

(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2014-519340

(P2014-519340A)

(43) 公表日 平成26年8月14日(2014.8.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 254 頁)

(21) 出願番号	特願2014-516002 (P2014-516002)	(71) 出願人	511107212
(86) (22) 出願日	平成24年6月14日 (2012.6.14)		カリス ライフ サイエンスズ ルクセンブルク ホールディングス エス.アー. エール.エル.
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月31日 (2014.1.31)		ルクセンブルク大公国 エル2124 ルクセンブルク リュド マレシェ 102
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/042519	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02012/174282		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成24年12月20日 (2012.12.20)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/526,623		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年8月23日 (2011.8.23)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	61/497,895	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成23年6月16日 (2011.6.16)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/501,680		
(32) 優先日	平成23年6月27日 (2011.6.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカー組成物および方法

(57) 【要約】

診断法、治療関連法または予後判定法のためにバイオマーカーを評価して、表現型、たとえば病状もしくは疾患または疾患の病期もしくは進行を同定し、疾患、病状、病期および病状のステージのための候補治療レジメンを選択し、かつ治療効果を決定することができる。体液からの循環バイオマーカーを生理学的状態のプロファイリングまたは表現型の決定に使用することができる。これらは、核酸、タンパク質および循環構造、たとえば小胞および核酸-タンパク質複合体を含む。

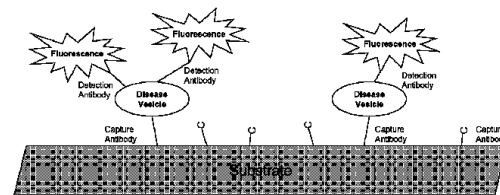
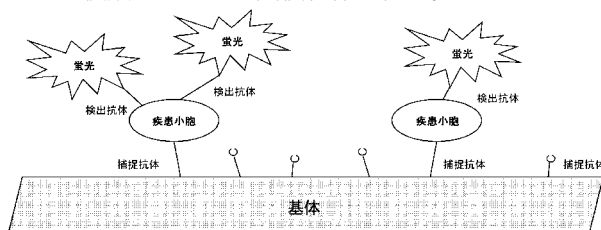


FIG. 2A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 生物学的試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程であって、該一つまたは複数のバイオマーカーが、表5から選択される一つまたは複数のバイオマーカーを含む、工程；および

(b) 該一つまたは複数のバイオマーカーの該存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む、方法。

【請求項2】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、miR-22、let7a、miR-141、miR-182、miR-663、miR-155、miR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628-5p、miR-517^{*}、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224^{*}、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b^{*}、miR-1179およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、miR-22、let7a、miR-141、miR-920、miR-450aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、表20～24のいずれかにおける遺伝子およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、A2ML1、BAX、C10orf47、Clorf162、CSDA、EIF3、ETFB、GABARAPL2、GUK1、GZMH、HIST1H3B、HLA-A、HSP90AA1、NRGN、PRDX5、PTMA、RABAC1、RABAGAP1L、RPL22、SAP18、SEPW1、SOX1およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、A2ML1、GABARAPL2、PTMA、RABAC1、SOX1、ETFBおよびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1、EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質CIII、ミオグロビン、テナシンC、MSH6、クローディン-3、クローディン-4、カベオリン-1、凝固因子III、CD9、CD36、CD37、CD53、CD63、CD81、CD136、CD147、Hsp70、Hsp90、Rab13、デスモリン-1、EMP-2、CK7、CK20、GCDF15、CD82、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8、HLA-DR、miR-200マイクロRNA、miR-200cおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項9】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-432、hsa-miR-326、hsa-miR-2110、hsa-miR-181a-2^{*}、hsa-miR-107、hsa-miR-301a、hsa-miR-484、hsa-miR-625^{*}およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項10】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-20a^{*}、hsa-miR-375、hsa-miR-200b、hsa-miR-379、hsa-miR-572、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-23a^{*}、hsa-miR-1236、hsa-miR-609、hsa-miR-17^{*}、hsa-miR-130b、hsa-miR-619、hsa-mi

R-624*、hsa-miR-198およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 1 1】

前記一つまたは複数のバイオマーカーがmiR-497を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 2】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、AQP2、BMP5、C16orf86、CXCL13、DST、ERCC1、GNAO1、KLHL5、MAP4K1、NELL2、PENK、PGF、POU3F1、PRSS21、SCML1、SEMG1、SMARCD3、SNAI2、TAF1C、TNNT3およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 3】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、ADRB2、ARG2、C22orf32、CYorf14、EIF1AY、FEV、KLK2、KLK4、LRR26、MAOA、NLGN4Y、PNPLA7、PVRL3、SIM2、SLC30A4、SLC45A3、STX19、TRIM36、TRPM8およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 4】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、ADRB2、BAIAP2L2、C19orf33、CDX1、CEACAM6、EEF1A2、ERN2、FAM110B、FOXA2、KLK2、KLK4、LOC389816、LRR26、MIPOL1、SLC45A3、SPDEF、TRIM31、TRIM36、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 5】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、ASTN2、CAB39L、CRIP1、FAM110B、FEV、GSTP1、KLK2、KLK4、LOC389816、LRR26、MUC1、PNPLA7、SIM2、SLC45A3、SPDEF、TRIM36、TRPV6、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 6】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、miRs-26a+b、miR-15、miR-16、miR-195、miR-497、miR-424、miR-206、miR-342-5p、miR-186、miR-1271、miR-600、miR-216b、miR-519ファミリー、miR-203およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるマイクロRNAを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 1 7】

- (a) 生物学的試料から一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を単離する工程；
- (b) 該一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を有する一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程；および
- (c) 該一つまたは複数の核酸バイオマーカーの該存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む、方法。

【請求項 1 8】

前記核酸-タンパク質複合体が、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A)、TNRC6B、TNRC6C、HNRNPA2B1、HNRPAB、ILF2、NCL (ヌクレオリン)、NPM1 (ヌクレオホスミン)、RPL10A、RPL5、RPLP1、RPS12、RPS19、SNRPG、TROVE2、アポリポタンパク質、アポリポタンパク質A、アポA-I、アポA-II、アポA-IV、アポA-V、アポリポタンパク質B、アポB48、アポB100、アポリポタンパク質C、アポC-I、アポC-II、アポC-III、アポC-IV、アポリポタンパク質D (アポD)、アポリポタンパク質E (アポE)、アポリポタンパク質H (アポH)、アポリポタンパク質L、APOL1、APOL2、APOL3、APOL4、APOL5、APOL6、APOLD1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 1 9】

前記核酸-タンパク質複合体が、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項17記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

前記核酸－タンパク質複合体が、Ago2、アポリポタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

前記一つまたは複数の核酸が一つまたは複数のマイクロRNAを含む、請求項17記載の方法。

【請求項 22】

前記一つまたは複数のマイクロRNAが表5におけるマイクロRNAを含む、請求項21記載の方法。

10

【請求項 23】

前記一つまたは複数のマイクロRNAが、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451、let7aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む、請求項21記載の方法。

【請求項 24】

前記核酸－タンパク質複合体が、Ago2、アポリポタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含み、かつ前記一つまたは複数のマイクロRNAが、miR-16およびmiR-92aならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む、請求項21記載の方法。

【請求項 25】

20

(a) 生物学的試料由来の微小胞集団中の一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーを検出する工程；

(b) 検出された微小胞集団と結合した一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程；および

(c) 該一つまたは複数の核酸の該存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む、方法。

【請求項 26】

前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーの前記レベルが、前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルに正規化される、請求項25記載の方法。

30

【請求項 27】

前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが、PCSA、Ago2、CD9およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項25記載の方法。

【請求項 28】

前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーが、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451、let7aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 29】

前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーがPCSAおよびAgo2を含み、かつ前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーがmiR-22を含む、請求項25記載の方法。

40

【請求項 30】

前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーがPCSAおよび／またはCD9を含み、かつ前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーがmiR-22を含む、請求項25記載の方法。

【請求項 31】

前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーがPCSAを含み、かつ前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーが、表22～24のいずれかから選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項25記載の方法。

【請求項 32】

前記バイオシグネチャーが、前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーと一つま

50

たは複数の核酸バイオマーカーとのレベルの比から算出されるスコアを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 3 3】

前記一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーがPCSAおよびPSMAを含み、かつ前記一つまたは複数の核酸バイオマーカーがmiR-22およびlet7aを含む、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

前記スコアを算出することが、

(a) 微小胞部分集団中のmiR-22ペイロードのレベルを該微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第一の倍数；

(b) 該微小胞部分集団中のlet7aペイロードのレベルを該微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第二の倍数；および

(c) 該微小胞部分集団と結合したPSMAタンパク質のレベルの第三の倍数の合計をとることを含む、請求項32記載の方法。

【請求項 3 5】

前記スコアを算出することが前記合計の単調変換を含む、請求項34記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第一の倍数が10である、請求項34記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第二の倍数が10である、請求項34記載の方法。

【請求項 3 8】

前記第三の倍数が1である、請求項34記載の方法。

【請求項 3 9】

前記バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程をさらに含み、該比較を使用して癌を特徴決定する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 0】

前記参照バイオシグネチャーが、癌を有しない対象由来である、請求項39記載の方法。

【請求項 4 1】

前記特徴決定が、対象における前記癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における該癌を転移性または高悪性度として同定することを含む、請求項39記載の方法。

【請求項 4 2】

前記比較する工程が、前記バイオシグネチャーが前記参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、前記癌に関する予後判定、診断またはセラノーシス (theranosis) 用の判定を提供することを含む、請求項39記載の方法。

【請求項 4 3】

前記生物学的試料が体液を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 4】

前記体液が、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液 (CSF)、痰、唾液、骨髄、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー腺液もしくは尿道球腺液、女性射精液、汗、糞便、毛髪、涙液、囊胞液、胸膜液および腹膜液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、腔分泌液、粘膜分泌液、水便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胞胚腔液または臍帯血を含む、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

前記生物学的試料が尿、血液または血液由来物を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 6】

前記生物学的試料が細胞培養物を含む、請求項1～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 7】

前記生物学的試料が組織試料を含む、請求項1～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項 48】

前記生物学的試料が一つまたは複数の微小胞を含有する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 49】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが前記一つまたは複数の微小胞と結合している、請求項48記載の方法。

【請求項 50】

前記一つまたは複数の微小胞が20nm～2000nmの直径を有する、請求項48記載の方法。

【請求項 51】

前記一つまたは複数の微小胞が20nm～200nmの直径を有する、請求項48記載の方法。

10

【請求項 52】

前記一つまたは複数の微小胞が、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、分画遠心分離法、ナノ膜限外ろ過法、免疫吸着捕捉法、アフィニティー精製法、アフィニティー捕捉法、イムノアッセイ法、マイクロ流体工学分離法、フローサイトメトリーまたはそれらの組み合わせに供される、請求項48記載の方法。

【請求項 53】

前記一つまたは複数の微小胞を一つまたは複数の結合物質と接触させる、請求項48記載の方法。

【請求項 54】

前記一つまたは複数の結合物質が、核酸、DNA分子、RNA分子、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、ペプチド、zDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、ペプチド、デンドリマー、膜タンパク質標識物質、化学物質またはそれらの組み合わせを含む、請求項53記載の方法。

20

【請求項 55】

前記一つまたは複数の結合物質を使用して前記一つまたは複数の微小胞を捕捉および／または検出する、請求項53記載の方法。

【請求項 56】

前記一つまたは複数の結合物質が、前記一つまたは複数の微小胞上の一つまたは複数の表面抗原に結合する、請求項53記載の方法。

【請求項 57】

前記一つまたは複数の表面抗原が一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項56記載の方法。

30

【請求項 58】

前記一つまたは複数のタンパク質が、CD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3およびEpCamの一つまたは複数を含む、請求項57記載の方法。

【請求項 59】

前記一つまたは複数のタンパク質が、テトラスパニン、CD9、CD63、CD81、CD63、CD9、CD81、CD82、CD37、CD53、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8または表3におけるタンパク質の一つまたは複数を含む、請求項57記載の方法。

【請求項 60】

前記一つまたは複数のタンパク質が、表3～5のいずれかにおける一つまたは複数のタンパク質を含む、請求項57記載の方法。

40

【請求項 61】

前記一つまたは複数の結合物質を使用して前記一つまたは複数の微小胞を捕捉する、請求項53記載の方法。

【請求項 62】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、前記捕捉された一つまたは複数の微小胞内のペイロードを含む、請求項61記載の方法。

【請求項 63】

前記ペイロードが、一つまたは複数の核酸、ペプチド、タンパク質、脂質、抗原、糖質

50

および／またはプロテオグリカンを含む、請求項62記載の方法。

【請求項 6 4】

前記核酸が、一つまたは複数のDNA、mRNA、マイクロRNA、snoRNA、snRNA、rRNA、tRNA、siRNA、hnRNAまたはshRNAを含む、請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

前記一つまたは複数のバイオマーカーがmRNAを含む、請求項62記載の方法。

【請求項 6 6】

前記癌が、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；副腎皮質癌；AIDS関連癌；AIDS関連リンパ腫；肛門癌；虫垂癌；星状細胞腫；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；基底細胞癌；膀胱癌；脳幹部神経膠腫；脳腫瘍（脳幹部神経膠腫、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、星状細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、上衣細胞腫、中間型松果体実質腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、および松果体芽腫を含む）；乳癌；気管支腫瘍；バーキットリンパ腫；原発不明癌；カルチノイド腫瘍；原発不明癌腫；中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；中枢神経系胚芽腫；子宮頸癌；小児癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；結腸直腸癌；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；内分泌膵島細胞腫瘍；子宮内膜癌；上衣芽腫；上衣腫；食道癌；嗅神経芽細胞腫；ユーイング肉腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；肝臓外胆管癌；胆嚢癌；胃癌；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質細胞腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；妊娠性絨毛性腫瘍；神経膠腫；毛様細胞性白血病；頭頸部癌；心臓癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；眼内黒色腫；膵島腫瘍；カボジ肉腫；腎臓癌；ランゲルハンス細胞組織球症；喉頭癌；口唇癌；肝臓癌；悪性線維性組織球腫；骨癌；髄芽腫；上衣細胞腫；黒色腫；メルケル細胞癌；メルケル細胞皮膚癌；中皮腫；原発不明転移性扁平上皮性頸部癌；口腔癌；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫；多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄増殖性腫瘍；鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；非黒色腫皮膚癌；非小細胞肺癌；口腔癌；口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫；その他の脳および脊髄の腫瘍；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；膵臓癌；乳頭腫症；副鼻腔癌；副甲状腺癌；骨盤癌；陰茎癌；咽頭癌；中間型松果体実質腫瘍；松果体芽腫；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍/多発性骨髄腫；胸膜胚芽腫；原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；原発性肝細胞肝癌；前立腺癌；直腸癌；腎臓癌；腎細胞（腎臓）癌；腎細胞癌；気道癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；セザリー症候群；小細胞肺癌；小腸癌；軟部組織肉腫；扁平上皮癌；頸部扁平上皮癌；胃癌；テント上原始神経外胚葉性腫瘍；T細胞リンパ腫；精巣癌；咽頭癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌；移行上皮癌；腎盂と尿管の移行上皮癌；絨毛性腫瘍；尿管癌；尿道癌；子宮癌；子宮肉腫；陰癌；外陰癌；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；またはウィルムス腫瘍を含む、請求項39記載の方法。

【請求項 6 7】

前記癌が前立腺癌を含む、請求項1～6、9～10または12～38のいずれか一項に従属する請求項39記載の方法。

【請求項 6 8】

前記癌が肺癌を含む、請求項1、11、15、17～22、25または26のいずれか一項に従属する請求項39記載の方法。

【請求項 6 9】

前記癌が乳癌を含む、請求項1、13、17～22、25または26のいずれか一項に従属する請求項39記載の方法。

【請求項 7 0】

前記癌が結腸直腸癌を含む、請求項1、14、17～22、25または26のいずれか一項に従属する請求項39記載の方法。

【請求項 7 1】

前記癌が卵巣癌を含む、請求項1、7～8、17～22、25または26のいずれか一項に従属する請求項39記載の方法。

【請求項 7 2】

インビトロで実施される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 3】

前記請求項のいずれか一項記載の方法を実施するための、試薬の使用。

【請求項 7 4】

請求項1～72のいずれか一項記載の方法を実施するように構成された試薬を含む、キット。

【請求項 7 5】

前記試薬が、表3～5、9～11、16～27、29または31～32のいずれかにおけるバイオマーカの少なくとも一つに結合することができる結合物質である、請求項74記載のキット。

10

【請求項 7 6】

単離されたPCSA+小胞。

【請求項 7 7】

miR-22、let7a、miR-141、miR-182、miR-663、miR-155、miR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628-5p、miR-517^{*}、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224^{*}、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b^{*}、miR-1179およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む、請求項76記載の小胞。

【請求項 7 8】

表20～24のいずれかから選択される一つまたは複数のメッセンジャーRNA (mRNA) を含む、請求項76記載の小胞。

20

【請求項 7 9】

(a) 基体につながれている第一の部分と、関心対象のマイクロRNA配列に対して少なくとも75%相補的である第二の部分と、標識を含む第三の部分とを含み、該第二の部分が該第一の部分と該第三の部分との間に配置されている、オリゴヌクレオチド、および

(b) マイクロRNA

を含む、組成物。

【請求項 8 0】

前記基体が平面基体、カラム、またはビーズを含む、請求項79記載の方法。

【請求項 8 1】

前記オリゴヌクレオチドの前記第二の部分が、(b)のマイクロRNAに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である、請求項79記載の方法。

30

【請求項 8 2】

前記オリゴヌクレオチドの前記第二の部分が、関心対象のマイクロRNA配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である、請求項79記載の方法。

【請求項 8 3】

前記オリゴヌクレオチドの前記第三の部分が間接的に標識されている、請求項79記載の方法。

【請求項 8 4】

前記オリゴヌクレオチドの前記第三の部分がビオチン化されている、請求項79記載の方法。

40

【請求項 8 5】

前記標識がストレプトアビジンを含む、請求項83記載の方法。

【請求項 8 6】

前記オリゴヌクレオチドの前記第三の部分の前記標識が蛍光標識、放射能標識または酵素標識を含む、請求項79記載の方法。

【請求項 8 7】

前記標識がフィコエリスリン (PE) を含む、請求項79記載の方法。

【請求項 8 8】

50

前記オリゴヌクレオチドの前記第三の部分が間接的に標識されている、請求項79記載の方法。

【請求項 89】

(b) のマイクロRNAがタンパク質と複合した状態にある、請求項79記載の方法。

【請求項 90】

前記タンパク質が、Argonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A)、TNRC6B、TNRC6C、HNRNPA2B1、HNRPAB、ILF2、NCL (ヌクレオリン)、NPM1 (ヌクレオホスミン)、RPL10A、RPL5、RPLP1、RPS12、RPS19、SNRPG、TROVE2、アポリポタンパク質、アポリポタンパク質A、アポA-I、アポA-II、アポA-IV、アポA-V、アポリポタンパク質B、アポB48、アポB100、アポリポタンパク質C、アポC-I、アポC-II、アポC-III、アポC-IV、アポリポタンパク質D (アポD)、アポリポタンパク質E (アポE)、アポリポタンパク質H (アポH)、アポリポタンパク質L、APOL1、APOL2、APOL3、APOL4、APOL5、APOL6およびAPOLD1からなる群より選択される、請求項89記載の方法。

10

【請求項 91】

前記タンパク質が、Ago1、Ago2、Ago3およびAgo4からなる群より選択される、請求項89記載の方法。

【請求項 92】

前記タンパク質が組み換えタンパク質を含む、請求項89記載の方法。

【請求項 93】

前記タンパク質がAgo2を含む、請求項92記載の方法。

20

【請求項 94】

前記組成物が生物学的試料を含む、請求項79記載の方法。

【請求項 95】

前記マイクロRNAが生物学的試料から単離される、請求項79記載の方法。

【請求項 96】

前記生物学的試料が体液を含む、請求項94または95記載の方法。

【請求項 97】

前記体液が、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液 (CSF)、痰、唾液、骨髄、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー腺液もしくは尿道球腺液、女性射精液、汗、糞便、毛髪、涙液、囊胞液、胸膜液および腹膜液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、腔分泌液、粘膜分泌液、水便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胞腔液または臍帯血を含む、請求項96記載の方法。

30

【請求項 98】

前記体液が尿、血液または血液由来物を含む、請求項96記載の方法。

【請求項 99】

前記マイクロRNAがタンパク質と複合した状態で単離される、請求項95記載の方法。

【請求項 100】

(i) 請求項79～99のいずれか一項記載の組成物を供給する工程；

(ii) 前記マイクロRNAを前記オリゴヌクレオチドに結合させる条件下で、該組成物をインキュベートする工程；および

(iii) 前記基体からの前記標識の切断の量を検出する工程を含む、方法。

40

【請求項 101】

前記基体からの前記標識の切断の量を検出する工程が、工程 (ii) の前後で該基体と接触している標識の量を検出することを含む、請求項100記載の方法。

【請求項 102】

前記基体からの前記標識の切断が、前記マイクロRNAと複合した状態にあるタンパク質の存在を示す、請求項100記載の方法。

【請求項 103】

50

前記タンパク質が、Ago1、Ago2、Ago3およびAgo4からなる群より選択される、請求項10記載の方法。

【請求項104】

前記基体からの前記標識の切断の量がリアルタイムで観測される、請求項100記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2011年6月16日出願の米国特許仮出願第61/497,895号、2011年6月20日出願の 10
米国特許仮出願第61/499,138号、2011年6月27日出願の米国特許仮出願第61/501,680号、2011年7月8日出願の米国特許仮出願第61/506,019号、2011年7月11日出願の米国特許仮出願第61/506,606号、2011年7月11日出願の米国特許仮出願第61/506,598号、2011年7月14日出願の米国特許仮出願第61/507,989号、2011年7月25日出願の米国特許仮出願第61/511,455号、2011年8月15日出願の米国特許仮出願第61/523,763号、および2011年8月23日出願の米国特許仮出願第61/526,623号の恩典を主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本出願は、2012年6月7日出願の国際特許出願第PCT/US2012/041387号の一部継続出願である。国際特許出願第PCT/US2012/041387号は、2011年6月7日出願の米国特許仮出願第61/ 20
494,196号、2011年6月7日出願の米国特許仮出願第61/494,355号および2011年7月14日出願の米国特許仮出願第61/507,989号の恩典を主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

本出願はまた、2012年2月17日出願の国際特許出願第PCT/US2012/025741号の一部継続出願である。国際特許出願第PCT/US2012/025741号は、2011年2月24日出願の米国特許仮出願第61/446,313号、2011年6月27日出願の米国特許仮出願第61/501,680号、2011年4月4日出願の米国特許仮出願第61/471,417号、2011年8月15日出願の米国特許仮出願第61/523,763号および2011年2月22日出願の米国特許仮出願第61/445,273号の恩典を主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。 30

【0004】

本出願はまた、2011年8月18日出願の国際特許出願第PCT/US2011/048327号の一部継続出願である。国際特許出願第PCT/US2011/048327号は、2010年8月18日出願の米国特許仮出願第61/374,951号、2010年9月2日出願の米国特許仮出願第61/379,670号、2010年9月9日出願の米国特許仮出願第61/381,305号、2010年9月15日出願の米国特許仮出願第61/383,305号、2010年10月8日出願の米国特許仮出願第61/391,504号、2010年10月15日出願の米国特許仮出願第61/393,823号、2010年11月9日出願の米国特許仮出願第61/411,890号、2010年11月17日出願の米国特許仮出願第61/414,870号、2010年11月23日出願の米国特許仮出願第61/416,560号、2010年12月10日出願の米国特許仮出願第61/421,851号、2010年12月15日出願の米国特許仮出願第61/423,557号、2010年12月29日出願の米国特許仮出願第61/428,196号 40
の恩典を主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0005】

本出願はまた、2011年3月1日出願の国際特許出願第PCT/US2011/026750号の一部継続出願である。国際特許出願第PCT/US2011/026750号は、2009年11月12日に 50
出願された米国特許出願第12/591,226号の一部継続出願である。米国特許出願第12/591,226号は、2008年11月12日に 出願された米国特許仮出願第61/114,045号;2008年11月12日に 出願された同第61/114,058号;2008年11月13日に 出願された同第61/114,065号;2009年2月9日に 出願された同第61/151,183号;2009年10月2日に 出願された同第61/278,049号;2009年10月9日に 出願された同第61/250,454号;および2009年10月19日に 出願された同第61/253,027号の恩典を主張

し、2010年3月1日に出願された米国特許仮出願第61/274,124号;2010年6月22日に出願された同第61/357,517号;2010年7月15日に出願された同第61/364,785号の恩典も主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0006】

本出願はまた、2011年4月6日出願の国際特許出願第PCT/US2011/031479号の一部継続出願でもある。国際特許出願第PCT/US2011/031479号は、2010年4月6日に出願された米国特許仮出願第61/321,392号;2010年4月6日に出願された同第61/321,407号;2010年5月6日に出願された同第61/332,174号;2010年5月25日に出願された同第61/348,214号、2010年5月26日に出願された同第61/348,685号;2010年6月11日に出願された同第61/354,125号;2010年6月16日に出願された同第61/355,387号;2010年6月21日に出願された同第61/356,974号;2010年6月22日に出願された同第61/357,517号;2010年7月8日に出願された同第61/362,674号;2010年11月12日に出願された同第61/413,377号;2010年4月9日に出願された同第61/322,690号;2010年5月13日に出願された同第61/334,547号;2010年7月15日に出願された同第61/364,785号;2010年8月2日に出願された同第61/370,088号;2010年9月2日に出願された同第61/379,670号;2010年9月9日に出願された同第61/381,305号;2010年9月15日に出願された同第61/383,305号;2010年10月8日に出願された同第61/391,504号;2010年10月15日に出願された同第61/393,823号;2010年11月9日に出願された同第61/411,890号;および2010年11月23日に出願された同第61/416,560号の恩典を主張する。これらの出願は全てその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0007】

背景

癌のような病態および疾患に関するバイオマーカーは、生物学的分子、たとえばタンパク質、ペプチド、脂質、RNA、DNAならびにそれらのバリエーションおよび修飾を含む。

【0008】

DNA、RNAおよびタンパク質のような特異的バイオマーカーの同定は、病態または疾患の診断、予後判定またはセラノーシス(theranosis)用を使用されるバイオシグネチャーを提供することができる。バイオマーカーは、循環中のDNA、RNA、タンパク質および小胞を含む体液中で検出することができる。循環バイオマーカーは、タンパク質、たとえばPSAおよびCA125ならびに核酸、たとえばSEPT9 DNAおよびPCA3メッセンジャーRNA(mRNA)を含む。循環バイオマーカーは、循環小胞に結合していてもよい。小胞とは、細胞から流出する膜封じ込め構造であり、血液、血漿、血清、母乳、腹水、気管支肺泡洗浄液および尿を含む複数の体液中に見いだされている。小胞は、タンパク質、RNA、DNA、ウイルスおよびプリオンのための輸送小胞として細胞間の連絡に関与する可能性がある。マイクロRNAは、メッセンジャーRNAの転写および分解を調節する短いRNAである。マイクロRNAは、体液中に見いだされ、腫瘍細胞から流出する小胞内の成分として確認されている。小胞および/またはマイクロRNAを含む、疾患に関連した循環バイオマーカーの解析は、疾患またはその重篤度を検出し、疾患への素因を決定し、治療判断を下すことを支援することができる。

【0009】

生物学的試料中に存在する小胞はバイオマーカーの供給源を提供する。たとえば、マーカーは、小胞内に存在する(小胞ペイロード)、または小胞の表面に存在する。また、小胞の特徴(たとえばサイズ、表面抗原、起始細胞の決定、ペイロード)が、診断、予後判定またはセラノーシス用の読み取り値を提供することができる。疾患を検出し、治療するために使用することができるバイオマーカーを同定する必要性が残る。マイクロRNA、タンパク質、および小胞と結合した他のバイオマーカーならびに小胞の特徴が診断、予後判定およびセラノーシスを提供することができる。

【0010】

本発明は、疾患または疾患進行を示すバイオマーカーを検出することによって表現型を特徴決定する方法およびシステムを提供する。バイオマーカーは、小胞マーカー、タンパ

ク質、核酸、mRNA、またはおよびマイクロRNAを非限定的に含む循環バイオマーカーであることができる。バイオマーカーは、核酸-タンパク質複合体であることができる。

【発明の概要】

【0011】

概要

本明細書において、循環バイオマーカー、たとえば生物学的試料中に存在する小胞、マイクロRNA、またはタンパク質を解析することによって表現型を特徴決定する方法および組成物が開示される。対象または個人の表現型を特徴決定することは、疾患もしくは病態の診断、疾患もしくは病態の予後、疾患期もしくは病態期、薬物効果、生理学的状態、臓器窮迫もしくは臓器拒絶反応、疾患もしくは病態進行、疾患もしくは病態への治療関連性または具体的な生理学的もしくは生物学的状態の決定を含むことがあるが、これらに限定されない。

【0012】

ある局面において、本発明は、(a) 生物学的試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程であって、該一つまたは複数のバイオマーカーは表5から選択される一つまたは複数のバイオマーカーを含む、工程；および(b) 該一つまたは複数のバイオマーカーの該存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む、バイオシグネチャーを同定する方法を提供する。方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含んでもよく、該比較を使用して癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーは、対象由来であることができる。たとえば、参照バイオシグネチャーは、対象由来の非悪性試料、たとえば正常な隣接組織由来であることもできるし、または時間経過とともに対象から採取された異なる試料由来であることもできる。特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノースイス用の判定を提供することを含んでもよい。

【0013】

いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、miR-22、let7a、miR-141、miR-182、miR-663、miR-155、miR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628-5p、miR-517^{*}、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224^{*}、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b^{*}、miR-1179およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーは、miR-22、let7a、miR-141、miR-920、miR-450aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択することができる。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために使用することができる。

【0014】

他の態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、表20~24のいずれかにおける遺伝子およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA)を含む。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーは、A2ML1、BAX、C10orf47、C1orf162、CSDA、EIFC3、ETFB、GABARAPL2、GUK1、GZMH、HIST1H3B、HLA-A、HSP90AA1、NRGN、PDX5、PTMA、RABAC1、RABAGAP1L、RPL22、SAP18、SEPW1、SOX1およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるmRNAを含んでもよい。一つまたは複数のバイオマーカーはまた、A2ML1、GABARAPL2、PTMA、RABAC1、SOX1、ETFBおよびそれらの組み合わせからなる群より選択されることもできる。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために使用することができる。

【0015】

一つまたは複数のバイオマーカーは、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1、EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質CIII、ミオグロビン、テナシンC、MSH6、クローディン-3、クローディン-4、カベオリン-1、凝固因子III、CD9、CD36、CD37、CD53、CD63、CD81、CD136、CD147、Hsp70、Hsp90、Rab13、デスモコリン

-1、EMP-2、CK7、CK20、GCDF15、CD82、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8、HLA-DR、miR200 マイクロRNA、miR-200cおよびそれらの組み合わせからなる群より選択されてもよい。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーは、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD 95、FAP-1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。バイオシグネチャーは、卵巣癌を特徴決定するために使用することができる。

【0016】

いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-432、hsa-miR-326、hsa-miR-2110、hsa-miR-181a-2^{*}、hsa-miR-107、hsa-miR-301a、hsa-miR-484、hsa-miR-625^{*}およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌の存在を検出するために使用することができる。一つまたは複数のバイオマーカーはまた、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-20a^{*}、hsa-miR-375、hsa-miR-200b、hsa-miR-379、hsa-miR-572、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-23a^{*}、hsa-miR-1236、hsa-miR-609、hsa-miR-17^{*}、hsa-miR-130b、hsa-miR-619、hsa-miR-624^{*}、hsa-miR-198およびそれらの組み合わせからなる群より選択することもできる。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば転移性前立腺癌と非転移性前立腺癌とを区別するために使用することができる。

10

【0017】

もう一つの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーはmiR-497およびその組み合わせを含む。バイオシグネチャーは、肺癌を特徴決定するために使用することができる。

20

【0018】

一つまたは複数のバイオマーカーは、AQP2、BMP5、C16orf86、CXCL13、DST、ERCC1、GNAO1、KLHL5、MAP4K1、NELL2、PENK、PGF、POU3F1、PRSS21、SCML1、SEMG1、SMARCD3、SNAI2、TAF1C、TNNT3およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) であることができる。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を非癌試料から区別するために使用することができる。

【0019】

いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、ADRB2、ARG2、C22orf32、CYorf14、EIF1AY、FEV、KLK2、KLK4、LRRRC26、MAOA、NLGN4Y、PNPLA7、PVRL3、SIM2、SLC30A4、SLC45A3、STX19、TRIM36、TRPM8およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌を非前立腺癌試料、たとえば乳癌試料から区別するために使用することができる。

30

【0020】

他の態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、ADRB2、BAIAP2L2、C19orf33、CDX1、CEACAM6、EEF1A2、ERN2、FAM110B、FOXA2、KLK2、KLK4、LOC389816、LRRRC26、MIPOL1、SLC45A3、SPDEF、TRIM31、TRIM36、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌を非前立腺癌試料、たとえば結腸直腸癌試料から区別するために使用することができる。

40

【0021】

さらに他の態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、ASTN2、CAB39L、CRIP1、FAM110B、FEV、GSTP1、KLK2、KLK4、LOC389816、LRRRC26、MUC1、PNPLA7、SIM2、SLC45A3、SPDEF、TRIM36、TRPV6、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌を非前立腺癌試料、たとえば肺癌試料から区別するために使用することができる。

【0022】

一つまたは複数のバイオマーカーはまた、上記mRNAの一つを認識するマイクロRNAであ

50

ることもできる。たとえば、マイクロRNAは、miRs-26a+b、miR-15、miR-16、miR-195、miR-497、miR-424、miR-206、miR-342-5p、miR-186、miR-1271、miR-600、miR-216b、miR-519ファミリー、miR-203およびそれらの組み合わせからなる群より選択することができる。

【0023】

もう一つの局面において、本発明は、(a) 生物学的試料から一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を単離する工程、(b) 一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を有する一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程、および(c) 一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む方法を提供する。方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含んでもよく、該比較を使用して癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーは対象由来であることができる。たとえば、参照バイオシグネチャーは、対象由来の非悪性試料、たとえば正常な隣接組織由来であることもできるし、または時間経過とともに対象から採取された異なる試料由来であることもできる。特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノーシス用の判定を提供することを含んでもよい。

【0024】

核酸-タンパク質複合体は、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A)、TNRC6B、TNRC6C、HNRNPA2B1、HNRPAB、ILF2、NCL (ヌクレオリン)、NPM1 (ヌクレオホスミン)、RPL10A、RPL5、RPLP1、RPS12、RPS19、SNRPG、TROVE2、アポリポタンパク質、アポリポタンパク質A、アポA-I、アポA-II、アポA-IV、アポA-V、アポリポタンパク質B、アポB48、アポB100、アポリポタンパク質C、アポC-I、アポC-II、アポC-III、アポC-IV、アポリポタンパク質D (アポD)、アポリポタンパク質E (アポE)、アポリポタンパク質H (アポH)、アポリポタンパク質L、APOL1、APOL2、APOL3、APOL4、APOL5、APOL6、APOLD1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含んでもよい。たとえば、一つまたは複数のタンパク質は、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択することができる。一つまたは複数のタンパク質はまた、Ago2、アポリポタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択することもできる。

【0025】

核酸-タンパク質複合体は一つまたは複数のマイクロRNAを含んでもよい。ある態様において、一つまたは複数のマイクロRNAは表5における一つまたは複数のマイクロRNAであることができる。たとえば、一つまたは複数のマイクロRNAは、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451、let7aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択することができる。ある態様において、核酸-タンパク質複合体は、Ago2、アポリポタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含み、ならびに一つまたは複数のマイクロRNAは、miR-16およびmiR-92aならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む。バイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌を非癌試料から区別するために使用することができる。

【0026】

さらに別の態様において、本発明は、(a) 生物学的試料由来の微小胞集団中の一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーを検出する工程、(b) 検出された微小胞集団と結合した一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程、および(c) 一つまたは複数の核酸の存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む方法を提供する。たとえば、一つまたは複数の核酸バイオマーカーのレベルは、

一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルに正規化することができる。方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含んでもよく、該比較を使用して癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーは対象由来であることができる。たとえば、参照バイオシグネチャーは、対象由来の非悪性試料、たとえば正常な隣接組織由来であることもできるし、または時間経過とともに対象から採取された異なる試料由来であることもできる。特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノーシス用の判定を提供することを含んでもよい。

【0027】

ある態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーは、PCSA、Ago2、CD9およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む。一つまたは複数の核酸バイオマーカーは、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451、let7aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAであることができる。たとえば、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよびAgo2を含んでもよく、ならびに一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22を含んでもよい。もう一つの例として、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよび/またはCD9を含んでもよく、ならびに一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22を含んでもよい。もう一つの態様において、ならびに一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAを含み、一つまたは複数の核酸バイオマーカーは、表22~24のいずれかから選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。このバイオシグネチャーは、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌を非癌試料から区別するために使用することができる。

【0028】

バイオシグネチャーは、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルと一つまたは複数の核酸バイオマーカーのレベルとの比から算出されるスコアを含んでもよい。ある態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよびPSMAを含み、ならびに一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22およびlet7aを含む。この場合、スコアを算出することは、(a) 微小胞部分集団中のmiR-22ペイロードのレベルを微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第一の倍数、(b) 微小胞部分集団中のlet7aペイロードのレベルを微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第二の倍数、および(c) 微小胞部分集団と結合したPSMAタンパク質のレベルの第三の倍数の合計をとることを含んでもよい。第一、第二および第三の倍数は、バイオシグネチャーの決定を最適化するように選択することができる。ある態様において、第一の倍数および第二の倍数はいずれも10である。第三の倍数は1であることができる。

【0029】

システムの方法のいくつかの態様において、生物学的試料は体液を含む。適切な体液は、非限定的に、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液 (CSF)、痰、唾液、骨髓、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー腺液もしくは尿道球腺液、女性射精液、汗、糞便、毛髪、涙液、囊胞液、胸膜液および腹膜液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、膈分泌液、粘膜分泌液、水便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胞胚腔液または臍帯血を含む。たとえば、生物学的試料は尿、血液または血液由来物を含んでもよい。

【0030】

システムの方法のいくつかの態様において、生物学的試料は、組織試料、組織試料由来の細胞またはそのような細胞から放出される循環バイオマーカーを含む。たとえば、本発明の方法を実施して、組織試料のバイオシグネチャーを同定することができる。生物学的試料は細胞培養物試料を含んでもよく、たとえば、試料は、培養細胞および/またはその

ような培養細胞から放出された循環バイオマーカーを含む培地を含んでもよい。組織試料または培養試料は、癌試料であってもよいし、または腫瘍試料もしくは腫瘍細胞を含んでもよい。

【0031】

本発明の方法において、生物学的試料は一つまたは複数の微小胞を含んでもよい。いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは一つまたは複数の微小胞と結合している。一つまたは複数の微小胞は、10nm~2000nm、たとえば20nm~1500nm、20nm~1000nm、20nm~500nmまたは20nm~200nmの直径を有してもよい。

【0032】

一つまたは複数の微小胞は、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である方法を使用して、試料から単離することができる。いくつかの態様において、一つまたは複数の微小胞は、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、分画遠心分離法、ナノ膜限外ろ過法、免疫吸着捕捉法、アフィニティー精製法、アフィニティー捕捉法、アフィニティー選択法、イムノアッセイ法、ELISA、マイクロ流体工学分離法、フローサイトメトリーまたはこれらの組み合わせに供される。

【0033】

一つまたは複数の微小胞を一つまたは複数の結合物質と接触させてもよい。いくつかの態様において、一つまたは複数の結合物質は、核酸、DNA分子、RNA分子、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、ペプチド、zDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、ペプチド、デンドリマー、膜タンパク質標識物質、化学物質またはこれらの組み合わせを含む。たとえば、結合物質は抗体またはアプタマーであることができる。一つまたは複数の結合物質を使用して一つまたは複数の微小胞を捕捉および／または検出することができる。ある態様において、一つまたは複数の結合物質は、一つまたは複数の微小胞上の一つまたは複数の表面抗原に結合する。一つまたは複数の表面抗原は一つまたは複数のタンパク質を含むことができる。

【0034】

一つまたは複数のタンパク質は、本明細書に開示されるもののような、対象の細胞上の任意の有用なバイオマーカーであることができる。ある態様において、一つまたは複数のタンパク質は、一つまたは複数の細胞特異的または癌特異的細胞マーカー、たとえばCD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、EpCamまたは表4もしくは5におけるタンパク質を含む。一つまたは複数のタンパク質はまた、一般的小胞マーカー、たとえばテトラスパニン、CD9、CD63、CD81、CD63、CD9、CD81、CD82、CD37、CD53、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8または表3におけるタンパク質の一つまたは複数を含んでもよい。いくつかの態様において、一つまたは複数のタンパク質は、表3~5のいずれかにおける一つまたは複数のタンパク質を含む。

【0035】

一つまたは複数の結合物質を使用して一つまたは複数の微小胞を捕捉することができる。捕捉された微小胞は、さらなる評価のために使用することができる。たとえば、微小胞内のペイロードを評価することができる。微小胞ペイロードは、一つまたは複数の核酸、ペプチド、タンパク質、脂質、抗原、糖質および／またはプロテオグリカンを含む。核酸は、一つまたは複数のDNA、mRNA、マイクロRNA、snoRNA、snRNA、rRNA、tRNA、siRNA、hnRNAまたはshRNAを含んでもよい。ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、一つまたは複数の捕捉された微小胞内のペイロードを含む。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーはmRNAペイロードを含むことができる。一つまたは複数のバイオマーカーはまた、マイクロRNAペイロードを含むことができる。一つまたは複数のバイオマーカーはまた、タンパク質ペイロード、たとえば内膜タンパク質または可溶性タンパク質を含むことができる。

【0036】

本発明の方法は、インビトロで、たとえばインビトロ生物学的試料または細胞培養試料を使用して実施することができる。

10

20

30

40

50

【0037】

さらなる態様において、分析される癌は、非小細胞肺癌および小細胞肺癌を含む肺癌（小細胞癌腫（燕麦細胞癌）、混合小細胞／大細胞癌腫および複合小細胞癌腫を含む）、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、脳癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、皮膚癌、骨癌、胃癌、乳癌、膵臓癌、神経膠腫、神経膠芽腫、肝細胞癌腫、乳頭状腎臓癌腫、頭頸部扁平上皮細胞癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫または固形腫瘍であってもよい。

【0038】

複数の態様において、本方法により特徴決定される癌は、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；副腎皮質癌；AIDS関連癌；AIDS関連リンパ腫；肛門癌；虫垂癌；星状細胞腫；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；基底細胞癌；膀胱癌；脳幹部神経膠腫；脳腫瘍（脳幹部神経膠腫、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、星状細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、上衣細胞腫、中間型松果体実質腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、および松果体芽腫を含む）；乳癌；気管支腫瘍；パーキットリンパ腫；原発不明癌；カルチノイド腫瘍；原発不明癌腫；中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；中枢神経系胚芽腫；子宮頸癌；小児癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；結腸直腸癌；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；内分泌膵島細胞腫瘍；子宮内膜癌；上衣芽腫；上衣腫；食道癌；嗅神経芽細胞腫；ユーイング肉腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；肝臓外胆管癌；胆嚢癌；胃癌；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質細胞腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；妊娠性絨毛性腫瘍；神経膠腫；毛様細胞性白血病；頭頸部癌；心臓癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；眼内黒色腫；膵島腫瘍；カボジ肉腫；腎臓癌；ランゲルハンス細胞組織球症；喉頭癌；口唇癌；肝臓癌；悪性線維性組織球腫；骨癌；髄芽腫；上衣細胞腫；黒色腫；メルケル細胞癌；メルケル細胞皮膚癌；中皮腫；原発不明転移性扁平上皮性頸部癌；口腔癌；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫；多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄増殖性腫瘍；鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；非黒色腫皮膚癌；非小細胞肺癌；口腔癌；口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫；その他の脳および脊髄の腫瘍；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；膵臓癌；乳頭腫症；副鼻腔癌；副甲状腺癌；骨盤癌；陰茎癌；咽頭癌；中間型松果体実質腫瘍；松果体芽腫；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍/多発性骨髄腫；胸膜胚芽腫；原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；原発性肝細胞肝癌；前立腺癌；直腸癌；腎臓癌；腎細胞（腎臓）癌；腎細胞癌；気道癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；セザリー症候群；小細胞肺癌；小腸癌；軟部組織肉腫；扁平上皮癌；頸部扁平上皮癌；胃癌；テント上原始神経外胚葉性腫瘍；T細胞リンパ腫；精巣癌；咽頭癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌；移行上皮癌；腎盂と尿管の移行上皮癌；絨毛性腫瘍；尿管癌；尿道癌；子宮癌；子宮肉腫；陰癌；外陰癌；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；またはウィルムス腫瘍を含む。たとえば、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌または卵巣癌であることができる。

【0039】

本発明の方法は、インビトロで、たとえばインビトロ生物学的試料または細胞培養試料を使用して実施することができる。

【0040】

ある局面において、本発明は、本発明の方法のいずれかを実施するための試薬を提供する。関連する局面において、本発明は、本発明の方法のいずれかを実施するための試薬を含むキットを提供する。試薬は、非限定的に一つまたは複数のバイオマーカーに対する抗体またはアプタマーを含む結合物質であってもよい。たとえば、試薬は、表3～5、9～11、16～27または31～32のいずれかにおけるバイオマーカーの少なくとも一つに結合することができる結合物質であることができる。いくつかの態様において、結合物質は、直接的に標識されている、または間接的に標識されるように構成されている。

【0041】

もう一つの局面において、本発明は、単離されたPCSA+小胞を提供する。小胞は、miR-22、let7a、miR-141、miR-182、miR-663、miR-155、mirR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628

-5p、miR-517*、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224*、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b*、miR-1179およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含むペイロードを含んでもよい。小胞はまた、表20~24のいずれかから選択される一つまたは複数のメッセンジャーRNA (mRNA) を含むペイロードを含んでもよい。

【0042】

さらに別の局面において、本発明は、(a) 基体につながれている第一の部分と、関心対象のマイクロRNA配列に対して少なくとも75%相補的である第二の部分と、標識を含む第三の部分とを含み、第二の部分が第一の部分と第三の部分との間に配置されているオリゴヌクレオチド、および(b) マイクロRNAを含む組成物を提供する。基体は、本明細書に開示される基体、たとえば平面基体、カラムまたはビーズであることができる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドの第二の部分は、関心対象のマイクロRNA配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である。オリゴヌクレオチドの第二の部分は、(b) のマイクロRNAに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的であることができる。

【0043】

複数の態様において、オリゴヌクレオチドの第三の部分は直接標識されている。他の態様において、オリゴヌクレオチドの第三の部分は間接的に標識されている。オリゴヌクレオチドの第三の部分は、たとえば、ストレプトアビジンを含む標識、たとえばストレプトアビジン-フィコエリスリン(PE)(SAPE)の結合を容易にするために、ビオチン化されていることができる。任意の有用な標識を使用することができる。たとえば、オリゴヌクレオチドの第三の部分は、蛍光標識、放射能標識または酵素標識を含んでもよい。

【0044】

ある態様において、(b) のマイクロRNAはタンパク質と複合した状態にある。タンパク質は、Argonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182(TNRC6A)、TNRC6B、TNRC6C、HNRNPA2B1、HNRPA2B1、ILF2、NCL(ヌクレオリン)、NPM1(ヌクレオホスミン)、RPL10A、RPL5、RPLP1、RPS12、RPS19、SNRPG、TROVE2、アポリポタンパク質、アポリポタンパク質A、アポA-I、アポA-II、アポA-IV、アポA-V、アポリポタンパク質B、アポB48、アポB100、アポリポタンパク質C、アポC-I、アポC-II、アポC-III、アポC-IV、アポリポタンパク質D(アポD)、アポリポタンパク質E(アポE)、アポリポタンパク質H(アポH)、アポリポタンパク質L、APOL1、APOL2、APOL3、APOL4、APOL5、APOL6およびAPOLD1からなる群より選択することができる。たとえば、マイクロRNAは、Ago1、Ago2、Ago3およびAgo4の一つまたは複数によって結合されていることができる。タンパク質は核酸分解活性を示すことができる。タンパク質は組み換えタンパク質を含んでもよい。非限定的な例として、タンパク質は組み換えAgo2(rAgo2)を含んでもよい。

【0045】

複数の態様において、組成物は生物学的試料を含む。また、マイクロRNAは生物学的試料から単離されてもよい。単離されたマイクロRNAは、Ago1、Ago2、Ago3およびAgo4を含む上記のようなタンパク質とのリボ核タンパク質複合体であってもよい。生物学的試料は体液を含んでもよい。有用な体液の非限定的な例は、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液(CSF)、痰、唾液、骨髄、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液、前立腺液、カウパー腺液もしくは尿道球腺液、女性射精液、汗、糞便、毛髪、涙液、囊胞液、胸膜液および腹膜液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、腔分泌液、粘膜分泌液、水便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液、胞腔液または臍帯血を含む。たとえば、体液は尿、血液または血液由来物を含むことができる。

【0046】

関連する局面において、本発明は、(i) 上記に教示した組成物を供給する工程、(ii) マイクロRNAをオリゴヌクレオチドに結合させる条件下で、組成物をインキュベートす

る工程、および (iii) 基体からの標識の切断の量を検出する工程を含む方法を提供する。ある態様において、基体からの標識の切断の量を検出する工程は、工程 (ii) の前後で基体と接触している標識の量を検出することを含む。もう一つの態様において、基体からの標識の切断は、マイクロRNAと複合した状態にあるタンパク質の存在を示す。タンパク質は、Ago1、Ago2、Ago3およびAgo4を含む上記のようなタンパク質であることができる。基体からの標識の切断の量は、切断反応が起こる前および起こった後で観測することができる。または、基体からの標識の切断の量は、リアルタイムで観測することもできる。

【0047】

参照による引用

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、参照することにより組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同程度に、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1Aは、核酸を含むバイオシグネチャーを同定して表現型を特徴決定する方法を示す。図1Bは、小胞または小胞集団のバイオシグネチャーを同定して表現型を特徴決定する方法を示す。

【図2A】小胞バイオシグネチャーを評価することによって表現型を特徴決定する方法を示す。そのタンパク質を発現する小胞を捕捉する捕捉抗体でコーティングされた平坦な基体の略図である。捕捉抗体は、患部細胞に由来する小胞（「疾患小胞」）に特異的であるかまたは特異的ではない小胞タンパク質に対する捕捉抗体である。検出抗体は、捕捉された小胞に結合し、蛍光シグナルを提供する。検出抗体は、一般に小胞と結合しているかまたは起始細胞もしくは疾患、たとえば癌と関連している、抗原を検出することができる。

【図2B】小胞バイオシグネチャーを評価することによって表現型を特徴決定する方法を示す。そのタンパク質を発現する小胞を捕捉する、捕捉抗体でコーティングされたビーズの略図である。捕捉抗体は、患部細胞に由来する小胞（「疾患小胞」）に特異的であるかまたは特異的ではない小胞タンパク質に対する捕捉抗体である。検出抗体は、捕捉された小胞に結合し、蛍光シグナルを提供する。検出抗体は、一般に小胞と結合しているかまたは起始細胞もしくは疾患、たとえば癌と関連している、抗原を検出することができる。

【図2C】小胞バイオシグネチャーを評価することによって表現型を特徴決定する方法を示す。図2Bに示すようにビーズを使用する多重化によって実施することができるスクリーニングスキームの例である。

【図2D】小胞バイオシグネチャーを評価することによって表現型を特徴決定する方法を示す。小胞を捕捉し、検出して表現型を特徴決定するための例示的スキームを示す。

【図2E】小胞バイオシグネチャーを評価することによって表現型を特徴決定する方法を示す。小胞ペイロードを評価して表現型を特徴決定するための例示的スキームを示す。

【図3】本発明のいくつかの例示的態様において使用することができるコンピュータシステムを示す。

【図4】対象由来の小胞を検出するビーズベースの方法を用いた結果を示す方法を示す。所与の強度で捕捉されたビーズ数は、小胞が、その強度において、どのような頻度で検出タンパク質を発現するかを示す1つの指標である。所与のビーズに対してシグナルが強くなるほど、検出タンパク質の発現が多くなる。係る図は、正常な患者を1本の曲線に、癌患者を別の曲線に組み合わせて、生物統計学分析を用いて、曲線を微分することによって得られた標準化されたグラフを示す。検出器によって読み取られたビーズ数の変動を考慮するために、各個人からのデータを標準化し、合算し、次いで、各集団中の異なる試料数を考慮するために、再度標準化する。

【図5】TMPRSS2-ERGの発現を評価することによってEpCamを有する血漿からの前立腺癌細胞由来の小胞の捕捉を示す。VCaP精製した小胞を正常な血漿に添加し、次いで、EpCamあるいはそのアイソタイプ対照抗体のいずれかでコーティングされたDynal磁気ビーズと共にインキュベートした。DynalビーズからRNAを直接単離した。各試料由来の等量のRNAをR

10

20

30

40

50

T-PCR、続いて、Taqmanアッセイに使用した。

【図 6】CD9ビーズ捕捉したmiR-21またはmiR-141発現の棒グラフを示す。前立腺癌患者からの1mlの血漿、250ng/mlのLNCaP、または正常な精製小胞を、CD9でコーティングしたDyna-beadsと共にインキュベートした。ビーズおよびビーズの上清からRNAを単離した。また、1例の試料（#6）は、比較のために捕捉しなかった。マイクロRNA発現をqRT-PCRで測定し、各試料のCTの平均値を比較した。CD9捕捉は、前立腺癌試料中のmiR-21およびmiR-141の検出を改善する。

【図 7】MoFlo XDPを使用する小胞の分離および同定を示す。

【図 8 A】ミクロスフェアプラットフォームを使用して所望の小胞の存在またはレベルが評価される、試料中の小胞の検出の略図を表し、カラムベースのろ過法を使用して血漿から小胞を単離したのち、単離した小胞を、ミクロスフェアプラットフォームを使用して評価する略図を表す。

【図 8 B】ミクロスフェアプラットフォームを使用して所望の小胞の存在またはレベルが評価される、試料中の小胞の検出の略図を表し、超遠心分離法のような高速遠心分離法による小胞の膜の圧縮の略図を示す。

【図 8 C】ミクロスフェアプラットフォームを使用して所望の小胞の存在またはレベルが評価される、試料中の小胞の検出の略図を表し、レーザー検出を使用する、ミクロスフェアに結合した小胞の検出の略図を表す。

【図 9 A】正常な前立腺試料とPCa試料とを識別する小胞バイオシグネチャーの能力を示す。癌マーカーはEpCamおよびB7H3を含むものであった。一般的小胞マーカーはCD9、CD81およびCD63を含むものであった。前立腺特異的マーカーはPCSAを含むものであった。PCSAと同様にPSMAを使用することができる。試験は、正常な試料に対し、PCa試料に関して感度98%および特異度95%であることがわかった。

【図 9 B】正常および前立腺癌患者における、図9Aの小胞マーカーの平均蛍光強度（MFI）をY軸上に示す。

【図 10】試料が前立腺癌に関して陽性であるかどうかを判定するための小胞前立腺癌アッセイに関する決定木の略図である。

【図 11】上昇したPSAレベルを使用する検出に対する、決定木に従う前立腺癌の小胞検出アッセイの結果を示す。

【図 12】対照およびPCa試料から単離された小胞中のmiR-145のレベルを示す。

【図 13 A】前立腺癌に対する小胞ベースの診断アッセイから偽陰性を同定するためのマイクロRNAの使用を示し、小胞内のmiR分析を使用して偽陰性を真陽性に変換して、それによって感度を改善するスキームを示す。図13Aに示された略図においてはmiR-107およびmiR-141を用いることができる。

【図 13 B】前立腺癌に対する小胞ベースの診断アッセイから偽陰性を同定するためのマイクロRNAの使用を示し、小胞内のmiR分析を使用して偽陽性を真陰性に変換して、それによって特異度を改善するスキームを示す。図13Bに示された略図においてはmiR-107およびmiR-141を用いることができる。

【図 13 C】小胞診断アッセイによって判定された真陽性（TP）、小胞診断アッセイによって判定された真陰性（TN）、小胞診断アッセイによって判定された偽陽性（FP）および小胞診断アッセイによって判定された偽陰性（FN）の場合のmiR-107の標準化レベルがY軸上に示されている。

【図 13 D】小胞診断アッセイによって判定された真陽性（TP）、小胞診断アッセイによって判定された真陰性（TN）、小胞診断アッセイによって判定された偽陽性（FP）および小胞診断アッセイによって判定された偽陰性（FN）の場合のmiR-141の標準化レベルがY軸上に示されている。

【図 14】結腸直腸癌（CRC）細胞株および患者試料におけるKRAS配列決定を示す。試料は、細胞株（図14B）もしくは患者からの組織試料（図14D）から得られたゲノムDNAまたは細胞株から放出された小胞内のRNAペイロード（図14A）もしくは患者からの血漿試料（図14C）から得られたcDNAを含む。

10

20

30

40

50

【図15A】ヒト血漿からのマイクロRNAの免疫沈降を示す。ヒト血漿の様々な分画中に検出されたmiR-16の平均量を示す。「ビーズ」は、Argonaute2 (Ago2)、アポリポタンパク質A1 (アポA1)、GW182およびIgG対照に対する抗体を使用して共免疫沈降させたmiR-16の量である。「Dyna」は、DynabeadプロテインGを使用する免疫沈降を指し、「Magna」は、MagnaBindプロテインGビーズを指す。「上清」は、免疫沈降反応の上清中に検出されたmiR-16の量である。詳細に関しては実施例を参照すること。

【図15B】ヒト血漿からのマイクロRNAの免疫沈降を示す。miR-92aを検出したことを除き、図15Aと同じである。

【図16】PE標識抗PCSA抗体およびFITC標識抗Ago2抗体で染色された複合体のフローソーティングを示す。

10

【図17A】ヒト血漿試料中のPCSA/Ago2陽性複合体中のマイクロRNAの検出を示す。血漿試料は、前立腺癌の対象 (PrC) または正常な対照 (正常) 由来であった。ヒト血漿からの全循環微小胞集団中のmiR-22コピー数を示す。

【図17B】ヒト血漿試料中のPCSA/Ago2陽性複合体中のマイクロRNAの検出を示す。血漿試料は、前立腺癌の対象 (PrC) または正常な対照 (正常) 由来であった。PCSAおよびArgonaute 2 (Ago2) に対する抗体を使用してソートされた血漿由来複合体を示す。RNAを単離し、PCSA/Ago2二重陽性イベントの集団中のmiR-22のコピー数を決定した。

【図17C】ヒト血漿試料中のPCSA/Ago2陽性複合体中のマイクロRNAの検出を示す。血漿試料は、前立腺癌の対象 (PrC) または正常な対照 (正常) 由来であった。各血漿試料に関してフローサイトメトリーによってカウントされたPCSA/Ago2二重陽性イベントの数を示す。

20

【図17D】ヒト血漿試料中のPCSA/Ago2陽性複合体中のマイクロRNAの検出を示す。血漿試料は、前立腺癌の対象 (PrC) または正常な対照 (正常) 由来であった。各血漿試料に関してmiR-22のコピー数をPCSA/Ago2陽性イベントの総数で割ったものを示す。これは、PCSA/Ago2二重陽性複合体一つあたりのmiR-22のコピー数を出す。

【図18A】抗CD9および／または抗PCSAで染色された循環微小胞 (cMV) のフローサイトメトリーを示す。CD9およびPCSAに対する標識抗体を使用する、血漿由来cMVの分析を示す。

【図18B】抗CD9および／または抗PCSAで染色された循環微小胞 (cMV) のフローサイトメトリーを示す。抗CD9および抗PCSAによる二重免疫沈降ののちの、二重陽性CD9/PCSA cMVの濃縮を示す。図18Aと図18Bとの間で領域R7中の二重陽性集団を比較されたい。

30

【図18C】抗CD9および／または抗PCSAで染色された循環微小胞 (cMV) のフローサイトメトリーを示す。PCSAに対する標識抗体を使用する、血漿由来cMVの分析を示す。

【図18D】抗CD9および／または抗PCSAで染色された循環微小胞 (cMV) のフローサイトメトリーを示す。PCSAに対する抗体を使用する単独免疫沈降ののちの、PCSA陽性イベントの濃縮を示す。図18Cと図18Dとの間で領域R4中の集団を比較されたい。

【図19A】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。ABI Taqman検出キット (Assay ID#000398) によって測定された非修飾血漿中のmiR-22コピー数を示す。

【図19B】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。ABI Taqman検出キットによって測定された患者血漿から濃縮された全循環微小胞集団中のmiR-22コピー数を示す。

40

【図19C】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。抗CD9カラムから放出された出発原料を使用して抗PCSAカラム上に保持されたmiR-22コピー数を示す。

【図19D】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。ビーズベースのアッセイ法を使用して測定された、試料対応PCSA MFIに対するmiR-22のコピー数を示す。二重免疫沈降に使用された癌および正常入力血漿に関する平均PCSA MFIシグナルはそれぞれ161.67および729.17であった。

【図19E】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。入力血漿中のmiR-22のコピー数を示す。

【図19F】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。図19Eにおける入力血漿から抗PCSAカラム上に保持されたcMVからのmiR-22のコピー数を示す。

50

【図 19 G】様々な血漿分画中のmiR-22のレベルを示す。ビーズベースのアッセイ法を使用して測定された、試料対応PCSA MFIに対するmiR-22のコピー数を示す。単独IPに使用された癌および正常血漿に関する平均PCSA MFIシグナルはそれぞれ69.17および526.51であった。

【図 20 - 1】血漿から単離されたcMVと結合したPCSAおよびPSMAタンパク質ならびにmiR-22およびlet7aマイクロRNAのレベルから導出されたスコアを使用する、PCa試料と正常（非PCa）試料との区別を示す。図20Aは、正常および癌試料に関して算出されたスコアのプロットを示す。図20Bは、正常が、正常（前立腺病状なし）、異型、炎症および高度前立腺上皮内新生物（高度PINまたはHGPIN）のグループに分けられ、そして癌が、待機療法（WW）または癌に関して同定されたグループに分けられている図20Aのデータを示す。

10

【図 20 - 2】血漿から単離されたcMVと結合したPCSAおよびPSMAタンパク質ならびにmiR-22およびlet7aマイクロRNAのレベルから導出されたスコアを使用する、PCa試料と正常（非PCa）試料との区別を示す。図20Cは、データを用いて生成されたROC曲線を示す。AUCは0.77であった。

【図 21 A】異なる試料集団におけるmiR-920の差次的発現に関する例示的プロットを示す。試料は、血漿から単離されたPCSA発現性cMVにおけるマイクロRNAを含んでいた。miR-920は、前立腺癌（「癌」）および正常（「正常」）と比べて、交絡疾患（すなわち高度PIN（「HGPIN」）および炎症性疾患（「炎症」））において過剰発現している。

【図 21 B】異なる試料集団におけるmiR-450aの差次的発現に関する例示的プロットを示す。試料は、血漿から単離されたPCSA発現性cMVにおけるマイクロRNAを含んでいた。miR-450aは、他と比べて、癌において下方制御されている。

20

【図 22】小胞mRNAペイロードレベルのマイクロアレイプロファイリングから選択されたmRNAの未処理のバックグラウンド減算蛍光値のドットプロットを示す。各プロット中、Y軸は未処理のバックグラウンド減算蛍光値（未処理BGsub蛍光）を示す。X軸は、四つの正常な対照血漿および前立腺癌患者からの四つの血漿のドットプロットを示す。図示されているmRNAは、A2ML1（図22A）、GABARAPL2（図22B）、PTMA（図22C）、RABAC1（図22D）、SOX1（図22E）およびETFB（図22F）である。

【図 23】図23A～23Bは、X軸上に示すような、非再発性前立腺癌試料および転移性前立腺癌試料から単離された小胞中のmiR-141（図23A）およびmiR-375（図23B）のレベルを示す。Taqmanアッセイ法を使用して、小胞から単離されたmiRを検出した。p値がプロットの下方に示されている。Y軸は、検出されたmiRのコピー数を示す。

30

【図 24 - 1】図24Aおよび24Bは、患者血液試料を使用して肺癌と正常（非肺癌）とを区別するためのマイクロRNA miR-497を示す。Y軸は、試料0.1ml中のmiR-497のコピー数を示す。図24Aにおいて、水平線は1154コピーのコピー数を示す。図24Bにおいて、水平線は1356のコピー数を示す。

【図 24 - 2】図24Cは、循環微小胞（cMV）中のmiR-497のレベルを検査することによって非小細胞肺癌試料と正常な血漿試料とを区別するための受信者動作特性（ROC）曲線である。データは図24Bに対応する。

【図 25 A】ガラススライドに結合したVcap由来微小胞の電子顕微鏡写真である。

【図 25 B】Vcap由来微小胞の走査型電子顕微鏡写真である。

40

【図 25 C】ポリ-L-リジンでコートされたポリスチレンビーズに結合したVcap微小胞の走査型電子顕微鏡写真である。

【図 25 D】試料捕集プロトコルにおいて指定されているような、血液を血漿にする処理を示す。

【図 26 - 1】マイクロRNA機能アッセイ法を示す。図26Aは、標識された合成RNA分子261～266および関心対象の標的マイクロRNAを含有するリボ核タンパク質複合体267を示す。図26Bは、リボ核タンパク質複合体267によって認識されたとき、標的認識部位263の合成RNA分子が切断され、それによって標識265～266が解放される様子を示す。

【図 26 - 2】マイクロRNA機能アッセイ法を示す。図26C～Eは、様々な供給源からの入力リボ核タンパク質複合体を示す。

50

【発明を実施するための形態】

【0049】

発明の詳細な説明

生物学的試料、たとえば細胞培養物、生物または対象由来の試料の表現型を特徴決定する方法およびシステムが、本明細書において開示される。表現型は、一つまたは複数のバイオマーカーを評価することによって特徴決定することができる。バイオマーカーは、小胞または小胞集団、提示された小胞表面抗原または小胞ペイロードと結合し得る。本明細書において使用される小胞ペイロードは、小胞内に封じ込められた実体を含む。小胞結合バイオマーカーは、膜結合バイオマーカーおよび可溶性バイオマーカーの両方を含むことができる。バイオマーカーはまた、体液中で評価される循環バイオマーカー、たとえば核酸（例えばマイクロRNA）もしくはタンパク質/ポリペプチド、またはこれらの機能性フラグメントであることもできる。断りない限り、小胞またはバイオマーカー成分に関して本明細書において使用される「精製」または「単離」という用語は、細胞または生物からのそのような成分の部分的または完全な精製または単離をいう。さらに、断りない限り、結合物質を使用する小胞単離への言及は、小胞を結合物質と結合させることを含み、そのような結合が、出発原料中の他の生物学的実体から該小胞を隔てる完全な単離をもたらすかどうかには関わらない。

【0050】

循環バイオマーカー、たとえば核酸バイオマーカーを解析することによって表現型を特徴決定する方法が、非限定的な説明のための例として、図1Aのスキーム6100Aに示されている。最初の工程6101において、生物学的試料、たとえば体液、組織試料または細胞培養物を得る。核酸を試料から単離する（6103）。核酸は、DNAまたはRNA、たとえばマイクロRNAであることができる。このような核酸の評価は、表現型に関するバイオシグネチャーを提供することができる。標的表現型（たとえば、疾患対健康、治療の前後）と関連した核酸をサンプリングすることにより、表現型を示す一つまたは複数の核酸マーカーを決定することができる。本発明の様々な局面は、試料中に存在する一つまたは複数の核酸分子（たとえばマイクロRNA）を評価することによって決定される（6105）、所定の表現型に対応する（6107）バイオシグネチャーに関する。図1Bは、小胞を使用して核酸分子を単離するスキーム6100Bを示す。一例において、生物学的試料を採取し（6102）、一つまたは複数の小胞、たとえば特定の起始細胞からの小胞および／または特定の疾患状態と関連した小胞を試料から単離する（6104）。小胞に結合した表面抗原を特徴決定する、および／または小胞内に存在する成分（「ペイロード」）の存在またはレベルを決定することによって小胞を解析する（6106）。断りない限り、本明細書において使用される「抗原」という用語は、一般に、結合物質が結合し得るバイオマーカーをいい、結合物質は、抗体、アプタマー、レクチン、またはバイオマーカーに対する他の結合物質のいずれでもよく、そのようなバイオマーカーが宿主における免疫反応を誘発するかどうかは問われない。小胞ペイロードは、ペプチドおよびポリペプチドを含むタンパク質であってもよいし、DNAおよびRNAのような核酸であってもよい。RNAペイロードは、メッセンジャーRNA（mRNA）およびマイクロRNA（本明細書においてはmiRNAまたはmiRとも呼ばれる）を含む。小胞のバイオシグネチャーに基づいて表現型を特徴決定する（6108）。本発明のもう一つの例示的な方法においては、スキーム6100Aおよび6100Bをいっしょに実施して表現型を特徴決定する。このようなスキームにおいては、小胞および核酸、たとえばマイクロRNAを評価して、それによって表現型を特徴決定する。

【0051】

関連する局面においては、バイオマーカーの発見のための方法であって、一つの試料中の小胞表面マーカーまたはペイロードマーカーを評価する工程、およびマーカーを別の試料と比較する工程を含む方法が本明細書に提供される。試料を識別するマーカーを本発明にしたがってバイオマーカーとして使用することができる。そのような試料は、対象または対象群からの試料であることができる。たとえば、群は、たとえば、所与の疾患または障害に対する所与の治療に対する既知の応答者および非応答者であることができる。既知

の応答者と非応答者とを識別することが見いだされたバイオマーカーは、対象が、治療剤、たとえば薬物または生物製剤のような治療に応答する可能性があるかどうかのバイオシグネチャーを提供する。

【0052】

表現型

膜小胞のような小胞を解析することによって個人の表現型を特徴決定するための製品およびプロセスが、本明細書において開示される。表現型は、対象の観察可能な任意の特徴または特性、たとえば疾患もしくは病態、病期もしくは病態期、疾患もしくは病態に対する感受性、病期もしくは病態の予後、生理学的状態または治療剤に対する応答であり得る。表現型は、対象の遺伝子発現ならびに環境要因の影響および二つの間の相互作用ならびに核酸配列に対する後成的変化から生じ得る。

10

【0053】

対象における表現型は、生物学的試料を対象から得、その試料由来の一つまたは複数の小胞を解析することによって特徴決定することができる。たとえば、対象または個人の表現型の特徴決定は、疾患または病態を検出すること（前駆症状早期検出を含む）、疾患または病態の予後判定、診断またはセラノーシスを決定すること、または疾患または病態の病期または進行を決定することを含むことができる。表現型の特徴決定はまた、特定の疾患、病態、病期および病態期に適切な治療または治療効果を同定すること、疾患進行、特に疾患回帰、転移拡散または疾患再発の予測および尤度解析を含むこともできる。表現型はまた、病態または疾患の臨床的に明確なタイプまたはサブタイプ、たとえば癌または腫瘍であることもできる。表現型決定はまた、生理学的状態の決定または移植後のような臓器窮迫もしくは臓器拒絶反応の評価であることもできる。本明細書に記載される製品およびプロセスは、個人ベースにおける対象の評価を可能にし、これにより、治療におけるより効率的かつ経済的な決定の恩典を提供することができる。

20

【0054】

ある局面において、本発明は、対象が疾患または障害に対する治療に応答する可能性があるかどうかを予測するためのバイオシグネチャーを同定するための生物学的試料の解析に関する。表現型の特徴決定は、対象の応答者／非応答者状態を予測することを含み、応答者は疾患に対する治療に応答し、非応答者はその治療に応答しない。小胞を対象において解析し、治療に応答するかまたは応答しないことが知られている以前の対象の小胞解析と比較することができる。対象における小胞バイオシグネチャーが、治療に応答することが知られている以前の対象の小胞バイオシグネチャーとより密接に合致するならば、その対象を、その治療に対する応答者として特徴決定または予測することができる。同様に、対象における小胞バイオシグネチャーが、治療に応答しなかった以前の対象の小胞バイオシグネチャーとより密接に合致するならば、その対象を、その治療に対する非応答者として特徴決定または予測することができる。治療は、任意の適切な疾患、障害または他の病態に対する治療であることができる。本方法は、応答者／非応答者状態と相関する小胞バイオシグネチャーが知られている任意の疾患状況において使用することができる。

30

【0055】

本明細書において使用される「表現型」という用語は、本発明の方法を使用して同定される小胞バイオシグネチャーに帰される任意の特性または特徴を意味することができる。たとえば、表現型は、治療に応答する可能性があるという対象の正体であることもできるし、より広くいうと、対象から得られた試料に関して特徴決定されたバイオシグネチャーに基づく診断、予後判定またはセラノーシス用の決定であることもできる。

40

【0056】

いくつかの態様において、表現型は、表1に記載されたもののような疾患または病態を含む。たとえば、表現型は、腫瘍、新生物または癌の存在またはそれらを発生させる可能性を含むことができる。本明細書に記載される製品またはプロセスによって検出または評価される癌は、乳癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、過形成性ポリープ、腺腫、結腸直腸癌、高度異形成、低度異形成、前立腺肥大症、前立腺癌、黒色腫、膵臓癌、脳癌（たとえば神経

50

膠芽腫など）、血液悪性腫瘍、肝細胞癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、食道癌、消化管間質腫瘍（GIST）、腎細胞癌（RCC）または胃癌を含むが、これらに限定されない。結腸直腸癌はCRCデュックスBまたはデュックスC～Dであり得る。血液悪性腫瘍は、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫DLBCL、B細胞リンパ腫DLBCL胚中心様、B細胞リンパ腫DLBCL活性化B細胞様およびバーキットリンパ腫であり得る。

【0057】

表現型は、前癌状態、たとえば光線角化症、萎縮性胃炎、白板症、紅色肥厚症、リンパ腫様肉芽腫症、前白血病、線維症、頸部異形成、子宮頸部異形成、色素性乾皮症、バレット食道、結腸直腸ポリープまたは悪性腫瘍に発展する可能性がある他の異常な組織増殖もしくは病変であることができる。悪性転換性ウイルス感染症、たとえばHIVおよびHPVもまた、本発明にしたがって評価することができる表現型を提示する。

10

【0058】

本発明の方法によって特徴決定することができる癌は、非限定的に、癌腫、肉腫、リンパ腫もしくは白血病、胚細胞腫、芽細胞腫または他の癌を含むことができる。癌腫は、非限定的に、上皮新生物、扁平上皮癌腫、基底細胞新生物、基底細胞癌腫、移行上皮乳頭腫および癌腫、腺腫および腺癌腫（腺）、腺腫、腺癌腫、形成性胃組織炎、インスリノーマ、グルカゴノーマ、ガストリノーマ、ビポーマ、胆管癌腫、肝細胞癌、腺様嚢胞癌腫、虫垂カルチノイド腫、プロラクチノーマ、好酸性顆粒細胞腫、ヒュルトレ細胞腺腫、腎細胞癌腫、グラビッツ腫、多発性内分泌腺腫、子宮内膜腺腫、付属器および皮膚付属器新生物、粘膜表皮新生物、嚢胞、粘液および漿液新生物、嚢胞腺腫、腹膜偽粘液腫、管、小葉および髄質新生物、腺房細胞新生物、複合上皮新生物、ウォーシン腫、胸線腫、特定化生殖腺新生物、性索間質腫、きょう膜腫、顆粒膜細胞腫、男性胚細胞腫、セルトリライディッヒ細胞腫、グロムス腫、傍神経節腫、褐色細胞腫、グロムス腫、母斑および黒色腫、メラノサイト母斑、悪性黒色腫、黒色腫、結節性黒色腫、異形成母斑、悪性黒子黒色腫、表在拡大型黒色腫および悪性末端性ほくろ性黒色腫を含む。肉腫は、非限定的に、アスクン腫瘍、ブドウ状肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性神経鞘腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、たとえば胞巣状軟部肉腫、血管肉腫、葉状嚢肉腫、皮膚線維肉腫、デスモイド腫、線維形成性小円形細胞腫、類上皮肉腫、骨外性軟骨肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管外皮腫、血管肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫および滑膜肉腫を含む。リンパ腫および白血病は、非限定的に、慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫（たとえばワルデンストロームのマクログロブリン血症）、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髓腫、形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖病、maltリンパ腫とも呼ばれる節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、結節辺縁帯B細胞リンパ腫（nmz1）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、バーキットリンパ腫／白血病、T細胞前リンパ球性白血病、T細胞大顆粒リンパ球性白血病、活性NK細胞白血病、成人T細胞白血病／リンパ腫、節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型腸症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、芽球NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫／セザリー症候群、原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖性疾患、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽細胞T細胞リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、不特定の未分化大細胞リンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫（結節性硬化症、混合細胞充実度、リンパ球豊富、リンパ球枯渇または非枯渇）および結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫を含む。胚細胞腫は、非限定的に、胚細胞腫、未分化胚細胞腫、精上皮腫、非胚細胞腫、胎児性癌腫、内胚葉洞腫、絨毛癌腫、奇形腫、多胚腫および生殖腺芽細胞腫を含む。芽細胞腫は、非限定的に、腎芽腫、髄芽腫および網膜芽細胞腫を含む。他の癌は、非限定的に、口唇癌腫、喉頭癌腫、下咽頭癌腫、舌癌腫、唾液腺癌腫、胃癌腫、腺癌腫、甲状腺癌腫（髄様および甲状腺乳頭癌腫）、腎癌腫、腎実質癌腫、子宮頸癌腫、子宮内膜癌腫、子宮内膜癌腫、絨毛癌腫、精巣癌腫、泌尿器癌腫、黒色腫、脳腫瘍、たとえば神経膠芽腫、星状細胞腫、髄膜腫、髄芽腫および末梢神経外胚

20

30

40

50

葉性腫瘍、胆嚢癌腫、気管支癌腫、多発性骨髄腫、基底細胞腫、奇形腫、網膜芽細胞腫、脈絡膜黒色腫、精上皮腫、横紋筋肉腫、頭蓋咽頭腫、骨肉腫、軟骨肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、ユーイング肉腫および形質細胞腫を含む。

【0059】

さらなる態様において、解析される癌は、非小細胞肺癌および小細胞肺癌を含む肺癌（小細胞癌腫（燕麦細胞癌）、混合小細胞／大細胞癌腫および複合小細胞癌腫を含む）、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、脳癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、皮膚癌、骨癌、胃癌、乳癌、膵臓癌、神経膠腫、神経膠芽腫、肝細胞癌、乳頭状腎臓癌腫、頭頸部扁平上皮細胞癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫または固形腫瘍であってもよい。

【0060】

複数の態様において、癌は、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；副腎皮質癌；AIDS関連癌；AIDS関連リンパ腫；肛門癌；虫垂癌；星状細胞腫；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；基底細胞癌；膀胱癌；脳幹部神経膠腫；脳腫瘍（脳幹部神経膠腫、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、中枢神経系胚芽腫、星状細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽腫、上衣腫、髄芽腫、上衣細胞腫、中間型松果体実質腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、および松果体芽腫を含む）；乳癌；気管支腫瘍；バーキットリンパ腫；原発不明癌；カルチノイド腫瘍；原発不明癌腫；中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍；中枢神経系胚芽腫；子宮頸癌；小児癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；結腸直腸癌；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；内分泌膵島細胞腫瘍；子宮内膜癌；上衣芽腫；上衣腫；食道癌；嗅神経芽細胞腫；ユーイング肉腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；肝臓外胆管癌；胆嚢癌；胃癌；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質細胞腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；妊娠性絨毛性腫瘍；神経膠腫；毛様細胞性白血病；頭頸部癌；心臓癌；ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；眼内黒色腫；膵島腫瘍；カポジ肉腫；腎臓癌；ランゲルハンス細胞組織球症；喉頭癌；口唇癌；肝臓癌；悪性線維性組織球腫；骨癌；髄芽腫；上衣細胞腫；黒色腫；メルケル細胞癌；メルケル細胞皮膚癌；中皮腫；原発不明転移性扁平上皮性頸部癌；口腔癌；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫；多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄増殖性腫瘍；鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；非黒色腫皮膚癌；非小細胞肺癌；口腔癌；口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫；その他の脳および脊髄の腫瘍；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；膵臓癌；乳頭腫症；副鼻腔癌；副甲状腺癌；骨盤癌；陰茎癌；咽頭癌；中間型松果体実質腫瘍；松果体芽腫；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍/多発性骨髄腫；胸膜胚芽腫；原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；原発性肝細胞肝癌；前立腺癌；直腸癌；腎臓癌；腎細胞（腎臓）癌；腎細胞癌；気道癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；セザリー症候群；小細胞肺癌；小腸癌；軟部組織肉腫；扁平上皮癌；頸部扁平上皮癌；胃癌；テント上原始神経外胚葉性腫瘍；T細胞リンパ腫；精巣癌；咽頭癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌；移行上皮癌；腎盂と尿管の移行上皮癌；絨毛性腫瘍；尿管癌；尿道癌；子宮癌；子宮肉腫；陰癌；外陰癌；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；またはウィルムス腫瘍を含む。本発明の方法は、これらおよび他の癌を特徴決定するために使用することができる。したがって、表現型の特徴決定は、本明細書に開示される癌のいずれかの診断、予後判定またはセラノーシスを提供することであることができる。

【0061】

該表現型はまた、炎症性疾患、免疫疾患、または自己免疫疾患であり得る。例えば、該疾患は、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）、骨盤炎症、血管炎、乾癬、糖尿病、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病、関節リウマチ、乾癬、全身性エリテマトーデス（SLE）、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、シェーグレン病、CREST症候群、強皮症、リウマチ性疾患、臓器拒絶反応、原発性硬化性胆管炎、または敗血症であり得る。

【0062】

該表現型はまた、アテローム性動脈硬化症、うっ血性心不全、不安定プラーク、脳卒中

10

20

30

40

50

、または虚血等の心血管疾患を含み得る。該心血管疾患または病態は、高血圧症、狭窄、血管閉塞、または血栓事象であり得る。

【0063】

該表現型はまた、多発性硬化症（MS）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）、統合失調症、双極性障害、うつ病、自閉症、プリオン病、ピック病、認知症、ハンチントン病（HD）、ダウン症候群、脳血管疾患、ラスマッセン脳炎、ウイルス性髄膜炎、全身性エリテマトーデスに伴う中枢神経障害（NPSLE）、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、伝染性海綿状脳症、虚血性再灌流障害（例えば、脳卒中）、脳外傷、微生物感染、または慢性疲労症候群等の神経系疾患を含み得る。該表現型はまた、線維筋痛症、慢性神経因性疼痛、または末梢神経因性疼痛等の病態であり得る。

10

【0064】

該表現型はまた、細菌、ウイルス、またはイースト菌感染症等の感染症を含み得る。例えば、該疾患もしくは病態は、ウィップル病、プリオン病、肝硬変、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、HIV、肝炎、梅毒、髄膜炎、マラリア、結核、またはインフルエンザであり得る。HIVまたはHCV様粒子等のウイルスタンパク質は、ウイルスの状態を特徴決定するために、小胞中で評価され得る。

【0065】

該表現型はまた、周産期または妊娠に関連した病態（例えば、子癇前症もしくは早産）、鉄代謝に関連する代謝性疾患もしくは病態等の代謝性疾患もしくは病態を含み得る。例えば、ヘプシジンは、鉄分不足を特徴決定するために、小胞中で評価され得る。該代謝性疾患または病態はまた、糖尿病、炎症、または周産期の病態であり得る。

20

【0066】

本発明の方法は、1つまたは複数のバイオマーカーを含む候補バイオシグネチャーにより評価され得るこれらならびに他の疾患および障害を特徴決定するために使用され得る。したがって、表現型の特徴決定は、本明細書に開示される疾患および障害のうち1つの診断、予後判定、またはセラノーシスを提供することが可能である。

【0067】

本発明の様々な態様において、本明細書に開示される病状または疾患のいずれかのためのバイオシグネチャーは、カテゴリが、1) 疾患特異的バイオマーカー、2) 細胞または組織特異的バイオマーカー、3) 小胞特異的バイオマーカー（たとえば一般的小胞バイオマーカー）、4) 血管形成特異的バイオマーカー、および5) 免疫調節バイオマーカーの一つまたは複数を含む、いくつかの異なるマーカーカテゴリの一つの一つまたは複数のバイオマーカーを含むことができる。すべてのそのようなマーカーの例が本明細書に開示され、当業者に公知である。さらには、特定の疾患または病状において役割を有することを特徴とする、当技術分野において公知のバイオマーカーを、本発明の組成物および方法における標的としての使用に適合させることもできる。さらなる態様において、そのようなバイオマーカーは、すべてが小胞表面バイオマーカーであることもできるし、または小胞表面マーカーと小胞ペイロードマーカー（すなわち、小胞によって包囲された分子）との組み合わせであることもできる。加えて、本明細書に記されるように、評価される生物学的試料は、任意の生物学的流体であることもできるし、またはそのような生物学的流体内に存在する個々の成分（たとえば小胞、核酸、タンパク質またはそれらの複合体）を含むこともできる。

30

40

【0068】

対象

対象の1つ以上の表現型を、対象から得られる生体試料中の小胞などの一つまたは複数の小胞を分析することによって決定することができる。対象または患者としては、ウシ、トリ、イヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、または霊長類動物（ヒトおよび非ヒト霊長類を含む）等の哺乳動物を挙げることができるが、これらに限定されない。対象はまた、シベリアトラ等の絶滅の危機に瀕しているために重要な哺乳動物、ヒトによって消費に農場

50

で育てられる動物等の経済的に重要な哺乳動物、またはペットとして、または動物園で飼育されている動物等の、ヒトにとって社会的に重要な動物が含まれ得る。このような動物の例としては、ネコおよびイヌ等の肉食動物、ブタ (pig)、雄ブタ、およびイノシシを含むブタ (swine)、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、およびラクダ、またはウマ等の反芻動物または有蹄動物が挙げられるが、これらに限定されない。また、絶滅の危機に瀕したトリ、または、動物園で飼育されるトリ、ならびに家禽 (fowl)、さらに具体的には、家畜化された家禽、すなわち、シチメンチョウ、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ホロホロチョウ等の家禽類 (poultry) も含まれる。また、家畜化されたブタおよびウマ (競争馬を含む) も含まれる。加えて、農業および水産、ならびに他の活動と関係がある動物等の、商業活動と関係がある任意の動物種も含まれ、ここで、疾患のモニタリング、診断、および治療の選択は、経済的生産性および/または食物連鎖の安全性のため、畜産において通常の業務である。

10

【0069】

該対象は、癌等の既存の疾患もしくは病態を有し得る。あるいは、該対象は、いかなる既知の既存の病態を有していなくてもよい。該対象はまた、癌の治療等の、現行または過去の治療に対し非応答性であり得る。

【0070】

試料

対象から得られる生物学的試料は任意の体液または生物学的液体であることができる。たとえば、生物学的試料は、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液 (CSF)、痰、唾液、骨髄、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液 (前立腺液を含む)、カウパー液もしくは尿道球腺液、女性射精液、汗、糞便、毛髪、涙液、囊胞液、胸膜液および腹膜液、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、膈分泌液、粘膜分泌液、水便、腓液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液または他の洗浄液を含むがこれらに限定されない任意の生物学的液体であることができる。生物学的試料はまた、胎児もしくは母体起源であってもよい胞胚腔液、臍帯血または母体循環物を含むこともある。生物学的試料はまた、小胞および他の循環バイオマーカーを得ることができる組織試料または生検材料であってもよい。たとえば、試料由来の細胞を培養し、培養物から小胞を単離することができる (たとえば実施例1を参照)。様々な態様において、本明細書に開示されるバイオマーカーおよび/またはバイオシグネチャーは、様々な方法、たとえば血液、血漿、血清または前記生物学的試料のいずれかからの核酸分子の抽出、ポリペプチド (または機能性フラグメント) バイオマーカーを同定するためのタンパク質または抗体アレイの使用ならびに核酸およびポリペプチド分子の同定および評価のための当技術分野において公知の他のアレイ、配列決定、PCRおよびプロテオミックス技術を使用して、そのような生物学的試料から直接評価することができる (たとえば、核酸もしくはポリペプチドバイオマーカーまたはそれらの機能性フラグメントの存在またはレベルの同定)。加えて、そのような試料中に存在する1つまたは複数の成分をまず単離または濃縮して、選択されたバイオマーカーの存在またはレベルを評価するため、例えば所与のバイオシグネチャーを評価するために、さらに処理することができる。例えば、微小胞を試料から単離した後に、タンパク質および/または核酸バイオマーカーに関して該微小胞をプロファイリングすることができる。

20

30

40

【0071】

表1は、疾患、病態または生物学的状態の例のリストおよび小胞を解析することができる生物学的試料の対応するリストを示す。

【0072】

(表1) 様々な疾患、病態または生物学的状態の小胞解析のための生物学的試料の例

疾患、病態、または生物学的状態の例	生物学的試料の例
以下の組織型/体組織を冒す癌/腫瘍： 乳房、肺、卵巣、結腸、直腸、前立腺、膵臓、脳、骨、結合組織、腺、皮膚、リンパ、神経系、内分泌腺、胚細胞、尿生殖器、血液/血液、骨髄、筋肉、眼、食道、脂肪組織、甲状腺、下垂体、脊髄、胆管、心臓、胆嚢、膀胱、精巣、子宮頸部、子宮内膜、腎臓、卵巣、消化管/胃腸、胃、頭頸部、肝臓、白血病、呼吸器/胸郭、原発不明癌（CUP）	血液、血清、血漿、脳脊髄液（CSF）、尿、痰、腹水、滑液、精液、乳頭吸引液、唾液、気管支肺胞洗浄液、涙、口腔咽頭洗浄液、大便、腹水、胸水、汗、涙、眼房水、心膜液、リンパ液、糜粥、乳糜、胆汁、水便、羊水、母乳、膝液、耳垢、カウパー液または尿道球腺液、女性射精液、間質液、月経分泌物、粘液、膿、皮脂、腔潤滑液、嘔吐物
神経変性/神経性疾患： パーキンソン病、アルツハイマー病および多発性硬化症、統合失調症、および双極性障害、痙攣性障害、てんかん	血液、血清、血漿、CSF、尿
心血管疾患： アテローム性動脈硬化症、心筋症、心内膜炎、不安定プラーク、感染症	血液、血清、血漿、CSF、尿
脳卒中： 虚血、脳内出血、くも膜下出血、一過性脳虚血発作（TIA）	血液、血清、血漿、CSF、尿
疼痛性障害：末梢神経因性疼痛および慢性神経因性疼痛、ならびに線維筋痛症	血液、血清、血漿、CSF、尿
自己免疫疾患：全身性および限局性疾患、リウマチ性疾患、狼瘡、シェーグレン症候群	血液、血清、血漿、CSF、尿、滑液
消化器系の異常： バレット食道、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、憩室症および憩室炎、セリアック病	血液、血清、血漿、CSF、尿
内分泌障害： 真性糖尿病、様々な型の甲状腺炎、副腎障害、下垂体障害	血液、血清、血漿、CSF、尿
皮膚の疾患および障害：乾癬	血液、血清、血漿、CSF、尿、滑液、涙
泌尿器系障害： 良性前立腺肥大症（BPH）、多発性嚢胞腎、間質性膀胱炎	血液、血清、血漿、尿
肝疾患/傷害： 肝硬変、（天然または合成化学物質源への曝露により）誘発された肝毒性	血液、血清、血漿、尿
腎臓疾患/傷害： 急性、亜急性、慢性状態、有足細胞傷害、巣状分節状糸球体硬化症	血液、血清、血漿、尿
子宮内膜症	血液、血清、血漿、尿、腔分泌液
骨粗鬆症	血液、血清、血漿、尿、滑液
膵炎	血液、血清、血漿、尿、膝液
喘息	血液、血清、血漿、尿、痰、気管支肺胞洗浄液
アレルギー	血液、血清、血漿、尿、痰、気管支肺胞洗浄液
プリオン関連疾患	血液、血清、血漿、CSF、尿
ウイルス感染症；HIV/AIDS	血液、血清、血漿、尿
敗血症	血液、血清、血漿、尿、涙、鼻洗浄
臓器拒絶反応/移植	血液、血清、血漿、尿、様々な洗浄液

10

20

30

40

示差的状态： 腺腫 対 過形成性ポリープ、過敏性大腸症候群（IBS） 対 正常、結腸癌のデュークス病期分類A、B、C、 および／またはD、低度過形成を伴う腺腫 対 高度過形成を伴う腺腫、腺腫 対 正常、結腸直腸癌 対 正常、IBS 対 潰瘍性大腸炎（UC） 対 クローン病（CD）	血液、血清、血漿、尿、痰、大便、結腸洗浄液
妊娠に関連した生理学的状態、病態、または付随疾患： 遺伝的リスク、有害妊娠事象	母体の血清、血漿、羊水、臍帯血

【0073】

10

本発明の方法は、血液試料または血液由来物を使用して表現型を特徴決定するために使用することができる。血液由来物は血漿および血清を含む。血漿は、全血の液体成分であり、全血量の約55%までを構成する。血漿は、主に水ならびに少量のミネラル、塩、イオン、栄養素および溶解状態のタンパク質で構成されている。全血中、赤血球、白血球および血小板が血漿内に懸濁している。血清とは、フィブリノーゲンまたは他の凝固因子を有しない血漿（すなわち、全血から血球および凝固因子を差し引いたもの）をいう。

【0074】

生物学的試料は、生物学的試料の直接評価によるのか、生物学的試料から得られる一つまたは複数の小胞のプロファイリングによるのかにかかわらず、バイオマーカーの解析を実施しない当事者のような第三者を通して得ることができる。たとえば、試料は、試料が由来する対象の臨床医、医師または他の健康管理者を通して得ることができる。または、生物学的試料は、小胞を解析する同じ当事者によって得ることもできる。加えて、アッセイされる生物学的試料は、保管（たとえば凍結）されるか、または他の様式で保存条件下に貯蔵される。

20

【0075】

バイオマーカー解析に使用される生物学的試料の量は、0.1~20mL、たとえば約20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1または0.1mL未満の範囲であることができる。

【0076】

体液の試料は、表現型を特徴決定するための試料として使用することができる。たとえば、試料中のバイオマーカーを評価して、疾患の診断、予後判定および／またはセラノーシスを提供することができる。バイオマーカーは、循環バイオマーカー、たとえば循環タンパク質または核酸であることができる。バイオマーカーはまた、小胞または小胞集団と結合していることもできる。本発明の方法は、生物学的試料または対象中に存在することがある一つまたは複数の小胞および一つまたは複数の異なる小胞集団を評価するために適用することができる。生物学的試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの解析を使用して、解析のためにさらなる生物学的試料を得るべきかどうかを判定することができる。たとえば、体液の試料中の一つまたは複数の小胞の解析は、組織生検材料を得るべきかどうかの決定を支援することができる。

30

【0077】

患者からの試料は、循環バイオマーカーおよびその中に含まれる他の関心のある実体をその後の分析のために保存する条件下、捕集することができる。ある態様において、試料は、CellSave保存チューブ（Veridex, North Raritan, NJ）、PAXgene血液DNAチューブ（QIAGEN GmbH, Germany）およびRNAlater（QIAGEN GmbH, Germany）の一つまたは複数を使用して処理される。

40

【0078】

CellSave保存チューブ（CellSaveチューブ）は無菌真空血液捕集チューブである。各チューブは、Na2EDTAおよび細胞保存剤を含有する溶液を含む。EDTAはカルシウムイオンを吸収し、それが血液凝固を減らす、またはなくすことができる。保存剤は、上皮細胞および他の細胞の形態および細胞表面抗原発現を保存する。捕集および処理は、製造者によって提供されるプロトコールに記載されているように実施することができる。当業者に公知

50

であるような標準的瀉血手法にしたがって、各チューブを真空にして静脈全血を吸引する。CellSaveチューブは、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,466,574号、第5,512,332号、第5,597,531号、第5,698,271号、第5,985,153号、第5,993,665号、第6,120,856号、第6,136,182号、第6,365,362号、第6,551,843号、第6,620,627号、第6,623,982号、第6,645,731号、第6,660,159号、第6,790,366号、第6,861,259号、第6,890,426号、第7,011,794号、第7,282,350号、第7,332,288号、第5,849,517号および第5,459,073号に開示されている。

【0079】

PAXgene血液DNAチューブ（PAXgeneチューブ）は、核酸の単離のために全血を捕集するためのプラスチック真空チューブである。チューブは、全血標本の捕集、輸送および貯蔵ならびにその中に含まれる核酸、たとえばDNAまたはRNAの単離に使用することができる。血液は、標準的瀉血プロトコールの下、添加物を含む排気チューブの中に捕集される。捕集および処理は、製造者によって提供されるプロトコールに記載されているように実施することができる。PAXgeneチューブは、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,906,744号、第4,741,446号、第4,991,104号に開示されている。

【0080】

RNAlater RNA安定化試薬（RNAlater）は、組織中のRNAの速やかな安定化のために使用される。RNAは、採取された試料中では不安定であることがある。水性RNAlater試薬は組織および他の生物学的試料に浸透して、それにより、その中に含まれるRNAを安定化し、保護する。このような保護は、下流の分析が組織または他の試料中のRNAの発現プロファイルを反映することを保証するのに役立つ。試料は、採取の直後、適量のRNAlater試薬に浸漬される。捕集および処理は、製造者によって提供されるプロトコールに記載されているように実施することができる。製造者にしたがって、試薬は、RNAを、37℃では1日、18～25℃では7日間または2～8℃では4週間保存して、液体窒素またはドライアイスなしで試料の処理、輸送、貯蔵および発送を可能にする。試料はまた、たとえば貯蔵のために、－20℃または－80℃に置くこともできる。保存された試料は、全RNA、mRNAおよびマイクロRNAをはじめとする任意のタイプのRNAを分析するために使用することができる。RNAlaterはまた、DNA、RNAおよびタンパク質分析のための試料を捕集するのに役立つこともできる。RNAlaterは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,346,994号に開示されている。

【0081】

小胞

本発明の方法は、一つまたは複数の小胞を評価する工程、例えば小胞集団を評価する工程を含むことができる。本明細書において使用される小胞とは、細胞から流出する膜小胞である。小胞または膜小胞は、非限定的に、循環微小胞（cMV）、微小胞、エキソソーム、ナノ小胞、デキソソーム、ブレブ、小水疱、プロスタソーム、微粒子、内腔内小胞、膜フラグメント、内腔内エンドソーム小胞、エンドソーム様小胞、エキソサイトーシスビヒクル、エンドソーム小胞、エンドソーマル小胞、アポトーシス体、多胞体、分泌小胞、リン脂質小胞、リポソーム小胞、アルゴソーム、テキサソーム、セクレソーム、トレロソーム、メラノソーム、オンコソームまたはエキソサイトーシスビヒクルを含む。さらに、小胞は、様々な細胞プロセスによって産生されることがあるが、本発明の方法は、そのような小胞が生物学的試料中に存在し、本明細書に開示される方法によって特徴決定することができる限り、任意の一つの機構に限定されない、または依存しない。断りない限り、ある種の小胞を使用する方法を他の種類の小胞に適用することができる。小胞は、ペイロードとも呼ばれる可溶性成分を含むことができる内部区画を包囲する細胞膜に類似した脂質二重層を有する球形構造を含む。いくつかの態様において、本発明の方法は、直径約40～100nmの小さな分泌小胞であるエキソソームを使用する。種類および特徴の決定を含む膜小胞の考察に関しては、Thery et al., Nat Rev Immunol. 2009 Aug; 9(8):581-93を参照すること。様々な種類の小胞のいくつかの性質は表2におけるものを含む。

【0082】

(表2) 小胞の性質

特徴	エキソソーム	微小胞	エクソソーム	膜粒子	エキソソーム 様小胞	アポトーシス 小胞
サイズ	50-100 nm	100-1,000 nm	50-200 nm	50-80 nm	20-50 nm	50-500 nm
スクロース中 の密度	1.13-1.19 g/ml			1.04-1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16-1.28 g/ml
EMでの外観	カップ形	不規則形状、 電子密	バイラメラ 円形構造	円形	不規則形状	不均一
遠沈	100,000 g	10,000 g	160,000- 200,000 g	100,000- 200,000 g	175,000 g	1,200 g, 10,000 g, 100,000 g
脂質組成	コレステロール、 スフィンゴ ミエリンおよび セラミド において濃縮; 脂質ラフト含有; PPS露出	PPS露出	コレステロール および ジアシル グルセロール において濃縮; PPS露出		脂質ラフト なし	
主要 タンパク質 マーカー	テトラスパニン (たとえばCD63、 CD9)、Alix、 TSG101	インテグリン、 セレクチン および CD40リガンド	CR1および タンパク質 分解酵素; CD63なし	CD133; CD63なし	TNFR1	ヒストン類
細胞内 起源	内部区画 (エンドソーム)	細胞膜	細胞膜	細胞膜		

10

20

略号:ホスファチジルセリン (PPS)、電子顕微鏡法 (EM)

【0083】

小胞は、原形質膜または内部膜に由来する流出膜結合粒子または「微粒子」を含む。小胞は、細胞から細胞外環境に放出され得る。小胞を放出する細胞は、非限定的に、外胚葉、内胚葉または中胚葉から生じるかまたはそれらに由来する、細胞を含む。細胞は、遺伝子的、環境的および／または他の変動または変更を有することもある。たとえば、細胞は腫瘍細胞であり得る。小胞は、ソース細胞における任意の変化を反映し、それにより、発生する細胞、たとえば様々な遺伝子突然変異を有する細胞における変化を反映することができる。一つの機構において、小胞は、細胞膜のセグメントが自発的に陥入し、最終的に開口分泌されるとき、細胞内に生成される（たとえば、Keller et al., Immunol. Lett. 107(2):102-8 (2006)を参照すること）。小胞はまた、原形質膜の部分の脱出膨出（ブレブ形成）分離および封止から生じるか、または腫瘍起源の種々の膜結合タンパク質を含有する任意の細胞内膜に画定された小胞構造の輸送から生じる、脂質二重膜によって画定された細胞由来構造も含み、これには、腫瘍由来マイクロRNAまたは細胞内タンパク質を非限定的に含む、小胞内腔中に含有される分子とともに腫瘍由来タンパク質に選択的に結合する宿主循環に由来する表面結合分子を含む。ブレブおよびブレブ形成は、Charras et al., Nature Reviews Molecular and Cell Biology, Vol. 9, No. 11, p. 730-736 (2008)にさらに記載されている。腫瘍細胞から循環または体液中に流出する小胞は「腫瘍由来循環小胞」と呼ばれることもある。そのような小胞がエキソソームである場合、それは腫瘍由来循環エキソソーム (CTE) と呼ばれることもある。場合によっては、小胞は、特定の起始細胞に由来することもできる。CTEは一般に、起始細胞特異的小胞と同様に、ときには特異的な様式で、たとえば体液からのCTEまたは起始細胞特異的小胞の単離を可能にする一つまたは複数の固有のバイオマーカーを有する。たとえば、細胞または組織特異的マーカーは、起始細胞を同定するために使用される。そのような細胞または組織特異的マーカーの例は本明細書に開示されており、さらに、bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/で入手可能なTissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER) データベース、Liu et al. (2008) TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulatio

30

40

50

n. BMC Bioinformatics. 9:271、genome.dkfz-heidelberg.de/menu/tissue_db/index.htmlで入手可能なTissueDistributionDBsにおいてアクセスすることもできる。

【0084】

小胞は、約10nm、20nmまたは30nmよりも大きい直径を有することができる。小胞は、40nm、50nm、100nm、200nm、500nm、1000nm、1,500nm、2,000nmよりも大きい、または10,000nmよりも大きい直径を有することができる。小胞は、約20~2000nm、約20~1500nm、約30~1000nm、約30~800nm、約30~200nmまたは約30~100nmの直径を有することができる。いくつかの態様において、小胞は、10,000nm、2000nm、1500nm、1000nm、800nm、500nm、200nm、100nm、50nm、40nm、30nm、20nm未満または10nm未満の直径を有する。本明細書において数値に関して使用される「約」という用語は、その数値の上下10%の変動が、指定された値に帰される範囲内であることを意味する。様々な種類の小胞の一般的なサイズが表2に示されている。小胞を評価して、一つの小胞またはいくつかの小胞の直径を計測することができる。たとえば、小胞集団の直径の範囲または小胞集団の平均直径を測定することができる。小胞直径は、当技術分野において公知の方法、たとえば電子顕微鏡法のような画像化技術を使用して評価することができる。ある態様において、一つまたは複数の小胞の直径は、光学粒子検出を使用して測定される。たとえば、「Optical Detection and Analysis of Particles」と題する2010年7月6日発行の米国特許第7,751,053号および「Optical Detection and Analysis of Particles」と題する2010年7月15日発行の米国特許第7,399,600号を参照すること。

【0085】

いくつかの態様において、小胞は、生物学的試料の事前の単離、精製または濃縮なしに生物学的試料から直接アッセイされる。たとえば、試料中の小胞の量それ自体が、診断、予後判定またはセラノーシス用の判定を提供するバイオシグネチャーを提供することができる。または、試料中の小胞は、解析の前に試料から単離、捕捉、精製または濃縮することもできる。前記のように、本明細書において使用される単離、捕捉または精製は、試料中の他の成分からの、部分的単離、部分的捕捉または部分的精製を含む。小胞単離は、本明細書に記載されるような様々な技術、たとえばクロマトグラフィー、ろ過法、遠心分離法、フローサイトメトリー、アフィニティー捕捉（たとえば平坦面またはビーズへの）および／またはマイクロ流体工学を使用して実施することができる。

【0086】

小胞特徴を参照と比較することによって表現型特徴決定を提供するために、エキソソームのような小胞を評価することができる。いくつかの態様においては、小胞の表面抗原が評価される。表面抗原は、小胞の解剖学的起源および／または細胞ならびに他の表現型情報、たとえば腫瘍の状態の指標を提供することができる。たとえば、患者試料、たとえば血液、血清または血漿のような体液中に見られる小胞は、結腸直腸起源および癌の存在を示す表面抗原に関して評価される。表面抗原は、表面タンパク質、脂質、糖質および他の膜成分を非限定的に含む、小胞膜表面上で検出することができる、情報をもたらす任意の生物学的実体を含むことがある。たとえば、腫瘍抗原を発現する結腸由来の小胞の陽性検出は、患者が結腸直腸癌を有していることを示すことができる。このように、本発明の方法を使用して、たとえば、対象から得られた一つまたは複数の小胞の疾患特異的および細胞特異的バイオマーカーを評価することにより、解剖学的または細胞起源と関連する任意の疾患または病態を特徴決定することができる。

【0087】

もう一つの態様においては、表現型特徴決定を提供するために一つまたは複数の小胞ペイロードが評価される。小胞のペイロードは、小胞内に封じ込められた状態で検出することができる情報をもたらす任意の生物学的実体を含み、タンパク質および核酸、たとえばゲノムもしくはcDNA、mRNAまたはそれらの機能性フラグメントおよびマイクロRNA (miR) を非限定的に含む。加えて、本発明の方法は、小胞表面抗原（小胞ペイロードに加えて、またはそれを除いて）を検出して表現型特徴決定を提供することに関する。たとえば、小胞は、小胞表面抗原に特異的である結合物質（たとえば抗体またはアプタマー）を使用し

て特徴決定することができ、結合した小胞をさらに評価して、本明細書に開示される一つまたは複数のペイロード成分を同定することができる。本明細書に記載されるように、関心対象の表面抗原または関心対象のペイロードを有する小胞のレベルを参照と比較して表現型を特徴決定することができる。たとえば、試料中の癌関連表面抗原または小胞ペイロード、たとえば腫瘍関連mRNAまたはマイクロRNAの、参照に比した場合の過剰発現は、その試料中の癌の存在を示すことができる。評価されるバイオマーカーは、所望の標的試料の選択および所望の参照試料と標的試料との比較に基づいて、存在しても存在しなくてもよく、増加していても減少していてもよい。標的試料の非限定的な例は、疾患、治療／非治療、長期的研究におけるような様々な時点を含み、参照試料の非限定的な例は、非疾患、正常、様々な時点および候補治療に対する感受性または耐性を含む。

10

【0088】

マイクロRNA

生物学的試料またはそのような生物学的試料から得られる小胞中で様々なバイオマーカー分子を評価することができる。マイクロRNAは、本発明の方法によって評価される一つのクラスのバイオマーカーを含む。本明細書においてはmiRNAまたはmiRとも呼ばれるマイクロRNAは、長さ約21~23ヌクレオチドの短いRNA鎖である。miRNAは、DNAから転写される遺伝子によってコードされるが、タンパク質へと翻訳はされず、したがって、非コードRNAを含む。miRは、pri-miRNAとして知られる一次転写物からプロセシングされてpre-miRNAと呼ばれる短いステムループ構造になり、最終的には一本鎖miRNAになる。pre-miRNAは一般に、自己相補的領域において自らに折り重なる構造を形成する。そして、これらの構造が、動物においてはヌクレアーゼDicerによって、または植物においてはDCL1によってプロセシングされる。成熟したmiRNA分子は、一つまたは複数のメッセンジャーRNA (mRNA) 分子に対して部分的に相補的であり、タンパク質の翻訳を調節するように機能することができる。miRNAの同定された配列は、公表されているデータベース、たとえばwww.microRNA.org、www.mirbase.orgまたはwww.mirz.unibas.ch/cgi/miRNA.cgiでアクセスすることができる。

20

【0089】

miRNAは一般に、命名規則にしたがって番号「mir- [番号]」を割り当てられる。miRNAの番号は、以前に同定されたmiRNA種に対するその発見の順序にしたがって割り当てられる。たとえば、最後に公表されたmiRNAがmir-121であるならば、次に発見されるmiRNAはmir-122と命名される、などである。既知のmiRNAに対して相同であるmiRNAが異なる生物から発見されるならば、その名称は、[生物同定子]-mir-[番号]の形態の任意選択の生物同定子を与えられる。同定子は、ヒトの場合のhsaおよびハツカネズミの場合のmmuを含む。たとえば、mir-121へのヒト相同体はhsa-mir-121と呼ばれ、マウス相同体はmmu-mir-121と呼ばれ、ラット相同体はrno-mir-121と呼ばれる等。

30

【0090】

成熟マイクロRNAは一般に接頭辞「miR」で指定され、遺伝子または前駆体miRNAは接頭辞「mir」で指定される。たとえば、mir-121はmiR-121の前駆体である。異なるmiRNA遺伝子または前駆体が同一の成熟miRNAへとプロセシングされる場合、遺伝子／前駆体は、番号付き接尾辞によって規定することができる。たとえば、mir-121-1およびmir-121-2は、miR-121へとプロセシングされる異なる遺伝子または前駆体を指す。密接に関連した成熟配列を示すためには文字付き接尾辞が使用される。たとえば、mir-121aおよびmir-121bは、それぞれ、密接に関連したmiRNAであるmiR-121aおよびmiR-121bへとプロセシングされることができる。本発明に関連して、本明細書において接頭辞mir-*またはmiR-*によって指定されるマイクロRNA (miRNAまたはmiR) は、そうではないことが明示的に述べられない限り、前駆体および／または成熟種の両方を包含すると理解される。

40

【0091】

二つの成熟miRNA配列が同じ前駆体に由来しているのが認められることもある。それらの配列の一方が他方よりも豊富であるならば、接尾辞「*」を使用して、一般的でない方のバリエーションを指定することができる。たとえば、miR-121は優勢な産物であるが、miR-1

50

21*は、前駆体の反対側のアームに見られる、一般的ではない方のバリエーションである。優勢なバリエーションが同定されないならば、miRNAは、前駆体の5'アームからのバリエーションの場合の接尾辞「5p」および3'アームからのバリエーションの場合の接尾辞「3p」によって識別することができる。たとえば、miR-121-5pは前駆体の5'アームに由来し、miR-121-3pは3'アームに由来する。それほど一般的ではないが、5pおよび3pバリエーションは、それぞれセンス（「s」）形態およびアンチセンス（「as」）形態とも呼ばれる。たとえば、miR-121-5pはmiR-121-sと呼ばれることもあり、miR-121-3pはmiR-121-asと呼ばれることもある。

【0092】

上記命名規則は時とともに考案されたものであり、絶対的規則というよりも一般的なガイドラインである。たとえば、miRNAのletおよびlinファミリーは、それらのあだ名で呼ばれ続けている。前駆体／成熟形態のためのmir/miRNA規則もまたガイドラインであり、どの形態が参照されているのかを決定するためには文脈を考慮に入れるべきである。miRNA命名のさらなる詳細は、www.mirbase.orgまたはAmbros et al., A uniform system for microRNA annotation, RNA 9:277-279 (2003)に見ることができる。

【0093】

植物miRNAは、Meyers et al., Plant Cell. 2008 20(12):3186-3190に記載されているような異なる命名規則に従う。

【0094】

複数のmiRNAが遺伝子調節に関与しており、miRNAは、遺伝子制御の主要な段階と目下認識されている、拡大中の非コードRNAのクラスの一部である。いくつかの場合において、miRNAは、標的mRNAの3'UTRに埋め込まれた調節部位に結合することによって翻訳を妨害して、翻訳の抑制を招くことができる。標的認識は、標的部位とmiRNAのseed領域（miRNAの5'末端の位置2〜8）との相補的塩基ペアリングを含むが、seed相補性の厳密な程度は正確には決定されず、3'ペアリングによって変化することができる。他の場合においては、miRNAは、低分子干渉RNA（siRNA）のように機能し、完全に相補的なmRNA配列に結合して標的転写物を破壊する。

【0095】

複数のmiRNAの特徴決定により、これらが、初期発生、細胞増殖および細胞死、アポトーシスおよび脂肪代謝を含む多様なプロセスに影響することが示されている。たとえば、いくつかのmiRNA、たとえばlin-4、let-7、mir-14、mir-23およびパンタムは、細胞分化および組織発達において重要な役割を有することが示されている。他のものもまた、それらの異なる空間的および時間的発現パターンにより、同様に重要な役割を有すると考えられている。

【0096】

miRBase (www.mirbase.org) で入手可能なmiRNAデータベースは、公表されているmiRNA配列および注釈の検索可能なデータベースを含む。miRBaseに関するさらなる情報を、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる以下の文献:Griffiths-Jones et al., miRBase: tools for microRNA genomics. NAR 2008 36(Database Issue):D154-D158、Griffiths-Jones et al., miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. NAR 2006 34(Database Issue):D140-D144およびGriffiths-Jones, S. The microRNA Registry. NAR 2004 32(Database Issue):D109-D111に見ることができる。miRBaseのRelease 16に含まれる代表的miRNAは、2010年9月に入手可能になった。

【0097】

本明細書に記載されるように、マイクロRNAは、癌および他の疾患に関与することが知られており、試料中の表現型を特徴決定するために評価することができる。たとえば、Ferracin et al., Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis, Exp Rev Mol Diag, Apr 2010, Vol. 10, No. 3, Pages 297-308、Fabbri, miRNAs as molecular biomarkers of cancer, Exp Rev Mol Diag, May 2010, Vol. 10, No. 4, Pages 435-444を参照すること。小胞およびmiRNAを単離し、特徴決定するための技術は当業者に公知である。本明細書において提示される方法に加えて、さらなる方法を、それぞれが参照によりそ

の全体が本明細書に組み入れられる、「METHODS FOR ASSESSING RNA PATTERNS」と題する2011年2月15日発行の米国特許第7,888,035号ならびに「METHODS AND SYSTEMS FOR ISOLATING, STORING, AND ANALYZING VESICLES」と題する2010年11月30日出願の国際特許出願第PCT/US2010/058461号および「DETECTION OF GASTROINTESTINAL DISORDERS」と題する2011年1月13日出願の第PCT/US2011/021160号に見ることができる。

【0098】

循環バイオマーカー

循環バイオマーカーは、体液、たとえば血液、血漿、血清中に検出可能であるバイオマーカーを含む。循環癌バイオマーカーの例は、心臓トロポニンT (cTnT)、前立腺癌に対する前立腺特異的抗原 (PSA) および卵巣癌に対するCA125を含む。本発明の循環バイオマーカーは、タンパク質、核酸、たとえばDNA、mRNAおよびマイクロRNA、脂質、糖質および代謝産物を非限定的に含む、体液中に検出することができる任意の適切なバイオマーカーを含む。循環バイオマーカーは、細胞と結合していないバイオマーカー、たとえば膜結合性であるバイオマーカー、膜フラグメントに埋め込まれたバイオマーカー、生物学的複合体の一部であるバイオマーカーまたは溶液中に遊離状態にあるバイオマーカーを含むことができる。一つの態様において、循環バイオマーカーは、対象の生物学的流体中に存在する一つまたは複数の小胞と結合したバイオマーカーである。

【0099】

様々な表現型の特徴決定に使用するための循環バイオマーカーが同定されている。たとえば、Ahmed N, et al., Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. Br. J. Cancer 2004、Mathelin et al., Circulating proteinic biomarkers and breast cancer, Gynecol Obstet Fertil. 2006 Jul-Aug; 34(7-8):638-46. Epub 2006 Jul 28、Ye et al., Recent technical strategies to identify diagnostic biomarkers for ovarian cancer. Expert Rev Proteomics. 2007 Feb; 4(1):121-31、Carney, Circulating oncoproteins HER2/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. Expert Rev Mol Diagn. 2007 May; 7(3):309-19、Gagnon, Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer, Curr Opin Obstet Gynecol. 2008 Feb; 20(1):9-13、Pasterkamp et al., Immune regulatory cells: circulating biomarker factories in cardiovascular disease. Clin Sci (Lond). 2008 Aug; 115(4):129-31、Fabbri, miRNAs as molecular biomarkers of cancer, Exp Rev Mol Diag, May 2010, Vol. 10, No. 4, Pages 435-444、国際公開公報第2007/088537号、米国特許第7,745,150号および第7,655,479号、米国特許公開公報20110008808、20100330683、20100248290、20100222230、20100203566、20100173788、20090291932、20090239246、20090226937、20090111121、20090004687、20080261258、20080213907、20060003465、20050124071および20040096915を参照すること。これらの刊行物それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0100】

小胞濃縮

小胞または小胞の集団は、分析前および／または分析中に単離、精製、濃縮または他のやり方で富化されてもよい。断りない限り、小胞またはバイオマーカー成分について本明細書において使用される用語「精製」、「単離」、または同等のものは、細胞または生物からのそのような成分の部分的または完全な精製または単離を含むことが意図される。小胞の解析は、生物学的試料の一つまたは複数の小胞集団の量を定量することを含むことができる。たとえば、不均一な小胞集団を定量することもできるし、均一な小胞集団、たとえば特定のバイオマーカープロファイルを有する小胞集団、特定のバイオシグネチャーを有する小胞集団または特定の細胞型に由来する小胞集団を不均一な小胞集団から単離し、定量することもできる。小胞の解析はまた、本明細書に記載するように、小胞の一つまたは複数の特定のバイオマーカープロファイルまたはバイオシグネチャーを定量的または定性的に検出することを含むこともできる。

【0101】

小胞は、体液バンクなどに貯蔵および保管し、必要に応じて解析のために取り出すことができる。小胞はまた、生きた対象または死んだ対象から事前に採取および貯蔵されている生物学的試料から、単離してもよい。加えて、小胞は、King et al., *Breast Cancer Res* 7(5):198-204 (2005)に記載されているように、回収された生物学的試料から単離してもよい。小胞は、保管または貯蔵された試料から単離してもよい。または、小胞は、生物学的試料から単離し、試料の貯蔵または保管なしに解析してもよい。さらには、第三者が、生物学的試料を採取または貯蔵してもよく、解析のために小胞を採取または貯蔵してもよい。

【0102】

濃縮された小胞集団を生物学的試料から得ることができる。たとえば、小胞を、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、分画遠心分離法、ナノ膜限外ろ過法、免役吸着捕捉法、アフィニティー精製法、マイクロ流体工学分離法またはこれらの組み合わせを使用して生物学的試料から濃縮または単離することもできる。

【0103】

サイズ排除クロマトグラフィー、たとえばゲル透過カラム、遠心分離法または密度勾配遠心分離法およびろ過法を使用することができる。たとえば、小胞は、分画遠心分離法、アニオン交換および／またはゲル透過クロマトグラフィー（たとえば米国特許第6,899,863号および第6,812,023号に記載）、スクロース密度勾配、オルガネラ電気泳動（たとえば米国特許第7,198,923号に記載）、磁気活性化細胞ソート（MACS）またはナノ膜限外ろ過濃縮器によって単離することができる。単離または濃縮法の種々の組み合わせを使用することができる。

【0104】

豊富にあるタンパク質、たとえばアルブミンおよび免疫アルブミンが、生物学的試料からの小胞の単離を妨げることがある。たとえば、小胞は、血液のような生物学的試料中に見られるもっとも豊富なタンパク質に特異的である複数の抗体を使用するシステムを使用して、生物学的試料から単離することができる。このようなシステムは、いくつかのタンパク質を一度に除去することができ、それにより、起始細胞特異的小胞のような比較的豊富でない種を顕在化させる。

【0105】

この種のシステムは、生物学的試料、たとえば血液、脳脊髄液または尿からの小胞の単離のために使用することができる。生物学的試料からの小胞の単離はまた、Chromy et al., *J Proteome Res* 2004; 3:1120-1127に記載されているように、豊富タンパク質除去法によって改善することもできる。もう一つの態様において、生物学的試料からの小胞の単離はまた、Zhang et al., *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:144-155に記載されているように、糖ペプチド捕捉を使用して血清タンパク質を除去することによって改善することもできる。加えて、尿のような生物学的試料由来の小胞は、Pisitkun et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101:13368-13373に記載されているように、分画遠心分離ののち、細胞質または抗細胞質エピトープに対する抗体との接触によって単離することもできる。

【0106】

生物学的試料からの小胞の単離または濃縮はまた、音波処理（たとえば超音波を印加することによって）、洗浄剤、他の膜活性化剤またはこれらの組み合わせの使用によって改善することができる。たとえば、超音波エネルギーは、潜在的な腫瘍部位に適用することができ、かつ、理論に拘束される訳ではないが、組織からの小胞の放出を増加させることができ、本明細書に開示される一つまたは複数の方法を使用して生物学的試料から解析または評価することができる小胞集団の濃縮を可能にする。

【0107】

試料取り扱い

本明細書に記載されるような循環バイオマーカーを検出する方法、たとえば抗体アフィニティー単離法とともに、必要に応じて様々な濃縮または単離手法を使用して結果の一貫性を最適化することができる。そのような工程は、振とうまたはボルテックスのようなか

10

20

30

40

50

く拌、たとえばPEGを用いるポリマーベースの単離のような様々な単離技術およびろ過または他の工程におけるの様々なレベルまでの濃縮を含むことができる。当業者には、小胞含有試料を試験する様々な段階でそのような処理を適用することができることが理解されよう。一つの態様においては、試料そのもの、たとえば血漿または血清のような体液をボルテックスする。いくつかの態様においては、一つまたは複数の試料処理工程、たとえば小胞単離を実施したのち、試料をボルテックスする。かく拌は、所望により、いくつかまたはすべての適切な試料処理工程で実施することができる。プロセスを改善するために、たとえば関心のあるバイオマーカーの凝集または分解を抑制するために、様々な工程において添加物を導入することができる。

