

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7278595号
(P7278595)

(45)発行日 令和5年5月22日(2023.5.22)

(24)登録日 令和5年5月12日(2023.5.12)

(51)国際特許分類

G 0 1 N	33/574 (2006.01)	F I	G 0 1 N	33/574	D Z N A
G 0 1 N	33/53 (2006.01)		G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)		G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N	5/09 (2010.01)		C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)		C 1 2 N	5/09	

請求項の数 26 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-551363(P2019-551363)
(86)(22)出願日	平成30年3月16日(2018.3.16)
(65)公表番号	特表2020-512549(P2020-512549)
	A)
(43)公表日	令和2年4月23日(2020.4.23)
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/056760
(87)国際公開番号	WO2018/167312
(87)国際公開日	平成30年9月20日(2018.9.20)
審査請求日	令和3年2月22日(2021.2.22)
(31)優先権主張番号	17161411.8
(32)優先日	平成29年3月16日(2017.3.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁(EP)

(73)特許権者	514084347 ユニベルシテ リブレ デ ブリュッセル ベルギー 1 0 5 0 ブリュッセル アベ ニュー エフ . デー . ルーズベルト 5 0
(74)代理人	110002860 弁理士法人秀和特許事務所
(72)発明者	プランパン , セドリック ベルギー 1 3 8 0 オヘイン シュマン ドゥ ムーラン 2 9
(72)発明者	ソティロポウロウ , パナギオタ ベルギー 1 9 5 0 クラーイネム プテ イット ノルマンディー 9
(72)発明者	パシュシェンコ , エヴゲーニア ベルギー 1 0 4 0 ブリュッセル ヴァン マルランストラート 5 ピー 1 2

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD 3 2 1マーカーの発現に基づく循環腫瘍細胞の検出、定量化、及び / 又は単離

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象由来の生体試料中の循環腫瘍細胞 (C T C) を検出又は定量化するための方法であつて、前記生体試料中の循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現を検出することを含み、循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現により、前記細胞が循環腫瘍細胞であると同定されることを含み、

前記対象がヒトである、方法。

【請求項 2】

前記生体試料から前記 C D 3 2 1 を発現する C T C を単離することを更に含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記生体試料が、対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は別の滲出液若しくは分泌液由來の循環細胞を含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記循環細胞が、対象の末梢血由来である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

循環 C D 3 2 1 陽性腫瘍細胞が、前記細胞による、少なくとも 1 つの汎白血球マーカー及び少なくとも 1 つの血小板マーカーの発現の不存在により非造血性であると同定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

a) 前記対象由来の生体試料を提供することであって、前記生体試料は、前記対象由來の循環細胞、好ましくは対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は別の滲出液若しくは分泌液由來の循環細胞、より好ましくは対象の末梢血由來の循環細胞を含むこと、

b) 前記生体試料において、少なくとも1つの汎白血球マーカーに対して陰性であり、かつ少なくとも1つの血小板マーカーに対して陰性である非造血細胞を検出すること、

c) b)で検出される前記細胞によるCD321の発現を検出することであって、b)で検出される細胞によるCD321の発現により、前記細胞が循環腫瘍細胞であると同定されること、

を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

a) 前記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

b) 前記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

c) 前記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、前記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

d) 前記汎白血球マーカーがCD45であり、

e) 前記血小板マーカーがCD42aであり、又は、

f) 前記汎白血球マーカーがCD45であり、前記血小板マーカーがCD42aである、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記腫瘍が、上皮、間葉、又はメラニン細胞由來である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記CD321の発現を検出することが、CD321タンパク質若しくはCD321mRNA又は両方を検出することを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記CTCが、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を使用する技術を使用して検出、定量化、又は単離される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記技術が、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、をさらに使用する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記1つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

前記CTCが、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合せからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記単離されたCTC、その溶解物、又はその1つ以上の腫瘍抗原を腫瘍ワクチンに製剤化することをさらに含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記腫瘍ワクチンが樹状細胞をさらに含む、請求項15に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

前記単離された C T C を生化学分析、突然変異分析、トランスクリプトーム分析、及び / 又はプロテオーム分析に供することをさらに含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

対象における新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための方法であって、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって前記対象における C T C を検出又は定量化することを含む、方法。

【請求項 19】

対象における新生物疾患の転移能を決定するための方法であって、前記新生物疾患が転移能を有すると同定するために、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって前記対象における C T C を検出又は定量化することを含む、方法。 10

【請求項 20】

対象における新生物疾患の再発を決定するための方法であって、前記新生物疾患が再発したと同定するために、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって前記対象における C T C を検出又は定量化することを含む、方法。

【請求項 21】

対象が抗癌療法を必要としているかどうかを決定するための方法であって、前記対象が抗癌療法を必要としていると同定するために、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって前記対象における C T C を検出又は定量化することを含む、方法。 20

【請求項 22】

新生物疾患を有する対象における抗癌療法の有効性を決定するための方法であって、療法中又は療法後の前記対象における C T C の量が療法前と比較して低下したことにより、前記療法が有効であると同定するために、療法前及び療法中又は療法後に請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって前記対象における C T C を検出又は定量化することを含む、方法。

【請求項 23】

- a) - C D 3 2 1 に特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、
 - 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品、
- b) - C D 3 2 1 に特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、
 - 少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品、又は
- c) - C D 3 2 1 に特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、
 - 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、
 - 少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品

からなる群から選択される、部品のキット又は製造品。

【請求項 24】

- a) 前記汎白血球マーカーが、 C D 4 5 、 L S P 1 、 C D 4 8 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、
- b) 前記血小板マーカーが、 C D 3 6 、 C D 4 1 、 C D 4 2 a 、 C D 4 2 b 、 C D 6 1 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され
- c) 前記汎白血球マーカーが、 C D 4 5 、 L S P 1 、 C D 4 8 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、前記血小板マーカーが、 C D 3 6 、 C D 4 1 、 C D 4 2 a 、 C D 4 2 b 、 C D 6 1 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、
- d) 前記汎白血球マーカーが C D 4 5 であり、
- e) 前記血小板マーカーが C D 4 2 a であり、又は
- f) 前記汎白血球マーカーが C D 4 5 であり、前記血小板マーカーが C D 4 2 a である、請求項 2 3 に記載の部品のキット又は製造品。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

前記1つ以上の作用因子が、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術における使用のために構成される、請求項23又は24に記載の部品のキット又は製造品。

【請求項 26】

前記1つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアブタマーである、請求項23～25のいずれか一項に記載の部品のキット又は製造品。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0001】**

本発明は、対象における腫瘍細胞、より特定的には循環腫瘍細胞（C T C）を検出、定量化、又は単離するための方法と、新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための関連する方法と、そのような方法を行うのに有用な部品のキットと、に関する。

【背景技術】**【0002】**

腫瘍細胞の検出、定量化、又は単離は、対象における新生物疾患の特徴付け、診断、予後、又はモニタリングの助けになり得る。単離された腫瘍細胞はまた、新生物疾患の研究及び腫瘍ワクチンの調製のための貴重なツールも提供する。

20

【0003】

原発腫瘍を離れて循環に入る腫瘍細胞は、循環腫瘍細胞（C T C）として知られている。C T Cの一部は、遠位部位に侵入し、肝臓、骨、肺などの第2の臓器中で播種性腫瘍細胞（D T C）として留まることができ、D T Cの一部は転移へと進行することができる。循環中の腫瘍細胞の検出、定量化、又は単離は、癌疾患の管理にとって非常に重要であり、癌の進行、治療に対する反応、及び転移能を追跡するための低侵襲性手段を提供する。

【0004】

上皮細胞接着分子（E p C A M）は、現在、C T Cを同定するために使用される標準的なマーカーである。例えば、市販のV e r i d e x C e l l S e a r c h（登録商標）C T C アッセイは、抗E p C A M抗体に結合した磁性粒子を使用して、血液からC T Cを捕捉する。濃縮された細胞は、有核細胞を同定するための核酸色素であるD A P I、上皮由来の細胞を同定するためのフィコエリスリン（P E）に結合した抗サイトケラチン抗体、及びすべての白血球を同定するためのアロフィコシアニン（A P C）に結合した抗白血球抗体で染色される。試料は、C T Cの計数のためにC e l l T r a c k s A n a l y z e r I I（登録商標）で分析される。

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明は、腫瘍細胞、特に、循環腫瘍細胞（C T C）を検出、定量化、又は単離するための代替方法及び／又は改善された方法、特に、対象における新生物疾患の特徴付け、診断、予後、又はモニタリングのための代替方法及び／又は改善された方法を考案する必要性に対処するものである。

40

【0006】

本発明の特定の代表的な実施形態を説明する実験セクションにより裏付けられるように、本発明者らは、腫瘍及びC T Cの検出に使用されるE p C A M又はケラチンなどの従来のマーカーが、実際には癌細胞の亜集団（s u b p o p u l a t i o n）によってのみ発現されることを実証した。その結果として、そのような従来のマーカーに基づく腫瘍細胞及びC T C検出方法は、腫瘍細胞又はC T Cの存在を検出できない可能性があり、あるいは試料中の腫瘍細胞又はC T Cの量を少なくとも著しく過小評価する可能性がある。同様に、そのような従来のマーカーに基づくインサイチュー検出方法は、腫瘍の完全かつ正確

50

な視覚化を提供できない可能性がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、多数の癌細胞株、患者由来の異種移植片、及び原発腫瘍の広範な分析を行って、CD321が癌細胞によって広く発現され、EpCAM又はケラチン-14などの古典的なマーカーよりも普遍的に発現されることを同定した。したがって、例示的な腫瘍におけるすべてのEpCAM陽性細胞及びケラチン-14陽性細胞がCD321を共発現したのに対して、かなりの割合の腫瘍細胞がCD321を発現したがEpCAM及びケラチン-14を発現しなかった。さらに、本発明者らは、CTCにおけるEpCAMの発現が頻繁に失われ、かなりより変動しやすかったのに対し、CTCにおけるCD321の発現が確実に維持されたことを実証した。したがって、有利なことに、CD321によって、腫瘍細胞、より特定的にはCTCの同定がそれらの上皮間葉転換(EMT)状態とは無関係に可能となり、このことは、EpCAMなどの上皮マーカー、間葉マーカー、又は特定のEMTマーカーのみの使用と比較して、CD321をより信頼できる及び/又は癌細胞及び特にCTCの高感度のマーカーとして位置づけるものである。

【0008】

したがって、本発明者らのデータにより、CD321が腫瘍細胞、より特定的には固形腫瘍細胞の実質的に普遍的又は包括的なマーカーとして、特にCTCの検出及び癌のインサイチュー検出のための信頼できるマーカーとして同定された。

【0009】

したがって、一態様では、本発明は、対象由来の生体試料中の腫瘍細胞を検出又は定量化する方法であって、生体試料中の腫瘍細胞によるCD321の発現を検出することを含む方法を提供する。

【0010】

さらなる態様は、対象由来の生体試料から腫瘍細胞を単離するための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞によるCD321の発現を検出することと、生体試料からCD321を発現する腫瘍細胞を単離することと、を含む方法を提供する。

【0011】

別の態様は、対象由来の生体試料中の循環腫瘍細胞(CTC)を検出又は定量化するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞によるCD321の発現を検出することを含み、循環非造血細胞によるCD321の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定される、方法を提供する。

【0012】

さらなる態様は、対象由来の生体試料から循環腫瘍細胞(CTC)を単離するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞によるCD321の発現を検出することを含み、循環非造血細胞によるCD321の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定され、生体試料からCD321を発現するCTCを単離すること、を含む方法を提供する。

【0013】

さらなる態様は、対象における腫瘍細胞又はCTCを検出又は定量化するための上記の方法を含む方法、特に、

- 対象における新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための方法、
- 対象における新生物疾患の転移能を決定する方法であって、対象における腫瘍細胞又はCTCの存在により、新生物疾患が転移能を有すると同定される、方法、
- 対象における新生物疾患の再発を決定するための方法であって、対象における腫瘍細胞又はCTCの存在により、新生物疾患が再発したと同定される、方法、
- 対象が抗癌療法を必要としているかどうかを決定するための方法であって、対象における腫瘍細胞又はCTCの存在により、対象が抗癌療法を必要としていると同定される、方法、又は

- 新生物疾患有する対象における抗癌療法の有効性を決定するための方法であって、療法前及び療法中又は療法後に対象における腫瘍細胞又はCTCを検出又は定量化すること

10

20

30

40

50

を含み、療法中又は療法後の対象における腫瘍細胞又はC T Cの量が療法前と比較して低下したことにより、上記療法が有効であると同定される、方法を提供する。

【0014】

本明細書で教示される方法を実施するのに有用な部品のキットも提供される。

【0015】

したがって、一態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子(*agent*)と、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品に関する。

【0016】

別の態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、を含む部品キット又は製造品に関する。

10

【0017】

さらに別の態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品に関する。

【0018】

別の態様において、対象における腫瘍の*in situ*画像化のための方法であって、CD321に特異的に結合することができる作用因子を対象に投与することを含み、上記作用因子が画像診断装置(*imaging modality*)によって検出可能な標識を含み、腫瘍細胞によって発現されるCD321に上記作用因子が特異的に結合することを可能にし、上記画像診断装置を使用して対象における腫瘍を視覚化する、方法を提供する。

20

【0019】

本発明のこれらの態様及びさらなる態様並びに好ましい実施形態は、以下のセクション及び添付の特許請求の範囲に記載されている。添付の特許請求の範囲の主題は、これにより本明細書に具体的に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

30

【図1】図1は、CD321が細胞株、患者由来の異種移植片(PDX)、及び原発腫瘍で均一に発現されることを示している。A.類表皮癌(A431)、肺扁平上皮癌(SK MES)、及び乳腺癌(HCC1937、MCF7、MBA-MD-436)由来の細胞株は、高レベルのCD321を均一に発現した(塗りつぶしたヒストグラム)が、成人の皮膚線維芽細胞はCD321を発現しなかった。FACSプロットは、単一の生細胞でゲーティングした(gated)。空のヒストグラムは、アイソタイプ対照による染色を示している。B.皮膚(SP12 PI)、肺(L28 PI)、頭頸部(HNA7 PI及びHN8 PI)、及び食道癌(EH2 PI)由来の第1継代での患者由来異種移植片は、CD321を均一に発現した(塗りつぶしたヒストグラム)。FACSプロットは、マウス及びヒト由來の免疫細胞及び内皮細胞を排除した後、生細胞でゲーティングした。空のヒストグラムは、アイソタイプ対照による染色を示している。C.肺癌(L31)及び食道癌(EMS4)由来のヒト原発腫瘍におけるCD321の発現。プロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングした。

40

【図2A】図2Aは、CD321が、古典的な上皮マーカーEpCAMと比較してより高い感度で腫瘍細胞を標識することを示している。皮膚癌の原発腫瘍由来のCD321+EpCAM+腫瘍細胞及びCD321+EpCAM-腫瘍細胞の代表的なFACSプロット(上のパネル)及びそれぞれの定量化(下のパネル)。癌細胞を同定するのに一般に使用される古典的な上皮マーカーEpCAMは、常にCD321と共に局在したが、CD321は、すべての場合において非常に多く多数の細胞を標識し、このことは、CD321が古

50

典型的な上皮細胞マーカー E p C A M よりも高感度で腫瘍細胞を検出できることを実証している。プロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングした。

【図 2 B】図 2 B は、C D 3 2 1 が、古典的な上皮マーカー E p C A M と比較してより高い感度で腫瘍細胞を標識することを示している。肺癌の原発腫瘍由来の C D 3 2 1 + E p C A M + 腫瘍細胞及び C D 3 2 1 + E p C A M - 腫瘍細胞の代表的な F A C S プロット（上のパネル）及びそれぞれの定量化（下のパネル）。癌細胞を同定するのに一般に使用される古典的な上皮マーカー E p C A M は、常に C D 3 2 1 と共に局在したが、C D 3 2 1 は、すべての場合において非常に多く多数の細胞を標識し、このことは、C D 3 2 1 が古典的な上皮細胞マーカー E p C A M よりも高感度で腫瘍細胞を検出できることを実証している。プロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングした。

【図 2 C】図 2 C は、C D 3 2 1 が、古典的な上皮マーカー E p C A M と比較してより高い感度で腫瘍細胞を標識することを示している。頭頸部癌の原発腫瘍由来の C D 3 2 1 + E p C A M + 腫瘍細胞及び C D 3 2 1 + E p C A M - 腫瘍細胞の代表的な F A C S プロット（上のパネル）及びそれぞれの定量化（下のパネル）。癌細胞を同定するのに一般に使用される古典的な上皮マーカー E p C A M は、常に C D 3 2 1 と共に局在したが、C D 3 2 1 は、すべての場合において非常に多く多数の細胞を標識し、このことは、C D 3 2 1 が古典的な上皮細胞マーカー E p C A M よりも高感度で腫瘍細胞を検出できることを実証している。プロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングした。

【図 3】図 3 は、C D 3 2 1 が、古典的な上皮マーカーであるケラチン - 14 よりも高感度での腫瘍細胞の同定を可能にすることを示している。頭頸部、肺、及び皮膚の腫瘍切片についての C D 3 2 1 及びケラチン - 14 の代表的な免疫蛍光画像。ケラチン - 14 は常に C D 3 2 1 と共に局在したが、C D 3 2 1 はより多くの割合の癌細胞で発現したことに留意すべきである。

【図 4 A】図 4 A は、C D 3 2 1 が、上皮間葉転換（E M T）状態とは無関係に腫瘍細胞の同定を可能とすることを示している。原発性肺 S C C 由来の腫瘍上皮細胞（C D 3 2 1 + E p C A M +、ゲート P 5）及び腫瘍間葉細胞（C D 3 2 1 + E p C A M -、ゲート P 6）の単離に使用される F A C S 戦略。腫瘍細胞は、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後に選択されたことに留意すべきである。

【図 4 B】図 4 B は、C D 3 2 1 が、上皮間葉転換（E M T）状態とは無関係に腫瘍細胞の同定を可能とすることを示している。それぞれの集団の R N A 配列決定により推定される、図 4 A に記載のようにして F A C S 選別された（これらの亜集団を単離するための F A C S 戦略は、免疫内皮細胞及び大部分の癌関連線維芽細胞の排除後に、単一の生細胞でゲーティングすることであった）C D 3 2 1 + E p C A M - 腫瘍細胞及び C D 3 2 1 p + E p C A M + 腫瘍細胞で発現された遺伝子の相対的発現。

【図 4 C】図 4 C は、C D 3 2 1 が、上皮間葉転換（E M T）状態とは無関係に腫瘍細胞の同定を可能とすることを示している。それぞれの集団の R N A 配列決定により推定される、図 4 A に記載のようにして F A C S 選別された（これらの亜集団を単離するための F A C S 戦略は、免疫内皮細胞及び大部分の癌関連線維芽細胞の排除後に、単一の生細胞でゲーティングすることであった）C D 3 2 1 + E p C A M - 腫瘍細胞及び C D 3 2 1 p + E p C A M + 腫瘍細胞で発現された遺伝子の相対的発現。

【図 5 A】図 5 A は、C D 3 2 1 が、E p C A M よりも高感度での循環腫瘍細胞（C T C）の同定を可能にすることを示している。正常なドナー及び乳癌又は肺癌を有する患者の末梢血の C D 3 2 1 及び E p C A M 染色の代表的な F A C S プロット。免疫細胞及び血小板を排除した後、プロットを単一の生細胞でゲーティングした。E p C A M + 細胞は、常に C D 3 2 1 + であったが、C D 3 2 1 は、E p C A M がマークしていない追加の細胞も標識したことに留意すべきである。

【図 5 B】図 5 B は、C D 3 2 1 が、E p C A M よりも高感度での循環腫瘍細胞（C T C）

10

20

30

40

50

)の同定を可能にすることを示している。ヒトCD321(マウス細胞を認識しない)により染色された、ヒト肺多形癌腫が移植されたマウス(黒色の列)又は移植されていないマウス(白色の列)の末梢血及び肺組織における腫瘍細胞の存在を示すヒストグラム。ヒト由来の癌循環細胞及び肺における転移の両方を検出するCD321免疫染色の能力に留意すべきである。

【図6-1】図6-1は、CD321が、細胞株、患者由来の異種移植片(PDX)、及び原発腫瘍で均一に発現されることを示している。a、アイソタイプ対照及び成人皮膚線維芽細胞は、CD321に対して陰性染色を示す。b～d、結腸直腸癌細胞株(b)、乳癌細胞株(c)、及び肺癌細胞株(d)は、高レベルのCD321を均一に発現する(塗りつぶしたヒストグラム)。FACSプロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングされる。空のヒストグラムは、アイソタイプ対照による染色を示している。

【図6-2】図6-2は、CD321が、細胞株、患者由来の異種移植片(PDX)、及び原発腫瘍で均一に発現されることを示している。e、f、メラノーマ細胞株は、CD321を低レベルで均一に発現する。g、子宮内膜癌細胞株、食道癌細胞株、外陰癌細胞株、及び皮膚癌細胞株は、高レベルのCD321を均一に発現する。FACSプロットは、単一の生細胞でゲーティングされる。FACSプロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングされる。空のヒストグラムは、アイソタイプ対照による染色を示している。

【図6-3】図6-3は、CD321が、細胞株、患者由来の異種移植片(PDX)、及び原発腫瘍で均一に発現されることを示している。h、異なるタイプの癌由来の第1継代での患者由来異種移植片は、CD321を均一に発現する(塗りつぶされたヒストグラム)。FACSプロットは、マウス及びヒト由来の免疫細胞及び内皮細胞を排除した後、生細胞でゲーティングされる。i、原発性肺癌及び食道癌は、高レベルのCD321を発現する(塗りつぶしたヒストグラム)。FACSプロットは、免疫細胞及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でゲーティングされる。空のヒストグラムは、アイソタイプ対照による染色を示している。

【図7】図7は、CD321が、古典的な上皮マーカーEpCAMと比較してより高感度で腫瘍細胞を標識することを示している。a～c、肺癌及び頭頸部癌の代表的なFACSプロット。CD321+EpCAM+腫瘍細胞及びCD321+EpCAM-腫瘍細胞の存在を示す、肺癌及び頭頸部癌の代表的なFACSプロット。これは、CD321が古典的な上皮細胞マーカーEpCAMよりも高感度で腫瘍細胞を検出できることを示している。免疫及び内皮細胞並びに大部分の癌関連線維芽細胞を排除した後、単一の生細胞でプロットをゲーティングする。d、CD321+EpCAM+腫瘍細胞及びCD321+EpCAM-腫瘍細胞の存在を示す、肺癌患者由来の異種移植片の代表的な免疫蛍光画像。

【図8-1】図8-1は、CD321が、ヒト対象における循環腫瘍細胞(CTC)の高感度の同定を可能にすることを示している。a、正常なヒトドナー並びに乳癌、肺癌、及び結腸直腸癌を有するヒト患者におけるCD321+循環腫瘍細胞数を示すドットプロット。平均±SEM。CD321+循環腫瘍細胞は、赤血球の溶解並びに免疫細胞及び血小板の排除後に、単一の生細胞でのゲーティングで計数された。b、正常なヒトドナー並びに異なる病期の肺癌を有するヒト患者におけるCD321+循環腫瘍細胞の数を示すドットプロット、これは循環CD321+細胞数と病期との間の強い相関関係を示している。平均±SEM。CD321+循環腫瘍細胞は、赤血球の溶解並びに免疫細胞及び血小板の排除後に、単一の生細胞でのゲーティングで計数された。CD321+循環腫瘍細胞は、赤血球の溶解並びに免疫細胞及び血小板の排除後に、単一の生細胞でのゲーティングで計数された。

【図8-2】図8-2は、CD321が、ヒト対象における循環腫瘍細胞(CTC)の高感度の同定を可能にすることを示している。c、抗癌療法前後の進行乳癌を有するヒト患者におけるCD321+循環腫瘍細胞数を示すドットプロット、これはCD321+循環腫瘍細胞数と療法に対する反応との相関関係を示している。CD321+循環腫瘍細胞は

10

20

30

40

50

、赤血球の溶解並びに免疫細胞及び血小板の排除後に、単一の生細胞でのゲーティングで計数された。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、単数及び複数の指示対象の両方を含む。

【0022】

本明細書で使用される「含む (comprising)」、「含む (comprise)」、及び「から構成される (comprised of)」との用語は、「含む (including)」、「含む (include)」、又は「含む (containing)」、「含む (contain)」と同義であり、包含的又は開放型であり、追加の、記載されていないメンバー、要素、又は方法の工程を除外するものではない。この用語はまた、「からなる」及び「から本質的になる」も包含し、これらは特許用語において確立された意味を享受する。10

【0023】

端点による数値範囲の記載は、それぞれの範囲内に含まれるすべての数及び分数並びに記載された端点を含む。

【0024】

本明細書で使用される「約」又は「およそ」との用語は、パラメーター、量、一時的な時間などの測定可能な値を指す場合、特定の値からの変動、例えば、特定の値の及び特定の値からの+/-10%以下、好ましくは+/-5%以下、より好ましくは+/-1%以下、さらにより好ましくは+/-0.1%以下の変動を、包含することを意味し、その限りにおいてそのような変動は開示された発明において適切に機能する。修飾語「約」が指す値自体も、具体的にかつ好ましく開示されていると理解されたい。20

【0025】

「1つ以上」又は「少なくとも1つ」との用語、例えば、1つ以上のメンバー又はメンバー群のうちの少なくとも1つのメンバーは、それ自体明確であるが、さらなる例示により、この用語は、特に、上記メンバーのうちのいずれか1つへの言及、又は上記メンバーのうちのいずれかの2つ以上、例えば、上記メンバーのうちの3以上、4以上、5以上、6以上又は7以上など、及び最大ですべての上記メンバーを包含する。別の例では、「1つ以上」又は「少なくとも1つ」は、1、2、3、4、5、6、7又はそれ以上を指し得る。30

【0026】

本明細書における本発明の背景の議論は、本発明の文脈を説明するために含まれる。これは、言及される資料のいずれかが、特許請求の範囲のいずれかの優先日時点でいずれかの国において公開され、公知であり、又は一般常識の一部であったことを認めるものではない。

【0027】

本開示全体を通して、様々な公開公報、特許、及び公開された特許明細書が、識別し得る引用文献によって参照される。本明細書で引用されるすべての文書は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特に、本明細書で具体的に言及されるそのような文書の教示又はセクションは、参照により組み込まれる。40

【0028】

別に定義しない限り、技術用語及び科学用語を含む、本発明を開示す際に使用されるすべての用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。さらなるガイダンスにより、本発明の教示をより良く理解するために用語の定義が含まれる。本発明の特定の態様又は本発明の特定の実施形態に関連して特定の用語が定義される場合、そのような含意は、別に定義されない限り、本明細書全体にわたって、すなわち本発明の他の態様又は実施形態の文脈においても適用されることを意味する。

