

(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2015-524054

(P2015-524054A)

(43) 公表日 平成27年8月20日(2015.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 Z NAM	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/48 S	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	GO 1 N 33/53 M	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-513193 (P2015-513193)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月23日 (2013. 5. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/060671
 (87) 国際公開番号 W02013/174948
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 61/651, 437
 (32) 優先日 平成24年5月24日 (2012. 5. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514298335
 ラールスル
 フランス国, エフー75280 パリ セ
 デ 06, リュ ドゥ セーブル, 101
 (71) 出願人 505138886
 アシスタンス パブリケーオピトー ドゥ
 パリ
 フランス国, エフー75001 パリ, ア
 ブニュー ビクトリア 3
 (71) 出願人 595166088
 アンスティテュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メ
 ディカル
 フランス国, エフー75013 パリ, リ
 ユ ドゥ トルビアク 101
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 濾過を通して生物学的サンプルから抽出された又は単離された希少細胞の多重分析のための方法

(57) 【要約】

希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞のフィルターを通して通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的性質を有するフィルターを通して、処理されるか、又は希釈され得る生物学的サンプルを濾過することを含んで成る、生物学的サンプルから希少細胞を単離又は抽出する方法に関する。この方法はまた、生物学的サンプル中の希少細胞の存在を診断同定し、そして診断目的、例えば疾患早期診断、すなわち癌の早期診断のために、それらの診断同定及び分子特性決定を用い、そして治療を選択し、誘導し、モニターし、そして特に標的治療を選択し、そしてそれらに対する応答及び/又は耐性をモニターするために、濾過によるそれらの希少細胞の抽出又は単離の後、希少細胞に対して行われる複数分析も包含する。濾過による希少細胞の単離及び抽出の後、実施される濾過段階及び種々の複数分析を達成するための道具、装置及び/又は試薬を包含するキットに関する。

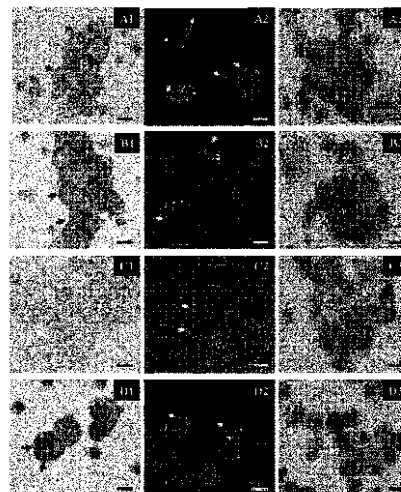


Fig.1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

希少細胞に関連する状態、障害又は疾患を同定し、診断し、又は予後診断を提供する方法であって、

(a) 生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離するか又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有し；

(b) 前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態を決定し、そして / 又は前記単離された希少細胞を免疫標識し、そして / 又は前記単離された希少細胞上の分子分析を実施し；そして

(c) 前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態及び / 又は免疫標識及び / 又は分子分析に基づいて、希少細胞の存在及び / 又は数及び / 又は特性に関連する状態、障害又は疾患、及び / 又は状態、障害又は疾患の段階を同定し、診断し、又は予後診断を提供することを含んで成る方法。

【請求項 2】

前記生物学サンプルが、血液、体液、粘液、又は粘膜から得られたサンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、遺伝子疾患若しくは障害、又は炎症、変性、心血管及び感染性状態、障害若しくは疾患から成る群から選択される疾患を包含する、非癌性又は非腫瘍性状態若しくは障害を、対象自体有するか又は有する疑いがあるか、又はそれらの状態又は障害を有する胎児を有する対象から得られる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生物学的サンプルが、癌、又は非癌性増殖性状態、障害又は疾患を有するか、あるいは非癌性増殖性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記生物学的サンプルが、炎症性及び / 又は変性状態、障害又は疾患を有するか、あるいは炎症性及び / 又は変性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる；又は

前記生物学的サンプルが、心血管性状態、障害又は疾患を有するか、あるいは心血管性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる；又は

前記生物学的サンプルが、感染状態、障害又は疾患を有するか、あるいは感染状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 生物学的サンプルをポリカーボネートフィルターに通すことにより希少細胞を単離又は抽出し、そしてポリカーボネートフィルター上のその単離又は抽出された希少細胞を回収することを含んで成るか、又は

(a) 生物学的サンプルを PET (ポリエチレンテレフタレート) フィルターに通すことにより希少細胞を単離又は抽出し、そして PET (ポリエチレンテレフタレート) フィルター上のその抽出又は単離された希少細胞を回収することを含んで成る、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

濾過により単離又は抽出された前記希少細胞が、(b) におけるように、又は培養のために、さらなる分析の前に支持体に移される、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記単離又は抽出された希少細胞が、(b) の前に培養される、請求項 1 ~ 7 の何れか

10

20

30

40

50

1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記単離又は抽出された希少細胞が、(b)の前に固定されるか；又は
前記単離又は抽出された希少細胞が、(b)の前にフィルター上で染色又は免疫染色される、請求項 1～8の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

(b)前記単離又は抽出された希少細胞の細胞形態を決定することを含んで成る、請求項 1～9の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

(b)前記単離された希少細胞を免疫標識することを含んで成る、請求項 1～10の何れか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 12】

(b)前記単離された希少細胞に対する分子分析を実施することを含んで成る、請求項 1～11の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

(b)前記単離又は抽出された希少細胞の DNA、RNA 又はマイクロ RNA の分子分析を含んで成る、請求項 1～12の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

(b)前記単離又は抽出された希少細胞のタンパク質、ペプチド又はポリペプチドの分子分析を含んで成る、請求項 1～13の何れか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 15】

希少細胞の有無の検出方法であって、

(a)生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離か又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有し；

(b)任意には、前記単離又は抽出された希少細胞を培養し；

(c)任意には、前記単離又は抽出された希少細胞、又は任意には、培養された希少細胞を固定するか又は染色し；

(d)希少細胞 DNA、RNA 及び / 又はマイクロ RNA の免疫標識、及び / 又は *in situ* 分子分析、及び / 又は分子分析により、及び / 又は希少細胞タンパク質分子の分子分析により、(a)、(b)又は(c)からの単離又は抽出された希少細胞を分析することを含んで成る方法。 30

【請求項 16】

前記単離又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞における ALK 突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又は ALK 突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含し；

前記単離又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞における K - R A S 及び / 又は E G F R 突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又は K - R A S 及び / 又は E G F R 突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含し； 40

前記単離又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞における B - R A F 及び / 又は H E R 2 突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又は B - R A F 及び / 又は H E R 2 突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含し；又は

(d)希少細胞の上皮から間葉への移行の状態を決定し；希少細胞が転移性又は侵襲性細胞に関連する遺伝子発現徴候を有するかどうかを決定するか；又は希少細胞が転移又は 50

侵襲に関連する決定基を発現するかどうかを決定することにより、前記単離又は抽出された希少細胞を分析することを含んで成る、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

異なった時点で同じ対象から得られる生物学的サンプルを用いて、請求項 15 又は 16 に記載の方法を反復することを含んで成る個別化された医学療法であって、

前記生物学的サンプルが、希少細胞に関連する状態についての治療の間、又は希少細胞に関連する状態、障害又は疾患についての異なった治療レジメンの間、異なった点で、治療の前後、同じ患者から得られ；

前記個別化された医学治療がさらに、(e) 治療レジメンの有効性を決定するためにか、又は治療レジメンに対する耐性を検出するために、異なった時点で得られたサンプル間の希少細胞の数を比較することを含んで成り、ここで検出された希少細胞の相対数の低下が、治療レジメンの相対的有効性を示し、そして検出される希少細胞の相対数の上昇が、治療レジメンに対する耐性又は治療レジメンの無効力を示し；そして任意には、

(f) (e) に基づいて対象についての効果的な個別化された標的治療法を選択することを含んで成る治療法。

【請求項 18】

希少細胞の分子特性に対する候補薬物又は候補治療の効果を評価し、そして薬物又は治療を付与しない対照と比較して、対象における希少細胞の数を減じる薬物又は治療を選択し、そして対照と比較して、希少細胞の相対数を減じるか、又は希少細胞の分子又は免疫学的特性を改変する薬物又は治療を選択することを含んで成る、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 19】

生物学的サンプルをフィルターに通して、そしてフィルター上の単離された希少細胞を回収することにより単離又は抽出された 1 又は 2 以上の希少細胞を含んで成る組成物であって、ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有する、組成物。

【請求項 20】

体液から希少細胞を抽出又は単離するための 1 又は 2 以上のフィルター、
 濾過の前に、体液を処理するための 1 又は 2 以上の緩衝液、希釈剤又は他の剤、
 希少細胞が体液から抽出又は単離された後に、その希少細胞を懸濁し、洗浄し、又は他
 方では処理するための 1 又は 2 以上の緩衝液、
 フィルターから単離又は抽出された希少細胞を、異なった支持体上にトランスファーす
 るための 1 又は 2 以上のトランスファー緩衝液、
 1 又は 2 以上の細胞形態及び / 又は細胞化学染色試薬又は他の細胞染料、又はそのた
 めの緩衝液、
 希少細胞を免疫標識するための 1 又は 2 以上の抗体又は他の試薬、又はそのための緩衝
 液、

フィルター又は他の支持体上の希少細胞の *in situ* 分析のための 1 又は 2 以上の試薬、
 希少細胞を溶解するための 1 又は 2 以上の溶解剤又は溶解緩衝液、

希少細胞タンパク質の分子分析のための 1 又は 2 以上の抗体又は他の試薬、又はそのた
 めの緩衝液、

PCR 包含をする、希少細胞核酸の分子分析のための 1 又は 2 以上のプローブ、プライ
 マー、ヌクレオチド、酵素又は他の試薬、
 の少なくとも 1 つを含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2012年5月24日に提出された米国特許仮出願第 61 / 651, 437
 号に対する優先権を 35 U.S.C. § 119 (e) 下で主張するものであり、それは

10

20

30

40

50

参照によりその全体が本明細書に組込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、濾過による生物学的サンプルからの希少細胞の単離、及びそれらの希少細胞及びそれらの成分の続く分析を包含する。希少細胞は、他の種類の細胞とは異なる特徴を有するか、又は他の種類の細胞とは異なる頻度で生物学的サンプルに出現する。このタイプの希少細胞は、希少腫瘍又は希少癌細胞、希少な種類の内皮細胞、希少胎児細胞、及び希少な感染白血球細胞（白血球）を包含する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の記載

希少細胞（rare cells）。希少細胞は、ヒト又は動物から得られた生物学的サンプルにおいて絶対的又は相対的低量で存在する。希少細胞の存在は、特定の疾患、障害又は状態と、しばしば相関する。例えば、希少細胞は、腫瘍又は癌を有する対象の血液に見出される。

【0004】

希少細胞の種類（kinds of rare cells）。多くの様々な種類の希少細胞が存在し、そして希少細胞は非排他的には、次のものであり得る：

- 上皮細胞及びそれらの前駆細胞、間葉細胞及びそれらの前駆細胞、成熟及び未成熟上皮細胞及びそれらの前駆細胞、繊維芽細胞及びそれらの前駆細胞、及びメラニン細胞及びそれらの前駆細胞；

- 単球及びマクロファージ及びそれらの前駆細胞、活性化されたリンパ球及びそれらの前駆細胞、血漿細胞及びそれらの前駆細胞、好酸球及びそれらの前駆細胞、好塩基球及びそれらの前駆細胞、及び巨核球及びそれらの前駆細胞；

- 任意のサブタイプの幹細胞；

- 任意の起源及びタイプの胎児細胞、例えばリンパ系、赤血球、骨髄、幹胎児細胞、栄養膜細胞、例えば細胞栄養芽細胞及び合胞体、及び胚細胞；及び

- 任意の起源及びタイプの及び任意の程度の分化の腫瘍細胞、例えば幹腫瘍細胞、腫瘍微小塞栓、凝集腫瘍細胞、任意のタイプの集団腫瘍細胞、及び任意の起源及びタイプの異型細胞。

【0005】

いくつかの種類希少細胞は、病理学的細胞である。そのような病理学的細胞の例としては、次のものを挙げることができる：腫瘍又は癌細胞、例えば肺癌、前立腺癌、結腸癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌、肝臓癌、胃癌、食道癌、及び任意のタイプの癌、肉腫、骨髄腫、黒色腫、骨肉腫、神経芽細胞腫、白血病及びリンパ腫に由来するか又は起因する細胞。

【0006】

希少細胞はまた、生物学的サンプル中の希少細胞の数が病理学的に高められるか、又は低められる状態にも関連している。それらは、次の細胞を包含する：

- 癌を有する患者、又は心血管疾患、例えば心臓発作を有する患者の血液における病理学的に高い数値で存在する内皮細胞；

- 細胞内ウイルス、細菌又は他の病原体、例えばHIV、HBV、HPV、赤痢菌、リーシュマニア（leishmania）、結核の桿菌、感染された単球、感染されたマクロファージ、感染されたリンパ球、活性化されたリンパ球を担持する細胞；及び

- 遺伝子疾患に関連する突然変異を担持する細胞、例えば異数性21、13、18、XXY、XO、サラセミア、嚢胞性線維症、脊髄性筋萎縮症、デュシェーヌ病、ハンチントン病等により影響される胎児からの胎児細胞、及び遺伝子突然変異、又は特定の病理、例えばウイルス感染、炎症、慢性変性疾患、アルツハイマー病、糖尿病、代謝障害に対する感受性に関連する分子特性を担持する細胞。

【0007】

希少細胞はまた、非病理学的状態、例えば妊娠にも関連している。

10

20

30

40

50

【0008】

希少細胞は典型的には、体液における細胞集団中に、約 10^3 ～約 10^{10} 個の細胞、約 10^4 ～約 10^{10} 個の細胞、約 10^5 ～約 10^{10} 個の細胞、約 10^6 ～約 10^{10} 個の細胞、約 10^7 ～約 10^{10} 個の細胞、又は約 10^8 ～約 10^{10} 個の細胞当たり1個の細胞として存在することができる。希少細胞は典型的には、1mlの体液中、500個未満の細胞、200個未満の細胞、100個未満の細胞、50個未満の細胞、又はさらに10個未満の細胞として存在することができる。例えば、循環腫瘍細胞（CTC）は、典型的には、血液1ml当たり、約 6×10^6 個の白血球、約 2×10^8 個の血小板及び約 4×10^9 個の赤血球間に、1～10又は1～500個のCTCが存在することが知られている[75]。

【0009】

希少細胞を単離するための従来の方法

希少細胞は、生物学的サンプルから抽出又は単離され得る。抽出された細胞は、他の細胞からの単離を伴わないで、液体サンプルから抽出された細胞である。単離された希少細胞は、液体サンプルに存在する他の種類の細胞から単離された希少細胞である。生物学的サンプルから抽出された又は単離された非希少細胞に対する希少細胞の割合は変化し、従って、抽出された又は単離された希少細胞の純度は可変であり得る。

【0010】

いくつかの方法が生物学的サンプルから希少細胞を抽出又は単離するために提案されており；特にいくつかの方法が血液から腫瘍又は胎児の細胞を単離するために報告されている。しかしながら、それらの方法は、(i)最小の損失が、又はまったくの損失なしでの希少細胞の抽出又は単離、(ii)最小の選択バイアスか、又はまったくの選択バイアスなしでの希少細胞の抽出又は単離、及び(iii)多重分析方法へのそれらの容易な又は同時使用を可能にする手段での希少細胞の抽出又は単離の三重課題に対処していない。

【0011】

サンプル中のいくらかの希少細胞を単に回収する方法は、続く分析方法における単離又は抽出された希少細胞の使用を定量的に損なう。それらの方法はまた、選択バイアスも導くことができる。

【0012】

選択バイアスは、抽出又は単離方法がサンプル中の1又はいくつかのタイプの選択された希少細胞の損失を導く場合に生じる。例えば、抗上皮細胞抗体への希少腫瘍細胞の結合により血液サンプルから腫瘍細胞を単離する方法は、抗体に結合する上皮細胞抗原を発現しない希少腫瘍細胞の損失をもたらす。

【0013】

厳しい抽出又は単離方法、又は他方で、単離された又は抽出された希少細胞の検出できる特性を変える方法は、続く分析方法へのそれらの使用を損なう。

【0014】

希少細胞の診断的重要性。希少細胞の検出及び特性化、並びに診断及び治療におけるこれらの使用は、ヒト及び動物の臨床診療及び研究のためにますます重要であると予想される。希少細胞は、個別化された医学又は治療診断、すなわち患者の特定の遺伝子特性、及び患者の希少細胞の特性に基づいて患者のための個別化された診断療法への使用のために特に価値がある。この設定によれば、希少細胞は、それらの診断的同定及び広範な特性化を提供する複数の手法により分析される必要がある。例としては、癌に罹患した患者の血液から単離された希少細胞は、予後及び/又は治療診断値を有する遺伝子突然変異の検出を目的とした分子分析により特徴づけられ得る。しかしながら、遺伝子突然変異を標的とする分子分析のみが血液中の腫瘍細胞の有無を診断することを目的とした分析を伴わないで実施される場合、その試験の結果はバイアスにより影響される。事実であれば、所定の患者の血液から単離された希少細胞が腫瘍細胞を含まない場合、単離された希少細胞における遺伝子突然変異の不在が、循環腫瘍細胞における遺伝子突然変異の不在を示さないであろう。従って、生物学的サンプルから抽出された又は単離された希少細胞に対して実施される多重分析は、標的化された治療を選択するために使用される信頼できる情報を得る

10

20

30

40

50

ために、それらの有効性に従うために、及び可能性ある薬物耐性を検出するために必要とされる。

【0015】

さらに、血液又は他の生物学的サンプルから抽出された又は単離された希少細胞は、非排他的には、外科的及び半外科的介入、生検、腹式穿刺、胸腔穿刺、穿刺、脊椎穿刺、羊水穿刺、絨毛膜標本採取及び臍帯穿刺を含む、侵襲性外科又は半外科方法を通して得られるサンプルに代わるものとして使用され得る。この設定によれば、希少細胞は、診断及び/又は治療診断使用並びに広範な分子及び/又は遺伝子特性化のために、複数分析により調べられる必要がある貴重な材料を提供する。

【0016】

肺癌由来の希少細胞。肺癌は最も普及している新生物であり、且つ世界の腫瘍関連死亡の主要原因である[1 - 5]。切除される肺癌の管理及び転移性腫瘍のより効果的治療における最近の進歩にもかかわらず、肺癌患者の治療率は低いままである。しかしながら、肺癌における発癌性ドライバー変異の最近の発見及び標的療法の高まる開発が、進行期患者の新たな有望な結果を示している[6 - 8]。それらの療法の中で、ゲフィチニブ及びエルロチニブ、すなわち腺癌の10～20%で活性化チロシン変異を示す、上皮成長因子受容体(EGFR)に対して生じたチロシン-キナーゼ阻害剤が使用される[7, 9]。つい最近は、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)(2p23)及び棘皮動物微小管関連タンパク質様-4(EML4)(2p21)遺伝子を包含するゲノム変化が、ALK小分子阻害剤(クリゾチニブ)に対して卓越した好反応を有する一部の肺癌患者に同定された[7, 10 - 13]。ALK-遺伝子再配置が、ほとんどの腫瘍においてKRAS及びEGFR関連変異のないほとんどのシリーズによれば、非小細胞肺癌(NSCLCs)の1～7%で見出された[10, 12 - 14]。固形又は腺房成長パターン、篩状構造、粘性細胞(印環細胞又は杯細胞)の存在、多くの脂肪外粘液、鱗状成長の欠如、及び重要な核多形性の欠如を提供する特定の組織学的特徴が、このサブセットのALK-陽性肺腺癌を特徴づける[14]。さらに、ALK再配置を有する腫瘍の患者は、若く、ほとんどのシリーズにおいて、より頻繁には男性であり、そして禁煙者/かつての軽い禁煙者では決してなかった[12, 14]。

【0017】

循環腫瘍細胞(CTC)は、シリーズ及び方法によれば、肺癌患者の40%以上で単離され得る[15 - 17]。さらに、疾患の後期及び初期の両段階での肺癌患者の予後は、CTCの存在及び数に相関する[15, 16]。CTCは、異なった直接的及び間接的方法により単離され得る[18, 19]。ゲノム変化、特に、EGFR遺伝子に生じる突然変異が、NSCLC患者において単離されたCTCに示されている[20]。

【0018】

発明者は、CTCが肺癌の手術を受けた患者において初期段階の疾患においてさえ、異なった方法により単離され得ることを、以前に示している[15, 21]。さらに、CTCの存在及び数は、悪い予後に関連した[15]。興味あることには、それらのサイズに従ってCTCを単離した直接的方法(ISET、上皮腫瘍の細胞のサイズによる単離)を用いることにより、発明者は、悪性特徴によるCTCの良好な特性決定を可能にした悪性細胞病理学的基準を定義した「22, 23」。さらに、NSCLC患者からISETにより単離されたCTCに免疫細胞化学(ICC)アプローチを適用することにより、我々のグループ及び別のグループは、可変数のCTCが上皮-間葉転換(EMT)表現型を表示することを示した[17, 21, 24, 25]。

【0019】

肺癌患者から単離されたCTCにおけるALK-遺伝子再配置の評価はまだ、報告されたことはない。これは、肺生検及び腫瘍組織除去に関連する可能性ある病的状態を回避することにおける肺癌患者の非侵襲性プレ検診のための適切な臨床的目標である。

【0020】

栄養膜性希少細胞。母体血液から栄養膜細胞を単離するための非侵襲性方法は、例えば

10

20

30

40

50

、2010年1月26日に発行された米国特許第7,651,838号に記載のように、報告されている。しかしながら、完全に非侵襲的で且つ安全（例えば、流産誘発の危険性を伴わないで）なアプローチを通して子宮頸サンプルから栄養膜細胞を入手する方法についての必要性がある。そのような方法は、遺伝的欠陥、疾患又は障害の非侵襲性出生前診断のためにこのアプローチが有用であるためには、妊婦から栄養細胞を一貫して回収しなければならない（Imudia AN, Kumar S, Diamond MP, DeCherney AH, Armant DR. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction. Fertil Steril. 2010; 93:1725-30）。例えば、妊婦中の胎児のトリソミー21の診断が、遊離DNAを抽出し、そして次の次世代配列決定により、遊離性胎児DNAを分析することにより達成され得る。遊離性胎児DNAの量が少な過ぎる場合、胎児異数性の有無についての信頼できる結果が得られず、従って、循環胎児細胞が非侵襲性出生前診断の実施のために分析され得る。米国特許第7,651,838号は、非侵襲性方法を通しての血液からの栄養膜細胞の単離を記載する。栄養膜細胞は、子宮頸サンプルから単離されるか又は抽出され得るが、しかしそれは、子宮頸サンプル、子宮頸粘液、又は粘膜から得られたサンプルから栄養膜細胞を、いかにして、一貫して且つ非侵襲的に（流産誘発の危険性なしに）入手するかは知られていない（Imudia AN, et al Fertil Steril. 2010; 93:1725-30）。

10

【0021】

本発明者は、本明細書に開示される濾過及び他の単離及び分析方法を用いて、生物学的サンプル、例えば血液及び粘膜分泌物から希少細胞を抽出することにより、上記課題を解決しようとした。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

発明の簡単な要約

本明細書に開示される方法は、生物学的サンプルから希少細胞を抽出するか、又は単離するための最も適切な手段として濾過を用いることによりそれらの問題や課題を解決する。濾過によるそれらの抽出又は単離の後、希少細胞は、複数の又はさらに同時分析方法のために適切な状態で存在する。この方法は、生物学的サンプルから希少細胞を効果的に単離するか又は抽出し、希少細胞を同定し、そして次に、診断目的のために、及び治療を選択し、ガイドし、モニターするために、及び特に、標的化された治療を選択し、そしてそれらに対する応答及び/又は耐性をモニターするために、希少細胞を分子的に特徴づける。

30

【0023】

本発明は、希少細胞を分析するか又は特徴づけるための種々のモードを包含する。それらは、(i) 診断又は治療診断目的のために、及び続く療法の選択のために、濾過により単離された希少細胞の定量及び定性分析への使用；(ii) 濾過により単離された同じ希少細胞に対して実施される複数の分析を包含する「定性分析」、同じサンプルに対する複数の分析は、希少細胞が豊富でない状態、又は少数の希少細胞を含む生物学的サンプルに関連する問題を回避し；(iii) 希少細胞の培養及びRNA分析を可能にする、濾過による固定されていない（新鮮な）希少細胞の単離を包含する「定性分析」；及び(iv) 侵襲性癌の初期診断のためへの濾過により単離された循環腫瘍細胞の使用；及び(v) 遺伝子患者の非侵襲性診断のためへの子宮頸粘膜サンプルから単離された栄養膜細胞の使用を包含する。

40

【0024】

その側面の1つによれば、本発明は、希少細胞に関連する状態、障害又は疾患を同定し、診断し、又は予後診断を提供する方法に関し、ここで前記方法は、(a) 生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離するか又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を

50

有し；(b)前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態を決定し、そして/又は前記単離された希少細胞を免疫標識し、そして/又は前記単離された希少細胞上の分子分析を実施し；そして(c)前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態、及び/又は免疫標識及び/又は分析に基づいて、希少細胞の存在及び/又は数、及び/又は特性に関連する状態、障害又は疾患及び/又は段階を同定し、診断し、又は予後診断を提供することを含んで成る。この方法は、対象の生物学的サンプルにおける希少細胞を単離し、抽出し、濃縮するか、又は他方では、精製するために使用され得る。生物学的サンプルは、希少細胞を含むか又は含むことが疑われている何れかのものであり得る。それらは、血液又は他の細胞外流体、血液以外の体液、例えば羊水、房水及び硝子体液、胆汁、血清、血漿、母乳、脳脊髄液、耳垢(耳垢)、内リンパ、外リンパ、女性精液、胃液、粘液、例えば鼻水、痰及び粘膜から集められた他の材料、腹水、胸水、唾液、皮脂(皮脂)、精液、汗、涙、膺分泌、嘔吐物、及び尿を包含する。そのような生物学的サンプルは好ましくは、非侵襲的に得られるが、しかしながら、サンプルはまた、生検組織から、又は固体又は半固体組織サンプルから製造された細胞懸濁液から得られる。

