

(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2005-501236

(P2005-501236A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/48

F I

G O 1 N 33/48

K

テーマコード (参考)

2 G O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2003-523608 (P2003-523608)	(71) 出願人	399012963 イムニベスト・コーポレイション IMMUNIVEST CORPORATION アメリカ合衆国19899デラウェア州 ウィルミントン、ピー・オー・ボックス8 985、ノース・マーケット・ストリート 1105番、スウィート1300
(86) (22) 出願日	平成14年8月23日 (2002.8.23)		
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月23日 (2004.2.23)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/026867		
(87) 国際公開番号	W02003/018757		
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)		
(31) 優先権主張番号	60/314, 151	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成13年8月23日 (2001.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106231 弁理士 矢野 正樹
(31) 優先権主張番号	60/369, 628		
(32) 優先日	平成14年4月3日 (2002.4.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

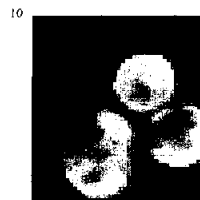
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析用の細胞および生物学的検体の安定化

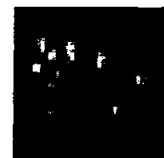
(57) 【要約】

血液検体中の稀な細胞を安定化させ、血液検体の品質を維持し、および細胞固定剤としても働く組成物および方法を開示し、これは、標的細胞（例えば、循環腫瘍細胞）の喪失、および標的細胞、非一標的細胞および血漿成分からのデブリスおよび凝集体の形成を最小化し、それにより、循環腫瘍細胞（CTC）および、究極的には、癌患者における腫瘍負荷のより正確な分析および分類を可能とする。検体の安定化は、癌患者から吸い取った血液検体からの稀な細胞の豊富化を必要とするプロトコルにおいて特に望ましい。例えば、通常の処理、混合、震盪、血液輸送による遅延で遭遇する潜在的にストレスのかかる条件へのそのような検体の暴露は、CTCの数を減少させるのみならず、もし存在すれば、標的細胞の正確な計数に干渉することが見出されている血液検体中でデブリスおよび凝集体を発生させないことが観察された。安定化剤は、イン・ビボCTC崩壊およびイン・ビトロ試料劣化の間を区別するのに必要である。

a. Intact CTC



b. Suspect CTC

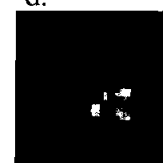


Not Assigned Events

c.



d.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 抗凝固剤、および
b. 安定化剤；
よりなる生物学的検体を保存するための組成物。

【請求項 2】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸（DCTA）、およびエチレンビス（オキシエチレンニトリロ）四酢酸（EGTA）よりなる群から選択される請求項 2 記載の組成物。 10

【請求項 4】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 4 記載の組成物。

【請求項 6】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 6 記載の組成物。 20

【請求項 8】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 9】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールよりなる群から選択される請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】

該安定化剤が少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わせたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 1 記載の組成物。 30

【請求項 11】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1000 ないし約 35000 の範囲にある請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 12 記載の組成物。 40

【請求項 15】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 12 記載の組成物。

【請求項 16】

- a. 抗凝固剤、および
b. 安定化剤；
よりなる循環腫瘍細胞を含むことが疑われる血液試料を保存するための組成物。

【請求項 17】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 16 記載の組成物。

【請求項 18】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (DCTA)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (EGTA) よりなる群から選択される請求項 17 記載の組成物。

【請求項 19】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 16 記載の組成物。

【請求項 20】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 19 記載の組成物。 10

【請求項 21】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 16 記載の組成物。

【請求項 22】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 21 記載の組成物。

【請求項 23】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 16 記載の組成物。

【請求項 24】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、およびグリオキサールよりなる群から選択される請求項 23 記載の組成物。 20

【請求項 25】

該安定化剤が、少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 16 記載の組成物。

【請求項 26】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 25 記載の組成物。

【請求項 27】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 16 記載の組成物。 30

【請求項 28】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1000 ないし約 35000 の範囲にある請求項 27 記載の組成物。

【請求項 29】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 27 記載の組成物。

【請求項 30】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 27 記載の組成物。

【請求項 31】

a. 生物学的検体、
b. 抗凝固剤、および
c. 安定化剤；
よりなる安定化された細胞組成物。 40

【請求項 32】

該生物学的検体が、循環腫瘍細胞を含むことが疑われる血液の画分である請求項 31 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 33】

該循環腫瘍細胞が該安定化剤によって安定化されている請求項 32 記載の安定化された細胞組成物。 50

【請求項 3 4】

該抗－凝固剤がキレート剤である請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 3 5】

該抗－凝固剤がエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、1, 2－ジアミノシクロヘキサン四酢酸（DCTA）、およびエチレンビス（オキシエチレンニトリロ）四酢酸（EGTA）よりなる群から選択される請求項 3 4 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 3 6】

該抗－凝固剤が錯化剤である請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 3 7】

該抗－凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 3 6 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 3 8】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 3 9】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 3 8 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 0】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 1】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールよりなる群から選択される請求項 4 0 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 2】

該安定化剤が少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 3】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 4 2 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 4】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 5】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1 0 0 0 ないし約 3 5 0 0 0 の範囲にある請求項 4 4 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 6】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 4 4 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 7】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 4 4 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 8】

該抗－凝固剤および該安定化剤が、該生物学的検体の合計容量の約 0 . 1 ないし約 5 0 % の容量で存在する請求項 3 1 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 4 9】

該容量が該生物学的検体の合計容量の約 0 . 3 ないし約 3 0 % の範囲にある請求項 4 7 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 5 0】

該容量が該生物学的検体の合計容量の約 0 . 3 ないし約 5 % の範囲にある請求項 4 7 記載の安定化された細胞組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

- a. 細胞を含む生物学的検体を入手し、次いで、
b. 該生物学的検体を、該細胞を安定化することができる安定化剤と接触させる；
ことを特徴とする生物学的検体を保存する方法。

【請求項 5 2】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 5 2 記載の方法。

10

【請求項 5 4】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 5】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサルよりなる群から選択される請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

該安定化剤が、少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 7】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 5 6 記載の方法。

20

【請求項 5 8】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 9】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1 0 0 0 ないし約 3 5 0 0 0 の範囲にある請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 1】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 5 8 記載の方法。

30

【請求項 6 2】

該検体をさらに抗凝固剤と接触させる請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (DCTA)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (EGTA) よりなる群から選択される請求項 6 3 記載の方法。

40

【請求項 6 5】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 6】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 7】

該生物学的検体と接触させる前に、該抗凝固剤および該安定化剤を合わせる請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 8】

50

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 67 記載の方法。

【請求項 69】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (DCTA)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (EGTA) よりなる群から選択される請求項 68 記載の方法。

【請求項 70】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 67 記載の方法。

【請求項 71】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 70 記載の方法。 10

【請求項 72】

該抗凝固剤および該安定化剤を、該生物学的検体の合計容量の約 0.1 ないし約 50% の容量で存在させる請求項 67 記載の方法。

【請求項 73】

該容量が、該生物学的検体の合計容量の約 0.3 ないし約 30% の範囲にある請求項 72 記載の方法。

【請求項 74】

該容量が、該生物学的検体の合計容量の約 0.3 ないし約 5% の範囲にある請求項 72 記載の方法。 20

【請求項 75】

a. 細胞を含む生物学的検体を入手し、次いで、
b. 該生物学的検体を、該細胞を安定化させることができる安定化剤と接触させる；
ことを特徴とする循環腫瘍細胞を含むことが疑われる血液試料を保存する方法。

【請求項 76】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 75 記載の方法。

【請求項 77】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 76 記載の方法。 30

【請求項 78】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 75 記載の方法。

【請求項 79】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールよりなる群から選択される請求項 78 記載の方法。

【請求項 80】

該安定化剤が少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 75 記載の方法。

【請求項 81】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 80 記載の方法。 40

【請求項 82】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 75 記載の方法。

【請求項 83】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1000 ないし約 35000 の範囲にある請求項 82 記載の方法。

【請求項 84】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 82 記載の方法。

【請求項 85】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 6】

該検体をさらに抗凝固剤と接触させる請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 8 7】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 8 8】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (D C T A)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (E G T A) よりなる群から選択される請求項 8 7 記載の方法。 10

【請求項 8 9】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 9 0】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 8 9 記載の方法。

【請求項 9 1】

該生物学的検体と接触させる前に、該抗凝固剤および該安定化剤を合わせる請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 9 2】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 9 1 記載の方法。 20

【請求項 9 3】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (D C T A)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (E G T A) よりなる群から選択される請求項 9 2 記載の方法。

【請求項 9 4】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 5】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 9 3 記載の方法。 30

【請求項 9 6】

該抗凝固剤および該安定化剤が、該生物学的検体の合計容量の約 0. 1 ないし約 5 0 % の容量で存在する請求項 8 6 記載の方法。

【請求項 9 7】

該容量が、該生物学的検体の合計容量の約 0. 3 ないし約 3 0 % の範囲にある請求項 9 6 記載の方法。

【請求項 9 8】

該容量が、該生物学的検体の合計容量の約 0. 3 ないし約 5 % の範囲にある請求項 9 6 記載の方法。 40

【請求項 9 9】

a. 抗凝固剤、および

b. 安定化剤；

を含む排気された血液吸尿管よりなる生物学的検体を保存するための装置。

【請求項 1 0 0】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 9 9 記載の装置。

【請求項 1 0 1】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、ジエチレントリアミン五酢酸 (D T P A)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (D C T A)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (E G T A) よりなる群から選択される請求項 1 0 0 記 50

載の装置。

【請求項 102】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 99 記載の装置。

【請求項 103】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 102 記載の装置。

【請求項 104】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 99 記載の装置。

【請求項 105】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 104 記載の装置。 10

【請求項 106】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 99 記載の装置。

【請求項 107】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサルよりなる群から選択される請求項 106 記載の装置。

【請求項 108】

該安定化剤が、少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 99 記載の装置。 20

【請求項 109】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 108 記載の装置。

【請求項 110】

該安定化剤が凍結乾燥されている請求項 99 記載の装置。

【請求項 111】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 99 記載の装置。

【請求項 112】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1000 ないし約 35000 の範囲にある請求項 111 記載の装置。 30

【請求項 113】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 112 記載の装置。

【請求項 114】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8000 ないし約 20000 の範囲にある請求項 112 記載の装置。

【請求項 115】

該さらなる安定化剤が凍結乾燥されている請求項 111 記載の装置。

【請求項 116】

該抗凝固剤および安定化剤が、該吸尿管の合計容量の約 0.1 ないし約 50% の容量で存在する請求項 99 記載の装置。 40

【請求項 117】

該容量が、該吸尿管の合計容量の約 0.3 ないし約 30% の範囲にある請求項 116 記載の装置。

【請求項 118】

該容量が、該吸尿管の合計容量の約 0.3 ないし約 5% の範囲にある請求項 116 記載の装置。

【請求項 119】

- a. 抗凝固剤、および
- b. 安定化剤；

を含有する排気された血液吸尿管よりなる循環腫瘍細胞を含むことが疑われる血液試料を保存するための装置。

【請求項 1 2 0】

該抗凝固剤がキレート剤である請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 2 1】

該抗凝固剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、1, 2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸 (DCTA)、およびエチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (EGTA) よりなる群から選択される請求項 1 2 0 記載の装置。

【請求項 1 2 2】

該抗凝固剤が錯化剤である請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 2 3】

該抗凝固剤がヘパリンおよびシトレートよりなる群から選択される請求項 1 2 2 記載の装置。

【請求項 1 2 4】

該安定化剤がホルムアルデヒドドナーである請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 2 5】

該ホルムアルデヒドドナーがアミンもしくはアミドのメチロールもしくはヒドロキシメチル誘導体、ジアゾリニジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、メテンアミンおよびパラホルムアルデヒドよりなる群から選択される請求項 1 2 3 記載の装置。

【請求項 1 2 6】

該安定化剤がアルデヒドである請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 2 7】

該アルデヒドがホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールよりなる群から選択される請求項 1 2 6 記載の装置。

【請求項 1 2 8】

該安定化剤が、少なくとも 1 つの重金属元素と組み合わされたホルムアルデヒドドナーまたはアルデヒドである請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 2 9】

該重金属元素がクロム、マンガンおよび亜鉛よりなる群から選択される請求項 1 2 8 記載の装置。

【請求項 1 3 0】

該安定化剤が凍結乾燥されている請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 3 1】

さらなる安定化剤がポリエチレングリコールである請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 3 2】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 1 0 0 0 ないし約 3 5 0 0 0 の範囲にある請求項 1 3 1 記載の装置。

【請求項 1 3 3】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 5 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 1 3 1 記載の装置。

【請求項 1 3 4】

該ポリエチレングリコールの分子量が約 8 0 0 0 ないし約 2 0 0 0 0 の範囲にある請求項 1 3 1 記載の装置。

【請求項 1 3 5】

該さらなる安定化剤が凍結乾燥されている請求項 1 3 1 記載の装置。

【請求項 1 3 6】

該抗凝固剤および該安定化剤が、該吸尿管の合計容量の約 0. 1 ないし約 5 0 % の容量で存在する請求項 1 1 9 記載の装置。

【請求項 1 3 7】

10

20

30

40

50

該容量が、該吸取管の合計容量の約 0.3 ないし約 30% の範囲にある請求項 136 記載の装置。

【請求項 138】

該容量が、該吸取管の合計容量の約 0.3 ないし約 5% の範囲にある請求項 136 記載の装置。

【請求項 139】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 140】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 16 記載の組成物。

【請求項 141】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 31 記載の安定化された細胞組成物。

【請求項 142】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 51 記載の方法。

【請求項 143】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 75 記載の方法。

【請求項 144】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 99 記載の装置。

【請求項 145】

さらなる安定化剤が、検体容量の約 0.1% ないし約 5%、好ましくは約 0.1% ないし約 1%、最も好ましくは約 0.1% ないし約 0.5% の濃度のポリエチレングリコールである請求項 119 記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明者：Galla Ghandra Rao、Melissa Hermann、Herman Rutner および Leon WMM Testrappen

【0002】

優先権の情報

本出願は、2001 年 8 月 23 日に提出された米国仮出願番号 60/314,151 および 2002 年 4 月 3 日に提出された米国仮出願番号 60/369,628 に対して米国特許法第 119 条 (e) の下に優先権を主張する。これらの出願は、共に、ここに引用して一体化させる。

【0003】

発明の分野

本発明は、一般に、細胞および血液の安定化の分野、さらに詳しくは、血液検体中の稀な細胞の安定化、最も詳しくは、引き続いての豊富化および分析のための全血中の循環腫瘍細胞 (CTC) の安定化に関する。

【0004】

発明の背景

腫瘍細胞は 1869 年と早くに血液中で検出された。原発性癌は、臨床的発現の出現に先

10

20

30

40

50

立って、初期の病気段階において新形成細胞を循環系に放出することを始めるという証拠がある。腫瘍の血管形成に際して、循環系に放出される腫瘍細胞は、離れた部位に付着し、そこで集落化して転移を形成することができる。これらの循環腫瘍細胞は、通常、健康な個体では見出されず、かくして、特定の癌腫の診断および治療のための基礎を形成することができる。新生血管形成は、腫瘍が、検出のためにはほぼ5 mmの腫瘍サイズを要する乳房撮影法のごとき慣用的方法によって、検出されるには余りにも小さなサイズである1ないし2 mmの直径まで成長したときに起こる。現在の価値ある標準的乳房撮影法よりもより初期の段階で少数のCTCを検出するための感度および特異性を有するテスト方法は、初期段階の癌の診断および病気の管理を劇的に改良できるであろう。Terstappenらによる米国特許第6,365,362号にそのようなテストが教示されており、ここに、それを引用して一体化させる。 10

【0005】

全血は、患者の体内で起こるとここに定義されるイン・ビボで、血液吸取後に起こるとここでは定義される、6時間を超える間に延長された保存で特に起こり得る多数の生化学および酵素反応を受けることができる細胞および可溶性成分の種々の集団を含む複雑な体液である。これらの反応のいくつかは、外来性種としての循環腫瘍細胞の破壊に向けられる。患者の免疫応答は、さらに、ファゴサイトーシスおよび好中球活性化を含めた通常の防御メカニズムによって、腫瘍細胞を弱らせるか、または破壊する。化学療法は、同様に、壊死による細胞死滅を誘導することによって、細胞の機能および増殖の双方を低下させることが意図される。 20

【0006】

これらの外的破壊因子に加え、きびしい条件の環境中で損傷した腫瘍細胞は、プログラムされた死滅またはアポトーシスを受けるであろう。アポトーシスまたは壊死を受けつつある細胞は、変化した膜透過性を有し、それによりDNA、RNAおよび他の細胞成分の逃避を可能とし、それは、細胞デブリスの形成および結局はCTCの完全な崩壊に至る。そのような腫瘍細胞デブリスは、無傷細胞に特徴的なエピトープを依然として担っており、循環癌細胞の偽の増加に至り得る。健康な個体からの全血検体でさえ、低下した血液の質と広く分類され、ここで定義される細胞組成の実質的な変化を受け、これは、24時間よりも長い間の延長された貯蔵で起こり得る。赤血球は破裂し、ヘモグロビンを放出し、細胞ゴーストを生じる。白血球、特に顆粒球は、貯蔵に際して不安定であり、消滅することが知られている。そのような変化は、正常な血液細胞に由来する細胞デブリスの量を増加させるか、または蛋白質が、CTCのごとき稀な標的細胞の単離および検出に干渉することが見出されている。これらの破壊的プロセスの組み合わせられた効果は、例えば、フローサイトメトリーおよび顕微鏡分析で容易に検出できる細胞デブリスの実質的な増加を示す。そのような分析のための方法は、ここに引用して一体化させる、「循環腫瘍細胞、断片およびデブリスの分析」なる発明の名称の共通に所有された同時係属出願に記載されている。 30