【0029】

10

20

30

40

50

以下の節では、本発明の異なる態様又は実施形態がより詳細に定義される。そのように定義された各態様又は実施形態は、そうでないことが明確に示されない限り、任意の他の態様又は実施形態と組み合わせることができる。特に、好ましい又は有利であると示されている任意の特徴は、好ましい又は有利であると示されている任意の他の特徴と組み合わせることができる。

【 0 0 3 0 】

本明細書全体にわたる「一実施形態」、「実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、又は特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な場所における「一実施形態では」又は「実施形態では」という語句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態を指しているわけではないが、その場合もある。さらに、特定の特徴、構造、又は特性は、本開示から当業者に明らかのように、1つ以上の実施形態では、任意の適切な方法で組み合わせることができる。さらに、本明細書に記載されるいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれるいくつかの特徴を含むが他の特徴を含まない一方で、異なる実施形態の特徴の組み合わせは、本発明の範囲内であり、当業者によって理解されるように異なる実施形態を形成することを意味する。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求の範囲に記載される実施形態のいずれかを任意の組み合わせで使用することができる。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の特定の代表的な実施形態を示す実験セクションで裏付けられるように、本発明者らは、CD321を腫瘍細胞の実質的に普遍的又は包括的マーカーとして、特にCTCの検出及び癌のインサイチュー検出のための信頼できるマーカーとして同定した。

20

【 0 0 3 2 】

したがって、本発明は、一態様では、対象由来の生体試料中の腫瘍細胞を検出又は定量化するための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞によるCD321の発現を検出することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

さらなる態様は、対象由来の生体試料から腫瘍細胞を単離するための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞によるCD321の発現を検出することと、生体試料からCD321を発現する腫瘍細胞を単離することと、を含む方法を提供する。

30

【 0 0 3 4 】

したがって、腫瘍細胞のバイオマーカーとしてのCD321の使用、特に、対象由来の生体試料中の腫瘍細胞を検出若しくは定量化するのに有用な、又は対象由来の生体試料から腫瘍細胞を単離するのに有用なバイオマーカーとしてのCD321の使用も提供される。

【 0 0 3 5 】

別の態様は、対象由来の生体試料中の循環腫瘍細胞（CTC）を検出又は定量化するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞によるCD321の発現を検出することを含み、循環非造血細胞によるCD321の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定される、方法を提供する。

【 0 0 3 6 】

さらなる態様は、対象由来の生体試料からCTCを単離するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞によるCD321の発現を検出することを含み、循環非造血細胞によるCD321の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定され、生体試料からCD321を発現するCTCを単離すること、を含む方法を提供する。

40

【 0 0 3 7 】

したがって、CTCのバイオマーカーとしてのCD321の使用、特に、対象由来の生体試料中のCTCを検出若しくは定量化するのに有用な、又は対象由来の生体試料からのCTCを単離するのに有用なバイオマーカーとしてのCD321の使用も提供される。

【 0 0 3 8 】

さらなる態様は、対象における新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞又はCTCを検出又は定量化するための上記の方法の

50

いずれか 1 つによって、対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

さらなる態様は、対象における新生物疾患の転移能を決定する方法であって、生体試料中の腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化するための上記の方法のいずれか 1 つによって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、新生物疾患が転移能を有すると同定される、方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

さらなる態様は、対象における新生物疾患の再発を決定するための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化するための上記の方法のいずれか 1 つによって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、新生物疾患が再発したと同定される、方法を提供する。

10

【 0 0 4 1 】

さらなる態様は、対象が抗癌療法を必要としているかどうかを決定するための方法であって、生体試料中の腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化するための上記の方法のいずれか 1 つによって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、対象が抗癌療法を必要としていると同定される、方法を提供する。

【 0 0 4 2 】

さらなる態様は、新生物疾患有する対象における抗癌療法の有効性を決定するための方法であって、療法前及び療法中又は療法後に、生体試料中の腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化するための上記の方法のいずれか 1 つによって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、療法中又は療法後の対象における腫瘍細胞又は CTC の量が療法前と比較して低下したことにより（例えば、試料の所与の重量又は体積あたりで測定される）、上記療法が有効であると同定される、方法を提供する。

20

【 0 0 4 3 】

腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化するための本方法は、生体試料中の上記腫瘍細胞又は CTC の有無を決定する、測定する、実証する、結論付ける、又は確認すること可能にする。この方法は、定性的結果 - 例えば、腫瘍細胞又は CTC が試料中に「存在する」対「存在しない」又は「検出された」対「検出されない」という結論を提供することができる。この方法はまた、定量的な結果 - 例えば、試料中に検出される腫瘍細胞若しくは CTC の総数、試料の所与の重量又は体積あたりで検出される腫瘍細胞若しくは CTC の数、又は試料に含まれる腫瘍細胞若しくは CTC 対全（有核）細胞の割合も提供することができる。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の方法はまた、生体試料から腫瘍細胞又は CTC を単離することを可能にし得る。組成物又は混合物（例えば、生体試料）の特定の成分（例えば、腫瘍細胞又は CTC）に関して本明細書全体にわたって使用される「単離する」との用語は、そのような成分を組成物又は混合物の 1 つ以上又は他の（実質的に）すべての成分から単離するプロセス又は技術を包含する。この用語は、至純（absolute purity）を必要としない。代わりに、成分を単離することにより、1 つ以上又は他のすべての成分に対する該成分の存在量が出発組成物又は出発混合物よりも多い、別個の環境が生じるであろう。別個の環境とは、单一の媒体、例えば单一の溶液、分散液、ゲル、沈殿物などを表し得る。したがって、生体試料から腫瘍細胞又は CTC を単離することにより、生体試料中に含まれるすべての他の細胞に対する腫瘍細胞又は CTC の存在量が特に増加し得る。例として、生体試料から腫瘍細胞又は CTC を単離することにより、腫瘍細胞又は CTC が上記細胞集団の全細胞の少なくとも 50 %（数による）、例えば、細胞集団の全細胞のうちの少なくとも 55 %、好ましくは少なくとも 60 % 若しくは少なくとも 65 %、より好ましくは少なくとも 70 % 若しくは少なくとも 75 %、より好ましくは少なくとも 80 % 若しくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 % 若しくは少なくとも 95 %、さらに

40

50

より好ましくは少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又はさらには 1 0 0 %を構成する、細胞集団が得られる。

【 0 0 4 5 】

腫瘍細胞又は C T C を検出、定量化、又は単離する行為は、別々に若しくは任意の組み合わせで（連続的に若しくは同時に）行う場合もあるし、又は別々に行えない場合もある。例として、試料中の腫瘍細胞又は C T C を定量化するように構成された方法は、試料中の上記腫瘍細胞又は C T C の有無も必然的に検出する。別の例では、試料から腫瘍細胞又は C T C を単離するように構成された方法は、試料中の上記腫瘍細胞又は C T C の有無も必然的に検出し、任意選択により、単離された腫瘍細胞又は C T C を定量化することを可能にし得る。

10

【 0 0 4 6 】

「新生物疾患」との用語は、一般に、良性（周囲の正常組織に浸潤していない、転移を形成していない）、前悪性（前癌性）、又は悪性（隣接組織に侵入し、転移を起こすことができる）に関わらず、新生細胞の成長及び増殖によって特徴付けられる任意の疾患又は障害を指す。新生物疾患との用語は、一般に、すべての形質転換された細胞及び組織、並びにすべての癌性の細胞及び組織を含む。新生物疾患又は障害には、限定されないが、異常な細胞増殖、良性腫瘍、前悪性癌病变又は前癌性病变、悪性腫瘍、及び癌が含まれる。新生物疾患又は障害の例には、前立腺、結腸、腹部、骨、胸部（b r e a s t）、消化器系、肝臓、脾臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺）、目、頭頸部、神経（中枢及び末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟部組織、脾臓、胸部（t h o r a c i c）、又は尿生殖路などの任意の組織又は臓器に位置する良性、前悪性、又は悪性の新生物である。

20

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する場合、「腫瘍」又は「腫瘍組織」との用語は、過剰な細胞分裂に起因する組織の異常な腫瘍を指す。腫瘍又は腫瘍組織は、異常増殖特性を有し、かつ身体機能に有用ではない新生細胞である腫瘍細胞を含む。腫瘍、腫瘍組織、及び腫瘍細胞は、良性、前悪性、若しくは悪性であり得、又はいかなる癌性能力を有さない病変を表し得る。腫瘍又は腫瘍組織はまた、腫瘍関連非腫瘍細胞、例えば、腫瘍又は腫瘍組織に供給する血管を形成する血管細胞を含み得る。非腫瘍細胞は、例えば腫瘍又は腫瘍組織における血管新生の誘導のように腫瘍細胞によって複製及び発達が誘導され得る。

30

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される場合、「癌」との用語は、機能不全による又は制御不能な細胞成長によって特徴付けられる悪性新生物を指す。「癌」との用語には、原発性悪性細胞又は腫瘍（例えば、元の悪性腫瘍又は腫瘍の部位以外の対象の体内の部位に細胞が移動していないもの）及び継発性悪性細胞又は腫瘍（例えば、元の腫瘍部位とは異なる第 2 の部位への悪性細胞又は腫瘍細胞の移動である転移から生じるもの）が含まれる。「転移性」又は「転移」との用語は、一般に、ある器官又は組織から別の隣接しない器官又は組織への癌の広がりを指す。他の隣接しない臓器又は組織における新生物疾患の発生は、転移と呼ばれる。

40

【 0 0 4 9 】

癌の例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が含まれる。そのような癌のより具体的な例には、限定されないが、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、及び肺大細胞癌を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌（he p a t o c e l l u l a r c a n c e r）、胃腸癌を含む胃癌（g a s t r i c c a n c e r）又は胃癌（s t o m a c h c a n c e r）、脾臓癌、神経膠腫、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌（he p a t o m a）、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌又は腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、並びに C N S 癌、メラノーマ、頭頸部癌、骨癌、骨髄癌、十二指腸癌、食道癌、甲状腺癌、又は血液癌が含まれる。

50

【0050】

癌又は悪性腫瘍の他の非限定的な例には、限定されないが、急性小児リンパ芽球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、副腎皮質癌、成人（原発性）肝細胞癌、成人（原発性）肝臓癌、成人急性リンパ性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人ホジキン病、成人ホジキンリンパ腫、成人リンパ球性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、成人原発性肝臓癌、成人軟部肉腫、AIDS関連リンパ腫、AIDS関連悪性腫瘍、肛門癌、星細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、腎盂尿管癌、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星細胞腫、脳星細胞腫、子宮頸癌、小児（原発性）肝細胞癌、小児（原発性）肝臓癌、小児急性リンパ芽球性白血病、小児急性急性骨髓性白血病、小児脳幹神経膠腫、膠芽腫、小児小脳星細胞腫、小児脳星細胞腫、小児頭蓋外胚細胞腫瘍、小児ホジキン病、小児ホジキンリンパ腫、小児視床下部及び視経路神経膠腫、小児急性リンパ芽球性白血病、小児髄芽腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体及びテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児原発性肝臓癌、小児横紋筋肉腫、小児軟部肉腫、小児視経路及び視床下部神経膠腫、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性白血病、直腸癌、皮膚T細胞性リンパ腫、内分泌膵島細胞癌、子宮内膜癌、上衣腫、上皮癌、食道癌、ユーリング肉腫及び関連する腫瘍、外分泌膵臓癌、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管腫瘍、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍、有毛細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血症、下咽頭癌、腸癌、眼内メラノーマ、膵島細胞癌、膵島細胞膵臓癌、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、口唇及び口腔癌、肝臓癌、肺癌、リンパ増殖性疾患、マクログロブリン血症、男性乳癌、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髄芽腫、メラノーマ、中皮腫、転移性原発不明扁平上皮性頸部癌、転移性原発性扁平上皮性頸部癌、転移性扁平上皮性頸部癌、多発性骨髓腫、多発性骨髓腫/形質細胞腫瘍、骨髓異形成症候群、骨髓性白血病（Myelogenous Leukemia）、骨髓性白血病（Myeloid Leukemia）、骨髓増殖性疾患、鼻腔及び副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽腫、妊娠中の非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚癌、非小細胞肺癌、原発不明転移性扁平上皮性頸癌、中咽頭癌、骨肉腫/悪性線維性肉腫、骨肉腫/悪性線維性組織球腫、骨肉腫/骨の悪性線維性組織球腫、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵臓癌、パラプロテイン血症、紫斑病、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、形質細胞腫瘍/多発性骨髓腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂尿管癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部肉腫、扁平上皮性頸部癌、胃癌、テント上原始神経外胚葉性及び松果体腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、腎孟及び尿管の移行上皮癌、移行性腎孟尿管癌（Transitional Renal Pelvis and Urethra Cancer）、絨毛性腫瘍、尿管腎孟細胞癌（Urethra and Renal Pelvis Cell Cancer）、尿管癌、子宮癌、子宮肉腫、腔癌、視経路及び視床下部神経膠腫、外陰癌、ワルデンシュトームマクログロブリン血症、又はウィルムス腫瘍が含まれる。

【0051】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。固形腫瘍は、通常は囊胞又は液体領域を含まない新生物塊を形成する任意の腫瘍を包含する。固形腫瘍は、良性、前悪性、又は悪性であり得る。固形腫瘍の例は、癌腫、肉腫、メラノーマ、及びリンパ腫である。白血病は、一般に、固形腫瘍を形成しない。したがって、特定の実施形態では、腫瘍は白血病以外の腫瘍であり得る。固形腫瘍はまた、固形腫瘍に由来する転移も包含する。

【0052】

特定の好ましい実施形態では、固形腫瘍の任意の転移などの腫瘍の任意の転移を含む、固形腫瘍などの腫瘍は、上皮、間葉、又はメラニン細胞由来である。

【0053】

上皮由来の腫瘍には、限定されないが、皮膚、肺、腸、結腸、胸部、膀胱、頭頸部（唇

10

20

30

40

50

、口腔、唾液腺、鼻腔、鼻咽頭、副鼻腔、咽頭、喉、喉頭、及び関連する構造を含む)、食道、甲状腺、腎臓、肝臓、脾臓、膀胱、陰茎、精巣、前立腺、腫、子宮頸部、又は肛門などのいくつかの部位のいずれかにおける上皮組織に由来する任意の腫瘍が含まれる。

【 0 0 5 4 】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は、限定されないが、皮膚、肺、腸、結腸、胸部、膀胱、頭頸部(唇、口腔、唾液腺、鼻腔、鼻咽頭、副鼻腔、咽頭、喉、喉頭、及び関連する構造を含む)、食道、甲状腺、腎臓、肝臓、脾臓、膀胱、陰茎、精巣、前立腺、腫、子宮頸部、又は肛門などのいくつかの部位のいずれかにおける上皮組織に由来する任意の悪性新生物を含む、癌腫であり得る。

【 0 0 5 5 】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は、扁平上皮癌(SCC)であり得る。SCCには、限定されないが、皮膚、頭頸部(唇、口腔、唾液腺、鼻腔、鼻咽頭、副鼻腔、咽頭、喉、喉頭、及び関連する構造を含む)、甲状腺、食道、肺、陰茎、前立腺、腫、子宮頸部、肛門、又は膀胱に由来するSCCが含まれ得る。

【 0 0 5 6 】

間葉由来の腫瘍には、限定されないが、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、線維組織、又は他の結合組織若しくは支持組織などのいくつかの部位のいずれかの間葉組織に由来する任意の腫瘍が含まれる。

【 0 0 5 7 】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は、限定されないが、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、線維組織、又は他の結合組織若しくは支持組織などのいくつかの部位のいずれかの間葉組織に由来する任意の悪性新生物を含む、肉腫であり得る。

【 0 0 5 8 】

メラニン細胞由来の腫瘍には、限定されないが、皮膚、口、目、又は小腸などのいくつかの部位のいずれかにおけるメラニン細胞に由来する任意の腫瘍が含まれる。

【 0 0 5 9 】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は、限定されないが、皮膚、口、目、又は小腸などのいくつかの部位のいずれかのメラニン細胞に由来する任意の悪性新生物を含む、メラノーマであり得る。

【 0 0 6 0 】

特定の好ましい実施形態では、腫瘍は、皮膚癌、好ましくは皮膚扁平上皮癌、肺癌、好ましくは肺扁平上皮癌又は肺多形癌、頭頸部癌、乳腺癌、及び食道癌を含む群又はそれからなる群から選択され得る。

【 0 0 6 1 】

したがって、本明細書全体にわたって使用される「腫瘍細胞」との用語は、良性、前悪性(前癌性)、又は悪性に関わらず、任意の新生細胞を広く包含する。この用語は、特に、原発性及び続発性悪性細胞、循環腫瘍細胞(CTC)、播種性腫瘍細胞(DTC)、並びに転移性腫瘍細胞を含む、癌細胞を包含する。

【 0 0 6 2 】

「循環腫瘍細胞」又は「CTC」との用語は、原発腫瘍などの腫瘍から循環系又は滲出液若しくは分泌液に流入した任意の腫瘍細胞を示す。特定の実施形態では、CTCは、腫瘍から血管系又はリンパ系などの循環系に流入し得る。血液又はリンパ液などの循環液は、CTCを単一細胞又は細胞塊として体中に運ぶことができる。したがって、CTCは血液又はリンパ液に存在し得、あるいは尿、糞便、又は他の滲出液若しくは分泌液に存在し得る。CTC又はCTCの一部は、遠隔部位に侵入し、播種性腫瘍細胞(DTC)として第2の臓器に留まり得る。DTC又はDTCの一部は、第2の臓器の転移へと進行することが可能であり得る。

【 0 0 6 3 】

本明細書全体にわたって使用される「試料」又は「生体試料」との用語には、対象から得られた(単離された、取り出した)任意の生物学的標本が含まれる。試料には、限定さ

10

20

30

40

50

れないが、臓器組織（例えば、原発性又は転移性腫瘍組織）、全血、血漿、血清、全血細胞、赤血球、白血球（例えば、末梢血単核細胞）、唾液、尿、排泄物（糞便）、涙、汗、皮脂、乳頭吸引液、乳管洗浄液（ductal lavage）、腫瘍滲出液、滑液、脳脊髄液、胸水液（pleural effusion fluid）などの胸水（pleural fluid）、腹水（ascites fluid）などの腹腔液（peritoneal cavity fluid）、リンパ液、細針吸引液、羊水、任意の他の体液、滲出液又は分泌液、細胞溶解物、細胞分泌産物、炎症液、精液、及び膣分泌物が含まれ得る。好ましくは、試料は、非侵襲的又は低侵襲的方法、例えば、血液採取（「液体生検」）、尿採取、糞便採取、組織（例えば腫瘍組織）生検、又は対象由来の試料の提供／取り出し／単離を可能にする胸水サンプリング若しくは腹腔液サンプリングなどの細針吸引などにより容易に入手可能であり得る。本明細書で使用される「組織」との用語は、臓器の細胞を含むだけでなく上記の血液及び他の体液も含む、ヒト身体のすべての種類の細胞を包含する。組織は健常であってもよいし、又は例えば腫瘍組織のように病理学的变化に罹患していてもよい。組織は、生きている対象に由来してもよいし、又は死骸組織に由来してもよい。

【0064】

特に有用な試料は、腫瘍細胞を含むことが知られているか、又はそれを含むことが予想若しくは予測されるか、又はそれを含む可能性があることが知られているか、あるいはそれを含む可能性があることが予想若しくは予測される試料である。さらに特に有用な試料は、循環細胞を含むことが知られているか、又はそれを含むことが予想若しくは予測されるか、又はそれを含む可能性があることが知られているか、あるいはそれを含む可能性があることが予想若しくは予測される試料である。さらに特に有用な試料は、循環腫瘍細胞を含むことが知られているか、又はそれを含むことが予想若しくは予測されるか、又はそれを含む可能性があることが知られているか、あるいはそれを含む可能性があることが予想若しくは予測される試料である。

【0065】

さらなる有用な実施形態では、原発腫瘍部位の外側の腫瘍細胞、特に固形腫瘍細胞を検出又は定量化し得る。例えば、試料は、原発（固形）腫瘍部位以外の組織から取得し得る。限定ではなく例として、腫瘍細胞、特に固形腫瘍細胞は、脳脊髄液、胸水液などの胸水、又は腹水などの腹腔液で検出又は定量化し得る。特定の実施形態では、上記の液体試料などの原発腫瘍部位の外側の腫瘍細胞の存在により、対象における新生物疾患が転移能を有すると同定され得る。

【0066】

試料の任意の好適な重量又は体積を分析のために対象から取り出し得る。限定されないが、液体試料は、1 mL ~ 20 mL、例えば5 mL、7 . 5 mL、10 mL、15 mL、又は20 mLの体積を有し得る。固体試料は、1 g ~ 20 g、例えば5 g、7 . 5 g、10 g、15 g、又は20 gの重量を有し得る。

【0067】

特定の好ましい実施形態では、生体試料は組織生検又は組織細針吸引液である。他の好ましい実施形態では、生体試料は切除された組織である。

【0068】

特定の好ましい実施形態では、生体試料は、腫瘍生検又は腫瘍細針吸引液、例えば、原発性又は転移性腫瘍組織由来の生検又は細針吸引液である。他の好ましい実施形態では、生体試料は切除された腫瘍組織、例えば切除された原発性又は転移性腫瘍組織である。

【0069】

さらに好ましい実施形態では、生体試料は、循環細胞を含む。特定の好ましい実施形態では、生体試料は、血液、尿、糞便、リンパ液、又は別の滲出液若しくは分泌液由来の循環細胞を含む。特に好ましい実施形態では、生体試料は、末梢血由来の循環細胞を含む。

【0070】

特定の好ましい実施形態では、生体試料は、循環腫瘍細胞を含む。特定の好ましい実施

10

20

30

40

50

形態では、生体試料は、血液、尿、糞便、リンパ液、又は別の滲出液若しくは分泌液由來の循環腫瘍細胞を含む。特に好ましい実施形態では、生体試料は、末梢血由來の循環腫瘍細胞を含む。

【0071】

「対象」、「個体」、又は「患者」との用語は、本明細書全体にわたって交換可能に使用され、典型的には及び好ましくはヒトを示すが、非ヒト動物、好ましくは温血動物、さらにより好ましくは、例えば、非ヒト靈長類、げっ歯類、イヌ科動物、ネコ科動物、ウマ科動物、ヒツジ(ovine)、ブタ(porcine)などの哺乳動物への言及も包含し得る。「非ヒト動物」との用語には、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト靈長類（特に高等靈長類）、ヒツジ、イヌ、げっ歯類（例えば、マウス又はラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、ウシなどの哺乳動物、及びニワトリ、両生類、爬虫類などの非哺乳動物が含まれる。特定の実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物である。特定の好ましい実施形態では、対象はヒトである。他の実施形態では、対象は、疾患モデルとしての実験動物又は動物代替物である。この用語は、特定の年齢及び性別を示すものではない。したがって、成人及び新生児対象並びに胎児は、男性又は女性に関わらず、包含されることが意図される。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、及びマウスが含まれる。対象との用語は、トランスジェニック種を含むことがさらに意図される。

10

【0072】

好適な対象には、限定されないが、新生物疾患のスクリーニングのために医師に示す対象、新生物疾患を示す症状及び兆候を医師に示す対象、新生物疾患と診断された対象、抗癌療法を受けた対象、抗癌処置を受けている対象、寛解期にある新生物疾患を有する対象が含まれ得る。

20

【0073】

したがって、本明細書で意図される腫瘍細胞は、動物細胞、好ましくは温血動物細胞、より好ましくは脊椎動物細胞、さらにより好ましくは、ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物細胞であり得、特定の特に好ましい実施形態では、ヒト細胞であり得る。

【0074】

本明細書に開示される腫瘍細胞又は循環腫瘍細胞などの細胞は、本明細書の文脈において、CD321などの、1つ以上の遺伝子、ポリペプチド、又はタンパク質などの1つ以上のマーカーの「発現を含む」又は逆にそれらを「発現しない」と述べる場合があり、あるいはCD321などの、1つ以上の遺伝子、ポリペプチド、又はタンパク質などの1つ以上のマーカーに対して「陽性である」(+)又は逆に「陰性である」(-)と記載する場合がある。

30

【0075】

このような用語は一般的であり、細胞表現型を特徴付けるときに当業者によく理解されている。追加のガイダンスにより、細胞が、CD321などの、所与の遺伝子、ポリペプチド、若しくはタンパク質などの所与のマーカーの発現に対して陽性である、若しくは該マーカーを発現する、又は該マーカーを含むと言う場合、当業者は、細胞中又は細胞上のマーカーを検出又は定量化することができる測定を行ったときに、マーカーについての明確なシグナルの存在又は証拠について結論付けるであろう。好適には、マーカーについての明確なシグナルの存在又は証拠は、細胞について得られた測定結果と、陰性対照（例えば、マーカーを発現することが知られていない細胞）及び/又は陽性対照（例えば、マーカーを発現することが知られている細胞）について行われた同じ測定の結果との比較に基づいて結論付けられるであろう。測定方法がマーカーの定量的評価を可能にする場合、陽性細胞は、陰性対照細胞によってマーカーについて生成されたシグナルよりも、又は陰性対照細胞集団によってマーカーについて生成された平均シグナルよりも、少なくとも1.5倍、例えば、少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍又はさらに高いマーカーについてのシグナルを生成し得る。さらに、陽性細胞は、陰性対照細胞集団によってマーカーについて生成された平均シグナルよりも高い、3.0以上の標準偏差、例えば3.5以上

40

50

、4.0以上、4.5以上、又は5.0以上の標準偏差であるマーカーについてのシグナルを生成し得る。

【0076】

「マーカー」との用語は、当該技術分野で広く普及しており、一般に生体分子、より特定的には内因性生体分子、及び／又はその検出可能な部分を広く示し、検査物における（例えば、細胞、細胞集団、組織、器官、若しくは生物における又はそれらに対する、例えば対象の生体試料における）定性的及び／又は定量的評価は、検査物の表現型及び／又は遺伝子型の1つ以上の態様に関して予測するものであるか、又は情報価値がある。「マーカー」及び「バイオマーカー」との用語は、本明細書全体にわたって互換的に使用され得る。

10

【0077】

好ましくは、本明細書で意図されるマーカーは、ペプチド、ポリペプチド、及び／若しくはタンパク質ベースであるか、又は核酸ベースであり得る。例えば、マーカーは、所与の遺伝子によってコードされるペプチド、ポリペプチド、及び／若しくはタンパク質、又はその検出可能な部分で構成され得る。さらに、「核酸」との用語は一般に、DNA、RNA、及びDNA/RNAハイブリッド分子を包含するが、マーカーの文脈においては、この用語は典型的には、ヘテロ核RNA(hnRNA)、プレmRNA、メッセンジャーRNA(mRNA)、若しくはコピーDNA(cDNA)、又はそれらの検出可能な部分を指す。そのような核酸種は、これらが遺伝子の発現に関する定性的及び／又は定量的情報を含むので、マーカーとして特に有用である。特に好ましくは、核酸ベースのマーカーは、所与の遺伝子のmRNA、若しくはmRNAから作られるcDNA、又はそれらの検出可能な部分を包含し得る。

20

【0078】

本明細書全体にわたって使用される「タンパク質」との用語は、一般に、1つ以上のポリペプチド鎖、すなわちペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基のポリマー鎖を含む高分子を包含する。この用語は、天然、組換え、半合成、又は合成で生産されたタンパク質を包含してもよい。この用語はまた、限定されないが、グリコシリ化、アセチル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、ユビキチン化、シグナルペプチド除去、N末端Met除去、プロ酵素又はプロホルモンの活性型への変換などの、ポリペプチド鎖の1つ以上の共発現型修飾又は発現後型修飾を有するタンパク質を包含してもよい。この用語はさらに、対応する天然タンパク質に対するアミノ酸配列の変化、例えばアミノ酸の欠失、付加、及び／又は置換などを有するタンパク質バリエント又は変異体も含む。この用語は、完全長タンパク質及びタンパク質部分又は断片、例えば、そのような完全長タンパク質のプロセシング後に生じる天然に存在するタンパク質部分の両方を企図している。

30

【0079】

本明細書全体にわたって使用される「ポリペプチド」との用語は、一般に、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基のポリマー鎖を包含する。したがって、タンパク質が単一のポリペプチド鎖のみから構成される限り、「タンパク質」と「ポリペプチド」との用語は、そのようなタンパク質を示すために本明細書で互換的に使用され得る。この用語は、任意の最小の長さのポリペプチド鎖に限定されない。この用語は、天然、組換え、半合成、又は合成により生成されたポリペプチドを包含し得る。この用語はまた、限定されないが、グリコシリ化、アセチル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、ユビキチン化、シグナルペプチド除去、N末端Met除去、プロ酵素又はプロホルモンの活性型への変換などの、ポリペプチド鎖の1つ以上の共発現型又は発現後型の修飾を有するポリペプチドを包含し得る。この用語はさらに、対応する天然ポリペプチドに対するアミノ酸配列の変化、例えばアミノ酸の欠失、付加、及び／又は置換などを有するポリペプチドバリエント又は変異体も含む。この用語は、完全長ポリペプチド及びポリペプチド部分又は断片、例えば、そのような完全長ポリペプチドのプロセシング後に生じる天然に存在するポリペプチド部分の両方を企図している。

40

【0080】

50

本明細書全体にわたって使用される「ペプチド」との用語は、好ましくは、50個以下のアミノ酸、例えば、45個以下のアミノ酸、好ましくは40個以下のアミノ酸、例えば35個以下のアミノ酸、より好ましくは30個以下のアミノ酸、例えば、25個以下、20個以下、15個以下、10個以下、又は5個以下のアミノ酸から本質的になる本明細書で使用されるポリペプチドを指す。

【0081】

本明細書全体にわたって使用される「核酸」との用語は、典型的には、ヌクレオシド単位から本質的に構成される任意の長さのポリマー（好ましくは直鎖状ポリマー）を指す。ヌクレオシド単位は、一般に、複素環式塩基及び糖基を含む。複素環式塩基には、特に、天然に存在する核酸中に広く存在しているアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、及びウラシル（U）などのプリン塩基及びピリミジン塩基、他の天然に存在する塩基（例えば、キサンチン、イノシン、ヒポキサンチン）、並びに化学的又は生化学的に修飾された（例えば、メチル化された）非天然の塩基又は誘導体化塩基が含まれ得る。例示的な修飾核酸塩基には、限定されないが、5'-置換ピリミジン、6'-アザピリミジン、並びに2'-アミノプロピルアデニン、5'-プロピニルウラシル、及び5'-プロピニルシトシンを含むN-2', N-6及びO-6置換プリンが含まれる。特に、5'-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を高めることが示されており、さらにより特定的には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせる場合における、アンチセンス作用因子などでの好ましい塩基置換であり得る。糖基には、特に、ペントース（ペントフラノース）基、例えば好ましくは天然に存在する核酸に一般的なリボース及び／若しくは2'-デオキシリボース、又はアラビノース、2'-デオキシアラビノース、トレオース、若しくはヘキソース糖基、並びに修飾又は置換糖基（限定されないが、2'-O-アルキル化糖、例えば、リボースなどの2'-O-メチル化若しくは2'-O-エチル化糖；2'-O-アルキルオキシアルキル化糖、例えば、リボースなどの2'-O-メトキシエチル化糖；又は2'-O, 4'-C-アルキレン結合糖、例えば、リボースなどの2'-O, 4'-C-メチレン結合若しくは2'-O, 4'-C-エチレン結合糖；2'-フルオロアラビノースなど）が含まれ得る。ヌクレオシド単位は、特に、天然に存在する核酸に一般的なホスホジエステル結合、さらには、修飾ホスフェート又は修飾ホスホネートベースの結合、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホロチオエートなどのアルキルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネートなどのアルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホトリエステルなどのホスホトリエステル、ホスホルアミデート、ホスホロビペラジデート、ホスホロモルホリデート、架橋ホスホロアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロチオエート；さらには、シロキサン、カーボネート、スルファメート、カルボアルコキシ、アセトアミデート、3'-N-カルバメートなどのカルバメート、モルホリノ、ボラノ、チオエーテル、3'-チオアセタール、及びスルホンヌクレオシド間結合を含む、多くの知られているヌクレオシド間結合のいずれかによって互いに結合され得る。好ましくは、ヌクレオシド間結合は、修飾ホスフェートベースの結合、例えば、より好ましくはホスホジエステル、ホスホロチオエート、若しくはホスホロジチオエート結合、又はそれらの組み合わせなどを含む、ホスフェートベースの結合であり得る。「核酸」との用語はまた、限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、リン酸基を有するペプチド核酸（PHONA）、ロックド（locked）核酸（LNA）、モルホリノホスホジアミデート骨格核酸（PMO）、シクロヘキセン核酸（CeNA）、トリシクロDNA（tcDNA）、及びアルキルリンカー又はアミノリンカーを備えた骨格部を有する核酸（例えば、Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270: 1628-1644を参照のこと）を含む核酸模倣体などのポリマーを含有する任意の他の核酸塩基も包含してもよい。本明細書で使用される「アルキル」は、特に、低級炭化水素部分、例えば、メチル、エチル、エテニル、プロピル、1-プロペニル、2-プロペニル、及びイソプロピルなどのC1～C4直鎖状若しくは分枝状飽和又は不飽和炭化水素を包含する。本明細書で意図される核酸は、天然に存在するヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、又はそれらの混合物を含み得る。修飾ヌクレオシドは、修飾複素環式塩基、修飾糖部

10

20

30

40

50

分、修飾ヌクレオシド間結合、又はそれらの組み合わせを含み得る。「核酸」との用語は、さらに好ましくは、具体的には hnRNA、プレmRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、増幅産物、オリゴヌクレオチド、及び合成（例えば化学合成）DNA、RNA、又はDNA/RNAハイブリッドを含む、DNA、RNA及びDNA/RNAハイブリッド分子を包含する。核酸は、天然に存在してもよく、例えば自然に存在しても、若しくは自然から単離されてもよく、組換え体、すなわち組換えDNA技術により產生されたものであってもよく、及び／又は部分的若しくは全体的に化学的若しくは生化学的に合成されてもよい。「核酸」は、二本鎖、部分的に二本鎖、又は一本鎖であり得る。一本鎖の場合、核酸はセンス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。さらに、核酸は円形状又は線状であり得る。

10

【0082】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を含む任意のマーカーへの言及は、当該技術分野においてそれぞれの名称で一般的に知られているマーカーに対応する。これらの用語は、見出だされた任意の生物、特に動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくはヒト及び非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物、さらにより好ましくはヒトのそのようなマーカーを包含する。

【0083】

この用語は、特に、天然の配列、すなわち、一次配列がマーカーに天然に見出されるマーカー又は天然に由来するマーカーの一次配列と同じである配列を有する、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を含む、そのようなマーカーを包含する。当業者は、天然の配列が、異種間ににおいて、そのような種間の遺伝的多様性に起因して異なり得ることを理解している。さらに、天然の配列は、同種の異なる個体間又は個体内において、所与の種内の正常な遺伝的多様性（変異）に起因して異なり得る。また、天然の配列は、同種の異なる個体間ににおいて又は個体内でさえ、体細胞突然変異又は転写後若しくは翻訳後修飾に起因して異なり得る。本明細書では、任意のそのようなマーカーのバリエント又はアイソフォームが意図されている。したがって、自然で見出された、又は自然に由来するマーカーの配列はすべて、「天然」と見なされる。この用語は、生物、臓器、組織、又は細胞の一部を形成するとき、生体試料の一部を形成するとき、及びそのような供給源から少なくとも部分的に単離されるときにおけるマーカーを包含する。この用語は、組換え又は合成手段によって生成される場合のマーカーも包含する。

20

【0084】

特定の実施形態では、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を含むマーカーはヒトであり得、すなわち、それらの一次配列は、天然に存在するヒトマーカーの対応する一次配列又は該ヒトマーカーに存在する対応する一次配列と同じであり得る。したがって、これに関連する「ヒト」との修飾語句は、そのマーカーの由来又は供給源ではなく、それぞれのマーカーの一次配列に関する。例えば、そのようなマーカーは、ヒト対象の試料中に存在するか、若しくは該試料から単離されてもよいし、又は他の手段（例えば、組換え発現、無細胞転写若しくは翻訳、又は非生物学的核酸若しくはペプチド合成）によって取得してもよい。

30

【0085】

文脈からそうでないことが明白でない限り、任意のマーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくは核酸、又はそれらの断片への本明細書における言及はまた、一般に、例えば、リン酸化、グリコシリ化、脂質化、メチル化、システイン化（cysteinylation）、スルホン化、グルタチオン化、アセチル化、メチオニンのメチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンへの酸化などを含む、発現後修飾を有するなどの上記マーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくは核酸、又はそれらの断片の修飾形態も包含し得る。

40

【0086】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を含む任意のマーカーへの本明細書における言及はまた、その断片も包含する。したがって、任意の1つのマーカーの測

50

定（又はその量の測定）への本明細書における言及は、マーカーの測定及び／又はその1つ以上の断片の測定を含み得る。

【0087】

例えば、任意のマーカー及び／又はその1つ以上の断片は、纏めて測定されてもよく、その結果、測定された量は纏めて測定された種の合計量に対応する。別の例では、任意のマーカー及び／又はその1つ以上の断片はそれぞれ個別に測定されてもよい。

【0088】

ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質に関して本明細書全体にわたって使用される「断片」との用語は、一般に、典型的にはN末端及び／又はC末端が切断された形態のペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質などの、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の一部を示す。好ましくは、断片は、上記ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列の長さの少なくとも約30%、例えば少なくとも約50%若しくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%、又はさらに約99%を含み得る。例えば、完全長のペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の長さを超えない限り、断片は、対応する完全長のペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の5個以上の連続するアミノ酸、若しくは10個以上の連続するアミノ酸、若しくは20個以上の連続するアミノ酸、又は30個以上の連続するアミノ酸、例えば40個以上の連続するアミノ酸、例えば50個以上の連続するアミノ酸、例えば60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、200個以上、300個以上、400個以上、500個以上、若しくは600個以上の連続するアミノ酸の配列を含み得る。10 20

【0089】

核酸（ポリヌクレオチド）に関する「断片」との用語は、一般に、核酸の5'及び／又は3'切断形態を示す。好ましくは、断片は、上記核酸の核酸配列の長さの少なくとも約30%、例えば少なくとも約50%若しくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、さらにより好ましくは少なくとも約95%又はさらに約99%を含み得る。例えば、完全長の核酸の長さを超えない限り、断片は、対応する完全長の核酸の5個以上の連続するヌクレオチド、若しくは10個以上の連続するヌクレオチド、若しくは20個以上の連続するヌクレオチド、又は30個以上の連続するヌクレオチド、例えば40個以上の連続するヌクレオチド、例えば50個以上の連続するヌクレオチド、例えば60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、200個以上、300個以上、400個以上、500個以上、若しくは600個の連続するヌクレオチドの配列を含み得る。30

【0090】

この用語は、インビボ及び／又はインビトロで、任意の作用機序により、例えば、限定されないが、選択的転写又は翻訳、エキソ及び／又はエンドタンパク質分解、エキソ及び／又はエンド核酸分解、あるいはペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸の分解、例えば物理的、化学的、及び／又は酵素的タンパク質分解又は核酸溶解などにより生じる断片を包含する。

【0091】

本明細書は、CD321を癌細胞の有用なマーカーとして教示す。上記のように、CD321マーカーは、好ましくはペプチド、ポリペプチド、及び／若しくはタンパク質ベース、又は核酸ベースであり得る。特定の好ましい実施形態では、本明細書で教示されるCD321の発現を検出することは、CD321タンパク質若しくはCD321 mRNA又は両方を検出することを含む。40

【0092】

「CD321」への言及は、当該技術分野において該名称で一般に知られている、CD321マーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を示す。追加のガイドンスにより、CD321は、接合部接着分子A、JAM-A、接合部接着分子1、JAM-1、血小板F11受容体、F11R、血小板接着分子1、及びPAM-1としても知ら50

れている。C D 3 2 1をコードする遺伝子は、F 1 1 R、J A M I、及びJ C A Mという名称でも知られている。

【0093】

例として、ヒトF 1 1 R mRNA配列は、N C B I G e n b a n k (h t t p : / / w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v /)受託番号NM_016946.4が付けられている。NM_016946.4のヌクレオチド271(開始コドン)から1170(停止コドン)は、C D 3 2 1コード配列を構成し、以下に再現されている(配列番号1)：

```
ATGGGGACAAAGGCGCAAGTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCTCTTATATTGGCGATCCT  
GTTGTGCTCCCTGGCATTGGGCAGTGTACAGTGCACCTCTGAACCTGAAGTCAGAA 10  
TTCCTGAGAATAATCCTGTGAAGTTGTCCGTGCCTACTCGGGCTTTCTTCTCCCCGTG  
TGGAGTGGAAAGTTGACCAAGGAGACACCACAGACTCGTTGCTATAATAACAAGATC  
ACAGCTTCCTATGAGGACCGGGTACCTTCTGCCACTGGTATCACCTCAAGTCCGT  
GACACGGGAAGACACTGGGACATACACTTGTATGGTCTTGAGGAAGGCGAACAGCT  
ATGGGGAGGTCAAGGTCAAGCTCATCGTGCTTGTGCCTCCATCCAAGCCTACAGTTAAC  
ATCCCCCTCCTGCCACCATGGAACCGGGCAGTGCTGACATGCTCAGAACAGATGG 20  
TTCCCCACCTTCTGAATACACCTGGTCAAAGATGGGATAGTGATGCCTACGAATCCA  
AAAGCACCCGTGCCCTCAGCAACTCTTCATGTCCATGTGAATCCCACAAACAGGAGAGCTG  
GTCTTGATCCCCGTGCAGCCTCTGATACTGGAGAATACAGCTGTGAGGCACGGAATGG  
GTATGGGACACCCATGACTTCAAATGCTGCGCATGGAAGCTGGAGCGGAATGTGG  
GGGTGATCGTGGCAGCCGTCCTGTAACCTGATTCTCCTGGGATCTGGTTTGGC 30  
ATCTGGTTGCCTATAGCCAGGCCACTTGACAGAACAAAGAAAGGGACTTCGAGTAA  
GAAGGTGATTTACAGCCAGCCTAGTGCCAGTGAAGGAGAATTCAAACAGACCTCGT  
CATTCTGGTGTGA.
```

【0094】

例として、ヒトC D 3 2 1前駆体タンパク質配列は、N C B I G e n b a n k受託番号N P _ 0 5 8 6 4 2 . 1が付けられ、以下に再現されている(配列番号2)：

```
MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLAGSVTVHSSEPEVRI彭NPVKLSCAYSGFSSPRVE  
WKFDQGDTTRLVCYNNKITASYEDRVTFLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGNSYGE  
VKVKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGVIMPTNPKSTRA 30  
FSNSSYVNLNPTTGELEVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTGPMTSNAVRMEAVERNVGVIVAA  
VLVTLLGILVFGIWFAYSRGHFDRKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEGFKQTSSFLV.
```

【0095】

当業者は、配列データベース又は本明細書で表される配列が、マーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸の前駆体のものであり得、成熟分子から処理された部分を含み得ることを理解することができる。例として、配列番号2のアミノ酸1～27は、成熟C D 3 2 1から処理されたシグナルペプチドを構成することが示され又は予測される。

【0096】

当業者は、すべてのC D 3 2 1アイソフォームが含まれることを理解することができる。例として、C D 3 2 1の選択的スプライシングアイソフォームは、以下に示される配列番号3のアミノ酸81～129を欠いていることが知られている(配列番号3)：

```
MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLAGSVTVHSSEPEVRI彭NPVKLSCAYSGFSSPRVE  
WKFDQGDTTRLVCYNNKITVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGVIMPTNPKSTRA  
IVMPTNPKSTRAFSNSSYVNLNPTTGELEVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTGPMTSNAVRMEAVERNVGVIVAA  
AVERNVGVIVAAVLVTLLGILVFGIWFAYSRGHFDRKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEGFKQTSSFLV
```

【0097】

例として、ヒトC D 4 5、L S P 1、C D 4 8、C D 3 6、C D 4 1、C D 4 2 a、C D 4 2 b、及びC D 6 1のm R N A及びタンパク質配列には、以下のN C B I G e n b

10

20

30

40

50

a n k 受託番号が付けられている： C D 4 5 タンパク質 (N P _ 0 0 2 8 2 9 . 3 、 N P _ 5 6 3 5 7 8 . 2) 、 C D 4 5 m R N A (N M _ 0 0 2 8 3 8 . 4 、 N M _ 0 8 0 9 2 1 . 3) ； L S P 1 タンパク質 (N P _ 0 0 1 0 1 3 2 7 1 . 1 、 N P _ 0 0 1 0 1 3 2 7 2 . 1 、 N P _ 0 0 1 0 1 3 2 7 3 . 1 、 N P _ 0 0 1 2 2 9 8 6 1 . 1 N P _ 0 0 1 2 7 5 9 3 4 . 1 、 N P _ 0 0 2 3 3 0 . 1) ； L S P 1 m R N A (N M _ 0 0 1 0 1 3 2 5 3 . 1 、 N M _ 0 0 1 0 1 3 2 5 4 . 1 、 N M _ 0 0 1 0 1 3 2 5 5 . 1 、 N M _ 0 0 1 2 4 2 9 3 2 . 1 、 N M _ 0 0 1 2 8 9 0 0 5 . 1 、 N M _ 0 0 2 3 3 9 . 2) ； C D 4 8 タンパク質 (N P _ 0 0 1 7 6 9 . 2) ； C D 4 8 m R N A (N M _ 0 0 1 7 7 8 . 3) ； C D 3 6 タンパク質 (N P _ 0 0 0 0 6 3 . 2 、 N P _ 0 0 1 0 0 1 5 4 7 . 1 、 N P _ 0 0 1 0 0 1 5 4 8 . 1 、 N P _ 0 0 1 1 2 0 9 1 5 . 1 、 N P _ 0 0 1 1 2 0 9 1 6 . 1 、 N P _ 0 0 1 2 7 6 8 3 7 . 1 、 N P _ 0 0 1 2 7 6 8 3 8 . 1 、 N P _ 0 0 1 2 7 6 8 4 0 . 1 、 X P _ 0 0 5 2 5 0 7 7 0 . 1 、 X P _ 0 0 5 2 5 0 7 7 1 . 1 、 X P _ 0 0 5 2 5 0 7 7 2 . 1) ； C D 3 6 m R N A (N M _ 0 0 0 0 7 2 . 3 、 N M _ 0 0 1 0 0 1 5 4 7 . 2 、 N M _ 0 0 1 0 0 1 5 4 8 . 2 、 N M _ 0 0 1 1 2 7 4 4 3 . 1 、 N M _ 0 0 1 1 2 7 4 4 4 . 1 、 N M _ 0 0 1 2 8 9 9 0 8 . 1 、 N M _ 0 0 1 2 8 9 9 0 9 . 1 、 N M _ 0 0 1 2 8 9 9 1 1 . 1 、 X M _ 0 0 5 2 5 0 7 1 3 . 1 、 X M _ 0 0 5 2 5 0 7 1 4 . 1 、 X M _ 0 0 5 2 5 0 7 1 5 . 4) ； C D 4 1 タンパク質 (N P _ 0 0 0 4 1 0 . 2 、 X P _ 0 1 1 5 2 3 0 5 1 . 1) ； C D 4 1 m R N A (N M _ 0 0 0 4 1 9 . 4 、 X M _ 0 1 1 5 2 4 7 4 9 . 1) ； C D 4 2 a タンパク質 (N P _ 0 0 0 1 6 5 . 1 、 X P _ 0 0 5 2 4 7 4 3 1 . 1 、 X P _ 0 1 1 5 1 1 0 0 3 . 1 、 X P _ 0 1 1 5 1 1 0 0 4 . 1) ； C D 4 2 a m R N A (N M _ 0 0 0 1 7 4 . 4 、 X M _ 0 0 5 2 4 7 3 7 4 . 3 、 X M _ 0 1 1 5 1 2 7 0 1 . 1 、 X M _ 0 1 1 5 1 2 7 0 2 . 1) ； C D 4 2 b タンパク質 (N P _ 0 0 0 1 6 4 . 5) ； C D 4 2 b m R N A (N M _ 0 0 0 1 7 3 . 6) ； C D 6 1 タンパク質 (N P _ 0 0 0 2 0 3 . 2) ； C D 6 1 m R N A (N M _ 0 0 0 2 1 2 . 2) 。

【 0 0 9 8 】

本明細書に開示される特定の態様及び実施形態は、生体試料中の循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現を検出することを含む、生体試料中の循環腫瘍細胞 (C T C) を同定することに依存し、循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現により、上記細胞が C T C であると同定される。

【 0 0 9 9 】

「循環細胞」との用語は、対象の循環液中又は滲出液中若しくは分泌液中に存在するか又は見出される任意の細胞を指す。この用語は、特に、対象の循環液中、好ましくは対象の血液中又はリンパ液中、より好ましくは対象の血液中、さらにより好ましくは対象の末梢血に存在するか又は見出される細胞を示し得る。

【 0 1 0 0 】

循環細胞には、造血細胞及び非造血細胞が含まれる。「造血細胞」との用語は、血液細胞成分を形成する細胞、より特定的には造血幹細胞若しくは造血前駆細胞に由来する細胞、及び／又は赤血球系統、リンパ系統、若しくは骨髄系統に由来する細胞を意味する。造血細胞の例には、赤血球、白血球、及び血小板が含まれる。

【 0 1 0 1 】

反対に、「非造血細胞」との用語は、造血幹細胞若しくは造血前駆細胞に由来していないか、又は赤血球系統、リンパ系統、及び骨髄系統以外の細胞系統に由來した任意の細胞を広く包含する。非造血細胞の例には、赤血球、白血球、及び血小板以外の細胞が含まれる。例として、循環非造血細胞は、血液若しくはリンパ液などの循環系に、又は血液、造血組織、リンパ組織以外の組織若しくは臓器由来の滲出液若しくは分泌液に流れ出る。

【 0 1 0 2 】

循環細胞は、細胞の形態、挙動、及び／又はマーカー発現の評価に基づくなどの任意の好適な基準により、造血性又は非造血性のいずれかとして同定又は分類することができる。例として、形態学的に、赤血球 (e r y t h r o c y t e) (赤血球 ((r e d b l

10

20

30

40

50

ood cell))は、両凹形状、約 6 ~ 8 μm の直径、及び細胞核の欠如によって同定することができ、血小板 (thrombocyte) (血小板 (platelet)) は、レンズ形状、約 2 ~ 3 μm の最大直径、及び細胞核の欠如によって同定することができる。例として、赤血球は、1 × ACK (塩化アンモニウムカリウム) (Ammonium Chloride Potassium) 緩衝液 (155 mM NH₄C1、10 mM KHCO₃、0.1 mM EDTA、pH 7.3) などの低張溶液中での溶解に対する比較的より大きな感度によって、又は好ましくは赤血球を溶解するための古典的な低張ショック (赤血球が溶解されるまでに約 10 ~ 20 秒間であることを可能とする好適量の水中の 0.2% w/v NaCl 溶液を添加し、同じ体積の水中の 1.6% w/v NaCl 溶液を添加することによって等張性を回復させる) を使用して、あるいは好ましくはまた市販の BD FACS (商標) 溶解液 (カタログ番号 349202; h t t p : / / www.bdbiosciences.com / ds / is / tds / 23 - 1358.pdf) を使用して、同定することができる。例として、抗凝固血液の沈降により赤血球、白血球、血小板を単離することができ、したがってそれらを同定することができ、この沈降により、赤血球が底層に集まり、白血球及び血小板が底層と最上部プラズマ層との間に挟まれたバフィーコートに集まる。

【0103】

特定の実施形態では、白血球は、例えば、CD45 (タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体 C 型 ; PTPRC)、白血球特異的リンタンパク質 - 1 (LSP1)、及び / 又は CD48 (B リンパ球活性化マーカー、BLAST - 1、シグナル伝達リンパ球活性化分子 2、SLAMF2) などの少なくとも 1 つの汎白血球マーカーの発現 (陽性) の存在によって同定することができる。

【0104】

特定の実施形態では、血小板は、例えば、CD36 (血小板糖タンパク質 4 ; 脂肪酸トランスロカーゼ ; FAT)、CD41 (インテグリン - IIB ; ITGA2B)、CD42a (糖タンパク質 IX (血小板) ; GP9)、CD42b (血小板糖タンパク質 Ib 鎖 ; GP1BA)、及び / 又は CD61 (インテグリン 3 ; ITGB3) などの少なくとも 1 つの血小板マーカーの発現が存在すること (陽性) によって同定することができる。

【0105】

特定の実施形態では、赤血球ではない循環細胞は、上記細胞による少なくとも 1 つの汎白血球マーカー及び少なくとも 1 つの血小板マーカーの発現が不存在であること (陰性) によって非造血細胞と同定することができる。

【0106】

特定の実施形態では、赤血球でもなく血小板でもない循環細胞は、該細胞による少なくとも 1 つの汎白血球マーカーの発現が存在であること (陰性) によって非造血細胞と同定することができる。

【0107】

特定の実施形態では、赤血球でもなく白血球でもない循環細胞は、該細胞による少なくとも 1 つの血小板マーカーの発現が存在であること (陰性) によって非造血細胞と同定することができる。

【0108】

したがって、特定の実施形態では、循環 CD321 陽性細胞、特に循環 CD321 陽性腫瘍細胞は、該細胞による少なくとも 1 つの汎白血球マーカーの発現が存在であることによって非造血性であると同定される。

【0109】

特定の実施形態では、循環 CD321 陽性細胞、特に循環 CD321 陽性腫瘍細胞は、該細胞による少なくとも 1 つの汎白血球マーカー及び少なくとも 1 つの血小板マーカーの発現が存在することによって非造血性であると同定される。

【0110】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書で教示される方法は、以下の工程：

a) 対象由来の生体試料を提供する工程であって、該生体試料が対象由来の循環細胞を含む、提供する工程と、

b) 上記生体試料において、少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに対して陰性であり、かつ少なくとも 1 つの血小板マーカーに対して陰性である非造血細胞を検出する工程と、

c) b) で検出された細胞による CD321 の発現の検出する工程であって、b) で検出された細胞による CD321 の発現によって、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定される、検出する工程と、を含み得る。

【 0 1 1 1 】

工程 a) において、生体試料は、好ましくは、対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は他の滲出液若しくは分泌液、より好ましくは対象の末梢血由来の循環細胞を含み得る。 10

【 0 1 1 2 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の実施形態では、汎白血球マーカーは、 CD 45 、 LSP1 、 CD48 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 1 1 3 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の実施形態では、血小板マーカーは、 CD3 6 、 CD41 、 CD42a 、 CD42b 、 CD61 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 1 1 4 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の実施形態では、汎白血球マーカーは、 CD45 、 LSP1 、 CD48 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、血小板マーカーは、 CD36 、 CD41 、 CD42a 、 CD42b 、 CD61 、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。 20

【 0 1 1 5 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の好ましい実施形態では、汎白血球マーカーは CD45 である。

【 0 1 1 6 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の好ましい実施形態では、血小板マーカーは CD42a である。

【 0 1 1 7 】

本明細書で教示される方法及び使用の特定の好ましい実施形態では、汎白血球マーカーは CD45 であり、血小板マーカーは CD42a である。 30

【 0 1 1 8 】

マーカー、例えばペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくは核酸、又は 2 つ以上のマーカーの群は、好ましくは他の分子及び分析物、例えば他のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸を実質的に排除して、上記マーカー又は上記マーカー群の有無及び / 又は量が検査物中で検出され又は決定される場合、検査対象物中で（例えば、細胞、細胞集団、組織、器官、又は生物中で又はそれらに対して、例えば対象由来の生体試料において）「測定される」。

【 0 1 1 9 】

特に、マーカーの種類（例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸）、検査物の種類（例えば、細胞、細胞集団、組織、器官、又は生物、例えば、対象の生体試料の種類、例えば、全血、組織生検）、検査物中のマーカーの予想される存在量、並びにマーカーを検出するために使用される検出方法の種類、頑健性、感度、及び / 又は特異性などの当業者によって評価及び決定することができる要因に応じて、マーカーを検査物中で直接測定してもよいし、又は検査物をマーカーの適切な測定を達成することを目的とした 1 つ以上の処理工程に供してもよい。 40

【 0 1 2 0 】

既存の、利用可能な、又は従来の任意の分離、検出、及び / 又は定量化方法を使用して、検査物中の（例えば、細胞、細胞集団、組織、器官、若しくは生物中の又はそれらに対

10

20

30

40

50

する、例えば、対象由来の生体試料中のマーカーの有無(例えば、存在対不存在又は検出可能な量対検出不能な量の読み出し)及び/又は量(例えば、絶対量又は相対量の読み出し)を測定し得る。

【0121】

特定の例において、そのような方法には、特に、酵素活性、膜チャネル活性、物質結合活性、遺伝子調節活性、又はマーカー、例えばペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくは核酸の細胞シグナル伝達活性のアッセイを含む、生化学的アッセイ方法が含まれ得る。

【0122】

他の例では、そのような方法には、マーカー(好ましくは、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質など)を分離、検出、及び/又は定量化するアッセイの能力が、単離可能、検出可能、及び/又は定量化可能な免疫学的結合作用因子(抗体)などの結合作用因子とマーカーとの間の特異的結合によって付与される、免疫学的アッセイ法が含まれ得る。免疫学的アッセイ法には、限定されないが、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別(FACS)、蛍光顕微鏡法、マイクロ流体システムを使用した蛍光ベースの細胞選別、親和性クロマトグラフィーなどの免疫親和性吸着ベースの技術、磁性粒子分離、磁気活性化細胞選別、又はマイクロ流体システムを使用したビーズベースの細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びELISPOTベースの技術、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンプロットなどが含まれる。

【0123】

さらなる例では、そのような方法には質量分析法が含まれ得る。一般に、ペプチドの質量に関する、好ましくは選択されたペプチドの断片化及び/又は(部分)アミノ酸配列に関する、正確な情報を取得することができる任意の質量分析(MS)技術(例えば、タンデム質量分析、MS/MS; 又はポストソース分解、TOF MS)は、マーカー(好ましくはペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質など)の分離、検出、及び/又は定量化に対して本明細書で有用であり得る。好適なペプチドMS及びMS/MS技術並びにシステムは、それ自体周知であり(例えば、Methods in Molecular Biology, vol.146: 'Mass

Spectrometry of Proteins and Peptides', by Chapman, ed., Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. Methods Enzymol 193: 455-79; 又はMethods in Enzymology, vol.402: 'Biological Mass Spectrometry', by Burlingame, ed., Academic Press 2005, ISBN 9780121828073を参照のこと)、本明細書で使用し得る。バイオマーカーペプチド分析に適したMSの装置、機器、及びシステムには、限定されないが、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)MS、MALDI-TOFポストソース分解(PSD); MALDI-TOF/TOF; 表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF)MS; エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)ⁿ(nはゼロより大きい整数); ESI 3D又はリニア(2D)イオントラップMS; ESIトリプル四重極型MS; ESI四重極直交型TOF(Q-TOF); ESIフーリエ変換MSシステム; シリコン上脱離/イオン化(DIOS); 二次イオン質量分析(SIMS); 大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS)ⁿ; 大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS); APPI-MS/MS; 及びAPPI-(MS)ⁿが含まれ得る。タンデムMS(MS/MS)装置でのペプチドイオン断片化は、例えば衝突誘起解離(CID)などの当該技術分野で確立された方法を使用して達成し得る。質量分析によるマーカーの検出及び定量化は、特にKuhn et al.

2004(Proteomics 4: 1175-86)によって記載されるような多重反応モニタリング(MRM)を使用し得る。MSペプチド分析方法は、上流ペプチド若しくはタンパク質の分離又は画分方法、例えばクロマトグラフィー及び他の方法などと有

10

20

30

40

50

利に組み合わせてもよい。

【 0 1 2 4 】

他の例では、そのような方法にはクロマトグラフィー法が含まれ得る。「クロマトグラフィー」との用語は、化学物質又は生物学的物質などの物質、例えば、好ましくはペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質などのマーカーを分離するための方法を包含し、当該技術分野ではそのように称され、広く利用可能である。好ましい手法では、クロマトグラフィーは、液体又は気体の移動流（「移動相」）によって運ばれる物質の混合物（分析物）が、これらが上記移動相と固定相との間での固定された液相又は固相（「固定相」）の周囲又はその上を流れるときの分析物の異なる分布の結果として、成分に分離されるプロセスを指す。固定相は、通常、微細化固体、フィルター材料のシート、又は固体表面上の液体の薄膜などであり得る。クロマトグラフィーは、生体由来の化合物、例えばアミノ酸、タンパク質、タンパク質又はペプチドの断片などの単離にも広く適用可能である。10

【 0 1 2 5 】

クロマトグラフィーは、好ましくはカラムナー（すなわち、ここでは固定相がカラムに堆積又は充填されている）、好ましくは液体クロマトグラフィー、さらにより好ましくはHPLCであり得る。クロマトグラフィーの詳細は当該技術分野で周知であるが、さらなるガイダンスのために、例えば、Meyer M., 1998, ISBN:047198373X、及び「Practical HPLC Methodology and Applications」, Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc.,

1993を参照のこと。クロマトグラフィーの例示的な種類には、限定されないが、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、順相HPLC（NP-HPLC）、逆相HPLC（RP-HPLC）、陽イオン又は陰イオン交換クロマトグラフィーなどのイオン交換クロマトグラフィー（IEC）、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、ゲル濾過クロマトグラフィー又はゲル透過クロマトグラフィーを含むサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、クロマトフォーカシング、免疫親和性クロマトグラフィー、固定化金属親和性クロマトグラフィーなどの親和性クロマトグラフィーなどが含まれる。20

【 0 1 2 6 】

好ましくはペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質などのマーカーを分離、検出、及び／又は定量化するためのさらなる技術を、上記の分析方法のいずれかと任意選択で組み合わせて使用し得る。そのような方法には、限定されないが、化学抽出分配、キャピラリー等電点電気泳動（CEF）、キャピラリー等速電気泳動（CITP）、キャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）などを含む等電点電気泳動（IEF）、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D-PAGE）、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）、キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、ミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）、フリーフロー電気泳動（FFE）などが含まれる。30

【 0 1 2 7 】

特定の例において、そのような方法は、核酸レベル、より特定的にはRNAレベル、例えばhnRNA、プレmRNA、mRNA、又はcDNAのレベルでマーカーを分離、検出、及び／又は定量化することを含み得る。当該技術分野で知られている標準的な定量的RNA又はcDNA測定ツールを使用し得る。非限定的な例には、ハイブリダイゼーションベースの分析、マイクロアレイ発現分析、デジタル遺伝子発現プロファイリング（DG E）、RNAインサイチューハイブリダイゼーション（RISH）、ノーザンプロット分析など；PCR、RT-PCR、RT-qPCR、エンドポイントPCR、デジタルPCRなど；支持（supported）オリゴヌクレオチド検出、パイロシーケンシング、合成によるポロニーサイクリックシーケンシング（polony cyclic sequencing）、同時双方向シーケンシング、シングルモレキュールシーケンシング（single-molecule sequencing）、シングルモレキュールリアルタイムシーケンシング（single molecule real time sequ40

10

20

30

40

50

encoding)、トゥルーシングルモレキュールシーケンシング(true single molecule sequencing)、ハイブリダイゼーション支援ナノポアシーケンシング(hybridization-assisted nanopore sequencing)、合成によるシーケンシング(sequencing by synthesis)、単一細胞RNAシーケンシング(sc-RNA seq)などが含まれる。

【0128】

さらなる例では、本明細書で論じたような方法の任意の組み合わせを使用し得る。

【0129】

本明細書で特定される腫瘍細胞又はCTCなどの細胞は、特にCD321陽性腫瘍細胞又はCTCなどの細胞によって発現される又は発現されないペプチド、ポリペプチド、タンパク質、若しくは核酸などの特定のマーカー又はマーカーの組み合わせに関して一般に記載され又は特徴付けられる。したがって、特定の細胞を検出、定量化、又は単離するための本方法は、マーカーをベースとし、すなわち、本明細書では、マーカーの発現があること又はマーカーの発現が不存在であることが特定の細胞を象徴化する又は特徴づけるものとして教示される、マーカー又はマーカーの組み合わせを発現する又は発現しない細胞の検出、定量化、又は単離を伴い得るものであり、又はそれらの検出を伴い得る。

10

【0130】

既存の、利用可能な、若しくは従来の任意の分離、検出、及び／又は定量化方法を使用して、検査物(例えば、細胞集団、組織、器官、若しくは生物、又は対象由来の生体試料)中の特定の細胞の有無(例えば、存在対不存在又は検出可能な量対検出不能な量の読み出し)及び／又は量(例えば、絶対量又は相対量の読み出し)を測定してもよいし、又は上記検査物から特定の細胞を単離してもよい。そのような方法により、検査物に含まれる他の細胞を実質的に排除して、検査物(例えば、細胞集団、組織、器官、生物、又は対象由来の生体試料)中の特定の細胞又は該検査物から特定の細胞を検出、定量化、又は分離することが可能となる。そのような方法により、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、若しくはさらには100%の感度で、及び／又は少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、若しくはさらには100%の特異性で、特定の細胞を検出、定量化、又は分離することが可能となり得る。例として、そのような方法によって検出、定量化、又は単離されたすべての細胞の少なくとも40%(数による)、例えば、少なくとも45%、好ましくは少なくとも50%、少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも65%、さらにより好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、さらにより好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又はさらに100%は、特定の細胞、特に特定の腫瘍細胞又はCTCなどに対応し得る。

20

30

40

【0131】

特定の実施形態では、特定の細胞を検出、定量化、又は単離するための方法は、細胞の生存能力を低下させる又は無くす処置又は工程を含み得る。例えば、細胞内マーカーを測定することを含む方法は、典型的には、細胞膜の透過化及び潜在的に細胞の固定を必要とし、核酸マーカーを測定することを含む方法は、典型的には、細胞から核酸(特にRNA、より特定的にはmRNAなど)を取得することを必要とし得る。特定の他の実施形態では、特定の細胞を検出、定量化、又は単離するための方法は、細胞の生存率を実質的に維持し得る。例えば、細胞外又は細胞表面マーカーを測定することを含む方法は、細胞膜の

50

完全性を乱すことを必要とせず、細胞の固定／透過化を必要としなくてよい。

【 0 1 3 2 】

特定の実施形態では、特定の細胞を検出、定量化、又は単離する方法は、单一細胞ベースであり得、すなわち、特定の細胞を個々の細胞として個別的に検出、定量化、又は単離することを可能にし得る。他の実施形態では、特定の細胞を検出、定量化、又は分離する方法は、細胞集団ベースであり得、すなわち、個々の細胞に関する情報を提供することなく又は個々の細胞を単離することなく、特定の細胞を細胞の群又は集合として検出、定量化、又は分離することを単に可能とし得る。

【 0 1 3 3 】

特定の細胞を検出、定量化、又は単離するための方法は、マーカーの分離又は定性的及び／若しくは定量的測定が特定の細胞の検出、定量化、又は分離と相關するか又はそれらに変換され得る限り、マーカーを測定するための上記の技術のいずれかを使用し得る。例えば、マーカーを測定するための上記の生化学的アッセイ法、免疫学的アッセイ法、質量分析法、クロマトグラフィー法、若しくは核酸分析法、又はそれらの組み合わせのいずれかを、特定の細胞の検出、定量化、又は単離に使用し得る。

10

【 0 1 3 4 】

したがって、特定の実施形態では、腫瘍細胞又はC T Cは、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される。

20

【 0 1 3 5 】

フローサイトメトリーは、細胞集団の個々の細胞を、これらが單一列の狭い流れにおいてレーザービームを通過する際の光学特性（例えば、吸光度、光散乱、及び蛍光特性など）によって分析する方法を包含する。フローサイトメトリー法には、特定の光学特性を有する細胞集団を他の細胞から分離する蛍光活性化細胞選別（F A C S）法が含まれる。

【 0 1 3 6 】

元素質量分析ベースのフローサイトメトリー又はマスサイトメトリーは、蛍光色素標識結合試薬を質量タグ付けした結合試薬、すなわち、定義された質量を有する元素又は同位体でタグ付けした結合試薬に置き換えることによって細胞を分析する手法を提供する。これらの方法では、標識された粒子はマスサイトメーターに導入され、そこでこれらの粒子は個別に霧化及びイオン化される。次いで、個々の粒子を元素分析に供し、使用された質量タグの存在量を同定及び測定する。次いで、各粒子と関連する同位体元素の識別性及び量が保存及び分析される。元素分析の分解能及び使用し得る元素同位体の数により、1つの粒子に対して最大100個以上のパラメーターを同時に測定することが可能である。

30

【 0 1 3 7 】

蛍光顕微鏡法は、細胞集団の個々の細胞をそれらの蛍光特性により顕微鏡で分析する方法を広く包含する。蛍光顕微鏡法での手法は、手動、好ましくは半自動又は自動であってよい。

【 0 1 3 8 】

親和性クロマトグラフィーとも称する親和性分離は、好適な液相（例えば、懸濁水溶液中の細胞集団）などの移動相に存在する細胞と好適な固相などの固定相との特異的相互作用及びそれによる該細胞の該固定相への吸着、続いて残りの移動相からの固定相の分離、及び固定相からの吸着細胞の回収（例えば、溶出）を伴う技術を広く包含する。親和性分離はカラムナーであってもよく、あるいは遠心分離又は磁場の印加（例えば、固定相が磁性粒子又はビーズなどの磁性粒子を含む）などの好適な技術によって固定相が液相から回収／分離されるバッチ処理を伴ってよい。したがって、磁気細胞分離もまた本明細書で企図される。

40

【 0 1 3 9 】

マイクロ流体システムは、様々な物理的原理を利用して、正確かつ高スループットの細胞検出、定量化、及び／又は選別を可能にする。マイクロチップ上の細胞選別は、必要

50

な機器のサイズを小さくし、潜在的に生物危害を与えるエアロゾルを排除し、細胞選別に一般的に関連する複雑なプロトコルを簡素化することにより、多くの利点を提供する。本明細書全体にわたって使用される「マイクロ流体システム」との用語は、1つ以上の流体マイクロチャネルを有するシステムを広く指す。マイクロチャネルは、最大値が典型的には1mm未満、好ましくは500μm未満、より好ましくは400μm未満、より好ましくは300μm未満、より好ましくは200μm未満、例えば100μm以下である断面寸法を有する流体チャネルを示す。そのようなマイクロ流体システムは、流体、及び／又は液滴、気泡、カプセル、粒子、細胞などの物体を操作するために使用することができる。マイクロ流体システムは、例えば、蛍光標識ベース（例えば、フルオロフォアが結合した抗体などのフルオロフォアが結合した結合作用因子を使用）の細胞選別、ビーズベース（例えば、ビーズが結合した抗体などのビーズが結合した結合作用因子）の細胞選別、又は非標識（label-free）細胞選別（Shields et al., Lab Chip. 2015, vol. 15: 1230-1249に総説されている）を可能とし得る。

【0140】

特定の実施形態では、上記の方法及び技術は、腫瘍細胞又はCTCなどの本明細書で特定される細胞によって発現される又は発現されないペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸などの1つ以上のマーカーに特異的に結合できる作用因子を使用し得る。

【0141】

したがって、特定の実施形態では、技術は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を使用する。

【0142】

さらなる実施形態では、技術は、

- CD45、LSP1、及びCD48からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーなどの少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子、及び1つ以上の作用因子CD36、CD41、CD42a、CD42b、及びCD61からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーなどの少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる作用因子；若しくは

- CD45、LSP1、及びCD48からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーなどの少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子；又は

- CD36、CD41、CD42a、CD42b、及びCD61からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーなどの少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子をさらに使用する。

【0143】

結合作用因子は、様々な形態であってもよく、例えば、凍結乾燥され、溶液中に遊離され、又は固相上に固定化されていてもよい。それらは、例えば、マルチウェルプレートにおいて、又はアレイ若しくはマイクロアレイとして提供されてもよく、あるいはそれらは別々に、個別に、又は組み合わせて包装されてもよい。

【0144】

本明細書全体にわたって意図される結合作用因子には、特に、抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、アプタマー、シュピーゲルマー（spiegelmer）（L-アプタマー）、光アプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、オリゴヌクレオチドなどの核酸（例えば、ハイブリダイゼーションプローブ又は增幅若しくは配列決定プライマー及びプライマー対）、低分子、又はそれらの組み合わせが含まれてもよい。

【0145】

特定の好ましい実施形態では、1つ以上の結合作用因子は、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである。

【0146】

本明細書全体にわたって使用される「特異的に結合する」との用語は、実質的に無作為

的な又は関連のない他の分子を排除し、及び任意選択で実質的に構造的に関連する他の分子を除外して、作用因子（本明細書では「結合作用因子」又は「特異的結合作用因子」としても示される）が1つ以上の所望の分子又は分析物（例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸）に結合することを意味する。「特異的に結合する」との用語は、作用因子がその意図された標的に排他的に結合することを必ずしも必要としない。例えば、結合条件下でのそのような意図された標的に対する親和性が、好適な対照分子（例えば、ウシ血清アルブミン、カゼイン）などの非標的分子に対する親和性よりも、少なくとも約2倍大きい、好ましくは少なくとも約5倍大きい、より好ましくは少なくとも約10倍大きい、さらに好ましくは少なくとも約25倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも約50倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも約100倍大きい、又は少なくとも約1000倍大きい、若しくは少なくとも約 10^4 倍大きい、若しくは少なくとも約 10^5 倍大きい、若しくは少なくとも約 10^6 倍大きい、又はそれ以上大きい場合、作用因子は目的の標的に特異的に結合すると言つてもよい。

【0147】

好ましくは、特異的結合作用因子は、 $K_A = 1 \times 10^6 M^{-1}$ 、より好ましく $K_A = 1 \times 10^7 M^{-1}$ 、さらに好ましくは $K_A = 1 \times 10^8 M^{-1}$ 、さらにより好ましくは $K_A = 1 \times 10^9 M^{-1}$ 、さらに好ましくは $K_A = 1 \times 10^{10} M^{-1}$ 若しくは $K_A = 1 \times 10^{11} M^{-1}$ 又は $K_A = 1 \times 10^{12} M^{-1}$ のそのような結合の親和性定数（ K_A ）で意図された標的に結合することができ、ここで、 $K_A = [SBA_T] / [SBA][T]$ であり、SBAは特異的結合作用因子を示し、Tは意図された標的を示す。 K_A の決定は、例えば平衡透析及びスキヤッチャードプロット分析などを使用した当該技術分野で知られている方法で行うことができる。

【0148】

本明細書で使用される場合、「抗体」との用語は、その最も広い意味で使用され、一般に任意の免疫学的結合作用因子を指す。この用語は、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成される多価（例えば、2価、3価以上の）抗体及び/又は多重特異性抗体（例えば、二重以上の特異性抗体）、並びに所望の生物学的活性（特に目的の抗原、すなわち抗原結合断片に特異的に結合する能力）を示す限り抗体断片、並びにそのような断片の多価複合体及び/又は多重特異性複合体を具体的に包含する。「抗体」との用語は、免疫化を含む方法によって生成された抗体を含むだけでなく、任意のポリペプチド、例えば、目的の抗原上のエピトープに特異的に結合することができる少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含むように作成される組換え発現ポリペプチドも含む。したがって、この用語は、インビトロ又はインビボで生成されるかどうかに関わらず、そのような分子に適用される。

【0149】

抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMクラス抗体のいずれか、好ましくはIgGクラス抗体であり得る。抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、それらから精製された（例えば、親和性精製された）抗血清又は免疫グロブリンであり得る。抗体は、モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体の混合物であり得る。モノクローナル抗体は、より高い選択性及び再現性で特定の抗原又は抗原内の特定のエピトープを標的化することができる。限定ではなく例として、モノクローナル抗体は、Kohler et al. 1975 (Nature 256: 495) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製し、又は組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号）によって作製し得る。モノクローナル抗体はまた、Clackson et al. 1991 (Nature 352: 624 - 628) 及びMarks et al. 1991 (J Mol Biol 222: 581 - 597) によって記載された技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離し得る。

【0150】

抗体結合作用因子は抗体断片であり得る。「抗体断片」は、無傷の抗体の一部を含み、これは該抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、

10

20

30

40

50

F(ab')₂、Fv、及びscFv断片、VHドメイン、VLドメイン、及びVHHドメインなどの單一ドメイン(sd)Fv、ダイアボディ、線状抗体(linear antibodies)、单鎖抗体分子、特に重鎖抗体、並びに抗体断片から形成される多価抗体及び/又は多重特異性抗体、例えば、ダイアボディ、トリボディ(triabodies)、及びマルチボディ(multiabodies)が含まれる。上記の名称Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFvなどは、それらの分野で確立されている意味を有することが意図される。

【0151】

抗体との用語は、任意の動物種、好ましくは、例えば鳥類及び哺乳動物を含む脊椎動物種に由来する1つ以上の部分に由来する抗体又はそれを含む抗体を含む。限定されないが、抗体は、ニワトリ、七面鳥、ガチョウ、アヒル、ホロホロチョウ、ウズラ、又はキジであり得る。抗体はまた、限定されないが、ヒト、ネズミ(例えばマウス、ラットなど)、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ブタ、ラクダ(例えば、カメリス・バクトリアヌス(Camelus bactrianus)及びカメリス・ドロマデリウス(Camelus dromaderius))、ラマ(例えば、ラマ・パッコス(Lama pacos)、ラマ・グラマ(Lama glama)、若しくはラマ・ビクーニャ(Lama vicugna))、又はウマであり得る。

10

【0152】

当業者は、抗体が、1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、及び/又は置換(例えば保存的置換)を、そのような改変がそれぞれの抗原の結合を維持する限り含むことができるこことを理解するであろう。抗体はまた、その構成アミノ酸残基の1つ以上の天然又は人工の修飾(例えば、グリコシル化など)を含み得る。

20

【0153】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体並びにそれらの断片を作製する方法は、組換え抗体又はその断片を作製する方法と同様に、当該技術分野で周知である(例えば、「Antibodies:A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow and Lane, 「Using Antibodies:A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour

Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques", by Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; 「Monoclonal Antibodies:A Practical Approach」, by Dean & Shepherd, eds., Oxford University Press

30

2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248:「Antibody Engineering:Methods and Protocols」, Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921)。

【0154】

特定の実施形態では、作用因子はナノボディ(登録商標)であり得る。「ナノボディ(Nanobody)(登録商標)」及び「ナノボディ(Nanobodies)(登録商標)」との用語は、Ablynx NV(ベルギー)の商標である。「ナノボディ」との用語は当該技術分野で周知であり、その最も広い意味で本明細書で使用される場合、(1)重鎖抗体、好ましくはラクダ科動物由来の重鎖抗体のVHHドメインを単離することにより、(2)VHHドメインをコードするヌクレオチド配列の発現により、(3)天然に存在するVHHドメインの「ヒト化」により、又はそのようなヒト化VHHドメインをコードする核酸の発現により、(4)任意の動物種由来、特に哺乳動物種由来、例えばヒト由来のVHドメインの「ラクダ化」、又はそのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現により、(5)当該技術分野で記載される「ドメイン抗体」若しくは「dAb」の「ラクダ化」、又はそのようなラクダ化dAbをコードする核酸の発現により、(6)タンパク質、ポリペプチド、又はそれ自体知られている他のアミノ酸配列を調製するための合成又は半合成技術を使用することにより、(7)それ自体知られている核酸合成のための技術を使用してナノボディをコードする核酸を調製し、続いてそのようにして得られ

40

50

た核酸の発現により、及び／あるいは（8）上記のうちの1つ以上の任意の組み合わせにより、得られる免疫学的結合作用因子を包含する。本明細書で使用される「ラクダ科動物」は、旧世界のラクダ科動物（カメリス・バクトリアヌス及びカメリス・ドロマデリウス）及び新世界のラクダ科動物（例えば、ラマ・パッコス、ラマ・グラマ、及びラマ・ビクニヤ）を含む。

【0155】

ヒトCD321に結合することができる抗体の例には、限定されないが、以下の供給業者から入手可能なものが含まれる（「#」はカタログ番号を表す）：Merck Millipore（#04-593、ウサギモノクローナル、クローンEP1042Y）；R&D Systems（#MAB1103、マウスモノクローナル、クローン65480）；Origene Antibodies（#TA506034、マウスモノクローナル、クローンOTI6E11；#TA506017、マウスモノクローナル、クローンOTI3H3）；Novus Biologicals（#H00050848-M01、マウスモノクローナル、クローン2E3-1C8）；Abcam（#ab17261、マウスモノクローナル、クローンM.Ab.F11；#ab201562、マウスモノクローナル、クローンMM0785-60M31）；Invitrogen（#14-9321-82、マウスモノクローナル、クローンWK9；#MA1-34731、マウスモノクローナル、クローンM.Ab.F11）；及びSanta Cruz（#sc-135956、マウスモノクローナル、クローン43；sc-53624、マウスモノクローナル、クローン1H2A9；#sc-53623、マウスモノクローナル、クローンJ10.4；#sc-53622、マウスモノクローナル、クローンJ3F.1；#sc-52690、マウスモノクローナル、クローンM.Ab.F11）。所与の抗原検出技術又は方法のための所与の抗体の適合性に関する情報は、抗体の供給業者から容易に入手できる。

【0156】

CD45、LSP1、若しくはCD48などの汎白血球マーカーに対する抗体又はCD36、CD41、CD42a、CD42b、若しくはCD61などの血小板マーカーに対する抗体などの、本明細書に記載の他のマーカー、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質に結合する多数の抗体はまた、様々な供給業者から市販されている。この情報はそれぞれの供給業者から取得でき、好都合に目録も作られ、Weizmann Institute（www.genecards.org）によって管理されるGeneCards（登録商標）データベースなどの公衆に利用可能なデータベースで検索することができる。

【0157】

「抗体様タンパク質足場」又は「工学操作された(engineered)タンパク質足場」との用語は、典型的にはコンビナトリアル工学（ファージディスプレイ又は他の分子選択技術と組み合わせた部位特異的ランダム突然変異誘発など）によって得られるタンパク質性の非免疫グロブリン特異的結合作用因子を広く包含する。通常、そのような足場は、頑健で小さな可溶性単量体タンパク質（クニット（Kunitz）阻害剤若しくはリポカリンなど）又は細胞表面受容体の安定的に折り畳まれた膜外ドメイン（プロテインA、フィブロネクチン、アンキリンリピートなど）に由来する。

【0158】

そのような足場は、Binz et al.、Gebauer及びSkerra、Gill 1及びDamble、Skerra 2000、並びにSkerra 2007で広範に概説されており、限定されないが、2つのアルファヘリックス上に境界面を提供する58残基の3つのヘリックス束であるブドウ球菌プロテインAのZドメインに基づくアフィボディ（Nygren）；異なるプロテアーゼ特異性用に設計することができる、小さくて（約58残基）頑健な、典型的にはヒト由来のジスルフィド架橋セリンプロテアーゼ阻害剤（例えば、LACI-D1）に基づく工学操作されたクニットドメイン（Nixon及びWood）；2～3つの露出したループを有するIg様の サンドイッチフォールド（94残基）を探るが中央のジスルフィド架橋を欠失する、ヒトフィブロネクチンIIIの10

10

20

30

40

50

番目の細胞外ドメイン(10Fn3)に基づくモノボディ又はアドネクチン(Koide及びKoide);ヒト、昆虫、及び他の多くの生物に豊富に存在する、開放端において4つの構造的に可変なループによって小さなリガンドに対する結合部位を自然に形成する8本鎖のバレルタンパク質(約180残基)の多様なファミリーである、リポカリン由来のアンチカリン(Skerra 2008);典型的には3回のターンの繰り返しに起因する堅固な境界面を提供する、設計されたアンキリンリピートドメイン(166残基)であるDARpins(Stumpp et al.);アビマー(多量体化LDLR-Aモジュール)(Silverman et al.);及びシステインリッチなノッティン(knottin)ペプチド(Kolmar)を含む。

【0159】

「アプタマー」との用語は、ペプチドなどの標的分子に特異的に結合する一本鎖若しくは二本鎖のオリゴDNA、オリゴRNA、若しくはオリゴDNA/RNA又はそれらの任意の類似体を指す。有利なことに、アプタマーは、標的に対してかなり高い特異性及び親和性(例えば、 $1 \times 10^9 M^{-1}$ のオーダーの K_A)を示す。アプタマーの作製は、特に、米国特許第5,270,163号; Ellington & Szostak 1990(Nature 346:818-822); Tuerk & Gold 1990(Science 249:505-510);又は「The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications」, by Klussmann, ed., Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592に記載され、これらは参考により本明細書に組み込まれる。

「光アプタマー」との用語は、標的分子に共有結合又は架橋することができる1つ以上の光反応性官能基を含有するアプタマーを指す。「シュピーゲルマー(spiegelmær)」との用語は、L-DNA、L-RNA、又は他の左巻きのヌクレオチド誘導体若しくはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左巻きのヌクレオチドを含有するアプタマーは、右巻きヌクレオチドを含有する基質に対して通常は作用する天然に存在する酵素による分解に対して耐性である。「ヌクレオチド模倣体」との用語は、対応するペプチドのトポロジカル類似体である非ペプチド作用因子を指す。ペプチドのペプチド模倣体を合理的に設計する方法は、当該技術分野で既知である。例えば、8マーの硫酸化ペプチドCCK26-33に基づく3つのペプチド模倣体及び11マーのペプチドサブスタンスPに基づく2つのペプチド模倣体の合理的設計、並びに関連するヌクレオチド模倣体の設計原理は、Horwelle 1995(Trends Biotechnol 13:132-134)に記載されている。

【0160】

本明細書全体にわたって使用される「オリゴヌクレオチド」との用語は、本明細書で定義される核酸(核酸類似体及び模倣体を含む)オリゴマー又はポリマーを指す。好ましくは、より特定的にはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドは、(実質的に)一本鎖である。本明細書で意図するオリゴヌクレオチドは、好ましくは長さが約10~約100ヌクレオシド単位(すなわち、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体)、好ましくは約15~約50、より好ましくは約20~約40、さらに好ましくは約20~約30であり得る。本明細書で意図するオリゴヌクレオチドは、1つ以上若しくはすべての天然に存在しない複素環式塩基及び/又は1つ以上若しくはすべての天然に存在しない糖基及び/又は1つ以上若しくはすべての天然に存在しないヌクレオシド間結合を含み得、これらを含ませると、例えば、ヌクレアーゼの存在下での安定性の増加、ハイブリダイゼーション親和性の増加、ミスマッチに対する寛容性の増加などの特性が改善され得る。

【0161】

オリゴヌクレオチド結合作用因子などの核酸結合作用因子は、典型的には、目的の標的核酸に対して少なくとも部分的にアンチセンスである。「アンチセンス」との用語は、一般に、例えば標的DNA、hnRNA、プレmRNA、又はmRNAなどの標的核酸中の所与の配列と特異的にアニーリングする(ハイブリダイズする)ように構成された作用因子(例えばオリゴヌクレオチド)を指し、典型的には、上記標的核酸配列に相補的又は実質的に相補的である核酸配列を含む、本質的にそれからなる、又はそれからなる。ハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーションプローブ又は増幅若しくは配列決定プライマー及びプライマー対などの本明細書での使用に好適なアンチセンス作用因子は、典型的には、高ストリンジエンシー条件でそれぞれの標的核酸配列とアニーリング（ハイブリダイズ）することが可能であり得、生理学的条件下で標的に特異的にハイブリダイズすることが可能であり得る。核酸に関する本明細書全体にわたって使用される「相補的」又は「相補性」との用語は、塩基対合、好ましくはワトソン・クリック塩基対合による、許容塩（イオン強度）及び温度条件下での一本鎖核酸の通常の結合を指す。例として、相補的なワトソン・クリック塩基対合は、塩基 A と T、A と U、又は G と C の間で起こる。例えば、配列 5' - A - G - U - 3' は配列 5' - A - C - U - 3' と相補的である。

【0162】

10

オリゴヌクレオチドへの言及は、特に、限定されないが、核酸検出技術で一般的に使用されるハイブリダイゼーションプローブ並びに / 又は増幅プライマー及び / 若しくは配列決定プライマーなどを含み得る。

【0163】

「低分子」との用語は、医薬品で一般的に使用される有機分子に相当するサイズを有する化合物、好ましくは有機化合物を指す。この用語は、生体高分子（タンパク質、ペプチド、核酸など）を除外する。好ましい有機低分子は、サイズが最大約 5000 Da、例えば最大約 4000、好ましくは最大 3000 Da、より好ましくは最大 2000 Da、さらにより好ましくは最大約 1000 Da、例えば最大約 900 Da、約 800 Da、約 700 Da、約 600 Da、又は最大約 500 Da の範囲である。

20

【0164】

本明細書で論じられる結合作用因子は、検出可能な標識を好適に含み得る。「標識」との用語は、検出可能な、好ましくは定量可能な読み取り又は特性を提供するために使用され得、かつ結合作用因子などの目的の実体に結合するか又はその一部となり得る、任意の原子、分子、部分、又は生体分子を指す。標識は、例えば、質量分析手段、分光学的手段、光学的手段、比色分析手段、磁気的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、又は化学的手段により好適に検出可能であり得る。標識には、限定されないが、染料；³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹Iなどの放射能標識；電子密度の高い試薬；酵素（例えば、イムノアッセイで一般的に使用される西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）；ビオチン - ストレプトアビジンなどの結合部分；ジゴキシゲニンなどのハプテン；発光性、リン光性、又は蛍光性部分；質量タグ；及び蛍光色素単独又は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により発光スペクトルを抑制若しくはシフトし得る部分との組み合わせが含まれる。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、結合作用因子には、別の作用因子（例えば、プローブ結合パートナー）による検出を可能にするタグが提供され得る。そのようなタグは、例えば、ビオチン、ストレプトアビジン、his タグ、myc タグ、マルトース、マルトース結合タンパク質、又は結合パートナーを有する当該技術分野で知られている任意の他の種類のタグであり得る。プローブ：結合パートナーの配置で、利用し得る結合の例は、任意であり得、例えば、ビオチン：ストレプトアビジン、his タグ：金属イオン（例えば、Ni²⁺）、マルトース：マルトース結合タンパク質などが含まれる。

40

【0166】

マーカーと結合作用因子との結合体は、検出を容易にするために検出剤と結合又は付着させ得る。検出剤の例には、限定されないが、発光標識、色素などの比色標識、蛍光標識、若しくは電気活性剤（例えばフェロシアニド）などの化学標識、酵素、放射性標識、又は高周波標識が含まれる。検出剤は粒子であり得る。そのような粒子の例には、限定されないが、コロイド状金粒子、コロイド状硫黄粒子、コロイド状セレン粒子、コロイド状硫酸バリウム粒子、コロイド状硫酸鉄粒子、金属ヨウ素酸塩粒子、ハロゲン化銀粒子、シリカ粒子、コロイド状金属（含水）酸化物粒子、コロイド状金属硫化物粒子、コロイド状セレン化鉛粒子、コロイド状セレン化カドミウム粒子、コロイド状金属リン酸塩粒子、コロ

50

イド状金属フェライト粒子、有機層若しくは無機層で被覆された上記のコロイド状粒子のいずれか、タンパク質分子若しくはペプチド分子、リポソーム、又はポリスチレンラテックスビーズなどの有機ポリマーラテックス粒子が含まれる。好ましい粒子は、コロイド状金粒子であり得る。

【0167】

すでに述べたように、特定の態様は、新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングに関連する用途において本明細書で教示される腫瘍細胞又はCTCを検出、定量化、又は単離するための使用及び方法を用いる。

【0168】

「診断」及び「モニタリング」との用語は一般的なものであり、医療業務では十分に理解されている。限定することなくさらなる説明により、「診断」との用語は、一般に、症状及び兆候に基づいて、並びに / 又は様々な診断手順の結果から（例えば、診断された疾患又は状態に特徴的な1つ以上のバイオマーカーの存在、不存在、及び / 又は量を知ることなどから）、対象における疾患又は状態について認識する、決定する、又は結論付けるプロセス又は行為を指す。

10

【0169】

「モニタリング」との用語は、一般に、経時的に発生し得る変化に対する対象における疾患又は状態の追跡調査を指す。

【0170】

「予後」との用語は、一般に、疾患又は状態の進行及び回復の見込み（例えば、確率、期間、及び / 又は程度）に関する予想を指す。本明細書で教示される疾患又は状態の良好な予後は、一般に、好ましくは許容可能な期間内での、疾患又は状態からの満足のいく部分的又は完全な回復の予測を包含し得る。そのような疾患又は状態の良好な予後は、より一般には、好ましくは所与の期間内に、そのような疾患又は状態がさらに悪くならないか又は悪化しないことが予測されることを包含し得る。本明細書で教示される疾患又は状態の予後不良は、一般に、基準未満の回復及び / 若しくは不十分な遅い回復の予測、又はそのような疾患若しくは状態が実質的に回復しないか若しくはさらに悪化することを含み得る。

20

【0171】

この用語には、病気の予測も含まれる。「予測する」又は「予測」との用語は、一般に、（まだ）上記疾患又は状態を有していない対象における疾患又は状態の事前の宣言、示唆、又は予告を指す。例えば、対象における疾患又は状態の予測は、対象が例えば特定の期間内に又は特定の年齢までに疾患又は状態を発症する確率、見込み、又はリスクを示し得る。上記の確率、見込み、又はリスクは、特に、絶対値、範囲、若しくは統計として示されてもよいし、又は好適な対照対象若しくは対象集団に関連して（例えば、一般的な、正常な、若しくは健康な対象又は対象集団などに関連して）示されてもよい。したがって、対象が疾患又は状態を発症する確率、見込み、又はリスクは、好適な対照対象又は対象集団と比較して、増加若しくは減少として又は倍増若しくは倍減として有利に示され得る。本明細書で使用される場合、対象における本明細書で教示される状態又は疾患の「予測」との用語はまた、対象がそのような状態又は疾患の「陽性」の予測を有すること、すなわち対象がそのような状態又は疾患のリスクを有すること（例えば、対照対象又は対象集団と比較して、リスクが有意に増加している）を特に意味し得る。対象における本明細書に記載される本明細書で教示される疾患又は状態の「予測なし」との用語は、対象がそのような状態又は疾患の「陰性」の予測を有すること、すなわちそのような状態又は疾患有する対象のリスクが対照対象又は対象集団に対して有意に増加していないことを特に意味し得る。

30

【0172】

増殖性疾患の診断、予測、予後及び / 又はモニタリングのための本方法は、1つ以上のインピトロ処理及び / 又は分析工程を対象から取り出した試料に適用するという点で、インピトロ方法として十分に適格であり得る。「インピトロ」との用語は、一般に、体、例

40

50

えば動物又はヒトの体の外部又は外側を意味する。

【 0 1 7 3 】

例として、対象由来の生体試料中の腫瘍細胞又はC T Cの存在は、対象が新生物疾患有していることの指標を提供することができ、すなわち対象における新生物疾患の診断を提供すること又はそれに貢献することができ；対象由来の生体試料中の腫瘍細胞又はC T Cの存在は、寛解期の新生物疾患有していることが既知である対象が再発したことの指標を提供することができ；対象由来の生体試料中のC T Cの存在は、対象が転移能を有する新生物疾患有していることの指標を提供することができ（「転移能」との用語は、原発腫瘍などの腫瘍が転移を引き起こす能力を広く指し、転移性疾患の再発の能力、転移性癌の急速な進行の能力、及び／又は転移性癌が療法、例えば化学療法及び／又は免疫療法に対する耐性を示す能力も具体的に包含し得る）；対象由来の生体試料中の比較的高い量のC T Cは、対象が比較的高い転移能を有する新生物疾患有していることの指標を提供することができ；対象由来の生体試料中の比較的少ない量のC T Cは、対象が比較的低い転移能を有する新生物疾患有していることの指標を提供することができ；対象由来の生体試料中の比較的高い量の腫瘍細胞又はC T Cは、対象が新生物疾患の比較的不良な予後を有していることの指標を提供することができ；対象の生体試料中の比較的少ない量の腫瘍細胞又はC T Cは、対象が新生物疾患の比較的良好な予後を有していることの指標を提供することができ；第1の早い時点で同じ対象から得られた生体試料に対する、第2の遅い時点で得られた対象由来の生体試料中の腫瘍細胞又はC T Cの量の増加は、対象における新生物疾患が上記第1の時点と第2の時点との間に進行したこと又は悪化したことの指標を提供することができ；第1の早い時点で同じ対象から得られた生体試料に対する、第2の遅い時点で得られた対象由来の生体試料中の腫瘍細胞又はC T Cの量の減少は、例えば自然に及び／又は治療に応答して、対象における新生物疾患が上記第1の時点と第2の時点との間に退行したことの指標を提供することができる。

【 0 1 7 4 】

特定の実施形態では、方法は、患者由来の試料で測定された腫瘍細胞又はC T Cの量を参考値と比較することに依存してもよく、上記参考値は新生物疾患の知られている予測、診断、及び／又は予後を表す。

【 0 1 7 5 】

例えば、別の異なる参考値は、新生物疾患有するリスク（例えば、異常に上昇したりスク）の予測に対し、該新生物疾患有するリスクがないことの予測又は該新生物疾患有する正常のリスクの予測を表し得る。別の例では、別の異なる参考値は、そのような新生物疾患有するリスクの異なる程度の予測を表し得る。

【 0 1 7 6 】

さらなる例において、別の異なる参考値は、所与の新生物疾患の診断に対し、そのような新生物疾患のないとの診断（例えば、健康であるとの診断、又は該新生物疾患から回復したとの診断など）を表し得る。別の例では、別の異なる参考値は、様々な重症度のそのような新生物疾患の診断を表し得る。

【 0 1 7 7 】

さらに別の例では、別の異なる参考値は、本明細書で教示される所与の新生物疾患の良好な予後に対し、該新生物疾患の不良な予後を表し得る。さらなる例では、別の異なる参考値は、そのような新生物疾患の様々に好ましい又は好ましくない予後を表し得る。

【 0 1 7 8 】

このような比較は、一般に、少なくとも1つの差異又は偏差の有無、及び任意選択で、比較される値間のそのような差異又は偏差の大きさの有無を決定するための任意の手段を含み得る。比較は、目視検査、測定値の算術的又は統計的比較を含み得る。このような統計的比較は、限定されないが、ルールを適用することを含む。

【 0 1 7 9 】

参考値は、他の細胞集団及びバイオマーカーに対して以前に使用された既知の手順に従って確立され得る。例えば、参考値は、上記新生物疾患の特定の診断、予測、及び／又は

10

20

30

40

50

予後によって特徴付けられる（すなわち、新生物疾患の上記診断、予測、及び／又は予後が当てはまる）個体又は個体集団で確立され得る。そのような集団は、限定されないが、2以上、10以上、100以上、又はさらには数百以上の個体を含む。

【0180】

第2の値からの第1の値の「偏差」は、一般に、任意の方向（例えば、増加：第1の値 > 第2の値又は減少：第1の値 < 第2の値）及び変化の任意の範囲を包含し得る。

【0181】

例えば、偏差は、比較される第2の値に対して、限定されないが、少なくとも約10%（約0.9倍以下）、若しくは少なくとも約20%（約0.8倍以下）、若しくは少なくとも約30%（約0.7倍以下）、若しくは少なくとも約40%（約0.6倍以下）、若しくは少なくとも約50%（約0.5倍以下）、若しくは少なくとも約60%（約0.4倍以下）、若しくは少なくとも約70%（約0.3倍以下）、若しくは少なくとも約80%（約0.2倍以下）、又は少なくとも約90%（約0.1倍以下）の第1の値の減少を包含し得る。10

【0182】

例えば、偏差は、比較される第2の値に対して、限定されないが、少なくとも約10%（約1.1倍以上）、若しくは少なくとも約20%（約1.2倍以上）、若しくは少なくとも約30%（約1.3倍以上）、若しくは少なくとも約40%（約1.4倍以上）、若しくは少なくとも約50%（約1.5倍以上）、若しくは少なくとも約60%（約1.6倍以上）、若しくは少なくとも約70%（約1.7倍以上）、若しくは少なくとも約80%（約1.8倍以上）、若しくは少なくとも約90%（約1.9倍以上）、若しくは少なくとも約100%（約2倍以上）、若しくは少なくとも約150%（約2.5倍以上）、若しくは少なくとも約200%（約3倍以上）、若しくは少なくとも約500%（約6倍以上）、又は少なくとも約700%（約8倍以上）の第1の値の増加を包含し得る。20

【0183】

好ましくは、偏差は、統計的に有意な観察された変化を指し得る。例えば、偏差は、所与の集団における参照値の誤差範囲（例えば、標準偏差若しくは標準誤差、又はその所定の倍数、例えば、 $\pm 1 \times S D$ 若しくは $\pm 2 \times S D$ 若しくは $\pm 3 \times S D$ 又は $\pm 1 \times S E$ 若しくは $\pm 2 \times S E$ 若しくは $\pm 3 \times S E$ により表される）外にある観測された変化を指し得る。偏差はまた、所与の母集団における値によって定義される参照値範囲外（例えば、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、若しくは80%以上、若しくは85%以上、若しくは90%以上、若しくは95%以上、又はさらに100%以上を含む、上記集団における値の範囲外）の値を指し得る。30

【0184】

さらなる実施形態では、偏差は、観察された変化が所与の閾値又はカットオフ値（cut-off）を超えている場合に結論付けられ得る。そのような閾値又はカットオフ値は、当該技術分野で一般的に知られているように選択され、予測方法の選択された感度及び／又は特異性、例えば少なくとも50%、若しくは少なくとも60%、若しくは少なくとも70%、若しくは少なくとも80%、若しくは少なくとも85%、若しくは少なくとも90%、又は少なくとも95%の感度及び／又は特異性を提供し得る。40

【0185】

例えば、受信者動作特性（ROC）曲線分析を使用して、許容可能な感度及び特異性に基づき、又は陽性適中率（PPV）、陰性適中率（NPV）、陽性尤度比（LR+）、陰性尤度比（LR-）、Youden指数、若しくは類似のものなどのそれ自体周知である関連する性能評価尺度に基づき、本診断検査の臨床使用のために、腫瘍細胞又はCTCの量若しくはバイオマーカーの最適なカットオフ値を選択することができる。

【0186】

限定ではなく例として、末梢血の7.5mL試料中の少なくとも1つのCTCの検出は、対象が新生物疾患を有すること、より特定的には転移能を有する新生物疾患を有することの指標を提供することができる。対象における比較的高い量のCTCの検出（例えば、

10

20

30

40

50

末梢血 1 mLあたり 0.5 以上、1 以上、2 以上、又は 3 以上の CTC) は、対象が、比較的少ない量の CTC (例えは、末梢血 1 mLあたりそれぞれ 0.5 未満、1 未満、1 未満、2 未満、又は 3 未満の CTC) を有する対象よりも新生物疾患の比較的不良の予後を有していることを示すことができる。

【 0187 】

本明細書全体にわたって使用される「療法」又は「処置」との用語は、疾患又は障害などの病的状態の 1 つ以上の症状又は測定可能なマーカーの緩和又は測定可能な減少を指す。この用語は、一次治療、及びネオアジュバント処置、アジュバント処置、補助療法を包含する。「抗癌療法」又は「抗癌処置」との用語は、新生物疾患の 1 つ以上の症状又は測定可能なマーカーの緩和又は測定可能な減少を広く指す。測定可能な減少には、測定可能なマーカー又は症状の統計的に有意な低下が含まれる。一般に、この用語は、治癒的処置並びに症状の軽減及び / 又は疾患の進行の遅延を指向する処置の両方を包含する。これらの用語は、病的状態の発生の見込みを予防又は減少させることを目的とする、既に発症した病的状態の治療的処置及び予防又は予防的手段の両方を包含する。特定の実施形態では、これらの用語は治療的処置に関連し得る。特定の他の実施形態では、これらの用語は予防的治療に関連し得る。寛解期中の慢性的な病的状態の処置は、治療的処置とみなされ得る。この用語は、本発明の文脈において適切なエクスピボ処置又はインビボ処置を包含し得る。

10

【 0188 】

抗癌療法の非限定的な例には、外科手術、放射線療法、化学療法、生物学的療法、及びそれらの組み合わせが含まれる。

20

【 0189 】

本明細書全体にわたって使用される「外科手術」との用語は、対象由来の新生物組織又は新生細胞の外科的除去を含む処置を広く示す。癌の外科手術は、腫瘍全体を除去し、腫瘍を減量し、又は痛み若しくは圧迫を引き起こしている腫瘍若しくはその一部を除去し得る。癌の外科手術には、特に、従来の開腹手術、腹腔鏡手術、凍結手術、レーザー手術、温熱レーザーアブレーション又は高周波アブレーションなどの熱アブレーション、光線力学療法、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【 0190 】

本明細書全体にわたって使用される「放射線療法」との用語は、X 線、ガンマ線、中性子、陽子、又は他の線源からの放射線などの電離放射線への新生物組織の曝露を含む処置治療を広く示す。放射線源は外部装置 (外部ビーム放射線療法) であってもよく、又は放射性物質を新生物組織の近くの体内に配置してもよく (内部放射線療法又は近接照射療法) 、又は放射性物質を注射、注入、若しくは摂取により全身に送達してもよく (全身放射性同位元素療法) 、かつ自然に若しくは癌標的化抗体などの標的化部分によって腫瘍組織に集中させてもよい。

30

【 0191 】

本明細書で使用される「化学療法」との用語は、広く考えられ、一般に、化学物質又は組成物を使用する処置を包含する。化学療法剤は、典型的には、細胞毒性又は細胞増殖抑制効果を示し得る。

40

【 0192 】

特定の実施形態では、化学療法剤は、アルキル化剤、細胞毒性化合物、代謝拮抗剤、植物アルカロイド、テルペノイド、トポイソメラーゼ阻害剤、又はそれらの組み合わせであり得る。

【 0193 】

「アルキル化剤」との用語は、一般に、生理的条件下で求核性官能基をアルキル化することができる剤を指す。アルキル化剤の例には、限定されないが、シクロホスファミド、カルムスチン、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、メクロレタミン、メルファラン (塩酸塩) 、クロラムブシリ、イホスファミド、ロムスチン、マイトマイシン C 、チオテバ、ブスルファン、及びそれらの組み合わせが含まれる。

50

【0194】

「細胞毒性化合物」との用語は、一般に、細胞に毒性のある剤を指す。細胞毒性化合物の例には、限定されないが、アクチノマイシン（ダクチノマイシンとしても既知である）；ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、及びエビルビシンなどのアントラサイクリン；プレオマイシン；プリカマイシン；ミトキサントロン；マイトイシン；及びその組み合わせが含まれる。

【0195】

「代謝拮抗剤」との用語は、一般に、プリン又はピリミジンなどの代謝産物の使用を阻害することができる剤を指す。代謝拮抗剤は、細胞周期のS期にプリン及びピリミジンがDNAに取り込まれるのを妨げ、それにより正常な発達及び分裂を停止させる。代謝拮抗剤の例には、限定されないが、アザチオプリン、カベシタピン、シタラピン、5-フルオロウラシル、メルカプトプリン、メトトレキサート、ネララピン、ペメトレキセド、及びそれらの組み合わせが含まれる。

10

【0196】

植物アルカロイド及びテルペノイドは、植物に由来し、微小管機能を妨げることにより細胞分裂をブロックする。非限定的な例には、ビンカアルカロイド及びタキサン、並びにそれらの組み合わせが含まれる。ビンカアルカロイドの例には、限定されないが、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、及びそれらの組み合わせが含まれる。タキサンの例には、限定されないが、パクリタキセル、ドセタキセル、及びそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0197】

「トポイソメラーゼ阻害剤」との用語は、一般に、DNAのトポロジーを維持する酵素を指す。非限定的な例には、I型及びII型トポイソメラーゼ阻害剤が含まれる。I型トポイソメラーゼ阻害剤の例には、限定されないが、イリノテカン、トポテカン、及びそれらの組み合わせなどのカンプトテシンが含まれる。II型トポイソメラーゼ阻害剤の例には、限定されないが、アムサクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、リン酸エトポシド、ミトキサントロン、テニボシド、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0198】

特定の実施形態では、化学療法剤は、シクロホスファミド、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、ボルテゾミブ、ジゴキシン、ジギトキシン、ヒペリシン、シコニン、オウゴニン、ソラフェニブ、エベロリムス、イマチニブ、ゲルダナマイシン、パノビノスタット、カルムスチン、シスプラチン、カルボプラチン、メクロレタミン、メルファラン（塩酸塩）、クロラムブシリ、イホスファミド、ブスルファン、アクチノマイシン、ダウノルビシン、バルルビシン、エビルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン、ミトキサントロン、マイトイシン、アザチオプリン、メルカプトプリン、フルオロウラシル、メトトレキサート、ネララピン、ペメトレキセド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、パクリタキセル、ドセタキセル、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニボシド、アナストロゾール、エキセメスタン、ボスチニブ、イリノテカン、バンデタニブ、ビカルタミド、ロムスチン、クロファラピン、カボザンチニブ、シタラピン、サイトキサン、デシタピン、デキサメタゾン、ヒドロキシウレア、デカルバジン、ロイプロリド、エビルビシン、アスパラギナーゼ、エストラムスチン、ビスモデギブ、アミホスチン、フルタミド、トレミフェン、フルベストラント、レトロゾール、デガレリクス、フルダラピン、プララトレキサート、フロクスウリジン、ゲムシタピン、カルムスチンウェハー、エリブリン、アルトレタミン、トポテカン、アキシチニブ、ゲフィチニブ、ロミデプシン、イキサベピロン、ルキソリチニブ、カバジタキセル、カルフィルゾミブ、クロラムブシリ、サルグラモスチム、クラドリビン、ロイプロリド、ミトタン、プロカルバジン、メゲストロール、メスナ、塩化ストロンチウム-89、マイトイシン、フィルグラスチム、ペグフィルグラスチム、ソラフェニブ、ニルタミド、ペントスタチン、タモキシフェン、ペガスパルガーゼ、デニロイキンジフチトックス、アリトレチノイン、カルボプラチン、ブレドニゾン

30

40

50

、メルカプトプリン、ゾレドロン酸、レナリドマイド、オクトレオチド、ダサチニブ、レゴラフェニブ、ヒストレリン、スニチニブ、オマセタキシン、チオグアニン、エルロチニブ、ベキサロテン、デカルバジン、テモゾロミド、チオテパ、サリドマイド、B C G、テムシロリムス、ベンダムスチン塩酸塩、トリプトレリン、三酸化ヒ素、ラパチニブ、膀胱内バルルビシン (*valrubicin intravesical*)、トレチノイン、アザシチジン、パゾパニブ、テニボシド、ロイコボリン、クリゾチニブ、カペシタбин、エンザルタミド、ジブ-アフリベルセプト (*ziv-aflibercept*)、ストレプトゾシン、ベムラフェニブ、ゴセレリン、ボリノstatt、ゾレドロン酸、アビラテロン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され得る。

【0199】

10

本明細書で使用される「生物学的療法」との用語は、広く考えられ、一般に、生体分子などの生体物質若しくは組成物、又はウイルス若しくは細胞などの生物作用因子 (*biological agent*) を使用する処置を包含する。特定の実施形態では、生体物質又は組成物は、治療的利益の基礎となる薬理作用又は効果を発揮し得る。特定の他の実施形態では、生体物質又は組成物は、化学療法剤又は放射性同位体を新生物組織又は新生細胞に送達する又はそれらに対して標的化するために使用され、例えば、生体物質又は組成物を化学療法剤又は放射性同位体と結合させ得る（限定ではなく例として、癌標的化モノクローナル抗体と細胞毒性化合物との結合体）。

【0200】

20

特定の実施形態では、生体分子は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、若しくは低分子（一次代謝産物、二次代謝産物、若しくは天然産物など）、又はそれらの組み合わせであり得る。好適な生体分子の例には、限定されないが、インターロイキン、サイトカイン、抗サイトカイン、腫瘍壊死因子 (TNF)、サイトカイン受容体、ワクチン、インターフェロン、酵素、治療用抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はそれらの組み合わせが含まれる。

【0201】

30

好適な生体分子の例には、限定されないが、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ・ベドチン、カツマキソマブ、セツキシマブ、ダラツムマブ、デニロイキン・ディフティトックス、デノスマブ、ジヌツキシマブ、エロツズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、⁹⁰Y-イブリツモマブ・チウキセタン、イダルシズマブ、インターフェロンA、イピリムマブ、ネシツムマブ、ニボルマブ、オビヌツズマブ、オファツムマブ、オララツマブ、パニツムマブ、ペムブロリズマブ、ラムシルマブ、リツキシマブ、タソネルミン、¹³¹I-トシツモマブ、トラスツズマブ、アド-トラスツズマブ・エムタンシン (*Ado-trastuzumab emtansine*)、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0202】

好適な腫瘍溶解性ウイルスの例には、限定されないが、タリモジーンラハーパレブベックが含まれる。

【0203】

40

抗癌療法のさらなる分類には、特にホルモン療法（内分泌療法）、免疫療法、及び幹細胞療法が含まれ、これらは一般に生物学的療法に含まれると考えられている。

【0204】

ホルモン療法又は内分泌療法は、特にホルモン依存性又はホルモン感受性の乳癌、前立腺癌、卵巣癌、精巣癌、子宮内膜癌、又は腎臓癌などのホルモン依存性又はホルモン感受性の癌の処置のために、ホルモン又は抗ホルモン薬が投与される処置を包含する。

【0205】

50

好適なホルモン療法の例には、限定されないが、タモキシフェン；アタナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、及びそれらの組み合わせなどのアロマターゼ阻害剤；ゴセレリン、リュープロレリン、トリプトレリン、及びそれらの組み合わせなどの黄体形成ホルモン遮断薬；ビカルタミド、酢酸シプロテロン、フルタミド、及びそれらの組み合

わせなどの抗アンドロゲン剤；デガレリクスなどのゴナドトロピン放出ホルモン遮断薬；酢酸メドロキシプロゲステロン、メgestrol、及びそれらの組み合わせなどのプロゲステロン処置；並びにそれらの組み合わせが含まれる。

【0206】

「免疫療法」との用語は、対象の免疫系を調節する任意の処置を広く包含する。特に、この用語は、体液性免疫応答、細胞性免疫応答、又はその両方などの免疫応答を調節する任意の処置を含む。免疫応答は、典型的には、B細胞、細胞傷害性T細胞（CTL）、Tヘルパー（Th）細胞、制御性T（Treg）細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞、単球、マクロファージ、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、好塩基球、好酸球、又は好中球などの免疫系の細胞による、刺激に対する応答を伴い得る。抗癌処置の文脈において、免疫療法は、好ましくは、腫瘍細胞の死を達成するなどのために、免疫応答、特に腫瘍組織又は細胞に特異的にに対する免疫応答などを誘発、誘導、又は増強し得る。免疫療法は、免疫系の任意の成分、例えば、限定されないがT細胞（例えば、CTL又はTh細胞）、樹状細胞、及び／又はNK細胞などの任意の免疫細胞の存在量、機能、及び／又は活性を調節、増加又は増強し得る。

10

【0207】

免疫療法は、T細胞及び／又は樹状細胞などの免疫細胞が患者に移植される細胞ベースの免疫療法を含む。この用語はまた、対象の免疫系を調節する化合物及び／又は生体分子（例えば、抗体、抗原、インターロイキン、サイトカイン、又はそれらの組み合わせ）などの物質又は組成物の投与も含む。

20

【0208】

癌免疫療法の例には、限定されないが、モノクローナル抗体、例えば腫瘍細胞によって発現されたタンパク質に対するFc工学操作（Fc-engineered）モノクローナル抗体、免疫チェックポイント阻害剤、予防用又は治療用癌ワクチン、養子細胞療法、及びそれらの組み合わせを使用する処置が含まれる。

【0209】

さらなるガイダンスにより、Fc最適化モノクローナル抗体は、腫瘍抗原などの腫瘍細胞により発現されるタンパク質に特異的に結合するように構成され、抗体依存性細胞傷害性、補体依存性細胞傷害性、及び／又は抗体依存性細胞媒介性食作用などのエフェクター機能を媒介する工学操作されたFc部分を含む。

30

【0210】

本明細書全体にわたって使用される「腫瘍抗原」との用語は、正常細胞又は非腫瘍細胞と比較して、細胞内又は腫瘍細胞表面上（好ましくは腫瘍細胞表面上）に関わらず腫瘍細胞によって固有に（uniquely）又は示差的に発現される抗原を指す。例として、腫瘍抗原は、腫瘍細胞内又は腫瘍細胞上に存在し、典型的には正常細胞若しくは非腫瘍細胞内又は正常細胞若しくは非腫瘍細胞上に存在し得ず（例えば、精巣及び／又は胎盤などの限られた数の正常組織によってのみ発現される）、あるいは腫瘍抗原は、正常細胞若しくは非腫瘍細胞内又は正常細胞若しくは非腫瘍細胞上よりも腫瘍細胞内又は腫瘍細胞上に多くの量で存在し得、あるいは腫瘍抗原は、正常細胞若しくは非腫瘍細胞内又は正常細胞若しくは非腫瘍細胞上に見出されるものとは異なる形態で腫瘍細胞内又は腫瘍細胞上に存在し得る。したがって、この用語には、腫瘍特異的膜抗原を含む腫瘍特異的抗原（TSA）、腫瘍関連膜抗原を含む腫瘍関連抗原（TAA）、腫瘍上の胚抗原、成長因子受容体、成長因子リガンドなどが含まれる。この用語にはさらに、癌／精巣（CT）抗原が含まれる。腫瘍抗原の例には、限定されないが、-ヒト绒毛性ゴナドトロピン（HCG）、糖タンパク質100（gp100/Pme117）、癌胎児性抗原（CEA）、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質1（gp75/TRP1）、チロシナーゼ関連タンパク質2（TRP-2）、NY-BR-1、NY-CO-58、NY-ESO-1、MN/gp250、イディオタイプ、テロメラーゼ、滑膜肉腫Xブレークポイント2（SSX2）、ムチン1（MUC-1）、メラノーマ関連抗原（MAGE）ファミリーの抗原、高分子量メラノーマ関連抗原（HMW-MAA）、T細胞1によって認識されるメラノーマ抗原

40

50

(M A R T 1)、ウィルムス腫瘍遺伝子1(W T 1)、H E R 2 / n e u、メソテリン(M S L N)、フェトプロテイン(A F P)、癌抗原125(C A - 125)、及びr a s又はp 5 3の異常な形態が含まれる。新生物疾患におけるさらなる標的には、限定されないが、C D 3 7(慢性リンパ性白血病)、C D 1 2 3(急性骨髓性白血病)、C D 3 0(ホジキン/大細胞型リンパ腫)、M E T(N S C L C、胃食道癌)、I L - 6(N S C L C)、及びG I T R(悪性メラノーマ)が含まれる。

【0 2 1 1】

免疫チェックポイントは、免疫反応を減速又は停止させ、免疫細胞の制御されない活性による過度の組織損傷を防ぐ阻害経路である。免疫チェックポイント標的の阻害は、腫瘍細胞に対するC T Lなどの免疫細胞による免疫応答を刺激することができる。

10

【0 2 1 2】

阻害のための免疫チェックポイント標的の例には、限定されないが、P D - 1(P D - 1阻害剤の例には、限定されないが、ベンプロリズマブ、ニボルマブ、及びそれらの組み合わせが含まれる)、C T L A - 4(C T L A - 4阻害剤の例には、限定されないが、イピリムマブ、トレメリムマブ、及びそれらの組み合わせが含まれる)、P D - L 1(P D - L 1阻害剤の例には、限定されないが、アテゾリズマブが含まれる)、L A G 3、B 7 - H 3(C D 2 7 6)、B 7 - H 4、T I M - 3、B T L A、A 2 a R、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(K I R)、I D O、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0 2 1 3】

「ワクチン」との用語は、一般に、ワクチン接種対象が免疫応答、好ましくは防御免疫応答又は免疫寛容(寛容化ワクチン)を引き起こすように誘導される成分を含む、対象へのインビオ投与のための治療用又は予防用医薬組成物を指す。

20

【0 2 1 4】

任意選択により、ワクチンは、免疫応答を増強するための1つ以上のアジュバントをさらに含み得る。好適なアジュバントには、例えば、限定されないが、サポニン、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル(mineral gels)、リゾレシチンなどの界面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油又は炭化水素エマルジョン、カルメット・グラン桿菌(B C G)、キーホールリンペットヘモシアニン(K L H)、モノホスホリルリピドA(M P L)、コリネバクテリウム・バルバム(C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m)、非メチル化C p Gモチーフを含有するオリゴデオキシヌクレオチド、及びQ S - 2 1が含まれる。

30

【0 2 1 5】

任意選択により、ワクチンは、1つ以上の免疫刺激分子、又は免疫寛容を促進する1つ以上の分子をさらに含み得る。そのような分子の非限定的な例には、様々なサイトカイン、リンホカイン、及びケモカインが含まれる。例として、インターロイキン(例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 1 2、I L - 1 3)などの免疫賦活、免疫増強、及び炎症誘発活性を有する分子；成長因子(例えば、顆粒球・マクロファージ(G M)コロニー刺激因子(C S F))；及びマクロファージ炎症性因子、F 1 t 3リガンド、B 7 . 1；B 7 . 2の他の免疫賦活分子などの非限定的な例がある。

40

【0 2 1 6】

腫瘍ワクチンには、a)癌を引き起こすウイルスによる感染を防ぐワクチン、b)既存の癌を処置するワクチン(治療用癌ワクチン)、又はc)癌の発生を防ぐ若しくはその効果を改善するワクチン(予防用癌ワクチン)のいずれかが含まれる。

【0 2 1 7】

治療用又は免疫治療用腫瘍ワクチンとしても知られているタイプb)又はc)の腫瘍ワクチンを製造する1つの手法は、癌患者から腫瘍細胞を単離し、例えば、該腫瘍細胞を生存不能にすることにより、該腫瘍細胞の溶解物を調製することにより、又は該腫瘍細胞由来のタンパク質を単離することにより、該腫瘍細胞から免疫原性組成物を調製し、該免疫原性組成物を含むワクチンで対象(例えば、同じ癌患者又は別の対象)を免疫化することである。免疫原性組成物は、上記腫瘍細胞により発現される腫瘍抗原を含有し、それによ

50

り、ワクチン接種は、腫瘍抗原及び腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答（例えば、B細胞又はC T L応答）を誘発又は刺激することができる。

【0218】

治療用抗癌ワクチン接種の別の手法は、患者においてインサイチューで免疫応答を生じさせることである。これにより、溶解性ウイルス複製後に放出される腫瘍抗原に対する抗腫瘍免疫応答が強化され、結果として、インサイチューで患者に特異的な抗腫瘍ワクチンが提供される（好適な腫瘍溶解性ウイルスの例には、限定されないが、タリモジーンラハーパレブベックが含まれる）。さらに別の手法は、癌発生で生理学的役割を果たす化合物で患者を免疫化して、ヒトの身体がその化合物を排除するようにすることである。そのような場合、この化合物は自己抗原又は自己ハプテンであり、すなわち、患者に投与されたときに強い免疫応答を引き起こさないが、担体に結合されたときに十分な免疫応答を誘発することができる。10

【0219】

治療用抗癌ワクチン接種への別の手法には、樹状細胞ワクチンが含まれる。この用語は、抗原に対する免疫反応が所望される該抗原を負荷した樹状細胞を含むワクチンを広く包含する。

【0220】

「樹状細胞」（D C）との用語は、リンパ組織又は非リンパ組織に見出される形態学的に類似した細胞型の多様な集団の任意のメンバーを指し得る。D Cは、例えば、「プロフェッショナル」抗原提示細胞を含み、M H C拘束性T細胞を感作する高い能力を有し得る。D Cは、例えば、機能、表現型及び／又は遺伝子発現パターン、特に細胞表面表現型によって認識され得る。これらの細胞は、その特有の形態、高レベルの表面M H CクラスI I発現、並びに抗原をC D 4 + 及び／又はC D 8 + T細胞、特にナイーブT細胞に提示する能力によって特徴付けられる。機能的に、D Cは、抗原提示の決定のための当業者に知られている任意の好適なアッセイにより同定され得る。そのようなアッセイには、例えば、検査抗原の提示によって抗原刺激を受けた（a n t i g e n - p r i m e d）細胞及び／又はナイーブT細胞を刺激する能力の検査、続いてT細胞増殖の決定、I L - 2などのサイトカインの放出などが含まれ得る。樹状細胞は、当該技術分野で周知の方法によって生体試料から単離又は生成することができる。D Cの単離又は生成に好適な生体試料には、限定されないが、末梢血試料、骨髄試料、臍帯血試料などが含まれる。限定ではなく例として、生体試料中に存在するD Cは、D Cによって発現される又は発現されないことが知られている選択表面マーカーの免疫蛍光又は免疫磁気標識付けにより、それぞれ対応する蛍光活性化細胞選別（F A C S）ゲーティング戦略又は免疫磁気分離と組み合わせて単離し得る。あるいは、D Cを好適なサイトカインとともにインキュベートすることにより、D CをC D 1 4 + 单球から生成することができる（Z h o u & T e d d e r , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 1 9 9 6 , v o l . 9 3 , 2 5 8 8 - 9 2 ）。

【0221】

本明細書全体にわたって使用される「抗原負荷」との用語は、抗原の抗原性エピトープが、細胞内であるか又は免疫細胞表面上であるかに関わらずM H Cに提示されるように、特に抗原提示細胞などの、より特定的には樹状細胞などの免疫細胞に1つ以上の抗原を送達する方法又はプロセスを指す。典型的には、免疫細胞が抗原と接触する、抗原を発現する（必要な場合）、抗原を処理する、及び抗原をM H Cに提示することを可能とする条件下で、免疫細胞と、抗原を含む組成物又は抗原をコードする核酸を含む組成物と、をインビトロ／エクスピボで接触させる又はインキュベートすることを含むプロセスにより、免疫細胞に抗原を負荷させ得る。当業者は、抗原の効果的な負荷を可能にするのに十分なインキュベーション温度及び時間を知っているであろう。例えば、インキュベーション工程は、典型的には約25～約37の温度で約1～約2又は約4時間であってもよく、及び／又は約4度で一晩などであってもよい。例として、免疫細胞を、単離された抗原、例えば、天然に存在する抗原供給源から単離された抗原、あるいは好適な宿主若しくは宿主細胞発現系（例えば、好適な細菌、酵母、真菌、植物、若しくは動物宿主又は宿主細胞発

10

20

30

40

50

現系)によって組換え的に產生され、かつそれらから単離された抗原、又は無細胞転写若しくは翻訳により產生された抗原、又は非生物学的核酸若しくはペプチド合成により組換え的に產生された抗原、を含む組成物と接触させてもよい。別の例として、免疫細胞を、天然に存在する抗原供給源を含む組成物と接触させ、すなわち、該天然に存在する供給源から抗原を実質的に単離することなく接触させてもよい。例えば、免疫細胞を、抗原を天然で発現する細胞又はそのような細胞の細胞片、例えば腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞を含む組成物と接触させてもよい。好適には、そのような細胞は、加熱死(heat killed)、アポトーシス、壊死、若しくは他の処理などの機械的、化学的、又は物理的処理により、生存不能とし、好ましくは溶解させ、例えば死滅させ、好ましくは溶解させてもよい。さらなる例により、免疫細胞を、抗原を組換え的に產生する好適な宿主又は宿主細胞発現系の細胞と接触させてもよく、すなわち該細胞から抗原を実質的に単離することなく接触させてもよい。好適には、そのような細胞は、加熱死若しくは他の処理などの機械的、化学的、又は物理的処理により、生存不能とし、好ましくは溶解させ、例えば死滅させ、好ましくは溶解させてもよい。抗原をコードする核酸、一般的には組換え核酸を免疫細胞に導入することにより、免疫細胞に抗原を負荷させてもよく、それにより免疫細胞は抗原を発現する。

【0222】

養子細胞療法(ACT)は、免疫機能及び特性を新しい宿主に移すという目的で、細胞、特に細胞傷害性T細胞(CTL)などの最も一般的な免疫由来細胞を同じ患者又は新しいレシピエント宿主に戻すことを指すことができる。可能な場合、自家細胞の使用は、組織拒絶及び移植片に対する宿主疾患の問題を最小限に抑えることにより、レシピエントに役立つ。

【0223】

自己腫瘍浸潤リンパ球(TIL)又は遺伝的にリダイレクトされた(genetically modified redirected)末梢血単核細胞の養子移入を使用して、メラノーマ及び結腸直腸癌を含む進行性固形腫瘍を有する患者、並びにCD19を発現する造血器悪性腫瘍を有する患者の処置に成功している。腫瘍関連抗原などの選択された抗原に特異的なT細胞などの免疫系細胞の養子移入が特に企図される。

【0224】

例えば、選択されたペプチド特異性を有する新しいTCR鎖及び鎖を導入することによってT細胞受容体(TCR)の特異性を変えることにより、T細胞を遺伝的に修飾するための様々な戦略を採用し得る。あるいは、悪性細胞などの選択された標的に特異的なT細胞などの免疫応答細胞を產生するためにキメラ抗原受容体(CAR)を使用してもよく、様々な受容体キメラ構築物が記載されている。

【0225】

CAR構築物の例には、限定されないが、1) 例えば、CD3又はFcRのいずれかの膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメインにフレキシブルなリンカー、例えばCD8ヒンジドメイン及びCD8膜貫通ドメインによって連結された特異的な抗体のV_Hに連結されたV_Lを含む、抗原に特異的な抗体の一本鎖可変断片からなるCAR、2) CD28、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)などの1つ以上の共刺激分子の細胞内ドメインをエンドドメイン(endodomain)内にさらに組み込んだCAR、又はそのような共刺激エンドドメインの組み合わせをさらに含むCARが含まれる。

【0226】

癌における幹細胞療法は、一般に、放射線療法及び/又は化学療法によって破壊された骨髄幹細胞を置き換えることを目的とし、限定されないが、自家、同系、又は同種異系の幹細胞移植を含む。幹細胞、特に造血幹細胞は、典型的には、骨髄、末梢血、又は臍帯血から得られる。

【0227】

抗癌剤の投与経路、用量、及び治療レジメンの詳細は、例えば「Cancer Clinical Pharmacology」(2005) ed. By Jan H. M. Schellens, Howard L. McLeod and David R.

Newell, Oxford University Pressに記載されているように、当該技術分野で知られている。

【0228】

本明細書で教示される方法によって単離された腫瘍細胞又はC T Cは、様々な用途で使用することができる。

【0229】

限定ではなく例として、有利には生存不能にされた、そのような腫瘍細胞若しくはC T C又はそれらの溶解物、あるいは1つ以上のそれらの腫瘍抗原（例えば、単離されたタンパク質として、又は腫瘍細胞若しくはC T Cから単離されたタンパク質組成物に含まれるもの）を、本明細書の別の箇所で教示されているように、腫瘍ワクチンに製剤化することができる。任意選択により、そのような腫瘍ワクチンは、本明細書の他の箇所で説明されているように、樹状細胞をさらに含むことができる。

10

【0230】

限定ではないが別の例により、そのような腫瘍細胞又はC T Cをさらなる分析に供して、細胞の特性を明らかにし又は特徴付けてもよい。例えば、細胞は、生化学分析、突然変異分析、トランスクリプトーム分析、及び／又はプロテオーム分析に供されてもよい。そのような分析は、例えば新生物疾患及び／又は細胞の循環表現型の原因となり得る又はそれらと関連し得る、細胞の生化学的特性、ゲノム及び／又はミトコンドリア変異、遺伝子発現プロファイル及びシグネチャ、並びにタンパク質発現プロファイル及びシグネチャを明らかにすることができます。

20

【0231】

本発明のさらなる態様は、対象における腫瘍のインサイチュー画像化のための方法であって、CD321に特異的に結合することができる作用因子を対象に投与することであって、該作用因子は画像診断装置によって検出可能な標識を含み、該作用因子が腫瘍細胞によって発現されるCD321に特異的に結合することを可能にする、投与することと、上記画像診断装置を使用して対象における腫瘍を視覚化することと、を含む方法に関する。

【0232】

「画像化」との用語は、身体の内部の視覚的描写及び／又は臓器若しくは組織の機能の視覚的描写を作成するための任意の医療画像化技術又はプロセスを広く包含する。本明細書で企図される画像診断装置又は画像診断技術には、限定されないが、X線ラジオグラフィー、X線コンピューター断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）、陽電子放射断層撮影法（PET）、PET-CT、及び単一光子放射コンピューター断層撮影法（SPECT）が含まれる。好ましくは、画像診断装置は、PET、PET-CT、又はSPECTなどのPETベースであり、より好ましくはPETであり得る。

30

【0233】

本発明の画像化方法において、CD321特異的結合作用因子は、例えば検出可能になるように、すなわち、適切な画像診断装置による検出及び視覚化を可能にするために標識される。限定ではなく例として、PETベースの画像化技術に好適な標識には、¹¹C、³N、¹⁵O、¹⁸F、⁶⁸Ga、⁸⁹Zr、又は⁸²Rbなどの放射性核種が含まれる。

【0234】

さらなる態様は、本明細書全体にわたって記載される使用及び方法を実施するのに有用な部品のキット又は製造品に関する。

40

【0235】

したがって、一態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子、及び少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を含む、部品のキット又は製造品に関する。

【0236】

別の態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子、及び少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を含む、部品のキット又は製造品に関する。

50

【0237】

さらに別の態様は、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子、及び少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を含む、部品のキット又は製造品に関する。

【0238】

本明細書全体にわたって使用される「部品のキット」及び「キット」との用語は、特定の方法を実施するために必要な成分を含有し、それらの輸送及び保管を可能にするように包装された製造品を指す。キットに含まれる成分の包装に好適な材料には、水晶、プラスチック（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート）、ボトル、フランコ、バイアル、アンプル、紙、封筒、又は他の種類の容器、担体、若しくは支持体が含まれる。キットが複数の成分を含む場合、成分の少なくとも1つのサブセット（例えば、複数の成分のうちの2つ以上）又は成分のすべてを物理的に分離してもよく、例えば、別々の容器、担体、若しくは支持体中又は別々の容器、担体、若しくは支持体上に含めてもよい。キットに含まれる成分は、特定の方法を実施するのに十分であっても又は十分でなくともよく、したがって、方法を実施するためにそれぞれ外部試薬又は物質が不要であっても又は必要であってもよい。典型的には、キットは、液体取扱い装置、環境（例えば、温度）制御装置、分析機器などの標準的な実験装置と組み合わせて使用される。任意選択でアレイ又はマイクロアレイ上に提供される、本明細書で教示される記載された結合作用因子、例えば、抗体、ハイブリダイゼーションプローブ、增幅及び／又は配列決定プライマーなどに加えて、本キットはまた、特定の方法において有用な、溶媒、緩衝液（例えば、限定されないが、ヒスチジン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ギ酸緩衝液、安息香酸緩衝液、TRIS（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）緩衝液、若しくはマレイン酸緩衝液、又はそれらの混合物など）、酵素（例えば、限定されないが、熱安定性DNAポリメラーゼなど）、検出可能な標識、検出試薬、及び対照製剤（陽性及び／又は陰性）のうちのいくつか又はすべてを含み得る。典型的には、キットはまた、印刷挿入物又はコンピューター読み取り可能な媒体上などにおけるその使用説明書を含み得る。これらの用語は、本文脈で使用される場合、任意の人工の有形構造製造品を広く包含する「製造品」との用語と交換可能に使用され得る。

【0239】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の実施形態では、汎白血球マーカーは、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0240】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の実施形態では、血小板マーカーは、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0241】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の実施形態では、汎白血球マーカーは、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、血小板マーカーは、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0242】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の好ましい実施形態では、汎白血球マーカーはCD45である。

【0243】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の好ましい実施形態では、血小板マーカーはCD42aである。

【0244】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の好ましい実施形態では、汎白血球マーカーはCD42bである。

10

20

30

40

50

球マークは C D 4 5 であり、血小板マークは C D 4 2 a である。

【 0 2 4 5 】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸などのマーク、例えば、C D 3 2 1 、C D 4 5 、L S P 1 、C D 4 8 、C D 3 6 、C D 4 1 、C D 4 2 a 、C D 4 2 b 、又はC D 6 1 に特異的に結合することができる作用因子は、本明細書の他の箇所で説明されている。

【 0 2 4 6 】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の実施形態では、1つ以上の作用因子は、本明細書の他の箇所で説明されているように、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術における使用のために構成される。

10

【 0 2 4 7 】

本明細書で教示される部品のキット又は製造品の特定の実施形態では、1つ以上の作用因子は、本明細書の他の箇所で説明されているように、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアブタマーである。

【 0 2 4 8 】

本明細書に開示されるキットの例は、限定されないが、以下の通りであり：

- A) 、 B 1) 、及び C 1) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 、 B 2) 、及び C 2) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 、 B 3) 、及び C 3) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び B 1) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び B 2) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び C 3) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び C 1) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び C 2) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) 及び C 3) の混合物を含む容器を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 1) 及び C 1) の混合物を含む別個の容器と、を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 2) 及び C 2) の混合物を含む別個の容器と、を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 3) 及び C 3) の混合物を含む別個の容器と、を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 1) を含む別個の容器と、及び C 1) を含む別個の容器と、を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 2) を含む別個の容器と、及び C 2) を含む別個の容器と、を含むキット、
- A) を含む容器と、 B 3) を含む別個の容器と、及び C 3) を含む別個の容器と、を含むキット；

20

ここで、「A 」は、抗ヒト C D 3 2 1 抗体を表し、「B 1 」は、抗ヒト汎白血球マーク抗体を表し、「C 1 」は、抗ヒト血小板マーク抗体を表し、「B 2 」は、抗ヒト C D 4 5 抗体、抗ヒト L S P 1 抗体、及び抗ヒト C D 4 8 抗体からなる群から選択される抗体を表し、「C 2 」は、抗ヒト C D 3 6 抗体、抗ヒト C D 4 1 抗体、抗ヒト C D 4 2 a 抗体、抗ヒト C D 4 2 b 抗体、及び抗ヒト C D 6 1 抗体からなる群から選択される抗体を表し、「B 3 」は、抗ヒト C D 4 5 抗体を表し、「C 3 」は、抗ヒト C D 4 2 a 抗体を表す。

30

【 0 2 4 9 】

したがって、本出願は、以下の記述 1 ~ 2 8 に記載の特に好ましい態様及び実施形態を提供する：

記述 1 . 対象由來の生体試料中の循環腫瘍細胞 (C T C) を検出又は定量し、及び任意選択で、生体試料から上記 C T C を単離するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現を検出することを含み、循環非造血細胞による C D 3 2 1 の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞と同定され、任意選択で、生体試料から C D 3 2

40

50

1を発現するC T Cを単離すること、を含む方法。

【0250】

記述2. 生体試料が、対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は他の滲出液若しくは分泌液由来の循環細胞、好ましくは対象の末梢血由来の循環細胞を含む、記述1に記載の方法。

【0251】

記述3. 循環CD321陽性腫瘍細胞が、上記細胞による少なくとも1つの汎白血球マーカー及び少なくとも1つの血小板マーカーの発現の不存在により非造血性と同定される、記述1又は2に記載の方法。

【0252】

記述4:

a) 対象由來の生体試料を提供することであって、上記生体試料は、対象由來の循環細胞、好ましくは対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は他の滲出液若しくは分泌液由來の循環細胞、より好ましくは対象の末梢血由來の循環細胞を含む、提供することと、

b) 上記生体試料において、少なくとも1つの汎白血球マーカーに対して陰性であり、かつ少なくとも1つの血小板マーカーに対して陰性である非造血細胞を検出することと、

c) b)で検出された細胞によるCD321の発現を検出することであって、b)で検出された細胞によるCD321の発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定されることと、

を含む、記述1～3のいずれか1つに記載の方法。

【0253】

記述5.

a) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

b) 上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

c) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

d) 上記汎白血球マーカーがCD45であり、

e) 上記血小板マーカーがCD42aであり、又は

f) 上記汎白血球マーカーがCD45であり、上記血小板マーカーがCD42aである、記述3又は4に記載の方法。

【0254】

記述6. 腫瘍が固形腫瘍である、記述1～5のいずれか1つに記載の方法。

【0255】

記述7. 腫瘍が、上皮、間葉、又はメラニン細胞由來である、記述1～6のいずれか1つに記載の方法。

【0256】

記述8. 対象がヒトである、記述1～7のいずれか1つに記載の方法。

【0257】

記述9. CD321の発現を検出することが、CD321タンパク質若しくはCD321mRNA又は両方を検出することを含む、記述1～8のいずれか1つに記載の方法。

【0258】

記述10. C T Cが、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述1～9のいずれか1つに記載の方法。

【0259】

記述11. 技術が、CD321に特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を使用する、記述10に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 2 6 0 】

記述 12 . 技術が、少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、をさらに使用する、記述 10 又は 11 に記載の方法。

【 0 2 6 1 】

記述 13 . 1 つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1 つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、記述 11 又は 12 に記載の方法。

【 0 2 6 2 】

記述 14 . C T C が、C D 3 2 1 に特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子を使用する技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

【 0 2 6 3 】

記述 15 . 技術が、少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、をさらに使用する、記述 14 に記載の方法。

【 0 2 6 4 】

記述 16 . 1 つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1 つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、記述 14 又は 15 に記載の方法。

【 0 2 6 5 】

記述 17 . C T C が、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述 14 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【 0 2 6 6 】

記述 18 . 単離された C T C 、その溶解物、又はその 1 つ以上の腫瘍抗原を腫瘍ワクチンに製剤化することをさらに含み、任意選択で、腫瘍ワクチンが樹状突起をさらに含む、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 6 7 】

記述 19 . 単離された C T C を生化学分析、突然変異分析、トランスク립トーム分析、及び / 又はプロテオーム分析に供することをさらに含む、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

【 0 2 6 8 】

記述 20 . 対象における新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための方法であって、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つに定義された方法によって対象における C T C を検出又は定量化することを含む方法。

【 0 2 6 9 】

記述 21 . 対象における新生物疾患の転移能を決定するための方法であって、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における C T C を検出又は定量化することを含み、対象における C T C の存在により、新生物疾患が転移能を有すると同定される、方法。 40

【 0 2 7 0 】

記述 22 . 対象における新生物疾患の再発を決定するための方法であって、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における C T C を検出又は定量化することを含み、対象における C T C の存在により、新生物疾患が再発したと同定される、方法。

【 0 2 7 1 】

記述 23 . 対象が抗癌療法を必要としているかどうかを決定するための方法であって、記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における C T C を検出又は定量化することを含み、対象における C T C の存在により、対象が抗癌療法を必要としていると同定される、方法。

【 0 2 7 2 】

10

20

30

40

50

記述 24. 新生物疾患有する対象における抗癌療法の有効性を決定するための方法であって、療法前及び療法中又は療法後に記述 1 ~ 17 のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における CTC を検出又は定量化することを含み、療法中又は療法後の対象における CTC の量が療法前と比較して低下したことにより、上記療法が有効であると同定される、方法。

【0273】

記述 25.

a) - CD321 に特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

を含む部品のキット又は製造品、

b) - CD321 に特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

を含む部品のキット又は製造品、あるいは

c) - CD321 に特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、

を含む部品キット又は製造品

からなる群から選択される、部品のキット又は製造品。

【0274】

記述 26.

a) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

b) 上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

c) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

d) 上記汎白血球マーカーが CD45 であり、

e) 上記血小板マーカーが CD42a であり、又は

f) 上記汎白血球マーカーが CD45 であり、上記血小板マーカーが CD42a である、記述 25 に記載の部品のキット又は製造品。

【0275】

記述 27. 1 つ以上の作用因子が、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術における使用のために構成される、記述 25 又は 26 に記載の部品のキット又は製造品。

【0276】

記述 28. 1 つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1 つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、記述 25 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の部品のキット又は製造品。

【0277】

実施例 1 の表 1 - 1 ~ 1 - 3 に記載されるさらなるマーカーも、CD321 について本明細書に記載されている用途に対応する用途において有用であると想定される。これらのマーカーには、特に、CD40、CD49e、CD146、2ミクログロブリン、及びそれらの組み合わせが含まれる。

【0278】

したがって、本出願はまた、以下の記述 1' ~ 31' に示されるような態様及び実施形態

10

20

30

40

50

も提供する：

記述1' . 対象由来の生体試料中の腫瘍細胞を検出又は定量化し、及び任意選択で、生体試料から腫瘍細胞を単離する方法であって、生体試料中の腫瘍細胞によるCD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーの発現を検出することと、任意選択で、生体試料から上記マーカーを発現している腫瘍細胞を単離することと、を含む方法。

【0279】

記述2' . 生体試料が、腫瘍生検若しくは細針吸引液、又は切除された腫瘍組織である、記述1' に記載の方法。

【0280】

記述3' . 対象由来の生体試料中の循環腫瘍細胞(CTC)を検出又は定量化し、及び任意選択で、生体試料から上記CTCを単離するための方法であって、生体試料中の循環非造血細胞によるCD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーの発現を検出することを含み、循環非造血細胞による上記マーカーの発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定され、任意選択で、生体試料から上記マーカーを発現するCTCを単離することと、を含む、記述1' に記載の方法。

10

【0281】

記述4' . 生体試料が、対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は別の滲出液若しくは分泌液由来の循環細胞、好ましくは対象の末梢血由来の循環細胞を含む、記述3' に記載の方法。

20

【0282】

記述5' . 上記マーカーに対して陽性の循環腫瘍細胞が、上記細胞による少なくとも1つの汎白血球マーカー及び少なくとも1つの血小板マーカーの発現の不存在により非造血性であると同定される、記述3' 又は4' に記載の方法。

【0283】

記述6' .

a) 対象由来の生体試料を提供することであって、上記生体試料は、対象由来の循環細胞、好ましくは対象の血液、尿、糞便、リンパ液、又は他の滲出液若しくは分泌液由来の循環細胞、より好ましくは対象の末梢血由来の循環細胞を含む、提供すること、

30

b) 上記生体試料において、少なくとも1つの汎白血球マーカーに対して陰性であり、かつ少なくとも1つの血小板マーカーに対して陰性である非造血細胞を検出すること、

c) b) で検出された細胞によるCD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーの発現を検出することであって、b) で検出された細胞による上記マーカーの発現により、上記細胞が循環腫瘍細胞であると同定されること、

を含む、記述3' ~ 5' のいずれか1つに記載の方法。

【0284】

記述7' .

a) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

40

b) 上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

c) 上記汎白血球マーカーが、CD45、LSP1、CD48、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、上記血小板マーカーが、CD36、CD41、CD42a、CD42b、CD61、及びそれらの組み合せからなる群から選択され、

d) 上記汎白血球マーカーがCD45であり、

e) 上記血小板マーカーがCD42aであり、又は

f) 上記汎白血球マーカーがCD45であり、上記血小板マーカーがCD42aである、記述5' 又は6' に記載の方法。

50

【0285】

記述8' . 腫瘍が固形腫瘍である、記述1' ~ 7' のいずれか1つに記載の方法。

【0286】

記述9' . 腫瘍が、上皮、間葉、又はメラニン細胞由来である、記述1' ~ 8' のいずれか1つに記載の方法。

【0287】

記述10' . 対象がヒトである、記述1' ~ 9' のいずれか1つに記載の方法。

【0288】

記述11' . 上記マーカーの発現を検出することが、マーカータンパク質若しくはマーカー-mRNA又は両方を検出することを含む、記述1' ~ 10' のいずれか1つに記載の方法。 10

【0289】

記述12' . 腫瘍細胞又はCTCが、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述1' ~ 11' のいずれか1つに記載の方法。

【0290】

記述13' . 技術が、CD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を使用する、記述12' に記載の方法。

【0291】

記述14' . 技術が、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、をさらに使用する、記述12' 又は13' に記載の方法。 20

【0292】

記述15' . 1つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、記述13' 又は14' に記載の方法。

【0293】

記述16' . 腫瘍細胞又はCTCが、CD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子を使用する技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述1' ~ 11' のいずれか1つに記載の方法。 30

【0294】

記述17' . 技術が、少なくとも1つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、少なくとも1つの血小板マーカーに特異的に結合することができる1つ以上の作用因子と、をさらに使用する、記述16' に記載の方法。

【0295】

記述18' . 1つ以上の作用因子が、それぞれ独立して、1つ以上の抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、又はアプタマーである、記述16' 又は17' に記載の方法。

【0296】

記述19' . 腫瘍細胞又はCTCが、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、蛍光顕微鏡法、親和性分離、磁気細胞分離、マイクロ流体分離、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して検出、定量化、又は単離される、記述16' ~ 18' のいずれか1つに記載の方法。 40

【0297】

記述20' . 単離された腫瘍細胞若しくはCTC、それらの溶解物、又はそれらの1つ以上の腫瘍抗原を腫瘍ワクチンに製剤化することをさらに含み、任意選択で、腫瘍ワクチンが樹状細胞をさらに含む、記述1' ~ 19' のいずれか1つに記載の方法。

【0298】

記述21' . 単離された腫瘍細胞又はCTCを生化学分析、突然変異分析、トランスクリプトーム分析、及び/又はプロテオーム分析に供することをさらに含む、記述1' ~ 19' 50

のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 9 9 】

記述 22' . 対象における新生物疾患の診断、予後、又はモニタリングのための方法であって、記述 1' ~ 19' のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含む方法。

【 0 3 0 0 】

記述 23' . 対象における新生物疾患の転移能を決定するための方法であって、記述 1' ~ 19' のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、新生物疾患が転移能を有すると同定される、方法。

10

【 0 3 0 1 】

記述 24' . 対象における新生物疾患の再発を決定するための方法であって、記述 1' ~ 19' のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、新生物疾患が再発したと同定される、方法。

【 0 3 0 2 】

記述 25' . 対象が抗癌療法を必要としているかどうかを決定するための方法であって、記述 1' ~ 19' のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、対象における腫瘍細胞又は CTC の存在により、対象が抗癌療法を必要としていると同定される、方法。

20

【 0 3 0 3 】

記述 26' . 新生物疾患有する対象における抗癌療法の有効性を決定するための方法であって、療法前及び療法中又は療法後に記述 1' ~ 19' のいずれか 1 つで定義される方法によって対象における腫瘍細胞又は CTC を検出又は定量化することを含み、療法中又は療法後の対象における腫瘍細胞又は CTC の量が療法前と比較して低下したことにより、上記療法が有効であると同定される、方法。

【 0 3 0 4 】

記述 27' . 対象における腫瘍のインサイチュー画像化のための方法であって、 CD32 1、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる作用因子を対象に投与することであって、上記作用因子が画像診断装置によって検出可能な標識を含み、上記作用因子が腫瘍細胞によって発現される上記マーカーに特異的に結合することを可能にする、投与することと、上記画像診断装置を使用して対象における腫瘍を視覚化することと、を含む方法。

30

【 0 3 0 5 】

記述 28' .

a) - CD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品、

b) - CD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合できる 1 つ以上の作用因子と、を含む部品のキット又は製造品、あるいは

c) - CD321、CD40、CD49e、CD146、2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

- 少なくとも 1 つの汎白血球マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

40

50

- 少なくとも 1 つの血小板マーカーに特異的に結合することができる 1 つ以上の作用因子と、

を含む部品のキット又は製造品

からなる群から選択される、部品のキット又は製造品。

【 0 3 0 6 】

記述 2 9 ' .

a) 上記汎白血球マーカーが、 C D 4 5 、 L S P 1 、 C D 4 8 、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

b) 上記血小板マーカーが、 C D 3 6 、 C D 4 1 、 C D 4 2 a 、 C D 4 2 b 、 C D 6 1 、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

c) 上記汎白血球マーカーが、 C D 4 5 、 L S P 1 、 C D 4 8 、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、上記血小板マーカーが、 C D 3 6 、 C D 4 1 、 C D 4 2 a 、 C D 4 2 b 、 C D 6 1 、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

d) 上記汎白血球マーカーが C D 4 5 であり、

e) 上記血小板マーカーが C D 4 2 a であり、 又は

f) 上記汎白血球マーカーが C D 4 5 であり、 上記血小板マーカーが C D 4 2 a である、 記述 2 8 ' に記載の部品のキット又は製造品。

【 0 3 0 7 】

記述 3 0 ' . 1 つ以上の作用因子が、 フローサイトメトリー、 マスサイトメトリー、 蛍光活性化細胞選別、 蛍光顕微鏡法、 親和性分離、 磁気細胞分離、 マイクロ流体分離、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択される技術における使用のために構成される、 記述 2 8 ' 又は 2 9 ' に記載の部品キット又は製造品。

【 0 3 0 8 】

記述 3 1 ' . 1 つ以上の作用因子が、 それぞれ独立して、 1 つ以上の抗体、 抗体断片、 抗体様タンパク質の足場、 又はアプタマーである、 記述 2 8 ' ~ 3 0 ' のいずれか 1 つに記載の部品のキット又は製造品。

【 0 3 0 9 】

本発明をその特定の実施形態に関連して説明してきたが、 上記の説明に照らして多くの代替、 修正、 及び変形が当業者に明らかであることは明白である。 したがって、 添付の特許請求の範囲の真意及び広い範囲において、 以下のようなすべてのそのような代替、 修正、 及び変形を包含することが意図されている。

【 0 3 1 0 】

本明細書で開示される本発明の態様及び実施形態は、 以下の非限定的な例によってさらに裏付けられる。

【 実施例 】

【 0 3 1 1 】

実施例 1 - C D 3 2 1 は、 細胞株、 患者由来の異種移植片 (P D X) 、 及び原発腫瘍において一貫して発現される。

2 5 1 細胞表面マーカーの発現を、 癌細胞株の代表的集団 (S K M E S 扁平上皮肺癌細胞株、 A 4 3 1 類表皮癌細胞株) 由来の細胞、 患者由来の異種移植片 (第 3 繼代の頭頸部癌 P D X) 、 及び原発腫瘍 (原発性皮膚扁平上皮癌) において成人皮膚線維芽細胞と比較して評価した。 以下の表は、 該マーカーの発現の半定量的表現を提供するものである。

【 0 3 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

抗原	SKMES 肺	A431皮膚	H&N PDX P3	原発性皮膚SCC	成人皮膚線維芽細胞
CD8b	-	B	-	NA	-
CD9	XX	XX	XX	-	XX
CD10	X	-	-	NA	XX
CD13	XX	-	-	NA	XX
CD15	-	-	X	NA	x?
CD24	B	XX	-	-	-
CD29	X	X	X	-	XX
CD30	X	-	-	NA	-
CD36	X	-	-	NA	-
CD39	X	-	-	NA	-
CD40	XX	XX	-	-	
CD44	B	XX	B	X	XX
CD46	XX	XX	XX	-	XX
CD47	XX	XX	XX	XX	XX
CD49a	-	X	-	NA	X
CD49b	-	XX	X	-	XX
CS49c	-	XX	XX	-	XX
CD49d	-	B	-	NA	XX
CD49e	XX	XX	-	-	-
CD49f	-	XX	X	-	-
CD51/61	XX	-	X	-	X
CD54	-	XX	-	NA	X
CD55	-	XX	XX	X	XX
CD56	-	XX	-	NA	XX
CD58	-	-	XX	NA	XX
CD59	XX	XX	XX	XX	X
CD61	X	-	B	-	-

10

20

30

40

50

【表1 - 2】

抗原	SKMES 肺	A431皮膚	H&N PDX P3	原発性皮膚 SCC	成人皮膚線維芽細胞
CD63	xx	xx	xx	-	xx
CD66	-	B	x	-	-
CD69	x	-	-	NA	x
CD71	xx	xx	xx	-	x
CD73	xx	xx	NA	-	xx
CD77	-	B	-	NA	B
CD81	xx	xx	x	-	xx
CD91	-	?	-	NA	xx
CD95	-	xx	xx	-	xx
CD98	-	xx	xx	-	xx
CD99	xx	x	-	-	xx
CD104	xx	x	?	-	-
CD107a	-	x	xx	-	xx
CD108	-	x	-	NA	x
CD109	-	x	-	NA	-
CD117	-	-	B	NA	-
CD119	-	x	-	NA	xx
CD127	xx	-	-	NA	-
CD128	xx	-	-	NA	-
CD130	-	x	-	NA	xx
CD141	-	xx	-	NA	xx
CD142	-	xx	-	NA	xx
CD146	xx	B	xx	-	-
CD147	xx	xx	xx	xx	xx
CD151	x	B	xx	-	xx
CD164	x	xx	xx	-	xx
CD165	B	-	-	-	xx
CD166	xx	xx	xx	-	xx
CD171	x	?	-	-	-
CD201	-	xx	-	NA	xx
CD205	-	x	-	NA	-
CD220	-	-	xx	NA	-
CD221	-	xx	xx	-	xx
CD227	-	B	x	-	x
CD271	-	x	-	NA	-
CD274	xx	xx	-	-	-
CD321	xx	xx	xx	x	-
CD326	x	xx	xx	-	-
CD338	-	x	-	NA	-
CD340	x	xx	xx	-	x
B2M	xx	xx	xx	NA	-
CLA	-	x	-	NA	-
EGFR	xx	xx	-	-	xx
Dis-GD2	B	-	-	NA	B
fMLP-R	x	-	-	NA	-
SSEA4	B	xx	-	x	B

10

20

30

40

【表1 - 3】

抗原	SKMES 肺	A431皮膚	H&N PDX P3	原発性皮膚 SCC	成人皮膚線維芽細胞
TRA-1-60	B	-	-	NA	-
TRA-1-81	B	-	-	NA	-

【0313】

「B」は「二峰性 (b i m o d a l) 発現」を示し、ここで、マーカー発現は不均一であり、いくつかの細胞は陽性であり、他の細胞は陽性ではない。

50

【0314】

CD321は、検査したすべての癌組織で確実に発現されるが、成人皮膚線維芽細胞では発現されないことが明らかになった。

【0315】

さらなる広範な検証により、CD321は、癌細胞株、患者由来の異種移植片(PDX)、及び原発腫瘍によって一貫して発現されることが確認された(図1及び図6-1～図6-3)。

【0316】

上記の表に記載されるさらなるマーカーも、CD321について本明細書に記載されている用途に対応する用途において有用であると想定される。これらのマーカーには、特に、CD40、CD49e、CD146、2ミクログロブリン(2M)、及びそれらの組み合わせが含まれる。

10

【0317】

実施例2-腫瘍細胞によるCD321の発現と従来の上皮マーカーの発現との比較

古典的なマーカーE p C A Mは、癌細胞を同定するために従来から使用されている。CD321及びE p C A Mの発現を、皮膚癌、肺癌、及び頭頸部癌の原発腫瘍由来の腫瘍細胞で比較した。E p C A Mは、常にCD321と共に局在したが、CD321は、すべての場合で非常に多数の細胞を標識し、このことは、CD321がE p C A Mよりも高い感度で腫瘍細胞を検出したことを実証している(図2A～C及び図7)。

20

【0318】

さらに、CD321及び古典的な上皮マーカーであるケラチン-14の発現を、頭頸部腫瘍、肺腫瘍、及び皮膚腫瘍の組織切片で比較した。ケラチン-14は、常にCD321と共に局在したが、CD321は、癌細胞の大部分で発現し、このことは、CD321がケラチン-14よりも高い感度で腫瘍細胞を検出したことを実証している(図3)。

【0319】

E p C A M及びサイトケラチンなどの上皮マーカーは、溢出に必要と考えられ、かつ、腫瘍始原細胞に特徴的なプロセスである上皮間葉転換(EMT)中に失われる。

【0320】

一方、CD321は、EMT状態とは無関係に腫瘍細胞の同定を可能にした(図4A～C)。

30

【0321】

実施例3-CD321の発現により、循環腫瘍細胞(CTC)の高感度な同定が可能となる。

免疫細胞及び血小板の排除後、正常なドナー及び乳癌又は肺癌を有する患者の末梢血由来の細胞をCD321及びE p C A Mについて染色した。E p C A M+細胞は常にCD321+であったが、CD321はE p C A Mがマークしていない追加の細胞も標識した(図5A)。

【0322】

ヒト肺多形癌を移植したマウスの末梢血及び肺組織由来の細胞をヒトCD321について染色した。ヒトCD321+細胞は、肺における循環及び転移の両方で確実に検出された(図5B)。

40

【0323】

CD321は、ヒト癌患者対象における循環腫瘍細胞(CTC)の高感度な同定を可能にする(図8-1a)。CTCの検出は、癌の様々なステージ(図8-1b)及び抗癌療法への反応(図8-2c)と相關している。

【0324】

実施例4-循環腫瘍細胞(CTC)を検出、定量化、又は単離する方法

本発明の原理を具体化する循環腫瘍細胞(CTC)を検出、定量化、又は単離するための方法の一例は、以下の工程又は操作を含み得る。

【0325】

50

癌を有しているか、又は癌を有している疑いのあるヒト対象由来の末梢血の試料（例えば、1 mL ~ 20 mL、例えば、5 mL、7.5 mL、又は10 mL）が提供される。血液試料は、典型的には、抗凝固剤を含有する（例えばEDTAを含有する）容器又はチューブに収集され、保管される。

【0326】

赤血球（RBC）は、次の手順のいずれか1つ又は組み合わせによって分析から除去される：

- RBCを溶解する従来の方法で、抗体染色の前又は後に末梢血試料を処理し（下記参照）、例えば、1×ACK（塩化アンモニウムカリウム）緩衝液（155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、0.1 mM EDTA、pH 7.3）などの市販のRBC溶解緩衝液を使用して、若しくは好ましくは赤血球を溶解するための古典的な低張ショック（赤血球が溶解されるまでに約10~20秒間であることを可能とする好適量の水中の0.2% w/v NaCl溶液を添加し、同じ体積の水中の1.6% w/v NaCl溶液を添加することにより等張性を回復させる）を使用して、又は好ましくはまた市販のBD FACS（商標）溶解液（カタログ番号349202；http://www.bdbiosciences.com/ds/iss/tds/23-1358.pdf）を使用して処理し、及び/あるいは

- 末梢血試料を遠心単離によって血漿、バフィーコート、及びRBC画分に分離し、白血球、血小板、及びCTCを含むバフィーコート画分を下流の分析に使用する。

【0327】

抗体染色の前に、例えば死細胞対生細胞を選択的に標識する十分な量の色素と試料を接触させることにより、死細胞を分析から除外し得る。例えば、無傷の（透過処理されていない）細胞試料をHoechst 33342と接触させると、生細胞はそれらの核に色素を取り込まないが、死細胞又は死にかけている細胞はそれらの核に色素を取り込むこととなる。その後、FACSでゲートアウトするなどして、Hoechst陽性細胞を選択して、分析を生細胞でのみ実施し、死細胞又は死にかけている細胞による非特異的な抗体結合によって混乱させないようにすることができる。

【0328】

抗体染色の前に、細胞を収集する必要はないが、0.5% w/v ウシ血清アルブミン（BSA）を任選選択で含む1×リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの好適な緩衝液で洗浄してもよい。したがって、全血試料又はバフィーコート画分中の抗体染色は、事前の洗浄なしで可能である。

【0329】

細胞は、1) 蛍光標識された抗ヒトCD321抗体、2) 蛍光標識された抗ヒト汎白血球マーカー抗体、及び3) 蛍光標識された抗ヒト血小板マーカー抗体とともに、抗原抗体結合を促進する条件で、例えば、2~3% w/v BSA又は5~10% w/v ウシ胎児血清（FBS）及び1% w/v アジ化ナトリウムを含む1×PBSなどの好適な緩衝液中、約4で少なくとも30分間、インキュベートされる。例えば、試料は、1) 蛍光標識された抗ヒトCD321抗体、2) 蛍光標識された抗ヒトCD45抗体、及び3) 蛍光標識された抗ヒトCD42a抗体とともにインキュベートされる。非CD321アイソタイプ抗体は、陰性対照として使用される。抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。フローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡法により、1) のフルオロフォアは、2) 及び3) のフルオロフォアの各々と区別できる。2) 及び3) のフルオロフォアは、フローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡法によって互いに区別し得るが、その必要はない。例えば、1) のフルオロフォアはアロフィコシアニン（APC）であり、2) 及び3) のフルオロフォアはR-フィコエリスリン（PE）であり、又はその逆である。

【0330】

典型的には、抗体とのインキュベーション後、0.5% w/v BSA及び1% w/v アジ化ナトリウムを含む1×PBSなどの好適な緩衝液中で細胞を1~3回洗浄して、抗体結合の特異性を確保する。

10

20

30

40

50

【0331】

そのように処理された細胞は、従来のフローサイトメトリー又は手動若しくは（半）自動蛍光顕微鏡法によって分析され、フルオロフォア1)に陽性であり、かつ、フルオロフォア2)及び3)に陰性である、CD321陽性CTCを構成する細胞が検出及びカウントされる。フローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡法のデータは、例えば表形式又は一変量若しくは二変量ヒストグラムとして好適に表される。CTC負荷は、例えば試料あたり又は血液1mLあたりのCTCカウントとして好適に表すことができる。

【0332】

任意選択で、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して、CTCを選別及び単離してもよい。

10

【0333】

実施例5 - 循環腫瘍細胞（CTC）を検出、定量化、又は単離する方法

本発明の原理を具体化する循環腫瘍細胞（CTC）を検出、定量化、又は単離する方法の別の例は、以下の工程又は操作を含み得る。

【0334】

癌を有しているか、又は癌を有している疑いのあるヒト対象由来の末梢血の試料（例えば、1mL～20mL、例えば5mL、7.5mL、又は10mL）が提供される。血液試料は、典型的には、抗凝固剤を含有する（例えばEDTAを含有する）容器又はチューブに収集され、保管される。

【0335】

試料は、抗原抗体結合を促進する条件で、第1の抗ヒトCD321抗体と結合された磁性流体粒子とともにインキュベートされる。第1の抗ヒトCD321抗体が結合した細胞は、免疫磁気的に濃縮されている。CD321-磁性流体標識細胞は、1)蛍光標識された第2の抗ヒトCD321抗体とともにインキュベートされ、ここで、第1及び第2の抗ヒトCD321抗体はCD321と非競合的に結合し、2)蛍光標識された抗ヒト汎白血球マーカー抗体、例えば蛍光標識された抗ヒトCD45抗体とともにインキュベートされ、及び3)DNA結合色素、例えば4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）又はHoechst 33342などの好適な細胞透過性核対比染色剤とともにインキュベートされる。抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。フローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡法により、1)でのフルオロフォアは2)でのフルオロフォアと区別できる。例えば、1)でのフルオロフォアはアロフィコシアニン（APC）であり、2)でのフルオロフォアはR-フィコエリスリン（PE）であり、又はその逆である。

20

【0336】

蛍光標識された細胞の任意の洗浄及び磁気分離の後、CellTracks Analyzer II（登録商標）（Janssen Diagnostics、LLC）などを使用して、半自動蛍光顕微鏡法により細胞を分析する。CTCは、CD321に対して陽性に染色され、かつ、CD45に対して陰性に染色される有核細胞として定義され、全血試料の設定体積あたり（例えば、血液1mL又は7.5mLあたり）計数される。

30

【0337】

実施例6 - 循環腫瘍細胞（CTC）を検出、定量化、又は単離する方法

特に、図8-1～図8-2のものなどの、前の実施例におけるヒト血液試料中のCTCに関するデータを収集するために使用される、本発明の原理を具体化する循環腫瘍細胞（CTC）を検出、定量化、又は単離するための方法のさらなる例は、以下の手順又は操作が含むものであった。

40

【0338】

BDS溶解緩衝液を使用する方法

血液7.5mL～10mLの試料を処理し、以下のプロトコルの指示を使用して分析した：

- 血液を50mLファルコンチューブに移し、FACS緩衝液（PBS+2%V/VFS）を添加する

50

- 350 g で 10 分間遠心分離する
- 細胞ペレットをかき乱さないように上清を慎重に廃棄する
- FACS 緩衝液でもう 1 回洗浄を繰り返す
- 1 × BD FACS (商標) 溶解液 (カタログ番号 349202) を使用して、室温で 10 分間、赤血球の溶解を行う (BD 溶解緩衝液は、細胞が固定されて透過性になるように PFA を含有する)
- 350 g で 10 分間遠心分離する
- 上清を廃棄する
- 適切な量の FACS 緩衝液 (細胞の数に応じて、通常 300 ~ 400 μl) に細胞ペレットを再懸濁する
- 抗体 : 抗ヒト CD321 - PE (BD カタログ番号 552556) (希釈 1 : 50)、抗ヒト Epcam - APC (BD カタログ番号 347200) (希釈 1 : 50)、抗ヒト CD45 - BV421 (BD カタログ番号 563879) (希釈 1 : 100)、抗ヒト CD42a - FITC (BD カタログ番号 558818) (希釈 1 : 50) を添加する
- 氷上 4° で、暗所にて 30 分間インキュベートする
- FACS 緩衝液で洗浄する
- 300 ~ 400 μl の FACS 緩衝液で再懸濁し、FACS により分析する。

【0339】

低張 RBC 溶解を使用する方法

血液 7.5 ml ~ 10 ml の試料を処理し、以下のプロトコルの指示を使用して分析した :

- 血液 1 mlあたり 2.5 ml の NaCl 0.2% w/v を添加
- 10 秒間待つ
- 血液 1 mlあたり 2.5 ml の NaCl 1.6% w/v を添加
- 350 g で 10 分間遠心分離する
- 上清を廃棄する
- BD 溶解緩衝液プロトコルにおいて上記のようにして染色及び FACS 分析を進める。このプロトコルでは、細胞の最後の洗浄後及び分析前に、Hoechst 33342 色素 1 : 2000 を添加して死細胞を除去する。

【0340】

引用文献リスト

Binz et al.:Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains.

Nat Biotechnol 2005, 23:1257-1268.

Gebauer and Skerra:Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol. 2009, 13:245-55.

Gill and Damle:Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds. Curr Opin Biotechnol 2006, 17:653-658.

Koide and Koide:Monobodies:antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain. Methods Mol Biol 2007, 352:95-109.

Kolmar:Alternative binding proteins:biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. FEBS J 2008, 275:2684-2690.

Nixon and Wood:Engineered protein inhibitors of proteases. Curr Opin Drug Discov Dev 2006, 9:261-268.

Nygren:Alternative binding proteins:Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. FEBS J 2008, 275:2668-2676.

Silverman et al.:Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. Nat Biotechnol 2005, 23:1556-1561.

Skerra:Engineered protein scaffolds for molecular recognition. J Mol Recog

10

20

30

40

50

nit 2000, 13:167-187.

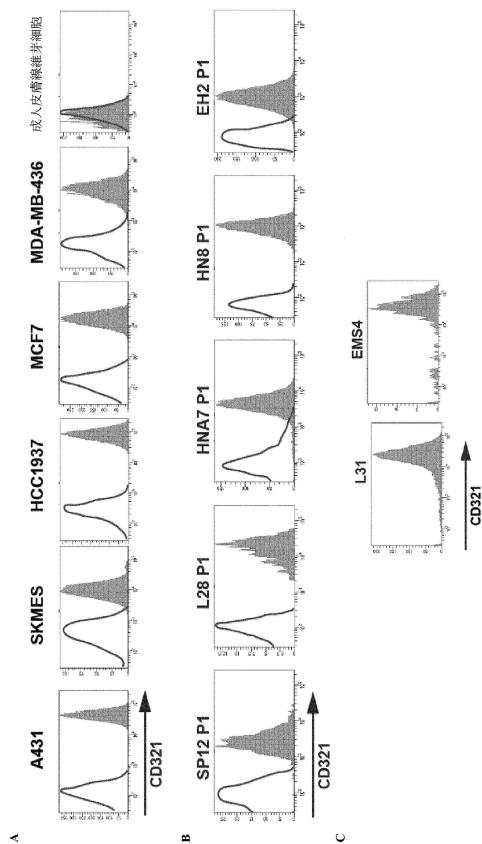
Skerra:Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 2007, 18:295-304.

Skerra:Alternative binding proteins:Anticalins-harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J* 2008, 275:2677-2683.

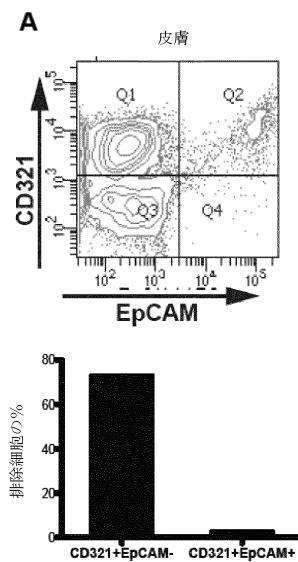
Stumpp et al.:DARPins:a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 2008, 13:695-701.

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

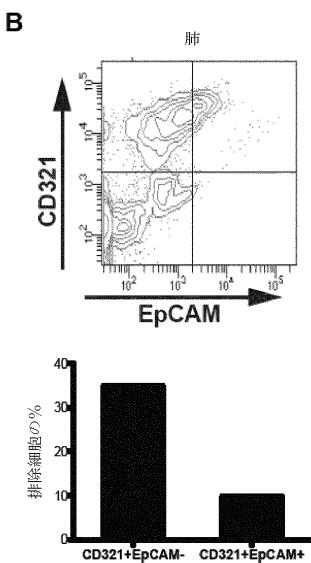
20

30

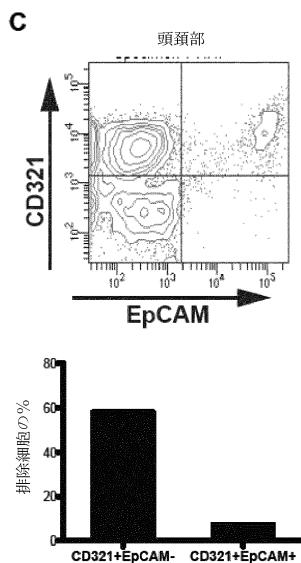
40

50

【図 2 B】

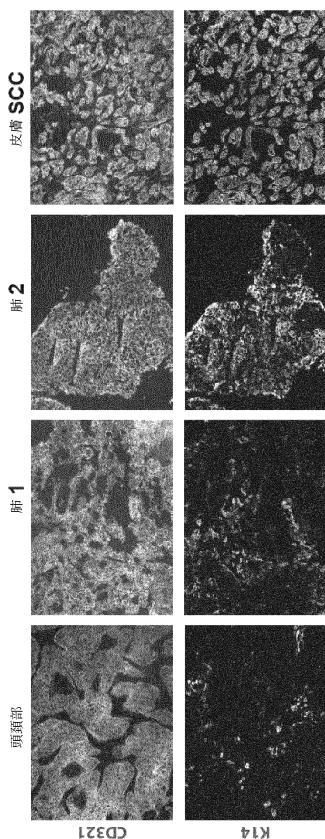


【図 2 C】



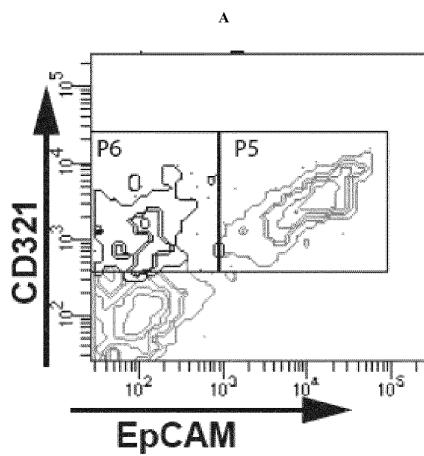
10

【図 3】



20

【図 4 A】

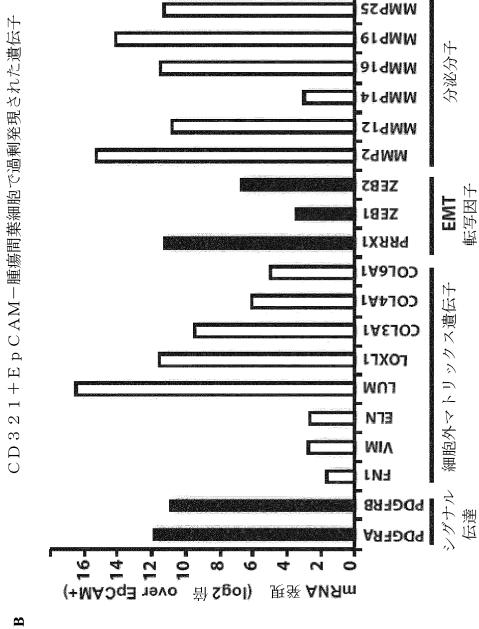


30

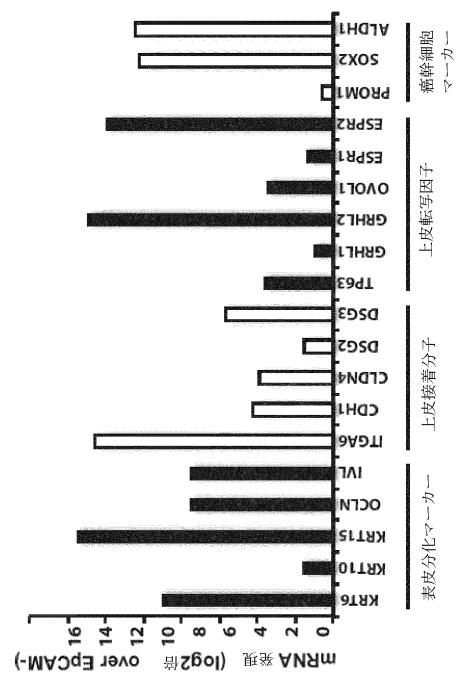
40

50

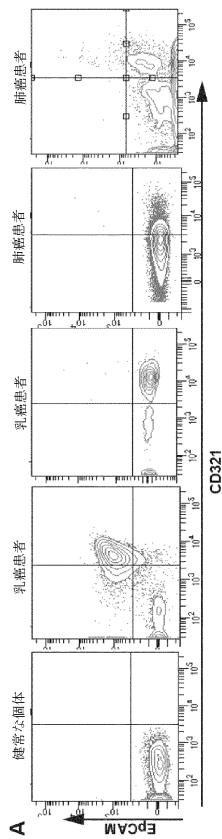
【図 4 B】



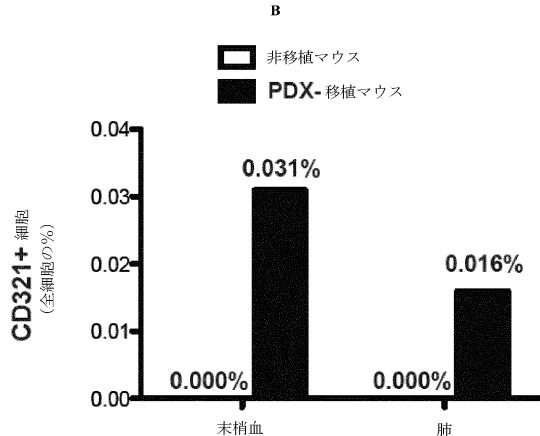
【図 4 C】



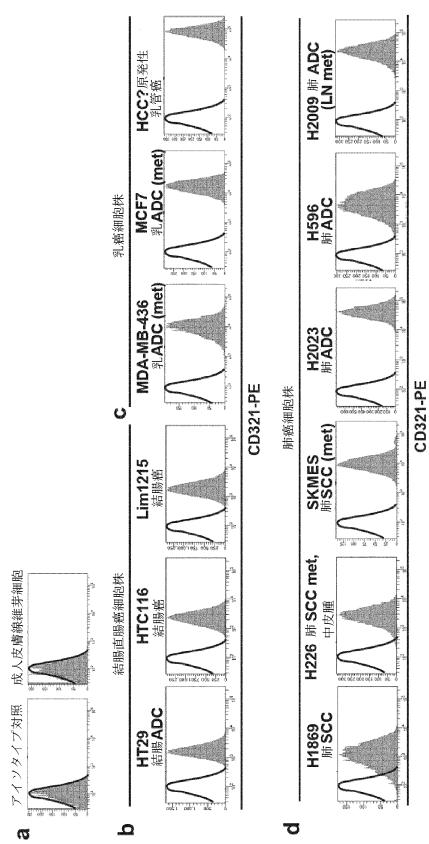
【図 5 A】



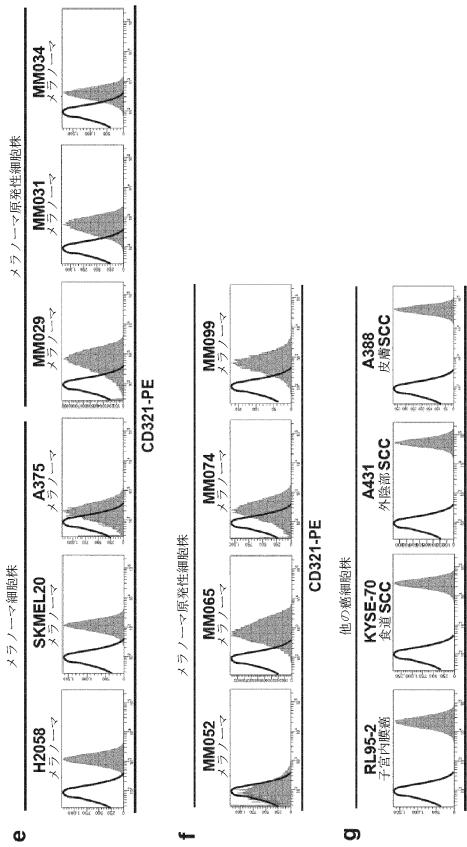
【図 5 B】



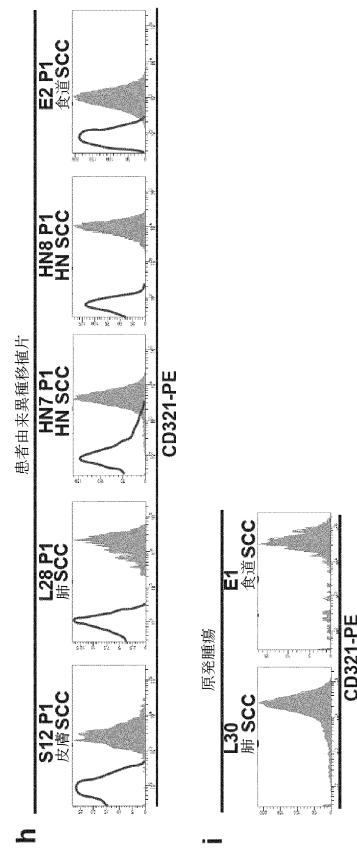
【図 6 - 1】



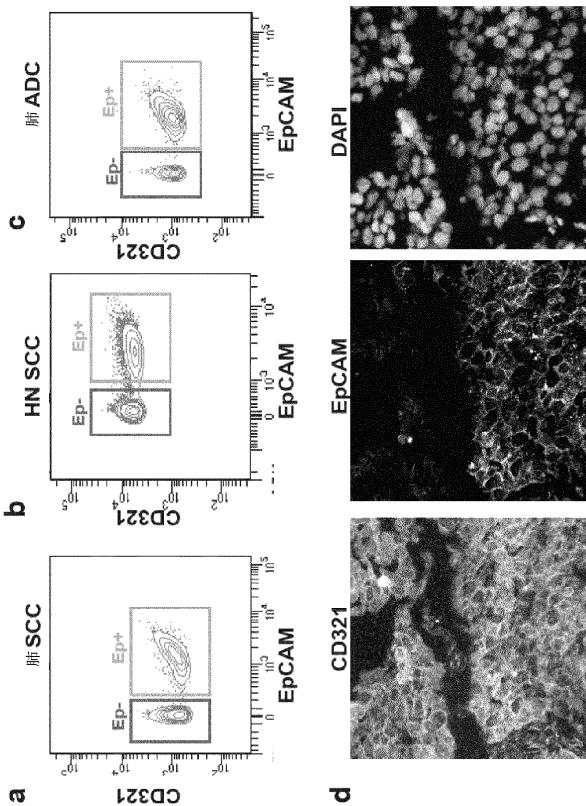
【図 6 - 2】



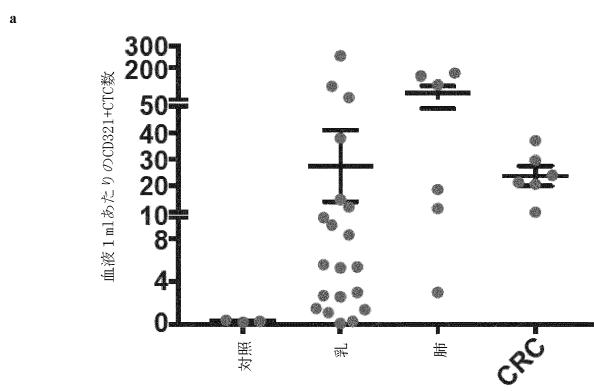
【図 6 - 3】



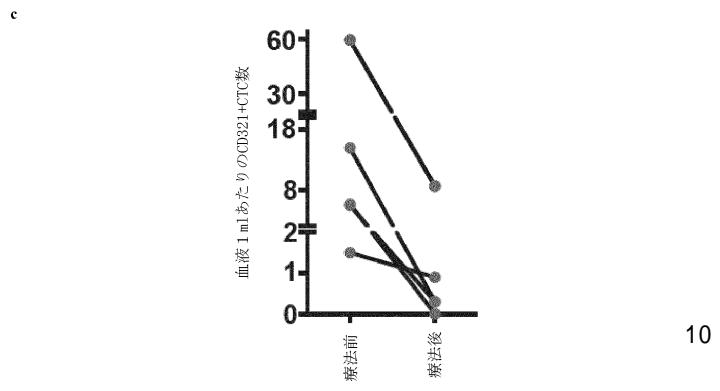
【図 7】



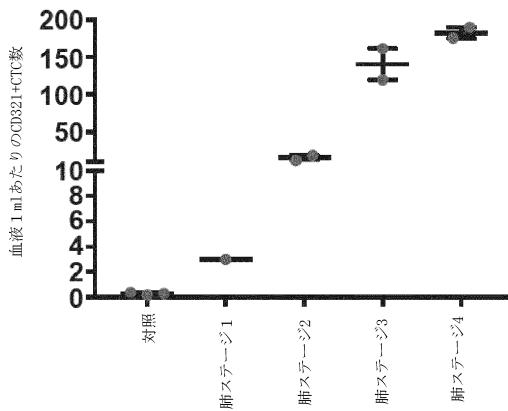
【図8-1】



【図8-2】



b



【配列表】

0007278595000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 1 2 Q 1/04

審査官 高田 亜希

(56)参考文献

国際公開第2015/095527 (WO, A1)
米国特許出願公開第2011/0059475 (US, A1)
特表2017-503488 (JP, A)
国際公開第2016/118086 (WO, A1)
特表2007-526761 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G 01 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 5 / 0 9
C 1 2 Q 1 / 0 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)