(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-502863
(P2005-502863A)
(43)公表日　平成17年1月27日(2005.1.27)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/574	G01N 33/574	D	2G045
C12Q 1/02	C12Q 1/02		4B063
G01N 33/49	G01N 33/49	A	
G01N 33/543	G01N 33/543	541A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 89 頁）

(21)出願番号　特願2003-523961(P2003-523961)
(86)(22)出願日　平成14年8月23日(2002.8.23)
(85)翻訳文提出日　平成16年2月23日(2004.2.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/026861
(87)国際公開番号　WO2003/019141
(87)国際公開日　平成15年3月6日(2003.3.6)
(31)優先権主張番号　60/314,151
(32)優先日　平成13年8月23日(2001.8.23)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/369,628
(32)優先日　平成14年4月3日(2002.4.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　399012963
イムニベスト・コーポレイション
ＩＭＭＵＮＩＶＥＳＴ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ
アメリカ合衆国１９８９９デラウェア州
ウィルミントン、ピー・オー・ボックス８９８５、ノース・マーケット・ストリート１１０５番、スウィート１３００
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106231
弁理士　矢野　正樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】循環腫瘍細胞、断片およびデブリスの分析

(57)【要約】
本発明で記載された方法および試薬は、循環腫瘍細胞、クラスター、断片およびデブリスを分析するのに用いられる。分析は、フローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）蛍光顕微鏡イメージングシステムを含めた多数のプラットフォームで行われる。損傷された細胞の分析は重要であることが示された。しかしながら、損傷の２つの源：イン・ビボおよびイン・ビトロがある。イン・ビボでの損傷はアポトーシス、壊死または免疫応答によって起こる。イン・ビトロでの損傷は、試料獲得、取扱、輸送、処理または分析の間に起こる。従って、イン・ビトロの損傷を制限し、低下させ、排除し、または少なくとも制限して、それが分析に干渉するのを妨げるのは望ましい。本明細書中には、ＣＴＣによって判断された悪性疾患を含めた循環する稀な細胞、クラスター、断片およびデブリスに基づいて病気を診断、モニター、およびスクリーニングする方法が開示される。また、これらの方法を用いて生物学的検体をアッセイするためのキットも提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷の稀な細胞を含有することが疑われる混合された細胞集団を含み、およびさらに
ｉ．稀な細胞に由来する細胞断片、または
ｉｉ．稀な細胞に由来する細胞デブリス；
を含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷の稀な細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングした磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料、該無傷の稀な細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された稀な細胞、および該標識された細胞断片または該標識された細胞デブリスを分析することを含み、該標識された稀な細胞、該標識された細胞断片、および該標識された細胞デブリスの存在は病気の存在を示す；
ことを特徴とするテスト対象において病気を診断する方法。
【請求項２】
該生物学的検体が血液である請求項１記載の方法。
【請求項３】
該生物学的検体を得た後に、それを、該生物学的検体を安定化することができる剤と接触させる請求項２記載の方法。
【請求項４】
該磁性粒子がコロイド状である請求項１記載の方法。
【請求項５】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷な稀な細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスが豊富化された、分離された磁気－標識化合物画分を生じさせる請求項１記載の方法。
【請求項６】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項１記載の方法。
【請求項７】
該分析が、形態学的分析およびエピトープ分析よりなる群から選択される少なくとも１つに基づく請求項１記載の方法。
【請求項８】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷な稀な細胞および稀な細胞のクラスターを含むことが疑われる混合された細胞集団を含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷な稀な細胞および稀な細胞の該クラスターと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングした磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料、該無傷の稀な細胞および稀な細胞の該クラスターを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された稀な細胞および稀な細胞の該標識されたクラスターを分析することを含み、該標識された稀な細胞および稀な細胞の該標識されたクラスターの存在は病気の存在を示す；
ことを特徴とする、テスト対象において病気を診断する方法。
【請求項９】
該生物学的検体が血液である請求項１５記載の方法。

【請求項１０】
該生物学的検体を得た後、それを、該生物学的検体を安定化することができる剤と接触させる請求項１６記載の方法。
【請求項１１】
該磁性粒子がコロイド状である請求項１５記載の方法。
【請求項１２】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷の稀な細胞および稀な細胞の該クラスターが豊富化された、分離された磁気－標識化合物画分を生じさせる請求項１５記載の方法。
【請求項１３】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項１５記載の方法。
【請求項１４】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷な悪性細胞を含むことが疑われる混合された細胞集団を含み、およびさらに
ｉ．悪性細胞に由来する細胞断片、または
ｉｉ．悪性細胞に由来する細胞デブリスを含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的検体は、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングされた磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された悪性細胞、および該標識された細胞断片、該標識された細胞デブリスを分析し、該標識された悪性細胞、該標識された細胞断片、および該標識された細胞デブリスの存在は、悪性疾患の存在を示す；
ことを特徴とするテスト対象において悪性疾患を診断する方法。
【請求項１５】
該生物学的検体が血液である請求項１４記載の方法。
【請求項１６】
該生物学的検体を得た後に、それを、該生物学的検体を安定化させることができる剤と接触させる請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
該磁性粒子がコロイド状である請求項１４記載の方法。
【請求項１８】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスが豊富化された、別々の磁気－標識画分を生じさせる請求項１４記載の方法。
【請求項１９】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項１４記載の方法。
【請求項２０】
該分析が、さらに、アポトーシスまたは壊死によって引き起こされるそれらの起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類することを含む請求項１４記載の方法。
【請求項２１】
分析が、さらに、機械的損傷、薬物－誘導損傷、または免疫学的損傷によって引き起こさ

れるそれらの起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類することを含む請求項２０記載の方法。
【請求項２２】
該分類が、形態学的分析およびエピトープ分析よりなる群から選択される少なくとも１つをベースとする請求項２０記載の方法。
【請求項２３】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷な悪性細胞および悪性細胞のクラスターを含むことが疑われる混合された細胞集団を含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷の悪性細胞および悪性細胞の該クラスターと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングした磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料、該無傷の悪性細胞および悪性細胞の該クラスターを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガント、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ、
ｄ．該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターを分析することを含み、該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターの存在が、悪性疾患の存在を示す；
ことを特徴とする、テスト対象において悪性疾患を診断する方法。
【請求項２４】
該生物学的検体が血液である請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
該生物学的検体を得た後に、それを、該生物学的検体を安定化させることができる剤と接触させる請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
該磁性粒子がコロイド状である請求項２３記載の方法。
【請求項２７】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷の悪性細胞および悪性細胞クラスターが豊富化された、分離された磁気－標識画分を生じさせる請求項２３記載の方法。
【請求項２８】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項２３記載の方法。
【請求項２９】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷な悪性細胞を含むことが疑われる混合された細胞集団を含み、さらに、
ｉ．悪性細胞に由来する細胞断片、または
ｉｉ．悪性細胞に由来する細胞デブリスを含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドとカップリングされた磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料は、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された悪性細胞、および該標識された細胞断片または該標識された細胞デブリスを分析することを含み、該標識された悪性細胞、該標識された細胞断片、および標識された細胞デブリスの存在は、悪性疾患の存在を示す；
ことを特徴とする、テスト対象において悪性疾患をスクリーニングする方法。
【請求項３０】

該生物学的検体が血液である請求項２９記載の方法。
【請求項３１】
該生物学的検体を得た後に、それを、該生物学的検体を安定化させることができる剤と接触させる請求項３０記載の方法。
【請求項３２】
該磁性粒子がコロイド状である請求項２９記載の方法。
【請求項３３】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスが豊富化された、分離された磁気－標識画分を生じさせる請求項２９記載の方法。
【請求項３４】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項２９記載の方法。
【請求項３５】
該分析が、さらに、アポトーシスまたは壊死によって引き起こされるそれらの起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類することを含む請求項２９記載の方法。
【請求項３６】
機械的損傷、薬物－誘導損傷、または免疫学的損傷によって引き起こされるそれらの起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類することを含む請求項３５記載の方法。
【請求項３７】
該分類が、形態学的分析およびエピトープ分析よりなる群から選択される少なくとも１つに基づく請求項３５記載の方法。
【請求項３８】
ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷の悪性細胞および悪性細胞のクラスターを含むことが疑われる混合された細胞集団を含み；
ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷の悪性細胞および悪性細胞の該クラスターと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングされた磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；
ｃ．該磁気－標識試料は、該無傷の悪性細胞および悪性細胞の該クラスターを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターを分析することを含み、該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターの存在は悪性疾患の存在を示す；
ことを特徴とする、テスト対象において悪性疾患をスクリーニングする方法。
【請求項３９】
該生物学的検体が血液である請求項３８記載の方法。
【請求項４０】
該生物学的検体を得た後に、それを、該生物学的検体を安定化させることができる剤と接触させる請求項３９記載の方法。
【請求項４１】
該磁性粒子がコロイド状である請求項３８記載の方法。
【請求項４２】
該磁気－標識試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷の悪性細胞および悪性細胞の該クラスターが豊富化された、分離された磁気－標識画分を生じさせる請求項３８記載の方法。
【請求項４３】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイ

トメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項３８記載の方法。

【請求項４４】

ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は無傷な悪性細胞を含むことが疑われる混合された細胞集団を含み、およびさらに

ｉ．悪性細胞に由来する細胞断片、または

ｉｉ．悪性細胞に由来する細胞デブリスを含み；

ｂ．磁気－標識試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドとカップリングされた磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；

ｃ．該磁気－標識試料、該無傷の悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンド、他の検体成分の実施的排除まで、接触させ；

ｄ．該標識された悪性細胞、および標識された細胞断片、該標識された細胞デブリスを分析し、該標識された悪性細胞、該標識された細胞断片、および該標識された細胞デブリスの存在は悪性疾患の存在を示す；

ことを特徴とする、テスト対象において悪性疾患をモニターする方法。

【請求項４５】

該生物学的検体が血液である請求項４４記載の方法。

【請求項４６】

該生物学的検体が得られた後に、それを、該生物学的検体を安定化することができる剤と接触させる請求項４５記載の方法。

【請求項４７】

該磁性粒子がコロイド状である請求項４４記載の方法。

【請求項４８】

該磁気的に標識された試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスが豊富化された、分離された磁気的に標識された画分を得る請求項４４記載の方法。

【請求項４９】

該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項４４記載の方法。

【請求項５０】

該分析が、さらに、アポトーシスまたは壊死によって引き起こされたその起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類することを含む請求項４４記載の方法。

【請求項５１】

分析が、さらに、機械的損傷、薬物－誘導損傷、または免疫学的損傷によって引き起こされたその起源に基づいて細胞断片または該細胞デブリスを分類すること含む請求項５０記載の方法。

【請求項５２】

該分類が、形態学的分析およびエピトープ分析よりなる群の少なくとも１つに基づく請求項５０記載の方法。

【請求項５３】

ａ．テスト対象から生物学的検体を得、該検体は、無傷悪性細胞および悪性細胞のクラスターを含有することが疑われる混合された細胞集団を含み；

ｂ．磁気的に標識された試料を調製し、ここに、該生物学的試料は、該無傷悪性細胞および悪性細胞の該クラスターと特異的に反応する第１の生物特異的リガンドにカップリングした磁性粒子と、他の検体成分の実質的排除まで、混合され；

ｃ．該磁気的に標識された試料を、該無傷悪性細胞および悪性細胞の該クラスターを特異的に標識する少なくとも１つのさらなる生物特異的リガンドと、他の検体成分の実質的排除まで、接触させ；
ｄ．該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターを分析し、該標識された悪性細胞および悪性細胞の該標識されたクラスターの存在は悪性疾患の存在を示す；
ことを特徴とする、テスト対象において悪性疾患をモニターする方法。
【請求項５４】
該生物学的検体が血液である請求項５３記載の方法。
【請求項５５】
該生物学的検体が得られた後に、それを、該生物学的検体を安定化することができる剤と接触させる請求項５４記載の方法。
【請求項５６】
該磁性粒子がコロイド状である請求項５３記載の方法。
【請求項５７】
該磁気的に標識された試料を調製する工程の後に、該試料を高勾配磁場に付して、該無傷悪性細胞および悪性細胞の該クラスターが豊富化された、分離された磁気的に標識された画分を得る請求項５３記載の方法。
【請求項５８】
該分析がマルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容法、スペクトルイメージング分析、手による細胞分析、および自動細胞分析よりなる群から選択される請求項５３記載の方法。
【請求項５９】
ａ．ｉ．磁性コア材料、
ii．蛋白質ベースのコーティング材料、および
iii．該悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスの第１の特徴的な決定基に特異的に結合する抗体
を含むコートされた磁性ナノ粒子；
ｂ．該悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスの第２の特徴的な決定基に対する結合特異性を有する少なくとも１つの抗体；
ｃ．該悪性細胞、および該細胞断片または該細胞デブリスのさらなる特徴を染色することができる剤；
を含む、悪性細胞、および悪性細胞に由来する細胞断片または悪性細胞に由来する細胞デブリスの存在につき生物学的検体をアッセイするためのキット。
【請求項６０】
さらに、異なる特徴的な決定基につき各々が特異的な抗体のパネルを含む請求項５９記載のキット。
【請求項６１】
さらに、非－標的存在を標識することができる特異的剤をさらに含む請求項５９記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
Galla Chandra Rao, Christopher Larson, Madeline Repollet, Herman Rutner, Leon Terstappen, Shawn Mark O'HaraおよびSteven Gross
【０００２】
優先権の情報
本出願は、２００１年８月２３日に出願された米国仮出願番号60/314,151および２００２年４月３日に出願された60/369,628に対して米国特許法第１１９条（ｅ）の下で優先権を主張する。
【０００３】

発明の背景
多くの臨床家は、癌はその初期段階においては器官が限定された病気であると考える。しかしながら、この認識は間違いであり、癌は、しばしば、それがまず現在利用可能な方法を用いて検出される時点までは全身病であるようである。原発性癌は、臨床的発現の現れる前に、初期病気段階において新形成細胞を循環系に放出し始める。腫瘍の血管形成に際し、循環系に放出された腫瘍細胞は、離れた部位に付着し、集落化して、転移を形成する。これらの循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）は、健康な個体の細胞では通常は見出されないマーカーを含み、かくして、特定の癌腫の診断および治療のための基礎を形成する。よって、循環系における腫瘍細胞の存在を用いて、乳癌についての乳房造影、または前立腺癌についての前立腺特異的抗原（ＰＳＥ）の測定のごとき、他のテストの代わりに、またはそれと組み合わせて癌につきスクリーニングすることができる。標的細胞上または中の会合したマーカーに向けられた適当なモノクローナル抗体を使用することによって、または細胞蛋白質発現についての他のアッセイを用いることによって、あるいは細胞ｍＲＮＡの分析によって、そのような細胞の器官起源、例えば、乳癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌または他の非造血系癌は容易に決定することができる。

【０００４】
かくして、癌細胞を検出できる場合、腫瘍の実質的に臨床的兆候はないが、その存在ならびに起源の器官を同定することが可能であろう。もし外科的処置の後にＣＴＣが検出されれば、もしＣＴＣが再発の兆候であれば、アジュバント療法を開始できる。そのような療法のコストに鑑みれば、そのような治療に対する患者に必要性、または効率の予測は、臨床的情報の重要かつ便利なピースである。また、もしＣＴＣの数が変化すれば、それは進行（ＣＴＣ増加）または応答（ＣＴＣ減少）を予測することができるのも明らかである。

【０００５】
悪性腫瘍は、隣接する組織に侵入できる組成物の能力によって特徴付けられる。一般に、１ｍｍの直径を持つ腫瘍は血管形成され、動物実験は、腫瘍に存在する細胞の４％と多くが２４時間以内に循環系に放出され得ることを示す（Butler, TP & Gullino PM, 1975 Cancer Research 35:512-516）。腫瘍の放出能力は、腫瘍の攻撃性にほとんど依存するようである。腫瘍細胞は連続的ベースで循環系に放出されるが、離れた転移を生じるのはほとんどないか、または非常に小さな割合に過ぎないと考えられる（Butler & Gullino, supra）。腫瘍質量の増加は、単細胞、または増加した接着性（およびおそらくはより大きな侵入可能性）を持つ細胞のクラスターとして、ＣＴＣの頻度の増加に比例すると予測される。もしこれが当てはまれば、高レベルの感度を持つ利用可能な方法は、離れた転移を持つ患者ならびに局所化された病気を持つ患者における腫瘍負荷の評価を容易とするであろう。局所化された病気を持つ患者の末梢血液中の腫瘍細胞の検出は、初期段階における腫瘍を検出するのみならず、腫瘍の潜在的進入性に関する兆候を供する能力を有する。

【０００６】
しかしながら、全血は、特に、２４時間を越える延長された貯蔵について、イン・ビボおよびイン・ビトロでの多数の生化学および酵素反応を受けることができる細胞および可溶性成分の種々の集団を含む複雑な体液である。これらの反応のいくつかは、外来性種として認識されるＣＴＣの免疫学的破壊に関連する。患者の免疫応答は、ファゴサイトーシスおよび好中球活性化を含めた通常の防御メカニズムによって腫瘍細胞を弱めたり、または破壊する。化学療法は、同様に、壊死による細胞死滅を誘導することによって、細胞機能および増殖を共に低下させることが意図される。これらの外的破壊因子の他に、ひどい環境で損傷した腫瘍細胞は、プログラムされた死滅またはアポトーシスを受け得る。アポトーシスまたは壊死を受けつつある（ＣＴＣを含めた）正常および異常細胞は、変化した膜透過性を有し、これはＤＮＡ、ＲＮＡおよび他の細胞内成分の逃避を可能とし、損傷した細胞、断片化された細胞、細胞デブリス、および究極的な完全な崩壊の形成に導かれる。そのような腫瘍細胞デブリスは、無傷細胞に特徴的なエピトープまたは決定基を依然として担うことができ、検出された循環癌細胞の数の偽の増加に至り得る。健康な個体からの全血検体もまた、２４時間を越える長期の貯蔵で、ここでは減少した血液質と分類される

、不安定な血液細胞成分の破壊を受けると観察された。例えば、赤血球は破裂し、ヘモグロビンを放出し、細胞ゴーストを生じる。白血球、特に顆粒球は不安定であって、貯蔵に際して減少することが知られている。そのような変化は、ＣＴＣのごとき稀な標的細胞の単離および検出に干渉し得る細胞デブリスの量を増加させる。集合的には、吸取後またはイン・ビトロ損傷と定義される、これらの破壊的プロセスの組合せ効果は、細胞デブリスを実質的に増加させ得、これは、CellSpotter（登録商標）またはCellTracks^{TM}のごときフローサイトメトリーおよび顕微鏡分析で容易に検出できる。

【０００７】

顕微鏡イメージングによる循環腫瘍細胞の検出は、分類可能な腫瘍細胞の偽の減少および干渉性の染色可能なデブリスの対応する増加によって、同様に、悪影響される。よって、血液検体の一体性または品質の維持は非常に重要である。というのは、血液吸取および検体処理の間には２４時間もの長い遅れがあり得るからである。そのような遅延は予期されるべきである。というのは、このアッセイのために血液処理で用いる技術および器具は、試験場毎に容易に入手できないからである。試料の処理のために試験所に試料が到達するのに必要な時間は、かなり変化し得る。従って、試料を処理することができる時間ウインドウを確立するのが重要である。ルーチン的な血液学分析において、血液試料は２４時間以内に分析することができる。しかしながら、稀な血液細胞の分析はより臨界的であるので、血液試料を分析することができる時間ウインドウはより短い。その例は、血液細胞の免疫表現型分けであり、これは、一般に、２４時間以内に行われなければならない。癌細胞アッセイにおいて、大容量の血液が処理されなければならず、ＣＴＣおよび造血系細胞双方からの細胞を崩壊させることによって放出された物質はバックグラウンドを増加させかねず、従って、腫瘍細胞を検出する能力を低下させるので、血液試料のイン・ビトロ分解はより問題となり得る。

【０００８】

観察された小さなデブリスおよび大きな凝塊－様凝集体の起源および性質は十分には理解されないが、標的細胞、非－標的細胞に由来する細胞成分または要素、およびおそらくは血漿成分を含むと考えられる。ＣＴＣは免疫学的に外来性種と考えることができるので、宿主の正常な細胞免疫応答は血液吸取前であってもイン・ビボで起こるであろう。また、多数のＣＴＣが腫瘍部位から継続的に放出され得、定常レベルが維持され、ここに、ＣＴＣの破壊は放出速度と等しく、それは、腫瘍負荷のサイズに依存する（JG Morenoら, "Changes in Circulating Carcinoma Cells in Patients with Metastatic Prostate Cancer Correlates with Disease State." Urology 58. 2001参照）。

【０００９】

種々の方法が、血液から腫瘍細胞を回収するためのこの特定の分野で知られている。例えば、ＡｍＣｅｌｌおよびＭｉｌｔｅｎｙｉに対する米国特許第6,190,870号は、免疫磁気単離、続いてのフローサイトメトリーによる計数を教示する。しかしながら、免疫磁気分離の前に、血液試料は密度勾配を用いて予備処理される。さらに、無傷細胞以外の単離または計数の議論はない。また、試料の目に見える形態学的分析もない。

【００１０】

米国特許第6,197,523号において、Rimmらは、１００μｌの血液試料中の癌細胞の計数を記載している。該方法は、見出された細胞の同一性を確認するためにキャピラリー顕微鏡を用いる。該方法は、小さな試料容量のため多数存在するに違いない無傷細胞に対して特異的である。しかしながら、断片またはデブリスのごとき他の単離または計数の議論はない。

【００１１】

Immunivestに対する米国特許第6,365,362号において、血液中の腫瘍細胞についての試料を免疫磁気的に豊富化し、それを分析するための方法が記載されている。該方法は無傷細胞の分析に特異的に向けられており、ここに、細胞の数は病気状態と相関する。単離された細胞は核酸およびさらなるマーカーの存在について標識され、これは、分析の間において非－標的試料成分の排除を行う。

【００１２】
WO 02/20825において、Chenは、腫瘍細胞を計数するための接着マトリックスの使用を記載している。簡単に述べれば、マトリックスを、推測される転移可能性を持つ生きた癌細胞を結合させるであろう特異的接着分子でコートする。次いで、マトリックスは、捕獲された細胞の存在およびタイプについて分析することができる。また、スクリーニング処理においてマトリックスを用いる方法も記載されている。無傷細胞およびアポトーシスまたは壊死細胞の間を区別する工程が取られるが、アポトーシスまたは壊死細胞は分析から特異的に排除される。
【００１３】
Cell WorksからのWO 00/47998において、ＣＴＣ、末端および増殖について２つの経路が記載されている。形態学的差によって示されるごとく、双方の経路は末端または増殖経路いずれかで進行する「不確定」細胞で開始する。末端経路における細胞は結局は破壊され、増殖経路にある細胞は転移性腫瘍としての新しい転移性コロニーを形成する。この増殖経路（細胞およびクラスター）が潜在的診断としての焦点であるが、細胞断片またはデブリスの重要性を最小化する。これらの２つの経路は、患者試料で観察される形態学的差を説明するように設計された。
【００１４】
一般に、より抵抗性で増殖性の細胞が生き残って、二次的または転移性部位を確立する。末梢循環系においては、活性化された好中球およびマクロファージによってＣＴＣがさらにイン・ビボ（イン・ビトロにおいても）攻撃され、その結果、徐々に、膜が開口され、電解質、より小さな分子が漏れ出し、かつ細胞の生存に必須であるＤＮＡ、クロマチン等を含めた臨界的細胞エレメントが結局は喪失される。細胞の死滅の臨界的時点において、細胞の破壊はさらにアポトーシスによって支援される。アポトーシスは一連の段階的な遅い細胞内事象によって特徴付けられ、これは、細胞外種、例えば、細胞傷害性抗－腫瘍薬物によってトリガーされまたは媒介される壊死または迅速な細胞死滅とは異なる。これらの破壊的プロセスの全てまたはいくつかは、崩壊しつつあるＣＴＣからの、ならびに薬物療法中の正常な造血細胞の不意な破壊からの染色可能なＤＮＡ、ＤＮＡ断片および「ＤＮＡラダー」構造を含めたデブリスおよび／または凝集体の形成に至り得る。なぜならば、ほとんどの細胞傷害性薬物は毒性用量近くで投与されるからである。
【００１５】
WO 00/47998、米国特許第6,190,870号および他の刊行物に示されているごとく、ＣＴＣは生きた細胞および死滅した細胞双方として循環することができ、ここに、「死滅した」は十分な範囲の損傷したおよび断片化された細胞ならびにＣＴＣ－由来デブリスを含む。細胞負荷は、おそらくは、細胞の形態学的特徴を担うが、凝塊および／または凝集体とは区別されるクラスターおよび損傷したＣＴＣを含めた、双方の無傷ＣＴＣの合計によって最良に示される。しかしながら、いくつかの損傷した細胞は大きなポアを有することができ、液体および粒子状細胞ゾル内容物の漏出を引き起こし、その結果、約１．０６ないし１．０８の浮遊密度が１．１２を超えるまで変化するか、あるいはＲＢＣの密度を超える（生きたおよび死滅した細胞は、Pharmaciaプロトコルに従うとｄ＝１．１２および１．１６のグラジエントの界面で分離することができる）。WO 00/47998で用いられている慣用的密度勾配は、約１．０８ないし１．１１の密度の範囲を有する捨てられたＲＢＣ層においてそのような損傷したＣＴＣを喪失するであろう。サイトケラチンについて陽性染色されるＣＴＣデブリスもまたＲＢＣまたはそれより高い範囲に入る密度を有することができる。というのは、（プラズマ－バフィーコート界面近くに位置させることができる親油性膜断片はおそらく除外されるが）ほとんどの細胞内成分は１．１５ないし１．３の範囲の密度を有するからである。よって、損傷したＣＴＣおよびＣＴＣデブリスのかなりの割合がバフィーコート層の外に位置し、WO 00/47998におけるもののごとく、密度勾配方法によって観察されないであろう。損傷されたまたは断片化されたＣＴＣのいくつかのイメージが示されるが、サイトスピンまたは引き続いての処理の間に損傷が起こり、かくして、それが人工物となるかなりの可能性がある。ほとんどの無傷腫瘍細胞の密度はＷＢＣの領