10

20

30

40

50

【0025】

生物学的サンプルは、興味ある対象、例えば癌又は腫瘍を有することが知られているか、癌又は腫瘍を有することが疑わしいか、又は癌又は腫瘍を進行する危険性がある対象から得られる。サンプルはまた、希少細胞に関連するか又は希少細胞により引起される任意の他の状態、障害又は疾患、例えば非癌性増殖性状態、障害又は疾患を有するか、有することが疑われるか又はその危険性を有することが知られている対象からも得られる。例えば、生物学的サンプルは、炎症性及び/又は変性状態、障害又は疾患を有するか、又は炎症性及び/又は変性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られるか；又は生物学的サンプルは、心血管性状態、障害又は疾患を有するか、又は心血管性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られるか；又は生物学的サンプルは、感染状態、障害又は疾患を有するか、又は感染状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる。

【0026】

上記開示される方法における段階(a)においては、希少細胞は、生物学的サンプルを、ポリカーボネートフィルター、PET(ポリエチレンテレフタレート)、又は他の適切な多孔性フィルター又は材料に通し、そしてポリカーボネートフィルター上の希少細胞を回収することにより、単離されるか、抽出されるか、濃縮されるか、又は他方では、精製され得る。

【0027】

生物学的サンプルは、新鮮であり得、例えば対象から最近採取されたサンプル、貯蔵されたサンプル、例えば保存された、冷蔵された又は凍結されたサンプル、又は別の処理、例えば固定化を受けたサンプルであり得る。生物学的サンプルに依存して、粘液溶解剤、抗凝固剤、プロテアーゼにより処理され得るか、又はサンプルに希少細胞を保存する条件下で生物学的サンプルにおける特定タイプの細胞を選択的に除く溶解剤により処理され得る。

【0028】

フィルターに通す前、生物学的サンプルは、希釈されるか又は他方では、処理され、希少細胞の単離、抽出、濃縮又は精製を促進され得る。

【0029】

本明細書に記載される濾過方法により、単離され、抽出され、濃縮されるか、又は他方では、精製される希少細胞は、(b)におけるように、さらなる分析の前に、又は培養のために、支持体に移され得る。

【0030】

希少細胞は、濾過によるそれらの単離又は抽出の後、分子分析のために個別に収集され、又は濾過により生物学的サンプルから単離された又は抽出された複数の又はすべての希

少細胞は、(b)における分析のために収集され得る。さらに、単離された又は抽出された希少細胞は、(b)における分析の前に、培養されるか、又は拡張され得る。例えば、希少細胞は、特定薬物又は剤、例えば生物、化学又は放射線剤の存在及び不在下で培養され、そのように処理されなかった希少細胞と比較し、薬物又は剤に対するそれらの応答が決定され得る。この方法は、特定患者から単離された希少細胞に標的化された治療法を選択し、そして治療に対する患者の応答をモニターするか、又は特定の薬物又は剤による治療に対する耐性の進行をモニターするために使用され得る。

【0031】

(b)における分析の前に、単離された又は抽出された希少細胞は、それらを単離するために使用されるフィルター上でin situ固定されるか、又は染色されるか、又はフィルターからの除去の後、固定されるか、又は染色され得る。例えば、単離された又は抽出された希少細胞は、フィルター又は別の支持体上での染色又は免疫染色の後又は前、in situ分子分析により(b)において分析され得るか；又は(b)単離された希少細胞(又は続いて、培養されるか又は増殖された希少細胞)が移されるフィルター又は別の支持体上での単離された又は抽出された希少細胞のin situ細胞形態分析を包含することができる。単離された又は抽出された細胞はまた、それらの細胞を支持体に固定する必要がない他の方法によっても分析されるか又は評価され得る。

10

【0032】

本明細書に開示される方法によれば、(b)希少細胞又は培養された希少細胞が適用されるフィルター又は別の支持体上の単離された又は抽出された希少細胞のタンパク質、核酸又は他の成分のin situ分子分析を含んで成ることができる。例えば、(b)における分子分析は、単離された又は抽出された希少細胞のタンパク質、ペプチド又はポリペプチド；単離された又は抽出された希少細胞のDNA、RNA又はマイクロRNA；又はポリペプチド又は核酸を除く、希少細胞の他の成分の分子分析を包含することができる。

20

【0033】

本明細書に開示される方法はまた、さらに、(b1)細胞形態分析、免疫標識、又はin situ分子分析の後、単離された又は抽出された希少細胞のイメージを可視化すること、及び/又は(b2)細胞形態分析、免疫標識又はin situ分子分析の後、単離された又は抽出された希少細胞のイメージを記録することを包含することができる。

30

【0034】

別の実施形態によれば、本発明は、(a)生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離するか又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有し；(b)任意には、前記単離された又は抽出された希少細胞を培養し；(c)任意には、前記単離された又は抽出された希少細胞、又は任意には、培養された希少細胞を固定するか又は染色し；(d)希少細胞DNA、RNA及び/又はマイクロRNAの免疫標識、及び/又はin situ分子分析、及び/又は分子分析により、及び/又は希少細胞タンパク質分子の分子分析により、(a)、(b)又は(c)からの単離された又は抽出された希少細胞を分析することを含んで成る、希少細胞の有無の検出方法に向けられる。この方法は、上記に記載される同じ種類の生物学的サンプルを使用し、そして上記に記載される生物学的サンプルの希釈又は前処理の後、希少細胞を単離するか又は抽出することができる。濾過の後、希少細胞はまた、固定されるか、又は新鮮のまま使用されるか、又は上記に記載される他の処理または段階にゆだねられ得る。段階(d)によれば、単離され、濃縮され、抽出されたか、又は他方では、精製された希少細胞は溶解されるか、又は損なわれないまま使用され得る。

40

【0035】

単離された又は抽出された希少細胞が溶解される場合、(d)は、溶解された希少細胞における状態、障害又は疾患に関連する変異タンパク質及び/又は変異RNA、及び/又はDNA変異を検出することを包含する。例えば、希少細胞は、希少細胞内に含まれるポリペプチド又は他の免疫学的成分を単離するために溶解されるか、検出される成分を単離

50

するか、濃縮するか又は他方では、精製するために溶解されるか、又は分子分析のために核酸を単離するために溶解され得る。

【0036】

この方法はさらに、溶解された希少細胞における変異DNA、及び/又は変異RNA及び/又は変異タンパク質の検出に基づいて、治療の有効性を評価するか、又は治療に対する可能性ある耐性を検出するために、個別化された医薬のための標的化された治療を選択することを包含する。例えば、希少細胞の溶解の後、(d)は、溶解された希少細胞におけるALK突然変異の有無を検出し、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はALK突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出し；溶解された希少細胞におけるK-RAS及び/又はEGFR突然変異の有無を検出し、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はK-RAS及び/又はEGFR突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出し；又は溶解された希少細胞におけるBRAF及び/又はHER2突然変異の有無を検出し、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はBRAF及び/又はHER2突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含する。

10

【0037】

本発明はまた、異なった時点で同じ対象から得られる生物学的サンプルを用いて、上記に開示される工程を反復することを含んで成る個別化医学療法も企画する。例えば、希少細胞サンプルは、薬物又は他の剤による治療の前に、再び又は数度、その治療の間、及び再び治療が終了した後、対象から単離され得る。これは、治療の有効性の経時的評価を可能にする。

20

【0038】

従って、生物学的サンプルは、希少細胞に関連する状態についての治療の間、又は希少細胞に関連する状態、障害又は疾患についての異なった治療レジメンの間、異なった時点で、治療の前後、同じ患者から得られる。この個別化医学療法はまた、治療レジメンの有効性を決定するためか、又は治療レジメンに対する耐性を検出するために、異なった時点で得られたサンプル間の希少細胞の数を比較し、ここで検出された希少細胞の相対数の低下が、治療レジメンの相対的有効性を示し、そして検出される希少細胞の相対数の上昇が、治療レジメンに対する耐性又は治療レジメンの無効力を示し；そして任意には、(f) (e)に基づいて対象についての効果的な個別化された標的治療法を選択することをさらに含んで成る(e)及び/又は(f)も包含することができる。

30

【0039】

希少細胞の種類、同一性又は起源は、例えば、免疫学的に、それらのタンパク質、核酸、又は他の成分の染色により、物理的外観により、又は分子分析により決定され得る。例えば、(d)は、希少細胞の上皮から間葉への移行の状態を決定することにより単離された又は抽出された希少細胞を分析し；幹希少細胞の状態を決定することにより単離された又は抽出された希少細胞を分析し；又は希少細胞が転移性又は侵襲性細胞に関連する遺伝子発現徴候を有するかどうかを決定するか、又は希少細胞が転移又は侵襲に関連する決定基を発現するかどうかを決定することにより、前記単離された又は抽出された細胞を分析することを含んで成る。

40

【0040】

本明細書に記載される方法はまた、さらに、(d)に基づいて希少細胞に関連する状態、障害又は疾患の早期診断を行うこと、あるいは前記状態の予後診断を行なうことも包含することができる。例えば、上記に記載される方法は、(d)に基づいて希少細胞に関連する癌及び/又は侵襲性癌の早期診断の実施を包含することができ；癌及び/又は侵襲性癌が発生する器官の早期診断の実施を包含することができ；又は(d)に基づいて希少細胞に関連する感染性状態、障害又は疾患の早期診断の実施を包含することができる。

【0041】

本明細書に開示される方法は、さらに、希少細胞の分子特性に対する候補薬物又は候補

50

治療の効果を評価し、そして薬物又は治療を付与しない対照と比較して、対象における希少細胞の数を減じる薬物又は治療を選択し、そして対照と比較して、希少細胞の相対数を減じるか、又は希少細胞の分子又は免疫学的特性を改変する薬物又は治療を選択することを含んで成る。

【0042】

本明細書に開示される方法はまた、さらに、希少細胞に関連する状態、障害又は疾患を進行する対象の素因及び/又は危険性を評価することを含んで成り、ここで基線又は対照値に比較して、希少細胞の相対数の上昇が前記状態、障害又は疾患を進行する素因又は高められた危険性を示すか、又は基線又は対照値に比較して、希少細胞における分子又は免疫学的変化が、前記状態、障害又は疾患を進行する素因又は高められた危険性を示す。例えば、それらは、遺伝的状态、障害又は疾患；癌、腫瘍又は新生物状態、障害又は疾患；又は感染性状態、障害又は疾患を進行する対象の素因及び/又は危険性を評価することを含んで成る。

10

【0043】

本明細書に開示される方法の他に、本発明はまた、体液から希少細胞を抽出するか又は単離するための1又は2以上のフィルター、濾過の前に、体液を処理するための1又は2以上の緩衝液、希釈剤又は他の剤、希少細胞が体液から抽出されるか又は単離された後、その希少細胞を懸濁し、洗浄し、又は他方では、処理するための1又は2以上の緩衝液、フィルターからの単離された又は抽出された希少細胞を、異なった支持体上にトランスファーするための1又は2以上のトランスファー緩衝液、1又は2以上の細胞形態及び/又は細胞化学染色試薬又は他の細胞染料、又はそのための緩衝液、希少細胞を免疫標識するための1又は2以上の抗体又は他の試薬、又はそのための緩衝液、フィルター又は他の支持体上の希少細胞のin situ分析のための1又は2以上の試薬、希少細胞を溶解するための1又は2以上の溶解剤又は溶解緩衝液、希少細胞タンパク質の分子分析のための1又は2以上の抗体又は他の試薬、又はそのための緩衝液、希少細胞核酸の分子分析(PCRを包含する)のための1又は2以上のプローブ、プライマー、ヌクレオチド、酵素又は他の試薬、の少なくとも1つを含んで成るキットにも向けられる。

20

【0044】

本発明はまた、生物学的サンプルをフィルターに通して、そしてフィルター(前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有する)上の単離された希少細胞を回収することにより単離されたか、濃縮されたか、抽出されたか、又は他方では、精製された1又は2以上の希少細胞を含んで成る組成物にも向けられる。

30

【0045】

濾過段階、及び濾過の後、実施される種々の種類の複数分析の両者を達成するための道具、装置及び/又は試薬を含むキットが、上記方法を促進するためにアセンブリーされ得る。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1A】図1は、A(ケース1)及びB(ケース2)を示す。A1及びB1。幾つかの膜補強(矢印)を伴って強く且つ細胞質染色(評点3+)を示す循環腫瘍細胞(5A4m Abを用いてのALK免疫染色、免疫ペルオキシダーゼ、元の倍率×1000;バー:16µm)。A2及びB2。二重カラー2p23 LSI ALK遺伝子座特異的スプリットプローブによりハイブリダイズされた循環細胞核。2種のプローブ(3、赤;5、緑)は、赤及び緑シグナル(矢じり)の明確な分離を示し、これが2p23 ALK遺伝子座における再配置を示す。プローブは、再配置を有さない核におけるオーバーラップするシグナルを与える(矢印)。単離された3シグナル(赤)がまた観察される(アスタリスク)(元の倍率×1000;バー:16µm)。A3及びB3。ISET方法により単離された悪性細胞形態基準を示す循環細胞(元の倍率×1000;MGG染色;バー16µm)。C。組織腫瘍において負のFISH ALK及び負のIHC ALKを有する

40

50

1人の患者。C 1。染色を示さない循環腫瘍細胞（評点0）（5 A 4 m A bを用いてのA L K免疫染色、免疫ペルオキシダーゼ、元の倍率×1000；バー：16 μm）。C 2。二重カラー2 p 2 3 L S I A L K遺伝子特異的スプリットプローブによりハイブリダイズされた循環細胞核。2種のプローブ（3、赤；5、緑）が、再配置のない核におけるオーバーラップするシグナルを与えた（矢印）。スプリットシグナルは、それらの腫瘍細胞には検出されなかった（元の倍率×1000；バー：16 μm）。C 3。I S E T方法により単離された悪性細胞形態基準を示す循環細胞（元の倍率×1000；M G G染色；バー：16 μm）。D。I S E T方法により単離されたH 2 2 2 1 3細胞。D 1。幾つかの膜補強（矢印）を伴って強く且つ細胞質染色（評点3+）を示す5 A 4 m A bを用いてのA L K免疫染色（免疫ペルオキシダーゼ、元の倍率×1000）。D 2。末梢血液中にスパイクされ、そしてさらに、I S E T方法により単離されたH 2 2 2 8腫瘍細胞系に対して二重カラー2 p 2 3 L S I A L K遺伝子座特異的スプリットプローブを用いてのF I S H。2種のプローブ（3、赤；5、緑）は、赤及び緑シグナルの明確な分離を示し（矢じり）、これは2 p 2 3 A L K遺伝子座における再配置を示す。プローブは、再配置なしで核におけるオーバーラップシグナルを与えた（矢印）。単離された3シグナル（赤）がまた観察される（アスタリクス）（元の倍率×1000；バー：16 μm）。D 3。血液濾過の後、M G Gにより染色されたH 2 2 2 8細胞（元の倍率×1000；M G G染色；バー：16 μm）。

10

【0047】

【図1B】図1Bは、A（ケース3）、B（ケース4）及びC（ケース5）を示す。A 1 - C 1。幾つかの膜補強（矢印）を伴って強く且つ細胞質染色（評点3+）を示す循環腫瘍細胞（5 A 4 m A bを用いてのA L K免疫染色、免疫ペルオキシダーゼ、元の倍率×1000；バー：16 μm）。A 2 - C 2。二重カラー2 p 2 3 L S I A L K遺伝子座特異的スプリットプローブによりハイブリダイズされた循環細胞核。2種のプローブ（3、赤；5、緑）は、赤及び緑シグナル（矢じり）の明確な分離を示し、これが2 p 2 3 A L K遺伝子座における再配置を示す。プローブは、再配置を有さない核におけるオーバーラップするシグナルを与える（矢印）。単離された3シグナル（赤）がまた観察される（アスタリクス）（元の倍率×1000；バー：16 μm）。A 3 - C 3。I S E T方法により単離された悪性細胞形態基準を示す循環細胞（元の倍率×1000；M G G染色；バー16 μm）。

20

30

【0048】

【図2】図2は、悪性特徴を有する循環性非血液細胞、すなわちC O P Dを有する患者においてI S E T方法を用いて検出された循環性腫瘍細胞（C T C）の細胞形態分析を示す。

【0049】

（A）及び（B） 進行した肺癌のC O P Dを有する患者におけるI S E T方法により単離され、そしてM G G染色プロトコルにより同定されたC T C。（A）悪性細胞形態特徴を有する単離されたC T C（二重矢印：フィルターの孔）。（B）悪性細胞形態特徴を有する9種のC T Cから構成されるクラスター（C T M）（元の倍率×1000；バー：8 μm；二重矢印：フィルターの孔）。

40

【0050】

（C）及び（D） C O P Dを有する患者に関してI S E T方法を用いて、濾過された血液上に観察される、免疫染色されたC T C。（C）C O P Dを有する患者においてのみパン - サイトケラチン抗原を強く発現するC T C。（D）C O P Dを有する患者においてパン - サイトケラチン及びビメンチン抗原を同時発現するC T C（元の倍率×400；バー：16 μm；パン - サイトケラチン抗体（K L 1）による免疫ホスファターゼ染色及び抗ビメンチン抗体による免疫ペルオキシダーゼ染色；二重矢印：フィルターの孔）。

【0051】

【図3】図3は、子宮頸サンプルにおける栄養膜細胞（A）及び合胞体栄養細胞（B）のI S E Tを用いての検出を示す。単離された細胞の胎児性質は、有益なマーカーD 5 S 6

50

15 (A) 及び D21S11 (B) による STR - 遺伝子型決定により確認された。

【発明を実施するための形態】

【0052】

発明の詳細な記載

サンプル。生物学的サンプルは、静脈及び動脈の血液、リンパ液、尿、精液、腹水、脳脊髄液、胸膜液、唾液、痰、鼻液、関節液、涙液、尿道及び尿管からの液体、胆液、膵液、胃液、腸液、直腸液、腔液を非排他的に含んで成る生体液、粘膜及び器官、例えば口、喉頭、咽頭、子宮、子宮頸部、膣、食道、胃、小腸及び大腸の粘膜から非排他的に集められたサンプル、乳房、前立腺、肝臓、肺、骨髄及び他の器官からサンプルを非排他的に含んで成る、生検又は他の外科的介入により非排他的に集められたサンプルを、非排他的に含んで成る。

10

【0053】

フィルター及び濾過。希少細胞を単離するか又は抽出するために使用され得るフィルターは、定義される希少細胞の抽出又は単離に適合される厚さ、孔サイズ及び密度を有する、ポリカーボネート、PET (ポリエチレンテレフタレート) 又は他の材料の膜を、非排他的に含んで成る。公開米国特許出願第 2009/0226957 号において Paterlini - Brecht により開示される、フィルター、濾過装置、濾過方法、緩衝液及び他の用品は、参照により本明細書に組込まれる。

【0054】

それらは、(i) 少なくとも 1 つの基本的濾過領域を含むフィルターの使用を包含する方法、ここで各基本的濾過領域が限定された表面積を有し；及び (ii) 前記各基本的濾過領域及び基本的濾過領域の数が濾過される液体のタイプ、分離される生物学的粒子のタイプ、及び濾過される液体の体積の関数として選択されることを包含する。

20

【0055】

従って、本発明は、精製又は分析のために及びたぶん、診断のために、生物学的粒子及びそれらを含む流体を分離する方法に関し、分離される生物学的粒子の性質に適切な多孔性のフィルターを通して少なくとも 1 つの垂直濾過段階を含んで成り、結果的に、前記生物学的粒子がフィルターにより保護され、ここで少なくとも 1 つの基本的濾過域を含んで成るフィルターが使用され、各基本的濾過域は制限された表面を有し、そして各基本的濾過域の表面及び基本的濾過域の数が、濾過される流体の性質、分離される生物学的粒子の性質、及び濾過される流体の体積に従って選択されることを特徴とする。

30

【0056】

前記方法の各基本的濾過域は、0.6 cm ~ 3 cm の直径を有するディスクの表面に等しい表面を有し、そして基本的濾過域の数は、濾過域に対する濾過される流体の体積の比率が 40 ml / cm² 未満、及び好ましくは 0.14 ml / cm² 以上になるよう選択される。

【0057】

好ましくは、各基本的濾過域が、0.8 cm 以上か又は 0.8 cm に等しい直径を有するディスクの表面に等しい表面を有する。

【0058】

好ましくは、フィルターは、3 µm ~ 100 µm のサイズに調整された孔、及び $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個の孔 / cm² の孔密度を有する。

40

【0059】

好ましくは、濾過は、0.05 パール ~ 1 パールへの圧力の低下により、場合によっては、1 パール未満への圧力の上昇により実施される。

【0060】

濾過を行うためには、基本的濾過域を配置することにより、濾過残留物を分析する手段に関連する適切なバッジを形成するフィルターを用いることが好ましい。

【0061】

好ましくは、フィルターを形成するバッジは、濾過される液体を含み、そして滅菌する

50

か、又はDNA、RNA又はタンパク質を消化する酵素からそれを開放するために、使用の前に、処理される少なくとも1つのチャンバーを包含する使い捨ての濾過モジュールに組込まれる。

【0062】

分離されるべき生物学的粒子は、例えば細胞である。この場合、細胞含有流体の濾過の前に、濾過のための流体サンプルは、細胞含有液体、例えば生物学的流体、又は細胞培養物のサンプルから、分離される細胞により予備富化することにより、及び/又はそれを希釈することにより分離され得る。

【0063】

細胞を含む流体は血液であり得、そして好ましくは、この場合、フィルターは $5\mu\text{m} \sim 25\mu\text{m}$ の調整された孔を有する。

【0064】

前記工程は、生物学的流体、例えば血液、尿、腹水、脳脊髄液、乳、胸膜溢出、子宮頸部を洗浄するための流体、生検、外科的な方法又は口内洗浄により得られる細胞懸濁液における、診断目的のための細胞、例えば腫瘍、胎児、内皮、線維芽細胞、筋肉、神経又は単球細胞、細胞株、臓器細胞、前駆体又は造血細胞の検出のために、又は動物又は植物細胞の検出のために使用され得る。

【0065】

本発明はまた、前記工程を実施するための濾過モジュールにも関し、ここで前記モジュールは、少なくとも1つの開口を含むベースによりその下部に閉じられた少なくとも1つの区画を含むチャンパーブロック；少なくとも1つの穴を含むフィルター支持ドロワー、各穴はチャンパーブロックにおける開口部に対向して配置され；チャンパーブロックの下面と支持ドロワーとの間に把持されるフィルターを含んで成る。

【0066】

このモジュールにおいては、チャンパーブロックのベースにおける各開口の寸法、及びフィルター支持ドロワーにおける各穴の寸法は、チャンパーブロックのベースにおける開口部、フィルター支持ドロワーにおける関連する穴から成る各対が限定された表面の基本的濾過域を定義し、そしてそこで、各区画の有用な体積が区画ベースに位置する基本的濾過域の数に比例するようにされる。

【0067】

好ましくは、基本的濾過域の表面は、 $0.6\text{cm} \sim 3\text{cm}$ の相当直径を有するディスクのその域に等しく、そして区画のベースの含まれる開口部の表面の合計に対する各区画の有用な体積の比率は、 $40\text{ml}/\text{cm}^2$ 未満、及び好ましくは $0.14\text{ml}/\text{cm}^2$ 以上、及び前記範囲のすべての中間値及び下位範囲である。

【0068】

好ましくは、チャンパーブロックのベースにおける少なくとも1つの開口部の寸法及びフィルター支持ドロワーにおける対応する穴の寸法は、対応する基本的濾過域の表面が直径 0.8cm のディスクのその域以上か又は等しいようにされる。

【0069】

好ましくは、少なくとも1つの区画は少なくとも1つの取り外し可能な分離壁により部分区画に分割され、その結果、少なくとも1つの部分区画は、そのベースに、少なくとも1つの開口部を含み、そして部分区画のベースにおける開口部の表面の合成に対する前記部分区画の比率は、 $40\text{ml}/\text{cm}^2$ 未満、及び好ましくは $0.14\text{ml}/\text{cm}^2$ 以上、及び上記範囲のすべての中間値及び下位範囲である。

【0070】

好ましくは、濾過モジュールは、チャンパーブロックのベースと、チャンパーブロックのベースにおける穴に対応する少なくとも1つの穴を含むフィルターとの間に配置される溝付き密封ジョイントを含み、前記穴は少なくとも1つの突出するリップにより囲まれている。

【0071】

10

20

30

40

50

さらに、濾過モジュールは好ましくはまた、フィルター支持体と、そのフィルター支持体における穴の反応側に少なくとも1つの開口部を含むフィルターとの間にプレートジョイントも含む。

【0072】

フィルターはパッチを形成することができ、その中心部は少なくとも1つの多孔性領域を含み、そしてその周囲はフィルター支持体上でのその位置を割出すための手段を含むフレームを形成する。

