

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-505143

(P2021-505143A)

(43) 公表日 令和3年2月18日(2021.2.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 C	
G O 1 N 33/49 (2006.01)	G O 1 N 33/49 X	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-530651 (P2020-530651)	(71) 出願人 591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日 平成30年12月7日 (2018.12.7)	(74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日 令和2年8月3日 (2020.8.3)	(74) 代理人 100123582 弁理士 三橋 真二
(86) 国際出願番号 PCT/EP2018/083963	(74) 代理人 100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87) 国際公開番号 W02019/110796	(74) 代理人 100141977 弁理士 中島 勝
(87) 国際公開日 令和1年6月13日 (2019.6.13)	
(31) 優先権主張番号 62/596, 253	
(32) 優先日 平成29年12月8日 (2017.12.8)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多血小板血漿サンプルからの核酸の検出

(57) 【要約】

多血小板血漿から核酸を単離および検出するための方法および組成物を本明細書中に提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的核酸を検出するための方法であって、以下の：

- (a) 対象からの血液サンプルを準備し；
- (b) 他の血液成分から多血小板血漿（PEP）を分離し；
- (c) PEPから核酸を精製し；および
- (d) 標的核酸を検出すること、

を含み、ここで、該検出が、PCR、次世代シーケンシング（NGS）、またはハイブリダイゼーションによって実施され、かつ、ここで、該標的核酸が癌に関連する、方法。

【請求項 2】

10

前記標的核酸が、癌に罹患していない対象からのPEP中と比べて、癌に罹患している対象からのPEP中ではより高いレベル、またはより低いレベルにて存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸が、癌に罹患していない対象からのPEPと比較して、癌に罹患している対象からのPEP中では変異型の状態で存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

変異体が、挿入、欠失、置換、および/または融合変異体である、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

20

前記ステップc)において精製される核酸がRNAである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出が逆転写酵素PCRによって実施される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸がmiRNAである、請求項5～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ステップc)において精製される核酸がDNAである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

30

前記PEPの分離が、血液サンプルを遠心分離して、赤血球細胞および白血球細胞からPEPを分離し、そして、そのPEPを別の器に単離することを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記遠心分離が120～360×gにて実施される、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記PEPの分離が、血液サンプルを濾過して、赤血球細胞および白血球細胞からPEPを分離することを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】**

40

【0001】

患者の血液からの無細胞核酸（cfRNAおよびcfDNA）は分子診断のための非侵襲的ツールを提供するが、回収される量が制限要素となることが多い。近年では、患者の血漿が、疾患治療を観察するための、そして、多くの場合、初期診断のために、cfRNAやcfDNAまたは循環腫瘍DNA（ctDNA）にとって最適な液体生検検体となることが多い。無細胞核酸の収量は、患者の血漿からのものは非常に限られているが、それが非侵襲的サンプルタイプとして使用されることが最も多い。侵襲組織生検は、特に後期において、癌患者にとって実現可能でないことが多い。身体中の生体液に見られる細胞外小胞（EV）は、細胞から放たれ（Yanez-Mo et al. (2015) J. Extracellular Vesicles 4:27066）、さらに、癌細胞は、エキソソームを含め、大量のEVを放出する。そして該EVは、その中に放たれた腫瘍RNAを

50

含有し、そして、癌患者からの生体液中に高いレベルで存在する (Brock et al. (2015) Translational Cancer Res. 4:280)。腫瘍細胞によって放たれたEVは、起源となる腫瘍細胞に対する知見を提供し得る、癌関連バイオマーカーを含む無細胞核酸の供給源である。EV (例えば、それぞれ30~100nmおよび100nm~1 μ mの範囲のエキソソームおよびマイクロソーム) だけではなく、増強された徴候は存在するが、大きな本体は、それらの起源である細胞からの核酸を担持している。通常1~5 μ mである血小板は、血液中に二番目に大量に存在する細胞型であって、1マイクロリットルあたり150,000~300,000個の範囲にあり、かつ、腫瘍由来の核酸の起源であることも示された (例えば、Nilsson et al. (2011) Blood 118: 3680)。実際には、癌患者の血中に見られる血小板はまた、腫瘍環境下で血小板に移された生体分子も担持する (例えば、Best et al. (2015) Cancer Cell 28:666) 10)。したがって、癌患者の生体液中に見られる血小板は、腫瘍によって教育された血小板 (TEP) と呼ばれ、非侵襲様式で癌を検出および特徴づけするためのバイオマーカーの別の有用な供給源になり得る。

【発明の概要】

【0002】

多血小板血漿 (PEP) 中の核酸を検出するためのキット、アッセイ、および方法が、本明細書中に提供される。一態様において、標的核酸を検出するための方法であって、以下の: (a) 対象からの血液サンプルを準備し; (b) 他の血液成分から多血小板血漿 (PEP) を分離し; (c) そのPEPから核酸を精製し; および (d) 標的核酸を検出すること、を含む方法が提供される。別の態様において、標的核酸を検出するための方法であって、以下の: (a) 対象からの血液サンプルを準備し; (b) 他の血液成分から多血小板血漿 (PEP) を分離し; (c) PEPから核酸を精製し; および (d) 標的核酸を検出すること、を含む方法が提供される。本明細書中、検出は、PCR、次世代シーケンシング (NGS)、またはハイブリダイゼーションによって実施され、かつ、標的核酸は癌に関連する。特定の実施形態において、検出は、ハイブリダイゼーションアッセイによって実施される。特定の実施形態において、検出は、PCRまたは次世代シーケンシングによって実施される。 20

【0003】

いくつかの実施形態において、精製される標的核酸は、RNA、例えば、miRNAまたはmRNAである。特定の実施形態において、標的核酸はmiRNAである。いくつかの実施形態において、検出は、逆転写酵素PCR (RT-PCR) によって実施される。他の実施形態において、精製される標的核酸はDNAである。 30

【0004】

いくつかの実施形態において、PEPを分離することは、血液サンプルを遠心分離して、赤血球細胞および白血球細胞からPEPを分離すること、および、例えば、PEPをピペット操作で取り出すことによって、もしくは赤血球細胞および白血球細胞をピペット操作によって取り出すことによって、別の器にPEPを単離することを含む。いくつかの実施形態において、遠心分離は100~200gにて実施される。いくつかの実施形態において、遠心分離は120~360gにて実施される。いくつかの実施形態において、遠心分離は、例えば、血小板が約300~400gにて分離され、および血漿が約1000~1800gにて分離され、そして、2つの成分が組み合わせられてPEPを形成するように、別々のステップで実施される。いくつかの実施形態において、PEPを分離することは、血液サンプルを濾過 (例えば、サイズ濾過) して、赤血球細胞および白血球細胞とPEPとを分離することを含む。 40

【0005】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、対照 (例えば、癌に罹患していないかまたは癌のリスクが低い対象または集団) からのPEP中と比べて、癌に罹患している対象からのPEP中でより高いかまたは低いレベルにて存在する。例えば、標的核酸は、癌サンプルにおいて過剰発現または過少発現されることが知られているRNA (例えば、mRNA、スプライス変異体、またはmiRNA) である可能性がある。いくつかの実施形態において、標的核酸は、対照 (例えば、癌に罹患していないかまたは癌のリスクが低い対象または集団) からのPEPと比較して、癌に罹患している対象からのPEP中に変異型で存在する。いくつかの 50

