

(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2018-518689

(P2018-518689A)

(43) 公表日 平成30年7月12日(2018.7.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	4 C 0 8 2
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
A 6 1 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 N 5/10 A	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 N 5/10 F	
	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2018-511341 (P2018-511341)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月12日 (2016.5.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月12日 (2018.1.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/031982  
 (87) 国際公開番号 W02016/183270  
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016.11.17)  
 (31) 優先権主張番号 62/161,595  
 (32) 優先日 平成27年5月14日 (2015.5.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513016884  
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ  
 ザ ユニヴァーシティ オブ イリノイ  
 THE BOARD OF TRUSTE  
 ES OF THE UNIVERSIT  
 Y OF ILLINOIS  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 61801  
 アーバナ エス ライト ストリート  
 506 ヘンリー アドミニストレーショ  
 ン ビルディング 352

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカーとして循環腫瘍細胞を使用するがん治療の有効性をモニタリングするための方法

(57) 【要約】

予測マーカーなどの循環腫瘍細胞動態を使用して、がん治療、例えば、放射線療法の有効性をモニタリングするための方法が記載される。

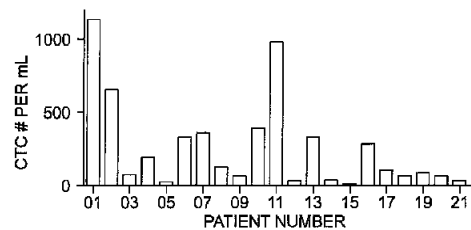


FIG. 1A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

がん治療の有効性をモニタリングするための方法であって、

(a) がん治療前の被験体からの生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞 (CTC) の数を決定すること、および

(b) (a) において決定したCTCの数を、がん治療の間または後の 1 以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定したCTCの数と比較することを含み、ここで、CTCの数は、固定化細胞ローリング剤および 1 以上の固定化CTC特異的捕捉剤を含む少なくとも 1 つのチャンパーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される、前記方法。

10

## 【請求項 2】

がん治療での処置の間または後のCTCの数の変化が、がん治療に対する被験体の応答を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

変化が増加である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

変化が減少である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

細胞ローリング剤がE-セレクチンである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

1 以上の固定化CTC特異的捕捉剤が、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、上皮増殖因子受容体 2 型 (HER-2)、および上皮増殖因子受容体 (EGFR) と結合する抗体を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

1 以上のCTC特異的捕捉剤が、ポリエチレングリコールに共有結合した改変ポリ (アミドアミン) デンドリマーを介して固定化される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

生物学的サンプルが末梢血である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

がん治療が固形腫瘍の処置のためである、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

がん治療が、頭頸部がん、肺がん、直腸がん、食道がんまたは子宮頸がんの処置のためである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

がん治療が放射線療法を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

(c) CTCの数が放射線療法の間または後に変化する場合、放射線療法を改変することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

放射線療法が、電離放射線量を増加することによって改変される、請求項 12 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

放射線療法が、電離放射線量を減少することによって改変される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

放射線療法が、少分割照射法によって改変される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 16】

放射線療法が、過分割照射法によって改変される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 17】

放射線療法が、化学療法、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、放射線

50

増感剤、またはこれらの組み合わせを施すことによって改変される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

フローベースのデバイスが、1 mL 当たり約 2 . 1 個の細胞の検出閾値を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

CTCの純度が約 49%である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

放射線療法の有効性をモニタリングするための方法であって、

(a) 放射線療法の線量を投与する前に、被験体からの生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞 (CTC) の数を決定すること、および

(b) (a) において決定したCTCの数を、放射線療法の間または後の 1 以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定したCTCの数と比較することを含み、ここで、CTCの数は、固定化細胞ローリング剤および 1 以上の固定化CTC特異的捕捉剤を含む少なくとも 1 つのチャンパーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

イントロダクション

本願は、2015年5月14日に出願された米国仮特許出願第62/161,595号に対する優先権の利益を主張し、この出願の内容は、その全体を参照して本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた契約番号R01-CA182528および全米科学財団によって与えられた契約番号DMR-1409161の下、政府の支援により行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

循環腫瘍細胞 (CTC) は、がん管理における重要なバイオマーカーである。その確立された臨床上の適用としては、腫瘍の非侵襲性「液体生検」としての使用、ならびに乳がん、前立腺がんおよび結腸直腸がんにおける予後バイオマーカーとしての使用 (Cohen, et al. (2008) J. Clin. Oncol. 26:3213-3221; Cristofanilli, et al. (2004) N. Engl. J. Med. 351:781-791; de Bono, et al. (2008) Clin. Cancer Res. 14:6302-6309)、ならびに前立腺がんにおける有効性マーカーとしての使用 (de Bono, et al. (2008) Clin. Cancer Res. 14:6302-6309; Goldkorn, et al. (2014) J. Clin. Oncol. 32:1136-1142; Sher, et al. (2011) J. Clin. Oncol. 29 (suppl; abstract LBA4517):293s; Lowes, et al. (2012) Clin. Transl. Oncol. 14:150-156) が挙げられる。しかしながら、相対的に感受性が低い既存のCTCアッセイは、その広範な臨床上の採用が制限されている。CTCは、血中の無数の血液細胞中の 1 個という少数から構成されており、極端にまれである。さらに、血流中の大多数のCTCは、循環中にアポトーシスまたは壊死を生じ、末梢血中においてさらに少数の検出可能なCTCを生じる。バイオマーカーとしてのそれらの使用のためのCTCの希少性を克服するために、高感度および高特異性でCTCを検出および捕捉することができるデバイスの開発が、CTC研究および臨床試験への橋渡しに極めて重要である。

【0004】

無数のCTC検出方法が、開発されている。現在までにFDAによって唯一承認されたシステムであるCELLSEARCH (商標) および現在利用可能なCTC検出技術のほとんどは、上皮細胞接着分子 (EpcAM) などの腫瘍上皮マーカーの発現に依存する、免疫アフィニティーベースの濃縮を利用する。しかしながら、多数のCTCが、上皮間葉転換 (EMT) に主に起因して、細胞表面上に下方制御された上皮マーカーを頻繁に表示するので、EpcAMベースのCTC検

10

20

30

40

50

出技術は、感受性が低いことが示されている。さらに、既存の検出方法を使用して報告される典型的に低い捕捉純度（全ての捕捉細胞の中で低い割合のCTC）は、捕捉後のCTCの分析を妨げる。

#### 【0005】

いくつかの手法により、CTC検出を改善することが示されている。第1に、aEpCAMおよびE-セレクトインを用いる表面機能付与は、aEpCAMのみを有する表面と比較して、優れた捕捉効率（3.2倍まで）を示す。この強化は、捕捉表面上にフローチャンバー内で早く流れる細胞を効率的に補充するE-セレクトイン誘導（E-selected-induced）細胞ローリングに起因すると考えられる（Myung, et al. (2010) Langmuir 26:8589-96）。また、多価結合により、表面の捕捉能力を改善できることが示されている。表面の捕捉能力は、解離定数における100万倍を超える強化および捕捉効率における7倍を超える増加によって観察されるとおり、G7ポリ（アミドアミン）（PAMAM） dendrimer 媒介多価結合効果の利用によって顕著に改善される（Myung, et al. (2011) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 50(49):11769-72）。さらに、細胞ローリングおよび多価結合の組み合わせ効果が、aEpCAM、抗ヒト上皮増殖因子受容体2型（aHER-2）、および抗上皮増殖因子受容体（aEGFR）などの複数のがん細胞特異的抗体を用いて適用され得ることが示されている（Myung, et al. (2014) Anal. Chem. 86(12):6088-94）。これらの手法を利用して、UICHIP（商標）と命名されるCTCデバイスが、CTCの効率的な捕捉のために開発されており、観察される強化は、臨床上的CTCに適用可能であると仮定される（WO 2010/124227およびWO 2015/134972）。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本発明は、（a）がん治療の前に被験体からの生物学的サンプル（例えば、末梢血）中の循環腫瘍細胞（CTC）の数を決定すること、および（b）（a）において決定されたCTCの数を、がん治療の間または後の1つ以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定したCTCの数と比較することによって、がん治療の有効性をモニタリングするための方法であり、ここで、CTCの数は、固定化された細胞ローリング剤（例えば、E-セレクトイン）および1つ以上の固定化されたCTC特異的捕捉剤（例えば、上皮細胞接着分子（EpCAM）、上皮増殖因子受容体2型（HER-2）、および上皮増殖因子受容体（EGFR）に結合する抗体）を含む少なくとも1つのチャンバーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される。1つの態様において、がん治療を用いる処置の間または後のCTCの数の変化（例えば、減少または増加）は、がん治療に対する被験体の応答を示す。他の態様において、1以上のCTC特異的捕捉剤は、ポリエチレングリコールに共有結合した改変ポリ（アミドアミン） dendrimer を介して固定されている。さらなる態様において、がん治療は、頭頸部がん、肺がん、直腸がん、食道がんまたは子宮頸がんの処置のためである。特定の態様において、がん治療は放射線療法であり、この方法は、（c）放射線療法の間または後にCTCの数が変化する場合、放射線療法（例えば、電離放射線量を増加もしくは減少させる、または、少分割照射法もしくは過分割照射法によって放射線を投与する、または、化学療法、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、放射線増感剤もしくはその組み合わせを施す）を改変する工程をさらに含む。特定の態様において、フローベースのデバイスは、1 mL 当たり約2.1個の細胞の検出閾値を有し、約49%のCTC純度レベルを提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0007】

