

(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2016-519286

(P2016-519286A)

(43) 公表日 平成28年6月30日(2016.6.30)

(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 B	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 H O 4 5
CO 7 K 16/28 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M	
	CO 7 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2016-502523 (P2016-502523)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月6日 (2015. 11. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/027701
 (87) 国際公開番号 W02014/152758
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)
 (31) 優先権主張番号 61/787, 611
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505060347
 ジャンセン ダイアグノスティックス, エルエルシー
 アメリカ合衆国 08869 ニュージャージー州 ラリタン 202 ユーエス・ハイウェイ 700
 (74) 代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延
 (74) 代理人 100130384
 弁理士 大島 孝文
 (72) 発明者 ラオ・ガーラ・チャンドラ
 アメリカ合衆国、08550 ニュージャージー州、プリンストン・ジャンクション、ハヴァーフォード・ロード 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 白血球の枯渇による循環腫瘍細胞の濃縮

(57) 【要約】

本開示の発明は、濃縮された希少細胞のサンプルから白血球を除去するための方法及びキットを含む。

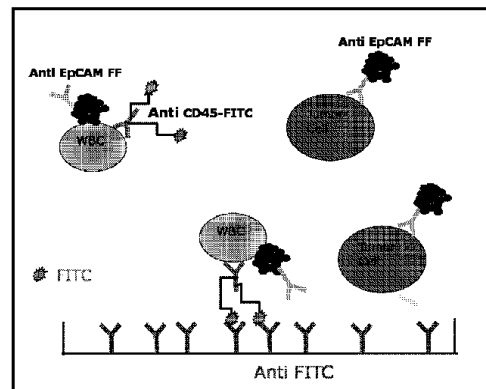


Figure 1 Depiction of haptent based white blood cell removal

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去する方法であって、
(a) ハプテンにコンジュゲートされた白血球マーカーで白血球を標識する条件下で、ハプテンにコンジュゲートされたかかる白血球マーカーを用いて、かかるサンプルを処置する工程と、

(b) 工程 (a) の組成物を、かかる標識した白血球に接着する第 2 の媒体を用いて処置する工程と、工程 (b) の組成物から、前記第 2 の媒体及びその接着した標識された白血球を分離する工程と、を含む、方法。

【請求項 2】

前記濃縮した希少細胞が、CTC、CEC、CMC、及びCMCからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記濃縮した希少細胞が、CTC及びCECからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記濃縮した希少細胞がCTCである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

かかる濃縮した希少細胞を免疫磁性マーカーで標識する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記濃縮した希少細胞がCTCである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記白血球マーカーが、CD45、CD19、CD15、グリコフォリンA、CD2、CD14、CD16、CE38、及びCD66bに対する抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記白血球マーカーが、抗-CD45である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記白血球マーカーが、CD45のエピトープを含む抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ハプチンが、フルオレセイン染料(「FITC」)、フィコエリトリン(「PE」)、アロフィコシアニン(「APC」)、及びビオチンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ハプテンがFITCである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記濃縮した希少細胞がCTCであり、前記白血球マーカーが抗-CD45であり、前記ハプチンがビオチンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットであって、ハプテンにコンジュゲートされる白血球マーカーと、前記白血球マーカー以外の第 2 のマーカーとを含み、前記第 2 のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む、キット。

【請求項 14】

濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットであって、前記希少細胞及び白血球を免疫磁性法でマーキングするための試薬と、ハプテンにコンジュゲートされる白血球マーカーと、前記白血球マーカー以外の第 2 のマーカーとを含み、前記第 2 のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、係属中の米国仮特許出願第61/787611号(表題「Improved Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells」、2013年3月15日出願)の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

上皮由来の循環腫瘍細胞(CTC)は、非常に低い頻度(血液1mL中に10個未満)で癌患者の血液中に存在する。循環中の腫瘍細胞の検出は、癌疾患管理にとって重要である可能性がある。低頻度の細胞の検出には、大量の血液の処理が必要である。大量の血液からCTCを計数し、特性化するには、CTCの濃縮が必要である。

10

【0003】

サイズ、密度、抗原に基づく、CTCの濃縮のために利用可能ないくつかの方法がある。希少細胞の濃縮のための十分確立された市販製品は、Verides Cell Search CTCアッセイである。Cell Search CTCアッセイは抗上皮細胞接着分子(EpCAM)にコンジュゲートした磁性粒子を用いて、7.5mLの血液からCTCを捕らえる。濃縮したサンプルを核酸染料DAPIで染色して有核細胞を識別し、上皮由来の細胞を識別するために、フィコエリトリンにコンジュゲートした抗サイトケラチン抗体を識別し、全ての白血球を識別するために、アロフィコシアニンにコンジュゲートした抗白血球抗体を識別する。サンプルは、CTCの計数のためにCell Tracks Analyzer IIで解析する。

20

【0004】

濃縮後の最終サンプルはCTC及び少数の白血球(1000~5000個)を含んでいる。この濃縮方法は99%を超える白血球(WBC)を除去する。希少細胞の計数中の白血球の存在は問題ではなく、プロセスに有害に影響しない。WBCを白血球マーカー(CD45)で標識して、WBCをCTCと区別することができる。しかしながら、そのようなCTCの中に存在する核酸の増幅によってその遺伝子型を定義するために、計数したCTCを分子的に特性化することが望まれる場合、白血球の存在はこの特性化に有害な影響を及ぼす。計数した分画中の白血球の比率はCTCの数と比較して高く、そのような白血球の核酸は、CTCで増幅されるので、それらの核酸、すなわちCTC又は白血球のソースを判定することは困難である(困難であった)。したがって、白血球を除去するための濃縮サンプルの更なる精製(CTCに対する白血球の比率を下げることは、信頼できる分子特性化ツールの開発のための大きな節目となるであろう。この需求は、以下の発明によって満たされる。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