実施形態において、変異型は、挿入、欠失、置換、および/または融合変異体、またはコピー数変異体である。

【0006】

いくつかの実施形態において、対象は、癌に罹患していることが疑われるか、または癌と診断された。いくつかの実施形態において、癌は、副腎、血液（例えば、リンパ腫または白血病）、脳、乳房、子宮頸部、結腸もしくは結腸直腸領域、食道、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、胃、または精巣の癌から選択される。

【0007】

いくつかの実施形態において、該方法は、標的核酸が、対照サンプル中と比べて、対象からのサンプル中でより高いかまたは低いレベルにて存在することを検出すること、および対象向けに見込まれる治療オプションと結果（より高いかまたは低いレベル）を関連させること、および対象向けに見込まれる治療オプションの報告を作成することをさらに含む。いくつかの実施形態において、該方法は、その報告に基づいて対象に推薦するか、または対象を治療することをさらに含む。

10

【0008】

いくつかの実施形態において、該方法は、標的核酸が、対照サンプル中と比べて、対象からのサンプル中において変異型の状態で存在することを検出すること、および対象向けに見込まれる治療オプションと結果（変異型）を関連させること、および対象向けに見込まれる治療オプションの報告を作成することをさらに含む。いくつかの実施形態において、該方法は、その報告に基づいて対象に推薦するか、または対象を治療することをさらに含む。

20

【0009】

血液サンプルからPEPを調製し、そして、そのPEP中の標的核酸を検出するためのキットが、本明細書中でさらに提供される。いくつかの実施形態において、該キットは、血液サンプル採集用の器を含み、ここで、その器は50~5000g、例えば、100~500gまたは100~1800g、での遠心分離に耐える。いくつかの実施形態において、該キットは血液サンプル採集用の器、および50~5000g、例えば、100~500gまたは100~1800g、での遠心分離に耐える別の器を含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、該キットは、核酸精製のための試薬をさらに含む。例えば、該キットは、（例えば、血小板やEV膜を破壊するための）溶解バッファー、核酸安定化試薬、核酸を結合するための試薬（例えば、クロマトグラフィー試薬または磁性ビーズ）、および/または洗浄および溶出バッファーを含む。

30

【0011】

いくつかの実施形態において、キットは、標的核酸を検出するための試薬をさらに含む。例えば、該キットは、（例えば、RT-PCRまたはPCRによる）核酸増幅および検出のための試薬を含む。いくつかの実施形態において、標的的特異的試薬としては、例えば、特定の標的配列のためのプライマーおよび/またはプローブが挙げられる。いくつかの実施形態において、該キットは、例えば、核酸分離の効率の決定のための対照、（核酸を標的化する）所定のバイオマーカーに関して陽性であることが知られている対照、または所定のバイオマーカーに関して陰性であることが知られている対照をさらに含む。

40

いくつかの実施形態において、該キットは、例えば、核酸の精製および/または検出のための器などの他の消耗品をさらに含む。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な説明

1. 序論

血小板は、血液の腫瘍または癌関連バイオマーカー（例えば、核酸やタンパク質）の供給源である。例えば、血漿などの血液画分もまた、癌細胞から放たれた、例えば、細胞外小胞（EV）中に、癌関連バイオマーカーを担持する。血漿は、循環腫瘍DNA（ctDNA）およ

50

びRNAの両方を含むが、血小板は主としてRNAを担持する。多血小板血漿（PEP）は豊かなバイオマーカー供給源を提供するので、その使用は、広範囲なバイオマーカーが患者サンプルから捕捉されることを確実にする。腫瘍によって教育された血小板（TEP）は、腫瘍細胞または腫瘍環境に由来するバイオマーカーを担持する。EVは血小板と異なった機構によって形成されるので、したがって、異なったサブセットのバイオマーカーを担持し得る。例えば、エキソソームやマイクロソームなどのEVは、通常30～1000nmのサイズである。血小板サイズは、個体間で異なるが、通常約2 μ mである。その一方、赤血球細胞および白血球細胞は、一般的に少なくとも8 μ mのサイズなので、血小板や他のEVから容易に分離できる。

【0013】

本開示は、PEPを調製するための方法を提供し、そして、血漿に比べて、血小板が血液量あたり相対的により多くの核酸を担持することを示す。特に、検出アッセイにおける使用のためのPEPおよび核酸抽出物を調製するための方法が、本明細書中に開示される。したがって、検出アッセイのためのPEPの使用は、血漿だけの使用に比べて、非常に低濃度で存在する疾患関連バイオマーカーを検出する可能性が高い。

【0014】

II. 定義

用語「多血小板血漿（PEP）」、「富血小板血漿（platelet rich plasma）」、「血小板高密度血漿（platelet dense plasma）」、および類似した用語は、血小板を濃縮していないその個体からの血漿サンプル中に見られるものに比べて、より高濃度の血小板を有する個体からの天然に存在しない血漿サンプルを指す。血漿とは、赤血球細胞および白血球細胞が取り除かれたが、（血清サンプルと異なって）凝固因子は維持している血液サンプルを指す。PEPは、血液細胞成分を取り除くが、血小板を維持するように、例えば、遠心分離、重力濾過、またはサイズベースの濾過によって、血漿と同様に調製され得る。いくつかの実施形態において、PEPは、血液サンプルから血漿と血小板を別々に単離し、次に、その血漿と血小板を再び組み合わせることによって調製される。

【0015】

用語「無細胞核酸」、「無細胞RNA」、「無細胞DNA」、および類似した用語は、本開示との関連において、細胞をほぼ取り除くように加工された、個体からの非組織サンプル（例えば、液体生検検体）を指す。非組織サンプルの例としては、血液、尿、唾液、涙液、粘液などが挙げられる。血小板は無核であるが、細胞に分類されることもある。本明細書中に別段の注釈がない限り、無細胞核酸はPEPからのそれらを含まない。

【0016】

用語「バイオマーカー」とは、個々のサンプルを差別化するのに使用される任意の検出可能マーカー、例えば、非発癌サンプルに対する癌、を指すこともできる。バイオマーカーとしては、修飾（例えば、DNAのメチル化、タンパク質のリン酸化）、示差的発現、および突然変異または変異体（例えば、単一ヌクレオチド変異、挿入、欠失、スプライス変異体、および融合変異体）が挙げられる。バイオマーカーは、DNA、RNAおよび/またはタンパク質サンプル中で検出され得る。特に、PEPは、豊かなRNAの供給源であり、したがって、突然変異だけでなく、miRNA、融合、および変異発現レベルを検出するために有効である。

【0017】

用語「多重」とは、複数の（2以上の）標的が検出されるアッセイのことを指す。

用語「容器（receptacle）」、「器（vessel）」、「チューブ」、「ウェル」、「チャンパー」、「マイクロチャンパー」などは、試薬またはアッセイ液を収容できる容器のことを指す。容器がキットの形であり試薬を収容しているか、または増幅反応に使用する予定である場合、汚染や蒸発を防ぐために密閉または密封することができる。容器がアッセイに使用される場合、少なくとも該アッセイの設定の間、開放状態にまたは利用可能にすることができる。

【0018】

10

20

30

40

50

マーカー遺伝子またはマーカー遺伝子産物に言及する時の用語「個別に検出される」または「個別検出」という用語は、各マーカーが1の多重反応において検出されることを示す。すなわち、各マーカーが異なる標識と結合されている（異なるように標識されたプローブにより検出される）。