【図1A-1C】図1A-1Cは、UICHIP（商標）-S上の dendrimer および複数の抗体の組み合わせを介する強化されたCTC捕捉感受性を示す。図1A、UICHIP（商標）-Sを使用して得られた全ての患者（01~21）からの血液1 mL 当たりの顕著なCTCカウント。図1B、文献からのCELLSEARCH（商標）結果と比較した、患者血液7.5 mL 当たりのUICHIP（商標）-S上の顕著に高い捕捉されたCTCカウント（ $5 \pm 2$ ,  $n = 19$ 、CELLSEARCH（商標） $v s . 1663 \pm 389$ ,  $n = 20$ ）。平均の線は、平均値  $\pm$  SEを示す。図1C、aEpCAMのみでコーティングした対照表面上に捕捉したCTCカウント（点線）と比較した、抗体混

合物 (ABMIX)、G7デンドリマー (G7)、および2つの組み合わせの強化 (倍)。平均線は、平均値 ± SEを示す。

【0008】

【図2A - 2C】図2A-2Cは、UICHIP (商標) -DへのE-セレクチン媒介細胞ローリングの添加を介する、強化されたCTC捕捉特異性を示す。図2A、UICHIP (商標) -Dを使用して得られた患者 (UNC 02 ~ 21) からの血液 1 mL 当たりの顕著なCTCカウント。血液サンプルがヘパリンの代わりにEDTAで処理され、細胞のローリング応答を不安定化させるので、患者01のCTCカウントは、含まれなかったことに留意すべきである。図2B、UICHIP (商標) -DおよびUICHIP (商標) -Sを使用して測定されたCTCカウントの比較。図2C、健康ドナーからの血液サンプルを使用して得られたCTCカウント。UICHIP (商標) -SおよびUICHIP (商標) -Dを使用するベースラインCTCカウントは、それぞれ、1 mL 当たり  $7.7 \pm 1.1$  個および  $2.1 \pm 0.3$  個の細胞と測定された。図2D、UICHIP (商標) -Sを使用する場合と比較して、UICHIP (商標) -Dを使用する全ての捕捉細胞の中で顕著に強化されたCTC捕捉純度 (%)。この結果は、UICHIP (商標) -Dの捕捉特異性が、E-セレクチン媒介細胞ローリングを介して劇的に強化されたことを示す。

10

【0009】

【図3A - 3B】図3Aおよび3Bは、UICHIP (商標) -Dを使用する放射線療法 (RT) をモニタリングする治療効果を示す。図3A、CELLSEARCH (商標) を使用するHNSCCがん患者において報告されたCTCカウントと比較して (Groebe, et al. (2014) Clin. Cancer Res. 20: 525-33; Bozec, et al. (2013) Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 270:2745-9; Grisanti, et al. (2014) PLoS ONE 9(8):e103918; Nichols, et al. (2012) Head Neck 34:1440-4)、UICHIP (商標) -Dを使用して、顕著に多数のCTCを捕捉したこと ( $1663.3 \pm 389.2$  個の細胞 / 血液  $7.5$  mL、平均値 ± 標準誤差 (SE)) を検出した。図3B、RTの経過の間に完全なCTC測定値を有する16人の患者のうち、Pre-RTにおけるCTCカウント (中央値  $152$  個の細胞 / mL、 $43 \sim 849$  個の細胞 / mL) は、RTに反応して統計学的に有意に減少した (End-RTにおいて中央値  $29$  個の細胞 / mL、 $2 \sim 150$  個の細胞 / mL、 $p = 0.001$ )。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

30

循環腫瘍細胞 (CTC) は、がんケアにおける重要なバイオマーカーである。しかしながら、CTCの臨床上的利用は、既存のCTC捕捉アッセイの低い感受性によって制限されている。現在、UICHIP (商標) CTC捕捉プラットフォームを使用して、種々の腫瘍細胞の捕捉効率、E-セレクチン媒介細胞ローリングによる表面へのフローリング細胞の効率的な動員、ポリ (アミドアミン) (PAMAM) デンドリマー媒介多価結合効果による腫瘍細胞の強力な表面結合、およびaEpCAM、aHER-2およびaEGFRのような複数のがん細胞特異的抗体の混合物の組み合わせを介して、顕著に改善することが見出されている。詳細には、複数の抗体混合物のデンドリマー媒介多価結合効果に大きく起因して、UICHIP (商標) の高い感受性により、1 mL 当たり  $18.5 \sim 662$  個のCTCの捕捉を可能にすることが観察された。UICHIP (商標) -D上の細胞ローリングの誘導により、CTC検出特異性が顕著に改善された ( $48.6\%$  純度まで)。重要なことには、放射線療法前 (Pre-) および放射線療法後 (End-radiotherapy) の間でのCTCカウントの変化に基づいて、UICHIP (商標) -Dは、CTCが処置応答のための予測バイオマーカーとして使用できることを示した。したがって、CTCのUICHIP (商標) -D捕捉は、治療効果およびがん進行のモニタリングにおいて、および単離されたCTCの捕捉後分析を可能にする際に、有用である。例えば、がん発症に関連する遺伝子配列 (例えば、KRASおよびEGFR) は、UICHIP (商標) -Dを使用して単離された患者由来のCTCにおいて評価することができ、それにより、新しいがんバイオマーカーの発見および最終的な個別化医療適用を容易にする。

40

したがって、本発明は、一般に、がんを検出し、そして、がん治療と組み合わせるその予後を予測するアッセイに関する。いくつかの場合において、患者ががんの危険があるこ

50

とが疑われる場合、予防処置が使用され得る。他のがん被験体において、診断は、初期の治療介入を可能にし得る。なお他の状況において、ここで記載されるアッセイの結果は、反復処置の必要性に関する有用な情報を提供し得る。最後に、本発明は、治療有効性を示す（例えば、処置をモニタリングして、治療が特定の患者に利益を提供するかしないかを評価する）際に有用である。

#### 【0011】

本発明の方法にしたがって、被験体からの生物学的サンプル中のCTCの数は、がん治療が始まる前に決定され、治療の間または後の1以上の時点での同じ被験体からの同様の生物学的サンプル中のCTCの数と比較される。特定の態様において、方法は、CTCのレベルが高いかどうかに基づいて、がんを処置することをさらに含み得る。がんの首尾よい処置は、被験体のがん治療から治療上の利点を受ける際に明らかである。かかる利点としては、治療を用いる処置の前と比較して、処置後の生物学的サンプル中に存在するCTCの数の減少が挙げられる。首尾よい処置のさらなる指標としては、被験体のがんの兆候または症状の頻度または重篤度の減少、幸福の改善および/または生存時間の増加が挙げられ得る。

10

#### 【0012】

用語「循環腫瘍細胞」または「CTC」は、被験体から得られたサンプル中に見出される任意の循環がん細胞を意味することが意図される。典型的には、CTCは、固形腫瘍から分断されている。したがって、CTCは、しばしば、がんを有する患者の循環において非常に低濃度で見出される固形腫瘍から分断される上皮細胞である。CTCはまた、肉腫からの間葉細胞または黒色腫からのメラニン形成細胞であり得る。