【0108】

また、所望により、試料を様々な剤で処理することにより、結果を最適化することもできる。そのような剤は、凝集を抑制するための添加物および／またはpHもしくはイオン強度を調節するための添加物を含む。凝集を抑制する添加物は、ブロッキング剤、たとえばウシ血清アルブミン（BSA）およびミルク、カオトロピック剤、たとえばグアニジウム塩酸塩および洗浄剤または界面活性剤を含む。有用なイオン洗浄剤は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS、ラウリル硫酸ナトリウム（SLS））、ラウレス硫酸ナトリウム（SLS、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（SLES））、ラウリル硫酸アンモニウム（ALS）、臭化セトリモニウム、塩化セトリモニウム、ステアリン酸セトリモニウムなどを含む。有用な非イオン（両性イオン）洗浄剤は、ポリオキシエチレングリコール類、ポリソルベート20（Tween 20とも知られる）、他のポリソルベート（たとえば40、60、65、80など）、Triton-X（たとえばX100、X114）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（CHAPS）、CHAPSO、デオキシコール酸、デオキシコール酸ナトリウム、NP-40、グリコシド類、オクチルチオグルコシド類、マルトシド類などを含む。いくつかの態様においては、血小板凝集を減らすことが示されている界面活性剤Pluronic F-68を使用して、単離および／または検出中、小胞を含有する試料を処理する。F68は、0.1%～10%の濃度、たとえば1%、2.5%または5%の濃度で 사용할 ことができる。溶液のpHおよび／またはイオン強度は、塩化ナトリウム（NaCl）、リン酸緩衝食塩水（PBS）、トリス緩衝食塩水（TBS）、リン酸ナトリウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、クエン酸ナトリウムおよび食塩水・クエン酸ナトリウム（SSC）緩衝液をはじめとする様々な酸、塩基、緩衝液または塩によって調節することができる。いくつかの態様においては、NaClが0.1%～10%、たとえば1%、2.5%または5%の最終濃度で加えられる。いくつかの態様においては、Tween 20が0.005～2%、たとえば0.05%、0.25%または0.5%の最終濃度で加えられる。本発明と共に使用するためのブロッキング剤は、不活性タンパク質、たとえば乳タンパク質、無脂肪粉乳タンパク質、アルブミン、BSA、カゼインまたは血清、たとえば新生仔ウシ血清（NBCS）、ヤギ血清、ウサギ血清またはサケ血清を含む。これらのタンパク質は、0.1%～10%の濃度、たとえば1%、2%、3%、3.5%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%の濃度で加えることができる。いくつかの態様においては、BSAが0.1%～10%の濃度、たとえば1%、2%、3%、3.5%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%の濃度で加えられる。ある態様において、試料は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2005年7月13日出願の米国特許出願11/632946に提示されている方法にしたがって処理される。市販のブロッキング剤、たとえばPierce（Thermo Fisher Scientificの一部門、Rockford, IL）からのSuperBlock、StartingBlock、Protein-Freeが使用される場合もある。いくつかの態様においては、SSC／洗浄剤（たとえば0.5% Tween 20または0.1% Triton-X 100を含む20×SSC）が0.1%～10%の濃度、たとえば1.0%または5.0%の濃度で加えられる。

【0109】

小胞および他の循環バイオマーカーを検出する方法は、所望により、本明細書に記載されるプロトコールおよび処理の様々な組み合わせによって最適化することができる。検出プロトコールは、かく拌、単離法および添加物の様々な組み合わせによって最適化することができる。いくつかの態様において、患者試料は、単離工程の前後でボルテックスされ

10

20

30

40

50

、BSAおよび／またはF68を含む遮断剤で処理される。そのような処理は、大きな凝集塊またはタンパク質もしくは他の生物学的屑の形成を減らし、それにより、より一貫した検出読みを提供する場合がある。

【0110】

ろ過および限外ろ過

小胞は、対象由来の生物学的試料をろ過モジュールでろ過すること、およびそのろ過モジュールから小胞を含む保持物を捕集することにより、生物学的試料から単離することができ、それによって小胞を生物学的試料から単離することができる。本方法は、対象由来の生物学的試料をフィルタを含むろ過モジュールでろ過する工程、およびそのろ過モジュールから小胞を含む保持物を捕集する工程、それによって小胞を生物学的試料から単離する工程を含むことができる。一つの態様において、フィルタは、約100キロダルトンより

10

【0111】

本方法はさらに、小胞のバイオシグネチャーを決定する工程を含むことができる。本方法はさらに、保持物を複数の基体に適用する工程を含むこともでき、各基体は一つまたは複数の捕捉物質に結合され、複数の基体の各サブセットは、複数の基体の別のサブセットとは異なる捕捉物質または捕捉物質の組み合わせを含む。

【0112】

試料中の小胞のバイオシグネチャーを決定する方法であって、障害を有する対象由来の生物学的試料をろ過モジュールでろ過する工程、ろ過モジュールから一つまたは複数の小胞を含む保持物を捕集する工程、および一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーを決定する工程を含む方法も、本明細書において提供される。一つの態様において、ろ過モジュールは、約100または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含む。

20

【0113】

本明細書に開示される方法はさらに、対象由来の生物学的試料をろ過モジュールでろ過する工程、ろ過モジュールから一つまたは複数の小胞を含む保持物を捕集する工程、一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーを検出する工程、およびバイオシグネチャーに基づいて対象における表現型を特徴決定することによって、対象における表現型を特徴決定する工程を含むことができ、その特徴決定は少なくとも70%の感度である。いくつかの態様において、特徴決定は、バイオシグネチャーを有する一つまたは複数の小胞の量を測定

30

【0114】

複数の小胞の多重分析の方法も、本明細書において提供される。いくつかの態様において、本方法は、対象由来の生物学的試料をろ過モジュールでろ過する工程、ろ過モジュールから複数の小胞を含む保持物を捕集する工程、複数の小胞を複数の捕捉物質（該複数の捕捉物質は複数の基体に結合され、および複数の基体の各サブセットは複数の基体の別のサブセットとは差次的に標識されている）に適用する工程、複数の小胞の少なくともサブセットを捕捉する工程、および捕捉した小胞の少なくともサブセットに関してバイオシグネチャーを決定する工程を含む。一つの態様において、各基体は一つまたは複数の捕捉物質に結合されており、複数の基体の各サブセットは、複数の基体の別のサブセットと比較して異なる捕捉物質または捕捉物質の組み合わせを含む。いくつかの態様において、複数の基体の少なくともサブセットは、一つまたは複数の標識を含むなど、固有に標識されている。基体は、粒子またはビーズまたはそれらの任意の組み合わせであることができる。いくつかの態様において、フィルタは、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、または500キロダルトンよりも大きな分子を保持する。一つの態様において、ろ過モジュールは、約100または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含む。一つの態様において、ろ過モジュールは、約9、20、100、または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含む。

40

【0115】

いくつかの態様において、複数の小胞の多重分析の方法は、対象由来の生物学的試料を

50

、約100キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含むろ過モジュールでろ過する工程、ろ過モジュールから複数の小胞を含む保持物を捕集する工程、複数の小胞を、マイクロアレイに結合されている複数の捕捉物質に適用する工程、複数の小胞の少なくともサブセットをマイクロアレイ上に捕捉する工程、および捕捉した小胞の少なくともサブセットに関してバイオシグネチャーを決定する工程を含む。いくつかの態様において、フィルタは、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、または500キロダルトンよりも大きな分子を保持する。一つの態様において、ろ過モジュールは、約100または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含む。一つの態様において、ろ過モジュールは、約9、20、100、または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含む。

10

【0116】

生物学的試料は、ろ過による単離の前に清澄化することができる。清澄化には、細胞屑およびその他の望ましくない物質の選択的除去が含まれる。たとえば、細胞屑および、循環バイオマーカーの検出を妨げる他の成分を除去することができる。清澄化は、たとえば約5,000×g、4,000×g、3,000×g、2,000×g、1,000×gまたはそれ未満での低速遠心分離法による清澄化であることができる。そして、小胞を含有する上清、すなわち清澄化された生物学的試料を捕集し、およぼろ過して、清澄化された生物学的試料から小胞を単離することができる。いくつかの態様において、生物学的試料は、ろ過による小胞の単離の前に清澄化されない。

【0117】

20

いくつかの態様において、試料からの小胞の単離は、超遠心分離法のような高速遠心分離法を使用しない。たとえば、単離は、約100,000×gまたはそれを超えるような遠心速度の使用を要してはならない。いくつかの態様において、試料からの小胞の単離は、50,000×g、40,000×g、30,000×g、20,000×g、15,000×g、12,000×gまたは10,000×g未満の速度を使用する。

【0118】

適用可能な任意の数のろ過構造を用いて、関心対象の試料をろ過することができる。いくつかの態様において、循環バイオマーカーを生物学的試料から単離するために使用されるろ過モジュールは、繊維ベースのろ過カートリッジであることができる。たとえば、フィルタは、ポリプロピレン中空繊維のような中空のポリマー繊維であることができる。生物学的試料は、本明細書に開示される生物学的流体のような試料流体を、ぜん動ポンプのようなポンプ装置を備えたモジュールに汲み込むことにより、ろ過モジュールに導入することができる。ポンプ流量は、約0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9または10mL/分のように異なることができる。流量は、ろ過モジュールの構造、例えばサイズおよび処理能力を考慮して調整することができる。

30

【0119】

ろ過モジュールは膜ろ過モジュールであることができる。たとえば、膜ろ過モジュールは、かく拌セル装置（たとえば電磁かく拌機を含む）中に収容された親水性ポリフッ化ビニリデン（PVDF）フィルタディスク膜のようなフィルタディスク膜を含むことができる。いくつかの態様において、試料は、フィルタ膜の各側で生じる圧力勾配の結果としてフィルタを透過する。

40

【0120】

フィルタは、低い疎水吸収性および／または高い親水性を有する材料を含むことができる。たとえば、フィルタは、小胞保持および大部分のタンパク質の透過のための平均孔径と、ならびに親水性であり、それによってタンパク質吸着を抑制する表面も有することができる。たとえば、フィルタは、ポリプロピレン、PVDF、ポリエチレン、ポリフルオロエチレン、セルロース、二次酢酸セルロース、ポリビニルアルコールおよびエチレンビニルアルコール（EVAL（登録商標）、Kuraray Co., Okayama, Japan）からなる群より選択される材料を含むことができる。フィルタに使用することができるさらなる材料は、ポリスルホンおよびポリエーテルスルホンを含むが、これらに限定されない。

50

【0121】

ろ過モジュールは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400または500キロダルトン (kDa) よりも大きな分子を保持するフィルタ、たとえば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400または500 kDaのMWCO (分子量カットオフ) を有するフィルタを有することができる。MWCOの範囲が9 kDa、20 kDa、および/または150 kDaである限外ろ過膜を使用することができる。いくつかの態様において、ろ過モジュール内のフィルタは、約0.01 μm ～約0.15 μm 、およびいくつかの態様においては約0.05 μm ～約0.12 μm の平均孔径を有する。いくつかの態様において、フィルタは、約0.06 μm 、0.07 μm 、0.08 μm 、0.09 μm 、0.1 μm 、0.11 μm または0.2 μm の平均孔径を有する。

10

【0122】

ろ過モジュールは、市販のカラム、たとえばタンパク質を濃縮またはタンパク質を単離するために一般に使用されるカラムであることができる (例えば、限外ろ過)。例は、Millipore (Billerica, MA) のカラム、たとえばAmicon (登録商標) 遠心フィルタ、またはPierce (登録商標) (Rockford, IL) のカラム、たとえばPierce Concentratorフィルタ装置を含むが、これらに限定されない。Pierceの有用なカラムは、9kDa、20kDaおよび/または150kDaのMWCOを有する使い捨て限外ろ過遠心装置を含む。これらの濃縮装置は、円錐形の装置に溶接された高性能再生セルロース膜からなる。フィルタは、いずれも参照によりその全文が本明細書に組み入れられる米国特許第6,269,957号または第6,357,601号に記載されているようなフィルタであることができる。

20

【0123】

単離された小胞を含む保持物をろ過モジュールから捕集することができる。保持物は、保持物をフィルタから流し出すことによって捕集することができる。理論によって拘束されることなく、保持物をより容易に捕集し、および過酷な、または時間のかかる捕集技術の使用を最小限にするために、親水性の表面性を有し、それによってタンパク質吸着を抑制するフィルタ組成の選択を使用することができる。

【0124】

そして、捕集した保持物を、その後の分析、たとえば、本明細書にさらに記載されるような、保持物中の一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーの評価に使用することができる。分析は、捕集された保持物に対して直接実施することができる。または、一つまたは複数の小胞の分析の前に、捕集された保持物をさらに濃縮または精製することもできる。たとえば、本明細書に記載されるような、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、分画遠心分離法、免疫吸着捕捉法、アフィニティー精製法、マイクロ流体工学分離法またはこれらの組み合わせを使用して、保持物をさらに濃縮する、または小胞を保持物からさらに単離することができる。いくつかの態様において、保持物は別のろ過工程に供されることができる。または、フィルタを使用する小胞の単離の前に、小胞は、サイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法、分画遠心分離法、免疫吸着捕捉法、アフィニティー精製法、マイクロ流体工学分離法またはこれらの組み合わせを使用して濃縮または単離される。

30

40

【0125】

バイオマーカーを濃縮および単離するために、フィルタの組み合わせを使用することができる。たとえば、生物学的試料をろ過する前に、まず、約0.01 μm ～約2 μm 、約0.05 μm ～約1.5 μm のポロシティまたは孔径を有するフィルタでろ過してもよい。たとえば、生物学的試料を、約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400または500キロダルトン (kDa) よりも大きな分子を保持するフィルタ、たとえば、約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400または500のMWCO (分子量カットオフ) を有するフィルタを有するろ過モジュールでろ過する前に、まず、生物学的試料を、約0.01 μm ～約2 μm

50

、約0.05 μm ～約1.5 μm のポロシティまたは孔径を有するフィルタでろ過してもよい。いくつかの態様において、フィルタは、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0 μm の孔径を有する。フィルタはシリンジフィルタであってもよい。したがって、一つの態様において、本方法は、生物学的試料を、約1 μm よりも大きいポロシティを有するシリンジフィルタのようなフィルタでろ過したのち、約100または150キロダルトンよりも大きな分子を保持するフィルタを含むろ過モジュールでろ過する工程を含む。ある態様において、フィルタは1.2 μm フィルタであり、そしてろ過ののち、試料を、150kDaカットオフを有する7mlまたは20ml濃縮カラムに通す。

【0126】

ろ過モジュールはマイクロ流体工学装置の一構成要素であることができる。「ラブオンチップ」システム、生物医学微少電気機械システム(biomedical micro-electro-mechanical system) (Bio-MEM) または多成分一体化システム(multicomponent integrated system)とも呼ばれるマイクロ流体工学装置を小胞の単離および分析のために使用することができる。このようなシステムは、小胞の結合、バイオマーカーの検出および本明細書にさらに記載されるような他のプロセスを可能にするプロセスを小型化し、かつ区画化する。

【0127】

マイクロ流体工学装置はまた、ろ過モジュールを含むことにより、小胞の単離に使用することもできる。たとえば、マイクロ流体工学装置は、生物学的試料からのサイズに基づいて小胞を生物学的試料から単離するための一つまたは複数のチャンネルを使用することができる。生物学的試料は、小胞を選択的に通過させる一つまたは複数のマイクロ流体工学チャンネルに導入することができる。マイクロ流体工学装置はさらに、小胞の性質、たとえばサイズ、形状、変形性、バイオマーカープロファイルまたはバイオシグネチャーに基づいて小胞を選択するために、結合物質または一つより多いろ過モジュールを含むことができる。

【0128】

結合物質

結合物質(結合試薬とも呼ばれる)には、標的バイオマーカーに結合することができる物質が含まれる。結合物質は、標的バイオマーカーに特異的な結合物質でもよい。標的バイオマーカーに特異的とは、物質が標的バイオマーカーに結合することができることを意味する。標的は、本明細書において開示された任意の有用なバイオマーカー、例えば、小胞表面にあるバイオマーカーでよい。一部の態様において、標的は単一タンパク質などの単一分子であり、そのため、結合物質は単一タンパク質に特異的である。他の態様において、標的は、類似のエピトープまたは部分を有するファミリーまたはタンパク質などの分子グループでもよく、そのため、結合物質はタンパク質ファミリーまたはタンパク質グループに特異的である。分子グループはまた、タンパク質、DNA、またはRNAなどの分子クラスでもよい。結合物質は、小胞の成分またはバイオマーカーを結合することによって小胞を捕捉するのに用いられる捕捉物質でもよい。一部の態様において、捕捉物質は、小胞上の抗原に結合する、抗体もしくはそのフラグメントまたはアプタマーを含む。捕捉物質は、本明細書においてさらに説明されるように、任意で、基体に結合させ、小胞を単離するのに用いられてもよい。

【0129】

結合物質とは、循環バイオマーカー、たとえば小胞または小胞の成分に結合する物質である。結合物質は、捕捉物質および／または検出物質として使用することができる。捕捉物質は、たとえば小胞の成分またはバイオマーカーに結合することにより、循環バイオマーカーに結合およびこれを捕捉することができる。たとえば、捕捉物質は、小胞表面の抗原に結合する捕捉抗体または捕捉抗原であることができる。検出物質は、循環バイオマーカーに結合し、それにより、バイオマーカーの検出を容易にすることができる。たとえば、基体に対して隔離されている抗体またはアプタマーを含む捕捉物質を使用して試料中の小胞を捕捉することができ、標識を担持する抗体またはアプタマーを含む検出物質を使用して、検出物質の標識の検出を介して、捕捉された小胞を検出することができる。いくつ

かの態様において、小胞は、同じ小胞バイオマーカーを認識する捕捉物質および検出物質を使用することによって評価される。たとえば、小胞集団は、テトラスパニンを使用して、たとえば基体に結合した抗CD9抗体を使用することによって捕捉することができ、捕捉された小胞は、捕捉された小胞を標識するための蛍光標識された抗CD9抗体を使用して検出することができる。他の態様において、小胞は、様々な小胞バイオマーカーを認識する捕捉物質および検出物質を使用して評価される。たとえば、小胞集団は、細胞特異的マーカーを使用して、たとえば基体に結合した抗PCSA抗体を使用することによって捕捉することができ、捕捉された小胞は、捕捉された小胞を標識するための蛍光標識された抗CD9抗体を使用して検出することができる。同様に、小胞集団は、一般的小胞マーカーを使用して、たとえば基体に結合した抗CD9抗体を使用することによって捕捉することができ、捕捉された小胞は、捕捉された小胞を標識するための細胞特異的または疾患特異的マーカーに対する蛍光標識された抗体を使用して、検出することができる。

10

【0130】

結合物質によって認識されるバイオマーカーは本明細書において抗原と呼ばれる時もある。特別の定めのない限り、本明細書で使用する抗原は、結合物質のタイプにもバイオマーカーの免疫原性にも関係なく、結合物質が結合することができる任意の実体を含むことが意図される。抗原はその機能性フラグメントをさらに含む。例えば、抗原は、結合物質が結合することができるタンパク質のフラグメントを含む、結合物質が結合することができるタンパク質バイオマーカーを含んでもよい。

【0131】

一つの態様において、小胞は、小胞表面上のバイオマーカーに結合する捕捉物質を使用して捕捉される。本明細書にさらに記載されるように、捕捉物質を基体に結合させ、使用して、小胞を単離することができる。一つの態様において、捕捉物質は、物質または試料中に存在する小胞のアフィニティー捕捉または単離のために使用される。

20

【0132】

結合物質は、小胞を生物学的試料から濃縮または単離したのち、使用することができる。たとえば、まず小胞を生物学的試料から単離したのち、特異的バイオシグネチャーを有する小胞を単離または検出することができる。特異的バイオシグネチャーを有する小胞は、バイオマーカーに対する結合物質を使用して単離または検出することができる。特異的バイオマーカーを有する小胞は、不均一な小胞集団から単離または検出することができる。または、事前の単離または濃縮工程なしで、小胞を含む生物学的試料に対して結合物質を使用することもできる。たとえば、結合物質は、特異的なバイオシグネチャーを有する小胞を生物学的試料から直接単離または検出するために使用される。

30

【0133】

結合物質は、核酸、タンパク質または小胞の成分に結合することができる他の分子であることができる。結合物質は、DNA、RNA、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、Fab、Fab'、一本鎖抗体、合成抗体、アプタマー（DNA/RNA）、ペプチド、 α -DNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、合成または天然に存在する化学物質（薬物、標識試薬を含むが、それらに限定されない）、デンドリマーまたはこれらの組み合わせを含むことができる。たとえば、結合物質は捕捉抗体であることができる。本発明の態様において、結合物質は膜タンパク質標識物質を含む。たとえば、Alroyらの米国特許出願公開公報US2005/0158708に開示されている膜タンパク質標識物質を参照すること。ある態様において、小胞は、本明細書に記載されるように単離または捕捉され、小胞を検出するために一つまたは複数の膜タンパク質標識物質が使用される。

40

【0134】

いくつかの例においては、一つの結合物質を使用して小胞を単離または検出することができる。他の例においては、異なる結合物質の組み合わせを使用して小胞を単離または検出することもできる。たとえば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100種類の異なる結合物質を使用して、生物学的試料から小胞を単離または検出することもできる。また、以下にさらに記載され

50

るように、小胞に対する一つまたは複数の異なる結合物質は小胞のバイオシグネチャーを形成することができる。

【0135】

また、異なる結合物質を多重化のために使用することもできる。たとえば、異なる結合物質によって各小胞集団を単離または検出することにより、二つ以上の小胞集団の単離または検出を実施することができる。異なる結合物質は、標識されている異なる粒子に結合することができる。もう一つの態様においては、異なる結合物質を含むアレイを多重解析に使用することができ、異なる結合物質は、差次的に標識されるか、または、アレイ上の結合物質の位置に基づいて確かめることができる。多重化は、以下に記載するように、標識または検出法の分解能まで達成することができる。結合物質は、小胞を検出するために、たとえば起始細胞特異的小胞を検出するために使用することができる。結合物質または複数の結合物質は、それら自体が、小胞のバイオシグネチャーを提供する結合物質プロファイルを形成することができる。一つまたは複数の結合物質を、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図2から選択することができる。たとえば、不均一な小胞集団からの小胞の差次的検出または単離において、二つ、三つ、四つまたはそれ以上の結合物質を使用して小胞集団が検出または単離される場合、その小胞集団に関する特定の結合物質プロファイルによって、その特定の小胞集団のバイオシグネチャーが提供される。小胞は、任意の数の結合物質を多重に使用して検出することができる。このように、結合物質を使用して小胞のバイオシグネチャーを形成することもできる。そのバイオシグネチャーを使用して表現型を特徴決定することができる。

10

20

【0136】

結合物質はレクチンであることができる。レクチンは、多糖類および糖タンパク質に選択的に結合するタンパク質であり、植物および動物中に広く分布している。たとえば、ガラントス・ニバリス (*Galanthus nivalis*) 由来のガラントス・ニバリス アグルチニン (「GNA」) の形態のレクチン、ナルシッソス・シュードナルシッソス (*Narcissus pseudonarcissus*) 由来のナルシッソス・シュードナルシッソス アグルチニン (「NPA」) の形態のレクチン、および「シアノビリン」と呼ばれる藍藻類のノストック・エリプソスポルム (*Nostoc ellipsosporum*) 由来のレクチン (Boyd et al Antimicrob Agents Chemother 41(7):1521 1530, 1997, Hammar et al. Ann N Y Acad Sci 724:166 169, 1994, Kaku et al . Arch Biochem Biophys 279(2):298 304, 1990) のようなレクチンを使用して小胞を単離することができる。これらのレクチンは、高いマンノース含量を有する糖タンパク質に結合することができる (Chervenak et al. Biochemistry 34(16):5685 5695, 1995)。高マンノース糖タンパク質とは、 α -1 $\rightarrow$ 3または α -1 $\rightarrow$ 6マンノース-マンノース結合の形態のマンノース-マンノース結合を有する糖タンパク質をいう。

30

【0137】

結合物質は、一つまたは複数のレクチンに結合する物質であることができる。レクチン捕捉は、バイオマーカーであるカテプシンDの単離に適用することができる。なぜならカテプシンDは、ガラントス・ニバリス アグルチニン (GNA) およびコンカナバリンA (ConA) のレクチンに結合することができるグリコシル化タンパク質であるからである。

40

【0138】

レクチンを使用して小胞を捕捉する方法および装置は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、「METHODS AND SYSTEMS FOR ISOLATING, STORING, AND ANALYZING VESICLES」と題する2010年11月30日出願の国際特許出願第PCT/US2010/058461号、「AFFINITY CAPTURE OF CIRCULATING BIOMARKERS」と題する2009年12月3日出願の第PCT/US2009/066626号、「METHODS AND MATERIALS FOR ISOLATING EXOSOMES」と題する2010年6月4日出願の第PCT/US2010/037467号および「EXTRACORPOREAL REMOVAL OF MICROVESICULAR PARTICLES」と題する2007年3月9日出願の第PCT/US2007/006101号に記載されている。

【0139】

結合物質は抗体であることができる。たとえば、小胞は、小胞上に存在する一つまたは

50

複数の抗原に特異的な一つまたは複数の抗体を使用して単離されてもよい。たとえば、小胞は、その表面にCD63を有することができ、そしてCD63に対する抗体、すなわち捕捉抗体を使用して小胞を単離することができる。または、腫瘍細胞に由来する小胞はEpCamを発現することができ、EpCamおよびCD63に対する抗体を使用して小胞を単離することができる。小胞を単離するための他の抗体は、CD9、PSCA、TNFR、CD63、B7H3、MFG-E8、EpCam、Rab、CD81、STEAP、PCSA、PSMAまたは5T4に対する抗体、すなわち捕捉抗体を含むことができる。小胞を単離するための他の抗体は、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、MFG-E8、組織因子（TF）、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2またはTETSに対する抗体、すなわち捕捉抗体を含むことができる。

【0140】

いくつかの態様において、捕捉物質は、CD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、EpCam、PSCA、ICAM、STEAPまたはEGFRに対する抗体である。捕捉物質はまた、小胞のバイオマーカーを同定するために使用することもできる。たとえば、CD9に対する抗体のような捕捉物質は、CD9を小胞のバイオマーカーとして同定するであろう。いくつかの態様においては、多重分析の場合など、複数の捕捉物質を使用することができる。複数の捕捉物質は、CD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、EpCam、PSCA、ICAM、STEAPおよびEGFRの一つまたは複数に対する結合物質を含むことができる。いくつかの態様において、複数の捕捉物質は、CD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、MFG-E8および／またはEpCamに対する結合物質を含む。さらに他の態様において、複数の捕捉物質は、CD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、EpCam、PSCA、ICAM、STEAPおよび／またはEGFRに対する結合物質を含む。複数の捕捉物質は、TMEM211、MFG-E8、組織因子（TF）および／またはCD24に対する結合物質を含む。

【0141】

本明細書に参照される抗体は、免疫グロブリン分子または免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原および合成抗体に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子であり得る。免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、もしくはIgA）またはサブクラスのものであり得る。抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、合成抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体、一本鎖抗体、FabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメント、FvもしくはFv'部分、Fab発現ライブラリーにより産生されたフラグメント、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、または上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。抗体が抗原に優先的に結合する場合、および、例えば別の分子と約30%、20%、10%、5%、または1%未満の交差反応性を有する場合、抗体、または一般的にあらゆる分子は、抗原（または他の分子）に「特異的に結合する」。

【0142】

また、結合物質は、ポリペプチドまたはペプチドであり得る。ポリペプチドは、その最も広い意味で使用され、サブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣物の配列を含み得る。サブユニットは、ペプチド結合によって連結され得る。ポリペプチドは、天然に存在する、（酵素消化によるような）天然に存在するポリペプチドの処理された形態、化学的に合成された、もしくは組換え発現されたものであり得る。本発明の方法に使用されるポリペプチドは、標準技術を用いて化学的に合成され得る。ポリペプチドは、特殊な特性を付与するために、D-アミノ酸（L-アミノ酸に特異的なプロテアーゼに対して耐性である）、D-およびL-アミノ酸の組み合わせ、βアミノ酸、または種々の他のデザイナーアミノ酸もしくは天然に存在しないアミノ酸（例えば、β-メチルアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、およびNα-メチルアミノ酸等）を含み得る。合成アミノ酸には、リジンに対するオルニチン、およびロイシンまたはイソロイシンに対するノルロイシンが含まれ得る。加えて、ポリペプチドは、新規な特性を有するポリペプチドを調製するために、エステル結合等のペプチド模倣結合を有することができる。例えば、還元型のペプチド結合、すなわち、R₁-CH₂-NH-R₂（R₁およびR₂はアミノ酸残基または配列である）を組み込むポリペプチドを作製し得る。還元型のペプチド結合は、ジペプチドサブユニットとして導入

してもよい。このようなポリペプチドは、プロテアーゼ活性に対して耐性であり、延長された生体内での半減期を有することとなる。また、ポリペプチドは、側鎖が、アミノ酸の場合のように α 炭素に付いているのではなく、分子骨格に沿って窒素原子に付いている、ペプトイド(N-置換グリシン)を含むこともできる。ポリペプチドおよびペプチドは、本願を通して交換可能に使用されることを意図し、すなわち、ペプチドという用語が使用される場合、それは、ポリペプチドも含み得、ポリペプチドという用語が使用される場合、それは、ペプチドも含み得る。「タンパク質」という用語はまた、特記されない限り、本出願全体を通して「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語と互換的に使用されることも意図されている。

【0143】

小胞は、結合物質を使用して単離、捕捉または検出することもできる。結合物質は、小胞の「ハウスキーピングタンパク質」または一般的小胞バイオマーカーに結合する物質であってよい。バイオマーカーは、CD63、CD9、CD81、CD82、CD37、CD53、Rab-5b、アネキシンV、またはMFG-E8であってよい。四つの膜貫通ドメインを有する膜タンパク質のファミリーであるテトラスパニン是一般的小胞マーカーとして使用することができる。テトラスパニンはCD151、CD53、CD37、CD82、CD81、CD9およびCD63を含む。TSPAN1 (TSP-1)、TSPAN2 (TSP-2)、TSPAN3 (TSP-3)、TSPAN4 (TSP-4、NAG-2)、TSPAN5 (TSP-5)、TSPAN6 (TSP-6)、TSPAN7 (CD231、TALLA-1、A15)、TSPAN8 (CO-029)、TSPAN9 (NET-5)、TSPAN10 (オキュロスパニン)、TSPAN11 (CD151様)、TSPAN12 (NET-2)、TSPAN13 (NET-6)、TSPAN14、TSPAN15 (NET-7)、TSPAN16 (TM4-B)、TSPAN17、TSPAN18、TSPAN19、TSPAN20 (UP1b、UPK1B)、TSPAN21 (UP1a、UPK1A)、TSPAN22 (RDS、PRPH2)、TSPAN23 (ROM1)、TSPAN24 (CD151)、TSPAN25 (CD53)、TSPAN26 (CD37)、TSPAN27 (CD82)、TSPAN28 (CD81)、TSPAN29 (CD9)、TSPAN30 (CD63)、TSPAN31 (SAS)、TSPAN32 (TSSC6)、TSPAN33およびTSPAN34を含む、哺乳動物において同定された30種類超のテトラスパニンが存在する。他の一般的に認められた小胞マーカーは、表3に記載されたものを含む。これらのタンパク質のいずれをも小胞マーカーとして使用することができる。さらに、疾患または状態に関する候補バイオシグネチャーを同定する際に、本明細書または表3に開示された任意のマーカーを選択することができ、ここで、該1つまたは複数の選択されたバイオマーカーは、該疾患または状態に関与する機序において直接的または間接的な役割または機能を有する。

【0144】

(表3) 複数の細胞型からの小胞中に認められるタンパク質

10

20

30

クラス	タンパク質
抗原提示	MHC クラスI, MHC クラスII, インテグリン, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha M\beta 2$, $\beta 2$
免疫グロブリンファミリー	ICAM1/CD54, P-セレクション
細胞表面ペプチダーゼ	ジペプチジルペプチダーゼIV/CD26, アミノペプチダーゼn/CD13
テトラスパニン	CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9およびCD63
熱ショックタンパク質	Hsp70, Hsp84/90
細胞骨格タンパク質	アクチン, アクチン結合タンパク質, チューブリン
膜輸送および融合	アネキシンI, アネキシンII, アネキシンIV, アネキシンV, アネキシンVI, RAB7/RAP1B/RADGDI
シグナル伝達	Gi2 α /14-3-3, CBL/LCK
豊富な膜タンパク質	CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, Cd86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, C1orf58, BASP1, TACSTD1, STOM
他の膜貫通タンパク質	カドヘリン: CDH1, CDH2, CDH12, CDH3, デスモグレイン, DSG1, DSG2, DSG3, DSG4, デスモコリン, DSC1, DSC2, DSC3, プロトカドヘリン, PCDH1, PCDH10, PCDH11x, PCDH11y, PCDH12, FAT, FAT2, FAT4, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH19; PCDH20; PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDHA1, PCDHA10, PCDHA11, PCDHA12, PCDHA13, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHAC1, PCDHAC2, PCDHB1, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB12, PCDHB13, PCDHB14, PCDHB15, PCDHB16, PCDHB17, PCDHB18, PCDHB2, PCDHB3, PCDHB4, PCDHB5, PCDHB6, PCDHB7, PCDHB8, PCDHB9, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGA12, PCDHGA2; PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3, PCDHGC4, PCDHGC5, CDH9 (カドヘリン9, タイプ2 (T1-カドヘリン)), CDH10 (カドヘリン10, タイプ2 (T2-カドヘリン)), CDH5 (VE-カドヘリン(血管内皮)), CDH6 (K-カドヘリン(腎臓)), CDH7 (カドヘリン7, タイプ2), CDH8 (カドヘリン8, タイプ2), CDH11 (OB-カドヘリン(骨芽細胞)), CDH13 (T-カドヘリン-H-カドヘリン(心臓)), CDH15 (M-カドヘリン(筋小管)), CDH16 (KSP-カドヘリン), CDH17 (LI カドヘリン(肝臓-腸)), CDH18 (カドヘリン18, タイプ2), CDH19 (カドヘリン19, タイプ2), CDH20 (カドヘリン20, タイプ2), CDH23 (カドヘリン23, (神経感覚上皮)), CDH10, CDH11, CDH13, CDH15, CDH16, CDH17, CDH18, CDH19, CDH20, CDH22, CDH23, CDH24, CDH26, CDH28, CDH4, CDH5, CDH6, CDH7, CDH8, CDH9, CELSR1, CELSR2, CELSR3, CLSTN1, CLSTN2, CLSTN3, DCHS1, DCHS2, LOC389118, PCLKC, RESDA1, RET

10

20

30

【0145】

結合物質はまた、腫瘍細胞などの特定の細胞型に由来する小胞に結合する物質(例えば、Tissue Factor、EpCam、B7H3、RAGE、もしくはCD24に対する結合物質)でもよく、特定の起始細胞に由来する小胞に結合する物質でもよい。小胞を単離または検出するのに用いられる結合物質は、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1より選択される抗原に対する結合物質でもよい。小胞に対する結合物質はまた、国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図2に列挙される結合物質より選択されるものでもよい。結合物質は、テトラスパニン、MFG-E8、アネキシンV、5T4、B7H3、カベオリン、CD63、CD9、E-カドヘリン、Tissue Factor、MFG-E8、TMEM211、CD24、PSCA、PCSA、PSMA、Rab-5B、STEAP、TNFR1、CD81、EpCam、CD59、CD81、ICAM、EGFR、またはCD66などの抗原に対する結合物質でもよい。血小板に対する結合物質は、GpIa-IIa、GpIIb-IIIa、GpIIIb、GpIb、またはGpIXなどの糖タンパク質でもよい。結合物質は、CD9、Erb2、Erb4、CD81、Erb3、MUC16、CD63、DLL4、HLA-Drpe、B7H3、IFNAR、5T4、PSCA、MICB、PSMA、MFG-E8、Muc1、PSA、Muc2、Unc93a、VEGFR2、EpCAM、VEGF A、TMPRSS2、RAGE、PSCA、CD40、Muc17、IL-17-RA、および CD80のうちの1つまたは複数を含む抗原に対する結合物質でもよい。例え

40

50

ば結合物質は、CD9、CD63、CD81、B7H3、PCSA、MFG-E8、MUC2、EpCam、RAGE、およびMuc17のうちの1つまたは複数でもよい。小胞を単離または検出するために、1種または複数種の結合物質、例えば、前記抗原の2つ以上に対する1種または複数種の結合物質が用いられてもよい。ある特定の細胞型に由来する小胞または起始細胞に特異的な小胞を単離または検出する要望に基づいて、使用される結合物質が選択されてもよい。

【0146】

また、結合物質は、固体表面または基体に直接または間接的に連結することもできる。固体表面または基体は、マイクロアレイおよびウェル、ビーズ等の粒子、カラム、光ファイバー、ふき取り繊維(wipe)、ガラスおよび修飾もしくは機能性ガラス、水晶、雲母、ジアゾ化膜(紙もしくはナイロン)、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、紙、セラミック、金属、半金属、半導体材料、量子ドット、コーティングビーズもしくは粒子、他のクロマトグラフ材料、磁気粒子によって提供される表面；プラスチック(アクリル、ポリスチレン、スチレンもしくは他の材料のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE、Teflon(登録商標))等を含む)、多糖類、ナイロンもしくはニトロセルロース、樹脂、シリカもしくはシリコンおよび修飾シリコンを含むシリカ系材料、カーボン、金属類、無機ガラス、プラスチック、セラミック、導電性ポリマー(ポリピロールおよびポリインドール等のポリマーを含む)；核酸タイリングアレイ、ナノチューブ、ナノワイヤー、もしくはナノ粒子で装飾された表面等のマイクロ構造もしくはナノ構造の表面；またはメタクリル樹脂、アクリルアミド、糖ポリマー、セルロース、ケイ酸塩、または他の繊維性ポリマーもしくは鎖ポリマー等の多孔性表面もしくはゲルが挙げられるが、これらに限定されない、直接もしくは間接的に結合物質を付着し得る、任意の物理的に分離可能な固体であり得る。加えて、従来技術に公知であるように、基体は、デキストラン、アセチルアミド、ゼラチン、もしくはアガロース等のポリマーを含む材料の幾つかを用いて、受動的または化学的に誘導体化されたコーティングを用いてコーティングされ得る。このようなコーティングは、生体試料を有するアレイの使用を容易にすることができる。

【0147】

例えば、小胞を単離するために使用される抗体は、市販のプレート(例えば、Nunc、Milan Italyより市販)等のウェル等の固体基体に結合させることができる。各ウェルは、抗体でコーティングすることができる。幾つかの態様において、小胞を単離するために使用される抗体は、アレイ等の固体基体に結合する。該アレイは、分子相互作用、結合性アイランド、生体分子、ゾーン、ドメインの所定の空間的配置、または別の境界内に沈着した結合性アイランドもしくは結合物質の空間的配置を有し得る。さらに、アレイという用語は、表面がアレイの複数のコピーを有する場合のような、表面上に配置された複数アレイを指すよう、本明細書で使用され得る。また、複数のアレイを有するこのような表面は、マルチアレイ(multiple array)または反復アレイと称されることもある。

【0148】

アレイは、典型的には、結合事象を介して、実体、例えば、試料中の小胞の存在を検出することができるアドレス可能な部分を含有する。アレイはマイクロアレイと呼ばれることがある。アレイまたはマイクロアレイには、DNAマイクロアレイ、例えば、cDNAマイクロアレイ、オリゴヌクレオチドマイクロアレイおよびSNPマイクロアレイ、マイクロRNAアレイ、タンパク質マイクロアレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、細胞マイクロアレイ(トランスフェクションマイクロアレイとも呼ばれる)、化学物質マイクロアレイ、ならびに糖質アレイ(グリコアレイ)が含まれるが、それに限定されるわけではない。DNAアレイは、典型的には、試料中に存在する配列に結合することができるアドレス可能なヌクレオチド配列を含む。マイクロRNAを検出するために、マイクロRNAアレイ、例えば、ルイビル大学のMMChipsアレイまたはAgilentの市販のシステムを使用することができる。プロテインキナーゼ、転写因子タンパク質活性化の基質の同定、または生物学的に活性な低分子の標的の同定を含むが、それに限定されるわけではない、タンパク質間相互作用の同定のために、タンパク質マイクロアレイを使用することができる。タンパク質アレイ

は、異なるタンパク質分子、一般的には抗体、または関心対象のタンパク質に結合するヌクレオチド配列のアレイからなってもよい。非限定的な例では、表面に特定のタンパク質がある小胞を検出するために、タンパク質アレイを使用することができる。抗体アレイは、試料、例えば、細胞または組織溶解産物溶液からタンパク質または他の生物学的材料を検出するために捕捉用分子として用いられる、タンパク質チップ上にスポットされた抗体からなる。例えば、抗体アレイは、体液、例えば、血清または尿から小胞結合バイオマーカーを検出するのに使用することができる。組織マイクロアレイは、多重組織学的分析を行うためにアレイ様式で組み立てられた別々の組織コアからなる。細胞マイクロアレイはトランスフェクションマイクロアレイとも呼ばれ、細胞と相互作用して、アドレス可能な位置での細胞捕捉を容易にすることができる様々な捕捉物質、例えば、抗体、タンパク質、または脂質からなる。細胞アレイはまた、小胞と細胞膜との類似性のために小胞を捕捉するのに使用することもできる。化学物質マイクロアレイは化学物質のアレイからなり、化合物に結合するタンパク質または他の生物学的材料を検出するのに使用することができる。糖質アレイ(グリコアレイ)は糖質のアレイからなり、例えば、糖部分に結合するタンパク質を検出することができる。当業者であれば、本発明の方法に従って類似の技術または改善を使用できることを理解するであろう。

10

【0149】

また、結合物質は、ビーズまたはミクロスフェア等の粒子に結合させることもできる。例えば、小胞の成分に特異的な抗体は、粒子に結合させることができ、抗体が結合した粒子が、生体試料から小胞を単離するために使用される。幾つかの態様において、ミクロスフェアは、磁気または蛍光標識され得る。加えて、小胞を単離するための結合物質は、固体基体自体であり得る。例えば、アルデヒド／硫酸ビーズ (Interfacial Dynamics, Portland, OR) 等のラテックスビーズを使用することができる。

20

【0150】

また、磁気ビーズに結合した結合物質を、小胞を単離するために使用することもできる。例えば、患者からの血清等の生体試料を、結腸癌スクリーニングのために収集することができる。該試料は、磁気マイクロビーズに連結された抗CCSA-3 (結腸癌固有の抗原) と共にインキュベートすることができる。低密度のマイクロカラムは、MACS分離器の磁場内に置くことができ、次いで、トリス緩衝食塩水等の緩衝液で該カラムを洗浄する。次いで、磁気免疫複合体をこのカラムに適用し、結合していない、非特異性の材料を廃棄することができる。CCSA-3選択小胞は、分離器からカラムを除去し、収集管上にそれを置くことによって回収することができる。緩衝液をカラムに添加することができ、カラムに提供されたプランジャーを使用することによって、磁気標識された小胞を放出することができる。単離された小胞は、IgG溶出緩衝液中で希釈することができ、次いで、複合体は、小胞からマイクロビーズを分離するために遠心分離することができる。ペレット化した単離された起始細胞に特異的な小胞は、リン酸緩衝生理食塩水等の緩衝液中で再懸濁し、定量化することができる。あるいは、起始細胞に特異的な小胞を捕捉した抗体と磁気マイクロビーズとの間の強力な接着力によって、トリプシン等のタンパク質分解酵素を、遠心分離を必要とせずに、捕捉された小胞の放出に使用することができる。小胞を放出するのに少なくとも十分な時間、起始細胞に特異的な小胞を捕捉した抗体と共に、このタンパク質分解酵素をインキュベートすることができる。

30

40

【0151】

小胞を単離するための結合物質、例えば、抗体を、好ましくは、関心対象の小胞を含む生物学的試料と、少なくとも結合物質と小胞成分が結合するのに十分な時間、接触させる。例えば、抗体を、生物学的試料と、約10分、30分、1時間、3時間、5時間、7時間、10時間、15時間、1日、3日、7日、または10日を含むが、これに限定されない数秒から数日に及ぶ様々な間隔で接触させることができる。

【0152】

検出を容易にするために、結合物質、例えば、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許

50

出願第PCT/US2011/031479号の図1に列挙された抗原に特異的な抗体または国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図2に列挙された結合物質を標識することができる。適切な標識には、磁気標識、蛍光部分、酵素、化学発光プローブ、金属粒子、非金属コロイド粒子、ポリマー染料粒子、色素分子、色素粒子、電気化学的に活性な種、半導体ナノ結晶、または量子ドットもしくは金粒子を含む他のナノ粒子、フルオロフォア、量子ドット、あるいは放射性標識が含まれるが、それに限定されるわけではない。タンパク質標識には、下記のように緑色蛍光タンパク質(GFP)およびその変種(例えば、シアン蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質);ならびに発光タンパク質、例えば、ルシフェラーゼが含まれる。放射性標識には、放射性同位体(放射性核種)、例えば、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、または ^{213}Bi が含まれるが、それに限定されるわけではない。蛍光標識には、希土類キレート(例えば、ユーロピウムキレート)、ローダミンが含まれるが、それに限定されるわけではない。フルオレセインタイプには、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセインが含まれるが、それに限定されるわけではない。ローダミンタイプには、特に、TAMRA;ダンシル;リサミン;シアニン;フィコエリトリン;Texas Red;Cy3、Cy5、ダボキシル、NBD、Cascade Yellow、ダンシル、PyMPO、ピレン、7-ジメチルアミノクマリン-3-カルボン酸および他のクマリン誘導体、Marina Blue(商標)、Pacific Blue(商標)、Cascade Blue(商標)、2-アントラセンスルホニル(anthracenesulfonyl)、PyMPO、3,4,9,10-ペリレン-テトラカルボン酸、2,7-ジフルオロフルオレセイン(Oregon Green(商標)488-X)、5-カルボキシフルオレセイン、Texas Red(商標)-X、Alexa Fluor430、5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA)、6-カルボキシテトラメチルローダミン(6-TAMRA)、BODIPY FL、ビマン(bimane)、ならびにAlexa Fluor350、405、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、647、660、680、700、および750、ならびにその誘導体が含まれるが、それに限定されるわけではない。例えば、インターネットでprobes (dot) invitrogen (dot) com/handbookから入手可能な、「The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies」Tenth Editionを参照されたい。蛍光標識は、FAM、dRHO、5-FAM、6FAM、dR6G、JOE、HEX、VIC、TET、dTAMRA、TAMRA、NED、dROX、PET、BHQ、Gold540、およびLIZのうちの1つまたは複数であってもよい。

【0153】

結合物質は、直接的にまたは間接的に標識することができ、例えば、標識を、ビオチン-ストレプトアビジンによって抗体に付着させる。または、抗体は標識しないが、第1の抗体を関心対象の抗原と結合させた後に、標識した第2の抗体と接触させる。

【0154】

例えば、種々の酵素基質標識が、使用可能であるか、または開示されている(例えば、米国特許第4,275,149号を参照のこと)。酵素は、一般に、種々の技術を用いて測定することができる発色性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、基質における色変化を触媒し得、それは分光学的に測定することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化させ得る。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ;米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸塩デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ)、ヘテロ環オキシダーゼ(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ等)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等が含まれる。酵素-基質の組み合わせの例としては、過酸化水素が色素前駆物質(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンヒドロクロリド(TMB))を酸化する、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と基質としての過酸化水素;アルカリホスファターゼ(AP)と発色性基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート;および β -D-ガラクトシダーゼ(β -D-Gal)と発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシダーゼ)または蛍

光性基質4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0155】

使用した単離または検出の方法に依存して、結合物質は、アレイ、粒子、ウェル等の固体表面もしくは基体、および上記の他の基体に連結され得る。細胞表面に対する、抗体の直接化学的結合の方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、グルタルアルデヒドまたはマレイミドで活性化した抗体を用いて結合させることが含まれ得る。複数工程の手順を用いた化学的に結合させるための方法には、ビオチン化、例えば、これらの化合物のスクシンイミドエステルを用いたトリニトロフェノール (TNP) またはジゴキシゲニンの結合が含まれる。ビオチン化は、例えば、D-ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドの使用により達成され得る。スクシンイミド基は、7を超えるpH値で、および、約pH8.0と約pH8.5との間で優先的にアミノ基と効率的に反応する。ビオチン化は、例えば、ビオチンマレイミドを添加した後に、細胞をジチオスレイトールで処理することによって達成され得る。

【0156】

フローサイトメトリー

ビーズまたはミクロスフェア等の粒子を用いた小胞の単離または検出はまた、フローサイトメトリーを用いても行うことができる。フローサイトメトリーは、流体の流れ中に懸濁した微細粒子を選別するために使用することができる。粒子が通過する際、粒子を選別的に帯電させ、それらの出口で別個の経路に偏向させることができる。したがって、高度の精度および速度を伴って、生体試料等の元の混合物から集団を分離することが可能である。フローサイトメトリーは、光学／電子検出装置を流れる単一の細胞の物理的および／または化学的特性の同時の多様性解析を可能にする。単一周波数（色）の光線、多くの場合、レーザー光線が、流体力学的に集束された流体の流れに向けられる。多くの検出器が、1つは光線に沿って（前方散乱またはFSC）、および幾つかはこれに垂直に（側方散乱またはSSC）、流れが光線を通過する点に向けられ、1つ以上の蛍光検出器が存在する。

【0157】

光線を通過する各懸濁粒子は、何らかの方法で光を散乱し、粒子内の蛍光化合物が励起されて、光源より低い周波数で発光し得る。この散乱光および蛍光の組み合わせが、検出器によって拾われて、各検出器（蛍光発光ピークの各々に対して1つずつ）における輝度（brightness）の変化を解析することによって、個々の粒子それぞれの物理的および化学的構造についての種々の情報を外挿することが可能となる。FSCは、細胞の大きさと相関し、SSCは、核の形状、細胞質顆粒の量および種類、または膜の粗さ等の粒子の内部の複雑さに依存する。幾つかのフローサイトメーターは、蛍光の必要性を省き、光の散乱のみを測定に用いている。

【0158】

フローサイトメーターは、毎秒数千個の粒子を「リアルタイム」で解析することができ、指定された性質を有する粒子をアクティブに分離および単離することができる。フローサイトメーターは、各解析セッション中、複数の単一細胞に関する設定パラメータの高スループット自動化定量および分離を提供する。フローサイトメーターは複数のレーザーおよび蛍光検出器を有して、複数の標識が、それらの表現型によって標的集団をより正確に指定するために使用されることを可能にする。したがって、フローサイトメーター、たとえばマルチカラーフローサイトメーターを使用して、複数の蛍光標識または色を有する一つまたは複数の小胞を検出することができる。いくつかの態様において、フローサイトメーターはまた、様々な小胞集団を、たとえばサイズごと、または異なるマーカーごとにソートまたは単離することもできる。

【0159】

フローサイトメーターは、一つまたは複数のレーザ、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種類またはそれを上回るレーザーを有することもできる。いくつかの態様において、フローサイトメーターは、二つ以上の色または蛍光標識、たとえば少なくとも2、3、

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種類の異なる色または蛍光標識を検出することができる。たとえば、フローサイトメーターは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の蛍光検出器を有することができる。

【0160】

一つまたは複数の小胞を検出または解析し、異なる小胞集団をソートまたは分離するために使用することができる市販のフローサイトメーターの例は、MoFlo（商標）XDP Cell Sorter（Beckman Coulter, Brea, CA）、MoFlo（商標）Legacy Cell Sorter（Beckman Coulter, Brea, CA）、BD FACSAria（商標）Cell Sorter（BD Biosciences, San Jose, CA）、BD（商標）LSRII（BD Biosciences, San Jose, CA）およびBD FACSCalibur（商標）

10

（BD Biosciences, San Jose, CA）を含むが、これらに限定されない。以下にさらに記載されるように、小胞の多重解析には、マルチカラーまたはマルチ蛍光サイトメーターを使用することができる。いくつかの態様において、フローサイトメーターは、一つまたは複数の特徴に基づいて二つ以上の小胞集団をソートし、それにより、回収またはソートすることができる。例えば、各集団内の小胞が類似したサイズ範囲を有しかつ差次的に検出またはソートされることができるよう、2つの小胞集団のサイズが異なる。別の態様において、二種類の異なる小胞集団は、差次的に標識される。

【0161】

フローサイトメーターから得られるデータは、ヒストグラムを生成するように一次元にプロットすることもできるし、二次元でドットプロットとして見ることもできるし、より新規なソフトウェアを用いて三次元で見ることもできる。これらのプロット上の領域は、ゲートと呼ばれる一連のサブセット抽出によって順次分離することができる。特定のゲーティングプロトコルが、特に血液学に関して診断および臨床目的のために存在する。プロットは、多くの場合、対数スケールで作成される。異なる蛍光色素の放出スペクトルは重なり合うため、検出器におけるシグナルは電子的および計算的に補正されなければならない。バイオマーカーを標識するための蛍光体は、参照により本明細書に組み入れられるOrmerod, Flow Cytometry 2nd ed., Springer-Verlag, New York (1999)およびNida et al., Gynecologic Oncology 2005; 4 889-894に記載されたものを含むこともできる。

20

【0162】

多重化

30

多重実験は、一回のアッセイにおいて複数の解析対象物を同時に計測することができる実験を含む。小胞および結合するバイオマーカーを多重に評価することができる。異なる循環バイオマーカー、例えばマイクロRNA、タンパク質、または小胞集団を多重化するために、異なる結合物質を使用することができる。異なるバイオマーカー、例えば異なる小胞集団は、異なる結合物質を使用して単離または検出することができる。生物学的試料中の各集団は、上記のような異なるシグナル標識、たとえば蛍光体、量子ドットまたは放射性標識によって標識することができる。標識は、結合物質に直接結合させることもできるし、小胞に結合する結合物質を検出するために間接的に使用することもできる。二つ以上の親和性エレメントに結合する三つ以上の差次的に標識された小胞集団は、合計したシグナルを生成できるため、多重化アッセイにおいて検出される集団の数は標識の分解能およびシグナルの合計に依存する。

40

【0163】

少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100種類の異なる循環バイオマーカーの多重化を実施することもできる。たとえば、起始細胞に特異的な小胞の一つの集団を、異なる起始細胞に特異的な小胞の第二の集団とともにアッセイすることができ、その場合、各集団は異なる標識によって標識される。または、特定のバイオマーカーまたはバイオシグネチャーを有する小胞集団を、異なるバイオマーカーまたはバイオシグネチャーを有する第二の小胞集団とともにアッセイすることもできる。場合によっては、何百または何千の小胞が一回のアッセイにおいて評価される。

50

【0164】

一つの態様において、多重化解析は、ビーズ等の複数の基体に複数の小胞集団を含む複数の小胞を適用することによって行われる。各ビーズには、1つ以上の捕捉物質を結合させる。複数のビーズはサブセットに分割され、ビーズの各サブセットが、別のビーズサブセットとは異なる捕捉物質または捕捉物質の組み合わせを有するように、同一の捕捉物質または捕捉物質の組み合わせを有するビーズが、ビーズのサブセットを形成する。次いで、ビーズは、捕捉物質に結合する成分を含む小胞を捕捉するために使用することができる。異なるサブセットは、小胞の異なる集団を捕捉するために使用することができる。次いで、1つ以上のバイオマーカーを検出することによって、捕捉した小胞を分析することができる。

10

【0165】

フローサイトメトリーを、粒子ベースまたはビーズベースのアッセイと組み合わせて使用することができる。高感度自動化に合った比活性度を有する類似のリガンドおよびレポーター分子によるビーズコーティングを用いるマルチパラメトリック免疫アッセイまたは他のハイスループット検出アッセイを使用することができる。例えば、各サブセット中のビーズは、別のサブセットとは差次的に標識することができる。粒子ベースのアッセイ系において、アドレス可能なビーズまたはミクロスフェア上に、捕捉抗体等の小胞に対する結合物質または捕捉物質を固定化することができる。各個々の結合アッセイ（結合物質が抗体である場合の免疫アッセイ等）における各結合物質は、異なる型のミクロスフェア（すなわち、マイクロビーズ）に連結され、結合アッセイ反応は、ミクロスフェアの表面上で起こる。ミクロスフェアは、異なる標識で区別することができ、例えば、特定の捕捉物質を有するミクロスフェアは、異なる捕捉物質を有する別のミクロスフェアと比較した場合、異なるシグナル標識を有する。例えば、特定の結合物質を有するミクロスフェアの蛍光強度は、異なる結合物質を有する別のミクロスフェアの蛍光強度とは異なるように、別個の蛍光強度でミクロスフェアを染色することができる。異なる捕捉物質が結合したバイオマーカーは、異なる標識を使用して差次的に検出することができる。

20

【0166】

少なくとも2つの異なる標識または染色を用いて、ミクロスフェアを標識または染色することができる。幾つかの態様において、ミクロスフェアは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なる標識で標識される。複数のミクロスフェア中の異なるミクロスフェアは、2つ以上の標識または染色を有することができ、ミクロスフェアの種々のサブセットは、標識または染色の種々の比および組み合わせを有し、異なる結合物質を用いる、異なるミクロスフェアの検出を可能にする。例えば、該標識または染色の種々の比および組み合わせは、異なる蛍光強度を可能にし得る。あるいは、該種々の比および組み合わせは、結合物質を同定するために異なる検出パターンを生成するために使用され得る。ミクロスフェアは、外面的に標識もしくは染色することができるか、または内部蛍光またはシグナル標識を有し得る。ビーズは、それらの適切な結合物質を用いて、別々に負荷することができ、したがって、異なる結合物質が結合した差次的に標識されたミクロスフェア上の異なる結合物質に基づいて、異なる小胞集団を単離することができる。

30

【0167】

別の態様において、平面基体を用いて多重化解析を行うことができ、該基体は、複数の捕捉物質を含む。複数の捕捉物質は、小胞の1つ以上の集団を捕捉することができ、捕捉した小胞の1つ以上のバイオマーカーが検出される。平面基体は、本明細書にさらに記載される、マイクロアレイまたは他の基体であり得る。

40

【0168】

結合物質

小胞は、関心対象の小胞に特異的な新規な抗原に対する抗体等の、小胞の新規成分に対する結合物質を用いて、単離または検出され得る。関心対象の小胞に特異的な新規な抗原は、アレイまたは複数の粒子等の基体に結合した既知の組成の異なる試験化合物を用いて単離され得るかまたは同定され得、これは、大量の化学的／構造的空間を、そのほんの

50

わずかな空間のみを使用して適切にサンプリングをすることを可能にし得る。また、同定された新規な抗原は、小胞のバイオマーカーとしての役割も果たし得る。例えば、起始細胞に特異的な小胞に対して同定された新規な抗原は、有用なバイオマーカーであり得る。

【0169】

試料との接触に関して用いられる「物質」または「試薬」という用語は、本明細書に記載のように、または当技術分野において公知のように検出することができる、標的ポリペプチド、ペプチド、核酸分子、レプチン、脂質、または他の任意の生物学的実体を含む、標的分子に結合する、ハイブリダイズする、関連する、または他の点では標的分子を検出する、もしくは標的分子の検出を容易にするように設計された任意の実体を意味し得る。このような物質/試薬の例は当技術分野において周知であり、ユニバーサルまたは特異的な核酸プライマー、核酸プローブ、抗体、アプタマー、ペプチド、ペプチド核酸、ロックド核酸、レクチン、デンドリマー、化学物質、または本明細書に記載の、もしくは当技術分野において公知の他の実体を含むが、これに限定されない。

10

【0170】

結合物質は、試験化合物に対して均質あるいは非均質のいずれかの小胞集団をスクリーニングすることによって同定することができる。基体表面上の各試験化合物の組成は既知であるため、これは、親和性要素に対するスクリーンを構成する。例えば、試験化合物のアレイは、基体のアドレス可能な位置にある特定の位置で試験化合物を含み、小胞に対する1つ以上の結合物質を同定するために使用することができる。試験化合物は全て、コア配列または構造の軽微な変更に基づいて関連し得ないか、または関連し得る。異なる試験化合物には、所与の試験化合物（ポリペプチドアイソフォーム等）のバリエーション、構造的もしくは組成的に関連しない試験化合物、またはこれらの組み合わせが含まれ得る。

20

【0171】

試験化合物は、ペプチド、多糖類、有機化合物、無機化合物、ポリマー、脂質、核酸、ポリペプチド、抗体、タンパク質、多糖類、または他の化合物であり得る。試験化合物は、天然または合成であり得る。試験化合物は、多くの結合、または結合の組み合わせ（例えば、アミド、エステル、エーテル、チオール、ラジカル付加、金属配位等）、樹枝状構造物、環状構造物、空洞構造物、または特異的な付加がなされる骨格として働く多数の近接した付着部位を有する他の構造物のいずれかに基づく、直鎖状または分枝状のヘテロ多量体化合物を含むか、またはそれらからなり得る。これらの試験化合物は、当該技術分野において標準的な方法を用いて、基体上にスポットするか、またはインサイチューで合成することができる。加えて、試験化合物は、協同的結合等の有用な相互作用を検出するために、組み合わせてスポットするか、またはインサイチューで合成することができる。

30

【0172】

試験化合物は、既知のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり得、故に、小胞と結合する試験化合物を検出することにより、結合物質として使用することができる、既知のアミノ酸配列のポリペプチドの同定をもたらすことができる。例えば、均質の小胞集団を、可変アミノ酸のある長さを有する数個から1,000,000個の試験ポリペプチドを含む、スライド上のスポット型アレイに添加することができる。ポリペプチドは、C末端を介して表面に付着させることができる。ポリペプチドの配列は、システインを除く19種類のアミノ酸からランダムに作製することができる。結合反応は、各ポリペプチド結合標的に対する特異性の比率を決定することができるように、別の色素で標識した過剰な細菌タンパク質等の非特異的競合物を含むことができる。最も高い特異性および結合を有するポリペプチドを選択することができる。各スポット上のポリペプチドが何であるかは既知であり、故に、容易に同定することができる。起始細胞に特異的な小胞等の均質の小胞集団に特異的な新規な抗原が同定されると、続いて、その抗原を用いて、そのような起始細胞に特異的な小胞が、後に記載される方法において単離され得る。

40

【0173】

また、アレイは、小胞に対する結合物質として抗体を同定するために使用することもできる。試験抗体は、小胞を単離または同定するために使用することができる抗体を同定す

50

るために、アレイに付着させ、非均質の小胞集団に対してスクリーニングすることができる。起始細胞に特異的な小胞等の均質の小胞集団はまた、抗体アレイを用いてスクリーニングすることもできる。均質の小胞集団を単離または検出するために抗体を同定すること以外に、均質の集団に特異的な1つ以上のタンパク質のバイオマーカーを同定することができる。事前に選択した試験抗体、またはアレイに付着させたカスタム選択した試験抗体を用いて、市販のプラットフォームを使用することができる。例えば、Full Moon Biosystemsからの抗体アレイは、前立腺癌細胞由来の小胞を用いてスクリーニングし、結合物質としてBcl-XL、ERCC1、ケラチン15、CD81/TAPA-1、CD9、上皮特異抗原（ESA）、および脂肪細胞キマーゼに対する抗体を同定することができ、同定したタンパク質は、これらの小胞に対するバイオマーカーとして使用することができる。バイオマーカーは、小胞の中または表面に存在していても存在していなくてもよく、過小発現または過剰発現していてもよく、突然変異していても、修飾されていてもよく、かつ、病態を特徴決定するために使用されることができる。

10

【0174】

結合物質として使用される抗体または合成抗体はまた、ペプチドアレイを介して同定することもできる。別の方法は、抗体ファージディスプレイ法による合成抗体産生の使用である。抗体（例えば、Fab）のM13バクテリオファージライブラリーは、外殻タンパク質への融合としてファージ粒子の表面上に提示される。各ファージ粒子は固有の抗体を提示し、コードDNAを含むベクターも包含する。多様性に富むライブラリーを構築し、ファージプールとして示すことができ、固定化抗原に結合する抗体の選択に使用することができる。抗原結合ファージは固定化抗原によって保持され、非結合ファージは、洗浄することによって除去される。保持したファージプールは、大腸菌の宿主の感染によって増幅することができ、増幅したプールを、最終的に抗原結合クローンが多数を占める集団を得るように、さらなる回の選択に使用することができる。この段階で、個々のファージクローンを単離し、表示された抗体の配列を解読するために、DNA基配列決定法に供することができる。ファージディスプレイおよび当該技術分野において公知の他の方法の使用を通して、小胞に対する高親和性のデザイナー抗体を作製することができる。

20

【0175】

また、ビーズベースのアッセイを使用して、小胞を単離または検出するための新規な結合物質を同定することもできる。試験抗体またはペプチドは、粒子に結合させることができる。例えば、ビーズに抗体またはペプチドを結合させ、特定の組織または腫瘍型からの小胞を標的とすることができる新規な抗体を発見および特異的に選択するために、小胞集団の表面上に発現したタンパク質の検出および定量化に使用することができる。有機起源の任意の分子を、製造業者の説明書に従って、市販のキットの使用を通じてポリスチレンビーズに成功裏に結合させることができる。各ビーズセットは、ある検出可能な波長に着色することができ、それぞれは、既知の抗体またはペプチドと結合することができ、これは、どのビーズが、以前に結合した抗体またはペプチドのエピトープと一致するエキソソームタンパク質に結合するかを特異的に測定するために使用することができる。異なる強度を有する各ビーズが、上記のような、異なる結合物質を有するように、別個の蛍光強度でビーズを染色することができる。

30

40

【0176】

例えば、精製された小胞の調製物は、実験的に決定したアッセイのダイナミックレンジに従って、アッセイ緩衝液中で適切な濃度に希釈することができる。十分な量の結合したビーズを調製することができ、約1 μ lの抗体結合ビーズをウェルに分割し、最終量の約50 μ lまで調節することができる。抗体結合ビーズが真空対応プレートに添加されると、これらのビーズを洗浄して、適当な結合状態を確保することができる。次いで、小胞調製物の適切な量を試験される各ウェルに添加し、15~18時間等の間、混合物をインキュベートすることができる。検出抗体の希釈溶液を用いて十分な量の検出抗体を調製し、1時間、あるいは、必要な限り、混合物と共にインキュベートすることができる。次いで、これらのビーズを洗浄し、その後ストレプトアビジンフィコエリトリンからなる検出抗体（ビオ

50

チンを発現する)の混合物を添加することができる。次いで、これらのビーズを数回洗浄および真空吸引し、その後、計器が備わっているソフトウェアを用いて、懸濁アレイシステム上で解析することができる。次いで、小胞を選択的に抽出するために使用することができる抗原の同一性を、解析から解明することができる。

【0177】

イメージングシステムを用いるアッセイを使用して、特定の組織、細胞、または腫瘍型からの小胞を発見し、特に選択し、濃縮するために、小胞の表面上に発現したタンパク質を検出および定量化することができる。複数ウェル多重炭素コーティングプレートに結合した抗体、ペプチド、または細胞を使用することができる。パターン化した炭素の作用表面上に配置された捕捉抗体の使用を通して、ウェル中の多くの分析物の同時測定を達成することができる。次いで、増強電気化学発光プレートを用い、試薬で標識された抗体を用いて、電極ウェル中で分析物を検出することができる。有機起源の任意の分子を、炭素コーティングプレートに成功裏に結合させることができる。小胞の表面上に発現したタンパク質をこのアッセイから同定することができ、特定の組織または腫瘍型からの小胞を特に選択しかつ濃縮するための標的として使用することができる。

【0178】

また、この結合物質はアプタマーであり得、これは、これらの相補配列以外の分子に結合し得る核酸を意味する。アプタマーは、典型的に30~80の核酸を含み、かつ特定の標的分子に対して高い親和性を有する(報告されている解離定数(K_d)は 10^{-11} ~ 10^{-6} モル/l)。米国特許第5,270,163号、第6,482,594号、第6,291,184号、第6,376,190号、および米国特許第6,458,539号に記載されるような、試験管内進化法(SELEX)(Tuerk & Gold, Science 249:505-510, 1990、Ellington & Szostak, Nature 346:818-822, 1990)を用いて、標的に対するアプタマーを同定することができる。核酸のライブラリーを標的の小胞と接触させることができ、標的に特異的に結合する核酸が、ライブラリーにおける標的に特異的に結合しない核酸の残りから区分化される。区分化された核酸を増幅し、リガンドが濃縮されたプールを得る。結合、区分化、および増幅(すなわち、選択)の複数のサイクルにより、所望の活性を有する1つ以上のアプタマーの同定がもたらされる。小胞を単離するためのアプタマーを同定するための別の方法は、米国特許第6,376,190号に記載されており、同特許は、ライブラリーにおける核酸の頻度を、化学的に合成したペプチドへの結合によって増加または減少させることを説明する。米国特許公開第20090264508号に記載される、レーザーSELEXまたはdeSELEX等の修正された方法も使用することができる。

【0179】

結合物質に関して本明細書で使用する「特異的」という用語は、物質が、その標的に対して他の標的よりも高い親和性を、典型的には極めて高い親和性を有することを意味するが、該結合物質がその標的に対して絶対的に特異的であることを必要とする訳ではない。

【0180】

マイクロ流体工学

小胞を単離するまたは同定するための方法を、マイクロ流体工学デバイスと組み合わせることができる。マイクロ流体工学デバイスを用いて、本明細書に記載されるような小胞を単離または検出する方法を行うことができる。マイクロ流体工学デバイスは、「ラボチップ(lab-on-a-chip)」システム、生物医学的なマイクロ電気機械システム(bioMEMS)、または多構成の集積システムとも称され得、小胞を単離し、分析するために使用することができる。そのようなシステムは、小胞の結合、バイオシグネチャーの検出を可能にするプロセス、および他のプロセスを小型化および分画化する。

【0181】

マイクロ流体工学デバイスはまた、サイズ分離または親和性選択を通して小胞を単離するために使用することもできる。例えば、マイクロ流体工学デバイスは、サイズに基づいて、または生体試料から小胞を単離するための1つ以上の結合物質を用いることによって、生体試料から小胞を単離するための1つ以上のチャンネルを使用することができる。1つ以

上のマイクロ流体力学工学デバイスに生体試料を導入することができ、これにより、小胞の通過を選択的に可能にする。選択は、小胞のサイズ、形状、変形能、またはバイオシグネチャーなどの、小胞の特性に基づくものであり得る。

【0182】

一つの態様において、非均質の小胞集団をマイクロ流体力学工学デバイスに導入することができ、1つ以上の異なる均質小胞集団を得ることができる。例えば、異なるチャンネルは、異なる小胞集団を選択するために、異なるサイズ選択または結合物質を有し得る。故に、マイクロ流体力学工学デバイスは、複数の小胞を単離することができ、該複数の小胞の少なくとも1つのサブセットは、該複数の小胞の別のサブセットとは異なるバイオシグネチャーを含む。例えば、該マイクロ流体力学工学デバイスは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100の異なる小胞のサブセットを単離することができ、小胞のそれぞれのサブセットは、異なるバイオシグネチャーを含む。

10

【0183】

幾つかの態様において、該マイクロ流体力学工学デバイスは、小胞のさらなる濃縮または選択を可能にする1つ以上のチャンネルを含むことができる。第1のチャンネルの通過後、濃縮された小胞集団を第2のチャンネルに導入でき、第2のチャンネルに存在する一つまたは複数の結合物質等を通して、所望の小胞または小胞集団の通過をさらに濃縮することが可能になる。

【0184】

アレイベースのアッセイおよびビーズベースのアッセイを、マイクロ流体力学工学デバイスとともに使用することができる。例えば、結合物質をビーズに結合させることができ、マイクロ流体力学工学デバイス中でこのビーズと小胞との間の結合反応を行うことができる。また、マイクロ流体力学工学デバイスを用いて、多重化も行うことができる。異なる区画は、異なる小胞集団について異なる結合物質を含むことができ、各集団は、異なる起始細胞に特異的な小胞集団由来である。一つの態様において、それぞれの集団は、異なるバイオシグネチャーを有する。マイクロ流体力学工学デバイス中でミクロスフェアと小胞との間のハイブリダイゼーション反応を行うことができ、該反応混合物を検出デバイスに送達することができる。二重または多重レーザー検出系等の検出デバイスは、マイクロ流体力学系の一部であり得、そのカラーコーディングによってそれぞれのビーズまたはミクロスフェアを同定するためにレーザーを使用することができ、別のレーザーは、それぞれのビーズと関連するハイブリダイゼーションシグナルを検出することができる。

20

30

【0185】

任意の適切なマイクロ流体力学工学デバイスを、本発明の方法において使用することができる。小胞と共に使用することができるか、または使用のために適合させることができるマイクロ流体力学工学デバイスの例は、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,591,936号、第7,581,429号、第7,579,136号、第7,575,722号、第7,568,399号、第7,552,741号、第7,544,506号、第7,541,578号、第7,518,726号、第7,488,596号、第7,485,214号、第7,467,928号、第7,452,713号、第7,452,509号、第7,449,096号、第7,431,887号、第7,422,725号、第7,422,669号、第7,419,822号、第7,419,639号、第7,413,709号、第7,411,184号、第7,402,229号、第7,390,463号、第7,381,471号、第7,357,864号、第7,351,592号、第7,351,380号、第7,338,637号、第7,329,391号、第7,323,140号、第7,261,824号、第7,258,837号、第7,253,003号、第7,238,324号、第7,238,255号、第7,233,865号、第7,229,538号、第7,201,881号、第7,195,986号、第7,189,581号、第7,189,580号、第7,189,368号、第7,141,978号、第7,138,062号、第7,135,147号、第7,125,711号、第7,118,910号、第7,118,661号、第7,640,947号、第7,666,361号、第7,704,735号および国際公開公報第2010/072410号に記載されているものを含むが、それらに限定されない。本明細書に開示される方法で使用するためのもう一つの例が、Chen et al., "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum vesicles," Lab on a Chip, Dec. 8, 2009 DOI:10.1039/b916199fに記載されている。

40

50

【0186】

本発明と共に使用するための他のマイクロ流体工学装置には、米国特許第5,376,252号、同第6,408,878号、同第6,645,432号、同第6,719,868号、同第6,793,753、同第6,899,137号、同第6,929,030号、同第7,040,338号、同第7,118,910号、同第7,144,616号、同第7,216,671号、同第7,250,128号、同第7,494,555号、同第7,501,245号、同第7,601,270号、同第7,691,333号、同第7,754,010号、同第7,837,946号；米国特許出願第2003/0061687号、同第2005/0084421号、同第2005/0112882号、同第2005/0129581号、同第2005/0145496号、同第2005/0201901号、同第2005/0214173号、同第2005/0252773号、同第2006/0006067号；ならびに欧州特許第0527905号および同第1065378号に開示されるエラストマー層、エラストマー弁、およびエラストマーポンプを含むが、それに限定されるわけではない、エラストマー層、エラストマー弁、およびエラストマーポンプを含む装置が含まれる。これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。場合によっては、装置の大部分または全てはエラストマー材料からなる。ある特定の装置は、装置を通る溶液の流れを調節するための1種または複数種のエラストマー弁を備えた装置を用いてサーマルサイクリング反応(例えば、PCR)を行うように設計されている。装置は反応部位アレイを含んでもよく、それによって、複数の反応を行うことが可能になる。従って、装置を用いて、小胞から単離されたマイクロRNAを含む循環マイクロRNAを多重様式で評価することができる。一態様において、マイクロ流体工学装置は、(a)エラストマー基体の中に形成された第1の複数のフローチャネル；(b)反応部位アレイを規定するように、第1の複数のフローチャネルを交差する、エラストマー基体の中に形成された第2の複数のフローチャネルであって、それぞれの反応部位は第1のフローチャネルおよび第2のフローチャネルの1つの交点に位置する、第2の複数のフローチャネル；(c)それぞれの反応部位の中にある溶液を他の反応部位にある溶液から隔離するように動かすことができる、第1の複数のフローチャネルおよび第2の複数のフローチャネルに沿って配置され、かつ反応部位の間で間隔をおいて配置された複数の隔離弁であって、それぞれがフローチャネルの1つまたは複数进行を覆い、かつ交差する1種または複数種の制御チャネルを備える、隔離弁、ならびに(d)反応部位を互いに隔離するための弁を同時に動かすための手段を備える。装置の基本構造に対する様々な変更が本発明の範囲内で想定される。PCR方法を使用することによって、それぞれの反応部位においてマイクロRNAを検出することができる。例えば、この方法は、以下の工程：(i)第1の末端および第2の末端を有する第1の流体チャネルであって、第1の末端および第2の末端はチャネルを通過して互いに流体連通している、第1の流体チャネル；複数のフローチャネルであって、それぞれのフローチャネルは末端壁で終わる、複数のフローチャネル；第1の流体チャネルと流体連通しており、試料流体を導入するための入口；ならびに制御チャネルを備えるマイクロ流体工学装置を準備する工程であって、それぞれのフローチャネルは第1の流体チャネルから分岐し、第1の流体チャネルと流体連通し；第1の流体チャネルからフローチャネルの1つに入る水性流体は第1の流体チャネルを通り抜けた時しかフローチャネルから流れ出ることができず；それぞれのフローチャネルは、閉鎖時に、フローチャネルの1つの末端を第1の流体チャネルから隔離する弁と結びつけられ、それによって、隔離された反応部位が弁と末端壁との間に形成され；作動力が制御チャネルに加えられ、それによって、弁が閉鎖された時に、弁はそれぞれ、弁と結びつけられているフローチャネルに偏向される偏向可能な膜であり；作動力が制御チャネルに加えられた時に、それぞれのフローチャネルにある弁が閉鎖され、それぞれのフローチャネルの中に隔離された反応部位が生成される、工程；(ii)試料流体を入口に導入して、フローチャネルを試料流体で満たす工程；(iii)弁を動かして、試料流体をフローチャネル内の別々の部分に分ける工程；(iv)試料流体中の核酸を増幅する工程；(v)試料流体の部分进行分析して、増幅によって反応が生じたかどうかを判定する工程を含む。試料流体は、増幅可能な核酸標的、例えば、マイクロRNAを含有してもよく、条件は、PCR産物中の反応結果が形成されるようなポリメラーゼ鎖反応(PCR)条件でもよい。

【0187】

一態様において、マイクロRNAを検出するために用いられるPCRはデジタルPCRである。

デジタルPCRは、Brown, et al., 米国特許第6,143,496号、発明の名称「Method of sampling, amplifying and quantifying segment of nucleic acid, polymerase chain reaction assembly having nanoliter-sized chambers and methods of filling chambers」およびVogelstein, et al, 米国特許第6,446,706号、発明の名称「Digital PCR」によって説明され、これらは両方ともその全体が参照により本明細書に組み入れられる。デジタルPCRでは、試料中の個々の核酸分子が、多くの別々の領域、例えば、前記のマイクロ流体工学装置の反応部位の中に局在化および濃縮されるように、試料が分割される。試料を分割すると、ポアソンに従って評価することによって分子を計数することが可能になる。結果として、それぞれの部分は「0」個の分子または「1」個の分子、すなわち、それぞれ、負の反応または正の反応を含む。PCR増幅後に、正の反応であるPCR最終生成物を含む領域を計数することによって核酸を定量することができる。従来のPCRでは、出発コピー数はPCR増幅サイクル数に比例する。しかしながら、デジタルPCRは、試料の初期量を決定するのに増幅サイクル数に依存せず、そのため、標的核酸を定量するために不確定な指数データへの依存が無くなり、絶対定量が行われる。従って、この方法は、試料中のマイクロRNAを検出するための感度の高い手法を提供することができる。

【0188】

一つの態様において、小胞を単離または検出するためのマイクロ流体工学デバイスは、幅が約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55もしくは60mm未満、または幅が約2~60、3~50、3~40、3~30、3~20もしくは4~20mmのチャンネルを含む。マイクロチャンネルは、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65もしくは70 μm 未満または約10~70、10~40、15~35もしくは20~30 μm の深さを有することができる。さらに、マイクロチャンネルは、約1、2、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5または10cm未満の長さを有することができる。マイクロ流体工学デバイスは、広さが約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75もしくは80 μm 未満、または広さが約40~80、40~70、40~60もしくは45~55 μm である溝をその天井に有することができる。溝は、深さが約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45または50 μm 未満、たとえば約1~50、5~40、5~30、3~20または5~15 μm であることができる。

【0189】

マイクロ流体工学装置は、チャンネル内の表面に付着させたかチャンネル内に存在している1種または複数種の結合物質を有することができる。例えば、マイクロチャンネルは、1種または複数種の捕捉物質、例えば、EpCam、CD9、PCSA、CD63、CD81、PSMA、B7H3、PSCA、ICAM、STEAP、およびEGFRに対する捕捉物質を有してもよい。1つの態様において、マイクロチャンネル表面をアビジンで処理し、ビオチン化された捕捉物質、例えば、抗体をチャンネルに注入して、アビジンと結合させることができる。他の態様において、捕捉物質は、チャンパーまたはマイクロ流体工学装置の他の構成要素の中に存在する。捕捉物質はまた、マイクロ流体工学チャンネルを通して移動するように操作することができるビーズに付着させてもよい。1つの態様において、捕捉物質は磁気ビーズに付着させる。ビーズは、磁石を用いて操作することができる。

【0190】

生物学的試料は、少なくとも毎分約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45または50 μl 、たとえば毎分約1~50、5~40、5~30、3~20または5~15 μl の速度でマイクロ流体工学デバイスまたはマイクロチャンネル中に流すことができる。一つまたは複数の小胞をマイクロ流体工学デバイス中で捕捉し、直接検出することができる。または、解析の前に、捕捉した小胞を放出してマイクロ流体工学デバイスから出すこともできる。もう一つの態様においては、一つまたは複数の捕捉した小胞をマイクロチャンネル中で溶解させ、例えば、小胞内のペイロードを調べる

ために、溶解産物を解析することもできる。溶解緩衝液をチャンネル中に流し、捕捉した小胞を溶解させることができる。たとえば、溶解緩衝液は、少なくとも毎分約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、26、27、28、29、30、35、40、45または50 μ l、たとえば毎分約1~50、5~40、10~30、5~30または10~35 μ lの速度で装置またはマイクロチャンネル中に流すことができる。溶解産物を回収し、たとえばRT-PCR、PCR、質量分析法、ウエスタンブロット法または他のアッセイ法を実施することによって解析して、小胞の一つまたは複数のバイオマーカーを検出することができる。

【0191】

本明細書に記載の様々な単離システムおよび検出システムは、このような疾患および障害に関連するような診断、予後判定、疾患層別化、セラノーシス、応答者/非応答者の状態の予測、疾患モニタリング、治療モニタリングのために情報価値のある小胞などの循環バイオマーカーを単離または検出するのに使用することができる。単離法の組み合わせは本発明の範囲内である。非限定的な例では、試料をクロマトグラフィーカラムに流して、電気泳動移動度のサイズなどの特性に基づいて小胞を単離し、次いで、小胞をマイクロ流体工学装置に通すことができる。これらの工程の前、間、または後に結合物質を使用することができる。

【0192】

細胞および疾患特異的な小胞

本明細書に開示される結合物質を使用して、小胞、たとえば起始細胞小胞または特異的バイオシグネチャーを有する小胞を単離または検出することができる。結合物質は、不均一な小胞集団を試料から単離または検出するために使用することもできるし、均一な小胞集団、たとえば特異的バイオシグネチャーを有する起始細胞特異的小胞集団を不均一な小胞集団から単離または検出するために使用することもできる。

【0193】

起始細胞特異的小胞のような均一な小胞集団を解析し、使用して、対象の表現型を特徴決定することができる。起始細胞特異的小胞は、特定の細胞型に由来する小胞であり、特定の組織の細胞、関心対象の特定の腫瘍もしくは関心対象の患部組織からの細胞、循環腫瘍細胞または母体もしくは胎児起源の細胞を含むことができるが、これらに限定されない。小胞は、腫瘍細胞または肺、脾臓、胃、腸、膀胱、腎臓、卵巣、精巣、皮膚、結腸直腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓、胎盤もしくは胎児の細胞に由来することができる。単離された小胞はまた、尿小胞のような、特定の試料型からの小胞であることもできる。

【0194】

生物学的試料由来の起始細胞特異的小胞は、起始細胞に特異的である一つ以上の結合物質を使用して単離することができる。疾患または病態の解析のための小胞は、その疾患または病態のバイオマーカーに特異的な一つまたは複数の結合物質を使用して単離することができる。

【0195】

起始細胞特異的小胞の単離または検出の前に、上記のように、たとえば遠心分離法、クロマトグラフィーまたはろ過法によって小胞を濃縮して、起始細胞特異的小胞単離の前に、不均一な小胞集団を生成することができる。または、起始細胞小胞単離の前には小胞は濃縮されず、または生物学的試料は小胞に関して濃縮されない。

【0196】

図1Bは、起始細胞特異的小胞を単離または同定する方法6100Bを示すフローチャートを示す。まず、工程6102において、対象から生物学的試料を得る。試料は、第三者または解析を実施する同じ当事者から得ることができる。次に、工程6104において、生物学的試料から起始細胞特異的小胞を単離する。次いで、工程6106において、単離した起始細胞特異的小胞を解析し、工程6108において、特定の表現型に関してバイオマーカーまたはバイオシグネチャーを同定する。本方法は、複数の表現型に関して使用することができる。いくつかの態様においては、工程6104の前に、小胞を生物学的試料から濃縮または単離

して、均一な小胞集団を生成する。たとえば、特定の細胞型に由来する小胞の単離または同定に特異的な一つまたは複数の結合物質を使用する前に、遠心分離法、クロマトグラフィー、ろ過法または上記他の方法を使用して不均一な小胞集団を単離することもできる。

【0197】

起始細胞特異的小胞は、起始細胞特異的小胞に対して高い特異性で結合する一つまたは複数の結合物質を用いることによって、対象の生物学的試料から単離することができる。いくつかの例においては、一つの結合物質を用いて起始細胞特異的小胞を単離することができる。他の例においては、結合物質の組み合わせを用いて起始細胞特異的小胞を単離することもできる。たとえば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100種類の異なる結合物質を使用して起始細胞小胞を単離することもできる。したがって、一つまたは複数の結合物質を使用することによって小胞集団（たとえば、同じ結合物質プロファイルを有する小胞）を同定することができる。

【0198】

一つまたは複数の結合物質は、起始細胞、たとえば腫瘍、自己免疫疾患、心血管疾患、神経疾患、感染症または他の疾患もしくは障害に関連する起始細胞に特異的である標的抗原に対するそれらの特異性に基づいて選択することができる。起始細胞は、そのような疾患および障害に関連する診断、予後判定、疾患層別化、セラノーシス、応答者／非応答者状態の予測、疾患モニタリング、治療モニタリングなどに情報をもたらす細胞であることができる。起始細胞はまた、それらに使用するためのバイオマーカーを発見するために有用な細胞であることもできる。起始細胞特異的小胞、疾患特異的小胞または腫瘍特異的小胞を単離するために単独で、または組み合わせて使用することができる抗原の非限定的な例は、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1に示され、本明細書にも記載されている。抗原は、結合物質が接触可能である膜結合抗原を含むことができる。抗原は、表現型を特徴決定することに関連するバイオマーカーであることができる。

【0199】

当業者は、情報をもたらす小胞を単離するために使用することができる適用可能な抗原が本発明によって考慮されることを理解するであろう。本明細書に概説するように、表面抗原および／またはそのフラグメントを認識する結合物質、たとえば抗体、アプタマーおよびレクチンを選択することができる。結合物質は、所望の細胞型または位置に特異的な抗原を認識することができ、かつ／または、所望の細胞と関連したバイオマーカーを認識することができる。細胞は、たとえば、腫瘍細胞、他の患部細胞、疾患のマーカーとして働く細胞、たとえば活性化された免疫細胞などであることができる。当業者は、関心対象の任意の細胞に対する結合物質が、これらの細胞と関連した小胞を単離するのに有用であることができることを理解するであろう。当業者はさらに、関心対象の小胞を検出するために本明細書に開示される結合物質を使用できることを理解するであろう。非限定的な例として、小胞バイオマーカーに対する結合物質は、同じまたは異なる結合物質の一つまたは複数が結合する小胞を検出するために、直接的または間接的に標識されることができる。

【0200】

癌、自己免疫疾患、心血管疾患、神経疾患、感染症または他の疾患もしくは障害と関連した小胞への結合に有用な結合物質についてのいくつかの標的が表4に提示されている。記載されたある障害と関連する細胞に由来する小胞は、表中の抗原の一つを使用して特徴決定することができる。結合物質、たとえば抗体またはアプタマーが、記載された抗原のエピトープ、そのフラグメントを認識することもできるし、結合物質が任意の適切な組み合わせに対して使用されることもできる。小胞を特徴決定するために、疾患または障害と関連した他の抗原を認識することもできる。当業者は、小胞を特徴決定するための情報をもたらす小胞を評価するために使用することができる任意の適用可能な抗原が、単離、捕

捉または検出のために本発明によって考慮されることを理解するであろう。

【0201】

(表4) 様々な疾患および障害の特徴決定に使用するための例示的抗原

疾患または障害	標的
乳癌、たとえば腺細胞または間質細胞	BCA-225、hsp70、MART1、ER、VEGFA、クラスIIIb チューブリン、HER2/neu (Her2+乳癌の場合)、GPR30、ErbB4 (JM) イソ型、MPR8、MISIIR
乳癌	CD9、MIS Ri、ER、CD63、MUC1、HER3、STAT3、VEGFA、BCA、CA125、CD24、EPCAM、ERB B4
乳癌	BCA-225、hsp70、MART1、ER、VEGFA、クラスIII b-チューブリン、HER2/neu (例えば、Her2+乳癌の場合)、GPR30、ErbB4 (JM) イソ型、MPR8、MISIIR、CD9、EphA2、EGFR、B7H3、PSM、PCSA、CD63、STEAP、CD81、ICAM1、A33、DR3、CD66e、MFG-E8、TROP-2、マンマグロビン、ヘプシン、NPGP/NPFF2、PSCA、5T4、NGAL、EpCam、ニューロキニン受容体-1 (NK-1またはNK-1R)、NK-2、Pai-1、CD45、CD10、HER2/ERBB2、AGTR1、NPY1R、MUC1、ESA、CD133、GPR30、BCA225、CD24、CA15.3 (MUC1 分泌型)、CA27.29 (MUC1 分泌型)、NMDAR1、NMDAR2、MAGEA、CTAG1B、NY-ESO-1、SPB、SPC、NSE、PGP9.5、プロゲステロン受容体 (PR) またはそのイソ型 (PR(A) またはPR(B))、P2RX7、NDUFB7、NSE、GAL3、オステオポンチン、CHI3L1、IC3b、メソテリン、SPA、AQP5、GPCR、hCEA-CAM、PTP IA-2、CABYR、TMEM211、ADAM28、UNC93A、MUC17、MUC2、IL10R-β、BCMA、HVEM/TNFRSF14、Trappin-2 エラフィン、ST2/IL1 R4、TNFRF14、CEACAM1、TPA1、LAMP、WF、WH1000、PECAM、BSA、TNF
乳癌	CD10、NPGP/NPFF2、HER2/ERBB2、AGTR1、NPY1R、ニューロキニン受容体-1 (NK-1またはNK-1R)、NK-2、MUC1、ESA、CD133、GPR30、BCA225、CD24、CA15.3 (MUC1 分泌型)、CA27.29 (MUC1 分泌型)、NMDAR1、NMDAR2、MAGEA、CTAG1B、NY-ESO-1
乳癌	SPB、SPC、NSE、PGP9.5、CD9、P2RX7、NDUFB7、NSE、GAL3、オステオポンチン、CHI3L1、EGFR、B7H3、IC3b、MUC1、メソテリン、SPA、PCSA、CD63、STEAP、AQP5、CD81、DR3、PSM、GPCR、EphA2、hCEA-CAM、PTP IA-2、CABYR、TMEM211、ADAM28、UNC93A、A33、CD24、CD10、NGAL、EpCam、MUC17、TROP-2、MUC2、IL10R-β、BCMA、HVEM/TNFRSF14、Trappin-2 エラフィン、ST2/IL1 R4、TNFRF14、CEACAM1、TPA1、LAMP、WF、WH1000、PECAM、BSA、TNFR
乳癌	BRCA、MUC-1、MUC 16、CD24、ErbB4、ErbB2 (HER2)、ErbB3、HSP70、マンマグロビン、PR、PR(B)、VEGFA
卵巣癌	CA125、VEGFR2、HER2、MISIIR、VEGFA、CD24、c-反応性タンパク質 EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパクAI、アポリポタンパクCIII、ミオグロビン、テネイシンC、MSH6、クローディン-3、クローディン-4、カベオリン-1、凝固因子III、CD9、CD36、CD37、CD53、CD63、CD81、CD136、CD147、Hsp70、Hsp90、Rab13、デスモリン1、EMP-2、CK7、CK20、GCDF15、CD82、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8、HLA-DR、CD95

10

20

30

40

肺癌	CYFRA21-1、TPA-M、TPS、CEA、SCC-Ag、XAGE-1b、HLAクラス1、TA-MUC1、KRAS、hENT1、キニンB1受容体、キニンB2受容体、TSC403、HTI56、DC-LAMP
肺癌	SPB、SPC、PSP9.5、NDUFB7、gal3-b2c10、iC3b、MUC1、GPCR、CABYR および muc17
結腸直腸癌	CEA、MUC2、GPA33、CEACAM5、ENFB1、CCSA-3、CCSA-4、ADAM10、CD44、NG2、エフリンB1、プラコグロビン、ガレクチン4、RACK1、テトラスパニン-8、FASL、A33、CEA、EGFR、ジペプチダーゼ1、PTEN、NA (+) 依存性グルコース輸送体、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ1A、TMEM211、CD24
前立腺癌	PSA、TMPRSS2、FASLG、TNFSF10、PSMA、NGEP、IL-7RI、CSCR4、CysLT1R、TRPM8、Kv1.3、TRPV6、TRPM8、PSGR、MISHIR、ガレクチン-3、PCA3、TMPRSS2:ERG
脳癌	PRMT8、BDNF、EGFR、DPPX、Elk、デンシン-180、BAI2、BAI3
血液癌（血液悪性腫瘍）	CD44、CD58、CD31、CD11a、CD49d、GARP、BTS、ラフトリン
黒色腫	DUSP1、TYRP1、SILV、MLANA、MCAM、CD63、Alix、hsp70、メオシン、p120カテニン、RGRL、シンタキシン結合タンパク質1&2、カベオリン
肝臓癌（肝細胞癌）	HBxAg、HBsAg、NLT
子宮頸癌	MCT-1、MCT-2、MCT-4
子宮内膜癌	α V β 6インテグリン
乾癬	flt-1、VPF受容体、kdr
自己免疫疾患	Tim-2
過敏性腸疾患（IBDまたは症候群（IBS）	IL-16、IL-1 β 、IL-12、TNF α 、インターフェロン γ 、IL-6、Rantes、IL-12、MCP-1、5HT
糖尿病、たとえば膵臓細胞	IL-6、CRP、RBP4
バレット食道	p53、MUC1、MUC6
線維筋痛症	ネオプテリン、gp130
良性前立腺肥大（BPH）	KIA1、無傷のフィブロネクチン
多発性硬化症	B7、B7-2、CD-95 (fas)、Apo-1/Fas
パーキンソン病	PARK2、セルロプラスミン、VDBP、タウ、DJ-1
リウマチ性疾患	シトルリン化フィブリン α 鎖、CD5抗原様フィブリノーゲンフラグメントD、CD5抗原様フィブリノーゲンフラグメントB、TNF α
アルツハイマー病	APP695、APP751またはAPP770、BACE1、シスタチンC、アミロイド β 、Tタウ、補体因子H、 α 2マクログロブリン
頭頸部癌	EGFR、EphB4、エフリンB2
消化管間質腫瘍（GIST）	c-kitPDGFRA、NHE-3
腎細胞癌	c PDGFRA、VEGF、HIF 1 α
統合失調症	ATP5B、ATP5H、ATP6V1B、DNM1
末梢神経因性疼痛	OX42、ED9
慢性神経因性疼痛	ケモカイン受容体（CCR2/4）
プリオン病	PrPSc、14-3-3 ζ 、S-100、AQP4
脳卒中	S-100、ニューロン特異的エノラーゼ、PARK7、NDKA、ApoC-I、ApoC-III、SAAまたはAT-IIIフラグメント、Lp-PLA2、hs-CRP
心血管疾患	FATP6
食道癌	CaSR
結核	抗原60、HSP、リポアラビノマンナン、スルホ脂質、アシル化トレハロースファミリーの抗原、DAT、TAT、トレハロース6,6-ジミコレート（コード因子）抗原
HIV	gp41、gp120
自閉症	VIP、PACAP、CGRP、NT3
喘息	YKL-40、S-ニトロソチオール、SSCA2、PAI、アンフィレグリン、ペリオスチン
狼瘡	TNFR
肝硬変	NLT、HBsAg
インフルエンザ	ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ
不安定プラーク	α v β 3インテグリン、MMP9

【 0 2 0 2 】

前記表4および本明細書で開示される他のバイオマーカーリストは例示的であり、本出

10

20

30

40

50

願人らは、開示される様々なバイオマーカーを様々な病態または病状に関して組み込むことを考慮している。たとえば、本発明の方法は、診断、予後判定またはセラノーシス用のシグネチャーを提供するのに有用である様々なバイオマーカーを、様々な疾患または病状に関して使用してもよい。一つの態様において、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である血管形成性、炎症性または免疫関連の抗原（またはバイオマーカー）を本発明の方法に使用して、バイオシグネチャーの同定において生物学的試料をスクリーニングすることができる。実際のところ、微小胞集団を評価するための本出願人らの多重手法の融通性によって、その病因が必ずしも同じ特定の細胞機序および生物学的機序を有さなくてもよい異なる症状または疾患、たとえば血管形成または免疫応答の制御もしくは調節に関するバイオマーカーが関与する異なる癌に関して、様々なマーカー（および、場合によっては、重複するマーカー）を評価することが容易になる。そのような重複するバイオマーカーと組織または細胞特異的バイオマーカーとの組み合わせが、微小胞結合バイオマーカーとともに、本発明の方法および組成物を実施するための一連の強力なツールを提供する。

【0203】

起始細胞に特異的な小胞は、新規結合物質を用い、本明細書記載の方法を用いて、単離され得る。さらに、起始細胞に特異的な小胞はまた、そのような小胞の細胞結合パートナーまたは結合物質に基づく単離方法を用いて、生体試料から単離することもできる。そのような細胞結合パートナーとしては、1つ以上の固有のバイオマーカーが存在する場合、そのような小胞にのみ結合する、ペプチド、タンパク質、RNA、DNA、アプタマー、細胞、または血清付随タンパク質を挙げることができるが、これらに限定されない。単一の結合パートナーもしくは結合物質、または単独の適用もしくは組み合わせた適用が起始細胞に特異的な単離もしくは検出をもたらす結合パートナーもしくは結合物質の組み合わせを用いて、起始細胞に特異的な小胞の単離または検出を行うことができる。そのような結合物質の限定されない例を、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図2に提供する。例えば、乳癌を特徴決定するための小胞は、エストロゲン、プロゲステロン、トラスツズマブ、CCND1、MYC PNA、IGF-1 PNA、MYC PNA、SC4アプタマー（Ku）、AII-7アプタマー（ERB2）、ガレクチン-3、ムチン型O-グリカン、L-PHA、ガレクチン9、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない、1つ以上の結合物質を用いて単離することができる。

【0204】

結合物質はまた、i) 起始細胞に特異的な小胞に特異的な抗原の存在、ii) 起始細胞に特異的な小胞に特異的なマーカーの不在、またはiii) 起始細胞に特異的な小胞に特異的なバイオマーカーの発現レベルに基づいて、起始細胞に特異的な小胞を単離または検出するために使用され得る。小胞の起始細胞の特徴を除外するまたは同定するように設計された特定の結合物質でコーティングされた表面に、非均質の小胞集団を適用することができる。固体表面または基体上に抗体等の種々の結合物質を配列させることができ、十分な時間、非均質の小胞集団を固体表面または基体に接触させて、相互作用を行う。次いで、アレイ表面または基体上のある抗体位置に対する特異的な結合または非結合は、ある起始細胞に特異的な小胞集団の抗原に特異的な特徴を同定する役目を果たすことができる。換言すれば、結合事象は、結合抗体によって認識される抗原を有する小胞の存在を示唆し得る。反対に、結合事象が無いことは、結合抗体によって認識される抗原を有する小胞が存在しないことを示唆し得る。

【0205】

起始細胞に特異的な小胞は、上記の、磁気捕捉法、蛍光活性化細胞分取（FACS）、またはレーザーサイトメトリー法を用いて、1つ以上の結合物質を用いて濃縮または単離することができる。磁気捕捉法としては、磁気活性化セルソーター（MACS）のマイクロビーズまたは磁気カラムの使用を挙げることができるが、これらに限定されない。使用することができる免疫親和性および磁気粒子の方法は、米国特許第4,551,435号、同第4,795,698号

、同第4,925,788号、同第5,108,933号、同第5,186,827号、同第5,200,084号、または同第5,158,871号に記載されている。起始細胞に特異的な小胞はまた、米国特許第7,399,632号に記載の一般的方法に従って、小胞に特異的な抗原の組み合わせを用いることによって、単離することもできる。

【0206】

また、生体試料について起始細胞に特異的な小胞を単離するか、そうでなければ濃縮するための任意の他の適切な方法を、本発明と組み合わせて使用することができる。例えば、ゲル浸透カラム等のサイズ排除クロマトグラフィー、遠心分離法もしくは密度勾配遠心分離法、およびろ過法は、本明細書に記載の抗原選択法と組み合わせて使用することができる。また、起始細胞に特異的な小胞は、Koga et al. , Anticancer Research, 25:3703-3708(2005)、Taylor et al. , Gynecologic Oncology, 110:13-21(2008)、Nanjee et al. , Clin Chem, 2000;46:207-223、または米国特許第7,232,653号に記載の方法に従って単離され得る。 10

【0207】

診断、予後判定、疾患層別化、セラノーシス、応答者/非応答者の状態の予測、疾患モニタリング、治療モニタリングなどを行うために、小胞を単離および/または検出することができる。1つの態様において、疾患または障害を有する細胞、例えば、腫瘍もしくは悪性腫瘍、自己免疫疾患、心血管疾患、神経学的疾患、または感染症の部位に由来する細胞から小胞が単離される。一部の態様において、単離された小胞は、このような疾患および障害に関連する細胞、例えば、疾患原因において役割を果たし、分析が、このような疾患および障害に関連する診断、予後判定、疾患層別化、セラノーシス、応答者/非応答者の状態の予測、疾患モニタリング、治療モニタリングなどのために情報価値のある免疫細胞に由来する。小胞は、新規のバイオマーカーを発見するのにさらに有用である。小胞に結合したバイオマーカーを特定することによって、本明細書に記載の表現型を特徴決定するために、単離された小胞を評価することができる。 20

【0208】

いくつかの態様において、本発明の方法は、個人由来の生物学的試料中に存在する一つまたは複数の微小胞集団を評価することにより、個人における癌の存在または個人において癌が発症する可能性を特徴決定することに関する。微小胞は、本明細書に開示される、または当技術分野において実施される一つまたは複数のプロセスを使用して単離することができる。 30

【0209】

そのような微小胞集団は、微小胞集団のバイオマーカープロファイル、すなわちバイオシグネチャーを参照試料と比較して、試験試料に関する診断、予後判定またはセラノーシス用の特徴決定を提供することにより、個人に関する疾患表現型特徴決定をそれぞれ別々に、または集合的に提供することができる。

【0210】

小胞集団は、本明細書に開示されるような様々な生物学的試料および体液から評価することができる。

【0211】

バイオマーカー評価

本発明の一面において、生物学的試料を分析し、試料中の循環バイオマーカー、例えば、循環小胞、タンパク質、または核酸の1つまたは複数の集団の存在、レベル、量、または濃度を決定することによって対象の表現型が特徴決定される。複数の態様において、特徴決定は、試料中の循環バイオマーカーが参照と比べて変化したかどうか決定する工程を含む。参照は標準または対照と呼ばれることもある。変化は、完全な存在もしくは非存在、定量レベル、参照、例えば、存在する全ての小胞のレベル、ハウスキーピングマーカーのレベル、および/またはスパイクインマーカーのレベルと比較した相対レベル、高レベル、低レベル、過剰発現、過小発現、ディファレンシャルな発現、変異または他の変化した配列、修飾(グリコシル化、リン酸化、エピジェネティック変化)などを含むが、それ 50

に限定されるわけではない、試料と参照との任意の測定可能な差を含んでもよい。一部の態様において、循環バイオマーカの量を決定する前に、循環バイオマーカを試料から精製または濃縮する。特別の定めのない限り、本明細書で使用する「精製された」または「単離された」は部分的または完全な精製または単離を指す。他の態様において、循環バイオマーカは、先に精製または濃縮されることなく試料から直接評価される。循環小胞は起始細胞特異的小胞でもよく、特定のバイオシグネチャーを有する小胞でもよい。バイオシグネチャーには、特定のバイオマーカパターン、例えば、検出するために望ましい表現型、例えば、疾患表現型を示すバイオマーカパターンが含まれる。バイオシグネチャーは1種または複数種の循環バイオマーカを含んでもよい。診断、予後判定、セラノシス、または応答者/非応答者の状態の予測などの表現型を特徴決定する時にバイオシグネチャーを使用することができる。一部の態様において、バイオシグネチャーは、生理学的状態または生物学的状態、妊娠または妊娠の段階を決定するために用いられる。バイオシグネチャーはまた、治療効力、疾患もしくは状態の段階、または疾患もしくは状態の進行を決定するために使用することもできる。例えば、1つまたは複数の小胞の量は、疾患の段階の上昇または進行に比例してもよく、反比例してもよい。検出された小胞量はまた、疾患もしくは状態の進行をモニタリングするために、または治療に対する対象の応答をモニタリングするために使用することもできる。

【0212】

循環バイオマーカは、循環バイオマーカのレベルを参照レベルまたは参照値と比較することによって評価することができる。参照値は、身体的エンドポイントまたは時間的エンドポイントに特有のものでよい。例えば、参照値は、評価される試料が得られた対象と同じ対象に由来してもよい。または、参照値は、試料の代表的な集団(例えば、疾患の症状を示さない正常対象由来の試料)に由来してもよい。従って、参照値は、ある特定の試料においてアッセイされるバイオシグネチャーの対象試料読み取り値と比較される閾値測定値でもよい。このような参照値は、年齢(例えば、新生児、幼児、青少年、青年、中年の成人、老人および様々な年齢の成人)、人種/民族群、正常対疾患対象、喫煙者対非喫煙者、療法を受けている対象対非未治療対象、ある特定の個体または同様の診断もしくは治療を受けた対象群に対する治療の異なる時点、あるいはその組み合わせを含むが、これに限定されない、ある特定のコホートに対応する試料の群からプールされたデータに従って設定されてもよい。さらに、ある特定の個体に対する治療の異なる時点でのバイオシグネチャーを決定することによって、個体が治療を受けている疾患または状態の治療または進行に対する個体の応答をモニタリングすることができる。

【0213】

参照値は、個別化された追跡を提供するように、同じ対象から評価された試料に基づいてもよい。一部の態様において、対象由来の試料中のバイオシグネチャーを頻繁に試験すると、その対象について以前に確立された参照値との比較が良好に行われる。このような時間経過測定値は、医師が対象の疾患の段階または進行を正確に評価し、従って、治療のためのより良い決定を知らせるのに用いられる。場合によっては、対象自身のバイオシグネチャーが経時的に比較された時、従って、対象について個別化された閾値、例えば、診断が行われる閾値が定義された時に、バイオシグネチャーのばらつきは小さくなる。時間的な対象内ばらつきがあると、個人個人が、疾患状態または生理学的状態の最適分析のための長期対照として役立つことができる。例示として、対象血液中の前立腺細胞由来小胞のレベルを経時的に測定する場合を考える。対象血液中の前立腺由来小胞レベルの急激な上昇は、例えば、前立腺癌による前立腺細胞の過剰増殖を示し得る。

【0214】

特定の表現型を有しない非罹患者(種々な年齢、民族的背景および性別の)に関して、参照値は、非罹患者における関心対象のバイオシグネチャーを測定することによって確立することができる。たとえば、参照集団の参照値を、試験対象における一つまたは複数の循環バイオマーカ集団の検出のためのベースラインとして使用することができる。対象由来の試料が参照と同様なレベルまたは値を有する場合、その対象を、疾患を有しない、

または疾患を発症する可能性が低いものと同定することができる。

【0215】

または、参照値またはレベルは、ある特定の表現型を有する個人における一つまたは複数の小胞集団の量を測定することによって、その表現型を有する個人に関して確立することができる。加えて、特定の表現型に関して値のインデックスを作成することができる。たとえば、異なる病期は、異なる病期の個人から得られる、異なる値を有することができる。対象の値をインデックスと比較し、対象のレベルがインデックスと最も密接に相関している、病期または進行などの疾患の診断または予後を決定することができる。他の態様においては、治療の効果に関して値のインデックスが作成される。たとえば、特定の疾患を有する個人の小胞のレベルを生成し、どの治療がその個人に有効であったかに注目することができる。これらのレベルを使用して、対象の値が比較される値を生成することができ、たとえば対象が治療に関して応答者または非応答者である可能性があるかどうかをそのレベルから予測することにより、個人に対する治療または治療法を選択することができる。

10

【0216】

いくつかの態様においては、特定の癌のバイオマーカーを特異的に標的とする抗原を用いて循環バイオマーカーを単離または検出することにより、その特定の癌に罹患していない個人に関する参照値が決定される。非限定的な例として、非患者個人に関して記載された同じ技術を使用して様々な病期の結腸直腸癌および非癌性のポリープを有する個人を調査することができ、各群の循環小胞のレベルを測定することができる。いくつかの態様においては、レベルは、少なくとも二重または三重反復で実施された少なくとも二つの別個の実験からの平均±標準偏差として決定される。統計的検定を用いてこれらの群の間の比較を実施して、観察されたバイオマーカー識別の統計的有意性を決定することができる。いくつかの態様においては、統計的有意性は、パラメトリック統計的検定を用いて決定される。パラメトリック統計的検定は、非限定的に、一部実施要因計画法、分散分析法（ANOVA）、t検定、最小二乗法、ピアソン相関、単回帰、非線形回帰、多重線形回帰または多重非線形回帰を含むことができる。または、パラメトリック統計的検定は、一方向分散分析、二方向分散分析または反復計測分散分析を含むことができる。他の態様においては、統計的有意性は、非パラメトリック統計的検定を使用して決定される。例は、ウィルコクソン符号順位検定、マン・ホイットニー検定、クラスカル・ウォリス検定、フリードマン検定、スピアマンの順位相関係数、ケンドールτ分析およびノンパラメトリック回帰検定を含むが、これらに限定されない。いくつかの態様においては、統計的有意性は、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005または0.0001未満のp値で決定される。p値はまた、たとえば、ボンフェローニ補正、その変形または当業者に公知の他の技術、たとえばホフバーグ補正、ホルム・ボンフェローニ補正、シダック補正、ダネット補正もしくはテューキー多重比較を使用して、多重比較に関して補正することができる。いくつかの態様においては、ANOVAののち、各集団からのバイオマーカーの検定後比較のためにテューキー補正が実施される。

20

30

【0217】

参照値はまた、疾患再発モニタリング（またはMSにおける増悪段階）、治療応答モニタリングまたは応答者／非応答者状態の予測のために確立することもできる。

40

【0218】

いくつかの態様においては、本明細書においては合成小胞とも呼ばれる人工小胞を使用して、小胞の参照値が決定される。たとえばリボソームを使用して人工小胞を製造する方法は当業者には公知である。人工小胞は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるUS20060222654およびUS4448765に開示されている方法を使用して製造することができる。人工小胞は、捕捉および／または検出を容易にするための公知のマーカーを用いて構成することができる。いくつかの態様においては、人工小胞は処理の前に体液試料中に添加される。たとえばろ過法または本明細書に開示される他の単離法を使用する処理の間、無傷の合成小胞のレベルを追跡して、処理された試料に対する初期試料中の小胞の量の対照を

50

提供することができる。同様に、任意の処理工程の前または後で人工小胞を試料中に添加することもできる。いくつかの態様において、人工小胞は、小胞の単離および検出に使用される機器を校正するために使用される。

【0219】

人工小胞は、ビーズベースのアッセイ法のようなアッセイ法の実行可能性を試験するための対照として製造および使用することができる。人工小胞は、ビーズおよび検出抗体の両方に結合することができる。したがって、人工小胞は、各抗体が結合するアミノ酸配列／立体配置を含む。人工小胞は、抗体が結合する精製タンパク質または合成ペプチド配列を含むことができる。人工小胞は、生物学的分子を付着させることができるビーズ、たとえばポリスチレンビーズであることもできる。ビーズが使用可能なカルボキシ基を有するならば、使用可能なアミン基を介して、たとえばカルボジイミドカップリングを使用して、タンパク質またはペプチドをビーズに連結することもできる。

10

【0220】

もう一つの態様において、人工小胞は、アビジンでコーティングされたポリスチレンビーズであることができ、ビオチンが、合成時に、またはビオチン・マレイミド化学を介して、選択されたタンパク質またはペプチドの表面に配置される。ビーズ表面に配されるタンパク質／ペプチドは、人工小胞が使用される用途に特異的な比率で混合したのち、ビーズに結合させることができる。そして、これらの人工小胞は、捕捉ビーズと検出抗体との間のリンクとして働くことができ、それにより、アッセイの構成要素が正しく作用していることを示すための対照を提供する。

20

【0221】

値は、定量的または定性的な値であることができる。値は、小胞のレベルの直接的測定値（たとえば体積あたりの質量）または特定のバイオマーカーの量のような間接的尺度であることができる。値は、数値のような定量値であることができる。他の態様において、値は、小胞なし、低レベルの小胞、中レベルの小胞、高レベルの小胞またはこれらの変形のような定性値である。

【0222】

参照値は、データベースに記憶し、循環バイオマーカーのレベルもしくは量、たとえば小胞もしくはマイクロRNAの全量、または小胞もしくはマイクロRNAの特定の集団、たとえば起始細胞特異的な小胞もしくはマイクロRNA、もしくは特定のバイオシグネチャーを有する小胞からのマイクロRNAの量に基づいて、疾患または病態の診断、予後判定、セラノース、疾患層別化、疾患モニタリング、治療モニタリングまたは非応答者／応答者状態の予測のための参照として使用することができる。説明のための例として、癌の診断を決定する方法を考えてみる。癌の参照対象および癌ではない参照対象由来の小胞または他の循環バイオマーカーを評価し、データベースに記憶する。参照対象は、癌または別の状態、たとえば健康な状態を示すバイオシグネチャーを提供する。そして、試験対象由来の試料をアッセイし、マイクロRNAバイオシグネチャーをデータベース中のものに対して比較する。対象のバイオシグネチャーが、癌を示す参照値とより近く相関しているならば、癌の診断を下すことができる。逆に、対象のバイオシグネチャーが、健康な状態を示す参照値とより近く相関しているならば、その対象を無疾患者と決定することができる。当業者は、この例が非限定的であり、他の表現型、たとえば他の疾患、予後判定、セラノース、疾患層別化、疾患モニタリング、治療モニタリングまたは非応答者／応答者状態の予測などを評価するために拡張することができることを理解するであろう。

30

40

【0223】

表現型を特徴決定するためのバイオシグネチャーは、表面抗原またはペイロードなどの、小胞に結合するバイオマーカーを含む、小胞などの循環バイオマーカーを検出することによって決定することができる。ペイロード、例えばタンパク質またはmRNAもしくはマイクロRNAなどのRNAの種類は、小胞内で評価することができる。または、試料中のペイロードは、ペイロードを小胞から単離することなく表現型を特徴決定するために解析される。小胞を評価するために多くの解析技術が使用可能である。いくつかの態様において、小胞

50

レベルは、当技術分野において公知の手法にしたがって、質量分析法、フローサイトメトリー、免疫細胞化学的染色法、ウェスタンブロット法、電気泳動法、クロマトグラフィーまたはX線結晶写真法を使用して特徴決定される。たとえば、小胞は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるClayton et al., Journal of Immunological Methods 2001; 163-174に記載されているフローサイトメトリーを使用して特徴決定し、定量的に計測することができる。小胞レベルは、上記のような結合物質を使用して測定することもできる。たとえば、小胞に対する結合物質を標識し、その標識を検出し、使用して、試料中の小胞の量を測定することができる。結合物質は、基体、たとえば上記のようなアレイまたは粒子に結合することができる。または、小胞は直接標識することもできる。

【0224】

10

電気泳動タグまたはeタグを使用して小胞の量を測定することができる。eタグは、核酸または抗体に結合した小さな蛍光分子であり、それぞれ一つの特異的核酸配列またはタンパク質に結合するように設計されている。eタグがその標的に結合したのち、酵素を使用して、結合したeタグを標的から切断する。「レポーター」と呼ばれる、解放されたeタグから生成されるシグナルは、試料中の標的核酸またはタンパク質の量に比例する。eタグレポーターは、毛管電気泳動によって同定することができる。各eタグレポーターに固有の電荷質量比、すなわち、その電荷をその分子量で割ったものが、毛管電気泳動読み取り値における特異的なピークとして示される。このように、小胞の特異的バイオマーカーをeタグで標的化することにより、小胞の量またはレベルを測定することができる。

【0225】

20

小胞レベルは、試料中の小胞の全集団のような不均一な小胞集団から測定することができる。または、特定の起始細胞小胞のレベルのような小胞レベルは、小胞の均一な集団または実質的に均一な集団、たとえば前立腺癌細胞からの小胞から測定される。さらに他の態様において、レベルは、特異的なバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせ、たとえば前立腺癌に特異的なバイオマーカーを有する小胞に関して測定される。小胞のレベルの測定は、小胞のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの決定とともに実施することができる。または、小胞の量の測定は、小胞のバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせの決定の前または後に実施することもできる。

【0226】

小胞の量の測定は、多重にアッセイすることができる。たとえば、二つ以上の小胞集団、たとえば本明細書に開示されるもののような異なるバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせを有する異なる起始細胞特異的小胞の量の測定を実施することができる。

30

【0227】

診断または関連する試験の性能は一般に、統計的尺度を使用して評価される。特徴決定の性能は、感度、特異度および関連する尺度を計測することによって評価することができる。たとえば、関心対象の循環バイオマーカーのレベルをアッセイして、表現型を特徴決定する、たとえば疾患を検出することができる。疾患を検出するためのアッセイの感度および特異度が決定される。

【0228】

真陽性とは、たとえば疾患または障害などの特徴を有すると正しく同定された、該特徴を有する対象である。偽陽性とは、試験により特徴を有すると誤って同定された、該特徴を有しない対象である。真陰性とは、試験により特徴をしないと正しく同定された、該特徴を有しない対象である。偽陰性とは、試験により特徴を有しないと誤って同定された、該特徴を有する人である。試験がこれらのクラスを識別する能力により、試験性能の尺度が提供される。

40

【0229】

試験の特異度は、真陰性の数を実際の陰性の数（すなわち、真陰性と偽陽性との合計）で割ったものと定義される。特異度は、どれほど多くの対象が陰性として正しく同定されるのかの尺度である。100%の特異度は、試験がすべての実際の陰性を認識する、たとえば、すべての健康な人が健康と認識されることを意味する。特異度が低いほど、陽性と判

50

定される陰性がより多いことを示す。

【0230】

試験の感度は、真陽性の数を実際の陽性の数（すなわち、真陽性と偽陰性との合計）で割ったものと定義される。感度は、どれほど多くの対象が陽性として正しく同定されるのかの尺度である。100%の感度は、試験がすべての実際の陽性を認識する、たとえば、すべての病人が病人と認識されることを意味する。感度が低いほど、陰性と判定されることによって見逃される陽性がより多いことを示す。

【0231】

試験の精度は、真陽性および真陰性の数をすべての真および偽陽性ならびにすべての真および偽陰性の合計で割ったものと定義される。これは、感度計測値と特異度計測値とを合わせた一つの数値を提供する。

【0232】

感度、特異度および精度は特定の識別閾値において決定される。たとえば、前立腺癌（PCa）検出のための一般的な閾値は、血清中、前立腺特異的抗原（PSA）4ng/mLである。この閾値以上のPSAのレベルはPCaに関して陽性とみなされ、それ未満のレベルは陰性とみなされる。閾値が変化すると、感度および特異度もまた変化する。たとえば、癌を検出する場合の閾値が高まると、対象を陽性とみなすことがより困難になり、偽陽性が少なくなるため、特異度は高まる。同時に感度が低下する。受信者動作特性曲線（ROC曲線）は、二項分類系の場合、その識別閾値が変化するときの真陽性率（すなわち感度）対偽陽性率（すなわち、1-特異度）のグラフプロットである。ROC曲線は、閾値が変化するとき、感度および特異度がどのように変化するのを示す。ROC曲線の曲線下面積（AUC）が、閾値の全範囲にわたる試験の性能を示す集計値を提供する。AUCは、分類器が、ランダムに選択された陽性試料をランダムに選択された陰性試料よりも高く順位付けする確率に等しい。0.5のAUCは、試験が正しく順位付けする確率が50%であり、識別能がないに等しいことを示す（コイントスもまた、正しく順位付けする確率は50%である）。1.0のAUCは、試験がすべての対象を正しく順位付け（分類）することを意味する。AUCは、ウィルコクソン順位検定に等しい。

【0233】

本発明のバイオシグネチャーを使用して、少なくとも50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69または70%の感度、たとえば少なくとも71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86または87%の感度で表現型を特徴決定することができる。いくつかの態様において、表現型は、少なくとも87.1、87.2、87.3、87.4、87.5、87.6、87.7、87.8、87.9、88.0または89%の感度、たとえば少なくとも90%の感度で特徴決定される。表現型は、少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の感度で特徴決定することができる。

【0234】

本発明のバイオシグネチャーを使用して、少なくとも50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96または97%の特異度、たとえば少なくとも97.1、97.2、97.3、97.4、97.5、97.6、97.7、97.8、97.8、97.9、98.0、98.1、98.2、98.3、98.4、98.5、98.6、98.7、98.8、98.9、99.0、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9または100%の特異度で対象の表現型を特徴決定することができる。

【0235】

本発明のバイオシグネチャーを使用して、たとえば循環バイオマーカーのレベルまたは他の特徴に基づいて、少なくとも50%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも55%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも60%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも65%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも70%

の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも75%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも80%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも85%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも86%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも87%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも88%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも89%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも90%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも91%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも92%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも93%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも94%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも95%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも96%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも97%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも98%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度、少なくとも99%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度または実質的に100%の感度および少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、99または100%の特異度で対象の表現型を特徴決定することができる。

10

20

【0236】

本発明のバイオシグネチャーを使用して、少なくとも60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96または97%の精度、たとえば少なくとも97.1、97.2、97.3、97.4、97.5、97.6、97.7、97.8、97.8、97.9、98.0、98.1、98.2、98.3、98.4、98.5、98.6、98.7、98.8、98.9、99.0、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9または100%の精度で対象の表現型を特徴決定することができる。

30

【0237】

いくつかの態様においては、本発明のバイオシグネチャーを使用して、少なくとも0.60、0.61、0.62、0.63、0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、0.70、0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96または0.97、たとえば少なくとも0.971、0.972、0.973、0.974、0.975、0.976、0.977、0.978、0.978、0.979、0.980、0.981、0.982、0.983、0.984、0.985、0.986、0.987、0.988、0.989、0.99、0.991、0.992、0.993、0.994、0.995、0.996、0.997、0.998、0.999または1.00のAUCで対象の表現型を特徴決定する。

【0238】

さらには、特異度、感度、精度またはAUCを決定するための信頼レベルを、少なくとも50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%の信頼度で決定することもできる。

40

【0239】

他の関連する性能の尺度は、陽性および陰性尤度比〔陽性LR＝感度／（1-特異度）、陰性LR＝（1-特異度）／特異度〕を含む。このような尺度はまた、本発明の方法の試験性能を測るために使用することもできる。

【0240】

分類

50

本発明のバイオシグネチャーを使用して試料を分類することができる。解析を識別するための技術は当業者に公知である。たとえば、試料を、所与の疾患または障害に対する所与の治療に対する応答者または非応答者として分類するか、またはそれであると予測することができる。多くの統計的分類技術が当業者に公知である。教師あり学習法においては、二つ以上の群からの試料の群が統計的分類法によって解析される。二つ以上の群を識別する分類器を構築するために使用することができるバイオマーカーを発見することができる。そして、分類器が新たな試料を二つ以上の群の一つと関連させることができるように新たな試料を解析することができる。一般に使用される教師あり分類器は、非限定的に、ニューラルネットワーク（多層パーセプトロン）、サポートベクターマシン、k近傍法、混合正規分布モデル、ガウシアン、ナイーブベイス、決定木および放射基底関数（RBF）分類器を含む。線形分類法は、フィッシャー線形判別解析、ロジスティック回帰、ナイーブベイス分類器、パーセプトロンおよびサポートベクターマシン（SVM）を含む。本発明で使用するための他の分類器は、二次分類器、k近傍法、ブースティング、決定木、ランダムフォレスト、ニューラルネットワーク、パターン認識、ベイジアンネットワークおよび隠れマルコフモデルを含む。当業者は、これらまたは他の分類器が、それらのいずれかの改良を含め、本発明の範囲内にあると考えられることを理解するであろう。