【0007】

顕微鏡イメージングによる循環腫瘍細胞の検出は、分類可能な腫瘍細胞の偽りの減少および干渉する染色可能なデブリスの対応する増加によって同様に悪影響を受ける。よって、血液吸取および検体処理の間に24時間もの長い遅れがあり得るので、血液検体の完全性または品質の維持は極度に重要である。 40

【0008】

このアッセイのための血液の処理で用いられる技術および器具は各研究所では容易には入手できないので、そのような遅れはかなり通常のものである。試料処理のために研究所に試料が到達するのに必要な時間はかなり変化し得る。従って、試料を処理することができる時間ウィンドウを確立するのは重要である。しかしながら、稀な血液細胞の分析はより臨界的であるので、血液試料を分析できる時間ウィンドウは短縮される。その例は、一般に行うのに24時間以内を必要とする血液細胞の免疫表現型分けである。癌血液アッセイにおいては、より大きな容量の血液を処理しなければならない、血液試料の劣化はより問題 50

となり得る。というのは、細胞を崩壊させることによって放出される物質はバックグラウンドを左右させかねず、従って腫瘍細胞を検出する能力を低下させるからである。

【0009】

経時的な正常血液細胞の安定性および安定化に関する膨大な公開されたまたは特許された技術があり、いくつかの専有市販の安定化剤、例えばStreck Laboratories, Omaha, NEからのCyto-ChexTM、BioErgonomics, St, Paul, MNからのStabilCyteTM、およびUK MEQAS, Sheffield, UKからのTRANSfixTMが、白血球を保存するために入手できる。

【0010】

WO 97/45729においては、TRANSfixTM安定化剤が、病理学的検体の分析に特に、H I Vおよび白血病血液検体で適していると主張されている。しかしながら、これらの出願では、長期間の貯蔵の間にC T Cを安定化し、または保護するためのTRANSfixTM安定化剤の使用についてデータは示されていない。TRANSfixTM安定化剤は架橋固定剤パラホルムアルデヒドおよび重金属イオンを含むと主張されている。また、それは、フローサイトメトリーによって測定されたごとく、少なくとも5日間顆粒球を含めた白血球の一体性を保存することが示された。C T Cまたは他の病原体についてはデータは示されていない。

10

【0011】

パラホルムアルデヒド、またはパラホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、グリオキサルを含む試薬の欠点にもかかわらず、そのような試薬は、血液または組織学検体中の腫瘍細胞を固定し、安定化するために頻繁に使用されている（例えば、D.B.Tseら、米国特許第6,004,762号参照）。さらに膜構造および脆いC T Cの一体性を弱めるサポニンまたは界面活性剤のごときポアー形成試薬をC T Cに浸透させた後、効果的な固定は特に重要である。浸透化は、例えば、核染色D A P I（4, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）での、およびサイトケラチンについてのごとき、C P Cを特徴付け、およびそれを正常血液細胞から区別するのに用いられる標識抗体での細胞内エレメントの染色または免疫染色を可能とするのに必要である。

20

【0012】

二官能性または架橋性アルデヒドに対する別の固定剤が用いられてきた。より古い固定剤のいくつかは、皮革のなめしの作用の態様と同様に重金属、例えばクロムまたはマンガンに基づいているが、特異性および毒性のそれらの欠如は適用を制限する。固定に対するもう1つのアプローチは、保存剤として化粧品で広く用いられているホルムアルデヒドの単官能性誘導体、または複素環アミンまたはアミドのメチロール誘導体、例えば、ジアゾリジニル尿素およびイミダゾリジニル尿素を利用する。また、（約20,000 MWの）ポリエチレングリコールは白血球のための効果的な安定化剤として記載されている。そのような化合物は、一時的には、血液学制御として用いるための特定の血液細胞集団を安定化されることが意図された。Streck Laboratories, Omaha NEに対して発行されたいくつかの米国特許に開示されている（米国特許第5,459,073号；米国特許第5,849,517号；米国特許第5,981,282号；米国特許第6,017,764号；米国特許第6,051,433号；米国特許第6,124,089号；米国特許第6,159,682号；米国特許第6,200,500号）。

30

【0013】

メチロール誘導体の作用態様は知られていないが、過剰な固定剤の除去に際して解離し得る細胞蛋白質のアミノ基との弱い可逆的な結合を含むと推測される。メチロールまたはヒドロキシメチル誘導体は、化学的に不安定であり、蛋白質とで短い範囲の、または単一炭素の架橋を形成し得る少量のホルムアルデヒドを放出し得る。いわゆるホルムアルデヒドドナーから放出されたホルムアルデヒドは、核酸塩基、特に、アデニンと反応して、ヒドロキシメチロール誘導体およびメチレンブリッジを可逆的に形成し、それにより、核酸を不可逆的に架橋させると報告されており、これは化粧品における殺生物作用態様であり得る。しかしながら、遊離ホルムアルデヒドは、前記特許においてはCyto-ChexTM安定化剤において有効成分であるとは主張されていない。これらの特許は、血液または他の生物学的検体において、C T Cを安定化するか、または固定化する用途を開示していない。血液中の腫瘍細胞の循環は、C T Cの知られた脆性のため正常な血液細胞と同様に安定化され

40

50

、もしそれが起これば、C T Cのいずれの安定化も処理工程の間に終始存在すると推定することができない。従って、ここに、我々が、もし存在すれば、C T Cの正確な分類および計数を必要とする豊富化および検出手法で臨界的であることを示した、貯蔵の間にイン・ビトロでC T Cを安定化するための、および血液を加工し、および血液の品質を保持するための効果的な試薬を同定することに対する明らかな要望が存在する。

【0014】

発明の概要

安定化剤は、イン・ビボでの腫瘍細胞の崩壊およびイン・ビトロ試料分解による崩壊を区別するのに必要である。本発明により、生物学的検体の品質を維持するための安定化剤、固定剤および保存剤として働くいくつかの組成物が発見された。また、生物学的検体を安定化するための方法および装置も発見された。これらの改良または発見は、本明細書中に記載された発明が、当該分野におけるシステムおよび方法を凌いで大いに改良され、および全血におけるC T Cの豊富化および計数の適用を有することを可能とした。

10

【0015】

多数の組成物が、血液検体を保存するのに発見されている。これらの組成物は、抗凝固剤および安定化剤の組合せである。さらに、本発明は、安定化された試料、抗凝固剤、および安定化剤または複数安定化剤の組成物を教示する。さらに、本発明は、生物学的検体をこれらの組成物と接触させて安定性を増強させる種々の方法を教示する。さらに、本発明は、生物学的検体をこれらの組成物と接触させて、安定性を増強するための種々の装置を教示する。一般に、これらは、生物学的検体を保存するために、特に、血液試料中のC T Cを保存するのに用いることができる。

20

【0016】

従って、血液吸取に先立って、安定化剤を血液収集試験管へ添加することを含む改良されたプロトコルが提供される。また、血液試験管中の変化させた容量の検体を補うためのプロトコルを含めた、血液吸取直後に安定化剤を血液試験管に添加する方法が本発明によって提供される。

【0017】

さらに、生物学的検体の処理で用いる1以上の緩衝液に安定化剤を添加し、かくして、必要であれば、両者は安定化剤および／または固定化剤として働く方法が本発明によって提供される。従って、本発明の主な目的は、分析に先立って、生物学的検体用の安定化剤を提供することにある。本発明の具体的な用途は、血液試料中のC T Cを安定化させることに向けられる。不意の混合の間に、または輸送中の不意の混合または震盪の間に、あるいは分析に先立っての検体の機械的再混合の間に起こり得るごとく、機械的応力に暴露された場合、全血検体を少なくとも24時間、72時間まで維持するための安定化剤および保存剤を提供するのが本発明のもう1つの目的である。

30

【0018】

本発明によるこれらの発見は、当業者によって考えることができる組成物および方法の多くのさらなる潜在的適用の例示であり、かくして、本発明の範囲を限定する意図ではないことは理解され、認識されるべきである。従って、添付の請求の範囲と共に、以下の詳細な記載から、本発明の他の目的および利点は当業者に明らかであろう。

40

【0019】

発明の詳細な記載

本明細書中においては、当業者によく理解される種々の用語を用いる。これらの用語の意図された意味は、認められた意味から逸脱するものではない。

検体試料または血液の品質は、以下のパラメーターによってここでは定義され、実験的に決定される；

1. C T Cまたはスパイクされた培養腫瘍細胞と比較して、バックグラウンドとして非特異的に選択される白血球の相対的数；
2. 核染色D A P Iで検出可能に染色される粒状物質およびより大きな凝集体によって測定されるD N AまたはD N A断片を含む細胞デブリス；および

50

3. 白血球上のCD-45についてのフィコエリスリン(PE)標識抗-サイトケラチン抗体で、またはアロフィコシアニン(ATC)-標識抗体で非特異的に、または特異的に検出される細胞質デブリスまたは凝集体。

【0020】

用語「生物学的検体」または「生物学的試料」は相互交換的に用いることができ、注目する細胞を含むことが疑われ、かつ分析されるべきヒト対象から採取された流体または組織の小部分をいう。生物学的検体は流体または細胞部分、または可溶性物質を含む部分をいうこともできる。生物学的検体または生物学的試料は、限定されるものではないが、末梢血液、組織ホモゲネート、乳頭吸引物、結腸洗浄物、痰、気管支洗浄物のごとき体液、およびヒト対象から得ることができる細胞のいずれの他の源も含む。例示的な組織ホモゲネートは、乳癌患者における前哨節から得ることができる。

【0021】

用語「稀な細胞」とは、本明細書中においては、生物学的検体に普通には存在しないが、感染症、慢性病、負傷または妊娠のごとき異常な状態のインジケータとして存在し得る細胞と定義される。また、稀な細胞とは、生物学的検体に普通は存在し得るが、正常な生物学的検体に典型的には存在する細胞よりも数桁低い頻度で存在する細胞もいう。

【0022】

用語「抗-凝固剤」または「抗-凝固試薬」は相互交換的に用いることができ、いずれの望まない天然または人工の凝固、凝集反応、または凝集をも阻害する目的で生物学的検体に添加される組成物をいい、さらに、集合的に、「クランピング」または「集塊形成」と定義される。しかしながら、そのような集塊は、もし、それらが無傷CTCについての分類基準を満たすならば、無傷CTCとして個々にカウントされるCTCの「クラスター」または凝集体とは区別されなければならない。二次転移性腫瘍部位を確立するためのその接着性および特性によって、CTCのクラスターは、単一CTCよりも大きな増殖能力を有すると考えられ、かくして、それらの存在は診断的にはかなり有意義である。凝固の例は、血液凝固であり、通常の抗-凝固剤が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、1,2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(DCTA)、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸(EGTA)によって例示される、またはヘパリン、ならびにヘパリン硫酸および低分子量ヘパリンのごときヘパリン種のごとき錯化剤によって例示されるキレート化剤である。

【0023】

(ここでは、相互交換可能に用いられる)理想的な「安定化剤」または「保存剤」は、標的細胞の単離、検出および計数、および非標的細胞からのその区別を断じて邪魔しない、生物学的検体中の凝集体および/または細胞デブリスに干渉する形成を最小化させつつ、生物学的検体に存在する注目する標的細胞を保存することができる組成物と定義される。他の用語においては、抗-凝固剤と組み合わせた場合、安定化剤は抗-凝固剤の性能に対立的に作用するべきではない。逆に、抗-凝固剤は安定化剤の性能に干渉すべきではない。加えて、開示された凝固剤は、浸透された細胞を固定し、それにより、それを安定化させる第3の機能としても働き、ここに、該表現「浸透された」または「浸透」および「固定する」、「固定された」または「固定」は、細胞生物学においては慣用的に定義されるごとく用いられる。本明細書中における安定化剤の記載は、濃度または量が損傷を引き起こすことなく標的細胞を安定化させるのに有効な場合、細胞生物学における当業者に容易に明らかな、適切な濃度または量においてこれらの剤を用いることを意味する。稀な細胞を保存する目的で本発明の組成物、方法および装置を用いる者は、明らかに、それらを用いてこれらの同一の稀な細胞を損傷し、または破壊せず、従って、適切な濃度または量を固有に選択するであろう。例えば、ホルムアルデヒドドナーであるイミダゾリジニル尿素は、当該検体の容量の0.1ないし10%、より好ましくは0.5ないし5%、最も好ましくは約1ないし3%の好ましい濃度にて効果的であることが判明した。また、ポリエチレングリコールのごときさらなる剤は、検体容量の約0.1%ないし5%、より好ましくは約0.1%ないし1%、最も好ましくは約0.1%ないし0.5%の好ましい濃度で添

加された場合、効果的であることが判明した。

【0024】

安定化剤は、少なくとも数時間の間、試料を保存することができなければならない。しかしながら、本明細書中に示した実施例では、試料は少なくとも72時間まで安定化させることができるのが示される。そのような長期間の安定性は、試料が、処理および分析が行われる場所とは離れた場所で得られる場合に重要である。さらに、試料は、輸送の間の機械的損傷に対して安定化されなければならない。

【0025】

用語「循環腫瘍細胞」またはCTCとは、しばしば、大きな数で腫瘍から放出されることが知られている細胞をいう。定常状態レベルは、腫瘍負荷のサイズに依存する、CTCの破壊が放出速度に等しい場合に維持される(JG Morenoら、"Changes in Circulating Carcinoma Cells in Patients with Metastatic Prostate Cancer Correlates with Disease State" Urology 58. 2001参照)。一般に、より抵抗性で増殖性の細胞は、生存して、二次的または転移性部位を確立する。循環腫瘍細胞は、本発明によって安定化し、または固定すべき好ましい標的の稀な細胞である。

10

【0026】

用語「細胞組成物」とは、生物学的検体に由来する最もありそうには異なるタイプの複数の細胞をいう。この細胞組成物は、標的および非標的細胞を共に含む。例えば、癌を有することが疑われる対象から採取された血液の一部において、細胞組成物は赤血球細胞、白血球細胞、およびもし存在すれば循環腫瘍細胞であろう。しかしながら、本明細書中に記載するごとく、技量のある生物学者であれば、生物学的検体の源に依存して、他の生物学的検体は異なる細胞型を含むことを認識するであろう。

20

【0027】

(ここに引用して一体化させる) 米国特許第6,365,362号においてTerstappenらによって教示されたもののごとき豊富化の方法の間に、豊富化された細胞画分は主として白血球および、もし存在すれば、かなり少ない数のCTCを含む。処理の間に、細胞には温和な界面活性剤ImmunipermTM (0.05%サポニン-Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PAを含有するPDS)を浸透させて、約8mmの直径の小さなポアを形成させ、免疫染色抗体、抗-サイトケラチン-PE、および核染色DAPIの侵入を可能とする。DAPIは、細胞および細胞外BME中のアデニン-チミンに選択的に結合する蛍光インターカラーティング色素である。これらのポアは、さらに、細胞膜の構造的な一体性を弱め、穴を「ふさぐ」ための染色の後に、細胞固定剤または安定化剤を必要とする。前記したごとく、浸透した膜を強化することを意図した、当該分野において慣用的なアルデヒドおよび重金属ベースの固定剤は、本発明で用いる磁気収集のプロセスおよび染色プロトコルに適合しないことが判明した。対照的に、本発明で用いるCyto-ChexTM安定化剤は、予期せぬことに、染色後工程において固定剤としてかなり効果的であることが判明し、かくして、本明細書中で提案された試薬処方に含める。よって、同時または順次に記載され、本発明で用いる安定化剤は、3つの臨界的な機能を行うことが発見された：

30

1. 輸送、貯蔵、試料調製および引き続いての分析のための血液検体中でのCTC非標的細胞の安定化
2. デブリスおよび／または凝集体形成を阻害することによる血液検体の品質の維持および
3. 浸透後における固定剤としての働き。

40

【0028】

これらの機能の1以上は、本発明で利用される豊富化アッセイにおいてCTCまたは稀な細胞の正確な分子に必須であることが判明した。

(例えば、DAPIのごとき核色素によって染色可能な) 染色可能な核の存在は、有核細胞の必須の形態学的特長である。陽性DAPI染色は、DAPI-虚弱またはDAPI-陰性によって特徴づけられた「疑われるCTC」および／または抗-サイトケラチン抗体によって認識される細胞骨格蛋白質の不規則なまたはまだらな細胞質染色から区別される

50

「無傷CTC」としてのサイトケラチン－陽性細胞を定義し、それを分化させるにおける臨界的な要素である（図5a）。無傷および疑われるCTCは、ともに、DAPI－陽性であるが、白血球－特異的マーカーCD45を発現する白血球から区別することができる。「疑われるCTC」は、無傷CTCと結合することができ、「無傷CTC」に由来するか、あるいは腫瘍部位から循環系に放出された上皮細胞起源の壊死、アポトーシス細胞または「アポトーシス体」であり得るいくつかの形態学的特徴を依然として有する（図5b）。

