

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7293244号

(P7293244)

(45)発行日 令和5年6月19日(2023.6.19)

(24)登録日 令和5年6月9日(2023.6.9)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 K

C 1 2 N 5/078(2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

請求項の数 28 (全30頁)

(21)出願番号 特願2020-542712(P2020-542712)
(86)(22)出願日 平成30年10月19日(2018.10.19)
(65)公表番号 特表2021-500585(P2021-500585
A)
(43)公表日 令和3年1月7日(2021.1.7)
(86)国際出願番号 PCT/US2018/056747
(87)国際公開番号 WO2019/079743
(87)国際公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)
審査請求日 令和3年10月15日(2021.10.15)
(31)優先権主張番号 62/574,515
(32)優先日 平成29年10月19日(2017.10.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 520137257
ストレック, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ネブラスカ 6 8 1 2 8
, ラピスタ, サウス 1 0 9 ティーエ
イチ ストリート 7 0 0 2
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁理士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 溶血、凝固調節および細胞外小胞の安定化のための組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、

(i) イミダゾリジニル尿素と、(i i) クエン酸、クエン酸三ナトリウム、およびデキストロースを含む抗凝固剤と、(i i i) α -シクロデキストリンまたはその官能化誘導体と、を含む、組成物。

【請求項 2】

前記抗凝固剤が、抗凝固クエン酸系デキストロース - A (A C D - A)、抗凝固クエン酸系デキストロース - B (A C D - B)、またはクエン酸 - リン酸 - デキストロース - アデニン (C P D A) である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記デキストロースが 2 % ~ 2 0 % の濃度で存在する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

クエン酸イオン濃度が 2 0 0 m M ~ 5 0 0 m M である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記クエン酸が 0 . 5 % ~ 4 % の濃度で存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

10

20

前記クエン酸三ナトリウムが3 % ~ 15 %の濃度で存在する、請求項1 ~ 5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項7】

前記イミダゾリジニル尿素が10 % ~ 40 %の濃度で存在する、請求項1 ~ 6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

前記α - シクロデキストリンが0.75 % ~ 4 %の濃度で存在する、請求項1 ~ 7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】

生物学的試料をさらに含む、請求項1 ~ 8のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項10】

前記生物学的試料が血液を含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記生物学的試料の安定性が、2 ~ 37 の温度範囲で最低1日維持される、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項12】

前記生物学的試料の安定性が、2 ~ 37 の温度範囲で1日 ~ 最大8日まで維持される、請求項9または10に記載の組成物。

【請求項13】

請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の組成物で単一の血液試料を処理する方法であって、前記単一の血液試料を前記組成物と接触させることと、DNA、RNA、細胞外小胞、循環腫瘍細胞、循環希少細胞、またはタンパク質のうちの1つ以上を前記単一の血液試料から単離することを含む、方法。

20

【請求項14】

血液試料からDNAおよびRNAの両方を単離するための、請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項15】

血液試料から細胞外小胞を単離するための、請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項16】

循環腫瘍細胞または腫瘍破片を単離するための、請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の組成物の使用。

30

【請求項17】

細胞の溶解を阻害するための方法であって、前記細胞を請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の組成物と接触させることを含み、前記阻害が前記細胞からの核酸および/または細胞外小胞の放出を防止する、方法。

【請求項18】

前記細胞が白血球である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記細胞が赤血球である、請求項17に記載の方法。

40

【請求項20】

前記核酸が無細胞RNA (cfRNA)、無細胞DNA (cfDNA)、細胞性RNA、または細胞性DNAである、請求項17 ~ 19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

溶解が少なくとも24時間阻害される、請求項17 ~ 20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

溶解が、少なくとも2日、または少なくとも3日、または少なくとも4日まで阻害される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記細胞を少なくとも24時間維持し、次いで細胞から前記核酸を単離することをさら

50

に含む、請求項 1 7 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記細胞が室温で維持される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞の安定化における使用のための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記使用が前記細胞を前記組成物と接触させることを含み、前記接触が前記細胞からの核酸および/または細胞外小胞の放出を防止することを特徴とする、組成物。

【請求項 2 6】

前記細胞が白血球である、請求項 2 5 に記載の使用のための組成物。

【請求項 2 7】

前記細胞が赤血球である、請求項 2 5 に記載の使用のための組成物。

【請求項 2 8】

前記核酸が、無細胞 RNA (c f RNA)、無細胞 DNA (c f DNA)、細胞性 RNA、または細胞性 DNA である、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

この出願は、2017年10月19日に提出された米国仮出願第62/574,515号の利益を主張し、その開示は参照によりその全体が組み込まれる。

【0 0 0 2】

本教示は、血液試料調節組成物に関する。より具体的には、本教示は、血液試料内の構成要素が様々な診断指標の下流試験のために十分な完全性を維持するように、血液試料のメカニズムを調節するための組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

リキッドバイオプシーの登場（例えば、身体からの血液やその他の液体試料の分析）は、出生前医療と癌診断に革命をもたらした。患者の血液試料から循環 DNA (c f DNA または無細胞 DNA)（例えば、胎児または癌）、無細胞 RNA、および循環腫瘍細胞を分離および分析することが可能になった。分析機能が進歩するにつれて、リキッドバイオプシーアッセイの必要性は、関連する分析前変数を考慮して、感度と特異性に関して下流の結果を最大化することである。リキッドバイオプシー試料の収集に関連する分析前の最も重要な変数の1つは、特に、これらの試料がリファレンスラボに到達するまでにかかる大幅な遅延時間を考慮すると、細胞と核酸の安定化である。全血試料は、リキッドバイオプシー研究にとって最も効率的な患者試料であるが、複数の遅延時間要因によって制限される。これらの中で最も重要なのは、白血球と赤血球/網状赤血球の脆弱性である。具体的には、血液の保存により、アポトーシス性白血球からのゲノム DNA の時間依存性放出と、悪化する白血球と網状赤血球の両方からの細胞 RNA が放出される。PCR 型のリキッドバイオプシーアッセイの場合、無細胞 RNA および DNA の非特異的増加は、標的転写物（例えば、変異した癌遺伝子 DNA、胎児 DNA など）を希釈するリスクがある。

【0 0 0 4】

全血での核酸安定化には複数の商用オプションが存在するが、これらは DNA または RNA のいずれかを安定化することを目的としており、両方を同時に安定化することはできない。無細胞 DNA の安定化に特化した収集チューブには、CELL - FREE DNA BCT (登録商標) (Streck)、ccfDNA PAXgene (Qiagen)、LBGuard (Biomatrix)、Cell - Free DNA (Roche) などがある。これらのチューブは、アポトーシスを起こした白血球からの DNA の放出を防ぐと説明されており、吸引時の血漿無細胞 DNA レベルを採取後 7 ~ 14 日まで維持する。RNA 分析用の収集チューブには、PAXgene Blood RNA (Qiagen)

10

20

30

40

50

n)、RNA Gard (Biomatrica)、Tempus Blood RNA (Thermo Sci.)が含まれる。利用可能なRNAチューブの落とし穴は、それらが収集された血液試料の完全な溶解に基づいており、その結果、圧倒的に過剰な赤血球特異的転写産物(例えば、グロビン α および β mRNA)に基づいているという事実である。したがって、グロビンおよびリボソームRNAを枯渇させ、有益な標的とするmRNAプールを濃縮するには、その後の試料処理が必要である。市場で唯一の非溶解RNA採血チューブは、StreckのCELL-FREE RNA BCT(登録商標)である。このチューブには狭い温度範囲が必要であり、重要なことに、RNAの安定化のみを目的としている。循環するRNAとDNAの両方を効率的に安定化させる血液収集チューブはまだ報告されていない。

10

【0005】

血液凝固を防止し、溶血を最小限に抑えるために赤血球の平均細胞体積(MCV)を維持する抗凝固剤に基づく収集装置およびその中に配置された組成物を提供することが望ましいであろう。組成物は好ましくは白血球成分を安定化し、それにより血漿中のDNAの放出および過剰な蓄積を阻止する。この組成物はさらに、赤血球の構造的完全性を維持し、保存期間の関数としての膜小胞の放出を防ぐ赤血球保護剤として作用するであろう。循環または無細胞RNAは、微小胞や細胞外小胞(エキソソームを含むがこれに限定されない)を含む膜小胞にカプセル化されているため、これは重要である。望ましい組成は、広い温度範囲で最低6日間試料の安定性と完全性を維持する。cfDNAおよび膜小胞の血漿濃度、したがってcfRNAは、理想的には実質的に吸引時濃度を維持する。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本教示は、赤血球MCVを維持し、白血球溶解を実質的に防止し、細胞外膜小胞(例えば、エキソソーム、エクソソームなど)の放出を実質的に防止する組成物を提供すること。本明細書で提供される方法は、白血球および赤血球を安定化させ、それにより、生体試料中の細胞からの核酸および膜小胞の放出を実質的に防止することを目的とする。本開示の組成物は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応、次世代配列決定および/またはその他による下流分析のための生物学的試料安定化および調節剤としての使用に特に適している。

【0007】

組成物は、アルデヒド、1つ以上の抗凝固剤またはキレート剤、および1つ以上の多糖を放出することができる1つ以上の成分を含むことができる。組成物は、約4~約6のpHを有してよい。

30

【0008】

組成物は、1つ以上のアミンを含んでよい。組成物は、クエン酸ナトリウム組成物を含んでよい。組成物は、1つ以上のホルムアルデヒド供与体を含んでよい。組成物は、エチレンジアミン四酢酸またはその塩を含んでよい。組成物は、転写阻害剤を含んでよい。組成物は、アクチノマイシンD、アルファ-アマニチン、フラボピリドール、DRP(5,6-ジクロロ-1- β -D-リボフラノシル-1H-ベンズイミダゾール)、およびトリプトライドの1つまたは任意の組み合わせを含んでよい。組成物は、ホルムアルデヒドを含んでよい。組成物は、別々に添加されたホルムアルデヒドを実質的に含まなくてもよい。組成物は、エチレンジアミン四酢酸を実質的に含まなくてもよい。組成物は、ヘパリンナトリウムを実質的に含まなくてもよい。多糖は、デンプン、セルロース、グリコーゲン、またはそれらの任意の組み合わせから選択することができる。

40

【0009】

アルデヒドを放出することができる1つ以上の成分は、ジアゾリジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、1,3,5-トリス(ヒドロキシエチル)-s-トリアジン、オキサゾリジン、1,3-ビス(ヒドロキシメチル)-5,5-ジメチルイミダゾリジン-2,4-ジオン、クオタニウム-15、DMDMヒダントイン、2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール、5-ブロモ-5-ニトロ-1,3-ジオキサン、トリス(ヒドロキ

50

シメチル)ニトロメタン、ヒドロキシメチルグリシネート、ポリクオタニウム、またはそれらの組み合わせから選択することができる。組成物は、イミダゾリジニル尿素を含んでもよい。組成物は、イミダゾリジニル尿素を含んでもよく、アルデヒドを放出することができる他の成分を実質的に含まなくてもよい。組成物は、ジアゾリジニル尿素を含んでもよい。組成物は、イミダゾリジニル尿素およびジアゾリジニル尿素の両方を含んでもよい。組成物は、2 - ブロモ - 2 - ニトロプロパン - 1 , 3 - ジオールを含んでもよい。

【 0 0 1 0 】

組成物は、約 0 . 1 体積 % ~ 約 1 体積 % の 1 つ以上の多糖を含んでもよい。試料収集後に存在するホルムアルデヒドの量は、約 1 0 p p m ~ 約 1 0 , 0 0 0 p p m でよい。

【 0 0 1 1 】

アミンは、存在する場合、利用可能な遊離アルデヒドをクエンチすることがある。試料の安定性は、約 4 ~ 約 5 0 の温度範囲で最低 6 日間維持することができる。さらなる実施形態では、試料の安定性は、約 2 ~ 約 5 0 、または約 2 ~ 約 3 7 の温度範囲で最低 6 日間維持される。c f D N A と細胞外小胞の血漿濃度、および c f R N A は、吸引時濃度とほぼ同じである。赤血球 M C V が維持され、白血球溶解が実質的に抑制され、細胞外小胞 (例えば、エキソソーム) の放出が実質的に抑制されてよい。4 日目および 6 日目に、およびおそらく採血後を超えて回復するエキソソームの数は、採血時に存在するエキソソーム集団と実質的に類似するように、白血球は実質的に安定化することができる。フローサイトメトリーによる白血球の免疫表現型検査が可能になるように、細胞の形態および表面抗原の発現を維持することができる。

【 0 0 1 2 】

循環腫瘍細胞 (C T C) と腫瘍破片の安定化および分離も促進することができる。特に 2 つ以上の血液成分を分析して、病態または疾患の存在、疾患の重症度、あるいは疾患の治療の成功または失敗の指標を特定することができる時に、生物学的試料中の複数の成分を試験することも促進される。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載の教示はさらに、白血球および赤血球を安定化して、生体試料中の細胞内からの核酸および細胞外小胞の放出を実質的に防ぐための、本明細書に記載の組成物の使用方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

