

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6318149号  
(P6318149)

(45) 発行日 平成30年4月25日(2018.4.25)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 Z
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26 Z N A
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 Z

請求項の数 18 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-516178 (P2015-516178)	(73) 特許権者	514311405 パイオマ インコーポレイテッド アメリカ合衆国, 33133 フロリダ州 、マイアミ, サウス ベイショア レーン 1827
(86) (22) 出願日	平成25年6月5日(2013.6.5)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(65) 公表番号	特表2015-524068 (P2015-524068A)	(72) 発明者	エズリン, アラン, エム. アメリカ合衆国, 33133 フロリダ州 、マイアミ, サウス ベイショア レーン 1827
(43) 公表日	平成27年8月20日(2015.8.20)	審査官	海野 佳子
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/044351		最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02013/184830		
(87) 国際公開日	平成25年12月12日(2013.12.12)		
審査請求日	平成28年5月30日(2016.5.30)		
(31) 優先権主張番号	61/656,945		
(32) 優先日	平成24年6月7日(2012.6.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 脳腫瘍検出のための5-ALA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍を検出する方法であって、  
脳由来微小粒子に結合した5-ALAのプロトポルフィリンIX (PPIX) への変換  
レベルの検出前に、生体試料から当該脳由来微小粒子を分離するステップと、

上記脳由来微小粒子と結合した5-ALAのプロトポルフィリンIX (PPIX) への変換  
レベルを検出することによって、WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍  
を検出するステップと、を含み、

上記生体試料は、5-アミノレブリン酸(5-ALA)を含む医薬組成物を投与された  
被検者から得た生体試料であり、

上記のWHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍は、膠芽腫(GBM)である  
、方法。

【請求項2】

上記被検者が、脳腫瘍の治療を以前に受けていた、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

上記被検者が、WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍の治療を以前に受け  
ていた、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

上記生体試料は全血である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

上記生体試料は血漿または血清である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

上記生体試料は脳脊髄液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

上記生体試料は、尿、涙、母乳、リンパ液、滑液、気管支肺胞洗浄液、羊水、唾液、眼液、腹水、および呼吸器飛沫からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

上記医薬組成物はグリオラン<sup>T M</sup>である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

上記 5 - A L A を含む医薬組成物は経口投与される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 10】

上記 5 - A L A を含む医薬組成物は腫瘍内投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

上記医薬組成物は、5 m g / k g、10 m g / k g、20 m g / k g、または 30 m g / k g の濃度で 5 - A L A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

上記 5 - A L A を含む医薬組成物は、3 時間、4 時間、または 5 時間投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

5 - A L A の P P I X への上記変換レベルは、蛍光を測定することによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 14】

5 - A L A の P P I X への上記変換レベルは、5 - A L A から P P I X への変換経路に沿って代謝物レベルを測定することによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

5 - A L A の P P I X への上記変換レベルは、変換酵素レベルを測定することによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

上記変換酵素は、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ ( C P O X ) である、請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

WHO グレード I I I およびグレード I V の脳腫瘍の再発を評価する方法であって、脳由来微小粒子に結合した 5 - A L A のプロトポルフィリン I X ( P P I X ) への変換レベルの検出前に、生体試料から当該脳由来微小粒子を分離するステップと、

上記脳由来微小粒子と結合した 5 - A L A のプロトポルフィリン I X ( P P I X ) への変換レベルを検出することによって、WHO グレード I I I およびグレード I V の脳腫瘍の再発を評価するステップと、を含み、

上記生体試料は、5 - アミノレブリン酸 ( 5 - A L A ) を含む医薬組成物を投与された被検者から得た生体試料であり、

上記の WHO グレード I I I またはグレード I V の脳腫瘍は、膠芽腫 ( G B M ) である、方法。

40

【請求項 18】

WHO グレード I I I およびグレード I V の脳腫瘍の再発は、脳由来微小粒子と結合した 5 - A L A の量を検出することによって評価される、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願のクロスリファレンス〕

本出願は、2012年6月7日に提出された米国仮出願第 61 / 656 , 945 号の利益を主張するものであり、当該米国仮出願は、その全体が、参照により本明細書に組み込

50

まれる。

【0002】

〔技術分野〕

本開示は、脳腫瘍を検出する方法、および、そのような腫瘍の存在および再発を評価する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

脳に発生する最も一般的な癌の形態は、膠芽腫と呼ばれる最も悪性で進行が早い悪性度Ⅳの腫瘍である。悪性度のより低い神経膠腫が進行し、その後、悪性度ⅣのGBMになることが多い。現在、この生命を脅かす疾患の標準的な管理の間に起こる疾患再発の区別は、非常に複雑であり、放射線療法後の腫瘍壊死と区別することが困難である。そのため、治療、およびリスクの基準が非常に複雑かつ不正確なものになっている。

10

【0004】

GBMに対する現在の標準的な治療計画としては、外科的切除、体外照射療法、および経口化学療法等がある。しかしながら、切除することが難しい腫瘍の触手のような突起部、血液脳関門に起因する薬物アクセスの制限等を含む治療の難しさのため、平均余命は、一般的に12～16ヶ月にすぎない。限られた治療効果および再発の可能性を考慮すると、治療後に患者を綿密に監視することが重要である。現在、MRI画像では、放射線療法による放射性壊死と、固形腫瘍の再発とを適切に区別することは不可能である。そのため、医師は、MRI等の複数の方法によって経験的に患者の進行状況を判断しなければなら

20

【0005】

他のWHOグレードⅢおよびⅣの腫瘍に対する標準的な治療計画、および治療の難しさは類似している。

【0006】

5-ALAが有効成分であるグリオランは、蛍光下で、通常の脳組織と腫瘍組織との差の可視化を可能とすると共に、神経外科医によるより完全な切除率を可能とする試薬としてヨーロッパで使用が認可されている。高いグレードの脳腫瘍（WHOグレードⅢおよびⅣ、例えば、GBM、神経膠肉腫、未分化星状細胞腫等）は、通常の脳組織、および低いグレードの脳腫瘍（WHOグレードⅠおよびⅡ、例えば、髄芽腫、乏突起膠腫等）より高い速度で、5-ALAを蛍光ポルフィリンに代謝させるため、増強された蛍光を有している。しかし、5-ALAのシグナルを非侵襲的に検出することが可能であるか否かは知られていない。

30

【0007】

したがって、種々の被検者において、WHOグレードⅢおよびⅣの脳腫瘍を検出し、そのような腫瘍の存在および再発を評価する簡易かつ非侵襲的な方法に対する要求は依然としてある。

【0008】

また、全てのタイプの固形腫瘍を検出および評価し、さらに治療に対する反応、または疾患再発をもたらす突破を検出する簡易かつ非侵襲的な方法に対する一般的な要求も依然としてある。

40

【発明の概要】

【0009】

上記の要求に応えるために、本開示は本明細書に記載された方法を提示している。

【0010】

本開示は、WHOグレードⅢおよびグレードⅣの脳腫瘍を検出する方法と、そのような腫瘍の存在および再発を評価する方法とを記載している。これらの方法は、腫瘍から放出され、有効成分として5-アミノレブリン酸（5-ALA）を有する医薬組成物の投与後に体液から分離された微小粒子と結合されたアミノレブリン酸の代謝における酵素

50

バイオマーカーまたは最終生成物を定量し、脳由来微小粒子と結合する5 - A L Aを検出することによって行われる。

【0011】

一態様では、本開示は、WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍を検出する方法を提供し、上記方法は、5 - アミノレブリン酸(5 - A L A)を含む医薬組成物を被検者に投与するステップと、上記被検者から得た生体試料において、放出された微小粒子の量を測定し、脳由来微小粒子と結合したP P I Xの存在を検出する手段によって、腫瘍内のプロトポルフィリンIX(P P I X)への5 - A L Aの変換レベルを検出することによって、WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍の存在または再発を検出するステップとを含んでいる。

10

【0012】

上記方法を実施する時、5 - A L AのP P I Xへの変換レベルは、蛍光を測定すること、5 - A L AのP P I Xへの変換経路に沿って代謝物のレベルを測定すること、または、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ(C P O X)のような変換酵素のレベルを測定することによって検出されうる。

【0013】

上記方法のいくつかの実施形態では、上記方法は、上記脳由来微小粒子に結合した5 - A L Aの検出前に、上記生体試料から得た当該脳由来微小粒子を分離するステップを含んでいる。

【0014】

別の態様では、本開示は、WHOグレードIIIおよびグレードIVの脳腫瘍の再発を評価する方法を記載しており、上記方法は、5 - アミノレブリン酸(5 - A L A)を含む医薬組成物を被検者に投与するステップと、上記被検者から得た生体試料における脳由来微小粒子と結合した5 - A L Aを検出することによって、WHOグレードIIIおよびグレードIVの脳腫瘍の再発を評価するステップとを含んでいる。WHOグレードIIIおよびグレードIVの脳腫瘍の再発は、脳由来微小粒子と結合した5 - A L A量を検出することによって評価してもよい。いくつかの実施形態では、上記方法は、上述した態様に記載された方法を用いて5 - A L AのP P I Xへの変換レベルを検出することによって再発を検出する。

20

【0015】

上記態様のある実施形態では、上記被検者が、脳腫瘍、特に、WHOグレードIIIまたはグレードIVの脳腫瘍の治療を以前に受けている。治療される腫瘍は、未分化星状細胞腫、膠芽腫、未分化乏突起膠腫、未分化上衣腫、未分化乏突起星細胞腫、極性海綿芽細胞腫、星芽腫、または大脳膠腫症であってもよい。

30

【0016】

さらに別の態様では、本開示は固形腫瘍を検出する方法を提供し、上記方法は、固形腫瘍に選択的に局在するようになる癌治療薬を被検者に投与するステップであって、上記治療薬が代謝物に変換されるステップと、上記被検者から得た生体試料における固形腫瘍由来微小粒子と結合した、代謝物または変換酵素を検出することによって、上記固形腫瘍を検出するステップとを含んでいる。

40

【0017】

さらに別の態様では、本開示は固形腫瘍を標的とする癌治療薬のレベルを測定する方法を提供し、上記方法は、固形腫瘍に選択的に局在するようになる癌治療薬を被検者に投与するステップであって、上記治療薬が代謝物に変換されるステップと、上記被検者から得た生体試料における固形腫瘍由来微小粒子と結合した代謝物のレベルを検出するステップと、上記代謝物のレベルに基づいて、上記固形腫瘍における、上記癌治療薬のレベル、または変換酵素のレベルを決定するステップとを含んでいる。

【0018】

上述した態様に関する好ましい固形腫瘍には、卵巣腫瘍、乳部腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、肺腫瘍、結腸腫瘍、腎臓腫瘍、および膀胱腫瘍が含まれる。

50

## 【0019】

上記全態様のある実施形態では、上記生体試料は、全血、血清、血漿、または脳脊髄液である。別の実施形態では、上記生体試料は、血清、尿、涙、母乳、リンパ液、滑液、気管支肺胞洗浄液、羊水、唾液、眼液、腹水、または呼吸器飛沫である。

## 【0020】

上記全態様のある実施形態で用いられる上記医薬組成物は、5 - A L Aを含む任意の組成物であってもよいが、概してグリオラン<sup>T M</sup>である。上記医薬組成物は、経口投与、静脈内投与、くも膜下腔内投与、また腫瘍内投与してもよい。好ましい実施形態では、上記医薬組成物は、1 k gあたり20 m gの濃度で5 - A L Aを含んでいる。上記医薬組成物は、3時間、4時間、または5時間投与してもよい。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

特許または出願書類は、カラー印刷された少なくとも1つの図面を含んでいる。カラーの図面を備えた本特許または出願公開公報の写しは、請求および手数料の支払いによって特許庁から提供される。

【図1A】図1Aは、d d H 2 0中のコントロール血清のサイズ排除クロマトグラフィー（左軸、青線、吸光度：280 n m）、および伝導率測定（右軸、茶線）の結果を示している。

【図1B】図1Bは、100% P B S中のコントロール血清のサイズ排除クロマトグラフィー（左軸、青線、吸光度：280 n m）、および伝導率測定（右軸、茶線）の結果を示している。

20

【図2A】図2Aは、d d H 2 0中の被検者の血清のサイズ排除クロマトグラフィー（左軸、青線、吸光度：280 n m）、および伝導率測定（右軸、茶線）の結果を示している。

【図2B】図2Bは、10% P B S中の被検者の血清のサイズ排除クロマトグラフィー（左軸、青線、吸光度：280 n m）、および伝導率測定（右軸、茶線）の結果を示している。

【図2C】図2Cは、100% P B S中の被検者の血清のサイズ排除クロマトグラフィー（左軸、青線、吸光度：280 n m）、および伝導率測定（右軸、茶線）の結果を示している。

