

(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2009-534666

(P2009-534666A)

(43) 公表日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 G O 5 4
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	4 B O 6 5
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/46 U	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-506737 (P2009-506737)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月18日 (2007.4.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月15日 (2008.12.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/066856
 (87) 国際公開番号 W02007/121464
 (87) 国際公開日 平成19年10月25日 (2007.10.25)
 (31) 優先権主張番号 60/745,014
 (32) 優先日 平成18年4月18日 (2006.4.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503317500
 ウェルスタット バイオロジックス コー
 ポレイション
 アメリカ合衆国 メリーランド 2087
 8, ガイザーズバーグ, クロッパー
 ロード 930
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環内皮細胞の検出

(57) 【要約】

血液試料から内皮細胞を濃縮した後、その濃縮した内皮細胞に対して、その内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行うことにより、血液試料中の内皮細胞を検出する。前記イムノアッセイは、血液1ミリリットル当たり300個の内皮細胞から発現した抗原を検出することができる。前記方法は、成熟循環内皮細胞または循環内皮前駆細胞をアッセイするために使用することができる。本発明は、血液試料中の循環内皮細胞 (mCECおよび/またはCEP) のレベルを定量化するのに十分な感度を有するイムノアッセイを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液試料中の内皮細胞をアッセイする方法であって、該血液試料から該内皮細胞を濃縮した後、該濃縮した内皮細胞に対して、該内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、

該イムノアッセイが、血液 1 ミリリットル当たり 300 個の内皮細胞から該抗原を検出することができることによってか、または 160 ピコグラムの抗原タンパク質から該抗原を検出することができることによって定義される感度を有し、

該イムノアッセイが、該血液試料中に存在する内皮細胞数に比例してシグナルを発生する、

方法。

10

【請求項 2】

血液試料中の内皮細胞に対して内皮細胞抗原をアッセイする方法であって、該血液試料から該内皮細胞を濃縮した後、該濃縮した内皮細胞に対して、該内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、

該イムノアッセイが、血液 1 ミリリットル当たり 300 個の内皮細胞から該抗原を検出することができることによってか、または 160 ピコグラムの抗原タンパク質から該抗原を検出することができることによって定義された感度を有し、

該イムノアッセイが、該内皮細胞上の該抗原の量に比例してシグナルを発生する、

方法。

20

【請求項 3】

前記イムノアッセイが、血液 1 ミリリットル当たり 150 個の内皮細胞から前記抗原を検出することができる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記イムノアッセイが、血液 1 ミリリットル当たり 30 個の内皮細胞から前記抗原を検出することができる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記イムノアッセイが、4 ピコグラムの抗原タンパク質から前記抗原を検出することができる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記イムノアッセイが、1 ピコグラムの抗原タンパク質から前記抗原を検出することができる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記内皮細胞が、成熟循環内皮細胞および循環内皮前駆細胞からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記内皮細胞が成熟循環内皮細胞であり、前記抗原が CD 146 および vWF からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記内皮細胞が循環内皮前駆細胞であり、前記抗原が VEGFR - 2 および CD 133 からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記イムノアッセイが検出に電気化学発光を使用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

前記イムノアッセイが、検出に化学発光、蛍光化学発光、蛍光偏光、および時間分解蛍光から選択される技法を使用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

前記イムノアッセイが無傷の内皮細胞に対して行われ、前記抗原の細胞外ドメインに選択的に結合する抗体を使用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記イムノアッセイ前に前記濃縮した内皮細胞を溶解する工程をさらに含み、該イムノアッセイが該細胞溶解産物に対して行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記イムノアッセイが前記抗原に対するポリクローナル抗体を使用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記イムノアッセイが前記抗原に対するモノクローナル抗体を使用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記内皮細胞に選択的に結合することができる免疫磁気ビーズに前記血液を接触させることにより、該内皮細胞が濃縮される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

循環内皮細胞には、骨髄由来の循環内皮前駆細胞 (CEP) と成熟循環内皮細胞 (mCEC) の 2 つの異なる群がある (非特許文献 1 ; さらなる背景については、非特許文献 2 ; 非特許文献 3 を参照)。循環内皮細胞の測定は、血管新生阻害剤の生物活性の代理マーカーとしての機能を果たし、このような癌療法が有益となる患者を選択するのに使用される (非特許文献 1)。例えば、高レベルの VEGFR を発現する CEP 患者は、ペバシズマブ (Avastin) などの VEGFR 阻害剤による治療に最適な候補者である。また、レベルの増大が病勢進行を示すため、mCEC 測定は癌に有用である (非特許文献 4 ; 非特許文献 5)。

20

【0002】

しかし、「現在のところ、これらの [血管新生阻害] 剤の臨床試験は、生物学的効果を測定し、最も有益となる患者を予測する代理マーカーがないために実施できない状況である」とされている (非特許文献 6)。したがって、抗血管新生療法が有益となる癌患者を予測する試験が必要とされている。

【0003】

循環内皮細胞は、心臓血管系の医学分野で重要な予後因子である。低レベルの CEP は、心血管事象の危険性が高いことを示している (非特許文献 7 ; 非特許文献 8 ; 非特許文献 9)。心血管事象の危険性がある患者をより適切に予測する試験が必要とされている。心筋梗塞 (MI) の疑いがある患者では、高レベルの CEP が、最近 MI を発症したことを示す。したがって、患者が心筋梗塞を発症した疑いがある場合に、どの患者が心筋梗塞を発症したかを予測するより優れた試験が必要とされている。

30

【0004】

既刊文献で使用されている、CEP および mCEC を定量化する手法は、「難事」であると記載されている (非特許文献 3) フローサイトメトリー (非特許文献 8) を使用することが多い。これは、自動化に容易に適用できない、厄介で時間のかかる手法である。フローサイトメトリーなどに関するその他の問題として、フローサイトメトリーでは背景染色が高い点がある。一般的に、フローサイトメトリーでは、分析した細胞の 0.1 ~ 0.5% で非特異性染色が見られるが、これは多すぎるため、わずか 0.0001% にもなり得る所望の循環内皮細胞群の検出や計数を遮断してしまうことになる (非特許文献 3)。過度のデータ記憶容量も、フローサイトメトリーによるまれな事象の分析に関連する問題である (非特許文献 3)。文献で使用されている別の CEP 測定方法は、コロニー計数法によるものである (非特許文献 7)。この方法は、フローサイトメトリーよりも時間を要し、実行に 1 週間を超える時間を要する (非特許文献 7)。したがって、本発明の方法は、循環内皮細胞の迅速な評価を可能にし、かつフローサイトメトリーによるまれな事象の分析に固有の問題 (背景問題、過度のデータ記憶容量) を回避するという点で、本分野における飛躍的な進歩である。