【0019】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド（例えばリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）のポリマーを指し、天然型（例えば、アデノシン、グアニジン、シトシン、ウラシルおよびチミジン）、および非天然型（ヒト修飾）核酸を意味する。この用語は、ポリマーの長さ（例えばモノマーの数）により限定されない。核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよく、一般に5'-3'ホスホジエステル結合を含むが、場合によってはヌクレオチド類似体が別の結合を有することがある。モノマーは典型的にはヌクレオチドを指す。用語「非天然ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」とは、修飾された窒素含有塩基、糖またはリン酸基を含むヌクレオチドを指すか、あるいは構造中に非天然の成分を含んでいるヌクレオチドを指す。非天然ヌクレオチドの例としては、ジデオキシヌクレオチド、ピオチン化、アミノ化、脱アミノ化、アルキル化、ベンジル化および蛍光標識されたヌクレオチドが挙げられる。

10

【0020】

用語「プライマー」とは、適当な条件下で核酸ポリメラーゼによるポリヌクレオチド鎖合成の開始点として働く短鎖核酸（オリゴヌクレオチド）を指す。ポリヌクレオチド合成および増幅反応は、典型的には適当なバッファー、dNTPsおよび/またはrNTPs、並びに1以上の任意の補因子を含み、適当な温度にて実施される。プライマーは典型的には、標的配列に少なくとも実質的に相補的である（例えば0、1、2または3つのミスマッチを有する）少なくとも1つの標的ハイブリダイズ領域を含む。この領域は、典型的には約8～約40ヌクレオチド、例えば12～25ヌクレオチドの長さである。「プライマー対」とは、標的配列に関して互いに反対方向に向けられ、増幅条件下で増幅生成物を産生する正プライマーと逆プライマーのことを指す。いくつかの実施形態において、複数のプライマー対が、単一の共通した正プライマーまたは逆プライマーを利用する。例えば、複数の対立遺伝子特異的正プライマーは、例えば、複数の対立遺伝子が互いに極めて接近している場合、同じ、共通した逆プライマーとのプライマー対の一部と見なされることができる。

20

【0021】

本明細書中で用いるとき、「プローブ」は、特異的に意図された標的生体分子、例えばプローブにハイブリダイズする着目の核酸配列、に選択的に結合することができる任意の分子を意味する。該プローブは少なくとも1つの非ヌクレオチド成分で検出可能に標識される。いくつかの実施形態において、該プローブはフルオロフォアおよびクエンチャー（クエンチャー）で標識される。

30

【0022】

単語「相補的」または「相補性」は、第二のポリヌクレオチド中の別の核酸と塩基対を形成できるポリヌクレオチド中の核酸の能力のことを指す。例えば、配列A-G-T（RNAの場合はA-G-U）は配列T-C-A（RNAの場合はU-C-A）に相補的である。相補性は、塩基対合に従うと一部の核酸のみがマッチする部分的相補性であるか、または塩基対合に従うと全部の核酸がマッチする完全相補性であることができる。プローブまたはプライマーは、それが標的配列に対して少なくとも部分的に相補的であるならば、標的配列に「特異的である」と考えられる。条件に依存して、標的配列に対する相補性の程度は、長い配列の場合よりも、プライマーのような短い核酸のほうが典型的に高い（例えば80%、90%、95%またはそれ以上）。

40

【0023】

用語「特異的に増幅する」とは、プライマーセットが統計的に有意なレベルで非標的配列よりも標的配列を増幅することを意味する。用語「特異的に検出する」とは、プローブが統計的に有意なレベルで非標的配列よりも標的配列を検出することを示す。当業者に理解されるように、特異的増幅および検出は、陰性対照（ネガティブコントロール）、例え

50

ば試験サンプルと同じ核酸を含むが標的配列を含まないサンプル、または核酸を欠いているサンプルを使って測定することができる。例えば、標的配列を特異的に増幅し検出するプライマーおよびプローブは、バックグラウンド（非標的配列）から容易に識別可能であるCt、例えばバックグラウンドよりも少なくとも2、3、4、5、5~10、10~20または10~30サイクル少ないCtを生じる。用語「対立遺伝子特異的」PCRとは、標的配列の特定の対立遺伝子変異体の特異的に増幅するプライマーを使用した標的配列の増幅を指す。典型的には、該正プライマーまたは逆プライマーとしては、その位置における対立遺伝子変異体の厳密な相補配列が挙げられる。

【0024】

2以上の核酸または2以上のポリペプチドに関連する「一致」または「相同性」という用語は、BLASTまたはBLAST2.0配列比較演算法を使ってデフォルトパラメーターを用いて測定した場合、または手動整列と目視検査により測定した場合、特定の領域に関して同一であるかまたは特定の割合だけ同一であるヌクレオチドもしくはアミノ酸を有する（例えば、比較窓または指定領域に関して最大の一致になるよう比較し整列した時に、約60%一致、例えば少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い一致を有する）、2以上の配列または部分配列を指す。例えばncbi.nlm.nih.gov/BLASTのNCBIウェブサイトを参照のこと。そのような配列は「実質的に同一」と言われる。相同性は最適に整列された配列に関して決定され、その定義を欠失および/または付加を有する配列、並びに置換を有する配列にも適用する。当技術分野で一般に用いられる演算法は、ギャップなどをカウントする。典型的には、長さが少なくとも約8~25アミノ酸またはヌクレオチドである配列を含む領域に渡り、または長さが50~100アミノ酸またはヌクレオチドである領域に渡り、または参照配列の全長に渡り、相同性が存在する。

【0025】

用語「単離する」、「分離する」、「精製する」、および類似した用語は、完全であることを意図しない。例えば、RNAの単離は、100%の非RNA分子が取り除かれることを必要とせず、および血小板の分離は、100%の非血小板血液成分の除去を必要としない。当業者には、所定の状況において許容可能なレベルの純度がわかる。

【0026】

用語「キット」とは、本明細書に記載のRNAまたはDNAを特異的に増幅、捕捉、標識/変換または検出する、少なくとも1つの試薬、例えば核酸プローブまたはプローブプールなどを含む任意の製品（例えばパッケージまたは容器）を指す。

【0027】

用語「増幅条件」とは、プライマーのハイブリダイゼーションおよび鋳型依存性伸長を可能にする核酸増幅反応（例えばPCR増幅）の条件を指す。用語「アンプリコン」または「増幅生成物」とは、標的核酸配列の全部またはその断片を含み、かつ任意の適当な増幅法による試験管内増幅の生成物として形成される核酸分子を指す。当業者は、正および逆プライマー（プライマー対）が増幅生成物の境界線を限定することを知っているだろう。プライマーに対して用いられる用語「増幅生成物を産生する」とは、適当な条件下（例えばヌクレオチドポリメラーゼとNTPsの存在下）で、プライマーが特定の増幅生成物を産生することを示す。諸種のPCR条件がPCR Strategies (Innis他、1995, Academic Press, San Diego, CA)中の第14章：PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis他、Academic Press, NY, 1990)に記載されている。

【0028】

用語「増幅生成物」は、増幅反応の生成物を指す。増幅生成物には、ポリヌクレオチド合成の各ラウンドを開始させるのに用いられるプライマーが含まれる。「アンプリコン」は、増幅に指向されるターゲット配列であり、この用語は増幅生成物を指すためにも用いられることがある。アンプリコンの5'および3'端の境界は、正および逆プライマーにより限定される。

【0029】

10

20

30

40

50

用語「個体」、「対象」、および「患者」は、本明細書中では互換的に使用される。該個体は、診断前、治療前だが診断後、治療中、または治療後であり得る。本開示との関連において、通常、個体は医療を求めている。