30

【図3A】図3は、光散乱 N T Aによって分析された G B M患者の試料の典型的な微小粒子に関する。図3Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図3B】図3Bは、N T A分析により得た試料のビデオ画像を示しており、赤い点は、追跡された粒子を示している。

【図3C】図3Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図3D】図3Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示している。

【図4A】図4は、N T Aによって蛍光モードで分析されたコントロールの青色蛍光微小粒子に関する。図4Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図4B】図4Bは、N T A分析により得た試料のビデオ画像を示しており、赤い点は、追跡された粒子を示している。

40

【図4C】図4Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図4D】図4Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図5A】図5は、N T Aによって蛍光モードで分析された、P B Sで処理した被検者の試料に関してあり、当該試料は、小さい微小粒子をほとんど有していない、大きい微小粒子の明確な分布と、低い多分散指数とを示している。図5Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図5B】図5Bは、N T A分析により得た試料のビデオ画像を示しており、赤い点は、追跡された粒子を示している。

【図5C】図5Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

50

【図5D】図5Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図6A】図6は、NTAによって蛍光モードで分析された、PBSで処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、小さい微小粒子をほとんど有していない、大きい微小粒子の明確な分布と、低い多分散指数とを示している。図6Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図6B】図6Bは、NTA分析により得た試料のビデオ画像を示しており、淡青色の点は、蛍光によって追跡された粒子を示している。

【図6C】図6Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図6D】図6Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

10

【図7A】図7は、NTAによって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有する、大量の小さい微小粒子と、高い多分散指数とを示している。図7Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図7B】図7Bは、NTA分析により得た試料のビデオ画像を示しており、淡青色の点は、蛍光によって追跡された粒子を示している。

【図7C】図7Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図7D】図7Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

20

【図8A】図8は、NTAによって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有する、大量の小さい微小粒子と、高い多分散指数とを示している。図8Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

【図8B】図8Bは、NTA分析により得た試料のビデオ画像を示しており、淡青色の点は、蛍光によって追跡された粒子を示している。

【図8C】図8Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図8D】図8Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図9A】図9は、NTAによって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有していない、大量の小さい微小粒子と、高い多分散指数とを示している。図9Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

30

【図9B】図9Bは、NTA分析により得た試料のビデオ画像を示しており、淡青色の点は、蛍光によって追跡された粒子を示している。

【図9C】図9Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図9D】図9Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図10A】図10は、NTAによって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有していない、大量の小さい微小粒子と、高い多分散指数とを示している。図10Aは、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

40

【図10B】図10Bは、NTA分析により得た試料のビデオ画像を示しており、淡青色の点は、蛍光によって追跡された粒子を示している。

【図10C】図10Cは、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図10D】図10Dは、微小粒子試料の粒径および相対強度を3Dプロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図11A】図11は、NTAによって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有していない、大量の小さい微小粒子と、非常に高い多分散指数とを示している。図11Aは、微小粒子試料の粒

50

径分布および濃度を示している。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、N T A 分析により得た試料のビデオ画像を示しており、赤い点は、追跡された粒子を示している。

【図 1 1 C】図 1 1 C は、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図 1 1 D】図 1 1 D は、微小粒子試料の粒径および相対強度を 3 D プロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図 1 2 A】図 1 2 は、N T A によって蛍光モードで分析された、水で処理した被検者の試料に関しており、当該試料は、大きい微小粒子の明確な分布を有していない、大量の小さい微小粒子と、非常に高い多分散指数とを示している。図 1 2 A は、微小粒子試料の粒径分布および濃度を示している。

10

【図 1 2 B】図 1 2 B は、N T A 分析により得た試料のビデオ画像を示しており、赤い点は、追跡された粒子を示している。

【図 1 2 C】図 1 2 C は、微小粒子試料の粒径および相対強度を示している。

【図 1 2 D】図 1 2 D は、微小粒子試料の粒径および相対強度を 3 D プロットで示しており、青が低い値、赤が高い値をそれぞれ示している。

【図 1 3 A】図 1 3 は、光散乱 N T A および蛍光 N T A による、水中と P B S 中とにおけるサイズ排除クロマトグラフィー後の微小粒子の定量結果を対比したまとめを示している。図 1 3 A は、P B S で調製して得られた結果を示している。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、水で調製して得られた結果を示している。

【図 1 4】図 1 4 は、未処理の U 8 7 細胞、5 - A L A で 4 時間処理した U 8 7 細胞、5 - A L A で 2 4 時間処理した U 8 7 細胞における P P I X 値を検出するためのフローサイトメトリー実験の結果を示している。

20

【図 1 5】図 1 5 は、癌由来の微小粒子中に C P O X が検出されたことを示すウエスタンプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

〔定義〕

本明細書において用いられる「5 - A L A」は、5 - アミノレブリン酸を指している。

【0023】

本明細書において用いられる「P P I X」は、プロトポルフィリン I X を指している。

30

【0024】

本明細書において用いられる「微小粒子」は、あらゆる種類の細胞から放出された任意の小胞を指しており、当該微小粒子として、例えば、エキソソーム、微小胞等が挙げられる。

【0025】

本明細書において用いられる「WHO グレード I I I または I V」は、WHO グレード I I I または I V の基準を満たす腫瘍として実際に等級付けされている腫瘍、または、WHO 基準の下で評価された場合に、WHO グレード I I I または I V の腫瘍であったと等級付けられたであろうと考えられる腫瘍を指している。

【0026】

40

〔概要〕

本開示は、腫瘍細胞の蛍光誘導による視覚化のために用いられる、選択的に固形腫瘍に局在するようになる癌治療薬を投与し、被検者から得た生体試料中の固形腫瘍由来の微小粒子と結合した、薬物代謝物または変換酵素を検出することによって、固形腫瘍を検出する方法に関する。

【0027】

より具体的には、本開示は、有効成分として 5 - アミノレブリン酸 ( 5 - A L A ) を有する医薬組成物を被検者に投与し、当該被検者から得た生体試料中の 5 - A L A が P P I X へ変換したレベルを検出することによって、WHO グレード I I I または I V の脳腫瘍を検出する方法、または、そのような腫瘍の再発を検出する方法に関する。

50

## 【0028】

また、本開示は、固形腫瘍に対する蛍光ガイド下手術の添加剤として用いられる内因性アミノ酸を高容量で投与し、被検者から得た生体試料中の固形腫瘍由来の微小粒子と結合した、代謝物または変換酵素を検出することによって、固形腫瘍を検出する方法に関する。

## 【0029】

また、本開示は、固形腫瘍に選択的に局在するようになる癌治療薬を投与し、被検者から得た生体試料中の固形腫瘍由来の微小粒子と結合した代謝物のレベルを検出し、当該代謝物のレベルに基づいて固形腫瘍中の癌治療薬のレベルを決定することにより、固形腫瘍を対象としたガン治療薬のレベルを測定する方法に関する。

10

## 【0030】

本開示は、5 - A L Aのポルフィリン代謝物であるP P I Xが選択的に脳腫瘍細胞に蓄積するという理解、および、P P I Xの細胞内濃度と均衡する濃度で、W H OグレードI I IおよびI Vの脳腫瘍から放出された微小粒子中にP P I Xが検出されるという新たな知見に少なくとも部分的に基づいている。

## 【0031】

〔固形腫瘍の検出方法〕

本明細書に記載の方法は、未分化星状細胞腫、多形性膠芽腫、未分化乏突起膠腫、未分化上衣腫、未分化乏突起星細胞腫、極性海綿芽細胞腫、星芽腫、または大脳膠腫症のようなW H OグレードI I IおよびI Vの脳腫瘍を検出する。

20

## 【0032】

W H OグレードI I IおよびI Vの脳腫瘍を被検者において検出するために、有効成分として5 - A L Aを有する医薬組成物を用いることができる。ここでいう被検者とは、この方法を用いてそのような腫瘍を検出することによる利点が、上記医薬組成物を投与することによって生じ得るいかなる有害な影響にも勝っている被検者であればいずれの被検者でもよい。いくつかの実施形態において、上記の被検者には、他の非侵襲的検出手段が適切でない脳腫瘍を示す症状、または、5 - A L Aを用いる検出が他の方法と比較してより高い感度を示す脳腫瘍を示す症状に苦しむ被検者が含まれる。

## 【0033】

ある実施形態では、上記医薬組成物が、少なくとも1つの脳腫瘍、場合によってはW H OグレードI I IまたはI Vの腫瘍の治療を以前に受けた被検者に対して投与される。これらの被検者は、以前に、外科手術、放射線療法、化学療法、それらの組み合わせ、または他の適した治療を受けていてもよい。本方法がグレードI I IまたはグレードI Vの腫瘍の治療を以前に受けていた被検者に対して用いられるという特別な場合には、本方法は腫瘍の再発を検出するために用いられる。

30

## 【0034】

また、本明細書に記載の方法は、区別されることが必要な組織、例えば、通常の組織よりも高い速度で5 - A L Aを代謝する、他の種類の脳腫瘍およびW H Oのあらゆるグレードの固形腫瘍を検出するためにも利用できる。特に、上記方法は、増殖性の高い腫瘍に用いてもよい。そのような腫瘍として、卵巣、乳房、膵臓、前立腺、肺、結腸、腎臓、および膀胱の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本明細書の実施形態のいくつかは脳腫瘍に関してのみ記載されているが、これらの実施形態は、他の固形腫瘍の検出に関しても存在すると理解されるべきである。

40

## 【0035】

〔他の方法〕

本明細書に記載の方法は、いずれも、腫瘍由来の微小胞と結合するP P I Xへの5 - A L Aの変換レベルを本明細書に記載の方法を用いて検出することによって、固形腫瘍の再発、固形腫瘍の体積、または固形腫瘍量の程度を評価するために用いることができる。

## 【0036】

〔有効成分として5 - アミノレブリン酸を有する医薬組成物〕

50

本明細書に開示された医薬組成物は、有効成分として5 - アミノレブリン酸 ( 5 - A L A ) を有している。医薬組成物中の5 - A L A の好ましい濃度の例として、1 m g / m L、3 m g / m L、5 m g / m L、10 m g / m L、15 m g / m L、20 m g / m L、25 m g / m L、30 m g / m L、35 m g / m L、40 m g / m L、45 m g / m L、50 m g / m L、55 m g / m L、および60 m g / m L が挙げられ、いずれも粉末状である。5 - A L A は、被検者への投与に適した形態であればいずれの形態であってもよく、例えば、遊離性粉末、液体で再構成される粉末、錠剤、またはカプセル等の形態である。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態において、5 - A L A は、本明細書に開示されている医薬組成物中の唯一の有効成分である。その他の実施形態では、上記組成物は、固形腫瘍細胞に特異的に局在するようになる5 - A L A の能力を高める他の有効成分、あるいは、自体固形腫瘍細胞に特異的に局在するようになる他の有効成分を含んでいる。

10

【 0 0 3 8 】

特に好ましい実施形態では、有効成分として5 - アミノレブリン酸を有する上記医薬組成物は、グリオラン<sup>TM</sup>であり、グリオラン中には、粉末状の5 - A L A が30 m g / m L の濃度で含まれている。

【 0 0 3 9 】

〔有効成分として5 - アミノレブリン酸を有する医薬組成物の投与〕

上記の医薬組成物は、重大な副作用を引き起こすものではないと共に、本明細書に記載の方法に適した時間の経過後に腫瘍のサイトゾルに十分に負荷されるように、被検者によって代謝され得る任意の投与量で被検者に投与してもよい。5 - A L A の投与量の例として、1 m g / m L、3 m g / m L、5 m g / k g、10 m g / k g、15 m g / k g、20 m g / k g、25 m g / k g、30 m g / k g、35 m g / k g、40 m g / k g、45 m g / k g、50 m g / k g、55 m g / k g、および60 m g / k g が挙げられる。

20

【 0 0 4 0 】

上記医薬組成物は、その利便性から経口投与することが好ましい。しかし、上記医薬組成物は、他の経路を介して、例えば、静脈内、くも膜下腔内、腫瘍内、または、手術中に洗浄液または注入液として嚢胞性空間内へ直接投与されるように製剤されてもよい。

【 0 0 4 1 】

腫瘍のサイトゾルが5 - A L A で負荷されて微小粒子を放出し始めるように、上記医薬組成物は、微小粒子と結合する5 - A L A を検出するための所望の時間が経過する前に、十分に投与される。微小粒子中の5 - A L A の含有量が腫瘍のサイトゾル中の5 - A L A と平衡状態となるのに十分なくらい前に、上記医薬組成物を投与することが好ましい。例えば、微小粒子と結合した5 - A L A が検出される、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、24時間、または48時間前に、上記医薬組成物を投与してもよい。検出の2 ~ 4時間前に5 - A L A を投与することが最も好ましく、4時間前がさらに好ましい。

