

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-529078

(P2014-529078A)

(43) 公表日 平成26年10月30日(2014. 10. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 GO 4 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 B	
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)		

(21) 出願番号 特願2014-529846 (P2014-529846)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月6日 (2012. 9. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年3月26日 (2014. 3. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/053933
 (87) 国際公開番号 W02013/036620
 (87) 国際公開日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/531, 575
 (32) 優先日 平成23年9月6日 (2011. 9. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7417-1880 フランクリン・レイ
 クス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
 (74) 代理人 100114557
 弁理士 河野 英仁

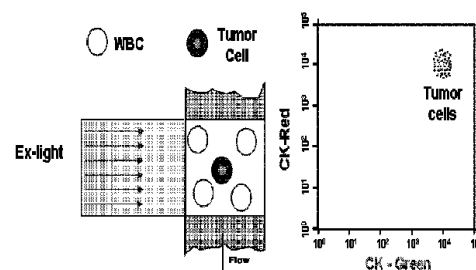
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料中の希少標的細胞のサイトメトリー検出のための方法及び組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 本開示は、試料中の希少標的細胞を検出するためのサイトメトリー方法を提供する。ある態様では、本方法及び組成物は、血液などの生体試料中の循環腫瘍細胞 (CTC) などの希少標的細胞の検出を容易にすることができる。本方法の態様は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第1及び第2の結合部材に試料を接触させるステップと、試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を分析して、試料中の希少標的細胞を検出するステップとを有する。主題の方法を実施するためのシステム、組成物及びキットが更に提供される。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の希少標的細胞を検出する方法であって、

前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に前記試料を接触させるステップと、

前記試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の前記希少標的細胞を検出するステップと

を有することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記第 1 及び第 2 の結合部材は、抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントは、前記マーカの同一のエピトープに結合することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 及び第 2 の結合部材に標識を付すことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 及び第 2 の結合部材に標識を直接付すことを特徴とする請求項 4 に記載の方法

。

【請求項 6】

前記試料中の非希少細胞に標識を付さないことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記試料中の有核細胞を透過処理剤で透過処理するステップを更に有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記マーカはサイトケラチンであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記マーカは、CD 1 a、CD 2、CD 3、CD 4、CD 7、CD 8、CD 1 0、CD 1 1 b、CD 1 3、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 2 3、CD 2 5、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 4、CD 3 8、CD 4 1、CD 4 5、CD 5 6、CD 5 7、CD 6 1、CD 6 4、CD 7 1、CD 7 4、CD 7 9 a、CD 1 0 3、CD 1 1 7、CD 1 3 3、CD 1 3 8、CD 2 7 1、CD 3 0 3、CD 3 0 4、b c l-2、T d T、F M C 7、グリコホリン A、サイトケラチン、E p C A M、E p h B 4、E G F R、C E A、H E R 2 及び M U C-1 から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 1 0】

前記試料は全血であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記試料をヒトから得ることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

マーカを含む希少標的細胞、及び

該希少標的細胞の前記マーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材を含むことを特徴とする細胞試料。 40

【請求項 1 3】

希少標的細胞を含む試料を、該希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に接触させるように構成され、前記試料中の非希少細胞は標識が付されていないサイトメトリー試料流体サブシステム、及び

該サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結されたサイトメータを備えていることを特徴とするサイトメトリーシステム。

【請求項 1 4】

希少標的細胞を含む試料を、該希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第1及び第2の結合部材に接触させるように構成されたサイトメトリー試料流体サブシステム、及び

該サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結され、前記試料のアッセイにより、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の前記希少標的細胞を検出するように構成されたサイトメータ

を備えていることを特徴とするサイトメトリーシステム。

【請求項15】

試料中の希少標的細胞を特定するためのキットであって、

前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第1及び第2の結合部材、及び

前記試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の前記希少標的細胞を検出するための前記第1及び第2の結合部材の使用説明

を備えていることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

フローサイトメトリーとは、研究において、ユーザが試料流体中の成分を速やかに解析して分取することを可能にする広く認められている手法である。フローサイトメータは、担体流体（例えばシース流体）を使用して、試料成分を略1つずつ照射域に通過させる。各試料成分はレーザなどの光源に照射され、各試料成分により散乱した光が検出されて解析される。試料成分は、照射域を出ると、その光学的特性及び他の特性に基づいて分離され得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0002】

【特許文献1】 米国特許第7332288号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

循環腫瘍細胞（CTC）とは、対象の血流中に入り、腫瘍から剥離した細胞のことである。この細胞は、血液中に入ると、対象の身体を循環することができ、他の組織に侵入し、新たな腫瘍を成長させることができる。このようにしてCTCは転移に関与し、癌に罹患している対象の主な死因となる。CTCの検出は極めて困難であるという事実、すなわち、CTCは並外れて希少であり、正常細胞との識別が困難である場合があるという事実により、CTCを計数するという取り組みは阻まれてきた。CTCを検出する現存の手法には感受性及び／又は特異性に限界があり、多くの正常細胞が癌性であると誤判断され、多くの癌細胞が解析で見逃されている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、試料中の希少標的細胞を検出するためのサイトメトリー方法を提供する。ある態様では、本方法は、血液などの生体試料中の循環腫瘍細胞（CTC）などの希少標的細胞の検出を容易にすることができる。本方法の態様は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第1及び第2の結合部材に試料を接触させるステップと、試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を分析して、試料中の希少標的細胞を検出するステップとを有する。主題の方法を実施するためのシステム、組成物及びキットが更に提供される。

【0005】

対象とする希少標的細胞には、原核細胞（例えば細菌細胞又は古細菌細胞）及び真核細胞（例えば、神経細胞、筋細胞、上皮細胞（例えば循環腫瘍細胞）などの哺乳類の細胞、

幹細胞（例えば造血幹細胞）、脂肪細胞など）が含まれるが、これらに限定されない。希少標的細胞は、インビトロ源（例えば培養で成長させた研究用細胞由来の細胞の懸濁液）から得られた試料、又はインビボ源（例えば哺乳類の対象、ヒト対象など）から得られた試料を含む種々の試料から検出され得る。

【0006】

主題の方法の実施には種々の結合部材を使用することができる。結合部材は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合することができる。対象とするマーカには、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD45、CD56、CD57、CD59、CD61、CD64、CD71、CD74、CD79a、CD90、CD103、CD117、CD133、CD138、CD271、CD303、CD304、bc1-2、C-kit、TdT、FMC7、SCA-1、グリコホリンA、サイトケラチン、EpCAM、EphB4、EGFR、CEA、HER2及びMUC-1が含まれるが、これらに限定されない。ある態様では、マーカは、希少標的細胞の表面上及び／又は希少標的細胞の内部にあってもよい。有核細胞は透過処理されて、第1及び第2の結合部材の細胞内のマーカへの結合を可能にすることができる。主題の方法のある態様では、試料中の非希少細胞を染色しない（例えば、CD45については染色しない）。

10

【0007】

ある態様では、結合部材に標識を付すことができる。結合部材の標識は、本明細書により詳細に説明する通り、直接的に付されても間接的に付されてもよい。対象とする標識には、インドカルボシアニン（C3）、インドジカルボシアニン（C5）、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green488、Alexa Fluor（登録商標）-355、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor647、Alexa Fluor660、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700、JOE、リサミン（Lissamine）、ローダミン グリーン（Rhodamine Green）、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、カルボキシフルオレセイン（FAM）、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン（dローダミン）、カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、RiboGreenなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0008】

対象とする結合部材には、抗体、及び該抗体の抗原結合性フラグメントが含まれる。ある実施形態では、第1の結合部材及び第2の結合部材が抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントである場合、これらはマーカの同一のエピトープに結合する。

【0009】

本開示によって、キットが更に提供される。キットは、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第1及び第2の結合部材、及び、生体試料のフローサイトメトリーアッセイにより、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を分析して、生体試料中の希少標的細胞を検出するための第1及び第2の結合部材の使用説明を備えることができる。本明細書により詳細に説明する通り、組成物及びシステムが更に提供される。

40

【0010】

本発明は、添付の図面と併せて読むと、以下の詳細な説明から理解を深めることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本開示による方法の概略図である。この特定の実施例において、（「腫瘍細胞」

50

と称される) 希少標的細胞は (CK) - Red 及び CK - Green の両方のサイトケラチンで標識が付されているが、非希少細胞 (ここでは白血球すなわち WBC) は標識が付されていない。細胞は、流れを示す矢印で示されているように、フローサイトメータ内を下方に流れる。励起光 (「Ex 光」) が当てられて、CK - Red 及び / 又は CK - Green の蛍光を生じさせる。各標識が蛍光色素である 2 色の蛍光の組合せが、フローサイトメトリアッセイで閾値として使用される。得られた CK - Red 蛍光 (y 軸) 対 CK - Green 蛍光 (x 軸) の密度プロットが、機器によって検出された腫瘍細胞の数を示す。

【図 2】パネル A ~ B は、標識のフルオレセインイソチオシアネート (FITC, パネル A) 及び標識の Alexa Fluor 647 (パネル B) の発光スペクトルを表す。各々へのレーザ励起線が矢印で示されている。

10

【図 3】本開示のアッセイ手順のフローチャートである。試料 7.5 mL を、BD Vacutainer CPT 管中で製造元の指示に従ってスピンさせ、WBC 部分を分離する。次いで、WBC 分画を固定し、透過処理し、染色して FACS、例えば BD Biosciences 製の FACSCanto (登録商標) フローサイトメータで解析する。

【図 4】パネル A ~ D は、WBC の存在下での、血液からの種々の濃度の HT-29 腫瘍細胞の濃縮及び解析を示す密度プロットである。パネル A: 10,000 HT-29 細胞 / mL を含有する血液試料 0.5 mL に、赤血球溶解、固定及び遠心分離を施した。WBC 分画を除去して透過処理した。CK-FITC 及び CK-Alexa 647 を 60 m 添加した。試料を、BD Biosciences 製の FACSCanto (登録商標) フローサイトメータを使用して解析した。パネル B: HT-29 細胞が、出発濃度 1,000 HT-29 細胞 / mL で存在した。パネル C: HT-29 細胞が、出発濃度 100 HT-29 細胞 / mL で存在した。パネル D: HT-29 細胞が、出発濃度 0 HT-29 細胞 / mL で存在した。

20

【図 5】パネル A ~ C は、WBC の存在下での、血液からの HT-29 腫瘍細胞の濃縮及び解析を示す密度プロットである。血液試料を 1 × BD FACS Lysing solution で溶解して、試料中の赤血球を溶解した。試料を 1 × BD FACS Permeabilizing Solution 2 で透過処理して洗浄し、次いで 0.55 mL Rx 体積の CK Ab-FITC 及び CK Ab-Alexa 647 の結合体で細胞内で染色し、この混合物 0.36 mL を、更なる洗浄はせずに中流速 (36 µL / 分) にて、BD Biosciences 製の FACSCanto (登録商標) フローサイトメータで製造元の指示に従って計数した。パネル A: 血液 7.5 mL 及び濃度 10,000 HT-29 細胞 / mL を使用しての陽性計数。プロットは 1 分の計数を示す。パネル B: 血液 7.5 mL 及び濃度 0 HT-29 細胞 / mL を使用しての陰性計数。プロットは 10 分の計数を示す。パネル C: 緩衝液のみ、15 分の計数。累積すると、パネル A ~ C は、34,363,636 個の WBC を背景に、1 個の HT-29 腫瘍細胞が観察され、15 分の稼働中に「緩衝液のみ」には偽陽性のドットが記録されなかったことを示す。

30

【図 6】パネル A ~ C は、本開示の方法の識別効率を示す。WBC 及び HT-29 腫瘍細胞を含有する試料を、本明細書に記載する通りに調製し、CK-APC 及び CK-FITC で試料に標識を付した。パネル A 及び B: SSC 対 APC (パネル A) 及び FITC (パネル B) を示す標準的な 1 色の密度プロット。HT-29 腫瘍細胞は、プロット中に濃い目のドットで表されているが、非特異的な事象から容易に検出することができなかった。パネル C: 試料中の APC 及び FITC の両方を測定すると、狭い対角線上に下降するドットプロットが得られ、腫瘍細胞が容易に特定される。

40

【図 7】パネル A ~ C は図 6 の試料の陰性試料を示す。これらの試料中に HT-29 腫瘍細胞は存在していなかった。パネル A 及び B: SSC 対 APC (パネル A) 及び FITC (パネル B) を示す 1 色の密度プロットが多く偽陽性を示した。パネル C: 偽陽性の事象が観察されなかった。

