の癌細胞から前記タンパク質を検出できる、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記免疫アッセイが、血液1ミリリットルあたり3個の癌細胞から前記タンパク質を検出できる、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記免疫アッセイが、4ピコグラムの前記タンパク質を検出できる、項目1または2に記載の方法。

(項目7)

前記免疫アッセイが、検出に電気化学発光を用いる、項目1または2に記載の方法。

(項目8)

前記免疫アッセイが、検出に化学発光、蛍光化学発光、蛍光偏光および時間分解蛍光から選択される技術を用いる、項目1または2に記載の方法。

(項目9)

抗EGFR薬剤での処置から利益を得る可能性がある癌患者を処置する方法であって、該患者の血液試料が項目1または2に記載の方法で試験して陽性である該患者に、抗EGFR薬剤を投与する工程を含む、方法。

(項目10)

前記薬剤が、セツキシマブ、パニツムマブ、エルロチニブおよびゲフィチニブからなる群より選択される、項目9に記載の方法。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本明細書で用いる場合、移行部の用語「含む」は、制限がない。この用語を用いる請求項は、その請求項に記載されるものの他に、要素を含みうる。つまり、例えば、請求項は、記載された要素またはその等価物が存在する限りは、そこに具体的に記載されない他のステップも含む方法と読み取ることができる。

略語：

C T C：循環腫瘍細胞

10

20

30

40

50

EGFR：上皮成長因子受容体 ERCC1：除去修復交差相補群 1

ECL：電気化学発光

IHC：免疫組織化学

ホスホEGFR：リン酸化されたEGFR

RRM1：リボヌクレオチド還元酵素サブユニットM1

TS：チミジル酸合成酵素

本明細書で用いる場合、用語「抗EGFR薬剤」とは、抗体を含み、EGFRのチロシンキナーゼ活性の小分子阻害剤を含む、EGFRを標的にする抗癌剤のことである（概説として、Ciardiello F、2005年、Future Oncol 1巻：221～234頁；およびMacarulla Tら、2006年、Onkologie 29巻：99～105頁）を参照されたい）。抗EGFR薬剤は、限定されないが、セツキシマブ、パニツムマブ、エルロチニブおよびゲフィチニブを含む。

10

【0010】

本明細書で用いる場合、用語「白金薬剤」とは、抗癌特性を有する白金含有化合物のことである（最近の概説として、Farrnell NP、2004年、Semin Oncol 31巻（6号補遺14）：1～9頁）Cosaert JおよびQuoix E、2002年、Br J Cancer 87巻：825～33頁；Desoize BおよびMadoulet C、2002年、Crit Rev Oncol Hematol 42巻：317～25頁を参照されたい）。白金薬剤は、限定されないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンおよびネダプラチンを含む。

20

【0011】

本明細書で用いる場合、用語「タキサン」とは、パクリタキセルおよび関連化合物のことである（Abal Mら、2004年、Curr Cancer Drug Targets 3巻：193～203頁；Ferlini Cら、2003年、Curr Med Chem Anticancer Agents 3巻：133～8頁；およびAgrawal NRら、2003年、Curr Oncol Rep 5巻：89～98頁を参照されたい）。タキサンは、限定されないが、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む。

【0012】

本明細書で用いる場合、用語「ピンカアルカロイド」とは、ピノレルピン、ならびにピンブラスチンおよびピンクリスチンのような関連化合物のことである（概説として、Chan、1998年、Pharmacotherapy 18巻：1304～7頁；Zhou X.-J. およびRahmani R.、1992年、Drugs、44巻、補遺4、1～16頁を参照されたい）。

30

【0013】

本発明は、血液試料中の循環癌細胞中のタンパク質（EGFR、ERCC1、RRM1、TSおよび - チューブリンからなる）のレベルを定量するのに十分に感度が高い方法を提供し、ある抗癌療法（限定されないが、EGFRを標的にする療法；白金薬剤；ゲムシタピン；5-FUおよびラルチレキセド；タキサン；およびピンカアルカロイドを含む）から利益を得る可能性があるこれらの癌患者を同定する方法を提供する。血液試料を試験して、このような療法から利益が得られるさらなる患者を同定する簡便、高感度かつ迅速な手段は、癌治療の分野において、重要な進歩となる。以下に記載するように、電気化学発光（ECL）検出を用いるような循環癌細胞中のこれらの癌タンパク質を検出する迅速で高感度な免疫学的アッセイは、このことを達成するために好ましい手段である。

