

(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2014-526032

(P2014-526032A)

(43) 公表日 平成26年10月2日(2014.10.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 P	4 B O 6 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 186 頁)

(21) 出願番号 特願2014-514849 (P2014-514849)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月7日 (2012.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月27日 (2014.1.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/041387
 (87) 国際公開番号 W02012/170711
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012.12.13)
 (31) 優先権主張番号 61/494,196
 (32) 優先日 平成23年6月7日 (2011.6.7)
 (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 61/494,355
 (32) 優先日 平成23年6月7日 (2011.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511107212
 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.
 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
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌に対する循環バイオマーカー

(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。

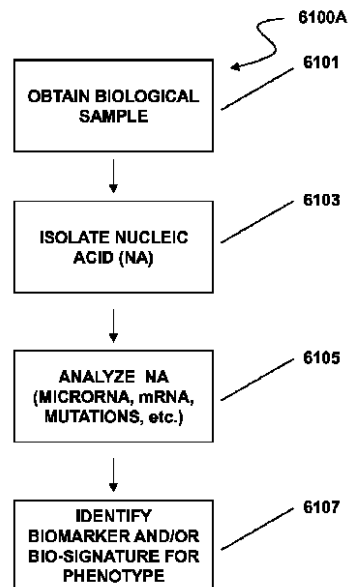


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 対象由来の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、A2ML1、BAX、C10orf47、C1orf162、CSDA、EIFC3、ETFB、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、工程；ならびに

(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。

10

【請求項 2】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、A2ML1、GABARAPL2、PTMA、RABAC1、SOX1、ETFBおよびこ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、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

前記特徴決定が、前記癌の存在もしくはリスクを同定すること、または該癌を転移性もしくは高悪性度として同定することを含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記特徴決定が、前記対象が治療的処置に応答しているかどうか、または該対象が治療的処置に応答する可能性があるのかもしくは応答しない可能性があるのかを判定することを含む、請求項3記載の方法。

20

【請求項 6】

前記治療的処置が、待機療法、外科的骨盤リンパ節切除術、根治的前立腺摘除術、経尿道的前立腺切除術(TURP)、精巣摘出術、放射線療法、外照射療法(EBRT)、 ^{125}I 、パラジウム、イリジウム、ホルモン療法、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、ロイプロリド、ゴセレリン、プセレリン、抗アンドロゲン、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、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、エストロゲン、凍結療法、化学療法、生物学的療法、超音波および陽子線照射の一つまたは複数を含む、請求項5記載の方法。

30

【請求項 7】

前記バイオシグネチャーを参照と比較する工程が、前記一つまたは複数のバイオマーカーのいずれかが該参照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用の判定を提供することを含む、請求項3記載の方法。

【請求項 8】

前記癌が前立腺癌を含む、請求項3~7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

(a) 対象由来の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CA-125、CA 19-9、C反応性タンパク質、CD95、FAP-1およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、工程；ならびに

40

(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 10】

前記一つまたは複数のバイオマーカーが、EGFR、EGFRvIII、アポリポタンパク質A1、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

50

、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をさらに含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記miR200マイクロRNAがmiR-200cを含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

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、請求項9～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

前記特徴決定が、前記癌の存在もしくはリスクを同定すること、または該癌を転移性もしくは高悪性度として同定することを含む、請求項12記載の方法。

10

【請求項14】

前記比較する工程が、前記一つまたは複数のバイオマーカーのいずれかが参照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用の判定を提供することを含む、請求項12記載の方法。

【請求項15】

参照が非癌試料を含み、かつ該参照と比較して増大したFAP-1のレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す、請求項12記載の方法。

【請求項16】

参照が非癌試料を含み、かつ該参照と比較して低下したCD95のレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す、請求項12記載の方法。

20

【請求項17】

参照が非癌試料を含み、かつ該参照と比較して低下した前記miR200マイクロRNAのレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す、請求項12記載の方法。

【請求項18】

前記癌が卵巣癌である、請求項12～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

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20】

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、嚢胞液、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、請求項19記載の方法。

30

【請求項21】

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22】

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

40

【請求項23】

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22記載の方法。

【請求項24】

前記一つまたは複数の微小胞が20nm～1500nmの直径を有する、請求項22記載の方法。

【請求項25】

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22記載の方法。

【請求項26】

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

50

、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これらの組み合わせに供される、請求項22記載の方法。

【請求項27】

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22記載の方法。

【請求項28】

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、化学物質またはこれらの組み合わせを含む、請求項27記載の方法。

10

【請求項29】

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27記載の方法。

【請求項30】

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27記載の方法。

【請求項31】

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30記載の方法。

20

【請求項32】

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31記載の方法。

【請求項33】

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31記載の方法。

【請求項34】

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31記載の方法。

30

【請求項35】

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27記載の方法。

【請求項36】

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35記載の方法。

【請求項37】

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、糖質および/またはプロテオグリカンを含む、請求項36記載の方法。

【請求項38】

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37記載の方法。

40

【請求項39】

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36記載の方法。

【請求項40】

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41】

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42】

請求項1~40のいずれか一項記載の方法を実施するための試薬を含む、キット。

50

【請求項43】

A2ML1、BAX、C10orf47、C10orf162、CSDA、EIFC3、ETFB、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mRNAを含む、単離された小胞。

【請求項44】

CA-125、CA 19-9および/またはC反応性タンパク質を含む、単離された微小胞集団。

【請求項45】

CD95および/またはFAP-1ならびに一つまたは複数のmir200マイクロRNAを含む、単離された微小胞集団。

10

【請求項46】

前記mir200マイクロRNAがmir200cである、請求項45記載の集団。

【請求項47】

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をさらに含む、請求項44または45記載の集団。

20

【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7日出願の米国特許仮出願第61/494,196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。

【0002】

本出願は、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

【0003】

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。

40

【0004】

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日に出願された米国特

50

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。

【0005】

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】

【0006】

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。

【0007】

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シス(theranosis)用で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、気管支肺胞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、疾患と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。

【0008】

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。

【0009】

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】

【0010】

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。

【0011】

ある局面において、本発明は、一つまたは複数のバイオマーカーがA2ML1、BAX、C10orf47、C1orf162、CSDA、EIFC3、ETFB、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、対象由来の生物学的試料中の該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、ならびに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。ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば一つ、二つ、三つ、四つ、五つまたは六つのバイオマーカーは、A2ML1、GABARAPL2、PTMA、RABAC1、SOX1、ETFB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はPTMAを含むことができる。

【0012】

本方法はさらに、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むことができ、その比較を使用して癌を特徴決定する。いくつかの態様において、特徴決定は、癌の存在もしくはリスクを同定すること、または癌を転移性または高悪性度として同定することを含む。いくつかの態様において、特徴決定は、対象が治療的処置に応答しているかどうか、または対象が治療的処置に応答する可能性があるのかもしくは応答しない可能性があるのかを判定することを含む。処置は、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任意の癌処置、たとえば、待機療法、外科的骨盤リンパ節切除術、根治的前立腺摘除術、経尿道的前立腺切除術(TURP)、精巣摘出術、放射線療法、外照射療法(EBRT)、 I^{125} 、パラジウム、イリジウム、ホルモン療法、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、ロイプロリド、ゴセレリン、ブセレリン、抗アンドロゲン、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、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、エストロゲン、凍結療法、化学療法、生物学的療法、超音波および陽子線照射であることができる。

【0013】

さらに他の態様において、バイオシグネチャーを参照と比較する工程は、一つまたは複数のバイオマーカーのいずれかが参照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む。

【0014】

癌は、本明細書に開示される任意の適切な癌であることができる。ある態様において、癌は前立腺癌を含む。

【0015】

10

20

30

40

50

もう一つの態様において、本発明は、一つまたは複数のバイオマーカー、たとえば一つ、二つ、三つ、四つまたは五つ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およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、対象由来の生物学的試料中の該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、ならびに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。ある態様において、一つまたは複数のバイオマーカーはさらに、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を含む。miR200マイクロRNAはmiR-200cであってもよい。

10

20

30

40

50

【0016】

本方法はさらに、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むことができ、その比較を使用して癌を特徴決定する。いくつかの態様において、特徴決定は、癌の存在もしくはリスクを同定すること、または癌を転移性または高悪性度として同定することを含む。いくつかの態様において、特徴決定は、対象が治療的処置に応答しているかどうか、または対象が治療的処置に応答する可能性があるのかもしくは応答しない可能性があるのかを判定することを含む。さらに他の態様において、バイオシグネチャーを参照と比較する工程は、一つまたは複数のバイオマーカーのいずれかが参照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用の判定を提供することを含む。ある態様において、参照は非癌試料を含み、参照と比較して増大したFAP-1のレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す。関連する態様において、参照は非癌試料を含み、参照と比較して低下したCD95のレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す。さらに別の関連する態様において、参照は非癌試料を含み、参照と比較して低下したmiR200マイクロRNAのレベルが癌またはより高悪性度の癌を示す。癌は、本明細書に開示される任意の適切な癌であることができる。ある態様において、癌は卵巣癌を含む。

【0017】

本発明の方法において、生物学的試料は体液を含んでもよい。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、嚢胞液、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、腭液、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(血清、血漿など)を含んでもよい。

【0018】

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。

【0019】

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付される。

【0020】

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。

【0021】

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、対象の小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小胞マーカー、たとえばCD9、CD63、CD81、PSMA、PCSA、B7H3、EpCamまたは表4もしくは5中のタンパク質を含む。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中の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。

【0022】

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。

【0023】

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。

【0024】

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。

【0025】

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、髓芽腫、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；パークットリンパ腫；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

10

20

30

40

50

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。

10

【0026】

20

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。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か、または間接的に標識されるように構成されている。

【0027】

もう一つの局面において、本発明は、A2ML1、BAX、C10orf47、C1orf162、CSDA、EIFC3
 、ETFB、GABARAPL2、GUK1、GZMH、HIST1H3B、HLA-A、HSP90AA1、NRGN、PRDX5、PTMA、RAB
 AC1、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mRNAを含む、単離された小胞を提供する。小胞は、非限定的
 に前立腺癌を含む癌を有する対象由来の生物学的試料から単離されてもよい。または、小
 胞は、前立腺細胞を含む培養物を非限定的に含む細胞培養物を含む、生物学的試料から単
 離されてもよい。

30

【0028】

さらに別の局面において、本発明は、CA-125、CA 19-9および/またはC反応性タンパク
 質を含む、単離された微小胞集団を提供する。ある局面において、本発明は、CD95および
 /またはFAP-1ならびに一つまたは複数のmir200マイクロRNAを含む、単離された微小胞集
 団を提供する。ある態様において、mir200マイクロRNAはmir200cを含む。いくつかの態様
 において、単離された微小胞集団はさらに、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、miR
 200マイクロRNA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
 イオマーカーを含む。小胞は、非限定的に卵巣癌を含む癌を有する対象由来の生物学的試
 料から単離されてもよい。または、小胞は、卵巣細胞を含む培養物を非限定的に含む細胞
 培養物を含む、生物学的試料から単離されてもよい。

40

【0029】

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

50

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】

【0030】

【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。

10

【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。

20

【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、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。

30

【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Dyna1磁気ビーズと共にインキュベートした。Dyna1ビーズからRNAを直接単離した。各試料からの等量のRNAをRT-PCR、続いて、Taqmanアッセイに使用した。

40

【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Dyna1ビーズ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8A】マイ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が

50

ら小胞を単離したのち、単離した小胞を、マイ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8B】マイ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8C】マイ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、マイクロスフェアに結合した小胞の検出の略図を表す。

【図9A】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9B】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13A】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miR-107およびmiR-141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13B】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miR-107およびmiR-141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13C】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13D】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】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の選択されたmRNA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。各プロット中、Y軸は未加工のバックグラウンド減算蛍光値(未加工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14A)、GABARAPL2(図14B)、PTMA(図14C)、RABAC1(図14D)、SOX1(図14E)およびETFB(図14F)である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

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

10

20

30

40

50

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。

【0032】

循環バイオマーカ、たとえば核酸バイオマーカ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。

【0033】

関連する局面においては、バイオマーカ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またはペイロードマーカを評価する工程、およびマーカ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を本発明にしたがってバイオマーカ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。

【0034】

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

10

20

30

40

50

に核酸配列に対する後成的変化から生じ得る。

【0035】

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。

10

【0036】

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ตอบสนอง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提供するための小胞の解析に関する。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ตอบสนองし、非応答者はその治療にตอบสนองしない。小胞を対象において解析し、治療にตอบสนอง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ตอบสนอง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ตอบสนอง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。