40

50

【0005】

CEPおよびmCECは、0.01%~0.0001%と推定される血液中の単核細胞の微小画分を表す(非特許文献3)。これらの細胞は生体の血管新生活性や血管形成活性に関する洞察をもたらすことから、末梢血中のこれらの細胞を計数することが医学的に重要である。血管新生は腫瘍増殖に重要であることが明らかにされており、新規の抗血管新生療法(承認薬のベパシズマブなど)は腫瘍増殖を遅らせるまたは予防するのに使用されている。血管新生および血管形成はまた、鎌状赤血球病、血管炎および肺高血圧症をはじめとする癌以外のその他多くの疾患でも有害である(非特許文献3)。対照的に、冠動脈疾患では、血管形成または血管再生が心臓組織への血流を改善するのに望ましい。

【非特許文献1】Beaudryら, Clin Cancer Res, 2005, 11: 3514

10

【非特許文献2】Rosenzweig; New Engl J Med, 2005, 353: 1055-1057

【非特許文献3】Khan SS, 2004; Cytometry Part B, Clinical Cytometry 64B: 1-8

【非特許文献4】Mancuso Pら, 2001, Blood 97: 3658-61

【非特許文献5】Beerapoort LVら, 2004, Ann Oncol 15: 139-45

【非特許文献6】Davis DW, ら, 2003, Br J Cancer 89: 8-14

20

【非特許文献7】Hill JMら, 2003, New Engl J Med 348: 593-600

【非特許文献8】Werner N, ら, 2005, New Engl J Med 353: 999-1007

【非特許文献9】Schmidt-Lucke Cら, Circulation 2005, 111: 2981-87

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

30

本発明は、血液試料中の内皮細胞をアッセイする方法であって、血液試料から内皮細胞を濃縮した後、濃縮した内皮細胞に対して、血液試料1mL当たり300個の内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含む、方法を提供する。あるいは、前記アッセイは160ピコグラムの抗原タンパク質から抗原を検出することができる。

【0007】

本発明は、血液試料中の内皮細胞上に存在する内皮細胞抗原をアッセイする方法であって、血液試料から内皮細胞を濃縮した後、濃縮した内皮細胞に対して、内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、前記イムノアッセイが、血液1ミリリットル当たり300個の内皮細胞から抗原を検出することができることによってか、または160ピコグラムの抗原タンパク質から抗原を検出することができることによって定義される感度を有し、前記イムノアッセイが内皮細胞上の抗原量(すなわち抗原数)に比例してシグナルを発生する、方法を提供する。

40

【0008】

本発明は、血液試料中の循環内皮細胞(mCECおよび/またはCEP)のレベルを定量化するのに十分な感度を有するイムノアッセイを提供する。前記イムノアッセイは、種々の疾患(例えば、癌、鎌状赤血球病、血管炎、糖尿病、肺高血圧症および心血管疾患)の危険性が高い患者を特定する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

50

(発明の詳細な説明)

本明細書で使用される、「含む (c o m p r i s i n g) 」という移行語はオープンエンドな語である。本用語を使用する請求項は、当該請求項に列挙される要素に加えて、他の要素も含むことができる。したがって、例えば、本特許請求の範囲では、列挙される要素またはその等価物が存在する限り、特許請求の範囲で具体的に列挙されない他の手順も含む方法が記載されている。

【 0 0 1 0 】

本明細書で使用される、試料から所与の種類の細胞を「濃縮する」こととは、前記試料中の他の種類の細胞からこのような細胞を精製または部分精製することを意味する。

略語：

m C E C : 成熟循環内皮細胞

C E P : 循環内皮前駆細胞

E C L : 電気化学発光

H U V E C : ヒト臍帯静脈内皮細胞

M I : 心筋梗塞

P B M C : 末梢血単核細胞

V E G F : 血管内皮増殖因子

V E G F R 2 : 血管内皮増殖因子受容体 2 型

C E P は以下のマーカーの存在により区別することができる (K h a n ら , 2 0 0 4 ; R o s e n z w e i g , 2 0 0 5 , N e w E n g l J M e d 3 5 3 : 1 0 5 5 - 7) 。

- ・ C D 1 3 3 (m C E C に存在しない)
- ・ V E G F R - 2 (血管細胞接着分子 1 ; K D R と呼ばれる)
- ・ C D 3 4

- ・ C D 4 5 の欠失および C D 3 の欠失

m C E C は以下のマーカーの存在により区別することができる。

- ・ C D 1 4 6 (C E P に存在しない)
- ・ フォンヴィレブランド因子 (v W F)
- ・ C D 3 1 (P E C A M - 1 と呼ばれる : 血小板内皮細胞接着分子 1)
- ・ C D 4 5 の欠失および C D 3 の欠失 (これは活性化 T 細胞が C D 1 4 6 を発現できるため重要である ; K h a n ら , 2 0 0 4) 。

【 0 0 1 1 】

本発明は血液試料中の循環内皮細胞 (m C E C および / または C E P) のレベルを定量化するのに十分な感度を有するイムノアッセイを提供する。前記イムノアッセイは、種々の疾患 (例えば、癌、鎌状赤血球疾患、血管炎、糖尿病、肺高血圧症および心血管疾患) の危険性が高い患者を特定する方法を提供する。予防策を講じるには、本発明で提供される、血液試料を試験してこのような患者を特定するための便利で、感度がきわめて高く、迅速な方法がきわめて望ましい。電気化学発光 (E C L) 検出の使用は、これを達成するのに好ましい方法である。

【 0 0 1 2 】

本発明は、血液から循環内皮細胞を単離するのに使用する方法の高い特異性と、ECLなどの特定の免疫学的アッセイの高感度とを組み合わせることに基づく。循環内皮細胞は最初に免疫磁気ビーズを使用して濃縮される。

【 0 0 1 3 】

本発明の検出方法の一実施形態において、免疫学的アッセイは、血液 1 ミリリットル当たり 3 0 0 個、より好ましくは 1 5 0 個、より好ましくは 1 0 0 個、より好ましくは 3 0 個、最も好ましくは 1 0 個の内皮細胞から抗原を検出することができるようなものである。

【 0 0 1 4 】

以下は、内皮細胞を濃縮する方法の好ましい実施形態である。

10

20

30

40

50

【0015】

患者から血液試料（通常約8～20mL）を採取する。

- 1．赤血球の除去。
- 2．正常な白血球をさらに枯渇させる任意の陰性選択。好ましい実施形態はこの手順を含む。
- 3．循環内皮細胞（mCECまたはCEP）の陽性選択。
- 4．循環mCECまたはCEPに由来する1つ以上の抗原に対するイムノアッセイを使用したmCECまたはCEPの検出および定量化

- 1．赤血球の除去。

【0016】

赤血球を除去するためには、密度に基づく分離（例えば、Becton Dickinson BD Vacutainer CPTチューブへの直接の血液採取の後、遠心分離）のほか、PURESCRIPT RBC溶解バッファー（Gentra、米国ミネソタ州ミネアポリス）、FACS溶解液（BDIS）、IMMUNOLYSE（Coulter）、OPTILYSE B（Immunotech）、およびACK溶解バッファー（Biosource、米国メリーランド州ロックビル）などの市販の溶解バッファーを使用した分離を含むがこれらに限定されない種々の方法が利用可能である。

