(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-548752
(P2022-548752A)
(43)公表日　令和4年11月21日(2022.11.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｎ	*5/073(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/073		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/09 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/09		
Ｃ１２Ｎ	*5/074(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/074		
Ｃ１２Ｑ	*1/6844(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6844	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全80頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-517916(P2022-517916)
(86)(22)出願日　令和2年9月24日(2020.9.24)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月18日(2022.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/076801
(87)国際公開番号　WO2021/058692
(87)国際公開日　令和3年4月1日(2021.4.1)
(31)優先権主張番号　19199283.3
(32)優先日　令和1年9月24日(2019.9.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　509138394
キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
ドイツ， ヒルデン ４０７２４， キアゲン シュトラーセ １， ポストコード ８７０
(74)代理人　100094569
弁理士　田中 伸一郎
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777
最終頁に続く

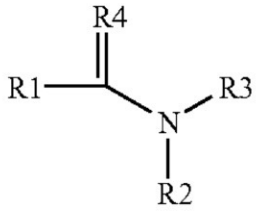
(54)【発明の名称】　安定化細胞を含有体液サンプルのマルチモード解析

(57)【要約】
細胞含有体液に含まれる複数の生物学的標的を安定化して単離する方法であって、（Ａ）細胞含有体液を、以下の安定化因子のうちの１つ以上：（ａ）少なくとも１つの一級、二級もしくは三級アミド、（ｂ）少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／又は（ｃ）少なくとも１つのアポトーシス阻害剤を含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルを提供すること、（Ｂ）安定化期間の間、前記安定化細胞含有体液サンプルを維持すること、（Ｃ）細胞亜集団、細胞外核酸、細胞外小胞、及び細胞内核酸からなる群から選択される３以上の生物学的標的を安定化細胞含有体液から富裕化するために安定化細胞含有体液サンプルを処理することを含む。本方法は単一の安定化細胞含有体液サンプルからの異なる生物学的標的のマルチモード解析を可能にする。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞含有体液に含まれる複数の生物学的標的を安定化して富裕化する方法であって、
（Ａ）　細胞含有体液を、以下の安定化因子のうちの１つ以上を含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルを提供すること：
（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤；、
（Ｂ）　安定化期間の間、前記安定化細胞含有体液サンプルを維持すること；
（Ｃ）
－少なくとも１つの細胞亜集団、
－細胞外核酸、
－細胞外小胞、及び
－細胞内核酸
からなる群から選択される３つ以上の生物学的標的を前記安定化細胞含有体液から富裕化するために、前記安定化細胞含有体液サンプルを処理すること、
とを含む、前記方法。
【請求項２】
富裕化細胞亜集団が標的希少細胞を含み、任意に、前記標的希少細胞が、腫瘍細胞、特に循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、胎児細胞、幹細胞、ウイルスまたは寄生生物により感染した細胞、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、及び循環内皮前駆細胞（ＥＰＣ）からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
工程（Ｃ）が、少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を、安定化体液から得ることを含み、（Ｃ）における処理が、
態様Ａによると、
（ａａ）　安定化細胞含有体液サンプルを、少なくとも１つの細胞含有画分と、少なくとも１つの細胞枯渇画分とに分離することと、
（ｂｂ）　前記細胞含有画分をさらに処理することであって、前記細胞含有画分をさらに処理することが、
（ｉ）好ましくは標的希少細胞を含む細胞亜集団を、前記細胞含有画分から富裕化すること、及び／又は
（ｉｉ）　前記細胞含有画分から、ゲノムＤＮＡであってよい細胞内核酸を富裕化すること、
を含み、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／又は
（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、
を含む、または、
態様Ｂによると、
（ａａ）前記安定化細胞含有体液サンプルから、好ましくは標的希少細胞を含む細胞亜集団を富裕化することと、
（ｂｂ）　前記標的細胞亜集団が取り除かれた前記安定化細胞含有体液サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離することと、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／又は

（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、
を含み、および、
（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化すること、
を含む、または、
態様Ｃによると、
（ａａ）　前記安定化細胞含有体液サンプルを少なくとも２つのアリコートに分割し、好ましくは希少細胞を含む細胞亜集団を、前記提供したアリコートのうちの少なくとも１つから富裕化することと、
（ｂｂ）　少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を提供することと、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／又は
（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、
を含み、および、
（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化すること、
を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
（Ｄ）富裕化した３つ以上の生物学的標的を解析のために処理することをさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
以下の特徴のうちの１つ以上を有する、請求項４に記載の方法：
（ｉ）工程（Ｃ）が、標的希少細胞を富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）が、細胞レベルで前記富裕化した標的希少細胞を解析すること、及び／又は、細胞内核酸を前記富裕化した標的希少細胞から単離して、１つ以上の標的分子を前記単離した細胞内核酸内で検出することによって前記標的富裕化した希少細胞を解析すること、を含み、任意に、前記細胞内核酸がｍＲＮＡを含む；
（ｉｉ）工程（Ｃ）が、細胞枯渇画分を前記安定化細胞含有体液サンプルから得て、細胞外核酸を前記得られた細胞枯渇画分から単離することを含み、任意に、前記細胞外核酸が細胞外ＤＮＡを含むか、もしくは細胞外ＤＮＡから本質的になり、後続の工程（Ｄ）が、１つ以上の標的分子を前記単離した細胞外核酸内で検出することを含む；
（ｉｉｉ）工程（Ｃ）が、細胞外小胞を、前記安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞枯渇画分から富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）が、ＲＮＡを前記富裕化した細胞外小胞から単離することと、１つ以上の標的分子を前記単離したＲＮＡ内で検出することと、を含む；及び／又は
（ｉｖ）工程（Ｃ）が、少なくとも（ｉ）循環腫瘍細胞、（ｉｉ）ゲノムＤＮＡ、及び（ｉｉｉ）循環無細胞ＤＮＡを、生物学的標的として単離することを含み、工程（Ｄ）が、（ｉ）ＲＮＡを前記循環腫瘍細胞から単離し、バイオマーカーＲＮＡ分子を前記単離したＲＮＡ内で検出すること；（ｉｉ）ゲノムＤＮＡを検出、例えば増幅及び／又は配列決定すること、ならびに、（ｉｉｉ）バイオマーカー分子を前記単離した循環無細胞ＤＮＡ内で検出すること、を含む。
【請求項６】
標的希少細胞及び／または細胞外小胞を親和性捕捉により富裕化することを含む、請求項１～５のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項７】
細胞含有体液が、以下の特徴のうちの１つ以上を有する、請求項１～６のうちの１項以上に記載の方法：

－　循環体液である；
－　血液、尿、唾液、滑液、羊水、涙液、リンパ液、液（脳脊髄液）、汗、腹水、母乳、気管支洗浄、腹膜浸出液及び胸膜滲出液、骨髄吸引物及び乳頭吸引物、精液／精漿、体分泌物または体排泄物から選択される；
－　血液及び尿から選択される；及び／又は
－　血液である。
【請求項８】
安定化組成物が、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドを含み、前記安定化組成物が、式１に従った少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドを含み、任意に、式１に従った少なくとも１つの化合物が、一級、二級、または三級カルボン酸アミド、任意に、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパンアミド及び／またはブタンアミドなどのＮ，Ｎ－ジアルキルプロパンアミドである、請求項１～７のうちの１項以上に記載の方法：
【化１】



式１

［式中、Ｒ１は水素またはアルキル基、好ましくはＣ１～Ｃ５アルキル基、Ｃ１～Ｃ４アルキル基、またはＣ１～Ｃ３アルキル基、より好ましくはＣ１～Ｃ２アルキル基であり、Ｒ２及びＲ３は同一または異なっており、水素及び炭化水素基、好ましくは、直鎖または分岐鎖様式で配置される１～２０個の炭素鎖の長さを有するアルキル基から選択され、Ｒ４は酸素、硫黄、またはセレン基であり、好ましくはＲ４は酸素である］。
【請求項９】
安定化組成物が少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、前記ポリ（オキシエチレン）ポリマーがポリエチレングリコールであってよい、請求項１～８のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項１０】
安定化組成物が以下の特徴のうちの１つ以上を有する、請求項９に記載の方法：
ａ）　含まれるポリ（オキシエチレン）ポリマーが非置換ポリエチレングリコールである；
ｂ）　前記組成物が、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む；
ｃ）　前記組成物が、１５００未満の分子量を有する少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、好ましくは、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、任意に、前記ポリマーの分子量は１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にある；
ｄ）　前記組成物が、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む；及び／又は
ｅ）　前記組成物が、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、前記高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーが、１５００～５００００、２０００～４００００、３０００～３００００、３０００～２５０００、３０００～２００００、及び４０００～１５０００から選択される範囲にある分子量を有し、かつ／または、前記低分子量のポリ（オキシエチ

レン）ポリマーが、１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にある分子量を有する。
【請求項１１】
安定化組成物が、アポトーシス阻害剤として少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤を含み、任意に、前記カスパーゼ阻害剤が以下の特徴の１つ以上を有する、請求項１～１０のうちの１項以上に記載の方法：
ａ） 前記カスパーゼ阻害剤が汎カスパーゼ阻害剤である；
ｂ） 前記カスパーゼ阻害剤がカスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｃ） 前記カスパーゼ阻害剤が、好ましくはカルボキシル末端において、Ｏ－フェノキシ（ＯＰｈ）基で修飾された、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｄ） 前記カスパーゼ阻害剤が、好ましくはＮ末端において、グルタミン（Ｑ）基で修飾された、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｅ） 前記カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈ、Ｂｏｃ－Ｄ－（ＯＭｅ）－ＦＭＫ、及びＺ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｐ（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される；
ｆ） 前記カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈ及びＺ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｐ（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される；及び／又は
ｇ） 前記カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈである。
【請求項１２】
安定化組成物が、
（ａ） （好ましくは請求項８に規定した）少なくとも１つの一級、二級、または三級アミド、
（ｂ） （好ましくは請求項９または１０に規定した）少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
（ｃ） （好ましくは請求項１１に規定した）少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤；ならびに
（ｄ） 任意に、ＥＤＴＡなどのキレート剤を含む、請求項１～１１のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項１３】
細胞含有体液が血液であり、前記血液を、
ａ） 式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ） ３０００～３００００、または３５００～２５０００の範囲などの、３０００～４００００の範囲にある分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、１００～８００、２００～８００、または２００～５００の範囲などの、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ） 少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤、好ましくは汎カスパーゼ阻害剤、任意にＱ－ＶＤ－ＯＰｈ；ならびに
ｄ） 任意にＥＤＴＡなどのキレート剤であってよい、抗凝血物質、
と接触させ、
前記血液サンプルが前記添加剤、及び任意にさらに安定化のための添加剤、と接触した後で、得られる混合物／安定化血液サンプルが、
－ ０．３～４％、例えば０．５～３％、０．５～２％、または０．７５～１．５％の範囲にある濃度で前記式１に従った１つ以上の化合物、
－ ０．２％～１．５％（ｗ／ｖ）、例えば０．２５％～１．２５％（ｗ／ｖ）、０．３％～１％（ｗ／ｖ）、または０．４％～０．７５％（ｗ／ｖ）の範囲にある濃度で、前記高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、
－ １．５％～１０％、例えば２％～６％の範囲にある濃度で、前記低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
－ １μＭ～１０μＭ、例えば３μＭ～７．５μＭの範囲にある濃度で、前記カスパーゼ阻害剤を含む、請求項１～１２のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項１４】

以下の特徴のうちの１つ以上を有する、請求項１～１３のうちの１項以上に記載の方法：
（ｉ） 細胞含有体液サンプルの前記安定化が、有核細胞の溶解を誘発または促進する濃度の添加剤を使用することを伴わない；
（ｉｉ） 安定化が、タンパク質－核酸もしくはタンパク質－タンパク質架橋を誘発しない；
（ｉｉｉ） 安定化が、タンパク質－核酸及び／又はタンパク質－タンパク質架橋を誘発する架橋剤、例えばホルムアルデヒド、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、もしくはホルムアルデヒド放出剤の使用を伴わない；
（ｉｖ） 安定化が毒性因子の使用を伴わない；及び／又は
（ｖ） 安定化因子が、水を含む安定化組成物に含有される。
【請求項１５】
工程（Ａ）で使用する安定化が、安定化サンプルにおけるタンパク質－核酸またはタンパク質－タンパク質架橋を誘発せず、任意に、工程（Ｃ）が、細胞外小胞を、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞枯渇画分から富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）が、ＲＮＡを前記富裕化した細胞外小胞から単離することと、１つ以上の標的分子を単離したＲＮＡ内で検出することと、を含む、請求項１～１４のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項１６】
細胞含有体液、好ましくは血液を、
ａ） 式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ） 少なくとも３０００の分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び任意に、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ） 少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤；ならびに
ｄ） 任意にキレート剤、好ましくはＥＤＴＡ、
と接触させる、請求項１４または１５に記載の方法。
【請求項１７】
工程（Ｃ）が、
－希少細胞、好ましくは循環腫瘍細胞、
－細胞外核酸、
－細胞外小胞、及び
－細胞内核酸
からなる群から選択される３つ以上の生物学的標的を安定化細胞含有体液から富裕化するために、前記安定化細胞含有体液サンプルを処理することを含む、請求項１４～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
工程（Ｃ）が、安定化体液サンプルから、少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を得ることを含み、工程（Ｃ）が、安定化細胞含有体液サンプルから得られた前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化することをさらに含み、後続の工程（Ｄ）が、前記富裕化細胞外小胞からＲＮＡを単離することを含む、請求項１４～１７のうちの１項以上に記載の方法。
【請求項１９】
工程（Ｄ）が、１つ以上の標的分子を単離したＲＮＡ内で検出することを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
ゲノムＤＮＡを前記細胞含有画分から単離することを含む、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
処理工程（Ｃ）が、安定化細胞含有体液サンプル、または、安定化細胞含有体液サンプ

ルから得られた細胞含有画分を密度勾配遠心分離工程に供することを含み、任意に、前記細胞含有体液サンプルが血液である、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
安定化血液サンプル、または前記安定化血液サンプルから得られた細胞含有画分を、前記密度勾配遠心分離工程を行う前に希釈溶液で希釈する、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
希釈溶液が以下の特徴の１つ以上を有し、密度勾配遠心分離の後で、異なる層が形成され、前記形成された層がＰＢＭＣ層を含む、請求項２２に記載の方法：
（ａ）低張性溶液もしくは等張性溶液である；
（ｂ）張性調節剤を含む；
（ｃ）ポリオール、任意に糖もしくは糖アルコール、を含む；
（ｄ）糖、任意にグルコース、を含む；
（ｅ）糖アルコール、任意にグリセロール、を含む；及び／または
（ｆ）塩、任意にアルカリ金属塩、任意に塩化物塩、を含む。
【請求項２４】
（ａ）希釈溶液が、グルコースであってもよい還元糖を、２～１０％、３～７％、または４～６％（ｗ／ｖ）の範囲の濃度で含む、
（ｂ）希釈溶液が糖アルコール及び塩を含み、任意に、前記希釈溶液が最大０．５Ｍのグリセロール、及び最大２％の塩化ナトリウムを含む、
（ｃ）希釈溶液が０．７～１．２％の塩化ナトリウム、及び０．０７５～０．１５Ｍのグリセロールを含む、及び／又は、
（ｄ）希釈溶液が、
（ｉ）５％（ｗ／ｖ）のグルコース、
（ｉｉ）０．９％のＮａＣｌ＋０．１Ｍのグリセロール、及び
（ｉｉｉ）少なくとも１つの張性調節剤を含み、（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義した希釈溶液の質量オスモル濃度に一致する質量オスモル濃度を有する希釈溶液、または、質量オスモル濃度が（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義する前記溶液の質量オスモル濃度の±２０％、±１５％、または±１０％の範囲内にある、
請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
希釈溶液がＤＭＳＯを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２６】
安定化血液サンプルまたはその細胞含有画分を処理するための、請求項２２～２５のいずれか１項に記載の希釈溶液の使用であって、前記血液サンプルが、（ａ）少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、（ｂ）少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または少なくとも１つのアポトーシス阻害剤を含む安定化組成物、任意に、請求項８～１３、または１４のいずれか１項に記載される安定化組成物で安定化される、前記使用。
【請求項２７】
含まれる単核細胞の密度を回復するための、好ましくは、勾配密度遠心分離のための、請求項２６に記載の使用であって、希釈溶液を前記勾配密度培地と接触させる前に、希釈液を安定化血液サンプルまたはその細胞含有画分と接触させる、前記使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
単一の安定化細胞含有体液サンプルから、注目する異なる生物学的標的を解析するための、リキッドバイオプシーベースの方法及びワークフローを提供する。
【背景技術】
【０００２】
ヒト体液（特に血液、尿、唾液、液など）における、生物学的標的（例えば細胞、タン

パク質、核酸）の解析としてのリキッドバイオプシー（ＬＢ）は、臨床実践におけるコンパニオン診断のための強力なツールである。生物学的標的とも本明細書では呼ばれる重要なリキッドバイオプシー検体としては、希少細胞、細胞外核酸、細胞外小胞、細胞内核酸、加えて特定の細胞亜集団が挙げられる。がん及び出生前試験におけるリキッドバイオプシーは最も関心が高まっており、現在存在する試験のいくつかは既に日常患者診療に導入されている。

【０００３】

固形腫瘍及び血液学的悪性腫瘍は、生体物質を全身循環内に排出することが知られている。これら生体物質としては、細胞（ＣＴＣとも呼ばれる、循環腫瘍細胞）、ならびに、エクソソーム及び他の種類のサブ細胞膜小胞などの、細胞外小胞（ＥＶとも呼ばれる）が挙げられる。無細胞循環核酸は、例えば変異について、がんに関する情報を含有することもまた知られている。これらの生体物質は、末梢全血、腹膜または胸膜滲出液などの、容易に入手可能な体液に存在し、タンパク質、核酸、及び脂質を含む分子情報を運搬する。これらの循環生体物質によりもたらされる分子情報は、例えば予後、治療応答、再発、または治療耐性メカニズムと相関し得る。先行技術において、最小限の侵襲性試験のためのこれらの生物学的標的に対して高い関心がもたれている。これらの標的は、バイオプシーの課題を回避する著しい利点を呈し、容易かつ繰り返して入手して、最小限の侵襲による腫瘍分子情報の反映を提供することができる。細胞外核酸、細胞外小胞、または循環腫瘍細胞は、貴重な診断、予後、予測、及び監視情報を提供することができることが、当該技術分野において理解されている。この情報は、例えば、その中に含まれるバイオマーカーを解析することで利用することができる。バイオマーカーは、解析される生体サンプルで測定可能な生物学的分子であり、単独で、または他のバイオマーカーと組み合わせてのいずれかで、いくつかの臨床的に重要な病状の指標となることができる。バイオマーカーは例えば、診断用、代理用、予後用、及び／または予測用であることができる。バイオマーカーは例えば、核酸（例えば、ＤＮＡもしくはＲＮＡ分子）、またはタンパク質であってよい。

血液は、リキッドバイオプシー用の、最も優れた材料源である。細胞ベースのリキッドバイオプシー試験は多くの場合、がんにおけるＣＴＣといった、標的細胞集団の解析に依存する（さらなる例としては、がん、糖尿病、心血管または急性腎臓病における内皮細胞、出生前試験における胎児細胞、移植組織学における器官特異的な細胞がある）（例えば、Ｐａｎｔｅｌ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ，Ｆｅｂ ２０１９；Ｎｅｕｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ，２０１８，Ｖｏｌ．１６： １９０－１９５；Ｌｅｈｍａｎｎ－Ｗｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１６ Ｍａｒ ２９，Ｖｏｌ．１１３（１３）：Ｅ１８２６－３４；Ｓｎｙｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，２０１１ Ａｐｒ １２，Ｖｏｌ．１０８（１５）：６２２９－３４を参照されたい）。

【０００４】

ＣＴＣは、がん患者の原発性または転移性腫瘍から剥離し、血液中に発見することができる。これらの細胞は、希少な細胞集団の典型である：１～１０個のＣＴＣを10^6～10^8個の血液細胞のバックグラウンド中に発見することができ、循環中の半減期時間は２．５時間に制限される。ＣＴＣは、遠隔転移の種となる。がん患者の末梢血中に、ＣＴＣの存在が導入され、これは全体的かつ疾患を有しない生残のためのサロゲートマーカーとして確認されており、予後、予測、及び治療法案内バイオマーカーとして使用することができる。計数に加えて、ＣＴＣについて表現型、遺伝子型、及び転写特徴を検査することにより、治療及びアウトカムに関連する情報がもたらされる。しかし、ＣＴＣ解析は、１）高バックグラウンドの白血球（ＷＢＣ）中でＣＴＣの量が少ないこと、及び、２）循環系におけるＣＴＣの短い半減期時間、により妨げられる。その希少性故に、ＣＴＣは検出／分析前に富裕化される必要がある。複数の既存の富裕化方法は基本的に、標識依存性アプローチ、及び標識非依存性アプローチに分けることができる（Ｊｏｏｓｓｅ ｅｔ ａ

ｌ．，ＥＭＢＯ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，２０１５ Ｊａｎ，Ｖｏｌ．７（１）：１－１１）。標識依存法は、細胞表面の特異的抗原の発現といった、生物学的特徴に基づく標的細胞集団の単離に依存する一方で、標識非依存法は、サイズ、密度、変形性、及び他の特徴といった、腫瘍細胞の物理的性質を利用する。ＣＴＣの検出は、細胞レベル（標的タンパク質の抗原特異的染色に基づく）、及び、例えば、腫瘍関連転写物、ゲノム、またはエピゲノム異常の検出に基づき、分子レベルで可能である。

【０００５】

別の優れたリキッドバイオプシー検体は、循環無細胞ＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）などの細胞外核酸である。ｃｃｆＤＮＡの主たる源は、アポトーシス及びネクローシス細胞に由来するモノヌクレオソームＤＮＡ断片である。さらに、細胞外ＤＮＡは、小胞結合アポトーシス小体、微小粒子、マイクロ小胞、エクソソームまたはヒストン／ＤＮＡ複合体、ヌクレオソーム、及びビロソームとしても存在する。加えて、細胞外ＲＮＡは、エクソソーム及び他の細胞外小胞（ＥＶ）の内側に存在する。がん患者において、特定の割合のｃｃｆＤＮＡは、腫瘍細胞由来の循環腫瘍ＤＮＡ（ｃｔＤＮＡ）である。ゲノム及びエピゲノムレベルでの腫瘍特異的異常を考慮すると、ｃｔＤＮＡは高いバックグラウンドの野生型ｃｃｆＤＮＡの中で効率的に検出することができる。現代技術（デジタル液滴ＰＣＲ、ＢＥＡＭｉｎｇ、次世代配列決定など）により、ｃｃｆＤＮＡベースのリキッドバイオプシー試験を開発して臨床実践に素早く実装することが可能となる（例えば、ｃｏｂａｓ ＥＧＦＲ Ｍｕｔａｔｉｏｎ Ｔｅｓｔ ｖ２、Ｔｈｅｒａｓｃｒｅｅｎ ＫＲＡＳ試験）。同様の着想が、移植組織学における、非侵襲性の出生前試験及び器官拒絶（それぞれ、母性のｃｃｆＤＮＡのバックグラウンドにおける希少な胎児ＤＮＡ断片の検出、及び、自原性野生型ｃｃｆＤＮＡのバックグラウンドにおける器官特異的な同種異系（ａｌｌｏｇｅｎｏｕｓ）ＤＮＡの検出に依存する）で実装される。

【０００６】

ＣＴＣ及びｃｃｆＤＮＡなどの、十分に確立された生物学的標的の他に、ｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ内容物、循環非コードＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ及び他のもの）、ならびに栓球（血小板）を含む、細胞外小胞（ＥＶ）などのさらなる標的検体をリキッドバイオプシーとの関連において解析することができる（Ａｎｆｏｓｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ，２０１８ Ｓｅｐ，Ｖｏｌ．１５（９）：５４１－５６３；Ｉｎ’ｔ Ｖｅｌｄ，Ｗｕｒｄｉｎｇｅｒ，Ｂｌｏｏｄ，２０１９ Ｍａｒ ４，ｐｉｉ：ｂｌｏｏｄ－２０１８－１２－８５２８３０を参照されたい）。

さらに、末梢性単核血液細胞（ＰＭＢＣ）などの細胞含有体液サンプルに含まれる細胞亜集団のゲノム及びエピゲノムプロファイリングは、がん患者における初期診断及びイムノサーベイランスの監視のための有用なバイオマーカーとなり得る（Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１８ Ｎｏｖ，Ｖｏｌ．５６３（７７３２）：５７９－５８３；Ａｂｕ Ａｌｉ Ｉｂｎ Ｓｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，２０１８，Ｖｏｌ．９，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：４９１５ ａｎｄ Ｎｉｃｈｉｔａ ｅｔ ａｌ．，Ａｌｉｍｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ，２０１４ Ｍａｒ，Ｖｏｌ．３９（５）：５０７－１７を参照されたい）。

血液などの体液サンプルに含まれるこれらの生物学的標的の十分に認識された臨床的可能性にもかかわらず、これらの利用は依然として困難なままである。がんに関連する情報を得るための、無細胞循環核酸、ＥＶ、またはＣＴＣに含まれる分子バイオマーカーの解析に基づく既存の方法は多くの場合、感度、及び／または堅牢性に関する欠点を有する。個別化医療におけるコンパニオン診断としてのリキッドバイオプシーの役割を考慮すると、リキッドバイオプシー解析のための、完全かつ標準化されたワークフローが必要とされる。解析前条件が解析試験の影響に著しく影響を及ぼす可能性がある。試験が採血後３～４時間より後に行われる場合、全てのリキッドバイオプシー検体に安定化が必要である。注目する生物学的標的の安定化は十分かつ信用できるものでなければならない。現在、ＣＴＣ解析（例えば、ＣｅｌｌＳａｖｅ、Ｔｒａｎｓｆｉｘ）、またはｃｔＤＮＡ解析（Ｓｔｒｅｃｋ ＢＣＴ、ＰＡＸｇｅｎｅ Ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブ）のいずれか

に対して利用可能な血液安定化チューブ（ＢＣＴ）が存在する。Ｓｔｒｅｃｋ　ＢＣＴなど、これらのチューブのいくつかはＣＴＣ解析との適合性を主張するが、このような主張は基本的に、一つの特定のＣＴＣ富裕化及び検出技術に限定されている。さらに、ホルムアルデヒドまたはホルムアルデヒド放出物質（例えば、Ｓｔｒｅｃｋ　ＢＣＴで利用される）を用いることは、核酸分子間、または、タンパク質と核酸との間に架橋を誘発することにより細胞外核酸単離の有効性、及び、下流の解析の有効性を損なうので難点がある。

【０００７】

先行技術の少なくとも１つの欠点を克服し、リキッドバイオプシーベースの改善された分析法を提供することが本発明の目的である。具体的には、単一細胞含有体液サンプルから、複数の生物学的標的の信頼できる富裕化及び分析を可能にする方法を提供することが、本開示の目的である。

【発明の概要】

【０００８】

本開示は、例えば、同一の細胞含有体液サンプルからの、標的細胞（例えばＣＴＣ）などの細胞亜集団、及び、細胞外ＤＮＡなどの細胞外核酸の同時安定化、富裕化、及び検出、加えて、このような安定化サンプル由来の細胞外小胞（ＥＶ）などの他の生物学的標的の同時安定化、富裕化、及び解析のための方法、及びそのようなワークフローを提供する。さらに、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）などの質の高い細胞内核酸を、安定化細胞含有体液サンプルの細胞画分から単離することができる。特に、本開示に従った安定化技術により収集及び安定化された単一細胞含有体液サンプル由来の、細胞外ＤＮＡ、ＣＴＣ、ＥＶ、及びｇＤＮＡの並行リキッドバイオプシー解析のためのワークフローを提供する。

【０００９】

第１の態様に従うと、細胞含有体液に含まれる複数の生物学的標的を安定化し、富裕化することを含む方法であって、

（Ａ）　細胞含有体液を、以下の安定化因子のうちの１つ以上：

（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、

（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または

（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤

を含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルを提供することと、

（Ｂ）　安定化期間の間、前記安定化細胞含有体液サンプルを維持することと、

（Ｃ）　前記安定化細胞含有体液から、希少細胞、細胞外核酸、細胞外小胞、及び細胞内核酸からなる群から選択される、３つ以上の生物学的標的を単離するために、前記安定化細胞含有体液サンプルを処理することと、を含む、前記方法が提供される。

本方法は、

（Ｄ）　前記富裕化した３つ以上の生物学的標的を解析すること

をさらに含むことができる。

【００１０】

本出願の他の目的、特徴、利点、及び態様が、以下の記載及び添付の特許請求の範囲から、当業者には明らかとなろう。しかし、以下の記載、添付の特許請求の範囲、及び具体的な実施例は、本出願の好ましい実施態様を示しているが、例示としてのみ与えられることが理解されなければならない。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】ヒト汎サイトケラチン（緑）及び細胞核（青）に対する、ＭＣＦ７乳癌細胞株細胞の免疫細胞化学染色。上のパネルは、未処理のＭＣＦ７細胞における染色を示す。下のパネルは、本開示の安定化溶液中で３０分間安定化したＭＣＦ７細胞を染色することを表す。

【図２】Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ密度勾配媒体を用いた遠心分離後の血液サンプル。ＥＤＴＡ含有ＢＣＴ内に収集し、ＰＢＳで希釈した血液サンプルを参照として使用する。層

（上から下に向かって）は、血小板豊富な血漿、ＰＢＭＣ環、フィコール、赤血球富裕化画分である。ＰＢＳで希釈した安定化サンプルにおいて、上述の画分は観察することができず、これらの画分は５％グルコースまたは０．９％ＮａＣｌ＋０．１Ｍグリセロール含有溶液を添加した後でのみ存在する。これにより、種々の画分を得るために正しい層形成を復元することができる。

【図３】スパイクから３、２４、３０、及び４８時間後の実験時点における、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ　チューブに保管した血液からの、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７によるスパイクした腫瘍細胞の検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ　チューブに収集し、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液、または２０μＬのＰＢＳ／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃で保管した血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７。図３Ａは２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクしたサンプルの結果を示す。図３ＢはＰＢＳのみでスパイクしたサンプル（非スパイク対照サンプル）の結果を示す。

【図４】スパイクから３、２４、４８、及び７２時間後の実験時点における、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ　チューブ（図４Ａ；ｎ＝１１）、及び、Ｓｔｒｅｃｋ　Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ　ＤＮＡ　ＢＣＴ（図４Ｂ；ｎ＝８）に保管した血液について、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７によるスパイクした腫瘍細胞の検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ　チューブ及びＣｅｌｌ－Ｆｒｅｅ　ＤＮＡ　ＢＣＴ（Ｓｔｒｅｃｋ）に収集し、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃（ＰＡＸ）及びＲＴ（Ｓｔｒｅｃｋ）で保管した血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ　Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７。図４Ｃ及び４Ｄは、３、２４、４８、または７２時間、２～８℃、または室温のいずれかで保管した、２０個のＬＮＣａＰ９５／５ｍＬ血液でスパイクした、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化血液に対するＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ　Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７の性能を示す。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ　チューブに収集し、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクした血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７。

【図５】ＥＤＴＡ安定化血液、または、本開示に従った安定化技術を用いて安定化した血液を処理した場合の、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ細胞富裕化ワークフローを用いた細胞捕捉効率を示す。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブで収集した血液は室温における３日間の保管と適合性があり、室温で３日間保管した後でも処理することができる。

【図６】精製したＥＶから得られたＲＮＡのＲＴ－ｑＰＣＲによる解析。Ｃｔ値が低いほど、より良い結果を示す。

【図７】後続のｃｃｆＤＮＡ及びｇＤＮＡ単離のためのＣＴＣ富裕化後のＣＴＣ枯渇血液を収集するためのオプションを伴う、ＡｄｎａＴｅｓｔＳｅｌｅｃｔ及び－Ｄｅｔｅｃｔ手順の略図（図１１もまた参照されたい）。

【図８】保管時間にわたる、ＣＴＣ富裕化後のサンプル（ＣＴＣ枯渇血液）、及び対照サンプル（即ち、ＣＴＣ富裕化なしのサンプル）中の、ヒト１８Ｓ　ｒＤＮＡ遺伝子（それぞれ、左及び右パネル）の６６及び５００ｂｐ断片の発現における絶対差の評価。箱プロットは、メジアン（水平線）、ならびに２５～７５％四分位数間領域（箱）、ならびに、データ範囲（ひげ）及びアウトライナー（ひげの外の点）の最小値及び最大値を示す。Ｐ値は、対応のない両側ｔ検定に対応する。

【図９】スパイクの３時間後、及び、全ての時点（３～７２ｈ、ｎ＝１１ドナー、１２個のサンプルはＣＴＣ富裕化なしで、３２個はＣＴＣ枯渇サンプル）における、２００μＬの、全血（即ち、ＣＴＣ富裕化なしのサンプル、ｎ＝３ドナー）由来の細胞画分及びＣＴＣ富裕化後のサンプル（ｎ＝８ドナー）からの、ｇＤＮＡ収率の評価。データは全て、ボックスプロットで示し、メジアン及び四分位数が、ボックス、及び１０／９０百分位数内に両側として含まれる。個別のデータポイントは、円として重ねた。Ｐ値は、対応のない

