(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-22002
(P2012-22002A)
(43)公開日　平成24年2月2日(2012.2.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	Y	2G045
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	M	4B063
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	541A	
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		

審査請求 有　請求項の数 30　ＯＬ　外国語出願　（全 46 頁）

(21)出願番号　特願2011-198211 (P2011-198211)
(22)出願日　平成23年9月12日 (2011.9.12)
(62)分割の表示　特願2008-501850 (P2008-501850)の分割
原出願日　平成17年3月14日 (2005.3.14)

(71)出願人　309021320
ベリデックス・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
Ｖｅｒｉｄｅｘ，ＬＬＣ
アメリカ合衆国ニュージャージー州ラリタン、ルート２０２、１００１番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100156122
弁理士　佐藤　剛

最終頁に続く

(54)【発明の名称】循環腫瘍細胞を用いる転移性乳癌患者の療法中の各追跡期間ポイントでの無増悪および全生存を予測する方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ＣＴＣの存在および数に基づくＭＢＣを有する患者における疾患増悪までの時間、全生存および療法に対する応答を予想することに予後有用性を有する癌試験方法を提供する。
【解決手段】Cell Spotter（登録商標）Systemを用いて血中のＣＴＣを計数する。該システムは上皮細胞を免疫磁気的に濃縮し、該細胞を蛍光標識し、ＣＴＣを同定および定量する。末梢血液腫瘍負荷で検出されたＣＴＣの絶対数は、部分的に、生存、増悪までの時間および療法に対する応答の予測における因子である。患者の生存の平均時間は、７．５ｍｌの血液当たり（５）のＣＴＣの閾値数に依存する。転移癌におけるＣＴＣの検出は、転移癌を有する患者における新規な診断要素を表し、血液中の腫瘍細胞の存在の生物学的役割を示唆し、ＣＴＣの検出が将来的な療法臨床試験の適当な代理マーカーと考えられ得ることを示している。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項１】

療法中のいずれかのポイントでの患者における全生存予後診断のための方法であって、

ａ）該患者から生物学的標本を得、ここに、該標本は、稀少細胞を含有することが疑われる混合細胞集団を含み；

ｂ）該標本の画分を富化し、ここに、該画分は稀少細胞を含有し；

ｃ）無傷である該稀少細胞の構造の完全性を確認し；次いで

ｄ）該無傷の稀少細胞を分析して、患者生存を決定し、ここに、該分析は、事前決定された統計的関連性に基づいて、該患者の無傷の稀少細胞計数と該全生存予後診断とを関連させることを含むことを特徴とする該方法。

【請求項２】

循環する該稀少細胞が、内皮細胞、母体循環中の胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、ウイルス感染細胞およびその組合せよりなる群からのものであることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項３】

該画分が免疫磁気的富化により得られ、該標本を、他の集団の実質的な排除のために、該稀少細胞に特異的に結合する生体特異的リガンドに結合する磁気粒子と混合し、次いで、標本－磁気粒子混合物を磁場に付して、磁気粒子に結合した稀少細胞が富化された細胞懸濁物を生成することを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項４】

該生体特異的リガンドが、上皮細胞表面抗原に対して指向された抗体であることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項５】

該稀少細胞が、該上皮細胞表面抗原としてＥｐＣＡＭを有することを特徴とする請求項４記載の方法。

【請求項６】

該構造の完全性が、免疫組織化学的手順、ＲＴ－ＰＣＲ手順、ＰＣＲ手順、ＦＩＳＨ手順、フローサイトメトリー手順、イメージサイトメトリー手順およびその組合せよりなる群から選択された手順によって決定されることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項７】

該分析が最後の追跡期間中に生じる該無傷の稀少細胞計数の変化に基づいて、該生存予後診断を示すことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項８】

該分析が閾値数に対するＣＴＣ数の測定に基づき、該閾値を超えるかまたは等しい該測定が、低い該生存予後診断を示すことを特徴とする請求項７記載の方法。

【請求項９】

該閾値が５個の循環する腫瘍細胞であることを特徴とする請求項８記載の方法。

【請求項１０】

該生存予後診断が、転移性乳癌患者、転移性前立腺癌患者、膀胱癌患者、転移性結腸癌患者およびその組合せよりなる群からの該患者のために決定される請求項１記載の方法。

【請求項１１】

療法中のいずれかのポイントでの患者における全生存を評価するための稀少細胞分析システムであって、

ａ）該患者からの生物学的標本中の細胞を安定化する手段、ここに、該手段は、該標本中の稀少細胞の特徴的な決定因子を保存し；

ｂ）該標本の画分を富化する手段、ここに、該画分は、無傷の稀少細胞を含有し；

ｃ）該無傷の稀少細胞の構造の完全性を確認する手段；および

ｄ）該無傷の稀少細胞を分析する手段、ここに、該手段は、事前決定された統計的関連性に基づいて、該無傷の稀少細胞計数と該全生存とを相関させることを含む該システム。

【請求項１２】

該安定化手段が、抗凝固剤、安定化剤およびその組合せよりなる群から選択されることを特徴とする請求項１１記載の稀少細胞分析システム。

【請求項１３】

該富化手段が、免疫磁気、密度遠心およびその組合せよりなる群からのものである請求項１１記載の稀少細胞分析システム。

【請求項１４】

該確認手段が、免疫組織化学的手段、ＲＴ－ＰＣＲ手段、ＰＣＲ手段、ＦＩＳＨ手段、フローサイトメトリー手段、イメージサイトメトリー手段およびその組合せよりなる群からのものである請求項１１記載の稀少細胞分析システム。

【請求項１５】

該分析手段が、カプランーメイヤー分析、コックス比例ハザード回帰分析およびその組合せよりなる群からのものである請求項１１記載の稀少細胞分析システム。

【請求項１６】

療法中のいずれかのポイントでの患者における疾患増悪までの時間を評価する方法であって、

ａ）該患者から生物学的標本を得、ここに、該標本は、稀少細胞を含有することが疑われる混合細胞集団を含み；

ｂ）該標本の画分を富化し、ここに、該画分は、該稀少細胞を含有し；

ｃ）無傷である該稀少細胞の構造の完全性を確認し；次いで

ｄ）該稀少細胞を分析して、疾患増悪までの時間を決定し、ここに、該分析は、事前決定された統計的関連性に基づいて、該患者の無傷の稀少細胞計数と疾患増悪までの該時間を相関させることを特徴とする該方法。

【請求項１７】

循環する該稀少細胞が、内皮細胞、母体循環中の胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、上皮細胞、ウイルス感染細胞およびその組合せよりなる群からのものであることを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項１８】

該画分が免疫磁気的富化により得られ、該標本を、他の集団の実質的な排除のために、該稀少細胞に特異的に結合する生体特異的リガンドに結合する磁気粒子と混合し、次いで、標本－磁気粒子混合物を磁場に付して、磁気粒子に結合した稀少細胞が富化された細胞懸濁物を生成することを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項１９】

該生体特異的リガンドが、上皮細胞表面抗原に対して指向された抗体であることを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２０】

該稀少細胞が、該上皮細胞表面抗原としてＥｐＣＡＭを有することを特徴とする請求項１９記載の方法。

【請求項２１】

該構造の完全性が、免疫組織化学的手順、ＲＴ－ＰＣＲ手順、ＰＣＲ手順、ＦＩＳＨ手順、フローサイトメトリー手順、イメージサイトメトリー手順およびその組合せよりなる群から選択された手順によって決定されることを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２２】

該分析が、最後の追跡期間中に生じる該無傷の稀少細胞計数の変化に基づいて、疾患増悪までの時間を示すことを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２３】

該分析が閾値数に対するＣＴＣ数の測定に基づき、該閾値を超えるかまたは等しい該測定が、疾患増悪までの少ない時間を示すことを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２４】

該閾値が５個の循環する腫瘍細胞であることを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２５】

該増悪までの該時間が、転移性乳癌患者、転移性前立腺癌患者、膀胱癌患者、転移性結腸癌患者およびその組合せよりなる群からの該癌患者のために決定されることを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項２６】

療法中のいずれかのポイントでの患者における疾患増悪までの時間を評価するための稀少細胞分析システムであって、

ａ）該患者からの生物学的標本中の細胞を安定化する手段、ここに、該手段は、該標本中の稀少細胞の特徴的な決定因子を保存し；

ｂ）該標本の画分を富化する手段、ここに、該画分は、無傷の稀少細胞を含有し；

ｃ）該無傷の稀少細胞の構造の完全性を確認する手段；および

ｄ）該無傷の稀少細胞を分析するための手段、ここに、該手段は、事前決定された統計的関連性に基づいて、該無傷の稀少細胞計数と疾患増悪までの該時間とを相関させることを含む該システム。

【請求項２７】

該安定化手段が、抗凝固剤、安定化剤およびその組合せよりなる群からのものである請求項２６記載の稀少細胞分析システム。

【請求項２８】

該富化手段が、免疫磁気、密度遠心およびその組合せよりなる群からのものである請求項２６記載の稀少細胞分析システム。

【請求項２９】

該確認手段が、免疫組織化学的手段、ＲＴ－ＰＣＲ手段、ＰＣＲ手段、ＦＩＳＨ手段、フローサイトメトリー手段、イメージサイトメトリー手段およびその組合せよりなる群からのものである請求項２６記載の稀少細胞分析システム。

【請求項３０】

該分析手段が、カプランーメイヤー分析、コックス比例ハザード回帰分析およびその組合せよりなる群からのものである請求項２６記載の稀少細胞分析システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

これは、2003年2月27日付で出願した仮出願第60/450,519号および2003年11月25日付で出願した仮出願第60/524,759号の優先権を主張する2004年2月26日付で出願したPCT/US04/005848(WO 2004/076643)の優先権を主張する非仮出願である。

【０００２】

（発明の分野）

本発明は、一般的に、血中の形態的に無傷の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の存在に基づく、転移癌患者の癌予後および生存に関する。より詳細には、転移性乳癌患者の７．５ｍｌの血液中の循環腫瘍細胞の存在を疾患増悪までの時間および生存性と相関付ける、診断方法、試薬および装置を記載する。循環腫瘍細胞は、約５ないし５０ｍｌの末梢血液中の１または２個の癌細胞を単離およびイメージングすることができる高感度な方法によって決定し、腫瘍細胞数のレベルと治療の間の腫瘍細胞数における増加を、増悪までの時間、死亡までの時間および療法に対する応答と相関付ける。

【背景技術】

【０００３】

癌患者の治療および管理を改善するための努力にもかかわらず、癌患者における生存は多くの癌のタイプについて過去２０年間にわたって改善されていない。したがって、大部分の癌患者は原発性癌によって殺されないが、その代わりに転移：元の腫瘍から離脱し、体中を移動し、遠位まで移動する場合もある悪性細胞によって確立された複数の広範に拡がる腫瘍コロニー、に倒れる。癌における最も首尾のよい療法ストラテジーは、早期の検出およびなお組織は制限されるが腫瘍の外科的除去である。癌の早期検出は、癌によって

は実行可能であることが証明されており、特に子宮頸癌におけるＰＡＰスメア、乳癌におけるマンモグラフィーおよび前立腺癌における血清前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）のような適当な診断テストが存在する場合には実行可能であることが証明されている。しかしながら、早期ステージに検出される多くの癌は外科的切除の前に微小転移を確立している。したがって、癌の悪性の可能性の早期および正確な決定は、適当な療法の選択に重要である。

【０００４】

最適な療法は、診断および予後情報の組合せに基づくであろう。正確および再現性のある診断テストは、生存に関する詳細な情報を提供するであろう予後評価と一緒に、特定の癌の転移性質に関する詳細な情報を提供する必要がある。

【０００５】

適当に設計された予後テストは、危険性および生存の確率に関する情報を医師に与え、この情報はかわって、不必要な治療を授かることに利益がないことを患者に与える。選択した療法が予後テストに基づいて有効であるという知識から、患者のモラルも持ち上げられるであろう。そのようなテストに関連する費用の節約は、医師が有効でない療法を置き換える理論的根拠が提供されるため、有意義になり得る。生存に焦点を合わせた転移癌の治療および検出における適当に開発された診断および予後データバンクは、明らかに、医学に対して膨大な恩恵を提供するであろう（米国特許第6,063,586号）。

【０００６】

原発性癌が十分に早期に検出されれば、それは外科的手術、放射線または化学療法、あるいはこれらの治療の幾つかの組合せによって排除し得る場合がある。

【０００７】

残念ながら、転移コロニーは検出および除去するのが困難であり、それらのすべてを首尾良く治療するのは不可能な場合もある。したがって、臨床的見地からは、転移は、癌の本来的な増悪における決定的な事象と考えることができる。さらに、転移する能力は、悪性腫瘍を独特に特徴付ける性質である。

【０００８】

可溶性腫瘍抗原：

癌および癌転移の複雑性ならびに長年にわたる癌患者を治療することにおける失敗に基づいて、治療をガイドするための診断テストを開発し、転移または再発に対するかかる治療の効果をモニターすることに多くの試みがなされている。

【０００９】

診断腫瘍学に有用なテストを開発する最初の試みのうちの１は、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）の処方であった。この抗原は、胎児細胞に見られ、ある種の癌における腫瘍細胞において再度見られる。ＣＥＡを試験する有用性ならびに前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、ＣＡ１５．３、ＣＡ１２５、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＣＡ２７．２９、可溶性細胞残渣として組織試料または血液のいずれかに見出されるｐ２７のごとき他の多くの「腫瘍」抗原の有用性を評価するために膨大な努力がなされている。これらおよび他の残渣抗原は、循環および非－循環の腫瘍細胞の双方の破壊から由来すると考えられ、したがって、それらの存在が常に転移の可能性を、特にアポトティック（apoptotic）状態にある間に細胞が破裂する場合は、反映しているとは限らない。

【００１０】

癌患者における腫瘍増悪を予測するために用いるさらなる試験は、バイオプシー収集した腫瘍試料中のテロメラーゼ活性のような酵素インデックスを、好ましくないまたは好ましい予後の指標と関連付けるのに焦点をあてている（米国特許第5,693,474号；米国特許第5,639,613号）。このタイプの分析において酵素活性を評価することには、ゲル電気泳動およびウェスタンブロッティング分析のような時間のかかる研究室手順が含まれ得る。また、腫瘍の起源に基づくシグナル対ノイズ比および感度には変動がある。これらの欠点にも関わらず、血中の特異的可溶性腫瘍マーカーは、治療の早期に、治療ストラテジーを開発するための迅速かつ有効なアプローチを提供し得る。例えば、転移乳癌を有する患者