40

【0014】

本発明は、血液から循環癌細胞を単離するために用いられる手順の高い特異性を、ECLのようなある免疫学に基づくアッセイの高い感度と組み合わせることに基づく。循環癌細胞は、まず、濃縮される。用語「癌細胞を濃縮する」とは、非癌細胞に対する癌細胞の割合を増加させる任意の処理ステップの実行のことである。濃縮のある好ましい方法は、血液から循環癌細胞を単離して精製することにより免疫磁性ビーズを用いる。別の好ましい濃縮方法は、Becton DickinsonのBD VACUTAINER CP

50

Tチューブでの全血試料の回収、および遠心分離 (B e c t o n D i c k i n s o n の推奨する手順による) による濃縮された癌細胞を含有する末梢血単核細胞画分の取得からなる。別の好ましい癌細胞の濃縮方法は、全血試料の回収、その後の赤血球細胞の溶解からなる。

【 0 0 1 5 】

本発明の検出方法のある実施形態において、免疫学的アッセイの感度レベルは、アッセイが、血液 1 ミリリットルあたり 1 0 0 細胞以下、より好ましくは血液 1 ミリリットルあたり 3 0 細胞以下、より好ましくは血液 1 ミリリットルあたり 1 0 細胞以下、より好ましくは血液 1 ミリリットルあたり 3 細胞以下、最も好ましくは血液 1 ミリリットルあたり 1 細胞以下の濃度で血液に加えた場合に、癌細胞からタンパク質を検出できるようなものである。検出されるタンパク質の量で感度が定義される本発明の実施形態において、アッセイは、6 4 ピコグラムのタンパク質、より好ましくは 1 6 ピコグラムのタンパク質、より好ましくは 4 ピコグラムのタンパク質、さらにより好ましくは 1 ピコグラムのタンパク質を検出できる。

10

【 0 0 1 6 】

癌、特に乳癌の患者から血液の試料 (通常、約 8 ~ 2 0 m l の範囲) を採取する。以下に詳述するステップを含む。

【 0 0 1 7 】

1 . 赤血球の除去
2 . 正常白血球をさらに枯渇させるための任意のネガティブ選択。好ましい実施形態はこのステップを含む。

20

【 0 0 1 8 】

3 . 循環腫瘍細胞 (C T C) のポジティブ選択
4 . 腫瘍細胞タンパク質の抽出
5 . C T C に対する腫瘍細胞タンパク質の定量

1 . 赤血球の除去

限定されないが、密度に基づく分離 (B e c t o n D i c k i n s o n B D V A C U T A I N E R C P T チューブへの血液の直接の回収)、その後の遠心分離のような) および P U R E S C R I P T R B C 溶解緩衝液 (G e n t r a、ミネアポリス)、F A C S 溶解溶液 (B D I S)、I M M U N O L Y S E (C o u l t e r)、O P T I L Y S E B (I m m u n o t e c h)、および A C K 溶解緩衝液 (B i o s o u r c e、メリーランド州ロックビル) のような市販の溶解緩衝液を含む、赤血球を除去するための種々の方法が利用可能である。

30

【 0 0 1 9 】

好ましい方法は、抗凝固剤 (E D T A またはクエン酸) とともに B D V a c u t a i n e r C P T チューブを用いる。これらのチューブは、正しい遠心分離 (スイングアウトバケツローターで 1 , 1 0 0 x g にて 1 0 分間) の際に、赤血球および好中球の除去を可能にする物質を含む。遠心分離の後に、チューブに底部には赤血球 (赤血球) および好中球の細胞沈殿物が含まれる。細胞沈殿物の上方にはゲルバリアがあり、ゲルバリアの上方には、腫瘍細胞、リンパ球および単球が血漿の底にバンドとして存在する。腫瘍細胞、リンパ球および単球は、次いで、ゲルバリアの上方の頂部から容易に回収できる。この方法は、赤血球だけでなく好中球も除去するので、好ましい。

40

2 . 正常白血球をさらに枯渇させるためのネガティブ選択。

【 0 0 2 0 】

本発明の好ましい実施形態は、腫瘍細胞の単離のためのネガティブ選択ステップを用いる。ネガティブ選択は、白血球、特にリンパ球および単球のさらなる枯渇を可能にする。このステップは、白血球抗原、特に共通白血球抗原である C D 4 5 と、グリコホリン A のような赤血球抗原との両方に対して二重特異的である抗体の使用を含む。このような二重特異性抗体の商業的に入手可能なカクテルは、S T E M C E L L T E C H N O L O G I E S (R o s e t t e s e p カタログ # 1 5 1 2 7 および # 1 5 1 6 7) から入手可能で

