

(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2015-505966

(P2015-505966A)

(43) 公表日 平成27年2月26日 (2015. 2. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/552 (2006.01)	GO 1 N 33/552	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B O 2 9
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	D 4 B O 6 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P 4 H O 4 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-546147 (P2014-546147)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月7日 (2012. 12. 7)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年8月4日 (2014. 8. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/068586
 (87) 国際公開番号 W02013/086428
 (87) 国際公開日 平成25年6月13日 (2013. 6. 13)
 (31) 優先権主張番号 61/568, 793
 (32) 優先日 平成23年12月9日 (2011. 12. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389821
 ザ スクリップス リサーチ インスティ
 テュート
 アメリカ合衆国、92037 カリフォル
 ニア州、ラ ジョラ、ノース トレーイ
 パインズ ロード 10550-ティービ
 ーシー 8
 (71) 出願人 514144733
 ゲルド マリエンフェルド
 ドイツ国 97922 ラウダ-コエニグ
 ショフェン スエトゼルストル. 20
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環腫瘍細胞を特定するための装置、システム、及び方法

(57) 【要約】

様々な目的物、特に循環腫瘍細胞の特定のための装置、システム、及び方法を提供する。一態様では、該システムは、限定はされないが、走査システム、画像保管システム、及び分析システムを含む。分析システムは、様々な基準(これには、細胞核の面積又は体積、CD-45陰性状態、及びサイトケラチン陽性状態が含まれ得る)に基づいて、完全な細胞などの所望の目的物を特定することが好ましい。好ましくは、含まれるのは、画像化ステップ中に細胞を含有するためのスライド、平底面を含むウェル、ウェルの辺を決定するウェルの外縁の境界(該境界は、ウェルの底部表面と隣接し、かつ、その間に流体封鎖を提供する)である。ここでは、本発明は、実質的に単層の目的物、例えば細胞を提供する、単一の画像化ウェルを提供する。

【選択図】 図 3

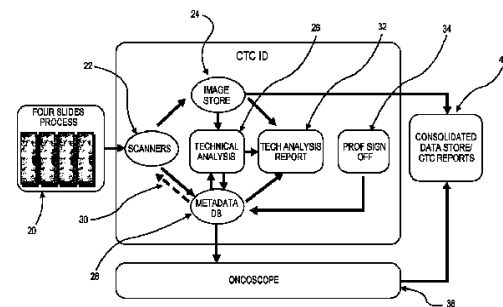


FIG. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板の表面に配置された細胞を分析するためのウェルであって、

a) 平底面、及び

b) 該ウェルの外縁を成す境界(該境界は、底部表面と隣接し、かつ底部表面との間に流体封鎖を提供する)

を含み、該境界内に単層の少なくとも150万個の細胞を受け入れるように構成され、かつ該平底面の面積が少なくとも7.0cm²である、前記ウェル。

【請求項 2】

単層の少なくとも250万個の細胞を受け入れるように構成される、請求項1記載のウェル 10

【請求項 3】

単層の少なくとも300万個の細胞を受け入れるように構成される、請求項1記載のウェル

【請求項 4】

前記平底面の面積が、少なくとも10.0cm²である、請求項1記載のウェル。

【請求項 5】

前記平底面の面積が、少なくとも11.7cm²である、請求項1記載のウェル。

【請求項 6】

周長が、少なくとも12.0cmである、請求項1記載のウェル。 20

【請求項 7】

周長が、少なくとも14.0cmである、請求項1記載のウェル。

【請求項 8】

周長が、少なくとも15.0cmである、請求項1記載のウェル。

【請求項 9】

前記基板が、ガラスを含む、請求項1記載のウェル。

【請求項 10】

前記基板が、長さ、幅、厚さを含む平面の基板である、請求項1記載のウェル。

【請求項 11】

前記長さが約7から8cmであり、前記幅が約2から3cmである、請求項1記載のウェル。 30

【請求項 12】

前記厚さが約5から10 mmである、請求項10記載のウェル。

【請求項 13】

前記基板の表面の少なくとも40%、53%、又は62%を占める、請求項1記載のウェル。

【請求項 14】

前記外縁が長方形であり、かつ前記基板が長方形である、請求項1記載のウェル。

【請求項 15】

前記境界が、該境界を通過する流体の流れを防止する構造的境界又は疎水性コーティングである、請求項1記載のウェル。

【請求項 16】

前記境界が、ガラスを含む構造的境界である、請求項15記載のウェル。 40

【請求項 17】

前記ウェルの周長が、少なくとも15cmであり、かつ前記ウェルの平底面の面積が、少なくとも10cm²である、請求項1記載のウェル。

【請求項 18】

前記基板が、基準マーカを含む、請求項1記載のウェル。

【請求項 19】

前記ウェルが、カバーガラスをさらに含む、請求項1記載のウェル。

【請求項 20】

前記平底面が、細胞付着性コーティングを含む、請求項1記載のウェル。 50

【請求項 2 1】

以下を含む、細胞を分析するためのシステム：

- a) 請求項1から20のいずれか1項記載のウェル；
- b) 照明システム；
- c) 画像化システム；
- d) 細胞選別基準を分析するための機能を含む分析モジュール；及び
- e) 使用者のための出力部。

【請求項 2 2】

前記照明システム及び画像化システムが、光源、励起フィルターホイール、ミラー、光発光フィルターホイール、カメラ、ライトフィールドカメラ、データ記憶モジュール、又はこれらの組み合わせを含む、請求項21記載のシステム。

10

【請求項 2 3】

前記光源が、広範囲照明器である、請求項22記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記分析モジュールが、該分析モジュールによって分析されたデータが投入されるメタデータ・データベースと動作可能に連結された回路を含む、請求項21記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記細胞選別基準が、細胞の形態、核の面積若しくはサイズ、細胞マーカーの有無、細胞マーカーの強度、又はこれらの組み合わせから選択される、請求項21記載のシステム。

20

【請求項 2 6】

前記細胞マーカーが、細胞表面マーカー又は核マーカーである、請求項25記載のシステム。

【請求項 2 7】

データ管理システムをさらに含む、請求項21記載のシステム。

【請求項 2 8】

前記データ管理システムが、データ記憶モジュールを含む、請求項27記載のシステム。

【請求項 2 9】

細胞アッセイを実施するための方法であって、

- a) 細胞集団を含むサンプルを、請求項1から20のいずれか1項記載のウェルと接触させることと；
 - b) 請求項21から28のいずれか1項記載のシステムによって、該細胞集団を分析し、それによって細胞アッセイを前もって決めることと
- を含む前記方法。

30

【請求項 3 0】

前記分析が、前記細胞集団内での細胞型の特徴付けを含む、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

前記分析が、サイトケラチン、CD45、核の面積若しくはサイズ、細胞形態、又はこれらの組み合わせの検出を含む、請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

前記サンプルが、血液サンプルである、請求項29記載の方法。

40

【請求項 3 3】

細胞集団を含むサンプル中の循環腫瘍細胞を検出する方法であって、

- a) 請求項1から20のいずれか1項記載のウェルを、該サンプルと接触させることと；
 - b) 請求項21から28のいずれか1項記載のシステムによって、該細胞集団を分析することと；
 - c) (b)の分析によって、循環腫瘍細胞を検出し、それによって、該サンプル中の循環腫瘍細胞を検出することと
- を含む前記方法。

【請求項 3 4】

前記サンプルが、血液サンプルである、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

50

前記サンプルの体積が、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10mlである、請求項34記載の方法。

【請求項36】

1mlのサンプルにつき、2、5、7、10、15、20、又は50個を超える循環腫瘍細胞が検出される、請求項33記載の方法。

【請求項37】

前記分析が、サイトケラチン、CD45、核の面積若しくはサイズ、細胞形態、又はこれらの組み合わせの検出を含む、請求項33記載の方法。

【請求項38】

前記循環腫瘍細胞が、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、かつ、DAPI画像化により、非アポトーシス性の完全な核を含むと特徴付けられる、請求項37記載の方法。

10

【請求項39】

対象における癌を診断する又は癌の予後を提供するための方法であって、

- a) 請求項1から20のいずれか1項記載のウェルを、該対象由来の細胞集団を含むサンプルと接触させることと；
 - b) 請求項21から28のいずれか1項記載のシステムによって、該細胞集団を分析することと；
 - c) (b)の分析によって、循環腫瘍細胞を検出することと；
 - d) 該循環腫瘍細胞の特徴付けを行うことと；
 - e) (d)の特徴付けによって診断又は予後を判定し、それによって、該対象における癌を診断する又は癌の予後を提供することと
- を含む前記方法。

20

【請求項40】

前記サンプルが、血液サンプルである、請求項39記載の方法。

【請求項41】

前記サンプルの体積が、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10mlである、請求項40記載の方法。

【請求項42】

1mlのサンプルにつき、2、5、7、10、15、20、又は50個を超える循環腫瘍細胞が検出される、請求項39記載の方法。

【請求項43】

前記分析が、サイトケラチン、CD45、核の面積若しくはサイズ、細胞形態、又はこれらの組み合わせの検出を含む、請求項39記載の方法。

30

【請求項44】

前記循環腫瘍細胞が、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、かつ、DAPI画像化により、非アポトーシス性の完全な核を含むと特徴付けられる、請求項43記載の方法。

【請求項45】

前記循環腫瘍細胞の特徴付けを行うことが、該細胞が由来する癌の型を判定することを含む、請求項39記載の方法。

【請求項46】

前記対象に、化学療法レジメンを施すことをさらに含む、請求項39記載の方法。

40

【請求項47】

前記レジメンが、1以上の化学療法薬の投与を含む、請求項46記載の方法。

【請求項48】

化学療法レジメンに対する対象の応答性を判定するための方法であって、

- a) 請求項1から20のいずれか1項記載のウェルを、該対象由来の細胞集団を含むサンプルと接触させることと；
- b) 請求項21から28のいずれか1項記載のシステムによって、該細胞集団を分析することと；
- c) (b)の分析によって、循環腫瘍細胞を検出することと；
- d) 該循環腫瘍細胞の特徴付けを行って、化学療法薬の投与の有効性を判定し、それによって、治療レジメンに対する対象の応答性を判定することと

50

を含む前記方法。

【請求項 49】

以下を含むキット：

- a) 請求項1から20のいずれか1項記載のウェル；
- b) 細胞におけるサイトケラチン又はCD45の存在を免疫学的に判定するための試薬；及び
- c) サンプル中の循環腫瘍細胞を検出するためのキットを利用するための説明書。

【請求項 50】

前記試薬が、サイトケラチン及びCD45と特異的に結合する抗体を含む、請求項46記載のキット。

【請求項 51】

10

DAPI染色を実施するための試薬をさらに含む、請求項46記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は概して、医療診断に、より詳細には、循環腫瘍細胞(CTC)を特定及び分類することに関する。

【背景技術】

【0002】

20

(背景情報)

循環腫瘍細胞研究の分野は、上皮癌(癌腫)を有する患者における長期的な疾患モニタリングの、未だ対処されていない重要な医学的必要性に応えて、急速に発展している。治療法への応答及び疾患進行を予測及びモニタリングすることは、特に重要である。患者の癌の経過を通して、疾患の治療法-応答性が変化するからである。白血病などの液性腫瘍では、悪性細胞は、疾患の期間内の多くの時点で、血流から容易に採取することができ、適切な治療法調節を適用することができる。しかし、癌腫などの固形腫瘍は、組織生検が、公知のリスクを伴う侵襲手法であることから、一般に、初期診断の時点でしか採取されない。時折、遠隔転移が最初に明らかになった時点で、繰り返し腫瘍採取物を集めて、遠い病変部が、実際に患者の既知の原発腫瘍からの転移に相当することが確認される。

30

【0003】

癌挙動の現在の認識では、固形組織形状の原発性癌腫及び転移性癌腫の、それぞれの微小環境における理解は進歩しているが、血流を占め、血流を通して広がる、流体相中の癌腫挙動の理解においては、かなりの隔たりが存在する。主に固形として存在する癌については、捕らえにくいわずかな量の循環成分が、その中に、将来の遠隔転移を引き起こす細胞を含有するので、これは、本発明の魅力的な標的となる。

