

(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2021-521466

(P2021-521466A)

(43) 公表日 令和3年8月26日 (2021.8.26)

(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 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	2 G O 5 4
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2021-505631 (P2021-505631)	(71) 出願人	520398696
(86) (22) 出願日	平成31年4月15日 (2019.4.15)		バイオアフィニティ テクノロジーズ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月9日 (2020.12.9)		BIOAFFINITY TECHNOLOGIES, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/027550		アメリカ合衆国 テキサス州 78257
(87) 国際公開番号	W02019/200403		, サン アントニオ, スイート 1206
(87) 国際公開日	令和1年10月17日 (2019.10.17)		, ウェスト インターステート 10 22211
(31) 優先権主張番号	62/657, 584		22211 West Interstate 10, Suite 1206, San Antonio, TX 78257 (US)
(32) 優先日	平成30年4月13日 (2018.4.13)	(74) 代理人	110000659
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺の健康状態を決定するシステム及び方法

(57) 【要約】

被験者の肺疾患の可能性の予測であって、被験者からの ex - vivo 喀痰サンプルを、サンプル中の白血球集団に発現するバイオマーカに結合する第1の標識プローブと、顆粒球プローブ、T細胞プローブ、B細胞プローブ、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される第2の標識プローブと、マクロファージ細胞集団のバイオマーカに結合する第3の標識プローブと、サンプル中の疾患関連細胞に結合する第4の標識プローブと、上皮細胞集団に発現するバイオマーカに結合する第5の標識プローブと、上皮細胞集団上に発現する細胞表面バイオマーカに結合する第6の標識プローブとの1つ以上で標識し、標識プローブの存在又は不在に基づいて平均蛍光シグネチャ及びプロファイルを検出することを含むデータを取得することを含む予測。

【選択図】 図 1

NON - BLOOD cell signatures - HIGH-RISK samples

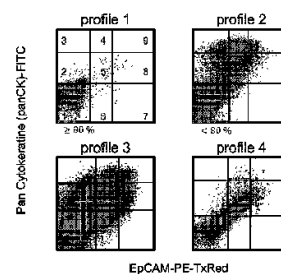


FIG. 25

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者の肺疾患の可能性を予測する方法であって、

e x - v i v o 喀痰サンプルを、以下のプローブ、

i) 喀痰細胞の白血球集団に発現するバイオマーカに結合する第 1 の標識プローブ、

i i) 喀痰細胞の顆粒球細胞集団に発現するバイオマーカに結合する顆粒球プローブ、喀痰細胞の T 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合する T 細胞プローブ、喀痰細胞の B 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合する B 細胞プローブ、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される第 2 の標識プローブ、

i i i) マクロファージ細胞集団のバイオマーカに結合する第 3 の標識プローブ、

i v) 前記喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する第 4 の標識プローブ、

v) 喀痰細胞の上皮細胞集団に発現するバイオマーカに結合する第 5 の標識プローブ、及び

v i) 喀痰細胞の上皮細胞集団に発現する細胞表面バイオマーカに結合する第 6 の標識プローブ

の 1 つ以上で標識するステップと、

前記標識された喀痰サンプルをフローサイトメトリーで分析して、i) ~ v i) の標識プローブのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータを取得するステップと、

前記細胞ごとの標識データにおける標識プローブの存在又は不在のプロファイルに基づいて、前記細胞ごとのデータから被験者の肺疾患の可能性を検出するステップとを含む方法。

【請求項 2】

バイオマーカ 1 を同定するために、i) に対して陽性である喀痰細胞と比較して、i) に対して陰性である前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータ中の前記喀痰細胞の比率を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記比率が 2 未満の場合、前記喀痰サンプルがバイオマーカ 1 に対して陽性であることを示す、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記陽性バイオマーカ 1 が、少なくとも約 80 % の感度及び少なくとも 50 % の特異性を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

バイオマーカ 2 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i) に対して陰性かつ i v) 及び v) に対して陽性の前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

i) に対して陰性かつ i v) 及び v) に対して陽性の喀痰細胞の割合が 0.03 % を超える場合、前記喀痰サンプルがバイオマーカ 2 に対して陽性であることを示す、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記陽性バイオマーカ 2 が、少なくとも 90 % の感度及び少なくとも 50 % の特異性を有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

バイオマーカ 2 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i) に対して陰性かつ i v) 及び v) に対して陽性の前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

i) に対して陰性かつ i v) 及び v) に対して陽性の喀痰細胞の割合が 0.03 % を超える場合、前記喀痰サンプルがバイオマーカ 2 に対して陽性であることを示す、請求項 8

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 10】

前記陽性バイオマーカ 1 と前記陽性バイオマーカ 2 との組み合わせが、少なくとも 80 % の感度及び少なくとも 80 % の特異性を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

バイオマーカ 3 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i)、iii) に対して陽性かつ FITC 自家蛍光を示す前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

i)、iii) に対して陽性かつ FITC 自家蛍光を示す喀痰細胞の割合が 0.03 % を超える場合、前記喀痰サンプルがバイオマーカ 3 に対して陽性であることを示す、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記陽性バイオマーカ 3 が、少なくとも 60 % の感度及び少なくとも 70 % の特異性を有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

バイオマーカ 3 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i)、iii) 及び v) に対して陽性の前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

i)、iii) に対して陽性かつ FITC 自家蛍光を示す喀痰細胞の割合が 0.03 % を超える場合、前記喀痰サンプルがバイオマーカ 3 に対して陽性であることを示す、請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 16】

前記陽性バイオマーカ 1、前記陽性バイオマーカ 2、及び前記陽性バイオマーカ 3 の組み合わせが、少なくとも 80 % の感度及び少なくとも 80 % の特異性を有する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

バイオマーカ 4 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i) に対して陰性かつ v) 及び vi) に対して陽性の前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 18】

i) に対して陰性かつ v) 及び vi) に対して陽性の細胞の割合が 2 % を超える場合、前記サンプルがバイオマーカ 4 に対して陽性であることを示す、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記陽性バイオマーカ 4 が、少なくとも 70 % の感度及び少なくとも 70 % の特異性を有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

バイオマーカ 4 を同定するために、前記標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、i) に対して陰性かつ v) 及び vi) に対して陽性の前記喀痰細胞を決定するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 21】

i) に対して陰性かつ v) 及び vi) に対して陽性の細胞の割合が 2 % を超える場合、前記サンプルがバイオマーカ 4 に対して陽性であることを示す、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記陽性バイオマーカ 1、前記陽性バイオマーカ 2、前記陽性バイオマーカ 3、及び前記陽性バイオマーカ 4 の組み合わせが、少なくとも 70 % の感度及び少なくとも 75 % の特異性を有する、請求項 21 に記載の方法。

50

【請求項 23】

前記フローサイトメトリー分析が、直径が約 5 μm 未満及び約 30 μm を超える細胞をデータ分析から除外するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記フローサイトメトリー分析が、死細胞及び複数の細胞塊である細胞をデータ分析から除外するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

喀痰細胞の白血球集団に発現するバイオマーカに結合する前記第 1 の標識プローブが、CD45 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 2 の標識プローブが、喀痰細胞の顆粒球細胞集団に発現するバイオマーカに結合する顆粒球プローブであり、CD66b 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 2 の標識プローブが、喀痰細胞の T 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合する T 細胞プローブであり、CD3 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 の標識プローブが、喀痰細胞の B 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合する B 細胞プローブであり、CD19 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 2 の標識プローブが、前記顆粒球プローブ、前記 T 細胞プローブ、及び前記 B 細胞プローブの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記顆粒球プローブが CD66b 抗体又はそのフラグメントであり、前記 T 細胞プローブが CD3 抗体又はそのフラグメントであり、前記 B 細胞プローブが CD19 抗体又はそのフラグメントである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

喀痰細胞のマクロファージ細胞集団のバイオマーカに結合する前記第 3 の標識プローブが、CD206 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する前記第 4 の標識プローブが、テトラ(4-カルボキシフェニル)ポルフィリン(TCPP)である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

喀痰細胞の上皮細胞集団上に発現するバイオマーカに結合する前記第 5 の標識プローブが、panCytokeratin 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

喀痰細胞の上皮細胞集団に発現する細胞表面バイオマーカに結合する前記第 6 の標識プローブが、EpCam 抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患関連細胞が、肺癌細胞又は腫瘍関連免疫細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記肺疾患が、喘息、COPD、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌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 37】

前記喀痰細胞が固定されているか、又は固定されていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 i) ~ vi) の標識プローブのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとの

10

20

30

40

50

サイトメトリーデータを含むデータが、喀痰サンプルシグネチャを生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 39】

前記喀痰サンプルシグネチャが、前記肺疾患を同定する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記肺疾患が、喘息、COPD、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記喀痰サンプルシグネチャが、コントロール喀痰サンプルシグネチャ（非罹患）及び肺疾患サンプルシグネチャのデータベースと比較されて、肺疾患が同定される、請求項 39 に記載の方法。

10

【請求項 42】

肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 1 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（TCPP）蛍光色素、並びに ii) EpCAM、及び / 又は panCytokeratin、iii) CD45、CD206、CD3、CD19、CD66b 又はそれらの任意の組み合わせから選択される細胞のマーカに対して向けられた蛍光色素結合抗体又はそのフラグメントを含む、試薬組成物。

20

【請求項 43】

肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 2 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（TCPP）蛍光色素、並びに以下の細胞のマーカ、ii) EpCAM 及び / 又は panCytokeratin、及び iii) CD45 に対して向けられた蛍光色素結合抗体又はそのフラグメントを含む、試薬組成物。

【請求項 44】

肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 3 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（TCPP）蛍光色素、並びに以下の細胞のマーカ、CD45、CD206、CD3、CD19、及び CD66b の 1 つ以上に対して向けられた蛍光色素結合抗体又はそのフラグメントを含む、試薬組成物。

30

【請求項 45】

被験者の肺疾患の可能性を予測する方法であって、ex - vivo 喀痰サンプルを、i) 前記喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する標識プローブ、及び ii) 喀痰細胞のマーカに対して向けられた 1 つ以上の蛍光色素結合プローブで標識するステップと、前記標識された喀痰サンプルをフローサイトメトリーで分析して、前記 i) ~ ii) の標識プローブのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータを取得するステップと、前記細胞ごとの標識データにおける i) 及び ii) の存在又は不在のプロファイルに基づいて、前記細胞ごとのデータから被験者の肺疾患の可能性を検出するステップとを含む方法。

40

【請求項 46】

前記 i) ~ ii) のいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータが、喀痰サンプルシグネチャを生成する、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記喀痰サンプルシグネチャが、前記肺疾患を同定する、請求項 46 に記載の方法。

50

【請求項 48】

前記肺疾患が、喘息、COPD、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌からなる群から選択される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記喀痰サンプルシグネチャが、コントロール喀痰サンプルシグネチャ（非罹患）及び肺疾患サンプルシグネチャのデータベースと比較されて、肺疾患が同定される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 50】

前記喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する前記標識プローブが、テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（TCPP）である、請求項 45 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2018年4月13日に提出された「肺の健康状態を決定するシステム及び方法」と題された米国仮特許出願第62/657,584号の出願の優先権及び利益を主張し、その明細書及び特許請求の範囲は参照により本明細書に組み込まれる。

連邦政府による資金提供を受けた研究又は開発に関する声明

20

【0002】

該当せず

共同研究契約の当事者

【0003】

該当せず

コンパクトディスクで提出された資料の参照による組み込み

【0004】

該当せず

発明者又は共同発明者による先行開示に関する陳述

【0005】

該当せず

著作権で保護された資料

30

【0006】

該当せず

【背景技術】

【0007】

以下の議論は、著者及び発行年による多数の刊行物に言及しており、最近の刊行日のために、特定の刊行物は、本発明に対する先行技術と見なされないことに留意されたい。本明細書におけるそのような刊行物の議論は、より完全な背景のために与えられており、そのような刊行物が特許性決定の目的のための先行技術であることを認めるものとして解釈されるべきではない。

40

【0008】

低線量コンピュータ断層撮影（LDCT）は、特に米国メディケア・メディケイドサービスセンター（CMS）によって、55歳～75歳の、30年間毎日1箱のタバコに相当する量を喫煙し、かつ15年間禁煙していない個人として定義された高リスク集団において、早期診断の方法として肺癌をスクリーニングする現在の標準治療である。これまでで最大の肺癌検診スクリーニング試験である全米肺癌スクリーニング試験（LCST: National Lung Cancer Screening Trial）によれば、LDCTの感度は93.8%である一方、その特異性は73.4%であることが示されている。LCSTによれば、調査した高リスク集団におけるLDCTの偽陽性率が3.8%

50

であったことが示され、L D C Tで陽性と判定されたが肺癌を患っていない患者では、多くの不必要な、しばしば侵襲的な、潜在的に有害な事後手順につながった。したがって、L D C Tの特異性を改善し、それによってその偽陽性率を低下させることに差し迫った必要性がある。この必要性に対処するアプローチの1つは、L D C Tの補助として使用できる、肺癌に対する高い特異性を備えた追加のアッセイの開発である。蛍光性の高いテトラ(4-カルボキシフェニル)ポルフィリン(T C P P)は、正常細胞と比較して癌細胞に選択的に結合するため、癌細胞を周囲のバックグラウンド細胞から区別できる診断標識の開発に独自に適している。肺癌のリスクが高い個人をスクリーニングする標準治療は、L D C Tを使用した胸部の年次画像診断から構成される(1)。L D C Tは非常に感度が高いものの、偽陽性率が高く、最終的に癌の検査で陰性となる患者に対して関連するリスクを伴う複数の反射診断手順につながる。リスクには、追加の高線量放射線被曝、並びに胸腔穿刺、気管支鏡検査、及びコア針生検などの侵襲的手順による合併症及び罹患状態が含まれる。これらの手順に関連する有害事象のリスク及び追加の経済的負担は重大であり、L D C T結果の陽性判定後の、より安全でより侵襲性の低い反射検査の医学的必要性は明らかである(2)。代替の検査方法は、手頃な価格の補助検査を用いて、特異性を高め、偽陽性率を下げ、スクリーニングの陽性予測値を改善することによって、L D C Tの高感度を理想的に補完する。

10

【0009】

液体生検の形態の低侵襲技術が、L D C T結果の陽性判定後の、反射性肺癌検査のために提案されている。液体生検を使用して、循環腫瘍細胞(C T C)及び遊離腫瘍核酸を患者の末梢血サンプルから収集することができる。C T C及び核酸は、次世代シーケンシング(N G S)などの分子技術を使用して検査し、癌の存在を予測できる癌関連遺伝子変異の存在と、特定の標的療法に対する患者の腫瘍の反応とを判定する(3)。これらの技術は肺癌の推定50~75%の突然変異を同定できるが(4、5)、腫瘍にそのような特定の遺伝子異常がないL D C T陽性患者は、液体生検では陰性の結果となる。さらに、C T Cはまれであり(10⁹個の正常細胞あたり1細胞程度)、腫瘍の核酸濃度は、臨床的に利用可能なほとんどの分子検査法の検出限界を下回ることが多い(6)。したがって、液体生検は、患者の腫瘍ゲノムに関する貴重な治療情報を提供する可能性があるが、早期癌診断を目的とした検査よりも、肺癌診断アルゴリズムのより後の段階でより適切に利用される。

20

30

【0010】

気管支洗浄検体の液状化細胞診検査は、従来の喀痰スミアを使用した病理検査のために、潜在的な悪性細胞のサンプリングを提供する。患者の気道から細胞を回収するために使用される気管支鏡検査の手順は、コア針肺組織生検よりも侵襲性が低い。しかしながら、依然として出血などの有害事象のリスクがある(7)。さらに、関連する医療費は、特に入院患者ベースで実行される場合、多額になる可能性がある。L D C T陽性患者のごく少数(すなわち、4%未満)のみが実際に肺癌を患っていることが判明することを考えると、診断材料を提供するために、代替の、経済的で、よりアクセスしやすい肺の悪性細胞供給源に対する医学的必要性がある。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

病理学者は、肺癌の非侵襲的で迅速かつ特異的な検出方法として、数十年にわたって喀痰の定期的な細胞学的検査を行ってきた。従来の喀痰細胞診では、サンプルを染色し、悪性細胞について顕微鏡でスクリーニングする。しかしながら、従来の喀痰細胞診は感度が低い(約65%)という問題がある(8)。K R A S変異検査を含む、喀痰分析の感度を高めるさまざまな方法が試みられてきた。患者の腫瘍が実際にK R A S変異している場合、K R A S検査は感度及び特異性の両方を有し得るが、実際にK R A S遺伝子変異を有するのは肺癌の15~20%だけである。したがって、K R A S変異陰性腫瘍細胞はこの技術では検出されない(9)。自動喀痰サイトメトリーと呼ばれる代替のD N Aベースのア

50

ブローチは、悪性腫瘍に関連する変化について喀痰上皮細胞の核DNA特性を評価するために、特別な染色及びコンピュータ支援画像分析を利用する。この技術は、従来の細胞診よりもやや感度が高いものの、その特異性は約50%に過ぎない(10)。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の一実施形態は、被験者の肺疾患の可能性を予測する方法であって、*ex-vivo* 喀痰サンプルを、以下のブローチ、*i*) 喀痰細胞の白血球集団に発現するバイオマーカに結合する第1の標識ブローチ、*ii*) 喀痰細胞の顆粒球細胞集団に発現するバイオマーカに結合する顆粒球ブローチ、喀痰細胞のT細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合するT細胞ブローチ、喀痰細胞のB細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合するB細胞ブローチ、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される第2の標識ブローチ、*iii*) マクロファージ細胞集団のバイオマーカに結合する第3の標識ブローチ、*iv*) 前記喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する第4の標識ブローチ、*v*) 喀痰細胞の上皮細胞集団に発現するバイオマーカに結合する第5の標識ブローチ、及び *vi*) 喀痰細胞の上皮細胞集団に発現する細胞表面バイオマーカに結合する第6の標識ブローチの1つ以上で標識するステップを含む方法を提供する。標識された喀痰サンプルは、例えば、フローサイトメトリー分析されて、*i*) ~ *vi*) の標識ブローチのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータが取得される。細胞ごとのデータは、細胞ごとの標識データにおける標識ブローチの存在又は不在のプロファイルに基づいて、被験者の肺疾患の可能性を決定するために検出される。得られたデータをさらに分析して、喀痰サンプル中のバイオマーカの存在又は不在を同定することができる。例えば、疾患関連細胞は、肺癌細胞又は腫瘍関連免疫細胞であり得る。肺疾患は、喘息、COPD、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌からなる群から選択され得る。さらに、標識された喀痰細胞は、固定されていても固定されていなくてもよい。

10

20

【0013】

標識された喀痰サンプルから収集されたデータは、細胞の集団及びそこから同定されたバイオマーカによって特徴付けることができる。例えば、バイオマーカ1を同定するために、*i*) に対して陽性である痰細胞と比較して、*i*) について陰性である、標識された喀痰サンプルから収集されたデータ中の喀痰細胞の比率が決定される。一例では、比率が2未満の場合、喀痰サンプルがバイオマーカ1に対して陽性であることを示す。一実施形態では、陽性バイオマーカ1は、バイオマーカ1を適用して、肺癌(c) 喀痰サンプルを高リスク(HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも約80%の感度及び少なくとも50%の特異性を有する。感度は、少なくとも85%、90%、又は95%であり、特異性は、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%である。

30

【0014】

別の例では、バイオマーカ2を同定するために、標識された喀痰サンプルから収集されたデータから、*i*) に対して陰性かつ *iv*) 及び *v*) に対して陽性の喀痰細胞を同定する。例えば、*i*) に対して陰性かつ *iv*) 及び *v*) に対して陽性の喀痰細胞の割合が0.03%を超える場合、喀痰サンプルがバイオマーカ2に対して陽性であることを示す。一実施形態では、陽性バイオマーカ2は、バイオマーカ2を適用して、肺癌(c) 喀痰サンプルを高リスク(HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも90%の感度及び少なくとも50%の特異性を有する。感度は、少なくとも80%、85%、又は95%であり、特異性は、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%である。

40

【0015】

別の例では、喀痰細胞が *i*)、*iii*) に対して陽性かつ FITC 自家蛍光を示す場合、バイオマーカ3が同定される。例えば、*i*)、*iii*) に対して陽性かつ FITC 自家蛍光を示す喀痰細胞の割合が0.03%を超える場合、喀痰サンプルがバイオマーカ3に

50

対して陽性であることを示す。一実施形態では、陽性バイオマーカ 3 は、バイオマーカ 3 を適用して、肺癌 (c) 喀痰サンプルを高リスク (HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも 60 % の感度及び少なくとも 70 % の特異性を有する。感度は、少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 % であり、特異性は、少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 % である。

【0016】

別の例では、バイオマーカ 4 を同定するために、喀痰細胞が i) に対して陰性かつ v) 及び v i) に対して陽性である場合、バイオマーカ 4 が同定される。例えば、i) に対して陰性かつ v) 及び v i) に対して陽性の細胞の割合が 2 % を超える場合、サンプルがバイオマーカ 4 に対して陽性であることを示す。一実施形態では、陽性バイオマーカ 4 は、

10

【0017】

別の実施形態では、陽性バイオマーカ 1 と陽性バイオマーカ 2 との組み合わせなど、複数のバイオマーカを組み合わせることにより、バイオマーカ 1 及び 2 を適用して肺癌 (c) 喀痰サンプルを高リスク (HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも 80 % の感度及び少なくとも 80 % の特異性を有することができる。さらに、陽性バイオマーカ 1、2、及び 3 を組み合わせることにより、バイオマーカ 1 ~ 3 を適用して肺癌 (c) 喀痰サンプルを高リスク (HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも 80 % の感度及び少なくとも 80 % の特異性を生成する。さらに、陽性バイオマーカ 1 ~ 4 によって、バイオマーカ 1 ~ 4 を適用して肺癌 (c) 喀痰サンプルを高リスク (HR) 喀痰サンプルから区別するために、少なくとも 70 % の感度及び少なくとも 75 % の特異性を生成する。感度は、少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 % であり、特異性は、少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又は 95 % である。

20

【0018】

一実施形態では、フローサイトメトリー分析は、データ分析から、直径が約 5 μ m 未満及び約 30 μ m を超える細胞を除外すること、死細胞及び複数の細胞塊である細胞を除外

30

【0019】

別の実施形態では、喀痰細胞の白血球集団に発現するバイオマーカに結合する第 1 の標識プローブは、CD45 抗体又はそのフラグメントであり得る。

【0020】

別の実施形態では、第 2 の標識プローブは、喀痰細胞の顆粒球細胞集団に発現するバイオマーカに結合し、CD66b 抗体又はそのフラグメントから選択され得る顆粒球プローブ、喀痰細胞の T 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合し、CD3 抗体又はそのフラグメントである T 細胞プローブ、喀痰細胞の B 細胞細胞集団に発現するバイオマーカに結合し、CD19 抗体又はそのフラグメントである B 細胞プローブの 1 つ以上であり、個別に又は組み合わせて、喀痰サンプルに添加される。

40

【0021】

別の実施形態では、喀痰細胞のマクロファージ細胞集団のバイオマーカに結合する第 3 の標識プローブは、CD206 抗体又はそのフラグメントである。

【0022】

さらに別の実施形態では、喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する第 4 の標識プローブは、テトラ (4 - カルボキシフェニル) ポルフィリン (TCPP) である。

【0023】

さらに別の実施形態では、喀痰細胞の上皮細胞集団に発現するバイオマーカに結合する第 5 の標識プローブは、panCytokeratin 抗体又はそのフラグメントである

50

。

【 0 0 2 4 】

さらなる実施形態において、喀痰細胞の上皮細胞集団に発現する細胞表面バイオマーカに結合する第 6 の標識プローブは、E p C a m 抗体又はそのフラグメントである。

【 0 0 2 5 】

収集されたデータは、喀痰サンプルシグネチャを生成するための i) ~ v i) の標識プローブのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含み得る。喀痰サンプルのシグネチャは、肺及び / 又は肺疾患の健康状態を同定する。肺疾患は、喘息、C O P D、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌からなる群から選択され得る。さらに、喀痰サンプルのシグネチャは、コントロール喀痰サンプルシグネチャ（非罹患）及び肺疾患サンプルシグネチャのデータベースと比較されて、肺疾患が同定される。本発明のいくつかの実施形態では、結果は、訓練されたアルゴリズムを使用して分類される。本発明の訓練されたアルゴリズムは、疾患を発症するリスクが高い被験者からの既知の喀痰サンプル、疾患を有すると認められた被験者の喀痰サンプル、及び正常であると同定された（疾患を有さないか、又は疾患を発症するリスクが高い）被験者からの喀痰サンプルの参照セットを使用して開発されたアルゴリズムを含む。サンプルの分類に適したアルゴリズムには、k 近傍アルゴリズム、概念ベクトルアルゴリズム、単純ベイズアルゴリズム、ニューラルネットワークアルゴリズム、隠れマルコフモデルアルゴリズム、遺伝的アルゴリズム、及び相互情報特徴選択アルゴリズム、又はそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。場合によっては、本発明の実施形態の訓練されたアルゴリズムには、細胞学者又は病理学者による診断又は被験者の病歴に関する情報などの、喀痰サンプルシグネチャ又は細胞ごとのサイトメトリーデータ又は平均蛍光シグネチャ以外のデータが組み込まれ得る。プログラムされたコンピュータでは、データは訓練されたアルゴリズムに入力され、肺疾患を有する可能性が高い、中程度、又は低いものに喀痰サンプルを分類し、肺疾患の上記喀痰サンプルの上記分類を同定するレポートを電子的に出力する。

10

20

【 0 0 2 6 】

本発明の一実施形態は、肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 1 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（T C P P）蛍光色素、並びに i i) E p C A M、及び / 又は p a n C y t o k e r a t i n、及び i i i) C D 4 5、C D 2 0 6、C D 3、C D 1 9、C D 6 6 b 又はそれらの任意の組み合わせから選択される細胞のマーカに対して向けられた蛍光色素結合抗体又はそのフラグメントを含む、試薬組成物を提供する。