【0029】

粒子または検出可能な事象の第3のカテゴリーは表IIおよび図5および図5bにおいて印をつけた「帰属されない事象」、「疑われるCTC」と同様な染色特徴を有することができるが、細胞の構造形態学的特徴は欠き、すなわち、それらは、安定化された血液検体と比較して不安定化が統計学的により支配することが見出された大いに不規則な凝集体または凝塊である（ $p = 0.0327$ ）。安定化された血液検体における「無傷CTC」に対する実質数の「疑われるCTC」の存在は、増殖／腫瘍負荷、患者の免疫状態および／または治療応答に関する臨床化に対して重要な診断情報を提供することができる。表Iは、8人の癌患者における無傷CTC、疑われるCTC、および「帰属されない事象の相対数」に対する異なる安定化剤の安定化効果を示す。表IIは、安定化剤無しと比較した発散したCyto-ChexTM安定化剤での（帰属されない事象）の数の有意な減少（ $p = 0.0327$ ）および癌腫を持つ31人の患者における安定化剤無し（ $p = 0.0004$ ）と比較したCTCに対するCyto-ChexTM安定化剤の有意な安定化効果を示す。疑われるCTCの数は、安定化された、および安定化されていない血液の間で統計学的に異ならなかった（ $t = 0.1548$ ）。不安定化血液におけるバックグラウンドの上昇についてのありそうな原因は、「真実の」疑われるCTCとは区別できない人工物である。イン・ビボで形成された人工物および疑われるCTCまたは腫瘍デブリスの間の識別は、臨床的重要性を有することができ、血液吸取およびCTC分析の間の試料の分解によって引き起こされた人工物からの寄与なくして患者の血液中のCTC状態の評価を可能とする血液／CTC安定化剤に対する必要性を強調する。以下の実施例で用いた豊富化プロセスにおいて、（ここでは包括に特別に言及しない限りは無傷および疑われるCTC双方よりなる）CTC、細胞断片および細胞デブリスは、（例えば、ここに引用して一体化させる米国特許第6,120,856号に記載されたごとく、約 $0.2\mu\text{m}$ （ 200nm ）直径に付着した抗EpCAM抗体で）CTC上の特異的な表面マーカーを認識する磁氣的に標識された抗体で捕獲される。CTCの表面の多数の小さいが密な磁性粒子の存在はさらに、磁気（場内）インキュベーションの間および磁気収集の間に、高勾配磁気セパレーター（例えば、米国特許第5,186,827号および第5,466,574号のもとで特許されたImmunicon四極子9MS17）内で発生した強力な磁場中での、磁氣的に標識された細胞の迅速な移動の間に弱まった非安定化細胞膜をさらに高くした。

【0030】

本発明の安定化剤は、遠心、攪拌およびピペッティングにおけるごとき、普通の検体処理の間にさえ磁気および非－磁気応力双方から起こり得る磁氣的に標識した細胞に対する損傷を阻害することが判明した。例えば、Dynal Inc., Lake Success, NYによって販売されている $2.8\mu\text{m}$ および $4.5\mu\text{m}$ 直径のより大きな磁性粒子またはビーズでの免疫磁気標識を用いる場合に、稀な細胞およびCTCに対する実質的により大きな損傷が観察された。

【0031】

血液吸取および引き続いての検体の処理の間に、末梢循環系に存在する生存するつぶされた腫瘍細胞には、排気した試験管への血液吸取の間における乱れによって、および検体の処理、例えば、分析に先立っての血液試験管の輸送および混合によって、さらに応力がかかり、損傷され得る。そのような機械的な損傷は、絶え間ない免疫学的、アポトーシス的および壊死的プロセスに追加されるものであり、時間依存的にイン・ビトロで起こるCTCの破壊に至る。我々は、検体がより長く貯蔵されれば、CTCの喪失はより大きくなり

、かつ干渉するデブリスおよび／または凝集体の量はより大きくなることを見出した。事実、本明細書に示すデータ（図1および2）は、室温に24時間以上保存したいくつかの血液検体におけるCTCカウントの劇的な減少を示し、これは、血液吸取の後におけるCTCの実質的なイン・ビトロ破壊を示す。貯蔵の間の造血系細胞の喪失はよく知られた現象であって、Streck Labsその他による前記特許の主題であるが、混合または輸送による機械的損傷の発生は、今日まで、CTCまたは稀な細胞の喪失で認識された因子ではなかった。細胞デブリスの形成、およびCTCまたは他の稀な細胞の分析におけるデブリスおよび凝集体を蓄積する干渉効果は今日まで同様に認識されていなかった。それは、比較的大きな血液容量（5ないし50mL）の処理を必要とするかなり感度の良い豊富化アッセイ、および容量低下（1mL未満）の後における標的細胞の引き続いての顕微鏡検出またはイメージングにおいて最も明らかであり、かつ問題なようである。そのようなデブリスは通常は見られないか、あるいは、例えば、フローサイトメトリーによる慣用的な非豊富化アッセイにおいて、または密度勾配方法による豊富化において、干渉しない。

10

20

30

【0032】

要約すると、前記因子の全てまたはいくつかは、本発明で開示する豊富化手法によるCTCの検出に干渉しないように観察されたイン・ビトロのデブリスおよび／または凝塊形成に寄与することが判明した。本発明で開示する安定化剤組成物およびその使用は、予期せぬことに、CTCを保存し、検出可能な細胞デブリスおよび凝集体の形成を低下させることによって血液検体の品質を劇的に改良し、かつ豊富化プロセスにおいて安定化剤および固定剤として働くことが判明した。より重要なことには、CTCに対するイン・ビトロ損傷、および血液検体の品質の劣化を最小化する効果的な安定化剤の発見は、患者におけるCTCのイン・ビボ状態のより完全な像を提供する。図5に示すごとく、無傷CTC、損傷したまたは疑われるCTCの数、ならびにCTCに対する損傷の程度は、腫瘍負荷、腫瘍細胞の増殖能力、および／または治療の有効性の診断的に重要なインジケータとして働く。対照的に、非安定化試料を用いる現在の技術は、避けることのできるイン・ビトロ貯蔵および処理の損傷に、CTCに対する避けることのできないイン・ビボ損傷を重ねる。損傷したCTCからの断片およびデブリスの分析は、患者で起こりつつあるのが何かを理解するのに重要である。従って、そのような分析を行うための方法および試薬は、「循環腫瘍細胞、断片およびデブリス」なる発明の名称の同時係属出願に記載されている。その共通に所有された出願を、ここに、引用して一体化させる。

30

【0033】

以下の実施例により本発明を説明するが、これは本発明の範囲を限定する意図のものではなく、むしろ、本発明の一般的な使用の場合を提供する。

【0034】

実施例1

血液中における循環腫瘍細胞の安定化

Cyto-ChexTM、StabilCyteTMおよびTRANSfixTMは、商業的に入手可能であって、長時間の間血液検体中の血液細胞を安定化する用途を有する3つの安定化剤の例である。これらの安定化剤は、（主として、収縮を最小化することによって）細胞のサイズを維持し、主として、フローサイトメトリーによって測定されるごとく、細胞表面の抗原を保持するように最適化される。意図した出願は、一般に、直接的分析を含み、試料の広範な操作または特定の細胞集団の豊富化を必要としない。対照的に、本発明で単離され、検出された循環腫瘍細胞、または他の稀な標的細胞は非常に低い頻度で存在する病理学的に異常なまたは稀な細胞を含み、そのように定義され、かくして、検出に先立って実質的な豊富化を必要とする。

40

【0035】

CTCは、室温または2ないし8℃における24時間の貯蔵の後においてさえ血液中ですばしば検出できるが、前記した理由によりより脆くなり得る。いずれの操作または豊富化方法もこれらの脆性細胞を損傷しかねないことが示され、かくして、単離のプロセスの間に、潜在的細胞の喪失およびデブリスおよび凝集体の形成がもたらされる。図1および2

50

は、24時間までの貯蔵に際してのいくつかの検体におけるCTCの実質的な喪失を示す。

【0036】

本実施例においては、24時間古い検体からの豊富化の後におけるCTCの患者に対する種々の安定化剤の効果を調べた。進行した癌腫を持つ患者からの血液試料を入手し、以下のごとく、血液吸取の2時間前に安定化剤で処理した。各患者から、EDTAを含有する異なる試験管へ吸い取られた血液をプールし、等容量の1部を別々の試験管に入れた。Cyto-ChexTM安定化剤、StabilCyteTM安定化剤、およびTRANSfixTM安定化剤よりなる添加剤を、30%Cyto-ChexTM安定化剤、20%StabilCyteTM安定化剤、および10%TRANSfixTM安定化剤において別々の試験管に添加し、ここに、これらは血液容量のパーセントである。1つの試験管を、緩衝剤または安定化剤を添加しない対照として用いた。次いで、試料を混合し、室温にて24時間貯蔵した。等容量のImmunicon System緩衝液(0.5%BSA、0.2%カゼインおよび0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS)を各試料に添加した。混合の後、試料を800×gにて10分間遠心して、血漿を除去した。Immunicon AB緩衝液(制御された可逆的凝集のメディエーターとしてのストレプトアビジンを含有するSystem緩衝液)(ここに引用して一体化される米国出願番号09/351,515および09/702,188に記載された技術)を、1.5×初期血液容量の最終容量まで試験管に添加した。試料を混合した後、CA EpCAMフェロフルイド(抗-EpCAM抗体にカップリングした、制御された可逆的凝集のメディエーターとしてのデスチオビオチンと共に0.2μmの磁性粒子)を試料に添加して、CTCを磁氣的に標識した。

10

20

【0037】

ここに引用して一体化させる米国出願番号09/240,939に記載されているごとく、各10分後にQMS17磁石の内側で再度混合しつつ2回の10分間の期間、Immunicon四極子高勾配磁気セパレーター(ここに引用して共に一体化させる米国特許第5,186,827号および第5,466,574号下で特許されたQMS17)の内側でCA EpCAMフェロフルイドと共に試料をインキュベートした。これらの磁気インキュベーション後、試料を20分間で磁氣的に分離した。未収集画分を吸い取り、試験管をQMS17から取り出した。磁氣的に収集した画分をSystem緩衝液に再度懸濁させ、QMS17にて10分間で再度分離した。未収集画分を再度吸い取り、収集された細胞を200μlのImmunipermTM(0.05%サポニンを含有するPBS)に再度懸濁させて、捕獲された細胞を浸透させ、細胞内染色を可能とした。

30

【0038】

浸透した試料を、いくつかの蛍光マーカー:20μlの抗-サイトケラチン-PE、20μl抗-CD45-APCおよび20μlDAPIよりなるカクテルで15分間で染色した。区別するための抗-サイトケラチンは上皮細胞を染色し、抗-CD45は白血球を染色して、標的CTCから非特異的に染色されたいずれの白血球も区別する。DAPIは、全ての有核細胞を同定し、細胞を非有核細胞デブリスから区別するのに用いられる。磁気分離によって過剰の染色試薬を洗い流した後、試料を320μLのImmunicon CellFixTM(0.5%BSA、10mg/mLビオチンおよび25%Cyto-ChexTM安定化剤を含有するSystem緩衝液)に再度懸濁させた。

40

【0039】

各試料は、(ここに引用して一体化させる米国出願番号10/074,900に記載されているごとく)Immunicon CellSpotter(登録商標)チャンバー、(ここに引用して一体化させる米国特許第6,136,182号に記載されているごとく)二極の角度をつけた磁石アセンブリーにフィットするように設計された光学的に平坦で透明な上方観察ウインドウを備えたキュレット様-エンクロージャーに移した。観察ウインドウの下面の磁氣的に表示された標的細胞の磁気収集により、蛍光顕微鏡によるイメージングが可能となる。試料チャンバーの表面は4つの異なるフィルターで自動的にスキャンした。ソフトウェアによりイメージを収集し、分析するが、引き続いての再観察および分類のための優れたCTC候補としてのサイトケラチン-PEおよびDAPI双方につき陽性であるイメージのみ提示する。パン

50

白血球マーカーCD45-APCの陰性染色を除き、サイトケラチン-PEおよびDAPIについての形態および陽性染色を確認した後、分類された無傷CTC、疑われるCTCおよび「帰属されない事象」（デブリス粒子）をカウントした。表Iは、分析に先立っての24時間における、種々の安定化剤での8人の癌患者からの検体を保存する効果を示す。結果は「無傷CTC」、「疑われるCTC」および「帰属されない事象」の事象として表す。

【0040】

【表1】

表I: (室温での24時間後における) 臨床試料における安定化剤の効果

患者識別番号	無傷 CTC				疑われる CTC				帰属されない事象			
	N	T	S	C	N	T	S	C	N	T	S	C
D12 (乳癌)	1	3	6	2	5	4	4	7	72	31	17	34
JM38 (前立腺癌)	23	72	61	72	61	161	169	173	324	160	61	55
JM33 (前立腺癌)	14	20	23	26	25	29	27	33	357	76	93	68
JM40 (前立腺癌)	9	107	101	121	198	358	323	345	1034	1075	500	635
D13 (乳癌)	1	2	0	3	3	8	4	9	143	180	187	70
D9 (乳癌)	58	106	81	89	46	41	42	38	421	105	107	135
JDS002 (乳癌)	0	1	0	0	1	2	1	0	82	48	92	82
JDS009 (乳癌)	0	0	0	0	0	2	0	0	47	44	12	32

N=安定化剤なし
T=TRANSfix™安定化剤
S=StabilCyte™安定化剤
C=Cyto-Chex™安定化剤

【0041】

安定化剤を添加しない血液試料と比較した場合、より多数の無傷および疑われるCTCが、全ての3つの安定化剤でのこれらの血液試料の24時間の貯蔵の後に患者試料のほとんどで検出された。無傷CTCから疑われるCTCへの実質的な変換は安定化されていない検体で起こる可能性があり、あるいは細胞が喪失される可能性がある。これらのデータの統計学的解析は、安定化剤および安定化剤無しの間で検出された合計CTCの数の有意な差を示す(p-値=0.02)この差は乳癌および前立腺癌双方の試料で観察された。しかしながら、3つのテストした安定化剤の間では差はなかった(p-値=0.18)。安定化剤の存在下で検出されたより多い数の無傷および疑われるCTCは非特異的染色による人工物であるとは考えられない。というのは、この効果は正常なドナーからの24時間古い試料で観察されなかったからである。これらのデータは、癌患者からの血液試料での安定化剤の添加により、貯蔵の間および試料処理工程において循環腫瘍細胞を保存し、かくして、イン・ビボレベルの無傷CTCおよび疑われるCTCのより正確な分類を可能とすることを明瞭に示す。

【0042】

実施例2

分析についての試料の品質の保持

CTCは低い頻度で血液に存在し、検出には大きな試料容量および効果的な豊富化方法が必要とする。CTCのための豊富化方法は、細胞を損傷し、細胞からのDNA漏出によりデブリスおよび凝塊を生じさせかねない磁気分離方法を含めた何回かの洗浄工程を含む。しかしながら、予期せぬことには、むしろ驚くべきことには、血液細胞を懸濁したまま保持するためにほとんどの血液癌研究所でルーチン的に行われているとき、旋回器での血

10

20

30

40

50

液試験管の温和な回転させながらの混合は、C T Cの検出および計数に干渉しかねない細胞デブリスの有意な形成を引き起こすことが判明した。さらに、血液吸引またはアッセイ試験管の不完全な充填は、さらに、この混合損傷を悪化させることが観察されたが、静止した試験管で損傷は観察されなかった。図3に示すごとく、送付の間の患者試料のいずれかの混合または他の機械的な応力もまた、予期せぬことに、干渉デブリスを増加させることが示された。表I Iは、血液試料の一晩の送付の後における、C T Cの回収に対するCyto-ChexTM安定化剤の効果を示す。C T Cの検出は、各臨床研究所ではルーチンの入手できない大きな試料容量ならびに特殊な技能および装置を必要とする。その結果、それらの血液試料は、処理のために中央研究所まで送らなければならない。前記したごとく、C T Cはデリケートであって、いずれの機械的混合または震盪も送付の間に細胞の損傷をし

10

20

30

40

50

【0043】

C T Cおよび試料の品質に対するこれらの悪影響は、今日まで検出から逃げてきた。というのは、そのように応力のかかった試料は、ほとんどの研究所または臨床分析で依然として満足できるからである。例えば、フローサイトメトリーによるイムノフェノタイピングは、デブリスの存在が見かけ上分析に干渉しないいずれの豊富化方法も必要としない。しかしながら、我々の試験は、顕微鏡または他の光学的方法によって豊富化された稀な標的細胞をアッセイする場合に、血液試料の品質を保持するのに臨界的に重要であることを示唆する。