【0030】

用語「サンプル」または「生物学的サンプル」とは、核酸を含むまたは含むと推定される任意の組成物を指す。この用語には、細胞、組織または血液、例えばDNA、RNA、タンパク質、無細胞部分または細胞溶解物の精製もしくは分離された成分が含まれる。該サンプルは、例えば、腫瘍または転移病巣からのFFPETである可能性がある。サンプルは凍結または新鮮組織からのものであり得ることもでき、または液体サンプル、例えば血液もしくは血液成分（血漿または血清）、尿、精液、唾液、痰、粘液、精液、涙、リンパ液、脳脊髄液、洗口液/咽頭洗浄液、気管支肺胞洗浄液、ぬぐい液から選別したものなどからのものであり得る。サンプルは、細胞株を含めて、個体から得られた細胞のインビトロ培養物の構成物または成分を含んでもよい。サンプルは、個体から直接得られたサンプルから部分的に処理されたもの、例えば細胞溶解物または赤血球を枯渇した血液であることもできる。

10

【0031】

用語「個体からサンプルを得る」とは、個体からの生物学的サンプルを試験のために用意することを意味する。これは、個体からの直接の取得であることができ、または個体からサンプルを直接取得した第三者からの取得であることができる。

【0032】

用語「個体向けに治療法を提供する」とは、個体に対して治療法を定めるか、推薦するか、または利用可能にすることを意味する。該治療法は、実際には、第三者によって個体に投与されても（例えば、入院患者の注射）、または個体自身によって個体に投与されてもよい。

20

【0033】

「対照」サンプルまたは数値とは、試験サンプルまたは試験条件に対する比較のための、基準、通常は既知の基準、として利用される値のことを指す。例えば、試験サンプルは試験条件から、例えば癌の疑いのある個体から、採取し、そして既知の条件、例えば、癌に罹患していない個体からのサンプル（陰性対照）、または癌に罹患していることが分かっている個体からのサンプルまたは着目の標的配列（陽性対照）と比較することができる。本開示との関連において、試験サンプルは典型的には癌患者、または癌に罹患していることが疑われる患者からのものである。対照は多数の試験または結果から蓄積された平均値または一領域を表わすこともできる。対照は反応条件のために用意することもできる。例えば、核酸の存在、質および/または量についての対照（例えば内部標準）としては、サンプル中に存在することが分かっている配列（例えばハウスキーピング遺伝子、例えばアクチン、グロビン、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、リボソームタンパク質L37およびL38、PPIアーゼ、EIF3、真核性翻訳伸長因子2（eEF2）、DHFRまたはコハク酸デヒドロゲナーゼ）を検出するであろうプライマーまたはプローブを挙げるることができる。いくつかの実施形態において、内部標準は、一般的に（例えば、別のエクソン内の）変異体でない同じ遺伝子領域からの配列であり得る。既知の追加のポリヌクレオチド、例えば指定された長さを有するものも追加することができる。陰性対照の例は、核酸を含まないもの、またはサンプル中に存在しないであろう配列、例えば異なる種からの配列、に特異的なプライマーまたはプローブを含むものである。当業者は、対照の選択が、例えば対照が細胞型や生物体に適しているように、特定のアッセイに依存することを理解するであろう。当業者は、任意の数のパラメーターの評価のために対照を設計することができることを理解するだろう。例えば、対照は、薬理学的データ（例えば半減期）に基づいた治療上の有利性または治療上の評価基準（例えば有利性および/または副作用の比較）を比較するために構築することができる。対照は試験管内用途のために設計することができる。当業者は、対照が一定の状況において有用ありかつ対照数値に対する比較に基づいてデータを解析することができることを理解するだろう。例えば、一定のパラメーターの数値が対照の中で大きく変動する場合、試験サンプル内の変動は有意であると

30

40

50

見なされないだろう。

【0034】

用語「標識」、「タグ」、「検出可能成分」などの用語は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的または他の物理的手段により検出可能である組成物を指す。例えば、有用な標識としては、蛍光色素（フルオロフォア）、発光剤、放射性同位体（例えば ^{32}P 、 ^3H ）、高電子密度試薬、親和性に基づく成分、例えばポリA（ポリTと相互作用する）またはポリTタグ（ポリAと相互作用する）、Hisタグ（Niと相互作用する）、またはストレプトアビジンタグ（ビオチンで分離できる）が挙げられる。当業者は、核酸に結合された検出可能標識が天然に存在しないことを理解しているであろう。

【0035】

別段定義されない限り、本明細書中で用いる技術用語および科学用語は、当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。例えば、Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4th ed. 2007); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989)を参照のこと。用語「a」または「an」は、1以上を意味することが意図される。ステップまたは要素の記述に先行するとき、用語「含む（「comprise」、「comprises」および「comprising」）は、さらなるステップまたは要素の追加が任意であり、かつ、排除されないことを意味することを意図する。

【0036】

III. 核酸サンプル

バイオマーカー検出のためのサンプルは、核酸を含むと思われる任意の起源、例えば、組織、皮膚、（例えば、頬側、腔の）ぬぐい液、尿、唾液などから取得され得る。本開示との関連において、サンプルは、血液または血液分画から取得される。

【0037】

細胞を含むサンプルの場合、細胞を分離し（例えばサイズ分別濾過または遠心を使って）、それにより無細胞核酸（cfNA）、例えばエキソソーム、微小胞、ウイルス粒子または自由に循環しているものの中の核酸を残すことができる。いくつかの実施形態において、血小板もまた、無細胞成分と共に捕捉されて、多血小板血漿を形成する。血液は、任意の少なくとも3つの異なった方法によって加工され得る。加えて、同じ血液サンプルが、血小板、血漿、およびPEPを取得するために使用され得る。血液は、血小板、血漿、および/またはPEP画分を濃縮および取得するために異なった速度にて遠心分離され得る。例えば、約120g（例えば、100~200g）での遠心分離はPEPをもたらし、約360g（例えば、250~450g）では血小板（RNA）をもたらし、および約1500g（例えば、1000~1800g）では血漿（RNAおよびDNA）をもたらす。

【0038】

生物学的サンプルから核酸を単離する方法は、例えばSambrook他に記載のように既知であり、いくつかのキットが市販されている（例えばRoche社から入手可能な、高純度RNA単離キット（High Pure RNA Isolation Kit）、高純度ウイルス核酸キット（High Pure Viral Nucleic Acid Kit）、MagNA Pure LC全核酸単離キット（MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit）、細胞・組織用DNA単離キット（DNA Isolation Kit for Cells and Tissues）、哺乳類血液用DNA単離キット（DNA Isolation Kit for Mammalian Blood）、高純度FFPET DNA単離キット（High Pure FFPET DNA Isolation Kit））。本開示方法との関連において、RNAが収集されるが、いくつかの実施形態において以前に調製したcDNAに分類子を用いることができる。

【0039】

IV. 癌関連核酸

PEPは、疾患に罹患しているかまたは疾患のリスクが高い個体からの血液サンプル中に存在する疾患関連バイオマーカーを検出するのに有用である。特に、血液成分は、例えば、血液中に担持された核酸の状態、癌関連バイオマーカーを担持することが知られている。無細胞核酸、例えば、血清や血漿中のDNA、は、通常、平均~166ヌクレオチドの断片