50

ある。このカクテルは、グリコホリンA、およびヒト造血細胞上の種々の細胞表面抗原（CD2、CD16、CD19、CD36、CD38、CD45、CD66b）に対する二重特異性抗体を含む。これらの二重特異性抗体の1または複数種を、血液回収前にBD Vacutainer CPTチューブに加える。好ましい実施形態において、1種より多い白血球関連CD分子に対する二重特異性抗体のカクテルを用いる。血液をCPT vacutainerチューブに導入するとき、二重特異性抗体は、それぞれが白血球と多数の赤血球とからなるイムノロゼットを形成する。これらのイムノロゼットは、赤血球のものに近似する密度を有し、遠心分離したときに、赤血球沈殿物中に見出され、よって、細胞沈殿物およびゲルバリアの上方に見出される腫瘍細胞画分から、白血球がさらに除去される。血漿中の腫瘍細胞を含む画分を、さらなる処理のために回収する。

10

3. 循環腫瘍細胞（CTC）のためのポジティブ選択

CTCを単離する好ましい方法は、免疫磁性ビーズを用いる。循環癌細胞の単離の他の方法は、ろ過（Vona Gら、2000年、Am J Pathol. 2000年156巻：57～63頁）を含む。好ましい実施形態において、免疫磁性ビーズは、上皮細胞接着分子（EPCAM）、サイトケラチン-19のようなサイトケラチンのような癌細胞の表面上で選択的に見出される抗原に対する抗体、特にサイトケラチンと他の表面マーカー、癌胎児抗原（CEA）、膀胱腫瘍抗原、CA19.9、CA125、CD138（シンデカン-1）、CD227（MUC1）、E-カドヘリン、P-カドヘリン、EGFR、Her2/neu、AUA1、TACSTD1およびガレクチン-3；ならびに（b）白血球またはリンパ腫細胞の場合：CD3、CD19、CD20、CD34、CD38、CD45、CD123、CD138、B220、HLA-DRおよびCXCR4；ならびにc）癌幹細胞の場合：CD34、CD40、CD48、CD49f、CD90、CD96、CD123、CD133、CD150、CD244、CXCR4、ABC G2およびESAに対する抗体のカクテルを有する。免疫磁性ビーズは、種々のサイズ（50ミクロンから200nm未満）であってよく、EPCAMに対する抗体を有するDYNALビーズ（>1.5ミクロンから約50ミクロン）（商業的に入手可能である）を含む。本発明の実施形態において、EasySep（商標）ヒトEPCAMポジティブ選択カクテルおよびEasySep（商標）磁性ナノ粒子（Stemcell Technologies）を、前のステップからの血漿中の腫瘍細胞の画分に加える。次いで、磁石を用いて、腫瘍細胞を残りの物質から分離し、腫瘍細胞を水溶液で洗浄する。

20

30

4. 腫瘍細胞タンパク質の抽出

次のステップにおいて、濃縮または精製された腫瘍細胞は、次いで、細胞溶解およびCTCタンパク質の抽出への準備ができています。限定されませんが、Pierce溶解緩衝液[M-PER（登録商標）抽出試薬（Pierce Biotechnology, Inc.、イリノイ州ロックフォードの製品番号78501）]およびSigma溶解緩衝液[Sigma Cellytic（商標）-M（Sigma製品番号C2978、Sigma-Aldrich, Inc.、ミズーリ州63103セントルイス）]

のような商業的に入手可能な種々のキットを用いる。

【0021】

溶解の後に、細胞破片を遠心分離により除去して、測定される抗原を含む溶解上清が残る。

【0022】

好ましい実施形態において、SigmaまたはPierceのキットを用いる。

5. CTCでの腫瘍細胞タンパク質の定量

検出および定量を、次いで、アッセイされるタンパク質に結合する抗体を用いる高感度サンドイッチイムノアッセイを用いることにより達成する。表1は、本発明においてアッセイされるタンパク質を列挙する。種々の抗体をイムノアッセイに用いることができ、少なくとも1種のポリクローナル抗体を用いることが好ましく、2種のポリクローナル抗体を用いることが最も好ましい。

40

50

【0023】

それぞれのタンパク質の検出は、分析されるタンパク質に対する抗体の2つの組を用いるサンドイッチイムノアッセイを用いることにより達成される。電気化学発光を用いる好ましい実施形態において、一方の抗体はビオチンに結合し、他方はルテニウム検出分子に結合している。