【0044】

実施例3

2ないし3時間混合された正常検体の試料の品質に対するCyto-ChexTM安定化剤の効果
細胞核のD A P Iでの染色は、通常、もし核が無傷であれば浸透された、生きたまたは死滅した細胞内部で検出することができる。また、もしD N Aが漏出すれば、D N A染色は、細胞外部の染色可能な凝集体のごとき細胞断片または細胞デブリスで検出することもできる。かくして、D A P Iへの染色、および蛍光顕微鏡下での観察は試料の品質を容易にチェックすることができる。3つの試験管分の血液を正常なドナーから10mLのP A 抗一凝固処理した試験管に吸い取った。CellStabilizeTM注射デバイスを用いることによって、キャッププラグを取り外すことなくCyto-ChexTM安定化剤を1つの血液試験管に以下のごとく添加した。適切な量の安定化剤の所望の最終濃度までの添加を可能とする血液容量を見積るのを可能とする平滑化にて、血液試験管をキャリブレートされたデバイスに入れた。第2の針(20G, 11/2インチ)およびシリンジを用いて安定化剤の排気および必要な容量を試験管に注入しつつ、1つの針(27g, 1/2インチ)を試験管のストッパーを通して挿入した。検体試験管をデバイスから取り出し、試験管を数回倒立させることによって混合した。2つの血液検体(1つは安定化剤無しのもの、もう1つは30% Cyto-ChexTM安定化剤を含む試験管)を巡回ミキサーで2ないし3時間混合して、送付の条件を模倣した。安定化剤無しの対照として用いるために第3の血液試験管は混合しなかった。2ないし3時間後、7.5mLの血液を各「安定化剤無し」試験管から移し、9.75mLの血液を「Cyto-ChexTM安定化剤」試験管から、実施例1に記載したごとき処理のために、別の15mLのポリプロピレン製遠心管に移した。

【0045】

試料を、蛍光イメージング顕微鏡を用いるCellSpotter(登録商標)分析のためにImmunic on CellSpotter(登録商標)チャンバーに移した。チャンバーの観察ウインドウの下面に磁氣的に配置された標的細胞につき、試料を4つの異なるフィルターでスキャンした。異なるフィルターからのイメージを貯蔵した。検出可能な有核C T Cおよび非標的細胞の数と比較して試料の品質を検出可能なD A P I染色事象(無傷C T C、疑われるC T C、および染色可能な帰属されない事象)またはデブリスの数から決定した。最適な試料の品質のためには、染色可能な細胞デブリスおよび凝集体は、無傷C T Cおよび疑われるC T C

の正確な検出および計数を可能とするように小さく保つべきである。

【0046】

図3におけるイメージは、30% Cyto-ChexTM安定化剤を添加した試験管(図3b)と比較した。安定化剤無しでの血液試験管の輸送(図3a)の損傷効果を示す。同様に、図4a、図4b、および図4cは、細胞核のDAPIでの染色を示す。安定化剤または攪拌なしの対照試料(図4a)およびCyto-ChexTM安定化剤+混合を伴う試料(図4c)と比較して、細胞を存在するいずれの安定化剤もなくして、混合した場合に(図4b)多数のDAPI染色可能細胞凝塊およびDNAデブリスがあった。これらのデータは、予期せぬことに、血液試料の混合が脆性CTCのみならず、正常な造血細胞をも損傷し、それにより、豊富化後に検出できるデブリスおよび凝集体を生じること示す。驚くべきことに、試料を混合する前の安定化剤の血液試料への添加は、双方の細胞損傷を最小化し、治療の品質を保持した。

10

【0047】

実施例4

送付の間における循環腫瘍細胞におけるCyto-ChexTM安定化剤の効果

本実施例では、2つの試験管のEDTA抗凝固処理した血液を、浸透した段階の病気を持つ31人の癌患者(3人は2回の別々の回数を受けた反復患者であった)から吸い取った。Cyto-ChexTMの最終容量が合計容量の30%となるように、実施例3に記載したCellStabilizeTMデバイスでの排気を用い、Cyto-ChexTM安定化剤を試験管の1つの組に直接注入した。試験管の第2の組は未処理対照であった。次いで、双方の試料の組を、アイスバック無しの1晩の郵便によってImmuniconに送った。当該日付の古い試料をCTCの豊富化およびCellSpotterTM分析による検出によって処理した。CTCを豊富化し、それを検出するのに本実施例で用いた手法は、実施例1で用いた手法と同様である。Cyto-ChexTM安定化剤の添加の有り無しでの血液試料に対する結果を表IIに示す。

20

【0048】

【表2】

表 II

患者識別番号	癌タイプ	無傷 CTC		疑われるCTC		帰属されない事象	
		無し	有り	無し	有り	無し	有り
20370 (1)	乳癌	0	1	1	4	44	21
7493 * (2)	乳癌	9	16	3	4	35	20
23435 (3)	乳癌	0	0	0	0	55	40
24948 (4)	肺癌	2	3	2	8	292	307
10520 (5)	乳癌	0	7	0	12	1939	104
26858 (6)	子宮癌	0	1	0	0	53	24
25000 (7)	前立腺癌	0	2	0	4	801	242
23549 (8)	肺癌	1	1	11	1	3194	135
25167 (9)	乳癌	0	0	0	0	31	28
26041 (10)	大腸癌	0	0	0	4	649	120
24164 (11)	子宮内膜癌	0	0	0	2	628	86
20942 (12)	乳癌	0	0	1	0	201	115
28217 (13)	乳癌	1	4	0	7	52	33
19710 (14)	大腸癌	0	0	0	0	110	27
19218 (15)	肺癌	0	0	1	0	53	25
28162 (16)	直腸癌	0	0	1	0	1544	79
23530 (17)	前立腺癌	21	106	26	42	142	179
24948 (18)	肺癌	0	6	3	7	283	46
28287 (19)	肺癌	0	1	0	1	155	32
27851 * (20)	腎臓癌	0	0	0	1	12	13
28186 * (21)	子宮癌	0	0	1	0	33	21
21515 * (22)	乳癌	0	0	0	0	17	20
25084 * (23)	卵巣癌	0	0	0	0	17	63
25000 * (24)	前立腺癌	0	6	2	1	25	63
25254 * (25)	肺癌	0	0	0	0	20	24
22488 (26)	乳癌	2	0	2	3	19	28
21688 (27)	乳癌	0	2	3	3	36	91
16925 (28)	乳癌	2	10	3	3	76	64
28327 * (29)	膀胱癌	62	285	105	72	139	113
19218 (30)	肺癌	0	0	0	0	19	41
13517 (31)	前立腺癌	8	16	7	5	270	39

無しー安定化剤の添加無し

有りー30% (最終容量) Cyto-Chex™ 添加

* = 5ml の検体, 全てその他は7.5ml

【0049】

1 を超える無傷 CTC を示したいずれの試料も陽性であると考えられた。安定化剤無しまたは有りでのデータ組への Wilcoxon 署名のランクテストの適用により、以下の p 値が得られた：

- ・無傷 CTC、 $p < 0.0004$ (大いに有意)、
- ・CTC が疑われる、 $p < 0.155$ (有意でない)、および
- ・帰属されない事象、 $p < 0.0327$ (有意)

【0050】

Cyto-Chex™ 安定化剤を加えた場合、ほとんどの検体は陽性となるか、あるいは無傷 CTC の増加を示した。非安定化検体でより多くの無傷 CTC または疑われる CTC が検出された場合は、おそらくは、人工的なものであり、無傷または疑われる CTC からの「帰属されない事象」として分類される特徴的な細胞形態を伴わずして染色可能なデブリスおよび凝集体を区別するのが困難な結果である。平均して約 3 倍を超える無傷 CTC は、非安定化検体と比較して、安定化された検体で検出された。これらのデータは、腫瘍細胞

10

20

30

40

50

および検体双方の品質を維持するに置いて、全血安定化剤の予期せぬ保存効果を強調する。

【0051】

実施例 5

24 v s 72 時間安定化

送付実験において（実施例 4）、安定化が、血液を吸い取った 24 時間後に処理された試料で細胞を保存することが示された。しかしながら、細胞を少なくとも 72 時間安定とするのが望ましいであろう。本実施例では、血液吸取の 24 および 72 時間後に血液試料を処理し、以下のごとく分析した：最小 2 つの 10 mL の EDTA Vacutainer（登録商標）試験管の血液（試験管当たり～8 mL の血液）を転移性癌患者から得た。血液吸取の 15 分以内に、適当な量の Cyto-ChexTMを手動で EDTA 試験管の各々に添加して、実施例 3 に記載したごとき CellStabilizeTM 注入デバイスを用いて、30 容量 Cyto-ChexTMを得た。

【0052】

血液検体の受領に際して、血液をプールし、7.5 mL の安定化された血液を、実施例 1 に記載したのと同じアッセイを用いて、24 時間および／または 72 時間においてテストし、実施例 1 に記載したのと同じ CellSpotter（登録商標）システム分析を用いて分析した。これらの 2 つの時点において CTC を比較した。90% 出力において、0.01 の両側 p 値と共に 0.95 の予測された相関係数を検出するために、対値を持つ合計 8 検体が必要である。24 時間 v s 72 時間比較において、対値を持つ合計 28 検体があったが、1 つの試料は極端に高い CTC を有し、それは図 6 には存在しない。

【0053】

図 6 は、24 時間 v s 72 時間における明らかな CTC 結果を伴う 27 検体のプロットを示す。回帰方程式、r-平方値、相関係数、および t-検定 p 値をグラフに示す。r-平方値およびパーソンの相関係数は、24 時間後における CTC カウントが 72 時間におけるそれと高度に相関することを示し、t-検定は、2 つのカウントの平均が統計学的に有意には異なることを示す（24 時間 = 11, 72 時間 = 11）。直線の傾き（1.0803）は、血液安定化剤でのインキュベーションの 24 時間および 72 時間後におけるほぼ同数の明白な CTC を示す。ウイルコキソン（Wilcoxon）の非パラメーター兆候ランクテストは、さらに、これらの 2 つの時点における 2 つの CTC カウントが有意には異なることを示した（p = 0.9105）。該結果は、安定化剤でのインキュベーションの 72 時間の後に CTC の喪失はなく、72 時間におけるカウントは 24 時間におけるカウントとほとんど同一であることを示す。

【0054】

実施例 6

安定化剤の添加の様式

前記したごとく、血液中の CTC は（無傷、損傷した等のごとく）異なる形態で存在し、一般に、それらは脆い。試験管中のさらなる細胞損傷を防ぐためには、血液が試験管中に吸い取られるや否や安定化剤を加える必要はない。しかしながら、添加の時点に制御するのは困難なプロセスであり、これは、血液吸取の場所に依存する。血液を吸い取るいくつかの部位は、必ずしも安定化剤を有する必要はなく、従って、試料をもう 1 つの部位に送って、安定化剤を添加する必要がある。これは、安定化剤添加の種々の時点を作り出す。これらの部位においてさえ、安定化剤添加の時点は吸い取られた試験管の数に依存するであろう。血液を吸い取る切開者は安定化剤を添加しないが、安定化剤添加のために試料を他の技術者に渡すであろう。

【0055】

従って、好ましい安定化剤が、一時的な過浸透圧条件への暴露および細胞に対する可能な損傷を最小化するために、濃縮された液体として、または水中の溶液としての希釈された形態で用いることができる。液体または固体安定化剤は、好ましくは、血液吸取に先立って、または、最適ではないが、しかる後直ちに血液吸取容器に加えて、血液吸取の間の乱れによる損傷からの最大保護効果を得る。

【0056】

プレフィル血液収集試験管、例えば、10 mLのVacutainer（登録商標）試験管（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）または（Greiner America, Lake Mary, FLからの）Vacuette（登録商標）試験管は商業的に入手可能であり、減圧に先立って、約2 mLの液体試薬で、または粒状コーティング物質で予め充填される。プレフィル試験管を製造するための別の手段は、凍結された液体の慣用的なイン・サイチュ凍結乾燥を含む。もう1つの特許された技術は、250 μ Lまでの液滴を液体窒素に滴下し、続いて、容器の内側で凍結されたビーズを慣用的に凍結乾燥して、区別される剛直なビーズを形成することによって調製される、区別される凍結乾燥ビーズ、いわゆるLyoSpheres（米国特許第6,106,836号；Akzo Nobel N.V., オランダ国）、およびBiolyph（ミネアポリス, MN）を利用する。

【0057】

まとめると実施例1ないし6は、安定化剤の血液試料への添加は、本発明で使用する豊富化アッセイにおいて、試料の品質およびCTCを維持することを示す。安定化剤の最適な量は変化し、実施例6に記載したごとく、液体から凍結乾燥されたペレット、さらに粉末への範囲の安定化剤のタイプおよび物理的状态に依存することが認識されるべきである。例えば、Cyto-ChexTM安定化剤の濃度は、1ないし50%、好ましくは約5ないし約40%、最も好ましくは約10ないし約30%の範囲がすることでき、TRANSfixTM安定化剤については、0.1ないし30%好ましくは約1ないし25%、最も好ましくは約1ないし10%の範囲とすることができるのが判明したが、他のタイプの安定化剤についての濃度または量は特定の範囲とは異なるかも知れず、各安定化剤および適用について最適化されなければならないのは認識されるべきである。理想的には、抗凝固剤および該安定化剤は、安定化剤の同一の効果的な濃度を維持しつつ、生物学的検体の合計容量の約0.1ないし50%、より好ましくは約0.3ないし30%、最も好ましくは約0.3ないし5%の容量で存在させる。最も重要には、あまり希釈しないのがより望ましい。

【0058】

本発明によって提供される改良は、前記した米国特許、および本明細書中に記載したことも好ましい具体例を参照することにより当業者に容易に明らかであろう。本発明の1つの特に有利な態様は、それが、貯蔵の間、豊富化処理の間に、全血中の稀な標的細胞およびCTCを維持するための安定化剤を開示することである。本発明によって提供されるさらなる改良は、血液吸取に先立っての、または血液吸取の直後における安定化剤の添加、および液体および固体双方の形態における安定化剤の利用に由来する。本発明によって提供される改良を、前記実施例1ないし6での好ましい具体例により記載し、例示してきた。

【0059】

本発明は、さらに、無傷CTC、疑われるCTC、および帰属されない事象の分析を改良し、後者は血液吸取時に存在する、または、処理の間に形成されたデブリスおよび／または凝集体よりなる。本発明は、特に、CTCの稀な細胞を安定化させるための組成物および態様を開発する本発明の改良された組成物および方法の開発でなされた広範な研究プロジェクトの結果である。本明細書中に開示したごとく、これらの改良を取り込んだ本発明の好ましい具体例は、本発明が、癌診断に加えた分野および適用で利用されるのを可能とすると信ずる。本発明の改良された診断態様は、好ましい具体例のこれまでの記載によって限定されるべきでないのは当業者に明らかであろう。最後に、前記で掲げたある具体例は詳細な記載を与えるが、以下の請求の範囲は該詳細な記載によってその範囲が制限されるものではない。事実、以下の請求の範囲の精神の逸脱することなく種々の修飾をなすことができる。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】図1は、室温での24時間の保存の後における、9人の癌患者からの全血検体中の検出可能なCTCの減少を示す。

【図2】図2は、0、6、18および24時間における、3人の癌患者からの全血検体中

の検出可能なC T Cを示す。

【図3】図3は、表I I中の1人の癌患者番号28162からの2つの検体試験管：a.) 安定化剤を含まない検体試験管、b.) 30% Cyto-ChexTM安定化剤を含む検体試験管の送付後における、検体品質に対するCyto-ChexTM安定化剤の効果を示す。イメージは、核酸色素D A P Iを添加した後の豊富化された試料における細胞のD N Aの染色を示す。丸い物体の大部分は、C T Cを含めた有核細胞内側の核を表し、他方、不規則な凝塊は損傷した細胞から放出されたD N Aを含み得る。

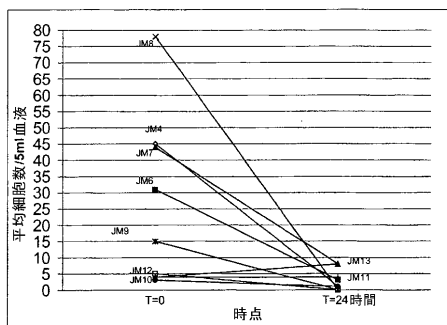
【図4】図4は、a) 混合無し、かつ安定化剤無し、b) 混合有り、かつ安定化剤無し、c) 30% Cyto-ChexTM安定化剤の存在下で混合有りにて、24時間の放置、または旋回器での混合後における検体品質に対するCyto-ChexTM安定化剤の効果を示す。D A P I染色後のイメージ解析は、図3 b)に記載する。 10

【図5】図5は、3つのタイプのC T C分解：無傷C T C (図5 a)、疑われるC T C (図5 b)、および「帰属されない事象」(図5 cおよび5 d)を示す。

【図6】図6は、有意に類似するカウント、ならびに比較用の統計学的有意性を示す、24時間および72時間における、27人の対象の安定化された血液からのC T Cを比較する。

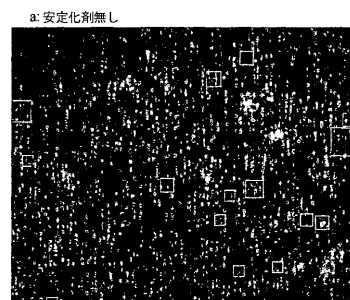
【図1】

Figure 1

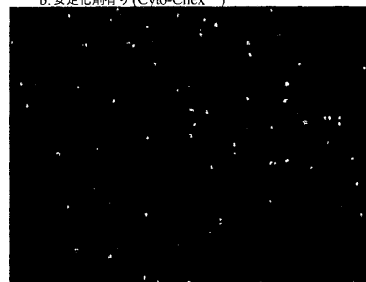


【図3】

Figure 3

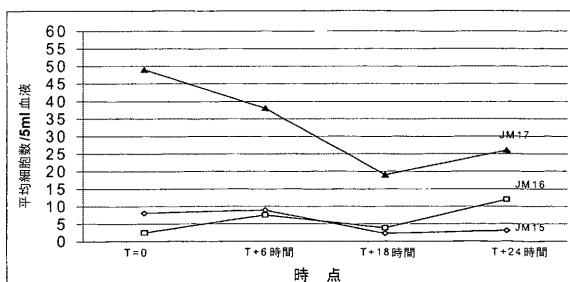


b: 安定化剤有り (Cyto-ChexTM)



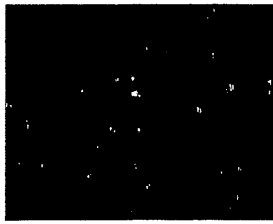
【図2】

Figure 2

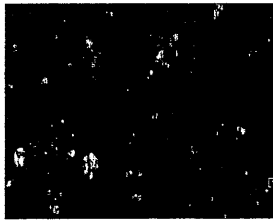


【図 4】

Figure 4



a: 混合無し、かつ安定化剤無し



b: 安定化剤無しの混合された試料



c: 安定化剤(30%)有りの混合された試料

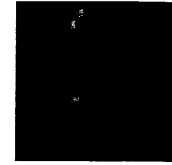
【図 5】

Figure 5

a. 無傷 CTC



b. 疑われる CTC

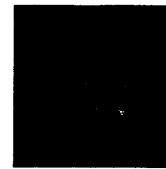


帰属されない事象

c.