30

【 0 0 2 7 】

本発明の別の実施形態は、肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 2 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（T C P P）蛍光色素、並びに以下の細胞のマーカ、i i) E p C A M 及び / 又は p a n C y t o k e r a t i n、及び i i i) C D 4 5 に対して向けられた蛍光色素結合抗体を含む、試薬組成物を提供する。

40

【 0 0 2 8 】

本発明の別の実施形態は、肺疾患の可能性に関連する細胞集団内の 1 つ以上のバイオマーカを同定するための、被験者の喀痰サンプルからの喀痰細胞のフローサイトメトリー表現型分類のための第 3 の試薬組成物であって、i) テトラ（4 - カルボキシフェニル）ボルフィリン（T C P P）蛍光色素、並びに以下の細胞のマーカ、C D 4 5、C D 2 0 6、C D 3、C D 1 9、及び C D 6 6 b の 1 つ以上に対して向けられた蛍光色素結合抗体を含む、試薬組成物を提供する。

【 0 0 2 9 】

さらに別の実施形態は、被験者の肺疾患の可能性を予測する方法であって、e x - v i

50

v o 喀痰サンプルを、i) 喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する標識プローブ、及び i i) 喀痰細胞のマーカーに対して向けられた 1 つ以上の蛍光色素結合プローブで標識するステップを含む方法を提供する。標識された喀痰サンプルは、フローサイトメトリー分析されて、i) ~ i i) の標識プローブのいずれかの平均蛍光シグネチャに基づく細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータが取得される。細胞ごとの標識データにおける i) 及び i i) の存在又は不在のプロファイルに基づいて、細胞ごとのデータから、被験者の肺疾患の可能性が検出される。細胞ごとのサイトメトリーデータを含むデータは、i) ~ i i) のいずれかの平均蛍光シグネチャに基づくことができ、喀痰サンプルシグネチャを生成する。一実施形態では、喀痰サンプルシグネチャは、例えば、肺疾患を同定し、肺疾患は、喘息、C O P D、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、及び肺癌からなる群から選択される。さらに、喀痰サンプルシグネチャは、コントロール喀痰サンプルシグネチャ（非罹患）及び肺疾患サンプルシグネチャのデータベースと比較されて、標識された喀痰サンプルから肺疾患が同定される。一実施形態では、喀痰サンプル中の疾患関連細胞に結合する標識プローブは、テトラ（4 - カルボキシフェニル）ポルフィリン（T C P P）である。

10

20

30

40

50

【0030】

本発明の適用性のさらなる範囲は、添付の図面と併せて、以下の詳細な説明に部分的に示され、以下を検討することにより当業者には部分的に明らかになるか、又は本発明の実施により学習される。本発明の目的及び利点は、添付の特許請求の範囲で特に指摘される手段及び組み合わせによって実現及び達成され得る。

【図面の簡単な説明】

【0031】

本明細書に組み込まれ、その一部を成す添付の図面は、本発明の 1 つ以上の実施形態を示し、説明とともに、本発明の原理を説明するのに役立つ。図面は、本発明の 1 つ以上の実施形態を例示することのみを目的とし、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0032】

【図 1 A - B】解離した喀痰細胞のサイトスピンを示す。抗体又は T C P P で染色する前の、処理された喀痰細胞のライトギムザ染色サイトスピンスライド。

【0033】

【図 1 C - E】細胞又は粒子の光学特性を分析する光源及び検出器を有するフローサイトメトリーベースのシステムを示し、前方散乱（F S C）及び側方散乱（S S C）は、図 1 D に示すヒストグラムの測定値としてのパルス高さ及び面積の測定値とともに、経時的にレーザ光源のゾーンを通過する細胞又は粒子の例示的な光学特性として同定される。

【0034】

【図 2 A - I】ビーズ（図 2 A 及び図 2 G）及び細胞（図 2 B ~ F、図 2 H、及び図 2 I）のフローサイトメトリードットプロット図 2（A ~ F）及び等高線プロット図 2（G ~ I）を示す。

【0035】

【図 3 A - H】喀痰中の造血細胞の同定及び特性評価のためのドットプロット及び等高線プロットを示す。

【図 3 I - K】喀痰中の造血細胞の同定及び特性評価のためのドットプロット及び等高線プロットを示す。

【0036】

【図 4 A - G】C D 6 6 b プローブ又は C D 2 0 6 プローブのいずれかに曝露された C D 4 5 陽性 喀痰細胞のドットプロット（図 4 A、図 4 C、図 4 F ~ G）及びヒストグラム（図 4 B、図 4 D 及び図 4 E）を示す。

【0037】

【図 5】y（軸）上に、内部に「×」の付いた黒丸として示されるマクロファージ / スライドの数、及び黒丸として示される C D 4 5 陽性 / C D 2 0 6 陽性 細胞、並びに x（軸）

上にサンプル数を示すグラフであり、CD206陽性細胞集団の存在は、喀痰スミア上の多数のマクロファージの存在と一致する。

【0038】

【図6】分析のための喀痰サンプル調製のフローチャートを示す。HCC15癌細胞をCellMask(商標)Greenで標識し(ステップ1)、別のチューブで、解離した喀痰細胞をPE標識抗CD45抗体で染色した(ステップ2)。

【0039】

【図7A-C】喀痰細胞のドットプロットを示し、図7Aは、CD45ゲートを表し、図7Bは、CD45陽性細胞のTCPPゲートを表し、図7Cは、CD45陰性細胞のTCPPゲートを表す。

10

【図7D-F】図7D~Fは、アイソタイプコントロールで処理された未染色の喀痰細胞及び染色された喀痰細胞を表す。

【0040】

【図8A-B】健康なボランティア及び肺癌の有無にかかわらず高リスクの患者から得られた喀痰サンプルの予備的な比較分析を示す。図6及び図7に詳述された実験と同様に、異なるドナーからの5つの喀痰サンプルが分析された。白抜きのドットは健康なボランティアからのサンプル(H)を表し、黒のドットは癌のない高リスク患者からのサンプル(HR)を表し、×の付いたドットは肺癌が認められた患者からのサンプル(C)を表す。図8Aは、分析された各サンプル内のCD45陰性細胞(左)及びCD45陽性細胞(右)の総数を示す。図8Bは、分析された各サンプル内のCD45陰性細胞(左)及びCD45陽性細胞(右)内のTCPP陽性細胞の割合を示す。

20

【0041】

【図9A-F】本発明の一実施形態による、TCPP陽性細胞の存在について喀痰細胞を分析する1つの戦略のドットプロットを示す。

【0042】

【図10A-B】QCビーズ及びプロトコルに記載の喀痰サンプルチューブ#6が、フローサイトメトリー及び結果として得られるドットプロットを介して分析されることを示す。図10Aは、実行中のQCビーズから得られたプロファイルに最初に設定されるビーズサイズ除外(「BSE」)ゲート(ボックス)を示す。図10Bは、すべての喀痰サンプルに適用されたBSEゲートを示す。

30

【0043】

【図11A-F】図11A、図11Bに示されるような未染色の喀痰細胞(チューブ#4)及び図11Cのような染色された喀痰細胞(チューブ#6)を決定して、図11Cのボックスに示されるような生細胞(LC)及び図11Dに示されるような単一細胞(SC)を同定するためのフローサイトメトリー及び結果として得られるドットプロットを介して分析された喀痰サンプルを示す。図11E及び図11Fは、喀痰細胞のドットプロットを示し、図11Eにアイソタイプコントロールを設定し、BSE、LC、SCゲートの適用後に残っている細胞のCD45陽性及びCD45陰性集団を設定する。

【0044】

【図12A-C】チューブ#6の喀痰サンプルのCD45陽性細胞分析を示す。すべてのプロファイルは、BSE、LC、及びSCゲートを介して選択されたCD45陽性細胞を示す。

40

【0045】

【図13A-B】FITC/Alexa488(F/A)のアイソタイプコントロール(チューブ#5)、及び(F/A)と結合されたCD66b/CD3/CD19細胞マーカーのプロープで処理された細胞(チューブ#6)のドットプロットを示す。

【0046】

【図14A-B】PE-CF594アイソタイプコントロール(チューブ#5)、及びPE-CF594と結合されたCD206細胞マーカーのプロープで処理された細胞のドットプロットを示す。

50

【 0 0 4 7 】

【図 1 5 A - B】y 軸に F I T C / A l e x a 4 8 8、x (軸) に P E - C F 5 9 4 を示す、喀痰細胞 (チューブ # 5) のアイソタイプコントロールのドットプロットを示す。二重陰性ゲート又は集団 1 パラメータが確立される。提示されているのは、アイソタイプコントロールからのドットプロット図 1 5 A 及び疑似カラープロット図 1 5 B であり、これらは、B S E、L C、及び C D 4 5 陽性細胞ゲートを介してゲートされている。水平の点線は、図 1 3 で決定された F I T C / A l e x a 4 8 8 の陽性 / 陰性のカットオフを表し、垂直の点線は、図 1 4 で決定された P E - C F 5 9 4 の陽性 / 陰性のカットオフから導出される。

【 0 0 4 8 】

【図 1 6 A - B】チューブ # 6 による喀痰サンプルからのドットプロット (A) 及び疑似カラープロット (B) を示し、カクテル (C D 6 6 b / C D 3 / C D 1 9 - F I T C / A l e x a 4 8 8 抗体 (y 軸) 及び P E - C F 5 9 4 と結合されたマーカ C D 2 0 6 (x 軸) からの平均蛍光強度を測定した。B S E、L C、及び S C ゲートからも選択された C D 4 5 陽性細胞が示されている。図 1 5 に描画されているのと同じ集団 1 (実線のボックス内部) 及びカットオフ (点線) がこれらのプロファイルに適用される。

【 0 0 4 9 】

【図 1 7 A - C】2 つのサンプル (A 及び B は同じ) からの喀痰 C D 4 5 陽性 チューブから生成された疑似カラープロットを示し、図 1 6 の喀痰サンプルの集団 2 ~ 6 に設定されたゲートが適用される。すべてのプロットは、B S E、L C、及び S C ゲートを介してゲートされた C D 4 5 陽性 喀痰細胞を示す。水平及び垂直の点線は、アイソタイプコントロール上に設定された (図示せず)。図 1 7 A ~ B は、集団 5 の F I T C 平均蛍光強度が中間であり、水平のカットオフラインを横切るときのゲート 4 及びゲート 5 の描画を示す。図 1 7 C は、集団 6 の右上のボックスを示す。

【 0 0 5 0 】

【図 1 8】y 軸に喀痰サンプル中のすべての血液 (C D 4 5 陽性) 細胞の割合 (%) 及び x 軸にプロファイルタイプ 1、2、及び 3 のグラフを示す。示されているシグネチャは、高リスク (H R) サンプルの C D 4 5 陽性細胞のプロファイル 1 のものである。

【 0 0 5 1 】

【図 1 9 A - C】H R 及び癌細胞からの C D 4 5 陽性 喀痰細胞のシグネチャ 1 ~ 3 のグラフ、及び H R 及び C 喀痰サンプルのすべての C D 4 5 陽性 血液細胞の割合としての集団 6 の分析を示す。

【 0 0 5 2 】

【図 2 0 A - D】喀痰中の異なる上皮亜集団について描画されたゲートを有する C D 4 5 陰性 喀痰サンプルのドットプロットを示す。

【 0 0 5 3 】

【図 2 1 A - B】F I T C / A l e x a 4 8 8 及び C D 4 5 陰性 喀痰細胞のアイソタイプコントロール (チューブ # 5) 及び p a n C y t o k e r a t i n / A l e x a s 4 8 8 で標識された喀痰細胞 (チューブ # 7) のドットプロットを示す。C D 4 5 陰性 喀痰細胞における陽性 F I T C / A l e x a 4 8 8 染色のカットオフが決定される。

【 0 0 5 4 】

【図 2 2 A - B】P E - C F 5 9 4 及び喀痰細胞のアイソタイプコントロール (チューブ # 5)、及び E p C A M - P E - C F 5 9 4 で標識された喀痰細胞 (チューブ # 7) のドットプロットを示す。C D 4 5 陰性 喀痰細胞及び喀痰における陽性 P E - C F 5 9 4 染色のカットオフの決定。

【 0 0 5 5 】

【図 2 3 A - B】B S E、L C 及び C D 4 5 細胞ゲートを介してゲートされた、アイソタイプコントロールを有する C D 4 5 陰性細胞 (チューブ # 5) のドットプロットを示す。水平の点線は、図 2 1 で決定された F I T C / A l e x a 4 8 8 の陽性 / 陰性のカットオフを表し、垂直の点線は、図 2 2 で決定された P E - C F 5 9 4 の陽性 / 陰性のカットオ

10

20

30

40

50

フから導出される。

【0056】

【図24A - B】CD45^{陰性}細胞の集団2～9の喀痰細胞及びゲートのドットプロットを示す。

【0057】

【図25】集団1～9の異なるシグネチャを有するプロファイル1～4のCD45^{陰性}ドットプロットの別のグラフを示す。

【0058】

【図26】集団1、集団2、集団5、及びPanCK++の中央値を横切るプロファイル1のシグネチャを示す。

10

【0059】

【図27】肺癌を発症するリスクが高いと分類された被験者からの喀痰サンプルからのCD45^{陰性}細胞と、肺癌を有すると分類された被験者からの喀痰サンプルとのシグネチャ1～4の比較を示す。

【0060】

【図28A - B】喀痰サンプルからのすべてのCD45^{陰性}細胞の割合(%)としてのPanCK++(集団3+4+9)の量から生じるバイオマーカの適用に対する80%の感度及び85%の特異性を示す。

【0061】

【図29A - C】喀痰サンプル中の細胞のCD45^{陰性}/CD45^{陽性}の比率(バイオマーカ1)を決定するための、HR及びC喀痰サンプルからの喀痰サンプル中の細胞の癌リスク分析を示す。

20

【0062】

【図30A - B】分析された喀痰サンプルにバイオマーカ1を適用して、肺癌患者又は肺癌を発症するリスクが高い被験者からのサンプルを同定する際の90%の特異性及び54%の感度を示す。

【0063】

【図31A - C】TCP Pで陽性に標識された喀痰サンプル(チューブ#7)中のCD45^{陰性}細胞(バイオマーカ2)の癌リスク分析を示す。

【0064】

30

【図32A - B】分析された喀痰サンプルにバイオマーカ2を適用して、肺癌患者又は肺癌を発症するリスクが高い被験者からのサンプルを同定する際の63%の特異性及び100%の感度を示す。

【0065】

【図33A - C】分析される喀痰サンプルにバイオマーカ1+2を適用して、肺癌患者又は肺癌を発症するリスクが高い被験者からのものとしてサンプルを同定するための本発明の一実施形態に従って、90%の感度及び90%の特異性を得るように、HR及びC喀痰サンプルの喀痰サンプルを分析するための図25及び図27で同定されたバイオマーカ1とバイオマーカ2との組み合わせを示す。

【0066】

40

【図34A - C】サンプル中のすべてのCD45+細胞の%として、HR及びC喀痰サンプルからの集団6中の細胞の量を特定するためのCD45^{陽性}細胞(バイオマーカ3)のドットプロットを示す。

【0067】

【図35A - B】分析された喀痰サンプルにバイオマーカ3を適用して、肺癌患者又は肺癌を発症するリスクが高い被験者からのサンプルを同定する際の88%の特異性及び60%の感度を示す。

【0068】

【図36A - B】HR及びC喀痰サンプルからの集団3+4及び9に見られる、panCytokeratin^{陽性}でもある喀痰サンプルからのCD45^{陰性}細胞(バイオマーカ

50

4) の癌リスク分析を示す。

【0069】

【図37A - B】分析された喀痰サンプルにバイオマーカ4を適用して、肺癌患者又は肺癌を発症するリスクが高い被験者からのサンプルを同定する際の83%の特異性及び80%の感度を示す。

【0070】

【図38A - E】98%の特異性及び78%の感度を有する、HR及びC喀痰サンプルにバイオマーカ1～4を適用した、喀痰サンプルからの細胞の癌リスク分析を示す。

【0071】

【図39】本明細書に記載の肺から細胞集団を分画するシステム及び方法、並びに肺疾患について高リスク、中リスク、及び低リスクとして喀痰サンプルを分類するアルゴリズムを含む、被験者の肺の健康に関するスクリーニングフローチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

【0072】

さらに、以下の用語の定義は以下のとおりである。特定の用語が本明細書で以下に定義されていない場合、その用語は、当業者による文脈内でのその典型的な使用の範囲内で意味を有するものとすることが理解される。

【0073】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「及び」及び「the」は、文脈から明らかに別段でない限り、複数形の参照を含むことに留意されたい。

【0074】

「較正する」という用語は、コントロール試薬に対する機械の感度を設定することを意味する。

【0075】

「補正する」という用語は、サンプルをコントロールと比較してバックグラウンドを決定することを意味する。

【0076】

「分画する」又は「分画された」という用語は、さらに分析するためにイベントのサブセットを選択することを意味する。分画の一例は、分析中にデータを除外する/含めるための「ゲート」を使用することである。

【0077】

「ゲート」という用語は、これらの対象集団を調査及び定量化するために、通常は前方散乱、側方散乱、及びマーカ発現などの共通の特性を有する細胞集団の周囲に境界が配置されることを意味する。

【0078】

「プローブ」という用語は、細胞若しくは粒子の表面上のバイオマーカ又は細胞若しくは粒子内のマーカに親和性を有し、それらに結合するリガンド、ペプチド、抗体又はそれらのフラグメントを意味する。

【0079】

ポルフィリンはあらゆる種類の癌細胞に集中する。さらに、特定のポルフィリンは自然に蛍光を発し、特徴的な光子放出プロファイルを有する。ポルフィリン組成物は、癌細胞又は病状に関連する細胞を標識するポルフィリンの蛍光を周囲のバックグラウンド細胞から区別するためのハイスループットアッセイ（特にフローサイトメトリーアッセイ）で使用するために本明細書に記載されている（11）。

【0080】

ここで図1A～図1Bを参照すると、解離した喀痰細胞のサイトスピンが示されている。抗体又はTCPPで染色する前の、処理された喀痰細胞のライトギムザ染色サイトスピンスライドを図1Aに示す。図1Aには、頬上皮細胞（BEC）が多すぎる（そのうちのいくつかは*記号で示されている）。マクロファージは矢印で、デブリは矢印で示されて

10

20

30

40

50

いる。図 1 B は、スライド上の B E C 及びマクロファージのより容易な同定を可能にする（矢尻で示される）より少ないデブリの存在を示す。

【 0 0 8 1 】

フローサイトメトリーでは、各細胞又は粒子が流体力学的にフォトセルに集束される。細胞 / 粒子がフォトセルを通過するときに、各細胞又は粒子は 1 つ以上の光線を通る。光散乱又は蛍光（ F L ）発光（細胞又は粒子がフルオロフォアで標識されている場合）は、細胞 / 粒子の特性に関する情報を提供する。レーザは、現代のフローサイトメトリーで最も一般的に使用される光源である。レーザは、離散周波数（コヒーレント光）で単一波長の光（レーザ線）を生成する。これらは、紫外から遠赤色までのさまざまな波長で利用可能であり、さまざまな範囲の電力レベル（光子出力 / 時間）を有する。前方方向に散乱された光（通常はレーザ光線軸から最大 20 ° ずれる）は、前方散乱（ F S C ）チャンネルと呼ばれる光電子増倍管（ P M T ）又はフォトダイオードによって収集される。 F S C は、細胞 / 粒子のサイズにほぼ等しい。通常、より大きい細胞はより小さい細胞よりも多くの光を屈折させる。励起線に対しておよそ 90 ° の角度で測定される光は、側方散乱（ S S C ）と呼ばれる。 S S C チャンネルは、細胞又は粒子の相対的な複雑さ（例えば、粒度及び内部構造）に関する情報を提供する。 F S C 及び S S C は両方ともすべての細胞又は粒子に固有であり、この 2 つの組み合わせを使用して、例えば、これに限定されないが、血液、喀痰などの異種サンプルにおいて、細胞タイプを大まかに区別することができる。細胞又は粒子がレーザ光線を通り、時間の関数として信号が生成されると、イベントが同定される。 F S C 及び S S C の場合、細胞又は粒子がレーザ中で費やす時間はイベントの幅「 W 」として測定され、一方、光電子増倍管によって測定される電流出力の最大高さは高さ「 H 」であり、面積「 A 」は、細胞又は粒子がサイトメータのレーザ光線の照合点を通ることによって生成されるパルスの積分を表す。本明細書で使用されるように、細胞及び粒子はそれぞれ、フォトセル内の光線を通る時のイベントとして記録され得る。

【 0 0 8 2 】

ここで図 1 C を参照すると、光散乱プロファイル（前方散乱（ F S C ）は細胞サイズを表し、側方散乱（ S S C ）は粒度を表す）が示されており、「 A 」は、細胞又は粒子がサイトメータの照合点を通ることによって生成されるパルスの積分を表す。図 1 D は、得られたヒストグラムであり、 y （軸）上にレーザパルス強度（ H ）、及び x （軸）上に時間（ W ）を有し、曲線の下の面積が（ A ）として示されている。図 1 E は、異なる粒度及びサイズを有する細胞の S S C - A 対 F S C - A プロットをプロット上に示す。光散乱プロファイル（前方散乱（ F S C ）は細胞サイズを表し、側方散乱（ S S C ）は粒度を表す）であって、「 A 」は、細胞又は粒子がサイトメータの照合点を通ることによって生成されるパルスの積分を表す。

R F C を強化するために光散乱をゲートする。

【 0 0 8 3 】

気管支を裏打ちする特殊な気道上皮細胞及び腺細胞が粘液を分泌する。肺の深部で生成される粘液には、上皮細胞、肺胞細胞、マクロファージ、及びその他の造血（血液）細胞など、肺組織から再利用される多種多様な細胞が含まれ得る（ 17 ）。粘液には非細胞性物質も含まれており、これらは、喫煙者、高度に汚染された地域に住んでいる人、又はその他の気道アレルゲン（花粉など）にさらされている人の肺で特に顕著である。肺の中から発生する粘液が吐き出されると、それは喀痰と呼ばれる。喀痰は、多くの B E C （又は頬細胞）を含む口腔内で生成される唾液と混合されることが多く、これにより、すでに複雑な組織サンプルに別の細胞成分が追加される（図 1 を参照）。

【 0 0 8 4 】

顕微鏡検査とは対照的に、フローサイトメトリーは、サイズ、粒度、及び / 又は蛍光マーカーに基づいて関係のないデブリ及び細胞を除去することによって、対象の細胞のサンプルを濃縮することを可能にするため、喀痰の細胞集団に関する多次元情報及び / 又はより

正確な情報を提供することができる。喀痰細胞分析において赤色蛍光細胞（R F C）を濃縮するための第 1 のステップは、R F C のサイズ（直径）を近づけることであり、より小さい又はより大きいものはすべて除外される。R F C は、T C P P の取り込みが最も高い細胞、すなわち、癌細胞及び癌関連マクロファージであり、これは、どちらの細胞タイプも、他のどの細胞タイプよりも多くの T C P P を取り込むためである（18～22）。肺癌細胞のサイズは、癌の種類によって異なるが、培養された肺癌細胞と大きく異なることはあまりない。文献検索（表 1）は、例えば、H C C 1 5 肺癌細胞の直径は 20～30 μ m であるのに対し、肺マクロファージの直径は 21 μ m と測定されることを明らかにしている。特に興味深いのは、マクロファージ及びリンパ球であり、なぜなら、これらの細胞タイプの各々の特定の亜集団は、癌に関連する場合にそれらの機能を変化させることが知られているからである（23～26）。しかしながら、R B C（6～8 μ m）及びそれより小さいもの（デブリ）、並びに B E C（65 μ m）及びそれより大きいものは、以降の分析から除外することができる。

10

【表 1】

表 1

細胞タイプ	直径（ μ m）	参照
造血細胞		
赤血球	6－8	Wheater ら（43）
顆粒球	9－12	Wheater ら（43）
単球	14－17	Wheater ら（43）
リンパ球	7－8	Wheater ら（43）
その他		
肺マクロファージ	21	Krombach ら（44）
I 型肺上皮細胞（肺細胞）	最大 50	Kini（45）
II 型肺上皮細胞（肺細胞）	9－15	Kini（45）
頬上皮細胞（頬細胞）	65	Paszkiewicz ら（14）
HCC15 肺癌細胞	20－30	Fillmore ら（46）

20

30

【0085】

ここで図 2 A～図 2 I を参照すると、SSC 及び FSC シグネチャを有する細胞を示すフローサイトメトリプロファイルが示されている。ビーズ（図 2 A 及び図 2 G）及び細胞（図 2 B～図 2 F、図 2 H、及び図 2 I）のフローサイトメトリドットプロット図 2 A～図 2 F 及び等高線プロット図 2 G～I が示されている。図 2 A は、左から右へ 5、10、20、30 及び 50 μ m のビーズを示す光散乱プロットである。個々のビーズのサイズは、水平 FSC 軸上に手動で描画され、図 2 B～図 2 F に引き継がれる。SSC は当初は低く保たれていたため、予想よりも高い SSC を有する細胞を視覚化することができた。図 2 B は、Cell Mask（商標）Orange で染色された赤血球（RBC）の光散乱プロットである。図 2 C は、Cell Mask（商標）Far Red で染色された白血球（WBC）の光散乱プロットである。図 2 D は、Cell Mask（商標）Orange で染色された扁平上皮肺癌細胞（HCC15）細胞の光散乱プロットである。図 2 E は、Cell Mask（商標）Green で染色された頬上皮細胞（BEC）の光散乱プロットである。図 2 F は、分析のために 1 つのチューブにまとめられた WBC（図 2 C のように配置される）、HCC15 細胞（図 2 D のように配置される）及び BEC（図 2 E のように配置される）の光散乱プロファイルである。図 2 F の縞模様のボックスは、対象の細胞を含む光散乱ゲートを示し、サイズが 5～30 μ m のすべてが含まれる。図 2 G

