(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6449781号
(P6449781)

(45)発行日　平成31年1月9日(2019.1.9)　(24)登録日　平成30年12月14日(2018.12.14)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N	15/10	(2006.01)	C12N	15/10	120Z
C12Q	1/6806	(2018.01)	C12Q	1/6806	ZNAZ
C12M	1/26	(2006.01)	C12M	1/26	

請求項の数 34　(全 105 頁)

(21)出願番号　特願2015-551774 (P2015-551774)
(86)(22)出願日　平成26年1月3日(2014.1.3)
(65)公表番号　特表2016-502862 (P2016-502862A)
(43)公表日　平成28年2月1日(2016.2.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/010173
(87)国際公開番号　WO2014/107571
(87)国際公開日　平成26年7月10日(2014.7.10)
審査請求日　平成28年11月2日(2016.11.2)
(31)優先権主張番号　61/748,575
(32)優先日　平成25年1月3日(2013.1.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　513282272
エクソサム　ダイアグノスティクス，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，マサチューセッツ　０２４５１，ウォルサム，セカンド　アベニュ　２６６，スイート　２００
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微細小胞の単離方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
生体試料から核酸を抽出するための方法であって、
（ａ）捕捉面と生体試料を前記捕捉面上又は前記捕捉面中での微細小胞画分の保持に充分な条件下で接触させること、ここで、前記捕捉面は、正に帯電し、第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている３枚の膜を含み、
（ｂ）前記微細小胞が前記捕捉面上又は前記捕捉面中にある間に前記微細小胞画分を溶解すること、及び
（ｃ）前記微細小胞画分から前記核酸を抽出すること
を含む、方法。
【請求項２】
前記３枚の膜の各々が再生セルロースを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記３枚の膜の各々が少なくとも３μｍ、又は３～５μｍの範囲の孔径を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記３枚の膜が互いに同一である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記生体試料が血漿、血清、尿、脳脊髄液又は細胞培養上清である、請求項１に記載の方法。

【請求項６】
ステップ（ａ）が前記生体試料をローディングバッファーと接触させることをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記ローディングバッファーが中性のｐＨを有する、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記核酸がＲＮＡを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記ＲＮＡがｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、又はそれらの組合せを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記生物試料が４ｍＬ未満、又は０．１～４ｍＬ、又は１ｍＬの体積を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
生体試料から核酸を抽出するための方法であって、
（ａ）捕捉面と生体試料を前記捕捉面上又は前記捕捉面中での微細小胞画分の保持に充分な条件下で接触させること、ここで、前記捕捉面は、正に帯電し、第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている３枚の膜を含み、
（ｂ）前記捕捉面から前記微細小胞を溶出して微細小胞画分を獲得すること、及び
（ｃ）前記微細小胞画分から前記核酸を抽出すること
を含む、方法。
【請求項１２】
ステップ（ｃ）由来の前記溶出微細小胞画分を回転濃縮器により濃縮して濃縮微細小胞画分を獲得し、且つ、前記核酸を前記濃縮微細小胞画分から抽出する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記３枚の膜の各々が再生セルロースを含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記３枚の膜の各々が少なくとも３μｍ、又は３～５μｍの孔径を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記３枚の膜が互いに同一である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
前記生体試料が血漿、血清、尿、脳脊髄液又は細胞培養上清である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１７】
前記生物試料が４ｍＬ未満、又は０．１～４ｍＬ、又は１ｍＬの体積を有する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１８】
請求項１に記載の方法を使用するためのキットであって、
１以上の容器に、
（a）微細小胞を単離するための装置であって、
内部チューブ及び外部フリットを含むカラム；
カラム内に配置された捕捉面、ここで、前記捕捉面は、正に帯電し、第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている３枚の膜を含み；
外部フリットと内部チューブとの間に捕捉面を固定するホルダー；及び
収集チューブ
を含む、装置；並びに
（b）１以上の試薬
を含む、キット。