30

【 0 0 4 2 】

〔生体試料〕

本明細書に記載された方法において用いられる生体試料としては、5 - A L A の検出を可能とするのに十分な量の固形腫瘍由来の微小粒子を含む任意の生体試料が挙げられる。上記試料は、全血、血清、または血漿であることが好ましい。いくつかの実施形態において、上記生体試料は、血清、尿、涙、母乳、リンパ液、滑液、気管支肺胞洗浄液、羊水、唾液、眼液、腹水、または呼吸器飛沫である。

40

【 0 0 4 3 】

〔固形腫瘍由来微小粒子と結合した5 - アミノレブリン酸のP P I X への変換レベルの検出〕

固形腫瘍由来微小粒子と結合した5 - アミノレブリン酸のP P I X への変換レベルは、当業者に公知の任意の方法を用いて検出する。

【 0 0 4 4 】

50

< 微小粒子の分離 >

これらの方法における最初のステップは、当業者に公知の標準的な方法を用いて全種類の組織に由来する微小粒子を分離することを含んでいてもよく、結果として特定のアイデンティティ・マーカー（例えば、アネキシン）で微小粒子が分離されることになる。上記の標準的な方法として、超遠心分離、ショ糖勾配、親和性精製、濾過、ゲル濾過、または親和性捕捉が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 4 5 】

上記の方法の次のステップは、組織特異的微小粒子集団の分離であってもよい。

【 0 0 4 6 】

脳由来の微小粒子が必要であると共に、生体試料に脳由来微小粒子のみが含まれると予想される場合、特異的に脳に由来する微小粒子を分離または特定するために特定のステップを行う必要はない。しかし、5 - A L A は脳以外の組織と結合するので、生体試料が非脳組織由来の微小粒子を含む可能性がある場合、本方法は、脳由来の微小粒子を分離または特定するステップを含むべきである。脳特異的腫瘍マーカーの例として、E G F R v i i i、テネイシン - C が挙げられる。代替的な方法には、微小粒子源としての他の組織を排除するために、他の細胞種に見られる他の抗体 - 抗原を用いる方法が含まれる。骨髄細胞と、脳と、内皮細胞とからそれぞれ発生した微小粒子間の区別をするために、例えば、R G D インテグリン（アルファ V ベータ 3）およびグリコフォリン A モノクローナルを用いてもよい。例えば、グリコフォリンを有する微小粒子は、骨髄に由来している。

【 0 0 4 7 】

< 5 - A L A の P P I X への変換の検出 >

腫瘍由来の微小粒子を分離した後、これらの微小粒子と結合する 5 - A L A の P P I X への変換レベルを様々な方法によって測定することができる。かかる方法の一例は、5 - A L A の代謝の結果生じる P P I X が検出される。この方法は、P P I X の蛍光を検出することによって行うことができる。青色光（波長 4 0 0 ~ 4 1 0 n m）で励起すると、P P I X は赤紫光を発する。蛍光は、ナノ粒子トラッキング解析において検出されてもよい。ナノ粒子トラッキング解析は、例えば、N T A 分析法（Nanosight Ltd, Wiltshire, UK）を用いて行うことができる。これにより、微小粒子の総数が直接測定され、定量される。

【 0 0 4 8 】

他の方法によれば、5 - A L A を P P I X へ変換する酵素の検出が行われる。当該酵素としては、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、A L A デヒドラターゼ、P B G デアミナーゼ、ウロポルフィリノーゲン I I I シンターゼ、ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼ、およびコプロポルフィリノーゲン I I I オキシダーゼ（C P O X）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに他の方法によれば、変換経路における主要な代謝物または中間体を検出する。主要な代謝物または中間体としては、ポルホピリノーゲン（P B G）、ヒドロキシメチルピラン、ウロポルフィリノーゲン I I I、コプロポルフィリノーゲン I I I、またはプロトポルフィリノーゲンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 4 9 】

〔実施例〕

〔実施例 1 : 5 - A L A を投与された G B M 患者からの血液由来の微小粒子の検出および評価〕

本実施例では、経口投与後の小分子薬物の検出を実施する。上記薬物は腫瘍細胞に吸収され、酵素的に変換され、そして投与から数時間以内に循環する微小粒子に再流入される。さらに、上記の腫瘍細胞中での小分子薬物の酵素的な変換は、蛍光によって、血液由来の微小粒子から検出可能であった。

【 0 0 5 0 】

この研究の目的は、( i ) グリオラン<sup>T M</sup> を経口投与された膠芽腫（G B M）患者の血清から採取したナノメートル径の微小粒子を分離し、( i i ) 2 つの異なる分離方法（d

10

20

30

40

50

d H<sub>2</sub> OおよびPBSに基づくクロマトグラフィー)を用いて微小粒子の数を定量し、および、(iii) UVレーザーで励起した時、これらの微小粒子が、検出可能なレベルの内因性蛍光を含んでいるか否かを判断することである。

#### 【0051】

グリオラン(登録商標)(5-アミノレブリン酸塩酸塩)は、現在、神経膠腫(WHOグレードIIIおよびIV)の手術中に、悪性組織を可視化するためにヨーロッパで認可されている。当該剤は、現在、腫瘍の切除を最大にするために、蛍光ガイド下手術の添加剤として研究されている。本研究は、腫瘍由来の微小粒子を内因的に標識化、追跡、および定量するための新規な手段として、グリオラン(登録商標)で負荷された腫瘍が、5-ALA由来の蛍光物質を含む循環微小粒子を放出することが可能であるか否かを明らかにするために行われた。

10

#### 【0052】

グリオラン(登録商標)(20mg/kg)の経口投与前、および、経口投与後48時間までの異なる時点で、手術中のGBM患者(n=19、口腔腫瘍選択性、手術結果向上)から血清試料を収集した。ゲル濾過によって微小粒子を分離し、微小粒子の粒径/数、およびタンパク質含有量について、ナノ粒子トラッキング解析(NTA)およびBCAを用いて評価した。微小粒子からの内因性蛍光を、NTAを用いて蛍光検出モード(ex=405nm、em>430nm)にて評価した。その結果は、微小粒子(モード直径:50~100nm)が、血清(タンパク質含有量=血清に対して283.5+47μg/ml)1mLに対して、約10<sup>11</sup>粒子/mLの濃度で含まれることを示している。粒径(約20nm~約200nm)に基づいた多数の微小粒子の表現型が、蛍光モード下で観察された。これは、放出された微小粒子の少なくとも2つの主な集団の生合成中にサイトゾル蛍光物質が捕捉されることを示している。グリオラン(登録商標)を投与されたGBM患者からの微小粒子は、投与後に全微小粒子数のごく一部(約0.1%)で観察された蛍光種を含んでいる。このことは、放出された微小粒子と共に細胞サイトゾルが循環する可能性があることを示唆している。これらの結果は、4~48時間で定量化できる。

20

#### 【0053】

この実施例は、経口投与後の小分子薬物が、腫瘍細胞によって吸収され、酵素的に変換され、そして投与から数時間以内に循環微小粒子に再流入可能であるということを初めて証明した。このように腫瘍の機能を直接測定することによって、この新規の「液体生検」手法に関する多様な治療および薬剤開発の提供が可能となる。

30

〔材料および方法の概要〕

<微小粒子の分離>

2つの医療センターで手術中のGBM患者からの凍結された血清試料を受領した。これらの血清試料は、グリオラン(登録商標)(5-アミノレブリン酸、5-ALA)を経口投与する直前、および、投与後の異なる時点で採取された。

#### 【0054】

2%アガロース(アガロース2B、ABT、www.abtbeads.com)を固定相とし、ddH<sub>2</sub>OまたはpH7.4のPBSを移動相とするサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、コントロール(「健常」なAB血清、Sigma Aldrich, St. Louis, MO)、および、患者の血清または血漿試料から微小粒子を分離した。カラムを、100mLの40%v/vのアガローススラリーのddH<sub>2</sub>O溶液を入れたバイオラッドエコノカラム(2.5cmID×10cm)に装填した。その結果、最終装填ベッドボリュームが約40mLのカラムが得られ、当該カラムを4で一晩おいて平衡状態にした。実験日にカラムを平衡状態にするために、当該カラムを300mLの移動相で洗浄した。ベッドボリュームへの装填試料は、1~2.5%v/vの間で変動したが、これはサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の製造業者の指示書の範囲(<5%v/v)に十分入っている。

40

#### 【0055】

血清試料、血漿試料、および微小粒子試料は、実施可能な範囲でできるだけ暗い周囲条件下で処理した。微小粒子を回収し、アンバーエッペンドルフチューブ内に保存した。カ

50

ラムの空隙（除外）容量（約 10 mL：微小粒子が溶出すると考えられる）と、カラムの保持（充填）容量（約 40 mL）とを明確にするために、タンパク質スタンダードとブルーデキストリンとの混合物を用いた。

【0056】

Frac 950 フラクションコレクターを備えた GE AKTA Purifier 10 システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用いて、試料の  $A_{280}$  と、試料の伝導率をモニターしながら、2 mL / 分の流速で希釈剤を流して、室温で試料を処理した。2 mL / 分の流速と 30 秒の収集周期性とを用いて、1 mL の溶出試料を得た。

【0057】

研究用試料またはヒトの健常コントロール群 (A B 血清、Sigma Aldrich) からのいずれかの血清は、 $A_{280}$  でモニターした時、保持容量が約 10 mL と約 40 mL の 2 つの部分的な分離されたピーク (# 1 および # 2) をもたらした。複数の供血者の部位からの血清は、同様の溶出プロファイルをもたらした。試料中の伝導率の大部分は、2% アガロースサイズ排除カラムから溶出された時に、イオン、電荷を有するアミノ酸 / ペプチド、および他の低分子量種の物であると予想されるように、2 つのピークのうちの後者 (溶出量が約 40 mL) に関連していた。このパラメーターは、第 2 のピーク (ピーク # 2) の始まりを区分するために使用した。

【0058】

その高い分子量を考慮すると、微小粒子は、アガロースカラムの空隙（除外）容量 (ピーク # 1) に溶出する。ピーク # 1 の吸光度  $A_{280}$  と関連する第 1 の  $7 \times 1$  mL 分画を収集、貯留し、次の処理のために  $7 \times 1$  mL のアリコートに分けて、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。全タンパク質および微小粒子含有量について、研究セットにおける各試料に関しピーク # 1 から得た 1 ミリの分画を分析した (下記参照)。

【0059】

< 微小粒子のタンパク質含有量 >

標準曲線を作成するために、BSA を用いて、製造業者の指示書に従って、サーモサイエンティフィックマイクロピシニコニン酸タンパク質アッセイ (Thermo Scientific Micro bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay) を用いて、微小粒子の調合液における総タンパク質濃度を定量した。

【0060】

< 微小粒子含有量および粒径分布 >

ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) 法 (Nanosight, LM 10 system, NanoSight Ltd. Wiltshire, UK) を用いて、平均流体力学的直径が 50 ~ 500 nm の微小粒子を定量した。この確率的な単一粒子検出方法は、個々の粒子からの光の散乱に基づいて、平均 (時間平均、視野) 粒子数、および粒子の予想流体力学的直径を測定するために、ストークス・アインシュタインの関係を用いる。さらなる詳細については、www.nanosight.com、Dragovic らの文献 (2011)、および、それらの参考文献から入手可能である。

【0061】

50 ~ 400 nm の標準ビーズを用いて計器を校正および検定した。システムを校正するために 100 nm のビーズに対して実験をした。標準ビーズ (直径: 100 nm) は、室温で、低粘度 (約 1 cP) 水溶液中で約 97 ( $\pm 2$ ) nm の実験直径をもたらした。測定対象である微小粒子は、50 ~ 150 nm の平均流体力学的直径を有すると予想される。

【0062】

例えば、1 フレームごとの対象粒子、データ収集期間; PMT 電圧、識別設定等についての製造業者の指示書を利用してすべての測定を実施した (www.nanosight.com、および標準的な計器設定の詳細については、Dragovic et al., (2011) (ナノ粒子トラッキング解析を用いた細胞小胞の粒径および表現型) Nanomedicine: NBM 2011;7:780-788, doi:10.1016/j.nano.2011.04.003)。

【0063】

10

20

30

40

50

標準的な蛍光の読取工程（60秒）の間に、光安定性が高い蛍光物質のみが観察される。これは、蛍光粒子は、少しでもあるとすれば、総収集期間の大部分にわたって発光領域に存在しているためである。したがって、観察細胞中を一定の低流速で移動する試料から収集した蛍光から得られたデータを分析するLM10NTA解析ソフトウェアの改良版が用いられた。各分析測定を3回繰り返して各試料を分析した。

