

(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2017-501694
(P2017-501694A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 2 G 04 5
C 12 N 5/09 (2010.01)	C 12 N 5/09	Z N A 4 B 06 3
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	A 4 B 06 4
C 12 P 21/00 (2006.01)	C 12 P 21/00	C 4 B 06 5
C 07 K 14/00 (2006.01)	C 07 K 14/00	4 C 08 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-536918 (P2016-536918)	(71) 出願人	500039463 ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニバ ーシティ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国、テキサス・78701、 オースティン、ウエスト・セブンス・スト リート・201
(86) (22) 出願日	平成26年12月4日 (2014.12.4)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月29日 (2016.7.29)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/068630	(72) 発明者	カーリー, ラフ アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, マロニール ストリー ト 3726
(87) 國際公開番号	W02015/085096		
(87) 國際公開日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		
(31) 優先権主張番号	61/911,863		
(32) 優先日	平成25年12月4日 (2013.12.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】診断および療法のためのエキソソーム中のゲノムDNA、RNAおよびタンパク質の分析

(57) 【要約】

本発明は、ヒトの体液試料由来のエキソソームが染色体全てにわたる二本鎖ゲノムDNAを含有し、がんなどの疾患における目的の遺伝子の変異状態を決定するために使用することができるることを提供する。さらに、本発明は、治療用タンパク質を作製するためのエキソソームの使用、および療法における治療用タンパク質の使用、ならびに、がんを診断し、治療応答をモニタリングするための、がん細胞由来エキソソームの検出を提供する。一局面において、がん細胞由来エキソソームを単離する方法が提供され、この方法は、(a)がん患者から体液試料を得るステップと、(b)上記体液試料のエキソソーム画分を単離するステップと、(c)上記エキソソーム画分からグリビカン1を含むエキソソームを単離し、それにより、がん細胞由来エキソソームを単離するステップとを含む。

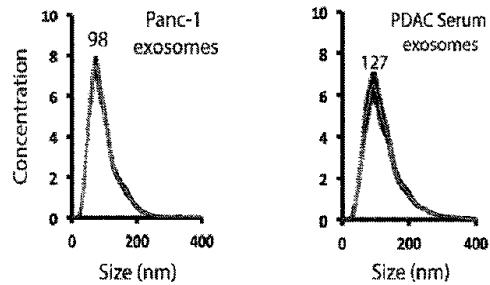


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

がん細胞由来エキソソームを単離する方法であって、
(a) がん患者から体液試料を得るステップと、
(b) 前記体液試料のエキソソーム画分を単離するステップと、
(c) 前記エキソソーム画分からグリピカン1を含むエキソソームを単離し、それにより、がん細胞由来エキソソームを単離するステップと
を含む、方法。

【請求項 2】

前記がん細胞由来エキソソームからゲノム二本鎖DNA、RNA、またはタンパク質を単離するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記がん細胞由来エキソソームから単離されたDNA、RNA、またはタンパク質を検出するステップをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ステップ(b)または(c)の単離が、免疫磁気捕捉、接着に基づく選別、磁気活性化選別、または蛍光活性化選別(FACS)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記患者におけるがん細胞由来エキソソームの数を定量化するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記がん細胞由来エキソソームについて遺伝子型決定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記体液試料が、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液/涙、または血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 9】

患者におけるがんを診断する方法であって、
(a) 患者から体液試料を得るステップと、
(b) 前記体液試料のエキソソーム画分を単離するステップと、
(c) 前記エキソソーム画分中のグリピカン1の存在についてアッセイするステップであって、グリピカン1が存在している場合、前記患者はがんを有すると診断されるステップと
を含む、方法。

【請求項 10】

前記患者におけるグリピカン1を含有するエキソソームの数を定量化するステップをさらに含む、請求項9に記載の方法。 40

【請求項 11】

前記方法が、がん患者における療法に対する応答をモニタリングする方法としてさらに定義され、ここでグリピカン1を含有するエキソソームの数が時間をわたって減少する場合、前記患者は、療法に対して陽性に応答していたといえる、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記患者が以前にがんと診断されておらず、前記方法が早期がん検出の方法である、請求項9に記載の方法。

【請求項 13】

前記患者が寛解状態にあり、前記方法が再発を検出する方法である、請求項9に記載の 50

方法。

【請求項 1 4】

前記患者に抗がん療法を施すステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記体液試料が、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液／涙、または血清である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記患者に関する前記診断を報告するステップをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 8】

報告するステップが、書面での報告書または電子報告書を作成することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記報告書を前記患者、医師、病院または保険会社に提供するステップをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

被験体からゲノム二本鎖 DNA を単離する方法であつて、

20

(a) 患者から試料を得るステップと、

(b) 前記試料のエキソソーム画分を単離するステップと、

(c) 前記エキソソーム画分からゲノム二本鎖 DNA を単離するステップとを含む、方法。

【請求項 2 1】

ステップ (b) が、グリビカン 1 を含むエキソソームを単離することをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 DNA の配列解析を実施するステップをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 3】

遺伝子の変異状態を決定するステップをさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記遺伝子が K R A S または p 5 3 である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記遺伝子の前記変異状態が、がんバイオマーカーである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記がんバイオマーカーを使用して、前記患者ががんを有すると診断する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記遺伝子の前記変異状態を報告するステップをさらに含む、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

報告するステップが、書面での報告書または電子報告書を作成することを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記報告書を前記患者、医師、病院または保険会社に提供するステップをさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記試料が、リンパ液、唾液、尿、または血清である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 1】

50

前記試料が、細胞を本質的に含まない、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 32】

前記被験体が、がんを有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 33】

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、脾がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記がんが膵管腺癌である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記被験体が、がんについて以前に治療されている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 36】

前記被験体が、腫瘍の外科的除去を以前に受けている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 37】

被験体におけるがんバイオマーカーを同定する方法であって、
(a) 請求項 20 に従ってゲノム DNA を単離するステップと、
(b) 前記ゲノム DNA の配列解析を実施するステップと、
(c) 少なくとも 1 種の遺伝子の変異状態を決定し、それにより、がんバイオマーカーを同定するステップと
を含む、方法。

【請求項 38】

ステップ (c) が、少なくとも 2 種の遺伝子の前記変異状態を決定することを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記がんバイオマーカーの存在を使用して、前記患者ががんを有すると診断する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、脾がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記がんが膵管腺癌である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記被験体が、がんについて以前に治療されている、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

前記被験体が、腫瘍の外科的除去を以前に受けている、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 44】

前記遺伝子の前記変異状態を報告するステップをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 45】

報告するステップが、書面での報告書または電子報告書を作成することを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記報告書を前記患者、医師、病院または保険会社に提供するステップをさらに含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

被験体におけるがんを治療する方法であって、請求項 37 に従って被験体ががんバイオマーカーを有することを同定するステップと、前記被験体に抗がん療法を施すステップとを含む、方法。

【請求項 48】

10

20

30

40

50

前記抗がん療法が、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、標的化療法、免疫療法または外科療法である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記被験体がヒトである、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

疾患の治療を必要とする患者における疾患を治療する方法であって、

(a) 試料からエキソームを得るステップと、

(b) 前記エキソームに治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、

(c) トランスフェクトされた前記エキソームを患者に提供し、それにより、前記患者における前記疾患を治療するステップと
を含む、方法。

【請求項51】

前記疾患が、がんである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

治療用タンパク質の投与を必要とする患者に治療用タンパク質を投与する方法であって、

(a) 試料からエキソームを得るステップと、

(b) 前記エキソームに治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、

(c) 前記エキソームを、前記治療用タンパク質を前記エキソーム内で発現させることを可能にする条件下でインキュベートするステップと、

(d) インキュベートした前記エキソームを患者に提供し、それにより、治療用タンパク質を前記患者に投与するステップと
を含む、方法。

【請求項53】

前記試料が、前記患者から得られる、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

被験体における疾患を治療する方法であって、請求項37に従って被験体ががんバイオマーカーを有することを同定するステップと、請求項52に従って前記被験体に治療用タンパク質を投与するステップとを含む、方法。

【請求項55】

前記がんバイオマーカーがp53変異であり、前記治療用タンパク質が野生型p53である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

組換えタンパク質を作製する方法であって、

(a) 試料からエキソームを得るステップと、

(b) 前記エキソームに組換えタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、

(c) 前記エキソームを、前記組換えタンパク質を発現させることを可能にする条件下でインキュベートし、それにより、前記組換えタンパク質を作製するステップと
を含む、方法。

【請求項57】

前記組換えタンパク質を精製するステップをさらに含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

それを必要とする患者に前記タンパク質を投与するステップをさらに含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

それを必要とする患者にインキュベートした前記エキソームを投与するステップをさらに含む、請求項56に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 0】

インキュベートした前記エキソソームが、前記患者にとって自己由来である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記患者が、がんと診断されている、請求項 5 8 または 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記試料が、組織培養培地試料である、請求項 5 0 、 5 2 または 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記試料が、体液試料である、請求項 5 0 、 5 2 または 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 4】

前記体液試料が、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液／涙、または血清である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記体液試料が、前記患者から得られる、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記核酸が m R N A である、請求項 5 0 、 5 2 または 5 7 のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 6 7】

前記核酸がプラスミドである、請求項 5 0 、 5 2 または 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6 8】

請求項 5 6 に記載の方法に従って作製された、精製された組換えタンパク質。

【請求項 6 9】

患者における疾患の治療に使用するための、治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトしたエキソソームを含む組成物。

【請求項 7 0】

前記疾患が、がんである、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記エキソソームが、前記患者にとって自己由来である、請求項 6 9 に記載の組成物。

30

【請求項 7 2】

前記エキソソームが、前記治療用タンパク質を前記エキソソーム内で発現させることを可能にする条件下でインキュベートされたものである、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

請求項 3 7 に従って、前記患者が、がんバイオマーカーを有すると同定されている、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

前記がんバイオマーカーが p 5 3 変異であり、前記治療用タンパク質が野生型 p 5 3 である、請求項 7 3 に記載の組成物。

40

【請求項 7 5】

疾患を治療するための医薬品の製造における、治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトしたエキソソームの使用。

【請求項 7 6】

前記疾患が、がんである、請求項 7 5 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

この出願は、2013年12月4日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 9 1 1 , 8 6 3 号（これは、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

50

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、一般に、遺伝学、タンパク質生化学、および腫瘍学の分野に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子解析および治療における、エキソソームのゲノムDNAおよびタンパク質の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

P D A C 患者に関して、腫瘍が明白な切除縁 (surgical margin) を伴って早期に検出された場合には、脾頭十二指腸切除術 (ウィップル手順) が治癒的なものになり得る。脾がんの診断の遅れに起因して、外科的に切除可能な腫瘍が見られるのは患者のおよそ 15 % のみである (Conlonら、1996 年)。疾患の病期と外科手術後の転帰を比較する試験では、疾患がより早い段階で診断されれば P D A C の死亡率が低下することが示唆されている (Bilimoriaら、2007 年)。

10

【0004】

サイトカインおよびケモカインなどの可溶性因子を介した直接の細胞間接触に加えて、エキソソームが細胞間コミュニケーションにおいて中心的な役割を果たすという新たな証拠が存在する (Kahler および Kaliluri、2013 年)。エキソソームは、サイズが 40 ~ 150 nm の、小さな、膜に結合した小胞である (Panら、1985 年; Tramsら、1981 年)。エキソソームは、がん細胞、間葉細胞、栓球 (Kahler および Kaliluri、2013 年; Heijnenら、1999 年; Raposoら、1996 年)、免疫細胞 (Theryら、2009 年)、血小板 (Janowska-Wieczorekら、2005 年)、および内皮細胞 (Hergenreiderら、2012 年) などの多くの異なる細胞型から分泌される。エキソソーム生合成の第 1 のステップは、後期エンドソームの境界膜から内向きに突き出ることを伴う (Trajkovicら、2008 年)。このプロセスの間に、エキソソームに親細胞由来の RNA 分子およびタンパク質がパッケージングされる (Tramsら、1981 年; Trajkovicら、2008 年)。細胞外空間に放出された後、腫瘍由来のエキソソームから、発がん活性を有するタンパク質および RNA がレシピエント細胞に移行し得る (Kaczewskala、2012 年; Grangeら、2011 年; Peinadoら、2012 年)。エキソソームは様々な条件下で非常に安定なため、それらの生物学的カーゴを細胞外環境における分解および変性から保護することができる (Taylor および Gercel-Taylor、2008 年)。循環中のゲノム DNA が主にエキソソームに含有される (Kahler ら、2014 年)。星状細胞および神経膠芽腫細胞由来のエキソソームはミトコンドリア DNA を担持する (Guescini ら、2010 年)。さらに、神経膠芽腫細胞株由来のエキソソームは少量の一本鎖 DNA ならびに高レベルの転移因子を含有している (Balaj ら、2011 年)。

20

30

【0005】

エキソソームは、血清、唾液、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液 / 涙、および腹水などの、がん患者の体液の全てにおいて見いだされる (Peinado ら、2012 年; Lau ら、2013 年; Choi ら、2011 年)。そのようなものとして、エキソソームは、がんにおける有望な診断用および予測用バイオマーカーである。しかし、がん患者由来の循環 DNA に対する遺伝子プロファイリング試験では、単離された DNA が体の全ての細胞を代表していることから変異および遺伝的欠陥を難しくしているという事実のために混乱している (Murtaza ら、2013 年; Yong、2014 年; Kirk、2013 年; Corwley ら、2013 年)。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Conlon ら、Annals of Surgery (1996) 2

50

23:273~279

【非特許文献2】Bilimoriaら、Annals of Surgery (2007) 246:173~180

【非特許文献3】KahlerトおよびKalluri、J. Mol. Med. (Berlin.) (2013) 91:431~437

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

いくつかのエキソソームマーカーが提唱されており、それらとして、テトラスパニンファミリーのメンバー(CD9、CD63、CD81)、輸送のために必要なエンドソーム選別複合体のメンバー(ESCRT; TSG101、Alix)、および熱ショックタンパク質(Hsp60、Hsp70、Hsp90)が挙げられる(TaylorおよびGercel-Taylor、2011年)。上皮腫瘍細胞は、上皮細胞接着分子(EpCAM)を保有するエキソソームを分泌する(TaylorおよびGercel-Taylor、2008年; Silvula、2012年; Runzら、2007年)。黒色腫由来のエキソソームは、腫瘍関連抗原Mart-1およびチロシナーゼ関連タンパク質2(TYRP2)を含有する(Peinadoら、2012年; Mearesら、2004年; Andreら、2002年)。胃がん、乳がん、および肺がんに由来するエキソソームは、ヒト上皮増殖因子受容体(HER)ファミリーのメンバーを担持する(Adamczykら、2011年; Baranら、2010年; Ciravoloら、2012年)。しかしながら、これらのマーカーはいずれもがん由来のエキソソームに特異的なものではなく、がんエキソソームを同定し、他の細胞によって産生されるエキソソームと区別するために使用することができる特異的なマーカーがないために、がん患者の血清からエキソソームを特異的に単離することは難しいままである。がん由来のエキソソームに対するマーカーにより、循環中の低頻度の変異の検出の感度が有意に上昇する。したがって、循環中のがん細胞由来エキソソームを特異的に検出し、単離する手順が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明は、ヒト血清試料由来のエキソソームが、染色体全てにわたる二本鎖ゲノムDNAを含有し、例えば、KRASおよびp53の変異状態を決定するために使用することができることを提供する。さらに、本発明は、がん細胞由来エキソソームを、例えば、エキソソーム表面マーカーグリビカン-1(GPC1)に基づいてなどで同定し、単離するための方法を提供する。さらに、本発明は、エキソソームを使用して、治療用タンパク質または核酸(例えば、干渉RNA)を作製し、疾患細胞に送達し得ることを提供する。

【0009】

一実施形態では、本発明は、被験体からゲノム二本鎖DNAを単離する方法であって、(a)患者から試料を得るステップと、(b)試料のエキソソーム画分を単離するステップと、(c)エキソソーム画分からゲノム二本鎖DNAを単離するステップとを提供する。一部の態様では、ステップ(b)は、グリビカン1(GPC1)を含むエキソソームを単離することを含み得る。

【0010】

一部の態様では、方法は、DNAの配列解析を実施するステップ、例えば、遺伝子(例えば、KRASまたはp53)の変異状態を決定するステップを含み得る。一部の態様では、変異状態は、がんバイオマーカーであってよい。一部の態様では、がんバイオマーカーの存在を使用して、患者ががんを有すると診断することができる。一部の態様では、方法は、遺伝子の変異状態および/または患者に関する診断を報告するステップを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、書面での報告書または電子報告書を作成することを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、報告書を患者、医師、病院または保険会社に提供することを含み得る。

10

20

30

40

50

【0011】

一部の態様では、試料は、リンパ液、唾液、尿、血清、または脳脊髄液であってよい。一部の態様では、試料は、細胞を本質的に含まないものであってよい。

【0012】

一部の態様では、被験体は、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん (cervical cancer)、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんなどのがんを有してよい。一部の態様では、がんは、膵管腺癌であってよい。一部の態様では、被験体は、がんについて以前に治療され得る。一部の態様では、被験体は、腫瘍の外科的除去を以前に受けていてよい。

10

【0013】

一実施形態では、本発明は、被験体におけるがんバイオマーカーを同定する方法であって、(a) 本発明の実施形態に従ってゲノムDNAを単離するステップと、(b) ゲノムDNAの配列解析を実施するステップと、(c) 少なくとも1種の遺伝子の変異状態を決定し、それにより、がんバイオマーカーを同定するステップとを含む方法を提供する。一部の態様では、ステップ(c)は、少なくとも2種の遺伝子の変異状態を決定することを含み得る。

20

【0014】

一部の態様では、がんバイオマーカーの存在により、患者ががんを有すると診断することができる。がんは、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんなどの任意の型のがんであってよい。一態様では、がんは、膵管腺癌であってよい。一部の態様では、被験体は、がんについて以前に治療され得る。一部の態様では、被験体は、腫瘍の外科的除去を以前に受けていてよい。

【0015】

一部の態様では、方法は、遺伝子の変異状態および/または患者に関する診断を報告するステップを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、書面での報告書または電子報告書を作成することを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、報告書を患者、医師、病院または保険会社に提供することを含み得る。

30

【0016】

一実施形態では、本発明は、被験体におけるがんを治療する方法であって、本発明の実施形態に従って被験体ががんバイオマーカーを有することを同定するステップ、および被験体に抗がん療法を施すステップを含む方法を提供する。一部の態様では、抗がん療法は、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、標的化療法、免疫療法または外科療法であってよい。一態様では、被験体は、ヒトであってよい。

【0017】

一実施形態では、本発明は、疾患の治療を必要とする患者における疾患を治療する方法であって、(a) 試料からエキソソームを得るステップと、(b) エキソソームに治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、(c) トランスフェクトされたエキソソームを患者に提供し、それにより、患者における疾患を治療するステップとを含む方法を提供する。一部の態様では、エキソソームは、患者にとって自己由来であってよい。一部の態様では、疾患はがんであってよい。

40

【0018】

一実施形態では、本発明は、治療用タンパク質の投与を必要とする患者に治療用タンパク質を投与する方法であって、(a) 試料からエキソソームを得るステップと、(b) エキソソームに治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、(c) エキソソームを、治療用タンパク質をエキソソーム内で発現させることを可能にする条件下でインキュベートするステップと、(d) インキュベートしたエキソソームを患者に提供し、それにより、治療用タンパク質を患者に投与するステップとを含む方法を提供する。一部の態様では、エキソソームは、患者にとって自己由来であってよい。

50

【0019】

一実施形態では、本発明は、被験体における疾患を治療する方法であって、本実施形態に従って被験体ががんバイオマーカーを有することを同定するステップと、本実施形態に従って被験体に治療用タンパク質を投与するステップとを含む方法を提供する。一態様では、がんバイオマーカーはp53変異であってよく、治療用タンパク質は野生型p53であってよい。別の態様では、がんバイオマーカーはKRAS変異であってよく、治療用タンパク質は野生型KRASであってよい。

【0020】

一実施形態では、本発明は、組換えタンパク質を作製する方法であって、(a)試料からエキソソームを得るステップと、(b)エキソソームに組換えタンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするステップと、(c)エキソソームを、組換えタンパク質を発現させることを可能にする条件下でインキュベートし、それにより、組換えタンパク質を作製するステップとを含む方法を提供する。

10

【0021】

一部の態様では、方法は、組換えタンパク質を精製するステップを含み得る。ある特定の態様では、方法は、それを必要とする患者に、精製された、組換えタンパク質を投与するステップを含み得る。一部の態様では、方法は、それを必要とする患者に、インキュベートしたエキソソームを投与するステップを含み得る。一部の態様では、エキソソームは、患者にとって自己由来であってよい。一態様では、患者は、がんと診断され得る。

20

【0022】

実施形態の一部の態様では、試料は、組織培養培地試料であってよい。実施形態の他の態様では、試料は、体液試料(例えば、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液/涙、または血清)であってよい。ある特定の態様では、体液試料、したがって、それから得られるエキソソームは、治療方法を受けている患者から得ることができる。

【0023】

実施形態の一部の態様では、核酸は、mRNAであってよい。実施形態の一部の態様では、核酸は、プラスミドであってよい。

30

【0024】

一実施形態では、本発明は、実施形態の方法に従って作製された、精製された組換えタンパク質を提供する。

【0025】

一実施形態では、本発明は、がん細胞由来エキソソームを単離する方法であって、(a)がん患者から体液試料を得るステップと、(b)体液試料のエキソソーム画分を単離するステップと、(c)エキソソーム画分からグリビカン1を含むエキソソームを単離し、それにより、がん細胞由来エキソソームを単離するステップとを含む方法を提供する。一部の態様では、方法は、がん細胞由来エキソソームからゲノム二本鎖DNA、RNA、またはタンパク質を単離するステップを含み得る。一部の態様では、方法は、がん細胞由来エキソソームにおける特定のDNA配列、RNA配列、またはタンパク質の存在を検出するステップを含み得る。一部の態様では、特定のDNA配列を検出するステップは、DNA配列における特定の変異または欠損を検出することを含み得る。一部の態様では、特定のDNA配列を検出するステップは、DNA配列の特定のエピジェネティック状態を検出することを含み得る。一部の態様では、特定のRNA配列を検出するステップは、RNA配列における特定の変異または欠損を検出することを含む。一部の態様では、タンパク質を検出するステップは、例えは、変異したタンパク質、付加変異タンパク質、欠失変異タンパク質、改変タンパク質(例えは、翻訳後修飾の状態が変更されたタンパク質)、または短縮されたタンパク質などの、欠陥のあるタンパク質を検出することを含む。一部の態様では、タンパク質を検出するステップは、エピジェネティック変化を検出することを含み得る。

40

【0026】

ある特定の態様では、ステップ(b)または(c)の単離は、免疫磁気捕捉、接着に基

50

づく選別、磁気活性化選別、または蛍光活性化選別（FACS）を含み得る。一部の態様では、方法は、患者におけるがん細胞由来エキソソームの数を定量化するステップを含み得る。一部の態様では、方法は、がん細胞由来エキソソームについて遺伝子型決定するステップを含み得る。

【0027】

ある特定の態様では、体液試料は、リンパ液、唾液、尿、または血清であってよい。ある特定の態様では、がんは、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんであってよい。

【0028】

一実施形態では、本発明は、患者におけるがんを診断する方法であって、（a）患者から体液試料を得るステップと、（b）体液試料のエキソソーム画分を単離するステップと、（c）エキソソーム画分中のグリビカン1の存在についてアッセイするステップであって、グリビカン1が存在している場合、患者ががんを有すると診断するステップとを含む方法を提供する。一部の態様では、方法は、患者におけるグリビカン1を含有するエキソソームの数を定量化するステップを含み得る。患者におけるグリビカン1を含有するエキソソームの数を定量化するステップは、例えば、免疫アフィニティ捕捉、血球計算分析（cytometric analysis）、またはELISAを含み得る。

【0029】

一部の態様では、方法は、がん患者における療法に対する応答をモニタリングする方法と定義することができ、ここでグリビカン1を含有するエキソソームの数が時間をわたって減少すれば、患者が療法に対して陽性に応答しているといえる。一部の態様では、患者は、がんを有すると以前に診断されていなくてもよく、方法は、早期がん検出の方法であってよい。一部の態様では、患者は寛解の状態にあってよく、方法は、再発を検出する方法であってよい。一態様では、方法は、患者に抗がん療法を施すステップを含み得る。

【0030】

ある特定の態様では、体液試料は、リンパ液、唾液、尿、脳脊髄液、骨髄吸引液、眼滲出液／涙、または血清であってよい。ある特定の態様では、がんは、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、脳がん、肝がん、膀胱がん、胃がん、膵がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんであってよい。

【0031】

一部の態様では、方法は、患者に関する診断を報告するステップを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、書面での報告書または電子報告書を作成することを含み得る。一部の態様では、報告するステップは、報告書を患者、医師、病院または保険会社に提供することを含み得る。

【0032】

一部の実施形態では、本発明は、試料からエキソソームを単離すること、エキソソーム由来のゲノムDNAを単離すること、がん細胞由来エキソソームを単離すること、試料および／または患者におけるがん細胞由来エキソソームの数を定量化すること、エキソソーム内で組換えタンパク質を発現させること、エキソソーム内で発現させた組換えタンパク質を用いて患者を治療すること、および／または組換えタンパク質を発現するエキソソームを用いて患者を治療することにおいて使用するためのキットを提供し得る。

【0033】

一実施形態では、患者における疾患の治療に使用するための、治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトしたエキソソームを含む組成物が提供される。一部の態様では、疾患は、がんであってよい。一部の態様では、エキソソームは、患者にとって自己由来であってよい。一部の態様では、エキソソームは、治療用タンパク質をエキソソーム内で発現させることを可能にする条件下でインキュベートしたものであってよい。一部の態様では、患者は、本実施形態に従って、がんバイオマーカーを有することが同定されて

10

20

30

40

50

いてよい。一部の態様では、がんバイオマーカーはp53変異であってよく、治療用タンパク質は野生型p53であってよい。

【0034】

一実施形態では、疾患を治療するための医薬品の製造における、治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトしたエキソソームの使用が提供される。一部の態様では、疾患は、がんであってよい。

【0035】

本発明の方法および/または組成物の文脈において考察されている実施形態を本明細書に記載されている任意の他の方法または組成物に関して使用することができる。したがって、1つの方法または組成物に関するある実施形態を本発明の他の方法および組成物にも同様に適用することができる。

10

【0036】

本明細書で使用される場合、「a(1つの)」または「a n(1つの)」という特定は、1つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲で使用される場合、「含む(contains)」という単語と同時に使用される場合、「a(1つの)」または「a n(1つの)」という単語は、1つまたは1つ超を意味し得る。

【0037】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すかまたは代替物が相互排他的であることが明示されていなければ、「および/または」の意味を示すために使用されるが、本開示は、代替物のみ、ならびに「および/または」を指すという定義を支持する。本明細書で使用される場合、「別の(another)」とは、少なくとも第2のまたはそれ超を意味し得る。

20

【0038】

本出願全体を通して、「約」という用語は、値が、その値を決定するために使用されるデバイス、方法に固有の誤差の変動、または試験対象の中で存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0039】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の発明の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、この発明の詳細な説明から本発明の主旨および範囲内の様々な変化および改変が当業者に明らかになるので、発明の詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであるが、単に例示として示されていることが理解されるべきである。

30

【0040】

以下の図は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、これらの図の1つまたは複数を、本明細書で提示されている特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することによってよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1A】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト肺がん細胞株由来のエキソソームおよび肺がんを有する患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、Nanoseight(登録商標)LM10(図1A)および電子顕微鏡(図1B)を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株(Panc-1およびT3M4)由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび肺がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した(Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、およ

40

50

び臍がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図1B】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト臍がん細胞株由来のエキソソームおよび臍がんを有する患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、NanoSight(登録商標)LM10(図1A)および電子顕微鏡(図1B)を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株(Panc-1およびT3M4)由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび臍がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した(Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、および臍がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図1C】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト臍がん細胞株由来のエキソソームおよび臍がんを有する患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、NanoSight(登録商標)LM10(図1A)および電子顕微鏡(図1B)を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株(Panc-1およびT3M4)由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび臍がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した(Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、および臍がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図1D】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト臍がん細胞株由来のエキソソームおよび臍がんを有する患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、NanoSight(登録商標)LM10(図1A)および電子顕微鏡(図1B)を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株(Panc-1およびT3M4)由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび臍がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した(Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、および臍がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図1E】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト臍がん細胞株由来のエキソソームおよび臍がんを有す

10

20

30

40

50

る患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、NanoSight (登録商標) LM10 (図1A) および電子顕微鏡 (図1B) を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株 (Panc-1およびT3M4) 由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび肺がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した (Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、および肺がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図1F】図1A～Fは、エキソソームが二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することを示す図である。図1A～B、ヒト肺がん細胞株由来のエキソソームおよび肺がんを有する患者由来のヒト血清試料由来のエキソソームの存在および濃度を、NanoSight (登録商標) LM10 (図1A) および電子顕微鏡 (図1B) を使用して決定した。図1C、ウエスタンプロット法により、TSG101のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。図1D、エキソソーム溶解およびDNA抽出後のRNA汚染を排除するために、2種の細胞株 (Panc-1およびT3M4) 由来のDNA溶出液ならびに対応するエキソソーム由来のDNA溶出液をDNase IおよびRNase Aで処理した。その後、溶出液を2%アガロースゲルに流した。図1E、Panc-1エキソソーム由来の二本鎖DNAおよび肺がんを有する患者および有さない患者由来のヒト血清エキソソーム由来の二本鎖DNAの存在を二本鎖DNA検出キットによって確認した (Panc-1由来のエキソソームDNA、健康なドナー1名由来のエキソソームDNA、および肺がんを有する患者1名由来のエキソソームDNAについての代表図)。図1F、ウエスタンプロット法により、TSG101およびCD63のエキソソーム特異的発現によってエキソソームを特徴付けた。

【図2-1】図2A～Eは、エキソソームが、変異したKRASおよびp53DNAを含有することを示す図である。図2A、KRASのエクソン2およびイントロン2にわたる466bpの断片ならびにp53の4エクソンおよび3イントロンにわたる1564bpの断片をPCRによって增幅した。図2B、Panc-1細胞および対応するエキソソーム由来のゲノムDNAのサンガー配列決定法により、KRASのコドン12における同じヘテロ接合性変異 (GGTからGATへ) およびp53のコドン273における同様のホモ接合性変異 (CGTからCATへ) が明らかになった。T3M4細胞および対応するエキソソームでは、p53のコドン220における同じホモ接合性変異 (TATからTGTへ) が示された。図2C、PCR增幅により、肺がんを有する患者2名由来の循環エキソソームにおけるDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。KRAS DNAの466bpの断片およびp53 DNAのエクソン7および8ならびにイントロン7にわたる609bpの断片が回収された。エキソソームが枯渇した血清試料をPCRに供したところ、KRASアンプリコンもp53アンプリコンも検出されなかった。図2D、血清エキソソーム由来DNAのサンガー配列決定法により、コドン22にKRAS変異を有するDNAが検出された。第2の患者では、サンガー配列決定法により、コドン12におけるKRAS変異およびコドン273におけるp53変異が明らかになった。図2E、PCR增幅により、健康なドナー2名および肺がんを有する患者2名由来の循環エキソソーム内のDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。

【図2-2】図2A～Eは、エキソソームが、変異したKRASおよびp53 DNAを含有することを示す図である。図2A、KRASのエクソン2およびイントロン2にわたる466bpの断片ならびにp53の4エクソンおよび3イントロンにわたる1564bpの断片をPCRによって增幅した。図2B、Panc-1細胞および対応するエキソソーム

10

20

30

40

50

ーム由来のゲノムDNAのサンガー配列決定法により、KRASのコドン12における同じヘテロ接合性変異(GGTからGATへ)およびp53のコドン273における同様のホモ接合性変異(CGTからCATへ)が明らかになった。T3M4細胞および対応するエキソソームでは、p53のコドン220における同じホモ接合性変異(TATからTGTへ)が示された。図2C、PCR増幅により、膵がんを有する患者2名由来の循環エキソソームにおけるDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。KRAS DNAの466bpの断片およびp53 DNAのエクソン7および8ならびにイントロン7にわたる609bpの断片が回収された。エキソソームが枯渇した血清試料をPCRに供したところ、KRASアンプリコンもp53アンプリコンも検出されなかった。図2D、血清エキソソーム由来DNAのサンガー配列決定法により、コドン22にKRAS変異を有するDNAが検出された。第2の患者では、サンガー配列決定法により、コドン12におけるKRAS変異およびコドン273におけるp53変異が明らかになった。図2E、PCR増幅により、健康なドナー2名および膵がんを有する患者2名由来の循環エキソソーム内のDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。

【図2-3】図2A～Eは、エキソソームが、変異したKRASおよびp53 DNAを含有することを示す図である。図2A、KRASのエクソン2およびイントロン2にわたる466bpの断片ならびにp53の4エクソンおよび3イントロンにわたる1564bpの断片をPCRによって増幅した。図2B、Panc-1細胞および対応するエキソソーム由来のゲノムDNAのサンガー配列決定法により、KRASのコドン12における同じヘテロ接合性変異(GGTからGATへ)およびp53のコドン273における同様のホモ接合性変異(CGTからCATへ)が明らかになった。T3M4細胞および対応するエキソソームでは、p53のコドン220における同じホモ接合性変異(TATからTGTへ)が示された。図2C、PCR増幅により、膵がんを有する患者2名由来の循環エキソソームにおけるDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。KRAS DNAの466bpの断片およびp53 DNAのエクソン7および8ならびにイントロン7にわたる609bpの断片が回収された。エキソソームが枯渇した血清試料をPCRに供したところ、KRASアンプリコンもp53アンプリコンも検出されなかった。図2D、血清エキソソーム由来DNAのサンガー配列決定法により、コドン22にKRAS変異を有するDNAが検出された。第2の患者では、サンガー配列決定法により、コドン12におけるKRAS変異およびコドン273におけるp53変異が明らかになった。図2E、PCR増幅により、健康なドナー2名および膵がんを有する患者2名由来の循環エキソソーム内のDNAの長い断片に関する証拠がもたらされた。

【図3A】図3A～Bは、血清由来のエキソソームが、染色体全てにわたるゲノムDNAを含有することを示す図である。患者2名からの血清由来のエキソソームDNAおよび対応する原発性腫瘍に対して全ゲノム配列決定を行った。ヒト染色体全てにわたるBIC-seqコントロールフリー10g₂コピー数プロファイル、BINサイズ1000bp；RAWプロファイル-黒色、分割-中央、灰色の線。プロファイルにより、体細胞染色体の増加(アップ)および減少(ダウン)、ならびに正常な多型が実証される。第2の場合(図3B)では、試料中のがん細胞が少数である可能性に起因して、PDACに関して予測される構造的な染色体再編成の欠乏が説明される。配列決定により、循環エキソソームが染色体全てにわたるゲノムDNAを含有することが明らかになった。

