

(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2020-511137

(P2020-511137A)

(43) 公表日 令和2年4月16日(2020.4.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M 4 C 0 8 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	A 4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-550590 (P2019-550590)
 (86) (22) 出願日 平成30年3月15日 (2018. 3. 15)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年10月25日 (2019. 10. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/022747
 (87) 国際公開番号 W02018/170329
 (87) 国際公開日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)
 (31) 優先権主張番号 62/473, 273
 (32) 優先日 平成29年3月17日 (2017. 3. 17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/522, 509
 (32) 優先日 平成29年6月20日 (2017. 6. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 516001591
 ナントミクス, エルエルシー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90
 232, カルバー シティ, 9920 ジ
 エファーソン ブールバード
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c f R N Aに関する液体生検

(57) 【要約】

c f R N Aは、疾患関連遺伝子の発現レベルを特定及び定量化するために使用され、更に、このような遺伝子における変化の非侵襲的監視を可能にする。更に、疾患関連遺伝子の定量的分析は、処置が疾患関連遺伝子の存在に依存する場合、処置応答の予測を可能にする。

【選択図】 図 5

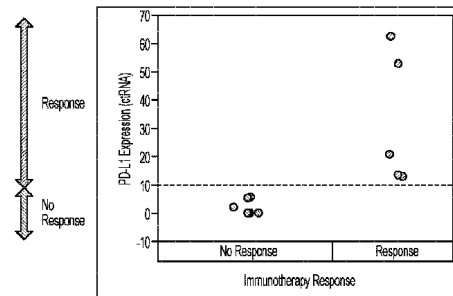


Figure 5B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チェックポイント阻害剤による処置に対する、癌を有する個体の処置応答を予測する方法であって：

前記個体から血液を採取し、前記血液から c f R N A を単離するステップであって、前記 c f R N A はチェックポイント阻害遺伝子をコードする、ステップと；

定量的 P C R 法を用いて前記 c f R N A を定量化するステップと；

前記 c f R N A の量が事前に決定された閾値レベルを超える場合、陽性の処置応答を予測するステップと、

を含む方法。

10

【請求項 2】

前記チェックポイント阻害剤が、P D 1 又は P D - L 1 に対する抗体であり、前記 c f R N A が P D - L 1 c f R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 c f R N A を単離するステップが、R N A 安定化及び細胞保存を用いる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記定量的 P C R 法がリアルタイム P C R を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

定量化するステップが、内部標準として - アクチンを使用する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記閾値レベルが、- アクチンに対する P D - L 1 に関して C T > 1 0 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記定量的 P C R 法を用いて少なくとも第 2 の c f R N A を定量化するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも第 2 の c f R N A が T I M 3 又は L A G 3 をコードする、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

少なくとも第 2 の c f R N A を定量化するステップを更に含み、前記少なくとも第 2 の c f R N A は、腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子、腫瘍関連遺伝子、又は癌特異的遺伝子をコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

癌を有する個体の処置の進行を監視する方法であって：

前記個体から血液を採取し、前記血液から c f R N A を単離するステップであって、前記 c f R N A がチェックポイント阻害遺伝子をコードするか、又は前記 c f R N A が腫瘍関連遺伝子若しくは癌特異的遺伝子をコードするか、又は前記 c f R N A が腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子をコードする、ステップと；

定量的 P C R 法を用いて前記 c f R N A を定量化するステップと；

前記 c f R N A の量を用いて患者記録を更新するステップと、

を含む方法。

40

【請求項 11】

前記チェックポイント阻害遺伝子が P D - L 1、T I M 3、又は L A G 3 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記腫瘍関連遺伝子又は癌特異的遺伝子が、C E A、M U C 1、ブラキュリ、H E R 2、P C A 3、又は A R - V 7 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

50

腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子が、ネオエピトープをコードする、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記cfRNAを単離するステップが、RNA安定化及び細胞保存を用いる、請求項10に記載の方法。

【請求項15】

前記定量的PCR法がリアルタイムPCRを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項16】

定量化するステップが、内部標準としてβ-アクチンを使用する、請求項10に記載の方法。

10

【請求項17】

前記患者記録が、前記cfRNAの量がβ-アクチンに対するHER2に関してCT>5であるか又はβ-アクチンに対するPCA3に関してCT>10である場合に更新される、請求項10に記載の方法。

【請求項18】

前立腺癌を検出する方法であって：

個体から血液を採取し、前記血液からcfRNAを単離するステップであって、前記cfRNAは、PCA3又はアンドロゲン受容体のスプライスバリエーション7をコードする、ステップと；

定量的PCR法を用いて前記cfRNAを定量化するステップと；

20

前記cfRNA量が事前に決定された閾値レベルを超える場合、前記個体が癌を有すると診断するステップと、を含む方法。

【請求項19】

PCA3cfRNAの量がβ-アクチンに対してCT>10である場合に、前記個体が癌を有すると診断される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

少なくとも第2のcfRNAを定量化するステップを更に含み、前記少なくとも第2のcfRNAは、腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子、腫瘍関連遺伝子、癌特異的遺伝子、又はチェックポイント阻害遺伝子をコードする、請求項18に記載の方法。

30

【請求項21】

前記第2のcfRNAが、PD-L1、LAG3、TIM3、AR-V7、PSA、及びPSMAをコードする、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

癌を処置する方法であって：

PD-L1陰性癌と診断された個体に薬物を投与するステップと；

血液からcfRNAを単離することにより前記個体の処置を監視するステップであって、前記cfRNAはPD-L1をコードする、ステップと；

定量的PCR法を用いて前記cfRNAを定量化するステップと；

前記cfRNAの検出後に、前記処置にチェックポイント阻害剤を含めるステップと、を含む方法。

40

【請求項23】

前記PD-L1陰性癌が固形癌である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記固形癌が乳癌である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記薬物がアフィニートールである、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

cfRNAを定量化する前記ステップがリアルタイムPCRを使用する、請求項22に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記チェックポイント阻害剤は、前記 c f R N A が検出され、経時的に増加する場合に含められる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 c f R N A が検出され、前記 c f R N A レベルが - アクチンに対して C T > 10 である場合に、前記チェックポイント阻害剤が含められる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

患者における免疫シグネチャーを決定する方法であって：

個体の血液中の異なる c f R N A 分子の量を決定するステップであって、前記 c f R N A 分子が異なるチェックポイント阻害遺伝子をコードする、ステップを含み；

10

前記決定するステップは、チェックポイント阻害剤、化学療法薬、免疫療法薬、及び放射線処置のうちの少なくとも1つによる処置の前又は間に行われる、方法。

【請求項 30】

前記異なる c f R N A 分子のうちの少なくとも1つが P D - L 1、L A G 3、又は T I M 3 をコードする、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記量を決定するステップがリアルタイム P C R を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

20

チェックポイント阻害剤による処置に対する、癌を有する個体の処置応答を予測するための c f R N A の使用であって、前記 c f R N A がチェックポイント阻害遺伝子をコードし、前記 c f R N A が閾値レベルを超える、使用。

【請求項 33】

前記チェックポイント阻害剤が、P D 1 又は P D - L 1 に対する抗体であり、前記 c f R N A が P D - L 1 c f R N A である、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 34】

前記閾値レベルが、- アクチンに対する P D - L 1 に関して C T > 10 である、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 35】

30

癌を有する個体の処置を監視するための c f R N A の使用であって、前記 c f R N A がチェックポイント阻害遺伝子をコードするか、又は前記 c f R N A が腫瘍関連遺伝子若しくは癌特異的遺伝子をコードするか、又は前記 c f R N A が腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子をコードする、使用。

【請求項 36】

前記チェックポイント阻害遺伝子が P D - L 1、T I M 3、又は L A G 3 である、請求項 35 に記載の使用。

【請求項 37】

前記腫瘍関連遺伝子又は癌特異的遺伝子が、C E A、M U C 1、ブラキュリ、H E R 2、P C A 3、又は A R - V 7 である、請求項 35 に記載の使用。

40

【請求項 38】

腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子が、ネオエピトープをコードする、請求項 35 に記載の使用。

【請求項 39】

個体における前立腺癌の検出における、P C A 3 又はアンドロゲン受容体のスプライスバリエント 7 をコードする c f R N A の使用。

【請求項 40】

前記 c f R N A の量が閾値レベルを超える場合に、前記個体が前立腺癌を有すると診断される、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

50

PCA3 cfRNAに関する前記閾値レベルが、 - アクチンに対して CT > 10 である、請求項 40 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年3月17日に提出されたシリアル番号62/473, 273、2017年6月20日に提出されたシリアル番号62/522, 509、及び2017年12月1日に提出されたシリアル番号62/593, 534を有する本発明者らの同時係属米国仮特許出願に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明の分野は、特に腫瘍細胞由来のcfRNAに関する場合の循環遊離RNA (cfRNA) の検出及び定量化のシステム及び方法である。

【背景技術】

【0003】

背景技術の説明は、本発明を理解するのに有用であり得る情報を含む。本明細書で提供される情報が、先行技術であるか、若しくは現在特許請求されている発明に関連していること、又は具体的に若しくは暗黙に参照される刊行物が先行技術であることを容認するものではない。

【0004】

全ての刊行物及び特許出願は、あたかも個々の各刊行物又は特許出願が参照により組み込まれるように具体的に且つ個々に示されるかのように、それと同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれた参考文献における用語の定義又は使用が、本明細書で提供されるその用語の定義と一致しないか、又は反対である場合、本明細書で提供されるその用語の定義が適用され、参考文献におけるその用語の定義は適用されない。

【0005】

過去10年間にわたり、癌の治療は、手術及び放射線と組み合わせた一般的な化学療法に基づく治療から、患者全体にわたる腫瘍の遺伝的多様性を考慮に入れた、より個別化された処置へと変化してきた。従って、処置計画は、現在、より標的化された治療を可能にする分子マーカーの同定をしばしば必要とする。多くの場合、このような情報は、癌組織生検からの様々な核酸分子の分析によって得られる。しかしながら、組織生検はしばしば、最初の診断又は手術に限定され、後の生検は、患者に重大な危険性及び不快感をもたらす傾向がある。更に、腫瘍組織生検は、サンプリングの偏り、及び治療過程の間に患者の腫瘍マーカーとして核酸分子を監視する能力が限られているという点で問題となる傾向がある。

【0006】

腫瘍細胞及び非腫瘍細胞由来の核酸分子は血液から得ることができることが知られていたが(例えば、Clin Canc. Res. (1999) Vol 5, 1961-1965; Canc Res. (1977) 37: 646-650参照)、これらの核酸がいずれかのキャリア又は他の構造と会合又は結合しているかどうかは明らかでなかった。実際には、より最近になって、RNAが循環腫瘍細胞(例えば、国際公開第2017/180499号参照)、エキソソーム(例えば、国際公開第2015/082372号参照)、及びキャリアタンパク質(例えば、国際公開第2010/079118号、又はProc. Natl. Acad. Sci (1985) 82, 3455参照)を含む様々な供給源に由来し得ることが発見された。

【0007】

残念ながら、且つおそらく、RNAと様々なキャリア又は他の構造との異なる位置/会合に起因して、循環核酸の正確な定量化は、しばしば問題であった。例えば、無細胞RNAを使用する神経芽細胞腫における疾患状態検出は、全細胞RNA分析に対する信頼できる代替物ではないことが示された(例えば、Pediatr Blood Cancer. 2010 Jul 1; 54(7): 897-903参照)。同様に、国際公開第20