10

【0241】

教師あり法を使用する分類は一般に以下の方法によって実施される。

【0242】

教師あり学習の所与の問題を解く（たとえば、手書きを認識することを学ぶ）ためには、様々な工程を考慮しなければならない。

20

【0243】

1. 訓練事例を集める。これらは、たとえば、疾患または障害を有するまたは有しない対象、治療に応答するまたは応答しないことが知られている対象、疾患が進行しているまたは進行していない対象などから得られる試料を含む。訓練試料は、分類器を「訓練」するために使用される。

【0244】

2. 学習された機能の入力「特徴」表現を決定する。学習された機能の精度は、入力オブジェクトがどのように表現されるのかに依存する。一般に、入力オブジェクトは、オブジェクトを記述する複数の特徴を含む特徴ベクトルに変換される。次元の数が災いになるため、特徴の数は多すぎるべきではないが、出力を正確に予測するのに十分に多くあるべきである。特徴は、バイオマーカー、たとえば本明細書に記載されるような小胞に由来するバイオマーカーのセットを含むこともできる。

30

【0245】

3. 学習された機能および対応する学習アルゴリズムの構造を決定する。学習アルゴリズム、たとえば人工ニューラルネットワーク、決定木、ベイス分類器またはサポートベクターマシンを選択する。学習アルゴリズムは、分類器を構築するために使用される。

【0246】

4. 分類器を構築する。集めた訓練事例に対して学習アルゴリズムを実行する。訓練事例のサブセット（確認事例とも呼ばれる）に対する性能を最適化することによって、または交差確認を介して、学習アルゴリズムのパラメータを調節することもできる。パラメータ調節および学習ののち、訓練事例から切り離されたナイーブな試料の試験事例に対してアルゴリズムの性能を計測することもできる。

40

【0247】

上記のように分類器が決定されると、それを使用して、試料、たとえば本発明の方法によって解析される対象の試料を分類することができる。例として、有疾患参照対象および無疾患参照対象における関心対象の循環バイオマーカーのレベルのデータを訓練および試験事例として使用して分類器を構築することができる。試験対象由来の試料中に見られる循環バイオマーカーレベルを評価し、分類器を使用して、その対象を有疾患者または無疾患者として分類する。もう一つの例として、特定の疾患に応答するまたは応答しないこと

50

がわかっている参照対象における関心対象の小胞バイオマーカーのレベルのデータを訓練および試験事例として使用して分類器を構築することができる。試験対象由来の試料中に見られる小胞バイオマーカーレベルを評価し、分類器を使用して、その対象を有疾患者または無疾患者として分類する。

【0248】

また、教師なし学習法を本発明で 사용할 ことができる。クラスタリングは、クラスタリングアルゴリズムが標識を使用せずに一連の試料を相関させる教師なし学習法である。もっとも類似する試料が「クラスタ」にソートされる。新たな試料をクラスタにソートし、それにより、その試料がもっとも密接に関連する他のメンバーとともに分類することもできる。当業者に周知の多くのクラスタリングアルゴリズム、たとえば階層クラスタリングを本発明とともに使用することができる。

10

【0249】

バイオシグネチャー

本発明にしたがって、表面およびペイロード小胞結合バイオマーカーならびに／またはマイクロRNAおよびタンパク質を含む循環バイオマーカーを含む、小胞集団を評価することにより、バイオシグネチャーを得ることができる。対象に由来するバイオシグネチャーを使用して、その対象の表現型を特徴決定することができる。バイオシグネチャーはさらに、一つまたは複数のさらなるバイオマーカー、たとえば循環バイオマーカーまたは関心対象の小胞と結合したバイオマーカーのレベルを含むことができる。関心対象の小胞のバイオシグネチャーは、小胞表面に存在する特定の抗原またはバイオマーカーを含むことができる。バイオシグネチャーはまた、検査されるマイクロRNAを含む、ペイロードとして小胞内に担持される一つまたは複数の抗原またはバイオマーカーを含むことができる。バイオシグネチャーは、小胞表面に存在する一つまたは複数の抗原またはバイオマーカーと小胞中に検出される一つまたは複数のバイオマーカーとの組み合わせを含むことができる。バイオシグネチャーはさらに、小胞に関する、そのバイオマーカー以外の他の情報を含むこともできる。そのような情報は、小胞サイズ、循環半減期、代謝半減期およびインビボまたはインビトロの比活性を含むことができる。バイオシグネチャーは、分類器を構築するために使用されるバイオマーカーまたは他の特徴を含むことができる。

20

【0250】

いくつかの態様において、マイクロRNAは生物学的試料中で直接検出される。たとえば、体液中のRNAは、市販のキット、たとえばmirVanaキット (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX)、MagMAX (商標) RNA単離キット (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) およびQIAzol溶解試薬およびRNeasy Midiキット (Qiagen Inc., Valencia CA) を使用して単離することができる。マイクロRNAの特定の種類は、以下に記載するようなアレイまたはPCR技術を使用して決定することができる。

30

【0251】

いくつかの態様においては、表現型を特徴決定するために、小胞とのマイクロRNAペイロードが評価される。バイオシグネチャーを決定する前に小胞を精製または濃縮することができる。たとえば、起始細胞特異的小胞を単離し、そのバイオシグネチャーを決定することができる。または、小胞のバイオシグネチャーは、事前の精製または濃縮なしに、試料から直接アッセイすることもできる。本発明のバイオシグネチャーは、疾患もしくは病態の診断、予後判定もしくはセラノーシス、または本明細書に記載される類似尺度を決定するために使用することができる。バイオシグネチャーはまた、治療効果、疾患もしくは病態の病期または疾患もしくは病態の進行または応答者／非応答者状態を決定するために使用することもできる。さらに、バイオシグネチャーは、妊娠のような生理学的状態を決定するために使用することもできる。

40

【0252】

小胞そのものの特徴を評価してバイオシグネチャーを決定することができる。特徴は、病期もしくは進行、疾患もしくは病態の治療的暗示を診断、検出もしくは決定するため、または生理学的状態を特徴決定するために使用することができる。そのような特徴は、非

50

限定的に、小胞のレベルまたは量、小胞サイズ、小胞半減期、小胞の循環半減期、小胞の代謝半減期または小胞の活性の変動の時間的評価を含む。

【0253】

バイオシグネチャーに含まれることができるバイオマーカーは、一つまたは複数のタンパク質またはペプチド（たとえば、タンパク質シグネチャーを提供する）、核酸（たとえば、記載のRNAシグネチャーまたはDNAシグネチャー）、脂質（たとえば脂質シグネチャー）またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、バイオシグネチャーはまた、小胞中に存在する薬物または薬物代謝産物の種類または量（たとえば、薬物シグネチャーを提供する）を含むことができる。なぜならそのような薬物は、生物学的試料が採取される対象によって摂取されて、薬物またはその薬物の代謝産物を担持する小胞を生じさせることがあるからである。

10

【0254】

バイオシグネチャーはまた、一つまたは複数のバイオマーカーの発現レベル、存在、不在、突然変異、バリエーション、コピー数変化、切断、複製、修飾または分子集合を含むことができる。遺伝子バリエーションまたはヌクレオチドバリエーションとは、コード領域およびコード領域におけるヌクレオチド塩基欠失、挿入、転位および置換を非限定的に含む、特定の座における遺伝子またはcDNA配列の変化または変更をいう。欠失は、一つのヌクレオチド塩基の欠失、遺伝子のヌクレオチド配列の部分もしくは領域の欠失または遺伝子配列全体の欠失であることができる。挿入は、一つまたは複数のヌクレオチド塩基の挿入であることができる。遺伝子バリエーションは、転写調節領域、mRNAの非翻訳領域、エキソン、イントロンまたはエキソン／イントロン接合部で起こることができる。遺伝子バリエーションは、停止コドン、フレームシフト、アミノ酸の欠失、遺伝子転写物スプライス形態の変化またはアミノ酸配列の変化を生じさせることもある。

20

【0255】

一つの態様においては、小胞内の核酸ペイロードを含む核酸バイオマーカーがヌクレオチドバリエーションに関して評価される。核酸バイオマーカーは、一つまたは複数のRNA種、たとえばmRNA、miRNA、snoRNA、snRNA、rRNA、tRNA、siRNA、hnRNA、shRNA、エンハンサーRNA（eRNA）、またはこれらの組み合わせを含むことができる。同様に、DNAペイロードを評価してDNAシグネチャーを形成することもできる。

【0256】

RNAシグネチャーまたはDNAシグネチャーには、小胞中に存在するRNAまたはDNAの突然変異、後成的修飾または遺伝子バリエーション解析を含めることもできる。後成的修飾はDNAメチル化のパターンを含む。たとえば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるLesche R. and Eckhardt F., DNA methylation markers: a versatile diagnostic tool for routine clinical use. Curr Opin Mol Ther. 2007 Jun; 9(3):222-30を参照すること。したがって、バイオマーカーは、DNAのセグメントのメチル化状態であることができる。

30

【0257】

バイオシグネチャーは、一つまたは複数のmiRNAシグネチャーを、mRNAシグネチャー、DNAシグネチャー、タンパク質シグネチャー、ペプチドシグネチャー、抗原シグネチャーまたはそれらの任意の組み合わせを非限定的に含む一つまたは複数のさらなるシグネチャーと組み合わせて含むことができる。たとえば、バイオシグネチャーは、一つまたは複数のmiRNAバイオマーカーを一つまたは複数のDNAバイオマーカー、一つまたは複数のmRNAバイオマーカー、一つまたは複数のsnoRNAバイオマーカー、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカー、一つまたは複数のペプチドバイオマーカー、一つまたは複数の抗原バイオマーカー、一つまたは複数の抗原バイオマーカー、一つまたは複数の脂質バイオマーカーまたはそれらの任意の組み合わせとともに含むことができる。

40

【0258】

バイオシグネチャーは、たとえば参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US

50

2011/031479号の図1および2にそれぞれ記載された、または本明細書の他の箇所に記載された、一つまたは複数の抗原または結合物質（たとえば、一つまたは複数の結合物質に結合する能力）ものの組み合わせを含むことができる。バイオシグネチャーはさらに、一つまたは複数の他のバイオマーカー、たとえば非限定的にmiRNA、DNA（たとえば一本鎖DNA、相補的DNAまたは非コードDNA）またはmRNAを含むことができる。小胞のバイオシグネチャーは、たとえば国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1に示す一つまたは複数の抗原、たとえば国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図2に示す一つまたは複数の結合物質、および、たとえば国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図3～60に示す病態または疾患の一つまたは複数のバイオマーカーの組み合わせを含むことができる。バイオシグネチャーは、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえばmiRNAを、癌細胞に特異的な一つまたは複数の抗原（たとえば国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1に示すような）とともに含むことができる。

10

【0259】

いくつかの態様において、本方法において使用される小胞は起始細胞に特異的であるバイオシグネチャーを有し、かつ、起始細胞を表す、疾患特異的または生物学的状態特異的な診断、予後判定または治療関連のバイオシグネチャーを導出するために使用される。他の態様において、小胞は、診断、予後判定、病期決定、治療関連の決定または生理学的状態特徴決定に使用するための該起始細胞の該バイオシグネチャーとは異なる、所与の疾患または生理学的状態に特異的であるバイオシグネチャーを有する。バイオシグネチャーはまた、起始細胞特異的小胞と非特異的小胞との組み合わせを含むことができる。

20

【0260】

バイオシグネチャーは、診断基準、たとえば疾患の存在、病期決定、疾患モニタリング、疾患層別化または疾患の検出、転移もしくは再発もしくは進行の監視を評価するために使用することができる。バイオシグネチャーはまた、治療介入を含む治療モダリティに関する決定を下す際に臨床的に使用することもできる。バイオシグネチャーはさらに、手術を実施するかどうか、または手術とともにどの治療標準を使用すべきか（たとえば術前または術後に）を含む治療の決定を下すために臨床的に使用することもできる。説明のための例として、高悪性度型の癌を示す循環バイオマーカーのバイオシグネチャーにより、患者を治療するためにより侵襲的な外科処置および／またはより侵襲的な治療レジメンが必要とされる。

30

【0261】

また、バイオシグネチャーは治療関連の診断において、疾患の診断または正しい治療レジメンの選択、たとえばセラノーシスの提供に有用な試験を提供するために使用することができる。セラノーシスは、疾患状態の治療法または治療に影響する能力を提供する診断試験を含む。セラノーシス試験は、診断または予後試験がそれぞれ診断または予後判定を提供するのと同様な様式でセラノーシスを提供する。本明細書において使用されるセラノーシスとは、予測的医療、個別化医療、統合医療、薬理診断学およびDx/Rxパターンニングを含む、所望の形態の治療関連の試験を包含する。治療関連の試験は、個々の対象における薬物応答を予測および評価する、すなわち、個別化医療を提供するために使用することができる。薬物応答の予測とは、たとえば対象が曝露されるかまたは他の様式で治療される前に、その対象が候補治療剤に対して応答者または非応答者である可能性があるかどうかを判定することであり得る。薬物応答の評価は、薬物に対する応答をモニターすること、たとえば治療の開始後、時間経過とともに対象の改善またはその欠如をモニターすることであることができる。治療関連の試験は、治療から恩恵を受ける可能性が特に高い対象をその治療に選択するか、または個々の対象において治療効果の早期かつ客観的指示を提供するのに有用である。このように、本明細書に開示されるバイオシグネチャーは、より有望な治療を選択するために治療を変更すべきであることを示し、それにより、有益な治療が遅れるという多大な犠牲を避け、かつ、効果のない薬物を投与するという金銭および罹患率の犠牲を避ける。

40

【0262】

50

治療関連の診断はまた、心血管疾患、癌、感染症、敗血症、神経疾患、中枢神経系関連の疾患、血管内関連の疾患および自己免疫関連の疾患を非限定的に含む多様な疾患および障害の臨床診断および管理に有用である。治療関連の診断はまた、薬物毒性、薬物耐性または薬物応答の予測に役立つ。治療関連の試験は、たとえば免疫組織化学的試験、臨床化学、免疫アッセイ法、細胞ベースの技術、核酸試験または全身画像化法を非限定的に含む任意の適当な診断試験形式において展開することもできる。治療関連の試験はさらに、治療の決定を支援する試験、治療毒性または治療試験に対する応答をモニターする試験を含むことができるが、これらに限定されない。このように、バイオシグネチャーを使用して、治療に対する対象の応答を予測またはモニターすることができる。バイオシグネチャーは、特定の治療を開始、排除または変更したのち、対象に関して別の時点で決定することができる。

10

【0263】

いくつかの態様において、対象が治療に応答しているかどうかの決定または予測は、バイオシグネチャーの一つまたは複数の成分（すなわち、関心対象のマイクロRNA、小胞および／またはバイオマーカー）の量の変化、特定のバイオシグネチャーの一つまたは複数の成分の量または成分に関して検出されるバイオシグネチャーに基づいて下される。もう一つの態様において、対象の病態は、異なる時点でバイオシグネチャーを決定することによってモニターされる。病態の進行、後退または再発が決定される。また、時間経過とともに治療に対する応答を計測することもできる。したがって、本発明は、対象における疾患または他の病態の状態をモニターする方法であって、対象由来の生物学的試料からバイオシグネチャーを単離もしくは検出する工程、特定のバイオシグネチャーの成分の全量を検出する工程または一つもしくは複数の成分のバイオシグネチャー（たとえばバイオマーカーの存在、不在または発現レベル）を検出する工程を含む方法を提供する。バイオシグネチャーは、疾患または病態の状態をモニターするために使用される。

20

【0264】

小胞の1種または複数種の新規のバイオシグネチャーも同定することができる。例えば、1種または複数種の小胞を、薬物治療または治療法に反応する対象から単離し、参照、例えば、薬物治療または治療法に反応しない別の対象と比較することができる。バイオシグネチャー間の差を求め、他の対象を、ある特定の薬物または治療法に対する反応者または非反応者と同定するのに使用することができる。

30

【0265】

いくつかの態様において、バイオシグネチャーは、特定の疾患または病態が薬物に耐性であるかどうかを判定するために使用される。対象が薬物耐性であるならば、医師は、そのような薬物治療によって貴重な時間を無駄にする必要はない。薬物選択または治療レジメンの早期確認を得るために、対象から得られた試料に関してバイオシグネチャーを決定する。そのバイオシグネチャーを使用して、特定の対象の疾患が薬物耐性と関連したバイオマーカーを有するかどうかを評価する。そのような決定は、医師が重要な時間および患者の財源を有効な治療に充てることを可能にする。

【0266】

そのうえバイオシグネチャーを用いて、対象が罹患しているかどうか、もしくは疾患を発症するリスクを有するかどうかを評価するか、または、疾患の病期もしくは進行を評価することもできる。たとえば、バイオシグネチャーを使用して、対象が、前立腺癌、結腸癌、または本明細書に記載のその他の癌を有するかどうかを評価することができる。さらに、バイオシグネチャーを使用して、結腸癌のような疾患または病態の病期を決定することができる。

40

【0267】

さらに、小胞、たとえば不均一な小胞集団の量および一つまたは複数の均一な小胞集団、たとえば同じバイオシグネチャーを有する小胞集団の量の決定を使用して、表現型を特徴決定することができる。たとえば、試料中の小胞の全量（すなわち、細胞型特異的ではない）の決定および一つまたは複数の異なる起始細胞特異的小胞の存在の判定を使用して

50

、表現型を特徴決定することができる。以下にさらに記載されるように、正常な対象と関心対象の表現型を有する対象との比較に基づいて閾値または参照値または量を測定することができ、その閾値または参照値に基づく基準を決定することができる。その様々な基準を使用して表現型を特徴決定することができる。

【0268】

一つの基準は、試料中の不均一な小胞集団の量に基づくことができる。一つの態様においては、一般的小胞マーカー、たとえばCD9、CD81、およびCD63を使用して、試料中の小胞の量を測定することができる。CD9、CD81、CD63、またはこれらの組み合わせの発現レベルを検出することができ、そのレベルが閾値よりも大きいならば、基準は満たされる。もう一つの態様において、CD9、CD81、CD63、またはこれらの組み合わせのレベルが閾値または参照値よりも低いならば、基準は満たされる。もう一つの態様において、基準は、小胞の量が閾値または参照値よりも高いかどうかに基づくことができる。もう一つの基準は、特定のバイオシグネチャーを有する小胞の量に基づくことができる。特定のバイオシグネチャーを有する小胞の量が閾値または参照値よりも低いならば、基準は満たされる。もう一つの態様において、特定のバイオシグネチャーを有する小胞の量が閾値または参照値よりも高いならば、基準は満たされる。基準はまた、特定の細胞型に由来する小胞の量に基づくことができる。量が閾値または参照値よりも低いならば、基準は満たされる。もう一つの態様において、量が閾値よりも高いならば、基準は満たされる。

【0269】

非限定的な例において、バイオマーカーPCSAまたはPSCAを検出することによって前立腺細胞からの小胞が決定され、かつ、検出されたPCSAまたはPSCAのレベルが閾値レベルよりも大きいならば基準が満たされると考えられる。閾値とは、対照細胞株または対照対象由来の試料中の同じマーカーのレベルであることができる。別の基準は、癌細胞に由来する小胞または一つまたは複数の癌特異的バイオマーカーを含む小胞の量に基づくことができる。たとえば、バイオマーカーB7H3、EpCamまたは両方を決定することができ、検出されたB7H3および／またはEpCamのレベルが閾値レベルよりも大きい、または事前に決定された範囲内であるならば、基準は満たされる。量が閾値または参照値よりも低い、または高いならば、基準は満たされる。基準はまた、品質管理尺度または値を満たすような結果の信頼性であることもできる。対照試料中のB7H3および／またはEpCamの量よりも多い、試験試料中のB7H3および／またはEpCamの検出量は、その試験試料中の癌の存在を示すことがある。

【0270】

上記のように、複数のマーカーの解析を組み合わせ、基準が満たされるかどうかを評価することができる。説明のための例において、バイオシグネチャーを使用して、一般的小胞マーカーCD9、CD63およびCD81の一つまたは複数、PCSAまたはPSMAを含む一つまたは複数の前立腺上皮マーカーおよび一つまたは複数の癌マーカー、たとえばB7H3および／またはEpCamを検出することにより、対象が前立腺癌を有するかどうかを評価する。対象由来の試料中のマーカーのレベルが、前立腺癌を有しない対照個人よりも高いことは、その対象における前立腺癌の存在を示す。いくつかの態様においては、複数のマーカーが多重に評価される。

【0271】

当業者は、上記のように基準を満たすことに基づくそのような規則を任意の適切なバイオマーカーに適用することができることを理解するであろう。たとえば、基準は、小胞の特徴、たとえば存在する小胞の量、存在する特定のバイオシグネチャーを有する小胞の量、存在する小胞ペイロードバイオマーカーの量、存在するマイクロRNAまたは他の循環バイオマーカーの量などに適用することができる。適切なバイオマーカーの比率を決定することができる。説明のための例として、基準は、小胞表面タンパク質と別の小胞表面タンパク質との比率、小胞表面タンパク質とマイクロRNAとの比率、一つの小胞集団と別の小胞集団との比率、一つの循環バイオマーカーと別の循環バイオマーカーとの比率などであることができる。

【0272】

対象の表現型は、任意の数の有用な基準を満たすことに基づいて特徴決定することができる。いくつかの態様においては、バイオマーカーごとに少なくとも一つの基準が使用される。いくつかの態様においては、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90または少なくとも100種類の基準が使用される。たとえば、癌の特徴決定に関して、対象を癌と診断するときに、以下の複数の異なる基準を使用することができる:1) 対象由来の試料中のマイクロRNAの量が参照値よりも高いかどうか、2) 細胞型特異的小胞(すなわち、特定の組織または臓器に由来する小胞)内のマイクロRNAの量が参照値よりも高いかどうか、または、3) 一つもしくは複数の癌特異的バイオマーカーを有する小胞内のマイクロRNAの量が参照値よりも高いかどうか。マイクロRNAの量が参照以下である場合にも、同様な規則を適用することができる。本方法はさらに、試料が品質管理尺度を満たすならば対象に関する結果が提供されるような品質管理尺度を含むことができる。いくつかの態様において、基準は満たされるが、品質管理が疑わしい場合、対象は再評価される。

【0273】

他の態様においては、複数のバイオマーカーの評価のための一つの尺度が決定され、その尺度が参照と比較される。例示として、前立腺癌の試験は、血液試料中のmiR-141のレベルに対してPSAのレベルを増倍することを含んでもよい。そのレベルの積が閾値よりも高いならば、基準は満たされて、癌の存在を示す。もう一つの例示として、一般的小胞マーカーに対する複数の結合物質が、同一の標識、たとえば同一の蛍光体を担持することができる。検出される標識のレベルを閾値と比較することができる。

【0274】

基準は、同じ種類の複数のバイオマーカーに加え、複数の種類のバイオマーカーにも適用することができる。たとえば、一つまたは複数の循環バイオマーカー(たとえばRNA、DNA、ペプチド)、小胞、突然変異などのレベルを参照と比較することができる。バイオシグネチャーの様々な成分は、異なる基準を有することができる。非限定的な例として、癌を診断するために使用されるバイオシグネチャーは、参照と比較した場合の一つのmiR種の過剰発現、および別の参照と比較した場合の小胞表面抗原の過剰発現を含むことができる。

【0275】

バイオシグネチャーは、小胞の量、小胞の構造、または小胞の他の情報をもたらし特徴を比較することによって決定することができる。小胞構造は、透過電子顕微鏡法(たとえば、Hansen et al., Journal of Biomechanics 31, Supplement 1:134-134(1) (1998)を参照)または走査電子顕微鏡法を使用して評価することができる。方法および技術の様々な組み合わせまたは一つまたは複数の小胞の解析を使用して、対象の表現型を決定することができる。

【0276】

バイオシグネチャーは、非限定的に、バイオマーカーの存在もしくは不在、コピー数、発現レベルまたは活性レベルを含むことができる。バイオシグネチャーの他の有用な成分は、バイオマーカーの突然変異(たとえば、転写または翻訳産物の活性に影響を及ぼす突然変異、たとえば置換、欠失、または挿入突然変異)、バリエーションまたは翻訳後修飾の存在を含む。タンパク質バイオマーカーの翻訳後修飾は、非限定的に、バイオマーカーのアシル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、脱アセチル化、アルキル化、メチル化、アミド化、ビオチン化、 γ カルボキシル化、グルタミル化、グリコシル化、グリシル化、ヒドロキシル化、ヘム部分の共有結合、ヨウ素化、イソプレニル化、リポイル化、プレニル化、GPIアンカー形成、ミリスチル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、ヌクレオチドもしくはその誘導体の共有結合、ADPリボシル化、フラビン付加、酸化、パルミトイル化、PEG化、ホスファチジルイノシトールの共有結合、ホスホパンテテイル化、ポリシアル化、ピログルタミン酸形成、プロリルイソメラーゼによるプロリンのラセミ化、tRNA媒介アミノ酸付加、たとえばアルギニル化、硫酸化、チロシンへの硫酸基付加また

はセレノイル化を含む。

【0277】

本明細書に記載される方法を使用して、疾患、病態または生理的状态と関連したバイオシグネチャーを同定することができる。バイオシグネチャーはまた、対象が癌を患っているかどうか、または癌を発症するリスクを有するかどうかを判定するために使用することもできる。癌を発症するリスクを有する対象は、素因を有するおそれのある対象または前駆症状的早期疾患を有する対象を含むことができる。

【0278】

バイオシグネチャーはまた、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、心血管疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経障害、多発性硬化症、敗血症、もしくは膵臓炎を非限定的に含む他の疾患、または参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図3～58に記載された任意の疾患、病態もしくは徴候に対する診断またはセラノーシス決定を提供するために使用することもできる。

【0279】

バイオシグネチャーはまた、末梢血、臍帯血、または羊水から、所与の妊娠状態（たとえば、ダウン症候群に特異的なmiRNAシグネチャー）または有害な妊娠転帰、たとえば子癇前症、早産、早期破水、子宮内発育遅延、もしくは不育症を同定するために使用することもできる。バイオシグネチャーはまた、母親、全ての発育段階の胎児、着床前の胚または新生児の健康を示すために使用することもできる。

【0280】

バイオシグネチャーはまた、前駆症状診断のために使用することもできる。さらに、バイオシグネチャーは、疾患を検出する、疾患期もしくは進行を決定する、疾患の再発を決定する、治療プロトコルを同定する、治療プロトコルの効果を決定する、または年齢および環境曝露に関連する個人の生理学的状態を評価するために使用することもできる。

【0281】

小胞のバイオシグネチャーのモニタリングはまた、早期曝露または未知もしくは未確認毒物への曝露の状況を非限定的に含む、対象における毒性曝露を同定するために使用することもできる。作用機序に関して一つの特定の理論によって拘束される訳ではないが、小胞は、損傷した細胞から流出し、その過程で、膜成分および包み込まれた細胞質内容物の両方を含む細胞の特定の内容物を区分することができる。毒物／薬品に曝露された細胞は、小胞流出を増加させて毒物またはその代謝産物を排出し、それにより、小胞レベルの増加を生じさせることがある。したがって、小胞レベル、小胞バイオシグネチャー、または両方のモニタリングは、潜在的な毒物に対する個人の応答の評価を可能にする。

【0282】

本発明の小胞および／または他のバイオマーカーは、一つまたは複数の特定の抗原、結合物質、バイオマーカー、またはこれらの任意の組み合わせを検出することにより、薬物誘発毒性の状態または損傷した臓器を同定するために使用することができる。小胞のレベル、小胞のバイオシグネチャーの変化、または両方を使用して、薬物、抗生物質、工業用薬品、毒性抗生物質代謝産物、薬草、家庭用薬品、および他の生物によって産生される化学物質（天然または合成）を非限定的に含む任意の数の毒物への急性、慢性、または職業的曝露に関して個人をモニターすることができる。加えて、バイオシグネチャーは、原発不明癌（CUP）としても知られる未知の起源の癌を含む病態または疾患を同定するために使用することもできる。

【0283】

前記のように、生物学的試料から小胞を単離して、不均一な小胞集団に達することができる。そして、その不均一な小胞集団を、所与の起始細胞に特異的である小胞集団の抗原特異的特徴を除外または同定するように設計された特異的結合物質でコーティングされた基体と接触させることができる。さらに、上記のように、小胞のバイオシグネチャーは細胞の癌状態と相関し得る。対象において癌を阻害する化合物が変化、たとえば小胞のバイ

オシグネチャーの変化を生じさせることがあり、その変化を、時間および治療の過程にわたって小胞の連続単離によってモニターすることができる。特異的バイオシグネチャーを有する小胞のレベルまたはレベルの変化をモニターすることができる。

【0284】

一局面において、対象の表現型を特徴決定する工程は、対象が療法に応答する可能性があるのかまたは療法に応答しない可能性があるのかを判定する方法を含む。本発明の方法はまた、対象が応答する可能性があるのかまたは応答しない可能性があるのかの予測において有用な新たなバイオシグネチャーを決定する工程も含む。療法に応答する1つまたは複数の対象(応答者)および同じ療法に応答しない1つまたは複数の対象(非応答者)の小胞を調査することができる。調査は、対象を、関心対象の治療に対する応答者または非応答者と分類する小胞バイオシグネチャーを同定するために行うことができる。一部の局面では、小胞の存在、量、およびペイロードがアッセイされる。小胞のペイロードは、例えば、内部タンパク質、核酸、例えば、miRNA、脂質、または糖質を含む。

【0285】

セラノーシスのために、応答者には存在するまたは存在しないが非応答者ではそうではないバイオシグネチャーを使用することができる。応答者由来の試料を、以下:小胞の量、小胞の独特のサブセットまたは種の量、このような小胞におけるバイオマーカー、このような小胞のバイオシグネチャーなどの1つまたは複数について分析することができる。1つの場合、応答者および非応答者からの小胞、例えば、微小胞またはエキソソームを、1種または複数種のmiRNA、例えば、miRNA-122、miR-548c-5p、miR-362-3p、miR-422a、miR-597、miR-429、miR-200a、および/またはmiR-200bの存在および/または量について分析する。セラノーシスのために、応答者と非応答者とのバイオシグネチャーの差を使用することができる。別の態様において、疾患または状態のある対象から小胞を入手する。このような疾患または状態のない対象からも小胞を入手する。両対象群からの小胞を、この群の全ての対象に関連するが、他の群からの対象にはない独特のバイオシグネチャーについてアッセイする。次いで、このようなバイオシグネチャーまたはバイオマーカーを、状態もしくは疾患の有無の診断指標として、または対象が群(有疾患/無疾患、高悪性度疾患/高悪性度でない疾患、応答者/非応答者など)の一方に属していると分類するために使用することができる。

【0286】

一局面において、対象の表現型を特徴決定する工程は、疾患の段階を決定する方法を含む。本発明の方法はまた、段階の決定において有用な新たなバイオシグネチャーを決定する工程を含む。例示において、小胞は、I期癌をもつ患者およびII期またはIII期の同じ癌をもつ患者からアッセイされる。一部の態様において、小胞は転移性疾患患者においてアッセイされる。それぞれの患者群からの小胞間のバイオシグネチャーまたはバイオマーカーの差が同定され(例えば、III期癌からの小胞は高発現の1種または複数種の遺伝子またはmiRNAを有することがある)、それによって、異なる段階の疾患を区別するバイオシグネチャーまたはバイオマーカーが同定される。次いで、このようなバイオシグネチャーを用いて、疾患を有する患者の段階を決定することができる。

【0287】

場合によっては、バイオシグネチャーは、ある期間にわたって、例えば、毎日、週2回、毎週、隔週、月2回、毎月、隔月、3ヶ月に2回、年4回、年2回、2年に1回、または毎年、対象から小胞をアッセイすることによって決定される。例えば、ある特定の療法の応答者または非応答者を示すシグネチャーを検出するために、その療法を受けている患者のバイオシグネチャーを経時的にモニタリングすることができる。同様に、異なる段階の疾患をもつ患者の小胞を経時的に調査する。各時点での小胞のペイロードまたは物理的特性を比較することができる。従って、時間パターンがバイオシグネチャーを形成してもよく、次いで、このバイオシグネチャーを、セラノーシス、診断、予後判定、疾患層別化、治療モニタリング、疾患モニタリング、または応答者/非応答者の状態の予測のために使用することができる。単なる例示として、時間経過にわたって漸増する量の小胞バイオマーカー

ー(例えば、miR122)は転移性癌と関連づけられるのに対して、時間経過にわたってほとんど変化のない量の小胞バイオマーカーは非転移性癌と関連づけられる。時間経過は、少なくとも1週間超、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、6週間、8週間、2ヶ月、10週間、12週間、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、1年、18ヶ月、2年、または少なくとも3年、続いてもよい。

【0288】

小胞のレベル、特定のバイオシグネチャーを有する小胞のレベル、または小胞のバイオシグネチャーはまた、病態に対する治療法の効果を評価するために使用することもできる。たとえば、小胞のレベル、特定のバイオシグネチャーを有する小胞のレベル、または小胞のバイオシグネチャーを使用して、癌治療、たとえば化学療法、放射線療法、手術、または対象における癌を阻害するのに有用な任意の他の治療法の効果を評価することができる。加えて、バイオシグネチャーは、小胞のバイオシグネチャーに対して調節作用を有する候補または試験化合物もしくは物質(たとえばタンパク質、ペプチド、ペプチド模倣薬、ペプトイド、小分子または他の薬物)を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用することもできる。このようなスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、たとえば、病態または疾患を調節、たとえば阻害、改善、治療または予防するのに有用でありうる。

【0289】

たとえば、特定の癌に対する好結果の治療を受けている患者から小胞のバイオシグネチャーを得ることができる。バイオシグネチャーを決定するために、同じ薬物で治療されていない癌患者からの細胞を培養し、その培養物から小胞を得ることができる。細胞を試験化合物で処理し、培養物からの小胞のバイオシグネチャーを、好結果の治療を受けている患者から得られた小胞のバイオシグネチャーと比較することができる。好結果の治療を受けている患者のバイオシグネチャーに類似したバイオシグネチャーを生じさせる試験化合物をさらなる研究のために選択することができる。

【0290】

また、小胞のバイオシグネチャーは、治験においてバイオシグネチャーに対する物質(たとえば薬物化合物)の影響をモニターするために使用することもできる。また、小胞のレベル、小胞のバイオシグネチャーの変化、または両方のモニタリングを試験化合物、たとえば癌細胞を阻害するための試験化合物の効果を評価する方法において使用することもできる。

【0291】

疾患、病態、または症候群の診断または存在もしくは発症のリスクの確認に加えて、本明細書で開示する方法および組成物は、さらに、そのような疾患、病態、または症候群を有する対象の治療を最適化するためのシステムも提供する。また、小胞のレベル、小胞のバイオシグネチャー、または両方を使用して、特定の治療介入(薬学的または非薬学的)の有効性を決定し、その介入を、1)有害な転帰を発生させるリスクを低減する、2)介入の有効性を高める、または3)耐性状態を同定するように変更することもできる。このように、疾患、病態もしくは症候の存在またはこれらを発現するリスクを診断または確認することに加えて、本明細書に開示される方法および組成物はまた、このような疾患、病態または症候を有する対象の治療を最適化するためのシステムを提供する。たとえば、小胞のバイオシグネチャーを同定することにより、診断と治療とを統合して対象のリアルタイム治療を改善することによる、疾患、病態または症候を治療するための治療関連の手法を決定することができる。

【0292】

小胞のレベル、小胞のバイオシグネチャー、または両方を同定する試験を使用して、治療レジメンを最適化するために、どの患者が特定の治療にもっとも適しているかを同定し、薬物がどれほど良好に作用しているかに関するフィードバックを提供することができる。たとえば、妊娠誘発性高血圧症および関連する病態において、治療関連の診断は、治療を最適化するために、重要なパラメータ(たとえばサイトカインおよび/または増殖因子

レベル)の経時的变化をフレキシブルにモニターすることができる。

【0293】

FDA、MDA、EMA、USDAおよびEMAによって定義されるような調査機関の治験設定内で、本明細書に開示されるバイオシグネチャーによって決定されるような治療関連の診断は、治験設計を最適化し、効果をモニターし、薬物安全性を向上させるための重要な情報を提供することができる。たとえば、治験設計に関して、治療関連の診断は、患者階層化、患者の適格性(包含/排除)の決定、均一な治療群の形成、および対応する症例対照コホートに対して最適化される患者試料の選択のために使用することができる。したがって、このような治療関連の診断は、患者の効果強化のための手段を提供することができ、それにより、治験募集に必要とされる個人の数を最小化することができる。たとえば、効果に関して、治療関連の診断は、治療をモニターし、効果基準を評価するのに有用である。または、安全性に関して、治療関連の診断は、薬物の有害反応を阻止する、または投薬過誤を防ぐ、および治療レジメンの順守をモニターするために使用することができる。

【0294】

いくつかの態様において、本発明は、治験を受ける治療に対する応答者および非応答者を同定する方法であって、治験に登録された対象において循環バイオマーカを含むバイオシグネチャーを検出する工程、および応答者と非応答者とを識別するバイオシグネチャーを同定する工程を含む方法を提供する。さらなる態様において、バイオシグネチャーは、ドラッグナীবな対象において計測され、対象が応答者であるのか非応答者であるのかを予測するために使用される。予測は、ドラッグナীবな対象のバイオシグネチャーが、応答者として同定された治験対象とより密接に相関しているかどうかに基づくことができ、それにより、ドラッグナীবな対象は応答者であると予測される。逆に、ドラッグナীবな対象のバイオシグネチャーが、非応答者として同定された治験対象とより密接に相関しているならば、本発明の方法は、そのドラッグナীবな対象が非応答者であると予測することができる。したがって、その予測を使用して、治療に対する潜在的応答者および非応答者を層別化することができる。いくつかの態様において、予測は、たとえば治療する医師が薬物を投与するかどうかを判定するのを支援することにより、治療の進路を手引きするために使用される。いくつかの態様において、予測は、さらなる治験に登録するための患者の選択を手引きするために使用される。非限定的な例においては、II相治験における応答者/非応答者状態を予測するバイオシグネチャーを使用して、III相治験のための患者を選択し、それにより、III相患者集団における応答の見込みを高めることができる。当業者は、応答者/非応答者状態以外の基準で対象を層別化するためのバイオシグネチャーを同定するように本方法を適合させることができることを理解するであろう。一つの態様において、基準は治療安全性である。したがって、本方法は、治療に対する有害な事象を有する可能性がある対象またはそうでない対象を同定するために、上記のように踏襲される。非限定的な例においては、II相治験における安全性プロファイルを予測するバイオシグネチャーを使用して、III相治験のための患者を選択し、それにより、III相患者集団における治療安全性プロファイルを高めることができる。

【0295】

したがって、小胞のレベル、小胞のバイオシグネチャー、またはその両方は、薬物効果をモニターし、所与の薬物に対する応答または耐性を決定し、またはその両方を実施して、それによって薬物安全性を高めるために使用することができる。たとえば、結腸癌において、小胞は一般に結腸癌細胞から流出し、それを末梢血から単離して、一つまたは複数のバイオマーカ、たとえば、KRAS mRNAを単離するために使用することができ、その後、そのバイオマーカを配列決定してKRAS突然変異を検出することができる。mRNAバイオマーカの場合、mRNAをcDNAに逆転写し、配列決定し(たとえば、サンガー配列決定法、パイロシーケンシング法、NextGen配列決定法、RT-PCRアッセイ法によって)、薬物(たとえばセツキシマブまたはパニツミマブ)に対する耐性を与える突然変異が存在するかどうかを判定することができる。もう一つの例においては、肺癌細胞から特異的に流出する小胞を生物学的試料から単離して、肺癌バイオマーカ、たとえばEGFR mRNAを単離する

ために使用することができる。EGFR mRNAをcDNAにプロセッシングし、配列決定して、肺癌に特異的な薬物または治療に対して耐性または応答を示すEGFR突然変異が存在するかどうかを判定する。

【0296】

一つまたは複数のバイオシグネチャーは、特定の群におけるバイオシグネチャーのセットに関して得られた情報が、診断、予後判定、または治療の管理、たとえば治療選択を非限定的に含む臨床的に関連する決定を下すための妥当な基礎を提供するように分類されることができる。

【0297】

大部分の診断マーカーと同様に、多くの場合、正しい医学的判断を下すのに十分である最小数のマーカーを使用することが望ましい。これは、さらなる解析までの治療の遅れならびに時間および資金の不適切な使用を防ぐ。

【0298】

疾患状態、病期、進行、予後；治療効果もしくは選択；または生理学的状態に関して、たとえば小胞のバイオシグネチャーなどの定性的および定量的性質を臨床転帰と関連させるために、試料（たとえば血清および組織バイオバンク）に対して遡及的解析を実施する方法もまた、本明細書において開示される。さらに、本明細書に開示される方法および組成物は、疾患状態、病期、進行、予後；治療効果もしくは選択；または生理学的状態に関して、小胞の定性的および定量的バイオシグネチャーを臨床転帰と関連させるために、試料（たとえば、治験において個人から採取された血清および／または組織）に対して前向き分析を実施するために使用される。本明細書において使用されるように、小胞のバイオシグネチャーは、起始細胞特異的小胞を同定するために使用することができる。さらに、バイオシグネチャーは、小胞の表面マーカープロファイルまたは小胞の内容物に基づいて決定することもできる。

【0299】

本発明にしたがって表現型を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、複数の成分（たとえばマイクロRNA、小胞または他のバイオマーカー）または特徴（たとえば小胞サイズまたは形態）を含むことができる。バイオシグネチャーは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、75または100種類の成分または特徴を含むことができる。二つ以上の成分または特徴、たとえば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、75または100種類の成分を有するバイオシグネチャーは、表現型を特徴決定することにおいてより高い感度および／または特異度を提供することもできる。いくつかの態様において、複数の成分または特徴の評価は、より少ない成分または特徴を評価することに比べて、感度および／または特異度の増加をもたらす。他方、多くの場合、正しい医学的判断を下すのに十分である最小数の成分または特徴を使用することが望ましい。より少数のマーカーは、分類器の統計的過剰適合を避けることができ、さらなる解析までの治療の遅れならびに時間および資金の不適切な使用を防ぐことができる。したがって、本発明の方法は、最適な数の成分または特徴を決定する工程を含む。

【0300】

本発明のバイオシグネチャーは、上記のように感度、特異度、精度、または同様な性能測定基準で表現型を特徴決定するために使用することができる。バイオシグネチャーはまた、試料をある群に属するもの、たとえば有疾患群もしくは無疾患群、高悪性度疾患を有する群もしくは有しない群、または応答者もしくは非応答者の群に属するものとして分類するための分類器を構築するために使用することもできる。一つの態様において、分類器は、対象が高悪性度の癌を有するの、高悪性度でない癌を有するのかを決定するために使用される。説明のための前立腺癌の場合において、これは、医師が、癌を経過観察する、すなわち「待機療法」を処方するの、前立腺切除術を実施するのかを決定するのを支援することができる。もう一つの態様において、分類器は、乳癌患者がタモキシフェンに応答する可能性があるかどうかを判定するために使用され、それにより、医師が、患者を

タモキシフェンまたは別の薬物で治療すべきかどうかを判定することを支援する。

【0301】

バイオマーカー

表現型を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、一つまたは複数のバイオマーカーを含むことができる。バイオマーカーは、循環バイオマーカー、膜結合マーカー、または小胞内もしくは小胞表面上に存在する成分であることができる。これらのバイオマーカーは、非限定的に、核酸（たとえばRNA（mRNA、miRNAなど）またはDNA）、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、抗原、脂質、糖質またはプロテオグリカンを含む。

【0302】

バイオシグネチャーは、バイオマーカー（たとえば、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1、3～60に記載された任意の一つまたは複数のバイオマーカー）の存在もしくは不在、発現レベル、突然変異状態、遺伝的変異状態、または任意の修飾（たとえば後成的修飾、または翻訳後修飾）を含むことができる。バイオマーカーの発現レベルを対照または参照と比較して、試料中のバイオマーカーの過剰発現または過小発現（または上方制御もしくは下方制御）を決定することができる。いくつかの態様において、対照または参照レベルは、病態または疾患を有しないまたは示さない対象由来の対照試料中の同じバイオマーカー、たとえばmiRNAの量を含む。もう一つの態様において、参照レベルの対照は、様々な生物学的設定、たとえば罹患状態 対 非罹患状態においてそのレベルが影響を受けるとしてもごくわずかであるハウスキーピングマーカーのレベルを含む。さらに別の態様において、対照または参照レベルは、同じ対象中の、ただし異なる時点で採取された試料中の同じマーカーのレベルを含む。他の種類の対照が本明細書に記載されている。

【0303】

核酸バイオマーカーは様々なRNAまたはDNA種を含む。たとえば、バイオマーカーは、mRNA、マイクロRNA（miRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、リボソームRNA（rRNA）、ヘテロ核RNA（hnRNA）、リボソームRNA（rRNA）、siRNA、トランスファーRNA（tRNA）またはshRNAであることができる。DNAは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、相補的DNAまたは非コードDNAであることができる。miRNAは、長さが平均で約22ヌクレオチドである短いリボ核酸（RNA）分子である。miRNAは、標的メッセンジャーRNA転写物（mRNA）の三つの主要な非翻訳領域（3'UTR）中の相補的配列に結合する転写後制御因子として作用し、それが遺伝子サイレンシングを生じさせることができる。一つのmiRNAが何千ものmRNAに対して作用することもある。miRNAは、負の調節、たとえば転写物分解および隔離、翻訳抑制における複数の役割を有し、また、正の調節、たとえば転写および翻訳活性化においても役割を有することがある。遺伝子調節に影響することにより、miRNAは、多くの生物学的プロセスに影響することができる。発現したmiRNAの様々なセットが様々な細胞型および組織中に見られる。

【0304】

本発明で使用するためのバイオマーカーはさらに、断りない限り本明細書を通して互換可能に使用される語であるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含む。いくつかの態様において、タンパク質バイオマーカーは、上記のような、その修飾状態、切断、突然変異、発現レベル（たとえば、参照レベルと比較した場合の過剰発現または過小発現）および／または翻訳後修飾を含む。非限定的な例において、疾患のバイオシグネチャーは、疾患を有しない試料よりも疾患に関連した試料中でより優勢である特定の翻訳後修飾を有するタンパク質を含むことができる。

【0305】

バイオシグネチャーは、複数の同じ種類のバイオマーカー（たとえば2種以上の異なるマイクロRNAまたはmRNAの種）または一つまたは複数の異なる種類のバイオマーカー（たとえばmRNA、miRNA、タンパク質、ペプチド、リガンドおよび抗原）を含むこともできる。

。

10

20

30

40

50

【0306】

一つまたは複数のバイオシグネチャーは、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1、3～60に記載されたものから選択される少なくとも一つのバイオマーカーを含むことができる。特定の起始細胞バイオシグネチャーが一つまたは複数のバイオマーカーを含むこともある。国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図3～58は、小胞に由来し、小胞から解析することができる多くの疾患または病態特異的バイオマーカーを記載する表を示す。バイオマーカーはまた、CD24、ミッドカイン、ヘプシジン、TM PRSS2-ERG、PCA-3、PSA、EGFR、EGFRvIII、BRAFバリエーション、MET、cKit、PDGFR、Wnt、 β カテニン、K-ras、H-ras、N-ras、Raf、N-myc、c-myc、IGFR、PI3K、Akt、BRCA1、BRCA2、PTEN、VEGFR-2、VEGFR-1、Tie-2、TEM-1、CD276、HER-2、HER-3またはHER-4であることができる。バイオマーカーはまた、アネキシンV、CD63、Rab-5bもしくはカベオリンまたはmiRNA、たとえばlet-7a、miR-15b、miR-16、miR-19b、miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-92、miR-93、miR-320もしくはmiR-20であることもできる。バイオマーカーはまた、国際公開公報第2009/100029号に開示されている任意の遺伝子またはそれらのフラグメント、たとえばその中の表3～15に記載されているものであることもできる。

10

【0307】

別の態様において、小胞は、稀な細胞、例えば、国際公開公報第2006054991号に記載の細胞に由来する細胞フラグメントまたは細胞破片を含む。小胞の1種または複数種のバイオマーカー、例えば、CD146、CD105、CD31、CD133、CD106、またはこれらの組み合わせを評価することができる。1つの態様において、小胞を単離または検出するために、1種または複数種のバイオマーカーに対する捕捉物質が用いられる。一部の態様において、小胞のバイオマーカーCD45、サイトケラチン(CK)8、CK18、CK19、CK20、CEA、EGFR、GUC、EpCAM、VEGF、TS、Muc-1、またはこれらの組み合わせのうち1つまたは複数が評価される。1つの態様において、腫瘍由来小胞はCD45⁺、CK⁺であり、核酸を含み、CD45の非存在またはCD45の低発現もしくは低検出を有し、サイトケラチン(例えば、CK8、CK18、CK19、またはCK20)の検出可能な発現および核酸の検出可能な発現を有する。

20

【0308】

本願全体を通じて、CD9、EphA2、EGFR、B7H3、PSM、PCSA、CD63、STEAP、CD81、ICAM1、A33、DR3、CD66e、MFG-E8、TROP-2、マンマグロビン、ヘプシン、NPGP/NPFF2、PSCA、5 T4、NGAL、EpCam、ニューロキニン受容体-1(NK-1もしくはNK-1R)、NK-2、Pai-1、CD45、CD10、HER2/ERBB2、AGTR1、NPY1R、MUC1、ESA、CD133、GPR30、BCA225、CD24、CA15.3(MUC1分泌型)、CA27.29(MUC1分泌型)、NMDAR1、NMDAR2、MAGEA、CTAG1B、NY-ESO-1、SPB、SPC、NSE、PGP9.5、P2RX7、NDUFB7、NSE、GAL3、オステオポンチン、CHI3L1、IC3b、メソテリン、SPA、AQP5、GPCR、hCEA-CAM、PIPIA-2、CABYR、TMEM211、ADAM28、UNC93A、MUC17、MUC2、IL10R- β 、BCMA、HVEM/TNFRSF14、Trappin-2、エラフィン、ST2/IL1R4、TNFRF14、CEACAM1、TPA1、LAMP、WF、WH1000、PECAM、BSA、TNFR、またはこれらの組み合わせを含むが、それに限定されるわけではない、小胞バイオシグネチャーの一部として評価することができる任意の数の有用なバイオマーカーが開示される。

30

【0309】

本明細書に開示される方法および組成物における評価に有用な他のバイオマーカーは、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6329179号および第7,625,573号、米国特許公開公報第2002/106684号、第2004/005596号、第2005/0159378号、第2005/0064470号、第2006/116321号、第2007/0161004号、第2007/0077553号、第2007/104738号、第2007/0298118号、第2007/0172900号、第2008/0268429号、第2010/0062450号、第2007/0298118号、第2009/0220944号および第2010/0196426号、米国特許出願第12/524,432号、第12/524,398号、第12/524,462号、カナダ国特許CA2453198ならびに国際公開公報第1994022018号、同第2001036601号、同第2003063690号、同第2003044166号、同第2003076603号、同第2005121369号、同第2005118806号、同第2005/078124号、同第2007126386号、同第2007088537号、同第2007103572号、同第2009019215号、同第2009021322号、同第20

40

50

09036236号、同第2009100029号、同第2009015357号、同第2009155505号、同第2010/065968号および同第2010/070276号に開示されているような、病態または生理学的状態と関連したバイオマーカーを含む。小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含む、これらの特許および出願に開示されているバイオマーカーは、表現型を特徴決定する、たとえば癌または他の疾患の診断、予後判定、またはセラノーシスを提供するためのシグネチャーの一部として評価することができる。さらに、これらに開示されている方法および技術は、小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含むバイオマーカーを評価するために使用することもできる。

【0310】

本明細書に開示される方法および組成物における評価に有用なバイオマーカーのもう一つの群は、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,692,916号、第6,960,439号、第6,964,850号、第7,074,586号、米国特許出願第11/159,376号、第11/804,175号、第12/594,128号、第12/514,686号、第12/514,775号、第12/594,675号、第12/594,911号、第12/594,679号、第12/741,787号、第12/312,390号および国際PCT特許出願第PCT/US2009/049935号、第PCT/US2009/063138号、第PCT/US2010/000037号に開示されているような、癌の診断、予後判定、およびセラノーシスと関連するバイオマーカーを含む。有用なバイオマーカーはさらに、米国特許出願第10/703,143号および第10/701,391号に記載されている、炎症性疾患のバイオマーカー、第11/529,010号に記載されている、関節リウマチのバイオマーカー、第11/454,553号および第11/827,892号に記載されている、多発性硬化症のバイオマーカー、第11/897,160号に記載されている、移植拒絶反応のバイオマーカー、第12/524,677号に記載されている、狼瘡のバイオマーカー、第PCT/US2009/048684号に記載されている、骨粗鬆症のバイオマーカー、第10/742,458号に記載されている、感染症および敗血症のバイオマーカー、第12/520,675号に記載されている、敗血症のバイオマーカーを含む。これらの特許または出願はすべて参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。mRNAを含む、これらの特許および出願に開示されているバイオマーカーは、表現型を特徴決定する、たとえば癌または他の疾患の診断、予後判定、またはセラノーシスを提供するためのシグネチャーの一部として評価することができる。さらに、これらに開示されている方法および技術は、小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含むバイオマーカーを評価するために使用することもできる。

【0311】

本明細書に開示される方法および組成物における評価に有用なさらに他のバイオマーカーは、Wieczorek et al., Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans, Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 May; 82(10):3455-9、Wieczorek et al., Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker, Cancer Res. 1987 Dec 1; 47(23):6407-12、Escola et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. J. Biol. Chem. (1998) 273:20121-27、Pileri et al. Binding of hepatitis C virus to CD81 Science, (1998) 282:938-41、Kopreski et al. Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma, Clin. Cancer Res. (1999) 5:1961-1965、Carr et al. Circulating Membrane Vesicles in Leukemic Blood, Cancer Research, (1985) 45:5944-51、Weichert et al. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. Clinical Cancer Research, 2005, 11:6574-81、Iorio et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res (2005) 65:7065-70、Taylor et al. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signaling defects British J Cancer (2005) 92:305-11、Valadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells Nature Cell Biol (2007) 9:654-59、Taylor et al. Pregnancy-associated exosomes and

their modulation of T cell signaling J Immunol (2006) 176:1534-42、Koga et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes Anticancer Res (2005) 25:3703-08、Seligson et al. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma Clin Cancer Res (2004) 10:2659-69、Clayton et al. (Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. Eur J Immunol (2003) 33:522-31)、Simak et al. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers Trans Med Reviews (2006) 20:1-26、Choi et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells J Proteome Res (2007) 6:4646-4655、Iero et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity Cell Death Diff (2008) 15:80-88、Baj-Krzyworzeka et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes Cencr Immunol Immunother (2006) 55:808-18、Admyre et al. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines J Allergy Clin Immunol (2007) 120:1418-1424、Aoki et al. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles Endocrinol (2007) 148:3850-3862、Baj-Krzyworzeka et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes Cencr Immunol Immunother (2006) 55:808-18、Skog et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers Nature Cell Biol (2008) 10:1470-76、El-Hefnawy et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics Clin Chem (2004) 50:564-573、Pisitkun et al., Proc Natl Acad Sci US A, 2004; 101:13368-13373、Mitchell et al., Can urinary exosomes act as treatment response markers in Prostate Cancer?, Journal of Translational Medicine 2009, 7:4、Clayton et al., Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2, Cancer Res 2007; 67:(15). August 1, 2007、Rabesandratana et al. Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes. Blood 91:2573-2580 (1998)、Lamparski et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. J Immunol Methods 270:211-226 (2002)、Keller et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. Kidney Int'l 72:1095-1102 (2007)、Runz et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. Gyn Oncol 107:563-571 (2007)、Redman et al. Circulating microparticles in normal pregnancy and preeclampsia placenta. 29:73-77 (2008)、Gutwein et al. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. Clin Cancer Res 11:2492-2501 (2005)、Kristiansen et al., CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients, Brit J Cancer 88:231-236 (2003)、Lim and Oh, The Role of CD24 in Various Human Epithelial Neoplasias, Pathol Res Pract 201:479-86 (2005)、Matutes et al., The Immunophenotype of Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes and its Relevance to the Differential Diagnosis With Other B-Cell Disorders, Blood 83:1558-1562 (1994)、Pirruccello and Lang, Differential Expression of CD24-Related Epitopes in Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome: A Potential Marker for Circulating Sezary Cells, Blood 76:2343-2347 (1990)に開示されているような、病態または生理学的状態と関連したバイオ

マーカーを含む。小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含む、これらの刊行物に開示されているバイオマーカーは、表現型を特徴決定する、たとえば癌または他の疾患の診断、予後判定、またはセラノースを提供するためのシグネチャーの一部として評価することができる。さらに、これらに開示されている方法および技術は、小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含むバイオマーカーを評価するために使用することもできる。

【0312】

本明細書に開示される方法および組成物における評価に有用なさらに他のバイオマーカーは、Rajendran et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:11172-11177、Taylor et al., Gynecol Oncol 2008; 110:13-21、Zhou et al., Kidney Int 2008; 74:613-621、Buning et al., Immunology 2008、Prado et al. J Immunol 2008; 181:1519-1525、Vella et al. (2008) Vet Immunol Immunopathol 124(3-4):385-93、Gould et al. (2003). Proc Natl Acad Sci USA 100(19):10592-7、Fang et al. (2007). PLoS Biol 5(6):e158、Chen, B. J. and R. A. Lamb (2008). Virology 372(2):221-32、Bhatnagar, S. and J. S. Schorey (2007). J Biol Chem 282(35):25779-89、Bhatnagar et al. (2007) Blood 110(9):3234-44、Yuyama, et al. (2008). J Neurochem 105(1):217-24、Gomes et al. (2007). Neurosci Lett 428(1):43-6、Nagahama et al. (2003). Autoimmunity 36(3):125-31、Taylor, D. D., S. Akyo, et al. (2006). J Immunol 176(3):1534-42、Pecche, et al. (2006). Am J Transplant 6(7):1541-50、Iero, M., M. Valenti, et al. (2008). Cell Death and Differentiation 15:80-88、Gesierich, S., I. Berezoversuskiy, et al. (2006), Cancer Res 66(14):7083-94、Clayton, A., A. Turkes, et al. (2004). Faseb J 18(9):977-9、Skriner, K. Adolph, et al. (2006). Arthritis Rheum 54(12):3809-14、Brouwer, R., G. J. Pruijn, et al. (2001). Arthritis Res 3(2):102-6、Kim, S. H., N. Bianco, et al. (2006). Mol Ther 13(2):289-300、Evans, C. K, S. C. Ghivizzani, et al. (2000). Clin Orthop Relat Res (379 Suppl):S300-7、Zhang, H. G., C. Liu, et al. (2006). J Immunol 176(12):7385-93、Van Niel, G., J. Mallegol, et al. (2004). Gut 52:1690-1697、Fiasse, R. and O. Dewit (2007). Expert Opinion on Therapeutic Patents 17(12):1423-1441(19)に開示されているような、病態または生理学的状態と関連したバイオマーカーを含む。小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含む、これらの刊行物に開示されているバイオマーカーは、表現型を特徴決定する、たとえば癌または他の疾患の診断、予後判定、またはセラノースを提供するためのシグネチャーの一部として評価することができる。さらに、これらに開示されている方法および技術は、小胞バイオマーカーおよびマイクロRNAを含むバイオマーカーを評価するために使用することもできる。

【0313】

別の局面において、本発明は、CD9、HSP70、Gal3、MIS、EGFR、ER、ICB3、CD63、B7H4、MUC1、DLL4、CD81、ERB3、VEGF、BCA225、BRCA、CA125、CD174、CD24、ERB2、NGAL、GPR30、CYFRA21、CD31、cMET、MUC2、またはERB4からなる群より選択される、対象に由来する試料中の1種または複数種の循環バイオマーカーのレベルを検出する工程を含む、癌を評価する方法を提供する。CD9、HSP70、Gal3、MIS、EGFR、ER、ICB3、CD63、B7H4、MUC1、DLL4、CD81、ERB3、VEGF、BCA225、BRCA、BCA200、CA125、CD174、CD24、ERB2、NGAL、GPR30、CYFRA21、CD31、cMET、MUC2、またはERB4。別の態様において、1種または複数種の循環バイオマーカーは、CD9、EphA2、EGFR、B7H3、PSMA、PCSA、CD63、STEAP、STEAP、CD81、B7H3、STEAP1、ICAM1 (CD54)、PSMA、A33、DR3、CD66e、MFG-8e、EphA2、ヘプシン、TMEM211、EphA2、TROP-2、EGFR、マンマグロビン、ヘプシン、NPGP/NPFF2、PSCA、5T4、NGAL、NK-2、EpCam、NGAL、NK-1R、PSMA、5T4、PAI-1、およびCD45からなる群より選択される。さらに別の態様において、1種または複数種の循環バイオマーカーは、CD9、MIS Rii、ER、CD63、MUC1、HER3、STAT3、VEGFA、BCA、CA125、CD24、EPCAM、およびERB B4からなる群より選択される。これらの群から、任意の数の有用なバイオマーカー、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個以上の有用なバイオマーカーを評価することができる。一部の態様において、1種または複数種のバイオマーカーは、Gal3

、BCA200、OPNおよびNCAMの1つまたは複数、例えば、Gal3およびBCA200、OPNおよびNCAM、または4つ全てである。癌を評価する工程は、癌の診断、予後判定、またはセラノーシスを行う工程を含んでもよい。癌は乳癌でもよい。マーカーは小胞または小胞集団と結合してもよい。例えば、1種または複数種の循環バイオマーカーは小胞表面抗原または小胞ペイロードでもよい。さらに、捕捉用抗原、検出用抗原、またはその両方として小胞表面抗原を使用することができる。

【0314】

さらに、本発明は、CD9、HSP70、Gal3、MIS、EGFR、ER、ICB3、CD63、B7H4、MUC1、DLL4、CD81、ERB3、VEGF、BCA225、BRCA、CA125、CD174、CD24、ERB2、NGAL、GPR30、CYFRA21、CD31、cMET、MUC2、またはERB4からなる群より選択される、対象に由来する試料中の1種または複数種の循環バイオマーカーのレベルを検出する工程を含む、治療剤に対する反応を予測する方法を提供する。バイオマーカーはまた、CD9、EphA2、EGFR、B7H3、PSMA、PCSA、CD63、STEAP、STEAP、CD81、B7H3、STEAP1、ICAM1 (CD54)、PSMA、A33、DR3、CD66e、MFG-8e、EphA2、ヘプシン、TMEM211、EphA2、TROP-2、EGFR、マンマグロビン、ヘプシン、NPGP/NPFF2、PSCA、5T4、NGAL、NK-2、EpCam、NGAL、NK-1R、PSMA、5T4、PAI-1、およびCD45からなる群より選択することもできる。さらに別の態様において、1種または複数種の循環バイオマーカーは、CD9、MIS Rii、ER、CD63、MUC1、HER3、STAT3、VEGFA、BCA、CA125、CD24、EPCAM、およびERB B4からなる群より選択される。これらの群から、任意の数の有用なバイオマーカー、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個以上の有用なバイオマーカーを評価することができる。一部の態様において、1種または複数種のバイオマーカーは、Gal3、BCA200、OPNおよびNCAMの1つまたは複数、例えば、Gal3およびBCA200、OPNおよびNCAM、または4つ全てである。治療剤は、癌を治療するための治療剤でもよい。癌は乳癌でもよい。マーカーは小胞または小胞集団と結合してもよい。例えば、1種または複数種の循環バイオマーカーは小胞表面抗原または小胞ペイロードでもよい。さらに、捕捉用抗原、検出用抗原、またはその両方として小胞表面抗原を使用することができる。

【0315】

本明細書において同定されるバイオマーカーを評価または検出するために、様々な方法またはプラットフォームを使用することができる。そのような方法またはプラットフォームの例は、本明細書に開示されるまたは当技術分野において公知である、抗体アレイ、マイクロビーズまたは他の方法を使用することを含むが、それらに限定されない。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーに対する捕捉抗体またはアプタマーをアレイまたはビーズに結合させることができる。そして、検出可能な薬剤を使用して、捕捉された小胞を検出することができる。いくつかの態様において、捕捉された小胞は、小胞の全集団を検出する一般的小胞バイオマーカー、たとえばテトラスパニンまたはMFG-E8を認識する薬剤、たとえば抗体またはアプタマーを使用して検出される。これらは、CD9、CD63および／またはCD81のようなテトラスパニンを含むことができる。他の態様において、捕捉された小胞は、小胞の起源、たとえば組織または臓器のタイプに特異的なマーカーを使用して検出される。いくつかの態様において、捕捉された小胞は、内皮起源の細胞または小胞のためのマーカーであるCD31を使用して検出される。所望により、捕捉に使用されるバイオマーカーを検出に使用することもできるし、検出に使用されるバイオマーカーを捕捉に使用することもできる。

【0316】

本発明の方法は、バイオマーカーが様々な疾患または病状に対応する、そのような様々な疾患または病状を評価するために使用することができる。たとえば、本発明の方法は、本明細書に開示されるような一つまたは複数の癌を評価するために適用され、その場合、方法は、対象由来の試料中の、5T4 (トロホブラスト)、ADAM10、AGER/RAGE、APC、APP (βアミロイド)、ASPH (A-10)、B7H3 (CD276)、BACE1、BAI3、BRCA1、BDNF、BIRC2、C1 GALT1、CA125 (MUC16)、カルモジュリン1、CCL2 (MCP-1)、CD9、CD10、CD127 (IL7R)、CD174、CD24、CD44、CD63、CD81、CEA、CRMP-2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CYFRA21、Der1

in-1、DLL4、DPP6、E-CAD、EpCaM、EphA2 (H-77)、ER (1) ESR1 α 、ER (2) ESR2 β 、ErbB4、ErbB2、erb3 (Erb-B3)、PA2G4、FRT (FLT1)、Gal3、GPR30 (G結合ER1)、HAP1、HER3、HSP-27、HSP70、IC3b、IL8、INSIG、ジャンクションプラコグロビン、ケラチン15、KRAS、マンマグロビン、MART1、MCT2、MFGE8、MMP9、MRP8、Muc1、MUC17、MUC2、NCAM、NG2 (CSPG4)、Ngal、NHE-3、NT5E (CD73)、ODC1、OPG、OPN、p53、PARK7、PCSA、PGP9.5 (PARK5)、PR (B)、PSA、PSMA、RAGE、STXBP4、サバイビン、TFF3 (分泌)、TIMP1、TIMP2、TMEM211、TRAF4 (足場)、TRAIL-R2 (細胞死受容体5)、TrkB、Tsg 101、UNC93a、VEGF A、VEGFR2、YB-1、VEGFR1、GCDPF-15 (PIP)、BigHB (TGF β 1由来タンパク質)、5HT2B (セロトニン受容体2B)、BRCA2、BACE 1、CDH1-カドヘリンからなる群より選択される一つまたは複数の循環バイオマーカーのレベルを検出することを含む。方法は、指定された標的バイオマーカーのタンパク質、RNAまたはDNAを検出することを含むことができる。一つまたは複数のマーカーは、生物学的流体、たとえば本明細書に開示される流体から直接評価することもできるし、またはたとえば小胞表面抗原もしくは小胞ペイロード (たとえば可溶性タンパク質、mRNAまたはDNA) として小胞とのその結合に関して評価することもできる。本発明の方法および組成物を使用して決定される特定のバイオシグネチャーは、任意の数の有用なバイオマーカーを含むことができ、たとえば、バイオシグネチャーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはより多くの異なるバイオマーカー (または、いくつかの場合、同じバイオマーカー、たとえばタンパク質および核酸の異なる分子) を含むことができる。本明細書または参照により組み込まれる出願に開示されているように、小胞表面抗原を捕捉抗原、検出抗原または両方として使用することもできる。

10

20

【0317】

本発明の方法および組成物は、癌の様々な情報提供的局面を同定する、たとえば、転移、血管形成を示すバイオシグネチャーを同定する、または同じ腫瘍もしくは腫瘍系列の様々な病期、クラスもしくはサブクラスを分類することを含め、癌の様々な局面を評価するために適用される。

【0318】

さらには、本発明の方法は、疾患または病状が対象における免疫調節に影響するかどうかを判定する工程を含む。たとえば、免疫調節に関する一つまたは複数の循環バイオマーカーは、CD45、FasL、CTLA4、CD80およびCD83の一つまたは複数であることができる。転移に関する一つまたは複数の循環バイオマーカーは、Muc1、CD147、TIMP1、TIMP2、MMP7およびMMP9の一つまたは複数であることができる。血管形成に関する一つまたは複数の循環バイオマーカーは、HIF2a、Tie2、Ang1、DLL4およびVEGFR2の一つまたは複数であることができる。任意の数、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはより多くの有用なバイオマーカーをグループから評価することができる。癌は乳癌であることができる。マーカーは小胞または小胞集団と結合していることができる。たとえば、一つまたは複数の循環バイオマーカーは、小胞表面抗原または小胞ペイロードであることができる。小胞表面抗原をさらに捕捉抗原、検出抗原または両方として使用することもできる。

30

【0319】

バイオシグネチャーはDLL4またはcMETを含んでもよい。Delta-like 4 (DLL4) はNotchリガンドであり、血管形成中に上方制御される。cMET (c-Met、MET、またはMNNG HOS Transforming遺伝子とも呼ばれる) は、リガンドが肝細胞増殖因子 (HGF) である膜受容体型チロシンキナーゼをコードする癌原遺伝子である。METタンパク質は、時として、肝細胞増殖因子受容体 (HGFR) と呼ばれる。METは通常、上皮細胞上で発現し、不適切な活性化が腫瘍成長、血管形成、および転移を誘発することがある。DLL4およびcMETは、小胞集団を検出するためのバイオマーカーとして使用することができる。

40

【0320】

小胞に由来し、小胞から解析することができるバイオマーカーは、miRNA (miR)、miRNA*ナンセンス (miR*) および他のRNA (mRNA、preRNA、priRNA、hnRNA、snRNA、siRNA、shRNAを含むが、これらに限定されない) を含む。miRNAバイオマーカーは、そのmiRNAおよびマイクロRNA*ナンセンスだけでなく、その前駆体分子、priマイクロRNA (pri-miR)、

50

およびpreマイクロRNA (pre-miR) をも含み得る。miRNAの配列は、公表されているデータベース、たとえば<http://www.mirbase.org/>、<http://www.microrna.org/>または使用可能な他のデータベースから得ることができる。断りない限り、miR、miRNAおよびマイクロRNAという用語は、全体を通して交換可能に使用される。いくつかの態様において、本発明の方法は、小胞を単離すること、および単離された小胞中のmiRNAペイロードを評価することを含む。バイオマーカーはまた、核酸分子（たとえばDNA）、タンパク質、またはペプチドであることもできる。バイオマーカーに関して、有無、発現レベル、突然変異（たとえば遺伝子突然変異、たとえば欠失、転座、重複、ヌクレオチドまたはアミノ酸置換など）を決定することができる。また、バイオマーカーの任意の後成的修飾またはコピー数変化を解析することもできる。

10

【0321】

分析される1つ以上のバイオマーカーは、特定の組織もしくは起始細胞、疾患、または生理的状态を示し得る。さらに、本明細書に記載のバイオマーカーのうちの1つまたは複数の存在、不在、または発現レベルは、疾患、病態、予後、または薬物の有効性を含む、対象の表現型と相関性があり得る。以下に記載される該特異的なバイオマーカーおよびバイオシグネチャーは、疾患、病態比較、病態、および／または生理的状态のそれぞれに対する非包括的な例を構成する。さらに、表現型に対して評価される1つ以上のバイオマーカーは、起始細胞に特異的な小胞であり得る。

【0322】

表現型を特徴決定するために使用される1つ以上のmiRNAは、国際公開公報第2009/036236号に開示されるものから選択される。例えば、表I～VI（図6～11）に列記される1つ以上のmiRNAを使用して、本明細書にさらに記載されるような、結腸腺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、B細胞リンパ腫、膵臓癌、びまん性大細胞型BCL癌、CLL、膀胱癌、腎臓癌、低酸素症腫瘍、子宮平滑筋腫、卵巣癌、C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌、ALL、アルツハイマー病、骨髄線維症、真性赤血球増加症、血小板血症、HIV、またはHIV-Iの潜伏を特徴決定することができる。

20

【0323】

該1つ以上のmiRNAは、小胞中で検出され得る。該1つ以上のmiRNAは、miR-223、miR-484、miR-191、miR-146a、miR-016、miR-026a、miR-222、miR-024、miR-126、およびmiR-32であり得る。1つ以上のmiRNAはまた、PBMC中でも検出され得る。該1つ以上のmiRNAは、miR-223、miR-150、miR-146b、miR-016、miR-484、miR-146a、miR-191、miR-026a、miR-019b、またはmiR-020aであり得る。該1つ以上のmiRNAを使用して、特定の疾患もしくは病態を特徴決定することができる。例えば、膀胱癌の疾患に関しては、miR-223、miR-26b、miR-221、miR-103-1、miR-185、miR-23b、miR-203、miR-17-5p、miR-23a、miR-205、または任意の組み合わせ等の1つ以上のmiRNAを検出することができる。該1つ以上のmiRNAは、上方制御または過剰発現され得る。

30

【0324】

幾つかの態様において、該1つ以上のmiRNAを使用して、低酸素症腫瘍を特徴決定する。該1つ以上のmiRNAは、miR-23、miR-24、miR-26、miR-27、miR-103、miR-107、miR-181、miR-210、またはmiR-213であり得、上方制御され得る。また、1つ以上のmiRNAを使用して、子宮平滑筋腫を特徴決定することもできる。例えば、子宮平滑筋腫を特徴決定するために使用される該1つ以上のmiRNAは、let-7ファミリーメンバー、miR-21、miR-23b、miR-29b、またはmiR-197であり得る。該miRNAは、上方制御したものであり得る。

40

【0325】

上方制御され得るmiR-190、下方制御され得るmiR-31、miR-150、およびmiR-95、またはこれらの任意の組み合わせ等の1つ以上のmiRNAによって、骨髄線維症を特徴決定することもできる。さらに、miR-34a、miR-342、miR-326、miR-105、miR-149、miR-147、またはこれらの任意の組み合わせ等があるが、これらに限定されない、1つ以上のmiRNAを検出することによって、骨髄線維症、真性赤血球増加症、または血小板血症を特徴決定することもできる。該1つ以上のmiRNAは、下方制御され得る。

50

【0326】

1つ以上のバイオマーカーについて小胞を評価することによって特徴決定することができる表現型の他の例をさらに本明細書に記載する。

【0327】

該1つ以上のバイオマーカーは、プローブを用いて検出され得る。プローブは、DNAもしくはRNA等のオリゴヌクレオチド、アプタマー、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、Fab、Fab'、一本鎖抗体、合成抗体、ペプチド、zDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、合成もしくは天然に存在する化学物質（薬物もしくは標識試薬が挙げられるが、これらに限定されない）、デンドリマー、またはこれらの任意の組み合わせ等を含み得る。該プローブは、例えば、直接標識することによって、直接的に検出され得るか、または標識試薬等を通して間接的に検出され得る。該プローブは、バイオマーカーに選択的に認識することができる。例えば、オリゴヌクレオチドであるプローブは、miRNAバイオマーカーに選択的にハイブリダイズすることができる。

10

【0328】

複数の局面において、本発明は、対象における疾患または障害の診断、セラノーシス、予後判定、疾患層別化、病期決定、治療モニタリング、または応答者／非応答者状態の予測を提供する。本発明は、小胞表面上に存在するバイオマーカーを評価することを含む、対象由来の小胞を評価すること、および／または小胞内のペイロード、たとえばタンパク質、核酸、または他の生物学的分子を評価することを含む。小胞を使用して評価することができ、疾患または障害に関連する任意の適切なバイオマーカーを使用して、本発明の方法を実施することができる。さらに、本明細書に記載されるような小胞を評価するために任意の適切な技術を使用することができる。本発明の方法により評価されうる特定の疾患に対する例示的なバイオマーカーには、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号に記載されたバイオマーカーが含まれる。

20

【0329】

バイオシグネチャーを同定するために、または候補バイオシグネチャーを同定するために、本明細書に記載の任意のタイプのバイオマーカーまたは特異的バイオマーカーを評価することができる。例示的なバイオマーカーには、表5のバイオマーカーが含まれるが、それに限定されるわけではない。本明細書において開示された表現型を特徴決定するための小胞を捕捉および／または検出するために、表のマーカーを使用することができる。場合によっては、特徴決定を向上させるために、複数回の捕捉および／または検出が用いられる。マーカーはタンパク質として検出されてもよく、mRNAとして検出されてもよく、これらは遊離的に循環していてもよく、他の生物学的分子との複合体中であってもよい。マーカーは小胞表面抗原として検出されてもよく、小胞ペイロードとして検出されてもよい。「例示的なクラス」は、公知のマーカーであるマーカーの表示を示す。当業者であれば、ある特定の場、これらのマーカーを代替りの状況でも使用できることを理解するであろう。例えば、あるタイプの疾患を特徴決定するために使用することができるマーカーを、適宜、別の疾患を特徴決定するために使用することもできる。様々な系統に由来する腫瘍に関するバイオマーカーとして使用できる腫瘍マーカーの非限定的な例を考慮されたい。

30

40

【0330】

（表5）例示的な小胞結合バイオマーカー

例示的なクラス	バイオマーカー
薬物関連標的 および 予後マーカー	ABCC1, ABCG2, ACE2, ADA, ADH1C, ADH4, AGT, AR, AREG, ASNS, BCL2, BCRP, BDCA1, β IIIチューブリン, BIRC5, B-RAF, BRCA1, BRCA2, CA2, カベオリン, CD20, CD25, CD33, CD52, CDA, CDKN2A, CDKN1A, CDKN1B, CDK2, CDW52, CES2, CK 14, CK 17, CK 5/6, c-KIT, c-Met, c-Myc, COX-2, サイクリン D1, DCK, DHFR, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, E-カドヘリン, ECGF1, EGFR, EML4-ALK 融合体, EPHA2, エピレグリン, ER, ERBR2, ERCC1, ERCC3, EREG, ESR1, FLT1, 葉酸受容体, FOLR1, FOLR2, FSHB, FSHPRH1, FSHR, FYN, GART, GNA11, GNAQ, GNRH1, GNRHR1, GSTP1, HCK, HDAC1, hENT-1, Her2/Neu, HGF, HIF1A, HIG1, HSP90, HSP90AA1, HSPCA, IGF-1R, IGFRBP, IGFRBP3, IGFRBP4, IGFRBP5, IL13RA1, IL2RA, KDR, Ki67, KIT, K-RAS, LCK, LTB, リンホトキシン β 受容体, LYN, MET, MGMT, MLH1, MMR, MRP1, MS4A1, MSH2, MSH5, Myc, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NRAS, ODC1, OGFR, p16, p21, p27, p53, p95, PARP-1, PDGFC, PDGFR, PDGFRA, PDGFRB, PGP, PGR, PI3K, POLA, POLA1, PPARG, PPARGC1, PR, PTEN, PTGS2, PTPN12, RAF1, RARA, ROS1, RRM1, RRM2, RRM2B, RXRB, RXRG, SIK2, SPARC, SRC, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5, サバイビン, TK1, TLE3, TNF, TOP1, TOP2A, TOP2B, TS, TUBB3, TXN, TXNRD1, TYMS, VDR, VEGF, VEGFA, VEGFC, VHL, YES1, ZAP70
癌治療関連マーカー	AR, AREG (アンフィレギュリン), BRAF, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERBB4, ERCC1, EREG, GNA11, GNAQ, hENT-1, Her2, Her2 エキソン 20 インサート, IGF1R, Ki67, KRAS, MGMT, MGMT メチル化, MSH2, MSI, NRAS, PGP (MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, ROS1, ROS1 転座, RRM1, SPARC, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS, TUBB3, VEGFR2
癌治療関連マーカー	AR, AREG, BRAF, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERBB4, ERCC1, EREG, GNA11, GNAQ, Her2, Her2 エキソン 20 インサート, IGF1R, Ki67, KRAS, MGMT-Me, MSH2, MSI, NRAS, PGP (MDR-1), PIK3CA, PR, PTEN, ROS1 転座, RRM1, SPARC, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS, TUBB3, VEGFR2
結腸癌治療関連マーカー	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
結腸癌治療関連マーカー	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
黒色腫治療関連マーカー	BRAF, cKIT, ERBB3, ERBB4, ERCC1, GNA11, GNAQ, MGMT, MGMT メチル化, NRAS, PIK3CA, TUBB3, VEGFR2
黒色腫治療関連マーカー	BRAF, cKIT, ERBB3, ERBB4, ERCC1, GNA11, GNAQ, MGMT-Me, NRAS, PIK3CA, TUBB3, VEGFR2
卵巣癌治療関連マーカー	BRCA1, cMET, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, hENT-1, HER2, IGF1R, PGP(MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
卵巣癌治療関連マーカー	BRCA1, cMET, EML4-ALK(転座), ER, ERBB3, ERCC1, HER2, PIK3CA, PR, PTEN, RRM1, TLE3, TS
乳癌治療関連マーカー	BRAF, BRCA1, EGFR, EGFR T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, HER2, Ki67, PGP (MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, ROS1, ROS1 転座, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
乳癌治療関連マーカー	BRAF, BRCA1, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, HER2, Ki67, KRAS, PIK3CA, PR, PTEN, ROS1 転座, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
NSCLC癌治療関連マーカー	BRAF, BRCA1, cMET, EGFR, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ERCC1, Her2 エキソン 20 インサート, KRAS, MSH2, PIK3CA, PTEN, ROS1 (トランス), RRM1, TLE3, TS, VEGFR2

10

20

30

40

NSCLC癌治療関連 マーカー	BRAF, cMET, EGFR, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ERCC1, Her2 エキソン20 インサート, KRAS, MSH2, PIK3CA, PTEN, ROS1 転座, RRM1, TLE3, TS
癌/血管	Erb 2, Erb 3, Erb 4, UNC93a, B7H3, MUC1, MUC2, MUC16, MUC17, 5T4, RAGE, VEGF A, VEGFR2, FLT1, DLL4, Epcam
組織(乳房)	BIG H3, GCDFP-15, PR(B), GPR 30, CYFRA 21, BRCA 1, BRCA 2, ESR 1, ESR2
組織(前立腺)	PSMA, PCSA, PSCA, PSA, TMPRSS2
炎症/免疫	MFG-E8, IFNAR, CD40, CD80, MICB, HLA-DRb, IL-17-Ra
一般の小胞 マーカー	HSPA8, CD63, Actb, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, HSP90AA1, ENO1, YWHAZ, PDCD6IP, CFL1, SDCBP, PKN2, MSN, MFGE8, EZR, YWHAG, PGK1, EEF1A1, PPIA, GLC1F, GK, ANXA6, ANXA1, ALDOA, ACTG1, TPI1, LAMP2, HSP90AB1, DPP4, YWHAB, TSG101, PFN1, LDHB, HSPA1B, HSPA1A, GSTP1, GNAI2, GDI2, CLTC, ANXA5, YWHAQ, TUBA1A, THBS1, PRDX1, LDHA, LAMP1, CLU, CD86
一般の小胞膜 マーカー	CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, CD86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, C1orf58, BASP1, TACSTD1, STOM
一般の小胞 マーカー	MHC クラス I, MHC クラス II, インテグリン類, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha M \beta 2$, $\beta 2$, ICAM1/CD54, P-セレクチン, ジペプチジルペプチダーゼIV/CD26, アミノペプチダーゼ n/CD13, CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9, CD63, Hsp70, Hsp84/90アクチン, アクチン結合タンパク質, チューブリン, アネキシンI, アネキシンII, アネキシンIV, アネキシンV, アネキシンVI, RAB7/RAP1B/RADGDI, Gi2 α /14-3-3, CBL/LCK, CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, Cd86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, C1orf58, BASP1, TACSTD1, STOM
小胞マーカー	A33, a33 n15, AFP, ALA, ALIX, ALP, アネキシンV, APC, ASCA, ASPH (246- 260), ASPH (666-680), ASPH (A-10), ASPH (D01P), ASPH (D03), ASPH (G- 20), ASPH (H-300), AURKA, AURKB, B7H3, B7H4, BCA-225, BCNP, BDNF, BRCA, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir, CD1.1, CD10, CD174 (Lewis y), CD24, CD44, CD46, CD59 (MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD73, CD81, CD9, CDA, CDAC1 1a2, CEA, C-Erb2, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CXCL12, CYFRA21-1, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, EphA2 (H-77), ER, ErbB4, EZH2, FASL, FRT, FRT c.f23, GDF15, GPCR, GPR30, Gro- α , HAP, HBD 1, HBD2, HER 3 (ErbB3), HSP, HSP70, hVEGFR2, iC3b, IL 6 Unc, IL-1B, IL6 Unc, IL6R, IL8, IL-8, INSIG-2, KLK2, L1CAM, LAMN, LDH, MACC-1, MAPK4, MART-1, MCP-1, M-CSF, MFG-E8, MIC1, MIF, MIS RII, MMG, MMP26, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC1 seq1, MUC1 seq11A, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NPGP/NPFF2, OPG, OPN, p53, p53, PA2G4, PBP, PCSA, PDGFRB, PGP9.5, PIM1, PR (B), PRL, PSA, PSMA, PSME3, PTEN, R5- CD9 Tube 1, Reg IV, RUNX2, SCRNI, セプラーゼ, SERPINB3, SPARC, SPB, SPDEF, SRVN, STAT 3, STEAP1, TF (FL-295), TFF3, TGM2, TIMP-1, TIMP1, TIMP2, TMEM211, TMPRSS2, TNF- α , Trail-R2, Trail-R4, TrKB, TROP2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VEGF A, YPSMA-1
小胞マーカー	NSE, TRIM29, CD63, CD151, ASPH, LAMP2, TSPAN1, SNAIL, CD45, CKS1, NSE, FSHR, OPN, FTH1, PGP9, アネキシン 1, SPD, CD81, EPCAM, PTH1R, CEA, CYTO 7, CCL2, SPA, KRAS, TWIST1, AURKB, MMP9, P27, MMP1, HLA, HIF, CEACAM, CENPH, BTUB, INTG b4, EGFR, NACC1, CYTO 18, NAP2, CYTO 19, アネキシン V, TGM2, ERB2, BRCA1, B7H3, SFTPC, PNT, NCAM, MS4A1, P53, INGA3, MUC2, SPA, OPN, CD63, CD9, MUC1, UNCR3, PAN ADH, HCG, TIMP, PSMA, GPCR, RACK1, PSCA, VEGF, BMP2, CD81, CRP, PRO GRP, B7H3, MUC1, M2PK, CD9, PCSA, PSMA
小胞マーカー	TFF3, MS4A1, EphA2, GAL3, EGFR, N-gal, PCSA, CD63, MUC1, TGM2,

10

20

30

40

	CD81, DR3, MACC-1, TrKB, CD24, TIMP-1, A33, CD66 CEA, PRL, MMP9, MMP7, TMEM211, SCRNI, TROP2, TWEAK, CDACC1, UNC93A, APC, C-Erb, CD10, BDNF, FRT, GPR30, P53, SPR, OPN, MUC2, GRO-1, tsg 101, GDF15
小胞マーカー	CD9, Erb2, Erb4, CD81, Erb3, MUC16, CD63, DLL4, HLA-Drpe, B7H3, IFNAR, 5T4, PCSA, MICB, PSMA, MFG-E8, Muc1, PSA, Muc2, Unc93a, VEGFR2, EpCAM, VEGF A, TMPRSS2, RAGE, PSCA, CD40, Muc17, IL-17-RA, CD80
良性前立腺肥大症(BPH)	BCMA, CEACAM-1, HVEM, IL-1 R4, IL-10 Rb, トラッピン-2, p53, hsa-miR-329, hsa-miR-30a, hsa-miR-335, hsa-miR-152, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-200a, hsa-miR-145, hsa-miR-29a, hsa-miR-106b, hsa-miR-595, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-99a, hsa-miR-20b, hsa-miR-373, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-29b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-663, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-15a, hsa-miR-888, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-365, hsa-miR-10b, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-181a, hsa-miR-19a, hsa-miR-125b, hsa-miR-760, hsa-miR-7a, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-7c, hsa-miR-1979, hsa-miR-103
転移性前立腺癌	hsa-miR-100, hsa-miR-1236, hsa-miR-1296, hsa-miR-141, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-200b, hsa-miR-20a*, hsa-miR-23a*, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-452, hsa-miR-572, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-937, miR-10a, miR-134, miR-141, miR-200b, miR-30a, miR-32, miR-375, miR-495, miR-564, miR-570, miR-574-3p, miR-885-3p
転移性前立腺癌	hsa-miR-200b, hsa-miR-375, hsa-miR-141, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-181a, hsa-miR-574-3p
前立腺癌	hsa-miR-574-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-432, hsa-miR-326, hsa-miR-2110, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-107, hsa-miR-301a, hsa-miR-484, hsa-miR-625*
転移性前立腺癌	hsa-miR-582-3p, hsa-miR-20a*, hsa-miR-375, hsa-miR-200b, hsa-miR-379, hsa-miR-572, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-23a*, hsa-miR-1236, hsa-miR-609, hsa-miR-17*, hsa-miR-130b, hsa-miR-619, hsa-miR-624*, hsa-miR-198
転移性前立腺癌	FOXO1A, SOX9, CLNS1A, PTGDS, XPO1, LETMD1, RAD23B, ABCC3, APC, CHES1, EDNRA, FRZB, HSPG2, TMPRSS2 ETV1 融合体
前立腺癌	hsa-let-7b, hsa-miR-107, hsa-miR-1205, hsa-miR-1270, hsa-miR-130b, hsa-miR-141, hsa-miR-143, hsa-miR-148b*, hsa-miR-150, hsa-miR-154*, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-18a*, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-204, hsa-miR-2110, hsa-miR-215, hsa-miR-217, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-23b*, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-301a, hsa-miR-301a, hsa-miR-326, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-365*, hsa-miR-373*, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-432, hsa-miR-450a, hsa-miR-451, hsa-miR-484, hsa-miR-497, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-518f, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-595, hsa-miR-617, hsa-miR-625*, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-634, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-93, hsa-miR-96
前立腺癌	CD9, PSMA, PCSA, CD63, CD81, B7H3, IL 6, OPG-13, IL6R, PA2G4, EZH2, RUNX2, SERPINB3, EpCam
前立腺癌	A33, a33 n15, AFP, ALA, ALIX, ALP, アネキシンV, APC, ASCA, ASPH (246-260), ASPH (666-680), ASPH (A-10), ASPH (D01P), ASPH (D03), ASPH (G-20), ASPH (H-300), AURKA, AURKB, B7H3, B7H4, BCA-225, BCNP, BDNF, BRCA, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir, CD1.1, CD10, CD174 (Lewis y), CD24, CD44, CD46, CD59 (MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD73, CD81, CD9, CDA, CDAC1 1a2, CEA, C-Erb2, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CXCL12, CYFRA21-1, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, EphA2 (H-77), ER, ErbB4, EZH2, FASL, FRT, FRT c.f23, GDF15, GPCR, GPR30, Gro- α , HAP, HBD 1, HBD2, HER 3 (ErbB3), HSP, HSP70, hVEGFR2, iC3b, IL 6 Unc, IL-1B, IL6 Unc, IL6R, IL8, IL-8, INSIG-2, KLK2, L1CAM, LAMN, LDH, MACC-1, MAPK4, MART-1, MCP-1, M-CSF, MFG-E8, MIC1, MIF, MIS RII, MMG, MMP26, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC1 seq1, MUC1 seq11A, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NPGP/NPFF2, OPG, OPN, p53, p53, PA2G4, PBP, PCSA, PDGFRB, PGP9.5, PIM1, PR (B), PRL, PSA, PSMA, PSME3, PTEN, R5-CD9 Tube 1, Reg IV, RUNX2, SCRNI, セブラーゼ, SERPINB3, SPARC, SPB, SPDEF, SRVN, STAT 3, STEAP1, TF (FL-295), TFF3, TGM2, TIMP-1, TIMP1, TIMP2, TMEM211, TMPRSS2, TNF- α , Trail-R2, Trail-R4, TrKB, TROP2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VEGF A, YPSMA-1
前立腺癌 小胞マーカー	5T4, ACTG1, ADAM10, ADAM15, ALDOA, ANXA2, ANXA6, APOA1, ATP1A1, BASP1, C1orf158, C20orf114, C8B, CAPZA1, CAV1, CD151, CD2AP,

10

20

30

40

	CD59, CD9, CD9, CFL1, CFP, CHMP4B, CLTC, COTL1, CTNND1, CTSB, CTSZ, CYCS, DPP4, EEF1A1, EHD1, ENO1, F11R, F2, F5, FAM125A, FNBP1L, FOLH1, GAPDH, GLB1, GPX3, HIST1H1C, HIST1H2AB, HSP90AB1, HSPA1B, HSPA8, IGSF8, ITGB1, ITIH3, JUP, LDHA, LDHB, LUM, LYZ, MFG E8, MGAM, MMP9, MYH2, MYL6B, NME1, NME2, PABPC1, PABPC4, PACSIN2, PCBP2, PDCD6IP, PRDX2, PSA, PSMA, PSMA1, PSMA2, PSMA4, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB8, PTGFRN, RPS27A, SDCBP, SERINC5, SH3GL1, SLC3A2, SMPDL3B, SNX9, TACSTD1, TCN2, THBS1, TPI1, TSG101, TUBB, VDAC2, VPS37B, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ	
前立腺癌 小胞マーカー	FLNA, DCRN, HER 3 (ErbB3), VCAN, CD9, GAL3, CDADC1, GM-CSF, EGFR, RANK, CSA, PSMA, トリ IgY, B7H3, PCSA, CD63, CD3, MUC1, TGM2, CD81, S100-A4, MFG-E8, インテグリン, NK-2R(C-21), PSA, CD24, TIMP-1, IL6 Unc, PBP, PIM1, CA-19-9, Trail-R4, MMP9, PRL, EphA2, TWEAK, NY-ESO-1, マンマグロビン, UNC93A, A33, AURKB, CD41, XAGE-1, SPDEF, AMACR, セプラーゼ/FAP, NGAL, CXCL12, FRT, CD66e CEA, SIM2 (C-15), C-Bir, STEAP, PSIP1/LEDGF, MUC17, hVEGFR2, ERG, MUC2, ADAM10, ASPH (A-10), CA125, Gro- α , Tsg 101, SSX2, Trail-R4	10
前立腺癌 小胞マーカー	NT5E (CD73), A33, ABL2, ADAM10, AFP, ALA, ALIX, ALPL, AMACR, Apo J/CLU, ASCA, ASPH (A-10), ASPH (D01P), AURKB, B7H3, B7H4, BCNP, BDNF, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir (フラゲリン), CD10, CD151, CD24, CD3, CD41, CD44, CD46, CD59(MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD81, CD9, CDA, CDADC1, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CSA, CXCL12, CXCR3, CYFRA21-1, DCRN, DDX-1, DLL4, EGFR, EpCAM, EphA2, ERG, EZH2, FASL, FLNA, FRT, GAL3, GATA2, GM-CSF, Gro- α , HAP, HER3 (ErbB3), HSP70, HSPB1, hVEGFR2, iC3b, IL-1B, IL6 R, IL6 Unc, IL7 R α /CD127, IL8, INSIG-2, インテグリン, KLK2, Label, LAMN, マンマグロビン, M-CSF, MFG-E8, MIF, MIS RII, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC17, MUC2, Ncam, NDUFB7, NGAL, NK-2R(C-21), NY-ESO-1, p53, PBP, PCSA, PDGFRB, PIM1, PRL, PSA, PSIP1/LEDGF, PSMA, RAGE, RANK, Reg IV, RUNX2, S100-A4, セプラーゼ/FAP, SERPINB3, SIM2 (C-15), SPARC, SPC, SPDEF, SPP1, SSX2, SSX4, STEAP, STEAP4, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, Trail-R2, Trail-R4, TrKB (ポリ), Trop2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VCAN, VEGF A, wnt-5a(C-16), XAGE, XAGE-1	20
前立腺癌治療	hsa-miR-1974, hsa-miR-27b, hsa-miR-103, hsa-miR-146a, hsa-miR-22, hsa-miR-382, hsa-miR-23a, hsa-miR-376c, hsa-miR-335, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-221, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-16	
前立腺癌	let-7d, miR-148a, miR-195, miR-25, miR-26b, miR-329, miR-376c, miR-574-3p, miR-888, miR-9, miR1204, miR-16-2*, miR-497, miR-588, miR-614, miR-765, miR92b*, miR-938, let-7f-2*, miR-300, miR-523, miR-525-5p, miR-1182, miR-1244, miR-520d-3p, miR-379, let-7b, miR-125a-3p, miR-1296, miR-134, miR-149, miR-150, miR-187, miR-32, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-342-3p, miR-378, miR-378*, miR-384, miR-451, miR-455-3p, miR-485-3p, miR-487a, miR-490-3p, miR-502-5p, miR-548a-5p, miR-550, miR-562, miR-593, miR-593*, miR-595, miR-602, miR-603, miR-654-5p, miR-877*, miR-886-5p, miR-125a-5p, miR-140-3p, miR-192, miR-196a, miR-2110, miR-212, miR-222, miR-224*, miR-30b*, miR-499-3p, miR-505*	30
前立腺癌	hsa-miR-451, hsa-miR-223, hsa-miR-593*, hsa-miR-1974, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-19b, hsa-miR-320b, hsa-miR-92a, hsa-miR-21, hsa-miR-675*, hsa-miR-16, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-144, hsa-miR-126, hsa-miR-137, hsa-miR-1913, hsa-miR-29b-1*, hsa-miR-15a, hsa-miR-93, hsa-miR-1266	40
前立腺癌	miR-148a, miR-329, miR-9, miR-378*, miR-25, miR-614, miR-518c*, miR-378, miR-765, let-7f-2*, miR-574-3p, miR-497, miR-32, miR-379, miR-520g, miR-542-5p, miR-342-3p, miR-1206, miR-663, miR-222	
前立腺癌	hsa-miR-877*, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-300, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-329, hsa-miR-550, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-603, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-938, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-1296, hsa-miR-384, hsa-miR-487a, hsa-miRPlus-C1089, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-525-5p	
前立腺癌	miR-588, miR-1258, miR-16-2*, miR-938, miR-526b, miR-92b*, let-7d, miR-378*, miR-124, miR-376c, miR-26b, miR-1204, miR-574-3p, miR-195, miR-499-3p, miR-2110, miR-888	
前立腺 (PCSA+ cMV)	miR-182, miR-663, miR-155, miR-125a-5p, miR-548a-5p, miR-628-5p, miR-517*,	

	miR-450a, miR-920, hsa-miR-619, miR-1913, miR-224*, miR-502-5p, miR-888, miR-376a, miR-542-5p, miR-30b* およびmiR-1179
前立腺癌	miR-183-96-182 クラスター (miRs-183, 96 および 182), 金属イオン輸送体、例えば、hZIP1, SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14
前立腺癌	RAD23B, FBP1, TNFRSF1A, CCNG2, NOTCH3, ETV1, BID, SIM2, LETMD1, ANXA1, miR-519d, および miR-647
前立腺癌	RAD23B, FBP1, TNFRSF1A, NOTCH3, ETV1, BID, SIM2, ANXA1および BCL2
前立腺癌	ANPEP, ABL1, PSCA, EFNA1, HSPB1, INMT および TRIP13
前立腺癌	E2F3, c-met, pRB, EZH2, e-cad, CAXII, CAIX, HIF-1 α , Jagged, PIM-1, ヘプシン, RECK, クラスレリン, MMP9, MTSP-1, MMP24, MMP15, IGFBP-2, IGFBP-3, E2F4, カベオリン, EF-1A, カリクレイン 2, カリクレイン 3, PSGR
前立腺癌	A2ML1, BAX, C10orf47, C1orf162, CSDA, EIFC3, ETV1, GABARAPL2, GUK1, GZMH, HIST1H3B, HLA-A, HSP90AA1, NRG1, PRDX5, PTMA, RABAC1, RABAGAP1L, RPL22, SAP18, SEPW1, SOX1
cMVにおけるアンドロゲン受容体(AR)経路のメンバー	GTF2F1, CTNNB1, PTEN, APPL1, GAPDH, CDC37, PNRC1, AES, UXT, RAN, PA2G4, JUN, BAG1, UBE2I, HDAC1, COX5B, NCOR2, STUB1, HIPK3, PXN, NCOA4
cMVにおけるEGFR1経路のメンバー	RALBP1, SH3BGR1, RBBP7, REPS1, SNRPD2, CEBPB, APPL1, MAP3K3, EEF1A1, GRB2, RAC1, SNCA, MAP2K3, CEBPA, CDC42, SH3KBP1, CBL, PTPN6, YWHAB, FOXO1, JAK1, KRT8, RALGDS, SMAD2, VAV1, NDUFA13, PRKCB1, MYC, JUN, RFXANK, HDAC1, HIST3H3, PEBP1, PXN, TNIP1, PKN2
cMVにおけるTNF- α 経路のメンバー	BCL3, SMARCE1, RPS11, CDC37, RPL6, RPL8, PAPOLA, PSMC1, CASP3, AKT2, MAP3K7IP2, POLR2L, TRADD, SMARCA4, HIST3H3, GNB2L1, PSMD1, PEBP1, HSPB1, TNIP1, RPS13, ZFAND5, YWHAQ, COMMD1, COPS3, POLR1D, SMARCC2, MAP3K3, BIRC3, UBE2D2, HDAC2, CASP8, MCM7, PSMD7, YWHAG, NFKBIA, CAST, YWHAB, G3BP2, PSMD13, FBL, RELB, YWHAZ, SKP1, UBE2D3, PDCD2, HSP90AA1, HDAC1, KPNA2, RPL30, GTF2I, PFDN2
結腸直腸癌	CD9, EGFR, NGAL, CD81, STEAP, CD24, A33, CD66E, EPHA2, フェリチン, GPR30, GPR110, MMP9, OPN, p53, TMEM211, TROP2, TGM2, TIMP, EGFR, DR3, UNC93A, MUC17, EpCAM, MUC1, MUC2, TSG101, CD63, B7H3
結腸直腸癌	DR3, STEAP, epha2, TMEM211, unc93A, A33, CD24, NGAL, EpCam, MUC17, TROP2, TETS
結腸直腸癌	A33, AFP, ALIX, ALX4, ANCA, APC, ASCA, AURKA, AURKB, B7H3, BANK1, BCNP, BDNF, CA-19-9, CCSA-2, CCSA-3&4, CD10, CD24, CD44, CD63, CD66 CEA, CD66e CEA, CD81, CD9, CDA, C-Erb2, CRMP-2, CRP, CRTN, CXCL12, CYFRA21-1, DcR3, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, FASL, FRT, GAL3, GDF15, GPCR (GPR110), GPR30, GRO-1, HBD 1, HBD2, HNP1-3, IL-1B, IL8, IMP3, L1CAM, LAMN, MACC-1, MGC20553, MCP-1, M-CSF, MIC1, MIF, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NNMT, OPN, p53, PCSA, PDGFRB, PRL, PSMA, PSME3, Reg IV, SCRNI, Sept-9, SPARC, SPON2, SPR, SRVN, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, TNF- α , TPA, TPS, Trail-R2, Trail-R4, TrKB, TROP2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VEGFA
結腸直腸癌	miR 92, miR 21, miR 9, miR 491
結腸直腸癌	miR-127-3p, miR-92a, miR-486-3p, miR-378
結腸直腸癌	TMEM211, MUC1, CD24および/またはGPR110 (GPCR 110)
結腸直腸癌	hsa-miR-376c, hsa-miR-215, hsa-miR-652, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-190, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-202, hsa-miR-195
結腸直腸癌 小胞マーカ	A26C1A, A26C1B, A2M, ACAA2, ACE, ACOT7, ACP1, ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTBL2, ACTBL3, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTN1, ACTN2, ACTN4, ACTR3, ADAM10, ADSL, AGR2, AGR3, AGRN, AHCY, AHNK, AKR1B10, ALB, ALDH1A1, ALDH1A1, ALDOA, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA2P2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, AP2A1, AP2A2, APOA1, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARHGAP, ARPC3, ARPC5L, ARPC1, ARVCF, ASCC3L1, ASNS, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1B1, ATP4A, ATP5A1, ATP5B, ATP5I, ATP5L, ATP5O, ATP6AP2, B2M, BAIAP2,

10

20

30

40

	BAIAP2L1, BRI3BP, BSG, BUB3, C1orf58, C5orf32, CAD, CALM1, CALM2, CALM3, CAND1, CANX, CAPZA1, CBR1, CBR3, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8, CD44, CD46, CD55, CD59, CD63, CD81, CD82, CD9, CDC42, CDH1, CDH17, CEACAM5, CFL1, CFL2, CHMP1A, CHMP2A, CHMP4B, CKB, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC1, CLIC4, CLSTN1, CLTC, CLTCL1, CLU, COL12A1, COPB1, COPB2, CORO1C, COX4I1, COX5B, CRYZ, CSPG4, CSRP1, CST3, CTNNA1, CTNNB1, CTNND1, CTTN, CYFIP1, DCD, DERA, DIP2A, DIP2B, DIP2C, DMBT1, DPEP1, DPP4, DYNC1H1, EDIL3, EEF1A1, EEF1A2, EEF1AL3, EEF1G, EEF2, EFNBI, EGFR, EHD1, EHD4, EIF3EIP, EIF3I, EIF4A1, EIF4A2, ENO1, ENO2, ENO3, EPHA2, EPHA5, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPPK1, ESD, EZR, F11R, F5, F7, FAM125A, FAM125B, FAM129B, FASLG, FASN, FAT, FCGBP, FER1L3, FKBP1A, FLNA, FLNB, FLOT1, FLOT2, G6PD, GAPDH, GARS, GCN1L1, GDI2, GK, GMDS, GNA13, GNAI2, GNAI3, GNAS, GNB1, GNB2, GNB2L1, GNB3, GNB4, GNG12, GOLGA7, GPA33, GPI, GPRC5A, GSN, GSTP1, H2AFJ, HADHA, hCG_1757335, HEPH, HIST1H2AB, HIST1H2AE, HIST1H2AJ, HIST1H2AK, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4F, HIST1H4H, HIST1H4I, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H4L, HIST2H2AC, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST3H2A, HIST4H4, HLA-A, HLA-A29.1, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-H, HNRNPA2B1, HNRNP2, HPCAL1, HRAS, HSD17B4, HSP90AA1, HSP90AA2, HSP90AA4P, HSP90AB1, HSP90AB2P, HSP90AB3P, HSP90B1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA9, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, IDH1, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IGH@, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM, IGHV4-31, IGK@, IGKC, IGKV1-5, IGKV2-24, IGKV3-20, IGSF3, IGSF8, IQGAP1, IQGAP2, ITGA2, ITGA3, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB4, JUP, KIAA0174, KIAA1199, KPNB1, KRAS, KRT1, KRT10, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT2, KRT20, KRT24, KRT25, KRT27, KRT28, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT75, KRT76, KRT77, KRT79, KRT8, KRT9, LAMA5, LAMP1, LDHA, LDHB, LFNG, LGALS3, LGALS3BP, LGALS4, LIMA1, LIN7A, LIN7C, LOC100128936, LOC100130553, LOC100133382, LOC100133739, LOC284889, LOC388524, LOC388720, LOC442497, LOC653269, LRP4, LRPPRC, LRSAM1, LSR, LYZ, MAN1A1, MAP4K4, MARCKS, MARCKSL1, METRNL, MFGE8, MICA, MIF, MINK1, MITD1, MMP7, MOBKL1A, MSN, MTCH2, MUC13, MYADM, MYH10, MYH11, MYH14, MYH9, MYL6, MYL6B, MYO1C, MYO1D, NARS, NCALD, NCSTN, NEDD4, NEDD4L, NME1, NME2, NOTCH1, NQO1, NRAS, P4HB, PCBP1, PCNA, PCSK9, PDCD6, PDCD6IP, PDIA3, PDXK, PEBP1, PFN1, PGK1, PHB, PHB2, PKM2, PLEC1, PLEKHB2, PLSCR3, PLXNA1, PLXNB2, PPIA, PPIB, PPP2R1A, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKAR2A, PRKDC, PRSS23, PSMA2, PSMC6, PSMD11, PSMD3, PSME3, PTGFRN, PTPRF, PYGB, QPCT, QSOX1, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB13, RAB14, RAB15, RAB1A, RAB1B, RAB2A, RAB33B, RAB35, RAB43, RAB4B, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB6B, RAB7A, RAB8A, RAB8B, RAC1, RAC3, RALA, RALB, RAN, RANP1, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B, RAP2C, RDX, REG4, RHOA, RHOC, RHOG, ROCK2, RP11-631M21.2, RPL10A, RPL12, RPL6, RPL8, RPLP0, RPLP0-like, RPLP1, RPLP2, RPN1, RPS13, RPS14, RPS15A, RPS16, RPS18, RPS20, RPS21, RPS27A, RPS3, RPS4X, RPS4Y1, RPS4Y2, RPS7, RPS8, RPSA, RPSAP15, RRAS, RRAS2, RUVBL1, RUVBL2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A6, S100P, SDC1, SDC4, SDCBP, SDCBP2, SERINC1, SERINC5, SERPINA1, SERPINF1, SETD4, SFN, SLC12A2, SLC12A7, SLC16A1, SLC1A5, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC29A1, SLC2A1, SLC3A2, SLC44A1, SLC7A5, SLC9A3R1, SMPDL3B, SNAP23, SND1, SOD1, SORT1, SPTAN1, SPTBN1, SSBP1, SSR4, TACSTD1, TAGLN2, TBCA, TCEB1, TCP1, TF, TFRC, THBS1, TJP2, TKT, TMED2, TNFSF10, TNIK, TNKS1BP1, TNPO3, TOLLIP, TOMM22, TPI1, TPM1, TRAP1, TSG101, TSPAN1, TSPAN14, TSPAN15, TSPAN6, TSPAN8, TSTA3, TTYH3, TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA3C, TUBA3D, TUBA3E, TUBA4A, TUBA4B, TUBA8, TUBB, TUBB2A, TUBB2B, TUBB2C, TUBB3, TUBB4, TUBB4Q, TUBB6, TUFM, TXN, UBA1, UBA52, UBB, UBC,	10 20 30 40
--	---	---

	UBE2N, UBE2V2, UGDH, UQCRC2, VAMP1, VAMP3, VAMP8, VCP, VIL1, VPS25, VPS28, VPS35, VPS36, VPS37B, VPS37C, WDR1, YWHAB, YWHAH, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ
結腸直腸癌	hsa-miR-16, hsa-miR-25, hsa-miR-125b, hsa-miR-451, hsa-miR-200c, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-658, hsa-miR-370, hsa-miR-1296, hsa-miR-636, hsa-miR-502-5p
前立腺癌	NY-ESO-1, SSX-2, SSX-4, XAGE-1b, AMACR, p90 自己抗原, LEDGF
乳癌	miR-21, miR-155, miR-206, miR-122a, miR-210, miR-21, miR-155, miR-206, miR-122a, miR-210, let-7, miR-10b, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-143, miR-145, miR-1b
乳癌	GAS5
乳癌	ER, PR, HER2, MUC1, EGFR, KRAS, B-Raf, CYP2D6, hsp70, MART-1, TRP, HER2, hsp70, MART-1, TRP, HER2, ER, PR, クラス IIIb-チューブリン, VEGFA, ETV6-NTRK3, BCA-225, hsp70, MART1, ER, VEGFA, クラス IIIb-チューブリン, HER2/neu (例えばHer2+ 乳癌の場合), GPR30, ErbB4 (JM)アイソフォーム, MPR8, MISIIR, CD9, EphA2, EGFR, B7H3, PSM, PCSA, CD63, STEAP, CD81, ICAM1, A33, DR3, CD66e, MFG-E8, TROP-2, マンマグロビン, ヘプシン, NPGP/NPFF2, PSCA, 5T4, NGAL, EpCam, ニューロキニン受容体-1(NK-1またはNK-1R), NK-2, Pai-1, CD45, CD10, HER2/ERBB2, AGTR1, NPY1R, MUC1, ESA, CD133, GPR30, BCA225, CD24, CA15.3 (MUC1 分泌型), CA27.29 (MUC1 分泌型), NMDAR1, NMDAR2, MAGEA, CTAG1B, NY-ESO-1, SPB, SPC, NSE, PGP9.5, プロゲステロン受容体(PR)またはそのアイソフォーム (PR(A)ま P2RX7, NDUFB7, NSE, GAL3, オステオポンチン, CHI3L1, IC3b, メソテリン, S AQP5, GPCR, hCEA-CAM, PTP IA-2, CABYR, TMEM211, ADAM28, UNC93A, MUC17, MUC2, IL10R-β, BCMA, HVEM/TNFRSF14, トラップリン-2, エラフィン, ST2/IL1 R4, TNFRF14, CEACAM1, TPA1, LAMP, WF, WH1000, PECAM, BSA, TNFR
乳癌	CD9, MIS Rii, ER, CD63, MUC1, HER3, STAT3, VEGFA, BCA, CA125, CD24, EPCAM, ERB B4
乳癌	CD10, NPGP/NPFF2, HER2/ERBB2, AGTR1, NPY1R, ニューロキニン受容体-1 (NK-1またはNK-1R), NK-2, MUC1, ESA, CD133, GPR30, BCA225, CD24, CA15.3 (MUC1 分泌型), CA27.29 (MUC1 分泌型), NMDAR1, NMDAR2, MAGEA, CTAG1B, NY-ESO-1
乳癌	SPB, SPC, NSE, PGP9.5, CD9, P2RX7, NDUFB7, NSE, GAL3, オステオポンチン, CHI3L1, EGFR, B7H3, IC3b, MUC1, メソテリン, SPA, PCSA, CD63, STEAP, AQP5, CD81, DR3, PSM, GPCR, EphA2, hCEA-CAM, PTP IA-2, CABYR, TMEM211, ADAM28, UNC93A, A33, CD24, CD10, NGAL, EpCam, MUC17, TROP-2, MUC2, IL10R-β, BCMA, HVEM/TNFRSF14, トラップリン-2 エラフィン, ST2/IL1 R4, TNFRF14, CEACAM1, TPA1, LAMP, WF, WH1000, PECAM, BSA, TNFR
乳癌	BRCA, MUC-1, MUC 16, CD24, ErbB4, ErbB2 (HER2), ErbB3, HSP70, マンマグロビン, PR, PR(B), VEGFA
乳癌	CD9, HSP70, Gal3, MIS, EGFR, ER, ICB3, CD63, B7H4, MUC1, DLL4, CD81, ERB3, VEGF, BCA225, BRCA, CA125, CD174, CD24, ERB2, NGAL, GPR30, CYFRA21, CD31, cMET, MUC2, ERBB4
乳癌	CD9, EphA2, EGFR, B7H3, PSMA, PCSA, CD63, STEAP, CD81, STEAP1, ICAM1 (CD54), PSMA, A33, DR3, CD66e, MFG-8e, TMEM211, TROP-2, EGFR, マンマグロビン, ヘプシン, NPGP/NPFF2, PSCA, 5T4, NGAL, NK-2, EpCam, NK-1R, PSMA, 5T4, PAI-1, CD45
乳癌	PGP9.5, CD9, HSP70, gal3-b2c10, EGFR, iC3b, PSMA, PCSA, CD63, MUC1, DLL4, CD81, B7-H3, HER 3 (ErbB3), MART-1, PSA, VEGF A, TIMP-1, GPCR GPR110, EphA2, MMP9, mmp7, TMEM211, UNC93a, BRCA, CA125 (MUC16), マンマグロビン, CD174 (Lewis y), CD66e CEA, CD24 c.sn3, C-erbB2, CD10, NGAL, epcam, CEA (癌胎児性抗原), GPR30, CYFRA21-1, OPN, MUC17, hVEGFR2, MUC2, NCAM, ASPH, ErbB4, SPB, SPC, CD9, MS4A1, EphA2, MIS RII, HER2 (ErbB2), ER, PR (B), MRP8, CD63, B7H4, TGM2, CD81, DR3, STAT 3, MACC-1, TrKB, IL 6 Unc, OPG - 13, IL6R, EZH2, SCRNI, TWEAK, SERPINB3, CDAC1, BCA-225, DR3, A33, NPGP/NPFF2, TIMP1, BDNF, FRT, フェリチン重鎖, セプラーゼ, p53, LDH, HSP, ost, p53,

10

20

30

40

	CXCL12, HAP, CRP, Gro- α , Tsg 101, GDF15
乳癌	CD9, HSP70, Gal3, MIS (RII), EGFR, ER, ICB3, CD63, B7H4, MUC1, CD81, ERB3, MART1, STAT3, VEGF, BCA225, BRCA, CA125, CD174, CD24, ERB2, NGAL, GPR30, CYFRA21, CD31, cMET, MUC2, ERB4, TMEM211
乳癌	5T4 (栄養芽細胞), ADAM10, AGER/RAGE, APC, APP (β -アミロイド), ASPH (A-10), B7H3 (CD276), BACE1, BAI3, BRCA1, BDNF, BIRC2, C1GALT1, CA125 (MUC16), カルモジュリン 1, CCL2 (MCP-1), CD9, CD10, CD127 (IL7R), CD174, CD24, CD44, CD63, CD81, CEA, CRMP-2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CYFRA 21, デルリン1, DLL4, DPP6, E-CAD, EpCaM, EphA2 (H-77), ER(1) ESR1 α , ER(2) ESR2 β , Erb B4, ErbB2, erb3 (Erb-B3), PA2G4, FRT (FLT1), Gal3, GPR30 (G 共役 ER1), HAP1, HER3, HSP-27, HSP70, IC3b, IL8, insig, ジャンクシオン プラコグロビン, ケラチン15, KRAS, マンマグロビン, MART1, MCT2, MFGE8, MMP9, MRP8, Muc1, MUC17, MUC2, NCAM, NG2 (CSPG4), Ngal, NHE-3, NT5E (CD73), ODC1, OPG, OPN, p53, PARK7, PCSA, PGP9.5 (PARK5), PR(B), PSA, PSMA, RAGE, STXBP4, サバイビン, TFF3 (分泌型), TIMP1, TIMP2, TMEM211, TRAF4 (足場), TRAIL-R2 (デスレセプター 5), TrkB, Tsg 101, UNC93a, VEGF A, VEGFR2, YB-1, VEGFR1, GCDPF-15 (PIP), BigH3 (TGF β 1誘導タンパク質), 5HT2B (セロトニン受容体 2B), BRCA2, BACE 1, CDH1-カドヘリン
乳癌	AK5.2, ATP6V1B1, CRABP1
乳癌	DST.3, GATA3, KRT81
乳癌	AK5.2, ATP6V1B1, CRABP1, DST.3, ELF5, GATA3, KRT81, LALBA, OXTR, RASL10A, SERHL, TFAP2A.1, TFAP2A.3, TFAP2C, VTCN1
乳癌	TRAP; 腎細胞癌; フィラミン; 14.3.3, Pan; プロヒビチン; c-fos; Ang-2; GSTmu; Ang-1; FHIT; Rad51; インヒビリン α ; カドヘリン-P; 14.3.3 γ ; p18INK4c; P504S; XRCC2; カスパーゼ 5; CREB結合タンパク質; エストロゲン受容体; IL17; クローディン 2; ケラチン 8; GAPDH; CD1; ケラチン, LMW; γ グルタミルシステインシンセターゼ(GCS)/グルタミン酸-システインリガーゼ; a-B-クリスタリン; Pax-5; MMP-19; APC; IL-3; ケラチン 8 (リン酸化特異的Ser73); TGF- β 2; ITK; Oct-2; DJ-1; B7-H2; 形質細胞マーカー; Rad18; エストリオール; Chk1; プロラクチン受容体; ラミニン受容体; ヒストン H1; CD45RO; GnRH受容体; IP10/CRG2; アクチン, 筋肉特異的; S100; ジストロフィン; チューブリン-a; CD3 ζ ; CDC37; GABA a受容体1; MMP-7 (マトリライシン); ヘレグリン; カスパーゼ 3; CD56/NCAM-1; ガストリン 1; SREBP-1 (ステロール調節エレメント結合タンパク質-1); MLH1; PGP9.5; 第VIII因子関連抗原; ADP-リボシル化因子 (ARF-6); MHC II (HLA-DR) Ia; サバイビン; CD23; G-CSF; CD2; カルレチニン; ニューロン特異的エノラーゼ; CD165; カルボニン; CD95 / Fas; ウロコルチン; 熱ショックタンパク質27/hsp27; Topo II β ; インスリン受容体; ケラチン5/8; sm; アクチン, 骨格筋; CA19-9; GluR1; GRIP1; CD79a mb-1; TdT; HRP; CD94; CCK-8; チミジンホスホリラーゼ; CD57; アルカリホスファターゼ(AP); CD59 / MACIF / MIRL / プロテクチン; GLUT-1; α -1-抗トリプシン; プレセニリン; ムチン 3 (MUC3); pS2; 14-3-3 β ; MMP-13 (コラゲナーゼ-3); Fli-1; mGluR5; 肥満細胞キマーゼ; ラミニン B1/b1; 神経フィラメント (160kDa); CNPase; アミリンペプチド; Gai1; CD6; α -1-抗キモトリプシン; E2F-2; MyoD1
非浸潤性乳管癌 (DCIS)	ラミニン B1/b1; E2F-2; TdT; アポリポタンパクD; 顆粒球; アルカリホスファターゼ (AP); 熱ショックタンパク質 27/hsp27; CD95 / Fas; pS2; エストリオール; GLUT-1; フィブネクチン; CD6; CCK-8; sm; 第VIII因子関連抗原; CD57; プラスミノーゲン; CD71 / トランスフェリン受容体; ケラチン 5/8; チミジンホスホリラーゼ; CD45/T200/LCA; 上皮特異的抗原; マクロファージ; CD10; MyoD1; Gai1; bcl-XL; hPL; カスパーゼ 3; アクチン, 骨格筋; IP10/CRG2; GnRH受容体; p35nck5a; ADP-リボシル化因子(ARF-6); Cdk4 ; α -1-抗トリプシン; IL17; ニューロン特異的エノラーゼ; CD56/NCAM-1; プロラクチン受容体; Cdk7; CD79a mb-1; コラーゲン IV; CD94; ミエロイド特異的マーカー; ケラチン 10; Pax-5; IgM (m-重鎖); CD45RO; CA19-9; ムチン 2; グルカゴン; 肥満細胞キマーゼ; MLH1; CD1; CNPase; パーキン; MHC II (HLA-DR) Ia; B7-H2; Chk1; ラムダ軽鎖; MHC II (HLA-DP および DR); ミオゲニン; MMP-7 (マトリライシン); Topo II β ; CD53; ケラチン 19; Rad18; Ret オンコプロテイン; MHC II (HLA-DP); E3結合タンパク質 (ARM1); プロゲステロン受容体; ケラチン 8; IgG; IgA; チューブリン; インスリン受容体基質-1; ケラチン 15; DR3; IL-3; ケラチン 10/13; サイクリン D3; MHC I (HLA25 および HLA-Aw32); カルモジュリン; 神経フィラメント (160kDa)