【図 8】パネル A ~ C は、種々の出発濃度を使用したときの、試料中の HT-29 腫瘍細胞の画像を示す。WBC 及び HT-29 細胞を含有する試料を、CK-FITC 及び CK

50

ー P E で染色した。H T - 2 9 細胞は、濃度 5, 0 0 0 細胞 / m L (パネル A) 、濃度 5 0 0 細胞 / m L (パネル B) 又は濃度 0. 0 細胞 / m L (パネル C) で存在していた。P E チャンネルでは、H T - 2 9 細胞の濃度が 0. 0 細胞 / m L (パネル C) の場合でも事象が観察された。

【図 9】 パネル A ~ B は、アッセイプロトコル及び W B C の存在下での血液からの H T - 2 9 腫瘍細胞の画像を示す。パネル A : 細胞を撮像するためのアッセイ手順。試料を図 5 に関して上述した通りに調製し、水銀灯を使用した Z E I S S 顕微鏡を使用して撮像した。パネル B : 左から右へ夫々、細胞を含有する C K - F I T C (F I T C チャンネル) の画像、細胞を含有する C K - A l e x a 6 4 7 (A P C チャンネル) の画像、及び重ね合わせた画像。全ての図は 1 0 0 の画像を表わす。

【図 1 0 A】 試料の調製技術を比較するプロットを示す。「溶解」と示されたプロットは、溶解及び遠心分離を使用して血液中の H T - 2 9 腫瘍細胞を処理することを要件とする。

【図 1 0 B】 試料の調製技術を比較するプロットを示す。「C P T」と示されたプロットは、B D V a c u t a i n e r C P T 管を使用して処理することを要件とする。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

本開示は、試料中の希少標的細胞を検出するためのサイトメトリー方法を提供する。本方法の態様は、希少標的細胞のマーカーに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に試料を接触させるステップと、試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、試料中の希少標的細胞を検出するステップとを有する。主題の方法を実施するためのシステム、組成物及びキットが更に提供される。

【0 0 1 3】

本発明を更に詳細に説明する前に、本発明は、説明される特定の実施形態に限定されず、言うまでもなく変更され得ることを理解すべきである。更に、本発明の範囲が添付の請求項によってのみ限定されているので、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明するためだけに用いられており、限定することを意図していないことを理解すべきである。

【0 0 1 4】

ある範囲の値が与えられる場合、その範囲の上限及び下限の間の、文脈が別段に明示しない限りは下限の単位の 1 0 分の 1 までの各介在値、及びその記載された範囲内の任意の他の記載された値又は介在する値が本発明に包含されることを理解されたい。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限度を条件として本発明に包含される。記載された範囲が限度のうち的一方又は両方を含む場合、これらの含まれた限度の一方又は両方を除外した範囲も本発明に包含される。

【0 0 1 5】

本明細書に使用されている全ての技術的な用語及び科学的な用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同一の意味を有する。本明細書に述べられている方法及び材料と同様の又は相当する全ての方法及び材料が本発明の実施又は試験で更に使用され得るが、典型的な例示となる方法及び材料を説明する。

【0 0 1 6】

本明細書に引用されている全ての刊行物及び特許は、個々の刊行物又は特許が、具体的に且つ個別に参照によって組み込まれると示されているかのように参照によって本明細書に組み込まれ、刊行物の引用に関連する方法及び／又は材料を開示して記載すべく、参照によって本明細書に組み込まれる。任意の刊行物の引用は、出願日前のその開示に関するものであって、先行発明を理由として、本発明がこのような刊行物に先行する権限がないことを認めるものであるとみなされるべきではない。更に、提供される刊行物の日付は、実際の公開日とは異なる場合があり、個別に確認する必要がある。

【0017】

単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」が、本明細書及び請求項で用いられている場合、文脈が別段に明示しない限り、複数の指示対象を含むことを留意すべきである。更に、請求項がいかなる選択的な要素も排除して記載されていることを留意すべきである。従って、この記述は、請求項の要素の記載に関する「唯一の(solely)」、「のみの(only)」等の排他的用語の使用、又は「否定的な(negative)」限定の使用のための先行記載として機能すべく意図される。

【0018】

当業者が本開示を読むと明らかであるように、本明細書に説明され例示された個々の実施形態は夫々、別々の構成要素及び特徴を有しており、別々の構成要素及び特徴は、本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他の複数の実施形態のいずれかの特徴から容易に分離されてもよく、又はいずれかの特徴と容易に組み合わせられてもよい。全ての記載された方法は、記載された事象の順序で、又は論理的に可能な任意の他の順序で実行され得る。

【0019】

方法

上記の通り、本開示は、試料中の希少標的細胞を検出するためのサイトメトリー方法を提供する。「サイトメトリー方法」という用語は、本明細書において、フローサイトメトリー方法及び／又はイメージングサイトメトリー方法を記載するために使用される。従って、「サイトメトリーアッセイ」とはフローサイトメトリーアッセイ及び／又はイメージングサイトメトリーアッセイを意味し、「サイトメータ」はフローサイトメータ及び／又はイメージングサイトメータを意味することができる。

【0020】

本発明の実施形態の態様は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する少なくとも第1及び第2の結合部材に試料を接触させるステップを有する。サイトメトリーで試料を調べて、結合した第1及び第2の結合部材を含む細胞の存在を検出することによって、希少標的細胞を試料中に検出することができる。

【0021】

ある実施形態では、試料中の希少標的細胞を検出する本発明の方法は定性的であり、希少標的細胞の検出は定性的である。例えば、標的細胞が試料中に存在するか又は存在しないという判定がなされる。ある実施形態では、試料中の希少標的細胞を検出する本発明の方法は定量的であり、希少標的細胞の検出は定量的である。本方法は、試料中の希少標的細胞の数の定量的測定値を決定するステップを有することができる。ある実施形態では、試料中の希少標的細胞の数を定量するステップは、存在する希少標的細胞の数が所定の閾値を上回るか又は下回るかを決定するステップを有する。

【0022】

本方法の種々のステップ及び態様を、以下に更に詳細に記載する。

【0023】

希少標的細胞

上記の通り、本開示は、試料中の希少標的細胞を検出するためのサイトメトリー方法を提供する。「希少標的細胞」という用語は、本明細書で使用する場合、試料中に存在するある型の細胞を意味するために使用され、ある型の細胞の数が、試料中の細胞の総数の50.0%未満であり、例えば、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満又は0.001%未満である。ある態様では、細胞試料中、非希少細胞の数が希少標的細胞の数より例えば 10^5 倍以上、 10^6 倍以上、 10^7 倍以上、 10^8 倍以上又は 10^9 倍以上を含む 10^4 倍以上多い。対象とする希少標的細胞型には、原核細胞（例えば細菌細胞又は古細菌細胞）及び真核細胞（例えば神経細胞、筋細胞、上皮細胞（例えば循環腫瘍細胞）などの哺乳類の細胞、幹細胞（例えば造血幹細胞）、希少リンパ球（例えば制御性T細胞）、脂肪細胞など）が含まれるが、これらに限定されない。

【0024】

「非希少細胞」という用語は、希少標的細胞ではない試料中の細胞を意味するために使用することができる。非希少細胞は、原核細胞（例えば細菌細胞又は古細菌細胞）及び真核細胞（例えば、神経細胞、白血球、筋細胞、上皮細胞、脂肪細胞などの哺乳類の細胞）を含むが、これらに限定されない任意の型の細胞とすることができる。主題の方法のある態様では、サイトメトリ解析の前に、非希少細胞は特異的に標識が付されない及び／又は染色されない。例えば、ある態様では、非希少細胞はCD45について染色されない。ある態様では、非希少細胞は、希少細胞より標識が付される数が大幅に少ない場合がある（例えば非特異結合のため）。このようなある態様では、希少細胞は、サイトメトリ解析によって、標識が付された大幅に少ない非希少細胞と識別され得る。

10

【0025】

試料

本明細書で使用する「試料」及び「細胞試料」という用語は、懸濁液中に1又は複数の別個の細胞を任意の所望の濃度で含有する任意の試料を意味する。例えば、細胞試料は、1ミリリットル当たり 10^{11} 個以下、 10^{10} 個以下、 10^9 個以下、 10^8 個以下、 10^7 個以下、 10^6 個以下、 10^5 個以下、 10^4 個以下、 10^3 個以下、500個以下、100個以下、10個以下又は1個の細胞を含有することができる。試料は既知の数の細胞又は未知の数の細胞を含有することができる。好適な細胞には、真核細胞（例えば哺乳類の細胞）及び／又は原核細胞（例えば細菌細胞又は古細菌細胞）が含まれる。

【0026】

本発明の方法の実施において、試料は、インビトロ源（例えば培養で成長させた研究用細胞由来の細胞の懸濁液）、又はインビボ源（例えば哺乳類の対象、ヒト対象など）から得られる。ある実施形態では、細胞試料はインビトロ源から得られる。インビトロ源には、原核（例えば細菌、古細菌の）細胞培養物、原核及び／又は真核（例えば哺乳動物、プロテスト（*protest*）、真菌などの）細胞を含有する環境試料、真核細胞培養物（例えば、樹立細胞株の培養物、既知の細胞株又は購入した細胞株の培養物、不死化細胞株の培養物、初代細胞の培養物、研究用酵母の培養物など）、組織培養物などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0027】

ある実施形態では、試料はインビボ源から得られ、組織から得られる試料（例えば、組織生検由来の細胞懸濁液、組織試料由来の細胞懸濁液など）及び／又は体液（例えば、全血、分画した血液、血漿、血清、唾液、リンパ液、間質液など）を含むことができる。場合により、対象由来の細胞、液又は組織が、評価の前に培養されるか、保管されるか又は処理される。インビボ源は、生きている多細胞生物を含み、非診断用細胞試料でも診断用細胞試料でも生成することができる。

30

【0028】

ある実施形態では、試料源は「哺乳動物」又は「哺乳類」であり、これらの用語は、肉食動物（例えばイヌ及びネコ）、齧歯目（例えばマウス、モルモット及びラット）、及び霊長目（例えばヒト、チンパンジー及びサル）の各目を含む哺乳綱の生物を記載するために広く使用される。場合により、対象はヒトである。本方法は、両性及び任意の発生段階（すなわち、新生児、乳児、若年、青年、成人）のヒト対象から得られる試料に適用することができる。ある実施形態では、ヒト対象は、若年、青年又は成人である。本発明はヒト対象由来の試料に適用することができる一方、本方法は、トリ、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜及びウマなどであるがこれらに限定されない他の動物対象由来の試料に（すなわち「非ヒト対象」に）実施することができると理解すべきである。

40

【0029】

本方法に使用される試料は、あらゆる便宜的な方法で得られる。ある態様では、試料は静脈穿刺によって得られる血液である。血液はサイトメトリ解析の前に、対象から得て処理されてもよい。サイトメトリ解析用に試料を得て処理する方法は当該技術分野において周知である。例えば、ある態様では、図3に提示したアッセイを使用して試料を処理

50

してもよい。この例の場合、血液試料は、標準的な静脈穿刺プロトコルに従って対象から静脈穿刺によって得られる。細胞試料をBD Vacutainer（登録商標）CPT管中に採取し、製造元の指示に従って処理する。この管を、略室温（約18℃～約25℃）で20分以上、相対遠心力約1500～約1800にて遠心分離する。遠心分離後、単核細胞層及び血小板層を回収して再懸濁する。この分画を、あらゆる便宜的なプロトコルを使用して、例えばBD FACS Permeabilizing Solution 2などの市販の試薬を使用することによって固定する及び／又は透過処理することができる。

【0030】

結合部材

上記の通り、本発明の態様は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する少なくとも第1及び第2の結合部材に試料を接触させるステップを有することができる。本明細書で使用する「結合部材」という用語は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合するあらゆる作用物質（例えばタンパク質、小分子など）を意味する。「特異的な結合」、「特異的に結合する」などの用語は、溶液又は反応混合物中での他の分子又は部分と比較してある分子に優先的に結合することを意味する。ある実施形態では、結合部材と結合部材が特異的に結合する希少標的細胞のマーカとの親和性は、これらが互いに特異的に結合して結合複合体になると、 K_d （解離定数） $10^{-6}M$ 以下、例えば $10^{-7}M$ 以下、 $10^{-8}M$ 以下、例えば $10^{-9}M$ 以下、 $10^{-10}M$ 以下、 $10^{-11}M$ 以下、 $10^{-12}M$ 以下、 $10^{-13}M$ 以下、 $10^{-14}M$ 以下、 $10^{-15}M$ 以下を特徴とする。「親和性」とは、結合の強さを意味し、結合親和性の増加が K_d の低下と相関関係にある。