における血清ＨＥＲ－２／ｎｅｕおよび血清ＣＡ１５－３の検出は、転移乳癌の予後因子となることが示されている（Ali S. M., Leitzel K., Chinchilli V. M., Engle L., Demers L., Harvey H. A., Carney W., Allard J. W.およびLipton A., Relationship of SerumHER-2/neu and Serum CA15-3 in Patients with Metastatic Breast Cancer, Clinical Chemistry, 48(8): 1314-1320(2002)).ＨＥＲ－２／ｎｅｕの増加は、ホルモン療法に対する応答の低下を生じ、ホルモン受容体－陽性転移乳癌に対する応答を予想するのに重要な予後因子である。従って、ＨＥＲ－２／ｎｅｕオンコジーン産物が関係する悪性腫瘍において、レベルの上昇に基づく療法をモニターし、または危険性を評価する方法が記載されている（米国特許第5,876,712号）。しかしながら、双方の場合において、緩解の間のまたは健全な正常における場合でさえ、基底レベルは比較的高く、患者において見出された濃度と重複する場合があり、したがって多重の試験およびモニタリングを行って、患者依存性のベースラインおよびカットオフ・レベルを確立する必要がある。

【００１１】

前立腺癌においては、血清中のＰＳＡレベルが早期検出に有用であることが証明されている。追跡医師検査（デジタル直腸検査）およびバイオプシーと共に使用する場合、ＰＳＡテストはそれが最善に治療される場合、早期ステージでの前立腺癌の検出を改善した。

【００１２】

しかしながら、ＰＳＡまたは関連するＰＳＭＡ試験は、望まれるものを多くを残す。例えば、ＰＳＡの上昇したレベルは、疾患のステージと弱く相関し、腫瘍の転移可能性の信頼し得る指標となるように思えない。これは、一部はＰＳＡが正常前立腺組織および良性の前立腺過形成（ＢＨＰ）組織の成分であるという事実に起因する。さらに、申し立てられた局在化された前立腺癌および対応する低血清ＰＳＡ濃度を有する患者の約３０％は、転移疾患を有し得る（Morenoら, Cancer Research, 52: 6110 (1992))。

【００１３】

<u>遺伝子マーカー：</u>

悪性前立腺癌細胞の存在を判定する１のアプローチは、血中のＰＳＡからのメッセンジャーＲＮＡの発現について試験されている。これは、血液試料から全ｍＲＮＡを単離し、逆転写ＰＣＲを行うという面倒な手順を介して行われている。血中の離脱した細胞の存在といずれの患者がより活発な治療からの恩恵を受けるかを同定する能力との間の有意な相関は全く記載されていない（Gomella LG., J of Urology, 158: 326-337 (1997))。加えて、この技術を用いて、偽陽性が観察される場合もある。追加された欠点も存在する。それは、試料サイズに基づくこの技術の感度に対して、有限の実際的な限界が存在するということである。典型的には、試験は、シグナルを検出する前に、１腫瘍細胞／血液０．１ｍｌ（血液１ｍｌ中の約１０個の腫瘍細胞）の実際的感度下限に対応する、干渉する赤血球から単離した$１０^{５}$ないし$１０^{６}$細胞に対して行う。より高感度は、血液から単離された腫瘍細胞中のｈＫ２ ＲＮＡを検出することによって示唆されている（米国特許第6,479,263号；米国特許第6,235,486号）。

【００１４】

血液ベースのヌクレオチドマーカーを用いる定性的ＲＴ－ＰＣＲに基づく実験を用いて、操作前血液中の陽性ＣＥＡ ｍＲＮＡを有する患者に対しての無疾患生存の可能性はＣＥＡ ｍＲＮＡについて陰性の患者のものよりも悪いことが示されている（Hardingham J. E., Hewett P. J., Sage R. E., Finch J. L., Nuttat J. D., Kotasel D.およびDovrovic A., Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease, Int. J. Cancer, 89: 8-13(2000): Taniguchi T., Makino M., Suzuki K., Kaibara N., Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen ｍＲＮＡ levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma, Cancer 89: 970-976 (2000))。この終点の予測値はＣＥＡ ｍＲＮＡレベルに依存し、それはＧ－ＣＳＦ、サイトカイン、ステロイドまたは環境因子によって、健全な個人においても誘導される。従って、ＣＥＡ ｍＲＮＡマーカーは特異

性を欠いており、循環結腸直腸癌細胞に対して明らかにユニークではない。ステージＨ－ＩＶ患者における悪性メラノーマのマーカーとしての末梢血液および骨髄中のチロシナーゼｍＲＮＡを関係させる報告もある（Ghossein R. A., Coit D., Brennan M., Zhang Z. F., Wang Y., Bhattacharya S., Houghton A.およびRosai J., Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma, Clin. Cancer Res., 4 (2): 419-428 (1998))。重ねて、可溶性腫瘍マーカーとしてチロシナーゼｍＲＮＡを用いることが、転移可能性および患者生存の指標として可溶性腫瘍抗原の以前に引用した限界にあてられている。

【００１５】

実験条件下では外観上は予想的であるが、前記および他の実験は、長期の追跡期間でのまたは満足のいく特異性での一定のデータを提供していない。従って、これらの努力は、血中の抗原に対するｍＲＮＡの出現が一般的に大部分の癌に対して予測的でなく、しかも患者にほとんど希望がない場合に検出される場合があるため、幾分役に立たないことを証明している。

【００１６】

これにも拘わらず、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）は、循環腫瘍細胞の定量的検出と患者予測とを相関付けると報告された唯一の手順となっている。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、結腸直腸癌患者の末梢血液中のＣＥＡ ｍＲＮＡを定量化するために使用されている（Ito S., Nakanishi H., Hirai T., Kato T., Kodera Y., Feng Z., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A.およびTatematsu M., Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a Light Cycler, Cancer Letters, 183: 195-203 (2002)）。カプラン・メイヤー型分析（Kaplan-Meier type analysis）を用いると、操作後血液中に陽性ＣＥＡ ｍＲＮＡを有する患者の無増悪生存は、ＣＥＡ ｍＲＮＡについて陰性である場合よりも有意に短い。これらの結果は、腫瘍細胞は血流に分離し（おそらくは、外科的手順の間に、または、操作時にすでに存在していた微小転移から）、結腸直腸癌を有する患者における貧弱な患者転帰を生じたことを示唆している。このアッセイの感度は、感度において従来のＲＴ－ＰＣＲと同様の再現性よい検出可能なレンジを提供した。言及したように、これらの検出レンジは、腫瘍細胞数への増幅した産物の信頼できない変換に基づく。外挿した細胞カウントは、転移増幅することができない損傷したＣＴＣも含み得る。さらに、ＰＣＲ－ベースのアッセイは、腫瘍細胞を定量化できないということと共に、可能性のある試料コンタミネーションによって制限される。最も重要なことには、ＰＣＲ、フローサイトメトリー、細胞質酵素および循環腫瘍抗原に基づく方法は、仮定したＣＴＣの転移可能性の基礎をなす構造一体性を確認する本質的形態情報を提供できず、従って、その一部分を本発明において具体化する高感度イメージング法よりも機能的に信頼性の低い代理アッセイを構成する。

【００１７】

癌の検出および予後における無傷の腫瘍細胞の評価：

血中における無傷の腫瘍細胞の検出は、その原発性腫瘍の切除を受けた癌患者における再発転移疾患への直接的な関連を提供する。残念ながら、悪性細胞の同じ広がりは、従来の腫瘍病期分類手順によって見落され続けている。最近の研究は、癌患者の骨髄中の単一のカルシノーマ細胞の存在が転移再発の独立した予後因子であることを示している（Diel IJ, Kaufman M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. J Clin Oncol, 10: 1534-1539, 1992）。しかし、これらの侵入的技術は、血中のばら播かれた上皮腫瘍細胞の検出と比較して、ルーチンまたは多重の臨床アッセイには望ましくないまたは受け入れられないように考えられる。

【００１８】

別のアプローチは免疫磁気分離技術を取込み、無傷の循環癌細胞の決定的な検出におけるより大きな感度および特異性を提供する。このシンプルかつ感度の高い診断ツールは、

記載されているように（米国特許第6,365,362号；米国特許第6,551,843号；米国特許第6,623,982号；米国特許第6,620,627号；米国特許第6,645,731号；WO 02/077604；WO 03/065042；およびWO 03/019141）本願発明において用いて、７．５ないし３０ｍｌの血液中の５以上の腫瘍細胞の閾値レベルに基づく個々の患者の統計学的生存可能性と相関する（１ないし２の腫瘍細胞は所定の個人の循環中の約３０００ないし４０００の合計腫瘍細胞に相当する）。

【００１９】

この診断ツールを用いれば、癌患者からの血液試料（WO 03/018757）を、例えばＥｐＣＡＭのような上皮細胞抗原に対して向けられた抗体でコートした磁性ビーズと一緒にインキュベートする。抗－ＥｐＣＡＭコート磁性ナノ粒子で標識した後に、磁気的に標識した細胞を磁気分離器を用いて単離する。免疫磁気的に富化した画分は、下流の免疫細胞化学分析用またはイメージサイトメトリー、例えばCell Spotter（登録商標） System（Immunicon Corp., PA）用にさらに処理する。磁性画分は、下流の免疫細胞化学分析、ＲＴ－ＰＣＲ、ＰＣＲ、ＦＩＳＨ、フローサイトメトリー、または他の型のイメージサイトメトリー用にも用い得る。

【００２０】

本発明の一つの具体例は、免疫磁気的な選択および分離を利用して全血試料中に存在するいずれの上皮細胞も高度に富化および濃縮した後のイメージサイトメトリーを含む。捕捉された細胞は白血球特異的マーカーでおよび１またはそれを超える腫瘍細胞特異的蛍光モノクローナル抗体で検出可能に標識して、捕捉された ＣＴＣの同定および計数を可能とし、ならびに多義的装置またはコンタミネーションしている非標的細胞からの目視識別を可能とする。７．５－３０ｍｌの血液当たり１または２個の上皮細胞という並はずれた感度では、このアッセイにより低い腫瘍細胞の大きさの早期ステージにおいても腫瘍細胞の検出が許容される。本発明の具体例はイメージサイトメトリーに限定されるものではなく、匹敵する感度および特異性のいずれの単離およびイメージング・プロトコールをも含む。

【００２１】

現在利用し得る予測プロトコールは、転移乳癌（ＭＢＣ）のごとき癌を有する患者における無増悪生存期間または全生存期間を予測するためにＣＴＣを相関付けるための堅実な信頼し得る手段を実証していない。従って、ＭＢＣのみならず一般に転移癌における転移可能性を有する癌細胞の正確な検出に対する明らかな要望が存在する。また、この要望は、所定の患者に対して最も有効な療法を選択する要望によって強調される。発明者らは、診断後の第１の追跡での患者における無増悪生存または全生存を予測する方法を記載する（WO 2004/076643）。この方法において、７．５ｍｌの血液中の≧５の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）が貧弱な臨床的転帰と関連する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２２】

本発明において、発明者らは、転移性乳癌患者の治療中の各追跡時点にて、無増悪生存または全生存を予測する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【００２３】

本発明は、転移性乳癌患者についての迅速な疾患増悪および死亡率を出現する正確な指標を提供するための治療中のいずれかの時間にて、転移癌を有する患者における循環上皮細胞の絶対数、変化、またはその双方に基づく、疾患増悪までの時間、生存および療法に対する応答を評価することにおける、免疫磁気的富化およびイメージサイトメトリーのごとき診断ツールを取り込んでいる癌予後のための方法および手段である。当該システムは、上皮細胞を免疫磁気的に濃縮し、細胞を蛍光標識し、陽性計数につきＣＴＣを同定および定量化する。細胞カウントの統計解析により、生存を予想する。

【００２４】

　より詳細には、本発明は、ＭＢＣにおける患者生存、疾患増悪までの時間および療法に対する応答を評価するための装置、方法およびキットを提供する。生存の予想は、死亡および疾患増悪までの経時的な血中の循環腫瘍細胞数の閾値比較に基づく。癌を有すると診断された患者の長期間の追跡研究の統計解析により、血中に見出されたＣＴＣ数の閾値および生存の予想を確立した。ＣＴＣの不存在は、５個よりも少ない形態学的に無傷のＣＴＣと定義する。生存を予想するためのＣＴＣの存在または不存在は、治療を選択するのに有用である。例えば、転移乳癌について以前に未治療の女性におけるＣＴＣの不存在を用いて、より少ない副作用およびより高いクウォリティー・オブ・ライフをもってホルモン療法－対－化学療法を選択できる。対照的に、ＣＴＣの存在を用いてより高い副作用を有するが高危険性集団の中でより有効に生存を延長し得る化学療法を選択し得るであろう。従って、本発明は、転移乳癌を有する女性におけるＣＴＣの検出における予後役割を有する。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】腫瘍細胞として捕捉した対象を確認するために用いたCell Spotter（登録商標）蛍光分析プロフィール。チェックマークは、複合イメージに基づく陽性腫瘍細胞を示す。複合イメージは、上皮細胞マーカー（ＥＣ－ＰＥ）および核染色（ＮＡＤＹＥ）についての陽性選択に由来する。陰性選択も、白血球マーカー（Ｌ－ＡＰＣ）および対照（ＣＮＴＬ）に必要である。

【図２】腫瘍状態における変化を測定するための診断方法の比較。ラジオグラフィー・イメージングを用いた分離した病変の物理学的測定の最近の標準を示す（パネルＡ）。血中のＣＴＣ数をカウントすることによって負った転移癌における変化を評価する能力を図示するモデルを示す（パネルＢ）。

【図３】６９名の患者におけるＣＴＣ数と腫瘍サイズとの間の相関の欠如。

【図４】療法に対して部分的な応答または安定した疾患状態を有する患者におけるＣＴＣ数における変化。すべての症例において減少または検出不可能のままであったかのいずれかのＣＴＣ。