【0073】

割出し手段は例えば、フィルター支持体上に提供される、対応する直径のスタツズと協力するよう企画された異なる直径の少なくとも2つの穴である。

【0074】

好ましくは、フィルター中の少なくとも中心多孔性部分は、 1 cm^2 当たり $3\text{ }\mu\text{m} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ の孔 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個を含む。すべての中間孔サイズ値及び下位範囲は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27.5、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、87.5、90、92.5、95、97.5及び $100\text{ }\mu\text{m}$ を包含するこの範囲内に企画される。すべての中間孔密度範囲及び下位範囲はまた、1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^3 、 10^4 、1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^4 、 10^5 、1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^5 、 10^6 及び1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^6 個の孔/ cm^2 内に企画される。

【0075】

好ましくは、濾過モジュールはまた、区画の上部開口を閉じるための少なくとも1つのストッパーも含む。

【0076】

好ましくは、チャンパーブロックは、その下部で、外側に延び、そして少なくとも1つのアセンブリーピンと協力し、フィルター支持体とチャンパーブロックとの間へのフィルターの把持を可能にするリムを含み、前記アセンブリーピンはチャンパーブロックのリム上に延びる破断できる端を含む。

【0077】

好ましくは、すべてのそのパーツは、滅菌操作に適し、そしてRNアーゼ、DNアーゼ又はプロテイナーゼを含まないようにそれらをするよう企画された材料から製造される。

【0078】

最終的に、本発明は、フィルター支持体とチャンパーブロックとの間のフィルターに対して圧力をかけるよう企画された、開放位置と把持位置との間を移動できる少なくとも1つのカムを含む、濾過機上に濾過モジュールを保持するための濾過モジュール支持体に関する。

【0079】

好ましくは、少なくとも1つのカムは、濾過モジュールが破断できる一端に少なくとも1つの固定ピンを含む場合、少なくとも1つの固定ピンの端が、少なくとも1つのカムによりフィルターに圧力が適用される場合、切断されるように企画される。

【0080】

支持ブロックは、濾過機の一部を形成する。

【0081】

好ましくは、濾過モジュールはまた、支持ブロックに関連して濾過モジュールの方向を指図するために、支持ブロック上の補完的手段と協力するよう企画された手段も含み、そして支持ブロックは、支持ブロックに関連して濾過モジュールの方向を割出すために、濾過モジュール上の手段と協力するよう企画された手段を含む。

【0082】

本発明に従って、流体に含まれる生物学的粒子を単離するための方法は、単離される粒子の性質に適合する特性を有するフィルター上で流体を濾過することから成る。生物学的

10

20

30

40

50

粒子は、細胞、赤血球細胞、血小板凝集体、フィブリン又は組織廃棄物であり得る。濾過される流体は特に、処理の前に、濾過操作による単離の促進を受けた生物学的流体のサンプルから得られる流体である。後でより詳細に説明されるであろうこの事前操作は、特に単離される粒子が細胞である場合、一般的に、1又は複数の以下の操作を含む：単離される細胞を前富化するよう企画された化学的処理、希釈、単離される細胞の濾過による分離を促進するよう企画された化学的処理。

【0083】

同様に、濾過のための流体のサンプルを調製するためのそれらの条件として、本発明者は、検出される細胞を単離する方法において良好な信頼性を達成するためには、濾過される流体の体積に、フィルターの特定の特性を適合させることが必要であることを注目した。特に、フィルターは、基本的濾過域に分割されるべきであり、各域は0.6cm~3cm、及び好ましくは0.8cm以上及びさらに良好には、0.8cm~1.5cm、及び前記範囲のすべての中間値及び下位範囲の直径のディスクの表面に等しい表面を有する。基本的濾過域は例えば、ディスクの形状で存在することができる。

【0084】

さらに、各基本的濾過域を通して通過する、濾過される流体の量は、1ml~100mlであり、そして好ましくは、この体積は8ml~15mlである。それらの範囲は、上記範囲中のすべての中間値を及び下位範囲を包含する。

【0085】

従って、特定サンプルを濾過するためには、装置は、濾過されるサンプルの体積に比例してフィルター上の多数の基本的濾過域を定義するために使用されるべきである。

【0086】

一般的に、濾過されるサンプルの体積は、一方では、最初に採取され得る生物学的流体の体積、及び他方では、分離される生物学的粒子の性質に特に依存する可能な希釈に依存する。採取される体積は特に、採取される流体の性質及び流体が採取される患者の年齢に依存する。当業者は、採取される流体の性質及び流体が採取される患者に依存して採取される体積をいかにして決定するかを知っている。

【0087】

希釈は、採取される流体に見出され得る、単位体積当たりの粒子の数に特に依存する。実際、濾過が満足のゆく条件下で実施される場合、濾過される流体の単位体積当たり単離される粒子の数は、フィルターの目詰まりを避けるために大き過ぎるべきではない。さらに、工程が多数の細胞と共に混合された特定の希少細胞の検出を意図するものである場合、単離体積当たりの細胞の数は、フィルターに求められる細胞を見つける合理的可能性を達成するために、単位体積当たりの細胞の数は、少な過ぎるべきではない。当業者はまた、問題の流体の性質及び求められる細胞の型に依存して、それらの希釈率をいかにして決定するかを知っている。

【0088】

患者から採取される生物学的サンプルは例えば、血液、尿、腹水、脳脊髄液、乳又は胸膜溢出であり得；それはまた、子宮頸部の洗浄からの流体、又は患者からの生物学的サンプルの採取に起因する任意の他の流体でもあり得る。

【0089】

分析方法はまた、患者から直接採取されなかったサンプル、及び例えば、スメア又は生検、又はヒト又は動物組織サンプルから製造された細胞培養培地、又はさらに、ヒト又は動物細胞系培養培地から採取されたサンプルにおける細胞を調べるためにも使用され得る。

【0090】

採取される生物学的流体が血液である場合、採取される量は一般的に、1ml~20mlであり、そして血液は、それらの条件下で、1~20の基本的濾過域上で濾過される、濾過のための流体のサンプルを得るために、1:5~1:20に変化する比率で希釈される。それらの値は、上記範囲のすべての中間値及び下位範囲を包含する。

10

20

30

40

50

【0091】

すべての他の流体に関しては、サンプルはほぼ5ml～10mlであり、そして1:2～1:10の比率で希釈されるか、又はそれらは希釈され得ない。それらのサンプルは、特に1:10の比率で希釈された10mlのサンプルである場合、5又はそれ以上の多くの数の基本的濾過域上で濾過される。それらの値は、上記範囲のすべての中間色を包含する。

【0092】

求められる細部は特に、希少細胞、例えば腫瘍細胞、胎児細胞、内皮細胞、線維芽細胞、筋細胞、神経細胞、単球細胞、細胞株、器官細胞（肝臓、腎臓等）、前駆体及び造血細胞である。例として与えられるこの列挙は、限定的ではない。

10

【0093】

濾過の前に、細胞は、密度勾配型の処理により又は対象でない細胞の溶解により、又は免疫介在方法により、正又は負のスクリーニングにより、増殖を求められる細胞を刺激することにより、等により前-富化され得る。

【0094】

このリストは限定的ではなく、そして当業者は、単離しようとする細胞の性質に適した前-富化方法を、いかにして選択するかを知っている。

【0095】

同様に、前-富化処理として、細胞を含む流体サンプルは、濾過操作により分離を促進するために、求められる細胞の性質に従って試薬により処理され得る。

20

【0096】

処理の目的は、生物学的サンプルが血液を含み、そして例えばサポニン及びEDTAから成る場合、赤血球細胞を溶解し、そして血液を抗凝固することであり得る。

【0097】

処理の目的はまた、濾過が固定された細胞を単離することを意図する場合、例えばホルムアルデヒドの添加により、有核細胞を規定することであり得る。この場合、処理の目的は、富化を可能にすることである。

【0098】

濾過が固定されていない細胞の単離を意図する場合、生物学的サンプルは、試薬により、及び生物学的膜を剛性に一時的にするために適切な条件下で（例えば、多糖、DMSOの添加による、冷却することにより、等により）、処理され得る。

30

【0099】

当業者は、求められる細胞の性質に従って最も適切な方法をいかにして選択するかを知っている。

【0100】

次に、求められる最終物への濾過を適切にするために、希釈され、前富化されるか、又は試薬により処理され得る生物学的サンプルは、 $1\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ のサイズの調整された、そして分離される粒子の性質に適切なポリカーボネート又は同等の材料から製造されたフィルターを通して濾過される。すべての中間値及び下位範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27.5、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、87.5、90、92.5、95、97.5及び $100\mu\text{m}$ を包含するこの範囲内に企画される。このサイズは好ましくは、 $3\mu\text{m}$ ～ $25\mu\text{m}$ であり、そして特に、腫瘍細胞又は上皮細胞が単離される場合、約 $8\mu\text{m}$ である。

40

【0101】

孔密度は、分離されるべき粒子の性質に適合される。好ましくは、フィルターの孔密度は、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個の孔/ cm^2 及びより良好には、 $5 \times 10^4 \times \sim 5 \times 10^5$ 子の孔/ cm^2 である。それらの範囲内のすべての中間値及び下位範囲は、以下の特定の値と同様に企画される：1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^3 、 10^4 、1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^4 、 10^5 、1、2、3、4、5、6、7、8、

50

又は 9×10^5 、 10^6 及び 1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9×10^6 の孔 / cm^2 。

【0102】

濾過は、0.05 パール ~ 1 パール、及び好ましくは、ほぼ 0.1 パールの圧力の低下で実施される。この範囲のすべての中間値及び下位範囲は、次の範囲内に企画される：0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90 及び 1.0 パール。濾過はフィルター上に位置する流体に対する圧力のわずかな上昇により助けられる。しかしながら、この圧力の上昇は、1 パール末端である。それらの条件は特に、細胞分離のために適切である。

10

【0103】

この工程は、異なった目的のために、例えば生物学的流体中の懸濁下での希少細胞を調査するために、診断を可能にするために、又は溶液中の要素の良好な状態での分析を可能にするために流体を精製するために、使用され得る。

【0104】

前記工程が細胞を調査し、そしてそれらを分析するために使用される場合、濾過の後、流体を濾過するために使用されたフィルターは回収され、濾過域が明確に同定され、そしてリンクが、それらの濾過域と、濾過されたサンプルとの間で行われることを確認する。次に、フィルターは、濾過域で回収することが可能であった細胞を分析するために使用される。

20

【0105】

それら自体知られているそれらの分析方法は、例えば次のタイプのものである：細胞学的染色（ヘマトキシリン、エオシン、等）、免疫標識（免疫組織化学、免疫蛍光）PNA、FISH、PRINS、PCRI *in situ* 又は他の分子技法、分光光度法、レーザー顕微解剖、続く DNA（DNA 抽出、遺伝子型判定、定量的 PCR、突然変異分析、CGH（比較ゲノムハイブリダイゼーション））、RNA（転写体の PCR による抽出及び分析、定量的 PCR）及びタンパク質（タンパク質抽出、マイクロ配列決定、等）に対する標的化された分子分析。

【0106】

分子分析は、フィルター上に保持され、そしてサザン技法に類似する技法によりスライド上に転置され、定義される基準（異なった性質をマーキングするか又はそれを行わないで、細胞の形態学的特徴）に従って、フィルター又はスライドから、それぞれ顕微解剖され、そして個々の又はプールされた分析にゆだねられる、富化細胞に対して実施され得る。

30

【0107】

細胞はまた、それらの DNA、RNA 及びタンパク質を抽出し、そして分析するために、適切な緩衝液により洗浄することにより、フィルターから分離され得る。

【0108】

次に、濾過により単離される要素は、顕微鏡により試験され、そしてフィルター上に得られるイメージの分析が手動的に、又は自動化された手段、特にイメージ分析装置を用いることにより実施され得る。

40

【0109】

前記工程はまた、生物学的流体、例えば分析されるべき DNA、RNA 又はタンパク質を、溶液に含む尿を精製するためにも使用され得る。流体を精製する目的は、分析を妨げる可能性ある、流体に存在するすべての生物学的粒子を排除することである。この場合、フィルターは保持されず、そしてそれは分析される、濾過された流体である。

【0110】

この濾過方法、及びサンプル調製及び分析方法は、前に言及されたように、たぶん極めて少量で特定の細胞の存在に関連する病状を検出する診断のために使用され得る。特に、前記工程は、外科手術の間、患者の血液中に放出された可能性がある癌細胞を検出するた

50

めに使用され得る。当業者は、特定の病状を検出するためにどんな細胞を調査するかを知っている。

【0111】

支持体。支持体は、非多孔性固体支持体、例えばスライド、ペトリ皿又は培養ウェル、又は次の任意のタイプの培養、処理又は分析のために細胞の支持体として使用され得るガラス又はプラスチック、又は任意の固体材料から製造される任意の他の支持体を表す：タンパク質、RNA又はDNA分析を包含する、細胞形態、免疫標識、in situ分子分析、及びタンパク質、RNA又はDNA分析を包含する、分子分析のための細胞の収集。

【0112】

濾過。希少細胞を抽出し、単離し、精製し、又は濃縮するための生物学的サンプルの濾過は、定義された希少細胞の抽出又は単離のために適合された孔のサイズ及び密度を有する、ポリカーボネート、PET（ポリエチレンテレフタレート）、又は他の材料による膜を非排他的に用いることにより、及び希少細胞を単離するか又は抽出するためにフィルター下に適用される圧力の降下を用いることにより実施され得る。

【0113】

生物学的サンプルの垂直濾過による細胞の抽出は、さらなる分析のために、例えば希少細胞の検出及び特性決定、及び診断のために、それらの積層化を可能にし、そしてそれらを利用可能にする。生物学的サンプルの垂直濾過による細胞の単離は、それらの細胞の富化及びさらなる分析、例えば希少細胞の検出、特性決定及び/又は診断のために、それらを利用可能にするために、より少ない細胞からの希少細胞の単離を可能にする。典型的には、血液の濾過による希少細胞の単離は、それらのサイズが6～9ミクロンであるように、体内の最小細胞である、大部分の好中球、及び成熟リンパ球及び赤血球（赤血球は核を含まず、従って、それらは真の細胞とは見なされず、そして一般的に、濾過の前に、溶解される）の分離、及び好中球及び成熟リンパ球よりも大きな細胞、例えば活性化リンパ球、単球、マクロファージ、幹細胞、腫瘍細胞、癌細胞、腫瘍微小塞栓、成熟及び未成熟内皮細胞、上皮細胞、好中球及び成熟リンパ球以外の間葉系細胞、メラノサイト、骨髄芽球、前骨髄球、巨核芽球、巨核球、及び一般的に、好中球及び成熟リンパ球ではない体内のすべての細胞のフィルター上での保持を可能にする。さらに、血液の濾過による希少細胞の単離はまた、フィルターの反対側に、濾過により単離された希少細胞とは異なる、生物学的サンプル中の血漿及び白血球、又は他の成分の収集を可能にする。血清は、遊離DNA及びRNA、及びタンパク質、例えば癌患者における遊離腫瘍DNA及び腫瘍RNA、及び腫瘍マイクロRNA及びタンパク質、及び妊娠女性における遊離胎児DNA、胎児RNA及び胎児マイクロRNA、及びタンパク質を含む。用語「遊離」（free）とは、「外部細胞」（outside cells）、従って血漿における遊離核酸を示す。遊離腫瘍DNAは、癌患者における腫瘍変異の診断のために使用され、そして遊離胎児DNAは、異数性及び他の遺伝性疾患、胎児の性別、RhD状態、父性テストの出生前診断のために使用される。希少細胞及び血漿と同時での白血球の収集は、個人の遺伝的背景についての情報を分析し、そして得るために有用であり得る。遊離腫瘍DNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質は、腫瘍マス及び/又は腫瘍転移及び/又は循環腫瘍細胞区画からの溶解された、たぶんアポトーシス腫瘍細胞に由来すると思われる。遊離腫瘍DNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質の分析は、血漿からDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質を抽出し、そして分子分析により突然変異を探ることにより行われる。例えば、肺癌患者におけるK-Ras突然変異の存在のすばやい分析は、血漿から遊離DNAを抽出し、そしてPCR、CastPCR、Cokd PCR、デジタルPCR及び他の標的分子試験により突然変異誘発されたK-Ras分子を探ることにより行われ得る。従って、循環腫瘍細胞におけるK-Ras変異の分析は、血漿DNAにおけるKRas変異の分析に関連付けることができる。さらに、その研究は、安価である、血漿におけるKRas変異の調査で開始することができ、そして変異が見出されない場合、それは、それよりも高価である、循環腫瘍細胞中のKRas変異の調査を続けることができる。

【0114】

10

20

30

40

50

胎児の性別の診断は、血漿DNAの分析により、容易に且つ低費用で行われる。しかしながら、血漿中の遊離胎児DNAの量が低い場合、Y特異的分子分析による負のシグナルは、信頼できる結果の入手を可能にしない。この場合、より高価な、循環胎児細胞の分析を加える可能性が、胎児の性別の信頼できる診断の入手を可能にするであろう。

【0115】

HBV、HCV又はHIV、又は細菌又は他の病原体により引起されるそれらの感染性患者の検出は、血漿から分子、例えばDNA、及び/又はRNA、及び/又はマイクロRNA及び/又はタンパク質を検出し、そしてウイルス又は細菌又は他の病原体DNA、及び/又はRNA、及び/又はマイクロRNA及び/又はタンパク質の存在を、分子分析により探すことにより実施され得る。補完的試験として、病原体に対して特異的なDNA、及び/又はRNA、及び/又はマイクロRNA及び/又はタンパク質が、循環希少細胞において探求され得る。

10

【0116】

特定の場合、希少細胞中の変異又は感染分子、血漿中の変異又は感染分子、及び個人のゲノム特徴に対する情報を、同時に入手することも有用である。この場合、循環希少細胞を単離するための濾過の後、血漿及び白血球の収集が非常に有用である。例えば、感染した患者においては、血漿中の循環希少細胞における感染分子、例えばTBC細胞からのDNAを見出し、そして白血球中の遺伝的感染性形質を見出すことが有用である。例えば、遺伝的起源の癌患者においては、血漿及び白血球中の循環腫瘍細胞における突然変異、例えばBRCA1又はBRCA2を見出すことが有用であろう。例えば、妊婦においては、男性胎児のみに影響を与える遺伝病であるデュシェンヌ病の存在について胎児細胞中の希少細胞を分析し、胎児が男であるかどうかを知るために遊離胎児DNAにおけるY配列を見出し、そして母性白血球中のキャリアー状態を見出すことが有用である。例えば、妊婦においては、後期発生の優勢遺伝病であるハンチントン病の存在について循環胎児希少細胞を分析し、遊離胎児DNA中のハンチントン変異配列を見出し、そして母性白血球中のハンチントン変異の存在を見出すことが有用である。実際、変異は優性であるので、両親のいずれか1人における変異の存在は、影響を受ける胎児の50%に危険性を与える。遺伝子分析が、胎児に影響があることを発見した場合、変異が母性白血球の分析を通して、母親により運ばれて来たかどうかを調べることは有用であろう。

20

【0117】

それらの例は、排他的ではない。一般的に、循環希少細胞を単離し、そして即時分析、又は貯蔵及び後での分析のために血漿及び白血球を同時に収集する可能性は、非侵襲性個別医療において高い可能性及び価値を有する。

30

【0118】

濾過される生物学的サンプルへのフィルターの孔サイズの適合は、識別サイズの細胞、例えば腫瘍微小塞栓及び合胞体栄養細胞、細胞及び多核細胞群、及び個々の細胞よりも大きなサイズを有する細胞材料の選択的単離、従って、20-25ミクロンよりも大きな直径の孔を用いての濾過による、高純度(白血球及び他の小細胞による低い汚染か、又は汚染が存在しない)での血液又は他の流体からのそのような材料の効果的単離、従って、濾過による、すべての白血球及び赤血球の排除を可能にする。

40

【0119】

同様に、所定の腫瘍型の及び/又は所定の患者における特定サイズの腫瘍細胞を研究することにより、及び/又は単離される特定サイズの特定希少細胞を研究することにより、単離された腫瘍及び/又は希少細胞の回収率及び純度を最大するよう、孔サイズ、孔密度及び他の化学的又は物理的特徴を適合することが可能である。例えば、胎児細胞サイズは、10-30ミクロンで変化できる。合胞体栄養細胞サイズは一般的に、100ミクロン以上である。丸くはないが、しかし細長い細胞である成熟内皮細胞のサイズは、10-20ミクロン当たり約40又は50ミクロンである。従って、興味ある孔サイズ範囲は、5-30ミクロンであり、そして大きな孔サイズは、すべての白血球の排除を可能にする。実際、マイクロファージ及び単球である大きな白血球は、一般的に20ミクロンよりも大

50

きくないサイズを有する。孔のサイズは、孔密度に非常に密接に適合されるべきであり、そしてフィルター材料は、希少細胞の収集を可能にする孔間でなければならないので、 1 cm^2 あたり $0.5 \sim 2.0 \times 10^5$ の孔の範囲で存在する。

【0120】

腫瘍細胞サイズ。定義による腫瘍細胞は、それらはタンパク質を生成し、そして増殖できるので、「休止細胞」(resting cells)ではなく、従って、それらのクロマチンは開放されており、そして大多数(数として)の白血球であり、そして従って腫瘍細胞よりも小さい、成熟リンパ球及び成熟好中球のような成熟白血球のクロマチンのように決して圧縮されない。個々の腫瘍細胞サイズは、腫瘍型に依存して、 $10\text{ミクロン} \sim 50\text{ミクロン}$ 又はそれ以上に変化することができる。小細胞肺癌(SCLC)由来の腫瘍細胞のサイズ：リンパ球のサイズの $1.5 \sim 3$ 倍($12 \sim 24\text{ミクロン}$)、非小細胞肺癌(NSCLC)由来の腫瘍細胞のサイズ：リンパ球のサイズの3倍以上(24ミクロン)。腫瘍微小塞栓サイズは一般的に、 100ミクロン よりも大きい。

10

【0121】

濾過の利点。濾過による希少細胞の抽出又は単離は、他の抽出/単離方法よりもいくつかの利点を有する：

それは、非常に高い感度で希少細胞の単離、例えば 1 ml の血液において、濾過の前に、スパイクされ得、従って数百万の白血球及び数十億の赤血球と共に混合され得る1個の希少細胞の収集を可能にする。

【0122】

それは、希少細胞により発現される抗原から独立して希少細胞の抽出又は単離を可能し、従って希少細胞の損失を導く分離のバイアスの回避を可能にする。

20

【0123】

それは、形態学的、免疫標識、in situ分子分析、及び他の非希少細胞の妨害なしでの分子分析を包含する、希少細胞の多重分析を促進する。

【0124】

それは、それらの多重分析、例えば形態学的、免疫標識、in situ分子分析、及び他の非希少細胞の妨害を有さない分子分析を容易にする、単離された希少細胞の純度の調節を可能にする。

【0125】

それは、単一細胞又は単一細胞群として、又は追加の分子分析のために残留する非希少細胞と共に混合される細胞として、個々の希少細胞の収集を可能にする。

30

【0126】

それは、数百万の白血球及び数十億の赤血球を除くことにより、希少細胞の検出及び計数を高速化する。

【0127】

それは、さらなる分析のために固定された又は新鮮な細胞の抽出又は単離を可能にする。

【0128】

濾過の他のモード。種々の濾過モードが、それらが他の種類の細胞からの希少細胞の単離、及び/又はさらなる分析のためにフィルター上への希少細胞の積層化を可能にする限り、使用され得る。例えば、フィルターを通過する他の種類の細胞から希少細胞を分離するための力は、重力、正又は負の圧力、又は遠心力であり得る。

40

【0129】

サンプルの前処理。生物学的サンプルは、赤血球を溶解するために使用される剤、例えばサポニン、塩化アンモニウム、溶菌抗体、低張液、抗凝固剤、例えばEDTA、ヘパリン、クマジン、その他のビタミンK拮抗薬、第Xa因子拮抗薬、トロンピン阻害剤;アスピリン(サリチル酸)、血小板凝固を妨げる他の剤(http://en.wikipedia.org/wiki/Antiplaquet_drug, 2013年、5月21日にアクセスされた)、粘液溶解薬及び固定剤(下記を参照のこと)により、濾過の前及び/又は後、希釈され、そして/又は処理され得

50

る。

【0130】

濾過により生物学的サンプルから抽出された又は単離された希少細胞は、固定された細胞又は新鮮細胞であり得る。濾過により生物学的サンプルから抽出された又は単離された、固定された又は新鮮細胞は、分析、分子分析又は培養のために、スライド、ペトリ皿、ウェル又は試験管又は他の支持体を非排他的に包含する支持体に移転され得る。支持体へのフィルターからの細胞の移転は、収集及び/又は離脱手段及び/又は緩衝液を用いることにより得られる。例えば、フィルターからのすべての細胞を、スライド又は固体支持体に移転し、そして希少細胞の損失を回避するために、市販の接着剤スライド、例えばSuperFrost Ultra Plus (登録商標) slides or Clearcell (登録商標) 及びAdcell (登録商標) BioAdhesion Slidesを使用し、そして/又はフィルターへの細胞の付着を防ぐ剤、例えばシリコン処理剤、例えばSigmacote (登録商標) 又は類似物により、濾過の前に、フィルターを処理することが可能である。フィルター上に収集されるすべての細胞を、スライド又は何れか他の支持体に移転し、そして希少細胞の損失を回避するために、フィルターの裏、従って細胞に付着しないスライドに適用される溶液による移転を助けることがまた可能であり、そしてフィルターから細胞を離脱するであろう固体表面の方への孔を通しての緩衝液の流束を創造し、その結果、それらはスライド又は他の固体支持体に付着できる。スライド又は他の固体支持体へのフィルター上に集められた細胞及び希少細胞の移転のこの工程はまた、フィルターの裏に適用される正の空気及び/又は液体圧力を用いることにより改善され得る：空気及び/又は液体は、孔を通過し、そして細胞のスライド又は他の固体支持体への移転を助けるであろう。フィルターからの細胞及び希少細胞を離脱し、そしてスライド又は固体支持体にそれらを移転するそれらのすべてのプロトコルは、フィルター上の細胞が乾燥されない場合、従って、移転が濾過後すぐに行われる場合、良好に作動するであろう。