10

20

30

40

50

16/077709号に記載されているように、特定の関連にかかわらず、血液中の変異遺伝子又は不適切に融合した遺伝子から比較的少量のcfRNAを検出することができるが、そのようなRNAの検出量は有意に変化した。更に、検出された量のいずれかが、細胞内の生理学的現実の反映であり、又は問題の特定のRNAの安定性の関数であるかは未知のままであった。例えば、709号公報のデータは、PD-1/PD-L1をコードするcfRNAの量がしばしば非常に可変であり、サンプル、患者の状態、及び他の因子に依存し得ることを示している。その結果、抗PD-1/PD-L1療法に対する癌患者の適格性を決定するための予後因子及び/又は指標としてPD-L1 cfRNA発現レベルを使用する報告は今日まで存在しない。

【0008】

従って、生物学的流体からの核酸分析の多数の方法が当該技術分野で既知ではあるが、それらの全て又は殆ど全ては、様々な欠点を被る。従って、cfRNA分析のための改善されたシステム及び方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本発明の主題は、処置応答を予測するため、処置を追跡するため、及び/又は癌を診断するための、様々な組成物、及び1つ以上のcfRNAのcfRNAレベルの使用方法に関する。特に好ましい態様において、本発明者らは、特定の癌に関する処置応答を予測できる、特定のcfRNA、特にPD-L1及びHER2に関する発現閾値レベルを決定することができることを発見した。

【0010】

本発明の主題の一態様において、個体から血液を採取し、血液からcfRNAを単離するステップを含み、ここでcfRNAはチェックポイント阻害遺伝子をコードし、且つ定量的PCR法を用いてcfRNAを定量化する更なるステップを含む、チェックポイント阻害剤による処置に対する、癌を有する個体の処置応答を予測する方法。次いで、cfRNAの量が閾値レベルを超える場合、陽性の処置応答が予測される。

【0011】

好ましい実施形態において、チェックポイント阻害剤は、PD1又はPD-L1に対する抗体であり、cfRNAはPD-L1 cfRNAである。更に、cfRNAを単離するステップは、RNA安定化及び細胞保存の少なくとも1つを用いることが一般に好ましい。最も典型的には、定量的PCR法は、好ましくは内部標準としてβ-アクチンを使用するリアルタイムPCRを含む。PD-L1が定量化される場合、閾値レベルは、β-アクチンに対するPD-L1に関してCT>10であり得る。加えて、所望される場合、少なくとも1つの第2のcfRNAが、定量的PCR法を用いて定量化され得る。本発明の主題を限定するものではないが、意図される第2のcfRNAは、TIM3又はLAG3、腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子、腫瘍関連遺伝子、又は癌特異的遺伝子をコードし得る。

【0012】

本発明の主題の別の態様では、本発明者らはまた、個体から血液を採取し、血液からcfRNAを単離するステップ(ここで、cfRNAはチェックポイント阻害遺伝子をコードし、又はcfRNAは腫瘍関連遺伝子若しくは癌特異的遺伝子をコードし、又はcfRNAは腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子をコードする)と;定量的PCR法を用いてcfRNAを定量化するステップと;cfRNAの量を使用して患者記録を更新するステップとを含む、癌を有する個体の処置を監視する方法を意図する。

【0013】

例えば、好適なチェックポイント阻害遺伝子には、PD-L1、TIM3又はLAG3が含まれ、腫瘍関連又は癌特異的遺伝子には、CEA、MUC1、ブラキユリ、HER2、PCA3又はAR-V7が含まれ、腫瘍及び患者特異的変異を有する好適な遺伝子は、好ましくはネオエピトープをコードする。上記のように、cfRNAを単離するステップは、RNA安定化及び細胞保存を用い、且つ定量的PCR法はリアルタイムPCR(例え

10

20

30

40

50

ば、内部標準として - アクチンを使用する) を含むことが一般に好ましい。患者記録は、 $cfRNA$ の量が - アクチンに対する $HER2$ に関して $CT > 5$ であり、又は - アクチンに対する $PCA3$ に関して $CT > 10$ である場合に更新され得る。

【0014】

本発明の主題の更に別の態様では、本発明者らは、個体から血液を採取し、血液から $cfRNA$ を単離するステップ(ここで、 $cfRNA$ は、 $PCA3$ 又はアンドロゲン受容体のスプライスバリエーション7をコードする)と; 定量的 PCR 法を用いて $cfRNA$ を定量化する更なるステップと; $cfRNA$ 量が閾値レベルを超える場合、個体が癌を有すると診断する尚更なるステップとを含む、前立腺癌を検出する方法を意図する。最も典型的には、 $PCA3$ $cfRNA$ の量が - アクチンに対して $CT > 10$ である場合、個体は癌を有すると診断される。

10

【0015】

所望であれば、腫瘍及び患者特異的変異を有する遺伝子、腫瘍関連遺伝子、癌特異的遺伝子、又はチェックポイント阻害遺伝子をコードする少なくとも第2の $cfRNA$ を定量化することができる。従って、このような第2の遺伝子には、 $PD-L1$ 、 $LAG3$ 、 $TIM3$ 、 $AR-V7$ 、 PSA 及び $PSMA$ が含まれる。

【0016】

本発明の主題の更に別の態様では、本発明者らはまた、 $PD-L1$ 陰性癌と診断された個体に薬物を投与するステップと; 血液から $cfRNA$ を単離することにより個体の処置を監視するステップ($cfRNA$ は $PD-L1$ をコードする)と; 定量的 PCR 法を用いて $cfRNA$ を定量化するステップと; $cfRNA$ の検出後に、処置にチェックポイント阻害剤を含めるステップとを含む、癌を処置する方法も意図する。

20

【0017】

このような方法において、 $PD-L1$ 陰性癌は固形癌(例えば、乳癌)であり、及び/又は薬物はアフィニートールであることが典型的に意図される。最も典型的には、 $cfRNA$ を定量化するステップはリアルタイム PCR を使用し、 $cfRNA$ が検出され、経時的に増加する場合、チェックポイント阻害剤が含まれる。このような方法の更なる好ましい態様では、チェックポイント阻害剤は、 $cfRNA$ が検出され、且つ $cfRNA$ レベルが - アクチンに対して $CT > 10$ である場合に含まれる。

【0018】

更に、本発明者らはまた、個体の血液中の異なる $cfRNA$ 分子の量を決定するステップを含む、患者における免疫シグネチャーを決定する方法を意図し、ここで、 $cfRNA$ 分子は異なるチェックポイント阻害遺伝子(例えば、 $PD-L1$ 、 $TIM3$ 、 $LAG3$)をコードする。典型的には、決定するステップは、チェックポイント阻害剤、化学療法薬、免疫療法薬、及び放射線処置のうちの少なくとも1つによる処置の前又は間に行われる。

30

【0019】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様及び利点は、同様の数字が同様の構成要素を表す添付の図面と共に、好ましい実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、健康な対象及び癌と診断された対象に関して $cfDNA$ 及び $cfRNA$ の血漿濃度を比較するグラフを示す。

【図2-1】図2Aは、様々な癌タイプにわたって $PD-L1$ $cfRNA$ の血漿濃度を比較するグラフを示す。

【図2-2】図2Bは、健康な対象に関する $PD-L1$ $cfRNA$ の血漿濃度を示すグラフを示す。図2Cは、 $PD-L1$ $cfRNA$ の血漿濃度の直線範囲を示すグラフを示す。

【図3】図3Aは、臨床試験における肺癌患者に関する $PD-L1$ $cfRNA$ の相対発

50

現を示すグラフを示す。図 3 B は、臨床試験における肺癌患者に関して I H C によって測定された P D - L 1 発現を示すデータを示す。

【図 4】図 4 は、処置中の P D - L 1 c f R N A レベルと共に、ニボルマブに対する非応答者及び応答者の P D - L 1 c f R N A レベルを示すグラフと、肺腫瘍サンプルの対応する I H C 染色を示す。

【図 5】図 5 A は、P D - L 1 I H C によって決定された P D - L 1 状態と P D - L 1 c f R N A レベルとを相関させるグラフを示す。図 5 B は、P D - L 1 c f R N A レベルとニボルマブ応答状態とを相関させるグラフを示し、P D - L 1 c f R N A レベルに関する臨床的に関連する発現閾値を示す。

【図 6】図 6 A ~ 図 6 D は、癌と診断され、処置を受けている対象の P D - L 1 c f R N A レベルに関する血漿濃度を比較するグラフを示す。

【図 7】図 7 は、抗 P D 1 / P D - L 1 組成物を用いた処置を示唆する、アフィニトールを用いた処置の関数としての P D - L 1 c f R N A レベルを示すグラフを示す。

【図 8】図 8 は、癌処置応答状態を全体的な c f R N A / - アクチン c f R N A と相関させるグラフを示す。

【図 9】図 9 A は、c f R N A レベルによって測定した P D - L 1 及び H E R 2 の相対的な共発現を示すグラフを示す。図 9 B は、H E R 2 c f R N A レベルを、H E R 2 I H C / F I S H によって決定された H E R 2 状態と相関させるグラフを示し、H E R 2 c f R N A レベルに関する臨床的に関連する発現閾値を示す。

【図 10】図 10 は、c f R N A レベルによって測定された胃癌における P D - L 1 及び H E R 2 の相対的な共発現を示すグラフである。

【図 11】図 11 は、ペルツズマブ及びトルスツズマブ (t r u s t u z u m a b) 処置応答を H E R 2 c f R N A レベルと相関させるグラフを示す。

【図 12】図 12 は、選択されたチェックポイント関連遺伝子に関する c f R N A シグネチャーを示す。

【図 13】図 13 は、A R - V 7 c f R N A が好適なマーカーであることを示す、前立腺癌患者における A R - V 7 c f R N A レベル及び A R c f R N A レベルに関する例示的な結果を示す。

【図 14】図 14 は、P C A 3 c f R N A が好適なマーカーであることを示す、非前立腺癌及び前立腺癌患者における P C A 3 c f R N A レベルに関する例示的な結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明者らは、c f R N A が診断、処置の監視のための高感度、選択的、及び定量的マーカーとして、並びに患者の反復及び非侵襲的サンプリングを可能にする発見ツールとしてさえ使用できることを発見した。最も好ましい態様では、c f R N A は、細胞の完全性を保存し、c f R N A 及び / 又は c t D N A を安定化する条件下で処理される全血から単離される。特に、このような細胞保存条件下での全血処理の間に損傷した非腫瘍細胞から放出された R N A に対する c f R N A の比は、臨床的に意味のある結果を提供し得る定量分析を実施するのに十分高い。非核酸成分から分離された後、循環核酸は、好ましくはリアルタイム定量的 P C R を用いて定量化される。従って、本発明者らはまた、血液中の c f R N A の単離、監視及び定量化のためのキット、試薬及び説明書、特に、以下により詳細に議論されるように、特定の遺伝子に関する c f R N A の存在を定量的に決定するのに好適なプライマーのためのオリゴヌクレオチドを意図した。