【図５】疾患増悪を有する患者におけるＣＴＣ数における変化。疾患増悪に伴い増加したかまたは検出不可能のままであったかのいずれかのＣＴＣ。

【図６】ＣＴＣ数における患者の傾向。パネルＡは７．５ｍｌの血液当たり５よりも少ないＣＴＣを有する典型的な患者を示す。パネルＢは療法の過程の間にＣＴＣの減少を有する典型的な患者を示す。パネルＣはＣＴＣの減少につづいて増加を有する典型的な患者を示す。パネルＤはＣＴＣにおける増加を有する典型的な患者を示す。

【図７】迅速な増悪を有するＭＢＣ患者を識別するための最適ＣＴＣカットオフの決定。解析は、トレーニング・セットに含まれる１０２名の患者からのベースラインで得たＣＴＣ数を用いて行った。７．５ｍｌの血液中のＣＴＣの選択した数以上を有する患者の中央ＰＦＳは実線によって示し、選択したＣＴＣレベル未満を有する患者の中央ＰＦＳは破線によって示す。ＣＴＣが増加し、５のＣＴＣで安定になるプラトーに達する（水平線によって示した）に従い中央値ＰＦＳは低下した。黒色の点はすべての１０２名の患者に対する～５．９箇月の中央ＰＦＳを示す。≧ＣＴＣ／７．５ｍｌの選択したカットオフを、すべての続く解析に用いた。

【図８】ＰＦＳおよびＯＳについてのベースラインＣＴＣの予想値。新たな系列の療法を開始する前に採取したベースライン血液を用いた、７．５ｍｌの血液中に＜５（黒線）および≧５（灰色線）のＣＴＣを有するＭＢＣ患者のＰＦＳおよびＯＳの確率を示す。ＰＦＳおよびＯＳは、ベースライン血液を採取した時点から計算した。パネルＡ：ベースラインＣＴＣカウントを用いたＰＦＳの確率（ｎ＝１７７、ｌｏｇ－ｒａｎｋ　ｐ＝０．０００１、ＣｏｘＨＲ＝１．９５、カイ^{2}＝１５．３３、ｐ＝０．０００１）。パネルＢ：ベースラインＣＴＣカウントを用いたＯＳの確率（ｎ＝１０２、ｌｏｇ－ｒａｎｋ　ｐ＝０．０００３、ＣｏｘＨＲ＝３．９８、カイ^{2}＝１２．６４、ｐ＝０．０００４）。

【図９】転移性乳癌を有する１７７名の患者の患者におけるベースライン血液採取の日付

からの臨床的増悪までの時間または死亡（図９Ａ）あるいは死亡までの時間（図９Ｂ）を予測するための療法の開始前および開始後１５－２０週間までのＣＴＣレベルのカプラン－メイヤープロット。異なる４群の患者が比較される：第１群、全ての血液採取時間ポイントにて＜５　ＣＴＣを有する８３名（４７％）の患者；第２群、療法の開始前に≧５　ＣＴＣを有し、それらの最終血液採取の時点にて＜５　ＣＴＣに減少した３８名（２１％）の患者；第３群、療法の開始前に＜５　ＣＴＣを有し、それらの最後の血液採取の時点にて≧５　ＣＴＣに増加した１７名（１０％）の患者；および第４群、全ての血液採取時間ポイントにて≧５　ＣＴＣを有する３９名（２２％）の患者。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

本発明の目的は、患者生存の早期予後指標としての循環腫瘍細胞の検出を提供する。

本発明の最も広い態様下、一貫性が維持される限り、試料の収集および操作に制限は存在しない。従って、細胞は当該技術分野で知られている方法によって得ることができる。

【００２７】

血中のＣＴＣを単離し、富化しおよび分析するためのいずれの有効な機構も適当であるが、循環腫瘍細胞を収集する１の方法は、免疫磁気的富化技術、免疫蛍光標識技術と最初の血液採取後の適当な分析プラットフォームとを結合する。関連した試験は、全血試料中のこれら稀少細胞を検出するための、および、上皮起源の悪性腫瘍における疾患の臨床過程におけるそれらの役割を調べるための感度および特異性を有している。全血試料から稀少細胞が感度および特異性をもって検出され、本発明の診断アッセイにおいて、それらを収集し使用することを可能とし、すなわち、悪性腫瘍における疾患の臨床過程を予測する。

【００２８】

本技術を用いて、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）が検出可能な量で血中に存在することが示されている。このことは、癌患者の末梢循環における上皮起源の細胞の意義を調べるためのツールを創製した（Racila E., Euhus D., Weiss A. J., Rao C., McConnell J., Terstappen L. W. M. M.およびUhr J. W., Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4589-4594 (1998)）。この研究は、これらの血液－骨細胞が癌の病態生理学において極めて重要な役割を有し得ることを実証した。血液５ｍｌ当たり１の上皮細胞の検出感度を有すれば、アッセイは、免疫磁気試料富化および蛍光モノクローナル抗体染色に続いて、試料の迅速および高感度分析のためのフローサイトメトリーを取り込む。結果は、乳房の転移カルシノーマについて治療した８名の患者の末梢血液中の上皮細胞数が疾患の増悪および療法に対する応答と相関することを示す。局在化した疾患を有する１４名の患者のうちの１３、リンパ節巻添え(involvement)を有する５名の患者のうちの５名、および遠位転移を有する１１名の患者のうちの１１名で、上皮細胞が末梢血液中に見出された。上皮細胞数は、広範囲な疾患を有する患者におけるよりも顕著に多かった。

【００２９】

免疫磁気的に富化した試料をイメージサイトメトリーによって分析するように、アッセイをイメージサイトメトリー分析に形成した（実施例１を参照されたし）。これは、蛍光ベースの顕微鏡イメージ分析システムであり、これは、フローサイトメトリー分析と対比して、事象の視覚化および形態的特徴の評価がさらに対象を同定することを許容する。

【００３０】

血液からの単離した細胞を自動的に計数するために用いた自動蛍光顕微鏡システムは、一体化されたコンピュータ制御蛍光顕微鏡およびディスポーザブルな試料カートリッジを保持する磁気拘束（yoke）アセンブリーを有する自動ステージを可能とする。磁気拘束は、試料チャンバー内の磁性流体標識した候補腫瘍細胞を顕微鏡観察するために試料カートリッジの上方の観察表面に磁気的に局在し得るように設計されている。ソフトウェアにより、サイトケラチンに対する抗体で標識され、上皮起源を有する疑わしい癌細胞は、最終的な選択のためにオペレーターに示される。

【００３１】
腫瘍細胞の単離は当該技術分野において知られているいずれの手段によってもなし得るが、１つの具体例は７．５ｍｌの全血における腫瘍細胞を単離するための細胞安定化および浸透処理手順を用いる。上皮細胞特異的な磁気粒子を添加し、２０分間インキュベートする。磁気分離後に、免疫磁気結合した抗体に結合した細胞を試験管の壁に磁気的に保持する。次いで、結合しなかった試料を吸引し、等張溶液を添加して試料を再懸濁する。核酸色素、サイトケラチン（上皮細胞のマーカー）に対するモノクローナル抗体およびＣＤ４５（広スペクトル白血球マーカー）を試料とインキュベートする。磁気分離後に、結合しなかった画分を再度吸引し、結合および標識した細胞を０．２ｍｌの等張溶液に再懸濁する。蛍光顕微鏡検鏡するために、試料を細胞提示チャンバーに懸濁し、磁場が磁気標識細胞に向いている磁気デバイスに入れる。細胞は自動的に同定され、チェックリスト計数のためにオペレーターに候補循環腫瘍細胞が示される。計数チェックリストは、完全細胞を構成する所定の形態基準からなる（実施例１を参照されたし）。

【００３２】
癌生存における予後因子として無傷の循環腫瘍細胞を用いることと一緒に、免疫磁気的富化およびイメージサイトメトリーの診断可能性は、適当な治療を決定するための迅速かつ高感度な方法を提供し得る。従って、本発明においては、装置、方法およびキットが、生存可能性の予後評価のための転移および原発性患者の血液中の減少した腫瘍細胞の迅速な計数および特徴付けのために提供される。

【００３３】
本発明の方法は、好ましいまたは好ましくない生存を評価し、予後が好ましいものである場合に有害な副作用を生じ得る必要でない療法を防止することにさえ有用である。従って、本発明は、広範な種々の癌のいずれの予後にも使用でき、かかる癌には限定するものではないが、以下の強調する癌を含む固形癌および白血病が含まれる：Apudo細胞腫、分離腫、鰓腫、悪性カルチノイド症候群、カルチノイド心臓病、癌腫（すなわち、ウォーカー、基底細胞、基底有棘細胞、ブラウン－ピアース、腺管、エールリッヒ腫瘍、クレブス２、メルケル細胞、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、硬性癌、細気管支癌、気管支原生癌、扁平上皮癌および移行上皮癌）、造血障害、白血病（すなわち、Ｂ細胞型白血病、混合型白血病、ヌル細胞型白血病、Ｔ細胞型白血病、Ｔ細胞性慢性、ＨＴＬＶ－ＩＩ関連白血病、リンパ球性急性白血病、リンパ球性慢性白血病、肥満細胞型白血病および骨髄性白血球）、悪性組織球症、ホジキン病、免疫増殖性小腸疾患、非ホジキンリンパ腫、骨髄腫、細網内皮症、メラノーマ、軟骨芽細胞腫、軟骨腫、軟骨肉腫、線維腫、骨線維肉腫、巨細胞腫、組織球腫、脂肪腫、脂肪肉腫、中皮腫、粘液腫、粘液肉腫、骨腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、滑膜腫、腺線維腫、リンパ腺腫、癌肉腫、脊索腫、頭蓋咽頭腫、未分化胚細胞腫、過誤腫、間葉腫、中腎腫、筋肉腫、エナメル上皮腫、セメント質腫、歯牙腫、奇形腫、胸腺腫、絨毛性腫瘍、腺癌、腺腫、胆管腫、真珠腫、円柱腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、顆粒膜細胞腫、男性胚細胞腫、肝細胞癌、汗腺腫、膵島細胞腫、イシディグ（icydig）細胞腫、乳頭腫、セルトリ細胞腫、莢膜細胞腫、平滑筋腫、子宮筋腫、平滑筋肉腫、筋芽細胞腫、筋腫、筋肉腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、上衣細胞腫、神経節腫、神経膠腫、髄芽腫、髄膜腫、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経上皮腫、神経線維腫、神経細胞腫、傍神経節腫、非クロム親和傍神経筋腫、被角血管腫、好酸球増多随伴性血管類リンパ組織増殖症、硬化性血管腫、血管腫症、グロムス血管腫、血管内皮細胞腫、血管腫、血管周皮腫、血管肉腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、松果体腫、癌肉腫、軟骨肉腫、嚢胞肉腫、葉状嚢胞肉腫、線維肉腫、血管肉腫、子宮肉腫、白血肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、筋肉腫、粘液肉腫、卵巣カルシノーマ、横紋筋肉腫、肉腫（すなわち、ユーイング実験、カポシおよびマスト細胞）、新生物（すなわち、骨、胸部、消化器系、結腸直腸、肝臓、膵臓、下垂体、精巣、眼窩、頭部および首部、中枢神経系、聴覚、骨盤、気道および尿生殖器）、神経繊維腫症および子宮頸部形成異常。

【００３４】
以下の実施例は、患者からの血液中のＣＴＣの予測および予後値を説明する。以下の実

施例は説明のために提供するものであり、いかなる場合においても本発明の範囲を限定するものでないことを注記しておく。

【実施例】

【００３５】

実施例１

Cell Prep（商標）を用いた循環サイトケラチン陽性細胞の計数

サイトケラチン陽性細胞は、全血の７．５ｍｌ試料を用いて細胞保存システムによって単離する。上皮細胞特異的な免疫磁気流体を添加し、２０分間インキュベートする。２０分間の磁気分離後に、免疫磁気結合した抗体に結合した細胞を試験管の壁に磁気的に保持する。次いで、未結合の試料を吸引し、等張溶液を添加して試料を再懸濁する。核酸色素、サイトケラチン（上皮細胞のマーカー）に対するモノクローナル抗体およびＣＤ４５（広スペクトルの白血球マーカー）を試料と一緒に１５分間インキュベートする。磁気分離後に、未結合画分を再度吸引し、結合および標識した細胞を０．２ｍｌの等張溶液に再懸濁する。試料を、蛍光顕微鏡検鏡するために、細胞提示チャンバーにおいて懸濁し、その磁場が磁気標識した細胞に向いている磁気装置に入れる。細胞は自動的に同定され；当該システムによって対照細胞が計数され；一方、示したチェックリストを用いる計数のために操作者に候補循環癌細胞が提示される（図１）。

【００３６】

実施例２

腫瘍負荷の評価：ラジオグラフィーイメージ分析とＣＴＣの絶対数との間の比較

転移病変のラジオグラフィー測定を最近使用して、転移疾患を有する癌患者における腫瘍負荷が評価されている。一般的に、最大の病変を測定し、合算して腫瘍負荷が得られる。乳癌患者における肝臓転移の二次元測定の例を図２Ａに図示する。血流中の腫瘍負荷を測定する必要性を図示するモデルを、実際の活性腫瘍負荷の測定として、したがって疾患の全体活性のより良好な測定として図２Ｂに図示する。ＣＴＣの絶対数がイメージングによって測定した腫瘍の寸法と相関するかを決定するために、ＭＢＣを有する患者における予測試験を行った。

【００３７】

イメージサイトメトリーを用いて、測定可能なＭＢＣを有する６９名の患者からの７．５ｍｌの血液中のＣＴＣを計数した。腫瘍負荷は、療法を開始する前の８までの測定可能な病変の二次元ラジオグラフィー測定によって評価した。腫瘍負荷は、個々の測定（mm^2）を付加することによって決定した。ＣＴＣは、療法の開始前に採取した血液中で計数した。

【００３８】

図３は６９名の患者における７．５ｍｌ中のＣＴＣ数－対－腫瘍測定の二次元合算を示す。図３から、腫瘍のサイズと血中の腫瘍細胞の絶対数との間に相関は存在しない。イメージングにより測定した大きな腫瘍を有するいくらかの患者は少数のＣＴＣを有し、また反対でもあった。