10

20

【0131】

濾過による固定された細胞の抽出又は単離は、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、RCL2、水銀、例えばB5及びツェンカー固定液、メチルアルコール、エチルアルコール、ピクリン酸塩、例えばブアン液、リゴ固定液、等を、非排他的に含んで成る固定剤を用いて、濾過の前に、それらの細胞を固定することにより実施される。

30

【0132】

濾過による生物学的サンプルから抽出された又は単離された新鮮希少細胞は、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、RCL2、水銀、例えばB5及びツェンカー固定液、メチルアルコール、エチルアルコール、ピクリン酸塩、例えばブアン液、リゴ固定液等を、非排他的に含んで成る固定剤を用いて、濾過の後、固定され得る。

【0133】

希少細胞の培養。生物学的サンプルから抽出された又は単離された希少細胞は、それらの数を増やすために、及びそれらの検出及び/又は診断及び/又は特徴付けを促進するために培養され得る。培養プロトコルは、希少細胞の純度を高めるために、非希少細胞の増殖に対する希少細胞の増殖を選択的に刺激する手段を包含することができる。非希少細胞の増殖に対する希少細胞の増殖を選択的に刺激する手段は、希少細胞の増殖を刺激する特定の増殖因子及び/又は剤、他の細胞型との希少細胞の同時培養及び/又は希少細胞の増殖を助けるフィルダー層の使用、及び非希少細胞の増殖及び/又は生存性を阻止する手段、例えば阻害抗体、細胞周期のブロッカー、プロアポトーシス因子、siRNA、及び非希少細胞の増殖及び/又は排除のブロックを得るためにそれらの希少細胞を特異的に標的とする任意のタイプの薬物を、非排他的に包含する。

40

【0134】

希少細胞の特徴付け。希少細胞検出及び/又は診断及び/又は特徴付けは、細胞形態及び/又は免疫標識及び/又は分子分析を通して得られる。細胞形態及び/又は免疫標識分

50

析は、損なわれていない細胞、すなわち原形質膜及び/又は細胞質限界、及び/又は核限界が認識できる細胞に対して、in situで実施される。

【0135】

細胞形態分析は、ヘマトキシリン及び/又はエオシンによる染色、メイグリュンワルド及び/又はギムザ染色、パパニコロー染色、フォイルゲン染色及びすべてのタイプの染色、及び細胞形態学的詳細を分析し、そして細胞成分を分析し、そして/又は定量化することを目的とする化学論的染色を、非排他的に包含する。細胞形態分析は、PAS、スーダン、アルシアンブルー染色、カルシウム、脂質、多糖類、酵素及び他の分子を、非排他的に包含する細胞成分を明らかにすることができる酵素及び非酵素方法を、非排他的に包含する細胞化学分析を、非排他的に包含する。免疫標識は、上皮抗原、間葉抗原、器官特異的抗原、腫瘍特異的抗原、胎児特異的抗原は、幹細胞特異的抗原、転写因子、変異タンパク質及び任意のタンパク質及び/又はペプチド、及び/又はこの検出が細胞同定及び/又は診断及び/又は特徴付けを助けることができる細胞成分に対する抗体を、非排他的に包含する抗体により、細胞成分を標識することを、非排他的に包含する。免疫標識はまた、免疫細胞化学、免疫蛍光、免疫-PCR、及び免疫学的リンク及び細胞標的物を明らかにするために使用される手段に結合される抗体を通して細胞構造のすべてのタイプの標識を、非排他的に包含する。

10

【0136】

FISH(蛍光in situハイブリダイゼーション)、PRINS(プライムされたin situ標識)、TUNEL(末梢デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニック末端標識)、免疫PCR、PNA(ペプチド核酸)、in situPCR、及び分子プローブを非排他的に用いる他の方法を、非排他的に包含する分子分析は、損なわれていない細胞に対して、in situで実施され得る。

20

【0137】

in situ染色及び/又は免疫標識、及び/又はin situ分子分析の後、希少細胞のイメージ分析が実施され得、そしてイメージは、細胞溶解を示唆する、さらなる希少細胞分子分析の前に、情報を得るために保存され、そして/又は移され得る。

【0138】

PCR、逆転写酵素-PCR、リアルタイムPCR、デジタルPCR、全ゲノム増幅、配列決定、高処理配列決定、キャスト-PCR、コールドPCR、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)、CGHアレイ、マイクロアレイ分析、メチル化分析、多型分析、等を、非排他的に包含する分子分析は、DNA、RNA、マイクロRNA及びタンパク質分子を非排他的に包含する分子成分を分析するために、その構造が破壊され、そして/又は溶解された細胞に対して行われ得る。

30

【0139】

PCR、逆転写酵素-PCR、リアルタイムPCR、デジタルPCR、全ゲノム増幅、配列決定、高処理配列決定、キャスト-PCR、コールドPCR、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)、CGHアレイ、マイクロアレイ分析、メチル化分析、多型分析、等を、非排他的に包含する分子分析は、個々の細胞、又は個々の細胞群、又は生物学的サンプルから濾過を通して抽出された又は単離されたすべての細胞を標的とすることができる。

40

【0140】

形態学的基準及び/又は免疫標識に従って同定された個々の細胞又は細胞群に対する標的化された分析は、目的の細胞を含むフィルター部分、又は支持体への移転後の細胞のレーザー顕微解剖、続いて細胞タンパク質の溶解、及び細胞DNA(ゲノム及び/又はミトコンドリアDNA)、RNA、マイクロRNA及びタンパク質分子の分子分析を用いることによって実施され得る。他方では、濾過により抽出された又は単離された希少細胞は、フィルターから分離され得、そして形態学的基準及び/又は免疫標識に従って同定された個々の細胞又は細胞群は、磁場(磁場に基づいてのシリコン生物システム又は他の方法)により、又は手動又は自動毛管マイクロピペットにより単離され得る。他方では、濾過によ

50

り抽出された又は単離されたすべての細胞は、フィルター上で、又は支持体への移転の後、適切な緩衝液を用いることにより溶解され、PCR、逆転写酵素-PCR、リアルタイムPCR、デジタルPCR、全ゲノム増幅、配列決定、高処理配列決定、キャスト-PCR、コールドPCR、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)、CGHアレイ、マイクロアレイ分析、メチル化分析、多型分析、等を、非排他的に用いることにより、それらのDNA(ゲノム及び/又はミトコンドリアDNA)、RNA、マイクロRNA、又はタンパク質分子分析が行われ得る。

【0141】

非侵襲性治療診断。他の側面の中で、本発明は、血液からの循環腫瘍細胞の単離、及び非侵襲性治療診断のためのそれらの使用を可能にする。治療診断は、特定の「標的化された」(targeted)治療の処方を書くためへの診断結果の使用である。それらの手順は、応答するか否か、所定の治療に対するそれらの感受性を予測するために、腫瘍細胞に存在する特定の分子バイオマーカーを利用する。癌治療は高価であり、そしてしばしば、毒性であるので、治療診断は、患者への悪影響のために医療費負担を最小限にすることが重要である。治療診断バイオマーカーは現在、一次腫瘍及び転移組織において見出される。しかしながら、一次腫瘍下での腫瘍細胞は遺伝的に不均一であり、そして生検は最適な標的治療法を設定するために有用な遺伝子情報を担持する腫瘍細胞クラスターを見逃していることが示されている。転移は、より良好な基準であると思われるが、しかしそれらの生検を得ることは困難である。実際、癌患者の物理的な条件が、それらの侵襲処置にリンクされる高罹患率のために、侵襲性アプローチ(手術又は生検)を通して一次腫瘍又は転移からサンプルを得ることを妨げる。さらに、腫瘍細胞の遺伝的特徴は、標的治療を逃れる新規の「腫瘍細胞変異体」を検出するために、治療の間、それらに従うことを標的治療の圧力下で変更することができる。しかしながら、癌細胞の遺伝的特徴の侵襲性追跡調査は、関連する罹患率のために、臨床的状況下で、実行不可能である。最後に、介入の前に、腫瘍量を低め、そして腫瘍を良好に除去するために手術前に目的の標的療法を適用するために、特定患者の腫瘍細胞の遺伝的特性を非侵襲的に研究することが有用である。

10

20

30

【0142】

標的治療は現在、多くの一般的な癌(乳癌、肺癌、結腸直腸癌、等)のために利用でき、そして症例に比例してのそれらの有効性を示している。しかしながら、腫瘍応答の実証された予測因子の不在下で、それらの高価な標的療法は、比例しての恩恵を伴わないで関連する費用の大幅な増加を伴って、大多数の患者に処方されるか、又は処方されず、患者へのそれらの療法からの恩恵が妨げられる。

【0143】

従って、治療診断バイオマーカーの実施は、印象的な治療改善を導くことが予測される。しかしながら、腫瘍組織(一次腫瘍、転移)に向けられる治療診断は、衰弱した患者において実施され得ず、非常に費用がかかり、そしてしばしば、不完全なデータを提供する侵襲性(外科的又は半外科的)手順を意味する。従って、非侵襲的に得られる腫瘍細胞及び腫瘍微小塞栓の分析は、臨床腫瘍学において最も重要なものである。

【0144】

希少細胞の遺伝的特徴付け。腫瘍細胞の遺伝的特徴付けに基づく情報は、循環腫瘍細胞(CTC)、循環腫瘍微小塞栓(CTM)、及び生物学的流体(尿、腹水、精液、脳脊髄液(CSF)、唾液、痰、等)から収集された腫瘍細胞から、非排他的に得られる。

40

【0145】

腫瘍細胞の遺伝的特性を研究する方法は、検出される遺伝的異常に従って変化する。それらは、目的の遺伝子又は配列、及び/又は全エキソーム(exome)又は全ゲノム/トランスクリプトーム配列に標的化された、細胞学、細胞化学、免疫細胞化学分析、FISH、PRINS、免疫PCR、DNA及びRNA抽出及び分析に依存することができる。

【0146】

いくつかの治療診断バイオマーカーは、非小細胞肺癌(NSCLC)及び大腸癌について特に検証されて来た。上皮成長因子受容体(EGFR)は、膜受容体チロシンキナーゼ

50

である。EGFRの過剰発現又は過活性が、多くの癌に見られる。EGFR変異は、NSCLCを有するすべての患者の10%~15%で、及びEGFRチロシンキナーゼ阻害剤、例えばゲフィチニブ(AstraZeneca)又はエルロチニブ(Roche)に対して臨床学的に应答する患者の80%で検出される。既知のEGFR変異は、EGFRチロシンキナーゼドメインのエキソン18~21に位置する変異を包含する。それらの変異は、特に肺癌において十分に記載されている。L858R変異又はエキソン19欠失変異を有する一次腫瘍の患者は、野生型KRAS腫瘍を有する患者よりも、EGFR阻害剤に対して良好な应答を有する[13]。L858R変異及びエキソン19欠失変異は、最も頻繁なEGFR変異の中で、それぞれ、すべてのEGFR変異の約43%及び48%の頻度で肺腫瘍に存在する(<http://www.mycancergenome.org>, 2013年、5月21日にアクセスされた)。

10

【0147】

KRAS(V-Ki-ras2 Kirstenラット肉腫ウィルス癌遺伝子相同体としても知られている)は、内膜に位置する21kDaのGTPアーゼをコードする。このタンパク質は、EGFRの上流のシグナルトランスダクション経路のコア成分である。KRAS変異は、肺腺癌の15-25%で発生する(<http://www.mycancergenome.org>, 2013年、5月21日にアクセスされた)。KRASのより頻繁な変異が、KRASキナーゼ活性の構成的活性かをもたらす。点突然変異は、KRAS遺伝子のエキソン2におけるコドン12(すべてのKRAS変異の82%)及び13(すべてのKRAS変異の17%)で発生する。標準的配列決定は、すべてのコドン12及び13の変異を1つの試験で検出する(G12C:c34G>T, G12R:c34G>C, G12A:c35G>C, G12D:c35G>A, G12V:c35G>A, G12S:c34G>A, G13C:c37G>T, G13D:c38G>A)。

20

【0148】

野生型KRASは、NSCLC患者におけるEGFR阻害剤の効力のために必要とされる[13]。野生型KRASはまた、転移性結腸直腸癌の患者における抗-EGFR治療抗体(Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb, Merck Serono)の効力のために必要とされる「14, 15」。コドン61及び146における変異がまた報告されているが、しかしそれらは、マイナーな割合のKRAS変異(1~4%)を表し、そしてそれらの臨床関連性は不明のままである[15]。

30

【0149】

最近、KRAS変異を有するNSCLC患者は、効果的な治療法を有さない。Ganetespib(Synta Pharmaceuticals)は、第III相臨床試験を継続中であるシャペロンHsp90の小分子阻害剤である。第II相試験は、単剤療法として週1度、投与されるganetespibによる処置の8週間後で、KRAS-変異体NSCLCを有する患者の60%以上で、腫瘍の収縮を示した(International Association for the Study of Lung Cancer, 14th World Conference on Lung Cancer)。

【0150】

より最近では、末分化リンパ腫キナーゼ(ALK)(2p23)及び棘皮動物微小管関連タンパク質様-4(EML4)(2p21)遺伝子を包含するゲノム変化が、下位組の肺癌患者に同定された。それらの患者は、ALK小分子阻害剤Crizotinib(Pfizer)に対する卓越した好反応を有する[16, 17, 18, 19]。実際、Crizotinibが現在、第III相臨床試験下で試験され、そして第II相試験の予備結果が、ALK再配置肺腫瘍において印象的な90%の病勢制御率を明確にした[20]。この再配置は、EGFR及びKRAS関連変異を有さないほとんどのシリーズ、特に後期腺癌において、NSCLCの1~7%に見出された[21]。

40

【0151】

2種の他の卓越した治療診断バイオマーカーが、他のタイプの癌において検証されている。ヒト上皮成長因子受容体-2(HER2)は、細胞膜表面-結合受容体チロシンキナーゼであり、そして通常、細胞増殖及び分化を導くシグナルトランスダクション経路に包含される。HER2遺伝子座は、乳癌の20~30%で増幅され、そしてこの増幅の存在

50

は、標的療法トラスツズマブ（抗 - H E R 2、R o c h e）に対する腫瘍応答の指標である [2 2]。

【 0 1 5 2 】

Zelboraf (Roche) は、V - r a f マウス肉腫ウイルス癌遺伝子相同体 B 1 (B R A F) 遺伝子 V 6 0 0 E 変異を有するメラノーマ患者の治療のために食品医薬品局 (F D A) により最近、承認された非常に効果的な薬物である。この変異はまた、肺癌患者の 1 % で存在するので、肺癌患者は、将来的にこの薬の対象となって来ている。臨床試験により検証された又は進行中の他の治療診断バイオマーカーは、次のものを包含する：

- 乳癌及び卵巣癌：E R、P R、B R C A 1、B R A C 2
- 消化管癌：c - k i t、C D C 4、p 5 3
- 非小細胞肺癌：R O S 1、H E R 2、F G F R、P D G F R A、V E G F R、P I 3 K
- M T O R、M E K、S T A T 3、A K T、R E T 融合体
- 前立腺癌：組換え T M P R S S 2 / E R G。

10

【 0 1 5 3 】

腫瘍細胞の非侵襲性治療診断分析に関しては、本発明により処方される現在の未解決問題は次のものである：

腫瘍細胞は、それらの損失を回避するために、及び最大の純度を伴って、すなわち最少の汚染性非腫瘍細胞を伴って（分子分析により得られる異なった負の結果を回避するために）、非常に敏感な態様で、生物学的サンプルから抽出されるか、又は単離されるべきである。

20

【 0 1 5 4 】

さらに、非侵襲的に得られる腫瘍細胞は、希少な、低く表される材料であり；さらに、それらは非侵襲治療診断試験として使用されるために、いくつかの分析及び分子分析の対象である必要がある。それらの未解決問題は、臨床腫瘍学における非侵襲性治療診断試験の開発及び広範な適用を妨げる。本発明は、次の段階を包含する工程を介して、上述の問題に対する解決策を記載する：

(i) 材料（ポリカーボネート、P E T、等）、厚さ、孔サイズ及び孔密度の特徴が、単離される腫瘍細胞の型及び数に、及び非侵襲的に腫瘍細胞及び腫瘍微小塞栓を単離するために処理される生物学的流体に特異的に合わせて調整される膜を用いることによる生物学的サンプルの濾過。

30

【 0 1 5 5 】

(i i) 細胞学的染色、免疫染色、F I S H、T u n e l、P R I N S、免疫 P C R、及び治療診断試験として細胞溶解なしで実施される任意のタイプの分析による単離された細胞の染色 / 標識。

【 0 1 5 6 】

(i i i) 細胞イメージの走査及び高密度記録を包含する、染色された / 標識された細胞のイメージ分析。イメージは、診断目的のために分析され、貯蔵され、そして / 又は診断工程において助ける専門家に情報的に移され得る。

40

【 0 1 5 7 】

(i v) 非侵襲的に集められた新鮮な又は固定された細胞の腫瘍細胞 - 標的化溶解。標的化アプローチは、レーザー捕獲顕微解剖 (L C M) 段階を包含する。L C M は、濾過による単離の後、単一の腫瘍細胞（又は腫瘍細胞群）の単離を可能にする。この方法は、純粋腫瘍 D N A の遺伝子分析への取り組みを可能にする。腫瘍細胞は不均一であり、そして正常組織（組織中の、及びフィルター上の）と共に混合されるので、L C M は現在、C T C の集団間の変異体 C T C の百分率を評価するための利用できる方法である。L C M に変わるものとして、顕微操作システム、D E P A r r a y (Silicon Biosystem) 又は Cell Selector (A L S) が存在する。溶解の後、細胞は、D N A 及び / 又は R N A 及び / 又はタンパク質分析を受ける。

【 0 1 5 8 】

50

(v) 非変異配列と共に混合される変異配列を標的化する分子分析(冷PCR、Cast PCR、等)を包含するそれらの分子(RNA、DNA及び/又はタンパク質)分析のために濾過により抽出された又は単離されたすべての固定又は新鮮細胞の非標的化溶解。

【0159】

(vi) 1又はいくつかのバイオマーカーに標的化されるか、又は全エクソン又はゲノム配列に適用されるRNA、DNA及び/又はタンパク質に対処される治療診断分子分析。

【0160】

この方策の利点は、以下の通りである：

(a) 最大の感度及び純度を伴って、及び免疫標識に基づく及び/又はマーカーに基づく捕獲システムに由来する、希少細胞の選択のバイアスの不在下で、生物学的サンプルから希少細胞を単離するための最適化されたアプローチ。

【0161】

(b) 非侵襲的に収集された同じ希少細胞に対して、いくつかの診断及び/又は予後及び/又は治療診断分析を実施する可能性。例えば、肺癌患者においては、非侵襲的に収集された同じ細胞から、ALK分析(FISH)、及びKRAS及びEGFR分子分析(細胞溶解後のDNA分析)の結果を得ることが可能であろう。例えば、感染性疾患の患者においては免疫系の細胞、例えば活性化されたリンパ球、又は単球及びマクロファージから、細胞内ウイルス(HIV、等)又は微生物学的剤(シゲラ(Shigella)、TBC菌(TBC bacillus)、リーシュマニア(Leishmania)、等)に対して特異的なFISH分析の結果、及び感染剤に対して特異的なDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質分析の結果を得ることが可能であろう。

【0162】

例えば、妊婦においては、単離された胎児希少細胞から、雄胎児細胞の存在を分析し、そして変異分子の存在又は不在、従って胎児性遺伝的障害の存在又は不在を示す、溶解された細胞に対して実施されるDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質変異分析を得るために、細胞病理学的及び/又は免疫標識及び/又はin situ分子分析(Y特異的プローブによるFISH又はPRINS)の結果を得ることが可能である。

【0163】

(c) 濾過により抽出された又は単離された腫瘍細胞又は他の希少細胞の存在、又は不在、及び数についての診断及び/又は予後及び/又は治療診断情報入手し、そして分析される生物学的サンプルの希少細胞中のDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質変異の存在又は不在、及び病理学的DNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質分子の存在又は不在についての診断及び/又は予後及び/又は治療診断情報の入手を可能にする細胞溶解に進む前、細胞病理学及び/又は免疫標識及び/又はin situ分子分析のイメージを貯蔵する可能性。

【0164】

例えば、癌患者においては、腫瘍細胞の存在を診断し、そしてin situ免疫学的及びin situ分子分析によりそれらを特徴付け、そして溶解された細胞に対して実施されるDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質変異分析を得るために、非侵襲的に収集された同じ腫瘍細胞から、細胞病理学及び/又は免疫標識及び/又はin situ分子分析の結果の貯蔵されたイメージを得ることが可能であろう。

【0165】

例えば、感染性疾患を有する患者においては、感染された細胞の存在を診断し、そしてそれらを、in situ免疫学的及びin situ分子分析により特徴付け、そして感染剤の分子の存在又は不在、従って感染剤の存在又は不在及び数を示すであろう、溶解された細胞からDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質分析入手するために、単離された希少細胞から、細胞病理学的及び/又は免疫標識及び/又はin situ分子分析の結果の貯蔵されたイメージを、非侵襲的に入手することが可能であろう。

10

20

30

40

50

【0166】

例えば、妊婦においては、胎児細胞の存在を診断し、そしてin situ免疫学的及びin situ分子分離により、それらを特徴付け、そして変異分子の存在又は不在、従って胎児遺伝子性疾患の存在又は不在を示す、溶解された細胞に対して実施されるDNA及び/又はRNA及び/又はタンパク質変異分析を入手するために、単離された胎児希少細胞から、細胞病理学的及び/又は免疫標識及び/又はin situ分子分析の結果の貯蔵されたイメージを、非侵襲的に入手することが可能であろう。

【0167】

それらの利点は、希少細胞を標的化し、そして非侵襲性治療診断分析のための工程を含んで成る任意の方法によっては、現在、提供されない。

10

【実施例】

【0168】

実施例1：濾過により血液から富化された新鮮な固定されていない腫瘍細胞の多重分析濾過。新鮮な腫瘍細胞を、公開された米国特許出願第2009-0226957号に記載のように、濾過により血液から抽出し、そして富化した。

【0169】

抽出された、非固定細胞を染色し、それらの形態を決定し、そしてそれらの核酸を抽出し、そして全ゲノム増幅の後、RT-PCR又はPCRにより分析した。

【0170】

血液から腫瘍希少細胞を抽出し、そして富化するために、血液サンプルを、赤血球細胞溶解のための緩衝液を用いて、20倍に希釈する。溶解を、穏やかな攪拌下で、5分間、室温で進行せしめる。

20

【0171】

次に、処理された血液サンプルを、すぐに、-6ミリバールの圧力下で濾過する。約200µlの溶液がウェルに残るように、濾過が完全に完了する前、濾過を停止する。

【0172】

富化された新鮮腫瘍細胞材料を、1mlの細胞培養培地(DMEM HEPES 1%ウシ胎児血清)を、ピペットで3度、軽く採取することにより集める。

【0173】

次に、集められた材料を、1000rpmで5分間、遠心分離し、そして上清液を注意して除く。ペレットを、細胞培養培地に再懸濁する。

30

【0174】

次に、抽出された細胞を、DMEM 10%ウシ胎児血清を用いて培養することができる。次に、抽出された又は培養された細胞を用いて、機能的アッセイを行い、例えば増殖アッセイ又は付着アッセイにより、分泌されたタンパク質について試験することができる。

【0175】

個々の腫瘍細胞を、(i)単純な細胞サイズ基準又は免疫標識に基づいて顕微鏡下で(マイクロ)ピペットを用いて；又は(ii)細胞ソーター、例えばDEParray (Silicon Biosystems)を用いて、単離できる。

40

【0176】

単一細胞を単離した後、DNA及び/又はRNAレベルでの核酸の分子分析を進めることができる。

【0177】

DNA分析。新鮮な単一細胞のDNA分析のために、細胞を、3-10µlの溶解緩衝液(100mモル/Lのトリス-HCl、pH 8;400µg/mLのプロテイナーゼK)を用いて、15分間、溶解する。プロテイナーゼKは、94で15分間、不活性化される。

【0178】

他方では、細胞を、熱安定性プロテイナーゼ、例えばprepGem (ZyGem)及びその関連す

50

る緩衝液（Gold緩衝液）を用いて、75℃で5分間、溶解し、続いて95℃で5分間、不活性化する。新鮮な単一細胞からのDNAの下流プロセッシングは、実施例Xに記載される固定された、顕微解剖された細胞のその1つと同一である。

【0179】

RNA分析。RNA分析のために、新鮮又は固定細胞、又は新鮮又は固定単一細胞を、400mMのトリス-HCl pH8、1000µg/mlのプロテイナーゼK及び2.5UのRNAアーゼ阻害剤を含む緩衝液に溶解する。逆転写のために、溶解された細胞からのRNAを、70℃で10分間、変性する。逆転写を、10単位のMMLV、10単位の阻害剤、ランダムプライマー、dNTP、及び酵素と共に供給される1×濃度の逆転写緩衝液の溶液40µlにおいて実施する。反応を典型的には、室温で15分間、及び42℃で30分間インキュベートする。次に、酵素を70℃で10分間、不活性化し、そして氷上で急冷し、その後、市販のキット（Life Technologies, Illumina）を用いて、PCRによる転写体-特異的増幅又は全cDNA増幅を行う。