CTCの濃縮後に白血球を除去する利用可能な方法は存在していない。それにはCTCの濃縮に用いられたのと同じ原理は用いられないので、ユニークな方法が必要である。例えば、濃縮方法が最初の工程で免疫磁性法を用いる場合、免疫磁性法以外の別の方法を用いる必要がある。

40

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】ハプテンに基づく白血球除去の解説図。

【図2】抗FITCでのインキュベーションの前及び後の白血球の解析。

【図3】白血球除去率(%)。

【図4】枯渇サンプル及び非枯渇サンプルの分子測定。

【図5】CD45枯渇後の検出。

【図6】白血球枯渇でスパイクインしたVcap細胞と培養したVcap細胞との相関関

50

係。

【図7】ビーズ枯渇の作用。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本明細書に記載の発明は、濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去する方法を含む、又は本質的に該方法からなる、又は該方法からなるものであって、かかる方法は、

(a) ハプテンにコンジュゲートされた白血球マーカーで白血球を標識する条件下で、ハプテンにコンジュゲートされたかかる白血球マーカーを用いて、かかるサンプルを処置する工程と、

(b) 工程(a)の組成物を、かかる標識した白血球に接着する第2の媒体を用いて処置する工程と、工程(b)の組成物から、第2の媒体及びその接着した標識された白血球を分離する工程と、を含む。

【0008】

本明細書で使用するとき、「白血球マーカー」は、白血球を標識するが希少細胞を標識しない物質を指す。白血球マーカーの例としては、CD45、CD19、CD15、グリコフォリンA、CD2、CD14、CD16、CE38、及びCD66bに対する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい白血球マーカーは抗CD45である。ハプテンとしては、フルオレセイン色素(「FITC」)、フィコエリトリン(「PE」)、アロフィコシアニン(「APC」)、及びビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいハプテンはFITCである。本明細書で使用するとき、用語「抗体」は、モノクローナル及びポリクローナルの両方の全抗体、特定のハプテンと結合する抗体フラグメント、特定のハプテンと結合する二重特異性抗体を含む。好ましい抗体はモノクローナル抗体である。

【0009】

本明細書で使用するとき、「第2の媒体」は、白血球マーカー以外の第2のマーカーを含む任意の表面を意味する。かかる第2のマーカーは、白血球マーカーにコンジュゲートされたハプテンに結合する。第2のマーカーの例としては、FITC、PE、APCに対する抗体が挙げられるがこれらに限定されず、好ましい第2のマーカーはFITCに対する抗体である。使用できる表面の例としては、マイクロタイタープレートが挙げられる。

【0010】

本明細書で使用するとき、「希少細胞」は、血中で低頻度の細胞である。希少細胞の例としては、循環腫瘍細胞(CTC)、循環内皮細胞(CEC)、循環多発性骨髄腫細胞(CMMC)、及び循環黒色腫細胞(CMC)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい希少細胞はCTC及びCECであり、特に好ましい希少細胞はCTCである。これらの希少細胞の濃縮分画は、既知の方法によって全血から生成し得る。かかる方法としては、非限定的に、米国特許第7,901,950号、同第6,365,362号、米国特許公開第2009/0136946号、及び同第2013/0189675号、並びに同第2014/0011685号の特許及び特許出願に開示されている方法並びに試薬が含まれ、これらの開示は参照することにより本明細書にその全体が組み込まれる。濃縮されたCTCを得るための好ましい方法は、例えば、米国特許第6,365,362号などの参考文献に開示されている免疫磁性法、及びCELL SEARCH製品ラインの方法である。

【0011】

CTCの濃縮分画からの白血球の枯渇の原理。図1に図示するように、CTC及び白血球は抗EpCAM磁性流体で標識し、白血球は白血球コンジュゲートハプテンで標識される。

【0012】

更に、本発明は、濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットを含み、かかるキットは、ハプテンにコンジュゲートする白血球マーカーと、

10

20

30

40

50

白血球マーカー以外の第2のマーカーとを含み、第2のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む。

【0013】

定義された用語の全ては、上記と同じ定義及び好ましい例を有する。

【0014】

また更に、本発明は、濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットを含み、かかるキットは、希少細胞及び白血球を免疫磁性法でマーキングするための試薬と、ハプテンにコンジュゲートされる白血球マーカーと、白血球マーカー以外の第2のマーカーとを含み、第2のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む。

10

【0015】

定義された用語の全ては、上記と同じ定義及び好ましい例を有する。

【0016】

本発明を以下の実施例によって例示するが、それらによって本発明の範囲を限定することは意図されない。

【実施例】

【0017】

実施例1：マイクロタイタープレートにコーティングした抗CD45を用いる白血球の枯渇

本実施例は、抗CD45を用いた白血球の枯渇を示す。CD45は白血球に存在する一般的な白血球マーカーであり、全ての白血球が抗CD45に結合することが期待される。抗CD45でコーティングした固相を用いて、白血球と結合させ、白血球とCTCとの混合物からそれらを特異的に除去するために、抗CD45を用いた。抗CD45を次のように固相にコーティングした。

20

【0018】

抗CD45(Veridex)を50mMの重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)にて50µg/mLまで希釈した。次に、抗CD45抗体溶液0.8mLを6ウェルのマイクロタイタープレートに添加し、室温(RT)で3時間、次いで2~8℃で一晩、インキュベートした。一晩のインキュベーション後、抗CD45抗体を吸引し、1mLのPBS/1%BSAを用いてウェルを室温で4時間ブロックした。緩衝液を吸引し、2mL