【0024】

本発明の好ましい実施形態において、タンパク質に対する抗体は、ビオチンに結合し、タンパク質に対する第2抗体は検出分子で標識されている。電気化学発光（ECL）の場合、検出分子はルテニウムである。ルテニウムを抗体に結合するための十分に有用な方法についての豊富な文献が、公に存在する（例えばLeeら、Am J Trop Med Hyg 2001年、65巻：1～9頁）。細胞溶解物の上清を、2種の抗体と混合し、短くインキュベートし、その後、トリプロピルアミンを含有する溶液中のストレプトアビジン被覆磁性ビーズを加える。電位を負荷し、かつ標的抗原が存在する下では、ルテニウム標識が励起され、光が放射され、ECL検出装置（例えばORIGENアナライザ、あるいはBioVeris Corporation、メリーランド州ゲーサースバーグのM-Series（登録商標）384またはRoche Diagnostics、インディアナ州インディアナポリスのElecSys（登録商標）1010もしくはElecSys（登録商標）2010のような商業的に入手可能な装置）を用いて検出される。

10

【0025】

本発明の好ましい実施形態において、本発明に従って利用されるイムノアッセイは、以下の抗体の組合せの1つを用いることができる（具体的なタンパク質に対する抗体の例について表2を参照されたい）

20

1. タンパク質に対するポリクローナル抗体の2つの組（最も好ましい実施形態）
2. タンパク質に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体
3. タンパク質に対する2つのモノクローナル抗体

表2. 抗体の例

【0026】

【表 2】

タンパク質	抗体
EGFR	ウサギポリクローナル抗体(AF231; R&D Systems, Inc.、ミネソタ州ミネアポリス); モノクローナル抗体(MAB1095、R&D Systems); また、アミノ酸Y1173のリン酸化を有するEGFRに対する特異性を有するR&Dカタログ番号AF1095ポリクローナル; アミノ酸Y1068のリン酸化を有するEGFRに対する特性を有するMAB1095モノクローナル; およびアミノ酸Y845のリン酸化を有するEGFRに対する特性を有するAF3394ポリクローナルのようなホスホEGFRに対する抗体
ERCC1	モノクローナル抗体8F1(ab2356、Novus Biologicals、コロラド州リトルトン); モノクローナル抗体カタログ番号ERC11-M(Alpha Diagnostics、テキサス州サンアントニオ)
RRM1	ポリクローナル抗体(カタログ番号H00006240-A01、Abnova Corporation、台湾台北); モノクローナル抗体(カタログ番号MAB3033、Chemicon International, Inc.、カリフォルニア州テメクラ)
TS	ウサギポリクローナル抗体(カタログ番号ab22254、Novus Biologicals); マウスモノクローナル抗体TS106(カタログ番号NB 600-550、Novus Biologicals); マウスモノクローナル抗体3A7、A11(カタログ番号ab990、Novus Biologicals); ヒツジポリクローナル抗体(カタログ番号ab7398、Novus Biologicals)
β -チューブリン	クラスIII β チューブリンに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体; クラスIII β チューブリンに対する抗体について例えばSeveら、2005年、Clin Cancer Res11巻:5481~6頁を参照されたい、およびMozzettiら、2005年Clin Cancer Res11巻:298~305頁を参照されたい。

10

20

30

本発明のイムノアッセイは、癌でないヒト有志由来の血液 1 ml あたりに加えた 100 個以下の癌細胞、好ましくは血液 1 ml あたり 30 個以下の細胞からタンパク質発現を検出できる。

40

【0027】

電気化学発光の他に、この用途に要求される高い感度を得ることができる他のイムノアッセイは、限定されないが、

a) Liu Yら、2003年(J Food Protection66巻:512~7頁)により記載されるような化学発光

b) Yu Hら、2000年(Biosens Bioelectron14巻:829~40頁)により記載されるような蛍光化学発光(FCL)

c) 蛍光偏光イムノアッセイ(Howanitz JH、1988年Arch Pathol Lab Med112巻:775~9頁を参照されたい)

50

d) 時間分解蛍光イムノアッセイ (Butcher Hら、2003年、J Immunol Methods 272巻: 247~56頁; Soukkaら、2001年、Clin Chem 47巻: 1269~78頁; Howanitz JH、1988年 Arch Pathol Lab Med 112巻: 775~9頁) を含む。

【0028】

好ましい実施形態において、アッセイにおいて用いられる循環腫瘍細胞の相対量が評価される。このことにより、細胞あたりの全タンパク質の割合を得ることが可能になり、細胞あたりのタンパク質のレベルが高い、中程度および低い癌細胞の対照標準と比較できる。これは、好ましい実施形態である。なぜなら、このことにより、発現が高いレベルである少数のCTCから得られる模倣シグナルをもたらす可能性がある、低レベルのタンパク質発現を有する多くのCTCが存在する擬陽性の状態が排除されるからである。この実施形態において、フローサイトメトリー分析、溶解細胞からの全DNAまたはヒストンのようなDNA関連抗原の定量(二倍体細胞あたり6pgのDNAが存在する)、 α -アクチンのようなハウスキーピング遺伝子の生成物の定量、および濁度または吸光度測定を含む種々のアプローチを用いて相対的細胞数を評価できる。