20

#### 【0013】

本明細書中で使用される場合、用語「生物学的サンプル」は、CTCを含む任意のサンプルを指す。サンプルの供給源としては、全血、骨髄、胸水、腹水、中枢（central）髄液、転移、新鮮な生検サンプル（例えば、新鮮な前立腺生検サンプル）、尿、唾液および気管支洗浄液（washes）が挙げられる。詳細には、サンプルは、例えば、全血または任意のその画分または構成成分を含む血液サンプルである。本発明の使用に適した血液サンプルは、静脈血、動脈血、末梢血、組織、臍帯血などのような、血液細胞またはその構成成分を含む任意の公知の供給源から抽出され得る。例えば、サンプルは、周知および慣用的な臨床方法（例えば、全血を引き出して処理するための手順）を使用して獲得し、処理することができる。特定の態様において、サンプルは、がんを有する被験体から引き出された末梢血であり得る。

30

#### 【0014】

がんを有する被験体は、CTC（またはCTCを含有するサンプル）が得られるか、または、本発明の方法が実施される任意の個体または患者を指すことが意図される。被験体は、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットを含む）、ネコ、イヌ、ウサギ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどを含む農耕動物、および霊長類（サル、チンパンジー、オラウータン、およびゴリラを含む）などの哺乳動物を含む動物であり得るが、一般に、被験体は、ヒトである。

#### 【0015】

特定の態様において、被験体は、がんを有し、がんを有することが疑われているか、または、がんを有する危険がある（例えば、家族歴、素因、または発癌物質への暴露に基づく）。かかるがんとしては、肺がん、乳がん、結腸がん、前立腺がん、膵臓がん、食道がん、全ての胃腸腫瘍、泌尿生殖器がん、腎臓がん、黒色腫、内分泌腫瘍、肉腫等が挙げられ得る。特定の態様において、がんは、乳がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、前立腺がん、肺がん、膵臓がん、肝臓がん、胃腸がん、結腸がん、または頭頸部がんである。特定の態様において、被験体は、固形腫瘍を有する。ある態様において、がんは、頭頸部がんである。別の態様において、がんは肺がん（小細胞および非小細胞）である。さらなる態様において、がんは、直腸がんである。なお別の態様において、がんは食道がんである。なおさらなる態様において、がんは子宮頸がんである。

40

#### 【0016】

50

本発明の方法を使用してモニタリングすることができるがん治療または処置としては、これらに限定されないが、化学療法、放射線療法、外科手術、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、またはそれらの組み合わせが挙げられる。特定の態様において、モニタリングされるがん治療は、放射線療法である。いくつかの態様において、放射線療法は、化学療法と組み合わせて使用される。

#### 【0017】

##### 化学療法

広範な種々の化学療法剤が、本発明に従って使用され得る。用語「化学療法」は、がんを処置するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、がんの処置において投与される化合物または組成物を暗示するために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内の活性の様式、例えば、これらが細胞周期に影響するか否か、およびどの段階で細胞周期に影響するか、によって分類される。あるいは、薬剤は、DNAを直接架橋する能力、DNAにインターカレートする能力、または、核酸合成に影響することによって染色体および有糸分裂異常を誘導する能力に基づいて特徴付けられ得る。化学療法剤としては、これらに限定されないが、パクリタキセル（タキソール）；ドセタキセル；ゲルミシチピン（germicitibine）；アルデスロイキン；アレムツズマブ；アリトレチノイン；アロプリノール；アルトレタミン；アミホスチン；アナストロゾール；三酸化ヒ素；アスパラギナーゼ；生BCG；ベキサロテンカプセル；ベキサロテングル；プレオマイシン；静脈内ブスルファン；ブスルファノラル（busulfanoral）；カルステロン；カベシタピン；カルボプラチン；カルムスチン；ポリフェプロサン移植片と共にカルムスチン；セレコキシブ；クロラムブシル；シスプラチン；クラドリピン；シクロホスファミド；シタラビン；リポソームのシタラビン（cytarabine liposomal）；ダカルバジン；ダクチノマイシン；アクチノマイシンD；ダルベポエチンアルファ；リポソームのダウノルピシン；ダウノルピシン；ダウノマイシン；デニロイキンジフチトクス；デクスラゾキサソ；ドセタキセル；ドキシソルピシン；リポソームのドキシソルピシン；プロピオン酸ドロモスタノロン；エリオットのB溶液（Elliott's B Solution）；エビルピシン；エポエチンアルファエストラムスチン；リン酸エトポシド；エトポシド（VP-16）；エキセメスタン；フィルグラスチム；フロクスウリジン（動脈内）；フルダラビン；フルオロウラシル（5-FU）；フルベストラント；ゲムツズマブオゾガマイシン；酢酸ゴセレリン；ヒドロキシウレア；イブリツモマブチウキセタン；イダルピシン；イホスファミド；メシル酸イマチニブ；インターフェロンアルファ - 2a；インターフェロンアルファ - 2b；イリノテカン；レトロゾール；ロイコボリン；レバミソール；ロムスチン（CCNU）；メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）；酢酸メゲストロール；メルファラン（L-PAM）；メルカプトプリン（6-MP）；メスナ；メトトレキサート；メトキサレン；マイトマイシンC；ミトタン；ミトキサントロン；ナンドロロン；フェンプロピオネート；ノフェツモマブ（Nofetumomab）；LOddC；オブレルベキン；オキサリプラチン；パミドロネート；ペガデマゼ；ペガスバルガーゼ；ペグフィルグラスチム；ペントスタチン；ピボプロマン；プリカマイシン；ミスラマイシン；ポルフィマーナトリウム；プロカルバジン；キナクリン；ラスプリカーゼ；リツキシマブ；サルグラモスチム；ストレプトゾシン；タルブピジン（talbuvidine）（LDT）；タルク；タモキシフェン；テモゾロミド；テニポシド（VM-26）；テストラクトン；チオグアニン（6-TG）；チオテパ；トポテカン；トレミフェン；トシツモマブ；トラスツズマブ；トレチノイン（ATRA）；ウラシルマスタード；パルルピシン；パルトルシタピン（一価のLDC）；ピンブラスチン；ピノレルピン；ゾレドロネート；およびこれらの任意の混合物が挙げられる。

#### 【0018】

##### 放射線療法

放射線療法（radiation therapy）とも呼ばれる放射線療法（radiotherapy）は、電離放射線を用いる、がんおよび他の疾患の処置である。電離放射線は、遺伝物質を損傷することによって処置される領域の細胞を傷害または破壊するエネルギーを蓄積し、これらの細胞が増殖し続けることを不可能とする。放射線は、がん細胞および正常細胞の両方を損

10

20

30

40

50

傷するが、後者は細胞自身を修復し、適切に機能する。本発明にしたがって使用される放射線療法としては、これらに限定されないが、 $\gamma$ 線、X線の使用および/または放射性同位体の腫瘍細胞への指向送達が挙げられる。DNA損傷因子の他の形態としてはまた、マイクロ波およびUV照射などが意図される。X線の投与範囲は、延長期間(3~4週間)の1日1回の線量の50~200レントゲンから単回線量の2000~6000レントゲンまでである。放射性同位体の投与範囲は、同位体の半減期、照射される放射線の強さおよび種類、新生物細胞による取り込みに依存して広範に変化する。放射線療法は、がんの部位に直接複数線量の放射線を送達する放射線標識抗体の使用(放射線免疫療法)および/または放射線増感剤の使用を含んでいてもよいことがさらに意図される。

#### 【0019】

##### 免疫療法

がん処置の文脈において、免疫療法は、一般に、がん細胞を標的化し破壊する免疫エフェクター細胞および分子の使用に頼っている。トラスツズマブ(HERCEPTIN(商標))は、かかる一例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカに特異的な抗体であってもよい。抗体は単独で、療法のエフェクターとして機能してもよいし、細胞の殺傷に実際に影響するように他の細胞を動員してもよい。抗体はまた、薬物または毒素(化学療法、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)に結合体化されてもよいし、単に標的化剤として機能してもよい。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接のいずれかで相互作用する表面分子を保有するリンパ球であり得る。種々のエフェクター細胞は、細胞障害性T細胞およびNK細胞を含む。治療モダリティ、すなわち、直接的な細胞障害活性およびErbB2の阻害または低減の組み合わせによって、ErbB2過剰発現がんの処置において治療上の利益を提供するだろう。