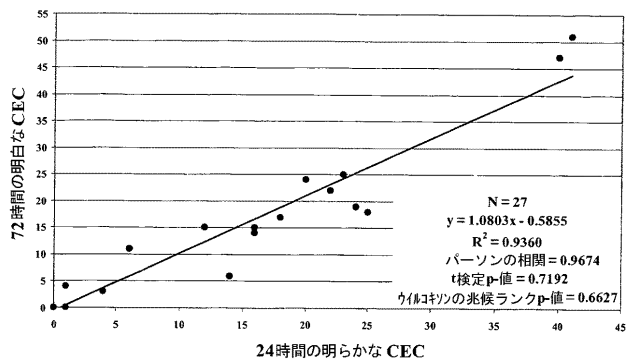
d.



【図 6】

Figure 6

24 時間 vs. 72 時間における CTC の数



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

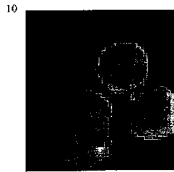
(10) International Publication Number
WO 03/018757 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/26867
(22) International Filing Date: 23 August 2002 (23.08.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/314,151 23 August 2001 (23.08.2001) US
60/369,628 3 April 2002 (03.04.2002) US
(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNIVEST CORPORATION [US/US]; Suite 100, 1105 Market Street, P.O. Box 8985 (US).
(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): RAO, Galla, Chandra [IN/US]; 9 Haverford Road, Princeton Junction, NJ 08550 (US). HERMANN, Melissa [US/US]; 2630 Pioneer Road, Haddonfield, PA 19040 (US). RUTNER, Herman [US/US]; 50 S. Penn Street, Apartment 609, Haddonfield, PA 19040 (US). TERSTAPPEN, Leon [NL/US]; 1354 Old Ford Road, Huntingdon valley, PA 19006 (US).
(74) Agents: MAYES, Jared et al.; Immunicon Corporation, Suite 100, 3401 Masons Mill Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).
(81) Designated States (national): AL, AG, AM, AN, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, GT, GU, HK, HN, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: STABILIZATION OF CELLS AND BIOLOGICAL SPECIMENS FOR ANALYSIS

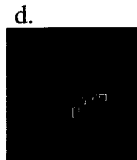
a. Intact CTC



b. Suspect CTC



Not Assigned Events



(57) Abstract: Compositions and methods for stabilizing rare cells in blood specimens, preserving the quality of blood specimens, and also serving as cell fixatives are disclosed which minimize losses of target cells (for example, circulating tumor cells) and formation of debris and aggregates from target cells, non-target cells and plasma components, thereby allowing more accurate analysis and classification of circulating tumor cells (CTC) and, ultimately, of tumor burdens in cancer patients. Stabilization of specimens is particularly desirable in protocols requiring rare cells enrichment from blood specimens drawn from cancer patients. Exposure of such specimens to potentially stressful conditions encountered, for example, in normal processing, mixing, shaking, delays due to transporting the blood, has been observed to not only diminish the number of CTC but also to generate debris and aggregates in the blood specimens that were found to interfere with accurate enumeration of target cells, if present. Stabilizers are necessary to discriminate between *in vivo* CTC disintegration and *in vitro* sample degradation.

WO 03/018757 A2

WO 03/018757 A2 

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

STABILIZATION OF CELLS AND BIOLOGICAL SPECIMENS FOR ANALYSIS

INVENTORS: Galla Chandra Rao, Melissa Hermann, Herman Rutner, and Leon WMM Terstappen

5

PRIORITY INFORMATION

This application claims priority under 35 USC §119(e) to US Provisional Applications No. 60/314,151 filed 23 August 2001, and No. 60/369,628 filed 03 April 2002. Both of these applications are incorporated by reference herein.

10

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates generally to the field of cell and blood stabilization, more particularly to the stabilization of rare cells in blood specimens and most particularly to stabilization of circulating tumor cells (CTC) in whole blood for subsequent enrichment and analysis.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Tumor cells were detected in blood as early as 1869. There is evidence that primary cancers begin shedding neoplastic cells into the circulation at an early disease stage prior to the appearance of clinical manifestations. Upon vascularization of a tumor, tumor cells shed into the circulation may attach and colonize at distant sites to form metastases. These circulating tumor cells are not normally found in healthy individuals and thus can form the basis for diagnosis and treatment of specific carcinomas. Neo-vascularization takes place when the tumor grows to a diameter of 1-2mm, a size too small to be detected by conventional methods such as mammography, which requires a tumor size of approximately 5mm for detection. A test method that has the sensitivity and specificity to detect small numbers of CTC at an earlier stage than the current gold standard, mammography, could dramatically improve early-stage cancer diagnosis and disease management. Such a test is taught in US #6,365,362 by Terstappen *et al.*, and is incorporated by reference herein.

20

25

30

Whole blood is a complex body fluid containing diverse populations of cellular and soluble components capable of undergoing numerous biochemical and enzymatic reactions that may occur particularly on prolonged storage for more than 6 hours *in vivo*, herein defined as occurring in the patient's body, and *in vitro*, herein defined as occurring after blood draw. Some of these reactions are directed to destruction of circulating tumor cells as foreign

WO 03/018757

PCT/US02/26867

species. The patient's immune response further weakens or destroys tumor cells by the normal defense mechanisms including phagocytosis and neutrophil activation. Chemotherapy similarly is intended to reduce both cell function and proliferation by inducing cell death by necrosis.

5 Besides these external destructive factors, tumor cells damaged in a hostile environment may undergo programmed death or apoptosis. Cells undergoing apoptosis or necrosis have altered membrane permeabilities, thereby allowing escape of DNA, RNA, and other cellular components leading to formation of cellular debris and eventual complete disintegration of CTC. Such tumor cell debris may still bear epitopes that are characteristic
10 of intact cells, and can lead to spurious increases in circulating cancer cells. Even whole blood specimens from healthy individuals undergo substantial changes in the cellular composition, broadly categorized and herein defined as decreased blood quality, which may occur with prolonged storage for periods of greater than 24 hours. Erythrocytes may rupture and release hemoglobin and produce cell ghosts. Leukocytes, particularly granulocytes, are
15 known to be labile and diminish on storage. Such changes increase the amount of cellular debris, derived from normal blood cells or proteins were found to interfere with the isolation and detection of rare target cells such as CTC. The combined effects of these destructive processes show a substantial increase in cellular debris that is readily detectable, for instance, with flow cytometric and microscopic analyses. Methods for such analysis are described in a
20 commonly owned, co-pending application entitled "Analysis of circulating tumor cells, fragments, and debris," which is incorporated by reference herein.

Detection of circulating tumor cells by microscopic imaging is similarly adversely affected by spurious decreases in classifiable tumor cells and a corresponding increase in
interfering stainable debris. Hence, maintaining the integrity or the quality of the blood
25 specimen is of utmost importance, since there may be a delay of as much as 24 hours between blood draw and specimen processing.

Such delays are quite common, since the techniques and equipment used in processing blood for this assay may not be readily available in every laboratory. The time necessary for a sample to arrive at a laboratory for sample processing may vary considerably.
30 It is therefore important to establish the time window within which a sample can be processed. In routine hematology analyses, blood samples can be analyzed within 24 hours. However, as the analysis of rare blood cells is more critical, the time window in which a blood sample can be analyzed shortens. An example is immunophenotyping of blood cells, which, in general, has to take place within 24 hours. In a cancer blood assay, larger volumes

WO 03/018757

PCT/US02/26867

of blood have to be processed, and degradation of the blood sample can become more problematic as materials released by disintegrating cells can increase the background and, therefore, decrease the ability to detect tumor cells.

There is a large body of published or patented art regarding the stability and
5 stabilization of normal blood cells over time and several proprietary commercial stabilizers are available for preserving white blood cells, e.g. Cyto-Chex™ from Streck Laboratories, Omaha, NE, StabiCyte™ from BioErgonomics, St. Paul, MN, and TRANSfix™ from UK NEQAS, Sheffield, UK.

In WO 97/45729, TRANSfix™ stabilizer is claimed to be suitable for analysis of
10 pathological specimens, specifically for HIV and leukemia blood specimens. However, no data are shown for these applications or for the use of TRANSfix™ stabilizer for stabilizing or protecting CTC during storage for prolonged periods. TRANSfix™ stabilizer is claimed to contain the crosslinking fixative, paraformaldehyde and heavy metal ions. It was shown to preserve the integrity of leukocytes including granulocytes for at least 5 days as measured by
15 flow cytometry. No data are shown for CTC or other pathogens.

Despite the shortcomings of paraformaldehyde or reagents containing
paraformaldehyde, formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal, such reagents are frequently used for fixing and stabilizing tumor cells in blood or histology specimens (see, for example, D.B.Tse et al., US #6,004,762). Effective fixing is particularly important after CTC have
20 been permeabilized with pore-forming reagents, such as saponin or surfactants, which further weaken the membrane structure and integrity of the fragile CTC. Permeabilization is required to permit staining or immunostaining of intracellular elements, for example, with the nuclear stain DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and with labeled antibodies, such as for cytokeratins, which are used for characterizing CTC and differentiating them from normal
25 blood cells.

Alternative fixatives to bifunctional or crosslinking aldehydes have been used. Some of the older fixatives are based on heavy metals, e.g. chromium or manganese, similar to the mode of action in tanning of leather hides, but their lack of specificity and toxicity limits applications. Another approach to fixation utilizes monofunctional derivatives of
30 formaldehyde, or methylol derivatives of heterocyclic amines or amides, e.g. diazolidinyl urea and imidazolidinyl urea that are widely used in cosmetics as preservatives. Also, polyethylene glycol (of about 20,000MW) is described as being an effective stabilizing agent for leukocytes. Such compounds are disclosed in several US patents issued to Streck

WO 03/018757

PCT/US02/26867

Laboratories, Omaha, NE, (US 5,459,073; US 5,849,517; US 5,981,282; US 6,017,764; US 6,051,433; US 6,124,089; 6,159,682; US 6,200,500) which are primarily intended for stabilizing specific blood cell populations for use as hematology controls.

The mode of action of methylol derivatives is unknown but is speculated to involve weak, reversible bonds with amino groups of cellular proteins, which may dissociate upon removal of the excess fixative. Methylol or hydroxymethyl derivatives are chemically labile and may release small amounts of formaldehyde that could form short-range or single carbon crosslinks with proteins. Formaldehyde released from these so-called formaldehyde donors has been reported to react with nucleic acid bases, particularly adenine, to reversibly form hydroxymethylol derivatives and methylene bridges thereby irreversibly crosslinking nucleic acids, which may be the biocidal mode of action in cosmetics. However, free formaldehyde is claimed not to be the active ingredient in the Cyto-Chex™ stabilizers in the foregoing patents. These patents do not disclose utility for stabilizing or fixing CTC in blood or other biological specimens. One cannot presume that tumor cells circulating in blood will be stabilized similar to normal blood cells due to the known fragility of CTC, and that any stabilization of CTC, if it does occur, would persist throughout the processing steps. There is therefore a clear need for identifying effective reagents for stabilizing CTC *in vitro* during storage and processing and for preserving the quality of blood, which we herein have shown to be critical in enrichment and detection procedures requiring accurate classification and enumeration of CTC, if present.

SUMMARY OF THE INVENTION

Stabilizing agents are necessary to discriminate between *in vivo* tumor cell disintegration and disintegration due to *in vitro* sample degradation. In accordance with the present invention, several compositions serving as stabilizers, fixatives, and preservatives for maintaining the quality of biological specimens have been discovered. Also, methods and apparatus for stabilizing biological specimens have been discovered. These improvements or discoveries have enabled the invention described herein to be greatly improved over systems and methods in the art, and to have applications for enrichment and enumeration of CTC in whole blood.

A number of compositions have been discovered to preserve biological specimens. These compositions are a combination of anti-coagulants and stabilizing agents. Further, the invention teaches a composition of a stabilized sample, an anti-coagulant, and a stabilizing agent or agents. Further, the invention teaches various methods for contacting biological

WO 03/018757

PCT/US02/26867

specimens with these compositions to enhance stability. Further, the invention teaches various apparatus for contacting biological specimens with these compositions to enhance stability. Generally, these can be used for preserving biological specimens, and specifically for preserving CTC in blood samples.

5 Accordingly, an improved protocol is provided, which comprises addition of stabilizers to the blood collection tube prior to blood draw. Also provided by the invention are methods for adding the stabilizers to the blood tube immediately after the blood draw, including protocols for compensating for the varying volume of the specimen in the blood tube.

10 Further provided by the invention are methods for adding the stabilizers to one or more buffers used in processing of the biological specimens thus serving both as stabilizer and/or as a fixative, as required. Accordingly, it is a primary object of the present invention to provide stabilizers for biological specimens prior to analysis. Specific uses of this invention are directed toward stabilizing CTC in blood samples. It is another objective of the invention to provide stabilizers and preservatives for maintaining the quality of whole blood
15 specimens for at least 24 hours, but up to 72 hours, when exposed to mechanical stress, such as may occur during inadvertent mixing or shaking during transport, or during mechanical re-mixing of the specimen prior to analysis.

It is to be understood and appreciated that these discoveries in accordance with the
20 invention are only those that are illustrative of the many additional potential applications of the compositions and methods that may be envisioned by one of ordinary skill in the art, and thus are not in any way intended to be limiting of the scope of the invention. Accordingly, other objects and advantages of the invention will be apparent to those skilled in the art from the following detailed description, together with the appended claims.

25

DESCRIPTION OF THE FIGURES:

Figure 1 depicts the decline of detectable CTC in whole blood specimens from 9 cancer patients after storage for 24 hours at room temperature.

Figure 2 depicts the detectable CTC in whole blood specimens from 3 cancer patients
30 at 0, 6, 18, and 24 hours.

Figure 3 depicts the effect of Cyto-Chex™ stabilizer on specimen quality after shipping two specimen tubes from one cancer patient, #28162 in Table II: a.) specimen tube without stabilizer, b.) specimen tube with 30% Cyto-Chex™ stabilizer. The images show the staining of the DNA of cells in the enriched sample after adding the nucleic acid dye DAPI.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

The majority of the round objects represent nuclei inside nucleated cells including CTC, while irregular agglomerates may include DNA released from damaged cells.

Figure 4 depicts the effect of Cyto-Chex™ stabilizer on specimen quality after standing for 24 hours or mixing on a nutator: a) without mixing and without stabilizer, b) with mixing and without stabilizer, c) with mixing in the presence of 30% Cyto-Chex™ stabilizer. Image analysis after DAPI staining is discussed in Figure 3b)

Figure 5 depicts 3 types of CTC degradation: Intact CTC (Figure 5a), Suspect CTC (Figure 5b), and "Not Assigned Events" (Figures 5c and 5d).

Figure 6 compares CTC from stabilized blood of 27 subjects at 24 hours and 72 hours showing significantly similar count, as well as the statistical significance for the comparison.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Herein, various terms that are well understood by those of ordinary skill in the art are used. The intended meaning of these terms does not depart from the accepted meaning.

Specimen, sample, or blood quality is herein defined and experimentally determined by the following parameters:

1. relative number of leukocytes that are non-specifically selected as background compared to CTC or spiked cultured tumor cells;
2. cell debris including DNA or DNA fragments as measured by particulate material and larger aggregates that are detectably stained with the nuclear stain DAPI; and
3. cellular cytoplasmic debris or aggregates that are either non-specifically or specifically stained with phycoerythrin (PE) labeled anti-cytokeratin antibodies or with allophycocyanin (APC)-labeled antibody for CD-45 on leukocytes.

The terms "biological specimen" or "biological sample" may be used interchangeably, and refer to a small portion of fluid or tissue taken from a human subject that is suspected to contain cells of interest, and is to be analyzed. A biological specimen may refer to the fluidic or the cellular portions, or to the portion containing soluble material. Biological specimens or biological samples include, without limit bodily fluids, such as peripheral blood, tissue homogenates, nipple aspirates, colonic lavage, sputum, bronchial lavage, and any other source of cells that is obtainable from a human subject. An exemplary tissue homogenate may be obtained from the sentinel node in a breast cancer patient.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

The term "rare cells" is defined herein as cells that are not normally present in biological specimens, but may be present as an indicator of an abnormal condition, such as infectious disease, chronic disease, injury, or pregnancy. Rare cells also refer to cells that may be normally present in biological specimens, but are present with a frequency several
5 orders of magnitude less than cells typically present in a normal biological specimen.