【0004】

固形腫瘍のこの流動相の臨床的重要性を十分に特徴付けるための研究は、循環腫瘍細胞(CTC)の特定のための容易に利用可能かつ信頼性が高い実験ツールが存在しないことによって、妨げられてきた。血液中のCTCの特徴が解明されていないことや頻度が低いことは、癌細胞を正常な上皮細胞と区別することの難しさと合わせて、流動相がどのようにして臨床的に重要であり得るのかに関する研究をかなり遅らせている。理想的な流動相生検は、大抵の上皮癌患者において、かなりの数のCTCを検出するであろう。また、診断を行う病理医及び/又は研究者に対して、計数だけでなく、さらなる分子的、形態的、及び/又は表現型的分析も可能にする形式で、CTCを保存及び提供するであろう。さらに、理想的な流動相生検は、さらなる分析のために、サンプル内のすべての他のCTC様細胞集団を保存すべきである。

40

【0005】

現在、CTC検出のためのFDA承認技術だけが、免疫磁気濃縮(immunomagnetic enrichment)に基づいている。この現在の「ゴールドスタンダード」試験は、CellSearch(登録商標)

50

と呼ばれ、上皮細胞接着分子(EpCAM)を発現する細胞を単離するための免疫磁気濃縮ステップを用いる[1]。さらに、CTCとして特定されるためには、細胞は、細胞質サイトケラチンを発現し、かつ5ミクロンよりも大きい直径を有する、核を含有しなければならない。この技術は、転移性の、乳癌、前立腺癌、及び直腸結腸癌を有する患者におけるCTC数の計数及びモニタリングの予後的有用性を明らかにしている；しかし、このシステムの感度は低く、大抵の患者において、ほとんど又は全くCTCを検出しない[2、3]。最新のCTC技術は、より高感度であると報告されており、濃縮戦略の変形を追究している；しかし、これらの手法は、検出可能な事象を、最初の濃縮ステップのために選択されたタンパク質の十分な発現を示す事象に直接的に偏らせる[4～8]。

【0006】

CTC生物学の分野には、落とし穴がたくさん存在する。最も難しい問題としては、感度及び特異性が挙げられる。癌患者における真の生物学的陽性の割合は、未知であり、健康な人又は非悪性腫瘍性疾患を有する人における循環性上皮細胞の割合は、同様に、確実には知られていない。感度-疾患が存在する場合の陽性試験(この場合はCTCの生物学的存在)-については、確実な知識の代わりに一般的に使用される戦略は、細胞株細胞を全血に入れる添加(spiking)実験、又は大きく変わり得る技術を使用した他の研究者の公表データである。どちらの手法にも問題点があり、この分野においては議論が残っている。特異性-疾患が存在しない場合の陰性試験-は、癌に対する本発明者らの現在の理解によれば循環癌細胞について陰性であるはずである患者サンプルを評価することによって、少なくともある程度、対処することができる。

【0007】

この目的のために、健康なドナーの血液が、陰性対照として一般に使用され、発表される数は変動するものの、臨床的に健康な人では一般に、少数のみのCTCしか検出されない。本明細書に論じる結果については、健康なドナー集団は、癌を有しないと思われているが不顕性癌についての広範な医学的評価を受けていない、様々な年齢の非実験室メンバーのボランティアで構成される。すべての癌は当然、初期には無症候性であるので、特異性決定について本当に陰性の集団を見つけることは、費用がかかる長期間の試みであろう。何故なら、明らかに健康な対象に対して侵襲的な医学検査を実施する必要がある、又は、対象がその後数年間にわたって、ある型の癌腫を顕在化しないことを確認するのに十分な時間、待つ必要があるからである。

【0008】

従来の技術では、アッセイ用の患者サンプルを提供するために、様々な形式が使用されてきた。これらの形式としては、フローサイトメトリーに基づくシステムなどの流体システム、及び静的システムが挙げられる。図1は、従来技術の静的画像化システムにおいて使用される3ウェルプレートの平面図を示す。スライドは、3つの等しいサイズのウェル領域を含む。一例では、各ウェル領域は、1.45cm平方である。その結果得られるスライドの総ウェル面積は、6.3cm²である。このウェルの外縁は、17.4cmである。3つのウェルが占める、スライド全体に対する割合は、23.6%である。スライドあたりの推定される細胞数は、125万から150万細胞の範囲内である。

【0009】

図2は、従来技術に使用される12ウェルプレートの平面図を示す。スライドは、12個の等しいサイズのウェル領域を含む。一例では、各ウェル領域は、直径0.5cmの円である。その結果得られるスライドの総ウェル面積は、2.4cm²である。このウェルの外縁は、19cmである。最後に、3つのウェルが占める、スライド全体に対する割合は、12.8%である。スライドあたりの推定される細胞数は、50万から60万細胞の範囲内である。

【0010】

徹底的な努力にもかかわらず、CTCの検出はこれまで、難しいままであった。必要とされるのは、効率的に、迅速に、かつ安価にCTCを検出することができる、高感度の特異的なシステムである。

【発明の概要】

【0011】

(発明の概要)

様々な目的物、特にCTCの特定のための装置、システム、及び方法を提供する。

【0012】

したがって、一態様では、本発明は、細胞を分析するためのシステムを提供する。このシステムは、本発明のウェル、照明システム、画像化システム、細胞選別基準を分析するための機能を有する分析モジュール、及び使用者のための出力部を含む。実施態様では、システムは、限定はされないが、走査システム、画像保管システム、及び分析システムを含むことができる。分析システムは、様々な基準(これには、細胞核の面積又は体積、CD-45陰性状態、及びサイトケラチン陽性状態が含まれ得る)に基づいて、完全な細胞などの所望の目的物を特定することが好ましい。好ましくは、含まれるのは、画像化ステップ中に細胞を含有するためのウェルを有するスライド、平底面を含むウェル、ウェルの辺を決定するウェルの外縁の境界(該境界は、ウェルの底部表面と隣接し、かつ、その間に流体封鎖を提供する)である。

10

【0013】

別の態様では、本発明は、基板の表面に配置された細胞を分析するためのウェルを提供する。ウェルは、平底面、及びウェルの外縁を成す境界(該境界は、底部表面と隣接し、かつ、その間に流体封鎖を提供する)を含む。本発明の実施態様は、実質的に単層の目的物、例えば細胞を提供する、単一の画像化ウェルを提供する。ウェルの面積は、好ましくは 7.5cm^2 超、より好ましくは 10cm^2 超、最も好ましくは実質的に 11.7cm^2 である。ウェルの周長は、それに対応して、好ましくは実質的に 12.5cm 、より好ましくは実質的に 14.5cm 、最も好ましくは実質的に 15.7cm である。ウェルによって被覆されるスライドの上部表面の割合は、好ましくは実質的に40%、より好ましくは53%、最も好ましくは実質的に62%である。ウェルは、それぞれ、好ましくは160万から190万個の細胞、より好ましくは210万から260万個の細胞、最も好ましくは、250万から300万個の細胞の単層の画像化が可能であるようなサイズである。好ましい画像化ウェルは、合計4つの辺を有する。(例えば3ウェルスライドが12の辺を有する従来の技術と比較して)辺の数及びその周長を減らすことによって、側壁境界線に関連する端部効果が最小限になる。

20

【0014】

ある手段では、高解像度でCTCを特定するために本明細書で使用される手法(HD-CTC)は、任意の単一のタンパク質濃縮戦略に頼らないという点で特徴的である。代わりに、すべての有核細胞が保持され、かつ、サイトケラチン(CK)(すなわち上皮細胞のみに見られる中間径フィラメント)を標的にするモノクローナル抗体、CD45を標的にする全白血球(pan leukocyte)特異的な抗体、及び核染色、すなわちDAPIを用いて免疫蛍光的に染色される。有核血液細胞は、核の輪郭及び細胞質分布の細かい細胞学的詳細を保持する高品質かつ高解像度のデジタル画像をもたらすために、複数の蛍光チャンネルで画像化される。この濃縮無しの戦略は、不均一であることが知られているCTC集団の詳細な形態的特徴付けを可能にするための高解像度の細胞形態を与えつつ、高感度かつ高特異性をもたらす。この手法の利点は、対象となる特定の集団を特定する及び該集団の特徴付けを行うために、複数の分析パラメータを追跡することができることである。

30

40

【0015】

本発明の実施態様は、転移性癌患者において「HD-CTC」を使用してサンプルを分析するために使用されている。このアッセイの重要な革新的側面は、血液検体に対する最小限の処理を伴うその単純性、及び、診断病理学/細胞病理学品質の画像を用いる専門的な形態的解析を可能にするその能力である。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、細胞アッセイを実施するための方法を提供する。この方法は、ある細胞集団を有するサンプルを本発明のウェルと接触させることと、本発明のシステムによってその細胞集団を分析し、それによって細胞アッセイを前もって決めることを含む。実施態様では、この分析は、CTCなどの細胞集団内の細胞型の特徴付けを含む

50

。

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、あるサンプル中のCTCを検出する方法を提供する。この方法は、本発明のウェルを該サンプルと接触させることと、本発明のシステムによってその細胞集団を分析することと；その分析に基づいてCTCを検出し、それによって該サンプル中のCTCを検出することとを含む。実施態様では、1mlのサンプルにつき、2、5、7、10、15、20、又は50個を超える循環腫瘍細胞が検出される。

【0018】

さらに別の態様では、本発明は、対象における癌を診断する又は癌の予後を提供するための方法を提供する。この方法は、本発明のウェルを、該対象由来の細胞集団を含むサンプルと接触させることと、本発明のシステムによって、該細胞集団を分析することと、該細胞集団中のCTCを検出することと、該CTCの特徴付けを行うことと、この特徴付けに基づいて診断又は予後を判定し、それによって、該対象における癌の予後を診断する又は提供することとを含む。

10

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、化学療法レジメンに対する対象の応答性を判定するための方法を提供する。この方法は、本発明のウェルを、対象由来の細胞集団を含むサンプルと接触させることと、本発明のシステムによって、該細胞集団を分析することと、その分析によって、CTCを検出することと、該CTCの特徴付けを行って、化学療法薬の投与の有効性を判定し、それによって、治療レジメンに対する対象の応答性を判定することとを含む。

20

【0020】

さらに別の実施態様では、本発明は、キットを提供する。このキットは、本発明の少なくとも1つのウェル、細胞におけるサイトケラチン又はCD45の存在を免疫学的に判定するための試薬、及びサンプル中のCTCを検出するためのキットを利用するための説明書を含む。

【0021】

本明細書に記載する装置、システム、及び方法によって、アッセイの信頼性及び確実性に対処する、制御された前向きプロトコルにおけるHD-CTCアッセイの第1の使用が提示され、Cellsearch(登録商標)アッセイとの分割サンプル比較における感度が比較され、転移性の乳癌、前立腺癌、及び膵臓癌を有する患者、並びに正常な対照におけるHD-CTC及びHD-CTCクラスターの出現率が確認される。重要なことに、「HD-CTC」の決定は、好ましくは、細胞(1又は複数)が、完全な核を有する、サイトケラチンを発現するがCD45を発現しない、周囲の良性白血球(WBC)とは形態的に異なる、及びその後の分析に適した完全な形態的に異常な上皮細胞と一致する細胞学的特徴を有するという、1以上の要件を必要とする。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】従来技術の3ウェルプレートの平面図である。