【図3B】図3A～Bは、血清由来のエキソソームが、染色体全てにわたるゲノムDNAを含有することを示す図である。患者2名からの血清由来のエキソソームDNAおよび対応する原発性腫瘍に対して全ゲノム配列決定を行った。ヒト染色体全てにわたるBIC-seqコントロールフリー10g₂コピー数プロファイル、BINサイズ1000bp；RAWプロファイル-黒色、分割-中央、灰色の線。プロファイルにより、体細胞染色体の増加(アップ)および減少(ダウン)、ならびに正常な多型が実証される。第2の場合(図3B)では、試料中のがん細胞が少数である可能性に起因して、PDACに関して予測される構造的な染色体再編成の欠乏が説明される。配列決定により、循環エキソソームが染色体全てにわたるゲノムDNAを含有することが明らかになった。

10

20

30

40

50

【図4-1】図4Aは、NanoSight（登録商標）技術を使用した粒子トラッキング解析を示す図である。左側の画像は、エキソソームの動画のスナップショットを示す。右側のグラフは、エキソソームのサイズ分布およびそれらの濃度の総合解析を示す。図4Bは、培養培地から採取したエキソソームの画像を示す電子顕微鏡図である。

【図4-2】図4Cは、エキソソームマーカーである抗CD9抗体を使用した、培養培地から採取したエキソソームの免疫金染色を示す図である。図4Dは、抗CD9抗体を使用した、培養培地から採取したエキソソームのフローサイトメトリー分析を示すグラフである。

【図4-3】図4Eは、いくつかの異なる細胞株から採取した培地におけるエキソソームの存在を示すために、CD9およびCD63エキソソームマーカーを使用した免疫プロット分析を示す図である。

【図5-1】図5Aは、異なる細胞株に由来するエキソソームのtRNAのノーザンプロットを示す図である。図5Bは、異なる細胞株から抽出されたエキソソームにおけるアミノ酸の存在を示す質量分析のヒートマップである。

【図5-2】図5Cは、異なる細胞株に由来するエキソソームにおける18S rRNAおよび28S rRNAの定量的RT-PCRを示すグラフである。説明文の各試料は、上から下に、グラフ上の各棒を左から右の順で表す。図5Dは、異なるエキソソームのタンパク質抽出物における真核生物翻訳開始因子3A、4A1および1Aの免疫プロット分析を示す図である。CD9を、エキソソームの存在を示すためのエキソソームマーカーとして使用した。

【図5-3】図5Eは、真核生物翻訳開始因子4A1の免疫沈降、その後の真核生物翻訳開始因子4A1および3Aの、エキソソームにおけるこれらの2種のタンパク質間の相互作用を示す免疫プロットを示す図である。

【図6-1】図6Aは、エキソソームからのタンパク質抽出物および陽性対照として細胞およびGFPベクターを使用したin vitro翻訳アッセイを示す図である。in vitro翻訳アッセイキットからのタンパク質溶解物を第2の陽性対照として使用した。GADPHをローディング対照として使用した。図6Bは、GFP抗体を使用した、GFPベクターを用いて電気穿孔したエキソソームの免疫金染色を示す図である。上のパネルは陰性対照を示し、下のパネルはエキソソームにおけるGFP染色を示す。

【図6-2】図6Cは、[³⁵S]メチオニンと一緒に培養したエキソソームのオートラジオグラフィーを示す図である。シクロヘキシミドおよび細胞をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。

【図7】図7は、野生型p53タンパク質をコードするプラスミドをMDA-MB-231由来のエキソソームに電気穿孔した。48時間の無細胞培養後に、電気穿孔したエキソソームを使用して、シクロヘキシミドを用いて前処理したMDA-MB-231細胞を処理し、野生型p53機能の下流の標的としてp21発現を評価した。

【図8-1】図8Aは、E10細胞、NIH-3T3細胞、HDF細胞、MCF10A細胞およびMDA-MB231細胞の培養培地由来のエキソソームにおけるグリピカン1に関する質量分析の結果を示すグラフである。図8Bは、非腫瘍形成性乳房上皮細胞（MCF10A）および乳がん細胞（MCF7およびMDA-MB231）から抽出したエキソソームのグリピカン1ウエスタンを示す図である。

【図8-2】図8Cは、非腫瘍形成性乳房上皮細胞（MCF10A）に由来するエキソソームおよび乳がん細胞（MDA-MB231）に由来するエキソソームのフローサイトメトリー分析を示すグラフである。

【図9A】図9A～Eは、GPC1が、がんエキソソームに特異的に存在することを示す図である。図9A、非腫瘍形成性細胞株由来のエキソソーム（HMLE）（左側のパネル）および腎がん由来のエキソソーム（T3M4）（右側のパネル）におけるGPC1の免疫透過型電子顕微鏡写真。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図9B、エキソソームの表面上のGPC1のFACS分析の略図。図9C、アルデヒド/硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの透過型電子顕微

10

20

30

40

50

鏡写真 (TEM) (左側のパネル)。アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたT3M4およびHMLEエキソソームにおけるGPC1の免疫金標識 (下の2つのパネル)。金粒子が黒色の点で示されている。陰性対照を、二次抗体のみを使用して実施した (右上)。図9D、がん細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (灰色) および非腫瘍形成性細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (黒色) のパーセントを示すグラフ。図9E、超遠心分離によって単離した、HMLE、HME-L、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、およびMIA PaCa2由来の、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたGPC1⁺エキソソームのFACS分析の代表的なヒストグラム。

【図9B】図9A～Eは、GPC1が、がんエキソソームに特異的に存在することを示す図である。図9A、非腫瘍形成性細胞株由来のエキソソーム (HMLE) (左側のパネル) および膵がん由来のエキソソーム (T3M4) (右側のパネル) におけるGPC1の免疫金透過型電子顕微鏡写真。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図9B、エキソソームの表面上のGPC1のFACS分析の略図。図9C、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの透過型電子顕微鏡写真 (TEM) (左側のパネル)。アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたT3M4およびHMLEエキソソームにおけるGPC1の免疫金標識 (下の2つのパネル)。金粒子が黒色の点で示されている。陰性対照を、二次抗体のみを使用して実施した (右上)。図9D、がん細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (灰色) および非腫瘍形成性細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (黒色) のパーセントを示すグラフ。図9E、超遠心分離によって単離した、HMLE、HME-L、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、およびMIA PaCa2由来の、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたGPC1⁺エキソソームのFACS分析の代表的なヒストグラム。

【図9C】図9A～Eは、GPC1が、がんエキソソームに特異的に存在することを示す図である。図9A、非腫瘍形成性細胞株由来のエキソソーム (HMLE) (左側のパネル) および膵がん由来のエキソソーム (T3M4) (右側のパネル) におけるGPC1の免疫金透過型電子顕微鏡写真。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図9B、エキソソームの表面上のGPC1のFACS分析の略図。図9C、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの透過型電子顕微鏡写真 (TEM) (左側のパネル)。アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたT3M4およびHMLEエキソソームにおけるGPC1の免疫金標識 (下の2つのパネル)。金粒子が黒色の点で示されている。陰性対照を、二次抗体のみを使用して実施した (右上)。図9D、がん細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (灰色) および非腫瘍形成性細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (黒色) のパーセントを示すグラフ。図9E、超遠心分離によって単離した、HMLE、HME-L、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、およびMIA PaCa2由来の、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたGPC1⁺エキソソームのFACS分析の代表的なヒストグラム。

【図9D】図9A～Eは、GPC1が、がんエキソソームに特異的に存在することを示す図である。図9A、非腫瘍形成性細胞株由来のエキソソーム (HMLE) (左側のパネル) および膵がん由来のエキソソーム (T3M4) (右側のパネル) におけるGPC1の免疫金透過型電子顕微鏡写真。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図9B、エキソソームの表面上のGPC1のFACS分析の略図。図9C、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの透過型電子顕微鏡写真 (TEM) (左側のパネル)。アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたT3M4およびHMLEエキソソームにおけるGPC1の免疫金標識 (下の2つのパネル)。金粒子が黒色の点で示されている。陰性対照を、二次抗体のみを使用して実施した (右上)。図9D、がん細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (灰色) および非腫瘍形成性細胞由来のGPC1⁺エキソソーム (黒色) のパーセントを示すグラフ。図9E、超遠心分離によって単離した、HMLE、HME-L、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、およびMIA PaCa2由来の、アルデヒド / 硫酸塩ビーズとカップリングしたGPC1⁺エキソソームのFACS分析の代表的なヒストグラム。

10

20

30

40

50

【図9E】図9A～Eは、GPC1が、がんエキソソームに特異的に存在することを示す図である。図9A、非腫瘍形成性細胞株由来のエキソソーム(HMLE)(左側のパネル)および脇がん由来のエキソソーム(T3M4)(右側のパネル)におけるGPC1の免疫金透過型電子顕微鏡写真。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図9B、エキソソームの表面上のGPC1のFACS分析の略図。図9C、アルデヒド/硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの透過型電子顕微鏡写真(TEM)(左側のパネル)。アルデヒド/硫酸塩ビーズとカップリングしたT3M4およびHMLEエキソソームにおけるGPC1の免疫金標識(下の2つのパネル)。金粒子が黒色の点で示されている。陰性対照を、二次抗体のみを使用して実施した(右上)。図9D、がん細胞由来のGPC1⁺エキソソーム(灰色)および非腫瘍形成性細胞由来のGPC1⁺エキソソーム(黒色)のパーセントを示すグラフ。図9E、超遠心分離によって単離した、HMLE、HME-L、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、およびMIA PaCa2由来の、アルデヒド/硫酸塩ビーズとカップリングしたGPC1⁺エキソソームのFACS分析の代表的なヒストグラム。

【図10-1】図10A～Fは、腫瘍を有するマウスにおけるがん細胞に由来するGPC1⁺循環エキソソーム(crExos)を示す図である。図10A、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスからの縦断的血液採取の概略図。血液試料を、腫瘍細胞を注射する前、ならびに腫瘍体積が300mm³、550mm³、1000mm³、および1350mm³に到達した時に得た。図10B、示されている体積のMDA-MB-231腫瘍を有するヌードマウス由来のGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図。図10C、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスにおける腫瘍体積とGPC1⁺crExosの百分率(%)の相関(ピアソン相関検定、相関係数r=0.98、P=0.004)。図10D、MDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソームに関する488レーザーと併せたNanoSight(登録商標)。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いた解析を示す。図10E、MDA-MB-231-CD63-GFPを注射したマウス由来のcrExosについてのNanoSight(登録商標)。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いたトラッキング解析を示す。図10F、crExosにおけるCD63-GFPとGPC1の重複発現についての共局在試験。FACS分析により、陰性対照としてMDA-MB-231細胞に由来するエキソソーム(左上のパネル)、陽性対照としてMDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソーム(中央上のパネル)、およびMDA-MB-231 CD63-GFP細胞を注射したマウスに由来するエキソソームを評価し、Allexa594とコンジュゲートした二次抗体のみを陰性対照として使用して分析した(右上のパネル)。FACS分析により、MDA-MB-231 CD63-GFPを同所性に注射したマウスに由来するCD63-GFP⁺エキソソームの画分のみが、GPC1陽性であることが示された(下の3つのグラフ)。

【図10-2】図10A～Fは、腫瘍を有するマウスにおけるがん細胞に由来するGPC1⁺循環エキソソーム(crExos)を示す図である。図10A、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスからの縦断的血液採取の概略図。血液試料を、腫瘍細胞を注射する前、ならびに腫瘍体積が300mm³、550mm³、1000mm³、および1350mm³に到達した時に得た。図10B、示されている体積のMDA-MB-231腫瘍を有するヌードマウス由来のGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図。図10C、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスにおける腫瘍体積とGPC1⁺crExosの百分率(%)の相関(ピアソン相関検定、相関係数r=0.98、P=0.004)。図10D、MDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソームに関する488レーザーと併せたNanoSight(登録商標)。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いた解析を示す。図10E、MDA-MB-231-CD63-GFPを注射したマウス由来のcrExosについてのNanoSight(登

10

20

30

40

50

録商標）。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いたトラッキング解析を示す。図10F、c r E x o sにおけるCD63-GFPとGPC1の重複発現についての共局在試験。FACS分析により、陰性対照としてMDA-MB-231細胞に由来するエキソソーム（左上のパネル）、陽性対照としてMDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソーム（中央上のパネル）、およびMDA-MB-231 CD63-GFP細胞を注射したマウスに由来するエキソソームを評価し、Allexa594とコンジュゲートした二次抗体のみを陰性対照として使用して分析した（右上のパネル）。FACS分析により、MDA-MB-231 CD63-GFPを同所性に注射したマウスに由来するCD63-GFP⁺エキソソームの画分のみが、GPC1陽性であることが示された（下の3つのグラフ）。

【図10-3】図10A～Fは、腫瘍を有するマウスにおけるがん細胞に由来するGPC1⁺循環エキソソーム（c r E x o s）を示す図である。図10A、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスからの縦断的血液採取の概略図。血液試料を、腫瘍細胞を注射する前、ならびに腫瘍体積が300mm³、550mm³、1000mm³、および1350mm³に到達した時に得た。図10B、示されている体積のMDA-MB-231腫瘍を有するヌードマウス由来のGPC1⁺c r E x o sのFACS分析についての代表的な散布図。図10C、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスにおける腫瘍体積とGPC1⁺c r E x o sの百分率（%）の相関（ピアソン相関検定、相関係数r=0.98、P=0.004）。図10D、MDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソームに関する488レーザーと併せたNanoSight（登録商標）。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いた解析を示す。図10E、MDA-MB-231-CD63-GFPを注射したマウス由来のc r E x o sについてのNanoSight（登録商標）。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いたトラッキング解析を示す。図10F、c r E x o sにおけるCD63-GFPとGPC1の重複発現についての共局在試験。FACS分析により、陰性対照としてMDA-MB-231細胞に由来するエキソソーム（左上のパネル）、陽性対照としてMDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソーム（中央上のパネル）、およびMDA-MB-231 CD63-GFP細胞を注射したマウスに由来するエキソソームを評価し、Allexa594とコンジュゲートした二次抗体のみを陰性対照として使用して分析した（右上のパネル）。FACS分析により、MDA-MB-231 CD63-GFPを同所性に注射したマウスに由来するCD63-GFP⁺エキソソームの画分のみが、GPC1陽性であることが示された（下の3つのグラフ）。

【図10-4】図10A～Fは、腫瘍を有するマウスにおけるがん細胞に由来するGPC1⁺循環エキソソーム（c r E x o s）を示す図である。図10A、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスからの縦断的血液採取の概略図。血液試料を、腫瘍細胞を注射する前、ならびに腫瘍体積が300mm³、550mm³、1000mm³、および1350mm³に到達した時に得た。図10B、示されている体積のMDA-MB-231腫瘍を有するヌードマウス由来のGPC1⁺c r E x o sのFACS分析についての代表的な散布図。図10C、MDA-MB-231細胞を同所性に注射したヌードマウスにおける腫瘍体積とGPC1⁺c r E x o sの百分率（%）の相関（ピアソン相関検定、相関係数r=0.98、P=0.004）。図10D、MDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソームに関する488レーザーと併せたNanoSight（登録商標）。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いた解析を示す。図10E、MDA-MB-231-CD63-GFPを注射したマウス由来のc r E x o sについてのNanoSight（登録商標）。黒い線は488レーザーを用いていないトラッキング解析を示し、灰色の線は488レーザーを用いたトラッキング解析を示す。図10F、c r E x o sにおけるCD63-GFPとGPC1の重複発現についての共局在試験。FACS分析により、陰性対照としてMDA-MB-231細胞に由来するエキソソーム（左上のパネル）、陽性対照としてMDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソーム（中央上のパネル）、およびMDA-MB-231 CD63-GFP細胞を注射したマウスに由来するエキソソームを評価し、Allexa594とコンジュゲートした二次抗体のみを陰性対照として使用して分析した（右上のパネル）。FACS分析により、MDA-MB-231 CD63-GFPを同所性に注射したマウスに由来するCD63-GFP⁺エキソソームの画分のみが、GPC1陽性であることが示された（下の3つのグラフ）。

としてMDA-MB-231 CD63-GFP細胞に由来するエキソソーム（中央上のパネル）、およびMDA-MB-231 CD63-GFP細胞を注射したマウスに由来するエキソソームを評価し、Alexa594とコンジュゲートした二次抗体のみを陰性対照として使用して分析した（右上のパネル）。FACS分析により、MDA-MB-231 CD63-GFPを同所性に注射したマウスに由来するCD63-GFP⁺エキソソームの画分のみが、GPC1陽性であることが示された（下の3つのグラフ）。

【図11-1】図11A～Iは、GPC1⁺crExosが膵がんに対する非侵襲的なバイオマーカーであることを示す図である。図11A、膵がんを有する患者由来のcrExosについてのTEM。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11B、CD9について免疫金標識したcrExosのTEM画像。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11C、健康なドナー（n=100）、乳がん患者（n=32）、および膵管腺癌を有する患者（PDAC；n=190）におけるGPC1⁺crExosのFACS分析を表す散布図（分散分析（ANOVA）、^{****}P<0.0001）。図11D、膵がんを有する患者47名のKRASの状態を表す棒グラフ。図11E、膵がんを有する患者3名由来のcrExosについてのTEM。GPC1の免疫金標識前に、FACSを使用してエキソソームをGPC1⁺集団（左側の列）とGPC1⁻集団（右側の列）に分離した。金粒子が黒色の点で示されている。図11F、FACSによってGPC1⁺集団（+；灰色）とGPC1⁻集団（-；黒色）に分けられたエキソソームにおけるKRAS G12D、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現（左側のパネル）またはKRAS G12V、KRAS野生型mRNA、および18s rRNA発現（右側のパネル）を表す散布図。図11G、健康なドナー（n=100）、良性膵疾患を有する患者（BPD；n=26）、膵がん前駆病変を有する患者（PCPL；n=7）およびPDACを有する患者におけるGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図（n=190；分散分析（ANOVA）、^{**}p<0.01、^{****}P<0.0001）。図11H、図11Eと同じ膵がんを有する患者のコホートにおける血清CA 19-9のELISAアッセイを表す散布図（ANOVA、^{*}P<0.05、^{****}P<0.0001）。図11I、膵がんを有する患者（n=190）と、対照（健康なドナー（n=100）および良性膵疾患を有する患者（n=26）、全部でn=126）におけるGPC1⁺crExos（灰色の線）、CA 19-9（灰色の破線）、エキソソーム濃度（黒い線）、およびエキソソームサイズ（黒い破線）についての受信者動作特性（ROC）曲線分析。略語：曲線下面積（AUC）、信頼区間（CI）、ナノメートル（nm）。

【図11-2】図11A～Iは、GPC1⁺crExosが膵がんに対する非侵襲的なバイオマーカーであることを示す図である。図11A、膵がんを有する患者由来のcrExosについてのTEM。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11B、CD9について免疫金標識したcrExosのTEM画像。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11C、健康なドナー（n=100）、乳がん患者（n=32）、および膵管腺癌を有する患者（PDAC；n=190）におけるGPC1⁺crExosのFACS分析を表す散布図（分散分析（ANOVA）、^{****}P<0.0001）。図11D、膵がんを有する患者47名のKRASの状態を表す棒グラフ。図11E、膵がんを有する患者3名由来のcrExosについてのTEM。GPC1の免疫金標識前に、FACSを使用してエキソソームをGPC1⁺集団（左側の列）とGPC1⁻集団（右側の列）に分離した。金粒子が黒色の点で示されている。図11F、FACSによってGPC1⁺集団（+；灰色）とGPC1⁻集団（-；黒色）に分けられたエキソソームにおけるKRAS G12D、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現（左側のパネル）またはKRAS G12V、KRAS野生型mRNA、および18s rRNA発現（右側のパネル）を表す散布図。図11G、健康なドナー（n=100）、良性膵疾患を有する患者（BPD；n=26）、膵がん前駆病変を有する患者（PCPL；n=7）およびPDACを有する患者におけるGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図（n=190；分散分析（ANOVA）

10

20

30

40

50

、 *** $p < 0.01$ 、 **** $P < 0.0001$ ）。図11H、図11Eと同じ肺がんを有する患者のコホートにおける血清CA 19-9のELISAアッセイを表す散布図(ANOVA、* $P < 0.05$ 、**** $P < 0.0001$)。図11I、肺がんを有する患者($n = 190$)と、対照(健康なドナー($n = 100$)および良性肺疾患を有する患者($n = 26$)、全部で $n = 126$)におけるGPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についての受信者動作特性(ROC)曲線分析。略語:曲線下面積(AUC)、信頼区間(CI)、ナノメートル(nm)。

【図11-3】図11A～Iは、GPC1⁺crExosが肺がんに対する非侵襲的なバイオマーカーであることを示す図である。図11A、肺がんを有する患者由来のcrExosについてのTEM。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11B、CD9について免疫金標識したcrExosのTEM画像。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11C、健康なドナー($n = 100$)、乳がん患者($n = 32$)、および肺管腺癌を有する患者(PDAC; $n = 190$)におけるGPC1⁺crExosのFACS分析を表す散布図(分散分析(ANOVA)、**** $P < 0.0001$)。図11D、肺がんを有する患者47名のKRASの状態を表す棒グラフ。図11E、肺がんを有する患者3名由来のcrExosについてのTEM。GPC1の免疫金標識前に、FACSを使用してエキソソームをGPC1⁺集団(左側の列)とGPC1⁻集団(右側の列)に分離した。金粒子が黒色の点で示されている。図11F、FACSによってGPC1⁺集団(+; 灰色)とGPC1⁻集団(-; 黒色)に分けられたエキソソームにおけるKRAS G12D、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現(左側のパネル)またはKRAS G12V、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現(右側のパネル)を表す散布図。図11G、健康なドナー($n = 100$)、良性肺疾患を有する患者(BPD; $n = 26$)、肺がん前駆病変を有する患者(PPCL; $n = 7$)およびPDACを有する患者におけるGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図($n = 190$; 分散分析(ANOVA)、* $p < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$)。図11H、図11Eと同じ肺がんを有する患者のコホートにおける血清CA 19-9のELISAアッセイを表す散布図(ANOVA、* $P < 0.05$ 、**** $P < 0.0001$)。図11I、肺がんを有する患者($n = 190$)と、対照(健康なドナー($n = 100$)および良性肺疾患を有する患者($n = 26$)、全部で $n = 126$)におけるGPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についての受信者動作特性(ROC)曲線分析。略語:曲線下面積(AUC)、信頼区間(CI)、ナノメートル(nm)。

【図11-4】図11A～Iは、GPC1⁺crExosが肺がんに対する非侵襲的なバイオマーカーであることを示す図である。図11A、肺がんを有する患者由来のcrExosについてのTEM。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11B、CD9について免疫金標識したcrExosのTEM画像。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図11C、健康なドナー($n = 100$)、乳がん患者($n = 32$)、および肺管腺癌を有する患者(PDAC; $n = 190$)におけるGPC1⁺crExosのFACS分析を表す散布図(分散分析(ANOVA)、**** $P < 0.0001$)。図11D、肺がんを有する患者47名のKRASの状態を表す棒グラフ。図11E、肺がんを有する患者3名由来のcrExosについてのTEM。GPC1の免疫金標識前に、FACSを使用してエキソソームをGPC1⁺集団(左側の列)とGPC1⁻集団(右側の列)に分離した。金粒子が黒色の点で示されている。図11F、FACSによってGPC1⁺集団(+; 灰色)とGPC1⁻集団(-; 黒色)に分けられたエキソソームにおけるKRAS G12D、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現(左側のパネル)またはKRAS G12V、KRAS野生型mRNA、および18S rRNA発現(右側のパネル)を表す散布図。図11G、健康なドナー($n = 100$)、良性肺疾患を有する患者(BPD; $n = 26$)、肺がん前駆病変を

10

20

30

40

50

有する患者 (P C P L ; n = 7) および P D A C を有する患者における G P C 1 + c r E x o s の F A C S 分析についての代表的な散布図 (n = 190 ; 分散分析 (A N O V A) 、 * * p < 0.01 、 * * * * P < 0.0001)。図 11 H、図 11 E と同じ腎がんを有する患者のコホートにおける血清 C A 19-9 の E L I S A アッセイを表す散布図 (A N O V A 、 * P < 0.05 、 * * * * P < 0.0001)。図 11 I、腎がんを有する患者 (n = 190) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および 良性腎疾患を有する患者 (n = 26) 、全部で n = 126) における G P C 1 + c r E x o s (灰色の線) 、 C A 19-9 (灰色の破線) 、エキソソーム濃度 (黒い線) 、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についての受信者動作特性 (R O C) 曲線分析。略語 : 曲線下面積 (A U C) 、信頼区間 (C I) 、ナノメートル (n m)。

【図 11-5】図 11 A ~ I は、 G P C 1 + c r E x o s が腎がんに対する非侵襲的なバイオマーカーであることを示す図である。図 11 A 、腎がんを有する患者由来の c r E x o s についての T E M 。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図 11 B 、 C D 9 について免疫金標識した c r E x o s の T E M 画像。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図 11 C 、健康なドナー (n = 100) 、乳がん患者 (n = 32) 、および腎管腺癌を有する患者 (P D A C ; n = 190) における G P C 1 + c r E x o s の F A C S 分析を表す散布図 (分散分析 (A N O V A) 、 * * * * P < 0.0001)。図 11 D 、腎がんを有する患者 47 名の K R A S の状態を表す棒グラフ。図 11 E 、腎がんを有する患者 3 名由来の c r E x o s についての T E M 。G P C 1 の免疫金標識前に、 F A C S を使用してエキソソームを G P C 1 + 集団 (左側の列) と G P C 1 - 集団 (右側の列) に分離した。金粒子が黒色の点で示されている。図 11 F 、 F A C S によって G P C 1 + 集団 (+ ; 灰色) と G P C 1 - 集団 (- ; 黒色) に分けられたエキソソームにおける K R A S G 12 D 、 K R A S 野生型 m R N A 、および 18 S r R N A 発現 (左側のパネル) または K R A S G 12 V 、 K R A S 野生型 m R N A 、および 18 s r R N A 発現 (右側のパネル) を表す散布図。図 11 G 、健康なドナー (n = 100) 、良性腎疾患を有する患者 (B P D ; n = 26) 、腎がん前駆病変を有する患者 (P C P L ; n = 7) および P D A C を有する患者における G P C 1 + c r E x o s の F A C S 分析についての代表的な散布図 (n = 190 ; 分散分析 (A N O V A) 、 * * p < 0.01 、 * * * * P < 0.0001)。図 11 H 、図 11 E と同じ腎がんを有する患者のコホートにおける血清 C A 19-9 の E L I S A アッセイを表す散布図 (A N O V A 、 * P < 0.05 、 * * * * P < 0.0001)。図 11 I 、腎がんを有する患者 (n = 190) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および 良性腎疾患を有する患者 (n = 26) 、全部で n = 126) における G P C 1 + c r E x o s (灰色の線) 、 C A 19-9 (灰色の破線) 、エキソソーム濃度 (黒い線) 、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についての受信者動作特性 (R O C) 曲線分析。略語 : 曲線下面積 (A U C) 、信頼区間 (C I) 、ナノメートル (n m)。

【図 12-1】図 12 A ~ F は、 G P C 1 + c r E x o s が K R A S G 12 D m R N A を特異的に有することを示す図である。図 12 A 、縦断的コホートにおける患者の血液採取を例示するための概略図。血液試料を、外科手術の前 (p r e - o p) 、および手術後として外科手術後 7 日目に得た。図 12 B 、 B P D (n = 4) 、 P C P L (n = 4) 、または P D A C (n = 29) を有する縦断的コホートの患者における、切除後の G P C 1 + c r E x o s の F A C S 分析の代表的な散布図 (対応のある両側スチュードント t 検定、 * * p < 0.01 、 * * * * P < 0.0001)。図 12 C 、切除後に G P C 1 + c r E x o s の降下 中央値の減少であった患者 (上の線) および G P C 1 + c r E x o s の降下 < 中央値の減少であった患者 (下の線) の全生存を示すカプランマイヤー曲線 (ログランク検定) (P = 0.016)。図 12 D 、切除後に G P C 1 + c r E x o s の降下 中央値の減少であった患者 (上の線) および G P C 1 + c r E x o s の降下 < 中央値の減少であった患者 (下の線) の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線 (ログランク検定) (P = 0.007)。図 12 E 、 0 日目から 7 日目の間に C A 19-9 の降下 中央値の減少であった患者 (上の線) および C A 19-9 の降下 < 中央値の減少であった

10

20

30

40

50

患者（下の線）の全生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.120$ ）。図12F、0日目から7日目の間にCA 19-9の降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびCA 19-9の降下<中央値の減少であった患者（下の線）の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.180$ ）。

【図12-2】図12A～Fは、GPC1⁺crExosがKRAS G12D mRNAを特異的に有することを示す図である。図12A、縦断的コホートにおける患者の血液採取を例示するための概略図。血液試料を、外科手術の前（pre-op）、および手術後として外科手術後7日目に得た。図12B、BPD（n=4）、PCPL（n=4）、またはPDAC（n=29）を有する縦断的コホートの患者における、切除後のGPC1⁺crExosのFACS分析の代表的な散布図（対応のある両側スチュードントt検定、 $** p < 0.01$ 、 $**** P < 0.0001$ ）。図12C、切除後にGPC1⁺crExosの降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびGPC1⁺crExosの降下<中央値の減少であった患者（下の線）の全生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.016$ ）。図12D、切除後にGPC1⁺crExosの降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびGPC1⁺crExosの降下<中央値の減少であった患者（下の線）の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.007$ ）。図12E、0日目から7日目の間にCA 19-9の降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびCA 19-9の降下<中央値の減少であった患者（下の線）の全生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.120$ ）。図12F、0日目から7日目の間にCA 19-9の降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびCA 19-9の降下<中央値の減少であった患者（下の線）の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.180$ ）。

【図12-3】図12A～Fは、GPC1⁺crExosがKRAS G12D mRNAを特異的に有することを示す図である。図12A、縦断的コホートにおける患者の血液採取を例示するための概略図。血液試料を、外科手術の前（pre-op）、および手術後として外科手術後7日目に得た。図12B、BPD（n=4）、PCPL（n=4）、またはPDAC（n=29）を有する縦断的コホートの患者における、切除後のGPC1⁺crExosのFACS分析の代表的な散布図（対応のある両側スチュードントt検定、 $** p < 0.01$ 、 $**** P < 0.0001$ ）。図12C、切除後にGPC1⁺crExosの降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびGPC1⁺crExosの降下<中央値の減少であった患者（下の線）の全生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.016$ ）。図12D、切除後にGPC1⁺crExosの降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびGPC1⁺crExosの降下<中央値の減少であった患者（下の線）の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.007$ ）。図12E、0日目から7日目の間にCA 19-9の降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびCA 19-9の降下<中央値の減少であった患者（下の線）の全生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.120$ ）。図12F、0日目から7日目の間にCA 19-9の降下 中央値の減少であった患者（上の線）およびCA 19-9の降下<中央値の減少であった患者（下の線）の疾患特異的生存を示すカプランマイヤー曲線（ログランク検定）（ $P = 0.180$ ）。

【図13-1】図13A～Gは、GPC1⁺crExosにより、GEMMにおける膵がんが予測されることを示す図である。図13A、縦断的コホートにおけるPtf1a^{cre/+}；LSL-Kras^{G12D/+}；Tgfb2^{f10x/f10x}（PKT）マウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で血液試料を得た。図13B、PKTマウス（E）および対照マウス（C）における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定したGPC1⁺crExosのFACS分析の代表的な散布図（分散分析（ANOVA）、 $**** P < 0.0001$ ）。図13C、PKTマウスにおける腫瘍体積とGPC1⁺crExosの相関（ピアソン相関検定、相関係数 $r = 0.67$ 、 $P = 0.0005$ ）。図13D、4週齢のPKTマウス（n=7）と、対照（対照同腹仔

10

20

30

40

50

($n = 6$) および急性膵炎を誘導したマウス ($n = 4$; 全部で $n = 10$) における、 $G P C 1^+ c r E x o s$ (灰色の線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (破線) についての受信者動作特性 (ROC) 曲線分析。図13E、横断的試験におけるPKTマウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、16日齢または20日齢の時点で血液試料を得た。図13F、横断的試験のPKTマウスおよび対照マウスにおける $G P C 1^+$ エキソソームのFACS分析についての代表的な散布図。マウスを16日齢から20日齢の間に屠殺した (対応のある両側スチューデントt検定、 $P < 0.0001$)。図13G、PKTマウスおよび対照において、16日齢から20日齢の間に診断されたPanIN病変の量についての代表的な散布図 (左側のパネル)。

【図13-2】図13A～Gは、 $G P C 1^+ c r E x o s$ により、GEMMにおける膵がんが予測されることを示す図である。図13A、縦断的コホートにおける $P t f 1 a^c r e / +$; $L S L - K r a s^{G 1 2 D / +}$; $T g f b r 2^{f 1 o x / f 1 o x}$ (PKT) マウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で血液試料を得た。図13B、PKTマウス (E) および対照マウス (C) における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定した $G P C 1^+ c r E x o s$ のFACS分析の代表的な散布図 (分散分析 (ANOVA)、 $^{* * * *} P < 0.0001$)。図13C、PKTマウスにおける腫瘍体積と $G P C 1^+ c r E x o s$ の相関 (ピアソン相関検定、相関係数 $r = 0.67$ 、 $P = 0.0005$)。図13D、4週齢のPKTマウス ($n = 7$) と、対照 (対照同腹仔 ($n = 6$) および急性膵炎を誘導したマウス ($n = 4$; 全部で $n = 10$) における、 $G P C 1^+ c r E x o s$ (灰色の線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (破線) についての受信者動作特性 (ROC) 曲線分析。図13E、横断的試験におけるPKTマウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、16日齢または20日齢の時点で血液試料を得た。図13F、横断的試験のPKTマウスおよび対照マウスにおける $G P C 1^+$ エキソソームのFACS分析についての代表的な散布図。マウスを16日齢から20日齢の間に屠殺した (対応のある両側スチューデントt検定、 $P < 0.0001$)。図13G、PKTマウスおよび対照において、16日齢から20日齢の間に診断されたPanIN病変の量についての代表的な散布図 (左側のパネル)。