The terms "anti-coagulant" or "anti-coagulating agent" may be used interchangeably, and refer to compositions that are added to biological specimens for the purpose of inhibiting any undesired natural or artificial coagulation, agglutination, or aggregation, further collectively defined as "clumping" or "clump formation". However, such clumps must be
10 differentiated from "clusters" or aggregates of CTC that are counted individually as Intact CTC if they meet the classification criteria for Intact CTC. Clusters of CTC, by virtue of their adhesiveness and propensity to establish secondary metastatic tumor sites, are believed to have greater proliferative potential than single CTC and their presence is thus
15 diagnostically highly significant. An example of coagulation is blood clotting and common anti-coagulants are chelating agents, exemplified by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), ethylenebis(oxyethylenitrilo) tetraacetic acid (EGTA), or by complexing agents, such as heparin, and heparin species, such as heparin sulfate and low-molecular weight heparins.

The ideal "stabilizer" or "preservative" (herein used interchangeably) is defined as a composition capable of preserving target cells of interest present in a biological specimen, while minimizing the formation of interfering aggregates and/or cellular debris in the biological specimen, which in any way can impede the isolation, detection, and enumeration of targets cells, and their differentiation from non-target cells. In other words, when
20 combined with an anti-coagulating agent, a stabilizing agent should not counteract the anti-coagulating agent's performance. Conversely, the anti-coagulating agent should not interfere with the performance of the stabilizing agent. Additionally, the disclosed stabilizers also serve a third function of fixing, and thereby stabilizing, permeabilized cells, wherein the expressions "permeabilized" or "permeabilization" and "fixing", "fixed" or "fixation" are
25 used as conventionally defined in cell biology. The description of stabilizing agents herein implies using these agents at appropriate concentrations or amounts, which would be readily apparent to one skilled in cell biology, where the concentration or amount is effective to stabilize the target cells without causing damage. One using the compositions, methods, and apparatus of this invention for the purpose of preserving rare cells would obviously not use

WO 03/018757

PCT/US02/26867

them in ways to damage or destroy these same rare cells, and would therefore inherently select appropriate concentrations or amounts. For example, the formaldehyde donor imidazolidinyl urea has been found to be effective at a preferred concentration of 0.1-10%, more preferably at 0.5-5% and most preferably at about 1-3% of the volume of said specimen. An additional agent, such as polyethylene glycol has also been found to be effective, when added at a preferred concentration of about 0.1%-5%, more preferably about 0.1%-1%, and most preferably about 0.1%-0.5% of the specimen volume.

A stabilizing agent must be capable of preserving a sample for at least a few hours. However, in the Examples presented herein, it is shown that samples can be stabilized for at least up to 72 hours. Such long-term stability is important in cases where the sample is obtained in a location that is distant to the location where processing and analysis will occur. Furthermore, the sample must be stabilized against mechanical damage during transport.

The term "circulating tumor cells" or CTC refers to cells known to be shed from tumors, often in large numbers. A steady-state level is maintained when destruction of CTC equals the shedding rate, which in turn depends on the size of the tumor burden (see JG Moreno *et al.* "Changes in Circulating Carcinoma Cells in Patients with Metastatic Prostate Cancer Correlates with Disease State." *Urology* 58. 2001). Generally, the more resistant and proliferative cells survive to establish secondary or metastatic sites. Circulating tumor cells are the preferred target rare cells to be stabilized or fixed by this invention.

The term "cell composition" refers to a plurality of cells, most likely of different types derived from a biological specimen. This cell composition will include both target and non-target cells. For example, in a fraction of blood taken from a subject that is suspected to have cancer, a cell composition would be red blood cells, white blood cells, and circulating tumor cells if present. However, the skilled biologist will recognize that other biological specimens, as described herein, would contain different cell types, depending on the source of the biological specimen.

During methods of enrichment, such as those taught by Terstappen *et al.* in US #6,365,362 (incorporated by reference herein), the enriched cell fraction contains mainly leukocytes and a much smaller number of CTC, if present. During processing, cells are permeabilized with a mild surfactant, Immuniperm™ (PBS containing 0.05% Saponin – Immunicon Corp, Huntingdon Valley, PA) to form small pores of about 8nm diameter to permit entry of the immunostaining antibody, anti-cytokeratin-PE, and the nuclear stain, DAPI. DAPI is a fluorescent intercalating dye that binds selectively to adenine-thymine in cellular and extra-cellular DNA. These pores further weaken the structural integrity of the

WO 03/018757

PCT/US02/26867

cell membrane and require a cell fixative or stabilizer after staining to "plug" the holes. As previously mentioned, the conventional aldehyde and heavy metal based fixatives in the art, which are intended to strengthen the permeabilized membrane, were found to be incompatible with the processes of magnetic collection and with the staining protocols used in this invention. In contrast, the Cyto-Chex™ stabilizers used in this invention were also unexpectedly found to be highly effective as fixatives in the post-staining steps and are thus included in the proposed reagent formulation herein. Hence, the stabilizers described and used in this invention concurrently or sequentially were discovered to perform three critical functions:

1. stabilization of CTC and non-target cells in blood specimens for transport, storage, sample preparation, and subsequent analysis,
 2. preserving the quality of the blood specimen by inhibiting debris and/or aggregate formation, and
 3. serving as a fixative after permeabilization.
- One or more of these functions were found to be essential for accurate analysis of CTC or rare cells in the enrichment assays utilized in this invention.

The presence of a stainable nucleus (e.g. stainable by a nuclear dye such as DAPI) is an essential morphological characteristic of a nucleated cell. Positive DAPI staining is a critical element in defining and differentiating cytokeratin-positive cells as "Intact CTC" (Fig. 5a), which are distinct from "Suspect CTC" characterized by DAPI-weak or DAPI-negative and/or irregular or speckled cytoplasmic staining of the cytoskeletal proteins recognized by the anti-cytokeratin antibodies. Both Intact and Suspect CTC can be distinguished from leukocytes that are DAPI-positive, but express the leukocyte-specific marker, CD45. "Suspect CTC" still have some morphological features that can be associated with Intact CTC and may be necrotic, apoptotic cells or "apoptotic bodies" of epithelial cell origin that originated from "Intact CTC" or were shed from the tumor site into the circulation (Fig 5b).

A third category of particles or detectable events, labeled "Not Assigned Events" in Table II and Figures 5c and 5d, can have staining characteristics similar to "Suspect CTC", but lack structural morphological features of cells, i.e. they are largely irregular aggregates or clumps that were found to be statistically more prevalent in unstabilized compared to stabilized blood specimens ($p=0.0327$). The presence of a substantial number of "Suspect CTC" relative to "Intact CTC" in a stabilized blood specimen can provide important diagnostic information to the clinician regarding the growth/tumor burden, immune status

WO 03/018757

PCT/US02/26867

and/or the therapeutic response of a patient. Table I shows the stabilizing effects of different stabilizers on the relative number of Intact CTC, Suspect CTC, and "Not Assigned Events" in eight cancer patients. Table II shows a significant decrease ($p=0.0327$) in the number of "Not Assigned Events" with Cyto-Chex™ stabilizer as compared to no stabilizer and the significant stabilizing effect of Cyto-Chex™ stabilizer on CTC as compared to no stabilizer ($p=0.0004$) in thirty-one patients with diverse carcinomas. The number of Suspect CTC was not statistically different between the stabilized and the not stabilized blood ($p=0.1548$). The likely cause for the increase in background in the unstabilized blood is the artifacts that cannot be discriminated from "true" Suspect CTC. Discrimination between artifacts and Suspect CTC or tumor debris formed *in vivo* can have clinical significance and emphasizes the need for a blood/CTC stabilizer that permits the assessment of the CTC status in a patient's blood without contributions from artifacts caused by sample degradation between the blood draw and the CTC analysis (i.e. *in vitro*).

In the enrichment processes used in the following Examples, CTC (herein generically consisting of both Intact and Suspect CTC, unless differentiated), cell fragments, and cellular debris are captured with magnetically labeled antibodies that recognize specific surface markers on the CTC (for example, with anti-EpCAM antibody attached to magnetic particles of about $0.2\mu\text{m}$ (200nm) diameter, as described in US #6,120,856 which is incorporated by reference herein). The presence of numerous small but dense magnetic particles on the surface of CTC can further stress the weakened non-stabilized cell membrane during the rapid migration of the magnetically labeled cells in the strong magnetic field generated inside a high-gradient magnetic separator (e.g. Immunicon quadrupole QMS17; patented under US patents #5,186,827 and #5,466,574) both during magnetic (in-field) incubation and during magnetic collection.

The stabilizers of this invention were found to inhibit damage to magnetically labeled cells that may occur both from magnetic and non-magnetic stresses even during normal specimen processing, such as in centrifugation, vortexing, and pipetting. For example, substantially greater damage to rare cells and CTC has been observed when using immunomagnetic labeling with the larger magnetic particles or beads of $2.8\mu\text{m}$ and $4.5\mu\text{m}$ diameters as sold by Dynal Inc., Lake Success, NY.

During blood draw and subsequent specimen processing, the surviving battered tumor cells present in the peripheral circulation may be further stressed and damaged by turbulence during blood draw into an evacuated tube and by specimen processing, e.g. transport of the

WO 03/018757

PCT/US02/26867

blood tube and mixing prior to analysis. Such mechanical damage is additional to on-going immunological, apoptotic, and necrotic in processes leading to destruction of CTC that occur *in vitro* in a time dependent manner. We have found that the longer the specimen is stored, the greater the loss of CTC, and the larger the amounts of interfering debris and/or aggregates. Indeed, data presented in this specification (Figures 1 and 2) show dramatic declines in CTC counts in several blood specimens stored at room temperature for 24 hours or longer, indicating substantial *in vitro* destruction of CTC after blood draw. While the losses of hematopoietic cells during storage are well known phenomena and the subject of above-cited patents by Streck Labs and by others, the occurrence of mechanical damage due to mixing or transport have to date not been recognized factors in the loss of CTC or rare cells. The formation of cellular debris and the interfering effects of accumulating debris and aggregates in the analysis of CTC or other rare cells have similarly been unrecognized to date. It appears to be most evident and problematic in highly sensitive enrichment assays requiring processing of relatively large blood volumes (5-50mL), and subsequent microscopic detection or imaging of target cells after volume reduction (less than 1mL). Such debris are either not normally seen, or do not interfere in conventional non-enrichment assays, for example, by flow cytometry or in enrichment by density gradients methods.

In summary, all or some of the above-cited factors can and were found to contribute to *in vitro* debris and/or clump formation that have been observed to interfere with detection of CTC by enrichment procedures as disclosed in this invention. Stabilizer compositions and uses thereof, as disclosed in this invention, have been unexpectedly found to preserve CTC, dramatically improve the quality of blood specimens primarily by reducing formation of detectable cellular debris and aggregates, and to serve as stabilizers and fixatives in the enrichment processes. Most importantly, the discovery of effective stabilizers for minimizing *in vitro* damage to CTC and degradation in the quality of the blood specimens provide a more complete picture of the *in vivo* status of the CTC in a patient. The number of Intact CTC, damaged, or Suspect CTC, as well as the degree of damage to the CTC, as illustrated in Figure 5, serve as diagnostically important indicators of the tumor burden, the proliferative potential of the tumor cells, and/or the effectiveness of therapy. In contrast, current art using non-stabilized samples superimposes unavoidable *in vivo* damage to CTC on avoidable *in vitro* storage and processing damage, and thus may yield erroneous information on CTC and tumor burdens in patients. Analysis of fragments and debris from damaged CTC is important to understand what is taking place in the patient. Therefore, methods and reagents for performing such analysis is described in a co-pending application entitled, "Analysis of

WO 03/018757

PCT/US02/26867

circulating tumor cells, fragments, and debris." That commonly-owned application is incorporated by reference herein.

The invention is illustrated by the following Examples herein, which are not intended to limit the scope of the invention, but rather provide cases for the general uses of the invention.

EXAMPLE 1

Stabilization of circulating tumor cells in blood

Cyto-Chex™, Stabilyte™ and TRANSfix™ are examples of three stabilizers that are commercially available and have shown utility in stabilizing blood cells in blood specimens for extended time periods. These stabilizers are optimized to maintain cell size (mainly by minimizing shrinking) and to preserve antigens on cell surfaces, primarily as determined by flow cytometry. The intended applications generally involve direct analyses and do not require extensive manipulation of the sample or enrichment of particular cell populations. In contrast, the circulating tumor cells, or other rare target cells, isolated and detected in this invention, comprise and are defined as pathological abnormal or rare cells present at very low frequencies, thus requiring substantial enrichment prior to detection.

CTC are often detectable in blood even after storage for 24 hours at room temperature or 2-8°C, but may become more fragile for reasons previously discussed. It was shown that any manipulation or enrichment methods could damage these fragile cells, thus resulting in potential cell losses and debris or aggregate formation during the process of isolation. Figures 1 and 2 illustrate the substantial losses of CTC in some specimens on storage for up to 24 hours.

In this Example, the effect of different stabilizers on recovery of CTC after enrichment from 24-hour-old specimens was examined. Blood samples from patients with advanced carcinomas were obtained and treated with stabilizers within 2 hours of blood draw as follows. Blood drawn from each patient into different tubes containing EDTA was pooled, and equal volumes were aliquotted into separate tubes. Various additives, consisting of Cyto-Chex™ stabilizer, Stabilyte™ stabilizer, and TRANSfix™ stabilizer, were added to the separate tubes at 30% Cyto-Chex™ stabilizer, 20% Stabilyte™ stabilizer, and 10% TRANSfix™ stabilizer, where these are percent of the blood volume. One tube was used as the control to which no buffer or stabilizer was added. The samples were then mixed and stored at room temperature for 24 hours. An equal volume of Immunicon System Buffer (PBS containing 0.5% BSA, 0.2% casein and 0.1% sodium azide) was added to each sample.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

After mixing, the samples were centrifuged at 800x g for 10 minutes to remove plasma. Immunicon AB Buffer (System Buffer containing streptavidin as a mediator of controlled reversible aggregation (techniques described in US Applications #09/351,515 and #09/702,188 incorporated by reference herein) was added to each tube to a final volume of 5 1.5x the initial blood volume. After mixing the samples, CA EpCAM ferrofluid (0.2µm magnetic particles coupled to anti-EpCAM antibody and with desthiobiotin as a mediator of controlled reversible aggregation) was added to the samples to magnetically label CTC.

The samples were incubated with the CA EpCAM ferrofluid inside Immunicon quadrupole high-gradient magnetic separators (QMS17; patented under U.S. patent numbers 10 5,186,827 and 5,466,574 both incorporated by reference herein) for two 10 minute time periods with remixing outside the QMS17 magnets after each 10 minute time period, as described in US Application #09/240,939 incorporated by reference herein. After these magnetic incubations, the samples were magnetically separated for 20 minutes. The uncollected fractions were aspirated, and the tubes were removed from the QMS17. The 15 magnetically collected fractions were resuspended in System Buffer and re-separated in the QMS17 for 10 minutes. The uncollected fractions were aspirated again and the collected cells were resuspended in 200µl of Immuniperm™ (PBS containing 0.05% Saponin) to permeabilize the captured cells to allow intracellular staining.

The permeabilized samples were stained for 15 minutes with a cocktail consisting of 20 several fluorescent markers: 20µl anti-cytokeratin-PE, 20µl anti-CD45-APC and 20µl DAPI. Anti-cytokeratin stains epithelial cells and anti-CD45 stains leukocytes to differentiate any 20 non-specifically stained leukocytes from target CTC. DAPI is used to identify all nucleated cells and to differentiate cells from non-nucleated cell debris. After washing out excess staining reagents by magnetic separation, the samples were resuspended in 320µL 25 Immunicon CellFix™ (System Buffer also containing 0.5% BSA, 10mg/mL biotin and 25% Cyto-Chex™ stabilizer).

Each sample was transferred to an Immunicon CellSpotter® chamber (as described in US Application #10/074,900 incorporated by reference herein), a cuvet-like enclosure with an optically flat transparent upper viewing window designed to fit into a bipolar angled 30 magnet assembly (as described in US #6,136,182 incorporated by reference herein). Magnetic collection of the magnetically labeled target cells on the underside of the viewing window allows imaging by means of a fluorescence microscope. The sample chamber surface was automatically scanned with four different filters. The software collects and

WO 03/018757

PCT/US02/26867

analyzes the images but presents only images that are positive for both cytokeratin-PE and DAPI as potential CTC candidates for subsequent re-viewing and classification. The classified Intact CTC, Suspect CTC, and "Not Assigned Events" (debris particles) were counted after confirming morphology and positive staining for cytokeratin-PE and DAPI, but

5 negative staining for the pan-leukocyte marker, CD45-APC. Table I shows the effect of storing specimens from eight cancer patients in various stabilizers for 24 hours prior to analysis. The results are expressed as "Intact CTC", "Suspect CTC" and "Not Assigned Events" events.