【0023】

40

【図2】従来技術の12ウェルプレートの平面図である。

【0024】

【図3】HD CTCシステム全体の機能ブロック図である。

【0025】

【図4】該システムの走査及び画像化構成部分の構成部分水平面図である。

【0026】

【図5】測定されるパラメータに基づく細胞のフィルタリングを表す、これらのパラメータ空間を通した可能な画像切片を示す。

【0027】

【図6】代表的なスライド及びウェルの平面図である。

50

【 0 0 2 8 】

【 図 7 】 代表的なスライド及びウェルの斜視図である。

【 0 0 2 9 】

【 図 8 】 期待されるSKBR3に対してプロットされた、観察される平均SKBR3を示す。

【 0 0 3 0 】

【 図 9 】 9つの異なる癌患者サンプルに対する、2つの別の処理装置間のCTC数の比較を示す。CTC数/mLは、0から203の範囲であった。

【 0 0 3 1 】

【 図 1 0 】 本明細書に記載するシステム、装置、及び方法と、CellSearch(登録商標)製品との比較試験データを示す。

10

【 0 0 3 2 】

【 図 1 1 】 前立腺、脾臓、乳房腫瘍の様々なサンプルについての、CTCの量をグラフ化した試験結果、及び健康な集団との比較を示す。

【 0 0 3 3 】

【 図 1 2 】 乳癌に関連する様々な患者サンプルについてのCTCの量を示す。

【 0 0 3 4 】

【 図 1 3 】 白血球(WBC)及びCTCの核面積に対する正規化した核面積(基準線領域の拡大表示を含む)を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 5 】

20

(詳細な説明)

本発明の組成物及び方法を記載する前に、本発明が、記載した特定の組成物、方法、及び実験条件に限定されないことを理解されたい。こうした組成物、方法、及び条件は、変わり得るからである。本明細書で使用される用語法が、特定の実施態様を説明することのみを目的としており、限定的な意図はないことも理解されたい。何故なら、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲内でのみ限定されることとなるからである。

【 0 0 3 6 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、文脈によってそうではないと明らかに決定付けられない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」には、複数の指示物が含まれる。したがって、例えば、「方法(単数形)」に対する指示物には、当業者が本開示等を読むと明らかとなるであろう、本明細書に記載する種類の1以上の方法及び/又はステップが含まれる。

30

【 0 0 3 7 】

別段の定義のない限り、本明細書で使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する分野の技術者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するのと類似の又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の実施又は試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料を、今から記載する。

【 0 0 3 8 】

一般に、「循環腫瘍細胞(単数形)」に対する指示物は、単一の細胞を指すことが意図されるのに対し、「循環腫瘍細胞(複数形)」又は「循環腫瘍細胞(複数形)のクラスター」に対する指示物は、2以上の細胞を指すことが意図される。しかし、当分野の技術者は、「循環腫瘍細胞」に対する指示物には、1以上の循環腫瘍細胞を含めた循環腫瘍細胞の集団が含まれることが意図されることを理解するであろう。

40

【 0 0 3 9 】

用語「循環腫瘍細胞」(CTC)又はCTC「クラスター」は、対象のサンプル中に検出される、あらゆる癌細胞又は癌細胞のクラスターを意味することが意図される。一般的に、CTCは、固形腫瘍から剥離したものである。したがって、CTCは、進行癌を有する患者の血液循環内に非常に低い濃度で検出される、固形腫瘍から脱落した上皮細胞であることが多い。CTCはまた、肉腫、又は黒色腫からのメラノサイト由来の、中皮性である可能性もある。CTCはまた、原発性、二次性、又は三次性腫瘍に由来する細胞である可能性もある。CTC

50

はまた、循環性の癌幹細胞である可能性もある。用語「循環腫瘍細胞」(CTC)又はCTC「クラスター」には、癌細胞が含まれるが、これには、血液循環内には通常は検出されない非腫瘍細胞、例えば、循環性の上皮又は内皮細胞も含まれることが意図される。したがって、腫瘍細胞及び非腫瘍上皮細胞は、CTCの定義に包含される。

【0040】

用語「癌」には、本明細書で使用される場合、限定はされないが、異形成、過形成、固形腫瘍、及び造血器癌を含めた、当技術分野で周知の様々な癌型が含まれる。多くの型の癌は、転移する、及び循環腫瘍細胞を脱落させる、又は転移性である、例えば、二次性の癌が転移した原発性の癌に起因することが知られている。さらなる癌としては、限定はされないが、以下の器官又は系を含めることができる：脳、心臓系、肺、消化器系、泌尿生殖路、肝臓、骨、神経系、婦人科系、血液系、皮膚、乳房、及び副腎。さらなる型の癌細胞としては、神経膠腫(シュワン細胞腫、神経膠芽腫、星状細胞腫)、神経芽細胞腫、褐色細胞腫、傍神経節腫、髄膜腫、副腎皮質癌腫、髄芽腫、横紋筋肉腫、腎臓癌、様々な型の血管性の癌、骨芽球性骨肉腫、前立腺癌、卵巣癌、子宮筋腫、唾液腺癌、脈絡叢癌、乳癌、膵臓癌、大腸癌、及び巨核芽球性白血病；並びに皮膚癌(悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮癌、カポジ肉腫、異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、蟹足腫、線維肉腫又は血管肉腫などの肉腫、及び黒色腫を含めて)が含まれる。

【0041】

本明細書に記載する装置及び方法を使用して、任意の適切なサンプル型から、CTCを検出及び特徴付けすることができる。本明細書で使用される場合、用語「サンプル」とは、本発明によって提供される方法に適したあらゆるサンプルをいう。サンプルは、検出に適した希少細胞を含む、任意のサンプルであり得る。サンプルの起源としては、全血、骨髓、胸膜液、腹膜液、脳脊髄液、尿、唾液、及び気管支洗浄液が挙げられる。一態様では、サンプルは、例えば、全血、又はその任意の分画若しくは構成成分を含めた、血液サンプルである。本発明と共に使用するのに適した血液サンプルは、血液細胞又はその構成成分(静脈血、動脈血、末梢血、組織、血管など)を含むことが知られている任意の起源からの抽出物であり得る。例えば、サンプルは、周知かつ慣例的な臨床的方法(例えば、全血を採取及び処理する手順)を使用して、獲得及び処理することができる。一実施態様では、例示的なサンプルは、癌を有する対象から採取された末梢血であり得る。

【0042】

図3は、システム全体の機能ブロック図である。1以上のスライド20が、分析のために調製される。サンプルの採取、調製、及び処理の説明については、以下の詳細な説明を参照されたい。スキャナー22は、1以上のスライド20を画像化する。スキャナー22は、4色スキャナーなどのマルチチャネルスキャナーであることが好ましい。スキャナー22からのデータは、画像記憶部24に送られる。画像記憶部24は、当分野の技術者に公知である通りの記憶装置、好ましくはRAIDシステムなどの大容量記憶装置から構成され得る。画像記憶部からの走査データは、検討のために、例えば専門家などによる専門的検討のために、技術分析モジュール26、技術分析報告モジュール32、及び又は出力部34のうちの1つ以上に提供される。技術分析モジュール26は、少なくとも、画像記憶部24からのデータを以下に詳細に記載する様式で分析する働きをする。この分析には、限定はされないが、細胞を核の面積又はサイズについて(例えば青色DAPIの強度について分析することによって)分析すること、CD-45の非存在について(例えばCD-45抗体と結合させた二次抗体の強度について走査することによって)分析すること、及び/又は、サイトケラチンと結合させた抗体の強度について分析することが含まれ、好ましくは、該技術分析報告は、データを伴うHTMLファイル(該ファイル内には、細胞又は目的物の画像が含まれる)を含む。自動分析を、医療専門家による分析で補うことができる。

【0043】

技術分析モジュール26の出力は、メタデータ・データベース28に提供されることが好ましい。メタデータ・データベースは、様々な形態のデータ分析のすべてによってもたらされた情報を含む。リターンループ制御経路30は、その後のスライド20(1又は複数)の再画

10

20

30

40

50

像化を制御するための、スキャンデータの使用及び分析を可能にする。細胞などの目的物のさらなる分析が必要とされる場合には、このシステムは、その目的物を再画像化することができる。スライドに対する目的物の接着又は付着の程度は、少なくとも再画像化の間、スライド上の目的物の位置を維持するのに十分であるべきである。さらに長い期間では、スライドに対する目的物の接着又は付着の程度は、例えば、以下に記載する、目的物のその後のさらなる処理のための、例えば、遺伝子型同定又は他のその後の分析のための、分析によって特定された特定の目的物のその後の特定を可能にするのに十分であるべきである。スライドの保管、及び細胞の位置が固定されたままであることが所望される時間の長さは、数時間から数ヶ月の範囲であり得る。好ましくは、このシステムは、例えばデータ及び報告のための、総合記憶部40を含む。

10

【0044】

メタデータ・データベース28からの情報は、データインベントリ管理システム38に提供されることが好ましい。このシステムは、システム全体のための管理システムを含む。このシステム38は、データの中で特に、患者識別とスライドとの相関を管理する。

【0045】

図4は、走査システムの、ある可能な手段の模式図である。ステージ42、例えばx-yステージは、1以上のスライド20を支持する。本明細書に記載するウェル面積のサイズについては、4つのスライドによって、1人の患者の典型的なサイズサンプルである約1000万細胞の走査が可能になる。光学経路は、本明細書に記載する実施態様と矛盾しない任意の形をとることができる。照明構成部分は、光源46、及び任意選択の励起フィルターホイール48を含むことができる。光源は、好ましくは広範囲照明器である。ダイクロイックミラー50は、照明をスライドまで通過させ、かつ、照明がカメラ54に戻るのを可能にする働きをする。ミラー50とカメラ54との間に、任意選択の発光フィルター(emission filter)ホイール52を設置することができる。次いで、出力を、先に記載した通りに保管する。

20

【0046】

図5は、スライド20によって支持される目的物の走査のための様々な選択肢を示す。複数次元での、好ましくは3次元の枠組みでの走査及び画像化が可能である。目的物は、効率的な目的物の走査及び画像化を可能にするのに十分に平らな単層で、スライド上に配置される、好ましくは単一焦点平面内に配置されるのが好ましい。平面の又は平らなスライドによって、画像平面の偏差が最小限になるため、均一な方式での単層の画像化が可能になる。平らな表面上での画像化はまた、画像の、より容易なZ-スタッキングも可能にする。図5に示す通り、非平面関係にある可能性がある様々な方向での画像化平面が可能である。図5に示す通り、CTC候補細胞の検出は一般的に、スライド画像から測定されるいくつかのパラメータを頼りにする。例えば、次元1~3は、核面積、サイトケラチン強度、及びCD-45強度であり得る。図5における平面は、CTC候補を定義する測定されるパラメータのそれぞれについての区切り境界を表す。或いは、又はさらに、デジタルカメラが、単一焦点平面を超越して光線を捕らえ、様々な画像平面からの画像のソフトウェア構築を可能にする光センサーを含む、ライトフィールドカメラシステムを利用することができる。デジタル光センサーと関連して、マイクロレンズなどのレンズを使用することができる。

30

【0047】

図6及び7は、スライド20の様々な特徴を明らかにする。このスライドは、本明細書に記載する発明の実施態様と矛盾しない任意のサイズ又は形状のものであり得る。ある手段では、スライド20の形状は一般に、長さL、幅W、及び厚さtを伴う長方形である。代表的な寸法は、実質的に7.5cmのL、実質的に2.5cmのW、及び7mmの厚さtである。スライド20は、上部表面72、平行な底部表面74、側面後退部66、側面68、及び端面70を含むことが好ましい。例えばバーコードによって、スライド識別部60を提供することができる。こうしたスライドは、Marienfeld Laboratory Glassware社を含めた様々な供給業者から入手できる。