本明細書の教示は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応、次世代配列決定および / またはその他による下流分析のための生物学的試料の安定化および調節剤として含む、本明細書に記載の組成物の使用方法をさらに提供する。本明細書に記載の方法は、単一の血液試料を組成物で処理し、D N A 、 R N A 、細胞外小胞、循環腫瘍細胞、循環希少細胞、およびタンパク質の 2 つ以上を試料から単離することを含んでもよい。

【 0 0 1 5 】

本明細書の教示は、血液試料から D N A および R N A の両方を単離するための、本明細書に記載されている組成物の使用をさらに提供する。本明細書の教示はさらに、血液試料から細胞外小胞を単離するために本明細書に記載されている組成物の使用を提供する。本明細書の教示はさらに、循環腫瘍細胞 / 腫瘍破片を単離するために本明細書に記載されている組成物の使用を提供する。

【 0 0 1 6 】

ある態様では、本開示は、(i) アルデヒドを放出することができる成分と、(i i) 抗凝固剤と、(i i i) シクロデキストリンまたはその官能化誘導体とを含む組成物を提供する。ある実施形態において、アルデヒドを放出することができる成分は、ジアゾリジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、1 , 3 , 5 - トリス (ヒドロキシエチル) - s - トリアジン、オキサゾリジン、1 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) - 5 , 5 - ジメチルイミダゾリジン - 2 , 4 - ジオン、クオタニウム - 1 5 、D M D M ヒダントイン、2 - ブロモ - 2 - ニトロプロパン - 1 , 3 - ジオール、5 - ブロモ - 5 - ニトロ - 1 , 3 - ジオキサン、トリス (ヒドロキシメチル) ニトロメタン、ヒドロキシメチルグリシネート、ポリクオ

10

20

30

40

50

タニウム、またはそれらの組み合わせである。ある実施形態では、アルデヒドを放出することができる成分は、イミダゾリジニル尿素である。さらなる実施形態では、アルデヒドを放出することができる成分は、ジアゾリジニル尿素である。さらに他の実施形態では、アルデヒドを放出することができる成分は、イミダゾリジニル尿素およびジアゾリジニル尿素を含む。ある実施形態では、抗凝固剤は、クエン酸塩およびデキストロースを含むクエン酸系抗凝固剤である。さらなる実施形態では、クエン酸系抗凝固剤は、抗凝固クエン酸デキストロース - A (A C D - A)、抗凝固クエン酸デキストロース - B (A C D - B)、またはクエン酸 - リン酸 - デキストロース - アデニン (C P D A) である。ある実施形態では、クエン酸系抗凝固剤は、約 0 . 7 5 % ~ 約 4 % の濃度で存在する。さらに他の実施形態では、抗凝固剤は、クエン酸、クエン酸三ナトリウム、およびブドウ糖を含む。ある実施形態では、デキストロースは、約 2 % ~ 約 2 0 % の濃度で存在する。さらなる実施形態において、クエン酸イオン濃度は、約 2 0 0 m M ~ 約 5 0 0 m M である。ある実施形態では、クエン酸は、約 0 . 5 % ~ 約 4 % の濃度で存在する。さらなる実施形態では、クエン酸三ナトリウムは、約 3 % ~ 約 1 5 % の濃度で存在する。

10

【 0 0 1 7 】

ある実施形態では、アルデヒドを放出することができる成分は、約 1 0 % ~ 約 4 0 % の濃度で存在する。さらなる実施形態では、シクロデキストリンは、 α - シクロデキストリンまたはその官能化誘導体である。ある実施形態では、 α - シクロデキストリンは、約 0 . 7 5 % ~ 約 4 % の濃度で存在する。

【 0 0 1 8 】

ある実施形態では、組成物はホルムアルデヒドをさらに含む。さらなる実施形態では、組成物は、別個に添加されたホルムアルデヒドを含まない。

20

【 0 0 1 9 】

さらなる実施形態では、試料の安定性は、約 2 ~ 約 3 7 の温度範囲で最低 1 日維持される。ある実施形態では、試料の安定性は、約 2 ~ 約 3 7 の温度範囲で約 1 日 ~ 最大 8 日まで維持される。

【 0 0 2 0 】

ある態様では、本開示は、細胞を本開示の組成物と接触させることを含む、細胞の溶解を阻害するための方法を提供し、阻害は、細胞からの核酸および / または細胞外小胞の放出を防止する。ある実施形態では、細胞は白血球である。さらなる実施形態では、細胞は赤血球である。ある実施形態では、核酸は、無細胞 R N A (c f R N A)、無細胞 D N A (c f D N A)、細胞性 R N A、または細胞性 D N A である。ある実施形態では、溶解は少なくとも約 2 4 時間阻害される。さらなる実施形態では、溶解は、少なくとも 2 日、または少なくとも 3 日、または少なくとも 4 日まで阻害される。なおさらなる実施形態では、本開示の方法は、細胞を少なくとも約 2 4 時間維持し、次いで細胞から核酸を単離することをさらに含む。ある実施形態では、細胞は室温で維持される。

30

【 0 0 2 1 】

ある態様では、本開示は、細胞を組成物と接触させることを含むことを特徴とする、細胞の安定化における使用のための本開示による組成物であって、接触は、細胞からの核酸および / または細胞外小胞の放出を防ぐ、組成物を提供する。ある実施形態では、細胞は白血球である。さらなる実施形態では、細胞は赤血球である。なおさらなる実施形態では、核酸は、無細胞 R N A (c f R N A)、無細胞 D N A (c f D N A)、細胞性 R N A、または細胞性 D N A である。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 3 つの異なる保存温度で 3 つの異なる製剤を利用して、血液保存時間の関数としての溶血を表すグラフである。

【 図 2 】 各種抗凝固剤使用時のエキソソーム放出を示すグラフである。

【 図 3 】 防腐剤のパーセンテージの関数としての血漿 D N A 濃度を表すグラフである。

【 図 4 A 】 防腐剤のパーセンテージの関数としての血漿 R N A 濃度を表すグラフである。

50

【図 4 B】血漿中 RNA 濃度を α - シクロデキストリンの割合の関数として表したグラフである。

【図 5 A】ユビキチン B mRNA のコピー数を α - シクロデキストリンの割合の関数として表したグラフである。

【図 5 B】 α - シクロデキストリンの割合の関数としてのヘモグロビン A mRNA のコピー数を示すグラフである。

【図 6】全血保存時間の関数としての無細胞 RNA (cfRNA) の総濃度を示している。血漿を分離し、市販のキット (Qiagen、QIAamp 循環核酸分離キット) を使用して cfRNA を抽出した。結果の cfRNA は、Qubit RNA HS アッセイ (Invitrogen) を使用して定量した。結果は、3 人の健康なドナーからの標準偏差の平均である。

10

【図 7】全血保存時間の関数としての赤血球特異的 (RBC 特異的) 転写物グロビン A1 / 2 の濃度の増加倍率を示す。cfRNA は、図 6 および以下の説明に示されているように分離され、逆転写され (Bio-Rad iScript)、市販のプライマー / プロープ (Thermo-Fisher を使用した液滴デジタル PCR 反応 (Bio-Rad QX200 セットアップ)) で使用された。結果は、3 人の健康なドナーからの標準偏差の平均である。

【図 8】全血保存時間の関数としての、ユビキチン B 転写産物 (すべての細胞で発現) の濃度の増加倍率を示している。cfRNA は、図 6 および以下の説明に示されているように分離され、逆転写され (Bio-Rad iScript)、市販のプライマー / プロープ (Thermo-Fisher を使用した液滴デジタル PCR 反応 (Bio-Rad QX200 セットアップ)) で使用された。結果は、3 人の健康なドナーからの標準偏差の平均である。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書に提示された説明および図は、当業者にその教示、その原理、およびその実際の応用を知ることが意図している。当業者は、特定の用途の要件に最も適している場合があるように、その教示をその多数の形態で適合および適用することができる。したがって、記載されている本教示の特定の実施形態は、教示を網羅または限定することを意図していない。したがって、教示の範囲は、上記の説明を参照して決定されるべきではなく、代わりに、添付の特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲とともに、そのような特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。特許出願や出版物を含むすべての記事や参考文献の開示は、あらゆる目的で参照により組み込まれている。以下の特許請求の範囲から収集されるように、他の組み合わせも可能であり、これもまた、参照によりこの書面による説明に組み込まれる。

30

【0024】

本明細書の教示は、エキソソーム、マイクロベシクル、およびアポトーシス小体 (以下、エキソソームまたは細胞外小胞と総称される) を含む細胞外小胞のベースラインレベルを維持することができる血液試料調節および細胞安定化組成物に関する。エキソソームのベースラインレベルは、採血直後の血液試料中のエキソソームの量または濃度を指す。細胞外小胞は核酸を運ぶため、無細胞核酸の保護膜として機能する。血液試料中の細胞外小胞と核酸の量は、白血球と赤血球の両方から小胞が放出されるため、採血後の時間とともに増加する。本明細書で扱う組成物は、細胞外小胞および核酸を含む個々の成分を保存し、細胞溶解を防止して細胞内物質を細胞から出させ、採血時に存在する細胞外物質を汚染することを目的とする。本明細書に開示される組成物は、血球を実質的に安定化することができる、その結果、4 日目および 6 日目に、およびおそらく採血後を超えて回復される細胞外小胞の数は、採血時に存在する細胞外小胞集団と実質的に同様である。したがって、無細胞 RNA (cfRNA)、無細胞 DNA (cfDNA)、タンパク質、および細胞外小胞の内側にあるその他の細胞物質 (細胞外小胞の外側にある無細胞物質に加えて) の濃度は、採血時の 4 日目および 6 日目に、およびおそらく採血後を超えて採血時と実質的に

40

50

同様である。したがって、本開示の組成物は、細胞外小胞、ゲノムDNAおよびRNAならびに他のRNA種（例えば、mRNA、miRNA、piRNA、siRNA、shRNAおよびその他）内にあるcfRNA、cfDNA、タンパク質および他の細胞物質の安定化を促進し、無細胞物質と細胞物質（例えば、白血球、循環腫瘍細胞（CTC）、循環胎児細胞、または他のまれな循環細胞）内のDNAとRNA）の両方の下流での分離と試験を可能にする。さらなる実施形態では、本開示の組成物は、直接的および間接的な細胞外小胞分析に有用である。細胞外小胞分析は、例えば、限定されないが、フローサイトメトリー分析によって行われる。

【0025】

生物学的試料の収集、生物学的試料の処理、および生物学的試料の分析のステップでは、多くの化学成分が一般的に使用される。しかしながら、これらの既知の成分の多くは、白血球、赤血球、まれな循環細胞、核酸、タンパク質、または細胞外小胞に有害である。さらに、これらの成分の多くは他の成分と結合して、白血球、赤血球、核酸、タンパク質、細胞外小胞、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環前駆細胞、または循環胎児細胞に有害な影響を与える可能性がある。さらに、特定の成分は特定の濃度では有益であるが、MCVの増加、白血球のアポトーシス誘導、有効性に必要な容量など、様々な理由で他の問題がある。その結果、有害な影響を与えずに上記の試料成分を効果的に安定させる化学成分の組み合わせを特定することは非常に困難である。

10

【0026】

安定化化合物として機能および／または機能する化学成分は溶液中の固体であるため、それらの使用可能性は溶解度および下流分析に許容される希釈量によって制限される。多くの化学成分が効果的な安定剤として利用されるためには、試料を安定させるのに十分な量で存在する必要がある。さらに、直接吸引式血液チューブを製造するために、安定化組成物は非常に少量で存在しなければならない。そのため、チューブの大部分は試料で満たされる。したがって、チューブ内の組成物の量は、理想的には約0.02～約2mLである。チューブ内の組成物の量は、少なくとも約0.5mL、または少なくとも約1mLでさえあり得る。チューブ内の組成物の量は、約3.0mL未満、または約2.0mL未満でさえあり得る。

20

【0027】

しばしば、特定の化学成分が効果的であるためには、それは効力のために十分に高い濃度で存在しなければならない。残念なことに、多くの化学成分が高濃度であると、（1例として）赤血球の凝集や破裂が発生し、MCVが増加し、他の問題の中で溶血が増加する可能性がある。

30

【0028】

これらの問題のバランスをとるには、（1）比較的少量の組成物の需要を満たす低濃度で効果的であることができ、および（2）白血球、赤血球、腫瘍や胎児細胞などの他のまれな循環細胞、核酸、エキソソームまたはタンパク質を損傷するような方法で他の成分と反応しない、化学成分を特定する必要がある。