【0022】

勿論、以下により詳細に議論されるように、1つ以上の所望の核酸が、特定の疾患、疾患段階、特定の変異に関して、又は個人的な変異プロファイル若しくは発現されたネオエピトープの存在に基づいてさえ、選択され得ることを理解するべきである。あるいは、特定の遺伝子の新たな変異又は発現の変化に関する発見又はスクリーニングが所望される場合、患者の c f R N A トランスクリプトームの少なくとも一部をカバーするように、リアル

10

20

30

40

50

タイム定量的PCRをRNAseqによって置き換え、又は補充することができる。更に、分析は、静的に、又は腫瘍若しくは転移の生検を必要とせずに動的画像を得るために反復サンプリングを用いて経時的に行い得ることを理解するべきである。

【0023】

異なる観点から見ると、本発明者らは一般に、発現を同定及び定量化し、且つ生検組織のタンパク質ベースの分析によってのみこれまで利用可能であった疾患の指標及び/又は駆動因子の変化の非侵襲的監視を可能にする、循環腫瘍RNA(cfRNA)の血液ベースのRNA発現試験のための様々な方法及び組成物を発見した。例えば、企図されるシステム及び方法は、疾患の指標及び/若しくは駆動因子の変化を監視すること、並びに/又は化学療法に対する新たな耐性に関連し得る薬物標的の変化を同定することを可能にする。有利には、企図されるシステム及び方法は、他のオミクス分析プラットフォーム、特にGPS Cancer(全ゲノム又はエキソーム配列決定、RNA配列及び発現分析、並びに定量的タンパク質分析を提供する)と統合して、オミクスプラットフォームによって同定される変化が本明細書に提示されるシステム及び方法によって非侵襲的に、分子的に監視される、強力な一次分析/監視組み合わせツールを確立する。

10

【0024】

いくつかの実施形態において、本発明者らは、患者における(例えば、固形)癌の状態を決定する方法を意図し、この方法は、癌との遺伝子の既知の関連及び/又は患者における癌組織の事前のオミクス分析のうち少なくとも1つに基づいて、癌関係遺伝子を選択するステップを含む。別のステップにおいて、癌関係遺伝子のcfRNAが患者の体液(例えば、全血、血清又は血漿)中で定量化され、更なるステップにおいて、cfRNAの量が癌状態に関連付けられる。あるいは、又は癌関係遺伝子に加えて、他のcfRNAもまた監視され得る。例えば、癌状態は、薬物による処置に対する癌の感受性、又は患者における癌の有無であり得る。最も典型的には、癌関係遺伝子は、癌関連遺伝子、癌特異的遺伝子、又は患者及び腫瘍特異的ネオエピトープをコードする遺伝子(GPS Cancerオミクス分析を用いて決定され得る)である。更に企図される態様において、以下により詳細に記載されるように、定量化するステップは、RNA安定化及び細胞保存下でのcfRNAの単離を含み、及び/又は定量化するステップは、cfRNAから調製されたcDNAのリアルタイム定量的PCRを含む。

20

【0025】

別の実施形態では、本発明者らはまた、患者から体液を得るステップと、少なくとも1つのチェックポイント阻害関連遺伝子に関して体液中のcfRNAを定量化するステップとを含み得る、チェックポイント阻害剤による処置のために患者を選択する方法を企図する。他の好適なcfRNAの中でも、特に意図されるcfRNAは、PD-L1及びHER2をコードするcfRNAを含む。勿論、cfRNAは、完全な遺伝子をコードする必要はなく、研究中の遺伝子の断片であり得ることを認識するべきである。次いで、cfRNAの量を、その量を可能性のある処置結果と関連付ける閾値と比較する。その結果、他の選択肢の中でも、処置結果は1つ以上のチェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、PD-L1、TIM3、及び/又はLAG3に対する抗体又は抗体断片)による処置、及び/又は様々な受容体を標的とする抗体(例えば、EGFR、ERCC1、IGF1、HER2など)による処置に関連している可能性がある。

30

40

【0026】

従って、本発明者らはまた、患者の血液サンプル中の第1及び第2のマーカのcfRNA量を決定するステップを含む、癌を処置する様々な方法を意図し、ここで、第1のマーカはチェックポイント阻害関連遺伝子であり、第2のマーカは、癌関連遺伝子、癌特異的遺伝子、又は患者及び腫瘍特異的ネオエピトープをコードする遺伝子のうちの1つである。更に、このような方法における第1及び第2のマーカの量は、(例えば、陽性に)関連することが意図される。次いで、第2のマーカの量を使用して、チェックポイント阻害剤による処置を決定し得る。例えば、第1のマーカはPD-1又はPD-L1(又は他のチェックポイント阻害関連マーカ)であり、第2のマーカはHER2であ

50

る。同様に、第1のマーカ-はPD-1又はPD-L1(又は他のチェックポイント阻害関連マーカ-)であり、第2のマーカ-はネオエピト-ブをコードするcfRNAである。

【0027】

更に別の実施形態において、本発明者らはまた、患者の血液サンプル中の複数のマーカ-のcfRNA量を決定するステップを含む、患者における免疫シグネチャーを決定する方法を意図し、ここで、複数のマーカ-は、チェックポイント阻害関連遺伝子を含む。最も典型的には、決定するステップは、チェックポイント阻害剤、化学療法薬、免疫療法薬、及び放射線処置のうち少なくとも1つによる処置の前又は間に行われる。更に、意図される方法は、少なくとも1つの共刺激マーカ-のcfRNA量を決定するステップ、及び/又は決定された量に基づいて処置計画を生成又は更新するステップを更に含み得る。

10

【0028】

一般に、cfRNA分析は、cfRNAを含む任意の体液を使用して行われることが意図される。従って、好適な体液には、全血、血漿、血清、リンパ液唾液、腹水、脊髄液、尿などが含まれ、これらの各々は新鮮であり、又は保存/凍結され得る。しかしながら、cfRNA分析は、生物学的サンプルとして全血を使用することが特に好ましい。全血は、重大な患者の不快感を伴わずに容易に得られ、単純且つ有効な様式で処理され得る。以下により詳細に記載されるように、本発明者らは、全血から細胞を除去するために使用されるプロトコルがRNAの安定性及び収率に対して有意な影響を有することを発見した。特に、本発明者らは、細胞の完全性を維持する条件下で細胞を全血から除去した場合、定量的cfRNA分析が有意に改善されることを発見した。いかなる理論又は仮説によっても束縛されることを望まないが、本発明者らは、血液中の非腫瘍細胞の細胞溶解が非cfRNAの放出における実質的な寄与因子であることを意図する。更に、特定のRNA安定化剤も、白血球及び赤血球に悪影響を及ぼし得、従って血漿中への非cfRNAの放出に寄与し得る。

20

【0029】

例えば、本明細書に提示される分析のために、標本は、RNA又はDNA安定化剤をそれぞれ含む、無細胞RNA BCT(登録商標)チューブ又は無細胞DNA BCT(登録商標)チューブ(両方とも、Streck Inc., 7002 S. 109th St., La Vista NE 68128から市販されている)中に採取された10mLの全血として許容された。有利には、cfRNAは、無細胞RNA BCTチューブ中の全血中で7日間安定であり、一方、ctDNAは、無細胞DNA BCTチューブ中の全血中で14日間安定であり、cfRNA又はctDNAの分解なしに、様々な位置からの患者サンプルの輸送のための時間を可能にする。しかしながら、RNA安定化剤が実質的な細胞溶解(例えば、3%以下、1%以下、又は0.1%以下、又は0.01%以下、又は0.001%以下)白血球及び/又は赤血球を溶解しない限り、多数の代替の収集チューブ及び組成物も好適であると考えられることに留意するべきである。異なる観点から見ると、好適なRNA安定化試薬は、試薬が血液と組み合わせられた後、血清又は血漿中のRNA量の実質的な増加(例えば、10%以下、又は5%以下、又は2%以下、又は1%以下の総RNAの増加)をもたらさない。勿論、多数の他の又は追加の収集様式もまた適切であると考えられ、且つcfRNA及び/又はctDNAは更なる処理の前に安定性を増加させるために、少なくとも部分的に精製され、又は固相に一時的に吸着され得ることを認識するべきである。

30

40

【0030】

容易に理解されるように、血漿の分画並びにctDNA及びcfRNAの抽出は、多数の様式で行われ得る。1つの例示的な好ましい態様では、10mLチューブ中の全血は、1600rcfで20分間、血漿を分画するために遠心分離される。適切な遠心分離速度は、既知の変換(例えば、RCF=1.1118×10⁻⁵×rpm²、rはロータ半径(cm))に従って、様々なロータに関して計算することができる。次いで、このようにして得られた血漿を、16,000rcfで10分間更に遠心分離して、細胞残屑を除去

50

する。勿論、遠心分離が血液細胞の実質的な細胞溶解をもたらさず / 血液細胞の完全性を維持する限り（例えば、全細胞の3%以下、又は1%以下、又は0.1%以下、又は0.01%以下、又は0.001%以下の溶解）、様々な代替の遠心分離プロトコルもまた好適であると考えられる。次いで、cfDNA及びcfRNAは、Qiagen又は他の市販の試薬を使用して、所望の体積（例えば、2mL）の血漿から抽出され得る。次いで、全ての単離されたctDNA及び / 又はcfRNAを、好ましくはバーコードされたマトリックス貯蔵チューブ中に保持する（例えば、DNAは-4で貯蔵され、RNAは-80で貯蔵され、又はctDNAに逆転写された後、-4で貯蔵される）。

【0031】

cfRNAの定量化は多くの様式で実施することができ、企図される方法には、デジタルPCR法による定量化、外部標準を使用する絶対定量法、及び最も典型的には内部標準を使用する相対定量法（例えば、 2^{-Ct} として表される）が含まれる。例えば、リアルタイムqPCR増幅は、2 μ LのctDNA、プライマー、及びプローブを含有する10 μ Lの反応混合物中のアッセイを用いて行うことができる。-アクチンは、ct-cDNAの入力レベルの内部標準として用いることができる。既知濃度の各分析物を有するサンプルの標準曲線を、各PCRプレート並びに各遺伝子に関する陽性及び陰性対照に含めることができる。次いで、核酸を含むマトリックスチューブ上の2Dバーコードをスキャンすることによって、試験サンプルを同定する。Ct(dCT)は、各分析物に関する定量的PCR(qPCR)増幅に由来するCt値から、個々の患者のそれぞれの血液サンプルに関する-アクチンのCt値を差し引いたものから計算した。患者標本の相対発現は、遺伝子発現値10に設定したUniversal Human Reference RNAの連続希釈のCtの標準曲線を用いて計算する（CTを各分析物の対数濃度に対してプロットした場合）。ctDNAは、同様の様式で分析され得る。