40

【0048】

ウェル62は、画像化されることとなる材料を含有かつ維持するように提供される。本明

50

細書に詳細に記載する形式では、ウェル62は、長方形であり、長さLと幅Wを有する。ウェル62の代表的な内部寸法は、一例としては、実質的に5.85cmのL及び実質的に2.5cmのWであり得る。ウェル62の外縁又は周長は、(特定の構造的境界であるか、他の材料による、例えば疎水性材料による境界であるかにかかわらず)境界64によって定めることができる。境界は、境界線と呼ぶことができる。境界又は境界線は、該プロセスにおいて使用される、細胞懸濁液、及び他のすべての試薬、溶液、緩衝液、又は他の液体を受け入れる及び含有するように適合される。境界又は境界線は、スライドの上部側面と共に、ウェルを形成する。これらの寸法を伴うウェル62の面積は、実質的に11.7cm²であり、ウェル62の周長は、実質的に15.7cmである。スライド20の端部からのウェル62の後退の程度は、走査システムの特徴などの、システムの他の状況に基づいて設定することができる。一実施態様は、画像化されることとなる実質的に単層の目的物、例えば細胞を提供する、好ましくは7.5cm²超、より好ましくは10cm²超、最も好ましくは実質的に11.7cm²の面積を有する単一の画像化ウェル62を提供する。このウェル62の周長は、それに対応して、実質的に12.5cm、より好ましくは実質的に14.5cm、最も好ましくは実質的に15.7cmであることが好ましい。ウェルによって被覆されるスライドの上部表面の割合は、好ましくは実質的に40%、より好ましくは53%、最も好ましくは実質的に62%である。

【0049】

好ましい画像化ウェル62は、合計4つの辺を有する。(例えば3ウェルスライドが12の辺を有する従来の技術(図1参照)と比較して)辺の数及びその周長を減らすことによって、側壁境界線に関連する端部効果が最小限になる。ウェルは、それぞれ、好ましくは160万から190万個の細胞、より好ましくは210万から260万個の細胞、最も好ましくは、250万から300万個の細胞の単層の画像化が可能であるようなサイズである。

【0050】

まとめると、以下のパラメータによって、本明細書に記載するウェルにおいて実質的に単層の細胞を画像化する場合の、システム、装置、及び方法の様々な尺度が定義される：

【表1】

面積	周長	被覆率	細胞数
11.7 cm ²	15.7 cm	62%	250万から300万
10 cm ²	14.5 cm	53%	210万から260万
7.5 cm ²	12.5 cm	40%	160万から190万

【0051】

スライドは、任意に、基準マークを備えることができる。細胞の位置が十分に固定された場合、スライドに指標を付けるために、他の構造を使用することができる。一例としては、境界を利用することができる。より具体的には、基準のために、ウェルの隅に90度の角を使用することができる。

【0052】

本明細書に記載する装置及びシステムは、最大限かつ最適な細胞密度と、最小限の端部効果を提供する。好ましい実施態様では、少なくとも150万個の細胞、任意にさらに多くの、例えば300万個の細胞を保持するために、単一の細胞ウェルが利用される。好ましい実施態様では、4つの側壁が、その細胞集団を含有する働きをする。それに対して、単一領域スライドではなく3領域スライドの使用では、2から3倍の数のスライドの使用、かつ、たった4つの端部ではなく各スライド上の12(3×4)の端部への対処が必要とされるであろう。いかなる流体分布も、端部がどんなに疎水性であろうと、端部効果を受ける。細胞分布によると、端部での細胞密度が、有意に低下していることが示される。標準のサイズの顕微鏡スライドを使用することができる限りは、これは、それほど制限されない。本明細書に記載する実施態様の目的と一致する、より大きいスライドガラスを利用することが

できる。しかし、通常のサイズのスライド（これらのスライドについては、例えばほんの数例を挙げると、自動制御装置、既存の顕微鏡システム、及び記憶システムなどの、大規模ベースのインストール済みの機械が存在する）を使用することによって、標準のサイズのままでいることによるプロセス利益がもたらされる。

【0053】

該システムは、1スライドにつき単一のカバースライドをさらに含むことが好ましい。該システムは、十分な質をもたらしながら、速度を最適化する働きをする。平らでない表面、細胞の重なり、流体の厚さの変化、及び又は各スライドに対する複数のカバースライドの使用を好ましくは避けることによって、画像化準備及びデータ収集の速度と質の両方が増大する。単一かつ非常に平らな均質な単層が好ましい。単一のカバースライドを使用するさらなる利点は、画像化のために均一な表面が提供されることである。標準の3ウェルスライドにおいて必要となるであろう3つのカバーガラスではなく単一のカバーガラスを使用することで、はるかに平らな封入媒体分布が提供される。

10

【0054】

実施態様では、本明細書に記載する通りに処理されるサンプルは、約1、2、5、7、10、15、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、さらには1000を超える希少細胞又はCTCを含む。

【0055】

本発明に記載した方法は、全体を通して論じた通り、CTCを検出する際に有用であるが、本発明はまた、CTCの特徴付けにおいても有用である。具体的には、検出可能なマーカーと、細胞の画像化及び分析を実施するための計算方法との様々な組み合わせの使用によって、癌の予後を評価する際に、また、疾患再発を引き起こす可能性がある治療不成功の早期検出のための治療有効性をモニタリングする際に有用な、有意義な特徴付けが可能になる。さらに、本発明によるCTC分析は、一連の治療法が完了している、発症前の患者における早期再発の検出を可能にする。これが可能であるのは、CTCの存在が、腫瘍の進行及び広がり、治療法に対する応答不良、疾患の再発、及び/又は長期にわたる生存率の低下と関連している及び/又は相関性があるからである。したがって、CTCの計数及び特徴付けは、治療法に対する応答に基づく初期リスク及び続発リスクを予測する基本特性について患者を階層化するための方法を提供する。

20

【0056】

用語「対象」とは、本明細書で使用される場合、主題の方法が実施される、あらゆる個人又は患者をいう。一般に、対象はヒトであるが、当分野の技術者には分かるように、対象は、動物である可能性もある。したがって、哺乳類、例えばげっ歯類(マウス、ラット、ハムスター、及びモルモットを含めて)、ネコ、イヌ、ウサギ、家畜(ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどを含めて)、及び霊長類(サル、チンパンジー、オランウータン、及びゴリラを含めて)などを含めた他の動物も、対象の定義内に含まれる。

30

【0057】

したがって、別の実施態様では、本発明は、対象における癌を診断又は予測するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載する通りにCTCを検出することを含む。次いで、CTCを分析して、該対象における癌を診断又は予測することができる。したがって、本発明の方法を使用して、例えば、癌患者及び癌のリスクがある患者を評価することができる。本明細書に記載する診断又は予測の方法のいずれかにおいては、診断又は予測をもたらすために、癌の1以上の指標(癌細胞など)の、又は他の任意の障害の指標の存在又は非存在を使用することができる。

40

【0058】

一態様では、血液サンプルは、患者から採取され、本明細書に記載する通りにCTCを検出するために処理される。本発明の方法を使用して、血液サンプル中のCTCの数が求められ、検出可能なマーカー及び細胞の画像化から集められた他のデータの分析によって、そのCTCが特徴付けられる。例えば、分析を実施して、サンプル中のCTCの数及び特徴付けを決定することができ、この測定から、最初の血液サンプル中に存在するCTCの数を求める

50

ことができる。

【0059】

種々の態様では、対象のCTCの数及び特徴付けの分析を、特定の時間経過にわたって、様々な間隔で行って、対象の進行及び病状を評価することができる。例えば、分析は、時間の関数としての循環上皮細胞のレベル及び特徴付けを追跡するために、1日、2日、3日、1週、2週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、又は1年などの一定の間隔で実施することができる。癌が存在する患者の場合、これによって、疾患の進行の有用な指標が提供され、医師が、患者の血流中のCTCの存在などの循環上皮細胞の増大、低下、又は無変化に基づいて適切な治療選択を行う手助けとなる。時間に伴うCTCの数の、例えば2倍、5倍、10倍、又はそれ以上といった、いかなる増大であっても、患者の予後を低下させ、また、これは、患者が治療法を変えるべきであるという早期指標である。同様に、例えば2倍、5倍、10倍、又はそれ以上といった、いかなる増大も、患者が、予後及び治療法に対する応答をさらに評価するための、画像化などのさらなる試験を受けるべきであることを示す。時間に伴うCTCの数の、例えば2倍、5倍、10倍、又はそれ以上といった、いかなる低下も、疾患安定化、及び治療法に対する患者の応答を示し、また、これは、治療法を変更しないという指標である。癌のリスクがある患者については、検出されるCTCの数の突然の増加は、患者が腫瘍を発症しているという早期の警告を提供する、したがって、早期診断を提供することができる。一実施態様では、顕示されたCTCの検出は、癌の病期分類を向上させる。

10

【0060】

本明細書に提供される方法のうちのいずれかでは、追加的臨床評価を提供するために、追加的分析を実施して、CTCの特徴付けを行うこともできる。例えば、画像分析に加えて、遺伝子チップ分析、及び特定の癌マーカーに特異的なプライマーを用いる多重化などの、遺伝子発現分析及びPCR技術を用いて、CTCが由来する腫瘍の型、転移状態、及び悪性の程度などの情報を得ることができる。さらに、患者の癌の特徴付けに関する追加的情報を評価する手段として、細胞サイズ、DNA又はRNA分析、プロテオーム解析、又はメタボローム解析を実施することができる。種々の態様では、分析には、以下のマーカーのうちの1つ以上に誘導される抗体、又は、以下のマーカーのうちの1つ以上に特異的なプライマーを使用するPCR多重化が含まれる:EGFR、HER2、ERCC1、CXCR4、EpCAM、E-カドヘリン、ムチン-1、サイトケラチン、PSA、PSMA、RRM1、アンドロゲン受容体、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、IGF1、cMET、EML4、又は白血球関連受容体(LAR)。

20

30

【0061】

例えば、追加的分析は、特定の治療レジメンに対する対象の応答性の判定を行うのに十分な、又は、癌の治療における候補薬剤の有効性を判定するのに十分なデータを提供することができる。したがって、本発明は、本明細書に記載する通りに対象のCTCを検出し、検出されたCTCを分析することによって、特定の治療レジメンに対する対象の応答性を判定する、又は、癌の治療における候補薬剤の有効性を判定する方法を提供する。例えば、薬物治療が患者に施された場合、本発明の方法を使用して、その薬物治療の有効性を判定することが可能である。例えば、薬物治療前の患者から採取されたサンプルと、薬物治療と同時に又は薬物治療後の患者から採取された1以上の細胞サンプルを、本発明の方法を使用して処理することができる。処理されたそれぞれのサンプルの分析の結果を比較することによって、薬物治療の有効性又は薬剤に対する患者の応答性を判定することができる。このようにして、不成功の化合物の早期特定を行うことができる、又は、有望な化合物の早期確認を行うことができる。

40

【0062】

候補化合物の臨床活性を見抜く4つの重要な指標として、HER2、EGFR、CXCR4、及びEphB4 RTKが挙げられる。HER2は、mRNA安定性、及びHER2転写物の細胞内局在を判定することによる、細胞の悪性度の指標を提供する。獲得変異に対するEGFRの抵抗性、及び/又は獲得された変異は、候補化合物、それに加えて、候補化合物と組み合わせて使用することができる可能な代替化合物の活性の重要な指標を提供する。白金を用いて誘発されるDNA修

50

復妨害のレベルの評価は、CXCR4マーカーの状態及び転移状態に関する洞察を提供する。さらに、EphB4受容体チロシンキナーゼの状態の評価は、細胞の転移の潜在的可能性に関する洞察を提供する。したがって、本発明の方法を使用して、こうした候補薬物を摂取する患者を、血液の高頻度のサンプルを採取し、各サンプル中の循環上皮細胞、例えばCTCの数を時間の関数として求めることによってモニタリングすることができる。Her2、EGFR、CXCR4、及びEphB4 RTK指標のさらなる分析は、癌の病状及び候補薬物の有効性に関する情報を提供する。同様に、ERRC1、サイトケラチン、PSA、PSMA、RRM1、アンドロゲン受容体、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、IGF1、cMET、EML4などは、候補化合物の臨床活性への洞察を提供する。臨床活性のこれらの指標の分析は、本明細書に論じる通りの検出可能なマーカーの分析(例えば、免疫組織化学及び蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH))、又は配列決定、遺伝子型同定、遺伝子発現、又は他の分子分析技術などの技術によるさらなる分析を介するものであり得る。