【0064】

〔結果〕

<微小粒子の分離>

ABコントロール血清：移動相としてddH<sub>2</sub>Oを用いた場合、装填されたABコントロール血清試料は、2つの部分的に分離されたA<sub>280</sub>nmのピークと、ほぼ例外なく第2溶出ピーク（Vpeak約40mL、図1A）と相関する伝導率の測定可能な溶出（イオン、電荷を有するペプチド/代謝物等によると考えられる）とをもたらした。これとは対照的に、伝導率は、ピーク#1（Vpeak約10mL）と関連していなかった。これは、高い分子量を有する対象の微小粒子が含まれているためであると考えられる。

10

【0065】

移動相として（100%v/v）PBSを用いた場合、ピーク#2に対するピーク#1の相対的なA<sub>280</sub>のピークの高さが、移動相としてddH<sub>2</sub>Oを用いて観察された高さと比較して大きく減少した（約90%）（図1B）。ピーク#2に関連する伝導率は、PBSの基線から約17mS/cmほど一時的に減少したが、これはピーク#2のピーク伝導率（<<17mS/cm）と一致する。

20

【0066】

GBM患者の血清：それほど目立たないが同様の効果が、臨床のGBM患者から得た血清を用いた場合に観察された（図2A～2C参照）。この特定の患者については、ピーク#1のA<sub>280</sub>は、ddH<sub>2</sub>O中の約2000mAUから、10%PBS中の約1000mAU、及び、100%PBS中の約800mAUにそれぞれ減少した。同等に、ピーク#2のA<sub>280</sub>は、約1500mAUから、約1900mAU、および、約200mAUにそれぞれ増加した。また、伝導率のプロファイルは条件に応じて予想通りに変化した。

【0067】

6人の患者の試料を使用して、0.5mLの血清を用いて、上述したようにddH<sub>2</sub>OおよびPBS中で微小粒子を分離し、その後、（図1A、1B、図2A～2Cに記載されているように）ピーク#1に含まれる（7つのうちの）1つのアリコートタンパク質濃度を測定した。結果を表1に示す。これらの6人の患者の総タンパク質濃度は、水中で約200～300μg/mLの範囲であり、PBS中で約5～10μg/mLの範囲であった。

30

【0068】

【表 1】

0. 5 mLの血清のサイズ排除クロマトグラフィーからの微小粒子タンパク質の分離

試料 ID	タンパク質 (μg/mL)		タンパク質比率 (PBS/ddH <sub>2</sub> O) (x100)
	ddH <sub>2</sub> O	PBS	
E43 / E41	218.9	5.1	2.3
E44 / E35	346.8	5.9	1.7
E45 / E38	270.6	3.9	1.4
E46 / E39	258.3	9.6	3.7
E53 / E31	328.5	12	3.7
E54 / E32	277.9	7.7	2.8
平均	283.5	7.4	2.6
中央値	274.3	6.8	2.6
SD	47.0	3.0	1.0

10

## 【0069】

20

分離処理において2つの移動相を比較した場合、10%のPBS、または漸次的に、100% v/vのPBSの移動相と比較して、試料が水の移動相に溶出したときに、コントロール試料と患者の試料の両方に対して高いUV吸光度が観測された。GBM患者から得た微小粒子（ピークでプールされた7 mLのうちの）1 mL中の総タンパク質濃度は、水と共に溶出した時は約200~300 μg/mL（元の血清中においては約5 mg/mL）であり、PBSで溶出した時は5~10 μg/mL（元の血清中においては約100~200 μg/mL）であった。ピーク#1中に検出された分子源または超分子源（例えば、「エクソソーム」、他の高MW粒子等）は、現在のデータからは決定できない。これらのデータは、空隙容量中に溶出している全ての微小粒子源から得られる総タンパク質の加重平均を示している。

30

## 【0070】

<微小粒子の定量>

クロマトグラフィー分離のピーク#1から得た微小粒子の定量（図1A、1B、図2A~2C参照）を、NTA解析法（Nanosight Ltd, Wiltshire, UK）を用いて行った。

## 【0071】

図3A~3Dに標準的なナノサイト（Nanosight）NTA分析結果を示す。この報告書には、粒子/粒径分布（左上）、試料のビデオ画像（右上）、強度に対する粒径（両下）が含まれている。分析前に、概して、1000倍に試料を希釈した。

## 【0072】

<微小粒子の定量に与える水およびPBSの影響>

40

（図2A~2Cにおいて参照された）2つの微小粒子試料については、3つの条件下（水、10% PBS、及び100% PBS）で分離した場合の総微小粒子数を、光散乱によりNTAを用いて定量した（表2参照）。

## 【0073】

希釈係数：次のことに注意すること：1 mLの装填血清から得た高分子重量分画は、クロマトグラフィー中に、7~10倍に希釈されると推定される（0.5 mLの装填血清では15~20倍に希釈される）。したがって、表2に示される貯留された微小粒子分画における総粒子数は、約 $3 \times 10^{11}$  / mLであるのに対し、元の血清ごとの概算粒子数は、約 $2 \times 10^{12}$  / mLと概算される。「LS」は、光散乱検出モードを指し、「FL」は蛍光検出モードを指している。

50

## 【 0 0 7 4 】

## 【表 2】

サイズ排除クロマトグラフィー後のNTAを介した微小粒子の定量

モード	ID	パラメーター	水 (平均)	0.1X PBS (平均)	1X PBS (平均)
LS	ミュンスター 150 (Munster150)	粒子数 ( $\times 10^{11}$ /mL)	3.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0
		モードサイズ (nm)	68.7 ± 8.1	105 ± 47.3	129 ± 6.1
		多分散指数	3.9 ± 0.3	4.1 ± 0.7	3.5 ± 0.1
LS	ミュンスター 151	粒子数 ( $\times 10^{11}$ /mL)	3.4 ± 0.4	0.4 ± 0	0.4 ± 0.0
		モードサイズ (nm)	74.3 ± 10.7	64.7 ± 5.7	145 ± 29.1
		多分散指数	4 ± 0.5	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2
FL	ミュンスター 150	粒子数 ( $\times 10^8$ /mL)	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0	0.8 ± 0.1
		モードサイズ (nm)	17 ± 3.5	13.3 ± 3.2	21.3 ± 9.8
		多分散指数	33.5 ± 1.9	29.9 ± 9	13.5 ± 4.6
FL	ミュンスター 151	粒子数 ( $\times 10^8$ /mL)	1.5 ± 1.5	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.3
		モードサイズ (nm)	13.3 ± 0.6	43.7 ± 54	14.3 ± 2.5
		多分散指数	25.4 ± 6.2	7.4 ± 1.3	16.1 ± 4.3

10

20

## 【 0 0 7 5 】

NTA法は、定義上は、単一粒子解析法であるため、あらゆる確率的測定に関連する長所および制限を有している。測定時間(30~60秒)は、データ量の管理と、全体としての試料集団を表すデータ精度の追及との間の実際的な折衷案として選択された。必然的に、少数の大きい(それゆえ比較的静止している)粒子が、視野におけるその滞留時間と、光散乱特性との両方に基づいて、統計に影響を与え得る。集団レベルで、NTAは、粒径分布分析を提供する。この粒径分布分析から、粒径分布に対する粒子数を要約するために、平均、モード、中央値、および他の統計パラメーターが定義されてもよい。本研究において、粒径分布に対する粒子数を表すために使用したアルゴリズムは、D90/D10インデックスであった。このインデックスは、粒子のうち最も大きい10%の粒子を含んでいる粒子直径と、最も小さい10%の粒子を含んでいる直径との比率である。D90/D10の比率は、「多分散指数」である。同一の流体力学的直径を有する粒子の完全に均質な集団は、多分散指数1.0を有する。多分散指数は、多分散の適用可能な唯一の測定方法であり、完全な粒径分布曲線の代わりとして容易に利用可能であるものと考えられる(図3A)。

30

## 【 0 0 7 6 】

PCS、FCSまたはFIDAのような、あらゆる単一粒子検出/確率論的な技術(と同様に、フレーム/視野ごとに測定された事象の最適値がある。試料は、時間平均で1視野につき約50粒子をもたらすよう希釈された(光散乱を介して総粒子数を測定する時、微小粒子試料を概して200~2000倍希釈することになる)。したがって、微小粒子数は、およそ1視野において約 $10^8$ /mLであり、それゆえ、微小粒子試料の希釈前は約 $10^{11}$ /mLであった。

40

## 【 0 0 7 7 】

表2は、光散乱(LS)モードで測定した場合、水中(約 $3 \times 10^{11}$  mL<sup>-1</sup>)において1mLの血清のクロマトグラフィーを行った時、PBS(約 $0.3 \times 10^{11}$  mL<sup>-1</sup>)と比較して、試料において検出された微小粒子が約1/10に減少したことを示している。A<sub>280</sub>の値(図2A~2C)と整合して、純水と、10%v/vPBSとの間に最大の差が観察され、10%PBSと100%PBSとの間にわずかな差が観察された。

50

PBS中で分離された試料についてはモード粒子径が増加しているように見える。但し、この差は大きなものではなく、 $D_{90}/D_{10}$ の多分散指数は大きく変化していない(3.5~4.1の範囲)。

【0078】

それにもかかわらず、表2から、図2A~2Cにおいて観察される $A_{280}$ のピークの減少は、光散乱モード下でNTAによって測定した場合に、50~150nmの流体力学的直径を有する微小粒子の対応する減少に関連するという結論に至る。

【0079】

微小粒子数は、分子の組成または細胞源と関係なく、15~500nmの流体力学的直径を有する光(又は蛍光、下記参照)を散乱する微小粒子の数として、運用上定義されている。

10

【0080】

<微小粒子の定量およびタンパク質濃度に対する水およびPBSの影響>

GBM患者から得た、他の一連の6つの0.5mLの血清試料に対して、10%PBSを除外した以外は表2に類似した実験を行った(表3)。この表には、総タンパク質含有量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )に対する微小粒子数/mL(光散乱下)の比率が含まれている。この比率の単位は $\text{ug}^{-1}(\times 10^8)$ である。

【0081】

6つの試料のすべてについて、光散乱NTAによって測定した場合、水中における微小粒子の分離が、4~5倍高い微小粒子数をもたらした(約10倍高い-表2)。しかし、PBS中で微小粒子を分離した場合、タンパク質の濃度は1/40~50に低下するため(表6)、粒子数/タンパク質( $\mu\text{g}$ )の比率は、PBS中において、約10倍高くなる。

20

【0082】

この差の分子的機序はすぐに明らかになるものではない。しかし、既に説明したように、また、下記に記載するように、測定した微小粒子は、「細胞エクソソーム」に加えて、脂質、タンパク脂質、および他の構成要素から寄与を受けている可能性がある。これらの種のいくつか、またはすべては、pH、イオン強度、または、特定の塩の相互作用によってかなり影響される可溶性および凝集特性を有している可能性がある。上記のpH、イオン強度、または、特定の塩の相互作用は、水、10%PBS、およびPBSの間で顕著に相違し得るので、サイズ排除クロマトグラフィー、および、その後のNTA測定に関するそれらの特性に影響を与え得る。

30

【0083】

【表 3】

0. 5 mL の血清のサイズ排除クロマトグラフィーから得た微小粒子タンパク質の分離

試料 ID	微小粒子数 ( $\times 10^{10}/\text{mL}$ )		微小粒子 数比率 (PBS/ $\text{H}_2\text{O}$ )	微小粒子/タン パク質 ( $\mu\text{g}^{-1} \times 10^8$ )		微小粒子/タン パク質比率 (PBS/ $\text{H}_2\text{O}$ )
	ddH <sub>2</sub> O	PBS		ddH <sub>2</sub> O	PBS	
E43 / E41	7.6 $\pm$ 1.2	1.5 $\pm$ 0.2	0.20	3.5	29.4	8.4
E44 / E35	8.6 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.0	0.24	2.5	35.6	14.2
E45 / E38	9.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	0.12	3.5	28.2	8.1
E46 / E39	8.5 $\pm$ 1.7	2.9 $\pm$ 0.2	0.34	3.3	30.2	9.2
E53 / E31	10.3 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.2	0.24	3.1	20.8	6.7
E54 / E32	8.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	0.24	3.2	27.3	8.5
平均	8.9	2.0	0.23	3.2	28.6	9.2
SD	0.9	0.7	0.07	0.4	4.8	2.6

10

## 【0084】

LM10NTA 計器およびソフトウェアは、2つのモード（帯域フィルターを有さないモード（光散乱モード）、あるいは帯域フィルターまたは他の干渉フィルターを備えたモード（蛍光モード））で駆動させることができる。現在の計器の構成では、試料観察チャンバとCCD検出器との間にカットオンフィルターが備えられている。このフィルターは、約430nm未満の波長で低透過率を示すと共に、約430nmより高い波長で高透過率を示すような光学的性質を有している（しかしながら、低透過率から高透過率への遷移は、正確に丁度430nmで生じるわけではない）。