【0029】

さらに、本明細書に記載の組成物により細胞形態および表面抗原発現が維持されるため、本明細書の教示による組成物は、フローサイトメトリーによる白血球の免疫表現型分類を容易にすることができる。循環腫瘍細胞および他のまれな循環細胞／材料（例えば、循環内皮細胞、循環前駆細胞、母体血液中の循環胎児核酸）の安定化および単離も、本教示による組成物を利用して促進することができる。本明細書に記載の組成物は、特に2つ以上の血液成分を分析して、病態または疾患の存在、疾患の重症度、疾患の治療の成功または失敗の指標を特定できる場合に、生体試料中の複数の成分の試験を容易にすることもできる。非限定的な1例として、機械的分離を使用して本明細書に開示される組成物で安定化されたCTCを分離することができる場合がある。このプロセスの後に、残りの試料をスピンドウンまたは遠心分離して血漿を収集し、その後、試料から（RNAを含むことがある）エキソソームおよび／または無細胞DNAを単離することができる。あるいは、最

40

50

初に血漿を単離し、その後バフィーコートからCTCおよびWBCを単離してもよい。残りの細胞試料から、残りの白血球集団またはCTCを含む他のまれな細胞集団から得られたタンパク質、DNA、およびRNAを分離して分析することができる。プロテオミクス分析はまた、本明細書に記載される組成物で処理された試料において促進することができる。したがって、本明細書に記載される組成物は、今日可能であると理解されているものを遥かに超える単一の試料を使用する分析の能力を促進することができる。本明細書の組成物の、溶血を実質的に防止し、エキソソームおよび関連する無細胞RNAを安定化し、無細胞DNAを安定化し、タンパク質を安定化する能力は、そのような多段階分析を可能にする。

【0030】

溶血は、特に血液試料に関連するため、一般的な問題である。溶血は、以下の1つ以上の試料収集、試料輸送、試料保チューブ、および試料の下流処理中に発生する可能性がある。赤血球溶解（例えば、溶血）は、細胞成分分析に多くの課題を引き起こす可能性があり、したがって、溶血が減少するにつれて分析の質が向上する。多くの採血チューブには、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）が含まれる。EDTAは溶血をいくらか減らすことがわかっているが、ここで特定された試験結果（例えば、図1を参照）は、正しい抗凝固剤を注意深く選択することによって溶血の量を実際に減らすことができることを示している。EDTAに基づくもの、ヘパリン系、シュウ酸系、クエン酸系を含むが限定される、多くの抗凝固剤がある。本明細書の組成物は、様々な態様において、溶血の低下を示し、赤血球膜を安定化するその二重の能力により、特定の種類のクエン酸系抗凝固剤（例えば、抗凝固クエン酸デキストロース-AまたはACD-A）に基づく。赤血球の平均細胞容積（MCV）は、特定のクエン酸系抗凝固剤、具体的にはACD-AおよびACD-Bで減少または安定化することがある。ACD-AおよびACD-Bはそれぞれ、クエン酸、クエン酸三ナトリウム、およびブドウ糖を含む。溶液AのACDは8.5ミリリットルの血液用に濃縮されているが、溶液BのACDは6ミリリットルの血液用に濃縮されている。本明細書の組成物に利用されるクエン酸塩のモル濃度は、好ましくは約0.05M～約0.2Mである。本明細書の組成物に利用されるクエン酸塩のモル濃度は、約0.11Mであってもよい。本明細書に記載の組成物を形成するための残りの組成物は、約0.0025M～約0.1Mの最終モル濃度を有するように希釈することができる。

【0031】

溶血を低減したいという要望は、赤血球細胞の溶解を引き起こさない（または最小限に抑える）保存剤の特定を必要とする場合もある。特定の防腐剤は赤血球溶解の発生を増加させる可能性があり、したがって、本明細書に記載の組成物に含めるのに好ましい防腐剤ではない可能性がある。

【0032】

保存剤の濃度は、白血球溶解が最小化されるように選択することができる。白血球溶解は時間に依存し、ほとんどの試料は最終的に白血球溶解を経験し、保存剤の量は、採血から試料が処理されて試料成分を分離する（例えば、24時間～1週間、場合によってはそれ以上）までの期間、白血球溶解を排除しないとしても、白血球溶解を最小限に抑えるために十分な量である必要がある。したがって、（採血前の）組成物中の保存剤の濃度は、約0.25%～約2%でよい。濃度は、約2.5%～約10%でよい。濃度は、約4%～約7%でよい。濃度は、約2.5%～約50%でよい。濃度は、約2%～約100%でよい。

【0033】

存在する場合、アミンの濃度は、保存剤の濃度に直接依存する可能性がある。本質的に、アミンの存在は、防腐剤内の分子成分に化学的に結合するように作用する可能性がある。したがって、遊離し、アミンと反応する防腐剤成分のすべてが十分に反応し、したがって試料内で非反応性になるように、組成物中に十分なアミンが存在することが好ましい場合がある。そのような分子結合活性は、成分（ホルムアルデヒドでよい）の存在を低減することができるので、それにより、反応性遊離ホルムアルデヒドが、分析を単離する必要がある

10

20

30

40

50

試料成分に及ぼす可能性のある有害な影響を低減することができる。したがって、(採血前の)組成物中のアミンの濃度は、約0.01%~約0.2%でよい。濃度は、約0.03%~約0.1%でよい。濃度は、約0.05%~約0.09%でよい。濃度は、約0.75%~約3.75%でよい。

【0034】

エキソソーム濃度を安定化および/または保護し、同時に白血球溶解と赤血球溶解を最小限に抑えるための取り組みにおいて、生体試料の収集と試験で従来使用されている多くの化学物質は、エキソソームに損傷を与え、白血球溶解を増加させ、または赤血球溶解を増加させる方法で試料と相互作用するだろう。多くの伝統的な化学物質は、エキソソームと核酸の実際的な分離を妨害するが、他の化学物質は溶血を増加させる。さらに、一部の化学物質の濃度は、レベルによって効果が異なる。例えば、本明細書に記載される組成物で利用される特定の多糖は、溶血を増加させることが知られているが、特定のより低い濃度では、それらは赤血球溶解を減少させるように作用することが発見された。

10

【0035】

本明細書の組成物はまた、1つ以上の転写阻害剤を含んでもよい。典型的には、生体試料を安定化させるための組成物は、核酸の分解および/またはそれらの相対濃度(例えば、遺伝子発現)の変化を阻止するヌクレアーゼ、代謝、および/またはプロテアーゼ阻害剤を含む。しかしながら、本明細書の教示は、少なくとも部分的に、製剤の目的がベースラインのRNAレベルを維持することであるので、代わりに転写阻害剤の使用を組み込むことに関する。白血球(および他のまれな循環細胞)は、採血後に細胞シグナル伝達を受け、RNA遺伝子発現プロファイルを変化させる。採血後わずか2時間で、RNAプロファイルが変更される。意味のある結果を得るには、実行可能な標的を特定するために、ベースラインのRNAプロファイル(吸引時または吸引時に近い)を維持する必要がある。これを行うには、RNA分解の阻害が必要であるだけでなく、新しいRNA転写産物(mRNA、microRNA、lncRNA、piRNA、YRNA、circRNAおよびその他のncRNAを含む)の阻害が重要である。

20

【0036】

赤血球溶解を防止するための努力において、本明細書の教示による組成物は、赤血球のサイズの変化を実質的に防止するのを助けることができる可能性がある。これは白血球にも当てはまる可能性がある。本明細書に開示される組成物の赤血球および白血球のサイズを維持する能力は、赤血球および白血球の溶解を実質的に防止する能力に寄与することができ、それにより溶血を回避し、バックグラウンドのゲノム核酸の採血後の試料への放出を回避する。

30

【0037】

本明細書に記載される組成物は、起源に関係なく、核酸を保存するようにさらに作用することができる。1例として、本明細書に記載される組成物は、血小板起源のRNAを安定化することが可能であり得る。血小板には、mRNA、miRNA、circRNAなどの重要なRNA種が大量に含まれており、血小板のmRNAの発現パターンがヒトの疾患で変化するという証拠が増えている。したがって、本明細書に開示される組成物の利点は、血小板起源のmRNAが、他の起源のRNAを用いて分析されて単離され得ることである。

40

【0038】

本明細書に記載される組成物の1つ以上の成分が、試料安定化の2つ以上の面に有効性を提供することができる。1例として、本明細書に記載の多糖は、細胞外小胞(したがって、そこに位置するRNA)の完全性を維持するように作用し、赤血球溶解を低減するように作用する可能性がある。特定の成分(様々な二糖類を含む)が考慮されたが、効果的な方法で溶血を軽減するか、または軽減することができなかった。

【0039】

本教示は、一般に、血液または他の生物学的材料を含む生物学的試料を保存するための方法に関する。本明細書に記載の組成物は、1つ以上の防腐剤、1つ以上の抗凝固剤また

50

はキレート剤、1つ以上の多糖、1つ以上のアミン、および1つ以上の転写阻害剤、および1つ以上のリボヌクレアーゼ阻害剤を含んでよい。組成物は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、またはさらにすべてのこれらの成分を含むことができる。

【0040】

保存剤は、ジアゾリジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、1,3,5-トリス(ヒドロキシエチル)-s-トリアジン、オキサゾリジン、1,3-ビス(ヒドロキシメチル)-5,5-ジメチルイミダゾリジン-2,4-ジオン、クオタニウム-15、DMDMヒダントイン、2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール、5-ブロモ-5-ニトロ-1,3-ジオキサン、トリス(ヒドロキシメチル)ニトロメタン、ヒドロキシメチルグリシネート、ポリクオタニウム、またはそれらの組み合わせから選択することができる。保存料は、イミダゾリジニル尿素およびジアゾリジニル尿素的混合物を含んでよい。保存料は、イミダゾリジニル尿素を含んでもよく、他の保存料を含まなくてもよい。保存料は、ジアゾリジニル尿素を含んでもよく、他の保存料を含まなくてもよい。保存料は、オキサゾリジンを含んでよい。保存料は、オキサゾリジン化合物の混合物を含んでよい。保存料は、二環式オキサゾリジン組成物を含んでよい。保存料は、トリアジンを含んでよい。

10

【0041】

保存料は尿酸の誘導体であってもよい。保存剤は、アルデヒドと尿酸との誘導体との反応生成物でよい。保存剤は、アルデヒド(ホルムアルデヒドでよい)の少なくとも一部が生物学的試料と接触した時に反応性になるように選択され得る。ただし、存在するホルムアルデヒドの量(試料収集の前または後)は、生物学的試料に存在する核酸、細胞外小胞、またはタンパク質への損傷を避けるために十分に低くなければならない。ホルムアルデヒドの放出は、組成物および/または組成物と試料の組み合わせのpHを上昇させる可能性がある。組成物のpHおよび/または組成物と試料の組み合わせを制御する取り組みにおいて、ホルムアルデヒドは制御された方法で放出され得る。組成物および/または試料は、所定の方法で経時的にホルムアルデヒドの放出を引き起こすための成分と接触され得る。ホルムアルデヒドは、ホルムアルデヒドの放出および/または制御放出を可能にするために、本明細書で論じられるようにカプセル化されてもよい。組成物および/または組成物と試料の組み合わせを高温(例えば、周囲温度または室温を超える温度)に曝して、温度の上昇がホルムアルデヒドの放出または放出の増加(したがって、pHの増加)を引き起こす可能性もある。あるいは、ホルムアルデヒドは、ホルムアルデヒド放出剤が組成物と接触するとすぐに放出されてもよい。ホルムアルデヒドは、組成物が試料と接触すると放出され得る。ホルムアルデヒド放出剤は、ホルムアルデヒドをカプセル化したり、制御放出を強制するために何らかの方法で組成物を処理したりする必要なしに、ホルムアルデヒドが本質的に経時的に放出されるように選択することができる。

20

30

【0042】

組成物および/または試料および組成物は、本明細書の教示に従って、安定化チューブ内に含まれる成分の1つ以上の副産物をさらに含んでよい。これらの副産物の1つ以上にアルデヒドが含まれる場合がある。1つ以上の副産物は尿素を含んでよい。1つ以上の副産物は、アラントイン、(4-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキソ-イミダゾリジン-4-イル)-尿素、(3,4-ビス-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキソ-イミダゾリジン-4-イル)-尿素、および(3-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキソ-イミダゾリジン-4-イル)-尿素から選択することができる。

40

【0043】

試料収集の前または後のいずれかに存在するアルデヒドは、40,000ppm未満、30,000ppm未満、20,000ppm未満、さらには10,000ppm未満の量になる場合がある。そうは言っても、白血球および/または赤血球の1つ以上を効果的に架橋および安定化するために、いくらかのホルムアルデヒドが存在している可能性がある。したがって、ホルムアルデヒドは、少なくとも2,000ppm、少なくとも5,000ppm、またはさらには少なくとも10,000ppmの量で存在し得る。試料との接触前の組成物中の遊離ホルムアルデヒドの量は、組成物の、最大約0.5重量パーセン

50

ト、最大約 1.0 重量パーセント、最大約 2 重量パーセント、または最大約 3 重量パーセントでさえあり得る。組成物は、約 20 ppm 未満のアルデヒドを含んでよい。組成物は、約 15 ppm 未満のアルデヒドを含んでよい。組成物は、約 10 ppm 未満のアルデヒドを含んでよい。組成物は、約 5 ppm 未満のアルデヒドを含んでよい。組成物は、少なくとも約 0.1 ppm ~ 約 20 ppm のアルデヒドを含んでよい。組成物は、少なくとも約 0.5 ppm ~ 約 15 ppm のアルデヒドを含んでよい。組成物は、少なくとも約 1 ppm ~ 約 10 ppm のアルデヒドを含んでよい。