#### 【0020】

現在調査中または使用中の免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えば、ウシ型結核菌(*Mycobacterium bovis*)、*Plasmodium falciparum*、ジニトロクロロベンゼンおよび芳香族化合物(US 5,801,005およびUS 5,739,169); サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、および; IL-1、GM-CSFおよびTNF; 遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53(US 5,830,880およびUS 5,846,945); ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗p185(US 5,824,311)である。

#### 【0021】

##### 外科手術

がんを有するヒトの約60%が、何らかの種類の外科手術を受け、これは、予防、診断または進行度診断、治療、および対症療法的な外科手術を含む。治療外科手術は、本発明の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法および/または代替療法などの他の療法と組み合わせて使用し得るがん処置である。

#### 【0022】

治療外科手術は、全てまたは一部のがん性組織が物理的に除去され、切除され、および/または破壊される切除術を含む。腫瘍切除術は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除術に加えて、外科手術による処置としては、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡制御手術(モース手術)が挙げられる。本発明は、表在型がん、前がん、または偶発量の正常組織の除去と組み合わせて使用され得ることがさらに意図される。

#### 【0023】

一部または全部のがん性細胞、組織または腫瘍の切除の際、身体中にキャビティが形成されてもよい。処置は、灌流、直接注射、またはさらなる抗がん治療を用いる領域の局所適用を伴っていてもよい。かかる処置は、例えば、1、2、3、4、5、6、または7日毎、または、1、2、3、4、および5週毎、または、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12月毎に反復され得る。これらの処置は、投与量を変更するものであってもよい。

#### 【0024】

10

20

30

40

50

## 他の薬剤

化学療法、放射線療法、または生物学的療法と組み合わせて使用するための別の形態の療法としては、患者の組織が高温（106 °Fまで）に曝される手順である温熱療法が挙げられる。外部または内部加熱デバイスは、局所、領域、または全身の温熱療法の適用に関与し得る。局所温熱療法は、腫瘍のような小さい領域への熱の適用を含む。熱は、身体の外側のデバイスから腫瘍を標的化する高周波で外的に生成され得る。内部熱は、薄い加熱ワイヤまたは温水を充填した中空チューブを含む滅菌プローブ、移植されたマイクロ波アンテナ、または高周波電極を含んでいてもよい。

### 【0025】

ホルモン療法もまた使用され得る。ホルモンの使用は、テストステロンまたはエストロゲンのような特定のホルモンのレベルを低下させるため、または、効果をブロックするために、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、または子宮頸がんのような特定のがんの処置において使用され得る。この処置はしばしば、処置選択肢として、または、転移のリスクを低減するために、少なくとも1つの他のがん治療と組み合わせて使用される。

10

### 【0026】

本明細書中に開示される方法において適用される治療剤の量は、薬学的に有効であれば何でもよく、選択される治療剤のアイデンティティーおよび効力を含む、多数の因子に依存する。当業者は、特定の薬剤の治療有効量を決定する際に関与する因子に精通しているだろう。治療剤は、1回または1回を超えて適用され得る。非制限的な例において、治療剤は、1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日6回、起きているときに2時間毎、4時間毎、1日おき、1週間に1回などで適用される。処置は、当業者によって決定されるように任意の期間継続され得る。

20

### 【0027】

本明細書中で提示される結果によって、CTCは、がん治療のための予測バイオマーカーであることが実証されている。より詳細には、CTC動態、すなわち、がん治療処置レジームにわたるCTC数の変化は、がん治療に対する完全または不完全な応答を評価する際に使用される。本発明の方法にしたがって、CTCの数は、処置前および後の両方で決定され、がん治療レジーム、例えば、タイミングおよび/または線量の有効性を評価するために処置の経過の間に必要に応じて決定することができる。CTC数またはCTC動態における変化は、処置の前のCTCの数を、処置の間および/または後のCTCの数と比較することによって評価する。ある態様において、処置経過にわたるCTCの一貫した減少によって、治療（例えば、化学療法を伴うかまたは伴わない放射線療法）に対する完全な腫瘍応答が予測される。別の態様において、CTC数が処置の間に増加すれば、最終的なCTCカウントにかかわらず、CTC動態/バイオマーカーは、治療に対する不完全な応答を予測する。

30

### 【0028】

本明細書中で実証されるように、生物模倣型プラットフォームのUICHIP（商標）は、CTCを測定するための高度の感受性および特異性を提供する。確かに、がんのステージ、患者の医療履歴、またはがんの種類にかかわらず、UICHIP（商標）-Dは、1 mLの末梢血当たり、それぞれ、222個および101個の平均値および中央値のCTCを捕捉することができた。これは、健常ボランティアから提供された1 mLの血液当たり、7.5個のCTC（UICHIP（商標）-S）および2.1個のCTC（UICHIP（商標）-D）のカットオフ値よりも実質的に高かった。したがって、本発明の方法におけるCTC数は、細胞ローリング誘導剤および基板に付着した少なくとも1つのCTC特定捕捉剤を有するUICHIP（商標）デバイスを使用して決定される。WO 2010/124227およびWO 2015/134972を参照のこと。詳細には、本発明の方法は、フローベースのデバイスを使用し、ここで、デバイスは固定化された細胞ローリング剤および少なくとも1つのCTC特異的捕捉剤を有する少なくとも1つのチャンパーを含む。いくつかの態様において、捕捉剤は、CTCの表面上の部分に結合する、抗体、抗体フラグメント、操作された抗体、葉酸、トランスフェリン、ペプチド、およびアプタマーである。特定の態様において、フローベースのデバイスは、上皮細胞接着分子（EpCAM）、ヒト上皮増殖因子受容体2型（HER-2）、上皮増殖因子受容体（EGFR）、癌胎児

40

50

性抗原（CEA）、前立腺特異的抗原（PSA）、CD24、および葉酸結合受容体（FAR）の1つ以上に結合する捕捉剤を含む。CTC捕捉を容易にするために、捕捉剤は、ポリエチレングリコールに共有結合した改変ポリ（アミドアミン）デンドリマーを介して、デバイスの表面に付着を介して固定化されている。他の態様において、細胞ローリング誘導剤は、セレクチンまたはセレクチンのCTC結合フラグメントである。より詳細には、セレクチンは、E-セレクチン、P-セレクチンまたはL-セレクチンである。有利には、本発明の方法において使用されるフローベースのデバイスは、セレクチン媒介細胞ローリングによる表面へのフロー細胞の効率的な動員；ポリ（アミドアミン）デンドリマー媒介多価結合効果による腫瘍細胞の強力な表面結合；および複数のがん細胞特異的抗体、例えば、aEpCAM、aHER-2、およびaEGFRの使用を提供する。さらに、フローベースのデバイスを使用して、1 mL

10

当たり約2.1個の細胞の検出閾値を達成することができ、CTC純度は、細胞ローリング剤なしのデバイス（典型的には0.04%～10.7%）と比較して、約49%であった。したがって、本発明の方法はまた、1 mL当たり約2.0個の細胞の検出閾値および少なくとも約15%、20%、25%、30%、40%、45%または50%のCTC純度レベルを提供する。本発明の方法を使用して達成された検出閾値および高レベルの純度を考慮すると、がん治療の間または後のCTC数またはCTC動態における変化を容易に測定することができる。

#### 【0029】

したがって、本発明はまた、処置後のCTC数における変化（すなわち、増加または減少）に基づいて、がん治療を改変することを提供する。詳細には、がん治療が放射線療法である場合、前記治療は、CTCの数が増加（すなわち、不完全な応答）または減少（すなわち、完全な応答）する際に、それぞれ、電離放射線の線量を増加または減少させることにより、改変することができる。他の態様において、少分割照射法または過分割照射法の電離放射線の線量が腫瘍に投与される。さらなる態様において、放射線療法は、化学療法、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、放射線増感剤またはこれらの組み合わせを施すことによって改変される。