両側ｔ検定に対応する。
【図１０】本発明の方法に従ったＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブと適合性がある、リキッドバイオプシーベースの解析のための、種々のオプションについての概要。
【図１１】単一の安定化血液サンプルから複数の標的を解析するための、例示的な液体バイオプシーベースのワークフロー。本明細書にて開示するように、本発明に従った安定化技術を用いることにより、工程（Ｄ）に従った安定化血液サンプルを処理する前に、安定化した血液サンプルを室温で長期間保管することが可能となる。
【図１２】左パネル：Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅによる遠心分離の後で、ＥＤＴＡ及びＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ（それぞれ、左及び右）に収集した血液サンプル。層（上から下に向かって）は、血小板豊富な血漿、ＰＢＭＣ環、赤血球富裕化画分である。ＰＢＳで希釈したＰＡＸサンプルにおいては、上述の画分は明瞭には分離されない。右パネル：ＥＤＴＡサンプル（参照として採取、ｎ＝８）と比較した、ＰＡＸ安定化サンプルで観察された、ＭＮＣ回収の相対差。
【図１３】スパイクから３、２４、３０、４８、７２、１２０、及び１４４時間後の実験時点における、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からの、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ　Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７による検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集し、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃で保管した血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７。図１３は、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集した血液にスパイクされた腫瘍細胞を検出するための、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ　Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７試験の性能を示す。
【図１４】保管温度に関する試験性能。室温で保管したスパイクの３、２４、及び７２時間後の実験時点における（図１４Ａ）、または、２～８℃で保管したスパイクの３、２４、３０、４８、７２、１２０、及び１４４時間後における（図１４Ｂ）、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７によるＣＴＣ富裕化及び検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集し、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクした血液。
【図１５】検出限界（ＬＯＤ）を評価するための、スパイクした腫瘍細胞の数に関する試験性能。スパイクから３、２４、４８、７２、１２０、及び１４４時間後の実験時点における、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からの、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７による検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集し、５個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ（図１５Ａ）または２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液（図１５Ｂ）のいずれかでスパイクし、２～８℃で保管した血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７。
【図１６】血漿作製レジメンに依存した試験の性能。血液サンプルをＣＴＣ富裕化のために使用し、ＣＴＣ枯渇血液を血漿作製のために使用した（図１６Ａ）。あるいは、血漿をまず作製し（１９００ｇで１５分間）、次いで、細胞画分をＰＢＳにより初期容量まで再構成し、ＣＴＣ富裕化のために使用した（図１６Ｂ）。血漿作製の両方法は、スパイクから３、２４、４８、及び７２時間後の実験時点における、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からの、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７による検出を可能にすることにより、同様に十分機能した。
【図１７】血漿作製レジメンに依存した、ＥＺ１における試験の性能。図１６におけるような、同一の２つの血漿作製法を、まず、ＣＴＣを富裕化し、次いで、血漿を作製することにより（図１７Ａ）、または、まず血漿を作製し、次いでＣＴＣを富裕化することにより（図１７Ｂ）行った。図１６で実施したものと同一の実験を、ＥＺ１に適合したＡｄｎ

ａＴｅｓｔを用いてＥＺ１機器（自動ソリューション）で行ったときに、同様の十分な結果が観察された。スパイクから３、２４、４８、７２、及び１４４時間後の実験時点において、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からスパイクした腫瘍細胞をＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７により検出した。

【図１８】スパイクから３、２４、４８、及び７２時間後の実験時点における、ＡｄｎａＴｅｓｔ　Ｐｒｏｓｔａｔｅ　Ｃａｎｃｅｒ（「ＰｒｏｓｔａｔｅＤｉｒｅｃｔ」とも呼ばれる；図１８Ｂ、１８Ｄ、１８Ｆ、及び１８Ｈ）と比較しての、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からの、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７による検出（図１８Ａ、１８Ｃ、１８Ｅ、及び１８Ｇ）。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集し、ＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクした血液。図１８Ａ及び１８Ｂは、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃で保管することによる試験の性能を示す。図１８Ｃ及び１８Ｄは、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、室温で保管することによる試験の性能を示す。図１８Ｅ及び１８Ｆは、５個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃で保管することによる試験の性能を示す。図１８Ｇ及び１８Ｈは、血漿がまず作製され、細胞画分をＣＴＣ富裕化のために使用した、代替の血漿作製技術を用いた試験の性能を示す。

【図１９】ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒの性能。収集し、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ（図１９Ａ）、及びＡＣＤ－Ａ　ＢＣＴ（図１９Ｂ）に保管した血液における、スパイクから３、２４、４８、及び７２時間後の実験時点における、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒによる検出。材料：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ及びＡＣＤ－Ａ　ＢＣＴに収集し、２０個のＴ４８細胞／５ｍＬ血液でスパイクし、２～８℃で保管した血液。ＣＴＣ富裕化及び検出：ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒ。図１９Ａ及び１９Ｂは、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブがＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒと適合性があり、７２時間以内のサンプル保管した場合に腫瘍細胞の検出を可能にする（１００％感度）ことを示す。

【図２０】収集後（図２０Ａ）及びカセット内染色（図２０Ｂ）における、スパイクした腫瘍細胞（５０個のＭＣＦ７）の検出率。「Ｔ」は、室温における保管日数（０、１、２、３日）を意味する。

【図２１】Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ富裕化後に、腫瘍細胞の染色があるか否か。蛍光緑－抗汎角質化抗体染色（腫瘍細胞に対して特異的）；蛍光青－ＤＡＰＩ（核染色）。０（Ｔ０）または２（Ｔ２）日間の保管。

【図２２】ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ（「ＰｒｏｓｔａｔｅＤｉｒｅｃｔ」とも呼ばれる；図２２Ｂ）と比較した、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管したＰａｒｓｏｒｔｉｘベースの富裕化後の、スパイクした腫瘍細胞のＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７の検出部分を用いることによる検出（図２２Ａ）。図２２は、ＰＡＸ　ｃｃｆＤＮＡ収集血液サンプルにスパイクし、最大３日保管した細胞が、ＥＤＴＡ収集サンプルにスパイクしたかのように、効率的に検出可能であることを示す。

【図２３】実施例７で使用する、ｃｃｆＲＮＡ、ｃｃｆＤＮＡ、及びｇＤＮＡの解析のためのマルチモードワークフロー。

【図２４ａ】血液収集後に直接作製され（試験時点＝ＴＴＰ０）、示されたキットを用いて抽出した、ＰＡＸｇｅｎｅ及びＥＤＴＡ血漿における、ｍｉＲ１５０、ｌｅｔ７ａ及びｍｉＲ４５１マイクロＲＮＡｓ、ＡＣＴＢ　ｍＲＮＡ及び１８Ｓ　ｒＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）のｑＰＣＲ解析のC_T値。

【図２４ｂ】全血保管の１、３、または６日後に作製した、ＰＡＸｇｅｎｅ及びＥＤＴＡ血漿中の、ｍｉＲ１５０、ｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ４５１マイクロＲＮＡｓ及びＡＣＴＢ　ｍＲＮＡのｑＰＣＲ解析の、（ＴＴＰ０に対する）計算倍率変化。示されたキットを用いて

、ＲＮＡを抽出した。
【図２５ａ】血液収集後に直接作製され（ＴＴＰ０）、示されたキットを用いて抽出した、ＰＡＸｇｅｎｅ、Ｓｔｒｅｃｋ　ｃｆＤＮＡ、Ｓｔｒｅｃｋ　ＲＮＡ及びＢｉｏｍａｔｒｉｃａ血漿における、ｍｉＲ１５０、ｌｅｔ７ａ、及びｍｉＲ４５１マイクロＲＮＡのｑＰＣＲ解析のC_T値。
【図２５ｂ】保管の３日後（Ｔ３ｄ）に作製した、ＰＡＸｇｅｎｅ、Ｓｔｒｅｃｋ　ｃｆＤＮＡ、Ｓｔｒｅｃｋ　ＲＮＡ及びＢｉｏｍａｔｒｉｃａ血漿における、ｍｉＲ１５０、ｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ４５１マイクロＲＮＡ、及び１８Ｓ　ｒＤＮＡのｑＰＣＲ解析の、（ＴＴＰ０に対する）計算倍率変化。示されたキットを用いて、ＲＮＡを抽出した。
【図２６】ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ、Ｓｔｒｅｃｋ　ｃｆＤＮＡ、Ｓｔｒｅｃｋ　ＲＮＡ、及びＢｉｏｍａｔｒｉｃａチューブにおける全血から抽出したｇＤＮＡの濃度及びＤＮＡ完全性指標（ＤＩＮ）評価。ＱＩＡａｍｐ　Ｂｌｏｏｄ　ＤＮＡキットを用いて、最初の血漿遠心分離工程の後で細胞画分からＤＮＡを抽出し、ＴａｐｅＳｔａｔｉｏｎ　ＳｙｓｔｅｍのＡｇｉｌｅｎｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　ＳｃｒｅｅｎＴａｐｅ（登録商標）により解析した。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
本開示は、細胞含有体液に含まれる複数の生物学的標的を安定化し、富裕化するための有利な方法であって、
（Ａ）　細胞含有体液を、以下の安定化因子のうちの１つ以上：
（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、
を含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルを提供することと、
（Ｂ）　安定化期間の間、前記安定化細胞含有体液サンプルを維持することと、
（Ｃ）　前記安定化細胞含有体液から、少なくとも１つの細胞亜集団、細胞外核酸、細胞外小胞、及び細胞内核酸からなる群から選択される、３つ以上の生物学的標的を富裕化するために、前記安定化細胞含有体液サンプルを処理することと、を含む、前記方法を提供する。
本方法は、
（Ｄ）　前記富裕化した３つ以上の生物学的標的を解析のために、さらに処理すること
をさらに含むことができる。
当該方法の、各個別の工程、加えて、本方法の好適かつ好ましい実施態様を、この後で詳細に説明する。
【００１３】
工程（Ａ）
工程（Ａ）において、細胞含有体液を、以下の安定化因子：
（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤
の１つ以上、２つ以上、または３つ全てを含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルがもたらされる。安定化組成物は、収集容器、例えば収集管に含まれる、例えば予充填されることができる。細胞含有生体サンプルを、収集容器に導入してよい。細胞含有生物学的体液を安定化組成物と接触させる工程は、エクスビボで行う。
【００１４】
細胞含有体液サンプルの安定化における、個別の作用因子の有利な安定効果、及び、これらの作用因子の組み合わせを含む有利な安定化組成物は、例えば、ＷＯ２０１３／０４５４５７、ＷＯ２０１３／０４５４５８、ＷＯ２０１４／１４６７８０、ＷＯ２０１４／

１４６７８１、ＷＯ２０１４／１４６７８２、ＷＯ２０１４／０４９０２２、ＷＯ２０１５／１４０２１８、及びＷＯ２０１７／０８５３２１に開示され、本明細書に参照により組み込まれる。安定化因子（ａ）～（ｃ）の組み合わせを含む有利な安定化組成物もまた、本明細書の他の箇所に記載し、本開示と呼ばれる。

後続の実施例で示され、上述の文書により支持されるように、細胞含有体液に含まれる、注目する異なる生物学的標的の並行処理及び解析が可能である。本方法で用いる安定化技術は、細胞含有体液との接触の際に、希少細胞（例えば、循環腫瘍細胞など）、細胞外核酸（例えば、細胞外ＤＮＡ及びＲＮＡなど）、細胞外小胞、ならびに細胞内核酸（ゲノムＤＮＡなど）を含む、注目する多数の生物学的標的を有利に安定させる。後続の実施例で示すように、注目する複数の生物学的標的を安定化細胞含有体液サンプルから回収して古典的な解析及び検出法に供することができる。これにより、単一安定化細胞含有体液から非常に関心のある種々の生物学的標的のマルチモード解析が可能となる。

【００１５】

工程（Ｂ）

（Ｂ）において、安定化細胞含有体液サンプルを、意図する安定化期間の間維持する。

安定化細胞含有体液サンプルは例えば、安定化直後、もしくは安定化の後速やか（例えば、３時間以内）に処理することができ、または、より長い保存期間、維持することができる。安定化細胞含有体液サンプルを長い保存期間の間保存できることは特に有利である。安定化サンプルに含まれる生物学的標的も長い保存期間の間保存される。

【００１６】

複数の実施態様では、（Ｂ）は、処理工程（Ｃ）の前に安定化細胞含有体液サンプルを保管することを含む。保管は例えば、さらなる処理のために、安定化細胞含有体液サンプルを、収集及び安定化した場所から異なる場所に移動することを含み得る。

安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）の前に最大１２時間、または最大２４時間保管することができる。実施例で示すように、安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）の前に最大３０時間、最大３６時間、または最大４８時間維持することができる。複数の実施態様では、安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）の前に最大５０時間、または最大７２時間維持される。

意図する安定化期間の間、安定化細胞含有体液サンプルを維持するときに、安定化サンプルが凍結工程に供されないとしたら有利である。凍結工程はサンプルに含まれる細胞を損傷する可能性がある。したがって、凍結工程を避けることは細胞含有体液サンプルの保存を支持するので有利である。

【００１７】

複数の実施態様では、安定化細胞含有体液サンプルを、意図する安定化期間の間、室温（例えば、１５～２５℃）で維持する。他の実施態様ではサンプルは冷却され、例えば、１～１４℃、例えば１～１２℃、または２～１０℃、または２～８℃などの温度で、例えば維持される。複数の実施態様では、血液などの安定化細胞含有体液サンプルは、２～８℃で最大７２時間維持することができる。

複数の実施態様では、安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）を行う前に、少なくとも４時間、または少なくとも６時間維持される。複数の実施態様では、安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）を行う前に、少なくとも８時間、または少なくとも１２時間維持される。複数の実施態様では、安定化細胞含有体液サンプルは、処理工程（Ｃ）を行う前に、少なくとも２４時間、少なくとも３０時間、または少なくとも４８時間～７２時間（またはそれ以上）維持される。

【００１８】

工程（Ｃ）

安定化期間の後、少なくとも１つの細胞亜集団、細胞外核酸、細胞外小胞、及び細胞内核酸からなる群から選択される３つ以上の生物学的標的を安定化細胞含有体液から富裕化するために、安定化細胞含有体液サンプルは処理される。

本明細書にて開示するように、注目する複数の異なる生物学的標的が細胞含有体液内で

安定化され、その後、及び、さらに長い安定化期間の後であっても、同一の安定化サンプルから回収可能であることが非常に有利である。これにより、効率的なワークフローにおいて、単一の安定化細胞を含有する体液から得られた複数の異なる生物学的標的の並行／同時回収及び解析が可能となる。

【００１９】

本明細書にて開示するように、一実施態様では、富裕化された少なくとも１つの細胞集団は、標的希少細胞を含むか、または希少細胞から本質的になる。複数の実施態様では、標的希少細胞は、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの腫瘍細胞である。発明の背景で論じたように、ＣＴＣなどの腫瘍細胞は、特に注目する生物学的標的を代表する。

本明細書にて記載するように、安定化細胞含有体液サンプルを、少なくとも１つの細胞枯渇画分と少なくとも１つの細胞含有画分とに分離することが有利である。これにより、細胞含有体液サンプルに含まれる細胞は提供される細胞含有画分内で富裕化することができる。少なくとも１つの細胞含有画分は有核細胞を含んでよい。複数の実施態様では、少なくとも１つの細胞含有画分は有核細胞から本質的になる。

工程（Ｃ）における安定化細胞含有体液の処理のための好ましい態様、および生物学的標的を以下で説明する。

【００２０】

実施態様Ａ

実施態様Ａに従うと、（Ｃ）における処理は、

（ａａ）　安定化細胞含有体液サンプルを、少なくとも１つの細胞含有画分と少なくとも１つの細胞枯渇画分とに分離することと、

（ｂｂ）　前記細胞含有画分をさらに処理することであって、前記細胞含有画分をさらに処理することが、

（ｉ）　前記細胞含有画分から、例えば、標的希少細胞を含む少なくとも１つの細胞亜集団を富裕化すること、及び／または

（ｉｉ）　前記細胞含有画分から、細胞内核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を富裕化、例えば精製することを含む、さらなる処理と、

（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、

（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外核酸（例えば、細胞外ＤＮＡ）を富裕化、例えば精製すること、及び／または

（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化することを含む、さらなる処理、を含む。

【００２１】

本実施態様では、安定化細胞含有体液サンプル（例えば血液）は、（ａａ）において少なくとも１つの（例えば、有核血液細胞及びＣＴＣを含む）細胞含有画分と細胞枯渇画分（例えば血漿）とに分離される。好適な分離法は当技術分野において既知であり（例えば、遠心分離及び／または濾過を伴う）、本明細書の他の箇所に記載する。例えば、遠心分離ベースの分離法を用いる工程（ａａ）に従い、（血液凝固抑止された）安定化血液サンプルを処理する場合、安定化血液サンプルを、細胞枯渇画分（血漿）と細胞含有画分（白血球、及び存在する場合はＣＴＣ、及び任意に血小板を含んでもよいバフィーコート）と、赤血球画分と、に分離することができる。バフィーコートは工程（ｂｂ）において、細胞含有画分としてさらに処理することができ、血漿画分は、（ｃｃ）において、細胞枯渇画分としてさらに処理することができる。

【００２２】

注目する得られた細胞含有画分を次に、（ｂｂ）においてさらに処理する。標的希少細胞（例えばＣＴＣ）などの、少なくとも１つの細胞亜集団を、得られた細胞含有画分から富裕化することができる（（ｉ）を参照されたい）。さらに、細胞内核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を富裕化し、そのようにして細胞含有画分から精製することができる（（ｉｉ）を参照されたい）。複数の実施態様では、例えば、希少細胞（例えばＣＴＣ）及び細胞内

核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を含む少なくとも１つの細胞亜集団を共に、細胞含有画分から注目する生物学的標的として富裕化する。例えば、まず、希少細胞（例えばＣＴＣ）を含む注目する細胞亜集団を、（ｉｉ）で標的細胞亜集団（例えば、希少細胞）が取り除かれた／枯渇された残りの細胞含有画分から細胞内核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を精製する前に、（ｉ）の細胞含有画分から単離することができる。有利には、本実施態様により、一実施態様では希少細胞（ＣＴＣなど）を含む標的細胞亜集団を単離するために、全体積の細胞含有画分を用いることが可能となる。他の実施態様では、細胞含有画分は少なくとも２つのアリコートに分離され、少なくとも１つのアリコートを（例えば、希少細胞を含む）注目する細胞亜集団を富裕化するために使用し、少なくとも１つのアリコートをゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸を富裕化するために使用する。他の実施態様では、細胞含有画分は少なくとも２つのアリコートに小分けされ、少なくとも１つのアリコートを（例えば、希少細胞を含む）注目する細胞亜集団を富裕化するために使用し、少なくとも１つのアリコートをゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸を富裕化するために使用する。

細胞枯渇画分（例えば血漿）から細胞外核酸を単離し、及び／または、細胞外小胞を富裕化するため、得られた細胞枯渇画分を（ｃｃ）においてさらに処理する。本明細書にて開示するように、有利な実施態様において、細胞外ＤＮＡを細胞枯渇画分（例えば血漿）から精製する。さらに、実施例で示すように、細胞外小胞を細胞枯渇画分から富裕化することができる。細胞外小胞を富裕化するための例示的な好適かつ好ましい方法もまた、以下で説明する。複数の実施態様では、細胞外小胞及び細胞外核酸、好ましくは細胞外ＤＮＡが共に細胞枯渇画分から富裕化される。例えば、まず細胞枯渇画分から細胞外小胞を単離し、細胞外小胞が前もって取り除かれた残存する細胞枯渇画分から細胞外ＤＮＡを富裕化することができる。さらなる実施態様では、細胞枯渇画分は少なくとも２つのアリコートに分割され、少なくとも１つのアリコートは細胞外小胞を富裕化するために使用され、少なくとも１つのアリコートは当該アリコートから細胞外ＤＮＡなどの細胞外核酸を精製するために使用する。

【００２３】

実施態様Ｂ

実施態様Ｂに従うと、（Ｃ）における処理は、

（ａａ）　前記安定化細胞含有体液サンプルから、例えば、標的希少細胞を含む、少なくとも１つの細胞亜集団を富裕化することと、

（ｂｂ）　（例えば、標的希少細胞を含む）細胞亜集団が富裕化され、したがって取り除かれた安定化細胞含有体液サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離することと、

（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、

（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、（細胞外ＤＮＡであってもよい）細胞外核酸を富裕化すること、及び／または

（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、

を含むさらなる処理と、

（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化すること、とを含む。

【００２４】

工程（ａａ）において、例えば、標的希少細胞（例えばＣＴＣ）を含む少なくとも１つの細胞亜集団を安定化細胞含有体液サンプルから富裕化する。安定化サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離する前にまず、例えば希少細胞を含む注目する標的細胞亜集団を生体サンプルから単離することにより、細胞亜集団の全体的な取扱い時間が短縮される。細胞亜集団が希少な細胞を含むまたは希少細胞から本質的になる場合、これら希少で貴重な細胞への損傷を防止するために、これは特に有利である。一実施態様では、希少細胞（ＣＴＣなど）は、安定化細胞含有体液サンプル全体から富裕化される。有利には、これにより、収集したサンプル体積全部を希少細胞（ＣＴＣなど）を単離するために用い

ることが可能となる。このことは、ＣＴＣなどの特定の細胞が多くの場合希少であり、含まれる希少細胞（ＣＴＣなど）を確実に富裕化及び検出可能にするためには、より多くのサンプル体積を処理することが望ましいことを考慮すると有利である。

工程（ｂｂ）において、標的希少細胞（または、注目する他の細胞亜集団）が取り除かれた安定化細胞含有体液サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離する。したがって、完全な収集体積の安定化細胞含有体液サンプルを工程（ａａ）において希少細胞を富裕化するために使用した場合において、希少細胞、または所望する場合、その一部が取り除かれた安定化細胞含有体液サンプル全体を処理し、細胞含有画分及び細胞枯渇画分を提供する。

工程（ｃｃ）において、細胞枯渇画分をさらに処理する。詳細は、前記実施態様Ａと組み合わせて記載されており、ここでも適用されるそれぞれの開示も参照される。

さらに、工程（ｄｄ）においてゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸を細胞含有画分から富裕化することができる。

【００２５】

実施態様Ｃ

実施態様Ｃに従うと、（Ｃ）における処理は、

（ａａ）　前記安定化細胞含有体液サンプルを少なくとも２つのアリコートに小分けし、例えば希少細胞を含む、注目する少なくとも１つの細胞集団を、前記提供したアリコートのうちの少なくとも１つから富裕化することと、

（ｂｂ）　少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を提供することと、

（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、

（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、（細胞外ＤＮＡであてよもい）細胞外核酸を富裕化すること、及び／または

（ｉｉ）前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、を含む、さらなる処理と、

（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化することと、を含む。

【００２６】

工程（ａａ）において、安定化細胞含有体液サンプルは少なくとも２つのアリコートに分割される。少なくとも１つのアリコートを、注目する少なくとも１つの細胞集団を富裕化するために使用し、これは例えば、標的希少細胞（例えばＣＴＣ）を含むか、または希少細胞から本質的になることができる。これにより、希少細胞が取り除かれた安定化細胞含有体液サンプルの少なくとも１つのアリコートが提供される。注目する別の細胞亜集団が富裕化される場合にも、同じことを適用する。少なくとも１つのさらなるアリコートは、希少細胞（または、注目する他の細胞集団）を取りださなかった元の安定化細胞含有体液に対応する。

工程（ｂｂ）において、少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を提供する。工程（ｂｂ）は、（例えば、ＣＴＣなどの希少細胞を含むか、もしくは希少細胞から本質的になる）標的細胞集団が富裕化された安定化細胞含有体液サンプル、及び／または、工程（ａａ）において標的細胞集団を富裕化するために使用しなかった任意の残りの安定化細胞含有体液サンプル（アリコート）を、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離することを含むことができる。安定化細胞含有体液サンプルを少なくとも２つのアリコートに分割した場合において、細胞含有画分及び細胞枯渇画分を提供するために、標的細胞を取り除かなかったアリコートのみを処理することが可能である。あるいは、標的細胞を取り除いた少なくとも１つのアリコートを、標的細胞を取り出さなかった元の安定化体液サンプルのさらなるアリコートと再統合することができる。このようにプールすることにより、得られた細胞枯渇画分及び細胞含有画分の体積が有利に増加し、これは、これらの画分のさらなる処理及び解析に有益である。

工程（ｃｃ）、及び任意的工程（ｄｄ）は実施態様Ｂに対応し、前記開示を参照する。

【００２７】
サンプルを少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分に分離する例示的な好適かつ好ましい方法もまた、以下に記載する。このような方法を、特に、実施態様Ａ～Ｃにおける工程（Ｃ）において使用することができる。
特に、実施態様Ａ～Ｃにおける工程（Ｃ）で使用可能な、ＣＴＣなどの希少細胞、及び、他の標的細胞亜集団を富裕化する例示的な好適かつ好ましい方法を以下で説明する。本明細書にて開示するように、例えば、細胞内核酸（例えばＲＮＡ）を単離して、続いて検出するために、希少細胞などの取り出された標的細胞を工程（Ｄ）でさらに処理することができる。
特に、実施態様Ａ～Ｃにおける工程（Ｃ）で使用可能な、エクソソームなどの細胞外小胞を富裕化する例示的な好適かつ好ましい方法もまた、以下に記載する。本明細書にて開示するように、例えば、核酸（例えばＲＮＡ）を単離して検出を続けるために、回収した細胞外小胞を工程（Ｄ）でさらに処理することができる。
【００２８】
細胞含有体液サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離する方法
細胞含有体液を、少なくとも１つの細胞含有画分と少なくとも１つの細胞枯渇画分とに分離する方法は当該技術分野において周知であるので、詳述する必要はない。一般的な方法としては、遠心分離、濾過、及び密度勾配遠心分離が挙げられるが、これらに限定されない。異なる方法を組み合わせることもできる。そのような一般的な方法を、本開示に従って、安定化技術と組み合わせて有利に使用することができ、これにより、有利なことに安定化のために架橋剤を使用することを避けることが可能になり、それにより、一般的な確立された方法を使用することができる。サンプルに含まれる細胞の完全性を維持するためにこの方法を実施する。分離中に細胞が破壊されることで、例えば、細胞枯渇画分に含まれる細胞外核酸が破壊された細胞から放出される細胞核酸で汚染されるために、このことは有利である。
【００２９】
一実施態様に従うと、細胞含有画分を細胞枯渇画分から分離するために、少なくとも１つの遠心分離工程を行う。複数の実施態様では、遠心分離を、例えば８００～３０００ｘｇ、例えば１０００～２５００ｘｇ、または１５００～２０００ｘｇの範囲で行うことができる。遠心分離の期間は、例えば５～２０分、例えば１０～１５分の範囲であってよい。好適な条件は、当業者により選択可能である。細胞枯渇画分は上清として回収することができる。残存するあらゆる細胞、及び微粒子物質（例えば、細胞デブリ）が確実に細胞枯渇画分から取り除かれていることを保証するために、細胞枯渇画分を、得られた細胞画分（複数可）から取り出し、（任意に高速で行ってもよい）第２の遠心分離工程に供することができる。これは、後で細胞外ＤＮＡなどの細胞外核酸を細胞枯渇画分から精製するために有利であり得る。細胞枯渇画分を提供するために濾過工程を実施することもまた、本開示の範囲内である。このような方法は当該技術分野において周知であり、例えば、細胞外ＤＮＡなどの細胞外核酸を後で精製するために血漿を血液サンプルから得るために使用する（例えば、Ｃｈｉｕ ｅｔ ａｌ，２００１ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４７：９ １６０７－１６１３；Ｓｏｒｂｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒｓ ２０１９，１１，４５８を参照されたい）。注目する生物学的標的（複数可）として、エクソソーム及び／または血小板を細胞枯渇画分から回収するのが望ましい場合において、エクソソーム及び／または血小板を細胞枯渇画分に残し、そこからの回収のために利用可能となるように、分離手順（複数可）が選択される。例えば、第１の遠心分離工程後に得られる細胞画分を細胞含有画分として使用し、（例えば、ゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸を単離し、かつ／または、そこから標的細胞（例えばＣＴＣ）を富裕化するために）本明細書に記載するようにさらに処理することができる。
【００３０】
好適な遠心分離、及び／または濾過に基づく分離法は、以下を含むことができるが、これらに限定されない：

－　１９００ｘｇ（１５分）で遠心分離し、細胞枯渇画分を細胞画分（複数可）から分離し、細胞枯渇画分を１９００ｘｇ（１０分）で遠心分離すること。
－　１６００ｘｇ（１０分）で遠心分離し、細胞枯渇画分を細胞画分（複数可）から分離し、細胞枯渇画分を１６０００ｘｇ（１０分）で遠心分離すること。
－　１６００ｘｇ（１０分）で遠心分離し、細胞枯渇画分を細胞画分（複数可）から分離して、その後、例えば、０．２μｍ～０．８μｍのフィルターを用いて、細胞枯渇画分を濾過すること。
－　１６００ｘｇ（１０分）及び１６０００ｇ（１０分）で遠心分離し、その後、例えば、０．２μｍ～０．８μｍのフィルターを用いて、濾過すること。
－　１０００ｒｐｍ（１０分）及び３０００ｒｐｍ（１０分）で遠心分離すること。
さらなる組み合わせ及びバリエーションもまた、可能である。

【００３１】

例えば、含まれる生物学的標的（例えば、細胞外核酸または細胞外小胞）の、細胞成分による汚染を避けるために、提供される細胞枯渇画分は実質的に細胞非含有の実施態様におけるものである。このような細胞非含有画分は、上述の、遠心分離及び／または分離ベースの方法を使用して得ることができる。得られた細胞枯渇／細胞非含有画分を新しい容器に移してよい。当該画分は、例えば、細胞外核酸及び／又は細胞外小胞をそこから精製するために直接処理することもでき、または使用するまで保管（例えば冷却もしくは凍結）することができる。さらに処理される、得られた細胞含有画分は、有核細胞をさらに含むことができ、標的細胞（例えば希少細胞など）、及び／または細胞内核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を当該画分から単離することができる。

【００３２】

核となる一実施態様に従うと、細胞含有体液は血液である。血液サンプルは、診断目的で幅広く使用されるため、非常に重要である。細胞含有体液が血液である場合、安定化組成物が抗凝血物質、例えば、ＥＤＴＡなどのキレート化剤を含むのが好ましい。細胞枯渇血漿画分及び細胞含有細胞画分（バフィーコートなど）を提供するために、安定化血液サンプルを処理してよく、次いでこれらはさらに処理される。血漿の作製方法は当該技術分野において周知であり、遠心分離及び濾過、ならびに、このような方法の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３３】

細胞の亜集団、及びこのような亜集団の富裕化、特に、循環腫瘍細胞などの希少細胞の富裕化

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、細胞亜集団を安定化細胞含有体液サンプルから富裕化することを含む。標的細胞亜集団は、安定化細胞含有体液から直接富裕化することができるか、または、細胞含有、したがって、（安定化細胞含有体液サンプルを細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離することにより得られ得る）安定化細胞含有体液の細胞画分から富裕化することができる。細胞の富裕化亜集団を処理し、本明細書に記載するように、さらに（例えば、得られた細胞を解析し、かつ／または、当該集団から細胞内核酸を単離することにより）解析することができる。

所望の細胞亜集団は、当該技術分野において既知の方法を使用して富裕化することができる。好適な方法を、希少細胞の富裕化と組み合わせて以下に開示し、同様の方法を、他の細胞集団に対しても使用することができる。例えば、特定の細胞を、親和性捕捉ベースの方法を用いて細胞表面の特性に基づき富裕化することができる。さらに、細胞を、その密度に基づき分離、したがって富裕化することができる。例えば、密度勾配遠心分離により、特定の層内でＰＢＭＣ及び他の細胞型を富裕化することが可能となる。特定の細胞、即ち、それぞれの細胞集団もまた、ソート技術、例えばＦＡＣＳソーティングにより、富裕化することができる。

【００３４】

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、希少細胞を富裕化することを含む。したがって、一実施態様に従うと、富裕化細胞亜集団は標的希少細胞を含む。富裕化細胞亜集団はまた

、標的希少細胞から本質的になることもできる。これは、使用する富裕化法に左右される。

希少細胞は、バックグラウンド細胞の大きな集団の中で少量の細胞である。希少細胞は典型的には、10^5個の細胞内で1未満の濃度で発見される。したがって、希少細胞の検出、定量化、及び富裕化は困難である。希少細胞は、多くのがんの診断及び予後、出生前診断、ならびに、ウイルス感染症の診断といった、様々な用途に非常に重要である。典型的な希少細胞は、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、（例えば、母体血液を循環する）循環胎児細胞、幹細胞、及び、ウイルスまたは寄生生物により感染した細胞である。このような希少細胞は例えば、血液サンプル及び他の体液で発見され、これらから富裕化することができる。富裕化可能なさらなる希少細胞の種類は、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、及び循環内皮前駆細胞（ＥＰＣ）である。がん、糖尿病、心血管、または急性腎臓病における内皮機能不全の潜在的バイオマーカーである循環成熟内皮細胞（ＣＥＣ）は、10^6～10^8個の白血球において、１０～１００個のＣＥＣの頻度で観察されている。これと比較して、推定されるＣＴＣの頻度はさらに低く、10^6～10^8個の白血球中で１～１０個のＣＴＣの範囲である。

【００３５】

ＣＴＣなどの希少細胞を富裕化する種々の方法が知られており、当該技術分野において記述されており、既知の方法を、本発明と組み合わせて使用することができる（例えば、Ｎｅｕｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ，２０１８，Ｖｏｌ．１６： １９０－１９５；Ｈａｂｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１４ Ｊｕｎｅ；４（６）： ６５０－６６１、及びＣｈｅｎ，Ｌａｂ Ｃｈｉｐ： ２０１４ Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２１；１４（４）： ６２５－６４５を参照されたい）。希少細胞の富裕化、分離、または定量化は、例えば、細胞サイズ、密度、変形性、形状、電気分極性、及び磁化率などの物理的性質、及び／又は、表面特性（例えば、細胞表面でのマーカー遺伝子発現）などの、細胞の生物学的性質に基づき、様々な方法により行うことができる。勾配に基づく遠心分離（例えば、フィコール勾配を用いる）は、ある密度を有する特定の細胞型を富裕化するための、一般に使用される一方法である。濾過により、細胞サイズに基づく希少細胞の富裕化が可能となる。別のＣＴＣ富裕化原理はマイクロ流体を用いる。濾過法と比較して、マイクロ流体システムにより、単一細胞単離のための免疫蛍光標識といった下流解析のためにＣＴＣ富裕化細胞懸濁液を収集することが可能となる。ＣＴＣ、及び、他の希少細胞も、その電荷の差に基づいて分離することもできる。概して、腫瘍細胞の物理的性質、固有の細胞表面マーカーの発現、または、豊富な細胞（例えば、正常な白血球）を枯渇させてタグ付けされていないＣＴＣを富裕化することに依存するか否かに応じて、ＣＴＣ富裕化法は異なるクラスに広範に収まる。ＣＴＣの富裕化のために、例えば、抗体が媒介するがん細胞の捕捉に基づく免疫磁気法も使用することができる。