30

【0019】

本実施例では、白血球を非白血球から分離する原理を試験するために2つの実験を行った。1つの研究では、BD溶血試薬を用いて赤血球を溶血した後、純粋な白血球を全血から調製した。このサンプルは陽性対照として用いた。もう1つの研究では、CellSearch CTC Profileキットを用いてCellTracks AutoPrepシステムで7.5mLの血液を処理した。このCTC Profileキットは、循環腫瘍細胞の捕獲のための磁性流体磁性粒子にコンジュゲートされた抗上皮細胞接着分子(EpCAM)を含んでいる。標的細胞の濃縮後、試料を900µLのPBS/1%BSA緩衝液に再懸濁した。濃縮サンプルは標的細胞と白血球とを含有することになる。サンプルをマイクロタイタープレートのウェルに添加する前に、プレートを室温にし(最低30分間)、ウェルを2mLのPBS/5%BSAで2回洗浄した。次に、ウェルから緩衝液を吸引し、その後、サンプルを添加した。900µLのCTCアッセイサンプル及び全血からの純粋な白血球をプレートの2つの別々のウェルに添加した。15分毎にやさしく攪拌して1時間インキュベートした後、300µLの上清を除去して白血球数を判定した。サンプル中に存在した白血球数は、閾として前方散乱を用いてFACSCaliburフローサイトメーター(Beckton Dickinson)によって判定した。ウェル内の抗CD45に白血球が結合すれば、上清中の白血球数はインキュベーション工程前のサンプルと比較

40

50

して少なくなるはずである。上清中にあるのは、未結合の細胞でなくてはならない。結果を表 1 a に示す。

【 0 0 2 0 】

【表 1】

表 1 a : マイクロタイタープレートにコーティングした抗 CD 4 5 を用いたインキュベーションの前及び後の白血球数

サンプル	WBC 数		WBC 除去率 (%)
	抗-CD45コーティングしたプレートでのインキュベーション前	抗-CD45コーティングしたプレートでのインキュベーション後	
CTCアッセイなしの白血球	1000	200	80
CTCアッセイのサンプル	1200	1300	0

10

【 0 0 2 1 】

上記の結果は、抗 CD 4 5 でコーティングしたマイクロタイタープレートに純粋な白血球を加えることによって、それらの白血球を除去することができることを示している。しかしながら、CTCアッセイのサンプルの上清に白血球が見つかった。これは、CTCアッセイのサンプルからの白血球が、ウェルにコーティングされた抗 CD 4 5 に結合しなかったことを示唆している。それらの 2 つのサンプルの違いは、CTCアッセイのサンプルでは白血球が磁性流体磁性粒子で標識されていることである。白血球に存在する磁性流体磁性粒子が立体障害のためにプレート上での抗 CD 4 5 への結合を妨げている可能性がある。この問題を克服するために、CTCアッセイからのサンプルを、最初に、リンカーによってハプテンにコンジュゲートされた抗 CD 4 5 で標識した（実施例を参照）。次に、抗 CD 4 5 タグで予め標識した白血球を含有するサンプルを、抗ハプテンでコーティングしたマイクロタイタープレートに添加した。

20

【 0 0 2 2 】

実施例 2 : 抗フルオレセインイソチオシアネート (FITC) でのマイクロタイタープレートのコーティング

抗 FITC は BD Biosciences から購入し、50 mM の重炭酸ナトリウム (pH 8.5) にて 50 µg / mL まで希釈した。抗 FITC 800 µL を 6 ウェルのマイクロタイタープレートに添加し、室温で 3 時間、次いで 2 ~ 8 で一晩、インキュベートした。一晩のインキュベーション後、プレートを室温にした。上清を吸引し、次いで、プレートを PBS で 2 回リンスした。次いで、1 mL の PBS / 1 % BSA を用いて室温で 4 時間、ウェルをブロックした。緩衝液を吸引し、2 mL の PBS でウェルを 2 回リンスした。リンスの後、全緩衝液を吸引し、プレートを 1 時間乾燥した。プレートは、使用するまで密封されたビニール袋に入れて 2 ~ 8 で乾燥保管した。使用する日に、プレートを室温にした（最低 30 分間）。2 mL の PBS / 1 % BSA をウェルに加え、15 分間インキュベートした。吸引後、プレートを再び 2 mL の PBS / 1 % BSA でリンスした。サンプルをウェルに加える前に緩衝液を吸引した。

30

【 0 0 2 3 】

実施例 3 : FITC にコンジュゲートされた抗 CD 4 5 で白血球を標識し、マイクロタイタープレートを抗 FITC でコーティングした、CTCアッセイのサンプルからの白血球の除去

SKBR3 細胞でスパイクした 7.5 mL の EDTA 血液を、Cell Search CTC キットを用いて Auto Prep で処理した。この CTC アッセイからの濃縮されたサンプルを 2 µg / mL の最終濃度で抗 CD 4 5 - FITC で染色した。2 mL の PBS / 1 % BSA でサンプルを 2 回洗浄し、15 分間磁性分離することによって、過剰の CD 4 5 - FITC を除去した。最終的なサンプルを 900 µL の PBS / 5 % BSA に再懸濁し、次いで、抗 FITC でコーティングしたウェルに加えた。15 分毎にやさしく攪拌して、サンプルを 1 時間インキュベートした。1 時間後、300 µL の上清をウェルが

40

50

ら除去し、フローサイトメーターによって白血球及びSKBR3細胞の数を判定した。フローサイトメーターによってSKBR3細胞を検出するために、アロフィコシアニン染料(APC)にコンジュゲートされた抗Her2neuで細胞を標識した。白血球は抗CD45 - FITCで標識されているので、FITCチャンネルに検出された。図2には、枯渇の前及び後に検出された細胞が示されている。

【0024】

図2は、白血球の枯渇の前及び後の腫瘍細胞及び白血球の数を示す。白血球の数はそれぞれ、枯渇前は3594個、枯渇後は354個であり、このことは、白血球の約90%がサンプルから枯渇したことを示している。一方、腫瘍細胞の数はそれぞれ、枯渇前は2094個、枯渇後は1924個であり、このことは、腫瘍細胞の全て(>90%)が上清に存在していることを示している。この実施例は、腫瘍細胞の濃縮後にCTCアッセイサンプルに存在している白血球を本発明を用いて除去できることを示している。