10

20

30

40

非浸潤性乳管癌 (DCIS) 対 他の乳癌	マクロファージ; フィブロネクチン; 顆粒球; ケラチン19; サイクリンD3; CD45/T200/L CA; EGFR; トロンボスポンジン; CD81/TAPA-1; Ruv C; プラスミノージェン; コラーゲン IV; ラミニン B1/b1; CD10; TdT; フィラミン; bcl-XL; 14.3.3 γ; 14.3.3, Pan; p170; アポリポタンパクD; CD71 / トランスフェリン受容体; FHIT
肺癌	Pgrmc1 (プロゲステロン受容体膜コンポーネント 1)/シグマ-2受容体, STEAP, EZH2
肺癌	プロヒビチン, CD23, アミリンペプチド, HRP, Rad51, Pax-5, Oct-3/, GLUT-1, PSCA, トロンボスポンジン, FHIT, a-B-クリスタリン, LewisA, 血管内皮成長因子 (VEGF), 肝細胞因子ホモログ-4, Flt-4, GluR6/7, 前立腺アポトーシス応答タンパク質-4, GluR1, Fli-1, ウロコルチン, S100A4, 14-3-3β, P504S, HDAC1, PGP9.5, DJ-1, COX2, MMP-19, アクチン, 骨格筋, クローディン 3, カドヘリン-P, コラーゲン IX, p27Kip1, Catヘプシン D, CD30 (リード-スターンバーグ細胞マーカー), ユビキチン, FSH-b, TrxR2, CCK-8, サイクリン C, CD138, TGF-β2, 副腎皮質刺激ホルモン, PPAR-γ, Bcl-6, GLUT-3, IGF-I, mRANKL, Fas-リガンド, フィラミン, カルレチニン, Oct-1, 副甲状腺ホルモン, クローディン 5, クローディン 4, Raf-1 (リン酸化特異的), CDC14A ホスファターゼ, ミトコンドリア, APC, ガストリン 1, Ku (p80), Gai1, XPA, マルトース結合タンパク質, 黒色腫 (gp100), ホスホチロシン, アミロイド A, CXCR4 / フーシン, 肝性核因子-3B, カスパーゼ 1, HPV 16-E7, 軸索成長円錐, Lck, オルニチンデカルボキシラーゼ, γグルタミルシステインシンセターゼ(GCS)/グルタミン酸-システインリガーゼ, ERCC1, カルモジュリン, カスパーゼ 7 (Mch 3), CD137 (4-1BB), 酸化窒素シンターゼ, 脳 (bNOS), E2F-2, IL-10R, L-プラスチン, CD18, ビメンチン, CD50/ICAM-3, スーパーオキシドジスムターゼ, アデノウイルスタイプ 5 E1A, PHAS-I, プロゲステロン受容体(リン酸化特異的) - セリン 294, MHC II (HLA-DQ), XPG, ER Ca+2 ATPase2, ラミニン-s, E3結合タンパク質 (ARM1), CD45RO, CD1, Cdk2, MMP-10 (ストロメライン-2), sm, サーフアクタントタンパクB (Pro), アポリポタンパクD, CD46, ケラチン 8 (リン酸化特異的Ser73), PCNA, PLAP, CD20, Syk, LH, ケラチン 19, ADP-リボシル化因子(ARF-6), Int-2オンコプロテイン, ルシフェラーゼ, AIF(アポトーシス誘導因子), Grb2, bcl-X, CD16, バキシリン, MHC II (HLA-DPおよびDR), B細胞, p21WAF1, MHC II (HLA-DR), チロシナーゼ, E2F-1, Pds1, カルボニン, Notch, CD26/DPP IV, SV40 ラージT抗原, Ku (p70/p80), パーフォリン, XPF, SIM Ag (SIMA-4D3), Cdk1/p34cdc2, ニューロン特異的 エノラーゼ, b-2-ミクログロブリン, DNA ポリメラーゼβ, 甲状腺ホルモン受容体, ヒト, アルカリホスファターゼ(AP), 形質細胞マーカー, 熱ショックタンパク質 70/hsp70, TRP75 / gp75, SRF (血清応答因子), ラミニン B1/b1, 肥満細胞キマーゼ, カルデスモン, CEA / CD66e, CD24, レチノイド X受容体(hRXR), CD45/T200/LCA, 狂犬病ウイルス, チトクローム c, DR3, bcl-XL, ファスシン, CD71 / トランスフェリン受容体
肺癌	miR-497
卵巣癌	CA-125, CA 19-9, c-反応性タンパク質, CD95(Fas, Fas抗原, Fas受容体, FasR, TNFRSF6, APT1またはAPO-1とも呼ばれる), FAP-1, miR-200 マイクロRNA, EGFR, EGFRvIII, アポリポタンパクAI, アポリポタンパクCIII, ミオグロビン, テネシシンC, MSH6, クローディン-3, クローディン-4, カベオリン-1, 凝固因子III, CD9, CD36, CD37, CD53, CD63, CD81, CD136, CD147, Hsp70, Hsp90, Rab13, デスモコリン-1, EMP-2, CK7, CK20, GCDF15, CD82, Rab-5b, アネキシンV, MFG-E8およびHLA-DR. MiR-200 マイクロRNA (miR-200a, miR-200b, miR-200c), miR-141, miR-429, JNK, Jun
前立腺癌 対 正常	AQP2, BMP5, C16orf86, CXCL13, DST, ERCC1, GNAO1, KLHL5, MAP4K1, NELL2, PENK, PGF, POU3F1, PRSS21, SCML1, SEMG1, SMARCD3, SNAI2, TAF1C, TNNT3
前立腺癌 対 乳癌	ADRB2, ARG2, C22orf32, CYorf14, EIF1AY, FEV, KLK2, KLK4, LRRC26, MAOA, NLGN4Y, PNPLA7, PVRL3, SIM2, SLC30A4, SLC45A3, STX19, TRIM36, TRPM8
前立腺癌 対 結腸直腸癌	ADRB2, BAIAP2L2, C19orf33, CDX1, CEACAM6, EEF1A2, ERN2, FAM110B, FOXA2, KLK2, KLK4, LOC389816, LRRC26, MIPOL1, SLC45A3, SPDEF, TRIM31, TRIM36, ZNF613
前立腺癌 対 肺癌	ASTN2, CAB39L, CRIP1, FAM110B, FEV, GSTP1, KLK2, KLK4, LOC389816, LRRC26, MUC1, PNPLA7, SIM2, SLC45A3, SPDEF, TRIM36, TRPV6, ZNF613
前立腺癌	miRs-26a+b, miR-15, miR-16, miR-195, miR-497, miR-424, miR-206, miR-342-5p, miR-186, miR-1271, miR-600, miR-216b, miR-519ファミリー, miR-203

10

20

30

40

インテグリン	ITGA1 (CD49a, VLA1), ITGA2 (CD49b, VLA2), ITGA3 (CD49c, VLA3), ITGA4 (CD49d, VLA4), ITGA5 (CD49e, VLA5), ITGA6 (CD49f, VLA6), ITGA7 (FLJ25220), ITGA8, ITGA9 (RLC), ITGA10, ITGA11 (HsT18964), ITGAD (CD11D, FLJ39841), ITGAE (CD103, HUMINAE), ITGAL (CD11a, LFA1A), ITGAM (CD11b, MAC-1), ITGAV (CD51, VNRA, MSK8), ITGAW, ITGAX (CD11c), ITGB1 (CD29, FNRB, MSK12, MDF20), ITGB2 (CD18, LFA-1, MAC-1, MFI7), ITGB3 (CD61, GP3A, GPIIIa), ITGB4 (CD104), ITGB5 (FLJ26658), ITGB6, ITGB7, ITGB8
糖タンパク質	GpIa-IIa, GpIIb-IIIa, GpIIIb, GpIb, GpIX
転写因子	STAT3, EZH2, p53, MACC1, SPDEF, RUNX2, YB-1
キナーゼ	AURKA, AURKB
疾患マーカー	6Ckine, アディポネクチン, 副腎皮質刺激ホルモン, Agouti-関連タンパク質, アルドースレダクターゼ, α-1-抗キモトリプシン, α-1-抗トリプシン, α-1-ミクログロブリン, α-2-マクログロブリン, α-フェトタンパク質, アンフィレギュリン, アンジオゲニン, アンジオボエチン-2, アンジオテンシン変換酵素, アンジオテンシノゲン, アネキシン A1, アポリポタンパク A-I, アポリポタンパク A-II, アポリポタンパク A-IV, アポリポタンパク B, アポリポタンパク C-I, アポリポタンパク C-III, アポリポタンパク D, アポリポタンパク E, アポリポタンパク H, アポリポタンパク (a), AXL 受容体チロシンキナーゼ, B 細胞活性化因子, B リンパ球走化性因子, Bcl-2 様タンパク 2, β-2-ミクログロブリン, ベタセルリン, 骨形成タンパク質 6, 脳由来神経栄養因子, カルビンジン, カルシトニン, 癌抗原 125, 癌抗原 15-3, 癌抗原 19-9, 癌抗原 72-4, 癌胎児性抗原, Cat ヘプシン D, CD 40 抗原, CD40 リガンド, CD5 抗原様, 細胞性 フィブロネクチン, ケモカイン CC-4, クロモグラニン-A, 毛様体神経栄養因子, クラスレリン, コラーゲン IV, 補体 C3, 補体因子 H, 結合組織成長因子, コルチゾール, C-ペプチド, C-反応性タンパク質, クレアチンキナーゼ-MB, シスタチン-C, エンドグリン, エンドスタチン, エンドセリン-1, EN-RAGE, エオタキシン-1, エオタキシン-2, エオタキシン-3, 上皮成長因子, エピレグリン, 上皮細胞接着分子, 上皮由来好中球活性化タンパク質 78, エリスロポエチン, E-セレクトリン, エズリン, 第 VII 因子, Fas リガンド, FASLG 受容体, 脂肪酸結合タンパク質 (脂肪細胞), 脂肪酸結合タンパク質 (心臓), 脂肪酸結合タンパク質 (肝臓), フェリチン, フェツイン-A, フィブリノゲン, 線維芽細胞成長因子 4, 線維芽細胞成長因子塩基性, フィブリン-1C, 卵胞刺激ホルモン, ガレクチン-3, ゲルソリン, グルカゴン, グルカゴン様ペプチド 1, グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ, グルタミン酸-システインリガーゼ調節サブユニット, グルタチオンS-トランスフェラーゼ α, グルタチオンS-トランスフェラーゼ Mu 1, 顆粒球コロニー刺激因子, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子, 成長ホルモン, 成長調節性 α タンパク質, ハプトグロビン, HE4, 熱ショックタンパク質 60, ヘパリン結合 EGF 様成長因子, 肝細胞成長因子, 肝細胞成長因子受容体, ヘプシン, ヒト 絨毛性ゴナドトロピン β, ヒト 上皮成長因子受容体 2, 免疫グロブリン A, 免疫グロブリン E, 免疫グロブリン M, インスリン, インスリン様成長因子 I, インスリン様成長因子結合タンパク質 1, インスリン様成長因子結合タンパク質 2, インスリン様成長因子結合タンパク質 3, インスリン様成長因子結合タンパク質 4, インスリン様成長因子結合タンパク質 5, インスリン様成長因子結合タンパク質 6, 細胞間接着分子 1, インターフェロン γ, インターフェロン γ 誘導タンパク質 10, インターフェロン誘導 T 細胞 α 走化性因子, インターロイキン-1 α, インターロイキン-1β, インターロイキン-1 受容体, アンタゴニスト, インターロイキン-2, インターロイキン-2 受容体 α, インターロイキン-3, インターロイキン-4, インターロイキン-5, インターロイキン-6, インターロイキン-6 受容体, インターロイキン-6 受容体サブユニット β, インターロイキン-7, インターロイキン-8, インターロイキン-10, インターロイキン-11, インターロイキン-12 サブユニット p40, インターロイキン-12 サブユニット p70, インターロイキン-13, インターロイキン-15, インターロイキン-16, インターロイキン-25, カリクレイン 5, カリクレイン-7, 腎臓傷害分子-1, トランスフォーミング成長因子 β1 の乳酸グルタチオンリアーゼ潜伏関連ペプチド, レクチン様酸化 LDL 受容体 1, レプチン, 黄体形成ホルモン, リンホタクチン, マクロファージコロニー刺激因子 1, マクロファージ炎症性タンパク質-1 α, マクロファージ炎症性タンパク質-1β, マクロファージ炎症性タンパク質-3 α, マクロファージ炎症性タンパク質 3β, マクロファージ遊走阻止因子, マクロファージ誘導 ケモカイン, マクロファージ刺激タンパク質, マロンジアルデヒド改変低密度リポタンパク質, マスピン, マトリックスメタロプロテイナーゼ-1, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2,

10

20

30

40

	マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, マトリックスメタロプロテイナーゼ-7, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, マトリックスメタロプロテイナーゼ-10, メソテリン, MHC クラス I 鎖-関連タンパク質 A, 単球走化性タンパク質 1, 単球走化性タンパク質 2, 単球走化性タンパク質 3, 単球走化性タンパク質 4, γ インターフェロンに誘導されたモノカイン, ミエロイド前駆体阻害因子1, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, 神経成長因子β, ニューロン細胞接着分子, ニューロン特異的エノラーゼ, ニューロピリン-1, 好中球ゲラチナーゼ関連リポカリン, NT-proBNP, スクレオシドジホスフェートキナーゼB, オステオポンチン, オステオプロテジェリン, 膵臓ポリペプチド, ペプシノゲン I, ペプチド YY, ペルオキシレドキシン-4, ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ, 血清 成長因子, プラスミノーゲン アクチベーターインヒビター 1, 血小板由来成長因子BB, 妊娠関連血漿タンパク質 A, プログステロン, プロインスリン(総プロインスリンまたは完全プロインスリンを含む), プログクチン, プロスタシン, 前立腺特異的抗原(遊離PSA を含む), 前立腺酸性ホスファターゼ, プロテインS100-A4, プロテインS100-A6, 肺性および活性化調節ケモカイン, 終末糖化産物の受容体, 受容体チロシン-タンパク質キナーゼ erbB-3, レジスチン, S100 カルシウム結合タンパク質 B, セクレチン, セロトランスフェリン, 血清アミロイド P-コンポーネント, 血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ, 性ホルモン結合グロブリン, ソルチリン, 扁平上皮癌抗原-1, 幹細胞因子, ストロマ細胞由来因子-1, スーパーオキシドジスムターゼ 1 (可溶性), T リンパ球分泌タンパク質 I-309, Tamm-Horsfall 尿中糖タンパク質, T細胞特異的タンパク質 RANTES, テネイシン-C, テストステロン, テトラネクチン, トロンボモジュリン, トロンボポエチン, トロンボスポンジン-1, サイログロブリン, 甲状腺刺激ホルモン, チロキシン結合グロブリン, 組織因子, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, 組織型プラスミノーゲン アクチベーター, TNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体3, トランスフォーミング成長因子α, トランスフォーミング 成長因子β-3, トランスサイレシン, トレフォイルファクター 3, 腫瘍壊死因子α, 腫瘍壊死因子β, 腫瘍壊死因子受容体1, 腫瘍壊死因子受容体2, IgおよびEGF相同ドメイン2を有するチロシンキナーゼ, ウロキナーゼ型 プラスミノーゲンアクチベーター, ウロキナーゼ型 プラスミノーゲンアクチベーター受容体, 血管細胞接着分子-1, 血管内皮成長因子, 血管内皮成長因子B, 血管内皮成長因子C, 血管内皮成長因子D, 血管内皮成長因子受容体1, 血管内皮成長因子受容体2, 血管内皮成長因子受容体3, ビタミン K依存性タンパク質 S, ビトロネクチン, フォン・ヴィルブランド因子, YKL-40	10
疾患マーカー	アディポネクチン, 副腎皮質刺激ホルモン, Agouti-関連タンパク質, α-1-抗キモトリプシン, α-1-抗トリプシン, α-1-ミクログロブリン, α-2-マクログロブリン, α-フェトタンパク質, アンフィレギュリン, アンジオポエチン-2, アンジオテンシン変換酵素, アンジオテンシノゲン, アポリポタンパク A-I, アポリポタンパク A-II, アポリポタンパク A-IV, アポリポタンパク B, アポリポタンパク C-I, アポリポタンパク C-III, アポリポタンパク D, アポリポタンパク E, アポリポタンパク H, アポリポタンパク(a), AXL受容体チロシンキナーゼ, B リンパ球走化性因子, β-2-ミクログロブリン, ベタセルリン, 骨形成タンパク質 6, 脳由来神経栄養因子, カルビンジン, カルシトニン, 癌抗原125, 癌抗原19-9, 癌胎児性抗原, CD 40抗原, CD40 リガンド, CD5抗原様, ケモカイン CC-4, クロモグラニン-A, 毛様体神経栄養因子, クラスチリン, 補体C3, 補体因子H, 結合組織成長因子, コルチゾール, C-ペプチド, C-反応性タンパク質, クレアチンキナーゼ-MB, シスタチン-C, エンドセリン-1, EN-RAGE, エオタキシン-1, エオタキシン-3, 上皮成長因子, エピレグリン, 上皮由来好中球活性化タンパク質78, エリスロポエチン, E-セ렉チン, 第VII因子, Fasリガンド, FASLG受容体, 脂肪酸結合タンパク質 (心臓), フェリチン, フェツイン-A, フィブリノゲン, 線維芽細胞成長因子4, 線維芽細胞成長因子塩基性, 卵胞刺激ホルモン, グルカゴン, グルカゴン様ペプチド 1, グルタチオンS-トランスフェラーゼ α, 顆粒球コロニー刺激因子, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子, 成長ホルモン, 成長調節性 αタンパク質, ハプトグロビン, 熱ショックタンパク質 60, ヘパリン結合 EGF様成長因子, 肝細胞成長因子, 免疫グロブリン A, 免疫グロブリン E, 免疫グロブリン M, インスリン, インスリン様成長因子1, インスリン様成長因子結合タンパク質 2, 細胞間接着分子 1, インターフェロン γ, インターフェロン γ 誘導タンパク質 10, インターロイキン-1 α, インターロイキン-1β, インターロイキン-1受容体アンタゴニスト, インターロイキン-2, インターロイキン-3, インターロイキン-4, インターロイキン-5, インターロイキン-6, インターロイキン-6受容体, インターロイキン-7, インターロイキン-8, インターロイキン-10, インターロイキン-11, インターロイキン-12 サブユニット p40, インターロイキン-12	30
		40

	サブユニット p70, インターロイキン-13, インターロイキン-15, インターロイキン-16, インターロイキン-25, 腎臓傷害分子-1, レクチン様酸化LDL受容体1, レプチン, 黄体形成ホルモン, リンホタクチン, マクロファージコロニー刺激因子1, マクロファージ炎症性タンパク質-1α, マクロファージ炎症性タンパク質-1β, マクロファージ炎症性タンパク質-3α, マクロファージ遊走阻止因子, マクロファージ誘導ケモカイン, マロンジアルデヒド改変低密度リボタンパク質, マトリックスメタロプロテイナーゼ-1, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, マトリックスメタロプロテイナーゼ-7, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, マトリックスメタロプロテイナーゼ-10, 単球走化性タンパク質 1, 単球走化性タンパク質 2, 単球走化性タンパク質 3, 単球走化性タンパク質 4, γインターフェロンに誘導されたモノカイン, ミエロイド前駆体阻害因子1, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, 神経成長因子β, ニューロン細胞接着分子, 好中球グランチナーゼ関連リボカリン, NT-proBNP, オステオポンチン, 膵臓ポリペプチド, ペプチド YY, 胎盤成長因子, プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1, 血小板由来成長因子BB, 妊娠関連血漿タンパク質 A, プロゲステロン, プロインスリン (完全プロインスリンまたは総プロインスリンを含む), プロラクチン, 前立腺特異的抗原(遊離PSAを含む), 前立腺酸性ホスファターゼ, 肺性 および 活性化調節ケモカイン, 終末糖化産物の受容体, レジスチン, S100 カルシウム結合タンパク質 B, セクレチン, セロトランスフェリン, 血清アミロイド P-コンポーネント, 血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ, 性ホルモン結合グロブリン, ソルチリン, 幹細胞因子, スーパーオキシドジスムターゼ 1 (可溶性), T リンパ球分泌タンパク質 I-309, Tamm-Horsfall尿中糖タンパク質, T細胞特異的タンパク質 RANTES, テネシシン-C, テストステロン, トロンボモジュリン, トロンボポエチン, トロンボスポンジン-1, 甲状腺刺激ホルモン, チロキシン結合グロブリン, 組織因子, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, TNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体3, トランスフォーミング 成長因子α, トランスフォーミング 成長因子β-3, トランスサイレシン, トレフォイルファクター 3, 腫瘍壊死因子α, 腫瘍壊死因子β, 腫瘍壊死因子受容体2, 血管細胞接着分子-1, 血管内皮成長因子, ビタミン K依存性タンパク質 S, ビトロネクチン, フォン・ヴィルブランド因子	10
腫瘍学	6Ckine, アルドースレダクターゼ, α-フェトタンパク質, アンフィレギュリン, アンジオゲニン, アネキシン A1, B 細胞活性化因子, B リンパ球走化性因子, Bcl-2様タンパク質 2, ベタセルリン, 癌抗原125, 癌抗原15-3, 癌抗原 19-9, 癌抗原72-4, 癌胎児性抗原, Catヘプシン D, 細胞性フィブ्रोネクチン, コラーゲン IV, エンドグリン, エンドスタチン, エオタキシン-2, 上皮成長因子, エピレグリン, 上皮細胞接着分子, エズリン, 脂肪酸結合タンパク質 (脂肪細胞), 脂肪酸結合タンパク質 (肝臓), 線維芽細胞成長因子塩基性, フィブリン-1C, ガレクチン-3, ゲルソリン, グルコース-6-ホスフェート イソメラーゼ, グルタミン酸-システインリガーゼ 調節サブユニット, グルタチオンS-トランスフェラーゼ Mu 1, HE4, ヘパリン結合 EGF様成長因子, 肝細胞成長因子, 肝細胞成長因子受容体, ヘプシン, ヒト 絨毛性ゴナドトロピンβ, ヒト 上皮成長因子受容体2, インスリン様成長因子結合タンパク質 1, インスリン様成長因子結合タンパク質 2, インスリン様成長因子結合タンパク質 3, インスリン様成長因子結合タンパク質 4, インスリン様成長因子結合タンパク質 5, インスリン様成長因子結合タンパク質 6, インターフェロンγ 誘導タンパク質 10, インターフェロン誘導T細胞α走化性因子, インターロイキン-2受容体α, インターロイキン-6, インターロイキン-6受容体サブユニットβ, カリクレイン 5, カリクレイン-7, トランスフォーミング成長因子β1の乳酸グルタチオンリアーゼ 潜伏関連ペプチド, レプチン, マクロファージ炎症性タンパク質 3β, マクロファージ遊走阻止因子, マクロファージ刺激タンパク質, マスピン, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, メソテリン, MHC クラス I 鎖-関連タンパク質 A, 単球走化性タンパク質 1, γインターフェロンに誘導されたモノカイン, ニューロン特異的エノラーゼ, ニューロピリン-1, 好中球グランチナーゼ関連リボカリン, スクレオシドジホスフェートキナーゼ B, オステオポンチン, オステオプロテジェリン, ペプシノゲン I, ペルオキシレドキシン-4, ホスホセリン アミノトランスフェラーゼ, 血清 成長因子, 血小板由来成長因子BB, プロスタシン, プロテインS100-A4, プロテインS100-A6, 受容体チロシン-タンパク質キナーゼ erbB-3, 扁平上皮癌抗原-1, ストロマ細胞由来因子-1, テネシシン-C, テトラネクチン, サイログロブリン,	30 40

	組織型プラスミノージェンアクチベーター, トランスフォーミング 成長因子 α , 腫瘍壊死因子受容体I, IgおよびEGF相同ドメイン2を有するチロシンキナーゼ, ウロキナーゼ型 プラスミノージェンアクチベーター, ウロキナーゼ型 プラスミノージェンアクチベーター受容体, 血管内皮成長因子, 血管内皮成長因子B, 血管内皮成長因子C, 血管内皮成長因子D, 血管内皮成長因子受容体1, 血管内皮成長因子受容体2, 血管内皮成長因子受容体3, YKL-40	
疾患	アディポネクチン, α-1-抗トリプシン, α-2-マクログロブリン, α-フェトタンパク質, アポリポタンパクA-I, アポリポタンパクC-III, アポリポタンパクH, アポリポタンパク(a), β-2-ミクログロブリン, 脳由来神経栄養因子, カルシトニン, 癌抗原125, 癌抗原19-9, 癌胎児性抗原, CD 40抗原, CD40 リガンド, 補体C3, C-反応性タンパク質, クレアチンキナーゼ-MB, エンドセリン-I, EN-RAGE, エオタキシン-1, 上皮成長因子, 上皮由来好中球活性化タンパク質78, エリスロポエチン, 第VII因子, 脂肪酸結合タンパク質 (心臓), フェリチン, フィブリノゲン, 線維芽細胞成長因子塩基性, 顆粒球コロニー刺激因子, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子, 成長ホルモン, ハプトグロビン, 免疫グロブリン A, 免疫グロブリン E, 免疫グロブリン M, インスリン, インスリン様成長因子I, 細胞間接着分子 1, インターフェロンγ, インターロイキン-1α, インターロイキン-1β, インターロイキン-1受容体アンタゴニスト, インターロイキン-2, インターロイキン-3, インターロイキン-4, インターロイキン-5, インターロイキン-6, インターロイキン-7, インターロイキン-8, インターロイキン-10, インターロイキン-12 サブユニット p40, インターロイキン-12 サブユニット p70, インターロイキン-13, インターロイキン-15, インターロイキン-16, レプチン, リンホタクチン, マクロファージ炎症性タンパク質-1α, マクロファージ炎症性タンパク質-1β, マクロファージ誘導 ケモカイン, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, 単球走化性タンパク質 1, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, プラスミノージェンアクチベーターインヒビター 1, 妊娠関連血漿タンパク質 A, 前立腺特異的抗原(遊離PSA を含む), 前立腺酸性ホスファターゼ, 血清アミロイド P-コンポーネント, 血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ, 性ホルモン結合グロブリン, 幹細胞因子, T細胞特異的タンパク質 RANTES, トロンボポエチン, 甲状腺刺激ホルモン, チロキシン結合グロブリン, 組織因子, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, 腫瘍壊死因子α, 腫瘍壊死因子β, 腫瘍壊死因子受容体2, 血管細胞接着分子-1, 血管内皮成長因子, フォン・ヴィルブラント因子	10 20
神経学的	α-1-抗トリプシン, アポリポタンパクA-I, アポリポタンパクA-II, アポリポタンパクB, アポリポタンパクC-I, アポリポタンパクH, β-2-ミクログロブリン, ベタセルリン, 脳由来神経栄養因子, カルビンジン, 癌抗原125, 癌胎児性抗原, CD5抗原様, 補体C3, 結合組織成長因子, コルチゾール, エンドセリン-1, 上皮成長因子受容体, フェリチン, フェツイン-A, 卵胞刺激ホルモン, ハプトグロビン, 免疫グロブリン A, 免疫グロブリン M, 細胞間接着分子 1, インターロイキン-6受容体, インターロイキン-7, インターロイキン-10, インターロイキン-11, インターロイキン-17, 腎臓傷害分子-1, 黄体形成ホルモン, マクロファージ誘導 ケモカイン, マクロファージ遊走阻止因子, マクロファージ炎症性タンパク質-1α, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, 単球走化性タンパク質 2, ペプチド YY, プロラクチン, 前立腺酸性 ホスファターゼ, セロトランスフェリン, 血清アミロイド P-コンポーネント, ソルチリン, テストステロン, トロンボポエチン, 甲状腺刺激ホルモン, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, TNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体3, 腫瘍壊死因子受容体2, 血管内皮成長因子, ビトロネクチン	30
心血管	アディポネクチン, アポリポタンパクA-I, アポリポタンパクB, アポリポタンパクC-III, アポリポタンパクD, アポリポタンパクE, アポリポタンパクH, アポリポタンパク(a), クラスチリン, C-反応性タンパク質, シスタチン-C, EN-RAGE, E-セ렉チン, 脂肪酸結合タンパク質 (心臓), フェリチン, フィブリノゲン, ハプトグロビン, 免疫グロブリン M, 細胞間接着分子 1, インターロイキン-6, インターロイキン-8, レクチン様酸化LDL受容体1, レプチン, マクロファージ炎症性タンパク質-1α, マクロファージ炎症性タンパク質-1β, マロンジアルデヒド改変低密度リポタンパク質, マトリックスメタロプロテイナーゼ-1, マトリックスメタロプロテイナーゼ-10, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, マトリックスメタロプロテイナーゼ-7, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, 単球走化性タンパク質 1, ミエロペルオキシダーゼ, ミオグロビン, NT-proBNP, オステオポンチン, プラスミノージェン アクチベーター	40

	インヒビター 1, P-セレクチン, 終末糖化産物の受容体, 血清アミロイド P-コンポーネント, 性ホルモン結合グロブリン, T細胞特異的タンパク質 RANTES, トロンボモジュリン, チロキシン結合グロブリン, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, 腫瘍壊死因子 α , 腫瘍壊死因子受容体2, 血管細胞接着分子-1, フォン・ヴィルブランド因子
炎症	α -1-抗トリプシン, α -2-マクログロブリン, β -2-ミクログロブリン, 脳由来神経栄養因子, 補体C3, C-反応性タンパク質, エオタキシン-1, 第VII因子, フェリチン, フィブリノゲン, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子, ハプトグロビン, 細胞間接着分子 1, インターフェロン γ , インターロイキン-1 α , インターロイキン-1 β , インターロイキン-1受容体アンタゴニスト, インターロイキン-2, インターロイキン-3, インターロイキン-4, インターロイキン-5, インターロイキン-6, インターロイキン-7, インターロイキン-8, インターロイキン-10, インターロイキン-12 サブユニット p40, インターロイキン-12 サブユニット p70, インターロイキン-15, インターロイキン-17, インターロイキン-23, マクロファージ炎症性タンパク質-1 α , マクロファージ炎症性タンパク質-1 β , マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, マトリックスメタロプロテイナーゼ-9, 単球走化性タンパク質 1, 幹細胞因子, T細胞特異的タンパク質 RANTES, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, 腫瘍壊死因子 α , 腫瘍壊死因子 β , 腫瘍壊死因子受容体2, 血管細胞接着分子-1, 血管内皮成長因子, ビタミン D結合タンパク質, フォン・ヴィルブランド因子
代謝	アディポネクチン, 副腎皮質刺激ホルモン, アンジオテンシン変換酵素, アンジオテンシノゲン, 補体C3ades arg, コルチゾール, 卵巣刺激ホルモン, ガラニン, グルカゴン, グルカゴン様ペプチド 1, インスリン, インスリン様成長因子I, レプチン, 黄体形成ホルモン, 膵臓ポリペプチド, ペプチド YY, プロゲステロン, プロラクチン, レジスチン, セクレチン, テストステロン
腎臓	α -1-ミクログロブリン, β -2-ミクログロブリン, カルビンジン, クラステリン, 結合組織成長因子, クレアチニン, シスタチン-C, グルタチオンS-トランスフェラーゼ α , 腎臓傷害分子-1, ミクロアルブミン, 好中球ゲラチナーゼ関連リポカリン, オステオポンチン, Tamm-Horsfall尿中糖タンパク質, 組織メタロプロテイナーゼ阻害物質 1, トレフォイルファクター 3, 血管内皮成長因子
サイトカイン	顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子, インターフェロン γ , インターロイキン-2, インターロイキン-3, インターロイキン-4, インターロイキン-5, インターロイキン-6, インターロイキン-7, インターロイキン-8, インターロイキン-10, マクロファージ炎症性タンパク質-1 α , マクロファージ炎症性タンパク質-1 β , マトリックスメタロプロテイナーゼ-2, 単球走化性タンパク質 1, 腫瘍壊死因子 α , 腫瘍壊死因子 β , 脳由来神経栄養因子, エオタキシン-1, 細胞間接着分子 1, インターロイキン-1 α , インターロイキン-1 β , インターロイキン-1受容体アンタゴニスト, インターロイキン-12 サブユニット p40, インターロイキン-12 サブユニット p70, インターロイキン-15, インターロイキン-17, インターロイキン-23, マトリックスメタロプロテイナーゼ-3, 幹細胞因子, 血管内皮成長因子,
タンパク質	14.3.3 γ , 14.3.3 (Pan), 14-3-3 β , 6-ヒスチジン, a-B-クリスタリン, 腺房, アクチン β , アクチン (筋肉特異的), アクチン (Pan), アクチン (骨格筋), アクチビン受容体タイプII, アデノウイルス, アデノウイルス Fiber, アデノウイルスタイプ 2 E1A, アデノウイルスタイプ 5 E1A, ADP-リボシル化因子 (ARF-6), 副腎皮質刺激ホルモン, AIF (アポトーシス誘導因子), アルカリホスファターゼ (AP), α フェトタンパク質 (AFP), α ラクトアルブミン, α -1-抗キモトリプシン, α -1-抗トリプシン, アンフィレギュリン, アミリンペプチド, アミロイド A, アミロイドA4タンパク質前駆体, アミロイド β (APP), アンドロゲン受容体, Ang-1, Ang-2, APC, APC11, APC2, アポリポタンパクD, A-Raf, ARC, Ask1 / MAPKKK5, ATM, 軸索成長円錐, b ガラクトシダーゼ, b-2-ミクログロブリン, B7-H2, BAG-1, Bak, Bax, B細胞, B細胞リンカータンパク質 (BLNK), Bcl10 / CIPER / CLAP / mE10, bcl-2a, Bcl-6, bcl-X, bcl-XL, Bim (BOD), ビオチン, Bonzo / STRL33 / TYMSTR, ウシ血清アルブミン, BRCA2 (aa 1323-1346), BrdU, プロモデオキシウリジン (BrdU), CA125, CA19-9, c-Abl, カドヘリン (Pan), カドヘリン-E, カドヘリン-P, カルシトニン, カルシウムポンプATPase, カルデスモン, カルモジュリン, カルボニン, カルレチニン, カゼイン, カスパーゼ 1, カスパーゼ 2, カスパーゼ 3, カスパーゼ 5, カスパーゼ 6 (Mch 2), カスパーゼ 7 (Mch 3), カスパーゼ 8 (FLICE), カスパーゼ 9, カテニン α , カテニン β , カテニン γ , Catヘプシン D, CCK-8, CD1, CD10, CD100/白血球セマフォリン, CD105, CD106 / VCAM, CD115/c-fms/CSF-1R/M-CSFR, CD137 (4-1BB), CD138, CD14, CD15, CD155/PVR (ポリオウイルス受容体), CD16, CD165, CD18, CD1a, CD1b, CD2, CD20, CD21, CD23, CD231, CD24, CD25/IL-2受容体a, CD26/DPP IV, CD29, CD30 (リード-スターンバーグ細胞マーカー),

10

20

30

40

	CD32/Fcγ受容体II, CD35/CR1, CD36GPIIb/GPIV, CD3ζ, CD4, CD40, CD42b, CD43, CD45/T200/LCA, CD45RB, CD45RO, CD46, CD5, CD50/ICAM-3, CD53, CD54/ICAM-1, CD56/NCAM-1, CD57, CD59 / MAC1F / M1RL / プロテクチン, CD6, CD61/血小板糖タンパク質IIIa, CD63, CD68, CD71/トランスフェリン受容体, CD79a mb-1, CD79b, CD8, CD81/TAPA-1, CD84, CD9, CD94, CD95 / Fas, CD98, CDC14A ホスファターゼ, CDC25C, CDC34, CDC37, CDC47, CDC6, cdh1, Cdk1/p34cdc2, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk5, Cdk7, Cdk8, CDw17, CDw60, CDw75, CDw78, CEA / CD66e, c-erbB-2/HER-2/neu Ab-1 (21N), c-erbB-4/HER-4, c-fos, Chk1, 絨毛性ゴナドトロピンβ(hCG-β), クロモグラニン A, CIDE-A, CIDE-B, CITED1, c-jun, クラスリン, クローディン 11, クローディン 2, クローディン 3, クローディン 4, クローディン 5, クローディン 7, クローディン-1, CNPase, コラーゲン II, コラーゲン IV, コラーゲン IX, コラーゲン VII, コネキシン 43, COX2, CREB, CREB結合タンパク質, クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans), c-Src, カリン-1 (CUL-1), カリン-2 (CUL-2), カリン-3 (CUL-3), CXCR4/フーシン, サイクリン B1, サイクリン C, サイクリン D1, サイクリン D3, サイクリン E, サイクリン E2, 嚢胞性線維症膜コンダクタンズ制御因子, チトクローム c, D4-GDI, Daxx, DcR1, DcR2 / TRAIL-R4 / TRUND, デスミン, DFF40 (DNA 断片化因子40) /CAD, DFF45/ICAD, DJ-1, DNAリガーゼ I, DNAポリメラーゼβ, DNAポリメラーゼγ, DNA プライマーゼ(p49), DNA プライマーゼ(p58), DNA-PKcs, DP-2, DR3, DR5, ジスフェリン, ジストロフィン, E2F-1, E2F-2, E2F-3, E2F-4, E2F-5, E3結合タンパク質 (ARM1), EGFR, EMA/CA15-3/MUC-1, エンドスタチン, 上皮膜抗原(EMA / CA15-3 / MUC-1), 上皮特異的抗原, ERβ, ER Ca+2 ATPase2, ERCC1, Erk1, ERK2, エストラジオール, エストジオール, エストロゲン受容体, Exo1, エズリン/p81/80K/ サイトビル, F.VIII/VWF, 第VIII因子関連抗原, FADD (FAS関連デスドメイン含有タンパク質), ファスシン, Fas-リガンド, フェリチン, FGF-1, FGF-2, FHIT, フィブリン-1, フィブロネクチン, フィラグリン, フィラミン, FITC, Fli-1, FLIP, Flk-1/KDR/VEGFR2, Flt-1 / VEGFR1, Flt-4, Fra2, FSH, FSH-b, Fyn, Ga0, Gab-1, GABA a受容体1, GAD65, Gail, γ グルタミルトランスフェラーゼ (gGT), γグルタミルシステインシンセターゼ(GCS)/グルタミルシステインリガーゼ, GAPDH, ガストリン 1, GCDFP-15, G-CSF, GFAP, グリセリン, グルカゴン, グルコース調節タンパク質 94, GluR 2/3, GluR1, GluR4, GluR6/7, GLUT-1, GLUT-3, グリコーゲン合成キナーゼ3b (GSK3b), グリコホリンA, GM-CSF, GnRH受容体, ゴルジ複合体, 顆粒球, グランザイム B, Grb2, 緑色蛍光タンパク質 (GFP), GRIP1, 成長ホルモン (hGH), GSK-3, GST, GSTmu, H.Pylori, HDAC1, HDJ-2/DNAJ, 熱ショック因子1, 熱ショック因子2, 熱ショックタンパク質 27/hsp27, 熱ショックタンパク質 60/hsp60, 熱ショックタンパク質 70/hsp70, 熱ショックタンパク質 75/hsp75, 熱ショックタンパク質 90a/hsp86, 熱ショックタンパク質 90b/hsp84, ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori), ヘパラン硫酸プロテオグリカン, 肝性核因子-3B, 肝細胞, 肝細胞因子ホモログ-4, 肝細胞成長因子, ヘレグリン, HIF-1α, ヒストン H1, hPL, HPV 16, HPV 16-E7, HRP, ヒトナトリウム・ヨウ素共輸送体(hNIS), I-FLICE/CASPER, IFN γ, IgA, IGF-IR, IGF-1, IgG, IgM (m-重鎖), I-κ-Bキナーゼ b (IKKb), IL-1 α, IL-1β, IL-10, IL-10R, IL17, IL-2, IL-3, IL-30, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, インヒビリン α, インスリン, インスリン受容体, インスリン受容体基質-1, Int-2 オンコプロテイン, インテグリンβ5, インターフェロン-a(II), インターフェロン-g, インボルクリン, IP10/CRG2, IPO-38 増殖マーカー, IRAK, ITK, JNK 活性化キナーゼ (JNK1), κ軽鎖, ケラチン 10, ケラチン 10/13, ケラチン 14, ケラチン 15, ケラチン 16, ケラチン 18, ケラチン 19, ケラチン 20, ケラチン 5/6/18, ケラチン 5/8, ケラチン 8, ケラチン 8 (リン酸化特異的 Ser73), ケラチン 8/18, ケラチン (LMW), ケラチン (Multi), ケラチン (Pan), Ki67, Ku (p70/p80), Ku (p80), L1細胞接着分子, ラムダ軽鎖, ラミニンB1/b1, ラミニンB2/g1, ラミニン受容体, ラミニン-s, Lck, Lck (p56lck), ロイコトリエン (C4, D4, E4), LewisA, LewisB, LH, L-プラスチン, LRP / MVP, ルシフェラーゼ, マクロファージ, MADD, MAGE-1, マルトース結合タンパク質, MAPIB, MAP2a,b, MART-1/Melan-A, 肥満細胞キマーゼ, Mcl-1, MCM2, MCM5, MDM2, 酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA), Mek1, Mek2, Mek6, Mekk-1, 黒色腫 (gp100), mGluR1, mGluR5, MGMT, MHC I (HLA25 および HLA-Aw32), MHC I (HLA-A), MHC I (HLA-A,B,C), MHC I (HLA-B), MHC II (HLA-DP および DR), MHC II (HLA-DP), MHC II (HLA-DQ), MHC II (HLA-DR), MHC II (HLA-DR) Ia, 小眼球症, 乳脂肪球膜タンパク質, ミトコンドリア, MLH1, MMP-1 (コラゲナーゼ-I), MMP-10 (ストロメライシン-2), MMP-11 (ストロメライシン-3), MMP-13 (コラゲナーゼ-3), MMP-14 / MT1-MMP, MMP-15 / MT2-MMP, MMP-16 / MT3-MMP, MMP-19, MMP-2 (72kDa コラゲナーゼ IV), MMP-23, MMP-7 (マトリライシン), MMP-9 (92kDa コラゲナーゼ IV), モエシン, mRANKL, Muc-1, ムチン 2, ムチン 3 (MUC3),
--	---

10

20

30

40

	ムチン 5AC, MyD88, ミエリン / オリゴデンドロサイト, ミエロイド特異的マーカー, ミエロペルオキシダーゼ, MyoD1, ミオゲニン, ミオグロビン, ミオシン平滑筋重鎖, Nck, マウスIgG1の陰性対照, マウスIgG2aの陰性対照, マウスIgG3の陰性対照, マウスIgMの陰性対照, ウサギIgGの陰性対照, 神経フィラメント, 神経フィラメント (160kDa), 神経フィラメント (200kDa), 神経フィラメント (68kDa), ニューロン特異的エノラーゼ, 好中球エラスターゼ, NF κB / p50, NF κB / p65 (Rel A), NGF-受容体 (p75NGFR), 脳酸化窒素シンターゼ (bNOS), 内皮酸化窒素シンターゼ (eNOS), nm23, NOS-i, NOS-u, Notch, スクレオフォスミン(NPM), NuMA, Oct-1, Oct-2/, Oct-3/, オルニチンデカルボキシラーゼ, オステオポンチン, p130, p130cas, p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, p170, p170 / MDR-1, p18INK4c, p19ARF, p19Skp1, p21WAF1, p27Kip1, p300 / CBP, p35nck5a, P504S, p53, p57Kip2 Ab-7, p63 (p53 ファミリーメンバー), p73, p73a, p73a/b, p95VAV, 副甲状腺ホルモン, 副甲状腺ホルモン受容体タイプ1, パーキン, PARP, PARP (ポリADP-リボースポリメラーゼ), Pax-5, パキシリン, PCNA, PCTAIRE2, PDGF, PDGFR α, PDGFRβ, Pds1, パーフォリン, PGP9.5, PHAS-I, PHAS-II, ホスホ-Ser/Thr/Tyr, ホスホチロシン, PLAP, 形質細胞マーカー, プラスミノーゲン, PLC γ 1, PMP-22, ニューモシスチス・ジロベシ (<i>Pneumocystis jiroveci</i>), PPAR-γ, PR3 (プロテイナーゼ 3), プレセニリン, プロゲステロン, プロゲステロン受容体, プロゲステロン受容体(リン酸化特異的) - セリン 190, プロゲステロン受容体(リン酸化特異的) - セリン 294, プロヒビチン, プロラクチン, プロラクチン受容体, 前立腺アポトーシス応答タンパク質-4, 前立腺特異的酸性ホスファターゼ, 前立腺特異的抗原, pS2, PSCA, 狂犬病ウイルス, RAD1, Rad51, Raf1, Raf-1 (リン酸化特異的), RAIDDD, Ras, Rad18, 腎細胞癌, Ret オンコプロテイン, 網膜芽細胞腫, 網膜芽細胞腫 (Rb) (リン酸化特異的セリン608), レチノイン酸受容体 (b), レチノイド X 受容体(hRXR), レチノール結合タンパク質, ロドプシン (オプシン), ROC, RPA/p32, RPA/p70, Ruv A, Ruv B, Ruv C, S100, S100A4, S100A6, SHP-1, SIM Ag (SIMA-4D3), SIRP a1, sm, SODD (デスドメインのサイレンサー), ソマトスタチン受容体-I, SRC1 (ステロイド受容体コアアクチベーター-I) Ab-1, SREBP-1 (ステロール調節エレメント結合タンパク質-1), SRF (血清応答因子), Stat-1, Stat3, Stat5, Stat5a, Stat5b, Stat6, ストレプトアビジン, スーパーオキシドジスムターゼ, サーファクタントタンパクA, サーファクタントタンパクB, サーファクタントタンパクB (Pro), サバイビン, SV40 ラージT抗原, Syk, シナプトフィジン, シヌクレイン, シヌクレインβ, シヌクレイン pan, TACE (TNF-α 変換酵素) / ADAM17, TAG-72, tau, TdT, テネイシン, テストステロン, TGFβ3, TGF-β2, Thomsen-Friedenreich抗原, トロンボスポンジン, チミジンホスホリラーゼ, チミジル酸シンターゼ, チミングリコール類, サイログロブリン, 甲状腺ホルモン受容体β, 甲状腺ホルモン受容体, 甲状腺刺激ホルモン (TSH), TID-1, TIMP-1, TIMP-2, TNF α, TNFa, TNF-R2, Topo IIβ, Topo IIソメラーゼ IIa, トキソプラズマ・ゴンディ (<i>Toxoplasma Gondii</i>), TR2, TRADD, トランスフォーミング 成長因子a, トランスグルタミナーゼ II, TRAP, トロポミオシン, TRP75 / gp75, TrxR2, TTF-1, チューブリン, チューブリン-a, チューブリン-b, チロシナーゼ, ユビキチン, UCP3, uPA, ウロコルチン, 血管内皮成長因子(VEGF), ビメンチン, ビンキュリン, ビタミン D 受容体(VDR), フォンヒッペル・リンダウタンパク質, Wnt-1, キサンチンオキシダーゼ, XPA, XPF, XPG, XRCC1, XRCC2, ZAP-70, Zip キナーゼ	10
		20
既知の癌遺伝子	ABL1, ABL2, ABL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, AKT1, AKT2, ALDH2, ALK, ALO17, APC, ARHGEF12, ARHH, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, CANT1, CARD11, CARS, CBFA2T1, CBFA2T3, CBFB, CBL, CBLB, CBLC, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2a(p14), CDKN2C, CDX2, CEBPA, CEP1, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, CIITA, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, COL1A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC3, CTNNB1, CYLD, D10S170, DAXX, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, DICER1, DNMT3A, DUX4, EBF1, EGFR, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, FACL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO11, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FH, FHIT, FIP1L1, FLI1,	30
		40

	FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, HCMOGT-1, HEAB, HERPUD1, HEY1, HIP1, HIST1H4I, HLF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH@, IGK@, IGL@, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIT, KLK2, KRAS, KTN1, LAF4, LASP1, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LMO2, LPP, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2K4, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLH1, MLL, MLL2, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYST4, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NSD1, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNUTL1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1A, PRO1073, PSIP2, PTCH, PTEN, PTPN11, RAB5EP, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAPIGDS1, RARA, RB1, RBM15, RECQL4, REL, RET, ROS1, RPL22, RPN1, RUNC2A, RUNX1, RUNXPB2, SBDS, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, SEPT6, SET, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH3GL1, SIL, SLC45A3, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SOCS1, SOX2, SRGAP3, SRSF2, SS18, SS18L1, SSH3BP1, SSX1, SSX2, SSX4, STK11, STL, SUFU, SUZ12, SYK, TAF15, TAL1, TAL2, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TFPT, TFRC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF6, TOP1, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA@, TRB@, TRD@, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, USP6, VHL, VTI1A, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WTX, XPA, XPC, XPO1, YWHAE, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2	10
既知の癌遺伝子	AR, androgen receptor; ARPC1A, actin-related protein complex 2/3 subunit A; AURKA, Aurora kinase A; BAG4, BCL-2 associated anthogene 4; BCL2L2, BCL-2 like 2; BIRC2, Baculovirus IAP repeat containing protein 2; CACNA1E, calcium channel voltage dependent alpha-1E subunit; CCNE1, cyclin E1; CDK4, cyclin dependent kinase 4; CHD1L, chromodomain helicase DNA binding domain 1-like; CKS1B, CDC28 protein kinase 1B; COPS3, COP9 subunit 3; DCUN1D1, DCN1 domain containing protein 1; DYRK2, dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2; EEF1A2, eukaryotic elongation transcription factor 1 alpha 2; EGFR, epidermal growth factor receptor; FADD, Fas-associated via death domain; FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1; GATA6, GATA binding protein 6; GPC5, glypican 5; GRB7, growth factor receptor bound protein 7; MAP3K5, mitogen activated protein kinase kinase kinase 5; MED29, mediator complex subunit 5; MITF, microphthalmia associated transcription factor; MTDH, metadherin; NCOA3, nuclear receptor coactivator 3; NKX2-1, NK2 homeobox 1; PAK1, p21/CDC42/RAC1-activated kinase 1; PAX9, paired box gene 9; PIK3CA, phosphatidylinositol-3 kinase catalytic a; PLA2G10, phospholipase A2, group X; PPM1D, protein phosphatase magnesium-dependent 1D; PTK6, protein tyrosine kinase 6; PRKCI, protein kinase C iota; RPS6KB1, ribosomal protein s6 kinase 70kDa; SKP2, s-phase kinase associated protein; SMURF1, sMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1; SHH, sonic hedgehog homologue; STARD3, sTAR-related lipid transfer domain containing protein 3; YWHAQ, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta isoform; ZNF217, zinc finger protein 217	30
有糸分裂関連癌遺伝子	Aurora kinase A (AURKA); Aurora kinase B (AURKB); Baculoviral IAP repeat-containing 5, survivin (BIRC5); Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (BUB1); Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta, BUBR1 (BUB1B); Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (BUB3);	40

	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B); CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2); Cell division cycle 2 (CDC2)/CDK1 Cell division cycle 20 homolog (CDC20); Cell division cycle-associated 8, borealin (CDCA8); Centromere protein F, mitotin (CENPF); Centrosomal protein 110 kDa (CEP110); Checkpoint with forkhead and ring finger domains (CHFR); Cyclin B1 (CCNB1); Cyclin B2 (CCNB2); Cytoskeleton-associated protein 5 (CKAP5/ch-TOG); Microtubule-associated protein RP/ EB family member 1. End-binding protein 1, EB1 (MAPRE1); Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2); Extra spindle poles like 1, separase (ESPL1); Forkhead box M1 (FOXO1); H2A histone family, member X (H2AFX); Kinesin family member 4A (KIF4A); Kinetochore-associated 1 (KNTC1/ROD); Kinetochore-associated 2; highly expressed in cancer 1 (KNTC2/HEC1); Large tumor suppressor, homolog 1 (LATS1); Large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2); Mitotic arrest deficient-like 1; MAD1 (MAD1L1); Mitotic arrest deficient-like 2; MAD2 (MAD2L1); Mps1 protein kinase (TTK); Never in mitosis gene a-related kinase 2 (NEK2); Ninein, GSK3b interacting protein (NIN); Non-SMC condensin I complex, subunit D2 (NCAPD2/CNAP1); Non-SMC condensin I complex, subunit H (NACPH/CAPH); Nuclear mitotic apparatus protein 1 (NUMA1); Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin); (NPM1); Nucleoporin (NUP98); Pericentriolar material 1 (PCM1); Pituitary tumor-transforming 1, securin (PTTG1); Polo-like kinase 1 (PLK1); Polo-like kinase 4 (PLK4/SAK); Protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1 (PIN1); Protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1); RAD21 homolog (RAD21); Ras association (RalGDS/AF-6); domain family 1 (RASSF1); Stromal antigen 1 (STAG1); Synuclein-c, breast cancer-specific protein 1 (SNCG, BCSG1); Targeting protein for Xklp2 (TPX2); Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3); Ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C); Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBE2I/UBC9); ZW10 interactor, (ZWINT); ZW10, kinetochore-associated homolog (ZW10); Zwilch, kinetochore-associated homolog (ZWILCH)
リボヌクレオタンパク質複合体	アルゴノートファミリーメンバー, Ago1, Ago2, Ago3, Ago4, GW182 (TNRC6A), TNRC6B, TNRC6C, HNRNPA2B1, HNRPAB, ILF2, NCL (ヌクレオリン), NPM1 (ヌクレオフォスミン), RPL10A, RPL5, RPLP1, RPS12, RPS19, SNRPG, TROVE2, アポリポタンパク, アポリポタンパク A, apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo A-V, アポリポタンパク B, apo B48, apo B100, アポリポタンパク C, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, アポリポタンパク D (ApoD), アポリポタンパク E (ApoE), アポリポタンパク H (ApoH), アポリポタンパク L, APOL1, APOL2, APOL3, APOL4, APOL5, APOL6, APOLD1

10

20

30

【0331】

本開示は、様々な癌および癌の状態（たとえば転移性 対 非転移性）に関連するポリペプチドおよび／または核酸バイオマーカーの評価を含め、所与の試験試料のバイオシグネチャーを決定する際に評価することができる様々なバイオマーカーを提供する。

【0332】

一例において、試験試料は、CA-125、CA 19-9およびC反応性タンパク質を含むがこれらに限定されない一つまたは複数のバイオマーカーの存在またはレベルを決定することにより、癌に関して評価することができる。癌は、生殖管の癌、たとえば卵巣癌であることができる。一つまたは複数のバイオマーカーはさらに、CD95、FAP-1、miR-200マイクロRNA、EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質CIII、ミオグロビン、テナシンC、MSH6、クローディン-3、クローディン-4、カベオリン-1、凝固因子III、CD9、CD36、CD37、CD53、CD63、CD81、CD136、CD147、Hsp70、Hsp90、Rab13、デスモコリン-1、EMP-2、CK7、CK20、GCD15、CD82、Rab-5b、アネキシンV、MFG-E8およびHLA-DRの一つまたは複数を含む、一つまたは複数のバイオマーカー、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれ以上のバイオマーカーを含むことができる。miR-200マイクロRNA（すなわちmiR-200マイクロRNAファミリー）は、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141およびmiR-429を含む。そのような評価は、本明細書に開示されるバイオマーカーそれぞれに関するタンパク質、核酸または両方の存在またはレベルの決定を含むことができる。

40

【0333】

50

CD95 (Fas、Fas抗原、Fas受容体、FasR、TNFRSF6、APT1またはAPO-1とも呼ばれる) は、アポトーシスの誘発を通して主に免疫系中の組織ホメオスタシスを調節するプロトタイプ細胞死受容体である。癌進行中、CD95が頻繁に下方制御されて細胞が耐アポトーシス性になり、それにより、腫瘍回避のための機序の一部としてCD95の損失が暗示される。CD95の腫瘍形成活性は、JNKおよびJunを含む経路によって媒介される。FAP-1 (Fas関連ホスファターゼ1、タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体タイプ13 (APO-1/CD95 (Fas) 関連ホスファターゼ)、PTPN13とも呼ばれる) はタンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) ファミリーのメンバーである。FAP-1は、CD95と相互作用しかつCD95を脱リン酸化し、それにより、Fas媒介プログラム細胞死における役割に影響を与えることが報告されており。MiR-200ファミリーメンバーはCD95およびFAP-1を調節することができる。その出版物が参照によりその全文が本明細書に組み入れられる、Schickel et al. miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. Mol. Cell., 38, 908-915 (2010)を参照すること。

【0334】

本明細書に開示される本発明の方法は、本明細書に開示される癌を含むがこれらに限定されない癌の存在または癌への素因を決定するために、生物学的試料中に存在する微小胞集団に関してCD95および／またはFAP-1特徴決定またはプロファイリングを使用することができる。複数のバイオマーカーのための多重化分析を含む本発明の方法は、miR-200マイクロRNA (たとえばmiR-200c) を含むがこれらに限定されない本明細書に開示される他のバイオマーカーとともにCD95および／またはFAP-1バイオマーカー特徴決定を使用する。ある態様においては、個人由来の生物学的試験試料を評価して、CD95および／またはFAP-1タンパク質の存在およびレベルまたはCD95+および／またはFAP-1+循環微小胞 (「cMV」) 集団の存在またはレベルを決定し、およびその存在またはレベルを参照 (たとえば、無疾患または正常、処置前または異なる処置時点からの試料) と比較する。この比較を使用して試験試料を特徴決定する。たとえば、試験試料および参照におけるCD95タンパク質、FAP-1タンパク質、CD95+cMVおよび／またはFAP-1+cMVの存在またはレベルの比較を使用して、疾患表現型を決定する、または処置に対する応答／非応答を予測する。関連する態様においては、cMV集団をさらに評価して、参照試料のトレーニングセットにおいて疾患または他の予後判定、セラノーシスもしくは診断用の読み取り値を示すように予め決定されているmiR-200マイクロRNAの存在またはレベルを測定する。非癌参照と比較した試験試料中のFAP-1のレベルの増大が癌の存在またはより高悪性度の癌の存在を示してもよい。非癌参照と比較したCD95またはmiR200ファミリーメンバー、たとえばmiR-200cのレベルの低下が癌の存在またはより高悪性度の癌の存在を示してもよい。評価されるcMV集団は、免疫沈降法、フローサイトメトリーまたは本明細書に開示される、または当技術分野において公知である他の単離方法によって単離することができる。

【0335】

関連する局面において、本発明は、A2ML1、BAX、C10orf47、Clorf162、CSDA、EIFC3、E TFB、GABARAPL2、GUK1、GZMH、HIST1H3B、HLA-A、HSP90AA1、NRGN、PRDX5、PTMA、RABAC1、RABAGAP1L、RPL22、SAP18、SEPW1、SOX1およびこれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22のバイオマーカーのレベルを検出する工程を含む、癌を特徴決定する方法を提供する。一つまたは複数のバイオマーカーは、チモシン α 1へと開裂され、かつ免疫調節において役割を有するプロ／パラチモシンファミリーのメンバーであるPTMA (プロチモシン α) を含むことができる。チモシン α 1は、少なくとも35の国においてB型およびC型肝炎の処置のために承認されており、また、他の疾患の処置において免疫応答をブーストするためのワクチンとの封入のために承認されている。ある態様においては、バイオマーカーはmRNAを含む。mRNAは、本明細書に記載されるように単離された小胞から単離することができる。いくつかの態様において、試料中の全小胞集団は、たとえばろ過または遠心分離によって単離される。小胞はまた、親和性により、たとえば一般的小胞バイオマーカー、疾患バイオマーカーまたは細胞特異的バイオマ

ーカーへの結合物質を使用して単離することもできる。バイオマーカーのレベルを対照、たとえば癌を有しない試料と比較することができ、対照に対するバイオマーカーのレベルの変化を使用して癌を特徴決定する。癌は前立腺癌であることができる。

【0336】

ある態様において、本発明によって評価される癌は前立腺癌を含み、転移性前立腺癌と非転移性前立腺癌とを区別するためにマイクロRNA (miR) が使用される。前立腺癌病期分類は、前立腺を超える癌拡散のリスクを分類するプロセスである。そのような拡散は、外科手術または放射線のような局所療法によって治癒される確率に関連する。そのような予後分類において考慮される情報は、身体検査、画像診断、血液検査および／または生検を含む臨床および病理学的要因に基づく。

10

【0337】

前立腺癌を病期分類するために使用されるもっとも一般的なスキームは、AJCC (American Joint Committee on Cancer) によって公布され、かつTNMシステムと呼ばれている。TNMシステムは、腫瘍のサイズ、含まれているリンパ節の程度、転移を評価し、かつまた、癌悪性度を考慮に入れる。多くの他の癌と同様に、癌は、多くの場合、病期、たとえばI～IV期によって分類される。一般に、I期疾患は、他の理由、たとえば良性前立腺肥大症のために前立腺組織が切除されたとき試料の小さな部分に偶然に見つかる癌であり、その細胞は正常な細胞によく似ており、前立腺は、触診する指には正常に感じられる。II期においては、前立腺のより多くが含まれ、そして前立腺内にしこりを感じることができる。III期においては、腫瘍が前立腺嚢全体に拡散し、そして前立腺の表面にしこりを感じることができる。IV期疾患においては、腫瘍は近隣構造を侵襲しているか、またはリンパ節もしくは他の臓器に拡散している。

20

【0338】

Whitmore-Jewett病期分類が、今ではあまり使用されないもう一つの病期分類スキームである。グリーソン (Gleason) 分類システムは、生検からの細胞内容物および組織構造に基づくものであり、疾患の破壊性および最終予後の推定を提供する。

【0339】

TNM腫瘍分類システムを使用して、対象の体の中の癌の範囲を表すことができる。Tは、腫瘍のサイズおよびそれが近隣組織を侵襲しているかどうかを表し、Nは、含まれる所属リンパ節を表し、およびMが遠隔転移を表す。TNMは、UICC (International Union Against Cancer) によって維持され、そしてAJCC (American Joint Committee on Cancer) およびFIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) によって使用されている。当業者は、すべての腫瘍がTNM分類を有するわけではない (たとえば脳腫瘍) ことを理解する。一般に、T (a, is, (0)、1～4) は、原発腫瘍のサイズまたは直接的な範囲として計測される。N (0～3) は、所属リンパ節への拡散の程度を指し、N0は、腫瘍細胞が所属リンパ節には存在しないことを意味し、N1は、腫瘍細胞が最近隣または少数の所属リンパ節に拡散したことを意味し、N2は、腫瘍細胞がN1とN3との間の範囲に拡散したことを意味し、N3は、腫瘍細胞が最遠隔または多数の所属リンパ節に拡散したことを意味する。M (0/1) は転移の存在を指し、MXは、遠隔転移が評価されなかったことを意味し、M0は、遠隔転移が存在しないことを意味し、M1は、遠隔臓器への転移が起こった (所属リンパ節を超えて) ことを意味する。M1はさらに、以下のように線引きすることができる。M1aは、癌が所属リンパ節を超えてリンパ節に拡散したことを示し、M1bは、癌が骨に拡散したことを示し、およびM1cは、癌が他の部位に拡散した (骨が含まれるかにかかわらず) ことを示す。また、他のパラメータが評価されてもよい。G (1～4) は癌細胞の悪性度を指す (すなわち、正常細胞と同様に見えるならば、低悪性度であり、十分に分化していないように見えるならば、高悪性度である)。R (0/1/2) は手術の完全さを指す (すなわち、切除境界部が癌細胞を有しない、または有する)。L (0/1) はリンパ管中への侵襲を指す。V (0/1) は静脈中への侵襲を指す。C (1～4) はVの確かさ (質) の修飾要因を指す。

30

40

【0340】

前立腺腫瘍は、多くの場合、グリーソン分類システムを使用して評価される。グリーソン

50

ン分類システムは、生検材料を解釈するとき病理学者によって評価される顕微鏡的腫瘍パターンに基づく。前立腺癌が生検材料中に存在するとき、グリーソンスコアは、正常な腺組織構造（すなわち、腺の形状、サイズおよび分化）の損失の程度に基づく。伝統的なグリーソン分類システムは、専門用語的には腫瘍「悪性度」と呼ばれる五つの基本的組織パターンを有する。癌によって生じる正常な腺構造のこの損失の顕微鏡的決定は、1～5の範囲の数である悪性度によって表される（5が最悪）。悪性度1は一般に、癌性前立腺が正常な前立腺組織によく似ている状態である。腺は小さく、形が良く、高密度である。悪性度2では、組織はまだ形の良い腺を有するが、しかし腺はより大きく、それらの間により多くの組織を有し、悪性度3では、組織はまだ認識可能な腺を有するが、しかし細胞はより黒ずんでいる。高倍率で見ると、悪性度3試料のこれらの細胞のいくつかは腺を離れ、かつ周囲組織を侵襲し始めている。悪性度4試料は、認識可能な腺が少ない組織を有し、かつ多くの細胞が周囲組織を侵襲している。悪性度5試料の場合、組織は認識可能な腺を有さず、かつ多くの場合、周囲組織全体に及ぶシート状の細胞である。

【0341】

転移性前立腺癌と非転移性前立腺癌とを区別するmiRは、非転移性試料よりも転移性試料の中で過剰発現することができる。または、転移性前立腺癌と非転移性前立腺癌とを区別するmiRは、転移性試料よりも非転移性試料の中で過剰発現することができる。転移性前立腺癌を区別するのに有用なmiRは、miR-495、miR-10a、miR-30a、miR-570、miR-32、miR-885-3p、miR-564およびmiR-134からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5、6、7または8のmiRを含む。もう一つの態様において、転移性前立腺癌を区別するためのmiRは、hsa-miR-375、hsa-miR-452、hsa-miR-200b、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-1296、hsa-miR-17^{*}、hsa-miR-100、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-20a^{*}、hsa-miR-572、hsa-miR-1236、hsa-miR-181a、hsa-miR-937およびhsa-miR-23a^{*}からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14のmiRを含む。さらに別の態様において、転移性前立腺癌を区別するのに有用なmiRは、hsa-miR-200b、hsa-miR-375、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-17^{*}、hsa-miR-1296、hsa-miR-20a^{*}、hsa-miR-100、hsa-miR-452およびhsa-miR-577からなる群より選択される、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8または9のmiRを含む。転移性前立腺癌を区別するためのmiRは、miR-141、miR-375、miR-200bおよびmiR-574-3pからなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3または4のmiRであることができる。

【0342】

ある局面においては、癌と非癌試料とを区別するためにマイクロRNA（miR）が使用される。患者試料に由来する小胞を、その小胞内に含まれるmiRペイロードに関して分析することができる。試料は、精液、尿、血液、血清または血漿を含む体液であることができる。試料はまた、組織または生検試料を含むことができる。miRを検出するためにいくつかの異なる方法が利用可能である。いくつかの態様においては、複数のmiRの発現を同時に問うためにmiRパネルのアレイが使用される。Exiqon mIRCURY LNAマイクロRNA PCRシステムパネル（Exiqon, Inc., Woburn, MA）をそのような目的に使用することができる。癌を区別するmiRは、対照試料よりも癌の中で過剰発現することができる。または、癌を区別するmiRは、対照よりも癌試料の中で過剰発現することができる。癌を非癌から区別するのに有用なmiRは、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-331-3p、hsa-miR-326、hsa-miR-181a-2^{*}、hsa-miR-130b、hsa-miR-301a、hsa-miR-141、hsa-miR-432、hsa-miR-107、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-625^{*}、hsa-miR-497およびhsa-miR-484からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13のmiRを含む。もう一つの態様において、癌を非癌から区別するのに有用なmiRは、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-331-3p、hsa-miR-432、hsa-miR-326、hsa-miR-2110、hsa-miR-107、hsa-miR-130b、hsa-miR-301aおよびhsa-miR-625^{*}からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のmiRを含む。さらに別の態様において、癌を非癌から区別するのに有用なmiRは、hsa-miR-107、hsa-miR-326、hsa-miR-432、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-625^{*}、hsa-miR-2110、hsa-miR-301a、hsa-miR-141またはhsa-miR-373^{*}

からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8または9のmiRを含む。癌は上記の癌を含むことができる。例示的な態様において、癌は前立腺癌であり、マイクロRNA (miR) は、そして前立腺癌試料と非癌試料とを区別するために使用される。

【0343】

方法は、循環バイオマーカーの組み合わせを強化することを考慮する。たとえば、抗体アレイからの複数のマーカーおよびmiR分析を使用して、前立腺癌を正常、BPHおよびPCaから区別する、または転移性疾患を非転移性疾患に対して区別することができる。このようにして、改善された感度、特異度および／または精度を得ることができる。いくつかの態様においては、患者試料中の、hsa-miR-432、hsa-miR-143、hsa-miR-424、hsa-miR-204、hsa-miR-581fおよびhsa-miR-451からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5または6のmiRのレベルを検出して、前立腺癌の存在を評価する。これらのmiRのいずれかが、 $<4.0\text{ng/ml}$ の血清PSAを有するPCa患者において上昇することができる。ある態様において、本発明は、対由来の試料中の、hsa-miR-432、hsa-miR-143、hsa-miR-424、hsa-miR-204、hsa-miR-581fおよびhsa-miR-451からなる群より選択される一つまたは複数の、たとえば1、2、3、4、5または6のmiRのレベルを測定することを含む、前立腺癌を評価する方法を提供する。試料は、体液、たとえば血液、血漿または血清であることができる。miRは、試料から単離された小胞中で単離することができる。対象は、何らかの閾値、たとえば血液試料中2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8または6.0ng/ml未満のPSAレベルを有することができる。参照試料中よりも高いレベルのmiRが試料中のPCaの存在を示すことができる。いくつかの態様において、参照は、PCaを有しない対象由来の対照試料中の一つまたは複数のmiRのレベルを含む。いくつかの態様において、参照は、何らかの閾値、たとえば2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8または6.0ng/ml以上のPSAレベルを有する、PCaを有する対象由来の対照試料中の一つまたは複数のmiRのレベルを含む。閾値は4.0ng/mlであることができる。

【0344】

本発明のいくつかの態様においては、患者試料中の小胞を評価して、診断、予後判定またはセラノーシス用の読み取り値を提供する。患者試料の小胞分析は、本明細書に記載されるような小胞表面バイオマーカー、たとえば表面抗原および／または小胞ペイロード、たとえばmRNAおよびマイクロRNAの検出を含む。小胞分析方法は、それらの出願が参照により全体として本明細書に組み入れられる、「METHODS AND SYSTEMS OF USING EXOSOMES FOR DETERMINING PHENOTYPES」と題する2009年11月12日出願のPCT特許出願第PCT/US09/06095号、「METHODS AND SYSTEMS OF USING VESICLES FOR DETERMINING PHENOTYPES」と題する2010年7月7日出願の米国特許仮出願第61/362,674号および「DETECTION OF GI CANCERS」と題する2010年10月15日出願の米国特許仮出願第61/393,823号に提示されている。

【0345】

一つの局面において、本発明は、該対象由来の生物学的試料中の一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーを同定する方法であって、バイオシグネチャーが小胞表面抗原および小胞ペイロードの分析を含む方法を含む。表面抗原は表面タンパク質を含むことができ、および小胞ペイロードはマイクロRNAを含むことができる。たとえば、小胞は、小胞表面抗原を認識する結合物質を使用して捕捉することができ、そしてそれらの捕捉された小胞の中のマイクロRNAを評価することができる。したがって、バイオシグネチャーは、捕捉に使用される表面抗原および小胞内のマイクロRNAを含んでもよい。バイオシグネチャーは、診断、予後判定またはセラノーシス目的に使用することができる。たとえば、バイオシグネチャーは、癌を同定する、高悪性度または転移性の癌を同定する、または候補治療剤に応答する可能性がある癌を同定するシグネチャーであることができる。

【0346】

説明のための例として、B7H3に対する抗体を使用して試料中の小胞を捕捉し、次いで、

捕捉した小胞内のmiR-141のレベルを評価する方法を考えてみる。この例において、バイオシグネチャーは、B7H3を表面上に示すエキソソーム内のmiR-141のレベルを含む。試料中のB7H3+小胞のレベルおよび試料内のmiR-141のレベルに依存して、バイオシグネチャーは、試料が、癌を含有する、高悪性度の癌を含有する、特定の化学療法剤に応答する可能性がある、などということを示してもよい。

【0347】

一つの態様において、対象における癌を評価する方法は、該対象由来の生物学的試料中の一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーを同定する工程、一つまたは複数の一般的小胞タンパク質バイオマーカーのレベルを決定する工程、一つまたは複数の細胞特異的バイオマーカーのレベルを決定する工程、一つまたは複数の疾患特異的タンパク質バイオマーカーのレベルを決定する工程、および小胞中の一つまたは複数のマイクロRNAバイオマーカーのレベルを決定する工程を含み、該特徴決定が、該試料中のバイオマーカーの該レベルを参照と比較して、該対象が癌に罹患しやすいかどうか、または癌に罹患しているかどうかを判定することを含む。タンパク質バイオマーカーは、単一のアッセイにおいて多重に検出することができる。マイクロRNAバイオマーカーもまた、単一のアッセイにおいて多重に検出することができる。いくつかの場合、細胞特異的バイオマーカーと疾患特異的バイオマーカーとが重複してもよく、たとえば、一つのバイオマーカーが特定の細胞起源からの癌を同定するように働いてもよい。生物学的試料は、体液、たとえば血液、血清または血漿であることができる。

【0348】

一例において、本発明の方法は、患者からの血液試料から小胞を単離して、前立腺癌の存在または非存在を示す小胞を検出することを含む、前立腺癌の診断検査を含む。血液は血清または血漿であることができる。小胞は、特定の小胞表面抗原を認識する「捕捉抗体」を用いる捕捉によって単離される。前立腺癌診断アッセイ法のための表面抗原としては、血液中の小胞上に一般に存在し、したがって一般的小胞バイオマーカーとして働くテトラスパンニンCD9、CD63およびCD81、前立腺特異的バイオマーカーPSMAおよびPCSAならびに癌特異的バイオマーカーB7H3を含む。いくつかの場合、EpCamが、癌特異的バイオマーカーとして、B7H3とともに、またはそれに代えて使用される。捕捉抗体は基体につながれていることができる。ある態様において、基体は、蛍光標識されたビーズを含み、ビーズは捕捉抗体ごとに差別的に標識されている。所望により、癌を特徴決定するために、検出された小胞のペイロードを評価することもできる。

【0349】

上記のように、本発明のバイオマーカーを評価してバイオシグネチャーを同定することができる。ある局面において、本発明は、生物学的試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程であって、該一つまたは複数のバイオマーカーは表5から選択される一つまたは複数のバイオマーカーを含む、工程；および該一つまたは複数のバイオマーカーの該存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む、方法を提供する。いくつかの態様において、方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含み、該比較を使用して、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である癌を含む癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーはまた、対象由来、たとえば正常な隣接組織由来、または別の時点で対象から採取された試料由来であることもできる。癌を特徴決定する様々な方法が本明細書に開示されている。たとえば、癌の特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノーシス用の特徴決定を提供することを含む。生物学的試料は、非限定的に、本明細書に開示される体液を含む体液を含む。たとえば、体液は尿、血液または血液由来物を含んでもよい。

【0350】

一つまたは複数のバイオマーカーは、miR-22、let7a、miR-141、miR-182、miR-663、miR-155、miR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628-5p、miR-517^{*}、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224^{*}、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b^{*}、miR-1179およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーであることができる。ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、miR-22、let7a、miR-141、miR-920、miR-450aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される。一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、本明細書の表20~24のいずれかにおける遺伝子およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) であってもよい。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーは、A2ML1、BAX、C10orf47、Clorf162、CSDA、EIFC3、ETFB、GABARAPL2、GUK1、GZMH、HIST1H3B、HLA-A、HSP90AA1、NRGN、PRDX5、PTMA、RABAC1、RABAGAP1L、RPL22、SAP18、SEPW1、SOX1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのメッセンジャーRNA (mRNA) を含んでもよい。一つまたは複数のバイオマーカーは、A2ML1、GABARAPL2、PTMA、RABAC1、SOX1、ETFBおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される1、2、3、4、5または6のメッセンジャーRNA (mRNA) を含んでもよい。一つまたは複数のバイオマーカーは、微小胞集団のペイロードとして単離されてもよい。集団は、試料由来の微小胞の全集団であることもできるし、または特定の集団、たとえばPCSA+集団であることもできる。ある態様において、方法は、前立腺癌を評価するために使用される。たとえば、方法は、前立腺癌を含む試料を前立腺癌を有しない試料から区別するために使用することができる。

10

20

【0351】

ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1、EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質CIII、ミオグロビン、テナシンC、MSH6、クローディン-3、クローディン-4、カベオリン-1、凝固因子III、CD9、CD36、CD37、CD53、CD63、CD81、CD136、CD147、Hsp70、Hsp90、Rab13、デスモコリン-1、EMP-2、CK7、CK20、GCDF15、CD82、Rab-5b、アネキシニンV、MFG-E8、HLA-DR、miR200マイクロRNA、miR-200cおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される。一つまたは複数のバイオマーカーは、CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1、2、3、4または5のバイオマーカーを含んでもよい。一つまたは複数のバイオマーカーは、試料から直接単離されてもよいし、または表面抗原もしくは微小胞集団のペイロードとして単離されてもよい。ある態様において、方法は、卵巣癌を評価するために使用される。たとえば、方法は、卵巣癌を含む試料を卵巣癌を有しない試料から区別するために使用することができる。または、方法は、異なる病期または予後を有する卵巣癌の間で区別するために使用することもできる。

30

【0352】

もう一つの態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-141、hsa-miR-432、hsa-miR-326、hsa-miR-2110、hsa-miR-181a-2^{*}、hsa-miR-107、hsa-miR-301a、hsa-miR-484、hsa-miR-625^{*}およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。方法は、前立腺癌を評価するために使用することができる。たとえば、方法は、前立腺癌を含む試料を前立腺癌を有しない試料から区別するために使用することができる。さらに別の態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-20a^{*}、hsa-miR-375、hsa-miR-200b、hsa-miR-379、hsa-miR-572、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-23a^{*}、hsa-miR-1236、hsa-miR-609、hsa-miR-17^{*}、hsa-miR-130b、hsa-miR-619、hsa-miR-624^{*}、hsa-miR-198およびそれらの組み合わせからなる群より選択される

40

50

。たとえば、方法は、転移性前立腺癌を含む試料を非転移性前立腺癌を有する試料から区別するために使用することができる。一つまたは複数のバイオマーカーは、微小胞集団のペイロードとして単離されてもよい。

【0353】

一つまたは複数のバイオマーカーはmiR-497であってもよい。方法は、肺癌を評価するために使用することができる。たとえば、方法は、肺癌試料を非癌試料から区別するために使用することができる。一つまたは複数のバイオマーカーは、微小胞集団のペイロードとして単離されてもよい。

【0354】

一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、AQP2、BMP5、C16orf86、CXCL13、DST、ERCC1、GNAO1、KLHL5、MAP4K1、NELL2、PENK、PGF、POU3F1、PRSS21、SCML1、SEMG1、SMARCD3、SNAI2、TAF1C、TNNT3およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含んでもよい。mRNAは微小胞から単離されてもよい。方法は、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を癌を有しない正常な試料から区別するために使用することができる。もう一つの態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、ADRB2、ARG2、C22orf32、CYorf14、EIF1AY、FEV、KLK2、KLK4、LRRC26、MAOA、NLGN4Y、PNPLA7、PVRL3、SIM2、SLC30A4、SLC45A3、STX19、TRIM36、TRPM8およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。mRNAは微小胞から単離されてもよい。方法は、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を、別の癌、たとえば乳癌を有する試料から区別するために使用することができる。さらに別の態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、ADRB2、BAIAP2L2、C19orf33、CDX1、CEACAM6、EEF1A2、ERN2、FAM110B、FOXA2、KLK2、KLK4、LOC389816、LRRC26、MIPOL1、SLC45A3、SPDEF、TRIM31、TRIM36、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。mRNAは微小胞から単離されてもよい。方法は、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を、別の癌、たとえば結腸直腸癌を有する試料から区別するために使用することができる。さらに別の態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、ASTN2、CAB39L、CRIP1、FAM110B、FEV、GSTP1、KLK2、KLK4、LOC389816、LRRC26、MUC1、PNPLA7、SIM2、SLC45A3、SPDEF、TRIM36、TRPV6、ZNF613およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。mRNAは微小胞から単離されてもよい。方法は、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を、別の癌、たとえば肺癌を有する試料から区別するために使用することができる。一つまたは複数のバイオマーカーはまた、前立腺癌を特徴決定するために使用されるmRNAの一つまたは複数を制御するマイクロRNAであることもできる。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのバイオマーカーは、miRs-26a+b、miR-15、miR-16、miR-195、miR-497、miR-424、miR-206、miR-342-5p、miR-186、miR-1271、miR-600、miR-216b、miR-519ファミリー、miR-203およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるマイクロRNAを含んでもよい。マイクロRNAは、微小胞集団のペイロードとして評価することができる。

【0355】

本発明はまた、バイオマーカー複合体を評価することによってバイオシグネチャーを同定する方法を提供する。ある局面において、方法は、生物学的試料から一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を単離する工程、一つまたは複数の核酸-タンパク質複合体を有する一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程、および一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む。いくつかの態様において、バイオシグネチャーはまた、複合体の一つまたは複数のタンパク質または他の成分の存在またはレベルを含んでもよい。核酸-タンパ

ク質複合体は、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である方法を使用して生物学的試料から単離されてもよい。たとえば、複合体は、複合体の成分に対する結合物質を使用するアフィニティー選択、たとえば免疫沈降法、カラムクロマトグラフィーまたはフローサイトメトリーによって単離されてもよい。結合物質は、本明細書に記載されるようなもの、たとえば、複合体のタンパク質成分に対する抗体またはアプタマーであることができる。いくつかの態様において、方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含み、該比較を使用して、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である癌を含む癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーはまた、対象由来、たとえば、正常な隣接組織由来、または別の時点で採取された試料由来であることもできる。癌を特徴決定する様々な方法が本明細書に開示されている。たとえば、癌の特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノーシス用の特徴決定を提供することを含む。生物学的試料は、非限定的に、本明細書に開示される体液を含む体液を含む。たとえば、体液は尿、血液または血液由来物を含んでもよい。

10

【0356】

ある態様において、核酸-タンパク質複合体は、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A)、TNRC6B、TNRC6C、HNRNPA2B1、HNRNPAB、ILF2、NCL (ヌクレオリン)、NPM1 (ヌクレオホスミン)、RPL10A、RPL5、RPLP1、RPS12、RPS19、SNRPG、TROVE2、アポリボタンパク質、アポリボタンパク質A、アポA-I、アポA-II、アポA-IV、アポA-V、アポリボタンパク質B、アポB48、アポB100、アポリボタンパク質C、アポC-I、アポC-II、アポC-III、アポC-IV、アポリボタンパク質D (アポD)、アポリボタンパク質E (アポE)、アポリボタンパク質H (アポH)、アポリボタンパク質L、APOL1、APOL2、APOL3、APOL4、APOL5、APOL6、APOLD1およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはより多くのタンパク質を含む。たとえば、核酸-タンパク質複合体は、一つまたは複数のArgonauteファミリーメンバー、Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含んでもよい。核酸-タンパク質複合体は、Ago2、アポリボタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含む。

20

30

【0357】

複数の態様において、核酸-タンパク質複合体中の一つまたは複数の核酸は一つまたは複数のマイクロRNAを含む。たとえば、一つまたは複数のマイクロRNA、たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50またはより多くのマイクロRNAは、表5におけるマイクロRNAであることができる。一つまたは複数のマイクロRNAは、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451、let7aおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNA、たとえば1、2、3、4、5または6のマイクロRNAを含んでもよい。一つまたは複数のマイクロRNAは、非限定的に、前立腺癌を含む癌を特徴決定する、たとえば診断、予後判定判定またはセラノーシス用の判定を行うために評価されてもよい。

40

【0358】

ある態様において、核酸-タンパク質複合体は、Ago2、アポリボタンパク質I、GW182 (TNRC6A) およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のタンパク質を含み、ならびに一つまたは複数のマイクロRNAは、miR-16およびmiR-92aならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される一つまたは複数のマイクロRNAを含む。一つまたは複数のマイクロRNAは、前立腺癌を特徴決定するために評価されてもよい。

【0359】

50

本発明はさらに、関心対象の微小胞集団中の核酸を検出する工程を含む、バイオシグネチャーを決定する方法を提供する。小胞集団は、生物学的試料中の全集団であることもできるし、または特定の表面抗原を有する部分集団のような部分集団であることもできる。方法は、生物学的試料由来の微小胞集団中の一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーを検出する工程、検出された微小胞集団と結合した一つまたは複数の核酸バイオマーカーの存在またはレベルを決定する工程、および一つまたは複数の核酸の存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程を含む。微小胞集団を検出し、タンパク質を検出し、および核酸を評価するための技術は、本明細書に開示されたものであることもできるし、または当技術分野において公知のものであることもできる。たとえば、微小胞は、一つまたは複数のタンパク質に対するアフィニティー選択によって単離することができ、お

10

よび核酸は、選択された微小胞から単離することができる。一つまたは複数の核酸バイオマーカーのレベルは、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルまたは微小胞集団のレベルに正規化することができる。いくつかの態様において、方法はさらに、バイオシグネチャーを参照バイオシグネチャーと比較する工程を含み、該比較を使用して、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である癌を含む癌を特徴決定する。参照バイオシグネチャーは、癌を有しない対象由来であることができる。参照バイオシグネチャーはまた、対象由来、たとえば、正常な隣接組織由来、または別の時点で採取された試料由来であることもできる。癌を特徴決定する様々な方法が本明細書に開示されている。たとえば、癌の特徴決定は、対象における癌の存在もしくはリスクを同定すること、

20

または対象における癌を転移性または高悪性度として同定することを含んでもよい。比較工程は、バイオシグネチャーが参照バイオシグネチャーに対して変化しているかどうかを判定し、それにより、癌に関する予後判定、診断またはセラノースイス用の特徴決定を提供することを含む。生物学的試料は、非限定的に、本明細書に開示される体液を含む体液を含む。たとえば、体液は尿、血液または血液由来物を含んでもよい。

【0360】

微小胞集団中の一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーを検出するために使用されるタンパク質は、本明細書中、たとえば表3〜5または9〜11に開示されている一つまたは複数のバイオマーカーを含んでもよい。たとえば、一つまたは複数のタンパク質は、PCSA、Ago2、CD9およびそれらの組み合わせからなる群より選択することができる。たとえば、一つまたは複数のタンパク質は、PCSA、Ago2、CD9、PCSAおよびAgo2、PCSAおよびCD9、Ago2およびCD9またはPCSA、Ago2およびCD9のすべてであることができる。表3中にあるようなもう一つの一般的小胞マーカー、たとえばCD63またはCD81のようなテトラスパニンを、CD9に代えて、またはCD9に加えて使用することもできる。そのような複数のバイオマーカーは、特定の起源を有する微小胞集団を同定するために使用することができる。たとえば、PCSAは、前立腺由来の小胞を同定することができ、一方、CD9は、壊死組織片は別として、小胞を同定する。PCSA、PSMA、PSCA、KLK2またはPBP（前立腺結合タンパク質）は、前立腺癌を特徴決定するためのバイオマーカーとして使用することができる。

【0361】

一つまたは複数の核酸バイオマーカーは、本明細書に開示されている、たとえば表5における一つまたは複数の核酸を含んでもよい。ある態様において、一つまたは複数の核酸は一つまたは複数のマイクロRNAを含む。たとえば、一つまたは複数のマイクロRNAは、miR-22、miR-16、miR-148a、miR-92a、miR-451およびlet7aの1、2、3、4、5または6から選択することができる。ある態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよびAgo2を含み、および一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22を含む。もう一つの態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよび／またはCD9を含み、ならびに一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22を含む。方法は、前立腺癌のような癌を特徴決定するために、たとえば癌試料を非癌試料から区別するために使用することができる。

【0362】

他の態様において、一つまたは複数の核酸はmRNAを含む。mRNAは、微小胞内のペイロー

10

20

30

40

50

ドとして評価することができる。たとえば、一つまたは複数の核酸バイオマーカーは、表5から選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。mRNAはまた、表22~24のいずれかから選択されてもよい。いくつかの態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAを含み、一つまたは複数の核酸バイオマーカーは、表22~24のいずれかから選択されるメッセンジャーRNA (mRNA) を含む。方法は、前立腺癌のような癌を特徴決定するために、たとえば癌試料を非癌試料から区別するために使用することができる。

【0363】

一つまたは複数の核酸バイオマーカーのレベルは、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルに正規化することができる。ある態様において、バイオシグネチャーは、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーのレベルと一つまたは複数の核酸バイオマーカーのレベルとの比から算出されるスコアを含む。たとえば、核酸のレベルをタンパク質のレベルで割ることができる。

10

【0364】

スコアは、複数のタンパク質および複数の核酸から算出することができる。ある態様において、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーはPCSAおよびPSMAを含み、ならびに一つまたは複数の核酸バイオマーカーはmiR-22およびlet7aを含む。方法は、前立腺癌を特徴決定するために、たとえば前立腺癌試料を非前立腺癌試料から区別するために使用される。スコアは、a) 微小胞部分集団中のmiR-22ペイロードのレベルを微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第一の倍数、b) 微小胞部分集団中のlet7aペイロードのレベルを微小胞部分集団と結合したPCSAタンパク質のレベルで割った第二の倍数、およびc) 微小胞部分集団と結合したPSMAタンパク質のレベルの第三の倍数の合計をとることを含んでもよい。第一、第二および第三の倍数は、前立腺癌を区別する方法の能力を最大化するように選択することができる。たとえば、倍数は、約0.0001、0.001、0.01、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000または10000であることができる。ある態様において、第一の倍数は10であり、第二の倍数は10であり、第三の倍数は1である。スコアは、以下のように合計の平均であることができる。

20

スコア = 平均 (10*miR22/PCSA MFI, 10*let-7a/PCSA MFI, PSMA MFI)

【0365】

当業者は、スコアを算出することが合計の単調変換を含んでもよいことを理解するであろう。代替バイオマーカーを使用して他の癌を特徴決定するような他の設定における他のバイオマーカーに関しても同様なスコアリング式を立てることができる。

30

【0366】

比較のための適切な参照試料を選択することにより、同定されたバイオシグネチャーは、診断用の読み取り値 (たとえば、参照試料は正常または無疾患である)、予後判定用の読み取り値 (たとえば、参照試料は、不十分または良好な疾患転帰、高悪性度などの試料である) またはセラノーシス用の読み取り値 (たとえば、参照試料は、選択された処置に応答性または非応答性のコホートからの試料である) を提供することができる。

【0367】

本発明の方法において使用可能なさらなるバイオマーカーには、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる、2012年2月17日出願の国際特許出願第PCT/US2012/025741号、2011年8月18日出願の国際特許出願第PCT/US2011/048327号、2011年3月1日出願の国際特許出願第PCT/US2011/026750号、および2011年4月6日出願の国際特許出願第PCT/US2011/031479号に記載されたバイオマーカーが含まれる。

40

【0368】

遺伝子融合

小胞の評価した1つ以上のバイオマーカーは、遺伝子融合であり得る。融合遺伝子は、2つの以前は別個の遺伝子の並列によって作製されるハイブリッド遺伝子である。これは、染色体転座もしくは逆位、欠失によって、またはトランススプライシングを介して生じ得る。結果として得られる融合遺伝子は、細胞増殖因子、血管新生因子、腫瘍プロモーター、または細胞の悪性形質転換および腫瘍の生成の一因となる他の因子の異常発現をもたら

50

す等の、遺伝子の異常な時間的および空間的発現を引き起こし得る。このような融合遺伝子は、1) 細胞増殖因子、腫瘍プロモーター、または遺伝子発現の増加をもたらす発癌性を促進する他の遺伝子のコード領域に隣接した1つの遺伝子の強力なプロモーター領域の並列のため、または2) 2つの異なる遺伝子のコード領域の融合によりキメラ遺伝子、ひいては異常な活性があるキメラタンパク質が生じるため、発癌性であり得る。

【0369】

融合遺伝子の一例は、慢性骨髄性白血病（CML）の約90%および急性白血病のサブセットにおける特徴的分子異常である、BCR-ABLである（Kurzrock et al., *Annals of Internal Medicine* 2003;138(10):819-830）。BCR-ABLは、染色体9番と22番の間の転座に起因する。転座は、BCR遺伝子の5'領域およびABL1の3'領域を接合し、キメラBCR-ABL1遺伝子を生じ、これは、構造的に活性なチロシンキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする（Mittleman et al., *Nature Reviews Cancer* 2007;7(4):233-245）。異常なチロシンキナーゼ活性は、脱調節された細胞シグナリング、細胞増殖および細胞生存、アポトーシス抵抗性および増殖因子非依存性をもたらし、これらの全ては、白血病の病態生理の一因となる（Kurzrock et al., *Annals of Internal Medicine* 2003;138(10):819-830）。

【0370】

別の融合遺伝子は、バーキットリンパ腫の約80%を決定付ける特徴である、IGH-MYCである（Ferry et al. *Oncologist* 2006; 11(4):375-83）。この原因となる事象は染色体8番と14番の転座であり、免疫グロブリン重鎖遺伝子の強力なプロモーターに隣接してc-Mycの発癌遺伝子をもたらし、c-myc過剰発現を引き起こす（Mittleman et al., *Nature Reviews Cancer* 2007;7(4):233-245）。c-myc転位は、永続的に増殖性の状態をもたらす場合、リンパ腫発生において重要な事象である。それは、細胞周期、細胞分化、アポトーシス、および細胞粘着を通して、進行において広範な影響を有する（Ferry et al. *Oncologist* 2006;11(4):375-83）。

【0371】

多くの再発融合遺伝子は、Mittlemanデータベース（cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mittleman）にカタログ化されており、小胞中で評価され、表現型を特徴決定するために使用することができる。遺伝子融合は、血液悪性腫瘍または上皮腫瘍を特徴決定するために使用することができる。例えば、TMPRSS2-ERG、TMPRSS2-ETV、およびSLC45A3-ELK4融合を検出し、前立腺癌を特徴決定するために使用することができ、乳癌については、ETV6-NTRK3およびODZ4-NRG1を検出することができる。

【0372】

さらに、融合遺伝子の存在もしくは不在、または発現レベルを評価することを、癌等の表現型の診断、および、治療の選択に対する治療反応のモニタリングに使用することができる。例えば、BCR-ABL融合遺伝子の存在は、CMLの診断のための特徴であるだけでなく、CMLの治療のための、受容体チロシンキナーゼ阻害剤である薬物メシル酸イマチニブ（グリベック、Novartis社）の標的でもある。イマチニブ療法は、分子反応（BCR-ABLの消失＋血液細胞）をもたらし、BCR-ABL＋CML患者において無増悪生存率を向上している（Kantarjian et al., *Clinical Cancer Research* 2007;13(4):1089-1097）。

【0373】

遺伝子融合の存在、非存在または発現レベルに関する小胞の評価は、遺伝子融合の存在、非存在または発現レベルに関して不均一小胞集団を評価することによる評価であることができる。または、評価される小胞は、特定の細胞タイプに由来する小胞、たとえば上記のような起始細胞特異的小胞であることができる。表現型を特徴決定するために評価することができる融合の使用例は、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号に記載されているものを含む。

【0374】

遺伝子関連miRNAバイオマーカー

特定の転写物と相互作用することが知られ、表現型を特徴決定するために評価すること

ができるmiRNAバイオマーカーの例示的使用例は、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号に記載されているものを含む。

【0375】

核酸-タンパク質複合体バイオマーカー

ヒト血漿中のマイクロRNAが、循環微小胞、Argonauteタンパク質ならびにHDLおよびLDL複合体と結合していることがわかっている。たとえば、Arroyo et al., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 2011. 108:5003-08. Epub 2011 Mar 7、Collino et al., Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. PLOS One. 2010 5(7):e11803を参照すること。Argonauteファミリーのタンパク質はRNA干渉（RNAi）遺伝子サイレンシングにおいて役割を演じる。Argonauteタンパク質は、短いRNA、たとえばマイクロRNA（miRNA）または短い干渉性RNA（siRNA）に結合し、かつそれらの相補的mRNAの翻訳を抑制する。これらはまた、アンチジーンRNAまたはagRNAとも知られる短いRNAが相補的プロモータ領域の転写抑制を指示する転写型遺伝子サイレンシング（TGS）にも関与している。Argonauteファミリーメンバーは、Argonaute 1（「真核生物翻訳開始因子2C,1」、EIF2C1、AGO1）、Argonaute 2（「真核生物翻訳開始因子2C,2」、EIF2C2、AGO2）、Argonaute 3（「真核生物翻訳開始因子2C,3」、EIF2C3、AGO3）およびArgonaute 4（「真核生物翻訳開始因子2C,4」、EIF2C4、AGO4）を含む。いくつかのArgonauteアイソタイプが同定されている。Argonaute 2は、それがマイクロRNAサイレンシング経路における標的メッセンジャーRNAのサイレンシングにおいて役割を演じるRNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）内のエフェクタタンパク質である。

【0376】

タンパク質GW182は微小胞と結合し、また、すべてのヒトArgonauteタンパク質（たとえばAgo1、Ago2、Ago3、Ago4）およびそれらの関連するmiRNAに結合する能力を有する。たとえば、Gibbings et al., Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity, Nat Cell Biol 2009 11:1143-1149. Epub 2009 Aug 16、Lazzaretti et al., The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. RNA. 2009 15:1059-66, Epub 2009 Apr 21を参照すること。TNRC6A遺伝子（6Aを含むトリヌクレオチドリピート）によってコードされるGW182は、RNA干渉（RNAi）およびマイクロRNA経路を通して転写後遺伝子サイレンシングにおいて機能する。TNRC6BおよびTNRC6Cもまた、6ファミリーを含むトリヌクレオチドリピートのメンバーであり、かつ遺伝子サイレンシングにおいて同様な役割を演じる。GW182は、GW体またはP体として知られる細胞質体中のmRNAおよびArgonauteタンパク質と結合する。GW182は、miRNA依存性翻訳抑制およびArgonauteファミリータンパク質による相補的mRNAのsiRNA依存性ヌクレオチド鎖切断開裂に関与している。

【0377】

ある局面において、本発明は、核酸-タンパク質複合体バイオマーカーを分析する工程を含む、表現型を特徴決定する方法を提供する。本明細書において使用される核酸-タンパク質複合体は、少なくとも一つの核酸および少なくとも一つのタンパク質を含み、また、脂質のような他の成分も含むことができる。核酸-タンパク質複合体は小胞に結合していてもよい。ある態様において、RNA-タンパク質複合体が単離され、および結合したRNAのレベルが評価され、そのレベルを使用して表現型を特徴決定する、たとえば診断、予後判定、セラノーシスまたは本明細書に記載される他の表現型を提供する。RNAはマイクロRNAであることができる。マイクロRNAは、小胞およびタンパク質と結合していることがわかっている。いくつかの場合、この結合が、RNAアーゼまたは他の因子による分解からmiRNAを保護するように働いてもよい。非限定的に小胞結合miR、Ago結合miR、起始細胞小胞結合miR、循環Ago結合miR、循環HDL結合miRおよび全miR内容物を含む、マイクロRNAの様々

な集団の内容物を試料の中で評価することができる。

【0378】

複合体を単離するために使用されるタンパク質バイオマーカーは、一つまたは複数のArgonauteタンパク質またはArgonauteファミリーメンバーと結合する他のタンパク質であることができる。これらは、非限定的に、Argonauteタンパク質Ago1、Ago2、Ago3、Ago4およびそれらの様々なアイソフォームを含む。タンパク質バイオマーカーは、GW182 (TNRC6A)、TNRC6Bおよび／またはTNRC6Cであることができる。タンパク質バイオマーカーは、P体またはGW体と結合したタンパク質、たとえばSW182、Argonaute、デキャッピング酵素またはRNAヘリカーゼであることができる。たとえば、Kulkarni et al. On track with P-bodies. Biochem Soc Trans 2010, 38:242-251を参照すること。タンパク質バイオマーカーはまた、HNRNPA2B1 (不均一核リボ核タンパク質a2/b1)、HNRPAB (不均一核リボ核タンパク質A/B)、ILF2 (インターロイキンエンハンサ結合因子2、45kDa)、NCL (ヌクレオリン)、NPM1 (ヌクレオホスミン (核小体リントタンパク質b23、ヌマトリン))、RPL10A (リボソームタンパク質110a)、RPL5 (リボソームタンパク質15)、RPLP1 (リボソームタンパク質、大、p1)、RPS12 (リボソームタンパク質s12)、RPS19 (リボソームタンパク質s19)、SNRPG (小さな核リボ核タンパク質ポリペプチドg)、TROVE2 (Troveドメインファミリー、メンバー2) の一つまたは複数であることができる。Wang et al., Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. Nucleic Acids Res. 38:7248-59. Epub 2010 Jul 7を参照すること。タンパク質バイオマーカーはまた、脂質 (脂肪およびコレステロールのような油溶性物質) に結合して、脂質をリンパ系および循環系の中で輸送するリボタンパク質を形成するタンパク質であるアポリタンパク質であることもできる。Vickers et al., MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, Nat Cell Biol 2011 13:423-33, Epub 2011 Mar 20を参照すること。アポリタンパク質は、アポリタンパク質A (アポA-I、アポA-II、アポA-IVおよびアポA-Vを含む)、アポリタンパク質B (アポB48およびアポB100を含む)、アポリタンパク質C (アポC-I、アポC-II、アポC-IIIおよびアポC-IVを含む)、アポリタンパク質D (アポD)、アポリタンパク質E (アポE)、アポリタンパク質H (アポH) またはこれらの組み合わせであることができる。アポリタンパク質は、アポL1、アポL2、アポL3、アポL4、アポL5、アポL6、アポLD1またはこれらの組み合わせを含むアポリタンパク質Lであることができる。アポリタンパク質L (アポL) は、コレステロール輸送において中心的役割を演じる高密度リボタンパク質ファミリーに属する。タンパク質バイオマーカーは、リボタンパク質の成分、たとえばキロミクロン、超低密度リボタンパク質 (VLDL)、中間密度リボタンパク質 (IDL)、低密度リボタンパク質 (LDL) および／または高密度リボタンパク質 (HDL) の成分であることができる。ある態様において、タンパク質バイオマーカーはLDLまたはHDLの成分である。成分はアポEであることができる。成分はアポA1であることができる。タンパク質バイオマーカーは、一般的小胞マーカー、たとえばテトラスパニン、または非限定的にCD9、CD63および／またはCD81を含む表3に記載された他のタンパク質であることができる。タンパク質バイオマーカーは、EpCam、B7H3および／またはCD24のような癌マーカーであることができる。タンパク質バイオマーカーは、組織特異的バイオマーカー、たとえば前立腺バイオマーカー-PSCA、PCSAおよび／またはPSMAであることができる。これらまたは他の有用なタンパク質バイオマーカーの組み合わせを使用して、関心対象の複合体の特定の集団を単離することもできる。

【0379】

核酸-タンパク質複合体は、複合体の一つまたは複数の成分に対する結合物質を使用することによって単離することができる。非限定的にアフィニティー単離法、免疫捕捉法、免疫沈降法およびフローサイトメトリーを含む、タンパク質を単離するための様々な技術が当業者に公知である、および／または本明細書に提示されている。結合物質は、本明細書に記載されているものを含む任意の適切な結合物質であることができ、たとえば一つまたは複数の結合物質は、核酸、DNA分子、RNA分子、抗体、抗体フラグメント、アプタマー

10

20

30

40

50

、ペプチド、zDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、ペプチド、デンドリマー、膜タンパク質標識物質、化学物質またはこれらの組み合わせを含む。ある態様において、結合物質は、抗体、抗体コンジュゲート、抗体フラグメントおよび／またはアプタマーを含む。本発明とともに使用することができるタンパク質－核酸複合体を評価するさらなる方法に関しては、またWang et al., Export of microRNAs and microRNA A-protective protein by mammalian cells. Nucleic Acids Res. 38:7248-59. Epub 2010 Jul 7、Keene et al., RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNA and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. Nat Protoc 2006 1:302-07、Hafner, Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. Cell 2010 141:129-41を参照すること。

10

【0380】

本発明はさらに、タンパク質と複合した状態で見いだされるmiRNAを同定する方法を提供する。一つの態様において、タンパク質－核酸複合体の集団は上記のように単離される。その集団のmiRNA内容物が評価される。この方法は、様々な関心対象試料（たとえば、有疾患、無疾患、応答者、非応答者）に対して使用することができ、および試料中のmiRNA内容物を比較して、試料間で差異を示すmiRNAを同定することができる。本明細書にはmiRNAを検出する方法が提供される（アレイ、PCRなど）。同定されたmiRNAを使用して、本明細書の方法にしたがって表現型を特徴決定することができる。たとえば、発見のために使用される試料は、癌血漿試料および非癌血漿試料であることができる。癌試料と非癌試料とを区別するタンパク質複合miRNAを同定することができ、および血漿試料中の癌を検出するためにその区別するmiRNAを評価することができる。

20

【0381】

本発明はまた、非ペイロードmiRを小胞含有試料から除去したのち、小胞内のmiR内容物を評価することにより、小胞内のマイクロRNAペイロードを区別する方法を提供する。miRは、RNアーゼまたはmiRNAを分解する他の実体を使用して試料から取り出すことができる。いくつかの態様において、試料は、RNアーゼ処理の前に、タンパク質複合体からマイクロRNAを除去するための薬剤によって処理される。薬剤は、タンパク質を分解する酵素、たとえばプロテイナーゼKまたはトリプシンのようなタンパク質分解酵素または任意の他の適切な酵素であることができる。この方法を使用して、遊離miRNAまたは循環タンパク質複合体中のmiRNAとは別に、小胞とともに含まれるマイクロRNA分画を評価することにより、本明細書の方法にしたがって表現型を特徴決定することができる。

30

【0382】

バイオマーカー検出

バイオシグネチャーは、本明細書に開示されるように、循環バイオマーカー、例えばマイクロRNA、タンパク質、小胞または他のバイオマーカーの存在、レベルまたは濃度を検出することによって定性的または定量的に検出することができる。これらのバイオシグネチャー成分は、当業者には公知の多数の技術を使用して検出することができる。たとえば、バイオマーカーは、マイクロアレイ解析、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）（PCRベースの方法、たとえばリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法（RT-PCR）、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法（Q-PCR/qPCR）などを含む）、対立遺伝子特異的プローブによるハイブリダイゼーション、酵素的突然変異検出、ライゲーション連鎖反応法（LCR）、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ法（OLA）、フローサイトメトリーヘテロ二本鎖解析、ミスマッチの化学的切断、質量分析法、核酸配列決定、一本鎖高次構造多型分析法（SSCP）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）、温度勾配ゲル電気泳動法（TGGE）、制限断片長多型、連続的遺伝子発現解析（SAGE）またはこれらの組み合わせによって検出することができる。核酸のようなバイオマーカーは、検出前に増幅することができる。バイオマーカーはまた、免疫アッセイ法、免疫ブロット法、免疫沈降法、酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA、EIA）、ラジオ免疫アッセイ法（RIA）、フローサイトメトリーまたは電子顕微鏡法（EM）によって検出することもできる。

40

50

【0383】

バイオシグネチャーは、本明細書に記載されるような捕捉物質および検出物質を使用して検出することができる。捕捉物質は、抗体、アプタマーまたはバイオマーカーを認識し、バイオマーカーを捕捉するために使用することができる他の実体を含むことができる。捕捉することができるバイオマーカーは、循環バイオマーカー、たとえば体液中に溶解した状態にあるタンパク質、核酸、脂質または生物学的複合体を含む。同様に、捕捉物質は、小胞を捕捉するために使用することもできる。検出物質は、バイオマーカーを認識し、かつバイオマーカー小胞を検出するために使用することができる抗体もしくは他の実体、または小胞を認識し、かつ小胞を検出するのに有用である抗体もしくは他の実体を含むことができる。いくつかの態様において、検出物質は標識され、その標識が検出されて、それにより、バイオマーカーまたは小胞が検出される。検出物質は、結合物質、たとえば抗体またはアプタマーであることができる。他の態様において、検出物質は、膜タンパク質標識物質のような小分子を含む。たとえば、Alroyらの米国特許公開公報第US2005/0158708号に開示された膜タンパク質標識物質を参照すること。ある態様においては、小胞が、本明細書に記載されるように単離または捕捉され、その小胞を検出するために一つまたは複数の膜タンパク質標識物質が使用される。多くの場合、捕捉および検出物質によって認識される抗原または他の小胞部分は互換可能である。非限定的な例として、起始細胞特異的抗原を表面に有し、癌特異的抗原を表面に有する小胞を考えてみる。一例において、小胞は、起始細胞特異的抗原に対する抗体を使用して、たとえば捕捉抗体を基体に繫留することによって捕捉することができ、次いで、小胞は、癌特異的抗原に対する抗体を使用して、たとえば検出抗体を蛍光色素で標識し、その色素によって放出される蛍光放射線を検出することによって検出される。もう一つの例において、小胞は、癌特異的抗原に対する抗体を使用して、たとえば捕捉抗体を基体に繫留することによって捕捉することができ、次いで、小胞は、起始細胞特異的抗原に対する抗体を使用して、たとえば検出抗体を蛍光色素で標識し、その色素によって放出される蛍光放射線を検出することによって検出される。

10

20

【0384】

いくつかの態様において、同じバイオマーカーが捕捉物質および検出物質の両方によって認識される。このスキームは、状況に依存して使用することができる。一つの態様において、バイオマーカーは、関心対象の小胞を検出する、たとえば起始細胞特異的小胞を捕捉するだけで十分である。他の態様において、バイオマーカーは、多機能性である、たとえば起始細胞特異性および癌細胞特異性の両方を有する。バイオマーカーは、捕捉および検出のための他のバイオマーカーとともに使用することもできる。

30

【0385】

バイオマーカーを検出する一つの方法は、上記のように生物学的試料から不均一な小胞集団を精製または単離する工程、およびサンドイッチアッセイ法を実施する工程を含む。集団中の小胞は、捕捉物質によって捕捉することができる。捕捉物質は、一次抗体のような捕捉抗体であることができる。捕捉抗体は、基体、たとえばアレイ、ウェルまたは粒子に結合していることができる。捕捉または結合された小胞は、検出抗体のような検出物質によって検出することができる。たとえば、検出抗体は、小胞の抗原に対する抗体であることができる。検出抗体は、直接的に標識され、検出されることができる。または、検出物質は、検出物質と反応することができる酵素結合二次抗体を介するなど、間接的に標識され、検出されることができる。国際公開公報第2009092386号に記載されているように、検出試薬または検出基質を加え、反応を検出することができる。捕捉物質がRab-5bに結合し、検出物質がCD63またはカベオリン1に結合またはこれを検出する説明のための例において、捕捉物質は抗Rab-5b抗体であることができ、検出物質は抗CD63または抗カベオリン1抗体であることができる。いくつかの態様において、捕捉物質は、CD9、PSCA、TNFR、CD63、B7H3、MFG-E8、EpCam、Rab、CD81、STEAP、PCSA、PSMAまたは5T4に結合する。たとえば、捕捉物質は、CD9、PSCA、TNFR、CD63、B7H3、MFG-E8、EpCam、Rab、CD81、STEAP、PCSA、PSMAまたは5T4に対する抗体であることができる。捕捉物質はまた、MFG-E8、アネキ

40

50

シンV、Tissue Factor、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2またはTETSに対する抗体であることもできる。検出物質は、CD63、CD9、CD81、B7H3またはEpCamに結合またはこれを検出する物質、たとえばCD63、CD9、CD81、B7H3またはEpCamに対する検出抗体またはアプタマーであることができる。捕捉物質および／または検出物質の様々な組み合わせをいっしょに使用することができる。ある態様において、捕捉物質はPCSA、PSMA、B7H3および場合によってはEpCamを含み、検出物質は一つまたは複数の一般的小胞バイオマーカー、例えば、CD9、CD63およびCD81などのテトラスパニンを含む。もう一つの態様において、捕捉物質はTMEM211およびCD24を含み、検出物質は一つまたは複数のテトラスパニン、たとえばCD9、CD63およびCD81を含む。もう一つの態様において、捕捉物質はCD66およびEpCamを含み、検出物質は一つまたは複数のテトラスパニン、たとえばCD9、CD63およびCD81を含む。捕捉物質および／または検出物質は、CD9、Erb2、Erb4、CD81、Erb3、MUC16、CD63、DLL4、HLA-Drpe、B7H3、IFNAR、5T4、PCSA、MICB、PSMA、MFG-E8、Muc1、PSA、Muc2、Unc93a、VEGFR2、EpCAM、VEGF A、TMPRSS2、RAGE*、PSCA、CD40、Muc17、IL-17-RA、およびCD80のうちの1つまたは複数を含む抗原に対するものであることができる。例えば、捕捉物質および／または検出物質は、CD9、CD63、CD81、B7H3、PCSA、MFG-E8、MUC2、EpCam、RAGE、およびMuc17のうちの1つまたは複数に対するものであることができる。場合によっては、そのようなテトラスパニンおよび／または他の一般的小胞マーカーの数の増加が検出シグナルを改善することができる。タンパク質または他の循環バイオマーカーはまた、サンドイッチ手法を使用して検出することもできる。捕捉された小胞を回収し、使用して、その中に含まれるペイロード、たとえばmRNA、マイクロRNA、DNAおよび可溶性タンパク質を解析することができる。

【0386】

いくつかの態様において、捕捉物質はEpCam、B7H3、RAGEまたはCD24に結合またはこれを標的とし、小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはCD9および／またはCD63である。一つの態様において、捕捉物質はEpCamに結合またはこれを標的とし、小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはCD9、EpCamおよび／またはCD81である。一つの捕捉物質は、CD9、PSCA、TNFR、CD63、B7H3、MFG-E8、EpCam、Rab、CD81、STEAP、PCSA、PSMAまたは5T4から選択することができる。一つの捕捉物質はまた、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2、MFG-E8、TF、アネキシンVまたはTETSに対する抗体であることもできる。いくつかの態様において、一つの捕捉物質は、PCSA、PSMA、B7H3、CD81、CD9およびCD63から選択される。

【0387】

他の態様において、捕捉物質はPCSAを標的とし、捕捉された小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはB7H3および／またはPSMAである。他の態様において、捕捉物質はPSMAを標的とし、捕捉された小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはB7H3および／またはPCSAである。他の態様において、捕捉物質はB7H3を標的とし、捕捉された小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはPSMAおよび／またはPCSAである。さらに他の態様において、捕捉物質はCD63を標的とし、小胞表面で検出される一つまたは複数のバイオマーカーはCD81、CD83、CD9および／またはCD63である。本明細書に開示される様々な捕捉物質およびバイオマーカーの組み合わせを使用して、表現型を特徴決定する、たとえば疾患、たとえば癌を検出、診断または予後判定することができる。いくつかの態様において、小胞は、前立腺癌を特徴決定するために、EpCamを標的とする捕捉物質ならびにCD9およびCD63の検出；PCSAを標的とする捕捉物質ならびにB7H3およびPSMAの検出；またはCD63の捕捉物質およびCD81の検出を使用して解析される。他の態様において、小胞は、結腸癌を特徴決定するために、CD63を標的とする捕捉物質およびCD63の検出；またはCD9を標的とする捕捉物質およびCD63の検出を使用して使用される。当業者は、捕捉物質および検出物質の標的を互換可能に使用することができることを理解するであろう。説明のための例において、PCSAを標的とする捕捉物質ならびにB7H3およびPSMAを標的とする検出物質を考えてみる。これらのマーカーすべてはPCa由来の小胞を検出するのに有用であるため、捕捉物質によってB7H3またはPSMAを標的とすることができ、検出

物質によってPCSAを認識することができる。たとえば、いくつかの態様において、検出物質はPCSAを標的とし、小胞を捕捉するために使用される一つまたは複数のバイオマーカーはB7H3および／またはPSMAを含む。他の態様において、検出物質はPSMAを標的とし、小胞を捕捉するために使用される一つまたは複数のバイオマーカーはB7H3および／またはPCSAを含む。他の態様において、検出物質はB7H3を標的とし、小胞を捕捉するために使用される一つまたは複数のバイオマーカーはPSMAおよび／またはPCSAを含む。いくつかの態様において、本発明は、PSMA、B7H3および／またはPCSAに対する捕捉物質および／または検出物質を使用して体液中の前立腺癌細胞を検出する方法を提供する。体液は、血清または血漿を含む血液を含むことができる。体液は射精液または精液を含むことができる。さらなる態様において、前立腺癌を検出する方法はさらに、CD81、CD83、CD9および／またはCD63に対する捕捉物質および／または検出物質を使用する。本方法はさらに、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2およびTETSの一つまたは複数を有する小胞を捕捉する工程、ならびに捕捉された小胞の一つまたは複数の一般的小胞抗原、たとえばCD81、CD63および／またはCD9で検出する工程を含む、GI障害を特徴決定する方法を提供する。さらなる物質が、さらなる生物学的識別能力をもたらしことにより、および／または実験ノイズを減らすことにより、試験性能を改善する、たとえば試験精度またはAUCを改善することができる。

【0388】

本発明で使用するためのバイオマーカーを検出する技術は、平坦な基体、たとえばアレイ（たとえばバイオチップまたはマイクロアレイ）を、特定のバイオシグネチャーの検出を容易にする捕捉物質として基体に固定化された分子とともに使用することを含む。アレイは、一つまたは複数のバイオマーカーまたは小胞をアッセイするためのキットの一部として提供することができる。上述され、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1または3～60に示されるバイオマーカーを同定する分子を、前駆症状的疾患を含む疾患の検出および診断用のアレイに含めることができる。いくつかの態様において、アレイは、関心対象のバイオマーカーを特異的に同定するように選択された生体分子を含むカスタムアレイを含む。カスタマイズされたアレイは、統計的性能を高めるバイオマーカー、たとえばバイオシグネチャーを同定するさらなる生体分子を検出するように改変されることができ、それが、多変量予測モデル（たとえばロジスティック回帰、判別分析または回帰木モデル）における交差検定エラー率の改善につながる。いくつかの態様において、カスタマイズされたアレイは、疾患、病態または徴候の生物学を研究し、所定の生理学的状態におけるバイオシグネチャーをプロファイリングするように構成される。カスタマイズされたアレイに含まれるマーカーは、統計的基準、たとえば、表現型または生理学的状態の間を区別する際に所望のレベルの統計的有意性を有することに基づいて選択される。いくつかの態様においては、マイクロアレイ上の生体分子を排除または包含するために、 p 値=0.05の標準有意性が選択される。 p 値は、複数の比較に関して補正することができる。説明のための例として、有疾患対象または無疾患対象由来の試料から抽出された核酸を、何千もの遺伝子配列に結合する高密度マイクロアレイにハイブリダイズさせることができる。有疾患試料または無疾患試料の間でレベルが有意に異なる核酸を、試料を有疾患または無疾患として識別するためのバイオマーカーとして選択することができる。選択されたバイオマーカーを検出するために、カスタマイズされたアレイを構成することができる。いくつかの態様において、カスタマイズされたアレイは、比較的少ない数、たとえば何千ではなく何十または何百のアドレス可能な結合物質を有するアレイを意味する低密度マイクロアレイを含む。低密度アレイを基体表面に形成することができる。いくつかの態様において、カスタマイズ可能な低密度アレイは、プレートウェル、たとえばTaqMan（登録商標）Gene Expression Assays（Applied Biosystems by Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA）におけるPCR増幅を使用する。

【0389】

平面アレイは一般に、アレイ型式における生体分子のアドレス可能な位置（たとえばパ

ッド、アドレスまたは微小位置)を含む。アレイのサイズはアレイの組成および最終用途に依存する。2種類の異なる分子から何千もの分子までを含むアレイを製造することができる。一般に、アレイは、アレイの最終用途および製造方法に依存して、二つから100,000以上までの分子を含む。本発明で使用するためのマイクロアレイは、関心対象のバイオシグネチャー中に存在するバイオマーカー、たとえばそのバイオシグネチャーを構成するマイクロRNAもしくは他の生体分子または小胞を同定または捕捉する少なくとも一つの生体分子を含む。いくつかのアレイにおいては、異なる組成または同一組成の複数の基体を使用される。したがって、平面アレイは、より小さい複数の基体を含むこともできる。

【0390】

本発明は、バイオマーカー、たとえば関心対象のバイオシグネチャーと関連したバイオマーカーを検出するために多くの種類のアレイを使用することができる。有用なアレイまたはマイクロアレイは、非限定的に、DNAマイクロアレイ、たとえばcDNAマイクロアレイ、オリゴヌクレオチドマイクロアレイおよびSNPマイクロアレイ、マイクロRNAアレイ、タンパク質マイクロアレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、細胞マイクロアレイ(トランスフェクションマイクロアレイとも呼ばれる)、化学物質マイクロアレイ、ならびに糖質アレイ(グリコアレイ)を含む。これらのアレイは上記でさらに詳細に説明されている。いくつかの態様において、マイクロアレイは、バイオマーカー結合が間接的に(たとえば蛍光を介して)モニターされる認識分子(たとえば抗体)の高密度固定化アレイを提供するバイオチップを含む。図2Aは、関心対象の小胞抗原に対する捕捉抗体が表面に繫留されている例示的な構成を示す。捕捉された小胞はその後、関心対象の同じまたは異なる小胞抗原に対する検出抗体を使用して検出される。捕捉抗体は、使用可能でありかつ望ましい場合、繫留されているアプタマーに置き換えることもできる。蛍光検出体が表示されている。他の検出体、たとえば酵素反応、検出可能なナノ粒子、放射標識などを同様に使用することができる。他の態様において、アレイは、生化学的または分子間の相互作用によるタンパク質捕捉を質量分析法(MS)による検出と併せて含む形式を含む。小胞は表面から溶出させ、その中のペイロード、たとえばマイクロRNAを解析することができる。

【0391】

バイオシグネチャーの一つまたは複数のバイオマーカーを検出するために使用することができるアレイまたはマイクロアレイは、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,329,209号、第6,365,418号、第6,406,921号、第6,475,808号および第6,475,809号ならびに米国特許出願第10/884,269号に記載されている方法にしたがって製造することができる。本明細書に記載されるバイオマーカーのセットの特定の選択を検出するためのカスタムアレイは、これらの特許に記載されている方法を使用して製造することができる。また、Affymetrix (Santa Clara, CA)、Illumina (San Diego, CA)、Agilent (Santa Clara, CA)、Exiqon (Denmark) またはInvitrogen (Carlsbad, CA) から市販されているものを非限定的に含む市販のマイクロアレイを使用して本発明の方法を実施することもできる。カスタムおよび/または市販のアレイは、本明細書に記載のようなタンパク質、核酸ならびに他の生物学的分子および実体(たとえば細胞、小胞、ビリオン)の検出のためのアレイを含む。

【0392】

いくつかの態様において、アレイに固定化される分子はタンパク質またはペプチドを含む。一つまたは複数の種類のタンパク質を表面に固定化することもできる。特定の態様において、タンパク質は、タンパク質の変性を最小化する、タンパク質の活性の変化を最小化する、またはタンパク質とそれが固定化される表面との間の相互作用を最小化する方法および材料を使用して固定化される。

【0393】

有用なアレイ表面は、所望の形、形態またはサイズであることができる。表面の非限定的な例は、チップ、連続面、曲面、可撓面、フィルム、プレート、シートまたはチューブを含む。表面は、約1平方マイクロメートルから約500cm²までの範囲の面積を有すること

ができる。表面の面積、長さおよび幅は、実施されるアッセイ法の要件にしたがって異なることもある。考慮される要素は、たとえば、取り扱い易さ、表面が形成される材料の制限、検出システムの要件、付着システム（たとえば、アレイヤ）の要件などを含むことができる。

【0394】

特定の態様において、結合アイランドまたは固定化生体分子の群またはアレイを分離するための物理的手段を使用することが望ましい。そのような物理的分離は、関心対象の異なる溶液に対する異なる群またはアレイの曝露を容易にする。したがって、特定の態様において、アレイは、任意の数のウェルを有するマイクロウェルプレート内に位置する。このような態様においては、ウェルの底がアレイ形成のための面として作用することもできるし、アレイを他の面に形成したのち、ウェルの中に配置することもできる。ウェルを有しない面が使用されるような特定の態様においては、結合アイランドを形成することもできるし、分子を表面に固定化し、アイランドまたは生体分子に対応するように空間的に配設された穴を有するガasketをその表面に配置することもできる。このようなガasketは好ましくは液密である。ガasketは、アレイを製造する工程のいずれかの時点で表面に配置することもでき、群またはアレイの分離がもはや不要であるならば、取り除くこともできる。

【0395】

いくつかの態様において、固定化された分子は、その固定化された分子と接触する生物学的試料中に存在する一つまたは複数のバイオマーカーまたは小胞に結合することができる。いくつかの態様において、固定化された分子は、その固定化された分子と接触する一つまたは複数の小胞中に存在する分子を修飾する、または、その分子によって修飾される。試料を接触させることは一般に、試料をアレイの上に重ねることを含む。

【0396】

溶液中の分子またはアレイ表面に固定化された分子の修飾または結合は、当技術分野において公知の検出技術を使用して検出することができる。そのような技術の例は、免疫学的技術、たとえば競合的結合アッセイ法およびサンドイッチアッセイ法；共焦点スキャナ、共焦点顕微鏡またはCCDベースのシステムのような機器、および蛍光、蛍光偏光（FP）、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、全内反射蛍光（TIRF）、蛍光相関分光法（FCS）のような技術を使用する蛍光検出法；比色／分光分析技術；表面で吸着される物質の質量の変化を計測する表面プラズモン共鳴；従来の放射性同位元素結合およびシンチレーション近接アッセイ法（SPA）を含む、放射性同位元素を使用する技術；質量分析法、たとえばマトリックス支援レーザー脱離／イオン化質量分析法（MALDI）およびMALDI飛行時間（TOF）型質量分析法；タンパク質フィルムの厚さを測定する光学的方法である偏光解析法；表面に吸着する物質の質量を計測するための非常に高感度の方法である水晶結晶板微量天秤法（QCM）；走査型プローブ顕微鏡法、たとえば原子間力顕微鏡法（AFM）、走査力顕微鏡法（SFM）または走査型電子顕微鏡法（SEM）；ならびに電気化学、インピーダンス、音響、マイクロ波およびIR／ラマン検出のような技術を含む。たとえば、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられるMere L, et al., "Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening, "Drug Discovery Today 4(8):363-369 (1999)およびその中に引用されている参照文献、Lakowicz J R, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition, Plenum Press (1999)またはJain KK: Integrative Omics, Pharmacoproteomics, and Human Body Fluids. In: Thongboonkerd V, ed., ed. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods and Applications. Volume 1: Totowa, N. J.: Humana Press, 2007を参照されたい。