【0031】

本発明のある態様では、試料を希少標的細胞のマーカに特異的に結合する2より多い結合部材、例えば3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、約10～15又は約15以上の結合部材と接触させてもよい。

【0032】

結合部材は、希少標的細胞のマーカに特異的に結合することができる。「マーカ」という用語は、本明細書で使用する場合、希少標的細胞の表面又は内部に存在する任意の分子を意味するために広く一般的に使用され、マーカは、希少標的細胞にある濃度と同一の濃度で正常な非希少細胞に通常存在しない。ある態様では、結合部材は、希少標的細胞の異なるマーカ（例えばEpCam及びサイトケラチンなどの異なる型のマーカ）に特異的に結合することができる。ある態様では、マーカは希少標的細胞の表面に存在してもよい。他の態様では、マーカは希少標的細胞の内部に含有される。かかる態様では、試料の細胞は、第1及び第2の結合部材が細胞内のマーカに特異的に結合することができるように、透過処理される必要がある場合がある。試料の細胞を透過処理する方法は当該技術分野において周知であり、例えばBD FACS Permeabilizing Solution 2の使用などの、市販の試薬及びプロトコルを含む。本方法の実施において、細胞を透過処理するあらゆる便宜的な手段を使用してもよい。

【0033】

対象とするマーカには、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD45、CD56、CD57、CD59、CD61、CD64、CD71、CD74、CD79a、CD90、CD103、CD117、CD133、CD138、CD271、CD303、CD304、bc1-2、C-kit、TdT、FMC7、SCA-1、グリコホリンA、サイトケラチン、EpCAM、EphB4、EGFR、CEA、HER2及びMUC-1が含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

ある実施形態では、結合部材は標識又は標識が付された結合部材を含む。「標識」及び「検出可能な標識」という用語は、本明細書で使用する場合、検出可能な分子を意味し、

10

20

30

40

50

放射性同位元素、蛍光体、化学発光体、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、発色団、染料、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又はハプテン）、挿入染料などを含むがこれらに限定されない。「蛍光体」という用語は、検出可能な範囲に蛍光を呈することができる物質又は該物質の一部を意味する。

【0035】

対象とする標識は、直接的及び間接的に検出可能な標識の両方を含む。本明細書に記載する方法の使用に好適な標識は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、化学的手段又は他の手段によって間接的又は直接的に検出可能なあらゆる分子を含む。対象とする標識には、フルオレセイン及びフルオレセインの誘導体、ローダミン及びローダミンの誘導体、シアニン及びシアニンの誘導体、クマリン及びクマリンの誘導体、Cascade Blue及びCascade Blueの誘導体、Lucifer Yellow及びLucifer Yellowの誘導体、BODIPY及びBODIPYの誘導体などが含まれるが、これらに限定されない。対象とする標識には、インドカルボシアニン（C3）、インドジカルボシアニン（C5）、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green488、Alexa Fluor-355、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor647、Alexa Fluor660、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700、JOE、リサミン（Lissamine）、ローダミン グリーン（Rhodamine Green）、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、カルボキシフルオレセイン（FAM）、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン（dローダミン）、カルボキシテトラメチルローダミン（TAMRA）、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、RiboGreenなどのような蛍光色素分子も含まれる。

【0036】

蛍光標識は、（例えばフローサイトメータ内の）放射光を検出するための光検出器を使用して検出され得る。酵素標識は通常、酵素に基質を加え、酵素の基質への作用によって生成する反応生成物を検出することによって検出され、比色標識は、着色した標識を単に可視化することによって検出されることができ、抗原標識は、抗原標識に特異的に結合する抗体（又は抗体の結合フラグメント）を付与することによって検出され得る。抗原標識に特異的に結合する抗体は、直接的又は間接的に検出可能となる。例えば抗体は、信号（例えば蛍光）を発する標識部分（例えば蛍光色素分子）に結合され得る。抗体は、適切な基質（例えば蛍光チラミド、Fast Redなど）を与えられると検出可能な生成物（例えば蛍光生成物）を生成する酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなど）に結合され得る。

【0037】

本方法の結合部材に、異なる標識が付されてもよい。ある態様では、標識が互いに識別され得るように標識が選択され、例えば第1の標識の発光スペクトル及び第2の標識の発光スペクトルが略重なり合わないよう選択される。例えば、図2のパネルA～Bは略重なり合わない2つの標識、フルオレセインイソチオシアネート（FITC、パネルA）及びAlexa Fluor647（パネルB）の発光スペクトルを表す。FITCは波長約488nmの光を使用して励起させられ、Alexa Fluor647の発光スペクトルと略重なり合わないFITCの発光スペクトルはフィルタ（例えば530/30フィルタ）を使用して検出され得る。検出可能な発光スペクトルが重なり合わない2つの異なる標識を利用すると、得られるフローサイトメトリーアッセイの結果を、y軸上の第1の標識の蛍光対x軸上の第2の標識の蛍光の密度プロットとしてプロットすることが可能になる（例えば図1を参照）。

【0038】

ある態様では、結合部材は抗体又は抗体の抗原結合性フラグメントであってもよい。「抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、抗体又は任意のアイソタイプの免疫グロブリン、抗原への特異的結合を保つ抗体のフラグメントを含み、F a b、F v、s c F v及びF dの各フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、抗体の抗原結合部分及び非抗体タンパク質を含む融合タンパク質を含むがこれらに限定されない。抗体は、特異的結合対の部材、例えばビオチン（ビオチン－アビジン特異的結合対の部材）など、他の部分に更に結合されてもよい。F a b'、F v、F (a b')₂、及び又は抗原への特異的結合を保つ他の抗体フラグメント、並びにモノクローナル抗体もこの用語に包含される。

10

【0039】

試料は、希少標的細胞の同一のマーカに特異的な少なくとも2つの結合部材に接触することができる。従って、結合部材が抗体である場合、希少標的細胞のマーカは抗体に結合される1又は複数の抗原を含むことができる。「抗原」とは当該技術分野においてよく理解されている用語であり、抗体分子又はT細胞受容体の抗原結合部位によって特異的に結合され得るあらゆる物質を含む。「エピトープ」とは、特異的B細胞及び／又はT細胞が反応する抗原上の部位を意味する。同一のエピトープを認識する抗体は、1つの抗体が標的抗原への別の抗体の結合を阻止する能力を示す簡易な免疫測定法で特定され得る。ある態様では、複数の抗体（例えば第1の結合部材、第2の結合部材、第3の結合部材など）が同一のエピトープに結合する。他の態様では、複数の抗体は異なるエピトープに結合する。

20

【0040】

対象とする所与のマーカに種々の結合部材を使用することができる。例えば、対象とするマーカがC D 4 5である場合、対象とする結合部材には、クローンC 0－F 1 1、H I 1 0 0、H I 3 0、U C H L 1、3 0－F 1 1、2 D 1、L 4 8、R A 3－6 B 2及びD 0 5 8－1 2 8 3によって生成された市販の抗体（全てB D B i o s c i e n c e s製）が含まれるが、これらに限定されない。しかし、場合により、本方法にはC D 4 5についての染色ステップが含まれない。

【0041】

マーカがサイトケラチンである場合、対象とする結合部材には、クローンC A M 5. 2によって生成され、主にヒトサイトケラチン7及びサイトケラチン8と反応する市販の抗体（B D B i o s c i e n c e s製）、クローンK A 4によって生成され、主にヒトサイトケラチン14、15、16及び19と反応する抗体（B D B i o s c i e n c e s製）、クローンR C K 1 0 2によって生成され、主にヒト、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌ及び／又はウサギサイトケラチン5及び8と反応する抗体（ロディッシュ（L o d i s h）等著、「M C B」, 2000年, p. 795－847に記載されており、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる）、クローンR C K 1 0 5によって生成され、主にヒト、マウス、ラット、ハムスター、ブタ及び／又はイヌサイトケラチン7と反応する抗体（ロディッシュ（L o d i s h）等著、上記に記載）、クローンA E 1/A E 3によって生成された抗体（M i l l i p o r e製）、クローンC－11によって生成された抗体（ミカリアン（M i k a e l i a n）等著、「T o x i c o l P a t h o l」, 2004年, 32版, p. 181－191に記載されており、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる）、クローンL d s 1 0 3によって生成された抗体（サウスゲート（S o u t h g a t e）等著、「L a b. I n v e s t.」, 1987年, 56版, p. 211－223に記載されており、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる）、及びクローンC K 2によって生成された抗体（ワッチャー（W a c h t e r）等著、「J. H e p a t o l.」, 1990年, 11版, p. 232－239に記載）が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0042】

対象とするE p C A M結合部材には、抗E p C A M抗体B e r E P 4（シェバーニ（S

50

heibani) 等著, 「Am J Surg Pathol.」, 1991年8月, 15版8号, p. 779-784に記載され、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる)、KS1/4 (アントロヴィック (Antolovic) 等著, 「BMC Biotechnol」, 2010年, 10版, 35に記載され、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる)、クローンG8. 8によって生成され、主にマウスEpCAMと反応する抗体 (BD Biosciences製)、及びクローンEBA-1によって生成され、主にヒトEpCAMと反応する抗体 (BD Biosciences製) が含まれるがこれらに限定されない。

【0043】

対象とするEGFR結合部材には、クローン13/EGFRによって生成された抗体、クローン9H2によって生成された抗体、クローンEGFR. 1によって生成された抗体、クローン12A3によって生成された抗体、及びクローン17/eps15によって生成された抗体 (BD Biosciences製) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0044】

対象とするCEA結合部材には、クローンCOL-1によって生成された抗体、クローンB1. 1/CD66によって生成された抗体、及びクローンB6. 2/CD66によって生成された抗体 (BD Biosciences製) が含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

対象とするHER2結合部材には、クローンNeu24. 7によって生成された抗体、クローン42/c-erbB-2によって生成された抗体、クローン3B5によって生成された抗体 (BD Biosciences製)、及びクローン9G6によって生成された抗体 (ハンコック (Hancock) 等著, 「Cancer Res.」, 1991年, 51版, p. 4575-4589に記載され、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0046】

対象とするMUC-1結合部材には、クローンHMPVによって生成された抗体 (BD Biosciences製) が含まれるが、これに限定されない。

【0047】

サイトメトリー解析

本開示の方法は、試料のフローサイトメトリーアッセイを含んでもよい。フローサイトメトリーアッセイの手順は当該技術分野において周知である。例えば、オーメロッド (Ormerod) 編, 「Flow Cytometry: A Practical Approach」, Oxford Univ. Press, 1997年、ジャロチェスキー (Jaroszeski) 等編, 「Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology」, 91号, Humana Press, 1997年、「Practical Flow Cytometry」, 第3編, Wiley-Liss, 1995年、ヴィルゴ (Virgo) 等著, 「Ann Clin Biochem. Jan」, 2012年, 49 (pt1), 17-28、リンデン (Linden) 等著, 「Semin Throm Hemost.」, 2004年10月, 30版5号, p. 502-11、アリソン (Alison) 等著, 「J Pathol」, 2010年12月, 222版4号, p. 335-344、及びハービグ (Herbig) 等著, 「Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.」, 2007年, 24版, 3号, p. 203-255を参照されたい。これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。ある態様では、試料のフローサイトメトリーアッセイは、複数の蛍光色素分子の同時励起及び検出が可能なフローサイトメータ、例えば製造元の指示に従って実質的に使用されるBD Biosciences製のFACSCanto (登録商標) フローサイトメータの使用を含む。本開示の方法は、ホールデン (Holden) 等著, 「Nature Methods」, 2005年, 2版, p. 77

30

40

50

3 及びヴァレット等著 (Vallet), 「Cytometry」, 2004 年, 59 版, p. 167-171 に記載されているようなイメージサイトメトリーを含んでもよく、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0048】

本方法のある態様では、サイトメトリーアッセイは、前方光散乱 (FSC) 及び／又は側方光散乱 (SSC) を含む。他の態様では、サイトメトリーアッセイは、第 1 の結合部材の標識及び第 2 の結合部材の標識の両方を検出することを含み (図 4 のパネル A~D 及び図 5 のパネル A~C)、この場合、散乱光ではなく標識の組合せ (例えば各標識が蛍光色素である 2 色の蛍光の組合せ) がアッセイにおける閾値として使用される。かかる態様では、試料中の希少標的細胞の特定には、第 1 の標識及び第 2 の標識の両方の検出を必要とする場合がある。ある態様では、試料中の希少標的細胞の特定には、3 以上の標識の検出 (例えば第 3 の結合部材、第 4 の結合部材など) を必要とする場合がある。