【００３６】

一実施態様に従うと、標的希少細胞は、細胞含有体液サンプルに含まれる腫瘍細胞である。好ましくは、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）は、安定化血液サンプルなどの安定化体液サンプル由来の標的希少細胞として得られる。発明の背景で開示するように、循環腫瘍細胞は当該技術分野において周知である。一般に、ＣＴＣは、原発腫瘍から血管系またはリンパに排出され、循環中に体内を巡って運ばれる細胞である。ＣＴＣは、積極的に、または非積極的に排出されることがある。これらは、単一細胞として、またはアグリゲート（いわゆる、循環腫瘍微小塞栓）として、血液及びリンパ系を循環し得る。したがって、ＣＴＣは原発腫瘍が起源であり、離れた生命器官における、さらなる腫瘍（転移）のその後の増殖のための生きた種を構成することができる。これらは、がん転移に密接に関連しており、これが、がんの死亡率の主たる原因であると考えられる。ＣＴＣは、転移を起源とすることもまた可能である。ＣＴＣは多くの異なるがんで明らかにされており、末梢血で発見されるＣＴＣは固形腫瘍由来であり、固形腫瘍の、離れた部位への血行性転移拡大に関与することが幅広く受け入れられている。本明細書で使用する場合、用語「ＣＴＣ」は特に

、あらゆる種類の腫瘍、特に固形腫瘍、特には転移性固形腫瘍に由来する循環細胞を含む。本明細書で使用する場合、用語「ＣＴＣ」とはとりわけ、（ｉ）サイトケラチンまたは上皮マーカー分子（ＥｐＣａｍなど）を発現する、インタクトの生きた核を有し、ＣＤ４５が存在しないがん細胞であると確認されたＣＴＣ；（ｉｉ）がん幹細胞、又は、サイトケラチン若しくはＥｐＣａｍ及びＣＤ４５などの上皮マーカーの発現を欠き得る上皮間葉転換（ＥＭＴ）を受けている細胞である、サイトケラチン陰性（ＣＫ$^{-}$）ＣＴＣ；（ｉｉｉ）アポトーシス（細胞死）を受けた伝統的なＣＴＣであるアポトーシス性ＣＴＣ；（ｉｖ）通常、サイトケラチン陽性及びＣＤ４５陰性であるが、サイズ及び形状が白血球に類似している、小型ＣＴＣ、（ｖ）休眠ＣＴＣ、加えて、例えば、上述の種類のＣＴＣのいずれかの２つ以上の個別のＣＴＣのＣＴＣクラスター、または、互いに結合した前記種類のＣＴＣの混合物を含むが、これらに限定されない。ＣＴＣクラスターは例えば、従来の小型及び／またはＣＫ$^{-}$ ＣＴＣを含有することができる。

【００３７】

ＣＴＣは一般に、体液中の非常に希少な細胞である。ＣＴＣに関する情報を提供するために、腫瘍細胞の富裕化、または、血液中の他の有核細胞の除去が必要である。任意の方法を、安定化細胞含有体液サンプル、または、その得られた細胞含有画分からＣＴＣを富裕化するのに好適な本方法と組み合わせて使用することができる。ＣＴＣは多くの場合希少なので、一般的なＣＴＣ富裕化手順はほとんどの場合、富裕化ＣＴＣが正常細胞のバックグラウンド中で一定の程度含まれるようにするため、他の細胞型を所望のＣＴＣと併せて同時に単離する。にもかかわらず、このような方法は、ＣＴＣを富裕化し、したがって解析のためにＣＴＣを富裕化するのに有用な方法である。様々な生体サンプルからＣＴＣを富裕化する方法は当該技術分野において周知であり、上記で要約した。例示的な好適な方法を以下に簡潔に記載する。

ＣＴＣは、様々な物理的、及び／または親和性捕捉に基づく方法を用いて富裕化することができる。ＣＴＣは、ＣＴＣ細胞の正の選択を含む方法により、例えば、ＣＴＣを直接標的にする方法により、または、例えば、非ＣＴＣ細胞（例えば、血液の場合は白血球）を枯渇させることによる、ネガティブ選択を含む方法により富裕化することができる。例えば、濾過に基づく方法、変形性または密度または他の物理的方法を用いて、ＣＴＣをサイズにより富裕化する方法もまた適している。さらに、上述の方法の組み合わせを使用することができる。

【００３８】

好ましい実施態様に従うと、ＣＴＣは親和性捕捉により富裕化される。このような親和性に基づく捕捉法は、ＣＴＣを表面（例えばビーズ、膜、または他の表面）に特異的に結合させる。ＣＴＣに対する特異性は、ＣＴＣ上に存在する構造物、例えばエピトープまたは抗原に結合する１つ以上の結合因子（例えば抗体）を用いることにより達成される。複数の実施態様では、前記１つ以上の結合因子は、ＣＴＣ上に存在する腫瘍関連マーカーに結合する。例えば、ＣＴＣは、ＣＴＣ細胞を捕捉可能な抗体でコーティングされた固相（例えば磁気ビーズ）を使用して富裕化することができる。ＣＴＣ捕捉のために、所望のＣＴＣ細胞上のエピトープまたは抗原に対して高い特異性及び親和性で結合する２つ以上の抗体の組み合わせを使用することができる。結合因子は、腫瘍の種類に応じて、ＣＴＣ上に存在する標的エピトープまたは抗原を標的にして選択することもできる。例えば、原発腫瘍の種類に応じて、潜在的なＥＭＴまたは腫瘍幹細胞表現型の変化も考慮に入れて、結合因子（例えば抗体）により標的化可能な種々の構造物、例えば、エピトープまたは抗原がＣＴＣ上に存在し得る。例えば、上皮間葉転換（ＥＭＴ）の過程において表現型の変化を受ける、または、腫瘍幹細胞性を示すＣＴＣをもまた、富裕化することができるため、そのような結合因子（例えば抗体）に基づく捕捉プラットフォームを用いることは有利である。好ましい実施態様に従うと、結合因子により標的化されるエピトープは、例えばＥｐＣＡＭ、ＥＧＦＲ、及びＨＥＲ２などの、上皮及び／または腫瘍関連抗原である。循環腫瘍細胞を富裕化するための、市販されているシステムは、ＡｄｎａＴｅｓｔ（ＱＩＡＧＥＮ）である。

正の選択に基づき、ＣＴＣを得るための好適なＣＴＣ富裕化法を提示する別の方法は、上皮細胞細胞表面マーカーであるＥｐＣＡＭを標的にする抗体磁気ナノ粒子コンジュゲートにより血液から分離される上皮細胞の計数、ならびに、サイトケラチン（ＣＫ８、１８、１９）、及び蛍光核染色に対して蛍光標識した抗体によるＣＴＣのその後の同定に基づく。適切な方法を、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（Ｍｅｎａｒｉｎｉ／Ｖｅｒｉｄｅｘ ＬＬＣ）の市販されているシステムで用いる。ＣＴＣ富裕化、したがって、ＣＴＣを単離するための他の既知の方法としては、Ｅｐｉｃ ｓｃｉｅｎｃｅｓ社の方法、ＩＳＥＴ試験、マイクロ流体細胞ソーターの使用（変化した堰き止め式物理的バリアを用いて、サイズの違いに基づき、例えば未処理全血からＣＴＣを分離して捕捉する、μＦＣＳ）、ＳｃｒｅｅｎＣｅｌｌ（例えば、ヒト全血からの、感度が高く特異的な、ＣＴＣの単離を可能にする、濾過ベースのデバイス）、Ｃｌｅａｒｂｒｉｄｇｅ、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ、及びＩｓｏＦｌｕｘが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３９】

一実施態様に従うと、安定化サンプルは血液サンプルであり、工程（Ｃ）は、密度勾配遠心分離に基づく富裕化法を任意に用いて、ＰＢＭＣを安定化したサンプルから富裕化することを含む。好適な方法を後述する。発明の背景で開示するように、末梢単核血液細胞（ＰＭＢＣ）の、ゲノム及び／またはエピゲノムプロファイリングは、がん患者におけるイムノサーベイランスの初期診断及び監視のための、注目するバイオマーカーを提示する。さらにこれを、例えば、ＲＮＡなどの細胞内核酸を単離してＣＴＣ特異的標的核酸分子を検出することにより、含まれるＣＴＣを解析するために使用することができる。さらに、ＣＴＣのような特定の細胞型をさらに富裕化して精製するため、富裕化ＰＢＭＣ画分を使用することができる。

【００４０】

一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルは血液であり、工程（Ｃ）は、標的リンパ球を細胞亜集団として安定化サンプルから富裕化することを含む。一実施態様に従うと、リンパ球はＴ４及び／またはＴ８リンパ球から選択される。一実施態様に従うと、安定化血液サンプルは免疫欠損を有する患者から得た。このようなサンプルにおけるＴ４及びＴ８リンパ球の解析に特に診断上の価値がある。

【００４１】

一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルは血液であり、工程（Ｃ）は、血小板を細胞亜集団として安定化サンプルから富裕化することを含み、任意に、工程（Ｄ）が実施され、ＲＮＡを富裕化血小板から単離することを含む。血小板を血液サンプルから富裕化する方法は当技術分野において既知であり、本発明と組み合わせて使用することができる。複数の実施態様では、血小板豊富な血漿（ＰＲＰ）が、遠心分離により安定化（血液凝固阻止）血液サンプルから得られる。血小板豊富な血漿を得るのに好適な方法は当該技術分野において記載されており（Ｓｏｒｂｅｒ ｅｔ ａｌ，２０１９もまた参照されたい）、本開示に使用する、及び／または適合させることができる。血小板豊富な血漿は他の白血球及び赤血球は枯渇している。血小板は次いで、得られた血小板豊富な血漿から、そのそれぞれの部分から、当該技術分野において既知の方法を使用して単離することができる。複数の実施態様では、血小板を単離するために使用しなかった残りの血漿部分を、細胞外核酸（例えばｃｃｆＤＮＡ）、及び／またはエクソソームをそこから単離するために、さらに処理することができる。複数の実施態様では、得られた上清から細胞外核酸及び／またはエクソソームを単離する前に、残りの細胞または細胞デブリから取り除くために残りの血漿部分を再び遠心分離にかける、及び／または濾過する。

【００４２】

一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルは血液であり、工程（Ｃ）は、芽細胞を標的細胞亜集団として、安定化サンプルから富裕化することを含む。芽細胞は、任意に磁性粒子を用いることで、親和性捕捉により富裕化される。芽細胞は例えば、細胞表面マーカー（ＣＤ３４及び／またはＣＤ１１７であってよい）を標的にすることにより富裕化することができる。芽細胞の解析は、例えば、安定化血液サンプルが急性骨髄性白血病を有す

る患者から入手されたときに有用である。
上記のとおり、安定化細胞含有体液サンプルから富裕化可能なさらなる希少細胞の種類は、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、及び循環内皮前駆細胞（ＥＰＣ）である。このような標的細胞は、ＣＤ３１、ＣＤ３４、ＣＤ１０５、ＣＤ１３３、及びＣＤ１４６を含むがこれらに限定されない特異的マーカーに基づいて同定及び富裕化することができる。
【００４３】
密度勾配遠心分離工程
一実施態様に従うと、処理工程（Ｃ）は、安定化血液サンプルまたはその細胞画分を、密度勾配遠心分離工程に供することを含む。密度勾配遠心分離工程を行うことにより、安定化細胞含有体液サンプルを、細胞枯渇血漿画分（または、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞画分を入力材料として処理する場合には、細胞枯渇液体）と、種々の細胞含有画分とに分離することが可能となる。複数の実施態様では、細胞含有画分及び細胞枯渇画分を得るために、安定化細胞含有体液サンプルをまず工程（Ｃ）で処理する。上述の方法（例えば、遠心分離及び／または濾過）が、本目的のために使用することができる。例えば、安定化血液サンプルを血漿画分と細胞画分とに分離することができる。次に、得られた血漿画分を、他の箇所で記載したように、（ｉ）細胞外核酸、及び／または（ｉｉ）細胞外小胞、の富裕化のために使用することができる。得られた細胞画分を次に、密度勾配遠心分離にかけることができる。この目的のために、希釈溶液を用いて細胞画分を希釈することができる。希釈した細胞画分を次に密度勾配遠心分離にかける。密度勾配遠心分離手順を次に、細胞含有体液、例えば血液などに対して知られており記載されているとおりに実施することができる。
密度勾配遠心分離の実施態様は、安定化血液サンプルを用いる実施例で以下に記載されている。しかし、他の種類の安定化細胞含有体液サンプルもまた適宜処理することができる。
【００４４】
安定化血液サンプル（または、その細胞画分）を密度勾配媒体と接触させる。好適な密度勾配媒体は市販されており、Ｆｉｃｏｌｌ（登録商標）、Ｆｉｃｏｌｌ（登録商標）－Ｐａｑｕｅ、及びＬｙｍｐｈｏｐｕｒｅが挙げられるが、これらに限定されない。密度勾配遠心分離技術（Ｆｉｃｏｌｌ（登録商標）Ｐａｑｕｅ、ＯｎｃｏＱｕｉｃｋ（登録商標）など）を使用して、異なる細胞密度に基づき、末梢血単核球細胞を、赤血球及び多形核細胞（例えば顆粒球）を含む全血の他の構成成分から分離することができる。安定化血液サンプル（またはその細胞画分）を、密度勾配遠心分離工程を行う前、好ましくは、安定化血液サンプル（またはその細胞画分）を密度勾配媒体と接触させる前に、希釈溶液により希釈する。希釈は、少なくとも１：１の比率であってよい。希釈した安定化血液サンプル（または、希釈したその細胞画分）を、密度勾配媒体の上部（好ましい）、またはその下に上層することができ、遠心分離して、別個の細胞集団を血漿から分離させ、通常は、赤血球及び顆粒球をチューブの底にペレット化させ、単核細胞（ＣＴＣなどの希少細胞を含む）を、その低い密度により、勾配媒体層の上の、収集及び解析のためにアクセス可能な界面層に残す。しかし、本明細書に記載し、当該技術分野において公知であるように、細胞集団の密度を人工的に変化させ、異なる細胞含有層内に定まるようにすることができる。例えば、ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ（商標）ＣＴＣ富裕化カクテル（ＳｔｅｍＣｅｌｌ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）をＦｉｃｏｌｌ（登録商標）分離と組み合わせることにより、ＣＤ４５を発現する白血球を赤血球に架橋させる四量体抗体複合体を利用して、標識された白血球の密度を人工的に変化させ、底にペレット化させることにより、ＣＴＣについて界面層を富裕化させてＣＴＣ富裕化が可能となる。
【００４５】
実施例に示すように、血液サンプルを安定させるために本開示に従って使用する安定化組成物は、安定化因子（ａ）～（ｃ）を組み合わせて使用する実施態様において、変化した層パターンが密度勾配遠心分離の後で提供されるという結果をもたらし得る。取扱いエラーを避けるために、安定化血液サンプル（またはその細胞画分）を予め処理し、安定化

血液サンプル（またはその細胞画分）が、密度勾配遠心分離の際に一般的なＥＤＴＡ安定化血液サンプル（またはその細胞画分）の層パターンに似た層パターンをもたらすことを確実にするのが有利である。安定化血液サンプル（または、その細胞画分）を、一般的に用いられるＰＢＳとは異なる希釈溶液で希釈した場合に、このことが達成可能であることが発見された。使用する希釈溶液は、本明細書に記載する低張性溶液または等張性溶液であってよい。希釈は、少なくとも１：１の比率で行ってよい。

【００４６】

一実施態様では、前記希釈溶液は張性調節剤を含む。張性調節剤は、当技術分野において既知であり、塩（例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、乳酸ナトリウム）などの化合物、ならびに、糖類（例えばグルコース、デキストラン、デキストロース、ラクトース、トレハロース）及び糖アルコール（例えばグリセロール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール）などのポリオールが挙げられる。希釈溶液はポリオールを含んでよい。本明細書で使用する場合、用語「ポリオール」とは、複数のヒドロキシル基を有する物質を意味し、糖類（還元糖及び非還元糖）、ならびに糖アルコールが挙げられる。ポリオールは、少なくとも３つ、少なくとも４つ、または少なくとも５つのヒドロキシル基を含んでよい。特定の実施態様では、ポリオールは、≦６００Ｄａである分子量（例えば、１２０～４００Ｄａの範囲）を有する。「還元糖」とは、遊離アルデヒドまたはケトン基を含有し、金属イオンを還元することができるか、または、タンパク質中のリジン及び他のアミノ基と共有反応することができる糖である。「非還元糖」とは、遊離アルデヒドまたはケトン基を欠き、フェーリング液またはベネジクト液などの穏やかな酸化剤により酸化されない糖である。還元糖及び非還元糖の例は、当業者に知られている。複数の実施態様では、含まれる化合物（張性調節剤／ポリオール）は、細胞膜に浸透することができる。

【００４７】

複数の実施態様では、張性調節剤として含まれる作用可能なポリオールは、糖または糖アルコールである。糖及び／または糖アルコールの組み合わせもまた、使用することができる。糖は、還元糖または非還元糖であってよい。複数の実施態様では、糖は還元糖である。複数の実施態様では、希釈溶液はグルコースを含む。一実施態様では、希釈溶液は、還元糖（グルコースであってもよい）を、２～１０％、３～７％、または４～６％（ｗ／ｖ）の範囲の濃度で含む。さらなる実施態様では、希釈溶液は（グリセロールであってもよい）糖アルコールを含む。複数の実施態様では、希釈溶液は塩を含む。塩は張性調節剤として作用することができる。塩はアルカリ金属塩、任意に、塩化ナトリウムなどの塩化物塩であってよい。複数の実施態様では、希釈溶液は、糖アルコール（グリセロールなど）及び塩（アルカリ金属塩（塩化ナトリウムなど）であってもよい）を含む。一実施態様では、希釈溶液は、最大０．５Ｍのグリセロール、及び最大２％の塩化ナトリウムを含み、任意に、希釈溶液は０．７～１．２％の塩化ナトリウム、及び０．０７５～０．１５Ｍのグリセロールを含んでもよい。複数の実施態様では、希釈溶液は、（ｉ）５％（ｗ／ｖ）のグルコース、（ｉｉ）０．９％のＮａＣｌ＋０．１Ｍのグリセロール、及び、（ｉｉｉ）少なくとも１つの張性調節剤を含み、（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義した希釈溶液の質量オスモル濃度に一致する質量オスモル濃度を有する希釈溶液、または、質量オスモル濃度が（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義する溶液の質量オスモル濃度の±２０％、±１５％、または±１０％の範囲内にある希釈液、から選択される。

【００４８】

一実施態様に従うと、希釈溶液はＤＭＳＯを含む。希釈溶液は、１％～１０％（ｖ／ｖ）、例えば１％～５％（ｖ／ｖ）の濃度でＤＭＳＯを含んでよい。

【００４９】

複数の実施態様では、安定化血液サンプルは希釈溶液中で、１０分以内、５分以内、または３分以内でインキュベートされ、その後、希釈した安定化血液サンプル（またはその細胞画分）を密度勾配媒体と接触させる。希釈した安定化血液サンプル（またはその細胞画分）は希釈後に直接処理され、密度勾配媒体と接触するのが好ましい。

実施例で示すように、このような希釈溶液を用いることで、安定化血液細胞の密度が有利に回復されることにより、密度勾配遠心分離の後で、ＥＤＴＡ－安定化血液サンプルにおいて形成される層と本質的に同じ種類の層が形成され得ることを保証する。密度勾配遠心分離の後で種々の層が形成され、明確なＰＢＭＣ層が形成される。形成された層は（上から下に向かって）最上層（例えば、安定化血液サンプルの場合には血漿を含み、または、安定化血液サンプルの細胞画分を処理する場合には、希釈溶液を主に含む）、ＰＢＭＣ層（安定化サンプル中に存在する場合はＣＴＣもまた含む）、密度勾配媒体層、またさらに、顆粒球及び赤血球を含むことができる。さらなる層が顆粒球／赤血球層の下に形成されることがある。ＰＢＭＣ層が明瞭に形成されることが重要であるが、これは、この層が、例えばＣＴＣ解析のために細胞亜集団としてさらに処理され得るためである。一実施態様では、この方法は、形成したＰＢＭＣ層を収集することにより、ＰＢＭＣ画分を提供することを含む。収集したＰＢＭＣ画分を洗浄することができる。緩衝液（ＰＢＳ緩衝液または他の好適な溶液であってよい）を使用して、洗浄を行うことができる。収集したＰＢＭＣ層をさらに処理、及び／または解析することができる。発明の背景で開示するように、末梢単核血液細胞（ＰＭＢＣ）のゲノム及び／またはエピゲノムプロファイリングは、がん患者におけるイムノサーベイランスの初期診断及び監視のための注目するバイオマーカーを提示する。さらに、当該層を、当該層から特定の細胞型、例えばＣＴＣ、を富裕化するために使用してよい。安定化血液サンプルを密度勾配遠心分離にかける場合に、ＰＢＭＣ層の上で形成し得る血漿画分はまた、さらに処理することもでき、廃棄してもよい。血漿を処理する実施態様を、本明細書の他の箇所に記載する。

【００５０】

一実施態様では、本方法は、循環腫瘍細胞を富裕化または検出するために、収集したＰＢＭＣ画分を用いることを含む。

このように富裕化した生物学的標的を、工程（Ｄ）でさらに処理し、解析することができる。例えば、ゲノムＤＮＡを収集した（任意に、循環腫瘍細胞を予め枯渇させた）ＰＢＭＣ画分から精製してよい。さらに、少なくともＰＢＭＣ細胞の画分を、白血球計数または他の解析に供してよい。さらに、特定の細胞型を収集したＰＢＭＣ画分から富裕化してよい。

【００５１】

細胞外核酸及び富裕化細胞外核酸

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、細胞枯渇画分を安定化細胞含有体液サンプルから得ることと、細胞外核酸を得られた細胞枯渇画分から富裕化、特に精製することと、を含む。

【００５２】

本明細書で使用する場合、「細胞外核酸（ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄｓ／ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）」とは特に、細胞内に含有されないが細胞含有体液サンプルの細胞外画分には含まれる核酸を意味する。それぞれの細胞外核酸はまた、多くの場合、細胞非含有核酸とも呼ばれる。これらの用語は本明細書では、同義語として用いられる。循環体液（血液など）から得られる細胞非含有核酸はまた、循環細胞非含有核酸、例えばｃｃｆＤＮＡまたはｃｃｆＲＮＡとも呼ばれる。細胞外核酸は、細胞含有体液（例えば、血漿または血清、好ましくは血漿）から入手可能な細胞枯渇画分から富裕化することができる。用語「細胞外核酸」とは例えば、細胞外ＲＮＡ、加えて、細胞外ＤＮＡを指す。体液の細胞非含有画分で発見される、典型的な細胞外核酸の例としては、例えば細胞外腫瘍関連または腫瘍由来のＤＮＡ及び／またはＲＮＡ、他の細胞外疾患に関連するＤＮＡ及び／またはＲＮＡ、エピジェネティック組み換えされたＤＮＡ、胎児ＤＮＡ、及び／またはＲＮＡ、例えばｍｉＲＮＡ及びｓｉＲＮＡなどの低分子干渉ＲＮＡといった哺乳動物細胞外核酸、ならびに、例えばウイルス性核酸、例えば原核生物（例えば細菌）、ウイルス、真核細胞寄生生物または真菌由来の、細胞外核酸集団に放出された病原体核酸などの非哺乳動物細胞外核酸が挙げられるが、これらに限定されない。細胞外核酸集団は通常、損傷した、または死にかけている細胞から放

出された、ある量の細胞内核酸を含む。例えば、血液中に存在する細胞外核酸集団は通常、損傷した、または死にかけている細胞から放出された細胞内グロビンｍＲＮＡを含む。これは、インビボで生じる自然のプロセスである。細胞外核酸集団に存在する、このような細胞内核酸は、その後の核酸検出法において、対照の目的をも果たすことができる。本明細書に記載する安定化法は特に、サンプルのエクスビボでの取扱いにより、細胞含有体液が収集された後で、細胞外核酸集団に含まれるゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸の量が著しく増加するというリスクを低下させる。したがって、エクスビボでの取り扱いによる細胞外核酸集団の変化は、本開示に従った安定化技術により著しく低下するか、または防止されることさえあり得る。

富裕化した、好ましくは精製した細胞外核酸は、細胞外ＤＮＡを含むか、または細胞外ＤＮＡから本質的になるのが好ましい場合がある。循環体液から得られる、ｃｃｆＤＮＡ（循環無細胞ＤＮＡ）などの細胞外ＤＮＡは診断用途のための貴重なツールであり、したがって、診断及び予後目的のため、当該技術分野において幅広く用いられる。

【００５３】

一実施態様では、単離した細胞外核酸は、細胞外ＲＮＡを含むか、または細胞外ＲＮＡから本質的になる。細胞含有体液サンプル（安定化血液サンプルの場合は血漿など）から得られる細胞枯渇画分は細胞外ＲＮＡを含むことが、当該技術分野においては周知であり記述されている。

ＱＩＡａｍｐ（登録商標）循環核酸キット（ＱＩＡＧＥＮ）、ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙＤＳＰ循環ＤＮＡキット、Ｃｈｅｍａｇｉｃ　循環ＮＡキット（Ｃｈｅｍａｇｅｎ）、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ血漿ＸＳキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）、血漿／血清循環ＤＮＡ精製キット（Ｎｏｒｇｅｎ　Ｂｉｏｔｅｋ）、血漿／血清循環ＲＮＡ精製キット（Ｎｏｒｇｅｎ　Ｂｉｏｔｅｋ）、高純度ウイルス性核酸大型容積キット（Ｒｏｃｈｅ）、及び、細胞外核酸を抽出して精製するのに好適な、市販されている他のキットなどの、細胞外核酸を精製するのに好適な方法及びキットは、当技術分野において既知であり、市販もされている。ＷＯ　２０１３／０４５４３２及びＷＯ２０１６／１９８５７１で開示されている方法も参照する。記載する方法は、細胞外ＤＮＡなどの細胞外核酸を、本明細書に記載する安定化法を用いて安定化した血液サンプルから得られた血漿から精製するのに特に好適である。

【００５４】

一実施態様では、血液の場合、細胞外核酸は、予め富裕化した細胞外小胞からではなく、血漿または血清（好ましくは血漿）などの細胞枯渇画分から単離される。

一実施態様では、後続の工程（Ｄ）が実施され、これは、１つ以上の標的分子を、工程（Ｃ）で精製した細胞外核酸の中で検出することを含む。

【００５５】

細胞外小胞、及び細胞外小胞の富裕化

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、細胞外小胞を、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞枯渇画分から富裕化することを含む。

【００５６】

本明細書で使用する場合、用語「細胞外小胞（ＥＶ）」は、特に、細胞起源の、任意の種類の分泌小胞を意味する。ＥＶは、エクソソーム、微小小胞体（ＭＶ）、及びアポトーシス小体に幅広く分類することができる。エクソソーム及び微小小胞体などのＥＶが、細胞により分泌される小さな小胞である。ＥＶは、血液及び尿を含む、多くの異なる体液を介して循環することが発見されており、これにより、ＥＶが容易に入手可能となる。ＥＶの組成は親細胞と似ているために、循環ＥＶは、バイオマーカーのための貴重な供給源である。循環ＥＶは、エクソソームとＭＶとの混合物で構成される可能性が高い。循環ＥＶは、脂質二分子膜により分解から保護されている核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、他の小ＲＮＡ）、ＤＮＡ及びタンパク質を含有する。内容物は適宜、具体的にパッケージ化され、局所、及び離れた細胞通信のメカニズムを示す。ＥＶは、細胞間でＲＮＡを輸送することができる。エクソソームなどのＥＶは循環バイオマーカーの豊富で多様な供給源

である。供給源の細胞は健常な細胞、またはがん細胞であってよい。エクソソームなどのＥＶは多くの場合、がん細胞、特に分裂するがん細胞により、活発に分泌される。腫瘍微小環境の一部として、エクソソームなどのＥＶは、線維芽細胞の増殖、線維形成性反応、そしてまた、上皮間葉転換（ＥＭＴ）及びＳＣの開始、加えて、療法耐性の確立、ならびに、転移及び療法耐性の開始において、重要な役割を果たすようである。エクソソームはＣＴＣよりも小さく、バイオマーカー１つにつき、より少数のコピーを含む。ＣＴＣと比較して、ＥＶは、体液中に非常に大量に、例えば、血漿１ｍＬ当たりで約10^{9}～10^{12}個の小胞で存在するため、容易に得ることができる。

【００５７】

上述のように、本方法は一実施態様では、細胞外小胞の富裕化を含む。任意の方法を、細胞外小胞を安定化細胞含有体液サンプルから単離、したがって富裕化するのに好適な本方法と組み合わせて使用することができる。本明細書にて開示するように、細胞枯渇画分、例えば安定化血液サンプルの場合は血漿、を提供するために、安定化細胞含有体液サンプルをまず処理することができる。細胞枯渇画分を提供するための異なる選択肢を本明細書で開示する。次いで、血漿などの細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化することができる。用語「富裕化」は再び、広い意味で用いられ、細胞外小胞の濃縮または精製をカバーする。細胞外小胞は、細胞成分を回収した後に、事実上任意の体液から富裕化することができる。エクソソームなどの細胞外小胞を富裕化する好適な方法は当技術分野において既知であるので、本明細書で詳述する必要はない。細胞外小胞を富裕化するための例示的な好適な方法を簡潔に本明細書に記載する。

エクソソームを含む細胞外小胞は、例えば血漿または血清などの、安定化体液の細胞枯渇画分から富裕化することができる。例えば、細胞外小胞は、超遠心分離、限外濾過、勾配及び親和性捕捉、または、適当な方法の組み合わせにより富裕化することができる。多数の手順及び商用製品が例えば、細胞外小胞／エクソソーム単離のために利用可能であり、当業者に知られている。例示的な非限定的単離法を、以下に記載する。

細胞外小胞、及び特にエクソソームは、例えば、超遠心分離を伴う方法により富裕化することができる。例示的な超遠心分離単離法は、Ｔｈｅｒｙ ｅｔ ａｌ．（Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｘｏｓｏｍｅｓ ｆｒｏｍ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｓｕｐｅｒｎａｔａｎｔｓ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｆｌｕｉｄｓ．Ｕｎｉｔ ３．２２，Ｓｕｂｃｅｌｌｕｌａｒ Ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｒｇａｎｅｌｌｅｓ，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．，２００６）により記載されている。このように、一実施態様に従うと、細胞外小胞は超遠心分離により富裕化される。

富裕化した細胞外小胞の純度を高めるために、細胞及び細胞断片、及び任意に、所望する場合はアポトーシス小体を、例えば遠心分離または濾過により、細胞外小胞を富裕化する前に取り除くことができる。例えば、≧０．８μｍ、≧０．７μｍ、または≧０．６μｍの粒子を除外する濾過法を使用することができる。

【００５８】

一実施態様に従うと、細胞外小胞は、固相への親和性捕捉により富裕化することができる。一実施態様に従うと、エクソソームなどの細胞外小胞は、細胞外小胞、例えばエクソソーム膜上に露出したタンパク質に対する抗体でコーティングした磁気ビーズを使用する免疫磁気捕捉により富裕化される。

一実施態様に従うと、細胞外小胞は、細胞枯渇サンプルを小胞捕捉物質を通過させることで捕捉される。結合した細胞外小胞を洗浄し、その後溶出することができる。ｅｘｏＥａｓｙ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）などの親和性捕捉に基づく商用システムは、細胞外小胞精製のために利用可能であり、本発明と組み合わせて使用することができる。

ＰＥＧなどの体積排除ポリマーの使用に基づく方法も、ＥＶの単離のために記述されている。この中で、ポリマーは水分子と結びついて、細胞外小胞などの可溶性の低い構成成分を溶液外に押しやることで作用し、短時間の低速遠心分離により収集することが可能と

なる。この原理を用いる商用製品は、ＥｘｏＱｕｉｃｋ（Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＵＳＡ）、及びＴｏｔａｌ Ｅｘｏｓｏｍｅ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＵＳＡ）である。このように、一実施態様に従うと、細胞外小胞は、体積排除ポリマーによる沈殿により富裕化される。また、エクソソームなどの細胞外小胞は、例えば、サンプルを不連続なスクロース勾配またはイオジキサノール勾配に上層し、高速遠心分離に供することにより、その密度に基づいて富裕化することができる。このように、一実施態様に従うと、エクソソームなどの細胞外小胞は、密度勾配遠心分離により富裕化される。

【００５９】

一実施態様に従うと、細胞外小胞は、エクソソーム及び／または微小小胞体を含む、または主にこれらからなる。したがって、一実施態様では、富裕化生物学的標的は、エクソソームから本質的になる。したがって、ある実施態様では、富裕化された生物学的標的は、本質的にエクソソームからなる。

【００６０】

本明細書にて開示するように、回収した細胞外小胞を、例えば、ＲＮＡなどの核酸を、当該細胞外小胞から単離するために工程（Ｄ）でさらに処理することができる。したがって、ＲＮＡを、富裕化細胞外小胞、特に、富裕化エクソソームなどから精製することができる。したがって、エクソソームなどの細胞外小胞に存在するＲＮＡ分子を解析することで関係する分子情報を入手することができる。ＥＶは、ｍｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｔＲＮＡ（及びその断片）、ヴォールトＲＮＡ、Ｙ　ＲＮＡ、ｒＲＮＡの断片、加えて、長い非コードＲＮＡ、また加えてｍＲＮＡを含む、様々な小さなＲＮＡ種を含有することが示されている。