40

50

は、F S C - W × S S C - W 光散乱等高線プロットの 5 μ m (下) 及び 30 μ m (上) のピーズを示す。図 2 H は、(図 2 E のように) C e l l M a s k (商標) G r e e n で染色された B E C の F S C - W × S S C - W 光散乱等高線プロットである。図 2 I は、組み合わされた細胞集団 (F S C - W × S S C - W 光散乱等高線プロットに表示された W B C、B E C 及び H C C 15) を示す。B E C (30 μ m より大きい、破線のボックスの外側に位置する細胞) と、対象の細胞 (30 μ m より小さい、破線のボックスの内側に位置する細胞) との間の分離がはっきりと見える。破線のボックスは、W × W ゲートを示し、ほとんどの B E C を簡単に除外できる対象の集団を同定する。

【0086】

一実施形態では、デブリ及び B E C は、さらに分析される細胞の集団から除外される。標準サイズのピーズ (5、10、20、及び 50 μ m) が、光散乱プロファイルで使
10
用される (前方散乱 (F S C) は細胞サイズを表し、側方散乱 (S S C) は粒度を表す; 図 2 A)。これらのピーズが実際に表 1 に示す情報に従って細胞サイズを予測することを確認するために、ピーズを健康なボランティアから分離された R B C、W B C 及び B E C、並びに培養 H C C 15 肺癌細胞と比較する。異なる細胞タイプは、異なる色の C e l l M a s k (商標) 色素で標識されているため、別々に (図 2 B ~ E) 及び組み合わせて (図 2 F) 分析することができる。図 2 B に示され、文献 (表 1) から予測されるように、R B C は最小のピーズと一致する。同様に、W B C のサイズはおよそ 10 ~ 20 μ m の範囲であるが (図 2 C)、H C C 15 細胞の大部分は直径が 30 μ m 未満である (図 2 D)。唾
20
液をフローサイトメータ (主に B E C で構成) で分析した場合、予想に反して、文献に記載されているように、B E C の大部分は 30 μ m 以下の細胞として投影され (図 2 E)、50 μ m を超える細胞としては投影されない。これらの結果は、サイズを使用して (5 μ m ピーズ以下のサイズをすべて除去することによって) デブリを除外することができることを示すが、サイズを使用して B E C を除外することはできない。

【0087】

B E C は、B E C を W B C 及び H C C 15 細胞と区別する非常に高い S S C 特性を示す (図 2 F)。S S C 及び F S C は、フローサイトメータによって、高さ (H)、幅 (W)、及び曲線下面積 (A) の値を有する電子信号として変換される。S S C 及び F S C パラ
30
メータのさまざまな組み合わせを調べることにより、S S C - W 及び F S C - W は、30 μ m ピーズよりも低い S S C - W を示す細胞の周囲にゲートを設定することにより、ほとんどの B E C の除去を可能にするプロファイルをもたらした (図 2 G ~ 図 2 I)。

造血細胞の個別集団への細分画

【0088】

フローサイトメトリによる喀痰分析の別の態様は、さまざまな造血 (血液) 細胞集団の特性評価である。共通の W B C マーカ C D 45 は、すべての W B C の細胞表面に発現している。C D 45 抗原に対して向けられた抗体などのプローブを使用すると、造血細胞 (C D 45 陽性細胞) を、正常な肺上皮細胞及び潜在的な肺癌細胞 (C D 45 陰性細胞) などの他の細胞と区別することができる。喀痰中の特定の造血亜集団を同定するために、追加のプローブ、例えば、顆粒球 (C D 66 b)、マクロファージ (H L A - D R、C D 1
40
1 b、C D 11 c、C D 206) 及びリンパ球 (C D 3 及び C D 19) に向けられた抗体を使用した。表 2 に、プローブ及びフルオロフォアの例を示す。

【表 2】

表 2

マーカ	抗体／色素	フルオロフォア	レーザ光源：	チューブ #1	チューブ #2	
死細胞	生存率染色	B V 5 1 0	405 nm	✓	✓	
癌（関連）細胞	T C P P	A P C	633 nm	✓	✓	
白血球	CD 4 5	P E	561 nm	✓	✓	10
顆粒球	CD 6 6 b	F I T C		✓		
T細胞	CD 3	A l e x a 4 8 8	488 nm			
B細胞	CD 1 9	A l e x a 4 8 8				
マクロファージ	CD 2 0 6	P E - C F 5 9 4 (T x - R e d)	561 nm	✓		
上皮細胞	E p C A M	P E - C F 5 9 4 (T x - R e d)			✓	
	C y t o k e r a t i n (C K)	F I T C	488 nm		✓	20

【 0 0 8 9 】

ここで図 3 A ~ 図 3 K を参照すると、喀痰中の造血細胞の同定及び特性評価が示されている。図 3 A は、F C S - A 対 S S C - A の光散乱プロットで提示された喀痰細胞を示す。x 軸上の数字が付いた黒球は、光散乱ゲートを設定するために使用されるビーズのサイズを表し、これは、デブリ及び B E C、すなわち、5 μ m ビーズよりも小さいものすべて（左側の垂直線）及び 30 μ m を超えるものすべて（右側の垂直線）を除外する。図 3 B は、図 3 A の光散乱ゲート内の細胞の F S C - W $\times$ S S C - W 等高線プロットを示す（「W」は、信号の幅を表す）。30 μ m のサイズ除外ゲートは、上側のボックスで検出される細胞がいずれも 30 μ m より大きくなるような水平線として同定される。図 3 C は、図 3 B に示す W $\times$ W ゲートによって選択された細胞を有する F S C - A 対 F S C - H ドットプロットを示し、「H」は、サイトメータのレーザからの光を検出する光電子増倍管によって出力される電流の最大量を表す。示されたゲート長方形にはすべての単一細胞が含まれるが、細胞ダブレットは除外される。図 3 D は、C D 4 5 特異性のゲートを決定するために P E アイソタイプコントロールで染色された、図 3 A ~ C に示される光散乱ゲートから以前に選択された喀痰細胞のドットプロットを示す（上側のボックスによって示される）。図 3 E は、図 3 A ~ 図 3 C に示される光散乱ゲートから以前に選択された喀痰細胞のドットプロットを示し、細胞は抗 C D 4 5 - P E 抗体で染色されている。C D 4 5 抗原を発現するすべての細胞（C D 4 5 陽性細胞）は上側のボックスに捕捉される。次に、C D 4 5 陽性の上側ボックス／ゲート内の細胞を C D 6 6 b の発現についてさらに分析した。抗 C D 6 6 抗体のバックグラウンド蛍光は、F I T C - アイソタイプコントロールでの染色に基づいて図 3 F に示されている。図 3 G は、抗 C D 6 6 b で染色された C D 4 5 陽性細胞を示す。C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陽性細胞は、上側のボックスで示されている。図 3 H は、図 3 G の上側のボックスから選別された細胞のライトギムザ染色である。図 3 I は、B S E ゲートを通してのみ選択された、未染色の喀痰細胞を示すドットプロットを示す。この特定のサンプルは、C D 4 5 発現の検出に使用されるチャンネルである P E チャンネルの中間染色を示すボックス内にある細胞の大きな垂集団を示す。この垂集団の存在は、サンプルを C D 4 5 陰性細胞と C D 4 5 陽性細胞に分離するカットオフをどこに設定するか

を決定することを困難にする。図 3 J は、図 3 I と同じサンプルの $W \times W$ ゲートを示すドットプロットを示す。下側のボックス ($W \times W$ ゲート) の細胞は対象の細胞であり、一方、上側のボックスで捕捉された細胞は S E C であり、対象の真の未染色の喀痰集団を明らかにするために除外する必要がある。図 3 K は、B S E ゲート及び $W \times W$ ゲートを介して選択された未染色の喀痰細胞を示し、陰性集団は明確に同定可能であり、C D 4 5 陰性ゲートは、水平線「ゲート」を下回る平均蛍光強度を有する。

【 0 0 9 0 】

図 3 は、肺癌を発症するリスクが高い患者から得られた代表的なサンプルを示す。上側のパネルの最初の 2 つのプロファイル (図 3 A 及び図 3 B) は、それぞれ、デブリ及び B E C を除外するための光散乱ゲートを示す。細胞ダブレットを除外する追加のダブレット識別ゲート (図 3 C) も同様に適用された。対角上のボックス内にある細胞は単一細胞 (S C) である。上側の最も右のプロファイル (図 3 D) は、P E 標識 C D 4 5 抗体のバックグラウンド染色を決定するために P E 標識アイソタイプコントロール抗体で染色された、前の 3 つの光散乱ゲート (デブリ、B E C、及び細胞ダブレットの除去) を通じて選択された細胞を示す。このサンプルの特定の C D 4 5 - P E 染色を図 3 E に示し、C D 4 5 陽性細胞は上側のボックスで同定される。F I T C 標識アイソタイプコントロール抗体で共染色された喀痰細胞の C D 4 5 陽性集団を図 3 F に示し、F I T C 標識 C D 6 6 b 抗体で共染色された喀痰細胞の C D 4 5 陽性集団を図 3 G に示す。C D 6 6 b 陽性細胞は図 3 G の上側のボックスで示される。これらの細胞が顆粒球であることを確認するために、C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陽性細胞を F A C S A r i a 機器を使用して選別し、細胞遠心分離によってスライドに移し、ライトギムザで染色した。図 3 H に示すように、C D 6 6 b 陽性抗体で同定された血液細胞は確かに顆粒球であった。

【 0 0 9 1 】

残りの C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性細胞には、他のすべてのタイプの造血細胞が含まれるが、喀痰中の他の造血細胞は比較的まれであるため、マクロファージ及び単球、又はリンパ球である可能性が最も高い (17、27)。マクロファージの特異的マーカーは、図 4 A の細胞集団の大部分は、H L A - D R 及び / 又は C D 1 1 b を発現したので、C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性マクロファージ / 単球であることを確認した。

【 0 0 9 2 】

ここで図 4 A ~ 図 4 G を参照すると、C D 6 6 b プロープ又は C D 2 0 6 プロープのいずれかに曝露された C D 4 5 陽性喀痰細胞が示されている。図 4 A ~ 図 4 E は、さまざまなマクロファージ集団を含む C D 6 6 b 陰性集団を示す。図 4 A の C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性喀痰細胞は、H L A - D R を、場合によって C D 1 1 b を発現する。図 4 A は、抗 H L A 抗体のバックグラウンド染色を決定するためにアイソタイプコントロールで染色された C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性喀痰細胞を示すドットプロットを示す。同じアイソタイプコントロール染色はまた、図 4 B のヒストグラムにおいて、薄い灰色の曲線 (I) によって表されている。図 4 B の濃い灰色の曲線 (C) は、同じ細胞の H L A - D R 染色を表す。薄い灰色の曲線と比較した濃い灰色の曲線の右側へのシフトは、細胞が H L A - D R に対して陽性に染色されることを示す。抗 C D 1 1 b 抗体のバックグラウンド染色を決定するためのアイソタイプコントロールを図 4 C に示す。C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性細胞集団は、C D 1 1 b 染色が図 4 D 及び図 4 E それぞれの蛍光ヒストグラムでよりよく視覚化できるように、小さい (S) 細胞と大きい (L) 細胞とに分割された。アイソタイプコントロール (I) は、「S」及び「L」ヒストグラムの薄い灰色の曲線で表され、一方、抗 C D 1 1 b 抗体染色 (C) は、「S」及び「L」ヒストグラムの濃い灰色の曲線で表される。小さい細胞のみが C D 1 1 b に対して陽性に染色される。図 4 F ~ 図 4 G は、C D 4 5 陽性喀痰細胞のアイソタイプコントロール染色 (左側のドットプロット) 及び C D 2 0 6 染色 (右側のドットプロット) を示す。図 4 A ~ 図 4 B は、さまざまなマクロファージ集団を含む C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性喀痰細胞を示す。図 4 A の C D 4 5 陽性 C D 6 6 b 陰性喀痰細胞は、H L A - D R エピトープを、場合によって C D 1 1 b を発現する。C D 1 1 b マーカーは、骨髓細胞に見られる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

別の実施形態では、C D 3 / C D 1 9 マーカを C D 6 6 b マーカと組み合わせると、識別可能なリンパ球集団を図らずも収容するサンプル中のマクロファージ / 単球集団 (細胞の C D 6 6 b 陰性 / C D 3 陰性 / C D 1 9 陰性 サブセット) における潜在的なリンパ球汚染の同定が可能になる (2 8 ~ 3 0) 。 T C P P 信号について分析された C D 4 5 陽性細胞集団から C D 3 陽性 / C D 1 9 陽性 / C D 6 6 b 陽性細胞集団をゲーティングすることは、T C P P 標識に関連する信号を改善するさらに別の方法である。

【 0 0 9 4 】

ここで図 5 を参照すると、喀痰スミア上の多数のマクロファージの存在と一致する C D 2 0 6 陽性細胞集団の存在が示されている。15 個の喀痰サンプルを、ライトギムザ染色した喀痰スミアとフローサイトメータでの C D 2 0 6 染色とにより、マクロファージの存在について個別に分析した。喀痰スミアのライトギムザ染色は、P A P 染色で置き換え可能であることに留意されたい。プロットされているのは、スライドごとにカウントされたマクロファージの数 (× の付いた実線のドット) 、及び分析された 15 個のサンプルごとの C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性細胞の % (実線のドット) である。黒い点線は、データが同じサンプルを表すことを示すために付されている。スライド上にマクロファージがないことは白抜きのドットで表され、決定的でない C D 2 0 6 プロファイルは × の付いた白抜きのドットで表される。図 5 に示すように、喀痰スミアで大量のマクロファージが同定された場合、フローサイトメトリーによって C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性細胞の明確な集団も観察される。スライド上にマクロファージがないか、ほとんどない場合、C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性プロファイルは信頼できない。喀痰中の C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性細胞の明確な集団の存在 (サイズに関係なく) は、スライド上で観察された多数のマクロファージ (> 1 3) と一致し、高品質 (すなわち、肺深部) の喀痰サンプルを示す。C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性細胞集団が存在しない場合 (サンプル 2 、 1 0 、 及び 1 1) 、又は認識が困難な場合 (サンプル 3 及び 4) 、喀痰スミアは 0 ~ 少数のマクロファージ (1 3) を示し、この喀痰サンプルの質が低いことを示す。15 個の喀痰サンプルを、ライトギムザ染色した喀痰スミアとフローサイトメータでの C D 2 0 6 染色とにより、マクロファージの存在について個別に分析した。プロットされているのは、スライドごとにカウントされたマクロファージの数 (× の付いた実線のドット) 、及び分析された 15 個のサンプルごとの C D 4 5 陽性 C D 2 0 6 陽性細胞の割合 (%) (実線のドット) である。黒い点線は、データが同じサンプルを表すことを示すために付されている。スライド上にマクロファージがないことは白抜きのドットで表され、決定的でない C D 2 0 6 プロファイルは × の付いた白抜きのドットで表される。

C y P a t h (登録商標) アッセイによる喀痰中の癌細胞の同定

【 0 0 9 5 】

癌の早期発見のためのフローサイトメトリーに基づく喀痰分析の別の要素は、癌細胞の C y P a t h (登録商標) 標識である。高リスク患者 (おそらく肺癌がない) から得られた喀痰サンプルを分析し、サンプルにおよそ 3 % の H C C 1 5 癌細胞をスパイクした。図 6 に概説されているこの実験では、H C C 1 5 肺癌細胞を C e l l M a s k (商標) G r e e n で標識し、この緑色で混合物中のすべての癌細胞を同定できるようにした。喀痰細胞を抗 C D 4 5 - P E 抗体で染色したため、C D 4 5 陰性の H C C 1 5 細胞を含む非造血細胞から造血細胞を区別することができた (データ記載なし) 。細胞固定後、細胞混合物を T C P P で標識し、フローサイトメトリーで細胞を分析した。

【 0 0 9 6 】

図 6 を参照すると、肺癌細胞がスパイクされた喀痰分析の実験装置が示されている。H C C 1 5 癌細胞を C e l l M a s k (商標) G r e e n で標識し (ステップ 1) 、別のチューブで、解離した喀痰細胞を P E 標識抗 C D 4 5 抗体で染色した (ステップ 2) 。それぞれのチューブの過剰な C e l l M a s k (商標) G r e e n 及び抗 C D 4 5 抗体を洗い流した後、2 つの細胞懸濁液を混合した (ステップ 3) 。次に、混合細胞懸濁液を固定し

、蛍光成分としてTCPPを含むCyPath（登録商標）溶液とインキュベートした（ステップ4）。図6には、分析のための喀痰サンプル調製のフローチャートが示されている。HCC15癌細胞をCellMask（商標）Greenで標識し（ステップ1）、別のチューブで、解離した喀痰細胞をPE標識抗CD45抗体で染色した（ステップ2）。それぞれのチューブの過剰なCellMask（商標）Green及び抗CD45抗体を洗い流した後、2つの細胞懸濁液を混合した（ステップ3）。次に、混合細胞懸濁液を固定し、蛍光成分としてTCPPを含むCyPath（登録商標）アッセイ溶液とインキュベートした（ステップ4）。

【0097】

ここで図7A～図7Cを参照すると、CD45-PEマーカ、cell mask green及びTCPPで処理された喀痰細胞のドットプロットが示されており、サンプルは肺癌細胞（HCC15）でスパイクした。図7Aは、約4%のHCC15肺癌細胞がスパイクされた喀痰細胞におけるCD45発現の代表的なドットプロットである。HCC15細胞（CD45^{陰性}）は、以前に緑色蛍光色素CellMask（商標）Greenで標識されていた（図6を参照）。CD45^{陽性}細胞を示す上側のゲートは、適切なアイソタイプコントロールに基づいている（図7Dを参照）。下側のゲートは、非造血性のCD45^{陰性}細胞を示す。図7Bは、TCPP（y軸）及びCellMask（商標）Green染色（x軸）に対するCD45^{陽性}細胞のドットプロット分析を示す。CD45^{陽性}細胞の明確に同定可能な集団、おそらくマクロファージはTCPPに対して陽性に染色され、左上のボックス内にある。図7Cは、TCPP（y軸）及びCellMask（商標）Green染色（x軸）に対するCD45^{陰性}細胞のドットプロット分析を示す。CellMask（商標）Green^{陽性}細胞は、喀痰サンプルに追加されたHCC15細胞であり、すべてTCPPに対して陽性に染色される（右上の象限）。CellMask（商標）Green^{陰性}細胞は喀痰細胞であり、1.2%のバックグラウンド染色を示す（左下の象限）。図7A～図7Cに示す3つの光散乱ゲートを、喀痰細胞とHCC15細胞との混合物に適用した後、CD45発現について細胞を分析した（図7A）。次に、TCPPの取り込みを、CD45^{陽性}（上側のボックスで概説された集団）とCD45^{陰性}細胞集団（下側のボックスで概説された集団）との両方で決定した。CD45^{陽性}細胞の少数のみがTCPPの取り込みを示す（図7B）。対照的に、CD45^{陰性}細胞はTCPP^{陽性}細胞の非常に個別的な集団を示し、CellMask（商標）Greenに対して陽性に染色される（図7Cの右上の象限）。CellMask（商標）Greenで処理された唯一の細胞はHCC15肺癌細胞であるため、TCPP^{陽性}CellMask（商標）Green^{陽性}細胞は、スパイクされたHCC15肺癌細胞である。TCPPで染色されなかったCellMask（商標）Green^{陽性}細胞はなく（図7C、右下の象限）、CyPath（登録商標）が喀痰サンプルにスパイクされたすべての癌細胞を染色したことを示す。

【0098】

小規模なパイロット実験で5つの喀痰サンプルを分析した。1つは健康なボランティアから、3つは癌のない高リスク患者から、1つは肺癌患者からであった。分析は、図7に記載のように実施した。つまり、各サンプルにCellMask（商標）Green標識HCC15細胞をスパイクし、図7に記載のように分析した。サンプルにHCC15細胞をスパイクする理由は、これらの細胞がCyPath（登録商標）染色の陽性コントロールとして機能するからである。分析した5つのサンプルのうちCサンプルは1つのみであったが、データは、肺癌患者の喀痰サンプルが、疾患のない別の患者から得られたものとは異なることを示唆しており、C喀痰サンプルには、癌のない個人から採取されたサンプルよりもCD45^{陰性}細胞が多く、CD45^{陽性}細胞が少ない（図8A）。最も重要なのは、CサンプルがCD45^{陰性}（上皮）細胞集団の中で最も多くのTCPP^{陽性}細胞を示したことである。CD45^{陽性}集団におけるTCPP標識は、他の非癌サンプルからCサンプルを一意に同定しなかった（図8B）。

【0099】

10

20

30

40

50

ここで図 8 A ~ 図 8 B を参照すると、健康なボランティア及び癌の有無にかかわらず高リスクの患者から得られた喀痰サンプルの予備的な比較分析が示されている。図 6 及び図 7 に詳述された実験と同様に、異なるドナーからの 5 つのサンプルが分析された。白抜きのドットは健康なボランティアからのサンプル (H) を表し、黒のドットのサンプルは癌のない高リスク患者からのサンプル (HR) を表し、×の付いたドットは肺癌が認められた患者からのサンプル (C) を表す。図 8 A は、分析された各サンプル内の CD 4 5 陰性細胞 (左) 及び CD 4 5 陽性細胞 (右) の総数を示す。図 8 B は、分析された各サンプル内の CD 4 5 陰性細胞 (左) 及び CD 4 5 陽性細胞 (右) 内の T C P P 陽性細胞の割合を示す。

【0100】

ここで図 9 A ~ 図 9 F を参照すると、本発明の一実施形態によれば、T C P P 陽性細胞の存在について喀痰細胞を分析する 1 つの戦略が示されている。図 9 A は、喀痰細胞とそこに混合された H C C 1 5 細胞との混合物が抗 CD 4 5 - P E 抗体で処理されたドットプロットを示す。上側のゲートには CD 4 5 陽性細胞が含まれており、適切なアイソタイプコントロールに基づいている (図示せず)。下側のゲートは、非造血性の CD 4 5 陰性細胞を示す。図 9 B は、T C P P 及び F I T C 標識プローブのカクテルで処理された細胞を示す。F I T C 標識プローブには、CD 6 6 b (顆粒球)、CD 3、及び CD 1 9 (リンパ球) に対して向けられた抗体が含まれる。図 9 B には 4 つの象限がある。水平線より上の細胞は T C P P に対して陽性に染色された細胞であり、垂直線より右の細胞は F I T C に対して陽性に染色された細胞である。円は、このサンプルに存在するさまざまな細胞集団を示すために描画されている。図 9 C は、F I T C 強度 (y 軸) 対 F S C - A (x 軸; 細胞サイズを表す) を示すドットプロットに描かれた、図 9 B と同じ細胞の分析を表す。細胞集団は、図 9 B と図 9 C との間で同定される。右下の象限からの細胞は顆粒球と一致するプロファイルを示し、図 9 B の右上の象限からの細胞は肺泡マクロファージのプロファイルと一致するプロファイルを示す。図 9 D は、サンプルにスパイクされた H C C 1 5 細胞を含む CD 4 5 陰性喀痰細胞の T C P P 標識 (y 軸) 対 F I T C 蛍光強度 (x 軸) を示す。喀痰細胞の CD 4 5 陰性画分には H C C 1 5 細胞が含まれているため、このパネルには T C P P 陽性細胞の大集団が見られると予想される。このサンプルには、左上の象限の円と中央及び右上の象限の円とで示されるように、2 つの T C P P 陽性集団がある。図 9 E は、図 9 D と同様の CD 4 5 陰性細胞のプロファイルを示すが、サンプルにスパイクされた H C C 1 5 細胞を含まないコントロールサンプルに由来する。図 9 D の左上の象限の細胞集団は、図 9 E の左上の象限 (空の円) のドットプロットプロファイルには存在しない。この空の円から欠落している細胞は H C C 1 5 細胞である。図 9 F は、図 9 D と同じ細胞集団を表し、ドットプロットは、CD 4 5 - P E 強度 (y 軸) 対 F S C - A (x 軸) を示す。図 9 D 及び図 9 E の左上の細胞集団並びに右上及び中央の細胞集団は、図 9 F で同定される。

【0101】

図 9 は、CD 4 5 陽性細胞における T C P P 染色が肺泡マクロファージ集団に関連することを示唆している。CD 4 5 陽性 (造血) 細胞コンパートメント (図 9 A) は、F I T C チャネル及び T C P P の蛍光強度に基づいて、細胞の 3 つの亜集団に細分された (図 9 B)。CD 6 6 b / CD 3 / CD 1 9 対 F S C プロファイルでバックゲートした場合、T C P P で染色されなかった図 9 B の右下の丸で囲んだ細胞集団によって示される集団は、CD 6 6 b / CD 3 / CD 1 9 カクテルで陽性に染色された比較的小さな細胞であるように見え (図 9 C)、これらの細胞はおそらく顆粒球である。図 9 B の他の F I T C 陽性集団 (右上の丸で囲まれた細胞集団及び T C P P に対して陽性に染色される) は、比較的大きな細胞であることが判明した。それらの緑色の蛍光は、自家蛍光によるものである可能性が最も高く、図 3 F のアイソタイプコントロールプロファイルによって以前に示された CD 6 6 / CD 3 / CD 1 9 染色によるものではない。大きなサイズ及び高い自家蛍光は、右上の細胞集団が肺泡マクロファージである可能性が高いことを示唆している (35、36)。図 9 B の左下の細胞集団は、比較的小さな細胞からなり、この亜集団も CD 6 6