10

【0049】

ある態様では、サイトメトリー解析の前に、非希少細胞を試料から分離してもよい。非希少細胞を試料から除去するあらゆる便宜的な手段を使用することができる。対象とする分離方法には、磁気分離技術、例えば米国特許第 5945281 号明細書、米国特許第 6858440 号明細書、米国特許第 6645777 号明細書、米国特許第 6630355 号明細書及び米国特許第 6254830 号明細書、国際出願第 PCT/US2012/032423 号明細書、及びホッペナー (Hoepfner) 等著, 「Recent Results Cancer Res.」, 2012 年, 195 版, p. 43-58 に記載されているものが含まれるがこれらに限定されず、これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。対象とする分離方法には、例えば米国特許第 6929750 号明細書に記載されているような音波による濃縮器又は分離器を含む方法が更に含まれ、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0050】

サイトメトリー解析に分取を含めてもよい。希少標的細胞と特定された試料中の細胞を分取し、次いであらゆる便宜的な解析技術によって解析することができる。対象とする解析技術には、シーケンシング、Cell Search によるアッセイ (米国食品医薬品局, 「Final rule. Fed Regist 69」, 2004 年, p. 26036-26038 に記載)、CTC Chip によるアッセイ (ナグラス (Nagath) 等著, 「Nature」, 2007 年, 450 版, p. 1235-1239 に記載)、MagSweeper によるアッセイ (タラサ (Talasaz) 等著, 「Proc Natl Acad Sci U S A」, 2009 年, 106 版, p. 3970-3975 に記載) 及びナノ構造基材によるアッセイ (ワン エス (Wang S) 等著, 「Angew Chem Int Ed Engl」, 2011 年, 50 版, p. 3084-3088 に記載) が含まれるが、これらに限定されない。これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。所望の場合、分取プロトコルに、生存希少細胞及び死滅希少細胞の識別を含めてもよく、その場合、かかる細胞を特定するあらゆる便宜的な染色プロトコルを本方法に組み入れてもよい。

30

【0051】

システム

主題の方法を実施するためのサイトメトリーシステムを更に提供する。サイトメトリーシステムは、下記のようにサイトメトリー試料流体サブシステムを備えてもよい。加えて、サイトメトリーシステムは、サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結されたサイトメータを備えている。本開示のシステムは、複数の追加の構成要素、例えばデータ出力デバイス (例えばモニタ、プリンタ及び／又はスピーカ)、データ入力デバイス (例えばインターフェースポート、マウス、キーボードなど)、流体処理構成要素、電源などを備えてもよい。

40

【0052】

ある態様では、サイトメトリーシステムは、希少標的細胞を含む試料を、希少標的細胞

50

のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に接触させるように構成されたサイトメトリー試料流体サブシステムを備えている。サイトメトリー試料流体サブシステムは、試料中の非希少細胞に特異的に標識が付されない及び／又は試料中の非希少細胞が染色されない（例えば C D 4 5 については染色されない）ように更に構成されてもよい。サイトメトリーシステムは、サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結されたサイトメータを備えてもよい。

【0053】

他の態様では、システムは、希少標的細胞を含む試料を、希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に接触させるように構成されたサイトメトリー試料流体サブシステム、及びフローサイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結され、試料のアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、試料中の希少標的細胞を検出するように構成されたサイトメータを備えてもよい。ある態様では、サイトメータは、第 1 の結合部材に結合した第 1 の標識及び第 2 の結合部材に結合した第 2 の標識の蛍光の組合せを検出閾値として使用するように構成されている。

【0054】

キット

上記の方法の 1 又は複数の実施形態を実施するためのキットを更に提供する。主題のキットは、様々な構成要素及び試薬を備えてもよい。場合によっては、キットは、本方法に使用される試薬（例えば上記の通り）と、コンピュータプログラムが格納され、コンピュータにロードされると、コンピュータプログラムがコンピュータを作動させて本明細書に記載のサイトメトリーアッセイを実施するコンピュータ可読媒体と、コンピュータプログラムを取得するためのアドレスを有する物理的な基板とを少なくとも備えている。

【0055】

上述した構成要素に加えて、主題のキットは、本方法を行うための使用説明を更に備えてもよい。これらの使用説明は、主題のキット内に様々な形態で備えられてもよく、使用説明のうちの一又は複数のキット内に備えられてもよい。これらの使用説明が備えられる一形態は、好適な媒体又は基板上に印刷された情報であり、例えば、情報が印刷されている一又は複数の紙片、キットの包装体、又は添付文書等である。更なる別の手段は、情報が記録されているコンピュータ可読媒体であり、例えば、C D、D V D、ブルーレイ、フラッシュメモリ等である。存在し得る更なる別の手段は、転送されるサイトの情報にアクセスするためにインターネットを介して使用可能なウェブサイトアドレスである。あらゆる簡便な手段がキット内に設けられ得る。

【0056】

有用性

主題の方法、組成物、システム及びキットは、試料中の希少標的細胞を検出することが望ましい種々の異なる用途に使用される。

【0057】

本開示の非限定的且つ例示的な実施形態を以下に提供する。

【0058】

付記 1. 試料中の希少標的細胞を検出する方法であって、

前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に前記試料を接触させるステップと、

前記試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の希少標的細胞を検出するステップとを有することを特徴とする方法。

【0059】

付記 2. 前記試料のサイトメトリーアッセイは、前記試料のフローサイトメトリーアッセイを有することを特徴とする付記 1 に記載の方法。

【0060】

付記 3. 前記試料のサイトメトリーアッセイは、前記試料のイメージサイトメトリーア

ッセイを有することを特徴とする付記 1 又は 2 に記載の方法。

【0061】

付記 4. 前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 3 の結合部材に前記試料を接触させるステップと、

前記試料のサイトメトリーアッセイにより、結合した第 1、第 2 及び第 3 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の希少標的細胞を検出するステップとを更に有することを特徴とする付記 1 乃至 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0062】

付記 5. 少なくとも前記第 1 及び第 2 の結合部材は抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントであることを特徴とする付記 1 乃至 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0063】

付記 6. 前記抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントは、前記マーカ上の重複するエピトープに結合することを特徴とする付記 5 に記載の方法。

【0064】

付記 7. 前記抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントは、前記マーカ上の同一のエピトープに結合することを特徴とする付記 6 に記載の方法。

【0065】

付記 8. 前記第 1 及び第 2 の結合部材に標識を付すことを特徴とする付記 1 乃至 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0066】

付記 9. 前記第 1 及び第 2 の結合部材に標識を直接付すことを特徴とする付記 8 に記載の方法。

20

【0067】

付記 10. 前記第 1 の結合部材又は前記第 2 の結合部材に、インドカルボシアニン (C3)、インドジカルボシアニン (C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green488、Alexa Fluor-355、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor647、Alexa Fluor660、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700、JOE、リサミン (Lissamine)、ローダミン グリーン (Rhodamine Green)、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、カルボキシフルオレセイン (FAM)、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン (dローダミン)、カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)、カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen 及び RiboGreen から選択される標識を付すことを特徴とする付記 8 又は 9 に記載の方法。

30

【0068】

付記 11. 前記第 1 の結合部材の標識及び前記第 2 の結合部材の標識は異なる標識であることを特徴とする付記 8 乃至 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0069】

付記 12. 前記試料中の非希少細胞を特異的に染色しないことを特徴とする付記 1 乃至 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0070】

付記 13. 前記試料中の非希少細胞を CD45 について染色しないことを特徴とする付記 1 乃至 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0071】

付記 14. 前記マーカは細胞内のマーカであることを特徴とする付記 1 乃至 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0072】

50

付記 15. 前記試料中の有核細胞を透過処理剤で透過処理するステップを有することを特徴とする付記 14 に記載の方法。

【0073】

付記 16. 前記マーカーは、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD45、CD56、CD57、CD59、CD61、CD64、CD71、CD74、CD79a、CD90、CD103、CD117、CD133、CD138、CD271、CD303、CD304、bc1-2、C-kit、TdT、FMC7、SCA-1、グリコホリンA、サイトケラチン、EpCAM、EphB4、EGFR、CEA、HER2 及び MUC-1 から選択されることを特徴とする付記 1 乃至 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0074】

付記 17. 前記試料は血液であることを特徴とする付記 1 乃至 16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0075】

付記 18. 前記試料は全血であることを特徴とする付記 1 乃至 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0076】

付記 19. 前記試料を哺乳類の対象から得ることを特徴とする付記 1 乃至 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0077】

付記 20. 前記試料をヒト対象から得ることを特徴とする付記 1 乃至 19 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0078】

付記 21. 前記希少標的細胞は上皮細胞であることを特徴とする付記 1 乃至 20 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0079】

付記 22. 前記上皮細胞は循環腫瘍細胞であることを特徴とする付記 21 に記載の方法。

30

【0080】

付記 23. 前記マーカーは、CK4、CK7、CK8、CK10、CK13、CK14、CK18、CK19 及び CK20 から選択されるサイトケラチンであることを特徴とする付記 22 に記載の方法。

【0081】

付記 24. 前記第 1 及び第 2 の結合部材は抗体であり、クローン CAM5.2、KA4、RCK102、RCK105、C-11、Lds103 又は CK2 によって生成された抗体として、実質的に同一のエピトープに結合することを特徴とする付記 22 に記載の方法。

【0082】

付記 25. 前記試料のサイトメトリーアッセイは、分取を有することを特徴とする付記 1 乃至 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0083】

付記 26. 前記希少標的細胞を回収することを特徴とする付記 25 に記載の方法。

【0084】

付記 27. 前記希少標的細胞のアッセイを、その後に行うことを特徴とする付記 26 に記載の方法。

【0085】

付記 28. マーカーを含む希少標的細胞、及び

該希少標的細胞のマーカーに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材

50

を含むことを特徴とする細胞試料。

【0086】

付記29. 前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第3の結合部材を更に含むことを特徴とする付記28に記載の細胞試料。

【0087】

付記30. 前記第1及び第2の結合部材は抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントであることを特徴とする付記28又は29に記載の細胞試料。

【0088】

付記31. 前記抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントは、前記マーカ上の重複するエピトープに結合することを特徴とする付記30に記載の細胞試料。

10

【0089】

付記32. 前記抗体又は該抗体の抗原結合性フラグメントは、前記マーカ上の同一のエピトープに結合することを特徴とする付記31に記載の細胞試料。

【0090】

付記33. 前記第1及び第2の結合部材は標識が付されていることを特徴とする付記28乃至32のいずれか1つに記載の細胞試料。

【0091】

付記34. 前記第1及び第2の結合部材は標識が直接付されていることを特徴とする付記33に記載の細胞試料。

【0092】

付記35. 前記第1又は第2の結合部材は、インドカルボシアニン(C3)、インドジカルボシアニン(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Texas Red、Pacific Blue、Oregon Green488、Alexa Fluor-355、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor647、Alexa Fluor660、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700、JOE、リサミン(Lissamine)、ローダミングリーン(Rhodamine Green)、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、カルボキシフルオレセイン(FAM)、フィコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン(dローダミン)、カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、Pico Green及びRiboGreenから選択される標識が付されていることを特徴とする付記33又は34に記載の細胞試料。

20

30

【0093】

付記36. 前記第1の結合部材の標識及び前記第2の結合部材の標識は異なる標識であることを特徴とする付記33乃至35のいずれか1つに記載の細胞試料。

【0094】

付記37. 前記細胞試料中の非希少細胞が特異的に染色されていないことを特徴とする付記28乃至35のいずれか1つに記載の細胞試料。

40

【0095】

付記38. 前記細胞試料中の非希少細胞がCD45について染色されていないことを特徴とする付記28乃至37のいずれか1つに記載の細胞試料。

【0096】

付記39. 前記マーカは細胞内のマーカであることを特徴とする付記28乃至38のいずれか1つに記載の細胞試料。

【0097】

付記40. 前記マーカは、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、C

50

D 4 5、C D 5 6、C D 5 7、C D 5 9、C D 6 1、C D 6 4、C D 7 1、C D 7 4、C D 7 9 a、C D 9 0、C D 1 0 3、C D 1 1 7、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 2 7 1、C D 3 0 3、C D 3 0 4、b c l-2、C-k i t、T d T、F M C 7、S C A-1、グリコホリンA、サイトケラチン、E p C A M、E p h B 4、E G F R、C E A、H E R 2 及びM U C-1 から選択されていることを特徴とする付記 2 8 乃至 3 9 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0098】