【0017】

好ましい方法では、抗凝固剤（EDTAまたはクエン酸塩）を有するBD Vacutainer CPTチューブが使用される。これらのチューブは、適切な遠心分離（1,100xgで10分間、スウィングアウトバケットローター）時に赤血球や好中球の除去を可能にする原料を含む。遠心分離後に、チューブの底部には赤血球や好中球の細胞ペレットができる。この細胞ペレットの上にはゲルバリアであり、さらにこのゲルバリアの上には、血漿底部の帯状部として腫瘍細胞、リンパ球および単球がある。その後、これらの腫瘍細胞、リンパ球および単球は、ゲルバリアの上の最上部から容易に採取することができる。本方法は、赤血球だけでなく好中球も除去することから好ましい方法である。

- 2．正常な白血球をさらに枯渇させるための陰性選択。

【0018】

本発明の好ましい実施形態は、内皮細胞の単離に陰性選択手順を使用する。陰性選択とは、不要な細胞を選択的に除去することである。陰性選択により、白血球、特にリンパ球および単球をさらに枯渇させることができる。1つの手法として、CD45および/またはCD3などの1つ以上の白血球抗原に対する抗体が付着した磁気ビーズを使用する手法がある。好ましい実施形態においては、白血球に対する複数の抗体が使用される。これらの磁気ビーズを血液試料に添加し、これらの磁気ビーズを磁石で取り除くことにより、白血球由来の試料がさらに枯渇され、内皮細胞が濃縮される。陰性選択の別の手法には、白血球抗原、特に一般的な白血球抗原であるCD45、ならびにグリコフォリンAなどの赤血球抗原の両方に対して二重特異性を有する抗体の使用が含まれる。血液採取前に、1つ以上のこれらの二重特異性抗体をBD Vacutainer CPTチューブに添加する。好ましい実施形態においては、複数の白血球関連CD分子に対する二重特異性抗体のカクテルが使用される。血液をVacutainer CPTチューブに導入すると、二重特異性抗体は、それぞれが白血球と多くの赤血球とからなる免疫ロゼットを形成する。これらの免疫ロゼットは、赤血球の密度とほぼ同じ密度を有しており、遠心分離時に赤血球ペレット中に存在し、それによって細胞ペレットやゲルバリアの上にある腫瘍細胞画分から白血球をさらに除去する。血漿中に腫瘍細胞を有する画分は、さらなる処理のために採取される。

- 3．循環内皮細胞（mCECまたはCEP）の陽性選択。

【0019】

循環内皮細胞を単離する好ましい方法では、免疫磁気ビーズが使用される。循環細胞を単離する他の方法には、濾過が含まれる（Vona Gら, 2000, Am J Pathol. 2000 156:57-63）。好ましい実施形態において、免疫磁気ビーズ

10

20

30

40

50

は、内皮細胞の表面に選択的に認められる抗原に対する抗体を有する。例としては、a) CEPの場合：CD133、VEGFR-2およびCD34；b) mCECの場合：CD146、vWFおよびCD31が含まれるが、これらに限定されない。これらの抗原の1つに対する抗体を有する免疫磁気ビーズが使用される。免疫磁気ビーズは種々のサイズ(50ミクロン~200nm未満)となる場合があり、これらのビーズにはDYNALビーズ(1.5ミクロン超~約50ミクロン)が含まれる。本発明の一実施形態においては、上述の抗体の一つを有する、EasySep(登録商標)陰性選択カクテルおよびEasySep(登録商標)磁性ナノ粒子(Stemcell Technologies)を、前の手順で得た内皮細胞を有する画分に添加する。次いで、磁石を使用して残りの原料から内皮を濃縮または単離し、これらの内皮細胞を水溶液で洗浄する。

4. 循環mCECsまたはCEPに由来する1つ以上の抗原に対するイムノアッセイを使用した、mCECまたはCEPの検出および定量化。

【0020】

好ましい実施形態において、これらの単離または濃縮されたmCECsまたはCEPはアッセイの前に溶解され、先に使用した磁気ビーズが磁石により除去される。溶解には、Pierce Lysis Buffer [M-PER(登録商標)Extraction Reagent(Pierce Biotechnology, Inc. 製品番号78501、米国イリノイ州ロックフォード)]、およびSigma Lysis Buffer [Sigma Cellytic(登録商標)-M(Sigma製品番号C2978、Sigma-Aldrich, Inc.、米国ミズーリ州セントルイス 63103)]を含むがこれらに特定されない、市販の細胞溶解試薬を使用することができる。溶解後に、測定するmCECまたはCEP抗原とともに溶解産物の上清を残したまま遠心分離することによって細胞残骸が除去される。

【0021】

次いで、アッセイ中の抗原に結合する抗体を使用した高感度サンドイッチイムノアッセイを使用することにより、mCECまたはCEPに特異的な抗原の検出を行うことができる。好ましくは少なくとも1つのポリクローナル抗体、最も好ましくは2つのポリクローナル抗体をはじめとする種々の抗体をイムノアッセイに使用することができる。本発明の好ましい実施形態においては、1つの抗体がビオチンと結合した後、ERに対する2つ目の抗体が検出分子で標識される。電気化学発光(ECL)を使用したより好ましい実施形態において、前記検出分子はルテニウムである。ルテニウムを抗体に結合させるのに十分有用な方法を提供する公知の文献は豊富に存在する(例えば、Leera, Am J Trop Med Hyg 2001, 65:1-9)。次いで、溶解産物の上清を2つの抗体と混合し、短時間インキュベートした後、トリプロピルアミンを含有する溶液中で、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズを添加する。電位を印加し、標的抗原(ER)が存在する状況下で、ルテニウム標識が励起され、ECL検知器(ORIGEN分析器、あるいはBIOVERIS Corporation(米国メリーランド州ゲイサーズバーグ)のM-Series(登録商標)384のような市販の機器など)を使用して光が発光され、検出される。ECLシグナルは、最初の血液試料中のmCECおよびCEPの数に比例する。

【0022】

本発明の好ましい実施形態において、本発明に基づいて使用されるイムノアッセイは、以下の組み合わせの1つを使用することができる。

1. 内皮抗原に対する2組のポリクローナル抗体(最も好ましい実施形態)。
2. 内皮抗原に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体。
3. 内皮抗原に対する2つのモノクローナル抗体。

【0023】

本発明の好ましい実施形態において、内皮細胞の濃縮または単離に使用される抗原標的は、サンドイッチイムノアッセイの抗原標的と異なる。これらの2つの抗原標的は抗原対を形成し、これらの抗原対の例には以下が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

【 化 1 - 1 】

アッセイされる 内皮細胞の種 類	抗原対番号	このような抗原に対する 抗体を有する磁気ビー ズを使用した濃縮または 単離のための抗原標的	サンドイッチイムノアッセ イの抗原標的
MCECs	1 (mCECに好ましい)	vWF	CD146
	2	CD146	vWF
	3	CD31	CD146
	4	CD31	vWF
CEPs	1 (mCEPに好ましい)	CD133	VEGFR-2
	2	VEGFR-2	CD133
	3	CD34	CD133
	4	CD34	VEGFR-2
	5	VLA-4(CD49d/CD 29ヘテロ二量体)	LFA-1(CD11a/CD1 8ヘテロ二量体)
	6	LFA-1(CD11a/CD1 8ヘテロ二量体)	VLA-4(CD49d/CD 29ヘテロ二量体)
	7	CD11a	CD146, VEGFR-2, CD133
	8	CD11b	CD146, VEGFR-2, CD133
	9	CD11c	CD146, VEGFR-2, CD133
	10	CD18	CD146, VEGFR-2, CD133