20

## 【0085】

それにもかかわらず、光路に設けられたカットオンフィルターを有する蛍光モードで、約 $10^8 \text{ mL}^{-1}$ の濃度で100nmの蛍光微小球を容易に検出することができ、室温で測定した場合、概して、約95~105nmの流体力学的直径がもたらされた。典型的な蛍光粒子分布分析の概要を図4A~4Cに示す。このようにして、我々は、約 $10^8$ 粒子/mLの濃度で、ストークスシフトが大きく、光安定性が良く、しかも量子収量/消衰係数が高いナノメートルサイズの外因性蛍光物質を容易に検出および定量することができるという結論に至った。

30

## 【0086】

<GBM患者における蛍光微小球の検出>

示されているように、サイズ排除クロマトグラフィー用の移動相として水（図13B）、またはPBS（図13A）を用いて、GBM患者から分離した微小粒子であって、標識化されていない微小粒子に関する同様の実験を行った場合に得られたデータを図13にまとめた。405nmのレーザー（以下「蛍光」と称す）で試料を励起した後に430nmのカットオンフィルターを透過し、CCDによって検出された光は、外因的に標識化されていないので、微小粒子内の内因性の蛍光物質からのみ発生するという事実を我々は重要視している（Dragovic et al. (2011)と比較）。

40

## 【0087】

これらの実験において、我々は、（散乱）総粒子数（約 $10^{10}/\text{mL}$ ）と比較して非常に低濃度（約 $10^8/\text{mL}$ ）であるにもかかわらず、試料中に蛍光微小粒子と見られるものを観察した。したがって、微小粒子試料を分析した結果、それらはクロマトグラフィー法によって得られたアリコートから予め希釈されたものではなかった（「純微小粒子」とも称される）。

## 【0088】

50

次に、長時間の間に光退色したと見られる明らかな蛍光を観察したので、流速に基づいた測定を行った。それによって、微小粒子の新しい（「光退色していない」）アリコートで視野を「満たす」ために、低速（nL/分）で試料をフローセルに注入し、そして該フローセルから試料を取り出した。試料流速を制御し確認するNTA分析ソフトウェアを使用した。最後に、これらの実験で用いた計器の光路は、視野において干渉した。この干渉は、この影響を除去するために分析法の変更を必要とした。このことによって、得られたデータの質が必然的に損なわれた。3つの主な手順および光散乱方法に対する計器変更によって、表13に示すデータを得た。

【0089】

〔考察〕

蛍光測定に関して図13に示すモードサイズ、粒子数、および多分散指数（D90/D10）の計算は、光散乱について用いたものと同一であり、NTA分析ソフトウェアから得られたものであることに注目することは重要である。

【0090】

具体的には、このレポートのデータについて、NTA分析法ソフトウェアは、ゲーティングなしに、最も多い粒径（モードサイズ）および粒子数を選択する。多くの試料について、比較的狭い分布内に、多くの小さな粒子（15～30nm）が観察された。それゆえ、上記の粒子は、一般に、モード（最も一般的な）粒径として表される。このモード粒径を割り出すための自動分析は、多くの試料に存在する、より大きい（50～500nm）微小粒子を確認するものではない。小さい蛍光粒子および大きい蛍光粒子が広範囲であることは、高D90/D10多分散指数（多くの試料において10よりも大きい）に反映されている。PBS中で調製された試料については、2つの粒子集団のうち大きい方がモード値である場合がある。したがって、その場合、自動分析は、この粒径範囲を自動値として選択する。

【0091】

現在用いられている自動分析の制限の結果、手動で各蛍光集団ファイルを再検討し、その粒径分布に従って、それらを定性的に4つの容器に分類した（表6；実施例1の末尾のデータ付録）。実施例XPSの結果、およびデータ記述をデータ付録にまとめた。

【0092】

〔データのまとめ〕

50～100nmのモード流体力学的直径を有する微小粒子を、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分離し、ナノ粒子トラッキング解析（NTA）を用いて微小粒子の粒径/数を特徴づけ、BCAを用いてタンパク質含有量を特徴づけた。移動相として、ddH<sub>2</sub>O、またはpH7.4のPBSのいずれかを用いてクロマトグラフィーによって微小粒子を得た。また、このようにして得られた微小粒子中の内因性蛍光を、蛍光検出モード（ $e_x = 405 \text{ nm}$ 、 $e_m > 430 \text{ nm}$ ）で、NTAを用いて評価した。

【0093】

これらの結果は、光散乱によって測定した50～100nmのモード直径を有する微小粒子が、ddH<sub>2</sub>O中でクロマトグラフィーを用いて分離した場合、約 $10^{12}$ 粒子/mLの血清濃度でGBM患者の血清に存在することを示している。しかしながら、PBS中でサイズ排除クロマトグラフィーを行った場合、水中における場合と比較して、モードサイズが著しく少ない（4～10倍少ない）微小粒子が得られた。さらに、PBS中で分離された微小粒子は、水中で分離された微小粒子と比較して、より少ないタンパク質含有量を有すると思われる。この差異の根拠はすぐに明らかになるものではない。

【0094】

ほぼこれらの寸法（約15～500+nmの不均一性の高い見かけの粒径分布であるにもかかわらず）の微小粒子が、蛍光モード下で観測されている。このことは、405nmで励起された時、これらの微小粒子が、430nmより高い波長の蛍光を有する内因性蛍光物質を含有することを意味している。これらの蛍光微小粒子の数は、光散乱によって測定した微小粒子総数の1%より遥かに小さいと思われる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

結論として、グリオラン / 5 - A L A を経口投与された G B M 患者の血清から調製した微小粒子は、サイズ排除クロマトグラフィーによって分離された場合、投与から約 4 ~ 4 8 時間後に、定量可能な、微小粒子の総数のうちのごく少数 ( < < 1 % ) に観測される内因性の蛍光物質を含有している。

## 【 0 0 9 6 】

表 4 は、血清から分離された微小粒子から示されたデータのまとめの概略を示している。N T A 分析によって評価された微小粒子の量、それらの粒径、および蛍光の範囲が示されている。

## 【 0 0 9 7 】

## 【表 4】

血清微小粒子データのまとめ

	光散乱	蛍光モード	注
粒子数 (手術前)	$5.6 + 0.3 (x 10^{10}/ml)$	$3.3 + 0.7 (x 10^8/ml)$	N= 19 (p < 0.01)
モードサイズ (nm)	56 +/- 21	46.5 +/- 10	
4 時間	$1.4 x 10^{10}/ml$	$0.8 x 10^8/ml$	$0.8 x 10^8/ml$ で 7 時間
古典的な S E C の緩衝剤数 (x $10^8$ ) (N=18) 手術前	$2.04 x 10^{10}/ml$	$1.2 x 10^8/ml$	総計の 1%未満 (p < 0.01)

## 【 0 0 9 8 】

〔実施例 1 の物質および方法の詳細〕

< 物質 >

A B 血清 (血液型が A B 型であるグループの供血者から得たヒトの血清) : S i g m a A l d r i c h , S t . L o u i s , M O

バイオラッド、エコノカラム ( B i o - R a d E c o n o m C o l u m n ) クロマトグラフィーカラム ( 2 . 5 c m I D x 1 0 c m )

マイクロ B C A タンパク質アッセイキット (サーモサイエンティフィック ( T h e r m o S c i e n t i f i c ) )

P S ビーズ : 1 0 0 n m のポリスチレンビーズ

2 % 架橋アガロース ( A B T , w w w . a b t b e a d s . c o m , F l o r i d a , U S A )

P B S : リン酸緩衝生理食塩水 ( p H : 7 . 4 )

G E A K T A P u r i f i e r 1 0 、 および F R A C 9 5 0 システム ( G E H e a l t h c a r e ) , P i s c a t a w a y , N J )

< サイズ排除クロマトグラフィーパラメーター >

## 【 0 0 9 9 】

10

20

30

【表 5】

システム	パラメーター	設定
GE Health car AKTA Purifier 10 と組 合わせたバイオラッド エコノカラムクロマ トグラフィーカラム	ステップ 1 : 洗浄段階	300 mL
	ステップ 2 : 試料の装填	0.4 ~ 1 mL の血清 / 血漿
	ステップ 3 : 洗浄	重力によって完全に廃液 するために 1 mL で洗浄
	ステップ 4 : 洗浄	重力によって完全に廃液 するために 1 mL で洗浄
	ステップ 5 : 洗浄	3 mL 付加
	ステップ 6 : 定組成溶出	30 分間で 2 mL / 分、 収集周期 : 0.5 分
UV 吸光度	UV 吸光度の収集	280 nm (AU)
伝導率	伝導率	S / m
Frac 950 フラ クションコレクター	分画の収集 (定組成溶出ス テップの間のみ)	30 分間で 1 mL の分画を 収集 ; 合計 60 分画を収 集

10

## 【0100】

## &lt; 臨床試料 &gt;

血清の研究試料は、ミュンスター (ドイツ) のスポンサー、および米国のエモリー (Emory) 大学から提供され、約 1 ~ 2 mL のアリコートにおいてドライアイスで凍結された状態で、DHMRI で受領した。室温 (約 22 °C) で作業台上で一旦解凍し、下記に記載のように、微小粒子を分離するために 0.4 ~ 1 mL のアリコートを処理した。残った試料があれば再び凍結させ、-80 °C で保管した。

20

## 【0101】

## &lt; 蛍光 NTA XPS の結果 &gt;

図 5 ~ 12 において、粒子数 (n) は、NTA ソフトウェアによって直接的に生成された。つまり、粒径分布範囲にわたって全粒子が均等にカウントされるように、ゲーティングが適用されなかった。モード (nm) は、NTA ソフトウェアによって直接的に生成され、最も一般的なサイズを指している。平均 (nm) は NTA ソフトウェアによって直接的に生成され、全値の平均値を指している。D90 / D10 は、NTA ソフトウェアによって得られた値から計算され、試料の幅 / 分散性の程度を指している。定性的ピークは、ソフトウェアがバイモーダル分布を検出した場合に、どこに第 2 の「大きい」ピークが生じるかに関する定性的評価を指している。「カテゴリー」は、主観的に選択された 4 つのカテゴリー (または特徴) の (A ~ D の) うちの 1 つを指している。

30

## 【0102】

## 〔データ付録〕

この付録は、上記の結果および考察の項目で言及された表 6 を含んでいる。

## 【0103】

【表 6】

粒径分布分類を行った、蛍光NTAによる、PBS対水におけるサイズ排除クロマトグラフ  
フィー後の微小粒子の定量

DHMRI ID	粒子数 (n) (x10 <sup>8</sup> /mL)	D90/D10 比 率	モード (nm)	平均 (nm)	定性的ピーク (nm)	分類
Pre-E3	4.43	2.7	267	261	267	A (優位を占める大きい粒子)
E54	1.66	19.5	25	243	180	B (大きい粒子と小さい粒子が混合した集団)
	0.88	14.4	17	334	250	B
	0.98	10.7	20	342	250	B
E53	1.00	16.8	18	262	200	B
	1.44	18.3	20	245	200	B
	1.02	14.4	24	373	250	B
E52	0.43	17.2	12	292	192	B
	0.48	19.8	13	329	250	B
	0.51	12.2	13	304	200	B
E51	0.46	6.2	14	208	191	B
	0.52	17.2	17	181	150	B
	0.37	12.3	9	186	125	B
E50	0.46	3.1	15	22	15	C (優位を占める小さい粒子)
	0.61	13.8	14	71	50	C
	0.29	14	11	178	150	B
E49	0.25	4.6	13	470	200	B

10

20

【 0 1 0 4 】

	0.31	5.0	215	443	215	A
	0.29	5.2	246	474	246	A
E48	0.36	3.7	13	23	15	C
	0.03	1.2	87	87	87	C
	0.06	17.9	11	118	104	B
E47	0.60	7.9	12	37	15	C
	0.32	4.8	18	23	20	C
	0.48	7.0	15	41	20	C
E46	0.92	14.2	22	308	250	B
	0.49	5	18	332	250	B
	0.46	5	29	359	230	B
E45	1.02	8.3	22	84	80	B
	0.54	10	12	119	100	B
	0.21	4.0	76	129	100	B
E44	0.84	18.9	12	249	170	B
	1.4	13	21	134	150	B
	0.92	17	14	326	200	B
E43	0.65	14	14	320	200	B
	0.68	8.2	13	312	180	B
	1.23	7.7	20	350	300	B
E42	1.46	20	12	302	200	B
	0.72	5.5	209	372	209	A
	0.89	4.6	249	331	249	A
E41	1.42	14	14	245	200	B
	1.19	6.7	144	263	144	A
	0.81	4.3	148	294	148	A
E40	0.78	14.6	13	396	280	B
	1.08	8.2	10	473	250	B
	1.6	15.9	28	292	290	B
E39	2.12	6.6	234	381	234	A
	3.43	6.2	90	153	90	A
	3.72	6.1	100	182	100	A
E38	1.18	6.1	160	278	160	A
	1.11	5.4	185	284	185	A
	1.41	6.5	200	250	200	A
E37	0.67	18	10	128	100	B
	0.74	15	21	104	140	B
	0.46	5.8	193	313	193	A
E36	0.27	13.2	8	342	200	B
	0.86	9.2	19	86	100	B
	0.68	6.9	12	391	227	B
E35	1.86	5.4	159	264	159	A
	1.45	4.2	157	288	157	A
	1.58	5.7	215	271	215	A
E34	0.28	5.2	14 (195)	388	195	B (A)
	0.17	5.2	18 (349)	440	349	B (A)
	0.23	6.7	13 (239)	310	239	B (A)