域に入り得るが、患者試料中の損傷したＣＴＣは、それらをグラジエント技術の範囲外のＲＢＣ層に置くほどの、より高い密度を有することもあるだろう。

【００１６】

米国特許出願番号2001/0024802は、断片およびデブリスをビーズに結合させるための方法を記載している。その公開された出願は、注目する断片およびデブリスの密度についての多数の可能性を記載していた。遠心に際し、ビーズは、断片および／またはデブリスにカップリングしたビーズの規定の所定の比重（密度）のため、ＲＢＣ上方の層に位置するであろう。しかしながら、このシステムは、断片およびデブリスをこれらのビーズに正確に結合させることに依存する。もしいずれかの他の試料成分がビーズに結合すれば、それは所望の位置には出現できず、引き続いて、分析に付されない。

【００１７】

元のその組織中の上皮細胞は、確立された増殖および発生の「規則」に従う。これらの規則は集団制御を含む。これは、正常な環境下では、細胞の数およびサイズが一定であり、生物の正常な増殖および発生で必要な場合にのみ変化することを意味する。上皮細胞または不滅化細胞の基底細胞のみが分裂し、上皮細胞にとってその機能を行う必要がある場合にそれは分裂し、上皮細胞の性質および位置に常に依存する。ある程度異常ではあるが良性環境下では、細胞は増殖し、基底層は通常よりも分裂し、過形成を引き起こす。いくつかの他の異常ではあるが良性な環境下では、細胞は特定の細胞について正常であるものを超えたサイズまで増大し、葉酸欠乏におけるごとく細胞の巨大発育を引き起こす。

【００１８】

上皮組織は、プレ悪性または悪性病巣のため細胞のサイズまたは数が増加し得る。これらの場合、前記したのと同様な変化が、低グレードの上皮内病巣における温和から悪性疾患における重症の範囲の核異常性に伴う。これらの細胞の変化は上皮の厚さの一部に影響し得、それが重傷度を増大させるにつれ、そのような内皮より厚い一部を含むであろう。これらの細胞は接触阻止の制限に従わず、組織制御なくして増殖し続ける。上皮の全厚みが悪性変化によって影響される場合、該状況はイン・サイチュにて癌腫と認識される（ＣＩＳ）。

【００１９】

悪性細胞は、結局は、基底膜を通過することができ、その悪性可能性が増大するにつれ、器官の間質を浸す。間質を浸した後、これらの細胞は血管に到達するためのポテンシャルを有すると考えられる。一旦それらが血管に浸潤すると、細胞はそれらが起源とするのとは完全に異なる環境にいる。

細胞は単一の細胞として、または２以上の細胞のクラスターとして血管に浸潤することができる。循環系を通って循環する上皮起源の単一細胞は、２つの結果のうち１つを有するように運命付けられている。それは、死滅するか、生き残ることができる。

【００２０】

単一細胞：

１．該細胞は、内部変化によるアポトーシス、または細胞自体におけるメッセージを介して死滅し得る。これらのメッセージは進入前に細胞で観察されているか、あるいはそれは血液中にある間に受け取ることができるか、あるいは、それが、宿主の免疫系の影響により死滅し、これはこの環境に対して「外来性」のものとしてこれらの細胞を認識し得る。細胞死滅の結果は有核細胞、斑点状細胞または無定形細胞としてCellSpotter（登録商標）で同定することができる。これらの細胞は、細胞分裂またはコロニーまたは転移の確立のポテンシャルを有しない。

・有核細胞は核崩壊および排除の結果である（核崩壊および核溶解）。それらはケラチンにつき陽性であって、核酸につき陰性である。

・斑点状細胞はサイトケラチンおよびＤＡＰＩにつき陽性であって、細胞変性および細胞質崩壊の証拠を示す。これらの細胞は、細胞骨格蛋白質が浸出するにつれ、療法または宿主の免疫系に対する応答を示し得る。

【００２１】

CellSpotter（登録商標）を用いて同定可能なもう１つの死滅しつつある腫瘍細胞は無定形細胞である。これらの細胞は、おそらくは、調製プロセスの間に損傷され、これらの細胞がより弱く、よりデリケートな細胞であるが、アポトーシスまたは免疫攻撃の結果でもあり得る兆候である。

【００２２】

２．生きた悪性上皮細胞は、循環系で生き残り、離れた器官においてコロニーを形成するポテンシャルを有し得る。これらの「生存細胞」は、CellSpotter（登録商標）において、高い核物質／細胞質物質比を有する無傷細胞として出現する。これらの細胞は、おそらくは、未分化であり、潜在的には、血液中で分裂することができ、離れた毛細血管中で浸出することができる小さなクラスターを形成することができ、そこで細胞は新しいコロニーを確立することができるか、あるいはそれが浸出まで単一細胞として存在でき、一旦それがそれ自身を新しい組織中で確立すれば、このようにして新しいコロニーを開始する。

【００２３】

クラスター：B Brandtらによって記載されているごとく循環系に入るクラスターを一次腫瘍細胞は放出することができる（"Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood." Cancer Research 56 p4556-4561. 1996）。これらのクラスターは、クラスターとして存在し、離れた組織に侵入することができるか、それは、おそらくは血液における圧力の差または免疫系の介入のため循環系で解離することができるようになる。もしこれらの細胞が単一の細胞に解離すれば、前記単一細胞について記載した２つの経路のうちの１つに従うことができる（１および２参照）。クラスター形成は、内部細胞を免疫系から保護する盾として外部細胞を用いることによって生存において効果を有することができる。

一旦新しいコロニーが新しい器官で確立されれば、いくつかの悪性細胞は、複製して新しい腫瘍を形成し続けるであろう。もしそれが新しい毛細血管に到達すれば、転移ストーリーが繰り返され、二次転移が起こる。

【００２４】

公知の癌腫を持つ患者における治療のモニタリング：

腫瘍細胞の数の減少および／または応答指数の増加は、患者療法に対する応答を表すことができる。

・合計腫瘍細胞＝死滅しつつある細胞＋生存細胞（ＴＴＣ＝ＤＣ＋ＳＣ）

・応答指数＝死滅しつつある細胞／合計腫瘍細胞（ＲＩ／ＤＣ／ＴＴＣ）

応答指数が高くなれば、療法に対する応答は良好となる。低い応答指数は、患者が治療に応答していないか、あるいは患者の免疫系が腫瘍負荷を取り扱うことができないことを示しえる。

【００２５】

予備処理訪問において全てが生存細胞であった５０の合計腫瘍細胞を有し（ａ　ＲＩ＝０／５０＝０）、かつ（処理後に）追跡で５０ＴＴＣを有する患者はＲＩに応じて異なる結果を有し得る。もし全てのＴＴＣがＳＣであれば、（すなわち、ＤＣ＝０）、療法に対する応答はなかった。もし５０細胞があるが、応答指標が４０／５０＝０．８であれば、免疫系または療法は腫瘍負荷に対して負の効果を有しており、従って、陽性患者応答である。

【００２６】

公知のプレ－悪性疾患を持つ患者での追跡における決定：パップ塗抹が異型性または低グレードの上皮内病巣を持つ細胞を有すると診断された場合、常に、よりひどい異常性をこれらの患者が有する確率があり、その細胞がサンプリングエラーとして除かれた。これらの患者は膣顕に付し、バイオプシーに付すことができるか、あるいは反復パップ塗抹のために３ヶ月以内に戻すことができる。もし非典型的な細胞がサンプリングされなかった悪性細胞の小さな焦点領域で同時に存在すれば、患者は３ヶ月待機し、しかる後、いずれかの追跡を受ける。これは、いくつかのプレ－悪性疾患が他のものより早く進行するように見えるのを説明できる（サンプリングエラーにより誤診断し、統計学において人工物を引

き起こす）。これらは、通常、より「攻撃的な」プレ－悪性疾患であると説明される。CellSpotter（登録商標）を用いて、これらの患者の判断系統で助けることができる。異常なパップを持つ全ての患者（米国においてパップ塗抹の５ないし１０％）は、循環上皮細胞につき直ちにテストすることができる。陽性テストを持つ患者は直ちにかつ攻撃的に追跡されるべきである。陰性結果を持つ患者は、反復パップのために３ヶ月待機することができる。これは、医師および健康専門家のためにプロセスを作成する決定を単純化し、追跡手法を患者が信頼するのを助ける。

【００２７】

スクリーニング：CellSpotter（登録商標）イメージ分析は、特別な組織特異的抗体を全ての異常な試料での第２のテストで用いるという条件下で、一般的に集団のスクリーニングで用いることができる。患者におけるＣＴＣの同定は、転移のプロセスを開始してしまったか、あるいは開始しつつある一次悪性疾患があることを示すことができる。もしこれらの細胞が、新しいマーカーで起源の組織に関して同定されれば、ＣＴがガイドした微小針吸引（ＦＮＡ）のような器官特異的テストを用いてそのような悪性疾患の存在または不存在を証明することができる。一次が同定できない患者は、個々のベースラインを確立した後に反復テストで追跡することができる。

【００２８】

まとめると、前記因子の全てまたはいくつかは、本発明に開示したごとく全血からの直接的な豊富化手法によるＣＴＣの検出を混乱させることが観察されたデブリスおよび／または凝集体形成に寄与することが判明した。無傷ＣＴＣ、損傷したまたは疑われるＣＴＣの数ならびにＣＴＣに対する損傷の程度は、さらに、腫瘍負荷、腫瘍細胞の増殖能力および／または療法の有効性の診断的に重要なインジケーターとして働くことができる。対照的に、先行技術の方法およびプロトコルは、ＣＴＣに対する避けることのできないイン・ビボ損傷を、避けることのできるイン・ビトロ貯蔵および処理損傷と組み合わせて、かくして、癌患者においてＣＴＣおよび腫瘍負荷についての誤った情報を生じる。最後に、高度な感度および特異性でもって機能するここに記載する本発明の比較的単純な血液テストは、「全身パイオプシ」と考えることができる。

【００２９】

発明の簡単な記載

本発明で記載される方法および試薬は、循環腫瘍細胞、クラスター、断片およびデブリスを分析するのに用いる。分析は、フローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）蛍光顕微鏡イメージング系を含めた多数のプラットフォームで行われる。実施例は、明白なまたは無傷のＣＴＣのみならず、疑われるＣＴＣまたは損傷した断片、ＣＴＣのクラスター、およびデブリスを分析する重要性を示す。断片およびデブリスを形成する損傷を模倣するのは可能である。また、安定化剤の使用を介する血液吸取および試料処理の間のＣＴＣのさらなる損傷を阻害するのも可能である。

【００３０】

検体の獲得、輸送、貯蔵、処理または分析によって引き起こされたイン・ビトロ損傷およびアポトーシス、壊死、または患者の免疫系によって引き起こされたイン・ビボ損傷の間を区別する能力はここに示されている。事実、イン・ビトロ損傷を制限し、低下させ、排除し、または少なくとも緩和して、それが分析中に干渉するのを防ぐのが望ましい。

【００３１】

本明細書中において、ＣＴＣ、クラスター、断片、およびデブリスによって決定される悪性疾患を含めた、循環する稀な細胞に基づく病気を診断し、モニターし、およびスクリーニングする方法が記載される。また、これらの方法を用いて生物学的検体をアッセイするためのキットが提供される。

【００３２】

発明の詳細な記載

本明細書中においては、当業者によってよく理解される種々の用語が用いられる。これらの用語の意図された意味は、認められた意味から逸脱しない。

癌腫を持つ患者における最小限残存する病気は臨床的重要性を有するという証拠が得られつつある。最小限残存する病気を効果的にモニターするためには、定性的および定量的評価が必要である。血液または骨髄中の癌腫細胞の頻度は低いので、分析用の試料の調製に関与するわずらわしい手動での試料調整方法は、しばしば、誤った結果に導く。これらの制限を克服するために半自動試料調製システムが開発されており、これは、ここに引用して一体化させる２０００２年２月２０日に出願された共通に所有される同時係属米国出願番号10/081,996に記載されているごとく、可変性を最小化し、より矛盾のない結果を提供する。

【００３３】

注目する物質、および標的物質がそれに特異的に結合するもう１つの物質の間での複合体形成に基づいて前記標的物質を分析または分離するために、種々の方法が利用できる。未結合物質からの複合体の分離は、重力により、例えば、標的物質にカップリングした微粉砕粒子またはビーズを沈降させることによって、またはそれを遠心することによって達成することができる。そのような粒子またはビーズは、結合した／遊離した分離工程を容易とするために磁性とすることができる。免疫および他の生物特異的親和性反応で用いられているごとく、磁性粒子は当該分野でよく知られている。一般に、磁気または重力分離を容易とするいずれの物質もこの目的で使用することができる。しかしながら、磁気分離手段が選択すべき方法であるのが明瞭となった。

【００３４】

磁性粒子はサイズ；大きな（１．５ないし約５０ミクロン）、小さな（０．１７ないし１．５ミクロン）またはコロイド状（＜２００ｎｍ）（これは、ナノ粒子とも言う）に基づいて分類することができる。フェロ流体またはフェロ流体－様物質としても知られているナノ粒子は、古典的なフェロ流体の特性の多くを有し、ときどき、コロイド状超常磁性粒子とここでは言う。

【００３５】

前記したタイプの小さな磁性粒子は、生物－特異的親和性反応に関係する分析でかなり有用である。というのは、それらが、便宜には、生物機能的ポリマー（例えば、蛋白質）で被覆され、非常に高い表面積を供し、合理的な反応速度を与えるからである。０．７ないし１．５ミクロンの範囲の磁性粒子は、例えば、米国特許第3,970,518号；4,018,886号；4,230,685号；4,267,234号；4,452,773号；4,554,088号および4,659,678号を含めた特許文献に記載されている。これらの粒子のあるものは、免疫学的試薬のための有用な固体支持体であることが開示されている。

【００３６】

磁気分離をなすことができる効率ならびに磁気的に標識された細胞の回収および純度は多くの因子に依存するであろう。これらは:

・分離すべき細胞の数
・そのような細胞の受容体またはエピトープ密度
・細胞当たりの磁気的負荷
・磁性材料の非特異的結合(ＮＳＢ)
・捕獲された非標的細胞の持ち越し
・使用される技術
・血管の性質
・血管表面の性質
・媒体の粘度および
・使用する磁気分離デバイス;

を含む。システムの非特異的結合のレベルが通常当てはまるように実質的に一定であれば標的集団が減少するにつれて純度が減少する。

【００３７】

標的化細胞の集団がより小さくなれば、磁気的に標識し、回収するのはより困難となるという事実は明らかではない。さらに標識および回収は、使用される磁性粒子の性質に顕著

に依存するであろう。例えば、細胞を、Dynalビーズのごとき大きな磁性粒子と共にインキュベートすると、ビーズが効果的に核酸するのに余りにも大きいので、該システムの混合によって生じた衝突を介して細胞は標識される。かくして、非常に初期の癌における腫瘍細胞の場合に当てはまるごとく、もし細胞が血液１ｍｌ当たり１細胞またはそれ未満でさえの頻度で集団に存在すれば、標的細胞を標識化する確率は、該システムに添加された磁性粒子数および混合の時間の長さに関係するであろう。実質的な時間のそのような粒子と細胞との混合は有害であるので、粒子濃度をできる限り増加させることが必要となる。しかしながら、分離に際して多量の磁性粒子と混合された稀な細胞に代えて、他の血液細胞と混合された稀な細胞で置き換えることができるので、加えることができる磁性粒子の量には制限がある。後者の条件は、注目する細胞を数えて、またはそれを調べる能力を顕著には改良しない。

【００３８】

本発明を実施するのに用いる好ましい磁性粒子はコロイドとして挙動する粒子である。そのような粒子は、一般には約２００ｎｍ未満のそのサブミクロン粒子サイズおよび長期間溶液からの重力分離に対するその安定性によって特徴づけられる。多くの他の利点に加え、このサイズの範囲は、個々の粒子が、細胞分析に通常適用される分析技術に対して目に見えなくする。９０ないし１５０ｎｍの範囲内の、かつ７０ないし９０％の磁性質量を有する粒子は、本発明で用いられると考えられる。適切な磁性粒子は、例えば、磁性コアに結合され、例えば物理的に吸収されるか、あるいはそれに対して共有結合され、かつ安定化コロイド特性を付与する分子によって囲まれた超常磁性材料の結晶性コアよりなる。コーティング材料は、好ましくは、試料で見出される生物学的マクロ分子および磁性コアの間の非特異的相互作用を妨げるのに効果的な量で適用すべきである。そのような生物学的マクロ粒子は、非標的細胞の表面のシアル酸残基、レクチン、糖蛋白質および他の膜成分のごとき炭水化物を含むことができる。加えて、該材料はできる限り多くのナノ粒子当たりの磁性質量を含むべきである。該コアを含む磁性結晶のサイズはそれが完全な磁気ドメインを含まないよう十分に小さい。ナノ粒子のサイズはブラウンエネルギーがその磁気モーメントを超えるように十分に小さい。その結果、北極、南極の整列およびこれらのコロイド磁気粒子の引き続いての相互の引力／反発は、この溶液の安定性に寄与する中程度に強い磁場においてさえ起こるようには見えない。最後に、磁性粒子が、高勾配外部磁場セパレーターで分離できるべきであろう。その特徴は試料の取り扱いを容易とし、強磁性ビーズまたはスチールウールを付加したより複雑な内部グラジエントカラムよりも経済的な利点を提供する。前記した特性を有する磁性粒子は、各々を引用して本明細書の一部とみなす米国特許第4,795,698号、第5,597,531号および第5,698,27号に記載されたベース材料の修飾によって調製することができる。粒子を製造する改良された方法は米国特許第5,698,271号に記載されている。これらの材料はプロセスがコーティングのレベルを顕著に増加させる高温コーティング工程を含む点で、’５３１特許に開示されたものの改良である。このプロセスを用いるウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）のコーティングで作成されたナノ粒子は’５３１のＤＣ－ＢＳＡと比較した場合、３ないし５倍低い非特異的結合特徴を有する。非特異的結合のこの減少は、ＢＳＡコーティング材料の増大したレベルに直接よるものであることが示されている。そのようなナノ粒子をＢＳＡコーティングを除去するように処理した場合、非特異的結合は高レベルに復帰する。かくして、酸化鉄結晶表面にコートされたＢＳＡの量および細胞の非特異的結合の間には直接的な関係が存在すると判断された。典型的には、全血からの細胞とこれらの粒子との非特異的結合は、０．３％であり、これは、’５３１から生じたものよりも有意に良好である。かくして、全血１０ｍｌより、豊富化のために標的化された細胞での単離される約２００，０００の非標的細胞が存在するであろう。

【００３９】

小さなナノ粒子（３０ないし７０ｎｍ）はより容易に拡散するので、それは、より大きなカウンターパートと比較して細胞を優先的に標識するであろう。内部グラジエントカラムにおけるごとく非常に高いグラジエントを用いると、サイズにもかかわらず、これらの材

料の効率はほとんど差がない。他方、外部グラジエント、或いはミクロビーズまたはスチールウールカラムで生じることができるよりも低い大きさのグラジエントを用いる場合、細胞上の小さなナノ粒子の占有は有意な効果を有する。これは、結果として、ＤＣナノ粒子を分画し、回収に対する効果を調べることによって当てはまることが示された。これらの実験および他の最適化実験に基づき、過剰に小さいかまたは大きなナノ粒子を欠くベースのコートされた磁性粒子を調製できる場合、磁気を基にまたはカラムで粒子を分画することができる手段が確立された。例えば平均直径１００ｎｍのコートされた粒子を生産することができ、これは、８０ｎｍより小さなまたは１３０ｎｍより大きなせいぜい痕跡量の材料を含む。同様に９０ないし９５ｎｍより小さな、１６０ｎｍを超える識別可能な材料で、約１２０ｎｍの材料を作成することができる。回収に際して最善に行ったそのような材料は、６０ないし７０ｎｍのナノ粒子を含ませることによってサブ最適とすることができよう。本発明を実施するのに用いる好ましい粒子サイズの範囲は、ベースのコートされた磁性粒子、例えば、ＢＳＡでコートされたマグネタイトでは９０ないし１５０ｎｍである。

【００４０】

これまでの高度に磁気的であり低い非特異的結合を使用する外部場デバイスでの高勾配磁気分離に基づき、コロイド磁気粒子は、特に、もし注目するサブセットが全集団の小さな割合のみを含むならば、真核生物細胞の混合された集団から注目する細胞サブセットを分離するための選択された方法である。そのような材料は、その拡散特性のため、血液中の腫瘍細胞のごとき稀な事象を見出し、それを磁気的に標識する。腫瘍細胞分析のための磁気分離が成功するためには、磁性粒子は造血細胞で存在しないエピトープに対して特異的でなければならない。

【００４１】

非常に種々の分析方法および基準を用いて腫瘍細胞を同定し、最初の試みは、何が免疫細胞化学によって腫瘍細胞を構成するかを規定する基準を標準化するためになされる。この実験において前立腺癌患者からの血液試料を、ＥｐＣＡＭを発現した細胞につき、免疫磁気的に豊富化させた。腫瘍細胞は、細胞骨格蛋白質サイトケラチン（ＣＫ＋）の発現、通常の白血球抗原ＣＤ４５（ＣＤ４５－）の不存在、および多色蛍光分析により核酸（ＮＡ＋）の存在によって同定した。稀な事象または稀な細胞は、フローサイトメトリーおよび顕微鏡によって免疫表現型分けすることができる。フローサイトメトリー分析は、低いレベルの蛍光さえ再現性よく定量する能力に優れており、他方、形態学的特徴は免疫表現型分けで同定された物体の分類を助けることができるので、顕微鏡はより有効な特異性を有する。フローサイトメトリーおよび顕微鏡によって前立腺癌患者の血液中で検出されたＣＴＣの数の間には相関があるが、ＣＫ＋、ＣＤ４５－、ＮＡ＋物体の顕微鏡観察は少数の物体のみが無傷で出現したことを示す。この観察は循環腫瘍細胞の実質的な部分においてアポトーシスを示したという他の報告と合致する。

【００４２】

用語「生物学的検体」または「生物学的試料」は相互交換的に用いることができ、注目する細胞を含むことが疑われ、かつ分析すべきヒトテスト対象から採取した小さな割合の流体または組織をいう。生物学的検体は、流体部分、細胞部分、および可溶性物質を含む部分をいう。生物学的検体または生物学的試料は、限定されるものではないが、末梢血液、組織ホモゲネート、乳首吸引物、結腸洗浄液、痰、気管支（歯槽）洗浄液、肋膜液、腹腔液、心臓周辺液、尿、その他ヒトテスト対象から得ることができる細胞の源のごとき体液を含む。例示的な組織ホモゲネートは、乳癌患者における前哨節から得ることができる。

【００４３】

用語「稀な細胞」とは、本明細書中においては、通常は生物学的検体に存在しないが、免疫疾患、慢性病、負傷または妊娠のごとき異常な状態のインジケーターとして存在することができる細胞と定義される。また、稀な細胞とは、通常は生物学的検体に存在し得るが、正常な生物学的検体に典型的に存在する細胞よりは数桁小さな頻度で存在する細胞もいう。

【００４４】
用語「決定基」は、これまでの標的生物存在のいずれかに言及して用いる場合、免疫応答をしばしば誘導するマクロ分子抗原に存在する化学的モザイクを広くいう。また、決定基は「エピトープ」と相互交換的に用いることができる。本明細書中で相互交換的に用いる「生物特異的リガンド」または「生物特異的試薬」は、決定基に特異的に結合することができる。決定基は、（リガンドまたは試薬のごとき）特異的結合物質への選択的結合、選択的結合が起こるのが必要とされる存在に関与し、かつそれを担う標的生物存在のその部分をいう。基本的な用語において、決定基は、特異的結合対反応において、そのための結合親和性を有する剤、リガンドおよび／または試薬によって認識される標的生物存在での分子接触領域である。

【００４５】
本明細書中で用いる用語「特異的結合対」は、抗原－抗体、受容体－ホルモン、受容体－リガンド、アゴニスト－アンタゴニスト、レクチン－炭水化物、核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）ハイブリダイジング配列、Ｆｃ受容体またはマウスＩｇＧ－プロテインＡ、アビジン－ビオチン、ストレプトアビジン－ビオチン、ウイルス－受容体相互作用を含む。