10

20

30

40

50

の状態が存在する（例えば、50～300bp、例えば、Lo et al. (2016) Trends Genet.32:360を参照のこと）。EVおよび血小板中に存在するRNAは、完全なmRNA種から、サイズが約18～27ヌクレオチド～の範囲に及びmiRNAまでのサイズ範囲を示す（例えば、Lin et al. (2017) Annual Rev Cancer Biol. 1:163）。したがって、PEPは、血漿からの核酸（RNAおよびDNA）、および血小板からのRNAを含み、そして、広範囲なバイオマーカーを濃縮した優れた液体生検検体を構成する。血小板は、血漿に比べて、より大量のmiRNA供給源であるが、しかしながら、血漿は血小板では見られないctDNAを含んでいる。癌関連バイオマーカーとしては、挿入、欠失、および置換突然変異体、融合の多型、スプライス変異体、miRNA（例えば、存在および/またはレベル）、（例えば、非発癌サンプルと比較した）示差的発現レベル、およびコピー数多型が挙げられる。

10

【0040】

癌関連突然変異の最も総合的な情報源は、ウェブサイトcancer.sanger.ac.uk（バージョン81、2017年5月）にて利用可能なCOSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer) データベースである。PEPは、サンプルを提供する個体にとって適切な場合、データベースに列挙された任意の突然変異を検出するためのサンプル供給源として使用され得る。COSMICデータベースでは、起源の組織、治療効果、およびシグナル伝達経路を含め、多くの方法でバイオマーカーを分類している。miRNAに関しては、miRbase (mirbase.org)において見られるデータベース)は総合的なデータソースを提供する。したがって、医療提供者は、肝臓癌に罹患している患者に関して肝臓癌に関連しているマーカーを選択することができ、その後、その患者が第一線治療法に反応しないかまたは対応して再発する場合には、薬剤抵抗性に関連する突然変異のデータベースに問い合わせる。PEPは、サンプルを提供した個体に適切な場合、データベースに列挙された任意の突然変異を検出するためのサンプル供給源として使用される。PEPは、それが比較的非侵襲的様式で取得され、かつ、比較的濃縮された癌関連バイオマーカーの供給源を提供するので、観察のために特に有利である。

20

【0041】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、挿入または欠失突然変異である。開示したPEPサンプル供給源を使用して検出できるインデル突然変異の例としては：METエクソンの14欠失またはVHL欠失が挙げられるが、これだけに限定されるものではない。

【0042】

いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、置換突然変異（例えば、ミスセンス、ナンセンス、SNP）である。開示したPEPサンプル供給源を使用して検出できる癌関連突然変異を含む遺伝子の例としては：EGFR、BRAF、NRAS、KRAS、ABL1、ADAMTS5、ALK、APC、ARAF、ARID1A、ATM、ATP2B4、B2M、BCL2、BCL6、BCL7A、BTG1、CARD11、CCND3、CD58、CD274 (PDL1)、CD798、CDH9、CDKN2A、CIITA、CNNB1、CNTNAP2、CPXCR1、CREBBP、CSMD3、CTNNB1、DCDC1、DDR2、DUSP22、EML4、EP300、EPHA6、ERBB2、ERBB3、ESR1、EZH2、FBXW7、FGFR1、FGFR2、FOXO1、FOXP1、GATA3、GNA13、GNAS、GRK7、GRM8、HCN1、HIST1H1B、HIST1H1C、HIST1H1E、IDH1、IKZF3、IRF4、ITPKB、JAK2、JAK3、KCNB2、KDM4C、KIT、LRI G3、LRR1Q3、MAP2K1、MEF2B、MET、MLH1、MSN、MYC、MYD88、NOTCH1、NOTCH2、NRXN1、PDL2、PGM5、PIK3CA、PIM1、PNPLA1、POM121L12、POU2F2、PTEN、PTPN1、PTPN11、PTPN6、PTPRD、RAF1、RB1、REG3A、REL、ROBO2、ROS1、S1PR2、SATB2、SGK1、SLC34A2、SLP1、SMA D4、SMARCB1、SOCS1、SPTA1、ST6GAL2、STAT6、SYT4、TBL1XR1、TNFAIP3、TNFRSF14、TNR、TP53、TRHDE、TRIM58、UNC5C、VHL、XPO1、ZIC4、およびZNF598が挙げられるが、これだけに限定されるものではない。

30

40

【0043】

いくつかの実施形態において、（単数もしくは複数の）癌関連バイオマーカーとしては、少なくとも1つの融合変異体が挙げられる。検出できる融合変異体の例としては、例えば、ALK、RET、ROS、NTRK（神経栄養因子チロシン受容体キナーゼ）、BRAF、ABL、およびFGFR（繊維芽細胞成長因子受容体）などのチロシンキナーゼに關与するものが挙げられる。現在開示したPEPサンプル供給源を使用して検出できる融合変異体の特定の例としては

50

: EML4-ALK、EML4-CCDC142、CCDC142-ALK、KIF5B-ALK、HIP1-ALK、KLC1-ALK、TFG-ALK、KIF5B-RET、CCDC6-RET、NCOA4-RET、TRIM33-RET、ERC1-RET、BCR-ABL、CD74-RABGAP1L、RAD51AP2-ALK、EML-AKAP13、DCTN1-ALK、EML4-RABGAP1L、CD74-ROS1、STRN-ALK、MYO7A-ALK、EML4-LBH、EML-CUX1、FGFR3-TACC3、C11orf95-RELA、DNAJB1-PRKACA、TMPRSS2-ERG、PML-RARA、EGFR-SEPT14、RPS6KB1-VMP1、ETV6-NTRK3、SND1-BRAF、ETV6-ROS1、EML-AFF3、MLL-MLLT10、MLL-ELL、EHMT1-GRIN1、NSD1-ZFN346、PPP1CB-PLB1、KDM2A-RHOD、NSD1-NUP98、およびMLL-MLLT4が挙げられるが、これだけに限定されるものではない（例えば、Yoshihara et al. (Dec. 15, 2014) Oncogeneを参照のこと）。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、（単数もしくは複数の）癌関連バイオマーカーとしては、少なくとも1つのコピー数多型（CNV）が挙げられる。現在開示したPEPサンプル供給源を使用して検出できるCNVの例としては：AKT1、AR、ATM、C6、CCND1、CCND2、CNBD1、CWF19L2、DCDC2、DIO2、ERBB2、ERBB3、EPHX4、ESR1、EXOC4、FERD3L、FGFR1、GNA11、GRM8、IDH2、INSL5、KRAS、KIF5B、KIT、MAP2K1、MYD88、NPM1、PDGFRB、SLC17A8、SLC5A10、SLP1、TNR、およびTP53が挙げられるが、これだけに限定されるものではない。

10

【 0 0 4 5 】

癌関連バイオマーカーの検出は、そのバイオマーカーに関連している癌を診断するのに、そのバイオマーカーに関連している癌を発症する見込みを予測するのに、患者向けの適切な治療を選択するのに、癌療法を受けている患者の治療経過を観察するのに、癌患者の予後を提供するのに使用され得る。

20

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、標的療法は、癌関連バイオマーカーの存在または不存在に基づいて患者に対して処方、提供、または投与される。いくつかの薬物が、特定のバイオマーカープロファイルを有する患者向けである。EGFR突然変異を有する患者は、例えば、アファチニブ、セツキシマブ、ダコミチニブエルロチニブ、ゲフィチニブ、HG-5-88-01、ラパチニブ、オシメルチニブ、およびペリチニブ、から選択される標的療法を受ける可能性がある。VEGFR、KIT、またはPDGFRに突然変異を有する患者は、例えば、アムパチニブ、アキシチニブ、カバザチニブ、イマチニブ、モテサニブ、マシチニブ、ポナチニブ、パゾパニブ、およびソラフェニブ、から選択される標的療法を受ける可能性がある。多くの特異的突然変異に対処するために、新たな標的療法が開発されており、そのため、当業者は、その時に個体向けの標的療法を選択するのに最も良い状況にある。加えて、患者は標準的な化学療法の利益を得ることができる。よって、いくつかの実施形態において、化学療法は、癌関連バイオマーカーの存在または不存在に基づいて患者に対して処方、提供、または投与される。これはCHOP（シクロホスファミド；ドキシソルピシン；ピンクリスチン；およびプレドニソロン）またはR-CHOP（これはさらにリツキシマブおよび/またはエトポシドを含む）療法を含むことができる。この混合物は、一定期間の間、または腫瘍サイズの縮小および/または症状の軽減が検出されるまで、周期的に投与することができる。例えば、CHOPまたはR-CHOPは2または3週間ごとに投与することができる。