10

【0063】

CTCの分析は、特定の臨床試験のための候補対象を決定する方法を提供する。例えば、臨床試験の特定の治療レジメンが、潜在的に成功する可能性があるかどうかを決定するために、ある候補の検出されたCTCを分析して、特定のマーカーが存在するかどうかを決定することができる。したがって、別の実施態様では、本発明は、臨床試験のための候補対象を決定するための方法を提供する。この方法は、本明細書に記載する通りに対象のCTCを検出することを含む。次いで、CTCを分析して、その候補対象が特定の臨床試験に適しているかどうかを決定することができる。

20

【0064】

臨床試験中のCTCの分析は、患者が実験的薬物に応答するか応答しないかに関する情報を提供することとなる。ここでは、顕示されたCTCの実質的な変化又は低下がないことは、応答を示し、顕示されたCTCの増大は、応答不良を示す。増大又は低下は、2倍、10倍、又はそれ以上であり得る。この情報は、薬物の有効性の早期指標であり、研究者によって、臨床試験における副次的評価項目として使用され得る。

【0065】

以下の実施例は、例示を目的とするものであり、本発明を限定しない。

【実施例】

【0066】

(実施例1)

(CTCの検出及び特徴付け)

(実験結果)

【0067】

(CTCからHD-CTC:定義の精緻化)

【0068】

該システムは、分析において利用されることとなる細胞に関する1以上の尺度を定義することが好ましい。同じ患者における固形の同じ腫瘍由来の細胞との直接的比較を用いる、上皮癌を有する患者における多くの候補事象の調査に基づいて、様々な手法によって、完全なCTCが定義される[9~12]。これらの定義に基づいて、かつ基準を精緻化するためにHD-CTCアッセイを利用して、HD-CTCの定義が確立された。この定義が発展して、HD-CTCが、患者の体内の癌腫の固体析出物に由来する完全な細胞である可能性が最も高い細胞であることが確実にってきた。こうした要件を部分的に満たすが、以下に論じる厳密な包含基準には達しない、すべての他の集団が、この分析において追跡される。何故なら、これらのうちの多くは、生物学的意義を有する可能性がある断片化された又はアポトーシス性の腫瘍細胞に相当する可能性があるが[13]、これらは、さらなるその後の方法論による評価への適合性が予測不可能であるという理由で、HD-CTC計数において排除されるからである。本出願の目的のために、これらのうちの一部又はすべてを満たす、様々な基準を使用することができる。

40

【0069】

50

乳癌、直腸結腸癌、及び肺癌患者の症例研究において、CTCを、形態的に特徴付ける、また、その原発腫瘍に関して信用を与えることができる。高分化型の肺腺癌を有する患者におけるCTCの形態的検査を通して、循環細胞を、例えば細胞質に対する核の比が比較的低い細胞を含めたこの型の腫瘍と一致する形態的特徴と同一であるとした。血液循環中で特定される腫瘍細胞の形態は、その患者の原発腫瘍の微細針吸引生検において見られる形態と類似していた[9]。より大きなコホートの乳癌及び直腸結腸癌患者において評価されると、CTCは、原発性及び転移性腫瘍において通常見られる細胞の形態的不均一性と一致する、細胞学的外観における高度の患者間及び患者内不均一性を示した[10、11]。

【0070】

このプラットフォームは、目的物のサイズ及び蛍光強度に関する補助的な半定量的データを用いる細胞ごとのアノテーションを用いて増強される、蛍光画像と個々のチャネル画像との同時的な細胞形態レビューを可能にする。HD-CTCは、DAPI画像化によって非アポトーシス性に見える完全な核を伴う、a)サイトケラチン陽性である細胞;b)CD45陰性である細胞に分類される。CKについての陽性は、蛍光シグナルが、周囲の細胞のシグナルを有意に上回ることと定義される。陰性は、周囲の細胞のシグナルと同じレベル又はそれ未満であることと定義される。CD45についての陰性は、全細胞のうちの99%が包括的に検出可能である境界状態に達しない、目視検出未満の強度を有することと定義される。癌患者に見られる代表的なHD-CTCの集合は示さないが、HD-CTCは、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、かつDAPI核を含有し、かつ周囲の白血球と形態的に異なる。

【0071】

核がアポトーシス性であるように見えない限りは、サイトケラチンチャネルにおいて可視化される細胞質小胞形成などの、細胞質の穏やかなアポトーシス性変化は許容される。これらの半定量的特性に加えて、HD-CTCは、正常なWBCと形態的に異ならなければならない、かつ、標準の診断的細胞病理学において使用される基準(主にサイズの拡大として具体化されるが、核及び細胞質の構造的組成、細胞質形状、及び核形状などの細胞形態的特徴も包含する)による悪性細胞と適合する形態を有しなければならない。平均WBC核サイズの1.3倍という、より低い核サイズの切り捨て値を設定することができる。最新の合意は確立されておらず、生物学的事実も今のところ未知であるので、いささか自由裁量ではあるが、この境界は、サイトケラチンでの誤った非特異的染色(すなわちCD45陽性かつサイトケラチン陽性)を示す、健康なドナーにおいてWBCとして特定された細胞の最も大きい核サイズの評価に基づいて設定される。癌診断の臨床範囲では、慣例的に固定及び染色されたヒト組織においては、実質的にすべての生存可能な上皮細胞は、実質的にすべての白血球よりも大きいので、この手法は、保守的な仮定であると感じられる。この範囲の対極では、HD-CTCの通常形態的特徴は、周囲のWBC核の平均サイズの5倍までの、より大きい核である。通常観察される他の特徴としては、周囲のWBC核のものとは異なる核輪郭(例えば伸長)、核に対して偏心的な分布の細胞質を伴う大きな細胞質ドメイン、多辺形の又は引き伸ばされたような細胞質形状、並びに高頻度のダブレット及び3個以上のHD-CTCのクラスターが挙げられる。

【0072】

表1: 転移性の前立腺癌、乳癌、及び膵臓癌患者、並びに正常な対照から得られた1mLの血液あたりにHD-CTCを有する患者の割合。

【表2】

	N	≥2	≥5	≥10	≥50
前立腺	20	90%	80%	65%	40%
乳房	30	80%	70%	60%	27%
膵臓	18	61%	44%	44%	11%
正常	15	7%	0%	0%	0%

【0073】

(転移性癌を有する患者におけるHD-CTCの出現率)

【 0 0 7 4 】

30人の転移性乳癌患者、20人の転移性前立腺癌患者、18人の転移性膵臓癌患者、及び15人の正常な対照のコホートにおいて、HD-CTCを計数した。調査した3つの型の癌におけるHD-CTCの出現率を、表1に示す。この手法を使用すると、5 HD-CTC/mLは、前立腺癌患者の80%に(平均=92.2)、乳癌患者の70%に(平均=56.8)、膵臓癌患者の50%に(平均=15.8)、正常な対照の0%に(平均=0.6)見られた。

【 0 0 7 5 】

図8は、期待されるSKBR3に対してプロットされた、観察された平均SKBR3を示す。正常な対照の血液の4つの一定分量に、様々な数のSKBR2細胞を添加して、スライドあたり約10、30、100、及び300個の癌細胞を含む、4つのスライドをもたらした。各4つ組の平均を、標準偏差を表すエラーバーと共に示す。

10

【 0 0 7 6 】

(添加実験を使用する、アッセイの線形性及び感度)

【 0 0 7 7 】

アッセイの線形性及び感度を試験するために、様々な数の乳癌細胞株SKBR3を、正常な対照血液に添加し(4つ組)、HD-CTCアッセイに従って処理した。図8に示す通り、観察された平均SKBR3を、期待されるSKBR3に対してプロットし、0.9997という相関係数(R^2)が示される。

【 0 0 7 8 】

(癌腫を有する患者におけるHD-CTC数のアッセイ確実性)

20

【 0 0 7 9 】

HD-CTCアッセイのアッセイ確実性を、複数の処理装置及び分割サンプルに対して試験した。2つの別の処理装置によって、9個の異なる患者サンプルに対して、2連の試験を実施した。図9は、0.979という相関係数(R^2)と共に、この比較についての $Y=1.163x-4.3325$ という回帰方程式を与える、分割サンプルを使用する2つの処理装置間のHD-CTC数/mLの比較を示す。すべてのデータは、実験内容を知らされていない1人の操作者によって解析された。線の傾きは、1を超えており、これは、2つの処理装置間のわずかな系統的線形変動を示唆している。

【 0 0 8 0 】

図9は、9個の異なる癌患者サンプルに対する、2つの別の処理装置間のCTC数の比較である。CTC数/mLは、0から203の範囲であった。

30

【 0 0 8 1 】

(正常な対照由来のサンプルにおけるアッセイ特異性)

【 0 0 8 2 】

組織の健康なドナープールからの15人の健康なドナーを、年齢が24歳から62歳の範囲である8人の女性と7人の男性で構成される対照集団として評価した。健康な対照1人を除くすべての人において、こうした事象の数は、体積について補正すると、1 HD-CTC/ml以下であった。除外者は、4/mlというHD-CTC数を有する健康な女性ドナーであった。彼女の細胞のそれぞれに、系統立てられた再検査を行うと、そのうちの約3分の1は、すべての包含基準を容易に満たしたのに対し、残りの3分の2は、すべての基準を満たしたが、1以上の基準による包含については、下限の近くであった。4人の他の健康なドナーは、それぞれ1 HD-CTC/mlを有し、ゼロではない部類に分類された。これらの細胞の明示された再検査によって、約3分の1はすべての包含基準を確実に満たしたのに対し、残りの3分の2の細胞はすべての基準を満たしたが、1以上の基準による包含については下限の近くであったという点で、類似のパターンが示された。後者の型の事象の例としては、周囲のWBCよりも30%大きい、形態的評価によれば有意に大きくは見えない細胞や、わずかに焦点がずれており、目によって検出できないアポトーシス性の核変化を有する可能性がある細胞や、最後に、切り捨て値を超える客観的なサイトケラチン強度測定値を有するが、主観的には、単一チャンネル蛍光検査によれば周囲のWBCよりも有意に明るくは見えない偶発的な細胞が挙げられる。

40

50

【 0 0 8 3 】

(HD-CTCアッセイとCellSearch(登録商標)との比較)

【 0 0 8 4 】

合計15人の患者(5人の転移性乳癌及び10人の転移性前立腺癌)を、CellSearch(登録商標)とHD-CTCアッセイとの両方を用いて、CTCについて評価した。各患者から、2本のチューブの血液を採取した。一方のチューブの7.5mLの血液は、CellSaveチューブ(Veridex社、ニュージャージー州Raritan)内に採取し、CellSearch(登録商標)アッセイを使用するCTCの計数のためにQuest Diagnostics(カリフォルニア州San Juan Capistrano)に送った。第2のチューブの血液は、各患者から採取し、サンプルがQuest Diagnosticsで処理されるタイミングを模倣するために血液採取の24時間後に、標準のHD-CTCプロセスと一致するHD-CTCプロトコルに従って処理した。表2は、この対照比較の結果を示す。CellSearch(登録商標)アッセイは、試験された5/15患者において、7.5mLの血液あたり2以上のCTCを検出した。それに対して、HD-CTCアッセイは、有意に多い患者において(HD-CTCは、試験された14/15患者において特定された)、有意に多い数のCTCを検出した。

【 0 0 8 5 】

表2:5人の転移性乳癌患者と10人の転移性前立腺癌患者からのHD-CTCアッセイとCellSearch(登録商標)との比較。CellSearch(登録商標)の値は、血液1mLあたりのCTCの数に補外されている。

【表 3】

癌型	HD/CTC/mL	CellSearch/mL
乳房 #1	49.3	0.1
乳房 #2	87	0
乳房 #3	33.4	0.1
乳房 #4	199.3	0.1
乳房 #5	5	3.1
前立腺 #1	2.3	0
前立腺 #2	8.4	0.4
前立腺 #3	107.3	2.8
前立腺 #4	1.3	0
前立腺 #5	150.5	0.1
前立腺 #6	0	0
前立腺 #7	1.4	0.5
前立腺 #8	1.5	0.1
前立腺 #9	145.3	0.8
前立腺 #10	57.6	0

【 0 0 8 6 】

(HD-CTCの形態的範囲)