【0032】

ctDNAに関しては、診断試験におけるctDNAの正確性が、癌の診断ツールとして採用されて以来、問題となっていることに注意するべきである。異常に高い偽陽性率を伴う問題は、疾患の進行を監視する際にctDNAに頼る場合、特に疾患の存在の予測にctDNAの使用を考慮する場合に対処する必要がある。図1に示すように、健康な個体は癌患者と同様の量の総ctDNAを産生するが、総cfRNAのレベル（例えば、-アクチンを使用する定量化によって決定されるような）は、健康な個体において有意に低い。更に、実質的な細胞溶解をもたらさない条件下でcfRNA単離プロトコルを実施した場合、総cfRNAのレベルは、癌患者と健康な個体との間で有意に異なった。実際に、健康な個体の群の間に重複はなく、それによって癌患者がそれらの総cfRNAレベルによって区別されることを可能にした。逆に、癌患者と健康な個体におけるctDNAのレベルの間には重複があった。従って、ctDNAは、これらの2つの群を区別することができなかつた。更に意図される方法において、総cfRNAが単離される場合、cfDNAは適切なDNaseを使用して（例えば、DNAのオンカラム消化を使用して）除去及び / 又は分解され得ることを理解するべきである。同様に、ctDNAが単離される場合、cfRNAは、適切なRNaseを使用して除去及び / 又は分解され得る。更に、cfRNA（ここではPD-L1）の線形検出範囲は、以下により詳細に示すように、実質的な細胞溶解をもたらさない条件下で単離プロトコルを行った場合に有意であった。

【0033】

cfRNAという用語は、全長RNA及び全長RNAの断片（50~150塩基、15~500塩基、又は500~1,000塩基以上の長さを有し得る）を含むことに留意するべきである。従って、cfRNAは、全長RNA（典型的にはmRNA）の100~80%、又は80~60%、又は60~40%、又は40~20%、又は更にそれ未満であり得るRNAの一部を表し得る。更に、cfRNAという用語は、典型的には腫瘍由来RNA（非腫瘍細胞由来のRNAとは対照的に）を指し、従って、cfRNAは、固形腫瘍の腫瘍細胞、血液由来癌、循環腫瘍細胞、及びエキソソーム由来であり得ることを理解するべきである。しかしながら、最も典型的には、cfRNAは膜によって封入されない（

10

20

30

40

50

従って、循環腫瘍細胞又はエキソソーム由来である)。更に、cfRNAは腫瘍において(例えば、薬物耐性の関数として、又は処置レジメンにตอบสนองして、スプライスバリエーションとしてなど)、又は遺伝子の変異形態として(例えば、融合転写物として、単一又は多塩基変異を有する遺伝子の転写物としてなど)独特に発現され得ることを理解するべきである。従って、異なる観点から見ると、企図されるcfRNAは特に、対応する非腫瘍細胞と比較して腫瘍細胞に固有であり、又は対応する非腫瘍細胞と比較して腫瘍細胞において有意に過剰発現(例えば、少なくとも3倍、又は少なくとも5倍、又は少なくとも10倍)しており、又は対応する非腫瘍細胞と比較して変異(例えば、ネオエピトープを導くミスセンス又はナンセンス変異)を有する転写物を含む。

【0034】

従って、好適な標的核酸に関して、適切な標的は特に、疾患及び/又は疾患の処置に関連する遺伝子を含むことを理解するべきである。例えば、疾患標的は、1つ以上の癌関連遺伝子、癌特異的遺伝子、患者及び腫瘍特異的変異を有する遺伝子(及び特にネオエピトープの形成を導くもの)、癌ドライバー遺伝子、並びに癌において過剰発現されることが知られている遺伝子を含む。結果として、好適な標的は、「機能的」タンパク質(例えば、酵素、受容体、転写因子など)をコードするもの、及び「非機能的」タンパク質(例えば、構造タンパク質、チューブリンなど)をコードするものを含む。異なる観点から見ると、好適な標的はまた、罹患した細胞又は器官(例えば、前立腺に関するPCA3、PSAなど)に特異的である標的、又はKRAS(例えば、G12V、G12D、G12Cなど)若しくはBRAF(例えば、V600E)における様々な変異などの、異なる癌においてより一般的に見出される標的を含むことができる。本発明者らによって確認された例示的な標的には、AKT1、BRAF、CDK6、CYP3A4、ERBB3、FGFR1、JAK1、MAP2K1、AR-V7、ALK、BRCA1、CDKN2A、DDR2、ERBB4、FGFR2、JAK2、MET、AR、ARAF、BRCA2、CTNNB1、OPYD、FGF19、FGFR3、KOR、MTOR、PD-U、ATM、CCND1、CYP2C19、EGFR、FGF3、FLT3、KIT、NRAS、PD-1、BIM、CDK4、CYP2D6、HER2、FGF4、HRAS、KRAS、NRG1、TIM3、NTRK1、PTCH1、SMO、NTRK2、PTEN、STK11、NTRK3、RAF1、LAG3、TP53、PDGFRA、RET、TSC1、PIK3CA、ROS1、TSC2及びUGT1A1が含まれる。

【0035】

従って、好適な処置標的は、特定の分子実体を標的とする特定の薬物による処置に対する疾患細胞の感受性を示す1つ以上のマーカーを含むことを理解するべきである。例えば、本明細書に提示されるシステム及び方法は、キナーゼ阻害剤によって標的化される特定のキナーゼの存在及び発現レベル、又は合成リガンドによって標的化される特定のシグナル伝達受容体の存在及び発現レベル、又は合成アンタゴニスト若しくは抗体などによって標的化される特定のチェックポイント受容体の存在及び発現レベルを同定するために有用であり得、且つ好適な標的はまた、下記の表1に示すように、適応によってグループ化され得る。

【0036】

【表1】

	EGFR	ROS1	KRAS	ALK	PD-L1	NRAS	BRAF	AR-V7
肺	✓	✓	✓	✓	✓			
結腸			✓		✓	✓	✓	
前立腺					✓			✓
黒色腫					✓		✓	

表1

10

20

30

40

50

【0037】

腫瘍関連抗原及び腫瘍特異的抗原のような既知のマーカーに加えて、患者の腫瘍の事前のオミクス分析は、1つ以上のネオエピトープの存在を明らかにし得ることも理解すべきである。例えば、以前の分析は、好ましくは米国特許第9721062号に記載されているような増分同期アラインメントを使用して、及び/又はRNAseqを使用して、全ゲノム又はエキソームの腫瘍対一致正常比較によって行うことができる。加えて、最も好ましくは定量的質量分析法を用いて、プロテオミクス分析を行うことができる。従って、cfRNAはまた、cfRNAがそのような患者及び腫瘍特異的変異（例えば、ネオエピトープ）を含む場合、患者及び腫瘍特異的様式で腫瘍RNAを検出するために使用され得ることを理解すべきである。例えば、このような検出は、特に処置が患者及び腫瘍特異的変異（例えば、ネオエピトープ）を標的とする免疫療法である場合、処置効果を監視する際に有用であり得る。別の例において、患者及び腫瘍特異的変異の検出はまた、免疫又は化学療法で処置され得る（新たに生じた）処置標的を明らかにし得る。

10

【0038】

従って、企図される組成物及び方法は、疾患関連マーカーの発見において、より典型的には好適な標的の定量化において使用されて、処置のための機構的標的の存在に関する情報を得、及び/又は癌細胞集団が処置に従うか、若しくは応答発生を予測するための定量的なプロキシマースラインを得ることができると理解すべきである。例えば、意図される組成物及び方法は、標的がネオエピトープである場合、ネオエピトープの発現及び量を使用して、ネオエピトープを治療標的として検証し、ネオエピトープの発現及び量を処置進行のためのプロキシマースラインとして使用することができる免疫療法に特に好適である。従って、cfRNAは、処置の前、処置の間、及び処置の後に発現されたネオエピトープの存在を確認するために使用され得、従って個体レベルで処置効力を予測及び/又は定量化することを可能にすることに注目すべきである。

20

【0039】

あるいは、及び他の好ましい使用の中でも、cfRNAを定量化して、チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1及びPD-L1を標的とする）を用いた処置に好適な患者を同定し得る。これは、PD-1及びPD-L1のレベルを確認するための便利且つ非侵襲的な方法が現在存在せず、患者がチェックポイント阻害剤（例えば、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブなど）を用いた処置から利益を得るかどうかを臨床医に知らせるので、特に有用である。実際、プログラムされた死リガンド1（PD-L1）又はその受容体、プログラムされた死1（PD-1）のような免疫チェックポイントは、多数の腫瘍タイプに関するアキレス腱であるように思われる。PD-L1は、腫瘍細胞に免疫逃避を提供するだけでなく、活性化T細胞のアポトーシススイッチをオンにする。この相互作用をブロックする処置は、いくつかの腫瘍タイプにおいて有望な臨床活性を示した。腫瘍PD-L1発現状態は、黒色腫（MEL）、腎細胞癌（RCC）、及び非小細胞肺癌（NSCLC）を含む多数の腫瘍タイプにおいて予後が示されている。加えて、腫瘍性PD-L1発現は、抗PD-1抗体に対する応答と密接に相関するよう思われる。しかしながら、PD-L1発現を定量化するための標準として一律に受け入れられる試験はない。更に、いくつかの抗PD-L1抗体が臨床試験段階にあり、2つがNSCLCを処置するためにFDAによって既に承認されている。従って、患者に抗PD-L1免疫療法を与える前に、PD-L1発現を測定することが重要である。本発明者らは、PD-L1発現及び他の免疫療法に関連する癌マーカーが、以下により詳細に示すように、様々な癌タイプから単離されたcfRNAにおけるPD-L1（及び他のマーカー）発現の頻度及びレベルを分析することによって、cfRNAを使用して定量化され得ることを今回発見した。

30

40

【実施例】

【0040】

全血からのcrRNAの単離：全血を静脈穿刺によって得、10mlを、RNA又はDNA安定剤をそれぞれ含む無細胞RNA BCT（登録商標）チューブ又は無細胞DNA BCT（登録商標）チューブ（Streck Inc., 7002 S. 109th

50

St., La Vista NE 68128) に収集した。次いで、サンプルチューブを 1,600rcf で 20 分間遠心分離し、血漿を取り出し、更に 16,000rcf で 10 分間遠心分離して、細胞残屑を除去した。血漿を使用して、市販の RNA 単離キットを使用して製造業者のプロトコル(僅かに変更)に従って cfRNA を単離した。詳細には、オンカラム DNAse 消化でサンプルから DNA を除去した。

【0041】

代替的なアプローチでは、cfRNA は、QiaSymphony 機器(Qiagen, 19300 Germantown Road; Germantown, MD 20874) 上のロボット抽出法を用いて自動化された様式でも得られ、該方法は、所望される場合、DNA 除去に適応するように僅かに変更された。ロボット抽出は、cfRNA サンプル中の約 12% の DNA 汚染を維持した。本発明者らは、同じ 21 の NSCLC サンプルにおける切除修復交差補完酵素(ERCC1) 対 アクチンの相対発現を測定して、2 つの抽出手順の間に有意差があるかどうかを決定した。特に、下記の表に示すように、自動化プロセス及び手動プロセスによって生成された相対発現に統計的差異はなかった。p = 0.4111 (対 t 検定; この検定では統計的差異は p < 0.05 であった)。