【００３９】

従って、ラジオグラフィーによって測定した腫瘍負荷は、血中に存在する腫瘍細胞の絶対数と相関しない。

【００４０】

実施例３

腫瘍負荷の評価：ラジオグラフィーイメージにおける変化とＣＴＣの絶対数における変化との間の比較

ラジオグラフィーイメージングは、特定の疾患が治療に応答しているか、安定化しているか、または増悪しているかを評価するための最近の標準である。ラジオグラフィー測定間の間隔は、意味のある結果を得るために少なくとも３箇月としなければならない。従って、治療サイクルの間の早期の療法に対する応答を予想し得る試験は、転移疾患について治療した患者の管理を改善して、クウォリティー・オブ・ライフを潜在的に向上し、かつ

、生存を潜在的に改善し得るであろう。この試験においては、ＭＢＣについて新たな系統の治療を開始した患者を評価して、ＣＴＣ数における変化がイメージングによって測定した患者状態における変化と相関するかを決定した。

【００４１】

このイメージングシステムを用いて、新たな療法を開始することに関して、および治療サイクルの間の種々の時点で、ＭＢＣ患者における７．５ｍｌの血液中のＣＴＣを計数した。ラジオグラフィー測定は療法開始前、療法開始１０－１２週後および治療サイクル完了後（療法開始約６月後）に、または最初になろうがなかろうが、患者が療法で増悪した時点に行った。

【００４２】

イメージ分析から、１４名の患者において部分的な応答が見出された（１７のデータセグメント。ＣＴＣはすべての症例において減少したかまたは検出不可能のままであった（図４を参照されたし）。イメージングによって安定な疾患は、３０名の患者において見出された（３７のデータセグメント）。ＣＴＣは全症例において減少したかまたは検出不可能のままであった（図４を参照されたし）。イメージングによる疾患増悪は、１４名の患者において見出された（１５のデータセグメント）。ＣＴＣは１５の症例のうちの７において増加した。他の８の症例では、いずれの時点においてもＣＴＣは全く検出されなかった。

【００４３】

ＣＴＣの増加は、疾患増悪を有する患者においてのみ観察された（１００％）。ＣＴＣの減少は部分的応答ないし安定な疾患を有する患者においてのみ観察された（１００％）。部分的応答または安定疾患を有する患者においては、６１の症例のうちの５４においてＣＴＣは双方の時点においても全く検出されなかった（８９％）。

【００４４】

実施例４

治療のガイドとしての、ＭＢＣについて処理した患者におけるＣＴＣ数における傾向

ＭＢＣを有する患者における試験を行い、ＣＴＣ数の変化における明らかな傾向がＭＢＣについて治療した患者において観察し得るか、および、ＭＢＣを有する患者の治療の最適化に治療する医師をガイドするために、かかる傾向に単純なルールを適用し得るかを決定した。

【００４５】

イメージサイトメトリーを用いて、７．５ｍｌの血液中のＣＴＣを計数した。ＭＢＣに対して新たな系統の療法を開始した８１名の患者を当該試験に登録した。ＣＴＣは、療法を開始する前におよびその後はほぼ毎月採取した血液中で計数した。

【００４６】

８１名の患者のうちの７６名（９４％）において、ＣＴＣ数における明らかな傾向が観察された。療法の過程の間は、５０％の患者の血液７．５ｍｌ当たりにＣＴＣ数が検出できないか、または５未満のＣＴＣが残存していた。典型的な例を図６Ａに示す。ＣＴＣ数は２２％の患者において療法の過程の間に減少した。典型的な例を図６Ｂに示す。６％の患者においては、ＣＴＣ数における減少に続いて療法の過程の間に増加することが観察された。典型的な例を図６Ｃに示す。１６％の患者においては、療法の過程の間にＣＴＣ数が増加した。典型的な例を図６Ｄに示す。４２名の例において、各血液の採取時に、２つの血液試料を調製し、分析した。最初の時点に採取した第１の試験管および追跡時点に採取した第１の試験管を用いた結果を、各時点に採取した第２の試験管を用いた結果と比較した。これらの例のうちの１のみにおいて、ＣＴＣ数における変化が、採取した第１の試験管と採取した第２の試験管の間で（あるいは、二重で）異なっていた（９８％の合致）。この場合においては、採取した第１の血液からの双方の試験管ともに０のＣＴＣを有していたが、採取した第２の血液に関しては、１の試験管が５のＣＴＣを有し（カットオフの下）、第２の試験管が６のＣＴＣ（カットオフの上）を有していた。ＣＴＣ測定の再現性の比較において、同じフィルムを２名の異なるエキスパート放射線技師によって判読さ

せた場合のラジオグラフィーイメージングの判読者間変動は、わずか８１％の合致しか生じなかった。さらに、１４６のイメージング・セグメントのセットにおける２の放射線技師間の合致は、増悪－対－無増悪を測定した場合は８５％であり、増悪、安定な疾患および部分的応答を測定した場合にはわずか５８％まで低下した。それに対して、２の異なる放射線技師によって同じデータセットに対してＣＴＣ測定の分析を行うと、１００％の合致を生じた。

【００４７】

従って、ＭＢＣについて治療した患者におけるＣＴＣの検出およびモニタリングは、ラジオグラフィーイメージングよりも、療法に対する応答を測定する方がより再現性のよい手法である。

【００４８】

実施例５

療法の開始前のＰＦＳおよびＯＳの予測

療法の開始前のＣＴＣレベルを無増悪生存（ＰＦＳ）および全生存（ＯＳ）と関連付ける実験を行い、それによって≧５　ＣＴＣ／７．５ｍｌの閾値を用いた。

【００４９】

測定し得るＭＢＣを有する１１７名の患者を、新たな系列の治療を開始する前のおよび６箇月までの引き続いての１箇月間隔の７．５ｍｌの血液中のＣＴＣについて試験した。いずれかの型の療法およびいずれかの系統の療法に入る患者を当該試行に含めた。疾患の増悪または応答は、各患者の部位において医師によって評価した。

【００５０】

図７に示すごとく、中央値ＰＦＳはＣＴＣレベルが上昇するに従って減少し、５のＣＴＣで平行になるプラトーに達した（水平線）。中央値ＰＦＳはすべての患者について約５．９箇月であった（黒点）。陽性患者についての中央値ＰＦＳにおける変化および に基づき、コックスハザード比に基づいて、≧５　ＣＴＣのカットオフをすべてのつづく分析に用いた。

【００５１】

図８は、ベースライン血液採取中で測定されたＣＴＣ数を用いた無増悪生存（ＰＳＦ）および全生存（ＯＳ）のカプラン・メイヤー分析を示している。１７７名の患者において、中央値ＰＦＳ時間は約５．０箇月であった。ベースラインにて≧５　ＣＴＣ／７．５ｍｌの血液を有する患者は、＜５　ＣＴＣを有する患者よりも有意に短いＰＳＦを有していた（各々、約２．７箇月－対－７．０箇月）。全体生存（ＯＳ）は、＞５　ＣＴＣ－対－＜５　ＣＴＣを有する患者について、各々、１０．１箇月－対－＞１８箇月の中央ＯＳを有して同じ傾向を反映した。

【００５２】

新しい系統の療法を開始する前のＣＴＣ数の測定は、患者がその療法において増悪するまでの時間を予想し、生存時間を予想する。この予想能力に基づいて、ベースラインにおけるＣＴＣの検出および測定は適当な治療の選択において有用であろう情報を医師に提供する。また、ＰＦＳおよびＯＳの観点から患者を高危険性および低危険性に階層化する能力は、療法試行に入れる適当な患者を選択するのに非常に有用となり得る。潜在的に高い毒性を有する新規な薬剤に関しては、乏しい予後因子を有する患者はより適当な標的集団となり得る。それに対して、最小限の毒性を有する薬剤および将来有望な療法効力は、好ましい予後因子を有する患者に向けてより適当に標的化し得る。

【００５３】

実施例６

転移性乳癌患者の療法中の各追跡時間ポイントでのＰＦＳおよびＯＳの予測

ＣＴＣをさらなる指定された間隔で処置経過にわたり連続的に評価した。その結果は、引き続いての「全ての」追跡時間ポイントでのＣＴＣレベルの評価が、臨床転帰を正確かつ再現可能に予測した。上昇したＣＴＣから非上昇レベル(＜５ＣＴＣ/７．５ｍＬ）に転換した患者は、そのＣＴＣが上昇しなかったものに同様であるＰＦＳおよびＯＳを示した

。これは、＜５個のＣＴＣを有する患者が治療に応答する、および／または比較的無痛性疾患を有するのいずれかのようであることをしめすであろう。対照的に、非上昇のＣＴＣレベルから上昇したＣＴＣレベルに転換した患者のＯＳは減少したが、上昇したＣＴＣレベルを常に示した患者のＯＳほど短くなかった。

【００５４】

ＣＴＣは、治療の新しい経過の開始前に先立ち、および治療開始後３－５、６－８、９－１４および１５－２０週間に１７７名のＭＢＣ患者において計数した。無増悪生存期間（ＰＦＳ）および全生存（ＯＳ）時間は、各追跡血液採取の日付から計算した。カプラン－メイヤープロットおよび生存分析は、各血液採取にて≧５のＣＴＣ／７．５ｍＬの閾値を用いて行った。

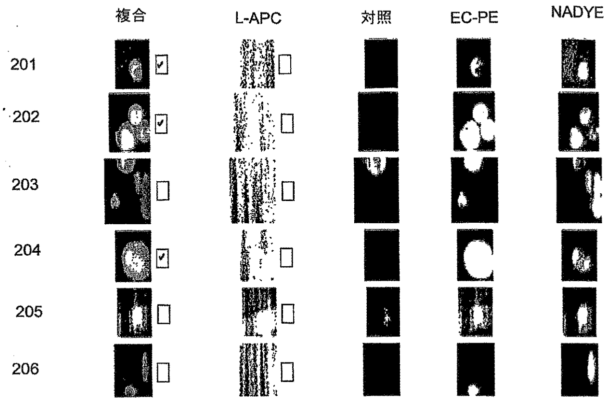
【００５５】

５回の血液採取時間ポイントでの＜５個のＣＴＣを有する患者についての中央値ＰＦＳ時間は、各々、７．０、６．１、５．６、７．０および６．０箇月であった。≧５個のＣＴＣを有する患者では、中央値ＰＦＳは、これらの時間ポイントでかなり短かった：各々、２．７、１．３、１．４、３．０および３．６箇月。ベースラインおよび５回の血液採取時間ポイントでの＜５　ＣＴＣを持つ患者についての中央値ＯＳは、全て、＞１８．５箇月であった。≧５個のＣＴＣを有する患者では、中央値ＯＳは、これらの時間ポイントにてかなり短かった：各々、１０．９、６．３、６．３、６．６および６．７箇月。ベースラインおよび治療開始後９－１４週までの中央値ＰＦＳ（図９Ａ）およびＯＳ（図９Ｂ）時間は、統計的に有意に異なっていた。

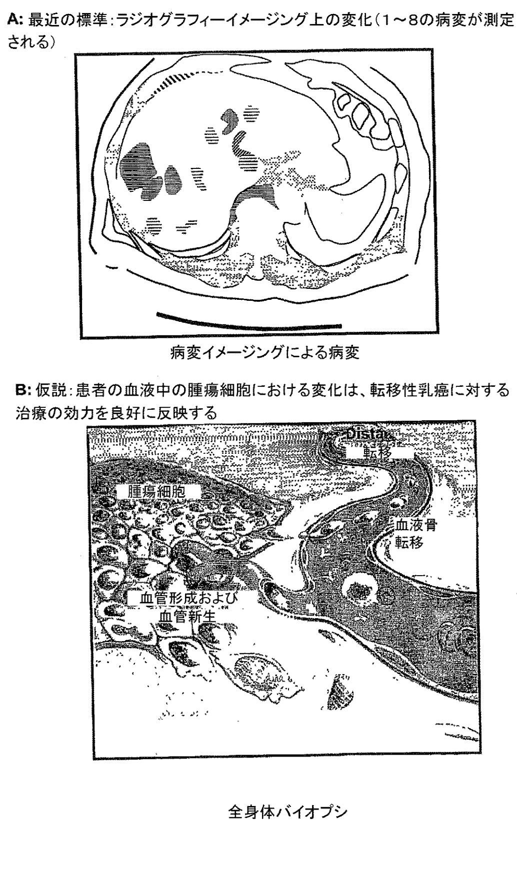
【００５６】

療法中のいずれの時間にも上昇したＣＴＣの検出は、ＭＢＣ患者についての迅速な疾患増悪および死亡率の正確な指標である。結果的に、ＣＴＣは、転移性乳癌を持つ患者の臨床経過中のいずれかの時間ポイントにて５未満まで低下して、ＰＦＳおよびＯＳを最大化し、療法に関連した利益を最大化しなければならない。