【図13-3】図13A～Gは、 $G P C 1^+ c r E x o s$ により、GEMMにおける膵がんが予測されることを示す図である。図13A、縦断的コホートにおける $P t f 1 a^c r e / +$; $L S L - K r a s^{G 1 2 D / +}$; $T g f b r 2^{f 1 o x / f 1 o x}$ (PKT) マウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で血液試料を得た。図13B、PKTマウス (E) および対照マウス (C) における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定した $G P C 1^+ c r E x o s$ のFACS分析の代表的な散布図 (分散分析 (ANOVA)、 $^{* * * *} P < 0.0001$)。図13C、PKTマウスにおける腫瘍体積と $G P C 1^+ c r E x o s$ の相関 (ピアソン相関検定、相関係数 $r = 0.67$ 、 $P = 0.0005$)。図13D、4週齢のPKTマウス ($n = 7$) と、対照 (対照同腹仔 ($n = 6$) および急性膵炎を誘導したマウス ($n = 4$; 全部で $n = 10$) における、 $G P C 1^+ c r E x o s$ (灰色の線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (破線) についての受信者動作特性 (ROC) 曲線分析。図13E、横断的試験におけるPKTマウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、16日齢または20日齢の時点で血液試料を得た。図13F、横断的試験のPKTマウスおよび対照マウスにおける $G P C 1^+$ エキソソームのFACS分析についての代表的な散布図。マウスを16日齢から20日齢の間に屠殺した (対応のある両側スチューデントt検定、 $P < 0.0001$)。図13G、PKTマウスおよび対照において、16日齢から20日齢の間に診断されたPanIN病変の量についての代表的な散布図 (左側のパネル)。

【図13-4】図13A～Gは、 $GPC1^{+crExos}$ により、GEMMにおける膵がんが予測されることを示す図である。図13A、縦断的コホートにおける $Ptf1a^{cre/+}$ ； $LSL-Kras^{G12D/+}$ ； $Tgfb2^{fl/fl \times /fl/fl}$ (PKT)マウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で血液試料を得た。図13B、PKTマウス(E)および対照マウス(C)における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定した $GPC1^{+crExos}$ のFACS分析の代表的な散布図(分散分析(ANOVA)、 $^{* * * *} P < 0.0001$)。図13C、PKTマウスにおける腫瘍体積と $GPC1^{+crExos}$ の相関(ピアソン相関検定、相関係数 $r = 0.67$ 、 $P = 0.0005$)。図13D、4週齢のPKTマウス($n = 7$)と、対照(対照同腹仔($n = 6$)および急性膵炎を誘導したマウス($n = 4$ ；全部で $n = 10$)における、 $GPC1^{+crExos}$ (灰色の線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(破線)についての受信者動作特性(ROC)曲線分析。図13E、横断的試験におけるPKTマウスおよび対照マウスからの血液採取を例示するための概略図。安樂死させる前に、16日齢または20日齢の時点で血液試料を得た。図13F、横断的試験のPKTマウスおよび対照マウスにおける $GPC1^{+}$ エキソソームのFACS分析についての代表的な散布図。マウスを16日齢から20日齢の間に屠殺した(対応のある両側スチューデントt検定、 $P < 0.0001$)。図13G、PKTマウスおよび対照において、16日齢から20日齢の間に診断されたPanIN病変の量についての代表的な散布図(左側のパネル)。

【図14-1】図14A～Hは、エキソソームの単離を示す図である。図14A、Nanoseight(登録商標)分析により、最頻サイズが105ナノメートル(nm)であるNIH/3T3細胞、MCF10A細胞、HDF細胞、MDA-MB-231細胞およびE10細胞のエキソソームサイズ分布および濃度が示される。図14B、MDA-MB-231由来のエキソソームの透過型電子顕微鏡写真(TEM)。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図14C、CD9のMDA-MB-231由来のエキソソームの免疫金およびTEM。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図14D、E10細胞、NIH/3T3細胞、MDA-MB-231細胞、MCF10A細胞およびHDF細胞から抽出されたエキソソームタンパク質におけるフロチリン(flotillin)1およびCD81の免疫プロット。図14E、HMLE、HDF、HMLE、MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2における $GPC1$ mRNAのRT-qPCR測定。結果は平均±標準偏差として示されている(両側スチューデントt検定、 $P < 0.05$)。図14F、HMLE細胞株、HDF細胞株、HMLE細胞株、MCF7細胞株、MDA-MB-231細胞株、T3M4細胞株、PANC-1細胞株およびMIA-PaCa2細胞株における $GPC1$ の免疫プロット(上のパネル)。-アクチンをローディング対照として使用した(下のパネル)。図14G、非腫瘍形成性細胞株3種(HDF、HMLE、HMLE)および腫瘍形成性細胞株5種(MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2)に由来するエキソソームにおけるタンパク質の発現を示すための $GPC1$ の免疫プロット(上のパネル)。ローディング対照としてフロチリン1の免疫プロット(下のパネル)。図14H、MDA-MB-231由来のエキソソームおよびT3M4由来のエキソソームを供した異なる層のスクロース勾配でのフロチリン1の免疫プロット。

【図14-2】図14A～Hは、エキソソームの単離を示す図である。図14A、Nanoseight(登録商標)分析により、最頻サイズが105ナノメートル(nm)であるNIH/3T3細胞、MCF10A細胞、HDF細胞、MDA-MB-231細胞およびE10細胞のエキソソームサイズ分布および濃度が示される。図14B、MDA-MB-231由来のエキソソームの透過型電子顕微鏡写真(TEM)。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図14C、CD9のMDA-MB-231由来のエキソソームの免疫金およびTEM。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズーム

10

20

30

40

50

した挿入図を示す。図14D、E10細胞、NIH/3T3細胞、MDA-MB-231細胞、MCF-10A細胞およびHDF細胞から抽出されたエキソソームタンパク質におけるフロチリン(flotillin)1およびCD81の免疫プロット。図14E、HMEC、HDF、HMLE、MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2におけるGPC1 mRNAのRT-qPCR測定。結果は平均±標準偏差として示されている(両側スチュードントt検定、 $P < 0.05$)。図14F、HMEC細胞株、HDF細胞株、HMLE細胞株、MCF7細胞株、MDA-MB-231細胞株、T3M4細胞株、PANC-1細胞株およびMIA-PaCa2細胞株におけるGPC1の免疫プロット(上のパネル)。-アクチンをローディング対照として使用した(下のパネル)。図14G、非腫瘍形成性細胞株3種(HDF、HMEC、HMLE)および腫瘍形成性細胞株5種(MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2)に由来するエキソソームにおけるタンパク質の発現を示すためのGPC1の免疫プロット(上のパネル)。ローディング対照としてフロチリン1の免疫プロット(下のパネル)。図14H、MDA-MB-231由来のエキソソームおよびT3M4由来のエキソソームを供した異なる層のスクロース勾配でのフロチリン1の免疫プロット。

【図14-3】図14A~Hは、エキソソームの単離を示す図である。図14A、NanoSight(登録商標)分析により、最頻サイズが105ナノメートル(nm)であるNIH/3T3細胞、MCF-10A細胞、HDF細胞、MDA-MB-231細胞およびE10細胞のエキソソームサイズ分布および濃度が示される。図14B、MDA-MB-231由来のエキソソームの透過型電子顕微鏡写真(TEM)。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図14C、CD9のMDA-MB-231由来のエキソソームの免疫金およびTEM。金粒子が黒色の点で示されている。右上の画像はデジタルズームした挿入図を示す。図14D、E10細胞、NIH/3T3細胞、MDA-MB-231細胞、MCF-10A細胞およびHDF細胞から抽出されたエキソソームタンパク質におけるフロチリン(flotillin)1およびCD81の免疫プロット。図14E、HMEC、HDF、HMLE、MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2におけるGPC1 mRNAのRT-qPCR測定。結果は平均±標準偏差として示されている(両側スチュードントt検定、 $P < 0.05$)。図14F、HMEC細胞株、HDF細胞株、HMLE細胞株、MCF7細胞株、MDA-MB-231細胞株、T3M4細胞株、PANC-1細胞株およびMIA-PaCa2細胞株におけるGPC1の免疫プロット(上のパネル)。-アクチンをローディング対照として使用した(下のパネル)。図14G、非腫瘍形成性細胞株3種(HDF、HMEC、HMLE)および腫瘍形成性細胞株5種(MCF7、MDA-MB-231、T3M4、PANC-1、MIA-PaCa2)に由来するエキソソームにおけるタンパク質の発現を示すためのGPC1の免疫プロット(上のパネル)。ローディング対照としてフロチリン1の免疫プロット(下のパネル)。図14H、MDA-MB-231由来のエキソソームおよびT3M4由来のエキソソームを供した異なる層のスクロース勾配でのフロチリン1の免疫プロット。

【図15-1】図15A~Cは、ヒト血清試料におけるNanoSight(登録商標)分析を示す図である。図15A、患者血清由来のエキソソームを供した異なる層のスクロース勾配から抽出されたタンパク質のフロチリン1の免疫プロット。図15B、NanoSight(登録商標)分析により、健康なドナー($n = 100$)、乳がん患者($n = 32$)、およびPDACを有する患者($n = 190$)に由来する循環エキソソームの濃度(血清1mL当たりのエキソソームの数)が示される(分散分析(ANOVA)、 $* P < 0.05$ 、 $**** P < 0.0001$)。図15C、NanoSight(登録商標)分析により、健康なドナー($n = 100$)、乳がん患者($n = 32$)、およびPDACを有する患者($n = 190$)に由来する循環エキソソームのサイズが示される(分散分析(ANOVA)、 $*** p < 0.001$)。

【図15-2】図15A~Cは、ヒト血清試料におけるNanoSight(登録商標)

10

20

30

40

50

分析を示す図である。図15A、患者血清由来のエキソソームを供した異なる層のスクロース勾配から抽出されたタンパク質のフロチリン1の免疫プロット。図15B、Nano Sight (登録商標) 分析により、健康なドナー (n = 100)、乳がん患者 (n = 32)、およびPDACを有する患者 (n = 190) に由来する循環エキソソームの濃度 (血清 1 mL 当たりのエキソソームの数) が示される (分散分析 (ANOVA)、* P < 0.05、*** P < 0.0001)。図15C、Nano Sight (登録商標) 分析により、健康なドナー (n = 100)、乳がん患者 (n = 32)、およびPDACを有する患者 (n = 190) に由来する循環エキソソームのサイズが示される (分散分析 (ANOVA)、*** p < 0.001)。

【図16-1】図16A～Eは、腫瘍病期に特異的な分析を示す図である。図16A、上皮内癌 (CIS) またはI期膵がんを有する患者 (n = 5) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) におけるGPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についての受信者動作特性 (ROC) 曲線分析。図16B、IIa期膵がんを有する患者 (n = 18) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26)、全部でn = 126) におけるGPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16C、IIb期膵がんを有する患者 (n = 117) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16D、IIII期膵がんを有する患者 (n = 11) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16E、IV期膵がんを有する患者 (n = 41) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) のROC曲線分析 (略語: 曲線下面積 (AUC)、信頼区間 (CI)、ナノメートル (nm))。

【図16-2】図16A～Eは、腫瘍病期に特異的な分析を示す図である。図16A、上皮内癌 (CIS) またはI期膵がんを有する患者 (n = 5) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) におけるGPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についての受信者動作特性 (ROC) 曲線分析。図16B、IIa期膵がんを有する患者 (n = 18) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26)、全部でn = 126) におけるGPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16C、IIb期膵がんを有する患者 (n = 117) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16D、IIII期膵がんを有する患者 (n = 11) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰色の線)、CA 19-9 (灰色の破線)、エキソソーム濃度 (黒い線)、およびエキソソームサイズ (黒い破線) についてのROC曲線分析。図16E、IV期膵がんを有する患者 (n = 41) と、対照 (健康なドナー (n = 100) および良性膵疾患を有する患者 (n = 26、全部でn = 126)) における、GPC1⁺crExos (灰

10

20

30

40

50

色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)のROC曲線分析(略語:曲線下面積(AUC)、信頼区間(CI)、ナノメートル(nm))。

【図16-3】図16A~Eは、腫瘍病期に特異的な分析を示す図である。図16A、上皮内癌(CIS)またはI期膵がんを有する患者(n=5)と、対照(健康なドナー(n=100)および良性膵疾患を有する患者(n=26、全部でn=126))におけるGPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についての受信者動作特性(ROC)曲線分析。図16B、IIa期膵がんを有する患者(n=18)と、対照(健康なドナー(n=100)および良性膵疾患を有する患者(n=26)、全部でn=126)におけるGPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についてのROC曲線分析。図16C、IIb期膵がんを有する患者(n=117)と、対照(健康なドナー(n=100)および良性膵疾患を有する患者(n=26、全部でn=126))における、GPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についてのROC曲線分析。図16D、II期膵がんを有する患者(n=11)と、対照(健康なドナー(n=100)および良性膵疾患を有する患者(n=26、全部でn=126))における、GPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)についてのROC曲線分析。図16E、IV期膵がんを有する患者(n=41)と、対照(健康なドナー(n=100)および良性膵疾患を有する患者(n=26、全部でn=126))における、GPC1⁺crExos(灰色の線)、CA 19-9(灰色の破線)、エキソソーム濃度(黒い線)、およびエキソソームサイズ(黒い破線)のROC曲線分析(略語:曲線下面積(AUC)、信頼区間(CI)、ナノメートル(nm))。

【図17】図17A~Bは、縦断的ヒト試験。図17A、膵がんを有する患者におけるGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図(ANOVA、*P<0.05)。図17B、手術前日および手術後7日目の、良性膵疾患を有する縦断的コホートの患者(BPD)(n=4)、膵がん前駆病変(PCPL)を有する縦断的コホートの患者(n=4)、および膵管腺癌(PDAC)(n=29)を有する縦断的コホートの患者における、血清CA 19-9(U/mL)のELISAアッセイについての代表的な散布図(対応のある両側スチューデントt検定、**P<0.01)。

【図18-1】図18A~Dは、PDAC GEMM縦断的試験を示す図である。図18A、PKTマウス(E)および対照マウス(C)における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定したエキソソームサイズのNanoSight(登録商標)分析についての代表的な散布図(分散分析(ANOVA)、*P<0.05)。図18B、PKTマウス(E)および対照マウス(C)における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定したエキソソーム濃度のNanoSight(登録商標)分析についての代表的な散布図(ANOVA、*P<0.05)。(略語:対照(C)、実験的(E))。図18C、個々のPKTマウスにおける時間をわたっての、MRIによって測定された腫瘍体積および%GPC1⁺crExosを示すグラフ(破線を伴う丸:腫瘍体積;実線を伴う四角:%GPC1⁺crExos)。図18D、対照マウス(n=3)およびセルレイン(Cerulin)により誘導された急性膵炎を有するマウス(n=4)におけるGPC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図(両側スチューデントt検定、ns=P>0.05)。

【図18-2】図18A~Dは、PDAC GEMM縦断的試験を示す図である。図18A、PKTマウス(E)および対照マウス(C)における、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で測定したエキソソームサイズのNanoSight(登録商標)分析についての代表的な散布図(分散分析(ANOVA)、*P<0.05)。図18B、PKTマウス(E)および対照マウス(C)における、4週齢、5週齢、6週齢、

10

20

30

40

50

7週齢、および8週齢の時点で測定したエキソソーム濃度のNanosight（登録商標）分析についての代表的な散布図(ANOVA、*P<0.05)。〔略語：対照(C)、実験的(E)〕。図18C、個々のPKTマウスにおける時間をわたっての、MRIによって測定された腫瘍体積および%GpC1⁺crExosを示すグラフ(破線を伴う丸：腫瘍体積；実線を伴う四角：%GpC1⁺crExos)。図18D、対照マウス(n=3)およびセルレイン(Cerulin)により誘導された急性膵炎を有するマウス(n=4)におけるGpC1⁺crExosのFACS分析についての代表的な散布図(両側スチューデントt検定、ns=P>0.05)。

【図19】図19、PDAC GEMM横断的試験。FACS選別によってGpC1⁺集団(+；灰色)とGpC1⁻集団(-；黒色)に分けられたエキソソームにおけるKRAS G12D、KRAS野生型および18s mRNAの発現についての代表的な散布図。

【発明を実施するための形態】

【0042】

エキソソームは、多くの異なる細胞型によって放出される、エンドサトーシス起源の小さな小胞(40~150nm)である。腫瘍微小環境におけるエキソソームは、細胞間コミュニケーションを容易にすることにおいて重要な役割を果たし得る。エキソソームは、主にRNAおよびタンパク質を含有することが報告されている。本明細書で教示する通り、膵がん細胞由来のエキソソームおよび膵管腺癌を有する患者の血清由来のエキソソームは、ゲノムDNAを含有する。

【0043】

本発明では、エキソソームは、二本鎖ゲノムDNAの長い断片を含有することが見いだされ、これは、循環DNAは高度に断片化されており、推定される長さはたった60~100bpであるという現在の見解と矛盾する(MouliereおよびThierry、2012年)。KRASおよびp53の変異を、膵がん細胞株に由来するエキソソーム由来のゲノムDNAおよび膵がんを有する患者の血清に由来するエキソソーム由来のゲノムDNAを使用して検出することができる。さらに、膵がんを有する患者由来の血清エキソソームは、染色体全てにわたるゲノムDNAを含有し、エキソソーム由来DNAは、それらの親のがん細胞または腫瘍と同一の変異を担持する。これらの結果は、ゲノムDNA変異を決定して、がん患者の予後を予測し、個人向けの医学的手法による治療を改善するために血清由来のエキソソームを使用することができ、それにより、治療を調整するために特異的な変異の検出を使用することができるることを示すものである。例として、KRAS変異およびEGFR増幅により、転移性結腸直腸がんの一部の場合に効率的であることが証明されている薬物であるセツキシマブに対する耐性が予測される(Lievreら、2006年)。さらに、腫瘍にKRAS変異を有するがん患者は、エルロチニブを使用したEGFR標的化療法により悪化する。

【0044】

また、エキソソームは、mRNAの転写およびタンパク質翻訳を行う能力を有することが見いだされた。エキソソームにp53をコードするプラスミドをトランスフェクトしたところ、エキソソームは、p53タンパク質を発現し、タンパク質をp53欠損標的細胞に送達することができ、それにより、p21発現が増加した。これらの結果は、治療用タンパク質を疾患細胞において発現させ、かつ/または疾患細胞に送達するためにエキソソームを使用することができることを示すものである。

【0045】

正常な細胞に由来するエキソソームおよびがん細胞に由来するエキソソームに対して超高速液体クロマトグラフィー、続いて質量分析(UPLC-MS)を使用して、細胞表面プロテオグリカンであるグリピカン-1が、がん細胞由来エキソソームの表面上に特異的に濃縮されることが見いだされた。循環GpC1⁺エキソソーム(GpC1⁺crExos)をモニタリングし、フローサイトメトリー(FACS)を使用してがん患者の血清およびがんを有するマウスの血清から単離した。GpC1⁺crExosは、膵がんを有す

10

20

30

40

50

る患者の血清において絶対的な特異度および感度で検出され、これにより、健康な被験体および良性膵疾患を有する患者と、初期膵がんおよび後期膵がんを有する患者とが区別される。腫瘍の外科的切除前後の患者からの血清の比較分析において、G P C 1⁺ c r E x o s のレベルは腫瘍量に対応した。膵臓特異的 K R A S^{G 1 2 D} によって駆動される、自然発生膵臓腫瘍を有する患者由来の G P C 1⁺ c r E x o s および遺伝子操作されたマウスモデル (G E M M) 由来の G P C 1⁺ c r E x o s は、K R A S^{G 1 2 D} 変異を有する R N A を特異的に含有した。G P C 1⁺ c r E x o s は、M R I によるシグナルが陰性であるにもかかわらず初期 P a n I N 病変を検出するための信頼できるバイオマーカーとしての機能を果たした。G P C 1⁺ c r E x o s は、循環中のがんエキソソームを特異的に検出するために使用することができ、また、治癒的な外科療法の見込みを補助し得る、初期の膵がんを検出するための非侵襲的な診断およびスクリーニングツールである。さらに、グリピカン 1 陽性エキソソームの単離により、がん細胞由来のゲノム D N A 、 R N A 、および / またはタンパク質を単離する手段がもたらされる。

10

【 0 0 4 6 】

I . エキソソーム

「微小胞」および「エキソソーム」という用語は、本明細書で使用される場合、直径 (または粒子が球状でない場合には最大寸法) が約 1 0 n m から約 5 0 0 0 n m の間、より一般には 3 0 n m から 1 0 0 0 n m の間、最も典型的には約 5 0 n m から 7 5 0 n m の間の膜様粒子を指し、エキソソームの膜の少なくとも一部は、細胞から直接得られる。最も一般的には、エキソソームのサイズ (平均直径) は、ドナー細胞のサイズの最大 5 % である。したがって、特に意図されているエキソソームとして、細胞から発せられるものが挙げられる。

20

【 0 0 4 7 】

エキソソームは、例えば体液などの任意の適切な試料型から検出または単離することができる。本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、本発明によって提供される方法に適した任意の試料を指す。試料は、検出または単離に適したエキソソームを含む任意の試料であってよい。試料の供給源としては、血液、骨髄、胸膜液、腹腔液 (p e r i t o n e a l f l u i d) 、脳脊髄液、尿、唾液、羊水、悪性腹水、気管支肺胞洗浄液、滑液 (s y n o v i a l f l u i d) 、母乳、汗、涙、滑液 (j o i n t f l u i d) 、および気管支洗浄液が挙げられる。一態様では、試料は、例えば、全血または任意のその画分または成分を含めた血液試料である。本発明と共に使用するのに適した血液試料は、例えば、静脈、動脈、末梢、組織、臍帯などの血液細胞またはその成分を含む公知の任意の供給源から抽出することができる。例えば、試料は、周知の常套的な臨床的方法 (例えば、全血を抜き取り処理するための手順) を使用して入手し、処理することができる。一態様では、例示的な試料は、がんを有する被験体から抜き取られた末梢血であり得る。

30

【 0 0 4 8 】

エキソソームは、外科的試料、生検試料、組織、糞便、および培養細胞などの組織試料から単離することもできる。エキソソームを組織供給源から単離する場合には、単一細胞懸濁物を得るために組織を均質化し、その後に細胞を溶解してエキソソームを放出させが必要な場合がある。エキソソームを組織試料から単離する場合には、エキソソームの破壊をもたらさない均質化および溶解手順を選択することが重要である。本明細書において意図されているエキソソームは、生理的に許容される溶液、例えば、緩衝生理食塩水、増殖培地、種々の水性培地などの中の体液から単離することが好ましい。

40

【 0 0 4 9 】

エキソソームは、新しく採取した試料から単離することもでき、冷凍または冷蔵で保管されている試料から単離することもできる。必要ではないが、体液試料を清澄化した後に体積排除ポリマーを用いて沈殿させて試料に由来するあらゆる残屑を除去すると、より純度の高いエキソソームを得ることができる。清澄化の方法としては、遠心分離、超遠心分離、濾過、または限外濾過が挙げられる。最も典型的に、エキソソームは、当技術分野で

50

周知の多数の方法によって単離することができる。1つの好ましい方法は、体液または細胞培養上清からの分画遠心分離である。エキソソームを単離するための例示的な方法は、(Loscheら、2004年; MesriおよびAltieri、1998年; Morelら、2004年)に記載されている。あるいは、エキソソームは、(Combesら、1997年)に記載の通りフローサイトメトリーによって単離することもできる。

【0050】

エキソソームを単離するための許容されるプロトコールの1つとして、比較的低密度のエキソソームを浮遊させるための、スクロース密度勾配またはスクロースクッション(sucrose cushion)と組み合わせることも多い超遠心分離が挙げられる。逐次的な分画遠心分離によるエキソソームの単離は、他の微小胞または高分子複合体とサイズ分布が重複している可能性によって複雑になる。さらに遠心分離は、それらのサイズに基づいて小胞を分離するための手段としては不十分となる可能性がある。しかし、逐次的な遠心分離は、スクロース勾配超遠心分離と組み合わせれば、エキソソームの高濃縮を達成することができる。

10

【0051】

別の選択肢は、超遠心分離経路に対する代替法を使用したサイズに基づくエキソソームの単離である。超遠心分離よりも時間がかからず、また、特別な設備を使用する必要がない限外濾過手順を使用したエキソソーム精製の成功が報告されている。同様に、流体を駆動する陽圧を使用して1つのマイクロフィルターでの細胞、血小板、および細胞の残屑の除去、ならびに第2のマイクロフィルターへの30nmよりも大きな小胞の捕捉を可能にする市販のキットが利用可能である(EXOMIR(商標)、Bioso Scientific)。このプロセスに関しては、エキソソームは回収せず、それらのRNA内容物を第2のマイクロフィルターに捕捉した材料から直接抽出し、次いでそのRNA内容物をPCR分析に使用することができる。HPLCに基づくプロトコールにより、高度に純粋なエキソソームを得ることを潜在的に可能にできるが、これらのプロセスは専用の設備を必要とし、スケールアップが難しい。重大な問題は、血液と細胞培養培地がどちらも多数のナノ粒子(一部は非小胞)を同じサイズ範囲内にエキソソームとして含有することである。例えば、一部のmRNAは、エキソソームではなく細胞外タンパク質複合体内に含有され得るが、プロテアーゼ(例えば、プロテイナーゼK)を用いた処理を行つてあらゆる可能性のある「エキソソーム外」タンパク質による汚染を排除することができる。

20

【0052】

別の実施形態では、がん細胞由来エキソソームは、免疫特異性相互作用(例えば、免疫磁気捕捉)を伴うものなどの、試料をエキソソームについて濃縮するために一般に使用される技法によって捕捉することができる。免疫磁気捕捉は、免疫磁気細胞分離としても公知であり、一般には、特定の細胞型に見いだされるタンパク質に指向される抗体を小さな常磁性ビーズに付着させることを伴う。抗体をコーティングしたビーズを血液などの試料と混合すると、それらのビーズは特定の細胞に付着し、それを取り囲む。次いで、試料を強力な磁場に置き、それにより、ビーズを一方の側面にペレット化させる。血液を除去した後、捕捉された細胞はビーズと共に保持される。この一般的な方法の多くの変形が当技術分野で周知であり、エキソソームを単離するための使用に適する。一実施例では、エキソソームを磁気ビーズ(例えば、アルデヒド/硫酸塩ビーズ)に付着させ、次いで、抗体を混合物に添加して、ビーズに付着したエキソソームの表面上のエピトープを認識させることができる。

30

【0053】

本明細書で使用される場合、分析は、エキソソームの直接または間接的な視覚化を可能にし、in vivoにおけるものであってもex vivoにおけるものであってもよい任意の方法を含む。例えば、分析としては、これだけに限定されないが、固体基質に結合したエキソソームのex vivoにおける顕微鏡または血球計算による検出および視覚化、フローサイトメトリー、蛍光イメージングなどが挙げられる。例示的な態様では、

40

50

グリピカン 1 に指向される抗体を使用してがん細胞由来エキソソームを検出し、その後、固体基質に結合させ、顕微鏡または血球計算による検出を使用して視覚化する。

【 0 0 5 4 】

I I . 疾患の診断、予後判定、および治療

本発明の方法を使用したがん細胞由来エキソソームの検出、単離、および特徴付けは、がんの予後の評価において、および疾患の再発を導き得る治療失敗を早期検出するための治療有効性のモニタリングにおいて有用である。さらに、本発明に従ったがん細胞由来エキソソーム分析により、治療過程が完了している前駆症状性患者における早期再発の検出が可能になる。これは、がん細胞由来の存在が、ある期間にわたって腫瘍の進行および拡散、療法に対する不十分な応答、疾患の再発、および / または生存の減少に伴う、かつ / または相関する可能性があるので、可能である。したがって、がん細胞由来エキソソームの数え上げおよび特徴付けにより、患者を、療法に対する応答に基づいて最初のリスクおよびその後のリスクを予測するベースライン特性について層別化する方法がもたらされる。

10

【 0 0 5 5 】

したがって、別の実施形態では、本発明は、被験体におけるがんの診断または予後判定を行う方法を提供する。本発明に開示されている方法に従って単離されたがん細胞由来エキソソームを分析して、被験体におけるがんの診断または予後判定を行うことができる。そのように、本発明の方法は、例えば、がん患者およびがんのリスクがある者を評価するために使用することができる。本明細書に記載されている診断または予後判定の方法のいずれにおいても、ゲノムの変異もしくはがん特異的エキソソーム表面マーカーなどのがんの 1 つもしくは複数の指標、または任意の他の障害の 1 つもしくは複数の指標の、存在または非存在のいずれかを、診断または予後判定を行うために使用することができる。

20

【 0 0 5 6 】

一態様では、本明細書に記載の通り血液試料を患者から抜き取り、がん細胞由来エキソソームを検出し、かつ / または単離する。例えば、エキソソームをグリピカン 1 に結合する 1 つまたは複数の抗体で標識することができ、抗体には蛍光標識が共有結合していてよい。次いで、分析を実施して、試料中のがん細胞由来エキソソームの数および特徴付けを決定することができ、この測定から、最初の血液試料中に存在するがん細胞由来エキソソームの数を決定することができる。がん細胞由来エキソソームの数は、エキソソームを視覚的に定量化し、特徴付けるための血球計算または顕微鏡による技法によって決定することができる。がん細胞由来エキソソームは、当技術分野で公知の他の方法（例えば、ELISA）によって検出し、定量化することができる。

30

【 0 0 5 7 】

種々の態様では、被験体のがん細胞由来エキソソームの数および特徴付けの分析は、被験体の進行および病態を評価するために特定の時間経過にわたって、種々の間隔で行う。例えば、分析は、がん細胞由来エキソソームのレベルおよび特徴付けを時間に応じて追跡するために、1日、2日、3日、1週間、2週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、または1年などの定期的な間隔で実施することができる。現存するがん患者の場合では、これにより、疾患の進行の有用な指示がもたらされ、医療実施者ががん細胞由来エキソソームの増加、減少、または変化がないことに基づいて適切な治療上の選択を行う助けとなる。がん細胞由来エキソソームの時間をわたっての 2 倍、5 倍、10 倍またはそれ超の任意の増加により、患者の予後が低下し、これは、患者が療法を変化させるべきであるという早期指標である。同様に、2 倍、5 倍、10 倍またはそれ超の任意の増加により、患者が、予後および療法に対する応答をさらに評価するためにイメージングなどのさらなる検査を受けるべきであることが示される。がん細胞由来エキソソームにおける時間をわたっての 2 倍、5 倍、10 倍またはそれ超である任意の減少により、疾患の安定化および患者の療法に対する応答が示され、これは、療法を変化させないことの指標である。がんのリスクがある者については、検出されるがん細胞由来エキソソームの数が突発的に増加することにより、患者に腫瘍が発生しているという早期警告がもたらされ得、したがって、これ

40

50

により、早期診断がもたらされる。一実施形態では、がん細胞由来エキソソームの検出は、がんの病期分類と共に増加する。

【0058】

本明細書において提供される方法のいずれにおいても、追加的な臨床的評価をもたらすために、追加的な分析も実施してがん細胞由来エキソソームを特徴付けることができる。例えば、画像解析およびバルク数測定に加えて、特定のがんマーカーに特異的なプライマーを用いた多重化などのP C R 技法を使用して、がん細胞由来エキソソームが由来する腫瘍の型、転移の状態、および悪性疾患の程度などの情報を得ることができる。さらに、患者のがんの特徴付けに関する追加的な情報を評価する手段として、D N A またはR N A 分析、プロテオーム解析、またはメタボローム解析を実施することができる。

10

【0059】

例えば、追加的な分析により、特定の治療レジメンに対する被験体の応答性の決定を行うため、またはがんの治療における候補薬剤の効果を決定するために十分なデータがもたらされる。したがって、本発明は、本明細書に記載の通り被験体のがん細胞由来エキソソームを検出／単離し、前記がん細胞由来エキソソームを分析することによって特定の治療レジメンに対する被験体の応答性またはがんの治療における候補薬剤の効果を決定する方法を提供する。例えば、薬物治療を患者に施したら、本発明の方法を使用して薬物治療の有効性を決定することが可能である。例えば、薬物治療前に患者から取得した試料、ならびに薬物治療と同時にまたはその後に患者から取得した1つまたは複数の試料を、本発明の方法を使用して処理することができる。処理した試料それぞれの分析結果を比較することにより、薬物治療の有効性または薬剤に対する患者の応答性を決定することができる。このように、失敗した化合物の早期同定を行うこともでき、有望な化合物の早期検証を行うこともできる。

20

【0060】

本発明のある特定の態様は、エキソソームから単離したゲノムD N A に見いだされる遺伝子変異の存在に基づいて疾患または障害を予防または治療するために使用することができる。本発明の他の態様は、組換えタンパク質を発現するエキソソームを用いたまたはエキソソームから単離された組換えタンパク質を用いた患者の治療を提供する。本発明の他の態様は、患者試料中のがん細胞由来エキソソームの存在に基づいた疾患の診断を提供する。

30

【0061】

「被験体」という用語は、本明細書で使用される場合、本主題の方法が実行される任意の個体または患者を指す。一般に、被験体はヒトであるが、当業者には理解される通り、被験体は動物であってよい。したがって、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットを含む）、ネコ、イヌ、ウサギ、農場動物（ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどを含む）、および靈長類（サル、チンパンジー、オランウータン、およびゴリラを含む）などの哺乳動物を含めた他の動物が被験体の定義の範囲内に含まれる。

【0062】

「治療」および「治療すること」とは、疾患または健康に関連する状態に関する治療的利益を得るために治療剤を被験体に投与もしくは適用することまたは手順もしくはモダリティを被験体に対して実施することを指す。例えば、治療は、化学療法、免疫療法、もしくは照射療法を施すこと、外科手術を実施すること、またはそれらの任意の組合せを含み得る。

40

【0063】

「治療的利益」または「治療的に有効」という用語は、本出願全体を通して使用される場合、この状態の医学的治療に関して、被験体の健康（w e l l - b e i n g ）を促進または増強する任意のものを指す。これは、これだけに限定されないが、疾患の徵候または症状の頻度または重症度の低下を含む。例えば、がんの治療は、例えば、腫瘍の侵襲性的低下、がんの成長速度の低下、または転移の予防を伴い得る。がんの治療とは、がんを有する被験体の生存の延長を指す場合もある。

50

【0064】

「がん」という用語は、本明細書で使用される場合、固体腫瘍、転移性がん、または非転移性のがんを記載するために使用することができる。ある特定の実施形態では、がんは、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、十二指腸、小腸、大腸、結腸、直腸、肛門、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、脾臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮において生じるものであり得る。