10

【0180】

特定の例によれば、ALK遺伝子組換えは、Taqmanアッセイ（hs03654556、Hs03654557、Hs03654558、Hs03654560、Hs03654559、Life technologies）を用いて、又は標準PCRにより検出され得る。EML4-ALK組換え転写体3a及びb変異体の検出においては、次のプライマーを用いてことができる：

前方向プライマー：5'-GCATAAGATGTCATCATCAACCAAG-3'（配列番号1）

逆方向プライマー：5'-TCTTGCCAGCAAAGCAGTAGTTGG-3'（配列番号2）

20

【0181】

腫瘍細胞を、上皮マーカーに対する抗体、及び/又は治療診断のために重要なタンパク質（HER2、ALK、等）に対する抗体を用いて、多重免疫標識により同定する。循環腫瘍細胞を標的化する分析は、細胞切断モジュール（MMI, Zurich, Switzerland）を備えたNikon TE 2000U（Nikon Paris, France）を用いて、単一細胞レーザー捕獲顕微解剖（LCM）の後、可能にされる。

【0182】

顕微解剖された各細胞を、2~15µlの溶解緩衝液（100mMのトリス-HCl、pH8；400µg/mlのプロテイナーゼK）に溶解することができる。プロテイナーゼKを、94℃で15分間、不活性化する。他方では、前記細胞を、熱安定性プロテアーゼ、例えばprepGem（ZyGem）及びその関連緩衝液（Gold緩衝液）を用いて、75℃で15分間、溶解し、続いて95℃で5分間、不活性化する。

30

【0183】

WGAを、プライマー伸長前増幅（PEP）又は市販キット（Rubicon Genomics, Sigma, Qiagen, Silicon Biosystems）を用いて、実施できる。

【0184】

プライマー伸長前増幅（PEP）のために、ランダムプライマー（genPEP）の400µM溶液5µl、15mMのMgCl₂を含む10×PCR緩衝液（Life technologies）10µl、4種のdNTP（それぞれ、2mM）の混合物0.6µl、及び1µl（5U）のTaqポリメラーゼ（Life technologies）を、60µlの最終体積で、溶解された細胞に添加する。

40

【0185】

Rubicon GenomicsからのPicoPLEXを用いてのWGAのために、5µlの前増幅カクテルを最初に、溶解された細胞（合計体積15µl）に添加し、そして前増幅を、その製造業者の説明書に従って実施する。

【0186】

次に、60µlの増幅カクテルを添加し、そして増幅を、その製造業者の説明書に従って実施する。WGA生成物を、Zymo Research D4014キットを用いて、その製造業者の説明書に従って精製することができる。

【0187】

50

遺伝子 - 特異的増幅を、10 mMのトリス - HCl 6 μ l、50 mMのKCl、1.5 ~ 2.5 mMのMgCl₂、200 μ Mの各デオキシヌクレオチド、0.5 μ lのプライマー及び2 UのTaq Gold (Life technologies)を含む溶液60 μ l下で実施する。2 μ lのPCR product生成物を、「内部」遺伝子 - 特異的プライマー及び同じPCRプロトコルを用いて、20 μ l下で再増幅した。

【0188】

PicoPLEXからのWGA生成物を用いて、ネステッドPCRは、すべての遺伝子について必要ではないかも知れない。さらに、それらのWGA生成物は、高処理配列決定及びCGHマイクロアレイ分析と適合できる。

プライマー配列及びサイクリング条件は、下記表1に示される：

【0189】

【表1】

表1：プライマー配列及びサイクリング条件

プライマー	配列	特異的条件
KRAS OUT 前方向	AAAAGGTAAGTGGAGTATTTGA (配列番号3)	58℃で30秒間のアニーリング 2 mMの MgCl ₂
KRAS OUT 逆方向	TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC (配列番号4)	
KRAS IN 前方向	GTATTAACCTTATGTGTGACA (配列番号5)	58℃で30秒間のアニーリング 2 mMの MgCl ₂
KRAS IN 逆方向	GTCCTGCACCAGTAATATGC (配列番号6)	
BRAF-OUT 前方向	TTAGATCTCTTACCTAAACTCTCA (配列番号7)	55℃で30秒間のアニーリング 2.5 mM MgCl ₂
BRAF-OUT 逆方向	TCAGGGCCAAAAATTTAATCA (配列番号8)	
BRAF-IN 前方向	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG (配列番号9)	60℃で30秒間のアニーリング 2.2 mMの MgCl ₂
BRAF-IN 逆方向	CCACAAAATGGATCCAGACA (配列番号10)	
EGFR-エクソン 19- 前方向	TGC CAG TTA ACG TCT TCC TT (配列番号11)	61℃で30秒間のアニーリング 2.2 mMの MgCl ₂
EGFR-エクソン 19- 逆方向	CAG GGT CTA GAG CAG AGC AG (配列番号12)	
EGFR-エクソン 20- 前方向	CAT TCA TGC GTC TTC ACC TG (配列番号13)	55℃で30秒間のアニーリング 2.2 mMの MgCl ₂
EGFR-エクソン 20- 逆方向	TTA TCT CCC CTC CCC GTA TC (配列番号14)	
EGFR-エクソン 21- 前方向	CTT CCC ATG ATG ATC TGT CC (配列番号15)	60℃で30秒間のアニーリング 2.2 mMの MgCl ₂
EGFR-エクソン 21- 逆方向	GCTGCGAGCTGACCCAGAATGTCTGG (配列番号16)	
VHL-エクソン 1- パート1-前方向	GCGGTTCCATCCTCTAC (配列番号17)	55℃で30秒間のアニーリング 2.5 mM のMgCl ₂
VHL-エクソン 1- パート 1-逆方向	GGCCTCCATCTCCTCCTC (配列番号18)	
VHL-エクソン 1- パート 2-前方向	GAGTACGGCCCTGAAGAAGA (配列番号19)	30秒間タッチダウン (65~60 ℃) によるアニーリング 2.5 mMの MgCl ₂
VHL-エクソン 1- パート 2-逆方向	CCGTCGAAGTTGAGCCATAC (配列番号20)	
VHL-エクソン 1- パート 3-前方向	GCCGAGGAGGAGATGGAG (配列番号21)	54℃で30秒間のアニーリング 2.5 mMの MgCl ₂
VHL-エクソン 1- パート 3-逆方向	GCTTCAGACCGTGCTATCGT (配列番号22)	
VHL-エクソン 2- 前方向	ACCGGTGTGGCTCTTTAACA (配列番号23)	56℃で30秒間のアニーリング 2.5 mMの MgCl ₂
VHL-エクソン 2- 逆方向	TCCTGTACTTACCACAACAACCTT (配列番号24)	
VHL-エクソン 3- 前方向	GCCACTGAGGATTTGGTTTT (配列番号25)	58℃で30秒間のアニーリング 2.5 mMの MgCl ₂
VHL-エクソン 3- 逆方向	CAAAAGCTGAGATGAAACAGTG (配列番号26)	

【0190】

遺伝子 - 特異的 PCR の後、遺伝子の変異状態を、従来の配列決定、フラグメント分析、SNPアッセイ (Iaqmanアッセイ)、COLD-PCR、キャストPCR、又はHRM分析を用いて決定する。

【0191】

分子分析または、濾過スポット上に存在するすべての細胞の溶解の後、レーザー捕獲顕微解剖なしで実施され得る。希少細胞富化及び純度を、定義される希少細胞の純度を高めるよう適合された孔密度を有するフィルターを用いて改善することができる。

【0192】

白血球からの野生型DNAと共に混合される腫瘍細胞DNAを、少なくとも45µlの体積で、タンパク質溶解の後、集める。抽出されたDNAを、いくつかのWGA反応に分割するか、又は1つのWGA反応のために精製し、そして使用することができる。

【0193】

単一細胞に関して、WGAを、プライマー伸長前増幅(PEP)又は市販のキット(Rubicon Genomics, Sigma, Qiagen, Silicon Biosystems)を用いて、実施することができる。

【0194】

WGAの後、敏感な遺伝子変異-特異的アッセイを用いて、非変異DNA間の変異DNAの存在を評価することができる。これは、異なった方法、例えばデジタルPCR、COLD-PCR又はキャスト-PCRを用いて達成され得る。

【0195】

キャスト-PCRの場合、2µlの精製されたWGA DNA(約20ngのDNA)が、典型的な20µlのキャスト及び反応に使用され得る。

【0196】

実施例2：循環腫瘍細胞の遺伝学的特性化及び循環腫瘍細胞における、治療診断変異の検出：

肺癌。好ましい実施の形態によれば、希少細胞を、肺癌患者の血液から、濾過により単離し、腫瘍細胞を、細胞形態分析により、単離された希少細胞間で同定し、そしてALK特異的抗体及び分子プローブにより特徴づけることができる。

【0197】

ALK-遺伝子再配置、肺腺癌患者からの循環腫瘍細胞及び腫瘍組織に対する比較分析
この作業の目的は、1)肺腺癌を有する87人の患者においてISETにより単離された、悪性細胞病理学的基準を有するCTCにおけるALK状態を評価することとして、及び2)CTC及びその対応する腫瘍組織に見出されるALK状態を比較することとして、下記に記載される。このためには、ALK-遺伝子再配列についての二重免疫化学及びFISHアプローチに基づくアッセイが使用され、そしてCTC及び対応する腫瘍組織サンプルの両者に適用された。

【0198】

患者及びサンプル

NSCLCのために手術を受ける患者のためのISET方法を用いてのこれまでの研究によれば、細胞形態悪性特徴を有するCTCを、208の症例のうち76(37%)で検出した。

【0199】

本研究のために、本発明者は、一次腺癌を有する40の症例を、この後者の集団から選択した。さらに、2011年5月~12月の間、研究に包含される47人の肺腺癌患者は、悪性特徴を有するCTCを有した。それらの87人の患者の中で、34人は、固定緩衝液(細胞固定例を含む)を用いることにより、TSETにより、及び米国公開特許出願第2009-0226957号に記載のように、異なった時点で、すなわち手術の前、及び手術の後、7及び15日で、収集され、そして処理された血液サンプル(10ml)を有した。すべての患者は、この研究に参加するためにインフォームドコンセントを与えた。選択された87人の患者の主要臨床病理学的特徴が表2に要約されている。

【0200】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 : この研究に含まれる 87 人の症例の主要臨床病理学的データ
臨床学的及び病理学的パラメーター

	患者のNb (%)
全体	65 (100)
年齢(歳)	
平均	66
範囲	37-85
性別	
男性	41 (63)
女性	24 (37)
タバコへの暴露 (PY)	
数	53 (81)
平均	38.2
範囲	0 - 152
腫瘍サイズ (cm)	
平均	3.9
範囲	0.4 - 18
組織学	
侵襲性腺癌 (ADC)	65 (100)
腺房優勢ADC	33 (51)
乳頭優勢ADC	21 (32)
微小乳頭優勢ADC	4 (6)
鱗状優勢ADC	4 (6)
ムチン産生を伴う固形優勢ADC	3 (5)
CTCsの数	
> 50 CNHC-MF (範囲 51-500)	28 (43)
< 50 CNHC-MF (範囲 14-49)	37 (57)
pTNM病期	
I	30 (46)
IA	12
IB	18
II	16 (25)
IIA	9
IIB	7
III	14 (21)
IIIA	12
IIIB	2
IV	5 (8)
TTF1抗原発現	44 (67)
ネオアジュバント療法	14 (21)

TNM : 腫瘍節転移

PY : パックイヤー

CNHC-MF : 悪性特徴を有する循環性非血液学的細胞

【0201】

腫瘍は、7th pTNM分類、及び肺腺癌の最後の組織学的分類に従って分類された [26、27]。FISH分析は、ALK遺伝子のためのブレーク-アパートプローブを用いて、腫瘍サンプルに対して行われた (Vysis LSI ALK Dual Color, Abbott Molecular,

10

20

30

40

50

Abbott Park, IL) (補足データ)。適切に解釈されるためには、腫瘍細胞核は、少なくとも1つの共局在シグナルを有すべきである。ALK-再配置として考慮されるためには、解釈できる腫瘍細胞核の少なくとも15%が異常プロブハイブリダイゼーションパターンを保有すべきである[28]。免疫組織化学(IHC)が、室温で45分間インキュベートされたALKタンパク質(1:50、5A4; Abcam, Cambridge, UK)に対する一次抗体を用いて、脱パラフィン切片に対して行われた(補足データ)。i) EGF R変異ホットスポット、ii) KRAS変異ホットスポット、及びiii) BRAF変異についての標的変異分析が、これまでに記載されたようにして、パイロシーケンシングにより、凍結された腫瘍組織切片から抽出されたDNAから行われた[29、30](補足データ)。

10

【0202】

TSETフィルター上での免疫細胞化学(ICC)及び蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)。

ICC及びFISHを、6のスポットに対してMGG染色することにより検出される悪性特徴を有するCTCを含むその対応するフィルターの染色されていないスポット上でISET方法により単離されたCTCに対して行った[15]。フィルター当たり、2つのスポットをICCのために使用し、そして2つのスポットをFISHのために使用した。ICCのために、スポットを、室温で30分間、ALKタンパク質(1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, UK)に対する一次抗体と共にインキュベートした。反応を、3,3'-ジアミノベンジジンにより可視化し、続いてヘマトキシリンにより対比染色した。細胞質染色は、ALKに対して陽性であると見なされた[30](補足データ)。複数のスポットに対して行われるFISHは、ALK遺伝子(Vysis LSI ALK Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, IL)のためのブレイク-アパルトプロブを、その製造業者の説明書に従って使用した。スプリットシグナル又は単独の3シグナルを示す細胞は、ALK再配置に対して陽性であると見なされた[31]。フィルターを独立して試験し、そして臨床、IHC、ICCデータ及び組織遺伝子型を盲検した。我々は、手術の前、及び手術の7及び15日後、血液サンプリングを受けた34人の患者のCTCに対するALK検出についてのICC及びFISH結果の再現性を試験した。

20

【0203】

14~500の解釈できる腫瘍細胞核を、各患者について分析した。正しく解釈されるために、腫瘍細胞核は、少なくとも1つの共局在シグナルを有すべきである。ALK-再配置として見なされるためには、解釈できる腫瘍細胞核の少なくとも15%が、異常プロブハイブリダイゼーションパターンを保有すべきである。

30

【0204】

ATCC(Manassas, VA)から入手されるヒトNSCLC細胞系H2228を、ALK再配置陽性対照として使用した[32]。細胞を、これまでに記載されたように、10%ウシ胎児血清により補充されたRPMI 1640培地において培養し、そして維持した[32]。約50個の細胞を、健康な対象から採取された10mlの血液サンプル中に混合した。次に、サンプルを、これまでに記載されたようにして、ISET方法を用いて濾過した[23]。次に、抗-ALK抗体と共に、ブレイク-アパルトプロブ及びICCを用いてFISHを、上記のようにして実施した。

40

【0205】

陽性ALK免疫染色が、ムチン生成と共に固体優勢構造を有する腺癌に対応する5個の腫瘍に見出された。それらの5個の例は、数個の細胞における膜強化を伴って、前に定義されたようなすべての腫瘍細胞に対して強い陽性の細胞質染色(評点+3)を示した[31]。連続切片上の同じパラフィンブロックに対して行われたFISH分析は、ALK-再配置腺癌を実証した。他の82の腫瘍は、ALK免疫染色、及びFISH分析を用いてのALK-再配置に対して陰性であった。10の腫瘍(12%)は、EGFR変異誘発された(1つのエキソン18、16のエキソン19及び3のエキソン21変異)、そして20の腫瘍(24%)がKRAS変異誘発された(エキソン2の18のコードン12及びエキ

50

ソン2の2つのコドン13)。BRAF変異は検出されなかった。5つのALK-再配置腫瘍は、EGFR、KRAS及びBRAF野生型であった。

陽性ALK免疫染色が、腫瘍にALK-再配置を有する患者に対応する5人の患者において単離されたCTCに見出された(図1A、A1及びB1、及び図1B)。それらの5人の患者の臨床病理学的データが、表3に詳述されている。

【0206】

【表3】

表3. FISH ALK-遺伝子再配置を有する腫瘍の臨床病理学的データ、及び上皮腫瘍細胞のサイズによる単離(ISET)方法により単離されたCTCにおける抗-ALK抗体を用いての陽性免疫細胞化学

ケース番号	1	2	3	4	5
性別	男性	男性	女性	男性	女性
年齢	45歳	48歳	47歳	52歳	43歳
喫煙状態	喫煙歴のない	喫煙歴のない	喫煙歴のない	喫煙歴のない	喫煙歴のない
民族性	白人	C白人	白人	白人	白人
pTNM 段階	IIA	IIA	IIIB	IV	IV
組織学	固体構造を有する腺癌	固体構造を有する腺癌	固体構造を有する腺癌	固体構造を有する腺癌	固体構造を有する腺癌
EGFR、KRAS、BRAF変異についての状態	野生型	野生型	野生型	野生型	野生型
ALK FISH (腫瘍)	陽性 (細胞の40%)	陽性 (細胞の50%)	陽性 (細胞の60%)	陽性 (細胞の40%)	陽性 (細胞の50%)
ALK IHC (腫瘍)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)
CNHC-MFの数	≥ 50 細胞 (70-90の細胞)	≥ 50細胞 (60-150の細胞)	≥ 50細胞 (70-100の細胞)	≥ 50細胞 (60-100の細胞)	≥ 50細胞 (80-120の細胞)
ALK FISH (CTCs)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)
ALK ICC (CTCs)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)	陽性 (細胞の100%)
フォローアップ(5年)	生存 (再発なし)	生存 (再発なし)	死亡	死亡	死亡

略語：FNM=腫瘍節転移；CNHC-MF：悪性を有する循環非血液学的細胞

【0207】

5A4クローンを用いての抗-ALK ICCは、ほとんどの細胞において膜強化を有するCTCの100%の強い細胞質染色(評点計)を示した(図1、A1及びB1、及び図1B)。ALK FISHは、それらの5例において有益であった(図1、A2及びB2、及び図1B)。すべてのCTCは、異常シグナルパターンを有し、そして少なくとも3つのシグナルは、各例において細胞当たりを観察され、遺伝子増幅又は異数性の何れかと一致した(図1、A2及びB2、及び図1B)。さらに、FISHは、ALKトランスロケーションの存在を確認し、すべての例は細胞当たり5及び3プロブのブレイク-アパート及び複数シグナルを有した(図1、A2及びB2、及び図1B)。5例の何れも、FISHプロブのパートの損失を有さなかった。最終的に、それらの5人の患者に関して、MGGにより染色されたCTCは、これまでに記載されるように、悪性特徴を有するCTCを示した(図1、A3及びB3、及び図1B)[22]。ALK-ICC及びALK-FISHの陽性は、最初の検出の7及び15日後、ISETを用いて単離された

C N H C - M Fにより、各患者に関して、調整された。

【0208】

抗 - A L K抗体による陽性免疫染色、及びF I S H分析を用いてのA L K - 再配置は、M G G染色に基づく悪性特徴を有するC T Cを示す82人の他の選択された肺癌患者には実証されなかった(図1、C1 - C3)。I S E T方法により濾過されるよりも、血液サンプルにおいて希釈されたA L K - 再配置H2228細胞は、強い陽性A L K免疫染色及びA L Kトランスロケーションを実証した(図1、D1 - D3)。

【0209】

I C C及びF I S HによるA L Kの検出のための結果の再現性を、手術の前、及び手術の7及び15日後、血液サンプリングを受けた34人の患者からの血液サンプルの102のフィルターのC T Cに対して試験した。含まれる34人の患者のうち、5人の患者は、A L K陽性腫瘍組織を有し、そして29人の患者はA L K陰性腫瘍組織を有した。陽性結果は、A L K陽性腫瘍を有する5人の各患者から得られた3種の異なった血液サンプルからのC T Cについて、I C C及びF I S Hにより一貫して得られた。A L Kについての負の結果は、A L K陰性腫瘍を有する29人の各患者から得られた3種の異なった血液サンプルからのC T Cに対するI C C及びF I S Hにより一貫して得られた。

【0210】

補足データ：患者及びサンプル

F I S H分析を、A L K遺伝子についてブレイク - アパートプローブを用いて、腫瘍サンプルに対して実施した(Vysis LSI ALK Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, IL)(補正データ)。スライドを、63倍の対物レンズを用いて落射蛍光顕微鏡(Bx51、Olympus, Tokyo, Japan)上で読み取り(MI、EL、CB)、そしてイメージを、Soft Imagingシステム(Cell、Olympus)ソフトウェアを用いて分析した。結果は、臨床的及び免疫組織化学的データ及び遺伝子型について独立して盲検評価された。3人の病理学者の間での不一致が認められる場合、スライドは、コンセンサスを得るために再検討された。少なくとも50の解釈できる腫瘍細胞核が、各腫瘍について分析された。適切に解釈されるためには、腫瘍細胞核は、少なくとも1つの共局在シグナルを有すべきである。

【0211】

免疫組織化学法(IHC)を、室温で45分間インキュベートされたA L Kタンパク質(1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, UK)に対する一次抗体を用いて、脱パラフィン切片上で実施した。染色の強さ、及び陽性細胞の百分率を、次の通りに、半定量的に評価した：0 = 腫瘍細胞の染色なし、又は10%以下でのかすかな染色；1+ = 腫瘍の10%以上でわずかな染色；2+ = 中程度の染色；3+ = 強い染色。陽性A L K発現は、1+ ~ 3+として見なされた。検体における免疫組織化学染色は、臨床データ及び遺伝子型を、3人の病理学者(MI、VH及びPH)により、独立して盲検評価された。3人の病理学者間の不一致が認められた場合、スライドは、コンセンサスを得るために再検討された。

【0212】

i) コドン719、768、790及び858 - 861におけるE G F R変異ホットスポット、及びエキソン19における欠失及び複雑な変異、ii) コドン12、13及び61におけるK R A S変異ホットスポット、及びiii) コドン600及び464 - 469におけるB R A F変異についての標的変異分析を、これまでに記載のようにして、パイロシーケンシングにより、凍結された腫瘍組織切片から抽出されたD N Aから実施した[29、30]。P C R増幅を、その対応するTherascreen(登録商標)パイロキット(Therascreen(登録商標)EGFR Pyro(登録商標)キット、CE-IVD, Ref. 971480; theascreen(登録商標)KRAS Pyro(登録商標)キット、CE-IVD, 参考文献971460; Therascreen(登録商標)BRAF Pyro(登録商標)キット、CE-IVD, 参考文献971470; Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、その製造業者のプロトコルに従って実施した。P C R生成物(10 µ l)を、PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation(Qiagen)を用いて、その製造業者の標準プロトコルに従って、パイロシーケンシング分析のために24ウェル形式下で処理した。プレートを、配列決定のために、PyroMark Q24 System(Qiagen)に直接移した。データを、

PyroMark Q24 Software (Qiagen)により、自動的に分析した。

【0213】

補足データ：ISETフィルター上での免疫細胞化学（ICC）及び蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）

ICCに関しては、熱誘導エピトープ回収を、ALK用標的回収溶液（pH9）（Dako, Carpinteria, CA）により実施した。スポットを、3%過酸化水素により20分間、処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、続いて脱イオン水により2-4分間、洗浄した。次に、スポットを、ALKタンパク質（1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, UK）に対する一次抗体と共に、室温で30分間、インキュベートした。反応を、3,3'-ジアミノベンジジンにより可視化し、続いてヘマトキシリンにより対比染色した。細胞質染色は、ALKに関して陽性であるとして見なされた[30]。染色の強さ及び陽性細胞の百分率を、上記のようにして、3人の病理学者（MI、VH及びPH）により、半定量的に評価した。フィルターを、独立して試験し、そして臨床、IHCデータ、及び組織及び細胞遺伝子型について盲検した。3人の病理学者間での不一致が認められる場合、スライドはコンセンサスを得るために再検討された。

10

【0214】

本発明者は、ALK状態が下位組の肺癌患者において細胞形態学的アプローチにより特徴付けられるCTCにおいて非侵襲的に検出され得ることを、二重ICC-FISHアッセイを用いて示した。さらに、それらの結果は、一連の87人の肺腺癌患者において、CTCにおける及びその対応する腫瘍組織サンプルにおけるALK状態間の厳密な相関性を示した。それらの患者のうち5人は、西洋人の間で、ALK-遺伝子再配置に関連することが以前報告された臨床病理学的特徴を有し、そしてCTC、及び対応する切除された腫瘍サンプルの両者においてALK-遺伝子再配置を示した[28]。逆に、ALK-遺伝子再配置を有するCTCは、ALK標的療法とは無関係に、ALK-陽性肺癌患者の予後についての関連性にそれらの関心を集中する最近のFISH研究により示されるように、ALK-遺伝子再配置を有さない腫瘍を有する患者には決して見出されなかった[33-35]。それらの研究のいくつかは、プレ-ALK阻害剤により処置されなかった患者においては、ALK-陽性患者は最短の生存性を有し、そして高い転移の危険性と関連していたことを実証した[33、35]。さらに、ALK-陽性患者は、ALK-陰性患者よりも、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤処置に対して、より耐性であった[33]。逆に、最近の研究は、野生型EGFR ALK-陽性肺腺癌患者がより良好な成果を有したことを示している[33]。逆に、最近の研究は、野生型EGFR ALK-陽性肺腺癌患者がより良好な成果を有したことを示している[34]。現在の研究においては、5人のEGFR野生型ALK陽性患者の5年の追跡は、手術を受けた2人の第II期患者に関しては再発を示さず、ところが3人の第III b / IV期患者は、診断の6ヶ月以内に死亡した。アジュバント療法、特にALK再配置に対する標的療法は、それらの患者においては管理されなかった。