10

20

30

【 0 0 2 5 】

【化 1 - 2】

11	LFA-1 (CD11a/CD18ヘテ ロ二量体)	CD146, VEGFR-2, CD133	
12	VLA-4 (CD49d/CD29ヘテ ロ二量体)	CD146, VEGFR-2, CD133	
13	CD146, VEGFR-2, CD133	CD11a	10
14	CD146, VEGFR-2, CD133	CD11b	
15	CD146, VEGFR-2, CD133	CD11c	
16	CD146, VEGFR-2, CD133	CD18	
17	CD146, VEGFR-2, CD133	LFA-1 (CD11a/CD18ヘテ ロ二量体)	20
18	CD146, VEGFR-2, CD133	VLA-4 (CD49d/CD29ヘテ ロ二量体)	
19	CD31(PECAM)	CD146, VEGFR-2, CD133	
20	CD141	CD146, VEGFR-2, CD133	
21	CD105 (エンドゲリン)	CD146, VEGFR-2, CD133	30
22	CD144 (VEカドヘリン)	CD146, VEGFR-2, CD133	
23	tie2 (アンジオポイエチン1 受容体)	CD146, VEGFR-2, CD133	
24	Ulex ハリエニシダレクテン	CD146, VEGFR-2, CD133	
25	E-セレクチン	CD146, VEGFR-2, CD133	40

例えば、m C E Cを検出するための好ましい実施形態は、濃縮または単離のために v W F に対する抗体を有するビーズを使用した後、サンドイッチイムノアッセイによる検出のために C D 1 4 6 に対する 1 対の抗体を使用する方法である。C E Pを検出するための好ましい実施形態は、濃縮または単離のために C D 1 3 3 に対する抗体を有するビーズを使用した後、サンドイッチイムノアッセイによる検出のために V E G F R - 2 に対する 1 対の抗体を使用する方法である。C E Pを検出するための別の好ましい実施形態は、濃縮または単離のために C D 3 4 に対する抗体を有するビーズを使用した後、サンドイッチイムノアッセイによる検出のために V E G F R - 2 に対する 1 対の抗体を使用する方法である。

。

【0026】

本発明のイムノアッセイは、これまでに開発された内皮細胞抗原のいずれのイムノアッセイよりも高速であり、有意に高い感度を有する。本発明のイムノアッセイは、血液1mL当たり300個の循環mCECsまたはCEP、より好ましくは血液1mL当たり150個の循環mCECまたはCEP、より好ましくは血液1mL当たり100個の循環mCECまたはCEP、より好ましくは血液1mL当たり30個の循環mCECまたはCEP、最も好ましくは血液1mL当たり10個のmCECまたはCEPから抗原を検出することができる。本発明の実施形態において、前記アッセイは、4ピコグラムの抗原性タンパク質から抗原を検出することができ、より好ましくは、前記アッセイは1ピコグラムの抗原性タンパク質から抗原を検出することができる。

10

【0027】

別の好ましい実施形態において、本発明のイムノアッセイは、血液試料中の内皮細胞をアッセイする方法であって、血液試料から内皮細胞を濃縮した後、濃縮した内皮細胞に対して、内皮細胞により発現したVEGFR2を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、前記イムノアッセイが300個のヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)から、より好ましくは150個のHUVECから、より好ましくは100個のHUVECから、より好ましくは30個のHUVECから、最も好ましくは10個のHUVECからVEGFR2を検出することができる、方法からなる。

【0028】

別の好ましい実施形態において、本発明のイムノアッセイは、血液試料中の内皮細胞をアッセイする方法であって、血液試料から内皮細胞を濃縮した後、濃縮した内皮細胞に対して、内皮細胞により発現したVEGFR2を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、前記イムノアッセイが4ピコグラムのVEGFR2を、より好ましくは1ピコグラムのVEGFR2を、より好ましくは0.3ピコグラムのVEGFR2を、最も好ましくは0.1ピコグラム以上のVEGFR2を検出することができる、方法からなる。

20

【0029】

別の好ましい実施形態において、本発明のイムノアッセイは、血液試料中の内皮細胞に対して内皮細胞抗原をアッセイする方法であって、血液試料から内皮細胞を濃縮した後、濃縮した内皮細胞に対して、内皮細胞により発現した抗原を検出することができるイムノアッセイを行う工程を含み、前記イムノアッセイが血液1ミリリットル当たり300個の内皮細胞から、より好ましくは血液1ミリリットル当たり150個の内皮細胞から、より好ましくは血液1ミリリットル当たり100個の内皮細胞から、より好ましくは血液1ミリリットル当たり30個の内皮細胞から、最も好ましくは血液1ミリリットル当たり10個の内皮細胞から抗原を検出することができる、方法からなる。

30

【0030】

電気化学発光の他に、本出願に必要となる高感度をもたらすことができる他のイムノアッセイには、以下が含まれるが、これらに限定されない。

a) Liu Yら, 2003 (J Food Protection 66:512-7) に記載のような化学発光。

40

b) Yu Hら, 2000 (Biosens Bioelectron 14:829-40) に記載のような蛍光化学発光(FCL)

c) 蛍光偏光イムノアッセイ(Howanitz JH, 1988 Arch Pathol Lab Med 112:775-9を参照)。

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

【0031】

この感度により、本発明に基づく方法は、疾患(癌、鎌状赤血球疾患、血管炎、肺高血

50

圧症、糖尿病および心血管疾患を含むがこれらに限定されない)の増大の危険性がある患者、ならびにこのような疾患または疾患の悪化を予防する予防策が有益となる可能性がある患者を特定する。

【0032】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、よりよく理解されるが、以下の実施例は本明細書に記載の本発明を例示するものであり、制限するものではない。

【実施例】

【0033】

(実施例1)

患者が来院したら、凝固を予防するために血液試料をチューブに採取する。mCECを単離した後、溶解バッファーを使用して溶解する。mCECおよびビオチン化抗体に対する(mCEC由来抗原にも対する)抗原に対するルテニウム標識抗体を、トリプロピルアミン溶液およびアビジンが付着した磁気ビーズとともに添加する。電流を印加し、市販品(BioVeris CorporationまたはRoche Diagnostics)などのECL検出装置を使用して、電気化学発光(ECL)を検出する。シグナルは、循環血液中に存在する1mL当たりのmCEC量に比例する。

10

【0034】

(実施例2)