30

【 0 0 4 7 】

どの治療が選択されるかにかかわらず、それは、典型的には副作用を検出できるような低用量で始まり、例えば、副作用が出現するまでまたは患者の許容範囲内で、あるいは、臨床的利益が観察されるまで、用量が増加される。

40

【 0 0 4 8 】

V. 増幅と検出

核酸サンプルは、例えば核酸増幅を使って、例えば任意のプライマー依存性方法を使って、検出および定量に用いることができる。RNAサンプル中のバイオマーカーの検出において、予備的な逆転写工程が実施される（RT-PCRとも呼称される；リアルタイムPCRと混同してはならない）。例えば、Hierro et al. (2006) 72:7148を参照のこと。本明細書中で用いる用語「qRT-PCR」とは、逆転写および定量的PCRを指す。両反応は中断なく単一のチューブの中で実施することができ、例えば試薬を添加することができる。例えば、ポリ

50

Tプライマーを用いて、ポリAテールを有するサンプル中の全てのmRNAを逆転写することができ、ランダムオリゴヌクレオチドを使うことができ、あるいはcDNAに逆転写される特定の標的転写物に特異的であるプライマーを設計することができる。cDNA、またはサンプルからのDNAは、定量的増幅（リアルタイムまたは定量的PCR、すなわちRT-PCRまたはqPCR）に使用される最初の鋳型を形成することができる。qPCRは、PCR工程の各サイクル中に生成する生成物の信頼できる検出と測定を可能にする。そのような技術は当業界で周知であり、キットや試薬は例えばロシュ・モレキュラーシステムズ（Roche Molecular Systems）、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies）、バイオラッド社（Bio-Rad）などから市販されている。例えば、Pfaffl（2010）Methods: The ongoing evolution of qPCR vol. 50を参照のこと。

10

【0049】

別々の逆転写酵素と耐熱性DNAポリメラーゼを使用でき、例えば2段階反応（逆転写に続いてDNAポリメラーゼの添加と増幅を実施するもの）または複合反応（両酵素を一度に添加するもの）において使用できる。いくつかの実施形態において、逆転写酵素活性とDNA鋳型依存性活性の両方を有する耐熱性ポリメラーゼを使って、標的核酸を増幅する。酵素の例としては、Tth DNAポリメラーゼ、C. thermポリメラーゼ系、並びにUS 20140170730およびUS 20140051126に開示されたものが挙げられる。

【0050】

本明細書に記載のように使用されるプローブは、フルオロフォアおよび任意選択でクエンチャー（例えばTaqMan、LightCycler、Molecular Beacon、ScorpionまたはDual Labelledプローブ）で標識することができる。適当なフルオロフォアとしては、FAM、JOE、TET、Cal Fluor Gold 540、HEX、VIC、Cal Fluor Orange 560、TAMRA、Cyanine 3、Quasar 570、Cal Fluor Red 590、Rox、Texas Red、Cyanine 5、Quasar 670およびCyanine 5.5が挙げられるが、これだけに限定されるものではない。適当なクエンチャーとしてはTAMRA（FAM、JOEおよびTET用）、DABCYLおよびBHQ1-3が挙げられるが、これだけに限定されるものではない。

20

【0051】

検出装置は当業者に既知であり、特定の標識に合わせて適宜選択することができる。定量的PCRに適する検出装置としては、cobas（登録商標）およびLight Cycler（登録商標）システム（Roche社）、RRISM 7000および7300リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems社）などが挙げられる。6チャンネル式検出系は、CFX96リアルタイムPCR検出システム（Bio-Rad）およびRotorgene Q（Qiagen社）において入手可能であり、より高度の多重化（多元化）を可能にする。

30

【0052】

PCR検出において、結果は、閾値サイクル（Ctと略記され、場合によってはCqまたはCpと略記される）の形で表わすことができる。Ct値が低い結果は、例えばより高い標的核酸濃度またはより効率的な増幅という理由で、予め決められた閾値レベルへの達成がより迅速であることを反映する。閾値サイクルは一般に所定の標的についての増幅が直線領域にあるように選択される。いくつかの実施形態において、Ctは、例えばベースラインに関して、増幅シグナルが事前定義された閾値の線を超えた時点のサイクルとして設定され、または増幅曲線の二次導関数の最大値を求めることにより、設定される。Ctの決定は当業界で既知であり、例えば米国特許第7363168号明細書に記載されている。

40

【0053】

いくつかの実施形態において、デジタルPCR（dPCR）は、PEP中の癌関連バイオマーカーを検出するのに使用できる。例えば、デジタルドロップレットPCR（ddPCR）は、非常に低濃度であってサンプル中の標的核酸の絶対計測を測定するのに使用できる。dPCR法は、デジタル希釈またはドロップレット作製、PCR増幅、検出および（任意選択で）解析のステップを含む。分配ステップは、それぞれが核酸増幅の実施に必要な試薬を収容した複数の個々の反応容量（例えば、ドロップレット）の作製を含む。PCR増幅ステップは、アンプリコンを作製するための標的核酸の増幅に好適なサーモサイクリング条件に分配容量を晒

50

すことを含む。検出は、アンプリコンを含むおよび含まないそれらの分配容量の識別を含む。解析ステップは、例えば、サンプル中の標的核酸の濃度、絶対量または相対量（別の標的と比較したもの）が得られる定量を含む。市販のdPCRシステムは、例えば、Bio-Rad、RainDance、およびThermoFisherから入手可能である。dPCRの記述は、例えば、US20140242582 ; Kuypers et al. (2017) J Clin Microbiol 55:1621; and Whale et al. (2016) Biomol Detect Quantif 10:15に見られる。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、疾患関連バイオマーカーは、シーケンシング、例えば、大規模並列シーケンシング（MPS）または次世代シーケンシング（NGS）、を使用して検出される。次世代シーケンシング法は、並行して何百万個もの単一DNA分子をクローン的に増幅する。次に、各クローン集団を個別に配列決定する。NGS法としては、合成（例えば、Illumina）によるシーケンシング、ナノポアシーケンシング（例えば、Oxford Nanopore Technologies）、単一分子リアルタイムシーケンシング（例えば、Pacific Biosciences）、イオン半導体ベースのシーケンシング（Ion Torrent）、およびパイロシーケンシング（454 / Roche）が挙げられる。無細胞核酸は、短い断片、例えば、約50 ~ 200bp、の状態で存在しており、そのため、シーケンシング法のリード長制限は問題になりにくい。いくつかの実施形態において、シーケンシング法は、任意選択で標的濃縮ステップ、例えば、増幅ステップ、を含む。他の実施形態において、他の標的濃縮法、例えば、ライブラリベースまたはプローブベースの標的濃縮法（例えば、US7867703またはUS8383338）、が使用される。NGS方法は、例えば、Xu, Next Generation Sequencing: Current Technologies and Applications, Caister Acad. Press 2014 ; Ma et al. (2017) Biomicrofluidics 11:021501; Kelly (2017) Semin Oncol Nurs 33:208 ; およびSerrati et al. (2016) Oncol Targets Ther 9:7355に記載されている。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態において、疾患関連バイオマーカーは、例えば、アレイ解析などのハイブリダイゼーション法を使用して検出される。アレイでは、一般的に、特定の標的核酸に結合する何千もの指定可能位置を有するマイクロチップを利用する。市販のアレイシステムは、Affymetrixから入手可能である。例えば、GeneChipシステムは、発現レベルおよび配列情報の両方を検出するのに使用できる。マイクロアレイ解析の詳細と適用は、例えば、Bumgarner (2013) Curr Protoc Mol Biol 101: 22.1に記載されている。