20

30

【0215】

CTC単離及び特性決定を通してのALK-遺伝子再配置を検出するための非侵襲性アッセイは、臨床学的考慮に基づかれている。クリゾチニブによる治療は、信頼できる技術的アプローチによる腫瘍サンプルの系統的プレスクリーニングを意味する、実証されたALK-遺伝子再配置を有する腫瘍に制限されるべきである。しかしながら、肺癌患者からの腫瘍組織は、標的療法の使用のために患者の層別化を目的とした、病理学的試験及び増加するリストの免疫/分子分析の両者を実施するのに十分な量で必ずしも入手できない。アポトーシス細胞に由来され得、そして腫瘍細胞侵襲性質を欠いている、血漿中の遊離腫瘍DNA/RNAとは矛盾して、CTCは、「液体生検」を表し、そして非侵襲性治療診断のための理想的標的を構成することができる。

40

【0216】

本発明者は、CTCを単離するためにISETアプローチを使用した。なぜならば、彼ら及び他のものは、この方法がNSCLC患者におけるCTC単離のために高い感受性を

50

表すことを示しているからである [15 - 17]。以前に指摘したように、ISETによるCTC単離は、細胞サイズに依存し、そして任意の細胞マーカには無関係である。従って、上皮マーカーを発現する腫瘍細胞、及びEMTのために、上皮抗原を失ったこれらの腫瘍細胞は、ISETにより効果的に単離される [17, 21, 24, 25]。さらに、ICC及び分子分析、例えばFISHは、ISETを用いて単離され、そして特徴付けられたCTCにおいて開発され得る [17, 18, 21, 23 - 25]。興味深いことには、それは、手術の前、及び手術の7日及び15日後、試験された34人の下位群の患者及び腫瘍組織についての5人のALK-陽性患者に対するICC及びFISHによるALKの検出についての結果の再現性を実証された。一致した結果が、各患者から得られた3種のサンプルにおいて盲検的に得られた。それらの結果は、フィルター上のALKについて10

【 0217 】

肺腫瘍組織におけるALK-遺伝子再配置の信頼できる評価は、診断及び技術的な課題として認識されている [31, 36]。腫瘍サンプル上のALK状態は、FISH免疫組織化学及び/又は逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)を用いて評価され得る [31, 35 - 39]。FISHは、クリゾチニブによる現在の臨床試験において適格性基準として使用される診断方法である [38]。ヒトALKタンパク質に対して特異的な抗体(抗体クローンALK1)を有するHCは、遺伝子検査は不要と見なされるような感度及び特異性を有する、下位組の未分化大細胞リンパ腫におけるALK再配置について20

【 0218 】

発明者は、最近、正確に20/20NSCLC腫瘍組織を分類することが示されている、抗-ALK抗体、すなわちクローン5A4を使用した [36]。5人のALK-再配置された症例においては、50%以下の腫瘍細胞が腫瘍においてALK-FISH陽性であり、ところがそれらの細胞の100%はIHCによれば、ALK陽性であったことが注目された。しかしながら、ALKについてのIHCは腫瘍の特定領域において不均質であり、そして一部の細胞のみがかすかに染色され(1+)、ところが他の細胞は強く染色された(3+)。従って、最近の研究に記載されるように、ALK遺伝子再配置についてのIHCとFISHとの間の相関性が腫瘍の一部の領域でのみ観察され得 [40]、FISH陽性細胞と、「IHC 3+のみ」陽性細胞との間の良好で且つより適切な比較の問題を提起する。予備的データとして、本発明の研究は、CTCに対して実施されるICCは、ALK-再配置及び他のゲノム変更、例えばEGFR変異を検出するための有望なツールであり得ることを示している。この点に関して、いくつかのEGFR変異が、特定の抗体を用いて下位組の肺腺癌においてIHCにより示され得る [31, 41]。我々は、そのようなEGFR変異がこの下位組の肺癌におけるCTCに対するICCアプローチを用いても示され得ることを推測できる。本研究において検出されるすべてのCTCは、ALK-FISH陽性であり、そしてALKに対する特異的な抗体を用いてのICCによれば、強い陽性であることは注目に値する。この特異的なゲノム変更を有するCTCは、促進された移動性を有し、そして攻撃的組の腫瘍細胞を表す。ALK-遺伝子再配置がまた、RT-PCRにより検出され得る [30, 36]。RT-PCRは、種々のサイズの複数転写体の増幅を提供するために高品質のRNAを必要とする挑戦的なアプローチである [36]。最終的に、定量的リアルタイムPCRアプローチが、ALK転写体、及び得られる有望な結果を定量化するために最近、開発されて来た [36]。発明者は、RT-PCRアプローチを用いてALK再配置を見出そうとはしなかった。なぜならば、ISETにより単離されたCTCから実質的に抽出できるRNAの量及び質は、濾過の前血液希釈のために使用される市販の緩衝液はホルムアルデヒドを含むので、試験のためには十分ではないと思われるからである。しかしながら、この方法は、固定されたCTCに比較して、変わらな50

い感度で新鮮なCTCを単離するために開発された新規ISET緩衝液を用いて試験され得る。

【0219】

非侵襲性CTCベースの試験の使用は、標的療法に対する耐性に関与する可能性ある新規ゲノム変更を同定するために、患者のリアルタイム分子療法診断追跡の実施を可能にすることができる[42]。この点において、クリゾチニブに対する獲得耐性の出現は、ALK陽性肺癌患者の臨床診療における新規挑戦である[11、43、44]。実際、新規ゲノム変更は、クリゾチニブ治療中に発生する可能性があり、そして最初の標的治療を非効率にすることができる。従って、リアルタイムモニタリングは、ISETにより単離され、そして形態学的アプローチにより、診断的に特徴づけられたCTCについての分子試験を通して可能性ある追加のゲノム変更を検出することを目的に開発された。

10

【0220】

発明者は、ISETにより単離され、そして悪性特徴を有するCTCとして特徴づけられたCTCにおけるALK-遺伝子再配置の検出の実現可能性を示した。ICC及びFISH分子アプローチを用いての一貫性のある結果が見出され、そして重要なことには、87人の試験された患者における腫瘍組織に比較して、また、CTCにおいて一貫した結果が見出された。それらの結果は、肺癌患者の非侵襲性ALK状態プレスクリーニングの評価のためにCTCベースの治療診断アプローチを提供する。

【0221】

実施例3：侵襲性癌の早期診断への本発明の適用

20

「センチネル」(sentinel)循環腫瘍細胞は、慢性閉塞性肺疾患の患者における肺癌の早期診断を可能にする。

【0222】

循環腫瘍細胞(CTC)は、侵襲性癌の非常に早期の段階で循環すると思われ；しかしながら、それらは、侵襲性癌として、最初の顕著な特徴を報告されたことはない。我々は、慢性閉塞性肺疾患(COPC)、非小細胞肺癌(NSCLC)の前腫瘍状態を有する168人の患者のうち、ISET(腫瘍細胞のサイズによる単離)、すなわち高い感受性の「細胞病理学ベースの」CTC-プラットフォームにより検出されるCTCを有することが見出された約3人を報告している。毎年実施されるCTスキャンは、CTCが血液中に出現したわずか1~4年後、肺結節を検出し、これはその外科的切除、及び初期段階のNSCLCの病理学的診断を導く。次に、ISETを、手術の9又は12ヶ月後、反復し、そしてCTCの消出を示した。それらの3症例は、概念の証明として、「危険性のある」患者における侵襲性肺癌の初期指標として使用されるCTCの可能性を示す。

30

【0223】

循環腫瘍細胞(CTC)は、血液における「循環希少細胞」(CRC)のグループに属し、この検出は、非侵襲的予測医学に新しい経路を開くことができる。CRCは、それらのレベルは1mlの血液当たり1(又はそれよりも低い)ほどであるので、現在の血液分析によって検出できず、従って、1つの細胞は平均1千万の白血球及び50億の赤血球と混合される。さらに、CRCは異なったタイプのものであり、上皮及び間葉CTC、炎症性疾患及び医原性介入により広がる上皮非腫瘍細胞、内皮細胞、幹細胞及び胎児細胞(妊婦における)を包含する。従って、CTCの特異的検出は、他のCRCからのそれらの鑑別診断、及び感度及び診断特異性の二重の技術的課題を意味する[45]。

40

【0224】

それらの技術的困難性のために、CTCについての診断ではなく、循環上皮細胞の検出方法が、主に転移性癌を有する患者における予後/予測マーカーを開発するために使用されて来た[46]。しかしながら、臨床学的、分子及び動物研究からデータの組合せが、侵襲性癌がそれらの進行の非常に初期の段階で腫瘍細胞に広がることを、最近示しており、このことは、CTC検出のための敏感且つ診断アプローチがそれらの早期診断のための助けになる可能性がある[47、48]。

【0225】

50

肺癌は攻撃的で且つ高い侵襲性の疾患である。その早期診断は、9400万人の禁煙者が米国で主要な死亡原因である疾患についてのリスクが高いので、重要な問題である[49]。肺癌のリスクが高い53、454人を研究した国立肺検診試験は、低線量CTC検診が、20%の肺癌の死亡率の減少と関連していることを、最近示している「49」。しかしながら、この結果は、検診された26,309人の患者のうち、7191人が陽性であることが見出されたが、しかしわずが649人が肺癌を有することが判明したので、印象的な96.4%の偽陽性結果に関連した。さらに、肺癌を有する患者の合計数は1060であり、これはCT検診によっては見逃された411人の偽陰性を包含する。

【0226】

この設定で、本発明者は、肺癌の高度に侵襲性の特性が弱点として使用され、そしてCTCの感受性及び診断検出を介してその早期診断を可能にすることができることを推論した。従って、細胞病理学的診断を可能にする、損なわれていないCTCの非常に敏感な単離のための直接的なアプローチであるISET(腫瘍細胞のサイズによる単離)が使用された[46、50、51]。

10

【0227】

慢性閉塞性肺疾患(COPD)、すなわち肺癌のための危険因子として見なされる病状を有する、イメージングによる肺腫瘍検出の前に、血液にCTCを有することが見出されている3人の患者が説明される。

【0228】

この報告は、CTCの敏感且つ診断的同定が侵襲性癌の早期診断のための有望な試験を提供することを、ヒトにおいて最初に示している。

20

【0229】

症例報告

症例1

1995年、患者XB(男性、49歳)は、肺機能試験、50~79%の間のFEV1(1秒での強制呼気量)及び胸部X線に基づいて、中程度(GOLD2)の慢性閉塞性肺疾患(COPD)と診断された。彼は45PY(パックイヤー:45年間、1日1パックのタバコ)、喫煙した。14年後(2009年10月)、彼は、ISETにより試験され、そして細胞病理学的分析により同定される10mlの血液に67CTC及び3CTM(循環腫瘍微小塞栓)を有することが見出された。同じ日に実施された低線量スパイラルCTスキャンは、COPDの診断を確認したが、しかし肺結節を示すことには失敗した。次に、CTスキャンを、その後、毎年企画し、そして1年後(2010年10月)、右下肺葉に直径1.5cmの肺結節の存在を、最初に示した。手術が1ヶ月後、行われた。病理学的分析及び癌の病期分類は、リンパ節又は遠隔転移への広がりを持たない管状乳頭線癌ステージIAを示した(pT1aN0M0)。腫瘍の遺伝子型判定は、コドン12にK-Ras変異を示した。患者は何れの追加の治療も受けなかった。彼は、手術後9ヶ月でISETにより試験され、そしてCTCは彼の血液には見出されなかった。

30

【0230】

症例2

患者AC(男性、54歳)は、肺機能試験、30~49%のFEV1及び胸部X線に基づいて、1998年、重度(GOLD3)のCOPDと診断された。彼は60PY、喫煙した。11年後(2009年5月)、彼は、ISETにより試験され、そして細胞病理学的分析により同定される10mlの血液に43CTC及び1CTMを有することが見出された。同じ日に実施された低線量スパイラルCTスキャンは、COPDの診断を確認したが、しかし肺結節を示すことには失敗した。次に、CTスキャンを、毎年反復し、そして3年後(2012年9月)、左上肺葉に直径2.4cmの肺結節の存在を、最初に示した。患者は手術を1ヶ月後、受けた。病理学的分析及び癌の病期分類は、リンパ節又は遠隔転移への広がりを持たない管状乳頭線癌ステージIAを示した(pT1aN0M0)。腫瘍DNAの分析は、コドン12にK-Ras変異を示した。患者は何れの追加の治療も受けなかった。彼は、手術後12ヶ月でISETにより試験され、そしてCTCは彼の血液に

40

50

は見出されなかった。

【0231】

症例3

1999年、患者BM（男性、47歳）は、肺機能試験、50～79%の間のFEV₁（1秒での強制呼気量）及び胸部X線に基づいて、中程度（GOLD2）のCOPDと診断された。彼は55PY（パッケイヤー：3年間、1日1パックのタバコ）、喫煙した。9年後（2008年2月）、彼は、ISETにより試験され、そして細胞病理学的分析により同定される10mlの血液に32CTC及び1CTMを有することが見出された。同じ日に実施されたCTスキャンは、COPDの診断を確認したが、しかし肺結節を示すことには失敗した。次に、CTスキャンを、その後、毎年実施し、そして4年後（2012年8月）、右上肺葉に直径1.4cmの肺結節の存在を、最初に示した。手術が1ヶ月後、行われた。病理学的分析及び癌の病期分類は、リンパ節又は遠隔転移への広がりをもたない管状乳頭線癌ステージIAを示した（pT1aN0M0）。腫瘍の遺伝子型判定は、コドン12にK-Ras変異を示した。患者は何れの追加の治療も受けなかった。彼は、手術後12ヶ月でISETにより試験され、そしてCTCは彼の血液には見出されなかった。

10

【0232】

方法

ISET方法は、8ミクロンの孔を有するポリカーボネート膜上で循環CTC及びCTMを富化するエンジン式血液濾過ベースのアプローチである[50、51]。末梢血液（10ml）を、緩衝されたEDTAに収集し、4℃で維持し、そして収集の1時間以内で処理した。膜上の7個のスポットを、免疫細胞化学のために処理し、そして3個のスポットを、細胞分析のためにMay Grunwald Giemsa (MGG)染色により処理した。免疫細胞化学を、室温で45分間、フィルターに適用される、パン-サイトケラチン抗体（マウス、クローンKL-1、Immunotech、Marseille）及び抗-ビメンチン（マウス、クローンV9、Dako、Paris）による二重免疫標識を用いて、前述のようにして実施した。

20

【0233】

ISETを用いれば、患者は、MGG染色に基づいての単離された細胞の細胞病理学的分析、及び前に定義された基準に従っての、特徴的悪性特性を有する細胞の検出に基づいてCTCに関して陽性として見なされた[51]（図2）。

30

【0234】

結果

ISETを用いれば、168（1.8%）のCOPD患者のうち3人が、ISETによる単離、及び前に定義された基準に従って特徴的悪性特性を有する細胞の検出を可能にするMGG染色による単離された細胞の細胞病理学的分析に基づいて、CTCに関して陽性であることが見出された[51]。

【0235】

それらの追跡において肺癌を進行している、ISETに基づいての細胞病理学分析により検出されるバースラインでCTCを有する3人のCOPD患者は、単離されるか又はシートに分類された、32～67のCTCを有することが見出された（図2）。CTCは、大きな核、散乱核溝、ヘテロクロマチン塊、及び高い核/細胞質比を伴っての中程度の量の細胞質を明らかにした（図2）。さらに、それらの患者は次の通りに、時折りCTMを示した：患者1は3、9及び15のCTCから構成される3個のCTMを有し；患者2は、20の細胞と共に1つのCTMを有し；そして患者3は、12のCTCと共に1つのCTMを有した。時折り発生するの塊は、頻繁な複数の核小体及び核オーバーラッピングと共に、核異型、中程度～顕著な核の大小不同（anisonucleosis）を示す楕円形又は多角形CTCの三次元凝集性シートを明らかにした。その対応する免疫染色された細胞は主に、パン-サイトケラチンのみを発現した（図2）。しかしながら、少数のCTCは、弱い関連性のサイトケラチン発現と共にビメンチンを強く発現した（図2）。

40

【0236】

50

より良性の細胞形態学的特長を有する単離細胞をまた、168人(1.8%)のCOPD患者のうち3人にISETにより検出した。しかしながら、それらの3人の患者も又はCOPDを有する他の162人の患者も、続く追跡の間(平均追跡時間:48ヶ月)、肺結節の進行を示さなかった。CTCは、検出できる病状を有さない42人の対照喫煙者及び35人の非喫煙の健康な個人においては検出されなかった。

【0237】

議論

肺癌は、高い侵襲性癌であることが知られており、そして75%以上の患者が診断での手術の対象とならない[75]。その高い割合及び侵襲性特性のために、それは世界中の癌関連死の主要原因である[53]。この分野では、診断及び非侵襲性バイオマーカーの発見が、低線量スパイラルCTスキャン検診及び早期の外科的介入の次の段階を示すことが重要である可能性がある。肺癌の高度な悪性挙動性が侵襲能力に結合されるので、CTCの高感度診断検出の使用がCTスキャン調査を補完し、そしてCTスキャン検診に関連する誤った陽性及び陰性結果の低減を助けると思われた。従って、発明者は、COPDを有する168人の患者集団を標的にした。COPDは、米国において死因の第3位であり、そして喫煙比率の上昇により、2030年までに世界の死亡原因の第4位になると予測される。COPDは、肺癌の新生物発生前の状態として見なされ、そして全体として、COPD患者の2.2%が、毎年肺癌を発症すると計算されている。しかしながら、COPDの進行は、肺発癌に対する感受性を4~6倍まで高め、この観察は、COPD及び肺癌の両者における共有機構であると思われる。従って、COPDの早期診断は、早期COPD疾患過程における禁煙が疾患の進行を遅くし、そして罹患率及び死亡率を低めるので、重要である[54]。

10

20

【0238】

いくつかの方法が、可変の感度及び特異性を伴って、循環腫瘍細胞の単離及び検出に適用されて来た[45]。しかしながら、発明者は、肺癌の早期診断の設定によれば、細胞病理学的診断アプローチのみが、CTスキャン検診をまた包含する、肺癌の早期診断のための組合されたアプローチに使用される「センチネルCTC/CTM」を明らかにするのに適切である可能性があると考えた。

【0239】

ISETは、それらの免疫細胞病理学的及び分子分析も可能にする高感度態様で、血液から損なわれていないCTCを単離する、血液サンプルの直接的且つ迅速な治療である。

30

【0240】

本明細書に報告される3種の症例は、CTスキャンによる肺結節の検出の1~4年前、適切な数のCTC/CTMを明らかにした。不運なことには、ISETフィルターは、-20で貯蔵されず、CTC/CTMにおけるDNA変異の研究を不可能にする。しかしながら、それらのデータは、CTCが「in situ」癌の段階早期の侵襲性癌により拡散されるを示す、動物モデルにおいて得られる結果を、ヒトにおいて、初めて検証する。この設定下で、CTCもCTMも、検出できる病状を有さない42人の喫煙者に及び35人の禁煙の健康な個人に、ISETにより見出されなかったことを注目することはまた重要である。全体的に、癌を有さない562人の対象は、異なったグループ下でISETにより研究されており、そして彼らの血液にCTCを有さないことが示されている。

40

【0241】

最初に本明細書に示されるように、肺癌を発症する危険性の約3人の患者は、肺結節がイメージングにより同定される1~4年前、ISET及び細胞病理学により検出されるCTCを有することが見出された。それらの3人の患者においては、肺癌は、すばやい外科的切除を可能にする早期段階(IA)で診断され;次に、彼らは、手術の後、数ヶ月でCTCを有さないことが示された。危険性のある患者における肺癌の早期診断のための信頼できるツールとして、CTCの診断同定の可能性を評価するために、より大規模な研究が現在、必要とされる。

【0242】

50

実施例 4：経子宮頸サンプルから子宮頸栄養膜の単離及び特性決定のためへの本発明の適用

栄養膜。好ましい実施形態によれば、栄養膜細胞は、経子宮頸サンプルからの濾過により抽出され、細胞形態学的分析により同定され、そしてそれらのゲノムは、レーザー顕微解剖及び完全ゲノム増幅の後、PCRにより、それぞれ特徴づけられ得る。

【0243】

経子宮頸サンプルを、子宮頸部の中央開口部において回転される細胞採取用ブラシツールを用いて、妊娠の第2週～第15週の間妊婦から採取した。経子宮頸サンプルを、同定試薬を補充されたPBS溶液中に移した。サンプルを、濾過の前に、数ヶ月間、4℃で貯蔵することができる。

【0244】

経子宮頸サンプルを、濾過の前に、それらの細胞充実度に従って、滅菌蒸留水により希釈し、そして細胞形態学的染色により分析する。

【0245】

単一の栄養膜細胞を、レーザー捕獲顕微解剖により収集し、そして分子分析を、出版物(Saker et al, Prenatal Diagnosis 2006)により報告されるように、遺伝子型判定及び遺伝子分析のために実施する。

【0246】

妊婦の初期での妊婦における子宮頸栄養膜の非侵襲性単離のための新規アプローチ。

現代の妊婦検診の主要目的は、胎児損失の1～2%の危険性に結合される[55]、侵襲性出生前診断を、完全に安全な[非侵襲性]により置換することである。胎児DNAを、次の3種の源から非侵襲的に取得することができる：分娩又は流産後に血液中に保持されない、母体血液中の循環胎児細胞、特に循環赤血球及び栄養膜細胞；子宮膜から子宮頸部へのトランジットにおける経子宮頸栄養膜；及び母体血液中を循環する全細胞遊離DNAの一部である遊離胎児DNA。胎児細胞の非侵襲的回収は、純粹(母性DNAと混合されていない)胎児DNAを提供することが予測され、羊水穿刺及びCVSの非侵襲性且つ完全に信頼できる代替物の開発を可能にする。しかしながら、循環胎児細胞及び子宮頸栄養膜は、非常にまれであり、そしてそれらの単離は技術的挑戦である。細胞遊離胎児DNAを標的とする非常に強力な次世代配列決定アプローチは現在、利用でき、そして信頼でき、且つ非侵襲的出生前異数性の検出を提供することが証明されている[56, 57, 58, 59, 60]。しかしながら、それらの方法は、純粹な胎児DNAを標的としないので、羊水穿刺及びCVSを置換することはできない。さらに、それらのアプローチは、妊娠の早期で適用され得ず、そして洗練された高価な技術を必要とする。

【0247】

我々のチームは、循環栄養膜細胞が、栄養膜は末梢血液白血球よりも大きいので、ISET(上皮腫瘍/栄養膜細胞のサイズによる単離)により母体血液から容易に抽出され得ることを実証した。さらに、単離された細胞を遺伝的に分析し、そして非侵襲的出生前診断(NI-PND)におけるそれらの有用性が、2種の劣勢疾患、脊髄性筋萎縮症及び嚢胞性線維症のために実証された[61, 62]。

【0248】

子宮頸管内膜における胎児細胞の存在は、1971年、Shettleにより最初に示された。栄養膜細胞は、子宮腔における退縮性絨毛膜絨毛から、及びそれから子宮頸部に向かって脱落されると思われる[63, 64]。子宮腔は、脱落膜と壁側との融合に続いて、11～12週の妊娠期間で消出し、従ってそれらの希少細胞の収集の可能性は、一過性であることが予測され、そして妊娠初期条件に制限される。経子宮頸細胞(TCC)サンプリングと呼ばれる、子宮頸部、及び子宮腔の下極からの胎児細胞の収集は、母体血液からの胎児細胞の単離に代わるものであり、そしてNI-PNDのための純粹な胎児DNAの追加の源を提供する。TCCが単独で、脱落され、そして現在の妊娠を越えては保持されない栄養膜(細胞-及び合胞体栄養細胞)である事実は、大きな利点である。異なったTCCサンプリングアプローチが開発され、そして次のものを包含する：子宮内洗浄、子宮頸

10

20

30

40

50

管粘液吸引、及び細胞採取用ブラシを用いての子宮頸管サンプリング。最良のTCCサンプリング法の確認を目的とする多くの研究は、子宮及び子宮頸管洗浄が、5週ほどの早い妊娠期間の胎児細胞を一貫して得るための最も効果的方法であることを確立した[65, 66, 67, 68, 69, 70]。しかしながら、それらは最小限の又は半侵襲性として説明されて来たが、それらの方法に関する主要な関心は、胎児損失の危険性である[71, 72]。ほとんどの研究においては、サンプルは、妊娠の終了直前に採取され、従って、進行中の妊娠への影響は十分に検討されていない。

【0249】

理想的なサンプリング法は、合併症を負わせるべきではなく、進行中の妊娠に対して負の影響をもつべきではなく、病院外で実行するのに容易であるべきであり、そして費用対効果がよくあるべきである。安全な方法を、材料及び方法セッション(サンプルの収集)に記載のように採用した。最も重要なことは、この方法の安全性は、それが日常的に妊娠初期の間に実行されるという事実により実証される。

10

【0250】

この研究においては、子宮頸サンプルを収集するための安全なサンプリングアプローチは、それがサイズに応じて、要素、例えば精子及び白血球を排除するのでのみならず、またそれはレーザー顕微解剖及び何れか他のタイプの細胞分析を助ける細胞の最適層を形成するので、ISET、すなわち希少細胞を研究する非常に実用的な方法と組合される。胎児細胞の認識を促進するユニーク染色方法を利用することにより、単一の細胞栄養膜、及び合胞体栄養細胞を顕微解剖し、そして遺伝子型判定によりそれらの胎児性質を証明することが可能であった。血液から単離された栄養膜の場合のように、細胞がNI-PNDのための使用に適していることが、本明細書にまた示されている。遺伝病の非侵襲的出生前診断のための羊水穿刺及びCVSに変わる真の非侵襲性代替手段の一部として使用できる胎児細胞を一貫して且つ非侵襲的に取得する新規アプローチが提供される。