例示的かつ好ましいＲＮＡ単離法を、本明細書に記載する。

【００６１】

細胞内核酸、及び細胞内核酸の富裕化

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、安定化細胞含有体液サンプルから細胞内核酸を生物学的標的として富裕化する、例えば精製することを含む。細胞内核酸は、安定化細胞含有生体サンプルのアリコートから精製することができるか、または、安定化細胞含有生体サンプルを細胞含有画分と細胞枯渇画分のアリコート／部分とにそれぞれ分離し、細胞内核酸を前記細胞含有画分から精製することができる。任意に、例えば、希少細胞を含むか、または希少細胞から本質的になる標的細胞集団を予め取り除くことができ、したがって、例えば、希少標的細胞を枯渇させた安定化細胞含有体液、及び／または、その高濃度細胞含有画分から細胞内核酸を富裕化することができる。

さらに、安定化細胞含有体液から細胞の亜集団をまず富裕化することができ、次いで、細胞内核酸をその亜集団から富裕化することができる。好適な実施態様を本明細書に記載する。

本明細書にて開示するように、細胞含有画分内で細胞を富裕化、したがって濃縮することができる。細胞内核酸はＲＮＡ及びゲノムＤＮＡから選択することができる。一実施態様に従うと、ゲノムＤＮＡは生物学的標的として富裕化される。したがって、一実施態様に従うと、本方法は、細胞画分を安定化細胞含有体液サンプルから得ることと、ゲノムＤＮＡを細胞画分から富裕化することと、を含み、細胞画分は、ゲノムＤＮＡ単離の前に保管することができ、凍結してもよい。

ＲＮＡ及びゲノムＤＮＡなどの細胞内核酸を精製するのに好適な方法は当該技術分野において周知であり、本明細書においても簡潔に記載される。

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、少なくとも循環腫瘍細胞、ゲノムＤＮＡ、及び循環無細胞ＤＮＡを、生物学的標的として富裕化することを含む。

【００６２】

工程（Ｄ）

工程（Ｄ）は、富裕化した３つ以上の生物学的標的を解析のために処理することを含む

。特に、解析は、１つ以上のバイオマーカー分子を検出することを含むことができる。

【００６３】

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、例えば、希少細胞（例えばＣＴＣ）を含むか、または希少細胞から本質的になる細胞亜集団を富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）は、富裕化細胞亜集団を解析することを含む。細胞の解析は、細胞の基礎研究、創薬、診断、及び予後のために重要であり得る。解析は、分子レベル（ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、分泌分子など）で、または、細胞レベル（細胞代謝、細胞モルホロジー、細胞－細胞相互作用など）で行うことができる。したがって、後続の工程（Ｄ）は、細胞レベルで、（例えば、ＣＴＣなどの希少細胞を含むか、もしくはこれらから本質的になる）富裕化細胞亜集団を解析すること、及び／または、細胞内核酸、例えばＲＮＡを、富裕化細胞亜集団から富裕化することを含むことができる。本明細書にて開示するように、富裕化希少細胞は循環腫瘍細胞であるのが好ましい。

工程（Ｄ）は適宜、後続の精製のために細胞内核酸を放出させるために、（例えば、希少細胞を含むか、または希少細胞から本質的になる）富裕化細胞亜集団を溶解することを含んでよい。ゲノムＤＮＡ、加えてＲＮＡを精製するのに好適な方法は当該技術分野において公知であり、詳述する必要はない。

【００６４】

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）は、工程（Ｃ）で富裕化した細胞外核酸内で、１つ以上の標的分子を検出することを含む。

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）は、前記富裕化細胞外小胞からＲＮＡを富裕化することを含む。本明細書にて開示するように、細胞外小胞はエクソソームを含む、またはエクソソームから本質的になることができる。

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）は、ＲＮＡを細胞、好ましくは富裕化希少細胞、及び／または富裕化細胞外小胞から富裕化することを含む。富裕化ＲＮＡは、ｍＲＮＡ、及び／または非コードＲＮＡを含む、またはこれからなることができる。複数の実施態様では、精製ＲＮＡは、ｍｉＲＮＡを含むか、または、３５０ｎｔ以下の長さ、３００ｎｔ以下の長さ、もしくは２５０ｎｔ以下の長さの、ｍｉＲＮＡを含む小ＲＮＡから本質的になる。

【００６５】

一実施態様に従うと、工程（Ｃ）は、生物学的標的として、少なくとも循環腫瘍細胞、ならびに、循環無細胞ＤＮＡ、ならびにさらに、ゲノムＤＮＡ及び／または細胞外小胞を富裕化することを含み、工程（Ｄ）は、

－　富裕化循環腫瘍細胞を解析することであって、ＲＮＡを富裕化希少細胞から富裕化すること、及び、１つ以上の標的核酸分子を富裕化ＲＮＡ内で検出すること（これにより、例えば、富裕化循環腫瘍細胞を検出、及び／または特性決定することが可能となる）を含む、前記解析と、

－　１つ以上の標的核酸分子を、上記循環無細胞ＤＮＡ内で検出することと、を含む。

さらに、ゲノムＤＮＡがさらに富裕化される場合において、１つ以上の標的核酸分子をゲノムＤＮＡ内で検出することができる。細胞外小胞がさらに富裕化された場合において、ＲＮＡなどの核酸を細胞外小胞から富裕化することができ、１つ以上の標的核酸分子を富裕化核酸内で検出することができる。

血小板が工程（Ｃ）で富裕化される場合において、工程（Ｄ）において、ＲＮＡなどの核酸を血小板から富裕化することができ、１つ以上の標的核酸分子を、精製核酸内で検出することができる。

【００６６】

したがって、好ましい実施態様に従うと、工程（Ｄ）は、１つ以上の標的核酸分子を、単離された核酸内で検出することを含む。工程（Ｄ）は、単離ＲＮＡを逆転写してｃＤＮＡを提供することを含んでよい。工程（Ｄ）は、少なくとも１つの増幅工程（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、等温増幅、全ゲノム増幅など）を行うことをさらに含んでよい。一

実施態様に従うと、工程（Ｄ）は、定性的または定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行うことを含む。一実施態様に従うと、工程（Ｄ）は配列決定反応を行うことを含む。一実施態様に従うと、工程（Ｄ）は１つ以上のインタクトな細胞を解析することを含み、当該細胞は循環腫瘍細胞であってよい。

【００６７】

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）で検出される少なくとも１つの標的核酸分子は、以下の特徴のうちの１つ以上を有する：

－　がん関連腫瘍マーカーである；
－　診断、予後、及び／又は予測バイオマーカーである；
－　予後もしくは予測バイオマーカーである；
－　固形がん（転移性がんであり得る）と関連している；
－　乳癌もしくは前立腺癌、特に、転移性乳癌及び転移性前立腺癌と関連している；
－　陽性もしくは陰性応答マーカーである；及び／又は
－　治療マーカーである。

【００６８】

一実施態様に従うと、少なくとも１つの標的核酸分子は、標的核酸分子のパネルの一部を形成する。したがって、工程（Ｄ）は、標的核酸分子のパネルを検出することを含むことができる。パネルは、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、または少なくとも５０個の、標的核酸分子を含むことができる。標的核酸分子のパネルを（例えば、対応するプライマーのパネルを用いて、及びプローブを用いてもよい）検出することが、例えば、富裕化ＣＴＣを特性決定するために有利である。

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）は、ＲＮＡを循環腫瘍細胞から単離することと、バイオマーカーＲＮＡ分子を、単離した前記ＲＮＡ内で検出することと、を含む。

複数の実施態様では、工程（Ｄ）は、富裕化細胞を、免疫蛍光染色することを含む。富裕化細胞は、標的細胞、例えば標的希少細胞であることができる。複数の実施態様では、ＣＴＣは、免疫蛍光染色により解析される。例えば、染色すべき注目する標的細胞に特異的なマーカーに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて染色を行ってよい。例えば、ＣＴＣの場合、細胞はサイトケラチン、Ｅｐｃａｍ、ＥＧＦＲ、Ｅ－カドヘリン、ＨＥＲ２、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、及び／または他のＣＴＣマーカーに対して染色されてよい。さらに、染色は、排除マーカーを染色して、骨髄起源細胞を排除することを伴うことができる。このようなマーカーとしては、ＣＤ４５及び／またはＣＤ１４を挙げることができる。

【００６９】

ＲＮＡの富裕化

複数の実施態様では、本方法は、ＲＮＡを細胞、例えば希少細胞（例えばＣＴＣ）から富裕化、例えば精製することを含む。この方法は、ＲＮＡを細胞外小胞から単離することもまた含むことができる。用語「富裕化」とは再び、広い意味で用いられ、例えば、ＲＮＡの単離及び精製を包含する。好適なＲＮＡ単離法は当業者に既知であるので、本明細書で詳述する必要はない。例示的な実施態様を以下に、簡潔に記載する。

例えば、ＲＮＡ単離のためにフェノール及び／またはカオトロピック塩の使用に基づく方法を使用することができる。好適な方法の例としては、抽出、固相抽出、多ケイ酸に基づく精製、磁性粒子に基づく精製、フェノール－クロロホルム抽出、アニオン交換クロマトグラフィー（アニオン交換表面を用いる）、電気泳動、沈殿、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。適切な方法が当該技術分野において周知である。ＤＮＡがＲＮＡと共に富裕化される場合、ＤＮＡは、例えばＤＮａｓｅ分解により取り除くことができる。ＤＮＡ汚染が実質的に存在しないＲＮＡを特異的に単離する方法もまた、当該技術分野において公知である。論ずるように、残りのＤＮＡをさらにＤＮａｓｅ分解により取り除くことができ、かつ／または、バイオマーカーＲＮＡ分子の発現が増幅により検出される場合、イントロンを挟むプライマーを使用することができる。

ＲＮＡを単離するための、フェノール／クロロホルムに基づく有機抽出法の例は、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ法（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ ａｎｄ Ｓａｃｃｈｉ，１９８７：Ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｅｐ ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ＲＮＡ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｂｙ ａｃｉｄ ｇｕａｎｉｄｉｎｉｕｍ ｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ－ｐｈｅｎｏｌ－ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ．Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．（１６２）：１５６－１５９）、及びその変形形態である。フェノール／クロロホルムに基づく商業製品の例は、ｍｉＲＮｅａｓｙミニキット（ＱＩＡＧＥＮ）である。当該キットは、様々な異なる生体サンプルから高品質及び高収率の小ＲＮＡを含む総ＲＮＡを提供する。

【００７０】

一実施態様に従うと、ＲＮＡ単離は、ＲＮＡを固相に結合することと、ＲＮＡを固相から溶出させることと、を含む。ＲＮＡは、溶出前に洗浄してよい。ＲＮＡを固相に結合させる好適な固相及び適合性のある化学作用は当業者に既知であり、シリカ固相、及び、アニオン交換部分を備える固相が挙げられるが、これらに限定されない。

一実施態様に従うと、ＲＮＡ単離は、ＲＮＡを固相、特にシリカ固相などに結合させることを含み、少なくとも１つのカオトロピック剤（例えばグアニジウム塩）、及び／または少なくとも１種のアルコール（例えば、イソプロパノールもしくはエタノール）を、ＲＮＡ結合のために用いる。カオトロピック剤及びアルコール濃度の態様は、当業者に既知である。結合したＲＮＡを任意に洗浄してもよく、ＲＮＡが溶出される。

【００７１】

一実施態様に従うと、ＲＮＡ単離は、ＲＮＡを、アニオン交換部分を備える固相に結合することと、ＲＮＡを固相から溶出させることと、を含む。特に、電荷切り替え原理に基づく単離法を使用してよい。アニオン交換部分を備える好適な固相の例は、アニオン交換基で官能化された粒子材料またはカラムなどの材料を含むが、これらに限定されない。アニオン交換部分の例は、モノアミン、ジアミン、ポリアミン、及び窒素含有芳香族または脂肪属複素環基である。ＲＮＡは、ＲＮＡのアニオン交換部分への結合を可能にする結合条件で固相に結合する。その目的のために、当業者に知られている、好適なｐＨ及び／または塩状態を使用することができる。結合したＲＮＡを任意に、洗浄してもよい。任意の好適な溶出法を使用することができ、好適な実施態様が当業者に知られている。溶出は、例えば、ｐＨ値を変化させることを含むことがある。したがって、溶出は例えば、結合ｐＨよりも高い溶出ｐＨにて生じることができる。同様に、イオン強度も、溶出を補助する、または溶出させるために利用することができる。溶出もまた、加熱及び／または振盪により補助されることができる。

細胞（例えば、富裕化ＣＴＣ）及び／または富裕化細胞外小胞を溶解／分解して、ＲＮＡを細胞または細胞外小胞からＲＮＡ単離のために遊離させることができる。好適な溶解法が先行技術において周知である。細胞及び／または細胞外小胞を、破壊、それぞれ溶解のために、１つ以上の溶解剤と接触させることができる。これらは、溶解緩衝液などの破壊試薬に含めることができる。ＲＮＡは、溶解中に、ヌクレアーゼによる分解から保護されなければならない。一般に、溶解手順は、サンプル上での機械的、化学的、物理的、及び／または酵素的作用を含むことができるが、これらに限定されない。さらに、β－メルカプトエタノールまたはＤＴＴなどの還元剤を溶解のために加え、例えばヌクレアーゼの変性を補助することができる。一実施態様に従うと、少なくとも１つのカオトロピック剤、好ましくは、少なくとも１つのカオトロピック塩などを、溶解、及び破壊のために使用する。好適なカオトロピック剤、及び特に、好適なカオトロピック塩が、当業者に既知である。

【００７２】

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）で富裕化したＲＮＡ画分は、ｍＲＮＡを含むか、またはこれからなる。工程（Ｄ）は、（他のＲＮＡ種の中でも）ｍＲＮＡを含むＲＮＡを精製すること、加えて、ｍＲＮＡを選択的に精製することを包含する。本質的に純粋なｍＲＮＡは、例えば、ｍＲＮＡ（ただし、他のＲＮＡ種ではない）を、分解したサンプルから選択的に単離するＲＮＡ単離法を用いることにより得ることができる。精製ｍＲＮＡは例え

ば、まず全ＲＮＡを富裕化し、続いて、ｍＲＮＡを、単離した全ＲＮＡから選択的に富裕化することにより、連続して単離することもまた可能である。選択的なｍＲＮＡ単離に好適な方法は当業者に既知であるので、詳述を必要としない。十分に確立された方法は、固相（例えばカラムまたは磁気ビーズ）へのオリゴ（ｄＴ）捕捉に基づき、これにより、そのポリ（Ａ）テールを介してｍＲＮＡを特異的に単離することが可能となる。一実施態様に従うと、ｍＲＮＡは、得られた細胞可溶化物、例えば細胞可溶化物（ＣＴＣ溶解物など）から単離される。一実施態様に従うと、ｍＲＮＡは、得られた細胞可溶化物、例えばＣＴＣ溶解物から直接単離され、これは、実施例でもまた示される。ｍＲＮＡは、オリゴｄ（Ｔ）部分（例えば、オリゴｄ（Ｔ）$_{25}$部分）を含む固相（例えば、磁気ビーズまたはカラム）を用いて溶解物から捕捉することができる。さらなる実施態様に従うと、例えば、オリゴｄ（Ｔ）捕捉または他の好適な方法により、全ＲＮＡをまず単離し、次に、ｍＲＮＡを全ＲＮＡから単離する。一実施態様に従うと、全ＲＮＡは、得られた細胞外小胞溶解物／分解物から単離される。一実施態様に従うと、ｍＲＮＡを次に、例えばオリゴｄ（Ｔ）捕捉または他の好適な方法により、全小胞ＲＮＡから単離する。

【００７３】

一実施態様に従うと、工程（Ｄ）で単離したＲＮＡは、ｍｉＲＮＡを含むか、または、３５０ｎｔ以下の長さ、２５０ｎｔ以下の長さ、もしくは２００ｎｔ以下の長さの、ｍｉＲＮＡを含む小ＲＮＡから本質的になる。したがって工程（Ｄ）は、（他のＲＮＡ種の中でも）ｍｉＲＮＡを含むＲＮＡを精製すること、加えて、ｍｉＲＮＡを含むが、（例えば、４００ｎｔ以上の長さを有する）大きなＲＮＡ分子が枯渇した小ＲＮＡ分子を、特異的に精製することを包含することができる。大きなＲＮＡ分子とは分離して小ＲＮＡ分子を特異的に富裕化するのに好適な方法は先行技術において周知であるので、本明細書で記載する必要はない。

本明細書にて開示するように、単離ＲＮＡ（ｍＲＮＡなど）を逆転写してｃＤＮＡにし、続けて増幅させることができる。増幅により、試験される１つ以上の標的核酸分子に対応するアンプリコンがもたらされる。増幅に適したプライマーは、当業者が決定することができる。一実施態様に従うと、得られたｃＤＮＡを鋳型として用いる多重ＰＣＲを行うことにより、２つ以上の標的核酸分子（例えば、バイオマーカーＲＮＡ）の発現を並行して測定する。増幅に適したプライマーは、当業者が決定することができる。さらに、逆転写は、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行うことによる増幅工程と組み合わせることができる。一実施態様に従うと、単離したＲＮＡの中で、少なくとも１つのバイオマーカーＲＮＡ分子の発現を測定することは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行うことを含む。一実施態様では、半定量的ＰＣＲを行う。別の実施態様では、方法は半定量的ではない。バイオマーカーＲＮＡ分子が例えば、ＣＴＣ及び／またはＥＶで過剰発現しているか否かの測定が可能となるため、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を行うことが有利である。定量的ＰＣＲを行うのに好適な方法は当業者に周知であるので、本明細書で詳述する必要はない。解析した、個別の１つ以上のマーカーＲＮＡ分子に対する定量的ＰＣＲにおいて得られたＣｔ値を次に記録して、発現プロファイルを提供するために使用することができる。一実施態様に従うと、事前増幅工程は、逆転写工程の後、かつ、定量的ＰＣＲ反応を行う前に行う。このような事前増幅工程は、感度を改善することができる。これは、ＣＴＣが多くの場合希少であることを考慮すると都合が良い。解析した標的核酸分子（複数可）（例えば、１つ以上のバイオマーカーＲＮＡ分子）に対応するｃＤＮＡ分子を事前増幅することにより、より多くのＤＮＡ物質が、好ましくはｑＰＣＲである後の増幅工程のために提供される。これにより、結果を改善することができる。

【００７４】

細胞含有体液サンプル

有利には、細胞含有体液サンプルは、リキッドバイオプシーサンプルであってよい。一実施態様では、細胞含有体液は循環体液である。細胞含有体液は、血液、尿、唾液、滑液、羊水、涙液、リンパ液、液（脳脊髄液）、汗、腹水、母乳、気管支洗浄、腹膜浸出液及び胸膜滲出液、骨髄吸引物及び乳頭吸引物、精液／精漿、体分泌物または体排泄物から選

択することができる。細胞含有体液は、診断用白血球除去血輸血の産物であってもよい。一実施態様では、細胞含有体液は血液及び尿から選択される。一実施態様では、細胞含有体液は血液である。一実施態様では、血液は末梢血である。

【００７５】

本発明の方法は、対象、例えばがん患者などのヒト対象から入手された生体サンプルを用いるインビトロ法として行うことができる。少なくとも１つの生物学的標的が希少細胞（例えば、ＣＴＣなどの腫瘍細胞）である一実施態様では、細胞含有体液は、このような希少細胞を含むか、または、このような希少細胞を含むことが疑われる。

実施例により示されるように、循環腫瘍細胞、細胞外核酸（ｃｃｆＤＮＡなど）、エクソソームなどの細胞外小胞、及び細胞画分の細胞内核酸といった希少細胞、または、これらの特定の亜集団を、同一の安定化サンプル（例えば血液サンプル）から富裕化し、本方法で解析することができる。記載のワークフローにより、同じ安定化細胞含有体液から富裕化可能な複数の異なる生物学的標的の並行した解析が可能となる。

【００７６】

本開示に従って用いる安定化技術

上で開示したように、工程（Ａ）は、細胞含有体液を、以下の安定化因子：

（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、

（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または

（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、

の１つ以上、２つ以上、または好ましくは、３つ全てを含む安定化組成物と接触させることを含む。

これにより、安定化細胞含有体液サンプルがもたらされる。

安定化因子（ａ）～（ｃ）の好適な実施態様及び濃度、加えて、安定化組成物の有利な実施態様は、例えばＷＯ２０１５／１４０２１８に開示されており、本明細書に参照により組み込まれる。好適な実施態様もまた、以下で簡潔に記載する。

【００７７】

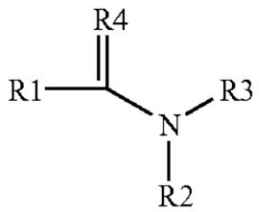
少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド

一実施態様に従うと、安定化組成物は、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドを含む。本明細書にて開示するように、このアミドは、カルボン酸アミド、チオアミド、またはセレノアミドであってよい。アミドはカルボン酸アミドであるのが好ましい。

【００７８】

一実施態様に従うと、組成物は適宜、式１に従った１つ以上の化合物を含む：

【化１】



式１

［式中、Ｒ１は水素またはアルキル基、好ましくはＣ１－Ｃ５アルキル基、Ｃ１－Ｃ４アルキル基、またはＣ１－Ｃ３アルキル基、より好ましくはＣ１－２アルキル基であり、Ｒ２及びＲ３は同一または異なっており、水素及び炭化水素基、好ましくは、直鎖または分岐鎖様式で配置される１～２０個の炭素鎖の長さを有するアルキル基から選択され、Ｒ４は酸素、硫黄、またはセレン基であり、好ましくはＲ４は酸素である。］

式１に従った１つ以上の化合物の組み合わせもまた、使用することができる。Ｒ１がアルキル基である実施態様では、１または２の鎖長が、Ｒ１については好ましい。式１に従

った化合物のＲ２及び／またはＲ３は、同一または異なっており、水素及び炭化水素基から選択され、アルキル基が好ましい。一実施態様に従うと、Ｒ２及びＲ３は共に水素である。一実施態様に従うと、Ｒ２及びＲ３のうちの一方は水素であり、他方は炭化水素基である。一実施態様に従うと、Ｒ２及びＲ３は同一の、または異なる炭化水素基である。炭化水素基Ｒ２及び／またはＲ３は互いに、短鎖アルキル及び長鎖アルキを含むアルキル、アルケニル、アルコキシ、長鎖アルコキシ、シクロアルキル、アリール、ハロアルキル、アルキルシリル、アルキルシリルオキシ、アルキレン、アルケンジイル、アリーレン、カルボキシレート、ならびにカルボニルを含む基から独立して選択することができる（これらの基に関しては、例えば、本明細書に参照により組み込まれるＷＯ　２０１３／０４５４５７の２０～２１ページを参照されたい）。Ｒ２及び／またはＲ３の鎖長ｎは特に、値１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０を有することができる。一実施態様に従うと、Ｒ２及びＲ３は、１～１０、好ましくは１～５、より好ましくは１～２の、炭素鎖の長さを有する。一実施態様に従うと、Ｒ２及び／またはＲ３はアルキル基、好ましくはＣ１～Ｃ５アルキル基である。好ましくは、式１に従った化合物はカルボン酸アミドであり、したがってＲ４は酸素である。カルボン酸アミドは一級、二級、または三級カルボン酸アミドであることができる。

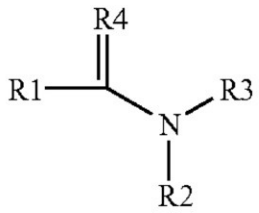
【００７９】

一実施態様に従うと、式１に従った化合物は、Ｎ，Ｎ－ジアルキル－カルボン酸アミドである。好ましいＲ１、Ｒ２、Ｒ３及びＲ４基は上述している。一実施態様に従うと、式１に従った化合物は、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ，Ｎ－ジエチルアセトアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、及びＮ，Ｎ－ジエチルホルムアミドからなる群から選択される。Ｒ４として、酸素の代わりに硫黄を含む、対応するチオ類似体もまた好適である。ＧＨＳ分類に従うと毒性因子でない、式１に従った少なくとも１つの化合物を使用するのが好ましい。一実施態様に従うと、式１に従った化合物は、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパンアミドなどのＮ，Ｎ－ジアルキルプロパンアミドである。

【００８０】

安定化組成物は、式１’に従った１つ以上の化合物を含むことができる：

【化２】



式１’

［式中、Ｒ１は水素またはアルキル基、好ましくはＣ１～Ｃ５アルキル基、より好ましくはメチル基であり、Ｒ２及びＲ３は、直鎖または分岐鎖様式で配置される１～２０個の炭素鎖の長さを有する、同一または異なる炭化水素基であり、Ｒ４は酸素、硫黄、またはセレン基である。］式１’は、上述の式１により包含され、Ｒ２及びＲ３が同一かまたは異なる炭化水素基（水素ではない）という点において限定されて、式１と比較される。あるいは、基Ｒ１～Ｒ４は、式１で上述したものに対応し、上記開示はここでもまた適用される。

組成物は、ブタンアミド及び／またはＮ，Ｎ－ジアルキルプロパンアミド、より好ましくは、Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパンアミドを含むのが好ましい。

【００８１】

一実施態様に従うと、安定化組成物は、０．４％～３８．３％、０．８％～２３．０％

、２．３％～１１．５％、３．８％～９．２％、５％～１５％、及び７．５％～１２．５％から選択される濃度で、１つ以上の一級、二級、または三級アミドを含む。上述の濃度は、一級、二級、または三級アミドが液体であるか否かに応じて、（ｗ／ｖ）または（ｖ／ｖ）を指す。少なくとも１つの一級、二級、または三級カルボン酸アミドを用いるのが好ましい。一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルを、１つ以上の一級、二級、または三級アミド（及び任意的に、安定化に用いるさらなる添加剤）を含む安定化組成物と接触させると、得られる混合物／安定化細胞含有体液サンプルは、０．２５％～５％、例えば０．３％～４％、０．４％～３％、０．５％～２％、または０．７５％～１．５％の範囲となる濃度範囲で、前記アミド（またはアミドの濃度）を含む。

【００８２】

少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー

一実施態様に従うと、安定化組成物は、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む。参照されるＷＯ２０１５／１４０２１８に詳述されているように、ポリ（オキシエチレン）ポリマーは、有利な安定化特性を示す。したがって、安定化組成物がポリ（オキシエチレン）ポリマーを含むのが有利である。

ポリ（オキシエチレン）ポリマーは、ポリエチレングリコールであるのが好ましい。非置換ポリエチレングリコールを使用してよい。一般に、ポリ（オキシエチレン）ポリマーに関して本出願で記載する全ての開示は、明示的に記載されていない場合であっても、好ましい実施態様のポリエチレングリコールに適用され、特に参照する。ポリ（オキシエチレン）ポリマーは、様々な分子量で使用することができる。ポリエチレングリコールは、式$HO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}H$［式中、ｎは整数全体であり、分子量に依存する。］であってよい。

ポリ（オキシエチレン）ポリマーの安定化効果とその分子量との間には、相関が見られた。高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーは、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーよりもより効果的な安定化因子であることが分かった。低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーによる効率的な安定化を達成するためには、一般に、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーと比較して、より高い濃度が推奨される。しかし、いくつかの用途に対しては、安定化のために使用する添加剤の量を低いまま維持するのが好ましい。したがって、複数の実施態様では、細胞含有体液、及び、その中に含まれる注目する生物学的標的における、強力な安定化効果を達成しながら、より低濃度のポリ（オキシエチレン）ポリマーの使用を可能にするため、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを安定化因子として使用する。

【００８３】

一実施態様に従うと、安定化組成物は、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む。含まれる高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーは、１５００～５００００、１５００～４００００、２０００～３００００、２５００～２５０００、３０００～２００００、３５００～１５０００、及び４０００～１２５００から選択される範囲の分子量を有することができる。あるいは、またはさらに、安定化組成物は、１５００未満の分子量を有する少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、好ましくは、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む。一実施態様では、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーの分子量は、１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にある。

【００８４】

一実施態様に従うと、工程（Ａ）で細胞含有体液と接触させる安定化組成物は、好ましくはポリエチレングリコールである、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを、０．４％～３５％（ｗ／ｖ）、例えば０．８％～２５％（ｗ／ｖ）、１．５％～２０％（ｗ／ｖ）、２．５％～１７．５％（ｗ／ｖ）、３％～１５％（ｗ／ｖ）、４％～１０％（ｗ／ｖ）、または３％～５％（ｗ／ｖ）から選択される濃度で含む。好適な濃度は、当業者により測定可能であり、とりわけ、高分子量のポリ（オキシエチレン）グリコールが、単

独で使用されるか、または、低ポリ（オキシエチレン）ポリマーなどのさらなるポリ（オキシエチレン）ポリマーと組み合わせて使用されるか否か、及び、ある量の細胞含有体液サンプルを安定化させるために使用する、安定化組成物の量、例えば体積に左右され得る。高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーは単独で、２．２％～３３．０％（ｗ／ｖ）の濃度で使用することができる。好適な濃度範囲は、４．４％～２２．０（ｗ／ｖ）％、６．６％～１６．５％（ｗ／ｖ）、及び８．８％～１３．２％（ｗ／ｖ）から選択することができる。高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーと組み合わせて使用する場合、濃度は、０．４％～３０．７％（ｗ／ｖ）の範囲であってよい。好適な濃度範囲は、０．８％～１５．３％（ｗ／ｖ）、１％～１０％（ｗ／ｖ）、１．５％～７．７％（ｗ／ｖ）、２．５％～６％（ｗ／ｖ）、３．１％～５．４％（ｗ／ｖ）、及び３％～４％（ｗ／ｖ）から選択することができる。

【００８５】

一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルを、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー（及び任意的に、安定化に用いるさらなる添加剤）を含む安定化組成物と接触させると、得られる混合物／安定化細胞含有体液サンプルは、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを、０．０５％～４％（ｗ／ｖ）、例えば０．１％～３％（ｗ／ｖ）、０．２％～２．５％（ｗ／ｖ）、０．２５％～２％（ｗ／ｖ）、０．３％～１．７５％（ｗ／ｖ）、及び０．３５％～１．５％（ｗ／ｖ）の範囲の濃度で含む。安定化細胞含有体液サンプル中での、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーの濃度は、０．２５％～１．５％（ｗ／ｖ）の範囲、例えば、０．３％～１．２５％（ｗ／ｖ）、０．３５％～１％（ｗ／ｖ）、または０．４％～０．７５％（ｗ／ｖ）の範囲であってよい。

一実施態様に従うと、安定化組成物は、好ましくはポリエチレングリコールである、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを、０．８％～９２．０％、例えば３．８％～７６．７％、１１．５％～５３．７％、１９．２％～３８．３％、２０％～３０％、または２０％～２７．５％の範囲内の濃度で含む。一実施態様に従うと、濃度は１１．５％～３０％である。上述の濃度は、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーが液体であるか否かに応じて、（ｗ／ｖ）または（ｖ／ｖ）を指す。

一実施態様に従うと、細胞含有体液サンプルを、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー（及び任意的に、安定化に用いるさらなる添加剤）を含む安定化組成物と接触させると、得られる混合物／安定化細胞含有体液サンプルは、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを、０．５％～１０％の範囲の濃度で含む。安定化細胞含有体液サンプル中での、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーの濃度は、１．５％～９％、例えば２％～８％、２～７％、２．５％～７％、及び３％～６％の範囲であることができる。

【００８６】

一実施態様では、安定化組成物は、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む。一実施態様では、安定化組成物は、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、前記高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーは、１５００～５００００、２０００～４００００、３０００～３００００、３０００～２５０００、３０００～２００００、及び４０００～１５０００から選択される範囲にある分子量を有し、前記低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーは、１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にある分子量を有する。好適な濃度を上述した。

【００８７】

少なくとも１つのアポトーシス阻害剤

一実施態様に従うと、安定化組成物は、少なくとも１つのアポトーシス阻害剤を含む。アポトーシス阻害剤はカスパーゼ阻害剤であるのが好ましい。好適なアポトーシス阻害剤及びカスパーゼ阻害剤は、ＷＯ　２０１３／０４５４５７　Ａ１、及びＷＯ　２０１３／

０４５４５８　Ａ１に記載されている。当該明細書に開示されているカスパーゼ阻害剤は、参照により本明細書に組み込まれている。本開示の方法で使用可能な１つ以上のカスパーゼ阻害剤を含む有利な安定化組成物は、ＷＯ　２０１４／１４６７８０　Ａ１、ＷＯ　２０１４／１４６７８２　Ａ１、ＷＯ　２０１４／０４９０２２　Ａ１、ＷＯ　２０１４／１４６７８１　Ａ１、ＷＯ２０１５／１４０２１８、及びＷＯ　２０１７／０８５３２１にもまた開示されている。

カスパーゼ阻害剤は細胞l透過性であるのが好ましい。カスパーゼ遺伝子ファミリーのメンバーは、アポトーシスにおいて重要な役割を果たす。個別のカスパーゼの基質の優先性または特異性は、カスパーゼ結合と成功裡に競合するペプチドを開発するために、利用されてきた。カスパーゼ特異的ペプチドを、例えばアルデヒド、ニトリル、またはケトン化合物に結合させることにより、カスパーゼ活性化の可逆的、または不可逆的阻害剤を作製することが可能である。例えば、Ｚ－ＶＡＤ－ＦＭＫなどの、フルオロメチルケトン（ＦＭＫ）由来のペプチドは細胞毒性効果が追加されることなく、効果的な不可逆的阻害剤として機能する。Ｎ末端にベンジルオキシカルボニル基（ＢＯＣ）、および及びＯ－メチル側鎖を備える合成された阻害剤は細胞透過性の増加を示す。さらに、、Ｃ末端にフェノキシ基を有する好適なカスパーゼ阻害剤を合成する。一例はＱ－ＶＤ－ＯＰｈであり、これは、アポトーシスを防止し、したがって、カスパーゼ阻害剤のＺ－ＶＡＤ－ＦＭＫよりも安定化を支持することにおいてさらに一層効果的な、細胞透過性の不可逆的広域スペクトルカスパーゼ阻害剤である。