【0044】

保存料は、少なくとも約 4、少なくとも約 5、またはさらには少なくとも約 6 の pH を有することがある。保存料は、8 未満、7 未満、または 6 未満の pH を有することがある。保存料は、約 4 ~ 約 6 の pH を有することがある。保存料は、少なくとも約 20 g / モル、少なくとも約 50 g / モルの分子量、または少なくとも約 80 g / モルの事象を有することがある。保存料は、約 500 g / モル未満、約 400 g / モル未満、または約 300 g / モル未満の分子量を有することがある。

10

【0045】

1 つ以上の保存剤は、約 0.5 体積% ~ 約 5.0 体積% の濃度で組成物中に存在してよい。1 つ以上の保存剤は、約 0.5 体積% ~ 約 1.0 体積% の濃度で組成物中に存在してよい。1 つ以上の保存剤は、約 5 体積% の濃度で組成物中に存在してよい。1 つ以上の保存剤は、約 2.5 体積% の濃度で組成物中に存在してよい。

【0046】

20

組成物の pH は、試料との接触前および試料との接触後に変化することがある。組成物は、組成物の pH を（試料接触前に）少なくとも約 3、少なくとも約 4、少なくとも約 5 ~ 約 11 未満、約 10 未満、またはさらには約 9 以下の範囲にさせるための 1 つ以上の成分を含んでよい。例えば、試料との接触前の組成物の pH は、3 ~ 約 6 でよい。組成物は、試料との接触時に酸性化合物の放出を引き起こす原因となる 1 つ以上の薬剤を含んでよい。組み合わせられた試料および組成物の pH は、少なくとも約 5、少なくとも約 6、またはさらには少なくとも約 7 でよい。組み合わせられた試料および組成物の pH は、約 10 未満、約 9 未満、またはさらには約 8 未満でよい。

【0047】

1 つ以上のアミンは、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、グリシン、オルニチン、および S - アデノシルメチオニン、アスパラギン酸、グルタミン、アラニン、アルギニン、システイン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、ロイシン、リジン、プロリン、セリン、スレオニン、またはそれらの組み合わせのうちの 1 以上から選択することができる。1 つ以上のアミンは、それらの反応能力に基づいて選択され得る。非限定的な 1 例として、1 つ以上のアミンがアルデヒド反応剤であることが可能である。例えば、アルデヒド反応剤は、トリス、リジン、グリシン、尿素、またはいずれかもしくは両方の誘導体（例えば、塩および / またはエステル）の 1 つまたは任意の組み合わせから選択されてよい。アルデヒド反応剤は、試料収集の前または後のいずれかに存在し得る任意の遊離ホルムアルデヒドと反応するように選択され得る。（採血前の）組成物中のアミンの濃度は、約 0.25 % ~ 約 1.5 % でよい。濃度は、約 0.3 % ~ 約 0.8 % でよい。濃度は、約 0.4 % ~ 約 0.7 % でよい。

30

40

【0048】

1 つ以上の抗凝固剤またはキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）およびその塩、エチレングリコール四酢酸（EGTA）およびその塩、ヒルジン、ヘパリン、クエン酸、クエン酸の塩からなる群から選択されてもよい。酸、シュウ酸、シュウ酸の塩、酸クエン酸デキストロース（ACD）、クエン酸、クエン酸 - テオフィリン - アデノシン - ジブリダモール（CTAD）、クエン酸 - ピリドキサルリン酸 - トリス、ヘパリン - β - ヒドロキシ - エチル - テオフィリン、ポリアネトールスルホン酸、ナトリウムフッ化物、ヘパリンナトリウム、トロンピンおよび PPACK（D - フェニルアラニル - L - プロリル - L - アルギニנקロロメチルケトン、およびそれらの任意の組み合わせからなる

50

群から選択することができる。したがって、(採血前の)組成物中の抗凝固剤の濃度は、約2.5%~約10%でよい。濃度は、約3%~約8%でよい。濃度は、約4%~約7%でよい。

【0049】

1つ以上の多糖は、デンプン、セルロース、グリコーゲン、またはそれらの組み合わせから選択することができる。1つ以上の多糖は、赤血球保護剤として作用することができる。1つ以上の多糖は、細胞溶解が遅くなるか、最小化されるか、実質的に防止されるか、またはそれらのいくつかの組み合わせであるように、赤血球膜を安定化するのを助けることができる。(採血前の)組成物中の多糖の濃度は、約0.001%~約5.0%であってよい。濃度は、約0.02%~約3.0%でよい。濃度は、約0.5%~約2.0%でよい。

10

【0050】

1つ以上の転写阻害剤は、試料内の1つ以上の成分の安定性を促進するように選択することができる。1つ以上の転写阻害剤は、アクチノマイシンD、 α -アマニチン、トリプトライド、5,6-ジクロロ-1- β -D-リボフラノシルベンズイミダゾール(DRB)、フラボピリドール、またはそれらの任意の組み合わせから選択することができる。濃度は、約0.5 μ M~約500 μ Mでよい。

【0051】

試料採血チューブは、1つ以上の酵素阻害剤を含んでよい。1つ以上の酵素阻害剤は、ピロリン酸ジエチル、エタノール、オーリントリカルボン酸(ATA)、グリセルアルデヒド、フッ化ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ホルムアミド、バナジル-リボヌクレオシド複合体、マカロイド、ヘパリン、ヒドロキシルアミン-第二銅イオン、ベントナイト、硫酸アンモニウム、ジチオスレイトール(DTT)、 β -メルカプトエタノール、システイン、ジチオエリスリトール、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフェン塩酸塩、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺などの二価カチオン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。

20

【0052】

試料採血チューブには、1つ以上の代謝阻害剤が含まれていてもよい。1つ以上の代謝阻害剤は、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトンリン酸、グリセルアルデヒド3-リン酸、1,3-ビスホスホグリセリン酸、3-ホスホグリセリン酸、2-ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸およびグリセリン酸ジヒドロキシ酢酸、フッ化ナトリウム、K₂C₂O₄、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。

30

【0053】

試料採血チューブは、1つ以上のプロテアーゼ阻害剤を含むことができる。1つ以上のプロテアーゼ阻害剤は、抗疼痛、アプロチニン、キモスタチン、エラストチナール、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、APMSF、TLCK、TPCK、ロイペプチン、大豆トリプシン阻害剤、インドール酢酸(IAA)、E-64、ペプスタチン、VdLPFFVdL、EDTA、1,10-フェナントリン、ホスホラモドン、アムスタチン、ベスタチン、ジプロチンA、ジプロチンB、アルファ-2-マクログロブリン、ライマメトリプシン阻害剤、膵臓プロテアーゼ阻害剤、卵白オボスタチン、卵白シスタチン、ドキシサイクリン、スルファサラジン、クルクミン、ホモシステイン、6-アミノカプロン酸、ドキシサイクリン、ミナサイクリンHCl、ニコチンアミド、キトサン、リジン、グリセルアルデヒド、フィチン酸、b-シトセロール、C-AMP、ポリリジン低分子量、ピオカニンA、スルファサラジン、テトラサイクリン、テトラサイクリン、シクロヘキサミド、リファンピシン、豆乳、スラミン、N-酪酸、ベニシラミン、N-アセチルシステイン、ベンザミジン、AEBSF、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。保護剤は、カリクリンA、ノジュラリン、NI PP-1、ミクロシスチンLR、トートマイシン、オカダ酸、カンタリジン、ミクロシスチンLR、オカダ酸、ホストリシン、トートマイシン、カンタリジン、エンドソール、ノジュラリン、シク

40

50

ロスポリン A、F K 5 0 6 / イムノフィリン複合体、シベルメトリン、デルタメトリン、フェンバレレート、b p V (p h e n)、デフォスタチン、m p V (p i c) D M H V、オルトバナジン酸ナトリウム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるホスファターゼ阻害剤を含んでよい。

【 0 0 5 4 】

試料採血チューブは、1 つ以上のヌクレアーゼ阻害剤を含んでよい。1 つ以上のヌクレアーゼ阻害剤は、ピロ炭酸ジエチル、エタノール、オーリントリカルボン酸 (A T A)、ホルムアミド、バナジル - リボヌクレオシド複合体、マカロイド、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、プロテイナーゼ K、ヘパリン、ヒドロキシルアミン - 第二銅イオン、ベントナイト、硫酸アンモニウム、ジチオスレイトール (D T T)、ベータ - メルカプトエタノール、システイン、ジチオエリスリトール、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフェン塩酸塩、または $M g + 2$ 、 $M n + 2$ 、 $Z n + 2$ 、 $F e + 2$ 、 $C a + 2$ 、 $C u + 2$ などの二価カチオン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。

10

【 0 0 5 5 】

試料採血チューブは、1 つ以上のホスファターゼ阻害剤を含んでよい。1 つ以上のホスファターゼ阻害剤は、カリクリン A、ノジュラリン、N I P P - 1、ミクロシスチン L R、トートマイシン、オカダ酸、カンタリジン、イミダゾール、ミクロシスチン L R、オカダ酸、ホストリシン、トートマイシン、カンタリジン、エンドソール、ノジュラリン、シクロスポリン A、F K 5 0 6 / イムノフィリン複合体、シベルメトリン、デルタメトリン、フェンバレレート、b p V (フェン)、デフォスタチン、m p V (p i c) D M H V、オルトバナジン酸ナトリウム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。

20

【 0 0 5 6 】

試料採血チューブは、二環式オキサゾリジン、D M D M ヒダントイン、ヒドロキシメチルグリシン酸ナトリウム、ヘキサメチレンテトラミン塩化アリル、殺生物剤、水溶性亜鉛塩、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。試料採血チューブは、約 1 ~ 約 7 の範囲の pH を有するポリアクリル酸または適切な酸を含んでよい。試料採血チューブは、アミン、アミノ酸、アルキルアミン、ポリアミン、一級アミン、二級アミン、アンモニウム塩、またはそれらの任意の組み合わせを含んでよい。試料採血チューブは、1 つ以上の第一級アミンを含んでよい。試料採血チューブは、1 つ以上のアミド (例えば、ブタンアミド) を含んでよい。試料収集チューブは、1 つ以上のアポトーシス阻害剤を含んでよい。試料収集チューブは、1 つ以上のカスパーゼ阻害剤を含んでよい。

30

【 0 0 5 7 】

試料採血チューブは、1 つ以上のポリマー成分を含んでよい。ポリマーは、ポリビニルピロリドン (P V P)、ポリエチレングリコール (P E G)、およびシクロデキストリンを含んでよいがこれらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

本明細書に記載される組成物は、以下：ドキシサイクリン、ポリエチレングリコール、スルファサラジン、ポリビニルピロリドン、クルクミン、グルコン酸マグネシウム、ホモシステイン、メチルセルロース (M C)、6 - アミノカプロン酸、エチルセルロース、アプロチニン、ヒドロキシエチルセルロース、ドキシサイクリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ミノサイクリン H C 1、デキストリン、ニコチンアミド、デキストラン、キトサン、ポリエチレンオキシド、リジン、ポリエチルオキサゾリン、グリセルアルデヒド、フィコール、フィチン酸、 α - シクロデキストリン、b - シトセロール、 β - シクロデキストリン、C - A M P、 γ - シクロデキストリン、ポリリジン、ゼラチン、ビオカニン A、糖類 (例えば、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース)、スルファサラジン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、デメクロサイクリン、ヒドロキシエチルメチルセルロース、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、シクロヘキサミド、リファンピシン、豆乳、大豆系プロテアーゼ阻害剤、スラミン、N - 酪酸、ペニシラミン、N - アセチルシステイン、ベンザミジン、A E B S F、アルファ - 2 - マクログロブ

40

50

リン、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含んでよい。前述の化合物の1つ以上が、本開示の組成物中のシクロデキストリンの代わりになり得ることが企図される。

【0059】

試料収集チューブは、1つ以上の界面活性剤を含んでよい。1つ以上の界面活性剤は、DMSO（ジメチルスルホキシド）、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、Cellulosolves（エチレングリコールジメチルエーテル）（フェノキシエタノール）、Triton X 100、Triton X 705（非イオン性洗剤）、1-メチル-2-ピロリジノン、Tween 20、Tween 40（非イオン性）、Brij 35（洗剤）、ポリオキシエチレンエーテル（Polyox）、コール酸ナトリウム、エチレンオキシドポリマー、モネンシン、モナクチン、ペンタクロロフェノール、2,4ジニトロフェノール、サポニン、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、またはそれらの組み合わせである。前述の界面活性剤の効果は、本明細書では濃度依存的であると考えられる。例えば、限定することなく、ある実施形態では、前述の界面活性剤のより低い濃度が、細胞を本開示の組成物と接触させることによって細胞の溶解を阻害するのに有用であると考えられ、当該阻害は細胞からの核酸および/または細胞外小胞の放出を防止する。