付記 4 1. 血液であることを特徴とする付記 2 8 乃至 4 0 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0099】

付記 4 2. 全血であることを特徴とする付記 2 8 乃至 4 1 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0100】

付記 4 3. 哺乳類の対象から得られたものであることを特徴とする付記 2 8 乃至 4 2 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0101】

付記 4 4. ヒトから得られたものであることを特徴とする付記 2 8 乃至 4 3 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0102】

付記 4 5. 前記希少標的細胞は上皮細胞であることを特徴とする付記 2 8 乃至 4 4 のいずれか 1 つに記載の細胞試料。

【0103】

付記 4 6. 前記上皮細胞は循環腫瘍細胞であることを特徴とする付記 4 5 に記載の細胞試料。

【0104】

付記 4 7. 希少標的細胞を含む試料を、該希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に接触させるように構成され、前記試料中の非希少細胞に標識が付されていないサイトメトリー試料流体サブシステム、及び

該サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結されたサイトメータを備えていることを特徴とするサイトメトリーシステム。

【0105】

付記 4 8. 前記サイトメトリー試料流体サブシステムはフローサイトメトリー試料流体サブシステムであり、前記サイトメータはフローサイトメータであることを特徴とする付記 4 7 に記載のサイトメトリーシステム。

【0106】

付記 4 9. 希少標的細胞を含む試料を、該希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材に接触させるように構成されたサイトメトリー試料流体サブシステム、及び

該サイトメトリー試料流体サブシステムに流体的に連結され、前記試料のアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を含む細胞の存在を分析して、前記試料中の希少標的細胞を検出するように構成されたサイトメータを備えていることを特徴とするサイトメトリーシステム。

【0107】

付記 5 0. 前記サイトメトリー試料流体サブシステムはフローサイトメトリー試料流体サブシステムであり、前記サイトメータはフローサイトメータであることを特徴とする付記 4 9 に記載のサイトメトリーシステム。

【0108】

付記 5 1. 試料中の希少標的細胞を特定するためのキットであって、

前記希少標的細胞のマーカに特異的に結合する第 1 及び第 2 の結合部材、及び

前記試料のフローサイトメトリーアッセイにより、結合した第 1 及び第 2 の結合部材を

10

20

30

40

50

含む細胞の存在を分析して、前記試料中の希少標的細胞を検出するための前記第1及び第2の結合部材の使用説明を備えていることを特徴とするキット。

【0109】

実施例

上記の本開示から理解され得る通り、本開示には多種多様な用途がある。従って、以下の実施例は、本発明を構成して使用する方法的完全な開示及び記載を当業者に提供するために提示されており、本発明者が自身の発明であるとみなすものの範囲を限定するものではなく、以下の実施例は、行われた全ての実験例又は行われた唯一の実験例であることを示すものでもない。当業者は、実質的に同様の結果を得るために変更されるか又は変形されてもよい種々の非臨界パラメータを容易に認識する。従って、以下の実施例は、本発明を構成して使用する方法的完全な開示及び記載を当業者に提供するために提示されており、本発明者が自身の発明であるとみなすものの範囲を限定するものではなく、以下の実施例は、行われた全ての実験例又は行われた唯一の実験例であることを示すものでもない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確さを確保するように努力しているが、多少の実験誤差及び偏差は考慮されるべきである。

【0110】

材料及び方法

以下の実施例で使用される一般的な材料及びプロトコルを以下に示す。

【0111】

精製した抗サイトケラチン抗体をBD (Franklin Lakes, New Jersey) から得た。抗体を2つの集団に分離し、FITC又はAlexa Fluor 647の蛍光色素を集団の抗体に夫々結合することによって、蛍光色素が結合した抗サイトケラチン抗体の集団を2つ生成した。HT-29結腸腺癌細胞をATCCから得た(ATCC HTB38)。

【0112】

血液試料を1×BD FACS溶解液を使用して溶解した。試料を、1×BD FACS Permeabilizing Solution 2を使用して透過処理した。全てのフローサイトメトリーアッセイを、BD Biosciences製のFACS Canto (登録商標) フローサイトメータを使用して実施した。全ての試薬及び材料を、製造元のプロトコルに従って使用した。

【0113】

実施例1：血液試料中の腫瘍細胞の検出

正常なドナーの静脈血を、ヘパリンナトリウムを含むBD Vacutainer管に採取した。HT-29腫瘍細胞を、血液試料に濃度(i) 10,000 HT-29細胞/mL、濃度(ii) 1,000 HT-29細胞/mL、濃度(iii) 100 HT-29細胞/mL、又は濃度(iv) 0 HT-29細胞/mLで添加した。4つの試料の各々について、7.5 mLを抜き取り、BD Vacutainer CPT管中でスピンさせWBC部分を分離した。CPT試料調製技術は、溶解及び遠心分離を使用するプロトコルと同様であった(図10A及び図10B)。次いで、WBC分画を固定し、透過処理し、CK-FITC及びCK-Alexa 647で60分間染色してFACSで解析した(図3)。

【0114】

APCチャネル(y軸)対FITCチャネル(x軸)の得られた密度プロット(図4のパネルA~D)は、HT-29腫瘍細胞の出発濃度が(i) 10,000 HT-29細胞/mL(パネルA)、(ii) 1,000 HT-29細胞/mL(パネルB)、及び(iii) 100 HT-29細胞/mL(パネルC)である試料中の細胞集団を示す。各プロットで観察された細胞の数は、HT-29腫瘍細胞の出発濃度に比例して減少した。HT-29腫瘍細胞の出発濃度が0細胞/mLの場合、細胞は観察されなかった(パネルD)。

。

10

20

30

40

50

【0115】

HT-29腫瘍細胞は、WBCの背景レベルが高い場合でも検出することができた（図5のパネルA～C）。HT-29細胞を濃度10,000細胞/mLで含有する血液試料（7.5mL）を1×FACS溶解液で溶解し、1×BD FACS Permeabilizing Solution 2で透過処理し、洗浄し、次いで0.55mL Rx体積のCK Ab-FITC及びCK Ab-A647の結合体で染色し、この混合物0.36mLを、更なる洗浄はせずに中流速（36μL/分）にてBD Biosciences製のFACSCanto（登録商標）フローサイトメータで計数した。34,363,636個のWBCを背景に、1個のHT-29腫瘍細胞が観察され、（パネルA～B）、15分の稼働中に「緩衝液のみ」には偽陽性のドットが記録されなかった（パネルC）。

10

【0116】

偽陽性の事象からのHT-29細胞の識別は、少なくとも第1及び第2の結合部材の検出を必要とすることで改善された。例えば、HT-29腫瘍細胞は、1つの結合部材のみの結合しか観察されない非特異的な事象からは容易に検出することができなかった（図6のパネルA～B、図7のパネルA～B）。第1及び第2の結合部材の検出を必要とすることにより、狭い対角線上に下降するドットプロットが得られ、HT-29細胞が容易に特定され（図6のパネルC）、同時に偽陽性の事象が排除された（図7のパネルC）。

【0117】

撮像によって、1つの結合部材のみの測定では、多くの偽陽性の事象が観察され得ることが更に明らかになった。例えば、図8のパネルA～Cは、種々の出発濃度でのHT-29腫瘍細胞の画像を示す。WBC及びHT-29腫瘍細胞を含有する試料を、CK-FITC及びCK-PEで染色した。HT-29細胞は、濃度5,000細胞/mL（パネルA）、500細胞/mL（パネルB）、又は0.0細胞/mL（パネルC）で存在した。PEチャンネルでは、HT-29細胞の濃度が0.0細胞/mL（パネルC）の場合でも事象が観察された。

20

【0118】

ZEISS顕微鏡及び水銀灯を使用して個々の細胞を更に撮像した（図9のパネルA～B）。試料を上記の通り調製し、個々の細胞を、水銀灯を使用したZEISS顕微鏡を使用して撮像した。FITCチャンネルから撮像した画像では、個々の細胞中のCK-FITCの存在が明らかになり、APCチャンネルでは個々の細胞中のCK-Alexa647の存在が明らかになり、重ね合わせでは細胞中に存在するCK-FITC及びCK-Alexa647の両方が示された（パネルBの右の画像）。各試料につき100画像を撮像した。

30

【0119】

上記の発明は、理解の明瞭化のために、図示及び例示によりある程度詳しく説明されているが、ある変更及び調整が、添付の請求項の趣旨又は範囲から逸脱することなく本発明になされてもよいことが、本発明の教示を考慮すると当業者に容易に明らかとなる。

【0120】

従って、前述の内容は本発明の本質を単に示しているに過ぎない。本明細書に明示的に説明されていないか又は示されていないが、本発明の本質を具体化して本発明の趣旨及び範囲に含まれる様々な構成を当業者が考案することが可能であることは明らかである。更に、本明細書に述べられている全ての実施例及び条件的な用語は、本発明の本質を理解する際に読者を支援することを本質的に意図するものであり、このように具体的に述べられた実施例及び条件に限定するものではない。更に、本発明の本質、態様及び実施形態だけでなく、本発明の具体的な実施例を述べている本明細書における全ての記載は、本発明の構造的且つ機能的な等価物の両方を含むことを意図するものである。加えて、このような均等物は、現時点で既知の均等物及び今後開発される均等物の両方、すなわち構造に関わらず同一の機能を有する開発された全ての要素を含むことを意図するものである。従って、本発明の範囲は、本明細書に示され説明された例示的な実施形態に限定されることを意

40

50

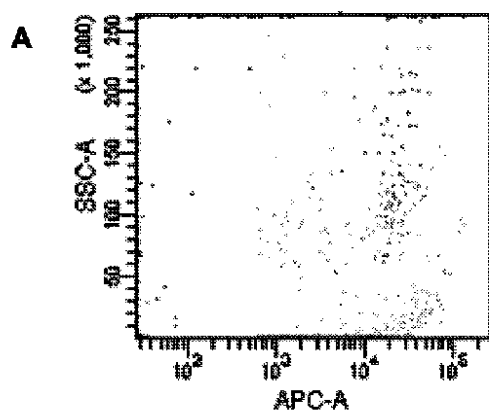
図するものではない。むしろ、本発明の範囲及び趣旨は、添付の特許請求の範囲により具体化される。

【0121】

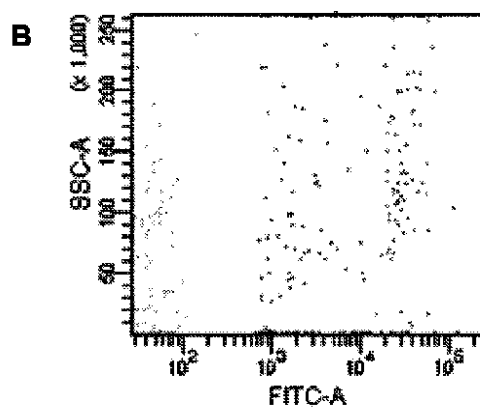
関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)に基づき、2011年9月6日出願された米国仮特許出願第61/531575号明細書の出願日の優先権を主張している。その開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