10 **Table I: Effect of stabilizers in clinical samples (after 24 hours at room temperature)**

Patient ID.	Intact CTC				Suspect CTC				Not Assigned Events			
	N	T	S	C	N	T	S	C	N	T	S	C
D12 (Breast cancer)	1	3	6	2	5	4	4	7	72	31	17	34
JM38 (Prostate cancer)	23	72	61	72	61	161	169	173	324	160	61	55
JM33 (Prostate cancer)	19	52	59	61	73	197	191	144	242	135	56	66
JM40 (Prostate cancer)	14	20	23	26	25	29	27	33	357	76	93	68
JM40 (Prostate cancer)	27	--	25	28	22	--	32	25	360	--	98	76
D13 (Breast cancer)	9	107	101	121	198	358	323	345	1034	1075	500	635
D9 (Breast cancer)	1	2	0	3	3	8	4	9	143	180	187	70
JDS002 (Breast cancer)	58	106	81	89	46	41	42	38	421	105	107	135
JDS009 (Breast cancer)	0	1	0	0	1	2	1	0	82	48	92	82
JDS009 (Breast cancer)	0	0	0	0	0	2	0	0	47	44	12	32

N = No stabilizer
T = TRANSfix™ stabilizer
S = Stabilyte™ stabilizer
C = Cyto-Chex™ stabilizer

15

Higher numbers of Intact and Suspect CTC were detected in most of the patient samples after 24-hour storage of these blood samples with all three stabilizers when

20 compared to blood samples with no added stabilizer. It may be possible that substantial conversions of Intact CTC to Suspect CTC had occurred in unstabilized specimens, or that the cells were lost. Statistical analysis of these data show significant differences in numbers of total CTC detected between stabilizers and no stabilizers (p-value = 0.02). This difference was seen with both breast and prostate cancer samples. However, there was no difference

25 between the three stabilizers tested (p-values = 0.18). The higher numbers of Intact and Suspect CTC detected in the presence of stabilizers are not believed to be artifacts due to non-specific staining, as this effect was not observed in 24-hour old samples from normal

WO 03/018757

PCT/US02/26867

donors. These data clearly show that addition of stabilizers to blood samples from cancer patients preserve circulating tumor cells during storage and in the sample processing steps, thus permitting more accurate classification of *in vivo* levels of Intact CTC and Suspect CTC.

5

EXAMPLE 2**Preservation of sample quality for analysis**

CTC are present in blood at a low frequency and require large sample volumes and efficient enrichment methods for detection. Enrichment methods for CTC involve several wash steps, including magnetic separation methods that can damage cells and create debris and clumps due to DNA leakage from cells. However, it was found unexpectedly, and rather surprisingly, that mild end-over-end mixing of blood tubes on a nutator, as routinely done in most hematology labs to keep the blood cells suspended, causes significant formation of cellular debris that can interfere with detection and enumeration of CTC. Furthermore, it was observed that incomplete filling of the blood draw or assay tubes further aggravated this mixing damage, but no damage was observed in stationary tubes. As shown in Figure 3, any mixing of patient samples during shipping or other mechanical stress was also shown to unexpectedly increase interfering debris. Table II shows the effect of Cyto-Chex™ stabilizer on the recovery of CTC after overnight shipment of the blood samples. The detection of CTC requires large sample volumes as well as special skills and equipment that are not routinely available in every clinical laboratory. As a result, those blood samples need to be shipped to a central lab for processing. As mentioned earlier, CTC are delicate and any mechanical mixing or shaking might damage the cells during shipping. Our data show that it is absolutely essential to add a stabilizing agent as disclosed in this invention to preserve both CTC and sample quality prior to transport, storage, and processing of blood specimens.

These adverse effects on CTC and sample quality may have escaped detection to date, since such stressed samples may still be satisfactory for most laboratory or clinical analyses. For example, immunophenotyping by flow cytometry do not require any enrichment methods and where the presence of debris apparently does not interfere with analysis. However, our findings suggest that it is critically important to preserve blood sample quality when assaying enriched rare target cells by microscopic or other optical methods.

EXAMPLE 3**Effect of Cyto-Chex™ stabilizer on sample quality of normal specimens mixed for 2-3 hours**

WO 03/018757

PCT/US02/26867

Staining of the cell nucleus with DAPI normally is detectable inside a permeabilized live or dead cell, if the nucleus is intact. DNA staining may also be detectable in cell fragments or cellular debris, such as stainable aggregates outside the cell if DNA has leaked out. Staining with DAPI and examination under a fluorescence microscope can thus readily check the sample quality.

Three tubes of blood were drawn into 10mL EDTA anti-coagulated tubes from a normal donor. Cyto-Chex™ stabilizer was added to one blood tube without removal of the cap plug by using the CellStabilize™ injection device as follows. The blood tube was placed in the calibrated device with graduations that allows estimating the blood volume to permit addition of the proper amount of stabilizer to the desired final concentration. One needle (27G, ½ inch) was inserted through the stopper of the tube as a vent and the required volume of stabilizer was injected into the tube using a second needle (20G, 1½ inch) and a syringe. The specimen tube was removed from the device and mixed by several inversions of the tube. Two blood specimens, one without stabilizer and another tube with 30% Cyto-Chex™ stabilizer were mixed for 2-3 hours on a nutator mixer to mimic shipping conditions. The third blood tube was not mixed for use as a control without stabilizer. After 2-3 hours, 7.5mL of blood was transferred from each "no stabilizer" tube while 9.75mL of blood was transferred from the "Cyto-Chex™ stabilizer" tube to separate 15ml polypropylene centrifuge tubes for processing as described in Example 1.

The samples were transferred to Immunicon CellSpotter® chambers for CellSpotter® analysis using fluorescent imaging microscopy. The samples were scanned in four different filters for target cells that had been magnetically aligned on the underside of the viewing window of the chamber. The images from different filters were stored. The sample quality was determined from the number of detectable DAPI stained events (Intact CTC, Suspect CTC, and stainable "Not Assigned Events" or debris) compared to the number of detectable nucleated CTC and non-target cells. For optimal sample quality, stainable cellular debris and aggregates must be kept small to permit accurate detection and enumeration of Intact CTC and Suspect CTC.

The images in Figure 3 show the damaging effect of transporting a blood tube without a stabilizer (Fig. 3a) compared to a tube with 30% Cyto-Chex™ stabilizer added (Fig. 3b). Similarly, Figures 4a, 4b, and 4c show the staining of cell nuclei with DAPI. There were numerous DAPI stainable cell clumps and DNA debris when samples were mixed without any stabilizer present (Fig. 4b) as compared to the control samples with no stabilizer or mixing (Fig. 4a) and samples with Cyto-Chex™ stabilizer plus mixing (Fig. 4c). These data

WO 03/018757

PCT/US02/26867

unexpectedly show that mixing of blood samples damages not only the fragile CTC, but also normal hematopoietic cells, thereby generating debris and aggregates that can be detected after enrichment. Surprisingly, addition of stabilizers to blood samples before mixing the samples was found to minimize both cell damage and to preserve sample quality.

5

EXAMPLE 4**Effect of Cyto-Chex™ stabilizer on circulating tumor cells during shipping**

In this Example, two tubes of EDTA anti-coagulated blood were drawn from 31 cancer patients (3 were repeat patients received two separate times) with advanced stage disease. Cyto-Chex™ stabilizer was directly injected into one set of tubes using venting with the CellStabilize™ device described in Example 3, such that final volume of Cyto-Chex™ was 30% the total volume. The second set of tubes was untreated controls. Both sample sets were then shipped to Immunicon by overnight service with no ice packs. The day-old samples were processed by enrichment of the CTC and detection by CellSpotter™ analysis.

The procedure used in this Example to enrich and detect the CTC is similar to the procedure used in Example 1. The results on blood samples with and without added Cyto-Chex™ stabilizer are shown in Table II.

TABLE II

Patient ID #	Cancer Type	Intact CTC		Suspect CTC		Not Assigned Events	
		Without	With	Without	With	Without	With
20370 (1)	Breast	0	1	1	4	44	21
7493 * (2)	Breast	9	16	3	4	35	20
23435 (3)	Breast	0	0	0	0	55	40
24946 (4)	Lung	2	3	2	8	292	307
10520 (5)	Breast	0	7	0	12	1939	104
26858 (6)	Uterus	0	1	0	0	53	24
25000 (7)	Prostate	0	2	0	4	801	242
23549 (8)	Lung	1	1	11	1	3194	135
25167 (9)	Breast	0	0	0	0	31	28
26041 (10)	Colon	0	0	0	4	649	120
24164 (11)	Endometrial	0	0	0	2	628	86
20942 (12)	Breast	0	0	1	0	201	115
28217 (13)	Breast	1	4	0	7	52	33
19710 (14)	Colon	0	0	0	0	110	27
19218 (15)	Lung	0	0	1	0	53	25
28162 (16)	Rectum	0	0	1	0	1544	79
23530 (17)	Prostate	21	106	26	42	142	179
24946 (18)	Lung	0	6	3	7	283	46
28287 (19)	Lung	0	1	0	1	155	32
27851 * (20)	Renal	0	0	0	1	12	13

WO 03/018757

PCT/US02/26867

28186 * (21)	Uterus	0	0	1	0	33	21
21515 * (22)	Breast	0	0	0	0	17	20
25084 * (23)	Ovary	0	0	0	0	17	63
25000 * (24)	Prostate	0	6	2	1	25	63
25254 * (25)	Lung	0	0	0	0	20	24
22488 (26)	Breast	2	0	2	3	19	28
21888 (27)	Breast	0	2	3	3	36	91
16925 (28)	Breast	2	10	3	3	76	64
28327 * (29)	Bladder	62	285	105	72	139	113
19218 (30)	Lung	0	0	0	0	19	41
13517 (31)	Prostate	8	16	7	5	270	39

Without - no stabilizer added

With - 30% (final volume) Cyto-Chex™ added

* = 5ml specimen, all others 7.5ml

5

Any sample that showed more than one Intact CTC was considered as positive.

Applying the Wilcoxon signed rank test to the data sets without and with stabilizer gave the following p-values:

- Intact CTC, $p < 0.0004$ (highly significant),
- Suspect CTC, $p < 0.155$ (not significant), and
- Not Assigned Events, $p < 0.0327$ (significant).

10

Most specimens became positive or showed increases in Intact CTC when Cyto-Chex™ stabilizer was added. The cases where more Intact CTC or Suspect CTC were detected in the non-stabilized specimens are probably artifactual and the result of difficulty in differentiating stainable debris and aggregates without characteristic cell morphology, classified as "Not Assigned Events" from Intact or Suspect CTC. About three times more Intact CTC, on the average, were detected with stabilized specimens compared to non-stabilized specimens. These data highlight the unexpected preservative effect of whole blood stabilizers in preserving both tumor cells and specimen quality.

15

20

EXAMPLE 5

24 vs. 72 hour stabilization

In the shipping study (Example 4), it was shown that stabilization preserves cells in samples processed 24 hours after the blood was drawn. However, it would also be desirable to have cells stable for at least 72 hours. In this Example, the blood samples were processed 24 and 72 hours after the blood draw and analyzed as follows: A minimum of two 10mL EDTA Vacutainer® tubes of blood (~8mL of blood per tube) were obtained from metastatic cancer patients. Within 15 minutes of the blood draw, an appropriate amount of CytoChex™

25

WO 03/018757

PCT/US02/26867

was manually added to each of the EDTA tubes to yield 30% CytoChex™ by volume using the CellStabilize™ injection device as described in Example 3.

Upon receipt of the blood specimens, the blood was pooled, and 7.5mL of stabilized blood was tested at 24 hours and/or 72 hours using the same assay and analyzed using the same CellSpotter® system analysis as described in Example 1. The CTC were compared at these two time points. At 90% power, to detect an expected correlation coefficient of 0.95 with a two-sided p-value of 0.01, a total of 8 specimens with paired values are required. In the 24 hours vs. 72 hours comparison, there were a total of 28 specimens with paired values, however one sample had extremely high CTC, and is not present in Figure 6.

Figure 6 shows the plot of 27 specimens with obvious CTC results at 24 hours vs. 72 hours. The regression equation, r-squared value, correlation coefficient, and the t-test p-value are shown on the graph. The r-squared value and Pearson's correlation coefficient show that the CTC counts after 24 hours are highly correlated with those at 72 hours, and the t-test shows that the means of the two counts are not statistically significantly different (24hr = 11, 72hr = 11). The slope of the line (1.0803) indicates approximately the same number of obvious CTC after 24 hours or 72 hours of incubation with the blood stabilizer. Wilcoxon's non-parametric sign-rank test further showed that the two CTC counts at these two time points are not significantly different (p=0.9105). The results show that there is no loss of CTC after 72 hours of incubation with the stabilizer, and that the counts at 72 hours are almost identical to those at 24 hours.

EXAMPLE 6

Modes of addition of stabilizers

As mentioned earlier, CTC in the blood exist in different forms (such as Intact, damaged, etc.) and in general they are fragile. The stabilizer needs to be added as soon as blood is drawn into the tube to prevent further cellular damage in the tube. However, it is a difficult process to control the time of addition, which depends upon the place of blood draw. Some sites where blood is drawn may not necessarily have a stabilizing agent, and therefore need to send the samples to another site to add a stabilizer. This creates variable time of stabilizer addition. Even in these sites, the time of stabilizer addition will depend upon the number of tubes drawn. The phlebotomist who draws blood may not add a stabilizer, but would transfer samples to other technicians for stabilizer addition.

Therefore, the preferred stabilizers may be used as concentrated liquids or in diluted form as solutions in water or buffers to minimize transient exposure to hyperosmotic

WO 03/018757

PCT/US02/26867

conditions and potential damage to cells. The liquid or solid stabilizers are preferably added to the blood draw container prior to blood draw or, less optimally, immediately thereafter to gain the maximum protective effect from damage due to turbulence during blood draw.

Pre-filled blood collection tubes, e.g. 10mL Vacutainer® tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) or Vacuette® tubes (from Greiner America, Lake Mary, FL), are commercially available, pre-filled with about 2mL liquid reagents or with particulate coating materials prior to evacuation. Alternative means for manufacturing pre-filled tubes include conventional *in situ* lyophilization of frozen liquids. Another patented technique utilizes discrete freeze-dried beads, so-called LyoSpheres (US #6,106,836; Akzo Nobel N.V., Netherlands), and Biolyph, (Minneapolis, MN), which are prepared by dropping liquid droplets of up to 250µL into liquid nitrogen followed by conventional lyophilization of the frozen beads inside the container to form discrete rigid beads.

In summary, Examples 1-6 show that the addition of stabilizers to blood samples preserves sample quality as well as CTC in the enrichment assays utilized in this invention. It is to be appreciated that the optimum amounts of stabilizers will vary, and depend on the type and physical state of the stabilizer, ranging from liquids to lyophilized pellets to powders as recited in Example 6. For example, although it has been found that the concentrations of Cyto-Chex™ stabilizer can range from 1-50%, preferably about 5-40% and most preferably about 10-30%, and from 0.1-30%, preferably about 1-25% and most preferably about 1-10% for TRANSfix™ stabilizer, it is to be appreciated that the concentrations or amounts for other types of stabilizers may differ from the specified ranges and must be optimized for each stabilizer and application. Ideally, anti-coagulating agents and said stabilizing agents would be present in volumes of about 0.1-50%, more preferably about 0.3-30%, and most preferably about 0.3-5% of the total volume of the biological specimen, while maintaining the same effective concentration of the stabilizing agent. More importantly, less dilution is more desirable.

The improvements provided by the present invention will be readily apparent to one skilled in the art by reference to the above-described US patents, and the preferred embodiments described herein. One particularly advantageous aspect of the present invention is that it discloses stabilizers for preserving rare target cells and CTC in whole blood during storage and during enrichment processes. Further improvements provided by the invention result from the addition of the stabilizers prior to or shortly after blood draw,

WO 03/018757

PCT/US02/26867

and the utilization of the stabilizers in both liquid and solid forms. The improvements provided by the invention have been described and exemplified in terms of preferred embodiments in the above-cited Examples 1-6.