10

20

30

40

50

／ C D 3 / C D 1 9 陰 性 であるため、マクロファージ及び／又は単球の異なるサブセットの細胞集団である可能性が高い。C D 4 5 陰 性 細胞を同様に分析した（図 9 C ~ E）。ここで、サンプルに追加された H C C 1 5 細胞を、追加されたスパイクされた H C C 1 5 細胞を含まないが、他の点では同様に処理されたアリコートと比較した（図 9 C と図 9 D とを比較）。スパイクされた H C C 1 5 肺癌細胞のないサンプルに存在しない集団は丸で囲まれている。T C P P に対して陽性に染色される細胞は、C D 4 5 を発現しない中型の細胞であり、左上の空の円で表されるように、図 9 E には存在しない。H C C 1 5 を含まないサンプルについて左上の円に細胞集団がないことによって、H C C 1 5 細胞集団の T C P P 染色プロファイルが確認される（図 9 E）。C D 4 5 陰 性 喀痰細胞（中央／右上に丸で囲まれている）の中の他の T C P P 陽 性 細胞集団は、H C C 1 5 細胞と同様のサイズの細胞を含む（図 9 F）。これらの細胞も C D 4 5 陰 性 であるが、F I T C チャンネルでの低レベルの自家蛍光によって H C C 1 5 細胞と区別することができる（図 9 D 及び図 9 E）。

10

【 0 1 0 2 】

ここで図 1 0 A ~ 図 1 0 B を参照すると、品質管理（Q C）ビーズを使用して、図 1 0 B のドットプロットにおいてビーズサイズ除外（B S E）ゲートを確立する。図 1 0 B の喀痰サンプルは、約 5 μ m のビーズサイズ付近に配置されたゲートの左側及び約 3 0 μ m のビーズサイズ付近に配置されたゲートの右側にある細胞を分析から除去するようにゲートされている。喀痰サンプル、コントロール、アイソタイプコントロール、及びビーズは、以下の実験プロトコルで説明されているように調製される。

20

【 0 1 0 3 】

ここで図 1 1 A ~ 図 1 1 F を参照すると、処理された及び処理されていない喀痰サンプルがフローサイトメトリーによって分析され、結果として得られるドットプロットが示されている。未処理の喀痰細胞は、まず、B S E ゲートを使用してサイズをゲートし、さらに分析するために約 5 μ m より大きく約 3 0 μ m より小さいサイズの細胞を選択する。図 1 1 A は、サイズ範囲内にある喀痰細胞のドットプロットを示す。サイズゲートは B S E ゲートと呼ばれる。B S E ゲートは、デブリ及び赤血球を除外するが、扁平上皮細胞（S E C）は除外しない。S E C は死細胞であるため、生存率色素 F V S 5 1 0 を使用した喀痰サンプル分析から排除される。図 1 1 B ~ 図 1 1 C は、処理されていない（図 1 1 B）及び処理された（図 1 1 C）喀痰細胞の、B V 5 1 0 蛍光対前方側方散乱のドットプロットを示す。色素を取り込まない喀痰細胞は生細胞（L C）であり、図 1 1 C の線の下側に位置している。生細胞ゲートは L C ゲートと呼ばれる。色素は死細胞を染色し、生細胞は F V S 5 1 0 で染色されない細胞である。本実施例では色素 F V S 5 2 0 を使用したが、他の生存率染色／色素も L C 集団を区別するために機能する。それを超えると細胞が F V S 5 1 0 に対して陽性である（したがって死細胞である）と見なされる閾値は、未染色のコントロールに基づく（図 1 1 B）。未染色のコントロールの大部分の細胞（9 5 % 以上）は L C ゲート内にあり、5 % 未満の細胞（「バックグラウンド染色」）は L C ゲートの外側にある。次に、この L C ゲートを F V S 5 1 0 で染色された喀痰サンプルに適用すると、生細胞は L C ゲート内の細胞であり、死細胞はゲート外にある。

30

【 0 1 0 4 】

図 1 1 D は、単一細胞対ダブレット細胞を同定するための未染色の喀痰サンプルのドットプロットである。細胞ダブレットは、フローサイトメータによって 1 つのイベントと見なされ、1 つのイベントには 2 つ以上の細胞を表す T C P P の量が含まれ得る。したがって、ダブレットは、人工的に高い T C P P 含有量のイベントを作成し、T C P P が癌細胞のマーカーとして使用されるため、癌細胞又は癌関連細胞であるという誤った示唆を与える可能性がある。ダブレットを排除するために、単一細胞（S C）集団を同定するためのゲートが描画される。F S C - A 対 F S C - H のドットプロットの喀痰細胞プロファイルが取得データから作成され、B S E / L C ゲートが S C 集団の分析に適用される。2 つの対角線が主な集団の軸に沿って、1 つは上部に沿って（図 1 1 D では「上側の対角線」として示され、もう 1 つは下部に（「下側の対角線」）描画される。下側の対角線は上側の

40

50

対角線とやや平行に走り、そこから細胞が主な集団から離れて広がっているように見える集団の「ノッチ」から開始して右に延びるのが最適である（図示せず）。広がっている細胞（すなわち、対角上の集団に従わない細胞又はドットはダブルットであり、分析から除外する必要がある。ＳＣゲートには、対角線方向の集団を形成する細胞のみが含まれる。ＳＣ細胞は、図１１Ｄの対角ゲート内に示されている。ＳＣゲートは、２つの対角線、すなわち１つは主な集団の上部に沿って走る（「上側の対角線」で示される）、もう１つは下部の主な集団に従う（「下側の対角線」）対角線を接続することによって作成される。下側の対角線を配置するには、ドットプロットに「ノッチ」を見つける必要があり、これは、主な対角線方向の細胞集団に従わない細胞の開始を示す。下側の対角線（薄い灰色の領域）の下側及び右側には、ＳＣゲートから除外される細胞ダブルットが含まれる。下側の対角線は、主な対角線の集団に上下に従いながら、ノッチを横切る必要がある。

【０１０５】

図１１Ｅ～図１１Ｆは、ＰＥコントロール又はＰＥフルオロフォアに結合されたＣＤ４５プロブのいずれかで処理された喀痰細胞のドットプロットを示す。図１１Ｅは、アイソタイプコントロールである。図１１Ｆは、細胞をＣＤ４５陽性（血液細胞）又はＣＤ４５陰性（非血液細胞）のいずれかとして同定し、ＣＤ４５ゲートと呼ばれる。

【０１０６】

被験者からの最初の喀痰サンプルは、フルオロフォアに結合されたＣＤ４５プロブ、フルオロフォアに結合されたＣＤ６６ｂ、ＣＤ３、ＣＤ１９のカクテル、フルオロフォアに結合したＣＤ２０６、及びＴＣＰＰで処理する（チューブ＃６）。図１２Ａ～図１２Ｃは、ＣＤ６６ｂ／ＣＤ３／ＣＤ１９－ＦＩＴＣ－Ａｌｅｘ４８８及びＣＤ２０６－ＰＥ－ＣＦ５９４マーカで処理されたＣＤ４５陽性喀痰細胞を選択するためのＢＳＥ、ＬＣ、ＳＣ及びＣＤ４５ゲートの適用によって選択された喀痰細胞のドットプロットを示す。適用されたゲートの基準を満たした細胞のみがさらに分析される。細胞の集団は、ＣＤ２０６抗体（ｘ軸）及びＣＤ６６ｂ／ＣＤ３／ＣＤ１９（ｙ軸）に沿ったフルオロフォア強度に基づいて同定された。各サンプルで、５～６個の集団を同定することができる。各集団の相対的なサイズは、サンプルごとに異なる。図１２Ａは、集団１が優勢であるプロファイル１を示す。図１２Ｂは、集団２が優勢であるプロファイル２を示す。図１２Ｃは、ＣＤ２０６陽性（ＣＤ２０６⁺）細胞が優勢である、すなわち、集団３～６のプロファイル３を示す。各タイプのプロファイルの優勢な集団は、太線のボックスで示されている。ＣＤ４５陽性喀痰細胞の３つの異なるシグネチャが示されている。以下の図でさらに同定されるように、アイソタイプコントロール及びコントロール喀痰サンプルに照らして、５～６個の細胞集団が確立される。マクロファージの存在は、サンプルが肺深部からのものであることを示す。表３は、各集団に存在する細胞タイプを示す。

【表３】

表３

集団	蛍光		細胞タイプ
	F I T C / A l e x a 4 8 8	P E - C F 5 9 4 (T e x a s - R e d)	
1	陰性	陰性	単球、マクロファージ、他の血液細胞
2	陽性	陰性	顆粒球、リンパ球
3	陽性	陽性	おそらくマクロファージ
4	陰性	陽性	マクロファージ
5	陽性	高	マクロファージ
6	高	高	マクロファージ

【0107】

図13A～図13Bを参照せずに、FITC/ALEXA-488のアイソタイプコントロール、及びFITC/ALEXA-488に結合されたCD66b/CD3/CD19プローブで処理された嗜痰細胞のドットプロットが示されている。図13Aは、FITC/Alexa488アイソタイプコントロールで染色されたCD45^{陽性}細胞のドットプロットが、x軸上のFSC対y軸上のFITC/Alexa488として表示されることを示す。図13Bは、CD66b/CD3/CD19-(FITC/Alexa488)及びCD206-(PE-CF594)に対して向けられた抗体のカクテルで染色されたCD45^{陽性}細胞のドットプロット(図11Aと同様)を示す。水平のFITC/Alexa488ゲートは、バックグラウンド染色を超える細胞に基づいて設定される。アイソタイプコントロールの陰性ゲートは、アイソタイプコントロールの細胞の約95%を含むように設定され、陽性ゲートは、約5%以下のバックグラウンドを含むように設定される。ほとんどのサンプルのCD45⁺細胞におけるFITC/Alexa488陰性ゲートの最高値は、平均で450であり、100～1000の範囲である。

10

【0108】

ここで図14A～図14Bを参照すると、PE-CF594のアイソタイプコントロール、及びPE-CF594で標識されたマーカで処理された嗜痰細胞のドットプロットが示されている。図14Aは、アイソタイプコントロールで染色されたCD45^{陽性}細胞のドットプロットを示しており、x軸上のFSC対y軸上のPE-CF594として表示されている。図14Bは、PEに結合され、CD206細胞マーカに対して向けられたプローブ/抗体で染色されたCD45^{陽性}細胞のドットプロット(図14Aと同様)である。図14Bは、それを超えてCD206標識に陽性の細胞集団が見出されるゲートを同定する。ほとんどのサンプルのCD45⁺細胞のPE-CF594陰性ゲートの最高値は、平均で250であり、90～500の範囲である。

20

【0109】

ここで図15A～図15Bを参照すると、二重陰性ゲート又は集団1を設定するドットプロットが示されている。図15Aは、FITC/Alexa488及びPE-CF594(Texas-Red)チャンネルのアイソタイプコントロールで染色されたCD45^{陽性}嗜痰細胞を表示するドットプロットであり、y軸上のFITC/Alexa488対x軸上のPE-CF594(Texas-Red)として表示される。図15Bは、図15Aに示されているものと同じドットプロットであり、アイソタイプコントロールからの疑似カラープロットとして示されており、BSE、LC、及びCD45^{陽性}細胞ゲートを介してゲートされている。水平の点線は、図13で決定されたFITC/Alexa488の陽性/陰性のカットオフを表し、垂直の点線は、図14で決定されたPE-CF594の陽性/陰性のカットオフから導出される。図15で決定された集団1のゲートは、それぞれ図16A及び図16Bに示されるCD66b/CD3/CD19(FITC/Alexa488-y軸)及びCD206(PE-CF594-x軸)に対して向けられた抗体で染色されたCD45^{陽性}嗜痰細胞のフルドットプロット及び疑似カラープロットに転送される。ほとんどのサンプルにおけるCD45^{陽性}細胞のFITC/Alexa488陰性ゲートの最高値は、平均で600であり、200～1050の範囲である。ほとんどのサンプルにおけるCD45^{陽性}細胞のPE-CF594陰性ゲートの最高値は、平均で500であり、200～750の範囲である。

30

40

【0110】

ここで図16A～図16Bを参照すると、図15のような嗜痰サンプルのドットプロットであり、CD45^{陽性}細胞は、FITC/Alexa488に結合されたCD66b/CD3/CD19抗体とPE-CF594と結合したCD206とのカクテルで染色され、細胞の異なる集団の存在について分析された。1～5として同定された細胞集団は、BSE、LC、及びCD45^{陽性}ゲートを適用した後も残る。図16Aの同じ集団1(ボックス)及びカットオフ(点線)は、図15に描画されたものと同様であり、図16A～図16Bに示されるプロファイルに適用される。

50

【 0 1 1 1 】

図 1 6 B は、確立された集団 2 ~ 6 のゲートを示す。集団 3、5、及び 6 は F I T C 自家蛍光であり、図 1 6 A に示すように水平の点線より上にあるはずである。F I T C における自家蛍光ではない集団 4 は、図 1 6 A に示すように点線を下回るはずである。集団 2 は、(集団 1 と同様に) C D 2 0 6 に対して陰性だが、C D 6 6 b / C D 3 / C D 1 9 に対して陽性の細胞として特徴付けられるため、集団 2 のゲートは集団 1 の上に描画され、図 1 6 A の垂直の点線である P E - C F 5 9 4 カットオフの右側にある。実線及び点線で形成された集団 1 の上のボックスは、集団 2 として図 1 6 B に示される。集団 5 は、P E - C F 5 9 4 陽性 及び F I T C 陽性 の両方であるプロファイルの右側にある完全に隔離された集団として同定できる (図 1 6 B、集団 5 ゲート)。場合によって、集団 5 は中間 F I T C / A l e x a 4 5 5 陽性 であり、その場合、集団 5 を隔離するためのゲートは、水平の赤い点線と交差する (図 1 7 A を参照)。

10

【 0 1 1 2 】

ここで図 1 7 A ~ 図 1 7 C を参照すると、C D 4 5 陽性 であり、2 つのサンプルからの C D 6 6 b / C D 3 / C D 1 9 - F I T C / A l e x a 4 8 8 のプロープで処理された喀痰サンプルからの疑似カラードットプロットである (図 1 7 A ~ 図 1 7 B は同じサンプルであるが、異なるゲートを示す。すべてのプロットは、B S E、L C、及び S C ゲートを介してゲートされた C D 4 5 陽性 喀痰細胞を示す。水平及び垂直の点線は、アイソタイプコントロール上に設定された (図示せず)。図 1 7 A ~ 図 1 7 B は、集団 5 の F I T C 平均蛍光強度が中間であり、カットオフラインを横切るときのゲート 4 及びゲート 5 の描画を示す。図 1 7 C は、集団 6 の右上のボックスを示す。

20

【 0 1 1 3 】

ここで図 1 8 を参照すると、x 軸上の各 () は、図 1 2 A ~ 図 1 2 C からのプロファイルを反映している。プロファイル 1 の場合、すべての C D 4 5 陽性 細胞の割合 (%) とした各集団 (集団 1、集団 2、集団 1 + 2、集団 3 + 4 + 5 + 6) の中央値が、高リスク (H R) 喀痰サンプルに対してプロットされる。プロファイルグループの各集団の中央値は、直線で結ばれる。プロファイル 1 のシグネチャは、プロファイル 1 の図 1 8 で同定された各集団の中央値間に線を引くことによって作成される。プロファイル 2 及び 3 のシグネチャは、肺癌を発症するリスクが高い被験者及び肺癌を有すると同定された被験者からの喀痰サンプルに対して同様に生成される。

30

【 0 1 1 4 】

ここで図 1 9 A ~ 図 1 9 C を参照すると、肺癌を発症するリスクが高い (H R) 被験者と癌 (C) を有すると同定された被験者から収集された喀痰からの血液細胞シグネチャの比較が示されている。図 1 9 A は、図 1 8 からのプロファイル 1 のシグネチャ (シグネチャ 1) を示す。図 1 9 B は、プロファイル 2 のシグネチャ (シグネチャ 2) を示す。図 1 9 C は、プロファイル 3 のシグネチャ (シグネチャ 3) を示す。集団 6 の細胞の割合 (%) が、H R 及び C 喀痰サンプルの各シグネチャについて決定及び同定された。

【 0 1 1 5 】

図 2 0 A ~ 図 2 0 D は、チューブ # 7 のように C D 4 5 並びに p a n C y t o k e r a t i n - A l e x a 4 8 8 及び E p C A M - P E - C F 5 9 4 データのカクテル並びに T C P P で処理された喀痰細胞のドットプロットを示す。ドットプロットに示される細胞は、B S E、L C、S C、C D 4 5 ゲートが適用された後に残っている細胞である。(C D 4 5 陰性) プロファイル 1 ~ 4 の細胞のドットプロットと、各集団が表す相対 T C P P 蛍光強度に加えて、各プロファイル 1 ~ 4 が表す各集団のすべての C D 4 5 陰性 細胞の割合とをさらに分析する。

40

【 0 1 1 6 】

各サンプルにおいて、図 2 0 A に示されるように、9 つの集団を同定することができる。各プロファイル 2 ~ 4 について、同じ 9 つの集団が同定される。各亜集団の相対的なサイズはサンプルごとに異なり、それぞれが異なるプロファイルを示す (プロファイル 1 ~ 4)。図 2 0 A は、集団 1 が優勢であり、すべての C D 4 5 陰性 細胞の 8 0 % 超を含むタ

50

イブのプロファイルを示す。図 2 0 B は、集団 1 も同様に優勢であるが、すべての C D 4 5 陰性細胞の 8 0 % 未満を含むタイプのプロファイルを示し、多くの場合、他のゲートの 1 つに明確な細胞集団がある。図 2 0 C は、依然として大きな集団 1 (ただし、8 0 % 未満) が存在するが、2 番目に大きい集団が集団 2 であるタイプのプロファイルを示す。図 2 0 D は、集団 5 が最も優勢な集団又は集団 1 に次いで 2 番目に優勢な集団であるプロファイルを示す。プロファイルごとに異なるシグネチャが存在する。シグネチャのタイプを決定するために最も重要な集団は、太線のボックスである。

【 0 1 1 7 】

図 2 1 A ~ 図 2 1 B は、F I T C / A l e x a 4 8 8 で処理されたか、又は p a n C y t o k e r a t i n / A l e x a 4 8 8 で処理された C D 4 5 陰性 嗜痰細胞のアイソタイプコントロールのドットプロットを示す。分析の前に、B S E、L C、S C、及び C D 4 5 陰性のゲートを分析のために集団に適用した。2 つのプロファイルが生成され、1 つは x 軸に前方側方散乱 A (F S C - A)、y 軸に F I T C / A l e x a 4 8 8 を有する C D 4 5 陰性細胞を表示し (図 2 1 A)、もう 1 つは x 軸に F S C - A、及び y 軸に p a n C y t o k e r a t i n / A l e x a 4 8 8 を有する C D 4 5 陰性細胞を表示する (図 2 1 B)。各プロファイルの陰性ゲートは、アイソタイプコントロールの細胞のおよそ 9 5 % を含むように設定されている。各プロファイルの陽性ゲートには、陰性ゲートの上の残りのスペースが含まれ、バックグラウンド染色の 5 % 以下を含むはずである。

【 0 1 1 8 】

図 2 2 A ~ 図 2 2 B は、P E - C F 5 9 4 のアイソタイプコントロール、並びに B S E、L C、S C 及び C D 4 5 陰性細胞ゲートを介してゲートされた C D 4 5 陰性 嗜痰細胞のドットプロットを示す。分析の前に、B S E、L C、S C、及び C D 4 5 陰性のゲートを分析のために集団に適用した。2 つのプロファイルが生成され、1 つは x 軸に前方側方散乱 A (F S C - A)、y 軸に P E - C F 5 9 4 を有する C D 4 5 陰性細胞を表示し (図 2 2 A)、もう 1 つは x 軸に F S C - A、y 軸に E p C A M - P E - C F 5 9 4 を有する C D 4 5 陰性細胞を表示する (図 2 2 B)。各プロファイルの陰性ゲートは、アイソタイプコントロールの細胞のおよそ 9 5 % を含むように設定されている。各プロファイルの陽性ゲートには、陰性ゲートの上の残りのスペースが含まれ、バックグラウンド染色の 5 % 以下を含むはずである。

【 0 1 1 9 】

ここで図 2 3 A ~ 図 2 3 B を参照すると、C D 4 5 陰性細胞の二重陰性ゲート又は集団 1 を有するドットプロットが示されている。図 2 3 A はドットプロットであり、図 2 3 B はアイソタイプコントロールからの疑似カラープロットであり、処理された嗜痰サンプルはフローサイトメータを介して分析され、細胞を表すイベントは B S E、L C、S C 及び C D 4 5 陰性細胞ゲートを介してゲートされる。図 2 3 A の水平の点線は、図 2 1 で決定された F I T C / A l e x a 4 8 8 の陽性 / 陰性のカットオフを表し、垂直の点線は、図 2 2 で決定された P E - C F 5 9 4 の陽性 / 陰性のカットオフから導出される。図 2 3 で決定された集団 1 のカットオフラインは、すべてのサイトケラチン (A l e x a 4 8 8 - y 軸) 及び E p C A M (P E - C F 5 9 4 - x 軸) に対して向けられた抗体で染色された C D 4 5 陰性細胞のフルドットプロット及び疑似カラープロットに組み込まれる。

【 0 1 2 0 】

ここで図 2 4 A ~ 図 2 4 B を参照すると、チューブ # 7 の C D 4 5 陰性 嗜痰細胞の集団 2 ~ 9 のゲートが、図示のように設定されている。図 2 4 A は嗜痰細胞のドットプロットであり、図 2 4 B は図 2 3 と同じ嗜痰サンプルからの疑似カラープロットであるが、今回は、すべてのサイトケラチンに対して向けられた A l e x a 4 8 8 標識抗体 (y 軸)、及び E p C A M に対して向けられた P E - C F 5 9 4 標識抗体 (x 軸) で細胞を染色する。B S E、L C、及び S C ゲートを介しても選択された C D 4 5 陰性細胞が示されている。図 2 3 に描画されているのと同じ集団 1 (実線のボックス内の細胞) 及びカットオフ (そこから延びる点線) が、これらのプロファイルに適用される。C y t o k e r a t i n + 細胞は、p a n C y t o k e r a t i n 抗体で高度に染色される細胞を示し、E p C A

10

20

30

40

50

M⁺細胞はE p C A M抗体で高度に染色される細胞を示す。集団1、2、及び3はE p C A M陰性であるため、集団1の上に、集団1と6との間に存在する垂直の縞模様の線の左側にあるはずである。最初の3つの集団間の違いは、それらが異なるレベルのp a n C y t o k e r a t i nを発現することである。集団2と3との間のカットオフは、p a n C y t o k e r a t i n - A l e x a 4 8 8で高度に染色された細胞を同定することによって決定される。高度にA l e x a 4 8 8で染色されたC D 4 5^{陰性}細胞のカットオフは10,000~20,000の蛍光強度(平均14,000)の範囲であり、このカットオフは集団3、並びに集団4及び9の下側の線を決定する。図24Aは、集団2と集団3とを分離する水平の縞模様の線を示し、この線より上の細胞は、この特定のサンプルにおいて、抗p a n C y t o k e r a t i n抗体で高度に染色されたと見なされる。カットオフは、10,000蛍光強度マークより上で明確な細胞集団が同定できる疑似カラープロットで決定された。集団1、6、及び7はp a n C y t o k e r a t i n陰性であり、集団6及び7は、水平の縞模様の線より下に、集団1の右側にある。集団1、6、及び7の間の違いは、これらの細胞で発現するE p C A Mのレベルである。集団7は、集団8及び9と同様に、E p C A Mを高度に発現する細胞の集団として同定される。E p C A Mを高度に発現する細胞のカットオフは、平均で3000であり、1000~6000の範囲である。図16Aの垂直の縞模様の線は、高度にE p C A Mを発現する細胞のカットオフを示しており、それによって集団7、8、及び9の左側を同定する。特定の実施形態において、F I T C高発現細胞は、P E - C F 5 9 4高発現細胞のカットオフ値として10,000を使用し、P E - C F 5 9 4陰性ゲート(又は垂直、実線、縞模様の線)の最高値を同定する値の10~15倍を使用する。

10

20

【0121】

図25は、B S E、L C、S C、及びC D 4 5^{陰性}のゲートが適用された後に残っている高リスク被験者からのチューブ#7の喀痰細胞のドットプロットを示す。ドットプロットは、図20に示され、図26でさらに分析されるように、肺癌を発症するリスクが高い被験者からのプロファイル1~4を示す。

【0122】

図26は、プロファイル1の非血液細胞シグネチャ(非血液細胞シグネチャ1)を示し、各パネルに示されている同じプロファイルの各集団(集団1、集団2、集団5、及びP a n C K + + (C D 4 5^{陰性})の中央値が同定され、プロファイル内の各集団の中央値から線を引くことによってシグネチャが生成される。各プロファイル1~4についてシグネチャが生成される。

30

【0123】

図27は、疾患のない肺癌を発症するリスクが高い(H R)被験者からの喀痰サンプルの非血液細胞シグネチャを示す(1 d c tは、追跡C及び肺癌を有する被験者(C)を示さない)。シグネチャ4では、Cサンプルのシグネチャの場合、集団5の矢印は平均E p C A M細胞発現の減少を示し、集団p C Kの矢印はH Rシグネチャ4と比較して平均p a n C y t o k e r a t i n発現が増加したことを示す。

【0124】

図28A~図28Bは、肺癌を発症するリスクが高い被験者及び肺癌を有すると同定された被験者からの喀痰サンプルについて分析されたすべてのC D 4 5^{陰性}細胞の割合としての集団3+4+9のP a n C K + +細胞の存在に対する感度及び特異性を示す。P a n C K + +バイオマーカを喀痰サンプルに適用することにより、癌細胞を同定するための感度80%、及び特異性85%を得た。

40

【0125】

図29A~図29Cは、喀痰サンプル中のC D 4 5^{陰性}/C D 4 5^{陽性}細胞の比率(バイオマーカ1)を分析した後の、癌を発症するリスクが高い被験者及び癌を有する被験者から得られた喀痰サンプル中の細胞の分析を示す。図29Aは、高リスクの個体からの喀痰サンプル中のC D 4 5^{陰性}/C D 4 5^{陽性}細胞の比率を示す。図29Bは、癌を有することが知られている被験者からの喀痰サンプル中のC D 4 5^{陰性}/C D 4 5^{陽性}細胞の比

