(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6502940号
(P6502940)

(45)発行日　平成31年4月17日(2019.4.17)　(24)登録日　平成31年3月29日(2019.3.29)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12N 5/09	(2010.01)	C12N	5/09	
C12N 5/078	(2010.01)	C12N	5/078	
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	101
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	M

請求項の数 29　(全 15 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-534877 (P2016-534877)
(86)(22)出願日　平成26年8月15日 (2014.8.15)
(65)公表番号　特表2016-527907 (P2016-527907A)
(43)公表日　平成28年9月15日 (2016.9.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/051343
(87)国際公開番号　WO2015/023982
(87)国際公開日　平成27年2月19日 (2015.2.19)
審査請求日　平成29年7月25日 (2017.7.25)
(31)優先権主張番号　61/866,972
(32)優先日　平成25年8月16日 (2013.8.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞への物質の選択的送達

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞の物理的特性に基づいて細胞に化合物を優先的に送達するための方法であって、
第1の細胞群および第2の細胞群を含む細胞懸濁液を提供する段階であって、該第1の細胞群が、該第2の細胞群とは相対的に異なるサイズ、直径、および／または膜の剛性を有する、段階;
該第1の細胞群に化合物を優先的に送達する大きさに作られている狭窄部を含むマイクロ流体チャネルに、該細胞懸濁液を通過させる段階であって、該狭窄部の通過が、化合物がマイクロ流体チャネルを通過する細胞懸濁液中の第2の細胞群と比較して優先的に変形された細胞に送達されるように該第1の細胞群を優先的に変形させる、段階;および
該細胞懸濁液を化合物と接触させる段階
を含み、それにより、該第1の細胞群に化合物を優先的に送達する、前記方法。
【請求項２】
前記第1の細胞群が、前記第2の細胞群と異なるサイズを有する、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
前記狭窄部が、前記化合物が優先的に送達される細胞懸濁液中の第1の細胞群のサイズより小さい直径を有する、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
前記狭窄部が、細胞懸濁液中のより小さい細胞群より小さい直径を有する、請求項2に

記載の方法。
【請求項５】
前記狭窄部が、細胞懸濁液中のより大きい細胞群より小さい直径を有する、請求項2に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞懸濁液が、該細胞懸濁液が狭窄部を含むマイクロ流体チャネルを通過する前に、化合物と接触される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記細胞懸濁液が、該細胞懸濁液が狭窄部を含むマイクロ流体チャネルを通過した後に、化合物と接触される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記細胞懸濁液が、末梢血細胞を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞懸濁液が、赤血球を除去した末梢血細胞集団を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１０】
前記第1の細胞群が循環腫瘍細胞を含み、かつ前記第2の細胞群が白血球を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１１】
前記化合物が、0.5kDa～5MDaの分子量を有する、請求項1に記載の方法。
【請求項１２】
前記化合物が、3kDa～10kDaの分子量を有する、請求項1に記載の方法。
【請求項１３】
前記化合物が、検出可能なマーカー、活性な生体分子、および毒素のうちの1つまたは複数を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１４】
前記化合物が、検出可能なマーカーを含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１５】
前記細胞懸濁液が全血を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞懸濁液が、腫瘍を含むリスクがある対象、または腫瘍を含むと診断された対象の全血を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項１７】
前記腫瘍が、黒色腫、結腸、前立腺、肺、膵臓、乳房、肝臓、脳、または血液の癌である、請求項16に記載の方法。
【請求項１８】
前記狭窄部が、幅4μm～10μm、長さ1μm～100μmの1～10個の連続した狭窄部を有する、請求項1に記載の方法。
【請求項１９】
前記狭窄部を通り抜ける細胞の速度が、10mm/s～10m/sの範囲に渡る、請求項1に記載の方法。
【請求項２０】
細胞懸濁液に圧力を加えて、細胞懸濁液を押し流してマイクロ流体チャネルの狭窄部を通過させる段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２１】
前記細胞懸濁液が化合物を含むか、または前記方法が、細胞懸濁液が狭窄部を通過した後に所定の時間の間、化合物を含有する溶液中で該細胞懸濁液をインキュベートする段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２２】
前記化合物が、色素、タンパク質、または核酸を含む、請求項21に記載の方法。
【請求項２３】

前記化合物が、磁性粒子、蛍光粒子、蛍光色素、蛍光タンパク質、蛍光タンパク質をコードする核酸、ルシフェラーゼ、または細胞死を誘導する化合物を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項２４】

検出可能なマーカーの取込みに基づき、細胞懸濁液中で細胞を選別し、それにより、第1の細胞群を単離する段階をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項２５】

検出可能なマーカーの取込みおよび抗体タグ付けに基づき、細胞懸濁液中で細胞を抗体でタグ付けし、細胞懸濁液中で細胞を選別し、それにより、第1の細胞群を単離する段階をさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項２６】

前記抗体が、第1の細胞群の標的に結合し、かつ前記細胞が、検出可能なマーカータグの存在および抗体タグの存在によって選別される、請求項25に記載の方法。

【請求項２７】

前記第1の細胞群が腫瘍細胞を含み、かつ前記抗体が腫瘍細胞選択的な抗体である、請求項26に記載の方法。

【請求項２８】

前記抗体が、第2の細胞群の標的に結合し、かつ前記細胞が、検出可能なマーカータグの存在および抗体タグの不在によって選別される、請求項25に記載の方法。

【請求項２９】

前記第2の細胞群が血液細胞を含み、かつ前記抗体が血液細胞選択的な抗体である、請求項28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に明確に組み入れられる、2013年8月16日に出願された米国特許仮出願第61/866,972号の優先権を主張する。

【０００２】

政府の支援

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与されたR01GM101420-01A1、米国国立衛生研究所によって授与されたRC1 EB011187-02、米国国立癌研究所によって授与されたP30-CA-14051のもとで、政府の支援を受けてなされ、GRFP第1次助成金番号は、米国国立科学財団によって授与された1122374番である。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【０００３】