20

#### 【0030】

本発明の特定の特徴としては、（a）放射線療法の線量を投与する前に被験体からの生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞（CTC）の数を決定すること、および（b）（a）において決定されたCTCの数を、放射線療法の間または後の1以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定されたCTCの数と比較することによって放射線療法の有効性をモニタリングするための方法であって、ここで、CTCの数は、固定化された細胞ローリング剤および1以上の固定化されたCTC特異的捕捉剤を含む少なくとも1つのチャンパーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される。1つの態様において、本発明の方法はさらに、増加した線量の放射線を被験体に投与する工程を含み、ここで、照射線の線量は、開始放射線処置に反応して、末梢血中のCTCのレベルが上昇していない被験体に投与された線量と比較して、増加している。この態様にしたがって、増加した線量の放射線は、小分割または過分割の様式で、投与され得る。別の態様において、本発明の方法はさらに、減少した線量の放射線を被験体に投与する工程を含み、ここで、放射線の線量は、開始放射線処置に反応して、末梢血中のCTCのレベルが上昇した被験体に投与される線量と比較して、減少している。なお別の態様において、本発明の方法はさらに、薬学的有効量の化学療法、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、放射線増感剤またはこれらの組み合わせと組み合わせ、末梢血中のCTCのレベルが上昇していない被験体に投与される線量と類似する、放射線線量を被験体に投与する工程を含む。

30

40

#### 【0031】

以下の非制限的な例は、本発明をさらに例示するために提供される。

#### 【実施例】

#### 【0032】

例1：材料および方法

材料

10

20

30

40

50

抗ヒト上皮細胞接着分子 (EpCAM) /TROP1抗体 (aEpCAM)、抗ヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (HER-2) /TROP1抗体 (aHER-2) および組み換えヒトE-セレクトリン (E-セレクトリン) をR&Dシステムズ (Minneapolis, MN) より購入した。抗ヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) 抗体 (aEGFR、N-20) は、Santa Cruz Biotech (Dallas, TX) から得た。エポキシ官能化ガラス表面 (SUPEREPOXY2 (登録商標)) は、TeleChem International, Inc. (Sunnyvale, CA) から購入した。PAMAMデンドリマー (第7世代)、ウシ血清アルブミン (BSA)、および全ての他の化合物は、他に示さない限り、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から得て、他に特定されない限り、さらなる精製なしで使用した。

### 【0033】

捕捉剤の固定化による表面機能付与

表面機能付与は、確立された方法を使用して実施した (Myung, et al. (2014) Anal. Chem. 86(12):6088-94; Myung, et al. (2011) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 50(49):11769-72)。手短に言うと、エポキシ官能化ガラススライドを、パターンを有するポリジメチルシロキサン (PDMS) ガスケットを用いて最初に適合させて、異なる薬剤の固定化のための領域を規定した。次いで、表面は、ヘテロ二官能化PEG (NH<sub>2</sub>-PEG-COOH)、第7世代の部分的にカルボキシル化されたPAMAMデンドリマーおよび抗体を、EDC/NHS化学を使用して引き続き固定化することによって機能付与した (Myung, et al. (2011) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 50(49):11769-72)。抗体結合体化のために、aEpCAM、aHER-2、aEGFRの全ての抗体溶液を、5 μg/mLの最終濃度で使用した。試薬溶液の各々の容量は、UICHIP (商標) -S (すなわち、E-セレクトリンなしのデバイス) については250 μLおよびUICHIP (商標) -D (すなわち、E-セレクトリンを有するデバイス) については200 μLに固定した。UICHIP (商標) -Dの場合には、抗体固定化表面全体を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中5 μg/mLの濃度で0.4 mLのE-セレクトリンで4時間処理した。全ての表面反応は、一定に緩やかに浸透しながら、室温で実施し、全ての調製工程の間に、表面を滅菌脱イオン (DDI) 水およびPBSで3回洗浄し、残渣試薬を除去した。タンパク質コーティングおよび非コーティング領域の両方の可能性のある非特異的結合は、1 μg/mLメトキシPEG-NH<sub>2</sub> (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) 溶液との最終インキュベーションによってブロックした。機能付与された表面は、4 で維持し、表面を使用する実験は、表面調製後1週間以内に実施した。

### 【0034】

研究設計

これは、ノースカロライナ大学チェペルヒル校 (UNC) のLineberger Comprehensive Cancer Centerで行われた単一機関による予測研究であった。組織学的に証明されたがんを有する患者は資格があった。放射線学的にステージII、IIIまたはIVの疾患と確認されることが必要であり、患者は、標準的な放射線療法 (RT) プロトコルを用いる処置を化学療法と共にまたは化学療法なしで開始した。全ての患者は、IRBによって承認された研究プロトコルに対して、書面によるインフォームドコンセントを与えた。データは、年齢、民族性、組織学的サブタイプ、喫煙状態、転移部位、RT受容、生存期間およびRT応答について収集した。

### 【0035】

血液サンプル

約12 mLの全末梢血を、健常ドナーまたはがん患者のいずれかから引き出した。そのベースライン検体をEDTA処理したBD VACUTAINER管に収集した最初に登録された患者を除き、血液は、ヘパリン処置したBD VACUTAINER管に収集して、凝固を防止した。血液検体を、がん患者から引き出し、室温に維持し、血液採取の24時間後に分析した。パフィーコート中のCTCを含む単核細胞を、先に記載された刊行物 (Myung, et al. (2014) Anal. Chem. 86(12):6088-94) のように、FICOLL-PAQUE Plus (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada) を使用して、全血から分離した。2% FBS含有PBSで2回パフィーコートを洗浄した後、回収された細胞を、0.2 mLの完全DMEM培地中で懸濁し、引き続き実験のために使用した。

10

20

30

40

50

## 【0036】

## CTC捕捉アッセイ

血液検体からCTCを捕捉するために、UICHIP (商標) -Sプラットフォームを、インキュベータ中で、パフィーコート中の単核細胞の懸濁液と共にインキュベートした。回収されたパフィーコート懸濁液を、2つに分けた：最初の半分は、UICHIP (商標) -Sのための650  $\mu\text{L}$ の完全DMEM培地と混合し、残りの半分は、UICHIP (商標) -Dのために直接使用した。表面を、250  $\mu\text{L}$ の細胞懸濁液と共に2時間インキュベートした。

## 【0037】

UICHIP (商標) -Dについて、フローチャンバー実験を、以前に報告されたように実施した (Myung, et al. (2010) Langmuir 26:8589-96)。単離されたパフィーコートの懸濁液を、シリンジポンプ (New Era pump Systems Inc., Farmingdale, NY) を使用して、フローチャンバーに注入した。フローチャンバーは、2つのチャンネル (各チャンネルについて60 mm (L)  $\times$  10 mm (W)  $\times$  0.125 mm (D)) を、血液サンプルの注入のための管と接続した。細胞のUICHIP (商標) -D捕捉を、0.22 dyn/cm<sup>2</sup>の剪断応力に相当する25  $\mu\text{L}/\text{min}$ のフロー下で連続的にモニタリングした。次いで、表面を、100  $\mu\text{L}/\text{min}$  (0.88 dyn/cm<sup>2</sup>) で、完全DMEM培地を使用して20分間、およびPBSを使用して15分間洗浄した。全捕捉プロセスは、OLYMPUS IX70倒立顕微鏡 (Olympus America, Inc., Center Valley, PA)、10 $\times$ 対物レンズおよびCCDカメラ (QImaging Retiga 1300B, Olympus America, Inc.) を使用してモニタリングした。

## 【0038】

表面捕捉細胞の中でCTCを同定するために、一連の免疫染色アッセイを実施した。4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した後、全ての捕捉細胞を、0.2 w/v% TRITON X-100 (浸透緩衝液) を用いて5~10分間処理して、抗体浸透を強化した。非特異的結合を妨げるために、スライド全体を、免疫染色の前に、2 w/v% BSA溶液を用いて30分間処理した。次いで、細胞を、以下の抗体で順次染色した：(1) ヒトサイトケラチンに対するウサギ抗体 (CK; 1:50, abcam)、(2) 抗CKに対するALEXAFLUOR 594結合体化二次抗体 (1:100, Invitrogen)、(3) ヒトCD45に対するウサギ抗体 (1:500, BD bioscience)、および(4) 抗CD45に対するALEXAFLUOR 488結合体化二次抗体 (1:100, Invitrogen)。DAPI含有マウント培地 (DAPI-included mounting media) (VectaShield Laboratories, Inc., Burlingame, CA) もまた使用して、単核細胞の核を染色し、分析の間の写真の退色を妨げた。次いで、スライドをカバーガラスおよびマニキュア液で密閉し、4で貯蔵した。免疫染色プラットフォームを、電動ステージおよび20 $\times$ 対物レンズを備えたZEISS 701共焦点顕微鏡、ならびにCCDカメラを使用してスキャンした。表面上のCK+/CD45-/DAPI+ CTCの数を、ImageJ (NIH) を使用する独立した観察/測定から得られた画像に基づいて、カウントした。