【 0 0 8 7 】

患者内で、及び患者を超えて、HD-CTCの形態的に不均一な集団を検出した。HD-CTCは、様々な形状、サイズ、及びサイトケラチン強度を有しており、ある場合には、大きなサイズ又は多辺形細胞質形状などの特有の細胞学的特徴は、患者のサンプル内でかなり特徴的かつ単調であった。他の場合には、単一のサンプル内のHD-CTC間に、細胞形態的多様性が存在していた。細胞サイズも様々であり;多くの患者サンプルは、隣接するWBC核の一樣に3又は4倍のサイズの核を有するHD-CTCを有していたのに対して、他の患者は、隣接するWBC核の一樣にわずかに1.3倍のサイズの核を有する細胞を有していた。ある患者は、幅広いサイズを有していた。サイトケラチンでの誤った非特異的染色(すなわちCD45陽性かつサイトケラチン陽性)を示す、WBCとして特定された細胞の最も大きい核サイズの評価に基づいて、平均WBC核の1.3倍のHD-CTC核サイズの下限基準を選択した。

【 0 0 8 8 】

このプラットフォームを使用することによって、詳細な形態的評価が可能になり、この

コホート内の癌患者の大多数(88%)において、HD-CTCダブレット、及び2 HD-CTCから30 HD-CTC超までの範囲のクラスターが特定された(データは示していない)。

【0089】

クラスターは、癌を有する大抵の患者において検出された。クラスターは、2個から30個を超えるHD-CTCの範囲であった。各HD-CTCを、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、かつDAPI核を含有し、かつ周囲の有核細胞と形態的に異なると決定した。

【0090】

(「他の」細胞型の形態)

【0091】

サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、核を含有するが、包含基準を満たさない、他の細胞様目的物は、HD-CTCとはみなされないが、アッセイによって追跡される。この手法の目的は、こうした基準を部分的にしか満たさないが、臨床的に意味がある可能性がある目的物(例えば、アポトーシス性腫瘍細胞、腫瘍細胞断片、又は上皮から間葉への移行を受けている細胞など)への接近を保持しながら、CTCの具体的な完全な表現型についての厳密な包含/除外基準を設けることである[13]。

10

【0092】

したがって、HD-CTCを追跡することに加えて、このコホートの患者において、アポトーシスを示す核を有していた細胞、外周的なサイトケラチンを有しなかった細胞、周囲のWBCと同じサイズ又は周囲のWBCよりも小さかった細胞、及びサイトケラチンが弱い又は陰性であった細胞を含めた、いくつかの異なる部類のサイトケラチン陽性細胞を目録化した(データは示していない)。最後に、多くの患者は、様々な型の高輝度のサイトケラチン陽性細胞に加えて、周囲のWBCと形態的に異なる、かつ、そのサンプル内のHD-CTCの核と似ている、かつ、CD45陰性であるが、やはりサイトケラチンが弱い又は陰性である核を有する、かなりの数の細胞を有していた(データは示していない)。

20

【0093】

いくつかの候補HD-CTCは、様々な形態的又は形態計測的包含基準を欠いているため、除外された。例えば、観察されたサイトケラチン強度が弱過ぎであった;核サイズが小さ過ぎであった;サイトケラチンが外周不十分である(核の2/3未満を囲む)と認められた;クラスターが複数の大きい細胞のものであるように見えるにもかかわらず、観察されたサイトケラチン強度が弱過ぎであった;核がアポトーシス性の崩壊変化を示した;核が小さ過ぎであり、かつ細胞質が外周不十分であった;後期アポトーシスの細胞であるように見られた;核が小さ過ぎであった(周囲のWBC核と同じサイズ);サイトケラチンが存在するが、外周的ではなかった;細胞質が外周不十分であり、かつ核が小さ過ぎであった。

30

【0094】

1人の前立腺癌患者においては、様々な型の疑似CTCも見られた。例えば、いくつかは、サイトケラチン及びCD45について陰性であったが、大きく、かつこの患者において見られる他のHD-CTCと似ている核を有していた。典型的なHD-CTC(これらの細胞は、サイトケラチン陽性、CD45陰性、DAPI核を有する)も観察された。複数の細胞、例えば4細胞のHD-CTCのクラスターも観察された。

【0095】

上皮から間葉への移行を受けている癌腫細胞の存在の可能性についての広範な現在の議論を考慮すると、これらの細胞の出現及びタンパク質発現パターンは、これらを、こうした細胞型の潜在的候補と特定する。或いは、これらの細胞は、細胞質の大部分を剥ぎ取られている、老いた腫瘍細胞である可能性がある。

40

【0096】

流体生検分析は、作用中の転移を明らかにする見込みを秘めている。この中では、捕らえにくい細胞集団が、血流を通して広がり、かつ最終的に遠隔転移をもたらす、癌のタネである。しかし、これらを調べてその発見を臨床的に適用するためには、この細胞は、大多数の癌患者において、確実に回収可能でなければならない。本明細書に記載する装置、システム、及び方法は、多数の癌患者における高解像度で高品質の細胞をもたらす、最大

50

限に包括的な、最小限に破壊的な、その上細胞学的に選択的なプラットフォームをもたらす。前立腺癌患者では稀な存在であると当初は知られていた[13]、これらの細胞のクラスターを、転移性癌を有する患者の大多数(88%)において特定するのは初めてである。

【0097】

該アッセイを使用するCTCの出現率は、多くの技術で報告されるよりもかなり高く、CTCチップによって報告されるのと同じ範囲内である[6]。さらに、CellSearch(登録商標)との直接的比較によって、このHD-CTCアッセイによって、より高い割合の患者において、有意に多いCTCが検出されることが示された。より高い感度に加えて、このアッセイはまた、細胞株と患者サンプルとの両方における確実な性能も実証する。該アッセイの再現性及び確実性は、各事象の半定量的特徴付けと共に、細胞のその後の分析にとって重要である。

10

【0098】

患者内で、及び患者を超えて、CTCの形態的に不均一な集団を検出した。CTCは、様々な形状、サイズ、及びサイトケラチン強度を有していた。ある場合には、大きなサイズ又は多边形細胞質形状などの特有の細胞学的特徴は、患者のサンプル内でかなり特徴的かつ単調であった。他の場合には、単一のサンプル内のHD-CTC間に、細胞形態的多様性が存在していた。細胞サイズも一貫性がなく様々であり、多くの患者サンプルは、隣接するWBC核の様に3又は4倍のサイズの核を有するHD-CTCを有しており、他の患者は、隣接するWBC核の様にこちらを問わず3分の1のサイズの核を有する細胞を有しており、他の患者は、患者内の高度なサイズ多様性を有していた。

20

【0099】

驚いたことに、患者のコホートは、大抵の患者において、HD-CTCのクラスターの共通の存在を示した。このコホート研究において評価された転移性癌患者の88%は、2~30 HD-CTCのサイズの範囲のクラスターを示した。こうしたクラスターの存在については、こうした大きな凝集体の循環系の通過のレオロジー、並びに、こうしたクラスターが、移動するにつれて該クラスターと共にそれ自体の微小環境基質を輸送し、それによって、最も多い又は唯一の、真に転移可能な循環腫瘍細胞であり得る、「多発小腫瘍」に相当するかどうかについての生物学的疑問を含めて、複数の疑問が生じる。このコホートの患者におけるクラスターのさらなる特徴付けを行うための、現在の調査は進行中である。

30

【0100】

HD-CTCを計数することに加えて、アポトーシスを示す核を有していた細胞、外周的なサイトケラチンを欠いていた細胞、周囲のWBCと同じサイズ又は周囲のWBCよりも小さかった細胞、及びサイトケラチンが弱い又は陰性であったCD45-陰性細胞を含めた、様々な他の部類のCTC様細胞を、独立に追跡した(データは示していない)。これらの事象の多くは、実際に、生物学的アノイクスの様々なステージ、又はこのプラットフォームにおいて利用される最小限の処理に続発する力学的破壊における循環悪性上皮細胞に相当する可能性があるが、様々な型の誤った陽性に相当する可能性があるものもある。最初の目的は、二次的な方法論によるその後の分析に適した、すべての潜在的に転移する可能性がある上皮細胞を含む可能性が非常に高い細胞集団を特定することである。断片化した、破壊された、核濃縮した、又は損傷した癌腫細胞は、標準の診断病理学における二次的な分析について信頼性が高いとはみなされないもので、これらは、この流動相生検プラットフォームにおいて「生存可能な循環腫瘍細胞を計数する」目的では除外される方がよい。これらの実施態様のシステム、装置、及び方法は、これらを探索、計数、及び追跡する。その存在が、腫瘍量を全体的に反映することによって、又は、腫瘍量及び腫瘍血管分布、並びに血管内の免疫監視機構の効率を含む、何らかの今のところよく理解されていない複雑な方程式を反映することによって、患者における腫瘍生物学と全体的に相関する可能性があることが認識されているからである。

40

【0101】

スライド上の他の場所にHD-CTCを有する患者においてしばしば見られる、興味深い非HD-CTC部類の1つは、一般的にサイズ基準によって周囲のWBCと形態的に異なる、かつ、CD45

50

陰性であるが、やはりサイトケラチンが弱い又は陰性である核を有する細胞からなる。HD-CTCアッセイの最も有意義な利点のうちの1つは、細胞の並行的な一定分量が凍結され、特定の高産生患者サンプルにおける遡及的マーカー選択が可能になることであるので、こうした細胞のさらなる特徴付けを行うための継続研究が進行中である。可能性としては、細胞質が変性した又は剥ぎ取られた上皮細胞、その生体起源に典型的なタンパク質を異常に発現している又は異常に欠いている細胞、又はもしかすると、上皮から間葉への移行などの異形成プロセスを受けている細胞が挙げられる。アッセイ及び画像化プラットフォームは現在、固定された細胞の分析に限られる；しかし、生細胞の計数及び画像化に対するこの手法の実用可能性を確立する取り組みが進行中である。

【0102】

それぞれの患者コホートのサンプルサイズが、小さすぎていかなる確固たる結論も出すことができない一方で、この手法を使用する異なる腫瘍型の間のCTCの検出頻度及び相対濃度(前立腺>乳房>膵臓)が、CellSearch(登録商標)などの他の方法を使用して観察された知見と一致することは注目に値するものである。以前の研究者は、腫瘍血管新生の生物学的又は解剖学的差異、転移の解剖学的部位、及び腫瘍細胞が門脈循環を介して除去されるかどうか、これらの違いのいくつかの原因となり得ることを示唆している[1]。

【0103】

図10は、本明細書に記載するシステム、装置、及び方法と、CellSearch(登録商標)製品との比較試験データを示す。一番左の列は、5例の乳癌腫瘍と10例の前立腺癌腫瘍を明らかにする。第2列は、mL/試験を記述する。第3列は、記載した実施態様のシステム、装置、及び方法を使用して観察されたCTCを示す。第4列は、算出されたCTC/mLを提供する。2つの一番右の列は、(第4列における1mLあたりに対して)7.5mLあたりとして報告されたCellSearch(登録商標)製品に対する比較データを提供する。

【0104】

図11は、前立腺、膵臓、乳房腫瘍の様々なサンプルについてのCTCの量、及び健康な集団との比較をグラフ化した試験結果を示す。左から右へ、前立腺癌、膵臓癌、乳癌についての、また、推定上の健康な集団についてのデータである。これらの結果は、本明細書に記載する実施態様のシステム、装置、及び方法を使用して観察されたCTCサンプルによるCTC数/mLを提供する。

【0105】

図12は、乳癌と比較した様々な患者サンプルについてのCTCの量を示す。一番左のグラフは、HER2-(非ハーセプチン上)及びHER2+(ハーセプチン)を示す。中央のグラフは、非ハーセプチン上(左)とハーセプチン上(右)との比較を示す。一番右の図は、HER2陰性(左)とHER2陽性(右)を示す。