技術分野

本発明の分野は、細胞への物質のサイズ選択的な送達に関する。

【背景技術】

【０００４】

背景

物質の細胞内送達は、難題である。ナノ粒子、電界、細孔形成化学物質などに依拠する既存技術は、特定の細胞型に一部の物質を送達することができるが、標的細胞の物理的特性に関して無差別的な様式であることが多い。標的細胞の物理的特性に依存する選択的な送達方法を開発することによって、研究用途、診断的用途、または治療的用途のために送達活動をよりロバストに管理できるようになるであろう。例えば、循環腫瘍細胞(CTC)は、血流中に存在する腫瘍細胞であり、体内の遠位部位への癌の転移または拡散をもたらすと考えられている。癌によるヒトの死亡の約90％は、転移が原因である。CTCの同定および特性決定が、転移癌を理解し、治療し、または予防するための鍵であり得る。さらに、これらの細胞は、周囲の血液細胞と比べて異なる物理的特性を有することが公知である。

【発明の概要】
【０００５】
概要
本発明の主題は、細胞の物理的特性、例えば、サイズ、体積、直径、細胞質ゾルの粘度、または膜の剛性に基づいて、1つまたは複数の細胞に物質を選択的に送達するための装置、システム、および方法を提供する。例えば、物質を、細胞サイズ依存的な様式で送達することができる。サイズの異なる細胞を含有する細胞懸濁液を、標的送達物質(例えば、色素、タンパク質、核酸など)の存在下で装置に通過させることができ、これらの物質を、集団内の大型細胞に選択的に送達することができる。資料に示す送達メカニズムは、大型細胞の細胞膜の選択的破壊によるものであり、大型細胞は、チャネルの狭窄部で変形するのに対し、小型細胞は、膜破壊を起こすほどには変形しない。
【０００６】
いくつかの実施形態例において、非腫瘍細胞と比べて腫瘍細胞を標識することを実現することができる。細胞は、蛍光色素または他の検出可能マーカーを用いるサイズ選択的なタグ付けのための装置を通過させられる。癌細胞と血液細胞(大半の血液細胞はCD45+である)の対比をさらに目立たせるために、細胞は、任意で、抗体、例えば腫瘍細胞選択的抗体、例えばCD45に対する抗体で染色される。試料は、セルソーター、例えば標準的な蛍光活性化セルソーター(FACS)を通過させられる。
【０００７】
集団内の、分裂が間近である細胞は、分裂を経たばかりの細胞よりも大きいため、いくつかの実施形態例において、細胞周期に基づく細胞標識を実現することができる。集団内の大型細胞への色素の送達を利用して、細胞周期の後期である個々の細胞を同定することができる。
【０００８】
リンパ腫細胞は、多くの場合、周囲の血液細胞より大きく、したがって、細胞内毒素を健常な周囲の血液細胞には送達せずにリンパ腫細胞に送達することができるため、いくつかの実施形態例において、血液の癌(例えばリンパ腫)に対する治療法を実現することができる。これにより、罹患細胞の選択的死滅を誘導することができる。
【０００９】
タグ付けされた細胞は、蛍光精製技術または磁気精製技術によって単離することができる。ロボットマニピュレーターを用いるフローサイトメトリーまたはマイクロアレイを使用して、蛍光に基づいて細胞を選択することができ、一方、磁気カラム、マイクロ流体磁気分離システム、またはマグネチックスイーパー(magnetic sweeper)を使用して、磁気的にタグ付けされた粒子を単離することができる。
【００１０】
細胞は、相対的なサイズまたは直径に基づいて同定することができる。したがって、比較的大型の細胞は、選択的または優先的にマーカーを取り込む。これは、大型細胞における細胞膜破壊の程度が比較的大きいため、すなわち、大型細胞の方が、小型細胞と比べて変形の程度が大きいことに起因する。大型細胞の膜破壊の程度が大きいことが原因で、小型細胞と比べて少なくとも10%、25%、50%、2倍、5倍、10倍、100倍、またはそれ以上のペイロード分子が、大型細胞の内部(細胞質)に到達する。この様式での検出可能マーカーの取込み、およびそれに続く、マーカー取込みに基づく選別の結果として、腫瘍細胞の純度は、末梢血中での純度レベルと比べて100倍、1,000倍、および最高で10,000倍またはそれ以上に上昇する。純度は、腫瘍細胞によって発現/過剰発現される公知のマーカーを標的とする抗体/該マーカーに結合する抗体を用いて評価される。あるいは、腫瘍細胞によっては発現されないが、血液細胞によって発現/過剰発現されるマーカー(CD45が一例である)に対する抗体。いずれのアプローチも、関心対象の細胞を選別するための対比を大きくするのを助ける。
【００１１】
サイズタグの蛍光が強く、CD45蛍光が弱い試料が、候補/潜在的CTCとして捕捉される。

FACSの結果は、本質的に相対的である。「強い」シグナルは、ベースラインの対照シグナルを最低でも10倍上回る(10倍高いレベルの)蛍光強度であり、「弱い」シグナルは、陽性対照集団の10分の1の低さである。

【００１２】

本発明の装置および方法は、患者に由来する血液試料中の白血球100万～1000万個当たり約1個またはそれ以上(2個、5個、10個、100個、1,000個、もしくはそれ以上)のCTCをどのように同定および/または単離するかという長年にわたる問題に対する解決法を提供する。例えば、血液1ml当たり1個のCTCは、癌患者において臨床的に意味を有する。したがって、循環腫瘍細胞を単離または同定するための方法は、細胞懸濁液を提供する段階;白血球と比べて循環腫瘍細胞を優先的に変形する大きさに作られている狭窄部を含むマイクロ流体チャネルに、該溶液を通過させる段階;狭窄部に該細胞懸濁液を通過させる段階;および該細胞懸濁溶液を検出可能マーカーと接触させる段階、を含む。懸濁液は、別の細胞群とは相対的に異なる物理的特性を有するある細胞群に化合物を優先的に送達する大きさに作られている狭窄部を含むマイクロ流体チャネルに通過させることができる。物理的特性には、細胞のサイズ、直径、細胞質ゾルの粘度、および/または膜の剛性(例えば、通過時間アッセイ法によって測定され、硬い細胞ほど、それほど硬くない細胞よりもゆっくりと、特殊なマイクロチャネルを通過する。例えば、Sharei et al., 2012, Anal. Chem. 84(15):6438-6443; Cross et al., 2007, Nature Nanotechnology 2:780-783において説明されている)が含まれ得る。前記接触は、変形処理の後に起こってよい。または、物質は、変形処理の前に細胞と予め混合されてもよい。CTCおよび白血球の両方ともが、変形する;しかし、大型細胞ほど、変形の程度が大きく、したがって、分子はそのような細胞に選択的に送達され、それによって、それらを治療またはタグ付けする。

【００１３】

例えば、マーカーは、検出可能に標識された、例えば、蛍光でまたは磁気で標識された物質、例えば、色素または粒子を含む。それらの色素または粒子は、腫瘍特異的である必要はない。任意で、それらは、腫瘍細胞に差別的に(例えば、非腫瘍細胞と比べて、少なくとも20%、50%、2倍、5倍、またはそれ以上)結合する。しかし、前記方法の特異性は、腫瘍細胞が白血球より若干大きいという発見に基づいており、装置は、サイズ選択性が高い。このサイズの差は、腫瘍のタイプに依存する。例えば、一般に、腫瘍細胞は、白血球より50%～400%大きい。したがって、送達物質は、細胞のサイズ特異的変形によってタグ付けされるのに十分なほど大きい細胞中に優先的に侵入する。その後、送達されたタグを次に検出して、CTCを同定する。

【００１４】

1つの例において、懸濁液は全血を含む。あるいは、細胞懸濁液は、血液以外の生理的食塩水中の細胞混合物である。典型的には、細胞懸濁液は、腫瘍を含むリスクがある対象、または腫瘍を含むと診断された対象の全血を含む。例えば、患者は、黒色腫、結腸、前立腺、乳房、肝臓、肺、膵臓、脳、または血液の転移性疾患に罹患していると推測されるか、罹患していると診断されたか、または罹患していると推測もしくは診断されている。CTCは、患者が転移性疾患を発症する前に存在する場合がある。したがって、CTCの早期検出は、そのような検出が、進行して転移性疾患を発症する可能性が高い患者の早期特定に相当するため、臨床的に重要である。

【００１５】

任意で、赤血球溶解が、細胞を装置に流して通過させる前の前処理段階として実施される。

【００１６】

装置は、非腫瘍細胞、例えば正常な赤血球または白血球から腫瘍細胞を区別する物理的パラメーターを特徴とする。例えば、狭窄部は、幅4μm～10μm、長さ1μm～100μmの1～10個の連続した狭窄部を含む。細胞の推定速度は、10mm/s～10m/sの範囲に渡り得る。細胞懸濁液を押し進めるかまたは前進させて装置を通過させるために、前記方法は、細胞に圧力を加える段階をさらに含む。圧力は、細胞懸濁液を押し流して装置を通過させるのに

使用され、狭窄箇所の通過が、細胞を変形させ、膜破壊、その結果、送達をもたらす。

【００１７】

前記方法は、検出可能な化合物を腫瘍細胞中に導入する段階を含む。したがって、細胞懸濁液がペイロードを含むか、または前記方法が、該細胞懸濁液が狭窄部を通過した後に所定の時間の間、ペイロードを含有する溶液中で該細胞懸濁液をインキュベートする段階をさらに含む。例えば、ペイロードは、磁性粒子、例えばナノ粒子、蛍光粒子、例えば、量子ドットもしくはカーボンナノチューブ、または蛍光色素もしくは蛍光タンパク質、あるいは蛍光タンパク質または検出を可能にする他の化合物(例えばルシフェラーゼ)をコードする遺伝物質(DNAまたはRNA)を含む。あるいは、前述の物質の組み合わせを送達して、細胞の検出および同時操作を可能にすることもできる。例えば、選別を可能にするための蛍光粒子を送達し、かつその後の腫瘍細胞の生存を助け、選別後のその成長および増殖を促進するためのDNA、RNA、またはタンパク質を同時送達して、培養された転移性細胞のさらなる研究を可能にすることができる。

【００１８】

また、管腔を画定し、かつ緩衝液中に懸濁された腫瘍細胞がそれを通過でき、非腫瘍細胞と比べて圧縮されるように構成されているマイクロ流体チャネルを含む、腫瘍細胞を非腫瘍細胞から区別するためのマイクロ流体システムも、本発明の範囲内である。非腫瘍細胞は、ある程度変形し得る;しかし、鍵となるのは、腫瘍細胞が十分に変形して細胞膜破壊を起こすのに対し、非腫瘍細胞は、サイズが比較的小さいため、膜破壊をもたらすほどには変形しない、ということである。小型細胞の膜は、破壊されないか、または大型細胞よりも破壊の程度が低く、例えば、場合によっては、小型細胞および大型細胞の両方が破壊されるが、小型細胞の方が大型細胞よりも、少ない量の物質を受け取る。マイクロ流体チャネルは、細胞を変形させる狭窄部を含み、この狭窄部の直径は、細胞の直径の関数である。狭窄部は、非腫瘍細胞と比べて腫瘍細胞を優先的に変形する大きさに作られる。この優先的変形は、非腫瘍細胞に対して腫瘍細胞への標的物質の送達を選択的に促進することを目的としている。選択的送達により、フローサイトメトリー(FACS)、顕微操作、磁気分離、細胞培養などの選別/濃縮方法によって所望の腫瘍集団を濃縮することが可能になる。

【００１９】

前記方法は、生理学的温度、例えば37℃、室温、例えば20℃、あるいは0～4℃で実施される。後者の場合、膜修復が遅れることが原因で、より優れた送達性能を得ることができ、細胞のエンドサイトーシス活性を低下させることによってエンドサイトーシスに起因するバックグラウンドを最小限にできるため、いくつかの場合において、後者が好ましい。前述したように、細胞懸濁液は、全血、またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)のような生理的緩衝液もしくは送達緩衝液としての組織培養培地中の任意の哺乳動物細胞懸濁液である。いくつかの例において、組織培養培地中のCaまたはMgが原因で効果が低くなるため、PBSが好ましい。

【００２０】

ある局面において、細胞の物理的特性に基づいた細胞の単離または同定は、細胞懸濁液を提供する段階;狭窄部を含むマイクロ流体チャネルに、該懸濁液を通過させる段階;狭窄部に該細胞懸濁液を通過させる段階;および該細胞懸濁溶液を化合物と接触させる段階、を含み得る。狭窄部は、比較的小型の細胞と比べて比較的大型の細胞を優先的に変形する大きさに作られてよい。

【００２１】

別の局面において、腫瘍細胞を非腫瘍細胞から区別するためのマイクロ流体システムは、管腔を画定し、かつ緩衝液中に懸濁された腫瘍細胞がそれを通過でき、非腫瘍細胞と比べて圧縮されるように構成されているマイクロ流体チャネルを含み得る。マイクロ流体チャネルは、細胞を変形させる狭窄部を含み得る。狭窄部の直径は、細胞の直径の関数であり得る。

【００２２】

以下の特徴の内の1つまたは複数が含まれてよい。例えば、物理的特性は、サイズおよび直径の内の1つまたは複数であってよい。細胞懸濁液は、末梢血細胞;および異なる物理的特性を有する少なくとも2種の異なる細胞型、の内の1つまたは複数を含んでよい。細胞懸濁液は、赤血球を除去した末梢血細胞集団を含んでよい。大型細胞は循環腫瘍細胞を含んでよく、小型細胞は白血球を含んでよい。化合物は、0.5kDa～5MDaの分子量を含んでよい。化合物は、3kDa～10kDaの分子量を含んでよい。化合物には、検出可能なマーカー(例えば、量子ドット、シアニン、フルオレセイン、ローダミン、およびそれらの誘導体、例えば、フルオレセインイソチオシアナート(FITC)またはテトラメチルローダミンイソチオシアナート(TRITC)もしくはNHS-ローダミン、フルオレセイン-5-マレイミドのようなマレイミド活性化蛍光体、ならびにAlexaFluor)、活性な生体分子、ならびに/または毒素(例えば、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、およびリシン、カスパーゼタンパク質、標的細胞を選択的に死滅させるための、きわめて重要な細胞機能を妨げる抗体(例えば、チューブリンに対する抗体))が、含まれ得る。化合物は、細胞機能に影響を及ぼすことができ(例えば、転写因子、siRNA、DNA、mRNA、抗体、低分子薬物)、かつ/または細胞死を誘導することができる。化合物は、細胞が狭窄部を通過した後に、細胞に侵入することができる。懸濁液は全血を含み得る。懸濁液は、腫瘍を含むリスクがある対象、または腫瘍を含むと診断された対象の全血を含み得る。腫瘍には、黒色腫、結腸、前立腺、肺、膵臓、乳房、肝臓、脳、または血液の癌が含まれ得る。狭窄部は、幅4μm～10μm、長さ1μm～100μmの1～10個の連続した狭窄部を含み得る。狭窄部を通り抜ける細胞の速度は、10mm/s～10m/sの範囲に渡り得る。細胞懸濁液に圧力を加えて、細胞を押し流してマイクロ流体チャネルの狭窄部を通過させることができる。

【００２３】

細胞懸濁液がペイロードを含んでもよく、または細胞懸濁液が、狭窄部を通過した後に所定の時間の間、ペイロードを含有する溶液中でインキュベートされてもよい。ペイロードは、磁性粒子、蛍光粒子、例えば、量子ドットもしくはカーボンナノチューブ、または蛍光色素もしくは蛍光タンパク質、あるいは蛍光タンパク質または検出を可能にする他の化合物(例えばルシフェラーゼ)をコードする遺伝物質(DNAまたはRNA)を含み得る。狭窄部は、非腫瘍細胞よりも腫瘍細胞を優先的に変形する大きさに作られてよい。

【００２４】

[本発明1001]

以下の段階を含む、細胞の物理的特性に基づいて細胞を単離、同定、または操作するための方法:

細胞懸濁液を提供する段階;

別の細胞群とは相対的に異なる物理的特性を有するある細胞群に化合物を優先的に送達する大きさに作られている狭窄部を含むマイクロ流体チャネルに、該懸濁液を通過させる段階;

該狭窄部に該細胞懸濁液を通過させる段階;および

該細胞懸濁溶液を化合物と接触させる段階。

[本発明1002]

物理的特性が、サイズ、直径、および膜の剛性の内の1つまたは複数である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

細胞懸濁液が、末梢血細胞;および異なる物理的特性を有する少なくとも2種の異なる細胞型、の内の1つまたは複数を含む、本発明1001の方法。

[本発明1004]

細胞懸濁液が、赤血球を除去した末梢血細胞集団を含む、本発明1001の方法。

[本発明1005]

大型細胞が循環腫瘍細胞を含み、小型細胞が白血球を含む、本発明1001の方法。

[本発明1006]

化合物が、0.5kDa～5MDaの分子量を含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]
化合物が、3kDa～10kDaの分子量を含む、本発明1001の方法。
[本発明1008]
化合物が、検出可能なマーカー、活性な生体分子、および毒素の内の1つまたは複数を含む、本発明1001の方法。
[本発明1009]
前記細胞が狭窄部を通過した後に、検出可能なマーカーが該細胞に侵入する、本発明1001の方法。
[本発明1010]
懸濁液が全血を含む、本発明1001の方法。
[本発明1011]
懸濁液が、腫瘍を含むリスクがある対象、または腫瘍を含むと診断された対象の全血を含む、本発明1001の方法。
[本発明1012]
前記腫瘍が、黒色腫、結腸、前立腺、肺、膵臓、乳房、肝臓、脳、または血液の癌を含む、本発明1010の方法。
[本発明1013]
狭窄部が、幅4μm～10μm、長さ1μm～100μmの1～10個の連続した狭窄部を含む、本発明1001の方法。
[本発明1014]
狭窄部を通り抜ける細胞の速度が、10mm/s～10m/sの範囲に渡る、本発明1001の方法。
[本発明1015]
細胞懸濁液に圧力を加えて、細胞を押し流してマイクロ流体チャネルの狭窄部を通過させる段階をさらに含む、本発明1001の方法。
[本発明1016]
細胞懸濁液がペイロードを含むか、または方法が、該細胞懸濁液が狭窄部を通過した後に所定の時間の間、ペイロードを含有する溶液中で該細胞懸濁液をインキュベートする段階をさらに含む、本発明1001の方法。
[本発明1017]
ペイロードが、磁性粒子;蛍光粒子、例えば、量子ドットまたはカーボンナノチューブ;蛍光色素;蛍光タンパク質;蛍光タンパク質、検出を可能にする他の化合物(例えばルシフェラーゼ)をコードする遺伝物質(DNAまたはRNA);細胞機能に影響を及ぼす化合物;および細胞死を誘導する化合物、の内の1つまたは複数を含む、本発明1016の方法。
[本発明1018]
管腔を画定し、かつ緩衝液中に懸濁された腫瘍細胞がそれを通過でき、非腫瘍細胞と比べて圧縮されるように構成されているマイクロ流体チャネルであって、該マイクロ流体チャネルが、細胞を変形させる狭窄部を含み、該狭窄部の直径が、細胞の直径の関数である、マイクロ流体チャネル
を含む、腫瘍細胞を非腫瘍細胞から区別するためのマイクロ流体システム。
[本発明1019]
狭窄部が、非腫瘍細胞よりも腫瘍細胞を優先的に変形する大きさに作られている、本発明1018のシステム。