10

【0025】

これを6つのサンプルで試験し、その結果を図3に示す。結果は、WBCの90%超が最小限の腫瘍細胞(SKBR3)の損失(<15%)で除去され得ることを示している。

【0026】

実施例4：循環内皮細胞(CEC)アッセイにおける白血球の枯渇

本実施例は、WBC枯渇の原理を他の希少細胞アッセイにも適用できることを示す。CellSearch CECアッセイは、CellSearch CECキットを用いて血液由来のCECを濃縮する。このキットは、CECの捕獲のための磁性流体磁性粒子にコンジュゲートされた抗CD146を含んでいる。このアッセイは、CTCアッセイと同様に、サンプルの調製のためにCellTracks AutoPrepシステムを用いる。CECは健全な血液サンプルに低頻度で存在するが、癌、心血管障害、感染症などの様々な条件によって上昇する。

20

【0027】

このアッセイを用いて、低頻度で存在するCEC(1試験につき細胞1~20個)への枯渇原理の作用、及びWBCの枯渇効率を試験した。

【0028】

CellSearch CECアッセイを用いて、CellTracks AutoPrepシステムで4mLのEDTA血液を処理した。濃縮された細胞は、全ての細胞の識別のために核酸染料(DAPI)で染色し、CECの識別のためにフィコエリトリン染料(PE)にコンジュゲートされた抗CD105で染色した。本実施例では、白血球を標識するために抗CD45 - FITCを使用した。染色工程後、サンプルを320µLの緩衝液に再懸濁し、CellTracks Analyzer IIでの解析のためにCellSearch解析カートリッジに移した。CellTracks Analyzer IIは、4つの異なる色でスキャンする4色蛍光顕微鏡であり、画像を解析し、DAPI及びCD105 - PEに陽性の画像を提示する。DAPI及びCD105に陽性かつCD45に陰性の細胞はCECとして数えられる。サンプルに存在するWBCの総数は、DAPI陽性に基いて数えられる。

30

【0029】

枯渇工程のために、濃縮及び染色の後、サンプルを900µLのPBS/1%BSAに再懸濁した。次いで、サンプルを、実施例4に記載したように抗FITCでコーティングしたマイクロタイタープレートに加えた。1時間後、サンプルを吸引し、磁性分離器を用いて320µLに濃縮した。次に、CellTracks Analyzer IIで解析するためにサンプル(320µL)をカートリッジに移した。上述のようにCEC及びWBCの数を判定した。WBCの枯渇の前及び後のCEC及びWBCの数を比較した。この研究の結果を表4aに示す。

40

【0030】

【表 2】

表 4 a : WBC の枯渇の前及び後の CEC 及び WBC の数

サンプル番号	CEC数		WBC数		WBC枯渇率(%)
	WBC枯渇前	WBC枯渇後	枯渇前	枯渇後	
D587	3	3	11, 877	1, 499	87. 4
D598	2	6	12, 116	3, 663	69. 8
D599	4	4	3, 463	300未満	NA
D611-1	17	15	12, 835	2, 694	79. 0
D611-2	17	12	12, 427	3, 307	73. 4
平均	8. 6	8	10544	2791	77. 4

10

【0031】

結果は、CECアッセイにおいて濃縮後のCECからもWBCを除去できる(>75%)ことを明らかに示している。更に、枯渇の前と後のCEC数に差はなかった(8.6対8)。このデータは、非常に低頻度(<20細胞)で存在しているときでさえも標的細胞が除去されないことを示している。

【0032】

実施例5: Cell Search Profileキット濃縮サンプルにおけるWBC枯渇の分子測定

6人の健常ドナーからの複製したEDTA血液7.5mLを、調整したCell Search CTC Profileキットを用いてAutoPrepで処理した。WBCの標識がAutoPrepで行われるように、ProfileキットのPBS/ビオチン試薬に、2µg/mLの最終的な試薬濃度で抗CD45-FITCを補充した。AutoPrepで濃縮後、各ドナーからのチューブ1つを、サンプルからWBCを除去した「枯渇」プロトコル、又は枯渇処理なしのサンプルにおけるWBC汚染を測定するための対照として用いられる「非枯渇」プロトコルのいずれかに供した。

20

【0033】

非枯渇プロトコル

AutoPrepからサンプルを取り出し、マグネットに15分間置いた。緩衝液を吸引し、細胞をRLT緩衝液(Qiagen)に溶解した。

【0034】

枯渇プロトコル

AutoPrepで濃縮後、2mLのPBS/1%BSAでサンプルを2回洗浄し、15分間磁性分離することによって、過剰のCD45-FITCを除去した。最終的なサンプルを900µLのPBS/5%BSAに再懸濁し、次いで、抗FITCでコーティングしたウェルに加えた。15分毎にやさしく攪拌して、サンプルを1時間インキュベートした。1時間後、300µLの上清をウェルから取り出し、細胞をマグネットに15分間置いた。緩衝液を除去し、細胞をRLT緩衝液(Qiagen)に溶解した。

30

【0035】

枯渇サンプル及び非枯渇サンプルの両方に関して、RNAをQiagen AllPrepキットを用いて精製し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitsキット(Life Technologies)を用いて逆転写した。表5aのリストの遺伝子について、TaqMan(登録商標)PreAmp Master Mix Kit(Life Technologies)及びプライマーセットを用いて、相補DNAを増幅した。白血球において発現することが知られている2つの遺伝子(CD45(別称PTPRC)及びBST1)の増幅サンプル並びに発現したハウスキーピング遺伝子(Bアクチン)について定量的PCRを実行した。非枯渇サンプルとの相関における枯渇サンプルのWBCの損失及びハウスキーピング特異性遺伝子シグナルによって、WBCの枯渇の有効性を測定した。