20

【0037】

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ตอบสนอง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。

30

【0038】

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デュークスBまたはデュークス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細胞様およびパーキットリンパ腫であり得る。

40

【0039】

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

50

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。

【0040】

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、形質細胞性骨髄腫、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（nm1）、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、パーキットリンパ腫/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。

【0041】

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。

【0042】

10

20

30

40

50

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；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ができる。

10

20

30

【0043】

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、1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。

【0044】

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、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。

40

【0045】

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、ラスムッセン脳炎、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

50

神経因性疼痛等の病態であり得る。

【0046】

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。

【0047】

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、子癩前症もしくは早産）、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。

10

【0048】

本発明の方法は、バイオマーカ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。

【0049】

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、ヒトによって消費用に農場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。

20

30

【0050】

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。

40

【0051】

試料

対象から得られる生物学的試料は任意の体液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、腔分泌液、粘膜分泌液、水便、腭液、鼻腔からの洗浄液、気管支肺吸引液または他の洗浄液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

50

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または、より具体的に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およびプロテオミク技術を使用して、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）。

10

【0052】

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。

【0053】

（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、痙縮性障害、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、膵液
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

<p>示差的状態： 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 クロウン病（CD）</p>	<p>血液、血清、血漿、尿、痰、大便、結腸洗浄液</p>
<p>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</p>	<p>母体の血清、血漿、羊水、臍帯血</p>

【 0 0 5 4 】

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。

【 0 0 5 5 】

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。

【 0 0 5 6 】

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。

【 0 0 5 7 】

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。

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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

10

20

30

40

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。

【0060】

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。

【0061】

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 °Cでは1日、18 ~ 25 °Cでは7日間または2 ~ 8 °C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 °Cまたは-80 °C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。

【0062】

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、プレブ、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。

【0063】

(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)

【0064】

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(プレブ形成)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。プレブおよびプレブ形成は、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。

【0065】

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20~1500nm、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、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、一つの細胞またはいくつかの細胞の直径を計測することができる。たとえば、細胞集団の直径の範囲または細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、一つまたは複数の細胞の直径は、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。

10

【0066】

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、試料中の細胞の量それ自体が、診断、予後判定またはセラノ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、試料中の細胞は、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。細胞単離は、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。

20

【0067】

細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細胞を評価することができる。いくつかの態様においては、細胞の表面抗原が評価される。表面抗原は、細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細胞は、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、細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細胞の陽性検出は、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細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。

30

40

【0068】

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細胞ペイロードが評価される。細胞ペイロードは、細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、細胞表面抗原（細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、細胞は、細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、結合した細胞をさらに評価して、本明細書に開示される一つ

50

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、参照に比べ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。

【0069】

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。

【0070】

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と呼ばれる。

【0071】

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。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。

【0072】

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-121^{*}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

10

20

30

40

50

勢なバリエーションが同定されないならば、miR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。

【0073】

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/miR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。miR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。

10

【0074】

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。

【0075】

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(sirRNA)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。

20

【0076】

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bantam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。

30

【0077】

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。

40

【0078】

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miR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

50

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。

【0079】

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。

10

【0080】

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 Fert. 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。

20

30

【0081】

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。

40

【0082】

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

50

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。

【0083】

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。

10

【0084】

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。

20

【0085】

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。

【0086】

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からの小胞は、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。

30

【0087】

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。

40

【0088】

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

50

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という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。

【0089】

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%の濃度で使用することができる。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。

【0090】

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、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

10

20

30

40

50

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。

【0091】

フィルタ

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キロダルトンよりも大きな分子を保持する。

10

【0092】

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。

【0093】

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

【0094】

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することを含む。さらに、特徴決定は約80%~100%の感度であることができる。

30

【0095】

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。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。

40

【0096】

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、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

50

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、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。

【0097】

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。たとえば、細胞屑のような非小胞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、およびろ過して、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。

【0098】

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。

【0099】

小胞を生物学的試料から単離するために利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。

【0100】

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。

【0101】

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。

【0102】

ろ過モジュールは、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または0.11 μmの平均孔径を有する。

【0103】

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。例は、Millipore（Billerica, M

10

20

30

40

50

A)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。

【0104】

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。

10

【0105】

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。

20

【0106】

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 、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。

30

40

【0107】

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、生物医学微小電気機械システム(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。

【0108】

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

50

ることできる。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過モジュールを含むことができる。

【0109】

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剤が含まれる。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、剤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。

10

20

【0110】

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。

30

40

【0111】

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

50

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。

【0112】

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。

【0113】

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。

10

【0114】

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。

20

【0115】

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。

30

【0116】

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ィー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

40

50

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。

【0117】

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」) 形態のレクチン、および「シアノピリン」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、 $-1 \rightarrow 3$ または $-1 \rightarrow 6$ 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。

10

【0118】

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。

20

【0119】

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。

30

【0120】

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る、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る、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。

40

【0121】

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

50

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。

【0122】

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有する分子であり得る。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」。

【0123】

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、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、 α -メチルアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、およびN-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。

【0124】

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を一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

10

20

30

40

50

(TSP-6)、TSPAN7 (CD231、TALLA-1、A15)、TSPAN8 (CO-029)、TSPAN9 (NET-5)、TSPAN10 (オキユロスパニン)、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。

【0125】

(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

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、MFG-E8、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、Clorf58、BASP1、TACSTD1、STOM

【0126】

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剤(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剤でもよい。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、Gp1a-IIa、Gp11b-IIIa、Gp111b、Gp1b、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のうちの一つまたは複数を含む抗原に対する結合物質でもよい。例えば結合物質は、CD9、CD63、CD81、B7H3、PSCA、MFG-E8、MUC2、EpCam、RAGE、およびMuc17のうちの一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。

【0127】

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、

10

20

30

40

50

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、テフロン（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。

10

【0128】

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。

20

【0129】

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化された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

30

40

50

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。

【0130】

また、結合物質は、ビーズまたはマイ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、マイクロスフェアは、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。

10

【0131】

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る、カラムに提供されたプランジャーを利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。

20

30

【0132】

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。

【0133】

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、こ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

40

50

、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}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。フルオレセイントイプには、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-アントラセンシルホニル(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。

10

20

30

40

50

【0134】

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。

【0135】

例えば、種々の酵素基質標識が、利用可能であるか、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)、 α -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 α -D-ガラクトシダーゼ(α -D-Gal)と発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル α -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 α -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。

【0136】

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。

【0137】

フローサイトメトリー

ビーズまたはマイ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、粒子を選択的に帯電させ、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。

10

【0138】

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。

20

【0139】

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。

30

【0140】

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。

40

【0141】

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

50

)、BD (商標) LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA) およびBD FACSCalibur (商標) (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。

【0142】

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。

10

【0143】

多重化

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。

20

30

【0144】

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。

40

【0145】

一つの態様において、多重化解析は、ビーズ等の複数個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。複数個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

50

とができる。

【0146】

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マイクロスフェア上に、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、異なる型のマイクロスフェア（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、マイクロスフェアの表面上で起こる。マイクロスフェアは、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マイクロスフェアは、異なる捕捉物質を有する別のマイ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マイ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マイクロスフェアの蛍光強度とは異なるように、別個の蛍光強度でマイ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。

10

【0147】

少なくとも2つの異なる標識または染色を用いて、マイ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、マイクロスフェアは、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。複数個のマイクロスフェア中の異なるマイクロスフェアは、2つ以上の標識または染色を有することができ、マイ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、異なるマイ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。マイクロスフェアは、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マイ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。

20

30

【0148】

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。

【0149】

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、アレイまたは複数個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。

40

【0150】

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。

50

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。

【0151】

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。

10

【0152】

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、組み合わせでスポットするか、またはインサイチューで合成することができる。

20

【0153】

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。

30

【0154】

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

40

50

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。

【0155】

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。

10

【0156】

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。

20

30

【0157】

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。

40

【0158】

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

50

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。

【0159】

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。

10

20

【0160】

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。

【0161】

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使用することができる。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。

30

【0162】

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。

40

【0163】

一つの態様において、非均質の小胞集団をマイクロ流体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

50

を含む。例えば、該マイクロ流体工学デバイスは、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。

【0164】

幾つかの態様において、該マイクロ流体工学デバイスは、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。

10

【0165】

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からのものである。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、マイクロ流体工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

【0166】

任意の適切なマイクロ流体工学デバイスを、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。

30

40

【0167】

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

50

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ンネル;(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ンネルを交差する、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ンネルであって、それぞれの反応部位は第1のフローチャンネルおよび第2のフローチャンネルの1つの交点に位置する、第2の複数のフローチャンネル;(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ンネルおよび第2の複数のフローチャンネルに沿って配置され、かつ反応部位の間で間隔を置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ンネルの1つまたは複数を覆い、かつ交差する1種または複数種の制御チャンネルを備える、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の流体チャンネルであって、第1の末端および第2の末端はチャンネルを通過して互いに流体連通している、第1の流体チャンネル;複数のフローチャンネルであって、それぞれのフローチャンネルは末端壁で終わる、複数のフローチャンネル;第1の流体チャン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;ならびに制御チャン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ンネルは第1の流体チャンネルから分岐し、第1の流体チャンネルと流体連通し;第1の流体チャンネルからフローチャンネルの1つに入る水性流体は第1の流体チャンネルを通り抜けた時しかフローチャンネルから流れ出ることができず;それぞれのフローチャンネルは、閉鎖時に、フローチャンネルの1つの末端を第1の流体チャン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;作動力が制御チャンネルに加えられ、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ンネルに偏向される偏向可能な膜であり;作動力が制御チャンネルに加えられた時に、それぞれのフローチャンネルにある弁が閉鎖され、それぞれのフローチャン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、フローチャン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ン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を含むとしてもよく、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。

【0168】

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

10

20

30

40

50

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。

【0169】

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のチャネルを含む。マイクロチャネルは、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。

【0170】

マイクロ流体工学装置は、チャネル内の表面に付着させたかチャ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。一つの態様において、マイクロチャ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。一つの態様において、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。

【0171】

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 μl 、たとえば毎分約1~50、5~40、10~30、5~30または10~35 μl の速度で装置またはマイクロチャ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。

10

20

30

40

50

【0172】

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。

【0173】

起始細胞および疾患特異的小胞

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。

【0174】

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。

【0175】

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。

【0176】

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。

【0177】

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。

【0178】

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

10

20

30

40

50

ることできる。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。

【0179】

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。

10

【0180】

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

20

30

【0181】

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。

40

【0182】

（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 Rii、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、デスモコリン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, II-7RI, CSC4, CysLT1R, TRPM8, Kv1.3, TRPV6, TRPM8, PSGR, MISHIR, ガレクチン-3, PCA3, TMPRSS2:ERG	10
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	$\alpha V \beta 6$ インテグリン	
乾癬	flt-1, VPF受容体, kdr	20
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, II-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, $\alpha 2$ マクログロブリン	30
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	40
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	$\alpha v \beta 3$ インテグリン, MMP9	

【 0 1 8 3 】

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

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。

10

20

30

40

50

【0184】

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。

【0185】

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。

【0186】

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。

【0187】

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

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

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。

【0191】

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。

40

【0192】

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、GCDF15、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

50

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。

【0193】

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、CD95を脱リン酸化することが報告されており、それにより、Fas媒介プログラム細胞死における役割を関与させる。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。

10

【0194】

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利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利用する。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。

20

30

【0195】

関連する局面において、本発明は、A2ML1、BAX、C10orf47、C1orf162、CSDA、EIFC3、ETFB、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 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)を含むことができる。チモシン 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

40

50

いる。ある態様において、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。

【0196】

さらには、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。

10

【0197】

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。

【0198】

バイオマーカー評価

本発明の一局面において、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、循環バイオマーカーの量を決定する前に、循環バイオマーカー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、循環バイオマーカーは、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ーパターン、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ー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ーを含んでもよい。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。

20

30

40

【0199】

循環バイオマーカーは、循環バイオマーカー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

50

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 cohorts 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。

10

【0200】

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りに試験すると、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。

20

【0201】

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ー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。

30

【0202】

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。

40

【0203】

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、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

50

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、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、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、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。

10

【0204】

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。

【0205】

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、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。

20

30

【0206】

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。ビーズが利用可能なカルボキシ基を有するならば、利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。

40

【0207】

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。

【0208】

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

50

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。

【0209】

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。

10

20

【0210】

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利用可能である。いくつかの態様において、小胞レベルは、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、ウエスタンブロット法、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。