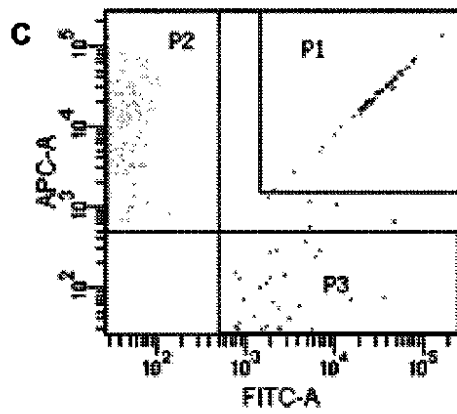
【図6A】



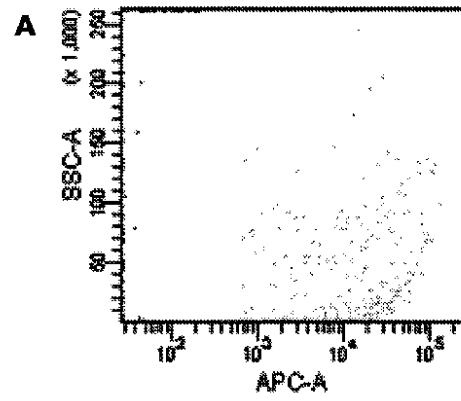
【図6B】



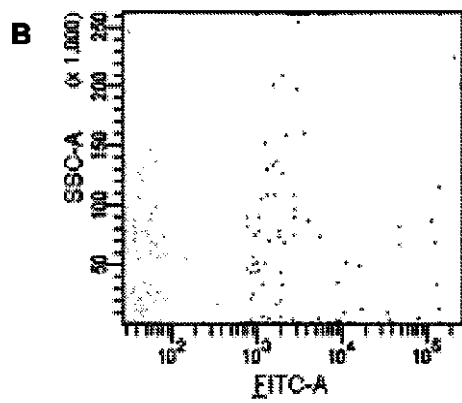
【図 6 C】



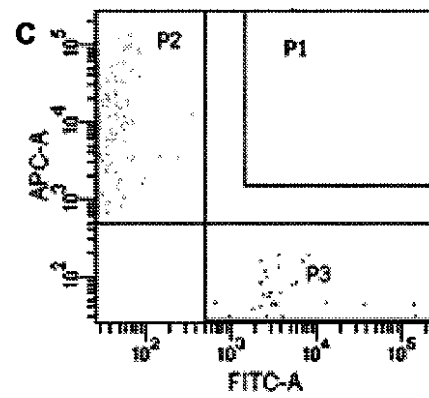
【図 7 A】



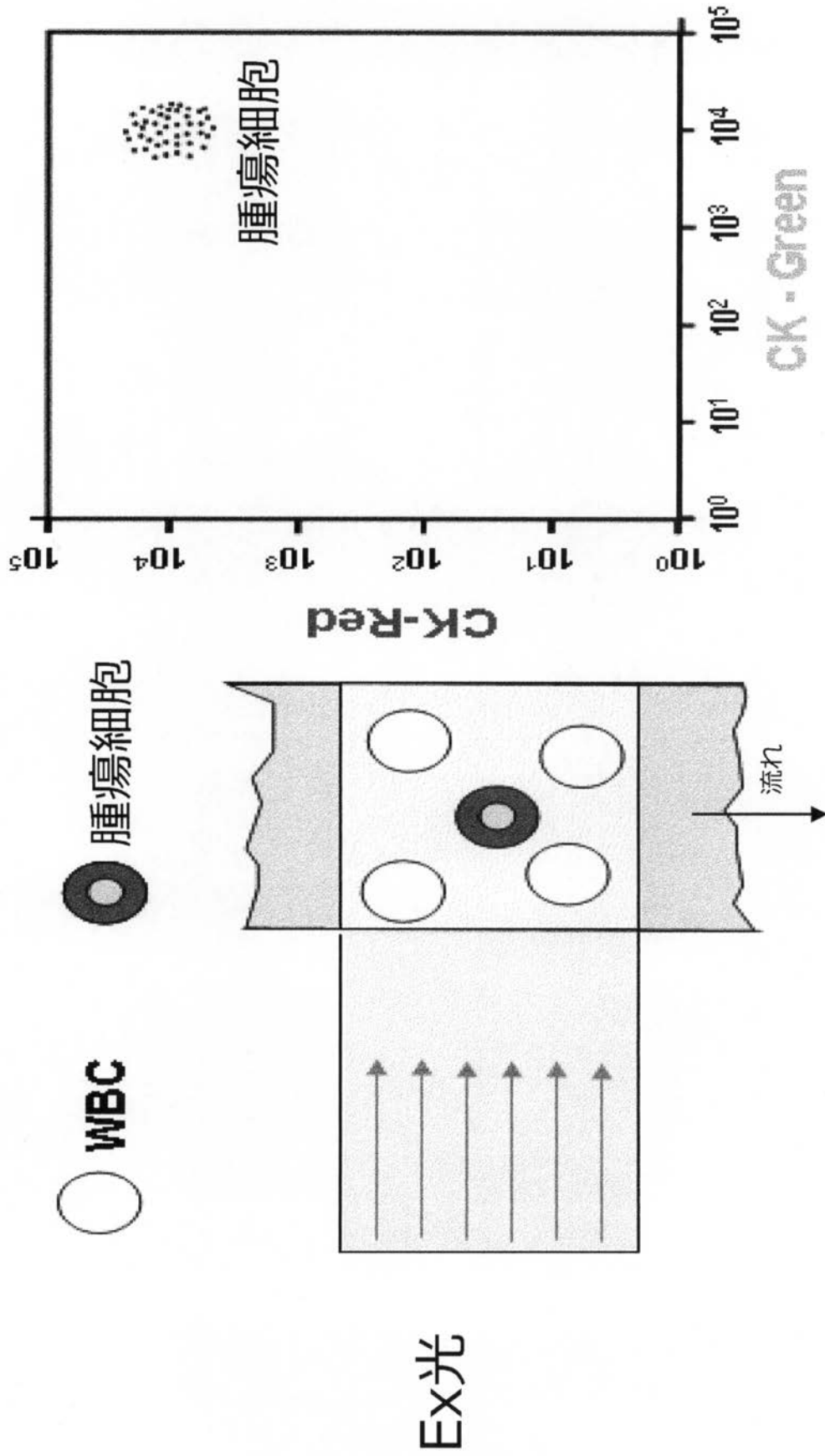
【図 7 B】



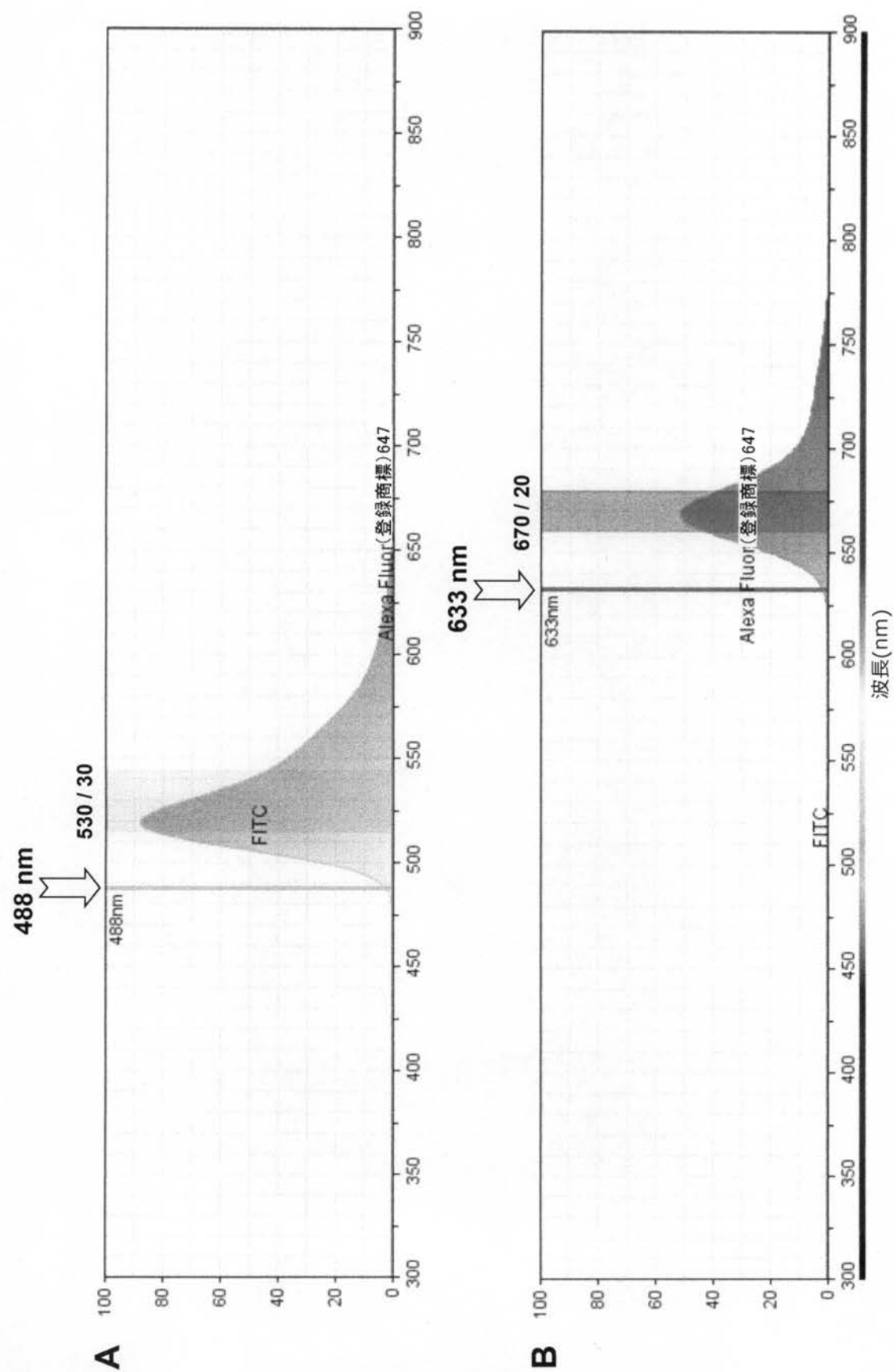
【図 7 C】



【図 1】



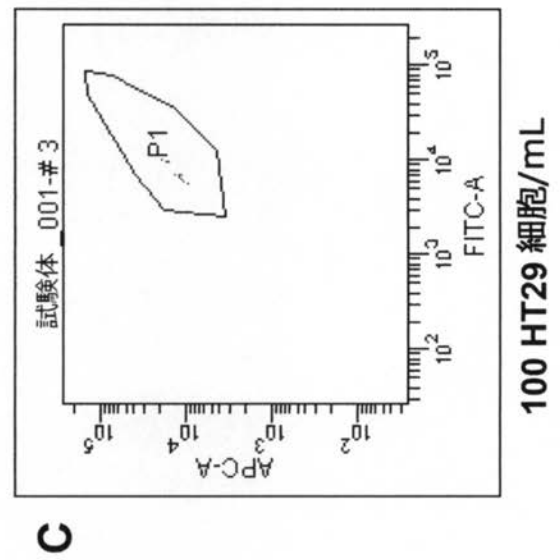
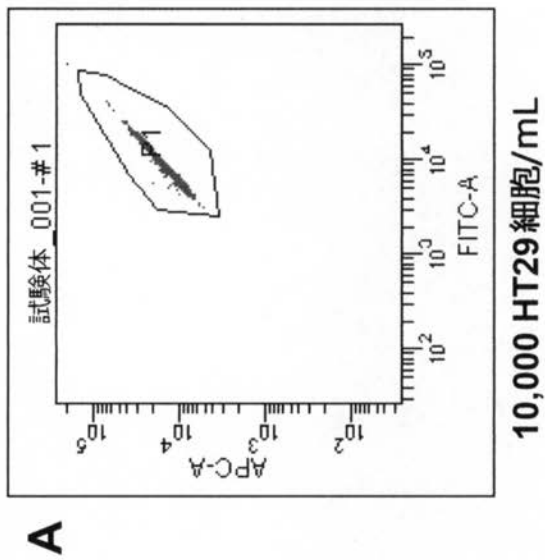
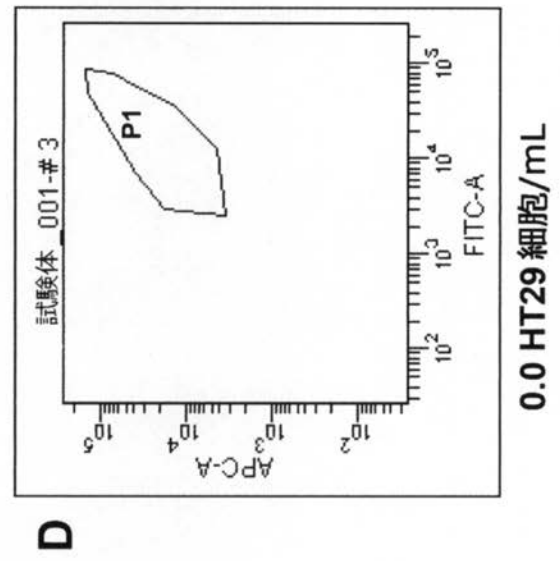
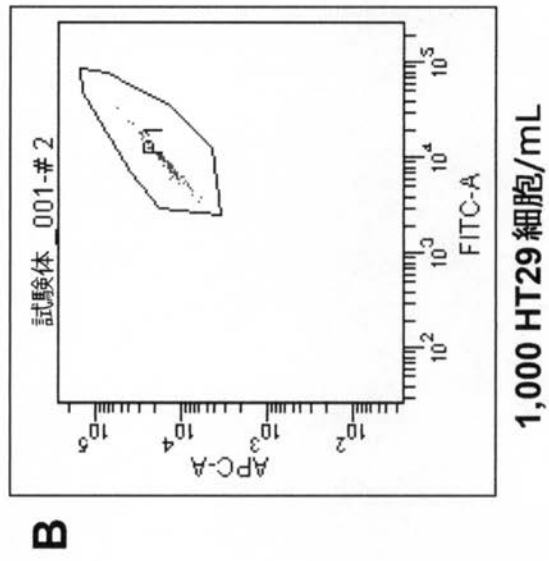
【図 2】