10

【0029】

その感度のために、本発明による方法は、特定の抗癌治療により利益を得るかまたは得ない可能性がある癌患者を同定するために有用である。

【0030】

本発明は、本明細書に記載される発明を説明するが限定しない以下の実施例を参照にして、よりよく理解される。

20

【実施例】

【0031】

(実施例1)

癌患者がオフィスを訪問し、血液試料をチューブに採取して凝固を防ぐ。Pierce溶解緩衝液およびSigma溶解緩衝液のような商業的に入手可能なキットを用いて、癌細胞を単離して、タンパク質を抽出する。EGFRに対するルテニウム標識ウサギポリクローナル抗体と、ビオチン標識ポリクローナル抗体(これもEGFRに対する)とを加え、その後、アビジンが付着した磁性ビーズの懸濁物、次いでトリプロピルアミン含有溶液を加える。電流を印加し、電気化学発光(ECL)を、商業的に入手可能なもの(BioVeris CorporationまたはRoche Diagnostics)のようなECL検出装置を用いて検出する。シグナルは、循環腫瘍細胞で見出されるEGFRの量に比例する。

30

【0032】

(実施例2)

抗体がERCC1に対する以外は、実施例1と同様の方法である。

【0033】

(実施例3)

抗体がRRM1に対する以外は、実施例1と同様の方法である。

40

【0034】

(実施例4)

抗体がTSに対する以外は、実施例1と同様の方法である。

【0035】

(実施例5)

抗体が α -チューブリンに対する以外は、実施例1と同様の方法である。

【0036】

(実施例6)

この実施例において、電気化学発光を用いるサンドイッチイムノアッセイを用いて癌細胞からEGFRを検出する感度を調べる。

50

【0037】

PBSアッセイ緩衝液を調製する。

・アッセイ緩衝液 PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 中の0.5% Tween-20および0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)

抗EGFRポリクローナル抗体を、まず、ビオチン標識(R&D SystemsのBAF231)および非ビオチン標識(R&D systemsのAF231)の形のもので得る。非ビオチン標識ポリクローナル抗体は、以下のようにしてルテニウム標識する(「TAG標識」)。

・1.5 μg/μlのルテニウム標識(BV-TAG-NHSエステル、カタログ#110034; BioVeris Corporation、米国メリーランド州ゲーサーズバーグ)をDMSO中で調製する。

・500 μlの抗体について、18.8 μlのBV-TAG-NHSを加え、200 μlのポリクローナル抗体について、3.8 μlのBV-TAG-NHSを加える。それぞれの場合において、溶液を1時間インキュベートし、反応を、20 μlの2Mグリシンの添加により停止する。

・各反応混合液中の結合していないBV-TAG-NHSエステルを、溶出にも用いるPBS(0.08%アジ化ナトリウムを含む)を用いて予め平衡化したPD-10ゲルろ過カラムを用いて除去する。それぞれの標識抗体について、各画分のタンパク質濃度をタンパク質アッセイにより決定し、高タンパク質含量の画分を、続く実施例に用いる。

【0038】

ルテニウム標識ポリクローナル抗体およびビオチン標識ポリクローナル抗体は、この実施例において、以下、「TAG-pAb」および「ビオチン-pAb」という。

【0039】

A431癌腫細胞(ATCCから、バージニア州マナッサス)を、ATCCが推奨する条件で6ウェル組織培養プレートにて成長させ、PBSで2回洗浄し、一定量を、血球計数器を用いて計数する。これらの細胞を、Sigma溶解緩衝液[Sigma Cell Lytic(商標)-M(Sigma製品番号C2978、Sigma-Aldrich, Inc.、ミズーリ州63103セントルイス)]を用いて溶解する。細胞溶解は、細胞破片の除去の前に5分間の激しいボルテックスを追加して、製造業者の推奨に従って行う。細胞破片を、Eppendorf遠心分離機(モデル5415C)で14,000 rpmにて30分間の遠心分離により、細胞溶解物から除去する。

【0040】

電気化学発光アッセイを、以下のようにして行う。

・それぞれのウェルに、連続的に、細胞溶解物上清を加え(1ウェルあたりの溶解物の量は、3~100細胞から抽出したものから変動する。抽出物を含まない対照ウェルも用いる)、次いで、50 μl/ウェルのTAG-AbおよびBiotin-Abの混合物(例えばそれぞれ0.5~2 μg/mlの濃度; PBSアッセイ緩衝液で希釈)を、96ウェルU底ポリプロピレンプレートのウェルに加え、一定の振盪を行いながら(例えば2時間)室温にてインキュベートする。