10

【0060】

試料収集チューブは、ビオチン、アルブミン（卵、ウシ）、ゼラチン、および類似のそのような化合物などのタンパク質を含むことができる。試料採取チューブは、ヒト胎盤由来のRNAse阻害剤、および類似のそのような化合物などのRNAse阻害剤を含んでよい。試料収集チューブは、塩酸グアニジニウム、ポリエチレンジイミンなどのポリカチオン、および類似のそのような化合物などの核酸安定剤を含むことができる。試料収集チューブは、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸、および類似のそのような化合物などのアミノ酸/ポリペプチドを含むことができる。試料収集チューブには、アルデヒド（ホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒド）、アルコール（エタノール、メタノール）、および類似のそのような化合物などの固定剤が含まれている場合がある。試料収集チューブは、EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）などの抗凝固剤、および同様の化合物を含んでよい。試料収集チューブは、ACD（Acid Citrate Dextrose）、ヘパリン、および類似のそのような化合物を含んでよい。試料収集チューブには、EDTA、PMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）、AEBSF（2-アミノエチルベンゼンスルホニルフルオリド）、および類似のそのような化合物などのプロテアーゼ阻害剤が含まれる場合がある。試料収集チューブは、トロロックス、 α -トコフェロール、B-メルカプトエタノール、および類似のそのような化合物などの抗酸化剤/還元剤を含んでよい。試料収集チューブは、DAPI（ジアミジノ-2-フェニルインドール）、ヨウ化プロビジウム、フルオレセインジアセテート、および類似のそのような化合物などの核酸色素を含んでよい。試料収集チューブは、糖（スクロース）、セルロース、および類似のそのような化合物などの炭水化物を含んでよい。化合物の上記の特定のリストは、特定の化合物の時々重複する機能を認識する重複の測定を含んでよいことを理解されたい。当業者は、本開示のこの態様を理解および認識するはずである。

20

30

【0061】

アルデヒド反応剤は、防腐剤に対して約1:20~約1:1の比率（重量）で存在し得る。アルデヒド反応剤は、抗凝固剤に対して（重量で）約1:25から約5:1の比率で存在し得る。保存剤は、抗凝固剤に対して約1:10~約15:1の比（重量）で存在し得る。

40

【0062】

組成物中の1つ以上の成分は、ゲル形態、液体形態、固体形態、またはそれらのいくつかの組み合わせでよい。組成物の1つ以上の成分は、粒子状であり得、そして/または試料収集容器および/または試料試験容器の壁にフィルムを形成し得る。1つ以上の成分を凍結乾燥し、次に試料収集容器の1つ以上の部分に噴霧することができる。組成物内の1つ以上の成分は、封入剤内に封入され得る。封入剤は、試料との接触時に封入材料を分解するか、さもなければ露出するように選択することができ、それにより、封入剤内の材料

50

を試料に送達する。組成物は、緩衝液または水などの不活性成分を含んでよい。

【 0 0 6 3 】

1つ以上の保存剤は、約0.5体積%～約5.0体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約0.5体積%～約1.0体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約0.5体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約0.75体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約1体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約2.5体積%の濃度で組成物中に存在し得る。1つ以上の保存剤は、約5体積%の濃度で組成物中に存在し得る。

【 0 0 6 4 】

組成物は、界面活性剤およびカオトロピック剤、ならびにRBC、WBC、血小板、および他のまねな循環細胞の溶解をもたらす物質のいずれかまたはそれ以上を実質的に含まなくてもよい。組成物は、細胞の活性化およびそれに続く、カルシウムイオノフォアおよび化学療法薬を含む膜小胞の放出をもたらす物質のいずれかまたはそれ以上を実質的に含まなくてもよい。組成物は、RBC溶血および抗マラリア薬、亜硝酸塩および重金属を含むRBC MCVの増加をもたらす物質のいずれかまたはそれ以上を実質的に含まなくてもよい。組成物は、抗凝血剤ヘパリン、カルシウムイオン、ヘムおよびヘモグロビンを含む、下流のPCR阻害をもたらす任意の1つ以上の物質を実質的に含まなくてもよい。組成物は、トロンピン、カルシウムイオン、シリカおよびセライトを含む、凝固をもたらす物質のいずれかまたはそれ以上を実質的に含まなくてもよい。組成物はさらに、トリス緩衝液、ウシ血清アルブミン、ポリソルベート20、アジ化ナトリウム、塩化ナトリウム、血清セパレーター、クロットアクティベーター、およびゲンタマイシンの1つ以上を実質的に含まなくてもよい。

【 0 0 6 5 】

生物学的試料は、少なくとも3日間安定させることができる。生物学的試料は、少なくとも5日間安定させることができる。生物学的試料は、少なくとも7日間安定させることができる。好ましくは、血液材料を含む生物学的試料のヘモグロビン分解は、少なくとも5日間安定化される。

【 0 0 6 6 】

本明細書に記載される組成物は、血液材料の分析が行われる遠隔部位への送達のために、組成物中に懸濁されたままである生体試料を取り扱うステップを含んでよい方法で利用され得る。この方法は、生物学的試料を輸送する（例えば、輸送する）ことを含んでよいが、それは、血液材料の分析が行われることになる部位への送達のために組成物中に懸濁されたままである。この方法は、取り扱いおよび/または輸送中に試料を温度変動に曝すことを含んでよい。例えば、そのような曝露は、約4℃～約37℃、または約2℃～約37℃の温度であり得る。この方法は、取り扱いおよび/または輸送中に試料を37℃までの温度に曝露することを含んでよい。遠隔サイトは、血液材料の下流分析が行われるべきサイトであり得る。部位は、血液材料のイムノアッセイまたは核酸分析が行われる部位であり得る。

【 0 0 6 7 】

組成物および/または試料は、試料容器に入れられてもよい。試料容器は、組成物、または少なくとも0.5mL、少なくとも1mL、少なくとも3mL、少なくとも5mL、少なくとも10mL、またはさらに少なくとも20mLの量の試料と組み合わせた組成物を含んでよい。試料容器は、組成物または試料と組み合わせられた組成物を、150mL未満、100mL未満、50mL未満、またはさらには20mL未満の量で含むことができる。本明細書に記載される組成物は、直接吸引式血液チューブ中に存在し得る。本明細書に記載される組成物は、生物学的試料を収集するための任意のデバイスに配置され得る。本明細書に記載される組成物は、試料の添加前に試料受容容器中に配置され得るか、または収集後に試料に添加され得る。

【 0 0 6 8 】

試料容器はチューブであってもよい。試料容器は円筒形であってもよい。試料容器はガ

10

20

30

40

50

ラスであってもよいし、ポリマーであってもよい。試料容器は、2017年2月13日に
出願された米国仮出願番号第62/454,451号および同第62/454,460号
ならびにPCT特許公開番号2017/031354号に教示されているような、化学的
に強化されたプラズマ蒸着コーティングでよいバリアコーティングを有することがあり、
これらの出願の内容全体は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

試料容器はキットの一部であってもよい。キットは、試料が試料容器内の試験施設に出
荷された場合でも、試料が試料容器内に残るように、試料容器用のキャップまたはカバー
を含んでよい。

【0070】

10

採血後の試料容器は、血液試料とホルムアルデヒドの組み合わせを含んでもよい。試料
容器は、血液試料、抗凝固剤、およびホルムアルデヒドの組み合わせを含んでよい。試料
容器は、血液試料、ホルムアルデヒド、抗凝固剤、および多糖の組み合わせを含んでよい。
試料容器は、血液試料、ホルムアルデヒド、抗凝固剤、多糖および転写阻害剤の組み合
わせを含んでよい。試料容器は、血液試料、ホルムアルデヒド、抗凝固剤、多糖、転写阻
害剤、およびアミノ酸の組み合わせを含んでよい。

【0071】

この方法は、病状の1つ以上の指標について生物学的試料を分析することを含んでよい。
生物学的試料は、異常な生物学的試料であり得る。例えば、異常な結果には、変化した
DNA、変化したRNA、および/または変化したタンパク質および/またはCTCを含
むまれな循環細胞、循環内皮細胞、循環前駆細胞、および循環胎児細胞が含まれ得る。循
環細胞はまた、核酸を含む循環細胞成分を含むと理解され得る。

20

【0072】

この方法は、血液材料を含む安定化された生物学的試料の分析を含んでよい。分析には
、1つ以上の試験方法が含まれる。この方法は、血液材料および/または血液材料中の1
つ以上の成分（例えば、血液細胞、希少細胞、核酸、循環腫瘍細胞/断片、循環内皮細胞
、循環前駆細胞、母体血液の胎児細胞、細胞外小胞）のイムノアッセイを含んでよい。イ
ムノアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、酵素イムノアッセイ（EIA）、
ラジオイムノアッセイ（RIA）、カウンティングイムノアッセイ（CIA）、フルオロイム
ノアッセイ（FIA）、化学発光（CLIA）およびフローサイトメトリーからなる群から選
択できる。この方法は、血液材料の核酸分析を含んでよい。核酸分析は、
遺伝子配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応、および次世代配列決定からなる群から選
択され得る。

30

【0073】

本教示の試料収集チューブは、収集された生物医学的試料の内容物の、試料収集チュー
ブの壁への付着に抵抗し得る。例えば、採血チューブの内面は、採取された血液試料の血
球への付着に抵抗する可能性がある。採血チューブは、採取された血液試料の核酸（例
えば、DNA）のチューブ壁への付着に抵抗することができる。

【0074】

本教示の試料収集チューブは、閉鎖された基部、基部から延在し、開放端で終わり、内
壁を有する中空室を画定する同一の細長い側壁を有するチューブを含んでよく、中空室は
血液試料を収集するように構成され、少なくともチューブの細長い側壁は、水分バリアと
低い吸湿率、チューブ内の試料を見ることができると光透過性および耐薬品性を有する熱可
塑性ポリマー材料、ならびに、場合によりチューブの側壁の大部分にある透明なシリコー
ン含有コーティングおよびエラストマーのストッパーを含む材料で作られる。血液試料を
収集する前に、チューブの中空チャンバーは周囲圧力に対して真空状態にあり、中空チャ
ンバーは固体、液体またはゲルから選択された初期状態の組成物、任意の抗凝固剤を含む
組成物、ならびに血液試料中を循環する核酸または希少細胞の単離および/または血液試
料のフローサイトメトリー試験を可能にするために血液試料の血球を安定化するように適
合された保存組成物で部分的に満たされている。組成物は、約2 ~ 約30 の温度範囲

40

50

にわたって少なくとも1ヶ月の期間、その初期状態を保持することができる。組成物は、血液試料の細胞性成分または無細胞成分の単離を可能にするための1つ以上の材料を含むように含まれ得るか、またはチューブは適合され得る。そのような物質は、プロテイナーゼKを含んでよいが、これに限定されないプロテアーゼまたはアミノ酸を含んでよい。

【0075】

血液試料収集チューブは、使い捨てのチューブであってもよい。血液試料収集チューブは、非発熱性またはエンドトキシンフリーである可能性がある。血液試料収集チューブは、分析目的で血液試料を収集するために使用できる。

【0076】

血液試料採取チューブは、安定化と保存のために使用される真空の直接吸引採血チューブである。血液試料収集チューブは、核酸の安定化と保存に使用できる。例えば、本教示の採血チューブは、母体血中を循環する無細胞胎児DNAを分析する非侵襲的出生前検査(NIPT)に使用されてもよい。出生前検査には、胎児の性別判定、1つ以上の染色体状態(トリソミーなど)の遺伝子スクリーニング、出生前のDNA父性検査などがある。チューブは、妊婦の母体血液試料の非侵襲的検査に適したキットの一部である場合がある。血液試料収集チューブは、循環腫瘍細胞および/または腫瘍DNAの安定化と保存に使用できる。血液試料収集チューブは、フローサイトメトリーの試験と分析に使用できる。チューブは、循環腫瘍細胞を検出するためのキットの一部であってもよい。チューブは、RNAおよび/またはDNAの核酸活性を示す癌を検出するためのキットの一部である場合がある。チューブは、病状の治療の有効性を決定するためのキットの一部であってもよい。チューブは、バイオマーカーの存在または心臓病の存在を試験するためのキットの一部である場合がある。チューブは、移植の適合性を試験するためのキットの一部である場合がある。

【0077】

真空採血チューブには通常、有効期限がある。期限切れのチューブは真空度が低下している可能性があり、採血時間が短くなり、血液と組成の比率が不適切になる。したがって、採血チューブが長時間真空を維持できることが重要である。本教示の採血チューブは、長期間(例えば、少なくとも24ヶ月)にわたって真空を維持する真空採血チューブを提供し得る。さらに、採血チューブの吸引許容値は正確でなければならない(例えば、記載されている採取容量のmLの $\pm 10\%$)。チューブ輸送中の環境の変動にもかかわらず、その閉鎖機構を含むチューブの構造が、チューブ内の必要な圧力の維持を促進することも重要である。このような変動には、温度の変化、気圧の変化、湿度の変化、その他の環境要因が含まれる。より具体的には、高高度で発生する可能性のある湿度と気圧の低下にもかかわらず、チューブはしっかりと閉じたままでなければならない。例として、環境気圧が400mmHg~800mmHgの範囲にある場合、チューブは密封されたままで、必要な内部圧力を維持する必要がある。