【 0 0 5 6 】

VI . キット

他の血液成分からの多血小板血漿（PEP）の分離を実施するためのキットが本明細書中で提供される。

いくつかの実施形態において、該キットは、血液採集用の器（例えば、チューブ、バイアル、マルチウェルプレートまたは多容器カートリッジ）を含む。いくつかの実施形態において、該採集用の器は、例えば、50 ~ 5000 x g、100 ~ 1000 x gにて、遠心分離に耐えるのに十分な耐久性がある。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、該血液採集用の器は、細胞物質から血小板や細胞外小胞を分離するためにサイズ濾過のための部品、例えば、1、2、3、4、5、2 ~ 4、または3 ~ 5 ミクロンフィルター、を有する。いくつかの実施形態において、該サイズ濾過部品は、サンプル用の器、例えば、血液採集用の器または別のサンプル用の器、への挿入のために別々に提供される。いくつかの実施形態において、該サイズ濾過部品は、スピンカラムである。いくつかの実施形態において、該サイズ濾過部品は、受動フィルターである。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態において、該キットは、核酸精製のための試薬および / または部品を含む。例えば、該キットは、溶解バッファー（例えば、界面活性剤、カオトロピック試薬、緩衝剤などを含む）、サンプル中のタンパク質または他の望ましくない物質を変性するための酵素または試薬（例えば、プロテイナーゼK、DNアーゼ）、核酸を保存するため

10

20

30

40

50

の酵素（例えば、DNアーゼおよび/またはRNアーゼ阻害剤）を含み得る。いくつかの実施形態において、該キットは、核酸分離のために部品、固体または半固体マトリックス、例えば、クロマトグラフィーマトリックスなど、磁性ビーズ、磁気ガラスビーズ、ガラスファイバー、シリカフィルターなどを含む。いくつかの実施形態において、該キットは、該固体または半固体マトリックスからの核酸の精製および放出のための洗浄および/または溶出バッファーを含む。例えば、該キットは、MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit、DNA Isolation Kit for Mammalian Blood、High PureまたはMagNA Pure RNA Isolation Kits (Roche)、DNeasyまたはRNeasy Kits (Qiagen)、PureLink DNAまたはRNA Isolation Kits (Thermo Fisher) などからの部品を含み得る。

【0059】

いくつかの実施形態において、該キットは、特定の標的核酸、例えば、癌に関連した標的核酸、の検出のための試薬を含む。例えば、該キットは、癌関連バイオマーカー、例えば、癌においてコピー数多型を有することが知られている突然変異または配列など、に対して特異的に結合するオリゴヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、検出試薬は、RT-PCR、qRT-PCR、qPCR、dPCR、シーケンシング（サンガーまたはNGS）のためのものである。

【0060】

該キットは、増幅のための試薬、例えば、逆転写および/または増幅に適した逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、dNTPs、バッファー、および/または他の要素（例えば、補因子またはアプタマー）をさらに含む。典型的には、アリコートサンプル（例えばRNAおよびDNA）、酵素および/または水と一緒に最終反応容量にまで添加できるように、（単数もしくは複数の）試薬混合物が濃縮される。いくつかの実施形態において、該キットが逆転写酵素（または逆転写活性を有する酵素）および/またはDNAポリメラーゼ（例えば耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばTaq、Z05およびその誘導体）をさらに含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、該キットは少なくとも1つの対照サンプル、例えば非癌性サンプル（またはプールしたサンプル）からの核酸、または標的核酸を担持していることが知られているサンプル（またはプールしたサンプル）からの核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、該キットは陰性対照、例えば核酸を欠くもの、突然変異核酸を欠くものを含む。いくつかの実施形態において、該キットが核酸調製用の消耗品、例えばプレートまたはチューブ、サンプル収集用のチューブなどをさらに含む。いくつかの実施形態において、該キットが使用説明書、ウェブサイトへの参照、またはソフトウェアをさらに含む。

【実施例】

【0062】

VII. 実施例

血小板および血漿における癌関連バイオマーカーHER2レベルの評価

HER2癌遺伝子を、同じ血液量からの血漿と血小板におけるバイオマーカーレベルを比較するための癌関連バイオマーカーとして選択した。2つの、5mlの血液サンプルを3人の乳癌患者それぞれから採血し、別々に加工した。

【0063】

多血小板血漿を、120 × gにてスイング式パッケージのエッペンドルフ5810R遠心分離機により調製して、赤血球をペレット化した。白血球像細胞層慎重に回避しながら、PEPを取り出し、新しいチューブに移した。次に、PEPを360 × gにて遠心分離して、血小板をペレット化した。血小板を、PBS + 0.4% EDTA中で洗浄し、次に、100 μlのRNA later中に回収した。血小板を、-80 °Cにて冷凍するか、またはRoche High Pure Kitに基づく手作業による血漿cfRNAサンプル調製法を使用して抽出した。血漿を、1500 × gにて遠心分離し、次に、手作業による血漿cfRNAサンプル調製法を使用して抽出することによって調製した。

【0064】

両サンプルタイプにおいて、溶出液を分析して、RINスコア（RNA完全性）を決定した。

10

20

30

40

50

その値は、RNA品質が血小板と血漿の間で大きく異なることを示した。該サンプルのそれぞれからの1mlの血液（20 μ l）に相当するものからの核酸を、ハウスキーピング遺伝子（SDH）とHER2の両方に関する二重反復アッセイを実施するために使用した。

【0065】

ハウスキーピング遺伝子とHER2の両方の発現は、血漿サンプル（それぞれ2~4Ctの範囲に及ぶ）と比較して、血小板サンプルにおいてかなり早く検出可能であった。3.3Ctの差は10倍の差に相当する。よって、その結果は、血小板が、血漿に比べて、約6~9倍多い核酸回収を有することを示す。HER2+乳癌患者におけるHER2発現に関して、血小板対血漿に基づくCtの1.4~4.3倍の増大は、4~13倍多いRNA回収に相当する。これは顕著な改善であり、より良好なダイナミックレンジ測定を可能にする。

10

【0066】

血漿中に見られる血小板および細胞外小胞は、異なる細胞プロセスを通して形成される。血小板は、通常、骨髄内の巨核細胞によって産生されるが、血液中で細胞外小胞を獲得することができる（Nilsson et al. (2011) Blood 118: 3680）。血小板ではmiRNAを含めたRNAが特に豊富であるが、それに対して、血漿はまたctDNAを含めたDNAも含む。血漿に見られる細胞外小胞は、ほぼすべての細胞によって放出される可能性がある。それぞれに見られるバイオマーカーは、患者の状況に関する独特な情報、例えば、患者の癌の起源または病因など、を追加することもある。