・25 μl中の10 μgの磁性ストレプトアビジンビーズ(例えばDYNABEADS M-280ストレプトアビジン、カタログ#110028、BioVeris Corporation、メリーランド州ゲーサーズバーグ)をそれぞれのウェルに加え、一定の振盪を行いながら(例えば30分間)インキュベートする。

・PBSアッセイ緩衝液をそれぞれのウェルに加えて、1ウェルあたり250 μlの最終容量にする。全ての条件を、少なくとも2連のウェルで試験する。96ウェルプレートを、次いで、M8 M-Series(登録商標)アナライザ(カタログ番号310800、BioVeris Corporation、メリーランド州ゲーサーズバーグ)を用いて、電気化学発光について分析する。

【0041】

このイムノアッセイを用いて、少なくとも10個のA431癌腫細胞由来のEGFRが

10

20

30

40

50

、バックグラウンドよりも高いシグナルで検出できる。

【0042】

(実施例7)

この実施例では、電気化学発光を用いるサンドイッチイムノアッセイを用いて組換えEGFRを検出する感度を調べた。

【0043】

PBSアッセイ緩衝液を調製した。

・アッセイ緩衝液：PBS（リン酸緩衝生理食塩水、pH7.2）中の0.5%Tween-20および0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）

標準希釈液を調製した。

・標準希釈液：PBS（リン酸緩衝生理食塩水、pH7.2）中の1%ウシ血清アルブミン（BSA）

抗EGFRポリクローナル抗体を、まず、ビオチン標識（R&D SystemsのBAF231）および非ビオチン標識（R&D systemsのAF231）の形のもので得た。非ビオチン標識ポリクローナル抗体は、LorenceおよびLu（WO2006/041959A2）の方法に従ってルテニウム標識する（「TAG標識」）。

【0044】

ルテニウム標識ポリクローナル抗体およびビオチン標識ポリクローナル抗体は、この実施例において、以下、「TAG-pAb」および「ビオチン-pAb」という。

【0045】

組換えEGFRタンパク質を、EGFR-Fcタンパク質（ヒトIgGのFc領域にリンカー基を介して融合している細胞外ドメインからなるキメラタンパク質；R&D systems、カタログ#344-ER）の形で得た。

【0046】

電気化学発光アッセイを、以下のようにして行った。

・標準物質を、1mlのPBS（pH7.2、0.35%BSAおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む）で希釈して、50µg/mlのストック溶液を得た。

・標準物質を、1ウェルあたり25µLを用いたときに1600、160、16および4pg/ウェルとなるように標準希釈液で希釈した。96ウェルU底ポリプロピレンプレートの各ウェルに（1ウェルあたり25µLの標準物質を含む）、50µl/ウェルのTAG-Abおよびビオチン-Abの混合物（例えば添加前に50µl中に1.0µg/mlの濃度）を加え、得られた溶液を、一定の振盪を行いながら（例えば2時間）室温にてインキュベートした。

・25µl中の10µgの磁性ストレプトアビジンビーズ（例えばDYNABEADS M-280ストレプトアビジン、カタログ#110028、BioVeris Corporation、メリーランド州ゲーサーズバーグ）をそれぞれのウェルに加え、一定の振盪を行いながら（例えば30分間）インキュベートした。

・PBSアッセイ緩衝液をそれぞれのウェルに加えて、1ウェルあたり250µlの最終容量にした。全ての条件を、少なくとも2連のウェルで試験した。96ウェルプレートを、次いで、M-Series（登録商標）384アナライザ（BioVeris Corporation、メリーランド州ゲーサーズバーグ）を用いて、電気化学発光について分析した。

【0047】

このイムノアッセイを用いて、1ウェルあたり4pgほど少ないEGFR標準物質を、バックグラウンドよりも高いシグナルで検出できた（表3）。

【0048】

表3.ルテニウム標識ポリクローナル（TAG-pAb）およびビオチン標識ポリクローナル抗体（ビオチン-pAb）を用いるイムノアッセイによる組換えEGFRの電気化学発光（ECL）検出。

【0049】

10

20

30

40

50

【表 3】

EGFR (pg/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドを超える)*
4	443
16	1187
160	8107
1600	69113

* 抗原を含まない対照ウェルからの平均シグナルを超える平均 E C L シグナル。

10

【 0 0 5 0 】

(実施例 8)