【0397】

マイクロアレイ技術は、質量分析（MS）および他のツールと組み合わせることができる。質量分析計へのエレクトロスプレーインタフェースをマイクロ流体工学デバイス中の毛管と一体化させることができる。たとえば、一つの市販システムは、固有の明確な電気泳動移動度を有する蛍光標識であるeTagレポーターを含み、各標識が切断可能な結合を介し

て生物学的または化学的プローブに結合している。各eTagレポーターの明確な移動度アドレスが、これらのタグの混合物が毛管電気泳動によって速やかに逆重畳積分され、定量化されることを可能にする。このシステムは、同じ試料からの同時発生的な遺伝子発現、タンパク質発現およびタンパク質機能解析を可能にする。参照によりその全体が本明細書に組み入れられるJain KK: Integrative Omics, Pharmacoproteomics, and Human Body Fluids. In: Thongboonkerd V, ed., ed. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods and Applications. Volume 1: Totowa, N. J.: Humana Press, 2007を参照されたい。

【0398】

バイオチップは、マイクロ流体力学またはナノ流体アッセイ法のための構成要素を含むことができる。マイクロ流体力学デバイス、バイオマーカーを単離または解析する、たとえばバイオシグネチャーを決定するために使用することができる。マイクロ流体力学システムは、小胞を単離、捕捉または検出し、マイクロRNAを検出し、循環バイオマーカーを検出し、バイオシグネチャーを検出するための一つまたは複数のプロセスまたは他のプロセスの小型化および区画化を可能にする。マイクロ流体力学デバイスは、システムの少なくとも一つの局面において一つまたは複数の検出試薬を使用することができ、そのような検出試薬を使用して一つまたは複数のバイオマーカーを検出することができる。一つの態様において、装置は、単離または結合された小胞表面のバイオマーカーを検出する。様々なプローブ、抗体、タンパク質または他の結合物質を使用して、マイクロ流体力学システム内のバイオマーカーを検出することができる。検出物質は、マイクロ流体力学デバイスの様々な区画に固定化することもできるし、装置の様々なチャンネルを通してハイブリダイゼーションまたは検出反応に導入することもできる。

【0399】

マイクロ流体力学デバイス中の小胞を溶解させ、その内容物、たとえばタンパク質または核酸、たとえばDNAまたはRNA、たとえばmiRNAまたはmRNAをマイクロ流体力学デバイス内で検出することができる。核酸は、マイクロ流体力学デバイス内で、検出前に増幅することもできるし、直接検出することもできる。したがって、マイクロ流体力学システムはまた、様々なバイオマーカーの検出を多重化するために使用することもできる。ある態様においては、小胞がマイクロ流体力学デバイス内で捕捉され、捕捉された小胞が溶解され、その小胞ペイロードからのマイクロRNAのバイオシグネチャーが決定される。バイオシグネチャーはさらに、小胞を捕捉するために使用される捕捉物質を含むことができる。

【0400】

新規なナノ製造技術が、高密度の精密アレイ、たとえば不均一ナノアレイとも知られるヌクレオチドベースのチップおよびタンパク質アレイの製造に依存するバイオセンシング用途の可能性を開拓している。ナノ流体力学により、マイクロチップ中の流体分析対象物の量をナノリットルレベルまでさらに減少することが可能になり、ここで使用されるチップがナノチップと呼ばれる（たとえば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるUnger M et al., Biotechniques 1999; 27(5): 1008-14, Kartalov EP et al., Biotechniques 2006; 40(1):85-90を参照すること）。現在、市販のナノチップは、試料を試薬と合わせ、混合し、反応をモニターすることによって実施することができる簡単な一工程アッセイ法、たとえば総コレステロール、総タンパク質またはグルコースアッセイ法を提供する。液体クロマトグラフィー（LC）およびナノLC分離に基づくゲルフリーの分析法（いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられるCutillas et al. Proteomics, 2005; 5:101-112およびCutillas et al., Mol Cell Proteomics 2005; 4:1038-1051）をナノチップと組み合わせて使用することができる。

【0401】

疾患、病態、症候群、または生理学的状態の同定に適したアレイが、キットに含まれ得る。キットは、非限定的例として、アレイの結合性アイランドまたは領域上への固定化用の分子の調製に有用な1種または複数種の試薬、固定化分子への小胞の結合の検出に有用な試薬、および使用のための指示書を含み得る。

【0402】

さらに、生物学的試料中の特定のバイオシグネチャーの検出を容易にする高速検出装置が、本明細書において提供される。この装置は、チップ上での生物学的試料調製をポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）と統合することができる。この装置は、生物学的試料中の小胞の特定のバイオシグネチャーの検出を容易にすることができ、例が、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPipper et al., *Angewandte Chemie*, 47(21), p. 3900-3904 (2008)に記載のように提供されている。参照によりその全体が本明細書に組み入れられるLi et al., *Adv Dent Res* 18(1):3-5 (2005)に記載されているように、診断用途のために、マイクロ／ナノエレクトロケミカルシステム（MEMS/NEMS）センサおよび口腔液を使用してバイオシグネチャーを組み込むことができる。

10

【0403】

平面アレイの代替として、粒子を使用するアッセイ、たとえば本明細書に記載されるようなビーズベースのアッセイをフローサイトメトリーと組み合わせて使用することができる。高感度自動化に合った比活性を有する同族のリガンドおよびレポーター分子を用いたビーズコーティングを使用する、マルチパラメトリックアッセイ法または他の高スループット検出アッセイ法を使用することができる。ビーズベースのアッセイシステムにおいては、バイオマーカーまたは小胞に対する結合物質、たとえば捕捉物質（たとえば捕捉抗体）をアドレス可能なミクロスフェア表面に固定化することができる。個々の結合アッセイのための各結合物質を異なる種類のミクロスフェア（すなわち、マイクロビーズ）に結合することができ、アッセイ反応は、図2Bに示されるようにそのミクロスフェアの表面で起こる。小胞に対する結合物質は、ビーズに結合した捕捉抗体であることができる。異なる蛍光強度を有する染色されたミクロスフェアをそれらの適切な結合物質または捕捉プローブとともに別々に添加する。必要に応じて、異なる結合物質を担持する異なるビーズセットをプールして、カスタムビーズアレイを生成することもできる。次いで、ビーズアレイを、アッセイを実施するための単一の反応容器の中で試料とともにインキュベートする。本発明とともに使用することができる、またはそれとともに使用するのに適合させることができるマイクロ流体工学デバイスの例は、本明細書に記載されるものを含むが、それらに限定されない。

20

【0404】

固定化された捕捉分子または結合物質とのバイオマーカーの産物形成を蛍光ベースのレポーターシステム（たとえば図2A～Bを参照）によって検出することができる。バイオマーカーは、蛍光体によって直接標識することもできるし、第二の蛍光標識された捕捉生体分子によって検出することもできる。捕捉されたバイオマーカーから導出されるシグナル強度をフローサイトメーターにおいて計測することができる。フローサイトメーターは、まず、その個々のカラーコードによって各ミクロスフェアを同定することができる。たとえば、異なる強度を有する各ビーズが異なる結合物質を有するよう、異なるビーズを異なる蛍光強度で染色することができる。ビーズは、少なくとも2種類の異なる標識または色素によって標識または染色することができる。いくつかの態様において、ビーズは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10種類の異なる標識で標識される。また、二つ以上の標識または色素を有するビーズは、標識または色素の様々な比率および組み合わせを有することができる。ビーズは、外部的に標識または染色することもできるし、内在性の蛍光またはシグナル標識を有することもできる。

30

40

【0405】

個々のビーズの各表面の捕捉されたバイオマーカーの量は、結合した標的に特異的な第二の色の蛍光によって計測することができる。これは、同じ実験内で一つの試料からの複数の標的の多重的定量化を可能にする。感度、信頼度および精度は、標準的なマイクロタイターELISA法に匹敵するか、またはそれよりも改善され得る。ビーズベースのシステムの利点は、小胞に対する捕捉生体分子または結合物質の、異なるミクロスフェアへの個々の結合が、多重化能力を提供することである。たとえば、図2Cに示すように、検出される5種類の異なるバイオマーカー（抗原、たとえばCD63、CD9、CD81、B7H3およびEpCamに対

50

する抗体によって検出される) および小胞を捕捉する(捕捉抗体、たとえばCD9、PSCA、TNFR、CD63、B7H3、MFG-E8、EpCam、Rab、CD81、STEAP、PCSA、PSMA、5T4および/またはCD24に対する抗体を使用) ための20種類のバイオマーカーの組み合わせは、約100種類の検出される組み合わせを生じさせることができる。図2Cに「EpCam 2x」、「CD63 2X」として示すように、一つの標的に対する複数の抗体を使用して、様々なエピトープに対して検出を探ることができる。もう一つの例において、多重解析は、CD24に対する結合物質を使用して小胞を捕捉すること、およびCD9、CD63および/またはCD81に対する結合物質を使用して、捕捉された小胞を検出することを含む。捕捉された小胞は、抗体のような検出物質を使用して検出することができる。検出物質は、本明細書に記載されるように、直接または間接的に標識され得る。

10

【0406】

少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100種類の異なるバイオマーカーの多重化を実施することができる。たとえば、差次的に標識されている複数の粒子を用いて、不均一な小胞集団のアッセイを実施することができる。少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100個の差次的に標識された粒子があることができる。粒子は、たとえばタグにより、外部的に標識されることもできるし、内在的に標識されることもできる。差次的に標識された各粒子を小胞に対する捕捉物質、たとえば結合物質に結合して、小胞の捕捉を生じさせることができる。関心対象の表現型を特徴決定するために、一般的小胞バイオマーカー、起始細胞特異的バイオマーカーおよび疾患バイオマーカーに対する捕捉物質を含む、複数の捕捉物質を選択することができる。そして、捕捉された小胞の一つまたは複数のバイオマーカーを複数の結合物質によって検出することができる。結合物質は、検出を容易にするために直接標識されることもできる。または、結合物質は第二の物質によって標識される。たとえば、結合物質は、小胞表面上のバイオマーカーに対する抗体であることもできる。結合物質はビオチンに結合する。第二の物質が、レポーターに結合したストレプトアビジンを含み、バイオマーカーを検出するために添加されることができる。いくつかの態様において、捕捉された小胞は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75または100種類の異なるバイオマーカーに関してアッセイされる。たとえば、多重検出器、すなわち、捕捉された小胞または小胞集団の複数のバイオマーカーの検出は、得られるシグナルを増大させることができ、感度、特異度または両方の増大およびより少量の試料の使用を可能にする。たとえば、二つ以上の一般的小胞マーカーを用いる検出は、より少ない数の検出マーカー、たとえば一つのマーカーを使用する場合に比べ、シグナルを改善することができる。例を示すならば、CD9、CD63およびCD81の二つ又は三つに対して標識された結合物質を用いる小胞の検出は、テトラスパニンのいずれか一つを個々に用いる検出に比べ、シグナルを改善することができる。

20

30

【0407】

また、免疫アッセイベースの方法またはサンドイッチアッセイ法を使用して、小胞のバイオマーカーを検出することもできる。例はELISAを含む。結合物質または捕捉物質をウェルに結合することができる。たとえば、小胞の抗原に対する抗体をウェルに結合させることができる。捕捉された小胞表面上のバイオマーカーを、本明細書に記載される方法に基づいて検出することができる。図2Aは、サンドイッチタイプの免疫アッセイ法を説明する図を示す。捕捉抗体は、対象の小胞抗原、たとえば一般的小胞バイオマーカー、起始細胞マーカーまたは疾患マーカーに対する抗体であることができる。図中、捕捉された小胞は、関心対象の小胞抗原に対する蛍光標識された抗体を使用して検出される。複数の捕捉抗体を、たとえばアレイ上の識別可能なアドレスまたは免疫アッセイプレートの異なるウェルにおいて使用することができる。検出抗体は、捕捉抗体と同じ抗原に対する抗体であることもできるし、他のマーカーに対して向けられることもできる。捕捉抗体は代替の結合物質、たとえば繫留されたアプタマーまたはレクチンと置き換えることもできるし、検出抗体がたとえば検出可能な(たとえば標識された)アプタマー、レクチンまたは他の結

40

50

合タンパク質もしくは実体で同様に置き換えることもできる。ある態様において、一般的小胞バイオマーカー、起始細胞マーカーおよび／または疾患マーカーに対する一つまたは複数の捕捉物質が、一般的小胞バイオマーカー、たとえばCD9、CD63およびCD81の一つまたは複数の非限定的に含むテトラスパニン分子に対する検出物質とともに使用される。

【0408】

図2Dは、本発明の方法にしたがって小胞を解析するための説明図を示す。捕捉物質を使用して小胞を捕捉し、検出物質を使用して捕捉された小胞を検出し、捕捉され、検出された抗体のレベルまたは存在を使用して表現型を特徴決定する。捕捉物質、検出物質および表現型の特徴決定は、本明細書に記載されるもののいずれかであることができる。たとえば、捕捉物質は、関心対象の小胞抗原を認識する、基体に繫留された抗体またはアプタマーを含み、検出物質は、関心対象の小胞抗原に対する標識された抗体またはアプタマーを含み、表現型の特徴決定は、疾患の診断、予後判定またはセラノーシスを含む。図2D(i)に示すスキームにおいては、一般的小胞バイオマーカー（6300）に対する一つまたは複数の捕捉物質によって小胞集団を捕捉する。次いで、捕捉された小胞を、起始細胞バイオマーカー（6301）および／または疾患特異的バイオマーカー（6302）に対する検出物質で標識する。起始細胞検出物質（6301）のみが使用されるならば、表現型（6303）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、一般的小胞マーカー（6300）および起始細胞バイオマーカー（6301）を含むことができる。疾患検出物質（6302）のみが使用されるならば、表現型（6303）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、一般的小胞マーカー（6300）および疾患バイオマーカー（6302）を含むことができる。あるいは、検出物質を使用して起始細胞バイオマーカー（6301）および疾患特異的バイオマーカー（6302）の両方を検出する。この場合、表現型（6303）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、一般的小胞マーカー（6300）、起始細胞バイオマーカー（6301）および疾患バイオマーカー（6302）を含むことができる。バイオマーカーの組み合わせは、関心対象の表現型を特徴決定するように選択され、本明細書に記載されるバイオマーカーおよび表現型から選択されることができる。

【0409】

図2D(ii)に示すスキームにおいては、起始細胞バイオマーカー（6310）および／または疾患バイオマーカー（6311）に対する一つまたは複数の捕捉物質によって小胞集団を捕捉する。次いで、捕捉された小胞を、一般的小胞バイオマーカー（6312）に対する検出物質を使用して検出する。起始細胞捕捉物質（6310）のみが使用されるならば、表現型（6313）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、起始細胞バイオマーカー（6310）および一般的小胞マーカー（6312）を含むことができる。疾患バイオマーカー捕捉物質（6311）のみが使用されるならば、表現型（6313）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、疾患バイオマーカー（6311）および一般的小胞バイオマーカー（6312）を含むことができる。あるいは、一つまたは複数の起始細胞バイオマーカー（6310）および一つまたは複数の疾患特異的バイオマーカー（6311）に対する捕捉物質を使用して小胞を捕捉する。この場合、表現型（6313）を特徴決定するために使用されるバイオシグネチャーは、起始細胞バイオマーカー（6310）、疾患バイオマーカー（6311）および一般的小胞マーカー（6313）を含むことができる。バイオマーカーの組み合わせは、関心対象の表現型を特徴決定するように選択され、本明細書に記載されるバイオマーカーおよび表現型から選択されることができる。

【0410】

小胞ペイロードを含むバイオマーカーを解析して表現型を特徴決定することができる。ペイロードは、小胞膜内に含まれる生物学的実体を含む。これらの実体は、非限定的に、核酸、たとえばmRNA、マイクロRNAまたはDNAフラグメント；タンパク質、たとえば可溶性および膜結合タンパク質；糖質；脂質；代謝産物；および様々な小分子、たとえばホルモンを含む。ペイロードは、細胞環境中に小胞が形成されるとき封じ込められる細胞環境の一部であることができる。本発明のいくつかの態様において、小胞表面抗原を検出することに加えて、ペイロードが解析される。特異的な小胞集団を上記のように捕捉したのち、

捕捉された小胞中のペイロードを使用して表現型を特徴決定することができる。たとえば、基体表面に捕捉された小胞をさらに単離して、その中のペイロードを評価することができる。あるいは、捕捉することなく試料中の小胞を検出し、ソートする。そのように検出された小胞をさらに単離して、その中のペイロードを評価することができる。ある態様においては、小胞集団をフローサイトメトリーによってソートし、ソートされた小胞中のペイロードを解析する。図2E(iii)に示すスキームにおいては、起始細胞バイオマーカー（6320）、疾患バイオマーカー（6321）および一般的小胞マーカー（6322）の一つまたは複数を使用して小胞集団を捕捉および／または検出する（6320）。一つまたは複数の血管形成性または免疫応答性のバイオマーカーを使用して、小胞を検出することもできる。単離された小胞のペイロードを評価する（6323）。ペイロード内で検出されたバイオシグネチャーを使用して表現型（6324）を特徴決定することができる。非限定的な例においては、関心対象の一つまたは複数の小胞抗原に対する抗体を使用して、患者からの血漿試料中の小胞集団を解析することができる。抗体は、所望の小胞集団を単離するために基体に繫留された捕捉抗体であることができる。あるいは、抗体を直接標識し、標識された抗体をフローサイトメトリーによるソートによって単離することもできる。単離された小胞集団から抽出されるマイクロRNAまたはmRNAの存在またはレベルを使用してバイオシグネチャーを検出することができる。そして、そのバイオシグネチャーを使用して、患者の診断、予後判定またはセラノーシスを実施する。

10

【0411】

他の態様においては、小胞ペイロードを、小胞の部分集団をはじめに捕捉または検出することなく、小胞集団中で解析する。たとえば、小胞は一般に、遠心分離法、ろ過法、クロマトグラフィーまたは本明細書に記載される他の技術を使用して、試料から単離することができる。その後、単離された小胞のペイロードを解析して、バイオシグネチャーを検出し、表現型を特徴決定することができる。図2E(iv)に示すスキームにおいては、小胞集団を単離し（6330）、単離された小胞のペイロードを評価する（6331）。ペイロード内で検出されたバイオシグネチャーを使用して表現型（6332）を特徴決定することができる。非限定的な例においては、サイズ排除および膜ろ過法を使用して、患者からの血漿試料から小胞集団を単離する。小胞集団から抽出されたマイクロRNAまたはmRNAの存在またはレベルを使用してバイオシグネチャーを検出する。そして、そのバイオシグネチャーを使用して患者の診断、予後判定またはセラノーシスを実施する。

20

30

【0412】

表現型を特徴決定する方法は、技術の組み合わせを使用して関心対象試料中の小胞集団を評価することができる。ある態様において、試料を様々なアリコットに分割し、および各アリコットを別々に分析する。たとえば、一つまたは複数のアリコットのタンパク質内容物を決定し、および一つまたは複数の他のアリコットのマイクロRNA内容物を決定する。タンパク質内容物とマイクロRNA内容物とを組み合わせる表現型を特徴決定することができる。もう一つの態様においては、関心対象の小胞を単離し、およびその中のペイロードを評価する。たとえば、フローサイトメトリー免疫沈降法のようなアフィニティー単離、または関心対象の表面マーカーに対する結合物質を使用する他の免疫捕捉技術により、所与の表面マーカーを有する小胞の集団を単離することができる。そして、単離された小胞を、表面内容物またはペイロードのようなバイオマーカーに関して評価することができる。所与の表面マーカーを有する小胞のバイオマーカープロファイルを使用して表現型を特徴決定することができる。非限定的な例として、PCSA+捕捉物質を使用して前立腺特異的小胞集団を単離することができる。PCSA+小胞から、PCSAそのもの、PSMA、B7H3またはEpCamのような表面抗原のレベルを評価することができる。また、PCSA+中のペイロード、たとえばマイクロRNAまたはmRNA内容物のレベルを評価することもできる。PCSA+小胞集団中のマーカーの組み合わせからバイオシグネチャーを構築することができる。

40

【0413】

ペプチドまたはタンパク質バイオマーカーは、質量分析法またはフローサイトメトリーによって解析することができる。小胞のプロテオーム解析を、免疫細胞化学的染色法、ウ

50

エスタンブロット法、電気泳動法、SDS-PAGE、クロマトグラフィー、X線結晶写真法または他のタンパク質解析技術により、当技術分野において周知の手法にしたがって実施することもできる。他の態様において、小胞のタンパク質バイオシグネチャーは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるChromy et al. J Proteome Res, 2004; 3:1120-1127に記載されているような二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法を使用して、または参照によりその全体が本明細書に組み入れられるZhang et al. Mol Cell Proteomics, 2005; 4:144-155に記載されているような液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて、解析することもできる。小胞は、たとえば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるBerger et al., Am J Pharmacogenomics, 2004; 4:371-381に記載されている活性ベースのタンパク質プロファイリングに供することもできる。他の態様において、小胞は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPisitkun et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2004; 101:13368-13373に記載されているようなナノスプレー液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法を使用してプロファイリングすることもできる。もう一つの態様において、小胞は、たとえば、LTQおよびLTQ-FTイオントラップ質量分析計を使用する液体クロマトグラフィー／MS/MS (LC-MS/MS) のようなタンデム質量分析法 (MS) を使用してプロファイリングすることもできる。参照によりその全体が本明細書に組み入れられるSmalley et al., J Proteome Res, 2008; 7:2088-2096に記載されているように、スペクトル計数を比較することによってタンパク質の正体を決定し、相対定量を評価することができる。

10

【0414】

20

また、小胞内の循環タンパク質バイオマーカーまたはタンパク質ペイロードの発現を同定することもできる。後者の解析は、場合によっては、関心対象の集団を捕捉するための捕捉物質を使用する特定の小胞の単離の後に続くこともできる。ある態様においては、免疫細胞化学的染色法を使用してタンパク質発現を解析する。試料を緩衝液中に再懸濁させ、細胞遠心分離機を使用して、免疫細胞化学的染色に備えた接着性スライド上、100×gでたとえば3分間、遠心分離することができる。サイトスピンを一晩風乾させ、染色まで-80℃で貯蔵することができる。そして、スライドを固定し、無血清ブロッキング試薬でブロッキングすることができる。そして、スライドを特異的抗体とともにインキュベートして、関心対象のタンパク質の発現を検出することができる。いくつかの態様において、小胞は、タンパク質発現解析の前に精製、単離または濃縮されない。

30

【0415】

小胞内の代謝産物マーカーまたは代謝産物の解析により、小胞ペイロードを含むバイオシグネチャーを特徴決定することができる。代謝産物標的解析、代謝産物プロファイリングまたは代謝フィンガープリンティングのような種々の代謝産物指向の手法が記載されている。たとえば、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられるDenkert et al., Molecular Cancer 2008; 7:4598-4617、Ellis et al., Analyst 2006; 8:875-885、Kuhn et al., Clinical Cancer Research 2007; 24:7401-7406、Fiehn O., Comp Funct Genomics 2001; 2:155-168、Fancy et al., Rapid Commun Mass Spectrom 20(15):2271-80 (2006)、Lindon et al., Pharm Res, 23(6):1075-88 (2006)、Holmes et al., Anal Chem. 2007 Apr 1; 79(7):2629-40. Epub 2007 Feb 27. Erratum in: Anal Chem. 2008 Aug 1; 80(15):6142-3、Stanley et al., Anal Biochem. 2005 Aug 15; 343(2):195-202、Lehtimäki et al., J Biol Chem. 2003 Nov 14; 278(46):45915-23を参照すること。

40

【0416】

Jain KK: Integrative Omics, Pharmacoproteomics, and Human Body Fluids. In: Thongboonkerd V, ed., ed. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods and Applications. Volume 1: Totowa, N.J.: Humana Press, 2007 (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)に記載されるシステムによって、ペプチドを分析することができる。このシステムは、体液、および小胞に存在するタンパク質の、高感度の分子フィンガープリントを生成することができる。クロマトグラフィー／質量分析、および人体における全ての安定した代謝産物の参照ライブラリー、例えば、Paradigm Genetic社のヒトメタボロ

50

ームプロジェクト (Paradigm Genetic's Human Metabolome Project) の使用を含む商業的応用は、代謝産物のバイオシグネチャーを検出するために使用することができる。代謝プロファイルを解析するための他の方法は、米国特許第6,683,455号 (Metabometrix)、米国特許出願公開第20070003965号および第20070004044号 (Biocrates Life Science) に記載される方法およびデバイスを含むことができ、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。他のプロテオミクスプロファイリング技術は、Kennedy, Toxicol Lett 120:379-384(2001)、Berven et al., Curr Pharm Biotechnol 7(3):147-58(2006)、Conrads et al., Expert Rev Proteomics 2(5):693-703、Decramer et al., World J Urol 25(5):457-65(2007)、Decramer et al., Mol Cell Proteomics 7(10):1850-62(2008)、Decramer et al., Contrib Nephrol, 160:127-41(2008)、Diamandis, J Proteome Res 5(9):2079-82(2006)、Immler et al., Proteomics 6(10):2947-58(2006)、Khan et al., J Proteome Res 5(10):2824-38(2006)、Kumar et al., Biomarkers 11(5):385-405(2006)、Noble et al., Breast Cancer Res Treat 104(2):191-6(2007)、Omen, Dis Markers 20(3):131-4(2004)、Powell et al., Expert Rev Proteomics 3(1):63-74(2006)、Rai et al., Arch Pathol Lab Med, 126(12):1518-26(2002)、Ramstrom et al., Proteomics, 3(2):184-90(2003)、Tammen et al., Breast Cancer Res Treat, 79(1):83-93(2003)、Theodorescu et al., Lancet Oncol, 7(3):230-40(2006)、またはZurbig et al., Electrophoresis, 27(11):2111-25(2006)に記載されている。

10

【0417】

mRNA、miRNA、または他の小RNAの解析のために、米国特許出願公開第2008132694号 (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる) に記載される方法等の核酸を単離するための任意の既知の方法を用いて、全RNAを単離することができる。これらとしては、市販の、膜ベースのRNA精製法を行うためのキットが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、これらのキットは、細胞および組織からのRNAの小規模 (30mg以下) の調製、細胞および組織からのRNAの中規模 (250mg 組織) の調製、および細胞および組織からのRNAの大規模 (1g 最大) の調製に使用可能である。低分子RNAを含有する全RNAの有効な単離のための他の市販のキットが使用可能である。このような方法は、小胞から核酸を単離するために使用され得る。

20

【0418】

あるいは、RNAは、米国特許第7,267,950号 (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる) に記載される方法を用いて単離することができる。米国特許第7,267,950号には、生物系 (細胞、細胞フラグメント、細胞小臓器、組織、臓器、または生物) からのRNAを抽出する方法が記載されており、RNAを含有する溶液は、RNAを結合させることができる基体と接触させ、陰圧を負荷することによって基体からRNAを回収する。あるいは、小RNA分子の単離を記載する、米国特許出願第20050059024号 (参照によりその全体が本明細書に組み入れられる) に記載される方法を用いて、RNAは、単離され得る。他の方法は、米国特許出願第20050208510、20050277121、20070238118号に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【0419】

一つの態様において、mRNAの発現解析は、試料から単離された小胞からのmRNAにおいて実行することができる。幾つかの態様において、該小胞は、起始細胞に特異的な小胞である。小胞から生成された発現パターンは、所与の病状、疾患の病期、治療関連のシグネチャー、または生理的状态を示すことができる。

40

【0420】

一つの態様において、全RNAが単離されると、cDNAを合成することができ、特異的mRNA標的に対するqRT-PCRアッセイ (例えば、Applied Biosystem's Taqman (登録商標) アッセイ) は、製造業者のプロトコールに従って行うことができるか、または発現のマイクロアレイを行って、1つの実験において、高度に多重化された発現マーカーのセットを検査することができる。遺伝子発現プロファイルを構築するための方法には、タンパク質またはペプチドをコードすることができる遺伝子によって産生されるRNAの量を決定するこ

50

とが含まれる。これは、定量的逆転写酵素PCR (qRT-PCR)、競合的RT-PCR、リアルタイムRT-PCR、差次的発現RT-PCR、ノーザンブロット分析、または他の関連試験によって達成され得る。個々のPCR反応を用いてこれらの技法を実行することが可能であるが、mRNAから産生される相補的DNA (cDNA) または相補的RNA (cRNA) を増幅し、マイクロアレイを介してそれを解析することも可能である。

【0421】

試料中のmiRNA産物のレベルは、ノーザンブロット分析、RT-PCR、qRT-PCR、インサイチュハイブリダイゼーション、またはマイクロアレイ解析が挙げられるが、これらに限定されない、生体試料中のmRNA発現レベルを検出するために適している任意の適切な技法を用いて測定することができる。例えば、遺伝子特異的なプライマーおよび標的cDNAを使用して、qRT-PCRは、少数の標的miRNA (単一解析および多重解析を介する) のいずれかの高感度の定量的なmiRNA測定を可能にするか、または、このプラットフォームを、96ウェルまたは384ウェルプレート形式を用いるハイスループット測定を行うために採用することができる。例えば、Ross JS et al, *Oncologist*.2008 May;13(5):477-93を参照されたい。これは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。多くの異なるアレイ配置およびマイクロアレイ産生のための方法は、当業者には公知であり、米国特許第5,445,934号、第5,532,128号、第5,556,752号、第5,242,974号、第5,384,261号、第5,405,783号、第5,412,087号、第5,424,186号、第5,429,807号、第5,436,327号、第5,472,672号、第5,527,681号、第5,529,756号、第5,545,531号、第5,554,501号、第5,561,071号、第5,571,639号、第5,593,839号、第5,599,695号、第5,624,711号、第5,658,734号、または第5,700,637号等の米国特許に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。miRNAをプロファイリングする他の方法は、Taylor et al., *Gynecol Oncol*.2008 Jul;110(1):13-21、Gilad et al, *PLoS ONE*.2008 Sep 5;3(9):e3148、Lee et al., *Annu Rev Pathol*.2008 Sep 25およびMitchell et al, *Proc Natl Acad Sci U S A*.2008 Jul 29;105(30):10513-8、Shen R et al, *BMC Genomics*.2004 Dec 14;5(1):94、Mina L et al, *Breast Cancer Res Treat*.2007 Jun;103(2):197-208、Zhang L et al, *Proc Natl Acad Sci U S A*.2008 May 13;105(19):7004-9、Ross JS et al, *Oncologist*.2008 May;13(5):477-93、Schetter AJ et al, *JAMA*.2008 Jan 30;299(4):425-36、Staudt LM, *N Engl J Med* 2003;348:1777-85、Mulligan G et al, *Blood*.2007 Apr 15;109(8):3177-88.Epub 2006 Dec 21、McLendon R et al, *Nature*.2008 Oct 23;455(7216):1061-8、ならびに米国特許第5,538,848号、第5,723,591号、第5,876,930号、第6,030,787号、第6,258,569号、および第5,804,375号に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。幾つかの態様において、マイクロRNAパネルのアレイを使用して、複数のmiRの発現を同時に照会する。Exiqon mIRCURY LNA マイクロRNA PCRシステムパネル (Exiqon, Inc., Woburn, MA)、またはTaqMan (登録商標) マイクロRNAアッセイおよびApplied Biosystems(Foster City, CA)のアッセイシステムを、そのような目的に使用することができる。

【0422】

マイクロアレイ技術は、何千もの転写物またはmiRNAの定常状態mRNAまたはmiRNAレベルを同時に測定することを可能にし、それによって、制御されていない細胞増殖の開始、停止、または調節等の効果を同定するための強力なツールを提供する。cDNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイ等の2つのマイクロアレイ技術を使用することができる。これらの分析の成果とは、典型的には、マイクロアレイ上の既知の位置で核酸配列にハイブリダイズする試料からのcDNA配列を検出するために使用された標識プローブから受けたシグナルの強度の測定値である。一般に、シグナルの強度は、cDNAの量に比例し、故に、mRNAまたはmiRNAは、試料細胞中に発現する。多くのこのような技法が使用可能であり、有用である。遺伝子発現を決定するための方法は、Linsleyらの米国特許第6,271,002号; Friendらの米国特許第6,218,122号; Peckらの米国特許第6,218,114号; またはWangらの米国特許第6,004,755号に見出され得、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0423】

発現レベルの解析は、このような強度を比較することによって行われ得る。これは、対照試料中の遺伝子の発現強度に対する試験試料中の遺伝子の発現強度の比率マトリックスを生成することによって行われ得る。対照試料は、参照として使用され得、年齢、民族、および性別を考慮するために異なる参照が使用され得る。異なる参照は、異なる病態または疾患、および疾患または病態の異なる病期用に、ならびに治療効果を決定するために使用することができる。

【0424】

例えば、小胞から単離されたものを含む、罹患組織に由来するmRNAまたはmiRNAの遺伝子発現強度は、同じ種類の正常組織における同様の要素の発現強度と比較することができる（例えば、罹患した乳房組織試料 対 正常乳房組織試料）。これらの発現強度の比は、試験試料と対照試料との間の遺伝子発現の倍率変化を示す。あるいは、小胞が正常組織（例えば、乳房）において通常存在しない場合、当該技術分野に公知であるような、絶対量測定法を使用して、正常組織に由来する小胞から単離されたmiRNAまたはmRNAを必要とせずに、存在するmiRNA分子の数を画定することができる。

【0425】

また、遺伝子発現プロファイルも、多くの方法で表示することができる。一般的な方法は、未加工の蛍光強度またはマトリックスの比を、縦の列が試験試料を示し、横の行が遺伝子を示す、グラフの樹状図（graphical dendrogram）に配列することである。データは、類似した発現プロファイルを有する遺伝子が互いに近位になるように配列される。各遺伝子の発現比は、色で視覚化される。例えば、1未満の比（下方制御を示す）はスペクトルの青の部分に現れ得るが、1より大きい比（上方制御を示す）はスペクトルの赤の部分の色として現れ得る。市販のコンピュータソフトウェアプログラムは、このようなデータを表示するために使用できる。

【0426】

特異的に発現したと見なされるmRNAまたはmiRNAは、疾患を有する患者において、無病個人と比較して過剰発現あるいは過小発現のいずれかであり得る。過剰発現および過小発現は、（それを測定するために使用したシステムのノイズの寄与を超える）検出可能な差異が、あるベースラインと比較してmRNAまたはmiRNAの発現量に見出されることを意味する相対的な用語である。この場合、ベースラインは、疾患のない個人の測定されたmRNA／miRNA発現である。次いで、罹患細胞における関心対象のmRNA／miRNAは、同じ測定方法を用いたベースラインレベルと比較して過剰発現または過小発現したものであり得る。この文脈において、罹患（diseased）とは、身体機能の適切な働きを妨害するもしくは乱す、または乱す可能性がある、身体状態の変化のことを指し、それは制御されていない細胞増殖によって生じる。ある人について、その人の遺伝子型または表現型の幾つかの態様が、疾患の存在と一致する場合に、疾患であると診断される。しかしながら、診断および予後判定を行うという行為は、再発または転移の可能性の決定および治療観察といった、疾患／状態の問題の決定を含んでいる。治療観察においては、正常組織とより一致するパターンにmRNA／miRNA発現プロファイルが変化したのかどうか、または変化しつつあるのかどうかを判定するために経時的に遺伝子の発現を比較することによって、所定の一連の治療の効果について、臨床的判断が行われる。

【0427】

過剰発現および過小発現のレベルは、ハイブリダイズしたマイクロアレイプローブの強度測定の倍率変化に基づいて区別される。2倍の違いは、このような区別を行うのに望ましい（あるいはp値が0.05未満）。すなわち、mRNA／miRNAが正常／非再発細胞に対して罹患／再発細胞において特異的に発現する前に、罹患細胞は、正常細胞と比較して少なくとも2倍より多い、もしくは2倍少ない強度をもたらしことが分かっている。より大きい倍率の差があるほど、診断もしくは予後判定の手段としてその遺伝子を使用することが好ましい。本発明の発現プロファイルのために選択されたmRNA／miRNAは、臨床用実験器具を使用した際、バックグラウンドを超える量で正常遺伝子もしくは非調節遺伝子のシグナルと

区別可能なシグナルの発生をもたらす発現レベルを有している。

【0428】

調節された遺伝子を非調節mRNA/miRNAおよびノイズと明確に区別するために、統計的値を使用することができる。統計的検定により、試料の様々な群の間で最も有意差のあるmRNA/miRNAを検出する。スチューデントのt-検定は、ロバストな統計的検定の一例であり、2群間の有意差を検出するために使用することができる。p値が低いほど、その遺伝子が異なる群の間の差を示している証拠がより説得力を持つ。とはいえ、マイクロアレイは、1回に2つ以上のmRNA/miRNAを測定するので、数万もの統計的検定を一度に行うことがあり得る。このため、全くの偶然によって低いp値を見出す可能性は低く、シダックの補正のみでなく、ランダム化/置換の実験を用いることでこの調整を行うことができる。t-検定による0.05未満のp値は、遺伝子に有意差があるという証拠となる。シダックの補正を計算に入れた後の0.05未満のp値は、より強力な証拠となる。各群の多数の試料に対して、ランダム化/置換検定を行った後の0.05未満のp値は、有意差を示す最も強力な証拠となる。

10

【0429】

一つの態様において、診断、予後判定、治療に関連する、または生理的状態の特異的なバイオシグネチャーのスコアを可能にするための事後確率スコアを生成する方法は、統計的に有意な数の患者からの循環バイオマーカー発現データを取得すること、選択されるバイオマーカーを取得するためにデータに線形判別分析を適用すること、および事後確率スコアとして適用され得る予測モデルを取得するために判別関数因子で選択されたバイオマーカーに、重み付けされた発現レベルを適用することによって、達し得る。同じ問題に答えるために、ロジスティック回帰およびニューラルネットワークアプローチ等の、他の解析手段も使用することができる。

20

【0430】

例えば、以下は、線形判別分析に使用することができる。

式中、

$I(p_{s,d})$ = 括弧で囲まれているプローブセットの強度の2を底とした対数。 $d(cp)$ = 疾患陽性群に対する判別関数、 $d(C_N)$ = 疾患陰性群に対する判別関数

$P(C_P)$ = 疾患陽性群に対する事後p値

$P(C_N)$ = 疾患陰性群に対する事後p値

30

である。

【0431】

多くの他の周知のパターン認識方法が使用可能である。以下の参照は、幾つかの例を提供する:加重投票法:Golubら(1999)、サポートベクターマシン(Support Vector Machines):Suら(2001)、およびRamaswamyら(2001)、K-最近傍法:Ramaswamy(2001)、ならびに相関係数:van't Veerら(2002)、これらの全ては、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0432】

以下にさらに記載される、バイオシグネチャーのポートフォリオは、ポートフォリオ内のバイオマーカーの組み合わせが、個々のバイオマーカーまたはランダムに選択されたバイオマーカーの組み合わせと比較して、改善された感度および特異度を示すように構築され得る。一つの態様において、バイオシグネチャーのポートフォリオの感度は、例えば、正常状態と比較して、罹患状態における転写物の発現によって示される、倍率の差に反映され得る。特異度は、転写物発現シグナルの、関心対象の条件に対する相関の統計的な測定に反映され得る。例えば、標準偏差は、このような測定として使用することができる。バイオシグネチャーのポートフォリオに包含するためのバイオマーカー群を考える場合、発現の測定における小さな標準偏差は、より高い特異度と相関する。相関係数等の他の変法の測定もまた、この限りにおいて使用することができる。

40

【0433】

非調節mRNA/miRNAまたはノイズのシグナルよりも大きいシグナルを生成するmRNA/miR

50

NAを選択するために使用することができる別のパラメータは、絶対シグナル差の測定の使用である。調節mRNA/miRNA発現によって生成されたシグナルは、正常または非調節遺伝子（絶対的基準において）のシグナルと少なくとも20%の差異がある。このようなmRNA/miRNAは、正常または非調節mRNA/miRNAのシグナルと少なくとも30%の差異がある発現パターンを生じることがさらになお好ましい。

【0434】

miRNAはまた、生体試料から増幅することによって検出し、かつ測定することができ、米国特許第7,250,496号、米国出願公開第20070292878号、第20070042380号、または第20050222399号に記載される方法を用いて測定することができ、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。マイクロRNAは、2011年2月15日に発行された "METHODS FOR ASSESSING RNA PATTERNS" と題される米国特許第7,888,035号に記載されるように評価され得、この出願はその全体が本明細書に組み入れられる。

【0435】

マイクロRNAのレベルは、当業者に公知の様々な技術を使用して正規化することができる。たとえば、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 (Applied Biosystems User Bulletin N°2) を使用して、miRNA発現の相対的定量化を実施することができる。マイクロRNAのレベルはまた、ハウスキーピング核酸、たとえばハウスキーピングmRNA、マイクロRNAまたはsnoRNAに対して正規化することもできる。本発明とともに使用することができるmiRNAレベルを正規化するさらなる方法が、それらの各々が参照によりその全文が本明細書に組み入れられるVasilescu, MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. PLoS One. 2009 Oct 12;4(10):e7405およびPeltier and Latham, Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. RNA. 2008 May;14(5):844-52. Epub 2008 Mar 28にさらに記載されている。

【0436】

リン酸-糖のポリヌクレオチド骨格が、可撓性擬似ペプチドポリマーで置き換えられる、合成核酸類似体の新しいクラスであるペプチド核酸 (PNA) は、バイオシグネチャーの解析に使用され得る。PNAは、相補RNAおよびDNA配列に対して高い親和性および特異性を持ってハイブリダイズする能力があり、ヌクレアーゼおよびプロテイナーゼによる分解に強い抵抗性を示す。ペプチド核酸 (PNA) は、ヒト染色体の急速なインサイチューでの同定およびコピー数多型 (CNV) の検出のための細胞遺伝学における用途を有する魅力的な新しいクラスのプローブである。マルチカラーペプチド核酸蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (PNA-FISH) プロトコルは、幾つかのヒトCNV関連の障害および感染症の同定に対して記載されている。PNAはまた、腫瘍を標的とする放射性核種-PNA-ペプチドキメラを用いて発癌遺伝子mRNAを非侵襲的に測定するための分子診断手段として使用することもできる。PNAを使用する方法は、Pellestor F et al, Curr Pharm Des.2008;14(24):2439-44, Tian X et al, Ann N Y Acad Sci.2005 Nov;1059:106-44, Paulasova P and Pellestor F, Annales de Genetique, 47(2004)349-358, Stender H. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Sep;3(5):649-55. Review, Vigneault et al., Nature Methods, 5(9), 777-779(2008)にさらに記載されており、各参照は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。これらの方法は、小胞から単離された遺伝物質をスクリーニングするために使用することができる。起始細胞に特異的な小胞にこれらの技法を適用する場合、これらの技法は、起始細胞に直接関連するある分子シグナルを同定するために使用することができる。

【0437】

突然変異解析は、小胞から同定されるものを含むmRNAおよびDNAに対して実行され得る。RNA起源のものである標的またはバイオマーカーの突然変異解析について、RNA (mRNA、miRNA、またはその他) をcDNAに逆転写し、続いて、既知のSNPなど (例えば、Taqman SNP アッセイによって)、または単一ヌクレオチド突然変異について配列決定またはアッセイすることができ、また、起始細胞中に存在する突然変異を決定するために挿入または欠失を探すための配列決定を用いてもよい。一方、多重連鎖反応依存性プローブ増幅 (MLPA)

は、関心対象の小さい特異的な領域におけるCNVを同定する目的で使用され得る。例えば、全RNAが、単離された結腸癌固有の小胞から得られると、cDNAを合成することができ、KRAS遺伝子のエキソン2および3に特異的なプライマーは、KRAS遺伝子のコドン12、13、および61を含有するこれらの2つのエキソンを増幅するために使用することができる。PCR増幅に使用される同じプライマーは、KRASのエキソン2および3において、突然変異を同定するために、ABI 3730上でBig Dye Terminator配列解析のために使用することができる。これらのコドンにおける突然変異は、セツキシマブおよびパニツミマブ (Panitumimab) 等の薬物に対する抵抗力を与えることで知られている。突然変異解析を行う方法は、Maheswaran S et al, July 2, 2008(10.1056/NEJMoa0800668)およびOrita, M et al, PNAS 1989, (86):2766-70に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

【0438】

突然変異解析を行う他の方法は、miRNA配列決定を含む。miRNAを同定し、プロファイリングするための応用は、クローニング技術、およびキャピラリーDNA配列決定または「次世代」配列決定技術の使用によって行うことができる。現在使用可能な新しい配列決定技術は、ハイブリダイゼーションに基づく方法では検出されないと考えられる少量のmiRNAまたは試料間の低い発現差異を示すものの同定を可能にする。このような新しい配列決定技術には、Nakano et al. 2006, Nucleic Acids Res. 2006; 34:D731-D735. doi:10.1093/nar/gkj077に記載される、大規模並列シグネチャー配列決定 (MPSS) 法、Margulies et al. 2005, Nature. 2005; 437:376-380に記載される、Roche/454プラットフォーム、またはBerezikov et al. Nat. Genet. 2006b; 38:1375-1377に記載される、イルミナ配列決定プラットフォームが含まれ、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0439】

バイオシグネチャーを決定するためのさらなる方法には、遺伝子の2つの対立遺伝子間で増幅し、同時に識別するための特異的なプライマーを含む対立遺伝子特異的なPCR、配列ならびにDNAおよびRNAアプタマーの微細な差異に基づく一本鎖核酸の電気泳動分離を含む一本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) によってバイオマーカーをアッセイすることが含まれる。DNAおよびRNAアプタマーは、高親和性を有する特定の分子に結合する能力に基づいてランダムなプールから選択することができる短いオリゴヌクレオチド配列である。アプタマーを使用する方法は、Ulrich H et al, Comb Chem High Throughput Screen. 2006 Sep; 9(8):619-32、Ferreira CS et al, Anal Bioanal Chem. 2008 Feb; 390(4):1039-50、Ferreira CS et al, Tumour Biol. 2006; 27(6):289-301に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【0440】

バイオマーカーはまた、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) を用いて検出することもできる。特異的なDNA配列を検出および局在化させるため、組織試料内で特異的なmRNAを局在化するため、または染色体異常を同定するためにFISHを用いる方法は、Shaffer DR et al, Clin Cancer Res. 2007 Apr 1; 13(7):2023-9、Cappuzo F et al, Journal of Thoracic Oncology, Volume 2, Number 5, May 2007、Moroni M et al, Lancet Oncol. 2005 May; 6(5):279-86に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

40

【0441】

小胞集団をそのペイロードに関して解析するための説明図が図2Eに提示されている。ある態様において、本発明の方法は、小胞を捕捉し (6330)、その中に含まれるマイクロRNA種のレベルを測定して (6331)、それによって表現型を特徴決定することにより (6332)、表現型を特徴決定する工程を含む。

【0442】

循環バイオマーカーまたは小胞を含むバイオシグネチャーは、それに対する結合物質を含むことができる。結合物質は、DNA、RNA、アプタマー、モノクローナル抗体、ポリクロ

50

ーナル抗体、Fab、Fab'、一本鎖抗体、合成抗体、アプタマー（DNA/RNA）、ペプチド、zDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、レクチン、合成または天然の化学物質（薬物および標識試薬を含むが、これらに限定されない）であることができる。

【0443】

上記のように、結合物質を使用して、小胞の成分に結合させることにより、小胞を単離または検出することができる。結合物質は、小胞を検出する、たとえば起始細胞特異的小胞を検出するために使用することができる。結合物質または複数の結合物質そのものが、小胞のバイオシグネチャーを提供する結合物質プロファイルを形成することができる。たとえば、不均一な小胞集団からの小胞の差次的検出または単離において二つ、三つ、四つまたはそれ以上の結合物質を使用して小胞集団を検出または単離するならば、その小胞集団の特定の結合物質プロファイルがその特定の小胞集団のバイオシグネチャーを提供する。

10

【0444】

説明のための例として、癌を特徴決定するための小胞は、PSA、PSMA、PCSA、PSCA、B7H3、EpCam、TMPRSS2、mAB5D4、XPSM-A9、XPSM-A10、ガレクチン3、Eセレクチン、ガレクチン1またはE4（IgG2a κ）またはそれらの任意の組み合わせを非限定的に含む一つまたは複数の結合物質によって検出することができる。

【0445】

結合物質はまた、一般的小胞バイオマーカー、たとえば「ハウスキーピングタンパク質」または抗原に対する結合物質であることもできる。バイオマーカーはCD9、CD63またはCD81であることができる。たとえば、結合物質は、CD9、CD63またはCD81に対する抗体であることができる。結合物質はまた、他のタンパク質、たとえば組織特異的または癌特異的小胞に対する結合物質であることもできる。結合物質は、PCSA、PSMA、EpCam、B7H3またはSTEAPに対する結合物質であることができる。結合物質は、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、MFG-E8、アネキシンV、TF、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2またはTETSに対する結合物質であることができる。たとえば、結合物質は、PCSA、PSMA、EpCam、B7H3、DR3、STEAP、epha2、TMEM211、MFG-E8、アネキシンV、TF、unc93A、A33、CD24、NGAL、EpCam、MUC17、TROP2またはTETSに対する抗体またはアプタマーであることができる。

20

【0446】

一般に、様々なタンパク質が小胞シェル上に均等または均一に分散しているわけではない。小胞特異的タンパク質がよりありふれている一方で、癌特異的タンパク質はそれほどありふれてはいない。いくつかの態様において、小胞の捕捉は、よりありふれた、より癌特異的でないタンパク質、たとえば一つまたは複数のハウスキーピングタンパク質または抗原もしくは一般的小胞抗原（たとえばテトラスパニン）を使用して達成され、一つまたは複数の癌特異的バイオマーカーおよび／または一つまたは複数の起始細胞特異的バイオマーカーは検出段階で使用される。もう一つの態様において、一つまたは複数の癌特異的バイオマーカーおよび／または一つまたは複数の起始細胞特異的バイオマーカーが捕捉に使用され、一つまたは複数のハウスキーピングタンパク質または抗原もしくは一般的小胞抗原（たとえばテトラスパニン）が検出に使用される。複数の態様において、同じバイオマーカーが捕捉および検出の両方に使用される。同じバイオマーカーに対して異なる結合物質、たとえば抗原の異なるエピトープに結合する抗体またはアプタマーを使用することもできる。

30

40

【0447】

さらなる細胞結合パートナーまたは結合物質を、当技術分野において公知の任意の従来法によって、または本明細書に記載されるように同定してもよく、かつさらに、診断、予後判定または治療関連マーカーとして使用してもよい。たとえば、小胞は、本明細書の表3、4または5に記載された一つまたは複数の結合物質を使用して検出することができる。たとえば、結合物質はまた、たとえば「ハウスキーピングタンパク質」または抗原のような一般的小胞バイオマーカーのためであることもできる。一般的小胞バイオマーカーは、CD9、CD63もしくはCD81または表3中の他のバイオマーカーであることができる。結合物質

50

はまた、他のタンパク質のため、たとえば起始細胞特異的または癌特異的小胞のためであることもできる。非限定的な例として、前立腺癌の場合、結合物質は、PCSA、PSMA、EpCam、B7H3、RAGEまたはSTEAPのためであることができる。結合物質は、表4～5におけるバイオマーカーに対するものであることができる。たとえば、結合物質は、PCSA、PSMA、EpCam、B7H3、RAGE、STEAP、または表4～5におけるその他のバイオマーカーに対する抗体またはアプタマーであることができる。

【0448】

様々なタンパク質が小胞表面に均等または均一に分散しているとは限らない。たとえば、一般に、小胞特異的タンパク質は比較的良好に見られるが、一方、癌特異的タンパク質は比較的良好に見られない。いくつかの態様において、小胞の捕捉は、比較的良好に見られる、比較 10
癌特異的でないタンパク質、たとえばハウスキーピングタンパク質または抗原を使用して達成され、癌特異的タンパク質は検出段階で使用される。検出システムの感度に依存して、一般的小胞マーカーに対する結合物質を使用して大きな小胞集団を捕捉したのち、関心対象の部分集団に特異的な検出物質によって細胞特異的小胞を検出する正反対の方法を使用することもできる。

【0449】

さらには、さらなる細胞結合パートナーまたは結合物質は、当技術分野において公知の従来法によって、または本明細書に記載されるように同定することもでき、さらに、診断、 20
予後判定または治療関連マーカーとして使用することもできる。

【0450】

マイクロRNA機能アッセイ

上記のように、マイクロRNAは、微小胞、HDLおよびLDL粒子ならびにリボ核タンパク質複合体 (RNP) の成分中に封入されて、血液のような体液中を循環する状態で見いだされることができる。マイクロRNAは、非限定的に、RT-qPCRまたは次世代配列決定法を含む、本明細書に記載される、または当技術分野において公知であるような利用可能な技術を使用して検出することができる。しかし、生物学的に活性化状態にあるマイクロRNAは、Argonaute (「Ago」) タンパク質 (たとえばAgo1、Ago2、Ago3またはAgo4) の一つまたは複数と結合し、そしてそれによって活性化される。本発明の一つの局面は、単一の反応において生物学的試料内の標的マイクロRNAの機能活性の検出を可能にする組成物および方法 30
に関する。Agoファミリーのタンパク質の考察に関しては、Hock and Meister, *Genome Biology*, 2008, 9:210を参照すること。

【0451】

より具体的には、一つまたは複数の核酸バイオマーカー (たとえばマイクロRNA) を評価するために、基体、合成RNA分子、標識およびRISC (RNA誘発サイレンシング複合体) 反応バッファ成分および場合によっては一つまたは複数の単離されたAgoタンパク質が使用される。本発明に使用することができる基体の例は、合成RNA分子の第一の区分、たとえば3'または5'末端が直接または間接結合を介してつながれる平面基体、マイクロビーズ、カラムなどを含むが、これらに限定されない。そのような基体は、本明細書に開示されている、または当技術分野において公知である。結合は、当技術分野において公知である方法、たとえば、Wittebolle et al., *Optimisation of the amino-carboxy coupling of oligonucleotides to beads used in liquid arrays*, *J Chem Tech Biotech* 81:476-480 (2006)に記載されているようなアミノカルボキシカップリングを使用して実施される。 40
そのような技術は当業者にはすでに公知である。

【0452】

合成RNA分子のもう一つの部分、たとえば反対側の3'または5'末端が標識または検出可能な分子に直接または間接的に取り付けられる。標識は、検出されることができる任意の分子であり、そのような標識または検出可能な分子は当技術分野において公知であり、かつ非限定的に、蛍光標識、放射能標識または酵素標識を含む。そのような標識のさらなる例が本明細書中で先に開示されている。基体につながった部分と標識された部分との間で、合成RNA分子は、関心対象の標的マイクロRNAに相補的である区分または部分を含む。所 50

望により、相補的区分は、標的マイクロRNAに対して完璧に相補的である、すなわち100%相補的であることができる。相補的区分と標的マイクロRNAとの間の結合の程度を操作して、たとえば、一つの特定の標的マイクロRNAの認識を可能にすることもできるし、またはたとえば標的マイクロRNAのファミリーの乱雑な認識を可能にすることもできる。そのような操作のための手段は、本明細書に開示されている、または当技術分野において公知であり、たとえば、塩基対ミスマッチまたは温度もしくは塩濃度のようなアッセイ条件。たとえば、相補的区分は、標的マイクロRNAに対して少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または少なくとも99%相補的であるような、標的マイクロRNAとのミスマッチを有してもよい。方法は、標識され、つながれた合成RNA分子を、関心対象の標的マイクロRNAを含む、または含むと思われる試料と接触させることを含む。標的マイクロRNAが試料中に存在し、かつAgoタンパク質に結合しているならば、Ago-マイクロRNAは、標的マイクロRNAと相補的領域との間の塩基対形成を介して合成RNA分子と結合することができる。そのような結合が、Agoタンパク質のヌクレオチド鎖切断活性による合成RNA分子の切断を容易にする。この切断が合成RNA分子の標識を基体から解放する。基体と結合した標識の量を、標的マイクロRNAを含む試料との接触の前後に検出することができる。標識の量における任意のそのような差が、入力試料中のAgo結合標的マイクロRNAの量を示す。

【0453】

アッセイ法に有用な反応条件およびバッファは当技術分野において公知である。反応は、アッセイ感度および標的存在度に依存して、室温、25℃、30℃、37℃または42℃～45℃までで5分ないし一晩実施される。たとえば、反応は、37℃で1～2時間、実施することができる。たとえば、Brown et al., Targent accessibility dictates the potency of human RISC. Nature Structural & Molecular Biology 12, 469-470 (2005)、Robb et al., Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. Nature Structural & Molecular Biology 12, 133-137 (2005)、Lima et al., Binding and Cleavage Specificities of Human Argonaute2. J. Biol. Chem. 2009 284: 26017-26028を参照すること。

【0454】

アッセイ法の例示的態様が図26に示されている。図26Aに示すように、合成RNA分子は、3'リンカー／延長領域262、中央miRNA標的化領域263および第二の5'リンカー／延長領域264を含む。RNAは、その3'末端262が基体、ここではマイクロビーズ261に結合し、およびその5'末端264がビオチン266とコンジュゲートしている。中央miRNA標的化領域263は、関心対象のmiRNA配列を補足するように設計されている。領域263は、関心対象の任意のマイクロRNAに相補的であることができる。図26に示す例においては、合成RNAのビオチン端を標識するためにストレプトアビジン-PE（フィコエリスリン）265が使用されている。上記のように、他の標識スキームを用いることもできる。たとえば、5'末端264は、Cy3、Cy5、または本明細書に開示される、もしくは当技術分野において公知である他の検出可能な部分で直接標識することができる。もう一つの例として、5'末端264は、標識されている別の相補的オリゴヌクレオチドとの塩基対形成によって間接的に標識することができる。標的マイクロRNAが試料中に存在し、かつ試料中の、または試料に加えられたAgoタンパク質267、たとえばAgo1～4のいずれか、たとえば組み換えAgo2（rAgo2）と結合しているならば、その標的マイクロRNAは、相補的マイクロRNA標的化領域263と結合し、そしてその後、Argonauteのヌクレオチド鎖切断活性によって領域263において合成RNAを切断する。たとえば、図26の工程268を参照すること、切断されたら、合成RNA分子の標識された末端（ここでは5'）が解放され、それにより、ビオチン／ストレプトアビジン-PE複合体265～266がマイクロビーズ261から切り離される。図26Bを参照すること。次に、基体マイクロビーズを単離し、洗浄して、切断され、解き放たれたRNAの末端を除去して、それにより、残りの、切断されておらず、まだ標識されたままの物質および任意の切断されているが、今や標識されていないRNAだけを残す。この洗浄工程ののち、PEシグナルの差は、元のアッセイ中に存在するAgo結合標的マイクロRNA267の濃度および活性と相関する。入力試料中のAgo結合標的マイクロRNAの量が、切断されたRNAのレベルを決定する。たとえば、

標的マイクロRNAが存在しないならば、または、存在するが、機能的な形態でAgoと結合していないならば、合成RNA標的領域263は、切断されないまま残り、およびシグナル強度は変化しない。

【0455】

アッセイ法を使用して、RNAおよび／またはArgonauteに予備添加されたRNAの任意の適切な供給源を検査することができる。たとえば、入力試料は、細胞溶解物、体液、血液分画（miRNAに結合したAgo2のような循環Argonauteを含んでもよい）、血漿、血清または単離された微小胞であってもよい。いくつかの態様において、試料から免疫沈降させたArgonauteが、アッセイ法のためのRNP複合体の入力源として使用される。標的マイクロRNAが存在し、かつ前述の供給源のいずれかにおけるArgonauteに添加されるならば、合成標的263は切断され、標識（たとえば、図26の例におけるビオチン-ストレプトアビジン-PE265～266）は解放される。

【0456】

図26C～Eは、アッセイ法のための入力として使用することができるRNAの様々な供給源を模式的に示す。図26Cは、Agoタンパク質269に結合してリボ核酸複合体267を形成するマイクロRNA268を示す。Agoタンパク質はAgo1、Ago2、Ago3またはAgo4であることができる。図26Dは、Agoへの結合物質2610を使用する、Argonaute-マイクロRNA複合体267の免疫沈降を示す。結合物質は、特定のArgonauteに特異的であるもの、たとえばAgo2に対する抗体またはアプタマーであることができる。他の態様において、結合物質は、一つより多いAgoファミリーメンバー、たとえばAgo1～4を認識する。さらに他の態様において、結合物質は、一つまたは複数のAgoタンパク質に間接的に結合することができる。たとえば、免疫沈降のための結合物質は、Agoタンパク質と複合体を形成するGW182に対する抗体またはアプタマーであることができる。図26Eは、たとえば細胞溶解物、体液または溶解微小胞からのArgonaute-マイクロRNA複合体267の直接分析を示す。

【0457】

または、アッセイ入力は、結合した試料供給源からのRNAを含むこともでき、これを次にAgoタンパク質、たとえば組み換えAgo（rAgo）を含む精製Agoと接触させる。このようにして、RNAは、非限定的に、細胞溶解物、体液、血漿、濃縮血漿、微小胞またはHDLおよびLDL粒子を含む任意の適切な供給源から単離することができる。単離されたら、Agoタンパク質、たとえば組み換えArgonaute2を使用して、試料中に存在する小さなRNAに結合させることができる。Ago結合RNAは、アッセイ法への入力として使用することができる。

【0458】

上記のように、合成RNA分子の第三の部分が標識され、したがって、相補的区分の切断が基体からの標識の除去を可能にする。したがって、基体から除去された標識の量は切断イベントの回数に対応する。切断イベントを検出する代替方法が本発明の範囲内であることが理解されよう。一つの態様においては、切断反応が起こることを許したのち、標識を反応混合物に加える。上記例に準じると、切断反応が起こったのちストレプトアビジン-PE265を加える。もう一つの例において、合成RNA分子の第三の部分は標識されない。むしろ、切断イベントは、切断反応が起こったのちカラム上に残る切断された合成RNA分子の量を検出することによって観測される。

【0459】

切断反応が起こる前および起こった後で、基体から解放される標識の程度を検出し、かつ比較することができる。または、対象の方法を使用して切断反応の速度を観測することもできる。ある態様において、基体から解放される標識の程度はリアルタイムで検出され、それにより、切断反応の速度が明らかにされる。

【0460】

マイクロRNA機能アッセイ法を使用して、対応したmiRNA標的化領域を含む合成RNAによって実質的に任意のマイクロRNAをスクリーニングすることができる。アッセイ法は、単独で実施することもできるし、または区別可能なマイクロビーズに結合した複数の合成標的を用いて多重に実施することもできる。

【0461】

ある態様において、miRアクセシシステムは、治療的RNAi分子送達および作用機序確認のために使用される。ここで、RNAi分子は、全身的または標的化されたやり方で、適切な細胞タイプ、組織または他の解剖学的領域に送達される。送達の確認およびRNAi治療作用機序の確認のために標的組織を分析することができる。たとえば、関心対象の組織における治療的RNAi分子の存在は、RNAi治療剤の活性化によるmRNAノックダウンによって直接駆動される表現型結果によって検出することもできるし、または、細胞の無関係なアポトーシスまたは炎症反応を通して検出することもできる。最後に、この方法を使用して、標的組織において活性化された治療的RNAi物質のIC50を確立することができる。

【0462】

癌のバイオシグネチャー

本明細書に記載されるように、循環バイオマーカーを含むバイオシグネチャーを使用して癌を特徴決定することができる。このセクションは、たとえば前立腺癌、GI癌または卵巣癌のバイオシグネチャーの一部として使用することができるバイオマーカーの非網羅的リストを提示する。いくつかの態様において、循環バイオマーカーは、小胞または小胞の集団と結合している。たとえば、小胞と結合した循環バイオマーカーを使用して、小胞または小胞集団を捕捉および／または検出することができる。

【0463】

本明細書に提示されるバイオマーカーは、他の疾患、たとえば他の増殖性疾患および他の細胞または組織起源の癌のバイオシグネチャーにおいても役立つ場合があることが理解されよう。たとえば、様々な細胞型における悪性転換は、よくあるイベント、たとえばp53または他の腫瘍サプレッサにおける突然変異によることができる。起始細胞バイオマーカーおよび癌バイオマーカーを含むバイオシグネチャーを使用して、癌の性質をさらに評価することができる。転移性癌を評価するために、転移性癌のバイオマーカーが起始細胞バイオマーカーとともに使用される場合がある。本発明と共に使用するためのそのようなバイオマーカーは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるDawood, Novel biomarkers of metastatic cancer, Exp Rev Mol Diag July 2010, Vol. 10, No. 5, Pages 581-590におけるものを含む。

【0464】

本発明のバイオシグネチャーは、参照に依存して上方制御される、下方制御される、または変化しないマーカーを含み得る。例示のためのみに、参照が正常な試料であるならば、バイオシグネチャーは、対象のバイオシグネチャーが参照と比較して変化しないならば、その対象が正常であることを示し得る。または、バイオシグネチャーは、突然変異した核酸またはアミノ酸配列を含み得、バイオシグネチャー中の成分のレベルが正常な参照と有疾患試料との間で同じである。別の場合、参照は癌試料であることができ、対象のバイオシグネチャーは、それが参照に実質的に類似しているならば、癌を示す。対象のバイオシグネチャーは、参照と比較して上方制御された成分および下方制御された成分の両方を含むことができる。例示のためのみに、参照が正常な試料であるならば、癌バイオシグネチャーは、上方制御されたオンコジーンおよび下方制御された腫瘍サプレッサの両方を含むことができる。小胞マーカーはまた、様々な状況において差次的に発現することができる。たとえば、テトラスパニン、非癌小胞と比較して癌小胞において過剰発現する場合があります、MFG-E8は、癌小胞と比較して非癌小胞において過剰発現することができる。

【0465】

セラノーシス

本明細書に開示されるように、小胞バイオマーカーおよび／または循環バイオマーカーを含む一つまたは複数のバイオマーカーを評価することによって対象に関する表現型を特徴決定する方法が開示される。バイオマーカーは、本明細書に開示される小胞バイオマーカーの多重化解析のための方法を使用して評価することができる。表現型の特徴決定は、対象に対するセラノーシスを提供すること、たとえば対象が、治療に応答すると予測されるか、治療に対して非応答性であると予測されるかを決定することを含むことができる。

治療に応答する対象を応答者と呼ぶことができ、治療に応答しない対象を非応答者と呼ぶことができる。病態を患う対象は、非限定的に病態の一つまたは複数の徴候の改善、既存の治療の一つまたは複数の副作用の減少、以前の治療もしくは他の治療と比較した場合の一つまたは複数の徴候の改善もしくは改善率の増大、または治療しない場合または以前の治療もしくは他の治療と比較した場合の生存期間の延長に基づいて、治療に対する応答者とみなすことができる。たとえば、病態を患う対象は、非限定的に検出可能であるか検出不可能であるかを問わず一つまたは複数の徴候の軽減もしくは改善、疾患の程度の低下、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化していない）、疾患の拡散の防止、疾患進行の遅延もしくは減速、疾患状態の改善もしくは緩和および緩解（部分的または全体的）を非限定的に含む有益なまたは所望の臨床結果に基づいて、治療に対する応答者とみなすことができる。治療はまた、治療を受けない場合または異なる治療を受けた場合に予測される生存期間と比較した場合の生存期間の延長を含む。

10

【0466】

本明細書に開示されるシステムおよび方法は、それを必要とする対象のために候補治療を選択するために使用することができる。治療法の選択は、小胞の一つまたは複数の特徴、たとえば小胞のバイオシグネチャー、小胞の量、または両方に基づくことができる。小胞の分類またはプロファイリング、たとえば小胞のバイオシグネチャー、小胞の量、または両方の同定を使用して、病態を患う個人の目的の一つまたは複数の候補治療剤を同定することができる。たとえば、小胞プロファイリングを使用して、対象が、ある特定の治療、たとえば対象が癌を患っている場合には癌治療に対して非応答者であるのか応答者であるのかを決定することができる。

20

【0467】

小胞プロファイリングを使用して対象に対する診断または予後判定を提供することができる、その診断または予後判定に基づいて治療法を選択することができる。または、治療法の選択は、対象の小胞プロファイルに直接基づくこともできる。さらには、対象の小胞プロファイルを使用して、疾患の進化を追跡する、薬の効果を評価する、疾患もしくは病態を患う対象のために既存の治療を適合させる、または疾患もしくは病態を患う対象に対する新たな治療を選択することができる。

【0468】

治療に対する対象の応答は、小胞、マイクロRNAおよび他の循環バイオマーカを含むバイオマーカを使用して評価することができる。一つの態様において、対象は、任意の治療の前に評価された対象の小胞プロファイルに基づいて非応答者または応答者として決定、分類または同定される。前処置中に、対象を非応答者または応答者として分類して、それにより、不要な治療選択肢を減らし、無効な治療から起こりうる副作用を回避することができる。さらには、対象を特定の治療に対する応答者として同定することができる、それにより、小胞プロファイリングを使用して、個別化した治療選択肢を提供することによって対象の生存期間を延ばす、対象の徴候もしくは病態を改善する、または両方を達成することができる。したがって、病態を患う対象は、本明細書に開示される一つまたは複数のシステムおよび方法を使用して小胞および他の循環バイオマーカから生成されたバイオシグネチャーを有し得、そして、そのプロファイルを使用して、対象が、その病態に対する特定の治療に対し、非応答者または応答者である可能性があるかどうかを判定することができる。対象が、はじめに考慮された治療に対して非応答者であるのか応答者であるのかを予測するためのバイオシグネチャーの使用に基づき、対象の病態を治療するために考慮される特定の治療をその対象のために選択することもできるし、別の、潜在的により最適な治療を選択することもできる。

30

40

【0469】

一つの態様において、ある病態を患う対象が現在ある治療で治療されている。治療前および治療中の一つまたは複数の時点でその対象から試料を得ることができる。その試料由来の小胞または他のバイオマーカを含むバイオシグネチャーを評価し、使用して、たとえばバイオシグネチャーの経時的変化に基づき、薬に対する対象の応答を決定することが

50

できる。対象が治療に応答していない、たとえばバイオシグネチャーが患者が応答していることを示さないならば、その対象を、治療に対して非応答性、すなわち非応答者として分類することができる。同様に、患者が治療に対して好ましく応答することができないことを示すような、病態の悪化と関連した一つまたは複数のバイオマーカーを検出することもできる。もう一つの例において、病態と関連した一つまたは複数のバイオマーカーは、治療にもかかわらず同じままであり、病態が改善していないことを示す。したがって、バイオシグネチャーに基づいて、異なる治療の選択を含め、対象に対する治療レジメンを変更または調節することができる。

【0470】

または、対象を、治療に応答していると決定することができ、その対象を、治療に対して応答性、すなわち応答者として分類することができる。たとえば、病態または障害の改善と関連した一つまたは複数のバイオマーカーを検出することができる。もう一つの例においては、病態と関連した一つまたは複数のバイオマーカーが変化し、それによって改善を示す。したがって、既存の治療を続けることができる。もう一つの態様においては、改善の兆しがある場合でさえ、バイオシグネチャーが別の治療法がより効果的でありうることを示すならば、既存の治療を調節または変更することもできる。既存の治療を別の治療と組み合わせることもできるし、現在の治療の量を増すこともできるし、異なる候補治療または治療を選択することもできる。異なる候補治療を選択するための基準は状況に依存し得る。一つの態様において、候補治療は、既存の治療で成功した対象にとって有効であることが知られているものであり得る。もう一つの態様において、候補治療は、類似した

10

20

【0471】

いくつかの態様において、対象は、癌治療のような治療の第二、第三またはそれ以降の治療法を受けている。第二、第三またはそれ以降の治療法の前に本発明のバイオシグネチャーを決定して、対象がその第二、第三またはそれ以降の治療法に対する応答者であるのか非応答者であるのかを決定することができる。もう一つの態様においては、第二、第三またはそれ以降の治療法の最中に対象に関してバイオシグネチャーを決定して、対象がその第二、第三またはそれ以降の治療法に対して応答しているかどうかを判定する。

【0472】

一つまたは複数の小胞を評価するための、本明細書に記載される方法およびシステムは、病態を患う対象が治療に応答性であるかどうかを判定するために使用することができ、したがって、病態の一つまたは複数の徴候を改善する、既存の治療の一つまたは複数の副作用を減らす、以前の治療もしくは他の治療と比較した場合の一つまたは複数の徴候の改善または改善率を増す、または治療しない場合または以前の治療もしくは他の治療と比較した場合に生存期間を延ばす治療を選択するために使用することができる。したがって、本明細書に記載される方法は、個別化した治療選択肢を提供することによって対象の生存期間を延ばすために使用することもできるし、対象にとって不要な治療選択肢および不要な副作用を減らすこともできる。

30

【0473】

生存期間の延長は、ある疾患、たとえば癌を患う個人または個人群が、治療過程を開始したのち、疾患進行をこうむらずにとどまる可能性を指す無増悪生存期間（PFS）の延長であることができる。これは、指定された期間ののち疾患が安定な状態にとどまる（たとえば進行の兆しを示さない）可能性がある、群中の個人の割合を指すことができる。無増悪生存率は特定の治療の有効性の指標である。他の態様において、生存期間の延長は、癌を患う個人または個人群が、特定の治療を開始したのち、無疾患状態にとどまる可能性を指す無病生存期間（DFS）の延長である。これは、指定された期間ののち疾患を有しない可能性がある、群中の個人の割合を指すことができる。無病生存率は特定の治療の有効性の指標である。類似した患者群において達成される無病生存期間に基づいて二つの治療戦略を比較することができる。無病生存期間は、癌生存率が記される場合に、しばしば「全

40

50

生存率」という用語とともに使用される。

【0474】

小胞プロファイリングによって選択された治療法を使用する無増悪生存期間（PFS）（期間B）を、対象が増悪した最近の治療法に関するPFS（期間A）と比較することにより、本明細書に記載される小胞プロファイリングによって選択された候補治療を非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較することができる。一つの状況においては、小胞プロファイリングにより選択された治療法が対象に利益を提供することを示すために、PFSB/PFSA比 ≥ 1.3 が使用される（たとえば、Robert Temple, Clinical measurement in drug evaluation. Edited by Wu Ningano and G. T. Thicker John Wiley and Sons Ltd. 1995、Von Hoff, D. D. Clin Can Res. 4:1079, 1999、Dhani et al. Clin Cancer Res. 15:118-123, 2009を参照すること）。 10

【0475】

小胞プロファイリングによって選択された治療を比較する他の方法は、4ヶ月で増悪または死亡しなかった対象の応答率（RECIST）および割合を決定することにより、非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較するものであり得る。PFSの数値に関して使用される「約」という用語は、数値に対する $\pm 10\%$ の変動をいう。小胞プロファイリングによって選択された治療からのPFSは、非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較して、少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または少なくとも90%延長され得る。いくつかの態様において、小胞プロファイリングによって選択された治療からのPFSは、非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較して、 20
少なくとも100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%または少なくとも約1000%延長され得る。さらに他の態様において、PFS比（小胞プロファイリングにより選択された治療法または新規治療におけるPFS／従来の治療法または治療におけるPFS）は少なくとも約1.3である。さらに他の態様において、PFS比は少なくとも約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0である。さらに他の態様において、PFS比は少なくとも約3、4、5、6、7、8、9または10である。

【0476】

同様に、本発明にしたがってバイオシグネチャーを決定して、または決定せずに治療が選択される対象において、DFSを比較することもできる。小胞プロファイリングによって選択された治療からのDFSは、非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較して、 30
少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または少なくとも90%延長され得る。いくつかの態様において、小胞プロファイリングによって選択された治療からのDFSは、非小胞プロファイリングにより選択された治療と比較して、少なくとも100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%または少なくとも約1000%延長され得る。さらに他の態様において、DFS比（小胞プロファイリングにより選択された治療法または新規治療におけるDFS／従来の治療法または治療におけるDFS）は少なくとも約1.3である。さらに他の態様において、DFS比は少なくとも約1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0である。さらに他の態様において、DFS比は少なくとも約3、4、5、6、7、8、9または10である。

【0477】

いくつかの態様において、微小胞プロファイリングによって選択された候補治療は対象におけるPFS比またはDFS比を増大させない。それにもかかわらず、小胞プロファイリングは対象に利益を提供する。たとえば、いくつかの態様においては、公知の治療が対象にとって使用可能ではない。そのような場合、小胞プロファイリングは、現在何の治療も同定されていない場合に候補治療を同定する方法を提供する。小胞プロファイリングは、PFS、DFSまたは寿命を少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月間、5週間、6週間、7週間、8週間、2ヶ月間、9週間、10週間、11週間、12週間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間、12ヶ月間、13ヶ月間、14ヶ月間、15ヶ月間、16ヶ月間、17ヶ月間、18ヶ月間、19ヶ月間、20ヶ月間、21ヶ月間、22ヶ月間、23ヶ月間、24ヶ月間または2年間、延ばすことができる。小胞プロファイリングは 50

、PFS、DFSまたは寿命を少なくとも2.5年間、3年間、4年間、5年間またはより多く延ばすことができる。いくつかの態様において、本発明の方法は、対象が緩解状態になるよう、転帰を改善する。

【0478】

治療の有効性は、他の手段によってモニターすることができる。完全寛解（CR）は、疾患の完全な消失を含む。検査、走査または他の試験において疾患は認められない。部分寛解（PR）は、いくつかの疾患が体内に残存するが、病変のサイズまたは数が30%以上減少していることをいう。疾患の安定（SD）とは、病変のサイズおよび数が相対的に変化ないままであることをいう。一般に、サイズにおける50%未満の減少またはわずかな増大は疾患の安定と記される。疾患の進行（PD）とは、疾患が、治療を受けてもサイズまたは数において増大したことをいう。いくつかの態様において、本発明の小胞プロファイリングは完全寛解または部分寛解を生じさせる。いくつかの態様において、本発明の方法は疾患の安定を生じさせる。いくつかの態様において、本発明は、非小胞プロファイリングが疾患の進行を生じさせる場合でも、疾患の安定を達成することができる。

10

【0479】

本発明のバイオシグネチャーに基づくセラノースは、本明細書に記載される表現型を非限定的に含む表現型に対するセラノースであることができる。表現型の特徴決定は、対象に対するセラノースを決定すること、たとえば、対象が、治療に応答する（「応答者」）または治療に対して非応答性である（「非応答者」）可能性があるかどうかを予測することを含む。本明細書において使用される、対象を治療に対する「応答者」または治療に対する「非応答者」として同定することは、対象を、治療に応答する可能性があるまたは治療に応答しない可能性があるかのいずれかとして同定することを含み、対象の応答の決定的予測を決定することを要しない。対象から得られた一つまたは複数の小胞または小胞集団を使用して、本明細書に開示されるバイオマーカー、たとえば表7に記載されたものを評価することにより、対象が特定の治療に対して非応答者であるのか応答者であるのかを決定する。バイオマーカーの高い発現レベルもしくは低い発現レベルまたはバイオマーカーの突然変異の検出を使用して、病態を有する対象に対する候補治療、たとえば薬学的介入を選択することができる。表7は、例示的な病態およびそのような病態に対する薬学的介入を示す。表は、介入の効果に影響するバイオマーカーを記載する。バイオマーカーは、本発明の方法を使用して、たとえば循環バイオマーカーまたは小胞結合バイオマーカーとして評価することができる。

20

30

【0480】

（表7）病態に対するバイオマーカーおよび薬学的介入の例

病態	薬学的介入	バイオマーカー
末梢動脈疾患	アトルバスタチン、 シンバスタチン、 ロスバスタチン、 プラバスタチン、 フルバスタチン、ロバスタチン	C反応性タンパク質 (CRP)、 血清アミロイドA (SAA)、 インターロイキン6、 細胞内接触分子 (ICAM)、 血管接着分子 (VCAM)、CD40L、 フィブリノーゲン、 フィブリンDダイマー、 フィブリノペプチドA、 ヴォン・ヴィレブランド因子、 組織プラスミノーゲン アクチベータ抗原 (t-PA)、 第VII因子、 プロトロンビンフラグメント1、 酸化低密度リポタンパク質 (oxLDL)、リポタンパク質A
非小細胞肺癌	エルロチニブ、カルボプラチン、 パクリタキセル、ゲフィチニブ	EGFR、 切除修復交差相補群1 (ERCC1)、 p53、Ras、p27、 クラスIII β チューブリン、 乳癌遺伝子1 (BRCA1)、 乳癌遺伝子2 (BRCA2)、 リボヌクレオチドレダクターゼ メッセンジャ1 (RRM1)
結腸直腸癌	パニツムマブ、セツキシマブ	K-ras
乳癌	トラスツズマブ、 アントラサイクリン類、 タキサン、メトトレキサート、 フルオロウラシル	HER2、 トポイソメラーゼII α 、 エストロゲン受容体、 プロゲステロン受容体
アルツハイマー病	ドネペジル、ガランタミン、 メマンチン、リバスチグミン、 タクリン	β アミロイドタンパク質、 アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、 APP670/671、APP693、APP692、 APP715、APP716、APP717、 APP723、プレセニリン1、 プレセニリン2、 脳脊髄液アミロイド β タンパク質42 (CSF-A β 42)、 脳脊髄液アミロイド β タンパク質40 (CSF-A β 40)、 F2イソプロスタニン、 4-ヒドロキシノネナール、 F4ニューロプロスタニン、 アクロレイン
不整脈	ジソピラミド、フレカイニド、 リドカイン、メキシレチン、 モリシジン、プロカインアミド、 プロパフェノン、キニジン、 トカイニド、アセブトロール、 アテノロール、ベタキソロール、 ビソプロロール、 カルベジロール、エスモロール、 メトプロロール、ナドロール、 プロプラノロール、ソタロール、 チモロール、アミオダロン、 アジミリド、ペプリジル、 ドフェチリド、イブチリド、 テジサミル、ジルチアゼム、	SERCA、AAP、コネキシン40、 コネキシン43、 ATP感受性カリウムチャネル、 Kv1.5チャネル、 アセチルコリン活性化カリウム チャネル

10

20

30

40

	ベラパミル、アジミリド、 ドロネダロン、アミオダロン、 PM101、ATI-2042、テジサミル、 ニフェカラン、アンバシリド、 エルセンチリド、トレセチリド、 アルモカラン、D-ソタロール、 BRL-32872、HMR1556、L768673、 ベルナカラン、AZD70009、 AVE0118、S9947、NIP-141/142、 XEN-D0101/2、ラノラジン、 ピルシカイニド、JTV519、 ロチガブチド、GAP-134	
関節リウマチ	メトトレキサート、 インフリキシマブ、 アダリムマブ、 エタネルセプト、 スルファサラジン	677CC/1298AA MTHFR、 677CT/1298AC MTHFR、 677CT MTHFR、G80AA RFC-1、 3435TT MDR1 (ABCB1)、 3435TT ABCB1、 AMPD1/ATIC/ITPA、IL1-RN3、 HLA-DRB103、CRP、HLA-D4、 HLA DRB-1、 抗シトルリンエピトープ含有 ペプチド、 抗A1/RA33、 赤血球沈降速度 (ESR) 、 C反応性タンパク質 (CRP) 、 SAA (血清アミロイド関連 タンパク質) 、 リウマチ因子、IL-1、TNF、 IL-6、IL-8、IL-1Ra、 ヒアルロン酸、アグレカン、 Glc-Gal-PYD、 オステオプロテグリン、RNAKL、 軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) 、 カルプロテクチン
動脈細動	ワーファリン、アスピリン、 抗凝固剤、ヘパリン、 キシメラガトラン	F1.2、TAT、FPA、 β トロンボグロブリン、 血小板因子4、 可溶性P-セレクトイン、 IL-6、CRP
HIV感染症	ジドブジン、ジダノシン、 ザルシタビン、スタブジン、 ラミブジン、サキナビル、 リトナビル、インジナビル、 ネビラン、ネルフィナビル、 デラビルジン、スタブジン、 エファビレンツ、 エトラビル、 エンフビルチド、ダルナビル、 アバカビル、アンブレナビル、 ロナビル/リトナビル、 テノフォビル、チプラナビル	HIV p24抗原、TNF-α、 TNFR-II、CD3、CD14、CD25、 CD27、Fas、FasL、 β 2ミクログロブリン、 ネオプテリン、HIV RNA、 HLA-B *5701
心血管疾患	リシノプリル、 カンデサルタン、 エナラプリル	ACE阻害剤、 アンギオテンシン

10

20

30

40

【0481】

癌

小胞バイオシグネチャーは、たとえば癌を患う対象が、特定の癌治療に対して応答者または非応答者である可能性があるかどうかを同定するような癌のセラノースに使用することができる。本方法は、本明細書、たとえば上記「表現型」部分に記載された癌を含む

50

癌のセラノーシスに使用することができる。これらは、非限定的に、肺癌、非小細胞肺癌および小細胞肺癌（小細胞癌腫（燕麦細胞癌）、小細胞／大細胞混合癌腫および複合小細胞癌腫を含む）、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、脳癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、骨癌、胃癌、乳癌、神経膠腫、神経膠芽腫、肝細胞癌、乳頭状腎臓癌腫、頭頸部扁平上皮癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫または他の固形癌を含む。

【0482】

癌を患う対象由来の試料中の、小胞と結合したマーカを含む循環バイオマーカのバイオシグネチャーを使用して、その対象のための候補治療を選択することができる。バイオシグネチャーは、本明細書に提示される本発明の方法にしたがって決定することができる。いくつかの態様において、候補治療は癌のための標準治療を含む。バイオシグネチャーを使用して、対象が特定の治療または標準治療に対して非応答者であるのか応答者であるのかを決定することができる。治療は、癌治療、たとえば放射線、手術、化学療法またはこれらの組み合わせであることができる。癌治療は、抗癌剤および化学療法レジメンのような治療であることができる。本発明の方法と共に使用するための癌治療は、非限定的に、表8に記載されたものを含む。

10

【0483】

（表8）癌治療

	治療または薬剤
癌療法	放射線、手術、化学療法、生物学的療法、ネオアジュバント療法、アジュバント療法、対症療法、経過観察
抗癌剤 (化学療法および生物製剤)	13-cis-レチノイン酸、2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、5-FU、6-メルカプトプリン、6-MP、6-TG、6-チオグアニン、アブラキサン、アキュテイン（登録商標）、アクチノマイシンD、アドリアマイシン（登録商標）、アドルシル（登録商標）、アフニートール（登録商標）、アグリリン（登録商標）、Ala-Cort（登録商標）、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリムタ、アリトレチノイン、アルカパンAQ（登録商標）、アルケラン（登録商標）、全トランス型レチノイン酸、αインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレライド、アナンドロン（登録商標）、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、Ara-C、アラネスブ（登録商標）、アレディア（登録商標）、アリミデックス（登録商標）、アロマシン（登録商標）、アラノン（登録商標）、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、ATRA、アバスチン（登録商標）、アザシチジン、BCG、BCNU、ベンダムスチン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ベキサール（登録商標）、ビカルタミド、BiCNU、ブレノキサン（登録商標）、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェクス（登録商標）、C225、カルシウムロイコポリン、カンパス（登録商標）、カンプトサル（登録商標）、シカンプトデシン11、カペシタビン、Carac（商標）、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウエーハ、カゾデックス（登録商標）、CC-5013、CCI-779、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン（登録商標）、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロバラム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン（登録商標）、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン（登録商標）、シタラビン、シタラビンリボソーム、シトサルU（登録商標）、シトキサン（登録商標）、ダカルバジン、ダコゲン、ダクチノマイシン、ダルベゴエチンα、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、塩酸ダウノルビシン、ダウノルビシンリボソーム、ダウノキソーム（登録商標）、デカドロン、デシタビン、デルタコルテフ（登録商標）、デルタゾン（登録商標）、デニロイキン、ディフティックス、DepoCyt（商標）、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、デキサゾン、デクスラゾキサン、DHAD、DIC、デオデックスドセタキセル、ドキシル（登録商標）、ドキシロピシン、ドキシロピシンリボソーム、ドロキシア（商標）、DTIC、DTIC-Dome（登録商標）、デュラロン（登録商標）、エフデックス（登録商標）、エリガード（商標）、エレンス（商標）、エロキサチン（商標）、エルスバル（登録商標）、Emcyt（登録商標）、エビルビン、エボエチンα、エルビタックス、エルロチニブ、Erwinia Lアスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオールエトボフォス（登録商標）、エトボシド、リン酸エトボシド、オイレキシ（登録商標）、エベロリムス、エビスタ（登録商標）、エキセメスタン、ファレストン（登録商標）、ファスロデックス（登録商標）、フェマーラ（登録商標）、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダーラ（登録商標）、フルダラビン、フルオロプレックス（登録商標）、フルオロウラシル、フルオロウラシル（クリーム）、フルオキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、FUDR（登録商標）、フルベストラント、G-CSF、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ジェムザール、グリーベック（商標）、グリアデル（登録商標）ウエーハ、GM-CSF、ゴセリン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ハロテスチン（登録商標）、ヘルセプチン（登録商標）、ヘキサドロール、ヘキサレン（登録商標）、ヘキサメチルメラミン、HMM、ハイカムチン（登録商標）、ヒドレア（登録商標）、酢酸ヒドロコート（登録商標）、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、リン酸ヒドロコルトン、ヒドロキシン尿素、イブリツモマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、イダマイシン（登録商標）、イダルビシン、イフェックス（登録商標）、IFN-α、イフォスファミド、IL-11、IL-2、イマチニブメシレート、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロンα、インターフェロンα2b（PEGコンジュゲート）、インターロイキン2、インターロイキン11、イントロンA（登録商標）（インターフェロンα2b）、イレッサ（登録商標）、イリノテカン、イソトレチノイン、イクサベピロン、イクセムブラ（商標）、キドローゼ（t）、ラナコルト（登録商標）、ラパチニブ、Lアスパラギナーゼ、LCR、レナリドマイド、レトロゾール、ロイコポリン、ロイケラン、ロイキン（商標）、ロイプロリド、ロイロクリスチン、ロイスタチン（商標）、リボソームAra-C Liquid Pred（登録商標）、ロムスチン、L-PAM、L-サルコリシン、ルブロン（登録商標）、ルブロンデボ（登録商標）、マツラン（登録商標）、マキシデックス、メクロレタミン、塩酸メクロレタミン、メドラロン（登録商標）、メドロール（登録商標）、メゲース（登録商標）、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス（商標）、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メチルプレドニゾン、メチルコルテン（登録商標）、マイトマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、Mプレドニゾル（登録商標）、MTC、MTX、ムスタルゲン（登録商標）、ムスチン、ムタマイシン（登録商標）、ミレラン（登録商標）、ミロセル（商標）、ミロタルグ（登録商標）、ナベルピン（登録商標）、ネララビン、ネオサル（登録商標）、ニューラスタ（商標）、ニューメガ（登録商標）、ニューボジェン（登録商標）、ネキサバル（登録商標）、ニランドロン（登録商標）、ニルタミド、ニペント（登録商標）、ナイトロジェンマスタード、ノバルデックス（登録商標）、ノバントロン（登録商標）、オクトレオチド、酢酸オクトレオチド、オンコスパール（登録商標）、オンコピン（登録商標）、オンタック（登録商標）、オンキサール（商標）、オプレベルキン、オラブレド（登録商標）、オラゾン（登録商標）、オキサリプラチン、パクリタキセル、タンパク質結合パクリタキセル、パミドロネート、パニツムマブ、パンレチン（登録商標）、パラプラチン（登録商標）、ペディアブレド（登録商標）、PEGインターフェロン、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、PEG-INTRON（商標）、PEG-Lアスパラギナーゼ、ペメトレキセド、ペントスタチン、フェニルアラニンマスタード、プラチノール（登録商標）、プラチノールAQ（登録商標）、プレドニゾン、プレドニゾン、プレロン（登録商標）、プロカルバジン、プロクリット（登録商標）、プロロイキン（登録商標）、カルムスチンインプラント付きプロリフェブロスパン20、プリネトール（登録商標）、ラロキシフェン、レプリミド（登録商標）、リウマトレックス（登録商標）、リツキサン（登録商標）、リツキシマブ、ロフェロンA（登録商標）（インターフェロンα2a）、ルベックス（登録商標）、

10

20

30

40

	塩酸ルビドマイシン、サンドスタチン（登録商標）、サンドスタチンLAR（登録商標）、サルグラモスチム、ソル・コーテフ（登録商標）、ソル・メドロール（登録商標）、ソラフェニブ、スプリセル（商標）、STI-571、ストレプトゾシン、SU11248、スニチニブ、スーテント（登録商標）、タモキシフェン、タルセバ（登録商標）、タルグレチン（登録商標）、タキソール（登録商標）、タキソテル（登録商標）、テモダール（登録商標）、テモゾロミド、テムシロリムス、テニボシド、TESPA、サリドマイド、サロミド（登録商標）、TheraCys（登録商標）、チオグアニン、チオグアニンタブロイド（登録商標）、チオホスホアミド、チオブレックス（登録商標）、チオテパ、TICE（登録商標）、トボサル（登録商標）、トボテカン、トレミフェン、トリセル（登録商標）、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレアンダ（登録商標）、トレチノイン、トレキサル（商標）、トリセノックス（登録商標）、TSPA、タイケルブ（登録商標）、VCR、ベクチビックス（商標）、ベルバン（登録商標）、ベルケード（登録商標）、ベプシド（登録商標）、ベサノイド（登録商標）、ピアデュール（商標）、ビダザ（登録商標）、ビンブラスチン、硫酸ビンブラスチン、ピンカサルPfs（登録商標）、ピンクリスチン、ビノレルビン、酒石酸ビノレルビン、VLB、VM-26、ボリノスタット、VP-16、Vumon（登録商標）、キセロダ（登録商標）、ザノサル（登録商標）、ゼパリン（商標）、ジネカード（登録商標）、ゾラデックス（登録商標）、ゾレドロン酸、ゾリンザ、ゾメタ（登録商標）
併用療法	CHOP（シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチンおよびブレドニゾン）、CVP（シクロホスファミド、ピンクリスチンおよびブレドニゾン）、RCVP（リツキシマブ＋CVP）、RCHOP（リツキシマブ＋CHOP）、RICE（リツキシマブ＋イホスファミド、カルボプラチン、エトボシド）、RDHAP（リツキシマブ＋デキサメタゾン、シタラビン、シスプラチン）、RESHAP（リツキシマブ＋エトボシド、メチルブレドニゾン、シタラビン、シスプラチン）、ピンクリスチン、ブレドニゾンおよびアントラシクリンを用い、アスパラギナーゼを用いる、または用いない併用治療、ダウノルビシン、ピンクリスチン、ブレドニゾンおよびアスパラギナーゼを用いる併用治療、テニボシドおよびAra-C（シタラビン）を用いる併用治療、メトトレキサートおよびロイコボリンを用いる併用治療、プレオマイシン、ドキシソルビシン、エトボシド、メクロレタミン、ブレドニゾン、ビンブラスチンおよびピンクリスチンを用いる併用治療、FOLFOX4レジメン（オキサリプラチン、ロイコボリンおよびフルオロウラシル [5-FU]）、FOLFIRIレジメン（塩酸イリノテカン、フルオロウラシルおよびロイコボリンカルシウム）、レバミゾールレジメン（5-FUおよびレバミゾール）、NCCTGレジメン（5-FUおよび低用量ロイコボリン）、NSABPレジメン（5-FUおよび高用量ロイコボリン）、XAD（XELOX（カペシタビン＋オキサリプラチン）＋ベバシズマブ＋ダサチニブ）、FOLFOX／ベバシズマブ／ヒドロキシクロキソン、ドイツAIOレジメン（葉酸、5-FUおよびイリノテカン）、Douillardレジメン（葉酸、5-FUおよびイリノテカン）、CAPOXレジメン（カペシタビン、オキサリプラチン）、FOLFOX6レジメン（オキサリプラチン、ロイコボリンおよび5-FU）、FOLFIRIレジメン（葉酸、5-FUおよびイリノテカン）、FUFOXレジメン（オキサリプラチン、ロイコボリンおよび5-FU）、FUOXレジメン（オキサリプラチンおよび5-FU）、IFLレジメン（イリノテカン、5-FUおよびロイコボリン）、XELOXレジメン（カペシタビン、オキサリプラチン）、KHAD-L（ケトコナゾール、ヒドロコルチゾン、デュタステリドおよびラパチニブ）
生物製剤	抗CD52抗体（たとえばアレムツズマブ）、抗CD20抗体（たとえばリツキシマブ）、抗CD40抗体（たとえばSGN40）
治療のクラス	アントラサイクリン類および関連物質、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、抗成長ホルモン（たとえばソマトスタチンアナログ）、併用療法（たとえばピンクリスチン、bcnu、メルファラン、シクロホスファミド、ブレドニゾン（VBMCP））、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、内分泌療法—酵素阻害剤、内分泌療法—他のホルモンアンタゴニストおよび関連薬剤、葉酸アナログ（たとえばメトトレキサート）、葉酸アナログ（たとえばペメトレキセド）、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ、ゴナドトロピン放出ホルモン、モノクローナル抗体（EGFR標的化、たとえばパニツマブ、セツキシマブ）、モノクローナル抗体（Her2標的化、たとえばトラスツズマブ）、モノクローナル抗体（多重標的化、たとえばアレムツズマブ）、他のアルキル化剤、抗新生物剤（たとえばアスパラギナーゼ、ATRA、ベキサロテン、セレコキシブ、ゲムシタビン、ヒドロキシアミノ、イリノテカン、トボテカン、ペントスタチン）、細胞毒性抗生物質、白金化合物、ボドフィロトキシン誘導体（たとえばエトボシド）、プロゲステロン、プロテインキナーゼ阻害剤（EGFR標的化）、プロテインキナーゼ阻害剤（Her2標的化治療、たとえばラパチニブ）、ピリミジンアナログ（たとえばシタラビン）、ピリミジンアナログ（たとえばフルオロピリミジン類）、サリチル酸および誘導体（たとえばアスピリン）、Srcファミリータンパク質チロシンキナーゼ阻害剤（たとえばダサチニブ）、タキサン類（たとえばnabパクリタキセル）、ピンカアルカロイド類およびアナログ、ビタミンDおよびアナログ、モノクローナル抗体（多重標的化、たとえばベバシズマブ）、プロテインキナーゼ阻害剤（たとえばイマチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ）
前立腺癌治療	経過観察（すなわち、治療なしのモニタリング）、手術（たとえば骨盤内リンパ節切除術、根治的前立腺摘除術、経尿道的な前立腺切除術（TURP）、睾丸摘出術）、放射線療法（たとえば外照射放射線療法（EBRT）、陽子線放射、放射性同位元素（すなわちヨウ素I125、パラジウムおよびイリジウム）の埋め込み）、ホルモン療法（たとえば黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、たとえばロイプロリド、ゴセレリン、プセレリンまたはオザレリクス；抗アンドロゲン、たとえばフルタミド、2-ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、酢酸メゲストロール、ニルタミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド；カルシトリオール、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）、エストロゲン（DES、クロロトリアニセン、エチニルエストラジオール、コンジュゲートエストロゲンUSPおよびDES二リン酸）、

10

20

30

40

	トリプトレリン、フィナステリド、酢酸シプロテロン、ASP3550)、凍結手術/凍結療法、化学療法および生物学的療法(デュタステリド、ゾレドロネート、アザシチジン、ドセタキセル、ブレドニゾロン、セレコキシブ、アトルバスタチン、AMT2003、大豆タンパク質、LHRHアゴニスト、PD-103、ザクロ抽出物、大豆抽出物、タキソテール、I-125、ゾレドロネ酸、ダサチニブ、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンD3、ビタミンE、ゲムシタピン、シスプラチン、レナリドミド、ブレドニゾン、デガレリクス、OGX-011、OGX-427、MDV3100、タスキニモド、カルバジタキセル、TOOKAD(登録商標)、ランレオチド、プロストバック、GM-CSF、レナリドミド、サマリウムSm-153レキシドロラム、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体アンタゴニスト、ソラフェニブ、ソラフェニブトシレート、ミトキサントロン、ABI-008、ヒドロコルチゾン、パノビノスタット、大豆・トマト抽出物、KHAD-L、TOK-001、シクスツムマブ、テムシロリムス、イクサベピロン、TAK-700、TAK-448、TRC105、シクロホスファミド、レナリドミド、MLN8237、GDC-0449、アルファラジン(登録商標)、ARN-509、PX-866、ISIS EIF4E Rx、AEZS-108、131I-F16SIPモノクローナル抗体、抗OX40抗体、マスカダインプラス、ODM-201、BBI608、ZD4054、エルロチニブ、rIL-2、エビルビシン、リン酸エストラムスチン、HuJ591-GSモノクローナル(177Lu-J591)、アブラキサン、IVIG、発酵小麦胚芽滋養物(FWGE)、153Sm-EDTMP、エストラムスチン、ミトキサントロン、ビンブラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、パゾパニブ、シタラビン、テストステロン置換、ゾレドロネ酸、塩化ストロンチウムSr89、パリカルシトール、サトラブラチン、RAD001(エベロリムス)、バルプロ酸、茶抽出物、Hamsa-1、ヒドロキシシクロロキン、シプロイセルT、セレノメチオニン、セレン、リコピン、スニチニブ、パンデタニブ、IMC-A12抗体、モノクローナル抗体IMC-3G3、イクサベピロン、ジインドリルメタン、メトホルミン、エファビレンツ、ダサチニブ、ニルタミド、アピラテロン、カボザンチニブ(XL184)、イソフラビン類、塩酸シナカルセト、SB939、LY2523355、KX2-391、オラパリブ、ゲネステイン、ジゴキシン、R04929097、イピリムマブ、パフェチニブ、マレイン酸セジラニブ、MK2206、硫酸フェネルジン、パモ酸トリプトレリン、サラカチニブ、STA-9090、テセタキセル、パシレオチド、アファチニブ、GTx758、ロナファルニブ、サトラブラチン、放射性標識抗体7E11、FP253/フルダラビン、コクサッキーA21(CVA21)ウイルス、ARRY-380、ARRY-382、抗PSMAデザインT細胞、ペメトレキセド二ナトリウム、ボルテゾミブ、MDX-1106、ホワイトボタンマッシュルーム抽出物、SU011248、MLN9708、BMTP-11、ABT-888、CX-4945、4SC-205、テモゾロミド、MGAH22、ビノレリピン二酒石酸塩、亜セレン酸ナトリウム、ポリノスタット、Ad-REIC/Dkk-3、ASG-5ME、IMF-001、プロヒピチン-TP01、DSTP3086S、リダホロリムス、MK-2206、MK-0752、多価不飽和脂肪酸、I-125、スタチン類、コレカルシフェロール、ω-3脂肪酸、ラロキシフェン、エトポシド、POMELLA(商標)抽出物、ルクリンデポ)、癌ワクチン(たとえばDNAワクチン、ペプチドワクチン、樹状細胞ワクチン、PEP223、PSA/TRICOM、プロストバック-V/TRICOM、プロストバック-F/TRICOM、PSAワクチン、TroVax(登録商標)、GI-6207、PSMAおよびTARPペプチドワクチン)、超音波、陽子線照射	10
結腸直腸癌治療	初回手術療法(たとえば局所切除術、原発巣の切除・吻合および周辺リンパ節の除去)、アジュバント療法(たとえばフルオロウラシル(5-FU)、カペシタビン、ロイコボリン、オキサリプラチン、エルロチニブ、イリノテカン、アスピリン、マイトマイシンC、スニチニブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、ペグフィルグラスチム、パニツムマブ、ラムシルマブ、クルクミン、セレコキシブ、FOLFOX4レジメン、FOLFOX6レジメン、FOLFIRIレジメン、FUFOXレジメン、FUOXレジメン、IFLレジメン、XELOXレジメン、5-FUおよびレバミゾールレジメン、ドイツAIOレジメン、CAPOXレジメン、Douillardレジメン、XAD、RAD001(エベロリムス)、ARQ197、BMS-908662、JI-101、ヒドロキシシクロロキン(HCQ)、イットリウム小球、EZN-2208、CS-7017、IMC-1121B、IMC-18F1、ドセタキセル、ロナファルニブ、メイトンシノイドDM4コンジュゲートヒト化モノクローナル抗体huC242、パクリタキセル、ARRY-380、ARRY-382、IMO-2055、MDX1105-01、CX-4945、パゾパニブ、イクサベピロン、OSI-906、NPC-1Cキメラモノクローナル抗体、プリパニブ、ポリADPリボース(PARP)阻害剤、R04929097、抗癌ワクチン、CEAワクチン、シクロホスファミド、イットリウムY90 DOTA抗CEAモノクローナル抗体M5A、MEHD7945A、ABT-806、ABT-888、MEDI-565、LY2801653、AZD6244、PRI-724、BKM120、チボザニブ、フロクスウリジン、デキサメトゾン、NKTR-102、ペリホシン、レゴラフェニブ、EP0906、セレブレックス、PHY906、KRN330、イマチニブメシレート、アザシチジン、エンチノスタット、PX-866、ABX-EGF、BAY43-9006、ESO-1リンパ球およびアルデスロイキン、LBH589、オラパリブ、ホスタマチニブ、PD0332991、STA-9090、コレカルシフェロール、GI-4000、IL-12、AMG706、テムシロリムス、デュラネルミン、ボルテゾミブ、ウルソジオール、リダホロリムス、ベリパリブ、NK012、ダロツズマブ、MK-2206、MK-0752、レナリドミド、レオライシン(登録商標)、AUY922、PRI-724、BKM120、アバスタチン、ダサチニブ)、アジュバント放射線療法(特に直腸癌の場合)	30
		40

【0484】

表8に示すように、癌治療は様々な外科的および治療的処置を含む。抗癌剤は、小分子および生物製剤のような薬を含む。本発明の方法は、治療効果をモニターする、対象を治療に対する応答者または非応答者として分類する、または候補治療剤を選択するようなセラノーシス目的に後で使用する事ができる循環バイオマーカーを含むバイオシグネチャーを同定するために使用することができる。本発明は、表8～10における癌治療を含むセ

ラノーシスをはじめとする、任意の癌治療のためのセラノーシスを提供するために使用することができる。本発明の方法によって候補治療として同定することができる癌療法は、非限定的に、図8~10に記載された化学療法剤およびそれらの適切な組み合わせを含む。一つの態様において、治療は、特定のタイプの癌、たとえば表8における前立腺癌、結腸直腸癌、乳癌および肺癌に関して記載された治療に特異的である。他の態様において、治療は、腫瘍の起源にかかわらず、特定のバイオシグネチャー、たとえば表9~10に記載されたマーカーを含むバイオシグネチャーを示す腫瘍に特異的である。

【0485】

本発明は、経時的に、たとえば治療の前後または治療後の期間にわたり対象における一連のバイオシグネチャーを同定する工程を含む、癌治療をモニターする方法を提供する。バイオシグネチャーを参照と比較して治療効果を決定する。ある態様において、治療は、表8~10から選択されるもの、たとえば放射線、手術、化学療法、生物学的療法、ネオアジュバント療法、アジュバント療法または経過観察である。参照は、別の個人または個人の群由来の参照であることもできるし、同じ対象由来の参照であることもできる。たとえば、癌事前治療を示すバイオシグネチャーを有する対象は、治療成功後の健康な状態を示すバイオシグネチャーを有し得る。逆に、対象は、治療不成功ののち、癌を示すバイオシグネチャーを有し得る。バイオシグネチャーを経時的に比較して、その対象のバイオシグネチャーが病態の改善を示すのか、悪化を示すのか、変化なしを示すのかを決定することができる。経時的に癌が悪化している、または変化がないならば、さらなる治療が求められる場合がある。たとえば、より高悪性度の前立腺癌を治療するためには、手術または放射線療法に加えてホルモン療法が使用される場合がある。以下のmiR:hsa-miR-1974、hsa-miR-27b、hsa-miR-103、hsa-miR-146a、hsa-miR-22、hsa-miR-382、hsa-miR-23a、hsa-miR-376c、hsa-miR-335、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-221、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-21、hsa-miR-16の一つまたは複数を、前立腺癌治療の効果をモニターするためのバイオシグネチャーにおいて使用することができる。以下の刊行物:Albulescu et al., Tissular and soluble miRNAs for diagnostic and therapy improvement in digestive tract cancers, Exp Rev Mol Diag, 11:1, 101-120に記載された一つまたは複数のmiRを、GI管の癌の治療をモニターするためのバイオシグネチャーにおいて使用することができる。

【0486】

いくつかの態様において、本発明は、候補治療を選択するために、対象由来の試料中のバイオシグネチャーを同定する方法を提供する。たとえば、バイオシグネチャーは、薬物関連の標的が突然変異または差次的に発現していることを示して、それにより、対象が特定の治療に応答するまたは応答しない可能性があるということを示し得る。候補治療は、表8~10において同定された抗癌剤または治療剤のクラスから選択することができる。いくつかの態様において、本方法にしたがって同定される候補治療は、少なくとも、5-フルオロウラシル、アバレリクス、アレムツズマブ、アミノグルテチミド、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、アスピリン、ATRA、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ビカルタミド、カルシトリオール、カペシタビン、カルボプラチン、セレコキシブ、セツキシマブ、化学療法、コレカルシフェロール、シスプラチン、シタラビン、ダサチニブ、ダウノルビシン、デシタビン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エルロチニブ、エトポシド、エキセメスタン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴナドレリン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イマチニブ、イリノテカン、ラパチニブ、レトロゾール、ロイプロリド、リボソームドキシソルビシン、メドロキシprogesteron、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メトトレキサート、マイトマイシン、nabパクリタキセル、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パニツムマブ、ペガスパルガーゼ、ペメトレキセド、ペントスタチン、ソラフェニブ、スニチニブ、タモキシフェン、タキサン類、テモゾロミド、トレミフェン、トラスツズマブ、VBMCPおよびビンクリスチンからなる治療の群から選択される。

【0487】

候補治療を選択するのと同様に、本発明はまた、そもそも癌を治療すべきかどうかを判定する方法を提供する。たとえば、前立腺癌は、対象を実質的に害する可能性が低い、高悪性度でない疾患であり得る。アンドロゲンアブレーション（ホルモン減少）との放射線療法が、局所的に進行した前立腺癌を治療する標準的方法である。ホルモン療法の病的状態は、インポテンス、ホットフラッシュおよび性欲損失を含む。加えて、前立腺切除術のような治療は、インポテンスまたは失禁のような病的状態を有することができる。したがって、本発明は、癌の悪性度または進行（たとえば病期またはグレード）を示すバイオシグネチャーを提供する。高悪性度でない癌または限局性の癌は、速やかな治療を要さず、むしろ経過観察される場合もある（たとえば前立腺癌の「経過観察」）。それに対し、高悪性度のまたは進行期の病巣はより侵襲性の治療レジメンを同時に要するであろう。

10

【0488】

検出することができるバイオマーカーおよび選択またはおそらくは回避することができる治療剤の例が表9に記載されている。たとえば、バイオシグネチャーは、前立腺癌を有する対象に関して同定され、バイオシグネチャーはアンドロゲン受容体（AR）のレベルを含む。小胞中のARの過剰発現または過剰産生、たとえば高レベルのmRNAレベルまたはタンパク質レベルがその対象に対する候補治療の同定を提供する。そのような治療は、対象を治療するための剤、たとえばビカルタミド、フルタミド、ロイプロリドまたはゴセレリンを含む。したがって、対象は、ビカルタミド、フルタミド、ロイプロリドまたはゴセレリンに対する応答者として同定される。もう一つの説明のための例において、NSCLCを患う対象由来の小胞中にBCRP mRNA、タンパク質または両方が高レベルで検出される。そして、その対象は、剤シスプラチンおよびカルボプラチンに対する非応答者として分類することができるか、または、それらの剤は、対象におけるNSCLCを治療するための他の剤よりも効果がないと考えられ、対象の治療には選択されない。対象から得られる小胞中、以下のバイオマーカーのいずれかを評価することができ、バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、ペプチドまたはペプチド模倣物の一つまたは複数を非限定的に含む形態にあることができる。さらに別の説明のための例において、KRAS、BRAF、PIK3CAおよび／またはc-kitの一つまたは複数における突然変異を使用して候補治療を選択することができる。たとえば、患者におけるKRASまたはBRAFの突然変異は、対象の治療においてセツキシマブおよび／またはパニツムマブが比較的效果が低い可能性があることを示唆することもできる。

20

【0489】

（表9）バイオマーカー、系統、および剤の例

バイオマーカー	系統	おそらく比較的效果が低い薬剤	考慮しうる薬剤
AR (高発現)	前立腺		ビカルタミド、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン
AR (高発現)	デフォルト		ビカルタミド、フルタミド、ロイプロリド、ゴセレリン
BCRP (高発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	シスプラチン、カルボプラチン	
BCRP (低発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		シスプラチン、カルボプラチン
BCRP (高発現)	デフォルト	シスプラチン、カルボプラチン	
BCRP (低発現)	デフォルト		シスプラチン、カルボプラチン
BRAF V600E (突然変異陽性)	結腸直腸	セツキシマブ、パニツムマブ	

40

BRAF V600E (突然変異陰性)	結腸直腸		セツキシマブ、 パニツムマブ	10
BRAF V600E (突然変異陽性)	他すべて	セツキシマブ、 パニツムマブ		
BRAF V600E (突然変異陰性)	他すべて		セツキシマブ、 パニツムマブ	
BRAF V600E (突然変異陽性)	デフォルト	セツキシマブ、 パニツムマブ		
BRAF V600E (突然変異陰性)	デフォルト		セツキシマブ、 パニツムマブ	
CD52 (高発現)	白血病		アレムツズマブ	
CD52 (低発現)	白血病	アレムツズマブ		
CD52 (高発現)	デフォルト (血液悪性腫瘍のみ)		アレムツズマブ	
CD52 (低発現)	デフォルト (血液悪性腫瘍のみ)	アレムツズマブ		
c-kit	ブドウ膜黒色腫			
c-kit(高発現)	消化管間質腫瘍 (GIST) ; WT cKIT陽性ブドウ膜 黒色腫の状況において イマチニブは有用でない ため、cKITはブドウ膜 黒色腫に対しては実施 されない (Hoffmann et al. 2009を参照)。		イマチニブ	20
c-kit (高発現)	肝外胆管腫瘍 ; WT cKIT陽性ブドウ膜 黒色腫の状況において イマチニブは有用でない ため、cKITはブドウ膜 黒色腫に対しては実施 されない (Hoffmann et al. 2009を参照)。		イマチニブ	
c-kit (高発現)	急性骨髄性白血病 (AML)		イマチニブ	
c-kit (高発現)	デフォルト; WT cKIT陽性 ブドウ膜黒色腫の状況に おいてイマチニブは有用 でないため、cKITは ブドウ膜黒色腫に対しては 実施されない (Hoffmann et al. 2009を参照)。		イマチニブ	
EGFR (高コピー数)	頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)		エルロチニブ、 ゲフィチニブ	
EGFR	頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)	エルロチニブ、 ゲフィチニブ		
EGFR (高コピー数)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		エルロチニブ、 ゲフィチニブ	
EGFR (低コピー数)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	エルロチニブ、 ゲフィチニブ		
EGFR (高コピー数)	デフォルト		セツキシマブ、パニツムマブ、 エルロチニブ、ゲフィチニブ	
EGFR (低コピー数)	デフォルト	セツキシマブ、パニツムマブ、 エルロチニブ、ゲフィチニブ		
ER (高発現)	乳房	イクサベピロン	タモキシフェンベースの 治療、アロマターゼ阻害剤 (アナストラゾール、レトロゾール)	40

ER (低発現)	乳房		イクサベピロン
ER (高発現)	卵巣		タモキシフェンベースの 治療、アロマターゼ阻害剤 (アナストラゾール、レトロゾール)
ER (高発現)	デフォルト		タモキシフェンベースの 治療、アロマターゼ阻害剤 (アナストラゾール、レトロゾール)
ERCC1 (高発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	カルボプラチン、 シスプラチン	
ERCC1 (低発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		カルボプラチン、 シスプラチン
ERCC1 (高発現)	小細胞肺癌 (SCLC)	カルボプラチン、 シスプラチン	
ERCC1 (低発現)	小細胞肺癌 (SCLC)		カルボプラチン、 シスプラチン
ERCC1 (高発現)	胃	オキサリプラチン	
ERCC1 (低発現)	胃		オキサリプラチン
ERCC1 (高発現)	デフォルト	カルボプラチン、シスプラチン、 オキサリプラチン	
ERCC1 (低発現)	デフォルト		カルボプラチン、シスプラチン、 オキサリプラチン
HER-2 (高発現)	乳房		ラパチニブ、トラスツズマブ
HER-2 (高発現)	デフォルト		ラパチニブ、トラスツズマブ
KRAS (突然変異陽性)	結腸直腸癌	セツキシマブ、 パニツムマブ	
KRAS (突然変異陰性)	結腸直腸癌		セツキシマブ、 パニツムマブ
KRAS (突然変異陽性)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	エルロチニブ、 ゲフィチニブ	
KRAS (突然変異陰性)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		エルロチニブ、 ゲフィチニブ
KRAS (突然変異陽性)	細気管支肺癌 (BAC) または 腺癌 (BAC重型)	エルロチニブ	
KRAS (突然変異陰性)	細気管支肺癌腫 (BAC) または 腺癌 (BAC重型)		エルロチニブ
KRAS (突然変異陽性)	多発性骨髄腫	VBMCP/ シクロホスファミド	
KRAS (突然変異陰性)	多発性骨髄腫		VBMCP/ シクロホスファミド
KRAS (突然変異陽性)	デフォルト	セツキシマブ、 パニツムマブ	
KRAS (突然変異陰性)	デフォルト		セツキシマブ、 パニツムマブ
KRAS (突然変異陽性)	デフォルト	セツキシマブ、エルロチニブ、 パニツムマブ、ゲフィチニブ	
KRAS (突然変異陰性)	デフォルト		セツキシマブ、エルロチニブ、 パニツムマブ、ゲフィチニブ
MGMT (高発現)	下垂体腫瘍、 乏突起膠腫	テモゾロミド	
MGMT (低発現)	下垂体腫瘍、 乏突起膠腫		テモゾロミド

10

20

30

40

MGMT (高発現)	神経内分泌腫瘍	テモゾロミド	
MGMT (低発現)	神経内分泌腫瘍		テモゾロミド
MGMT (高発現)	デフォルト	テモゾロミド	
MGMT (低発現)	デフォルト		テモゾロミド
MRP1 (高発現)	乳房	シクロホスファミド	
MRP1 (低発現)	乳房		シクロホスファミド
MRP1 (高発現)	小細胞肺癌 (SCLC)	エトポシド	
MRP1 (低発現)	小細胞肺癌 (SCLC)		エトポシド
MRP1 (高発現)	結節性びまん性大細胞型 B細胞性リンパ腫	シクロホスファミド/ ビンクリスチン	
MRP1 (低発現)	結節性びまん性大細胞型 B細胞性リンパ腫		シクロホスファミド/ ビンクリスチン
MRP1 (高発現)	デフォルト	シクロホスファミド、 エトポシド、ビンクリスチン	
MRP1 (低発現)	デフォルト		シクロホスファミド、 エトポシド、ビンクリスチン
PDGFRA (高発現)	胸膜の悪性孤立性線維性 腫瘍 (MSFT)		イマチニブ
PDGFRA (高発現)	消化管間質腫瘍 (GIST)		イマチニブ
PDGFRA (高発現)	デフォルト		イマチニブ
p糖タンパク質 (高発現)	急性骨髄性白血病 (AML)	エトポシド	
p糖タンパク質 (低発現)	急性骨髄性白血病 (AML)		エトポシド
p糖タンパク質 (高発現)	びまん性大細胞型B細胞性 リンパ腫 (DLBCL)	ドキソルビシン	
p糖タンパク質 (低発現)	びまん性大細胞型B細胞性 リンパ腫 (DLBCL)		ドキソルビシン
p糖タンパク質 (高発現)	肺	エトポシド	
p糖タンパク質 (低発現)	肺		エトポシド
p糖タンパク質 (高発現)	乳房	ドキソルビシン	
p糖タンパク質 (低発現)	乳房		ドキソルビシン
p糖タンパク質 (高発現)	卵巣	パクリタキセル	
p糖タンパク質 (低発現)	卵巣		パクリタキセル
p糖タンパク質 (高発現)	頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)	ビンクリスチン	
p糖タンパク質 (低発現)	頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)		ビンクリスチン
p糖タンパク質 (高発現)	デフォルト	ビンクリスチン、エトポシド、 ドキソルビシン、パクリタキセル	
p糖タンパク質 (低発現)	デフォルト		ビンクリスチン、エトポシド、 ドキソルビシン、パクリタキセル

10

20

30

40

PR (高発現)	乳房	化学内分泌療法	タモキシフェン、アナストラゾール、レトロゾール
PR (低発現)	デフォルト	化学内分泌療法	タモキシフェン、アナストラゾール、レトロゾール
PTEN (高発現)	乳房		トラスツズマブ
PTEN (低発現)	乳房	トラスツズマブ	
PTEN (高発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		ゲフィチニブ
PTEN (低発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	ゲフィチニブ	
PTEN (高発現)	結腸直腸		セツキシマブ、パニツムマブ
PTEN (低発現)	結腸直腸	セツキシマブ、パニツムマブ	
PTEN (高発現)	神経膠芽腫		エルロチニブ、ゲフィチニブ
PTEN (低発現)	神経膠芽腫	エルロチニブ、ゲフィチニブ	
PTEN (高発現)	デフォルト		セツキシマブ、パニツムマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブおよびトラスツズマブ
PTEN (低発現)	デフォルト	セツキシマブ、パニツムマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブおよびトラスツズマブ	
RRM1 (高発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	ゲムシタビン	
RRM1 (低発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		ゲムシタビン
RRM1 (高発現)	膵臓	ゲムシタビン	
RRM1 (低発現)	膵臓		ゲムシタビン
RRM1 (高発現)	デフォルト	ゲムシタビン	
RRM1 (低発現)	デフォルト		ゲムシタビン
SPARC (高発現)	乳房		nabパクリタクセル
SPARC (高発現)	デフォルト		nabパクリタクセル
TS (高発現)	結腸直腸	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	結腸直腸		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	膵臓	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	膵臓		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	頭頸部癌	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	頭頸部癌		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	胃	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	胃		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	非小細胞肺癌 (NSCLC)		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	肝臓	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	肝臓		フルオロピリミジン類
TS (高発現)	デフォルト	フルオロピリミジン類	
TS (低発現)	デフォルト		フルオロピリミジン類
TOP01 (高発現)	結腸直腸		イリノテカン

10

20

30

40

TOP01 (低発現)	結腸直腸	イリノテカン	
TOP01 (高発現)	卵巣		イリノテカン
TOP01 (低発現)	卵巣	イリノテカン	
TOP01 (高発現)	デフォルト		イリノテカン
TOP01 (低発現)	デフォルト	イリノテカン	
TopoIIa (高発現)	乳房		ドキソルビシン、リポソームドキソルビシン、エピルビシン
TopoIIa (低発現)	乳房	ドキソルビシン、リポソームドキソルビシン、エピルビシン	
TopoIIa (高発現)	デフォルト		ドキソルビシン、リポソームドキソルビシン、エピルビシン
TopoIIa (低発現)	デフォルト	ドキソルビシン、リポソームドキソルビシン、エピルビシン	

10

【0490】

検出することができるバイオマーカーおよびバイオマーカーシグネチャーに基づいて選択またはおそらくは回避することができる治療剤の他の例が表10に記載されている。たとえば、癌を患う対象の場合、対象由来の小胞中のADAの過剰発現の検出を使用して、対象を、ペントスタチンに対する応答者として分類する、またはペントスタチンを、対象を治療するために使用すべき剤として同定する。もう一つの例においては、癌を患う対象の場合、対象由来の小胞中のBCRPの過剰発現の検出を使用して、対象を、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカンおよびトポテカンに対する非応答者として分類する。すなわち、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカンおよびトポテカンは、対象を治療するのに最適とはいえない剤として同定される。