【００８８】

一実施態様に従うと、カスパーゼ阻害剤は、汎カスパーゼ阻害剤であり、したがって広域スペクトルカスパーゼ阻害剤である。カスパーゼ阻害剤は、ペプチドまたはタンパク質を含むか、またはこれからなる。一実施態様に従うと、カスパーゼ阻害剤は、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含む。前記カスパーゼ特異的ペプチドは、アルデヒド、ニトリル、またはケトン化合物により改変されるのが好ましい。一実施態様に従うと、カスパーゼ特異的ペプチドは、好ましくはカルボキシル末端で、Ｏ－フェノキシ（ＯＰｈ）、またはフルオロメチルケトン（ＦＭＫ）基で修飾される。タンパク質またはペプチドを含む、またはこれからなる好適なカスパーゼ阻害剤、及び、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含むカスパーゼ阻害剤は、ＷＯ　２０１３／０４５４５７の表１に開示されており、参照により本明細書に組み込まれている。表は、カスパーゼ阻害剤の例を示す。一実施態様では、カスパーゼ阻害剤は、（好ましくはカルボキシル末端において）Ｏ－フェノキシ（ＯＰｈ）基で修飾された、及び／または、（好ましくはＮ末端において）グルタミン（Ｑ）基で修飾された、ペプチドカスパーゼ阻害剤である。一実施態様では、含まれるカスパーゼ阻害剤は、Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈである。

【００８９】

一実施態様に従うと、カスパーゼ阻害剤は、Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈ、Ｚ－ＶＡＤ（ＯＭｅ）－ＦＭＫ、及びＢｏｃ－Ｄ－（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される。一実施態様に従うと、カスパーゼ阻害剤は、Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈ及びＺ－ＶＡＤ（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される。好ましい実施態様では、カスパーゼに対する広域スペクトル阻害剤であるＱ－ＶＤ－ＯＰｈが安定化のために使用される。Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈは細胞透過性であり、アポトーシスによる細胞死を阻害する。Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈは、極めて高濃度においてさえも細胞に対して毒性ではなく、アミノ酸のバリン及びアスパラギン酸にコンジュゲートしたカルボキシ末端フェノキシ基を含む。これは、３つの主要なアポトーシス経路である、カスパーゼ－９及びカスパーゼ－３、カスパーゼ－８及びカスパーゼ－１０、及びカスパーゼ－１２により媒介されるアポトーシスの防止においても、等しく効果的である（Ｃａｓｅｒｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。

工程（Ａ）で使用される安定化組成物は、１つ以上のカスパーゼ阻害剤、特に、生体サンプルに含有される細胞外核酸集団において安定化効果を得るのに十分な量で、Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈなどの改変カスパーゼ特異的ペプチドを含むカスパーゼ阻害剤を含むことができる。一実施態様に従うと、安定化組成物は、安定化組成物が、意図する体積の細胞含有生

物学的体液と接触して安定化した後で、０．１μＭ～２５μＭ、０．５μＭ～２０μＭ、１μＭ～１７μＭ、２μＭ～１６μＭ、より好ましくは３μＭ～１５μＭの終濃度のカスパーゼ阻害剤を得る濃度で、カスパーゼ阻害剤を含む。５μＭ～１５μＭの範囲の終濃度が、例えば血液サンプルの安定化のために十分好適である。

【００９０】

一実施態様に従うと、安定化組成物、及び、したがって、安定化試薬は、０．３５μｇ／ｍＬ～７０μｇ／ｍＬ、０．７μｇ／ｍＬ～６３μｇ／ｍＬ、１．７４μｇ／ｍＬ～５９μｇ／ｍＬ、１０．５μｇ／ｍＬ～５６μｇ／ｍＬ、ｏｒ　１５μｇ／ｍＬ～５０μｇ／ｍＬ、２０μｇ／ｍＬ～４５μｇ／ｍＬ、２５μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬ、及び３０μｇ／ｍＬ～３８μｇ／ｍＬから選択される濃度で、カスパーゼ阻害剤を含む。濃度は、０．７μｇ／ｍＬ～４５μｇ／ｍＬ、及び１．７４μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬから選択することができる。一実施態様に従うと、安定化組成物、及び、したがって安定化試薬は、０．６８μＭ～１３６μＭ、１．３６μＭ～１２２．５μＭ、３．３８μＭ～１１４．７２μＭ、２０．４μＭ～１０９μＭ、ｏｒ２９．２μＭ～９７．２μＭ、３８．９μＭ～８７．５μＭ、４８．６μＭ～７７．８μＭ、及び５８．３μＭ～７４μＭから選択される濃度でカスパーゼ阻害剤を含む。濃度は、２０．４μＭ～９７．２μＭ、及び２９．２μＭ～８７．５μＭから選択することができる。

安定化組成物（試薬）及び安定化される細胞含有体液を含む混合物中の上述したカスパーゼ阻害剤の濃度は、単一のカスパーゼ阻害剤の使用、およびカスパーゼ阻害剤の組み合わせの使用に適用される。上述の濃度は、汎カスパーゼ阻害剤、特に、Ｑ－ＶＤ－ＯＰｈ及び／またはＺ－ＶＡＤ（ＯＭｅ）－ＦＭＫなどの改変カスパーゼ特異的ペプチドを使用する際に特に好適である。改変カスパーゼ特異的ペプチドのさらなる例は、Ｂｏｃ－Ｄ－（ＯＭｅ）－ＦＭＫである。上述した濃度は例えば、血液サンプルの安定化に好適である。個別のカスパーゼ阻害剤、及び／または、他の細胞含有生体サンプルに好適な濃度範囲は、当業者により、例えば、実施例で記載する試験アッセイにおいて、種々の濃度の対応するカスパーゼ阻害剤を試験することにより、測定することができる。

【００９１】

安定化組成物のさらなる構成成分

細胞含有体液は、安定化組成物に含まれるのが好ましいさらなる添加剤ともまた接触させることができる。

一実施態様に従うと、さらなる添加剤はキレート剤である。キレート剤は、有機化合物の２つ以上の原子で金属との配位結合を形成できる有機化合物である。キレート剤としては、エチレンジニトリロ四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、エチレングリコール四酢酸（ＥＧＴＡ）、及び、Ｎ，Ｎ－ビス（カルボキシメチル）グリシン（ＮＴＡ）、ならびにさらに、クエン酸塩またはシュウ酸塩などのカルボン酸の塩が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様に従うと、ＥＤＴＡはキレート剤として使用される。本明細書で使用する場合、用語「ＥＤＴＡ」はとりわけ、例えば、K_2ＥＤＴＡ、K_3ＥＤＴＡ、またはNa_2ＥＤＴＡなどの、ＥＤＴＡ化合物のＥＤＴＡ部分を示す。ＥＤＴＡなどのキレート剤を用いることは、ＤＮａｓｅ及びＲＮａｓｅなどのヌクレアーゼが阻害されることにより、例えば、ヌクレアーゼによる細胞外核酸の分解を防止するという有利な効果もまた有する。高濃度で使用／添加されるＥＤＴＡは、安定化効果を支持する。

細胞含有体液サンプルが血液である場合、抗凝血物質をさらなる添加剤として使用する。抗凝血物質としては、ヘパリン、キレート剤、及び、クエン酸塩またはシュウ酸塩などの、カルボン酸の塩が挙げられるが、これらに限定されない。有利な実施態様では、抗凝血物質はＥＤＴＡなどのキレート剤である。例えば、K_2ＥＤＴＡを使用することができる。本実施態様は特に、安定化される体液が血液である場合に有用である。

【００９２】

一実施態様に従うと、さらなる添加剤は、Ｎ－アセチル－システインまたはグルタチオンであるチオアルコール、水溶性ビタミン、及び、水溶性ビタミンＥ誘導体から選択され

る少なくとも１つの化合物である。ＷＯ　２０１７／０８５３２１に開示されているように、これは、安定化組成物がさらにカスパーゼ阻害剤を含み、滅菌形態で提供される場合に有利であることができる。

【００９３】

一実施態様に従うと、使用する安定化技術は、以下の特徴のうちの１つ以上を有する：

（ｉ）　細胞含有体液サンプルの安定化が、有核細胞の溶解を誘発または促進する濃度の添加剤を使用することを伴わない；

（ｉｉ）　安定化が、タンパク質－核酸またはタンパク質－タンパク質架橋を誘発しない；

（ｉｉｉ）　安定化が、タンパク質－核酸及び／又はタンパク質－タンパク質架橋を誘発する架橋剤、例えばホルムアルデヒド、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、もしくはホルムアルデヒド放出剤の使用を伴わない；

（ｉｖ）　安定化が毒性因子の使用を伴わない；及び／又は

（ｖ）　安定化因子が、水を含む安定化組成物に含有される。

特に、安定化細胞含有体液サンプルを提供するために使用する安定化組成物が、タンパク質－ＤＮＡ及び／またはタンパク質－タンパク質架橋を誘発する架橋剤を含まないことが好ましい。タンパク質－ＤＮＡ及び／またはタンパク質－タンパク質架橋を誘発する架橋剤は例えば、ホルムアルデヒド、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、またはホルムアルデヒド放出剤である。架橋試薬は、核酸分子間、または、核酸とタンパク質との間での、分子間または分子内共有結合を引き起こす。この効果は、複雑な生体サンプルからの精製または抽出後に、このように安定化されて部分架橋した核酸の回収の減少をもたらし得る。例えば、全血サンプル中での循環核酸の濃度は既にかなり低く、このような核酸の収率をさらに低下させるどのような手段も回避されなければならない。これは、悪性腫瘍、または、妊娠の最初のトリメスター中の成長中の胎児に由来する、非常に希少な核酸分子を検出し分析する際に特に重要であり得る。したがって、ホルムアルデヒド放出剤が滅菌安定化組成物に含まれず、安定化のために追加的に使用されないことが好ましい。したがって、一実施態様に従うと、ホルムアルデヒドまたはホルムアルデヒド放出剤などの架橋剤は安定化組成物に含まれず、それぞれ、安定化のために使用されない。さらに、記載したように、安定化組成物は、例えばカオトロピック塩などの、一般に有核細胞または細胞の溶解を誘発する任意の添加剤を含まないのが好ましい。実施例で示すように、これは、安定化細胞含有体液サンプルから、注目する生物学的標的（例えばＣＴＣ、細胞外核酸、細胞亜集団、及び細胞内核酸）を効率的に回収することを可能にするため、ホルムアルデヒド、ホルムアルデヒド放出剤などの架橋試薬の使用を伴う既知の技術水準の安定化試薬及び方法を越える重要な利点である。

アルデヒドを放出可能な構成成分を含有しない安定化組成物を使用するのが有利である。これにより、後続する安定化サンプルからの核酸の単離における障害を回避することができる。

【００９４】

本安定化組成物における、安定化因子の有利な組み合わせ

一実施態様に従うと、使用する安定化組成物は、

（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドと、

（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、好ましくは高分子量のポリエチレングリコール及び低分子量のポリエチレングリコールと、

（ｃ）　任意に少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくはカスパーゼ阻害剤と、を含む。

【００９５】

一実施態様に従うと、使用する安定化組成物は、

（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドと、

（ｂ）　任意に少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーと、

（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくはカスパーゼ阻害剤と、を含む。

一実施態様に従うと、使用する安定化組成物は、

（ａ）　任意に少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドと、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーと、
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくはカスパーゼ阻害剤と、を含む。
【００９６】
一実施態様に従うと、使用する安定化組成物は、
（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドと、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーと、
（ｃ）　少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤と、を含む。
個別の安定化因子（ａ）～（ｃ）の好適かつ好ましい実施態様、加えて、好適かつ好ましい濃度は、上述している。
【００９７】
一実施態様に従うと、好ましくは血液である細胞含有体液を、
ａ）　上記式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ）　少なくとも３０００の分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び任意に、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ）　少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤；ならびに
ｄ）　任意にキレート剤、好ましくはＥＤＴＡ
と接触させる。
【００９８】
一実施態様に従うと、血液を、
ａ）　上記式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ）　３０００～３００００、または３５００～２５０００の範囲などの、３０００～４００００の範囲にある分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、１００～８００、２００～８００、または２００～５００の範囲などの、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ）　少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤、好ましくは汎カスパーゼ阻害剤、任意にＱ－ＶＤ－ＯＰｈ；ならびに
ｄ）　好ましくはキレート剤である抗凝血物質、好ましくはＥＤＴＡ
と接触させ、血液サンプルが前記添加剤、及び任意にさらに安定化のための添加剤、と接触した後で、得られる混合物／安定化血液サンプルは、
－　０．３～４％、例えば０．５～３％、０．５～２％、または０．７５～１．５％の範囲にある濃度で、式１に従った１つ以上の化合物、
－　０．２％～１．５％（ｗ／ｖ）、例えば０．２５％～１．２５％（ｗ／ｖ）、０．３％～１％（ｗ／ｖ）、または０．４％～０．７５％（ｗ／ｖ）の範囲にある濃度で、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、
－　１．５％～１０％、例えば２％～６％の範囲にある濃度で、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
－　１μＭ～１０μＭ、例えば３μＭ～７．５μＭの範囲にある濃度で、カスパーゼ阻害剤
を含む。
【００９９】
安定化組成物は液体であることができる。示した濃度が、血液サンプルの安定化のために特に好ましい。例えば、０．５ｍＬ～２．５ｍＬ、０．５ｍＬ～２ｍＬ、好ましくは１ｍＬ～２ｍＬまたは１ｍＬ～１．５ｍＬの液体安定化組成物を使用することができる。以下に示す濃度で安定化因子を含むこのような安定化組成物を、例えば、１０ｍＬの血液を安定化させるために使用することができる。
【０１００】
具体的な実施態様
本発明のさらなる実施態様を、以下に再び記載する。本発明は具体的には、以下の項目もまた提供する：

【０１０１】
実施態様１．
細胞含有体液に含まれる複数の生物学的標的を安定化して富裕化する方法であって、
（Ａ）　細胞含有体液を、以下の安定化因子のうちの１つ以上：
（ａ）　少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、
（ｂ）　少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤
を含む安定化組成物と接触させることにより、安定化細胞含有体液サンプルを提供することと、
（Ｂ）　安定化期間の間、前記安定化細胞含有体液サンプルを維持することと、
（Ｃ）
－少なくとも１つの細胞亜集団、
－細胞外核酸、
－細胞外小胞、及び
－細胞内核酸
からなる群から選択される３つ以上の生物学的標的を前記安定化細胞含有体液から富裕化するために安定化細胞含有体液サンプルを処理することと、を含む、前記方法。
【０１０２】
実施態様２．
富裕化した細胞亜集団が標的希少細胞を含む、実施態様１に記載の方法。
【０１０３】
実施態様３．
細胞亜集団が標的希少細胞から本質的になる、実施態様１または２に記載の方法。
【０１０４】
実施態様４．
標的希少細胞が、腫瘍細胞、特に循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、胎児細胞、幹細胞、ウイルスまたは寄生生物により感染した細胞、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、及び循環内皮前駆細胞（ＥＰＣ）からなる群から選択される、実施態様１～３のいずれか１つに記載の方法。
【０１０５】
実施態様５．
標的希少細胞が循環腫瘍細胞である、実施態様１～４のいずれか１つに記載の方法。
【０１０６】
実施態様６．
ゲノムＤＮＡであってもよい細胞内核酸が、安定化体液サンプルまたはその細胞含有画分から単離される、実施態様１～５のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１０７】
実施態様７．
工程（Ｃ）が、
－希少細胞、好ましくは循環腫瘍細胞、
－細胞外核酸、
－細胞外小胞、及び
－細胞内核酸
からなる群から選択される３つ以上の生物学的標的を安定化細胞含有体液から富裕化するために安定化細胞含有体液サンプルを処理することを含む、実施態様１～６のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１０８】
実施態様８．
工程（Ｃ）が、安定化体液サンプルから、少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を得ることを含み、任意に、細胞枯渇画分が、遠心分離及び／または濾過を伴う分離法により少なくとも１つの細胞画分から分離されてもよい、実施態様１

～７のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１０９】
実施態様９．
（Ｃ）における処理が、
（ａａ）　安定化細胞含有体液サンプルを、少なくとも１つの細胞含有画分と少なくとも１つの細胞枯渇画分とに分離することと、
（ｂｂ）　前記細胞含有画分をさらに処理することであって、前記細胞含有画分をさらに処理することが、
（ｉ）好ましくは標的希少細胞を含む細胞亜集団を、前記細胞含有画分から富裕化すること、及び／または
（ｉｉ）前記細胞含有画分から、細胞内核酸（例えばゲノムＤＮＡ）を富裕化することを含み、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってもよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／または
（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、
とを含む、実施態様１～８のいずれか１つに記載の方法。
【０１１０】
実施態様１０．
（Ｃ）における処理が、
（ａａ）　前記安定化細胞含有体液サンプルから、好ましくは標的希少細胞を含む細胞亜集団を富裕化することと、
（ｂｂ）　前記標的細胞亜集団が取り除かれた安定化細胞含有体液サンプルを、細胞含有画分と細胞枯渇画分とに分離することと、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってもよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／または
（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、を含み、
（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化することと、を含む、実施態様１～８のいずれか１つに記載の方法。
【０１１１】
実施態様１１．
（Ｃ）における処理が、
（ａａ）　前記安定化細胞含有体液サンプルを少なくとも２つのアリコートに分割し、好ましくは希少細胞を含む細胞亜集団を、前記提供されたアリコートのうちの少なくとも１つから富裕化することと、
（ｂｂ）　少なくとも１つの細胞含有画分及び少なくとも１つの細胞枯渇画分を提供することと、
（ｃｃ）　前記細胞枯渇画分をさらに処理することであって、前記細胞枯渇画分をさらに処理することが、
（ｉ）　前記細胞枯渇画分から、細胞外ＤＮＡであってもよい細胞外核酸を富裕化すること、及び／または
（ｉｉ）　前記細胞枯渇画分から細胞外小胞を富裕化すること、を含む、さらなる処理と、
（ｄｄ）　任意に、前記細胞含有画分から細胞内核酸、好ましくはゲノムＤＮＡを富裕化することと、
を含む、実施態様１～８のいずれか１つに記載の方法。
【０１１２】

実施態様１２．
（Ｄ）　富裕化した３つ以上の生物学的標的を解析のために処理することをさらに含む、実施態様１～１１のいずれか１つに記載の方法。
【０１１３】
実施態様１３．
工程（Ｃ）が標的希少細胞を富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）は、前記富裕化した希少細胞を解析することを含み、任意に、前記富裕化した希少細胞を解析することが、前記富裕化した希少細胞を細胞レベルで解析すること、及び／または、細胞内核酸、好ましくはＲＮＡを、前記富裕化した希少細胞から富裕化することを含む、実施態様１２に記載の方法。
【０１１４】
実施態様１４．
工程（Ｄ）が、富裕化した細胞内核酸を検出することを含み、前記検出が増幅及び／または配列決定を含んでもよい、実施態様１３に記載の方法。
【０１１５】
実施態様１５．
細胞内核酸がｍＲＮＡを含む、実施態様１３または１４に記載の方法。
【０１１６】
実施態様１６．
工程（Ｃ）が、細胞枯渇画分を安定化細胞含有体液サンプルから得ることと、細胞外核酸を、前記得られた細胞枯渇画分から富裕化することとを含む、実施態様１～１５のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１１７】
実施態様１７．
細胞外核酸が細胞外ＤＮＡを含むか、または細胞外ＤＮＡから本質的になる、実施態様１６に記載の方法。
【０１１８】
実施態様１８．
細胞外核酸が細胞外ＲＮＡを含むか、または細胞外ＲＮＡから本質的になる、実施態様１６または１７に記載の方法。
【０１１９】
実施態様１９．
工程（Ｄ）が、工程（Ｃ）で得られた細胞外核酸内で、１つ以上の標的分子を検出することを含む、実施態様１２～１８のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１２０】
実施態様２０．
工程（Ｃ）が、細胞外小胞を、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞枯渇画分から富裕化することを含み、後続の工程（Ｄ）が、ＲＮＡを前記単離した細胞外小胞から富裕化することを含む、実施態様６～１９のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１２１】
実施態様２１．
細胞外小胞が、エクソソームを含む、またはエクソソームから本質的になる、実施態様１～２０のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１２２】
実施態様２２．
ＲＮＡを富裕化する、好ましくは精製することを含み、任意に、前記ＲＮＡ富裕化が、ＲＮＡを固相に結合することと、前記結合したＲＮＡを前記固相から溶出することと、を含んでもよい、実施態様１～２１のうちの１つ以上に記載の方法。
【０１２３】
実施態様２３．

工程（Ｄ）が、細胞、好ましくは、富裕化した標的希少細胞、及び／または富裕化細胞外小胞からＲＮＡを富裕化する、好ましくは精製することを含む、実施態様１２～２２のいずれか１つ以上に記載の方法。

【０１２４】

実施態様２４．

以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様２２または２３に記載の方法：

（ｉ） 富裕化ＲＮＡがｍＲＮＡを含むか、またはｍＲＮＡから本質的になる。

（ｉｉ） 富裕化ＲＮＡが、ｍｉＲＮＡを含むか、または、３５０ｎｔ以下の長さ、３００ｎｔ以下の長さ、もしくは２５０ｎｔ以下の長さの、ｍｉＲＮＡを含む小ＲＮＡから本質的になる。

【０１２５】

実施態様２５．

工程（Ｄ）が、富裕化核酸、好ましくは精製核酸の中で、１つ以上の標的核酸分子を検出することを含む、実施態様１２～２４のいずれか１つ以上に記載の方法。

【０１２６】

実施態様２６．

少なくとも１つの標的核酸分子が、以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様２５に記載の方法：

－ がん関連腫瘍マーカーである；

－ 診断、予後、及び／又は予測バイオマーカーである；

－ 予後もしくは予測バイオマーカーである；

－ 転移性がんであってもよい固形がんと関連している；

－ 乳癌もしくは前立腺癌、特に転移性乳癌及び転移性前立腺癌と関連している；

－ 陽性もしくは陰性応答マーカーである；

－ 治療マーカーである；及び／又は

－ 標的核酸分子のパネルの一部を形成し、任意に、前記パネルが、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、または少なくとも５０個の標的核酸分子を含む。

【０１２７】

実施態様２７．

工程（Ｄ）が、以下のうちの１つ以上を含む、実施態様１２～２６のうちの１つ以上に記載の方法：

（ｉ）精製ＲＮＡを逆転写してｃＤＮＡを提供する；

（ｉｉ）少なくとも１つの増幅工程を行う；

（ｉｉｉ）定量的ポリメラーゼ連鎖反応を行う；及び／または

（ｉｖ）インタクトな細胞を分析することを含み、前記細胞は循環腫瘍細胞であってもよい。

【０１２８】

実施態様２８．

標的希少細胞及び／または細胞外小胞を親和性捕捉により富裕化することを含む、実施態様１～２７のうちの１つ以上に記載の方法。

【０１２９】

実施態様２９．

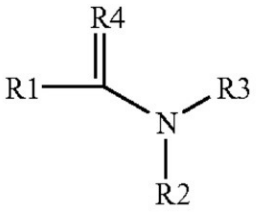
細胞含有体液が、以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様１～２８のうちの１つ以上に記載の方法：

－ 循環体液である；

－ 血液、尿、唾液、滑液、羊水、涙液、リンパ液、分泌液、脳脊髄液、汗、腹水、母乳、気管支洗浄物、腹膜浸出液及び胸膜滲出液、骨髄吸引物及び乳頭吸引物、精液／精漿、体分泌物もしくは体排泄物から選択される；

－ 血液及び尿から選択される；及び／又は

－　血液である。
【０１３０】
　実施態様３０．
　安定化組成物が、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドを含む、実施態様１～２１のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１３１】
　実施態様３１．
　安定化組成物が、式１に従った少なくとも１つの一級、二級、または三級アミドを含む、実施態様３０に記載の方法：
【化３】



式１

［式中、Ｒ１は水素またはアルキル基、好ましくはＣ１～Ｃ５アルキル基、Ｃ１～Ｃ４アルキル基、またはＣ１～Ｃ３アルキル基、より好ましくはＣ１～Ｃ２アルキル基であり、Ｒ２及びＲ３は同一または異なっており、水素及び炭化水素基、好ましくは、直鎖または分岐鎖様式で配置される１～２０個の炭素鎖の長さを有するアルキル基から選択され、Ｒ４は酸素、硫黄、またはセレン基であり、好ましくはＲ４は酸素である。］
【０１３２】
　実施態様３２．
　式１に従った少なくとも１つの化合物が一級、二級、または三級カルボン酸アミドである、実施態様３１に記載の方法。
【０１３３】
　実施態様３３．
　安定化組成物がＮ，Ｎ－ジアルキルプロパンアミド、好ましくはＮ，Ｎ－ジメチルプロパンアミド、及び／またはブタンアミドを含む、実施態様３０または３１に記載の方法。
【０１３４】
　実施態様３４．
　安定化組成物が、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む、実施態様１～３３のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１３５】
　実施態様３５．
　ポリ（オキシエチレン）ポリマーがポリエチレングリコールである、実施態様３４に記載の方法。
【０１３６】
　実施態様３６．
　安定化組成物が以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様３４または３５に記載の方法：
ａ）　含まれるポリ（オキシエチレン）ポリマーが非置換ポリエチレングリコールである；
ｂ）　組成物が、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む；
ｃ）　組成物が、１５００未満の分子量を有する少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、好ましくは、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレ

ン）ポリマーを含み、任意に、分子量は１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にあってよい；
ｄ）　組成物が、少なくとも１５００の分子量を有する高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーである、ポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーを含む；及び／又は
ｅ）　組成物が、高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーであるポリ（オキシエチレン）ポリマーを含み、前記高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーが、１５００～５００００、２０００～４００００、３０００～３００００、３０００～２５０００、３０００～２００００、及び４０００～１５０００から選択される範囲にある分子量を有し、かつ／または、前記低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマーが、１００～１０００、２００～８００、２００～６００、及び２００～５００から選択される範囲にある分子量を有する。

【０１３７】

実施態様３７．

安定化組成物が少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくはカスパーゼ阻害剤を含む、実施態様１～３６のいずれか１つ以上に記載の方法。

【０１３８】

実施態様３８．

アポトーシス阻害剤、カスパーゼ阻害剤が以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様３７に記載の方法：
ａ）　カスパーゼ阻害剤が汎カスパーゼ阻害剤である；
ｂ）　カスパーゼ阻害剤がカスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｃ）　カスパーゼ阻害剤が、好ましくはカルボキシル末端においてＯ－フェノキシ（ＯＰｈ）基で修飾された、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｄ）　カスパーゼ阻害剤が、（好ましくはＮ末端において）グルタミン（Ｑ）基で修飾された、改変カスパーゼ特異的ペプチドを含む；
ｅ）　カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈ、Ｂｏｃ－Ｄ－（ＯＭｅ）－ＦＭＫ、及びＺ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｐ（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される；
ｆ）　カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈ及びＺ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｐ（ＯＭｅ）－ＦＭＫからなる群から選択される；及び／または
ｇ）　前記カスパーゼ阻害剤がＱ－ＶＤ－ＯＰｈである。

【０１３９】

実施態様３９．

安定化組成物が、
態様Ａによると、
（ａ）　好ましくは、実施態様３１～３３のいずれか１つで規定されている、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミド、及び
（ｂ）　好ましくは、実施態様３５または３６で規定されている、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
（ｃ）　任意に少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくは、実施態様３８で規定されているカスパーゼ阻害剤；
態様Ｂによると、
（ａ）　好ましくは、実施態様３１～３３のいずれか１つで規定されている、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミド、
（ｂ）　任意に、好ましくは、実施態様３５または３６で規定されている、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくは、実施態様３８で規定されているカスパーゼ阻害剤；
態様Ｃによると、

（ａ）　任意に、好ましくは、実施態様３１～３３のいずれか１つで規定されている、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミド、
（ｂ）　好ましくは、実施態様３５または３６で規定されている、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくは、実施態様３８で規定されているカスパーゼ阻害剤、
を含む、実施態様１～３８のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１４０】
実施態様４０．
安定化組成物が、
（ａ）　好ましくは、実施態様３１～３３のいずれか１つで規定されている、少なくとも１つの一級、二級、または三級アミド、
（ｂ）　好ましくは、実施態様３５または３６で規定されている、少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
（ｃ）　少なくとも１つのアポトーシス阻害剤、好ましくは、実施態様３８で規定されているカスパーゼ阻害剤、
を含む、実施態様３９に記載の方法。
【０１４１】
実施態様４１．
以下の特徴のうちの１つ以上を有する、実施態様１～４０のうちの１つ以上に記載の方法：
（ｉ）　細胞含有体液サンプルの安定化が、有核細胞の溶解を誘発または促進する濃度の添加剤を使用することを伴なわない；
（ｉｉ）　安定化が、タンパク質－核酸もしくはタンパク質－タンパク質架橋を誘発しない；
（ｉｉｉ）　安定化が、タンパク質－核酸及び／又はタンパク質－タンパク質架橋を誘発する架橋剤、例えばホルムアルデヒド、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、もしくはホルムアルデヒド放出剤の使用を伴わない；
（ｉｖ）　安定化が毒性因子の使用を伴わない；及び／又は
（ｖ）　安定化因子が、水を含む安定化組成物に含有される。
【０１４２】
実施態様４２．
安定化組成物が、ＥＤＴＡであってよいキレート剤を含む、実施態様１～４１のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１４３】
実施態様４３．
細胞含有体液が血液であり、安定化組成物が抗凝血物質、好ましくはキレート剤を含む、実施態様１～４２のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１４４】
実施態様４４．
好ましくは血液である細胞含有体液を、
ａ）　式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ）　少なくとも３０００の分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び任意に、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ）　少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤；ならびに
ｄ）　任意にキレート剤、好ましくはＥＤＴＡ、
と接触させる、実施態様１～４３のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１４５】
実施態様４５．

細胞含有体液が血液であり、前記血液を
ａ）　式１に従った１つ以上の化合物；
ｂ）　３０００～３００００、または３５００～２５０００の範囲などの、３０００～４００００の範囲にある分子量を有する少なくとも１つの高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び、１００～８００、２００～８００、または２００～５００の範囲などの、１０００以下の分子量を有する低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー；
ｃ）　少なくとも１つのカスパーゼ阻害剤、好ましくは汎カスパーゼ阻害剤、任意にＱ－ＶＤ－ＯＰｈ；ならびに
ｄ）　好ましくはキレート剤、好ましくはＥＤＴＡである抗凝血物質
と接触させ、前記血液サンプルが前記添加剤、及び任意に、安定化のためのさらなる添加剤と接触した後で、得られる混合物／安定化血液サンプルが、
－　０．３～４％、例えば０．５～３％、０．５～２％、または０．７５～１．５％の範囲にある濃度で、式１に従った１つ以上の化合物、
－　０．２％～１．５％（ｗ／ｖ）、例えば０．２５％～１．２５％（ｗ／ｖ）、０．３％～１％（ｗ／ｖ）、または０．４％～０．７５％（ｗ／ｖ）の範囲にある濃度で、前記高分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、
－　１．５％～１０％、例えば２％～６％の範囲にある濃度で、低分子量のポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び
－　１μＭ～１０μＭ、例えば３μＭ～７．５μＭの範囲にある濃度で、カスパーゼ阻害剤、
を含む、実施態様１～４４のいずれか１つ以上に記載の方法。

【０１４６】

実施態様４６．

処理工程（Ｃ）が、安定化細胞含有体液サンプル、または、安定化細胞含有体液サンプルから得られた細胞含有画分を密度勾配遠心分離工程に供することを含み、任意に、前記細胞含有体液サンプルは血液であってよい、実施態様１～４５のいずれか１つに記載の方法。

【０１４７】

実施態様４７．

安定化血液サンプル、または、安定化血液サンプルから得られた細胞含有画分を、密度勾配媒体と接触させる、実施態様４６に記載の方法。

【０１４８】

実施態様４８．

安定化血液サンプル、または、安定化血液サンプルから得られた細胞含有画分を、密度勾配遠心分離工程を行う前に、好ましくは、希釈したサンプルを密度勾配媒体と接触させる前に、希釈溶液で希釈する、実施態様４６または４７に記載の方法。

【０１４９】

実施態様４９．

安定化血液サンプル、または、安定化血液サンプルから得られた細胞含有画分を、以下の特徴のうちの１つ以上を有する希釈溶液を使用して希釈する、実施態様４８に記載の方法：
（ａ）低張性溶液もしくは等張性溶液である；
（ｂ）張性調節剤を含む；
（ｃ）ポリオール、任意に糖もしくは糖アルコール、を含む；
（ｄ）糖、任意にグルコース、を含む；
（ｅ）糖アルコール、任意にグリセロール、を含む；及び／または
（ｆ）塩、任意にアルカリ金属塩、任意に塩化物塩、を含む。