【００４６】
用語「検出可能な標識」は、本明細書中では、物理的または化学的手段による直接的または間接的なその検出または測定が、テスト試料中における標的生物の存在を示すいずれの物質をいうのに用いられる。有用な検出可能な標識の代表的な例は、限定されるものではないが、以下の：光吸収、蛍光、反射、光散乱、リン光、またはルミネセンス特性に基づいて直接的または間接的に検出可能な分子またはイオン；その放射性特性によって検出できる分子またはイオン；その核磁気共鳴または常磁性特性によって検出可能な分子またはイオンを含む。光吸収または蛍光に基づいて間接的に検出可能な分子の群には、例えば、（例えば、非光吸収性から光吸収性分子へ、または非蛍光性から蛍光性分子へ）適当な基質を変換する種々の酵素が含まれる。分析は、マルチパラメーターフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、レーザー走査サイトメトリー、明視野ベースイメージ分析、毛細管測容分析、スペクトルイメージング分析、手動細胞分析、CellSpotter（登録商標）分析、CellTracks（商標）分析、および自動細胞分析を含めた多数の通常使用されるプラットフォームのいずれかを用いて行うことができる。

【００４７】
フレーズ「の実質的排除まで」とは、生物特異的リガンドまたは生物特異的試薬またはその対応する標的決定基の間の結合反応の特異性をいう。生物特異的リガンドおよび試薬はその標的決定基についての特異的結合活性を有するが、また、他の試料成分への低レベルの非特異的結合も呈し得る。

【００４８】
フレーズ「初期段階癌」は、「段階Ｉ」または「段階ＩＩ」癌とここでは相互交換的に用いられ、臨床的に器官－制限されていると判断される癌をいう。また、乳癌患者についての乳房造影、または肺癌患者についてのＸ－線のごとき慣用的な方法によって検出されるには余りにも小さな腫瘍も含まれる。乳房造影はほぼ2×10^{8}細胞を有する腫瘍を検出できるが、本発明の方法は、このサイズあるいはそれ以下に近似される腫瘍からの循環癌細胞の検出を可能とするはずである。

【００４９】
用語「豊富化」とは、本明細書中においては、元の生物学的試料における比率と比較して、処理された分析試料中の非特異的物質に対する標的生物存在（例えば、腫瘍細胞）の比率を実質的に増大させるプロセスをいう。末梢血液を出発物質として用いる場合、豊富化の程度を評価する場合には、赤血球細胞はカウントされない。本発明の方法を用い、循環上皮細胞は、少なくとも２，５００倍、より好ましくは５，０００倍、最も好ましくは１０，０００倍の程度まで白血球に対して豊富化することができる。

【００５０】
用語「抗－凝固剤」または「抗－凝固試薬」は相互交換的に用いることができ、いずれか

の望まない天然または人工の凝固を阻害する目的で生物学的検体に添加される組成物をいう。凝固の例は血液凝固であり、通常の抗－凝固剤はキレート剤であり、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、１，２－ジアミノシクロヘキサン四酢酸（ＤＣＴＡ）、エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）四酢酸（ＥＧＴＡ）によって、あるいはヘパリン、およびヘパリン硫酸および低分子量ヘパリンのごときヘパリン種のような錯化剤によって例示される。これは、さらに、集合的に、「凝塊」または「凝塊形成」とも定義できる。しかしながら、そのような凝塊は、もし、それが無傷ＣＴＣについての分類基準を満たすならば、単一無傷ＣＴＣとカウントされるＣＴＣの「クラスター」または凝集体から区別されなければならない。

【００５１】

ＣＴＣのクラスターは、単一ＣＴＣよりも大きな増殖能力を有すると考えられており、かくして、その存在は診断的にかなり重要である。二次転移性腫瘍部位を確立するための増大された特性についての１つの可能な原因は、その接着性であり得る。よりありそうな原因はＣＴＣクラスターの現実のサイズであり；より大きなクラスターは、小さな直径の毛細管または骨中のポアに入るようになる。一旦そこに入れば、クラスター中の細胞の生存率は、新しい転移部位における生存性の機会を決定するであろう。

【００５２】

理想的な（ここで相互交換的使用される）「安定化剤」または「保存剤」は、いずれにせよ、標的細胞の単離、検出および計数を妨げかねない、生物学的検体中の凝集体および細胞デブリスに干渉する形成、および非標的細胞からのその区別を最小化しつつ、生物学的検体に存在する注目する標的細胞を保存することができる組成物と定義される。換言すれば、抗－凝固剤と組み合わせた場合、安定化剤は抗－凝固剤の性能に悪影響しないはずである。逆に、抗－凝固剤は安定化剤の性能に干渉しないはずである。加えて、開示された安定化剤は固定の第３の機能を発揮し、それにより浸透化細胞を安定化し、ここに、表現「浸透化された」または「浸透化」および「固定する」、「固定化された」または「固定」は細胞生物学で慣用的に定義されるように用いられる。安定化剤の記載は、本明細書中では、濃度または量が損傷を引き起こすことなく標的細胞を安定化するのに効果的な場合、細胞生物学における当業者に容易に明らかであろう適切な濃度または量でのこれらの剤を用いることを意味する。稀な細胞を保存する目的で本発明の組成物、方法および装置を用いるものは、これらの同一稀な細胞を損傷し、または破壊する方法でそれを明らかに用いず、従って、適当な濃度または量を固有に選択するであろう。例えば、ホルムアルデヒドドナーであるイミダゾリジニル尿素は、該検体の容量の０．１ないし１０％、より好ましくは０．５ないし５％、最も好ましくは約１ないし３％で効果的であることが判明した。ポリエチレングリコールのごときさらなる剤は、検体容量の約０．１％ないし約５％、より好ましくは約０．１％ないし約１％、最も好ましくは約０．１％ないし約０．５％の好ましい濃度で添加した場合に効果的であることが判明した。

【００５３】

安定化剤は、少なくとも数時間の間は試料を保存できなければならない。しかしながら、試料は少なくとも７２時間まで安定化することができるのが示された。そのような長期安定性は、処理および分析が行われる位置から離れた位置で試料が得られる場合には重要である。さらに、試料は輸送の間に機械的損傷に対して安定化されなければならない。

【００５４】

安定化剤は、イン・ビボ腫瘍細胞の崩壊およびイン・ビトロでの試料劣化による崩壊を区別するのに必要である。従って、安定化剤の組成物、ならびにそこで用いる方法および装置は、「分析用の細胞および生物学的検体の安定化」なる発明の名称の同時係属出願に記載されている。その共通に所有された出願を、ここに引用して本明細書の一部とみなす。

【００５５】

用語「明白な細胞」または「無傷細胞」は相互交換的に用いることができ、核酸およびサイトケラチンを含有するイメージング分析の間に見出される細胞をいう。これらの細胞は通常肉眼では丸いかまたは卵形であるが、時々は、多角形または細長いものでもあり得、

個々の細胞または細胞のクラスターとして出現する。（例えば、核酸色素によって標識される）核酸領域は（例えば、抗－サイトケラチンによって標識される）細胞質領域よりも小さく、細胞質領域によって囲まれる。

【００５６】

用語「疑惑細胞」、「疑われる細胞」または「断片」は相互交換的に用いることができ、無傷細胞に似ているが、目では無傷細胞と区別できないイメージング分析の間に見出される細胞をいう。イメージング分析に基づき：

１．明白な細胞のような形状をし、サイトケラチンについて陽性的に染色されるが、核酸については陰性である有核細胞；

２．核酸については陽性的に染色されるが、不規則に染色されたサイトケラチンを有する斑点状または点状細胞；および

３．サイトケラチンおよび核酸についての陽性的に染色されるが形状は不規則であるか、あるいは異常に大きな無定形細胞；

を含めた多数の可能なタイプの疑われる細胞がある。これらの疑惑細胞は、ＣＴＣの性質ならびに患者の病気に対するさらなる情報を与えることができるので本発明で興味深い。染色またはイメージ人工物が分析の間に観察され得る可能性がある。例えば、有核細胞は、時々、核が染色されるが、対応する領域は核酸陰性である「ゴースト」領域を有するように見える。これは、標識またはイメージング技術を含めた多数の外的因子によって引き起こされ得る。また、核が「脱着された」細胞が観察された。これは、恐らくは、その核を放出する細胞を示し得るのに対して、これは、イメージングシステムの人工物によるように見える。しかしながら、そのような「人工物」は、真実である場合、無傷細胞に何が起こっているかについての価値ある情報を与える。従って、本発明の一部として、疑惑細胞はより綿密に分析されるであろう。

【００５７】

細胞断片は、デブリスが細胞に必ずしも似ていない点で「デブリス」とは異なる。本明細書中で用いる用語デブリスとは、処理の間に特異的または非特異的に標識され、分析の間にイメージとして目に見えるが、無傷および／または疑われる細胞とは区別される、分類されない物体をいう。例えば、損傷した細胞は核物質を放出するであろうと観察されている。処理の間に、この核物質は非特異的に磁気的に標識され、引き続いて、核酸染料で標識され得る。分析の間に、磁気的に標識され、染色された核物質は、それが依然として付着したサイトケラチンを有する場合には観察することができる。同様に磁気的に選択され、染色される他の物体があり、これは、分析の間に出現し、デブリスとして分類される。

【００５８】

本明細書中で用いる用語「形態学的分析」とは、サイズ、形状、またはある種の特徴の存在／不存在のごとき、物体についての目に見えて観察可能な特徴をいう。形態学的特徴を可視化するためには、物体は典型的には非特異的に染色される。本明細書中で用いる用語「エピトープ分析」とは、ある種のエピトープにつき標識されている物体でなされる観察をいう。エピトープ特徴を可視化するためには、物体は典型的には特異的に染色されるか、または標識される。形態学的分析は、物体のより完全な分析を供するためにエピトープ分析と組合わせることができる。

【００５９】

さらなる視覚による観察の重要性は、断片およびデブリスが、しばしば、「帰属されない事象」または「未帰属化事象」として分類される場合に明らかである。これらの用語はフローサイトメトリーのごとき非可視的分析から生じる。フローサイトメトリーが物体をイメージしないので、（ＷＢＣに非特異的に運ばれたものが陰性的に標識される場合に当てはまるごとく）標的細胞、または非標的細胞についての基準を満足する具体的集団に入らないいずれの事象も、これらの集団のいずれかの外にある。しかしながら、本明細書を通じて明らかになるように、これらの未帰属事象は重要である。

【００６０】

図１は、放出および転移を含めた種々のＣＴＣ段階のモデルである。図１ａは細胞、クラ

スター、断片およびデブリスについてのこれらの段階を示す。図１ｂはこれらの同一段階における試料からの実際のイメージを示す。細胞クラスター、断片およびデブリスのイメージは、患者試料のCellSpotter（登録商標）分析から取った。組織試料のイメージ（元の部位および転移部位）は、いずれかから取った（Manual of Cytology, American Society of Clinical Pathologies Press. 1983）。

【００６１】

簡単に述べれば、一次腫瘍から血液に放出された単細胞は血液中で生き残るか、または死滅するかのいずれかである。もしそれが生き残れば、血液中でそれは分裂するか、あるいは二次部位において集落化し得る。もし細胞が死滅すれば、方法に応じて、細胞は種々のタイプの断片またはデブリスへと分解する。もう１つの可能性は、細胞のクラスターが一次腫瘍から血液へ放出されることであり、そこで、それは単一細胞に解離し、あるいは無傷のままであり、二次部位で集落化する。もしクラスターが解離すれば、それは前記した単細胞と同様に挙動できる。もしクラスターが無傷のままであれば、小さな直径の毛細管中に入るようになる大きな直径のクラスターを含む、前記した理由で二次コロニーを形成するようである。一旦入れば、もし細胞が生きていれば、クラスターは新しい腫瘍を形成するであろう。

【００６２】

無傷細胞をほとんど伴わない断片およびデブリスの存在は、転移の機会がほとんどないことを示唆する。断片化された細胞は分裂せず、二次腫瘍を形成することができない。事実、無傷ＣＴＣのみが、またはおそらくはＣＴＣクラスターは二次部位を集落化できるであろう。接着および浸透プロセスにおいて役割を演じる抗原の同定は助けとなるであろう。クラスターの有りおよび無しでの患者の転移部位の追跡および評価は、さらなる洞察を提供するであろう。核形態学を用いて、細胞の活性状態および異常性を決定する。クロマチン凝塊、核小体およびクロマチン過剰の存在または不存在は、細胞が良性または悪性であるか、免疫応答に反応するか、または治療に反応するかを判断するのに用いられる。細胞質形態学は、分化のレベル（起源の組織）を判断するのに用いられる基準になる。例えば、細胞質形態学は細胞を鱗状ｖｓ腺状として分類することができる。

【００６３】

血液の吸取および引き続いての検体処理の間に、末梢循環系に存在する生存する強打された腫瘍細胞は、減圧にした試験管への血液の吸取の間の乱れによって、および検体の処理、例えば、血液試験管の輸送、および分析に先立っての混合によってさらに圧力がかかり、損傷され得る。そのような機械的な損傷は、進行する免疫学的、アポトーシス、および壊死プロセスに対して追加的であり、時間依存的にイン・ビトロで起こるＣＴＣの破壊に至る。我々は、検体をより長く貯蔵すれば、ＣＴＣの喪失はより大きくなり、干渉するデブリスおよび／または凝集体の量はより大きくなることを見出した。事実、本明細書中に示すデータ（図２および３）は、室温にて２４時間以上貯蔵したいくつかの血液検体におけるＣＴＣカウントの劇的な減少を示し、これは、血液吸取後におけるＣＴＣの実質的なイン・ビトロ破壊を示す。造血細胞の喪失はよく知られた現象であり、かつStreck Labsおよびその他の者による前記引用特許の主題であるが、混合または輸送による機械的損傷の発生は、今日まで、ＣＴＣまたは稀な細胞の喪失において認められた因子ではなかった。細胞デブリスの形成およびＣＴＣまたは他の稀な細胞の分析においてデブリスおよび／または凝集体を蓄積する干渉効果は、同様に、今日まで認められていない。それは、比較的大きな血液容量（５ないし５０ｍＬ）の処理、および容量低下（１ｍＬ未満）後の標的細胞の引き続いての顕微鏡検出またはイメージングを必要とするかなり感度の良い豊富化アッセイで非常に明らかであり、かつ問題であるように見える。そのようなデブリスは通常は観察されないか、あるいは、例えば、フローサイトメトリーによる慣用的非－豊富化アッセイ、または密度勾配方法による豊富化で干渉しない。

【００６４】

もし患者で観察されたこれらの損傷した上皮細胞および上皮細胞断片が化学療法によって誘導された腫瘍細胞のアポトーシスによって引き起こされ得るかを調べるために、腫瘍細

胞の死滅を模倣するモデルを開発した。前立腺細胞系ＬｎＣａＰの細胞を、パクリタキセルの有りまたは無しにて培養し、健康なドナーの血液にスパイクした。CellSpotter（登録商標）によって分析されたパクリタキセル処理試料の免疫磁気的に選択された細胞は、患者血液試料で観察されたものと似ていた。パクリタキセルで処理した細胞はアポトーシスの兆候を呈した。細胞の点状サイトケラチン染色パターンは、細胞骨格蛋白質の崩壊と対応するように見える（図４Ｂ　ｖｓ．６Ｂ）。細胞骨格危機を感知するプロアポトーシス遺伝子Ｂｉｍを活性化することができるパクリタキセルの微小管安定化効果に由来する配列における初期事象。アポトーシスに由来するカスパーゼ－切断サイトケラチンのさらなる証拠は、初期アポトーシスにおけるカスパーゼ切断に続いて暴露されたに過ぎないサイトケラチン１８のエピトープを認識するＭ３０ Cytodeath抗体（Roche Applied Science Mannheim, ドイツ国）で得られた。Ｍ３０で染色されたパクリタキセル処理ＬｎＣａＰ細胞およびＭ３０で染色されたより薄暗いサイトケラチン細胞であり、これは、アポトーシスを受けつつある細胞と合致する。

【００６５】

多数の異なる細胞分析プラットフォームを用いて、豊富化された試料中の細胞を同定し、それを計数することができるのは注意すべきである。そのような分析プラットフォームの例は、実施例ＩＩに記載した細胞の手動観察のための顕微鏡検出を用いるImmuniconのCellSpotter（登録商標）システム、磁性細胞固定化および分析システム、およびCellTracks（商標）システム、より進歩した自動光学走査システムである。これらの２つの分析プラットフォームは、手動または自動の定量的および定性的な細胞分析のための各装置および方法を開示する、ここに引用してその各々を本明細書の一部とみなす米国特許第5,876,593号；第5,985,153号および第6,136,182号に記載されている。

【００６６】

他の分析プラットフォームは、レーザー走査サイトメトリー（Compucyte）、明視野ベースイメージ分析（Chromavision）、および毛細管測容分析（Biometric Imaging）を含む。

【００６７】

本発明の好ましい具体例の方法および組成物を用いる血液中の循環上皮細胞の計数は、血液からの上皮細胞の免疫磁気選択（豊富化）、続いての試料の分析によって達成される。免疫磁気試料の調製は、試料の容量を減少させ、標的（上皮）細胞の10^4倍豊富化を得るのに重要である。マルチパラメーターフローサイトメトリー分析で用いる試薬は、上皮細胞が、２つの光散乱および３つの蛍光パラメーターのリストモード獲得によって生じた多次元空間中のユニークな位置に位置するように最適化される。これらは：

１．白血球（非腫瘍細胞）を同定するための汎－白血球抗体、ＣＤ４５に対する抗体；

２．残存する赤血球細胞、血小板および他の非有核事象の排除を可能とする細胞型特異的または核酸色素；および

３．サイトケラチンに対して向けられた生物特異的試薬または抗体、あるいは細胞を免疫磁気的に選択するのに用いられるものとは異なるＥｐＣＡＭエピトープに対する特異性を有する抗体；

を含む。

【００６８】

豊富化された腫瘍細胞集団の分析方法は、本発明の意図した使用に依存することは当業者に認識されるであろう。例えば、以下に記載するごとき癌をスクリーニングする、または病気の再発をモニターするにおいて、循環上皮細胞の数は、非常に少なくできる。ある「正常な」レベルの上皮細胞があるので（静脈注射の間に導入されたらしい）、正常または腫瘍細胞として上皮細胞を同定する分析方法が望ましい。その場合、顕微鏡ベースの分析は最も正確であることが判明するであろう。また、そのような検査は、形態学の検査、既知の腫瘍素質関連分子（例えば癌遺伝子）の同定も含むであろう。

【００６９】

患者

患者の年齢の範囲は４７ないし９１歳であり（平均７４歳）、最初の診断は実験に先立って２ないし１０年である。治療および段階のために、医療記録をレビューした。患者および健康なボランティアは認可された研究実験下で同意書通知に署名した。血液を１０ｍｌのEDTA Vacutainer（商標）試験管（Becton-Dickinson, NJ）に吸い取った。試料を室温で維持し、特に断りのない限り、収集後６時間以内に処理した。

【００７０】

試料の調製

上皮細胞接着分子（EpCAM）を同定するモノクローナル抗体で標識された磁性ナノ粒子を用いて、ここに引用して共に本明細書の一部とみなす、共通して所有された米国特許第6,365,362号および２００２年２月１９日に出願された米国特許出願10/079,939に教示されるごとく、造血細胞からの上皮細胞を磁気的手段によって標識し、分離した。２００μｌの容量に再懸濁させた磁気的に捕獲された細胞を蛍光標識して、造血細胞および上皮細胞の間を区別する。ピコエリスリン（ＣＫ－ＰＥ）にコンジュゲートしたケラチン４、５、６、８、１０、１３および１８を認識するモノクローナル抗体を用いて上皮細胞を同定し、ＣＤ４５を認識するモノクローナル抗体を用いて、白血球を同定し、およびサイトケラチンに非特異的に結合する造血細胞を同定した。

【００７１】

多色蛍光顕微鏡（CellSpotter（登録商標））分析のためにＣＤ４５をアロフィコシアニン（CD45-APC, Caltag, Ca）にコンジュゲートさせて、他方、フローサイトメトリー分析では、ペリジニンクロロフィル蛋白質がコンジュゲートしたＣＤ４５（CD45-PerCP, BDIS San Jose, CA）を用いた。核酸特異的色素ＤＡＰＩ（４，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）を用いて、CellSpotter（登録商標）システムにおける核を同定し、それを可視化し、Procountシステム（BDIS, San Jose, CA）における核酸色素を用いて、フローサイトメトリーによって細胞を同定した。インキュベーションの後、過剰の染色試薬を吸引し、捕獲された細胞を再懸濁し、フローサイトメトリー分析用の１２×７５ｎｍ試験管、または２つの磁石の間にチャンバーを保持する磁気ヨークアセンブリ（Captivate, Molecular Probes, OR）内に含まれた（ここに引用して本明細書の一部とみなす２００２年２月１２日に出願された米国出願10/074,900に記載された）CellSpotter（登録商標）分析チャンバーに移した。

【００７２】

実施例１

フローサイトメトリーを介する試料の分析

４８８ｎｍアルゴンイオンレーザー（BDIS, San Jose, CA）を備えたＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターで試料を分析した。核酸色素の蛍光での閾値を用い、データ獲得をＣｅｌｌＱｕｅｓｔ（BDIS, San Jose, CA）で行った。８０００ビーズまたは試料の８０％を分析した後、獲得を停止した。マルチパラメーターデータ解析は、リストモードデータ（Paint-A-Gate^{Pro} ,BDIS, San Jose, CA）で行った。ＣＴＣ事象についての解析基準は、順方向光散乱、直交光散乱によって規定される粒度、ＰＥ－標識抗－サイテトケラチンＭＡｂでの陽性染色、およびＰｅｒＣＰ－標識抗－ＣＤ４５Ｍａｂで染色無しによって規定されるサイズを含む。各試料につき、上皮細胞に典型的な領域に存在する事象の数を１．２５倍し、フローサイトメトリーによって分析されていない試料容量を説明した。

【００７３】

図２のパネルＡ、ＢおよびＣは、転移性前立腺癌を持つ患者の血液試料のフローサイトメトリー分析を示す。パネルＢにおける２つの垂直線は、白血球の核酸（ＮＡＧ）含量の低いおよび高い境界を示す（赤色ドット）。ＣＴＣ候補は、サイトケラチンを発現し（ＣＫ＋）、ＣＤ４５を欠き（ＣＤ４５－），核酸を含む（ＮＡＤ＋）．白血球と同等またはそれよりも高いＮＡＤを有するＣＴＣ候補は細胞と考えられ、黒色で示される。白血球より低いＮＡＤ含量のＣＫ＋、ＣＤ４５－、事象は標的細胞とは考えられず、青色で示した。順方向光散乱シグナルによって明らかなように、青色事象は黒色ＣＴＣと比較して、明ら

かに小さかった。ＮＡＤ染色強度についての閾値は、より低いＮＡＤ染色強度にてＣＫ＋、ＣＤ４５－事象の大部分を明らかに排除した。健康なドナーからの血液試料の分析において、そのようなＣＫ＋、ＣＤ４５－事象はほとんど観察されず、これは、この現象が癌に関連することを示唆する。健康なドナーからの血液の分析の典型的な例は図２Ｄ、図２Ｅおよび図２Ｆに示す。

【００７４】

実施例２

CellSpotter（登録商標）を介する試料の分析

CellSpotter（登録商標）システムは水銀アーク灯、１０倍対物レンズ、高分解能Ｘ、Ｙ、Ｚステージおよび４－フィルターキューブ交換器よりなる。４つのキューブの各々における励起、二色および発光フィルターはDAPI365nm/400nm/400nmのため、DiOC16480nm/495nm/510nmのため、PE546nm/560nm/580nmのため、およびAPC620nm/660nm/700nmのためであった。イメージは、デジタルフレームグラバーに連結したデジタルカメラで獲得した。チャンバーの表面は８０．２mm^2であり、５６０のイメージを生じる４フィルターの各々についての４列の３５イメージは、完全な表面を被覆するよう獲得されなければならない。CellSpotter（登録商標）獲得プログラムは、イメージが獲得されるべき領域、獲得すべきイメージの数、各イメージの位置および各位置で用いる顕微鏡焦点を決定する。試料からの全てのイメージを、特異的試料同定にユニークなディレクトリーに記録する。ＤＡＰＩおよびＣＫ－ＰＥにつき染色する位置についてサーチするために、試料から獲得されたイメージの全てにアルゴニズムを適用する。もし染色領域が潜在的腫瘍細胞のそれと合致すれば（ＤＡＰＩ＋，ＣＫ－ＰＥ＋）、ソフトウエアはこれらの領域の位置をデータベースに貯蔵する。ソフトウエアはボックスの各々の見本を提示し、使用者は、列に示されたイメージが腫瘍細胞と合致するか、または白血球マーカーＣＤ４５で染色されるのを確認することができる。ソフトウエアは各試料につきチェックされたボックスを表とし、情報はデータベースに貯蔵される。