## 【0039】

## 統計学的分析

統計学的分析を、SPSS version 21.0 for WINDOWS (登録商標) (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を使用して実施した。全ての患者について、Pre-RTとEnd-RTとの間のCTC絶対数における差異は、ウィルコクソンの符号順位検定を使用して計算した。フリードマン検定を使用して、3つの異なるCTC捕捉プラットフォーム (PEG-aEpCAM、PEG-ABmix、およびG7-ABmix) によって得られたCTC絶対レベルの統計学的差異を決定して評価した (データを図1Cに示す)。Pre-RTとEnd-RTとの間のCTC絶対数における差異を、ウィルコクソン符号順位検定によって比較した (データを図3Bに示す)。全ての統計学的試験は、 $P < 0.05$  (両側) の有意レベルで実施した。

## 【0040】

## 例2：表面調製およびUICHIP (商標) 製作

G7 PAMAM dendrimer、E-selektion、および抗体混合物を統合するUICHIP (商標) を、以前に記載した表面化学を使用して製作した (Myung, et al. (2011) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 50(49):11769-72)。手短かに言うと、部分的にカルボキシル化したG7 PAMAM

デンドリマーを、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド/N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(EDC/NHS)ベースのアミンカップリング化学を使用して、ヘテロ二官能性ポリエチレングリコール(PEG、COOH-PEG-NH<sub>2</sub>)リンカーを介してエポキシ官能化ガラススライド上に固定化した(Myung, et al. (2011) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 50(49):11769-72)。次いで、aEpCAM、aHER-2、およびaEGFRの抗体混合物(AB mix)を、EDC/NHSカップリングを介して、G7 PAMAMデンドリマーのカルボキシル末端に結合体化した(Myung, et al. (2011) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 50(49):11769-72; Myung, et al. (2014) *Anal. Chem.* 86(12):6088-94)。この工程により、デンドリマー表面上で第一級アミン基のほとんどを消費することができるので、PAMAMデンドリマーの正に荷電したアミン末端と負に荷電した細胞膜との間の非特異的な静電気相互作用を最小化するのに役立つ。デンドリマーがない表面と比較して、PAMAMデンドリマー固定化表面は、樹状ナノ構造に起因してより多くの抗体を固定化することができ、多価結合効果を媒介して、腫瘍細胞結合を顕著に強化することができる。ヒト組み換えE-セレクチン分子は、さらに、E-セレクチンのアミン基とガラススライド上のエポキシ基との間の共有結合の形成を介して固定化され、フロー細胞を捕捉表面に効果的に動員する。最後に、非特異的結合を最小化するために、機能付与された表面は、メトキシ-PEG-NH<sub>2</sub>と共にインキュベートされ、表面上に残るエポキシ基を消費する。表面は、X線光電子分光法および蛍光顕微鏡を使用して特徴付けられ、首尾よい表面機能付与を確認する。

10

【0041】

## 例3：患者人口統計学

20

腫瘍管理のためにRTを受けた組織学的に確認された原発性がんを有する患者は、この研究に登録された。直腸がん(n=1)、子宮頸がん(n=1)、前立腺がん(n=1)、口腔がん(n=2)、副鼻腔がん(n=3)、または中咽頭がん(n=13)を有する、合計21人の患者を、6か月の期間にわたり補充した。患者人口統計学および臨床情報を、表1に要約する。ベースライン血液検体(Pre-RT)を、RT開始一週間以内、典型的には、RT計画のためのCTシミュレーションの日または処置前の患者設定の日に収集した。RTの間、検体は、RTの最初の週の間(1W-RT)、RTの中途(Mid-RT)、およびRTの最終週の間(End-RT)を含む3つの時点まで収集した。最終的な検体は、RTの最後の週の少なくとも4週後に収集した(Post-RT)。

【表 1】

表 1

	評価可能な患者 (N = 21)	
	No.	%
ベースラインにおける年齢、年 中央値 範囲		57 42-84
性別		
女性	7	33
男性	14	67
人種		
白人	18	86
アフリカ系アメリカ人	3	14
がんの種類		
頭頸部	18	86
中咽頭	13	62
口腔	2	10
副鼻	3	14
直腸	1	5
子宮頸	1	5
前立腺	1	5
診断時の腫瘍ステージ		
II	3	14
III	1	5
IV	17	81
組織学的サブタイプ		
扁平上皮癌	18	86
HPV/P16 陽性	9	43
HPV/P16 陰性	4	19
HPV/P16 未知	2	10
腺癌	1	5
副鼻腔	2	10
喫煙状態		
現在の喫煙者	4	19
以前の喫煙者	8	38
喫煙歴なし	9	43

10

20

30

## 【 0 0 4 2 】

21人の登録患者のうち合計19人(90%)が、ベースライン測定後(Pre-RT)の引き続きCTC分析のために収集された少なくとも1つのオントリートメント検体を有していたが、17人の患者(81%)は、RTの完了(End-RT)の前に引き出された最終血液を有していた。Post-RT検体は、合計13人の患者(62%)から収集した。

40

## 【 0 0 4 3 】

例 4 : デンドリマーおよび複数の抗体を使用する強化されたCTC検出感受性

G7 PAMAMデンドリマーで機能付与された表面上に複数の抗体が固定化された表面のCTC検出感受性を、がん患者からの臨床血液サンプルを使用して測定した。G7デンドリマーおよびABmixを使用して静的条件下で(フローなし)CTCを検出するデバイスは、UICHIP(商標)-Sとして示される。サイトケラチン(CK、上皮マーカー)、CD45(白血球マーカー)、および核(DAPI)に対する標準的な免疫染色を実施して、表面上の捕捉細胞の中で、CK+/CD45-/DAPI+CTCを同定した。図1Aに示されるとおり、UICHIP(商標)-S表面は、4~1

50

、1134個の細胞/mLの範囲のCTC数を有する全ての患者からCTCを捕捉した。次いで、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）患者におけるCTCカウントを、CELLSEARCH（商標）（Groebe, et al. (2014) Clin. Cancer Res. 20:525-33; Bozec, et al. (2013) Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 270:2745-9; Grisanti, et al. (2014) PLoS ONE 9(8):e103918; Nichols, et al. (2012) Head Neck 34:1440-4）を使用して得られた報告数と比較した。なぜなら、HNSCC患者は、この研究において大多数のがん患者集団であったためである。結果における1mL当たりのCTCの数は、7.5を掛けて、UICHIP（商標）-Sについて使用される血液容量と一致させたことに留意するべきである。図1Bには、CELLSEARCH（商標）の報告された結果（7.5mL中にごく少数のCTCが検出された）と比較して、本発明の表面を使用して捕捉された、有意に高い数のCTC（2,448 ± 569.4個の細胞/血液7.5mL、平均値 ± 標準誤差（SE））を示す。捕捉効率に対する個々の成分の効果もまた、（1）PEG-aEpCAM；（2）PEG-ABmix；および（3）G7-ABmixコンジュゲート（UICHIP（商標）-S）を有する表面を使用して別々にCTCをカウントすることによって調査した。各処置の対比較によって、各表面成分のCTC捕捉感受性の全体的な強化への貢献についての洞察を提供した：ABmix効果についての（1）および（2）の対；G7 PAMAM dendrimer効果についての（2）および（3）の別の対；ならびにABmixおよびG7 PAMAM dendrimerの組み合わせ効果についての（1）および（3）の第3の対。図1Cに示されるように、これらの比較の結果により、各々が > 1 倍の強化を有し、特定の表面成分の各々による正の貢献が存在することが示された。3つの比較（ABmix、G7 dendrimer、および組み合わせ）を介して正の貢献（1倍強化）を示すサンプルの割合は、それぞれ、57.1%、81.0%、および76.2%であった（図1C）。