方法は実施例1と同じであるが、mCECは、vWFに対する抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用して単離または濃縮する。Sigma Lysis Buffer [Sigma Cellytic (登録商標) - M (Sigma製品番号C 2978、Sigma-Aldrich, Inc.、米国ミズーリ州セントルイス63103)]を使用して、これらの細胞を溶解する。細胞残骸を除去する前に5分間激しくボルテックシングして、製造元の推奨通りに細胞溶解を行う。Eppendorf Centrifuge (モデル5415C)で30分間14,000rpmにて遠心分離を行うことにより、細胞溶解産物から細胞残骸を除去する。磁性粒子をさらに枯渇させるために磁石を使用する。CD-146に対するルテニウム標識抗体およびCD-146に対するビオチン化抗体を溶解産物に添加した後、磁性ストレプトアビジンビーズおよびトリプロピルアミン含有溶液に添加する。電流を印加し、市販品(BioVeris Corporation)などのECL検出装置を使用して、電気化学発光(ECL)を検出する。このシグナルはmCEC量に比例しており、mCEC数は、このシグナルを陽性対照試料のシグナルと比較することにより予測することができる。

20

30

【0035】

(実施例3)

方法は実施例2と同じであるが、CEP数が測定され、CEPの単離または濃縮に使用される磁気ビーズは、vWFではなくCD133に対する抗体でコーティングされ、サンドイッチECLイムノアッセイは、CD-146ではなくVEGFR-2に対する抗体を使用する。

【0036】

(実施例4)

以下のアッセイバッファーを精製する：PBS(リン酸緩衝生理食塩水)中の0.5%のTween-20および0.5%のウシ血清アルブミン(BSA)。

40

【0037】

まず、CD146に対する抗体をビオチン化および非ビオチン化の両方の形態で得る。抗体のビオチン化は当該技術分野で周知であり、溶液中または固相中で行うことができる(Strachan Eら, 2004, J Mol Recognit 17:268-76)。ルテニウム標識(「TAG標識」)は以下の通りを行う。

・DMSO中で、ルテニウム標識(BV-TAG-NHSエステル、カタログ番号110034; BioVeris Corporation、米国メリーランド州ゲイサーズバーグ)1.5 μg/μLを精製する。

50

・抗体 500 μ L の場合は BV - TAG - NHS を 18.8 μ L 添加し、ポリクローナル抗体 200 μ L の場合は BV - TAG - NHS を 3.8 μ L 添加する。いずれの場合も、溶液を 1 時間インキュベートし、2 M のグリシン 20 μ L を添加することにより反応を停止する。

・PBS (0.08% のアジ化ナトリウムを含有) (溶出にも使用する) で事前に平衡化した PD - 10 ゲル濾過カラムを使用して、各反応混合物中の非結合 BV - TAG - NHS エステルを除去する。各標識抗体について、各画分中のタンパク質濃度をタンパク質アッセイにより測定し、タンパク質含有量の多い画分を次の実施例で使用する。

【0038】

CD146 に対するルテニウム標識抗体および CD146 に対するビオチン化抗体は、本実施例において以後「TAG - pAb」および「ビオチン - pAb」と呼ぶ。

10

【0039】

内皮細胞 [Cambrex Corporation (米国ニュージャージー州イストラザフォード 07073) のヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC、カタログ番号 CC - 2517)] を、製造元の推奨条件通りに 6 ウェルの組織培養プレート内で増殖させ、PBS で 2 回洗浄し、血球計を使用してアリコート进行を計数する。Sigma Lysis Buffer [Sigma Cellytic (登録商標) - M (Sigma 製品番号 C2978、Sigma - Aldrich, Inc.、米国ミズーリ州セントルイス 63103)] を使用して、これらの細胞を溶解する。細胞残骸を除去する前に 5 分間激しくボルテックシングして、製造元の推奨通りに細胞溶解を行う。Eppendorf Centrifuge (モデル 5415C) で 30 分間 14,000 rpm にて遠心分離を行うことにより、細胞溶解産物から細胞残骸を除去する。

20

【0040】

以下の通りに電気化学発光アッセイを行う。

・各ウェルに連続して細胞溶解産物の上清を添加し (1 ウェル当たりの溶解産物量は、30 ~ 100 個のいずれかの数の内皮細胞の抽出物であるかによって異なり、抽出されていない対照ウェルも使用する)、次いで、TAG - Ab とビオチン - Ab の混合物 50 μ L / ウェル (例えば、それぞれ 0.5 ~ 2 μ g / mL の濃度; PBS アッセイバッファーに希釈) を、96 ウェル U 底ポリプロピレンプレートのウェルに添加し、絶えず振盪させながら室温にてインキュベートする (例えば、2 時間)。

30

・10 μ g 磁性ストレプトアビジンビーズ (例えば、Dynabeads M - 280 Streptavidin、カタログ番号 110028、BioVeris, Corporation、米国メリーランド州ゲイサズバーグ) を含む 25 μ L を各ウェルに添加し、絶えず振盪させながらインキュベートする (例えば、30 分間)。

・PBS アッセイバッファーを各ウェルに添加し、1 ウェル当たり 250 μ L の最終量を作製する。少なくとも複数のウェルですべての条件を試験する。次いで、M8 M - Series (登録商標) Analyzer (カタログ番号 310800、BioVeris, Corporation、米国メリーランド州ゲイサズバーグ) を使用して、96 ウェルプレートを電気化学発光のために分析する。

40

【0041】

本イムノアッセイを使用する場合、ECL シグナルは HUVEC 細胞の数に比例し、CD146 は検出可能であり、少なくとも 1 ウェル当たり 100 個の HUVEC 細胞のベースラインを上回る。

【0042】

(実施例 5)

本実施例では、電気化学発光によるサンドイッチイムノアッセイを使用して組換え VEGFR2 を検出する感度を検査した。

【0043】

以下の PBS アッセイバッファーを精製した:

・アッセイバッファー: PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2) 中の 0.5% の

50

Tween - 20 および 0.5% のウシ血清アルブミン (BSA)。

【0044】

以下の標準希釈液を精製した：

・標準希釈液：PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2) 中の1%のウシ血清アルブミン (BSA)。

【0045】

まず、ビオチン化 (R&D Systems の BAF357) および非ビオチン化 (R&D Systems の AF357) の両方の形態で、抗 VEGFR2 ポリクローナル抗体を得た。非ビオチン化ポリクローナル抗体は、Lorence & Lu (PCT 国際特許公開第 2006/041959 A2 号) の方法に基づきルテニウム標識 (「TAG 標識」) されている。ルテニウム標識ポリクローナル抗体およびビオチン化ポリクローナル抗体は、本実施例において以後「TAG - pAb」および「ビオチン - pAb」と呼ぶ。

10

【0046】

VEGFR2 - Fc タンパク質 (リンカー基を介してヒト IgG の Fc 領域に融合される細胞外ドメインからなるキメラタンパク質；R&D Systems、カタログ番号 357 - KD) の形態で、組換え VEGFR2 タンパク質を得た。

【0047】

以下の通りに電気化学発光アッセイを行った。

・標準物質を PBS 1 mL (0.1% の BSA および 0.05% のアジ化ナトリウムにより pH 7.2) 中で希釈し、原液 50 µg/mL を形成した。