【0065】

がんは、具体的には以下の組織型のものであり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性；癌腫；癌腫、未分化；巨細胞および紡錘体細胞癌；小細胞癌；乳頭状癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；石灰化上皮腫（*pillomatrix carcinoma*）；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；ガストリノーマ、悪性；胆管癌；肝細胞癌；混合型肝細胞癌および胆管癌；柱状腺癌（*trabecular adenocarcinoma*）；腺様囊胞癌；腺腫様ポリープ内腺癌；腺癌、大腸家族性ポリポーシス；固体癌；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺胞腺癌（*branchiolo-alveolar adenocarcinoma*）；乳頭状腺癌；嫌色素性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞性腺癌；乳頭状濾胞性腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；類内膜癌（*endometroid carcinoma*）；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳道腺癌（*ceruminous adenocarcinoma*）；粘液性類表皮癌；囊胞腺癌；乳頭状囊胞腺癌；乳頭状漿液性囊胞腺癌；粘液性囊胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性腺管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；バジエット病、乳房；乳房細胞癌；腺扁平上皮癌；腺癌w/扁平上皮化生；胸腺腫、悪性；卵巣間質腫、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；アンドロプラストーマ、悪性；セルトリ細胞癌；ライディッヒ細胞腫、悪性；脂質細胞腫、悪性；傍神経節腫、悪性；乳房外傍神経節腫、悪性；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫（*giant angiomyxoma*）；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍、悪性；ミュラー管混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽腫；癌肉腫；間葉腫、悪性；ブレンナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胎生期癌；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；血管外皮細胞腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫；ユーリング肉腫；歯原性腫瘍、悪性；エナメル芽細胞歯牙肉腫（*ameloblastic odontosarcoma*）；エナメル上皮腫、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；髓膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン；側肉芽腫（*paragranuloma*）；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；特定された他の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病（*lymphosarcoma cell leukemia*）；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；单球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血病（*megakaryoblastic leukemia*）；骨髄性肉腫；およびヘアリー細胞白血病。

【0066】

「接触される」および「曝露される」という用語は、細胞に適用される場合、本明細書では、治療剤を標的細胞に送達するまたは標的細胞の直接近位に置くプロセスを記載するために使用される。細胞死滅を達成するために、例えば、1つまたは複数の薬剤を、細胞

10

20

30

40

50

を死滅させるまたは細胞が分裂するのを防ぐために有効な量で細胞に送達する。

【0067】

治療に対する患者の有効な応答または患者の「応答性」とは、疾患または障害のリスクがあるまたはそれに罹患している患者にもたらされる臨床的または治療的利益を指す。そのような利益としては、細胞応答または生物学的応答、完全奏効、部分奏効、安定病態（進行も再発もない）、または後の再発を伴う応答を挙げることができる。例えば、有効な応答は、がんと診断された患者における腫瘍サイズの縮小または無増悪生存であり得る。

【0068】

本明細書に記載の方法により、治療転帰を予測およびモニタリングし、かつ／またはそのような治療の利益を得る患者を同定または選択することができる。

10

【0069】

腫瘍性状態の治療に関しては、腫瘍性状態の病期に応じて、腫瘍性状態の治療は、以下の療法のうちの1つまたはそれらの組合せを伴う：腫瘍性組織を除去するための外科手術、放射線療法、および化学療法。他の治療レジメンを、抗がん剤、例えば、治療用組成物および化学療法剤の投与と組み合わせることができる。例えば、そのような抗がん剤を用いて治療される患者は、放射線療法も受けることができ、かつ／または外科手術も受けることができる。

【0070】

疾患の治療に関して、治療用組成物の適切な投与量は、上で定義した治療される疾患の型、重症度および疾患の経過、患者の臨床的な病歴および薬剤に対する応答、および主治医の裁量に左右される。薬剤は、一度にまたは一連の治療にわたって患者に適切に投与される。

20

【0071】

治療的なおよび予防的な方法および組成物は、所望の効果を達成するために有効な組み合わせた量でもたらすことができる。組織、腫瘍、もしくは細胞は、1つもしくは複数の薬剤を含む1つもしくは複数の組成物もしくは薬理学的製剤（複数可）と接触させることができる、または組織、腫瘍、および／もしくは細胞を2つもしくはそれ超の別個の組成物もしくは製剤と接触させる。また、そのような併用療法を化学療法、照射療法、外科療法、または免疫療法と併せて使用することができる意図されている。

30

【0072】

組み合わせでの投与としては、2つまたはそれ超の薬剤を同じ剤形で同時に投与すること、別々の剤形で同時に投与すること、および別々に投与することができる。すなわち、対象とする治療用組成物および別の治療剤を共に同じ剤形に製剤化し、同時に投与することができる。あるいは、対象とする治療用組成物および別の治療剤を同時に投与することができ、この場合、両剤は別々の製剤中に存在する。別の代替法では、治療剤が投与され、直後に他の治療剤が投与され得るか、または逆もまた同じである。別々の投与プロトコールでは、対象とする治療用組成物および別の治療剤は、数分離して、または数時間離して、または数日離して投与することができる。

【0073】

第1の抗がん治療（例えば、組換えタンパク質を発現するエキソソームまたはエキソソームから単離された組換えタンパク質を有するエキソソーム）は、第2の抗がん治療よりも前に、その間に、その後に、または種々の組合せで投与することができる。投与は、同時～数分～数日～数週間にわたる間隔であってよい。第1の治療を第2の治療と別々に患者にもたらす実施形態では、一般に、各送達の時間の間に著しい期間が過ぎず、したがって、2つの化合物がなお有利に組み合わさった効果を患者に対して発揮できることを確実にする。そのような例では、患者に第1の療法と第2の療法を互いと約12時間～24時間または72時間以内に、より詳細には、互いと約6～12時間以内にもたらすことが意図されている。いくつかの状況では、それぞれの投与の間に数日（2日、3日、4日、5日、6日、または7日）～数週間（1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、または8週間）が経過する場合に治療の期間を相当に延長することが望ましい。

40

50

【0074】

ある特定の実施形態では、治療の過程は、1～90日間またはそれ超（この範囲は間にある日を含む）続く。1つの薬剤を1日目～90日目（この範囲は間にある日を含む）のいずれかまたはそれらの任意の組合せの日にもたらすことができ、別の薬剤を1日目～90日目（この範囲は間にある日を含む）のいずれかまたはそれらの任意の組合せの日にもたらすことが意図されている。1日の中で（24時間の期間）、患者に薬剤（複数可）を1回または多数回投与することができる。さらに、治療の過程後に、抗がん治療を投与しない期間があることが意図されている。この期間は、例えば患者の予後、耐久力、健康などの患者の状態に応じて1～7日、および／または1～5週間、および／または1～12カ月またはそれ超（この範囲は間にある日を含む）であり得る。治療サイクルを必要に応じて繰り返すことが予想される。

10

【0075】

種々の組合せを使用することができる。以下の例に関しては第1の抗がん療法が「A」であり、第2の抗がん療法が「B」である：

【0076】

【化1】

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

20

本発明の任意の化合物または療法の患者への投与は、そのような化合物を投与するための一般的なプロトコールに従い、もしあれば、薬剤の毒性を考慮に入れる。したがって、一部の実施形態では、併用療法に起因する毒性をモニタリングするステップが存在する。

【0077】

1. 化学療法

多種多様な化学療法剤を本発明に従って使用することができる。「化学療法」という用語は、がんを治療するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」とは、がんの治療において投与される化合物または組成物を示すために使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内でのそれらの活性の様式、例えば、それらが細胞周期に影響を及ぼすかどうか、およびどの段階に影響を及ぼすかによってカテゴリー化される。あるいは、薬剤は、DNAと直接架橋結合する能力、DNAにインターラートする能力、または核酸合成に影響を及ぼすことによって染色体異常および有糸分裂異常を誘導する能力に基づいて特徴付けることができる。

30

【0078】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテバおよびシクロホスファミド（cyclosphosphamide）など；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファンなど；アジリジン、例えば、ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）など；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド（triethyleneephosphoramido）、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphoramido）、およびトリメチルオロメラミン（trimethylolomelamine）を含めたエチレンイミンおよびメチルアメラミン（methylamine）；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン（calystatin）；CC-1065（そのアドゼレシン合成類似体、カルゼレシン合成類似体およびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン（pancratistatin）；サルコジクチイン（sarcodectyin）；スpongiostatin（spongistatin）

40

50

n) ; ナイトロジエンマスター^ド、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン (chloraphazine) 、クロロホスファミド (cholophosphamide) 、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩 (mechlorethamine oxide hydrochloride) 、メルファラン、ノベムビシン (novembichin) 、フェネステリン (phenestetine) 、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスター^ドなど；ニトロソ尿素 (nitrosurea) 、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン (ranimustine) など；抗生素質、例えば、エンジイン抗生素質 (例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシンガムマ^{II}およびカリチアマイシンオメガ^{II}) など；ジネミシン (dynamycin) Aを含めたジネミシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネートなど；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗菌性発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラルナイシン (authrarhyncin) 、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カルビシン (carabacin) 、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン (chromomycinis) 、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン (モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む) 、エピルビシン、エソルビシン (esorubicin) 、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン、例えば、マイトイマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン (nogalarhyncin) 、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin) 、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin) 、ロドルビシン (rodorubicin) 、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルビシンなど；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) など；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、ブテロブテリン、およびトリメトレキサートなど；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprime) 、およびチオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、およびフロクスウリジンなど；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトンなど；抗副腎剤 (anti-adrenal) 、例えば、ミトタンおよびトリロスタンなど；葉酸補充剤、例えば、フォリン酸 (frolinic acid) など；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabil) ；ビサントレン (bisantrene) ；エダトラキセート (edatraxate) ；デフォファミン (defofamine) ；デメコルチン；ジアジクオン (diaziquone) ；エルフロルニチン (elformithine) ；エリプチニウム酢酸塩 (elliptinium acetate) ；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine) ；メイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサマイトシン (ansamitocin) ；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール (mopidanmol) など；ニトラクリン (nitraerine) ；ペントスタチン；フェナメット (phenamett) ；ピラルビシン；ロソキサントロン (losoxanthrone) ；ボドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシン (rhizoxin) ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に、T-2毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridin) Aおよびアングイジン (anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン (gacytosine) ；

10

20

30

40

50

) ; アラビノシド (「Ara-C」) ; シクロホスファミド ; タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル・ゲムシタピン ; 6 - チオグアニン ; メルカブトプリン ; 白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンなど ; ピンプラスチン ; 白金 ; エトポシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチン ; ビノレルビン ; ノバントロン (novantrone) ; テニポシド ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノブテリン ; ゼローダ ; イバンドロネット ; イリノテカン (例えば、CPT-11) ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO) ; レチノイド、例えば、レチノイン酸など ; カベシタピン ; カルボプラチン、プロカルバジン、プリカマイシン (plicomycin) 、ゲムシタピン (gemcitabine) 、ナベルビン、ファルネシル - タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金 (transplatin) 、および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。
10

【0079】

2. 照射療法

DNA損傷を引き起こすものであり、広範囲にわたって使用されている他の因子としては、一般に、線、X線、および／または放射性同位元素の腫瘍細胞への指向性送達として公知のものが挙げられる。マイクロ波、陽子線照射 (米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号) 、およびUV照射などの他の形態のDNA損傷性因子も意図されている。これらの因子は全て、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に対する広範囲の損傷に影響を及ぼす可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期間 (3~4週間) にわたって50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単回線量までにわたる。放射性同位元素の投与量範囲は広範に変動し、同位元素の半減期、放出される放射線の強度および型、および腫瘍性細胞による取り込みに左右される。
20

【0080】

3. 免疫療法

追加的な免疫療法を本発明の方法と組み合わせてまたは併せて使用することができるこれが当業者には理解されよう。がん治療の文脈において、免疫療法薬は、一般に、がん細胞を標的化し破壊する免疫エフェクター細胞および分子の使用に依拠する。リツキシマブ (Rituxan (登録商標)) がそのような例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに特異的な抗体であってよい。抗体は、単独では、療法のエフェクターとしての機能を果たし得る、または他の細胞を動員して実際に細胞死滅に影響を及ぼし得る。抗体はまた、薬物または毒素 (化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など) とコンジュゲートすることもでき、ただ単に標的化薬剤として機能する。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であってよい。種々のエフェクター細胞として、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。
30

【0081】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的化に適している、すなわち、大多数の他の細胞には存在しないマーカーをいくつか有するものでなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらはいずれも、本発明の文脈において、標的化するのに適し得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、CD20、がん胎児性抗原、チロシナーゼ (p97) 、gp68、TAG-72、HMG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbB、およびp155が挙げられる。免疫療法の代替の態様は、抗がん効果と免疫賦活効果を組み合わせることである。サイトカイン、例えば、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFNなど、ケモカイン、例えば、MIP-1、MCP-1、IL-8など、および増殖因子、例えばFLT3リガンドなどを含めた免疫賦活分子も存在する。
40

【0082】

10

20

30

40

50

現在調査されているまたは使用されている免疫療法の例は、免疫アジュvant、例えば、*Mycobacterium bovis*、*Plasmodium falciparum*、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物（米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号；*Hui*および*Hashimoto*、1998年；*Christodoulides*ら、1998年）；サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、IL-1、GM-CSF、およびTNF（*Bukowski*ら、1998年；*Davidson*ら、1998年；*Heilstrand*ら、1998年）；遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、およびp53（*Qin*ら、1998年；*Austin-Ward*および*Villaseca*、1998年；米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号）；ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオシドGM2、および抗p185（*Hollander*、2012年；*Hanibuchi*ら、1998年；米国特許第5,824,311号）である。1つまたは複数の抗がん療法を本明細書に記載されている抗体療法と共に使用することができる意図されている。

10

【0083】

4. 外科手術

がんを有する人のおよそ60%が、予防的外科手術、診断的または病期分類外科手術、治癒的外科手術、および待機的外科手術を含めた、何らかの型の外科手術を受ける。治癒的外科手術は、がん性組織の全部または一部を物理的に除去する、切り取る、および/または破壊する切除を含み、本発明の治療、化学療法、照射療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法などの他の療法と併せて使用することができる。腫瘍の切除とは、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを指す。腫瘍の切除に加えて、外科手術による治療としては、レーザー外科手術、冷凍外科、電気外科、および顕微鏡下手術（モース手術）が挙げられる。

20

【0084】

がん性細胞、組織、または腫瘍の一部または全部を切除すると、体内に腔が形成され得る。追加的な抗がん療法を用いた、その領域への灌流、直接注射、または局所的な適用によって治療を達成することができる。そのような治療は、例えば、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、もしくは7日毎に、または1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、および5週間毎に、または1カ月毎、2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎、7カ月毎、8カ月毎、9カ月毎、10カ月毎、11カ月毎、または12カ月毎に繰り返すことができる。これらの治療は、同様に投与量が変動するものである。

30

【0085】

5. 他の薬剤

他の薬剤を本発明のある特定の態様と組み合わせて使用して、治療の有効性を改善することができる意図されている。これらの追加的な薬剤としては、細胞表面受容体およびギャップ結合の上方制御に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤および分化誘導剤（*differentiation agent*）、細胞接着阻害剤、過剰増殖性細胞のアポトーシス誘導因子への感受性を上昇させる薬剤、または他の生物学的薬剤が挙げられる。ギャップ結合の数を増加させることによる細胞間シグナル伝達の増加により、近くの過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果が増大する。他の実施形態では、細胞増殖抑制剤または分化誘導剤を本発明のある特定の態様と組み合わせて使用して、治療の抗過剰増殖の有効性を改善することができる。細胞接着阻害剤により本発明の有効性を改善する意図されている。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（*FAK*）阻害剤およびロバスタチンである。さらに、抗体c225などの、過剰増殖性細胞のアポトーシスに対する感受性を増大させる他の薬剤を本発明のある特定の態様と組み合わせて使用して、治療有効性を改善することができる意図されている。

40

【0086】

I I I . 医薬組成物

局所的に進行したがんまたは転移性がんを有するがん患者における腫瘍細胞の成長を阻

50

害するため、最も好ましくは、がん細胞を死滅させるために、組換えタンパク質を発現するエキソソームまたはエキソソームから単離された組換えタンパク質を全身的にまたは局所的に投与することができる意図されている。これらは、静脈内、髄腔内、かつ/または腹腔内に投与することができる。これらは、単独で、または抗増殖性薬と組み合わせて投与することができる。一実施形態では、これらを、外科手術または他の手順の前に患者におけるがん負荷量を減少させるために投与する。あるいは、これらを外科手術後に投与して、あらゆる残存するがん（例えば、外科手術で排除できなかつたがん）が生存しないことを確実にすることができます。

【0087】

本発明は、治療用調製物の特定の性質によって限定されると意図されない。例えば、10 そのような組成物は、生理的に許容される液体、ゲル、固体担体、希釈剤、または賦形剤と共に製剤でもたらすことができる。これらの治療用調製物は、家畜動物を用いたものなどの獣医学的な使用、および他の治療剤と同様にヒトにおける臨床使用に関して哺乳動物に投与することができる。一般に、治療有効性のために必要な投与量は、使用の型および投与形式、ならびに個々の被験体の特定の要件に応じて変動する。

【0088】

臨床的適用が意図されている場合、組換えタンパク質および/またはエキソソームを意図された適用に適した形態で含む医薬組成物を調製することが必要な場合がある。一般に、医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に溶解または分散させた、有効量の1つまたは複数の組換えタンパク質および/またはエキソソームまたは追加的な薬剤を含有する。

「薬学的または薬理学的に許容される」という句は、必要に応じて、例えばヒトなどの動物に投与した際に有害な反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を生じさせない分子実体および組成物を指す。本明細書に開示されている組換えタンパク質および/またはエキソソームを含む医薬組成物、または追加的な活性成分の調製は、参照により本明細書に組み込まれる *Remington's Pharmaceutical Sciences*、第18版、1990年に例示されている通り、本開示を考慮すれば当業者にとって公知である。さらに、動物（例えば、ヒト）への投与に関しては、調製物は、FDA 20 Office of Biological Standardsにより求められる無菌性、発熱性、一般的な安全性、および純度の基準を満たすべきであることが理解されよう。

【0089】

さらに本発明のある特定の態様によると、投与に適した組成物は、不活性な希釈剤を伴つてまたは伴わずに、薬学的に許容される担体中でもたらすことができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、当業者にとって公知であるような任意のかつ全ての水性溶媒（例えば、水、アルコール/水溶液、エタノール、食塩溶液、非経口ビヒクル、例えば、塩化ナトリウム、リンゲルデキストロースなど）、非水性溶媒（例えば、脂肪、油、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルなど）、脂質、リポソーム、分散媒、コーティング（例えば、レシチン）、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗細菌剤または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、不活性ガス、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールまたはこれらの組合せ）、等張化剤（isotonic agent）（例えば、糖および塩化ナトリウム）、吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）、塩、薬物、薬物安定剤、ゲル、樹脂、充填剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、色素、流体および栄養分補充剤、同様の材料およびこれらの組合せを含む。担体は、同化できるものであるべきであり、それらとして、液体担体、半固体担体、すなわちペースト剤、または固体担体が挙げられる。さらに、所望であれば、組成物は、微量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、安定化剤、またはpH緩衝剤などを含有してよい。医薬組成物中の種々の成分のpHおよび正確な濃度は、周知のパラメータに応じて調整する。適切な流動性は、例え 40 50

ば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散物の場合では必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。

【0090】

薬学的に許容される担体は、特に、ヒトへの投与用に製剤化されるが、ある特定の実施形態では、非ヒト動物への投与用に製剤化されたものであり、ヒトへの投与は許容されない（例えば、政府の規制によって）薬学的に許容される担体を使用することが望ましい。任意の従来の担体が活性成分と適合しない（例えば、レシピエントまたは担体に含有される組成物の治療効果に対して有害である）場合を除き、治療用組成物または医薬組成物への担体の使用が意図されている。本発明のある特定の態様によると、組成物を担体と任意の都合がよく実用的な様式で、すなわち、溶解、懸濁、乳化、混合、封入、吸収などによって組み合わせる。そのような手順は当業者には常套的なものである。

10

【0091】

本発明のある特定の実施形態は、それを固体形態で投与するか、液体形態で投与するか、またはエアロゾル形態で投与するか、および、注射などの投与経路のために滅菌する必要があるかどうかに応じて異なる型の担体を含み得る。組成物は、静脈内に、皮内に、経皮的に、髄腔内に、動脈内に、腹腔内に、鼻腔内に、膣内に、直腸内に、筋肉内に、皮下に、粘膜に、経口的に、局部的に（topically）、局所的に（locally）、吸入（例えば、エアロゾル吸入）によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、直接標的細胞を浸漬する限局的灌流によって、カテーテルを介して、洗浄を介して、脂質組成物（例えば、リポソーム）中で、または当業者に公知の他の方法または上記の任意の組合せによって投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences、第18版、1990年を参照されたい）。

20

【0092】

活性化合物は、非経口投与用に製剤化することができ、例えば、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、またはさらには腹腔内経路による注射用に製剤化することができる。一般には、そのような組成物は、液体溶液または懸濁物として調製することができ、注射前に液体を添加して溶液または懸濁物を調製するために使用するのに適した固体形態を調製することもでき、調製物はまた、乳化されていてもよい。

30

【0093】

注射での使用に適した医薬形態は、滅菌した水溶液または分散物；ゴマ油、ピーナッツ油、または水性プロピレングリコールを含めた製剤；および滅菌された注射用溶液または分散物を即時調製するための滅菌粉末を含む。全ての場合において、形態は、滅菌しなければならず、容易に注射することができる程度に流体でなければならない。形態はまた、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の混入作用から保護されなければならない。

【0094】

治療薬は、遊離塩基、中性、または塩の形態で組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク質様組成物の遊離のアミノ基を用いて形成されるもの、または、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シウ酸、酒石酸、またはマンデル酸などの有機酸を用いて形成されるものが挙げられる。同様に、遊離のカルボキシ基を用いて形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、またはプロカイソなどの有機塩基に由来するものであってよい。製剤化されたら、溶液を投薬製剤（dosage formulation）と適合する様式で、治療的に有効な量で投与する。製剤は、注射溶液などの非経口投与用に製剤化されたもの、または肺に送達するためのエアロゾル、または薬物放出カプセル剤などの食事による投与用に製剤化されたものなどの種々の剤形で容易に投与される。

40

50

【0095】

本発明の特定の実施形態では、組成物を半固体または固体担体と徹底的に組み合わせるまたは混合する。混合は、粉碎などの任意の都合のよい様式で行うことができる。組成物を治療的活性の喪失、すなわち、胃における変性から保護するために、混合プロセスに安定化剤を加えることもできる。組成物に使用するための安定剤の例としては、緩衝液、グリシンおよびリシンなどのアミノ酸、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトールなどの炭水化物が挙げられる。

【0096】

さらなる実施形態では、本発明は、1つまたは複数の脂質および水性溶媒を含む医薬脂質ビヒクル組成物の使用に関し得る。本明細書で使用される場合、「脂質」という用語は、特徴的に水に不溶性であり、有機溶媒を用いて抽出可能である広範囲の物質をいずれも含むものと定義される。この広範なクラスの化合物は当業者には周知であり、「脂質」という用語は、本明細書で使用される場合、任意の特定の構造に限定されない。例として、長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含有する化合物が挙げられる。脂質は、天然に存在するものであっても合成されたもの（すなわち、人間が設計または作製したもの）であってもよい。しかし、脂質は、通常、生物学的物質である。生物学的脂質は当技術分野で周知であり、それらとして、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質（lysolipid）、スフィンゴ糖脂質、糖脂質、スルファチド（sulphatide）、エーテルと連結した脂肪酸およびエステルと連結した脂肪酸を有する脂質、重合可能な脂質、およびこれらの組合せが挙げられる。当然、本明細書に具体的に記載されているもの以外の、当業者に脂質であると理解される化合物も組成物および方法に包含される。

10

20

30

40

【0097】

当業者は、組成物を脂質ビヒクル中に分散させるために使用することができる技法の範囲に詳しいであろう。例えば、治療剤を、当業者に公知の任意の手段により、脂質を含有する溶液に分散させること、脂質を用いて溶解させること、脂質を用いて乳化すること、脂質と混合すること、脂質と組み合わせること、脂質と共有結合させること、脂質に懸濁物として含有させること、ミセルまたはリポソームに含有させるもしくはそれと複合体を形成すること、または他のやり方で脂質または脂質構造と結び付けることができる。分散によりリポソームの形成がもたらされてもよく、もたらされなくてもよい。

【0098】

「単位用量」または「投与量」という用語は、被験体における使用に適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な経路および治療レジメンに伴って上記で検討した所望の応答が生じるように算出された所定の量の治療用組成物を含有する。治療回数および単位用量の両方に応じて投与される量は、所望の効果に左右される。患者または被験体に投与される本発明の組成物の実際の投与量は、被験体の体重、年齢、健康、および性別などの身体的因子および生理的因子、治療される疾患の型、疾患の侵入の程度、以前または同時の治療介入、患者の特発性疾患、投与経路、ならびに特定の治療用物質の効力、安定性、および毒性によって決定することができる。例えば、用量は、投与当たり約1 μ g / kg / 体重～約1000mg / kg / 体重（この範囲は、間に入る用量を含む）またはそれ超、およびその中で導き出せる任意の範囲を構成し得る。本明細書において列挙されている数から導き出せる範囲の非限定的な例では、約5 μ g / kg / 体重～約100mg / kg / 体重、約5 μ g / kg / 体重～約500mg / kg / 体重などの範囲で投与することができる。いずれにしても、投与の責任がある実施者が、個々の被験体に対する組成物中の活性成分（複数可）の濃度および適切な用量（複数可）を決定する。

【0099】

動物患者に投与される組成物の実際の投与量は、体重などの身体的因子および生理的因子、状態の重症度、治療される疾患の型、以前または同時の治療介入、患者の特発性疾患

50

、および投与経路によって決定することができる。投与量および投与経路に応じて、好ましい投与量および／または有効量の投与の回数は、被験体の応答に応じて変動し得る。いずれにしても、投与の責任がある実施者が、個々の被験体に対する組成物中の活性成分（複数可）の濃度および適切な用量（複数可）を決定する。

【0100】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化合物は、単位の重量の約2%～約75%、または約25%～約60%、例えば、およびその中で導き出せる任意の範囲を構成し得る。当然、治療的に有用な組成物それぞれの中の活性化合物（複数可）の量は、化合物の任意の所与の単位用量で適切な投与量が得られるように調製することができる。溶解度、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、製品の貯蔵寿命、ならびに他の薬理学的考察事項などの因子が、そのような医薬製剤を調製する当業者により考慮され、したがって、種々の投与量および治療レジメンが望ましい可能性がある。

10

【0101】

他の非限定的な例では、用量は、投与当たり約1マイクログラム／kg／体重、約5マイクログラム／kg／体重、約10マイクログラム／kg／体重、約50マイクログラム／kg／体重、約100マイクログラム／kg／体重、約200マイクログラム／kg／体重、約350マイクログラム／kg／体重、約500マイクログラム／kg／体重、約1ミリグラム／kg／体重、約5ミリグラム／kg／体重、約10ミリグラム／kg／体重、約50ミリグラム／kg／体重、約100ミリグラム／kg／体重、約200ミリグラム／kg／体重、約350ミリグラム／kg／体重、約500ミリグラム／kg／体重から、約1000ミリグラム／kg／体重またはそれ超まで、およびその中で導き出せる任意の範囲も含み得る。本明細書において列挙されている数から導き出せる範囲の非限定的な例では、上記の数に基づいて約5ミリグラム／kg／体重～約100ミリグラム／kg／体重、約5マイクログラム／kg／体重～約500ミリグラム／kg／体重などの範囲で投与することができる。

20

【0102】

I V . 核酸およびベクター

本発明のある特定の態様では、治療用タンパク質をコードする核酸配列または治療用タンパク質を含有する融合タンパク質をコードする核酸配列が開示され得る。どんな発現系を使用するかに応じて、核酸配列を従来の方法に基づいて選択することができる。例えば、それぞれの遺伝子またはその変形体は、ある特定の系において発現させるためにコドン最適化することができる。目的のタンパク質を発現させるために、種々のベクターを使用することもできる。例示的なベクターとしては、これだけに限定されないが、プラスミドベクター、ウイルスベクター、トランスポゾン、またはリポソームに基づくベクターが挙げられる。

30

【0103】

V . 組換えタンパク質

一部の実施形態は、組換えタンパク質およびポリペプチドに関する。特定の実施形態は、少なくとも1つの治療的活性を示す組換えタンパク質またはポリペプチドに関する。別の態様では、タンパク質またはポリペプチドを、血清中での安定性が増大するように修飾することができる。したがって、本出願で「変形タンパク質」または「変形ポリペプチド」の機能または活性に言及する場合、これは、例えば、修飾されていないタンパク質またはポリペプチドに対して追加的な利点を有するタンパク質またはポリペプチドを含むことが当業者には理解されよう。「変形タンパク質」に関する実施形態は、「変形ポリペプチド」について実施され得、逆もまた同じであることが明確に意図されている。

40

【0104】

組換えタンパク質は、アミノ酸の欠失および／または置換を有し得、したがって、欠失を有するタンパク質、置換を有するタンパク質、および欠失と置換を有するタンパク質は、変形タンパク質である。一部の実施形態では、これらのタンパク質は、アミノ酸の挿入

50

または付加をさらに含んでよく、例えば融合タンパク質またはリンカーを有するタンパク質である。「改変消失タンパク質」は、天然のタンパク質の1つまたは複数の残基を欠くが、天然のタンパク質の特異性および/または活性を有し得る。「改変消失タンパク質」はまた、免疫原性または抗原性が低下したものであり得る。改変消失タンパク質の例は、少なくとも1つの抗原性領域、すなわち、改変タンパク質を投与することができる生物体の型などの特定の生物体において抗原性であることが決定されたタンパク質の領域からアミノ酸残基が消失したものである。

【0105】

置換または置き換え改変体は、一般には、タンパク質内の1つまたは複数の部位において1つのアミノ酸と別のアミノ酸の交換を含有し、ポリペプチドの1つまたは複数の性質、特に、そのエフェクター機能および/または生物学的利用能を調節するために設計することができるものである。置換は、保存的なもの、すなわち、1つのアミノ酸が形状および電荷が同様のアミノ酸で置き換えられたものであってもよく、保存的なものでなくてもよい。保存的置換は当技術分野で周知であり、それらとして、例えば、アラニンからセリンへの変化；アルギニンからリシンへの変化；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへの変化；アスパラギン酸からグルタミン酸への変化；システインからセリンへの変化；グルタミンからアスパラギンへの変化；グルタミン酸からアスパラギン酸への変化；グリシンからプロリンへの変化；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへの変化；イソロイシンからロイシンまたはバリンへの変化；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへの変化；リシンからアルギニンへの変化；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへの変化；フェニルアラニンからチロシン、ロイシン、またはメチオニンへの変化；セリンからトレオニンへの変化；トレオニンからセリンへの変化；トリプトファンからチロシンへの変化；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへの変化；およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへの変化が挙げられる。

10

20

30

【0106】

消失または置換に加えて、改変タンパク質は、残基の挿入を有し得、これは、一般には、ポリペプチド内の少なくとも1つの残基の付加を伴う。これは、標的化ペプチドまたはポリペプチドまたは単に単一の残基の挿入を含む。融合タンパク質と称される末端付加を以下に考察する。

【0107】

「生物学的機能的に同等」という用語は、当技術分野においてよく理解され、本明細書においてさらに詳細に定義される。したがって、タンパク質の生物活性が維持されることを条件に、対照ポリペプチドのアミノ酸と同一であるまたは機能的に同等であるアミノ酸を約70%から約80%の間、または約81%から約90%の間、またはさらには約91%から約99%の間有する配列が含まれる。ある特定の態様では、組換えタンパク質は、その天然の対応物と生物学的機能的に同等である。

40

【0108】

アミノ酸および核酸配列は、追加的なN末端またはC末端アミノ酸または5'配列または3'配列などの追加的な残基を含んでよく、それでも、配列が、タンパク質の発現に関する場合には生物学的なタンパク質の活性の維持を含めた、上記の基準を満たす限りは、本明細書に開示されている配列のうちの1つに記載されているものと本質的に同様であることも理解されよう。末端配列の付加は、特に、例えば、コード領域の5'部分もしくは3'部分のいずれかに隣接する種々の非コード配列を含み得る、または遺伝子内に存在することが公知である種々の内部配列、すなわちイントロンを含み得る核酸配列に当てはまる。

【0109】

本明細書で使用される場合、タンパク質またはペプチドは、一般には、これだけに限定されないが、約200アミノ酸超、最大で遺伝子から翻訳される全長配列のタンパク質；約100アミノ酸超のポリペプチド；および/または約3アミノ酸から約100アミノ酸までのペプチドを指す。便宜上、「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」

50

という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0110】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸残基」とは、当技術分野で公知の任意の天然に存在するアミノ酸、任意のアミノ酸誘導体、または任意のアミノ酸模倣物を指す。ある特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドの残基は連続しており、いかなる非アミノ酸によってもアミノ酸残基の配列が遮られていない。他の実施形態では、配列は1つまたは複数の非アミノ酸部分を含んでよい。特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドの残基の配列は、1つまたは複数の非アミノ酸部分で遮られていてよい。

【0111】

したがって、「タンパク質またはペプチド」という用語は、天然に存在するタンパク質、または少なくとも1つの修飾されたまたは通常のものではないアミノ酸に見いだされる20種の共通のアミノ酸の少なくとも1つを含むアミノ酸配列を包含する。

10

【0112】

本発明のある特定の実施形態は、融合タンパク質に関する。これらの分子は、N末端またはC末端において異種ドメインと連結した治療用タンパク質を有し得る。例えば、融合物に他の種由来のリーダー配列を使用して、異種宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にすることもできる。別の有用な融合としては、融合タンパク質の精製を容易にするために切断可能であることが好ましい、血清アルブミンアフィニティータグもしくは6ヒスチジン残基などのタンパク質アフィニティータグ、または抗体エピトープなどの免疫学的に活性なドメインの付加が挙げられる。非限定的なアフィニティータグとして、ポリヒスチジン、キチン結合性タンパク質(CBP)、マルトース結合性タンパク質(MBP)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が挙げられる。

20

【0113】

特定の実施形態では、治療用タンパク質を、X T E Nポリペプチド(Schellenbergerら、2009年)、IgG Fcドメイン、アルブミン、またはアルブミン結合性ペプチドなどの、in vivo半減期を増大させるペプチドに連結することができる。

30

【0114】

融合タンパク質を生成する方法は当業者には周知である。そのようなタンパク質は、例えば、完全な融合タンパク質の新規合成によって、または異種ドメインをコードするDNA配列を付着させ、その後、インタクトな融合タンパク質を発現させることによって、作製することができる。

【0115】

親タンパク質の機能活性が回復する融合タンパク質の作製は、遺伝子を、タンデムに接続したポリペプチド間でスプライスされるペプチドリンカーをコードする架橋DNAセグメントと接続することによって容易にすることができる。リンカーは、生じる融合タンパク質の適切なフォールディングを可能にするのに十分な長さのものであってよい。

40

【0116】

V I . タンパク質の精製

タンパク質の精製技法は当業者には周知である。これらの技法は、1つのレベルでは、細胞、組織、または器官をポリペプチド画分および非ポリペプチド画分に均質化および粗分画することを伴う。別段の指定がない限り、部分的または完全な精製(または均質性までの精製)を達成するために、クロマトグラフィー技法および電気泳動技法を使用して目的のタンパク質またはポリペプチドをさらに精製することができる。純粋なペプチドの調製に特に適する分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、および等電点電気泳動である。ペプチド精製の特に効率的な方法は、中高圧液体クロマトグラフィー(fast-performance liquid chromatography)(FPLC)またはさらには高速液体クロマトグラフィー(HPLC)である。