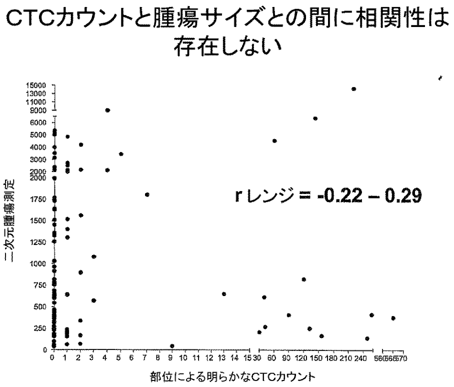
【図１】



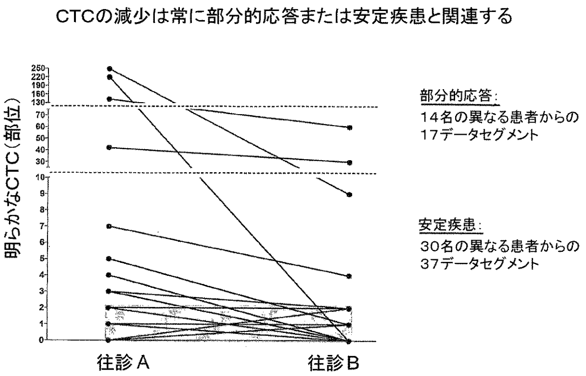
【図２】



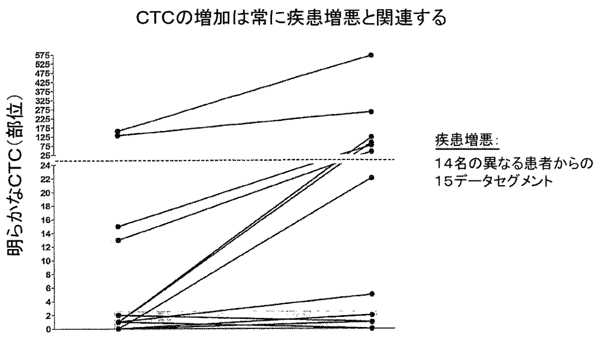
【図３】


CTCカウントと腫瘍サイズとの間に相関性は
存在しない
二次元腫瘍測定
r レンジ = -0.22 – 0.29
部位による明らかなCTCカウント

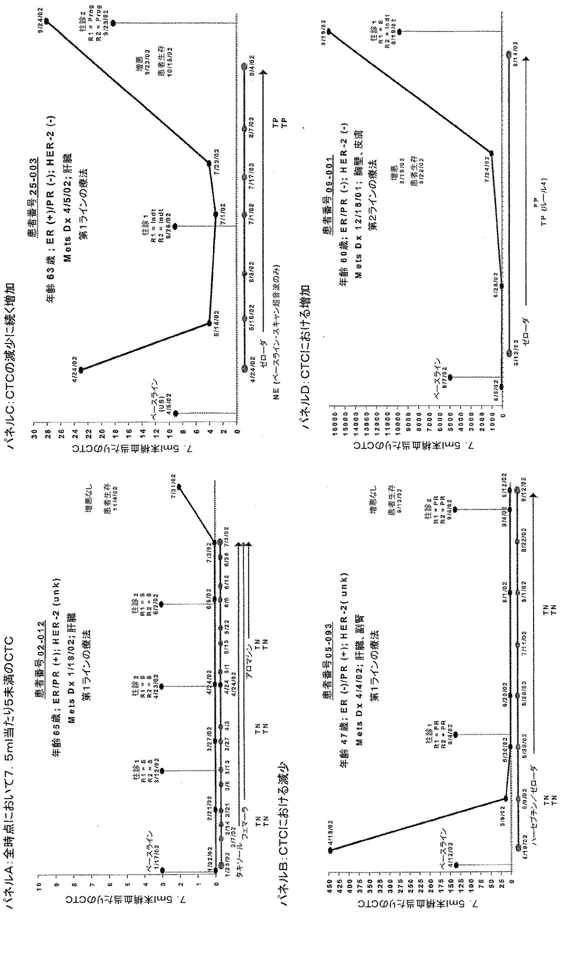
【図４】


CTCの減少は常に部分的応答または安定疾患と関連する
明らかなCTC（部位）
部分的応答:
１４名の異なる患者からの
１７データセグメント
安定疾患:
３０名の異なる患者からの
３７データセグメント
往診Ａ
往診Ｂ

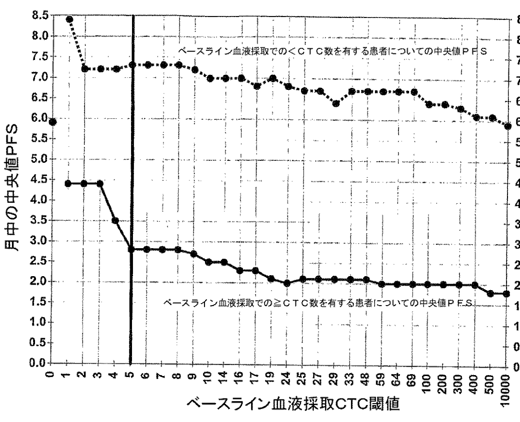
【図５】


CTCの増加は常に疾患増悪と関連する
明らかなCTC（部位）
疾患増悪:
１４名の異なる患者からの
１５データセグメント

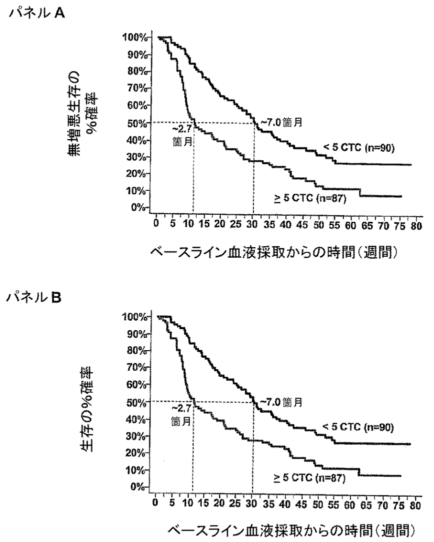
【図６】


パネルC:CTCの減少に続く増加
パネルD:CTCにおける増加
パネルA:全時点において7.5ml当たり5未満のCTC
パネルB:CTCにおける減少

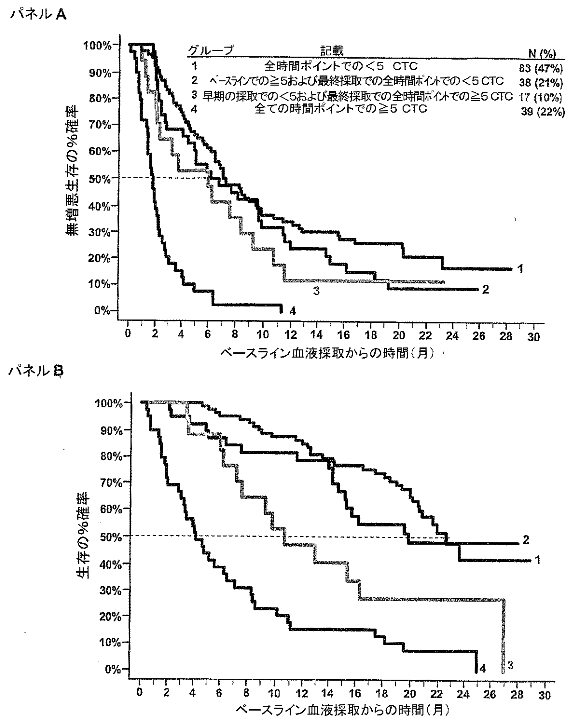
【図７】


月中の中央値PFS
ベースライン血液採取での＜ＣＴＣ数を有する患者についての中央値ＰＦＳ
ベースライン血液採取での≧ＣＴＣ数を有する患者についての中央値ＰＦＳ
ベースライン血液採取CTC閾値

【図８】


パネルA
無増悪生存の%確率
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
~7.0箇月
~2.7箇月
< 5 CTC (n=90)
≥ 5 CTC (n=87)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80
ベースライン血液採取からの時間（週間）
パネルB
生存の%確率
~7.0箇月
~2.7箇月
< 5 CTC (n=90)
≥ 5 CTC (n=87)
ベースライン血液採取からの時間（週間）

【図９】


パネルA
グループ 記載 N (%)
1 全時間ポイントでの<5 CTC 83 (47%)
2 ベースラインでの≧5および最終採取での全時間ポイントでの<5 CTC 38 (21%)
3 早期の採取での<5および最終採取での全時間ポイントでの≧5 CTC 17 (10%)
4 全ての時間ポイントでの≧5 CTC 39 (22%)
無増悪生存の%確率
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
ベースライン血液採取からの時間（月）
パネルB
生存の%確率
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
ベースライン血液採取からの時間（月）

フロントページの続き

(72)発明者　ジェフリー・ダブリュー・アラード
アメリカ合衆国１９４５４ペンシルベニア州ノース・ウェールズ、グウィネド・リー・ドライブ１０２番
(72)発明者　ジェラルド・ブイ・ドイル
アメリカ合衆国１９０８７ペンシルベニア州ラドナー、ティモシー・サークル１２９番
(72)発明者　ダニエル・エフ・ヘイズ
アメリカ合衆国４８１０９－０９４２ミシガン州アン・アーバー、イースト・メディカル・センター・ドライブ１５００番、キャンサー・センター６３２１、ユニバーシティ・オブ・ミシガン・コンプリヘンシブ・キャンサー・センター
(72)発明者　マイケル・クレイグ・ミラー
アメリカ合衆国１８９５１ペンシルベニア州クエイカータウン、カバード・ブリッジ・ドライブ８０３２番
(72)発明者　レオン・ウェー・エム・エム・テルスタッペン
アメリカ合衆国１９００６ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロード１３５４番

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 BA13 BB03 CB01 FB03
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ02 QQ08 QQ41 QR08 QR32 QR42 QR48
QR50 QR72 QR77 QR83 QS15 QS25 QS28 QS33 QS34 QS36
QX01 QX02

【外国語明細書】

WO 2006/104474 PCT/US2005/008602

Title: A method for predicting progression free and overall survival at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients using circulating tumor cells.

Inventors: Jeffrey W. Allard, Gerald V. Doyle, Daniel F. Hayes, Michael Craig Miller, Leon W.M.M Terstappen

Cross-Reference to Related Applications

This is a non-provisional application which claims priority to PCT/US04/005848 (WO 2004/076643), filed February 26, 2004 which claims priority of provisional Applications 60/450,519, filed February 27, 2003, and 60/524,759, filed November 25, 2003. Each of the aforementioned applications is incorporated in full by reference herein

Background

- Field of the Invention

The invention relates generally to cancer prognosis and survival in metastatic cancer patients, based on the presence of morphologically intact circulating cancer cells (CTC) in blood. More specifically, diagnostic methods, reagents and apparatus are described that correlate the presence of circulating cancer cells in 7.5 ml of blood of metastatic breast cancer patients with time to disease progression and survivability. Circulating tumor cells are determined by highly sensitive methodologies capable of isolating and imaging 1 or 2 cancer cells in approximately 5 to 50 ml of peripheral blood, the level of the tumor cell number and an increase in tumor cell number during treatment are correlated to the time to progression, time to death and response to therapy.

- Background Art

Despite efforts to improve treatment and management of cancer patients, survival in cancer patients has not improved over the past two decades for many cancer types. Accordingly, most cancer patients are not killed by their primary tumor, but they succumb instead to metastases:

multiple widespread tumor colonies established by malignant cells that detach themselves from the original tumor and travel through the body, often to distant sites. The most successful therapeutic strategy in cancer is early detection and surgical removal of the tumor while still organ confined. Early detection of cancer has proven feasible for some cancers, particularly where appropriate diagnostic tests exist such as PAP smears in cervical cancer, mammography in breast cancer, and serum prostate specific antigen (PSA) in prostate cancer. However, many cancers detected at early stages have established micrometastases prior to surgical resection. Thus, early and accurate determination of the cancer's malignant potential is important for selection of proper therapy.

Optimal therapy will be based on a combination of diagnostic and prognostic information. An accurate and reproducible diagnostic test is needed to provide specific information regarding the metastatic nature of a particular cancer, together with a prognostic assessment that will provide specific information regarding survival.

A properly designed prognostic test will give physicians information about risk and likelihood of survival, which in turn gives the patient the benefit of not having to endure unnecessary treatment. Patient morale would also be boosted from the knowledge that a selected therapy will be effective based on a prognostic test. The cost savings associated with such a test could be significant as the physician would be provided with a rationale for replacing ineffective therapies. A properly developed diagnostic and prognostic data bank in the treatment and detection of metastatic cancer focusing on survival obviously would provide an enormous benefit to medicine (US 6,063,586).

If a primary tumor is detected early enough, it can often be eliminated by surgery, radiation, or chemotherapy or some combination of those treatments. Unfortunately, the metastatic colonies are difficult to detect and eliminate and it is often impossible to treat all of them successfully. Therefore from a clinical point of view, metastasis can be considered the conclusive event in the natural progression of cancer. Moreover, the ability to metastasize is a property that uniquely characterizes a malignant tumor.

Soluble Tumor Antigen:

Based on the complexity of cancer and cancer metastasis and the frustration in treating cancer patients over the years, many attempts have been made to develop diagnostic tests to guide treatment and monitor the effects of such treatment on metastasis or relapse.

One of the first attempts to develop a useful test for diagnostic oncology was the formulation of an immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA). This antigen appears on fetal cells and reappears on tumor cells in certain cancers. Extensive efforts have been made to evaluate the usefulness of testing for CEA as well as many other "tumor" antigens, such as prostate specific antigen (PSA), CA 15.3, CA 125, prostate-specific membrane antigen (PSMA), CA 27.29, p27 found in either tissue samples or blood as soluble cellular debris. These and other debris antigens are thought to be derived from destruction of both circulating and non-circulating tumor cells, and thus their presence may not always reflect metastatic potential, especially if the cells rupture while in an apoptotic state.

Additional tests used to predict tumor progression in cancer patients have focused upon correlating enzymatic indices like telomerase activity in biopsy-harvested tumor samples with an indication of an unfavorable or favorable prognosis (US 5,693,474; US 5,639,613). Assessing enzyme activity in this type of analysis can involve time-consuming laboratory procedures such as gel electrophoresis and Western blot analysis. Also, there are variations in the signal to noise and sensitivity in sample analysis based on the origin of the tumor. Despite these shortcomings, specific soluble tumor markers in blood can provide a rapid and efficient approach for developing a therapeutic strategy early in treatment. For example, detection of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer have been shown to be prognostic factors for metastatic breast cancer (Ali S.M., Leitzel K., Chinchilli V.M., Engle L., Demers L., Harvey H.A., Carney W., Allard J.W. and Lipton A., Relationship of Serum HER-2/neu and Serum CA 15-3 in Patients with Metastatic Breast Cancer, Clinical Chemistry, 48(8): 1314-1320 (2002)). Increased HER-2/neu results in decreased response to hormone therapy, and is a significant prognostic factor in predicting responses to hormone receptor-positive metastatic breast cancer.

Thus in malignancies where the HER-2/neu oncogene product is associated, methods have been described to monitor therapy or assess risks based on elevated levels (US 5,876,712). However in both cases, the base levels during remission, or even in healthy normals, are relatively high and may overlap with concentrations found in patients, thus requiring multiple testing and monitoring to establish patient-dependent baseline and cut-off levels.

In prostate cancer, PSA levels in serum have proven to be useful in early detection. When used with a follow-up physical examination (digital rectal exam) and biopsy, the PSA test has improved detection of prostate cancer at an early stage when it is best treated.

However, PSA or the related PSMA testing leaves much to be desired. For example, elevated levels of PSA weakly correlate with disease stage and appear not to be a reliable indicator of the metastatic potential of the tumor. This may be due in part to the fact that PSA is a component of normal prostate tissue and benign prostatic hyperplasia (BHP) tissue. Moreover, approximately 30% of patients with alleged localized prostate cancer and corresponding low serum PSA concentrations, may have metastatic disease (Moreno et al., Cancer Research, 52:61 10 (1992)).