【0078】

採血チューブは、ストッパーとともに使用するように適合させることができる。ストッパーは、エラストマー材料を含んでもよい。ストッパーは、ブチルゴム誘導体を含んでよい。ストッパーは、ハロゲン化ブチルを含んでよい。ストッパーは、プロモブチルゴムを含んでもよい。ストッパーは、医薬品のプロモブチルゴムを含んでもよい。ストッパーは、ストッパー潤滑剤とともに使用することができる。ストッパーはコーティングされていてもよい。ストッパーは部分的にコーティングされている場合がある。例えば、コーティングはシリコンを含んでよい。チューブのストッパーは、チューブの内壁に接触するその外面の少なくとも一部を覆うシリコン油コーティングを含んでよい。

【0079】

本教示は、本教示の採血チューブおよびストッパーを含む採血チューブアセンブリを企図する。キャップの外壁とチューブの内壁のシールまたは境界面は、水分透過率が実質的に低下するようなものであると考えられる。ストッパーの外壁とチューブの内壁のシールまたは境界面は、酸素透過率が実質的に低下するようなものであると考えられる。効果的

10

20

30

40

50

なシールは、水分バリアとガスバリアの両方を提供する必要がある。本教示は、ストッパーがチューブの開口部からの引き抜きに抵抗する採血チューブアセンブリを提供する。本教示は、有効な水分透過バリアを提供し、それによって水分が組成物で満たされたチューブの内側から漏れることを防止し、それによって有効な酸素透過バリアを提供し、それにより酸素がチューブに浸透するのを防止する採血アセンブリを提供する。

【0080】

本明細書に記載される組成物は、チューブが約少なくとも約50%までの相対湿度に曝された場合、約20~約30℃の温度範囲にわたって少なくとも1ヶ月の期間、それらの初期状態を保持することが可能であり得る。組成物は、チューブが約75%までの相対湿度に曝された場合、約20~約30℃の温度範囲にわたって少なくとも1ヶ月の期間、その初期状態を保持することが可能であり得る。

10

【0081】

試料収集チューブの寸法は、約13mm×75mmである。チューブは、開放端に隣接する同一の広がりのある細長い側壁で測定して、約13mm×75mmの長さ(D×L)寸法までの外径を有することができる。試料収集チューブの寸法は、約16mm×100mmである。チューブは、開口端に隣接する同一の細長い側壁で測定して、約16mm×100mmの長さ(D×L)寸法までの外径を有することができる。血液試料収集チューブは、約2mL~約10mLの血液収集に適している場合がある。例えば、小さな採血チューブは、約2mLの血液試料採取に適しているかもしれない。例えば、大きな採血チューブは、約10mLの血液試料の採取に適しているかもしれない。

20

【0082】

採血チューブは、約50μL~約70μLの組成物充填許容量を含んでよい。採血チューブは、約54μL~約66μLの組成物充填許容量を含んでよい。採血チューブは、約60μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、約160μL~約220μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、約180μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、約200μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、約200μL~約1,000μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、約750μLの組成物充填許容量を含んでよい。チューブは、重量で約0.0600g~約0.0800gの組成物を含むことができる。チューブは、約0.0700gの重量で充填された組成物を含んでよい。チューブは、0.0650gのプラスマイナス10%の重量で充填された組成物を含んでよい。チューブは、0.0700gのプラスまたはマイナス10%の重量で充填された組成物を含んでよい。チューブは、0.0750gのプラスまたはマイナス10重量%の組成物充填物を含んでよい。チューブは、重量で約0.200g~約0.300gの組成物を含むことができる。チューブは、約0.250gの重量で充填された組成物を含んでよい。チューブは、0.225gのプラスマイナス10%の重量で充填された組成物を含んでよい。チューブは、0.250gのプラスまたはマイナス10重量%の組成物充填物を含んでよい。チューブは、0.275gのプラスまたはマイナス10重量%の組成物充填物を含んでよい。

30

【0083】

採血チューブは、約3mL~約5mLの吸引許容量を含んでよい。採血チューブは、約4mLの吸引許容量を含んでよい。採血チューブは、約7mL~約13mLの吸引許容量を含んでよい。採血チューブは、約10mLの吸引許容量を含んでよい。採血チューブは、約200μLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約750μLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約200μL~約750μLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約500μLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約500μL~約750μLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約1mLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約500μL~約1mLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約200μL~約1mLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約2mLの組成物充填容量を含んでよい。採血チューブは、約1mL~約2mLの組成物充填容量を含んでよい。例えば、10mLの採血チュー

40

50

ブは、約 1 mL ~ 約 2 mL の組成物充填容量を含んでよい。例えば、4 mL の採血チューブは、約 1 mL ~ 約 2 mL の組成物充填容量を含んでよい。

【0084】

本明細書に記載されている、組成物を含むチューブのポリマー材料は、水分バリアおよび低吸湿率、純度、透明性、耐薬品性、耐熱性、および強度のうちの1つ以上を有するとして特徴付けられ得る。高分子材料は、次の属性：低密度、高透明度、低複屈折、非常に低い吸水率、優れた水蒸気バリア性、可変熱変形特性、高剛性、強度と硬度、非常に良好な血液適合性、優れた生体適合性、酸およびアルカリに対する非常に優れた耐性、非常に優れた電気絶縁特性、および非常に優れた加工性 / 流動性のうちの1つ以上を有してよい。

【0085】

ポリマー材料は、環状オレフィンを含んでよい。ポリマー材料は、環状オレフィンコポリマー (COC) を含んでよい。ポリマー材料は、ポリエチレン、ポリプロピレン、または両方を含むホモポリマーまたはコポリマーを含むことができる。ポリマー材料は、環状部分を含んでよい。高分子材料は、ポリエステルを含んでよい。ポリマー材料は、ポリエステルテレフタレートまたはポリエチレンテレフタレートを含んでよい。ポリマー材料は、ポリカーボネートを含んでよい。高分子材料は、ポリ (メチルメタクリレート) を含んでよい。

【0086】

ポリマー材料は、優れた水蒸気バリア特性を有し得る。ポリマー材料は、低い水蒸気透過率 (MVT R) または水蒸気透過率 (WVT R) を有し得る。水蒸気透過率は、DIN 53 122 などの従来の試験方法に従って決定できる。ポリマー材料は、DIN 53 122 により測定されるように、23 および 85 % の相対湿度で約 0.023 g · mm / m² · d ~ 約 0.045 g · mm / m² · d の水蒸気透過率を有し得る。ポリマー材料は、23 および 85 % の相対湿度で約 0.023 g · mm / m² · d の水蒸気透過率を有し得る。ポリマー材料は、23 および 85 % の相対湿度で約 0.023 g · mm / m² · d 未満の水蒸気透過率を有し得る。

【0087】

試料収集チューブは、コーティングを含んでもよい。試料収集チューブは、コーティングされていない場合がある。試料収集チューブは、チューブの内壁にコーティングが施された採血チューブであってもよい。コーティングは、1つ以上の層を含んでよい。コーティングは、一般的に透明でよい。コーティングは、シリコン含有材料を含んでよい。

【0088】

コーティングは、1つ以上の機能を果たし得る。採血チューブのコーティングは、採血チューブの内面の1つ以上の特性を変えるようなものであってもよい。例えば、コーティングは、チューブの内壁の表面エネルギーを変える可能性がある。コーティングは、チューブの壁への核酸の付着を防止するのに役立つ。

【0089】

1つ以上の層を含むコーティングは、任意の適切なメカニズムを介してチューブの内壁に堆積させることができる。例えば、コーティングは、プラズマ、スプレー、および / またはスパッタ堆積法によってポリマー基板上に堆積されてもよい。蒸着法で塗布してもよい。化学蒸着法で塗布してもよい。物理蒸着法で塗布してもよい。

【0090】

本教示は、組成物が経時的に水分を失うことを可能にしない採血チューブを提供する。湿気が失われると、安定化組成物が濃縮され、赤血球溶解を含むすべての細胞の完全性を損ない、過剰な溶血を引き起こす可能性がある。

【0091】

本教示の採血チューブは、組成物を含んでよい。チューブは、1つ以上の成分を含む組成物を含んでよい。組成物の1つ以上の成分の比率は、約 5 : 1 ~ 約 15 : 1 (例えば、10 : 1) であってよい。組成物は固体であってもよい。組成物は実質的に固体であってよい。洗剤組成物は液体であってもよい。組成物はゲルであってよい。組成物はフィルム

10

20

30

40

50

であってもよい。組成物は水性物質を含んでよい。組成物は、組成物中に1つ以上の薬剤を含んでよい。適切な溶媒は、水、生理食塩水、ジメチルスルホキシド、アルコールおよびそれらの任意の混合物を含んでよい。

【0092】

採血チューブは、約4 mL～約10 mLの採血量を含んでよい。採血チューブは、約0.05 mL～約1 mLの組成物容量を含んでよい。採血チューブは、約0.20 mL～約0.90 mLの組成物容量を含んでよい。採血チューブは、約8 mL～約10 mLの採血量のために約0.20 mL～約0.30 mLの組成物を含むことができる。採血チューブは、約4 mL～約6 mLの採血量のために約0.60 mL～約0.90 mLの組成物を含んでよい。

10

【0093】

血液試料採取チューブは、以下：タンパク質（例：プリオン）、酵素、抗体、および、翻訳後の修飾を有するおよび有さない核酸を含む核酸を含んでもまたは含まなくてもよい生体物質、のうちの1つ以上の安定化と保存に使用できる。例えば、チューブは、表面フローサイトメトリー、細胞内サイトメトリー、ELISA型のアッセイ、および質量分析の1つ以上による分析のために試料を収集する。血液試料収集チューブは、細胞外小胞、エキソソーム、エクソソーム、および/または微小胞の安定化と保存に使用できる。血液試料採取チューブは、ウイルスの安定化と保存に使用できる。これには、ウイルスの不活化とウイルス量の定量化が含まれる場合がある。ウイルスには、DNA/RNA、ストランド/ダブルストランド、エンベロープ/非エンベロープのいずれかが含まれる場合がある。血液試料収集チューブは、細菌、カビ、酵母などの微生物の安定化と保存に使用できる。血液試料収集チューブは、細胞外寄生虫および/または細胞内寄生虫の安定化と保存に使用できる。血液試料採取チューブは、エキソソーム、循環腫瘍細胞、その他のまれな循環細胞、および腫瘍DNAの安定化と保存に使用できる。

20

【0094】

組成物は、血液試料を少なくとも約3日間保存するのに適している場合がある。組成物は、血液試料を少なくとも約7日間保存するのに適している場合がある。組成物は、血液試料を少なくとも約14日間保存するのに適している場合がある。組成物は、血液試料を少なくとも約30日間保存するのに適している場合がある。組成物は、血液試料を少なくとも約60日間保存するのに適している場合がある。組成物は、血液試料を少なくとも約90日間保存するのに適している場合がある。

30

【0095】

本開示の組成物の成分間の相乗作用

本開示の組成物の様々な成分と血液中の様々な細胞に対するそれらの影響との間の関係は複雑である。cfRNAを安定化させるには、WBCとRBCの両方の安定化が必要である。それぞれに無細胞画分を汚染するRNAが含まれているためである。例えば、限定することなく、アルデヒドを放出することができる成分（例えば、IDU）が組成物中に少なすぎると、WBCの安定化に影響はないが、アルデヒドを放出することができる成分が多すぎると（例えば、IDU）その後、RBCの不安定化が発生し始める。 α -シクロデキストリンは、白血球の安定に役立つが、赤血球を損傷する可能性がある。

40

【0096】

したがって、本開示の組成物の様々な成分が、例えば、細胞内の核酸の安定化に関して相乗効果を生み出すことが本明細書で開示される。したがって、本開示の態様の実施形態のいずれかにおいて、アルデヒドを放出することができるポリマーおよび成分は、例えば、細胞内の核酸の安定化に関して相乗効果を提供する。したがって、ある実施形態では、 α -シクロデキストリンとIDUは相乗的に作用して、例えば細胞内の核酸を安定化させる。さらなる実施形態では、 α -シクロデキストリンおよびDUは相乗的に作用して、例えば、細胞内の核酸を安定化させる。ある実施形態では、PEGおよびIDUは相乗的に作用して、例えば、細胞内の核酸を安定化させる。さらに別の実施形態では、PEGおよびDUは相乗的に作用して、例えば細胞内の核酸を安定化させる。