本発明それ自体と共に、本発明のこれらおよび他の能力は、以下の図面、詳細な説明、および特許請求の範囲を再検討した後に、より十分に理解されると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】急速な機械的変形によってCTCをサイズ選択的にタグ付けするためのシステムの図である。

【図２】マイクロ流体プラットホームのサイズ選択的送達とCD45に対する抗体染色とを組み合わせることにより、どちらか一方の技術を独立して用いるよりも、1桁以上優れた試

料濃縮倍率が得られることを示す棒グラフである。
【図３Ａ】細胞標識の模式図である。eBioscience RBC溶解緩衝液(カタログ番号00-4333)のような標準的な赤血球溶解試薬を用いるRBC溶解により、全血から赤血球細胞(RBC)を除去した。得られた懸濁液を、蛍光色素(および任意で他の化合物)と共にインキュベートされる圧縮チャネルマイクロフルイディクス装置に流して通過させた。次いで、懸濁液をCD45について標識し、蛍光活性化セルソーター(FACS)の機械で処理して、蛍光色素で標識されたCD45+ではない細胞を採取した。
【図３Ｂ】CellSqueeze装置によってPBMC(30-6チップ、50psi)、HT-29(30-6チップ、50psi)、SK-MEL-5(10-7チップ、50psi)、およびPANC-1(10-7チップ、50psi)に送達されたカスケードブルー結合型3kDaデキストランの一連のフローサイトメトリープロットである。
【図３Ｃ】圧縮チャネルを通過する前および後のPanc-1腫瘍細胞および血液細胞の一連の透過光顕微鏡写真および蛍光顕微鏡写真である。送達前の細胞を色素の存在下でインキュベートして、バックグラウンドのエンドサイトーシスに対する補正を施す。送達後の画像は、色素の保持および送達後に細胞が接着し成長する能力を実証するために、送達の24時間後に撮影した。大型の血液細胞もこのプロセスで標識される場合があるものの、これらの資料は、腫瘍細胞の選択的標識を実証している。
【図４】PBMCとリンパ腫の混合物におけるPBMCのパーセントに対してPBMC送達をプロットしたものであり、健常なPBMCと比べたリンパ腫細胞への色素の選択的送達を示している。懸濁液が、個数で99.9%が健常なPBMCである場合でさえ、いくつかの実施形態において、最高で8倍の送達特異性を実現することができる。他の実施形態において、より高い特異性を実現することができる。
【図５Ａ】全血中に添加され(40細胞/ml)、CD45対比染色(APC)で処理された、テトラメチルローダミンデキストラン標識Panc-1-GFP細胞のFACSプロットである。
【図５Ｂ】GFP対CD45のFACSプロットであり、GFP蛍光に基づいてPANC-1 GFPタグ付けを独立に確認できる方法を実証している。P5ゲートは、候補CTCを選別するための根拠として使用されると思われ、P4は、PANC-1GFP細胞のアイデンティティを確認するのに使用される。緑色の点は、正確な的中(hit)(P4およびP5)であり、赤色の点は偽陽性であり(P5のみ)、青色の点ははずれ(miss)(P4のみ)である。
【図５Ｃ】膵管腺癌を裏付ける、HTB1760の原発腫瘍の組織病理の写真である。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
詳細な説明
CTCは、血流中に存在する腫瘍細胞であり、遠位器官への癌の播種転移(dissemination)に関与していると考えられている。CTCは、癌患者にとって最小限に侵襲的な「液体生検材料」とみなされており、患者の転帰および治療有効性に関する予測指標として有用である。これらの単細胞を総合的に特性決定することにより、転移性播種、治療耐性、および腫瘍生物学がより良く理解される。
【００２７】
典型的なヒト赤血球は、約6.2～8.2μmの円盤径を有し、最も厚い箇所の厚さは2～2.5μmであり、中央の最も薄い部分の厚さは0.8～1μmであり、ほとんどの他のヒト細胞よりもはるかに小さい。白血球(白血球細胞)には、好中球(直径12～14μm)、好酸球(直径12～17μm)、好塩基球(直径14～16μm)、リンパ球(静止期の場合、直径は平均6～9μm、活性化型の場合、直径10～14μm)、および単球、すなわち、直径が最大で20μmであり得る最も大きなタイプの白血球細胞が含まれる。図1に示したように、通常、CTCと血液細胞のサイズに差があることによって、循環血液中の他の細胞からCTCを区別することが可能になる(CTCは約9～20μm;RBCは約8μmの円盤形;白血球は約7～12μm)。図1を参照されたい。続いて、抗体(もしくはその細胞特異的断片)または他の腫瘍細胞特異的リガンドを用いて腫瘍細胞を特異的に標識することにより、前記方法の選択性が高まる。
【００２８】
CTCは、血流中の単核細胞10^6～10^7個の中の1つとして存在するため、CTCと血液細胞の

免疫学的差異または形態学的差異に依拠する高感度の濃縮技術が使用される。多くの場合、免疫学的アプローチは、上皮細胞表面マーカー(例えばEpCAM)および腫瘍特異的タンパク質(例えば、Her2-neu、MUC I/MUC2、癌胎児性抗原(CEA)、マンマグロブリン(mammaglobulin)、およびαフェトプロテインなど)を標的とするか、またはCD45+細胞を除去することを目指す。マイクロフィルター、密度勾配分離、およびマイクロフルイディクスプラットホームは、形態学に基づく方法の例である。これらのアプローチはみな、固有の偏りを有し、低い濃縮効率を欠点としてもち、かつ相当数のCTCは、表面抗原を下方制御し得るか、または変動する形態学的特徴を提示し得る。CTCのどの部分集団が転移に関与しているか、または信頼性が高い予後マーカーであるかは依然としてほとんど不明であるため、これらの偏りは、当分野の大きな課題の原因となる。したがって、臨床的意義が最も大きい候補をスクリーニングするために、すべての候補CTCサブタイプの高感度単離を確実にすることができる技術を開発することが重要である。本明細書において説明する装置および方法は、関心対象のCTCサブタイプの単離および計数を可能にする。