【0106】

図13は、白血球(WBC)及びCTCの核面積に対する正規化した核面積(基準線領域の拡大表示を含む)を示す。基となるグラフにおける左軸は、0から700,000である。拡大表示は、0から400である。複数パラメータ分析の使用の利点は、図16及び17によって裏付けられる。図13に示す通り、核面積などの単一パラメータは、スライド上の候補の数を、扱いやすい量まで減らすことができない。核サイズに対する下限の使用が、ノイズの大部分(WBC)を取り除くように見えるかもしれないが、拡大表示によれば、非CTC候補の数が、実際のHD-CTCに比べてまだまだ大きいことが示される。CK強度及びCD-45強度などの、より多いパラメータの使用は、非HD CTC事象を有効に除外する働きをする。

【0107】

まとめると、HD-CTCアッセイは、(i)転移性癌を有する大抵の患者におけるかなりの数のCTCを検出する、(ii)Cellsearch(登録商標)システムよりも向上した感度を有する、(iii)その後の特徴付けのための理想的な形式でHD-CTCを提供する、(iii)長期間、凍結保管し、その後、新規のアッセイ又はマーカーが利用可能になった時に遡及的に分析することが可能なサンプルの前向き採取を可能にする。

【0108】

(実験方法)

【0109】

(患者及び血液サンプル採取)

【0110】

Scripps Clinic、University of California, San Diego、Billings Clinic、及びUniversity of California, San Franciscoで、治験審査委員会(Institutional Review Board)(IRB)認可プロトコルで、転移性癌患者からサンプルを抗凝血血液チューブに採取した。地元でない場所(UCSF、Billings Clinic)からのサンプルを、前の晩に輸送し、このサンプルを、24時間以内に受け取りかつ処理した。地元(Scripps Clinic及びUCSD)からのサンプルは、地元でない場所から来るサンプルを模倣するために、16~24時間、室温で保持した。The Scripps Research Institute(「TSRI」)Normal Blood Donor Serviceから、正常な対照からの血液検体も採取した。

10

【0111】

(HD-CTC検出のための血液サンプル処理)

【0112】

血液検体を5分間振動させ、その後、Hemocue白血球システム(HemoCue社、スウェーデン)を使用して、白血球(WBC)数を測定した。WBC数に基づいて、ある体積の血液を、赤血球溶血(塩化アンモニウム溶液)にかけた。遠心分離後、有核細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に再懸濁し、オーダーメイドのスライドガラス上に単層として付着させた。このスライドガラスは、標準の顕微鏡観察スライドと同じサイズであるが、生細胞の最大限の維持を可能にするコーティングを有する。(ある型の接着スライドは、少なくともMarienfeld Laboratory Glassware社(ドイツ)から得ることができる。)各スライドは、約300万個の有核細胞を保持することができるので、スライドあたりの蒔かれた細胞数は、患者のWBC数に依存していた。

20

【0113】

この研究のための癌患者におけるHD-CTC検出のために、4枚のスライドを試験として使用した。各患者について作製した残りのスライドは、将来的な実験のために-80℃で保管した。各患者からの4枚のスライドを解凍した。細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、冷メタノールで透過処理し、ヤギ血清を用いて非特異的結合部位をブロックした。その後、スライドを、モノクローナル抗panサイトケラチン抗体(Sigma社)及びCD45-Alexa 647(Serotec社)と共に、37℃で40分間インキュベートした。PBS洗浄後、スライドを、Alexa Fluor 555ヤギ抗マウス抗体(Invitrogen社)と共に、37℃で20分間インキュベートした。細胞を、DAPIで10分間、対比染色し、水性の封入媒体を用いて封入した。

30

【0114】

(画像化及び技術分析)

【0115】

各患者からのすべての4枚のスライドを、高速の信頼性が高い走査のために開発及び最適化されているオーダーメイドの蛍光走査顕微鏡を使用して走査した。各スライドを、10×対物レンズを使用して、3色で完全に走査し、6900を超える画像をもたらした。得られた画像を、核及び細胞質形状及びサイズだけでなくサイトケラチン強度、CD45強度を含めた多数の尺度に基づいて、見込みのある候補HD-CTCを特定する、分析アルゴリズムに送った。次いで、技術分析者が、アルゴリズムによってもたらされた見込みのある候補を調べ、色素凝集物などの明らかに細胞ではないヒットを排除する。

40

【0116】

(専門的な分析及び解析)

【0117】

見込みのあるすべての候補CTCを、病理学者がHD-CTCとしての各候補細胞を包含又は除外することが可能であるウェブベースの報告を通じた分析及び解析のために、血液病理学者に提供する。細胞は、サイトケラチン陽性、CD45陰性であり、かつ確認可能なアポトーシス性変化(小胞形成、変性した外観)又は破壊された外観のない完全なDAPI核を含有し、

50

かつ周囲の白血球と形態的に異なる(通常は形状に基づく特徴であるが、時折、純粹にサイズに基づく特徴である)場合に、HD-CTCと分類される。これらは、明らかに外周的であり、かつ、その内部に完全な核が含有される細胞質を有しなければならない。細胞質は、アポトーシス性変化(小胞形成、及び周囲の細胞質境界線での不規則な密度又は穏やかな破壊など)を示してもよいが、核との関連が問題になるほど破壊されてはならない。画像は、それぞれの蛍光チャネル表示能力を用いるデジタル画像、さらには合成画像として提供する。各細胞画像には、相対的な核サイズ、蛍光強度、及び相対的な蛍光強度に関する補助的な統計データで注釈を付ける。各HD-CTC候補を、問題とする細胞の細胞形態的特徴と、背景の白血球との状況的な比較を可能にするために、十分な周囲のWBCが存在する視野に入れる。

10

【0118】

HD-CTCアッセイは、早期の技術革新及び将来の自動化を念頭に置いて、また、これらの必要性のために、臨床環境と共に特別に開発された。すべての実験室プロセスは、最適化され、試験され、確認されている、厳しい標準の操作手順に従う。データ収集及び候補特定は、病理医の決定と、この決定のその後の追跡との両方を可能にする、特定のインターフェースを使用して自動化されている。完全自動化と、慣例的な設定に対する適合との両方についての詳細は、この早期研究骨格に起因することとなる。

【0119】

(細胞株実験)

【0120】

ドナーからの4つの一定分量(各2ml)に、様々な数のSKBR-3細胞を添加して、スライドあたり約300、100、30、及び10個の癌細胞を含む、4つのスライドをもたらしした。次いで、16枚のスライドを、HD-CTCサンプル調製プロトコルに従って、1人の操作者によって処理及び分析した。単一の機器を使用して、16枚のスライドすべてを画像化した。

20

【0121】

参考文献

【化 1】

- [1] Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. 2004 Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases Clin Cancer Res 10 6897-6904
- [2] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, et al 2004 Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer N Engl J Med 351 781-91
- [3] Miller MC, Doyle GV, and Terstappen LW 2010 Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer J Oncol. 617421 10
- [4] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, et al 2007 Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology Nature 450 1235-1239
- [5] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Lafrate AJ, Bell DW, et al 2008 Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells N Engl J Med 359 366-377
- [6] Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA, Lynch TJ 2009 The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. J Thorac Oncol 4 281-283 20
- [7] Pantel K, Alix-Panabieres C, and Riethdorf S 2009 Cancer micrometastases Nat Rev Clin Oncol 6 339-351
- [8] Alunni-Fabbroni M and Sandri NT 2010 Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization Methods 50 289-297
- [9] Marrinucci D, Bethel K, Luttgen M, Bruce RH, Nieva J, Kuhn P 2009 Circulating tumor cells from well- differentiated lung adenocarcinoma retain cytomorphic features of primary tumor type Arch Pathol Lab Med 133 1468-71
- [10] Marrinucci D, Bethel K, Lazar D, Fisher J, Huynh E, Clark P, Bruce R, Nieva J, Kuhn P 2010 Cytomorphology of Circulating Colorectal Tumor Cells: a small case series J Oncol 861341 30
- [11] Marrinucci D, Bethel K, Bruce RH, Curry DN, Hsieh B, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, et al 2007 Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells Hum Pathol 38 514-9
- [12] Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus N, et al 2006 High speed detection of circulating tumor cells Biosens Bioelectron 21 1893-1899
- [13] Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, de Bono JS, Terstappen LW 2010 All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer Ann Oncol 21 1851-1857

【 0 1 2 2 】

本明細書に引用したすべての刊行物及び特許を、あたかも、それぞれ個々の刊行物又は特許出願が、具体的かつ個々に参照によって組み込まれることが示されるかのよう、参照によって本明細書に組み込む。本開示の先述の実施態様を、明確性及び理解の目的のための実例又は実施例として、多少詳しく記載してきたが、本発明の教示に照らして、本明細書に記載する本発明の趣旨及び範囲を逸脱せずに、これにある種の変更及び改変を施すことができることは、当分野の技術者には容易に明らかであろう。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【 図 1 】

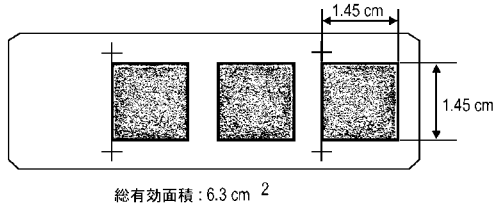


図 1
(従来技術)

【 図 2 】

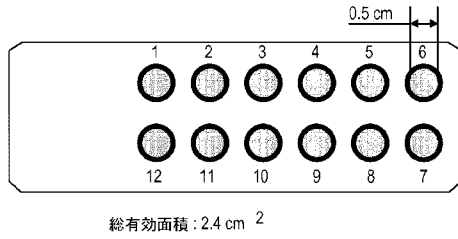


図 2
(従来技術)