50

【0117】

精製されたタンパク質またはペプチドとは、他の成分から単離可能な組成物を指すものとし、ここで、タンパク質またはペプチドは、その天然に得られる状態に対して任意の程度まで精製される。したがって、単離または精製されたタンパク質またはペプチドとは、それが天然に存在し得る環境から離れたタンパク質またはペプチドも指す。一般に、「精製された」とは、分画に供して種々の他の成分を除去したタンパク質またはペプチド組成物を指し、当該組成物は、その発現した生物活性を実質的に保持する。「実質的に精製された」という用語が使用される場合、この指定は、タンパク質またはペプチドが組成物の主要な成分を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ超を構成するなどの組成物を指す。

10

【0118】

タンパク質の精製における使用に適した種々の技法は当業者には周知である。これらとしては、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈殿、または熱変性、その後の遠心分離によるもの；イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーステップ；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびにこれらおよび他の技法の組合せが挙げられる。当技術分野で公知の通り、種々の精製ステップを実施する順序は変化させることができる、またはある特定のステップを省くことができ、それでも実質的に精製されたタンパク質またはペプチドを調製するために適した方法がもたらされると考えられる。

20

【0119】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化するための種々の方法は、本開示に照らして当業者に公知である。これらとしては、例えば、活性画分の比活性を決定すること、または画分内のポリペプチドの量をSDS/PAGE分析によって評価することができる。画分の純度を評価するための好ましい方法は、画分の比活性を算出すること、それを最初の抽出物の比活性と比較すること、したがって、画分中の純度の程度を算出し、「精製の倍率数(-fold purification number)」によって評価することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、当然、精製の後に続けるために選択される特定のアッセイ技法、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかに左右される。

30

【0120】

一般に、タンパク質またはペプチドを常にその最も精製された状態でもたらす必要はない。実際に、ある特定の実施形態ではより程度が低くしか実質的に精製されていない産物が有用であり得ることが意図されている。部分的な精製は、より少ない精製ステップを組み合わせて使用することによって、または同じ一般的な精製スキームの異なる形態を利用することによって達成することができる。例えば、HPLC機器を利用して陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを実施することにより、一般に、低圧クロマトグラフィーシステムを利用した同じ技法よりも高い精製「倍率」がもたらされることが理解される。相対的な精製の程度が低い方法には、タンパク質産物の総回収に関して、または発現されたタンパク質の活性の維持に関して利点があり得る。

40

【0121】

ある特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドを単離または精製することができる。例えば、精製を容易にするためにHisタグまたはアフィニティエピトープを組換えタンパク質に含めることができる。アフィニティークロマトグラフィーは、単離される物質とそれが特異的に結合する分子の間の特異的なアフィニティに依拠するクロマトグラフィーの手順である。これは、受容体-リガンド型の相互作用である。結合パートナーの一方を不溶性マトリックスに共有結合によりカップリングすることによってカラム材料を合成する。その後、カラム材料は、溶液からの物質に特異的に吸着することができる。溶出は、結合が起こらないように条件を変化させること（例えば、pH、イオン強度、温度などの変更）によって行う。マトリックスは、いかなる有意な程度にも分子を吸着せず

50

、広範囲の化学的安定性、物理的安定性、および熱安定性を有する物質であるべきである。リガンドは、その結合特性に影響を及ぼさないようにカップリングするべきである。リガンドはまた、比較的密接な結合をもたらすものであるべきである。試料もリガンドも破壊せずに物質を溶出することが可能であるはずである。

【0122】

サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）は、溶液中の分子をそれらのサイズ、より技術的な用語では、それらの流体力学的体積に基づいて分離するクロマトグラフィー方法である。S E Cは、通常、タンパク質および工業用ポリマーなどの大きな分子または高分子複合体に適用される。一般には、水溶液を使用してカラムを通して試料を輸送する場合には、技法はゲル濾過クロマトグラフィーとして公知であり、それに対して、ゲル浸透クロマトグラフィーという名称は、有機溶媒を移動相として使用する場合のものである。

10

【0123】

S E Cの根本原理は、サイズの異なる粒子が固定相を通って異なる速度で溶出する（濾過される）というものである。これにより、粒子の溶液がサイズに基づいて分離される。全ての粒子を同時にまたはほぼ同時にローディングすれば、同じサイズの粒子は一緒に溶出するはずである。各サイズ排除カラムは、分離することができる分子量の範囲を有する。排除限界により、この範囲の上限の分子量が規定され、そこが、分子が固定相に捕捉されるには大きすぎるところである。浸透限界により、分離の範囲の下限の分子量が規定され、そこが、十分に小さなサイズの分子が固定相のポアに完全に浸透することが可能なところであり、この分子質量を下回る分子は全て、単一バンドとして溶出するほどに小さい。

20

【0124】

高速液体クロマトグラフィー（または高圧液体クロマトグラフィー、H P L C）は、生化学および分析化学において化合物を分離、同定、および定量化するために頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの形態である。H P L Cでは、クロマトグラフィー充填材料（固定相）を保持するカラム、カラムを通して移動相（複数可）を移動させるポンプ、および分子の保持時間を示す検出器を利用する。保持時間は、固定相、分析される分子、および使用される溶媒（複数可）の間の相互作用に応じて変動する。

30

【0125】

V I I . キットおよび診断

本発明の種々の態様では、体液からエキソソームを精製し、そこからゲノムD N Aを単離するために必要な成分を含有するキットが構想される。キットは、標的D N A配列の増幅および／または標的D N Aのセグメントの配列決定に使用するためのオリゴヌクレオチドをさらに含有してよい。他の態様では、エキソソームを単離し、それに治療用タンパク質をコードする核酸をトランスフェクトするために必要な成分を含有するキットが構想される。さらに他の態様では、エキソソームを単離し、単離されたエキソソーム内のがん細胞由来エキソソーム特異的マーカーの存在を決定するために必要な成分を含有するキットが構想される。

【0126】

キットは、そのような成分のいずれかを含有する1つまたは複数の密閉されたバイアルを含んでよい。一部の実施形態では、キットは、エッペンドルフチューブ、アッセイプレート、シリング、ピン、またはチューブなどの、キットの成分と反応しない容器である適切な容器手段も含んでよい。容器は、プラスチックまたはガラスなどの滅菌可能な材料から作製されていてもよい。

40

【0127】

キットは、本明細書に記載の方法の手順ステップの概要を示す指示書をさらに含んでおく、本明細書に記載されているまたは当業者に公知である実質的に同じ手順に従う。指示情報は、コンピュータを使用して実行されると、試料からエキソソームを精製し、エキソソームからゲノムD N Aを単離する、エキソソームにおいて組換えタンパク質を発現させる、またはエキソソーム上のがん細胞由来マーカーを同定する実際または仮想の手順が表

50

示される機械可読指示を含有するコンピュータ可読媒体に入っていてよい。

【実施例】

【0128】

VIII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示されている技法は、本発明者により、本発明の実施においてよく機能することが発見された技法であり、したがって、それを実施するための好ましい方式を構成するとみなすことができる事が当業者には理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態に多くの変更を行うことができ、それでもなお、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを理解するべきである。

10

【0129】

材料および方法

患者試料および組織採取。Ethics Committee of the University of Heidelbergにより、患者からの血清採取が認可された。試験はReporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) 基準に従って行った。腎がんを有する患者由来の血清試料および組織試料、ならびに良性腎疾患を有する患者および急性または慢性疾患の証拠がなく、過去12カ月以内に外科手術を受けていない健康なドナー由来の血清試料のみを、University of HeidelbergのDepartment of General, Visceral and Transplantation Surgeryから受け取った。腎臓コホートには、腎臓の腺癌 (PDAC) を有する患者190名、腎炎を有する患者18名、良性漿液性囊胞腺腫を有する患者8名、腎管内乳頭状粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm) (IPMN) を有する患者5名、および腎上皮内腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasia) (PanIN) Ibを有する患者2名が含まれた。患者は、2006年から2012年の間にDepartment of General, Visceral, and Transplantation Surgery、University of Heidelbergにおいて外科手術を受けた患者であった。臨床情報には、年齢、性別、AJCC腫瘍病期、腫瘍サイズ (pT)、リンパ節転移の存在および数 (pN)、腫瘍悪性度 (G)、および (neo-) / アジュバント化学療法を用いた治療が含まれた。

20

【0130】

乳がんを有する患者32名由来の血清試料をMD Anderson Cancer Center、Houston、Texasにおいて採取した。臨床情報には、年齢、性別、AJCC腫瘍病期、腫瘍サイズ (pT)、リンパ節転移の存在および数 (pN)、腫瘍悪性度、および (neo-) / アジュバント化学療法を用いた治療が含まれた。

30

【0131】

血清試料採取および腫瘍試料採取に関する書面でのインフォームドコンセントを、全ての患者から手術前に、および各健康なドナーから得た後に、潜在的な予後マーカーに関する分析計画の開示と共に採取を行った。患者の腫瘍を外科的に切除する前に、ネオアジュバント照射療法も化学療法も提供しなかった。外科手術日に、外科的切開の直前に10mLの血清分離器チューブを使用して、中心静脈カテーテルを通じて血液試料を採取した。プロッキング食塩水による希釈を防止するために、抜き取った血液の最初の5~7mLを廃棄した。次いで、血液試料を2.500×gで10分遠心分離して血清を抽出し、血清を分析するまで-80°で保管した。同様に、腎臓の腺癌 (PDAC) を有する患者29名、慢性腎炎を有する患者4名、および腎管内乳頭状粘液性腫瘍 (IPMN) を有する患者4名において、外科手術の7日後に血液試料を採取した。

40

【0132】

動物試験。ヌードマウス (nu/nu) (Jackson Laboratoryから

50

購入した)に、乳房パッド(breast pad)当たり注射したPBS 20 μL中50万個のMDA-MB-231細胞またはMDA-MB-231-CD63GFP細胞での乳房パッド注射を行った。ブプレノルフィンを外科手術前に1回、および手術後24時間にわたって8~12時間ごとに皮下投与した(生理食塩水0.1mL中0.1mg/kg)。注射前、および腫瘍体積が250mm³、500mm³、1000mm³、および1500mm³の時点で血液を後眼窩から採取し、エキソソームを単離した。腫瘍サイズが1500mm³に達した時、または重症の疾患症状が存在した場合にマウスを安楽死させた。

【0133】

Ptf1acre/+ ; LSLKrasG12D/+ ; Tgfb2flox/flox (PKT)マウスに関する疾患の進行および遺伝子型決定は以前に記載されている(Ijichiら、2006年; Ozdemirら、2014年)。縦断的コホートにおいて、4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で後眼窩血液採取を実施した。8週齢の時点でまたは重症の疾患症状が存在した場合にマウスを安楽死させた。脾がんを有さない対照同腹仔4匹において、セルレイン(Cerulean)をi.p.注射することによって急性脾炎を誘導した(体重1kg当たり50μg、5時間にわたって1時間に1回(全部で5回注射))。注射に24時間後にマウスを屠殺した。全てのマウスを、MD Anderson Cancer Center (MDACC)動物施設において標準の収容条件下で収容し、動物手順は全て、MDACC institutional animal care and use committeeにより精査され認可された。

【0134】

細胞株。以下のヒト細胞株を使用した: HMLE細胞(American Type Culture Collection細胞(ATCC)、Manassas、VA)、BJ細胞(ATCC)、HDF細胞(ATCC)、HME L細胞(ATCC)、MCF-7細胞(ATCC)、MDA-MB231細胞(ATCC)、PANC-1細胞(ATCC)、SW480細胞(ATCC)、HCT 116細胞(ATCC)、MIA Paca-2細胞(ATCC)、およびT3M4細胞(Cell Bank、RIKEN BioResource Centre、Japan)。以下のマウス細胞株を使用した: NIH/3T3細胞(ATCC)、E10細胞(ATCC)、NMuMG細胞(ATCC)、4T1細胞(ATCC)、およびB16-F10細胞(ATCC)。HDF細胞およびBJ細胞は、20%(v/v)ウシ胎仔血清(FBS)、100U/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを補充したDMEM中で培養した。HMLE細胞およびMCF-10A細胞は、5%(v/v)ウマ血清、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシン、20ng/mLのEGF、0.5mg/mLのヒドロコルチゾン、100ng/mLのコレラ毒素、および10μg/mLのインスリンを補充したDMEM/F12中で成長させた。HME L細胞、MCF7細胞、MDA-MB-231細胞、HCT 116細胞、SW480細胞、4T1細胞、NIH/3T3細胞、E10細胞、U-87細胞、およびB16-F10細胞は、10%(v/v)FBS、100U/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持した。PANC-1細胞、MIA Paca-2細胞、およびT3M4細胞は、10%(v/v)FBS、100U/mLのペニシリン、アンホテリシンB、および100μg/mLのストレプトマイシンを補充した RPMI-1640 (Sigma、St. Louis、MO) 中で培養した。NMuMG細胞は、10%(v/v)FBS、100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシン、および10μg/mLのインスリンを補充したDMEM中で成長させた。すべての細胞株を加湿雰囲気中、5%CO₂、37℃で維持した。siRNAについて、Lipofectamine(登録商標)2000試薬(Invitrogen)を使用してトランスフェクションを実施した。GPC1 siRNA(カタログ番号S100032445、S100032459、S100032466、S103071033)およびスクランブルsiR

N AはQiagen (Hilden, Germany) から購入した。

【0135】

細胞からのエキソソームの単離。いくつかの改変を伴って以前に記載されている通り細胞の上清からエキソソームを得た (Kahlerら、2014年)。簡単に述べると、細胞を 225 cm^2 のフラスコ中で 80% ~ 90% 集密に達するまで成長させた。次に、培地を採取し、 $800 \times g$ で 5 分にわたって遠心分離し、その後、 $2000 \times g$ で 10 分の遠心分離ステップを行って細胞のデトリタスを廃棄した。次いで、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のポアフィルター (シリングフィルター、カタログ番号 6786-1302、GE Health care、GB) を使用して培地を濾過した。その後、採取した培地を、4、100, $000 \times g$ で 2 時間にわたって超遠心分離した。エキソソームペレットを 35 mL の $1 \times \text{PBS}$ で洗浄し、その後、第 2 の超遠心分離のステップを 4、100, $000 \times g$ で 2 時間にわたって行った。その後、上清を廃棄した。RNA抽出のために使用するエキソソームは TRIzol (登録商標) $500\text{ }\mu\text{L}$ に再懸濁させ、タンパク質抽出のために使用するエキソソームは溶解緩衝液 (8M 尿素 / 2.5% SDS、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のロイペプチド、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のペプスタチン、および 1 mM のフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)) $250\text{ }\mu\text{L}$ に再懸濁させた。フローサイトメトリー分析 (FACS)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、および免疫金染色のために使用するエキソソームは、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の $1 \times \text{PBS}$ に再懸濁させた。この試料 10 マイクロリットルを $1 \times \text{PBS}$ 中 1:100 に希釈し、NanoSight (登録商標) LM10 (NanoSight Ltd.、Milton Park, Amesbury, GB) を使用して分析した。

【0136】

ヒト血清試料からのエキソソームの単離。以前に記載されている通り、無細胞血清試料 $250\text{ }\mu\text{L}$ を氷上で解凍した (Kahlerら、2014年)。血清を 11 mL の $1 \times \text{PBS}$ 中に希釈し、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のポアフィルターを通して濾過した。その後、試料を 4、150, $000 \times g$ で終夜超遠心分離した。次に、エキソソームペレットを 11 mL の $1 \times \text{PBS}$ で洗浄し、その後、第 2 の超遠心分離のステップを 4、150, $000 \times g$ で 2 時間にわたって行った。その後、上清を廃棄した。RNA抽出のために使用するエキソソームは TRIzol (登録商標) $500\text{ }\mu\text{L}$ に再懸濁させ、タンパク質抽出のために使用するエキソソームは溶解緩衝液 (8M 尿素 / 2.5% SDS、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のロイペプチド、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のペプスタチン、および 1 mM の PMSF) $250\text{ }\mu\text{L}$ に再懸濁させた。FACS、TEM、および免疫金染色のために使用するエキソソームは、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の $1 \times \text{PBS}$ に再懸濁させた。この試料 10 マイクロリットルを $1 \times \text{PBS}$ 中 1:100 に希釈し、NanoSight (登録商標) LM10 (NanoSight Ltd.、Milton Park, Amesbury, GB) を使用して分析した。

【0137】

エキソソームのフローサイトメトリー分析。エキソソームを、 $4\text{ }\mu\text{m}$ のアルデヒド / 硫酸塩ラテックスビーズ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 体積のビーズ中エキソソーム約 $30\text{ }\mu\text{g}$ を室温で 1 時間にわたって混合することによって付着させた。この懸濁物を、 $1 \times \text{PBS}$ を用いて 1 mL まで希釈し、 $1 \times \text{PBS}$ 中 100 mM のグリシンおよび 2% BSA を使用して反応を停止させた。エキソソームが結合したビーズを $1 \times \text{PBS} / 2\% \text{ BSA}$ 中で洗浄し、2% BSA を用いてブロッキンし、FACSのために抗グリビカン-1 (GPC1; PIP A528055、Thermo-Scientific) を用いて染色した。二次抗体 Alexa-488 または Alexa-594 (Life Technologies, NY, USA) を使用した。

【0138】

Cancer Antigen CA19-9 ヒトELISA。膵がんを有する患者、膵がん前駆病変を有する患者、良性膵疾患有する患者、および健康なドナーにおける血清 Cancer Antigen CA 19-9 を、Cancer Antigen CA19-9 Human ELISA Kit (Abcam, ab108642) を製造者のプロトコールに従って使用して評価した。

【0139】

細胞からのDNA抽出。細胞を 225 cm^2 のフラスコ中で60%~70%集密に達するまで2~3日間成長させた。次に、細胞を無血清培地で48時間培養した。培地を採取し、1000 rpmで5分にわたって遠心分離し、その後、3000 rpmで10分の遠心分離ステップを行って細胞デトリタスを廃棄した。その後、0.22 μm のポアフィルター(Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を使用して培地を濾過した。馴化培地を合計225 mL採取し、4で2時間超遠心分離した。上清を廃棄し、追加的な225 mLの馴化させ、濾過した培地を4で2時間超遠心分離した。各超遠心分離ステップのエキソソームペレットをプールし、DNase I(1 U/ μL 、カタログ番号M6101、Promega、USA)10 μL と一緒に37で30分インキュベートした。その後、DNase Stop Solution(カタログ番号M199A、Promega、USA)50 μL を添加し、試料をウォーターバス中、65で5分加熱した。次に、プールしたエキソソームペレットをPBSで洗浄し、第2の超遠心分離のステップを4、150,000 $\times g$ で2時間にわたって実施した。上清を吸引した後、ペレットを200 μL のPBSに懸濁させた。この試料5マイクロリットルを得、1:100に希釈し、NanoSight(登録商標)LM10を使用したさらなる分析のために-20で保管した。残りのエキソソームペレットのDNAを、市販のDNA抽出キット(DNeasy(登録商標)Blood & Tissue Kit、カタログ番号69506、Qiagen、Germany)を製造者の説明書に従って使用して抽出した。最後に、DNAをAE緩衝液50 μL 中に溶出させ、処理するまで-20で保管した。Agilent DNA 7500 Reagent Kit(カタログ番号5067-1507、Agilent Technologies、USA)を使用して二本鎖DNAを解析した。

【0140】

ヒト血清試料からのDNA抽出。血清試料を解凍した後、血清500 μL (Bioanalyzer分析の場合には血清5 mL)を11 mLの1×PBS中に希釈し、0.22 μm のポアシリンジフィルター(カタログ番号6786-1302、GE Health care、GB)を通して濾過し、4、150,000 $\times g$ で終夜超遠心分離した。その後、エキソソーム枯渇血清を採取し、さらに処理するまで-80で保管し、一方、エキソソームペレットはDNase I(1 U/ μL 、カタログ番号M6101、Promega、USA)1 μL と一緒に37で30分インキュベートした。その後、DNase Stop Solution(カタログ番号M199A、Promega、USA)5 μL を添加し、試料をウォーターバス中、65で5分加熱した。次に、エキソソームペレットを11 mLの1×PBSで洗浄し、第2の超遠心分離のステップを4、150,000 $\times g$ で2時間にわたって実施した。上清を吸引した後、ペレットを200 μL のPBSに懸濁させた。この試料5マイクロリットルを得、1:100に希釈し、NanoSight(登録商標)LM10を使用したさらなる分析のために-20で保管した。残りのエキソソームペレットのDNAを、市販のDNA抽出キット(DNeasy(登録商標)Blood & Tissue Kit、カタログ番号69506、Qiagen、Germany)を製造者の説明書に従って使用して抽出した。最後に、DNAをAE緩衝液50 μL 中に溶出させ、処理するまで-20で保管した。

【0141】

ヒト原発性膵がんからのDNA抽出。切除後すぐに、膵腫瘍試料を液体窒素で急速凍結し、さらに処理するまで-80で保管した。腫瘍組織および近接する腫瘍間質の割合を評価するために、標準の方法により、各試料の参照切片10 μm を切り取り、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。腫瘍間質の割合が30%を超える試料をこの試験に含めた。市販のDNA抽出キット(DNeasy(登録商標)Blood & Tissue Kit、カタログ番号69506、Qiagen、Germany)を使用して製造者のプロトコールに従ってDNA単離を実施した。Nanodrop(登録商標)1000 spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific)を用いてDNA濃度を測定した。

c、Wilmington、DE、USA)を使用して腫瘍試料由来のDNAの量を定量化した。

【0142】

細胞およびエキソソームからのRNA抽出。TRIZol(登録商標)Plus RNA精製キット(Life Technologies、カタログ番号12183555)を製造者のプロトコールに従って使用して細胞およびエキソソームのRNAを単離した。Nanodrop(登録商標)ND-1000(Thermo Fischer Scientific)を使用してRNAを定量化した。

【0143】

ウエスタンプロット分析および抗体。TSG101および他のタンパク質のエキソソームでの発現をモニタリングするために、5 µg/mLのロイペプチド、1 µg/mLのペプスタチン、および1 mMのPMSFを含有する8 M尿素/2.5% SDS緩衝液中にエキソソームを収集し、5 µg/mLのロイペプチド、1 µg/mLのペプスタチン、および1 mMのPMSFを含有するRIPA緩衝液中に細胞を溶解させた。ブラッドフォード法による定量化に従って試料をローディングし、アクリルアミドゲルを使用して分析した。湿式電気泳動転写(wet electrophoretic transfer)を使用してゲル内のタンパク質をPVDF膜(Immobilon-P)に転写した。タンパク質プロットを、1×PBS中5%脱脂粉乳および0.05%Tween(登録商標)20を用いて室温で1時間にわたってブロッキングし、以下の一次抗体と一緒に4で終夜インキュベートした:1:300の抗TSG101(抗ab83; Abcam)、1:300の抗GPC1(PIPA528055; Thermo Scientific);1:300の抗-アクチン(A3854; Sigma-Aldrich);1:300の抗CD81(sc-166029; Santa-Cruz);1:300の抗フロチリン1(sc-25506; Santa-Cruz)。二次抗体を室温で1時間にわたってインキュベートした。抗体をインキュベートした後、1×PBSおよび0.05%Tween(登録商標)20を用いた洗浄をオービタルシェーカーにおいて10分間隔で4回実施した。Pierceからの化学発光試薬を使用してプロットを発光(develop)させた。

【0144】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)。細胞由来のDNAの量および細胞培地由来のエキソソーム由来のDNAの量を、Nanodrop(登録商標)1000 spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)を使用して定量化した。ヒト血清由来のエキソソーム由来のDNAの量を、Picogreen(登録商標)(Quant-iT(商標)Picogreen(登録商標)dsDNA Assay Kit、カタログ番号P11496、Life Technologies、USA)を使用して定量化した。10 µLの錆型DNA、1 µMの各プライマー、2.5 mMの各dNTP、2.5 10×PCR緩衝液、2.5 mMのMg溶液、0.5 µLのH₂O、および2.5 µLのTaqポリメラーゼを含有する2.5 µLの反応チューブでPCRを実施した。T100サーモサイクラー(Bio-Rad)において以下の条件下で増幅を行った:94で1分間;94で10秒、67で30秒、70で30秒を2サイクル;94で10秒、61で30秒、70で30秒を2サイクル;94で10秒、59で30秒、70で30秒を3.5サイクル;および4で最終的な保持。KRAS分析を以下のプライマーを使用して実施した:フォワード5'-AA GG CCT GCT GAAAATGACTG-3'(配列番号1)、リバース5'-TCA CAATACCAAGAAACCCAT-3'(配列番号2)。P53分析を以下のプライマーを使用して実施した:p53エクソン7-8p(609bp):フォワード5'-TCCTAGGTTGGCTCTGAC-3'(配列番号3)、リバース5'-CCTGCTTGCTTACCTCGCT-3'(配列番号4);p53エクソン5-8(1564bp):フォワード5'-TTCCCTCTTCCCTACAGTACCTCC-3'(配列番号5)。

10

20

30

30

40

50

番号5)、リバース5' - CCTGCTTGCCTACCTCGCT-3' (配列番号6)。PCR産物をQIAquick (登録商標) PCR精製キット (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して精製した。その後、配列決定反応をBigDye (登録商標) ターミネーターキット (v3.1, Life Technologies, USA) を製造者の説明書に従って使用して実施した。配列決定には以下のプライマーを使用した: KRAS、フォワード5' - AAGGCCCTGCTGAAAAATGACTG-3' (配列番号7) およびリバース5' - AGAATGGTCCCTGCACCAAGTAA-3' (配列番号8); p53エクソン5~8、フォワード5' - TCTTCCCTACAGTACCTCCCT-3' (配列番号9) およびリバース5' - GCTTGCCTTACCTCGCTTAGT-3' (配列番号10); p53エクソン7~8、フォワード5' - TAGGTTGGCTCTGACTGT-3' (配列番号11) およびリバース5' - GCTTGCCTTACCTCGCTTAGT-3' (配列番号12)。配列決定産物をABI 3730自動シーケンサー (Life Technologies, USA) で分離した。KRAS変異状態を Finch TV (Geospizza, Inc., Seattle, WA, USA) を使用して評価した。

【0145】

定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR)。qRT-PCRを、DNaseで処理したRNAを用い、7300 Sequence Detector System (Applied Biosystems)においてSuperScript (登録商標) II Platinum (登録商標) One-Step Quantitative RT-PCR System (カタログ番号11732-088、Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を製造者の推奨に従って使用して実施した。KRAS G12D mRNAに対するプライマーおよびKRAS G12V mRNAに対するプライマー(どちらもSigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)を以前報告されている通り設計した (Rachaganら、2011年)。簡単に述べると、フォワードプライマーの3'末端におけるKRAS G12Dの塩基の変更およびKRAS G12V変異を保持した。変異体KRAS対立遺伝子の増幅の特異性を増大させるために、KRAS変異の2つ前の位置に追加的な塩基変異を含めた。

【0146】

【化2】

KRAS G12D mRNAに対するフォワードプライマー配列: F-5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA-3' (配列番号13)

KRAS G12V mRNAに対するフォワードプライマー配列: F-5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGT-3' (配列番号14)

KRAS野生型mRNAに対するフォワードプライマー配列: F-5' - ACTTGTG GTAGTTGGAGCTGG-3' (配列番号15)。全てのKRASに対するリバースプライマー: R-5' - TTGGATCATATTCTGCCACAA-3' (配列番号16)。GPC1 mRNAプライマー対 (カタログ番号PPH06045A) および18s mRNAプライマー対 (カタログ番号QF00530467) はQiagen (Hilden, Germany) から購入した。閾値サイクル (Rothsteinら、2001年) (Ct) (すなわち、増幅された標的の量が固定閾値に達する分別サイクル数)を決定し、発現を、以前報告されている通り2^{-Ct}式を使用して測定した (LivakおよびSchmittgen、2001年)。

【0147】

電子顕微鏡。試料を、ポリ-L-リシンを用いて1時間処理した、400メッシュのホルムバールでコーティングした銅グリッドに置いた。過剰な試料を濾紙を用いてプロットし、次いで、Milliporeで濾過した水性1%酢酸ウラニルを用いて1分にわたって陰性染色した。濾紙を用いて染料をグリッドからプロット乾燥し、試料を乾燥させた。次いで、試料を、JEM 1010透過型電子顕微鏡 (JEOL, USA, Inc., Peabody, MA) を80kVの加速電圧で使用して検査した。AMT Image

10

20

30

40

50

g System (Advanced Microscopy Techniques Corp.、Danvers、MA) を使用してデジタル画像を得た。

【0148】

免疫金標識。最適な濃度で固定した検体を 400 メッシュの炭素 / ホルムバールでコートイングしたグリッドに置き、最低でも 1 分間ホルムバールに吸収させた。免疫金染色のために、グリッドをブロッキング / 透過処理ステップのためのブロッキング緩衝液に 1 時間入れた。グリッドを、すすぐすにすぐに適切な希釈度の一次抗体に 4 で終夜 (1 : 300 の抗 CD9 (ab92726、Abcam) および抗 GPC1 (PIP A528055、Thermo - Scientific)) に入れた。対照として、一部のグリッドは一次抗体に曝露させなかった。次の日に、グリッドの全てを PBS ですすぎ、次いで、10 10 nm の金粒子 (AURION、Hatfield、PA) を付着させた適切な二次抗体の液滴に室温で 2 時間浮遊させた。グリッドを PBS ですすぎ、0.1 M のリン酸緩衝液中 2.5 % グルタルアルデヒドに 15 分入れた。PBS および蒸留水ですすいだ後、グリッドを乾燥させ、酢酸ウラニルを使用して対比のために染色した。試料を Tecna (商標) BioTwins 透過型電子顕微鏡 (FEI、Hillsboro、OR) を用いて調べ、AMT CCD Camera (Advanced Microscopy Techniques Corp.) を用いて画像を取得した。

【0149】

スクロース勾配。エキソソームをさらに特徴付けるために、スクロース密度勾配を実施した。簡単に述べると、エキソソームを HEPES / スクロースストック溶液 (2.5 M のスクロース、20 mM の HEPES / NaOH 溶液、pH 7.4) 2 mL に再懸濁させた。エキソソーム懸濁物を、SW41 チューブ (Beckman) 中で直線的なスクロース勾配 (2.0 ~ 0.25 M のスクロース、20 mM の HEPES / NaOH、pH 7.4) の上に置いた。勾配を 4 、 210,000 × g で 16 時間にわたって超遠心分離した。次いで、勾配画分 1 mL を頂部から底部に採取した。屈折計を使用して密度を評価した。次に、エキソソームペレットを 1 × PBS で洗浄し、その後、第 2 の超遠心分離のステップを 4 、 150,000 × g で 2 時間にわたって行った。さらなる免疫ブロッティングおよび FACS 分析のために、エキソソームペレットを Laemmli 緩衝液および / または PBS に再懸濁させた。

【0150】

全ゲノムショットガン配列決定。全ゲノム配列決定を、エキソソームおよび対応する腫瘍試料において、ThruPLEX (登録商標) - FD ライブライープレップテクノロジー (カタログ番号 R40048、Rubicon Genomics、Ann Arbor、MI) を Illumina (登録商標) HiSeq 2000 配列決定プラットフォーム、ペアエンド 2 × 51 bp と組み合わせて使用して、網羅度 (coverage) 深さ 4 × まで実施した。コピー数プロファイルを評価し、構造的再配列に関する追加的な洞察を得るために、BIC-seq と称されるアルゴリズムを利用した (Xia, 2011 年)。

【0151】

MR 1 イメージング。7 T 小動物 MR システムを使用して MR 1 試験を行った。BioSpec (登録商標) USR70/30 (Bruker Biospin MRI、Billerica、MA) は、口径 30 cm および冷凍・冷蔵を備えた能動的に遮蔽された 7 T 磁石に基づく。このシステムは、最大勾配磁場 950 mT / m を送達する 6 cm の内径勾配を備える。内径 3.5 cm の直線状バードケージコイルにより MR シグナルを送受信する。画像撮像のために、T2 強調、呼吸同期、マルチスライスイメージングを、腹部のモーションアーチファクトを最小限にするために呼吸を毎分 25 呼吸に保持して実施した。マウスに関しては、脂肪シグナルによって T2 強調画像が遮蔽される場合には、脂肪抑制パルスモジュールを利用した。撮像パラメータは、Schmid (2013 年) から最低限に改変した。RARE-T2 強調パルスシーケンスを、56 ms の有効な Te を含み、総 TR が 2265 ms になるように改変した。マウス当たり 18 枚から 20 枚の間の

10

20

30

40

50

冠状スライスをスライス厚0.75mmおよびスライス間隔1mmで撮像した。平面では、平面内部分体積効果(in plane partial volume effect)を最小限にし、腹部を網羅するために十分なFOVを維持しながら、実験に十分な処理量ももたらされるように、画素サイズ0.156mm×0.156mm、マトリックスサイズ256×192(40mm×30mm FOV)を選択した。腫瘍量を測定するために、画像強度を正規化した後、各スライスに関して、疑わしい病変の領域にブラインドを引いた。体積を、mm²×1mmスライス距離で描かれた関心領域を加算することによって算出した。

【0152】

統計解析。GraphPad Prismバージョン6.0(GraphPad Software、La Jolla、CA、USA)およびMedCalc統計ソフトウェアバージョン13.0(MedCalc Software bvba、Acacialaan 22、Ostend、Belgium)を全ての算出に使用した。スチューデントt検定を適用してqPCR結果の発現差異を算出した。分散分析(ANOVA)検定を実施して、マウス血清試料およびヒト血清試料における多数の血清因子の差異を算出した。ANOVA検定が陽性であった場合、サブグループのペアワイズ比較にチューキー・クレーマー検定を適用した。対応のある両側スチューデントt検定を適用して、手術前血液試料と手術後の検体の間の、縦断的コホートにおけるGPC1⁺集団およびCA 19-9の差異を算出した。Delong方法(Delongら、1988年)を使用して血清因子の感度、特異度、陽性的中度、陰性的中度、および曲線下面積(AUC)を決定し、比較するために受信者動作特性(ROC)曲線を使用した。Youden-Indexを使用してカットオフ値を決定した。膵がんを有する患者の縦断的コホートにおける疾患特異的生存(診断からがんに関連した死亡または最後の経過観察までの時間)を視覚化するため(カプランマイヤー曲線)および評価するために、ログランク検定による単変量解析を行った。コックス比例ハザード回帰モデルを使用した多変量解析を実施して、年齢(連続変数)、AJCC腫瘍病期、および腫瘍悪性度(G)およびCA 19-9(UL/mL)に加えてGPC1⁺集団の減少の効果を評価した。マウス腫瘍量とGPC1⁺エキソームの間の相関分析を、スピアマン相関検定を使用して実施した。GraphPad Prism(GraphPad Software、La Jolla、CA、USA)およびMedCalc統計ソフトウェアバージョン13.0(MedCalc Software bvba、Acacialaan 22、Ostend、Belgium)を使用することによって図面を作成した。示されているP値は全て両側性であり、P値<0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0153】