10

【0042】

【表 2】

サンプル#	手動 (ERCC1) CT	手動 ACTB CT	手動 2^-ΔCT	手動 相対 発現	Qiasymphony (ERCC1) CT	Qiasymphony ACTB CT	Qiasymphony 2^-ΔCT	Qiasymphony 相対(ERCC1) 発現
1	30.09	22.31	0.00	2.75	29.76	22.27	0.01	3.37
2	31.22	23.46	0.00	2.79	31.30	23.35	0.00	2.47
3	31.50	23.65	0.00	2.64	30.64	23.48	0.01	4.26
4	32.02	24.35	0.00	2.97	30.58	23.41	0.01	4.21
5	31.60	25.12	0.01	6.78	31.79	24.20	0.01	3.15
6	30.30	23.54	0.01	5.61	30.47	22.96	0.01	3.31
7	30.94	22.33	0.00	1.54	30.49	20.35	0.00	0.54
8	31.96	24.60	0.01	3.67	31.16	24.05	0.01	4.38
9	31.74	23.29	0.00	1.74	30.67	23.52	0.01	4.26
10	31.73	24.64	0.01	4.43	31.87	24.18	0.00	2.94
11	29.77	22.23	0.01	3.25	30.52	22.21	0.00	1.92
12	31.44	24.19	0.01	3.99	30.85	24.20	0.01	6.07
13	31.48	23.73	0.00	2.82	31.28	23.59	0.00	2.94
14	29.61	21.91	0.00	2.92	29.11	21.58	0.01	3.28
15	30.47	24.20	0.01	6.76	30.35	23.45	0.01	6.59
16	30.30	23.91	0.01	6.21	31.56	24.31	0.01	5.19
17	30.55	23.73	0.01	4.60	29.60	22.16	0.01	4.53
18	30.77	23.92	0.01	4.49	32.34	23.87	0.00	2.23
19	30.90	24.79	0.01	7.56	32.17	24.21	0.00	3.16
20	31.90	23.52	0.00	1.57	31.66	23.24	0.00	2.31
21	30.42	23.85	0.01	5.48	30.50	23.29	0.01	5.33

20

30

【0043】

Qiagen からのカスタムキット(QiaSymphony Circulating NA Kit #1074536) は、1 つのカスタムキット中に 2 つのウイルス抽出キットを含んでいた(ウイルスキットは、QiaSymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit Version 1 #937055 と呼ばれる)。分析は、Qiagen 機器(Qiagen からのカスタムプログラムプロトコル CF 2000S_CR21040_ID993) 上の単一の専用のプログラム内で行った。

40

【0044】

cfRNA の定量化: 特に断らない限り、内部対照として - アクチンのプライマー対と共に rtPCT 及び遺伝子特異的プライマー対による相対的な定量化を用いて定量化を行った。例えば、増幅は、2 μL の cDNA、プライマー、及びプローブを含有する 10 μL の反応混合物中でのアッセイを用いて行った。 - アクチンは、ct-cDNA の入力レベルの内部標準として用いることができる。既知の濃度の各分析物を有するサンプルの標準曲線を、各 PCR プレート並びに各遺伝子に関する陽性及び陰性対照に含めた。核酸を含むマトリックスチューブ上の 2D パーコードをスキャンすることによって、試験サ

50

ンプルを同定した。Ct (dCT) は、各分析物に関する定量的PCR (qPCR) 増幅に由来するCt値から、個々の各患者の血液サンプルに関する - アクチンのCt値を差し引いたものから計算した。患者標本の相対発現は、遺伝子発現値10に設定したUniversal Human Reference RNAの連続希釈のCtの標準曲線を用いて計算した (Ctを各分析物の対数濃度に対してプロットした場合)。ctDNAを同様の様式で分析した。

【0045】

それぞれの遺伝子試験に関するCt対 \log_{10} 相対遺伝子発現 (標準曲線) を、反応 (歴史的反応) の数百のPCRプレートにわたって捕捉した。各アッセイに関して線形回帰分析を行い、これを用いて、先に進む元の標準曲線からの単一点から遺伝子発現を計算した。

10

【0046】

特に、図1に示すように、ctDNAは、健康なドナー及び癌患者、非小細胞癌 (NSCLC)、10人の癌及び9人の健康な個体から定量化された。統計的に有意な差は、2つの集団間の総ctDNAでは過剰には認められなかった。対照的に、総cfRNA量 (- アクチンによって測定される) は、2つの集団間で有意に異なり、総cfRNAの測定が癌の存在に関する有効な指標であり得ることを示した。

【0047】

次いで、本発明者らは、上記の結果が様々な他の癌タイプ及び選択された遺伝子 (例えば、PD-L1) にわたって確認され得るかどうかを研究し、乳癌、結腸癌、胃癌、肺癌、及び前立腺癌と診断された選択された患者からの血液サンプルを分析した。この一連の試験では、PD-L1cfRNAの相対発現を定量化した。結果を図2Aに示す。興味深いことに、全ての癌が図2Aに示すようにPD-L1を発現したわけではなく、様々な癌における陽性の頻度は、固形組織におけるIHCを用いたPD-L1の公表された発現と一致した。PD-L1cfRNAは、図2Bから分かるように、健康な患者では検出できなかった。

20

【0048】

アッセイバリデーション - 正確性: 例示的なPD-L1発現アッセイの正確性は、61の臨床サンプルからの本PD-L1アッセイ (「LiquidGeneDx」) によって生成された結果をデジタルPCR PD-L1アッセイ (実験室開発参照法、代替PD-L1検出アッセイ) と比較することによって決定した。結果を用いて、アッセイの臨床感度及び臨床特異性を決定した。本PD-L1アッセイ及びデジタルPCR PD-L1アッセイからの正確性の結果を表2に要約する。

30

【0049】

【表3】

	陽性一致率 (LiquidGeneDx 対デジタル PCR)	陰性一致率 (LiquidGeneDx 対デジタル PCR)
PD-L1	91%	94%

40

表2

【0050】

アッセイバリデーション - 検出限界 (LOD): 本PD-L1アッセイ (「LiquidGeneDx」) の分析感度を、95%検出率での20回の反復により決定した。cfRNAを患者の血漿から抽出し、ランダムヘキサマーを使用してcDNAに逆転写し、ThermoFisherの前増幅産物Taqman (登録商標) Preamp Master MixをPD-L1及び - アクチンプライマーと共に使用して、製造業者の説明書に従って10サイクル前増幅した。得られた前増幅cDNAを、患者の血漿からのPD-L1陰性のcDNAで2倍インクリメントで希釈した。全ての希釈サンプルを、増幅

50

及び成功したPCRに必要とされる最小量のPD-L1 cDNAに関して、Liquid GeneDxによって試験した。次いで、推定LODレベルでの20回の反復を使用して、最終LODを確認した。この研究における検出限界(LOD)合格基準は、20回の反復の全てで検出率が95%を超える最低濃度として決定した。20回の反復で検出率が95%を超えることができなかつた場合、次に高い濃度の希釈サンプルを推定LODとして使用して、20回の反復を用いて繰り返した。LOD試験結果の要約を表3に示し、*は最終LODを示す。

【0051】

【表4】

PD-L1 希釈 サンプル	有効陽性結果/総検査値					
	1.884ng	0.941ng	0.471ng	0.236ng	0.118ng*	0.059ng
PD-L1 発現	4/4	4/4	4/4	4/4	20/20	15/20

10

表3

【0052】

アッセイバリデーション - 検出限界(LOD) : 精密パネルは、低陽性PD-L1サンプル、中陽性PD-L1サンプル、高陰性PD-L1サンプル、陽性対照、及び鑄型なし対照を含んだ。全ての陽性サンプルは、PD-L1陽性癌細胞株から作製した。各精密パネルを、3人の異なる操作者(Op)によって、合計3日間(連続又は非連続)、1日当たり2つの機器に関して、1ラン当たり4連で、機器当たり2回試験した。精密パネルの各サンプルは、3日間にわたり合計48のデータ点を生成した。試験デザインを表4に示す。

20

【0053】

【表5】

	機器1		機器2	
	1日目	Op 1	Op 2	Op 3
2日目	Op 2	Op 3	Op 1	Op 2
3日目	Op 3	Op 1	Op 2	Op 3

30

表4

【0054】

アッセイ内精度は、2つの機器、2人の操作者、1日、及びサンプル当たり4回の反復を使用して行った。全ての反復試験の結果一致率は96%以上である。表5は、アッセイ内精度の例示的な要約である。

【0055】

【表6】

サンプル		発現	操作者1			操作者2		
			ラン1	ラン2	ラン3	ラン1	ラン2	ラン3
1	陽性	PD-L1	100%	96%	100%	100%	100%	100%
2	陰性	水	100%	100%	100%	100%	100%	100%

40

表5

【0056】

2つの機器、2人の操作者、3回のランを3日間にわたって行い、4連のランをアッセイ間精度に関して試験した。結果一致率は、独立したランにわたる全ての反復に関して9

50

6%以上に達した。結果の要約を表6に示す。

【0057】

【表7】

比較	標準	結果
操作者#1 対 操作者#2	結果一致率	99%
ラン間、操作者#1	結果一致率	96%
ラン間、操作者#2	結果一致率	100%

表6

10

【0058】

アッセイバリデーション - 線形範囲：本PD-L1アッセイ（「Liquid Gene Dx」）の定量的線形範囲を、cfRNA由来のPD-L1陽性患者のcDNAをプールされた陰性マトリックス（cfRNA由来のPD-L1陰性cDNA）に希釈することによって決定した。ctRNAを患者の血漿から抽出し、ランダムヘキサマーを使用してcDNAに逆転写し、Thermo Fisherの前増幅産物Taqman（登録商標）Preamp Master MixをPD-L1及び - アクチンプライマーと共に使用して、製造業者の説明書に従って10サイクル前増幅した。得られた前増幅cDNAを、患者の血漿からのPD-L1陰性のcDNAで2倍インクリメントで希釈した。全ての希釈サンプルをLiquid Gene Dx PD-L1によって試験して、その定量的直線範囲を決定した。図2Cは、最終的な線形範囲を示す。線の直線部分は、約32.5のCtまで延在する。 - アクチン及びPD-L1勾配も一致する。

20

【0059】

アッセイバリデーション - 特異性：試験サンプルを、TEバッファーマトリックス中のヒトPD-L1細胞株cDNAの連続希釈によって調製した。中陽性サンプルに関する標的分析物の濃度は、LOD濃度の4倍であった。各干渉物質を有する中陽性サンプル（各干渉物質を有する1つの分析物）及びベースラインサンプルを、本PD-L1アッセイ（「Liquid Gene Dx」）によって3連で試験した。表7は、干渉物質及びそれらの試験濃度のリストである。異なる干渉物質の試験濃度を有する全てのサンプルは、依然として、Liquid Gene Dx PD-L1アッセイによって陽性であると決定された。

30

【0060】

【表8】

干渉物質	干渉濃度
バッファ ACL	総量の0.1%
バッファ ACB	総量の0.2%
バッファ ACW1	総量の1%
バッファ ACW2	総量の1%
バッファ AVE	総量の1%
アルブミン	2 mg/mL
カゼイン	2 mg/mL
ヘモグロビン	0.4 mg/mL
アクチンDNA/RNA 混合物	総量の1 ng

40

表7

【0061】

特に、異なる干渉物質の試験濃度を有する全てのサンプルは、依然として、Liquid

50

d Gene Dx PD - L 1 アッセイによって陽性であると決定された。

【0062】

本 PD - L 1 アッセイ (「Liquid Gene Dx」) は、癌患者の血液中の PD - L 1 遺伝子及び他の遺伝子の発現を検出するためのリアルタイム PCR アッセイとして設計された。他の利点の中でも、そのような測定は、薬物療法の前及び間に、特定の薬物 (例えば、抗 PD - 1 抗体) を用いた可能性のある処置成功に関して臨床医に知らせることができる。