30

【0211】

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。

40

【0212】

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

50

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。

【0213】

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。

10

【0214】

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。

【0215】

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。

20

【0216】

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、陽性と判定される陰性がより多いことを示す。

【0217】

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。

30

【0218】

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。

【0219】

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

40

50

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。

【0220】

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。

10

【0221】

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、97.9、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。

20

【0222】

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

30

40

50

ができる。

【0223】

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。

【0224】

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。

【0225】

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。

【0226】

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。

【0227】

分類

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、これらおよび他の分類器が、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。

【0228】

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。

【0229】

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。

【0230】

10

20

30

40

50

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、治療に应答するまたは应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。

【0231】

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。

10

【0232】

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。

【0233】

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新しい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。

20

【0234】

ひとたび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、特定の疾患に应答するまたは应答しないこと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。

30

【0235】

また、教師なし学習法を本発明で使用することができる。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。

【0236】

40

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。パ

50

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。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ピボまたはインピト口の比活性を含むことができる。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。

【0237】

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。

【0238】

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。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。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、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。

【0239】

小胞そのものの特徴を評価して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。

【0240】

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、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。

【0241】

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。

【0242】

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ク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クは、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。

【0243】

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、バイオマーカークは、DNAのセグメントのメチル化状態であることができる。

10

【0244】

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ることができる。たとえば、バイオシグネチャーは、一つまたは複数のmiRNAバイオマーカークを一つまたは複数のDNAバイオマーカーク、一つまたは複数のmRNAバイオマーカーク、一つまたは複数のsnoRNAバイオマーカーク、一つまたは複数のタンパク質バイオマーカーク、一つまたは複数のペプチドバイオマーカーク、一つまたは複数の抗原バイオマーカーク、一つまたは複数の脂質バイオマーカーク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。

20

【0245】

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/US2011/031479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ク、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ク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ク、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。

30

40

【0246】

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。

【0247】

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

50

、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。

【0248】

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シスを提供する。本明細書において使用されるセラノシスとは、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。

【0249】

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。

【0250】

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

10

20

30

40

50

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。

【0251】

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。

【0252】

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。

10

【0253】

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。

20

【0254】

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、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。

30

【0255】

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。

40

【0256】

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

50

来の試料中の同じマーカ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-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。

【0257】

上記のように、複数のマーカの解析を組み合わせて、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-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-および一つまたは複数の癌マーカ-、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、複数のマーカが多重に評価される。

【0258】

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の量、存在するマイクロRNAまたは他の循環バイオマーカの量などに適用することができる。適切なバイオマーカ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的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的小胞集団との比率、一つの循環バイオマーカと別的小胞表面タンパク質との比率などであることができる。

【0259】

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は、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。

【0260】

他の態様においては、複数のバイオマーカ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。

【0261】

10

20

30

40

50

基準は、同じ種類の複数のバイオマーカに加え、複数の種類のバイオマーカ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（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。

【0262】

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す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。

10

【0263】

バイオシグネチャーは、非限定的に、バイオマーカ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の翻訳後修飾は、非限定的に、バイオマーカのアシル化、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、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、ミリストイル化、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リポシル化、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。

20

【0264】

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。

30

【0265】

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シス決定を提供するために使用することもできる。

40

【0266】

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、たとえば子癩前症、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。

【0267】

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

50

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。

【0268】

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別することができる。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。

10

【0269】

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。

20

【0270】

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でき、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。

30

【0271】

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。療法に応答する一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一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。

40

【0272】

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一つまたは複数について分析することができる。一つの場合、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、一種または複数種の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

50

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(有患者/無患者、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。

【0273】

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。

10

【0274】

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(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、続いてよい。

20

30

【0275】

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剤(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。

40

【0276】

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

50

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。

【0277】

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剤（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。

【0278】

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。

【0279】

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）の経時的変化をフレキシブルにモニターすることができる。

【0280】

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。

【0281】

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ー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

10

20

30

40

50

グナイーブ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、そのドラッグナイーブ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。

10

20

30

40

50

【0282】

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ー、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、そのバイオマーカーを配列決定してKRAS突然変異を検出することができる。mRNAバイオマーカーの場合、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、肺癌バイオマーカー、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。

【0283】

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。

【0284】

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。

【0285】

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相関させるために、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相関させるために、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。

【0286】

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。

10

【0287】

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か、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」を処方するのか、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。

20

【0288】

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。

30

【0289】

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

40

50

細書に記載されている。

【0290】

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できる。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。

10

【0291】

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と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。

20

【0292】

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。

【0293】

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パリアント、MET、cKit、PDGFR、Wnt、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。

30

40

【0294】

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

50

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。

【0295】

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、5T4、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⁻、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。

【0296】

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2009036236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。

【0297】

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。

【 0 2 9 8 】

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 Ce

ncer 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. Gynecol 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。

10

20

30

40

50

【 0 2 9 9 】

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、Pecher, 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. Ghivizza ni, et al. (2000). Clin Orthop Relat Res (379 Suppl):S300-7、Zhang, H. G., C. Li u, 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。

10

【0300】

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。

20

30

【0301】

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。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

40

50

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。

【0302】

1種または複数種のバイオマーカーを、抗体アレイ、マイクロビーズ、または本明細書において開示される、もしくは当技術分野において公知の他の方法を用いて検出することができる。例えば、1種または複数種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することができる。次いで、捕捉された小胞を、検出可能な物質を用いて検出することができる。一部の態様において、捕捉された小胞は、小胞の全集団を検出する一般的な小胞マーカー、例えば、テトラスパニンまたはMFG-E8を認識する物質、例えば、抗体またはアプタマーを用いて検出される。これらには、テトラスパニン、例えば、CD9、CD63、および/またはCD81が含まれ得る。他の態様において、捕捉された小胞は、小胞起源、例えば、組織または器官のタイプに特異的なマーカーを用いて検出される。一部の態様において、捕捉された小胞は、内皮由来の細胞または小胞のマーカーであるCD31を用いて検出される。所望のように、捕捉に用いられたバイオマーカーを検出にも使用することができ、逆の場合も同様に使用することができる。

【0303】

一局面において、本発明は、5T4(栄養芽細胞)、ADAM10、AGER/RAGE、APC、APP(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、CYFRA21、デルリン1、DLL4、DPP6、E-CAD、EpCaM、EphA2(H-77)、ER(1)ESR1、ER(2)ESR2、ErbB4、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)、Nga1、NHE-3、NT5E(CD73)、ODC1、OPG、OPN、p53、PARK7、PCSA、PGP9.5(PARK5)、PR(B)、PSA、PSMA、RAGE、STXBP4、サバイピン、TFF3(分泌型)、TIMP1、TIMP2、TMEM211、TRAF4(足場)、TRAIL-R2(デスレセプター5)、TrkB、Tsg101、UNC93a、VEGFA、VEGFR2、YB-1、VEGFR1、GCDPF-15(PIP)、BigH3(TGFb1誘導性タンパク質)、5HT2B(セロトニン受容体2B)、BRCA2、BACE1、CDH1-カドヘリン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。検出されたバイオマーカーは、タンパク質、RNA、またはDNAを含んでもよい。1種または複数種のマーカーは小胞と結合してもよく、例えば、小胞表面抗原として、または小胞ペイロード(例えば、可溶性タンパク質、mRNA、もしくはDNA)として小胞と結合してもよい。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。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。

【0304】

本発明はまた、対象に由来する試料中の、1種または複数種の免疫調節用循環バイオマーカーのレベル、1種または複数種の転移用循環バイオマーカーのレベル、および1種または複数種の血管形成用循環バイオマーカーのレベルを検出する工程;ならびにレベルを参照と比較し、それによって、癌を評価する工程を含む、癌を評価する方法を提供する。1種または複数種の免疫調節用循環バイオマーカーは、CD45、FasL、CTLA4、CD80、およびCD83の1つまたは複数でもよい。1種または複数種の転移用循環バイオマーカーは、Muc1、CD147、TIMP1、TIMP2、MMP7、およびMMP9の1つまたは複数でもよい。1種または複数種の血管形成用循環バイオマーカーは、HIF2a、Tie2、Ang1、DLL4、およびVEGFR2の1つまたは複数でもよい。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。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。

【0305】

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DLL4またはcMETを含む。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。

10

【0306】

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)、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/>または利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。

20

【0307】

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。

30

【0308】

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-1の潜伏を特徴決定することができる。

40

【0309】

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

50

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。

【0310】

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。

10

【0311】

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。

【0312】

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。

20

【0313】

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。

30

【0314】

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。

40

【0315】

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。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、こ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、mRN

50

A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、複合体で循環していてもよい。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わ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。

【 0 3 1 6 】

(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, IGF1RBP, IGF1RBP3, IGF1RBP4, IGF1RBP5, 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	
一般的小胞 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	10
一般的小胞膜 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	
一般的小胞 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, Gi 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	20
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	30
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	40
小胞マーカー	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, 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,トランプリン-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	10
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	
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	20
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	30
前立腺癌 小胞マーカー	5T4, ACTG1, ADAM10, ADAM15, ALDOA, ANXA2, ANXA6, APOA1, ATP1A1, BASP1, C1orf58, C20orf114, C8B, CAPZA1, CAV1, CD151, CD2AP, 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,	40

	LUM, LYZ, MFG8, 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, VDACC2, 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, SPPI, SSX2, SSX4, STEAP, STEAP4, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, Trail-R2, Trail-R4, TrKB (ホリ), 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	
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	40
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, クラステリン, MMP9, MTSP-1, MMP24, MMP15, IGFBP-2, IGFBP-3, E2F4, カペオリン, 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, ETFB, GABARAPL2, GUK1, GZMH, HIST1H3B, HLA-A, HSP90AA1, NRG1, PRDX5, PTMA, RABAC1, RABAGAP1L, RPL22, SAP18, SEPW1, SOX1	
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	10
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, SCR1, 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	20
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, AHNAK, AKR1B10, ALB, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDOA, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA2P2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, AP2A1, AP2A2, APOA1, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARHGAP1, ARPC3, ARPC5L, ARRCDC1, ARVCF, ASCC3L1, ASNS, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1B1, ATP4A, ATP5A1, ATP5B, ATP5I, ATP5L, ATP5O, ATP6AP2, B2M, BAIAP2, 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, EEF1A3, EEF1G, EEF2, EFNB1, 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, FCBP, 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,	30
		40

	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, PLSR3, 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, TNK1, TNKS1BP1, TNPO3, TOLLIP, TOMM22, TP11, 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, UBE2N, UBE2V2, UGDH, UQCRC2, VAMP1, VAMP3, VAMP8, VCP, VIL1, VPS25, VPS28, VPS35, VPS36, VPS37B, VPS37C, WDR1, YWHAB, YWHAH, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ	10
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	20
乳癌	GAS5	30
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)アインゾフォーム, MPR8, MIIIR, 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-I(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,	40

	NSE, PGP9.5, プログステロン受容体(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, トラッピン-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, トラッピン-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, SCRN1, 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, 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 (TGFβ1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,

10

20

30

40

	RASL10A, SERHL, TFAP2A.1, TFAP2A.3, TFAP2C, VTCN1	
乳癌	TRAP; 腎細胞癌; フィラミン; 14.3.3, Pan; プロヒピチン; c-fos; Ang-2; GSTmu; Ang-1; FHIT; Rad51; インヒピン 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-β2; 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; CD3ζ; 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; サバイピン; CD23; G-CSF; CD2; カルレチニン; ニューロン特異的エノラーゼ; CD165; カルポニン; CD95 / Fas; ウロコルチン; 熱ショックタンパク質27/hsp27; Topo IIβ; 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 / MIRC / 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; 14-3-3β; 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	10
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; フィブロネクチン; CD6; CCK-8; sm; 第VIII因子関連抗原; CD57; プラスミノゲン; 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 IIβ; 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); プログステロン受容体; 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)	20
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/LCA; EGFR; トロンボスポンジン; CD81/TAPA-1; Ruv C; プラスミノゲン; 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	プロヒピチン, 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	40

	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, プログステロン受容体(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 (ストロメライシン-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, パキシリン, 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, カルポニン, 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	10
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	20
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, クラステリン, 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, フィブリンゲン, 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, 卵巣刺激ホルモン, 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,	30 40

	<p>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1, 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, 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, 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, ヌ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ニン-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, プロゲステロン, 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), プロラクチン, 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</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
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,	