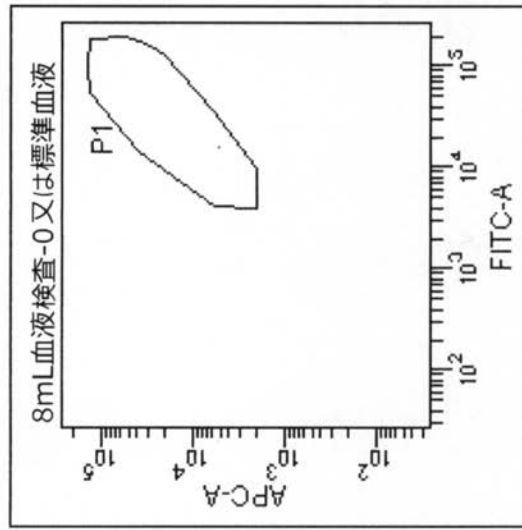
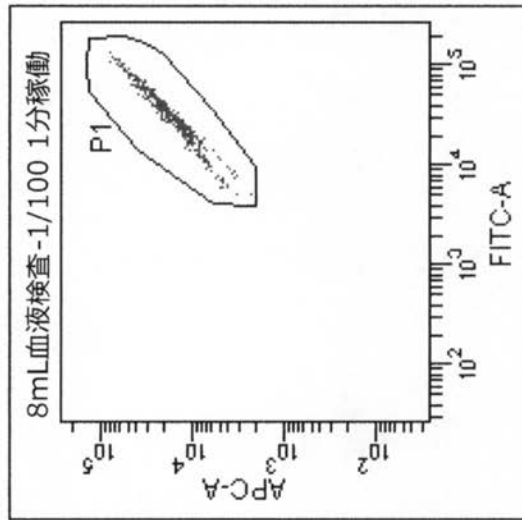
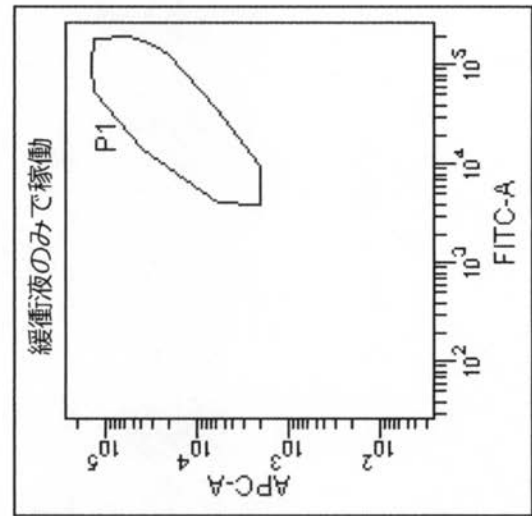
【図 3】



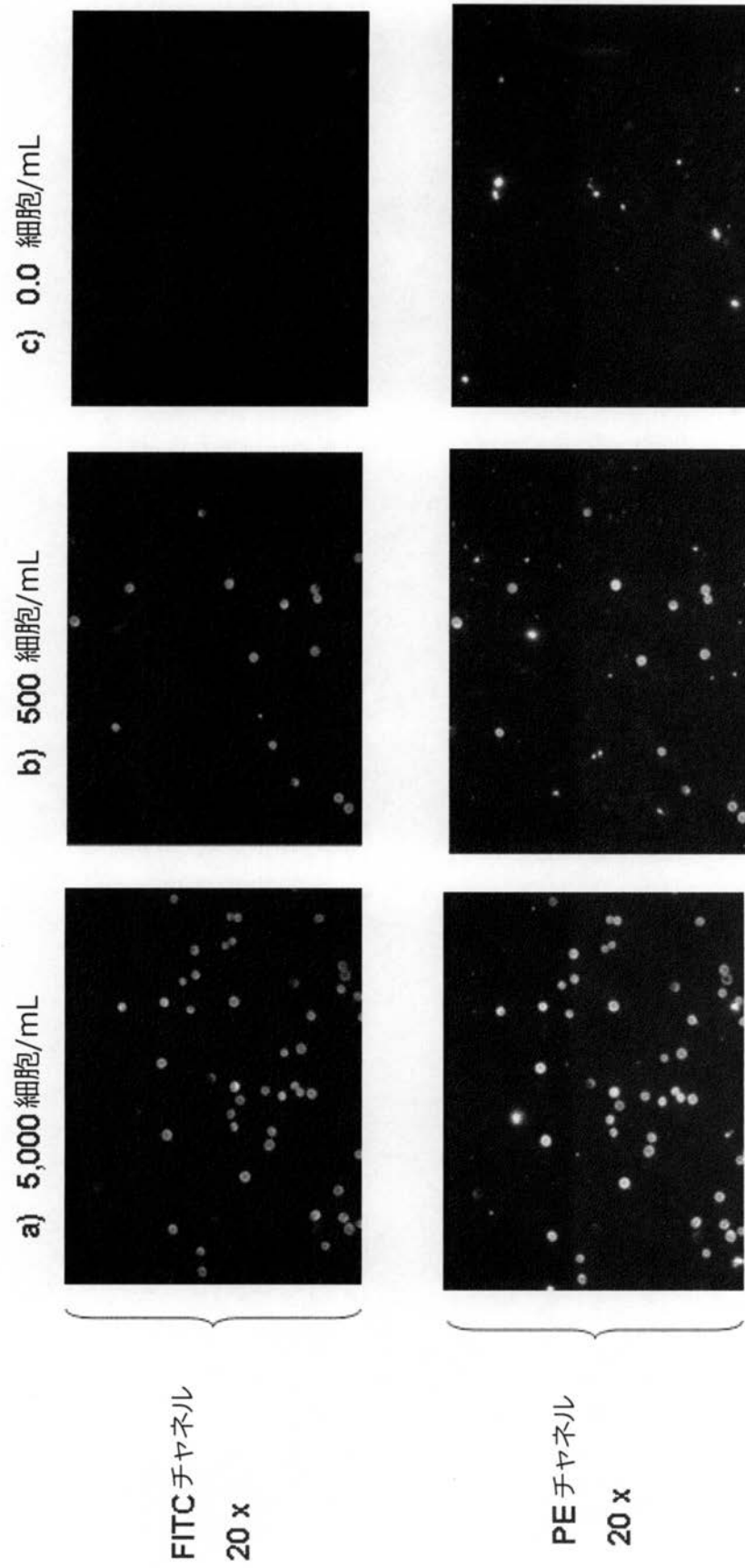
【図 4】



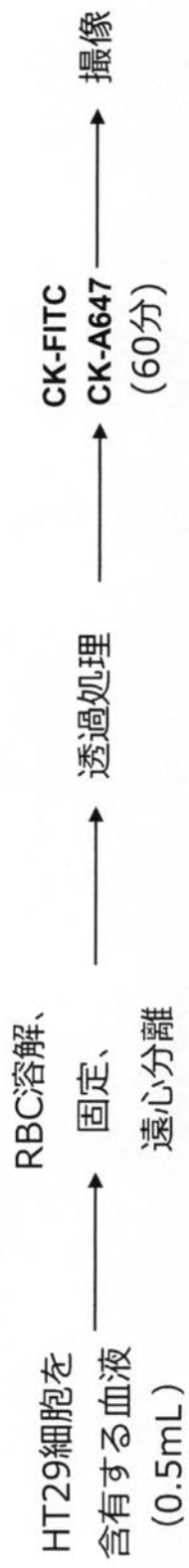
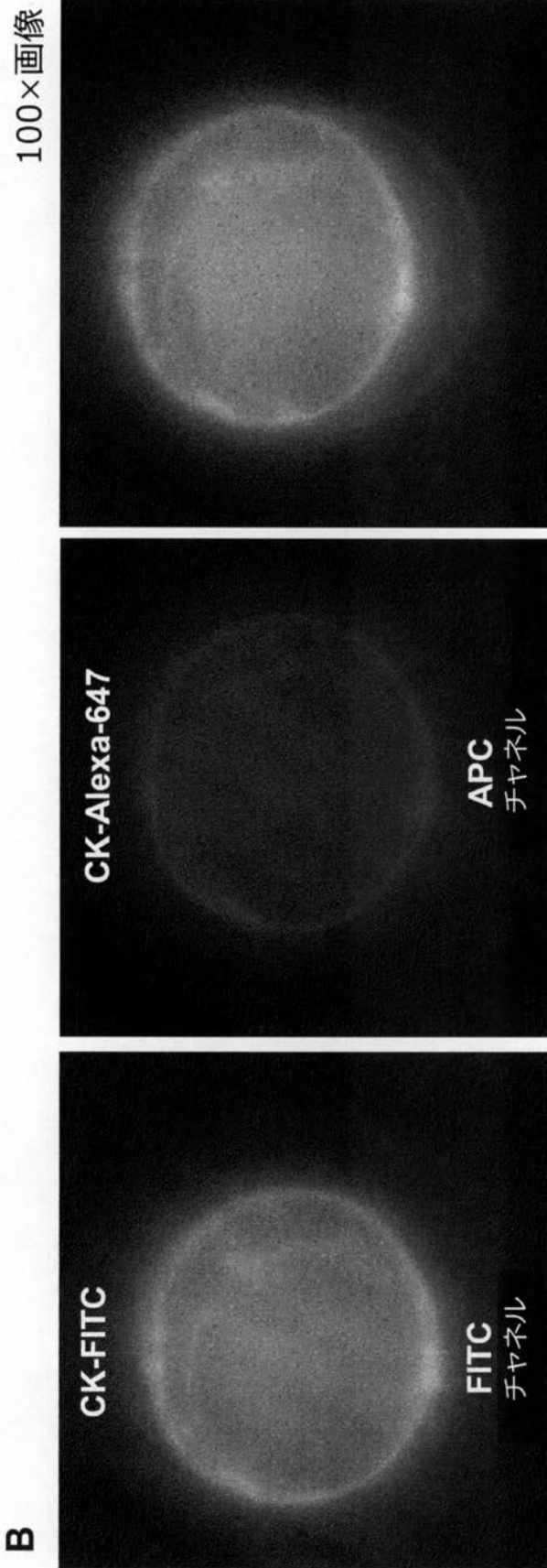
【図 5】