【0063】

cfRNA が正確に定量化され得るという上記の知見に基づいて、本発明者らは、定量化された cfRNA レベルがまた、FISH、質量分析などのような従来の方法によって測定される既知の分析物レベルと相関するかどうかを決定することを追求した。より詳細には、PD - L 1 発現の頻度及び強度を、Liquid Genomics Dx を使用して、320 人の連続した NSCLC 患者の血漿からの cfRNA によって測定し、また組織 IHC 試験を使用して、ペンプロリズマブ (Keytruda) の登録試験である Keynote Trial における陽性患者の頻度と比較した。特に、Keynote 試験における NSCLC 患者の 66% (1,475 / 2,222) は IHC による PD - L 1 の発現を有し (> 1% の細胞陽性)、一方、PD - L 1 の血液ベース cfRNA 試験を有する NSCLC 患者の 64% (204 / 320) は、図 3 A 及び 3 B から分かるように陽性であった。注目すべきことに、2 つの分析方法の間で PD - L 1 状態に有意差はなかったが、cfRNA 試験は定量的データを与えた。

【0064】

特に、2 人の選択患者 (Pt # 1 及び Pt # 2) の PD - L 1 状態の差異 (即ち、PD - L 1 陽性又は PD - L 1 陰性) も、図 4 から分かるように、IHC 分析及びニボルマブによる処置応答とよく相関していた。ここでは、2 人の扁平上皮肺癌患者を抗 PD - 1 抗体ニボルマブで処置した。患者 1 は、cfRNA 測定を用いて、組織又は血液中で PD - L 1 の発現を有さなかった。患者 1 はニボルマブに応答しなかった。腫瘍増殖は CT スキャンによって証明され、患者は急速に死亡した。対照的に、患者 2 は、cfRNA 測定を用いて、ベースラインで組織及び血液中に高レベルの PD - L 1 を有した。患者 2 は、薬剤の数サイクルにわたって持続的な応答でニボルマブに応答した。この応答は、劇的な腫瘍縮小を伴う CT スキャンによって実証された。興味深いことに、この患者の血液中の高レベルの遺伝子発現 (cfRNA によって測定) は 3 週間半後に消失したが、患者は応答し続けた。

【0065】

上記の観察された相関に基づいて、本発明者らは、PD - L 1 cfRNA の発現レベルが PD 1 / PD - L 1 シグナル伝達を妨害するニボルマブ又は他の治療剤を用いた処置に対する応答予測に好適な閾値レベルを提供し得るか否かを研究することを開始した。そのために、PD - L 1 発現を、cfRNA を用いて NSCLC 患者血漿中で測定し、IHC 状態と比較した。図 5 A は、cfRNA による応答閾値を上回る IHC 及び PD - L 1 発現によって決定されるような、抗 PD - L 1 治療剤を用いた処置応答状態と PD - L 1 状態との間の相関を示す。処置応答者と判定された患者は PD - L 1 陽性として IHC によっても判定されたが、処置に対する非応答者と判定された患者は全て、PD - L 1 陰性として IHC によって判定された。注目すべきことに、応答閾値をその後のデータに適用した場合、PD - L 1 cfRNA レベルを使用して、応答者と非応答者との間の同じ分離を達成することができた。この例では、10 の相対発現閾値が応答者を非応答者から正確に分離した。図 5 B は、 α -アクチンに対する PD - L 1 に関して $CT > 10$ の cfRNA 応答閾値が PD 1 / PD - L 1 チェックポイント阻害剤 (ここではニボルマブ) に対する陽性応答を予測することを示す。ニボルマブに対する全ての応答者は、処置前に閾値レベルを超える PD - L 1 を発現した。

【0066】

本発明者らは更に、PD - L 1 cfRNA 発現レベルが、進行性疾患 (PD)、安定

10

20

30

40

50

疾患（SD）、及び/又は部分応答（PR）の指標として、他の癌処置において使用できるかどうかを研究した。その目的のために、cfRNAによって測定されたPD-L1の動的変化が図6A～6Dに例示的に示すように、様々な処置レジメン下での処置過程の間に見出された。パネルAは、進行性疾患を有する患者におけるアブラキサンを用いた乳癌の処置過程にわたるPD-L1の相対発現レベルを示す。処置に対する応答の欠如は、PD-L1 cfRNAの上昇に反映され、CDX-011（グレムバツムマブ・ベドチン）を用いた処置に有利なようにアブラキサン処置を中止した。図6Aから分かるように、CDX-011を用いた処置は疾患安定化をもたらし、これはまた、PD-L1 cfRNAの減少に反映される。同様に、図6Bから分かるように、肺癌患者は、カルボプラチン/アリムタ併用療法で安定した疾患で処置され、患者が部分応答を示すにつれて、最初は高レベルのPD-L1 cfRNAが劇的に減少した。結腸癌の場合、進行性疾患を有する患者は、カペシタビン及びベバシズマブで処置された。処置中、相対PD-L1 cfRNA発現は有意に増加した。5-FU及びベバシズマブで癌を処置すると、図6Cから分かるように、患者は、PD-L1 cfRNAレベルの有意な低下を伴う部分応答を有した。従って、本発明者らは、PD-L1 cfRNAの定量的レベルがまた、処置応答を監視するために正確に役立ち得ることを意図する。

【0067】

更に別の例において、本発明者らは、図6Dに示すように、エキセメスタン/アフィニトールを用いた処置の際に、安定な疾患の乳癌を有する患者におけるPD-L1 cfRNAの急速な増加を観察した。特に、患者は、処置前に測定可能な量のPD-L1 cfRNAを有していなかった。この観察に基づいて、本発明者らはアフィニトール処置を受けた更なる乳癌患者サンプルを試験した。例示的な結果を図7に示す。容易に明らかなように、相対的なPD-L1 cfRNAは、第2の採血で、PD1/PD-L1チェックポイント阻害剤による処置に好適なレベルまで、処置後に有意に増加した。従って、本発明者らはまた、癌処置（特にPD1/PD-L1チェックポイント阻害剤以外の薬物を使用するもの）に続いて、PD-L1 cfRNA発現の出現を同定するためにPD-L1 cfRNAを少なくとも監視することができ、次いでPD1/PD-L1チェックポイント阻害剤による処置の指標として役立つことができることを企図する。異なる観点から見ると、癌処置中の以前には検出できなかったPD-L1 cfRNA発現の検出及び定量化は、PD1/PD-L1チェックポイント阻害剤で患者を（更に）処置するための指標として使用され得る。

【0068】

興味深いことに、図8から分かるように、癌の疾患状態はまた、少なくともある程度 - アクチンcfRNAに類似していた。血液はCTスキャンが行われるのと同時に、6～8週間毎に様々な治療下の患者から採血された。転移性乳癌を有する45人の患者の血漿からcfRNAを抽出し、30人の患者は最初の2サイクルの治療を完了した：PRを有する6/6の患者は、 - アクチンcfRNAレベルの変化を示さず（NC）又はレベルが減少し（DEC）、SDを有する13/16の患者は、cfRNAレベルのNC又はDECを示し、PDを有する6/8の患者は、cfRNAレベルの増加（INC）を受けた。cfRNAをランダムヘキサマーでcDNAに逆転写した。cfRNAのレベルをRT-qPCRで定量化し、CTスキャンで測定して、患者の応答（PR/SD/PD）と相関させた。cfRNA（PD-L1及びHER2を含む）における遺伝子発現のレベルを、採血中の患者において監視した。特に、進行性疾患を有する乳癌患者の - アクチンcfRNAレベルは、安定疾患及び/又は部分応答を有する患者の - アクチンcfRNAレベルより高かった。従って、 - アクチンcfRNAレベルの増加は、疾患状態、特に癌と既に診断された患者における進行性疾患の主要な指標として役立ち得ることを理解するべきである。

【0069】

乳癌サンプルの更なる研究に際して、本発明者らはまた、図9Aに示すように、腫瘍におけるHER2 cfRNAがPD-L1と共発現又は共調節されているように思われる

ことを発見した。これに基づいて、本発明者らは、次いで、抗HER2抗体を使用する免疫組織化学分析(IHC)によるHER2状態分類を使用して、IHC-HER2状態を、cfRNAレベルによって測定されるHER2の定量的相対発現と相関させた。注目すべきことに、HER2 cfRNA発現レベルとIHC-HER2状態との間に有意な相関(82%一致)があり、図9Bに例示的に示すように、-アクチンに対するHER2に関してCT>5を適用した。従って、HER2状態はまた、上記に提供されるような発現閾値を使用するHER2 cfRNAの検出及び定量化を用いて決定できることが意図される。

【0070】

更なる実験において、本発明者らはまた、少なくともいくつかの胃腫瘍におけるHER2 cfRNAも、図10に示すように、PD-L1と共発現又は共調節されているように見えることを発見した。このような発見は、全胃癌の約15%がHER2を発現することが知られていることから、特に注目に値する。結果として、本発明者らは、胃癌患者におけるHER2 cfRNAを検出又は定量化する方法を企図する。更に、本発明者らはまた、cfRNAによって測定される1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子(例えば、PD-L1、TIM3、LAG3)が他の癌特異的マーカー又は腫瘍関連マーカー(例えば、CEA、PSA、MUC1、ブラキュリなど)のためのプロキシマーカーとして使用され得ることを意図する。

10

【0071】

容易に理解されるように、HER2 cfRNAレベルの定量化はまた、処置に続いて、特に、抗HER2薬物を用いた処置が治療効果を有するか否かを評価するために使用され得る。例えば、転移性乳癌患者のコホートの例示的な2人の患者(それぞれ25及び12)における2つの抗HER2薬物(ペルツズマブ及びトルスツズマブ(trustuzumab))に対する部分的処置応答は、図11に示すように、陽性応答がcfRNAの減少と直接相関することを示した。実際に、過去3ヶ月間の処置では、検出可能な量のHER2 cfRNAは存在しなかった。

20

【0072】

観察された共発現又は共調節に基づいて、本発明者らは、次いで、免疫チェックポイント関連遺伝子の他のcfRNAレベルがPD-L1 cfRNAレベルと相関するかどうかを研究した。例示的な結果を図12に示す。ここで、PD-L1、TIM3、及びLAG3のcfRNAレベルを前立腺癌患者の血液サンプルから測定した。特に、1つを除く全てのサンプルにおいて、2つ以上のチェックポイント関連遺伝子が強く発現された。興味深いことに、また重要なことに、TIM3及びLAG3のレベルは、その前者がPD-1又はPD-L1阻害のための逃避メカニズム又は耐性因子として働くことが示されており、しばしばPD-L1発現を反映し、PD-1及びPD-L1以外の全てのチェックポイントタンパク質に対処する必要性を強調している。従って、免疫チェックポイント関連遺伝子のcfRNAレベルを癌患者に関して分析して、免疫シグネチャー又は患者を得ることができ、次いで、2つ以上のチェックポイント阻害薬を用いた適切な処置を勧めることができることを理解するべきである。理解されるように、遺伝子に関する好適な閾値は、上記のPD-L1及びHER2に関して記載される方法に従って確立され得る。