【００７５】

図３は、転移性前立腺癌を持つ患者からの血液試料のCellSpotter（登録商標）分析の例を示す。潜在的に腫瘍細胞を含む領域は見本の列に提示される。図面の左下方の隅にある定規は、見本のサイズを示す。左から右にかけ、これらの見本は核（ＤＡＰＩ）、細胞質ケラチン（ＣＫ－ＰＥ）、膜色素（$DiOC_{16}$（３））で染色した対照細胞および表面ＣＤ４５（ＣＤ４５－ＡＰＣ）染色を表す。左に示されたコンポジットイメージは、紫色核（ＤＡＰＩ）および緑色細胞質（ＣＫ－ＰＥ）染色の偽の色重なりを示す。コンポジットイメージの他にチェックボックスは、使用者が、列に示されたイメージが腫瘍細胞に合致するのを確認するのを可能とし、ＣＤ４５－ＡＰＣイメージの他にチェックボックスが、白血球または腫瘍細胞が非特異的に染色されるのを確認するものである。この患者の試料において、ソフトウエアは、腫瘍細胞と合致する染色を示した２７６１列の見本を検出した。２７６１列のうちの１８は、１６３１－１６４０および１８６９－１８７６と表した図面に示される。１６３１、１６３６、１６３８、１６４０、および１８７３－１８７６の数字を付した列をチェックし、４μｍよりも大きなサイズ、細胞質サイトケラチン染色によって囲まれた核の存在およびＤｉＯＣ１６（３）およびＣＤ４５染色の不存在として定義されるＣＴＣの特徴を呈する。腫瘍細胞の外観の差に注意されたし：列１６８３における細胞は大きく、列１６４０における細胞は有意により小さい。列１６３４および１８６９中の事象の免疫表現型は腫瘍細胞と合致するが、それらの形態は無傷細胞と合致しない。列１８６９における見本は、細胞のアポトーシスと合致する細胞骨格蛋白質の後退による大きな核および斑点状の細胞質を示す。列１６３４における見本は、その核を突き出させるように見える損傷した細胞を示す。列１６３２に示された見本は、サイトケラチンならびにＣＤ４５を共に染色し、ＣＤ４５に非特異的に結合する腫瘍細胞またはサイトケラチンで非特異的に染色される白血球いずれかである細胞を示す。この例においては、細胞の形態はリンパ球のそれとかなり類似する。列１６３３、１６３５、１６３７、１６３９、１８７０および１８７２に示した見本は、４μｍよりも大きいが、細胞に類似しな

いサイトケラチン染色物体を示す。見本１６３７、１６３９および１８７２におけるサイトケラチン染色物体は白血球に非常に近接する。

【００７６】

いくつかの患者試料におけるＣＴＣ候補のイメージの観察に基づき、ＣＴＣは３つのカテゴリー：無傷ＣＴＣ、損傷したＣＴＣ、およびＣＴＣ断片に分類され、全てはＣＤ４５で染色されず、ＤｉＯＣ$_{16}$（３）フィルターに出現しない。図４は、治療を受けつつある転移性前立腺癌を持つ患者の血液の単一試験管から単離された３つのカテゴリーのＣＴＣの例を示す。図３Ａに示した無傷腫瘍細胞は、比較的平滑な細胞質膜、細胞質全体の細胞骨格蛋白質、および核内に含まれる無傷核を持つ４μｍよりも大きな物体として定義される。図４Ｂに示された損傷したＣＴＣは、斑点状サイトケラチン染色または欠陥のある細胞質膜、およびサイトケラチン染色に関連する核を持つ４μｍよりも大きな物体と定義される。図４Ｃに示された腫瘍細胞断片は、細胞に対して形態学的類似性を有しない核物質の解離の有りまたは無しにて４μｍよりも大きな丸いサイトケラチン染色物体と定義された。

【００７７】

実施例３

前立腺癌患者におけるＣＴＣ

ＣＴＣは、フローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）双方によって、前立腺癌患者の１８の血液試料および健康な個人からの２７の試料で数えた。表１に示された結果は、CellSpotter（登録商標）によって検出された無傷ＣＴＣの数を増加させることによって分類された。

【００７８】

【表１】

表１－前立腺癌患者の１８の血液試料および健康な個人からの２７の試料における CellSpotter（登録商標）およびフローサイトメトリーによるＣＴＣの計数

	CellSpotter®						フローサイトメトリー
患者の試料	無傷ＣＴＣ		疑われるＣＴＣ		帰属されない事象		CK+CD45-NA+
	#	%	#	%	#	%	#
1	0	0	1	50	1	50	5
2	0	0	2	100	0	0	12
3	0	0	2	66	1	34	1
4	0	0	2	50	2	50	0
5	0	0	2	29	5	71	5
6	0	0	3	60	2	40	18
7	0	0	3	38	5	62	0
8	0	0	7	44	9	56	10
9	0	0	13	76	4	24	2
10	1	5	1	5	20	90	4
11	1	10	4	40	5	50	0
12	2	22	1	11	6	67	4
13	28	6	7	1	441	93	69
14	70	5	168	12	1204	83	683
15	322	3	448	13	4244	87	500
16	350	5	112	2	5924	93	723
17	350	2	1429	9	14412	89	2420
18	742	17	112	2	3641	81	310
平均	-	**4%**	-	**34%**	-	**62%**	-
健康なドナーからの２７の試料							
平均	0.04		0.96		4.96		0.7
標準偏差	0.19		1.85		3.98		1.14
最小	0		0		0		0
最大	1		7		15		4

#－７．５ｍｌ血液中の数ＣＴＣ　％－CellSpotter（登録商標）によって検出された全てのＣＴＣのパーセンテイジ

【００７９】

CellSpotter（登録商標）分析において、無傷ＣＴＣの割合は、最小分率のＣＴＣを明確に構成し、全てのＣＴＣの０％ないし２２％の範囲であった（平均４％）。損傷したＣＴＣの割合は１％ないし１００％の範囲であり（平均３４％）、ＣＴＣ断片は０％ないし９３％（平均６２％）の範囲のＣＴＣの大部分を構成した。患者間の３つのカテゴリーにわたるＣＴＣの分布は、無傷ＣＴＣおよび損傷したＣＴＣ（R^2＝０．２０）の間、および無傷ＣＴＣおよびＣＴＣ断片（R^2＝０．４２）の間の相関の欠如および損傷したＣＴＣおよびＣＴＣ断片の間のある程度の相関（R^2＝０．８８）によって増幅されたごとくかなり変化した。CellSpotter（登録商標）による無傷ＣＴＣおよびフローサイトメトリーによって計数したＣＴＣの比較は有意な相関を示さず（R^2＝０．２６）、有意な相関は損傷したＣＴＣおよびフローサイトメトリーによるＣＴＣの間（R^2＝０．９２）、およびＣＴＣ断片およびフローサイトメトリーによるＣＴＣの間（R^2＝０．９３）で見出された。フローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）によって検出されたＣＴＣの比較は、フローサイトメトリーによって検出されたＣＴＣが無傷ＣＴＣならびに損傷されたＣＴＣ、およびある程度はＣＴＣ断片を含むことを示唆する。

【００８０】

実施例４
ＬｎＣａｐ細胞におけるアポトーシスのイン・ビトロ誘導による細胞損傷の模倣
ＣＴＣのフローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）分析における細胞傷害剤によって誘導されたアポトーシスの効果を調べるために前立腺細胞系ＬｎＣａＰからの細胞を、４０ｎＭのパクリタキセルの存在下または不存在下で７２時間培養した。インキュベーションに続き、未処理ＬｎｃａＰ細胞はトリパンブルー排除によって＞９５％およびパクリタキセル処理細胞についての３３％の生存率を示した。処理されたおよび未処理のＬｎＣａＰ細胞を健康なドナーの血液にスパイクし、前記したフェロ流体方法によって選択し、CellSpotter（登録商標）システムによって分析した。パクリタキセルで処理されていないＬｎＣａＰ細胞がスパイクされた実験において、９５％を超えるＬｎＣａＰ細胞は無傷腫瘍細胞として分類された。パクリタキセル処理ＬｎＣａＰ細胞の形態学的外観は、患者試料で観察されたＣＴＣのそれとの密接な類似性を示し、これを図６に示した。パクリタキセル処理で生き残った無傷ＬｎＣａＰ細胞を図６ａに示し、そのうち大部分が斑点状のサイトケラチン染色を示す損傷したＬｎＣａＰを図６Ｂに示し、腫瘍断片は図６Ｃに示す。
パクリタキセル処理および未処理ＬｎＣａＰ細胞でスパイクされた正常な血液試料もまたフローサイトメトリー分析のために調製した。図２Ｇ、図２Ｈおよび図２Ｉにおいて、５０リットルのＬｎＣａＰ細胞でスパイクされた血液試料のフローサイトメトリー分析を示す。大きな順方向光散乱シグナルによって示されるごとき正常なヒト白血球よりも大きな核酸含有量および比較的大きなサイズを持つ圧倒的に明るいサイトケラチン陽性集団を、図面中に黒色で示す。白血球よりも小さなＮＡＤ含有量で、青色で示された、小数のＣＫ＋、ＣＤ４５－事象のみが試料中で検出される。図２Ｊ、２Ｋおよび２Ｌは血液中にスパイクされたパクリタキセル処理ＬｎＣａＰのフローサイトメトリー分析を示す。生きたＬｎＣａＰ細胞とは対照的にサイトケラチン染色体の広い分布が有意な割合の集団で観察された。これは、減少した濃度の核酸含有量を示す。加えて、白血球としての核酸含有量が低い多数の小さなサイトケラチン陽性事象が観察された。患者のパターンは、パクリタキセル処理ＬｎＣａＰ細胞のパターン酷似しており、これは、フローサイトメトリーによって検出されたＣＴＣが、癌患者の血液中の無傷のＣＴＣおよび種々の崩壊する細胞を表すという仮説を裏づける。
前記で示されたデータは前立腺癌を持つ患者の血液においてフローサイトメトリーおよびCellSpotter（登録商標）双方によって検出されたＣＴＣが無傷細胞および崩壊の種々の段階にある細胞よりなることを示す。パクリタキセルによってイン・ビトロで誘導されたアポトーシスは、患者血液試料中の検出されたＣＴＣがアポトーシス、壊死、または治療または療法、血管系を通過させることによる、機械的損傷、または免疫性によって引き起こされた様々な度合いのイン・ビボ損傷を受けつつあることを示唆する。
しかしながら、イン・ビトロで引き起こされた細胞崩壊のもう１つの源は、試料調製またはＣＴＣの安定化の欠如または他の血液成分によって血液吸取後に誘導されよう。損傷を引き起こすことが知られている試料エージングの効果を調べるために、前立腺癌を持つ１２人の患者から吸い取った血液試料を処理し、もし十分な血液が入手できれば、２時間以内、２４時間後、６時間および１８時間後にフローサイトメトリーによって分析した。１２人の患者試料の８において、ＣＴＣは、正常なドナーで検出されたそれの平均＋３ＳＤよりも大きなレベルで検出された。図２に示すごとく。試料エージングでのＣＴＣの喪失は、全ての８つの試料で観察された。
【００８１】
【表２】

表２－血液吸取後の種々の時点で処理し、分析された前立腺癌患者の８の血液試料におけるフローサイトメトリーでのＣＴＣの数

	血液吸取後の時間			
患者番号	＜２時間 #CTC	～６時間 #CTC	～１８時間 #CTC	～２４時間 #CTC
1	5	-	-	0
2	8	9	2	3
3	15	-	-	0
4	31	-	-	3
5	44	-	-	8
6	45	-	-	1
7	49	38	19	26
8	78	-	-	0

ｈｒ＝時間　　＃ＣＴＣ＝５ｍｌ血液中のＣＴＣの数

【００８２】
血液処理が遅れた場合に、ＣＴＣの数の有意な低下が検出され、これは、ＣＴＣの脆性を示し、正確なＣＴＣカウントを得るために、血液吸取後６時間未満に非安定化血液試料を処理することを必要とする。臨床的に関連する情報が腫瘍細胞分解の異なる段階に含まれるかを信頼性よく評価するには、身体内で生じつつあることの正確な反映を得るために、血液吸取の時点でＣＴＣを安定化させる血液保存剤が必要とされる。さらに、ＣＴＣにつき豊富化するのに用いられる感度の良いアッセイのための試料調製方法は、ＣＴＣの全てのクラスが捕獲され、従って、先行技術おける伝統的な密度勾配分離方法を排除することが必要である。

【００８３】
実施例５
明白なＣＴＣおよび疑われるＣＴＣは重要なインジケーターである。
ここに記載したもののごとき感度の良いアッセイにてイン・ビボおよびイン・ビトロ損傷の間を区別することができるのは重要である。これは、イン・ビボ細胞損傷を引き起こすことが知られている治療または療法の有効性を該アッセイが決定しようと試みる場合に、特に明らかである。もし試料の取扱または加工または分析の結果、標的細胞が損傷され、疑われる細胞、断片またはデブリスが形成されれば、該エッセイは意味のある結果を与えない。

【００８４】
アッセイを用いて、フローサイトメトリーによるいずれの豊富化方法もなしに１００μｌの血液中でＣＴＣを直接検出した。１００μｌのアッセイは、ＥｐＣＡＭのみを検出し、感度は非常に低い。しかしながら、高いＣＴＣカウントを持つ幾人かの進展した段階の癌患者は観察不能であると予測される。このアッセイは操作を含まない直接的なアッセイであるのでＣＴＣの信頼のおける見積もりを描くであろう。データは、いくつかの質問に答えるために、該アッセイを用いて幾人かの患者試料で得られた。

【００８５】
１００μｌのアッセイは、サイズおよび染色強度のごとき特性に基づいて細胞をカテゴリー化する。明白なＣＴＣは（白血球と同様に）明るい核酸染色を有し、陽性ＥｐＣＡＭ抗原は染色および白血球と同様のサイズまたはそれ以上を有する。疑われるＣＴＣはＥｐＣＡＭ抗体につき陽性であるいずれかの物体であるが、明白なＣＴＣとして特徴付けられない（すなわち、薄暗い核酸、白血球よりも小さなサイズ）。該アッセイは物体を双方のカテゴリーから同定する。

【００８６】
図５は、１００μｌアッセイによって決定された血液中の明白なおよび疑われるＣＴＣの存在を示す。１００μｌアッセイは直接的アッセイであって、いずれの分離または洗浄工程も含まないので、疑われるＣＴＣは試料処理の間に生じない（イン・ビトロ損傷）。前記データは、明白なＣＴＣおよび疑われるＣＴＣの数の間に相関があることも示す。疑われるＣＴＣの数は、明白なＣＴＣの数が増加するにつれ増加するようである。疑われるＣＴＣ　ｖｓ　明白なＣＴＣの数をプロットすると、２．９２の傾きは、明白なＣＴＣと比較した場合に、試料に存在する疑われるＣＴＣの割合を示す。r^2＝０．０９７の相関係数は、多数の臨床試料につき、明白なＣＴＣおよび疑われるＣＴＣの間の優れた相関を示す。加えて、疑われるＣＴＣはフェロ流体－選択アッセイで見られ、直接的アッセイによって血液中で検出される疑われるＣＴＣと同様な特性を有する。明白なＣＴＣに加えて疑われるＣＴＣを合計腫瘍細胞カウントに含めるのは重要である。
【００８７】
重要な質問は、１００μｌアッセイからのデータをどのようにしてフェロ流体－選択ＣＴＣ（豊富化ＣＴＣ）と比較するかである。フェロ流体アッセイはＣＴＣを定量的に検出するのであろうか？もう１つの質問は、もしフローアッセイデータが正しければ、フェロ流体－選択アッセイにおけるＣＴＣの回収は何であるかである。１００μｌアッセイにおいてＣＴＣの回収を決定する３つの主な因子は：
・ＥｐＣＡＭ密度、
・サイトケラチン陽性、および
・核陽性
である。疑われるＣＴＣは、明白なＣＴＣと比較してより低いＥｐＣＡＭ密度を有し、この重要性は未だよく理解されていない。
【００８８】
７ｍｌの血液を用い、フェロ流体－選択アッセイに対して１００μｌアッセイによって明白なおよび疑われるＣＴＣの比較を行った。このデータは、前立腺患者試料から得られ、フローサイトメトリーによって分析された。明白なおよび疑われるＣＴＣの双方は貯蔵時間と共に増加し、その傾向はフェロ流体－選択アッセイで検出されたＣＴＣと同様であり、それにより、１００μｌアッセイを確証する。フェロ流体－選択アッセイからのＣＴＣの回収は、１００μｌの血液中のＣＴＣに基づいて約９０％であった。また、この患者からのＣＴＣのＭＦＩ（ＥｐＣＡＭ密度に相関する平均蛍光強度）は高く（ＭＦＩ＝３００）、および全てのＥｐＣＡＭ陽性細胞はサイトケラチン陽性であることも知られていた。しかしながら、いくつかの他の臨床試料からのＣＴＣの回収は２０％と低かった。ＥｐＣＡＭ陽性／サイトケラチン陰性細胞、サイトケラチン薄暗細胞、および細胞に結合するフェロ流体の能力を阻害する細胞表面のムチンのごとき、より低い回収に寄与するいくつかの因子があり得る。
【００８９】
本明細書中に記載したアッセイは２つの時点において患者に行った。応答は病巣の二次元イメージングによって測定した。比率（比率＝明白なＣＴＣ／合計ＣＴＣ）は、先に記載した応答指標と同様であり、これは、治療の成功の数字のインジケーターとして用いることができる。結果を表ＩＩＩにまとめる。１．０に近い比率は、合計ＣＴＣが明白なＣＴＣであることを示し、０．０に近い比率はより多い疑われるＣＴＣまたはデブリスを示す。進行は、サイズが増大する病巣を示し、部分的応答は該比率が比較的低い処理に対する応答を示し、安定化は変化無し、または病巣サイズの低下を示す。陽性変化は、病気の進行に対応する無傷ＣＴＣの数の増加を示す。陰性変化は無傷ＣＴＣの数の減少、または疑われるＣＴＣおよび／またはデブリスの数の可能な増加を示し、これは処理に対する応答に対応する。
これらの結果は、処理に対する応答を分析した場合の疑われるＣＴＣおよびデブリスを含める重要性を示す。なぜならば、無傷または明白なＣＴＣ単独の数は多くの情報を与えないだろうからである。さらに、そのようなインジケーターは治療および療法の短期間モニ

タリング、または緩和および／または再発についての長期間モニタリングで有用である。

【００９０】

【表ＩＩＩ】

表ＩＩＩ　治療応答に対応する明白なＣＴＣおよび疑われるＣＴＣ

応答	比率１	比率２	変化
進行	0.3	0.0	-0.3
	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.6	0.1
	0.9	1.0	0.1
	0.3	0.5	0.2
	0.4	0.7	0.3
	0.0	0.4	0.4
	0.5	0.9	0.4
	0.0	0.5	0.5
	0.0	0.6	0.6
部分的応答	1.0	0.0	-1.0
	0.4	0.0	-0.4
	0.3	0.0	-0.3
	0.5	0.2	-0.3
	0.4	0.3	-0.1
	0.0	0.0	0.0
	0.3	1.0	0.7
安定化	1.0	0.0	-1.0
	0.5	0.0	-0.5
	1.0	0.7	-0.3
	0.3	0.0	-0.3
	0.4	0.3	-0.1
	0.1	0.0	-0.1
	0.2	0.1	-0.1
	0.6	0.5	-0.1
	0.9	0.8	-0.1
	0.0	0.0	0.0
	0.6	0.7	0.1
	0.6	0.8	0.2
	0.0	1.0	1.0

【００９１】

腫瘍細胞デブリスの計数は、大きな増殖細胞クラスターの検出よりも癌の診断および治療で重要であることが判明するであろう。おそらくは約１ないし３μｍ（血小板のサイズ）のサイズ範囲であるデブリス粒子は無傷細胞よりも多量で存在することが観察されているので、それらは無傷腫瘍細胞よりも別々の、独立したおよび恐らくより感受性の高いマーカーを構成することができる。損傷したＣＴＣの存在は、免疫系が無傷であって最も活性な場合には、初期段階の癌を検出するにおいて特に重要であろう。同様に、療法の間のデブリスの劇的な増加は、循環および組織腫瘍細胞双方の分解（すなわち、治療効果）を示唆し、腫瘍崩壊の間に観察されたカルシウムのような細胞成分のかなりの放出に平行する。可溶性腫瘍マーカーのように、そのようなデブリスは豊富化無しに、またはバフィーコート層の最小限の豊富化にて、検出可能であり、無傷細胞豊富化／分析よりも別のかつ潜在的により単純な診断ツールを構成する。形態学はＣＴＣデブリスでは失われるので、デブリスがサイトケラチンのごとき適当な決定基につき染色される限り、検出はフローサイトメトリーによってなすことができよう。

【００９２】

前記したごとく、ＤＮＡを伴うまたは伴わない損傷したまたは断片化されたＣＴＣは理論

的に予測され、従って、効果的な療法を受けつつある患者からの検体において、および強力な免疫系を持つ未処理患者からの検体において望ましくない事象ではない。合計検出可能事象に対する無傷ＣＴＣの比率または％は、患者の免疫系または療法に対する応答を評価するにおいて臨床家にとってより有用なパラメーターであることが判明するであろう。正常な免疫防御、特に活性化された好中球もまた、ＣＴＣが好中球よりもたとえ大きくても、「細胞外殺傷」と呼ばれるプロセスによって外来性種としてＣＴＣを損傷、または破壊することができる。免疫系が病気の最終的段階に圧倒するのでなければ、または療法が効果的でないのでなければ、無傷細胞として放出されたＣＴＣの小さなパーセンテイジを見出すに過ぎないのは驚くべきこととは見えない。

【００９３】

よって、イン・ビトロ癌検出：無傷循環細胞／クラスターの決定的な検出、および（全および腫瘍特異的ＲＮＡ／ＤＮＡ、および慣用的可溶性腫瘍マーカーを含めた）循環腫瘍デブリスのような推理方法のための多数の方法がある。しかしながら、それ自体十分な感度の方法はない。ＣＴＣ形態学と比較したデブリス検出のより低い特異性は、（例えば、三重標識で）最小化され得るスクリーニングにおいて問題であるが、それはモニタリングではより問題とはならないであろう。正常と比較した患者における無傷ＣＴＣおよび診断段階に対するデブリスデータについてのさらなる統計学的解析および相関は、デブリス分析の感度および特異性を評価するにおいて価値があるように見える。

【００９４】

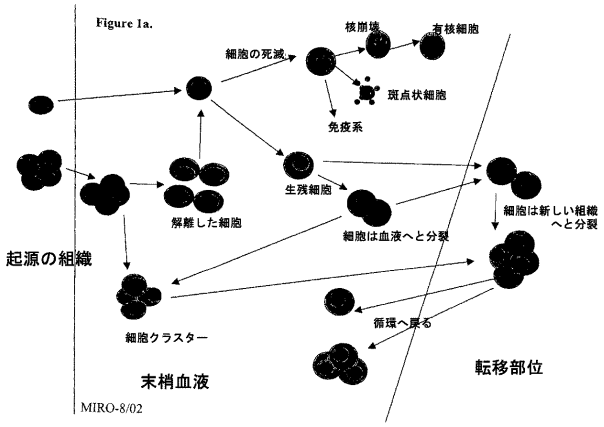
本発明の組成物、方法およびキットを用いて検出できる異なるタイプの癌の例には、APUD系細胞種（apudoma）、分離腫、鰓腫、悪性カルチノイド症候群、カルチノイド心疾患、癌、例えば、ウォーカー癌、基底細胞癌、基底有棘細胞癌、ブラウンーピアス（Brown-Pearce）癌、腺管癌、エールリヒ腫瘍、上皮内癌、クレブス２、メルケル細胞癌、粘液性癌腫、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭状癌、スキルス癌、細気管支癌、気管支原性肺癌、扁平上皮細胞癌および移行細胞細網内皮症、黒色腫、軟骨芽細胞腫、軟骨腫、軟骨肉腫、繊維腫、繊維肉腫、巨細胞腫、組織球腫、脂肪腫、脂肪肉腫、中皮腫、粘液腫、粘液肉腫、骨腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、滑膜腫、腺線維腫、腺リンパ腫、癌肉腫、脊索腫、間葉腫、中腎種、筋肉腫、エナメル上皮腫、セメント質腫、歯牙腫、奇形腫、絨毛腫、腺癌、腺腫、胆管腫、胆脂種、円柱腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、顆粒膜細胞腫、卵巣男性胚腫、肝臓癌、汗腺腫、島細胞腫、ライディッヒ細胞腫、乳頭腫、セルトリ細胞腫、卵胞膜細胞腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、筋原細胞腫、筋腫、筋肉腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、脳室上衣腫、節神経腫、神経膠腫、髄芽細胞腫、髄膜腫、神経鞘腫、神経芽細胞腫、神経症上皮腫、神経繊維腫、神経腫、傍神経節腫、非クロム親和性傍神経節腫、アンチオ角化腫（antiokeratoma）、硬化性血管腫、血管腫症、グロームス血管腫、血管内皮腫、血管腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、松果体腫、癌肉腫、軟骨肉腫、葉状嚢肉腫、繊維肉腫、血管肉腫、平滑筋肉腫、白血肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、筋肉腫、粘液肉腫、卵巣癌、横紋筋肉腫、肉腫（カポジ肉腫および肥満細胞肉腫）、新生物（例えば、骨、消化器系、結腸直腸、肝臓、膵臓、脳下垂体、睾丸、眼窩、頭頸部、中枢神経系、聴覚、骨盤、呼吸管および泌尿生殖器）、神経繊維腫症および子宮頚部形成異常が含まれる。