20

・標準物質を標準希釈液中で希釈し、1 ウェル当たり 25 µL を使用した場合、1600、160、16 および 4 pg/ウェルを産生した。96 ウェル U 底ポリプロピレンプレート (1 ウェル当たり標準物質 25 µL を有する) の各ウェルに、TAG - Ab とビオチン - Ab の混合物 50 µL/ウェル (例えば、添加前は 50 µL 中 1.0 µg/mL の濃度) を添加し、得られた溶液を絶えず振盪させながら室温にてインキュベートした (2 時間)。

・10 µg の磁性ストレプトアビジンビーズ (例えば、Dynabeads M - 280 Streptavidin、カタログ番号 110028、BioVeris Corporation、米国メリーランド州ゲイサズバーグ) を含む 25 µL を各ウェルに添加し、絶えず振盪させながらインキュベートした (30 分間)。

30

・PBS アッセイバッファーを各ウェルに添加し、1 ウェル当たり 250 µL の最終量を作製した。少なくとも複数のウェルですべての条件を試験した。次いで、M - Series (登録商標) 384 Analyzer (BioVeris Corporation、米国メリーランド州ゲイサズバーグ) を使用して、96 ウェルプレートを電気化学発光のために分析した。

【0048】

本イムノアッセイを使用すると、バックグラウンドを上回るシグナルによって、1 ウェル当たりわずか 4 pg の VEGFR2 標準物質を検出することができた (表 1)。

【0049】

表 1. ルテニウム標識ポリクローナル抗体 (TAG - pAb) およびビオチン化ポリクローナル抗体 (ビオチン - pAb) を使用したイムノアッセイによる組換え VEGFR2 の電気化学発光 (ECL) 検出

40

【0050】

【表 1】

VEGFR2 (pg/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドを上回る) *
4	722
16	1957
160	13021
1600	113347

* 抗原のない対照ウェルの平均シグナルを上回る平均 E C L シグナル。

10

【0051】

(実施例 6)

本実施例では、組換え E G F R を検出する感度の測定を繰り返しながら、内皮細胞と非内皮細胞から V E G F R 2 を検出するための V E G F R 2 に対する E C L イムノアッセイの特異性を測定した。方法は実施例 5 で使用する方法と同じであったが、(1) 低量の V E G F R 2 標準物質の試験を行い、また(2) H U V E C 細胞 (V E G F R 2 発現の陽性対照細胞) と K 5 6 2 ヒト白血病 (V E G F R 2 の陰性対照) からの細胞抽出物の追加分析を行った。

【0052】

H U V E C [C a m b r e x C o r p o r a t i o n (米 国 ニ ュ ー ジ ャ ー ジ ー 州 イ ー ス ト ラ ザ フ ォ ー ド 0 7 0 7 3) の カ タ ロ グ 番 号 C C - 2 5 1 7] を、 製 造 元 の 推 奨 条 件 通 り に (V E G F を 含 ま ない) 組 織 培 養 で 増 殖 さ せ、 P B S で 2 回 洗 浄 し、 血 球 計 を 使 用 し て ア リ コ ー ト を 計 数 し た。 K 5 6 2 細 胞 (A T C C、 米 国 バ ー ジ ニ ア 州 マ ナ ッ サ ス) を、 A T C C の 推 奨 条 件 通 り に 組 織 培 養 プ レ ー ト 内 で 増 殖 さ せ、 P B S で 2 回 洗 浄 し、 血 球 計 を 使 用 し て ア リ コ ー ト を 計 数 し た。 P i e r c e プ ロ テ ア ー ゼ 阻 害 剤 [カ タ ロ グ 番 号 7 8 4 1 0、 P i e r c e B i o t e c h n o l o g y] を 有 する P i e r c e R I P A B u f f e r [カ タ ロ グ 番 号 8 9 9 0 0、 P i e r c e B i o t e c h n o l o g y、 米 国 イ リ ノ イ 州 ロ ッ ク フ ォ ー ド] を 使 用 し て、 製 造 元 の 推 奨 条 件 通 り に H U V E C お よ び K 5 6 2 細 胞 の 溶 解、 お よ び 上 清 の 採 取 を 行 っ た。 1 ウ ェ ル 当 た り の 溶 解 産 物 の 上 清 量 は、 3 0 0 個、 6 2 5 個、 2 5 0 0 個 お よ び 1 0 , 0 0 0 個 の い ず れ か の 数 の 細 胞 か ら の 抽 出 物 で あ る か に よ っ て 異 な り、 実 施 例 5 に 記 載 の イ ム ノ ア ャ セ イ を 使 用 し て V E G F R 2 分 析 を 行 っ た。

20

30

【0053】

V E G F R 2 標 準 物 質 を 使 用 す る と、 バ ッ ク グ ラ ウ ン ド を 上 回 る シ グ ナ ル に よ っ て、 1 ウ ェ ル 当 た り わ ず か 1 p g の E G F R 標 準 物 質 を 検 出 す る こ と が で き る (表 2)。

【0054】

表 2 . ル テ ニ ウ ム 標 識 ポ リ ク ロ ー ナ ル 抗 体 (T A G - p A b) お よ び ビ オ チ ン 化 ポ リ ク ロ ー ナ ル 抗 体 (ビ オ チ ン - p A b) を 使 用 し た イ ム ノ ア ャ セ イ に よ る 組 換 え V E G F R 2 の 電 気 化 学 発 光 (E C L) 検 出。

【0055】

40

【表 2】

VEGFR2 (pg/ウェル)	平均ECLシグナル(バックグラウンドを上回る) *
1	504
4	1706
16	6289
160	26023
1600	91935

50

* 抗原のない対照ウェルの平均シグナルを上回る平均 E C L シグナル

細胞溶解産物を使用して、本実験の結果を図 1 および 2 に示す。図 1 は、本アッセイの V E G F R 2 検出能力を最もよく表したデータセットの下端を細胞数の少ないものからグラフで示している。図 1 は、1 ウェル当たり 2 5 0 0 個の細胞までの細胞範囲のデータのみを含んでいる。図 2 は、全データセット (1 ウェル当たり 1 0 , 0 0 0 個までの細胞) をグラフで示している。

【 0 0 5 6 】

V E G F R 2 は検出することができ、本実験における最低量の H U V E C 溶解産物を使用したウェル (1 ウェル当たり 3 0 0 個の細胞を添加した溶解産物 ; 図 1) を含め、本実験における H U V E C 細胞の溶解産物のベースラインを上回った。さらに、H U V E C 細胞の溶解産物 (V E G F R 2 発現の内皮細胞陽性対照) は、1 ウェル当たり 3 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 個の細胞の全試験範囲において、K 5 6 2 細胞の溶解産物 (V E G F R 2 発現のための陰性対照) よりも V E G F R 2 のイムノアッセイではるかに多いシグナルを発し、すべての K 5 6 2 細胞の溶解産物は陰性であり、V E G F R 2 検出結果の高い感度と特異性を示した (図 1 および 図 2) 。

10

【 0 0 5 7 】

(実施例 7)