Genetic markers:

One approach for determining the presence of malignant prostate tumor cells has been to test for the expression of messenger RNA from PSA in blood. This is being done through the laborious procedure of isolating all of the mRNA from the blood sample and performing reverse transcriptase PCR. No significant correlation has been described between the presence of shed tumor cells in blood and the ability to identify which patients would benefit from more vigorous treatment (Gomella LG., J of Urology, 158:326-337 (1997)). Additionally, false positives are often observed using this technique. There is an added drawback, which is that there is a finite and practical limit to the sensitivity of this technique based on the sample size. Typically, the test is performed on 10^5 to 10^6 cells separated from interfering red blood cells, corresponding to a practical lower limit of sensitivity of one tumor cell/0.1 ml of blood (about 10 tumor cells in one ml of blood) before a signal is detected.

Higher sensitivity has been suggested by detecting hK2 RNA in tumor cells isolated from blood (US 6,479,263; US 6,235,486).

Qualitative RT-PCR based studies with blood-based nucleotide markers has been used to indicate that the potential for disease-free survival for patients with positive CEA mRNA in pre-operative blood is worse than that of patients negative for CEA mRNA (Hardingham J.E., Hewett PJ. , Sage R.E., Finch J.L., Nuttal J.D., Kotasel D. and Dovrovic A., Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease, Int. J. Cancer 89:8-13 (2000); Taniguchi T., Makino M., Suzuki K., Kaibara N., Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma, Cancer 89:970-976 (2000)). The prognostic value of this endpoint is dependent upon CEA mRNA levels, which are also induced in healthy individuals by G-CSF, cytokines, steroids, or environmental factors. Hence, the CEA mRNA marker lacks specificity and is clearly not unique to circulating colorectal cancer cells. Other reports have implicated tyrosinase mRNA in peripheral blood and bone marrow as a marker for malignant melanoma in stage II-IV patients (Ghossein R.A., Coit D., Brennan M., Zhang Z.F., Wang Y., Bhattacharya S., Houghton A., and Rosai J., Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma, Clin Cancer Res., 4(2):419-428 (1998)). Again using tyrosinase mRNA as a soluble tumor marker is subject to the previously cited limitations of soluble tumor antigens as indicators of metastatic potential and patient survival.

The aforementioned and other studies, while seemingly prognostic under the experimental conditions, do not provide for consistent data with a long follow-up period or at a satisfactory specificity. Accordingly, these efforts have proven to be somewhat futile as the appearance of mRNA for antigens in blood have not been generally predictive for most cancers and are often detected when there is little hope for the patient.

In spite of this, real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been the only procedure reported to correlate the quantitative detection of circulating tumor cells with patient prognosis. Real-time RT-PCR has been used for quantifying CEA mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients (Ito S., Nakanishi H., Hirai T., Kato T., Kodera Y., Feng Z., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A., and Tatematsu M., Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a Light Cycler, Cancer Letters, 183:195-203 (2002)). Using Kaplan-Meier type analysis, disease free survival of patients with positive CEA mRNA in post-operative blood was significantly shorter than in cases that were negative for CEA mRNA. These results suggest that tumor cells were shed into the bloodstream (possibly during surgical procedures or from micro metastases already existing at the time of the operation), and resulted in poor patient outcomes in patients with colorectal cancer. The sensitivity of this assay provided a reproducibly detectable range similar in sensitivity to conventional RT-PCR. As mentioned, these detection ranges are based on unreliable conversions of amplified product to the number of tumor cells. The extrapolated cell count may include damaged CTC incapable of metastatic proliferation. Further, PCR-based assays are limited by possible sample contamination, along with an inability to quantify tumor cells. Most importantly, methods based on PCR, flowcytometry, cytoplasmic enzymes and circulating tumor antigens cannot provide essential morphological information confirming the structural integrity underlying metastatic potential of the presumed CTC and thus constitute functionally less reliable surrogate assays than the highly sensitive imaging methods embodied, in part, in this invention.

Assessment of intact tumor cells in cancer detection and prognosis:

Detection of intact tumor cells in blood provides a direct link to recurrent metastatic disease in cancer patients who have undergone resection of their primary tumor. Unfortunately, the same spreading of malignant cells continues to be missed by conventional tumor staging procedures. Recent studies have shown that the presence of a single carcinoma cell in the bone marrow of cancer patients is an independent prognostic factor for metastatic relapse (Diel IJ, Kaufman M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis.

J Clin Oncol, 10:1534-1539, 1992). But these invasive techniques are deemed undesirable or unacceptable for routine or multiple clinical assays compared to detection of disseminated epithelial tumor cells in blood.

An alternative approach incorporates immunomagnetic separation technology and provides greater sensitivity and specificity in the unequivocal detection of intact circulating cancer cells. This simple and sensitive diagnostic tool, as described (US6,365,362; US6,551,843; US6,623,982; US6,620,627; US6.645.731; WO 02/077604; WO03/065042; and WO 03/019141) is used in the present invention to correlate the statistical survivability of an individual patient based on a threshold level of greater than or equal to 5 tumor cells in 7.5 to 30 ml blood (1 to 2 tumor cells correspond to about 3000 to 4000 total tumor cells in circulation for a given individual).

Using this diagnostic tool, a blood sample from a cancer patient (WO 03/018757) is incubated with magnetic beads, coated with antibodies directed against an epithelial cell surface antigen as for example EpCAM. After labeling with anti-EpCAM-coated magnetic nanoparticles, the magnetically labeled cells are then isolated using a magnetic separator. The immunomagnetically enriched fraction is further processed for downstream immunocytochemical analysis or image cytometry, for example, in the Cell Spotter® System (Immunicon Corp., PA). The magnetic fraction can also be used for downstream immunocytochemical analysis, RT-PCR, PCR, FISH, flowcytometry, or other types of image cytometry.

One embodiment of the present invention includes image cytometry after immunomagnetic selection and separation to highly enrich and concentrate any epithelial cells present in whole blood samples. The captured cells are detectably labeled with a leukocyte specific marker and with one or more tumor cell specific fluorescent monoclonal antibodies to allow identification and enumeration of the captured CTCs as well as unequivocal instrumental or visual differentiation from contaminating non-target cells. At an extraordinary sensitivity of 1 or 2 epithelial cells per 7.5- 30 ml of blood, this assay allows tumor cell detection even in the early stages of low tumor mass. The embodiment of the present invention is not limited to image cytometry, but includes any isolation and imaging protocol of comparable sensitivity and specificity.

Currently available prognostic protocols have not demonstrated a consistently reliable means for correlating CTCs to predict progression free- or overall survival in patients with cancers such as metastatic breast cancer (MBC). Thus, there is a clear need for accurate detection of cancer cells with metastatic potential, not only in MBC but in metastatic cancers in general. Moreover, this need is accentuated by the need to select the most effective therapy for a given patient. We previously described a method for predicting progressiion free or overall survival in patients with the first follow-up after diagnosis (WO 2004/076643). In this method, ≥5 circulating tumor cells (CTCs) in 7.5ml_ of blood is associated with poor clinical outcoume. In the present invention, we provide a method for predicting progression free and overall survival at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients.

Summary of the Invention

The present invention is a method and means for cancer prognosis, incorporating diagnostic tools, such as immunomagnetic enrichment and image cytometry, in assessing time to disease progression, survival, and response to therapy based upon the absolute number, change, or combinations of both of circulating epithelial cells in patients with metastatic cancer at any time during therapy to provide an accurate indication of emerging rapid disease progression and mortality for metastatic breast cancer patients. The system immunomagnetically concentrates epithelial cells, fluorescently labels the cells, identifies and quantifies CTCs for positive enumeration. The statistical analysis of the cell count predicts survival.

More specifically, the present invention provides the apparatus, methods, and kits for assessing patient survival, the time to disease progression, and response to therapy in MBC. Prediction of survival is based upon a threshold comparison of the number of circulating tumor cells in blood with time to death and disease progression. Statistical analysis of long term follow-up studies of patients diagnosed with cancer established a threshold for the number of CTC found in blood and prediction of survival. An absence of CTCs is defined as fewer than 5 morphologically intact CTCs. The presence or absence of CTCs to predict survival is useful in making treatment choices.

For example, the absence of CTCs in a woman previously untreated for metastatic breast cancer could be used to select hormonal therapy vs chemotherapy with less side effects and higher quality of life. In contrast, the presence of CTCs could be used to select chemotherapy which has higher side effects but may prolong survival more effectively in a high risk population. Thus, the invention has a prognostic role in the detection of CTCs in women with metastatic breast cancer.

Brief Description of the Drawings

Figure 1: Cell Spotter® fluorescent analysis profile used to confirm objects captured as tumor cells. Check marks signify a positive tumor cell based on the composite image. Composite images are derived from the positive selection for Epithelial Cell Marker (EC-PE) and for the nuclear dye (NADYE). A negative selection is also needed for the leukocyte marker (L-APC) and for control (CNTL).

Figure 2: Comparison of diagnostic methods to measure changes in tumor status. Shown is the current standard of physical measurement of discrete lesions using radiographic imaging (Panel A). A model illustrating the ability to assess changes in metastatic cancer burden by counting the numbers of CTC in blood is shown (Panel B).

Figure 3: Lack of correlation between the number of CTCs and tumor size in 69 patients.

Figure 4: Changes in the numbers of CTCs in patients with a partial response to therapy or with a stable disease state. CTCs either decreased or remained undetectable in all cases.

Figure 5: Changes in the numbers of CTCs in patients with disease progression. CTCs either increased or remained undetectable with disease progression.

Figure 6: Patient trends in the number of CTCs. Panel A shows a typical patient with less than 5 CTCs per 7.5 ml of blood. Panel B shows a typical patient with a decrease in CTCs during the course of therapy. Panel C shows a typical patient with a decrease in CTCs followed by an increase. Panel D shows a typical patient with an increase in CTCs.

Figure 7: Determination of an optimal CTC cutoff for distinguishing MBC patients with rapid progression. Analysis was performed using the CTC numbers obtained at baseline from the 102 patients included in the training set. Median PFS of patients with greater than or equal to the selected number of CTC in 7.5mL of blood is indicated by the solid line and median PFS of patients with less than the selected CTC level is indicated by the dashed line. Median PFS decreased as CTC increased and reached a plateau that leveled off at 5 CTC (indicated by the vertical line). The black dot indicates the median PFS of -5.9 months for all 102 patients. The selected cutoff of $\geq$5 CTC/7.5ml_ was used in all subsequent analyses.

Figure 8: The predictive value of baseline CTC for PFS and OS. Probabilities of PFS and OS of MBC patients with <5 (black line) and $\geq$5 (gray line) CTCs in 7.5ml_ of blood using the baseline blood draw prior to initiation of a new line of therapy are shown. PFS and OS were calculated from the time of the baseline blood draw.. Panel A: the probability of PFS using the baseline CTC count (n=177, log-rank p=0.0001 , CoxHR =1.95, chi^2 =15.33, p= 0.0001). Panel B: the probability of OS using the baseline CTC count (n=102, log-rank p=0.0003, CoxHR =3.98, chi^2 =12.64, p= 0.0004).

Figure 9: Kaplan-Meier plot of CTC levels prior to and up to 15-20 weeks after the initiation of therapy to predict time to clinical progression or death (Figure 9A) or the time to death (Figure 9B) from the date of the baseline blood draw in 177 patients with metastatic breast cancer. Four different groups of patients are compared: Group 1, 83 (47%) patients with <5 CTCs at all blood draw time points; Group 2, 38 (21 %) patients with $\geq$5 CTCs prior to the initiation of therapy but who had decreased to <5 CTCs at the time of their final blood draw; Group 3, 17 (10%) patients with <5 CTCs prior to the

initiation of therapy who increased to $\geq$5 CTCs at the time of their last blood draw; and Group 4, 39 (22%) patients with $\geq$5 CTCs at all blood draw time points

Detailed Description of the Invention

The object of this invention provides for the detection of circulating tumor cells as an early prognostic indicator of patient survival.

Under the broadest aspect of the invention, there is no limitation on the collection and handling of samples as long as consistency is maintained. Accordingly, the cells can be obtained by methods known in the art.

While any effective mechanism for isolating, enriching, and analyzing CTCs in blood is appropriate, one method for collecting circulating tumor cells combines immunomagnetic enrichment technology, immunofluorescent labeling technology with an appropriate analytical platform after initial blood draw. The associated test has the sensitivity and specificity to detect these rare cells in a sample of whole blood and to investigate their role in the clinical course of the disease in malignant tumors of epithelial origin. From a sample of whole blood, rare cells are detected with a sensitivity and specificity to allow them to be collected and used in the diagnostic assays of the invention, namely predicting the clinical course of disease in malignant tumors.

With this technology, circulating tumor cells (CTC) have been shown to exist in the blood in detectable amounts. This created a tool to investigate the significance of cells of epithelial origin in the peripheral circulation of cancer patients (Racila E., Euhus D., Weiss A.J., Rao C , McConnell J., Terstappen L.W.M.M. and Uhr J.W., Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998)). This study demonstrated that these blood-borne cells might have a significant role in the pathophysiology of cancer. Having a detection sensitivity of 1 epithelial cell per 5 ml of blood, the assay incorporates immunomagnetic sample enrichment and fluorescent monoclonal antibody staining followed by flowcytometry for a rapid and sensitive analysis of a sample. The results show that the number of epithelial cells in peripheral blood of eight patients treated for metastatic carcinoma of the breast correlate with disease progression and response to therapy. In 13 of 14 patients with localized disease, 5 of 5 patients with lymph node involvement and 11 of 11 patients with distant metastasis, epithelial cells were found in peripheral blood. The number of epithelial cells was significantly larger in patients with extensive disease.

The assay was further configured to an image cytometric analysis such that the immunomagnetically enriched sample is analyzed by image cytometry (see Example 1). This is a fluorescence-based microscope image analysis system, which in contrast with flowcytometric analysis permits the visualization of events and the assessment of morphologic features to further identify objects.