【００９５】

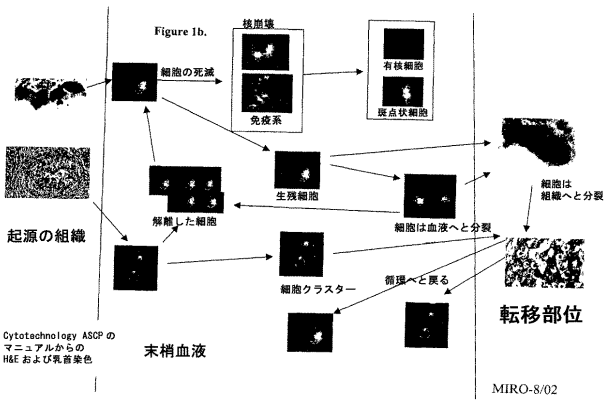
しかしながら、本発明は、循環上皮細胞および／またはクラスター、断片またはデブリスの検出に制限されない。例えば、心筋梗塞を有する患者の血液中で内皮細胞が観察されている。上皮細胞のように、内皮細胞、心筋細胞、ウイルス感染細胞は、利用可能なモノクローナル抗体によって認識される細胞型特異的決定基を有する。従って、本発明の方法およびキットは、そのような循環内皮細胞を検出するのに適用することができる。加えて、本発明は、本発明の組成物、方法およびキットを用いて評価することもできる、感染症を持つ患者の末梢血液における細菌細胞負荷の検出を可能とする。これらの稀な細胞が循環系において同様に挙動し、断片および／またはデブリスが前記したのと同様な条件で存在すると予測するのは合理的であろう。

【００９６】
本明細書中で開示した発明の好ましい具体例は、癌診断に加えた場および適用で本発明を使用できるようにすると考えられる。本発明の改良された診断対応は好ましい具体例のこれまでの記載によって限定されないことは当業者に明らかであろう。最後に、前記で示したある具体例は詳細な記載を提供するが、以下の請求の範囲は該詳細な記載によってその範囲が限定されない。事実、以下の請求の範囲の精神を逸脱することなく種々の修飾をなすことができる。
【図面の簡単な説明】
【００９７】
【図１】図１は、腫瘍放出および転移のモデルを示す。１ａは細胞、クラスターおよび断片の可能な段階を示す。１ｂは試料からの実際のイメージを持つ同一モデルを示す。
【図２】図２は、７．５ｍｌ血液からの免疫磁気的に豊富化された腫瘍細胞のフローサイトメトリー分析を示す。
【図３】図３は腫瘍細胞につき免疫磁気的に豊富化された転移性前立腺癌患者からの７．５ｍｌ血液試料のCellSpotter（登録商標）分析を示す。見本の線は、サイトケラチンＰＥ（緑色）およびＤＡＰＩ（マゼンタ）で染色された腫瘍候補を示す染色プロセスで用いられた種々の色素に対応する。
【図４】図４は、サイトケラチンＰＥ（緑色）およびＤＡＰＩ（マゼンタ）で染色された転移性前立腺癌を持つ患者の単一全血試料から単離された腫瘍細胞のCellSpotter（登録商標）分類を示す。Ａ－無傷細胞、Ｂ－損傷した腫瘍細胞、Ｃ－腫瘍細胞断片
【図５】図５は、２０の臨床試料における疑われるＣＴＣの数に対する明白なＣＴＣの数の比較を示す。
【図６】図６は、全血にスパイクされ、単離され、次いで、サイトケラチンＰＥ（緑色）ＤＡＰＩ（マゼンタ）で染色されたパクリタキセル処理ＬｎＣａＰ細胞のCellSpotter（登録商標）分類を示す。Ａ－無傷細胞、Ｂ－死滅しつつある腫瘍細胞、Ｃ－腫瘍細胞断片

【図１ａ】



【図１ｂ】



【図２】

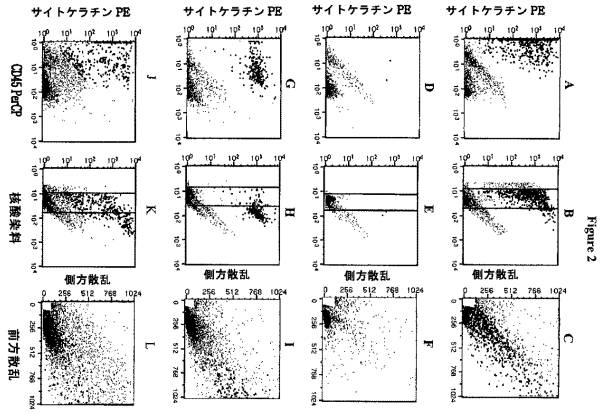
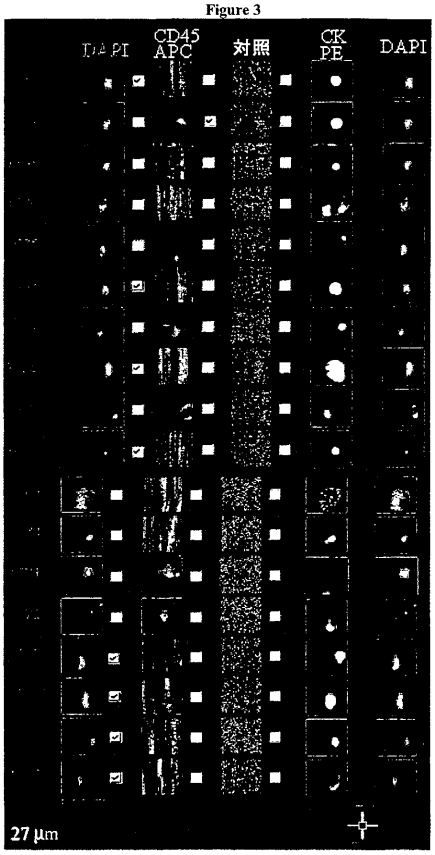


Figure 2

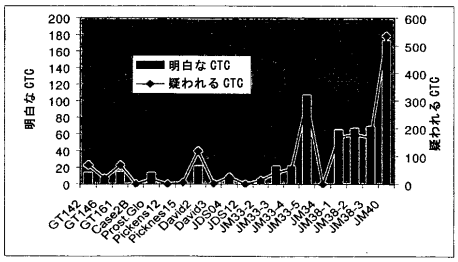
【図３】

Figure 3



【図５】

Figure 5



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/019141 A2

(51) International Patent Classification[7]: G01N

(21) International Application Number: PCT/US02/26861

(22) International Filing Date: 23 August 2002 (23.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/314,151 23 August 2001 (23.08.2001) US
60/369,628 3 April 2002 (03.04.2002) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **IMMUNIVEST CORPORATION** [US/US]; 1105 Market Street, Suite 100, PO Box 8985, Wilmington, DE 19899 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **RAO, Galla, Chandra** [IN/US]; 9 Haverford Road, Princeton Junction, NJ 08550 (US). **LARSON, Christopher** [US/US]; 211 E. 4th St., Media, PA 19063 (US). **REPOLLET, Madeline** [US/US]; 357 Camp Hill Road, Ft. Washington, PA 19034 (US). **RUTNER, Herman** [US/US]; 50 S. Penn St. - Apt #609, Hatboro, PA 19040 (US). **TERSTAPPEN, Leon** [NL/US]; 1354 Old Ford Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US). **O'HARA, Shawn, Mark** [US/US]; 1519 Isaacs Court, Ambler, PA 19002 (US). **GROSS, Steven** [US/US]; 1216 Lincoln Dr. West, Ambler, PA 19002 (US).

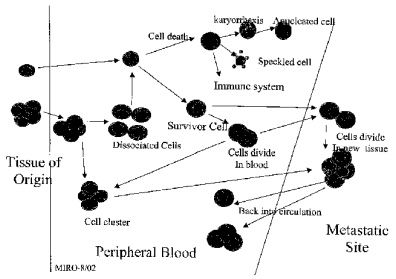
(74) Agents: **MAYES, Jared** et al.; Immunicon Corporation, 3401 Masons Mill Road Suite 100, Huntingdon Valley, PA 19006 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR CELLS, FRAGMENTS, AND DEBRIS



(57) Abstract: The methods and reagents described in this invention are used to analyze circulating tumor cells, clusters, fragments, and debris. Analysis is performed with a number of platforms, including flow cytometry and the CellSpotter® fluorescent microscopy imaging system. Analyzing damaged cells has shown to be important. However, there are two sources of damage: *in vivo* and *in vitro*. Damage *in vivo* occurs by apoptosis, necrosis, or immune response. Damage *in vitro* occurs during sample acquisition, handling, transport, processing, or analysis. It is therefore desirable to confine, reduce, eliminate, or at least qualify *in vitro* damage to prevent it from interfering in analysis. Described herein are methods to diagnose, monitor, and screen disease based on circulating rare cells, including malignancy as determined by CTC, clusters, fragments, and debris. Also provided are kits for assaying biological specimens using these methods.

WO 03/019141 A2

WO 03/019141 A2

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

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

ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR CELLS, FRAGMENTS, AND DEBRIS

Galla Chandra Rao, Christopher Larson, Madeline Repollet, Herman Rutner, Leon Terstappen, Shawn Mark O'Hara, and Steven Gross

PRIORITY INFORMATION

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

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many clinicians believe that cancer is an organ-confined disease in its early stages. However, it appears that this notion is incorrect, and cancer is often a systemic disease by the time it is first detected using methods currently available. There is evidence that primary cancers begin shedding neoplastic cells into the circulation at an early disease stage prior to the appearance of clinical manifestations. Upon vascularization of a tumor, tumor cells shed into the circulation may attach and colonize at distant sites to form metastases. These circulating tumor cells (CTC) contain markers not normally found in healthy individuals' cells, thus forming the basis for diagnosis and treatment of specific carcinomas. Hence, the presence of tumor cells in the circulation can be used to screen for cancer in place of, or in conjunction with, other tests, such as mammography for breast cancer, or measurements of Prostate Specific Antigen (PSA) for prostate cancer. By employing appropriate mononclonal antibodies directed to associated markers on or in target cells, or by using other assays for cell protein expression, or by the analysis of cellular mRNA, the organ origin of such cells may readily be determined, e.g., breast, prostate, colon, lung, ovarian or other non-hematopoietic cancers.

Thus, in cases where cancer cells can be detected, while there are essentially no clinical signs of a tumor, it will be possible to identify their presence as well as the organ of origin. If CTC are detected after surgery, one could stat adjuvant therapy if the CTC are a sign of relapse. Predicting the patient's need for such treatment, or the efficacy thereof, given the costs of such therapies, is a significant and beneficial piece of clinical information. It is also clear that if the number of CTC changes, it may predict progression (CTC increase) or response (CTC decrease).

Malignant tumors are characterized by their ability to invade adjacent tissue. In general, tumors with a diameter of 1mm are vascularized and animal studies show that as

much as 4% of the cells present in the tumor can be shed into the circulation in a 24 hour period (Butler, TP & Gullino PM, 1975 *Cancer Research* 35:512-516). The shedding capacity of a tumor is most likely dependent on the aggressiveness of the tumor. Although tumor cells are shed into the circulation on a continuous basis, it is believed that none or only a small fraction will give rise to distant metastasis (Butler & Gullino, *supra*). Increase in tumor mass might be expected to be proportional to an increase in the frequency of CTC, as single cells, or clusters of cells with increased adhesiveness (and possibly greater invasive potential). If this were found to be the case, methods available with a high level of sensitivity would facilitate assessment of tumor load in patients with distant metastasis as well as those with localized disease. Detection of tumor cells in peripheral blood of patients with localized disease has the potential not only to detect a tumor at an earlier stage but also to provide indications as to the potential invasiveness of the tumor.

However, whole blood is a complex body fluid containing diverse populations of cellular and soluble components capable of undergoing numerous biochemical and enzymatic reactions *in vivo* and *in vitro*, particularly on prolonged storage for more than 24hrs. Some of these reactions are related to immunological destruction of CTC that are recognized as foreign species. The patient's immune response weakens or destroys tumor cells by the normal defense mechanisms including phagocytosis and neutrophil activation. Chemotherapy similarly is intended to reduce both cell function and proliferation by inducing cell death by necrosis. Besides these external destructive factors, tumor cells damaged in a hostile environment may undergo programmed death or apoptosis. Normal and abnormal cells (including CTC) undergoing apoptosis or necrosis, have altered membrane permeabilities that allow escape of DNA, RNA, and other intracellular components leading to formation of damaged cells, fragmented cells, cellular debris, and eventual complete disintegration. Such tumor cell debris may still bear epitopes or determinants characteristic of intact cells and can lead to spurious increases in the number of detected circulating cancer cells. Whole blood specimens from healthy individuals also have been observed to undergo destruction of labile blood cell components, herein categorized as decreased blood quality, on prolonged storage for periods of greater than 24 hours. For example, erythrocytes may rupture and release hemoglobin and produce cell ghosts. Leukocytes, particularly granulocytes, are known to be labile and diminish on storage. Such changes increase the amount of cellular debris that can interfere with the isolation and detection of rare target cells such as CTC. The combined effects of these destructive processes, collectively defined as post-draw or *in vitro* damage, can substantially increase cellular debris, which is readily

detectable, for instance, in flow cytometric and microscopic analyses, such as CellSpotter® or CellTracks™.

Detection of circulating tumor cells by microscopic imaging is similarly adversely affected by spurious decreases in classifiable tumor cells and a corresponding increase in interfering stainable debris. Hence, maintaining the integrity or the quality of the blood specimen is of utmost importance, since there may be a delay of as much as 24 hours between blood draw and specimen processing. Such delays are to be expected, since the techniques and equipment used in processing blood for this assay may not be readily available in every laboratory. The time necessary for a sample to arrive at a laboratory for sample processing may vary considerably. It is therefore important to establish the time window within which a sample can be processed. In routine hematology analyses, blood samples can be analyzed within 24 hours. However, as the analysis of rare blood cells is more critical, the time window in which a blood sample can be analyzed is shorter. An example is immunophenotyping of blood cells, which, in general, must be performed within 24 hours. In a cancer cell assay, larger volumes of blood have to be processed, and *in vitro* degradation of the blood sample can become more problematic as materials released by disintegrating cells, both from CTC and from hematopoietic cells, can increase the background and therefore decrease the ability to detect tumor cells.

The origin and nature of observed small debris and large clump-like aggregates are not fully understood, but are believed to involve cellular components or elements originating from target cells, non-target cells, and possibly plasma components. Since CTC can be considered immunologically foreign species, normal cellular immune responses of the host will occur *in vivo* even before blood draw. Also large numbers of CTC can be continuously shed from a tumor site, and a steady-state level is maintained in which destruction of CTC equals the shedding rate which in turn depends on the size of the tumor burden (see JG Moreno *et al.* "Changes in Circulating Carcinoma Cells in Patients with Metastatic Prostate Cancer Correlates with Disease State." *Urology* **58**. 2001).

Various methods are known in this particular art field for recovering tumor cells from blood. For example, US Patent #6,190,870 to AmCell and Miltenyi teaches immunomagnetic isolation followed by flow cytometric enumeration. However, before immunomagnetic separation, the blood samples are pre-processed using density gradients. Furthermore, there is no discussion of isolating or counting anything other than intact cells. There is also no visual morphological analysis of the samples.

In US Patent #6,197,523, Rimm *et al.* describe enumerating cancer cells in 100μl blood samples. The methods use capillary microscopy to confirm the identity of cells that are found. The methods are specific for intact cells, which must be present in high numbers due to small sample volume. However, there is no discussion of isolating or enumerating anything other else, such as fragments or debris.

In US Patent #6,365,362 to Immunivest, methods are described for immunomagnetically enriching and analyzing samples for tumor cells in blood. The methods are specifically directed towards analyzing intact cells, where the number of cells correlates with the disease state. The isolated cells are labeled for the presence of nucleic acid and an additional marker, which allows the exclusion of non-target sample components during analysis.

In WO02/20825, Chen describes the use of an adhesion matrix for enumerating tumor cells. Briefly, the matrix is coated with specific adhesion molecules that will bind viable cancer cells with presumed metastatic potential. The matrix can then be analyzed for the presence and type of captured cells. Also described are methods for using the matrix in screening treatments. While steps are taken to discriminate between intact cells and apoptotic or necrotic cells, the apoptotic or necrotic cells are specifically excluded from analysis.

In WO00/47998 from Cell Works, two pathways are described for CTC, terminal and proliferative. Both pathways begin with an "indeterminate" cell that progresses, as determined by morphological differences, down either the terminal or proliferative pathway. A cell in the terminal pathway eventually is destroyed, and a cell in the proliferative pathway will form a new metastatic colony as a metastatic tumor. This proliferative pathway (cells and clusters) is the focus as a potential diagnostic, but minimizes the significance of cell fragments or debris. These two pathways were designed to explain morphological differences seen in patient samples.

Generally, the more resistant and proliferative cells survive to establish secondary or metastatic sites. In the peripheral circulation, CTC are further attacked *in vivo* (and also *in vitro*) by activated neutrophils and macrophages resulting progressively in membrane perforation, leakage of electrolytes, smaller molecules, and eventual loss of critical cellular elements including DNA, chromatin, etc, which are essential for cell viability. At a critical point of the cell's demise, cell destruction is further assisted by apoptosis. Apoptosis is characterized by a series of stepwise slow intracellular events, which differs from necrosis or rapid cell death triggered or mediated by an extracellular species, e.g. a cytotoxic anti-tumor

drug. All or some of these destructive processes may lead to formation of debris and/or aggregates including stainable DNA, DNA fragments and "DNA ladder" structures from disintegrating CTC as well as from inadvertent destruction of normal hematopoietic cells during drug therapy, since most cytotoxic drugs are administered at near toxic doses.

As shown in WO00/47998, US #6,190,870, and other publications, CTC can circulate as both live and dead cells, wherein "dead" comprises the full range of damaged and fragmented cells as well as CTC-derived debris. The tumor burden is probably best represented by the total of both intact CTC, including clusters, and damaged CTC, which bear morphological characteristics of cells, but are distinct from clumps and/or aggregates. However, some damaged cells, may have large pores allowing leakage of the liquid and particulate cytosolic contents resulting in a change in the buoyant densities from about 1.06-1.08 to greater than 1.12, or well above the densities of RBC (live and dead cells can be separated at the interface of gradients of d=1.12 and 1.16 according to a Pharmacia protocol). Conventional density gradients, as used in # WO00/47998 would lose such damaged CTC in the discarded RBC layer having a range in density of about 1.08 to 1.11. CTC debris that is positively stained for cytokeratin may also have densities falling in the RBC or higher ranges, since most intracellular components (with the possible exception of lipophilic membrane fragments that may be located near the plasma-buffy coat interface) have densities in the range of 1.15 to 1.3. Hence, a substantial portion of damaged CTC and CTC debris may be located outside the buffy coat layer, and would not be seen by the density gradient methods, such as those in WO00/47998. Some images of damaged or fragmented CTC are shown, but it is quite possible the damage occurred during cytospin or subsequent processing, and is thus artifactual. While the densities of most intact tumor cells may fall in the WBC region, it is quite likely that damaged CTC in patient samples have higher densities that may place them in the RBC layer; outside the reach of gradient techniques.

US Patent Application #2001/0024802 describes methods for binding fragments and debris to beads. That published application described numerous possibilities for the density of fragments and debris of interest. Upon centrifugation, the beads will be located in a layer above RBC, because of the pre-determined specific gravity (density) of the beads coupled to fragments and/or debris. However, this system is dependent on correctly binding fragments and debris to these beads. If any other sample component binds the beads, they may not appear in the desired location, and subsequently will not be subject to analysis.

Epithelial cells in their tissue of origin obey established growth and development "rules". Those rules include population control. This means that under normal circumstances

the number and size of the cells remains constant and changes only when necessary for normal growth and development of the organism. Only the basal cells of the epithelium or immortal cells will divide and they will do so when it is necessary for the epithelium to perform its function, whatever it is depending in the nature and location of the epithelium. Under some abnormal but benign circumstances, cells will proliferate and the basal layer will divide more than usual, causing hyperplasia. Under some other abnormal but benign circumstances, cells may increase in size beyond what is normal for the particular tissue, causing cell gigantism, as in folic acid deficiency.

Epithelial tissue may increase in size or number of cells also due to pre-malignant or malignant lesions. In these cases, changes similar to those described above are accompanied by nuclear abnormalities ranging from mild in low-grade intraepithelial lesions to severe in malignancies. It is believed that changes in these cells may affect portions of the thickness of the epithelium and as they increase in severity will comprise a thicker portion of such epithelium. These cells do not obey restrictions of contact inhibition and continue growing without tissue controls. When the entire thickness of the epithelium is affected by malignant changes, the condition is recognized as a carcinoma *in situ* (CIS).

The malignant cells eventually are able to pass through the basement membrane and invade the stroma of the organ as their malignant potential increases. After invading the stroma, these cells are believed to have the potential for reaching the blood vessels. Once they infiltrate the blood vessels, cells find themselves in a completely different environment from the one they originated from.

The cells may infiltrate the blood vessels as single cells or as clusters of two or more cells. A single cell of epithelial origin circulating through the circulatory system is destined to have one of two outcomes. It may die or it may survive.

Single Cells:

1. The cell may die either through apoptosis due to internal changes or messages in the cell itself. These messages may have been in the cell before intravasation or they may be received while in the blood, or it may die due to the influence of the immune system of the host, which may recognize these cells as "alien" to this environment. The results of cellular death are identifiable in CellSpotter® as enucleated cells, speckled cells or amorphous cells. These cells do not have the potential for cell division or for establishing colonies or metastases.

- Enucleated cells are the result of nuclear disintegration and elimination (karyorrhexis and karyolysis). They are positive for cytokeratin, and negative for nucleic acid.
- The speckled cells are positive for cytokeratin and DAPI and show evidence of cellular degeneration and cytoplasmic disintegration. These cells may represent response to therapy or to the host's immune system as the cytoskeletal proteins retract.
- Another dying tumor cell identifiable using CellSpotter® is the amorphous cell. These cells are probably damaged during the preparation process, a sign that these may be weaker, more delicate cells but may also be the result of apoptosis or immune attack.

2. A viable malignant epithelial cell may have the potential to survive the circulation and form colonies in distant organs. These "survivor cells" appear in CellSpotter® as intact cells with high nuclear material/cytoplasmic material ratio. These cells are probably undifferentiated and can potentially divide in blood and form small clusters that may extravasate in a distant capillary, where the cell may establish a new colony, or it may remain as a single cell until it extravasates, dividing once it establishes itself in the new tissue, starting this way a new colony.

Clusters: The primary tumor may shed clusters that enter the circulation as described by B Brandt *et al.* ("Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood." *Cancer Research* **56** p4556-4561. 1996). These clusters may remain as clusters and invade a distant tissue or they may become dissociated in the circulation, probably due to differences in pressure in blood or to the immune system's intervention. If these cells are dissociated into single cells, they may follow one of the two paths described for single cells above (see 1 and 2). Cluster formations may have an effect in survival by using the outside cells as a shield that protects the inner cells from the immune system.

Once a new colony is established in a new organ, some malignant cells will continue replicating to form a new tumor. If they reach new capillaries, the metastasis story may be repeated and secondary metastasis occurs.

Monitoring of treatment in patients with known carcinomas: A decrease in the number of tumor cells and/ or increase in the response index may represent a response to patient therapy.

- Total tumor cells = Dying cells + Survivor cells (TTC = DC + SC)
- Response Index = dying cells / total tumor cells (RI= DC / TTC).

The higher the response index, the better the response to therapy. A low response index may indicate that the patient is not responding to the treatment and or that the pt's immune system is not able to handle the tumor load.

A patient who has 50 total tumor cells that were all survivor cells at pre-treatment visit (a RI = 0/50 = 0) and has 50 TTC on follow-up (after treatment) visit may have different outcomes depending in the RI. If all the TTC are SC (i.e. DC = 0), there was no response to therapy. If there are 50 cells but the response index is 40/50 = 0.8, then either the immune system or the therapy is having a negative effect on tumor load, therefore, is a positive patient response.

Decisions in follow-up on patients with known pre-malignancies: When a pap smear is diagnosed as having cells with atypia or low-grade intraepithelial lesions, there is always the possibility that these patients have a more severe abnormality, which cells were missed as a sampling error. These patients can be colposcoped and biopsied or they may be asked to return in three months for a repeat pap smear. If the atypical cells were concurrent with a small focal area of malignant cells that did not get sampled, the patient will wait 3 months before she gets any follow-up. This may explain why some pre-malignancies seem to progress quicker than others (misdiagnoses due to sampling error, causing an artifact in statistics). These are usually explained as being a more "aggressive" pre-malignancy. CellSpotter® can be used to help in the decision tree of these patients. All patients with an abnormal pap (5-10% of the pap smears in the USA) can immediately be tested for circulating epithelial cells. Patients with positive tests should be followed-up immediately and aggressively. Patients with negative results may wait the three months for the repeat pap. This would simplify the decision making process for the physician and health professionals and help the patient trust her follow-up procedure.

Screening: CellSpotter® image analysis may be used for screening of the general population with the condition that special, tissue specific antibodies would be used on a second test on all abnormal samples. Identification of CTC in a patient may indicate that there is a primary malignancy that has started or is starting the process of metastasis. If these cells are identified as of the tissue of origin with new markers, then organ specific tests, like CT guided fine needle aspirations (FNA) can be used to verify the presence or absence of such malignancies. Patients where a primary cannot be identified may be followed-up with repeat tests after establishing an individual base line.

In summary, all or some of the above-cited factors can and were found to contribute to debris and/or aggregate formation that have been observed to confound the detection of CTC by direct enrichment procedures from whole blood as disclosed in this invention. The number of intact CTC, damaged or Suspect CTC as well as the degree of damage to the CTC, may further serve as diagnostically important indicators of the tumor burden, the proliferative potential of the tumor cells and/or the effectiveness of therapy. In contrast, the methods and protocols of the prior art combine unavoidable *in vivo* damage to CTC with avoidable *in vitro* storage and processing damage, thus yielding erroneous information on CTC and tumor burdens in cancer patients. Finally, the relatively simple blood test of the present invention described herein, which functions with a high degree of sensitivity and specificity, can be thought of as a "whole body biopsy."

BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION

The methods and reagents described in this invention are used to analyze circulating tumor cells, clusters, fragments, and debris. Analysis is performed with a number of platforms, including flow cytometry and the CellSpotter® fluorescent microscopy imaging system. The Examples show the importance of not only analyzing Obvious or Intact CTC, but Suspect CTC or damaged fragments, clusters of CTC, and debris. It is possible to mimic the damage that forms fragments and debris. It is also possible to inhibit further damage of CTC between the blood draw and sample processing through the use of stabilizing agents.

It has been shown herein that the ability to differentiate between *in vitro* damage, caused by specimen acquisition, transport, storage, processing, or analysis, and *in vivo* damage, caused by apoptosis, necrosis, or the patient's immune system. Indeed, it is desirable to confine, reduce, eliminate, or at least qualify *in vitro* damage to prevent it from interfering in analysis.

Herein are described methods to diagnose, monitor, and screen disease based on circulating rare cells, including malignancy as determined by CTC, clusters, fragments, and debris. Also provided are kits for assaying biological specimens using these methods.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 – Models of tumor shedding and metastasis. 1a. shows possible stages of cells, clusters, and fragments. 1b. shows the same model with actual images from samples.
Figure 2 – Flow cytometric analysis of immunomagnetically enriched tumor cells from 7.5ml blood.

Figure 3 – CellSpotter® analysis of a 7.5ml blood sample from a metastatic prostate cancer patient that was immunomagnetically enriched for tumor cells. The lines of thumbnails correspond to the different dyes used in the staining process showing tumor candidates stained with cytokeratin PE (green) and DAPI (magenta).

Figure 4 – CellSpotter® classifications of tumor cells isolated from a single whole blood sample of a patient with metastatic prostate cancer stained with cytokeratin PE (green) and DAPI (magenta).

A – intact cells

B – damaged tumor cells

C – tumor cell fragments

Figure 5 – A comparison of the number of Obvious CTC to Suspect CTC in 20 clinical samples.

Figure 6 – CellSpotter® classifications of paclitaxel treated LnCaP cells spiked into whole blood and isolated then stained with cytokeratin PE (green) and DAPI (magenta).

A – intact cells

B - dying tumor cells

C - tumor cell fragments

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

The evidence that minimal residual disease in patients with carcinoma has clinical significance is mounting. To effectively monitor minimal residual disease, a qualitative and quantitative assessment is needed. As the frequency of carcinoma cells in blood or bone marrow is low, the laborious manual sample preparation methods involved in the preparation of samples for analysis often leads to erroneous results. To overcome these limitations a semi-automated sample preparation system was developed that minimize variability and provide more consistent results, as described in commonly-owned pending US Application No. 10/081,996, filed 20 February 2002, which is incorporated by reference herein.

Various methods are available for analyzing or separating the above-mentioned target substances based upon complex formation between the substance of interest and another substance to which the target substance specifically binds. Separation of complexes from unbound material may be accomplished gravitationally, e.g. by settling, or, by centrifugation

of finely divided particles or beads coupled to the target substance. Such particles or beads may be made magnetic to facilitate the bound/free separation step. Magnetic particles are well known in the art, as is their use in immune and other bio-specific affinity reactions. Generally, any material that facilitates magnetic or gravitational separation may be employed for this purpose. However, it has become clear that magnetic separation means are the method of choice.

Magnetic particles can be classified on the basis of size; large (1.5 to about 50 microns), small (0.7-1.5 microns), or colloidal (<200nm), which are also referred to as nanoparticles. Nanoparticles, also known as ferrofluids or ferrofluid-like materials, have many of the properties of classical ferrofluids, and are sometimes referred to herein as colloidal, superparamagnetic particles.

Small magnetic particles of the type described above are quite useful in analyses involving bio-specific affinity reactions, as they are conveniently coated with biofunctional polymers (e.g., proteins), provide very high surface areas and give reasonable reaction kinetics. Magnetic particles ranging from 0.7-1.5 microns have been described in the patent literature, including, by way of example, US Patent Nos. 3,970,518; 4,018,886; 4,230,685; 4,267,234; 4,452,773; 4,554,088; and 4,659,678. Certain of these particles are disclosed to be useful solid supports for immunological reagents.

The efficiency with which magnetic separations can be done and the recovery and purity of magnetically labeled cells will depend on many factors. These include:

- number of cells being separated,
- receptor or epitope density of such cells,
- magnetic load per cell,
- non-specific binding (NSB) of the magnetic material,
- carry-over of entrapped non-target cells,
- technique employed,
- nature of the vessel,
- nature of the vessel surface,
- viscosity of the medium, and
- magnetic separation device employed.

If the level of non-specific binding of a system is substantially constant, as is usually the case, then as the target population decreases so will the purity.

Less obvious is the fact that the smaller the population of a targeted cell, the more difficult it will be to magnetically label and to recover. Furthermore, labeling and recovery will markedly depend on the nature of magnetic particle employed. For example, when cells are incubated with large magnetic particles, such as Dynal beads, cells are labeled through collisions created by mixing of the system, as the beads are too large to diffuse effectively. Thus, if a cell were present in a population at a frequency of 1 cell per ml of blood or even less, as may be the case for tumor cells in very early cancers, then the probability of labeling target cells will be related to the number of magnetic particles added to the system and the length of time of mixing. Since mixing of cells with such particles for substantial periods of time would be deleterious, it becomes necessary to increase particle concentration as much as possible. There is, however, a limit to the quantity of magnetic particles that can be added, as one can substitute a rare cell mixed in with other blood cells for a rare cell mixed in with large quantities of magnetic particles upon separation. The latter condition does not markedly improve the ability to enumerate the cells of interest or to examine them.

The preferred magnetic particles for use in carrying out this invention are particles that behave as colloids. Such particles are characterized by their sub-micron particle size, which is generally less than about 200nm, and their stability to gravitational separation from solution for extended periods of time. In addition to the many other advantages, this size range makes individual particles essentially invisible to analytical techniques commonly applied to cell analysis. Particles within the range of 90-150nm and having between 70-90% magnetic mass are contemplated for use in the present invention. Suitable magnetic particles are composed of a crystalline core of superparamagnetic material surrounded by molecules which are bonded, e.g., physically absorbed or covalently attached, to the magnetic core and which confer stabilizing colloidal properties. The coating material should preferably be applied in an amount effective to prevent non-specific interactions between biological macromolecules found in the sample and the magnetic cores. Such biological macromolecules may include carbohydrates such as sialic acid residues on the surface of non-target cells, lectins, glycproteins, and other membrane components. In addition, the material should contain as much magnetic mass per nanoparticle as possible. The size of the magnetic crystals comprising the core is sufficiently small that they do not contain a complete magnetic domain. The size of the nanoparticles is sufficiently small such that their Brownian energy exceeds their magnetic moment. As a consequence, North Pole, South Pole alignment and subsequent mutual attraction/repulsion of these colloidal magnetic particles does not appear to occur even in moderately strong magnetic fields, contributing to their solution stability.

Finally, the magnetic particles should be separable in high magnetic gradient external field separators. That characteristic facilitates sample handling and provides economic advantages over the more complicated internal gradient columns loaded with ferromagnetic beads or steel wool. Magnetic particles having the above-described properties can be prepared by modification of base materials described in U.S. Patents #4,795,698, #5,597,531, and #5,698,27, each incorporated by reference herein.

An improved method for making particles is described in U.S. Patent #5,698,271. These materials are an improvement over those disclosed in the '531 patent in that the process includes a high temperature coating step which markedly increases the level of coating. Nanoparticles made with bovine serum albumin (BSA) coating using this process, for example, have a 3-5-fold lower non-specific binding characteristic for cells when compared to the DC-BSA materials of '531. This decrease in non-specific binding has been shown to be directly due to the increased level of BSA coating material. When such nanoparticles were treated so as to remove BSA coating, non-specific binding returns to high levels. It was thus determined that a direct relationship exists between the amount of BSA coated on iron oxide crystal surfaces and the nonspecific binding of cells. Typically, the non-specific binding of cells from whole blood with these particles was 0.3%, which is significantly better than those, produced from '531. Thus, from 10ml of whole blood there would be about 200,000 non-target cells that would also be isolated with the cells targeted for enrichment.

Since small nanoparticles (30-70nm) will diffuse more readily they will preferentially label cells compared with their larger counterparts. When very high gradients are used, such as in internal gradient columns, the performance of these materials, regardless of size, makes little difference. On the other hand, when using external gradients, or gradients of lesser magnitude than can be generated on microbead or steel wool columns, the occupancy of small nanoparticles on cells has a significant effect. This was conclusively shown to be the case by fractionating DC nanoparticles and studying the effects on recovery. Based on these studies and other optimization experiments, means for fractionating nanoparticles magnetically or on columns was established where base coated magnetic particles could be prepared that were devoid of excessively small or large nanoparticles. For example, base coated particles of mean diameter 100nm can be produced which contain at best trace amounts of material smaller than 80nm or over 130nm. Similarly material of about 120nm can be made with no appreciable material smaller than 90-95nm and over 160nm. Such materials performed optimally with regard to recovery and could be made sub-optimal by the

inclusion of 60-70nm nanoparticles. The preferred particle size range for use in practicing this invention is 90-150nm for base coated magnetic particles, e.g., BSA-coated magnetite.

Based on the foregoing, high gradient magnetic separation with an external field device employing highly magnetic, low non-specific binding, colloidal magnetic particles is the method of choice for separating a cell subset of interest from a mixed population of eukaryotic cells, particularly if the subset of interest comprises but a small fraction of the entire population. Such materials, because of their diffusive properties, readily find and magnetically label rare events, such as tumor cells in blood. For magnetic separations for tumor cell analysis to be successful, the magnetic particles must be specific for epitopes that are not present on hematopoeitic cells.

A large variety of analytical methods and criteria are used to identify tumor cells, and the first attempts are being undertaken to standardize criteria that define what constitutes a tumor cell by immunocytochemistry. In this study, blood samples from prostate cancer patients were immunomagnetically enriched for cells that expressed EpCAM. Tumor cells were identified by the expression of the cytoskeletal proteins cytokeratin (CK+), the absence of the common leukocyte antigen CD45 (CD45-) and the presence of nucleic acids (NA+) by multicolor fluorescence analysis. Rare events or rare cells can be immunophenotyped by both flowcytometry and fluorescence microscopy. Flowcytometric analysis excels in its ability to reproducibly quantify even low levels of fluorescence whereas microscopy has the better specificity as morphological features can aid in the classification of the immunophenotypically identified objects. Although there was a correlation between the number of CTC detected in blood of prostate cancer patients by flowcytometry and microscopy, microscopic examination of the CK+, CD45-, NA+ objects showed that only few of the objects appeared as intact cells. This observation agrees with other reports that showed apoptosis in a substantial portion of circulating tumor cells.

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

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

The term "determinant", when used in reference to any of the foregoing target bioentities, refers broadly to chemical mosaics present on macromolecular antigens that often induce an immune response. Determinants may also be used interchangeably with "epitopes". A "biospecific ligand" or a "biospecific reagent," used interchangeably herein, may specifically bind determinants. A determinant refers to that portion of the target bioentity involved in, and responsible for, selective binding to a specific binding substance (such as a ligand or reagent), the presence of which is required for selective binding to occur. In fundamental terms, determinants are molecular contact regions on target bioentities that are recognized by agents, ligands and/or reagents having binding affinity therefor, in specific binding pair reactions.

The term "specific binding pair" as used herein includes antigen-antibody, receptor-hormone, receptor-ligand, agonist-antagonist, lectin-carbohydrate, nucleic acid (RNA or DNA) hybridizing sequences, Fc receptor or mouse IgG-protein A, avidin-biotin, streptavidin-biotin and virus-receptor interactions.

The term "detectably label" is used to herein to refer to any substance whose detection or measurement, either directly or indirectly, by physical or chemical means, is indicative of the presence of the target bioentity in the test sample. Representative examples of useful detectable labels, include, but are not limited to the following: molecules or ions directly or indirectly detectable based on light absorbance, fluorescence, reflectance, light scatter, phosphorescence, or luminescence properties; molecules or ions detectable by their radioactive properties; molecules or ions detectable by their nuclear magnetic resonance or paramagnetic properties. Included among the group of molecules indirectly detectable based on light absorbance or fluorescence, for example, are various enzymes which cause appropriate substrates to convert (e.g., from non-light absorbing to light absorbing molecules, or from non-fluorescent to fluorescent molecules). Analysis can be performed using any of a number of commonly used platforms, including multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, CellSpotter® analysis, CellTracks™ analysis, and automated cell analysis.

The phrase "to the substantial exclusion of" refers to the specificity of the binding reaction between the biospecific ligand or biospecific reagent and its corresponding target determinant. Biospecific ligands and reagents have specific binding activity for their target determinant yet may also exhibit a low level of non-specific binding to other sample components.

The phrase "early stage cancer" is used interchangeably herein with "Stage I" or "Stage II" cancer and refers to those cancers that have been clinically determined to be organ-confined. Also included are tumors too small to be detected by conventional methods such as mammography for breast cancer patients, or X-rays for lung cancer patients. While mammography can detect tumors having approximately 2 x 10^8 cells, the methods of the present invention should enable detection of circulating cancer cells from tumors approximating this size or smaller.

The term "enrichment" as used herein refers to the process of substantially increasing the ratio of target bioentities (e.g., tumor cells) to non-target materials in the processed analytical sample compared to the ratio in the original biological sample. In cases where peripheral blood is used as the starting materials, red cells are not counted when assessing the extent of enrichment. Using the method of the present invention, circulating epithelial cells may be enriched relative to leucocytes to the extent of at least 2,500 fold, more preferably 5,000 fold and most preferably 10,000 fold.

The terms "anti-coagulant" or "anti-coagulating agent" may be used interchangeably, and refer to compositions that are added to biological specimens for the purpose of inhibiting any undesired natural or artificial coagulation. An example of coagulation is blood clotting and common anti-coagulants are chelating agents, exemplified by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), 1,2-diaminocyclohexane tetraacetic acid (DCTA), ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (EGTA), or by complexing agents, such as heparin, and heparin species, such as heparin sulfate and low-molecular weight heparins. This may be further collectively defined as "clumping' or "clump formation". However, such clumps must be differentiated from "clusters" or aggregates of CTC that are counted as a single Intact CTC if they meet the classification criteria for Intact CTC.

Clusters of CTC are believed to have greater proliferative potential than single CTC and their presence is thus diagnostically highly significant. One possible cause for an increased propensity to establish secondary metastatic tumor sites may be the virtue of their adhesiveness. An even more likely cause is the actual size of a CTC cluster; larger clusters

will become lodged in small diameter capillaries or pores in bone. Once there, the viability of the cells in the cluster would determine the chance of survivability at the new metastatic site.

The ideal "stabilizer" or "preservative" (herein used interchangeably) is defined as a composition capable of preserving target cells of interest present in a biological specimen, while minimizing the formation of interfering aggregates and cellular debris in the biological specimen, which in any way can impede the isolation, detection, and enumeration of targets cells, and their differentiation from non-target cells. In other words, when combined with an anti-coagulating agent, a stabilizing agent should not counteract the anti-coagulating agent's performance. Conversely, the anti-coagulating agent should not interfere with the performance of the stabilizing agent. Additionally, the disclosed stabilizers also serve a third function of fixing, and thereby stabilizing, permeabilized cells, wherein the expressions "permeabilized" or "permeabilization" and "fixing", "fixed" or "fixation" are used as conventionally defined in cell biology. The description of stabilizing agents herein implies using these agents at appropriate concentrations or amounts, which would be readily apparent to one skilled in cell biology, where the concentration or amount is effective to stabilize the target cells without causing damage. One using the compositions, methods, and apparatus of this invention for the purpose of preserving rare cells would obviously not use them in ways to damage or destroy these same rare cells, and would therefore inherently select appropriate concentrations or amounts. For example, the formaldehyde donor imidazolidinyl urea has been found to be effective at a preferred concentration of 0.1-10%, more preferably at 0.5-5% and most preferably at about 1-3% of the volume of said specimen. An additional agent, such as polyethylene glycol has also been found to be effective, when added at a preferred concentration of about 0.1% to about 5%, more preferably about 0.1% to about 1%, and most preferably about 0.1% to about 0.5% of the specimen volume.

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

Stabilizing agents are necessary to discriminate between *in vivo* tumor cell disintegration and disintegration due to *in vitro* sample degradation. Therefore, stabilizing agent compositions, as well as methods and apparatus for their use, are described in a co-

pending application entitled "Stabilization of cells and biological specimens for analysis." That commonly owned application is incorporated by reference herein.

The terms "Obvious cells" or "intact cells" may be used interchangeably, and refer to cells found during imaging analysis that contain nucleic acid and cytokeratin. These cells are usually visually round or oval, but may sometimes be polygonal or elongated, and appear as individual cells or clusters of cells. The nucleic acid area (i.e. labeled by nucleic acid dye) is smaller than the cytoplasmic area (i.e. labeled by anti-cytokeratin), and is surrounded by the cytoplasmic area.

The terms "suspicious cells", "Suspect cells", or "fragments" may be used interchangeably, and refer to cells found during imaging analysis that resemble intact cells, but are not as visually distinct as intact cells. Based on imaging analysis, there are a number of possible types of Suspect cells, including:

1. Enucleated cells, which are shaped like Obvious cells, are positively stained for cytokeratin, but negative for nucleic acid;
2. Speckled or punctate cells, which are positively stained for nucleic acid, but have irregularly-stained cytokeratin; and
3. Amorphic cells, which stain positively for cytokeratin and nucleic acid, but are irregular in shape, or unusually large.

These suspicious cells are of interest in this invention because they may give additional information to the nature of the CTC, as well as the patient's disease. It is possible that staining or image artifacts may be observed during analysis. For example, enucleated cells sometimes appear to have a "ghost" region where the nucleus should have stained, but the corresponding region is nucleic acid negative. This may be caused by a number of external factors, including the labeling or imaging techniques. Also, cells have been observed with "detached" nuclei. While this may possibly indicate a cell releasing its nucleus, it is more likely that this appears due to an artifact of the imaging system. However, such "artifacts," when real, give valuable information about what may be happening to the intact cells. Therefore, as part of this invention, suspicious cells will be more closely analyzed.

Cell fragments are different than "debris" in that debris does not necessarily resemble a cell. The term debris as used herein, refers to unclassified objects that are specifically or non-specifically labeled during processing, and are visible as images during analysis, but are distinct from intact and/or Suspect cells. For example, it has been observed that damaged cells will release nuclear material. During processing, this nuclear material may be non-specifically magnetically labeled, and subsequently labeled with the nucleic acid stain.

During analysis, the magnetically labeled and stained nuclear material can be observed when it has cytokeratin still attached. There are other objects that are similarly magnetically selected and stained which appear during analysis that are classified as debris.

The term "morphological analysis" as used herein, refers to visually observable characteristics for an object, such as size, shape, or the presence/absence of certain features. In order to visualize morphological features, an object is typically non-specifically stained. The term "epitopical analysis" as used herein, refers to observations made on objects that have been labeled for certain epitopes. In order to visualize epitopic features, an object is typically specifically stained or labeled. Morphological analysis may be combined with epitopical analysis to provide a more complete analysis of an object.

The importance of further visual observation is apparent when fragments and debris are often classified as "Not Assigned Events," or "Unassigned events." These terms arise from non-visual analysis, such as with flow cytometry. Because flow cytometry does not image objects, any event not falling in the specified populations that meet the criteria for the target cells, or the non-target cells (as is the case when non-specifically carried over WBC are negatively labeled), will fall outside either of these populations. However, as will be apparent throughout this specification, these unassigned events are important.

Figure 1 is a model of various CTC stages, including shedding and metastasis. Figure 1a. shows these stages for cells, clusters, fragments, and debris. Figure 1b. shows actual images from samples at these same stages. The images of cells clusters, fragments, and debris were taken from CellSpotter® analyses of patient samples. The images of tissue samples (Origin and Metastatic sites) were taken from elsewhere (Manual of Cytology, American Society of Clinical Pathologists Press. 1983).

Briefly, a single cell shed from a primary tumor into the blood either survives or dies in blood. If it survives, it may possibly divide in blood, or colonize at a secondary site. If the cell dies, depending on the method, the cell degrades into various types of fragments or debris. Another possibility is a cluster of cells is shed from a primary tumor into the blood, where it may dissociate into single cells, or remain intact, and colonize at a secondary site. If the cluster dissociates, it can behave similar to the single cell described above. If the cluster remains intact, it is more likely to for a secondary colony for the reasons described above, which includes the large diameter cluster becoming lodged in a small diameter capillary. Once lodged, if the cells are viable, the cluster would form a new tumor.

The presence of fragments and debris with very few intact cells suggests that there will be little chance of metastasis. Fragmented cells will not divide, and cannot form

secondary tumors. Indeed, only intact CTC or possibly CTC clusters would be capable of colonizing secondary sites. Identification of antigens that play a role in the adhesion and penetration process may help. Follow up and assessment of metastatic sites of the patients with and without clusters will also provide further insight. Nuclear morphology is used to determine the activity status and abnormality of a cell. Chromatin clumping, the presence or absence of nucleoli, and hyperchromasia, are criteria used to determine whether a cell is benign or malignant, reacting to a immune response, or reacting to treatment. The cytoplasmic morphology is used to determine the level of differentiation (i.e. tissue of origin). For example, cytomplasmic morphology can classify cells as squamous versus glandular.

During blood draw and subsequent specimen processing, the surviving battered tumor cells present in the peripheral circulation may be further stressed and damaged by turbulence during blood draw into an evacuated tube and by specimen processing, e.g. transport of the blood tube and mixing prior to analysis. Such mechanical damage is additional to on-going immunological, apoptotic, and necrotic processes leading to destruction of CTC that occur *in vitro* in a time dependent manner. We have found that the longer the specimen is stored, the greater the loss of CTC, and the larger the amounts of interfering debris and/or aggregates. Indeed, data presented in this specification (Figures 2 and 3) show dramatic declines in CTC counts in several blood specimens stored at room temperature for 24hrs or longer, indicating substantial *in vitro* destruction of CTC after blood draw. While the losses of hematopoietic cells are well known phenomena and the subject of above-cited patents by Streck Labs and by others, the occurrence of mechanical damage due to mixing or transport have to date not been recognized factors in the loss of CTC or rare cells. The formation of cellular debris and the interfering effects of accumulating debris and/or aggregates in the analysis of CTC or other rare cells have similarly been unrecognized to date. It appears to be most evident and problematic in highly sensitive enrichment assays requiring processing of relatively large blood volumes (5-50mL), and subsequent microscopic detection or imaging of target cells after volume reduction (less than 1mL). Such debris are either not normally seen, or do not interfere in conventional non-enrichment assays, for example, by flow cytometry or in enrichment by density gradients methods.

To explore if these damaged epithelial cells and epithelial cell fragments observed in patients could be caused by apoptosis of tumor cells induced by chemotherapy, a model to mimic tumor cell death was developed. Cells of the prostate cell line LnCaP were cultured with or without paclitaxel and spiked into blood of healthy donors. The immunomagnetically selected cells of the paclitaxel treated samples analyzed by CellSpotter® resembled those

observed in the patient blood samples. Cells treated with paclitaxel displayed signs of apoptosis. The punctate cytokeratin staining pattern of the cells appear to correspond with a collapse of the cytoskeletal proteins (Figure 4B vs. 6B). The initiating event in the sequence resulting from the microtubule stabilizing effects of paclitaxel which in turn may activate the pro-apoptotic gene Bim that senses cytoskeletal distress. Further evidence of caspase-cleaved cytokeratin resulting from apoptosis was obtained with the M30 Cytodeath antibody (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) that recognizes an epitope of cytokeratin 18 that is only exposed following caspase cleavage in early apoptosis. Only the paclitaxel treated LnCaP cells stained with M30 and most of the dimmer cytokeratin cells stained with M30, which is consistent with cells undergoing apoptosis.

It should be noted that a number of different cell analysis platforms can be used to identify and enumerate cells in the enriched samples. Examples of such analytical platforms are Immunicon's CellSpotter® system, a magnetic cell immobilization and analysis system, using microscopic detection for manual observation of cells described in Example II, and the CellTracks™ system, an a more advanced automatic optical scanning system. These two analytical platforms are described in US Patents #5,876,593; #5,985,153 and #6,136,182, each of which are incorporated by reference herein as disclosing the respective apparatus and methods for manual or automated quantitative and qualitative cell analysis.

Other analysis platforms include laser scanning Cytometry (Compucyte), bright field base image analysis (Chromavision), and capillary Volumetry (Biometric Imaging).

The enumeration of circulating epithelial cells in blood using the methods and compositions of a preferred embodiment of the present invention is achieved by immunomagnetic selection (enrichment) of epithelial cells from blood followed by the analysis of the samples. The immunomagnetic sample preparation is important for reducing sample volume and obtaining as much as a 10^4 fold enrichment of the target (epithelial) cells. The reagents used for the multi-parameter flow cytometric analysis are optimized such that epithelial cells are located in a unique position in the multidimensional space created by the listmode acquisition of two light scatter and three fluorescence parameters. These include

1. an antibody against the pan-leukocyte antigen, CD45 to identify leucocytes (non-tumor cells);
2. a cell type specific or nucleic acid dye which allows exclusion of residual red blood cells, platelets and other non-nucleated events; and

3. a biospecific reagent or antibody directed against cytokeratin or an antibody having specificity for an EpCAM epitope which differs from that used to immunomagnetically select the cells.