(実施例1)

エキソームは、二本鎖ゲノムDNAの10kb未満の断片を含有する細胞のエキソームを2種のヒト膵がん細胞株(Panc-1およびT3M4)ならびに膵がんを有する患者の血清から単離した(Lugala、2012年; Theryら、2006年)。外部DNA汚染を減少させるために、以前に記載されている通り(Balajら、2011年)、DNA抽出前にエキソームをDNase Iで広範囲にわたって処理した。NanoSight(登録商標)LM10を使用して、がん細胞株および血清試料の両方からエキソームの存在およびそれらの濃度を確認した(図1A)。さらに、エキソームを同種の集団として電子顕微鏡によって(図1B)、およびエキソームマーカー、TSG101およびCD63の発現によって(図1CおよびF)同定した。さらに、エキソームDNAをがん細胞株から抽出した後、溶出液をRNase Aに供してRNAを排除した。その後、前処理した溶出液を2%アガロースゲルで分析した(図1D)。これにより、RNAを伴わないエキソーム中にDNAの長い断片が存在することが明らかになった。二本鎖DNA検出キットを使用することによって、膵がん細胞由来のエキソームおよび血清試料由来のエキソームがゲノム二本鎖DNAを含有することが示された(図1E)。

10

20

30

40

50

【0154】

(実施例2)

エキソソームは、変異したK R A S およびp 5 3 D N Aを含有する

K R A S およびp 5 3は、膵管腺癌において最も頻繁に変異した遺伝子である(B i a n k i nら、2012年)。細胞株およびその細胞株に由来するエキソソームから単離したD N Aの両方から、エクソン2およびイントロン2の一部をコードするK R A Sの466 b pの断片、ならびにイントロン5、6、および7を含む、エクソン5からエクソン8までにわたるp 5 3の1564 b pの断片を増幅した(図2A)。P a n c - 1およびT 3 M 4におけるK R A S変異およびp 5 3変異は、以前に記載されている(M o o r eら、2001年)。P a n c - 1は、コドン12においてヘテロ接合性K R A S変異(グリシンからアスパラギン酸へ)およびコドン273においてホモ接合性p 5 3変異(アルギニンからヒスチジンへ)を示す(M o o r eら、2001年)。T 3 M 4細胞は、野生型K R A Sを含有するが、コドン220においてホモ接合性p 5 3変異(チロシンからシスティンへ)を示す(M o o r eら、2001年)。P C R増幅されたD N Aのサンガーパ配列決定法により、P a n c - 1細胞に由来するエキソソームから単離したD N Aにおいて同一のK R A S変異およびp 5 3変異が検出され、また、T 3 M 4細胞に由来するエキソソームから単離したD N Aにおいて同一のp 5 3変異が検出された(図2B)。T 3 M 4細胞においてもそれから単離されたエキソソームにおいてもK R A S D N Aにおける変異は検出されなかった。

10

【0155】

20

細胞株を使用した観察に基づいて、膵がんを有する患者由来の循環血清エキソソームもK R A S D N Aおよびp 5 3 D N Aを含有し得ることが仮定された。エクソン2およびイントロン2の一部をコードするK R A Sの466 b pの断片を増幅した。その後、全てのヒト試料においてエクソン7および8ならびにイントロン7が重複している609 b pのp 5 3のD N A断片を単離した(図2CおよびE)。エキソソームが枯渇した血清試料中のD N Aの存在を評価するために、当該血清試料を使用したK R A Sおよびp 5 3についてのP C Rも実施した。しかし、エキソソーム枯渇血清ではK R A S P C R産物もp 5 3 P C R産物も増幅されなかった(図2CおよびE)。エキソソームから単離したD N AからのP C Rアンプリコンをサンガーパ配列決定法に供した。サンガーパ配列決定法により、膵がんを有する患者の血清試料においてK R A S変異を有するD N Aが検出された(図2D)。1つのK R A S変異はコドン12に位置し、G G TからT G Tへの塩基変化を特徴とするものであった。第2のK R A S変異はコドン22において見いだされ、C A GからC T Gへの塩基変化を伴うものであった。さらに、膵がんを有する患者1名において、コドン273において、C G TからC A Tへの塩基変化を伴うp 5 3変異が検出された(図2D)。

30

【0156】

(実施例3)

30

P D A C患者の末梢血由来の循環エキソソームは、全染色体にわたる二本鎖ゲノムD N Aを含有する

40

2つの膵がん試料を、対になった血清エキソソームD N Aおよび対応する腫瘍試料を使用して調査した。約160 b pの推定ライブラリー挿入断片サイズを用いて4×全ゲノム配列網羅度が達成された。ヒトゲノムにマッピングされた読み取りのパーセントはおよそ96%であった。腫瘍ゲノムD N AとエキソソームゲノムD N Aの間の適正に対になった百分率読み取りは約92%であった。固有の読み取り数としての配列の複雑性は全ての試料において 9×10^{-8} を超えた。血清由来のエキソソームの大部分が、核ゲノムD N Aと同様に全ての染色体に均一にわたるD N Aを含有した(図3Aおよび3B)。

【0157】

(実施例4)

哺乳動物のエキソソームはタンパク質を產生する

エキソソームが網状赤血球分化の副産物として最初に発見されてから(R a p o s oお

50

よび Stoorvogel、2013年；Hardingら、1984年）、エキソソームは、もう使われていないタンパク質の細胞排除の主に不活性な形態であると広範に考えられていた。しかし、まもなく、エキソソームがほとんど全ての哺乳動物細胞から分泌され、ほとんどの体液において実際に見いだされることが明らかになった（El-Andaloussiら、2013年）。エキソソームは、現在、細胞間コミュニケーションにおいて多数の機能を有し、抗原の提示と同程度に多様なプロセス（Raposoら、1996年；Zeeleenbergら、2008年）、HIVおよびマラリアなどの病原体の拡散（WileyおよびGummuluru、2006年；Regev-Rudzkiら、2013年）、線維症の発症（Borgesら、2013年）、およびおそらくとりわけ、がんの進行および転移（KahlerとKalluri、2013年；Skogら、2008年；Lugaら、2013年；Peinadoら、2012年）に関与することが公知である。それらはそのような幅広い病態に関与するので、エキソソーム生物学および内容物のより深い理解が不可避になっている。結果として、特に、がんの文脈において、いくつかの試験により、エキソソームの核酸またはタンパク質プロファイルが疾患の進行と相関し得ることが実証された（Skogら、2008年；Silvaら、2012年；TaylorおよびGercel-Taylor 2008年；Jiら、2013年）。結腸直腸がん細胞由来のエキソソームのプロテオミクスクラスタリングを伴うそのような最近のプロファイルの1つにより、タンパク質合成の数種の構成成分が同定された（Choiら、2012年）。これにより、真核生物開始因子、ADPリボシル化因子、およびリボソームタンパク質などの、エキソソームにおけるタンパク質翻訳機構の構成成分を同定した以前の質量分析試験が確認される（Valadiら、2007年；Pisitkunら、2004年）。これにより、mRNAおよびそれらの対応するタンパク質が同じエキソソームの内側にパッケージングされて見いだされ得るという観察と同様に、エキソソームが、それらのドナー細胞とは独立して核酸をタンパク質に翻訳することができるという興味深い可能性が生じる。

【0158】

エキソソームを、異なるマウスおよびヒト細胞株（正常な線維芽細胞および不死化線維芽細胞、HDFおよびNIH 3T3；肺上皮細胞、E10；非腫瘍形成性ヒト上皮乳房、MCF10A；三重陰性ヒト転移性乳癌（breast carcinoma）、MDA-MB-231；およびマウス転移性乳癌（mammary carcinoma）、4T1）から、確立された超遠心分離技法（Borgesら、2013年；Theryら、2006年）を使用して単離した。NanoSight（登録商標）（Sooら、2012年）ナノ粒子トラッキング解析により、サイズ分布のピークが直径 104 ± 1.5 nmである粒子が明らかになった（図4A）。エキソソーム抽出物を透過型電子顕微鏡（TEM）によってさらに分析し、それにより、脂質二重層を有し、サイズが $50 \sim 150$ nmである構造が明らかになった（図4B）。さらに、CD9抗体を使用した免疫金標識により、エキソソーム表面におけるテトラスパニンの発現が明らかになった（図4C）。エキソソームの正体を確認するために、エキソソームテトラスパニン表面マーカーCD9の発現を示すフローサイトメトリー分析も実施した（図4D）。エキソソームタンパク質抽出物の免疫プロット分析によってCD9マーカー、CD63マーカー、およびTSG101マーカーの発現も確認した（図4E）。

【0159】

選択された細胞株から収集されたエキソソームの正体および純度が確認されたので、エキソソーム内のタンパク質翻訳機構の成分の存在を決定した。エキソソームにはmRNAだけでなく、miRNAおよびtRNA断片を含めた小さな非コードRNAも濃縮されている（Nolte-t Hoenら、2012年）。ノーザンプロット分析により、一連の細胞株から収集されたエキソソーム由来のRNA抽出物におけるメチオニン、セリン、グリシン、バリン、およびロイシンに対するtRNAの存在を同定した（図5A）。さらに、エキソソームからのタンパク質抽出物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析により、それらが遊離アミノ酸を含有することが示された（図5B）。エキソソーム

10

20

30

40

50

がリボソーム RNA を含有することが、以前にハイスループット配列決定 (RNA - Seq) 技法を使用して示されている。エキソソーム RNA 抽出物の定量的 PCR 分析を使用してリボソーム RNA の存在を確認し、それにより、全てのエキソソームにおいて rRNA 断片 18 s および 28 s の存在が示された (図 5 C)。エキソソームにおけるリボソームタンパク質の存在が同定された、以前公開されたプロテオミクスデータと共に、これにより、エキソソーム内に機能的なリボソームサブユニットが存在することが示唆される。翻訳が行われるために、mRNA を認識し、翻訳を開始するために真核生物開始因子 (eIF) が 40 s リボソームサブユニットおよびメチオニンとカップリングした tRNA と複合体を形成する必要がある。eIF4A、eIF4E、および eIF4G を含有する eIF4 複合体は、真核生物 mRNA に存在する 5' キャップ構造を認識するので、特に重要である。以前の質量分析試験により、エキソソームにおける異なる eIF の存在が同定された (Valadisir, 2007 年; Pisitkun, 2004 年)。免疫プロット分析を使用してエキソソームにおける eIF4A1、eIF3A、および eIF1A の発現を確認した (図 5 D)。さらに、開始因子 eIF4A および eIF3A が免疫共沈降し、それにより、エキソソーム内に開始複合体が存在することが示唆された (図 5 E)。総合すると、これらのデータにより、エキソソーム内で活性なタンパク質翻訳が起こり得るという興味深い可能性がもたらされる。

【0160】

エキソソームの翻訳能力を決定するために、in vitro 翻訳アッセイにおいて、MCF10A 由来のエキソソームのタンパク質抽出物およびMDA-MB-231 由来のエキソソームのタンパク質抽出物を、哺乳動物細胞では発現しない緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする mRNA と一緒にインキュベートした。タンパク質抽出物のウエスタンプロット分析により、GFP の mRNA と一緒にインキュベートした後に GFP の発現が示され、これにより、タンパク質形成が確認される (図 6 A)。以前公開された技法 (El-Andaloussi, 2012 年) を使用して、インタクトなエキソソームにおける同じ翻訳コンピテンシーを調査した。電気穿孔したエキソソームを、タンパク質合成が起こるのを可能にするために 37 で 48 時間インキュベートした。電気穿孔したエキソソームの NanoSight (登録商標) 粒子トラッキング解析により、以前に記載された同じピーク 100 nm が明らかになり、これにより、エキソソーム完全性が電気穿孔プロセスによって損なわれないことが実証される。しかし、488 nm レーザーを用いた粒子トラッキング解析を使用して、電気穿孔したエキソソームのみが検出され、これにより、GFP タンパク質の発現が示される。金標識した抗体を用いたエキソソームの電子顕微鏡分析により、電気穿孔したエキソソームにおける GFP 発現がさらに示された (図 6 B)。ウエスタンプロット分析により、電気穿孔したエキソソームにおける GFP 発現が確認され、タンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミドを使用すると観察されなかった。ドナー細胞からのタンパク質抽出物を再度陽性対照として使用し、GFP プラスミドを電気穿孔した細胞において観察されたエキソソームにおいて見られたものと同等のサイズの GFP バンドが伴った。新規タンパク質合成の存在を探索するために、MCF10A 由来のエキソソームおよび MDA-MB-231 由来のエキソソームを [³⁵S] メチオニンと一緒にインキュベートした。[³⁵S] メチオニンの存在下で培養したエキソソームからのタンパク質抽出物のオートラジオグラフィーにより、新しく形成されたタンパク質への当該アミノ酸の組み入れが確認された (図 6 C)。[³⁵S] メチオニンの組み入れは、タンパク質翻訳の公知の阻害剤であるシクロヘキシミドを添加することにより阻害することができた。陽性対照として、対応するドナー細胞も [³⁵S] メチオニンと一緒にインキュベートし、[³⁵S] メチオニンの組み入れが示された (図 6 C)。さらに、エキソソームに、ホタルルシフェラーゼを 5' キャップ依存的様式で発現し、ウミシイタケルシフェラーゼをキャップ非依存的様式で発現するバイシストロン性プラスミドを電気穿孔した。発光分析により、電気穿孔したエキソソームにおけるホタルルシフェラーゼ活性が実証され、これにより、電気穿孔したエキソソームが古典的な真核生物キャップ依存的翻

10

20

30

40

50

訳の能力を有することが実証される。

【0161】

エキソソームの、それらの元の細胞とは独立してタンパク質を新規に合成する能力が実証されたので、次に、これにより、新しく形成された機能的なタンパク質のレシピエント細胞への送達がもたらされ得るかどうかを決定した。予め G F P プラスミドで電気穿孔したエキソソームを、シクロヘキシミドで処理し、したがって、それらの翻訳能力が損なわれた正常なヒト線維芽細胞と一緒にインキュベートした。エキソソームで処理した線維芽細胞を共焦点顕微鏡で観察することにより、細胞を、G F P を電気穿孔したエキソソームを用いて処理した場合には緑色のシグナルが検出されたが、対照エキソソームを用いた場合には検出されなかった。これにより、エキソソームにおいて新しく合成されたタンパク質をレシピエント細胞に送達することができる事が確認された。エキソソームにおいて翻訳されたタンパク質が、レシピエント細胞に送達された際に機能的に活性であることをさらに確認するために、M D A - M B - 2 3 1 細胞を用いた試験を実施した。この細胞株は、変異体不活性型の腫瘍抑制因子遺伝子 p 5 3 を発現することが公知である (G a r t e lら、2003年)。p 5 3 は、D N A 損傷に応答して作用して、p 2 1 の発現を誘導し、それにより、細胞周期の停止を導き得る (Z i l f o u およびL o w e 、2009年)。M D A - M B - 2 3 1 細胞由来のエキソソームを、野生型の p 5 3 をコードするプラスミドを用いて電気穿孔し、翻訳が起こるのを可能にするために48時間インキュベートした。電気穿孔したエキソソームをまたドナーM D A - M B - 2 3 1 細胞と一緒にインキュベートすることにより、p 2 1 遺伝子発現の増加がもたらされた (図7)。これにより、エキソソームにおいて新しく翻訳された機能的な形態の p 5 3 が細胞に送達されたことが示唆される。したがって、哺乳動物細胞由来のエキソソームは、機能的なタンパク質を翻訳し、それらをレシピエント細胞に送達する能力を有する。

10

20

30

40

【0162】

血小板は、刺激に応答して巨核球分化の後に残ったm R N A からタンパク質を産生する能力を有する (W e y r i c h ら、2004年)。神経生物学では、シナプス領域に沿って、大きなニューロンの樹状突起棘上にポリリボソームおよびm R N A 結合性タンパク質を含む小さな翻訳の巣が観察されている (S t e w a r d およびL e v y 、1982年；W e l l s 、2006年)。したがって、いくつかの生物学的構造は、それらの生物学的機能を支持するために、細胞の遺伝学的中心から離れた獲得生合成能を有する。しかし、これは、細胞外タンパク質翻訳に関する最初で唯一の報告である。これは、エキソソーム内の予想外のレベルの生物活性を示唆する他の最近の観察の結果として生じたものである。ウシ白血病ウイルスに感染したウシ乳由来のエキソソームが、例えば、逆転写酵素活性を有することが最近示された (Y a m a d a ら、2013年)。最近のデータにより、がん細胞に由来するエキソソームがm i R N A の前駆体からm i R N A を生成可能であることがさらに示されている。エキソソーム内のタンパク質翻訳が存在することの生物学的意義はまだ解明されていない。しかし、細胞がm R N A をエキソソームに選択的に組み入れることが可能であることが公知である (R a p o s o およびS t o o r v o g e l 、2013年)。これにより、起源の細胞では発現が抑圧されるm R N A をエキソソーム内に選択的にパッケージングし、それをタンパク質に翻訳することができるという興味深い可能性が生じる。これには、バイオマーカー評価ならびにエキソソームの治療的利用に関する潜在的意味があり得る。

【0163】

(実施例5)

G P C 1 は、がん細胞由来のエキソソーム上の特異的な表面タンパク質である

がん細胞に由来するエキソソームには存在するが、正常細胞に由来するエキソソームには存在しない表面マーカーであるタンパク質マーカーグリビカン1を使用して、がん細胞由来エキソソームを特異的に同定した。がん性および非腫瘍形成性の両方の種々の細胞株に由来するエキソソームに対して質量分析を実施した。グリビカン1タンパク質の存在は、がん細胞由来エキソソームにおいて排他的に認められ、その他では認められなかった (

50

図 8 A)。免疫プロット分析を実施し、がん由来のエキソソームでは、グリピカン 1 タンパク質の発現が示され、非腫瘍形成性細胞由来エキソソームではそれが示されなかった(図 8 B)。フローサイトメトリー分析を実施し、がん由来のエキソソームの表面でグリピカン 1 発現が示された(図 8 C)。

【 0 1 6 4 】

がん細胞(M D A - M B - 2 3 1、三重陰性ヒト転移性乳癌)、線維芽細胞(H D F、ヒト皮膚線維芽細胞; N I H / 3 T 3、マウス胚線維芽細胞)、および非腫瘍形成性上皮細胞(M C F 1 0 A、ヒト乳房上皮細胞; E 1 0、マウス肺上皮細胞)由来のエキソソームを、確立された超遠心分離法(L u g a r a、2 0 1 2 年; T h e r y ら、2 0 0 6 年)を使用して単離した。収集したエキソソームを N a n o S i g h t (登録商標) ナノ粒子トラッキング解析および透過型電子顕微鏡(T E M)によって分析し、これにより、それぞれ $1 0 5 \pm 5 \text{ nm}$ および $1 1 2 \pm 4 \text{ nm}$ の範囲の直径が明らかになった(図 1 4 A ~ B)(T h e r y ら、2 0 0 2 年)。エキソソーム純度を、免疫金標識および T E M による C D 9 の検出(図 1 4 C)、フロチリン 1 および C D 8 1 についてはウエスタンプロット分析(図 1 4 D)を使用して評価した(T h e r y ら、2 0 0 2 年)。超高速液体クロマトグラフィー-質量分析(U P L C - M S)を使用してエキソソームプロテオームを評価した(W i l s o n ら、2 0 0 5 年)。全ての細胞型(H D F、N I H / 3 T 3、E 1 0、M C F 1 0 A、および M D A - M B - 2 3 1)由来の全てのエキソソームにおいて、エキソソームマーカー-T S G 1 0 1、C D 9、および C D 6 3(各エキソソーム型におけるタンパク質の総数は、H D F = 2 6 1、N I H / 3 T 3 = 1 7 1、E 1 0 = 2 3 2、M C F 1 0 A = 2 1 4、および M D A - M B - 2 3 1 = 2 4 2 であった)を含めた、合計 1 1 2 0 種のタンパク質が見いだされた。B i o i n f o r m a t i c s 分析により、4 8 種のタンパク質(2 5 種の細胞質タンパク質、7 種の核内タンパク質、5 種の膜貫通タンパク質、1 種の膜アンカータンパク質、および 7 種分泌タンパク質)ががん細胞由来エキソソーム(M D A - M B - 2 3 1; 表 1)に排他的に存在することが明らかになった。これらの中で、グリピカン-1(G P C 1)は、唯一の膜アンカータンパク質として現れ、これはまた、乳がんおよび膵がんを含めた様々ながんにおいて過剰発現すると報告されている(表 1)(M a t s u d a ら、2 0 0 1 年; K l e e f f ら、1 9 9 8 年; S u ら、2 0 0 6 年)。G P C 1 発現は、いくつかの乳がん細胞株および膵がん細胞株において、非腫瘍形成性細胞と比較して上昇した(図 1 4 E ~ F)。非腫瘍形成性細胞株に由来するエキソソームとは対照的に、G P C 1 タンパク質は、免疫プロット分析によってがん細胞由来エキソソームにおいてのみ検出された(図 1 4 G)。さらに、免疫金 T E M により、G P C 1⁺ エキソソームはがんエキソソーム(T 3 M 4 膵がん株)では検出されたが、非がんエキソソームでは検出されなかった(H M L E; 図 9 A)。アルデヒド/硫酸塩ビーズとカップリングしたエキソソームの F A C S 分析を使用して、エキソソームの表面に G P C 1 タンパク質が検出された(図 9 B)。免疫金および T E M により、ビーズの表面に G P C 1 発現を伴うがんエキソソームが示されたが、非腫瘍形成性エキソソームでは G P C 1 発現は示されなかった(図 9 C)。さらに、細胞株からスクロース勾配を使用して得られたエキソソームでは、G P C 1 発現はがんエキソソームでは同定されたが、非腫瘍形成性細胞株に由来するエキソソームでは同定されなかった(図 9 B ~ D および図 1 4 H)。異なるエキソソーム精製方法により、G P C 1 が、多様ながん細胞株から単離されたがんエキソソームに特異的に存在することが確認された(図 9 E)。

【 0 1 6 5 】

【表1-1】

表1.タンパク質はMDA-MB-231がん細胞由来エキソソームに排他的に存在する

タンパク質名	遺伝子 ID	細胞での位置
ATP 結合性カセットサブファミリーA メンバー6	ABCA6	膜貫通
テトラスパニン-4	TSPAN4	膜貫通
8LIT および NTRK 様タンパク質4	SLITRK4	膜貫通
推定プロトカドヘリンベータ-18	PCDHB18	膜貫通
骨髄細胞表面抗原 CD33	CD33	膜貫通
グリビカン-1	GPC1	膜アンカー
ヒストンH2A2型-A	HIST1H2AA	核
ヒストンH2A1型-A	HIST1H1AA	核
ヒストンH3.3	H3F3A	核
ヒストンH3.1	HIST1H3A	核
ジンクフィンガータンパク質37ホモログ	ZFP37	核
ラミニンサブユニットベータ-1	LAMB1	分泌型
尿細管間質性腎炎抗原様	TINAGL1	分泌型
ペルオキシレドキシン04	PRDX4	分泌型
コラーゲンアルファ-2(IV)鎖	COL4A2	分泌型
推定タンパク質C3P1	C3P1	分泌型
ヘミセンチン-1	HMCN1	分泌型
推定ローフィリン-2様タンパク質	RHPN2P1	特定されていない
アンキリソリピートドメイン含有タンパク質62	ANKRD62	特定されていない
トリパータイトモチーフ (tripartite motif) 含有タンパク質42	TRIM42	特定されていない
接合部プロコグロビン	JUP	細胞質
チューブリンベータ2B鎖	TUBB2B	細胞質
エンドリボヌクレアーゼダイサー	DICER1	細胞質
E3ユビキチン-タンパク質リガーゼTRIM71	TRIM71	細胞質
カタニンp60ATPアーゼ含有サブユニットA様2	KATNAL2	細胞質
タンパク質S100-A6	S100A6	細胞質
5'-ヌクレオチダーゼドメイン含有タンパク質3	NT5DC3	細胞質
バリントRNAリガーゼ	VARS	細胞質
カズリン (Kazrin)	KAZN	細胞質
ELAV様タンパク質4	ELAVL4	細胞質
RINGフィンガータンパク質166	RNF166	細胞質
FERMおよびPDZドメイン含有タンパク質1	FRMPD1	細胞質
78kDaグルコース調節タンパク質	HSPA5	細胞質
輸送タンパク質粒子複合体サブユニット6A	TRAPPC6A	細胞質
スクアレンモノオキシゲナーゼ	SQLE	細胞質
腫瘍易罹患性遺伝子(Tumor susceptibility gene)101タンパク質	TSG101	細胞質
液胞タンパク質選別28ホモログ	VPS28	細胞質
プロスタグラジンF2受容体ネガティブ調	PTGFRN	細胞質

10

20

30

40

【表1-2】

タンパク質名	遺伝子 ID	細胞での位置
節因子		
イソブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、ミトコンドリア	ACAD8	細胞質
26Sプロテアーゼ調節性サブユニット6B	PSMC4	細胞質
伸長因子1-ガンマ	EEF1G	細胞質
タイチン	TTN	細胞質
チロシン-プロテインホスファターゼ13型	PTPN13	細胞質
トリオースリン酸イソメラーゼ	TPI1	細胞質
カルボキシペプチダーゼE	CPE	細胞質

10

20

30

40

50

腫瘍を有するマウスの体循環から GPC1⁺ エキソソームを単離することができるかどうかを決定するために、MDA-MB-231ヒト乳がん細胞をヌードマウスの乳房脂肪パッドに埋め込んだ。マウスから、がん細胞を接種する前に採血し、腫瘍の平均体積が 300 mm³、550 mm³、1000 mm³、および 1350 mm³ に達した時に繰り返して採血し、循環エキソソーム (c_rExos) を GPC1 の存在について評価した (図 10A)。GPC1⁺ c_rExos の相対的な百分率は腫瘍の成長に比例して上昇し、腫瘍量と相關した (図 10B ~ C; r = 0.98, P = 0.004)。がん細胞起源の GPC1⁺ c_rExos をさらに確認するために、MDA-MB-231細胞を、確立されたエキソソームのマーカーである CD63 のプロモーターの下で GFP が安定に発現されるように操作した (Thery ら、2006 年)。培養物中でこれらの細胞 (MDA-MB-231-CD63GFP) から分泌されるがんエキソソームは GFP について陽性であった (図 10D)。ヌードマウスへの MDA-MB-231-CD63GFP 細胞の同所性埋め込み後、腫瘍のサイズが約 1500 mm³ であるマウスから c_rExos を採取した。c_rExos の選択された集団は、GFP⁺ であることが見いだされ (図 10E)、また、GPC1 は GFP⁻ c_rExos では検出されなかつたので、がん細胞特異的 GFP⁺ c_rExos のみが GPC1 について陽性であった (図 10F)。

【0167】

(実施例 6)

GPC1⁺ エキソソームはがんの存在に対するバイオマーカーである

がん細胞株に由来するエキソソームおよび腫瘍を有するマウス由来の循環エキソソームは、GPC1 について 100% 陽性であった (図 9D および図 10F)。次に、c_rExos を、乳がんを有する患者 (n = 32)、膵管腺癌を有する患者 (PDAC, n = 190)、および健康なドナー (n = 100) (患者データは表 2 に示されている) から単離した。超遠心分離によって血清から精製した c_rExos の TEM 分析により、脂質二重層ならびに CD9 陽性が明らかになった (図 11A ~ B)。スクロース勾配単離によって精製した c_rExos でもエキソソームマーカーフロチリン 1 の発現が示された (図 15A) (Thery ら、2002 年; Thery ら、2006 年)。興味深いことに、c_rExos の相対的な濃度は、がん患者の血清において健康な個体と比較して有意に高く (図 15B)、また、PDAC c_rExos の平均サイズは、他の c_rExos の全て (乳がん患者および健康なドナー、図 15C) と比較して有意に小さかった。健康な個体由来の血清の分析により、c_rExos における GPC1 についての 0.3% から 4.7% までにわたる (平均 2.3%) ベースライン陽性が明らかになった。乳がん患者 32 名のうち 24 名 (75%) では、c_rExos GPC1⁺ レベルが健康な個体で認められるベースラインレベルに勝ることが実証された (P < 0.0001; 図 15C)。対照的に、190 の PDAC c_rExos では全て、GPC1⁺ c_rExos のレベルが健康な個体のレベルを勝ることが示された (P < 0.0001; 図 15C)。これらの結果により、GPC1⁺ c_rExos と、がん、特に PDAC の強力な相関が示される。

【0168】
【表2】

表2.患者および健常な参加者の人口統計

	参加者の数 (n=323)	参加者の% 膝がん	参加者の数 (n=32)		参加者の% 乳がん
			乳がん	乳がん	
総数		190	58.82%		32
性別					100%
男性	104	54.74%		0	0%
女性	86	45.26%		32	100%
年齢の中央値(範囲)	66(37-86)		57(30-85)		
AJCC病期					
0	0	n.a.	-	2	6%
1	1	2	1.05%	12	38%
II		n.a	-	17	53%
IIa		19	10.00%	n.a.	-
IIb		117	61.58%	n.a.	-
III		11	5.79%	1	3%
IV		41	21.58%	n.a.	-
腫瘍悪性度					
1	1	1	0.53%	8	25%
2	2	91	47.89%	13	41%
3	3	49	25.79%	10	31%
4	4	1	0.53%	n.a.	-
不明		48	25.26%	1	3%
腫瘍切除					
行った		152	80.00%	32	100%
行っていない		38	20.00%	0	0%
ネオアジュバント照射/化学療法					
受けた		10	5.26%	0	0%
受けていない		180	94.74%	32	100%

【 0 1 6 9 】
【 補 2 - 2 】

		参加者の数 (n=323)	参加者の% 良性腎疾患(BPD)	参加者の数 (n=32)	参加者の%
総数		26	8.05%		
性別					
男性	男性	18	69.23%		
女性	女性	8	30.77%		
年齢の中央値(範囲)	58.5(31-77)				
診断					
慢性腎炎	慢性腎炎	15	57.69%		
自己免疫性腎炎	自己免疫性腎炎	3	11.54%		
漿液性囊胞腺腫	漿液性囊胞腺腫	8	30.77%		
腎がん前駆病変(PCPL)					
総数		7	2.17%		
性別					
男性	男性	3	42.86%		
女性	女性	4	57.14%		
年齢の中央値(範囲)	65(46-74)				
新生物					
IPMN	IPMN	5	71.43%		
PanIN	PanIN	2	28.57%		
健康なドナー					
総数		100	30.96%		

略語:AmericanJointCommitteeonCancer(AJCC)、腎管内乳頭状粘液性腫瘍(IPMN)、腎上皮内腫瘍(PanIN)、該当なし(n.a.)