20

【0491】

(表10) バイオマーカー、剤、および耐性の例

遺伝子名	発現状態	候補薬剤	起こりうる耐性
ADA	過剰発現	ペントスタチン	
ADA	過小発現		シタラビン
AR	過剰発現	アバレリックス、ピカルタミド、フルタミド、ゴナドレリン、ゴセレリン、ロイプロリド	
ASNS	過小発現	アスパラギナーゼ、PEGアスパラギナーゼ	
BCRP (ABCG2)	過剰発現		シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカン、トポテカン
BRCA1	過小発現	マイトマイシン	
BRCA2	過小発現	マイトマイシン	
CD52	過剰発現	アレムツズマブ	
CDA	過剰発現		シタラビン
c-erbB2	上皮細胞中の高レベルのリン酸化	トラスツズマブ、c-erbB2キナーゼ阻害剤、ラパチニブ	
CES2	過剰発現	イリノテカン	
c-kit	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、イマチニブ	
COX-2	過剰発現	セレコキシブ	
DCK	過剰発現	ゲムシタビン	シタラビン
DHFR	過小発現	メトトレキサート、ペメトレキセド	
DHFR	過剰発現		メトトレキサート
DNMT1	過剰発現	アザシチジン、デシタビン	
DNMT3A	過剰発現	アザシチジン、デシタビン	

30

40

DNMT3B	過剰発現	アザシチジン、デシタビン	
EGFR	過剰発現	エルロチニブ、ゲフィチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ	
EML4-ALK	過剰発現 (存在)	クリゾチニブ	
EPHA2	過剰発現	ダサチニブ	
ER	過剰発現	アナストラゾール、エキセメスタン、フルベストラント、レトロゾール、メグストロール、タモキシフェン、メドロキシプロゲステロン、トレミフェン、アミノグルテチミド	
ERCC1	過剰発現		カルボプラチン、シスプラチン
GART	過小発現	ペメトレキセド	
GRN (PCDGF, PGRN)	過剰発現		抗エストロゲン療法、タモキシフェン、ファスロデックス、レトロゾール、Her-2過剰発現細胞中のハーセプチン、ドキシソルピシン
HER-2 (ERBB2)	過剰発現	トラスツズマブ、ラパチニブ	
HIF-1 α	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、ベバシズマブ	
I κ B- α	過剰発現	ボルテゾミブ	
MGMT	過小発現	テモゾロミド	
MGMT	過剰発現		テモゾロミド
MRP1 (ABCC1)	過剰発現		エトポシド、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ビノレルビン、トポテカン、テニポシド
P-gp (ABCB1)	過剰発現		ドキシソルピシン、エトポシド、エピルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ビノレルビン、トポテカン、テニポシド、リボソームドキシソルピシン
PDGFR- α	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、イマチニブ	
PDGFR- β	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、イマチニブ	
PR	過剰発現	エキセメスタン、フルベストラント、ゴナドレリン、ゴセレリン、メドロキシプロゲステロン、メグストロール、タモキシフェン、トレミフェン	
RARA	過剰発現	ATRA	
RRM1	過小発現	ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素	
RRM2	過小発現	ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素	
RRM2B	過小発現	ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素	
RXR- α	過剰発現	ベキサロテン	
RXR- β	過剰発現	ベキサロテン	
SPARC	過剰発現	nabパクリタキセル	
SRC	過剰発現	ダサチニブ	
SSTR2	過剰発現	オクトレオチド	
SSTR5	過剰発現	オクトレオチド	
TOPO I	過剰発現	イリノテカン、トポテカン	
TOPO II α	過剰発現	ドキシソルピシン、エピルビシン、リボソームドキシソルピシン	
TOPO II β	過剰発現	ドキシソルピシン、エピルビシン、リボソームドキシソルピシン	

10

20

30

40

TS	過小発現	カペシタビン、5-フルオロウラシル、ペメトレキセド	
TS	過剰発現		カペシタビン、5-フルオロウラシル
VDR	過剰発現	カルシトリオール、コレカルシフェロール	
VEGFR1 (Flt1)	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、ベバシズマブ	
VEGFR2	過剰発現	ソラフェニブ、スニチニブ、ベバシズマブ	
VHL	過小発現	ソラフェニブ、スニチニブ	

【0492】

本発明の態様において使用されるさらなる薬物の関連および規則は、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2010年2月12日出願の米国特許出願12/658,770、2010年2月11日出願のPCT国際特許出願第PCT/US2010/000407号、2010年10月27日出願のPCT国際特許出願第PCT/US2010/54366号および2010年12月28日出願の米国特許仮出願61/427,788に見られる。たとえば、第PCT/US2010/54366号の「Table 4: Rules Summary for Treatment Selection」を参照すること。

【0493】

任意の薬物関連標的が、セラノーシスを提供するバイオシグネチャーの一部であることができる。小分子または生物製剤のような治療剤によって修飾することができる標的を含む「薬となり得る標的」が、本発明のバイオシグネチャーに包含するための候補である。薬物関連標的はまた、表9および10に示すような、治療に対する耐性を与えることができるバイオマーカーを含む。バイオシグネチャーは、遺伝子、たとえばDNA配列および／または遺伝子産物、たとえばmRNAもしくはタンパク質または薬物関連標的に基づくことができる。そのような核酸および／またはポリペプチドを、存在もしくは不在、レベルもしくは量、活性、突然変異、配列、ハプロタイプ、再配列、コピー数または他の計測可能な特徴に関して適宜にプロファイリングすることができる。遺伝子または遺伝子産物は、たとえば小胞表面マーカーまたは小胞ペイロードとして小胞集団と結合していることができる。ある態様において、本発明は、癌のセラノーシスを実施する方法であって、一つまたは複数の薬物関連標的の存在またはレベルを含むバイオシグネチャーを同定する工程、およびバイオシグネチャーに基づいて候補治療を選択する工程を含む方法を提供する。薬物関連標的は、循環バイオマーカー、小胞または小胞結合バイオマーカーであることができる。薬物関連の標的は組織または起始細胞から独立していることができるため、薬物関連の標的を含むバイオシグネチャーを使用して、任意の増殖性疾患、たとえば、CUPSのような原因不明の癌を含む、様々な解剖学的起源からの癌のセラノーシスを提供することができる。

【0494】

本発明の方法を使用して評価される薬物関連標的は、非限定的に、ABCC1、ABCG2、ACE2、ADA、ADH1C、ADH4、AGT、AR、AREG、ASNS、BCL2、BCRP、BDCA1、 β IIIチューブリン、BIRC5、B-RAF、BRCA1、BRCA2、CA2、カベオリン、CD20、CD25、CD33、CD52、CDA、CDKN2A、CDKN1A、CDKN1B、CDK2、CDW52、CES2、CK14、CK17、CK5/6、c-KIT、c-Met、c-Myc、COX-2、サイクリンD1、DCK、DHFR、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、Eカドヘリン、ECGF1、EGFR、EML4-ALK融合体、EPHA2、エピレグリン、ER、ERBR2、ERCC1、ERCC3、EREG、ESR1、FLT1、葉酸受容体、FOLR1、FOLR2、FSHB、FSHPRH1、FSHR、FYN、GART、GNA11、GNAQ、GNRH1、GNRH1、GSTP1、HCK、HDAC1、hENT-1、Her2/Neu、HGF、HIF1A、HIG1、HSP90、HSP90AA1、HSPCA、IGF-1R、IGFRBP、IGFRBP3、IGFRBP4、IGFRBP5、IL13RA1、IL2RA、KDR、Ki67、KIT、K-RAS、LCK、LTB、リンホトキシン β 受容体、LYN、MET、MGMT、MLH1、MMR、MRP1、MS4A1、MSH2、MSH5、Myc、NFKB1、NFKB2、NFKBIA、NRAS、ODC1、OGFR、p16、p21、p27、p53、p95、PARP-1、PDGFC、PDGFR、PDGFRA、PDGFRB、PGP、PGR、PI3K、POLA、POLA1、PPARG、PPARGC1、PR、PTEN、PTGS2、PTPN12、RAF1、RARA、ROS1、RRM1、RRM2、RRM2B、RXRB、RXRG、SIK2、SPARC、SRC、SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5、スルビピン、TK1、TLE3、TNF、

10

20

30

40

50

TOP1、TOP2A、TOP2B、TS、TUBB3、TXN、TXNRD1、TYMS、VDR、VEGF、VEGFA、VEGFC、VHL、YES1、ZAP70またはそれらの任意の組み合わせを含む。これらのマーカーの一つまたは組み合わせを含むバイオシグネチャーを使用して、本発明にしたがって表現型を特徴決定する、たとえばセラノシスを提供することができる。これらのマーカーは、増殖性疾患に対する様々な化学療法剤の効果において役割を有することが知られている。したがって、マーカーを評価して、癌の起源または型から独立して、癌に対する候補治療を選択することができる。ある態様において、本発明は、癌に対する候補治療を選択する方法であって、一つまたは複数の薬物関連標的のレベルまたは存在を含むバイオシグネチャーを同定する工程、およびバイオシグネチャーを有する患者に関してその予測される効果に基づいて候補治療を選択する工程を含む方法を提供する。一つまたは複数の薬物関連標的は、上記または表9~10に記載された標的の一つであることができる。いくつかの態様においては、一つまたは複数の薬物関連標的の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45または少なくとも50が評価される。一つまたは複数の薬物関連標的は、たとえば小胞表面マーカーとして、または核酸（たとえばDNA、mRNA）もしくはタンパク質としての小胞ペイロードとして、小胞と結合していることができる。いくつかの態様において、一つまたは複数の薬物関連標的と相互作用することが知られるマイクロRNAの存在またはレベルが評価され、一つまたは複数の薬物関連標的を抑制することが知られるマイクロRNAの高いレベルが、一つまたは複数の薬物関連標的のより低い発現、ひいては薬物関連標的に対する治療に対する応答のより低い可能性を示すことができる。一つまたは複数の薬物関連標的は循環バイオマーカーであることができる。一つまたは複数の薬物関連標的は組織試料中で評価することができる。予測される効果は、一つまたは複数の薬物関連標的の存在またはレベルを参照値と比較することによって決定することができる。参照よりも高いレベルは、対象が応答者である可能性があることを示す。予測される効果は、分類器アルゴリズムを使用して決定することができ、分類器は、候補治療に対する応答者または非応答者であることが知られる対象における一つまたは複数の薬物関連標的のバイオシグネチャーを比較することによって訓練を受けたものである。一つまたは複数の薬物関連標的と適切な候補標的との分子結合が、本明細書の表9~10ならびにいずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる2010年2月12日出願の米国特許出願第12/658,770号、2010年2月11日出願のPCT国際特許出願第PCT/US2010/000407号、2010年10月27日出願のPCT国際特許出願第PCT/US2010/54366号、2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号のおよび2010年12月28日出願の米国特許仮出願第61/427,788号に示されている。

【0495】

国際特許出願第PCT/US2011/031479号の表11は、本発明の方法にしたがって解析されるセラノシス標的の多くの遺伝子および対応するタンパク質の記号ならびに名称の一覧を提供する。当業者によって理解されるように、遺伝子およびタンパク質は、化学文献において多数の代替名称を創製している。したがって、PCT/US2011/031479号の表11の一覧は、例示的であるが網羅的ではない編さんを構成する。遺伝子の別名および記述のさらなる一覧は、GeneCards（登録商標）（www.genecards.org）、HUGO Gene Nomenclature（www.genenames.org）、Entrez Gene（www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene）、UniProtKB/Swiss-Prot（www.uniprot.org）、UniProtKB/TrEMBL（www.uniprot.org）、OMIM（www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM）、GeneLoc（genecards.weizmann.ac.il/geneloc/）およびEnsembl（www.ensembl.org）を含む多様なオンラインデータベースを使用して見いだすことができる。一般に、以下の遺伝子記号および名称は、HUGOによって認可されたものに対応し、タンパク質名は、UniProtKB/Swiss-Protによって推奨されるものである。また、一般的な代替が提供されている。タンパク質名が前駆体を示す場合、その成熟タンパク質が同じく暗示される。本出願を通じて、遺伝子およびタンパク質記号は互換可能に使用されることがあり、意味は、必要に応じて文脈から導き出すことができる。

【0496】

例示として、非小細胞肺癌を患う対象に対する治療を選択することができる。一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば非限定的にEGFR、切除修復交差相補群1 (ERCC1)、p53、Ras、p27、クラスIII β チューブリン、乳癌遺伝子1 (BRCA1)、乳癌遺伝子2 (BRCA2) およびリボヌクレオチドレダクターゼメッセンジャー1 (RRM1) を対象由来の小胞から評価することができる。一つまたは複数のバイオマーカーの一つまたは複数の特徴に基づき、対象を、治療、たとえば非限定的にエルロチニブ、カルボプラチン、パクリタキセル、ゲフィチニブまたはこれらの組み合わせに関して応答者または非応答者であると決定することができる。

【0497】

もう一つの態様においては、結腸直腸癌を患う対象に対する治療を選択することができる。一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば非限定的にK-rasを対象由来の小胞から評価することができる。一つまたは複数のバイオマーカーの一つまたは複数の特徴に基づき、対象を、治療、たとえば非限定的にパニツムマブ、セツキシマブまたはこれらの組み合わせに関して応答者または非応答者であると決定することができる。

【0498】

もう一つの態様においては、乳癌を患う対象に対する治療を選択することができる。一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば非限定的にHER2、トポシオメラーゼII α 、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体を対象由来の小胞から評価することができる。一つまたは複数のバイオマーカーの一つまたは複数の特徴に基づき、対象を、治療、たとえば非限定的にトラスツズマブ、アントラサイクリン類、タキサン、メトトレキサート、フルオロウラシルまたはこれらの組み合わせに関して応答者または非応答者であると決定することができる。

【0499】

上記のように、癌のセラノーシスを実施するために使用されるバイオシグネチャーは、タンパク質またはmRNAもしくはマイクロRNAを含む核酸であることができる一つまたは複数のバイオマーカーの解析を含むことができる。バイオマーカーは、体液中に検出することもできるし、たとえば小胞抗原または小胞ペイロードとして小胞と結合した状態で検出することもできる。説明のための例においては、バイオシグネチャーを使用して、患者を、チロシンキナーゼ阻害剤に対する応答者または非応答者として同定する。バイオマーカーは、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる「METHODS AND KITS TO PREDICT THERAPEUTIC OUTCOME OF TYROSINE KINASE INHIBITORS」と題する2010年4月19日出願の国際公開公報第2010/121238号または「SYSTEMS AND METHODS OF CANCER STAGING AND TREATMENT」と題する2009年2月19日出願の国際公開公報第2009/105223号に記載されたものの一つまたは複数であることができる。

【0500】

ある局面において、本発明は、対象が、チロシンキナーゼ阻害剤に応答するもしくは応答しない可能性があるのかどうかを判定する方法であって、対象由来の試料中の小胞集団中の一つまたは複数のバイオマーカーを同定する工程を含み、参照と比較した場合の試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの差次的発現が、その対象がチロシンキナーゼ阻害剤に対して応答者または非応答者であることを示す方法を提供する。ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカーはmiR-497を含み、miR-497の発現の低下はその対象が応答者である（すなわち、チロシンキナーゼ阻害剤に感受性である）ことを示す。もう一つの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、miR-21、miR-23a、miR-23bおよびmiR-29bの一つまたは複数を含み、マイクロRNAの上方制御が、その対象が非応答者である（すなわち、チロシンキナーゼ阻害剤に耐性である）可能性があることを示す。いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーは、hsa-miR-029a、hsa-let-7d、hsa-miR-100、hsa-miR-1260、hsa-miR-025、hsa-let-7i、hsa-miR-146a、hsa-miR-594-Pre、hsa-miR-024、FGFR1、MET、RAB25、EGFR、KITおよびVEGFR2の一つまたは複数を含む。もう一つの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーはFGF1、HOXC10またはLHFPを含み、バイオマーカーのより高い発現は、対象が非応答者である（すなわち、チロシンキナー

ゼ阻害剤に耐性である)ことを示す。この方法を使用して、チロシンキナーゼ阻害剤に対する癌、たとえば非小細胞肺癌細胞、腎臓癌またはGISTの感度を決定することができる。チロシンキナーゼ阻害剤は、エルロチニブ、バンデタニブ、スニチニブおよび／またはソラフェニブまたは類似した作用機序によって作用する他の阻害剤であることができる。チロシンキナーゼ阻害剤は、特異的または非特異的な様式で一つまたは複数のチロシンキナーゼの作用を阻害する任意の剤を含む。チロシンキナーゼ阻害剤は、小分子、抗体、ペプチドまたはチロシン残基リン酸化を直接的に、間接的に、アロステリックに、または他の方法で阻害する任意の適切な実体を含む。チロシンキナーゼ阻害剤の具体例は、N-(トリフルオロメチルフェニル)-5-メチルイソキサゾール-4-カルボキサミド、3-[(2,4-ジメチルピロロ-5-イル)メチリデニル]インドリン-2-オン、17-(アリルアミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン、4-(3-クロロ-4-フルオロフェニルアミノ)-7-メトキシ-6-[3-(4-ホルホルニル)プロポキシ]キナゾリン、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリナミン、BIBX1382、2,3,9,10,11,12-ヘキサヒドロ-10-(ヒドロキシメチル)-10-ヒドロキシ-9-メチル-9,12-エポキシ-1H-ジインドロ[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]ピロロ[3,4-i][1,6]ベンゾジアゾシン-1-オン、SH268、ゲニステイン、STI571、CEP2563、4-(3-クロロフェニルアミノ)-5,6-ジメチル-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジンメタンスルホネート、4-(3-ブromo-4-ヒドロキシフェニル)アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン、4-(4'-ヒドロキシフェニル)アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン、SU6668、STI571A、N-4-クロロフェニル-4-(4-ピリジルメチル)-1-フタラジンアミン、N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-5-[(Z)-(5-フルオロ-1,2-ジヒドロ-2-オキソ-3H-インドール-3-イリジン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキサミド(一般にスニチニブとして知られる)、A-[A-[[4-クロロ-3(トリフルオロメチル)フェニル]カルバモイルアミノ]フェノキシ]-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミド(一般にソラフェニブとして知られる)、EMD121974およびN-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン(一般にエルロチニブとして知られる)を含む。いくつかの態様において、チロシンキナーゼ阻害剤は、上皮成長因子受容体(EGFR)、VEGFR、PDGFR β および／またはFLT3に対して阻害活性を有する。

【0501】

したがって、本発明の方法によって同定されるバイオシグネチャーに基づき、癌を患う対象に対する治療を選択することができる。したがって、バイオシグネチャーは、マイクロRNAを含む循環バイオマーカー、小胞または任意の有用な小胞結合バイオマーカーの存在またはレベルを含むことができる。

【0502】

本発明の方法を用いた他の疾患、例えば心血管疾患、神経学的疾患および障害、免疫疾患および免疫障害、ならびに感染症のセラノーシスに使用することができるバイオマーカーは、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号に記載されている。

【0503】

バイオシグネチャーの発見

本明細書に提供されるシステムおよび方法は、小胞の新規なバイオシグネチャー、たとえば表現型の診断、予後判定またはセラノーシスのための一つまたは複数の新規なバイオマーカーを同定する際に使用することができる。一つの態様においては、表現型を有する対象から一つまたは複数の小胞を単離し、その一つまたは複数の小胞のバイオシグネチャーを決定することができる。そのバイオシグネチャーを、その表現型を有しない対象と比較することができる。二つのバイオシグネチャーの間の差異を決定し、使用して、新規なバイオシグネチャーを形成することができる。そして、その新規なバイオシグネチャーを使用して、もう一つの対象を、その表現型を有するもの、または有しないものとして同定することができる。

【0504】

特定の表現型を有する対象由来のバイオシグネチャーの間の差異を、その特定の表現型を有しない対象由来のバイオシグネチャーと比較することができる。一つまたは複数の差異は小胞の任意の特徴における差異であることができる。たとえば、試料中の小胞のレベルまたは量、小胞の半減期、小胞の循環半減期、小胞の代謝半減期もしくは小胞の活性またはそれらの任意の組み合わせが、特定の表現型を有する対象由来のバイオシグネチャーと、その特定の表現型を有しない対象由来のバイオシグネチャーとの間で異なることができる。

【0505】

いくつかの態様においては、一つまたは複数のバイオマーカーが、特定の表現型を有する対象由来のバイオシグネチャーと、その特定の表現型を有しない対象由来のバイオシグネチャーとの間で異なる。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーの発現レベル、存在、不在、突然変異、バリエーション、コピー数変化、切断、複製、修飾、分子結合またはそれらの任意の組み合わせが、特定の表現型を有する対象由来のバイオシグネチャーと、その特定の表現型を有しない対象由来のバイオシグネチャーとの間で異なることができる。バイオマーカーは、循環バイオマーカー、たとえばタンパク質もしくはマイクロRNA、小胞または小胞中もしくは小胞表面に存在する成分、たとえば任意の核酸（たとえばRNAまたはDNA）、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、抗原、脂質、糖質またはプロテオグリカンを含む、本明細書に開示される、または生物学実体の特徴決定するために使用することができる任意のバイオマーカーであることができる。

【0506】

ある局面において、本発明は、新規なバイオシグネチャーを発見する方法であって、二つ以上の試料群の間でバイオマーカーを比較して、試料群間の差異を示すバイオマーカーを同定する工程を含む方法を提供する。複数のマーカーをパネル形式で評価して、個々のマーカーの性能を潜在的に改善することができる。いくつかの態様において、複数のマーカーは多重に評価される。群を識別する個々のマーカーまたはマーカー群の能力は、本明細書において使用されるような統計的識別分析または分類法を使用して評価することができる。マーカーの最適なパネルをバイオシグネチャーとして使用して、解析対象の表現型を特徴決定する、たとえば疾患または病態の診断、予後判定またはセラノースを提供することができる。最適化は、ROC AUC、精度、特定の特異度における感度または特定の感度における特異度を最大化することを非限定的に含む様々な基準に基づくことができる。パネルは、複数の型からのバイオマーカーを含むことができる。たとえば、バイオシグネチャーは、関心対象の小胞集団を捕捉するのに有用な小胞抗原を含むことができ、バイオシグネチャーはさらに、マイクロRNA、mRNAまたは可溶性タンパク質を非限定的に含む、小胞集団内のペイロードマーカーを含むことができる。最適な組み合わせは、二つの状況を比較した場合に最大のROC AUC値を有する小胞抗原およびペイロードマーカーとして同定することができる。もう一つの例として、バイオシグネチャーは、エキソソームを単離することによって得られない循環バイオマーカー、たとえば循環タンパク質および／またはマイクロRNAを評価することに加え、小胞集団を評価することによって決定することができる。

【0507】

表現型は、本明細書、たとえば上記「表現型」部分に記載されたもののいずれかであることができる。たとえば、表現型は、増殖障害、たとえば癌または非悪性増殖、周産期または妊娠関連の病態、感染症、神経学的障害、心血管疾患、炎症性疾患、免疫疾患または自己免疫疾患であることができる。癌は、非限定的に、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌（小細胞癌腫（燕麦細胞癌）、小細胞／大細胞混合癌腫および複合小細胞癌腫を含む）、結腸癌、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、脳癌、腎臓癌、卵巣癌、胃癌、黒色腫、骨癌、胃癌、乳癌、神経膠腫、神経膠芽腫、肝細胞癌、乳頭状腎臓癌腫、頭頸部扁平上皮癌腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫または他の固形腫瘍を含む。

【0508】

新規のバイオシグネチャーを発見するために、本明細書に記載の任意のタイプのバイオ

マーカーまたは特異的バイオマーカー、例えば表3～5におけるバイオマーカーを評価することができる。一態様において、発見のために選択されるバイオマーカーは、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図1～60、表9～10、または表16のいずれかに列挙された遺伝子およびマイクロRNAを含むが、それに限定されるわけではない、本明細書において列挙された細胞特異的バイオマーカーを含む。バイオマーカーは、表11に列挙されたものなどの、一つまたは複数の疾患関連標的、薬物関連標的、または予後判定用標的を含むことができる。バイオマーカーは、一つまたは複数の一般的小胞マーカー、一つまたは複数の細胞特異的小胞マーカーおよび／または一つまたは複数の疾患特異的小胞マーカーを含むことができる。

10

【0509】

(表11) 疾患関連バイオマーカーおよび薬物関連バイオマーカー

遺伝子 記号	遺伝子名	タンパク質 記号	タンパク質名
<i>ABCB1, PGP</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	<i>ABCB1, MDRI, PGP</i>	Multidrug resistance protein 1; P-glycoprotein
<i>ABCC1, MRP1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	MRP1, ABCC1	Multidrug resistance-associated protein 1
<i>ABCG2, BCRP</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ACE2	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2 precursor
ADA	adenosine deaminase	ADA	Adenosine deaminase
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	ADH1G	Alcohol dehydrogenase 1C
ADH4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	ADH4	Alcohol dehydrogenase 4
AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	ANGT, AGT	Angiotensinogen precursor
ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	ALK	ALK tyrosine kinase receptor precursor
AR	androgen receptor	AR	Androgen receptor
AREG	amphiregulin	AREG	Amphiregulin precursor
ASNS	asparagine synthetase	ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	Apoptosis regulator Bcl-2

20

30

BDCA1, CD1C	CD1c molecule	CD1C	T-cell surface glycoprotein CD1c precursor
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	BIRC5, サバイビン	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5; Survivin
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	B-RAF, BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-raf
BRCA1	breast cancer 1, early onset	BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	breast cancer 2, early onset	BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
CA2	carbonic anhydrase II	CA2	Carbonic anhydrase 2
CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	CAV1	Caveolin-1
CCND1	cyclin D1	CCND1, サイクリンD1, BCL-1	G1/S-specific cyclin-D1
CD20, MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	CD20	B-lymphocyte antigen CD20
CD25, IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	CD25	Interleukin-2 receptor subunit alpha precursor
CD33	CD33 molecule	CD33	Myeloid cell surface antigen CD33 precursor
CD52, CDW52	CD52 molecule	CD52	CAMPATH-1 antigen precursor
CDA	cytidine deaminase	CDA	Cytidine deaminase
CDH1, ECAD	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	E-Cad	Cadherin-1 precursor (E-cadherin)
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	CDK2	Cell division protein kinase 2
CDKN1A, P21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A, p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN1B, p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKN2A, P16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	CD21A, p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3
CES2	carboxylesterase 2 (intestine, liver)	CES2, EST2	Carboxylesterase 2 precursor
CK 5/6	cytokeratin 5 / cytokeratin 6	CK 5/6	Keratin, type II cytoskeletal 5; Keratin, type II cytoskeletal 6
CK14, KRT14	keratin 14	CK14	Keratin, type I cytoskeletal 14
CK17, KRT17	keratin 17	CK17	Keratin, type I cytoskeletal 17
COX2, PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2, PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2 precursor
DCK	deoxycytidine kinase	DCK	Deoxycytidine kinase
DHFR	dihydrofolate reductase	DHFR	Dihydrofolate reductase
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B
ECGF1, TYMP	thymidine phosphorylase	TYMP, PD- ECGF, ECDF1	Thymidine phosphorylase precursor
EGFR, ERBB1, HER1	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	EGFR, ERBB1, HER1	Epidermal growth factor receptor precursor
EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4	EML4	Echinoderm microtubule-associated protein- like 4
EPHA2	EPH receptor A2	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2 precursor
ER, ESR1	estrogen receptor 1	ER, ESR1	Estrogen receptor
ERBB2, HER2/NEU	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	ERBB2, HER2, HER- 2/neu	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 precursor

10

20

30

40

ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	ERCC1	DNA excision repair protein ERCC-1
ERCC3	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	ERCC3	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit
EREG	Epiregulin	EREG	Proepiregulin precursor
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT-1, VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor
FOLR1	folate receptor 1 (adult)	FOLR1	Folate receptor alpha precursor
FOLR2	folate receptor 2 (fetal)	FOLR2	Folate receptor beta precursor
FSHB	follicle stimulating hormone, beta polypeptide	FSHB	Follitropin subunit beta precursor
FSHPRH1, CENP1	centromere protein I	FSHPRH1, CENP1	Centromere protein I
FSHR	follicle stimulating hormone receptor	FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor precursor
FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	Tyrosine-protein kinase Fyn
GART	phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	GART, PUR2	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3
GNA11, GA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11, Ga-11, G-タンパク質サブユニットα-11	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
GNAQ, GAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	GNRH1, GON1	Progonadoliberin-1 precursor
GNRHR1, GNRHR	gonadotropin-releasing hormone receptor	GNRHR1	Gonadotropin-releasing hormone receptor
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	GSTP1	Glutathione S-transferase P
HCK	hemopoietic cell kinase	HCK	Tyrosine-protein kinase HCK
HDAC1	histone deacetylase 1	HDAC1	Histone deacetylase 1
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF	Hepatocyte growth factor precursor
HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HIG1, HIGD1A, HIG1A	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A	HIG1, HIGD1A, HIG1A	HIG1 domain family member 1A
HSP90AA1, HSP90, HSPCA	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90, HSP90A	Heat shock protein HSP 90-alpha
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor precursor
IGFBP3, IGFRBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP-3, IBP-3	Insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor
IGFBP4, IGFRBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP-4, IBP-4	Insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor

10

20

30

40

IGFBP5, IGFRBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP-5, IBP-5	Insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor
IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	IL-13RA1	Interleukin-13 receptor subunit alpha-1 precursor
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	KDR, VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor
KIT, c-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	KIT, c-KIT, CD117, SCFR	Mast/stem cell growth factor receptor precursor
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	K-RAS	GTPase KRas precursor
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	LCK	Tyrosine-protein kinase Lck
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB, TNF3	Lymphotoxin-beta
LTBR	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	LTBR, LTBR3, TNFR	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 3 precursor
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn
MET, c-MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	MET, c-MET	Hepatocyte growth factor receptor precursor
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	MGMT	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase
MKI67, KI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Ki67, Ki-67	Antigen KI-67
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	MLH1	DNA mismatch repair protein Mlh1
MMR	mismatch repair (refers to MLH1, MSH2, MSH5)		
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2
MSH5	mutS homolog 5 (E. coli)	MSH5, hMSH5	MutS protein homolog 5
MYC, c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC, c-MYC	Myc proto-oncogene protein
NBN, P95	nibrin	NBN, p95	Nibrin
NDGR1	N-myc downstream regulated 1	NDGR1	Protein NDGR1
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFKB2	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	NRAS	GTPase NRas, Transforming protein N-Ras
ODC1	ornithine decarboxylase 1	ODC	Ornithine decarboxylase
OGFR	opioid growth factor receptor	OGFR	Opioid growth factor receptor
PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PDGFC	platelet derived growth factor C	PDGF-C, VEGF-E	Platelet-derived growth factor C precursor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	PDGFRA, PDGFR2, CD140 A	Alpha-type platelet-derived growth factor receptor precursor
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	PDGFRB, PDGFR, PDGFR1, CD140 B	Beta-type platelet-derived growth factor receptor precursor

10

20

30

40

PGR	progesterone receptor	PR	Progesterone receptor
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	PI3K サブ ユニットp110α	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit; polymerase (DNA directed), alpha, polymerase (DNA directed), alpha 1	POLA, POLA1, p180	DNA polymerase alpha catalytic subunit
PPARG, PPARG1, PPARG2, PPAR-γ, NR1C3	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPARGC1A, LEM6, PGC1, PGC1A, PPARGC1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	PGC-1-α, PPARGC-1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PPAR-gamma coactivator 1-alpha
PSMD9, P27	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	p27	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9
PTEN, MMAC1, TEP1	phosphatase and tensin homolog	PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase; Mutated in multiple advanced cancers 1
PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPG1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12; Protein-tyrosine phosphatase G1
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF, RAF-1, c-RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RARA	retinoic acid receptor, alpha	RAR, RAR-α, RARA	Retinoic acid receptor alpha
ROS1, ROS, MCF3	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	ROS1, ROS	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RRM1	ribonucleotide reductase M1	RRM1, RR1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
RRM2	ribonucleotide reductase M2	RRM2, RR2M, RR2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
RRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	RRM2B, P53R2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B
RXRB	retinoid X receptor, beta	RXRB	Retinoic acid receptor RXR-beta
RXRG	retinoid X receptor, gamma	RXRG, RXRC	Retinoic acid receptor RXR-gamma
SIK2	salt-inducible kinase 2	SIK2, Q9H0K1	Salt-inducible protein kinase 2; Serine/threonine-protein kinase SIK2
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	ENT-1	Equilibrative nucleoside transporter 1
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	SPARC precursor; Osteonectin
SRC	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SSTR1	somatostatin receptor 1	SSTR1, SSR1, SS1R	Somatostatin receptor type 1
SSTR2	somatostatin receptor 2	SSTR2, SSR2, SS2R	Somatostatin receptor type 2
SSTR3	somatostatin receptor 3	SSTR3, SSR3, SS3R	Somatostatin receptor type 3
SSTR4	somatostatin receptor 4	SSTR4, SSR4, SS4R	Somatostatin receptor type 4
SSTR5	somatostatin receptor 5	SSTR5, SSR5, SS5R	Somatostatin receptor type 5

10

20

30

40

TK1	thymidine kinase 1, soluble	TK1, KITH	Thymidine kinase, cytosolic
TLE3	transducin-like enhancer of split 3 (E(spl) homolog, Drosophila)	TLE3	Transducin-like enhancer protein 3
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF, TNF- α , TNF-a	Tumor necrosis factor precursor
TOP1, TOPO1	topoisomerase (DNA) I	TOP1, TOPO1	DNA topoisomerase 1
TOP2A, TOPO2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	TOP2A, TOP2, TOPO2A	DNA topoisomerase 2-alpha; Topoisomerase II alpha
TOP2B, TOPO2B	topoisomerase (DNA) II beta 180kDa	TOP2B, TOPO2B	DNA topoisomerase 2-beta; Topoisomerase II beta
TP53	tumor protein p53	p53	Cellular tumor antigen p53
TUBB3	tubulin, beta 3	β III チューブリン, TUBB3, TUBB4	Tubulin beta-3 chain
TXN	thioredoxin	TXN, TRX, TRX-1	Thioredoxin
TXNRD1	thioredoxin reductase 1	TXNRD1, TXNR	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic; Oxidoreductase
TYMS, TS	thymidylate synthetase	TYMS, TS	Thymidylate synthase
VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	VDR	Vitamin D3 receptor
VEGFA, VEGF	vascular endothelial growth factor A	VEGF-A, VEGF	Vascular endothelial growth factor A precursor
VEGFC	vascular endothelial growth factor C	VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C precursor
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	VHL	Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor
YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	YES1, Yes, p61-Yes	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	ZAP-70	Tyrosine-protein kinase ZAP-70

10

20

30

40

50

【 0 5 1 0 】

バイオシグネチャー発見に使用されるバイオマーカーは、表11における小胞バイオマーカーの一つまたは複数を非限定的に含む、一般に小胞と結合するマーカーを含むことができる。他のバイオマーカーは、エキソソーム中で同定されるタンパク質およびRNA分子を開示するExoCartaデータベース (exocarta.ludwig.edu.auで入手可能) に開示されているものから選択することができる。また、Mathivanan and Simpson, ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. Proteomics. 2009 Nov 9(21):4997-5000を参照すること。

【 0 5 1 1 】

バイオシグネチャー発見に使用されるバイオマーカーは、A33、a33 n15、AFP、ALA、ALIX、ALP、アネキシンV、APC、ASCA、ASPH (246-260)、ASPH (666-680)、ASPH (A-10)、ASPH (D01P)、ASPH (D03)、ASPH (G-20)、ASPH (H-300)、AURKA、AURKB、B7H3、B7H4、BCA-225、BCNP1、BDNF、BRCA、CA125 (MUC16)、CA-19-9、C-Bir、CD1.1、CD10、CD174 (Lewis y)、CD24、CD44、CD46、CD59 (MEM-43)、CD63、CD66e CEA、CD73、CD81、CD9、CDA、CDAC1 1a2、CEA、C-Erb2、C-erbB2、CRMP-2、CRP、CXCL12、CYFRA21-1、DLL4、DR3、EGFR、Epcam、EphA2、EphA2 (H-77)、ER、ErbB4、EZH2、FASL、FRT、FRT c.f23、GDF15、GPCR、GPR30、Gro- α 、HAP、HBD1、HBD2、HER3 (ErbB3)、HSP、HSP70、hVEGFR2、iC3b、IL6 Unc、IL-1B、IL6 Unc、IL6R、IL8、IL-8、INSIG-2、KLK2、L1CAM、LAMN、LDH、MACC-1、MAPK4、MART-1、MCP-1、M-CSF、MFG-E8、MIC1、MIF、MIS RII、MMG、MMP26、MMP7、MMP9、MS4A1、MUC1、MUC1 seq1、MUC1 seq11A、MUC17、MUC2、Ncam、NGAL、NPGP/NPFF2、OPG、OPN、p53、p53、PA2G4、PBP、PCSA、PDGFRB、PGP9.5、PIM1、PR (B)、PRL、PSA、PSMA、PSME3、PTEN、R5-CD9 Tube 1、Reg IV、RUNX2、SCRN1、セプラーゼ、SERPINB3、SPARC、SPB、SPDEF、SRVN、STAT3、STEAP1、TF (FL-295)、TFF3、TGM2、TIMP-1、TIMP1

、TIMP2、TMEM211、TMPRSS2、TNF- α 、Trail-R2、Trail-R4、TrKB、TROP2、Tsg 101、TWEAK、UNC93A、VEGF AおよびYPSMA-1の一つまたは複数を非限定的に含む、一般に小胞と結合するマーカーを含むことができる。バイオマーカーは、NSE、TRIM29、CD63、CD151、ASPH、LAMP2、TSPAN1、SNAIL、CD45、CKS1、NSE、FSHR、OPN、FTH1、PGP9、アネキシン1、SPD、CD81、EPCAM、PTH1R、CEA、CYTO 7、CCL2、SPA、KRAS、TWIST1、AURKB、MMP9、P27、MMP1、HLA、HIF、CEACAM、CENPH、BTUB、INTG b4、EGFR、NACC1、CYTO 18、NAP2、CYTO 19、アネキシンV、TGM2、ERB2、BRCA1、B7H3、SFTPC、PNT、NCAM、MS4A1、P53、INGA3、MUC2、SPA、OPN、CD63、CD9、MUC1、UNCR3、PAN ADH、HCG、TIMP、PSMA、GPCR、RACK1、PCSA、VEGF、BMP2、CD81、CRP、PRO GRP、B7H3、MUC1、M2PK、CD9、PCSAおよびPSMAの一つまたは複数を含むことができる。バイオマーカーはまた、TFF3、MS4A1、EphA2、GAL3、EGFR、N-gal、PCSA、CD63、MUC1、TGM2、CD81、DR3、MACC-1、TrKB、CD24、TIMP-1、A33、CD66 CEA、PRL、MMP9、MMP7、TMEM211、SCRN1、TROP2、TWEAK、CDACC1、UNC93A、APC、C-Erb、CD10、BDNF、FRT、GPR30、P53、SPR、OPN、MUC2、GRO-1、tsg 101およびGDF15の一つまたは複数を含むことができる。複数の態様において、バイオシグネチャーを発見するために使用されるバイオマーカーは、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の図99、100、108A～C、114Aおよび／または115A～Eに示されたものの一つまたは複数を含む。

10

【0512】

当業者は、本明細書に開示された任意のマーカーまたは関心対象の二つの試料または試料群の間で比較することができる任意のマーカーを使用して、比較することができる所与の生物学的状況に関して候補バイオシグネチャーを発見することができることを理解するであろう。

20

【0513】

そして、一つまたは複数の差異を使用して、特定の表現型、たとえば病態の診断、疾患もしくは病態期の診断、病態の予後判定または病態のセラノーシスのための新規なバイオシグネチャーを形成することができる。そして、その新規なバイオシグネチャーを使用して他の対象における表現型を同定することができる。新たな対象に関して小胞のバイオシグネチャーを決定し、新規なバイオシグネチャーと比較して、その対象が、その新規なバイオシグネチャーが同定された特定の表現型を有するかどうかを判定することができる。

30

【0514】

たとえば、癌を有する対象のバイオシグネチャーを、癌を有しない別の対象と比較することができる。差異があるならばそれを使用して、癌の診断のための新規なバイオシグネチャーを形成することができる。もう一つの態様においては、進行期の癌を有する対象のバイオシグネチャーを、より進行していない病期の癌を有する別の対象と比較することができる。差異があるならばそれを使用して、癌の病期分類のための新規なバイオシグネチャーを形成することができる。さらに別の態様においては、進行期の癌を有する対象のバイオシグネチャーを、より進行していない病期の癌を有する別の対象と比較することができる。差異があるならばそれを使用して、癌の病期分類のための新規なバイオシグネチャーを形成することができる。

40

【0515】

一つの態様において、表現型は、治療薬に対する薬物耐性または非応答性である。特定の治療に対する非応答者から一つまたは複数の小胞を単離し、その小胞のバイオシグネチャーを決定することができる。非応答者から得られた小胞のバイオシグネチャーを、応答者から得られた小胞のバイオシグネチャーと比較することができる。非応答者からのバイオシグネチャーの間の差異を応答者からのバイオシグネチャーと比較することができる。一つまたは複数の差異は小胞の任意の特徴における差異であることができる。たとえば、試料中の小胞のレベルもしくは量、小胞の半減期、小胞の循環半減期、小胞の代謝半減期、小胞の活性またはそれらの任意の組み合わせが、非応答者からのバイオシグネチャーと、応答者からのバイオシグネチャーとの間で異なることができる。

50

【0516】

いくつかの態様において、一つまたは複数のバイオマーカーが、非応答者からのバイオシグネチャーと応答者からのバイオシグネチャーとの間で異なる。たとえば、一つまたは複数のバイオマーカーの発現レベル、存在、不在、突然変異、バリエーション、コピー数変化、切断、複製、修飾、分子結合またはそれらの任意の組み合わせが、非応答者からのバイオシグネチャーと応答者からのバイオシグネチャーとの間で異なることがある。

【0517】

いくつかの態様において、差異は、小胞中に存在する薬物または薬物代謝産物の量の差異であることができる。応答者および非応答者の両方を治療薬で治療することができる。応答者からのバイオシグネチャーと非応答者からのバイオシグネチャーとの間の比較を実施することができ、応答者からの小胞中に存在する薬物または薬物代謝産物の量は、非応答者中に存在する薬物または薬物代謝産物の量と異なる。差異はまた、薬物または薬物代謝産物の半減期の差異であることもできる。薬物または薬物代謝産物の量または半減期の差異を使用して、非応答者および応答者を同定するための新規なバイオシグネチャーを形成することができる。

10

【0518】

本明細書に記載される方法および組成物に有用な小胞は、その物理化学的特徴を使用することによって発見することができる。たとえば、小胞は、たとえば直径30~120nmの公知の範囲の生物学的物質をろ過することにより、そのサイズごとに発見することができる。サイズベースの発見法、たとえば分画遠心分離法、スクロース勾配遠心分離法またはろ過が小胞の単離のために使用されている。

20

【0519】

小胞は、その分子成分によって発見することができる。分子性質ベースの発見法は、小胞と結合した分子を認識する抗体を使用する免疫学的単離を含むが、これに限定されない。たとえば、小胞と結合した表面分子は、MHC-II分子、CD63、CD81、LAMP-1、Rab7またはRab5を含むが、これらに限定されない。

【0520】

当技術分野において公知の様々な技術が小胞の確認および特徴決定のために適用可能である。小胞の確認および特徴決定に有用な技術は、ウェスタンブロット法、電子顕微鏡法、免疫組織化学法、免疫電子顕微鏡法、FACS（蛍光活性化細胞ソート法）、電気泳動法（一次元、二次元）、液クロマトグラフィー、質量分析法、MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析法）、ELISA、LC-MS-MSおよびnESI（ナノエレクトロスプレーイオン化法）を含むが、これらに限定されない。たとえば、米国特許第2009/0148460号は、小胞を特徴決定するためのELISA法の使用を記載している。米国特許第2009/0258379号は、生物学的流体からの膜小胞の単離を記載している。

30

【0521】

小胞を、小胞内の1種または複数種の核酸、脂質、タンパク質もしくはポリペプチド、例えば、表面タンパク質もしくはペプチド、またはタンパク質もしくはペプチドについてさらに分析することができる。液体クロマトグラフィーなどの精製法と連結した質量分析を含む様々な技法によって、候補ペプチドを同定することができる。次いで、ペプチドを単離し、その配列を配列決定によって同定することができる。小胞から単離されたペプチドの配列を明らかにするために、ペプチドの正確な質量に基づいて配列を予測するコンピュータプログラムも使用することができる。例えば、高感度および高精度のペプチド配列決定のために、LTQ-Orbitrap質量分析を使用することができる。LTQ-Orbitrap法は説明されており(Simpson et al, Expert Rev. Proteomics 6:267-283,2009)、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0522】

小胞組成物

特定のバイオシグネチャーを有する単離された小胞もまた、本明細書において提供される。単離された小胞は、上記のように、特定の細胞型に特異的な、または表現型を特徴決

50

定するための一つまたは複数のバイオマーカーまたはバイオシグネチャーを含むことができる。また、単離された小胞は、1つ以上のバイオマーカーを含むことができ、正常な細胞に由来する単離された小胞（すなわち、関心対象の表現型がない対象に由来する細胞）と比較して、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルは、単離された小胞について、より高いか、より低いか、または同一である。例えば、単離された小胞は、B7H3、PSCA、MFG-E8、Rab、STEAP、PSMA、PCSA、5T4、miR-9、miR-629、miR-141、miR-671-3p、miR-491、miR-182、miR-125a-3p、miR-324-5p、miR-148b、およびmiR-222からなる群より選択される1つ以上のバイオマーカーを含むことができ、正常な細胞に由来する小胞と比較して、単離された小胞について、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルは、より高い。単離された小胞は、この群から選択される少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、16、17、18、または19個のバイオマーカーを含むことができる。単離された小胞は、EpCam、B7H3、PSMA、PSCA、PCSA、CD63、CD59、CD81、またはCD9からなる群より選択される1つ以上のバイオマーカーをさらに含むことができる。

10

【0523】

単離された小胞を含む組成物も本明細書に提供される。該組成物は、1つ以上の単離された小胞を含むことができる。例えば、該組成物は、複数の小胞、または小胞の1つ以上の集団を含むことができる。該組成物は、小胞について実質的に濃縮することができる。例えば、該組成物は、細胞残屑、細胞、またはエキソソーム非関連性のタンパク質、ペプチド、もしくは核酸（小胞内に含有されない生体分子等）が実質的に不在であり得る。細胞残屑、細胞、またはエキソソーム非関連性のタンパク質、ペプチド、もしくは核酸は、小胞と共に生体試料中に存在し得る。組成物は、細胞残屑、細胞、またはエキソソーム非関連性のタンパク質、ペプチド、もしくは核酸（小胞内に含有されない生体分子等）が実質的に不在であり得、1つ以上の小胞に対して1つ以上の結合物質または捕捉物質を用いるような、本明細書に開示される任意の方法によって得ることができる。小胞は、重量、または質量で、全組成物の少なくとも30、40、50、60、70、80、90、95、または99%を構成することができる。組成物の小胞は、非均質または均質の小胞集団であり得る。例えば、均質の小胞集団は、1つ以上の特性または特徴が均質である小胞を含む。例えば、1つ以上の特徴は、1つ以上の同じバイオマーカー、実質的に同様もしくは同一のバイオシグネチャー、同じ細胞型に由来するか、特定の大きさの小胞、およびこれらの組み合わせからなる群より選択することができる。

20

30

【0524】

故に、幾つかの態様において、組成物は、実質的に濃縮された小胞集団を含む。組成物は、1つ以上の特性または特徴が少なくとも30、40、50、60、70、80、90、95、または99%均質である小胞集団について濃縮することができる。例えば、1つ以上の特徴は、1つ以上の同じバイオマーカー、実質的に同様もしくは同一のバイオシグネチャー、同じ細胞型に由来するか、特定の大きさの小胞、およびこれらの組み合わせからなる群より選択することができる。例えば、小胞集団は、全てが特定のバイオシグネチャーを有すること、同じバイオマーカーを有すること、同じバイオマーカーの組み合わせを有すること、または同じ細胞型に由来することによって均質であり得る。幾つかの態様において、組成物は、特異的なバイオシグネチャーを有する集団、特定の細胞に由来する集団、または両方等の、実質的に均質の小胞集団を含む。

40

【0525】

小胞集団は、1つ以上の同じバイオマーカーを含むことができる。バイオマーカーは、任意の核酸（例えば、RNAまたはDNA）、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、抗原、脂質、糖質、またはプロテオグリカン等の、任意の成分であり得る。例えば、一集団中の各小胞は、同じまたは同一の1つ以上のバイオマーカーを含むことができる。幾つかの態様において、各小胞は、同じ1、2、3、4、5、6、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、または100個のバイオマーカーを含む。

【0526】

同じまたは同一のバイオマーカーを含む小胞集団は、バイオマーカーの同じ存在もしくは

50

は不在、発現レベル、突然変異状態、または修飾を有する集団中の各小胞を指すことができる。例えば、濃縮された小胞集団は、各小胞が、同じバイオマーカーの存在、同じバイオマーカーの不在、バイオマーカーの同じ発現レベル、バイオマーカーの同じ修飾、またはバイオマーカーの同じ突然変異を有する、小胞を含むことができる。バイオマーカーの同じ発現レベルは、過小発現している、過剰発現している等の、集団中の小胞などの定量的もしくは定性的指標を指すことができるか、または参照レベルと比較して、バイオマーカーの同じ発現レベルを有することができる。

【0527】

あるいは、バイオマーカーの同じ発現レベルは、集団中の各小胞について同様であるバイオマーカー発現を示す数値であり得る。例えば、各小胞のmiRNAのコピー数、タンパク質の量、またはmRNAのレベルは、集団中の各小胞について定量的に同様であり得、したがって、各小胞の数量は、変動が適切であれば、その集団中の各々の他の小胞の量から±1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、または20%である。

【0528】

幾つかの態様において、組成物は、実質的に濃縮された小胞集団を含み、濃縮された集団中の小胞は、実質的に同様の、または同一のバイオシグネチャーを有する。バイオシグネチャーは、小胞のレベルもしくは量、小胞の半減期における変動の時間的評価、循環小胞の半減期、もしくは小胞の代謝半減期、または小胞の活性等の1つ以上の小胞の特徴を含むことができる。また、バイオシグネチャーは、本明細書に記載されるもの等のバイオマーカーの存在もしくは不在、発現レベル、突然変異状態、または修飾を含むこともできる。

【0529】

集団中の各小胞のバイオシグネチャーは、少なくとも30、40、50、60、70、80、90、95、または99%同一であり得る。幾つかの態様において、各小胞のバイオシグネチャーは、100%同一である。濃縮された集団中の各小胞のバイオシグネチャーは、同じ1、2、3、4、5、6、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、または100個の特徴を有することができる。例えば、濃縮された集団中の小胞のバイオシグネチャーは、第1のバイオマーカーの存在、第2のバイオマーカーの存在、および第3のバイオマーカー過小発現であり得る。同じ集団中の別の小胞は、同じ第1および第2のバイオマーカーの存在ならびに第3のバイオマーカーの過小発現を有し、100%同一であり得る。あるいは、同じ集団中の小胞は、同じ第1および第2のバイオマーカーを有するが、第3のバイオマーカーの過小発現を有し得ない。

【0530】

幾つかの態様において、組成物は、実質的に濃縮された小胞集団を含み、これらの小胞は、同じ細胞型に由来する。例えば、これらの小胞は全て、特定の組織の細胞、関心対象の特定の腫瘍からの細胞、もしくは関心対象の罹患組織、循環腫瘍細胞、または母体もしくは胎児起源の細胞に由来し得る。該小胞は全て、腫瘍細胞に由来し得る。これらの小胞は全て、同じ組織または細胞に、例えば非限定的に肺、脾臓、胃、腸、膀胱、腎臓、卵巣、睾丸、皮膚、結腸直腸、乳房、前立腺、脳、食道、肝臓、胎盤、または胎児の細胞に、由来し得る。

【0531】

また、実質的に濃縮された小胞集団を含む組成物は、特定の大きさからなる小胞を含むこともできる。例えば、これらの小胞は全て、約10、20、または30nmを超える直径を有することができる。これらは、約10~1000nm、例えば約30~800nm、約30~200nm、または約30~100nmの直径を有し得る。幾つかの態様において、これらの小胞は全て、10,000nm、1,000nm、800nm、500nm、200nm、100nm、または50nm未満の直径を有し得る。

【0532】

1つ以上の特徴が均質である小胞集団は、組成物の全小胞集団の少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、95、または99%を構成することができる。幾つかの態様において、実質的に濃縮された小胞集団を含む組成物は、組成物が由来した生体試料中の小胞濃度と

10

20

30

40

50

比較して、少なくとも2、3、4、5、10、20、25、50、100、250、500、または1000倍の小胞濃度を含む。さらに他の態様において、該組成物は、第2の濃縮された小胞集団をさらに含むことができ、該小胞集団は、本明細書に記載される、1つ以上の特徴が少なくとも30%均質である。

【0533】

多重解析を使用して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10個の小胞集団等の1個を超える小胞集団について実質的に濃縮された組成物を得ることができる。各々の実質的に濃縮された小胞集団は、重量または質量で、該組成物の少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、または49%を構成することができる。幾つかの態様において、実質的に濃縮された小胞集団は、重量または質量で、該組成物の少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、95、または99%を構成する。

【0534】

実質的に濃縮された小胞集団は、本明細書に開示される、1つ以上の方法、プロセス、またはシステムを用いることによって得ることができる。例えば、小胞の2つ以上のバイオマーカーを標的とする2つ以上の結合物質を用いるような、小胞の1つ以上のバイオマーカーに対して1つ以上の結合物質を用いることによって、試料からの小胞集団の単離を行うことができる。1つ以上の捕捉物質を使用して、実質的に濃縮された小胞集団を得ることができる。1つ以上の検出物質を使用して、実質的に濃縮された小胞集団を同定することができる。

【0535】

一つの態様において、特定のバイオシグネチャーを有する小胞集団は、バイオシグネチャーのバイオマーカーに対して1つ以上の結合物質を用いることによって得られる。特定のバイオシグネチャーを有する実質的に濃縮された小胞集団を含む組成物をもたらす小胞を単離することができる。別の態様において、関心対象の特定のバイオシグネチャーを有する小胞集団は、関心対象のバイオシグネチャーの成分ではないバイオマーカーに対して1つ以上の結合物質を用いることによって得ることができる。故に、これらの結合物質を使用して、関心対象のバイオシグネチャーを有さない小胞を除去することができ、得られる組成物は、関心対象の特定のバイオシグネチャーを有する小胞集団について実質的に濃縮される。得られる組成物は、結合物質のバイオマーカーを含む小胞が実質的に不在であり得る。

【0536】

参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号。

【0537】

検出システムおよびキット

小胞について1つ以上のバイオシグネチャーを決定するように構成されている検出システムも提供される。検出システムは、非均質の小胞集団または1つ以上の均質の小胞集団を検出するために使用することができる。検出システムは、複数の小胞を検出するように構成することができ、該複数の小胞の少なくとも1つのサブセットは、該複数の小胞の別のサブセットとは異なるバイオシグネチャーを含む。検出システムは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100個の異なる小胞のサブセットを検出し、該小胞の各サブセットは、異なるバイオシグネチャーを含む。例えば、本明細書に開示される1つ以上の方法、プロセス、および組成物を用いるような、検出システムは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100個の異なる小胞集団を検出するために使用することができる。

【0538】

検出システムは、1つ以上の小胞に対して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、1000、2500、5000、7500、10,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、750

,000、または1,000,000個の異なるバイオマーカーを評価するように設定することができる。幾つかの態様において、1つ以上のバイオマーカーは、表3~5のいずれかから選択されるか、本明細書に開示される通りである。検出システムは、特定の起始細胞からの小胞等の特定の小胞集団を評価する、または小胞の複数個の特定の集団を評価するように設定することができ、ここで各小胞集団は、特定のバイオシグネチャーを有する。

【0539】

検出システムは、低密度検出システムまたは高密度検出システムであり得る。例えば、低密度検出システムは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なる小胞集団を検出することができる一方、高密度検出システムは、少なくとも約15、20、25、50、または100個の異なる小胞集団を検出することができる。別の態様において、低密度検出システムは、最大約100、200、300、400、または500個の異なるバイオマーカーを検出することができる一方、高密度検出システムは、少なくとも約750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9,000、10,000、15,000、20,000、25,000、50,000、または100,000個の異なるバイオマーカーを検出することができる。さらに別の態様において、低密度検出システムは、最大約100、200、300、400、または500個の異なるバイオシグネチャーまたはバイオマーカーの組み合わせを検出することができる一方、高密度検出システムは、少なくとも約750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9,000、10,000、15,000、20,000、25,000、50,000、または100,000個のバイオシグネチャーまたはバイオマーカーの組み合わせを検出することができる。

【0540】

検出システムは、小胞に選択的にハイブリダイズするプローブを含むことができる。検出システムは、小胞を検出するために複数のプローブを含むことができる。幾つかの態様において、非均質の小胞集団中の小胞の量を検出するために、複数のプローブが使用される。さらに他の態様において、均質の小胞集団を検出するために、複数のプローブが使用される。複数のプローブは、小胞の少なくとも2つの異なるサブセットを単離する、または検出するために使用することができ、ここで小胞の各サブセットは、異なるバイオシグネチャーを含む。

【0541】

本明細書に開示される1つ以上の方法、プロセス、および組成物を用いるような、検出システムは、本明細書に開示される1つ以上の方法、プロセス、および組成物を用いるような、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100個の異なる小胞のサブセットを検出する、または単離するように構成される複数のプローブを含むことができ、小胞の各サブセットは、異なるバイオシグネチャーを含む。

【0542】

例えば、検出システムは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100個の異なる小胞集団を検出するように構成される複数のプローブを含むことができる。検出システムは、1つ以上の小胞に対して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、1000、2500、5000、7500、10,000、100,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、750,000、または1,000,000個の異なるバイオマーカーに選択的にハイブリダイズするように構成される複数のプローブを含むことができる。幾つかの態様において、1つ以上のバイオマーカーは、表3~5のいずれかから選択されるか、または本明細書に開示される通りである。複数のプローブを、特定の起始細胞からの小胞等の特定の小胞集団を評価する、または小胞の複数個の特定の集団を評価するように構成することができ、各小胞集団は、特定のバイオシグネチャーを有する。

【0543】

検出システムは、小胞を検出するためのプローブを含む低密度検出システムまたは高密度検出システムであり得る。例えば、低密度検出システムは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なる小胞集団を検出するためにプローブを含むことができる一方

、高密度検出システムは、少なくとも約15、20、25、50、または100個の異なる小胞集団を検出するためにプローブを含むことができる。別の態様において、低密度検出システムは、最大約100、200、300、400、または500個の異なるバイオマーカーを検出するためにプローブを含むことができる一方、高密度検出システムは、少なくとも約750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9,000、10,000、15,000、20,000、25,000、50,000、または100,000個の異なるバイオマーカーを検出するためにプローブを含むことができる。さらに別の態様において、低密度検出システムは、最大約100、200、300、400、または500個の異なるバイオシグネチャーまたはバイオマーカーの組み合わせを検出するためにプローブを含むことができる一方、高密度検出システムは、少なくとも約750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9,000、10,000、15,000、20,000、25,000、50,000、または100,000個のバイオシグネチャーまたはバイオマーカーの組み合わせを検出するためにプローブを含むことができる。

10

【0544】

プローブは、特定の小胞集団、例えば、特定のバイオシグネチャーを有する小胞を検出するために特異的であり得、上記の通りである。前立腺固有の小胞を検出するための複数のプローブも提供される。複数のプローブは、表3~5のバイオマーカーのうちの1つまたは複数を検出するためのプローブを含むことができる。複数のプローブはまた、表3~5のバイオマーカーのうちの1つまたは複数を検出するための1種または複数種のプローブを含んでもよい。

【0545】

小胞の一つまたは複数のmiRNAを検出するための複数のプローブは、以下のmiRNA:miR-9、miR-629、miR-141、miR-671-3p、miR-491、miR-182、miR-125a-3p、miR-324-5p、miR-148bおよびmiR-222の一つまたは複数を検出するためのプローブを含むことができる。もう一つの態様において、複数のプローブは、EpCam、CD9、PCSA、CD63、CD81、PSMA、B7H3、PSCA、ICAM、STEAPおよびEGFRを検出するための一つまたは複数のプローブを含む。いくつかの態様において、複数のプローブは、EpCam、CD9、PCSA、CD63、CD81、PSMAおよびB7H3を検出するための一つまたは複数のプローブを含む。他の態様において、複数のプローブは、EpCam、CD9、PCSA、CD63、CD81、PSMA、B7H3、PSCA、ICAM、STEAPおよびEGFRを検出するための一つまたは複数のプローブを含む。さらに別の態様において、複数のプローブのサブセットは、EpCam、CD9、PCSA、CD63、CD81、PSMA、B7H3、PSCA、ICAM、STEAPおよびEGFRの一つまたは複数に対する捕捉物質であり、別のサブセットは、CD9、CD63およびCD81の一つまたは複数を検出するためのプローブである。複数のプローブはまた、r miR-92a-2*、miR-147、miR-574-5pまたはそれらの組み合わせを検出するための一つまたは複数のプローブを含むこともできる。複数のプローブはまた、miR-548c-5p、miR-362-3p、miR-422a、miR-597、miR-429、miR-200a、miR-200bまたはそれらの任意の組み合わせを検出するための一つまたは複数のプローブを含むこともできる。複数のプローブはまた、EpCam、CKおよびCD45を検出するための一つまたは複数のプローブを含むこともできる。いくつかの態様において、一つまたは複数のプローブは捕捉物質であることができる。もう一つの態様において、プローブは検出物質であることもできる。さらに別の態様において、複数のプローブは捕捉物質および検出物質を含む。

30

40

【0546】

捕捉物質などのプローブは、アレイまたはビーズ等の固体基体に付着され得る。あるいは、検出物質などのプローブは付着されない。検出システムは、上記のような、アレイベースのシステム、配列決定システム、PCRベースのシステム、またはビーズベースのシステムであり得る。検出システムはまた、上記のような、マイクロ流体工学デバイスであり得る。

【0547】

検出システムは、キットの一部であり得る。あるいは、キットは、本明細書に記載される、1つ以上のプローブセット、または複数のプローブを含み得る。キットは、1種の小胞、または非均質集団中の小胞等の複数種の小胞を検出するためにプローブを含むことがで

50

きる。キットは、均質の小胞集団を検出するためにプローブを含み得る。例えば、キットは、特定の起始細胞小胞、または同じ特定のバイオシグネチャーを有する小胞集団を検出するためにプローブを含み得る。

【0548】

コンピュータシステム

例えば、1つ以上のバイオマーカーの量、有無を決定することによって、分子的特徴について小胞をアッセイすることができる。作成されたデータを使用して、バイオシグネチャーを生成することができ、図3に示されるような、コンピュータシステムによって保存および解析することができる。1つ以上の表現型を有するバイオシグネチャーのアッセイまたは相関は、コンピュータ実行可能論理を用いること等によって、コンピュータシステムによって行うこともできる。

10

【0549】

図3に示されるような、コンピュータシステムを使用して、解析後のデータおよび結果を送信することができる。したがって、図3は、小胞からの結果が解析されこの解析が報告または生成され得る代表例の論理デバイスを示すブロック図である。図3は、小胞から生成されたデータを受信および保存し、1つ以上のバイオシグネチャーを生成するためのデータを解析し、1つ以上のバイオシグネチャーまたは表現型の特徴決定の報告書を生成するためのコンピュータシステム（またはデジタルデバイス）800を示す。また、コンピュータシステムは、生成したバイオシグネチャーの比較および解析、ならびにその結果を送信することもできる。あるいは、コンピュータシステムは、ネットワーク上のデータの送信を通して小胞解析の生データを受信し、解析を行うことができる。

20

【0550】

コンピュータシステム800は、場合によっては固定媒体812を有するサーバ809に接続されることができる媒体811および／またはネットワークポート805からの命令を読むことができる論理装置として理解することができる。図3に示すシステムは、CPU801、ディスクドライブ803、任意選択の入力装置、たとえばキーボード815および／またはマウス816ならびに任意選択のモニター807を含む。ローカルまたは遠隔場所にあるサーバ809への指示された通信媒体を介してデータ通信を達成することができる。通信媒体は、データを送信および／または受信する任意の手段を含むことができる。たとえば、通信媒体は、ネットワーク接続、ワイヤレス接続またはインターネット接続であることができる。そのような接続は、ワールドワイドウェブを介する通信を提供することができる。本発明に関連するデータは、関係者822による受信および／または閲覧のために、そのようなネットワークまたは接続を介して送信できると考えられる。受信する関係者822は、個人、健康管理提供者または健康管理管理者であることができるが、これらに限定されない。したがって、試験結果に関する情報およびデータは、世界中どこで作成することもでき、異なる場所に送信することができる。たとえば、アッセイが異なる建物、町、州、国、大陸または海外で実施される場合でも、上記のように、試験結果に関する情報およびデータを送信可能な形態で生成し、投げることができる。したがって、送信可能な形態の試験結果は、米国内の受信する関係者822へとインポートすることができる。したがって、本発明はまた、個人からの一つまたは複数の試料の診断に関する、送信可能な形態の情報を作成する方法を包含する。本方法は、（1）本発明の方法にしたがって試料から診断、予後判定、セラノーシスなどを決定する工程、および（2）決定工程の結果を送信可能な形態に具現化する工程を含む。送信可能な形態は作成方法の作成物である。一つの態様において、コンピュータ読み取り可能な媒体は、バイオシグネチャーのような生物学的試料の解析の結果の送信に適した媒体を含む。媒体は、小胞に関する結果、たとえば対象のバイオシグネチャーを含むことができ、そのような結果は、本明細書に記載される方法を使用して導出される。

30

40

【実施例】

【0551】

実施例1: 前立腺癌細胞株からの小胞の精製

50

前立腺癌細胞株を20% FBS（ウシ胎仔血清）および1% P/S/Gを含有する培養培地中で3~4日間培養する。次いで、細胞は、400xg、4℃で、10分間、予め回転させる。上清を保持し、2000xg、4℃で、20分間、遠心分離する。小胞を含有する上清は、Millipore Centricon Plus-70 (Cat #UFC710008 Fisher) を用いて濃縮することができる。

【0552】

Centriconは、1000xg、室温で、3分間、30mlのPBSで予め洗浄する。次に、15~70mlの事前回転させた細胞培養上清を濃縮カップに注ぎ入れ、1000xg、室温で、30分間、スイングバケットアダプタ (Fisher Cat # 75-008-144) 中で遠心分離する。

【0553】

収集カップ中のフロースルーを注ぎ出す。任意の追加の上清を用いて、濃縮カップ中の量を60mlに戻す。濃縮カップを、1000xg、室温で、30分間、遠心分離して、細胞上清を濃縮する。

【0554】

70mlのPBSを添加することによって濃縮カップを洗浄し、約2ml残留するまで、1000xgで、30~60分間遠心分離する。濃縮カップを小さな試料カップに反転させ、4℃で、1分間遠心分離することによって、フィルタから小胞を取り出す。PBSを用いて量を25mlにする。小胞を直ちに濃縮し、30% ショ糖クッション (Sucrose Cushion) に添加する。

【0555】

クッションを作製するために、4mlのトリス/30% ショ糖/D20溶液 (30g プロテアーゼフリーのショ糖、2.4g トリスベース、50ml D20、10N NCL小滴を用いてpHを7.4に調節し、D20を用いて100mlまで量を調節し、0.22umフィルタを通過させることにより滅菌する) を、30ml V字底薄壁の超遠心分離管の底部に充填させる。希釈した25mlの濃縮小胞を、境界面を乱すことなく、ショ糖クッションの上にそっと添加し、100,000xg、4℃で、75分間遠心分離する。ショ糖クッションの上にある約25mlを、10ml ピペットで慎重に除去し、約3.5mlの小胞を、先端先細トランスファーピペット (SAMCO 233) で収集し、未使用の超遠心分離管に移し、30ml PBSを添加する。チューブは、100,000xg、4℃で、70分間遠心分離する。上清を慎重に注ぎ出す。沈殿物は、200ul PBS中で再懸濁し、4℃で保管するか、またはアッセイのために使用することができる。BCAアッセイ (1:2) を使用して、タンパク質含有量を決定することができ、ウェスタンブロット法または電子顕微鏡検査を使用して、小胞精製を決定することができる。

【0556】

実施例2: VCaPおよび22Rv1からの小胞の精製

ヒト前立腺癌異種移植片 (CWR22R) に由来する、ヒト前立腺癌細胞株である、脊椎-前立腺癌 (VCaP) および22Rv1からの小胞を、まず、等量のPBS (1ml) で血清を希釈することによる超遠心分離によって、収集した。希釈流体を15ml ファルコンチューブに移し、2000xg、4℃で、30分間遠心分離した。上清 (約2ml) を超遠心分離管 5.0ml PA薄壁チューブ (Sorvall # 03127) に移し、12,000xg、4℃で、45分間遠心分離した。

【0557】

上清 (約2ml) を、新しい5.0ml 超遠心分離管に移し、2.5ml PBSを添加して最大容量まで充填し、110,000xg、4℃で、90分間遠心分離した。沈殿物を乱すことなく、上清を注ぎ出し、沈殿物を、1ml PBSで再懸濁した。チューブは、4.5mlのPBSを添加して、最大容量まで充填し、110,000xg、4℃で、70分間遠心分離した。

【0558】

沈殿物を乱すことなく、上清を注ぎ出し、さらに1mlのPBSを添加し沈殿物を洗浄した。量は、4.5mlのPBSを添加して、最大容量まで増加させ、110,000xg、4℃で、70分間遠心分離した。チューブ下部のPBSが約100 µlになるまで、P-1000ピペットで上清を除去した。残留部分の約90 µlをP-200ピペットで除去し、沈殿物を、約10 µlの残留しているPBSを用い、P-20ピペットを用いて静かに微小遠心管に取ることによって、収集した。残存沈殿物を、さらに5 µlの未使用のPBSを用いて乾燥チューブの底部から洗浄し、微小遠心管に収集し、500 µg/mlの濃度まで、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で懸濁した。

【0559】

実施例3: 血漿収集および小胞精製

標準的な静脈穿刺により、7ml K2-EDTAチューブ中に血液を収集する。4℃の遠心分離機中で、400gで、10分間、試料を回転させ、血液細胞（SORVALL Legend RT+遠心分離）から血漿を分離する。15ml ファルコン遠心分離チューブに慎重にピペットで取ることによって、上清（血漿）を移す。2,000gで20分間、血漿を回転させ、上清を収集する。

【0560】

保存のためには、約1mlの血漿（上清）をcryovialにアリコートし、ドライアイス上におき、それらを冷凍し、-80℃で保存する。試料が-80℃で保管された場合、小胞を精製する前に、冷水槽中で5分間、試料を解凍する。手で回転させて試料を混合し、不溶性物質を消失させる。

10

【0561】

第1の事前回転において、血漿を等量のPBSで希釈する（例えば、約2mlの血漿を2mlのPBSで希釈する）。希釈流体を15ml ファルコンチューブに移し、2000xg、4℃で、30分間遠心分離する。

【0562】

第2の事前回転に関しては、上清（約4ml）を50ml ファルコンチューブに慎重に移し、12,000xg、4℃で、45分間、Sorval中で遠心分離する。

【0563】

単離工程において、P1000ピペットを用いて、上清（約2ml）を5.0ml 超遠心分離PA薄壁チューブ（Sorvall #03127）に慎重に移し、さらに0.5mlのPBSを用いて最大容量まで充填する。チューブは、110,000xg、4℃で、90分間遠心分離する。

20

【0564】

第1の洗浄において、沈殿物を乱すことなく、上清を注ぎ出す。沈殿物は、1ml PBSで再懸濁または洗浄し、さらに4.5mlのPBSを添加して、最大容量まで管を充填する。チューブは、110,000xg、4℃で、70分間遠心分離する。同じ工程を繰り返すことによって、第2の洗浄を行う。

【0565】

チューブ下部のPBSが約100 μ lになるまで、P-1000ピペットで上清を除去することによって、小胞を収集する。約90 μ lのPBSを、P-200ピペットで除去および廃棄する。P-20ピペットを用いて静かに取ることによって、沈殿物および残留しているPBSを収集する。残存沈殿物を、さらに5 μ lの未使用のPBSを用いて乾燥チューブの底部から洗浄し、微小遠心管に収集する。

30

【0566】

実施例4: 抗体が結合したミクロスフェアおよび直接結合した抗体を用いた小胞の分析

この実施例は、抗体が結合した粒子の使用を示し、該抗体は、小胞を捕捉する。例えば、図2Aを参照のこと。検出抗体である、ある抗体は、標識が結合しており、捕捉した小胞上のバイオマーカーを検出するために使用される。

【0567】

まず、抗体が結合したミクロスフェアセット（Luminex, Austin, TX）を選択する。ミクロスフェアセットは、種々の抗体を含むことができ、ひいては、多重化を可能にする。ミクロスフェアを、ボルテックスで再懸濁し、約20秒間、超音波処理する。作業用のミクロスフェア混合物は、結合したミクロスフェアの原液を、Startblock（Pierce（37538））中の各セットのミクロスフェア100個/ μ Lの最終濃度まで希釈することによって調製する。各ウェルに対し、50 μ Lの作業用のミクロスフェア混合物を使用する。PBS-1% BSAあるいはPBS-BN（PBS、1% BSA、0.05% アジド、pH7.4）のいずれかが、アッセイ緩衝液として使用され得る。

40

【0568】

1.2 μ m ミリポアフィルタプレートを、100 μ l/ウェルのPBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））で事前に湿らせ、真空マニホールドによって吸

50

引する。50 μ lの作業用のミクロスフェア混合物のアリコート、フィルタプレート（ミリポアマルチスクリーン（Millipore Multiscreen）HTS（MSBVN1250））の適切なウェルに分注する。標準または試料の50 μ lのアリコートを、適切なウェルに分注する。フィルタプレートを覆い、プレート振とう器上で、室温で60分間培養する。プレートをシーラーで覆い、オービタルシェーカー上に置き、ビーズを再懸濁するために、15～30秒間、900に設定する。これに続いて、培養期間中、速度を550に設定する。

【0569】

上清は、真空マニホールドによって吸引する（全ての吸引工程において5インチ未満のHg）。各ウェルは、100 μ lのPBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））で2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。ミクロスフェアは、50 μ LのPBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））中で再懸濁される。PE結合検出抗体は、PBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））中で4 μ g/mL（または適切な濃度）まで希釈される。（注記：各反応に対し、50 μ Lの希釈した検出抗体が必要とされる。）50 μ lの希釈した検出抗体のアリコートを、各ウェルに添加する。フィルタプレートを覆い、プレート振とう器上で、室温で60分間培養する。フィルタプレートをシーラーで覆い、オービタルシェーカー上に置き、ビーズを再懸濁するために、15～30秒間、900に設定する。これに続いて、培養期間中、速度を550に設定する。上清は、真空マニホールドによって吸引する。ウェルは、100 μ lのPBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））で2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。ミクロスフェアは、100 μ lのPBS-1% BSA（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））中で再懸濁される。システムマニュアルに従って、Luminexアナライザ上でミクロスフェアを分析する。

【0570】

実施例5:抗体が結合したミクロスフェアおよびビオチン化抗体を用いた小胞の分析

本実施例は、抗体が結合している粒子の使用を示し、該抗体は、小胞を捕捉する。検出抗体である、ある抗体を、ビオチン化する。ストレプトアビジンに結合した標識は、バイオマーカーを検出するために使用される。

【0571】

まず、適切な抗体が結合したミクロスフェアセット（Luminex, Austin, TX）を選択する。ミクロスフェアを、ボルテックスで再懸濁し、約20秒間、超音波処理する。作業用のミクロスフェア混合物は、結合したミクロスフェアの原液を、Startblock（Pierce（37538））中の各セットのミクロスフェア50個/ μ Lの最終濃度まで希釈することによって調製される。（注記：各ウェルに対し、50 μ Lの作業用のミクロスフェア混合物が必要とされる。）Start Block中のビーズは、30分間および1時間以下ブロックしなければならない。

【0572】

1.2 μ m ミリポアフィルタプレートを、100 μ l/ウェルのPBS-1% BSA+アジド（PBS-BN）（Sigma（P3688-10PAK+0.05% Naアジド（S8032）））で事前に湿らせ、真空マニホールドによって吸引する。50 μ lの作業用のミクロスフェア混合物のアリコートを、フィルタプレート（ミリポアマルチスクリーン（Millipore Multiscreen）HTS（MSBVN1250））の適切なウェルに分注する。標準または試料の50 μ lのアリコートを、適切なウェルに分注する。フィルタプレートをシールで覆い、プレート振とう器上で、室温で60分間培養する。覆ったフィルタプレートをオービタルシェーカー上に置き、ビーズを再懸濁するために、15～30秒間、900に設定する。これに続いて、培養期間中、速度を550に設定する。

【0573】

上清を真空マニホールドによって吸引する（すべての吸引工程において5インチHg未満）。吸引は、Pall真空マニホールドによって実施することができる。プレートをマニホールド上に配置したとき、バルブは全オフ位置にセットする。ゆっくりと吸引するために、弁を開いて流体をウェルから引き込む。100 μ lの試料およびビーズをウェルから完全に吸引するには約3秒を要する。試料を抜き取った後、マニホールド上のページボタンを押し

てプレートから残留真空圧を解除する。

【0574】

各ウェルをPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 100 μ lで2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。ミク로스フェアをPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 50 μ l中に再懸濁させる。

【0575】

ビオチン化検出抗体をPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 中4 μ g/mLに希釈する。(注:反応ごとに希釈検出抗体50 μ lが必要である)。希釈検出抗体の50 μ lアリコートを各ウェルに加える。

10

【0576】

フィルタプレートをシーラーで覆い、プレートシェーカ上、室温で60分間インキュベートする。プレートをオービタルシェーカーに載せ、900で15~30秒にセットしてビーズを再懸濁させる。その後、インキュベーション期間中、速度を550にセットする。

【0577】

上清を真空マニホールドによって吸引する。吸引は、Pall真空マニホールドによって実施することができる。プレートをマニホールド上に配置したとき、バルブは全オフ位置にセットする。ゆっくりと吸引するために、バルブを開いて流体をウェルから引き込む。100 μ lの試料およびビーズをウェルから完全に吸引するには約3秒を要する。すべての試料を抜き取った後、マニホールド上のパージボタンを押してプレートから残留真空圧を解除する。

20

【0578】

各ウェルをPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 100 μ lで2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。ミク로스フェアをPBS-1% BSA (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 50 μ l中に再懸濁させる。

【0579】

ストレプトアビジン-R-フィコエリスリンレポーター (Molecular Probes 1mg/ml) をPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) 中4 μ g/mLに希釈する。希釈したストレプトアビジン-R-フィコエリスリン50 μ lを各反応に使用した。希釈したストレプトアビジン-R-フィコエリスリンの50 μ lアリコートを各ウェルに加える。

30

【0580】

フィルタプレートをシーラーで覆い、プレートシェーカ上、室温で60分間インキュベートする。プレートをオービタルシェーカーに載せ、900で15~30秒にセットしてビーズを再懸濁させる。その後、インキュベーション期間中、速度を550にセットする。

【0581】

上清を真空マニホールドによって吸引する。吸引は、Pall真空マニホールドによって実施することができる。プレートをマニホールド上に配置したとき、バルブは全オフ位置にセットする。ゆっくりと吸引するために、バルブを開いて流体をウェルから引き込む。100 μ lの試料およびビーズをウェルから完全に吸引するには約3秒を要する。すべての試料を抜き取った後、マニホールド上のパージボタンを押してプレートから残留真空圧を解除する。

40

【0582】

各ウェルをPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 100 μ lで2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。ミク로스フェアをPBS-1% BSA+アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% アジ化Na (S8032))) 100 μ l中に再懸濁させ、Luminexアナライザ上、システムマニュアルにしたがって分析する。

【0583】

実施例6: 血漿からの小胞濃縮

50

装備品:Pall life sciences Acrodisc、25mmシリンジフィルタ、w/1.2 μ m Versapor膜（無菌）付き、部品番号:4190、Pierce濃縮器、7ml/MWCO（分子量カットオフ）150K、部品番号:89922、BDシリンジフィルタ、10ml、部品番号:305482、Sorvall Legend RT Plus シリーズベンチトップ遠心器、w 15mlスイングバケットローター付き、PBS、pH7.4、Sigmaカタログ番号P3813-10PAK、無菌分子グレード水中に調製、コポリマー1.7ml遠心管、USA Scientificカタログ番号1415-2500。試薬に使用した水は無菌ろ過分子グレード水（Sigma、カタログ番号W4502）である。患者血漿の取り扱いバイオセーフティーフード中で実施される。

【0584】

手順:

1. 血漿試料のろ過手順

- 1.1 血漿試料を -80°C （ $-65^{\circ}\text{C} \sim -85^{\circ}\text{C}$ ）フリーザから取り出す。
- 1.2 室温水中で試料を解凍する（10～15分）。
- 1.3 必要な数をケースから取り出すことによってシリンジおよびフィルタを準備する。
- 1.4 プランジャーを引いて無菌分子グレード水4mLをシリンジの中に引き込む。1.2 μ mフィルタをシリンジ先端に取り付け、内容物をフィルタに通しながら7ml/MWCO 150KのPierceカラムに装填する。
- 1.5 カラムにふたをし、カラムをスイングバケット遠心器に入れ、Sorvall Legend RT plus遠心器中、 $1000 \times g$ および 20°C （ $16^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ ）で4分間スピンする。
- 1.6 スピン中、フィルタをシリンジから分解する。そして、プランジャーをシリンジから取り外す。
- 1.7 流体を管から捨て、カラムをペーパータオル上でやさしくたたいて残留水を除去する。
- 1.8 すべての血漿試料の出発量を計測し、記録する。 $900 \mu\text{l}$ 未満の量の試料は処理しなくてもよい。
- 1.9 空のシリンジおよびフィルタを空のPierceカラムに載せる。シリンジの開口端に1 $\times$ PBS 5.2mlを充填し、血漿をPBS中で3～4回ピペットで混合する。
- 1.10 シリンジのプランジャーを元に戻し、シリンジの内容物がフィルタを通過しながらPierceカラムに装填されるまでプランジャーをゆっくりと押す。内容物はフィルタを通過して滴下するはずである。

【0585】

2. 微小胞濃縮遠心分離プロトコール

- 2.1 7ml/MWCO 150KのPierceカラムを $2000 \times g$ および 20°C （ $16^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ ）で60分間または量が250～300 μL に減るまでスピンする。必要ならば、さらに15分きざみでスピンして、必要な量に到達させる。
- 2.2 スピンが終了すると、カラム15 $\times$ 上でピペットで混合し（気泡発生を避ける）、量（300 μL 以下）を抜き取り、新たな1.7mlコポリマー管に移す。
- 2.3 血漿濃縮物の最終量は血漿の初期量に依存する。元の血漿量が1mlであるならば、血漿は300 μl まで濃縮される。元の血漿量が1ml未満であるならば、濃縮物の量はその比率と合致すべきである。たとえば、元の量が900 μl であるならば、濃縮物の量は270 μl である。従うべき式は $x = (y/1000) * 300$ である（式中、 x は濃縮物の最終量であり、 y は血漿の初期量である）。
- 2.4 試料量を記録し、1 $\times$ PBSを試料に加えて最終試料量を構成する。
- 2.5 濃縮された微小胞を 4°C （ $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ）で貯蔵する。

【0586】

計算:

1. 濃縮血漿試料の最終量

$x = (y/1000) * 300$ （式中、 x は濃縮物の最終量であり、 y は血漿の初期量である）。

【0587】

実施例7:磁性ビーズを使用する小胞の捕捉

10

20

30

40

50

実施例2に記載されるように単離された小胞を使用する。小胞約40 μ lを、EpCam抗体コートされたDynalビーズ (Invitrogen, Carlsbad, CA) 約5 μ g (約50 μ l) およびスターティングブロック50 μ lとともにインキュベートする。小胞およびビーズを、振とうインキュベータ中、振とうしながら45°Cで2時間インキュベートする。Dynalビーズを含む管を磁気セパレータに1分間載せ、上清を除去する。ビーズを2回洗浄し、そのたびに上清を除去する。ビーズを2回洗浄し、そのたびに上清を除去する。

【0588】

実施例8: 小胞中のmRNA転写物の検出

Qiagen miRneasy (商標) キット (カタログ番号217061) を製造者の指示にしたがって使用して、実施例7のビーズ結合小胞からRNAを単離した。

10

【0589】

小胞をQIAzol (商標) 溶解試薬 (Qiagenカタログ番号79306) 中でホモジナイズする。クロロホルムの添加ののち、ホモジネートを遠心分離法によって水相と有機相とに分離する。RNAが上の水相に分配され、DNAが中間相に分配され、タンパク質が下の有機相または中間層に分配される。上の水相を抽出し、エタノールを加えて、18ヌクレオチド (nt) から上のすべてのRNA分子にとって適切な結合条件を提供する。そして、試料をRNeasy (商標) ミニスピンカラムに適用すると、全RNAが膜に結合し、フェノールおよび他の汚染物が効率的に洗い落とされる。そして、高品質RNAがRNaseフリー水中に溶離する。

【0590】

VCAPビーズ捕捉小胞からのRNAをTaqman TMRSS:ERG融合転写物アッセイ (Kirsten D. Mertz et al. Neoplasia. 2007 March; 9(3): 200-206) によって計測した。22Rv1ビーズ捕捉小胞からのRNAをTaqman SPINK1転写物アッセイ (Scott A. Tomlins et al. Cancer Cell 2008 June 13(6):519-528) によって計測した。また、両セットの小胞RNAに関してGAPDH転写物 (対照転写物) を計測した。

20

【0591】

より高いCT値がより低い転写物発現を示す。サイクル閾値 (CT) における一つの変化は2倍の変化に等しく、三つのCT差は4倍の変化に等しいなどであり、それは、 $2^{\Delta CT1 - CT2}$ によって算出することができる。この実験は、融合転写物TMRSS:ERGおよびIgG2陰性対照ビーズによって捕捉された等価物の発現のCTの差を示す (図5)。22RV1小胞中のSPINK1転写物の同じ比較は、70.5の変化倍率の場合で6.14のCT差を示した。GAPDHでの結果も同様であった (示さず)。

30

【0592】

実施例9: 対象からの血清試料の取得

対象 (健康な対象および癌の対象) から血液をEDTA管、クエン酸管または10ml Vacutainer SST plus血液捕集管 (BD367985またはBD366643、BD Biosciences) 中に捕集する。捕集から2時間以内に血漿単離のために血液を処理する。

【0593】

試料を室温で最低30分間、最大2時間放置する。1,000~1,300 $\times$ gおよび4°Cで15~20分間の遠心分離によって凝塊の分離を達成する。血清を取り出し、500 μ lアリコートとして500~750 μ lクライオチューブ中に分注する。標本を-80°Cで貯蔵する。

40

【0594】

所与の状況において、引き込まれる血液の量は約20~約90mlの範囲であることができる。いくつかのEDTA管からの血液を溜め、RNaseフリー/DNaseフリー50ml円錐管 (Greiner) に移し、Hettich Rotanta 460Rベンチトップ遠心器中、1,200 $\times$ gおよび室温で10分間遠心分離する。ペレットを乱さないようにペレットの上に0.5cmの一定高さの血漿上清を残しながら血漿を新鮮な管に移す。血漿を分割し、各アリコートの間で転倒させて混合し、-80°Cで貯蔵する。

【0595】

実施例10: ヒト血漿および血清試料からのRNA単離

ヒト血漿または血清400 μ lを氷上で解凍し、等量の2 $\times$ 変性溶液 (Ambion) によって溶

50

解する。試料が等しい量の酸フェノールクロロホルム（Ambionキットによって供給される）によって2回抽出されるように変更された液体試料のための製造者のプロトコールにしたがってmirVana PARISキット（Ambion）を使用してRNAを単離する。Ambion溶離溶液105 μ lを製造者のプロトコールにしたがって用いてRNAを溶離させる。各カラムから回収される溶離物の平均量は約80 μ lである。

【0596】

また、mirVana PARIS（Ambion）プロトコールのスケールアップバージョンを使用する。血漿10mlを氷上で解凍し、二つの5mlアリコート管を50ml管に移し、等量のmirVana PARIS 2×変性溶液で希釈し、30秒間ボルテックスすることによって徹底的に混合し、氷上で5分間インキュベートする。そして、等量（10ml）の酸／フェノール／クロロホルム（Ambion）を各アリコートに加える。得られた溶液を1分間ボルテックスし、JA17ローター中、8,000rpmおよび20℃で5分間スピンする。酸／フェノール／クロロホルム抽出を3回繰り返す。得られた水性量を100%分子グレードエタノール1.25容量部と徹底的に混合し、700 μ lアリコートを順次、mirVana PARISカラムに通す。製造者のプロトコールにしたがってカラムを洗浄し、溶離緩衝液（95℃）105 μ l中でRNAを溶離させる。合計1.5 μ lの溶離物をNanodropによって定量化する。

10

【0597】

実施例11: qRT-PCRを使用する血漿および血清からのRNA中のmiRNAレベルの計測

所与の試料のRNA単離からの約80 μ l溶離物からの一定量のRNA溶液1.67 μ lを逆転写（RT）反応へのインプットとして使用する。たとえばRNAが400 μ l血漿または血清試料から単離される試料の場合、RNA溶液1.67 μ lは、 $(1.67/80) \times 400 = 8.3 \mu$ l血漿または血清に対応するRNAを表す。既知のmiRNAに対応する化学合成RNAオリゴヌクレオチドの標準曲線を生成するために、RT反応への最終インプットが1.67 μ lの量を有するような各オリゴヌクレオチドの様々な水希釈物を作る。H₂O 1.387 μ l、10×逆転写緩衝液0.5 μ l、RNアーゼインヒビタ0.063 μ l（20単位/ μ l）、dTTPを含む100mM dNTP 0.05 μ l、Multiscribe逆転写酵素0.33 μ lおよびインプットRNA 1.67 μ lで構成される小規模RT反応においてTaqMan miRNA逆転写キットおよびmiRNA特異的ステムループプライマー（Applied BioSystems）を使用してインプットRNAを逆転写する。インプットRNA以外の成分は、Tetrad2ペルチエサーマルサイクラ（BioRad）を16℃で30分間、42℃で30分間および85℃で5分間使用して、より大きな量のマスタミックスとして調製することができる。Applied BioSystems 7900HTサーモサイクラ上、95℃で10分間、次いで95℃で15秒間および60℃で1分間の40サイクルにより、リアルタイムPCRを実施する。SDS相対定量ソフトウェアバージョン2.2.2（Applied BioSystems）により、ベースラインを割り当てるための自動Ct設定およびCt決定のための閾値を使用してデータを分析する。

20

30

【0598】

プロトコールはまた、たとえばmiRNAを検出するための前増幅工程を含むように変更することもできる。非希釈RT産物の1.25 μ lアリコートを、前増幅PCR試薬（反応あたりTaqMan PreAmpマスタミックス（2×）2.5 μ lおよび0.2×TaqMan miRNAアッセイ（TE中に希釈）1.25 μ lを含む）3.75 μ lと合わせて、5.0 μ lの前増幅PCRを生成し、それを、Tetrad2ペルチエサーマルサイクラ（BioRad）上、95℃で10分間加熱したのち、95℃で15秒間および60℃で4分間の14サイクルに付す。前増幅PCR産物を希釈し（H₂O 20 μ lを5 μ l前増幅反応生成物に加えることにより）、その後、希釈材料2.25 μ lをリアルタイムPCRに導入し、上記のように実施する。

40

【0599】

実施例12: 小胞からのマイクロRNAの抽出

本明細書に記載されるように患者試料から単離された小胞からマイクロRNAを抽出する。たとえば実施例6を参照すること。小胞の単離および濃縮のための方法が本明細書に提示されている。この実施例における方法はまた、はじめに小胞を単離することなく、患者試料からマイクロRNAを単離するために使用することもできる。

【0600】

50

Trizolを使用するプロトコール

このプロトコールは、Qiagen Inc. (Valencia CA) からのQIAzol溶解試薬およびRNeasy Midiキットを使用して、濃縮された小胞からマイクロRNAを抽出する。方法の工程は以下を含む。

1. RNase A 2 μ lを小胞濃縮物50 μ lに加え、37°Cで20分間インキュベートする。
2. QIAzol溶解試薬700 μ lを加え、1分間ボルテックスする。QIAzolの添加ののち、25fmol/ μ Lの*C. elegans*マイクロRNA (1 μ L) を含む試料をスパイクして、合計試料 (三つのアリコートを含めたもの) それぞれについて75fmol/ μ Lのスパイクイン(spike in)を作製する。
3. 55°Cで5分間インキュベートする。 10
4. クロロホルム140 μ lを加え、激しく15秒間振とうする。
5. 氷上で2~3分間冷やす。
6. 12,000 $\times$ gおよび4°Cで15分間遠心分離する。
7. 水相 (300 μ L) を新たな管に移し、100% EtOH 1.5容量部 (すなわち450 μ L) を加える。
8. 試料4ml以下を15ml捕集管中のRNeasy Midiスピンカラムにピペット移送する (三つの50 μ l濃縮物からの溶解物を合わせる)。
9. 2700 $\times$ gおよび室温で5分間スピンする。
10. フロースルーをスピンした物から捨てる。
11. 緩衝液RWT1mlをカラムに加え、2700 $\times$ gおよび室温で5分間遠心分離する。Midiキット中に提供されている緩衝液RW1を使用してはならない。緩衝液RW1はmiRNAを洗い落としてしまう。緩衝液RWTはQiagen Inc.からのMiniキット中に提供されている。 20
12. フロースルーを捨てる。
13. 緩衝液RPE1mlをカラムに加え、2700 $\times$ gおよび室温で2分間遠心分離する。
14. 工程12および13を繰り返す。
16. カラムを新たな15ml捕集管に入れ、溶離緩衝液150 μ lを加える。室温で3分間インキュベートする。
17. 2700 $\times$ gおよび室温で3分間遠心分離する。
18. 試料をボルテックスし、1.7mL管に移す。抽出した試料を-80°Cで貯蔵する。

【0601】

30

修正Trizolプロトコル

1. Epicentre RNアーゼAを229 μ g/mlの最終濃度まで加える (Epicentre (登録商標)、Illumina (登録商標) 社、Madison, WI)。(たとえば、濃縮物150 μ lに450 μ l PBSおよび28.8 μ l Epicentre RNアーゼAを加える [5 μ g/ μ l])。短時間、ボルテックスする。37°Cで20分間インキュベートする。リバースピペッティングを使用して「ベイビー」を100 μ lきざみで分取する。
2. 遠心機の温度を4°Cに設定する。
3. Trizol LS750 μ lを各100 μ l試料に加え、すぐにボルテックスする。
5. ベンチトップ上、室温 (RT) で5分間インキュベートする。
6. 全試料を、MixMate中RTで30分間、1400rpmでボルテックスする。ボルテックスする間、BCP相分離剤をプレートに加える。 40
7. 短時間、管を遠心分離処理する。試料を捕集マイクロチューブラックに移す。
8. 150 μ l BCPをプレート中の試料に加える。プレートにふたをし、15秒間、激しく振とうする。
9. RTで3分間インキュベートする。
10. 4°Cで15分間、6,000 $\times$ gで遠心分離処理する。遠心機温度を24°C (室温) にリセットする。
11. 500 μ l 100%EtOHを新たなSブロックの適切なウェルに加える。200 μ l水相を新たなSブロックに移し、10回ピペッティングすることによって水/EtOHを混合する。
12. 短時間、遠心分離処理する。 50

13. RNeasy 96 (Qiagen, Inc., Valencia, CA) プレートを新たなSブロックの上に配置する。水/EtOH試料混合物をRNeasy 96プレートのウェルの中にピペットで移す。AirPoreテープでRNeasy 96プレートを封止する。

14. RTで4分間、6000rpm (約5600×g) でスピンする。24℃未満の温度を避ける。

15. フロースルーを捨てることによってSブロックを空にし、AirPoreテープを剥がす。

14. バッファRWT700 μlをプレートに加え、AirPoreテープで封止し、RTで4分間、6,000rpmで遠心分離処理する。Sブロックを空にし、AirPoreテープを剥がす。

15. バッファRPE500 μlをプレートに加え、AirPoreテープで封止し、RTで4分間、6,000rpmで遠心分離処理する。Sブロックを空にし、AirPoreテープを剥がす。

16. バッファRPEさらに500 μlをプレートに加え、AirPoreテープで封止し、RTで10分間、6,000rpmで遠心分離処理する。Sブロックを空にし、AirPoreテープを剥がす。

17. RNeasy 96プレートを清浄な溶出マイクロチューブラックの上に配置する。RNアーゼフリーの水30 μlをRNeasy 96プレートのカラムの上にピペットで移す。AirPoreテープで封止する。

18. 水をカラム上に5分間位置させる。

19. カラムを6,000rpmで4分間遠心分離処理してRNAを溶出させる。マイクロチューブを溶出マイクロチューブキャップでふたをする。ベイベーと一緒に溜める。

20. -80℃で貯蔵する。

【0602】

MagMaxを使用するプロトコール

このプロトコールは、Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX) からのMagMAX (商標) RNA単離キットを使用して、濃縮された小胞からマイクロRNAを抽出する。本方法の工程は以下を含む。

1. QIAzol溶解試薬700mlを加え、1分間ボルテックスする。

2. ベンチトップ上、室温で5分間インキュベートする。

3. クロロホルム140 μlを加え、激しく15秒間振とうする。

4. ベンチトップ上で2~3分間インキュベートする。

5. 12,000×gおよび4℃で15分間遠心分離する。

6. 水相をディープウェルプレートに移し、100%イソプロパノール1.25容量部を加える。

7. MagMAX (商標) 結合ビーズを十分に振とうする。RNA結合ビーズ10 μlを各ウェルの中にピペット移送する。

8. 二つの溶離プレートおよび二つのさらなるディープウェルプレートを集める。

9. 一方の溶離プレートを「Elution」と標識し、他方の溶離プレートを「Tip Comb」と標識する。

10. 一方の深穴プレートを「1st Wash 2」と標識し、他方のディープウェルプレートを「2nd Wash 2」と標識する。

11. 両方のWash 2ディープウェルプレートを150 μlのWash 2で満たす。必ずエタノールを加えて事前に洗浄すること。試料の数と同じ数のウェルを満たす。

12. MagMax粒子プロセッサ上で適切な捕集プログラムを選択する。

13. スタートを押し、各適切なプレートを装填する。

14. 試料をマイクロ遠心管に移す。

15. ボルテックスし、-80℃で貯蔵する。残留ビーズが試料中に見られるであろう。

【0603】

実施例13: マイクロRNAアレイ

試料中のマイクロRNAレベルは、高密度および低密度の両アレイを含むアレイフォーマットを使用して分析することができる。アレイ分析は、たとえば、二つの試料中の複数のmiRの発現を分析し、統計分析を実施して、どのmiRが試料間で差次的に発現し、ひいてはバイオシグネチャーにおいて使用することができるのかを決定することにより、所望の状況における差次的発現を発見するために使用することができる。アレイはまた、試料中のバイオシグネチャーを同定することによって表現型を特徴決定するために、一つの試料中

の一つまたは複数のマイクロRNAの存在またはレベルを同定するために使用することもできる。この実施例は、本発明の方法を実施するために使用される市販のシステムを説明する。

【0604】

TaqMan低密度アレイ

所望により、TaqMan低密度アレイ (TLDA) miRNAカードを使用して、様々な試料群中のmiRNAの発現を比較する。Applied Biosystems (Foster City, CA) からのTaqMan (登録商標) マイクロRNAアッセイおよびアレイシステムを使用してmiRNAを捕集し、分析する。Applied BiosystemsのTaqMan (登録商標) ヒトマイクロRNAアレイを、製造者によって供給されるMegaplex (商標) Pools Quick Reference Cardプロトコールにしたがって使用する。

【0605】

Exiqon miRCURY LNAマイクロRNA

所望により、Exiqon miRCURY LNA (商標) Universal RTマイクロRNA PCRヒトパネルIおよびII (Exiqon, Inc, Woburn, MA) を使用して、様々な試料群中のmiRNAの発現を比較する。Exiqon 384ウェルパネルは750のmiRを含む。試料を、Universal cDNA合成キット (UniSp6 CP) からの合成RNAスパイクインに向けて対照プライマーに標準化する。結果をプレート間キャリブレーションプロープに標準化した。

【0606】

いずれのシステムでも品質管理基準が履行される。各指標に関する三つのデータセットの間の各プロープの標準化値を平均する。20%よりも高い平均CV%を有するプロープは分析に使用しない。結果を対応のあるt検定に付して、二つの試料群の間で差次的に発現したmiRを発見する。P値をBenjamini-Hochberg偽発見率検定と相関させる。GeneSpringソフトウェア (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) を使用して結果を分析する。

【0607】

実施例14: 小胞におけるマイクロRNAプロファイル

実施例1~3に記載されるように、22Rv1、LNCaP、Vcapおよび正常な血漿 (ドナー16名からプールした) から超遠心分離法によって小胞を捕集した。Exiqon miR単離キット (カタログ番号300110、300111) を使用してRNAを抽出した。BCAアッセイによる測定で等しい量の小胞 (30 μ g) を使用した。

【0608】

等しい量 (5 μ l) をマイクロRNAの逆転写反応に投入した。逆転写酵素反応物をヌクレアーゼフリー水81 μ l中に希釈したのち、この溶液9 μ lを個々のmiRアッセイそれぞれに加えた。miR-629は、PCa (前立腺癌) 小胞においてのみ発現することが見いだされ、正常な血漿小胞中では実質的に検出不可能であった。miR-9は、すべてのPCa細胞株中で高過剰発現する (コピー数による計測で正常に対して約704倍増) ことが見いだされたが、正常な血漿小胞中では非常に低い発現しか有しない。

【0609】

実施例15: 磁性EpCam捕捉小胞のマイクロRNAプロファイル

実施例7のビーズ結合小胞をQIAzol (商標) 溶解試薬 (Qiagenカタログ番号79306) に入れた。125fmolのc. elegans miR-39のアリコートを加えた。Qiagen miRneasy (商標) キット (カタログ番号217061) を製造者の指示にしたがって使用してRNAを単離し、RNaseフリー水30 μ l中に溶離させた。

【0610】

精製したRNA 10 μ lを、Veritiの96ウェルサーモサイクラを使用する、miR-9、miR-141およびmiR-629のための前増幅反応に入れた。前増幅溶液の1:5希釈物を使用して、miR9 (ABI 4373285)、miR-141 (ABI 4373137) およびmiR-629 (ABI 4380969) ならびにc. elegans miR-39 (ABI 4373455) のためのqRT-PCR反応をセットアップした。試料ごとに結果をc. elegans結果に標準化した。

10

20

30

40

50

【0611】

実施例16:CD9捕捉小胞のマイクロRNAプロファイル

実施例15におけるようなEpCamコートされたビーズの代わりにCD9コートされたDynalビーズ (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。前立腺癌患者からの小胞、LNCaPまたは正常な精製小胞を、CD9コートされたビーズとともにインキュベートし、実施例15に記載されるように、RNAを単離した。miR-21およびmiR-141の発現をqRT-PCRによって検出し、結果を図6に示した。

【0612】

実施例17:ろ過モジュールを使用する小胞の単離

PBS 6mLを血漿1mLに加える。そして、試料を、1.2マイクロメートル (μm) Pallシリンジフィルタに通して直接MWCO 100kDa (Millipore, Billerica, MA)、MWCO 150kDaの7mlカラム (Pierce (登録商標)、Rockford, IL)、MWCO 100kDaの15mlカラム (Millipore, Billerica, MA) またはMWCO 150kDaの20mlカラム (Pierce (登録商標)、Rockford, IL) に入れる。

【0613】

量が約250 μlになるまで管を60~90分間遠心分離する。保持物を捕集し、PBCを加えて試料を300 μlにする。そして、試料50 μlを、以下の実施例にさらに記載されるようなさらなる小胞分析に使用する。

【0614】

実施例18:フィルタで単離された小胞の多重解析

実施例17に記載された方法を使用して得られた小胞試料を、本明細書に記載される多重化アッセイに使用する。たとえば後述の実施例23~24を参照すること。捕捉抗体はCD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3およびEpCamである。検出抗体は、バイオマーカーCD9、CD81およびCD63またはB7H3およびEpCamのための検出抗体である。

【0615】

実施例19:小胞のフローサイトメトリー分析

MoFlo XDP (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) を使用して精製された血漿小胞を分析し、Summit 4.3ソフトウェア (Beckman Coulter) を使用して蛍光強度中央値を分析した。小胞は抗体で直接標識されるか、ビーズまたはミクロスフェア (たとえば磁性、たとえばBD FACS 7カラーセットアップを含むポリスチレン、カタログ番号335775) が組み込まれることができる。小胞は、以下の小胞抗原:CD9 (マウス抗ヒトCD9、MAB1880、R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、PSM (マウス抗ヒトPSM、sc-73651、Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)、PCSA (マウス抗ヒト前立腺細胞表面抗原、MAB4089、Millipore, MA, USA)、CD63 (マウス抗ヒトCD63、556019、BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、CD81 (マウス抗ヒトCD81、555675、BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、B7-H3 (ヤギ抗ヒトB7-H3、AF1027、R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、EpCAM (マウス抗ヒトEpCAM、MAB9601、R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) に対する結合物質によって検出することができる。小胞は、所望の小胞抗原に対する蛍光標識された抗体によって検出することができる。たとえば、抗体を標識するためにFITC、フィコエリスリン (PE) およびCy7が一般に使用される。

【0616】

多重ミクロスフェアによって抗体を捕捉するためには、ミクロスフェアをLuminex (Austin, TX, USA) から得、Pierce Thermoから得られるスルホNHSおよびEDC (それぞれカタログ番号24510および22981、Rockford, Ill, USA) を使用するミクロを使用して所望の抗体に結合させることができる。

【0617】

精製した小胞 (10 μg/ml) を5,000のミクロスフェアとともに振とうしながら室温で1時間インキュベートする。試料をFACS緩衝液 (0.5% FBS/PBS) 中1700rpmで10分間洗浄する。検出抗体を製造者の推奨濃度および室温で振とうしながら1時間インキュベートする。もう一度FACS緩衝液によって1700rpmで10分間洗浄したのち、試料をFACS緩衝液100 μl中

10

20

30

40

50

に再懸濁させ、FACS機にかける。

【0618】

さらに、ミクロスフェアを使用して小胞を検出する場合、標識された小胞を、その検出抗体含量にしたがって異なる管の中にソートすることができる。たとえば、FITCまたはPE標識ミクロスフェアを使用する場合、第一の管は、検出物質なしでミクロスフェア集団を含み、第二の管は、PE検出物質を有する集団を含み、第三の管は、FITC検出物質を有する集団を含み、第四の管は、PEおよびFITCの両検出物質を有する集団を含む。ソートされた小胞集団は、たとえばペイロード、たとえばmRNA、マイクロRNAまたはタンパク質含量を検査することによってさらに分析することができる。

【0619】

図7は、MoFlo XDPを使用する小胞の分離および同定を示す。この実験のセットにおいて、緩衝液だけの場合、約3000のトリガイベント（すなわち、大きな小胞のサイズぐらいの粒状物）があった。染色されない小胞の場合、約46,000のトリガイベント（レーザーを散乱させるのに十分なサイズの43,000の小胞）があった。染色された小胞の場合、500,000のトリガイベントがあった。小胞は、すべてFITCで標識されたテトラスパニンCD9、CD63およびCD81のための検出物質を使用して検出した。より小さな小胞は、検出物質で染色された場合、検出することができる。

【0620】

小胞の特定の集団のソーティングによる物理的単離は、部分的または完全に精製された小胞集団に対する、マイクロRNA分析のようなさらなる研究を容易にする。

【0621】

実施例20: 小胞の抗体検出

本明細書に記載される技術を使用して、抗体コートされたビーズを使用して患者試料中の小胞を検出して、患者試料中の小胞を評価する。以下の一般的プロトコールを使用する。

- a. 治療の地点（たとえば診療所、医師のオフィス、病院）で患者から血液を抜く。
- b. 血液の血漿画分をさらなる分析に使用する。
- c. 大きな粒子を除去し、小胞含有画分を単離するために、たとえば0.8または1.2マイクロメートル（ μm ）シリンジフィルタによって血漿試料をろ過したのち、たとえば150kDa分子量カットオフのサイズ排除カラムに通す。全体の概要が図8Aに示されている。図8Bに示すように、ろ過法が超遠心分離法よりも好ましい場合がある。理論によって拘束されることなく、高速遠心分離法は、膜中により固く係着したテトラスパニンとは反対に膜中に弱く係着したタンパク質標的を除去する場合があります、小胞中の細胞特異的標的を減らす場合があります、すると、細胞特異的標的は、小胞のバイオシグネチャーの後続の分析において検出されなくなるであろう。
- d. 小胞画分を、関心のあるマーカーに対する「捕捉」抗体と結合したビーズとともにインキュベートする。そして、捕捉された小胞を、標識された「検出」抗体、たとえばフィコエリスリンまたはFITC結合抗体によってタグ付けする。ビーズを標識することもできる。
- e. 試料中の捕捉され、タグ付けされた小胞を検出する。図8Cに示すように、蛍光標識されたビーズおよび検出抗体を検出することができる。標識されたビーズおよび標識された検出抗体の使用は、捕捉抗体によって結合した小胞を有するビーズの評価を可能にする。
- f. データを分析する。特定の捕捉抗体の蛍光強度中央値（MFI）の閾値を設定することができる。閾値よりも高い捕捉抗体の読みが特定の表現型を示すことができる。実例として、癌マーカーに対する捕捉抗体の閾値よりも高いMFIは、患者試料中の癌の存在を示すことができる。

【0622】

図8において、ビーズ816は毛管811を通過して流れる。異なる波長の二つのレーザー812の使用が、ビーズから導出される蛍光シグナルからの捕捉抗体818および標識された検出抗体819から生じる蛍光強度中央値（MFI）の両方の、検出器813における別々の検出を可

能にする。関心のある異なる捕捉抗体に結合した、それぞれが異なる蛍光で標識されたビーズの使用が、図示するように一回のアッセイにおける異なる小胞817集団の多重解析を可能にする。レーザー1(815)がビーズタイプ(すなわち捕捉抗体)の検出を可能にし、レーザー2(814)が、一般的小胞マーカー、たとえばCD9、CD63およびCD81を含むテトラスパニンを含むことができる検出抗体の計測を可能にする。異なる集団のビーズおよびレーザーの使用は、一回のアッセイにおける多くの異なる小胞の集団の同時多重解析を可能にする。

【0623】

実施例21: 前立腺癌の検出

高品質トレーニングセット試料を供給業者から得た。試料は、42例の正常な前立腺、42例のPCaおよび15例のBPH患者からの血漿を含むものであった。PCa試料は四例のIII期を含み、残りがII期であった。すべての研究室作業が完了するまで試料の正体を隠蔽した。 10

【0624】

試料由来の小胞は、ろ過法によって1.5マイクロメートルよりも大きな粒子を除去したのち、中空糸膜管を使用するカラム濃縮および精製によって得た。上記のビーズベースの多重化アッセイシステムを使用して試料を分析した。

【0625】

以下のタンパク質に対する抗体を分析した。

- a. 一般的小胞(MV)マーカー:CD9、CD81およびCD63
- b. 前立腺MVマーカー:PCSA
- c. 癌関連MVマーカー:EpCamおよびB7H3

20

【0626】

試料は、以下のような品質試験に合格することを求められた。多重化蛍光強度中央値(MFI) $PCSA + MFI_{B7H3} + MFI_{EpCam} < 200$ ならば、その試料は、バックグラウンドを超えるシグナルの欠如のため、不合格である。トレーニングセットにおいて、六例の試料(三例の正常および三例の前立腺癌)が十分な品質スコアを達成せず、除外された。また、MFIの上限を以下のように設定した。EpCamのMFIが > 6300 であるならば、試験は上限スコアを上回り、試料は癌ではない(すなわち、試験に関して「陰性」と見なされる。

【0627】

トレーニングセットタンパク質に対する六つの抗体のMFIスコアの結果にしたがって試料を分類した。試料がPCa陽性と分類されるためには以下の条件が満たされなければならない。 30

- a. 一般的小胞マーカーの平均MFI > 1500
- b. PCSA MFI > 300
- c. B7H3 MFI > 550
- d. EpCam MFI $550 \sim 6300$

【0628】

84例の正常およびPCaトレーニングデータ試料を使用すると、試験は、正常試料に対するPCaの場合で感度98%および特異度95%であることがわかった。図9Aを参照すること。正常と比較した場合のPCa試料のMFIの増加が図9Bに示されている。PSAおよびPCA3試験に比べて、この実施例に提示されたPCa試験は、スクリーニングされる正常な男性1000名のうち、PCaを有しない約220名が不必要な生検を受けずに済む結果をもたらすことができる。 40

【0629】

実施例22: ミクロスフェア小胞前立腺癌アッセイプロトコール

この例において、小胞PCa試験は、前立腺癌患者の血漿からの小胞上に存在するタンパク質バイオマーカーのセットを検出するためのミクロスフェアベースの免疫アッセイである。試験は、以下のタンパク質バイオマーカー:CD9、CD59、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3およびEpCAMに特異的な抗体を用いる。抗体でコートされたミクロスフェアによる小胞の捕捉ののち、小胞特異的バイオマーカーの検出のために、フィコエリスリン標識された 50

抗体を使用する。患者の血漿からの小胞へのこれらの抗体の結合のレベルに依存して、前立腺癌の有無の決定を行う。

【0630】

小胞は、上記に記載されるように単離される。

【0631】

ミクロスフェア

特異的抗体をミクロスフェア（Luminex）に結合したのち、ミクロスフェアを合わせて、L100-C105-01、L100-C115-01、L100-C119-01、L100-C120-01、L100-C122-01、L100-C124-01、L100-C135-01およびL100-C175-01からなるミクロスフェアマスタミックスを製造する。xMAP（登録商標）Classification CalibrationミクロスフェアL100-CAL1（Luminex）をLuminex LX200機器のための機器校正試薬として使用する。xMAP（登録商標）Reporter CalibrationミクロスフェアL100-CAL2（Luminex）をLuminex LX200機器のための機器レポーター校正試薬として使用する。xMAP（登録商標）Classification ControlミクロスフェアL100-CON1（Luminex）をLuminex LX200機器のための機器対照試薬として使用する。xMAP Reporter ControlミクロスフェアL100-CON2（Luminex）をLuminex LX200機器のためのレポーター対照試薬として使用する。

【0632】

捕捉抗体

本実施例において、以下の抗体を用いて、小胞上の個別のタンパク質標的に結合することによってある特定の集団の小胞を捕捉するのに用いるためのLuminexミクロスフェアをコーティングする：a. マウス抗ヒトCD9モノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C105をコーティングして*EPCLMACD9-C105を作製するために用いられるIgG2bであり；b. マウス抗ヒトPSMAモノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C115をコーティングしてEPCLMAPSMA-C115を作製するために用いられるIgG1であり；c. マウス抗ヒトPCSAモノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C119をコーティングしてEPCLMAPCSA-C119を作製するために用いられるIgG1であり；d. マウス抗ヒトCD63モノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C120をコーティングしてEPCLMACD63-C120を作製するために用いられるIgG1であり；e. マウス抗ヒトCD81モノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C124をコーティングしてEPCLMACD81-C124を作製するために用いられるIgG1であり；f. ヤギ抗ヒトB7-H3ポリクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C125をコーティングしてEPCLGAB7-H3-C125を作製するために用いられるIgG精製抗体であり；かつg. マウス抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体は、ミクロスフェアL100-C175をコーティングしてEPCLMAEpCAM-C175を作製するために用いられるIgG2b精製抗体である。

【0633】

検出抗体

本アッセイ法では、以下のフィコエリスリン（PE）標識抗体を検出プローブとして使用する：a. EPCLMACD81PE：マウス抗ヒトCD81 PE標識抗体は、捕捉された小胞上のCD81を検出するために用いられるIgG1抗体であり；b. EPCLMACD9PE：マウス抗ヒトCD9 PE標識抗体は、捕捉された小胞上のCD9を検出するために用いられるIgG1抗体であり；c. EPCLMACD63PE：マウス抗ヒトCD63 PE標識抗体は、捕捉された小胞上のCD63を検出するために用いられるIgG1抗体であり；d. EPCLMAEpCAMPE：マウス抗ヒトEpCAM PE標識抗体は、捕捉された小胞上のEpCAMを検出するために用いられるIgG1抗体であり；e. EPCLMAPSMAPE：マウス抗ヒトPSMA PE標識抗体は、捕捉された小胞上のPSMAを検出するために用いられるIgG1抗体であり；f. EPCLMACD59PE：マウス抗ヒトCD59 PE標識抗体は、捕捉された小胞上のCD59を検出するために用いられるIgG1抗体であり；かつg. EPCLMAB7-H3PE：マウス抗ヒトB7-H3 PE標識抗体は、捕捉された小胞上のB7-H3を検出するために用いられるIgG1抗体である。

【0634】

試薬調製

抗体精製：表12における以下の抗体を販売業者から受け取り、精製し、以下のプロトコールに従って所望の作用濃度に調整する。

【0635】

(表12) PCaアッセイ法用の抗体

抗体	用途
EPCLMACD9	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMACD63	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMACD81	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMAPSMA	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLGAB7-H3	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMAEpCAM	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMAPCSA	小胞捕捉のためのミクロスフェアのコーティング
EPCLMACD81PE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMACD9PE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMACD63PE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMAEpCAMPE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMAPSMAPE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMACD59PE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体
EPCLMAB7-H3PE	小胞バイオマーカー検出のためのPEコートされた抗体

10

20

【0636】

抗体精製のプロトコール:Pierce製のProtein G樹脂 (Protein G spinキット、prod #89979) を用いて抗体を精製する。フィルタ付きのP-200チップから作製したマイクロマトグラフィーカラムを精製に使用する。

【0637】

各マイクロカラムに、100 μ lのProtein G樹脂をPierceキットの100 μ lの緩衝液とともに充填する。数分待って樹脂を沈ませた後、カラムを乾燥させないようにしながら、必要に応じてP-200ピペットマンで空気圧をかけて緩衝液を排出する。カラムを0.6mlの結合緩衝液 (pH7.4、100mMリン酸緩衝液、150mM NaCl; Pierce, Prod #89979) で平衡化する。抗体をカラムに加える (<1mgの抗体をカラムに充填する)。カラムを1.5mlの結合緩衝液で洗浄する。5本のチューブ (1.5ml微量遠心分離チューブ) を調製し、10 μ lの中和溶液 (Pierce, Prod #89979) を各チューブに加える。キットの溶出緩衝液により、5本のチューブそれぞれに各チューブ100 μ l (計500 μ l) で抗体が溶出する。Nanodrop (Thermo scientific, Nanodrop 1000分光光度計) を用いて、各画分の相対的吸光度を280nmで測定する。最も高いOD読み取り値を有する画分を下流の使用のために選択する。Pierce製のSlide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce, prod 66333, 3KDaカットオフ) を用いて、0.25リットルのPBS緩衝液に対して試料を透析する。4℃で継続的に攪拌しながら、緩衝液を2時間ごとに最低3回交換する。次いで、透析した試料を1.5ml微量遠心分離チューブに移し、ラベルを付け、4℃ (短期間) または-20℃ (長期間) で保存することができる。

30

40

【0638】

ミクロスフェアワーキングミックスの組み合わせ: ミクロスフェアワーキングミックスMWM101には、表13の最初の4列の抗体、ミクロスフェア、およびコーティングされたミクロスフェアが含まれる。

【0639】

(表13) 抗体-ミクロスフェアの組み合わせ

抗体	ミクロスフェア	コートされたミクロスフェア
EPCLMACD9	L100-C105	EPCLMACD9-C105
EPCLMACD63	L100-C120	EPCLMACD63-C120
EPCLMACD81	L100-C124	EPCLMACD81-C124
EPCLMAPSMA	L100-C115	EPCLMAPSMA-C115
EPCLGAB7-H3	L100-C125	EPCLGAB7-H3-C125
bEPCLMAEpCAM	L100-C175	EPCLMAEpCAM-C175
EPCLMAPCSA	L100-C119	EPCLMAPCSA-C119

10

【0640】

ミクロスフェアを、以下のプロトコールに従って、上記に挙げた個々の抗体でコーティングする。

【0641】

タンパク質のカルボキシル化ミクロスフェアに対する2段階カルボジイミドカップリングのためのプロトコール: この手順全体にわたり、ミクロスフェアを光への長期の暴露から保護しなくてはならない。ミクロスフェアとともに提供されている商品情報シート (xMAP technologies、MicroPlex (商標) Microspheres) に記載されている指示に従って、カップリングしていないミクロスフェアのストックを再懸濁する。5×10⁶個のミクロスフェアのストックをUSA Scientific製の1.5ml微量遠心分離チューブに移す。ミクロスフェアのストックを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、ペレットにしたミクロスフェアを、ボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって100 μ lのdH₂O中に再懸濁する。ミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、洗浄したミクロスフェアを、ボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理 (Branson 1510, Branson ULTrasonics Corp.) によって80 μ lの100mMリン酸二水素ナトリウム、pH6.2中に再懸濁する。10 μ lの50mg/mlスルホ-NHS (Thermo Scientific、Cat# 24500) (dH₂O中に希釈) をミクロスフェアに加え、ボルテックスによって穏やかに混合する。10 μ lの50mg/ml EDC (Thermo Scientific、Cat# 25952-53-8) (dH₂O中に希釈) をミクロスフェアに加え、ボルテックスによって穏やかに混合する。ミクロスフェアを10分間隔でボルテックスによって穏やかに混合しながら、室温で20分間インキュベートする。活性化したミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、ミクロスフェアをボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって250 μ lの50mM MES、pH5.0 (MES、Sigma、Cat# M2933) 中に再懸濁する。(PBS-1% BSA+アジド (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% NaAzide (S8032))) 以外をアッセイ緩衝液ならびに洗浄緩衝液として使用してはならない。) 次いで、ミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。

20

30

【0642】

上清を除去し、ミクロスフェアをボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって250 μ lの50mM MES、pH5.0 (MES、Sigma、Cat# M2933) 中に再懸濁する。(PBS-1% BSA+アジド (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK+0.05% NaAzide (S8032))) 以外をアッセイ緩衝液ならびに洗浄緩衝液として使用してはならない。) 次いで、ミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにし、こうして50mM MES、pH5.0を用いた2回の洗浄が完了する。

40

【0643】

上清を除去し、活性化し、かつ洗浄されたミクロスフェアを、ボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって100 μ lの50mM MES、pH5.0中に再懸濁する。125、25、5、または1 μ gの量のタンパク質を再懸濁したミクロスフェアに加える。(注釈: 1～125 μ gの範囲で滴定を行って、特定のカップリング反応ごとに最適なタンパク質量を決めることができる。) 50mM MES、pH5.0を用いて総容量を500 μ lにする。カップリング反応をボルテ

50

ックスによって混合し、室温で（Labquakeローテーター，Barnstead上で回転させることによって）混合しながら2時間インキュベートする。カップリングしたミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、ペレットにしたミクロスフェアをボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって500 μ lのPBS-TBN中に再懸濁する。（使用する特定の試薬、アッセイ条件、多重化レベル等に対して濃度を最適化することができる。）

【0644】

ミクロスフェアを室温で（Labquakeローテーター，Barnstead上で回転させることによって）混合しながら30分間インキュベートする。カップリングしたミクロスフェアを室温にて $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、ミクロスフェアをボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって1mlのPBS-TBN中に再懸濁する。（試料、検出抗体、またはSA-PEを添加するたびに、プレートシーラーおよび光遮断物（アルミホイル等）で覆い、オービタルシェーカー上に置き、15～30秒間900に設定して、ビーズを再懸濁する。その後、インキュベーションの期間中はスピードを550に設定すべきである。）

【0645】

ミクロスフェアを $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする。上清を除去し、ミクロスフェアをボルテックスおよびおよそ20秒間の超音波処理によって1mlのPBS-TBN中に再懸濁する。ミクロスフェアを $\geq 8000 \times g$ での1～2分間の微量遠心分離によってペレットにする（これにより、1mlのPBS-TBNを用いた計2回の洗浄となる）。