10

20

30

40

E33	0.86	4.5	226	413	226	A
	0.87	4.3	348	454	348	A
	0.70	3.2	215	422	215	A
E32	1.63	5.4	223	367	223	A
	1.33	4.8	239	383	239	A
	1.39	5.0	326	416	326	A
E31	1.83	8.1	32 (293)	398	293	B (A)
	1.76	6.4	21 (190)	399	190	B (A)
	1.69	6.9	16 (348)	403	348	B (A)
E30	1.83	16	12	154	100	B
	1.51	11.7	17	339	200	B
	1.28	20.4	14	344	180	B
E29	0.67	10.8	27 (97)	286	97	B
	0.92	22.3	11	238	150	B
	2.13	9.7	179	247	179	A
E28	0.85	6.7	13	545	280	B
	0.96	10	23	475	350	B
	0.87	10	21	307	200	B
E27	0.59	42	11	414	?	D (「尾部」が長い)
	0.52	37	10	335	?	D
	0.54	29	10	298	300?	D
E26	1.66	26.5	15	432	200?	D
	1.38	28	12	343	?	D
	1.44	26	13	420	200?	D
E25	1.07	32	10	287	?	D
	1.05	32	10	296	?	D
	1.11	31	14	307	?	D

## 【 0 1 0 6 】

表 6 に示されている特徴を下記に記載する。

タイプ A の特徴：小さい (10 ~ 30 nm) 粒子がほとんどない；大きい粒子 (概して 100 ~ 300 nm) が明確に分布する；平均直径およびモード直径が比較可能 (2 倍以内) である、低 D<sub>90</sub> / D<sub>10</sub> (10 未満、概して 4 ~ 7) である；高粒子数 (1.0 × 10<sup>8</sup> / mL より大きい) と関連付けられることが多い；溶出緩衝剤として PBS を用いる。

タイプ B の特徴：小さい (10 ~ 50 nm) 粒子が多い；大きい粒子 (概して 100 ~ 500 nm) が明確に分布する；平均直径とモード直径が大きく異なる (概して 10 倍より大きい)；高 D<sub>90</sub> / D<sub>10</sub> (概して 10 ~ 20) である；低粒子数または中間的な粒子数 (概して 0.5 ~ 1.0 × 10<sup>8</sup> / mL) と関連付けられることが多い。溶出緩衝剤として、PBS、および特に水を用いた時に観察される。

タイプ C の特徴：小さい (10 ~ 50 nm) 粒子が多い；大きい粒子の明確な分布がない；平均直径およびモード直径が比較可能 (かつ直径が小さい)；高 D<sub>90</sub> / D<sub>10</sub> (概して 10 ~ 20) である；低粒子数または中間的な粒子数 (概して 0.5 ~ 1.0 × 10<sup>8</sup> / mL) と関連付けられることが多い；溶出緩衝剤として水を用いる。

タイプ D の特徴：小さい (10 ~ 50 nm) 粒子が多い；大きい粒子の明確な分布がない；平均直径およびモード直径が比較可能 (かつ直径が小さい)；高 D<sub>90</sub> / D<sub>10</sub> (概して 20 ~ 40) である；低粒子数または中間的な粒子数 (概して 0.5 ~ 1.0 × 10<sup>8</sup> / mL) と関連付けられることが多い；溶出緩衝剤として水または 10% PBS を用いる。

10

20

30

40

50

## 【0107】

〔実施例2：放出微小粒子中に観察されるCPOXの媒介による変換処理を介した、U87細胞株による5-ALAのPPIXへの変換〕

本実施例は、U87細胞培養が活発に5-ALAをPPIXに変換することを示しており、これらの細胞がコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ(CPOXタンパク質)を生成し、CPOXタンパク質およびPPIXが、癌細胞株中の放出微小粒子中に存在していることを示している。

## 【0108】

<U87のインビトロ研究>

T-75フラスコ内で成長したGBM腫瘍の典型的なU87細胞を、血清の非存在下で、4時間または24時間5-アミノレブリン酸(5-ALA; 250 µg/ml)に曝露し、その後、406 nmの紫波長での励起により、LSRIIFローサイトメーターにて細胞を蛍光励起させた。プロトポルフィリンIX(PPIX)を検出するために、フィルターの仕様を、450/50、または610/20のいずれかに設定した。

10

## 【0109】

時間の関数としての平均蛍光指数(MFI)は、5-ALAの非存在下では変化しなかったことが分かった。反対に、MFIは、5-ALAへの曝露の4時間後、および24時間後に観察され、5-ALAに曝露した後増加した(図14)。これらのデータは、ヘム合成経路における細胞代謝の生成物として、5-ALAのその代謝物への変換から得られる代謝生成物としてのPPIXの一時的な状態を示している。

20

## 【0110】

<癌細胞由来の微小粒子へのCPOXの蓄積>

酵素コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ(CPOX)は、ヘムポルフィリン代謝に参与する。この酵素が、放出される癌細胞由来の微小粒子に存在するか否かを調べるため、および5-ALAのPPIXへの代謝変換における当該酵素の役割を調べるため、癌細胞由来微小粒子のタンパク質試料についてタンパク質分析を行った。

## 【0111】

調整培地中の微小粒子を、Vencereminペプチド(New England Peptide, Gardner MA)のうちの1つを用いて培養上清から回収した。微小粒子を回収するために、Heldonin(Hdn; H2N-LKLFEGTLGWSFRSLSLGRGKQSP-OH)と称されるVencereminペプチドVn96reverseと、スクランブルペプチドNDNとを用いた。U87(GBM)およびHELA細胞を、Integraバイオリアクターで培養し、下部チャンバの上清試料(2 ml)を採取し、10 µlのプロテアーゼ阻害剤、および50 µgのHdnペプチド原液と混合した。微小粒子をバイオリアクター上清試料から調製し、CPOXの存在についてウエスタンブロットで分析した。調整培地の他のアリコートも、放出微小粒子を分離するためにExoQuick(SBI, Systems Biology)に曝露した。MFC7およびK562細胞株の細胞溶解物から得た全てのタンパク質も分析した。表7は、図14に示す各レーンで分析されたタンパク質試料源の名称を示している。

30

## 【0112】

【表 7】

特定プロットレーンのタンパク質源の特定

レーン番号	タンパク質の試料源：
1	H d n ペプチドで分離した G B M 細胞
2	N d n ペプチドで分離した G B M 細胞
3	E x o Q u i c k で分離した G B M 細胞
4	H d n ペプチドで分離した H E L A 細胞
5	N d n ペプチドで分離した H E L A 細胞
6	E x o Q u i c k で分離した H E L A 細胞
7	M C F 7 細胞溶解物
8	K 5 6 2 細胞溶解物

10

## 【 0 1 1 3 】

図 1 5 に示されるように、G B M および H E L A 細胞株から分離された微小粒子は、抗 C P O X 抗体を用いて調査したウエスタンブロットに見られるように C P O X タンパク質を蓄積した。非特定 N d n ペプチドで分離した試料は、C P O X タンパク質を蓄積しなかった。これらのデータは、癌細胞から放出された微小粒子中の C P O X 酵素の存在を示している。理論化を目的とするわけではないが、C P O X は微小粒子中の 5 - A L A の P P I X への変換に関わると考えられる。さらに、これらのデータは、5 - A L A の P P I X への変換に関わる、微小粒子中のミトコンドリア内のバイオマーカー ( C P O X ) を追跡する能力を明らかにし、腫瘍細胞のバイオマーカーとしての C P O X の使用を示唆している。

20

## 【 0 1 1 4 】

〔実施例 3：グリオラン<sup>T M</sup>の投与による G B M の検出〕

被検者は、外科的切除、体外照射療法、およびテモゾロマイドによって G B M 治療を受けている。

## 【 0 1 1 5 】

各病院の基準プロトコルによって、G B M の再発についての観察的および M R I 評価を用いて病気の再発の臨床的症状について定期的に ( 毎月 ) 被検者を評価する。

30

## 【 0 1 1 6 】

グリオラン<sup>T M</sup> ( 5 - A L A ) を、採血の予定時間の 3 時間前に 2 0 m g / k g 投与する。

## 【 0 1 1 7 】

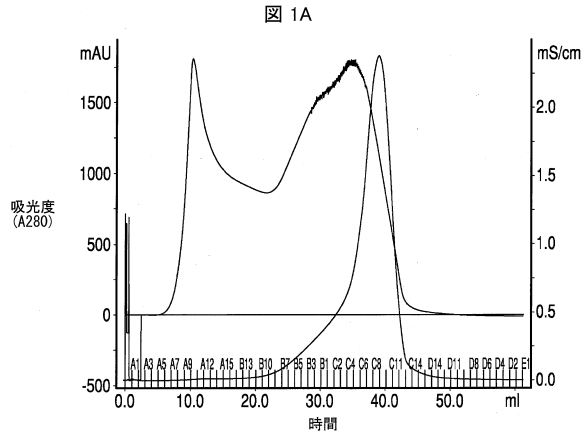
採血を行い、血清を生成するために凝固させるか、あるいは血漿を生成するために 5 分間 1 0 0 0 g で遠心分離する。生体液を - 8 0 で凍結させ、後の処理のために保存した。固体相として 2 % アガロースを用いるサイズ排除クロマトグラフィーを用いて微小粒子を分離する。移動相として、再蒸留した H<sub>2</sub>O ( 1 0 0 % v / v ) または P B S を用い、血清または血漿の装填容量はベッドボリュームの 2 % 未満であり、高分子量物質のための溶出分離はタンパク質スタンダードを用いて確認される。

40

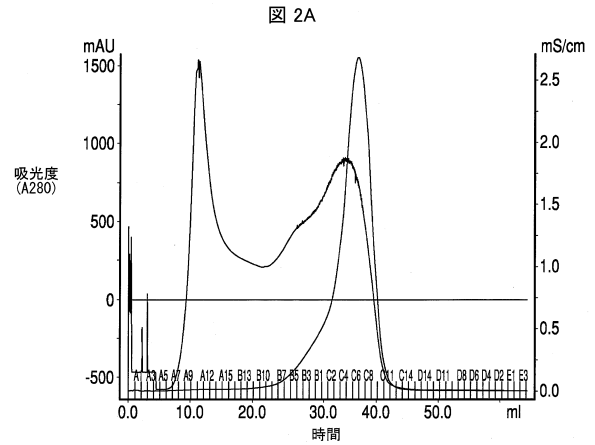
## 【 0 1 1 8 】

これらの微小粒子と関連する 5 - A L A を介した蛍光を、N T A 分析処理 ( Nanosight Ltd, Wiltshire, UK ) を用いて検出する。