【請求項１９】
前記１以上の試薬が、溶解緩衝液及び／又はローディングバッファーを含む、請求項１８に記載のキット。
【請求項２０】
前記３枚の膜の各々が３～５μｍの範囲の孔径を有する、請求項１８に記載のキット。
【請求項２１】
前記３枚の膜が互いに同一である、請求項１８に記載のキット。
【請求項２２】
前記膜が再生セルロースを含む、請求項１８に記載のキット。
【請求項２３】
前記収集チューブがカラムを受けるように構成されている、請求項１８に記載のキット。
【請求項２４】
微細小胞を単離するための装置であって、
内部チューブ及び外部フリットを含むカラム；
カラム内に配置された捕捉面、ここで、前記捕捉面は、正に帯電し、第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている３枚の膜を含み；
外部フリットと内部チューブとの間に捕捉面を固定するホルダー；及び
収集チューブ
を含む、装置。
【請求項２５】
前記外部フリットが大きな網状構造を含む、請求項２４に記載の装置。
【請求項２６】
前記外部フリットがカラムの第１端に構成されている、請求項２４に記載の装置。
【請求項２７】
前記内部チューブがわずかに円錐状である、請求項２４に記載の装置。
【請求項２８】
前記ホルダーが、内部チューブの第１端と外部フリットとの間に構成されている、請求項２４に記載の装置。
【請求項２９】
前記カラムが、収集チューブ内に適合するように構成されている、請求項２４に記載の装置。
【請求項３０】
前記収集チューブが、カラムを受けるように構成されている、請求項２４に記載の装置。
【請求項３１】
前記３枚の膜の各々が、３～５μｍの範囲の孔サイズを有する、請求項２４に記載の装置。
【請求項３２】
前記３枚の膜が互いに同一である、請求項２４に記載の装置。
【請求項３３】
前記膜が再生セルロースを含む、請求項２４に記載の装置。
【請求項３４】
前記内部チューブが生体試料を受けるように構成され、前記生体試料が０．１～４ｍＬの体積を有する、請求項２４に記載の装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、生体試料からの微細小胞の単離及びそれらの微細小胞からの核酸の抽出のた