50

率を示す。図 29 C は、2 人の被験者からの喀痰サンプル中の CD 45 陰性 / CD 45 陽性細胞の比率の分析である。

【0126】

図 30 A ~ 図 30 B は、HR 及び C サンプルからの喀痰サンプルをバイオマーカ 1 (喀痰サンプル中の CD 45 陰性 / CD 45 陽性細胞の比率) について分析するときの特異性が 54 % 及び感度が 90 % であることを示す。

【0127】

図 31 A ~ 図 31 C は、チューブ # 7 の CD 45 陰性 喀痰細胞のドットプロットを示す。喀痰サンプルは、癌を発症するリスクが高い被験者と癌のある被験者から採取し、BSE、LC、SC、及び CD 45 陰性 ゲートを適用した後に分析した。y 軸は TCPP 蛍光であり、x 軸は panCytokeratin - Alexa 488 である。バイオマーカ 2 の CD 45 陰性細胞の panCytokeratin - Alexa 488 に対して染色される細胞における TCPP の存在である。図 31 A は、高リスクの個人からの喀痰サンプル中の TCPP 標識細胞のドットプロットを示す。図 31 B は、癌を有することが知られている被験者からの喀痰サンプル中の TCPP 標識細胞のドットプロットを示す。集団 B は、細胞の TCPP 集団を示す。図 31 C は、各被験者からの集団 B において TCPP 陽性である喀痰サンプル中の CD 45 陰性細胞の割合の分析である。

10

【0128】

図 32 A ~ 図 32 B は、図 31 のバイオマーカ 2 を適用して、肺癌 (C) 喀痰サンプルを高リスク (HR) (非肺癌) 喀痰サンプルから区別する方法の一実施形態について、特異性が 63 % 及び感度が 100 % であることを示す。

20

【0129】

図 33 A ~ 図 33 C は、本発明の一実施形態に従って、肺癌を発症するリスクが高い被験者及び肺癌を有すると同定された被験者から得られた喀痰サンプルを分析するために、図 31 及び図 32 で同定されるように収集された喀痰サンプルに適用されるバイオマーカ 1 とバイオマーカ 2 との組み合わせを示す。図 33 C は、サンプルを癌を有する被験者又は癌を有さない被験者からのものとして同定するときの感度が 90 % 及び特異性が 90 % であることを示す。

【0130】

図 34 A ~ 図 34 C は、集団 6 中の CD 66 b / CD 3 / CD 19 + + 及び CD 206 + + 細胞の量を決定するために、CD 66 b / CD 3 / CD 19 及び CD 206 で標識された喀痰サンプル中の細胞の癌リスク分析を示す。集団 6 の水平ゲートは、10,000 ~ 30,000 (例えば、10,000 ~ 15,000、又は 15,000 ~ 20,000、又は 20,000 ~ 25,000、又は 25,000 ~ 30,000) の平均蛍光強度に設定される。肺癌を発症するリスクが高い被験者 (図 34 A) 及び肺癌を有すると同定された被験者 (図 34 B) から得られた喀痰サンプルに存在するすべての CD 45 陽性細胞と比較した集団 6 の細胞の総数 (バイオマーカ 3) が図 34 C に示されている。

30

【0131】

図 35 A ~ 図 35 B は、図 34 のバイオマーカを適用して、肺癌 (C) 喀痰サンプルを高リスク (HR) (非肺癌) 喀痰サンプルから区別する方法の一実施形態について、特異性が 88 % 及び感度が 60 % であることを示す。

40

図 36 A ~ 図 36 B は、肺癌を発症するリスクが高い被験者及び肺癌を有すると同定された 2 人の被験者から収集された喀痰サンプルからの CD 45 陰性細胞の癌リスク分析を示す。集団 3 + 4 + 9 で panCytokeratin 陽性 (又は高発現) である CD 45 陰性細胞の割合は、バイオマーカ 4 として同定される。

【0132】

図 37 A ~ 図 37 B は、図 36 のバイオマーカを適用して、肺癌 (C) 喀痰サンプルを高リスク (HR) (非肺癌) 喀痰サンプルから区別する方法の一実施形態について、特異性が 83 % 及び感度が 80 % であることを示す。

50

【0133】

図38A～図38Eは、バイオマーカ1、2、3、及び4の組み合わせを適用した、癌及び高リスク被験者からの喀痰サンプルからの細胞の癌リスク分析を示す。バイオマーカ1、2、3、及び4の組み合わせを喀痰サンプルに適用して、癌のないサンプルから癌サンプルを同定する場合、98%の特異性及び78%の感度が達成される。

【0134】

図39は、本明細書に記載の肺から細胞集団を分画するシステム及び方法を含む、被験者の肺の健康のためのスクリーニングフローチャートを示す。この標識方法(CyPath(登録商標)アッセイと呼ばれる)を使用した概念実証臨床研究では、TCPP標識肺喀痰中のRFCの蛍光強度パラメータを、患者の喫煙歴に関するデータと組み合わせて、81%の精度で研究参加者を癌対高リスクコホートに分類することができた(12)。CyPath(登録商標)強化喀痰細胞診の感度は従来の喀痰細胞診よりも高い(77.9%)ことが示されたが、染色されたスライド(12スライド/患者)からカウントされた細胞数(約600,000)がアッセイ感度の制限要因であった。癌サンプルのRFCのポアソン分布を使用すると、検査する細胞の数を100万を超えるように単純に倍増させると、RFC検出が95%に増加する可能性があると予測される(12)。さらに、サンプルの妥当性を検証するためにマクロファージ定量化のための別個の喀痰スミアステップを含める必要性は、自動化又は拡張性の可能性が低いアッセイ設計に貢献した。したがって、ハイスループットフローサイトメトリーは、臨床的に適切な時間枠内で数百万の細胞イベントの検査をサポートするスライドベースの検査の代替手段である。

10

20

実験プロトコル

ヒト喀痰サンプル

【0135】

3日間の喀痰サンプルを提供するためにボランティアを募集した。3つの異なる研究コホート: 1) 肺癌を発症するリスクが高いが、おそらく癌はない、2) 肺癌と診断されるリスクの高い個人、3) 癌と診断されておらず、肺癌を発症するリスクが高くない健康な個人(22歳以上)が含まれていた。高リスクコホートと分類される被験者は、55～75歳で、30パック年以上と定義される大量喫煙者とされた(13)。(30パック年の喫煙の例は、30年間にわたって1年につき1日1箱、15年間にわたって1年につき1日2箱などである。)健康なコホートの場合、被験者は、喫煙が5パック年以内であった、及び/又は15年以上前に禁煙しており、22歳以上である者とされた。その他の除外基準(すべてのコホートに適用可能)は、重度の閉塞性肺疾患、制御不能な喘息、最小労作の狭心症、妊娠、又は鉱業での勤務の存在であった。

30

喀痰の収集

【0136】

すべての研究参加者は、製造元の指示に従って、acapella(登録商標)補助デバイス(Smiths Medical社、ミネソタ州セントポール)の使用について訓練を受けた。acapella(登録商標)装置は、肺の深部から粘液分泌物を薄くして移動させるのに役立つ、FDA承認のハンドヘルドデバイスである。被験者は、デバイスを使用して、喀痰サンプルを滅菌収集カップに排出するように指示された。被験者は自宅でこの手順を繰り返し、2日目及び3日目の喀痰サンプルを収集した。被験者は、標本カップを冷暗所又は冷蔵庫に保管し、収集が完了してから1日以内に最初に収集した場所に戻すように指示された。完了した標本カップは冷凍輸送用アイスバックで梱包され、分析のために一晩で送られた。受領した3日間の収集サンプル(n=38)の細胞生存率は、平均64.3%(SD: 25.6%、範囲: 23.6～100%)で、すべて死細胞である類上皮細胞(BEC又は類細胞)は含まれない(14)。

40

喀痰の解離

50

【0137】

喀痰栓は、綿棒を使用して汚染唾液から分離した（15、16）。栓の選択が不可能な場合は、サンプル全体を処理した。喀痰は、喀痰栓重量（w/w）で、予熱した0.1%ジチオスレイトール（DTT）と1:4の比率で、及び0.5%N-アセチル-L-システイン（NAC）と1:1の比率で混合した。次に、混合物を室温で15分間揺り動かした。GIBCO（登録商標）ハンクス平衡塩溶液（HBSS、ThermoFisher Scientific社、マサチューセッツ州ウォルサム）を添加し（喀痰/DTT/NAC混合物の4倍量）、得られた細胞懸濁液を室温でさらに5分間揺り動かし、40~110µmのナイロン細胞ストレーナ（Falcon、Corning Inc社）に通してろ過してデブリを除去し、800×gで10分間遠心分離した。上澄みをデカントした後、細胞ペレットを1mLのHBSSに再懸濁させた。総細胞数は、細胞生存率を決定するためにトリパンブルー除外法を使用してノイバウエル血球計算盤で決定した。

10

喀痰スミア

【0138】

処理のために喀痰栓を移すのに使用したのと同じ綿棒を使用して、喀痰細胞を1つのスライドに移した。追加のスライドを使用して、喀痰サンプルを2つのスライドの間に、両方のスライドの大部分を覆うように塗り付けた（16）。スライドを風乾し、ライトギムザで染色した。片方又は両方のスライドを読み取り、病理学者がマクロファージの数をカウントした。

20

その他のヒトサンプル

血液

【0139】

2つの7mLバイアルの末梢血を、健康なボランティアから入手した。血液の大部分は、BD PharmLyse（商標）（BD Biosciences社、カリフォルニア州サンノゼ）で赤血球（RBC）を溶解することにより、白血球（WBC）を得るために使用した。残りはRBCのソースに使用した。

唾液

【0140】

BECは、健康なボランティアの口腔粘膜から、細胞スクレーパーで頬の内側をこすることによって採取した。BECを含む唾液は、喀痰細胞の解離と同じプロトコルを使用して処理した。

30

肺癌細胞

【0141】

HCC15肺癌細胞（ATCC社、バージニア州マナッサス）は、37℃に設定された5%CO₂インキュベータ内で、10%ウシ胎児血清と1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI1640で増殖させた。

40

フローサイトメトリー用の抗体及び試薬

【0142】

喀痰細胞を染色するために使用できる抗体の例は、汎白血球細胞表面マーカーCD45（抗CD45-PE）に対して向けられたPE標識抗体、顆粒球を同定するための抗CD66b-FITC、マクロファージを標識するための抗CD206-FITC、抗HLA-DR-BV421、抗CD11b-BV650、抗CD11b-APC及び抗CD11c-BV650であり、抗CD3-Alexa Fluor 488及び抗CD19-Alexa Fluor 488はそれぞれTリンパ球及びBリンパ球を標識するために使用できる。抗CD45、抗CD11b、抗CD3、及び抗CD19、並びにそれぞれのアイソタイ

50

ブコントロールは、BioLegend社（カリフォルニア州サンディエゴ）から購入したが、抗CD11c、抗CD66b、抗CD206、抗HLA-DR及びそれぞれのアイソタイプコントロールはBD Biosciences社から購入した。追加の抗体を表2に示す。

【0143】

テトラ（4-カルボキシフェニル）ポルフィリン（TCPP）はFrontier Scientific社（ユタ州ローガン）から購入し、CellMask（商標）原形質膜染色はThermoFisher Scientificから購入した。Megabead NISTトレサブル粒子サイズ標準（5、10、20、30、40、及び50 μ m）は、Polysciences, Inc社（ペンシルベニア州ワーリントン）から購入した。

10

【0144】

すべての抗体は、喀痰細胞、場合によっては血液細胞（CD3及びCD19）で滴定し、アイソタイプコントロールと比較した蛍光強度の最大差を反映する最適な染色濃度を決定した。TCPP及びEpCAMの最適濃度は、喀痰細胞及びHCC15細胞で滴定した。他の染色試薬及びビーズは、製造元の推奨に従って使用した。

フローサイトメトリー分析及び細胞選別

喀痰細胞集団の特性評価

【0145】

ここで図1Cを参照すると、各細胞がレーザからの光線を通過し、レーザからの光の散乱が前方散乱（FSC）検出器及び側方散乱（SSC）検出器で検出されるときに、細胞をフローサイトメトリーによって分析した。細胞のサイズ及び粒度は、図1Eに示すように特徴付けることができる。

20

【0146】

喀痰サンプル中の細胞は、生細胞（LC）及び死細胞（DC）の存在、並びに本明細書に記載のイベントとして捕捉された単一細胞（SC）又は二重細胞があるかどうかに基づいて分画することができる。

【0147】

図2～9の解離した喀痰サンプルの単一細胞懸濁液のサンプルを、以下のプローブ：約1 μ g/mLの抗CD45-PE、約3 μ g/mLの抗CD66b-FITC、並びに抗HLA-DR-BV421（5 μ g/mL）、抗CD11b-APC（4 μ g/mL）、抗CD11c-BV650（5 μ g/mL）、又は抗CD3-Alexa Fluor 488（2 μ g/mL）と抗CD19-Alexa Fluor 488（2 μ g/mL）との混合物のいずれかの1つ以上とともにインキュベートした。別のチューブで、解離した喀痰サンプルの単一細胞懸濁液を、喀痰の質を決定するために、約1 μ g/mLの抗CD45-PE及び4 μ g/mLの抗CD206-FITCとインキュベートした。すべてのインキュベーションは、光から保護して、氷上で35分間行った。細胞をHBSSで洗浄した後、細胞を1%パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Sciences社、ペンシルベニア州ハットフィールド）で4で30分間固定した。次に、細胞懸濁液を冷HBSSで洗浄し、分析まで氷上に置いた。

30

40

HCC15スパイク喀痰サンプルのTCPP/CyPath標識

【0148】

図1～図9を参照すると、解離した喀痰細胞は、抗CD45抗体で標識され、上記のように固定されている。HCC15細胞をトリプシンで採取し、DPBS（ThermoFisher Scientific社）で洗浄し、CellMask（商標）Green原形質膜染色で標識した。得られたCellMask（商標）Green標識HCC15細胞（cmgHCC15）を1%パラホルムアルデヒドで4で30分間固定し、HBSSで洗浄した。特定の喀痰細胞懸濁液に3%cmgHCC15細胞をスパイクした。次に

50

、固定した細胞の混合物を、冷却したTCPP (4 µg/mL) とともに4 で1時間インキュベートした。標識後、細胞を洗浄し、さらに分析するまで氷上に置いた。

【0149】

一実施形態では、サンプルは、4つのレーザ (404 nm、488 nm、561 nm、及び633 nm) を備えたBD LSR - II フローサイトメータ (BD Biosciences 社) を使用して分析した。喀痰全体、CD45^{陽性} CD206^{陽性}、CD45^{陽性} CD66b^{陽性}、又はCD45^{陽性} CD66^{陰性} の亜集団の細胞選別を、BD FACS Aria 細胞選別機 (BD Biosciences 社) で行った。収集後のデータ分析は、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Inc 社、オレゴン州アシュランド) を使用して行った。

10

細胞学

【0150】

全喀痰サンプルは、上記の喀痰解離法を使用して調製した。Cytopro 7620 (Wescor 社、ユタ州ローガン) Hettich 32A (Rotofix 社、マサチューセッツ州ビバリー) 細胞遠心分離機を使用して、スライドあたり1及び2.5 × 10⁵ 個の細胞でサイトスピンを調製した。スライドは、製造元のプロトコルに従って、ライト又はライトギムザ染色のいずれかで染色した。画像は、Nikon 社製Eclipse Ti 又はOlympus 社製BX40 顕微鏡で室温で作成した。Nikon 社製顕微鏡には、UPLAN Apo 20X/0.7 対物レンズ及びDS-Ri2 カメラ、Olympus 社製顕微鏡にはPLAPO 60X/1.4 対物レンズ及びSD100 カメラが装備されている。NIS - Elements Advanced Research (Nikon 社) 及びCellSens Standard (Olympus 社) を使用して画像を保護した。

20

【0151】

マクロファージは、喀痰サンプルの妥当性を検証するために伝統的に使用されてきた。細胞診によって喀痰サンプルを評価するためのパパニコロウ細胞病理学会のガイドラインは次のように述べている。「マクロファージの数の数値的なカットポイントは、一貫して文献中に報告されていないが、適切な標本には、このタイプの簡単に同定できる細胞が多数あるはずである」(31)。HLA - DR 及びCD11b (又はCD11c) は、CD14 及びCD206 とともに、肺内のマクロファージ及び単球のさまざまなサブセットのフローサイトメトリーによる同定に有用なマーカーであることが示されている(32、33)。CD206 は、胚発生中に肺に存在する長寿命の細胞である肺泡マクロファージに特異的なマーカーである(34)。CD206^{陽性} マクロファージは、造血起源であるが、血液循環には見られない。このマクロファージの集団は肺組織に特異的であり(34)、したがって、サンプルの妥当性を検証する手段として役立つ良い候補である。

30

喀痰サンプルの調製

【0152】

サンプルは、図10～図39に記載の分析用に調製される。簡単に言えば、喀痰サンプルを受領、処理、抗体標識し、1日目に色素標識を行う。サンプルはTCPPで処理し、2日目にフローサイトメトリーで分析する。図10～図39で分析された喀痰サンプルは、以下のように処理する。サンプルは、少なくとも1つのレーザ、又は少なくとも2つのレーザ、又は少なくとも3つのレーザ及び複数のチャネル、例えば5チャネル又は少なくとも5チャネルを有するがこれらに限定されないフローサイトメータで分析する。

40

喀痰の解離

【0153】

喀痰サンプルを秤量し、その重量に基づいて、解離試薬を以下のように添加する。1容量の0.5% NAC 溶液をサンプルに、4容量の0.10% DTT 溶液をサンプルに添加する。サンプルをボルテックスし、室温で撹拌する。その後、現在の総量に基づいて4容

50

量の 1 × ハンクス平衡塩溶液 (HBS) (喀痰 + NAC + DTT 溶液) を添加する。サンプルをろ過し、800 × g で 10 分間遠心分離する。上澄みを吸引し、サンプルサイズに応じてペレットを HBS で再懸濁する (例えば、小 (3 g 以下) サンプルに 250 μl HBS を添加、中 (3 g 超 8 g 以下) サンプルに 760 μl HBS を添加、大 (8 g 超) サンプルに 1460 μl HBS を添加) 。細胞収量の決定には 1 : 10 希釈液を使用する。

【 0 1 5 4 】

0 . 5 % N - アセチル - L - システイン (NAC) 溶液 : 0 . 8 5 g のクエン酸ナトリウム二水和物を 4 5 mL の ddH₂O、500 μL の 3 M NaOH、0 . 2 5 g NAC に添加し、溶解するまで攪拌する。pH 溶液を約 7 . 0 ~ 8 . 0 に調整し、ddH₂O で容量を 50 mL に調整する。

10

【 0 1 5 5 】

0 . 1 0 % ジチオスレイトール (DTT) 溶液 : 0 . 1 0 g の DTT を 100 mL の ddH₂O に添加し、溶解するまで攪拌する。溶液を 10 mL のアリコートに分割し、使用するまで - 20 で凍結 / 保存する。

【 0 1 5 6 】

1 mg / mL CyPath TCPP ストック溶液は次のとおりである。25 mL のイソプロパノールと 0 . 2 g の重炭酸ナトリウムとを 25 mL の ddH₂O に添加し、溶解するまで攪拌する。必要に応じて、溶液の pH を約 9 ~ 10 に調整する。0 . 0 5 g の TCPP を添加し、溶液を光から保護し、溶解するまで攪拌する。

20

【 0 1 5 7 】

表 4 は、カウント及び抗体標識のためにチューブに分注される細胞の μl を示す。

【 表 4 】

表 4 カウント及び抗体標識のためにチューブに分注される細胞の容量 (μL)

機能 :	サンプルサイズ		
	小 (≤ 3 g)	中 (> 3 ~ ≤ 8 g)	大 (> 8 g)
カウント	5	10	10
標識 :			
未染色のコントロール (# 4) *	20	50	50
アイソタイプコントロール (# 5) *	20	50	50
血液細胞分析 (# 6) *	115	350	725
上皮細胞分析 (# 7) *	115	350	725

30

* これらの番号はフローサイトメータのチューブ番号を示す

40

【 0 1 5 8 】

抗体 / FVS 標識

喀痰細胞は、表 4 に従って、表 5 で特定される試薬に分注され、この試薬は、解離した喀痰細胞を標識するための実験チューブ及びコントロールチューブを準備するために添加される。

【表 5】

表 5：標識試薬

マーカ	抗体	クロー ン	[ストック] (μ g/mL)	[最終] (μ g/mL)	希釈係数
生存率染色	固定可能な生存 率染色 (FVS510)	-	1000 X		
白血球	PE 抗 ヒ ト CD45 (IgG1)	H130	10	1	1:10
顆粒球	FITC 抗 ヒ ト CD66b (IgG1)	80H3	100	3	1:33
T細胞	Alexa488抗ヒト CD3 (IgG1)	UCHT1	200	2	1:100
B細胞	Alexa488抗ヒト CD19 (IgG1)	H1B19	200	2	1:100
マクロファージ	PE-CF594抗ヒト CD206 (IgG1)	19. 2	200	3	1:66. 7
上皮細胞	PE-CF594抗ヒト EpCAM (IgG1)	EBA-1	50	1	1:50
	Alexa488 抗 ヒ ト cyto- keratin (panCK)	C-11	500	4	1:125
panCK, CD3及ヒト CD19 アイソタ イプ	Alexa488 IgG1 κ	MOPC-21	200	4	1:50
CD66b アイソタイプ	FITC IgG1 κ	MOPC-21	50	3	1:16. 7
CD206/EpCAM ア イソタイプ	PE-CF594 IgG1 κ	X-40	200	3	1:66. 7
CompBead Plus	補正ビーズ	-	-	1 滴	
HBSS	-	-	1 X	-	
1% Flow-Fix PFA	-	-	1 %	1 %	

10

20

30

40

【 0 1 5 9 】

表 6、及び表 7、表 9：ビーズサイズ、フローサイトメータの補正、アイソタイプコントロール、喀痰バックグラウンド、及び処理された喀痰のサンプルは、記載のように調製される。

【表 6】

チューブ		Comp Bead Plus (+)	Comp Bead Plus (-)	抗 CD45 (μ L)	抗 CD66b (μ L)	抗CD3 (μ L)	抗CD19 (μ L)	抗CK (μ L)	抗CD206 (μ L)	抗EpCAM (μ L)	HBSS (μ L)	総量 (μ L)
#	名称											
1	PEビーズ	1 滴 *	1 滴	4							76	200
2	記入不要											
3	PE-CF594 ビーズ	1 滴	1 滴						4	4	72	200

表 6：機器設定用チューブ

* 1 滴 = 60 μ L

10

【表 7】

表 7：サンプル分析用チューブ

チューブ		略 痰 栓 重 量 (ステップ4)	細胞容 量 (μ L)	HBSS (μ L)	FVS510 (μ L)	抗体 (μ L)			
#	名称					抗CD4 5	PE-CF594 アイソタ イプ	Alexa488 アイソタ イプ	FITC ア イソタ イプ
4	未染色	小	20	80	-	-	-	-	-
		中	50	50					
		大	50	50					
5	アイソタイ プコントロ ール	小	20	59.9	0.6	10	1.5	2	6
		中	50	29.9	0.6				
		大	50	29.5	1				
6	CyPath アッセイ (血液細胞)					抗CD45	抗CD206	抗CD3	抗 CD19
		小	115	92.25	1.5	25	3.75	2.5	7.5
		中	350	64.5	3	50	7.5	5	15
		大	725	100	10	100	15	10	30
7	CyPath アッセイ (上皮細胞)					抗CD4 5	抗EpC AM	抗panCK	
		小	115	101.5	1.5	25	5	2	
		中	350	83	3	50	10	4	
		大	725	137	10	100	20	8	

20

30

【0160】

チューブ # 1 ~ # 7 を暗所で 35 分間インキュベートする。抗体のインキュベーション後、各チューブに冷 HBSS を充填し、上澄みを 800 x g で 10 分間 4 でスピンドウンする。上澄みを廃棄し、ペレットを以下のように再懸濁する。チューブ # 1 ~ # 3 に、0.5 mL の冷 HBSS をチューブに加え、フローサイトメトリーによるデータ取得まで 4 で氷上に保存する。チューブ # 4 及び # 5 に、2 mL の冷 1% PFA 固定液を添加する。チューブ # 6 及び # 7 に、10 mL の冷 1% PFA 固定液を添加する。ホイルで覆った氷上でチューブを 1 時間インキュベートする。固定インキュベーション後、各チューブに冷 HBSS を充填する。細胞を 1600 x g で 10 分間 4 でスピンドウンする。ペレットを乱さずに、できるだけ上澄みを吸引する。ペレットを残留液に再懸濁する。チューブ # 4 及び # 5 を 0.2 mL の冷 HBSS に再懸濁し、チューブ # 1 ~ # 3 とともに、フローサイトメトリーによるデータ取得まで 4 で氷上に保存する。チューブ # 6 及び # 7 について、次式に従って氷冷 HBSS を添加する。

40

各チューブの最終容量 (mL) = 0.15 * [総細胞 / 10⁶] (式 1)

【0161】

細胞 # については、トリパンブルーで 1:40 に希釈した細胞懸濁液から細胞数を取得

50

する。10 μ L の 1 : 40 希釈液を血球計算盤に加え、4つの大きな象限すべての細胞を数える。正確な細胞数は、象限ごとに 25 ~ 60 個の細胞を構成する。

【0162】

2日目にTCPP標識の準備ができるまで、チューブ#6及び#7は4 で氷上に一晚置く。

【表8】

表9：TCPP標識／機器試薬

試薬	会社
HBSS	Gibco
30 μ mNI STビーズ	Polysciences
20 μ mNI STビーズ	Polysciences
5 μ mNI STビーズ	Polysciences
Rainbowビーズ	Spherotech