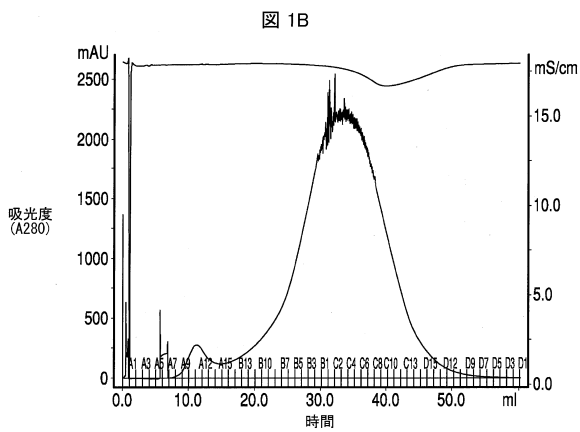
【 図 1 A 】



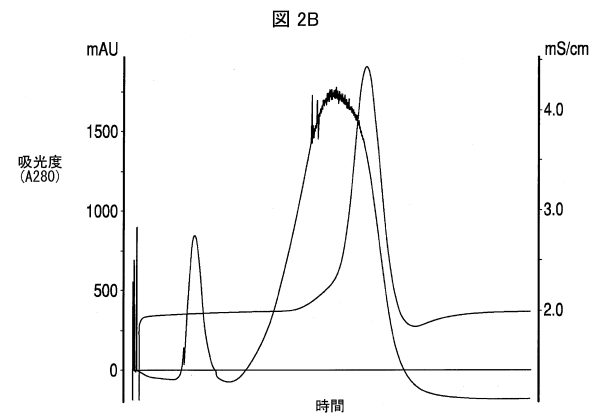
【 図 2 A 】



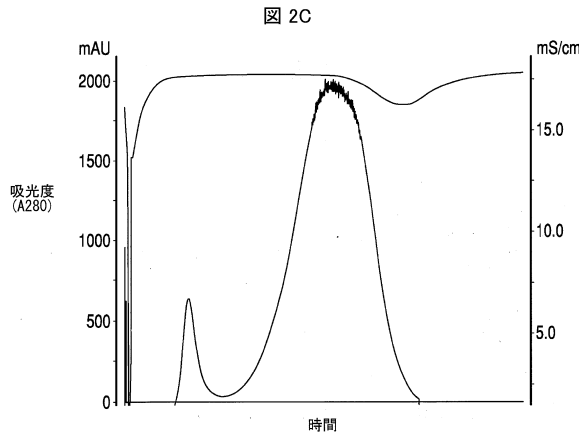
【 図 1 B 】



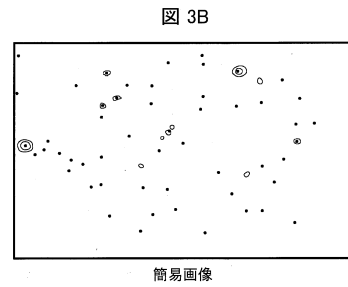
【 図 2 B 】



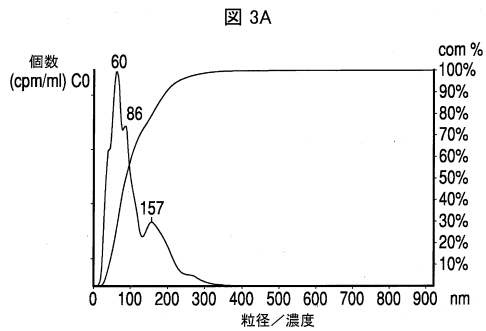
【 図 2 C 】



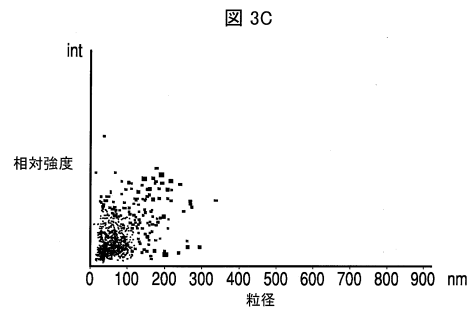
【 図 3 B 】



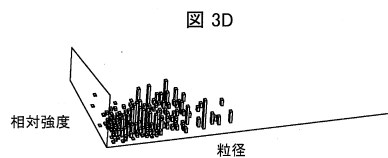
【 図 3 A 】



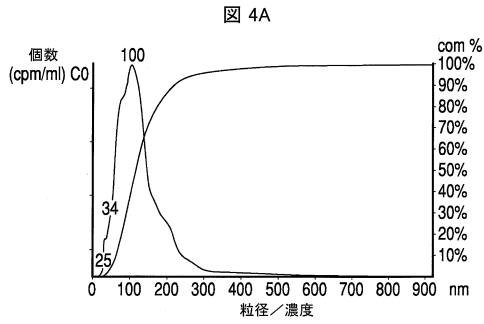
【 図 3 C 】



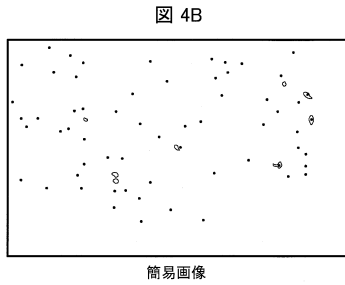
【 図 3 D 】



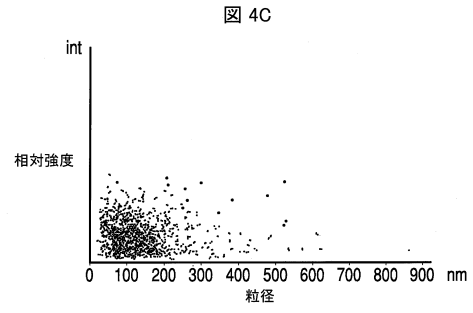
【 図 4 A 】



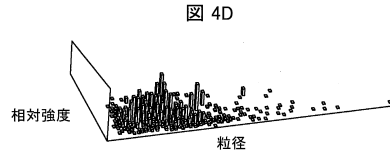
【 図 4 B 】



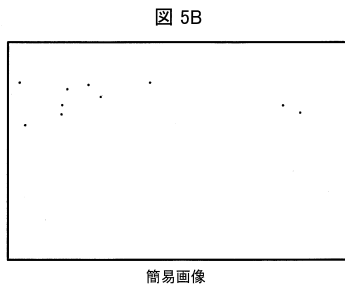
【 図 4 C 】



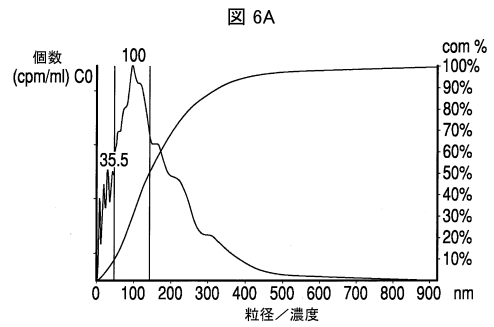
【 図 4 D 】



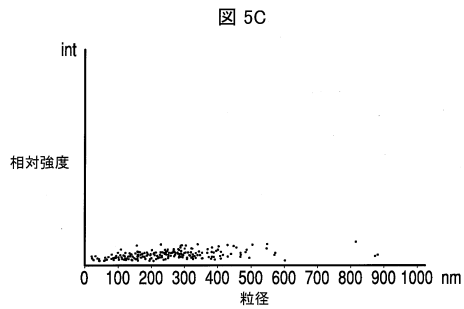
【 図 5 B 】



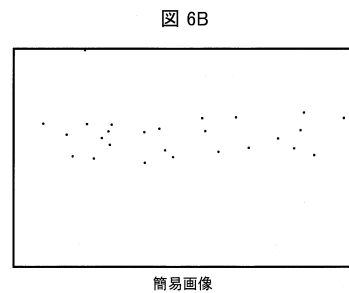
【 図 6 A 】



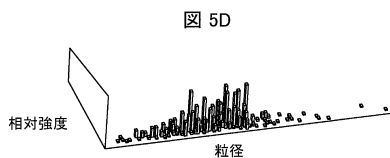
【 図 5 C 】



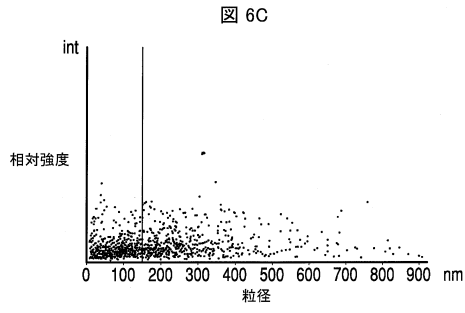
【 図 6 B 】



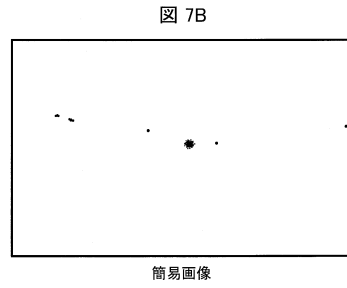
【 図 5 D 】



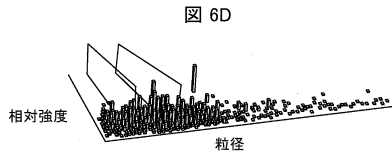
【 図 6 C 】



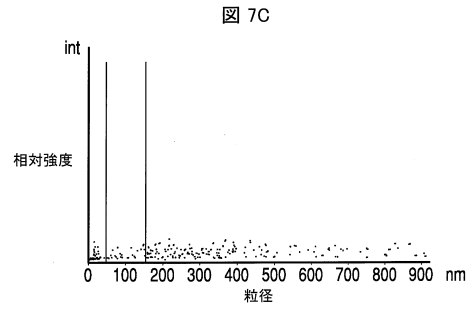
【 図 7 B 】



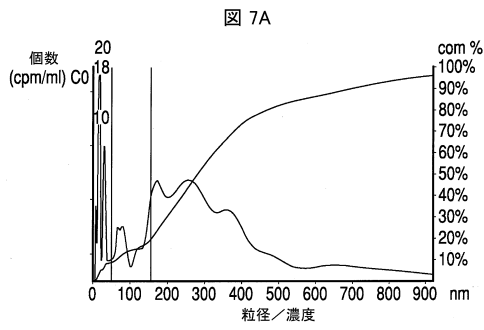
【 図 6 D 】



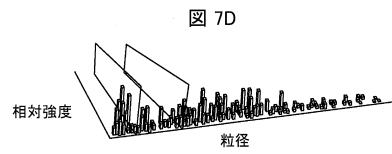
【 図 7 C 】



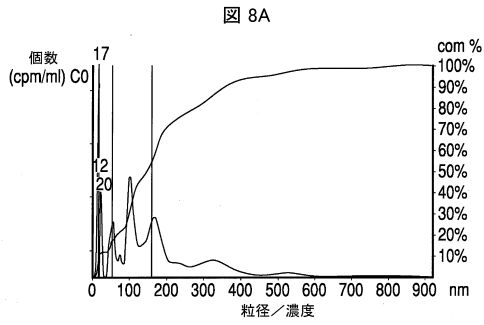
【 図 7 A 】



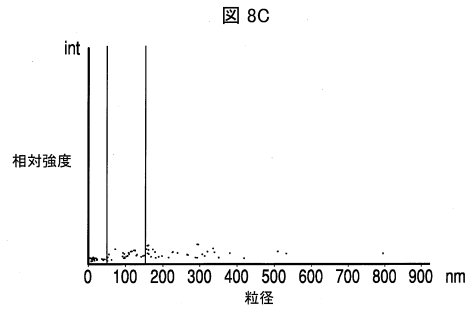
【 図 7 D 】



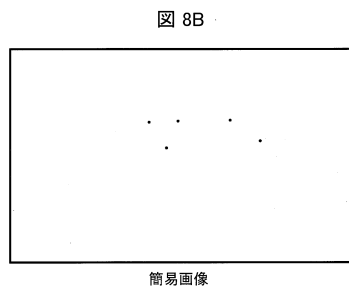
【 図 8 A 】



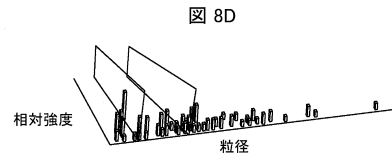
【 図 8 C 】



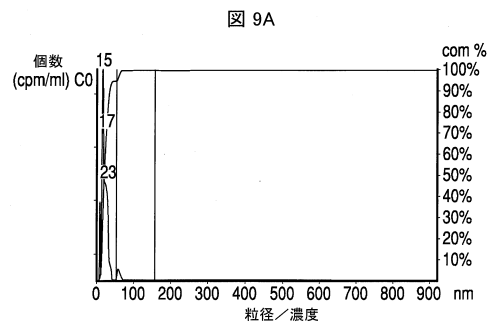
【 図 8 B 】



【 図 8 D 】

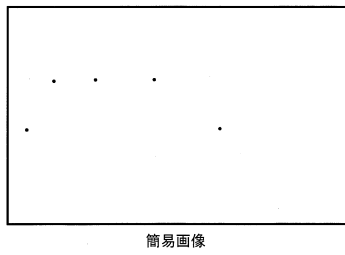


【 図 9 A 】



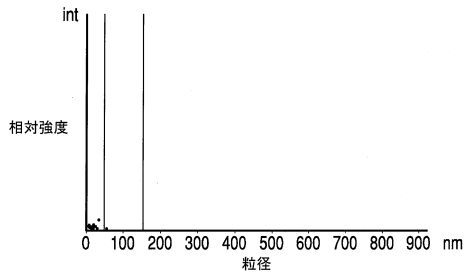
【図9B】

図9B



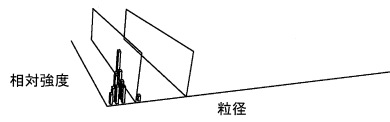
【図9C】

図9C



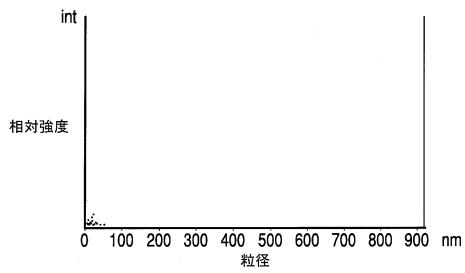
【図9D】

図9D



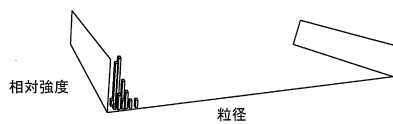
【図10C】

図10C



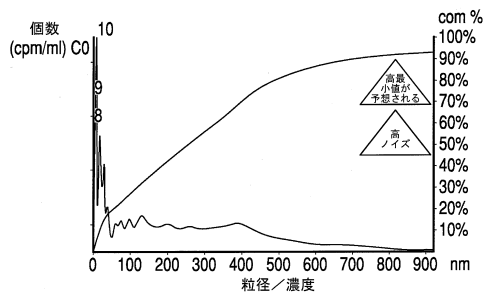
【図10D】

図10D



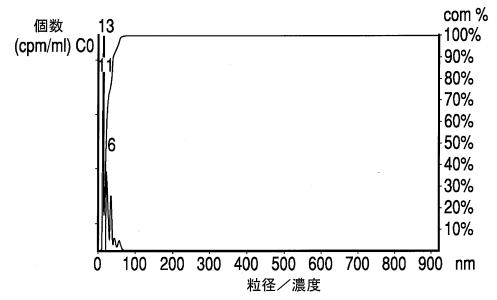
【図11A】

図11A



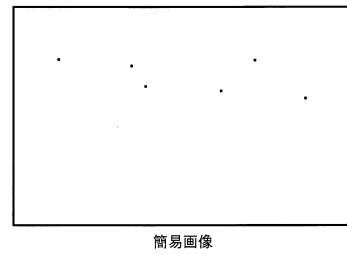
【図10A】

図10A



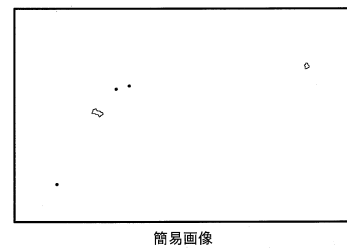
【図10B】

図10B



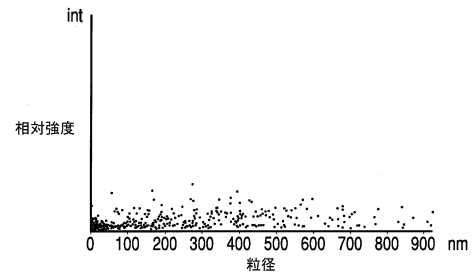
【図11B】

図11B



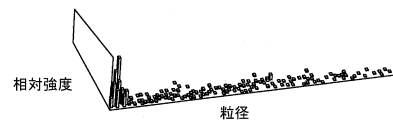
【図11C】

図11C



【図11D】

図11D



【図 1 2 A】

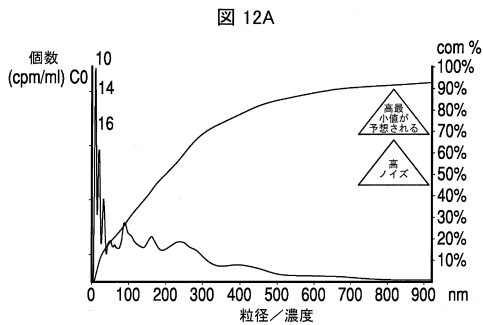


図 12A

【図 1 2 C】

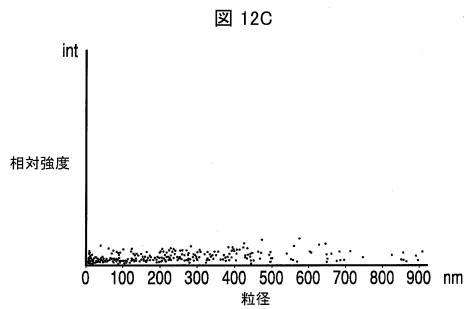


図 12C

【図 1 2 B】

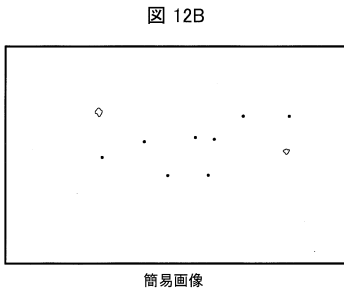


図 12B

【図 1 2 D】

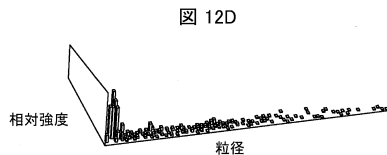


図 12D

【図 1 3 A 1】

図 13A

PBSで調製 DHMR ID	ミッドカ-1D		光散乱		ハラマ-9		蛍光		粒子の平均粒径比率 (μg), (× 10 <sup>9</sup> )
	粒子数 (× 10 <sup>10</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD	平均	SD	粒子数 (× 10 <sup>9</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD	
E29	150	3	129	3.5	0.4	0.8	0.1	15.8	19.0
E30	151	3.6	28.1	3.5	0.4	1.5	0.3	12.8	28.1
E31	8-CD (2)	2.5	88	6.1	0.2	1.8	0.1	12	20.8
E32	9-CD (3)	2.1	44.3	4.6	0.4	1.4	0.1	7.7	27.3
E33	11-NH (1)	1.5	75.7	5.4	0.1	0.8	0.1	5.3	34.0
E34	12-NH (2)	1.1	1.7	0.3	0.2	0.2	0.1	3.3	33.3
E35	32-ROTH (1)	2.1	77.7	5.5	0	1.6	0.2	5.9	35.6
E36	6-KWI.io	1.7	99.3	8.5	0.3	0.6	0.3	4.3	39.5

図 13Aから

図 13Aへ続く

【図 1 3 A 2】

図 13A

E37	24-M2		E38		E39		E40		E41		E42	
	粒子数 (× 10 <sup>10</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD	粒子数 (× 10 <sup>10</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD	粒子数 (× 10 <sup>10</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD	粒子数 (× 10 <sup>10</sup> /mL) 7-10分散指数	平均	SD