【０１５０】

実施態様５０．

希釈溶液が、グルコースであってよい還元糖を、２～１０％、３～７％、または４～６

％（ｗ／ｖ）の範囲の濃度で含む、実施態様４８または４９に記載の方法。
【０１５１】
実施態様５１．
希釈溶液がグリセロールであってよい糖アルコール、及び塩、任意にアルカリ金属塩を含む、実施態様４８～５０のいずれか１つに記載の方法。
【０１５２】
実施態様５２．
希釈溶液が、最大０．５Ｍのグリセロール、及び最大２％の塩化ナトリウムを含み、任意に、希釈溶液が０．７～１．２％の塩化ナトリウム、及び０．０７５～０．１５Ｍのグリセロールを含んでよい、実施態様５１に記載の方法。
【０１５３】
実施態様５３．
希釈溶液が、密度勾配遠心分離後に、ＥＤＴＡ安定化血液サンプルと比較して、少なくとも６０％、または少なくとも７０％の白血球を前記安定化サンプルから回収することができることを達成する、実施態様４８～５２のいずれか１つに記載の方法。
【０１５４】
実施態様５４．
希釈溶液が、
（ｉ）５％（ｗ／ｖ）のグルコース、
（ｉｉ）０．９％のＮａＣｌ＋０．１Ｍのグリセロール、及び
（ｉｉｉ）少なくとも１つの張性調節剤
を含み、（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義した希釈溶液の質量オスモル濃度に一致する質量オスモル濃度を有する希釈溶液、または、質量オスモル濃度が（ｉ）もしくは（ｉｉ）で定義する溶液の質量オスモル濃度の±２０％、±１５％、または±１０％の範囲内にある希釈液、
から選択される、実施態様４８～５３のいずれか１つに記載の方法。
【０１５５】
実施態様５５．
安定化血液サンプル、または、安定化血液サンプルから得られた細胞含有画分を、希釈サンプルを密度勾配媒体と接触させる前に、希釈溶液中で、１０分以内、５分以内、または３分以内でインキュベートする、好ましくは、希釈サンプルが、希釈の後に前記希釈サンプルを前記密度勾配媒体と接触させることにより直接処理される、実施態様４８～５４のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１５６】
実施態様５６．
密度勾配遠心分離後に種々の層が形成され、前記形成された層がＰＢＭＣ層を含む、実施態様４６～５５のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１５７】
実施態様５７．
形成されたＰＢＭＣ層を収集することにより、ＰＢＭＣ画分を提供することを含む、実施態様５６に記載の方法。
【０１５８】
実施態様５８．
循環腫瘍細胞を収集したＰＢＭＣ画分から単離することを含む、実施態様５６または５７に記載の方法。
【０１５９】
実施態様５９．
ゲノムＤＮＡを、（循環腫瘍細胞が前もって除去されていてもよい）収集したＰＢＭＣ画分から単離することを含む、実施態様４６～５８のいずれか１つに記載の方法。
【０１６０】

実施態様６０．
収集したＰＢＭＣ画分を、ＰＢＳ緩衝液でもよい緩衝液を使用して洗浄することを含む、実施態様４６～５９のいずれか１つに記載の方法。
【０１６１】
実施態様６１．
ＰＢＭＣ細胞の少なくとも一部分を白血球計数に供する、実施態様４６～５９のいずれか１つに記載の方法。
【０１６２】
実施態様６２．
細胞画分を安定化細胞含有体液サンプルから得ることと、ゲノムＤＮＡを前記細胞画分から単離することとを含み、前記細胞画分が、ゲノムＤＮＡ単離前に保管され、任意に凍結されてもよい、実施態様１～６１のいずれか１つに記載の方法。
【０１６３】
実施態様６３．
細胞集団または個別の細胞を、細胞選別を使用して富裕化することを含む、先行実施態様のいずれか１つに記載の方法。
【０１６４】
実施態様６４．
細胞含有体液サンプルが血液であり、工程（Ｃ）が、標的リンパ球を細胞亜集団として安定化サンプルから富裕化することを含む、先行する実施態様のいずれか１つに記載の方法。
【０１６５】
実施態様６５．
リンパ球がＴ４及び／またはＴ８リンパ球から選択される、実施態様６４に記載の方法。
【０１６６】
実施態様６６．
安定化血液サンプルが、免疫欠損を有する患者から入手される、実施態様６４または６５に記載の方法。
【０１６７】
実施態様６７．
細胞含有体液サンプルが血液であり、工程（Ｃ）が、血小板を細胞亜集団として安定化サンプルから富裕化することを含み、任意に、工程（Ｄ）が実施されてＲＮＡを前記富裕化血小板から単離することを含んでもよい、先行実施態様のいずれか１つに記載の方法。
【０１６８】
実施態様６８．
細胞含有体液サンプルが血液であり、工程（Ｃ）が、芽細胞を細胞亜集団として安定化サンプルから富裕化することを含む、先行実施態様のいずれか１つに記載の方法。
【０１６９】
実施態様６９．
芽細胞が親和性捕捉により、任意的に磁性粒子を用いて、富裕化される、実施態様６８に記載の方法。
【０１７０】
実施態様７０．
芽細胞が、ＣＤ３４及び／またはＣＤ１１７であってもよい細胞表面マーカーを標的にすることにより富裕化される、実施態様６８または６９に記載の方法。
【０１７１】
実施態様７１．
安定化血液サンプルが、急性骨髄性白血病を有する患者から入手された、実施態様６８～７０のいずれか１つに記載の方法。

【０１７２】
実施態様７２．
工程（Ｂ）が、（Ｃ）の前に安定化細胞含有体液サンプルを輸送及び／または保管することを含む、実施態様１～７１のいずれか１つに記載の方法。
【０１７３】
実施態様７３．
保管することが、安定化細胞含有体液サンプルを収集及び安定化の場所から異なる場所に、処理のために移動することを含む、実施態様７２に記載の方法。
【０１７４】
実施態様７４．
安定化細胞含有体液サンプルが、処理工程（Ｃ）の前に最大１２時間、または最大２４時間維持される、実施態様１～７３のいずれか１つに記載の方法。
【０１７５】
実施態様７５．
安定化細胞含有体液サンプルが、処理工程（Ｃ）の前に最大３６時間、または最大４８時間維持される、実施態様１～７４のいずれか１つに記載の方法。
【０１７６】
実施態様７６．
安定化細胞含有体液サンプルが、処理工程（Ｃ）の前に最大６０時間、または最大７２時間維持される、実施態様１～７５のいずれか１つに記載の方法。
【０１７７】
実施態様７７．
安定化細胞含有体液サンプルを、処理工程（Ｃ）の前に少なくとも６時間、少なくとも８時間、または少なくとも１２時間維持することを含む、実施態様１～７６のいずれか１つに記載の方法。
【０１７８】
実施態様７８．
安定化細胞含有体液サンプルを、処理工程（Ｃ）の前に少なくとも１６時間、少なくとも２４時間、または少なくとも４８時間維持することを含む、実施態様１～７７のいずれか１つに記載の方法。
【０１７９】
実施態様７９．
工程（Ｃ）が、少なくとも循環腫瘍細胞、ゲノムＤＮＡ、及び循環無細胞ＤＮＡを、生物学的標的として単離することを含む、実施態様１～７９のいずれか１つ以上に記載の方法。
【０１８０】
実施態様８０．
工程（Ｄ）が行われ、ＲＮＡを循環腫瘍細胞から単離することと、バイオマーカーＲＮＡ分子を前記単離したＲＮＡ内で検出することと、を含む、実施態様７９に記載の方法。
【０１８１】
実施態様８１．
単離ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施態様８１に記載の方法。
【０１８２】
実施態様８２．
安定化血液サンプルまたはその細胞含有画分を処理するための、実施態様４９～５４のいずれか１つで規定される希釈溶液の使用であって、血液サンプルが、（ａ）少なくとも１つの一級、二級、もしくは三級アミド、（ｂ）少なくとも１つのポリ（オキシエチレン）ポリマー、及び／または少なくとも１つのアポトーシス阻害剤を含む安定化組成物、任意に、実施態様３０～４４のいずれか１つで規定される安定化組成物、で安定化される、前記使用。

【０１８３】
実施態様８３．
含まれる単核細胞の密度を回復するための、好ましくは、勾配密度遠心分離のための、実施態様８３に記載の使用。
【０１８４】
実施態様８４．
希釈溶液を、勾配密度培地と接触させる前に、安定化血液サンプルまたはその細胞含有画分と接触させる、実施態様８２または８３に記載の実施態様。
【０１８５】
本発明は、本明細書で開示する例示的な方法及び材料により限定されず、本明細書に記載するものに類似する、または等価な、任意の方法及び材料を、本発明の実施態様の実践または試験において使用可能である。数値範囲は、その範囲を規定する数を含むものとする。本明細書において提供する見出しは、明細書全体を参照することにより読解することができる本発明の種々の態様または実施態様の限定ではない。
主題となる明細書や特許請求の範囲において使用される際、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、別段文脈が明確に規定しない限り、複数の態様を含む。用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「有する」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、及びこれらの変形は同じ意味で用いられ、非限定的なものして解釈されなければならない。組成物が、構成成分または材料を含むものとして記載される明細書を通して、複数の実施態様における組成物は、別様に記載されない限り、引用した構成成分または材料の任意の組み合わせからもまた、本質的になるか、またはそれらからなると想到される。「本開示」及び「本発明」などへの言及は、本明細書で教示される単独または複数の態様などを含む。本明細書で教示される態様は、用語「発明」により包含される。
本明細書に記載する好ましい実施態様を選択する、及び組み合わせることが好ましく、好ましい実施態様のそれぞれの組み合わせにより生じる具体的な主題もまた、本開示に属する。
用語「富裕化すること」、「富裕化」、及び類似の用語は、本明細書で広い意味で使用され、例えば、特に、標的（例えば、サンプルに由来する、ＤＮＡ及び／またはＲＮＡなどの核酸、循環腫瘍細胞などの希少細胞、細胞外小胞）の単離及び精製といった、任意の形態の富裕化を包含する。
【実施例】
【０１８６】
以下の実施例は、本開示に従った方法は重要な利点を有し、それにより、本開示に従った安定化技術を使用して収集及び安定化した単一細胞を含有する体液サンプルに基づくマルチモード解析を実施できることを示す。
１）　本開示の安定化技術を用いて安定化したサンプルに含まれる細胞の抗原構成が保存される。
２）　本開示の安定化技術を、異なる希少細胞富裕化技術（例えば、密度勾配遠心分離、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ装置、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ）と組み合わせて使用することができる。
３）　本開示の安定化技術を、細胞性トランスクリプトーム（例えば、希少細胞及び／または豊富な細胞などの、サンプルに含まれる細胞のＲＮＡ含有量）の解析のために使用することができる。
４）　本開示の安定化技術を、循環トランスクリプトーム（例えば、細胞外小胞由来のＲＮＡ）の解析のために使用することができる。
５）　本開示の安定化技術により、マルチモード試験（例えば、ＣＴＣ、単一の安定化血液サンプルのゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）に由来するｃｃｆＤＮＡ及び白血球の解析）が可能となる。
【０１８７】
以下の実施例は、本方法で使用する安定化技術は、スパイクした腫瘍細胞の安定化を有

利に達成し、さらに、そのコア表面構造、トランスクリプトーム、及びゲノムを保存することを示す。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ溶液（本発明に従った安定化組成物）で安定化したＭＣＦ７腫瘍細胞株細胞の免疫細胞化学染色は、安定化していないＭＣＦ７に匹敵する結果を示し、このことは、細胞抗原構成及びモルホロジーが保存されていることを示している。さらに、細胞密度は、特定の溶液を血液サンプルなどの安定化サンプルに添加することにより回復することができ、これにより、勾配密度遠心分離を使用する細胞分離が可能となる。本アプローチにより、例えば、ＰＢＭＣ及びＣＴＣを１つの層で富裕化（ｅｎｒｉｃｈ）、したがって濃縮（ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ）するために、古典的な密度に基づく血液画分の分離が可能となる。

種々のＣＴＣ解析ワークフローのためのフロントエンド溶液としての本開示の安定化技術を用いて安定化した収集血液の適合性が、ラベル非依存富裕化及び細胞読み出し（Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ、ＡＮＧＬＥ　ｐｌｃ）、ならびに、分子読み出しによるラベル依存性富裕化（ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７、ＱＩＡＧＥＮ　ＧｍｂＨ）に基づいて示される。結果は、両方のアプローチが、高レベルのＣＴＣ安定化及び回収を伴う本開示に従った安定化技術と適合性があることを示している。さらに、富裕化ＣＴＣはＲＮＡベースの解析に使用するのに有利であり得る。これらのデータは、本開示に従った安定化組成物を含む収集管に収集された細胞の、十分なトランスクリプトーム安定化の証拠を提供する。以下の実施例はさらに、細胞ＲＮＡだけでなく、（細胞外小胞、ＥＶにパッケージされた）循環ＲＮＡも解析のために利用可能であることを示す。本開示に従った安定化技術により安定化した細胞含有体液サンプルは、血液などの細胞含有体液サンプルに含まれる種々の生物学的標的のマルチモード試験に好適である。ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７試験に基づき確立したワークフローに基づき、例示的に示すように、単一の安定化血液サンプルをＣＴＣ、ｃｃｆＤＮＡ、及び白血球由来のゲノムＤＮＡの解析に使用することができる。

実施した実施例を、以下説明する：

【０１８８】

１．実施例１：本開示に従った安定化技術を使用して安定化した細胞における、抗原構成維持の評価。未処理及び安定化ＭＣＦ７がん細胞株細胞の、免疫細胞化学染色

ＭＣＦ７サイトスピンの調製

ヒト乳癌細胞株細胞（ＭＣＦ７）を、抗原保存性及びアクセス可能性に対する、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化溶液（ＰＡＸｃｃｆＤＮＡ）の影響を評価するためのＣＴＣモデルとして使用した。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化溶液は、安定化因子（ａ）～（ｃ）及び抗凝血物質を含む、本発明に従った、市販されている安定化組成物である。当該溶液は、市販されているＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉＸ）に含まれている（１．５ｍＬ）。

培養したＭＣＦ７細胞をトリプシン処理し、ＰＢＳ中で洗浄し、ＰＢＳまたはＰＡＸｃｃｆＤＮＡ溶液のいずれかで３０分間、室温でインキュベートした。その後、サイトスピンを調製し、室温で一晩乾燥させ、＋４℃で、染色するまで保管した。

【０１８９】

免疫細胞化学染色

サイトスピン上の細胞を固定し、透過処理し、抗体の非特異的結合に対抗する処理をし（ブロッキング工程）、１時間室温で、ヒト汎サイトケラチンに対する蛍光標識抗体及び核染色のためにＤＡＰＩで染色した。その後、サイトスピンを洗浄し、カバーし、１週間以内に蛍光顕微鏡により解析した。

【０１９０】

結果

非安定化及び（安定化溶液中で）安定化したがん細胞上の蛍光標識した抗ヒト汎サイトケラチン抗体からの特異的シグナルの存在は、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ内で安定化した細胞における抗原構成評価の実行可能性を明らかにする（図１）。

汎サイトケラチンは、安定化サンプル中の細胞表面で良好に検出された。このことは、細胞表面抗原が保存されていることを示している。核染色により、サイトケラチンの細胞質染色及び染色された細胞の保存された核（即ち、モルホロジー）が確認された。

【０１９１】

２．実施例２：ＣＴＣ富裕化及び解析のための本安定化技術の使用

２．１．ＣＴＣ富裕化のための、本安定化技術とフィコール密度遠心分離との組み合わせ

フィコール密度遠心分離は、血液画分、したがって細胞集団を、その密度に基づいて画分に分離するために一般的に使用される方法である。有核血液細胞は、約１．０６２ｇ／ｍＬの密度を有し、フィコール層（１．０７７ｇ／ｍＬ）、または同様の密度勾配媒体で遠心分離すると、赤血球（１．０９２ｇ／ｍＬ）及び血小板（１．０３０ｇ／ｍＬ）から効率的に分離することができる。得られる界面層は、ＣＴＣ及び他の希少な有核細胞を含む、ＰＢＭＣ画分を含有する。

ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化溶液で安定化した血液は、一般的なＰＢＳ緩衝液で希釈した場合に、ＥＤＴＡで保存された血液（参照として採取）で典型的に観察されるような血漿／ＰＢＭＣ／赤血球層を形成しないことが観察された（図２を参照されたい）。

これらの観察に基づいて、とりわけ、わずかに低張性及び等張性である種々の希釈溶液を、ＰＡＸｃｃｆＤＮＡ安定化血液細胞の密度を回復するために試験した。等張性の０．９％　ＮａＣｌを参照とした。次に、細胞膜を浸透可能な物質を含有する等浸透圧溶液（例えばグリセロール）を試験のための希釈溶液に含めた。目的は、特にマルチモード解析のために、注目する種々の密度ベースの画分を得るのに好適な、典型的な層形成を得ることであった。フィコール密度遠心分離の後での、回収した白血球（ＷＢＣ）の数として有効性を測定した。

【０１９２】

血液サンプルの処理

ＥＤＴＡチューブ（ＢＤ）またはＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉＸ）に収集した全血を使用した。ＥＤＴＡ安定化血液を得るためにＢＤバキュテイナーを使用した（安定化血液中のＥＤＴＡ濃度は約１．８ｍｇ／ｍＬである）。

４ｍＬの全血を採取し、示した時間（以下を参照）の間、４ｍＬのそれぞれの希釈溶液で希釈し、４ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、密度は１．０７７ｇ／ｍＬ）に重層した。サンプルをただちに、４００ｘｇで４０分間、加速及び減速なしで遠心分離にかけた。遠心分離後、上層の血漿画分を廃棄し、ＰＢＭＣ環のみを新しい１５ｍＬチューブに移し、ＰＢＳを満たして３００ｘｇで１０分間遠心分離にかけた（最大値で加速及び減速）。上清を取り除いた後、ペレットを２００μＬのＰＢＳに再懸濁し、ＷＢＣ計数（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）のために使用した。全血１ｍＬ当たりのＷＢＣの量をＰＡＸｃｃｆＤＮＡチューブに対して１．１５の希釈因数を考慮して計算した。

【０１９３】

試験設定

種々の張性調節剤及び濃度を含む以下の希釈溶液を試験した（表１）：

【表１】

表１：密度ベースのＭＮＣ（単核球）濃縮のために試験した物質及びインキュベーション時間

ＰＢＳ中の溶液	ＰＢＳ	グルコース 5%	グルコース 6.7%	NaCl 1.0%	NaCl 0.9%	NaCl 0.9% + 0.1Mグリセロール	グリセロール 25%
室温における、全血との同時培養時間	0分；5分；10分	0分；5分；10分	10分 15 分	5分；10分	0分；5分;	0分；5分;	10分

【０１９４】

結果

インキュベーションなしでＰＢＳで希釈したＥＤＴＡ血液をＷＢＣ計数のために参照として採取した。

ＥＤＴＡ安定化血液に本質的に一致する古典的な勾配密度遠心分離層パターンを得るための全血に対する最も効果的な希釈溶液の中に、５％グルコース（グルコースは血液細胞に取り込まれる）及び０．９％ＮａＣｌ＋０．１Ｍグリセロールがある。０．９％ＮａＣｌ＋０．１Ｍグリセロールを含む希釈溶液は、グリセロールによる細胞膜の浸透があるので、萎縮細胞において正常化効果も有するようである。最終の実験では、長時間のインキュベーション無しに添加した５％グルコース及び０．９％ＮａＣｌ＋０．１Ｍグリセロールについて、ＷＢＣの回収に関して非常に良好かつ匹敵する結果が得られた（それぞれ、参照から７９％及び８０％）（表２、図２を参照されたい）。少なくとも１つの張性調節剤を含み、本実験で明らかにされたリード希釈溶液と同様の質量オスモル濃度（例えば、±２０％、±１５％、または±１０％）を有する種々の希釈溶液もまた使用可能であり、所望の層パターン、ならびに、少なくとも５０％、少なくとも６０％、及び好ましくは少なくとも６５％のＷＢＣ回収率を達成するそれらの肯定的な効果を定型的な実験により測定することができる。

【表２】

表２

血液チューブ	EDTA	本開示に従った安定化				
緩衝液	PBS	PBS	5% グルコース	5% グルコース	0.9% NaCl + 0.1Mグリセロール	0.9% NaCl + 0.1Mグリセロール
同時培養、分	0	0	0	5	0	5
1mLのWBにWBC×10^3	3150,0	378,4	2487,5	2020,6	2511,6	2213,8
回収	100%	12%	79%	64%	80%	70%

【０１９５】

２．２　ＣＴＣ検出のための、本安定化技術とＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７との組み合わせ。

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣＴＣ富裕化は、細胞表面での標的タンパク質の発現に基づき捕捉される細胞の免疫磁気分離に依存しする。富裕化細胞の検出は、腫瘍細胞特異的転写物の検出に左右される。メーカーの推奨に従い、新たに採取したＥＤＴＡ血液（採血後４時間以内）またはＡＣＤ－Ａチューブに採取して＋４℃で最大３０分間保管した血液を使用することができる。

【０１９６】

（ａ）材料及び方法

細胞培養

ＬＮＣａＰ９５細胞を、３７℃及び５％CO_2にて、１０％活性炭処理血清及び１０％ペニシリン／ストレプトマイシンを含む、フェノールレッド非含有ＲＰＭＩ１６４０中で単一層として培養した。

採血及びサンプル調製

所与の署名したインフォームドコンセントの後に、２１名の健常な志願者からの全血を、肘脈への静脈穿刺によりＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉＸ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）に収集し、メーカーの指示に従い、採血直後にチューブを８回反転させた。

比較研究（以下の（ｃ）を参照）のために、健常なドナーから採血し、メーカーの指示に従ってＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ及びＰｒｏｖｉｄｅｒ　ＳｔｒｅｃｋのＢＣＴに収集した。

ドナー及び採血チューブ（ＢＣＴ）当たりで血液サンプルをプールし、採血の３０分以内に５ｍＬを１５ｍＬの円錐チューブに小分けして、直ちにスパイクした。サンプル当たり２０個のＬＮＣａＰ９５細胞または２０μＬのＰＢＳで手動スパイクした後、血液サンプルを２～８℃または室温で、試験設計に従い処理されるまで保管した。

【０１９７】

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７を使用する腫瘍細胞の富裕化及び検出

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７は、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＳｅｌｅｃｔ手順によりカバーされるＣＴＣ富裕化工程を利用する。ＣＴＣ検出のために、ＣＴＣ富裕化画分からｃＤＮＡを作製する。

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７は、前立腺特異的ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ＡＲ及びＡＲ－Ｖ７転写物、ハウスキーパーとしてのＧＡＰＤＨ、ならびに、白血球マーカーとしてのＣＤ４５を検出するためのリアルタイムＰＣＲに基づく読み出しに依存する。がん特異的転写物の少なくとも１つが検出された場合、試験を陽性とみなした。

ＡＲ－Ｖ７アッセイは非特異的ｃＤＮＡ事前増幅工程を含み、アッセイの感度を高めることを含む。事前増幅工程（１８サイクル）により、増幅はもはや直線的でなく、標的遺伝子の発現の定量は実行できない。ＡＲ－Ｖ７試験はメーカーの推奨に従って行った。

【０１９８】

データの評価

ＬＮＣａＰ９５細胞は、ＰＳＭＡ、ＡＲ、及びＡＲ－Ｖ７について陽性であることが知られており、ＰＳＡの不安定な発現を有することが知られている。したがって、全ての試験はＰＳＭＡ、ＡＲ、及びＡＲ－Ｖ７の検出に基づいて評価したが、ＰＳＡは解析から除外した。

ｃｃｆＤＮＡの収率、及びｇＤＮＡの収率の統計的評価を、対応のない両側Ｔ検定（ｇｇｐｌｏｔ２及びｇｇｐｕｂｒパッケージを用いたＲ－ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓバージョン３．５．１）を用いて行った。

【０１９９】

（ｂ）本開示に従った安定化組成物とＣＴＣ検出との適合性

第１のセットの実験において、スパイクした腫瘍細胞を検出するために、ＡｄｎａＴｅ

ｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７と本開示に従った安定化技術により収集及び安定化した血液の適合性を評価した。本開示に従った安定化組成物を含むチューブに収集した１０人のドナーに由来する全血サンプルを各ドナーについてプールし、５ｍＬのサンプルとして１５ｍＬの円錐チューブに小分けした。血液サンプルを、それぞれ２０個のＬＮＣａＰ９５細胞または非スパイク対照として２０μＬのＰＢＳで、手動でスパイクした。このセットアップにより、収集した安定化血液でＣＴＣが検出可能であるか否か、及び、安定化試薬そのものが試験性能（それぞれ、スパイクサンプル及び非スパイク対照）に何らかの影響を有するか否かを評価することが可能となった。スパイク後、３時間、２４時間、３０時間、及び４８時間後に処理するまで、全てのサンプルを２～８℃で保管した。

データは、全ての実験時点（スパイク後３時間、２４時間、３０時間、及び４８時間）において、腫瘍細胞をスパイクしたサンプルの試験における陽性を示す（図３Ａを参照）一方で、全ての非スパイク対照試験は陰性であった（図３Ｂを参照）。したがって、この確立されたワークフローは、本開示に従った安定化組成物を含むＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブの、ＣＴＣの単離及び検出のためのＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７との適合性を示す。本開示に従った安定化溶液そのものは、いかなる非特異的偽陽性結果をも引き起こさない。

現在、市販されているＡｄｎａＴｅｓｔは、血液が２～８℃（１４）で保管される場合、ＥＤＴＡまたはＡＣＤ－Ａ収集血液のいずれかと共にそれぞれ採血後４及び３０時間以内に用いることが推奨されている。アッセイの感度は、９０％と報告されている。本明細書で提示するデータは、本開示に従った安定化組成物を含むチューブに収集した血液においては、３０時間以内に１００％の感度、及び２～８℃で４８時間保管した後に９０％の感度を示す。

【０２００】

（ｃ）ＣＴＣ保存及び検出について、本開示の安定化技術と、他の市販されている安定化技術との比較

次に、最大７２時間保管し、本開示に従った安定化組成物を含むチューブ（ＰＡＸｇｅｎｅ Ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブ）に採集したサンプル、及び、Ｓｕｐｐｌｉｅｒ Ｓｔｒｅｃｋ（ＣＴＣ保存のためにも意図されている）のＣｅｌｌ－Ｆｒｅｅ ＤＮＡ ＢＣＴに採集したサンプルからのＣＴＣ検出の効率を評価した。

以前の実験と同様に、５ｍＬの血液当たり２０個のＬＮＣａＰ９５細胞をＣＴＣモデルとして使用した。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化サンプル（ｎ＝１１）は２～８℃で保管し、Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ ＤＮＡ　ＢＣＴ（ｎ＝８）に（メーカーの推奨に従い）室温で収集したサンプルをその後、上述のとおり、スパイクの３時間、２４時間、４８時間、及び７２時間後に、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７により処理した。

保管の７２時間後に、事例の９１％において、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡ安定化サンプルにおいてスパイクした腫瘍細胞を効率的に検出することができた（図４Ａを参照されたい）。対照的に、Ｓｕｐｐｌｉｅｒ　ＳｔｒｅｃｋのＢＣＴに収集された血液においては、スパイクした腫瘍細胞の検出は保管３時間以内の血液においてのみ陽性であった（図４Ｂを参照されたい）。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブの非架橋血液安定化の化学とは対照的に、ｓｕｐｐｌｉｅｒ　ＳｔｒｅｃｋのＣｅｌｌ－Ｆｒｅｅ ＤＮＡ　ＢＣＴは架橋剤ベースの細胞保存に依存する。したがって、ＲＮＡ検出が妨げられる。得られたデータは、他者によるこれらのＢＣＴでなされた観察に一致する（ＣＴＣ－ｍＲＮＡ（ＡＲ－Ｖ７）　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｆｒｏｍ　Ｂｌｏｏｄ　Ｓａｍｐｌｅｓ－Ｉｍｐａｃｔ　ｏｆ　Ｂｌｏｏｄ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　Ｔｕｂｅ　ａｎｄ　Ｓｔｏｒａｇｅ　Ｔｉｍｅ．Ｌｕｋ　ｅｔ　ａｌ，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｓｃｉ．２０１７　Ｍａｙ　１２；１８（５）を参照されたい）。

さらなる実験により、室温で保管した後にＣＴＣも富裕化可能であることがさらに示された（図４Ｃ及び４Ｄを参照されたい）。

【０２０１】
２．３　オールフロムワン（ａｌｌ－ｆｒｏｍ－ｏｎｅ）溶液との関係における、ＣＴＣ富裕化のための、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブとＰａｒｓｏｒｔｉｘ装置との適合性。
研究設計
ＰＡＸｇｅｎｅ　ｃｃｆＤＮＡ安定化血液の、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ（Ａｎｇｌｅ　ｐｌｃ、Ｇｕｉｌｄｆｏｒｄ、ＵＫ）富裕化機器との一般的な適合性、及び、（非）安定化血液由来のスパイク細胞の捕捉効率を本実験で試験した。Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ技術は、細胞を顕微鏡サイズの使い捨てカセットに捕捉することにより、血液細胞成分から、大きく変形し得る細胞、及び、さほど変形しない細胞（例えばＣＴＣ）を富裕化する。細胞をカセット内で染色及び計数することができ、逆流システムを使用して回収することができる。
本実験では、ＣＴＣ富裕化のためのモデルシステムアプローチを使用した。１名の健常ドナーから、血液をＥＤＴＡチューブ及びＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ中に採取した。血液をまず、５ｍＬ（ＥＤＴＡ）または６ｍＬ（ＰＡＸｇｅｎｅ）サンプルに小分けし、ＰＡＸｇｅｎｅ　ｃｃｆＤＮＡチューブ中のさらなる液体（チューブに含まれる安定化溶液）を検討した。次に、サンプルを全て、緑色蛍光タンパク質を安定して発現する２０００個の細胞（ＭＣＦ７－ＧＦＰ細胞として購入）でスパイクした。本細胞株の利点は、捕捉した細胞を、さらに染色または処理することなく富裕化カセット内で蛍光顕微鏡の下で検出及び計数可能であることである。
【０２０２】
ＥＤＴＡ血液サンプル及びＰＡＸｇｅｎｅ安定化血液サンプルを、収集日（ＴＴＰ０）にＰａｒｓｏｒｔｉｘ装置で処理し、カセットに捕捉されたＧＦＰ細胞の数を計数した。保存していないＥＤＴＡ血液からＣＴＣを捕捉することは機器の供給元により推奨されているワークフローであり、依然として臨床研究で用いられる主たるサンプル品質であるため、ＥＤＴＡ血液は参照としての役割を果たす。
室温で３日間血液保存した後で、細胞をＰＡＸｇｅｎｅ安定化全血（ＰＡＸｇｅｎｅ）から富裕化するか、または全血を一度に遠心分離にかけ（１５分、１９００ｘｇ）、血漿を廃棄して、血液を３ｍＬのＰＢＳで再構成して粘度を回復させた（ＰＡＸｇｅｎｅ再構成物）後でＰａｒｓｏｒｔｉｘ処理を行った。カセットに捕捉されたＧＦＰ細胞の数を再び蛍光顕微鏡を使用して計数した。
【０２０３】
結果
収集日において、捕捉されて計数した細胞の数は、ＰＡＸｇｅｎｅ　ｃｃｆＤＮＡチューブ内で収集した血液においてＥＤＴＡ対照（ＰＡＸｇｅｎｅに対して１０３％）と比較して同様であった。血液処理の前の遠心分離工程に関係なく、保存の３日後に、匹敵するがわずかに多くの数の細胞をカセット中に捕捉して計数することができた（図５を参照されたい）。
結論
ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブで収集した血液は、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ細胞富裕化ワークフローと適合性があり、室温で３日間保管した後であっても、及び血漿分離した後であっても処理することができる。
したがって、本開示に従った安定化技術を使用して収集及び安定化した血液サンプルから、オールフロムワン溶液は、ｃｃｆＤＮＡ、加えてＣＴＣを得るための両方に有利に適している。
【０２０４】
３．実施例３：細胞トランスクリプトーム（細胞のＲＮＡ内容物）を解析するために、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブを使用することができる
ＣＴＣ富裕化及びＲＮＡ解析のための、原理証明実験を章２．２に示す。ＡｄｎａＴｅｓｔは、ＲＴ－ＰＣＲを用いるＲＮＡベースのＣＴＣ検出に依存する。章２．２で上述し

たスパイク腫瘍細胞の検出が成功したことは、血液がＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集された場合に、個別の細胞のＲＮＡ含有量が少なくとも７２時間保存されることを示す。

【０２０５】

４．実施例４：循環トランスクリプトーム（細胞外小胞からのＲＮＡ）の解析のためにＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブを使用することができる

研究設計

本開示の安定化技術で安定した血液の、その後のＥＶ解析との適合性を、以下の研究で示した。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブを再び血液安定化のために使用した。

４名の健常なドナーからの全血を、１０ｍＬのＫ２－スプレー乾燥ＥＤＴＡチューブ（ＢＤバキュテイナー）、１０ｍＬのＳｔｒｅｃｋ　ｃｆＤＮＡ　ＢＣＴ、及び、１０ｍＬのＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブの、３つの異なる血液収集管にそれぞれ収集した。

収集後、各チューブから５ｍＬの血液を処理した。二重遠心分離により血漿を作製し、０．８μｍフィルターで濾過した。ｅｘｏＲＮｅａｓｙ　Ｓｅｒｕｍ／Ｐｌａｓｍａ　Ｍａｘｉキット（ＱＩＡＧＥＮ）に従いＲＮＡを単離し、２０μＬの水で溶出した。

精製したＲＮＡを、２９４ｂｐ断片の増幅についてＲＴ－ｑＰＣＲ　βアクチンアッセイにより解析した。解析は、Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ　Ｐｒｉｍｅｒ／Ｐｒｏｂｅ　ＲＴ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ及び２μＬの溶出液を用いて実施した。

【０２０６】

βアクチンのコピーにおける相対差を測定するための定量的リアルタイムＰＣＲアッセイ

ｃｃｆＤＮＡの量を測定するために、ＲＧＱ（ＱＩＡＧＥＮ）リアルタイムＰＣＲアッセイを、Ｒｏｔｏｒ－Ｇｅｎｅ　Ｑ機器上で２μＬの溶出液を用いて行った（表３）。ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　ＰＣＲ　Ｋｉｔ試薬（ＱＩＡＧＥＮ　ＧｍｂＨ）を用いて、２０μＬのアッセイ体積においてヒトβアクチン遺伝子の２９４ｂｐの断片を増幅する。

【表３】

表３．βアクチンアッセイのためのプライマー及びプローブの配列

		プライマー／プローブ	
標的	アンプリコンのサイズ［ｂｐ］	位置	配列５－３’
βアクチン	294	フォワード	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A
		リバース	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G
		プローブ	FAM－ ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT－BHQ

【０２０７】

結果

細胞外小胞（ＥＶ）は、本開示に従った安定化組成物を含有する血液収集管に収集した全血から作製した血漿から富裕化することができる。精製ＥＶから得られたＲＮＡを、阻害されることなくＲＴ－ｑＰＣＲにより解析することができた（図６を参照されたい）。