本実施例では、H U V E C 内皮細胞から V E G F R 2 を検出するための V E G F R 2 に対する E C L イムノアッセイの感度をさらに検査した。方法は実施例 6 で使用した方法と同じであったが、より少ない量の H U V E C 細胞の細胞抽出物 (V E G F R 2 発現の陽性対照細胞) を試験した。

20

【 0 0 5 8 】

H U V E C 内皮細胞の溶解産物を使用すると、バックグラウンドを上回るシグナルによって、1 ウェル当たりわずか 1 5 0 個の H U V E C 細胞の溶解産物を検出することができた (表 3) 。

【 0 0 5 9 】

表 3 . ルテニウム標識ポリクローナル抗体 (T A G - p A b) およびビオチン化ポリクローナル抗体 (ビオチン - p A b) を使用したイムノアッセイによる H U V E C 溶解産物の V E G F R 2 の電気化学発光 (E C L) 検出

30

【 0 0 6 0 】

【 表 3 】

1ウェル当たりの細胞数	平均ECLシグナル(バックグラウンドを上回る) *
150	207
200	261
300	338
625	504
2500	824

* 抗原のない対照ウェルの平均シグナルを上回る平均 E C L シグナル

40

(実施例 8)

本実施例では、少数のヒト末梢血単核細胞 (P B M C) について、V E G F R 2 に対するイムノアッセイの E C L シグナルを測定した。細胞溶解産物の試験方法は、ヒト P B M C の溶解産物を使用した点を除いて実施例 6 と同じ方法を使用した。ヒト P B M C は C e l l l u l a r T e c h n o l o g y L t d (米国オハイオ州クリーブランド ; 製品番号 C T L - U P 1) から入手した。実施例 7 に記載の通りに、V E G F R 2 の E C L イムノアッセイで、1 5 6 個、3 1 3 個、6 2 5 個、1 2 5 0 個および 1 5 0 0 個の P M B C の溶解産物を試験した。

【 0 0 6 1 】

結果は図 3 に示しており、比較のため、H U V E C を使用した実施例 6 のデータもこの

50

グラフに含まれている。試験したP B M Cの全範囲で、シグナルは少ないかまたはバックグラウンドレベルであった。これらの結果は、試験した最大量(2500個)のP B M Cでは内皮細胞が認められないと予想される事実と一致していた。背景技術の項目に記載した通り、C E Pおよびm C E Cは、0.01%~0.0001%と推定される血液中の単核細胞の微小画分を表す(Khan SSら, 2004)。本実験の結果から、内皮細胞の濃縮群において少数の汚染P B M Cが存在しても、このような濃縮した内皮細胞群の内皮細胞抗原の測定を妨げるようなシグナルをこれらの汚染P B M Cが発生させることはないことが示されている。

【0062】

(実施例9)

本実施例では、濃縮効果を測定した。本実施例では、免疫磁気ビーズを使用して、CD34+細胞の造血細胞試料の濃縮後の細胞からVEGFR2を検出する能力を2回試験した。前述の通り、EPCは、CD34+およびVEGFR2の両方を発現する。したがって、CD34+の濃縮によって、VEGFR2発現細胞が濃縮されることが予想される。Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit(現在ではCD34 MicroBead Kitと呼ばれる)をMiltenyi Biotec Inc.(米国カリフォルニア州オーバーン)から入手し、製造元の指示通りに使用した。このキットには、モノクローナルマウス抗ヒトCD34抗体であるQBEND/10に接合するMicroBeadが含まれる。CD34単離のための開始細胞として、ヒト臍帯血の培養物(Cambrex(米国ニュージャージー州イストラザフォード)、カタログ番号2C-101A)を使用し、以下の増殖因子(すべてPeprotech(米国ニュージャージー州ロッキーヒル)製)を有するStemSpan Serum Free培地(Stem Cell Technologies; www.stemcell.com)で増殖させた:ヒト血管内皮増殖因子(VEGF; 50ng/mL; カタログ番号100-20)、ヒトロンボポイエチン(20ng/mL; カタログ番号300-18);ヒトインターロイキン-6(20ng/mL; カタログ番号200-06)、ヒトFms関連チロシンキナーゼ3リガンド(Flt-3; 100ng/mL; カタログ番号300-19)、およびヒト幹細胞因子(SCF; 100ng/mL; カタログ番号300-07)。この受容体のリガンド(VEGF)の存在下において細胞を培養することにより得られた1細胞当たりのVEGFR2の発現レベルに対する効果は測定しなかった。

【0063】

これらのヒト臍帯血培養物2種に由来する最高250,000個の細胞の溶解産物(RIPAを使用するか、またはPierce M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent、Pierceカタログ番号78501の使用を追加して、実施例6と同様に実施)を、実施例5に記載のECLイムノアッセイを使用して、VEGFR2発現の分析を行った。

【0064】

本実験の結果を図4~図6に示す。図4~図6のいずれにおいても、CD34抗原に対する免疫磁気ビーズを使用した濃縮が、内皮細胞マーカーVEGFR2を発現する細胞の濃縮において大きな成功を収めたことが示されている。このことは細胞溶解産物を生成する方法に関係なく当てはまったものの、抽出に全く同じ細胞群を使用する場合には、RIPAバッファーを使用した方がより多いシグナルが得られた(M-PER溶解バッファーを使用した図4とRIPAを使用した図5を比較)。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】VEGFR2を検出する感度。HUVEC細胞(VEGFR2発現の陽性対照である内皮細胞)とK562(VEGFR2発現の陰性対照)それぞれの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルの比較を示す。1ウェル当たり300個、625個および2500個の細胞の溶解産物を使用したデータを示す。

10

20

30

40

50

【図2】内皮細胞と非内皮細胞のそれぞれからVEGFR2を検出する感度および特異性。HUVEC細胞(VEGFR2発現の陽性対照である内皮細胞)とK562(VEGFR2発現の陰性対照)それぞれの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルのさらなる比較を示す。X軸目盛りの増加を示すために、1ウェル当たり10,000個の細胞の溶解産物から得たデータもこのグラフに含めている点を除けば、図1に示したものと同一実験のデータを本図にも使用している。

【図3】内皮細胞と非内皮細胞のそれぞれからVEGFR2を検出する特異性。HUVEC細胞(VEGFR2発現の陽性対照である内皮細胞)とPMBcそれぞれの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルの比較を示す。1ウェル当たり2500個の細胞までの溶解産物を使用したデータを示す。図1および図2に比べると、この図3はPMBcの追加データを示している。比較のため、図1および図2のHUVEC細胞のデータと同じデータも示している。

【図4】濃縮効果。非濃縮ヒト臍帯血のex vivo培養物、または抗CD34抗体を有する免疫磁気ビーズを使用してCD34抗原を濃縮した同じ培養物のいずれかの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルの比較。この図では、実施例9に記載のM-Per Pierce Extraction Reagentを使用して、細胞を抽出した。フローサイトメトリーを使用したところ、5000個のCD34濃縮細胞中に960個のVEGFR2陽性細胞が存在すると予想された。