**B****A****C**

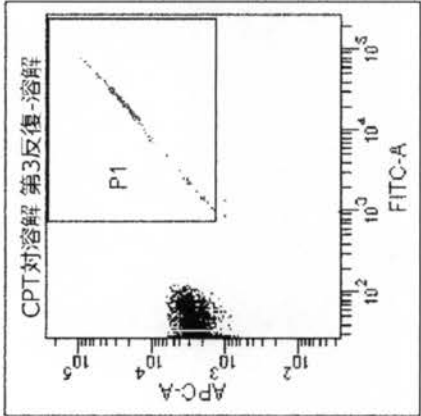
【図 8】



【図 9】

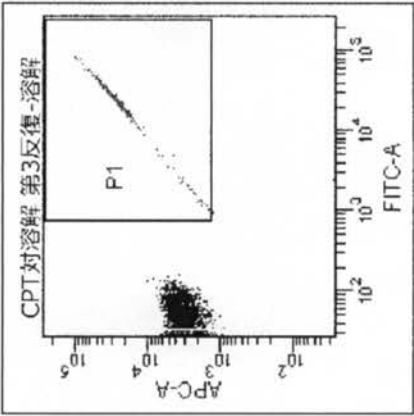
A**B**

【図 10 A】



溶解 - rep-1

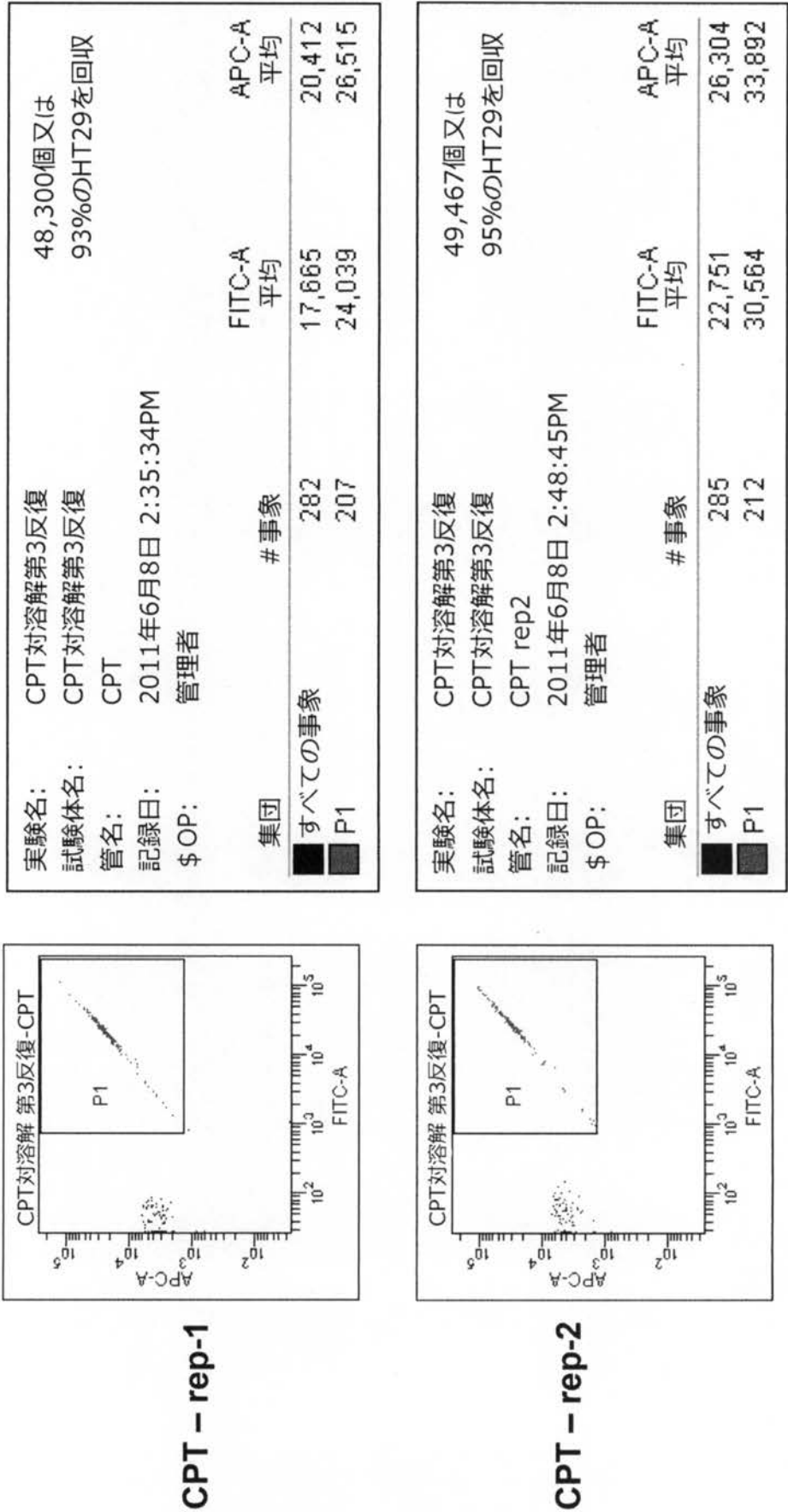
実験名:	CPT対溶解第3反復	40,600個又は
試験体名:	CPT対溶解第3反復	78%のHT29を回収
管名:	溶解	
記録日:	2011年6月8日 2:33:28PM	
SOP:	管理者	
集団		
すべての事象	# 事象	FITC-A 平均
P1	2,054	1,815
	174	21,013
		APC-A 平均
		4,629
		23,955



溶解 - rep-2

実験名:	CPT対溶解第3反復	47,833個又は
試験体名:	CPT対溶解第3反復	92%のHT29を回収
管名:	溶解 rep2	
記録日:	2011年6月8日 2:46:01PM	
SOP:	管理者	
集団		
すべての事象	# 事象	FITC-A 平均
P1	2,176	2,321
	205	24,171
		APC-A 平均
		5,664
		27,536

【図 1 0 B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/53933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/00; G01N 33/48 (2013.01) USPC - 435/7.24; 356/39 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 435/7.24; 356/39 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/7.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Google Scholar: circulating tumor cells, disseminated tumor cells, cancer stem cells, fluorescence, cytokeratin, CK4, CK7, CK8, CK10, CK13, CK14, CK18, CK19, CK20, Sarclectin, SCL, Keratin 7, KRT7, Keratin 8, KRT8, Keratin 18, KRT18, KRT19, Keratin 20, KRT20, antibody, CAM5.2, KA4, RCK102, RCK105, C-11		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masouleh, et al. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol. J Immunol Methods. 2010, 357(1-2):38-42; Abstract, pg 39, col 2; pg 41, col 2; pg 40, Fig 1 and its legend; Table 2	1, 2, 4-7, 9-12
X	US 7,332,288 B2 (Terstappen, et al.) 19 February 2008 (19.02.2008) Abstract, col 11, ln 38-50; col 12, ln 3-14; Fig 2, Fig 4(A-D)	1, 8 3
Y	US 2010/0323388 A1 (Chiu, et al.) 23 December 2010 (23.12.2010) Abstract, claims 1, 8, 13, 23, 27, 28; para [0004]-[0009], [0047], [0105], [0107], [0110], [0125], [0133]-[0138], Fig 16B	3
A	US 2011/0182881 A1 (Chin, et al.) 28 July 2011 (28.07.2011) Abstract, para [0050], [0051], [0065], [0128], [0182], [0190], [0195]	1-12
A	US 2011/0110931 A1 (Matsui) 12 May 2011 (12.05.2011) Abstract, para [0234]-[0246], [0250]-[0278]	1-12
A	US 2010/0184083 A1 (Panabieres, et al.) 22 July 2010 (22.07.2010) Abstract, claims 1-19; para [0007]-[0010], [0013], [0016], [0017], [0023], [0025], [0028]-[0030], [0035], [0039], [0065], [0073], Fig 1, 3	1-12
A	US 2009/0098138 A1 (Lorence) 16 April 2009 (16.04.2009) Abstract, para [0004]-[0009], [0016]-[0019], [0030]-[0037]	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 January 2013 (05.01.2013)		Date of mailing of the international search report 18 JAN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/53933

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7,863,012 B2 (Rao, et al.) 04 January 2011 (04.01.2011) Abstract	1-12
A	US 7,842,465 B2 (Hsieh, et al.) 30 November 2010 (30.11.2010) Abstract	1-12
A	US 7,785,810 B2 (Chen) 31 August 2010 (31.08.2010) Abstract	1-12
A	US 2009/0061456 A1 (Allard, et al.) 05 March 2009 (05.03.2009) Abstract	1-12
A	US 2008/0057505 A1 (Lin, et al.) 06 March 2008 (06.03.2008) Abstract	1-12
A	Gerges, et al. New technologies for the detection of circulating tumour cells. Br Med Bull. 2010, 94:48-64; Abstract	1-12
A	Brennan, et al. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. Nat Rev Cancer 2010, 10(9):605-17; Abstract	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/53933

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.1

Group I: claims 1-12, drawn to a method of detecting a rare target cell in a sample, the method comprising:
contacting the sample with first and second binding members that specifically bind to a marker of the rare target cell, and
cytometrically assaying the sample for the presence of cells comprising bound first and second binding members to detect the rare target cell in the sample.

Group II: claims 13-14, drawn to a cytometric system comprising:
a cytometric sample fluidic subsystem configured to contact a sample comprising a rare target cell with first and second binding members that specifically bind to a marker of the rare target cell, wherein non-rare cells of the sample are not labeled; and
a cytometer fluidically coupled to the cytometric sample fluidic subsystem.

..... See Supplemental Sheet to continue

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/53933

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group III: claim 15, drawn to a kit for identifying a rare target cell in a sample, the kit comprising: first and second binding members that specifically bind to a marker of the rare target cell; instructions for using the first and second binding members to cytometrically assay the biological sample for the presence of cells comprising bound first and second binding members to detect the rare target cell in the sample.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I and II do not include the inventive concept of a kit for identifying a rare target cell in a sample, as required by Group III.

The inventions of Groups I and III do not include the inventive concept of a cytometric system comprising: a cytometric sample fluidic subsystem configured to contact a sample comprising a rare target cell with first and second binding members that specifically bind to a marker of the rare target cell, wherein non-rare cells of the sample are not labeled; and a cytometer fluidically coupled to the cytometric sample fluidic subsystem, as required by Group II.

In addition, a method of claim 1 does not represent a contribution over prior art as being anticipated by a paper titled "Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol" by Masouleh, et al. (J Immunol Methods. 2010, 357(1-2):38-42) that discloses a method of detecting a rare target cell in a sample (Abstract, "OBJECTIVES: Accurate enumeration of circulating endothelial progenitor cells (CEP) is essential for their potential application as biomarkers of angiogenesis. In this study different stem cell markers (CD34, CD133) and endothelial cell antigens (KDR/VEGFR-2, CD31) in different flow cytometric protocols were assessed for the purpose of CEP quantification", wherein "CEP represent only a minute cell population in human peripheral blood" (Masouleh, pg 38, col 2), the method comprising:

-- contacting the sample with first and second binding members that specifically bind to a marker of the rare target cell (pg 39, col 2, "2.3. Immunostaining of blood samples... was performed as previously reported ... Sample aliquots ... were distributed into an isotype control tube and sample tubes, respectively, and antibodies were added to each tube according to Table 2. Following incubation ... samples were washed twice with 10 ml of cold PBS. Finally, the cells were resuspended in 1000 µL PBS for immediate flow cytometric analysis"), and
 -- cytometrically assaying the sample for the presence of cells comprising bound first and second binding members to detect the rare target cell in the sample (pg 39, col 2, "2.4. Flow cytometric analysis. For flow cytometric analysis, an FC500-Cytometer (Beckman Coulter) and CXP analysis software (version 2.2) were used (Schroers et al., 2005). In each analysis, 1,000,000 total events were collected..."; pg 41, col 2, 3rd para, "Applying our above described assay including the MNC/CD45- gating strategy we detected between 0.1% and 3.1% CD133+/CD31+CEP cells. Thus, CD133+/CD31+CEP cells are present in the blood of patients with cancer").

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

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

(74)代理人 100078868

弁理士 河野 登夫

(72)発明者 キラコシアン, レア

アメリカ合衆国 95129 カリフォルニア, サンノゼ, ウィリアムス ロード 4851

(72)発明者 ゴールドベルグ, エドワード

アメリカ合衆国 95033 カリフォルニア, ロス ガトス, ラ ヴェルネ ドライブ 1811

(72)発明者 レクトンワルド, ディーザー

アメリカ合衆国 95131 カリフォルニア, サンノゼ, パイン レイク コート 1393

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB24 BB39 CA25 DA80 FA37 FB03 FB12 GC11 GC15

专利名称(译)	用于细胞计量检测样品中稀有靶细胞的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2014529078A	公开(公告)日	2014-10-30
申请号	JP2014529846	申请日	2012-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	キラコシアンレア ゴールドベルグエドワード レクトンワルドディーザー		
发明人	キラコシアン,レア ゴールドベルグ,エドワード レクトンワルド,ディーザー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/48 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N15/1459 G01N33/533 G01N33/56972 G01N33/57484 G01N33/57492 G01N33/57496 G01N2015/1402 G01N2015/1477		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N33/543.597 G01N33/48.B G01N15/14.C		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/BB39 2G045/CA25 2G045/DA80 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC11 2G045/GC15		
优先权	61/531575 2011-09-06 US		
其他公开文献	JP6133297B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了用于检测样品中稀有靶细胞的细胞计数方法。在某些方面，所述方法和组合物可促进检测生物样品例如血液中的稀有靶细胞，例如循环肿瘤细胞（CTC）。方法的方面包括使样品与特异性结合稀有靶细胞的标记的第一和第二结合成员接触，并且通过细胞计量学测定样品中是否存在包含结合的第一和第二结合成员的细胞以检测例子。还提供了用于实施本主题方法的系统，组合物和试剂盒。

