

(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2011-510309

(P2011-510309A)

(43) 公表日 平成23年3月31日(2011.3.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	H

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2010-543379 (P2010-543379)  
 (86) (22) 出願日 平成21年1月26日 (2009. 1. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月22日 (2010. 9. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EE2009/000002  
 (87) 国際公開番号 W02009/092386  
 (87) 国際公開日 平成21年7月30日 (2009. 7. 30)  
 (31) 優先権主張番号 61/062, 528  
 (32) 優先日 平成20年1月25日 (2008. 1. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 12/321. 412  
 (32) 優先日 平成21年1月21日 (2009. 1. 21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510203647  
 ハンサビオメド・オサウヒング  
 エストニア、エーイー12618タリン、  
 アカデミア・テー19番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100127638  
 弁理士 志賀 美苗  
 (74) 代理人 100144923  
 弁理士 中川 将之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト体液中の微小胞を測定し、特徴付けるための新規な方法

(57) 【要約】

本開示は、サンドイッチELISA試験を用いて少量のヒト体液中のヒトエクソソームを捕捉し、検出し、特徴付け、定量する方法を提供する。この方法はエクソソーム調製物の全特徴付けを可能とし、したがって非侵襲的アッセイの使用によって健康状態と疾患関連状態を区別するツールを提供する。実際、この方法は、単純な血漿サンプルでの腫瘍のスクリーニング、診断および予後に有用であり得る。同時に、循環エクソソームの測定は患者に存在する腫瘍塊のレベルについての情報を得られる。ここで提供される方法は、循環エクソソーム中のウイルス性タンパク質またはプリオンタンパク質のような感染性および/または伝染性物質の存在を評価するのに好適である。

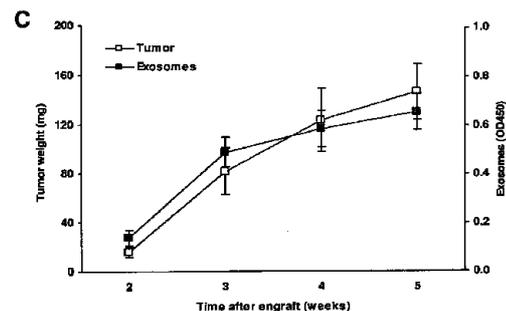


Fig 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト細胞由来サンプルまたは体液中のエキソソームを定量し、定性する方法であって、以下の段階：

- a) ヒト細胞由来サンプルまたは体液からエキソソーム調製物を精製する段階；
- b) 精製したエキソソーム調製物のエキソソームを一次抗体で捕捉する段階；
- c) 結合したエキソソームを検出抗体で検出する段階；
- d) 酵素結合二次抗体を前記検出抗体と反応させる段階；
- e) 基質を加える段階；そして
- f) 反応を検出する段階

10

を含む方法。

## 【請求項 2】

体液がヒト血漿サンプル、腹水、脳液、骨髄、尿、糞便または気管支肺胞洗浄液である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

使用する体液の体積が 2 ml 未満である、請求項 2 の方法。

## 【請求項 4】

一次抗体が抗 R a b - 5 b 抗体である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 5】

検出抗体が抗 C D 6 3 または抗カベオリン - 1 である、請求項 1 の方法。

20

## 【請求項 6】

腫瘍増殖を非侵襲的にモニターする方法であって、以下の段階：

- a) 定期的に患者の体液サンプルを採取する段階；
- b) 上記サンプルからエキソソーム調製物を精製する段階；
- c) 精製したエキソソーム調製物のエキソソームを一次抗体で捕捉する段階；
- d) 結合したエキソソームを検出抗体で検出する段階；
- e) 酵素結合二次抗体を前記検出抗体と反応させる段階；
- f) 基質を加える段階；
- g) 反応を検出する段階；そして
- h) 検出したエキソソームの量と腫瘍サイズとの相関を導く段階

30

を含む方法。

## 【請求項 7】

一次抗体が抗 R a b - 5 b 抗体であり、検出抗体が抗 C D 6 3 または抗カベオリン - 1 である、請求項 6 の方法。

## 【請求項 8】

腫瘍が黒色腫である、請求項 6 の方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 の方法を用いてカベオリン - 1 を有するエキソソームを検出する方法であって、検出抗体が抗カベオリン - 1 である、方法。

## 【請求項 10】

腫瘍が黒色腫である、請求項 9 の方法。

40

## 【請求項 11】

ヒト細胞由来サンプルまたは体液中のエキソソームを定量し、定性するための試験キットであって、以下のもの：

- a) ヒト細胞由来サンプルまたは体液からエキソソームを精製するための指示書；
- b) 精製したエキソソーム調製物のエキソソームを捕捉するための一次抗体調製物；
- c) 結合したエキソソームを検出するための検出抗体調製物；
- d) 検出抗体と反応するための酵素結合二次抗体調製物；および
- e) 酵素の基質

を含むキット。

50

## 【請求項 1 2】

一次抗体が抗 R a b - 5 b 抗体であり、検出抗体が抗 C D 6 3 または抗カベオリン - 1 である、請求項 1 1 の試験キット。

## 【請求項 1 3】

循環エキソソーム中の感染性および / または伝染性物質の存在を決定する方法であって、以下の段階

- a) ヒト細胞由来サンプルまたは体液からエキソソーム調製物を精製する段階；
- b) 精製したエキソソーム調製物のエキソソームを一次抗体で捕捉する段階；
- c) 結合したエキソソームを検出抗体で検出する段階；
- d) 酵素結合二次抗体を前記検出抗体と反応させる段階；
- e) 基質を加える段階；そして
- f) 反応を検出する段階

10

を含む方法。

## 【請求項 1 4】

感染性物質が H I V または H C V ウイルスタンパク質である、請求項 1 3 の方法。

## 【請求項 1 5】

伝染性物質がプリオンタンパク質である、請求項 1 3 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

20

本発明は一般に、ガン診断の分野に関する。より具体的には、本発明は、ヒト体液中のエキソソームを定量および定性する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

エキソソームは 30 ~ 120 nm のサイズの微小胞であり、通常は受容体放出および細胞間クロストークに使用されるエキソサイトーシス経路を介して能動的に分泌される。エキソソームは細胞培養物の上清および体液において、複数段階の超遠心分離の後に、検出することができる。主な組織適合性複合体タンパク質 ( M H C I 、 M H C I I ) および抗原提示に關与するタンパク質に加えて、エキソソームは多くの細胞機能に關与する膜および細胞質タンパク質を担持し得る。エキソソームは特定の生理的条件下で、樹状細胞 ( D C ) 、リンパ球、マスト細胞および上皮細胞のような多様な細胞タイプから分泌される。このプロセスは、多小胞体 ( M V B ) とも称されるこれらの複数の融合体由来の微小胞を含む、バスケット様細胞リザーバーの形成を導く。このプロセスは、特に正常細胞における、超微細構造の観察によって解明された。しかし、エキソソーム調製物の免疫電子顕微鏡観察およびウェスタンブロット分析によって、これらの微小胞は、初期エンドソーム ( 例えば R a b 5 ) 、リソソーム ( 例えば C D 6 3 、 C D 8 1 、 L A M P - 1 ) および後期ファゴソーム ( R a b 7 ) のような多様な細胞内液胞のマーカに加えて、いくつかの他のより細胞特異的なタンパク質 ( 例えば M H C クラス I I I 抗原 ) も共発現することが示されている。