【 図 4 】

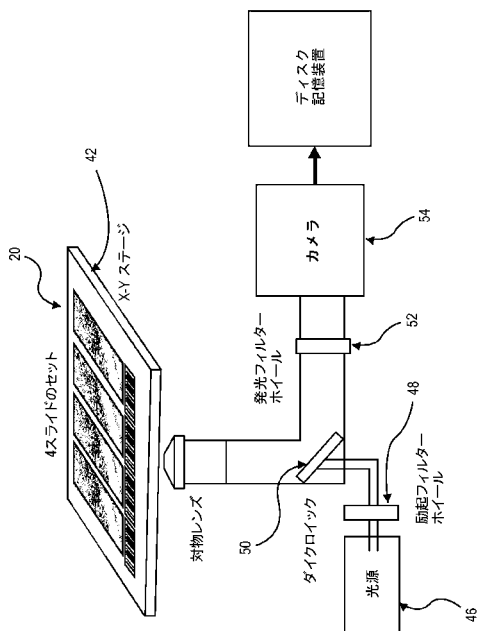


図 4

【 図 3 】

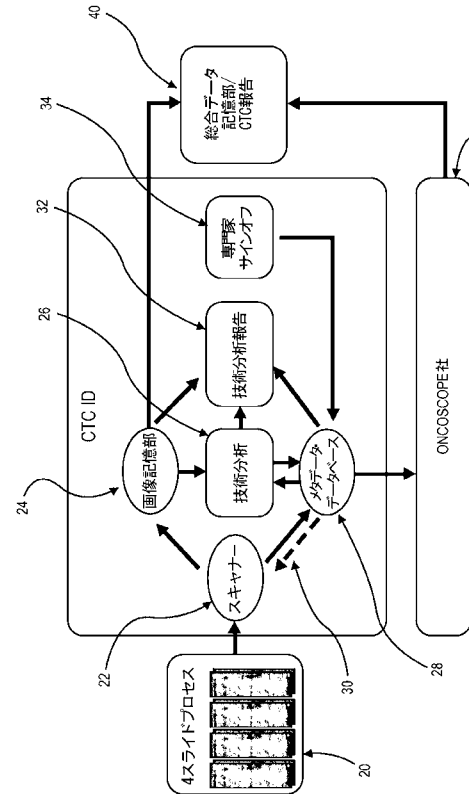


図 3

【 図 5 】

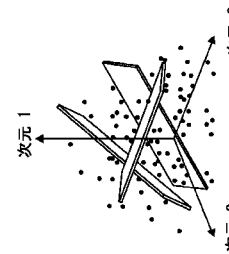


図 5

【 図 6 】

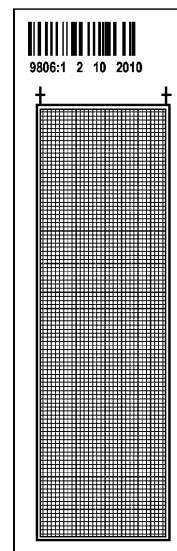


FIG. 6

【 図 7 】

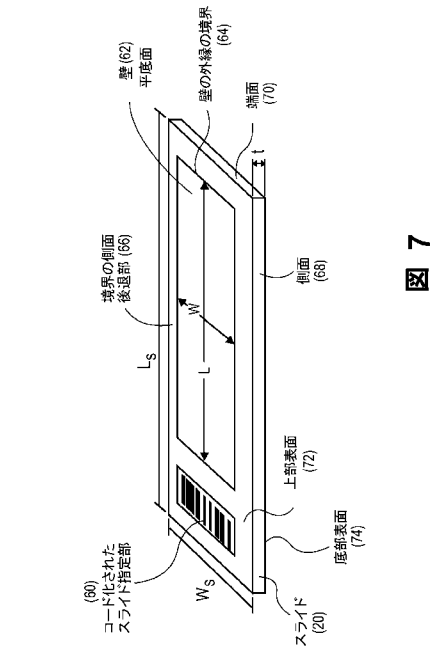


図 7

【 図 8 】

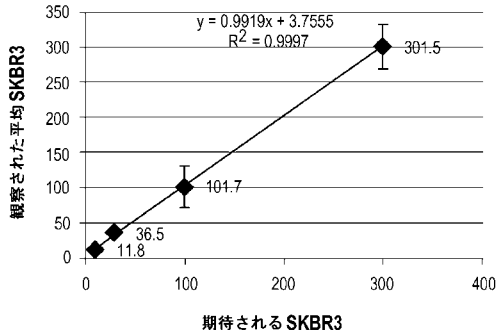


図 8

【 図 9 】

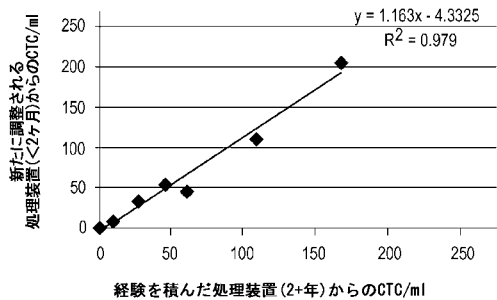


図 9

【 図 1 0 】

癌型	ml/試験	観察されたCTC	CTC /mL	CTC /7.5mL	CellSearch/7.5mL
乳癌 #1	2.53	125	49.3	370.0	1
乳癌 #2	2.66	231	87.0	652.3	0
乳癌 #3	0.96	32	33.4	250.3	1
乳癌 #4	2.96	588	199.3	1494.9	1
乳癌 #5	2.61	13	5.0	37.4	23
癌型	ml/試験	観察されたCTC	CTC /mL	CTC /7.5mL	CellSearch/7.5mL
前立腺癌 #1	3.55	8	2.3	16.9	0
前立腺癌 #2	3.92	33	8.4	63.1	3
前立腺癌 #3	1.01	108	107.3	805.0	21
前立腺癌 #4	2.99	4	1.3	10.0	0
前立腺癌 #5	2.17	326	150.5	1129.0	1
前立腺癌 #6	1.66	0	0.0	0.0	0
前立腺癌 #7	2.87	4	1.4	10.5	4
前立腺癌 #8	2.60	4	1.5	11.5	1
前立腺癌 #9	1.25	182	145.3	1089.9	6
前立腺癌 #10	0.66	38	57.6	428.9	0

図 10

【 図 1 1 】

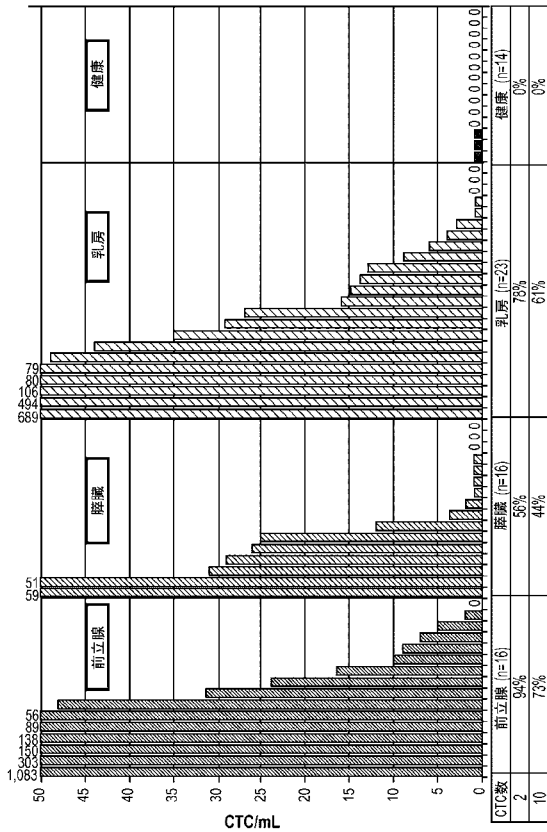


図 11

【図 12】

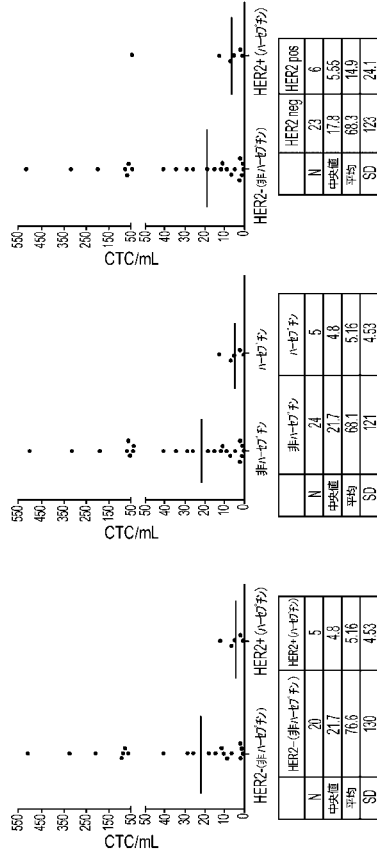


図 12

【図 13】

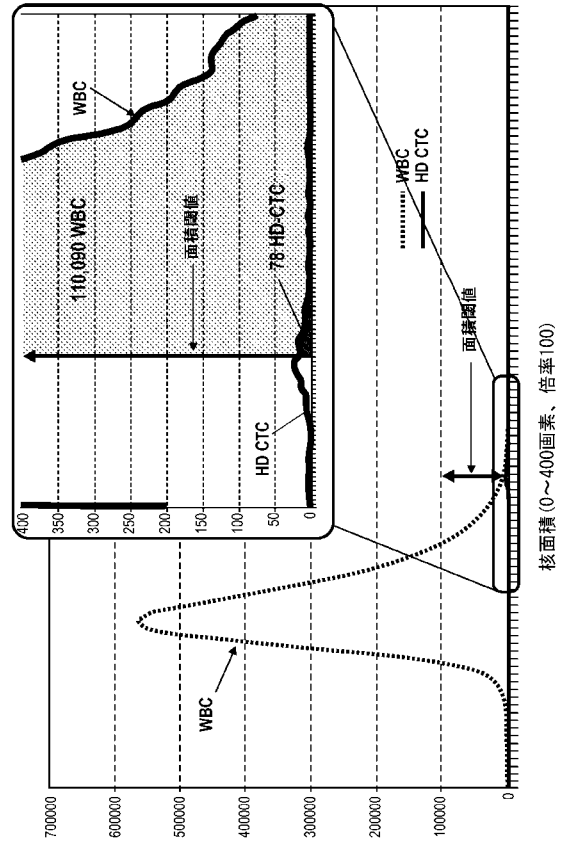


図 13

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/068586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N 33/74; G02B 21/34 (2013.01)

USPC - 435/7.23, 288.4

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)

IPC(8) - G01N 1/00, 1/28, 1/30, 33/50, 33/52, 33/53, 33/74; G02B 21/34 (2013.01)

USPC - 435/4, 7.1, 7.23, 287.9, 288.3, 288.4, 305.3, 305.4

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPC - G01N 33/53, 33/53, 33/74 (2013.01)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase, Google Patents

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0187485 A1 (JAKOBSEN et al) 12 December 2002 (12.12.2002) entire document	1-17, 20
Y		18-19, 21-28, 49-51
Y	US 2010/0184629 A1 (GIFFIN et al) 22 July 2010 (22.07.2010) entire document	18
Y	US 2003/0109059 A1 (ADRIEN et al) 12 June 2003 (12.06.2003) entire document	19
Y	US 2011/0238325 A1 (LETT et al) 29 September 2011 (29.09.2011) entire document	21-28
Y	WO 2011/093927 A1 (GARCIA-BLANCO et al) 04 August 2011 (04.08.2011) entire document	49-51

☐ 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

22 February 2013

Date of mailing of the international search report

14 MAR 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/068586

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.: 29-48
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		C 1 2 Q 1/04	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	

(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, PA, 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

(72) 発明者 ゲルド マリエンフェルド
ドイツ国 9 7 9 2 2 ラウダ - コエニグショフェン スエトゼルストル . 2 0

(72) 発明者 ピーター クーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 7 5 ソラナ ビーチ バーバラ アベニュー 7 0 8

(72) 発明者 アナンド コラトカル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 1 7 サン ディエゴ ニュー ハベン ロード 5 0 7 6

(72) 発明者 デナ マリヌッチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ カーメル ビュー ロード # 2 3 7 5 9

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA15 AA24 AA26 BA13 BB24 CA23 CA25 CB01 CB02
CB03 CB07 CB13 CB17 DA36 FA19 FB03 GB01 GB02 GC15
GC22 JA01 JA03 JA04 JA06 JA07
4B029 AA07 AA08 BB11 CC02 CC08 FA05 GA03 GB06 GB09
4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QS39
QX01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA51 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015505966A5	公开(公告)日	2016-03-31
申请号	JP2014546147	申请日	2012-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究学院 格尔德玛利亚广场宋飞		
申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究所 格尔德玛利亚广场宋飞		
[标]发明人	ゲルドマリエンフェルド ピータークーン アナンドコラトカル デナマリヌッチ		
发明人	ゲルド マリエンフェルド ピーター クーン アナンド コラトカル デナ マリヌッチ		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/48 C12M1/34 C12Q1/04 C07K16/28		
CPC分类号	G01N33/57492 B01L3/508 B01L3/5088 B01L2300/0822 B01L2300/161 G01N33/4833 G01N33/5011 G02B21/34 G02B21/365		
FI分类号	G01N33/552 G01N33/53.D G01N33/574.D G01N33/48.P C12M1/34.B C12Q1/04 C07K16/28		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA15 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA23 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB13 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA19 2G045/FB03 2G045/GB01 2G045/GB02 2G045/GC15 2G045/GC22 2G045/JA01 2G045/JA03 2G045/JA04 2G045/JA06 2G045/JA07 4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA05 4B029/GA03 4B029/GB06 4B029/GB09 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA71		
代理人(译)	石川彻		
优先权	61/568793 2011-12-09 US		
其他公开文献	JP2015505966A		

摘要(译)

提供了用于鉴定各种物体，特别是循环肿瘤细胞的装置，系统和方法。在一个方面，该系统包括但不限于扫描系统，图像存储系统和分析系统。分析系统优选基于各种标准来标识期望对象，例如完整细胞，所述标准可以包括细胞核区域或体积，CD-45阴性状态和细胞角蛋白阳性状态。优选地包括用于在成像步骤期间容纳细胞的载玻片，所述孔包括平坦的底部表面，在所述孔的周边处的边界限定所述井的侧面，所述边界与所述井的底部表面相邻并且提供流体在那里密封。本文的发明提供了单个成像井，其基本上提供单层物体，例如细胞。