10

【0163】

CyP athアッセイTCPPワーキング溶液は、冷HBSSを使用して20 μ g / mL TCPP溶液（ストックの1 : 50）として作成され、光から保護されている。FVS及びTCPP標識の未染色コントロールとして使用されるA549細胞を含むチューブ1本を入手する（チューブ#8）。FVS標識の補正チューブとして使用されるA549細胞を含むチューブ1本を入手する（チューブ#9）。TCPP標識の補正チューブとして使用されるA549細胞を含むチューブ1本を入手する（チューブ#10）。panCK標識の補正チューブとして使用されるA549細胞を含むチューブ1本を入手する（チューブ#11）。

20

TCPP 標識

【0164】

表10に従って、CyP athアッセイTCPPワーキング溶液の容量を添加する。

30

【表9】

表10：TCPP標識容量

チューブ#	細胞	TCPPワーキング溶液容量	実際に使用された容量
6	喀痰	式1で計算されたものと同じ容量	
7	喀痰	式1で計算されたものと同じ容量	
10	A549	300 μ L	300 μ L

40

【0165】

サンプルをTCPPで約1時間インキュベートし、チューブ#6、#7、及び#10に冷HBSSを充填し、1000 $\times$ gで15分間4 で遠心分離する。ペレットを乱さずに上澄みを吸引する。チューブ#6、#7、及び#10について、ペレットを冷HBSSで洗浄し、遠心分離ステップと洗浄ステップとを繰り返す。チューブ#6、#7、及び#10について、ペレットを残留液に再懸濁し、300 μ Lの冷HBSSをチューブ#10に添加し、総細胞数が20 $\times$ 10⁶ 個未満の場合、250 μ Lの冷HBSSをチューブ#6及び#7に添加し、15 mL コニカルチューブからフローサイトメトリーチューブ（それぞれ#6及び#7のラベルが付いた）に細胞を移す。

50

【 0 1 6 6 】

フローサイトメトリーデータ取得

以下の設定では、10,000 イベント/秒以下のフローサイトメトリー取得率が推奨される。

LSRIIで使用されるパラメータは次のとおりである。閾値、FSC電圧、SSC電圧、BV510電圧であって、この電圧は、BEC、PE電圧、FITC電圧、PE-TxRed電圧、及びAPC電圧を含むすべての細胞で確かめる必要がある。同等のフローサイトメータを使用してアッセイを最適化するために、当業者には、同じ又は同様の結果を達成するための好ましい設定が知られているであろう。

【 0 1 6 7 】

集団ゲートを決定する蛍光強度値の概要：

【表 1 0 】

血液：6ゲート

フルオロフォア	平均	範囲
集団 1 の設定		
FITC	600	200 - 1050
PE-CF594	500	200 - 750
集団 5 の設定		
FITC (集団 6 との境界)	3300	1,000 - 6,000
PE-CF594 (左の境界)	13,000	8,000 - 20,000

上皮：9ゲート

フルオロフォア	平均	範囲
集団 1 の設定		
FITC	250	90 - 500
PE-CF594	450	100 - 1,000
高発現のためのカットオフの設定		
FITC	14,200	10,000 - 30,000
PE-CF594	3,000	1,000 ~ 6,000 (=集団 1 を決定する PE-CF594 値の 10 ~ 20 × 値)

【 0 1 6 8 】

参照される設定はLSRII機器に特有であり、他のフローサイトメータによって異なり得るが、さまざまな機器を補正して同等の範囲を生成する方法は、当業者には明らかであることに留意されたい。

【 0 1 6 9 】

上記の例は肺癌検出の例示であるが、肺の他の疾患及び状態は、本明細書に開示されるシステム及び方法を用いて経時的に検出及び/又は監視することができる。例えば、被験者が喘息、COPD、インフルエンザ、慢性気管支炎、結核、嚢胞性線維症、肺炎、移植片対宿主病、喀痰などの肺疾患に関連する症状を発症又は悪化する傾向があると疑われる

場合、コントロール（非疾患）及び疾患サンプルプロファイルのデータベースと比較して、細胞集団の分布の変化について分析してもよい。

【0170】

明細書及び特許請求の範囲において、「約」又は「およそ」は、引用された数値の20パーセント（20%）以内を意味することに留意されたい。本明細書に開示されるすべてのコンピュータソフトウェアは、CD-ROM、DVD-ROM、ハードドライブ（ローカル又はネットワークストレージデバイス）、USBキー、他のリムーバブルドライブ、ROM及びファームウェアを含むがこれらに限定されない任意のコンピュータ可読媒体（媒体の組み合わせを含む）上に具現化され得る。

【0171】

少なくとも1つの実施形態において、当技術分野における通常の技術の1つによって容易に理解されるように、本発明による装置は、上記のステップを実施するコンピュータソフトウェアでプログラムされた汎用又は特定目的のコンピュータ又は分散システムを含み、このコンピュータソフトウェアは、C++、FORTRAN、BASIC、Java（登録商標）、アセンブリ言語、マイクロコード、分散プログラミング言語など、適切なコンピュータ言語であり得る。本装置はまた、様々なハードウェア実装において、複数のそのようなコンピュータ/分散システム（例えば、インターネット及び/又は1つ以上のイントラネットを介して接続されている）を含み得る。例えば、データ処理は、適切にプログラムされたマイクロプロセッサ、コンピューティングクラウド、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）などによって、適切なメモリ、ネットワーク、及びバス要素と組み合わせて実行され得る。フローサイトメータを移動するときに分析された細胞及び粒子から記録された多次元データが記録され、多次元光学特性に基づいて細胞集団の分析及び分画が可能になる。

【0172】

参考文献

1. National Lung Screening Trial Research Team, Church TR, Black WC, Aberle DR, Berg CD, Clingan KL, et al. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 May 23;368(21):1980-91.
2. Krantz SB, Meyers BF. Health risks from computed tomographic screening. *Thorac Surg Clin*. 2015 May;25(2):155-60.
3. Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of Plasma Genotyping Technologies in Non-Small Cell Lung Cancer: A Practical Review. *J Thorac Oncol*. 2017 Sep 1;12(9):1344-56.
4. Li T, Kung H-J, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and Genomic Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer: Implications for Current and Future Therapies. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1039-49.
5. The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM). A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 30;5(209):209ra153.
6. Speicher MR, Pantel K. Tumor signatures in the blood. *Nat Biotechnol*. 2014 May;32(5):441-3.
7. Stahl DL, Richard KM, Papadimos TJ. Complications of bronchoscopy: A concise synopsis. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2015;5(3):189-95.
8. Thunnissen FBJM. Sputum examination for early detection of lung cancer. *J Clin Pathol*. 2003 Nov;56(11):805-10.
9. Gao W, Keohavong P. Detection of point mutations of K-ras oncogene and p53 tumor-suppressor gene in sputum samples. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1105:325-44.
10. Li G, Guillaud M, LeRiche J, McWilliams A, Gazdar A, Lam S, et al. Automated Sputum Cytometry for Detection of Intraepithelial Neoplasias in the Lung. *Ana*

10

20

30

40

50

l Cell Pathol Amst. 2012;35(3):187-201.

1 1 . Osterloh J, Vicente M. Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors. J Porphyr Phthalocyaniones. 2002;6:305-24.

1 2 . Patriquin L, Merrick DT, Hill D, Holcomb RG, Lemieux ME, Bennett G, et al. Early Detection of Lung Cancer with Meso Tetra (4-Carboxyphenyl) Porphyrin-Labeled Sputum. J Thorac Oncol. 2015 Sep 1;10(9):1311-8.

1 3 . Wood DE. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines for Lung Cancer Screening. Thorac Surg Clin. 2015 May;25(2):185-97.

1 4 . Paszkiewicz GM, Timm EA, Mahoney MC, Wallace PK, Nasca MAS, Tammela TL, et al. Increased Human Buccal Cell Autofluorescence Is a Candidate Biomarker of Tobacco Smoking. Cancer Epidemiol Prev Biomark. 2008 Jan 1;17(1):239-44.

1 5 . Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. Eur Respir J. 1996 Jun 1;9(6):1174-80.

1 6 . Thomas H. Sputum: preparation and examination of Gram stained smears [Internet].

入手先：

https://www.uvmhealth.org/medcenter/Documents/8138Sputum_Gram_Stain.ppt

1 7 . Franks TJ, Colby TV, Travis WD, Tudor RM, Reynolds HY, Brody AR, et al. Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. Proc Am Thorac Soc. 2008 Sep 15;5(7):763-6.

1 8 . Korbelik M, Krosi G, Chaplin DJ. Photofrin Uptake by Murine Macrophages. Cancer Res. 1991 May 1;51(9):2251-5.

1 9 . Korbelik M, Krosi G, Olive PL, Chaplin DJ. Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. Br J Cancer. 1991 Sep;64(3):508-12.

2 0 . Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N. 1948 Aug;68(3):640.

2 1 . Rassmussen-Taxdal DS, Ward GE, Figge FHJ. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. Cancer. 1955 Jan 1;8(1):78-81.

2 2 . Altman KI, Salomon K. Localization of a halogenated porphyrin in mouse tumors. Nature. 1960 Sep 24;187:1124.

2 3 . Schupp J, Krebs FK, Zimmer N, Trzeciak E, Schuppan D, Tuettenberg A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. Cell Immunol [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2017 Nov 30];

入手先：

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874917301909>

2 4 . Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. Clin Transl Immunol. 2017 Sep 15;6(9):e154.

2 5 . Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. Br J Cancer. 2017 Aug 8;117(4):451-60.

2 6 . Murray PJ. Nonresolving macrophage-mediated inflammation in malignancy. FEBS J. :n/a-n/a.

2 7 . Brooks CR, van Dalen CJ, Hermans IF, Douwes J. Identifying leukocyte populations in fresh and cryopreserved sputum using flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2013 Mar 1;84B(2):104-13.

2 8 . Vidal S, Bellido-Casado J, Granel C, Crespo A, Plaza V, Juarez C. Flow cyt

ometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients. *Immunobiology*. 2012 Jul;217(7):692-7.

29 . Leckie MJ, Jenkins GR, Khan J, Smith SJ, Walker C, Barnes PJ, et al. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *Thorax*. 2003 Jan;58(1):23-9.

30 . Shiota Y, Matsumoto H, Hiyama J, Okamura M, Ono T, Mashiba H. Flow cytometric analysis of lymphocytes and lymphocyte subpopulations in induced sputum from patients with asthma. *Allergol Int*. 2000;49:125-33.

31 . Papanicolaou Society of Cytopathology Task Force, on Standards of Practice. Guidelines of the Papanicolaou Society of Cytopathology for the examination of cytologic specimens obtained from the respiratory tract. Papanicolaou Society of Cytopathology Task Force on Standards of Practice. *Diagn Cytopathol*. 1999 Jul;21(1):61-9.

10

32 . Freeman CM, Crudgington S, Stolberg VR, Brown JP, Sonstein J, Alexis NE, et al. Design of a multi-center immunophenotyping analysis of peripheral blood, sputum and bronchoalveolar lavage fluid in the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study (SPIROMICS). *J Transl Med*. 2015 Jan 27;13:19.

33 . Yu Y-RA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Jan;54(1):13-24.

20

34 . Desch AN, Gibbins SL, Goyal R, Kolde R, Bednarek J, Bruno T, et al. Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Mar 15;193(6):614-26.

35 . Patel VI, Booth JL, Duggan ES, Cate S, White VL, Hutchings D, et al. Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *J Immunol*. 2017 Feb 1;198(3):1183-201.

36 . Baharom F, Rankin G, Blomberg A, Smed-Soerensen A. Human Lung Mononuclear Phagocytes in Health and Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2017 Dec 13];8.

入手先 :

30

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410584/>

37 . Lay JC, Peden DB, Alexis NE. Flow cytometry of sputum: assessing inflammation and immune response elements in the bronchial airways. *Inhal Toxicol*. 2011 Jun;23(7):392-406.

38 . Erozan YS, Frost JK. Cytopathologic diagnosis of cancer in pulmonary material: a critical histopathologic correlation. *Acta Cytol*. 1970 Dec;14(9):560-5.

39 . Hinson KF, Kuper SW. THE DIAGNOSIS OF LUNG CANCER BY EXAMINATION OF SPUTUM. *Thorax*. 1963 Dec;18:350-3.

40 . Johnston WW, Bossen EH. Ten years of respiratory cytopathology at Duke University Medical Center.I. The cytopathologic diagnosis of lung cancer during the years 1970 to 1974, noting the significance of specimen number and type. *Acta Cytol*. 1981 Apr;25(2):103-7.

40

41 . Farber SM. Clinical appraisal of pulmonary cytology. *JAMA*. 1961 Feb 4;175:345-8.

42 . Ng AB, Horak GC. Factors significant in the diagnostic accuracy of lung cytology in bronchial washing and sputum samples.II. Sputum samples. *Acta Cytol*. 1983 Aug;27(4):397-402.

43 . Wheeler P R, Burkitt HG, Daniels V G. Functional histology. first edition. Norwich, England: Jarrold & Sons Ltd; 1979.

44 . Krombach F, Muenzing S, Allmeling AM, Gerlach JT, Behr J, Doerger M. Cell

50

size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. Environ Health Perspect. 1997 Sep;105 Suppl 5:1261-3.

45 .Kini SR. Color atlas of pulmonary cytopathology.Springer-Verlag New York, INc.; 2002. 301 p.

46 .Fillmore CM, Xu C, Desai PT, Berry JM, Rowbotham SP, Lin Y-J, et al. EZH2 inhibition sensitizes BRG1 and EGFR mutant lung tumors to TopoII inhibitors. Nature. 2015 Apr 9;520(7546):239-42.

【 0 1 7 3 】

本発明は、これらの実施形態を特に参照して詳細に説明されてきたが、他の実施形態は、同じ結果を達成することができる。本発明の変形及び改変は、当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲において、そのようなすべての改変及び同等物を網羅することを意図している。上記で引用されたすべての参考文献、出願、特許、及び刊行物の開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 図 1 A - B 】

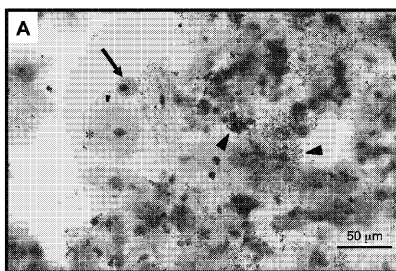


FIG. 1A

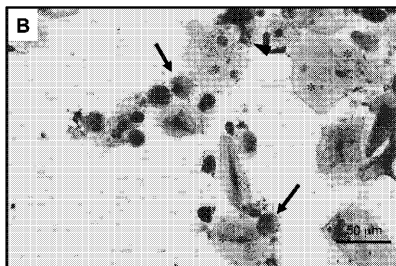
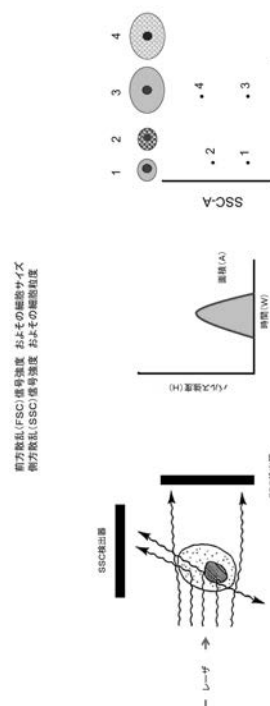
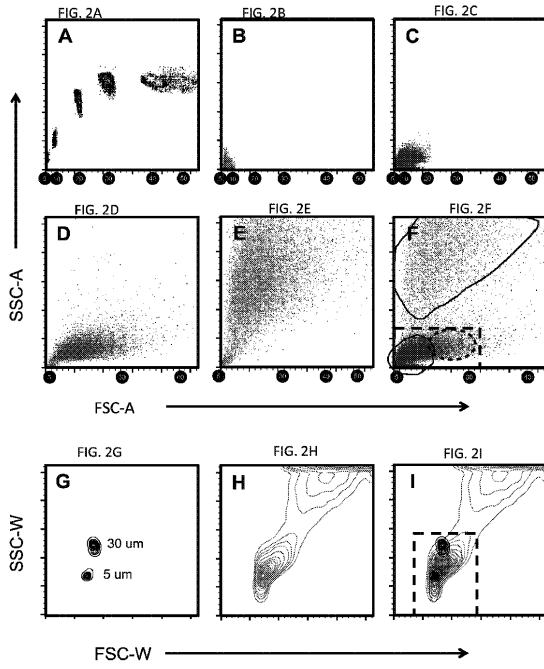