(実施例7)

G P C 1⁺ c r E x o s は、発がん性 K R A S^{G 1 2 D}をコードするm R N Aを特異的に含有する

エキソソームは、D N AおよびR N Aを含有し得る (K a h l e r tおよびK a l l u r i、2013年)。K R A Sは、膵がんにおいて頻繁に変異する遺伝子であり、変異した転写物が循環中に見いだされている (S k o gら、2008年; M o r r i sら、2010年; C h e nら、2013年)。P D A Cを有する患者47名からの原発性腫瘍試料について配列決定して、発がん性K R A Sの状態を評価した。16個のP D A C腫瘍が野生型K R A S対立遺伝子のみを含有し、14個のP D A C腫瘍がG 1 2 D変異した対立遺伝子を有し、11個のP D A C腫瘍がG 1 2 V変異した対立遺伝子を有し、5個のP D A C腫瘍がG 1 2 R変異した対立遺伝子を有し、そして1個のP D A C腫瘍がG 1 2 V / C変異を含有した (図11D)。十分な量の対応する血清がK R A S^{G 1 2 D}変異を有する患者10名およびK R A S^{G 1 2 V}変異を有する患者5名から入手可能であった。これらの患者由来のG P C 1⁺ c r E x o s およびG P C 1⁻ c r E x o s を、免疫金T E Mに供して特異的なG P C 1発現を確認した (図11E)。発がん性K R A S変異が検証された腫瘍を有するG P C 1⁺ c r E x o s 15個全てで、特異的なプライマーを使用したエキソソームm R N Aのq P C R分析により、同一の変異が明らかになった (図11F)。野生型K R A S m R N AはG P C 1⁺ c r E x o s およびG P C 1⁻ c r E x o s のどちらにおいても見いだされた (図11F)。

10

20

30

40

50

【0170】

(実施例8)

G P C 1⁺ 循環エキソソームにより初期膵がんが検出される

組織学的に検証された膵がん前駆病変 (P C P L) を有する患者7名からの血清、および組織学的に検証された良性膵疾患 (B P D) を有する患者26名からの血清のさらなる分析から、G P C 1⁺ c r E x o s のレベルにより、P C P Lを有する患者を健康な個体およびB P Dを有する患者と区別できることが示された (図11G)。具体的には、P C P L群 (P a N I N、n = 2; I P M N、n = 5) のG P C 1⁺ c r E x o s は常に健康なドナー群よりも高く (P = 0.0061)、同様に、B P D群 (慢性膵炎を有する患者18名および囊胞性腺腫を有する8名を含む; 図11G) におけるG P C 1⁺ c r E x o s よりも有意に高い。B P D群では、健康なドナーと比較して同様のG P C 1⁺ c r E x o s レベル (平均2.1%のG P C 1⁺ c r E x o s) が示された (図11G)。

30

40

50

【0171】

G P C 1⁺ c r E x o s の特異度および感度を、膵臓腺癌を有する患者に対する腫瘍マーカーとして現在使用されている循環タンパク質であるC A 19-9と比較した (D e l V i l l a n o ら、1983年)。C A 19-9レベルはP D A Cを有する患者の血清において健康なドナーと比較して上昇したが、C A 19-9レベルは良性膵疾患を有する患者の血清においても有意に上昇した (P < 0.0001; 図11H)。重要なことに、C A 19-9血清レベルでは、P C P Lを有する患者を健康なドナーと区別することはできなかった (図11H)。受信者動作特性 (R O C) 曲線から、G P C 1⁺ c r E x o s により、膵がんI期～IV期を有する患者と健康なドナーおよび良性膵疾患を有する患者を比較した場合にA U Cが1.0 (95% C I : 0.988～1.0)、感度が100% (95% C I : 98.1～100%)、特異度が100% (95% C I : 98.1～100%)、および陰性的中度が100% (95% C I : 86.8～100%; 図11I) である、ほぼ完全な分類子が明らかになることが示された (図11Iおよび16A～E; 表3～8)。対照的に、C A 19-9は、膵がんを有する患者と健康な対照の区別では劣る (A U Cが0.739、95% C I : 70.2～82.6%、p < 0.001; 図11Iおよび16A～E; 表3～8)。注目すべきことに、エキソソームの濃度もエキソソームのサイズも、膵がんを有する患者を対照と比較して層別化するための有効なパラメータではなかった (図11G、11I、および16A～E; 表3～8)。G P C 1⁺ c r E x o s は膵がんの各病期 (

上皮内癌、Ⅰ期ならびにⅡ～Ⅴ期)において100%の感度および特異度を示し、これにより、膵がん進行の全ての病期におけるその有用性が裏付けられ、膵がんの早期検出におけるその潜在的役割が強調される。

【0172】

【表3】

表3.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図11Iに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%CI	特異度	95%CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.998-1.00	>7.6	100	98.1-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.739	0.687-0.787	>26.3063	76.84	70.2-82.6	64.29	55.3-72.6
エキソソーム濃度(^10E09)	0.57	0.513-0.625	>32.8	25.79	19.7-32.6	92.06	85.9-96.1
エキソソームサイズ(nm)	0.676	0.621-0.727	≤122	63.16	55.9-70.0	70.63	61.9-78.4

10

20

【0173】

【表4】

表4.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図16Aに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%CI	特異度	95%CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.972-1.00	>7.6	100	47.8-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.735	0.651-0.808	>30.8435	80	28.4-99.5	66.67	57.7-74.8
エキソソーム濃度(^10E09)	0.581	0.492-0.667	≤23.75E08	60	14.7-94.7	43.65	34.8-52.8
エキソソームサイズ(nm)	0.663	0.576-0.744	≤107	60	14.7-94.7	88.1	81.1-93.2

30

【0174】

【表5】

表5.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図16Bに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%CI	特異度	95%CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.975-1.00	>7.6	100	81.5-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.668	0.585-0.744	>26.3063	66.67	41.0-86.7	64.29	55.3-72.6
エキソソーム濃度(^10E09)	0.648	0.564-0.726	>28.1E08	55.56	30.8-78.5	78.57	70.4-85.4
エキソソームサイズ(nm)	0.7	0.619-0.774	≤124	77.78	52.4-93.6	66.67	57.7-74.8

40

50

【0175】

【表6】

表6.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図16Cに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%C I	特異度	95% CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.985-1.00	>7.6	100	96.9-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.74	0.680-0.794	>25.3562	79.49	71.0-86.4	63.49	54.4-71.9
エキソソーム濃度(^10E09)	0.559	0.494-0.622	>31.7E08	27.35	19.5-36.4	89.68	83.0-94.4
エキソソームサイズ(nm)	0.692	0.630-0.749	≤122	66.67	57.4-75.1	70.63	61.9-78.4

10

【0176】

【表7】

表7.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図16Dに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%C I	特異度	95% CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.973-1.00	>7.6	100	71.5-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.729	0.646-0.801	>36.1015	72.73	39.0-94.0	71.43	62.7-79.1
エキソソーム濃度(^10E09)	0.566	0.478-0.650	>32.8E08	36.36	10.9-69.2	92.06	85.9-96.1
エキソソームサイズ(nm)	0.776	0.697-0.842	≤132	100	71.5-100.0	49.21	40.2-58.3

20

【0177】

【表8】

表8.受信者動作特性(ROC)曲線分析(図16Eに対応する)

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%C I	特異度	95% CI
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.978-1.00	>7.6	100	91.4-100.0	100	97.1-100.0
CA19-9(U/mL)	0.788	0.718-0.848	>61.2284	75.61	59.7-87.6	78.57	70.4-85.4
エキソソーム濃度(^10E09)	0.569	0.490-0.645	>26.5E08	51.22	35.1-67.1	70.63	61.9-78.4
エキソソームサイズ(nm)	0.604	0.525-0.678	≤122	56.1	39.7-71.5	70.63	61.9-78.4

40

(実施例9)

GPC1+循環エキソソームにより腫がん負荷量についての情報が得られる

GPC1+circExosレベルは、マウスにおける腫瘍量と相關した(図10B~C)。したがって、GPC1+circExosレベルにより、PDACを有する患者の転移性疾患負荷量についての情報が得られるかどうかを評価した。遠隔転移性疾患を有するPDAC患者のGPC1+circExosでは、リンパ節に限定された転移性疾患を有する患者(

50

平均 50.5%) または転移が分かっていない患者 (平均 39.9% ; 図 17A) と比較して有意に高い百分率の GPC1⁺ crExos (平均 58.5%) が示された。さらに、外科手術前の段階および外科手術後の段階 (手術後 7 日目 ; PDAC, n = 29, PCPL, n = 4, および BPD, n = 4 ; 図 12A) の PDAC 患者の血清における GPC1⁺ crExos を評価した。縦断的血液採取を受けた PDAC 患者 29 名のうち 28 名および PCPL 患者全員で、外科的切除後に GPC1⁺ crExos レベルの有意な低下が示された (PDAC : P < 0.0001 ; PCPL : p < 0.001 ; 図 12B) 。対照的に、CA 19-9 レベルは、PDAC 患者 29 名のうち 19 名においてのみ低下し、PCPL 患者では低下しなかった (PDAC : P = 0.003 ; PCPL : P = 0.81 ; 図 17B) 。 BPD 患者では、GPC1⁺ crExos および CA 19-9 のどちらにも切除前と切除後で差異は示されなかった (図 12B および 17B) 。

【 0178 】

縦断的試験コホートにおける GPC1⁺ crExos の予後の関連性を決定するために、患者を 2 つの群に分けた。群 1 は、GPC1⁺ crExos の減少が GPC1⁺ crExos の中央値の減少よりも大きいまたはそれと同等であること () によって定義され、群 2 は、GPC1⁺ crExos の減少が GPC1⁺ crExos の中央値の減少よりも小さいこと (<) によって定義された。群 1 では、群 2 (全生存および疾患特異的生存のどちらも 15.5 カ月) と比較して全生存 (26.2 カ月) および疾患特異的生存 (27.7 カ月) の改善が示され、これにより、外科手術後の GPC1⁺ crExos の減少が大きいことが生存の増大に関連することが示される (図 12C ~ D) 。 CA 19-9 レベルの低下は切除前の採血と切除後の採血を比較した場合に認められるが、この低下は、全生存および疾患特異的生存と有意には関連しない (図 12E ~ F および 17B) 。 GPC1⁺ crExos の降下、年齢の中央値、AJCC 病期、腫瘍悪性度、および CA 19-9 レベルを含めるための多変量検定についてコックス回帰モデルを使用して、GPC1⁺ crExos のみが、疾患特異的生存に対する独立した予後および予測マーカーであることが明らかになった (ハザード比 : 8.23, CI : 2.37 ~ 28.54, P = 0.001 ; 表 9 および 10) 。

【 0179 】

【 表 9 】

表 9. 膵がんを有する縦断的コホートの患者 (n=29) における全生存に対する予後パラメータの多変量解析 (コックス比例ハザード回帰モデル)

パラメータ	ハザード比	95%CI	P 値
0 日目から 7 日目の間の GPC1 の降下	5.511	1.697-17.892	0.005
年齢	0.96	0.898-1.026	0.227
AJCC 病期	1.203	0.429-3.374	0.726
腫瘍悪性度	1.024	1.004-1.044	0.018
0 日目から 7 日目の間の CA19-9 の低下	2.453	0.885-6.796	0.084

略語: 良性膵疾患 (BPD) 、膵がん前駆病変 (PCPL) 、膵管腺癌 (PDAC) 、信頼区間 (CI)

【 0180 】

10

20

30

40

【表10】

表10.膵がんを有する縦断的コホートの患者(n=29)における疾患特異的生存の多変量解析(コックス比例ハザード回帰モデル)

パラメータ	ハザード比	95%CI	P値
0日目から7日目の間のGPC1の低下	5.353	1.651-17.358	0.005
年齢	0.962	0.899-1.028	0.254
AJCC病期	1.177	0.428-3.237	0.752
腫瘍悪性度	1.016	0.992-1.041	0.197
0日目から7日目の間のCA19-9の低下	2.138	0.762-5.993	0.149

略語:良性膵疾患(BPD)、膵がん前駆病変(PCPL)、膵管腺癌(PDAC)、信頼区間(CI)

(実施例10)

GPC1⁺crExosを使用して初期PanIN病変を検出することができる

膵がんにおけるGPC1⁺crExosの特異度が高く感度の高い検出を踏まえて、GPC1⁺crExos出現の時間経過を血清において膵腫瘍量に対して評価した。この目的のために、PDACについて遺伝子操作したマウスモデル(GEMM)を使用した。Ptf1a^{cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfb2^{f10x/f10x}マウス(PKTマウス)(Ozdemirら、2014年)では、ヒト疾患の臨床的特徴および病理組織学的特徴が確実に再現される、完全な浸透度を伴うPDACが発生する(Ozdemirら、2014年; Ijichiら、2006年)。このマウスは、4.5週齢で膵上皮内腫瘍(PanIN)から一貫して進行し、8週齢でPDACにより死亡する(Ozdemirら、2014年; Ijichiら、2006年)。縦断的試験において、PKTおよび同腹仔対照マウスから4週齢、5週齢、6週齢、7週齢、および8週齢の時点で繰り返し採血した(n=7のPKTマウスおよびn=6の対照マウス;図13A)。PKTマウス7匹のうち3匹を、対照6匹のうち4匹と共に、第7週までに安楽死させ、PKTマウス3匹および対照2匹は第8週に安楽死させた。4週齢の時点で、PKTマウスでは平均8.4%のGPC1⁺crExosが示され、これは時間(および腫瘍量)に比例して上昇したが、対照マウスでは平均1.2%のGPC1⁺crExosが示され、このレベルは時間と共に一定に保たれた(図13Bおよび18A~B)。PDACの評価に使用される確立されたイメージングモダリティである磁気共鳴画像法(MRI)(LeeおよびLee、2014年)を、GPC1⁺crExosを測定するためにマウスの採血を行ったのと同時点で(例えば、4週、5週、6週、および7週に)実施した。群として評価すると、GPC1⁺crExosレベルは、MRIにより検出可能な膵臓腫瘍よりも前に現れた(図13Cおよび18C)。GPC1⁺crExosのサイズおよび濃度は、膵がんと最小限にしか相關せず(図18A~B)、一方、GPC1⁺crExosレベルは、MRIにより決定された腫瘍体積と相關し、腫瘍の成長に先立つようだった(ピアソン相関検定、 $r = 0.67$ 、 $P = 0.0005$ 、95%CI: 0.3504~0.8462;図13Cおよび18C)。重要なことに、セルレインにより誘導された急性膵炎を有するマウスにおいてGPC1⁺crExosの上昇は認められず、これにより、GPC1⁺crExosの上昇が膵がん特異的なものであることが裏付けられる(図18D)。GPC1⁺crExosについてのROC曲線分析により、評価した全ての年齢において、健康な同腹仔対照マウスと比較して、PKTマウスにおいて1.0のAUC(95%CI: 0.75~1.0)が示された(図13Dおよび表11~12)。

【0181】

10

20

30

40

【表11】

表 11.4 週齢の PKT マウス(n=7)と、対照(対照同腹仔(n=6)および急性脾炎を誘導したマウス(n=4)、全部で n=10)における、crGPC1+エキソソーム、エキソソーム濃度、およびエキソソームサイズについての受信者動作特性(ROC)曲線分析

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%C I	特異度	95%C I
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.805-1.00	>2.5	100	59.0-100.0	100	69.2-100.0
エキソソーム濃度(^10E08)	0.814	0.555-0.958	>5.76	100	59.0-100.0	70	34.8-93.3
エキソソームサイズ(nm)	0.657	0.393-0.865	>104	57.14	18.4-90.1	80	44.4-97.5

【0182】

【表12】

表 12.5 週齢(上の表)、6 週齢(中央の表)および 7 週齢(下の表)の PKT マウス(n=7)と、対照(対照同腹仔 n=6 および急性脾炎を誘導したマウス n=4、全部で n=10)における、GPC1 陽性エキソソーム、エキソソーム濃度、およびエキソソームサイズについての受信者動作特性(ROC)曲線分析

パラメータ	AUC	CI	カットオフ値	感度	95%C I	特異度	95%C I
5週							
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.794-1.000	>3.6	100	59.0-100.0	100	66.4-100.0
エキソソーム濃度(^10E08)	0.714	0.440-0.906	>8.02	85.71	42.1-99.6	60	26.2-87.8
エキソソームサイズ(nm)	0.746	0.472-0.925	>82	100	59.0-100.0	40	12.2-73.8
6週							
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.794-1.000	>2.6	100	54.1-100.0	100	69.2-100.0
エキソソーム濃度(^10E08)	0.783	0.512-0.945	≤743000 000	83.33	35.9-99.6	80	44.4-97.5
エキソソームサイズ(nm)	0.592	0.324-0.824	>104	50	11.8-88.2	80	44.4-97.5
7週							
GPC1+エキソソーム(%)	1	0.794-1.000	>2.5	100	54.1-100.0	100	69.2-100.0
エキソソーム濃度(^10E08)	0.725	0.451-0.913	>11.64	50	11.8-88.2	100	69.2-100.0
エキソソームサイズ(nm)	0.933	0.692-0.998	>104	100	54.1-100.0	80	44.4-97.5

16日齢および20日齢ほどの早期のPKTマウスにおける腫瘍量およびGPC1⁺crExosをアッセイするために横断的試験も開始した(図13E)。マウスをMRIにより画像化し、採血し、マウスが前PanIN～初期PanIN病変を示した、これらの早期時点での安樂死させた(図13E)。全てのPKTマウスでGPC1⁺crExosが検出された(PKT:平均8.3%、対照:平均1.8%;図13F)。PKTマウスの

10

20

30

40

50

組織学的分析により、P K Tマウス7匹のうち3匹において前P a n I N病変が確認され、それにもかかわらず、P K Tマウス7匹のうち4匹では組織学的病変は観察されず、G P C 1 + c r E x o sにより将来の膵がん出現が予測された(図13G)。さらに、16日齢および20日齢のP K TマウスにおいてM R Iによって膵臓関連腫瘍は観察されなかつた。注目すべきことに、組織学的病変が観察されなかつたP K Tマウス7匹のうち4匹では、リン酸化E R K(p E R K)などのK r a s活性化のための下流のシグナルが膵臓組織において検出された(図13G)。G P C 1 - c r E x o sと比較してG P C 1 + c r E x o sにおける変異体K R A S^{G 1 2 D} m R N Aの排他的な検出も観察された(図19)。

【0183】

10

本明細書において開示され、特許請求されている方法は全て、本開示に照らして、過度な実験を伴わずに作製し実行することができる。本発明の組成物および方法は好ましい実施形態に関して記載されているが、本発明の概念、主旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法および方法のステップまたは一連のステップに変形を適用することができるが当業者には明らかになろう。より詳細には、化学的にかつ生理的に関連するある特定の薬剤で本明細書に記載されている薬剤を置換することができるが、同じまたは同様の結果が達成されることが明らかになろう。当業者に対して明らかであるそのような同様の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の主旨、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

【0184】

20

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されている事項を補足する例示的な手続き上のまたは他の詳細をもたらす範囲で、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

【0185】

【化3】

U.S. Patent 4,870,287
U.S. Patent 5,739,169
U.S. Patent 5,760,395
U.S. Patent 5,801,005
U.S. Patent 5,824,311
U.S. Patent 5,830,880
U.S. Patent 5,846,945

10

Adamczyk *et al.*, Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sciences*, 89:304-312, 2011.

Al-Nedawi *et al.*, Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10:619-624, 2008.

Andre *et al.*, Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 360:295-305, 2002.

20

Austin-Ward and Villaseca, Gene therapy and its applications. *Rev. Med. Chil.*, 126:838-845, 1998.

Balaj *et al.*, Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2:180, 2011.

Ballehaninna and Chamberlain, Biomarkers for pancreatic cancer: promising new markers and options beyond CA 19-9. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34:3279-3292, 2013.

Baran *et al.*, Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 59:841-850, 2010.

30

Bardeesy and DePinho, Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews, Cancer*, 2:897-909, 2002.

Biankin *et al.*, Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491:399-405, 2012.

【0186】

【化4】

- Bilimoria *et al.*, National failure to operate on early stage pancreatic cancer. *Annals of Surgery*, 246:173-180, 2007.
- Borges *et al.*, TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24:385-392, 2013.
- Bukowski *et al.*, Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin. Cancer Res.*, 4:2337-2347, 1998.
- Chen *et al.*, BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 2:e109, 2013.
- Choi *et al.*, Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics*, 11:2745-2751, 2011.
- Choi *et al.*, The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of Proteome Research*, 11:1144-1151, 2012.
- Christodoulides *et al.*, Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology*, 144:3027-3037, 1998.
- Ciravolo *et al.*, Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 227:658-667, 2012.
- Combes *et al.*, A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma, *Thromb. Haemost.*, 77:220, 1997.
- Conlon *et al.*, Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Annals of Surgery*, 223:273-279, 1996.
- Crowley *et al.*, Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews, Clinical Oncology*, 10:472-484, 2013.
- David *et al.*, Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 111:3165-3176, 1990.
- Davidson *et al.*, Intralesional cytokine therapy in cancer: a pilot study of GM-CSF infusion in mesothelioma. *J. Immunother.*, 21:389-398, 1998.

【化5】

- DeLong *et al.*, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*, 44:837-845, 1988.
- Del Villano *et al.*, Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clinical Chemistry*, 29:549-552, 1983.
- Demory Beckler *et al.*, Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 12:343-355, 2013. 10
- El-Andaloussi *et al.*, Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nature Protocols*, 7:2112-2126, 2012.
- El-Andaloussi *et al.*, Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug Discovery*, 12:347-357, 2013.
- Gartel, A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin. *Oncology Research*, 13:405-408, 2003.
- Grange *et al.*, Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*, 71:5346-5356, 2011. 20
- Guescini *et al.*, C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Experimental Cell Research*, 316:1977-1984, 2010.
- Hanibuchi *et al.*, Therapeutic efficacy of mouse-human chimeric anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody against multiple organ micrometastases of human lung cancer in NK cell-depleted SCID mice. *Int. J. Cancer*, 78:480-485, 1998.
- Harding *et al.*, Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *European Journal of Cell Biology*, 35:256-263, 1984. 30
- Heijnen *et al.*, Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94:3791-3799, 1999.
- Hellstrand *et al.*, Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol.*, 37:347-353, 1998.
- Hergenreider *et al.*, Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14:249-256, 2012. 40
- Hidalgo, Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 362:1605-1617, 2010.
- Hollander, Immunotherapy for B-cell lymphoma: current status and prospective advances. *Front Immunol.*, 3:3, 2013.

【化6】

- Hui and Hashimoto, Pathways for Potentiation of Immunogenicity during Adjuvant-Assisted Immunizations with *Plasmodium falciparum* Major Merozoite Surface Protein 1. *Infec. Immun.*, 66:5329-5336, 1998.
- Ijichi *et al.*, Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes & Development*, 20:3147-3160, 2006.
- Janowska-Wieczorek *et al.*, Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *International Journal of Cancer*, 113:752-760, 2005.
- Jazieh *et al.*, The clinical utility of biomarkers in the management of pancreatic adenocarcinoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 24:67-76, 2014.
- Ji *et al.*, Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics*, 13:1672-1686, 2013.
- Kahlert and Kalluri, Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 91:431-437, 2013.
- Kahlert *et al.*, Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 289:3869-3875, 2014.
- Kirk, Breast cancer: Circulating tumour DNA the better of the blood biomarkers. *Nature Reviews, Clinical Oncology*, 10:247, 2013.
- Kleeff *et al.*, The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 102:1662-1673, 1998.
- Kosaka *et al.*, Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. *Frontiers in Genetics*, 4:173, 2013.
- Kucharzewska *et al.*, Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110:7312-7317, 2013.
- Lau *et al.*, Role of Pancreatic Cancer-derived Exosomes in Salivary Biomarker Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 288:26888-26897, 2013.
- Lee and Lee, Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20:7864-7877, 2014.
- Lievre *et al.*, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 66:3992-3995, 2006.

10

20

30

40

【化7】

- Livak and Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25:402-408, 2001.
- Locker *et al.*, ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24:5313-5327, 2006.
- Losche *et al.*, Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils, *Platelets*, 15:109-115, 2004. 10
- Luga *et al.*, Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151:1542-1556, 2012.
- Matsuda *et al.*, Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Research*, 61:5562-5569, 2001.
- Mears *et al.*, Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4:4019-4031, 2004. 20
- Mesri and Altieri, Endothelial cell activation by leukocyte microparticles, *J. Immunol.*, 161:4382-4387, 1998.
- Moore *et al.*, Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.*, 439:798-802, 2001.
- Morel *et al.*, Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors, *Curr. Opin. Hematol.*, 11:156-164, 2004.
- Morris *et al.*, KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews, Cancer*, 10:683-695, 2010. 30
- Mouliere and Thierry, The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(Suppl. 1):S209-215, 2012.
- Murphy *et al.*, Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology*, 145:1098-1109 e1091, 2013.
- Murtaza *et al.*, Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 497:108-112, 2013. 40
- Nolte-'t Hoen *et al.*, Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 40:9272-9285, 2012.

【0190】

【化8】

- Ostrowski *et al.*, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12:19-30; S11-S13, 2010.
- Ozdemir *et al.*, Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25:719-734, 2014.
- Pan *et al.*, Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101:942-948, 1985. 10
- Peinado *et al.*, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18:883-891, 2012.
- Pinzani *et al.*, Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods*, 50:302-307, 2010.
- Pisitkun *et al.*, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101:13368-13373, 2004.
- Qin *et al.*, Interferon-beta gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:14411-14416, 1998. 20
- Rachagani *et al.*, Activated KrasG(1)(2)D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. *British Journal of Cancer*, 104:1038-1048, 2011.
- Raposo *et al.*, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183:1161-1172, 1996.
- Raposo and Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200:373-383, 2013. 30
- Regev-Rudzki *et al.*, Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*, 153:1120-1133, 2013.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., A. R. Gennaro *et al.* (eds.), Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.
- Rickes *et al.*, Differentiation of pancreatic tumours by conventional ultrasound, unenhanced and echo-enhanced power Doppler sonography. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37:1313-1320, 2002. 40
- Rothstein *et al.*, Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engratment and tolerance in stringent transplant models. *J. Immunol.*, 166:322-329, 2001.

【化9】

Runz *et al.*, Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecologic Oncology*, 107:563-571, 2007.

Schellenberger *et al.*, *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.

Schmid *et al.*, Non-invasive monitoring of pancreatic tumor progression in the RIP1-Tag2 mouse by magnetic resonance imaging. *Molecular Imaging and Biology: MIB: The Official Publication of the Academy of Molecular Imaging*, 15:186-193, 2013.

Silva *et al.*, Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 51:409-418, 2012.

10

Skog *et al.*, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10:1470-1476, 2008.

Soo *et al.*, Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*, 136:192-197, 2012.

Steward and Levy, Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 2:284-291, 1982.

20

Su *et al.*, Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *The American Journal of Pathology*, 168:2014-2026, 2006.

Taylor and Gercel-Taylor, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110:13-21, 2008.

Taylor and Gercel-Taylor, Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Seminars in Immunopathology*, 33:441-454, 2011.

30

Thery *et al.*, Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2:569-579, 2002.

Thery *et al.*, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, Ed., Juan S. Bonifacino *et al.*, Chapter 3, Unit 3.22, 2006.

Thery *et al.*, Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews, Immunology*, 9:581-593, 2009.

Trajkovic *et al.*, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319:1244-1247, 2008.

40

Trams *et al.*, Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645:63-70, 1981.

【0192】

【化 1 0 】

- Valadi *et al.*, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9:654-659, 2007.
- Wells, RNA-binding proteins: a lesson in repression. *The Journal of Neuroscience*, 26:7135-7138, 2006.
- Weyrich *et al.*, Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30:491-498, 2004.
- Whipple *et al.*, Discovery of a novel molecule that regulates tumor growth and metastasis. *The Scientific World Journal*, 8:1250-1253, 2008.
- Whipple *et al.*, KrasG12D-driven genetic mouse model of pancreatic cancer requires glypican-1 for efficient proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 31:2535-2544, 2012.
- Wiley and Gummuluru, Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103:738-743, 2006.
- Wilson *et al.*, High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *Journal of Proteome Research*, 4:591-598, 2005.
- Xi *et al.*, Copy number variation detection in whole-genome sequencing data using the Bayesian information criterion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108:E1128-1136, 2011.
- Yachida *et al.*, Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467:1114-1117, 2010.
- Yamada *et al.*, Cell Infectivity in Relation to Bovine Leukemia Virus gp51 and p24 in Bovine Milk Exosomes. *PLoS One*, 8:e77359, 2013.
- Yong, Cancer biomarkers: Written in blood. *Nature*, 511:524-526, 2014.
- Zeelenberg *et al.*, Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Research*, 68:1228-1235, 2008.
- Zilfou and Lowe, Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1:a001883, 2009.

10

20

30

【図4-3】

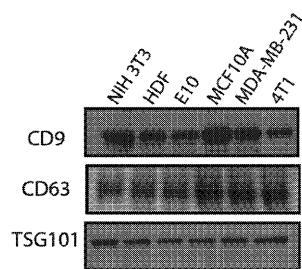


FIG. 4E

【図1A】

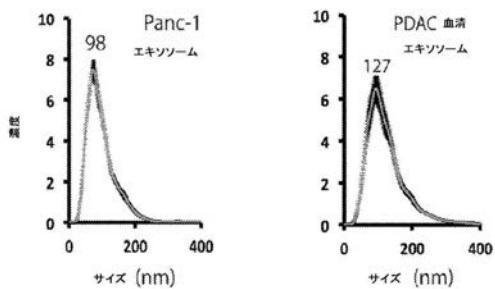


FIG. 1A

【図5-3】

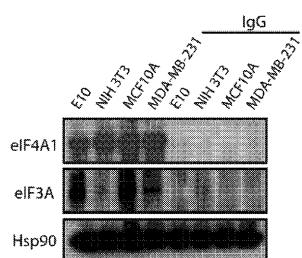


FIG. 5E

【図1B】



FIG. 1B

【図1C】

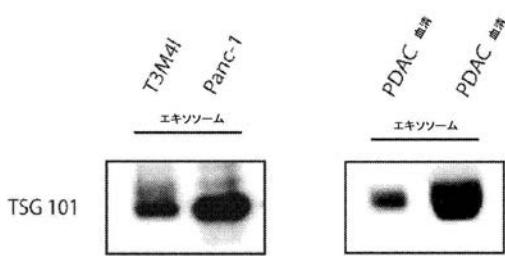


FIG. 1C

【図1E】

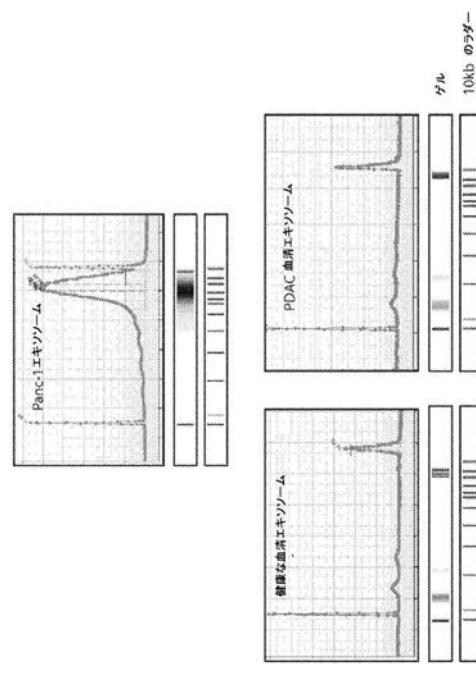


FIG. 1E

【図1D】

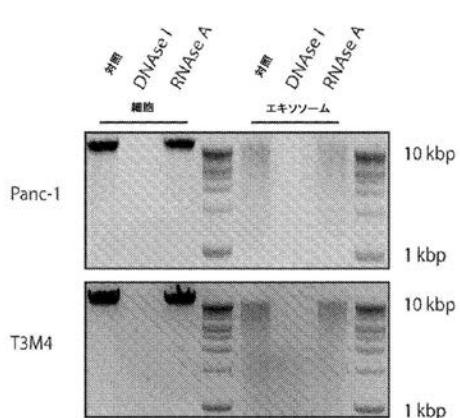


FIG. 1D

【図 1 F】

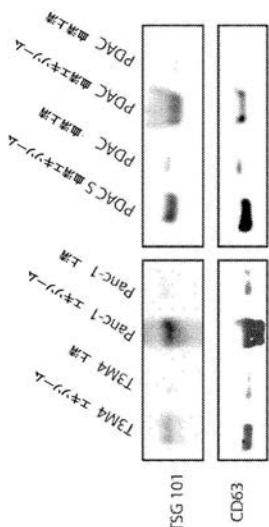
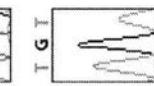
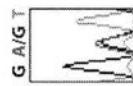
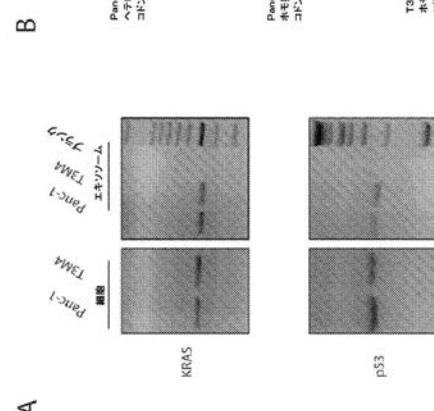


FIG. 1F

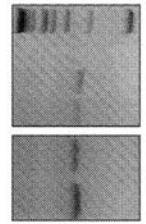
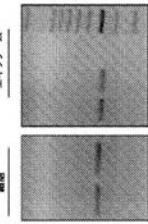
【図 2 - 1】



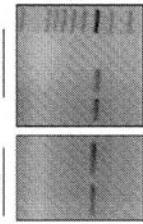
FIGS. 2A-B



A



B



C

D

E

【図 2 - 3】

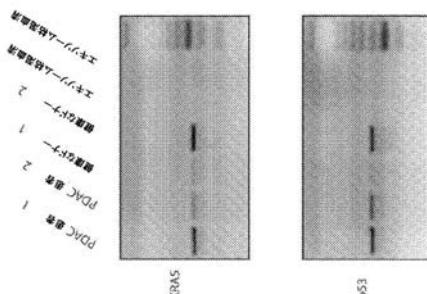
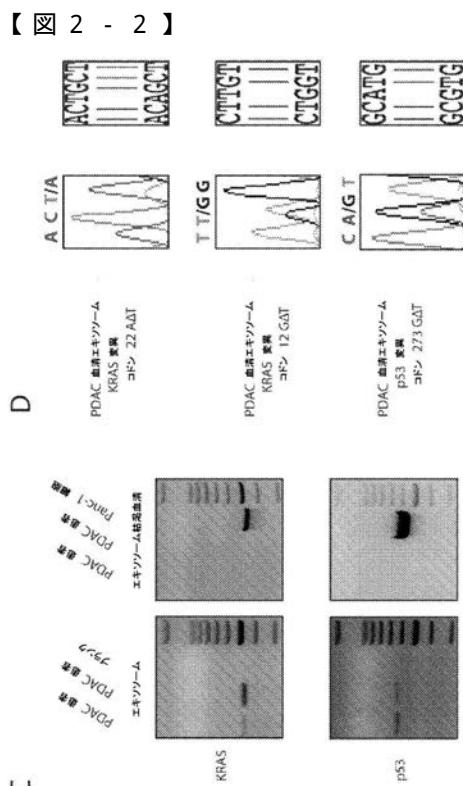


FIG. 2E

FIGS. 2C-D



C

D

E

FIG. 1F

【図3A】

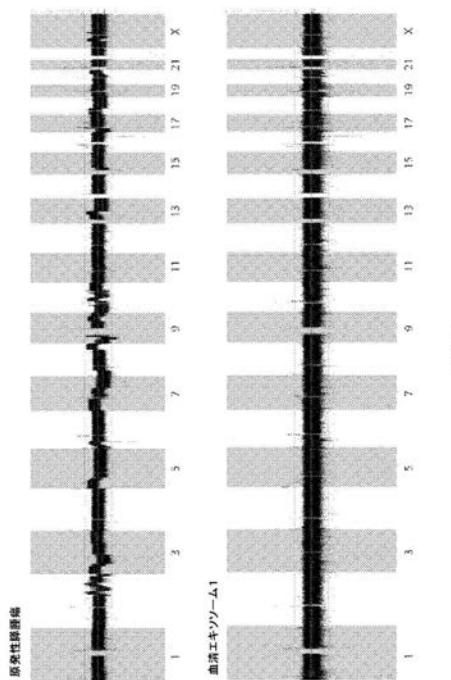


FIG.3A

【図3B】

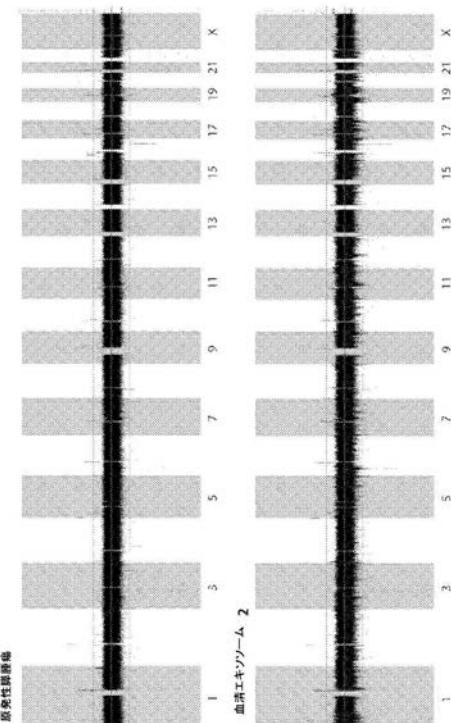
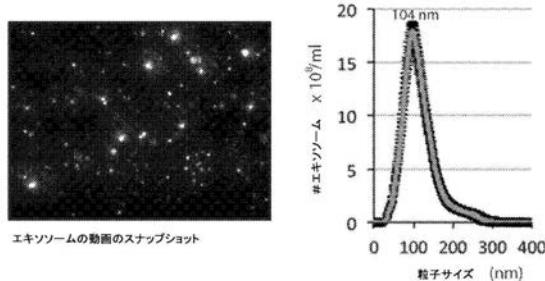


FIG.3B

【図4-1】



エキソソームの動画のスナップショット

FIG.4A

【図4-2】

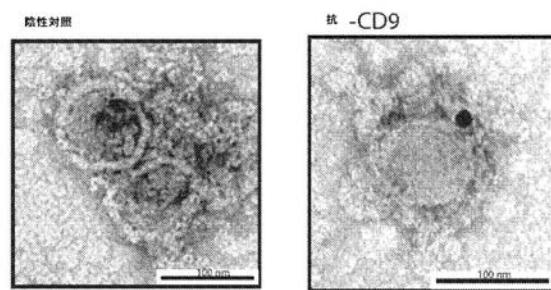


FIG.4C

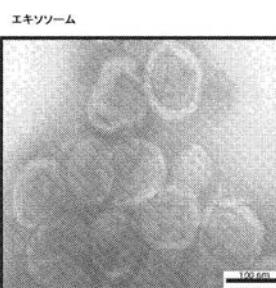


FIG.4B

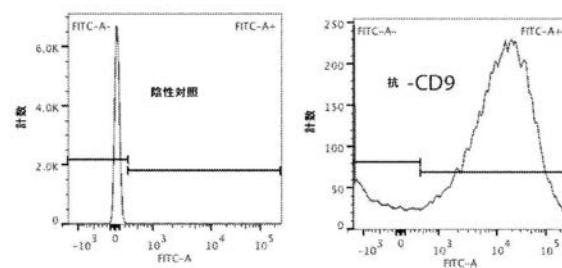


FIG.4D

【 図 5 - 1 】

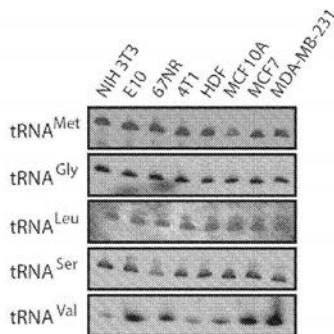


FIG. 5A

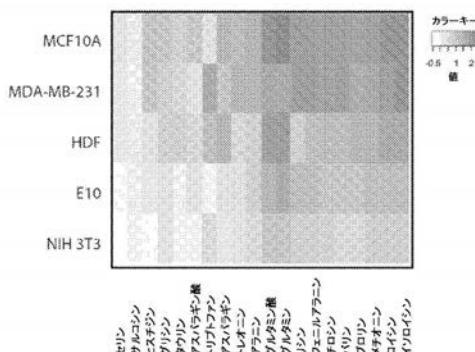


FIG. 5B

【 図 5 - 2 】

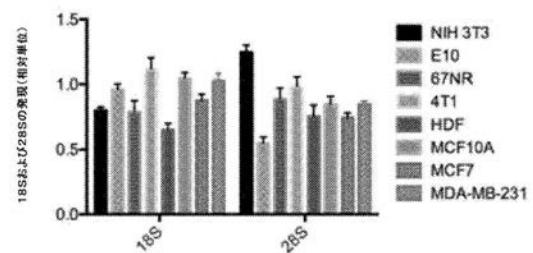


FIG. 5C

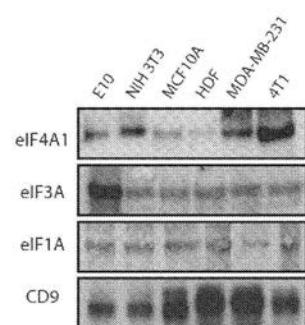


FIG. 5D

〔 义 6 - 1 〕

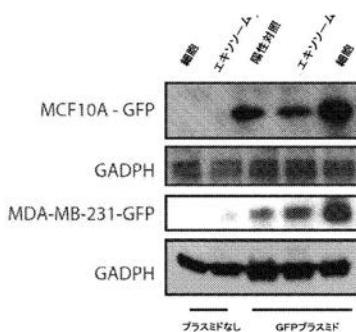


FIG. 6A

【 义 6 - 2 】

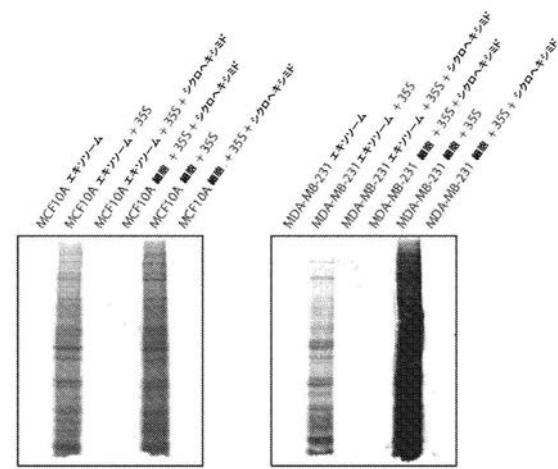


FIG. 6C

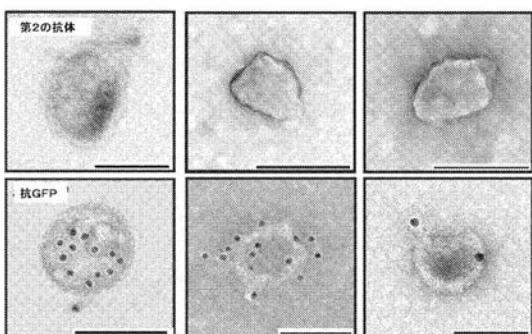


FIG. 6B

【図7】

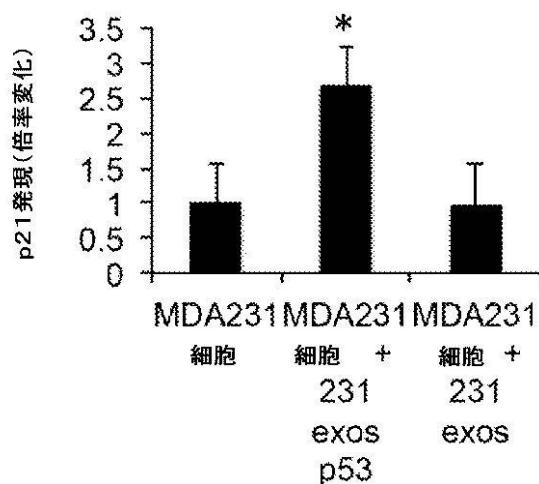


FIG. 7

【図8-1】

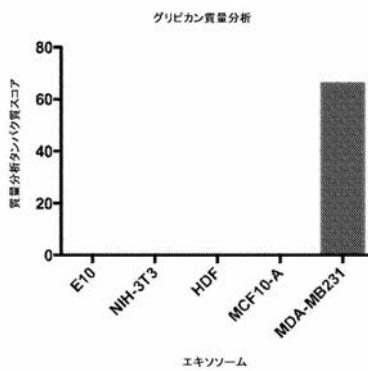


FIG. 8A

MDA-MB231 Exos
MCF10A Exos
MCF7 Exos

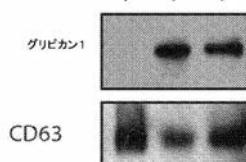


FIG. 8B

【図8-2】

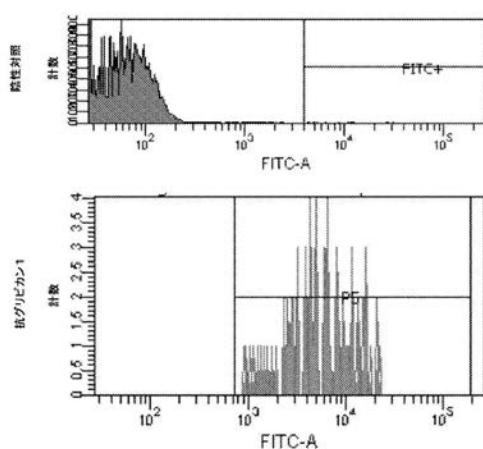


FIG. 8C

【図9A】

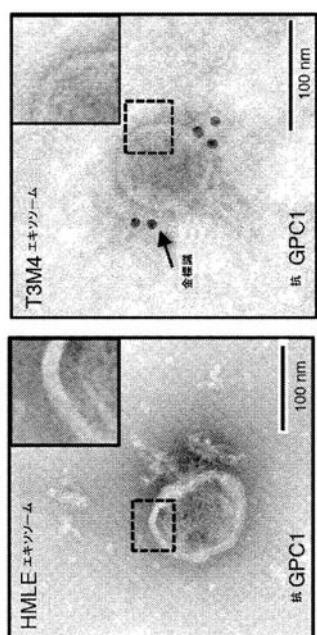


FIG. 9A

【図 9 B】

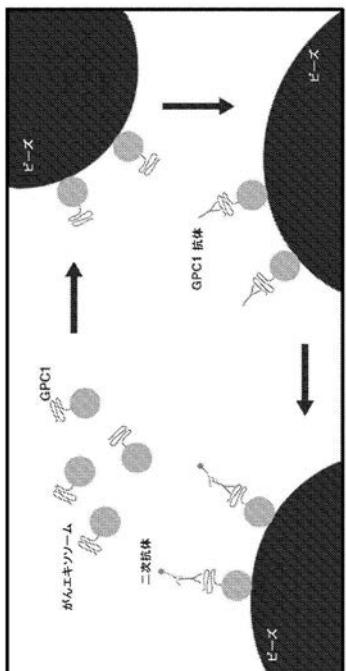


FIG. 9B

【図 9 C】

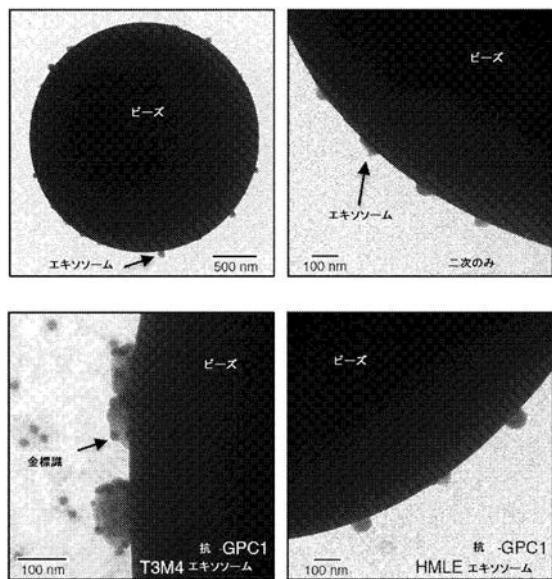


FIG. 9C

【図 9 D】

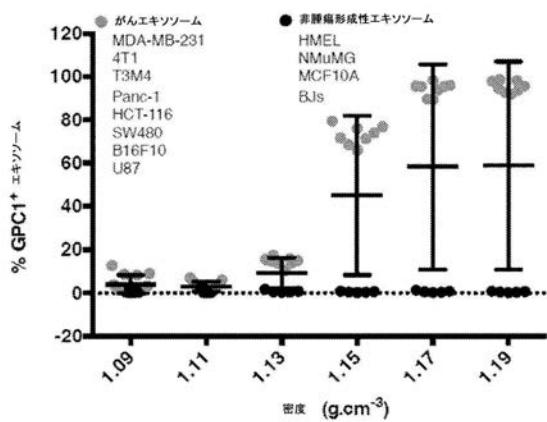


FIG. 9D

【図 9 E】

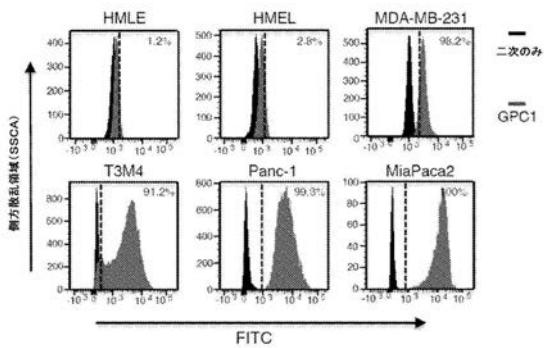


FIG. 9E

【図 10-1】

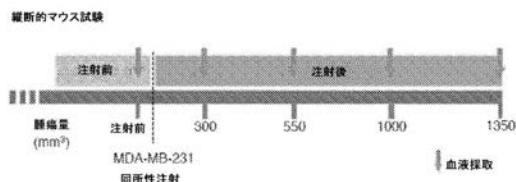


FIG. 10A

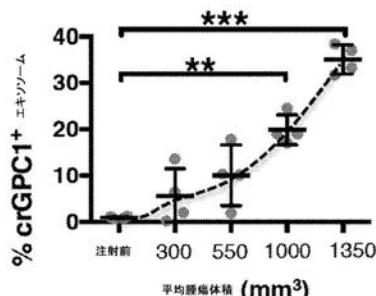


FIG. 10B

【図 10-2】

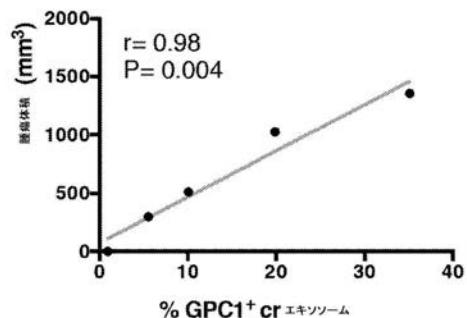


FIG. 10C

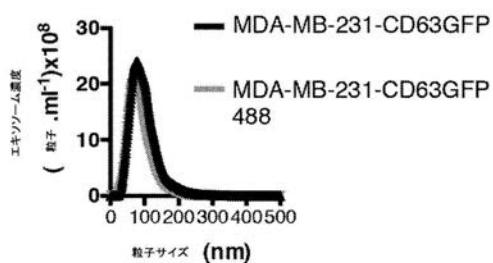
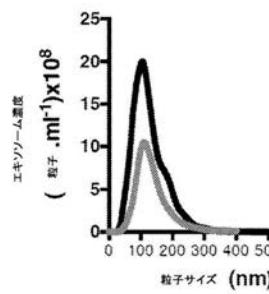


FIG. 10D

【図 10-3】



■ 純度エキソソーム
MDA-MB-231-CD63GFP

■ 節理エキソソーム
MDA-MB-231-CD63GFP - 488

FIG. 10E

【図 10-4】

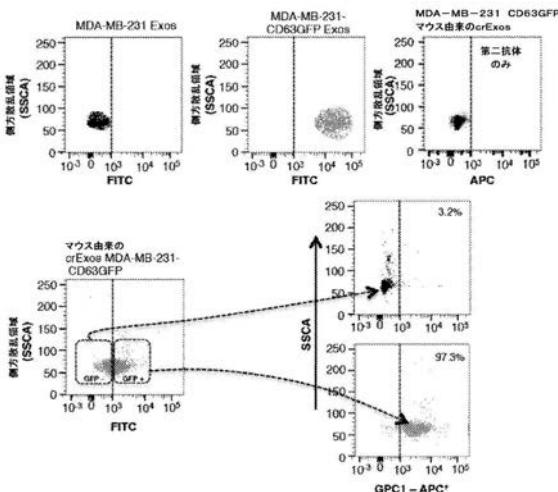
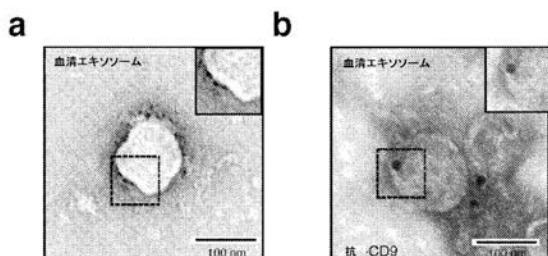


FIG. 10F

【図 11-1】



FIGS. 11A-B

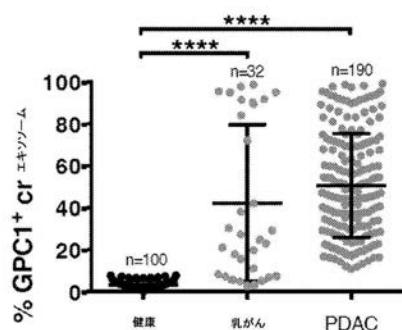


FIG. 11C

【図 11-2】

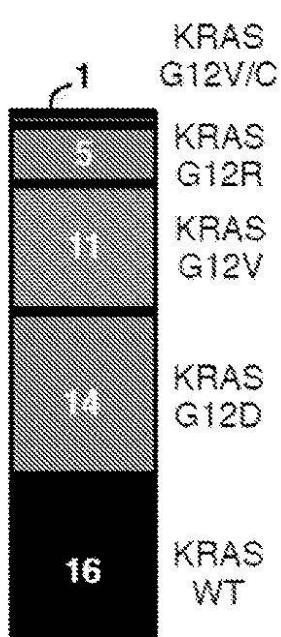


FIG. 11D

【図 11-3】

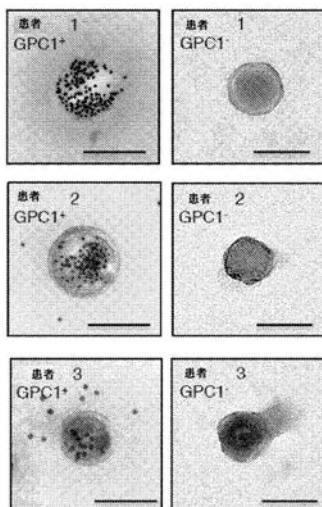


FIG. 11E

【図 11-4】

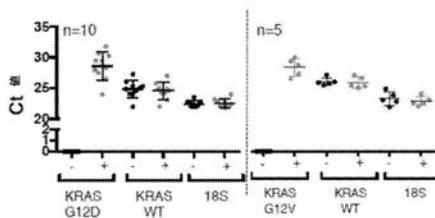


FIG. 11F

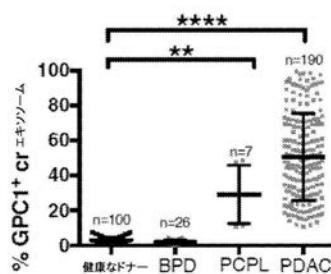


FIG. 11G

【図 1 1 - 5】

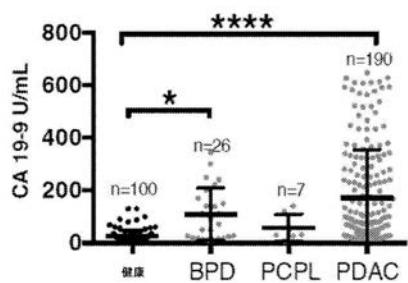


FIG. 11H

【図 1 2 - 1】

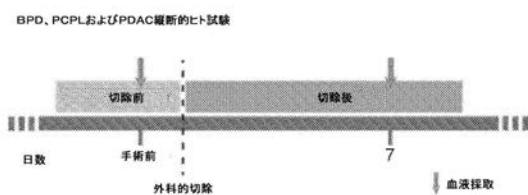


FIG. 12A

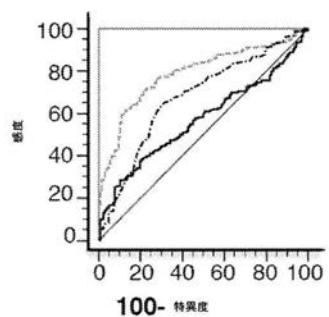


FIG. 11I

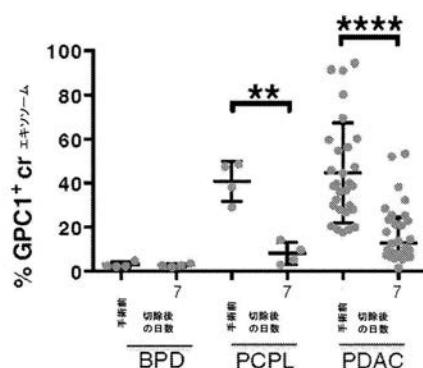


FIG. 12B

【図 1 2 - 2】

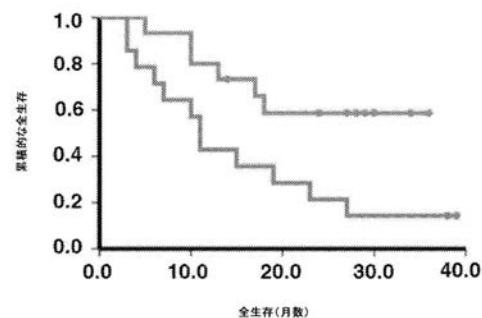


FIG. 12C

【図 1 2 - 3】

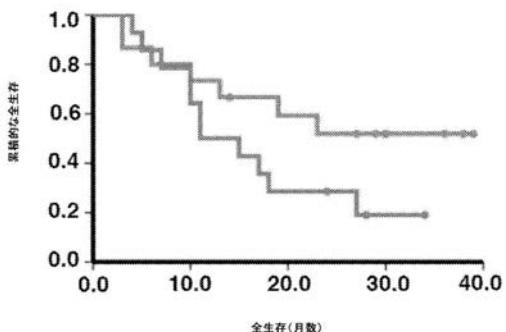


FIG. 12E

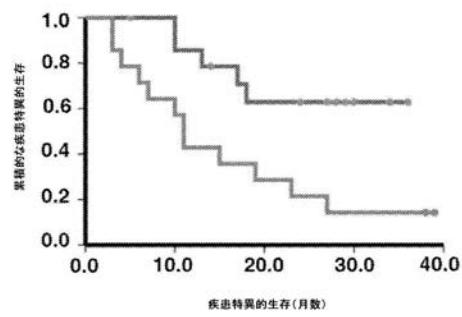


FIG. 12D

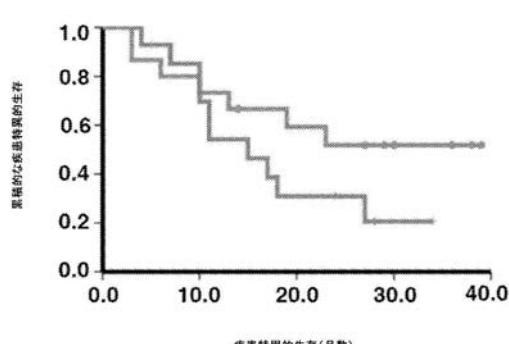


FIG. 12F

【図 13-1】

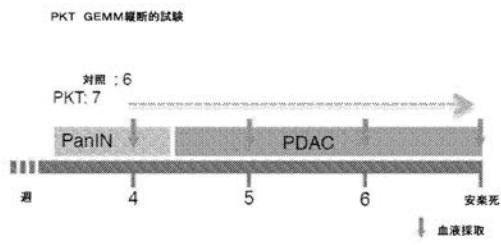


FIG. 13A

【図 13-2】

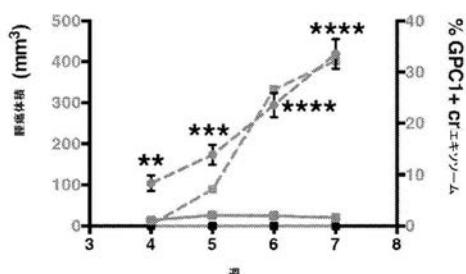


FIG. 13C

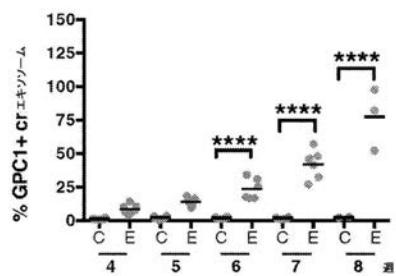


FIG. 13B

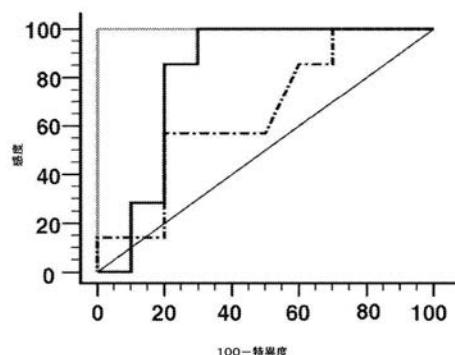


FIG. 13D

【図 13-3】

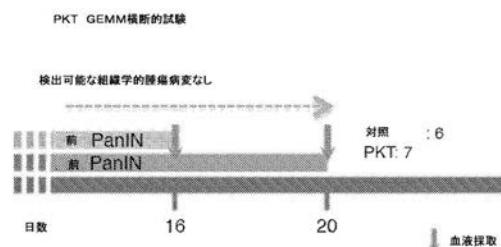


FIG. 13E

【図 13-4】

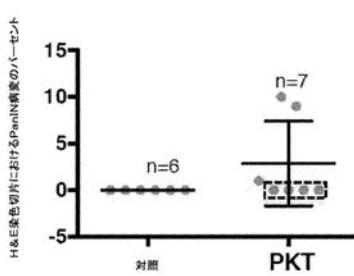


FIG. 13G

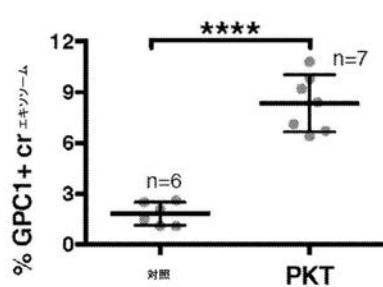


FIG. 13F

【図 14-1】

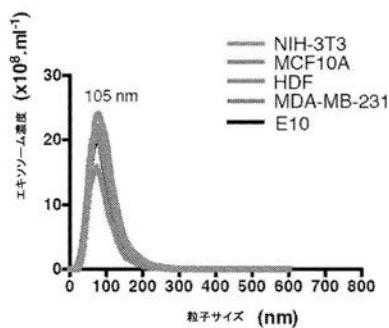


FIG. 14A

【図 14-2】

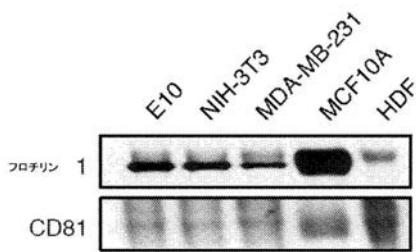
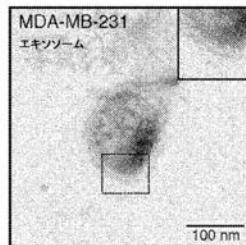
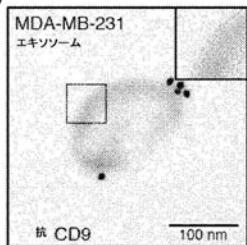


FIG. 14D

b**c**

FIGS. 14B-C

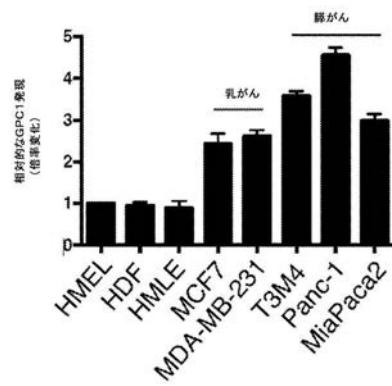


FIG. 14E

【図 14-3】

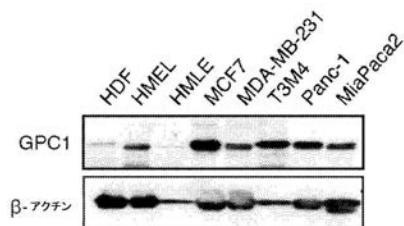


FIG. 14F

【図 15-1】

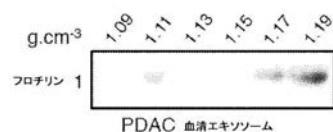


FIG. 15A

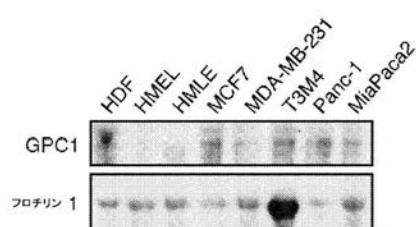


FIG. 14G

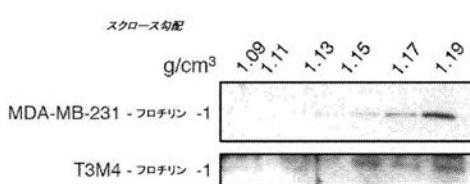


FIG. 14H

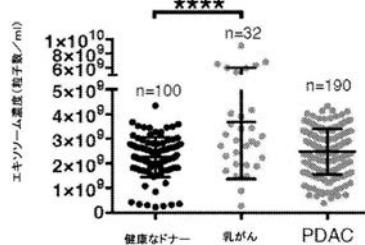


FIG. 15B

【図 15-2】

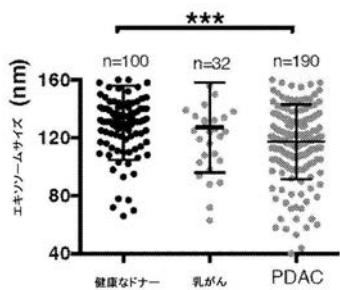


FIG. 15C

【図 16-1】

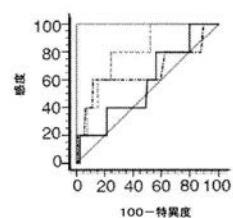


FIG. 16A

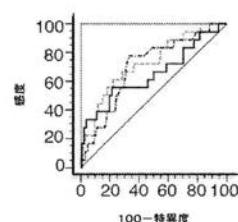


FIG. 16B

【図 16-2】

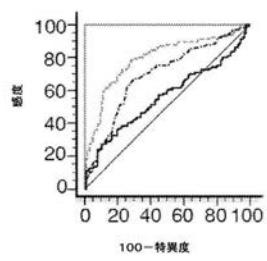


FIG. 16C

【図 16-3】

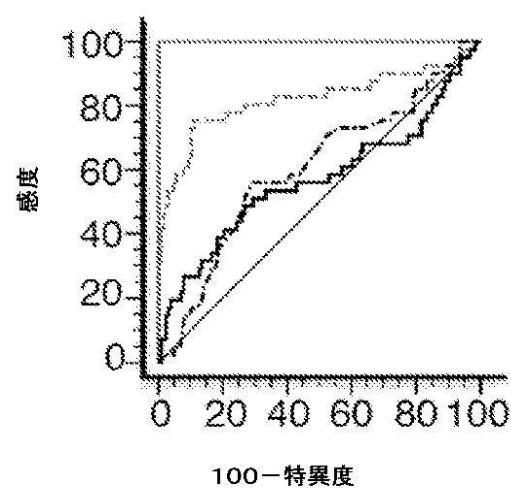


FIG. 16E

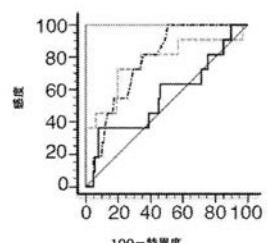


FIG. 16D

【図 17】

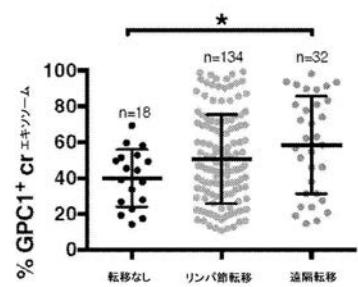


FIG. 17A

【図 18-1】

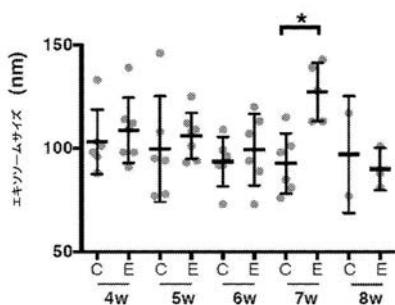


FIG. 18A

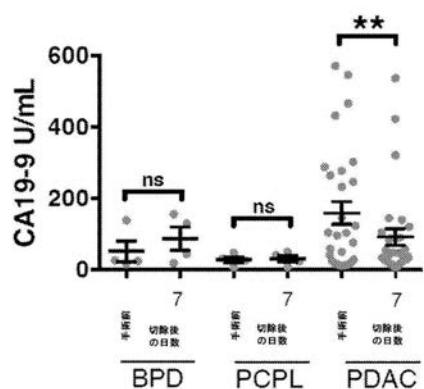


FIG. 17B

【図 18-2】

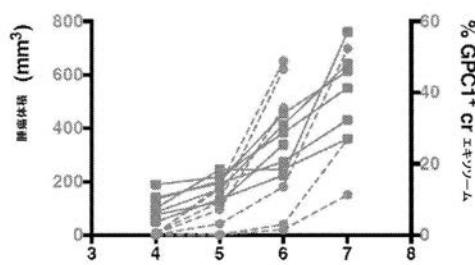


FIG. 18C

【図 19】

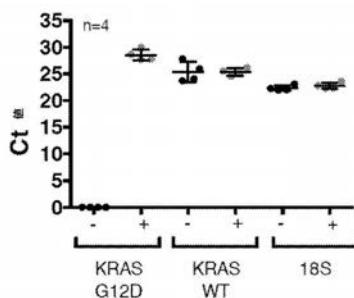


FIG. 19

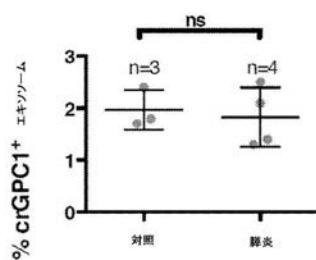


FIG. 18D

【配列表】

2017501694000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年8月16日(2016.8.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017501694000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/068630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 9/00 (2015.01)

CPC - A61K 9/00 (2015.01)

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)
IPC(8) - A61K 9/00; A61P 35/00 (2015.01)
USPC - 424/400; 435/6.1; 604/7

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

CPC - A61K 9/00; C12Q 2600/156 (2015.01) (keyword delimited)

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

Orbit, Google Patents, Google Scholar
Search terms used: method, isolation, purification, separation, exosome, microvesicle, expression, production, making, protein, recombinant, glycan

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0196426 A1 (SKOG et al) 05 August 2010 (05.08.2010) entire document	1-54, 62-66
Y		55, 67, 73-76
X	US 2013/0156801 A1 (BOND et al) 20 June 2013 (20.06.2013) entire document	56-59, 61, 68-70, 72
Y		60, 67, 71, 73-76
Y	US 2003/0064949 A1 (NIELSEN et al) 03 April 2003 (03.04.2003) entire document	55, 74
Y	ESCUDIER et al. "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial," J Transl Med. 02 March 2005 (02.03.2005), Vol. 3, No. 1:10, Pgs. 1-13. entire document	60, 71
A	US 2004/0028692 A1 (ZITVOGEL et al) 12 February 2004 (12.02.2004) entire document	1-76
A	WO 2004/014954 A1 (NOUVAX) 19 February 2004 (19.02.2004) entire document	1-76

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:	"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
"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	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 February 2015	23 FEB 2015
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

2014/068630

International application No.

PCT/US2014/068630

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00 4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N 33/48 P
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N 33/68 M
			G 0 1 N 33/48

(81)指定国 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, T J, 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, R 0, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 メロ, ソニア

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 0 4, ヒューストン, ファニン ストリート 5 2 5 3,
アパートメントナンバー 2 6 0 6

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 AA29 BA13 BA14 BB10 BB20 BB24
CA25 CA26 CA30 CB01 CB02 CB03 CB07 CB11 CB17 DA13
DA14 DA20 DA36 FA12 FA16 FA19 FA37 FB01 FB02 FB03
FB12 GB01 GC15 GC22 JA01
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR48
QR62 QR66 QS10 QS14 QS25 QS34 QS39 QX02
4B064 AG01 CA10 CA19 CC03 CC06 CC12 CC24 CD21 CE03 CE09
DA05
4B065 AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 BA03 BB25 BB32 BB37 BC03
BC07 BD09 BD15 BD16 BD18 CA24 CA44
4C084 AA01 AA02 AA17 BA44 NA14 ZB261 ZC782
4H045 AA10 AA20 AA30 EA20 FA74 GA15 GA20