50

【 0 0 9 7 】

本開示の組成物は、細胞外小胞、ゲノムDNAおよびRNAならびに他のRNA種（例えば、mRNA、miRNA、piRNA、siRNA、shRNAなど）内にあるcfRNA、cfDNA、タンパク質および他の細胞物質の安定化を促進し、無細胞および細胞性物質（例えば、白血球内のDNAおよびRNA、循環腫瘍細胞（CTC）、循環胎児細胞、または他のまれな循環細胞）の下流の単離および検査を可能にする。さらなる実施形態では、本開示の組成物は、直接的および間接的な細胞外小胞分析に有用である。

【 0 0 9 8 】

ある実施形態では、細胞は血液細胞である。さらなる実施形態では、血液細胞は、白血球（WBC）または赤血球（RBC）である。ある実施形態において、アルデヒドを放出することができる成分は、ジアゾリジニル尿素、イミダゾリジニル尿素、1,3,5-トリス（ヒドロキシエチル）-s-トリアジン、オキサゾリジン、1,3-ビス（ヒドロキシメチル）-5,5-ジメチルイミダゾリジンである。2,4-ジオン、クオタニウム-15、DMDMヒダントイン、2-プロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール、5-プロモ-5-ニトロ-1,3-ジオキサン、トリス（ヒドロキシメチル）ニトロメタン、ヒドロキシメチルグリシネート、ポリクオタニウム、またはそれらの組み合わせである。本開示の実施形態のいずれにおいても、アルデヒドを放出することができる成分は、イミダゾリジニル尿素（IDU）である。

【 0 0 9 9 】

ある実施形態では、ポリマーは、（当該技術分野で理解されている様々な分子量の）ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルピロリドン（PVP）、グルコン酸マグネシウム、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）である、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、（当該技術分野で理解されている様々な分子量の）デキストリン、（当該技術分野で理解されている様々な分子量の）デキストラン、ポリエチレンオキシド、ポリエチルオキサゾリン、（当該技術分野で理解されている様々な分子量の）フィコール、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ゼラチン、糖（例えば、限定されないが、スクロース、マンニトール、ラクトース、またはトレハロース）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロースである。本開示の実施形態のいずれにおいても、ポリマーは α -シクロデキストリンである。

【 0 1 0 0 】

本開示の組成物の各成分の濃度/量は、以下のように企図される。アルデヒドを放出することができる成分（例えば、IDUまたはDU）は、約10%～約40%の濃度で組成物中に存在すると考えられる。シクロデキストリンまたはその機能化誘導体（例えば、 α -シクロデキストリンまたはその機能化誘導体）は、約0.75%～約4%の濃度で組成物中に存在することが企図される。シクロデキストリンの官能化誘導体は当該技術分野で知られている（例えば、Hanesianら、J. Org. Chem. 60(15): 4786-4797(1995)およびZhouら、Polymer Chemistry 1: 1552-1559(2010)、そのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【 0 1 0 1 】

抗凝固剤に関して、クエン酸系抗凝固剤（例えば、ACD-A、ACD-B、またはCPDA）が約0.75%～約4%の濃度で存在することが企図される。クエン酸系でない抗凝固剤（例えば、EDTA）は、約0.05%～約2%の濃度で組成物中に存在すると考えられる。

【 0 1 0 2 】

本明細書で使用される場合、所与の成分の濃度または量は、生体試料（例えば、血液）の添加前の組成物中にある成分の濃度または量に関して記載される。したがって、生体試料が添加された後の、本明細書に記載される各成分の濃度または量は、約20分の1になると予想される。例として、生物学的試料の添加前の容器（例えば、血液チューブ）内の

10

20

30

40

50

組成物中に存在するIDUの量は、約10体積%～約40体積%であり得る。しかしながら、生物学的試料の添加後、容器内のIDUの濃度は、約0.5体積%から約2体積%になると予想される。したがって、生体試料の添加前の容器内の組成物の体積が0.2mlである場合、容器内のIDUの量は約20μL～約80μLである。生物学的試料の添加後、容器内のIDUの量は約1μL～約4μLである。

【0103】

本開示の態様または実施形態のいずれにおいても、同じまたは同様の特性を有する構成要素は、互いに置換されてもよい。例えば、本開示の任意の態様または実施形態において、DU（またはアルデヒドを放出することができる任意の成分）をIDUの代わりに使用することができる。本開示の任意の態様または実施形態では、代替糖（例えば、スクロース、マンニトール、ラクトース、またはトレハロース）をデキストロースの代わりに使用することができる。

10

【実施例】

【0104】

ここで提供される図は、白血球溶解を最小限に抑え、赤血球溶解を最小限に抑え、無細胞DNA、細胞外小胞（およびそこにあるRNA）、およびタンパク質の安定性を維持するための構成要素を特定するのに役立つ試験データを示している。

【0105】

図1は、様々な抗凝固剤を使用した赤血球MCVの変化を示すグラフである。赤血球の平均細胞体積の増加は、赤血球細胞溶解の増加（または増加の予測）を示す。グラフは、3つの異なるドナーからの3つの異なる保存温度での結果を示している。したがって、平均細胞体積を維持する能力を示す抗凝固剤が、試料収集時の平均細胞体積と同様のままであることが好ましい。

20

【0106】

図2は、様々な抗凝固剤の使用中的エキソソーム放出を示すグラフである。ゲノムDNAの放出と同様に、細胞外小胞の放出は、RNAの効果的な分離に課題をもたらす可能性がある。その結果、エキソソームの放出を維持し、検体採取時と同様の抗凝固剤が好ましい。

【0107】

図3は、防腐剤のパーセンテージの関数として血漿DNA濃度を示すグラフである。DNA濃度の増加は、ゲノムDNAの量の増加を示し、白血球溶解の増加を表す。したがって、望ましい量の保存剤は、DNA、細胞外小胞、またはタンパク質を損傷する可能性のある過剰な保存および架橋を回避しながら、DNA濃度を維持する。

30

【0108】

図4Aは、防腐剤のパーセンテージの関数としての血漿RNA濃度を示すグラフである。RNA濃度の増加は、放出されたエキソソームの量の増加を示している。したがって、望ましい量の保存剤は、DNA、細胞外小胞、またはタンパク質を損傷する可能性がある過剰な保存および架橋を回避しながら、RNA濃度を維持する。

【0109】

図4Bは、血漿RNA濃度をα-シクロデキストリンの割合の関数として示すグラフである。RNA濃度の増加は、放出されたエキソソームの量の増加を示している。したがって、望ましい量の多糖は、溶血を回避しながらRNA濃度を維持する。

40

【0110】

図5Aは、α-シクロデキストリンのパーセンテージの関数としてのユビキチンB mRNAコピー数を示すグラフである。RNA濃度の増加は、放出されたエキソソームの量の増加を示している。したがって、望ましい量の多糖は、溶血を回避しながらRNA濃度を維持する。

【0111】

図5Bは、α-シクロデキストリンのパーセンテージの関数としてのヘモグロビンA mRNAコピー数を示すグラフである。RNA濃度の増加は、放出されたエキソソームの

50

量の増加を示している。したがって、望ましい量の多糖は、溶血を回避しながらRNA濃度を維持する。

【0112】

本開示の組成物の成分の相乗効果

本開示の組成物を含む容器（例えば、採血チューブ）の作業仮説は、メッセンジャーRNA、マイクロRNA、非コードRNAなどを含む無細胞RNA（cfRNA）が細胞外小胞（EV）内のカプセル化によって血漿中で安定であるというものであった。したがって、本開示の態様は、cfRNAの吸引時間濃度の安定化に向けられているため、目標は、EVの初期濃度を維持することであった。図6、7、および8に示した実験では、RNA×BC Tが、採血後最大7日間、EVおよび関連するcfRNAの吸引時濃度を安定化したことが示された。実験では、RNA×BC Tの機能性成分は、防腐剤イミダゾリジニル尿素（IDU）とα-シクロデキストリンである。実験は、前述の各成分が単独で作用するか（相加効果）、または組み合わせが予期しない、より顕著な結果をもたらすか（相乗効果）を試験するために設計された。以下で説明し、図6～8に示すように、この組み合わせは予期しない相乗効果を示した。

10

【0113】

基礎抗凝固剤であるACD-Aの背景に、各防腐剤（すなわち、IDUおよびα-シクロデキストリン）を単独で（RNA×BC Tで使用されているのと同じ濃度で）または一緒に添加した。試料を各製剤含有チューブに収集し、血漿を直ちに（0日目）または室温で7日間保存した後（7日目）に単離した。無細胞RNAは、市販のQIAamp循環核酸分離キットとオンカラムDNase 1消化物を使用して血漿試料から精製された。すべて製造元の推奨（Qiagen）に準拠している。次いで、精製されたcfRNAは、製造元の推奨（Qubit HS RNAアッセイ、Thermo-Fisher）に従って総cfRNAの蛍光分析に、または転写物特異的RNA発現のための市販のプライマー/プローブセットを使用した液滴デジタルPCR（ddPCR、Bio-Rad QX200ワークフロー）に使用された。

20

【0114】

図6に示すように、蛍光分析によって測定された総cfRNAは、安定化されていないACD-A試料（n = 3の独立したドナー）で7日間にわたってほぼ60倍に増加した。IDUを単独で追加してもcfRNAの増加は妨げられなかったが、α-シクロデキストリンのみではcfRNAレベルの増加が制限された。ただし、IDUとα-シクロデキストリンを組み合わせると、総cfRNAレベルの増加が大幅に鈍化した（2～4倍の増加しか観察されなかった）。

30

【0115】

様々な細胞集団に対するIDUまたはα-シクロデキストリン保存剤の潜在的な優先度を判断するために、ddPCRを利用して、cfRNAレベルの転写物特異的变化を決定した。ヘモグロビンアルファ1およびアルファ2（HbA1/2）は赤血球によって発現され、これらの転写物の総レベルは総cfRNAのそれを反映している（図7）。グロビン転写物が血漿中に見られる主要な転写物であることを考えると、これは予想されていた。次に、すべての細胞によって発現される遺伝子であるユビキチンBのレベルを決定した。この点に関して、IDUへの影響は単独で観察されたが、ユビキチンB濃度をほぼ完全に安定させるには、IDUとα-シクロデキストリンの両方の組み合わせが必要であった（図8）。

40

【0116】

全体として、これらのデータは、アルデヒドを放出できる成分（IDUなど）とα-シクロデキストリンとの間で、cfRNAの吸引時間濃度を安定化させることで、予期しない相乗効果を示した。

【0117】

本明細書で使用されるように、別段の記載がない限り、教示は、属（リスト）の任意のメンバーが属から除外されてもよく、および/またはマーカッシュグループのメンバーは

50

、グループから除外されてもよいことを想定している。

【0118】

特に明記しない限り、本明細書に記載されている数値は、いずれかの低い値と高い値との間に少なくとも2単位の隔たりがある場合、1単位の増分で下限値から上限値までのすべての値を含む。1例として、例えば、温度、圧力、時間などのような構成要素、特性、またはプロセス変数の値の量が、例えば、1～90であると述べられている場合、好ましくは、20～80、より好ましくは30～70、例えば(15～85、22～68、43～51、30～32など)の中間範囲の値は、この仕様の教示内にあることが意図されている。同様に、個々の中間値も本教示の範囲内である。1未満の値の場合、1つの単位は、必要に応じて0.0001、0.001、0.01、または0.1と見なされる。これらは具体的に意図されているものの例にすぎず、列挙された最低値と最高値との間のすべての可能な数値の組み合わせは、同様の方法で本出願に明示的に述べられていると見なされる。明らかなように、2つ以上の成分の重量/体積パーセントとして表される量の比較教示は、明示的に述べられていなくても、2つ以上の成分の互いに対する相対重量比率も包含する。例えば、教示が2%Aと5%Bと記述している場合、当該教示にはA:Bの重量比が2:5も含まれる。特に明記しない限り、すべての範囲には、両方のエンドポイントとエンドポイントとの間のすべての数が含まれる。範囲に関連して「約」または「およそ」の使用は、範囲の両端に適用される。したがって、「約20～30」は、少なくとも特定のエンドポイントを含めて、「約20～約30」をカバーすることを意図している。

10

【0119】

特許出願や出版物を含むすべての記事や参考文献の開示は、あらゆる目的で参照により組み込まれる。

20

【0120】

組み合わせを説明するための「本質的に～からなる」という用語は、識別された要、成分、構成要素またはステップ、および組み合わせの基本的かつ新規な特性に実質的に影響を与えない他の要素の成分、構成要素またはステップを含むものとする。本明細書の要素、成分、構成要素またはステップの組み合わせを説明するための「含む (comprising)」または「含む (including)」という用語の使用は、要素、成分、構成要素、またはステップから本質的になる(すなわち、任意の追加の要、成分、構成要素またはステップの存在が、教示から導き出される特性および/または利点に実質的に影響を与えない、あるいはさらには、要素、成分、構成要素、またはステップからなる実施形態もまた企図する。