40

【0036】

図4において、それぞれ、丸は非枯渇(on depleted)サンプル、四角は枯渇サンプル

50

の個々の測定を示す。線は各サンプルタイプの平均測定値を示す。P値は、測定した各遺伝子の枯渇サンプルと非枯渇サンプルとの間で行った学生T試験の結果を表す。枯渇サンプルと非枯渇サンプルとの間のT試験は、CD45の枯渇の結果としてのWBC特異性遺伝子及びハウスキーピング遺伝子の有意な損失を示した。>2サイクルの平均デルタCt測定は、CD45枯渇サンプルにおけるWBCシグナルの>75%の低減を示している。

【0037】

【表3】

表5 a . . . CD45枯渇法で試験した遺伝子：

アフィメトリクス プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子表題
205648_at	WNT2	ウイングレス型MMTVインテグレーション部位ファミリーメンバー2
208711_s_at	CCND1	サイクリンD1
266_s_at	CD24	CD24分子
201596_x_at	KRT18	ケラチン18
202589_at	TYMS	チミジル酸シンターゼ
226553_at	TMPRSS2	膜貫通型プロテアーゼ、セリン2
225330_at	IGF1R	インスリン様成長因子1受容体
214352_s_at	KRAS	v-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ
201689_s_at	TPD52	腫瘍タンパク質D52
201005_at	CD9	CD9分子
224559_at	MALAT1	転移関連肺腺癌転写物1(非タンパク質コーディング)
218638_s_at	SPON2	スポンジン2、細胞外マトリックスタンパク質
217776_at	RDH11	レチノールデヒドロゲナーゼ11(オールトランスノ9-シスノ11-シス)
201656_at	ITGA6	インテグリン、α6
209605_at	TST	チオ硫酸スルフートランスフェラーゼ(ロダネーゼ)
204623_at	TFF3	トレフォイル因子3(腸)
202598_at	S100A13	S100カルシウム結合性タンパク質A13
221024_s_at	SLC2A10	溶質キャリアファミリー2(促進グルコース輸送体)、メンバー10
226192_at	AR	アンドロゲン受容体
212587_s_at	PTPRC	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、C
205715_at	BST1	骨髄間質細胞抗原1
	TMPRSS2 ERG	T1E4遺伝子融合
	AKR1C3	アルドーケト還元酵素ファミリー1、メンバーC3 (3-αヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、II型)

10

20

30

40

【0038】

実施例6：白血球枯渇後のCTC検出の改善

CD45枯渇法の潜在的利点の1つは、白血球が寄与するバックグラウンド遺伝子発現がある程度存在するときにCTCを検出する能力又はCTC遺伝子発現を特定化する能力が改善されていることである。白血球数の低下はバックグラウンド遺伝子発現を低下させ、より少数のCTCにおいて転写物を検出する能力を改善するはずである。

【0039】

この原理を実証するために、6人のドナーのそれぞれについて4つのサンプルを用意し、2つのサンプルを10個のVCaP細胞でスパイクし、2つのサンプルはスパイクしなかった。スパイクしたサンプルの1つ及びスパイクしていないサンプルの1つを、実施例

50

5に記載した「枯渇」及び「非枯渇」プロトコルの両方で用意した。RNA抽出、逆転写、及びプレ増幅キットは、実施例5と同様に実行した。公開データベースを検索して、WBC枯渇法の有用性の測定に有用であり得る、可能性のあるCTCマーカーのパネルを特定した。VCaP細胞において中～高発現であり、WBCにおいて一定範囲の発現を有する遺伝子を選択した。可能性のあるCTCマーカーS100A13及びAKR1C3のRT-PCRの結果。WBCの枯渇なし（非枯渇サンプル）では、どちらの遺伝子も、スパイクしなかったサンプルのセットと10個の細胞でスパイクしたサンプルのセットとの間の発現の有意差を示していない。枯渇セットでは、WBCが寄与したバックグラウンドが低下し、スパイクしなかったサンプルのセットと10個の細胞でスパイクしたサンプルのセットとの間に有意差が存在する。

10

【0040】

実施例7：白血球の枯渇後のCTCの分子特性化のためのWBCの枯渇の適用

CD45枯渇法の主な利点は、CTCの分子特性化の改善を可能にし、白血球が寄与するバックグラウンド遺伝子発現を最小限にすることである。

【0041】

この適用を実証するために、8人のドナーから8つのサンプルを調製し、それぞれ2つのサンプルを100個、50個、25個、10個のVCaP細胞でスパイクした。更に、VCaP細胞（例えば100個、50個、25個、10個の細胞）のみを含有する4つのサンプルを陽性対照として用いた。RNA抽出、逆転写、及びプレ増幅キットは、実施例6と同様に実行した。アンドロゲン受容体（AR）遺伝子、2つのARスプライスバリアント（ARV1及びARV3/7）、TMPRSS2並びにTMPRSS2：ERGのスプライスバリアントを、VCaP細胞のための試験遺伝子として選択した。WBCの枯渇後、純粋培養VCaP細胞と、VCaP細胞でスパイクした血液との間に、VCaP細胞におけるこれらの候補遺伝子の発現の検出において良好な相関が存在し、相関係数（ r^2 ）は > 0.9 であった。結果を図6に示す。

20

【0042】

実施例8：ビーズに基づく濾過を用いた白血球の枯渇

本実施例は、CellSearch Profile Kitを用いて濃縮したサンプルに存在する夾雑白血球の数を減少させるための代替方法を説明する。EpCAMに基づいた免疫磁性濃縮の後、夾雑CD45+WBCをプラスチックビーズで標識する。ビーズと結合したCD45+細胞を保持し未結合のCTCを通過させるフィルタで混合物を濾過して、WBCをCTCから分離する。こうして、より少ない数の夾雑WBCを用いる分子解析又は細胞解析にCTCが利用可能になる。