この実施例では、過剰発現癌細胞に対する非過剰発現癌細胞由来の E G F R を検出するための E G F R に対する E C L イムノアッセイについての特異性を、組換え E G F R を検出する感度を繰り返して決定することとともに決定した。方法は、MDA - M B - 4 6 8 乳癌腫細胞 (E G F R 過剰発現について陽性の対照細胞) および Z R - 7 5 - 1 乳癌腫細胞 (E G F R 過剰発現について陰性) 由来の細胞抽出物の分析を加えた、実施例 7 で用いたものであった。

【 0 0 5 1 】

MDA - M B - 4 6 8 および Z R - 7 5 - 1 細胞 (A T C C から、バージニア州マナッ 20
サス) を、A T C C が推奨する条件で 6 ウェル組織培養プレートにて成長させ、P B S で 2 回洗浄し、一定量を、血球計数器を用いて計数した。細胞の溶解および上清の取得は、P i e r c e 溶解緩衝液 [カタログ # 7 8 5 0 1 ; P i e r c e B i o t e c h n o l o g y、イリノイ州ロックフォード] を、P i e r c e プロテアーゼ阻害剤 [カタログ # 7 8 4 1 0 ; P i e r c e B i o t e c h n o l o g y] とともに用いて行った。1 ウェルあたりの溶解上清の量を、1 ~ 2 5 0 個の M D A - M B - 4 6 8 または Z R - 7 5 - 1 細胞からの抽出物で変動させ、実施例 7 に記載するイムノアッセイを用いて E G F R について分析した。

【 0 0 5 2 】

E G F R 標準物質を用いて、1 ウェルあたり 4 p g ほど少ない E G F R 標準物質を、再 30
び、バックグラウンドよりも高いシグナルで検出できた (表 4) 。

【 0 0 5 3 】

表 4 . ルテニウム標識ポリクローナル (T A G - p A b) およびビオチン標識ポリクロー 40
ナル抗体 (ビオチン - p A b) を用いるイムノアッセイによる組換え E G F R の電気化学発光 (E C L) 検出。

【 0 0 5 4 】

【表 4】

EGFR (pg/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドを超える)*
4	627
16	1919
160	12961
1600	113532

* 抗原を含まない対照ウェルの平均シグナルを超える平均 E C L シグナル。

【 0 0 5 5 】

細胞溶解物を用いるこの実験の結果を、図 1 および 2 に示す。図 1 は、低い細胞数から 50
E G F R を検出するこのアッセイの能力を見るのに最もよいデータのより低い端をグラフで示す。図 1 は、1 ウェルあたり 1 0 個の細胞までの細胞範囲についてのデータのみを含

む。図2は、全体のデータの組をグラフで示す（1ウェルあたり250個の細胞まで）。

【0056】

EGFRは検出可能であり、この実験におけるMDA-MB-468溶解物の最少量を用いるこれらのウェル（1ウェルあたり1個の細胞を加えたものの溶解物；図1）を含むこの実験におけるMDA-MB-468細胞の溶解物からのベースラインを超えていた。さらに、MDAMB-468細胞の溶解物（EGFR過剰発現について陽性の対照）は、1ウェルあたり1～250個の細胞の試験した範囲全体にわたってZR-75-1細胞（EGFR過剰発現について陰性）の溶解物よりも、EGFRについてイムノアッセイでかなり高いシグナルを示し、このことは、EGFR検出についての結果の高い特異性を示す（図1および2）。

10

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】MDA-MB-468乳癌細胞（EGFR過剰発現についての陽性対照）に対するZR-75-1（EGFR過剰発現についての陰性対照）の溶解物中のEGFRのイムノアッセイ検出についてのECLシグナルの比較を示す図である。1ウェルあたり1、2および10個の細胞の溶解物を用いたデータを示す。

【図2】MDA-MB-468乳癌細胞（EGFR過剰発現についての陽性対照）に対するZR-75-1（EGFR過剰発現についての陰性対照）の溶解物中のEGFRのイムノアッセイ検出についてのECLシグナルのさらなる比較を示す図である。X軸の目盛りを増加させて示すために、1ウェルあたり50および250個の細胞の溶解物材料から得られたデータもこのグラフに含めた以外は、図1に示すものと同じ実験のデータをこの図において用いる。