【0067】

PEP中の癌関連miRNAの評価

20

マイクロRNA（miRNA）は、mRNA発現、癌遺伝子もしくは腫瘍抑制因子としての機能を調整し得るか、または転移癌の調整に関与し得る。したがって、miRNAは、診断のため、または治療薬自体として役立つので、標的化治療薬の魅力的なモデルである。固有のmiRNAは、特定の癌の様々なレベルにおいて示差的な存在なので、それゆえ、魅力的な診断ツールとしても役立つ。別の利点は、miRNAが比較的安定しているという点である。

【0068】

前立腺癌患者からの血漿、PEP、および血小板サンプル中のmiRNAレベルを検出および比較すること模索された。前立腺癌に関する最新の試験では、前立腺特異的抗原（PSA）が注目されたが、それが特異的でなく、また高感度でもなかったため、過剰治療につながった。いくつかのmiRNAが前立腺癌に関与する（上方制御または下方制御される）ので、11個をqRT-PCRによる検出のために選択した。これらとしては、miR21-5p、Let7i-5p、miR20a-5p、miR30c-5p、miR200b-3p、miR141-3p、miR375-3p、miR145-5p、miR221-5p、miR30c-5p、および標準対照130b-3pが挙げられる。特にmiR100-5p、miR6749-5p、miR155-5p、miR31-5p、miR99a-5p、miR7107-5p、miR218-5p、miR4632-3p、miR4433a-3p、miR335-5p、miR3613-5p、およびmiR370-3pを含めた追加のmiRNAをNGSによって検出した。qRT-PCRおよびNGSからの結果を比較すると、おおむね一致していた。

30

【0069】

前立腺癌患者からサンプルを獲得する前に、前立腺癌細胞株における発現を評価した。骨転移由来のアンドロゲン抵抗性細胞株であるPC3は、侵襲性、かつ、転移性である。LnCapは、リンパ節転移由来であり、アンドロゲン感応性であり、かつ、アンドロゲン独立性進行を受け - 転移性になるように誘導され得る。両細胞株向けの我々の基準NGS法に関して、良好なリードアラインメントおよびリードサイズ分布を得た。qRT-PCR対NGSのリードカウントによって検出される選択miRNAのレベルは、概して、同じ方向に傾いたデータをもたらし、高度に発現されたmiRNAと合致するデータをもたらした。両細胞株はmiR21-5p、Let7i-5p、miR20a-5p、miR30c-5p、およびmiR200b-3pのqRT-PCRによって高度な発現を有し、かつ、LnCapもまた高度にmiR141-3pを発現した。

40

【0070】

血液を、4人の前立腺癌患者および1人の健常者から得た。各血液サンプルを加工して、血小板、PEP、および血漿を得た。

一般的に、血小板が最も高度な発現を示し、続いてPEP、その次に血漿であったが、い

50

くつかの例外が存在した。これらのmiRNAの多くが、カットオフに対して、有意に高い発現（例えば、血小板におけるmiR200b-3p）または低い発現（例えば、miR145-5p）を示す。該アッセイは、血小板が特に豊富なmiRNA供給源であり、その一方で、血漿では、それが比較的稀であることを明らかにした。以下のmiRNA：miR200b-3p、miR30c-5p、miR375-3p、およびLet7i-5pは、すべての患者の血小板対健常ドナーサンプルにおいてより高度に発現された。miR145-5pはすべての患者の血小板において下方制御された。

【 0 0 7 1 】

NGS法による結果をLogFc（単独の患者対対照に関する）およびp値（複数の患者対対照に関する）によって関連させ、比較したとき、以下のmiRNA：miR4433a-3p、miR335-5p、miR3613-5p、およびmiR370-3pが両方に共通であり、そのため、最も関連のある前立腺癌バイオマーカーであると考えた。

10

【 0 0 7 2 】

その結果は、血漿および血小板が様々なバイオマーカー（例えば、ctDNA対RNA、別のmiRNA、別のRNA断片など）の異なる量に寄与していることを示す。そのため、PEPは、より広範囲なバイオマーカーを検出するのに使用され、そして、所定の患者から必要とされるサンプル量を最小限にし得る。そのうえ、miRNAが癌だけではなく、多くの細胞プロセスに関与すると仮定すると（例えば、Ardekani and Naeini (2010) Avicenna J. Med. Biotechnol. 2:161を参照のこと）、PEPは、非癌性病態を検出または観察するためのmiRNA供給源として使用できる。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/083963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6806 ADD.		
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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MYRON G. BEST ET AL: "RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics", CANCER CELL, vol. 28, no. 5, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 666-676, XP055473997, US ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.018 the whole document -/--	1-7,9-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 February 2019		Date of mailing of the international search report 26/02/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Betz, Jürgen

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/083963

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>& Myron g Best ET AL: "RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics", Cancer Cell, 9 November 2015 (2015-11-09), pages 666-676, XP055552717, United States DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.018 Retrieved from the Internet: URL:file:///C:/Users/JB03843/AppData/Local/Temp/mmcl.pdf</p>	
X	<p>----- SIMON A. JOOSSE ET AL: "Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients", CANCER CELL, vol. 28, no. 5, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 552-554, XP055552467, US ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.007 the whole document</p>	1-11
X	<p>----- BEST MYRON G ET AL: "Swarm Intelligence-Enhanced Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer Using Tumor-Educated Platelets", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 32, no. 2, 14 August 2017 (2017-08-14), page 238, XP085156266, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2017.07.004 the whole document</p>	1-11
X	<p>----- R. J. A. NILSSON ET AL: "Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers", BLOOD, vol. 118, no. 13, 29 September 2011 (2011-09-29), pages 3680-3683, XP055017258, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-03-344408 the whole document</p> <p>----- -/--</p>	1-7,9-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/083963

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R Jonas ET AL: "Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer**", Oncotarget 1066 Oncotarget, 2 November 2015 (2015-11-02), XP055552496, Retrieved from the Internet: URL:file:///C:/Users/JB03843/AppData/Local/Temp/6279-91184-6-PB.pdf [retrieved on 2019-02-06] the whole document -----	1-7,9-11
X	PÉREZ-CALLEJO DAVID ET AL: "Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring.", TRANSLATIONAL LUNG CANCER RESEARCH OCT 2016, vol. 5, no. 5, October 2016 (2016-10), pages 455-465, XP002788713, ISSN: 2218-6751 the whole document -----	1-11
T	WO 2015/177222 A1 (COMPREHENSIVE BIOMARKER CT GMBH [DE]) 26 November 2015 (2015-11-26) -----	1-11

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/083963

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015177222 A1	26-11-2015	EP 3146069 A1	29-03-2017
		US 2017175192 A1	22-06-2017
		WO 2015177222 A1	26-11-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		P
C 1 2 N 15/10 (2006.01)		C 1 2 N 15/10		1 0 0 Z

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

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165
弁理士 津田 英直

(72)発明者 エマ ブラウン
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 ドワイト クオ
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 チトラ マノハー
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 プリシラ ムーンサミー
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 スネーハ ニシュタラ
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 ロリ スタイナー
アメリカ合衆国, カルフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0
, シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA25 AA26 AA35 BA13 BB03 BB10 CA02 CA11
CA24 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB07 CB09 CB11 CB14
CB26 DA12 DA13 DA14 DA20 DA36 FA11 FB01 FB02 FB03
FB06 FB08 FB12 FB13 FB15 GC15
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR62
QR66 QS10 QS13 QS14 QS25 QS39 QX02