めの新規の方法及びキットを提供する。
【背景技術】
【０００２】
関連出願
本願は２０１３年１月３日に提出された米国特許仮出願番号第６１／７４８５７５号の優先権と利益を主張するものであり、その内容の全体を参照によりここに援用するものである。
【０００３】
細胞が放出し、直径が０．８μｍ未満である膜小胞は集合的に微細小胞と呼ばれる。様々な細胞源に由来する微細小胞がタンパク質成分及び脂質成分に関して鋭意研究されている。近年、微細小胞がゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、及びメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）をはじめとするＤＮＡとＲＮＡの両方を含むことも分かった。
【０００４】
細胞が放出する微細小胞中に含まれる遺伝情報及びプロテオミクス情報のため、現在の研究は微細小胞を活用してこれらの細胞の状態、例えば、疾患状態又は疾病素質をさらに理解することに向けられている。よって、健康状態及び疾患の正確な診断のために生体試料から微細小胞を単離する方法及び高品質の核酸を抽出する方法の必要性が存在する。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、微細小胞を面に捕捉することでそれらの微細小胞を単離し、後にそれらの微細小胞を溶解してそれらの中に含まれる核酸を解離するための方法及びキットを提供する。幾つかの実施形態ではそれらの方法及びキットは微細小胞画分からＲＮＡを単離及び抽出する。これらの方法及びキットは本明細書においてＥＸＯ５０又はＥＸＯ５０ベース法及び／又はキットと呼ばれる。幾つかの実施形態ではそれらの方法及びキットは微細小胞画分からＤＮＡを単離及び抽出する。その後、さらなる分析のためにそのＲＮＡを処理することができる。これらの方法及びキットは本明細書においてＥＸ０５２又はＥＸ０５２ベース法及び／又はキットと呼ばれ、本明細書においてＥＸ０５２．２と呼ばれるＥＸ０５２法及び／又はキットの派生物を含み得る。その後、さらなる分析のためにそのＤＮＡを処理することができる。
【０００６】
本発明は、微細小胞を面に捕捉することでそれらの微細小胞を単離し、後にその捕捉面からそれらの微細小胞を溶出するための方法及びキットも提供する。これらの方法及びキットは本明細書においてＥＸ０５１と呼ばれる。その後、さらなる分析のためにそれらの微細小胞を処理することができる。
【０００７】
生体試料の微細小胞画分を単離し、生体試料のその微細小胞画分から核酸を抽出するために使用される従来の方法は、超遠心分離、例えば、１０，０００×ｇ未満で１～３時間の回転とその後の上清の除去、ペレットの洗浄、ペレットの溶解、及びカラム上での核酸、例えば、ＲＮＡの精製の使用に依存する。これらの従来の方法は、遅い、長々しい、バッチごとに変わりやすい、規模拡大に適していないといった幾つかの欠点を示した。単離及び抽出のための本方法及びキットはこれらの欠点を克服し、且つ、速く、強固であり、大容量に容易に規模拡大可能な単離及び抽出のための回転ベースのカラムを提供する。
【０００８】
本方法及びキットは次の普遍的手法を用いて生体試料からＲＮＡを単離及び抽出し、その手法は本明細書において「ＥＸＯ５０」と呼ばれる。まず、微細小胞画分を膜フィルターに結合し、そしてそのフィルターを洗浄する。その後、試薬を使用して膜上溶解とＲＮＡの解離を実施する。その後、ＰＬＧチューブを使用してクロロホルム抽出を実施し、続いてエタノール調整を実施する。その後、ＲＮＡをシリカカラムに結合し、洗浄し、その後に溶出する。その後、さらなる分析のためにそのＲＮＡを処理することができる。

【０００９】
ＥＸＯ５０法及びキットにおいて使用される膜は大孔径の孔を有し、全体として正に帯電している。幾つかの実施形態では１枚より多い膜がＥＸＯ５０法及びキットにおいて使用され、例えば、２枚以上の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚より多い膜が使用される。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる種類の膜である。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ種類の膜である。幾つかの実施形態では複数の層の膜が少なくとも２つの異なる種類の膜の組合せ物である。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が帯電している。幾つかの実施形態では少なくとも１層が帯電していない。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる電荷を有する。

【００１０】
幾つかの実施形態では前記の膜又は少なくとも１層の膜が正に帯電している膜である。幾つかの実施形態では前記捕捉面又は少なくとも１層は再生セルロース強塩基陰イオン交換（「ＲＣ／ＳＢＡＥ」）膜であり、その膜は正に帯電している膜であり、且つ、第四級アミンを有する陰イオン交換体である。例えば、そのＲＣ／ＳＢＡＥ膜は第四級アンモニウム$R-CH_2-N^+(CH_3)_3$で官能化されている。幾つかの実施形態ではその膜は少なくとも３ｕｍの孔径を有する。

【００１１】
ＥＸＯ５０法及びキットにおいて使用される膜の数は一度に分析することができる試料の総体積と相関する。本方法及びキットにおいて使用される層の数及び各層の能力、例えば、結合能、通過画分率、又は他の測定項目は使用することができる試料サイズの総体積に影響する。一つの層又は各層が高い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて多くの層を使用することができ、一つの層又は各層が低い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて少ない層を使用することができる。さらに、試料の粘度と組成も使用することができる試料サイズの総体積に影響する。例えば、試料が血漿である幾つかの実施形態ではＥＸＯ５０法及びキットにおいて使用される膜の各層につき約１ｍｌの試料が処理される。