It will be recognized by those skilled in the art that the method of analysis of the enriched tumor cell population will depend on the intended use of the invention. For example, in screening for cancers or monitoring for recurrence of disease, as described hereinbelow, the numbers of circulating epithelial cells can be very low. Since there is some "normal" level of epithelial cells, (very likely introduced during venipuncture), a method of analysis that identifies epithelial cells as normal or tumor cells is desirable. In that case, microscopy based analyses may prove to be the most accurate. Such examination might also include examination of morphology, identification of known tumor diathesis associated molecules (e.g., oncogenes).

Patients

Patients' age range was 47-91 year (mean 74), with initial diagnosis 2 to 10 years prior to study. Medical records were reviewed for therapy and stage. Patients and healthy volunteers signed an informed consent under an approved research study. Blood was drawn into 10ml EDTA Vacutainer™ tubes (Becton-Dickinson, NJ). Samples were kept at room temperature and processed within 6 hours after collection unless indicated otherwise.

Sample Preparation

Magnetic nanoparticles labeled with monoclonal antibodies identifying epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) were used to label and separate by magnetic means epithelial cells from hematopoietic cells, as taught in commonly-owned US Patent #6,365,362, and US Patent Application 10/079,939, filed 19 February 2002, both of which are fully incorporated by reference herein. The magnetically captured cells resuspended in a volume of 200µl are fluorescently labeled to differentiate between hematopoietic and epithelial cells. A monoclonal antibody that recognizes keratins 4, 5, 6, 8, 10, 13, and 18, conjugated to Phycoerythrin (CK-PE) was used to identify epithelial cells and a monoclonal antibody that recognizes CD45 was used to identify leukocytes and identify hematopoietic cells that non-specifically bind to cytokeratin.

For multicolor fluorescent microscopy (CellSpotter®) analysis CD45 was conjugated to Allophycocyanin (CD45-APC, Caltag, CA) whereas for flow cytometric analysis peridinin

chlorophyll protein conjugated CD45 (CD45-PerCP, BDIS San Jose, CA) was used. The nucleic acid specific dye DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was used to identify and visualize the nucleus in the CellSpotter® system and the nucleic acid dye in the Procount system (BDIS, San Jose,CA) was used to identify cells by flow cytometry. After incubation, the excess staining reagents were aspirated and the captured cells were resuspended and transferred into a 12x75 mm tube for flow cytometric analysis or to a CellSpotter® analysis chamber (as described in US Application 10/074,900, filed 12 February 2002, incorporated by reference herein) contained within a magnetic yoke assembly that holds the chamber between two magnets (Captivate, Molecular Probes, OR).

Example 1

Sample Analysis via Flow Cytometry

Samples were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer equipped with a 488nm Argon ion laser (BDIS, San Jose, CA). Data acquisition was performed with CellQuest (BDIS, San Jose, CA) using a threshold on the fluorescence of the nucleic acid dye. The acquisition was halted after 8000 beads or 80% of the sample was analyzed. Multiparameter data analysis was performed on the listmode data (Paint-A-Gate^{Pro}, BDIS, San Jose, CA). Analysis criteria for CTC events included size defined by forward light scatter, granularity defined by orthogonal light scatter, positive staining with the PE-labeled anti-cytokeratin MAb and no staining with the PerCP-labeled anti-CD45 Mab. For each sample, the number of events present in the region typical for epithelial cells was multiplied by 1.25 to account for the sample volume not analyzed by flow cytometry.

Figure 2 Panels A, B and C shows the flow cytometric analysis of a blood sample of a patient with metastatic prostate cancer. Two vertical lines in Panel B illustrate the low and high boundary of nucleic acid (NAD) content of leukocytes (red dots). CTC candidates express Cytokeratin (CK+), lack CD45 (CD45-) and contain nucleic acids (NAD+). CTC candidates having NAD equal or higher than leukocytes are considered cells and are depicted black. CK+, CD45- events with NAD content less than leukocytes were not considered target cells and depicted blue. The blue events were clearly smaller as compared with the black colored CTC as evident by the smaller forward light scatter signals. The threshold on the NAD staining intensity clearly excluded a large portion of CK+, CD45- events with even lower NAD staining intensity. In analysis of blood samples from healthy donors few such CK+, CD45- events are observed suggesting that this phenomenon is related to cancer. A

typical example of an analysis of a blood from a healthy donor is shown in Figures 2D, 2E, and 2F.

Example 2

Sample Analysis via CellSpotter®

The CellSpotter® system consists of a microscope with a Mercury Arc Lamp, a 10X objective, a high resolution X, Y, Z stage and a four-filter cube changer. Excitation, dichroic and emission filters in each of four cubes were for DAPI 365nm/400nm/400nm, for DiOC16 480nm/ 495nm/ 510nm, for PE 546nm/ 560nm/ 580nm and for APC 620nm/ 660nm/ 700nm. Images were acquired with a digital camera connected to a digital frame grabber. The surface of the chamber is 80.2 mm^2 and 4 rows of 35 images for each of the 4 filters resulting in 560 images have to be acquired to cover the complete surface. The CellSpotter® acquisition program automatically determines the region over which the images are to be acquired, the number of images to acquire, the position of each image and the microscope focus to use at each position. All the images from a sample are logged into a directory that is unique to the specific sample identification. An algorithm is applied on all of the images acquired from a sample to search for locations that stain for DAPI and CK-PE. If the staining area is consistent with that of a potential tumor cell (DAPI+, CK-PE+) the software stores the location of these areas in a database. The software displays thumbnails of each of the boxes and the user can confirm that the images represented in the row are consistent with tumor cells, or stain with the leukocyte marker CD45. The software tabulates the checked boxes for each sample and the information is stored in the database.

Figure 3 shows examples of CellSpotter® analysis of a blood sample from a patient with metastatic prostate cancer. Regions that potentially contain tumor cells are displayed in rows of thumbnails. The ruler in the left lower corner of the figure indicates the sizes of the thumbnails. From right to left these thumbnails represent nuclear (DAPI), cytoplasmic cytokeratin (CK-PE), control cells stained with a membrane dye ($DiOC_{16}(3)$) and surface CD45 (CD45-APC) staining. The composite images shown at the left show a false color overlay of the purple nuclear (DAPI) and green cytoplasmic (CK-PE) staining. The check box beside the composite image allow the user to confirm that the images represented in the row are consistent with tumor cells and the check box beside the CD45-APC image is to confirm that a leukocyte or tumor cell stain non-specifically. In this patient sample, the software detected 2761 rows of thumbnails that demonstrated staining consistent with tumor

cells. Eighteen of the 2761 rows are shown in the figure labeled 1631-1640 and 1869-1876. Rows numbered 1631, 1636, 1638, 1640, and 1873-1876 are checked off and display features of CTC defined as a size greater than 4μm, the presence of a nucleus surrounded by cytoplasmic cytokeratin staining and absence of $DiOC_{16}(3)$ and CD45 staining. Note the difference in appearance of the tumor cells: the cell in row 1638 is large and the one in row 1640 is significantly smaller. The immunophenotype of the events in rows 1634 and 1869 are consistent with tumor cells but their morphology is not consistent with intact cells. The thumbnails in row 1869 shows a large nucleus and speckled cytoplasmic due to retraction of cytoskeletal proteins consistent with apoptosis of the cell. The thumbnail in row 1634 shows a damaged cell that appears to extrude its nucleus. The thumbnail shown in row 1632 shows a cell that stains both with cytokeratin as well as CD45 and is either a tumor cell non-specifically binding to CD45 or a leukocyte non specifically staining with cytokeratin. In this instance the morphology of the cell closely resembles that of a lymphocyte. The thumbnails shown in rows 1633, 1635, 1637, 1639, 1870 and 1872 shows cytokeratin staining objects that are larger that 4 μm but have no resemblance to cells. The cytokeratin staining objects in thumbnails 1637, 1639 and 1872 are in close proximity of a leukocyte.

Based on observation of images of CTC candidates in several patient samples, CTC were classified into three categories: intact CTC, damaged CTC, and CTC fragments all not staining with CD45 and not appearing in the $DiOC_{16}(3)$ filter. Figure 4 displays examples of the three categories of CTC isolated from a single tube of blood of a patient with metastatic prostate cancer undergoing therapy. Intact tumor cells shown in Figure 3A were defined as objects larger than 4μm with a relatively smooth cytoplasmic membrane, cytoskeletal proteins throughout the cytoplasm, and an intact nucleus encompassed within the nucleus. Damaged CTC shown in Figure 4B were defined as objects larger than 4μm with speckled cytokeratin staining or ragged cytoplasmic membrane, and a nucleus associated with the cytokeratin staining. Tumor cell fragments shown in Figure 4C were defined as round cytokeratin staining objects larger than 4μm with or without association of nuclear material that had no morphological resemblance to a cell.

Example 3

CTC in Prostate Cancer Patients

CTC were enumerated in 18 blood samples of prostate cancer patients and 27 samples from healthy individuals by both flow cytometry and CellSpotter®. The results shown in Table 1 were sorted by increasing number of intact CTC detected by CellSpotter®.

Table 1 – Enumeration of CTC by CellSpotter® and flow cytometry in 18 blood samples of prostate cancer patients and 27 samples from healthy individuals.

	CellSpotter®						Flow Cytometry
Patient Sample	Intact CTC		Suspect CTC		Not Assigned Events		CK+CD45-NA+
	#	%	#	%	#	%	#
1	0	0	1	50	1	50	5
2	0	0	2	100	0	0	12
3	0	0	2	66	1	34	1
4	0	0	2	50	2	50	0
5	0	0	2	29	5	71	5
6	0	0	3	60	2	40	18
7	0	0	3	38	5	62	0
8	0	0	7	44	9	56	10
9	0	0	13	76	4	24	2
10	1	5	1	5	20	90	4
11	1	10	4	40	5	50	0
12	2	22	1	11	6	67	4
13	28	6	7	1	441	93	69
14	70	5	168	12	1204	83	683
15	322	3	448	13	4244	87	500
16	350	5	112	2	5924	93	723
17	350	2	1429	9	14412	89	2420
18	742	17	112	2	3641	81	310
Mean	-	**4%**	-	**34%**	-	**62%**	-
27 samples from healthy donors							
Mean	0.04		0.96		4.96		0.7
SD	0.19		1.85		3.98		1.14
Min	0		0		0		0
Max	1		7		15		4

- number CTC in 7.5 ml blood % - percentage of all CTC detected by CellSpotter®

In the CellSpotter® analysis, the proportion of intact CTC clearly constituted the smallest fraction of CTC and ranged from 0% to 22% of all CTC (mean 4%). The proportion of damaged CTC ranged from 1% to 100% (mean 34%) and the CTC fragments constituted the largest portion of CTC ranging from 0% to 93% (mean 62%). The distribution of CTC

over the three categories between the patients varied considerably as amplified by a lack of correlation between intact CTC and damaged CTC ($R^2 = 0.20$) and intact CTC and CTC fragments ($R^2 = 0.42$) and some correlation between damaged CTC and CTC fragments ($R^2 = 0.88$). Comparison of intact CTC by CellSpotter® and CTC enumerated by flow cytometry showed no significant correlation ($R^2 = 0.26$) whereas significant correlations were found between the damaged CTC and CTC by flow cytometry ($R^2 = 0.92$) and CTC fragments and CTC by flow cytometry ($R^2 = 0.93$). Comparison of the CTC detected by flow cytometry and CellSpotter® suggests that CTC detected by flow cytometry encompass intact CTC as well as damaged CTC and to a certain extent, CTC fragments.

Example 4

Mimicking cell damage by in-vitro induction of apoptosis in LnCaP cells

To investigate the effect of apoptosis induced by cytotoxic agents on flow cytometric and CellSpotter® analysis of CTC, cells from the prostate cell line LnCaP were cultured in the presence or absence of 40nM paclitaxel for 72 hours. Following incubation, untreated LnCaP cells demonstrated a viability of >95% by trypan blue exclusion and 33% for the paclitaxel treated cells. The treated and untreated LnCaP cells were spiked into blood of healthy donors, selected by the ferrofluid methods described above, and analyzed by the CellSpotter® system. In experiments in which LnCaP cells were spiked into blood that were not treated with paclitaxel greater than 95% of the LnCaP cells were classified as intact tumor cells. The morphologic appearance of the paclitaxel treated LnCaP cells showed close resemblance to that of the CTC observed in the patient samples and are shown in Figure 6. Intact LnCaP cells that survived paclitaxel treatment are shown in Figure 6A, damaged LnCaP, of which the majority show speckled cytokeratin staining, are shown in Figure 6B, and tumor fragments are shown in Figure 6C.

Normal blood samples spiked with paclitaxel treated and untreated LnCaP cells were also prepared for flow cytometric analysis. In Figures 2G, 2H, and 2I, the flow cytometric analysis of a blood sample spiked with 501 LnCaP cells is shown. A predominantly bright cytokeratin positive population with a nucleic acid content greater than normal human leukocytes and relatively large size as illustrated by the large forward light scatter signals are shown and depicted black in the figure. Only few CK+, CD45- events with NAD content less than leukocytes and depicted blue are detected in the sample. Figures 2J, 2K, and 2L shows the flow cytometric analysis of paclitaxel treated LnCaP cells spiked in blood. In contrast to

viable LnCaP cells, a wide distribution of cytokeratin staining was observed with a significant portion of the population demonstrating a decreased concentration of nucleic acid content. In addition, numerous small cytokeratin positive events with less nucleic acid content as leukocytes were observed. The pattern of the patient closely resembled that of the pattern of the paclitaxel treated LnCaP cells supporting the hypothesis that the CTC detected by flow cytometry represent intact CTC as well as a variety of disintegrating cells in blood of cancer patients.

The data shown above demonstrate that in the blood of patients with prostate cancer, CTC detected by both flow cytometry and CellSpotter® are comprised of intact cells and cells of cells at various stages of disintegration. The apoptosis induced *in vitro* by paclitaxel suggests that the detected CTC in patient blood samples are undergoing apoptosis, necrosis, or *in vivo* damage to a varying degree caused by the treatment or therapy, mechanical damage by passage through the vascular system, or by the immune system.

Another source of cell disintegration, caused *in vitro* could however, be introduced by the sample preparation or the lack of stabilization of CTC or other blood components after blood draw. To investigate the effect of sample aging, known to cause damage, blood samples drawn from 12 patients with prostate cancer were processed and analyzed by flow cytometry within two hours, after 24 hours, and after 6 and 18 hours if sufficient blood was available. In 8 of the 12 patient samples, CTC were detected at a level greater than the mean +3SD of that detected in normal donors. As shown in Table 2, a loss of CTC with sample aging was observed in all 8 samples.

Table 2 – Enumeration of CTC by flow cytometry in 8 blood samples of prostate cancer patients processed and analyzed at different time points after blood draw

	Time after blood draw			
Patient #	< 2hr #CTC	~6hr #CTC	~18hr #CTC	~24hr #CTC
1	5	-	-	0
2	8	9	2	3
3	15	-	-	0
4	31	-	-	3
5	44	-	-	8
6	45	-	-	1
7	49	38	19	26

8	78	-	-	0

hr = hours #CTC = number of CTC in 5 ml blood

Significant reductions in the number of CTC were detected when blood processing was delayed demonstrating the fragility of CTC, and making it necessary to process non-stabilized blood samples no later than six hours after blood draw to obtain accurate CTC counts. To reliably assess if clinically relevant information is contained within the different stages of tumor cell degradation, a blood preservative is needed that stabilizes CTC at the time of blood draw to obtain an accurate reflection of what is occurring inside the body. Furthermore, the sample preparation method for sensitive assays used to enrich for CTC requires that all classes of CTC are captured, and therefore excludes the use of traditional density gradient separation methods in the prior art.

Example 5

Obvious CTC and Suspect CTC are important indicators

It is important to be able to distinguish between *in vivo* and *in vitro* damage for sensitive assays, such as those described here. This is especially evident when the assay attempts to determine the effectiveness of treatments or therapies, which are known to cause *in vivo* cellular damage. If sample handling, processing, or analysis were to result in damaging the target cells, forming Suspect cells, fragments, or debris, the assay will not give meaningful results.

An assay was used to directly detect CTC in 100µl of blood without any enrichment method by flow cytometry. The 100µl assay detects only EpCAM positive cells and the sensitivity is very low. However, some advanced stage cancer patients with high CTC counts are expected to be observable. This assay should give a reliable confirmatory estimation of CTC because it is a direct assay that involves no manipulation. Data were generated with several patient samples using the assay to answer several questions.

The 100µl assay categorizes cells based on properties such as size and staining intensity. Obvious CTC have bright nucleic acid staining (similar to leukocytes), positive EpCAM antigen staining and size similar to leukocytes or larger. Suspect CTC are any objects positive for EpCAM antibody but not characterized as Obvious CTC (i.e. dim nucleic acid, size smaller than leukocytes). The assay identifies objects from both categories.

Figure 5 shows the presence of Obvious and Suspect CTC in blood as determined by the 100µl assay. The Suspect CTC are not created during sample processing (*in vitro*

damage) as the 100μl assay is a direct assay and does not involve any separation or wash steps. The data above also show there is a relationship between the number of Obvious and Suspect CTC. The number of Suspect CTC seems to increase as the number of Obvious CTC increases. When the numbers of Suspect versus Obvious CTC is plotted, the slope of 2.92 indicates the proportion of Suspect CTC present in sample when compared to Obvious CTC. The correlation coefficient of $r^2 = 0.0.97$ shows an excellent correlation between Obvious CTC and Suspect CTC for a number of clinical samples. In addition, Suspect CTC are also seen in the ferrofluid-selection assay, and have properties similar to Suspect CTC detected in the blood by the direct assay. It is important to include Suspect CTC in addition to Obvious CTC in total tumor cell count.

An important question is how the data from the 100μl assay compares with ferrofluid-selected CTC (enriched CTC). Does the ferrofluid assay quantitatively detect CTC? Another question is what is the recovery of CTC in the ferrofluid-selected assay if the flow assay data is correct. The three main factors determining the recovery of CTC in the 100μl assay are:

- EpCAM density,
- cytokeratin positivity, and
- nucleus positivity.

The Suspect CTC have lower EpCAM density compared to Obvious CTC and significance of this is not yet well understood.

A comparison was made of Obvious and Suspect CTC by the 100μl assay to the ferrofluid-selection assay using 7ml of blood. This data was obtained from prostate patient samples and analyzed by flow cytometry. Both Obvious and Suspect CTC increased with storage time and the trend was similar to CTC detected in the ferrofluid-selection assay, thereby validating the 100μl assay. The recovery of CTC from the ferrofluid-selection assay was about 90% based on the CTC in 100μl of blood. It was also known that MFI (Mean Fluorescence Intensity which correlates the EpCAM density) of CTC from this patient was high (MFI=300), and all EpCAM positive cells are cytokeratin positive. However, the recoveries of CTC from some other clinical samples have been as low as 20%. There may be several factors that contribute for a lower recovery, such as EpCAM positive/cytokeratin negative cells, cytokeratin dim cells, and mucin on the cell surface inhibiting the ability of ferrofluid to bind cells.

The assay described herein was performed on patients at two times. Response was measured by bi-dimensional imaging of the lesion. The Ratio (Ratio = Obvious CTC / Total

CTC) is similar to the Response Index described earlier, and can be used as a numeric indicator of treatment success. The results are summarized in Table III. Ratios near 1.0 indicate the Total CTC are Obvious CTC, and ratios near 0.0 indicate more Suspect CTC or debris. Progressive indicates the lesion increasing in size, Partial Response indicates a response to treatment where the Ratio is relatively low, and Stabilized indicates no change, or reduction in lesion size. A positive Change indicates an increase in the number of Intact CTC, corresponding to the progression of the disease. A negative Change indicates a decrease in the number of Intact CTC, or a possible increase in the number of Suspect CTC and/or debris, corresponding to a response to treatment.

These results show the importance of including Suspect CTC and debris when analyzing response to treatment because the numbers of Intact or Obvious CTC alone would not provide as much information. Furthermore, such indicators are useful for short-term monitoring of treatments and therapies, or longer term monitoring for remission and/or relapse.

Table III. Obvious CTC and Suspect CTC corresponding to treatment response

Response	Ratio1	Ratio2	Change
Progressive	0.3	0.0	**-0.3**
	0.0	0.0	**0.0**
	0.5	0.6	**0.1**
	0.9	1.0	**0.1**
	0.3	0.5	**0.2**
	0.4	0.7	**0.3**
	0.0	0.4	**0.4**
	0.5	0.9	**0.4**
	0.0	0.5	**0.5**
	0.0	0.6	**0.6**
Partial Response	1.0	0.0	**-1.0**
	0.4	0.0	**-0.4**
	0.3	0.0	**-0.3**
	0.5	0.2	**-0.3**
	0.4	0.3	**-0.1**
	0.0	0.0	**0.0**
	0.3	1.0	**0.7**
Stabilized	1.0	0.0	**-1.0**
	0.5	0.0	**-0.5**
	1.0	0.7	**-0.3**
	0.3	0.0	**-0.3**
	0.4	0.3	**-0.1**
	0.1	0.0	**-0.1**
	0.2	0.1	**-0.1**
	0.6	0.5	**-0.1**
	0.9	0.8	**-0.1**

	0.0	0.0	**0.0**
	0.6	0.7	**0.1**
	0.6	0.8	**0.2**
	0.0	1.0	**1.0**

Enumeration of tumor cell debris may prove more significant in cancer diagnostics and therapeutics than detection of large proliferative cell clusters. Since debris particles in the size range, probably about 1-3μm (the size of platelets), have been observed to be present in much larger amounts than intact cells, they may constitute a separate, independent, and possibly more sensitive marker than intact tumor cells. The presence of damaged CTC may be particularly relevant in detecting early-stage cancer, when the immune system is intact and most active. Similarly, dramatic increases in debris during therapy may suggest breakdown of both circulating and tissue tumor cells (i.e. therapeutic effectiveness), paralleling the massive release of cellular components like calcium observed during tumor disintegration. Like soluble tumor markers, such debris may be detectable in blood without enrichment, or with minimal enrichment in the buffy coat layer and constitute an alternative, and potentially simpler diagnostic tool than intact cell enrichment/analysis. Since morphology is lost in CTC debris, detection could be done by flow cytometry as long as the debris is stained for the appropriate determinants, such as cytokeratin.

As previously discussed, damaged or fragmented CTC with or without DNA are theoretically to be expected, and therefore are not undesirable events in specimens from patients undergoing effective therapy and in untreated patients with strong immune systems. The ratio or % of intact CTC to total detectable events may prove to be a more useful parameter to the clinician in assessing a patient's immune system or response to therapy. The normal immune defenses, especially activated neutrophils, also can damage or destroy CTC as foreign species by a process called "extracellular killing" even if the CTC are larger than the neutrophils. It does not seem surprising to find only a small percentage of the shed CTC as intact cells, unless the immune system is overwhelmed in the late stages of disease or therapy is ineffective.

Hence, there are a number of methods for *in vitro* cancer detection: conclusive detection of intact circulating cells/clusters, and inferential methods like circulating tumor debris (including total and tumor-specific RNA/DNA, and conventional soluble tumor markers. However, no method by itself may be sufficiently sensitive. Lower specificity of debris detection compared to CTC morphology may be a problem in screening that could be minimized (e.g. with triple labeling), but it may be a lesser problem in monitoring. Further

statistical analysis and correlations on debris data relative to intact CTC and diagnostic stage in patients compared to normals appear worthwhile in assessing the sensitivity and specificity of debris analysis.

Examples of different types of cancer that may be detected using the compositions, methods and kits of the present invention include apudoma, choristoma, branchioma, malignant carcinoid syndrome, carcinoid heart disease, carcinoma e.g., Walker, basal cell, basosquamous, Brown-Pearce, ductal, Ehrlich tumor, *in situ*, Krebs 2, merkel cell, mucinous, non-small cell lung, oat cell, papillary, scirrhous, bronchiolar, bronchogenic, squamous cell and transitional cell reticuloendotheliosis, melanoma, chondroblastoma, chondroma, chondrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, giant cell tumors, histiocytoma, lipoma, liposarcoma, mesothelioma, myxoma, myxosarcoma, osteoma, osteosarcoma, Ewing's sarcoma, synovioma, adenofibroma, adenolymphoma, carcinosarcoma, chordoma, mesenchymoma, mesonephroma, myosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, trophoblastic tumor, adenocarcinoma, adenoma, cholangioma, cholesteatoma, cylindroma, cystadenocarcinoma, cystadenoma, granulosa cell tumor, gynandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, islet cell tumor, leydig cell tumor, papilloma, sertoli cell tumor, theca cell tumor, leiomyoma, leiomyosarcoma, myoblastoma, myoma, myosarcoma, rhabdomyoma, rhabdomyosarcoma, ependymoma, ganglioneuroma, glioma, medulloblastoma, meningioma, neurilemmoma, neuroblastoma, neuroepithelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma nonchromaffin, antiokeratoma, angioma sclerosing, angiomatosis, glomangioma, hemangioendothelioma, hemangioma, hemangiopericytoma, hemangiosarcoma, lymphangioma, lymphangiomyoma, lymphangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, chondrosarcoma, cystosarcoma phyllodes, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomyosarcoma, leukosarcoma, liposarcoma, lymphangiosarcoma, myosarcoma, myxosarcoma, ovarian carcinoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma (Kaposi's, and mast-cell), neoplasms (e.g., bone, digestive system, colorectal, liver, pancreatic, pituitary, testicular, orbital, head and neck, central nervous system, acoustic, pelvic, respiratory tract, and urogenital), neurofibromatosis, and cervical dysplasia.