【００２９】

組み合わせられた濃縮方法では、免疫学に基づくアプローチと形態学に基づくアプローチの両方を統合して、少ない偏りで、かつ調整可能なパラメーターに基づいて、純粋なCTCをタグ付けし単離する。この方法は、マイクロ流体細胞内送達(図1)および抗体染色を組み合わせて、全血からの循環腫瘍細胞のロバストな高感度の精製をもたらし(図2)、幅4μ～10μm、長さ1μm～100μmの1～10個の連続した狭窄部を含む。細胞の推定速度は、10mm/s～10m/sの範囲に渡り得る。選択される個々の装置パラメーターは、標的腫瘍細胞のタイプに基づいて決定され、例えば、黒色腫患者と結腸癌患者とでは、異なる装置設計が、CTCを選択するのに使用される。腫瘍細胞のサイズ/直径の例には、黒色腫の約15um、結腸癌の約11um、および膵臓癌の約15umが含まれる。

【００３０】

このアプローチでは、急速な機械的変形送達システムが、多くのCTCと周囲の血液細胞の間にもともと存在するサイズの差を利用して、蛍光物質、磁性物質、および/または他の識別物質を腫瘍細胞に選択的に送達する。さらに別の処理において、抗体に基づく蛍光タグ付けおよび/または磁性タグ付けを用いて、候補CTCと周囲の血液細胞の対比を大きくする。CTC単離に対するサイズに基づくアプローチおよび免疫学的アプローチを独自に組み合わせることによって、この技術は、解析用の患者試料から候補腫瘍細胞を偏りなく単離するのに有用であることを実証した。いくつかの実施形態において、小型細胞および大型細胞の両方が変形するが、小型細胞の膜は、膜が傷つられる程度までは変形しない。例えば、大半の健常な白血球細胞の大きさが約8μmである全血中で15μmの腫瘍細胞に選択的に送達するためには、6umの幅の狭窄部が使用され得る。このような狭窄部は、両方の細胞型を変形すると思われるが、8μmの血液細胞ではなく15μmの腫瘍細胞の膜を極めて優先的に破壊するはずである。

【００３１】

臨床的/トランスレーショナルな意義

CTCは、耐性のメカニズムを理解し、かつ標的を定めた治療法の選択を導くための腫瘍生検材料の代用物として調査されている。処理前および処理後のCTCの数および組成の測定値から、治療の有効性および予後が示唆される。このアプローチは、細胞のサイズおよび表面抗原に基づいてCTCをタグ付けするためのロバストでハイスループットな使い捨て装置を使用する。さらに、多様な高分子を送達できることにより、細胞内環境に応答する分子プローブ(例えば、抗体、量子ドット、カーボンナノチューブ、および分子ビーコン)を送達し、それによって、標的細胞の細胞内特性に関するさらなる情報を提供することも可能になる。この組み合わせアプローチは、免疫学的分離のみまたは形態学的分離のみに依拠する代替方法では取り損なわれたであろうCTC集団を濃縮できるロバストなプラットホームを提供する。この技術は、患者のCTCを単離するのに有用である。

【実施例】

【００３２】

実施例1

全血または他の細胞懸濁液を、未標識磁性ビーズおよび/または抗体でコーティングした磁性ビーズの両方を用いて処理する。次いで、希少細胞のための正確性の高い磁気濃縮システムを用いて、これらの細胞を単離する。また、ナノウェル技術を用いて、ナノリットル未満の(subnanoliter)ウェル84,672個のエラストマーアレイから関心対象の単細胞を画像化しロボット制御で回収することによって、高純度の単離を実現することもできる。

【００３３】

様々な表現型の単独の、生きている、純粋で、完全なCTCを得ることにより、臨床的およびトランスレーショナルな意義に直接関係するゲノムレベルから機能レベルまでの多数の特性決定の取組みが可能になる。これらの方法により、少ない偏りで、生きている種々のCTCを高感度かつ特異的に濃縮することが可能になる。

【００３４】

実施例2

磁性ナノ粒子を腫瘍細胞株およびPBMCに送達する。EpCAMを発現する上皮癌細胞株、例えば、HT-29、LNCaP、およびSK-BR-3へのナノ粒子送達を、ヒト血液に由来する大量の末梢血単核細胞(PBMC)懸濁液と比較する。

【００３５】

ポリエチレングリコール(PEG)で表面をコーティングした10nmの酸化鉄ナノ粒子を、全血と混合した癌細胞に送達し、結果として生じるタグ付けされた細胞の混合物を、前述の細胞分離システムを用いて処理する。例えば、マイクロ流体送達システムを用いて細胞の急速な機械的変形を誘発して、細胞膜に一時的な細孔を生じさせた(図1)。このアプローチは、タンパク質、RNA、DNA、およびナノ粒子を含む種々の物質を様々な細胞型に送達できる能力を実証しており、全血、すなわち、マイクロ流体システムにとって問題を引き起こすことが多い媒体でもうまくいく。

【００３６】

例示的なタグ化分子、例えば、モデル分子としての蛍光標識された3kDaおよび70kDaのデキストランポリマーを用いて、サイズのみに基づいてPBMCと2種の異なる癌細胞株とを区別した。これらの結果からも、血液中の腫瘍細胞に磁性粒子を選択的に送達するためのシステムの有用性が示されている。PEGでコーティングした酸化鉄粒子を用いて、結腸癌(例えば、細胞株HT-29が良い例である)を磁気的にタグ付けする。ナノ粒子取込みを直接的に測定するために酸化鉄ナノ粒子表面にFITCを結合させることによって、さらなる濃縮を達成する。

【００３７】

PEGでコーティングした10nm酸化鉄ナノ粒子を、CTCを含むと推測されるか、またはCTCを含むと分かっている細胞懸濁液、例えば患者に由来する血液試料、または全血と別個に混合された細胞株HT-29細胞、LNCaP細胞、およびSK-BR-3細胞に送達する。次いで、例えば、正確性の高い磁気分離器を用いて、得られたタグ付きの細胞の混合物を精製する。分離器は、酸化鉄含有量の多いモデルCTCとそれほど効果的に標識されなかったPBMCとを正確に区別する。任意で、処理前に赤血球細胞を溶解するか、ナノ粒子濃度を上昇させるか、それらのサイズを変更するか、または複数の処理段階を組み入れる。