20

【図1】

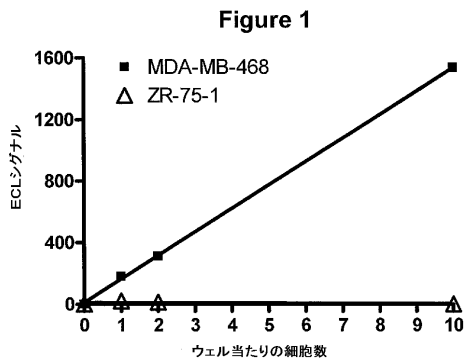


Figure 1

【図2】

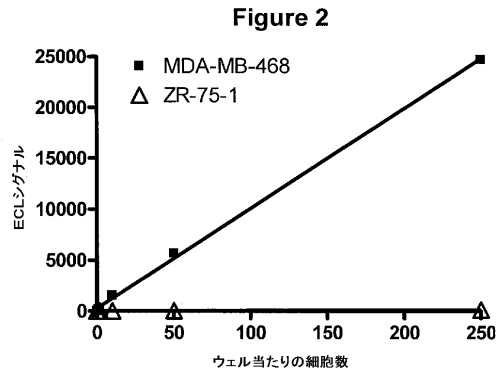


Figure 2

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)		A 6 1 K 31/5377	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)		G 0 1 N 33/532	B
C 0 7 D 239/94 (2006.01)		C 0 7 D 239/94	

(72)発明者 ローレンス, ロバート エム.
アメリカ合衆国 メリーランド 20817, ベテスダ, メイデン レーン 6308

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2005/117553(WO, A1)
特表2005-516217(JP, A)
特開平05-504934(JP, A)
国際公開第2004/091384(WO, A1)
特表2005-507997(JP, A)
特表平05-504934(JP, A)
特表2006-523314(JP, A)
特表平11-507726(JP, A)
特表2008-502328(JP, A)
特表2007-502983(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	从循环肿瘤细胞中检测蛋白质		
公开(公告)号	JP5025724B2	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	JP2009506738	申请日	2007-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	病毒防御公司		
申请(专利权)人(译)	那么统计生物公司		
当前申请(专利权)人(译)	那么统计生物公司		
[标]发明人	ローレンスロバートエム		
发明人	ローレンス, ロバート エム.		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/553 A61K45/00 A61K39/395 A61K31/517 A61K31/5377 A61P35/00 G01N33/532 C07D239/94		
CPC分类号	G01N33/574		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/553 A61K45/00 A61K39/395.N A61K31/517 A61K31/5377 A61P35/00 G01N33/532.B C07D239/94		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/745016 2006-04-18 US		
其他公开文献	JP2009534667A JP2009534667A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

衍生自癌细胞EGFR, ERCC1, RRM1, 胸苷酸合酶或β-微管蛋白的蛋白质是能够从血液样品中浓缩癌细胞然后检测上述蛋白质对抗浓缩的癌细胞的免疫测定法通过这样做在血液样本中被检测到。使用抗EGFR剂例如西妥昔单抗, 帕尼单抗, 厄洛替尼或吉非替尼治疗过度表达EGFR的癌症患者。本发明提供了一种治疗癌症患者的方法, 所述癌症患者可以从用抗EGFR剂治疗中受益, 所述方法包括通过上述方法对鉴定为过度表达EGFR的患者施用抗癌剂的步骤提供。

【表 1】

タンパク質	タンパク質のクラス	種々の薬剤の耐性または感受性の予測
EGFR	チロシンキナーゼ活性を有する感受性体	EGFRの過剰発現により、セツキシマブ、パニツムマブのような抗EGFR薬剤に対する応答が予測される
ERCC1	酵素(ヌクレオチド除去修復経路のメンバー)	ERCC1の過剰発現により、白金薬剤(例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン)に対する耐性が予測される [Reed(2005年、Clin. Cancer Res. 11巻: 6100-6102頁); Lords(2002年、Clin. Cancer Res. 8巻: 2285-21頁); Metzger(1998年、J. Clin. Oncol. 16巻: 305-316頁); Shirota(2001年、J. Clin. Oncol. 19巻: 4288-4294頁)]
リボヌクレオチド還元酵素(RRM1)	酵素	RRM1の過剰発現により、ゲムシタビンに対する耐性が予測される[Bergman, AMO(2005年、Clin. Cancer Res. 11巻: 9510-6頁)]
チモシル合成酵素(TS)	酵素	TSの過剰発現により、5-FUに対する耐性が予測される[Chenの過剰発現により、ラルチドレキセドへの応答がないことが予測される][Farrugia(2003年、Clin. Cancer Res. 9巻: 792-801頁)]
β-チューブリン(クラスIII)	構造	β-チューブリン(クラスIII)の過剰発現により、タキサンに対する耐性が予測される[Mostruis(2005年、Clin. Cancer Res. 11巻: 298-305頁)]; β-チューブリン(クラスIII)の過剰発現により、ビンカルカロイドに対する耐性が予測される[Bevys(2005年、Clin. Cancer Res. 11巻: 5481-6頁)]