対照的に、Ｓｔｒｅｃｋ　ｃｆＤＮＡ　ＢＣＴに収集した全血由来のＥＶから単離したＲＮＡを解析すると、Ｃｔ値の増加、したがって、不利な結果がもたらされたが、おそら

く最も高い可能性としては、ホルムアルデヒド放出剤ベースの安定化技術により誘発されたＲＮＡ分子上での架橋によるＲＴ－ｑＰＣＲの阻害のためであろう。

【０２０８】

５．実施例５：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブで安定化したサンプルをマルチモード試験のために使用することができる

本実施例は、本開示に従った安定化技術で収集及び安定化した単一の血液サンプルから得られた、（１）ＣＴＣ、（２）ｃｃｆＤＮＡ、及び（３）白血球由来のゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、の解析のための、３分岐型（３　ｆｒｏｍ　１）ワークフローを用いる例により後でさらに示されるように、安定化体液に含まれる異なる生物学的標的のマルチモード試験が実行可能であることを示す。

ＡｄｎａＴｅｓｔ　Ｓｅｌｅｃｔ手順により、ビーズ結合ＣＴＣ（ＣＴＣ枯渇血液）回収後の、全血残留物の収集が可能となる（図７を参照のこと）。したがって、収集した血液におけるマルチモード試験の実行可能性を示すために、上述した全ての実験からのＣＴＣ枯渇細胞をＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集した。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブにより、ｃｃｆＤＮＡ及び白血球ｇＤＮＡの同時解析が可能となる。章２．２に列挙する実験からのＣＴＣ枯渇細胞をｃｃｆＤＮＡ単離のために使用可能であり、収率は有利なことにＣＴＣ枯渇により影響を受けなかったことが、続いて明らかにされた。それぞれのドナーから並行して収集して５ｍＬサンプルに小分けし、２０個のＬＮＣａＰ９５細胞でスパイクし、同じ時間２～８℃で保管したがＣＴＣ富裕化のために使用しなかった対照サンプルを、ｃｃｆＤＮＡ及びｇＤＮＡ収率の参照として使用した。

【０２０９】

それぞれの対照サンプルと共に、ＣＴＣ枯渇細胞サンプルを、１９００ｘｇで１５分間遠心分離にかけた。得られた血液画分（血漿及び細胞画分）を、それぞれｃｃｆＤＮＡ抽出（１９００ｘｇにおける１０分間の、２回目の遠心分離後）、及びｇＤＮＡ単離のために使用した。

ＣＴＣ枯渇血液サンプル及び血漿作製のみに使用した血液からのｃｃｆＤＮＡの収率を、表４に示す。統計分析は、アーム間でも、同一実験のアーム内の最初と最後の試験時点においても、ｃｃｆＤＮＡ収率のいかなる有意差をも明らかにしなかった（図８を参照されたい）。したがって、ＣＴＣ枯渇は、収率、及びｉｎ　ｓｉｔｕ安定性の観点において、ｃｃｆＤＮＡの収率に著しい影響を有しなかった。

【表４】

表４：１ｍＬの利用した血漿に対して正規化した、１８Ｓ　ｒＤＮＡの６６ｂｐ及び５００ｂｐの断片の濃度（ｎｇ）として測定した、ｃｃｆＤＮＡの収率。

スパイク後の試験時点	0時間	24時間	48時間	72時間
１８Ｓ　ｒＤＮＡ遺伝子の６６ｂｐ断片の濃度、ｎｇ／１ｍＬ血漿				
CTC枯渇サンプルからの血漿	4.60 ± 2.33	4.50 ± 2.18	4.41 ± 2.17	3.70 ± 1.46
全血から生成した血漿	4.81 ± 2.15	4.55 ± 1.79	4.31 ± 1.80	3.58 ± 1.72
１８Ｓ　ｒＤＮＡ遺伝子の５００ｂｐ断片の濃度、ｎｇ／１ｍＬ血漿				
CTC枯渇サンプルからの血漿	0.51 ± 0.40	0.47 ± 0.31	0.53 ± 0.36	0.51 ± 0.29
全血から生成した血漿	0.48 ± 0.34	0.38 ± 0.29	0.42 ± 0.30	0.34 ± 0.26

【０２１０】

同様に、ＣＴＣ枯渇細胞サンプル（ｎ＝８）の遠心分離後に得られた細胞画分から抽出したｇＤＮＡの収率は、ＰＡＸｇｅｎｅ　ｃｃｆＤＮＡチューブで安定化した血液に関して報告した値の範囲内にあった。２００μＬ細胞画分から、ＣＴＣ枯渇のないサンプルからの９．４３μｇのＤＮＡ（７．６６～１１．２３μｇの範囲）と比較して、ＣＴＣ枯渇サンプルから平均で１０．３μｇのｇＤＮＡを単離することができた（５．３１～２１．９７μｇの範囲）。スパイク及び処理後３時間においても、全体においても（全時点、３～７２時間）、ＣＴＣ枯渇から抽出したｇＤＮＡの収率と、血漿作製のみに使用した血液との間に、統計的有意差はなかった（図９を参照されたい）。抽出ｇＤＮＡの純度は、ＣＴＣ枯渇及び対照サンプル（即ち、全血から作製）に対してそれぞれ（全時点の平均）、１．８６±０．０５及び１．８５±０．０６であり、これらは予想した値の範囲内である（１．７～１．９）。

【０２１１】

材料及び方法

血漿及び細胞画分の作製

ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブからの血漿を、メーカーの指示に従い作製した。簡潔に述べると、細胞を１９００ｘｇで１５分間遠心分離にかけた。細胞画分及び血漿画分を分離した。血漿含有画分を、１９００ｘｇで１０分間さらに遠心分離にかけ、それぞれのペレットを乱さずに血漿を収集し、－２０℃で保管した。ｇＤＮＡ抽出のために処理するまで、最初のスピン後に得られた細胞画分をすぐに－２０℃で凍結した。

【０２１２】

ｃｃｆＤＮＡワークフロー

ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙでのｃｃｆＤＮＡの自動精製

１．６～２．０ｍＬのＰＡＸｇｅｎｅ血漿から、ｃｃｆＤＮＡを、ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙ機器（ＱＩＡＧＥＮ）にてＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙ　ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡキット（共にＰｒｅＡｎａｌｙｔｉＸ）を使用して、磁気ビーズベースの抽出手順により単離した。

１８Ｓ　リボソームＤＮＡコピーについての絶対差を測定するための定量的リアルタイ

ムＰＣＲアッセイ
　６６及び５００ｂｐ断片のヒト１８Ｓ　ｒＤＮＡ遺伝子の絶対的定量化を、ＣＴＣ枯渇及び非スパイク血液サンプル由来のｃｃｆＤＮＡサンプルについて検量線を用いて行った（図８、及び、図１１に示すワークフローを参照されたい）。ＡＢＩ　７９００ＨＴ　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ－Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）上でＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　ＰＣＲ　Ｋｉｔ試薬（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、２０μＬのアッセイ体積にて８μＬの溶出液でリアルタイムＰＣＲアッセイを行った。計算した６６ｂｐ及び５００ｂｐの断片の量を、使用した血漿の体積に対して正規化した。
【０２１３】
　ｇＤＮＡワークフロー
　ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙでのｇＤＮＡの自動精製
　血漿分離後に得られた、２００μＬの分離した細胞画分からのゲノムＤＮＡを、ＱＩＡｓｙｍｐｈｏｎｙ機器（ＱＩＡＧＥＮ）上でＱＩＡＳｙｍｐｈｏｎｙ　ＤＳＰ　ＤＮＡ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔを用いる磁気ビーズベースの抽出手順により単離した。溶出体積は、サンプル当たり２００μＬであった。
　ｇＤＮＡの定量化、及びｇＤＮＡ純度の評価
　ｇＤＮＡの吸光度をＮａｎｏＤｒｏｐ８０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で測定した。吸光度を２６０ｎｍ、２８０ｎｍ、及び３２０ｎｍで測定した。ｇＤＮＡ（μｇ／ｍＬ）の濃度を、「５０×（Ａ２６０－Ａ３２０）」として計算し、総量をサンプルの体積を乗じた濃度として計算した。抽出ｇＤＮＡの純度を、２８０ｎｍにおける補正吸光度に対する、２６０ｎｍにおける補正吸光度の比率、即ち（Ａ２６０－Ａ３２０）／（Ａ２８０－Ａ３２０）として計算した。純粋なＤＮＡは、１．７～１．９のＡ２６０／Ａ２８０配給量を特徴とする。
【０２１４】
　全体の結論－実施例１～５
　ＣＴＣ及び他の希少細胞を含む細胞は、非安定化血液において急速に分解する。本開示の方法で使用する安定化技術（ここでは、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに基づいて示した）により、ｃｃｆＤＮＡレベル、ＣＴＣ、及び細胞外小胞の効果的な安定化及び解析が可能となり、これにより、安定化サンプルから富裕化可能な、複数の異なる生物学的標的の並行解析が可能となる。本明細書で実証されるとおり、本開示に従った安定化技術により、細胞抗原構成、ゲノム、及びトランスクリプトームレベルの安定化、加えて、血液循環トランスクリプトームの安定化が可能となる。
　このように、本発明に従ったワークフローは、本発明に従った安定化組成物を含む単一の収集管に収集した、個別のリキッドバイオプシー検体（ＣＴＣ、及び他の希少細胞、ｃｃｆＤＮＡ、ｃｔＤＮＡ、ＥＶ、白血球由来のｇＤＮＡ、細胞亜集団など）、ならびに、同一の血液サンプル由来のこのような検体の組み合わせの解析に好適である（図１０を参照されたい）。例示的なワークフローを図１１にも示す。
【０２１５】
　一実施態様に従うと、本開示に従った血液サンプルベースのワークフローは、
－　本開示に従った安定化組成物を含む収集管（例えば、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ、例えば少なくとも５ｍＬ、例えば１０ｍＬの採血体積；安定化溶液を含む体積、例えば１１．５ｍＬ）への血液収集、実験室への移動を含む。
－　安定化した血液の一部をＣＴＣ富裕化のために使用する（例えば５ｍＬ）。未処理血液（例えば、６．５ｍＬ）、及び、ＣＴＣ富裕化後の残留血液（約４．５ｍＬ）を血漿作製のために使用してよい（細胞枯渇画分）。血漿作製は、２段階の遠心分離手順を使用して実施することができる。
　　○　例えば最初の遠心分離後に得られた細胞画分を、ＰＢＭＣからの全ｇＤＮＡ抽出のために、または、標的ＰＢＭＣ亜集団からのＤＮＡ抽出のためのＦＡＣＳ選別のために使用する。

○　作製した血漿をさらに２回目の遠心分離工程で遠心分離にかける。得られた血漿をさらに、ｃｃｆＤＮＡ及び／またはＥＶ単離のために小分けすることができる。
－　富裕化ＣＴＣをさらに処理することができる。例えば、解析（例えば、ＣＴＣ転写物の検出）のために、富裕化ＣＴＣを溶解して細胞内核酸（例えばＲＮＡ、特にｍＲＮＡ）を単離することができる。さらに、富裕化ＣＴＣから得られた細胞内核酸を配列決定することができる。

【０２１６】

一実施態様に従うと、本開示に従った血液サンプルベースのワークフローは、
－　本開示に従った安定化組成物を含む収集管（例えば、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブ、例えば少なくとも５ｍＬ、例えば１０ｍＬの採血体積；安定化溶液を含む体積、例えば１１．５ｍＬ）への血液収集、実験室への移動、
－　安定化血液サンプルを、遠心分離により（例えば、２段階の遠心分離手順を使用して）血漿と細胞画分に分離すること、を含む。
○　得られた血漿のアリコートを、ｃｃｆＤＮＡの直接精製のために使用する。血漿のさらなるアリコートを、ＥＶの富裕化、及び、その後の、ＥＶからのＲＮＡの単離のために使用する。
－　細胞画分の１つのアリコートをｇＤＮＡの単離のために使用することができる。あるいは、またはさらに、ＣＴＣを捕捉し、ＣＴＣを枯渇させた残留ＰＢＭＣからの、その後のｇＤＮＡ単離のために、細胞画分のアリコート（好ましくは、その大部分）を使用する。
－　再び、富裕化ＣＴＣを上述のとおりにさらに処理することができる。

【０２１７】

６．実施例６：本発明に従ったＣＴＣ富裕化及び解析のための、安定化技術のさらなる使用

６．１．ＣＴＣ富裕化のための、安定化技術とフィコール密度遠心分離との組み合わせに関するさらなる実験

フィコール密度遠心分離は、実施例２と併せて上述しており、簡潔さのために当該実施例を参照する。前述したものと同一の方法論を用いて、収集してＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに保管した血液からの単核球（ＭＮＣ）富裕化の最適化を目的とするさらなる実験を行った。得られる界面層は、ＣＴＣ及び他の希少な有核細胞を含むＰＢＭＣ画分を含有する。

実施例２では、ＰＡＸｃｃｆＤＮＡ安定化血液では、ＥＤＴＡ保存血液（参照として採取）について典型的に観察されるような血漿／ＰＢＭＣ／赤血球層が形成されないことが観察された。したがって、ＥＤＴＡサンプルに対するＭＮＣ回収の相対的比較において、ＰＡＸ保存血液サンプルは多くの場合、ＥＤＴＡサンプルについて達成可能なＭＮＣ回収の７５％しか示さない（図１２）。

本発明の技術により安定化したサンプルを処理する場合にＭＮＣ回収を改善するために、細胞密度の回復を目的とする、さらなる、また種々の溶媒を評価した。

【０２１８】

結果

実施例２に加えて、さらなる濃度を他の補助液と同様に試験した。ＰＢＳのみで希釈したＰＡＸサンプルとの比較を行った。結果を下表５に示す。

【表５】

表５：異なる補助液（全てＰＢＳで希釈）に対するＰＡＸ＋ＰＢＳと比較しての、ＭＮＣ回収の結果－ＭＮＣ回収率の提示（ＰＢＳ＋ＥＤＴＡに対する割合）

溶液	インキュベーション時間、分	平均ＭＮＣ回収率、％
3%　グルコース	0	92
5%　グルコース	0	>150
5%　グルコース	5	>150
0.8% NaCl	0	>150
0.8% NaCl + 0.1M グリセロール	0	>150
0.9 %NaCl	0	126
0.9%NaCl	5	91
1.0% NaCl	5	95
1% DMSO	0	102
2% DMSO	0	94
3% DMSO	0	108
0.9% NaCl + 0.1Mグリセロール	0	109
1.0% NaCl + 0.1Mグリセロール	0	>150
1.0% NaCl + 0.1Mグリセロール	5	>150
1.0% NaCl + 0.15Mグリセロール	0	123
1.1% NaCl + 0.15Mグリセロール	0	111

【０２１９】

これらの観察に基づき、種々の低張性及び等張性溶液を、ＰＡＸｃｃｆＤＮＡ安定化血液細胞の密度を回復するために試験した。試験した溶液について十分かつ優れた回収率が観察され、このことは、アプローチの成功を示した。

表５で規定したリード希釈溶液と同様の質量オスモル濃度（例えば、±２０％、±１５％、または±１０％）を有する異なる希釈溶液も使用可能であり、所望の層パターンの達成、ならびに、少なくとも５０％、少なくとも６０％、及び好ましくは少なくとも６５％のＷＢＣ回収率を達成する明白な効果を、慣例的な実験により明らかにすることができる。

【０２２０】

６．２．ＣＴＣ検出のための、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブと、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌの組み合わせに関するさらなる実験

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣＴＣ富裕化、ならびに、関連する材料及び方法は実施例２と併せて上述されており、ここでは、簡潔さのために当該実施例を参照する。富裕化細胞の検出は腫瘍細胞特異的転写物の検出に左右される。メーカーの推奨に従い、新たに収集したＥＤＴＡ血液（採血後４時間以内）、およびＡＣＤ－Ａチューブに収集して＋４℃で最大３０時間保管した血液を使用することができる。

複数の実験において、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集され保管された血液が、３つの異なるＡｄｎａＴｅｓｔと適合性があるか否か、及び、血液保管の時間、保管条件（室温、ＲＴ　ｖｓ　２～８Ｃ）のどの程度まで適合性があるか、ならびに、どのＬＯＤ（２０個の腫瘍細胞／５ｍＬ血液ｖｓ５個の細胞／５ｍＬ血液）まで適合性があるかを評価した。

【０２２１】

Ａ．ＰＡＣｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡとＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７の組み合わせ

本セットの実験では、スパイクした腫瘍細胞を検出するための、本開示に従った安定化技術を用いて収集及び安定化した血液とＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７との、発見された上述の適合性をさらに評価し、確認した。したがって、Ａｄｎａｔｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７を用いる複数の実験において、モックサンプル（２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液）における腫瘍細胞検出率は、２～８℃での３０時間以内の保管で１００％であり、７２時間後に９３％にまで低下したことが示された（図１３を参照されたい）。１２０時間後であっても、６７％が依然として検出された。ここでも、これにより、本開示に従った安定化溶液そのものは、いかなる非特異的な偽陽性結果をも引き起こさないことが確認され、したがって、本明細書に記載するワークフローに上手く組み込むことができる。

保存条件（室温ｖｓ２～８℃）に関して試験性能を評価したところ、試験性能のわずかな低下が観察された（室温保管したサンプルにおいては７５％の試験陽性ｖｓ２～８℃で保管したサンプルにおいては８４％）（図１４Ａ及び１４Ｂを参照されたい）。しかし、室温で保管した後でもＣＴＣ全体を富裕化することができた。

【０２２２】

次に、試験の検出限界（ＬＯＤ）を評価した。ＰＡＸ　ｃｃｆＤＮＡチューブに収集したサンプルを、５または２０個の細胞／５ｍＬ血液のいずれかでスパイクした。結果は、２０個の細胞／５ｍＬ血液でスパイクしたサンプル（図１５Ｂを参照されたい）がよりよく検出され、５個の細胞／５ｍＬ血液（図１５Ａを参照されたい）は、より短い保管時間においてのみ十分であることを示している。より多くの数の細胞、例えば２０個の細胞／５ｍＬを使用してワークフロー全体における高感度（＞９０％）を達成するのが好ましい（図１５Ａ及び１５Ｂを参照されたい）。

最後に、血漿作製の種々のレジメンを試験した。本発明の実施例を通して使用したワークフローにおいて、血液サンプルをまずＣＴＣ富裕化のために使用し、ＣＴＣ枯渇血液を、さらなるマルチモード試験用の血漿作製のために使用した（図１６Ａを参照されたい）。代替の血漿作製法において、第１の工程として血漿を作製し（１９００ｇで１５分間）、次いで、細胞画分をＰＢＳにより初期容量まで再構成し、ＣＴＣ富裕化のために使用した（図１６Ｂを参照されたい）。検出した腫瘍細胞の結果を図１６に示す。具体的には、両方の血漿作製法において、最大７２時間の保管時点で、スパイクした腫瘍細胞の１００％が検出された。このことは、本発明に従った方法により安定化したサンプルを、ＣＴＣ富裕化及び検出に負の影響を及ぼすことなく、両方の種類の血漿作製法に使用することができることを示している。

これと一致して、血漿作製法の比較に関する同一の実験を、ＥＺ１に対するプロトタイプのＡｄｎａＴｅｓｔにより、ＥＺ１機器（自動ソリューション）で行ったときに、同様の結果が観察された（図１７Ａ及び１７Ｂを参照されたい）。

血漿作製のいずれの方法（即ち、マルチモード利用）も適用可能であることを、本実施例の結果は示す。

【０２２３】

Ｂ．ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブとＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒの組み合わせ

本実施例では、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ（「ＰｒｏｓｔａｔｅＤｉｒｅｃｔ」とも呼ばれる）を、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ

Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７と比較する。ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒは、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７よりも感度が低く、エンドポイントＰＣＲ評価に依存する（一方で、ＡＲ－Ｖ７試験はＲＴ－ＰＣＲ試験である）。

この比較において、上述の実験で使用したサンプルを、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ評価にも使用した。それ故、簡潔さのため、前記対応する章を参照する。

【０２２４】

比較結果を図１８に示し、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ　Ｐａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７によりなされた発見を確認する。具体的には、以下の結果が得られた：

－　モックサンプル（２０個のＬＮＣａＰ９５細胞／５ｍＬ血液）における腫瘍細胞検出率は、２～８℃での３０時間以内の保管で１００％であり、７２時間後に９３％にまで低下したことが示された（ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７については図１８Ａを、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒについては図１８Ｂを参照されたい）。

－　保存条件（室温ｖｓ２～８℃）に関して試験性能を評価したところ、試験性能の僅かな低下が観察された（ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７：室温保管サンプルに対しては７５％の試験陽性ｖｓ２～８℃で保管したサンプルに対しては８４％；ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ：室温保管サンプルに対しては５０％の試験陽性ｖｓ２～８℃で保管したサンプルに関しては８０％；それぞれ、図１８Ｃ及び１８Ｄを参照されたい）。ここでもまた、室温で保管した後でもＣＴＣ全体を富裕化することができた。

－　上記のように、５個の細胞／５ｍＬ血液のいずれかでスパイクし、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ（図１８Ｅを参照）またはＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ（図１８Ｆを参照）で試験することにより、検出限界（ＬＯＤ）を評価した。２０個の細胞／５ｍＬ血液（上を参照）でスパイクしたサンプルにより、よりよい検出がもたらされたことを結果は確認し、このことは、５個の細胞／５ｍＬ血液は、非常に短い保管時間においてのみ十分であることを示している。好ましくは、より多くの細胞数、例えば２０個の細胞／５ｍＬが両方の試験で検出される。

－　最後に、異なる血漿作製法を試験した。具体的には、血漿を第１の工程として作製し、細胞画分をＣＴＣ富裕化のために使用する代替の血漿作製法を使用した。富裕化ＣＴＣ画分を、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７（図１８Ｇを参照）、またはＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ（図１８Ｈを参照）のために使用した。代替の血漿作製法により、最大４８時間の保管について、スパイクした腫瘍細胞の１００％の検出が可能となり、このことは、本発明に従った方法により安定化したサンプルを、ＣＴＣ富裕化及び検出に負の影響を及ぼすことなく、両方の種類の血漿作製法に使用することができることを示している。したがって、有利なワークフローを提供することができる。

【０２２５】

６．３．ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブとＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒの組み合わせ

ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒの性能を、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒ及びＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７と併せて、上述のとおりの同様のスパイクインシステムで試験した。具体的には、５ｍＬの健常なドナー血液当たり２０個のＴ８４細胞をスパイクした。ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブを使用してサンプルを２～８℃で保管して、ＡＣＤ－Ａ　ＢＣＴに収集して同様にスパイクしたサンプルを用いた試験性能と比較した。性能を、スパイク後３時間、２４時間、４８時間、及び７２時間の時点で試験した。

結果は、本明細書に記載するワークフローで使用するのが好ましいＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブは、ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＣｏｌｏｎＣａｎｃｅｒと適合

性があり、サンプルの７２時間以内の保管の際に腫瘍細胞の検出が可能である（１００％感度）ことを示す（図１９Ａを参照されたい）。さらに、３時間及び２４時間におけるＡＣＤ－Ａ　ＢＣＴに匹敵する結果が得られた（図１９Ｂを参照されたい）。

【０２２６】

７．実施例７：オールフロムワン（ａｌｌ－ｆｒｏｍ－ｏｎｅ）溶液との関係における、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブの、ＣＴＣ富裕化のためのＰａｒｓｏｒｔｉｘ装置との適合性。

実施例２で既に試験した、ＰａｒｓｏｒｔｉｘベースのＣＴＣ（スパイクインモデルとしての、スパイクした腫瘍細胞）検出において、以下の選択肢をさらに評価した：

Ａ．腫瘍細胞の免疫蛍光検出に基づく腫瘍細胞の検出－上皮腫瘍特異的抗原の染色。

Ｂ．トランスクリプトームシグネチャーに基づく、スパイクした腫瘍細胞の検出（ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＡＲ－Ｖ７パネルによるＲＴ－ＰＣＲ）。

Ｐａｒｓｏｎｉｘ装置、ならびに、関連する材料及び方法についてのさらなる情報に関しては、簡潔さのために実施例２を参照する。

【０２２７】

Ａ．腫瘍細胞の免疫蛍光（ＩＦ）検出に基づく腫瘍細胞の検出－上皮腫瘍特異的抗原の染色

Ｐａｒｓｏｒｔｉｘ機器（Ａｎｇｌｅ　ＰＬＣ）は、腫瘍細胞の定量的（ＩＦベースの）検出のための２つのモードを提供する。ＣＴＣ富裕化プログラムの完了後、ＣＴＣ富裕化画分を収集し、約１００μＬの濃縮物として供給する。この濃縮物を、さらなるＩＦ染色及び顕微鏡調査のために顕微鏡スライドに配置する。あるいは、抗体染色を分離カセットで直接行うことができる。後者のアプローチは、回収、遠心分離、及び染色工程によるＣＴＣの潜在的なロスが減少するため、より効率的である。スパイクした腫瘍細胞（５０個のＭＣＦ７細胞）は、ＣＴＣ富裕化画分の回収後、またはカセット内染色のいずれかにおいて、汎サイトケラチンの免疫蛍光染色により検出した（それぞれ、図２０Ａ及び２０Ｂを参照されたい）。スパイクした血液の保管は（カセット内染色においても、回収した細胞においても）細胞の染色性に影響を及ぼさない。スパイクした腫瘍細胞は、あらゆる制限なく染色可能のようである（図２１を参照されたい）。したがって、細胞は容易に富裕化及び染色可能であり、それ故、本明細書に記載するマルチモードワークフローに有用である。

【０２２８】

Ｂ．トランスクリプトームシグネチャーに基づく、スパイクした腫瘍細胞の検出（ＡｄｎａＴｅｓｔ　ＡＲ－Ｖ７パネルによるＲＴ－ＰＣＲ）

ＩＦ染色の代替として、富裕化腫瘍細胞は、そのトランスクリプトームシグネチャーに基づき検出することができる。したがって、富裕化ＣＴＣは、Ｐａｒｓｏｒｔｉｘの実行後に回収され、本明細書で参照される、上述したＡｄｎａＴｅｓｔ　ＰｒｏｓｔａｔｅＣａｎｃｅｒＰａｎｅｌ　ＡＲ－Ｖ７（検出パーツのみ）を使用して検出した。図２２に示すように、ＰＡＸ　ｃｃｆＤＮＡ収集血液サンプルにスパイクし、最大３日（ＴＴＰは日数を示す）保管した細胞が、ＥＤＴＡ収集サンプルにスパイクしたかのように効率的に検出可能である。これらのデータは、ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブと、ＩＦ染色またはＲＴ－ＰＣＲベースアッセイのいずれかによるＣＴＣの富裕化のためのＰａｒｓｏｒｔｉｘ機器との適合性を強調する。

【０２２９】

８．実施例８：ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブで収集した血液サンプルに由来する、循環無細胞ＲＮＡ（ｃｃｆＲＮＡ）、循環無細胞ＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）、及びゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）のマルチモード解析

血液由来の循環無細胞ＤＮＡ（ｃｃｆＤＮＡ）の他に、循環無細胞ＲＮＡ（ｃｃｆＲＮＡ）もまた、バイオマーカー研究のために重要性が高まっている。両方の分析物からの知見を組みあわせると、背景にある分子プロセスの理解が深まると見込まれる。実施例８は、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）ｂｌｏｏｄ　ｃｃｆＤＮＡチューブを用いて収集した１つ

の血液サンプルからの、ｃｃｆＲＮＡ、ｃｃｆＤＮＡ、及びｇＤＮＡのマルチモード抽出及び解析を示し、これにより、本発明に従った有利な安定化組成物がもたらされる。

健常な同意済ドナーからの全血サンプルを、ＰＡＸｇｅｎｅ ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブ（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉＸ）、ＢＤバキュテイナー（登録商標）K_2ＥＤＴＡチューブ（ＢＤ）、無細胞ＤＮＡ ＢＣＴ（登録商標）（Ｓｔｒｅｃｋ（登録商標））、ＲＮＡ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ ＢＣＴ（商標）（Ｓｔｒｅｃｋ）、及び、ＬＢｇａｒｄ（登録商標）血液チューブ（Ｂｉｏｍａｔｒｉｃａ）に収集した。血漿は、採血直後、または、最大３日間の保管後に、二重遠心分離により作製した。図２３に示すように、無細胞核酸を抽出した。

【０２３０】

結果

ＥＤＴＡ及びＰＡＸｇｅｎｅ ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブ中での血液保管後の、血漿からのｃｃｆＲＮＡ収率を、図２４Ａ（ＴＴＰ０における比較）、及び図２４Ｂ（全血保管時の相対倍率変化）に示す。定量的ＰＣＲ解析により、ＰＡＸｇｅｎｅ ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブ及びＥＤＴＡチューブに収集した血液の血漿に由来するｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及びｃｃｆＤＮＡ標的の、同等の収率が明らかとなった。ＰＡＸｇｅｎｅ ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブにおける最大３日間の血液保管後、ＲＮＡ標的（それぞれ、ｅｘｏＲＮｅａｓｙ及びｍｉＲＮｅａｓｙで抽出した、小胞間及び小胞外の両方）は依然として検出可能でありＥＴＤＡよりも安定化が改善された。

安定化チューブ中の血液保管後の、血漿におけるｍｉＲＮＡ収率を図２５Ａ（ＴＴＰ０における比較）、及び図２５Ｂ（全血保管時の相対倍率変化）に示す。保管の３日後におけるＴＴＰ０（０日目）における高いC_T値及び低いＲＮＡ安定化効率により示されるように、ＲＮＡの抽出及び検出感度はホルムアルデヒド放出配合物（Ｓｔｒｅｃｋ及びＢｉｏｍａｔｒｉｃａ）を含有する血液収集管により影響を受けた。

ゲノムＤＮＡの収率及び完全性を図２６に示す。さらに、ＰＡＸｇｅｎｅ Ｂｌｏｏｄ ｃｃｆＤＮＡチューブにより、全血保管３日後の血漿分離後の血液細胞から効率的にｇＤＮＡを抽出することが可能となり、安定したＤＮＡ完全性指標により示されるようにＤＮＡはインタクトであった。対照的に、ｇＤＮＡの収率及び完全性はＳｔｒｅｃｋ ＲＮＡ及びＢｉｏｍａｔｒｉｃａチューブでの収集及び保管により低下した。

【０２３１】

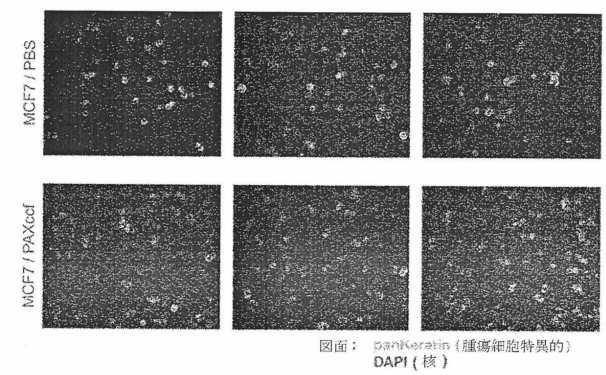
実施例８のマルチモード解析によって提供される結果は、本発明の安定化組成物の非架橋技術は非常に有利であり、単一のサンプルからの、無細胞ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃｃｆＤＮＡ、及びさらに、ゲノム細胞ｇＤＮＡの単離及び解析を可能にすることをさらに示す。加えて、及び、他の実施例により示されるように、ＣＴＣなどの、さらなる希少細胞集団を富裕化及び検出することができる。本発明は、リキッドバイオプシー調査で非常に有用な、有利なマルチモードワークフローを提供することを、データ全体は示す。

【０２３２】

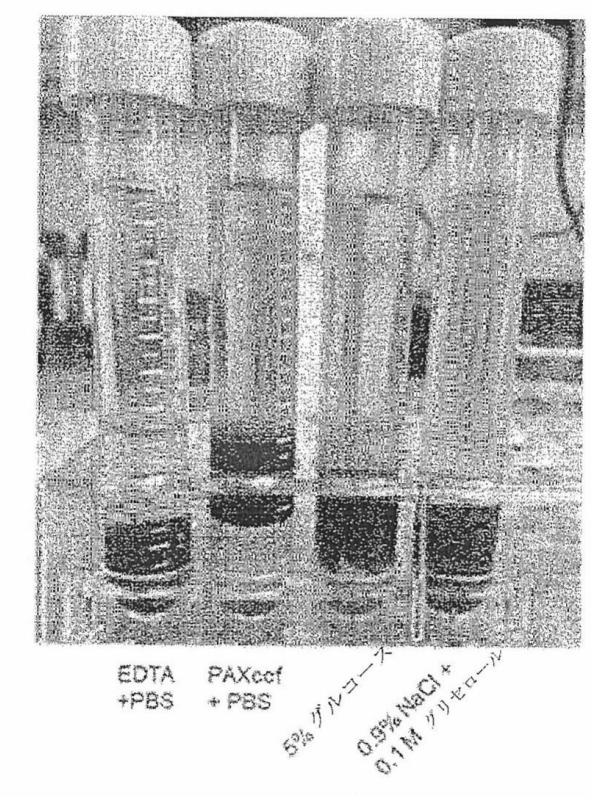
他の安定化技術は、本明細書に含まれる複数の実施例により示されるように、注目する試験標的の全血保管後に、解析効率が損なわれたことを示した。