【0646】

ミクロスフェアアッセイのためのプロトコール: 複数のフィコエリスリン検出抗体の調製は、実施例4に記載されているように使用した。システムマニュアルに従って、100 μ lをLuminexアナライザ（Luminex 200、xMAP technologies）で解析する（高PMT設定）。

【0647】

決定木: 図10のような決定木を用いて、ミクロスフェアアッセイの結果を評価し、対象が癌を有するかどうかを判定する。MFIの閾値限界を確立し、抗体に対するMFIスコアの結果に従って試料を分類して、試料が、解析を行うのに十分なシグナルを有するかどうか（例えば、第二の患者試料を入手し得る場合に、解析にとって有効な試料であるのか、または、さらなる解析にとって無効な試料であるのか）、および試料がPCa陽性であるかどうかを判定する。図10は、PCSA、PSMA、B7-H3、CD9、CD81、およびCD63を用いて得られたMFIを用いた決定木を示している。MFIが所定の閾値（TH）の標準偏差内にある場合、試料を不確定と分類する。この場合、第二の患者試料を入手することができる。検証のために、試料は、個々のテトラスパニンで小胞を捕捉する際およびすべてのテトラスパニンで標識する際に、十分なシグナルを有しなければならない。前立腺特異的マーカーのいずれか（PSMAまたはPCSA）が陽性に見なされ、かつ癌マーカー（B7-H3）も陽性に見なされる場合、検証に合格する試料は陽性と称される。

【0648】

結果: 実施例23を参照されたい。

【0649】

実施例23: ミクロスフェア小胞PCaアッセイの性能

本実施例では、小胞PCa試験は、前立腺癌患者の血漿に由来する小胞上に存在する一組のタンパク質バイオマーカーを検出するためのミクロスフェアベース免疫アッセイである。本試験は、実施例22の試験と同様に、以下に示した変更を加えて行われる。

【0650】

本試験では、循環微小胞を検出するように設計された多重化免疫アッセイが用いられる。本試験では、血漿などの患者試料中に存在する微小胞を捕捉するためにPCSA、PSMA、およびB7H3が用いられ、捕捉された微小胞を検出するためにCD9、CD81、およびCD63が用いられる。本アッセイの出力は、微小胞上に個々の捕捉タンパク質および検出タンパク質を含有する微小胞の抗体捕捉および蛍光標識抗体検出に起因する蛍光強度中央値(MFI)であ

る。PSMAまたはPCSA、およびB7H3タンパク質を含有する微小胞のMFIレベルが経験的に求められた閾値を上回れば、本試験より試料は「陽性」である。閾値を決定するための方法は、参照によりその全文が本明細書に組み入れられる2011年4月6日出願の「Circulating Biomarkers for Disease」と題する国際特許出願第PCT/US2011/031479号の実施例33において示されている。これらの2つの微小胞捕捉カテゴリーのうちいずれか1つが、経験的に求められた閾値より少ないMFIレベルを示せば、試料は「陰性」と決定される。または、ある特定の閾値を満たさないMFI値のために試料MFIが陽性結果または陰性結果をはっきりと生じなければ、または反復データの統計値のばらつきが大きすぎるのであれば、「不確定」の結果が報告される。本試験の「判定不能」解釈は、この患者試料が分析には不適当な微小胞品質を含んでいたことを示している。経験的に得られた閾値を求める方法については国際特許出願第PCT/US2011/031479号の実施例33を参照されたい。

10

【0651】

本試験では、実施例22と同様に以下のタンパク質バイオマーカー:CD9、CD59、CD63、CD81、PSMA、PCSA、およびB7H3に対する特異的抗体が用いられる。試料が陽性、陰性、または不確定と称されるかどうかを判定するために、表14に概説したように決定規準を設定する。実施例22も参照されたい。試料が陽性と判定されるためには、反復は、テトラスパニンマーカー(CD9、CD63、CD81)、前立腺マーカー(PSMAまたはPCSA)、およびB7H3について求められた4つ全てのMFIカットオフを超えなければならない。PSMAおよびPCSAからの3回の反復が両方とも、またはB7H3抗体からの3回の反復のいずれかがカットオフMFI値にまたがるのであれば、試料は不確定と判定される。テトラスパニンマーカー(CD9、CD63、およびCD81)、前立腺マーカー(PSMAまたはPCSA)、B7H3の少なくとも1つがMFIカットオフより少なければ、試料は陰性と判定される。

20

【0652】

(表14) 各捕捉抗体のMFIパラメータ

テトラスパニンマーカー (CD9, CD63, CD81)	前立腺マーカー (PSMA, PCSA)	B7H3	結果の決定
3種類の テトラスパニンからの 全反復の平均が MFI>500である。	2種類の前立腺 マーカー各々からの 全反復がPCSAについては MFI>350であり、 PSMAについては MFI>90である。	B7H3からの 全反復のMFIが >300である。	3つ全てが 真であれば、 試料は陽性と 判定される。
	各前立腺マーカーからの 反復セットが両方とも PCSAについては MFI=350より上の値および MFI=350より下の値、 PSMAについては MFI=90より上の値および MFI=90より下の値を有する。	B7H3からの いかなる反復も MFI=300より上の値 およびMFI=300より 下の値を有する。	いずれかが 真であれば、 試料は不確定と 判定される。
3種類の テトラスパニンからの 全反復のMFIが <500である。	2種類の前立腺 マーカー各々からの 全反復がPCSAについては MFI<350であり、 PSMAについては MFI<90である。	B7H3からの 全反復のMFIが <300である。	試料が不確定と 認定されない場合、 3つのうちいずれかが 真であれば、 試料は陰性と 判定される。

30

40

【0653】

生検によって確認されたPCaのある患者またはPCaのない患者296人からなるコホートにおいて、小胞PCa試験を高濃度PSAと比較した。結果のROC曲線を図11に示した。示したように、小胞PCa試験の曲線下面積(AUC)は0.94であったのに対して、同じ試料における高濃度PSAのAUCは0.68しかなかった。PCa試料は、高いPSA値のために発見される可能性があった。従って、この集団はPSAに有利なようにゆがめられており、このことが、AUCが本当の

50

臨床の場合において観察されるものより高い理由である。

【0654】

933例の患者血漿試料からなるコホートにおいて小胞PCa試験をさらに行った。結果を表15にまとめた。

【0655】

(表15) 933人の患者コホートにおける小胞PCa試験の性能

真陽性	409
真陰性	307
偽陽性	50
偽陰性	72
判定不能	63
不確定	32
合計	933
感度	85%
特異度	86%
精度	85%
判定不能率	8%
不確定率	5%

10

【0656】

表15に示したように、小胞PCa試験は、精度85%の場合、86%特異度レベルで85%感度レベルに達した。対照的に、感度85%でPSAは特異度が約55%であり、特異度86%でPSAは感度が約5%であった。図11。933例の試料の約12%は判定不能または不確定であった。患者からの試料を再収集および再評価することができた。933例の試料を対象にした小胞PCa試験のAUCは0.92であった。

20

【0657】

実施例24: 前立腺癌を検出するための小胞タンパク質アレイ

本実施例では、前立腺癌患者の血漿に由来する小胞上に存在する一組のタンパク質バイオマーカーを検出するために、タンパク質アレイ、具体的には、抗体アレイを用いて小胞PCa試験を行う。アレイは、以下のタンパク質バイオマーカー:CD9、CD59、CD63、CD81に特異的な捕捉抗体を含む。前記のように、例えば、実施例6に記載のように、小胞を単離する。PCaのリスクのある男性、例えば、50歳以上の男性の血漿から小胞をろ過および単離した後に、血漿試料を、様々な捕捉抗体を含むアレイとインキュベートする。アレイにハイブリダイズした患者血漿由来小胞に結合する、PSMA、PCSA、B7H3、およびEpCAMに対する蛍光標識検出抗体の結合レベルに応じて、前立腺癌の有無を判定する。

30

【0658】

第二のアレイ形式では、小胞を血漿から単離し、CD9、CD59、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、およびEpCamを含有するアレイにハイブリダイズさせる。捕捉された小胞を、Cy3および/またはCy5で標識された非特異的小胞抗体でタグ化する。蛍光を検出する。結合パターンに応じて、前立腺癌の有無を判定する。

【0659】

実施例25: miRを用いたBPHおよびPCaの区別

9人の正常男性個人および9人の第3期前立腺癌個人の血漿由来小胞に由来するRNAを、Exiqon miRCURY LNA マイクロRNA PCRシステムパネルによって分析した。Exiqon 384ウェルパネルでは750種類のmiRが測定される。試料を、Universal cDNA合成キット(UniSp6 CP)に由来する合成RNAスパイクインに対する対照プライマーに対して基準化した。各表示(BPHまたはPCa)の3つのデータセット全体での各プローブの基準化された値の平均をとった。平均CV%が20%を超えるプローブは分析に使用しなかった。

40

【0660】

結果分析から、BPH試料中の数種類のマイクロRNAが第3期前立腺癌試料と比較して2倍以上過剰発現していたことが明らかになった。これらのmiRには、表16に示したように、hsa

50

-miR-329、hsa-miR-30a、hsa-miR-335、hsa-miR-152、hsa-miR-151-5p、hsa-miR-200a、およびhsa-miR-145が含まれる。

【0661】

(表16) BPH対PCaにおいて過剰発現していたmiR

BPHにおける過剰発現 対 PCaにおける過剰発現	変化倍率
hsa-miR-329	12.32
hsa-miR-30a	6.16
hsa-miR-335	6.00
hsa-miR-152	4.73
hsa-miR-151-5p	3.16
hsa-miR-200a	3.16
hsa-miR-145	2.35

10

【0662】

実施例26: 対照試料およびPCa試料におけるmiR-145

図12は、対照試料におけるmiR-145および前立腺癌試料におけるmiR-145を比較している。実施例12と同様にRNAを収集した。対照には、PSA<4ng/mlおよび良性直腸診(DRE)の>75歳の白人および>65歳のアフリカ系アメリカ人が含まれる。図から分かるように、miR-145はPCa試料において低発現であった。miR-145は、初期/低悪性度PCaの患者と良性前立腺変化(例えば、BPH)の患者を見分けるのに有用である。

【0663】

実施例27: 小胞診断アッセイの性能を向上させるmiR

20

本明細書に記載のように、血漿患者試料中にある小胞を濃縮し、診断、予後判定、またはセラノーシス用の測定値を得るために評価した。患者試料の小胞分析には、本明細書に記載のような小胞表面バイオマーカー、例えば、表面抗原、および/または小胞ペイロード、例えば、mRNAおよびマイクロRNAの検出が含まれる。小胞中のペイロードを評価して、アッセイ性能を向上させることができる。例えば、図13Aは、小胞中のmiR分析を用いて、偽陰性を真の陽性に変換し、それによって感度を改善するためのスキームを示す。このスキームでは、小胞表面抗原分析によって陰性と判定された試料は、小胞を用いてペイロードを評価することによって真の陰性または真の陽性とさらに確認される。同様に、図13Bは、小胞中のmiR分析を用いて、偽陽性を真の陰性に変換し、それによって特異度を改善するためのスキームを示す。このスキームでは、小胞表面抗原分析によって陽性と判定された試料は、小胞を用いてペイロードを評価することによって真の陰性または真の陽性とさらに確認される。

30

【0664】

前立腺癌の診断検査には、前立腺癌の有無を示す小胞を検出するために、患者の血液試料から小胞を単離することが含まれる。例えば、実施例20~23を参照されたい。血液は血清または血漿でもよい。小胞は、特定の小胞表面抗原を認識する「捕捉抗体」を用いた捕捉によって単離される。前立腺癌診断アッセイ用の表面抗原には、一般的に、血中にある小胞上に存在し、従って、一般的小胞バイオマーカーとして働くテトラスパニンCD9、CD63、およびCD81、前立腺特異的バイオマーカーであるPSMAおよびPCSA、ならびに癌特異的バイオマーカーB7H3が含まれる。捕捉抗体は蛍光標識ビーズに繋ぎ止められ、捕捉抗体ごとにビーズは異なって標識されている。捕捉された小胞は、テトラスパニンCD9、CD63、およびCD81に対する蛍光標識「検出抗体」を用いてさらに強調される。ビーズからの蛍光および検出抗体からの蛍光は、前立腺癌診断アッセイ用の表面抗原を発現する、血漿試料中の小胞の量を求めるために用いられる。試料中の蛍光レベルは、前立腺癌のある試料を区別することができる参照レベルと比較される。本実施例では、小胞ベースの前立腺癌診断アッセイの性能を向上させるためにマイクロRNA分析が用いられる。

40

【0665】

図13Cは、小胞ベースの前立腺癌診断アッセイによって評価された試料中のmiR-107検出の結果を示す。図13Dは、小胞ベースの前立腺癌診断アッセイによって評価された試料中のmiR-141検出の結果を示す。これらの図において、小胞診断アッセイによって判定され

50

た真の陽性(TP)、小胞診断アッセイによって判定された真の陰性(TN)、小胞診断アッセイによって判定された偽陽性(FP)、および小胞診断アッセイによって判定された偽陰性(FN)の指示されたmiRの基準化レベルをy軸に示した。図13Cに示したように、miR-107を用いると、偽陰性と真の陰性が区別されることによって小胞アッセイの感度が高まる($p=0.0008$)。同様に、図13Dはまた、miR-141を用いると、偽陰性と真の陰性が区別されることによって小胞アッセイの感度が高まることを示す($p=0.0001$)。miR-141を添加した結果を表17に示した。miR-574-3pも同じように機能する。

【0666】

(表17) PCaを対象とした小胞ベース試験へのmiR-141の追加

	miR-141なし	miR-141あり
感度	85%	98%
特異度	86%	86%

10

【0667】

本実施例では、前立腺癌を示す表面抗原を介して小胞を検出し、小胞中のmiRを調べることによってシグネチャーの性能をさらに増強する。すなわち、特異度に悪影響を及ぼすことなく感度を上げる。この一般的な方法は、小胞の表面抗原または情報価値のある他の特徴が調べられる任意の状況について拡張することができ、次いで、特徴付けを向上させるために1種または複数種の追加バイオマーカーが用いられる。従って、1種または複数種の追加バイオマーカーはmiRである。これらはまた、mRNA、可溶性タンパク質、脂質、糖質、および関心対象の表現型を特徴付けるのに有用な他の任意の小胞結合生物学的実体も含んでよい。

20

【0668】

実施例28: 小胞単離および検出方法

本発明の方法を実施するために、小胞の単離および検出のために前記の技術に加えて当業者に公知の多数の技術を使用することができる。以下は、このようないくつかの方法の例示である。

【0669】

ガラスマイクロビーズ

Illumina, Inc. San Diego, CA, USAからVeraCode/BeadXpressとして入手可能。工程は以下の通りである。

30

1. 使用可能なカルボキシル基に抗体を直接結合体化することによってビーズを調製する。
2. ビーズ表面にある非特異的結合部位をブロックする。
3. ビーズを小胞濃縮試料に添加する。
4. 結合しなかった小胞が除去されるように、試料を洗浄する。
5. 小胞に特異的に結合する検出抗体として蛍光標識抗体を適用する。
6. 結合しなかった検出抗体が除去されるように、プレートを洗浄する。
7. 小胞の存在を判定するためにプレートウェルの蛍光を測定する。

【0670】

酵素結合免疫測定法(ELISA)

40

ELISAを行う方法は当業者に周知である。工程は大まかには以下の通りである。

1. 既知量の捕捉抗体が結合している表面を調製する。
2. 表面にある非特異的結合部位をブロックする。
3. 小胞試料をプレートに適用する。
4. 結合しなかった小胞が除去されるように、プレートを洗浄する。
5. 小胞に特異的に結合する検出抗体として酵素結合一次抗体を適用する。
6. 結合しなかった抗体-酵素結合体が除去されるように、プレートを洗浄する。
7. 酵素によって色シグナル、蛍光シグナル、または電気化学シグナルに変換される化学物質を適用する。
8. 小胞の存在および量を求めるために、プレートウェルの吸光度、蛍光シグナル、また

50

は電気化学シグナル(例えば、電流)を測定する。

【0671】

エレクトロケミルミネッセンス検出アレイ

Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USAから入手可能である。

1. 5mLの最適の緩衝液(例えば、PBS、TBS、HEPES)および75 μ Lの1% Triton X-100(0.015%最終)を組み合わせるによってプレートコーティング緩衝液を調製する。

2. コーティングしようとする捕捉抗体を希釈する。

3. プレートコーティング緩衝液(Tritonを含む)を用いて、1ウェルあたり5 μ Lの希釈捕捉抗体を調製する。

4. 誘電体を破らないように注意しながら、5 μ Lの希釈捕捉抗体を作用電極表面の中心に直接適用する。液滴は誘電体バリアの端までだんだんと広がるが、通過しないはずである。

5. プレートを蓋をせずに、一晩放置する。

【0672】

小胞含有試料および標識検出抗体を含有する溶液をプレートウェルに添加する。検出抗体は、エレクトロケミルミネッセント化合物、MSD SULFO-タグ標識で標識された抗標的抗体である。試料中に存在する小胞は、電極に固定化された捕捉抗体に結合し、標識検出抗体は小胞上の標的に結合して、サンドイッチを完成する。エレクトロケミルミネッセンス検出に必要な環境を設けるために、MSDリード(read)緩衝液を加える。プレートをリーダーに挿入し、プレート電極に電圧を印加すると、標識が電極表面に結合して発光する。リーダーは発光の強度を検出して、試料中の小胞の量を定量測定する。

【0673】

ナノ粒子

それぞれの金ナノ粒子セットに別々の抗体が結合している複数の金ナノ粒子セットを調製する。濃縮された微小胞を1種類のビーズタイプとガラススライド上で37°Cで4時間インキュベートする。十分な量の標的が存在すれば、赤色から紫色に色が変わる。標的ごとに別々にアッセイを行う。金ナノ粒子は、Nanosphere, Inc. of Northbrook, Illinois, USAから入手可能である。

【0674】

ナノサイト(Nanosight)

光学的粒子検出を用いて、一つまたは複数の小胞の直径を求めることができる。発明の名称が「粒子の光学的検出および分析(Optical Detection and Analysis of Particles)」であり、2010年6月6日に発行された米国特許第7,751,053号、および発明の名称が「粒子の光学的検出および分析」であり、2010年7月15日に発行された米国特許第7,399,600号を参照されたい。試料中の特異な小胞または小胞集団の量を評価できるように、粒子を標識および計数することもできる。

【0675】

実施例29:CRC細胞株および患者試料におけるKRAS配列決定

KRAS RNAを、CRC細胞株に由来する小胞から単離し、配列決定した。RNAをcDNAに変換した後に、配列決定した。表18において列挙した細胞株において配列決定を行った。

【0676】

(表18) CRC細胞株およびKRAS配列

10

20

30

40

細胞株	DNAまたは小胞cDNA	KRAS遺伝子型エクソン2	KRAS遺伝子型エクソン3
Colo 205	小胞cDNA	野生型 (WT)	WT
Colo 205	DNA	WT	WT
HCT 116	小胞cDNA	c.13G>GA	WT
HCT 116	DNA	c.13G>GA	WT
HT29	小胞cDNA	WT	WT
Lovo	小胞cDNA	c.13G>GA	WT
Lovo	DNA	c.13G>GA	WT
RKO	小胞cDNA	WT	WT
SW 620	小胞cDNA	c.12G>T	WT

10

【 0 6 7 7 】

表18および図14から、細胞株に由来するゲノムDNAにおいて検出された突然変異は、細胞株に由来する小胞内に含まれるRNAにおいても検出されたことが分かる。図14は、HCT116細胞における、小胞mRNAに由来するcDNAの配列(図14A)およびゲノムDNAに由来するcDNAの配列(図14B)を示す。

20

【 0 6 7 8 】

12例のCRC患者試料のKRASを配列決定した。表19に示したように、全て野生型(WT)であった。RNA抽出中に、全ての患者試料をDNase処理した。単離された小胞からRNAを抽出した。12人全員の患者のGAPDHが増幅されたことは、RNAが患者達の小胞に存在していたことを証明している。

【 0 6 7 9 】

(表 1 9) CRC患者試料およびKRAS配列

試料	試料の種類	ステージ	KRAS遺伝子型 エクソン2	KRAS遺伝子型 エクソン3
61473a6	結腸癌	1	WT	WT
62454a4	結腸癌	1	WT	WT
110681a4	結腸癌	1	WT	配列決定失敗
28836a7	結腸癌	1	WT	配列決定失敗
62025a2	結腸癌	2a	WT	WT
62015a4	結腸癌	2a	WT	WT
110638a3	結腸癌	2a	WT	WT
110775a3	結腸癌	2a	WT	WT
35512a5	結腸癌	3	WT	WT
73231a1	結腸癌	2a	WT	WT
85823a3	結腸癌	3b	WT	WT
23440a7	結腸癌	3c	WT	WT
145151A2/3	正常		WT	WT
139231A3	正常		WT	配列決定失敗
145155A4	正常		WT	配列決定失敗
145154A4	正常		WT	配列決定失敗

30

40

50

【0680】

患者がKRAS 13G>A突然変異陽性だと分かっている患者試料において、CRC患者試料の腫瘍からのKRAS突然変異は同じ患者からの血漿由来小胞においても同定することができた。図14は、この患者における、血漿中の小胞mRNAに由来するcDNAの配列(図14C)を示し、新鮮凍結パラフィン包埋(FFPE)腫瘍試料に由来するゲノムDNAの配列(図14D)も示す。

【0681】

実施例30: タンパク質-核酸複合体の免疫沈降

この実施例は、Ago2、アポリポタンパク質AIおよびGW182との複合体に含まれる血漿中のmiRNAのレベルを検査した。具体的には、Ago2、アポリポタンパク質AIおよびGW182に対する抗体との共免疫沈降ののち、miRNAレベルを評価した。

10

【0682】

免疫沈降を実施するために、ヒト血漿を、Ago2、アポリポタンパク質AI、GW182およびIgG対照に対する、プロテインGビーズに結合した抗体とともにインキュベートした。ビーズを調製するために、10 µgの抗AGO2 (ab57113, lot GR29117-1, Abcam, Cambridge, MA)、抗アポAI (PA1-22558, Thermo Scientific, Waltham, MA)、抗GW182 (A302-330A, Bethyl Labs, Montgomery, TX) または抗IgG (sc-2025, Santa Cruz, CA) をMagnabindプロテインGビーズ (Cat. #21349, Thermo Scientific) またはDynabeadプロテインG (Cat. #100.04D, Invitrogen, Carlsbad, CA) にコンジュゲートした。ビーズ200 µlを1.5mlエッペンドルフ管に入れ、磁気分離器 (Cat. #S1509S, New England Biolabs, Ipswich, MA) 上に1分間配置した。貯蔵バッファを取り出し、捨てた。ビーズをリン酸緩衝食塩水 (PBS) 200mlで一回洗浄した。抗体を、200 µl PBS中、室温 (RT) で30分間、次いで4°Cでさらに90分間、ビーズに結合させた。抗体結合ビーズを磁気分離器上に1分間配置した。結合していない抗体を取り出し、捨てた。ビーズを氷冷PBSで三回洗浄した。

20

【0683】

抗体コンジュゲートビーズをPBS 200 µl中に再懸濁させ、正常な対象 (すなわち癌を有しない) からのヒト血漿200 µlと混合した。混合物をThermo Scientific Labquake Shaker/Rotisserie上、4°Cで一晩転動させた。一晩インキュベートしたのち、ビーズを磁気分離器上に1分間または溶液が明澄になるまで配置した。ビーズを、冷PBS 200 µlで三回、およびNP-40洗浄バッファ (1% NP-40、50mM トリスHCl、pH7.4、150mM NaClおよび2mM EDTA) 200 µlで一回、洗浄した。NP-40バッファ洗浄ののち、試料を冷PBS 200 µlでさらに一回すすいだ。ビーズを磁気分離器上に1分間配置した。ビーズをPBS200 µl中で元の出発量に戻した。試料の3/4を前記 (Arroyo et al., 2011) のようなRNA単離に使用した。残りをウェスタン分析のために-20°Cで貯蔵した。

30

【0684】

単離されたRNAを、miR-16およびmiR-92aに関し、ABI Taqman検出キットABI_391およびABI_431 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) それぞれを使用してスクリーニングした。RNAを合成基準に対して数量化した。上清を捕集し、選択されたmiRNA (miR-16およびmiR-92a) に関して分析した。検出されたmiR-16およびmiR-92aのレベルを図15に示す。図15Aおよび図15Bにそれぞれ示すように、Magnabeadsを使用すると、miR-16およびmiR-92aは、IgG対照よりもずっと高いレベルでAgo2およびGW182と共免疫沈降した (「ビーズ」と印されたバーを比較)。Dynabeadsとの共免疫沈降は、さらには調査しなかった技術的理由のため、うまく行かなかった。

40

【0685】

ヒト血漿からのmiRNAの潜在的供給源には、小胞および/または循環Ago2結合リボタンパク質複合体 (RNP) を含む。miRは、GW182の捕捉を使用して、AGO1~4との複合体および小胞から同時に単離することができる。この実施例は、ヒト血漿中でmiR-16およびmiR-92aがAGO2およびGW182と共免疫沈降することを示す。

【0686】

実施例31: マイクロRNA複合体のフローソーティング

特定の組織に由来する循環マイクロRNAは、微小胞および他のマイクロRNA複合体を単離

50

するための組織特異的バイオマーカーを使用して単離することができる。この実施例は、ヒト血漿中のPCSA/Ago2二重陽性部分集団中のマイクロRNAが前立腺癌を非癌から区別することができることを示す。

【0687】

実施例17におけるように、前立腺癌対象3名および非前立腺癌男性対象3名からの血漿試料を処理して小胞を濃縮した。濃縮した小胞を、最適濃度の抗PCSA抗体、前立腺特異的バイオマーカーおよびAgo2 (ab57113, lot GR29117-1, Abcam, Cambridge, MA) を使用して染色した。使用した抗体は、PEで標識された抗PCSAおよびFITCで標識された抗Ago2であった。対応するアイソタイプ対照抗体を使用して陽性ゲートをセットして陽性領域および陰性領域を画定した。図16に示すような領域に基づいてソートされた集団を選択した。Beckman Coulter MoFlo-XDPセルソータおよびフローサイトメータを使用して、ソートされたイベントが純度>90%であることを保証するための高純度ソーティングモード（すなわち「Purify 1/Drop」）を使用して、陽性イベントを単離した。MoFlo-XDPは、毎秒50,000イベントまでの速度で二つの集団をソートすることができる。粒子ソートの純度および効率を保証するために、レートは平均で毎秒200~300イベントであった。陽性イベントを三つの2ml管にソートし、その後のmiR分析のために取っておいた。

【0688】

ソートしたら、各前立腺特異的部分集団からのマイクロRNA含量を評価した。濃縮された血漿由来の微小胞全体の比較を実施したとき、前立腺癌（PrC）試料と非癌試料（すなわち正常）との間でmiR-22の差次的発現はほとんど認められなかった（図17A）。各PCSA/Ago2二重集団から単離された全RNAからのmiR-22の平均コピー数レベルでも同様な結果が認められた（図17B）。マイクロRNAレベルを考慮に入れないならば、各血漿試料からのPCSA/Ago2二重陽性イベントの数は癌を非癌から有意に区別しなかった（図17C）。しかし、各ソートからのmiR-22の認められたコピーの数を各ソートからのイベントの特定の数で割ると、前立腺癌と非癌との間に明確な隔たりが認められた（図17D）。この後者の場合、すべてのPCa血漿試料中で、正常と比較して、より高いPCSA/Ago2二重陽性複合体あたりのmiR-22のレベルが認められた。

【0689】

実施例32: 循環微小胞の免疫沈降精製のためのプロトコル

この実施例は、二つのマーカーに対する抗体を使用して循環微小胞（cMV）を免疫沈降させるためのプロトコルを提供する。所望の関心対象小胞マーカーを捕捉する任意の適切な抗体を使用することができる。プロトコルはさらに、様々な体液からの小胞の分析のような、様々な試料供給源に適用することができる。この実施例においては、PCSAおよびCD9に対する抗体を使用して、前立腺特異的小胞を血漿から二重に免疫沈降させる。

1) 関心対象からの血漿1mlを解凍する。たとえば、前立腺癌を有する対象または対照、たとえば前立腺癌を有しない正常な男性。

2) 濃縮されていない血漿を、血漿に対する抗PCSA-PEコンジュゲート抗体40 μ lおよび抗CD9-FITC45 μ lで染色する。

3) 混合し、室温の暗所で30分間インキュベートする。

4) 300kDカラムを使用して血漿を1mlから300 μ lに濃縮して非結合抗体を除去する。

5) 濃縮された血漿50 μ lを取り出し、確保して、出発含量を決定する。フロー分析のために保存し、4℃で貯蔵する。

6) 染色された濃縮物の残り250 μ lに抗FITCマイクロビーズ20 μ lを加える。

7) 暗色でインキュベートし、シェーカー上で30分間冷蔵する。

8) マグネットから離れたところでカラムを分離バッファ（Miltenyi）100 μ l×3で洗浄することによってMultiSortカラム（Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA）を準備する。

9) 抗FITCマイクロビーズ（Miltenyi）とともに30分間のインキュベーションのち、バッファ200 μ lを加えて粘度を下げることににより、染色かつ標識された血漿を希釈する。まだ濃すぎるならば、さらに希釈する。

10) 血漿溶液約470 μ lを、マグネット上に位置する第一の洗浄されたカラム、カラム1

の上に加える。

- 11) 血漿溶液をフロースルーさせる。
- 12) 洗液100 μ l $\times$ 2を上貯蔵部に加えて非磁化粒子を除去する。
- 13) カラム1の全フロースルーは約670 μ lである。表現型のために保存する。
- 14) カラム1をマグネットから外す。
- 15) バッファ300 μ lを加え、プランジャを強く押して磁化cMVをカラム1から取り出す。
- 16) Multisort解放試薬 (Miltenyi) 10 μ lを保持量 (300 μ l) に加える。
- 17) 混合し、4℃の暗所で10分間インキュベートする。
- 18) 必要ならば、任意選択の洗浄工程を実施して、解放されたマイクロビーズを除去することができる。
- 19) MultiSort停止試薬 (Miltenyi) 20 μ lをcMV溶液に加える。
- 20) 抗PE MultiSortビーズ (Miltenyi) 20 μ lを加える。
- 21) 混合し、4℃の暗所で30分間インキュベートする。
- 22) 溶液を、マグネット上にある第二のカラム、カラム2の上に加える。
- 23) フロースルーさせ、フロースルーとして捕集する。
- 24) さらに100 μ lを加えて、任意の非磁化粒子をカラム2から洗い落とす (約450 μ l)

10

- 25) フロースルーを捕集し、フロー評価のために取っておく。
- 26) カラム2をマグネットから外し、バッファ300 μ lを加える。
- 27) プランジャを強く押して保持された細胞を押し出し、フロー評価のために取っておく。
- 28) 解放試薬10 μ lを加えてビーズを切断する。
- 29) 4℃の暗所で10分間インキュベートする。
- 30) 停止試薬20 μ lを加える。
- 31) フロー評価へと移す。

20

【0690】

小胞はまた、所望により、単一の抗体・カラム工程を使用して試料中で免疫沈降させることもできる。たとえば、前立腺特異的小胞は、抗PSCA抗体を用いる単一の免疫沈降を実施することによって捕捉することができる。

【0691】

30

フロー分析

上記のように捕集した五つの集団をフローサイトメトリーによって分析する。1) 最初の分離されていない血漿、2) フロースルーカラム1、3) 保持されたカラム1、4) フロースルーカラム2、および5) 保持されたカラム2。全集団が、上記で加えたCD9-FITCおよび抗PCSA-PEを有した。ビーズは除去されたが、しかしPEコンジュゲート抗体はcMV上に残留し、フローサイトメトリーで評価することができた。

- 1) cMVの溶液を、cMV/イベントの数量化のためのTruCount管に移す。
- 2) Beckman Coulter MoFlo-XDPセルソータを使用するフローサイトメトリーによって評価する。TruCount管 (Beckman Coulter) に基づいてイベントの数を算出する。

【0692】

40

実施例33: 血漿cMV中のmiRNA発現のcMVレベルへの正規化

この実施例は、細胞タイプ特異的cMV表面タンパク質マーカーの蛍光強度、免疫沈降および核酸検出を組み合わせることによって体液中のmiRNA発現を正規化する方法を示す。この手法は、関心対象のグループ間のバイオマーカーシグナルの増幅を可能にする。この実施例は、前立腺癌において上方制御されることが示されているマイクロRNAであるmiR-22を使用して、前立腺癌の対象および正常 (すなわち非前立腺癌) からの血漿試料を区別するためのこの手法を説明する。たとえば、Zhang et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity. Br J Cancer 103:1215-20 (2010)を参照すること。

【0693】

50

実施例32に概説した手法を使用して、前立腺癌および正常ドナーからの血漿微小胞を、抗CD9抗体（CD9-FITC BD Biosciences Catalog # 555371, BD Pharmingen, San Diego, CA）および抗PCSA抗体（社内で調製）によって二重に免疫沈降させた。図18Aは、Beckman Coulter MoFlo-XDPセルソータおよびフローサイトメータを使用して陽性イベントを同定する、例示的試料のための入力血漿を示す。図18A中、全血漿が主として二重陰性イベント（すなわちCD9-/PCSA-）を有することが見てとれる。R7と印された右上四半分中にいくらかの二重陽性（すなわちCD9+/PCSA+）がある。第一のCD9カラム上での捕捉、次いで解放および第二のPCSAカラムへの第二の捕捉を含む二重免疫沈降ののち、認められたcMV集団は、CD9+/PCSA+二重陽性イベントにおいて有意に濃縮されている。二重免疫沈降後の集団を示す図18Bを参照すること。

10

【0694】

上記集団を溶解させ、miRNA/mRNA含量に関して評価した。非処理の血漿中のmiR-22のレベルは、癌試料よりも正常試料において高かった。図19Aを参照すること。濃縮血漿中の全cMVから単離された全RNAからのmiR-22レベルに関して同様な傾向が認められた。図19Bを参照すること。しかし、単離されたCD9+/PCSA+cMV中のmiR-22の未処理のコピー数は、非癌試料に比べて癌試料においてより高かった。図19Cを参照すること。各二重陽性cMV集団からのmiR-22の認められたコピーの数を、実施例20におけるように抗PCSAを捕捉物質として使用して得られた対応するPCSA MFIと比較すると、この隔たりは増大した。図19Dを参照すること。

【0695】

20

第二の実験において、上記方法を使用して、抗PCSA抗体を使用する単一の免疫沈降を実施し、得られたcMV集団をフローサイトメトリーによって評価した。入力材料の例示的試料のフロー分析の結果が図18Cに示されている。はじめ、PCSA+試料は少なかった。抗PCSA抗体による免疫沈降ののち、集団はPCSA+cMVに関して高度に濃縮された。図18Dを参照すること。そして、この集団を溶解させ、前立腺癌ドナー血漿および正常ドナー血漿の両方からのmiRNA/mRNA含量に関して評価した。図19E~19Gを参照すること。二重免疫沈降の場合と同様に、各PCSA陽性cMV集団からのmiR-22の認められたコピー数を、対応するPCSA MFIと比較すると、癌と正常との間の隔たりは増大した。

【0696】

実施例34: 抗体捕捉miR発現の抗体レベルへの正規化のためのスコア

30

この実施例は、循環微小胞（cMV）中のmiRNAのレベルを検出することによって癌患者からの血漿を非癌患者から区別するためのスコアを生成する方法を例示する。

【0697】

前立腺癌患者および正常な個人（すなわち、前立腺癌を有しない）からの血漿を1.2 μM フィルタでろ過したのち、150kDaカラムで濃縮してcMVを濃縮した。実施例17を参照すること。前立腺特異的cMVを計測するために、PEコンジュゲート抗PCSA抗体を濃縮物200 μlとともにインキュベートした。Miltenyi磁気カラムを使用することにより、PCSA標識濃縮物をPCSA発現性cMVに関して精製した。実施例32を参照すること。Qiagen miRNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA) を使用して、PCSA発現性cMVを含有する保持されたビーズからRNAを単離した。PCSA標識濃縮物60 μlを、PCSA、PSMA、B7H3、CD81、CD63およびCD9に対するHPLC精製抗体からなるミクロスフェアアッセイに付した。PCSA、PSMAおよびB7H3に対する抗体を捕捉物質として使用し、CD81、CD63およびCD9に対する蛍光標識された抗体を検出物質として使用した。実施例22~23を参照すること。平均蛍光レベル（MFI）を記録した。

40

【0698】

各試料濃縮物からRNAを単離した。ABI 7900 (Applied Biosystems, life Technologies, Carlsbad, CA) 上で前増幅工程を用いるTaqmanアッセイを使用してmiR-22およびlet-7aのコピー数を決定した。診断スコアを算出するために、各試料中のmiR-22およびlet-7aのコピー数を10で乗じたのち、ミクロスフェアアッセイ法を使用して決定されたその試料中のPCSAのMFIで割った。これらの値の合計をミクロスフェアアッセイからのPSMAのMFI値に

50

加えた。三つすべての値の平均が診断スコアを出し、それを使用して癌と正常とを識別した。換言するならば、診断スコアは、 $10 \times \text{miR22/PCSA MFI}$ 、 $10 \times \text{let-7a/PCSA MFI}$ および PSMA MFI の平均に等しい。

【0699】

ランダムに選択した40の試料を使用してスコアの閾値を決定した。癌を区別するための531以上のしきいスコアを使用して、感度83%および特異度63%の性能を得た。閾値が水平破線によって示されている図20Aおよび20Bを参照すること。図20Cは、データを用いて生成されたROC曲線を示す。AUCは0.77であった。この閾値を使用して、20の試料の独立コホートを分類した結果、感度82%および特異度67%の性能が得られた。

【0700】

実施例35:PCaのmiRNAシグネチャー

この実施例は、前立腺癌を区別するために使用することができる循環微小胞 (cMV) のmiRNAシグネチャーを示す。

【0701】

実施例34に記載された試料のうち、PCSA発現性cMVに関して精製された21例を使用して、様々な試料集団を区別するマイクロRNAを同定した。試料コホートは、八つの前立腺癌、三つの高度PIN、二つの炎症性疾患および六つの正常 (すなわち非前立腺病状) を含むものであった。PCSA発現性cMVから単離されたRNAのmiR含量を、実施例25に記載されたExiqonカードを使用して分析した。癌試料を有意に識別するmiRを同定するための統計的分析を実施した。トップ17のmiRは、miR-182、miR-663、miR-155、miR-125a-5p、miR-548a-5p、miR-628-5p、miR-517*、miR-450a、miR-920、hsa-miR-619、miR-1913、miR-224*、miR-502-5p、miR-888、miR-376a、miR-542-5p、miR-30b*およびmiR-1179を包含した。図21は、miR-920 (図21A) およびmiR-450a (図21B) の例示的プロットを示す。図示するように、miR-920は、交絡疾患において過剰発現しているが、一方、miR-450aは癌において下方制御されている。

【0702】

実施例36:循環微小胞 (cMV) 中のタンパク質、mRNAおよびマイクロRNAバイオマーカーの分析

小胞タンパク質バイオマーカーは、ミクロスフェアベースのシステムを使用して分析される。関心対象の標的タンパク質に対する選択された抗体を差別的にアドレス指定可能なミクロスフェアにコンジュゲートする。たとえば、実施例22の方法を参照すること。コンジュゲーションののち、以下に記すように、抗体コートされたミクロスフェアを洗浄し、PBS (Catalog # 37538, Thermo Scientific, a division of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 中Starting Blockブロッキングバッファ中のインキュベーションによってブロックし、PBS中で洗浄し、血漿からの濃縮cMVとともにインキュベートする。cMVの捕捉ののち、ミクロスフェア-cMV複合体を洗浄し、テトラスパニンCD9、CD63およびCD81に対するフィコエリスリン (PE) 標識検出抗体 (すなわち、PE標識抗CD9、PE標識抗CD63およびPE標識抗CD81) とともにインキュベートし、洗浄したのち、ミクロスフェアリーダ上で検出する。ミクロスフェア100個からの蛍光シグナルを計測し、差別的にアドレス指定可能なミクロスフェアそれぞれ (それぞれが異なる捕捉抗体に対応する) の平均蛍光強度 (MFI) を算出する。上記テトラスパニン検出物質に加えて、検出物質と捕捉抗体との様々な組み合わせを検査する。

【0703】

患者試料中のcMVの総数を決定するためにフローサイトメトリーを使用する。患者血漿試料を、PBS中で100倍に希釈したのち、1試料あたりのイベントの数量化のために、BD Trucount管 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中、室温 (RT) で15分間インキュベートする。Trucount管は、フローサイトメトリーによって試料ごとにイベントを正規化するために使用することができる既知の数の蛍光ビーズを含有する。FACS Canto IIサイトメータ (BD Biosciences) による試料獲得およびFlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc., Ashland, OR) による分析を使用して、試料イベントの数および1管あたりのTrucountビーズの数を

決定する。1試料あたりの絶対数の計算は、必要ならば、製造者の取り扱い説明（BD Biosciences）および希釈係数による調節にしたがって得られる。

【0704】

血漿試料由来のcMVを有するペイロードからmiRNAを検査する。cMVを濃縮し、修正Trizol法を使用してmiRNAを抽出する。簡潔にいうと、cMVを、RNアーゼAによって処理（20 µg/ml、37℃で20分間、Epicentre（登録商標）、Illumina（登録商標）社、Madison, WI）したのち、Trizol処理（各100 µlに対しTrizol LS 750 µl）し、室温で30分間、1400rpmでボルテックスする。遠心分離後、上清を捕集し、miRNeasy 96精製キット（Qiagen, Inc., Valencia, CA）によってRNAをさらに精製し、-80℃で貯蔵する。RNA40ngを逆転写し、ABI 7900（Applied Biosystems, life Technologies, Carlsbad, CA）上、Exiqon qRT-PCR ヒトパネルIおよびIIに付す。たとえば、実施例13~14、25を参照すること。SDS 2.4ソフトウェア（Applied Biosystems）を使用してC_T値を算出する。すべての試料をインタープレートキャリブレーションおよびRT-PCR対照に対して正規化する。

【0705】

また、血漿試料由来のcMVペイロード中のメッセンジャーRNA（mRNA）を検査する。上記のように、cMVを単離し、RNアーゼAによって処理する。上記のように修正Trizol法を使用してmRNAを抽出し、Qiagen RNeasyミニキットによって70%エタノール（Qiagen, Inc.）で沈降させて精製する。捕集したRNAを逆転写し、一色遺伝子発現分析のためのAgilentの「Low Input Quick Amp Labeling」キットを製造者の取り扱い説明（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）にしたがって使用してCy-3標識する。標識した試料を、AgilentのWhole Genome 44K v2アレイにハイブリダイズさせ、製造者の仕様（Agilent Technologies）にしたがって洗浄する。Agilent Bスキャナ（Agilent Technologies）上でアレイをスキャンし、Feature Extractor（Agilent Technologies）ソフトウェアによってデータを抽出する。抽出したデータをグローバル正規化法によって正規化し、GeneSpring GXソフトウェア（Agilent Technologies）によって分析する。

【0706】

血漿からのcMVの特定の部分集団からmiRNAおよびメッセンジャーRNAの両方を検査することができる。たとえば、cMVを濃縮したのち、免疫沈降を使用して、PCSAに関して陽性である集団を単離する。実施例32~33を参照すること。上記のようにPCSA+cMVを単離し、miRNAおよびmRNAを単離し、分析する。同じ方法を使用して、関心対象の様々な小胞表面抗原に対する様々な捕捉物質を使用して単離された小胞のmiRNAおよびmRNA含量を検査する。加えて、一つより多い表面抗原に関して陽性である小胞を単離することができる。実施例32~33を参照すること。

【0707】

正規化した分析対象値をR（The R Project for Statistical Computingから入手可能、www.r-project.org）またはSASソフトウェア（SAS Institute Inc., Cary, NC）の中にインポートする。分析の前に、データを、適切な品質管理手段を使用してフィルタリングし、変換する。分析は以下のように実施する。

【0708】

シグネチャー性能評価（事前に指定されたシグネチャーまたは新規シグネチャーの場合）

上記方法（すなわち、単離された小胞集団のペイロード分析）を使用して生成された試料セットを使用して、臨床転帰の非盲検化または試料の臨床検査室検査の非盲検化のいずれかの前に完全に指定されるバイオシグネチャーの性能を評価することができる。そのような場合、シグネチャーは、事前に指定されたものとみなされ、すべての試料に関する予測される転帰を得るために、修正されない状態で、この試料セットに関する新たな分析対象物データに適用されなければならない。事前に指定されたシグネチャーの性能は、予測された転帰と真の転帰とを比較することによって評価される（たとえば、診断感度、特異度および精度に関して）。統計は性能推定値および信頼区間を含む。

【0709】

事前に指定されないシグネチャー（すなわち、臨床転帰および試料の検査室検査結果の

両方の先見によって導出されるもの) の場合、これらの試料はさらに、シグネチャーの性能を評価するために使用されてもよい。しかし、潜在的に偏った性能の推定を減らすために、以下に説明するように、マーカー選択およびクラス予測工程を含むk分割交差妥当化ループ内にネストされた状態で統計的分析を実施する。

【0710】

新規シグネチャーの場合のマーカー選択

マーカーは、当業者に公知の一般的に適用される技術のサブセットを使用する、疾患転帰との関連に関する検査によって統計的に情報提供的であるならば、新規シグネチャーに含まれる。それらは、1) ウェルチ (Welch) 検定—分散が等しくないときのグループ平均間の差に関するロバストなパラメトリック統計検定、2) ウィルコクソン (Wilcoxon) 符号順位検定—ROC AUCの改善 (0.50超) を示すものと解釈することができるロバストなノンパラメトリック統計検定、3) Youden's J—マーカーに関する、すべての可能な診断閾値にかけて最大の感度および特異度の組み合わせとして算出されるものを含む。統計的有意さは並べ替え検定によって評価する。

【0711】

マーカーは、実施された統計検定の数に関して検定が有意であるならば、統計的に情報提供的と判断される。より具体的には、たとえば偽発見率閾値を使用して、またはファミリーワイズエラー率の制御により、1比較あたりのp値を複数の検定に関して調節する。

【0712】

新規シグネチャーの形成

上記マーカー選択段階で情報提供的マーカーのサブセットが同定されたら、十分に確立されたモデル化技術を使用して新規なマルチマーカーモデルを形成する。フルトレーニングデータセットのモデルをトレーニングすることによってシグネチャーのためのパラメータを推定し、「シグネチャー性能評価」の下で記載されているように、「事前に指定されないシグネチャー」のための手法を使用してシグネチャーの性能を評価する。これらの工程においては、判別分析、サポートベクターマシン、ロジスティック回帰および決定木を含む簡単に十分に確立されたモデル化技術が使用される。すべてのモデルの結果が報告され、それにしたがって最適なマーカーパネルが同定される。

【0713】

利用可能ならば、関心対象の臨床変数のデータセットに対してさらなる事後分析を実施する。そのような変数としては、年齢、民族、PSAレベル、直腸内触診 (DRE) 結果、以前の生検の回数、生検および生検結果の適応症 (たとえばHGPIIN、異型、BPH、前立腺炎または前立腺癌) などがある。そのような分析は、以前に画定されたモデルに共変量または層別変数を導入することによって実施される。p値は複数の検定に関して補正される。

【0714】

実施例37: 循環微小胞 (cMV) における生物学的経路発現

この実施例においては、cMV中のmRNAペイロードの発現プロファイリングを実施する。cMV中に発現するmRNAの経路分析を実施して、もっとも有意な生物学的経路を同定する。

【0715】

全小胞集団中のmRNAをプロファイリングするために、実施例6に記載されたる過および濃縮を使用して、三つの前立腺癌試料および三つの非癌対照試料由来の血漿1mlからcMVを単離した。血漿濃縮物100 μ lからRNAを抽出したのち、それを、RNアーゼAによる処理のち、Trizol LS (Invitrogen, by life technologies, Carlsbad, CA) による溶解のための25 μ lアリコットに細分割した。四つのアリコットそれぞれからの水相を70%エタノールで沈降させ、単一のQiagenミニRNA抽出カラム (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 上で合わせ、30 μ l量に溶出させた。溶出したRNAは、標準的手段によって確実に数量化することは困難であることができる。したがって、10 μ l量をその後の標識反応に使用した。一色遺伝子発現分析のためのAgilentからの「Low Input Quick Amp Labeling」キットにより、製造者の取り扱い説明 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にしたがって、ただし以下の変更を加えて、試料をcy-3標識した。1) 第三の希釈比が1:5になるようにCy3

10

20

30

40

50

標識のためのスパイクインミックスを変更し、各試料に1 μ lを加えた。2) 試料ごとにVacufugeを二重反復で使用して試料10 μ lを2.5 μ lの容量まで減量した。3) 増幅された試料の精製工程までプロトコル全体を通して各試料を二重反復で処理した。精製プロトコルの開始時、2つ組の試料を合わせ、その後、カラムに通した。4) 精製後、試料を数量化しなかったが、精製された試料の全量をアレイにハイブリダイズさせた。次いで、標識された試料を、製造者の取り扱い説明 (Agilent Technologies) にしたがってAgilent Whole Genome 44Kマイクロアレイにハイブリダイズさせた。Feature Extractorソフトウェア (Agilent Technologies) によってデータを抽出し、GeneSpring GX (Agilent Technologies) によって分析した。表20中に見られるものを含め、4291のmRNAが濃縮物中に存在することがわかった。GeneSpringソフトウェアを使用して、発現パターンと関連する経路を同定した。上記分析にしたがうと、アンドロゲン受容体 (AR) およびEGFR1経路が、小胞集団中もっとも有意に発現した経路であった。ARおよびEGFR1経路のメンバーを表21に示す。

10

【 0 7 1 6 】

(表 2 0) 全cMV中のmRNA発現

DNAJA1, RPL23, RPS13, VASH1, YWHAZ, ORMDL3, UBE2I, DNTTIP2, RPL18, HLA-DRB1, C6orf62, GGA1, IMP3, JUN, NUDC, HLA-DRB5, NDUFB9, BTF3L1, RNF11, KLK3, DENND4B, NECAP2, PLAC8, C14orf166, HNRNP, MTHFS, TCP1, U2AF1, MRPS12, IL8RBP, OAZ1, STRA13, C2orf79, EBNA1BP2, HMGNI, PYCR2, CREB3L1, CHRDL1, ZNF254, UBE2B, GAPDH, NDUFV2, LCP2, VDAC3, TSSC1, RBM22, YWHAZ, GABARAPL2, PPP1CA, FCN1, DNAJB6, CD44, KIAA0430, HSP90AA1, ATP5J2, C17orf72, GLCC11, 7-Sep, CTSC, TNRC18, ARL6IP1, HLA-J, GPX4, SYK, RPL23AP53, SDPR, SFRS3, RPL35A, UBC, TALDO1, NKG7, MFN2, TNF2, SNCA, LYN, RHOC, PPIA, RHOA, TPM3, ATP6V1F, MYO1F, MUC5B, HS2ST1, BOLA3, HMGNI, FKBP1A, LOC100131582, DNAJA1, RPL10, SYCE1L, RPS25, RPS2, CDKN2A, AHSP, EPB42, C21orf7, LOC100288578, CFD, LOC100134569, LCK, CD52, HSD17B10, OAZ1, MAT2A, DCI, HSPA1A, RPL23A, CCT3, AQP2, LSP1, RNF10, RPL39, EIF3E, RPS29, MLXIPL, KPNA2, UTF1, TALDO1, CRLF3, YWHAB, HBQ1, SSR4, ST13, HLA-DRB3, PFN1, NOS3, FAM102B, WHAMM, PRR13, NPEPL1, MCL1, LOC100132247, NONO, IL26, CCDC69, LBH, RPL35, NCOR2, FBRS, RPS10, RPL4, FAM128B, RPS10, FBRS1, DYNLRB1, ISCU, PLA2G16, PRR5, RNASEH2A, TNRC6B, RPL36, PGSL, LGALS9C, NCOA4, SFRS5, CPNE5, C3AR1, RPL14, EEFD, EMX1, STK10, RPS10, ZFP36, C21orf58, SPATA2L, MTA1, FLJ43681, MRPS6, HIST1H2AD, PSMD8, ITGB2, RPSA, PMEP1, PARP1, TRAPPC5, ARPC5L, MRPL41, PDE4C, CCDC108, ANKK1, APBB1IP, MCT5, TCL1A, HLA-A, ZNF775, POLD4, ACTB, CYBA, DAD1, ARF1, MRPS21, FAM107A, RPL38, SMARCC2, DNAJB2, ANXA1, EVPL, PHPT1, ZNF784, GRB2, SCYL1, VPS4A, RPL23AP7, CTNNB1, HIST1H4H, SMARCC2, RPL36A1, WIP1, VPS35, C10orf125, RPL10A, RPS15, CARD16, GPM3, EIF3C, FPR1, ICT1, BZW1, C15orf28, HLA-A, RAB18, ETTB, IL1B, SLC45A4, BAX, IFI27, PPIA, NYX, SLC27A1, ANXA11, ACRBP, TERT, NDUFA6, ZCCHC18, CDC42, RPL30, TNRC4, PWP1, LOC729046, NDUFA4, UFC1, TUB, RDBP, ERBB2, OAZ1, RPS3, TSPG1, HNRNPAIL2, ARMXC6, FAM43B, C16orf11, CASP3, MIP, CUTA, PABPC1, LOC283663, HMOX1, RPS10P7, GNAS, C4orf3, MRPS21, SPARC, LSM3, TBCB, GRAMD1C, CHMP4A, RASL10B, LOC100293539, NDUFC1, CWC15, CHRN2, KRT10, SNX3, RAPIA, CPLX2, ILDR1, HIST1H2BI, ADAMTS13, MRPL34, FKBP3, ZNF680, SRRM3, MYOP, FTH1, MMD, POLR2F, ODC1, BLOC1S1, UBE2L3, MCM7, C14orf156, RPSA, ARHGAP1, ATP5SL, SOD1, RANBP1, CARD8, NACA, NCRNA00152, SUMO2, H3F3C, SNRPF, YWHAQ, SCLT1, DAD1, SNTA1, DHRS1, CYB5R3, SNX5, SLC25A5P1, ZNF714, C9orf131, MTMR14, RNF44, LOC100132161, HLA-DPB1, OR10H2, ID2, SSRP1, RPS27, MXI1, TEAD3, LOC648771, TMEM158, TIAM1, RPSA, IFI27L1, HINT1, USP33, H2AFZ, BLOC1S2, TNFAIP8L2, HMGB1L1, C20orf108, RPS29, LMO2, HNRNPAIL2, LOC647121, RAC1, NPC2, SMR3A, HIST1H4B, FXD5, LARS, RALGDS, NBP3, THEM5, MAPKAPK3, RPL23, TMSB10, MMP28, C19orf56, HMBS, PSMA2, MTCH1, GNB2L1, COX6B1, UBB, TIMM9, CASP8, BRD7, LCE3E, RPL14, MT1G, LBH, RPL3, RPL13, FLOT2, SYMPK, PMPCB, HMGNI, EEFD, ROD1, PTP4A2, PCBP1, CACNB3, FHIT, TMBIM6, LCE1D, HRASL5, TEF, TPT1, RPS15, SNHG5, RPL9, MIER1, MYC, DNAJC4, C6orf25, RPL21, CABP7, CTXN1, STMN1, FAM96B, SELK, COX17, SNRPB, FLJ22184, EIF3B, C12orf65, U2AF1, RPL32, FYN, SP5, LOC100130107, CCDC56, NBP20, MMADHC, PRDX5, SPINK7, BTN3A2, TMEM38A, ZNF2, DECR1, NDOR1, CDK3, HNRNPAIL2, SMAD2, HCN2, TOMM20, PFN1, SFRS18, B2M, SUB1, PKM2, COX6A2, NLGN2, MBD2, RILPL2, CASP1, NACA, CCL5, RPL37A, RPL22, DYNLL1, SAT1, LSM5, LOC441245, ZFAND6, EEFG, MAP3K3, LSM1, PSMB6, HBG1, EPHX3, HDAC1, LCE5A, PSMC1, MCM3, BAX, MRPL13, TUBA3D, MTIF3, NCF1, RPS17, RPL10, CIRBP, PSMA6, AMICA1, HNRNPA3, RPS25, C19orf56, POLE4, MAP1LC3B, FASTK, RPL23AP82, UQCRC1, RPL24, PRELID1, RPS19, RPL5, PGK1, KIAA0494, HP1BP3, DMWD, RPL26, EIF6, PCBP2, TRMT112, SEC11A, RPL21, MEI1, CCNI, NCKAP5L, TMSL3, AHNK, BTF3, HNRNPA1, PTPN6, SIPA1L1, POLR2J, C3orf1, C6orf48, LOC100128731, PCBP1, C17orf49, ETS2, HIST1H3D, TUBB6, SH3BGR1, CIAO1, FAM58A, HIST1H2BE, MRPL20, RPL29, HIST3H2A, LOC407835, RPL37, RAB35, FLI1, TNFRSF14, FAM129A, GNG5, RPL24, JAK1, C5orf39, LILRB3, C16orf3, A2M, ZNF592, NPHS2, HIGD1A, RP3-377H14.5, KRTAP5-8, PIP5K1C, FAM124A, C22orf32, S100A13, IFITM1, CSDA, NDUFA6, RPL12, FTH1, RARRES3, ZFAND5, RPL29, DAP3, RNF7, COX4I1, FAM110A, FOXN3, CXCR4, BBC3, RPS8, CD79A, POTEE, APOL3, PPM1A, FECH, RPLP0, EIF3K, LOC100293090, GGCT, TMEM93, RPS7, RAPIGAP, RABEP1, CEBPB, LGALS3, RCOR2, VIM, IFITM5, C1orf144, EIF3L, CAPNS1, NBP10, S100A12, E2F2, COX5B, ZNF24, CTBP2, RABAC1, C11orf83, ANKDD1A, CD48, HSPB1, VAV1, LSM4, GLTPD1, SH3KBP1, RPL3, RPS2, RPS3A, LCE2A, DAB1, LDHA, CMTM3, MTPN, SCARF2, AES, CD4, LOC645955, PFDN2, ELP2, CTDSP2, LSM6, EIF2B1, METAP2, TRMT112, ARPC2, TCF4, APOL1, TRMT5, LOC647979, SLC39A4, RPS15A, EIF3L, WFDC3, EVX1, CHCHD2, ARHGAP25, SNW1, SNHG8, TBCA, KIAA0125, HIST1H4E, ACTB, KLF6, EEFD, SLC2A1, ACADVL, RPS28, C19orf44, HDAC7, RPSAP52, NDUFA11, KIAA0240, CYTH1, GSTO1, MCAT, LAMP1, LOC644950, HIST1H3B, NDUFV1, MKRN1, TUBA4A, RPLP0, PALM, DNAJB5, PLEKHB2, UCRC, CLEC2D, CAMKK2, HMGNI, FAM119A, RPL18A, NGDN, RP11-431O22.2, KIF2A, HBB, SLC25A37, CMTM7, THOC7, ATP5G2, C7orf41, MAFA, VMA21, C14orf162, CLC, SLC25A5, LOC100132247, MKNK2, LOC729992, EEFA1, SLC25A6, FAU, SCGB3A2, RGS2, BCL11A, MRPL18, CCDC18, NDUFS7, LOC729678, SYNPO, RPLC36, PRSS36, CALM1, TLE4, UBA52, MYL6, COMMD6, TCF7, ATP5F1, OTOF, HOXA3, CLPP, CACNA1C, CCDC8A, BIRC5, SKP1, TSPO, RPS16, UBE2L3, GM2A, RPL36AP40, C9orf16, SLC9A3R2, STRBP, PPIAL4A, ADAMTS7, BRP44, ACP5, MPST, FBXO9, CCT4, CAND1, C10orf47, USP39, ST13, AKT2, NHP2, ENY2, SPG21, WIPF1, RAB37, TMEM37, TCEB1, BBX, RPSA, PDS5B, C20orf43, ZC3H6, ZNF493, LOC644563, 15-Sep, HIST1H1C, HECA, EXOSC9, MRPL55, RPS2P32, RPS27A, ANXA3, KCMF1, PLP2, KHDRBS1, RABGAP1L, OVCA2, SLC26A1, ATXN2L, C11orf9, RPL18A, MEX3D, TMEM14C, TSC22D1, HNRNPM, IGF2, NUCKS1, 5-Sep, NPEPPS, RPS20, BHLHE23, SQDRL, RPS4Y2, VNN2, RPS4P16, CORO1A, MIF, RPS26, RHEB, LOC642031, IGBP1, FOXA3, IGLL1, CCDC91, SF3A2, RPL14, HIST2H2BE, CCDC28A, SUMO2, H2AFZ, TRAF3IP3, VPREB3, MRPS34, HLA-DQA1, ZAP70, RHOH,

10

20

30

40

TRABD, USMG5, 7-Sep, ZMAT2, NCAN, CXCL3, C19orf24, TK1, LOC100130107, TRIP12, RPL17, BANP, VPS18, ATF4, ZFAND5, KRAS, KCNK15, SEPHS2, LOC728449, HDAC7, RPS3A, NSUN5B, TOMM7, KHSRP, ALAS2, TRAF3IP3, GTF2A2, GRIN2D, RPL8, RBM8A, LOC100129250, NEDD8, GIGYF2, PSMD13, PABPN1, FAHD1, GABARAP, CTSA, HSPD1, KLHL34, IK, ITPA, GMFG, GNAZ, SEPW1, SCRT2, LOC100288165, TANK, TFPT, C16orf81, PDCL3, UBL5, DCAF5, RNH1, RYBP, GGT6, TNRC18, IMMT, PSMD7, NACAP1, UBE2K, NKX1-2, SQSTM1, GPBP1, SUPT4H1, C6orf106, ATP5I, RPLP0, EN2, METTL5, BZRAP1, IK, SHISA5, HNRNPA1L2, DNAJC15, PRKAR2A, SDK2, RAB8A, RPL34, INPP5D, PXN, AHCY, HNRNPA1L2, ZNF492, UQCRCF1, UBE2S, ATP5D, MRGPRF, NDUFA7, CSNK2B, CKS1B, S100P, MRPL34, PWP2, CD99, SERPINA1, HNRNPA1L2, BAG1, PCDHGA7, LY96, LZIC, POLD1, STUB1, AKIRIN2, POLR2L, CDC2L1, ZNF253, CCDC97, AIP, RAC2, DEAF1, SOX17, NPM1, RPS2, NEDD8, MRPL32, VPS24, NDUFS1, COX5A, SPRR1A, LOC649294, TRIM4, FRG1, EIF1, MAN1B1, DUT, ATP6V0C, EFHD2, C1orf175, PLEKH01, HCLS1, ST13, MRPS25, LSM14A, SAT1, C1orf151, C11orf10, MT3, G3BP1, UBC, HNRNPA3, LEPROT, PPP1R9B, STMN3, GTF2I, HIST1H1D, YWHAQ, HIST2H2AC, RPL37A, FRG1, MED13L, PP1A4A, FBXO24, CAPI, RPL35, MGRN1, USP7, PTRF, KRTAP1-3, TMEM59, NDUFA13, MRPS24, UBA52, LOC440461, S100A6, CDC42, KIAA1462, SOD2, LSM14A, SAT1, C1orf151, RABGAP1L, SPIB, SAPS1, FAM129B, LIPE, PSMB8, MED10, SERBP1, NME2, GOLGA7, FLJ23867, KLF14, GLRX5, MRPL15, KCNK7, RPS11, PIM3, GMPR2, HCN4, RNASEH2C, CHMP2A, CSTA, ZNF713, BTG2, POTEF, CDC37, ZNF826, HNRNPC, YPEL5, RPS14, FTL, FOXD3, MXD1, RPL35, ATF6B, WWC3, DYNCL1L2, BAD, CRIP1, NEDD8, ZNF467, MRPS6, RABGAP1L, TPR, CCDC66, KISS1R, SEC14L1, BBS5, NP, YOD1, CGB1, S100A10, LOC100131262, PPBP, SDCBP, WASH1, C19orf28, RPS19BP1, PTMA, HBM, SERPINB1, RPS10, MYH14, C11orf73, C17orf88, CFL1, RPL23A, DNAJA1, IFI16, VAMP5, TUBA1C, MOGS, VDAC3, WDR1, GIMAP6, HSPA8, TP53TG3, UIMC1, PAPOLA, ZBTB45, RGS10, STRN4, EXOSC1, BCAM, ZNF444, MRPL53, MESDC1, C6orf115, DEXI, LOC126170, EID1, SELENBP1, EEFD1, RAB14, PDZK1IP1, TMEM201, FAM195B, PABPC1, C5orf4, OGDH, PPP1CA, HSP90AA1, C4orf14, CRTCL, TXNL1, C14orf43, RPL34, MNDA, NDUFV3, DRAP1, ANXA5, ARHGEF18, ARF5, SPSB3, ttag7.1015, LOC730144, RPL27A, ZNHIT1, HGS, TALDO1, CNN2, THRA, MRPS18C, FOXQ1, COMMD8, CTSG, BTIF3, ARL6IP4, TUBA1A, C15orf21, LENG8, ttag7.873, MRFAP1L1, LGR4, FAM128B, IRX5, USP4, ZBTB80S, AIF1L, CTSA, NDUFA12, CDKN1A, CAST, PPIA, EPB41, TMEM50A, RAN, EMP3, C13orf15, HNRNP, MRPS36, TBC1D10B, INTS10, LOC541471, ANAPC5, RNF5, C9orf167, DUSP23, HNRNPA3, RTN3, TALDO1, TXN, FARSB, BIN2, PP1A4A, OR2H1, LOC541472, ZC3H11A, EHBPI1L1, RPS3A, RNF220, LOC389641, SEC11A, POU3F3, NRN1, MAGEE1, CYP2W1, C11orf48, HEMGN, HBXP, SHARPIN, TMEM164, DOCK8, DVL1, HNRNPH1, MT1X, HNRNPC, AFTPH, VEGFB, GNG7, ZFPM1, ARHGAP27, HIST1H2BO, RRAS, C1orf56, LOC651250, RPS3A, EIF3M, LOC100132161, ZNHIT3, PTMA, C18orf10, NDUFB7, DEDD2, H2AFV, EIF4E2, RNF181, EIF3D, PIGY, ABR, LOC643997, SUMO2, ZFP36L1, TAGLN2, STAT6, NDUFV3, RAB11A, GNB1, EVI2A, C9orf163, LMOD1, BNP3L, DENND2D, ATG3, APO2S1, BLMH, CASP4, GZMB, NGFRAP1, RPS17, AGAP3, NCL, ANXA2P1, RPS5, NDUFB2, PCMTD1, GCA, EIF1, FGFR1OP2, C19orf73, PSMB10, LOC439949, ROMO1, RGL4, CD86, YWHAZ, RSL1D1, RPS10, ATP5B, NCOA4, NFE2, APOA1BP, ARL6IP4, ATP5L, LOC100288418, C17orf61, MDFI, EEFI1B2, A2ML1, ANK1, PUF60, HIST2H4B, DLX1, HARA1A, SOD1, KRT81, RPL12, NUP50, IGLL1, MT2A, CCDC12, ACTR2, LOC100130331, REPIN1, OXNAD1, SLC7A7, RNF151, C19orf43, C9orf18, DDX19A, NDUFB1, TNFAIP1, DPYSL2, VSIG10L, NDUFA1, RPS26, GTPBP6, KPNB1, TBCD, JMDJ8, CYTIP, HIST1H2BJ, LOC283177, LTA4H, PPP1R14B, DIRC1, APTX, FBXO7, MT1B, TRIM10, SUMO2, HLA-B, UFD1L, PIP4K2A, SH3BP5, GH1, HRASL5, CCL14, EIF4EBP1, MUC4, TACR2, USP17, HMGN2, SILV, TNXB, COX16, LOC100288755, ARL8A, ZNF429, SPEF1, RPS19, ALPP, AES, HIST3H2BB, PLEKHG6, CDKN2D, SYNPO, BAT3, ASCL2, MNT, PAQR6, H2AFZ, RPS10, PTPRE, UQCRCQ, RBM3, hCG_19809, LHPP, RPL13A, AK2, ZFR2, RNF168, RPL21, SHMT2, POLR1D, MAP3K7IP2, MAX, CYP11B1, CAMKK2, HNRNPC, GIMAP7, PDZD7, DCAF10, LAGE3, FTL, PTPN4, HNRNPK, DEFA3, RNF167, PSMA4, CCT7, EIF3M, IQSEC2, FBXO25, ICAM2, ZMAT2, SUMO2, SNRPD1, GIPR, RIOK3, AIF1L, GNAS, RELB, LOC493754, PSORS1C2, MRPS18B, CASP4, CAPZA2, S100A4, TPM3, OGFR, RPLP0P3, CAPG, SLU7, H19, LOC100289641, MRP63, POLR2L, HMGB1, C22orf28, PTDSS1, RPL36A, PPIA, NDUFA1, DDB1, PSMA7, SUB1, ANP32B, PAFAH1B1, RBMS1, ATP6V0E1, TERF2IP, TUBA4A, TUBA1B, C12orf62, SKA2, BCL3, CDC42SE2, RPL23A, TPM4, KCNMB1, HIST2H2AA4, FBXL15, PTMS, LOC100289173, TESC, RRAGA, BLVRB, KRT3, HIST1H2AM, FTH1, CD3G, RPL29, TCTE3, PLCH2, RPL15, TMIGD2, SFRS7, SPI00, LTB, GPT, NCF2, ADD1, LOC100294179, FOXO3, MED13L, BCKDHA, LOC100134663, HNRNPA1, SLC22A7, ZDHHC8, JSD2, ARDC2, ASB16, LOC100289587, PRPS1, SYNGR2, RPL9, GGT6, ZNF525, MRPL28, NIPBL, MS4A7, PKN2, ISCA2, PGLYRP1, ODF3L2, NDUFS4, SSB, CMIP, BAX, FAM107A, WDR45, NFE2L1, DDX1, SHISA4, MMP17, TMEM173, FGFBP2, GRIN1, HDGF, RNF114, CISH, TPT1, ABI3, CACYBP, HINT2, CKB, UBE2D3, LOC646577, IFITM3, ILK, LOC399851, TKT, UXT, NAB2, DYNLL1, SH3D20, SYF2, DARS, OAZ2, PHC2, WTAP, SOX3, COPS3, PREX1, EBP, RPL21, NDUFB11, ZC3H11A, GUK1, PP14571, BLVRA, SF3B2, MRPS2, RALBP1, PSMB1, NFKBIA, TNFSF12, RPS2P32, CAST, WHSC1L1, SLC40A1, TMEM160, MRPL20, CAR52, BASP1, SPSB4, CRELD2, APLN, PAK2, CD63, RAN, TUBA1C, CFL1, GSTP1, UBE2G2, HIST1H2AH, DEFA4, SERGEF, SARNP, RBM5, CBX1, ZNF716, DUSP9, ALAS2, AKAP13, SMEK1, PPP1R14B, BEX2, FCRLB, ECHDC2, MTA1, UQCRC2, MRPS33, TNFSF13B, HMGN3, RASSF1, RCC2, GRIPAP1, LOC119358, ICAM3, DRAP1, RPS27L, TMEM175, EIF4A3, NDUFB7, RPL21, SGTA, TOMM6, RPL21P44, C19orf60, LRP3, AMN, C19orf50, C13orf15, DCTN2, FAU, GSR, SAR1A, WDR1, HLA-DPA1, SLC25A37, TYROBP, EIF2AK1, UTP3, HSP90AA1, RPL22L1, MRPS15, POLR2G, UHMK1, PTEN, TCL6, SPCS1, AKR7L, RFXANK, H2AFJ, FAM65B, LCEIF, RPP21, PALM2-AKAP2, COX6C, RARS, RPL41, C6orf130, MFF, ATP6V0C, ALOX15B, MYL6, F8A1, RGS18, C11orf31, LOC100287593, MRPL14, CDCA3, FADD, ARHGDI1, HSP90B1, FLJ45445, H2AFY, HLA-DRB5, NPM1, GPI, ATP5E, GPR156, NAPRT1, TRADD, BCL2L12, LOC648771, PIGY, TNXB, HIST1H2AE, HMOX2, TARDBP, ACTB, RPS26, H2AFJ, SRRM1, NCF1, YWHAB, MAEA, TMSB4X, MT1H, LOC151009, RPL30, SPN, C20orf108, RPL23AP71, CSTB, HIST2H3D, BID, HIST2H3A, FAM26F, AGRP, RPL28, UBE2V1, ZNF219, FXYS5, VAMP2, EFHA1, MGC10814, RPL39, GZMH, GPR150, ADIPOR1, POLE3, PTMA, HSPA8, RPS3A, CEND1, CYFIP2, PIM1, 9-

10

20

30

40

Mar, FAM104A, CYB561D1, PAPOLA, UBB, SPPL2B, CLDN5, RFNG, WASH1, EFTUD2, YWHAQ, GBP4, RPA2, IRX3, HLA-B, LOC644246, KDM5A, CASKIN1, TOMM5, MRPL51, TMSL3, ZNF746, MRFAP1, BLOC1S2, ARL4C, PRKCH, DOK1, CCDC85B, C10orf116, GTF2F1, RAB31, NTNG2, ZCCHC17, ADAMTSL5, MFSD1, DPEP3, LOC646960, RALBP1, SEC31A, HOPX, GNA13, SH3GLB1, STK24, PSPH, KLRB1, PDCD2, RNF5, ALPL2, GRN, NPAS3, SLAIN2, ADRA2C, NPM1, NDUFS3, LOC284542, C14orf2, PPM1F, NKD2, CDH24, COX6A1, PRNP, PORCN, RBMX, EIF4A1, CCT6A, ATP5E, POLR2K, RPL7, CYP2B6, MFNG, C9orf25, GADD45B, PIGY, RNF10, PRR24, NAGK, FAM127B, PLEK, CCNDBP1, PNRC1, G3BP2, LOC440917, COTL1, HNRNPA1, RPL10A, MT1G, HIST1H2BH, IRF7, BCLAF1, hCG_2014417, STX10, CHCHD8, MRPL43, TMEM30B, AIP, CLIC1, RBBP7, GNAZ, BOLA3, RPL7A, ANAPC11, TRIM26, HERPUD1, LOC728875, TIMM10, YWHAQ, UBXN1, C6orf25, LOC648987, S100A9, NDUFB10, ZNF843, 9-Sep, EIF3A, TXNL4A, ACTB, CRTCL, GIMAP2, ALB, APPL1, MRFAP1, CAPN2, ZNF157, WNT10A, FXR1, LOC390282, MBP, LOC441455, HAGH, SF3B14, C17orf59, RPS23, HSPB1, LOC100133337, RHO, RTBDN, NAP1L1, NOSIP, SCRIB, MYO1C, TRAPPC5, PSMB4, TMEM111, C1orf229, LSM7, CDC42, GSTK1, ELF4, LOC100132247, KRTAP4-1, MOBKL1B, ZNF394, CSDE1, C18orf21, XRCC6, NDUFA2, CBL, POP7, NDUFB4, TUBB2C, RPS14, NPM1, CTTN, PEA15, EIF3G, MT1L, TNIP1, RPL34, TMEM191B, VWA1, MAPK11P1L, C16orf13, UBE2V1, LOC100128942, CKLF, TRIM29, EEF1D, DPY30, HES4, UBA52, TGFBI, CXorf21, KIAA1310, HLA-C, C14orf119, SASH3, PXN, HIPK3, ATP6V0D1, LYAR, GBP3, HDAC4, FIS1, EXOC3L2, TUBA1C, CCDC72, LRWD1, HBD, MSN, GFRA4, CC2D2B, EDF1, AKR7A2, LOC283788, UBA52, RXRA, PTMA, TMEM85, CNP, VPS28, SEC11C, SLC9A3R1, AES, NDOR1, IER2, C2orf14, SMARCA4, SEC61B, TIMM13, NPIP, EMB, ERCC5, TPM4, LRFN1, RAPH1, SRP14, PFDN1, SDF2L1, RPL21, ARRB2, UBC, GDI2, LPXN, LONP1, EIF4A2, ZNF492, HIST1H2AK, SH2D2A, MAL, RPL10, PLSCR3, ZNF430, RPL17, PGAM1, COTL1, FLJ11710, DDX47, YBX1, PRR7, SKAP1, RHBDL1, DCXR, CHCHD2, GLRX, SIX5, RPS7, TIMM8B, MT2A, LOC100130152, GNG2, RNASEH2C, CACNA1E, RAB2A, HIST1H2AG, HNRNPA3, MTPN, LOC113230, CHCHD2, TPT1, MRPL46, ZFP36L2, RPL7A, DNASE1L3, HLA-H, TAF10, IFI27, SERP1, IL32, LOC100127891, EIF3C, GNG11, FAM46C, PTGDS, NINJ1, CACNA1I, MAP7D1, PSME1, C16orf63, PSMD4, RPS10, IK, HMGN2, CDV3, MLL3, NPM1, HCFC1R1, SNRNP70, SKP1, CXXC5, TPM3, NEUROG3, FGF3, RSR1, CTRB2, SLC25A5, LAT, PHOX2A, LOC100130557, VIM, FAM111A, GAS5, HIST2H3D, FAM101B, FLJ32065, S1PR4, PTTG1, C20orf199, MGEA5, MARCKS, HIST1H4L, DDX39, NPIP, H3F3B, ARHGAP4, HIST1H2BL, SNRPE, TMEM86B, LDHB, ZFAND2B, RPL23A, LOC100290566, NDUFB8, YBX1, ZNF579, COX5A, NDUFB3, EEF1D, RPL12, H3F3A, DEF8, OLA1, GADD45GIP1, LOC644063, FBL, GIMAP1, GLA, LARPI, DBI, ZNF414, NUDT1, EPRS, MPP1, BANK1, FCGRT, MRPL54, C5orf32, ARPC5, LGALS2, SH3KBP1, CAMP, PRIC285, RNASEK, C11orf58, SLC25A39, KPNB1, PPP1CC, EIF3H, TPI1, ABHD2, CCDC104, HOXB13, HIST1H3G, C9orf23, THY1, UBE2F, PPP2R3C, IFIT1, JAK3, RAB31, PSMA5, ASAH2, MAN2A2, RPL26L1, WASF2, SP140, RPL22, DAD1, KLF13, PPP2R5E, OPTN, EML4, PPP2R5A, FNTA, GMIP, NARF, SNX20, ZNF385A, UBE2N, AP3D1, MOBKL2A, ATP5O, TNXB, FAM128B, EEF1A1, COMMD3, SSU72, RPL21, TSPAN5, CGNL1, ATP5I, HMGN2, FGR, SHFM1, TMEM11, CALM3, ISG20, NCRNA00188, NUDT5, CCL4, MAP2K3, HCRT, MAT2B, CXorf18, SLC25A5, HIST3H3, GCN1L1, C15orf63, HIST1H2BC, PPIA, CDKAL1, C17orf96, LGALS3BP, HAX1, RPS18, PPM1K, AKAP13, EIF4G2, BPGM, NCOR1, ARPC1B, COX7C, LCP1, TSPAN10, FTH1, TTC3, RPS13, FAM195A, NDUFA2, C1orf158, OTUD7A, RPS27, GZMA, MRPS31, RPL6, GTF3C6, NCL, MEAF6, MRPL23, RFC1, PSME2, IRF2BP2, CLEC3B, NOP56, NPM1, RPL29, ZNF675, GRIN1, CHMP4B, ATP5H, POLR2J, B3GNT7, IMPDH1, EIF4A1, PSAP, CDC26, ITPKB, SMPD4, C1orf162, FABP5, LTB4R2, PRDX5, YWHAZ, FOXS1, ZNF664, IER5, MAX, MRPL33, RPS12, HLA-DOA, PEBP1, FAM100B, SUGT1, ZMAT2, RNF141, MGLL, EIF5, POTEK, YBX1, SLC25A3, S100A11, HLA-DPA1, GBP4, CCND3, FTH1, LOC440983, UCP2, MTPN, RPL21, RPA3, TSTD1, EEF1B2, RPL35, FAM60A, CD53, CLEC2B, HLA-E, C9orf123, RPL37, MSN, EIF4EBP2, TFF3, BTG1, SPON2, RPL13, PSMB1, CALR, PDE2A, CMC1, RPL21, C12orf35, DCTN1, ELF2, S100A8, SFRS4, RPS24, TOX2, SSB, RPL23AP32, SRP72, RPS27A, HIST1H2BK, SS18L2, PYCARD, ADAR, RPL34, HLA-DMA, CDH22, TOP2B, SDCCAG1, LSM3, RASAL3, UROD, RUFY1, NDE1, SUMO2, BTF3, DYNLL2, XRCC6, PSMC1, AKR1A1, CD2, KIAA0174, MICAL2, AP2M1, IFI27L2, MYEOV2, ATP6AP2, LDHA, ACAA1, LOC442421, PPP1CC, WAC, C17orf90, RPL13A, PA2G4, NACCC1, WDFY4, NAT9, CA2, SF3A1, ACAD10, PSMB7, EFCAB4A, CX3CR1, NDUFC2, STARD7, SNRPD2, HIST1H2BM, CFP, TCEAL3, VTI1B, MDH2, LCE1A, C1orf54, ATOX1, DRAM2, C5orf26, RPL31, PPP1R16B, POP4, C16orf53, H3F3A, C21orf33, MESP1, LST1, CALM2, PEX10, PARD6G, SARDH, TAT, HLA-DPB2, RBM27, LOC100288418, LOC100291051, SLC35E4, ATG16L2, C3orf10, TCF3, NR1H3, SNX10, BCAM, NF2, HIST1H1E, LOC100190939, HIST1H2BG, UBE2D3, RPLP1, PLEKHO2, TNFR, EXOSC8, LOC100133075, RPAP1, FLJ10357, BIRC3, RPL11, LOC100292388, RPS2P32, MED19, ELFN1, TIMM17A, COX7A2L, PSMB9, DDX24, TADA3, SEMA3B, RPL31, GSK3A, SYNERIP, MORF4L1, RPL26L1, APIS2, FYB, C17orf37, C20orf30, LOC729313, FAM119B, CCT8, TSEN54, GABARAPL2, NDUFA8, GPSM3, CIB1, NXT1, C17orf74, CHMP4A, KRT8, CBX3, SLC35B2, DAZAP2, IFI30, BATF, POLD4, LOC100287848, SNX26, EZR, LSM2, CHST13, DDT, EIF3D, ATP5D, GBP6, RPS13, FBXO9, STK40, RBP7, HBA2, NDUFAF2, MT1A, H3F3A, ANKS3, LCE1C, MEX3D, SLA, HADHB, TTRAP, SRGN, RHOC, BOLA1, DOK3, GLIPR2, RPS3, LOC100287521, RPLP1, ERP29, RPL17, HCP5, AHNK, BMP8B, RPS2P45, LOC401859, MVP, CTBP1, RILP, HLA-DRA, LSM12, RPL23AP7, RPL15, HIST1H3C, ARF3, HMGB2, RPS3A, ZNF24, TYK2, FAM36A, EIF3F, SERBP1, COL27A1, EIF1AY, NUDT13, IAH1, ITSN2, RIC8A, C9orf89, LYSDM2, PSMA1, HNI1, FLII, ACTR3, TPM4, UBE2D2, BTBD6, BOLA2B, PPA1, P704P, HEBP1, SURF2, PSMA3, HRK, MX1, PTGES3, MUC2, LOC729082, HBD, NAMPT, NSUN5, WIPF1, TYMP, PDCD10, CSNK1E, IER5, MYL12B, CNPY2, PSIP1, NDUFB9, PSMD4, ACTR10, STRAP, C19orf25, EIF4B, HBG1, FRAT2, MKRN1, CDKN1C, ZNF681, MEG3, ZNF646, TBC1D10C, HOMER3, CAPZA1, CALM3, FLJ43681, AGPAT1, RPIA, RAX2, DDX5, TAF7, ITPK1, FAM102A, DNTTIP1, RPS14, DCTN3, CA1, COPS5, FUZ, CHURC1, CSNK1G2, NDRG2, CNIH4, FAU, LFE1, SRI, EXOC3L2, CIB1, EBF4, RPL26, TCEAL6, HIST1H3A, LOC100129113, HMGN1, DNAJC8, LBX1, FOXC2, HMGB1, POLM, ZNF644, REPS1, C12orf57, TAX1BP1, YBX1, RNF130, NHP2L1, NACA2, PABPC1, MEF2D, RARS2, TSEN34, RPS7P5, NOP58, ZG16B, EIF4B, ATXN7L2, UBE2E3, TPM3, NDUFS6, LOC92659, LZTS2, TUBA4A, CLU, TUBA4A, EEF1G, KIAA1949, SAPS1, FKBP4, NDUFAF3, GLUD1, LGALS1,

10

20

30

40

PRCP, LY86, ERGIC3, AIF1, C3orf10, ATF4, CXorf40B, FAM108A1, SYN1, SF3B1, ATXN2L, PLAC8, ECHS1, C1orf162, HSPE1, TUBB2A, TNFAIP2, NBPf3, RRP7B, MRPL38, MYH9, VASP, ALOX5AP, RPL21P44, HLA-F, OTUD5, GRASP, RPS21, SYNGR4, YWHAG, DSTN, ATP1A1, HIST1H4I, S100A11, C1orf38, TP53TG1, F13A1, DLC1, BAT3, FIBP, HSPA8, C1orf152, LOC100129122, KLHL35, LOC131055, SORL1, SSR2, CBX7, LOC90499, CITED4, RPL13A, CDC42EP5, BCAP31, SEPX1, LYPLAL1, NDUFB1, ZC3HAV1, PPP1R11, PRKCB, TPM1, WNT6, RNPEPL1, SECTM1, NSA2, CDC42SE2, RAB32, LOC100288252, C3orf26, DUSP15, AMZ2, RPL36A, APRT, SCARA5, CSPP1, VAT1, RHOQ, HPS6, BCR, PSMD1, LAS1L, MIXL1, FBXL17, PKM2, HINT1, GYPC, PYY2, LYNX1, SAPI8, ACTC1, FAM107B, HHATL, LCE1A, LOC152217, MRPL21, LOC728723, FIS1, THRAP3, RPS9, CRISPLD2, HEBP2, FCER1G, SPHK2, KRTCAP2, COPE, C10orf104, C18orf23, PFDN5, HIST1H3F, ENO1, OSBP1L8, PTPN18, HNRNPA1L2, IDH3B, ANXA6, TST, RHOA, POMP, RPL10L, TOMM20L, HMGN1, PRELID1, GUK1, PTPRCAP, RPLP0P2, C19orf22, LOC646791, TNFAIP8, LOC100192204, CCM2, LST1, MGST3, COPS6, C17orf89, CNOT2, ABLIM1, HSPA4, ZNF254, RPL34, NDUFS8, GLTSCR2, EIF4A1, FOXN2, SMARCD3, CTSB, EDARADD, ERH, TFF3, UBE2V1, CSDA, MLL5, IKZF1, CCL24, LILRA1, CROCCL2, C20orf24, RFTN1, HSP90AA1, ATP6V1G1, MAPK11, FOXO1, HMGN1, FAM45A, HIST1H2AJ, ACTBL2, EVL, TPM1, RASSF5, RRAS, ARHGEF15, NDUFA3, MT1E, HIST1H3E, RPL7, HIST1H2BN, TCOF1, PRAM1, FAM108A1, CASP5, AP1S2, CHCHD1, MT1H, PLEKHJ1, HIST1H4C, MYL12B, FLJ11235, PKC2, RAVER1, TCEAL8, HCST, SUB1, RAB13, FAM162A, ATP5G3, SCNM1, ANXA2, LOC100291560, ZNRD1, HLA-E, NDUFA4, MT2A, HIST1H3H, C19orf56, GNLY, ACTG1, WDR82, RANGRF, RASSF2, PHRF1, MON1B, ST13, SERBP1, AHNK, ARL6IP4, LOC400061, DEXI, PIP4K2A, C6orf106, ALOX5, JUNB, MEX3D, ZNF56, FAM113B, C20orf30, BUB3, EHD1, GLTSCR2, ZFAND5, RPS5, RPL7A, RPL10, SLC8A1, C19orf33, C11orf17, DNMI3P35, RPL23AP7, HBA1, POLR2L, HLA-G, LOC388564, RHPN1, CNTNAP2, UCN2, HNRNPA2B1, SLC2A4RG, KIAA1143, UCP3, SNX3, SSTR3, PFDN5, TUBB6, LOC100288578, MAT2A, PGD, CD36, LOC100289383, CDC2L1, RPL7A, H3F3B, EEF1A1, EIF4H, KRTAP2-4, C22orf9, LST1, GNAI2, HIST1H4J, TMEM149, RNASET2, NDUFS7, ZNF91, NOL7, ZNF714, WASF2, DIAPH1, PF4, COMMD1, C20orf24, H3F3A, RAB1B, RPL19, SNRPF, PF4V1, TRAM2, RPL9, ZNF48, RBM14, BRD2, NAMPT, PAIP2, NET1, SND1, TMEM141, PNKD, NOP56, MYL12A, RPL34, ITGB1BP1, NBPf10, EVI2B, PPDPF, EEF1D, GDNF, NBPf15, FOXPI, SARS, TPM3, KIAA1429, FAM49B, GFAP, ISCA1, INPP5K, HMGB1, SLC22A18AS, PPCS, ATP5J, ZNF706, MBNL1, HIST2H2AB, SUPT4H1, NTSC3, C17orf54, R3HDM2, RHOG, EIF1B, UBOX5, LOC391769, SFRS16, DUX4, CAMLG, ARIH2, RIOK3, ARPC3, ZNF625, UBC, DCAF12, LGALS7B, TIPRL, CAMTA1, CHCHD7, RAB7A, FAM108A1, ID1, FAM117A, ACTG1, POLR3GL, ARAP1, VCP, ABLIM3, YWHAZ, LOC728324, C17orf79, SERPINB1, CEBPD, YPEL3, BAT4, ST13, RPL5, LOC391358, ITB, HIST1H4F, PRDX6, C14orf169, KRTAP2-4, SNRPD1, LOC730256, STRADB, CHCHD10, TSPAN5, H3F3A, HIST1H2BD, LOC391334, ARHGAP9, HIGD2A, DDAH2, RPL13, TCEB2, TCEA1, ATP5A1, MRPL9, CCT5, SEC61B, FABP5, ACTR3, ZNF738, CDK2AP1, ALDOA, RPS28, BEST4, UQCRB, SIK1, ALDH2, CHCHD2, LIMD2, LAT2, C7orf47, CTSS, TOMM7, BBC3, CD48, PARP10, RAB10, FGD3, ARHGFE10L, ZNF92, NPIPL3, RPL29P2, FTL, GPX1, CASC3, MEA1, RPL31, LOC729991-MEF2B, ZNF341, RNF113A, MYCBP2, RPA4, FAM131B, TES, USP10, CECR1, CNFN, GNG10, DUSP6, CNH, PRDX1, ATP1F, GALR3, PARK7, LSM10, CMTM6, TXN, KLF2, NSUN5C, LOC100294102, PSMA6, SH3BGR1, BAALC, MALAT1, PABPC3, LOC100128775, CDA, RPL6, MRPL52, MAPRE2, SECISBP2, 13-Sep, TUBA1C, HMGB1, SNRPC, RSL1D1, HIST1H3B, LOC440311, AMD1, N4BP2L2, FTHL17, DLGAP3, SLC25A5, HES7, hCG_20426, PRDX2, GDF15, RSU1, FZD9, RWDD1, CLTC, PRPF40A, MED29, C2CD4A, EFHD2, TUSC2, PTP4A2, BECN1, DCAF11, LGALS7, PSMC1, EFNB3, TRAK2, TMEM63B, FKBP2, TAF12, SCAF1, ZNF727, CYB5R3, RPL18, PSMD9, IFITM4P, LOC729406, RBX1, POLR2J2, RPSA, DCAF4L2, GTF3A, ERCC2, USP15, LOC100131482, ACTR3, GIMAP4, EIF3K, HIST2H2AC, FCGR3A, TRAPPC2L, WFDC10B, TRAK2, HIST1H2AC, COX7A2, MRPL53, GSTO1, LOC646890, MAF, FLJ35390, VCP, VAMP8, HIST1H3D, CSDC2, SAT2, RPL21, PDZK1IP1, UBE2R2, C1orf113, CD63, TPM3, BNIP3L, PP1A4A, HSPB1, RSL1D1, UGP2, RPL27, GPR153, ACAT2, NCAPH, BRI3, WASH2P, PTP4A3, C19orf33, FYB, SNX2, ROBLD3, RPL19P12, HDAC2, LSM3, SERF2, CCT2, APBB1IP, PAX4, RPLP2, LSM8, MDH1, FGD1, DDX54, MAGOHB, ZNF182, SLC4A1, NCRNA00116, SF3B5, CCT6A, HIST1H2BE, CFLP1, EEF1G, HIST1H2BB, CLNS1A, PABPN1, RPA1, LOC100292427, SNF8, SAPI8, IL27, SLC34A3, UQCR, NDUFS5, PLAC4, ZCCHC17, ZDHHC22, HIST1H4D, NBR1, C11orf2, ALDOA, HMOX1, DRD4, RAC2, C6orf62, NDOR1, ROBLD3, ATAD3C, NOP10, SSR2, CCDC88B, GTF2H5, EIF4A2, C10orf84, RPS7, DYNLT1, RPS4X, CT47A11, IER2, NUDT21, LOC100128355, CHP, RPS25, CAT, SMCR5, PSMC6, PDCD4, 7-Sep, HSD17B11, VDAC1, TUBA8, COX4I1, CLEC2D, PPIA14A, LOC92249, PLIN4, HBA2, NENF, C19orf53, C17orf91, HLA-DMB, CDC42SE1, TMEM14B, CASC3, SNRPG, PRR13, TBX21, SLC44A2, IL7R, SIVA1, CDV3, DHX9, LOC728741, TMEM9B, CSDE1, IFITM2, ALKBH7, TSPYL2, PHB2, ORC6L, TRA2B, EMG1, GSN, OCIAD2, SIGIRR, ATP6V1A, WDR6, LFNG, GNG10, SNRPD3, HSBP1, LIME1, H3F3B, COMMD4, RNF126, ACTG1, CEACAM19, MT1X, COPZ1, HNRNPA1L2, TXNDC17, EIF3F, RPS4Y1, MFNG, CLTA, CCDC57, SPRR2E, FAM65A, AP3S1, UBXN1, RDBP, NSA2, SP110, TXNIP, RNF5, HLA-E, SDHAF1, LOC100129616, UTS2R, PTGES3, RPSA, COX7B, CEBPA, NME1, EID1, STARD8, PRKACB, ATN1, ADA, HNRNPA3, YBX1, URM1, FBXL19, PGK1, CNBP, AURKAIP1, C22orf13, RPL3, EIF3E, RAP1B, FBL, VDAC2, C19orf29, PPID, FAM89B, ARHGEF1, APEH, PCMTD1, CKS1B, RPL13, UQCRH, LOC100129292, POMC, TCF25, PLEKHF1, YWHAZ, RPS10, HIST1H2AJ, ERN1, HNRNPK, NRG1, YWHAZ, PTMA, PDCD6, LAPTM5, LYZ, C1QBP, FDPS, RPS15A, EXOC7, OSTF1, HIST1H2BF, FAM131C, EEF2, HIST1H2AM, MRPL33, SOX1, C4orf48, PRB3, NME2P1, CD37, CTDSPI, COX8A, FAM96A, RASGRP2, RP11-94I2.2, TAOK2, TAF1L, HLA-DPB1, TRIM58, STK4, HSPA8, LOC100288418, UQCRFS1, C7orf28B, SMARCE1, EPAS1, C19orf38, HIST1H4K, EIF3I, STK17B, CDKN1B, ISG15, NDRG1, C20orf141, EEF1A1, RPSA, CCDC115, NKX2-8, RPL13AP3, PPIA, SUSP3, ATP5J2, ZNF100, C6orf1, C7orf28A, CGGBP1, FLOT1, HSF1, KLF16, WAC, SCLT1, AMD1, UBXN6, UBE2F, SEC13, SSBP1, ZDHHC4, SERF2, RPS6, LRRC2, ENO1, ANXA2, CYTH4, RHOA

10

20

30

40

【 0 7 1 7 】

(表 2 1) 全cMV中の経路発現

経路	メンバー
アンドロゲン受容体 (AR)	GTF2F1, CTNNB1, PTEN, APPL1, GAPDH, CDC37, PNRC1, AES, UXT, RAN, PA2G4, JUN, BAG1, UBE2I, HDAC1, COX5B, NCOR2, STUB1, HIPK3, PXN, NCOA4
EGFR1	RALBP1, SH3BGRL, RBBP7, REPS1, SNRPD2, CEBPB, APPL1, MAP3K3, EEF1A1, GRB2, RAC1, SNCA, MAP2K3, CEBPA, CDC42, SH3KBP1, CBL, PTPN6, YWHAB, FOXO1, JAK1, KRT8, RALGDS, SMAD2, VAV1, NDUFA13, PRKCB1, MYC, JUN, RFXANK, HDAC1, HIST3H3, PEBP1, PXN, TNIP1, PKN2

【0718】

関連する一連の実験において、PCSA+cMV中の発現プロファイリングを実施した。実施例 32におけるような免疫沈降法を使用してPCSA+cMVを単離した。上記のようにAgilent Whole Genome 44Kマイクロアレイを使用して発現を実施した。表22中に見られるものを含め、2402のmRNAがPCSA捕捉試料中に見いだされた。TNF- α 経路がもっとも有意に過剰発現した経路であった。TNF- α 経路のメンバーを表23に示す。

【0719】

(表22) PCSA+cMV中のmRNA発現

LOC100132006, EHMT2, RPL23, RPS13, HDDC3, LOC150759, MEGF11, CRCP, LRP1, CDH6, C9orf30, MAB21L2, EPHA2, SYT2, BOK, NLE1, C2orf53, ORMDL3, TUT1, CYP2E1, C6orf81, GATAD2A, RPL18, C3orf21, MASP1, CLOCK, CENPP, NFKBIB, LOC729915, C17orf64, BLK, NR1H2, SMARCA4, ACVRL1, ARFIP1, NFKB2, tcag7.1196, JUN, LOC100128760, ZFYVE19, HLA-DRB5, NDUFB9, MFN1, CLK1, LOC100289600, SULT1A2, BTF3L1, IGSF10, RALY, KLK3, KIAA1751, RUVBL1, DNAJC3, C14orf166, BCAP31, HNRNPU, DFNB31, CENPBD1, WNK2, PNLIPRP1, OAZ1, GEMIN5, C19orf55, CHRDL1, CACNA1B, LOXL4, HIRIP3, hCG_1643808, COX4I2, FABP3, GAPDH, TSSC1, GABARAPL2, EXO1, POU6F2, STX8, HSP90AA1, TNFRSF11B, SPACA5, TNRC18, SAP30BP, FOXK2, RPL23AP53, PIK3R4, XPC, SOCS7, RPL35A, UBC, NKG7, SNCA, PTK2B, PPIA, LOC100289350, CDKN2B, TNNT2, MUC5B, MED6, NOL8, HS2ST1, SNRPC, LOC100131582, DNAJA1, RPL10, RPL10, SYCE1L, RPS25, PNMA1, RPS2, CDKN2A, LOC100288578, CFD, LOC100134569, CD52, NLRC5, OAZ1, DCI, RPL23A, LSP1, RPL39, VTA1, RPS29, MLXIPL, FAM133B, UTF1, HBQ1, SSR4, HLA-DRB3, NOS3, L1CAM, WHAMM, PRR13, IGF1, GPR61, IL26, CCDC69, RPL35, TFE3, RPL4, FAM128B, PAK1IP1, RPS10, FBRSL1, MEIS1, DYNLRB1, ISCU, PRR5, FCCR2A, DNAI2, EPSTI1, TNRC6B, RPL36, NCOA4, XRN1, RPL14, EEF1D, RPS10, LOC388152, TRIM55, SPATA2L, FLJ43681, TSSC4, HIST1H2AD, JMJD6, TCF7L2, RPSA, PMEP1, PRR13, SIRPG, ANKK1, MCTS1, TCL1A, HLA-A, ALDH3B1, POLD4, ACTB, SDK1, RPL38, SEC62, CASZ1, EVPL, ZNF784, DEPDC6, ZNF638, RPL23AP7, COMMD7, SMARCC2, RPL36AL, PHF21A, RPL10A, OR2H1, ATAD3A, C10orf82, RPS15, CAP2, CARD16, ZDHHC16, FPR1, ETFB, NPPC, BAX, IFI27, NYX, SLC27A1, LOC100133280, CAPN10, C11orf67, ACRBP, TERT, NDUFA6, RPL30, TNRC4, NDUFA4, ERBB2, OAZ1, RPS3, TPSG1, FAM43B, C16orf11, SIRPA, PABPC1, FAM73B, HMOX1, RPS10P7, GNAS, HPD, NEXN, SPARC, RASL10B, LOC100293539, TMTC4, C21orf91, GMPR, ADAMTS13, VDR, SRRM3, MYPOP, FTH1, BLOC1S1, UBE2L3, APP, RPSA, SOD1, CARD8, NACA, NCRNA00152, HTR1F, SUMO2, PHLDB3, H3F3C, PVALB, LOC286272, SCLT1, C9orf131, MTMR14, RNF44, HLA-DPB1, TP63, FGD3, RPS27, LOC648771, TMEM158, POLD3, RPSA, PEX1, USP33, POLRMT, RPS29, FXND5, RALGDS, BTRC, ZCCHC6, THEM5, RPL23, VAX2, TMSB10, MMP28, HMBS, GNB2L1, COX6B1, UBB, CASP8, CCS, LCE3E, RPL14, MRPL38, RPL3, RPL13, SYMPK, EEF1D, DNMT3A, PCBP1, FHIT, LCE1D, KCNQ1DN, HRASL5, SYT15, LOC643668, TPT1, RPS15, SNHG5, RPL9, DNAJC4, MYCNOS, RPL21, EGLN3, TUBG1, SNRPB, FLJ22184, RPL32, ASCC3, ZNF2, HCN2, B2M, PKM2, COX6A2, NACA, CCL5, RPL37A, PRM3, TTC1, DYNLL1, EEF1G, ACOT13, PSMB6, HBG1, LCE5A, BAX, LOC284998, RPS17, RPL10, TRIM24, IMP5, RPS25, RPL23AP82, SMARCA2, RPL24, PRELID1, RPS19, RPL26, TRMT112, RPL21, LOC100129917, CCNI, TMSL3, TMEM140, C6orf70, CA5A, POLR2J, C6orf48, LOC100128731, DLAT, PCBP1, MIA2, REEP5, SH3BGRL3, RPL29, HIST3H2A, RPL37, THUMPDI, APLNR, LOC100288331, SEC14L2, EXOC1, LPIN3, ZNF592, NPHS2, FANCM, RP3-377H14.5, FAM124A, S100A13, IFITM1, RPL12, IGF2, FTH1, RPL29, MAP3K6, CDC2L1, ING5, BBC3, RPS8, CD79A, LOC100129291, RPLP0, EIF3K, LOC100293090, RPS7, RABEP1, RAB8A, RCOR2, LOC220115, VIM, IFITM5, NBPFI0, S100A12, COX5B, PPP1R14A, CD48, HSPB1, GLTPD1, RPL3, RPS2, RPS3A, LCE2A, CLIP3, DAB1, MTPN, SCARF2, CD4, IL12RB2, ARPC2, RPS15A, EVX1, C19orf71, YWHAE, SNHG8, TBCA, KIAA0125, HIST1H4E, ACTB, EEF1D, TNNT2, RPS28, ZNF761, HDAC7, RPSAP52, PRICKLE3, BAG5, LOC644950, PHLDA1, RPLP0, UCRC, PALMD, RPL18A, HBB, GRIN3B, ATP5G2, MAFA, C14orf162, EEF1A1, SLC25A6, FAU, NDUFS7, SLK, COL6A2, SYNPO, RPL23A, UBA52, MYL6, COMMD6, HOXA3, GPR132, PLEKHN1, BST1, SURF1, CDC2L5, RPS16, ADAMTS7, MON1B, C10orf47, POLR2A, RPSA, TAOK3, ZC3H6, HIST1H1C, RPS2P32, RPS27A, RPL18A, MEX3D, POLR2E, 5-Sep, RPS20, SHISA9, ALX1, RPS4P16, MIF, RPS26, PAX9, LOC642031, LOC100289600, SF3A2, CCDC88C, RPL14, USMG5, RPL17, VPS18, PFKFB3, KCNK15, LOC728449, RPS3A, TOMM7, ALAS2, ZBTB46, GRIN2D, RPL8, NEDD8, FAHD1, KLHL34, IK, GMFG, GNAZ, GOSR1, SEPW1, SCRT2, LOC100288165, CCDC24, C16orf81, UBL5, RYBP, TNRC18, NKX1-2, SUPT4H1, ATP5I, RPLP0, EN2, BZRAP1, SDK2, RAB8A, RPL34, MXD4, FAM63B, UBE2S, ATP5D, MRGPRF, CD99,	
--	--

10

20

30

40

BAG1, POLD1, POLR2L, CDC2L1, RAC2, SIRT3, NPM1, RPS2, DDX49, LOC649294, URG4, TAP1, EIF1, MAN1B1, ARHGEF11, ATP6V0C, C1orf175, PLEKHO1, HCLS1, LSM1, NFE2L1, C1orf10, UBC, LEPROT, CEL, HIST1H1D, SFRS8, HIST2H2AC, RPL37A, MED13L, PPIA4A, FCRL2, RPL35, KRTAP1-3, LOC440461, S100A6, SOD2, PAX6, SAPS1, FAM129B, LIPE, NME2, FLJ23867, KLF14, RPS11, HCN4, PAX8, CSTA, ZNF713, POTEF, RPS14, FTL, FOXD3, MXD1, RPL35, HYAL1, ZNF506, ATF6B, CRIP1, ZNF467, IFI16, RABGAP1L, ANO7, CGB1, PTRF, LOC100131262, PPBP, SNX19, PTMA, HBM, LOC341056, SERPINB1, RPS10, C1orf88, CFL1, RPL23A, TUBA1C, VDAC3, HSPA8, TP53TG3, RGS10, BCAM, PFDN6, EEF1D, TMEM201, PABPC1, OGDH, RPL34, NNAT, RSRC2, LOC730144, RPL27A, ZNHIT1, TALDO1, FOXQ1, LRRC6, BTF3, ARL6IP4, MEPE, C15orf21, LENG8, N4BP3, LGR4, GJC1, FAM128B, IRX5, A4GALT, CTSA, PPIA, RALBP1, TAF3, LOC541471, MMP11, ADAMTS10, IL11, C9orf167, FLJ31356, RTN3, NIN, RYR3, YLPM1, PPIA4A, OR2H1, RPS3A, LOC389641, FAM177A1, MAGEE1, CYP2W1, HEMGN, ZFPM1, HIST1H2BO, RRAS, RPS3A, EIF3M, PTMA, EIF3D, TAGLN2, LMOD1, CASP4, GZMB, NGFRAP1, RPS17, AGAP3, SOX4, RPS5, NDUFB2, PCMTD1, EIF1, C19orf73, SIK1, PSMB10, ROMO1, CD86, RPS10, FAM154A, HILS1, NCOA4, ATP5L, LOC100288418, MDF1, EEF1B2, A2ML1, OSMR, DLX1, SOD1, SEC62, RPL12, LOC100130331, RNF151, VSIG10L, NDUFA1, RPS26, JMD18, LOC283177, LTA4H, CYP2F1, DIRC1, C1orf27, TRIM10, SUMO2, HLA-B, GH1, VAMP2, TNXB, LOC100288755, SUPV3L1, SPEF1, tcag7.907, RPS19, HIST3H2BB, RSPH10B, TBX3, RPS10, UQCRCQ, hCG_19809, RPL13A, ZFR2, RHOB1, RPL21, MAX, CAMKK2, PDZD7, DCAF10, FTL, DEFA3, IQSEC2, NRG4, GIPR, GNAS, RELB, ITIH2, CASP4, S100A4, OGFR, RPLP0P3, CCDC93, HMGB1, RPL36A, PPIA, NDUFA1, TUBA4A, TUBA1B, SCD5, HIST2H2AA4, SAFB, PTMS, BLVRB, HIST1H2AM, FTH1, RPL29, STEAP4, RPL15, TMIGD2, LTB, APOC4, HNRNPA1, SLC12A7, HLA-DOB, RPL9, GGT6, ZNF525, SLC8A2, EN1, PKN2, KRT16, ODF3L2, BAX, NFE2L1, CCDC50, TPT1, CKB, IFITM3, LOC399851, UXT, NAB2, DYNLL1, TUBB1, SOX3, RPL21, GUK1, CHD7, RPS2P32, GCET2, GRAP, SPSB4, GSTP1, UBE2G2, HIST1H2AH, VCX3A, SERGEF, DUSP9, SMEK1, FCRLB, ECHDC2, MTA1, SAFB, CREB3L3, LOC119358, DRAP1, TMEM175, RPL21, RPL21P44, LRP3, FAU, MOGAT1, DYRK4, TYROBP, RPL22L1, C12orf40, PTGR2, SLC46A1, LCE1F, MORN1, PALM2-AKAP2, COX6C, RPL41, ALOX15B, MYL6, RGS18, C1orf31, C18orf32, CUL1, ARHGDB, MPPED1, NPM1, ATP5E, LOC648771, TNXB, HIST1H2AE, ACTB, CCDC62, RPS26, H2AFJ, TMSB4X, LOC151009, RPL30, RPL23AP71, HIST2H3D, BID, AGRP, RPL28, ZNF219, FXYD5, GPR149, MGC10814, RPL39, GZMH, GPR150, PTMA, RPS3A, CEND1, CYB561D1, POU5F1P4, UBB, SPPL2B, CLDN5, GBP4, HLA-B, CASKIN1, TMSL3, ZNF746, NFYA, VGLL2, ODAM, ADAMTSL5, DPEP3, PSPH, ALPPL2, GRN, NPAS3, SLAIN2, ADRA2C, NPM1, C14orf2, COX6A1, PRNP, ATP5E, RPL7, PRR24, CDCA3, CXorf18, HNRNPA1, RPL10A, HIST1H2BH, BCLAF1, hCG_2014417, TMEM30B, GNAZ, RPL7A, ANAPC11, C21orf81, PRKCG, TMED10P, C6orf25, S100A9, NDUFB10, WNT2B, 9-Sep, ACTB, CRTCL1, ZNF157, SSX2, WNT10A, EHD2, SSTR2, RPS23, HSPB1, RHO, TMEM111, GSTK1, LOC100132247, C16orf93, XRCC6, CCNT1, NDUFA2, NDUFB4, RPS14, CTTN, RPL34, TMEM191B, H2AFJ, TRIM29, EEF1D, UBA52, HLA-C, LOC729732, EXOC3L2, CCDC72, HBD, EDF1, UBA52, PTMA, VPS28, AES, NDOR1, IER2, C2orf14, SMARCA4, ZNF575, LRFN1, SRP14, RPL21, UBC, LPXN, TMIE, HIST1H2AK, ID4, RPL10, RPL17, PRR7, CHCHD2, SIX5, RPS7, TIMM8B, MT2A, LOC100130152, FABP6, SCNN1D, MTPN, TPT1, RUVBL1, RPL7A, HLA-H, IL32, EIF3C, GNG11, CACNA1I, PSME1, RPS10, MLL3, HCFC1R1, SNRNP70, FGF3, RSRC1, MSRA, PHOX2A, VIM, GAS5, HIST2H3D, C20orf199, HIST1H4L, H3F3B, HIST1H2BL, ZNF658, TMEM86B, LDHB, RPL23A, LOC100290566, ZNF579, EEF1D, RPL12, H3F3A, FBL, DBI, ARPC5, LGALS2, LIG3, C1orf58, EIF3H, HOXB13, NRN1, RAB31, ASAH2, EENRB, RPL26L1, RPL22, CACNB2, AP3D1, ATP5O, TNXB, EEF1A1, RPL21, ATP5I, HMGN2, CALM3, ISG20, NCRNA00188, DCAF8, CXorf18, HIST3H3, CDKAL1, LOC338864, C17orf96, RPS18, COX7C, LCP1, TSPAN10, FTH1, RPS13, VARS2, RPS27, FTSJ2, RPL6, PSME2, RPL29, SMPD4, C1orf162, LTB4R2, YWHAZ, FOXS1, MAX, RPS12, SOX11, ITGAX, YBX1, SLC25A3, HLA-DPA1, FTH1, RPL21, KCNAB3, SSX5, UTP14A, EEF1B2, RPL35, HLA-E, RPL37, KRT77, RPL13, PSMB1, RPL21, S100A8, RPS24, RPS27A, HIST1H2BK, RPL34, CDH22, RUFY1, BTF3, GUCA1B, IFI27L2, MYEOV2, RPL13A, NCRNA00181, NACCI, LOC344967, CA2, ACAD10, SNRPD2, LCE1A, LOC90246, NPM2, H3F3A, MESPI, LST1, CALM2, CASZ1, PEX10, LRRC18, PARD6G, TAT, RBM27, LOC100288418, LOC100291051, SLC35E4, C3orf10, PIAS1, BCAM, FAM55A, LOC100190939, RPLP1, RPL11, LOC100292388, RPS2P32, ELFN1, SEMA3B, RPL31, ADAMTS13, PHF10, LOC729141, DIDO1, C17orf74, TRPS1, SLC35B2, IFI30, POLD4, LOC100287848, CYSLTR1, SNX26, EIF3D, GBP6, RPS13, HBA2, MT1A, H3F3A, LCE1C, MEX3D, RPS3, KIAA0368, RPLP1, ERP29, RPL17, BMP8B, LOC401859, RPS3A, BOLA2B, P704P, HRK, MUC2, HBD, MYL12B, NDUFB9, HBG1, MKRN1, TBC1D10C, FLJ43681, AGPAT1, RAX2, PAK6, FLYWCH2, RPS14, FUZ, ACTR8, TTC17, LPPR5, FAU, ACBD7, EXOC3L2, RPL26, HIST1H3A, DDN, LBX1, FOXC2, C12orf57, LOC642826, NACA2, PABPC1, RPS7P5, ATXN7L2, LOC92659, TUBA4A, TUBA4A, EEF1G, FKBP4, NDUFAF3, LGALS1, AIF1, ATF4, SYN1, RALYL, ATXN2L, C4orf31, MRPL38, RPL21P44, OTUD5, ADAMTSL5, GRASP, RPS21, POM121L8P, PLEKHA6, C1orf38, HSPA8, LOC100129122, KLHL35, TCF25, ZNF365, RPL13A, CDC42EP5, WNT6, RNPEPL1, LOC100288252, DUSP15, RPL36A, MIXL1, C19orf77, FBXL17, KLHL22, HINT1, LYNX1, HHATL, BARHL2, MRPL21, RPS9, FCER1G, C18orf23, PFDN5, RPL10L, TOMM20L, HMGN1, GUK1, PTPRCAP, RPLP0P2, LST1, ZNF254, RPL34, ERH, CCL24, CROCC2, PDE6C, DDX31, NDUFA3, FAM71B, HIST1H2BN, ZC3H13, PCDH17, MT1H, ETV5, HIST1H4C, MYL12B, FLJ11235, PCK2, RAVR1, HCST, SCNM1, ANXA2, LOC100291560, NDUFA4, MT2A, KIF19, PELI3, ACTG1, MON1B, BANP, ARL6IP4, MEX3D, VPS13D, GLTSCR2, RPS5, RPL7A, RPL10, SLC8A1, DNMP135, RPL23AP7, HBA1, POLR2L, HLA-G, TNFAIP8L3, PTHLH, TOE1, RHPN1, UCN2, UCP3, PFDN5, LOC100288578, IRGC, LOC100289383, RPL7A, EEF1A1, KRTAP2-4, GSTT1, FAM178A, RNASET2, GATS, PF4, H3F3A, RPL19, TRAM2, RPL9, NET1, MYL12A, RPL34, ORAI1, CCDC11, PDPF, EEF1D, GDNF, TPM3, C20orf151, OAS3, AZU1, SLC22A18AS, HIST2H2AB, C17orf54, DPP6, R3HDM2, TSPAN33, C20orf201, LOC391769, SFRS16, DUX4, ARPC3, UBC, LGALS7B, TCOF1, PGM5, ACTG1, YPEL3, NR2C2AP, RPL5, PRDX6, C14orf169, HCG18, H3F3A, LOC391334, CHST10, MAP6D1, RPL13, C6orf182, TCEB2, MPHOSPH8, FABP5, ZNF48, ALDOA, RPS28, KCNQ4, GCGR, UQCRB, SIK1, DNMT1, PPAN, TOMM7, PARP10, CDC34, RPL29P2, FTL, GPX1, RPL31, FAM131B, CNFN, GALR3, TXN, BAALC, ALKBH2, CDA, RPL6, MRPS22, LOC440311, FTHL17, DLGAP3, HES7,

10

20

30

40

FZD9, RWDD1, ANKRD50, SCAMP5, CT47B1, GATA3, DCAF11, JAK3, GRM4, LGALS7, EFN3, SCAF1, ZNF727, PLEKHG4B, GTF2H1, CYB5R3, RPL18, LOC100134359, PSMD9, RBX1, POLR2J2, RPSA, DCAF4L2, FAM163A, RSHL1, IGF1BP3, EIF3K, HIST2H2AC, WFDC10B, LOC100130811, USP30, COX7A2, MAF, VAMP8, CSDC2, RPL21, C1orf113, SGK269, BNIP3L, PPIA14A, RPL27, GPR153, NCAPH, BRI3, NDUFAF2, WASH2P, NID2, C19orf33, RHBG, RPL19P12, SERF2, PAX4, PPARGC1B, RPLP2, LOC440181, FGD1, C15orf37, ZNF182, SLC4A1, GOLGA6L10, SF3B5, HIST1H2BE, EEF1G, MTF, LOC100292427, UOCR, NDUFS5, ZDHHC22, DRD4, RAC2, NDOR1, SSR2, C10orf84, PHF7, RPS7, RPS4X, USP6, LOC440330, DRAM1, SNX15, RPS25, TUBA8, COX4I1, LOC92249, MYBL1, PLIN4, HBA2, C17orf91, TMOD4, PRR13, CDV3, CSDE1, IFITM2, TAF1, SCTR, PHB2, MYH6, FUZ, TCEAL7, LIME1, IL21, MAN1C1, H3F3B, C1orf170, GGT1, CEACAM19, HNRNP1L2, ZFAND2B, ZNF467, UBXN1, OSBPL10, RGNEF, SP110, HLA-E, AZI2, SDHAF1, MAPK13, HIFNT, DAP, C16orf82, RPSA, SPRN, STARD8, ATN1, TPTE2, RPL3, EIF3E, FBL, ALPL, DKK4, ARHGEF1, TNFRSF25, PCMTD1, C21orf93, RPL13, UQCRH, LOC100129292, SKIL, WHSC1L1, RPS10, EDEM2, NRG1, IFT57, FOXA3, RUNDC2C, PTMA, NRXN1, TCEA3, RPS15A, FAM167B, EXOC7, HIST1H2BF, HMGA2, FAM131C, SIRPD, HIST1H2AM, AIG1, TTLL5, FTCD, SOX1, ZNF138, PRB3, LOC346329, NME2P1, CTDSPI, C14orf126, COX8A, LOC26102, PSCA, TAF1L, HLA-DPB1, MYST4, ORC3L, SSX9, HSPA8, RGS12, LOC100288418, HEY2, PCSK4, SOBP, TMEM232, RGS19, ATP2B2, NTN1, C10orf35, PI4KAP2, LOC100287114, C1orf95, HADH, C20orf141, DSCR4, SEMG2, EEF1A1, SCRT1, CYB5A, RPSA, KIN, ST3GAL4, NKX2-8, RPL13AP3, FGF17, PPIA, SAA2, SLC37A1, MYST4, DDA1, PDE1C, CGGBP1, SLC23A3, KBTBD5, FLOT1, HSF1, BAT2D1, KLF16, AMHR2, WAC, EPB41L4A, ETFDH, TNN, SLURP1, CELA3B, LOC100272216, KLF1, TRPC4, D21S2091E, RBBP8, SSBP1, KCNH6, GRK4, FIBCD1, SERF2, RPS6, LRRC2, ENO1, DHDDS, C1orf226

【0720】

(表23) PCSA+cMV中の経路発現

経路	メンバー
TNF- α	BCL3, SMARCE1, RPS11, CDC37, RPL6, RPL8, PAPOLA, PSMC1, CASP3, AKT2, MAP3K7IP2, POLR2L, TRADD, SMARCA4, HIST3H3, GNB2L1, PSMD1, PEBP1, HSPB1, TNIP1, RPS13, ZFAND5, YWHAQ, COMMD1, COPS3, POLR1D, SMARCC2, MAP3K3, BIRC3, UBE2D2, HDAC2, CASP8, MCM7, PSMD7, YWHAG, NFKBIA, CAST, YWHAB, G3BP2, PSMD13, FBL, RELB, YWHAZ, SKP1, UBE2D3, PDCD2, HSP90AA1, HDAC1, KPNA2, RPL30, GTF2I, PFDN2

【0721】

表24中の遺伝子はすべて、全cMV集団に比べてPCSA+cMV中で有意に下方制御されていた。t検定をBenjamini and Hochberg偽発見率補正とともに使用して発現を比較した。有意に差次的に発現したmRNAを表に示す（補正p値 ≤ 0.05 ）。

【0722】

(表24) 全cMVに比べてPCSA+cMV中で下方制御されたmRNA

RPL23, RPS13, RPL18, NDUFB9, BTF3L1, KLK3, C14orf166, OAZ1, GAPDH, GABARAPL2, HSP90AA1, TNRC18, RPL23AP53, RPL35A, UBC, NKG7, SNCA, PPIA, HS2ST1, RPL10, SYCE1L, RPS25, RPS2, CD52, OAZ1, DCI, RPL23A, LSP1, RPL39, RPS29, HBQ1, SSR4, WHAMM, RPL35, RPL4, FAM128B, RPS10, FBRSL1, ISCU, PRR5, RPL36, NCOA4, RPL14, EEF1D, RPS10, HIST1H2AD, RPSA, PMEP1, ANKK1, TCL1A, POLD4, ACTB, RPL38, ZNF784, RPL23AP7, SMARCC2, RPL36AL, RPL10A, RPS15, IFI27, NYX, SLC27A1, NDUFA6, RPL30, NDUFA4, OAZ1, RPS3, TPSTG1, PABPC1, HMOX1, RPS10P7, GNAS, LOC100293539, MYPOP, FTH1, BLOC1S1, RPSA, SOD1, NACA, SUMO2, H3F3C, HLA-DPB1, RPS27, LOC648771, TMEM158, RPSA, RPS29, RALGDS, RPL23, TMSB10, GNB2L1, COX6B1, UBB, CASP8, RPL14, RPL3, RPL13, PCBP1, FHTT, LCE1D, HRASLS5, TPT1, RPS15, SNHG5, RPL9, RPL21, FLJ22184, RPL32, ZNF2, HCN2, COX6A2, NACA, RPL37A, DYNLL1, EEF1G, HBGI, LCE5A, RPS17, RPL10, RPS25, RPL23AP82, RPL24, PRELID1, RPS19, RPL26, TRMT112, RPL21, CCNI, TMSL3, C6orf48, PCBP1, SH3BGR13, RPL29, HIST3H2A, RPL37, RP3-377H14.5, IFITM1, RPL12, FTH1, RPL29, BBC3, RPS8, RPLP0, EIF3K, RPS7, RCOR2, VIM, IFITM5, NBPFI10, S100A12, COX5B, CD48, HSPB1, GLTPD1, RPL3, RPS2, RPS3A, MTPN, ARPC2, RPS15A, EVX1, SNHG8, TBCA, HIST1H4E, ACTB, EEF1D, RPS28, RPSAP52, LOC644950, RPLP0, UCRC, RPL18A, HBB, ATP5G2, EEF1A1, SLC25A6, FAU, NDUFS7, RPL23A, UBA52, MYL6, COMMD6, HOXA3, RPS16, ADAMTS7, RPSA, ZC3H6, HIST1H1C, RPS2P32, RPS27A, RPL18A, MEX3D, RPS20, RPS4P16, MIF, RPS26, LOC642031, SF3A2, RPL14, USMG5, RPL17, VPS18, KCNK15, LOC728449, RPS3A, TOMM7, ALAS2, GRIN2D, RPL8, NEDD8, GMFG, SEPW1, LOC100288165, C16orf81, UBL5, NKX1-2, ATP5I, RPLP0, SDK2, RPL34, UBE2S, ATP5D, BAG1, POLD1, POLR2L, CDC2L1, RAC2, NPM1, RPS2, LOC649294, EIF1, ATP6V0C, PLEKHO1, HCLS1, LSM1, NFE2L1, C11orf10, UBC, HIST1H1D, HIST2H2AC, RPL37A, PPIA14A, RPL35, KRTAP1-3, S100A6, SOD2, SAPS1, FAM129B, NME2, FLJ23867, RPS11, HCN4, CSTA, ZNF713, POTEF, RPS14, FTL, FOXD3, RPL35, CRIP1, ZNF467, PTMA, HBM, SERPINB1, RPS10, CFL1, RPL23A, TUBA1C, HSPA8, RGS10, BCAM, EEF1D, TMEM201, PABPC1, OGDH, RPL34, LOC730144, RPL27A, ZNHIT1, TALDO1, FOXQ1, BTF3, ARL6IP4, C15orf21, LGR4, FAM128B, IRX5, PPIA, RTN3, PPIA14A, RPS3A, MAGEE1, ZFPM1, HIST1H2BO, RRAS, RPS3A, EIF3M, PTMA, EIF3D, TAGLN2, CASP4, GZMB, RPS17, AGAP3, RPS5, NDUFB2, PCMTD1, EIF1, C19orf73, PSMB10, ROMO1, CD86, RPS10, NCOA4, ATP5L, EEF1B2, SOD1, RPL12, LOC100130331, VSIG10L, NDUFA1, RPS26, LTA4H, SUMO2, HLA-B, LOC100288755, RPS19, RPS10, UQCRQ, hCG 19809, RPL13A, RPL21, PDZD7, FTL, DEFA3,