30

【0043】

この方法を実証するために、10,000個のVCaP細胞を健常ドナーの血液の6つのチューブにスパイクし、CellSearch Profile Kitを用いて濃縮した。3つのサンプルは直ちにQiagen RLT緩衝液に溶解し（非枯渇サンプル）、残りの3つのサンプルは、以下に記載したビーズに基づく方法を用いて枯渇させた。CTC及び夾雑白血球を含有する濃縮分画を、CD45分子に特異性の抗体でコーティングした30ミクロンのプラスチックビーズと混合した（pluriBead、pluriSelect）。ビーズ/細胞混合物を8~10RPMで1時間室温でロックした。孔径27ミクロンのフィルタでサンプルを濾過した（pluriStrainer、pluriSelect）。フィルタを2回洗浄し、その濾過によって収集した細胞を、白血球特異性マーカーであるPTPRC（別称CD45）及び腫瘍細胞特異性マーカーであるアンドロゲン受容体（AR）に関して、RT-PCRによって解析した。非枯渇サンプルの発現レベルから枯渇サンプルの発現レベルを減算することによって（ $40 - Ct$ 値）、デルタCt値を算出した。白血球マーカーPTPRCに関しての3.1サイクルというデルタCtは、非枯渇サンプルと比べて、ビーズ枯渇プロトコルによって白血球のレベルが有意に低下したことを示している。腫瘍細胞特異性マーカーARに関してのわずか0.4サイクルというデルタCtは、ビーズ枯渇プロトコルが腫瘍特異性マーカーのレベルにほとんど影

40

50

響しなかったことを示している。図 7 に示す結果は、ビーズ枯渇手順に供したサンプルと、供していないサンプルにおける、白血球及び腫瘍細胞マーカーに関する R T - P C R の結果を示している。A R = アンドロゲン受容体、P T P R C = タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、C。

【 0 0 4 4 】

〔実施の態様〕

(1) 濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去する方法であって、

(a) ハプテンにコンジュゲートされた白血球マーカーで白血球を標識する条件下で、ハプテンにコンジュゲートされたかかる白血球マーカーを用いて、かかるサンプルを処置する工程と、

(b) 工程 (a) の組成物を、かかる標識した白血球に接着する第 2 の媒体を用いて処置する工程と、工程 (b) の組成物から、前記第 2 の媒体及びその接着した標識された白血球を分離する工程と、を含む、方法。

(2) 前記濃縮した希少細胞が、C T C、C E C、C M M C、及び C M C からなる群から選択される、実施態様 1 に記載の方法。

(3) 前記濃縮した希少細胞が、C T C 及び C E C からなる群から選択される、実施態様 1 に記載の方法。

(4) 前記濃縮した希少細胞が C T C である、実施態様 1 に記載の方法。

(5) かかる濃縮した希少細胞を免疫磁性マーカーで標識する、実施態様 1 に記載の方法。

【 0 0 4 5 】

(6) 前記濃縮した希少細胞が C T C である、実施態様 5 に記載の方法。

(7) 前記白血球マーカーが、C D 4 5、C D 1 9、C D 1 5、グリコフォリン A、C D 2、C D 1 4、C D 1 6、C E 3 8、及び C D 6 6 b に対する抗体からなる群から選択される、実施態様 1 に記載の方法。

(8) 前記白血球マーカーが、抗 - C D 4 5 である、実施態様 1 に記載の方法。

(9) 前記白血球マーカーが、C D 4 5 のエピトープを含む抗体フラグメントである、実施態様 1 に記載の方法。

(1 0) 前記ハプチンが、フルオレセイン染料 (「 F I T C 」)、フィコエリトリン (「 P E 」)、アロフィコシアニン (「 A P C 」)、及びビオチンからなる群から選択される、実施態様 1 に記載の方法。

【 0 0 4 6 】

(1 1) 前記ハプテンが F I T C である、実施態様 1 に記載の方法。

(1 2) 前記濃縮した希少細胞が C T C であり、前記白血球マーカーが抗 - C D 4 5 であり、前記ハプチンがビオチンである、実施態様 1 に記載の方法。

(1 3) 濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットであって、ハプテンにコンジュゲートされる白血球マーカーと、前記白血球マーカー以外の第 2 のマーカーとを含み、前記第 2 のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む、キット。

(1 4) 濃縮した希少細胞及び白血球を含むサンプルから白血球を除去するためのキットであって、前記希少細胞及び白血球を免疫磁性法でマーキングするための試薬と、ハプテンにコンジュゲートされる白血球マーカーと、前記白血球マーカー以外の第 2 のマーカーとを含み、前記第 2 のマーカーは、かかるハプテンに対する抗体を含む、キット。