However, the present invention is not limited to the detection of circulating epithelial cells and/or clusters, fragments, or debris. For example, endothelial cells have been observed in the blood of patients having a myocardial infarction. Endothelial cells, myocardial cells, and virally infected cells, like epithelial cells, have cell type specific determinants that are recognized by available monoclonal antibodies. Accordingly, the methods and the kits of the invention may be adapted to detect such circulating endothelial cells. Additionally, the

invention allows for the detection of bacterial cell load in the peripheral blood of patients with infectious disease, who may also be assessed using the compositions, methods and kits of the invention. It would be reasonable to expect that these rare cells will behave similarly in circulation, and that fragments and/or debris will be present in similar conditions as those described hereinabove.

The preferred embodiments of the invention as herein disclosed, are also believed to enable the invention to be employed in fields and applications additional to cancer diagnosis. It will be apparent to those skilled in the art that the improved diagnostic modes of the invention are not to be limited by the foregoing descriptions of preferred embodiments. Finally, while certain embodiments presented above provide detailed descriptions, the following claims are not limited in scope by the detailed descriptions. Indeed, various modifications may be made thereto without departing from the spirit of the following claims.

We claim:

1. A method for diagnosing disease in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact rare cells and further comprising:
        i. cell fragments derived from rare cells, or
        ii. cellular debris derived from rare cells;
    b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact rare cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;
    c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact rare cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;
    d. analyzing said labeled rare cells, and said labeled cell fragments or said labeled cellular debris, the presence of said labeled rare cells, said labeled cell fragments, and said labeled cellular debris indicating the presence of disease.
2. The method of Claim 1, wherein said biological specimen is blood.
3. The method of Claim 2, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.
4. The method of Claim 1, wherein said magnetic particles are colloidal.
5. The method of Claim 1, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact rare cells, and said cell fragments or said cellular debris.
6. The method of Claim 1, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.
7. The method of Claim 1, wherein said analysis is based on at least one of the group consisting of: morphologic analysis and epitopic analysis.

8. A method for diagnosing disease in a test subject comprising:

a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact rare cells and clusters of rare cells;
b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact rare cells and said clusters of rare cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact rare cells and said clusters of rare cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
d. analyzing said labeled rare cells and said labeled clusters of rare cells, the presence of said labeled rare cells and said labeled clusters of rare cells indicating the presence of disease.

9. The method of Claim 15, wherein said biological specimen is blood.
10. The method of Claim 16, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.
11. The method of Claim 15, wherein said magnetic particles are colloidal.
12. The method of Claim 15, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact rare cells and said clusters of rare cells.
13. The method of Claim 15, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

14. A method for diagnosing malignancy in a test subject comprising:
a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and further comprising:
i. cell fragments derived from malignant cells, or
ii. cellular debris derived from malignant cells;

b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

d. analyzing said labeled malignant cells, and said labeled cell fragments or said labeled cellular debris, the presence of said labeled malignant cells, said labeled cell fragments, and said labeled cellular debris indicating the presence of malignancy.

15. The method of Claim 14, wherein said biological specimen is blood.

16. The method of Claim 15, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.

17. The method of Claim 14, wherein said magnetic particles are colloidal.

18. The method of Claim 14, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris.

19. The method of Claim 14, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

20. The method of Claim 14, wherein said analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by apoptosis or necrosis.

21. The method of Claim 20, wherein analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by mechanical damage, drug-induced damage, or immunological damage.

22. The method of Claim 20, wherein said classification is based on at least one of the group consisting of: morphologic analysis and epitopic analysis.

23. A method for diagnosing malignancy in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and clusters of malignant cells;
    b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    d. analyzing said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells, the presence of said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells indicating the presence of malignancy.
24. The method of Claim 23, wherein said biological specimen is blood.
25. The method of Claim 24, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.
26. The method of Claim 23, wherein said magnetic particles are colloidal.
27. The method of Claim 23, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells and said clusters of malignant cells.
28. The method of Claim 23, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

29. A method for screening malignancy in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and further comprising:
        i. cell fragments derived from malignant cells, or
        ii. cellular debris derived from malignant cells;

b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

d. analyzing said labeled malignant cells, and said labeled cell fragments or said labeled cellular debris, the presence of said labeled malignant cells, said labeled cell fragments, and said labeled cellular debris indicating the presence of malignancy.

30. The method of Claim 29, wherein said biological specimen is blood.

31. The method of Claim 30, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.

32. The method of Claim 29, wherein said magnetic particles are colloidal.

33. The method of Claim 29, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris.

34. The method of Claim 29, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

35. The method of Claim 29, wherein said analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by apoptosis or necrosis.

36. The method of Claim 35, wherein analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by mechanical damage, drug-induced damage, or immunological damage.

37. The method of Claim 35, wherein said classification is based on at least one of the group consisting of: morphologic analysis and epitopic analysis.

38. A method for screening malignancy in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and clusters of malignant cells;
    b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    d. analyzing said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells, the presence of said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells indicating the presence of malignancy.
39. The method of Claim 38, wherein said biological specimen is blood.
40. The method of Claim 39, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.
41. The method of Claim 38, wherein said magnetic particles are colloidal.
42. The method of Claim 38, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells and said clusters of malignant cells.
43. The method of Claim 38, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

44. A method for monitoring malignancy in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and further comprising:
        i. cell fragments derived from malignant cells, or
        ii. cellular debris derived from malignant cells;

b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris, to the substantial exclusion of other specimen components;

d. analyzing said labeled malignant cells, and said labeled cell fragments or said labeled cellular debris, the presence of said labeled malignant cells, said labeled cell fragments, and said labeled cellular debris indicating the presence of malignancy.

45. The method of Claim 44, wherein said biological specimen is blood.

46. The method of Claim 45, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.

47. The method of Claim 44, wherein said magnetic particles are colloidal.

48. The method of Claim 44, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris.

49. The method of Claim 44, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

50. The method of Claim 44, wherein said analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by apoptosis or necrosis.

51. The method of Claim 50, wherein analysis further comprises classifying cell fragments or said cellular debris based on their origin as caused by mechanical damage, drug-induced damage, or immunological damage.

52. The method of Claim 50, wherein said classification is based on at least one of the group consisting of: morphologic analysis and epitopic analysis.

53. A method for monitoring malignancy in a test subject comprising:
    a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing intact malignant cells and clusters of malignant cells;
    b. preparing a magnetically-labeled sample wherein said biological sample is mixed with magnetic particles coupled to a first biospecific ligand which reacts specifically with said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    c. contacting said magnetically-labeled sample with at least one additional biospecific ligand which specifically labels said intact malignant cells and said clusters of malignant cells, to the substantial exclusion of other specimen components;
    d. analyzing said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells, the presence of said labeled malignant cells and said labeled clusters of malignant cells indicating the presence of malignancy.
54. The method of Claim 53, wherein said biological specimen is blood.
55. The method of Claim 54, wherein after said biological specimen obtained, it is contacted with an agent capable of stabilizing said biological specimen.
56. The method of Claim 53, wherein said magnetic particles are colloidal.
57. The method of Claim 53, wherein after the step of preparing said magnetically-labeled sample, said sample is subjected to a high gradient magnetic field to produce a separated magnetically-labeled fraction which is enriched for said intact malignant cells and said clusters of malignant cells.
58. The method of Claim 53, wherein said analysis is selected from the group consisting of: multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, and automated cell analysis.

59. A kit for assaying a biological specimen for the presence of malignant cells, and cell fragments derived from malignant cells or cellular debris derived from malignant cells, comprising:
    a. coated magnetic nanoparticles comprising:
        i. a magnetic core material,
        ii. a protein base coating material, and

iii. an antibody that binds specifically to a first characteristic determinant of said malignant cell, and said cell fragments or said cellular debris, wherein said antibody is coupled to said base coating material;

b. at least one antibody having binding specificity for a second characteristic determinant of said malignant cell, and said cell fragments or said cellular debris;

c. an agent capable of staining further features of said malignant cells, and said cell fragments or said cellular debris.

60. The kit of Claim 59, further comprising a panel of antibodies each specific for a different characteristic determinant.

61. The kit of Claim 59, further comprising a specific agent capable of labeling non-target entities.

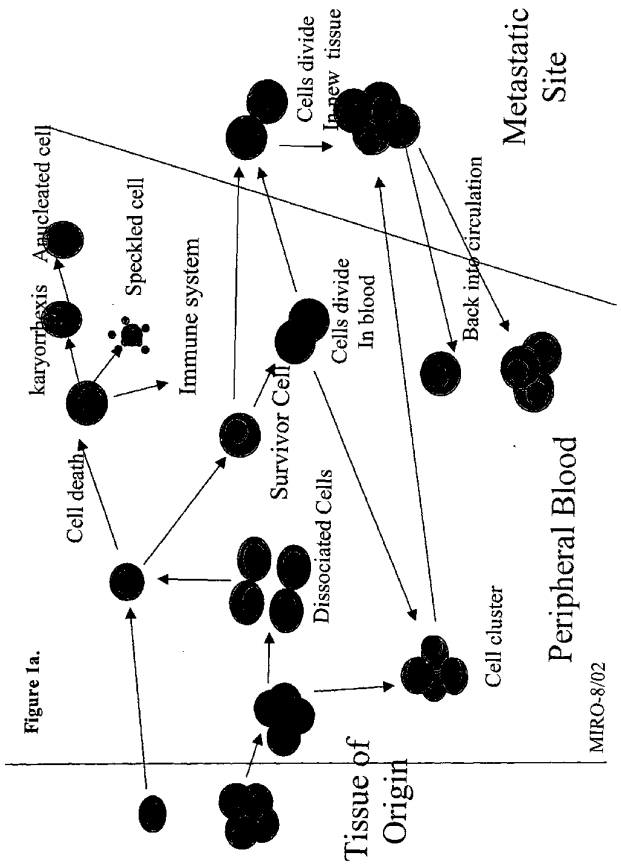

Metastatic Site
Cells divide In new tissue
Anucleated cell
karyorrhexis
Speckled cell
Immune system
Cells divide In blood
Back into circulation
Survivor Cell
Cell death
Dissociated Cells
Cell cluster
Peripheral Blood
Tissue of Origin
MIRO-8/02

Figure 1a.

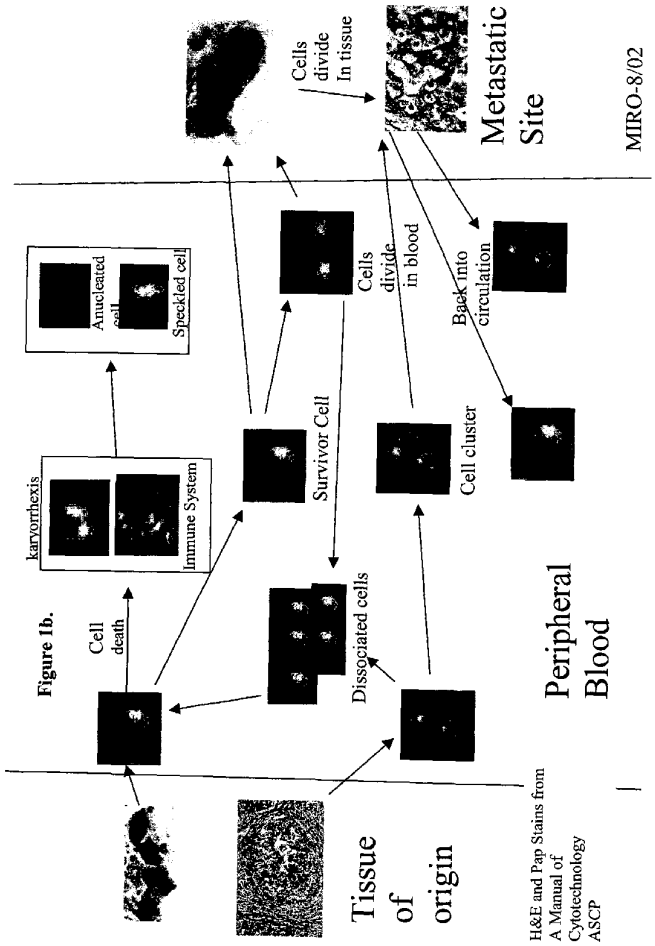

Cells divide In tissue
Metastatic Site
MIRO-8/02
Anucleated cell
Speckled cell
Cells divide in blood
Back into circulation
karyorrhexis
Immune System
Survivor Cell
Cell cluster
Cell death
Dissociated cells
Peripheral Blood
Tissue of origin
H&E and Pap Stains from A Manual of Cytotechnology ASCP

Figure 1b.

Figure 2

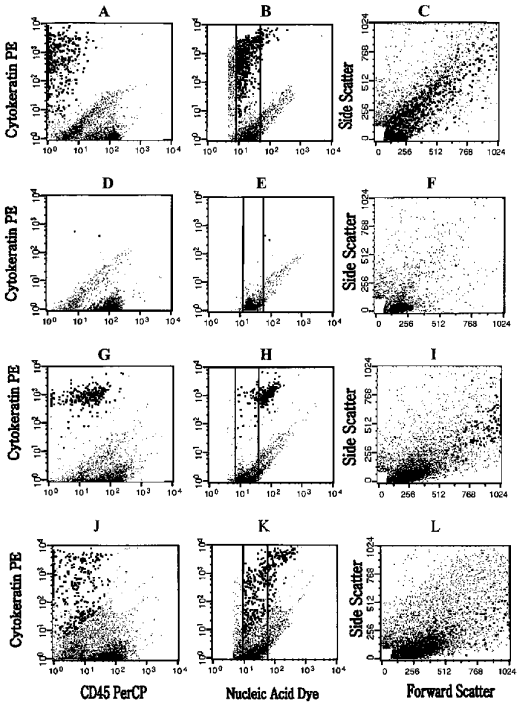

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
Cytokeratin PE
Side Scatter
CD45 PerCP
Nucleic Acid Dye
Forward Scatter

Figure 3

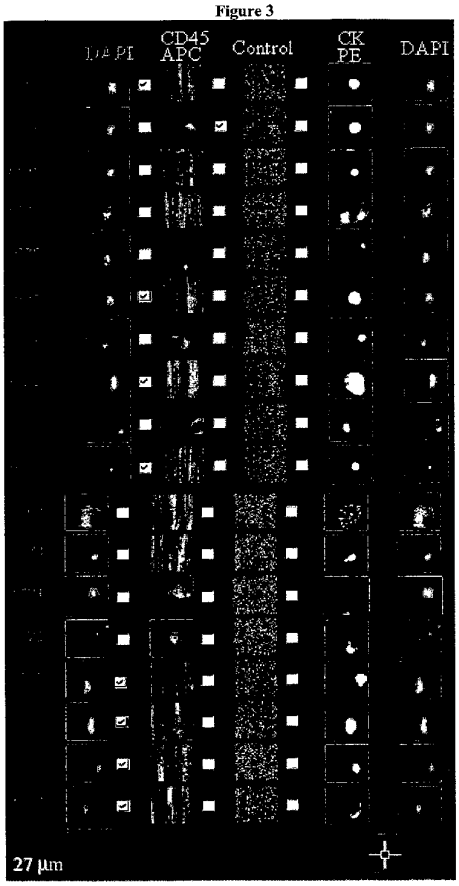


Figure 4

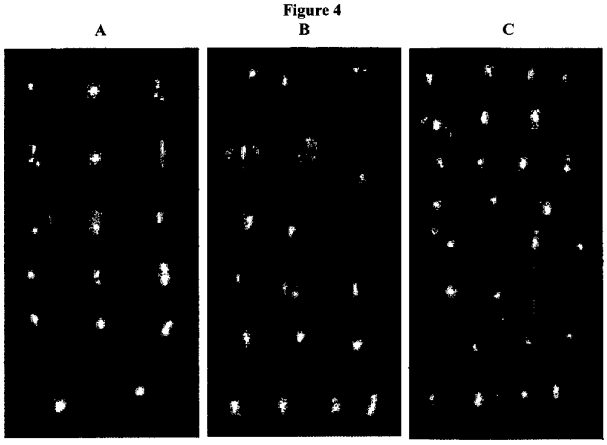


Figure 5

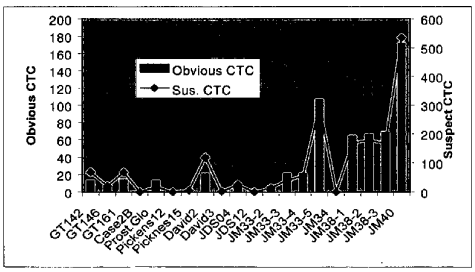
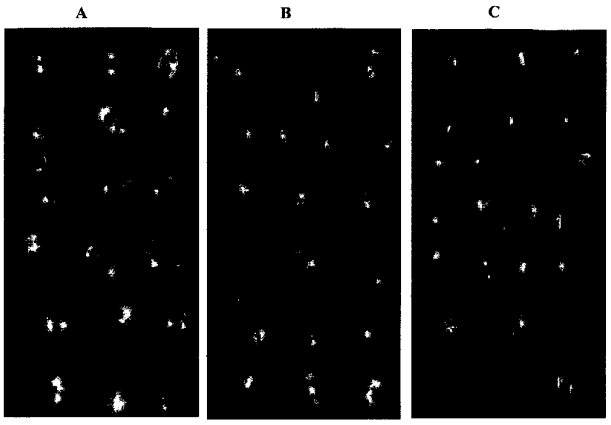


Figure 6



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/019141 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 1/00, 17/00, C12N 1/00, 5/00, 5/16, G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/US2002/026861

(22) International Filing Date: 23 August 2002 (23.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/314,151 23 August 2001 (23.08.2001) US
60/369,628 3 April 2002 (03.04.2002) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **IMMUNIVEST CORPORATION** [US/US]; 1105 Market Street, Suite 100, PO Box 8985, Wilmington, DE 19899 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **RAO, Galla, Chandra** [IN/US]; 9 Haverford Road, Princeton Junction, NJ 08550 (US). **LARSON, Christopher** [US/US]; 211 E. 4th St., Media, PA 19063 (US). **REPOLLET, Madeline** [US/US]; 357 Camp Hill Road, Ft. Washington, PA 19034 (US). **RUTNER, Herman** [US/US]; 50 S. Penn St. - Apt #609, Hatboro, PA 19040 (US). **TERSTAPPEN, Leon** [NL/US]; 1354 Old Ford Road, Huntingdon Valley, PA 19006 (US). **O'HARA, Shawn, Mark** [US/US]; 1519 Isaacs Court, Ambler, PA 19002 (US). **GROSS, Steven** [US/US]; 1216 Lincoln Dr. West, Ambler, PA 19002 (US).

(74) Agents: **MAYES, Jared** et al.; Immunicon Corporation, 3401 Masons Mill Road Suite 100, Huntindgon Valley, PA 19006 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
1 April 2004

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

WO 2003/019141 A3

(54) **Title:** ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR CELLS, FRAGMENTS, AND DEBRIS

(57) **Abstract:** The methods and reagents described in this invention are used to analyze circulating tumor cells, clusters, fragments, and debris. Analysis is performed with a number of platforms, including flow cytometry and the CellSpotter® fluorescent microscopy imaging system. Analyzing damaged cells has shown to be important. However, there are two sources of damage: *in vivo* and *in vitro*. Damage *in vivo* occurs by apoptosis, necrosis, or immune response. Damage *in vitro* occurs during sample acquisition, handling, transport, processing, or analysis. It is therefore desirable to confine, reduce, eliminate, or at least qualify *in vitro* damage to prevent it from interfering in analysis. Described herein are methods to diagnose, monitor, and screen disease based on circulating rare cells, including malignancy as determined by CTC, clusters, fragments, and debris. Also provided are kits for assaying biological specimens using these methods.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/26861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07K 1/00, 1700; C12N 1/00, 5/00, 5/16, ;G01N 33/53
US CL : 435.4,7.1, 325, 344, 810; 530/350,,412, 413, 827,828
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435.4,7.1, 325, 344, 810; 530/350,,412, 413, 827,828

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YS 6m190,870 A(SCHMITZ et al 20 February 2001, see especially columns 1-7, 9, 11	1-11, 13-17, 19, 22-26, 28, 30-32, 37, 39-41,59-61
Y	BRANDT et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. Cancer Research, 1996, Vol. 56, No. 20, pages 4556-4561, see especially the abstract.	8,9,12,23,24,27,38
Y	TANAKA et al. Inumunohistochemical study of localization of extracellular matrix after helium YAG laser irrigationin rat cornes. Japanese Journal of Opthalmology, Sep-Oct 2000, Vol 44, No. 5, pages 482-484.	5, 13, 19, 28, 34, 43
Y	Us 5,385,707A(MILTENYI et al)31 January, 1995, see especially col 5, lines 20-35.	4, 11, 17, 26, 32
Y/P	US20001/0024802 A (RIMM et al)27 September 2001, see entire document	1,7,14,22,29,37
Y/P	US 6,365,362 A (TERSTAPPEN et al) April 2002, see especially columns 8-10.	1,8,14,23,29,38,59-61

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
11 FEB 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Susan Ungar
Telephone No. 703-305-2181

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/26866

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group 1, claim(s) 1-6, 7-in-part, drawn to a method of diagnosing disease in a test subject wherein the analysis is based on morphologic analysis.

Group 2, claim(s) 1-6 and 7-in-part, drawn to a method of diagnosing disease in a test subject wherein the analysis is based on epitopic analysis.

Group 3, claim(s) 8-13, drawn to a different method of diagnosing disease in a test subject.

Group 4, claim(s) 14-21 and 22-in-part, 29-36 and 37-in-part drawn to a method of diagnosing malignancy wherein classification is based on morphologic analysis.

Group 5, claim(s) 14-21 and 22-in-part, 29-36 and 37-in-part drawn to a method of diagnosing malignancy wherein classification is based on epitotic analysis.

Group 6, claim(s) 23-28,38-43, drawn to a different method of diagnosing malignancy.

Group 7, claim(s) 41-51. 52-in-part, drawn to a method of monitoring malignancy wherein classification is based on morphologic analysis.

Group 8, claim(s) 41-51. 52-in-part, drawn to a method of monitoring malignancy wherein classification is based on epitotic analysis.

Group 9, claim(s) 53-58, drawn to a different method of monitoring malignancy.

Group 10, claim(s) 59-61, drawn to a kit.

The inventions listed as Groups 1-10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:
The technical feature linking groups 1-10 appears to be that they all relate to a method for diagnosis of disease comprising magnetically isolating cells and cell fragments from blood and morphologically analyzing them to detect them wherein disease is diagnosed.

However, US Patent No. 6,190,980 specifically teaches a method of diagnosing tumor cancer by magnetic isolation of tumor cells from blood and the morphologic analysis thereof wherein cancer cells are isolated, wherein the magnetic particles are colloidal, wherein the specimen is stabilized, wherein the specimens are analyzed by microscopy, wherein the cells are labeled with fluorescent antibodies which are conventionally used for immunofluorescent mircroscopy (see columns 1-7, 9, 11) and US Patent No. 6,265,362 teaches an almost identical assay wherein not only the magnetic beads are conjugated to antibodies that target the cancer, but also additional antibodies are used to also target the caner (col 8, lines 11-28).

Therefore, the technical feature linking the inventions of group 1-10 does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

Group 1 is drawn to said method. All of the other groups are drawn to different methods or products.

Accordingly, Groups 1-10 are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/2686

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
ADISCTI,ADINEWS,ANABSTR,BIOBUSINESS, BIOCOMMERCE, BIOSIS CABA, CANCERLIT, CAPLU, CEN, CIN, DGENE, DRUGNL, EMBAL, ESBIOBASE, MEDLINE, LIFESCI, PASCAL, PHOIN, SCISEARCH, USPATFUL, USPAT2,WPIDS
search terms:magnetic, cancer, blood, microscope, colloidal, isolation, diagnosis, screening, detect

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

International application No.
PCT/US02/25861

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-43 and 59-61

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガラ・チャンドラ・ラオ
アメリカ合衆国０８５５０ニュージャージー州プリンストン・ジャンクション、ヘイバーフォード・ロード９番
(72)発明者 クリストファー・ラーソン
アメリカ合衆国１９０６３ペンシルベニア州メディア、イースト・４ストリート２１１番
(72)発明者 マデリン・レポレット
アメリカ合衆国１９０３４ペンシルベニア州フォート・ワシントン、キャンプ・ヒル・ロード３５７番
(72)発明者 ハーマン・ラトナー
アメリカ合衆国１９０４０ペンシルベニア州ハットボロ、アパートメント・ナンバー６０９、サウス・ペン・ストリート５０番
(72)発明者 レオン・テルスタッペン
アメリカ合衆国１９００６ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロード１３５４番
(72)発明者 ショーン・マーク・オハラ
アメリカ合衆国１９００２ペンシルベニア州アンブラー、アイザックス・コート１５１９番
(72)発明者 スティーブン・グロス
アメリカ合衆国１９００２ペンシルベニア州アンブラー、リンカーン・ドライブ・ウエスト１２１６番

Ｆターム(参考) 2G045 AA02 AA26 CA25 CB02 DA78 FA12 FA16 FA36 FA37 FB03
FB07 FB12 GC15
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QR48 QS33 QS39 QX02 QX10