IQSEC2, GIPR, GNAS, CASP4, S100A4, OGFR, RPLP0P3, HMGB1, RPL36A, PPIA, NDUFA1, TUBA4A, TUBA1B, HIST2H2AA4, BLVRB, FTH1, RPL29, RPL15, LTB, HNRNPA1, RPL9, GGT6, ZNF525, PKN2, NFE2L1, TPT1, CKB, IFITM3, UXT, DYNLL1, SOX3, RPL21, GUK1, RPS2P32, GSTP1, HIST1H2AH, DUSP9, FCRLB, LOC119358, DRAP1, TMEM175, RPL21, RPL21P44, FAU, TYROBP, RPL22L1, LCE1F, PALM2-AKAP2, COX6C, RPL41, MYL6, C11orf31, ARHGDIB, NPM1, ATP5E, LOC648771, TNXB, HIST1H2AE, ACTB, RPS26, H2AFJ, TMSB4X, RPL30, RPL23AP71, HIST2H3D, BID, RPL28, ZNF219, FXYS5, MGC10814, RPL39, GPR150, PTMA, RPS3A, CYB561D1, UBB, SPPL2B, HLA-B, CASKIN1, TMSL3, ZNF746, DPEP3, PSPH, NPAS3, NPM1, C14orf2, COX6A1, ATP5E, RPL7, PRR24, HNRNPA1, RPL10A, HIST1H2BH, RPL7A, ANAPC11, S100A9, NDUFB10, 9-Sep, ACTB, CRTCL1, RPS23, HSPB1, RHO, XRCC6, NDUFA2, NDUFB4, RPS14, RPL34, TMEM191B, EEF1D, UBA52, HLA-C, EXOC3L2, CCDC72, HBD, EDF1, UBA52, PTMA, VPS28, IER2, SMARCA4, SRP14, RPL21, UBC, HIST1H2AK, RPL10, RPL17, PRR7, CHCHD2, RPS7, TIMM8B, MT2A, LOC100130152, MTPN, TPT1, RPL7A, IL32, EIF3C, CACNA1I, PSME1, RPS10, MLL3, FGF3, PHOX2A, VIM, GAS5, HIST2H3D, C20orf199, HIST1H4L, H3F3B, HIST1H2BL, LDHB, RPL23A, ZNF579, EEF1D, RPL12, H3F3A, FBL, DBI, ARPC5, LGALS2, C11orf58, EIF3H, RPL22, AP3D1, ATP5O, EEF1A1, RPL21, ATP5I, HMGN2, ISG20, NCRNA00188, HIST3H3, CDKAL1, C17orf96, RPS18, COX7C, LCP1, TSPAN10, FTH1, RPS13, RPS27, RPL6, PSME2, RPL29, C1orf162, YWHAZ, RPS12, YBX1, SLC25A3, HLA-DPA1, FTH1, RPL21, EEF1B2, RPL35, HLA-E, RPL37, RPL13, PSMB1, RPL21, S100A8, RPS24, RPS27A, HIST1H2BK, RPL34, RUFY1, BTF3, IFI27L2, MYEOV2, RPL13A, NACC1, SNRPD2, LCE1A, H3F3A, MESP1, LST1, CALM2, PARD6G, LOC100291051, SLC35E4, C3orf10, BCAM, RPLP1, RPL11, LOC100292388, RPS2P32, ELFN1, RPL31, C17orf74, IFI30, POLD4, LOC100287848, SNX26, EIF3D, GBP6, RPS13, HBA2, MT1A, H3F3A, RPS3, RPLP1, RPL17, LOC401859, RPS3A, BOLA2B, P704P, HRK, HBD, MYL12B, NDUFB9, HBG1, MKRN1, TBC1D10C, FLJ43681, RAX2, RPS14, FAU, ACBD7, RPL26, HIST1H3A, LBX1, C12orf57, NACA2, PABPC1, RPS7P5, TUBA4A, TUBA4A, EEF1G, NDUFAF3, LGALS1, AIF1, ATF4, ATXN2L, MRPL38, RPL21P44, RPS21, C1orf38, HSPA8, LOC100129122, RPL13A, CDC42EP5, WNT6, LOC100288252, RPL36A, HINT1, LYNX1, MRPL21, RPS9, FCER1G, C18orf23, PFDN5, RPL10L, HMGN1, GUK1, RPLP0P2, LST1, ZNF254, RPL34, NDUFA3, MT1H, HIST1H4C, MYL12B, RAVR1, HCST, ANXA2, LOC100291560, NDUFA4, MT2A, ACTG1, ARL6IP4, MEX3D, GLTSCR2, RPS5, RPL7A, RPL10, DNMI3P5, HBA1, POLR2L, HLA-G, UCP3, PFDN5, RPL7A, EEF1A1, KRTAP2-4, H3F3A, RPL19, RPL9, NET1, MYL12A, RPL34, PPDPF, EEF1D, GDNF, TPM3, HIST2H2AB, R3HDM2, LOC391769, SFRS16, DUX4, ARPC3, UBC, ACTG1, RPL5, PRDX6, H3F3A, LOC391334, RPL13, TCEB2, ALDOA, RPS28, UQCRB, SIK1, TOMM7, PARP10, RPL29P2, FTL, GPX1, RPL31, GALR3, TXN, BAALC, RPL6, LOC440311, DLGAP3, HES7, ZNF727, RPL18, PSMD9, POLR2J2, RPSA, EIF3K, HIST2H2AC, COX7A2, VAMP8, RPL21, C1orf113, BNIP3L, PPIAL4A, RPL27, GPR153, BRI3, WASH2P, RPL19P12, SERF2, PAX4, RPLP2, SF3B5, HIST1H2BE, EEF1G, UQCR, NDUFS5, DRD4, RAC2, NDOR1, SSR2, RPS7, RPS4X, RPS25, COX411, HBA2, PRR13, CDV3, CSDE1, IFITM2, PHB2, H3F3B, HNRNPA1L2, UBXN1, HLA-E, RPSA, RPL3, EIF3E, FBL, RPL13, UQCRH, LOC100129292, RPS10, PTMA, RPS15A, HIST1H2BF, FAM131C, HIST1H2AM, SOX1, NME2P1, CTDSPI, COX8A, HLA-DPB1, HSPA8, EEF1A1, RPSA, NKX2-8, RPL13AP3, PPIA, KLF16, SERF2, RPS6, LRRC2

10

20

【0723】

実施例38:循環微小胞 (cMV) からのmRNAのマイクロアレイプロファイリング

高密度アレイ上の大規模スクリーニングまたはcMV内のmRNAレベルは、試料の量および質によって妨げられることができる。前立腺癌を正常から区別するcMVペイロードmRNAのロバストな分析を可能にするためのプロトコルが開発された。

【0724】

実施例6に記載されたような過および濃縮を使用して、四つの前立腺癌試料および四つの非癌対照試料の血漿1mlからcMVを単離した。血漿濃縮物100 μlからRNAを抽出したのち、それを、RNアーゼAによる処理ののちTrizol LS (Invitrogen, by life technologies, Carlsbad, CA) による溶解のための25 μlアリコットに細分割した。四つのアリコットそれぞれからの水相を70%エタノールで沈降させ、一つのQiagenミニRNA抽出カラム (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 上で合わせ、30 μl量に溶出させた。溶出したRNAは、標準的手段によって確実に定量化することは困難であることができる。したがって、10 μl量をその後の標識反応に使用した。一色遺伝子発現分析のためのAgilentからの「Low Input Quick Amp Labeling」キットを用い、製造者の取扱説明 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にしたがって、ただし以下の変更を加えて、試料をcy-3標識した。1) 第三の希釈比が1:5になるようにCy3標識のためのスパイクインミックスを変更し、各試料に1 μlを加えた。2) 試料ごとにVacufugeを二重反復で使用して試料10 μlを2.5 μlまで減量した。3) 増幅された試料の精製工程までプロトコル全体を通して各試料を二重反復で処理した。精製プロトコルの開始時、2つ組の試料を合わせ、その後、カラムに通した。4) 精製後、試料を定量しなかったが、精製された試料の全量をアレイにハイブリダイズさせた。次いで、標識された試料を、製造者の取扱説明 (Agilent Technologies) にしたがってAgilent Whole Genome 44Kマイクロアレイにハイブリダイズさせた。特徴抽出 (Feature Extractor) ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いてデータを抽出し、およびGeneSpring GX (Agilent Technologies) を用いて分析した。試料の少なくとも50%において発現を示した遺伝子を最終分析に含めた。これらの基準を満たす2155のプローブを

30

40

50

検出した。2155のうち、24が、前立腺癌グループと対照グループとの間で有意に異なる発現（ p 値 <0.05 ）を有することがわかった。表25および図22を参照すること。表25は、四つの前立腺癌患者試料および四つ健康な対照試料中のcMVからのmRNAペイロードの間で有意に異なるように発現した24の遺伝子を示す。図22は、マイクロアレイからの選択された遺伝子の未加工のバックグラウンド減算蛍光値のドットプロットを示す。

【0725】

（表25）PCa試料および健康な試料由来のcMV中で差次的に発現したmRNA

GeneSymbol	p値	正常における変化	FCAbsolute
A2ML1	0.001	下方	1.88
GABARAPL2	0.002	上方	1.36
PTMA	0.002	上方	1.76
ETFB	0.003	上方	1.16
RPL22	0.008	下方	1.36
GUK1	0.009	上方	1.28
PRDX5	0.011	上方	1.48
HIST1H3B	0.014	上方	1.29
RABAC1	0.022	上方	1.33
PTMA	0.024	上方	1.65
C1orf162	0.026	下方	1.35
HLA-A	0.031	上方	1.23
SEPW1	0.033	上方	1.31
SOX1	0.034	下方	1.38
EIF3C	0.034	下方	1.30
GZMH	0.037	上方	1.81
CSDA	0.040	上方	1.79
SAP18	0.040	下方	1.36
BAX	0.043	上方	1.20
RABGAP1L	0.045	上方	2.19
C10orf47	0.047	下方	1.58
HSP90AA1	0.047	上方	1.46
PTMA	0.048	上方	1.52
NRGN	0.049	上方	2.57

表25中の略語：「遺伝子記号」は、アレイ上の各遺伝子項目に使用可能な名称を指す。各遺伝子の詳細はAgilent（www.chem.agilent.com）またはHUGOデータベース（www.genenames.org）から入手可能である。「FCAbsolute」は、グループ間で検出されたmRNAレベルにおける絶対的変動比を示す。

【0726】

実施例39: 卵巣癌のための循環微小胞アッセイ

この実施例において、小胞卵巣癌試験は、卵巣癌患者の血漿からの小胞上に存在するタンパク質バイオマーカーのセットを検出するためのミクロスフェアベースのイムノアッセイ法である。試験は、以下のタンパク質バイオマーカー：CD95、CD9、CD59、CD63、CD81およびEpCAMに対して結合特異性を有する抗体または他のリガンドもしくは結合物質（たとえばアプタマー、ペプチド、ペプチド核酸）を用いる。CD95およびEpCAMに対する抗体（または他の結合物質）でコートされたミクロスフェアによる小胞の捕捉ののち、フィコエリスリン標識された抗体を一般的小胞バイオマーカー（ここではCD9、CD59、CD63および／またはCD81）の検出のために使用する。患者の血漿からの小胞に対するこれらの抗体の結合のレベルに依存して、卵巣癌の存在または非存在の決定を下す。

【0727】

小胞は、たとえば上記実施例22および23に記載されたようにして単離される。そのようなタンパク質バイオマーカーのためのプロファイリングそのものが、試験試料のプロフィールを参照試料のプロフィールと比較することにより、診断、予後判定またはセラノーシス用の読み取り値を表すことができる。参照試料は、癌を有しない正常な試料中の微小胞

のレベルであることができ、CD95、CD9、CD59、CD63、CD81およびEpCAMを含む小胞のレベルの上昇が卵巣癌の存在を示す。

【0728】

加えて、バイオマーカーは、特定の試験試料をプロファイリング、同定または単離するために使用され、その特定の試験試料を、微小胞集団中に存在してもよい、または微小胞集団と結合していてもよい、さらなるバイオマーカーに関してさらに調べることができる。たとえば、微小胞の入力試料を、バイオマーカー（ここでは、CD95および／またはEpCamに結合する基体結合抗体）に特異的な結合物質を使用するアフィニティーまたは免疫沈降工程に付し、および単離されたバイオマーカー陽性（BM+）部分集団を、本明細書に開示される、または当技術分野において公知である方法を使用してさらに処理して、微小胞の部分集団中に存在するさらなるバイオマーカー（たとえばタンパク質、ペプチド、RNA、DNA）の存在を特徴決定し、かつ判定する。

10

【0729】

試験はさらに、本明細書中、たとえば実施例14~16に提示された方法を使用して、捕捉された小胞内のマイクロRNAのレベルを評価することを含むことができる。マイクロRNAは、miR-200cを含むmiR200ファミリーのメンバーを含む。非癌参照と比較して、低下したmiR200マイクロRNAのレベルが卵巣癌の存在を示す。より低いmiR200レベルはさらに、より高悪性度の癌を示す。

【0730】

実施例40:PCaにおいて差次的に発現したmiR

20

前立腺癌（PCa）検出のための血液系バイオマーカーを見いだす試みは難航した。血液中のマイクロRNA（miR）の数量化を使用して潜在的な遺伝子バイオマーカーを同定した。この実施例は、血漿由来の循環微小胞（cMV）を細胞からのmiRの濃縮供給源として使用して、PCa試料を健康な対照から区別することができるmiRバイオシグネチャーおよび転移性PCaのmiRバイオシグネチャーを例示する。

【0731】

前立腺癌の男性および対照（前立腺癌を有しないことを生検で確認済み）からの血漿試料のパネルを、本明細書に記載されるように、Exiqon RT-PCRパネルを使用して分析した。TNMスケールを使用して、前立腺癌は、MX試料（遠隔転移評価せず）、M0試料（遠隔転移なし）およびM1試料（遠隔転移確認済み）を含むものであった。

30

【0732】

患者試料から単離した小胞中にmiRを検出した。修正Qiagen miRneasyプロトコル（Qiagen GmbH, Germany）を使用して、各試料由来の凍結血漿濃縮物150 μ lからRNAを単離した。修正プロトコルは、小胞内で保護されたRNAだけが各試料中で分析されるように単離の前に濃縮試料をRNアーゼAで処理することを含むものであった。後続の工程における正規化のために、試料を既知の量の線虫（*C. elegans*）マイクロRNAでスパイクした。試料中の小胞から単離されたRNA40ngを各Exiqonパネルに使用した。

【0733】

Exiqon RT-PCRパネルは、750のmiRおよび対照アッセイを包含する二つの384カードからなるものであった。ABI 7900（Life Technologies Corporation, Carlsbad, California）上で実施されるSybrグリーンアッセイを使用して、qRT-PCRアッセイを実施した。各miRアッセイのCt値をインタープレートキャリブレータ（IPC）プローブおよびRT-PCR対照のCt値に正規化した。いくつかの品質チェックを配置した。IPC Ct値が>25であり、RT-PCR Ct値が>35であり、および試料が対照miR（すなわちmiR-16およびmiR-21）を増幅しなかったとき、試料を分析から除外した。GeneSpringソフトウェア（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA）を使用して試料データの主成分分析を実施してアウトライアーを同定した。三つの試料が、これらの品質尺度を使用する認定に合格しなかったため、分析から除外された。

40

【0734】

以下に指定するようにデータを試料グループ間で対応のあるt検定に付し、p値をBenjam

50

ini and Hochberg偽発見率検定によって補正した。Taqmanプローブ手法を使用して、もっとも有意なp値を示すmiRを妥当化した。

【0735】

非転移性PCa (n=64) および正常対照 (n=28) 試料において比較された750のmiRのうち10が、P値<0.01で>2.0の倍率変化を有することがわかった。表26を参照すること。妥当化セット (N=168) において、hsa-miR-107 (P=0.03) およびhsa-miR-574-3p (P=0.02) の発現を検査した。いずれも、非転移性PCa (n=133) 試料と対照 (n=35) 試料との間で有意に異なった。

【0736】

(表26) 非転移性前立腺癌 対 対照

miR	p値	前立腺癌における倍率変化
hsa-miR-574-3p	0.003	3.32
hsa-miR-141	0.008	3.22
hsa-miR-432	0.002	4.15
hsa-miR-326	0.001	6.36
hsa-miR-2110	0.005	5.98
hsa-miR-181a-2*	0.004	-2.75
hsa-miR-107	0.000	13.16
hsa-miR-301a	0.006	5.41
hsa-miR-484	0.009	2.92
hsa-miR-625*	0.003	4.00

【0737】

転移性 (n=15) および非転移性 (n=55) 試料の比較は、750のmiRのうち16が、P値<0.01で>2.0の倍率変化を有することを見いだした。表27を参照すること。その後の妥当化セット (転移性39および非転移性73) におけるこれらのmiRの数量化は、qRT-PCRによって検査されたいくつかのmiRが転移性PCaと非転移性PCaとを区別することができることを見いだした (hsa-miR-200b、hsa-miR-375、hsa-miR-141、hsa-miR-331-3p、hsa-miR-181aおよびhsa-miR-574-3p)。別個のコホートにおいて、hsa-miR-141およびhsa-miR-375のレベルは、非再発性PCa患者 (n=72) のcMVの中よりも転移性PCa患者 (n=47) の血清からのcMVの中で有意に高かった (P=0.0001)。図23を参照すること。

【0738】

(表27) 転移性 対 非転移性前立腺癌

miR	p値	転移性における倍率変化
hsa-miR-582-3p	0.001	2.51
hsa-miR-20a*	0.002	3.62
hsa-miR-375	0.003	10.71
hsa-miR-200b	0.003	3.90
hsa-miR-379	0.005	2.10
hsa-miR-572	0.005	-7.39
hsa-miR-513a-5p	0.005	2.23
hsa-miR-577	0.005	5.90
hsa-miR-23a*	0.005	2.30
hsa-miR-1236	0.005	2.63
hsa-miR-609	0.006	2.31
hsa-miR-17*	0.006	4.80
hsa-miR-130b	0.007	6.12
hsa-miR-619	0.008	3.37
hsa-miR-624*	0.009	6.09
hsa-miR-198	0.009	2.12

【0739】

血液由来のcMVは、表現型を特徴決定するためのmiRバイオマーカーの供給源である。miRのバイオシグネチャーは、非転移性PCa血液試料を対照から区別することができた。転移

性の血漿由来のcMV試料中、七つのmiRの発現が比較的高く、それらのうち二つ(hsa-miR-141およびhsa-miR-375)はさらに、転移性の血清由来のcMV中で上昇するということが立証された。この実施例は、前立腺癌の検出および転移性の症例の同定のためのcMVの血液系miRバイオシグネチャーを提供する。

【0740】

実施例41: エキソソーム亜集団の単離およびその後のmiRプロファイル

本実施例では、表面タンパク質組成物に基づいて特定された循環微小胞亜集団においてマイクロRNA(miR)発現パターンを調べた。前立腺癌細胞株(VCaP)から単離された小胞を、本明細書に記載の方法を用いて、表面タンパク質組成物に基づいてフローソーティングした。小胞をmiR発現差異について評価した。EpCam、CD63、またはB7-H3を標的とするフィコエリトリン標識抗体を用いて、蛍光標識細胞分取によって小胞亜集団を分取した。各小胞を個々の粒子として分析できるように、小胞をBeckman-Coulter MoFlo XDP(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)によって分取した。小胞表面に抗原が豊富にあるために、アイソタイプ対照を上回るFL2チャンネル強度の大幅な変化があった。その後、分取された小胞亜集団をmiR発現によって調べた。EpCam、CD63、およびB7-H3陽性亜集団のmiRプロファイルを全VCaP小胞集団のプロファイルと比較した。亜集団全体にわたって特異なmiR発現パターンが観察され、全ての発現パターンが、全集団において観察された発現パターンと異なっていた。群間でmiRの過剰発現および過小発現両方のパターンが観察された。これらのデータから、小胞亜集団は、表面タンパク質マーカーならびにその遺伝子含有量、この場合ではmiRに基づいて区別および分離できることが分かる。表面タンパク質組成物に基づいて患者血漿から組織特異的小胞集団を単離し、次いで、表面タンパク質組成物および遺伝子含有量の両方に基づいて分析する能力は、本明細書に記載のように診断、予後判定、およびセラノーシスの用途に使用することができる。

【0741】

実施例42: 肺癌を検出するためのマイクロRNA miR-497

現在、肺癌を早期診断するための血液検査は無い。血漿試料から単離された循環微小胞(cMV)中のマイクロRNAを調べた。実施例6に記載のように、小胞を単離した。トリゾル法を用いて、血漿1mlに含まれる小胞からRNAを抽出した。定量Taqman(登録商標)RT-PCR法を用いてマイクロRNAペイロードを検出した。16人の肺癌患者および15人の対照正常成人(すなわち、肺癌無し)からの血漿中のmiR-497の発現を調べた。2つの群間でmiR-497のコピー数の有意差が観察された($p=0.0001$)。図24Aを参照されたい。肺癌と正常試料とを区別するために、(血漿0.1ml中)1154コピーのmiR-497の閾値(図24Aの垂直線によって示される)を用いて、88%の感度および80%の特異度で肺癌を検出した。

【0742】

後続の試験では、主に初期段階の疾患(IA期=9、IB期=9、IIA期=1、IIB期=2、III期=1、IV期=2)からなる24人の非小細胞肺癌(NSCLC)患者および26人の健常個体からの循環微小胞(cMV)を凍結血漿1mlから単離した。肺癌患者および26人の対照正常成人(すなわち、肺癌無し)からの血漿試料に由来するcMV中のmiR-497の発現を調べた。患者の特徴を表28に示した。

【0743】

(表28) 患者の特徴

10

20

30

40

病期	男性	女性
IA 期	5	4
IB 期	4	5
IIA 期	1	0
IIB 期	1	1
III 期	1	0
IV 期	0	2
正常	14	12

10

【0744】

規準化されたコピー数の中央値は、正常個体については 9000 ± 307 コピー/ml ($\pm 95\%$ CIM) および NSCLC 患者については $27,500 \pm 1298$ コピー/ml ($\pm 95\%$ CIM) であった。癌の閾値を0.1ml 試料中1570コピー(すなわち、15,700コピー/ml)に設定すると、アッセイの感度は79%、特異度は81%、AUCは0.89であった。図24B～24Cおよび表29の結果を参照されたい。表29は、13,560コピー/mlおよび15,700コピー/mlのカットオフ閾値を用いた試験成績を示す。感度または特異度を優先するように閾値を調節することができる。

【0745】

20

(表29) 肺癌を検出するためのmiR-497

真陽性	21	19
真陰性	18	21
偽陽性	8	5
偽陰性	3	5
感度	88%	79%
特異度	69%	81%
精度	78%	80%
AUC	0.89	0.89
カットオフ (コピー/ml)	13,560	15,700

30

【0746】

実施例43: 循環バイオマーカー診断アッセイの前向き分析

序文:

非黒色腫皮膚癌を除くと、前立腺癌は、米国人男性を襲うもっとも一般的な癌である。2010年、合衆国内で217,730の新たな前立腺癌症例および32,050の死亡例があった(出典は国立癌研究所(National Cancer Institute))。前立腺癌の臨床態度は、十分に分化した顕微鏡的腫瘍から、浸潤および転移の可能性が高い高悪性度の高悪性度癌までの範囲である。

40

【0747】

前立腺特異的抗原(PSA)検査が前立腺癌の効果的な管理に対して成した有意な貢献にもかかわらず、この検査は、前立腺組織には特異的であるが、前立腺癌には特異的ではない抗原から生じる有意な欠点を有するものとして広く認識されている。正常なPSA値は現在、4.0ng/mL未満であると考えられているが、しかしこのカットオフは相変わらず論議的である。血清PSAが4.0～10ng/mLの範囲内であるならば、反復生検(たとえば10～12回のコア生検)を使用するとしても、前立腺生検で前立腺癌を発見する確率は約30%である。NCCN(National Comprehensive Cancer Network)ガイドラインにおいては、前立腺生検の場合で2.5ng/mLのPSAカットオフが推奨されている。アメリカ癌学会(American Canc

50

er Society) ガイドラインは、PSAが2.5ng/mLよりも高いならば生検を考慮するよう推奨している。

【0748】

検査はPSA抗原に対して非常に特異的であるため、それは、前立腺癌と、良性前立腺肥大症（BPH）および前立腺炎のような非悪性症状との両方において上昇する。さらに、すべての前立腺癌が過剰なレベルのPSAを血清中に放出するわけではなく、PSAレベルは、多様な他の要因、たとえば併用薬、年齢および人種によっても影響を受けることができる（たとえば、アフリカ系米国人は相対的に高いPSAレベルを有することが多く、アジア系男性は相対的に低いPSAレベルを有することが多い）。したがって、上昇したPSAは、可能性のある前立腺癌の設定におけるリスクアセスメントエイドとして最適以下の臨床感度、特異度および陽性予測値と関連している。現在の診断アルゴリズムに特異性を加える、前立腺癌の診断を支援するための検査が必要とされている。

【0749】

微小胞の生物学：

微小胞は、多様な細胞タイプにより、細胞膜の区域が自発的に陥入し、エキソサイトシスを受け、そして細胞外環境中に放出されるとき細胞内で生成されることができる。多様な細胞タイプが、樹状細胞、腫瘍細胞、リンパ球、中皮細胞、上皮細胞および様々な組織または臓器からの細胞を含む微小胞を生成してもよい。微小胞は、血漿膜または内部膜のいずれかに由来し、かつその後、細胞外環境中に放出される任意の膜結合粒子を含んでもよい。微小胞は、血漿膜の部分のヘルニア化膨出（小胞形成）、分離および封止から、または細胞起源の様々な膜結合タンパク質を含有する任意の細胞内膜結合小胞構造の搬出から生じる脂質二重層膜によって画定された細胞由来構造である。これらは、腫瘍由来のタンパク質に選択的に結合する宿主循環に由来する表面結合分子および微小胞またはエキソソーム内腔に含まれる分子、たとえば腫瘍由来のmiRNA、mRNAおよび細胞内タンパク質を含んでもよい。微小胞はまた、膜フラグメントを含むことができる。Valadi et al. (2007)は、マスト細胞に由来する微小胞の組成および内容物をプロファイリングし、それらがマイクロRNA（miRNA、miR）およびメッセンジャーRNA（mRNA）を実質的に豊富に含むことを見いだした。加えて、微小胞中に見られるRNAのプロフィールは、サイトゾル中に見られるRNAのプロフィールとは異なるものであった。たとえば、微小胞は、リボソームRNAを含有していなかったが、しかし多数の19~22ヌクレオチドmiRNAを含有していた。図25A~Cは、培養によって増殖させた前立腺癌細胞株から超遠心分離法によって単離された微小胞の透過型電子顕微鏡写真を示す。図25Aは、ガラススライドに結合したVcap由来の微小胞の電子顕微鏡写真であり、図25Bは、Vcap由来の微小胞の走査型電子顕微鏡写真であり、図25Cは、ポリ-L-リジンでコートされたポリスチレンビーズに結合したVcap微小胞の走査型電子顕微鏡写真である。

【0750】

腫瘍細胞による微小胞の分泌ならびにタンパク質および核酸（たとえばmiRNA）の輸送におけるそれらの関わりは、病理学的プロセスにおける微小胞の役割を実証する。微小胞は、非限定的に、血漿、気管支肺胞洗浄液および尿を含む、多数の体液中に見いだされている。他の生物学的機能として、微小胞は、細胞間通信に関与し、また、タンパク質、RNA、DNA、ウイルスおよびプリオンの輸送ビヒクルとして働く。

【0751】

微小胞およびバイオマーカー：

タンパク質バイオマーカーまたは腫瘍マーカーは、癌と関連しており、かつその測定または同定が疾患診断または臨床管理において有用である、血液または組織中に生じるタンパク質分子を含む。

【0752】

腫瘍マーカーは、非限定的に、以下を含む、多数の臨床目的に使用することができる。

（1）癌の存在に関する健康な集団または高リスク集団のスクリーニング、（2）癌または特定のタイプの癌の診断を下すときの支援、（3）予後を判定するときの支援、および（4

）治療モニタリングのサポート。

【0753】

臨床決定を支援するバイオマーカーに関する研究は急増しており、過去数年間、多様な遺伝子バイオマーカーが発見され、腫瘍患者のための治療決定を導くための使用に関して妥当化されている（たとえば、結腸直腸癌患者におけるKRAS、乳癌患者におけるHer2-neu過剰発現および非小細胞肺癌患者におけるEGFR）。しかし、今日利用可能な多くのタンパク質バイオマーカーは、意志決定を支援するために臨床医によって求められる感度、特異度および予測値を実証することができない。たとえば、癌胎児抗原（CEA）は、結腸直腸癌患者において最初に同定されたタンパク質であるが、しかしそれ以来、脾臓、胃、肺および乳房の悪性疾患を含む多様な悪性疾患ならびに多様な良性症状、たとえば肝硬変、炎症性腸疾患、慢性肺疾患および肺炎において上昇することがわかった。もう一つの例が、非粘液性卵巣癌腫の80%に存在する抗原であるCA-125であるが、しかしこれもまた、他の悪性疾患、たとえば子宮内膜、脾臓、肺、乳房および結腸の悪性疾患ならびに多様な良性症状、たとえば月経、妊娠および子宮内膜症において上昇する可能性がある。

10

【0754】

腫瘍細胞によって産生される微小胞は、腫瘍細胞起源の分子、たとえばmiRNA、mRNAおよびタンパク質を含有する。したがって、循環微小胞（cMV）の単離および濃縮は、腫瘍関連バイオマーカーの高濃縮供給源を与える。

【0755】

この実施例は、40～75歳の男性における前立腺癌の存在および／またはリスクの改善された評価を提供するバイオマーカーシグネチャー（バイオシグネチャー）を特徴とする、微小胞ベースの診断検査を開発するためのプロトコルを例示する。この微小胞ベースの手法はさらに、新生物性疾患の病期決定／モニタリング、治療的意志決定の支援および予後の判定に使用されてもよい。

20

【0756】

本明細書に記載されるように、本発明は、一部には、臓器限局性前立腺癌を有する男性からの血漿を前立腺癌を有しない男性から区別することができる、捕捉された循環微小胞に基づく多重サンドイッチイムノアッセイ法（以下に説明する）を提供する。このアッセイ法は、前立腺癌患者からの血漿中の微小胞上に存在するタンパク質バイオマーカーのセットを検出するためのミクロスフェアベースのイムノアッセイ法を含む。アッセイ開発中、数多くの微小胞表面抗原が検査され、最適化されたバイオシグネチャーパネルまたはマーカーが選択された。この予備的手法は、以下のタンパク質バイオマーカー:CD9、CD63、CD81、PCSA、B7H3およびPSMAに対する特異的抗体を用いた。

30

【0757】

PSMAおよびPCSAはいずれも、前立腺上皮細胞から分泌される微小胞を単離するために使用される前立腺特異的マーカーである。B7-H3は、形質転換細胞中に見られるタンパク質バイオマーカーであり、かつ癌細胞由来の微小胞を同定するために使用される。CD9、CD63およびCD81は、大部分の上皮細胞および上皮細胞から分泌される微小胞の上に見られるテトラスパニンまたは膜貫通タンパク質である。これらのテトラスパニンは一般的小胞マーカーとして働く（表3を参照）。アッセイ中、様々な結合した微小胞の検出にはフィコエリスリン（PE）標識抗テトラスパニン抗体が使用される。患者の血漿からの微小胞に対するこれらの抗体の結合のレベルに依存して、前立腺癌の存在またはリスクとの相関の決定が下される。

40

【0758】

前立腺癌患者を前立腺癌を有しない男性と比較する後向き研究において、このアッセイフォーマットは、83%の感度および86%の特異度を示した。このバイオシグネチャーは、前立腺癌のリスク増大のせいで前立腺生検を予定しているすべての男性から前向きのに集められた試料のセットで検査される。

【0759】

タンパク質バイオマーカーの使用に加えて、前立腺癌を検出し、かつ識別する感度およ

50

び特異度を改善するためにmiRNA分子がアッセイに加えられる。これは、血漿からcMVを捕集し、および濃縮し、特定のmiRNA種を抽出し、および計測し、前立腺癌とのそれらの相関を決定することによって達成される。たとえば、前立腺癌または転移性前立腺癌の存在と高い相関を有するmiRNAが上記実施例に提示されている。

【0760】

目的:

この前向き研究の目的は、血液試料からの前立腺癌の検出において高い精度を提供する微小胞ベースの前立腺癌特異的バイオシグネチャーを同定および／または確認することである。より具体的には、目的は、可能性のある前立腺癌の評価のために泌尿器科専門医にまわされる男性集団における前立腺癌の検出において支援になるアッセイ法を開発することである。アッセイ性能標的は、 ≥ 10 のコア超音波誘導生検の不完全なゴールドスタンダードに基づくROC分析において、 ≥ 0.80 のAUCで $\geq 80\%$ の感度および $\geq 80\%$ の特異度を含む。

10

【0761】

所期用途:

この実施例に記載される循環微小胞 (cMV) アッセイ法は、ヒト血漿中の微小胞中の特定のバイオマーカーの計測のためのものである。アッセイ法は、PSAの上昇および／または直腸内触診 (DRE) の異常によって前立腺癌のリスクが高いとみなされ、前立腺生検の候補とされてもよい40~79歳の男性における前立腺癌の検出における支援として使用されるためのものである。

20

【0762】

治験設計:

定められた包含基準を満たす、前立腺生検を予定されているすべての男性から血液試料を捕集する。試料を目録化し、適切なフォーマットで貯蔵する。症例報告書に収集した関連データを電子的に記憶し、紙のコピーを相応にファイリングする。試料捕集プロトコル (図25Dを参照) に指定されているように血液を血漿へと処理し、凍結し、捕集の場所 (たとえば病院または介護者のオフィス) からアッセイの場所まで輸送し、そこで処理し、タンパク質バイオマーカーおよび核酸バイオマーカーの両方に関して検査する。循環微小胞を血漿から単離し、分別ろ過法によって濃縮する。濃縮した微小胞を、生検で確認された前立腺癌を有する男性からの少なくとも50の前立腺癌試料および同じ場所から生検で陰性であった男性からの少なくとも50の試料のトレーニングセットにおいて、タンパク質およびmiRNAバイオマーカーに関して検査する。合衆国内の少なくとも三つの異なる捕集場所からの試料を使用する。

30

【0763】

PCaの存在と相関する潜在的バイオマーカーに関してタンパク質およびRNAの両方を検査する。

【0764】

方法:

Luminex 200計器システム上でタンパク質バイオマーカー選択を実施する。選択した抗体を、製造者の推奨プロトコルにしたがってLuminex Corp.からの差別的にアドレス指定可能なミクロスフェアにコンジュゲートする。コンジュゲーションののち、以下に記すように、コートされたミクロスフェアを洗浄し、PBS (Thermo Scientific, cat# 37538) 中Starting Blockブロッキングバッファ中のインキュベーションによってブロックし、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で洗浄し、血漿からの濃縮cMVとともにインキュベートする。ビーズ結合抗CD9、抗B7H3、抗PCSAおよび抗PSMAを使用してcMVを捕捉したのち、ミクロスフェア-cMV複合体を洗浄し、次いでフィコエリスリン標識検出抗体 (PE-CD9、PE-CD63およびPE-CD81) とともにインキュベートし、洗浄したのち、Luminex 200上で読み取る。標準プロトコルは、ミクロスフェア100個からの蛍光シグナルを計測し、差別的にアドレス指定可能なミクロスフェアそれぞれ (それぞれが異なる捕捉抗体に対応する) の平均蛍光強度 (MFI) を算出することを含む。上記テトラスパニン検出物質に加えて、検出物質と捕捉

40

50

抗体との様々な組み合わせを検査する。たとえば、所望により、表5における前立腺または他のマーカーバイオマーカーを評価する。

【0765】

評価される様々な集団中のcMVの総数をアッセイするためにフローサイトメトリーを使用する。適量の血漿試料を、PBS中で100倍に希釈したのち、1試料あたりのイベントの数量化のために、BD Trucount管 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中、室温で15分間インキュベートする。Trucount管は、フローサイトメトリーによって試料ごとにイベントと匹敵させることができる正確な数の蛍光ビーズを含有する。FACS Canto IIサイトメータ (BD Biosciences) による試料獲得およびFlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc., Ashland, OR) によるその後の分析が、試料イベントの数および1管あたりのTrucountビーズの数を明らかにする。最後に、BDからの取り扱い説明にしたがって1試料あたりの絶対数の計算を得たのち、希釈係数によって調節する。

10

【0766】

また、血漿試料由来のcMVからのマイクロRNAを検査する。cMVを濃縮し、Trizol法を使用してcMVからmiRNAを抽出する。簡潔にいうと、cMVを、RNアーゼA (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) 処理したのち (20 µg/ml、37°Cで20分間)、Trizol処理し (各100 µlに対しTrizol LS 750 µl)、室温で30分間、1400rpmでボルテックスする。遠心分離後、上清を捕集し、RNAを、miRNeasy 96 (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 精製キットによってさらに精製し、-80°Cで貯蔵する。RNA 40ngを逆転写し、ABI 7900 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) 上、Exiqon qRT-PCRヒトパネルIおよびII (Exiqon, Inc., Woburn, MA) に付す。SDS 2.4ソフトウェア (Applied Biosystems) によってCT値を算出する。すべての試料をインタープレートキャリブレータおよびRT-PCR対照に対して正規化する。

20

【0767】

また、血漿試料由来のcMVからメッセンジャーRNAを検査する。血漿試料のcMVからメッセンジャーRNAを検査する。まず、cMVを単離し、RNアーゼA 229 µg/mlによって37°Cで20分間処理する。次いで、Trizol法を使用してメッセンジャーRNAを抽出し、Qiagen RNeasy ミニキットによって70%エタノールで沈降させて精製する。試料RNAを逆転写し、一色遺伝子発現分析のためのAgilentの「Low Input Quick Amp Labeling」キットを製造者の取り扱い説明にしたがって使用して、cy-3標識する。標識した試料を、AgilentのWhole Genome 44K v2アレイにハイブリダイズさせ、製造者の仕様 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) にしたがって洗浄する。Agilent Bスキャナ上でアレイをスキャンし、Feature Extractor (Agilent Technologies) ソフトウェアによってデータを抽出する。抽出したデータをグローバル正規化法によって正規化し、GeneSpring GX (Agilent Technologies) ソフトウェアによって分析する。

30

【0768】

血漿からのcMVの特定の部分集団からmiRNAおよびメッセンジャーRNAの両方を検査する。たとえば、cMVを濃縮したのち、磁気免疫沈降を使用して、PCSAに関して陽性である集団を単離する。単離ののち、修正Trizol法を使用してmiRNAを抽出する。簡潔にいうと、cMVをRNアーゼA (Epicentre) 処理したのち (20 µg/ml、37°Cで20分間)、Trizol処理し (各100 µlに対しTrizol LS 750 µl)、室温で30分間、1400rpmでボルテックスする。遠心分離後、上清を捕集し、miRNeasy 96 (Qiagen) 精製キットによってRNAをさらに精製し、-80°Cで貯蔵する。RNA 40ngを逆転写し、ABI 7900上、Exiqon qRT-PCRヒトパネルIおよびIIに付す。SDS 2.4ソフトウェア (Applied Biosystems) によってCT値を算出する。すべての試料をインタープレートキャリブレータおよびRT-PCR対照および/またはcMVの数に対して正規化する。血漿試料のcMVからメッセンジャーRNAを検査する。まず、cMVを単離し、RNアーゼA (Epicentre) 229 µg/mlによって37°Cで20分間処理する。次いで、修正Trizol法を使用してメッセンジャーRNAを抽出し、Qiagen RNeasyミニキットによって70%エタノールで沈降させて精製する。試料RNAを逆転写し、一色遺伝子発現分析のためのAgilentの「Low Input Quick Amp Labeling」キットを製造者の取り扱い説明にしたがって使

40

50

用して、cy-3標識する。標識した試料を、AgilentのWhole Genome 44K v2アレイにハイブリダイズさせ、製造者の仕様にしたがって洗浄する。Agilent Bスキャナ上でアレイをスキャンし、Feature Extractor (Agilent Technologies) ソフトウェアによってデータを抽出する。抽出したデータをグローバル正規化法によって正規化し、GeneSpring GX (Agilent Technologies) ソフトウェアによって分析する。

【0769】

正規化した分析対象値をR (cran.org) およびSASソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC) の中にインポートし、品質管理分析に付し、変換したのち分析する。分析は以下のように進める。

1) シグネチャー性能評価 (事前に指定されたシグネチャーまたは新規シグネチャーの場合)

a. この試料セットを使用して、臨床転帰または試料の検査室検査のいずれかの非盲検化の前に完全に指定されるシグネチャーの性能を評価してもよい。そのような場合、シグネチャーは、事前に指定されたものとみなし、すべての試料に関する予測される転帰を得るために、修正されない状態で、この試料セットに関する新たな分析対象物データに適用しなければならない。予測転帰と真の転帰とを比較することにより (たとえば、診断感度、特異度および精度に関して)、事前に指定されたシグネチャーの性能を評価する。統計は性能推定値および信頼区間を含む。

b. 事前に指定されないシグネチャー (すなわち、臨床転帰および試料の検査室検査結果の両方の先見によって導出されるもの) の場合、これらの試料をさらに使用してシグネチャーの性能を評価してもよい。相対的に不偏性の性能の推定を保証するために、以下に説明するように、すべてのマーカー選択およびクラス予測工程を含むk分割交差妥当化ループ内にネストされた状態で統計分析を実施する。

2) 新規シグネチャーの場合のマーカー選択

a. マーカーは、一般的に適用される技術、たとえば、以下の技術のサブセットを使用する、疾患転帰との関連に関する検査によって統計的に情報提供的であることが示されるならば、新規シグネチャーに含まれる。

i) ウェルチ検定一分散が等しくないときのグループ平均間の差に関するロバストなパラメトリック統計検定。

ii) ウィルコクソン符号順位検定—ROC AUCの改善 (0.50超) を示すものと解釈することができロバストなノンパラメトリック統計検定

iii) Youden's J—マーカーに関する、すべての可能な診断閾値にかけて最大の感度および特異度の組み合わせとして算出されるもの。統計的有意さは並べ替え検定によって評価する。

b. マーカーは、実施された数統計検定に関して検定が有意であるならば、統計的に情報提供的と判断される。より具体的には、本発明者らは、たとえば偽発見率閾値を使用して、またはファミリーワイズエラー率の制御により、複数の検定に関して1比較あたりのp値を調節する。

3) 新規シグネチャーの形成

直前の (マーカー選択) 段階で情報提供的マーカーのサブセットが同定されたと仮定して、十分に確立されたモデル化技術を使用して新規なマルチマーカーモデルを形成する。フルトレーニングデータセットにおいてモデルをトレーニングすることによってシグネチャーのためのパラメータを推定し、「シグネチャー性能評価」の下で記載されているように、「事前に指定されないシグネチャーのため」の手法を使用して、シグネチャーの性能を評価する。本発明者らは、判別分析、サポートベクターマシン、ロジスティック回帰および決定木を含む簡単に十分に確立されたモデル化技術を重視する。すべてのモデルの結果を報告する。

【0770】

関心対象の臨床変数、たとえば以前の生検の回数、生検および生検結果の適応症 (たとえば前立腺上皮内高度腫瘍形成 (HGPIN)、異型小腺房増殖 (ASAP)、異型 (ATYPIA)、

10

20

30

40

50

良性前立腺肥大症（BPH）および前立腺炎）のデータセットに対してさらなる事後分析を実施してもよい。そのような分析は、以前に画定されたモデルに共変量または層別変数を導入することによって実施される。事後分析は、データの十分性の評価の後でのみ実施し、すべての検査および結果を記録し、複数の検査に関してP値を補正する。

【0771】

患者適格性：

包含基準

1. 性別:男性
2. 年齢範囲40～79歳
3. 任意の人種または民族
4. 日常のケアの一部として前立腺生検を予定しており、生検予定日前の7日の間に採血を受けることに合意する男性。
5. 前立腺生検病理報告書をすべての治験申込み用紙および患者試料とともにCarisに提出することができること。
6. 治験を理解するレベルの理解力および合意書にサインするレベルの言語能力があること。

除外基準

1. 前立腺切除術およびホルモン療法を含む前立腺癌のための任意の処置を以前に受けたことがある、または現在受けている。
2. 前立腺癌または非黒色腫皮膚癌を除く癌の診断を以前に受けたことがある。
3. 採血から30日以内に前立腺生検を受ける。
4. 採血当日、採血を実施する前にDREを実施した。
5. 静脈切開を拒絶する。
6. 合意書にサインすることを拒否する。

【0772】

前立腺採血プロジェクトへの参加に適格である個人の個人の人種、性別（男性限定）および民族的特徴は、泌尿器科的医療を受ける、または求める対象の人口統計を反映しなければならない。対象は、これらの人口統計にしたがって包含される。いかなる個人をも、人種、出身国、民族、身体障害またはHIV状態に基づいて前立腺採血プロジェクトから除外してはならない。

【0773】

患者またはデータ選択要件：

データ選択は、患者適格性基準に基づき、この治験に包含される対象に対応するデータレコードのサブセットに限定される（すなわち、検査室分析対象物データが利用可能である場合）。データフィールドは、表30におけるような（非PHI）ドナー同定、QCおよび臨床解釈に使用されるものを含む。

【0774】

（表30）患者データ

10

20

30

フィールド指定項目	補足
PHI匿名化患者識別子	現在のバイオレポジトリ・ドナー・バーコードで十分
施設コード	(上記匿名化患者バーコードに含まれてもよい)
人種	白人、黒人またはアフリカ系米国人、アメリカインディアンまたはアラスカ先住民、ハワイ先住民または太平洋諸島先住民、アジア系、不明
民族	ヒスパニックまたはラテン系、非ヒスパニックまたはラテン系、不明
性別	男性に限る
年齢	満年齢（生年月日ではない）
炎症度	急性、慢性、混合、NA（該当せず）、UNK（不明）
DRE結果	正常；異常、片側性<50%；異常、片側性>50%；異常、両側性；NA
総PSA	ng/ml
遊離PSA	%
前立腺体積	Cc
PCA3スコア	数値、Unk、NA
インデックス生検を命じる理由	異常な%遊離PSA、異常なDRE所見、異常な画像データ、異常なPSA密度、異常なPSA速度、アクティブサーベイランス、ASAP、PSA上昇、PCa家族歴、HGPIN、高PCA3、PCA上昇、異型
以前の前立腺生検の回数	
いずれかの以前の前立腺生検が陽性であったか	
炎症度（生検に関連）	急性、慢性、混合、NA、Unk
生検コア	
陽性生検コア	
一次グリーソン	
二次グリーソン	
総グリーソン	
AJCC病期	TNM、グループ期
病理学的診断	癌、非癌
診断の月／年	(HIPAA理由のため、診断日ではない)
送付した試料の数	送付した試料合計、管タイプごと
HGPIN結果	HGPINまたはHGPIN陰性
ASAP結果	ASAPまたはASAP陰性
異型結果	異型または異型陰性
炎症結果	慢性、急性または混合
データ入力者	データを入力した者を示すコード
データQC者	入力データに対してQCを実施した者を示すコード
ステータス	データ一部入力済、入力済、QC済、など

10

20

30

40

50

【0775】

患者またはデータ収集要件:

データフィールドは、採血される施設において臨床データ形式で捕捉される。施設職員が医療記録および患者由来の情報を使用してすべてのデータ要素を捕捉する。症例ごとに収集されたデータは、受領後48時間以内にデータベースに入力される。すべてのデータフィールドが満たされていなければならない、満たされないものがあるならば、施設に問い合わせが送られ、10営業日以内に回答が求められる。事前に選択されたデータフィールドが満たされなければならない、さもなければ、その患者は分析から除外される。

【0776】

当業者は、他の設定、たとえば他の疾患および前立腺癌以外の癌の診断、予後判定および／またはセラノーシス用の評価において同様なプロトコルを踏襲して、循環バイオマーカーを含むバイオシグネチャーを開発し、確認することができることを理解するであろう。たとえば、表5におけるバイオマーカーを他の設定のためのバイオシグネチャーの一部として使用することができる。

【0777】

実施例44: バイオマーカーを同定するためのデータマイニング

マイクロRNAは、mRNAの発現を制御することが知られている。多くの腫瘍タイプのmRNA発現に関する情報を含む発現データベースを創製した。データベースは、何千人もの患者に関してIllumina DASLマイクロアレイ (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用して得られたデータを含む。循環微小胞 (cMV) は、主要なRNA種としてマイクロRNAを含有し、また、mRNAをも含有する。この実施例においては、発現データベースからの癌腫中で差次的に発現するmRNAとcMV中で発現するmRNAとを関連づけた。また、腫瘍組織中で差次的に発現することが見いだされたmRNAを使用して、cMV中のマイクロRNA標的を発見した。

【0778】

発現データベースからの遺伝子発現データを評価して、前立腺癌 (PCa+)、乳癌 (BrCa)、肺癌 (LCa) および結腸直腸癌 (CRC) と、対応する正常組織 (PCa-) との間で、また、癌タイプ (表31) の間で、もっとも統計的に有意な差次的に発現した遺伝子を発見した。癌試料 (前立腺、結腸直腸、乳および肺) の発現データ (バージョンHT-12およびREF-8) を分析して、癌タイプの間で差次的に発現した遺伝子を検出した。同様に、前立腺癌 (PCa) 試料を正常前立腺試料に対して比較して、前立腺癌特異的プローブを検出した。分析を実施するために、分析の前に、20の随意選択アレイ (六つの乳癌アレイ、五つの結腸直腸癌アレイ、五つの肺癌アレイおよび四つの前立腺癌アレイ) のサブセットを採用して分位点参照分布を生成することによって発現データを正規化した。そして、データセット中のすべてのアレイを参照分布に対して正規化して、各アレイが同じ分位点分布を共有することを保証した。次に、データセット中のプローブごとに正規化発現データを分析した。Fスコア (フィッシャースコアとも知られる) 統計を使用してクラスの各対 (たとえば前立腺癌 対 乳癌および前立腺癌 対 正常前立腺) を比較することにより、差次的に発現したプローブ (およびそれらの対応する遺伝子) を検出した。クラス間変動 対 クラス内変動を計測するこの統計は、平均グループ差の二乗をグループ標準偏差の合計の二乗で割ることによって得た。PCa+試料の平均が二つのグループの低いほうであった場合、Fスコアをマイナスに設定した。最後に、Fスコアの絶対値を使用してFスコアを降順にソートし、トップの上方/下方制御されたマーカーをリストから選択した。

【0779】

(表31) PCa+試料と表記試料との間の統計的にもっとも有意な差次的に発現した遺伝子

ランク	PCa-	BrCa	CRC	LCa
1	<i>SEMG1</i>	KLK2	KLK2	KLK2
2	<i>MAP4K1</i>	KLK2	KLK2	KLK2
3	<i>CXCL13</i>	MAOA	KLK4	LRRC26
4	<i>GNAO1</i>	KLK4	LRRC26	LOC389816
5	<i>DST</i>	PVRL3	<i>CDX1</i>	KLK4
6	<i>AQP2</i>	SLC45A3	EEF1A2	CAB39L
7	<i>NELL2</i>	NLGN4Y	<i>FOXA2</i>	SPDEF
8	<i>TNNT3</i>	STX19	SPDEF	SIM2
9	<i>PRSS21</i>	CYorf14	<i>BAIAP2L2</i>	SLC45A3
10	<i>SNAI2</i>	C22orf32	FAM110B	PNPLA7
11	<i>BMP5</i>	PNPLA7	MIPOL1	TRIM36
12	<i>PGF</i>	SIM2	<i>CEACAM6</i>	<i>GSTP1</i>
13	<i>POU3F1</i>	FEV	SLC45A3	TRPV6
14	<i>ERCCI</i>	TRPM8	ADRB2	ASTN2
15	<i>TAF1C</i>	ARG2	LOC389816	<i>MUC1</i>
16	<i>KLHL5</i>	TRIM36	<i>C19orf33</i>	<i>MUC1</i>
17	<i>C16orf86</i>	ADRB2	ZNF613	ZNF613
18	<i>SMARCD3</i>	LRRC26	TRIM36	FAM110B
19	<i>PENK</i>	EIF1AY	<i>ERN2</i>	FEV
20	<i>SCML1</i>	SLC30A4	<i>TRIM31</i>	<i>CRIP1</i>

PCA+低いほう
PCA+高いほう

【0780】

前立腺癌の場合、もっとも有意に過剰発現および過小発現した遺伝子のリストを作成した。これらの遺伝子を、マイクロアレイを介して前立腺癌患者からのcMV中で検出されたmRNAのリストと比較した。また、組織リストからの一つの遺伝子AQP2がcMV中で発現するこ

とがわかった。これらのmRNAの発現に影響してもよいマイクロRNAに関するTargetScan公開データベースを使用して、前立腺腫瘍組織からの上方および下方制御される遺伝子のリストをマイニングした。検査した20のmRNAのうち11に関し、対応するマイクロRNAを発見した（表32）。次いで、このマイクロRNAのリストを、cMV中で確実に検出されることを本発明者らが見いだしたマイクロRNAのリストと比較した。この比較が、前立腺腫瘍組織中の関心対象のmRNAを制御するマイクロRNAのうち10がcMV中にも見いだされることを明らかにした（表32）。

【0781】

（表32）差次的に発現したmRNAと関連するマイクロRNA

PCa上方	TargetScan結果	cMV中で検出されるか？	PCa下方	TargetScan結果	cMV中で検出されるか？
ADCYAP1R1	標的なし	該当なし	SEMG1	標的なし	該当なし
HECTD3	miRs-26a+b	検出される	MAP4K1	miR-342-5p	検出されない
SLC44A4	標的なし	該当なし	CXCL13	miR-186	検出される
FASN	miRs-15/16/195/497/424	検出される	GNAO1	miR-1271	検出されない
MPG	標的なし	該当なし	DST	miR-600	検出されない
MIR720	標的なし	該当なし	AQP2	miR-216b	検出されない
PTBP1	miR-206	検出される	NELL2	miR-519ファミリー	検出されない
CPSF1	標的なし	該当なし	TNNT3	標的なし	該当なし
C2orf56	標的なし	該当なし	PRSS21	miR-206	検出される
HCRTR1	標的なし	該当なし	SNAI2	miR-203	検出される

【0782】

さらに、差次的に発現することがわかっているmRNAは、多くの場合、タンパク質レベルの差を示す。このマイニング活動の結果は、乳癌、肺癌および結腸癌を含む他の癌から前立腺癌を区別するために使用することができる、cMVと結合したタンパク質（たとえばKLK2）を同定した。KLK2は、前立腺組織と結合していることが知られている。

【0783】

実施例45: マイクロRNA機能アッセイ

マイクロRNAは、微小胞、HDLおよびLDL粒子ならびにリボ核タンパク質複合体（RNP）の成分中に封入されて、血液中を循環する状態で見いだされることができる。マイクロRNAは、RT-qPCRまたは次世代配列決定法のような利用可能な技術を使用して検出することができる。しかし、生物学的に活性な状態にあるマイクロRNAは、Argonauteタンパク質（Ago1～4）の一つと結合し、それによって活性化される。この実施例は、様々な供給源（非限定的に、細胞溶解物、体液、血漿、血清、単離された微小胞などを含む）からの試料内の所与のマイクロRNAの機能活性を単一の反応で検出することができるアッセイを提示する。

【0784】

アッセイは、マイクロビーズ、ビオチンとコンジュゲートした合成RNA分子、ストレプトアビジン-PE、組み換えArgonaute 2およびRISC（RNA誘発サイレンシング複合体）反応バッファ成分を含む。アッセイの成分が図26に示されている。図26Aに示すように、ビオチンとコンジュゲートした合成RNA分子は、3'リンカー／延長領域262、中央miRNA標的化領域263および第二の5'リンカー／延長領域264を含む。RNAは、その3'末端がマイクロビーズ261に結合し、およびその5'末端がビオチン266とコンジュゲートしている。中央miRNA標的化領域263は、関心対象のmiRNA配列を補足するように設計されている。任意の関心対象のマイクロRNAをこのアッセイ法に使用することができる。一例としてのみ、ここではlet-7aが使用されている。RNAのビオチン端を標識するためにストレプトアビジン-PE（フィコエリスリン）265が使用されている。標的let-7aが試料試料中に存在し、かつAgoタンパク質267、たとえば組み換えAgo2（rAgo2）と結合しているならば、let-7aは、相補的マイクロRNA標的化領域263と結合し、かつその後、Argonaute 2のヌクレオチド鎖切断活性によって領域263において合成RNAを切断する。図26の工程268を参照すること、切断されたら合成RNA分子の5'末端が解放され、それにより、ビオチン／ストレプトアビジン-PE

複合体がマイクロビーズ261から切り離される。図26Bを参照すること。次に、マイクロビーズを単離し、洗浄して、切断されたRNAを除去して、それにより、残りの、切断されていない物質および任意の切断されたRNAだけを残す。この洗浄工程ののち、PEシグナルの差が、元のアッセイ中に存在するAgo結合標的マイクロRNA267の濃度および活性と相関する。この実施例においては、入力試料中のAgo結合let-7aの量が、切断されたRNAのレベルを決定する。たとえば、let-7aが存在しないならば、合成RNA標的領域263は、切断されないまま残り、シグナル強度は変化しない。

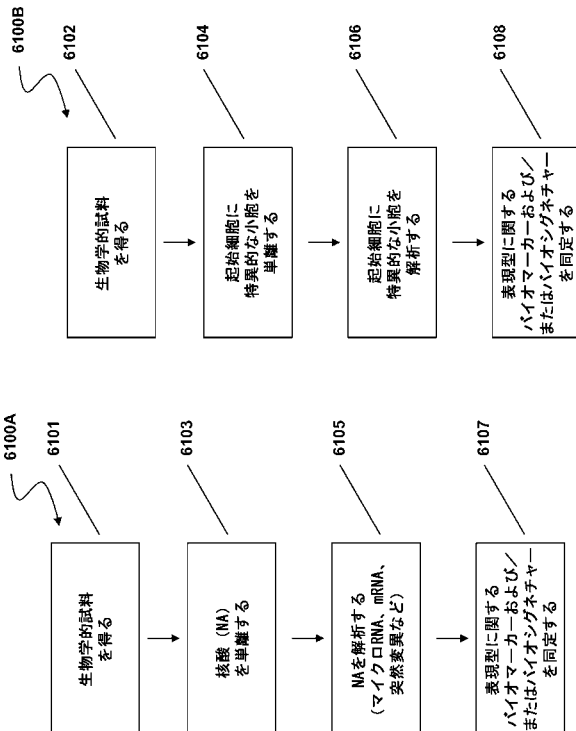
【0785】

図26C～Eは、アッセイ法のための入力として使用することができるRNAの様々な供給源を模式的に示す。図26Cは、Agoタンパク質269に結合してリボ核酸複合体267を形成するマイクロRNA268を示す。図26Dは、Agoへの結合物質2610を使用する、Argonaute-マイクロRNA複合体267の免疫沈降を示す。図26Eは、たとえば細胞溶解物、体液または溶解微小胞からのArgonaute-マイクロRNA複合体267の直接分析を示す。

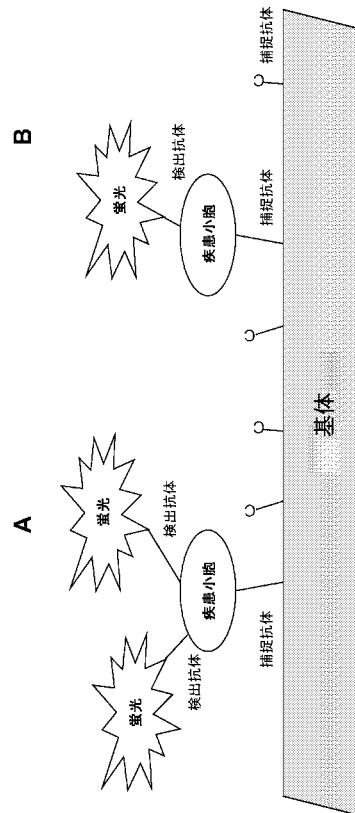
【0786】

本発明の好ましい態様が本明細書において示され、説明されたが、そのような態様は例としてのみ提供されているということが当業者には明らかであろう。本発明を逸脱することなく、数多くの変形、変更および置換が当業者には思いつくであろう。本明細書に記載された発明の態様に対する様々な代替が本発明の実施において用いられてもよいことが理解されよう。添付の特許請求の範囲が本発明の範囲を画定し、特許請求の範囲に入る方法および構造ならびにそれらの均等物が本発明の範囲によって包含されるものとみなされる。

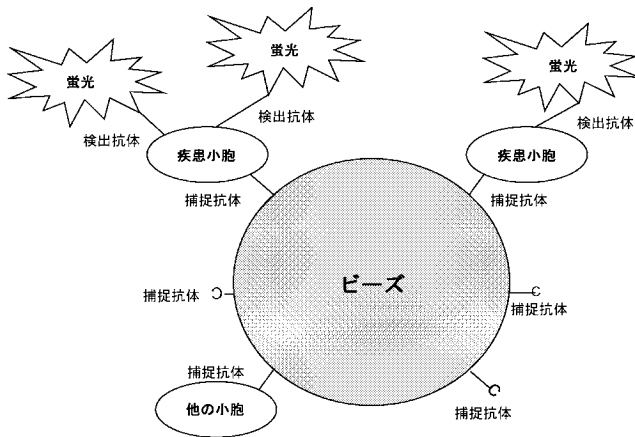
【図1】



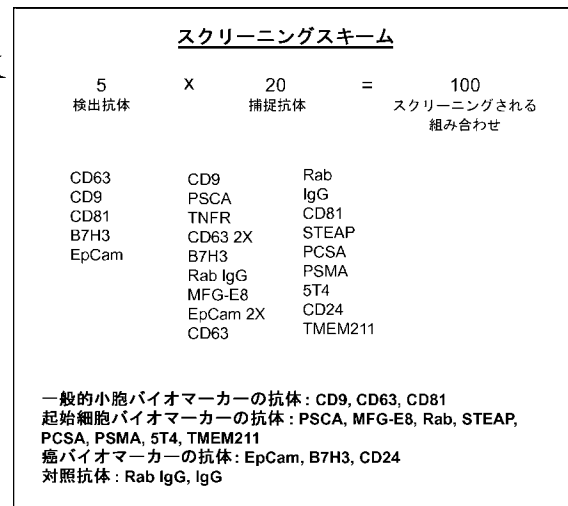
【図2A】



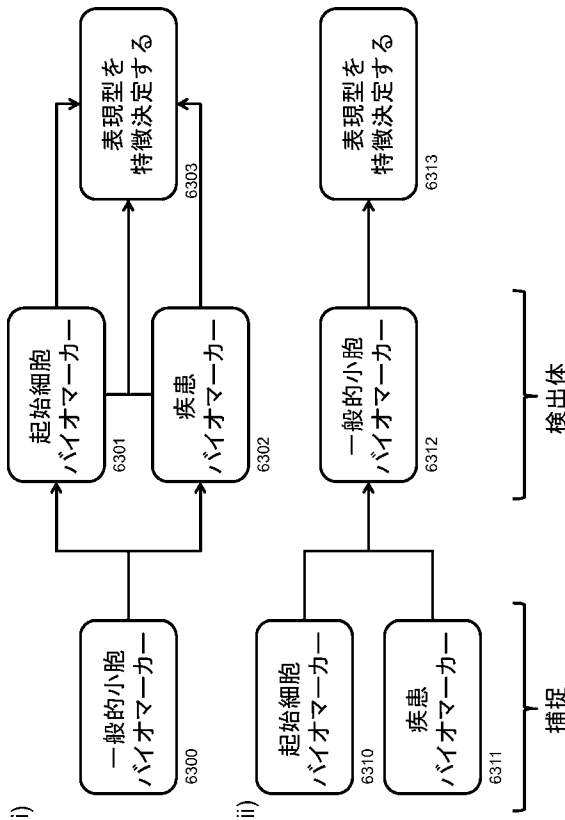
【図 2 B】



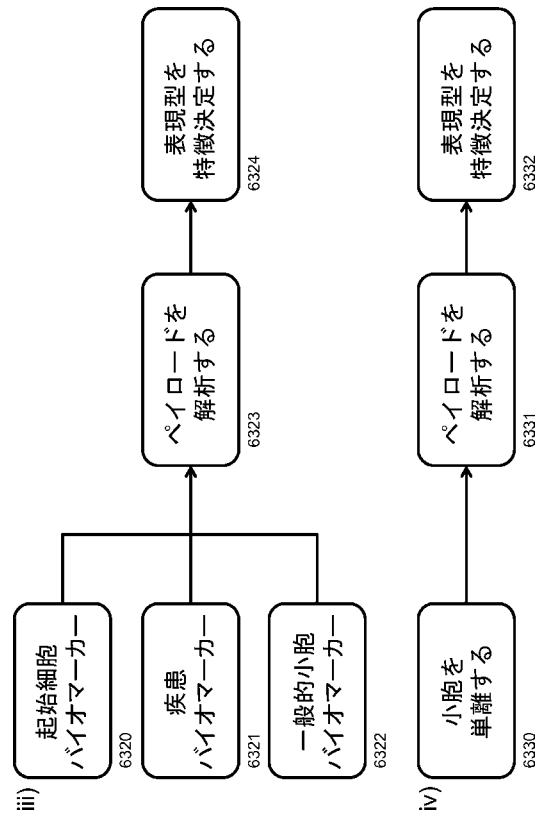
【図 2 C】



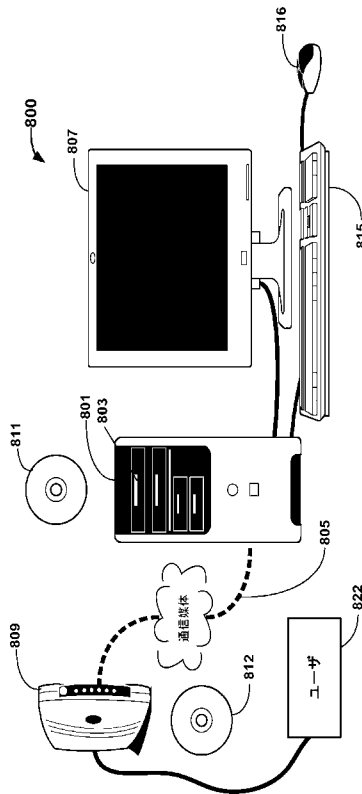
【図 2 D】



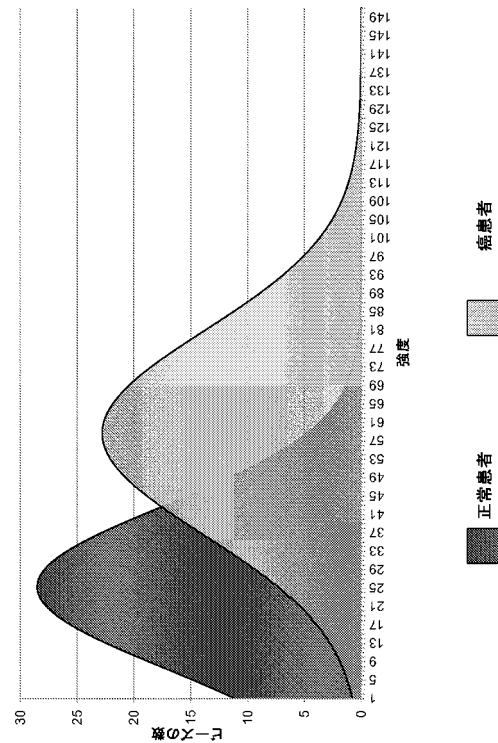
【図 2 E】



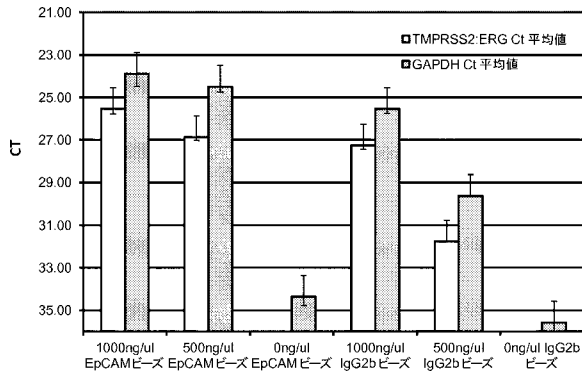
【図 3】



【図 4】

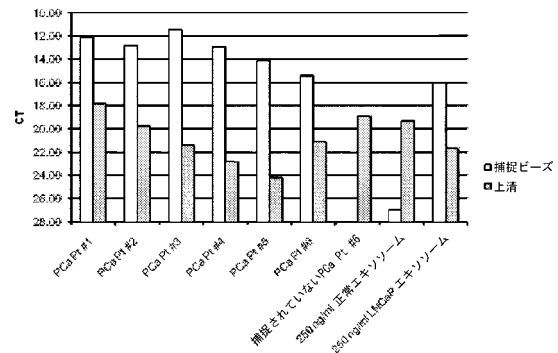


【図 5】

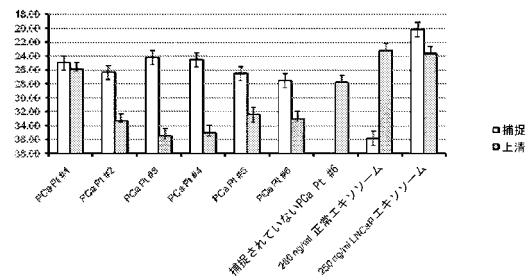


【図 6】

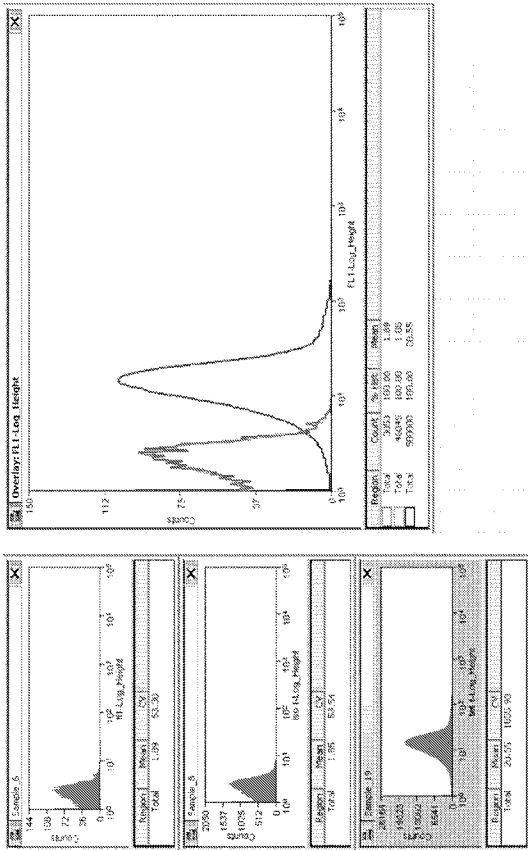
CD-9ビーズ捕捉によるmiR21発現



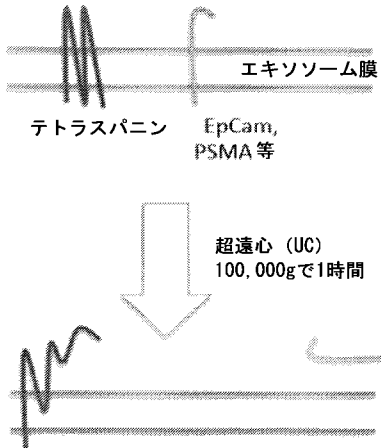
CD-9ビーズ捕捉によるmiR141の発現



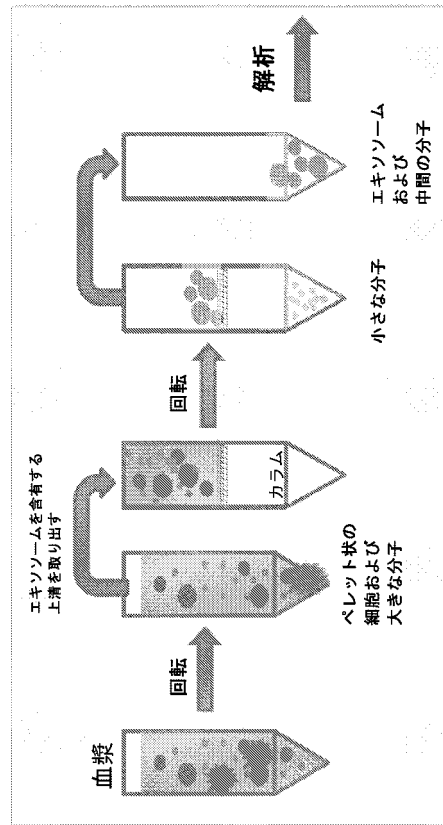
【圖 7】



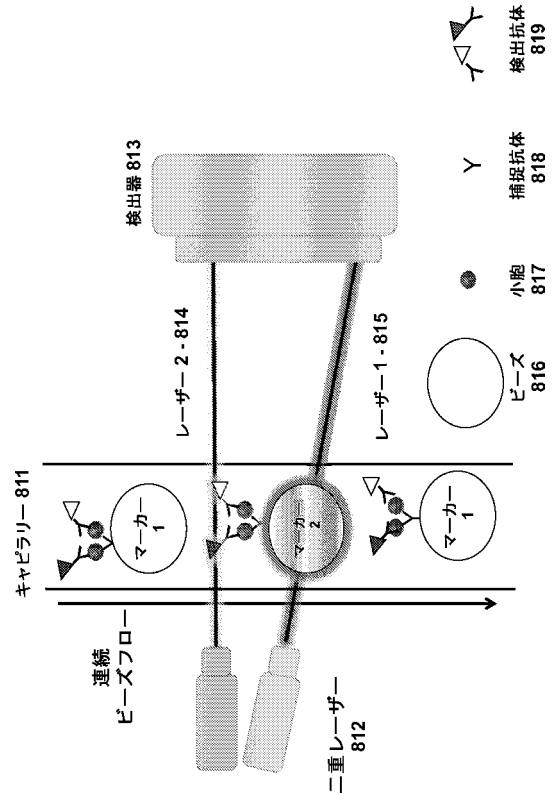
【図 8 B】



【図 8 A】

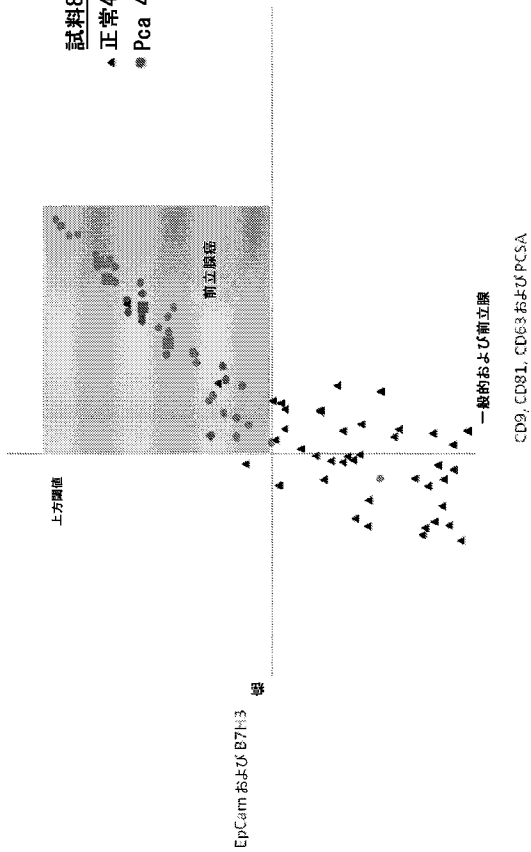


【 図 8 C 】

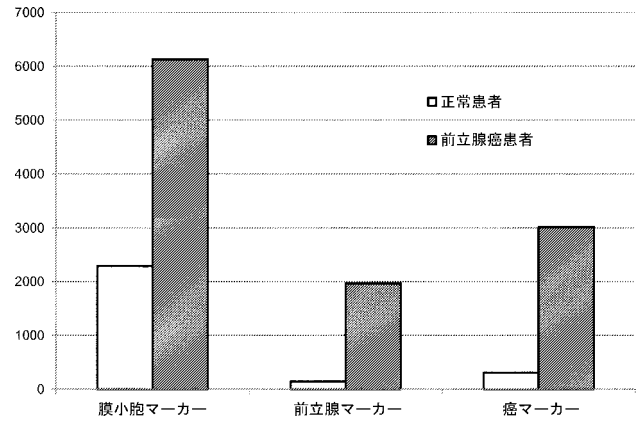


【図 9 A】

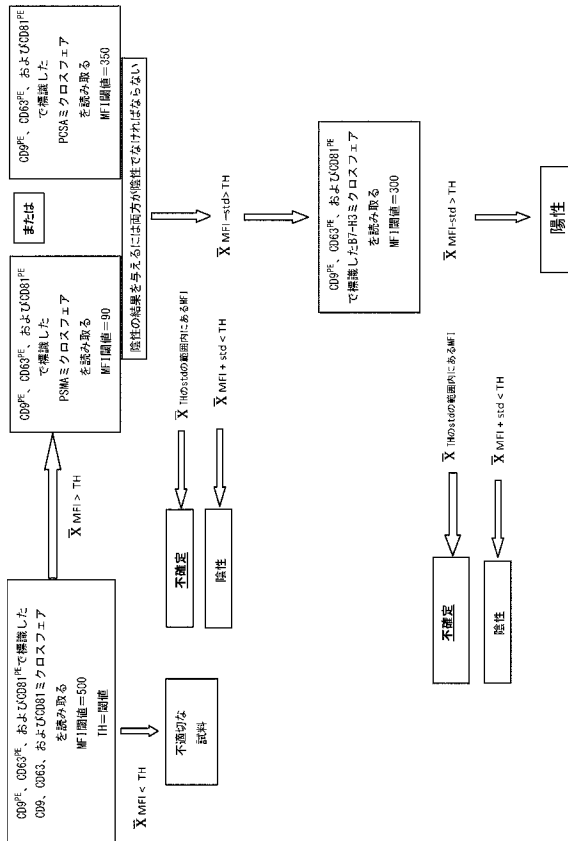
試料84例
▲ 正常42例
● Pca 42例



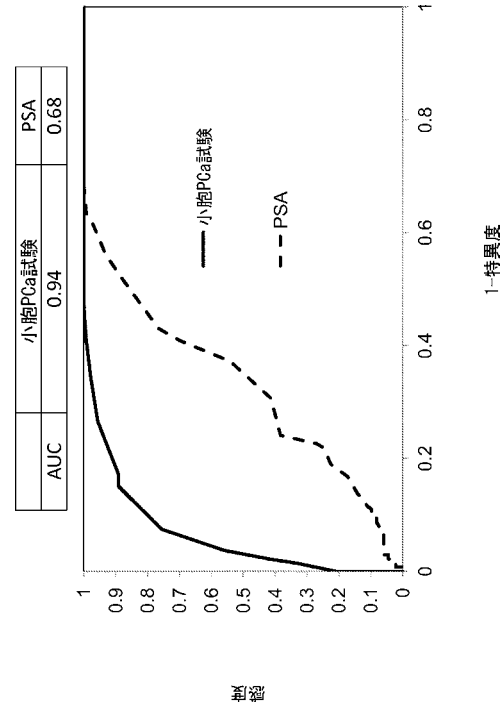
【図 9 B】



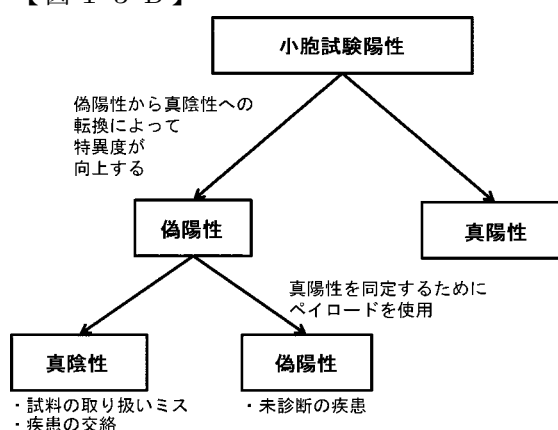
【図 10】



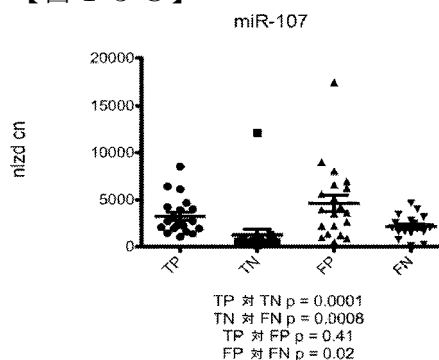
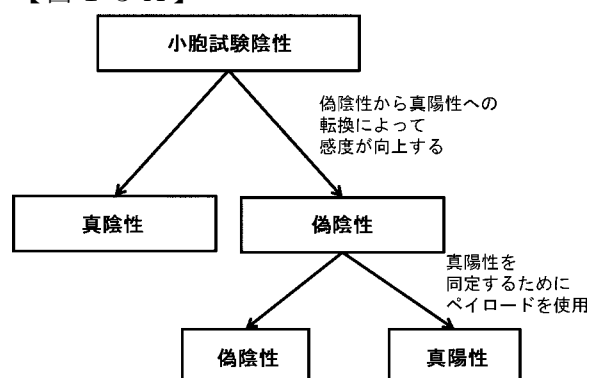
【図 11】



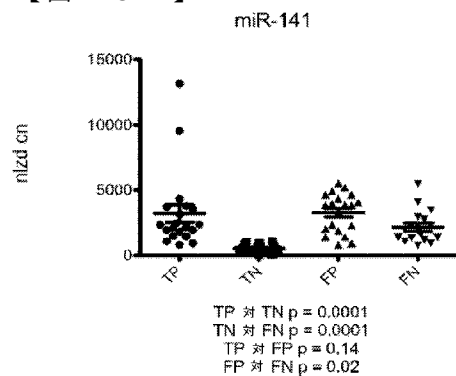
【图 13 B】



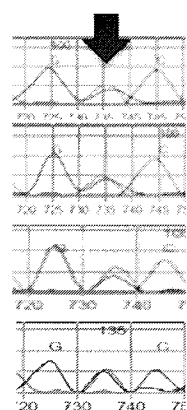
【図 1 3 C】



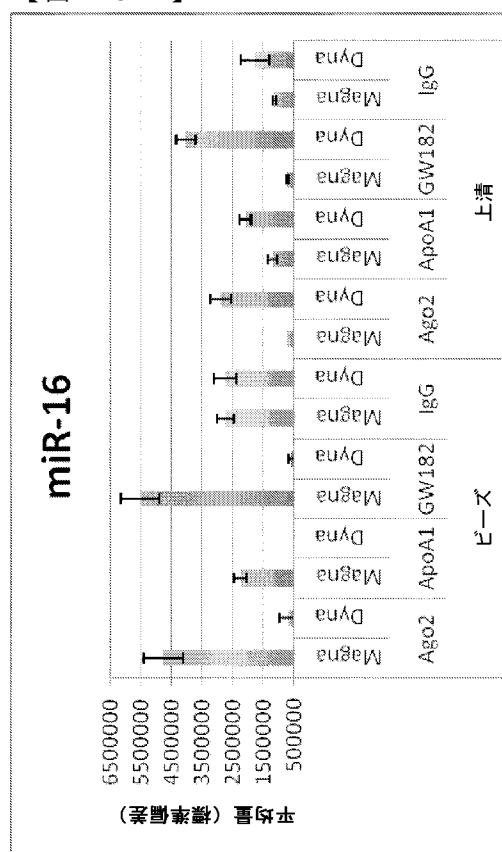
【図 15 A】



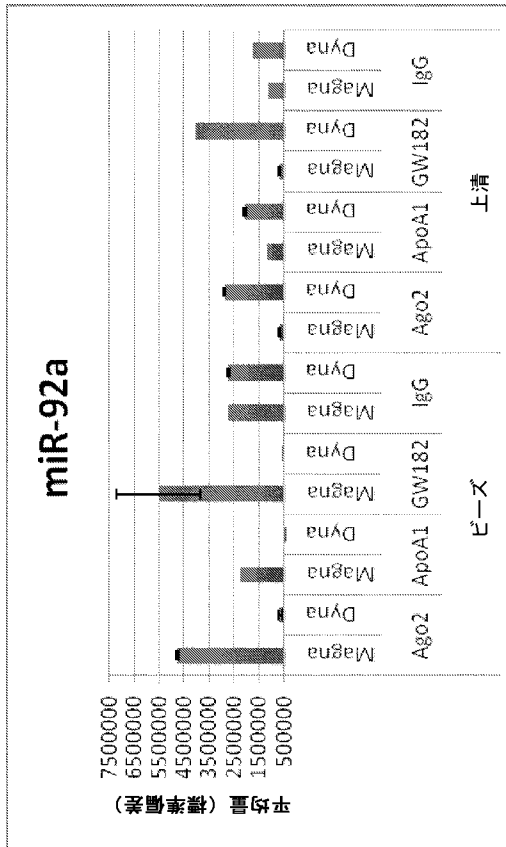
【図 15 A】



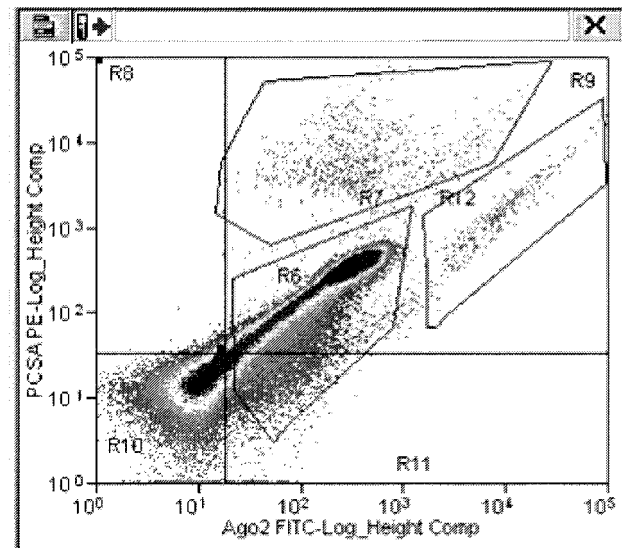
- A. 小胞由来のCRC細胞株cDNA
- B. 細胞由来のCRC細胞株cDNA
- C. CRC患者由来の血漿由来小胞cDNA
- D. CRC患者由来のFFPE DNA



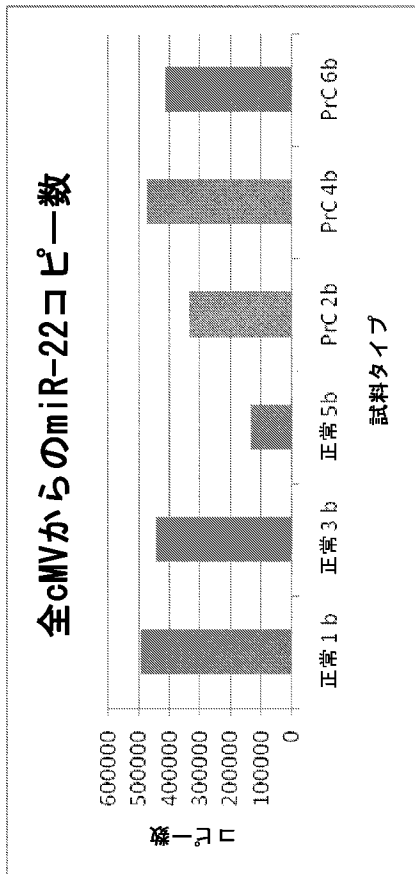
【図 15 B】



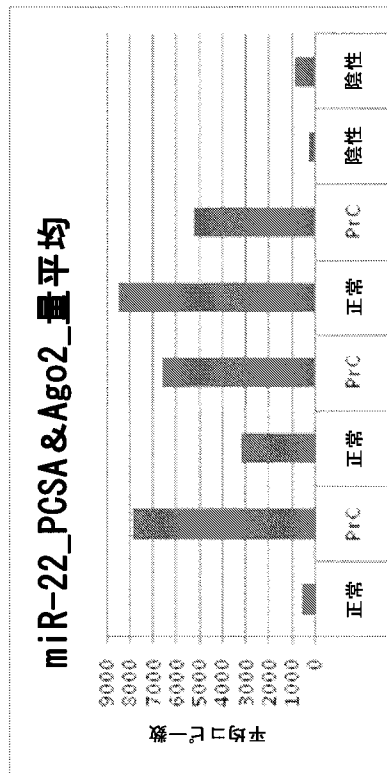
【図 16】



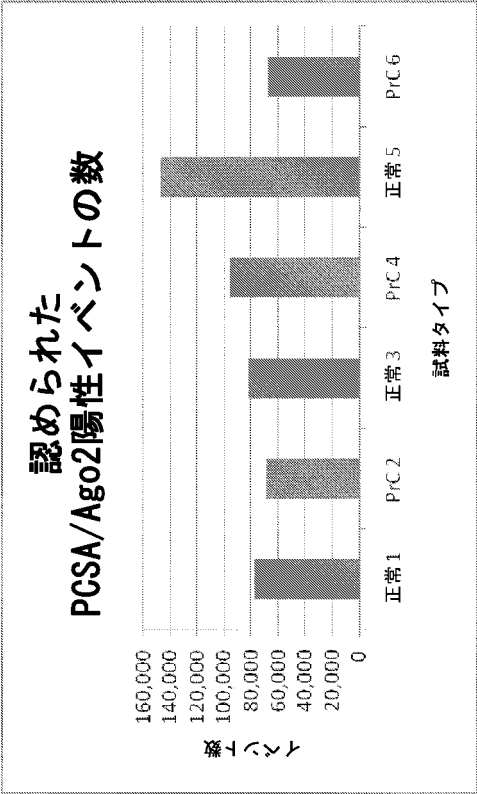
【図 17 A】



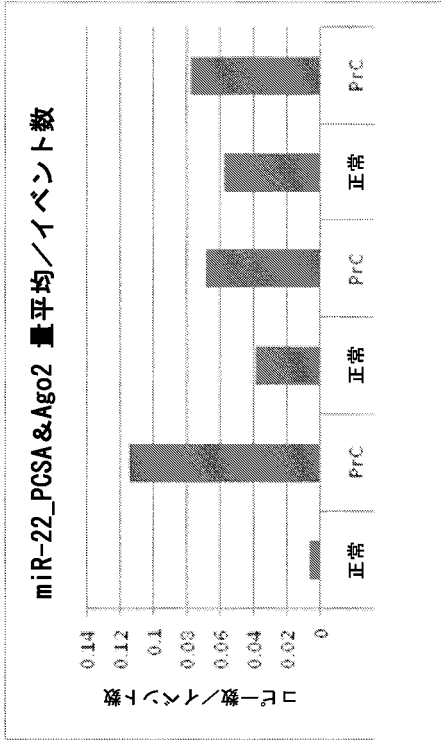
【図 17 B】



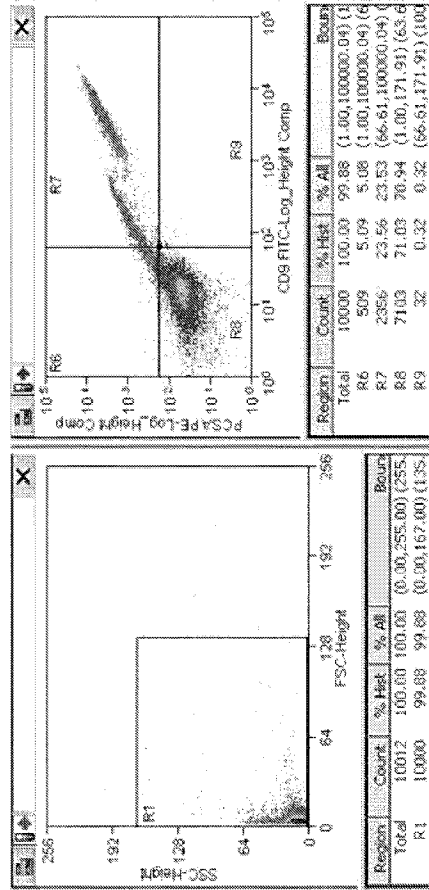
【図 17 C】



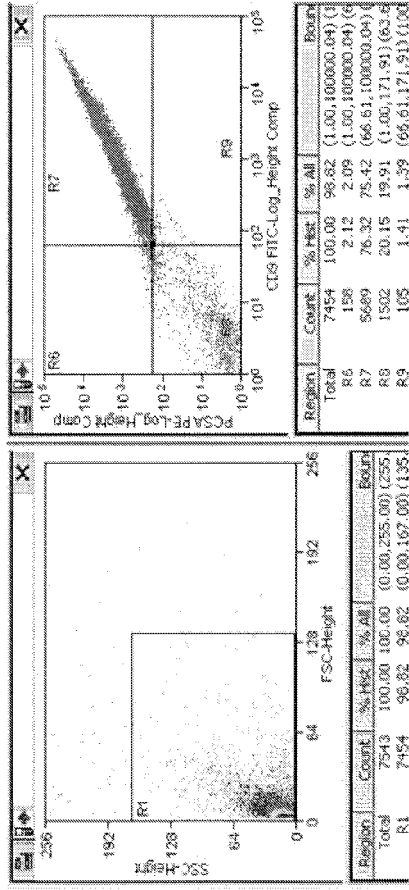
【図 17 D】



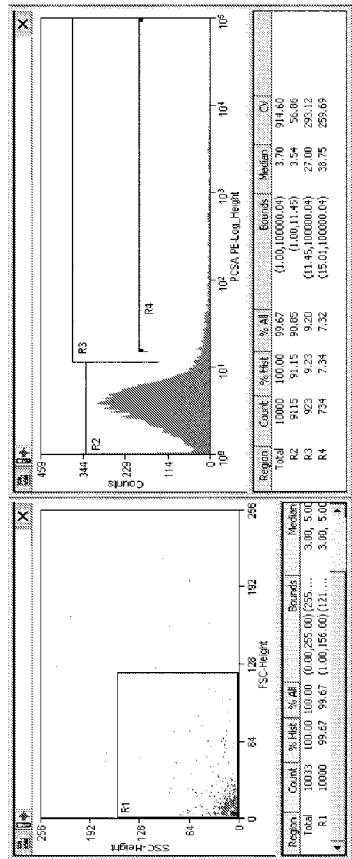
【図 18 A】



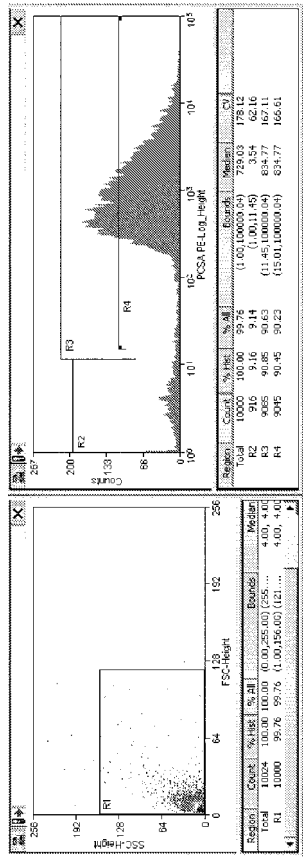
【図 18 B】



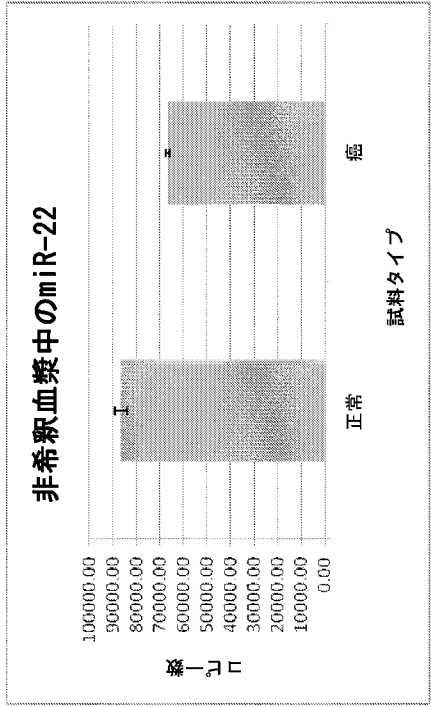
【図 18 C】



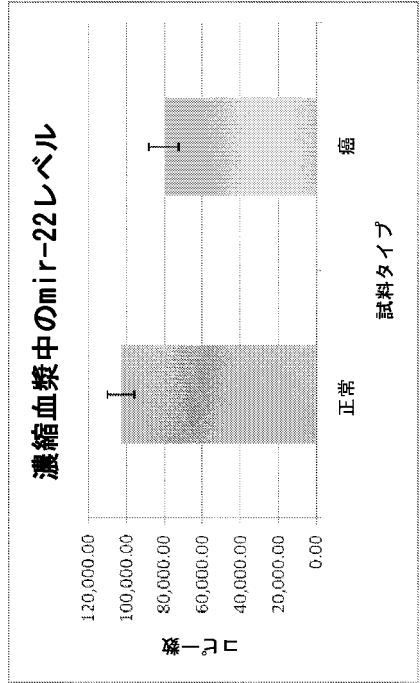
【図 18 D】



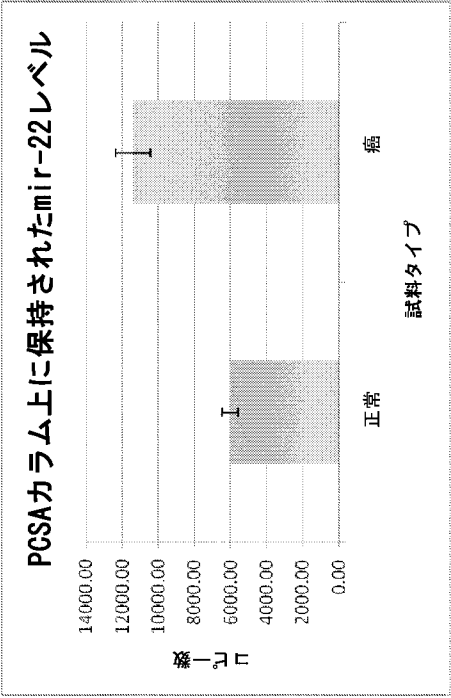
【図 19 A】



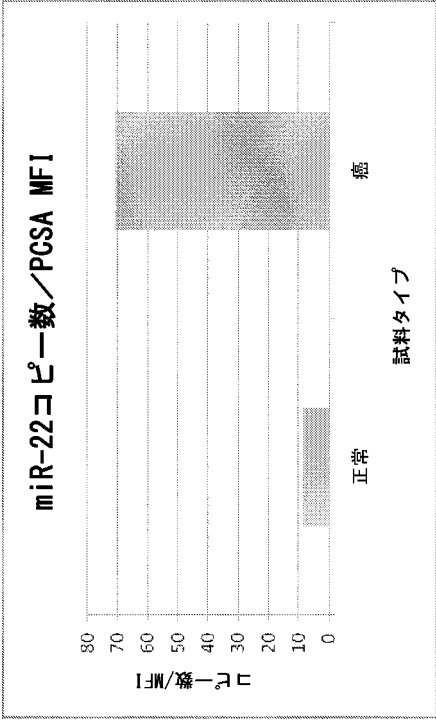
【図 19 B】



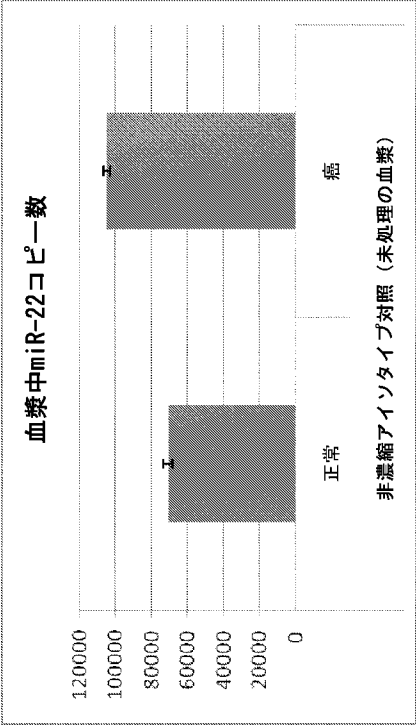
【図 19 C】



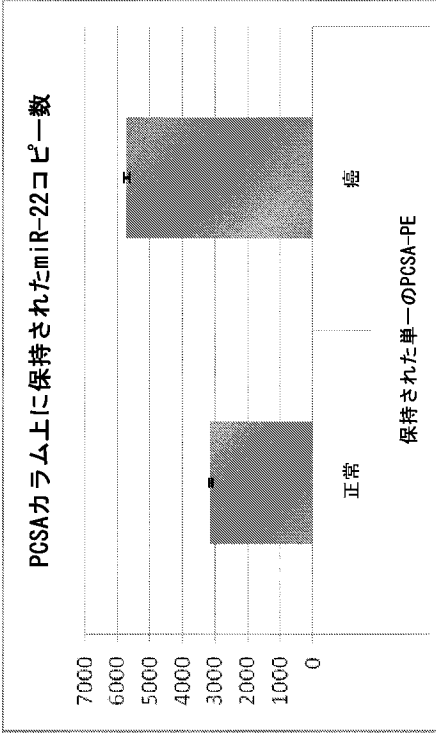
【図 19 D】



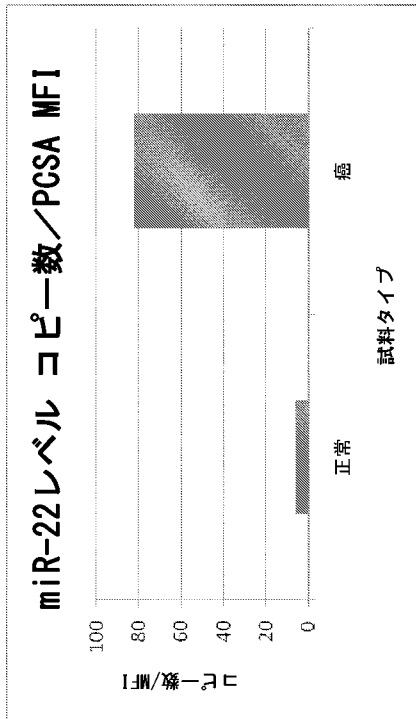
【図 19 E】



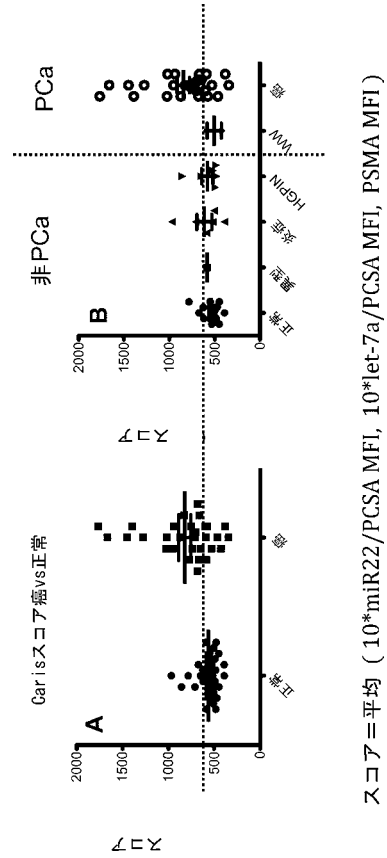
【図 19 F】



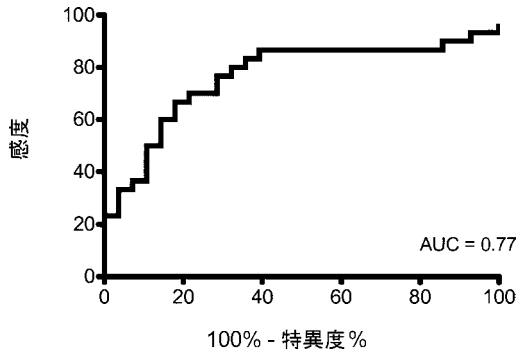
【図 19 G】



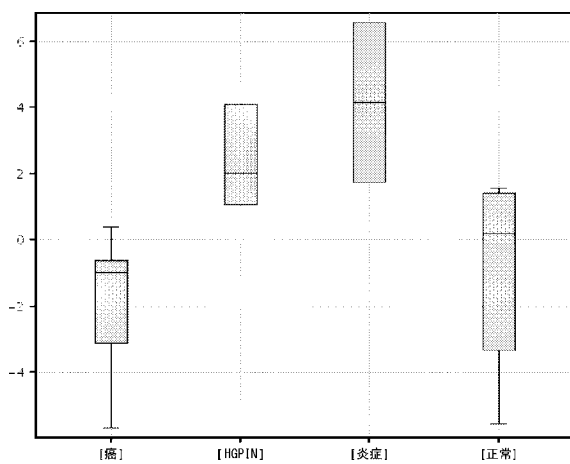
【図 20 - 1】



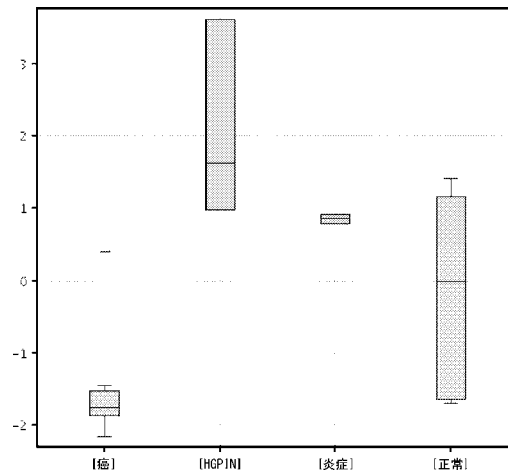
【図 20 - 2】



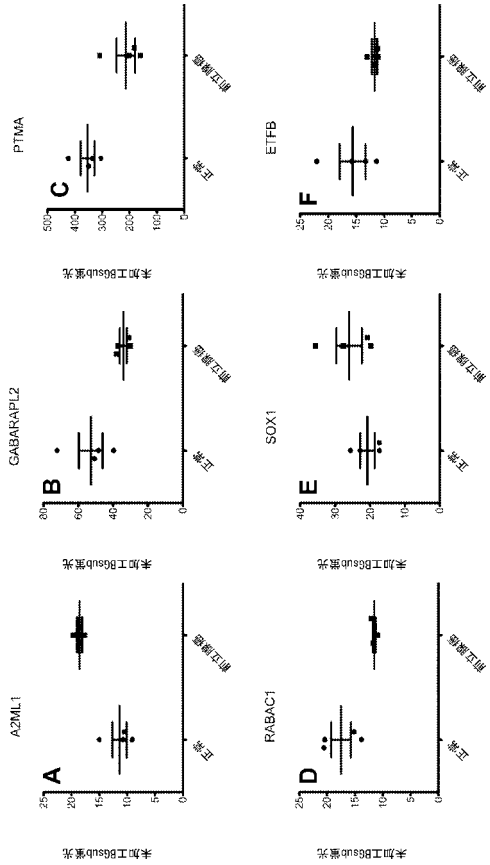
【図 21 A】



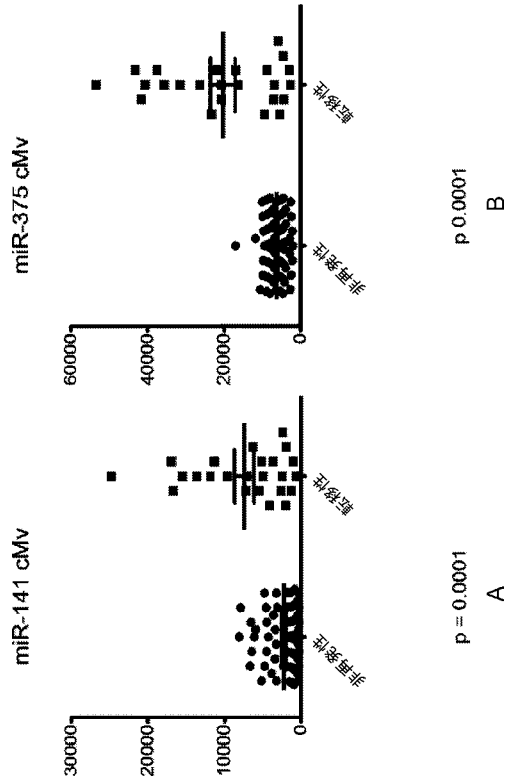
【図 21 B】



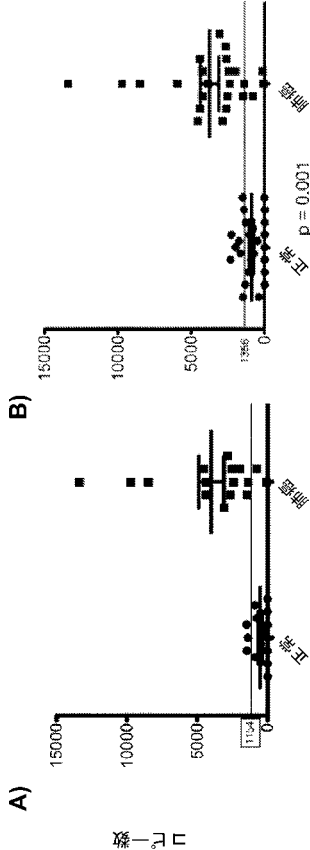
【 図 2 2 】



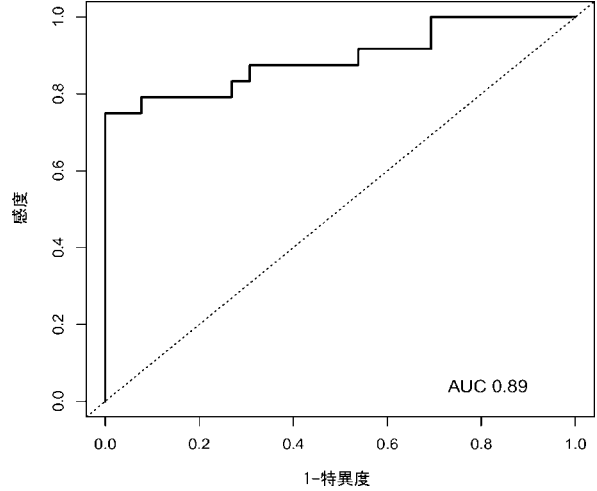
【 図 2 3 】



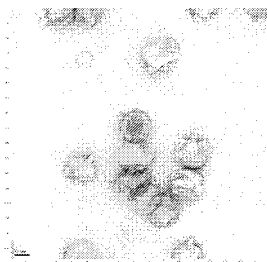
【 図 2 4 - 1 】



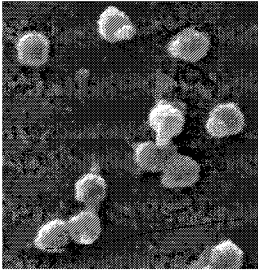
【 図 2 4 - 2 】



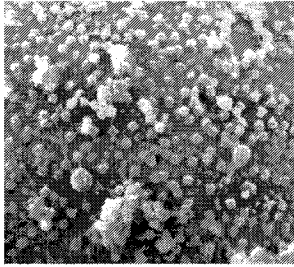
【 図 2 5 A 】



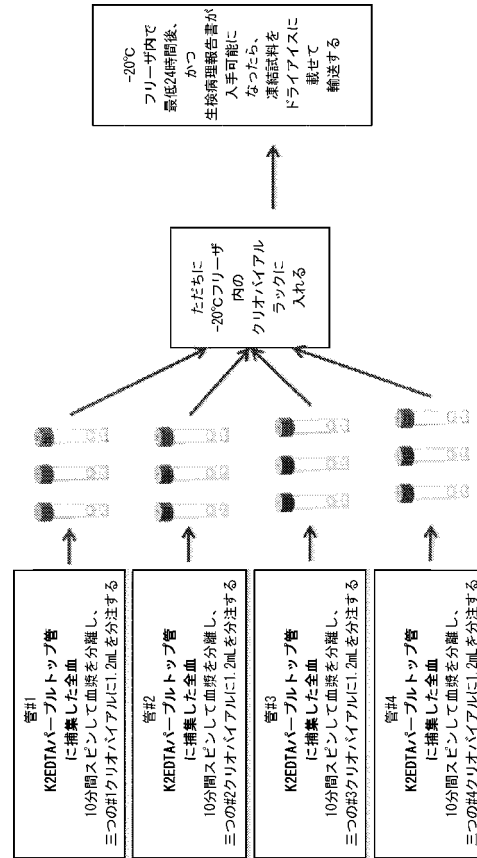
【図 25 B】



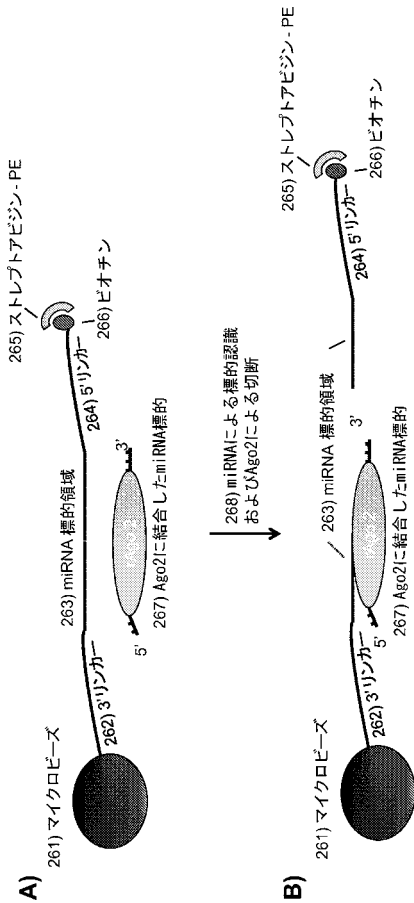
【図 25 C】



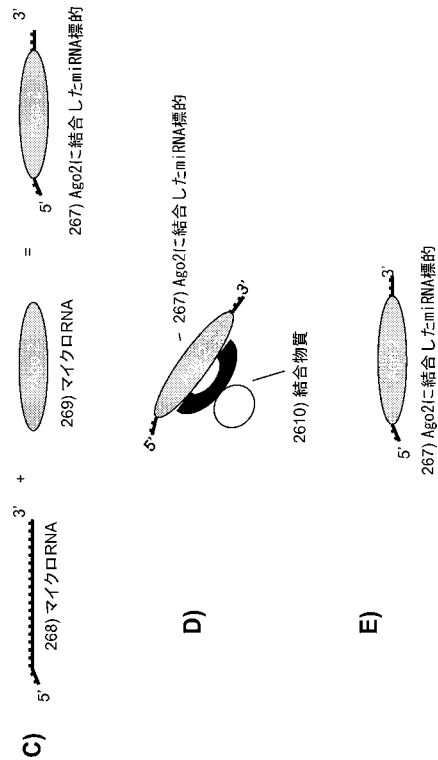
【図 25 D】



【図 26 - 1】



【図 26 - 2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/42519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/48, 33/53 (2012.01)

USPC - 435/6.11, 435/6.18

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)

IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/48, 33/53 (2012.01)

USPC - 435/6.11, 435/6.18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/48, 33/53 (2012.01), USPC - 435/6.11, 435/6.18, 435/6.1, 435/6.12, 536/23.1, 536/24.5, 514/44R, 514/44A: keyword search, as below

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 PubWEST, PatBase, Google Scholar - Search Terms: abcc1, multidrug resistance-associated protein 1, atp-binding cassette sub-family C member 1, leukotriene C(4) transporter, ltc4 transporter, abc29, mrp, mrp1, gs-x, cancer, signature, pattern, set, leukemia, neoplasia, malignant, tumor, prognosis, diagnose, theranose, stage, aggressiveness,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0304989 A1 (VON HOFF et al.) 2 December 2010 (02.12.2010) abstract; para [0008]; [0010]; [0284]; [0211]; [0256]; [0271]; [0109]	1, 39-42, 66
X	US 2011/0104717 A1 (FANTL et al.) 5 May 2011 (05.05.2011) para [0006]; [0065]; [0108]; [0109]; [0113]; [0114]; [0131]	1, 39-42, 66
X	US 2010/0267574 A1 (YOU et al.) 21 October 2010 (21.10.2010) abstract; para [0007]; [0008]; [0018]	1
A	LU et al., A Gene Expression Signature Predicts Survival of Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer, Plos Med, December 2006, Vol. 3, No. 12; pages 2229-2243. [online]; downloaded from http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0030467 on 6 November 2012.	1, 39-42, 66

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.


* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2012 (06.11.2012)

Date of mailing of the international search report

04 DEC 2012

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. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/42519

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.: 43-65, 67-75, 100-104
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:
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.

Groups I+: claims 1-16, 39-42 and 66, directed to a method comprising:
(a) determining a presence or level of one or more biomarker in a biological sample, wherein the one or more biomarker comprises one or more biomarker selected from Table 5; and
(b) identifying a biosignature comprising the presence or level of the one or more biomarker, wherein the first invention is limited to the first marker indicated in Table 5: ABCC1 (claims 1, 39-42 and 66)(applicants may opt for additional markers to be examined by specifying the marker and paying an additional invention search fee for each elected marker).

- Please see extra sheet for continuation -

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 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.:
1, 39-42 and 66

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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/42519

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Groups II+: claims 17-24, 39-42 and 66 directed to a method comprising:

- (a) isolating one or more nucleic acid-protein complex from a biological sample;
- (b) determining a presence or level of one or more nucleic acid biomarker with the one or more nucleic acid-protein complex; and
- (c) identifying a biosignature comprising the presence or level of the one or more nucleic acid biomarker; wherein the first invention is limited to the first marker indicated in claim 18, Ago1 (claims 17-19, 39-42 and 66)(applicants may opt for additional markers to be examined by specifying the marker and paying an additional invention search fee for each elected marker).

Groups III+: claims 25-42 and 66, directed to a method comprising:

- (a) detecting one or more protein biomarker in a microvesicle population from a biological sample;
- (b) determining a presence or level of one or more nucleic acid biomarker associated with the detected microvesicle population; and
- (c) identifying a biosignature comprising the presence or level of the one or more nucleic acid; wherein the first invention is limited to wherein the protein biomarker comprises PCSA, and the nucleic acid comprises miR-22 (claims 25-28, 30, 32, 39-42 and 66)(applicants may opt for additional markers to be examined by specifying the marker and paying an additional invention search fee for each elected marker).

Group IV: claims 76-78, directed to an isolated PCSA+ vesicle

Group V: claims 79-99, directed to composition comprising:

- (a) an oligonucleotide comprising a first portion that is tethered to a substrate, a second portion that is at least 75% complementary to a microRNA sequence of interest, and a third portion comprising a label, wherein the second portion is positioned between the first and third portions; and
- (b) a microRNA.

The inventions listed as Groups I+ to V 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 special technical feature of the claims of Groups I+ to V are indicated in the Group descriptions, above.

There is no common technical element shared by all of the above groups. Groups I+ to III+ share the common technical element of being related to biomarkers and signatures of biomarkers. Groups II+ and III+ share the common technical elements of being related to nucleic acid biomarkers and signatures associated therewith. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2011/0053157 A1 to Skog et al., which teaches the detection of biomarkers in microvesicles isolated from a biological sample from a subject (abstract), wherein the biomarkers may comprise nucleic acids (para [0020]), including microRNAs (para [0101]), as well as proteins (para [0113]); wherein the vesicles may comprise nucleic acid and protein complexes (para [0188]). Skog also teaches determining a signature of biomarker nucleic acids associated with said vesicles (para [0195]). Groups III+, and IV share the common technical elements of being related to microvesicles and PCSA. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2010/0203529 A1 to Kuslich et al., which teaches the use of exosomes for the detection of biomarkers (abstract), wherein one of the markers detected may be PCSA (para [0010]); and wherein the exosomes are microvesicles (para [0111]).

Therefore, the inventions of Groups I+ through V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/506,598
(32)優先日 平成23年7月11日(2011.7.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/523,763
(32)優先日 平成23年8月15日(2011.8.15)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/507,989
(32)優先日 平成23年7月14日(2011.7.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/506,606
(32)優先日 平成23年7月11日(2011.7.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/511,455
(32)優先日 平成23年7月25日(2011.7.25)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/499,138
(32)優先日 平成23年6月20日(2011.6.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/506,019
(32)優先日 平成23年7月8日(2011.7.8)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,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,CL,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,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ブラウン カーク
アメリカ合衆国 アリゾナ州 フェニックス ノース コーラル ゲーブルズ ドライブ 142

56

(72)発明者 ポロウスキー トレイシー

アメリカ合衆国 アリゾナ州 フェニックス ノース ミルクウィード ループ 2014

(72)発明者 スペッツラー デーヴィッド

アメリカ合衆国 アリゾナ州 スコッツデール ノース 第95 ウェイ 13539

Fターム(参考) 2G045 BB20 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 CB08 CB11 CB12 CB14

DA14 DA36

4B024 AA12 CA01 CA09 CA11 CA12 CA20 HA12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QQ53 QR32 QR35 QR55

QR62 QS25 QS32 QX02

专利名称(译)	生物标志物组合物和方法		
公开(公告)号	JP2014519340A	公开(公告)日	2014-08-14
申请号	JP2014516002	申请日	2012-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	圣杯生命科学卢森堡ES啊耶鲁萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	圣杯生命科学卢森堡控股上课啊，啤酒.埃尔.		
[标]发明人	ブラウンカーク ポロウスキー 트레이シー スベッツラーデーヴィッド		
发明人	ブラウン カーク ポロウスキー 트레이シー スベッツラー デーヴィッド		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6804 C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/57434 G01N33/57484 G01N33/6893		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/68 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/526623 2011-08-23 US 61/497895 2011-06-16 US 61/501680 2011-06-27 US 61/506598 2011-07-11 US 61/523763 2011-08-15 US 61/507989 2011-07-14 US 61/506606 2011-07-11 US 61/511455 2011-07-25 US 61/499138 2011-06-20 US 61/506019 2011-07-08 US		
其他公开文献	JP2014519340A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

可以评估生物标志物的诊断，治疗相关或预后方法，以鉴定表型，例如病症或疾病，或疾病的阶段或进展，选择针对疾病，病症，疾病阶段和病症阶段的候选治疗方案，并确定治疗效果。来自体液的循环生物标志物可用于分析生理状态或确定表型。这些包括核酸，蛋白质和循环结构（如小泡）以及核酸-蛋白质复合物。

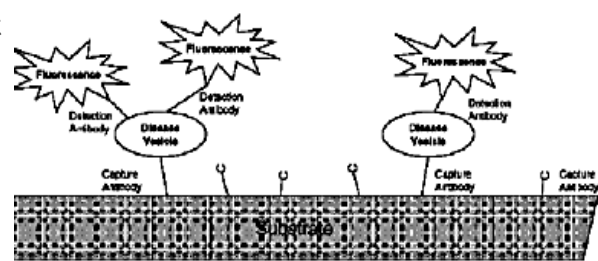


FIG. 2A