20

【0251】

材料及び方法

サンプルの収集:

TCCサンプルを、絨毛サンプリングの直前、単一遺伝子疾患を有する胎児をキャリアする危険性のある妊婦(Hopital Necker-Enfants Malades)から、及び妊娠の選択的終了(TOP)を受ける女性(Antoine Beclere)から収集した。すべての女性は、7~12週の妊娠期間であった。細胞は、従来のTCCサンプリング法とは異なり、細胞採取用ブラシを用いて得られ、我々の研究においては、ブラシは子宮頸管に挿入されないで、むしろ外部osで回転された。細胞採取用ブラシは、10mlのメタノール含有保存剤溶液に移された。

30

【0252】

アルシアンブルーによるサンプルの染色及び固定:

1mlの各サンプルを、1mlの1.1%アルシアンブルー8GX/3%氷酢酸溶液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と共に混合し、そして30-50分間インキュベートした。次に、サンプルを、水により25倍に希釈し、全体積を50mlにした。各サンプルを十分に混合し、そして5分間インキュベートした。

40

【0253】

ISETによるサンプルの濾過

ISETを、単なるわずかな変更を伴って、前述のようにして実施した[61]。手短には、希釈されたサンプル(50ml)を、校正された8µmの直径の円筒形の孔を有するポリカーボネートフィルターを通して濾過した。1mlのサンプルからの細胞を、フィルター上で10の直径0.6cmのスポット上に濃縮した。

【0254】

レッド核染色法による細胞核の染色:

フィルター上の濃縮された細胞核の核を染色するために、各スポットを、0.1%核ファーストレッド染色/5%硫酸アルミニウム溶液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

50

)により被覆し、2分間インキュベートし、そして次に、水により十分にすすいだ。フィルターを空気下で乾燥した。

【0255】

フィルターの分析及びレーザー顕微解剖：

典型的には、サンプル当たり2つのフィルターを構成し、そして従って、平均2mlの各サンプルを処理した。アルシアンブルーにより染色されなかった、及び細胞栄養膜-様又は合胞体栄養細胞-様形態を示す単一細胞を、Nikon TE 2000-U (Nikon Paris, France and MMI Zurich, Switzerland)レーザー装備の顕微鏡を用いてレーザー捕獲顕微解剖によりフィルターから取得した。各単一細胞を、PCRに適した微量遠心管の蓋上に放した。

10

【0256】

分子分析：

各顕微解剖された細胞を、15µlの溶解緩衝液(100mモル/lのトリス-HCl、pH8; 400µg/mlのプロテイナーゼK)に、60で2時間、溶解し、続いて、プロテイナーゼKを94で15分間、不活性化した。プライマー伸長前増幅(PEP)[73]のために、溶解された細胞に、ランダムプライマー(Kit genPEP 75 OD, Genetix, Boston, USA)の400µM溶液5µl、6µlのPCR緩衝液(25mMのMgCl₂/ゼラチン(1mg/ml)、100mMのTris-HCl、pH8.3、500mMのKCl)、4種のdNTP(それぞれ、2mMでの)の混合物3µl、及び1µl(5U)のTaqポリメラーゼ(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)を、60µlの最終体積で添加した。単一細胞遺伝子型判定を、父系及び母系ゲノムDNAの分析を通して有益であることが見出されたSTRプライマーを用いることにより実施し、胎児ゲノムを有する細胞を同定した。増幅を、6µLのPEP生成物、10mMのTris-HCl、50mMのKCl、2.5mMのMgCl₂、200µMの各デオキシヌクレオチド、0.5µMの各STR「外部」プライマー及び2UのTaq Gold(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を含む溶液60µlにおいて行った。10倍に希釈されたPCR外積2µlを、「内部」フルオレセイン化STRプライマー及び同じPCRプロトコルを用いて、20µlの最終体積で再増殖した。次に、1µlの20倍に希釈された内部PCR生成物を、13.5µlの脱イオン化されたHi-Diホルムアミド及び0.5µlのGenescan 400 HD(ROX)マーカー(Applied Biosystems)と共に混合し、そしてABI Prism 3100自動配列決定機(Applied Biosystems)中に負荷した。プロファイルを、Genescan及びGenotypeソフトウェアプログラム(Applied Biosystems)を用いて分析した。

20

30

【0257】

SMA及び嚢胞性線維症の非侵襲的出生前診断を、以前に記載のようにして実施した[62]。

【0258】

侵襲性診断を、Hopital Necker-Enfants Malades, Laboratoire de Genetique Medical e, Parisで行った。

【0259】

結果

合計21の子宮頸サンプルをスクリーンし、ここで細胞採取用ブラシを用いて、妊娠7-12週の妊婦から、外部osのレベルで、細胞を単独で取得した。それらの中で、14人が、単一遺伝子疾患を有する胎児をキャリアする危険性を提供するのを、絨毛サンプリング(CVS)のために予定され、そして7人の女性が妊娠の選択的終了(TOP)を受けようとした。

40

【0260】

子宮頸サンプルは典型的には、種々の母性細胞を含む。図3に示されるように、外子宮頸扁平上皮細胞は、顕微鏡画像で容易に認識される。しかしながら、子宮頸管細胞及び胎児細胞栄養層は、類似する形態を有し、そして従って、区別することは非常に困難である

50

。アルシアンブルーは子宮頸部の円柱上皮細胞を産生する粘液と反応し、そして従って、未染色のまま存続する胎児細胞の認識を促進するために使用された。栄養膜 - 様形態を示す細胞、すなわち大きな、不規則の高色素性核を有する丸形細胞（図3）が求められた。この形態において、我々は単一細胞栄養層を単離することができ、この胎児遺伝子型を、有益なSTRマーカーの蛍光PCR分析により確認した（図3、表4）。

【0261】

【表4】

表4. 21の子宮頸サンプルからの胎児細胞（細胞栄養層/合胞体栄養細胞）の単離及び
 嚢胞性線維症のための典型的な非侵襲的出生前診断

グループ	妊娠期間	有益なSTRマーカー	細胞栄養層/ 合胞体栄養細胞	胎児細胞/ ml サンプル	非侵襲性 診断	侵襲性 診断
1(CF)	12週 + 1日	D5S816/D21S1437	3	3	DeIF508 なし	確認 された
2(CF)	12週 + 4日	D7S486/D7S523	2	2	DeIF508 キャリア	確認 された
3(CF)	12週 + 1日	D21S1435	5	5	DeIF508 キャリア	確認 された
4(CF)	12週 + 6日	D7S523	3	3	DeIF508 キャリア	確認 された
5(CF)	12週 + 2日	D16S539/D7S523	5	5	DeIF508 キャリア	確認 された
6(CF)	12週 + 4日	D16S539/D7S523	3	3	DeIF508 なし	確認 された
7		D5S816/D21S1437	5	2.5		
8		D16S539	1/2	1.5		
9		D16S539/D5S816	4/2	2		
10		D21S1435	5	5		
11		D21S1435	3	3		
12		D16S3018	10	3.3		
13		D21S1435/D7S523	3	3		
14		D16S539/D5S816	2	0.5		
15(TOP)		D21S11	7/2	4.5		
16(TOP)		D16S539/D21S1435	6	6		
17(TOP)		D16S3018/D5S615	6	3		
18(TOP)		D5S615/D16S539	4	2		
19(TOP)		D16S539/D5S816	4	2		
20(TOP)		D16S539/D21S11	3	1.5		
21(TOP)		D5S615/D5S816	2/1	1.5		

TOP : 妊娠の終結、CF : 嚢胞性線維症

【0262】

合胞体栄養細胞層は、密な核を有し、そして多核化され、そして従って、分子分析のためにはあまり従順ではないと言われている。さらに、合胞体栄養細胞層は、かなり大きな断片であり、従って、混合細胞集団（胎児及び母性）の可能性が高められるはずである。しかしながら、サンプル当たりに回収される胎児細胞の数を増大するために、我々はまた、遺伝子型が再び、STR分析により決定された多核断片を顕微解剖し始めた（図3、表4）。我々は、純粋な胎児性質が認識された合胞体栄養細胞層を単離することができたが

(表4)、大部分の断片は、予想通り、胎児及び母性要素を含み、そして従って、この研究から排除された。

【0263】

我々は、すべての21のサンプルに、胎児細胞(細胞膜細胞層又は細胞栄養層のいずれか、及び合胞体栄養細胞層)を同定し、これは、処理されたサンプル1ml当たり0.5~6の胎児細胞の頻度であった(表4)。

【0264】

囊胞性線維症(CF)の非侵襲性診断のための我々の以前に公開されたプロトコルが子宮頸部から単離された胎児細胞に都合よく適用され得ることを示すために、典型的な診断が6つのCF家族のために行われた(表4)。CFの非侵襲性診断は、De1F508変異の存在に基づく[62]。我々は、すべての胎児が完全にDe1F508変異を欠いていたか、又はキャリアのみであったと判断した(表4)。我々の結果は、絨毛サンプリングにより確認された。

10

【0265】

議論

循環胎児希少細胞の単離のための適切な技法を開発するためのレースは、母性血流に制限されていない。母性血清における遊離胎児DNAを標的とする次世代完全ゲノム配列決定アプローチは特に異数性検出において有望であると思われるが、検出され得る遺伝性障害の範囲は、胎児DNAが母性DNAと混合されるので、単純に制限される。子宮頸部から胎児細胞の獲得は、代替源を提供し、そして利点を有し、例えば子宮頸部に見出される唯一のタイプの胎児細胞は、現妊娠を持続しないことが知られている栄養膜である。主要課題は、母性血流又は子宮頸部におけるそれらの希少細胞の回収及び単離にある。経子宮頸細胞(TCC)サンプリングは、子宮頸内膜及び子宮腔の下極から胎児細胞を回収するために開発された異なった方法を組合す。しかしながら、主要欠点は、それらの技法が最小限侵襲性又は半侵襲性であり、そして胎児損失の危険性を担持する事実である。少なくとも侵襲性TCCサンプリング法は、典型的には、子宮頸管粘液を取得するために、子宮頸管中に約2cm挿入される細胞採取用ブラシを使用する。しかしながら、長期追跡を包含する、通常の進行中の妊娠における大規模な研究が、この方法が安全であるとみなされ得る前、行われる必要がある。注目すべきはまた、著者が、抗原性マーカーで免疫蛍光顕微鏡を用いて胎児細胞を同定したが、しかし遺伝子型判定によりそれらの胎児性質を検証しなかったという事実である。妊娠初期の間に、日常に投与される、完全に非侵襲的で且つ安全なサンプリング法は、子宮頸部から細胞を採取し(ヘラ)、そして次に、細胞採取用ブラシが、子宮腔部と子宮頸部が出会う変換区域から細胞を取得するために、子宮頸部の中央開口部で回転される。我々は我々の研究において栄養膜細胞を分離するためにこのアプローチの採用を選択し、そしてそれを、単に膜上に細胞を積層し、そして従って、それらを顕微解剖のために維持する、我々の研究室で開発された技術であるISETと共に組合した。我々は、我々が試験したすべてのサンプルに胎児細胞及び従って、遺伝子検査のための純粋胎児DNA源を見出すことができた。我々は、母性血液の場合のように、細胞は遺伝子分析及び診断に適しており、そして従って、種々の遺伝子検査のための可能性を実証することを示す。完全に非侵襲的に、及び妊娠の間、安全であることが実証された、臨床学的に許容されるサンプリング法(採血及び我々の安全な子宮頸試験)により、2種の源から胎児細胞の単離が、遺伝病のための早期の、安全で、且つ信頼できる診断試験の開発のための道を開くことができた。

20

30

40

【0266】

本発明は次の特定の実施形態を包含する：

1. 希少細胞に関連する状態、障害又は疾患を同定し、診断し、又は予後診断を提供する方法であって、

(a) 生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離するか又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度

50

又は他の物理的特性を有し；

(b) 前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態を決定し、そして／又は前記単離された希少細胞を免疫標識し、そして／又は前記単離された希少細胞上の分子分析を実施し；そして

(c) 前記単離された又は抽出された希少細胞の細胞形態、及び／又は免疫標識及び／又は分析に基づいて、希少細胞の存在及び／又は数、及び／又は特性に関連する状態、障害又は疾患及び／又は段階を同定し、診断し、又は予後診断を提供することを含んで成る方法。

【0267】

2. 前記生物学的サンプルが、希少細胞、及び分子分析のために希少細胞から分離される白血球及び血漿の分離及び回収を可能にする態様で任意に濾過され得る血液である、実施形態1の方法。

10

【0268】

3. 前記生物学的サンプルが、血液以外の生物学的流体である、実施形態1又は2の方法。

【0269】

4. 前記生物学的サンプルが、粘液であるか、又は粘膜から得られる、実施形態1～3の何れか1の方法。

【0270】

5. 前記生物学的サンプルが、癌又は腫瘍を有するか、又は腫瘍又は癌を有する危険性を有する疑いがある対象から得られる、実施形態1～4の何れか1の方法。

20

【0271】

6. 前記生物学的サンプルが、癌、又は非癌性増殖性状態、障害又は疾患を有するか、又は非癌性増殖性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる、実施形態1～5の何れか1の方法。

【0272】

7. 前記生物学的サンプルが、炎症性及び／又は変性状態、障害又は疾患を有するか、又は炎症性及び／又は変性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる、実施形態1～6の何れか1の方法。

【0273】

8. 前記生物学的サンプルが、心血管性状態、障害又は疾患を有するか、又は心血管性状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られる、実施形態1～7の何れか1の方法。

30

【0274】

9. 前記生物学的サンプルが、感染状態、障害又は疾患を有するか、又は感染状態、障害又は疾患を有する疑いがあるか、又は有する危険性がある対象から得られ、実施形態1～8の何れか1の方法。

【0275】

10. (a) 生物学的サンプルをポリカーボネートフィルターに通すことにより希少細胞を単離するか又は抽出し、そしてポリカーボネートフィルター上のその単離された希少細胞を回収することを含んで成る、実施形態1～9の何れか1の方法。

40

【0276】

11. (a) 生物学的サンプルをPET(ポリエチレンテレフタレート)フィルターに通すことにより希少細胞を単離するか又は抽出し、そしてPET(ポリエチレンテレフタレート)フィルター上のその単離された希少細胞を回収することを含んで成る、実施形態1～10の何れか1の方法。

【0277】

12. (a) 生物学的サンプルを、任意の多孔性材料から製造されたフィルターに通すことにより希少細胞を単離するか又は抽出し、そして前記フィルター上のその単離された希少細胞を回収することを含んで成る、実施形態1～11の何れか1の方法。

50

- 【 0 2 7 8 】
 1 3 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、希釈される、実施形態 1 ~ 1 2 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 7 9 】
 1 4 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、新鮮である、実施形態 1 ~ 1 3 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 8 0 】
 1 5 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、固定される、実施形態 1 ~ 1 4 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 8 1 】 10
 1 6 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、細胞溶解剤により処理される、実施形態 1 4 又は 1 5 の方法。
- 【 0 2 8 2 】
 1 7 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、粘液溶解剤により処理される、実施形態 1 4 又は 1 5 の方法。
- 【 0 2 8 3 】
 1 8 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、タンパク質分解剤により処理される、実施形態 1 4 又は 1 5 の方法。
- 【 0 2 8 4 】
 1 9 . 前記生物学的サンプルが、(a) の前に、抗凝集剤により処理される、実施形態 1 1 4 又は 1 5 の方法。 20
- 【 0 2 8 5 】
 2 0 . 濾過により単離された又は抽出された前記希少細胞が、(b) におけるように、又は培養のために、さらなる分析の前に、支持体に移される、実施形態 1 ~ 1 9 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 8 6 】
 2 1 . 前記希少細胞が、濾過によるそれらの抽出又は単離の後、分子分析のために個々に収集される、実施形態 1 ~ 2 0 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 8 7 】
 2 2 . 濾過により抽出されるか又は単離されたすべての細胞は、(b) における使用のために収集される、実施形態 1 ~ 2 1 の何れか 1 の方法。 30
- 【 0 2 8 8 】
 2 3 . 前記単離された又は抽出された希少細胞が、(b) の前に、培養される、実施形態 1 ~ 2 2 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 8 9 】
 2 4 . 前記単離された又は抽出された希少細胞が、培養され、そして特定の薬物、及びそれらの異なった用量に対するそれらの感受性を試験するために使用される、実施形態 1 ~ 2 3 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 9 0 】
 2 5 . 前記単離された又は抽出された希少細胞が、患者に施される治療又は標的治療を選択し、そしてそれらに対する応答及び / 又は耐性をモニターするために使用される、実施形態 1 ~ 2 4 の何れか 1 の方法。 40
- 【 0 2 9 1 】
 2 6 . 前記単離された又は抽出された希少細胞が、(b) の前に、固定される、実施形態 1 ~ 2 5 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 9 2 】
 2 7 . 前記単離された又は希少細胞が、(b) の前に、フィルター上で染色されるか、又は免疫染色される、実施形態 1 ~ 2 6 の何れか 1 の方法。
- 【 0 2 9 3 】
 2 8 . 前記単離された又は抽出された希少細胞が、染色又は免疫染色の後又は前、in s 50

itu分子分析により、(b)において分析される、実施形態1~27の何れか1の方法。

【0294】

29.(b)がフィルター又は他の支持体上での単離された又は抽出された希少細胞のin situ細胞形態学的分析を包含する、実施形態1~28の何れか1の方法。

【0295】

30.(b)がフィルター又は他の支持体上での単離された又は抽出された希少細胞のin situ免疫標識を包含する、実施形態1~29の何れか1の方法。

【0296】

31.(b)がフィルター上の単離された又は抽出された希少細胞のタンパク質、核酸、又は他の成分のin situ分子分析を包含する、実施形態1~30の何れか1の方法。

10

【0297】

32.(b)が、単離された又は抽出された希少細胞のタンパク質、ペプチド又はポリペプチドの分子分析を包含する、実施形態1~31の何れか1の方法。

【0298】

33.(b)が、単離された又は抽出された希少細胞のDNA、RNA又はマイクロRNAの分子分析を包含する、実施形態1~32の何れか1の方法。

【0299】

34.(b1)細胞形態学的分析、免疫標識又はin situ分子分析の後、単離された又は抽出された希少細胞のイメージを可視化することを、さらに包含する、実施形態1~33の何れか1の方法。

20

【0300】

35.(b2)細胞形態学的分析、免疫標識又はin situ分子分析の後、単離された又は抽出された希少細胞のイメージを記録することを、さらに包含する、実施形態1~34の何れか1の方法。

【0301】

36.希少細胞の有無の検出方法であって、

(a)生物学的サンプルをフィルターに通し、そしてフィルター上のその単離された希少細胞を回収することにより希少細胞を単離するか又は抽出し；ここで前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有し；

30

(b)任意には、前記単離された又は抽出された希少細胞を培養し；

(c)任意には、前記単離された又は抽出された希少細胞、又は任意には、培養された希少細胞を固定するか又は染色し；

(d)希少細胞DNA、RNA及び/又はマイクロRNAの免疫標識、及び/又はin situ分子分析、及び/又は分子分析により、及び/又は希少細胞タンパク質分子の分子分析により、(a)、(b)又は(c)からの単離された又は抽出された希少細胞を分析することを含んで成る方法。

【0302】

37.前記単離された又は抽出された希少細胞が、(d)のために又は(d)の間、溶解される、実施形態36の方法。

40

【0303】

38.前記単離された又は抽出された希少細胞が、溶解され、そして(d)溶解された希少細胞における状態、障害又は疾患に関連する、変異誘発されたタンパク質、及び/又は変異誘発されたRNA及び/又はDNA変異の検出を包含する、実施形態36又は37の方法。

【0304】

39.溶解された希少細胞中の変異誘発されたDNA、及び/又は変異誘発されたRNA、及び/又は変異誘発されたタンパク質の検出に基づいて、治療効果を評価するか、又は治療に対する可能性ある耐性を検出するために、個別化医療のための標的治療を選択することをさらに包含する、実施形態38の方法。

50

【0305】

40. 前記単離され、そして抽出された希少細胞が、溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞中のALK変異の存在又は不在を検出することを包含する、実施形態36~39の何れか1の方法。

【0306】

41. 前記単離された又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞におけるALK突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はALK突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含する、実施形態36~40の何れか1の方法。

10

【0307】

42. 前記単離された又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞におけるK-RAS及び/又はEGFR突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はK-RAS及び/又はEGFR突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含する、実施形態36~41の何れか1の方法。

【0308】

43. 前記単離された又は抽出された希少細胞が溶解され、そして(d)前記溶解された希少細胞におけるB-RAF及び/又はHER2突然変異の有無を検出することを含んで成り、ここで前記工程がさらに、対象のための治療法を選択し、治療法の有効性を追跡し、又はB-RAF及び/又はHER2突然変異の有無に基づいて、治療法に対する耐性を検出することを包含する、実施形態36~42の何れか1の方法。

20

【0309】

44. 同じ対象から異なった時点で得られた生物学的サンプルを用いて、実施形態36~43の何れか1の方法を反復することを包含する個別化医学療法。

【0310】

45. 前記生物学的サンプルが、希少細胞に関連する状態についての治療の間、又は希少細胞に関連する状態、障害又は疾患についての異なった治療レジメンの間、異なった時点で、治療の前後、同じ患者から得られる、実施形態44の個別化医学療法。

【0311】

46. 前記個別化医学治療がさらに、
(e)治療レジメンの有効性を決定するためにか、又は治療レジメンに対する耐性を検出するために、異なった時点で得られたサンプル間の希少細胞の数を比較することを含んで成り、ここで検出された希少細胞の相対数の低下が、治療レジメンの相対的有効性を示し、そして検出される希少細胞の相対数の上昇が、治療レジメンに対する耐性又は治療レジメンの無効性を示し；そして任意には、
(f)(e)に基づいて対象についての効果的な個別化された標的治療法を選択することを含んで成る、実施形態45の個別化医学療法。

30

【0312】

47. (d)前記単離された又は抽出された希少細胞の分析が、その希少細胞のタイプ及び/又は起源を決定することを包含する、実施形態36~43の何れか1の方法。

40

【0313】

48. (d)前記単離された又は抽出された希少細胞の分析が、その希少細胞の上皮から間葉への移行の状態を決定することを包含する、実施形態36~43及び47の何れか1の方法。

【0314】

49. (d)前記単離された又は抽出された希少細胞の分析が、その幹希少細胞の状態を決定することを包含する、実施形態36~43及び47~48の何れか1の方法。

【0315】

50. (d)前記単離された又は抽出された希少細胞が、希少細胞が転移性又は侵襲性

50

細胞に関連する遺伝子発現徴候を有するかどうかを決定するか、又は希少細胞が転移又は侵襲に関連する決定基を発現するかどうかを決定することにより、前記単離された又は抽出された細胞を分析することを含んで成る、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 49 の何れか 1 の方法。

【0316】

51. (d) に基づく希少細胞に関連する状態、障害又は疾患の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 50 の何れか 1 の方法。

【0317】

52. (d) に基づく希少細胞に関連する癌及び/又は侵襲性癌の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 51 の何れか 1 の方法。

10

【0318】

53. 前記癌及び/又は侵襲性癌が起因する器官の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 52 の何れか 1 の方法。

【0319】

54. (d) に基づく希少細胞に関連する感染状態、障害又は疾患の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 53 の何れか 1 の方法。

【0320】

55. 希少細胞の分子特性に対する候補薬物又は候補治療の効果を評価し、そして薬物又は治療を付与しない対照と比較して、対象における希少細胞の数を減じる薬物又は治療を選択し、そして対照と比較して、希少細胞の相対数を減じるか、又は希少細胞の分子又は免疫学的特性を修正する薬物又は治療を選択することを含んで成る、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 54 の何れか 1 の方法。

20

【0321】

56. さらに、希少細胞に関連する状態、障害又は疾患を発症する対象の素因及び/又は危険性を評価することを含んで成り、ここで基線又は対照値に比較して、希少細胞の相対数の上昇が前記状態、障害又は疾患を発症する素因又は高められた危険性を示すか、又は基線又は対照値に比較して、希少細胞における分子又は免疫学的変化が、前記状態、障害又は疾患を進行する素因又は高められた危険性を示す、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 55 の何れか 1 の方法。

【0322】

57. 前記状態、障害又は疾患が遺伝性疾患である、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 56 の何れか 1 の方法。

30

【0323】

58. 前記状態、障害又は疾患が癌又は腫瘍性疾患である、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 57 の何れか 1 の方法。

【0324】

59. 前記状態、障害又は疾患が感染状態、障害又は疾患である、実施形態 36 ~ 43 及び 47 ~ 56 の何れか 1 の方法。

【0325】

60. 体液から希少細胞を抽出するか又は単離するための 1 又は 2 以上のフィルター、濾過の前に、体液を処理するための 1 又は 2 以上の緩衝液、希釈剤又は他の剤、

40

希少細胞が体液から抽出されるか又は単離された後、その希少細胞を懸濁し、洗浄し、又は他方では、処理するための 1 又は 2 以上の緩衝液、

フィルターからの単離された又は抽出された希少細胞を、異なった支持体上にトランスファーするための 1 又は 2 以上のトランスファー緩衝液、

1 又は 2 以上の細胞形態及び/又は細胞化学染色試薬又は他の細胞染料、又はそのための緩衝液、

希少細胞を免疫標識するための 1 又は 2 以上の抗体又は他の試薬、又はそのための緩衝液、

フィルター又は他の支持体上の希少細胞の in situ 分析のための 1 又は 2 以上の試薬、

50

希少細胞を溶解するための1又は2以上の溶解剤又は溶解緩衝液、

希少細胞タンパク質の分子分析のための1又は2以上の抗体又は他の試薬、又はそのための緩衝液、

希少細胞核酸の分子分析(PCRを包含する)のための1又は2以上のプローブ、プライマー、ヌクレオチド、酵素又は他の試薬、の少なくとも1つを含んで成るキット。

【0326】

61. 生物学的サンプルをフィルターに通して、そしてフィルター(前記フィルターは、希少細胞を保持するが、しかし他の種類の細胞の通過を可能にする、孔サイズ、孔密度又は他の物理的特性を有する)上の単離された希少細胞を回収することにより単離された又は抽出された1又は2以上の希少細胞を含んで成る組成物。

10

【0327】

62. 実施形態61の組成物を含むフィルター又は他の支持体。

【0328】

63. 実施形態36~43及び47~59の段階d)に基づいて、腫瘍細胞に関連する肺癌の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態36~43及び47~59の何れか1の方法。

【0329】

64. 実施形態36~43及び47~59の段階d)に基づいて、内皮細胞に関連する心血管疾患の存在及び/又は重症度の早期診断を行うことをさらに包含する、実施形態36~43及び47~59の何れか1の方法。

20

【0330】

参照による組込み

本開示により引用されるか又は言及される各文書、特許、特許出願又は特許出版物は、特に本文中の参考文献の引用を取り巻く特定の主題に関して、その全体が参照により組み込まれる。しかしながら、そのような参照が背景技術を構成し、そして引用された文献の正確性及び適切性に挑戦する権利が確保されているとは認められない。

【0331】

参考文献

1. Goya T, Asamura H, Yoshimura H et al., Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: a Japanese lung cancer registry study. Lung Cancer 2005;50: 227-34.

30

2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al., Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.

3. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura, H. Prognosis and survival after resection for bronchogenic carcinoma based on the 1997 TNM-staging classification: the Japanese experience. Ann Thorac Surg 2001;71: 1759-64.

4. Pfannschmidt J, Muley T, Bulzebruck H, et al., Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer: experiences in 2083 patients. Lung Cancer 2007;55:371-7.

5. van Rens MT, de la Riviere AB, Elbers HR, van Den Bosch JM. Prognostic assessment of 2,361 patients who underwent pulmonary resection for non-small cell lung cancer, stage I, II, and IIIA. Chest 2000;117:374-9.

40

6. Hirsch FR, Wynes MW, Gandara DR, Bunn PA Jr., The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2010;16:4909-11.

7. Mino-Kenudson M, Mark EJ., Reflex testing for epidermal growth factor receptor mutation and anaplastic lymphoma kinase fluorescence in situ hybridization in non-small cell lung cancer. Arch Pathol Lab Med 2011;135:655-64.

8. Pao W, Girard N., New driver mutations in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol 2011;12:175-80.

50

9. Bria E, Milella M, Cuppone F, et al., Outcome of advanced NSCLC patients harboring sensitizing EGFR mutations randomized to EGFR tyrosine kinase inhibitors or chemotherapy as first-line treatment: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2011;22:2277-85.
10. Gerber DE, Minna JD., ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010;18:548-51.
11. Sasaki T, Janne PA., New strategies for treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2011;17:7213-8.
12. Shaw AT, Solomon B., Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:2081-6. 10
13. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, et al., Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011;12:1004-12.
14. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, et al., Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1226-34.
15. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al., Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 2011;17:827-35.
16. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al., Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011a;29:1556-63. 20
17. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al., Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2011b Dec 14.
18. Paterlini-Brechot P, Benali NL., Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007;253:180-204.
19. Yu M, Stott S, Toner M, et al., Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 2011;192:373-82.
20. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al., Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-77. 30
21. Hofman V, Ilie MI, Long E, et al., Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* 2011;129:1651-60.
22. Hofman V, Long E, Ilie M, et al., Morphological analysis of circulating tumor cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumor cell (ISET) method. *Cytopathology* 2012;23:30-8
23. Vona G, Sabile A, Louha M, et al., Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156:57-63. 40
24. Hou JM, Krebs M, Ward T, et al., Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 2011;178:989-96.
25. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al., Detection of circulating tumor cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011;105:1338-41.
26. Lababede O, Meziane M, Rice T., Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams. *Chest* 2011;139:183-9. 50

27. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al., International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244-85.
28. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al., Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung carcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5216-23.
29. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al., Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005;7:413-21.
30. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al., KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or Irinotecan: Results From the MRC FOCUS Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:5931-7. 10
31. Hofman P, Ilie M, Hofman V, et al., Immunohistochemistry to identify EGFR mutations or ALK rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2011 Nov 18.
32. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al., EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4275-83.
33. Lee JK, Park HS, Kim DW, et al., Comparative analyses of overall survival in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive and matched wild-type advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2011 Nov 15. 20
34. Wu SG, Kuo YW, Chang YL, et al., EML4-ALK Translocation Predicts Better Outcome in Lung Adenocarcinoma Patients with Wild-Type EGFR. *J Thorac Oncol* 2012;7:98-104.
35. Yang P, Kulig K, Boland JM, et al., Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012;7:90-7
36. Just PA, Cazes A, Audebourg A, et al., Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer*. 2011 Dec 6 30
37. Paik JH, Choi CM, Kim H, et al., Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011 Nov 28.
38. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al., The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:1773-80
39. Popat S, Gonzalez D, Min T, et al., ALK translocation is associated with ALK immunoreactivity and extensive signet-ring morphology in primary lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]
40. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, et al., Correlation of ICH and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: ICH score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011; 6:459-65. 40
41. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, et al., Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:3349-55.
42. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, et al., Circulating tumor cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2010;2:351-65.
43. Katayama R, Khan TM, Benes C, et al., Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7535-40.
44. Heuckmann JM, Holzel M, Sos ML, et al., ALK mutations conferring different 50

ial resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin Cancer Res* 2011;17:7394-401.

45. Paterlini-Brechot P, Benali NL., Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007;253:180-204.

46. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al., Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol.* 2012;7:306-15.

47. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al., EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012;148:349-61. 10

48. Klein C., Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*, 2009 (9): 302-312.

49. National Lung Screening Trial Research Team: Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011 4;365:395-409.

50. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Flejou JF, et al., Preoperative Circulating Tumor Cell Detection Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method for Patients with Lung Cancer Is a New Prognostic Biomarker. *Clin Cancer Res.* 2011;17:827-35. 20

51. Hofman V, Long E, Ilie M, Bonnetaud C, Vignaud JM, Flejou JF, et al., Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method. *Cytopathology.* 2012;23:30-8.

52. Mazzone P, Mekhail T., Current and emerging medical treatments for non-small cell lung cancer: a primer for pulmonologists. *Respir Med.* 2012;106:473-92.

53. 2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al., Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.

54. Mets OM, Buckens CF, Zanen P, Isgum I, van Ginneken B, Prokop M, Gietema H A, Lammers JW, Vliegenthart R, Oudkerk M, van Klaveren RJ, de Koning HJ, Mali WP, de Jong PA., Identification of chronic obstructive pulmonary disease in lung cancer screening computed tomographic scans. *JAMA.* 2011; 306:1775-81. 30

55. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110:687-694.

56. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK, Xie J, Zhao W, Huang H et al., Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn* 2012; 32:1-8.

57. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M et al., Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012; 32:1233-1241. 40

58. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW., Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:13116-13121.

59. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM et al., Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20458-20463. 50

60. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR., Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16266-16271.
61. Vona G, Beroud C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, Munnich A, Vekemans M, Dumez Y, Lacour B et al., Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol* 2002; 160:51-58.
62. Mouawia H, Saker A, Jais JP, Benachi A, Bussieres L, Lacour B, Bonnefont JP, Frydman R, Simpson JL, Paterlini-Brechot P., Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:508-520. 10
63. Shettles LB. Use of the Y chromosome in prenatal sex determination. *Nature* 1971; 230:52-53.
64. Rhine SA, Cain JL, Cleary RE, Palmer CG, Thompson JF. Prenatal sex detection with endocervical smears: successful results utilizing Y-body fluorescence. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122:155-160.
65. Ergin T, Baltaci V, Zeyneloglu HB, Duran EH, Ergeneli MH, Batioglu S. Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95:37-41. 20
66. Cioni R, Bussani C, Bucciantini S, Scarselli G. Fetal cells in a transcervical cell sample collected at 5 weeks of gestation. *J Mat-Fet Neonat Med* 2005; 18:271-273.
67. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Marchionni M, Scarselli G. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population. *Prenat Diagn* 2005; 25:198-202.
68. Bussani C, Scarselli B, Cioni R, Bucciantini S, Scarselli G. Use of the quantitative fluorescent-PCR assay in the study of fetal DNA from micromanipulated transcervical samples. *Mol Diagn* 2004; 8:259-263.
69. Kingdom J, Sherlock J, Rodeck C, Adinolfi M. Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush. *Obstet Gynecol* 1995; 86:283-288. 30
70. Massari A, Novelli G, Colosimo A, Sangiuolo F, Palka G, Calabrese G, Camurri L, Ghirardini G, Milani G, Giorlandino C et al. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells. *Hum Genet* 1996; 97:150-155.
71. Chang SD, Lin SL, Chu KK, His BL. Minimally-invasive early prenatal diagnosis using fluorescence in situ hybridization on samples from uterine lavage. *Prenat Diagn* 1997; 17:1019-1025.
72. Chou MM, Lin SK, Ho ES. Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation. *Prenat Diagn* 1997; 17:77-80. 40
73. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:5847-5851.
74. Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, Armant DR. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod* 2009; 24:2086-2092.
75. Coumans, F. A. W., et al., Filter Characteristics Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood, *PLOS ONE* 8(4): e61770 (April 2013)
76. Coumans, F. A. W., et al., Filtration Parameters Influencing Circulating T 50

【 図 1 A 】

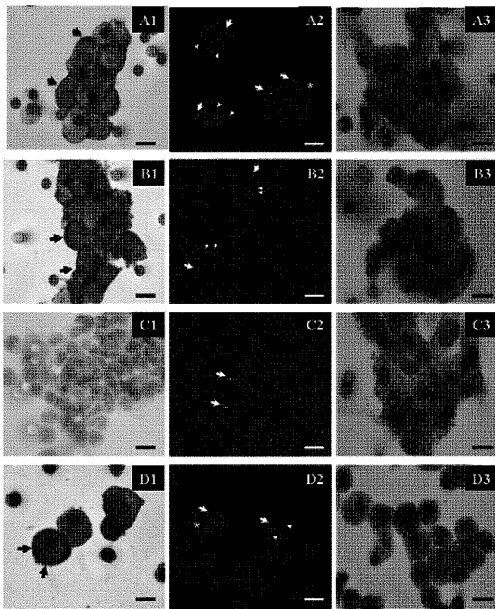


Fig.1A

【 図 1 B 】

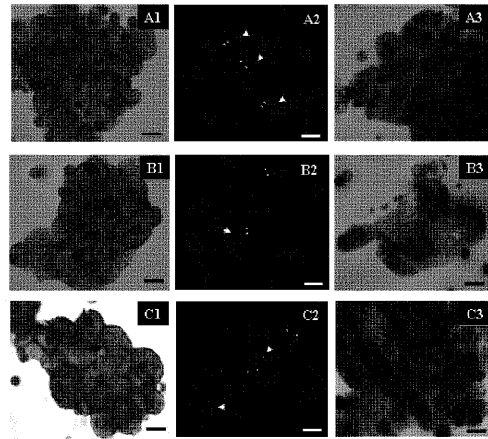
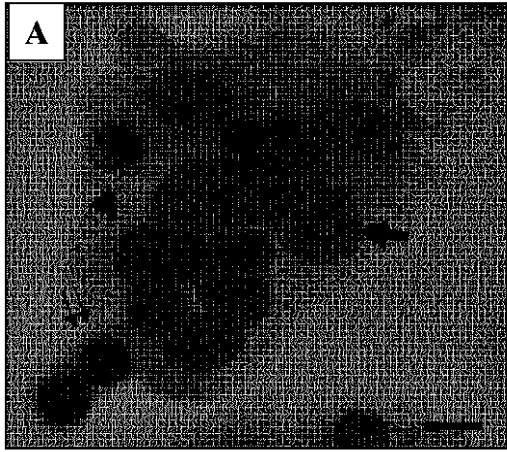
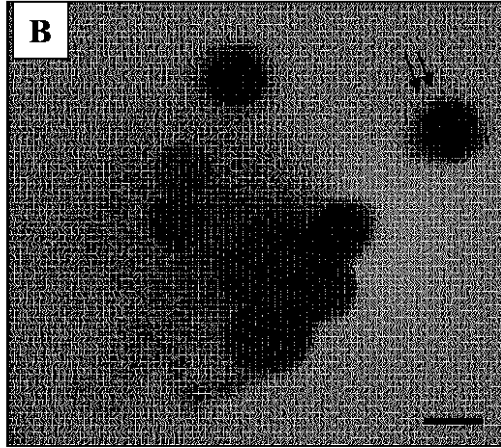


Fig.1B

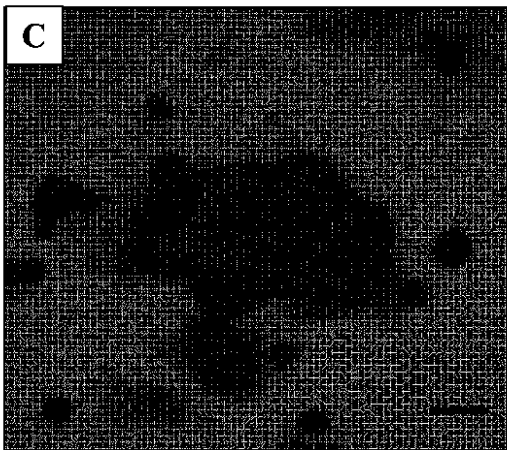
【 図 2 A 】



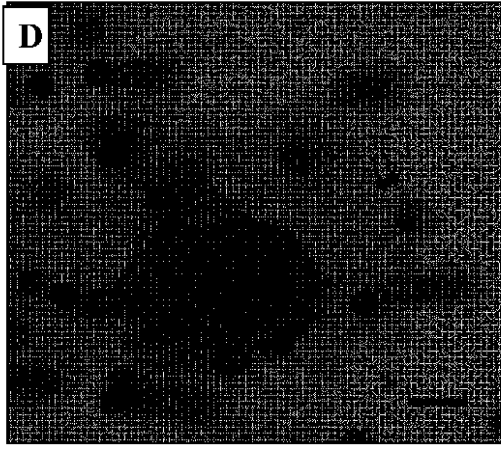
【 図 2 B 】



【 図 2 C 】



【 図 2 D 】



【 図 3 】

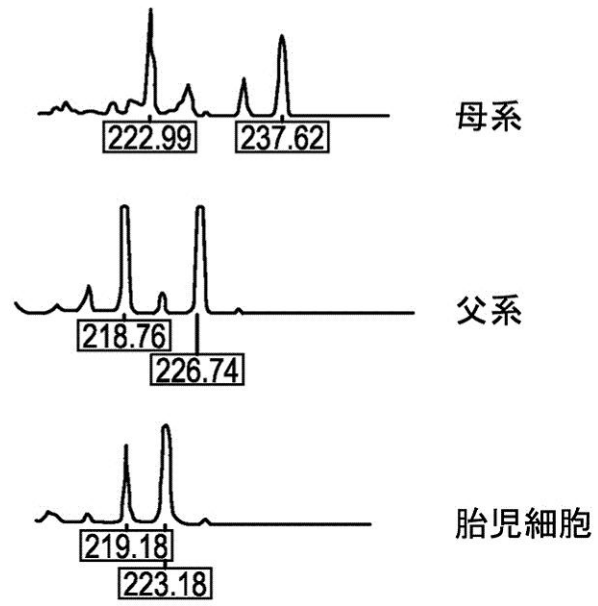
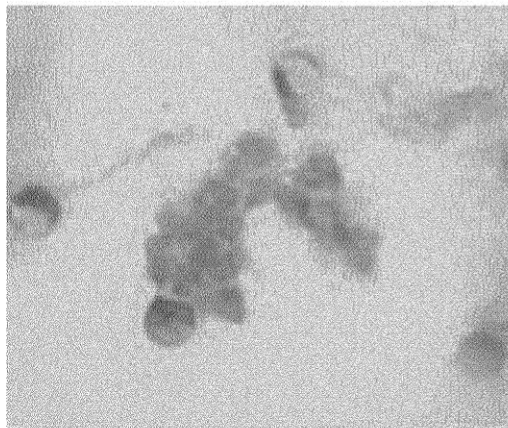
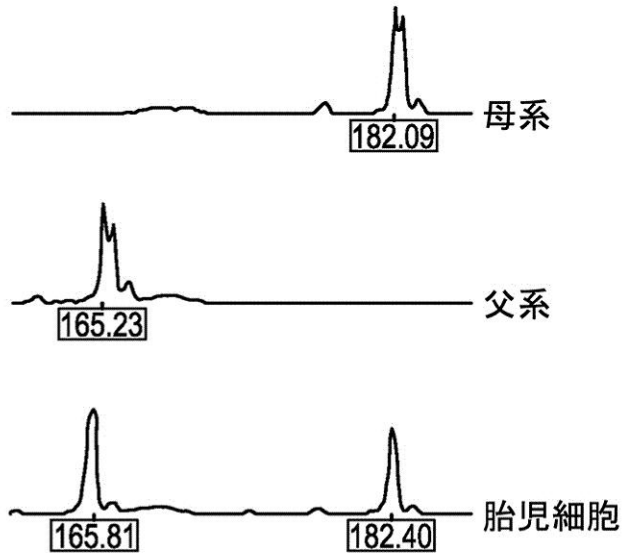
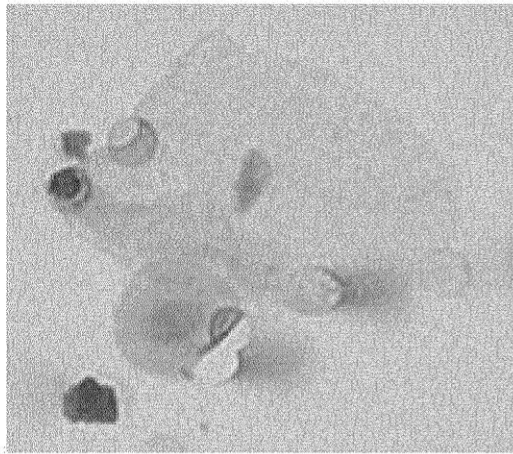


Fig.3

【 配列表 】

2015524054000001 . app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/060671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 C12N5/00 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/226957 A1 (PATERLINI-BRECHOT PATRIZIA [FR]) 10 September 2009 (2009-09-10) cited in the application paragraphs [0001], [0002], [0015], [0066], [0067], [0069], [0074] - [0076]; claims 1,13 -----	1,2,4, 6-15,19
X	US 7 651 838 B2 (PATERLINI-BRECHOT PATRIZIA [FR]) 26 January 2010 (2010-01-26) cited in the application columns 1,4,9,10; claims 1,14,18 column 12, last paragraph ----- -/--	1-15,19, 20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* 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		Date of mailing of the international search report
17 July 2013		25/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, Björn

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/060671

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2008/008515 A2 (AVIVA BIOSCIENCES CORP [US]; LIN PING [US]; GHETTI ANDREA [US]; SHI WE) 17 January 2008 (2008-01-17) abstract; claims 15, 22-26,29 paragraphs [0015], [0045] -----</p>	1-20
X	<p>WO 2005/047529 A1 (AVIVA BIOSCIENCES CORP [US]; WALKER GEORGE [US]; XU JUNQUAN [US]; YAMA) 26 May 2005 (2005-05-26) abstract; claim 70 -----</p>	1-20
X	<p>MINSEOK S. KIM ET AL: "SSA-MOA: a novel CTC isolation platform using selective size amplification (SSA) and a multi-obstacle architecture (MOA) filter", LAB ON A CHIP, vol. 12, no. 16, 10 May 2012 (2012-05-10), page 2874, XP055071795, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c2lc40065k the whole document -----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/060671

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/060671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009226957 A1	10-09-2009	CA 2601451 A1	28-09-2006
		EP 1866091 A2	19-12-2007
		FR 2883488 A1	29-09-2006
		FR 2947738 A1	14-01-2011
		JP 2008537485 A	18-09-2008
		US 2009226957 A1	10-09-2009
		WO 2006100366 A2	28-09-2006

US 7651838 B2	26-01-2010	CA 2452099 A1	07-11-2002
		EP 1383926 A2	28-01-2004
		FR 2824144 A1	31-10-2002
		JP 4404553 B2	27-01-2010
		JP 2004533243 A	04-11-2004
		US 2005049793 A1	03-03-2005
		WO 02088736 A2	07-11-2002

WO 2008008515 A2	17-01-2008	CA 2657621 A1	17-01-2008
		CN 101583722 A	18-11-2009
		EP 2041299 A2	01-04-2009
		US 2008206757 A1	28-08-2008
		WO 2008008515 A2	17-01-2008

WO 2005047529 A1	26-05-2005	CA 2544564 A1	26-05-2005
		EP 1694856 A1	30-08-2006
		US 2004142463 A1	22-07-2004
		WO 2005047529 A1	26-05-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 A
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 P 31/00	
	A 6 1 P 9/00	
	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 K 45/00	

(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

- (71)出願人 505138897
ユニベルシテ パリ デカルト
フランス国, エフ - 7 5 2 7 0 パリ セデ 0 6 , リュ ドゥ レコール ドゥ メドゥシーヌ
1 2
- (71)出願人 514298346
ソフィー ラジェ
フランス国, エフ - 7 5 0 1 3 パリ, アブニュ ディタリー, 6 9
- (71)出願人 514298357
パトリツィア パテルリニ - ブレコット
フランス国, エフ - 7 5 0 1 5 パリ, プールパール パストゥール, 3 5
- (71)出願人 514298379
ポール ホフマン
フランス国, エフ - 0 6 9 5 0 ファリコン, ルート ドゥ レール サン - ミッシェル, 4 4 2
- (71)出願人 514298380
ティエリ カピオ
フランス国, エフ - 7 5 0 1 9 パリ, リュ エミール デルポー, 3 3
- (74)代理人 100099759
弁理士 青木 篤
- (74)代理人 100077517
弁理士 石田 敬
- (74)代理人 100087871
弁理士 福本 積
- (74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

- (74)代理人 100195486
弁理士 千野 櫻子
- (72)発明者 ソフィー ラジェ
フランス国, エフ - 7 5 0 1 3 パリ, アブニュ ディタリー, 6 9
- (72)発明者 パトリツィア パテルリニ - ブレコット
フランス国, エフ - 7 5 0 1 5 パリ, プールバール パストゥール, 3 5
- (72)発明者 ポール ホフマン
フランス国, エフ - 0 6 9 5 0 ファリコン, ルート ドゥ レール サン - ミッシェル, 4 4 2
- (72)発明者 ティエリ カピオ
フランス国, エフ - 7 5 0 1 9 パリ, リュ エミール デルボー, 3 3
- F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BB04 BB22 BB24 CA25 CB01 DA13 DA14 DA36
FA03
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR42 QR50 QR55
QR62 QS25 QS28 QS34 QX02
4B065 AA90X AA90Y AB10 AC20 BA24 BD18 CA46
4C084 AA17 NA05 ZA361 ZB111 ZB261 ZB321 ZC411

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015524054A5	公开(公告)日	2016-07-07
申请号	JP2015513193	申请日	2013-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	Rarusuru 协助市民郭皮托巴黎 国家研究所德Rasante埃杜拉尔壳邦医疗 苏菲Raje 帕特里齐亚腻子琉璃2抖动库托 保罗·霍夫曼 蒂埃里Capio		
申请(专利权)人(译)	Rarusuru 援助Paburiku - OPITO巴黎 国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Yuniberushite巴黎笛卡尔 苏菲Raje 帕特里齐亚Paterurini - Burekotto 保罗·霍夫曼 蒂埃里Capio		
[标]发明人	ソフィーラジェ パトリツィアパテルリニブレコット ポールホフマン ティエリカピオ		
发明人	ソフィー ラジェ パトリツィア パテルリニ-ブレコット ポール ホフマン ティエリ カピオ		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/68 C12N5/071 A61P35/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P35/04 A61K45/00		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N2800/00 G01N2800/52 G01N2800/7028 A61P11/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C12Q1/6886		
FI分类号	G01N33/48.ZNA.M G01N33/48.S G01N33/48.P G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/53.Y C12Q1/68.A C12N5/00.202.A A61P35/00 A61P43/00.111 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P35/04 A61K45/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BB04 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB10 4B065/AC20 4B065/BA24 4B065/BD18 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA361 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB321 4C084/ZC411		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	61/651437 2012-05-24 US		

摘要(译)

从生物样品中分离或提取稀有细胞的方法，包括过滤生物样品，其可以通过具有孔径，孔密度或其他物理性质的过滤器进行处理或稀释，所述过滤器保留稀有细胞但允许其他种类细胞通过过滤器。该过程还包括在提取或通过过滤分离后对稀有细胞进行多次分析，以诊断性地鉴定生物样品中稀有细胞的存在，并将其诊断鉴定和分子表征用于诊断目的，例如用于疾病的早期诊断，即用于癌症的早期诊断并选择，指导，监测治疗，特别是选择靶向治疗并监测对它们的反应和/或抗性。包含工具，设备和/或试剂的试剂盒，用于完成过滤步骤和在通过过滤分离和提取稀有细胞后进行的各种多重分析。