The invention further improves the analysis of Intact CTC, Suspect CTC, and Not
5 Assigned Events, the latter consisting of debris and/or aggregates present at blood draw or formed during processing. The present invention is the result of an extensive research project that was undertaken in the development of the improved compositions and methods of the present invention, which particularly explored the compositions and modes for stabilizing rare cells, particularly of CTC. The preferred embodiments of the invention, which
10 incorporate these improvements, as herein disclosed, are also believed to enable the invention to be employed in fields and applications additional to cancer diagnosis. It will be apparent to those skilled in the art that the improved diagnostic modes of the invention are not to be limited by the foregoing descriptions of preferred embodiments. Finally, while certain embodiments presented above provide detailed descriptions, the following claims are not
15 limited in scope by the detailed descriptions. Indeed, various modifications may be made thereto without departing from the spirit of the following claims.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

We claim:

1. A composition for preserving biological specimens consisting of:
 - a. an anti-coagulating agent, and
 - b. a stabilizing agent.
- 5 2. The composition of Claim 1, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
3. The composition of Claim 2, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA).
- 10 4. The composition of Claim 1, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
5. The composition of Claim 4, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
6. The composition of Claim 1, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
- 15 7. The composition of Claim 6, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolinidiny urea, imidazolidinyl urea, methenamine, and paraformaldehyde.
8. The composition of Claim 1, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
9. The composition of Claim 8, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
- 20 10. The composition of Claim 1, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
11. The composition of Claim 10, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
- 25 12. The composition of Claim 1, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
13. The composition of Claim 12, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
14. The composition of Claim 12, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
- 30 15. The composition of Claim 12, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

16. A composition for preserving blood samples suspected to contain circulating tumor cells consisting of:
 - a. an anti-coagulating agent, and
 - b. a stabilizing agent.
- 5 17. The composition of Claim 16, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
18. The composition of Claim 17, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and
 - 10 ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
19. The composition of Claim 16, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
20. The composition of Claim 19, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
- 15 21. The composition of Claim 16, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
22. The composition of Claim 21, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolidinyl urea, imidazolidinyl urea, methenamine, and paraformaldehyde.
23. The composition of Claim 16, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
- 20 24. The composition of Claim 23, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
25. The composition of Claim 16, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
26. The composition of Claim 25, wherein said heavy metal element is selected from the
 - 25 group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
27. The composition of Claim 16, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
28. The composition of Claim 27, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
- 30 29. The composition of Claim 27, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
30. The composition of Claim 27, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

31. A stabilized cell composition consisting of:
- a. a biological specimen,
 - b. an anti-coagulating agent, and
 - c. a stabilizing agent.
- 5 32. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said biological specimen is a fraction of blood suspected to contain circulating tumor cells.
33. The stabilized cell composition of Claim 32, wherein said circulating tumor cells have been stabilized by said stabilizing agent.
34. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said anti-coagulating agent is a
10 chelating agent.
35. The stabilized cell composition of Claim 34, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
- 15 36. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
37. The stabilized cell composition of Claim 36, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
38. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said stabilizing agent is a
20 formaldehyde donor.
39. The stabilized cell composition of Claim 38, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolidinyl urea, imidazolidinyl urea, methenamine, and paraformaldehyde.
- 25 40. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
41. The stabilized cell composition of Claim 40, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal.
42. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said stabilizing agent is
30 formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
43. The stabilized cell composition of Claim 42, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
44. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

45. The stabilized cell composition of Claim 44, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
46. The stabilized cell composition of Claim 44, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
- 5 47. The stabilized cell composition of Claim 44, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.
48. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein said anti-coagulating agents and said stabilizing agents are present in volumes of about 0.1 to about 50% of the total volume of said biological specimen.
- 10 49. The stabilized cell composition of Claim 47, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 30% of the total volume of said biological specimen.
50. The stabilized cell composition of Claim 47, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 5% of the total volume of said biological specimen.
- 15 51. A method for preserving biological specimens consisting of:
- a. obtaining a biological specimen that contains cells, and
 - b. contacting said biological specimen with a stabilizing agent capable of stabilizing said cells.
52. The method of Claim 51, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
- 20 53. The method of Claim 52, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolidinyl urea, imidazolidinyl urea, methenamine, and paraformaldehyde.
54. The method of Claim 51, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
55. The method of Claim 54, wherein said aldehyde is selected from: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
- 25 56. The method of Claim 51, wherein said stabilizing agent is formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
57. The method of Claim 56, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
- 30 58. The method of Claim 51, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
59. The method of Claim 58, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

60. The method of Claim 58, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
61. The method of Claim 58, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.
- 5 62. The method of Claim 51, wherein said specimen is further contacted with an anti-coagulating agent.
63. The method of Claim 62, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
64. The method of Claim 63, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
- 10 65. The method of Claim 62, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
66. The method of Claim 65, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
- 15 67. The method of Claim 62, wherein said anti-coagulating agent and said stabilizing agent are combined before contacting said biological specimen.
68. The method of Claim 67, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
69. The method of Claim 68, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
- 20 70. The method of Claim 67, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
71. The method of Claim 70, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
- 25 72. The method of Claim 67, wherein said anti-coagulating agents and said stabilizing agents are present in volumes of about 0.1 to about 50% of the total volume of said biological specimen.
73. The method of Claim 72, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 30% of the total volume of said biological specimen.
- 30 74. The method of Claim 72, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to 5% of the total volume of said biological specimen.
75. A method for preserving blood samples suspected to contain circulating tumor cells consisting of:

WO 03/018757

PCT/US02/26867

- a. obtaining a biological specimen that contains cells, and
 - b. contacting said biological specimen with a stabilizing agent capable of stabilizing said cells.
76. The method of Claim 75, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
- 5 77. The method of Claim 76, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolinidinyl urea, imidazolidinyl urea, methenamine, and paraformaldehyde.
78. The method of Claim 75, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
79. The method of Claim 78, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
- 10 80. The method of Claim 75, wherein said stabilizing agent is formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
81. The method of Claim 80, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
- 15 82. The method of Claim 75, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
83. The method of Claim 82, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
84. The method of Claim 82, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
- 20 85. The composition of Claim 82, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.
86. The method of Claim 75, wherein said specimen is further contacted with an anti-coagulating agent.
- 25 87. The method of Claim 86, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
88. The method of Claim 87, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
- 30 89. The method of Claim 86, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
90. The method of Claim 89, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
91. The method of Claim 86, wherein said anti-coagulating agent and said stabilizing agent are combined before contacting said biological specimen.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

92. The method of Claim 91, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
93. The method of Claim 92, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
94. The method of Claim 91, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
95. The method of Claim 93, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
96. The method of Claim 86, wherein said anti-coagulating agents and said stabilizing agents are present in volumes of about 0.1 to about 50% of the total volume of said biological specimen.
97. The method of Claim 96, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 30% of the total volume of said biological specimen.
98. The method of Claim 96, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 5% of the total volume of said biological specimen.
99. An apparatus for preserving biological specimens consisting of an evacuated blood draw tube, said tube containing:
- a. an anti-coagulating agent, and
 - b. a stabilizing agent.
100. The apparatus of Claim 99, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
101. The apparatus of Claim 100, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA)..
102. The apparatus of Claim 99, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
103. The apparatus of Claim 102, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
104. The apparatus of Claim 99, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
105. The apparatus of Claim 104, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolinidiny urea, imidazolidiny urea, methenamine, and paraformaldehyde.
106. The apparatus of Claim 99, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

107. The apparatus of Claim 106, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
108. The apparatus of Claim 99, wherein said stabilizing agent is formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
- 5 109. The apparatus of Claim 108, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
110. The apparatus of Claim 99, wherein said stabilizing agent has been lyophilized.
111. The apparatus of Claim 99 wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
- 10 112. The apparatus of Claim 111, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
113. The apparatus of Claim 112, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
114. The apparatus of Claim 112, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.
- 15 115. The apparatus of Claim 111, wherein said additional stabilizing agent has been lyophilized.
116. The apparatus of Claim 99, wherein said anti-coagulating agents and said stabilizing agents are present in volumes of about 0.1 to about 50% of the total volume of said draw tube.
- 20 117. The apparatus of Claim 116, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 30% of the total volume of said draw tube.
118. The apparatus of Claim 116, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 5% of the total volume of said draw tube.
- 25 119. An apparatus for preserving blood samples suspected to contain circulating tumor cells consisting of an evacuated blood draw tube containing:
- a. an anti-coagulating agent, and
 - b. a stabilizing agent.
- 30 120. The apparatus of Claim 119, wherein said anti-coagulating agent is a chelating agent.
121. The apparatus of Claim 120, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of: ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), and ethylenebis(oxyethylenetriolo) tetraacetic acid (EGTA)..

WO 03/018757

PCT/US02/26867

122. The apparatus of Claim 119, wherein said anti-coagulating agent is a complexing agent.
123. The apparatus of Claim 122, wherein said anti-coagulating agent is selected from the group consisting of heparin and citrate.
- 5 124. The apparatus of Claim 119, wherein said stabilizing agent is a formaldehyde donor.
125. The apparatus of Claim 123, wherein said formaldehyde donor is selected from the group consisting of: methylol or hydroxymethyl derivatives of amines or amides, diazolinidiny urea, imidazolidiny urea, methenamine, and paraformaldehyde.
126. The apparatus of Claim 119, wherein said stabilizing agent is an aldehyde.
- 10 127. The apparatus of Claim 126, wherein said aldehyde is selected from the group consisting of: formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal.
128. The apparatus of Claim 119, wherein said stabilizing agent is formaldehyde donor or an aldehyde combined with at least one heavy metal element.
129. The apparatus of Claim 128, wherein said heavy metal element is selected from the group consisting of: chromium, manganese, and zinc.
- 15 130. The apparatus of Claim 119, wherein said stabilizing agent has been lyophilized.
131. The apparatus of Claim 119, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol.
132. The apparatus of Claim 131, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 1000 to about 35000.
- 20 133. The apparatus of Claim 131, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 5000 to about 20000.
134. The apparatus of Claim 131, wherein the molecular weight of said polyethylene glycol is in the range of about 8000 to about 20000.
- 25 135. The apparatus of Claim 131, wherein said additional stabilizing agent has been lyophilized.
136. The apparatus of Claim 119, wherein said anti-coagulating agents and said stabilizing agents are present in volumes of about 0.1 to about 50% of the total volume of said draw tube.
- 30 137. The apparatus of Claim 136, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 30% of the total volume of said draw tube.
138. The apparatus of Claim 136, wherein said volumes are in the range of about 0.3 to about 5% of the total volume of said draw tube.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

139. The composition of Claim 1, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
- 5 140. The composition of Claim 16, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
- 10 141. The stabilized cell composition of Claim 31, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
142. The method of Claim 51, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
- 15 143. The method of Claim 75, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
144. The apparatus of Claim 99, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.
- 20 145. The apparatus of Claim 119, wherein an additional stabilizing agent is polyethylene glycol at a concentration of about 0.1% to about 5%, preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.

WO 03/018757

PCT/US02/26867

1/5

Figure 1

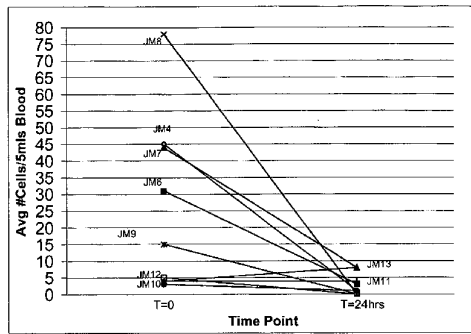
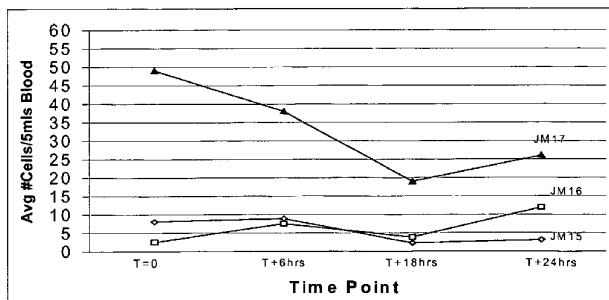


Figure 2



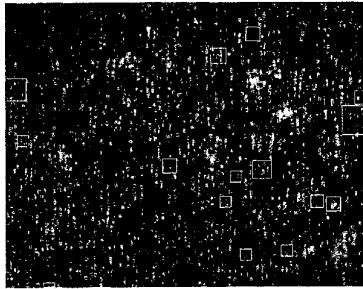
WO 03/018757

PCT/US02/26867

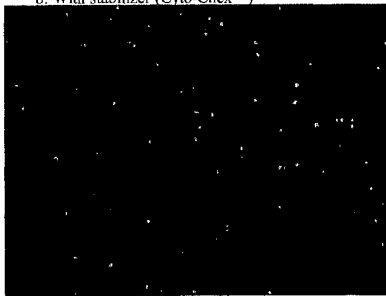
2/5

Figure 3

a: No stabilizer



b: With stabilizer (Cyto-Chex™)



WO 03/018757

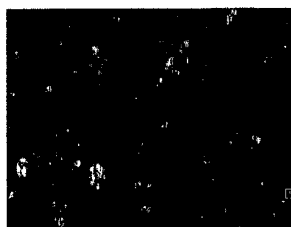
PCT/US02/26867

3/5

Figure 4



a: No mixing and no stabilizer



b: Mixed sample without stabilizer



c: Mixed sample with stabilizer (30%)

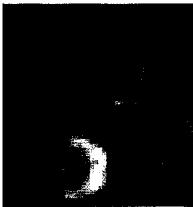
WO 03/018757

PCT/US02/26867

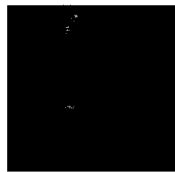
4/5

Figure 5

a. Intact CTC



b. Suspect CTC



Not Assigned Events

c.



d.

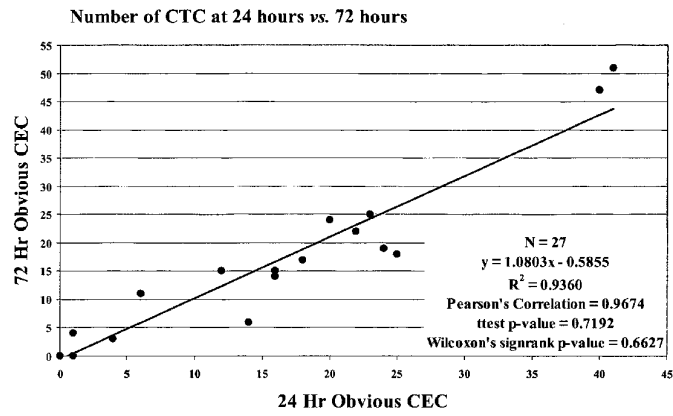


WO 03/018757

PCT/US02/26867

5/5

Figure 6



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018757 A3

- (51) International Patent Classification: **A01N 1/02**
- (21) International Application Number: **PCT/US02/26867**
- (22) International Filing Date: **23 August 2002 (23.08.2002)**
- (25) Filing Language: **English**
- (26) Publication Language: **English**
- (30) Priority Data:
60/314,151 23 August 2001 (23.08.2001) US
60/369,628 3 April 2002 (03.04.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **IMMUNIVEST CORPORATION** [US/US]; Suite 100, 1105 Market Street, P.O. Box 8983 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **RAO, Galla, Chandra** [IN/US]; 9 Haverford Road, Princeton Junction, NJ 08550 (US); **HERMANN, Melissa** [US/US]; 2530 Pioneer Road, Hatboro, PA 19040 (US); **RUTNER, Herman** [US/US]; 50 S. Penn Street, Apartment 609, Hatboro, PA 19040 (US); **TERSTAPPEN, Leon** [NL/US]; 1354 Old Ford Road, Huntingdon valley, PA 19006 (US).
- (74) Agents: **MAYES, Jared et al.**; Immunicon Corporation, Suite 100, 3401 Masons Mill Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

[Continued on next page]

(54) Title: STABILIZATION OF CELLS AND BIOLOGICAL SPECIMENS FOR ANALYSIS

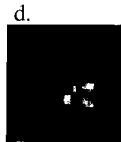
a. Intact CTC



b. Suspect CTC



Not Assigned Events



(57) Abstract: Compositions and methods for stabilizing rare cells in blood specimens, preserving the quality of blood specimens, and also serving as cell fixatives are disclosed which minimize losses of target cells (for example, circulating tumor cells) and formation of debris and aggregates from target cells, non-target cells and plasma components, thereby allowing more accurate analysis and classification of circulating tumor cells (CTC) and, ultimately, of tumor burdens in cancer patients. Stabilization of specimens is particularly desirable in protocols requiring rare cells enrichment from blood specimens drawn from cancer patients. Exposure of such specimens to potentially stressful conditions encountered, for example, in normal processing, mixing, shaking, delays due to transporting the blood, has been observed to not only diminish the number of CTC but also to generate debris and aggregates in the blood specimens that were found to interfere with accurate enumeration of target cells, if present. Stabilizers are necessary to discriminate between *in vivo* CTC disintegration and *in vitro* sample degradation.

WO 03/018757 A3

WO 03/018757 A3



SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:

12 September 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/26867
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 1/02 US CL : 435/2, 1.1; 422/50; 436/8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/2, 1.1; 422/50; 436/8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,500,534 A (FREHEL et al) 19 February 1985 (19.02.1985), column 3.	1-4, 6, 8-9, 16-19, 21, 23-24
Y		5, 7, 10-15, 20, 22, 25-145
Y	US 4,647,283 A (CARPENTIER et al) 03 March 1987 (03.03.1987), see entire document.	1-145
Y	US 4,040,785 A (KIM et al) 09 August 1977 (09.08.1977), see entire document.	1-145
Y	US 4,788,139 A (RYAN) 29 November 1988 (29.11.1988), see entire document.	1-145
Y	US 4,320,111 A (HIRSCH et al) 16 March 1982 (16.03.1982), see entire document.	1-145
☐ 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	"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	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"&" document member of the same patent family	
"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		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 September 2002 (30.09.2002)	19 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> L. Blaine Linnaker Telephone No. 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガラ・チャンドラ・ラオ

アメリカ合衆国08550 ニュージャージー州プリンストン・ジャンクション、ハイバーフォード
・ロード9番

(72)発明者 メリッサ・ハーマン

アメリカ合衆国19040 ペンシルベニア州ハットボロ、パイオニア・ロード2630番

(72)発明者 ハーマン・ラトナー

アメリカ合衆国19040 ペンシルベニア州ハットボロ、アパートメント609、サウス・ペン・
ストリート50番

(72)発明者 レオン・テルスタッペン

アメリカ合衆国19006 ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロー
ド1354番

Fターム(参考) 2G045 AA24 BA13 BB31 CB01