	<p>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, クラステリン, 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-セレクチン, 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, 卵巣刺激ホルモン, 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-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-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, 好中球ゲラチナーゼ関連リポカリン, 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, プログステロン, 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, テネイシン-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</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
腫瘍学	<p>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, 細胞性フィブロネクチン, 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,</p>	

	<p>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, 好中球セラチナーゼ関連リポカリン, 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, 組織型プラスミノーゲンアクチベーター, 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inkin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</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>疾患</p>	<p>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-1, EN-RAGE, エオタキシシン-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, フィブリンノゲン, 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-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-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-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, プラスミノーゲ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</p>	<p>30</p> <p>40</p>
<p>神経学的</p>	<p>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</p>	

	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-1 α , 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	10
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τεリン, C-反応性タンパク質, シスタチン-C, EN-RAGE, E-セレクトリン, 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-1 α , マクロファージ炎症性タンパク質-1 β , 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, プラスミノゲン アクチベーターインヒビター 1, P-セレクトリン, 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	20
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	30
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, 卵胞刺激ホルモン, 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	40
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τε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, 好中球グラー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,	

	<p>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-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-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,</p>
タンパク質	<p>14.3.3γ, 14.3.3 (Pan), 14-3-3β, 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드로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, カルポニン, 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), CD32/Fcγ受容体II, CD35/CR1, CD36/GPIIb/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, クローデイン 11, クローデイン 2, クローデイン 3, クローデイン 4, クローデイン 5, クローデイン 7, クローデイン-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・ネオフォルマンズ(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 / TRUNDD, 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 Ca²⁺ ATPase2, ERCC1, Erk1, ERK2, エストラジオール, エストリオール, エストロゲン受容体, Exo1, エズリン/p81/80K/サイトビルン, 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, フィブリリン-1, フィブロネクチン, フィラグリリン, 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)/グルタミン酸-システインリガーゼ, GAPDH, ガストリン 1, GCDFP-15, G-CSF, GFAP, グリセニン, 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,</p>

10

20

30

40

	<p>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 (<i>Helicobacter pylori</i>), 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-1a, 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-1R, 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), 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, p19Sklp, 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), RAIDD, 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クチベーター-1)</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

	<p>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イソメラーゼ IIa, トキソプラズマ・ゴンディ (Toxoplasma Gondii), 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</p>	10
既知の癌遺伝子	<p>ABL1, ABL2, ACSL3, 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, CBF3, CBL, CBLB, CBLC, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, 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, CRTCL3, CTNNA1, 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, FAFL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO11, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FH, FHIT, FIP1L1, FLI1, 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, MLL1, 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, PNU1L1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1A, PRO1073, PSIP2, PTCH, PTEN, PTPN11, RAB5EP, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAP1GDS1, RARA, RB1, RBM15, RECQL4, REL, RET, ROS1, RPL22, RPN1, RUNDC2A, RUNX1, RUNXBP2, SBDS, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, SEPT6, SET, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH3GL1, SIL, SLC45A3, SMARCA4, SMARCB1, SMO,</p>	20
		30
		40

	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, YWHAЕ, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2	
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	10 20
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); 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, mitosin (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 (FOXM1); 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);	30 40

	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)
--	---

【 0 3 1 7 】

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。 10

【 0 3 1 8 】

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。 20

【 0 3 1 9 】

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)。 30

【 0 3 2 0 】

別の融合遺伝子は、パ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)。 40

【 0 3 2 1 】

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。

【 0 3 2 2 】

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）。

【0323】

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。

10

【0324】

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。

20

【0325】

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。

30

40

【0326】

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、Gibbins 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

50

口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参与している。

【0327】

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、RN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。

【0328】

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、HNRPA2B1 (不均一核リボ核タンパク質a2/b1)、HNRPA2B1 (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 (Troved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、

10

20

30

40

50

超低密度リポタンパク質（VLDL）、中間密度リポタンパク質（IDL）、低密度リポタンパク質（LDL）および/または高密度リポタンパク質（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。

10

【0329】

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、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-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。

20

【0330】

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。

30

40

【0331】

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。

50

【0332】

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、免疫プロット法、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。

10

【0333】

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US2005/015870 8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。

20

30

40

【0334】

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

50

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。

【0335】

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、検出されることもできる。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ダプタ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な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のうちの一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のうちの一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/または他の一般的な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。

【0336】

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。

【0337】

10

20

30

40

50

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のであろう。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の一つまたは複数の有する小胞を捕捉する工程、ならびに捕捉された小胞を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。さらなる剤が、さらなる生物学的識別能力をもたらすことにより、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。

【0338】

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

10

20

30

40

50

、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。

10

20

30

40

50

【0339】

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。

【0340】

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利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、利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。

【0341】

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。

【0342】

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。

【0343】

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。

【0344】

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スケットをその表面に配置することもできる。このようなガスケットは好ましくは液密である。ガスケットは、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。

【0345】

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。

【0346】

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

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【0347】

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。

【0348】

バイオチップは、マイクロ流体工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。マイクロ流体工学デバイスは、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。マイクロ流体工学システムは、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。マイクロ流体工学デバイスは、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、マイクロ流体工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、マイクロ流体工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。

【0349】

マイクロ流体工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をマイクロ流体工学デバイス内で検出することができる。核酸は、マイクロ流体工学デバイス内で、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、マイクロ流体工学システムはまた、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工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。

【0350】

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。ナノ流体工学により、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

10

【0351】

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。

【0352】

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。

20

【0353】

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）をアドレス可能なマイ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マイクロスフェア（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マイ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マイ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。

30

40

【0354】

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

50

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マイ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。

10

【0355】

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、異なるマイ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。

20

【0356】

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、結合物質は第二の剤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。第二の剤が、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

30

40

50

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。

【0357】

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合タンパク質もしくは実体と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の一つまたは複数を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。

10

20

【0358】

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。

30

40

【0359】

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（

50

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。

10

【0360】

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)。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シスを実施する。

20

30

【0361】

他の態様においては、小胞ペイロードを、はじめに小胞の部分集団を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シスを実施する。

40

【0362】

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

50

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ことで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。

10

20

30

40

50

【0363】

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。

【0364】

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。サイトスピンを夜通し風乾させ、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。

【0365】

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。

【 0 3 6 6 】

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 (Metabotrix)、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)、Omn, *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。

【 0 3 6 7 】

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。

【 0 3 6 8 】

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

10

20

30

40

50

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。

【0369】

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。

10

【0370】

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、ノーザンプロット分析、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。

20

【0371】

試料中のmiRNA産物のレベルは、ノーザンプロット分析、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

30

40

50

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。

【0372】

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は、一般に、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。

10

【0373】

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。

20

【0374】

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、存在するmiRNA分子の数を画定することができる。

30

【0375】

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 dendogram) 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。

40

【0376】

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、

50

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。

【0377】

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変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す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。

【0378】

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でき得る。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。

【0379】

一つの態様において、診断、後判定、治療に関連する、または生理的状态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。

【0380】

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、

$l(p_{s_i d})$ = 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

である。

【0381】

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

10

20

30

40

50

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。

【0382】

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。

10

【0383】

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/miRNA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。

20

【0384】

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。

【0385】

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^{-C_T} 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。

30

40

【0386】

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利用され得る。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)プロトコールは、幾つかのヒトCNV関連の障害および感染症

50

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利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。

10

【0387】

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。

20

【0388】

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。現在利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。

30

40

【0389】

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アダプタ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アダプターは、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。アダプタ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

50

、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0390】

バイオマーカーはまた、蛍光インサイチュウ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。

【0391】

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。

【0392】

循環バイオマーカーまたは小胞を含むパ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。

【0393】

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、小胞のパ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パイオシグネチャーを提供する。

【0394】

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)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。

【0395】

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。

【0396】

一般に、様々なタンパク質が小胞シエ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

10

20

30

40

50

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。

【0397】

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。たとえば、結合物質は、PCSA、PSMA、EpCam、B7H3、RAGEまたはSTEAPに対する抗体またはアプタマーであることができる。

【0398】

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、比較的小胞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剤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。

【0399】

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、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。

【0400】

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。

【0401】

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または他の腫瘍抑制剤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

10

20

30

40

50

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。

【0402】

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抑制剤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。

【0403】

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ตอบสนองすると予測されるか、治療に対して非ตอบสนอง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ตอบสนองする対象をตอบสนอง者と呼ぶことができ、治療にตอบสนองしない対象を非ตอบสนอง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ตอบสนอง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ตอบสนอง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。

【0404】

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、病態を患う個人のため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ตอบสนอง者であるのか、ตอบสนอง者であるのかを決定することができる。

【0405】

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。

【0406】

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ーを含むバイオマーカー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、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ー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。

10

20

【0407】

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ー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变化に基づき、薬に対する対象の応答を決定することができる。対象が治療に反応していない、たとえばバイオシグネチャーが患者が反応していることを示さないならば、その対象を、治療に対して非反応性、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反応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。

30

【0408】

または、対象を、治療に反応していると決定することができ、その対象を、治療に対して反応性、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、類似したバイオシグネチャーを有する他の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。

40

【0409】

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

50

ヤーを決定して、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。

【0410】

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る。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。

10

【0411】

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「全生存率」という用語とともに使用される。

20

【0412】

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、PFS/BSR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）。

30

【0413】

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、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

40

50

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。

【0414】

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、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。

10

【0415】

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利用可能ではない。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、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。

20

【0416】

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、いくら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。

30

【0417】

本発明のバイオシグネチャーに基づくセラノーシスは、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シ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シスを決定すること、たとえば、対象が、治療に应答する（「应答者」）または治療に対して非应答性である（「非应答者」）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「应答者」または治療に対する「非应答者」として同定することは、対象を、治療に应答する可能性があるまたは治療に应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、対象の应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应答者であるのか应答者である

40

50

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。

【0418】

(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、 フォン・ヴィレブランド因子、 組織プラスミノゲン 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IIIβ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IIα、 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-Aβ42)、 脳脊髄液アミロイドβ タンパク質40 (CSF-Aβ40)、 F2イソプロスタノール、 4-ヒドロキシノネナール、 F4ニューロプロスタノール、 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、アセプトロール、 アテノロール、ベタキソロール、 ピソプロロール、 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、 ニフェカラント、アンバシリド、 エルセンチリド、トレセチリド、 アルモカラント、D-ソタロール、 BRL-32872、HMR1556、L768673、 ベルナカラント、AZD70009、 AVE0118、S9947、NIP-141/142、 XEN-DO101/2、ラノラジン、 ピルシカイニド、JTV519、 ロチガプチド、GAP-134		10
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	20
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-セレクトチン、 IL-6、CRP	30
HIV感染症	ジドブジン、ジダノシン、 ザルシタピン、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、 エトラビルン、 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、 β2ミクログロブリン、 ネオプテリン、HIV RNA、 HLA-B *5701	40
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	

【 0 4 1 9 】

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ズ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

癌のセラノー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。

【0420】

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

【0421】

（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)	<p>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）、アフィニール（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、アトリレチノイン、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（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）、ピカルタミド、BiCNU、ブレノキサン（登録商標）、プレオマイシン、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）、シカンプトテシン11、カペシタピン、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、シトロボラム因子、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、シタラビンリポソーム、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、ダルベポエチンα、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルピシン、塩酸ダウノルピシン、ダウノルピシンリポソーム、ダウノキノーム（登録商標）、デカドロン、デシタピン、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、デアテトックス、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、ドキシロピシンリポソーム、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）、エビルピシン、エボエチンα、エルビタックス、エルロチニブ、ErwiniaLアスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオールエトポフォス（登録商標）、エトポシド、リン酸エトポシド、オイレキシシン（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、ゲムシタピン、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、ゴセレリン、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、ヒドロキシル尿素、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）、イダルピシン、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）、リポソーム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、オンコスバル（登録商標）、オンコピン（登録商標）、オンタック（登録商標）、オンキサル（商標）、オペレベルキン、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）、</p>