30

## 【0003】

40

腫瘍細胞からのエキソソームの放出は正常細胞からのものよりも劇的に高く、しばしば免疫抑制効果と関連している。腫瘍由来エキソソームは、いくつかの腫瘍マーカー、例えば結腸癌についての C E A 、黒色腫についての M A R T - 1 または g p - 1 0 0 の発現を除き、多くの局面において正常細胞のエキソソームと同等である。さらに、腫瘍エキソソームの起源は、多くの局面において、正常なエキソソームのものとは異なっていると思われる。これはおそらく、悪性細胞は、細胞質から細胞外空間へ、そして細胞外空間から細胞質への、より動的な小胞の輸送を有するためである。

## 【0004】

がん進行における腫瘍エキソソームの役割は、最近現れた研究領域である。初期のデータは、これらの小器官が D C 介在性 T 細胞クロスプライミングのための腫瘍抗原物質の担

50

体として作用することを示唆している。かかる結果は、抗癌ワクチンとして腫瘍エキソソームを使用するという臨床的試みを支持する。これらの微小胞によって示される免疫系の多様な要素に対する抑制効果の膨大な数の証拠は、腫瘍エキソソームの疾患進行における関与を明らかに支持している。特に、多様な起源のヒト腫瘍細胞によって分泌されるエキソソームが、死亡リガンド（例えば FasL、TRAIL）の発現を介して、活性化された T 細胞においてアポトーシスを誘導し、NK 機能を阻害し、そして正常な単球から骨髄由来サブレッサー細胞の産生を促進できることが、近年示されている。これらのデータは、適当な腫瘍起源のエキソソームががん患者の血漿および新生物性浸出液において豊富に見られるという再現性のある証拠と共に、腫瘍細胞増殖および進行を可能にする宿主微小環境を形作る腫瘍エキソソームの役割を支持している。

10

#### 【0005】

がん進行におけるエキソソームの役割の理解が増えつつあること、そして悪性腫瘍および腫瘍増殖の新たな治療法、改善された診断方法および追跡の必要性が増えつつあるという事実を鑑みて、ヒト体液中のエキソソームを検出し、測定する方法およびツールが必要とされている。しかし実際には、エキソソームを検出するために現在使用されている方法は定量的でないか（TEM）、あるいはわずかにのみ定量的である（WB）。エキソソームを定量するためにフローサイトメトリーが使用されているが、この方法は、研究者が必要とする正確な測定ができない。実際に、FACS（蛍光活性化細胞選別装置）分析は、小さなサイズのものであっても、細胞を定量するための好適な方法であるが、かかる小胞（すなわち 50~100 nm）の量を定量するためには好適でない。さらに、合計平均蛍光のおおまかな測定によって、あるサンプル中にいくつの微小胞が存在するかを正確に定量することはできない。さらにまた、FACS 分析は異なるサンプルの同時分析ができない。したがって、少量の体液からエキソソームを検出し、定量する方法が必要とされている。さらに、がんの初期診断が疾患処置に必須であることに鑑みて、強力な腫瘍マーカーおよび予後因子が必要とされている。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

エキソソームについての有用なインビボデータを得るための中心的な問題は、ヒト体液、特に血漿からエキソソームを定量し、特徴付けるための、エキソソームを得る現在利用可能な方法の効率が低レベルであることである。体液は腹水、脳液、骨髄、尿、糞便または気管支肺胞洗浄液であってもよい。これらの現在直面している課題の解決法を提供するために、本開示は、体液、特にヒト血漿からエキソソームを検出し、定量する単純で信頼のできる方法を提供する。本開示に従って、ELISA ベースの試験（ExoTest と称する）は、健常ドナーおよび腫瘍患者の両方のヒト血漿からエキソソームを定量し、特徴付けることができる。この試験によって、ヒト黒色腫または結腸癌を移植された SCID マウスおよび腫瘍患者の両方の血漿から、エキソソーム様微小胞の特徴付けが可能である。本開示は、エキソソームの血漿レベルが腫瘍サイズと直接関係しており、カベオリン-1 が腫瘍患者の血漿から精製したエキソソームから排他的に検出可能であることを示している。本開示に従って、ヒト患者の血漿中の腫瘍エキソソームの検出は、ヒト悪性腫瘍の診断および追跡に有用である。

30

40

#### 【0007】

本明細書に開示した技術によって、腫瘍の診断、追跡およびスクリーニングに関する診療に有用な非侵襲的試験が可能となる。本開示による技術はまた、腫瘍の臨床研究に使用することもできる。さらに、あるウイルス（例えば HIV および HCV）およびプリオンが細胞によって放出されるエキソソームまたは血漿内で検出できることが知られているので、本開示の技術は、ウイルス性疾患、伝染病および自己免疫疾患の特徴付けおよび研究に使用することもできる。さらにまた、本発明は、エキソソームで発現されるタンパク質（例えば腫瘍マーカー、ウイルス性タンパク質、プリオンタンパク質）に基づく既存の臨床検査を改善するためのツールを提供する。

#### 【0008】

50

本発明の根拠は、次の2つの重要な点に基づく：

1. 特に少量の、ヒト血漿サンプルにおいてしばしば入手可能なエキソソームの定量および特徴付けを可能とする方法についての先行技術は存在しない。
2. 多くのヒト疾患状態、特にがんにおいて、非侵襲的診断および/または予後検査の満たされていない要求が存在する。

【0009】

したがって、本発明の目的は、特に少量の、エキソソームを定量し、特徴付ける方法を提供することである。

別の本発明の目的は、血漿サンプル中のエキソソームを定量し、特徴付ける方法を提供することである。

さらに別の本発明の目的は、2 ml未満の体液中のエキソソーム濃度を測定し、併せてエキソソームのタンパク質組成物のほぼ完全な特徴付けを行う方法を提供することである。

【0010】

さらに、本発明の目的は、複数サンプル中のエキソソームを同時に定量する方法を提供することである。

さらにまた、本開示による試験は、血漿中のエキソソームの定量が腫瘍サイズと関連していることを示す。したがって、別の本発明の目的は、がん患者の予後を追跡し、得る方法を提供することである。

さらに、本発明の目的は、血漿エキソソームの細胞源を確立し、それらの中の感染物質（HIV、HCV）および/または伝染物質（例えばプリオンタンパク質）の存在を評価する試験を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】ヒト黒色腫の細胞培養物上清から精製したエキソソームの検出。A. エキソソーム検出および定量のためのExoTest (ELISA)のスキーム図。B. ExoTestによる精製CD63+エキソソームの用量漸増分析。C. ヒト黒色腫細胞 (Me501)の培養物上清から精製した異なる量のエキソソーム中のCD63、Rab5bおよびLamp-1発現のウェスタンブロット分析。D. 上清Me501細胞から精製し、ラテックスビーズにコーティングした黒色腫由来エキソソームでのRab5bおよびCD63発現のFACS分析。