Automated fluorescence microscopic system, used for automated enumeration of isolated cells from blood, allows for an integrated computer controlled fluorescence microscope and automated stage with a magnetic yoke assembly that will hold a disposable sample cartridge. The magnetic yoke is designed to enable ferrofluid-labeled candidate tumor cells within the sample chamber to be magnetically localized to the upper viewing surface of the sample cartridge for microscopic viewing. Software presents suspect cancer cells, labeled with antibodies to cytokeratin and having epithelial origin, to the operator for final selection.

While isolation of tumor cells can be accomplished by any means known in the art, one embodiment uses a cell stabilization and permeabilization procedure for isolating tumor cells in 7.5 ml of whole blood. Epithelial cell-specific magnetic particles are added and incubated for 20 minutes. After magnetic separation, the cells bound to the immunomagnetic-linked antibodies are magnetically held at the wall of the tube. Unbound sample is then aspirated and an isotonic solution is added to resuspend the sample. A nucleic acid dye, monoclonal antibodies to cytokeratin (a marker of epithelial cells) and CD 45 (a broad-spectrum leukocyte marker) are incubated with the sample. After magnetic separation, the unbound fraction is again aspirated and the bound and labeled cells are resuspended in 0.2 ml of an isotonic solution. The sample is suspended in a cell presentation chamber and placed in a magnetic device whose field orients the magnetically labeled cells for fluorescence microscopic examination. Cells are identified automatically and candidate circulating tumor cells presented to the operator for checklist enumeration. An enumeration checklist consists of predetermined morphologic criteria constituting a complete cell (see example 1).

The diagnostic potential of immunomagnetic enrichment and image cytometry, together with the use of intact circulating tumor cells as a prognostic factor in cancer survival, can provide a rapid and sensitive method for determining appropriate treatment. Accordingly in the present invention, the apparatus, method, and kits are provided for the rapid enumeration and characterization of tumor cells shed into the blood in metastatic and primary patients for prognostic assessment of survival potential.

The methods of the invention are useful in assessing a favorable or unfavorable survival, and even preventing unnecessary therapy that could result in harmful side-effects when the prognosis is favorable. Thus, the present invention can be used for prognosis of any of a wide variety of cancers, including without limitation, solid tumors and leukemia's including highlighted cancers: apudoma, choristoma, branchioma, malignant carcinoid syndrome, carcinoid heart disease, carcinoma (i.e. Walker, basal cell, basosquamous, Brown-Pearce, ductal, Ehrlich tumor, Krebs 2, merkel cell, mucinous, non-small cell lung, oat cell, papillary, scirrhous, bronchiolar, bronchogenic, squamous cell, and transitional cell), histiocytic disorders, leukemia (i.e. B-cell, mixed-cell, null-cell, T-cell, T-cell chronic, HTLV-II-associated, lymphocytic acute, lymphocytic chronic, mast-cell, and myeloid), histiocytosis malignant, Hodgkin's disease, immunoproliferative small, non-Hodgkin's lymphoma, plasmacytoma, reticuloendotheliosis, melanoma, chondroblastoma, chondroma, chondrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, giant cell tumors, histiocytoma, lipoma, liposarcoma, mesothelioma, myxoma, myxosarcoma, osteoma, osteosarcoma, Ewing's sarcoma, synovioma, adenofibroma, adenolymphoma, carcinosarcoma, chordoma, craniopharyngioma, dysgerminoma, hamartoma, mesenchymoma, mesonephroma, myosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, thymoma, trophoblastic tumor, adenocarcinoma, adenoma, cholangioma, cholesteatoma, cylindroma, cystadenocarcinoma, cystadenoma, granulose cell tumor, gynandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, islet cell tumor, icydig cell tumor, papilloma, Sertoli cell tumor, theca cell tumor, leiomyoma, leiomyosarcoma, myoblastoma, myoma, myosarcoma, rhabdomyoma, rhabdomyosarcoma, ependymoma, ganglioneuroma, glioma, medulloblastoma, meningioma, neurilemmoma, neuroblastoma, neuroepithelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma nonchromaffin, angiokeratoma, angiolymphoid hyperplasia with eosinophillia, angioma sclerosing, angiomatosis, glomangioma, hemangioendothelioma, hemangioma, hemangiopericytoma, hemangiosarcoma, lymphangioma, lymphangiomyoma, lymphangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, chondroscarcoma, cystosarcoma, phyllodes, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomyosarcoma, leukosarcoma, liposarcoma, lymphangiosarcoma, myoswarcoma, myxosarcoma, ovarian carcinoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma (i.e. Ewing's experimental, Kaposi's and mast-cell), neoplasms (i.e. bone, breast, digestive system, colorectal, liver, pancreatic, pituitary, testicular, orbital, head and neck, central nervous system, acoustic, pelvic, respiratory tract, and urogenital, neurofibromatosis, and cervical dysplasia.

The following examples illustrate the predictive and prognostic value of CTCs in blood from patients. Note, the following examples are offered by way of illustration and are not in any way intended to limit the scope of the invention.

• Example 1

Enumeration of circulating cytokeratin positive cells using CellPrep™

Cytokeratin positive cells are isolated by a cell preservative system using a 7.5 ml sample of whole blood. Epithelial cell-specific immunomagnetic fluid is added and incubated for 20 minutes. After magnetic separation for 20 minutes, the cells bound to the immunomagnetic-linked antibodies are magnetically held at the wall of the tube. Unbound sample is then aspirated and an isotonic solution is added to resuspend the sample. A nucleic acid dye, monoclonal antibodies to cytokeratin (a marker of epithelial cells) and CD 45 (a broad-spectrum leukocyte marker) are incubated with the sample for 15 minutes. After magnetic separation, the unbound fraction is again aspirated and the bound and labeled cells are resuspended in 0.2 ml of an isotonic solution. The sample is suspended in a cell presentation chamber and placed in a magnetic device whose field orients the magnetically labeled cells for fluorescence microscopic examination. Cells are identified automatically; control cells are enumerated by the system, whereas the candidate circulating tumor cells are presented to the operator for enumeration using a checklist as shown (Figure 1).

- Example 2

Assessment of the tumor load: Comparison between radiographic image analysis and the absolute number of CTCs.

Radiographic measurements of metastatic lesions are currently used to assess tumor load in cancer patients with metastatic disease. In general, the largest lesions are measured and summed to obtain a tumor load. An example of a bidimensional measurement of a liver metastasis in a breast cancer patient is illustrated in Figure 2A. A model depicting the necessity for measuring tumor load in the blood stream is illustrated in Figure 2B as a measurement of the actual active tumor load, and thus a better measure of the overall activity of the disease. To determine whether or not the absolute number of CTCs correlated with the dimension of the tumor measured by imaging a prospective study in patients with MBC was performed.

Image cytometry was used to enumerate CTCs in 7.5 ml of blood from 69 patients with measurable MBC. Tumor load was assessed by bi-dimensional radiographic measurements of up to 8 measurable lesions before initiation of therapy. The tumor load was determined by addition of the individual measurements (mm^2). CTCs were enumerated in blood drawn before initiation of therapy.

Figure 3 shows the number of CTCs in 7.5 ml versus the bidimensional sums of tumor measurements in the 69 patients. From Figure 3, there is no correlation between the size of the tumor and the absolute number of tumor cells in the blood. Some patients with large tumors as measured by imaging have low numbers of CTCs and vice versa.

Thus, tumor burden as measured by radiographic imaging does not correlate with the absolute number of tumor cells present in the blood.

Example 3

Assessment of the tumor load: Comparison between changes in the radiographic image and changes in the absolute number of CTCs.

Radiographic imaging is the current standard to assess whether a particular disease is responding, stabilizing, or progressing to treatment. The interval between radiographic measurements must be at least 3 months in order to give meaningful results. Consequently, a test that could predict response to therapy earlier during the treatment cycle would improve the management of patients treated for metastatic diseases, potentially increase quality of life and possibly improve survival. In this study, patients starting a new line of treatment for MBC were assessed to determine whether a change in the number of CTCs correlated with a change in patient status as measured by imaging.

This imaging system was used to enumerate CTCs in 7.5 ml of blood in MBC patients about to start a new therapy, and at various time points during the treatment cycle. Radiographic measurements were made before initiation of therapy, 10-12 weeks after initiation of therapy and after completion of the treatment cycle (approximately 6 months after initiation of therapy), or at the time the patient progressed on therapy, whichever came first.

From image analysis, a partial response was found in 14 patients (17 data segments). CTCs either decreased or remained undetectable in all cases (see Figure 4). Stable disease by imaging was found in 30 patients (37 data segments). CTCs either decreased or remained not detectable in all cases (see Figure 4). Disease progression by imaging was found in 14 patients (15 data segments). CTCs increased in 7 of 15 cases. No CTCs were detected at either time point in the other 8 cases.

An increase in CTCs was only observed in patients with disease progression (100%). A decrease in CTCs was only observed in patients with a partial response or stable disease (100%). In patients with a partial response or stable disease, no CTCs were detected at both time points in 54 of 61 cases (89%).

• Example 4

Trends in the number of CTCs in patients treated for MBC as a guide to treatment.

A study in patients with MBC was performed to determine whether or not clear trends in changes of the number of CTC could be observed in patients treated for MBC, and whether or not simple rules could be applied to such trends in order to guide the treating physician in optimization of the treatment of patients with MBC.

Image cytometry was used to enumerate CTCs in 7.5 ml of blood. 81 patients, starting a new line of therapy for MBC, were enrolled in the study. CTCs were enumerated in blood drawn before initiation of therapy and at approximately every month thereafter.

Clear trends in the number of CTCs were observed in 76 of 81 (94%) patients. During the course of therapy, the number of CTCs was not detectable or remained below 5 CTC per 7.5 ml of blood in 50% of the patients. A typical example is shown in Figure 6A. The number of CTCs decreased during the course of therapy in 22% of the patients. A typical example is shown in Figure 6B. A decrease in the number of CTCs followed by an increase during the course of therapy was observed in 6% of the patients. A typical example is shown in Figure 6C. The number of CTCs increased during the course of therapy in 16% of the patients. A typical example is shown in Figure 6D. In 42 instances, 2 blood samples were prepared and analyzed at the time of each blood draw. Results using the first tubes drawn at the initial timepoint and the first tube drawn at the follow-up time point point were compared to results using the second tubes drawn at each timepoint. In only one of those cases, the change in the number of CTCs was different between the first tubes drawn and the second (or duplicate) tubes drawn (98% agreement). In this case, both tubes from the first blood draw had 0 CTCs, whereas for the second blood draw, one tube had 5 CTC(below the cut off) and the second tube had 6 CTC (above the cut off). In comparison to the reproducibility of CTC measurements, inter-reader variability of radiographic imaging when the same films were read by two different expert radiologists resulted in an agreement of only 81%. More over, the agreement between the two radiologists in a set of 146 imaging segments was 85% when Progression versus non progression was measured and decreased to only 58% when Progression, Stable Disease and Partial response were measured. In contrast, analysis of CTC measurement was performed on the same data set by two different technologists, resulting in 100% agreement.

Thus, detection and monitoring CTC in patients treated for MBC is a more reproducible procedure to measure response to therapy than radiographic imaging.

• Example 5

Prediction of PFS and OS before initiation of therapy.

A study to correlate CTC levels before initiation of therapy with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) was performed whereby a threshold value of ≥5 CTC's/7.5 ml was used.

177 patients with measurable MBC were tested for CTCs in 7.5 ml of blood before starting a new line of treatment and at subsequent monthly intervals for a period of up to six months. Patients entering into any type of therapy and any line of therapy were included in the trial. Disease progression or response was assessed by the physicians at the sites for each patient.

As shown in Figure 7, median PFS decreased as CTC levels increased and reached a plateau that leveled off at 5 CTCs (vertical line). The median PFS was approximately 5.9 months for all patients (black dot). Based on the change in median PFS for positive patients and the Cox Hazard's ratio, a cutoff of ≥ 5 CTCs was used for all subsequent analysis.

Figure 8 shows a Kaplan Meier analysis of Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) using the number of CTC measured in the baseline blood draws. In the 177 patients, the median PFS time was approximately 5.0 months. The patients with ≥ 5 CTCs/7.5 ml of blood at baseline had a significantly shorter PFS than patients with < 5 CTCs (approximately 2.7 months vs. 7.0 months, respectively). Overall survival (OS) reflected the same trend with a median OS of 10.1 months vs. > 18 months for patients with ≥ 5 CTCs vs. < 5 CTCs, respectively.

The measurement of the number of CTC prior to initation of a new line of therapy predicts the time until patients progress on their therapy, and predicts survival time. Because of this predictive ability, detection and measurement of CTCs at baseline provides information to physicians that will be useful in the selection of appropriate treatment. In addition, the ability to stratify patients into high and low risk groups in terms of PFS and OS may be very useful to select appropriate patients for entry into therapeutic trials. For novel drugs with potentially high toxicity, patients with poor prognostic factors may be the more appropriate target population. In contrast, drugs with minimal toxicity and promising therapeutic efficacy may be more appropriately targeted toward patients with favorable prognostic factors.

• Example 6

Prediction of PFS and OS at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients.

CTCs were assessed serially over the course of treatment at additional specified intervals. The results demonstrated that assessment of CTC levels at "all" subsequent follow-up time points, accurately and reproducibly predicted the clinical outcome. Patients who converted from elevated CTCs to non-elevated levels (<5CTC/7.5mL) exhibited PFS and OS similar to those whose CTCs were never elevated. This would imply that patients with <5 CTCs appear to either be responding to treatment and/or have relatively indolent disease. In contrast, OS of patients who converted from non-elevated CTC levels to elevated CTC levels decreased, but was not as short as the OS of patients that always exhibited elevated CTC levels.

CTCs were enumerated in 177 MBC patients prior to the initiation of a new course of therapy and 3-5, 6-8, 9-14, and 15-20 weeks after the initiation of therapy. Progression free survival (PFS) and overall survival (OS) times were calculated from the dates of each follow-up blood draw. Kaplan-Meier plots and survival analyses were performed using a threshold of ≥5 CTCs/7.5mL at each blood draw.

Median PFS times for patients with <5 CTC at the five blood draw time points were 7.0, 6.1 , 5.6, 7.0, and 6.0 months, respectively. For patients with ≥5 CTC, median PFS was significantly shorter at these time points: 2.7, 1.3, 1.4, 3.0, and 3.6 months, respectively. Median OS for patients with <5 CTC at baseline and the five blood draw time points were all >18.5 months. For patients with ≥5 CTC, median OS was significantly shorter at these time points: 10.9, 6.3, 6.3, 6.6, and 6.7 months, respectively. Median PFS (Figure 9A) and OS (Figure 9B) times at baseline and up to 9-14 weeks after the initiation of therapy were statistically significantly different.