30

40

【0073】

本発明の主題の尚更なる態様において、様々な代替のcfRNA種は、健康な個体を癌に罹患した個体から定量的に区別すること、及び/又は処置応答を予測することが実証された。例えば、アンドロゲン受容体のスプライスパリアント7(AR-V7)の検出は、ホルモン療法による前立腺癌の処置のための重要な考慮事項であった。従って、本発明者らは、ホルモン療法耐性が前立腺癌腫瘍増殖と、AR-V7 cfRNAの検出及び定量化を介したAR-V7の検出とに関連するか否かを研究した。図13は、前立腺癌患者からの血漿を使用するcfRNA法によるAR及びAR-V7遺伝子発現に関する例示的な結果を示す。AR-V7も、同じ患者からのCTCからのIHC技術を用いて測定した。特に、AR-V7のCTC及びcfRNAの結果は一致していた(データは示されていない)

50

い)。

【0074】

更に、PCA3は、PCA3 cfRNAが前立腺癌患者からの血漿中で検出及び定量化され、非前立腺癌患者サンプルが比較的低レベルから非検出レベルを有していた試験において、前立腺癌のマーカーとして同定された。非前立腺癌患者は、NSCLC及びCRC患者であった。図14から分かるように、PCA3は、cfRNAによって2つの群の間で差次的に発現されることが示され(前立腺癌患者と非前立腺癌患者との間の非重複中央値)、非侵襲的血液ベースcfRNA試験が前立腺癌を検出するために使用され得ることを示す。もう一度、試験された集団の先験的知識に基づいて、発現に関する閾値(ここでは、 α -アクチンに対するPCA3に関して $CT > 10$)が図14に例示的に示すように確立され得る。

10

【0075】

尚更なる研究において、本発明者らは、遺伝子発現及びcfRNAを含む核酸の総レベルにおける動的変化を測定するためのツールとして、癌患者(pt)の血漿から抽出された総無細胞循環腫瘍RNA(cfRNA)の分析を用いた。これらの分析は、疾患状態に関する洞察を更に再び提供し、抗腫瘍療法に対する転帰を予測することを可能にした。

【0076】

より詳細には、CTスキャンが行われたのと同時に、6~8週毎に様々な処置(tx)の下でptから血液を採取した。得られた血漿からcfRNAを抽出し、ランダムヘキサマーを用いて上記のようにcDNAに逆転写した。総cfRNAのレベルをRT-qPCRで定量化し、CTスキャンで測定したpt応答(PR/SD/PD)と相関させた。この研究では、合計30人の肺癌ptが2年臨床試験に登録された。民族性は、白人73%(22/30)、ヒスパニック20%(6/30)、その他7%(2/30)であった。非SQCCは全体の87%(26/30)であった。23ptがtxの最初の2サイクルを完了した。これらのうち、進行性疾患(PD)を有する6/8のptは、総cfRNAの増加した(INC)レベルを示し、安定疾患(SD)を有する8/12のptは変化なし(NC)又は減少した(DEC)総cfRNAのいずれかを示し、また部分応答(PR)を有する3/3のptはDEC総cfRNAを有し、これは、総cfRNAとpt応答との間の74%一致に対応する。血漿cfRNAにおいて測定されたPD-L1発現は、7/10のptにおける組織のものと同じであった。PD-L1が血中で陰性であり、組織中で陽性であった1ptでは、ptはペンブロリズマブに進んだ。免疫療法(ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ)で処置した7ptのうち、PDを有する3/3ptがINC PD-L1 cfRNA発現を示し、SDを有する3/3ptがPD-L1 cfRNAにおいてNCを有し、PRを有する1ptがDEC PD-L1 cfRNAを示し、これは、PD-L1発現レベルとpt応答との100%相関に対応する。処置後、NSCLCptにおける臨床応答と血漿cfRNAレベルの変化との間に有意な一致が観察された(74%)。pt血漿中のPD-L1発現の検出はまた、同じptの組織から得られた結果と相関した(70%)。標的療法を受けている間、7/7のptにおいてPD-L1発現のレベルは応答と相関した。従って、cfRNAレベルはtx応答を示すことができ、血漿中のPD-L1を使用して免疫療法に対する応答を監視できると結論付けることができる。

20

30

40

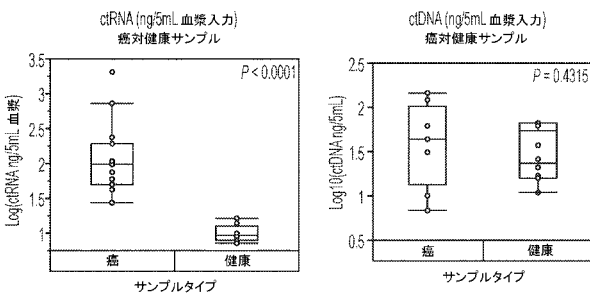
【0077】

当業者には、本明細書の発明概念から逸脱することなく、既に説明したものの以外にもっと多くの修正が可能であることが明らかであろう。従って、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲を除いて限定されるべきではない。更に、明細書と特許請求の範囲の両方を解釈する際、全ての用語は文脈と矛盾することのない、最も幅広い可能な方法で解釈されるべきである。特に、「含む」及び「含んでいる」という用語は、参照される要素、構成要素、又はステップが、存在し得、利用され得、又は明示的に参照されない他の要素、構成要素、又はステップと組み合わせられ得ることを示す、非排他的な方法で要素、構成要素、又はステップを参照するものとして解釈されるべきである。明細書の特許請求の範囲がA

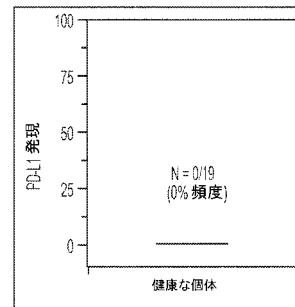
50

、 B、 C . . . 及び N からなる群から選択される何かのうちの少なくとも 1 つに言及する場合、本文は、 A + N、又は B + N などではなく、群からの 1 つの要素のみを必要とするものとして解釈されるべきである。

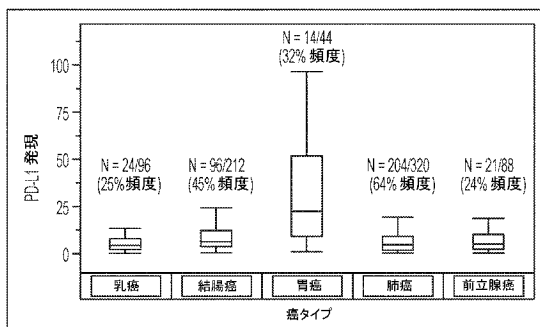
【 図 1 】



【 図 2 - 2 】

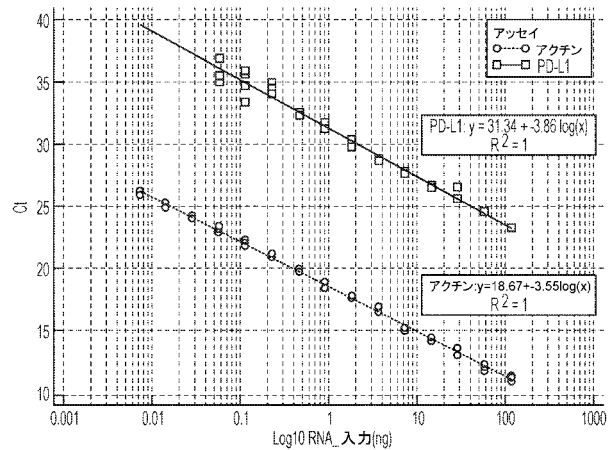


【 図 2 - 1 】



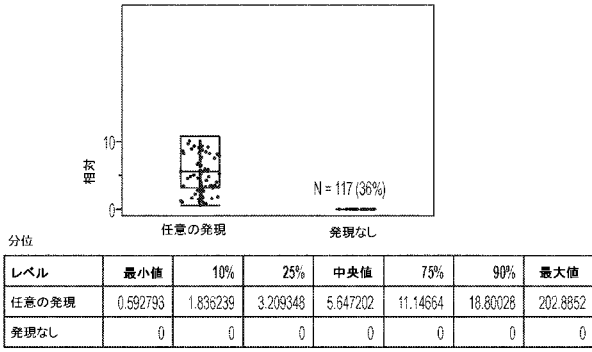
2A

2B



2C

【 図 3 】



3A

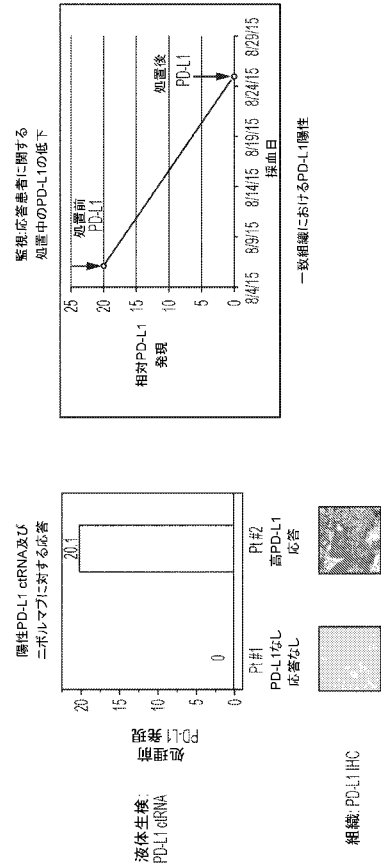
陽性及び陰性PD-L1発現の分布は、Keytruda試験におけるIHCとPCR cRNAアッセイとの間で同様である

方法	任意の発現	発現なし
PD-L1抗体を使用したIHC	66%(PD-L1に関する $\geq 1\%$ の腫瘍細胞染色)**	34%
PCR循環腫瘍RNAを使用したPD-L1の相対発現*	64%(UHR*のPD-L1発現=10に対して6.2-202)	36%

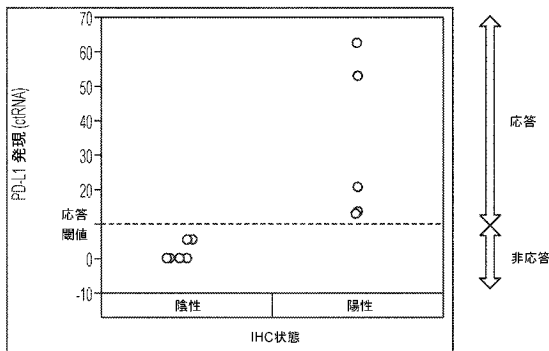
*UHR=Universal Human Reference Gene RNA
 **PD-L1の相対発現は、PD-L1及び β -アクチン、安定的に発現したハウスキーピング遺伝子に特異的なRT-PCRアッセイに関する ΔC_t を用いて決定する。
 -cRNAにより試験したNSCLC患者サンプルの64%(204/320)がPD-L1を発現する腫瘍を有した
 ***臨床試験においてKEYTRUDAに関してスクリーニングされた際、PD-L1に関して評価された患者のうち、患者の66%(n=1,475/2,222)が、KEYNOTE-010 11において $\geq 1\%$ PD-L1を発現する腫瘍を有した