10

20

30

40

	<p>塩酸レピドマイシン、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）、タキソテール（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、チオグアニンタプロイド（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）、トボサール（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、トリアンダ（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）、ピダザ（登録商標）、ピンブラスチン、硫酸ピンブラスチン、ピンカサルPfs（登録商標）、ピンクリスチン、ピノレルピン、酒石酸ピノレルピン、VLB、VM-26、ポリノスタット、VP-16、Vumon（登録商標）、キセロダ（登録商標）、ザノサール（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）</p>	10
併用療法	<p>CHOP（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾン）、CVP（シクロホスファミド、ピンクリスチンおよびプレドニゾン）、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、メチルプレドニゾン、シタラビン、シスプラチン）、ピンクリスチン、プ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、プ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、ドキシソルピシン、エトボシド、メクロレタミン、プレドニゾン、ピ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）</p>	20
生物製剤	<p>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）</p>	
治療のクラス	<p>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、プレドニゾン（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、モノクロナール抗体（EGFR標的化、たとえばパニツマブ、セツキシマブ）、モノクロナール抗体（Her2標的化、たとえばトラスツズマブ）、モノクロナール抗体（多重標的化、たとえばアレムツズマブ）、他のアルキル化剤、抗生物質（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、ゲムシタピン、ヒドロキソ尿素、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、モノクロナール抗体（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）</p>	30
前立腺癌治療	<p>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ナログ、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、酢酸メグエストロール、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ニリン酸）、</p>	40

	<p>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、プレドニゾロン、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、ゾレドロロン酸、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、プレドニゾン、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、パノピノスタット、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、エピルビシン、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、ピンプラスチン、カルボプラチン、パクリタキセル、パゾパニブ、シタラピン、テストステロン置換、ゾレドロロン酸、塩化ストロンチウムSr89、パリカルシトール、サトラプラチン、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、バンデタニブ、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、エファピレンツ、ダサチニブ、ニルタミド、アピラテロン、カボザニブ(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、アフアチニブ、GTx758、ロナファルニブ、サトラプラチン、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、ビノレルビン二酒石酸塩、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</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>結腸直腸癌治療</p>	<p>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ゲスロイキン、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)</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【0422】

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シス目的に後で使用すること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。

【0423】

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、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。

【0424】

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应答するまたは应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、アパレリクス、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、ピカルタミド、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、エトボシド、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、リポソームドキシソルビシン、メドロキシプロゲステロン、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。

【0425】

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

【0426】

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、たとえばピカルタミド、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、ピカルタミド、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効果が低い可能性があることを示唆することもできる。

20

【0427】

（表9）バイオマーカー、系統、および剤の例

30

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		ピカルタミド、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		ピカルタミド、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	
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		10
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	30
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	40
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、アロマトーゼ阻害剤 (アナストラゾール、レトロゾール)	

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		10
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	20
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		30
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	40
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	

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		ドキシソルビシン、リポソームドキシソルビシン、エピルビシン
TopoIIa (低発現)	乳房	ドキシソルビシン、リポソームドキシソルビシン、エピルビシン	
TopoIIa (高発現)	デフォルト		ドキシソルビシン、リポソームドキシソルビシン、エピルビシン
TopoIIa (低発現)	デフォルト	ドキシソルビシン、リポソームドキシソルビシン、エピルビシン	

10

【0428】

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

【0429】

(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、ペメトレキサド	
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、デシタピン		
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prog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	10
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	20
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、ピノレルピン、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、エピルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ピノレルピン、トポテカン、テニポシド、リポ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		30
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prog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	ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素		
RRM2	過小発現	ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素		
RRM2B	過小発現	ゲムシタピン、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		40
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、エピルピシン、リポ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、エピルピシン、リポソームドキシソルピシン		

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	

【 0 4 3 0 】

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。

【 0 4 3 1 】

任意の薬物関連標的が、セラノー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スを提供することができる。

【 0 4 3 2 】

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、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、EM L4-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、GNRH R1、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、リンホトキシン受容体、LYN、MET、MGMT、MLH1、MMR、MRP1、MS4A1、MSH2、MSH5、Myc、NFKB1、NFKB2、NFKB1A、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、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。

10

20

30

40

【0433】

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。

【0434】

50

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 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。

【0435】

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。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。

10

【0436】

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、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

20

【0437】

上記のように、癌のセラノー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。

30

【0438】

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

40

50

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)プロポキシル]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 および/またはFLT3に対して阻害活性を有する。

10

20

30

40

50

【0439】

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。

【0440】

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。

【0441】

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、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。

【0442】

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。

【0443】

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。

【0444】

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。

【0445】

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。

【0446】

10

20

30

40

50

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。

【0447】

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。

10

【0448】

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。

20

【0449】

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。

30

【0450】

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、1000nm、800nm、500nm、200nm、100nm、または50nm未満の直径を有し得る。

【0451】

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。

40

【0452】

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、3

50

0、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。

【0453】

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。

10

【0454】

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。

20

【0455】

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。

【0456】

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。

30

【0457】

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。

40

【0458】

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

50

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。

10

【0459】

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。

【0460】

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。

20

【0461】

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。

30

【0462】

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

40

50

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。

【0463】

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。

【0464】

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。

【0465】

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。

【0466】

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。

【0467】

コンピュータシステム

例えば、1つ以上のバイオマーカの量、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

10

20

30

40

50

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クセイまたは相関は、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。

【0468】

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。

10

20

30

40

50

【0469】

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、アクセイが異なる建物、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。

【実施例】

【0470】

実施例1:前立腺癌細胞株からの小胞の精製

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分で、10分間、予め回転させる。上清を保持し、2000xg、4分で、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。

【0471】

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。

【0472】

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。

【0473】

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。

【0474】

クッションを作製するために、4mlのトリス / 30%ショ糖 / D2O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 D2O、10N NCL小滴を用いてpHを7.4に調節し、D2O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、ウエ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。

【0475】

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。

【0476】

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。

【0477】

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。

【0478】

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。

【0479】

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

10

20

30

40

50

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。

【0480】

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。

【0481】

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。

10

【0482】

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。

【0483】

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。

【0484】

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。

20

【0485】

実施例4: 抗体が結合したマイ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。

30

【0486】

まず、抗体が結合したマイクロスフェアセット（Luminex, Austin, TX）を選択する。マイ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。マイクロスフェアを、ボルテックスで再懸濁し、約20秒間、超音波処理する。作業用のマイクロスフェア混合物は、結合したマイクロスフェアの原液を、Startblock（Pierce（37538））中の各セットのマイクロスフェア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の作業用のマイ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。

【0487】

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引する。50 μ lの作業用のマイ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。

40

【0488】

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H

50

g)。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。マイクロスフェアは、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し、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。マイクロスフェアは、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アナライザ上でマイクロスフェアを分析する。

10

【0489】

実施例5: 抗体が結合したマイ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。

【0490】

20

まず、適切な抗体が結合したマイクロスフェアセット (Luminex, Austin, TX) を選択する。マイクロスフェアを、ボルテックスで再懸濁し、約20秒間、超音波処理する。作業用のマイクロスフェア混合物は、結合したマイクロスフェアの原液を、Startblock (Pierce (37538)) 中の各セットのマイクロスフェア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の作業用のマイ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。

【0491】

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の作業用のマイ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。

30

【0492】

上清を真空マニホールドによって吸引する (すべての吸引ステップにおいて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。

40

【0493】

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。マイクロスフェアを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。

【0494】

ビオチン化検出抗体をPBS-1% BSA + アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK + 0.05

50

%アジ化Na (S8032))) 中4 µg/mLに希釈する。(注:反応ごとに希釈検出抗体50 µlが必要である)。希釈検出抗体の50 µlアリコートを各ウェルに加える。

【0495】

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。

【0496】

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 µl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。

10

【0497】

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 µlで2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。マイクロスフェアをPBS-1% BSA (Sigma (P3688-10PAK + 0.05% アジ化Na (S8032))) 50 µl中に再懸濁させる。

【0498】

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 µg/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 µl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 µlアリコートを各ウェルに加える。

20

【0499】

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。

【0500】

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 µl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。

30

【0501】

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 µlで2回洗浄し、真空マニホールドによって吸引する。マイクロスフェアをPBS-1% BSA + アジ化物 (PBS-BN) (Sigma (P3688-10PAK + 0.05% アジ化Na (S8032))) 100 µl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。

40

【0502】

実施例6: 血漿からの小胞濃縮

装備品:Pall life sciences Acrodisc、25mmシリンジフィルタ、w/1.2 µm 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スイングパ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はいオセイフティーフード中で実施される。

50

【0503】

手順:

1. 血漿試料のろ過手順

- 1.1 血漿試料を - 80 (- 65 ~ - 85) 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 μm 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 × gおよび20 (16 ~ 24) で4分間スピンする。 10
- 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 μl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 × 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。 20

【0504】

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 × gおよび20 (16 ~ 24) 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 × 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 $x = (y/1000) \cdot 300$ 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)。 30
- 2.4 試料量を記録し、1 × 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 (2 ~ 8) で貯蔵する。

【0505】

計算:

1. 濃縮血漿試料の最終量

$$x = (y/1000) \cdot 300 \text{ (式中、xは濃縮物の最終量であり、yは血漿の初期量である)。} \quad 40$$

【0506】

実施例7: 磁性ビーズを使用する小胞の捕捉

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 μlを、EpCam抗体コートされたDynaIビーズ (Invitrogen, Carlsbad, CA) 約5 μg (約50 μl) およびスターティングブロック50 μl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 ° で2時間インキュベートする。DynaI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。

【0507】

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。

【0508】

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) ミニスピナラムに適用すると、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。

10

【0509】

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。

【0510】

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、 $2^{\Delta CT1 - CT2}$ によって計算することができる。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)。

20

【0511】

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。

【0512】

試料を室温で最低30分間、最大2時間放置する。1,000 ~ 1,300 × gおよび4 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 μlアリコートとして500 ~ 750 μlクライオチューブ中に分注する。標本を - 80 で貯蔵する。

30

【0513】

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 × 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 で貯蔵する。

【0514】

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 μlを氷上で解凍し、等量の2 × 変性溶液 (Ambion) によって溶解する。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 μl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 μlである。

【0515】

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アリコートを経50ml管に移し、等量のmirVana PARIS

40

50

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、700μl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)105μl中でRNAを溶離させる。合計1.5μlの溶離物をNanodropによって定量化する。

【0516】

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80μl溶離物からの一定量のRNA溶液1.67μl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400μl血漿または血清試料から単離される試料の場合、RNA溶液1.67μlは、 $(1.67/80) \times 400 = 8.3 \mu\text{l}$ 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1.67μl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 1.387μl、10×逆転写緩衝液0.5μl、RNアーゼインヒビタ0.063μl(20単位/μl)、dTTPを含む100mM dNTP 0.05μl、Multiscribe逆転写酵素0.33μlおよびインプットRNA 1.67μl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。

【0517】

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ステップを含むように変更することもできる。非希釈RT産物の1.25μl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×)2.5μlおよび0.2×TaqMan miRNAアッセイ(TE中に希釈)1.25μlを含む)3.75μlと合わせて、5.0μl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 20μlを5μl前増幅反応生成物に加えることにより)、その後、希釈材料2.25μlをリアルタイムPCRに導入し、上記のように実施する。

【0518】

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。

【0519】

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。方法のステップは以下を含む。

1. RNase A 2μlを小胞濃縮物50μlに加え、37で20分間インキュベートする。
2. QIAzol溶解試薬700μlを加え、1分間ボルテックスする。QIAzolの添加ののち、25fmol/μLのC. elegansマイクロRNA(1μL)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合わせたもの)それぞれについて75fmol/μLのスパイクイン(spike in)を作製

10

20

30

40

50

する。

3. 55 で5分間インキュベートする。
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 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
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。
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. ステップ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。 20
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 で貯蔵する。

【 0 5 2 0 】

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で20分間インキュベートする。リバースピペ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 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。 30
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。
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 で15分間、6,000 \times gで遠心分離処理する。遠心機温度を24 (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回ピペティングすることによって水/EtOHを混合する。 40
12. 短時間、遠心分離処理する。
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 \times 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 μ l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 μ lをプレートに加え、AirPoreテープで封止し、RTで4分間、6,000rp 50

m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 μ l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 μ l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。ベイビーを一緒に溜める。

20. -80 で貯蔵する。

10

【0521】

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。本方法のステップは以下を含む。

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 μ l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 \times gおよび4 で15分間遠心分離する。

20

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 μ l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 μ l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。

30

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。

【0522】

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。

40

【0523】

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。Ap

50

plied 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。

【0524】

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ブに標準化した。

10

【0525】

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ブの標準化値を平均する。20%よりも高い平均CV%を有するプローブは分析に使用しない。結果をペア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。

【0526】

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 µg) を使用した。

20

【0527】

等しい量 (5 µl) 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 µl中に希釈したのち、この溶液9 µl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。

【0528】

30

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 µl中に溶離させた。

【0529】

精製したRNA 10 µl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。

40

【0530】

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。

【0531】

実施例17: 3過モジュールを使用する小胞の単離

50

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。

【0532】

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。

【0533】

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。

【0534】

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、ビーズまたはマイクロスフェア (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Cy 7が一般に使用される。

【0535】

多重マイクロスフェアによって抗体を捕捉するためには、マイクロスフェアを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, IL, USA) を使用するマイクロを使用して所望の抗体に結合させることができる。

【0536】

精製した小胞 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を5,000のマイ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 中に再懸濁させ、FACS機にかける。

【0537】

さらに、マイ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標識マイクロスフェアを使用する場合、第一の管は、検出物質なしでマイ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。

10

20

30

40

50

【0538】

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のトリガイメント（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のトリガイメント（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のトリガイメントがあった。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。

【0539】

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。

10

【0540】

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き取る。
- 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、小胞中の細胞特異的標的を減らす場合があり、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。

20

30

【0541】

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。

40

【0542】

実施例21: 前立腺癌の検出

50

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。

【0543】

試料からの小胞は、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、中空系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。

【0544】

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

10

【0545】

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。

【0546】

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。

20

- 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 $550 \sim 6300$

【0547】

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。

30

【0548】

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。

40

【0549】

小胞は、上記に記載されるように単離される。

【0550】

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

50

る。xMAP (登録商標) Classification Calibrationマイクロスフェア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マイクロスフェア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マイクロスフェア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マイクロスフェア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。

【0551】

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マイ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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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、マイクロスフェア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。

【0552】

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。

【0553】

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。

【0554】

(表12) PCaアッセイ法用の抗体

10

20

30

40

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

【0555】

20

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クロマトグラフィーカラムを精製に使用する。

【0556】

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

【0557】

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M WM101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。

40

【0558】

(表13) 抗体 - ミクロスフェアの組み合わせ

抗体	マイクロスフェア	コートされたマイクロスフェア
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

【0559】

マイクロスフェアを、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。

【0560】

タンパク質のカルボキシル化マイ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、マイ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。マイ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マイクロスフェアのストックを再懸濁する。5×10⁶個のマイ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。マイクロスフェアのストックを室温にて 8000×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、ペレットにしたマイクロスフェアを、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100μlのdH₂O中に再懸濁する。マイクロスフェアを室温にて 8000×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、洗浄したマイクロスフェアを、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80μlの100mMリン酸二水素ナトリウム、pH6.2中に再懸濁する。10μlの50mg/mlスルホ-NHS(Thermo Scientific、Cat# 24500)(dH₂O中に希釈)をマイ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。10μlの50mg/ml EDC(Thermo Scientific、Cat# 25952-53-8)(dH₂O中に希釈)をマイ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。マイクロスフェアを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。活性化したマイクロスフェアを室温にて 8000×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、マイ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250μl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、マイクロスフェアを室温にて 8000×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

【0561】

上清を除去し、マイ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250μl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、マイクロスフェアを室温にて 8000×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

【0562】

上清を除去し、活性化し、かつ洗浄されたマイクロスフェアを、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100μlの50mM MES、pH5.0中に再懸濁する。125、25、5、または1μgの量のタンパク質を再懸濁したマイクロスフェアに加える。(注釈:1~125μg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500μl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。カップリングしたマイクロスフェアを室温にて 8000 x 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、ペレットにしたマイ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。）

【0563】

マイ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。カップリングしたマイクロスフェアを室温にて 8000 x 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、マイ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90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50に設定すべきである。）

10

【0564】

マイクロスフェアを 8000 x 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、マイ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。マイクロスフェアを 8000 x 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）。

20

【0565】

マイ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）。

【0566】

決定木: 図10のような決定木を用いて、マイ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。

30

【0567】

結果: 実施例23を参照されたい。

【0568】

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マイ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。

40

【0569】

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

50

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

【0570】

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

【0571】

(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

【0572】

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

臨床の場において観察されるものより高い理由である。

【0573】

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。

【0574】

(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

【0575】

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

【0576】

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

【0577】

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。

40

【0578】

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。

【0579】

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。

【0580】

(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

【0581】

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。

【0582】

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

【0583】

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

【0584】

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。

【0585】

(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

【0586】

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

【0587】

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、このようにいくつかの方法の例示である。

【0588】

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. 利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。

【0589】

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。

【0590】

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)を組み合わせることで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。液滴は誘電体パ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。

【0591】

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。

【0592】

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 $^{\circ}$ 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化する。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。

【0593】

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。

【0594】

実施例29: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。

【0595】

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 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、一つの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 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 Q

10

20

30

40

50

quick Amp Labeling」キットを用い、製造者の取扱い説明 (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まで減量した。3) 増幅された試料の精製ステップ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。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のプロープを検出した。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18および図14を参照すること。表18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ふうに発現した24の遺伝子を示す。図14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。

10

【0596】

(表18) PCa試料および健康な試料からのcMV中で差次的に発現したmRNA

20

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

30

40

表18中の略語: 「遺伝子記号」は、アレイ上の各遺伝子項目に利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。

【0597】

実施例30: 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マイクロスフェアベースのイムノアッセ

50

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）でコートされたマイ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。

【0598】

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スティクス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。

10

【0599】

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利用するアフィニティーまたは免疫沈降ステップに付し、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利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。

20

【0600】

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。

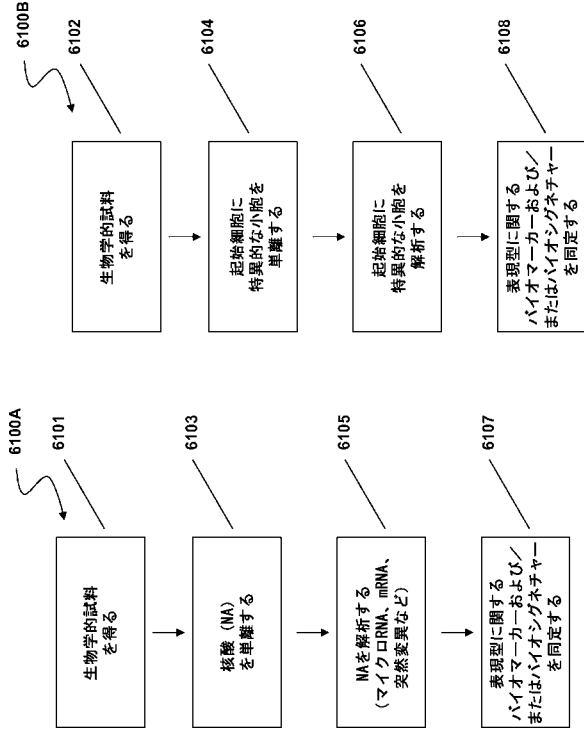
30

【0601】

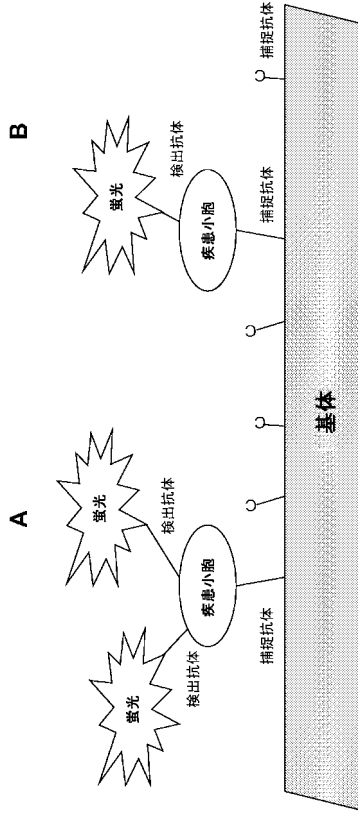
本発明の好ましい態様が本明細書において示され、説明されたが、そのような態様は例としてのみ提供されているということが当業者には明らかであろう。本発明を逸脱することなく、数多くの変形、変更および置換が当業者には思いつくであろう。本明細書に記載された発明の態様に対する様々な代替が本発明の実施において用いられてもよいことが理解されよう。添付の特許請求の範囲が本発明の範囲を画定し、特許請求の範囲に入る方法および構造ならびにそれらの均等物が本発明の範囲によって包含されるものとみなされる。

。

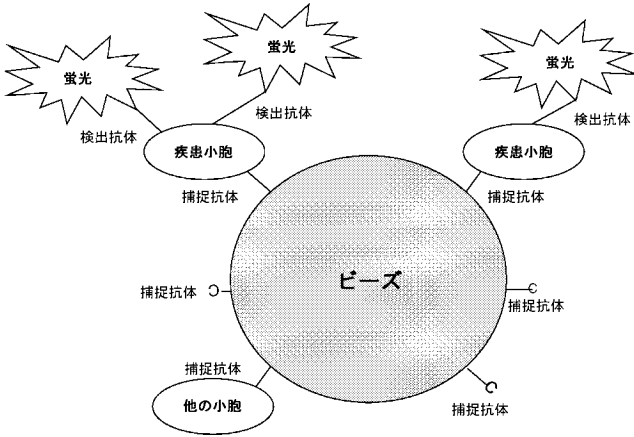
【 図 1 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



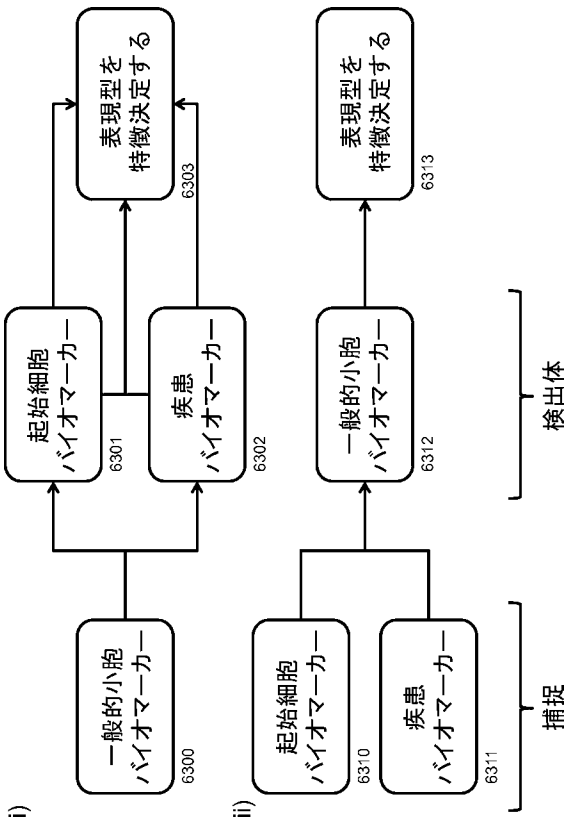
【 図 2 C 】

スクリーニングスキーム

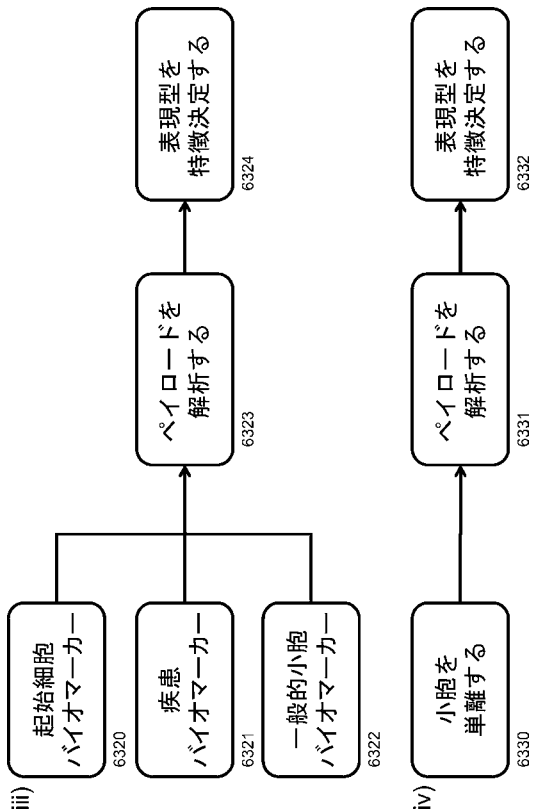
5 検出抗体	x	20 捕捉抗体	=	100 スクリーニングされる 組み合わせ
CD63		CD9		Rab
CD9		PSCA		IgG
CD81		TNFR		CD81
B7H3		CD63 2X		STEAP
EpCam		B7H3		PCSA
		Rab IgG		PSMA
		MFG-E8		5T4
		EpCam 2X		CD24
		CD63		TMEM211

一般的小胞バイオマーカーの抗体 : CD9, CD63, CD81
 起始細胞バイオマーカーの抗体 : PSCA, MFG-E8, Rab, STEAP,
 PCSA, PSMA, 5T4, TMEM211
 癌バイオマーカーの抗体 : EpCam, B7H3, CD24
 対照抗体 : Rab IgG, IgG

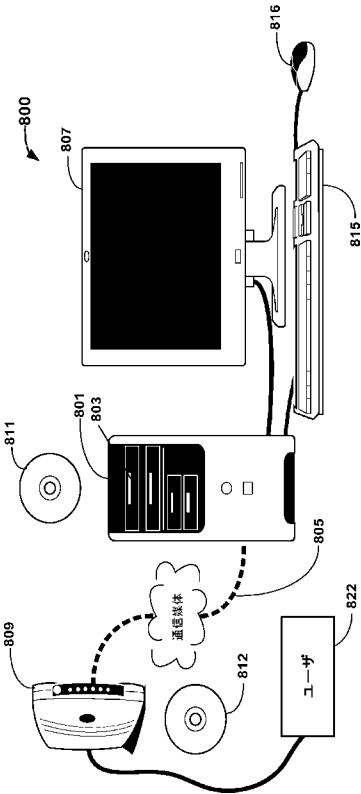
【図 2 D】



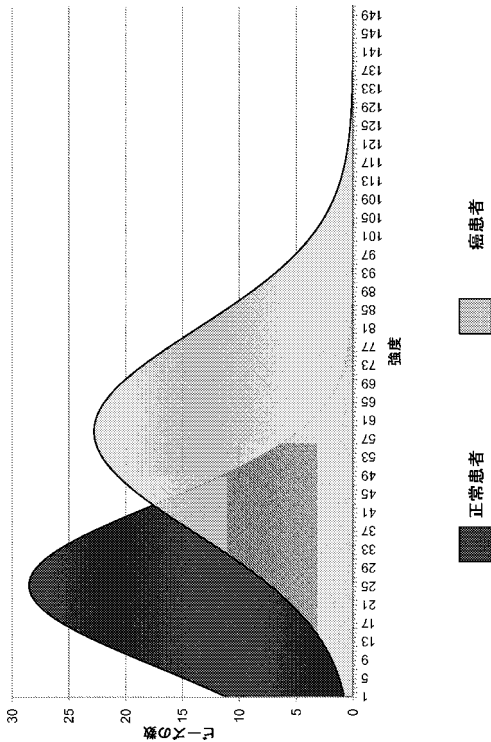
【図 2 E】



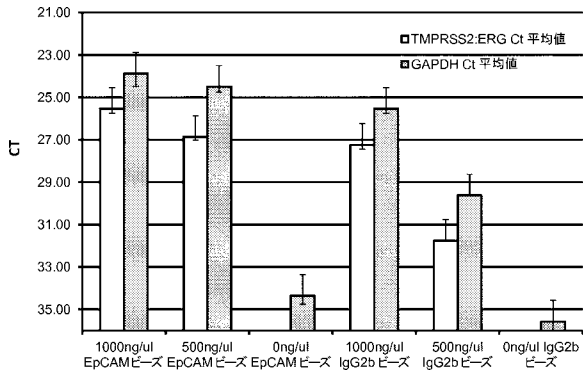
【図 3】



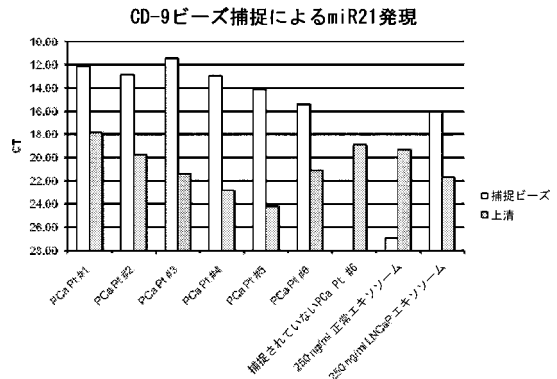
【図 4】



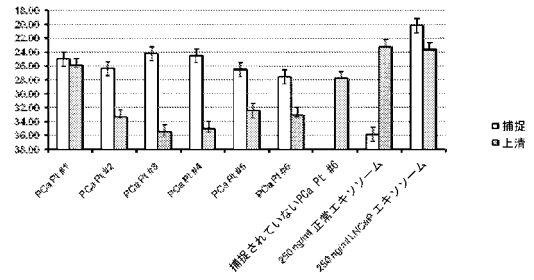
【 図 5 】



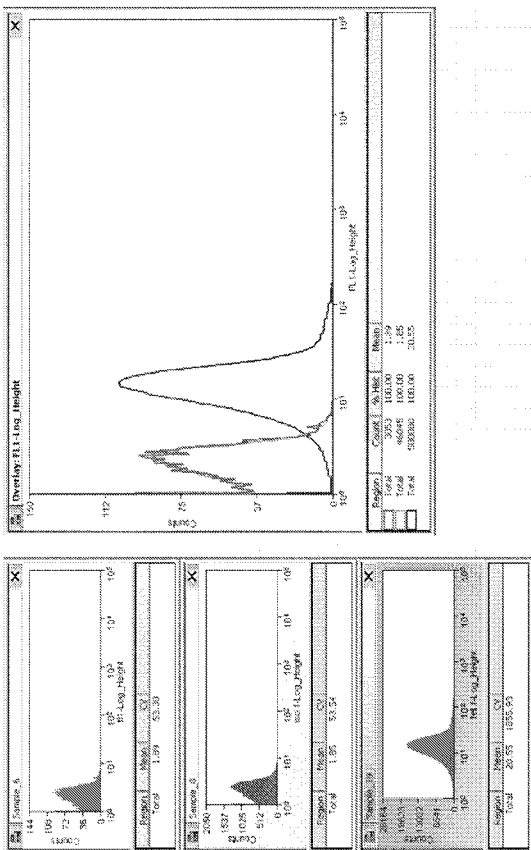
【 図 6 】



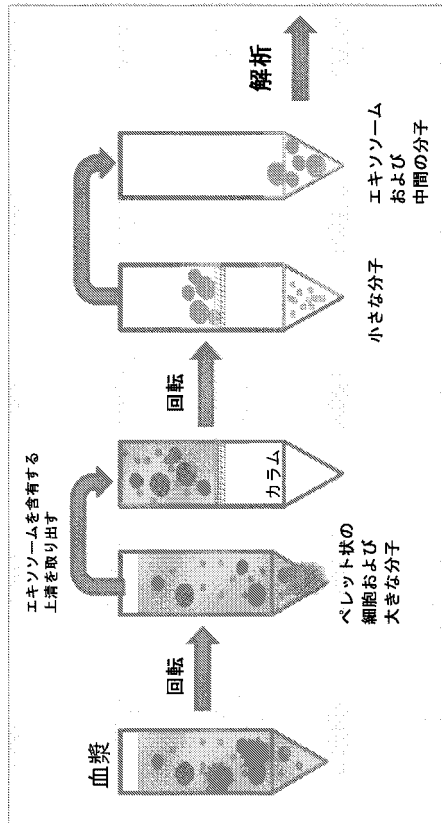
CD-9ビーズ捕捉によるmiR141の発現



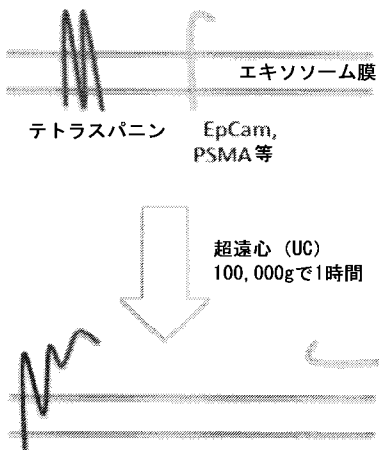
【 図 7 】



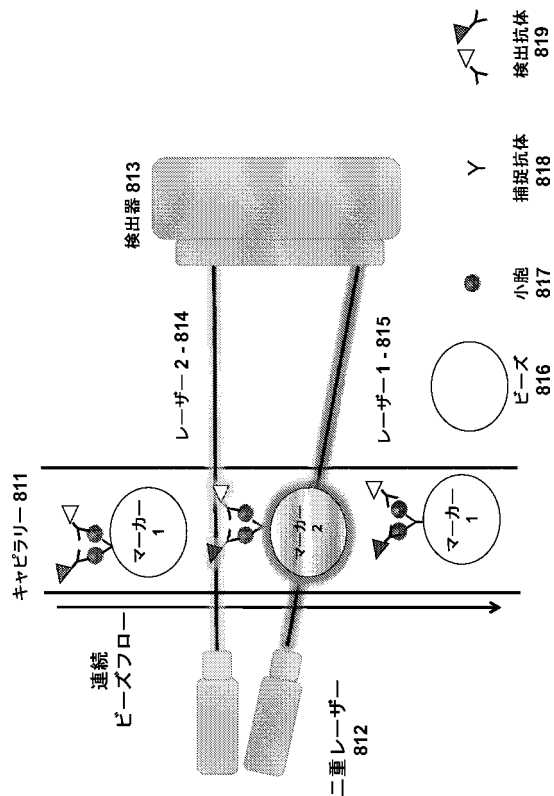
【 図 8 A 】



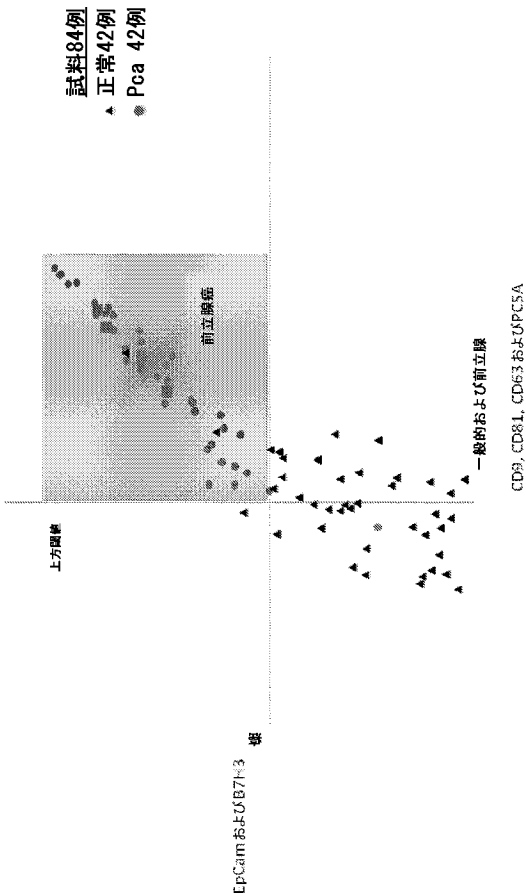
【図 8 B】



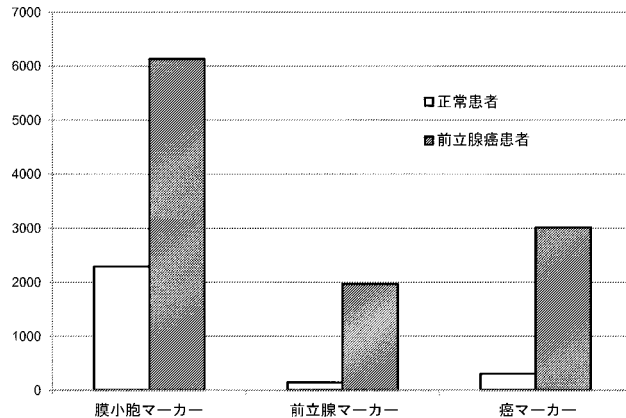
【図 8 C】



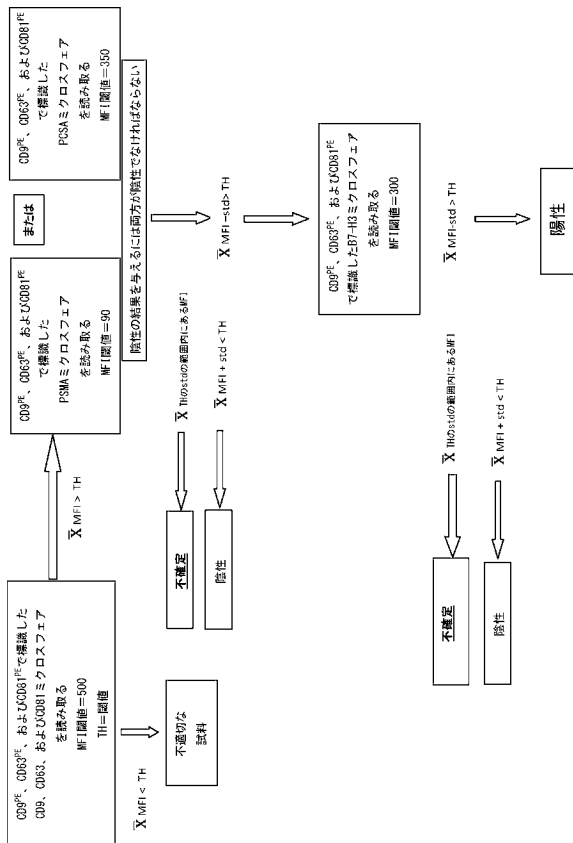
【図 9 A】



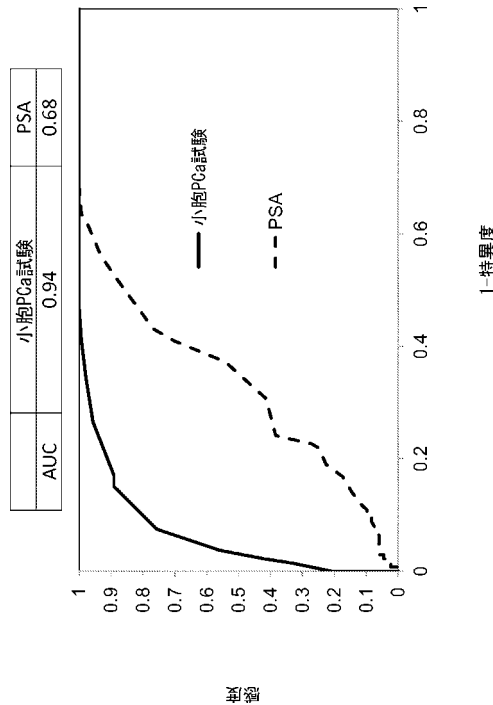
【図 9 B】



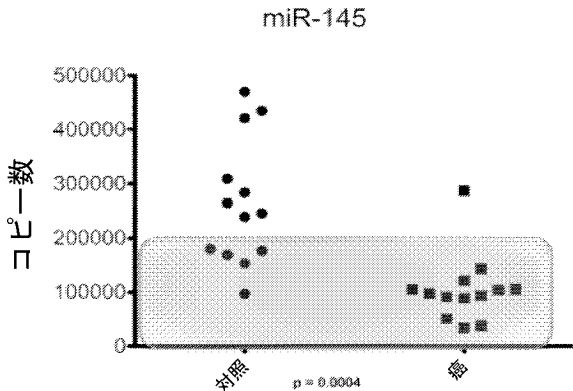
【図 1 0】



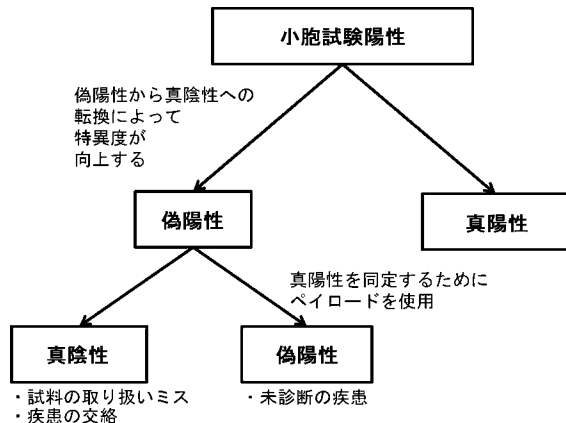
【図 1 1】



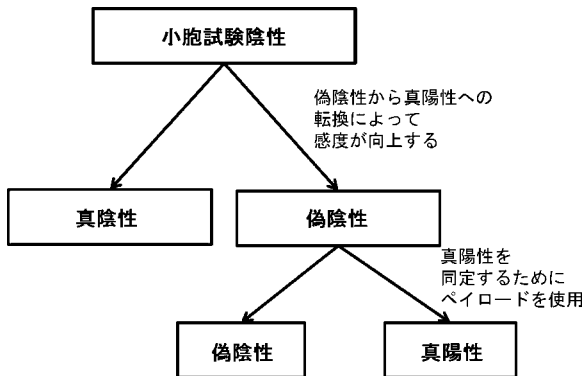
【図 1 2】



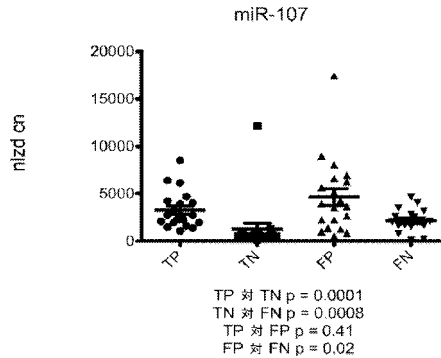
【図 1 3 B】



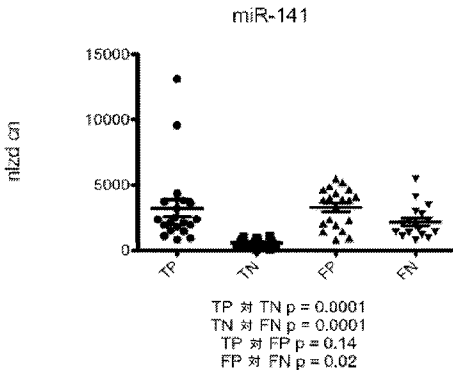
【図 1 3 A】



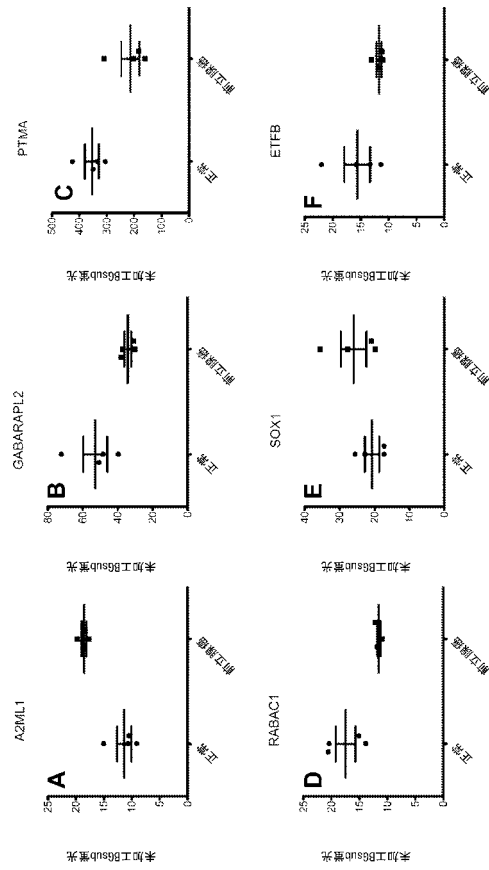
【図 1 3 C】



【 图 1 3 D 】



【 图 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/041387
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/574 (2012.01) USPC - 435/6.14 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 1/02; G01N 33/48, 53, 68, 563, 566, 574 (2012.01) USPC - 435/6.1, 6.11, 6.12, 6.14, 7.1; 436/64, 501 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Proquest		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7,897,356 B2 (KLASS et al) 01 March 2011 (01.03.2011) entire document	1, 3-7, 43-47
Y		2, 9-17
Y	US 7,314,721 B2 (GURE et al) 01 January 2008 (01.01.2008) entire document	2
Y	US 2010/0258464 A1 (LOVE et al) 07 October 2010 (07.10.2010) entire document	9-17
Y	US 2004/0224337 A1 (FOEHR et al) 11 November 2004 (11.11.2004) entire document	15
Y	US 2007/0042405 A1 (LOKSHIN) 22 February 2007 (22.02.2007) entire document	16
A	US 6,030,775 A (YANG et al) 29 February 2000 (29.02.2000) entire document	1-7, 9-17, 43-47
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 05 July 2012		Date of mailing of the international search report 10 AUG 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: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/041387

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.: 8, 18-42
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(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

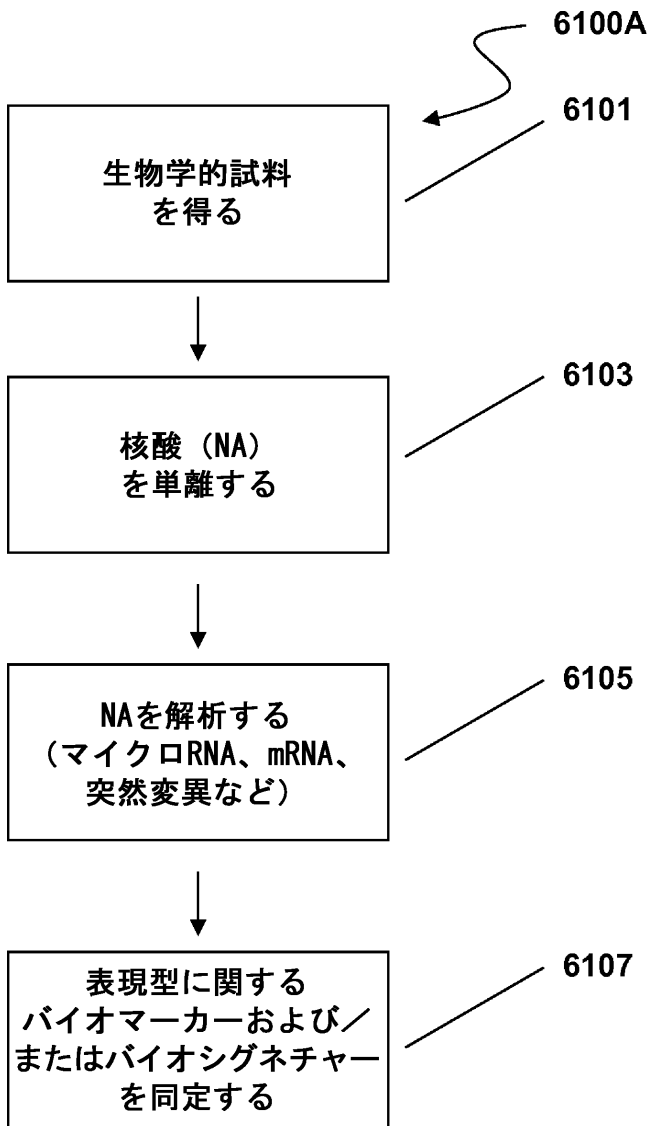
(72)発明者 ポロウスキー トレイシー
アメリカ合衆国 アリゾナ州 フェニックス ノース ミルクウィード ループ 2014

(72)発明者 イェーツ キンバリー
アメリカ合衆国 アリゾナ州 テンペ イースト ピアス ストリート 109

(72)発明者 アハバン レイ
アメリカ合衆国 バージニア州 ハイマーケット マルヴァーン ヒル コート 5804

Fターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 CB03 CB07 DA14 DA36 FA03
4B065 AA93X BA30 CA46

【要約の続き】



专利名称(译)	癌症的循环生物标志物		
公开(公告)号	JP2014526032A	公开(公告)日	2014-10-02
申请号	JP2014514849	申请日	2012-06-07
[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	ポロウスキー トレイシー イエーツ キンバリー アハバンレイ		
发明人	ポロウスキー トレイシー イエーツ キンバリー アハバン レイ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/53 C12N5/00		
CPC分类号	G01N33/57434 C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/57449 G01N33/57484 G01N2333/70578 G01N2800/52 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.P G01N33/574.A G01N33/53.M C12N5/00		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA03 4B065/AA93X 4B065/BA30 4B065/CA46		
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	61/494196 2011-06-07 US 61/507989 2011-07-14 US 61/494355 2011-06-07 US		
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, 以识别表型, 例如病症或疾病, 或疾病的阶段或进展, 选择疾病, 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, 例如囊泡和核酸 - 蛋白质复合物。

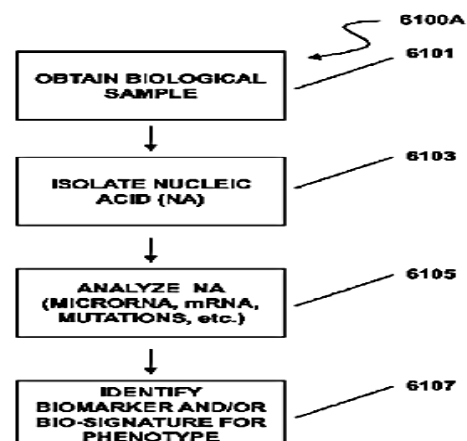


FIG. 1A