Detection of elevated CTCs at any time during therapy is an accurate indication of emerging rapid disease progression and mortality for MBC patients Accordingly, CTCs must decline to below 5 at any time point in the clinical course of a patient with metastatic breast cancer to maximize PFS and OS, and to maximize the benefit associated with therapy.

What is claimed is:

1. A method for overall survival prognosis in patients at any point during therapy comprising:
   a) obtaining a biological specimen from said patient, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing rare cells;
   b) enriching a fraction of said specimen, said fraction containing said rare cells;
   c) confirming structural integrity of said rare cells to be intact; and
   d) analyzing said intact rare cells to determine patient survival, wherein said analyzing correlates intact rare cell enumeration of said patient with said overall survival prognosis based upon a predetermined statistical association.
2. A method as claimed in claim 1, wherein said circulating rare cells are from the group consisting of endothelial cells, fetal cells in maternal circulation, bacterial cells, myocardial cells, epithelial cells, virally infected cells, and combinations thereof.
3. A method as claimed in claim 1, wherein said fraction is obtained by immunomagnetic enrichment, wherein said specimen is mixed with magnetic particles coupled to a biospecific ligand which specifically binds to said rare cells, to the substantial exclusion of other populations and subjecting specimen-magnetic particle mixture to a magnetic field to produce a cell suspension enriched in magnetic particle-bound rare cells.
4. A method as claimed in claim 1, wherein said biospecific ligand is an antibody directed against an epithelial cell surface antigen.
5. A method as claimed in claim 4, wherein said rare cells have EpCAM as said epithelial cell surface antigen.
6. A method as claimed in claim 1, wherein said structural integrity is determined by a procedure selected from a group consisting of immunocytochemical procedures, RT-PCR procedures, PCR procedures, FISH procedures, flowcytometry procedures, image cytometry procedures, and combinations thereof.

7. A method as claimed in claim 1, wherein said analyzing is based upon a change in said intact rare cell enumeration occuring during the last follow-up period to indicate said survival prognosis.
8. A method as claimed in claim 7, wherein said analyzing is based upon a measurement of CTC number relative to a threshold number, said measurement above or equal to said threshold is indicative of a lower said survival prognosis.
9. A method as claimed in claim 8, wherein said threshold is 5 circulating tumor cells.
10. A method as claimed in claim 1, wherein said survival prognosis is determined for said patients from the group consisting of metastatic breast cancer patients, metastatic prostate cancer patients, bladder cancer patients, metastatic colon cancer patients, and combinations thereof.
11. A rare cell analysis system for assessing overall survival in patients at any point during therapy comprising:
    a) means for stabilizing cells in a biological specimen from said patient, said means preserves characteristic determinants of rare cells in said specimen;
    b) means for enriching a fraction of said specimen, said fraction containing intact rare cells;
    c) means for confirming structural integrity of said intact rare cells; and
    d) means for analyzing said intact rare cells, wherein said means correlates said intact rare cell enumeration with said overall survival based upon a predetermined statistical association.
12. The rare cell analysis system of claim 11, wherein said stabilizing means is from the group consisting of anti-coagulating agents, stabilizing agents, and combinations thereof.
13. The rare cell analysis system of claim 11, wherein said enriching means is from a group consisting of immunomagnetic, density centrifugation, and combinations thereof.
14. The rare cell analysis system of claim 11, wherein said confirming means is from the group consisting of immunocytochemical means,

RT-PCR means, PCR means, FISH means, flowcytometry means, image cytometry means, and combinations thereof.

15. The rare cell analysis system of claim 11, wherein said analysis means is from the group consisting of Kaplan-Meier analysis, Cox proportional hazards regression analysis, and combinations thereof.

16. A method for assessing time to disease progression in patients at any time point during therapy comprising:

a) obtaining a biological specimen from said patient, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing rare cells;

b) enriching a fraction of said specimen, said fraction containing said rare cells;

c) confirming structural integrity of said rare cells to be intact; and

d) analyzing said intact rare cells to determine time to disease progression, wherein said analyzing correlates intact rare cell enumeration of said patient with said time to disease progression based upon a predetermined statistical association.

17. A method as claimed in claim 16, wherein said circulating rare cells is from the group consisting of endothelial cells, fetal cells in maternal circulation, bacterial cells, myocardial cells, epithelial cells, virally infected cells, and combinations thereof.

18. A method as claimed in claim 16, wherein said fraction is obtained by immunomagnetic enrichment, wherein said specimen is mixed with magnetic particles coupled to a biospecific ligand which specifically binds to said rare cells, to the substantial exclusion of other populations and subjecting specimen-magnetic particle mixture to a magnetic field to produce a cell suspension enriched in magnetic particle-bound rare cells.

19. A method as claimed in claim 16, wherein said biospecific ligand is an antibody directed against an epithelial cell surface antigen.

20. A method as claimed in claim 19, wherein said rare cells have EpCAM as said epithelial cell surface antigen.

21. A method as claimed in claim 16, wherein said structural integrity is determined by a procedure selected from a group consisting of

immunocytochemical procedures, RT-PCR procedures, PCR procedures, FISH procedures, flowcytometry procedures, image cytometry procedures, and combinations thereof.

22. A method as claimed in claim 16, wherein said analyzing is based upon a change in said intact rare cell enumeration during the last follow-up period to indicate said time to disease progression.

23. A method as claimed in claim 16, wherein said analyzing is based upon a measurement of CTC number relative to a threshold number, said measurement above or equal to said threshold is indicative of a lower said time to disease progression.

24. A method as claimed in claim 16, wherein said threshold is 5 circulating tumor cells.

25. A method as claimed in claim 16, wherein said time to progression is determined for said cancer patients from the group consisting of metastatic breast cancer patients, metastatic prostate cancer patients, metastatic colon cancer patients, bladder cancer patients, and combinations thereof.

26. A rare cell analysis system for assessing time to disease progression in a patient at any time during therapy, said rare cell analysis system comprising:

a) means for stabilizing cells in a biological specimen from said patient, said means preserves characteristic determinants of rare cells in said specimen;

b) means for enriching a fraction of said specimen, said fraction containing intact rare cells;

c) means for confirming structural integrity of said intact rare cells; and

d) means for analyzing said intact rare cells, wherein said means correlates said intact rare cell enumeration with said time to disease progression based upon a predetermined statistical association.

27. The rare cell analysis system of claim 26, wherein said stabilizing means is from the group consisting of anti-coagulating agents, stabilizing agents, and combination thereof.

28. The rare cell analysis system of claim 26, wherein said enriching means is from a group consisting of immunomagnetic, density centrifugation, and combinations thereof.
29. The rare cell analysis system of claim 26, wherein said confirming means is from the group consisting of immunocytochemical means, RT-PCR means, PCR means, FISH means, flowcytometry means, image cytometry means, and combinations thereof.
30. The rare cell analysis system of claim 26, wherein said analysis means is from the group consisting of Kaplan-Meier analysis, Cox proportional hazards regression analysis, and combinations thereof.

(57) Abstract: A cancer test having prognostic utility in predicting time to disease progression, overall survival, and response to therapy in patients with MBC based upon the presence and number of CTC's. The Cell Spotter® System is used to enumerate CTC's in blood. The system immunomagnetically concentrates epithelial cells, fluorescently labels the cells and identifies and quantifies CTC's. The absolute number of CTC's detected in the peripheral blood tumor load is, in part, a factor in prediction of survival, time to progression, and response to therapy. The mean time to survival of patients depended upon a threshold number of (5) CTC" per 7.5 ml of blood. Detection of CTC's in metastatic cancer represents a novel prognostic factor in patients with metastatic cancers, suggests a biological role for the presence of tumor cells in the blood, and indicates that the detection of CTC's could be considered an appropriate surrogate marker for prospective therapeutic clinical trials.

Figure 1

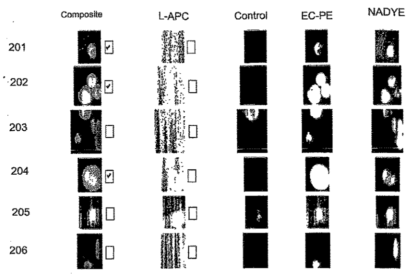
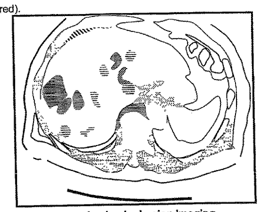


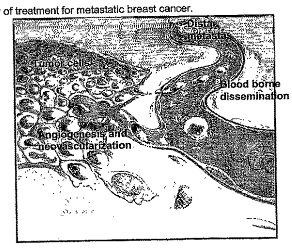
Figure 2

A: Current Standard: Changes on radiographic imaging (1 to 8 lesions measured).



Lesion by Lesion Imaging

B: Hypothesis: Change in tumor cells in blood of patients better reflect the efficacy of treatment for metastatic breast cancer.



Whole Body Biopsy

Figure 3

No correlation between CTC Counts and Tumor Size

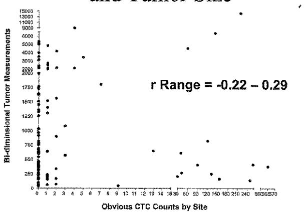


Figure 4

DECREASE in CTC always associated with **Partial Response** or **Stable Disease**

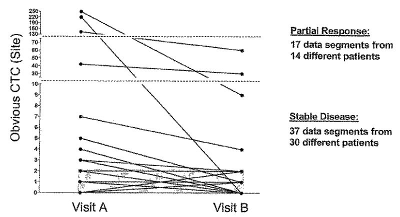


Figure 5

INCREASE in CTC always associated with disease **Progression**

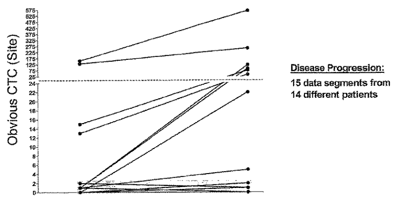
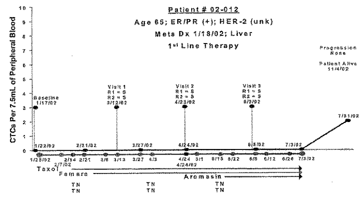


Figure 6

Panel A: Less than 5 CTC's per 7.5 ml at all time points



Panel B: Decrease in CTC's

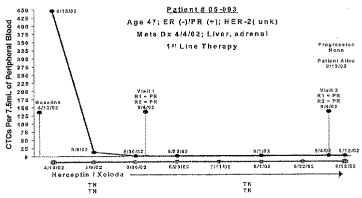
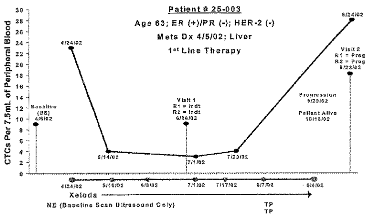


Figure 6 (continued)

Panel C: Decrease in CTC's followed by an increase



Panel D: Increase in CTC's

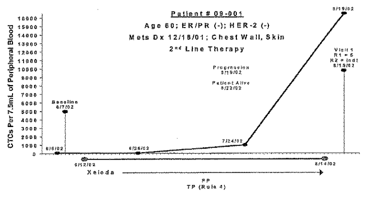


Figure 7

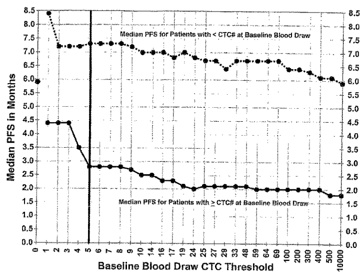
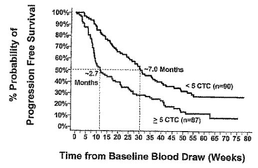


Figure 8

Panel A



Panel B

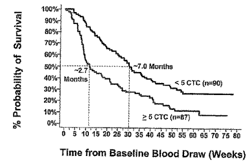
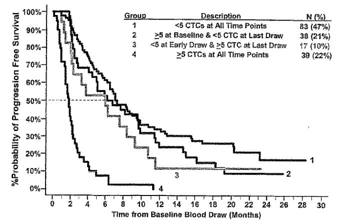
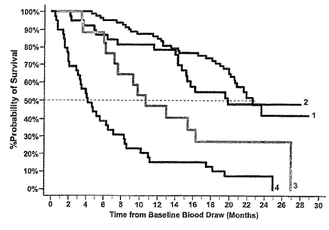


Figure 9

Panel A



Panel B



专利名称(译)	使用循环肿瘤细胞治疗转移性乳腺癌患者期间每个随访时间点预测进展和总生存的方法
公开(公告)号	JP2012022002A
公开(公告)日	2012-02-02
申请号	JP2011198211
申请日	2011-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	维里德克斯有限责任公司
申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司
[标]发明人	ジェフリーダブリューアラード ジェラルドブイドイル ダニエルエフヘイズ マイケルクレイグミラー レオンウェーエムエムテルスタッペン
发明人	ジェフリー·ダブリュー·アラード ジェラルド·ブイ·ドイル ダニエル·エフ·ヘイズ マイケル·クレイグ·ミラー レオン·ウェー·エム·エム·テルスタッペン
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/543 C12Q1/04
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.M G01N33/543.541.A C12Q1/04
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CB01 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ41 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR83 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供一种癌症测试方法，该方法可根据CTC的存在和数量在预测MBC患者的疾病进展时间，总体生存率和对治疗的反应方面具有预后效用。 SOLUTION：使用Cell Spotter（注册商标）系统对血液中的CTC进行计数。 该系统通过免疫磁性富集上皮细胞，对细胞进行荧光标记，并鉴定和定量CTC。 在外周血肿瘤负荷中检测到的CTC的绝对数量部分是预测存活率，进展时间和对治疗反应的因素。 患者生存的平均时间取决于每7.5毫升血液中CTC的阈值数量（5）。 在转移性癌症中检测CTC代表了转移性癌症患者的新型诊断元素，表明血液中肿瘤细胞的存在具有生物学作用，而CTC的检测可能适用于未来的治疗性临床试验。 它表明它可以被视为替代标记。 [选择图]无