10

20

#### 【0044】

例5：UICHIP（商標）-Dを使用する強化されたCTC検出

CTC検出特異性は、フロー下のE-セレクチン媒介細胞動員によって顕著に強化された。ABmix、G7 dendrimer および E-セレクチンを統合するUICHIP（商標）（UICHIP（商標）-Dと示される）は、20人の患者の血液サンプルから習慣的に調製されたフローチャンバー中でCTCを首尾よく捕捉し、CTCの数は、1mL当たり19～662個の細胞の範囲で変化した（図2A）。UICHIP（商標）-D上のE-セレクチンを用いるCa<sup>++</sup>依存性細胞ローリングはEDTA（Ca<sup>++</sup>キレート剤）の存在下で発生しないという事実に起因して、EDTA処置患者サンプルについてのCTCカウントは、UICHIP（商標）-Dを使用する分析について除外された。UICHIP（商標）-Dを使用して得られたCTCカウントは、UICHIP（商標）-Sのものと類似しており（ $R^2 = 0.9676$ 、図2B）、このことは、UICHIP（商標）の検出感受性が細胞ローリングによって顕著に影響されなかったことを示す。がん履歴を有さない3人の健常参加者からの血液検体を使用して、UICHIP（商標）-SおよびUICHIP（商標）-DのCTCカウントは、それぞれ、1mL当たり7.7 ± 1.1個および2.1 ± 0.3個の細胞であり、これを使用して、検出閾値を確立した（図2C）。感受性において顕著な改善がないにも関わらず、UICHIP（商標）-DのE-セレクチンによって誘導される細胞ローリングは、UICHIP（商標）-Sと比較して、捕捉純度を著しく強化した（図2D）。捕捉純度（特異性）は、白血球およびCTCを含む総DAPI+細胞当たりのCK+/CD45-/DAPI+ CTCカウントの比率によって計算した。捕捉細胞の中のCTC純度の観点のUICHIP（商標）-Dの特異性（48.6%まで）は、UICHIP（商標）-Sのもの（典型的に0.04～10.7%）と比較して、93.5倍まで劇的に改善された。免疫染色後の蛍光画像は、E-セレクチンの非存在（UICHIP（商標）-S）と存在（UICHIP（商標）-D）との間の差異を明確に示し、すなわち、白血球の非特異的捕捉を顕著に減少させた。

30

40

#### 【0045】

例6：CTC検出のためのUICHIP（商標）-Dの分析の重要性

CTC検出のための表面は、Pre-RTで測定した20人の患者からの血液サンプル中のCTCのカウント 対 End-RTで測定した16人の患者からのものの観点で、さらに比較した。Pre-RTにおいて、それぞれPEG-aEpCAM（ $p = 0.043$ ）およびPEG-ABmix（ $p < 0.001$ ）表面プラットフォームと比較して、G7-ABmix表面を有するCTCカウントの顕著な増加

50

が存在していた。異なる表面調製物間のCTCカウントのこの差異は、CTCレベルをEnd-RTで測定した際にも存続していた (G7-ABmix 対 PEG-aEpCAM、 $p = 0.006$ ; G7-ABmix 対 PEG-ABmix、 $p = 0.001$ )。しかしながら、Pre-RT ( $p = 0.906$ ) および End-RT ( $p = 0.76$ ) においてPEG-aEpCAMおよびPEG-ABmix方法を比較した際、CTCカウントにおいて統計学的に有意な差異は存在しなかった。全ての3つの方法によって得られたCTC絶対数の比較により、PEG-aEpCAMおよびPEG-ABmix表面 ( $p < 0.001$ ) と比較して、G7-ABmixプラットフォームUICHIP (商標) -Dについて有意に高いCTC捕捉が示された。G7-ABmixおよびE-セレクチンを有するUICHIP (商標) -Dは、平均で、Pre-RTで222個のCTC/mL (範囲、19~849) およびEnd-RTで44個のCTC/mL (範囲、2~150) を捕捉した。PEG-aEpCAMおよびPEG-ABmix方法の両方と比較して、有意に多くのCTCが捕捉され、それぞれ、Pre-RTにおいて187個のCTC/mL (範囲、9~814) および161個のCTC/mL (範囲、16~511) ならびにEnd-RTにおいて32個のCTC/mL (範囲、2~201) および33個のCTC/mL (範囲、1~131) が収集された。

10

#### 【0046】

例7: UiChip (商標) -Dを使用するCTCカウントの臨床上的重要性

全集団の中で、UICHIP (商標) -Dを用いて調査された全ての20人の患者 (100%) が、Pre-RTにおいて血液中に検出可能なCTCを有しており、平均で1mL当たり222個のCTC、1mL当たり101個の中央値カウントであった (範囲、1mL当たり19~662細胞)。これは、3人の健常ドナーからのサンプル中に見出された1.0mLの血液中の $2.1 \pm 0.3$ 個 (平均値  $\pm$  S.E.、図2C) のCTCよりも有意に高かった ( $P = 0.0091$ )。重要なことには、UICHIP (商標) -Dを使用して測定されたCTCカウントは、図3Aに示されるように、CELLSEARCH (商標) (Groebe, et al. (2014) Clin. Cancer Res. 20:525-33; Bozec, et al. (2013) Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 270:2745-9; Grisanti, et al. (2014) PLoS ONE 9(8):e103918; Nichols, et al. (2012) Head Neck 34:1440-4) を使用してHNSCC患者において報告されたCTCカウント (139~6364個の細胞/血液7.5mL) よりも顕著に高かった。興味深いことに、RTの経過中に完全なCTC測定値を有する17人の患者から、RTの際にCTCカウントの統計学的に有意な減少が観察された。平均CTCカウントは、Pre-RTにおいて222個の細胞/mL (19~849個の細胞/mLの範囲) から、End-RTにおいて44個の細胞/mL (2~150個の細胞/mLの範囲) に減少した ( $p = 0.001$ 、図3B)。

20

30

【 図 1 】

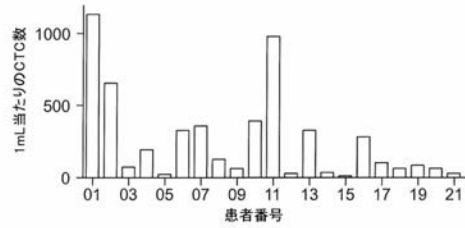


図1A

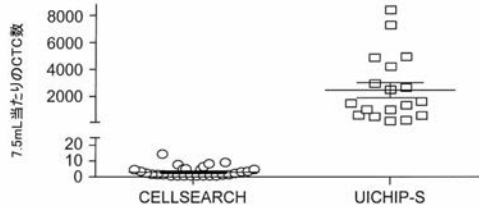


図1B

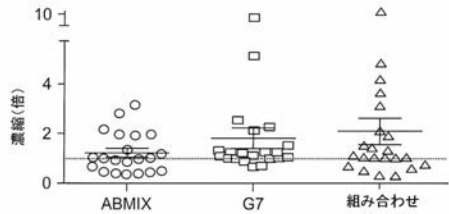


図1C

【 図 2 - 1 】

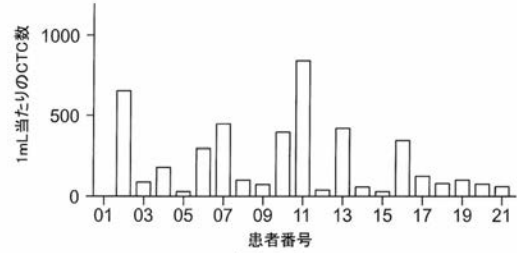


図2A

【 図 2 - 2 】

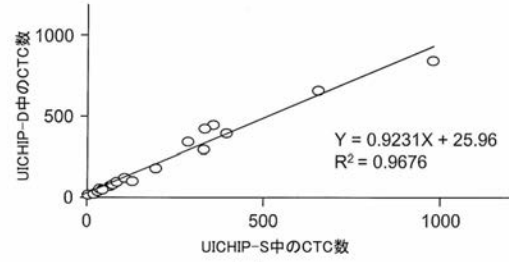


図2B

【 図 2 - 3 】

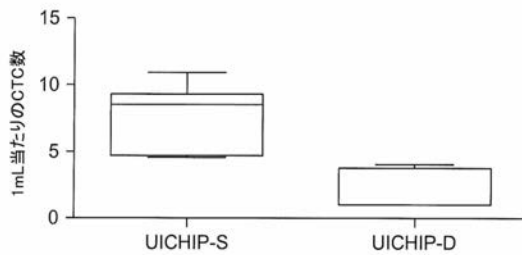


図2C

【 図 3 】

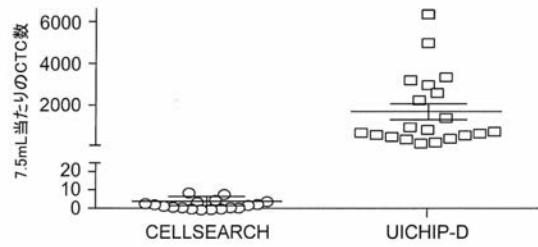


図3A

【 図 2 - 4 】

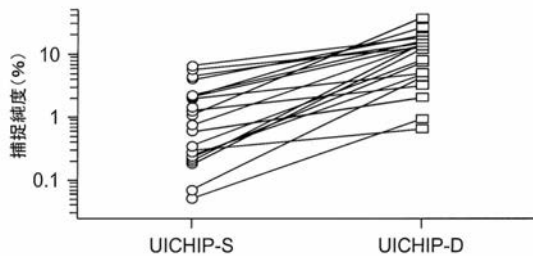


図2D

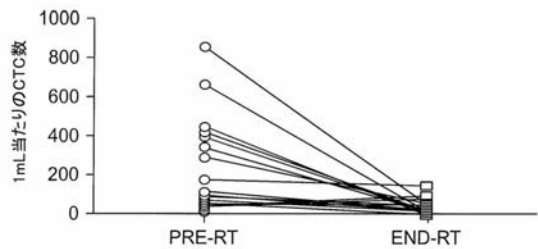


図3B

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年2月23日(2018.2.23)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