【図面】

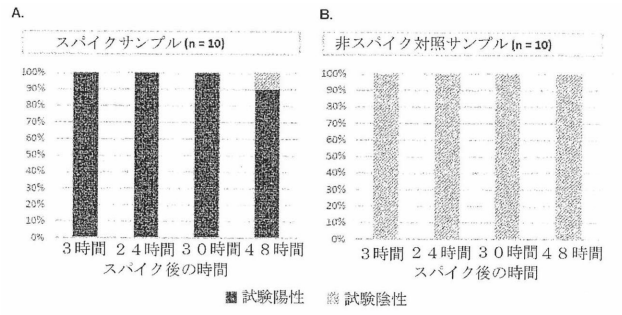
【図１】



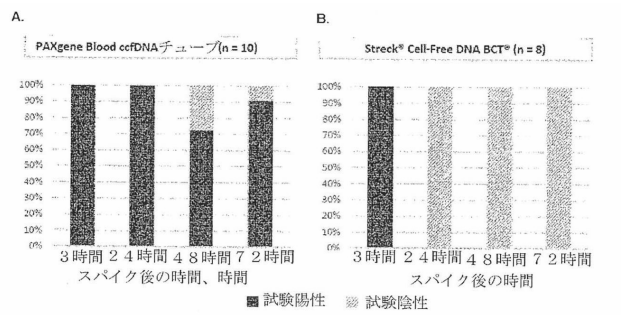
【図２】



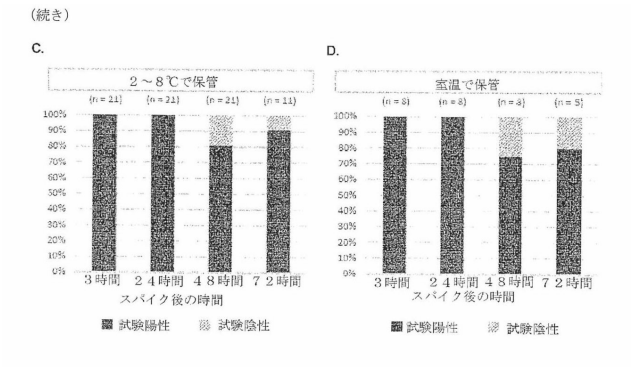
【図３】



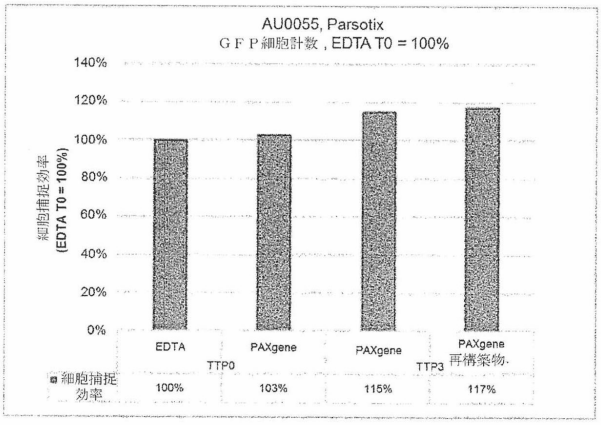
【図４－１】



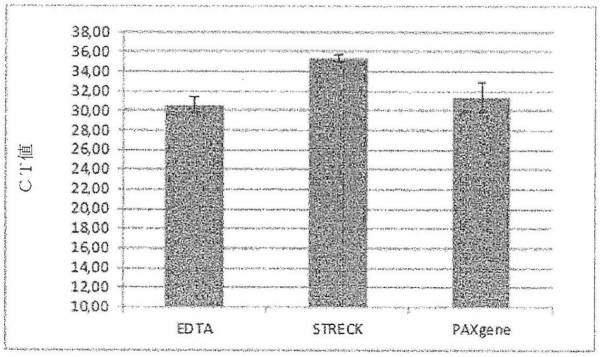
【図４－２】


（続き）
C.
２～８℃で保管
(n = 21)
(n = 21)
(n = 21)
(n = 11)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
３時間
２４時間
４８時間
７２時間
スパイク後の時間
試験陽性
試験陰性
D.
室温で保管
(n = 8)
(n = 8)
(n = 8)
(n = 5)
３時間
２４時間
４８時間
７２時間
スパイク後の時間
試験陽性
試験陰性

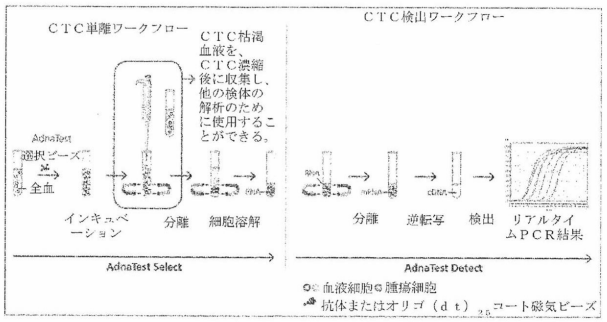
【図５】


AU0055, Parsotix
ＧＦＰ細胞計数，EDTA T0 = 100%
細胞捕捉効率
(EDTA T0 = 100%)
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
EDTA
PAXgene
PAXgene
PAXgene
再構築物.
TTP0
TTP3
細胞捕捉効率
100%
103%
115%
117%

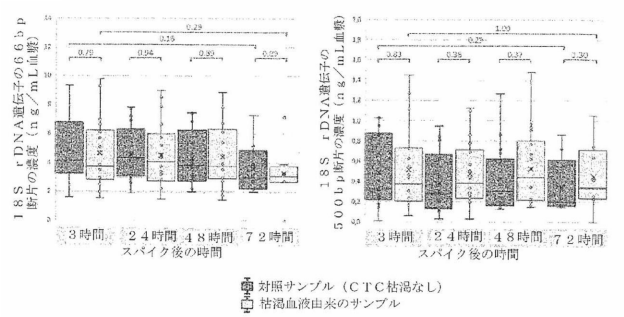
【図６】


CT値
38,00
36,00
34,00
32,00
30,00
28,00
26,00
24,00
22,00
20,00
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
EDTA
STRECK
PAXgene

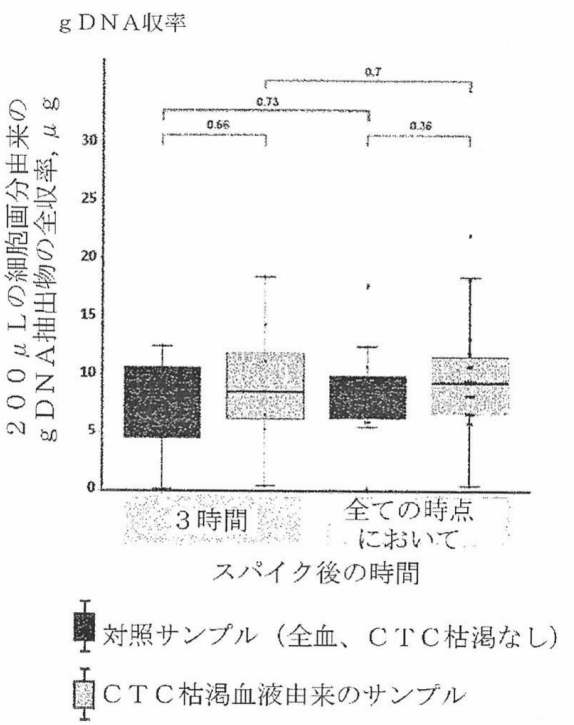
【図７】


ＣＴＣ単離ワークフロー
ＣＴＣ枯渇血液を、ＣＴＣ濃縮後に収集し、他の検体の解析のために使用することができる。
AdnaTest
選択ビーズ
全血
インキュベーション
分離
細胞溶解
AdnaTest Select
ＣＴＣ検出ワークフロー
分離
逆転写
検出
リアルタイムＰＣＲ結果
AdnaTest Detect
血液細胞
腫瘍細胞
抗体またはオリゴ（ｄｔ）
コート磁気ビーズ

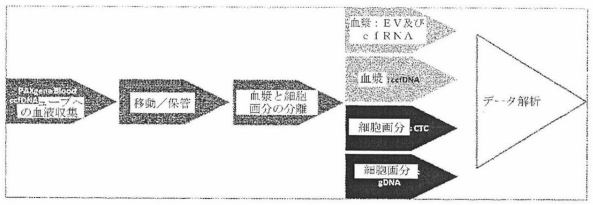
【図８】


18S rDNA遺伝子の66bp断片の濃度（ng／mL血漿）
18S rDNA遺伝子の500bp断片の濃度（ng／mL血漿）
3時間
24時間
48時間
72時間
スパイク後の時間
対照サンプル（CTC枯渇なし）
枯渇血液由来のサンプル

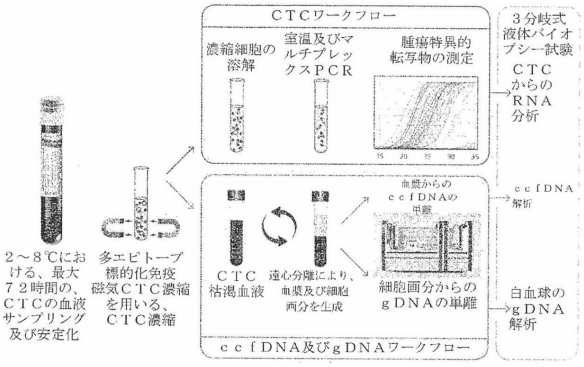
【図９】


gDNA収率
200μLの細胞画分由来のgDNA抽出物の全収率，μg
0.7
0.73
0.66
0.36
3時間
全ての時点において
スパイク後の時間
対照サンプル（全血、CTC枯渇なし）
CTC枯渇血液由来のサンプル

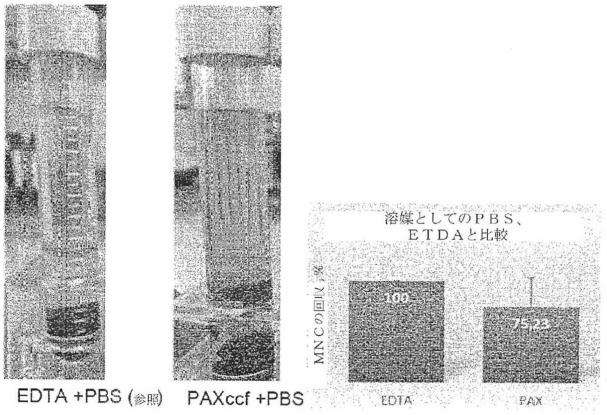
【図１０】


PAXgene Blood DNAチューブへの血液収集
移動／保管
血漿と細胞画分の分離
血漿：EV及びcfRNA
血漿 cfDNA
細胞画分 CTC
細胞画分 gDNA
データ解析

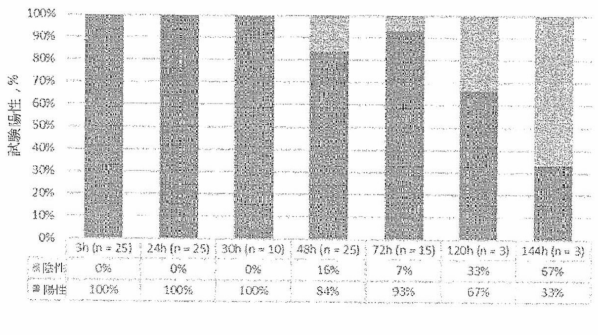
【図１１】


CTCワークフロー
濃縮細胞の溶解
室温及びマルチプレックスPCR
腫瘍特異的転写物の測定
3分岐式液体バイオプシー試験
CTCからのRNA分析
血漿からのcfDNAの単離
cfDNA解析
白血球のgDNA解析
2～8℃における、最大72時間の、CTCの血液サンプリング及び安定化
多エピトープ標的化免疫磁気CTC濃縮を用いる、CTC濃縮
CTC枯渇血液
遠心分離により、血漿及び細胞画分を生成
細胞画分からのgDNAの単離
cfDNA及びgDNAワークフロー

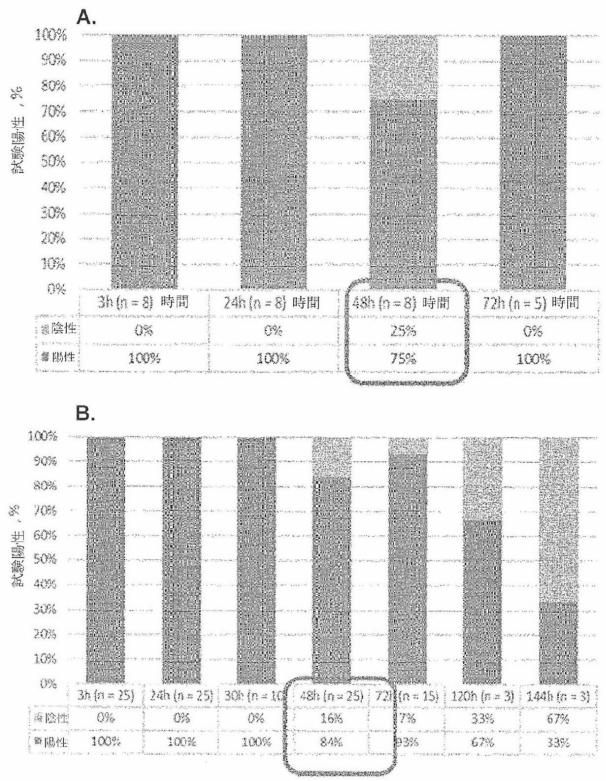
【図１２】



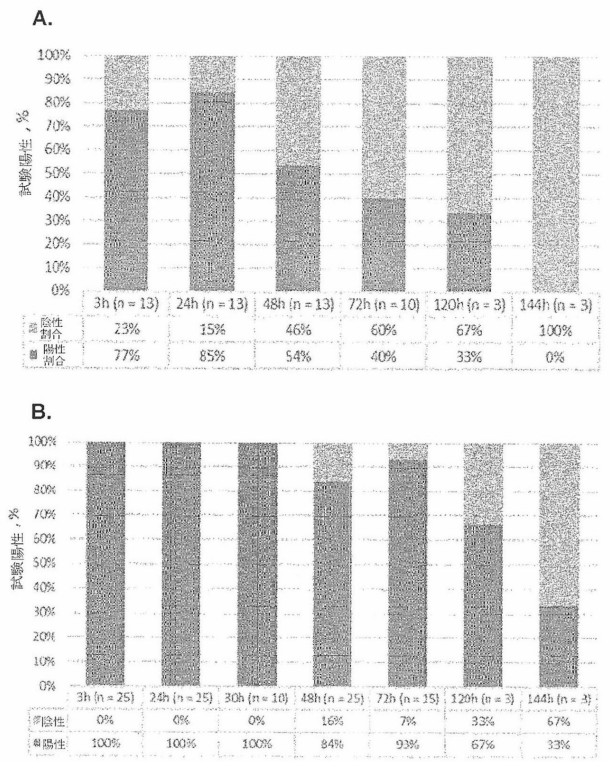
【図１３】



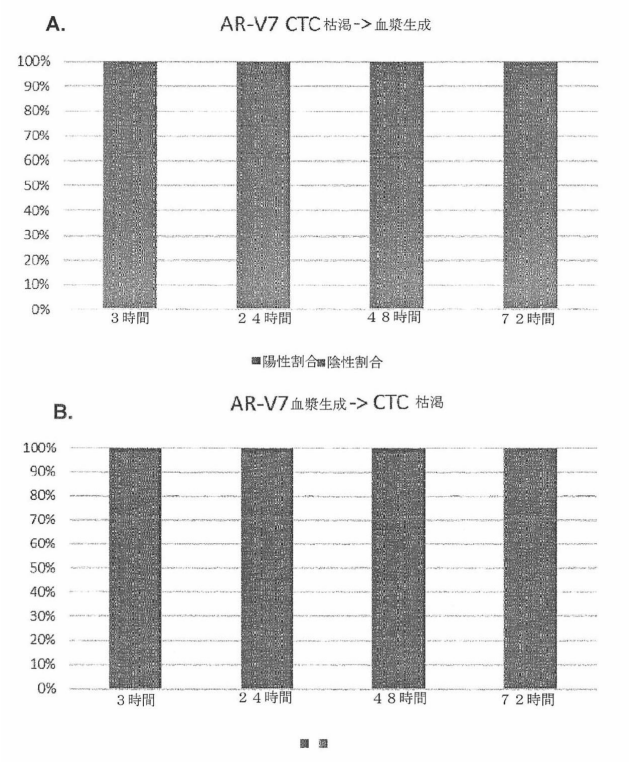
【図１４】



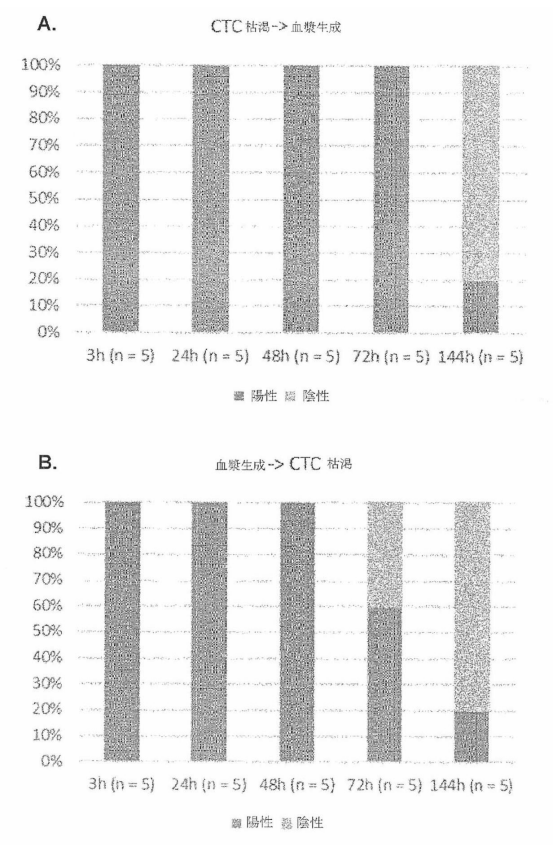
【図１５】



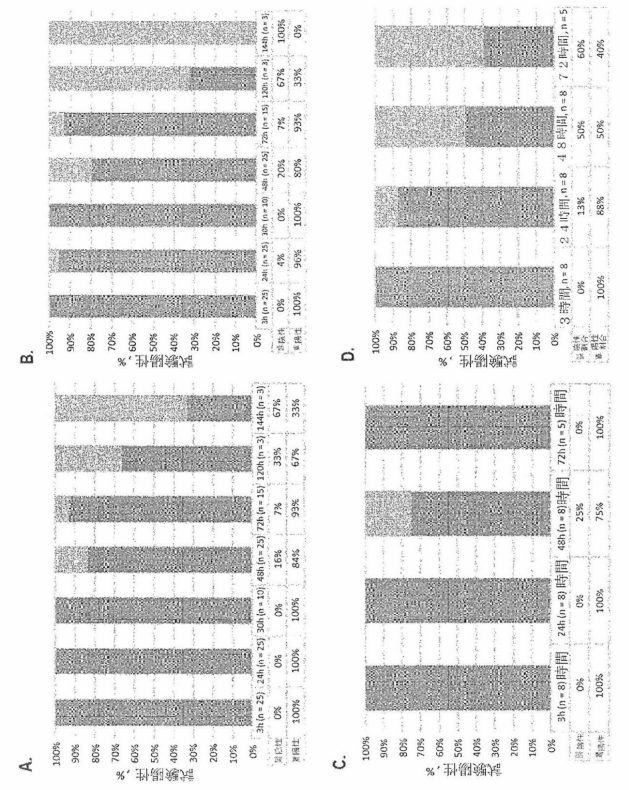
【図１６】



【図１７】

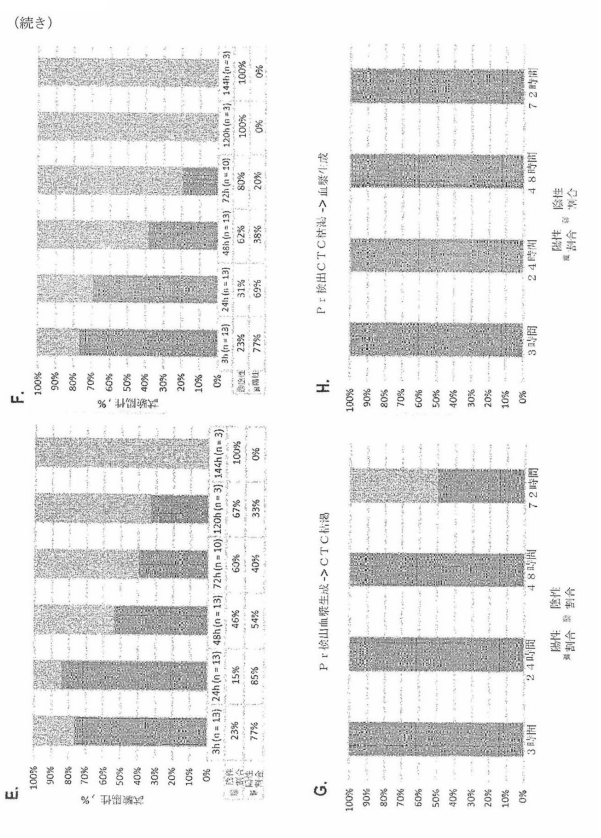


【図１８－１】

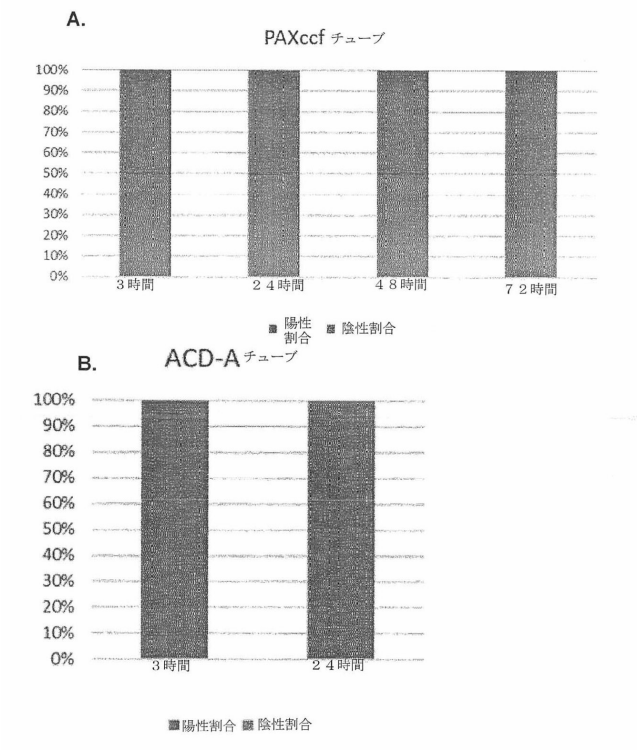


【図１８－２】

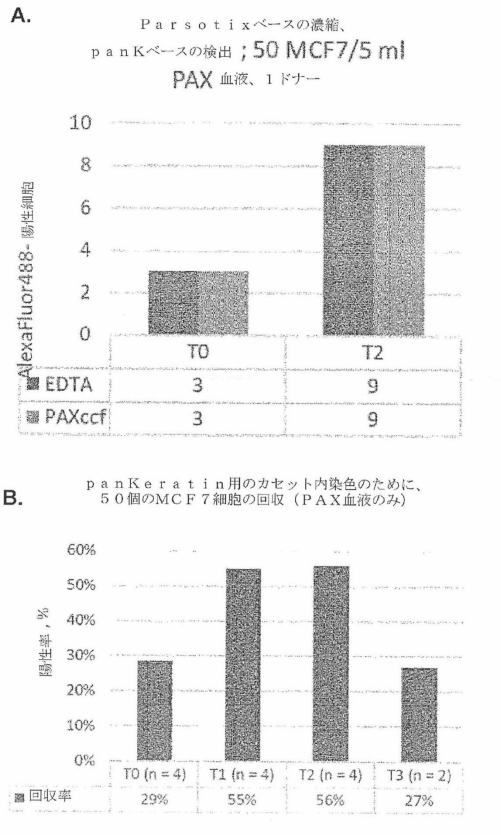
（続き）



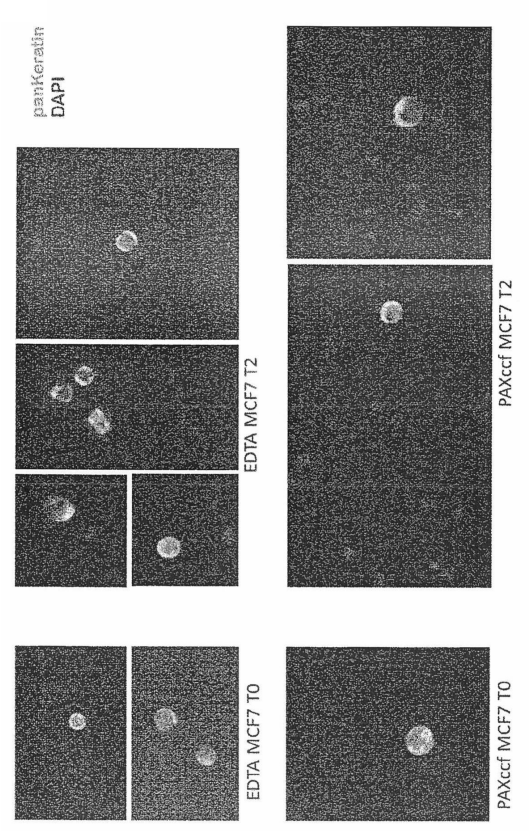
【図１９】



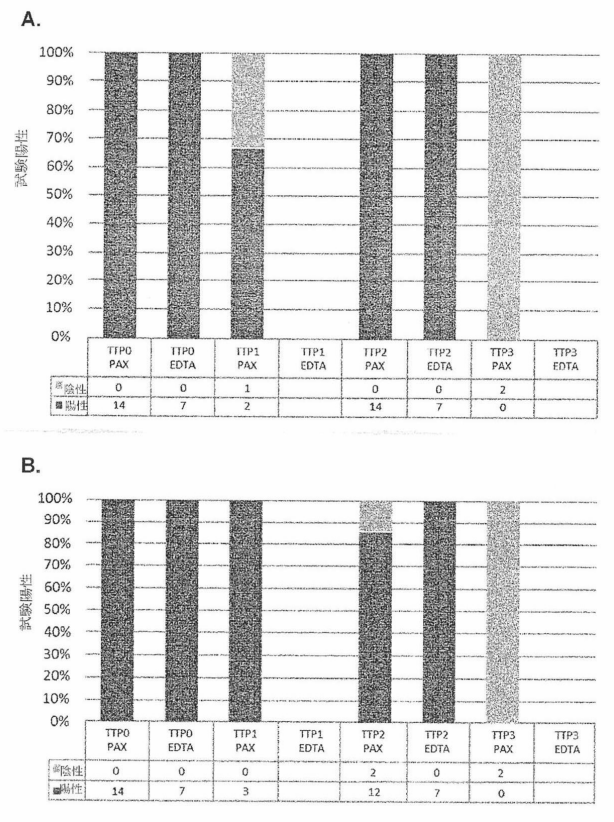
【図２０】



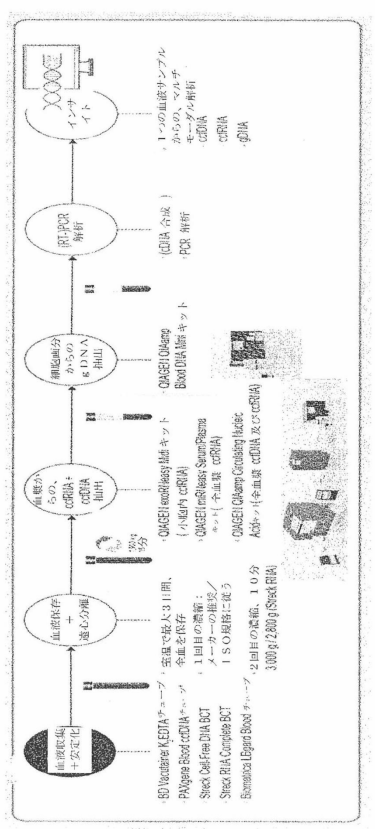
【図２１】



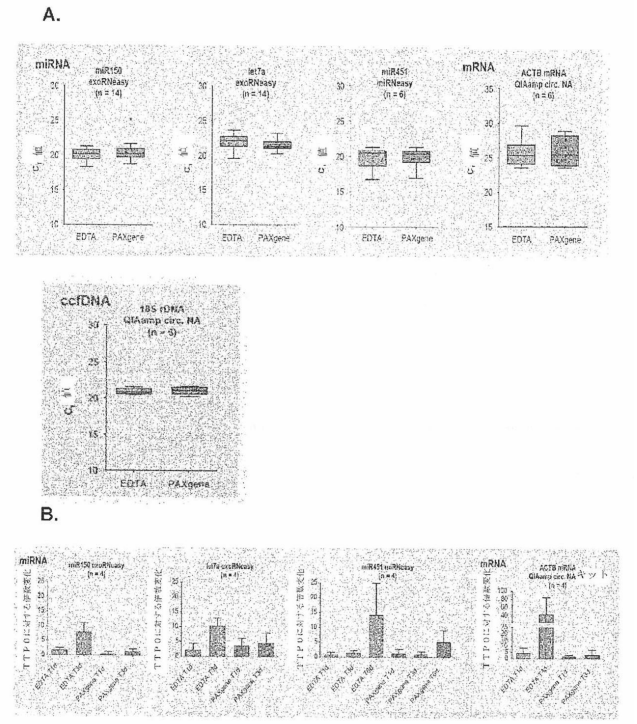
【図２２】



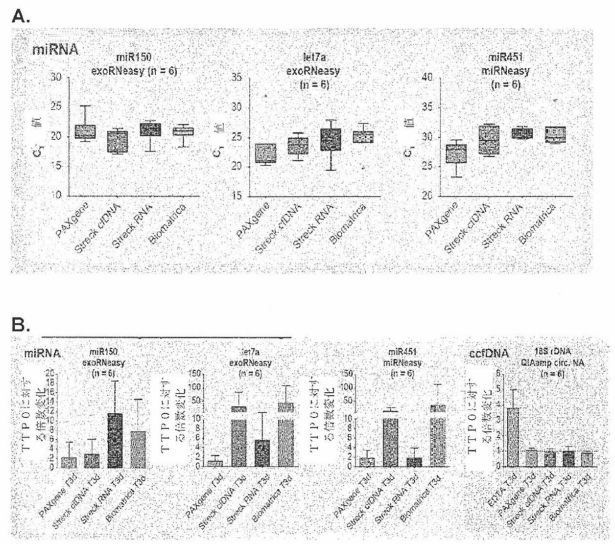
【図２３】



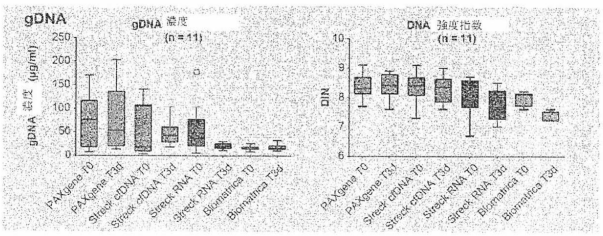
【図２４】



【図２５】



【図２６】



【配列表】

<u>20225487520000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C12Q1/6806
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/146780 A1 (QIAGEN GMBH [DE]) 25 September 2014 (2014-09-25) cited in the application the whole document	1-20
X	WO 2017/085321 A1 (QIAGEN GMBH [DE]) 26 May 2017 (2017-05-26)	1-20
Y	the whole document	21-27
X	WO 2019/079743 A1 (STRECK INC [US]) 25 April 2019 (2019-04-25)	1-20
Y	the whole document	21-27
Y	CN 106 480 017 A (WUHAN HYGEIANEY BIOSCIENCE CO LTD) 8 March 2017 (2017-03-08) the whole document	21-27
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2020	23/12/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Cornelis, Karen

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/076801

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARTIN H.D. NEUMANN ET AL: "ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress", COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 16, 1 January 2018 (2018-01-01), pages 190-195, XP055643681, Sweden ISSN: 2001-0370, DOI: 10.1016/j.csbj.2018.05.002 -----	1-27
A	DANIEL GRÖLZ ET AL: "Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows-Venous Whole Blood and Plasma", CURRENT PATHOBIOLOGY REPORTS, vol. 6, no. 4, 18 October 2018 (2018-10-18), pages 275-286, XP055633239, DOI: 10.1007/s40139-018-0180-z cited in the application -----	1-27
X,P	WO 2020/141187 A1 (QIAGEN GMBH [DE]) 9 July 2020 (2020-07-09) the whole document -----	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/076801

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014146780 A1	25-09-2014	CN 105121643 A	02-12-2015
		CN 105164258 A	16-12-2015
		EP 2976425 A1	27-01-2016
		EP 2976426 A1	27-01-2016
		JP 6407248 B2	17-10-2018
		JP 2016518827 A	30-06-2016
		JP 2016520293 A	14-07-2016
		US 2016281132 A1	29-09-2016
		US 2016281133 A1	29-09-2016
		WO 2014146780 A1	25-09-2014
		WO 2014146782 A1	25-09-2014
WO 2017085321 A1	26-05-2017	CA 3005694 A1	26-05-2017
		CN 108291250 A	17-07-2018
		EP 3377645 A1	26-09-2018
		JP 2019500023 A	10-01-2019
		US 2018312903 A1	01-11-2018
		WO 2017085321 A1	26-05-2017
WO 2019079743 A1	25-04-2019	CA 3079415 A1	25-04-2019
		CN 111372451 A	03-07-2020
		EP 3697209 A1	26-08-2020
		WO 2019079743 A1	25-04-2019
CN 106480017 A	08-03-2017	NONE	
WO 2020141187 A1	09-07-2020	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　市川 さつき
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
弁理士　松田 七重
(74)代理人　100111501
弁理士　滝澤 敏雄
(72)発明者　ババヤン アンナ
ドイツ連邦共和国 ４０７２４ ヒルデン キアゲン シュトラーセ １ キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング内
(72)発明者　ウリウス アンドレア
ドイツ連邦共和国 ４０７２４ ヒルデン キアゲン シュトラーセ １ キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング内
(72)発明者　グレルツ ダニエル
ドイツ連邦共和国 ４０７２４ ヒルデン キアゲン シュトラーセ １ キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング内
(72)発明者　ギュンター カル
ドイツ連邦共和国 ４０７２４ ヒルデン キアゲン シュトラーセ １ キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング内

Ｆターム（参考）　4B063　QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QS08 QS24
4B065　AA90X AA95X CA60