【図5】濃縮効果。非濃縮ヒト臍帯血のex vivo培養物、または抗CD34抗体を有する免疫磁気ビーズを使用してCD34抗原を濃縮した同じ培養物のいずれかの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルの比較。この図では、実施例9に記載のRIPA Extraction Bufferを使用して、細胞を抽出した点を除けば、図4で溶解産物を得るのに使用したのと同じ細胞を使用した。

【図6】濃縮効果。非濃縮ヒト臍帯血のex vivo培養物、または抗CD34抗体を有する免疫磁気ビーズを使用してCD34抗原を濃縮した同じ培養物のいずれかの溶解産物中のVEGFR2をイムノアッセイにより検出するためのECLシグナルの比較。この図では、臍帯血のex vivo培養物に由来する種々の細胞群を使用した。図4と同様に、M-Per Pierce Extraction Reagentを使用して、細胞を溶解した。フローサイトメトリーを使用したところ、5000個のCD34濃縮細胞中に700個のVEGFR2陽性細胞が存在すると予想された。

10

20

30

【 図 1 】

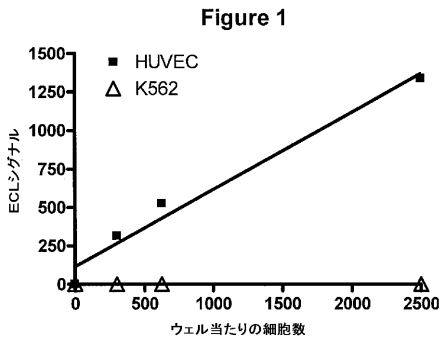


Figure 1

【 図 2 】

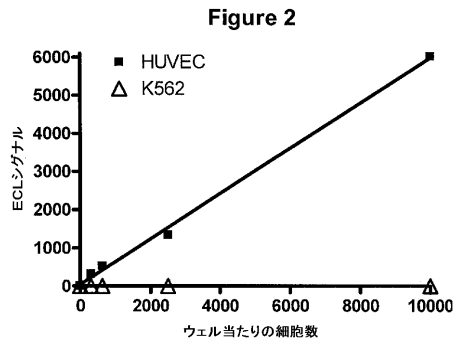


Figure 2

【 図 3 】

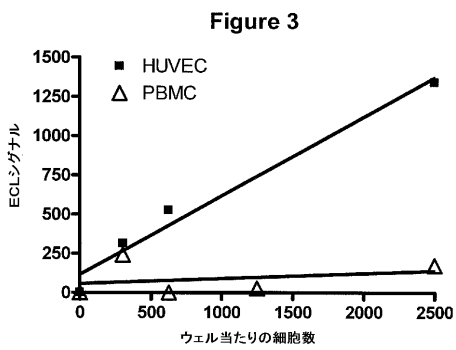


Figure 3

【 図 4 】

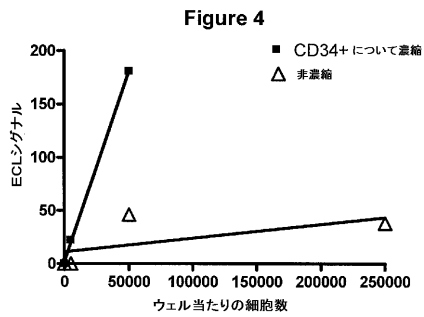


Figure 4

【 図 5 】

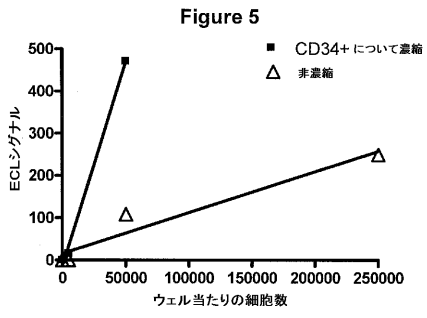


Figure 5

【 図 6 】

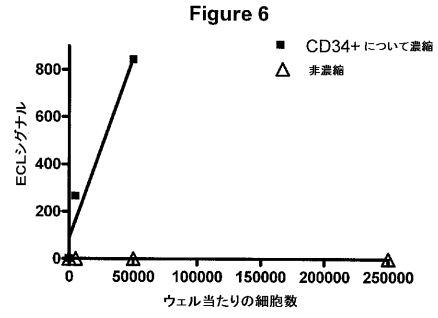
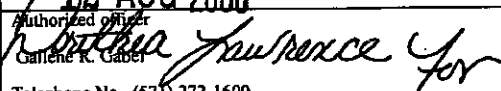


Figure 6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/66856
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01) USPC: 435/7.2,7.24,7.92,287.2;436/64,517,526,177,178 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) U.S. : 435/7.2,7.24,7.92,287.2;436/64,517,526,177,178 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) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS, WPIDS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	Database EMBASE, Accession No. 2007289244, XIE, S. et al., Isolation, culture, and biological characteristics of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD133 (+) cells. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research. 18 February 2007, Vol. 11, No. 7, pages 1287-1289, see Abstract.	1-16
X	Database MEDLINE, Accession No. 2006120503, SHAFFER, R. et al., Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effects of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. Cytometry. Part B, Clinical Cytometry. February 2006, Vol. 70, No. 2, pages 55-62, see Abstract.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input 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 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 23 June 2008 (23.06.2008)		Date of mailing of the international search report 12 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Catherine K. Gabler Telephone No. (571) 272-1600

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 5/06 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ローレンス , ロバート エム .
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 1 7 , ベテスタ , メイデン レーン 6 3 0 8
 Fターム(参考) 2G054 AA07 AB04 CA23 EA01 EA03 GA04
 4B065 AA93X AC20 BD14 CA46

专利名称(译)	检测循环内皮细胞		
公开(公告)号	JP2009534666A	公开(公告)日	2009-09-24
申请号	JP2009506737	申请日	2007-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	病毒防御公司		
申请(专利权)人(译)	那么统计生物公司		
[标]发明人	ローレンスロバートエム		
发明人	ローレンス, ロバート エム.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/542 G01N27/416 G01N21/78 G01N21/76 C12N5/06		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/54326 G01N33/582 G01N2333/70596 G01N2333/71 G01N2333/755 G01N2458/30 Y10T436/101666 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/542.A G01N27/46.U G01N21/78.C G01N21/76 C12N5/00.E		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/GA04 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BD14 4B065/CA46		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/745014 2006-04-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过浓缩来自血液样品的内皮细胞，然后对能够检测由内皮细胞表达的抗原的浓缩内皮细胞进行免疫测定来检测血液样品中的内皮细胞。免疫测定可以检测每毫升血液中300个内皮细胞表达的抗原。该方法可用于测定成熟的循环内皮细胞或循环内皮祖细胞。本发明提供了一种免疫测定法，其具有足够的灵敏度来定量血液样品中循环内皮细胞（mCEC和/或CEP）的水平。

6	LFA-1(CD11a/CD18ヘテロ二量体)	VLA-4(CD49d/CD29ヘテロ二量体)
7	CD11a	CD146, VEGFR-2, CD133
8	CD11b	CD146, VEGFR-2, CD133
9	CD11c	CD146, VEGFR-2, CD133
10	CD18	CD146, VEGFR-2, CD133