30

【0121】

複数の要素、成分、構成要素またはステップは、単一の統合された要素、成分、構成要素またはステップによって提供することができる。あるいは、単一の統合された要素、成分、構成要素またはステップは、別個の複数の要素、成分、構成要素またはステップに分割され得る。要素、成分、成分、またはステップを説明する「a」または「1つ(one)」の開示は、追加の要素、成分、成分、またはステップを排除することを意図していない。本明細書で特定の群に属する元素または金属に言及する場合はすべて、1989年にCRC Press、Inc.が発行および著作権を所有している元素の周期表を参照する。1つ以上の群への参照は、群に番号を付けるためにIUPACシステムを使用して、この元素周期表に反映されている1つ以上の群を指すものとする。

40

【0122】

上記の説明は、例示的であり限定的ではないことが意図されることが理解される。提供された例以外の多くの実施形態および多くの用途は、上記の説明を読むことで当業者に明らかになるであろう。したがって、教示の範囲は、上記の説明を参照して決定されるべきではなく、代わりに、そのような請求項が権利を与えられる等価物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。特許出願や出版物を含むすべての記事や参考文献の開示は、あらゆる目的で参照により組み込まれている。本明細書に開示される主題の任意の態様の以下の請求項の省略は、そのような主題の免責事項ではなく、

50

発明者がそのような主題を開示された発明の主題の一部であると見なしていないと見なされるべきではない。

【 0 1 2 3 】

本明細書に提示された説明および図は、当業者にその教示、その原理、およびその実際の応用を知ることが意図している。当業者は、特定の用途の要件に最も適している場合があるように、その教示をその多数の形態で適合および適用することができる。したがって、記載されている本教示の特定の実施形態は、教示を網羅または限定することを意図していない。したがって、教示の範囲は、上記の説明を参照して決定されるべきではなく、代わりに、そのような請求項が権利を与えられる等価物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。特許出願や出版物を含むすべての記事や参考文献の開示は、あらゆる目的で参照により組み込まれている。以下の特許請求の範囲から収集されるように、他の組み合わせも可能であり、これもまた、参照により、この書面による説明に組み込まれる。

10

20

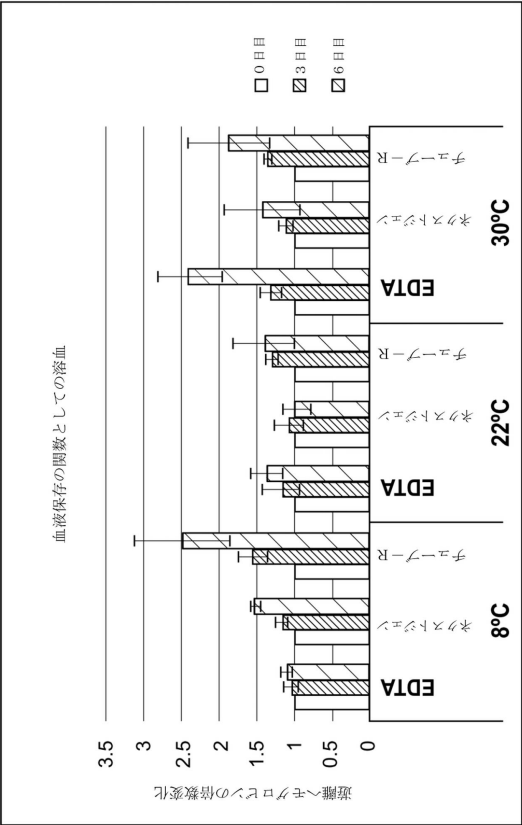
30

40

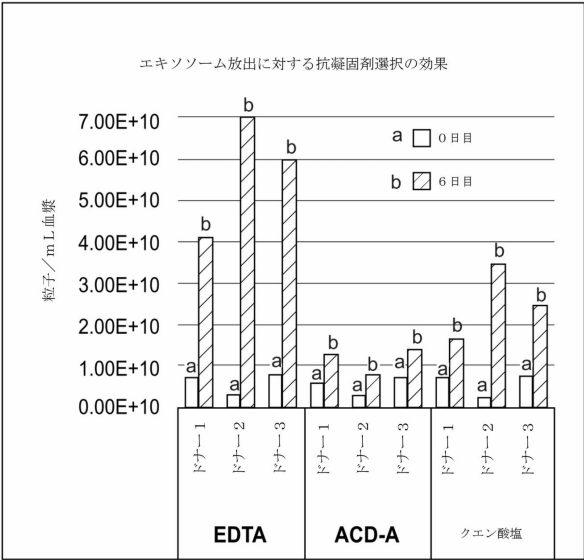
50

【図面】

【図 1】



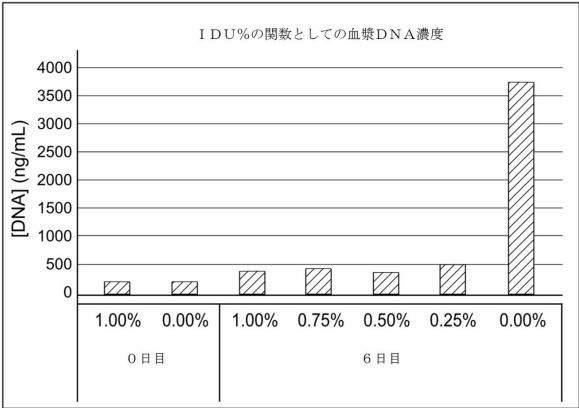
【図 2】



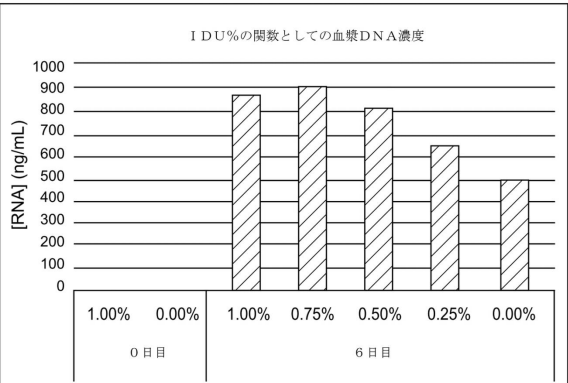
10

20

【図 3】



【図 4 A】

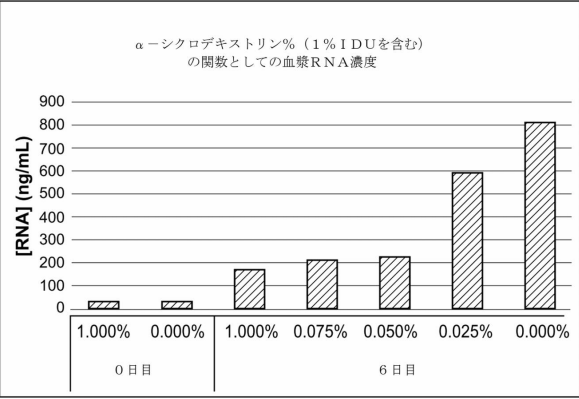


30

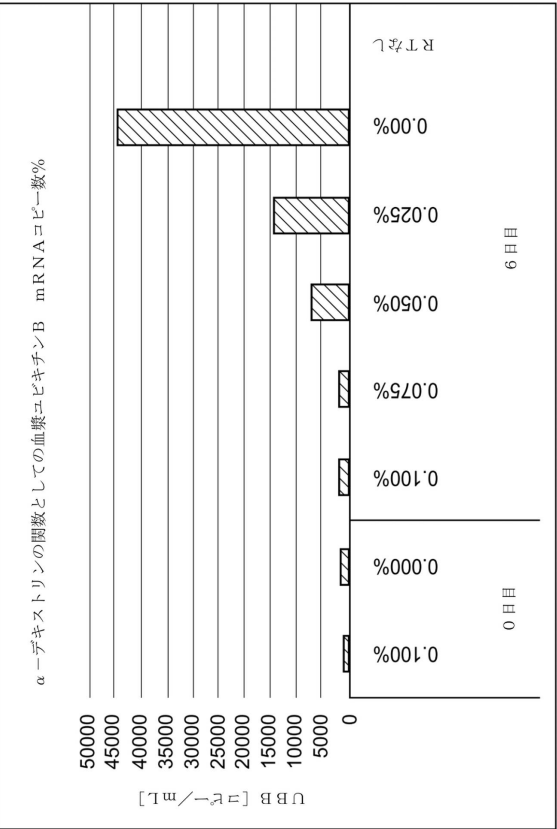
40

50

【 図 4 B 】



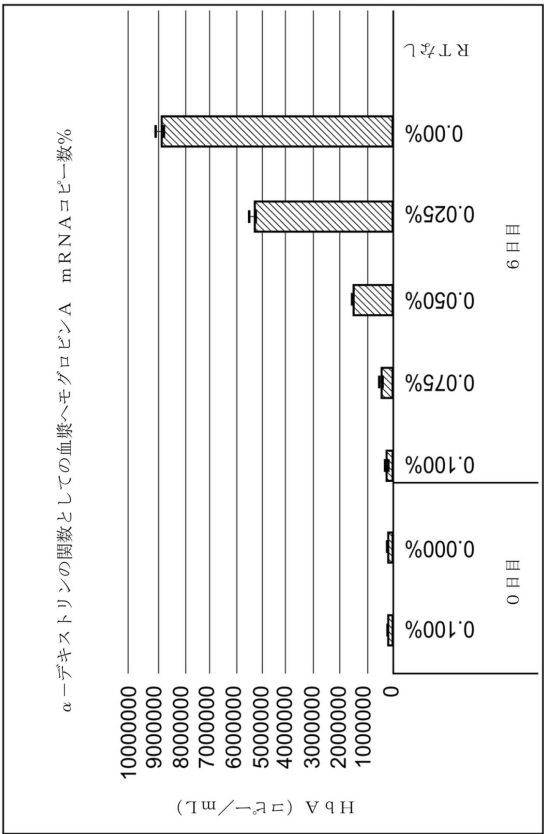
【 図 5 A 】



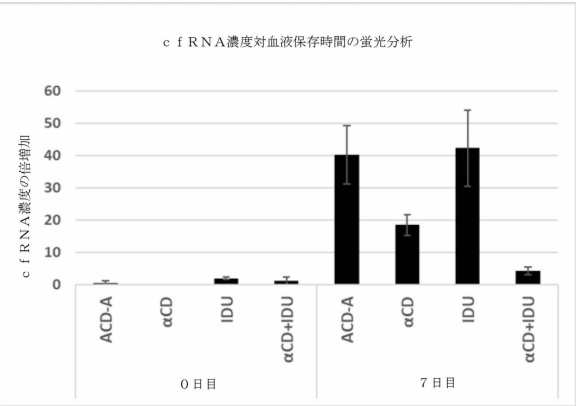
10

20

【 図 5 B 】



【 図 6 】

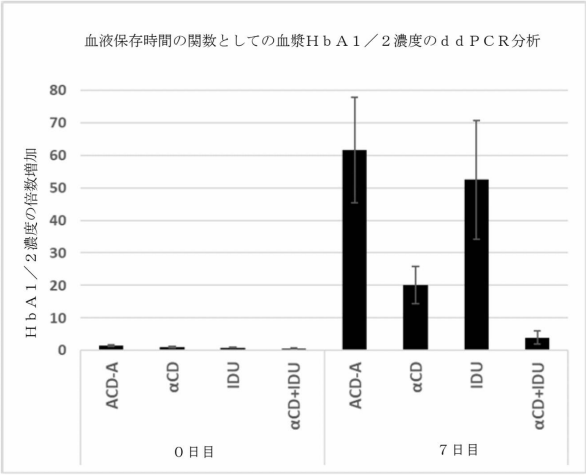


30

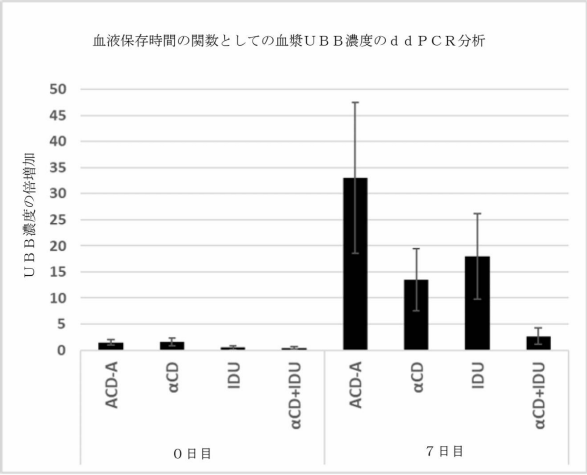
40

50

【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 ジョージ , ニコラス マイケル
アメリカ合衆国 ネブラスカ 68007 , ベニントン , ローズウォーター パークウェイ 15
941

(72)発明者 ハンスリー , ブラッドフォード エー .
アメリカ合衆国 ネブラスカ 68133 , パピリオン , アトラス ドライブ 2010

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特開2014-012656(JP,A)
中国特許出願公開第104070871(CN,A)
中国特許出願公開第105985904(CN,A)
特開2003-344389(JP,A)
中国特許出願公開第104381245(CN,A)
中国特許出願公開第104634628(CN,A)
米国特許出願公開第2011/0027771(US,A1)
特開2017-058326(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0183661(US,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
C12N 5/078
C12N 15/10