3B

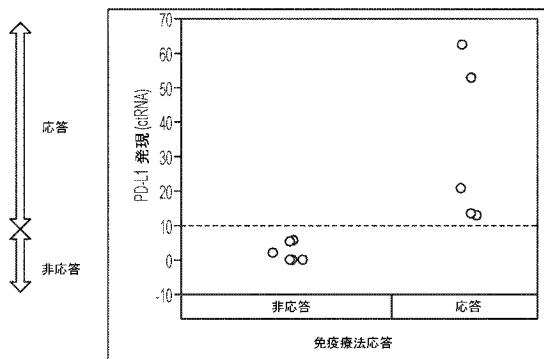
【 図 4 】



【 図 5 】

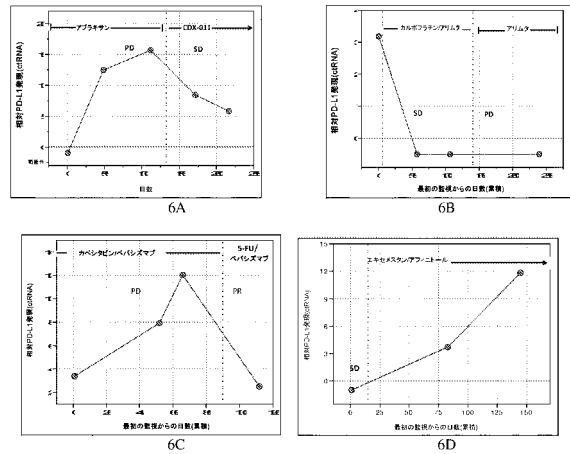


5A

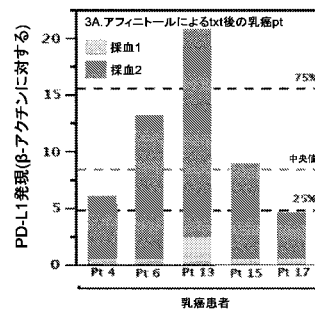


5B

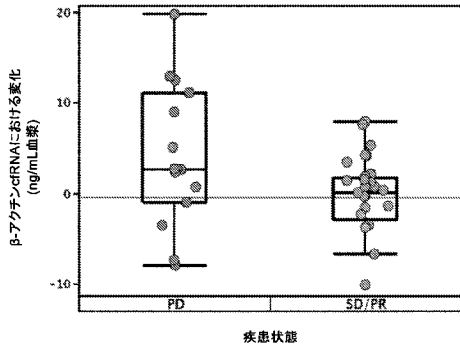
【 図 6 】



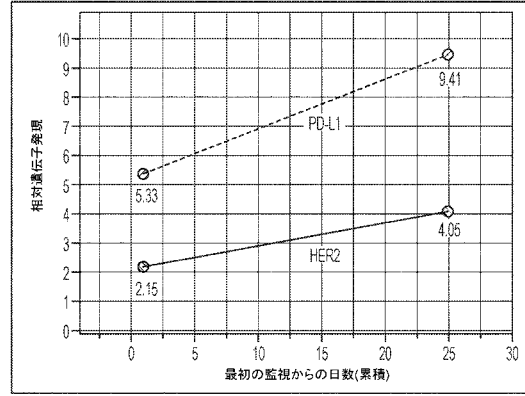
【 図 7 】



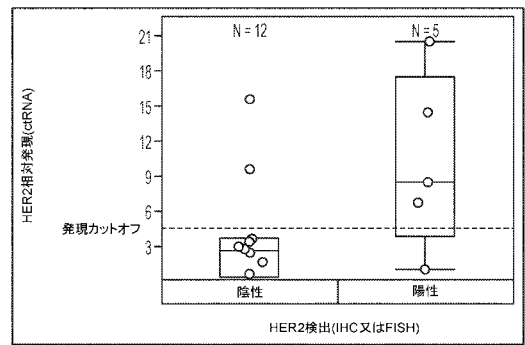
【 図 8 】



【 図 9 】

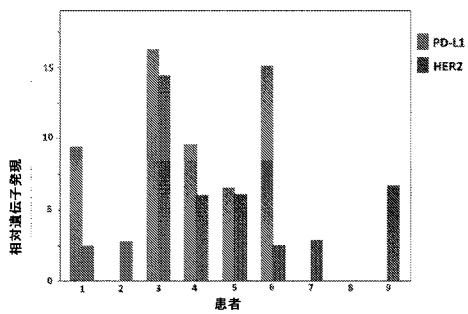


9A

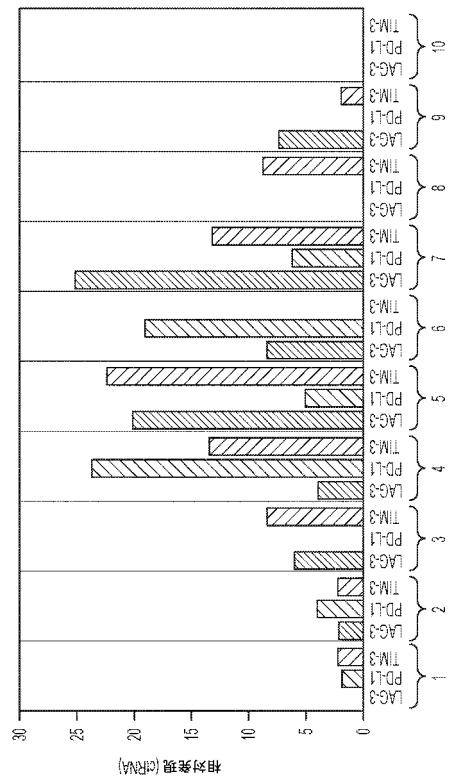


9B

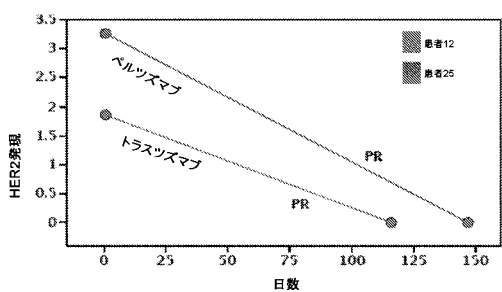
【 図 10 】



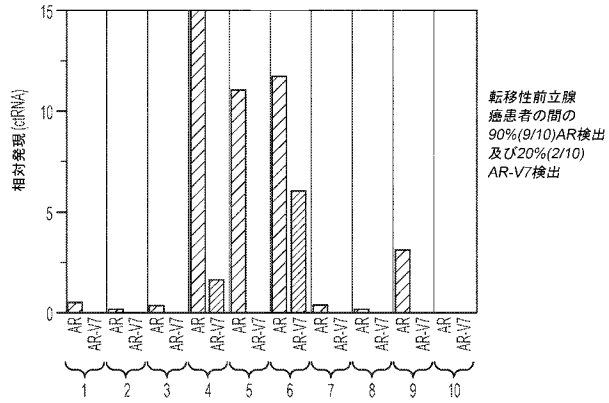
【 図 12 】



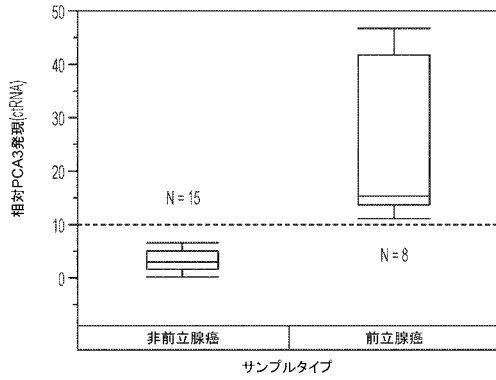
【 図 11 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/22747
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68, C12Q 1/6806 (2018.01) CPC - C12Q 1/6886, C12Q 2600/106, C12Q 2600/156, C12Q 1/6806		
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) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/077709 A1 (LIQUID GENOMICS, INC) 19 May 2016 (19.05.2016); abstract, para [0008], [0009], [0027], [0033], [0037], [0041], [0049], [0061], [0062], [0076], Claim 6	1-2, 4-7, 9-12, 15-17, 29-32, 34-37
Y		3, 8, 13-14, 18-28, 33, 38-41
Y	US 2014/0054508 A1 (STRECK, INC) 27 February 2014 (27.02.2014); para [0009]	3, 14
Y	US 8,841,418 B2 (KARSUNKY et al.) 23 September 2014 (23.09.2014); abstract	8
Y	US 2016/0326597 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 10 November 2016 (10.11.2016); abstract	13, 38
Y	US 2016/0298199 A1 (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.) 13 October 2016 (13.10.2016) para [0036]	18-21, 39-41
Y	US 2016/0340428 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 24 November 2016 (24.11.2016); para [0004]	22-28
Y	US 2016/0108123 A1 (NOVARTIS AG) 21 April 2016 (21.04.2016); para [0731]	25
Y	US 9,580,505 B2 (E. R. Squibb & Sons, LLC) 28 February 2017 (28.02.2017); abstract	33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 17 May 2018		Date of mailing of the international search report 01 JUN 2018
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. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 871-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z

(31) 優先権主張番号 62/593,534

(32) 優先日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(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

(72) 発明者 ダネンバーグ, キャスリーン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

(72) 発明者 ラビザデー, シャールーズ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

(72) 発明者 アッシャー, ジョシュア
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

(72) 発明者 ハイメス, ヨランダ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2, カルバー シティ, 9 9 2 0 ジェファーソン
ブルバード

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QS25
QS34 QX02
4C084 AA17 NA05 ZB261
4C086 AA01 AA02 CB22 MA01 MA04 NA05 ZB26

专利名称(译)	Cfrna液体活检		
公开(公告)号	JP2020511137A	公开(公告)日	2020-04-16
申请号	JP2019550590	申请日	2018-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	南托米克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Nantomikusu , LLC		
[标]发明人	ダネンバーグキャスリーン ラビザデーシャーローズ		
发明人	ダネンバーグ,キャスリーン ラビザデー,シャーローズ アッシャー,ジヨシユア ハイメス,ヨランダ		
IPC分类号	C12Q1/6851 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/686 A61P35/00 A61K31/436 A61K45/00 C12Q1/6886		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 C12Q2600/118		
FI分类号	C12Q1/6851.Z G01N33/53.M G01N33/574.A C12Q1/686.Z A61P35/00 A61K31/436 A61K45/00 C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB22 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/473273 2017-03-17 US 62/522509 2017-06-20 US 62/593534 2017-12-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

cfRNA用于鉴定和定量疾病相关基因的表达水平，并进一步允许非侵入性监测此类基因的变化。此外，疾病相关基因的定量分析将能够预测治疗反应，其中治疗取决于疾病相关基因的存在。

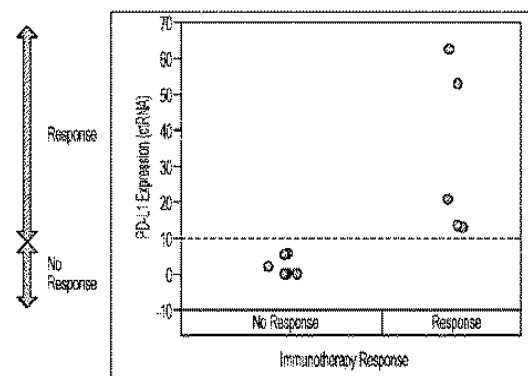


Figure 5B