【図2】ヒト黒色腫を移植したSCIDマウスの血漿エキソソームの検出。A. ExoTestによるヒト黒色腫細胞を移植したSCIDマウスの血漿から精製した腫瘍エキソソームの用量漸増分析。B. ヒト黒色腫細胞 (Me501)を移植したSCIDマウスの血漿から精製したエキソソーム内のRab-5bおよびCD63発現のFACS分析。C. 腫瘍増殖中の異なる時点で分析したMe501移植SCIDマウスにおける腫瘍サイズと血漿エキソソーム濃度の相関関係。マウスのグループは、各時点で5匹の動物によって代表された。エキソソーム濃度はOD450 x 1000として表す。

【図3】エキソソームでのカベオリン-1 (Cav-1)発現の特徴付け。A. 細胞抽出物ならびにヒト黒色腫細胞およびマクロファージ由来エキソソーム中のCav-1のウェスタンブロット分析。B. Me501細胞、Me501移植SCIDマウスおよび腫瘍ネガティブSCIDマウスの血漿から精製したエキソソーム中のCD64、Rab-5bおよびCav-1のウェスタンブロット分析。C. Me501移植SCIDマウスの血漿から精製したエキソソームでのCav-1発現のFACS分析。D. 黒色腫移植後5週目に屠殺した黒色腫担持SCIDマウス由来のCD63+およびCav1+エキソソームの血漿濃度。

【図4】黒色腫患者由来の血漿中のエキソソームの定量。健常ドナーおよび黒色腫患者の血漿から精製したエキソソームを、CD63 (A)またはカベオリン-1 (B)を検出抗原として用いてExoTestで定量した。データはボックスプロット代表として示す：各ボックスの水平および垂直の線は、それぞれ中央値と25~75パーセント値を示す。黒色の点は異常値を示す。エキソソーム濃度はOD450 x 10000として表す。グループ間の差は

10

20

30

40

50

Mann-Whitney検定によって評価した。

【図5】未分画サンプルでのExoTest (Elisa)。A. ヒトマクロファージ、黒色腫細胞および黒色腫患者由来の血漿から得た未分画培養物上清 (50 ml) と比較して、精製エキソソーム (タンパク質50 μg) 中で検出可能なエキソソームの量を測定した。データは平均 ± SDとして表す。B. 患者 (n=9、黒い菱形) および健常ドナー (n=4、白い菱形) の両方から得た精製または未分画血漿サンプルで測定した、CD63+ エキソソームの血漿濃度の回帰分析。エキソソーム濃度はOD450 × 1000として表す。

【図6】黒色腫患者由来の血漿中のエキソソームの定量。検出抗原としてCD63またはgp100およびMART-1のような典型的な黒色腫タンパク質を用いて、ExoTestによって黒色腫患者 (MEL) および健常ドナー (HD) の血漿から精製したエキソソームを定量した。データは平均 ± SDとして表す。エキソソーム濃度はOD450 × 1000として表す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

エキソソームは30~120 nmのサイズの微小胞であり、正常および腫瘍細胞によって細胞外環境に能動的に分泌される。がん進行におけるエキソソームの役割の理解が増えつつあること、そして悪性腫瘍および腫瘍増殖の新たな治療法、改善された診断方法および追跡の必要性が増えつつあるという事実に鑑みて、ヒト体液中のエキソソームを検出し、測定する方法およびツールが必要とされている。腫瘍微小環境に対する一連の有害な効果を通じて疾患進行を促進することにエキソソームが関与している可能性があるため、感受性が高く、特異的であり、そして実行可能なアッセイによって、ヒト血漿または血清中のエキソソームを定量する可能性は、極めて重要な問題となりつつある。かかるアッセイが利用可能であれば、がん予後におけるこれらの微小胞の潜在的な役割を評価し、そして腫瘍疾患を検出またはモニターするための新たな予後因子またはマーカーとしての、基礎的なツールとなり得る。しかし、現在使用されている方法、例えばTEMおよびWBは定量的でないか、わずかにのみ定量的であり、したがってヒト体液中のエキソソームを定量的に検出し、測定する方法が明らかに必要とされている。したがって、本開示の目的は、がん患者の診断および追跡試験のための新たなツールを腫瘍専門医に提供することである。さらにまた、本開示の目的は、ウイルス性疾患またはプリオン病のような、粒子が微小胞に感染する他のヒト疾患を診断するために使用する新たな方法を提供する。

【0013】

本明細書に開示する新規な定量試験は、エキソソームのELISA介在検出に基づいており、エキソソームを定量する初めての簡単な、感受性の高い、信頼できる試験である。この方法によって検出されるタンパク質は、エキソソームに特異的でなく、エンドソームおよびリソソームのような、膜が細胞膜構造に再利用されない細胞質小器官で排他的に共有されている。この特徴は、壊死腫瘍細胞由来のデブリ上のこれらのタンパク質またはそれらの可溶形態を検出する可能性を排除する。

【0014】

本開示のアッセイは好ましくは、腫瘍分泌エキソソームを優先的に検出することができる普遍的な腫瘍マーカー (カベオリン - 1) を含む。下記実施例に記載の異なる比較方法 (ウェスタンブロットティングとフローサイトメトリー) および異なる実験条件によって実施した一連の総合的研究は、本開示の新たな試験の信頼性を証明する。

【0015】

我々がExoTestと呼ぶ本開示の新たな方法は、ハウスキーピングタンパク質 (CD63およびRab-5) および腫瘍関連マーカーのカベオリン - 1の発現に基づいて血漿エキソソームを捕捉し、定量するサンドイッチELISA試験に基づく。ExoTestは、精製エキソソーム調製物中に存在するエキソソームを捕捉するために抗Rab5抗体を用いる。抗体を検出するため、ExoTestではエキソソーム抗原 (CD63) またはエキソソームの細胞源によって発現される他の抗原、例えば腫瘍の転移動態に関連するタンパク質であるカベオリン - 1を認識する抗体を使用する。実験の最初のセットでは

10

20

30

40

50

、我々はヒト腫瘍細胞系の培養培地由来のエキソソーム調製物を用いて、ウェスタンブロットおよびFACSによって得られた結果をExoTestの結果と比較した。結果は、3つの方法全てでエキソソーム調製物中の典型的なエキソソーム抗原が検出可能であったことを示した。しかし、FACSまたはWB分析と比較して、ExoTestはエキソソームおよびより少量の出発物質を含む同じ調製物中のより広いタンパク質群の定量分析が可能であった。この技術的特徴は、分析が血漿サンプルで実施されるとき、最も重要である。実際、ヒト黒色腫または結腸癌細胞を移植したSCIDマウスの血漿プールの分析は、WBを用いたとき、しばしば再現性がないか、あるいは少なくともとても難しいが、ExoTestはヒト腫瘍SCIDマウスの血漿中エキソソーム濃度の定量的分析が可能であった。新たな重要な発見は、ExoTestの結果に基づいて、血漿中エキソソーム濃度が腫瘍サイズと有意に関連づけられること、そして移植後の時間に伴って上昇することである。

10

#### 【0016】

さらに、循環エキソソームは、典型的なタンパク質と共に、マウスにおけるヒト腫瘍増殖によって発現される腫瘍マーカーを提示した(示さず)。したがって、検出抗原としてCD63を用いるExoTestは、黒色腫を有する患者および健常対象の血漿中のエキソソームを定量できた。腫瘍細胞は大量のエキソソームを分泌するため、黒色腫患者と健常対照人の血漿中のCD63ポジティブエキソソーム濃度に差がないことに、我々は本当に驚いた。可能性のある腫瘍特異的エキソソームを同定するために、我々は、検出抗原としてカベオリン-1を用いたExoTestを実施した。最近の刊行物に循環カベオリン-1の血漿濃度が転移性前立腺癌と有意に相関していることが報告されている。興味深いことに、カベオリン-1は癌化細胞形質転換、腫瘍形成および転移の病因に關与している。まず、我々はFACSおよびWBによって、腫瘍移植SCIDマウスおよび腫瘍患者の血漿から精製した、腫瘍由来エキソソームにカベオリン-1が存在することを示した。次いで、ExoTestを用いて、健常個体の血漿と比較して腫瘍患者におけるカベオリン-1ポジティブエキソソームの血漿濃度の顕著な上昇を我々は観察でき、これはカベオリン-1が特異的腫瘍マーカーを示し、ExoTestがかかる上昇を定量するためのうまくいく試験であることを示唆している。

20

#### 【0017】

つまるところ、本結果は、エキソソーム検出ExoTestはヒトにおける循環エキソソームの検出および定量に実用的であり、有用であることを示す。さらに、該試験は、血漿エキソソーム調製物中の異なるタンパク質を検出する可能性を提供し、特定のタイプの腫瘍患者に適用できる可能性がある。本開示はまた、血漿エキソソームの定量および特徴付けに基づく腫瘍患者の新規な予後/診断ツールを提供する。感受性の高い、信頼できる血清マーカーがなおも限定されており、LDH(乳酸デヒドロゲナーゼ)濃度が疾患コースおよび予後の評価のための唯一の予後血清因子であり続けるため、これは特に、黒色腫患者に関連する。

30

#### 【0018】

本発明を以下に詳細に記載する。実施例および実験の詳細は、当業者の理解を改善し、手助けするために提供する。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって決定される。

40

#### 【実施例】

#### 【0019】

##### 1. エキソソーム源

##### A. 細胞培養物上清

我々は2つのタイプのヒト腫瘍細胞系、すなわち黒色腫および結腸癌を用いた。Me1501およびMe1BSは、患者の黒色腫病変から外科手術によって切除して得た2つの転移性黒色腫細胞系である(Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy)。我々はまた、2つの結直腸癌細胞系、Colo206(結直腸癌患者の肝臓転移から作成)および1869col(Istituto Superiore di SanitaのDr. Maccalliから提供)も用

50

いた。全ての細胞系は、100 IU/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン (Gibco)、2 mMのグルタミン I (Gibco) および10%胎児ウシ血清 (FCS) (Invitrogen, Milan, Italy) を補ったRPMI 1640培地中で培養した。ヒト単球由来マクロファージ (MDM) は培養物中でCD14電磁ビーズ (Milteny Biotec, Germany) およびGM-CSF (500 U/ml) を5日間使用して、健常血液ドナーの軟膜から得た。

#### 【0020】

##### B. ヒト腫瘍SCIDマウス血漿

CB.17 SCID/SCIDメスマウス (Harlan, S. Pietro al Natisone, Italy) を4~5週齢で用いて、特定病原体を含まない条件下で維持した。動物に対する全ての手順はUKCCRガイドラインに従って実施した。SCIDマウスはマイクロアイソレーターケージ中で飼育し、食餌、水および寝具は全て、使用前にオートクレーブ処理した。マウスの右側腹部に $2.5 \times 10^6$ 細胞/マウスのヒト黒色腫または結腸癌細胞を皮下注射した。ノギスで腫瘍増殖を測定し、既報のとおり以下の式に従って腫瘍重量を推定した：腫瘍重量 (mg) = 長さ (mm) × 幅<sup>2</sup> (mm) / 2 (Luciani L et al., J. Natl. Cancer Inst., 2004)。移植した腫瘍を重量500 mgまで増殖させて、腫瘍増殖の間の異なる時点で屠殺したそれぞれの動物から、腫瘍移植マウス由来の血漿500 µlを採取した。

10

#### 【0021】

##### C. ヒトドナーおよび腫瘍患者の血漿

ヒト血漿サンプルは、原発性または転移性黒色腫を有する患者ならびに年齢と性別がマッチした健常ドナー由来のEDTA処理した全血から採取した。サンプルは分析まで-70

20

で保存した。

#### 【0022】

##### 2. インビトロおよびインビボエキソソーム調製物

T-175フラスコ中で72時間コンフルエントな細胞培養物からヒト黒色腫および結腸癌細胞系由来の調製物を採取し、わずかに修正したが既報のとおりに微小胞を単離した (Andreola et al., J. Exp. Med. 2002)。簡潔には、300 × gで10分間遠心分離して細胞をペレットにした後、上清を1,200 × gで20分間、次いで10,000 × gで30分間遠心分離した。0.22 µmのフィルター (Stericup(商標), Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) を用いて上清を濾過し、次いでBeckman超遠心分離器 (Beckman Coulter) で100,000 gで1時間遠心分離して、エキソソームをペレットにした。大量のリン酸緩衝化食塩水 (PBS) で1回洗浄した後、エキソソームを少量のPBSまたは適切な溶解バッファー中に再懸濁し、さらなる実験分析まで-80

30

#### 【0023】

血漿サンプルからエキソソームを得るために、ヒト腫瘍を移植したSCIDマウスまたは腫瘍患者および健常ドナー由来のヘパリン化血液を400 × gで20分間遠心分離した。次いで血漿を採取し、アリコートに分け、分析まで-70

#### 【0024】

##### 3. エキソソームのフローサイトメトリー分析

エキソソームでの抗原発現の決定を、ラテックスビーズに結合した精製エキソソームでのフローサイトメトリー分析によって実施した。エキソソーム調製物 (5~10 µg) を5 µlの直径4 µmアルデヒド/硫酸ラテックスビーズ (Interfacial Dynamics, Portland, OR) と共にインキュベートし、2% FCSを含む400 µlのPBS中に再懸濁した。エキソソームで被覆したビーズ (20 µl) を4 で、以下の抗体：抗Rab5 (Santa Cruz)、抗CD63 - FITC (Pharmingen)、抗CD81 - PE (Pharmingen)、抗カペロリン-1 (clone N-20, Santa Cruz) と共に30分間インキュベートして、次いで必要であれば、PE - またはFITC - 結合二次抗体と共にインキュベートして、FACSCaliburフローサイトメトリー (BD Biosciences) で分析した。

40

#### 【0025】

50

#### 4. エキソソームのウェスタンブロット分析

1%のTriton X-100、0.1%のSDS、0.1 MのTris HCl (pH 7)およびプロテアーゼ阻害剤 (10 µg/mlのアプロチニン、10 µg/mlのロイペプチンおよび2 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド) (Sigma)を含む溶解バッファー中に精製エキソソームを溶解した。エキソソームタンパク質濃度はBradfordマイクロアッセイ法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)で測定した。SDSサンプルバッファーに合計50 µgのタンパク質を再懸濁し、5分間煮沸し、10% SDS-PAGEゲルで分離し、ニトロセルロース (Protran BA85, Schleicher and Schuell)に電気ブロットした。CD63 (1:50に希釈)およびRab-5b (1:50に希釈)に対する抗体で膜をブロットし、適切なHRP結合二次抗体 (Amersham Pharmacia)と共にインキュベートして、高感度化学発光 (ECL, Pierce)で可視化した。

10

#### 【0026】

#### 5. エキソソームについてのELISA試験の開発 (ExoTest)

本開示に従う新規なELISA試験 (ExoTest)は、エキソソーム中の特定のタンパク質の存在に基づく。これらのタンパク質はエンドソームおよびリソソームのような細胞質小器官で共有されており (それぞれRab-5およびCD63)、それらの膜は細胞膜構造として放出または再利用されず、したがって膜破壊に由来する構造の存在の可能性を除外する。

#### 【0027】

96ウェルプレート (Nunc, Milan, Italy)を体積100 µl/ウェルのカルボネートバッファーpH 9.6中のポリクロナル抗Rab-5b抗体 (clone A-20 Santa Cruz)、最終濃度4 µg/mlでコーティングし、4で一夜インキュベートした。PBSで3回洗浄後、100 µl/ウェルのブロッキング溶液 (0.5%のBSAを含むPBS)を加え、室温で1時間静置した。PBSで3回洗浄した後、50 µgの精製エキソソーム (最終体積100 µl/ウェル)を加え、37で一夜インキュベートした。PBSで3回洗浄後、適切な検出抗体 (抗CD63 Mab (clone H5C6 Pharmingen)または抗カベオリン-1 Mab (clone 2297, Pharmingen))をブロッキング溶液中4 µg/mlで希釈し、100 µl/ウェルを37で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄後、ブロッキング溶液中1:50,000に希釈した100 µlのHRP結合抗マウスペルオキシダーゼ二次抗体 (Pierce, Milan, Italy)と共にプレートを室温で1時間インキュベートした。PBSで3回最終洗浄後、反応物をPOD (Roche Applied Science, Milan, Italy)で展開し、1 NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でブロックし、450 nmフィルター (Biorad)を用いてELISAリーダーで光学密度を記録した。

20

30

#### 【0028】

実施例2. ExoTestは細胞培養調製物中に存在するエキソソームの定量を提供し、ウェスタンブロット分析よりも高いエキソソームタンパク質検出の感受性を有する。

黒色腫および結腸癌細胞系の培養物上清を標準的な方法に従って処理して、上記のとおり精製エキソソームを得た。エキソソームを検出するために設定されたサンドイッチELISA (ExoTest、図1A参照)を細胞培養物上清から得たエキソソーム上清に対して、差動的遠心分離によって実施した。ExoTestは細胞培養物上清中に存在するエキソソームの定量を提供することができ、CD63+エキソソームが用量依存的に検出可能であった (図1B)。10 000 g遠心分離後に得たペレットに由来する分画によって代表されるネガティブコントロールにおいて、細胞培養培地のみおよび二次抗体のみから精製したエキソソームは、かろうじて測定可能な吸光度であった (OD = 0.07 +/- 0.01)。試験内および試験間変動は、3つの異なるプレートで実施した同じ調製物の6回再現で計算し、それぞれ30% および35%であった。

40

#### 【0029】

同じ精製エキソソーム調製物のウェスタンブロットおよびFACS分析によって、ExoTestで得た定量データを確認した。実際、両方のエキソソーム溶解物におけるWBによってRab-5b、Lamp-1および低い程度のCD63タンパク質が多様なエキソソーム調製物において検出され (図1D)、Rab-5bとCD63は両方ともラテッ

50

クスビーズに結合したエキソソームについてのFACSで検出された(図1D)。しかし、ExoTestによるエキソソーム検出および定量は、WB分析に対してCD63タンパク質の検出についてのより高い感受性を示した(図1C)。実際に、WBによってCD63またはRab-5bを適切に検出するためには少なくとも12.5 µgのエキソソームタンパク質が必要であったが、ExoTestは最少量の3 µgの精製エキソソーム調製物から開始して明確にエキソソームを検出できた。

#### 【0030】

実施例3．FACS、WBおよびExoTestによるヒト腫瘍を移植したSCIDマウスのインビボエキソソーム調製物の定性および定量結果の比較

ExoTestを用いてインビボでヒト腫瘍由来エキソソームを検出できるかを検証するため、我々はまず、ヒト黒色腫(Me501)および結腸癌細胞系をSCIDマウスに皮下注射する実験を実施した。最初の実験では、移植腫瘍(100~500 mg)を担持するSCIDマウスから屠殺時に得た血漿サンプルを、エキソソーム精製手順に供した。細胞培養物上清から精製したエキソソームとして、マウス血漿から精製したエキソソームもExoTest(図2A)およびFACS(図2B)によって明確かつ特異的に検出可能であった。対照SCIDマウス(ヒト腫瘍を移植されていない)の血漿から得たエキソソーム調製物はblankサンプルと同等のバックグラウンド光学密度をもたらし(OD=0.08±0.03)、したがって易感染性動物にエキソソームが存在しないことまたはマウスエキソソームがヒトCD63およびRab-5bと交叉反応しないことを示唆している。繰り返すが、WB分析を用いた結果と同等の結果を得るために必要なエキソソーム調製物の量は、ExoTestでは顕著に少なかった。

10

20

30

#### 【0031】

ExoTestによってヒトエキソソームが回収でき、検出できることを示した後、我々はヒト腫瘍SCIDマウスにおける血漿エキソソームの量と腫瘍負荷が相関しているかを評価する目的で、時間経過実験を実施した。これらの実験では、黒色腫腫瘍を移植後5週間まで増殖させて、エキソソームを精製し、移植後14日目から開始してその3週間後までの間、個々の動物の血漿から定量した。結果はExoTestによって検出されたヒトエキソソームの量が時間と共に、腫瘍サイズの増加と平行して増加したことを示しており(図2C)；これは血漿エキソソームの定量が腫瘍増殖をモニターするための有用な方法であることを示唆している。同様の結果がMeBS細胞でも得られた(示さず)。

40

#### 【0032】

実施例4．腫瘍エキソソームはカベオリン-1を発現する

エキソソームは細胞間コミュニケーションの重要かつ特異的な経路を代表することが知られているので、我々は、生理的条件下で腫瘍由来エキソソームが循環エキソソームと異なり得ると考えた。最近では、前立腺癌PC-3細胞系から単離されたプロスタソーム(前立腺癌細胞によって分泌される膜ベシクル)が、カベオラの主成分であるカベオリン-1タンパク質を含むことが報告されている。また、健常対象と比較して前立腺癌患者において、カベオリン-1の血清濃度が高いことも知られている(Tahir, 2003 #21)。しかし、このタンパク質と血中の膜ベシクルの関連を示唆する先行技術は存在しない。したがって、我々は黒色腫腫瘍を移植したSCIDマウスの血漿から得たエキソソームでのカベオリン-1の存在を評価した。図3Aの結果が示すとおり、Cav1はインビトロでヒト黒色腫によって分泌されたエキソソームにおいて強く発現されているが、例えば原発性単球由来マクロファージ(MDM)のような正常ヒト細胞由来の細胞抽出物およびエキソソームの両方では検出されない。これらの結果は、エキソソーム包埋形態で分泌されるCav1が黒色腫細胞の特異的な特徴であり得て、したがって腫瘍由来エキソソームのエクスピボ分析のための潜在的なマーカーであり得ることを示唆している。したがって、我々は黒色腫腫瘍を移植したSCIDマウスの血漿から得たエキソソームでのCav1の存在を試験した。Cav1はウェスタンブロット(図3B)、フローサイトメトリー(図3C)およびExoTest(図3D)によって黒色腫腫瘍を移植したSCIDマウスの血漿に由来するエキソソーム調製物中で検出されたが、対照動物の血漿由来エキソソームではCav

40

50

v 1 は検出されなかった (図 3 B、3 D)。黒色腫および結腸癌 (CRC) 患者からの結果と一致して、黒色腫についてのMelanA/Mart-1およびCRCについてのCEAのような他の腫瘍マーカーが、Cav1で得られた結果と同等の結果で、腫瘍を有するSCIDマウスの腫瘍エキソソームのインビボ放出をExoTestによる検出に使用できた。しかし、黒色腫は異種または少量のMelanA/MART-1を、とりわけ転移レベルで発現し得て、CEAはほとんどがCRC患者の血清中に溶解形態で存在するため、Cav1がより信頼でき、再現性のある腫瘍マーカーである。したがって、ExoTestを抗Cav1特異的抗体の封入体でさらに開発する。

#### 【0033】

実施例5. ExoTestによる腫瘍患者の血漿のインビボエキソソーム調製物の定量：予後のためのツールとしての血漿中エキソソーム量

ヒト腫瘍SCIDマウスで得られたデータによって、我々はExoTestがヒト血漿から精製したエキソソームの検出および特徴付けが同様に可能かを調査することを促された。定量が可能であれば、我々は腫瘍患者が健常ドナーの血漿中に存在するのは異なる量および/または質で循環血漿エキソソームを有し得るかを検証することを目的とした。エキソソームを腫瘍患者 (n=62) および健常ドナー (n=37) の血漿から精製して、Rab5およびCD63の存在についてExoTestおよびウェスタンブロット分析に供した。ExoTestによるCD63およびCav1に基づくエキソソームの定量は、表1に示す。

#### 【0034】

表1. 試験集団における血漿エキソソームおよびLDHレベル。CD63+およびCav1+ exoは、血漿エキソソームであり、OD450×1000として表す。血漿LDH値はIU/Lとして表す。データは平均として示す (95% C.I.)

【表1】

	CD63+	Cav1+ exo	LDH
黒色腫患者 (n=62)	478 (390~566)	524 (458~590)	438 (321~555)
健常ドナー (n=37)	236 (188~285)	213 (180~246)	360 (240~480)

#### 【0035】

ExoTestは黒色腫患者と健常ドナー両方由来の血漿精製エキソソーム中のエキソソームタンパク質を、健常ドナーと比較して4倍の黒色腫患者の血漿中エキソソーム濃度として、検出できた (図4A) ( $p < 0.001$ )。2種のエキソソームタンパク質マーカーの検出に基づくExoTestの感受性および特異性を決定するために、我々はCD63およびCav1発現血漿エキソソームの両方についてカットオフ (健常ドナーのサンプル中の平均  $\pm 2SD$ ) を計算し、それぞれ526および411 (OD450×1000)であった。CD63+エキソソームを検出するExoTestは低い感受性 (36%) および良好な特異性 (97.3%) を示したが、Cav1+エキソソームについてのExoTestはより高い感受性 (63%) および同様の特異性 (97.3%) を有した。この観察と一致して、Cav1+エキソソームの血漿レベルは黒色腫患者におけるCD63+エキソソームの濃度よりも有意に高かった ( $P = 0.04$ )。これらの結果は以下のことを示唆している：

- i) 黒色腫患者において循環Cav1はエキソソームと関連し得る、および
- ii) Cav1を有する血漿エキソソームの定量は、有用な腫瘍マーカーと考え得る。

#### 【0036】

さらに、我々は血漿LDHはCD63+またはCav1+血漿エキソソームと関連していないが、CD63+とCav1+血漿エキソソーム間で有意な相関が観察される (スピアマンの係数 0.25、 $P = 0.04$ ) ことを見出した (図4C)。さらに、ExoTestはがんまたは黒色腫患者の血漿中のMART-1またはCEAのような腫瘍抗原の存在を示した (図6)。

#### 【0037】

分析に含まれるほとんどの患者(57/62)は、進行した疾患に罹患していた(ステージII~IV)。全ての疾患段階において血漿エキソソーム濃度の広い分布がExoTestによって検出され、これは異なる患者の末梢循環中に存在するエキソソームの量のばらつきが多様なレベルの腫瘍悪性度を反映し得て、したがって黒色腫の新たな独立した予後因子となり得ることを示唆している。American Joint Committee on Cancer(AJCC)によって示された他の予後因子、例えば原発性黒色腫の厚みおよび潰瘍形成、転移性リンパ節の数、ならびに離れた転移の位置および数も、本開示の結果によって示唆されるように、エキソソーム血清含有量と相関し得る。

#### 【0038】

実施例6.エキソソーム定量のために全血漿を用いることができる

臨床目的でのExoTestの潜在的な適用によって、我々は、ExoTestが未分画生物学的液体におけるエキソソーム検出に用いることができるかを検証することを促された。超遠心分離の工程を避けることで容易な、再現性のよい分析が可能となる。したがって、我々は未分画サンプル(ヒトマクロファージおよび黒色腫細胞由来の細胞培養物上清、ならびにヒト血漿)と同じサンプルから精製したエキソソームからの、CD63+エキソソームの検出および定量を比較した。試験の感受性を増強するために、これらの特定の実験について、HRP結合Mabを15分でなく30分間インキュベートした。図5Aに示すとおり、未分画マクロファージおよび黒色腫培養物上清と9人の黒色腫患者由来の血漿から、エキソソームの存在がExoTestによって検出された。さらに、我々は4人の健常ドナー由来の血漿の同じ分析を実施した。分析したサンプルの総数(9人の患者と4人の健常ドナー)での回帰分析は2つのタイプの測定間で有意な相関を示した(図5B)。これらの結果は、全血漿を用いて、エキソソーム精製の複雑な、時間のかかる手順を回避した臨床設定においてExoTestの潜在的な適用が示唆される。

#### 【0039】

文献

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002 Aug; 2(8):569-79.

Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002 May;3(5):321-30.

Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, Le Pecq JB. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2002 Dec 15;270(2):211-26.

Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):10963-72.

Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3235-41

Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*. 1997 Dec;8(12):2631-45.

van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. 2001 Aug; 121(2):337-49.

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002; 195(10):1303-1316.

Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M,

10

20

30

40

50

- Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1796-804.
- Chaput N, Scharzt NE, Andre F, Zitvogel L. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 532:215-21.
- Taylor DD, Taylor CG, Jiang CG, Black PH. Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells. *Int J Cancer*. 1988 Apr 15; 41(4):629-35.
- Taylor DD, Lyons KS, Gercel-Taylor C. Shed membrane fragment-associated markers for endometrial and ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2002 Mar; 84(3):443-8. 10
- Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res*. 1998 Sep-Oct; 18(5A):3433-7.
- Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenback S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*. 2003 Oct; 22(4):578-83.
- Andre F, Scharzt NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002 Jul 27; 360(9329):295-305. 20
- Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeek JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jul; 31(1):114-21.
- Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005 Jul; 17(7):879-87.
- Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luider TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol*. 2004 May; 164(5):1807-15. 30
- Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Sallès JP, Perret B, Bonnerot C, Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J*. 2004 May 15; 380(Pt 1):161-71.
- Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J*. 2004 Apr
- de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4336-44.
- Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HF, Slot JW, Geuze HJ. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. 2003 Apr; 4(4):222-31. 40
- Scharzt NE, Chaput N, Andre F, Zitvogel L. From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther*. 2002 Aug; 4(4):372-81.
- Chaput N, Taieb J, Scharzt NE, Andre F, Angevin E, Zitvogel L. Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Mar; 53(3):234-9.
- Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26 40

;278(52):52347-54. *Blood*. 2003 Dec 15; 102(13):4336-44.

Flanagan J, Middeldorp J, Sculley T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol*. 2003 Jul; 84(Pt 7):1871-9.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1161-72.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998 May; 4(5):594-600.

Smith TJ, Weis JH. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. *Immunol Today*. 1996 Feb;17(2):60-3. Review.

Lozupone F, Luciani F, Venditti M, Rivoltini L, Pupa S, Parmiani G, et al. Murine granulocytes control human tumor growth in SCID mice. *Int J Cancer*. 2000;87:569-573.

Lozupone F, Pende D, Burgio VL, Castelli C, Spada M, Venditti M, et al. Adoptive transfer of an anti-MART-127-35-specific CD8+ T cell clone leads to immunoselection of human melanoma antigen-loss variants in SCID mice. *Eur J Immunol*. 2003; 33:556-566.

Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, Thompson TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3882-5.

Mouraviev V, Li L, Tahir SA, Yang G, Timme TM, Goltsov A, Ren C, Satoh T, Wheeler TM, Ittmann MM, Miles BJ, Amato RJ, Kadmon D, Thompson TC. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol*. 2002 Oct; 168(4 Pt 1):1589-96.

D D Taylor and C Gercel-Taylor Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects *British Journal of Cancer* (2005) 92, 305-31

1

10

20

30

【 図 1 】

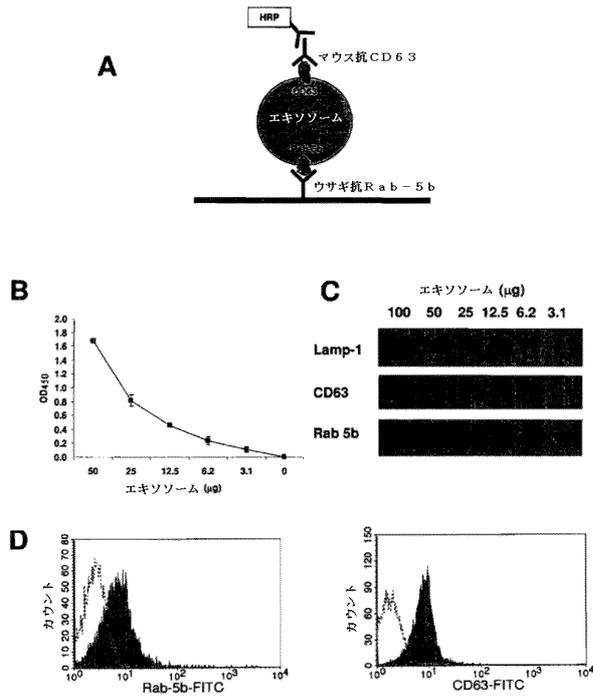


Fig 1

【 図 2 】

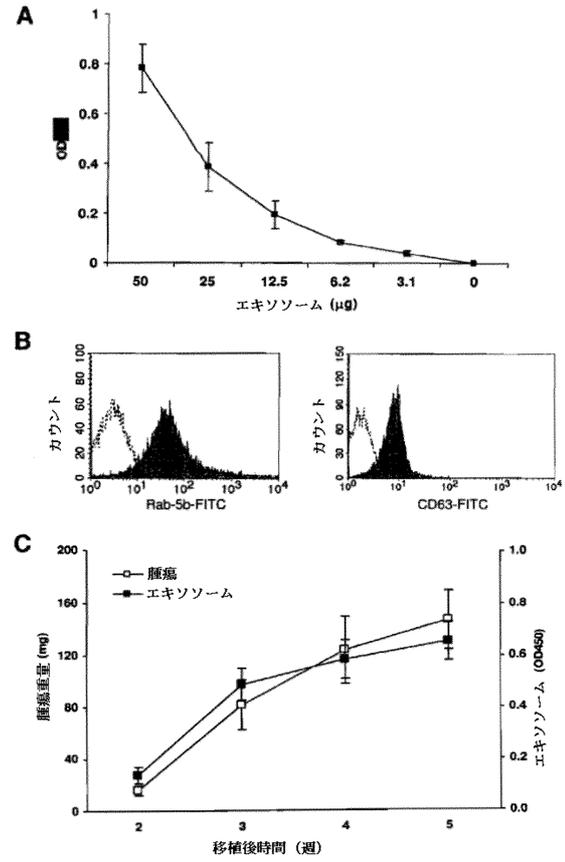


Fig 2

【 図 3 】

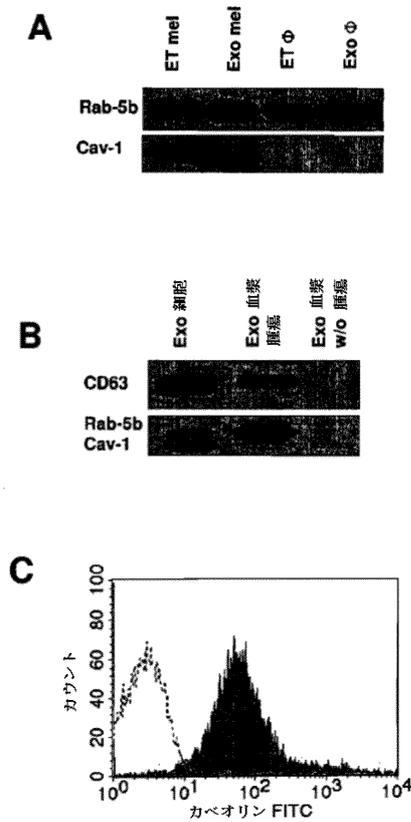


Fig 3

【 図 4 】

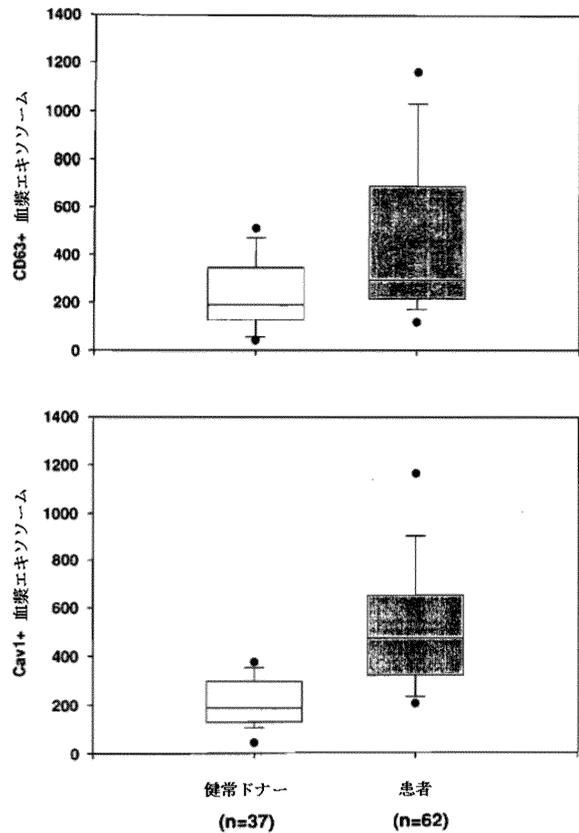


Fig 4

【 図 5 】

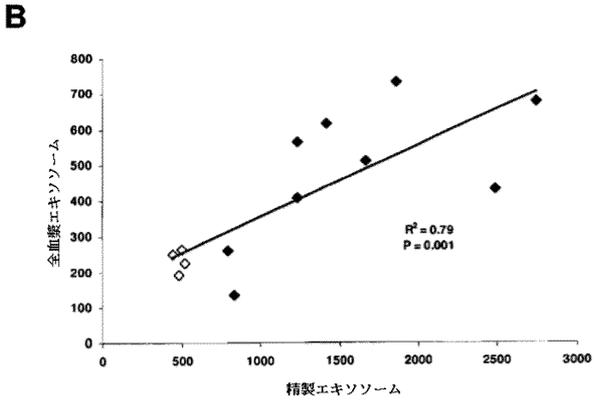
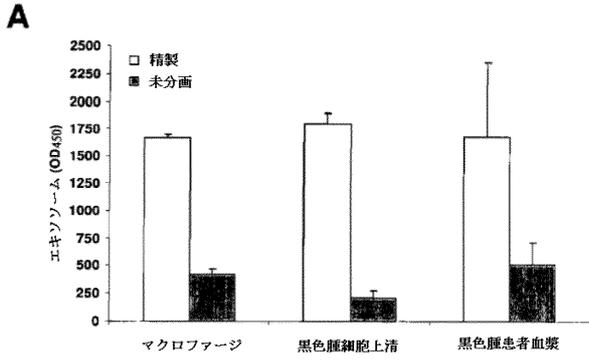


Fig 5

【 図 6 】

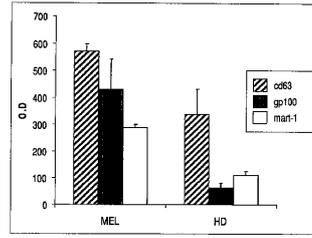


Fig 6

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EE2009/000002

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/53 G01N33/574 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOGA KENICHIRO ET AL: "Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes" ANTICANCER RESEARCH, vol. 25, no. 6A, November 2005 (2005-11), pages 3703-3707, XP002527286 ISSN: 0250-7005 page 3704	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 May 2009		Date of mailing of the international search report 03/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hohwy, Morten

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EE2009/000002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ADMYRE ET AL: "B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 120, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 1418-1424, XP022383439 ISSN: 0091-6749 page 1420 page 1419</p>	1-12
T	<p>LOGOZZI MARIANTONIA ET AL: "High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients." PLOS ONE 2009, vol. 4, no. 4, 2009, page e5219, XP002527287 ISSN: 1932-6203 the whole document</p>	1-12
Y	<p>CA 2 453 198 A1 (ICHIM THOMAS EMANUEL [CA]; MIN WEI-PING [CA]) 7 July 2005 (2005-07-07) page 10</p>	1-12
Y	<p>WO 03/063690 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]; THOMPSON TIMOTHY T [US] BAYLOR COLLEGE M) 7 August 2003 (2003-08-07) abstract</p>	1-12
Y	<p>AOKI MAOHITO ET AL: "Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and HormoneDependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles" ENDOCRINOLOGY, vol. 148, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 3850-3862, XP002527288 ISSN: 0013-7227 page 3857</p>	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EE2009/000002**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims 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.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
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.:
  
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.:

see additional sheet(s)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EE2009 /000002.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

**1. claims: 1-12**

A method for analysing exosomes, use of said method to monitor tumour growth, and a kit for performing said method.

**2. claims: 13-15**

A method for determining the presence of infectious agents within circulating exosomes.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EE2009/000002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CA 2453198	A1	07-07-2005	NONE
WO 03063690	A	07-08-2003	NONE

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 ステファノ・ファイス

イタリア、イ - 0 0 1 3 6 ローマ、ヴィア・スヴェトニオ 2 5 番

(72)発明者 マリアントニア・ロゴツィ

イタリア、イ - 0 0 1 5 9 ローマ、ヴィア・リッカルド・ツァンピエリ 2 7 番

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011510309A5</a>	公开(公告)日	2012-02-16
申请号	JP2010543379	申请日	2009-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	韩萨维奥梅德福Osau兴		
申请(专利权)人(译)	汉サビオ梅德韦杰夫·オサウヒング		
[标]发明人	ステファノファイス マリアントニアロゴツツイ		
发明人	ステファノ・ファイス マリアントニア・ロゴツツイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/576 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/567 G01N33/56988 G01N33/5743 G01N2333/16 G01N2333/18 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/576.Z G01N33/569.H		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二 中川正幸		
优先权	61/062528 2008-01-25 US 12/321412 2009-01-21 US		
其他公开文献	JP5583600B2 JP2011510309A		

#### 摘要(译)

本公开内容提供了通过使用夹心ELISA测试来捕获，检测，表征和量化小体积人体液体中的人外来体的方法。该方法允许外来体制剂的完全表征，从而通过使用非侵入性测定提供了将疾病相关病症与健康状态区分开的工具。事实上，这种方法可以用简单的血浆样本用于肿瘤的筛查，诊断和预后。同时，循环外泌体的测量可以提供关于患者中存在的肿瘤质量水平的信息。本文提供的方法适用于评估循环外泌体内一些感染性和/或可传播的试剂（例如病毒蛋白或朊病毒蛋白）的存在。