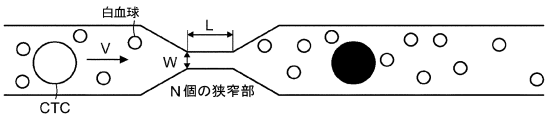
【００３８】

実施例3

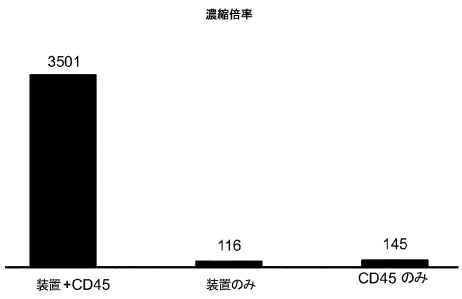
免疫学および形態学に基づく組み合わせられた方法を以下のように実施する。装置によって細胞サイズに基づく処理をした後、蛍光標識した抗CD45抗体のような抗体または他の腫瘍細胞特異的リガンドで細胞を処理する。次の3つの異なる分離アプローチの感度および特異性を比較した:1)装置のみ、2)抗CD45抗体のみ、3)装置+抗CD45抗体。形態学的タグ付け(装置)＋免疫学的タグ付け(例えば抗CD45抗体)は、個々の技術のいずれか一方と比べて優れた感度(および特異性)を示すことが判明した(図2)。例えば、抗CD45抗体のみの場合と比べて、感度の2～5倍の上昇および/または特異性の2～5倍の上昇が観察される。1桁以上の濃縮倍率が観察された(図2)。

【００３９】
実施例4
1つの例において、装置は、ケイ素およびガラスから作る。あるいは、シリコーン、PDMS、ポリカーボネート、アクリル樹脂、ポリプロピレン、ポリスチレンなどのポリマーを用いて装置を作る。いずれの装置も、滅菌済みであり(熱またはγ放射線)、使い捨てにできる。物質およびパラメーターを用いて、様々な細胞型に対する装置の性能を検証する。例えば、PEGでコーティングした量子ドット(10～50nmの範囲のサイズ)を用いる、ある流速範囲(100mm/s～10,000mm/s)における性能を用いて、ナノ粒子の送達効率および細胞の生死を判定する。例示的な装置は、参照により本明細書に組み入れられるPCT/US2012/060646に記載されている。
【００４０】
利点
既存のアプローチと比べた場合、この方法には以下の利点がある。抗体に基づく方法と比べて、このアプローチは、ほとんどの癌タイプに対して一般化でき、かついかなる特定の細胞表面マーカーにも依存しない、偏りのない単離手順を提供する。この装置および方法により、既存のマーカーによって単離できなかったCTCの同定が達成され、したがって、診断および予後に大きく関わる。
【００４１】
サイズに基づく既存の単離方法と比べて、本明細書において説明する装置および方法は、はるかに多い処理量を実現し、かつ特定のCTCサイズ範囲を捕捉するために「W」(図1)を変化させることによって調整可能である。例えば、幅6μmの狭窄部は、結腸癌細胞の捕捉に適しているのに対し、幅7μmおよび8μmは、それぞれ膵臓癌細胞および黒色腫細胞の捕捉に適している。さらに、既存の技術とは違って、このシステムは、抗体に基づく技術と組み合わさって、単離感度を高め、かつ/または(例えば、ある特定のサイズ＋表面マーカーのCTCを単離することによって)CTCの部分集団の多パラメーターの単離を可能にする。
【００４２】
一連の癌タイプに由来するCTCの効果的でロバストな単離を可能にすることにより、この技術は、癌との戦いにおいて価値あるプラットホームとなると思われる。この技術の予測能力および診断能力により、癌進行に不可欠である新しい遺伝子の同定が可能になり得、したがって、新規な治療薬の開発が可能になり得る。また、これにより、患者の平均余命および治療有効性のより正確な予測も実現し得る。
【００４３】
本明細書において説明するCTC単離方法は、免疫学的単離およびサイズに基づく単離を組み合わせて、高い濃縮倍率/回収率および調節可能な偏り(マーカー特異的対サイズ特異的)を得る。
【００４４】
いくつかの変形法を上記に詳細に説明したが、他の改変法も実行できる。例えば、前述の実施形態は、開示される特徴の様々な組み合わせおよびサブコンビネーションならびに/または上記に開示したいくつかの他の特徴の組み合わせおよびサブコンビネーションを対象としてよい。さらに、本明細書において説明する論理の流れは、所望の結果を実現するために、説明した特定の順序も順番も必要としない。他の態様は、添付の特許請求の範囲の範囲内であり得る。