【 図 1 】

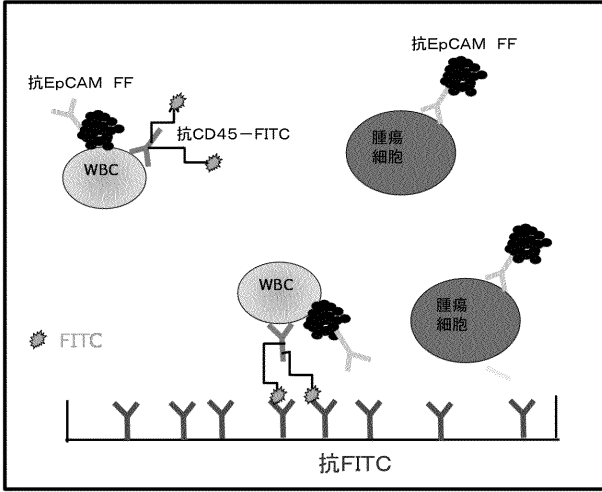


図1 ハブテンに基づく白血球の除去の解説図

【 図 2 】

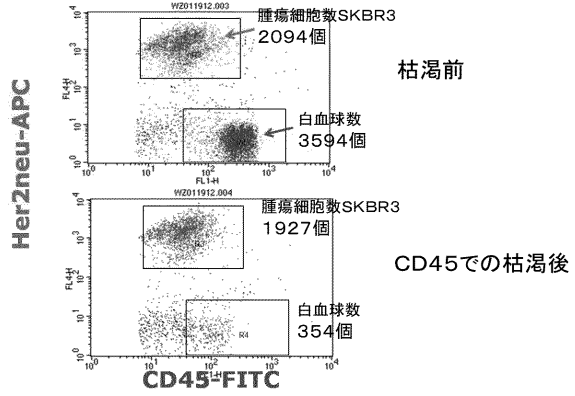


図2 抗FITCプレートでのインキュベーションの前及び後の白血球及びSKBR3腫瘍細胞のフローサイトメトリーによる解析

【 図 3 】

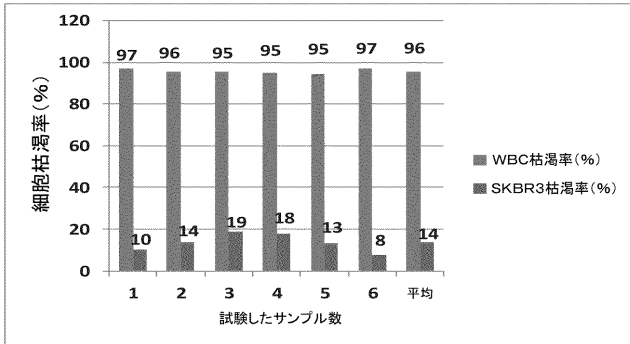


図3 抗FITCコーティングしたプレートによる、白血球及び腫瘍細胞の除去率 (%)

【 図 4 】

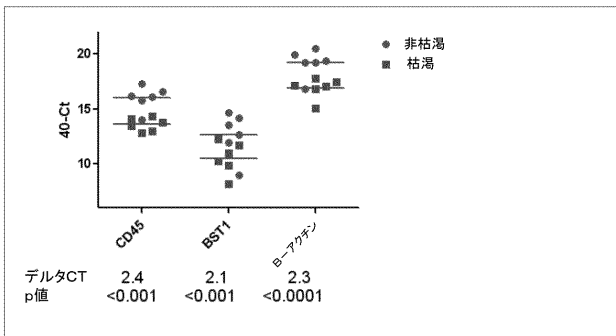


図4_WBC除去の分子測定

【 図 5 】

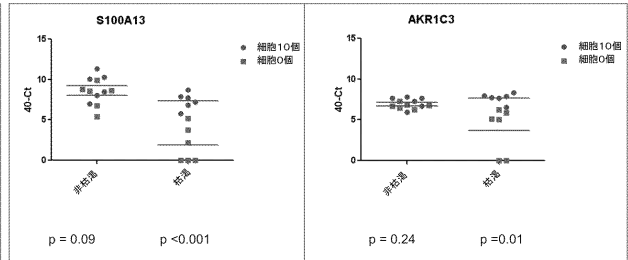


図5. CD45枯渇後に改善されたCTCマーカーの検出

【 図 6 】

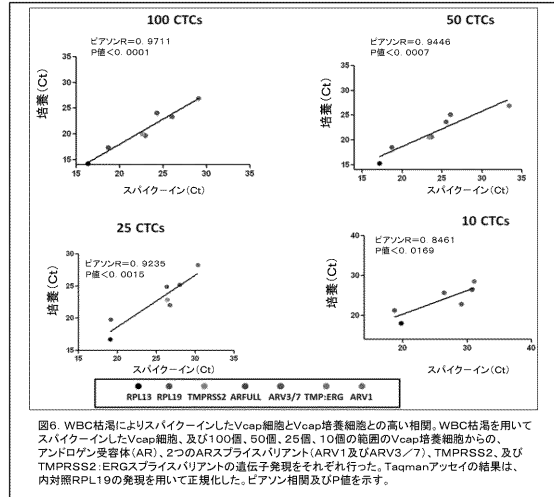


図6. WBC枯渇によりスパイクインしたVcap細胞とVcap培養細胞との高い相関。WBC枯渇を用いてスパイクインしたVcap細胞、及び100個、50個、25個、10個の範囲のVcap培養細胞からの、アンドロゲン受容体 (AR)、2つのARスプライスバリエント (ARV1及びARV3/7)、TMPRSS2、及びTMPRSS2-ERGスプライスバリエントの遺伝子発現をそれぞれ行った。Taqmanアッセイの結果は、内対照RPL19の発現を用いて正規化した。ピアソン相関及びP値を示す。

【 図 7 】

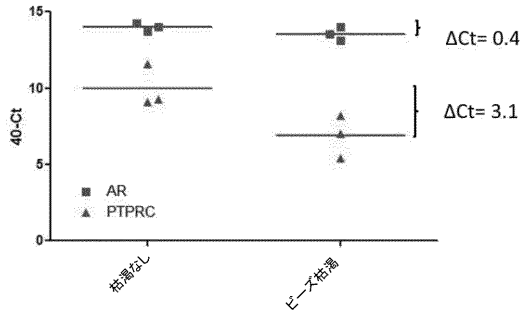


図7 白血球及び腫瘍細胞マーカーへのビーズ乾燥の作用

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/027701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/574 G01N33/58 G01N33/68 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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIYING YANG ET AL: "Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 102, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 521-534, XP055029603, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22066	1-4, 7-11,13, 14
Y	page 524, right-hand column, paragraph 2 - page 526, right-hand column, paragraph 3; figures 2,3; table II ----- -/--	5,6,12
<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 8 July 2014		Date of mailing of the international search report 21/07/2014
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 Wiesner, Martina