FIG. 1B

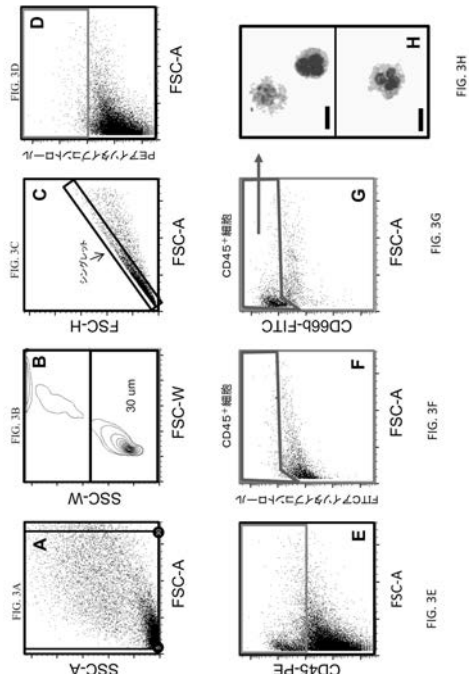
【 図 1 C - E 】



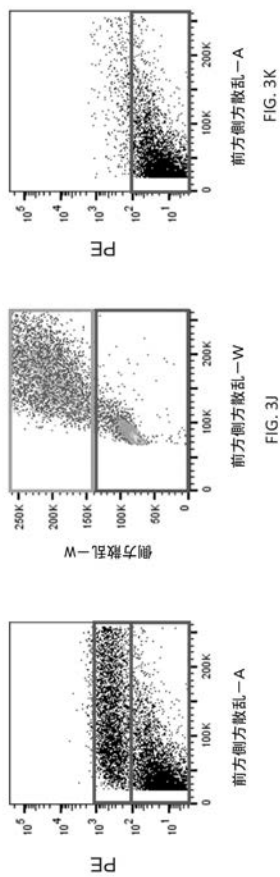
【図 2 A - 2 I】



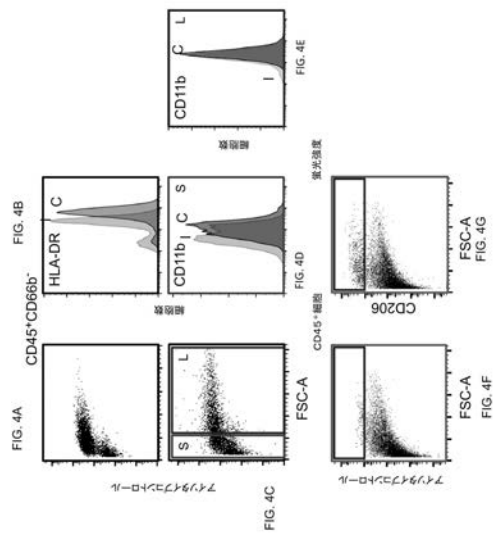
【図 3 A - H】



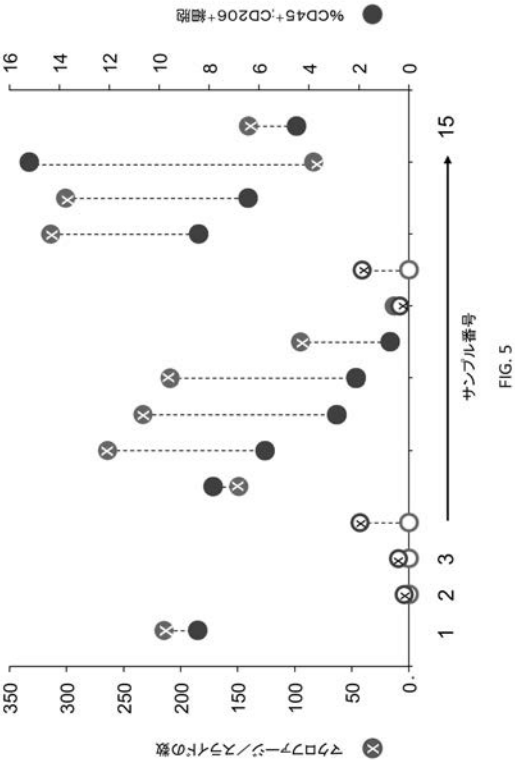
【図 3 I - K】



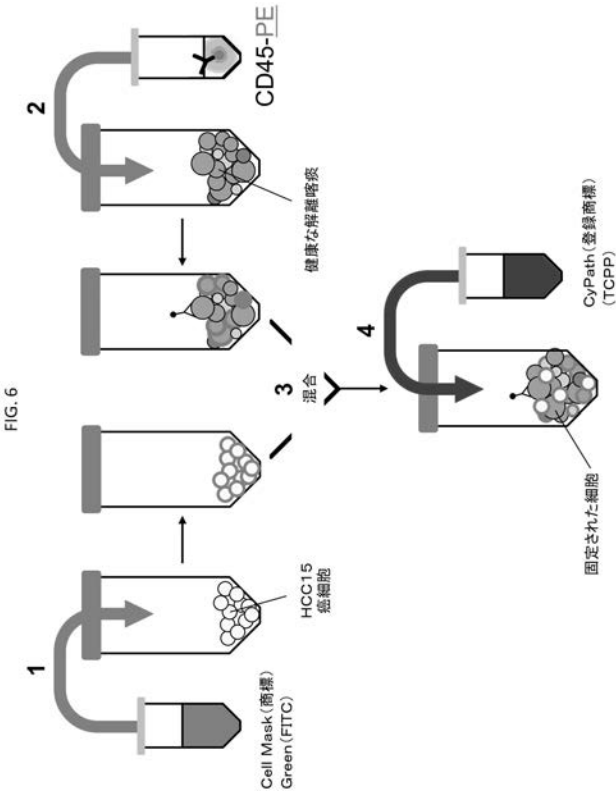
【図 4 A - G】



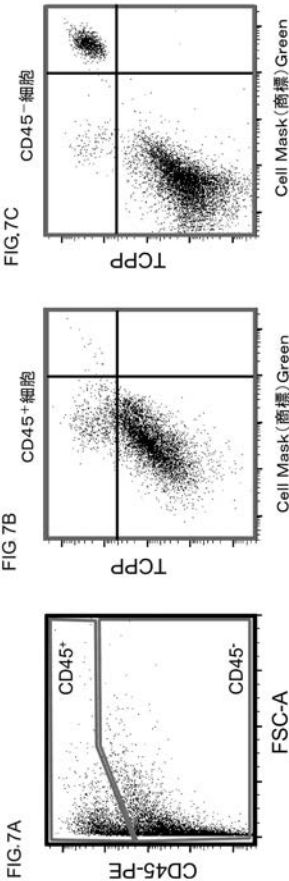
【 図 5 】



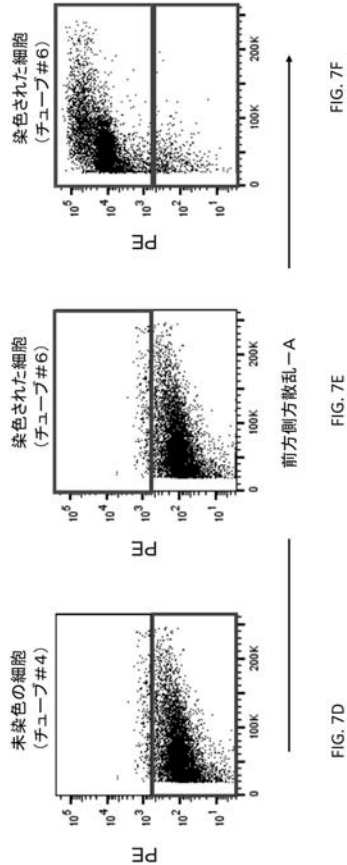
【 図 6 】



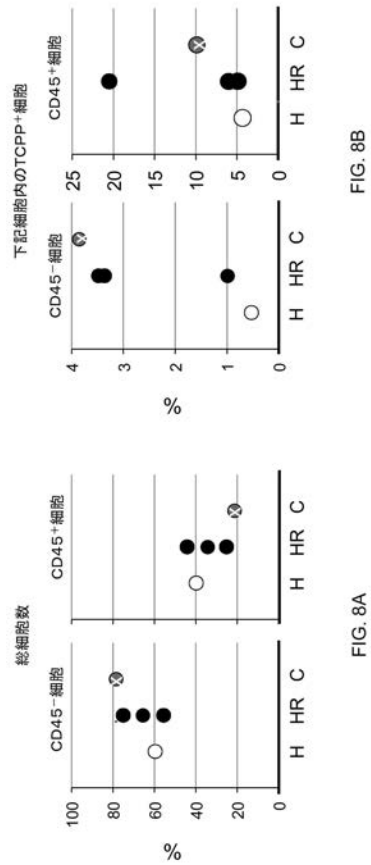
【 図 7 A - C 】



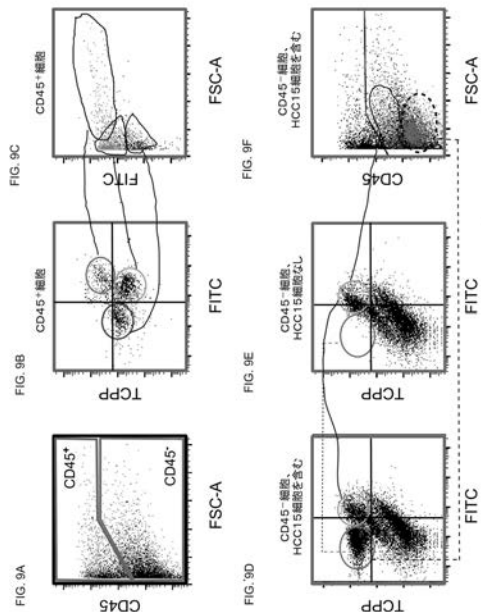
【 図 7 D - F 】



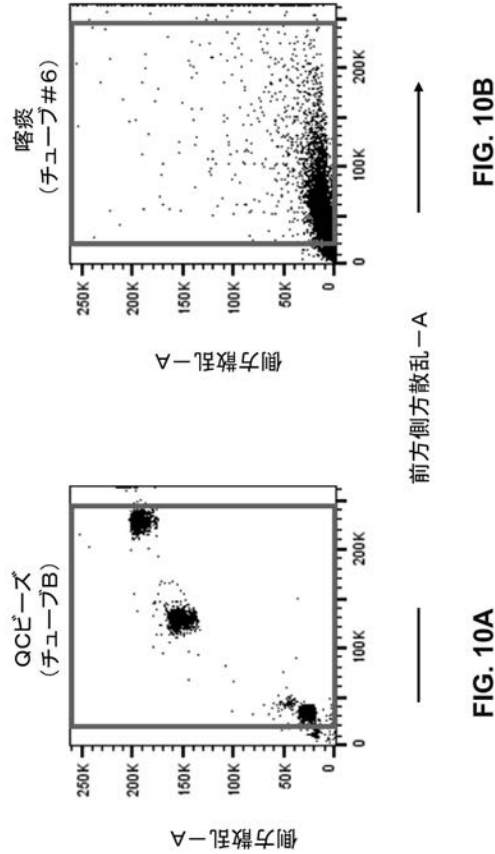
【図 8 A - B】



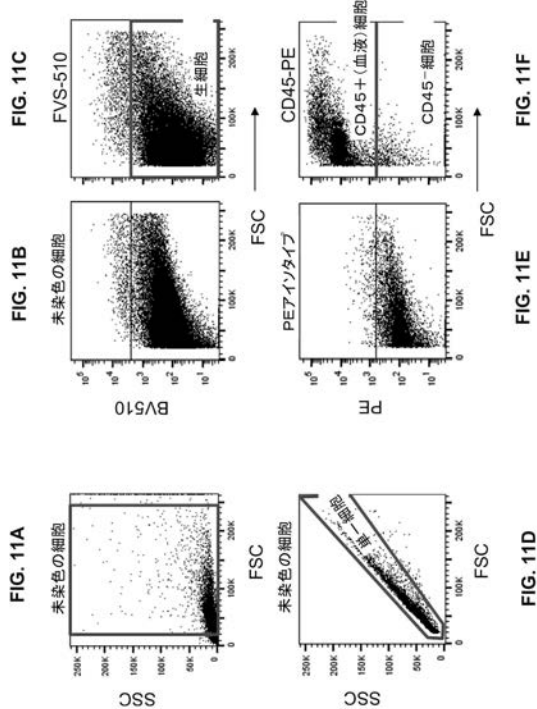
【図 9 A - F】



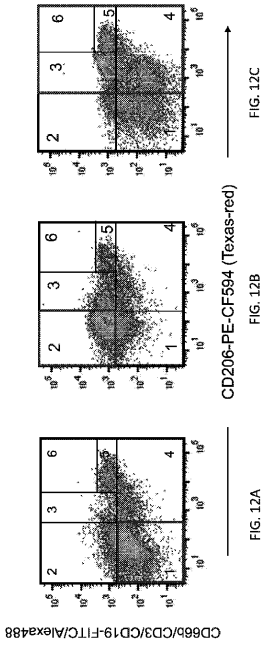
【図 10 A - B】



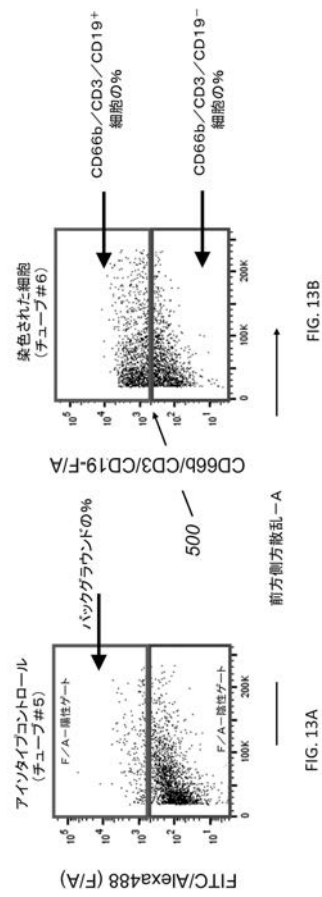
【図 11 A - F】



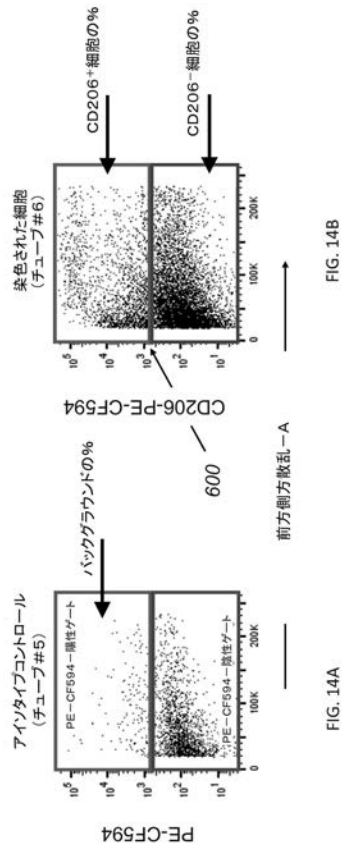
【図 12 A - 12 C】



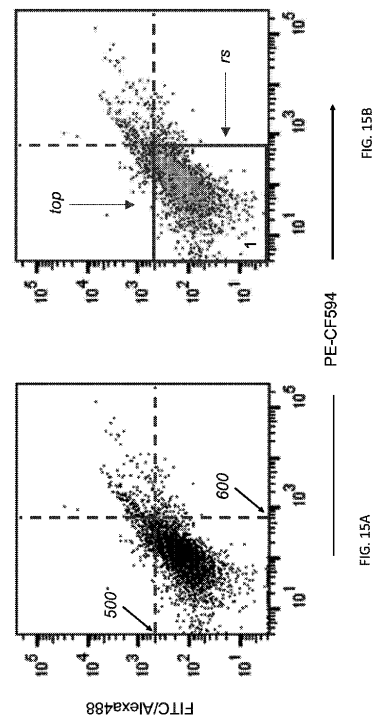
【図 13 A - B】



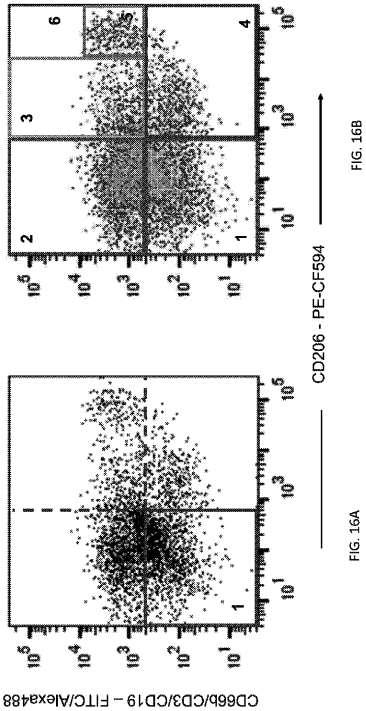
【図 14 A - B】



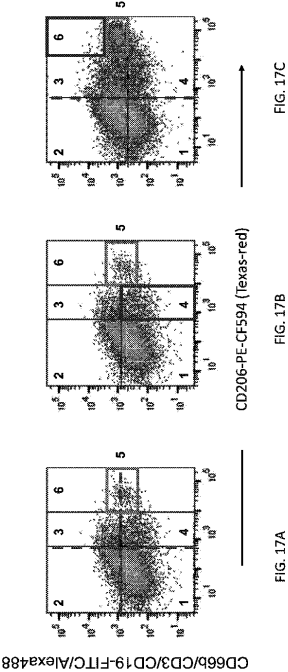
【図 15 A - 15 B】



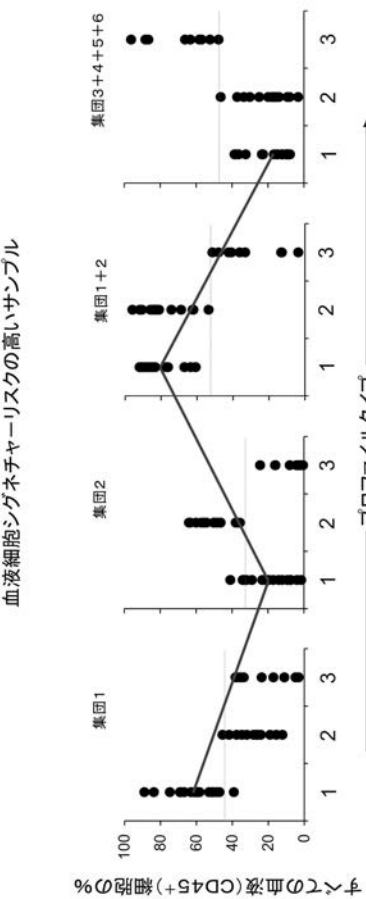
【図 16 A - 16 B】



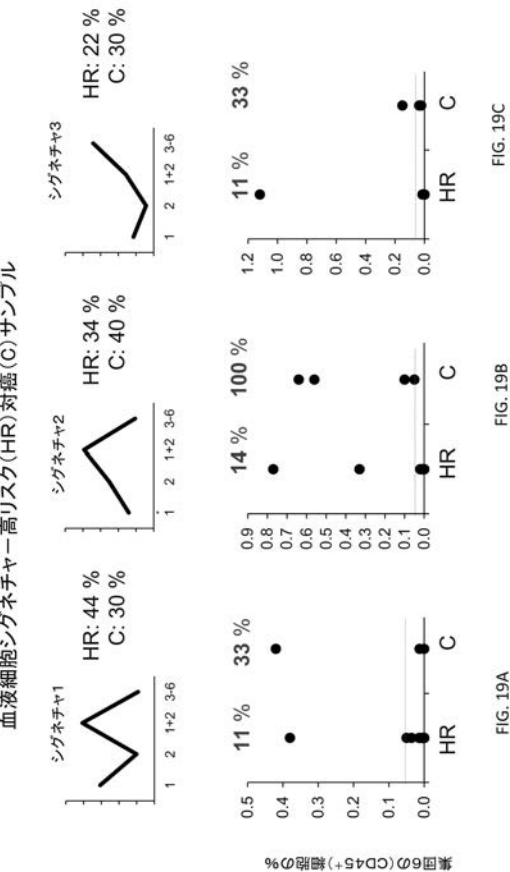
【図 17 A - 17 C】



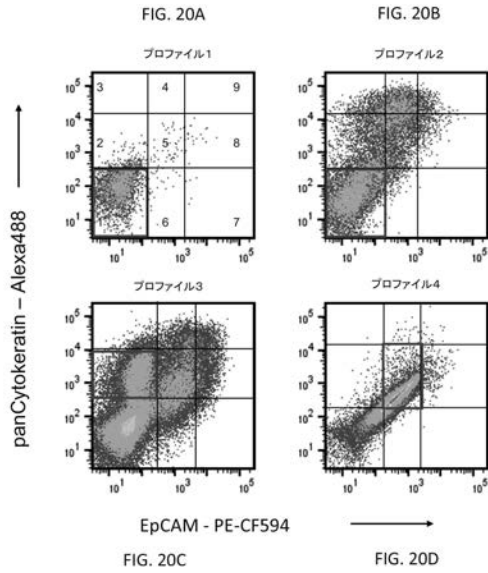
【図 18】



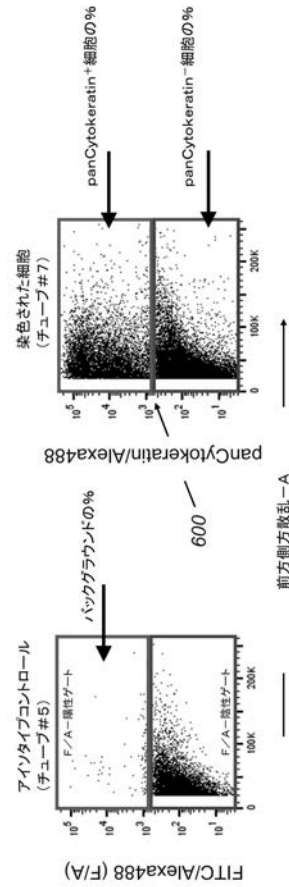
【図 19 A - C】



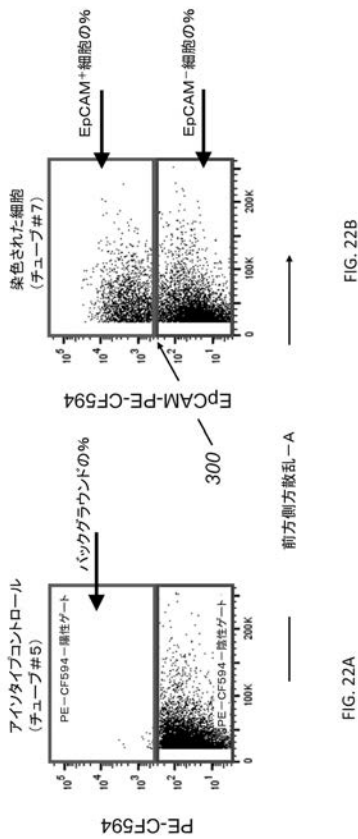
【図 20 A - D】



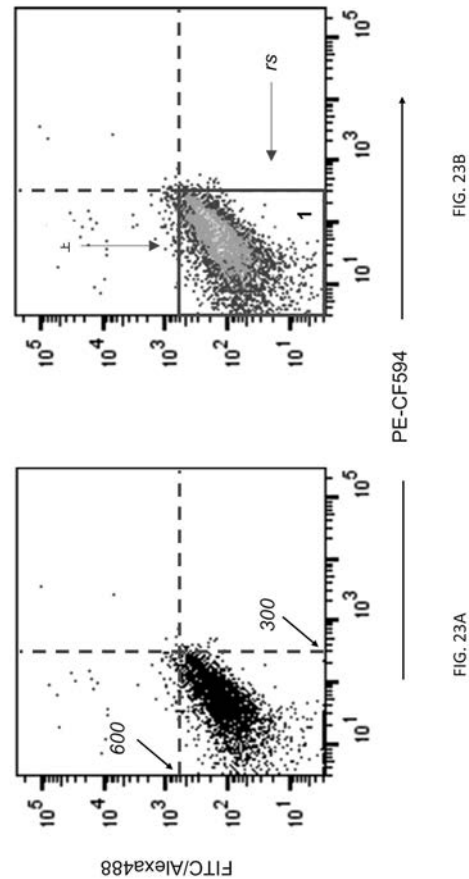
【図 21 A - B】



【図 22 A - B】



【図 23 A - B】



【図 24 A - B】

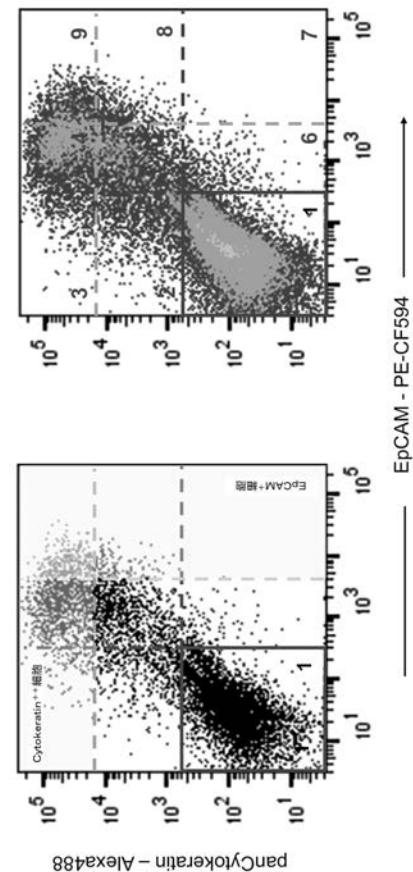


FIG. 24B

FIG. 24A

【図 26】

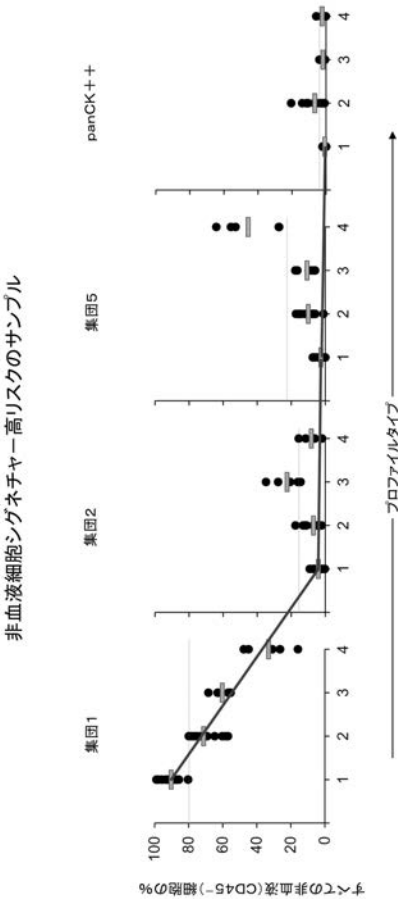


FIG. 26

【図 25】

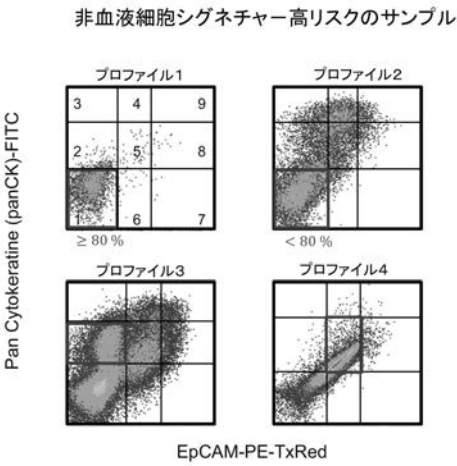


FIG. 25

【図 27】

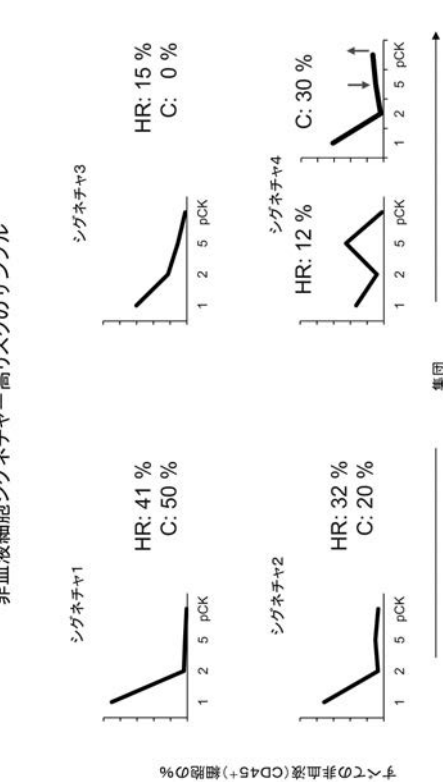
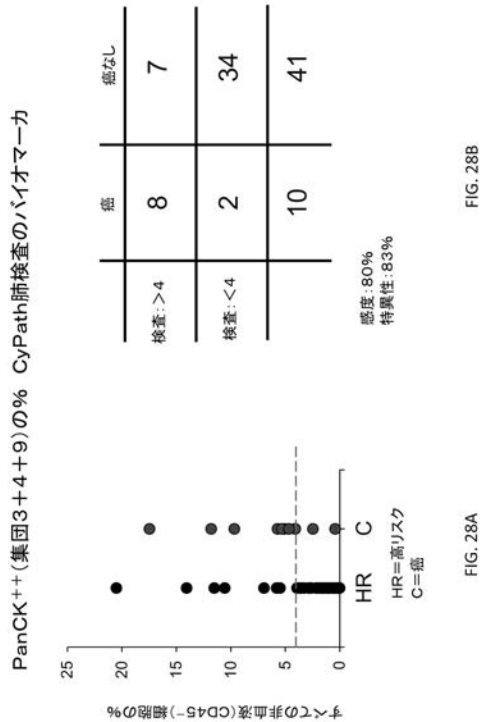
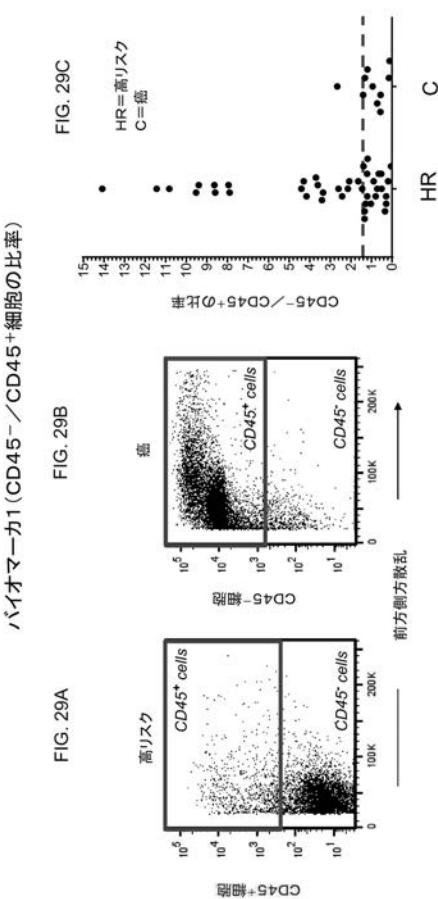