がん治療の有効性をモニタリングするための方法であって、

(a) がん治療前の被験体からの生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞(CTC)の数を決定すること、および

(b) (a)において決定したCTCの数を、がん治療の間または後の1以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定したCTCの数と比較することを含み、ここで、CTCの数は、固定化細胞ローリング剤および1以上の固定化CTC特異的捕捉剤を含む少なくとも1つのチャンパーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される、前記方法。

【請求項2】

がん治療での処置の間または後のCTCの数の変化が、がん治療に対する被験体の応答を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

変化が増加である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

変化が減少である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

細胞ローリング剤がE-セレクチンである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

1以上の固定化CTC特異的捕捉剤が、上皮細胞接着分子(EpCAM)、上皮増殖因子受容体2型(HER-2)、および上皮増殖因子受容体(EGFR)と結合する抗体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

1以上のCTC特異的捕捉剤が、ポリエチレングリコールに共有結合した改変ポリ(アミドアミン) dendrimer を介して固定化される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

生物学的サンプルが末梢血である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

がん治療が固形腫瘍の処置のためである、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

がん治療が、頭頸部がん、肺がん、直腸がん、食道がんまたは子宮頸がんの処置のためである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

がん治療が放射線療法を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

(c) CTCの数が放射線療法の間または後に変化する場合、放射線療法を改変することをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

放射線療法が、電離放射線量を増加することによって改変される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

放射線療法が、電離放射線量を減少することによって改変される、請求項12に記載の

方法。

【請求項 15】

放射線療法が、少分割照射法によって改変される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

放射線療法が、過分割照射法によって改変される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

放射線療法が、化学療法、遺伝子療法、免疫療法、標的化療法、ホルモン療法、放射線増感剤、またはこれらの組み合わせを施すことによって改変される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

フローベースのデバイスが、1 mL 当たり約 2 . 1 個の細胞の検出閾値を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

CTCの純度が約 49 %である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

放射線療法の有効性をモニタリングするための方法であって、

( a ) 放射線療法の線量を投与する前に、被験体からの生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞 ( CTC ) の数を決定すること、および

( b ) ( a ) において決定した CTC の数を、放射線療法の間または後の 1 以上の時点で同じ被験体からの同様の生物学的サンプルから決定した CTC の数と比較することを含み、ここで、CTC の数は、固定化細胞ローリング剤および 1 以上の固定化 CTC 特異的捕捉剤を含む少なくとも 1 つのチャンバーを有するフローベースのデバイスを使用して決定される、前記方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/031982

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - A61N 5/10; G01N 33/566; G01N 33/574 (2016.01) CPC - A61N 5/10; A61N 5/1064; B01L 2300/0877; G01N 33/5008; G01N 33/574; G01N 2800/52 (2016.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A61N 5/10; G01N 33/566; G01N 33/574 CPC - A61N 5/10; A61N 5/1064; B01L 2300/0877; G01N 33/5008; G01N 33/574; G01N 2800/52  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/375; 435/7.23; 435/287.2; 600/1 (keyword delimited)  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed  Search terms used: circulating tumor cells efficacy radiation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0077246 A1 (HONG et al) 29 March 2012 (29.03.2012) entire document	1-20
Y	US 2014/0329917 A1 (MARIENFELD et al) 06 November 2014 (06.11.2014) entire document	1-20
Y	WO 2014/144804 A1 (VARIAN MEDICAL SYSTEMS, INC) 18 September 2014 (18.09.2014) entire document	11-17, 20
A	✓ DE BONO et al. "Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer," Clin Cancer Res, 01 October 2008 (01.10.2008), Vol. 14, Pgs. 6302-9. entire document	1-20
A	✓ GOLDKORN et al. "Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer," J Clin Oncol. 10 March 2014 (10.03.2014), Vol. 32, Pgs. 1136-42. entire document	1-20
A	✓ MYUNG et al. "Enhanced tumor cell isolation by a biomimetic combination of E-selectin and anti-EpCAM: implications for the effective separation of circulating tumor cells (CTCs)," Langmuir, 01 June 2010 (01.06.2010), Vol. 26, Pgs. 1-21 [originally Pgs. 8589-96]. entire document	1-20
A	✓ MYUNG et al. "Differential detection of tumor cells using a combination of cell rolling, multivalent binding, and multiple antibodies," Anal Chem. 03 June 2014 (03.06.2014), Vol. 86, Pgs. 6088-94. entire document	1-20
<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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 July 2016	26 AUG 2016	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## 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, ST, 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, 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

(71)出願人 517395840

ザ ユニヴァーシティー オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル  
THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27517、チャペル ヒル、ヨーロッパ ドライブ 100、スイート 430  
100 Europa Drive, Suite 430, Chapel Hill, NC 27517 U.S.A.

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 ワン, アンドリュー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27713、ダルハム、クリムゾン オーク ドライブ 106

(72)発明者 エブラン, ミハエル

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27713、ダルハム、イーグル ビュー ドライブ 8404

(72)発明者 ホン, ソンピョ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60564、ネイパービル、キルバーン レーン 2804、#202

(72)発明者 ミュン, ジャヘ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60607、シカゴ、ダブリュー・レキシントン ストリート 1445、#1R

Fターム(参考) 4C082 AA01 AA05 AC02 AC03 AE01 AG02 AG24

专利名称(译)	使用循环肿瘤细胞作为生物标志物监测癌症治疗有效性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018518689A</a>	公开(公告)日	2018-07-12
申请号	JP2018511341	申请日	2016-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	盐湖城伊利诺伊州的董事会 北卡罗莱纳州的盐湖城大学教堂山分校 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校		
申请(专利权)人(译)	盐湖城伊利诺伊州的董事会 北卡罗莱纳州的盐湖城大学教堂山分校		
[标]发明人	ワンアンドリユー エブランミヒャエル ホンソンピョ ミュンジャハ		
发明人	ワン,アンドリユー エブラン,ミヒャエル ホン,ソンピョ ミュン,ジャハ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 A61N5/10 A61P35/00		
CPC分类号	A61N5/10 G01N33/543 G01N33/57492 G01N2800/52 A61N5/1001 A61N5/1064 A61N2005/1087 G01N33/56966 G01N33/57488 G01N33/5008 G01N2800/7028		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/53.D A61N5/10.A A61N5/10.F A61P35/00		
F-TERM分类号	4C082/AA01 4C082/AA05 4C082/AC02 4C082/AC03 4C082/AE01 4C082/AG02 4C082/AG24		
优先权	62/161595 2015-05-14 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

使用循环肿瘤细胞动力学例如预测标志物描述了用于监测癌症疗法(例如放射疗法)的功效的方法。

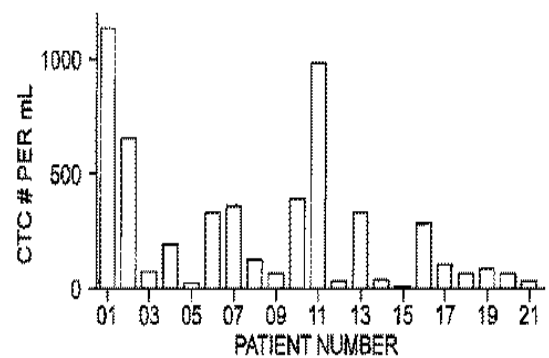


FIG. 1A