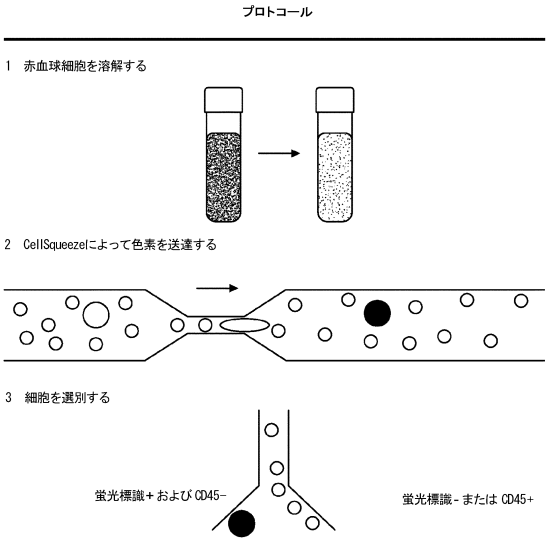
【図１】



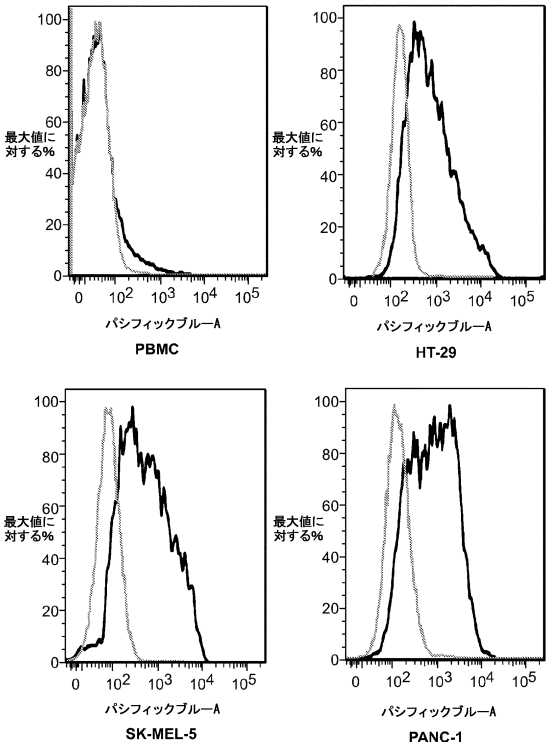
【図２】



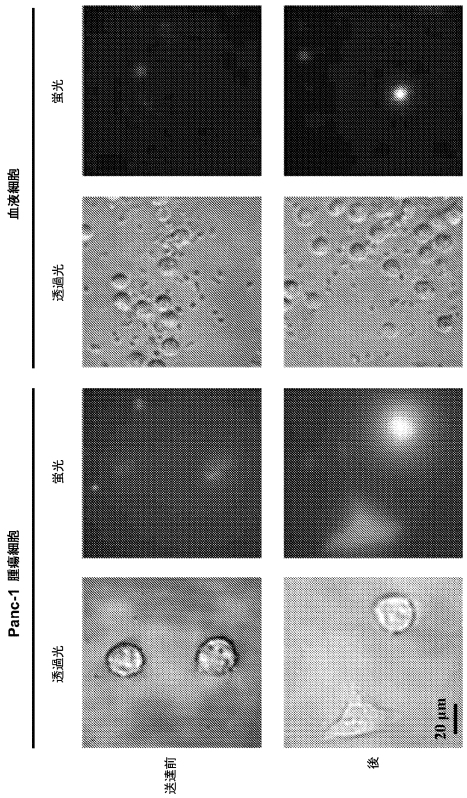
【図３Ａ】



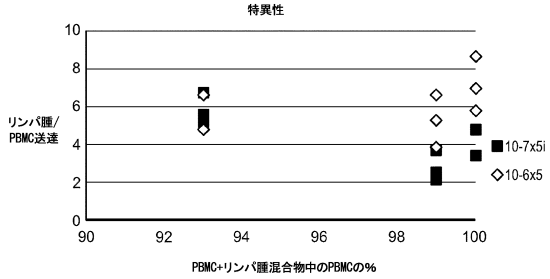
【図３Ｂ】



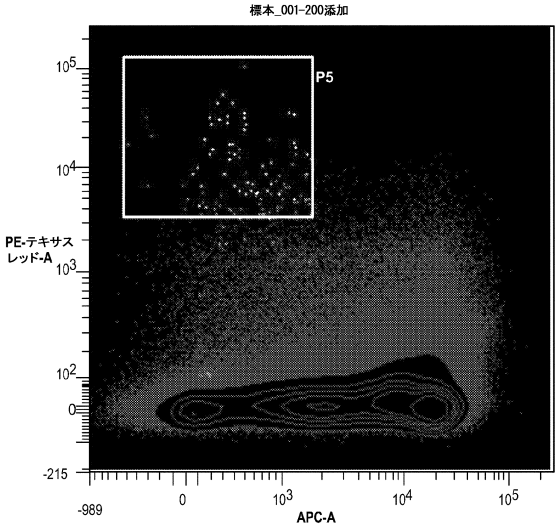
【図３Ｃ】



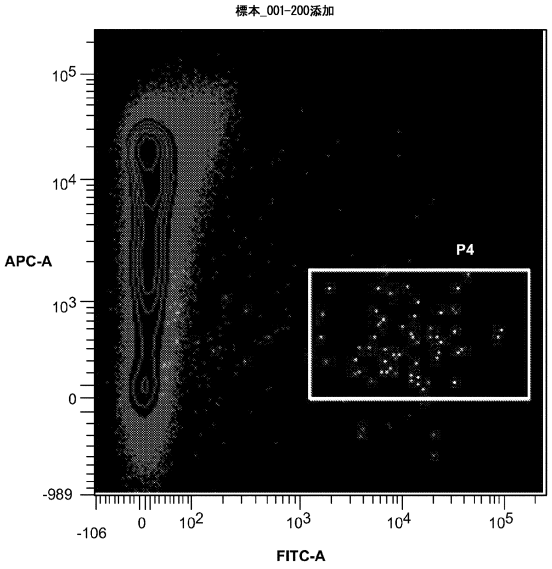
【図４】



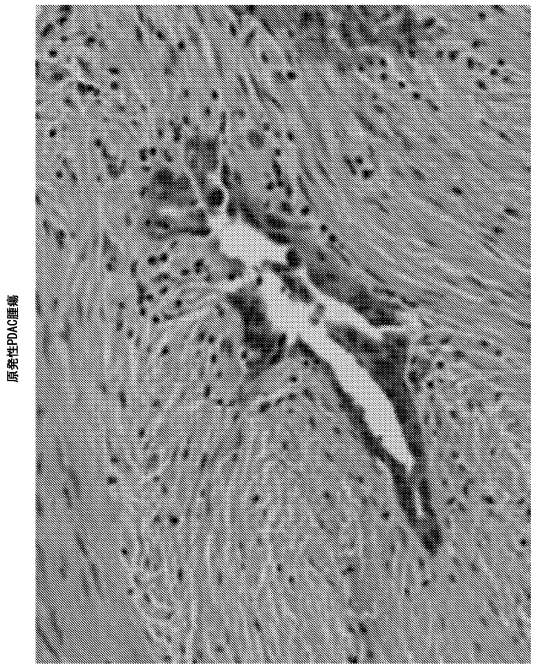
【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/49 A

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 シャレイ アーモン アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル ハイランド アベニュー ３３３
(72)発明者 アザルステインソン ビクトル エイ.
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ケネット スクエア ファーン ヒル ロード ２３
(72)発明者 チョ ナヒュン
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 クロスター カールソン コート ９３
(72)発明者 ランガー ロバート エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン モントベール ロード ９８
(72)発明者 ラブ ジェイ. クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル サマー ストリート ２２７ ユニット ２
(72)発明者 イェンセン クラヴス エフ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン アウトルック ドライブ １０３

審査官 布川 莉奈

(56)参考文献 国際公開第２０１３／０５９３４３（WO, A1）
特開２０１１－１６３８３０（JP, A）

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1／００－３／００
JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）