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/027701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN-LIN CHEN ET AL: "Separation and detection of rare cells in a microfluidic disk via negative selection", LAB ON A CHIP, vol. 11, no. 3, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 474-483, XP055127437, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c0lc00332h	1-4, 7-11,13, 14
Y	page 478, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3; figure 1 -----	5,6,12
Y	ZHIAN LIU ET AL: "Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 9, no. 70, 19 May 2011 (2011-05-19), XP021100797, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-9-70	5,6,12
A	page 2, right-hand column, paragraph 3 - page 3, left-hand column, paragraph 2 -----	1-4, 7-11,13, 14
A	US 6 365 362 B1 (TERSTAPPEN LEON W M M [US] ET AL) 2 April 2002 (2002-04-02) cited in the application column 18, paragraph 1 -----	1-14
A	WO 2011/063416 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]; BARBER THOMAS A [US]; SHAH AJAY [US]; WALSH JO) 26 May 2011 (2011-05-26) paragraph [000105] -----	1-14
A	MILTENYI S ET AL: "HIGH GRADIENT MAGNETIC CELL SEPERATION WITH MACS", CYTOMETRY, ALAN LISS, NEW YORK, US, vol. 11, no. 11, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 231-238, XP000999711, ISSN: 0196-4763, DOI: 10.1002/CYTO.990110203 the whole document ----- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/027701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. PARTRIDGE ET AL: "Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumour cells in patients with head and neck SCC", THE JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 189, no. 3, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 368-377, XP055127482, ISSN: 0022-3417, DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199911)189:3<368::AID-PATH441>3.0.CO;2-2 the whole document	1-14
A	ZIGEUNER ET AL: "IMMUNOMAGNETIC CELL ENRICHMENT DETECTS MORE DISSEMINATED CANCER CELLS THAN IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN VITRO", JOURNAL OF UROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 164, no. 5, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 1834-1837, XP005554031, ISSN: 0022-5347, DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67116-9 the whole document	1-14
A	UDO BILKENROTH ET AL: "Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 92, no. 4, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 577-582, XP055127483, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.1217 the whole document	1-14
A	KRIS R. JATANA ET AL: "Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck", ARCHIVES OF OTOLARYNGOLOGY - HEAD AND NECK SURGERY, vol. 136, no. 12, 20 December 2010 (2010-12-20), page 1274, XP055127484, ISSN: 0886-4470, DOI: 10.1001/archoto.2010.223 the whole document	1-14
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/027701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LARA O ET AL: "Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 32, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 891-904, XP004613157, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2004.07.007 the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/027701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6365362	B1	02-04-2002	
		AU 760560 B2	15-05-2003
		AU 2763699 A	30-08-1999
		BR 9907852 A	24-10-2000
		CA 2320418 A1	19-08-1999
		EP 1062515 A1	27-12-2000
		IL 137802 A	01-08-2006
		JP 3834326 B2	18-10-2006
		JP 5265855 B2	14-08-2013
		JP 2002503814 A	05-02-2002
		JP 2005010177 A	13-01-2005
		JP 2006208399 A	10-08-2006
		JP 2013047688 A	07-03-2013
		KR 100399475 B1	29-09-2003
		US 6365362 B1	02-04-2002
		US 2002009759 A1	24-01-2002
		US 2003129676 A1	10-07-2003
		WO 9941613 A1	19-08-1999

WO 2011063416	A2	26-05-2011	
		US 2013209988 A1	15-08-2013
		WO 2011063416 A2	26-05-2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 フォルク・ブラッド

アメリカ合衆国、 1 8 9 1 4 ペンシルベニア州、チャルフォント、サークル・ドライブ 1 1 2

(72)発明者 スミルノフ・デニス

アメリカ合衆国、 1 9 0 6 3 ペンシルベニア州、メディア、パークリッジ・ドライブ 8 4 1

(72)発明者 ニールセン・カール

アメリカ合衆国、 0 8 0 7 1 ニュージャージー州、ピットマン、ナインス・アベニュー 1 1 2

Fターム(参考) 2G045 BA01 BB12 CA11 CB01 DA78 DA80 FB03

4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS15 QS36 QX01

QX02

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	通过耗尽白细胞浓缩循环肿瘤细胞		
公开(公告)号	JP2016519286A	公开(公告)日	2016-06-30
申请号	JP2016502523	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	詹森诊断器材有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	扬森诊断, LLC		
[标]发明人	ラオガーラチャンドラ フォルクブラッド スミルノフデニス ニールセンカール		
发明人	ラオ・ガーラ・チャンドラ フォルク・ブラッド スミルノフ・デニス ニールセン・カール		
IPC分类号	G01N33/48 C12Q1/02 G01N33/53 C07K16/28		
FI分类号	G01N33/48.B C12Q1/02 G01N33/53.K G01N33/48.M C07K16/28		
F-TERM分类号	2G045/BA01 2G045/BB12 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/DA78 2G045/DA80 2G045/FB03 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS15 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
优先权	61/787611 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP6563379B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开的发明包括用于从富集的稀有细胞的样品中去除白细胞的方法和试剂盒。

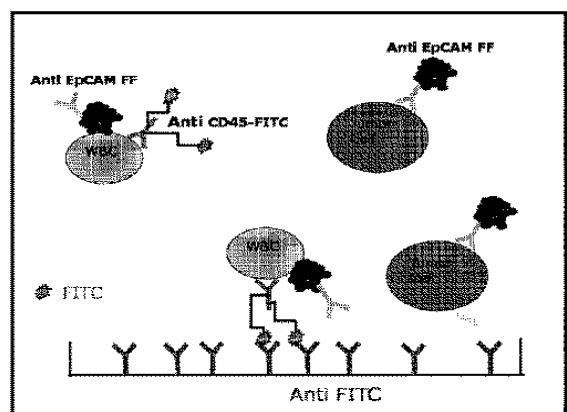


Figure 1 Depiction of haptene based white blood cell removal