	1.2	88.7	5.8	1.1	10.6	119.3	1.2	0.2	0.2	0.4	11.9	28.4
	1.1	103	4.9	1.1	119.3	6.0	0.6	0.6	0.6	0.6	8.4	5.2
	2.9	81.7	4.9	0.2	45.7	95.0	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	39.0
	3.9	81.7	5.6	0.2	45.7	6.3	0.3	0.3	0.3	0.3	156.9	8.6
	2.4	81.7	5.6	0.4	45.7	1.2	0.4	20.1	1.2	0.4	11.9	28.4
	1.5	102	6.2	0.1	18.1	102.0	1.1	0.3	0.3	0.3	78.2	8.4
	1.6	72.7	5.2	0.3	7.5	156.9	1.0	0.4	0.4	0.4	156.9	8.6

図 13Aから

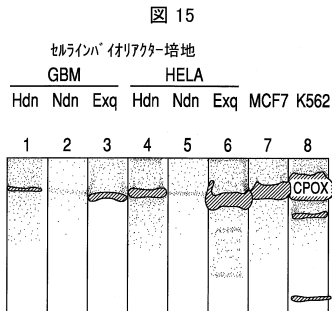
図 13Aへ続く

【 図 1 3 B 】

水で調製		光散乱		ハチマー		蛍光		粒子数の割合
DHMRID	ミックスID	平均	SD	粒子数 (×10 <sup>9</sup> /mL)	モト平均 (nm)	多分散指数	平均	(MFI) (×10 <sup>3</sup> )
E43	19MG-1	76	1.2	13.1	13.1	0.9	0.3	216.9
		3.8	0.6	101.3	101.3	1.1	3.7	3.5
E44	32-Rother (1)	8.6	0.6	16.8	16.8	1.1	0.3	346.8
		5.3	0.5	101.3	101.3	1.1	4.7	2.5
E45	27-AM.1.0	9.5	0.1	62.3	62.3	0.6	0.4	270.6
		5.1	0.1	89.7	89.7	0.6	3.2	3.3
E46	36-VS1.0.2	8.5	1.7	88.7	88.7	0.6	0.3	258.3
		5.4	0	103	103	1.2	5.9	3.1
E53	8-CO (2)	73.7	0.3	73.7	73.7	1.2	0.2	328.5
		6.1	10	61	61	1.9	3.1	3.2
E54	9-CO (3)	8.8	0.2	65	65	1.2	0.4	277.9
		6.1	0.3	6.1	6.1	1.9	4.0	14.9

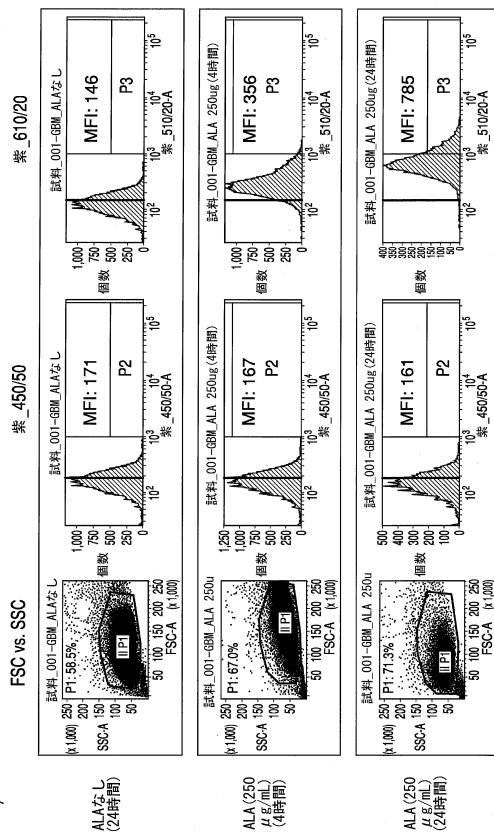
図 13B

【 図 1 5 】



【 図 1 4 】

図 14



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<b>G 0 1 N 33/493 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/493		Z
<b>G 0 1 N 33/487 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/487		
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>		C 0 7 K 14/47		

## (56)参考文献 特開2006-124372(JP,A)

KERBY SHEDDEN ET AL., Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells: Association with Gene Expression and Chemosensitivity Profiles 1,2, CANCER RESEARCH, 2003年 8月 1日, vol. 63, PP.4331-4337

Safaei et al., Abnormal Lysosomal Trafficking and Enhanced Exosomal Export of Cisplatin in Drug-resistant Human Ovarian Carcinoma Cells, Molecular Cancer Therapeutics, 2005年10月 1日, vol. 4, No. 10, PP.1595-1604

VALDES P A, COMBINED FLUORESCENCE AND REFLECTANCE SPECTROSCOPY FOR IN VIVO QUANTIFICATION OF IOMARKERS IN LOW- AND HIGH-GRADE GLIOMA SURGERY, JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, 2011年11月, V16 N11, P116007 1-14, CANCER B

LEE T H, MICROVESICLES AS MEDIATORS OF INTERCELLULAR COMMUNICATION IN CANCER THE EMERGING SCIENCE OF CELLULAR 'DEBRIS', SEMIN IMMUNOPATHOL, 2011年 9月, V33 N5, P455-467, U R L, <http://rd.springer.com/article/10.1007/s00281-011-0250-3#page-1>

CASAS A, TOPICAL AND INTRATUMORAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID IN A SUBCUTANEOUS MURINE MAMMARY ADENOCARCINOMA, CANCER LETTERS, 1999年 7月, V141 N1-2, P29-38, U R L, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383599000798>

ANAND S, LOW-DOSE METHOTREXATE ENHANCES AMINOLEVULINATE-BASED PHOTODYNAMIC THERAPY IN SKIN CARCINOMA CELLS IN VITRO AND IN VIVO, CLINICAL CANCER RESEARCH, 2009年 5月 15日, V15 N10, P3333-3343, U R L, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19447864>

VALDES P A, GADOLINIUM- AND 5-AMINOLEVULINIC ACID-INDUCED PROTOPORPHYRIN IX LEVELS IN HUMAN GLIOMAS : AN EX VIVO QUANTITATIVE STUDY TO CORRELATE PROTOPORPHYRIN IX LEVELS AND BLOOD-BRAIN BARRIER BREAKDOWN, J NEUROPATHOL EXP NEUROL, 2012年 9月, V71 N9, P 806-813, U R L, <http://jnen.oxfordjournals.org/content/71/9/806.abstract>

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )