

(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2021-522503

(P2021-522503A)

(43) 公表日 令和3年8月30日 (2021. 8. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/573 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 P	5 L O 9 9
GO 1 N 33/483 (2006. 01)	GO 1 N 33/573 A	
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 33/483 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-560403 (P2020-560403)
 (86) (22) 出願日 平成31年4月26日 (2019. 4. 26)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年12月17日 (2020. 12. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2019/050541
 (87) 国際公開番号 W02019/204940
 (87) 国際公開日 令和1年10月31日 (2019. 10. 31)
 (31) 優先権主張番号 3, 003, 032
 (32) 優先日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 カナダ (CA)

(71) 出願人 520413014
 ナノスティックス インコーポレイテッド
 カナダ ティー5ジェイ 4 ビー6 アル
 バータ、エドモントン、1 0 2 3 0 ジャ
 スパー アベニュー 4 5 6 0
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 ルイス、ジョン
 カナダ、アルバータ、エドモントン、ワン
 ハンドレッドアンドテン ストリート
 エヌダブリュー 5 6 2 5
 (72) 発明者 パブロスキー、ロバート
 カナダ、アルバータ、エドモントン、1 3
 9 アベニュー 5 3 0 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロフローサイトメトリーを使用して疾患を診断する方法

(57) 【要約】

患者における臨床的に有意な前立腺がんなどの疾患を診断する方法が開示される。疾患シグネチャーを識別するための方法もまた開示される。この方法は、粒子表現型を識別し、次いで機械学習を使用して患者が目的の疾患又は粒子疾患の粒子表現型を有するかどうかを決定するためのマイクロフロー μ F C M サイトメトリーを含む。本明細書に開示される μ F C M 分析ワークフローは、従来のゲーティング分析によって見落とされる場合がある μ F C M データ内の最も臨床的に有意な情報を識別するのに役立つ。

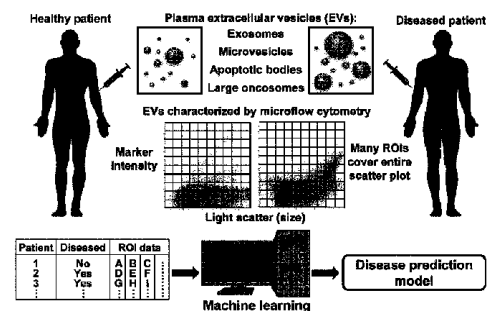


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者における疾患を診断する方法であって、

前記患者由来の試料を、目的の前記疾患についてのバイオマーカーに結合する 1 つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、

前記試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、前記試料に関連する 1 つ又は複数の光学特性を得るステップと、

前記シグナル強度、及び得られる場合、前記 1 つ又は複数の光学特性を処理して、前記試料中の異なる粒子表現型の濃度を計算するステップと、

機械学習アルゴリズムのための入力として粒子表現型の前記濃度を使用して、臨床的に有意な前立腺がんを有する患者の確率を決定するステップとを含む、方法。

10

【請求項 2】

疾患についての疾患シグネチャーを識別する方法であって、

健康な対象由来の試料及び既知の疾患を有する対象由来の試料を、目的の前記疾患についてのバイオマーカーに結合する 1 つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、

前記試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、各試料に関連する 1 つ又は複数の光学特性を得るステップと、

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーからの前記シグナル強度、及び存在する場合、前記 1 つ又は複数の光学特性を対数変換して、変換したシグナル強度を生成するステップと、

同様の変換したシグナル強度を有する粒子を、各バイオマーカーシグナルについての多くの異なる閾値を使用して関心領域 (ROI) 内にビンニングするステップと、

前記健康な対象由来の試料と、既知の疾患を有する対象由来の試料との間の各 ROI における前記粒子の濃度データを比較するステップと、

マーカーの各組合せから各 ROI についての受信者操作特性 (ROC) 曲線下面積 (AUC) 値を決定するステップと、

最も高い AUC 値を提供するバイオマーカーの組合せを選択して、前記疾患についての前記疾患シグネチャーを得るステップと

を含む、方法。

20

30

【請求項 3】

患者における臨床的に有意な前立腺がんを診断する方法であって、

前記患者由来の試料を、臨床的に有意な前立腺がんについてのバイオマーカーに結合する 1 つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、

前記試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、前記試料に関連する 1 つ又は複数の光学特性を得るステップと、

前記シグナル強度、及び得られる場合、前記 1 つ又は複数の光学特性を処理して、前記試料中の異なる粒子表現型の濃度を計算するステップと、

機械学習アルゴリズムの特徴 (すなわち、入力) として粒子表現型の前記濃度を使用して、臨床的に有意な前立腺がんを有する患者の確率を決定するステップと

を含む、方法。

40

【請求項 4】

前記処理するステップが、

前記シグナル強度を対数変換して、変換したシグナル強度を生成するステップと、

同様の変換したシグナル強度を有する粒子を、各関心領域 (ROI) が異なる粒子表現型であるとみなされる、各光学特性についての ROI 内にビンニングするステップと、

を含む、請求項 1 又は 3 に記載の方法。

50

【請求項 5】

前記対数変換するステップ及びビニングするステップが同時に行われる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記対数変換するステップ及びビニングするステップが別々に行われる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記粒子をビニングするステップが、光学特性当たりのセット数のピンを使用してビニングするステップを含む、請求項 4 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

複数の ROI を含む、請求項 2 及び 4 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

粒子表現型の前記決定が、

カーネル密度推定 (KDE) 関数を、全ての粒子の各バイオマーカーについての前記粒子シグナルデータにフィッティングするステップと、

前記バイオマーカーの陰性粒子集団に対する KDE プロットにおける Y 軸上の最も高い領域 (粒子密度) と交差する蛍光値 F_1 を識別するステップと、

F_1 から多くの異なるより高い蛍光シグナル強度について前記 KDE 曲線上の勾配を計算して、前記勾配がほとんど負である第 2 の蛍光値 F_2 を識別するステップと、

$F_1 + (2 * (F_2 - F_1)) + F_3$ (式中、 F_3 は、バイオマーカー陰性粒子がバイオマーカー陽性粒子として分類されないことを保証するために加えられる小さな任意の蛍光強度値である) に等しいバイオマーカー陽性粒子及びバイオマーカー陰性粒子を分離する前記蛍光強度の値 (F_s) を計算するステップと、

前記粒子が F_s を上回る (バイオマーカー陽性) 又は下回る (バイオマーカー陰性) バイオマーカーシグナルを有するかどうかに基づいて全ての粒子の前記バイオマーカー陽性状態を決定するステップと、

粒子を、前記粒子の光散乱強度に基づいて異なる推定サイズグループにビニングするステップと、

バイオマーカー陽性及び光散乱グループの全ての可能な組合せによって粒子表現型を決定するステップと

によって、各患者における各粒子について前記バイオマーカー陽性状態を識別する動的蛍光閾値化アルゴリズムを使用して実施される、請求項 1 又は 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記機械学習アルゴリズムが、個別 / バギング / ブースト決定木アルゴリズム、線形 / 二次 / 三次 / ガウスサポートベクターマシナルゴリズム、ロジスティック回帰、線形 / 二次 / 部分空間判別分析、又は k 近傍法アルゴリズムである、請求項 1 から 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記機械学習アルゴリズムが、ブースト決定木アルゴリズムである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ブースト決定木アルゴリズムが、XGBoost アルゴリズムである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記エクストリーム勾配ブースト決定木アルゴリズムが、平均化された出力確率を有する少なくとも 100 個のモデルのアンサンブルを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記予測スコアが標準治療スコアを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーが表 1 から選択される、請求項 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記 1 つ又は複数のバイオマーカーが表 2 から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料が血清試料である、請求項 1 から 16 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記試料が血漿試料である、請求項 1 から 16 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記試料が尿試料である、請求項 1 から 16 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記試料が精液試料である、請求項 1 から 16 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

従来のフローサイトメトリーが、マイクロフローサイトメトリーの代わりに使用され得る、請求項 1 又は 3 に記載の方法。

【請求項 22】

前立腺特異的バイオマーカーなどの組織特異的バイオマーカー、及び / 又はグレリンなどのがん特異的バイオマーカー、及び / 又はポリシアル酸などの転帰特異的バイオマーカーに結合するプローブの混合物が使用される、請求項 1 又は 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

概して、本発明は、診断方法及びその診断方法において試験されるバイオマーカーに関する。より具体的には、本発明は、臨床的に有意な前立腺がん診断のための細胞外小胞及びその臨床的に有意な前立腺がんを予測するためのバイオマーカーの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞外小胞 (EV: Extracellular vesicle) は、免疫学、神経学、心臓病学、及び腫瘍学などの様々な分野における診断及び予後に大きな可能性を秘めている。EV には、エキソソーム (30 ~ 100 nm)、微小胞 (50 ~ 2,000 nm)、アポトーシス小体 (500 ~ 4,000 nm)、及び非常に大きなオンコソーム (oncosome) (1,000 ~ 10,000 nm) が含まれる。正常細胞及び異常細胞は、それらの起源の細胞から mRNA、miRNA、及びタンパク質マーカーの多くを含有する EV を継続的に放出する。EV は、血液、尿、精液、及び脳脊髄液を含むほぼ全ての生体液中に見出されており、低侵襲性診断アッセイの有望な標的となっている。

【0003】

EV 特性付けのための複数の方法が存在する (Szatenek R ら、Int J Mol Sci 18 (6)、2017 年)。電子顕微鏡法は EV の最高解像度の画像を提供するが、ハイスループットデータ収集を欠き、多くのマーカーを同時に容易に測定することができず、生データが画像であるため、時間がかかり、複雑なデータ分析を必要とし得る (Harris JR、Arch Biochem Biophys 581: 3 ~ 18 頁、2015 年)。ナノ粒子追跡分析及び調整可能な抵抗パルス感知は、粒子の迅速な計数及びサイジングを可能にするが、EV マーカーを特性付けるためには理想的ではない (Gardiner C ら、J Extracell Vesicles 2、2013 年; Vogel R ら、Anal Chem 83 (9): 3499 - 3506、2011 年)。ナノスケール又は高感度フローサイトメトリーとも称されるマイクロフローサイトメトリー (μ FCM: Microflow cytometry) は、粒子の光学特性のハイスループット特性付けを可能にし、数百万の EV についての粒径、濃度、及びマーカー存在量の定量を数分で可能にする (Szatenek、上記)。これらの望ましい特性は、 μ FCM を高感度 EV ベースの臨床アッセイに非常に適したものにする。

【0004】

μ FCMは、分析を複雑にする大量のデータを生成する。100倍に希釈された典型的な10 μ Lの血漿試料は、1分の分析において、数十を超える光学特性を伴う各々5,000,000を超える事象を生じ得る。換言すれば、1 μ Lの血漿は10⁹を超える事象を有し得る。他の液体生検の種類は同様の濃度を有し得る。 μ FCMによるEVの分析は、試料分析当たり、ナノ粒子(NTA: Nanoparticle)又は電子顕微鏡法と比較して少なくとも500~50,000倍多い試料の事象を検査することができ、試料全体のより大きな代表的な分析を提供する。従来の細胞ベースのフローサイトメトリー分析は、典型的に、多くの細胞が同様のサイズを有し、マーカー陽性又は陰性として特性付けられるため、二変量散布図を生成し、4象限にわたってユーザが定義した関心領域(ROI: region of interest)内の事象濃度を定量することを含む。このような方法は、EVがサイズ、それ故、マーカー存在量に幅があるため、 μ FCMでは単純すぎ、それにより、非常に大きな複雑なデータセットを迅速に処理することができる μ FCM分析ツールの開発を必要とする。

10

【0005】

EVベースの診断/予後アッセイを開発する場合、EVは、生体試料内で特性付けされるだけでなく、患者の幸福及び/又は医療経済を改善することができる臨床的に意味のある状態を予測するそれらの能力についても分析されなければならない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

20

【非特許文献1】Szatunek Rら、Int J Mol Sci 18(6)、2017年

【非特許文献2】Harris JR、Arch Biochem Biophys 581:3~18頁、2015年

【非特許文献3】Gardiner Cら、J Extracell Vesicles 2、2013年

【非特許文献4】Vogel Rら、Anal Chem 83(9):3499-3506、2011年

【非特許文献5】Churm Rら、Obes Rev 18(2):140~148頁、2017年

30

【非特許文献6】Kasperzyk JLら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 22(12):2354~63頁、2013年

【非特許文献7】Rodriguez A及びLai A、Science 344(6191):1492~6頁、2014年

【非特許文献8】Bruggner RVら、Proc Natl Acad Sci USA 111(26):E2770~7頁、2014年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一態様によれば、患者における疾患を診断する方法が提供される。この方法は、患者由来の血漿、血清、尿又は他の体液試料などの液体生検を、目的の疾患についてのバイオマーカーに結合する1つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、1つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、試料に関連する1つ又は複数の光学特性を得るステップと、シグナル強度、及び得られる場合、カスタムアルゴリズムを用いて処理した1つ又は複数の光学特性を処理して、試料中の異なる粒子表現型の濃度を計算するステップとを含む。これらの粒子表現型の濃度は、臨床的に有意な前立腺がんを有する患者の確率を決定するための機械学習アルゴリズムのための特徴(すなわち、入力)として使用される。

40

【0008】

50

本発明の別の態様によれば、疾患についての疾患シグネチャーを識別する方法が提供される。この方法は、健康な対象由来の試料及び既知の疾患を有する対象由来の試料を、バイオマーカーについての1つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、1つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、各試料に関連する1つ又は複数の光学特性を得るステップと、1つ又は複数のバイオマーカーからのシグナル強度、及び存在する場合、1つ又は複数の光学特性を対数変換して、変換したシグナル強度を生成するステップと、同様の変換したシグナル強度を有する粒子を関心領域 (ROI) 内にビンニングするステップと、各ROIについて粒子の濃度を決定するステップと、健康な対象由来の試料と、既知の疾患を有する対象由来の試料との間の各ROIにおける粒子の濃度データを比較するステップと、マーカーの各組合せから各ROIについての受信者操作特性 (ROC: receiver operator characteristic) 曲線下面積 (AUC: area under the curve) 値を決定するステップと、最も高いAUC値を提供するバイオマーカーの組合せを選択して、疾患についての疾患シグネチャーを得るステップとを含む。

10

【0009】

本発明の更なる態様によれば、患者における臨床的に有意な前立腺がんを診断する方法が提供される。この方法は、患者由来の試料を、臨床的に有意な前立腺がんについての1つ又は複数のバイオマーカーに結合する1つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、1つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、試料に関連する1つ又は複数の光学特性を得るステップと、シグナル強度、及び得られる場合、異なる粒子表現型の濃度を決定するカスタムアルゴリズムを使用して1つ又は複数の光学特性を処理するステップと、機械学習アルゴリズムのための特徴 (すなわち、入力) として粒子表現型の濃度を使用して、臨床的に有意な前立腺がんを有する患者の確率を決定するステップと、特定の確率閾値の使用に基づいて疾患を有する患者を診断するステップとを含む。

20

【0010】

一実施例では、処理するステップは、シグナル強度を対数変換して、変換したシグナル強度を生成するステップと、同様の変換したシグナル強度を有する粒子を、各関心領域 (ROI) が異なる粒子表現型であるとみなされる、各光学特性についてのROI内にビンニングするステップとを含む。他の実施例では、対数変換するステップ及びビンニングするステップは同時又は別々に行われる。

30

【0011】

別の実施例では、粒子をビンニングするステップは、光学特性当たりのセット数のピンを使用してビンニングするステップを含む。

【0012】

更なる実施例では、この方法は複数のROIを含む。

【0013】

別の実施例では、粒子は、バイオマーカーに結合するプローブについてのそれらの陽性状態及びそれらの光散乱強度に基づいてビンニングされる。粒子がバイオマーカーについて陽性であるかどうかを決定するために、カーネル密度推定 (KDE: kernel density estimation) 関数が、特定の患者についての特定のバイオマーカーについてのシグナルヒストグラムに適用される。蛍光値F1は、バイオマーカーの陰性粒子集団に対するKDEプロットにおける最も高い領域から識別される。次に、KDE曲線の勾配が、多くの異なるより高いシグナル強度について計算される。第2の蛍光値F2は、勾配が最も負である場所から識別され、これは陰性粒子集団の右側の下半分である。バイオマーカー陽性粒子及びバイオマーカー陰性粒子を分離する蛍光強度の値 (Fs) は、 $F1 + (2 * (F2 - F1)) + F3$ (式中、F3は、バイオマーカー陰性粒子がバイオマーカー陽性粒子として分類されないことを保証するのに役立つように加えられる小

40

50

な任意の蛍光強度値である)に等しい。F sを上回る又は下回る蛍光強度を有する粒子は、それぞれ、バイオマーカーについて陽性又は陰性である。動的シグナル閾値化の方法は、時間の経過に伴う、及び異なる患者に対するシグナルシフトに耐性がある。各患者についての全ての粒子が各バイオマーカーについて陽性/陰性として分類されると、粒径を推定するために使用される対数変換光散乱シグナルは、任意の数のグループにビンニングされる。例えば、0～1の範囲のシグナル強度及び10のビンが存在する場合、0から0.1の間のシグナルはグループ1にあり、一方、0.9～1はグループ10にある。最後に、粒子表現型は、バイオマーカー状態(陰性/陽性)及び光散乱ビンの全ての可能な組合せに基づいて作成される。例えば、バイオマーカーA+及び光散乱ビン1/10粒子は、バイオマーカーA-及び光散乱ビン1/10粒子とは異なる。全ての粒子表現型の濃度が決定され、機械学習アルゴリズムのための入力特徴として使用される。

10

【0014】

なお更なる実施例では、機械学習アルゴリズムは、個別/バギング/ブースト決定木アルゴリズム、線形/二次/三次/ガウスサポートベクターマシナリアルゴリズム、ロジスティック回帰、線形/二次/部分空間判別分析、又はk近傍法アルゴリズムである。一実施例では、機械学習アルゴリズムは、ブーストされ、アンサンブルされた決定木アルゴリズム、例えば、XGBoostアルゴリズムである。

【0015】

一実施例では、エクストリーム勾配ブースト決定木アルゴリズムは少なくとも100個のモデルのアンサンブルを含み、各モデルの確率は臨床的に有意な前立腺がんの単一の確率値を生じるように平均化される。

20

【0016】

別の実施例では、予測スコアは標準治療スコアを含む。

【0017】

更なる実施例では、1つ又は複数のバイオマーカーは表1又は表2から選択される。

【0018】

なお更なる実施例では、試料は血清試料である。

【0019】

これら及び他の実施例及び特徴は、以下の説明及び図面を参照することにより、より良く理解されるであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の一実施例による方法の概略図を表す図である。

【図2】 μ FCMデータを使用した臨床的特徴の予測/関連付けを示す図である。A) LALS-PSMA、LALS-グレリン、及びPSMA-グレリンデータセットを使用して種々の臨床的特徴を予測するための受信者操作特性曲線下面積(ROC AUC: receiver operator characteristic area under the curve)マップ。各マップにおける最大の10%AUCを平均化し、比較した; B) LALS-PSMAデータセットを使用してPCaグレードグループ1+、2+、3+、4+及び5を予測するためのROC AUCマップ; C) LALS-グレリンデータセットを使用して糖尿病を予測するためのROC AUCマップ; 並びにD) LALS-PSMAデータセットを使用したPSA(右)、腫瘍ステージ(中央)、及び体重(右)についての相関係数マップ。

40

【図3】血漿試料からの粒子に対するPSMA/グレリンプロブ染色の変動性が従来の手動ゲーティング分析を複雑にすることを示す図である。A)、B)及びC)は、非臨床的に有意及び臨床的に有意なPCa患者についての大角度光散乱(LALS: large angle light scatter)及びPSMA(a)、LALS及びグレリン(b)、並びにPSMA及びグレリン(c)の代表的な散布図及びROC AUCマップである; D)手動ゲーティングによる患者の血漿中のPSMA/グレリンプロブ陽性粒子の定量; E)手動ROIデータを使用して臨床的に有意なPCa(グレードグループ

50

3 +) を予測するための R O C 曲線。

【図 4】 μ F C M データの v i S N E 分析を示す図である。A) 臨床的に有意及び非臨床的に有意な P C a 患者からの同数の粒子 (3 0 , 0 0 0) を v i S N E により分析した ; B) 高速検索 / 密度ピークアルゴリズムを使用して粒子をクラスター化した ; C) 臨床的に有意な P C a 粒子についての v i S N E クラスター純度。いくつかのクラスターは臨床的に有意な P C a 患者に由来する粒子に対してエンリッチメントを示す (矢印) 。

【図 5】P S M A - グレリンデータセットを使用して臨床的に有意な P C a を予測するための μ F C M データの機械学習の最適化を示す図である ; A) 、 B) 、 C) 最適な機械学習アルゴリズム (a) 、光学パラメーター当たりのピンの数 (b) 及びアンサンプルにおける X G B o o s t モデルの数 (c) ; D) モデル性能に対するグリッドサーチ X G B o o s t パラメーター、特徴選択、及びアンサンプルの効果 ; E) 臨床的に有意な P C a を予測するための手動ゲーティング、C I T R U S、及びカスタムビンニング - X G B o o s t アルゴリズムについての R O C 曲線。プロットした値は、5 倍交差検証の少なくとも 1 0 回の反復による $\pm$ S E M を表す。

【図 6】臨床的に有意な P C a を予測するための臨床及び μ F C M データの統合を示す図である。A) μ F C M ベースの X G B o o s t 予測並びに P S A、年齢、人種、D R E、以前の陰性生検、及び P C a の家族歴を含む S O C 臨床的特徴を使用したロジスティック回帰モデルからの臨床的に有意な P C a の予測のウォーターフォールプロット ; B) μ F C M データを伴う又は伴わない S O C のロジスティック回帰モデルの受信者操作特性曲線 ; C) がんと診断され、且つ異常 D R E を伴う前立腺肥大 (4 0 c m ³ (4 0 c c)) を有する又は有さない患者の割合 ; D) 、 E) 前立腺肥大を有する及び有さない男性における P S A (d) 及び P S A 密度 (e) 。プロットした値は平均 $\pm$ S E M である ; F) μ F C M + S O C ロジスティック回帰モデルを使用した前立腺肥大を有する男性における臨床的に有意な P C a の予測 ; 並びに G) 前立腺肥大を有する男性が、 μ F C M + S O C モデルを使用した生検を受けるべきかどうかの推奨。

【図 7】L A L S - P S M A - グレリンデータセットの v i S N E プロットのクラスタリングアルゴリズムの比較を示す図である。A) 、 B) 、及び C) クラスタリングアルゴリズムは、K 平均 (a) 、期待値最大化ガウス混合モデル (b) 、及び高速検索 / 密度ピーク (c) を含む。

【図 8】P S M A - グレリンデータセット変換後の X G B o o s t モデル性能のグラフ表示である。

【図 9】臨床的に有意な P C a を予測するために P S M A - グレリンデータセットを使用した X G B o o s t モデルからの可変ゲインマップ (a) 、並びに A U C (カラースケール) 及び可変ゲイン (グレースケール) マップのオーバーレイ (b) を示す図である。

【図 1 0】マイクロフローサイトメトリー及び超音波を使用した単一のがん細胞の高感度検出からの方法及び結果を表す図である。

【図 1 1】シフトしたマイクロフローサイトメトリーデータに対する臨床的予測の向上した精度を示す方法及び結果を表す図である。

【図 1 2】J a g g e d 1 についてのバイオマーカー結果を示す図である。

【図 1 3】カドヘリン 1 1、2 型、O B カドヘリンについてのバイオマーカー結果を示す図である。

【図 1 4】ポリシアル酸についてのバイオマーカー結果を示す図である。

【図 1 5】M E R T K についてのバイオマーカー結果を示す図である。

【図 1 6】プロステインについてのバイオマーカー結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 1】

臨床的に有意な前立腺がんを含む、疾患を診断するためのバイオマーカーを例示する実施例 ; 臨床的に有意な前立腺がんを含む、疾患を診断する方法 ; 並びに疾患予測モデル及びそれを使用する診断検査を開発する方法が本明細書に記載される。本明細書に記載される実施例及び実例は、当業者のために意図された例示目的のためであり、決して限定する

10

20

30

40

50

ことを意味しないことが理解される。開示全体にわたる実施例又は実例に対する全ての言及は、例示的で非限定的な実施例又は例示的で非限定的な実例に対する言及とみなされるべきである。

【0022】

別段に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。また、本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈が明確に別様を指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意されなければならない。例えば、「抗原」又は「抗体」に対する言及は、複数の抗原分子又は抗体を含むことが意図される。

10

【0023】

患者における、臨床的に有意な前立腺がんなどの疾患を診断する方法が提供される。本論述の目的のために、「臨床的に有意な前立腺がん」は、グリーソングループ3又はそれ以上を有する前立腺がんを意味する。この方法は、患者由来の試料を、目的の疾患についての1つ又は複数のバイオマーカーに結合する1つ又は複数のプローブ及び/又は抗体とインキュベートするステップと、試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、1つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、試料に関連する1つ又は複数の光学特性を得るステップと、シグナル強度、及び得られる場合、1つ又は複数の光学特性を、カスタムアルゴリズムを使用して処理して、患者試料中の異なる粒子表現型の濃度を決定するステップと、機械学習のための入力として患者試料からの粒子表現型の濃度データを使用して機械学習アルゴリズムの出力に基づいて疾患を有する患者を診断するステップとを含む。一実施例では、疾患は、がん、特に臨床的に有意な前立腺がんであり得、バイオマーカーは、がんバイオマーカー、特に臨床的に有意な前立腺がんバイオマーカーと相関する。

20

【0024】

疾患シグネチャーを識別する方法も提供される。この方法は、健康な対象由来の試料及び既知の疾患を有する対象由来の試料を、疾患についての1つ又は複数のバイオマーカーに結合する1つ又は複数のプローブとインキュベートするステップと、試料をマイクロフローサイトメトリーに供するステップと、1つ又は複数のバイオマーカーについてのシグナル強度を得るステップ、及び任意選択により、各試料に関連する1つ又は複数の光学特性を得るステップと、1つ又は複数のバイオマーカーからのシグナル強度、及び存在する場合、1つ又は複数の光学特性を対数変換して、変換したシグナル強度を生成するステップと、同様の変換したシグナル強度を有する粒子を関心領域(ROI)内にビンニングするステップと、各ROIにおける粒子の濃度(各ROIにおける全粒子数を、データ収集の間に分析される試料体積で除算することによって計算される)を決定するステップと、健康な対象由来の試料と、既知の疾患を有する対象由来の試料との間の各ROIにおける粒子の濃度データを比較するステップと、マーカーの各組合せから各ROIについての受信者操作特性(ROC)曲線下面積(AUC)値を決定するステップと、最も高いAUC値を提供するバイオマーカーの組合せを選択して、疾患についての疾患シグネチャーを得るステップとを含む。

30

40

【0025】

本発明において有用な試料には、血液(又はその成分)、精液、乳などの生体試料が含まれるが、これらに限定されない。本発明において、細胞外小胞は、他の方法において要求されるように、単離及び精製される必要はない。代わりに、血清又は血漿は、標準的な臨床診断手順に従って血液から単離され得、更なる精製及び処理を必要とすることなく、本明細書に記載される方法において使用され得る。

【0026】

試料は、目的の疾患若しくは診断される疾患についてのバイオマーカー、又はこの場合、EVのような特定の種類の小粒子に関連するプローブとインキュベートされる。プローブには、特異的抗原に対する、F(ab)、F(ab')₂若しくはF(ab')断片、

50

ミニボディ (mini body) などのような全抗体若しくは抗体成分、又は特異的標的に対するペプチドが含まれ得るが、これらに限定されない。プローブはまた、試料中の特定の成分の識別を可能にする種々の色素を含んでもよい。例えば、膜結合小粒子を染色する親油性色素とのインキュベーションは、試料中の脂質結合粒子からのタンパク質凝集体の分離に役立ち得る。典型的に、プローブは、プローブ結合標的の検出に役立つ、蛍光コンジュゲートなどの直接的にコンジュゲートした二次成分を有する。

【0027】

P S M A 陽性 E V を検出するために、試料は、D y L i g h t 4 0 5 などの色素と直接コンジュゲートした P S M A 特異的モノクローナル抗体 J 5 9 1 (B Z L B i o l o g i c s 、 L L C から入手可能) とインキュベートされ得る。或いは、非コンジュゲートプローブ (例えば、P S M A 特異的モノクローナル抗体 J 5 9 1) は、試料とのインキュベーション後、アッセイに使用される一次プローブを識別するために二次薬剤と更にインキュベートされ得る。例えば、Q d o t 5 6 5 コンジュゲートロバ抗マウス I g G 抗体とのインキュベーションは、その後の μ F C M アッセイにおける検出を可能にする。典型的に、バイオマーカープローブは、目的の疾患によって影響される細胞又は組織においてのみ発現されるか、又は主に発現される生体分子に特異的である。しかしながら、バイオマーカーは特定の細胞型に対して特異的であってもよい。更に、1つより多いバイオマーカーを使用して、目的の疾患及び/又は細胞型の1つより多い特徴を識別することができる。

【0028】

バイオマーカープローブとの試料のインキュベーションは、単一試料 + 単一プローブフォーマットとして、又は単一試料 + 複数プローブフォーマットとして行われ得る。インキュベーションのフォーマットは、各バイオマーカープローブが試料中の E V 集団に関する異なる情報を提供することができるので、異なる解決策を提供することができる。例えば、プローブは、脂質結合事象対非脂質結合事象、又は上皮粒子起源対非上皮粒子起源を示してもよい。他の場合には、プローブは、疾患の存在、疾患の存在及び侵襲性を示してもよい。インキュベーションにおける複数のプローブは、粒子起源、疾患の存在、及び疾患の侵襲性の同様の徴候を有し得る。したがって、プローブの組合せは疾患表現型の検出について有意な意味を有し得る。

【0029】

粒径及び計数は光散乱によって推定することができる。上記の蛍光強度と組み合わせた光散乱特性は、各粒子について固有の表現型を提供することができる。これらの粒子表現型は、単独で、又は複数のバイオマーカーと組み合わせて使用することができ、目的の疾患についての固有の疾患シグネチャーを提供することができる。

【0030】

試料は、これらに限定されないが、A p o g e e A 5 0 マイクロフローサイトメーター又は C y t o F L E X 又は D x F l e x フローサイトメーターなどの市販の機械を使用して μ F C M に供される。 μ F C M 分析から得られた生データは、M A T L A B 、 R 、又は P y t h o n で書かれたアルゴリズムを使用して抽出することができ、行として個々の粒子として、並びに列として光散乱及び蛍光強度として編成することができる。各粒子が記録された時間は別個の列に表すことができる。

【0031】

各粒子表現型についての光散乱 / 蛍光強度についての最小及び最大カットオフは、異なる光散乱 / 蛍光強度の範囲についての異なるカットオフの範囲を使用すること、及び以前に取得された患者データからの曲線下で最も高い受信者操作特性を提供するカットオフを識別することを含む、最適化実験によって決定することができる。

【0032】

各粒子表現型における粒子の数は、同様の光散乱及びマーカー強度を有する粒子をグループ化するカスタム処理スクリプトを使用して決定することができる。粒子表現型濃度は、粒子表現型数、試料を実施した時間の長さ、 μ F C M の試料流速、及び試料の希釈係数に基づいて計算される。患者が1つより多い μ F C M データファイル (すなわち、複数の

10

20

30

40

50

複製)を有する場合、粒子表現型濃度は、全ての複製 μ F C M の日付のファイルにわたって平均化され得る。

【0033】

また、各患者における各粒子についてのバイオマーカー陽性状態を識別することによって動的蛍光閾値化アルゴリズム (Dynamic Fluorescence Thresholding algorithm) を使用して試料中の粒子表現型濃度を計算することも可能である。各患者試料についての粒子がバイオマーカーについて陽性であるかどうかを決定するために、カーネル密度推定 (KDE) 関数が、単一の患者試料からの単一のプロブシグナルのヒストグラムプロットに適用される。蛍光値 F_1 は、KDE プロットの左側付近の最大ピークである、バイオマーカー陰性粒子集団についての KDE プロットにおける Y 軸上の最も高い領域 (粒子密度) と交差するヒストグラムプロットの X 軸上の領域 (蛍光強度) として識別される。次に、KDE 曲線の勾配が、 F_1 からの多くの異なるより高いシグナル強度について計算される。第2の蛍光値 F_2 は、勾配が最も負である場所から識別され、これは陰性粒子集団の右側の下半分である。バイオマーカー陽性粒子及びバイオマーカー陰性粒子を分離する蛍光強度値 (F_s) は、 $F_1 + (2 * (F_2 - F_1)) + F_3$ (式中、 F_3 は、バイオマーカー陰性粒子がバイオマーカー陽性粒子として分類されないことを保証するのに役立つように加えられる小さな任意の蛍光強度値である) に等しい。 F_s を上回る又は下回る蛍光強度を有する粒子は、それぞれ、バイオマーカーについて陽性又は陰性である。各患者についての全ての粒子が各バイオマーカーについて陽性/陰性として分類されると、粒径を推定するために使用される対数変換光散乱シグナルは、任意の数のグループにビンニングされる。最後に、粒子表現型は、バイオマーカー状態 (陰性/陽性) 及び光散乱ビンの全ての可能な組合せに基づいて作成される。

10

20

【0034】

上記で収集されたデータから、機械学習のためのデータセットが構築される。表は、全ての患者についての粒子表現型濃度を用いて作成することができる。1回の反復において、行は患者を表すことができ、列は粒子表現型濃度を表す。しかしながら、データは逆の様式で、又は何らかの他の表形式で表すことができることは当業者には明らかであろう。

【0035】

臨床的に関連するデータは、データセットが作成される方法に応じて、追加の列又は行として表に追加することができる。このデータは、機械学習についての付加的特徴として使用することができるか (例えば、 μ F C M データを用いた P S A は臨床的に有意な前立腺がんを有する人のより良い予測を提供するか?)、又は機械学習アルゴリズムが予測する必要があるラベルとして使用することができる (例えば、どの患者が臨床的に有意な前立腺がんを有するかの識別)。

30

【0036】

データセットが作成されると、臨床データを用いて又は用いずに μ F C M から臨床状態を予測することができる最適化された機械学習モデルが生成される。機械学習のために使用されるソフトウェアには、R、MATLAB、KNIME、及び python が含まれ得るが、これらに限定されない。機械学習モデルには、単一決定木、サポートベクターマシン、k 近傍法、線形回帰、ロジスティック回帰、判別分析、ランダムフォレスト、ニューラルネットワーク、及び X G B o o s t が含まれ得る。臨床状態を予測するために最も高い R O C A U C を提供するアルゴリズムは、更に最適化することができる。全ての機械学習アルゴリズムは、データを5つの別個のグループに分割することを含む5倍交差検証を使用して分析される。モデルは5つのグループのうちの4つを使用して作成することができ、モデル精度はホールドアウトされたグループに対して決定することができる。グループはシャッフルされ、このプロセスは、全ての患者がホールドアウトされたグループで1回使用されるように更に4回反復される。これにより、モデルを作成するために使用されなかったデータに対してモデル精度が決定されることが保証される。

40

【0037】

機械学習アルゴリズム最適化は、再帰的特徴量削減を使用してモデル作成前にどの μ F

50

C M / 臨床的特徴を保持 / 除去すべきかを識別することを含む。このアルゴリズムは全てのデータを使用してモデルから最も重要な特徴を識別する（例えば、Rにおけるxgb、重要度機能を使用したX G B o o s t 特徴重要度）。上位10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%の最も重要な特徴を含む複数のデータセットが作成され、5倍交差検証を使用して最も高いR O C A U Cを提供するデータセットは、最終的な機械学習モデルのために保持される特徴を含む。遺伝的アルゴリズム及び焼きなまし法を含む他の特徴選択アルゴリズムもまた、このステップで 사용할 ことができる。

【0038】

特徴選択の後、機械学習アルゴリズムの調整可能なパラメーターは、グリッドサーチによって最適化することができる。これは、各々の調整可能なアルゴリズムパラメーター（例えば、「nrounds」：100、200、及び300、並びに「max_depth」：3、4、及び5などのX G B o o s t パラメーター）についての複数の値を提供し、可能なパラメーター値のあらゆる組合せを試験することを含む。5倍交差検証を使用して最も高いR O C A U Cを提供するパラメーター値のセットが、最終的な機械学習モデルのために使用される。

10

【0039】

最終的な機械学習モデル最適化は、全てのモデルからの予測を平均化することによって、多く（典型的には100以上）のモデルと一緒にアンサンブルすることを含む。全てのモデルは上記の最適化された特徴及びパラメーターを使用するが、各モデルは、モデル作成のために、患者のわずかに異なるコホート（例えば、患者の無作為に選択した80%）を使用する。これにより、各モデルが固有になり、全てのモデルの予測の平均が、次いで完全なデータセットを有する単一のモデルを使用して、臨床状態のより正確且つ安定した予測を提供する。最終的に最適化されたアンサンブルモデルは将来の使用のためにコンピュータ上に保存される。

20

【0040】

最終的な機械学習モデルは、新しい患者の臨床状態を予測するために使用することができる。臨床データを伴う又は伴わない粒子表現型濃度を含む新しい患者データは、患者が特定の臨床状態を有する確率を予測するための最終的な機械学習モデルについての入力として使用することができる。

【0041】

上記の方法を使用して、以前に臨床的に有意な前立腺がんと診断された患者が、疾患と最も一般的に関連する粒子表現型 / バイオマーカーを決定するために研究された。これらの粒子表現型 / バイオマーカーを、図12、13、14、15及び16における概念の更なる証拠と共に表1に示す。

30

【表 1 - 1】

表1:臨床的に有意な前立腺がんに関連するバイオマーカー

遺伝子	タンパク質
SLC45A3	溶質キャリア45メンバー3又はプロステイン
FOLH1	PSMA、前立腺特異的膜抗原
GHSR	グレリン、成長ホルモン分泌促進因子受容体(GHSR)
JAG1	jagged 1
CDH11	カドヘリン11、2型、OB-カドヘリン(骨芽細胞)
SELE	セレクチンE
MERTK	MERがん原遺伝子、チロシンキナーゼ
GABRA2	ガンマーアミノ酪酸(GABA)A受容体、アルファ2
TNFRSF10 B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b
ABCC5	ATP結合カセット、サブファミリーC(CFTR/MRP)、メンバー5
LETMD1	LETM1ドメイン含有1
CADM1	細胞接着分子1

10

20

30

【表 1 - 2】

EMP2	上皮膜タンパク質2	
ENTPD2	エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ2	
ABCB11	ATP結合カセット、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバー11	
IL17RA	インターロイキン17受容体A	
RNF122	ringフィンガータンパク質122	10
ST14	腫瘍形成抑制14(結腸癌)	
SYPL1	シナプトフィジン様1	
LDLRAD3	低密度リポタンパク質受容体クラスAドメイン含有3	
HTR1F	5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)受容体1F、Gタンパク質共役型	20
EMP1	上皮膜タンパク質1	
TRPV6	一過性受容器電位カチオンチャネル、スーパーファミリーV、メンバー6	
KCNN2	カリウムチャネル、カルシウム活性化中間体/小コンダクタンスサブファミリーN アルファ、メンバー2	
CLCN6	クロライドチャネル、電圧感度6	30
SLC17A3	溶質キャリアファミリー17(有機アニオン輸送体)、メンバー3	
SLC44A4	溶質キャリアファミリー44、メンバー4	
SLC22A23	溶質キャリアファミリー22、メンバー23	
C9orf91	第9染色体オープンリーディングフレーム91	
RDH10	レチノールデヒドロゲナーゼ10(オールトランス)	40
PNKD	発作性非運動起源性ジスキネジア	

【表 1 - 3】

TMEM229	膜貫通タンパク質229B
	糖
	ポリシアル酸(polySA)
	神経細胞接着分子(N-CAM) l)

10

【0042】

「実例」

種々のサイズの異なるEVに起因して、目的は μ FCMデータを多くの異なるROI（ここで各ROIは異なるEVの濃度を表す）に分離すること、及び臨床状態を予測するためにROIデータに関する機械学習を使用することであった（図1）。このようなモデルを作成する前に、まず、どの臨床状態を μ FCMデータが最適に予測することができるかを識別することが重要であった。自動分析スクリプトを使用して、PSMA及びグレリンプローブに関連する10の異なる臨床状態を予測するための μ FCMデータのAUCマップを作成した。

20

【0043】

LALS-PSMA、LALS-グレリン、及びPSMA-グレリンAUCマップ内のAUCのうちの最も高い10%を平均すると、PCaグレードグループ5及び4+の予測が、最も高い平均AUCを生じた（図2a）。興味深いことに、3つ全ての二変量AUCマップは、グレードグループ5PCaの予測に関して0.8を超えるAUCを有するLALS-PSMAと共にこれらの高グレードPCaの予測に関して0.7を上回る上位10%のAUCを提供した。LALS-PSMA AUCマップは、異なるPCaグレードグループを比較した場合に興味深いパターンシフトを示した（図2b）。LALSを使用して粒径を推定すると、グレードグループ1+の予測は、0.5を超えるAUCを有する比較的小さなPSMA陽性粒子を示し、全体的にこれらのROIにおける粒子濃度が、グレードグループ1+PCaを有する患者において、より高いことを意味し、一方、より大きなPSMA陽性粒子は主に0.5を下回るAUCを示し、全体的にこれらのROIにおける粒子濃度が、グレードグループ1+PCaを有する患者において、より低いことを意味する。より高いグレードグループについてのAUCマップは、より大きなPSMA陽性粒子に対して0.8超のAUC及び多くのより小さなPSMA陽性粒子に対して約0.3のAUCを有するグレードグループ5PCaでこの表現型の漸進的逆転を実証した。この表現型逆転はグレードグループ3+AUCマップでかなり目立つようになった。以前の臨床試験では、前立腺全摘出術を受けたグレードグループ3のPCa患者は、0.5以下の10年の無再発進行であり、グレードグループ2のPCaを有するこれらの患者についての0.75超より有意に低かった（28）。このことにより、グレードグループ3のPCaを有する男性のほとんどは、原発腫瘍の外科的切除によってPCaの患者が治癒しないため、診断時に転移性疾患を有することが示唆される。理論によって制限されないが、より高いグレードのPCa患者におけるより大きなPSMA陽性粒子のより多くの存在量は、局所腫瘍細胞からのより大きなEV（ $>300\text{nm}$ ）が血管内への侵入を困難にするので、循環転移細胞に部分的に起因する可能性がある。

30

40

【0044】

エネルギー及びグルコース代謝におけるグレリンの役割（Churm Rら、Obes Rev 18（2）：140～148頁、2017年）に起因して、糖尿病を予測するためのAUCマップを作成した。様々な異なるサイズのグレリン陽性粒子は0.7付近のAUCを示したことから、糖尿病男性はグレリン受容体のレベルの上昇を伴うEVを有す

50

ることが示唆される（図 2 c）。

【 0 0 4 5 】

L A L S - P S M A データを使用して、P S A、腫瘍ステージ、及び体重についての相関マップを作成した（図 2 d）。P S M A に対してわずかに陽性の比較的大きな粒子は P S A と最も高い正の相関を実証したが、強い P S M A 陽性である大きな粒子は腫瘍ステージと最もよく相関した。このような相関は驚くことではない。なぜなら、1) 前立腺 P S M A 発現が、診断時に P S A と相関すると示されており（K a s p e r z y k J L ら、C a n c e r E p i d e m i o l B i o m a r k e r s P r e v 2 2 (1 2) : 2 3 5 4 ~ 6 3 頁、2 0 1 3 年）、2) より高いグレードの腫瘍ほど、より広がる可能性が高く、より高いグレードの A U C マップと腫瘍ステージ相関マップとの間の類似性が説明されるからである。

10

【 0 0 4 6 】

A U C / 相関マップの結果を考慮して、 μ F C M データを使用して、グレードグループ 3 + と定義された臨床的に有意な P C a を予測した。なぜなら、これらの患者はグレードグループ 2 及びより低い P C a 患者よりも顕著に悪化した転帰を実証するからである。

【 0 0 4 7 】

従来の分析のベンチマークを提供するために手動ゲーティングによって μ F C M データを分析した。特定の粒子集団の周囲に手動ゲートを作成することは重要なタスクである。なぜなら、異なる粒子集団が異なる患者散布図上に存在し、集団位置においていくらかのわずかなシフトを伴うからである（図 3 a、b、c）。簡略化のために、全てのマーカー陽性粒子をグループ化したゲートを作成した。非臨床的に有意な P C a と比較した場合、臨床的に有意な P C a ではグレリン陽性粒子の濃度のみが 2 . 1 倍有意に高かった（ $p < 0 . 0 5$ 、図 3 d）。臨床的に有意な P C a を予測するための P S M A -、グレリン -、及び P S M A / グレリン陽性粒子濃度の A U C は全て 0 . 6 を下回った（図 3 e）。これらの低い A U C は、0 . 5 を上回る及び下回る A U C を有する粒子を取り囲むゲートを示す A U C マップによって説明することができる（図 3 a、b、c）。

20

【 0 0 4 8 】

臨床的に有意及び非臨床的に有意な粒子の両方の v i S N E プロットは、従来の散布図で見られたよりも多くの粒子集団を一緒に見出した（図 4 a）。K 平均、期待値最大化ガウス混合モデル、及び高速探索 / 密度ピークアルゴリズムを使用して粒子をクラスター化し、最後のアルゴリズムは不規則な形状を有する大きなクラスターを維持することができる唯一のものであった（図 4 b 及び図 8）。2 つのクラスターは、臨床的に有意な P C a について 0 . 8 超のクラスター純度を達成したことから、これらの粒子集団は臨床的に有意な P C a 患者内でより高いレベルにあることが示唆される（図 4 c）。これらの結果は臨床的に利用するのに有望であるように見えるが、v i S N E の再現性のない性質は全てのデータを同時に分析することを必要とする。v i S N E は 1 0 0 , 0 0 0 個までの事象しか扱うことができないため、2 1 5 人の患者コホートにおける粒子の 9 9 . 9 9 % 超は分析から除外される。

30

【 0 0 4 9 】

μ F C M データからの臨床的に有意な P C a の予測を最適化するために、R O I からの粒子濃度を、2 4 の異なる機械学習アルゴリズムのための訓練データとして使用した。L A L S - P S M A、L A L S - グレリン、及び P S M A - グレリンデータセットでは、X G B o o s t が 0 . 6 1、0 . 6 2、及び 0 . 6 6 において最も高い A U C を提供した（図 5 a）。その後の全ての分析は、X G B o o s t と共に P S M A - グレリンデータセットを使用した。

40

【 0 0 5 0 】

決定木ベースのモデルについて予想されるように、 μ F C M データの単調変換は X G B o o s t モデル性能を改善しなかった（図 9）。X G B o o s t モデルの精度に対して最も重要な R O I を示す X G B o o s t 可変ゲインマップは、多くの異なる粒子集団が X G B o o s t モデルにとって重要であることを示した（図 1 0 a）。比較的高い可変ゲイン

50

を有する R O I は、0.5 を大きく上回る及び下回る A U C マップ上の領域とほとんど重なったことにより、臨床的に有意な P C a 患者において、より高い及びより低い濃度を有する粒子集団がこのモデルにとって重要であることが示唆される (図 10 b)。

【0051】

ビニングストラテジーを、32 を上回る又は下回るように変化させると、A U C が減少したことにより、この解像度のレベルが臨床的に有意な P C a を予測するのに好ましいことが示唆される。ますます大きな X G B o o s t モデルのアンサンブルを作成することにより、モデルの性能が向上した (図 5 c)。単一の X G B o o s t モデルと比較して、100 個のモデルのアンサンブルは A U C において 5 % の改善をもたらし、モデル変動性を 95 % 低下させた。より大きな X G B o o s t アンサンブルはより大きなモデル性能のために作られ得るが、精度におけるこのような小さな利点はより大きな処理 / メモリの要件も有する。グリッドサーチ X G B o o s t パラメーター及び再帰的特徴量削減は、X G B o o s t A U C をそれぞれ 3 % 及び 5 % 増加させた (図 5 d)。グリッドサーチ、特徴選択、アンサンブルを組み合わせると、X G B o o s t A U C が 12 % 有意に増加したことから ($p < 0.05$)、モデル最適化技法の間の相加的相互作用が示唆される。P S M A - グレリンデータセットの C i t r u s 及び手動ゲーティング分析により、本発明者の 0.75 において最適化した X G B o o s t モデルと比較して、それぞれ 0.52 及び 0.59 の有意に低い A U C が生じた ($p < 0.05$)。この最適化した X G B o o s t モデルはまた、臨床的に有意な P C a 患者と非臨床的に有意な P C a 患者との間で有意に異なる唯一の臨床的特徴である P S A より性能が優れていた ($p = 0.0015$ 、表 1)。

【0052】

この最適化したモデルを臨床的に有意な P C a を予測するための S O C と比較するために、本発明者の μ F C M ベースの X G B o o s t モデル予測を伴って又は伴わずに S O C を使用してロジスティック回帰モデルを作成した。S O C 及び μ F C M モデルからの患者予測のウォーターフォールプロットは、0.07332 のカットオフ確率を使用した場合、89 % の感度及び 49 % の特異性をもたらした (図 6 a 及び表 1)。 μ F C M 予測に S O C を加えると、A U C は 0.76 にわずかに増加し、これは S O C 単独からの 0.68 の A U C よりも有意に大きく ($p < 0.05$)、 μ F C M ベースの X G B o o s t モデルの臨床的価値が実証された (図 6 b)。

【表 2】

表2:PCaグレードグループによる患者特性

PCaグレードグループ による患者特性	グレードグループ ≤2	グレードグループ ≥3	p値	ROC AUC 平均(CI)	カットオフ ($\geq$)	感度 %(CI)	特異性 %(CI)	PPV %(CI)	NPV %(CI)
患者、n	188	27							
人種、n(白人%)	3(1.6)	1(3.7)	0.42	0.51(0.39-0.63)	-	3.7(0.094-19)	98(95-100)	25(0.63-81)	88(82-92)
PCaの家族歴、n(%)	53(29)	6(22)	0.65	0.53(0.42-0.65)	-	22(8.6-42)	71(64-78)	10(3.8-21)	86(80-91)
以前の陰性生検、n(%)	20(11)	1(3.7)	0.49	0.54(0.42-0.65)	-	3.7(0.094-19)	89(84-93)	4.8(0.12-24)	86(81-91)
DRE、n(異常%)	48(26)	10(37)	0.25	0.56(0.44-0.68)	-	37(19-58)	74(67-80)	17(8.6-29)	89(83-93)
年齢、yr、平均(CI)	62(60-63)	65(61-68)	0.2	0.58(0.45-0.70)	53.95	89(71-98)	14(9.7-20)	13(8.5-19)	90(73-98)
PSA、ng/ml、平均(CI)	7.4(6.2-8.7)	16(3.8-28)	0.0015	0.69(0.58-0.79)	5.25	89(71-98)	42(35-49)	18(12-26)	96(90-99)
SOCスコア	12(11-13)	17(11-23)	0.0023	0.68(0.57-0.79)	9.472	89(71-98)	30(24-37)	15(10-22)	95(86-99)
フローアッセイスコア、平均(CI)	35(34-36)	40(37-42)	<0.0001	0.75(0.66-0.84)	32.59	89(71-98)	48(41-56)	20(13-28)	97(91-99)
フローアッセイ+SOCスコア、平均(CI)	11(9-12)	24(16-32)	<0.0001	0.76(0.67-0.86)	7.332	89(71-98)	49(42-56)	20(13-28)	97(91-99)

【0053】

DRE、直腸指診；SOC、標準治療；CI、95%信頼区間；ROC AUC、受信者操作特性曲線下面積；PPV、陽性予測値；NPV、陰性予測値；

【0054】

215人の患者コホートを更に分析すると、前立腺肥大($>40\text{ cm}^3$ (40 cc))を有する男性はPCaを有する確率が有意に低いことが観察され、このことは、正常な大きさの前立腺を有する男性と比較して、前立腺肥大を有する、より多くのパーセンテージの男性が不必要な生検を受けていることを意味する。現在の臨床診療に基づくと、男性は主に高いPSAレベル及び/又は異常DREのために前立腺生検を受ける。異常DREを有する患者の割合は、正常な前立腺を有する男性と前立腺肥大を有する男性との間で同様であったが(図6c)、PSAレベルは前立腺肥大を有する男性において有意に高く($p<0.05$ 、図6d)、PSAの上昇が不必要な生検の数の増加の原因であることが示唆される。PSA密度(前立腺体積で除算したPSA)を使用してPSAレベルを正規化することは理想的でないことがある。なぜなら、PSA密度は前立腺肥大を有する男性にお

10

20

30

40

50

いて有意に低かったからである（図 6 e）。前立腺肥大を有する男性に関して、臨床的に有意な P C a についての S O C + μ F C M 確率スコアは、非臨床的に有意な P C a 患者と臨床的に有意な P C a 患者との間で有意に異なり（ $p < 0.0005$ 、図 6 f）、表 2 における以前に定義された確率カットオフ閾値を使用すると、臨床的に有意な P C a 及び非臨床的に有意な P C a を有する患者のそれぞれ 100% 及び 49% が生検を推奨され、不必要な生検の約半分が排除される一方で、臨床的に有意な P C a を検出するための感度は依然として 100% を維持する（図 6 g）。

【0055】

A．患者特性及び試料取得

生検前の血漿試料は、A l b e r t a P r o s t a t e C a n c e r R e s e a r c h I n i t i a t i v e (A P C a R I) バイオレポジトリから取得した。組み入れ基準は、(1) 前立腺の懸念のためにアルバータ州の泌尿器科クリニックを紹介され、前立腺生検を受ける予定であり、且つ(2) 前立腺異常の診断又は処置のために経尿道的前立腺手術を受けたことがある、以前に前立腺がんとは診断されていない成人男性であった。全ての患者には書面によるインフォームドコンセントが提供され、この研究は、P r o s t a t e C a n c e r C e n t r e (C a l g a r y , A l b e r t a , カナダ) 及び N o r t h e r n A l b e r t a U r o l o g y C e n t r e (E d m o n t o n , A l b e r t a , カナダ) における科学倫理委員会によって承認された。患者は 2014 年 6 月から 2015 年 9 月の間に登録された。経直腸的超音波ガイド下の前立腺生検を、患者当たり 12 コアの中央値で実施し、各病院の S O P に従って評価した。患者ケアのために臨床現場に検査結果を提供しなかった。患者試料を取得し、それらを用いて試験を実施した検査技師は、患者特性について盲検化された。血液を採取し、施設の S O P に従って血漿を採取するために処理し、治療群から - 80 の冷凍庫までの時間は 2 時間以下であった。特に、血液試料は臨床グレードのパキュテナーで採取した。血漿調製のために、試料を 2 段階遠心分離プロセスにかけた。最初に、他の血液成分から血漿の分離をもたらすために、標準的な $1300 \times g$ を 10 分間、続いて、血小板をペレット化するために 2 回目の $1300 \times g \times 10$ 分間の遠心分離を行う。血清チューブに採取した血液を、最初に 15 ~ 30 分間凝固させ、次いで単一の $1300 \times g \times 10$ 分間の遠心分離ステップを実施する。

【0056】

B． μ F C M アッセイ

凍結血漿試料を解凍し、 $16,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して大きな残屑及び血小板粒子を除去し、 $400 \mu g / mL$ の J 5 9 1 抗体及び 1 / 50 最終希釈の二次 Q d o t 5 6 5 コンジュゲートロバ抗マウス I g G 抗体とインキュベートした。また、試料を、グレリンの最初の 18 アミノ酸を含有する 0.025 mM のグレリン C y 5 プローブとインキュベートした。プローブインキュベーションの 30 分後、試料を二重濾過 ($0.22 \mu m$) したリン酸緩衝生理食塩水中で 100 倍希釈し、 $3.01 \mu L / 分$ の流速を使用して A p o g e e A 50 マイクロフローサイトメーターで分析した。試料は、2 分間まで、又は 5,000,000 の事象が記録されるまでのいずれか早い方まで実施した。各患者からの血漿は 3 連で実施した。 μ F C M データの従来の手動ゲーティング分析は、H i s t o g r a m バージョン 255.0.0.80 ソフトウェア (A p o g e e F l o w S y s t e m s) を使用して実施した。

【0057】

C． μ F C M データの処理

患者 μ F C M f c s ファイルを、カスタム M A T L A B (バージョン R 2017a) スクリプトを使用して分析した。各 f c s ファイル内で、全てのチャンネルについてのシグナル強度を対数変換し、同様の光学特性を有する粒子を、別段に記載されない限り、光学特性当たり 32 ビンを使用してビンニングした。粒子濃度の 3 つの異なる二変量ヒストグラムを作成した：1) 大角度光散乱 (L A L S) 及び P S M A 染色強度、2) L A L S 及びグレリンプローブ染色強度、並びに 3) P S M A 及びグレリンプローブ染色強度。各二変

量ヒストグラムは1024のROI(32×32ピン)を含んだ。各ROIにおける粒子濃度を患者当たり3回の反復にわたって平均した。

【0058】

D. μ FCMデータを用いた臨床的特徴の予測及び関連付け

μ FCMデータを使用して、バイナリ臨床的特徴(例えば、糖尿病を有する又は有さない患者、正常又は異常な直腸指診)を予測し、カスタムMATLABスクリプトを使用して順序又は区間の臨床的特徴(例えば、それぞれ腫瘍ステージ又はPSA)と関連付けた。自動分析に必要なコードを最小限にするために、 μ FCMデータが各臨床的特徴についてどのように分析されるべきかを記述するエクセル命令ファイルを作成した。命令ファイル内では、各臨床的特徴は別個の列であり、各行は特定の情報又は命令を含んだ。特定の情報は、データベース内の臨床的特徴の位置、各臨床的特徴に関するデータの種類(バイナリ又は順序/区間)、及びその臨床的特徴に関する欠測データを表す値が含まれた。命令は主に、特徴をバイナリ化する場合の値の閾値化、グリーソンスコアからのPCaグレードグループの導出、及び出生日から年齢の決定を含む、臨床的特徴がどのように変換されるべきかを含んだ。臨床的特徴についてデータが欠落している患者は、その臨床的特徴について分析から除外した。

10

【0059】

臨床的特徴データを、全ての患者についてのデータベースから取り出し、変換してから、各ROIについての μ FCM粒子濃度データを使用して臨床的特徴を予測し又は関連付けた。バイナリ臨床的特徴について、受信者操作特性(ROC)曲線下面積(AUC)値を各ROIについて決定し、AUCマップを、LALS-PSMA、LALS-グレリン、及びPSMA-グレリンを含む各二変量データセットについて作成した。順序/区間の臨床的特徴について、ピアソン相関係数を各ROIについて決定し、相関マップを各二変量データセットについて作成した。各AUCマップにおけるAUC値の最も高い10%を平均化し、これらの値を臨床的特徴にわたって比較した。

20

【0060】

E. μ FCMデータのviSNE分析

MATLAB(25)上で実行されるCytバージョン2.0ソフトウェアを使用してviSNEプロットを作成した。各患者の3連のfcsファイルを1つのfcsファイルに連結させた。2つの新たなfcsファイルを作成した: 1つはグレードグループ2及びより低いPCa(非臨床的に有意なPCa)を有する患者からの事象を使用し、もう1つはグレードグループ3及びより高いPCa(臨床的に有意なPCa)を有する患者からの事象を使用した。これらの2つのfcsファイルは合計約100,000の事象を有し、それらのグループ内の各患者からの事象の数は等しかった。Cytソフトウェアを用いて、これらの2つのfcsファイルの両方からの30,000の事象を無作為にサブサンプリングし、マージして、LALS、PSMA、及びグレリンチャンネルを使用したbh-SNE変換を使用してviSNEで可視化し、k平均及び期待値最大化ガウス混合モデルアルゴリズムでクラスター化した60,000の事象を作成した。viSNEの結果をCytからエクスポートし、また、MatlabについてのDensityClust関数(Rodriguez A及びLai O A、Science 344(6191): 1492~6頁、2014年)を使用した高速検索/密度ピークアルゴリズムを使用してクラスター化した。事象と対になったユークリッド距離は、pdist2関数を使用して決定した。paraSet関数を使用してデルタ及びローパラメーターを設定するために、近傍変数パーセントを2%に設定し、ガウスカーネルを使用した。1.5から5の間のデルタ値及び200から1900の間のロー値を使用してクラスター中心を選択した。全てのクラスタリングアルゴリズムについて、60,000の事象にわたって248のクラスターを作成した。臨床的に有意なPCaについてのクラスター純度を、各クラスター内の事象の総数で除算した臨床的に有意なPCa事象の数と定義した。少なくとも60個の粒子(全粒子の0.1%)を有するクラスターのみを分析した。

30

40

【0061】

50

F．臨床的に重要なPCaを予測するための機械学習モデルの最適化

MATLABの分類学習アプリを使用して、23の異なる機械学習アルゴリズムを試験し、粒子濃度の μ FCMデータを使用して臨床的に有意なPCaを予測した。これらのアルゴリズムには、個別/バギング/ブースト決定木、線形/二次/三次/ガウスサポートベクターマシン、ロジスティック回帰、線形/二次/部分空間判別分析、及びk近傍法が含まれた。XGBoostもまた、R(バージョン3.3.3)における「xgboost」パッケージを使用して試験した。全ての機械学習アルゴリズムはデフォルト設定を使用し、5倍交差検証を少なくとも10回反復し、反復の間に患者を無作為化した。

【0062】

次いで最も高いAUCを有する機械学習アルゴリズムを、1) μ FCMデータを処理するときに2、4、8、16、32、64、及び128ピンを比較すること、2) 同じ機械学習アルゴリズムを使用するが、訓練データとして患者の異なるサブセットを無作為に選択して、3、6、12、25、50、及び100個のモデルのアンサンブルを作成し、モデル予測を平均化すること、3) R「caret」パッケージと共に再帰的特徴量削減を使用して μ FCM ROIの最適なサブセットを選択すること、並びに4) グリッドサーチアルゴリズムパラメーター(XGBoost: `nrounds = 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400`; `max_depth = 3, 4, 5, 6`; `イータ = 0.01, 0.1`; `ガンマ = 0`; `colsample_bytree = 1`; `min_child_weight = 1`; `subsampling = 1`)によって最適化した。最も高いAUCを提供したバギング/アンサンブル/特徴/パラメーターと一緒に使用して、臨床的に有意なPCaを予測するための最終モデルを作成した。このモデルを、Histogramソフトウェアを使用して手動ゲーティング分析と比較し、R.Citrusを使用するデフォルト設定を用いたCitrusが、階層的クラスタリング及びlasso正規化ロジスティック回帰及び最短収縮重心法(nearest shrunken centroid method)(Bruggner RVら、Proc Natl Acad Sci USA 111(26): E2770~7頁、2014年)を使用することによってフローサイトメトリーデータから臨床状態を予測する。

【0063】

PSA、年齢、DRE、PCaの家族歴、以前の陰性生検、及び人種(黒人 = 1、その他の人種 = 0)を含む、標準治療(SOC)の臨床的特徴を最終的な μ FCMモデル確率予測に組み込むために、これらの特徴の全てを使用してロジスティック回帰モデルを作成した。このモデルを、 μ FCMデータを使用していない同様のロジスティック回帰モデルと比較した。

【0064】

G．統計解析

別段に記載されない限り、エラーバーを有するバー/ドットプロットは平均 $\pm$ 標準誤差を表す。2つのグループを比較する場合、対応のない両側t検定を区間データのために使用し、フィッシャーの正確確率検定を分割表のために使用した。テューキーの多重比較検定を使用して3以上のグループを比較するためにone-way ANOVAを使用した。Rにおける「pROC」パッケージを使用してDeLong法によってROC曲線を比較した。可能な場合、ROCカットオフ値を、約90%の感度を使用して決定し、得られた特異性及び陽性/陰性予測値を、GraphPad Prismバージョン6.01ソフトウェアを使用して決定した。

【0065】

マイクロフローサイトメトリーを使用して超音波処理した試料からEVを分析することによる循環腫瘍細胞検出のためのアッセイの開発

図10に示すように、アッセイ最適化のために、培地中の100,000個のHeLa-GFP細胞をインキュベートし、様々な量のマイクロバブル及び超音波に曝露した。超音波処理の前後に培地を蛍光EVについて分析した。アッセイ感度を試験するために、パルミトイル化したGFPを発現する0、1、5、10、100、及び1,000個のPC

3 前立腺がん細胞を、1,000,000個のHT1080細胞（バックグラウンド）と混合し、マイクロバブルにより超音波処理した。超音波処理前／後にマイクロフローサイトメトリーによって培地を分析した。

【0066】

このアッセイは、従来のフローサイトメトリーより高い理論的SNRを有する単一のがん細胞を検出する。15Mpa以上の圧力の超音波は最大EVを生成する。超音波媒介EV放出は超音波サイクル及びマイクロバブル濃度と共に直線的に増加する。

【0067】

光散乱シグナル及び蛍光シグナルを標準化するためのアルゴリズムの開発

図11に示すように、異なる電圧（+10Vで300～400V）下で校正ビーズから光散乱シグナルを記録した。光散乱ヒストグラムを作成し、350Vで実施したビーズに適合するように直線的にシフトした。各ビーズのヒストグラムピークを、350Vで実施したビーズの同じピークと適合するようにシフトした（非線形シフト）。

10

【0068】

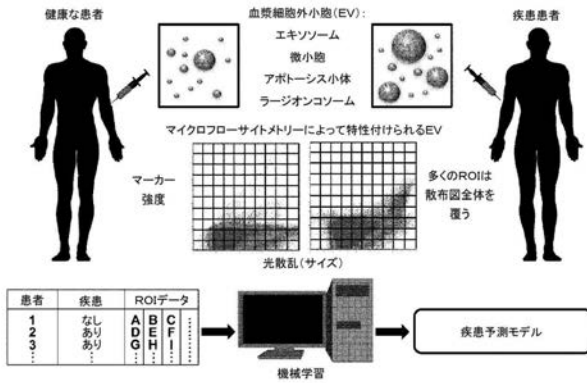
281人の患者からの血漿試料を前立腺特異的膜抗原で染色した。データを、固定した16×16ピニング（LALS対PSMA）を用いて、又は動的蛍光閾値化を使用してPSMAについて陽性若しくは陰性の粒子を識別し、更にPSMA陽性の程度に基づいてグループを分離するアルゴリズムを使用して処理した。XGBboostモデルを作成して侵襲性前立腺がん（グリーソン4+3及びそれ以上）を有する患者を予測した。モデルを、修正した蛍光（×0.125～256）と共に同じデータ上で使用し、AUCを計算した。

20

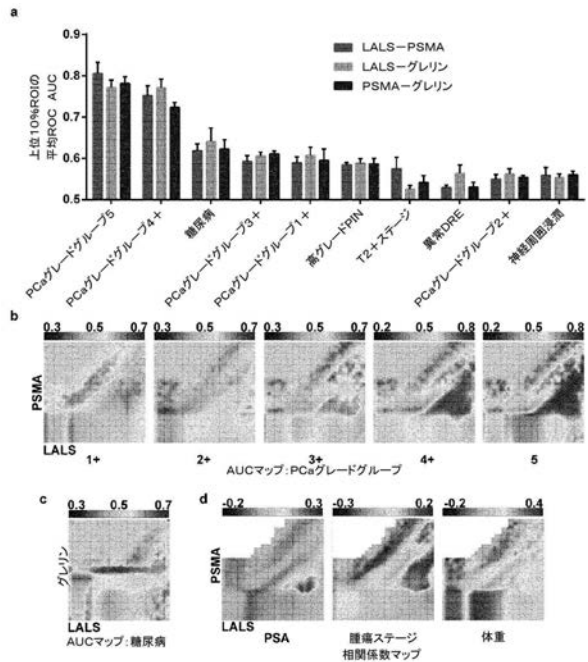
【0069】

非線形光散乱校正アルゴリズムは試料中の光散乱変動を補正するのに役立ち得る。動的蛍光閾値を用いてデータを処理することは、シフトしたデータに対するモデルの信頼性を保証するのに役立つ。これらの標準化アルゴリズムは、多くの診療所において使用される場合、経時的に臨床アッセイ予測を改善する。

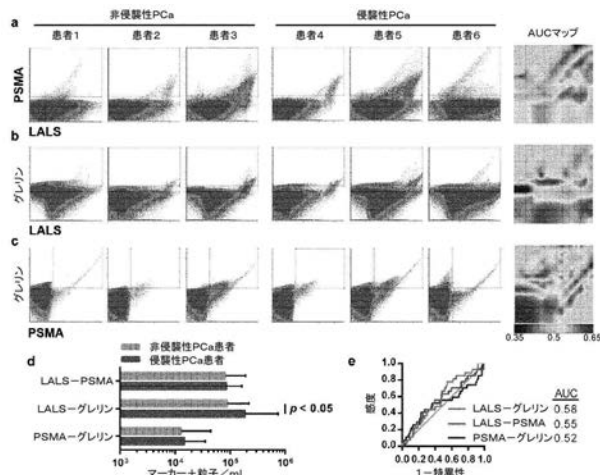
【図 1】



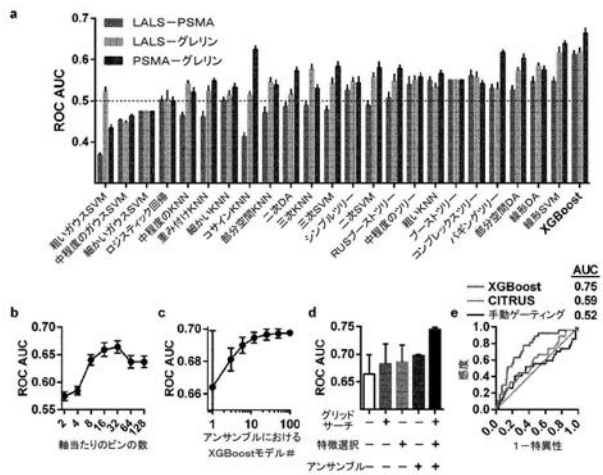
【図 2】



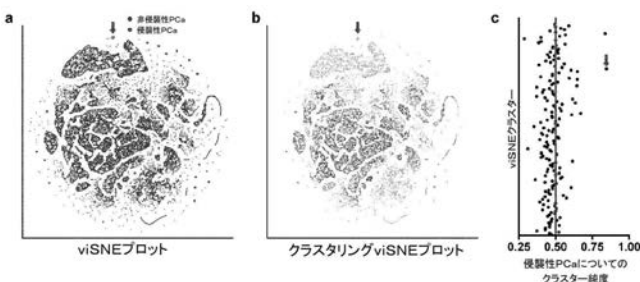
【図 3】



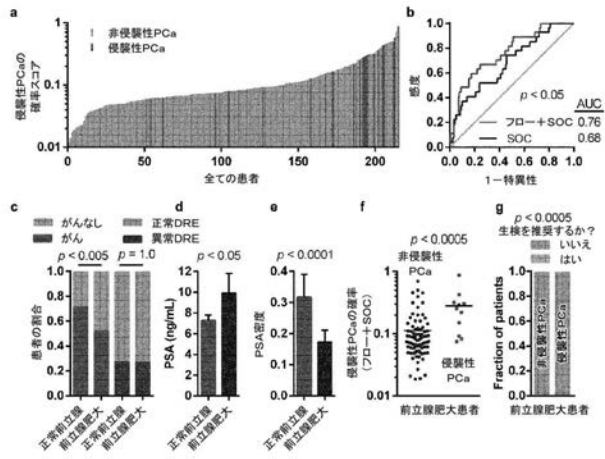
【図 5】



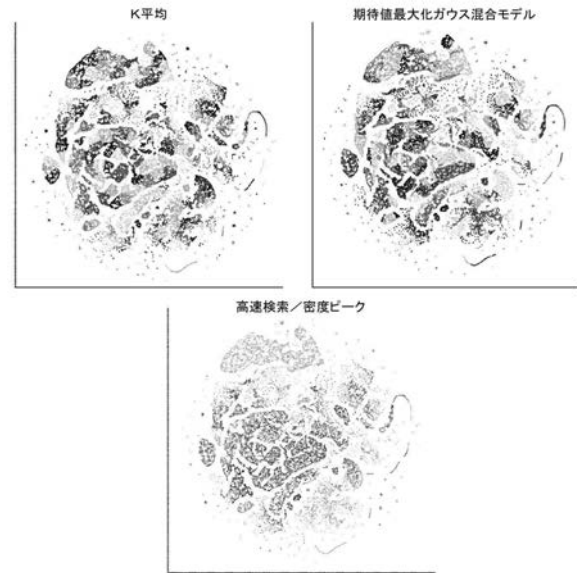
【図 4】



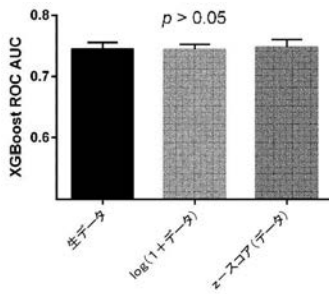
【図 6】



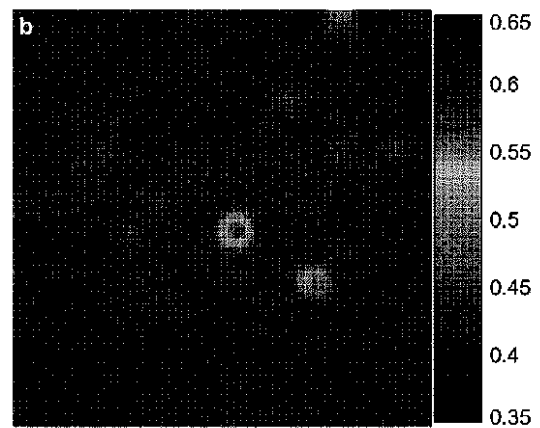
【図 7】



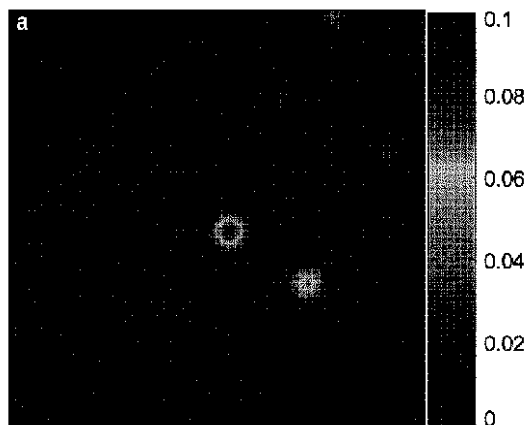
【図 8】



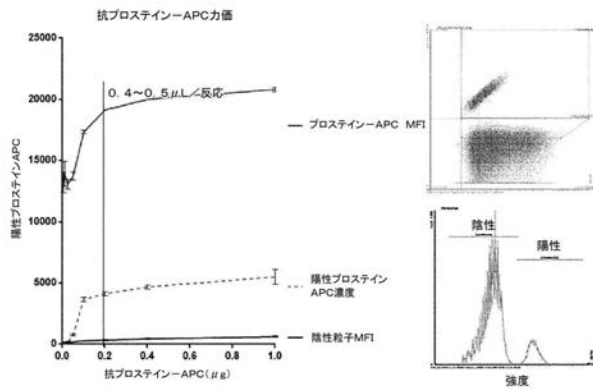
【図 9 b】



【図 9 a】



【図 16】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2019/050541
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>G01N 15/10</i> (2006.01), <i>G06N 20/00</i> (2019.01)		
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) Keywords searched across the entire IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) IEEEExplore, Google Patent, Google Scholar, Orbit Keywords: diagnosing, disease, microflow, cytometry, signal, intensit+, phenotype, machine, learning, sample, particle, algorithm, bind, biomarker, probability, patient, optical, cancer, predict, probe, log, transform, concentration, binning, dynamic, fluorescence, threshold+, algorithm, biomarker, light, slope, density, scatter, plot, kernel, extracellular, vesicles, region, interest		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US20050095611A1 (Chan et al.) 05 May 2005 (05-05-2005) ***para(s) [0006], [0007], [0139], [0140]-[0143],[0490]-[0499], [0522]-[0541], [0553], [0584], [0589]-[0593]***	1-8, 10-14, 17-22
Y	Pink et al., "Technical validation of a micro-flow cytometry platform for prostate cancer biomarker discover", Cancer Research, Volume 77, Issue 13, July 2017 (07-2017) ***entire document***	1-8, 10-14, 17-22 1-14, 17-22
A	EP1894131A2 (Yeatman et al) 05 March 2008 (05-03-2008) ***entire document***	1-14, 17-22
A	US8725426B2 (Shak et al.) 13 May 2014 (13-05-2014) ***entire document***	1-14, 17-22
A	US2007009970A1 (Heller et al.) 11 January 2007 (11-01-2007) ***entire document***	1-14, 17-22
A	US2012004130A1 (Mattoon et al.) 05 January 2012 (05-01-2012) ***entire document***	1-14, 17-22
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier application or patent but published on or after the international filing date 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) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" "X" "Y" "&"
Date of the actual completion of the international search 21 June 2019 (20-06-2019)		Date of mailing of the international search report 28 June 2019 (28-06-2019)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Richin Choi (819) 639-8435

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No.
PCT/CA2019/050541

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2005095611A1	05 May 2005 (05-05-2005)	US2005095611A1 WO2004099432A2 WO2004099432A3	05 May 2005 (05-05-2005) 18 November 2004 (18-11-2004) 09 August 2007 (09-08-2007)
EP1894131A2	05 March 2008 (05-03-2008)	EP1894131A2 EP1894131A4 EP1894131B1 US2006195269A1 US10181009B2 US2006195266A1 WO2005083128A2 WO2005083128A3 WO2006093507A2 WO2006093507A3	05 March 2008 (05-03-2008) 27 January 2010 (27-01-2010) 23 January 2013 (23-01-2013) 31 August 2006 (31-08-2006) 15 January 2019 (15-01-2019) 31 August 2006 (31-08-2006) 09 September 2005 (09-09-2005) 23 November 2006 (23-11-2006) 08 September 2006 (08-09-2006) 04 June 2009 (04-06-2009)
US8725426B2	13 May 2014 (13-05-2014)	US2013196321A1 US8725426B2 AU2013215448A1 AU2013215448B2 AU2018201688A1 CA2863040A1 CO7051010A2 EP2809812A1 EP2809812A4 EP3179393A2 EP3179393A3 HK1201881A1 IL233709D0 IL233709A IL254255D0 IL254255A IL262648D0 JP2015511814A JP6351112B2 JP2017113008A JP2019013255A MX2014009283A MX351626B NZ627887A NZ722902A SG10201605210PA SG11201404390WA US2014303002A1 WO2013116144A1	01 August 2013 (01-08-2013) 13 May 2014 (13-05-2014) 21 August 2014 (21-08-2014) 04 January 2018 (04-01-2018) 05 April 2018 (05-04-2018) 08 August 2013 (08-08-2013) 10 September 2014 (10-09-2014) 10 December 2014 (10-12-2014) 27 January 2016 (27-01-2016) 14 June 2017 (14-06-2017) 13 September 2017 (13-09-2017) 11 September 2015 (11-09-2015) 30 September 2014 (30-09-2014) 28 September 2017 (28-09-2017) 31 October 2017 (31-10-2017) 29 November 2018 (29-11-2018) 31 December 2018 (31-12-2018) 23 April 2015 (23-04-2015) 04 July 2018 (04-07-2018) 29 June 2017 (29-06-2017) 31 January 2019 (31-01-2019) 11 September 2014 (11-09-2014) 23 October 2017 (23-10-2017) 26 August 2016 (26-08-2016) 22 December 2017 (22-12-2017) 30 August 2016 (30-08-2016) 28 August 2014 (28-08-2014) 09 October 2014 (09-10-2014) 08 August 2013 (08-08-2013)
US2007009970A1	11 January 2007 (11-01-2007)	None	
US2012004130A1	05 January 2012 (05-01-2012)	US2012004130A1 EP2089712A2 EP2089712A4 JP2010510528A US2008254482A1 WO2008064336A2 WO2008064336A9 WO2008064336A8	05 January 2012 (05-01-2012) 19 August 2009 (19-08-2009) 22 September 2010 (22-09-2010) 02 April 2010 (02-04-2010) 16 October 2008 (16-10-2008) 29 May 2008 (29-05-2008) 31 July 2008 (31-07-2008) 18 December 2008 (18-12-2008)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 1 6 H 50/00	(2018.01)	G 0 1 N	21/64	F
		G 1 6 H	50/00	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . M A T L A B

(72) 発明者 ピンク、デズモンド

カナダ、アルバータ、エドモントン、 1 2 8 ストリート 1 0 9 6 4

(72) 発明者 バスケス、カタリーナ

カナダ、アルバータ、エドモントン、メイ コモン エヌダブリュー 7 4 3 6

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01

2G045 AA26 CA25 CA26 CB03 CB14 DA36 FA37

5L099 AA04