FIG. 27

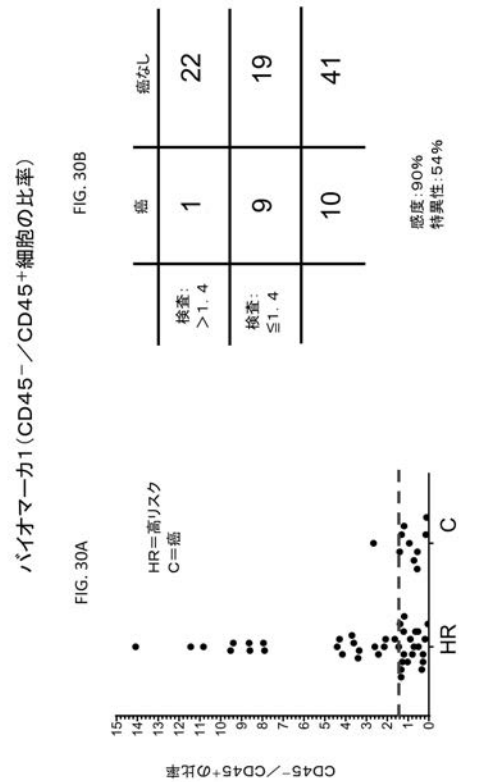
【 図 2 8 A - B 】



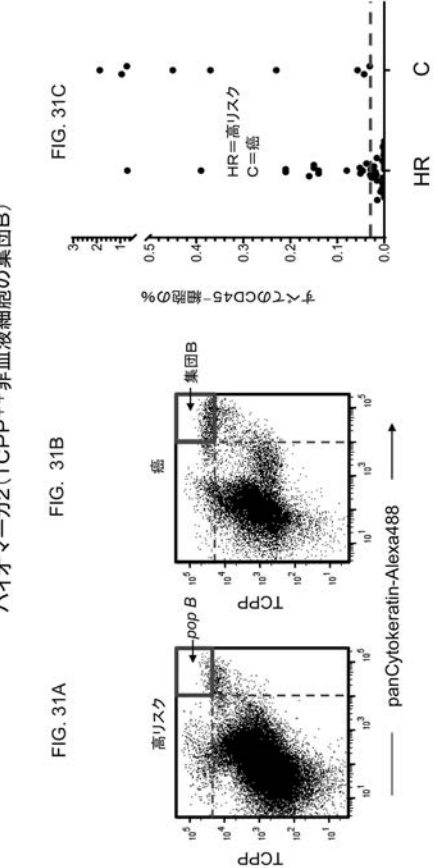
【 図 2 9 A - C 】



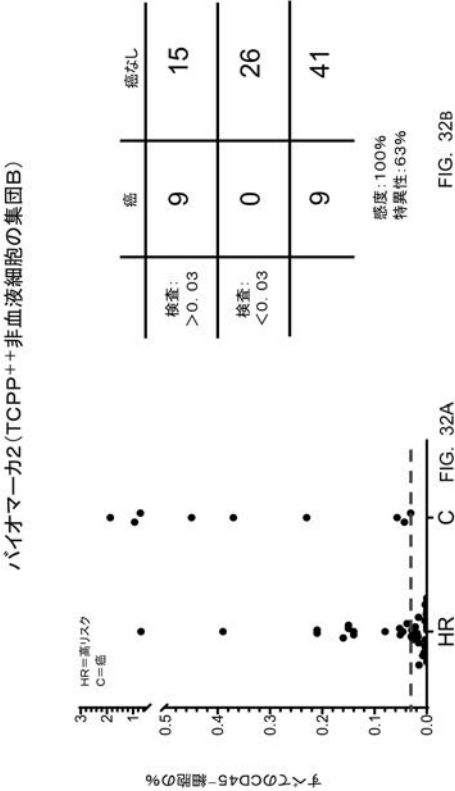
【 図 3 0 A - B 】



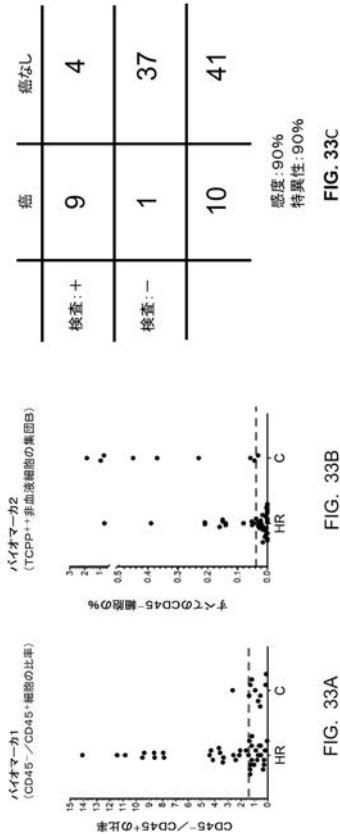
【 図 3 1 A - C 】



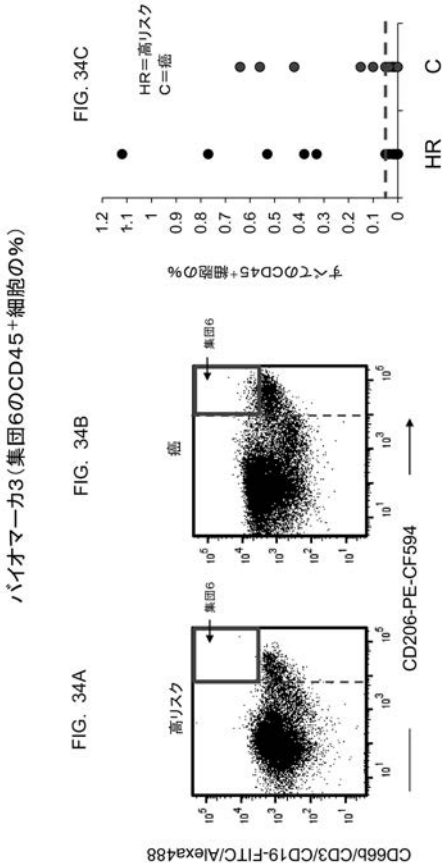
【 図 3 2 A - B 】



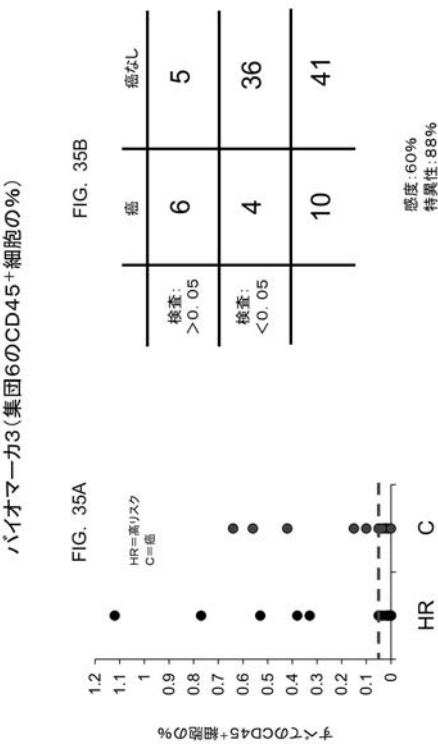
【 図 3 3 A - C 】



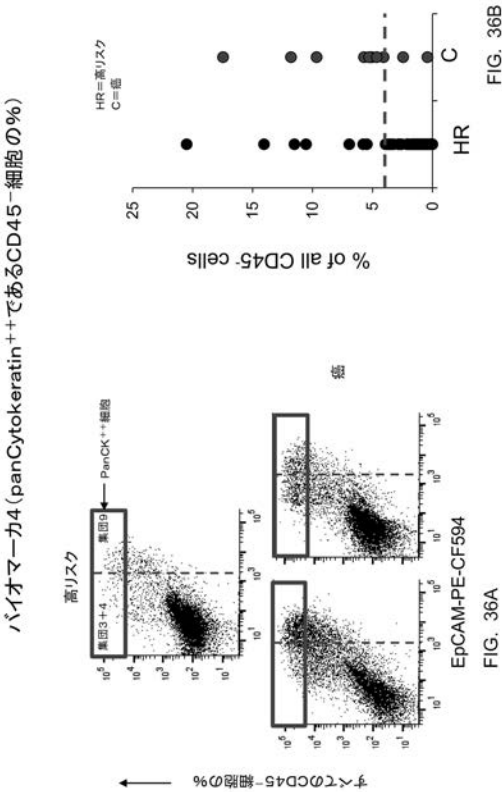
【 図 3 4 A - C 】



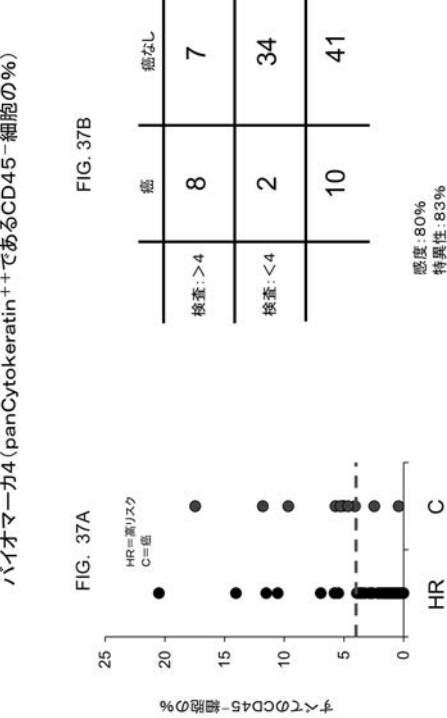
【 図 3 5 A - B 】



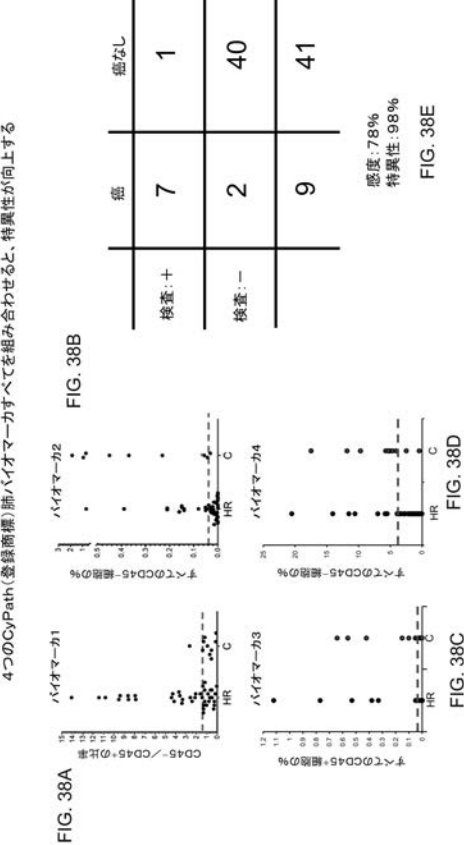
【図 36 A - B】



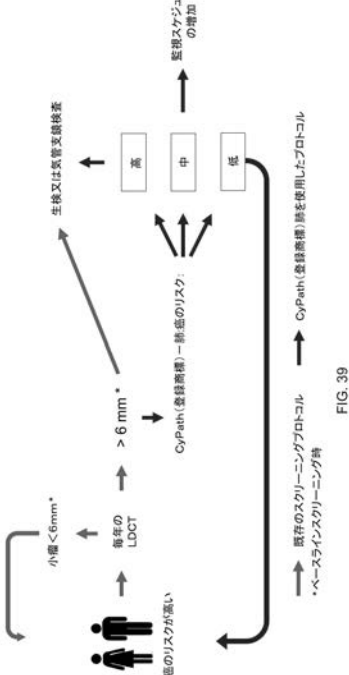
【図 37 A - B】



【図 38 A - E】



【図 39】



【 国際調査報告 】

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 5/078, 5/09; G01N 33/574, 33/483, 33/52, 21/64; C07K 16/28, 16/30 (2019.01)

CPC - C12N 5/0634, 5/0693, 5/0694; G01N 33/574, 33/57492, 33/52, 33/5091, 21/64, 21/6428; C07K 16/28, 16/30, 16/3023, 16/289, 16/2896

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)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0115121 A1 (GARWIN, J.) 22 August 2002; Table 2; abstract; paragraphs [0013]-[0014], [0016], [0022], [0024]-[0025], [0037]-[0038], [0046], [0049]-[0050], [0052], [0055]-[0056], [0143], [0147], [0154]-[0156]; claim 36.	1, 32, 35-41
Y		11-12, 17, 31, 34
A		5-10, 13-16, 18-22
D, Y	(PATRIQUIN, L et al.) Early Detection Of Lung Cancer With Meso Tetra (4-Carboxyphenyl) Porphyrin-Labeled Sputum. Journal of Thoracic Oncology. September 2015, Vol. 10, No. 9; pages 1-17; Table 2; abstract; page 2, fourth paragraph; page 4, first paragraph; page 4, fifth paragraph-page 5, first paragraph; page 5, fifth paragraph-page 6, second paragraph; page 7, fourth-fifth paragraphs; page 8, second-fourth paragraphs; page 9, first-third paragraphs; DOI: 10.1097/JTO.0000000000000627	1-4, 23-25, 33, 42-43, 45-50
A		5-10, 13-16, 20-22
Y	US 2011/0189670 A1 (KATZ, R. et al.) 4 August 2011; paragraphs [0011]-[0013], [0024], [0045], [0053], [0068], [0087], [0150], [0155], [0175], [0246]-[0247], [0249]-[0250], [0266], [0280], [0308]-[0309].	1-4, 23, 25, 33, 42-43, 45-50
A		5-10, 14-16, 18-22
D, Y	(YU, Y et al.) Flow Cytometric Analysis Of Myeloid Cells In Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 12 August 2015, Vol. 54, No. 1; pages 13-24; Figures 2, 5; abstract; page 14, first column, third paragraph-second column, second paragraph; page 14, third column, second paragraph; page 15, first column, first paragraph; page 15, first column, third paragraph-second column, second paragraph; page 19, third column, third paragraph-page 20, second column, first paragraph; Supp. Table 3; DOI: 10.1165/rcmb.2015-0146OC	1, 11-12, 24
A		13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

10 September 2019 (10.09.2019)

Date of mailing of the international search report

18 OCT 2019

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. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	(LU, Y et al.) Isolation And Characterization Of Living Circulating Tumor Cells In Patients By Immunomagnetic Negative Enrichment Coupled With Flow Cytometry. Cancer. 6 May 2015, Vol. 121; pages 3036-3045; abstract; page 3038, first column, second paragraph-second column, first paragraph; page 3040, first column, second paragraph-second column, first paragraph; page 3043, first column, fourth paragraph-second column, second paragraph; DOI: 10.1002/cncr.29444	17 — 18-19
Y	(ZHANG, C et al.) Noninvasive Imaging Of CD206-Positive M2 Macrophages As An Early Biomarker For Post-Chemotherapy Tumor Relapse And Lymph Node Metastasis. Theranostics. 26 September 2017, Vol. 7, No. 7; pages 4276-4288; abstract; page 4278, first column, third paragraph; page 4279, second column, first paragraph-page 4280, first column, first paragraph; page 4283, first column, second paragraph-second column, second paragraph; DOI: 10.7150/thno.20999	31
Y	(SKIRECKI, T et al.) Flow Cytometric Analysis Of CD133- and EpCAM-Positive Cells In The Peripheral Blood Of Patients With Lung Cancer. 20 August 2013, Vol. 62; pages 67-75; abstract; page 68, first column, third paragraph-second column, first paragraph; page 68, second column, seventh paragraph-page 69, second column, first paragraph; page 72, second column, second-third paragraphs; page 74, first column, third paragraph; DOI: 10.1007/s00005-013-0250-1	34
Y	(HOSOKAWA, M et al.) Size-Based Isolation Of Circulating Tumor Cells In Lung Cancer Patients Using A Microcavity Array System. PLoS ONE. 28 June 2013, Vol. 8, No. 6; pages 1-9; Table 1; page 6, second column, third paragraph; DOI: 10.1371/journal.pone.0067466	23
A	(MAESTRE-BATLLE, D et al.) Novel Flow Cytometry Approach To Identify Bronchial Epithelial Cells From Healthy Human Airways. Scientific Reports. 6 February 2017, Vol. 7, No. 42214; pages 1-9; abstract; page 2, sixth paragraph-page 3, third paragraph; page 3, eighth paragraph; DOI: 10.1038/srep42214	5-10, 14-16, 20-22
D, A	(FREEMAN, C et al.) Design Of A Multi-Center Immunophenotyping Analysis Of Peripheral Blood, Sputum And Bronchoalveolar Lavage Fluid In The Subpopulations And Intermediate Outcome Measures In COPD Study (SPIROMICS). Journal of Translational Medicine. 27 January 2015, Vol. 13; pages 1-17; DOI: 10.1186/s12967-014-0374-z	1-25, 31-43, 45-50

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-25 (each in-part), 31-42 (each in-part), 43, and 45-50; probes CD45, CD26, TCPP, Pancytokeratin, and EpCam
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

-***-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention is Lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-41, 45-50, a labeled CD45 antibody probe that binds a biomarker on a white blood cell population (probe) are directed toward methods and reagent compositions for predicting the likelihood of lung disease in a subject.

The methods and compositions will be searched to the extent they encompass a labeled CD45 antibody probe that binds a biomarker on a white blood cell population (first exemplary probe). Applicant is invited to elect additional specific probe(s), to be searched. Additional probe(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-4 (each in-part), 23-25 (each in-part), 35-41 (each in-part), and 45-49 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a labeled CD45 antibody probe that binds a biomarker on a white blood cell population (probe). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected probe(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a CD66B antibody granulocyte probe (probe).

Groups II+, Claims 42-44, a composition encompassing a fluorochrome-conjugated antibody directed against EpCAM (labeled antibody), and a fluorochrome-conjugated antibody directed against CD45 (labeled antibody) are directed toward reagent compositions.

The reagent compositions can be searched to the extent they encompass at least one of: a fluorochrome-conjugated antibody directed against EpCAM (first exemplary labeled antibody), and a fluorochrome-conjugated antibody directed against CD45 (second exemplary labeled antibody). Applicant is invited to elect additional labeled antibody(ies) with specified binding targets thereof, to be searched, where available as an option within at least one searchable claim. Additional labeled antibody(ies) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 42-44 (each in-part), encompass this first named invention of Groups II+ and thus these claims can be searched with payment of a fee for the search of Groups II+, to the extent that they encompass at least one of: a fluorochrome-conjugated antibody directed against EpCAM (labeled antibody), and a fluorochrome-conjugated antibody directed against CD45 (labeled antibody). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups II+ to be searched/examined. An exemplary election would be a fluorochrome-conjugated antibody directed against pancytokeratin (labeled antibody).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a method of predicting the likelihood of lung disease, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include a reagent composition comprising TCPP and at least one fluorochrome-conjugated antibody, not present in any of Groups I+.

[It should be noted that, should applicant elect for a search of Groups II+, the probes present in the first embodiment of Groups II+, TCPP, and the fluorochrome-conjugated antibody to EpCAM, would also be searched in Groups I+ without the requirement for a further additional invention election payment. Further, other additionally elected probe(s) encompassing fluorochrome-conjugated antibody(ies) that are shared by both groups would (should applicant elect for a search of Groups II+) would also be searched in both groups with the corresponding payment of a further additional elected invention fee for each additionally elected fluorochrome-conjugated antibody.]

Groups I+ share the technical features including the features of independent claims 1 and 45 of the application, as follows:

1, a method of predicting the likelihood of lung disease in a subject, said method comprising the steps of: labeling an ex-vivo sputum sample with one or more of the following: i) a first labeled probe that binds a biomarker expressed on a white blood cell population of sputum cells; ii) a second labeled probe selected from the group consisting of: a granulocyte probe that binds a biomarker expressed on a granulocyte cell population of sputum cells, a T-cell probe that binds a biomarker expressed on a T-cell population of sputum cells, a B-cell probe that binds a biomarker expressed on a B-cell population of sputum cells, or any combination thereof; iii) a third labeled probe that binds a biomarker on a macrophage cell population; iv) a fourth labeled probe that binds to a disease related cell in the sputum sample; v) a fifth labeled probe that binds to a biomarker expressed on an epithelial cell population of sputum cells; vi) a sixth labeled probe that binds to a cell surface biomarker expressed on an epithelial cell population of sputum cells; flow cytometrically analyzing the labelled sputum sample to obtain data comprising per cell cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the i)-vi) labeled probes; and detecting from the per cell data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the per cell labelled data.

45. A method of predicting the likelihood of lung disease in a subject, said method comprising the steps of: labeling an ex-vivo sputum sample with i) a labeled probe that binds to a disease related cell in the sputum sample and ii) one or more fluorochrome-conjugated probes directed against a sputum cell's markers; and flow cytometrically analyzing the labelled sputum sample to obtain data comprising per cell cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the i)-ii) labeled probes; and detecting from the per cell data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of i) and ii) in the per cell labelled data.

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

However, Claim 1 lacks novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2003/0190602 A1 to Pressman et al. (hereinafter 'Pressman')

As per Claim 1, Pressman discloses: a method of predicting the likelihood of lung disease in a subject (a method of detecting lung cancer in a subject using a panel with a positive predictive value (a method of predicting the likelihood of lung disease in a subject); paragraphs [0037], [0070], [0099]), said method comprising the steps of: labeling an ex-vivo sputum sample (said method comprising the steps of: contacting a sputum sample with one or more labeled probes (labeling an ex-vivo sputum sample); paragraphs [0037], [0057], [0077]) with a labeled probe that binds to a disease related cell in the sputum sample (a labeled probe that binds to a cancer (a disease related) cell in the sputum sample; paragraphs [0034], [0077]); and a labeled probe that binds to a biomarker expressed on an epithelial cell population of sputum cells (a labeled probe that binds to human epithelial related antigen [HERA] (a biomarker expressed on an epithelial cell) population of sputum cells); paragraphs [0062], [0077]); flow cytometrically analyzing the labelled sputum sample (flow cytometrically analyzing the labelled sputum sample; paragraphs [0010], [0060], [0077]) to obtain data comprising cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the labeled probes (to obtain data comprising cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the labeled probes; paragraph [0322]; mean AUC); and detecting from the data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the data (detecting from the data the probability (likelihood) of lung cancer (disease) in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the data); paragraphs [0019], [0405]).

Claim 45 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Pressman in view of the article 'Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS - Part III - Analytical Issues' by Tanqri et al. (hereinafter 'Tanqri').

As per Claim 45, Pressman discloses a method of predicting the likelihood of lung disease in a subject (a method of detecting lung cancer in a subject using a panel with a positive predictive value (a method of predicting the likelihood of lung disease in a subject); paragraphs [0037], [0070], [0099]), said method comprising the steps of: labeling an ex-vivo sputum sample (said method comprising the steps of: contacting a sputum sample with one or more labeled probes (labeling an ex-vivo sputum sample); paragraphs [0037], [0057], [0077]) with a labeled probe that binds to a disease related cell in the sputum sample (a labeled probe that binds to a cancer (a disease related) cell in the sputum sample; paragraphs [0034], [0077]); one or more fluorochrome-conjugated probes directed against a sputum cell's markers (a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof directed against a cytokeratin or pancytokeratin marker (one or more fluorochrome-conjugated probes directed against a sputum cell's markers); paragraphs [0060], [0077], [0081], [0171], [0191], [0825], [0999]); and (flow cytometrically analyzing the labelled sputum sample; paragraphs [0010], [0060], [0077]) to obtain data comprising cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the labeled probes (to obtain data comprising cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the labeled probes; paragraph [0322]; mean AUC); and detecting from the data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the data (detecting from the data the probability (likelihood) of lung cancer (disease) in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the data); paragraphs [0019], [0405]) comprising per cell cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the i)-ii) labeled probes; and detecting from the per cell data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the per cell labelled data. Pressman does not disclose: per cell cytometric data based upon a mean fluorescent signature of any of the labeled probes; and detecting from the per cell data the likelihood of lung disease in a subject based upon a profile of a presence or absence of labeled probes in the per cell labelled data. Tanqri discloses wherein clinical diagnostic assays (clinical diagnostic assays; abstract) using flow cytometers (using flow cytometers; page 291, first column, first paragraph) should be calibrated to enable measurement of data including antibodies bound per cell (should be calibrated to enable measurement of data including antibodies bound per cell; page 291, second column, second paragraph; page 297, first column, second paragraph), as well as distinguishing populations in a mixture based on a difference in mean signal intensity (as well as distinguishing populations in a mixture based on a difference in mean signal intensity; page 292, second column, second paragraph). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have specified the calibration and population distinguishing procedures disclosed by Tanqri in order to enable the flow cytometric analysis of the sputum sample by obtaining per cell cytometric data based upon the mean fluorescent signature of the antibody probes attached to the specific cell types in order to enable the detection of the cells and the determination of the likelihood that the subject has lung cancer, based on the disclosure of Pressman.

Groups II+ share the technical features of Claims 42-44 of the application, as follows:

42. A first reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease, wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome; ii) a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof directed against cell's markers selected from EpCAM, and/or panCytokeratin, iii) a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof directed against cell's markers selected from CD45, CD206, CD3, CD19, CD66b or any combination thereof.

43. A reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease, wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome; ii) fluorochrome-conjugated antibodies or fragments thereof directed against the following cell's markers: EpCAM and/or panCytokeratin, and iii) a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof directed against CD45.

44. A reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease, wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome; and fluorochrome-conjugated antibodies or fragments thereof directed against one or more of the following cell's markers: CD45, CD206, CD3, CD19, and CD66bc

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

PCT/US2019/027550 18.10.2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/27550

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

Claims 42-44 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Pressman in view of bioAffinity, as above, further in view of US 2011/0189670 A1 to Katz et al. (hereinafter 'Katz').

Claim 42 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Pressman in view of US 2015/0160197 A1 to bioAffinity Technologies, Inc. (hereinafter 'bioAffinity').

As per claim 42, Pressman discloses a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject (a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject; paragraphs [0010], [0037], [0060], [0077], [0081]) to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease (to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease; paragraphs [0077], [0124]), wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof (wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof; paragraphs [0060], [0077], [0081], [0171]) directed against a Cytokeratin (cytokeratin 7 or 20; paragraphs [0191], [0825]) or pancytokeratin cell marker (pancytokeratin (cell marker); paragraph [0999]). Pressman does not disclose wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome, and iii) a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof that binds to CD45. bioAffinity discloses labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic (labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic; abstract). Katz discloses detection and staging of lung cancer cells (detection and staging of lung cancer cells; paragraph [0024]) in a sputum sample (in a sputum sample; paragraph [0246]) using a CD45 binding agent (using a CD45 binding agent; abstract, paragraph [0011]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have included the use of a reagent composition comprising TCPP as a cell stain for potentially carcinomic cells in a sputum sample from a subject, as disclosed by bioAffinity, in order to detect said cells by flow cytometry and determine the presence of lung cancer in the subject thereby. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have used binding agents for additional markers, such as CD45, as disclosed by Katz, to better determine the stage of the cancer.

As per Claim 43, Pressman discloses a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject (a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject; paragraphs [0010], [0037], [0060], [0077], [0081]) to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease (to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease; paragraphs [0077], [0124]), wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof (wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof; paragraphs [0060], [0077], [0081], [0171]) directed against a Cytokeratin (cytokeratin 7 or 20; paragraphs [0191], [0825]) or pancytokeratin cell marker (pancytokeratin (cell marker); paragraph [0999]). Pressman does not disclose wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome, and iii) a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof that binds to CD45. bioAffinity discloses labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic (labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic; abstract). Katz discloses detection and staging of lung cancer cells (detection and staging of lung cancer cells; paragraph [0024]) in a sputum sample (in a sputum sample; paragraph [0246]) using a CD45 binding agent (using a CD45 binding agent; abstract, paragraph [0011]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have included the use of a reagent composition comprising TCPP as a cell stain for potentially carcinomic cells in a sputum sample from a subject, as disclosed by bioAffinity, in order to detect said cells by flow cytometry and determine the presence of lung cancer in the subject thereby. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have used binding agents for additional markers, such as CD45, as disclosed by Katz, to better determine the stage of the cancer.

As per Claim 44, Pressman discloses a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject (a reagent composition for flow cytometric phenotyping of sputum cells from a sputum sample of a subject; paragraphs [0010], [0037], [0060], [0077], [0081]) to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease (to identify one or more biomarkers within the population of cells that are associated with a likelihood of lung disease; paragraphs [0077], [0124]), wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof (wherein the reagent composition comprises: a fluorochrome-conjugated antibody or fragment thereof; paragraphs [0060], [0077], [0081], [0171]) directed against a Cytokeratin (cytokeratin 7 or 20; paragraphs [0191], [0825]) or pancytokeratin cell marker (pancytokeratin (cell marker); paragraph [0999]). Pressman does not disclose wherein the reagent composition comprises: i) a tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) fluorochrome, and iii) CD45. bioAffinity discloses labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic (labeling a sputum sample with TCPP to stain cells suspected of being dysplastic or carcinomic; abstract). Katz discloses detection and staging of lung cancer cells (detection and staging of lung cancer cells; paragraph [0024]) in a sputum sample (in a sputum sample; paragraph [0246]) using a CD45 binding agent (using a CD45 binding agent; abstract, paragraph [0011]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have included the use of a reagent composition comprising TCPP as a cell stain for potentially carcinomic cells in a sputum sample from a subject, as disclosed by bioAffinity, in order to detect said cells by flow cytometry and determine the presence of lung cancer in the subject thereby. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Pressman to have used binding agents for additional markers, such as CD45, as disclosed by Katz, to better determine the stage of the cancer.

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Pressman, Tanqri, bioAffinity and Katz references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(81)指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72)発明者 レベル, ヴィヴィアン, アイ.

アメリカ合衆国 テキサス州 78257, サン アントニオ, スイート 1206, ウェスト
インターステート 10 22211

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB08 DA36 FA37

2G054 AA03 AA08 AB05 BB05 CA23 CE02 EA03 GA03 GA04 GA05
GB01