【００１２】
幾つかの実施形態では膜上溶解に使用される薬剤はＱＩＡｚｏｌである。幾つかの実施形態ではそのＱＩＡｚｏｌは約７００ｕｌの体積で使用される。

【００１３】
本方法及びキットは次の普遍的手法を用いて生体試料からＤＮＡを単離及び抽出し、その手法は本明細書において「ＥＸ０５２」と呼ばれる。まず、微細小胞画分を膜フィルターに結合し、そしてそのフィルターを洗浄する。その後、試薬を使用して膜上溶解と核酸、例えば、ＲＮＡの解離を実施する。その後、エタノール沈殿を実施し、続いて溶解とプロテアーゼ消化を実施する。その後、ＤＮＡをシリカカラムに結合し、洗浄し、その後に溶出する。その後、さらなる分析のためにそのＤＮＡを処理することができる。

【００１４】
ＥＸ０５２法及びキットにおいて使用される膜は大孔径の孔を有し、全体として正に帯電している。幾つかの実施形態では１枚より多い膜がＥＸ０５２法及びキットにおいて使用され、例えば、２枚以上の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚より多い膜が使用される。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる種類の膜である。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ種類の膜である。幾つかの実施形態では複数の層の膜が少なくとも２つの異なる種類の膜の組合せである。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が帯電している。幾つかの実施形態では少なくとも１層が帯電していない。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層

の膜が異なる電荷を有する。

【００１５】

幾つかの実施形態では前記の膜又は少なくとも１層の膜が正に帯電している膜である。幾つかの実施形態では前記捕捉面又は少なくとも１層は再生セルロース強塩基陰イオン交換（「ＲＣ／ＳＢＡＥ」）膜であり、その膜は正に帯電している膜であり、且つ、第四級アミンを有する陰イオン交換体である。例えば、そのＲＣ／ＳＢＡＥ膜は第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている。幾つかの実施形態ではその膜は少なくとも３ｕｍの孔径を有する。

【００１６】

ＥＸ０５２法及びキットにおいて使用される膜の数は一度に分析することができる試料の総体積と相関する。本方法及びキットにおいて使用される層の数及び各層の能力、例えば、結合能、通過画分率、又は他の測定項目は使用することができる試料サイズの総体積に影響する。一つの層又は各層が高い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて多くの層を使用することができ、一つの層又は各層が低い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて少ない層を使用することができる。さらに、試料の粘度と組成も使用することができる試料サイズの総体積に影響する。例えば、試料が血漿である幾つかの実施形態ではＥＸ０５２法及びキットにおいて使用される膜の各層につき約１ｍｌの試料が処理される。

【００１７】

幾つかの実施形態では膜上溶解に使用される薬剤はＱＩＡｚｏｌである。幾つかの実施形態ではそのＱＩＡｚｏｌは約７００ｕｌの体積で使用される。

【００１８】

ＥＸ０５１法及びキットにおいて使用される膜は大孔径の孔を有し、全体として正に帯電している。幾つかの実施形態では１枚より多い膜がＥＸ０５１法及びキットにおいて使用され、例えば、２枚以上の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚より多い膜が使用される。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる種類の膜である。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ種類の膜である。幾つかの実施形態では複数の層の膜が少なくとも２つの異なる種類の膜の組合せである。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が帯電している。幾つかの実施形態では少なくとも１層が帯電していない。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる電荷を有する。

【００１９】

幾つかの実施形態では前記の膜又は少なくとも１層の膜が正に帯電している膜である。幾つかの実施形態では前記捕捉面又は少なくとも１層は再生セルロース強塩基陰イオン交換（「ＲＣ／ＳＢＡＥ」）膜であり、その膜は正に帯電している膜であり、且つ、第四級アミンを有する陰イオン交換体である。例えば、そのＲＣ／ＳＢＡＥ膜は第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている。幾つかの実施形態ではその膜は少なくとも３ｕｍの孔径を有する。

【００２０】

ＥＸ０５１法及びキットにおいて使用される膜の数は一度に分析することができる試料の総体積と相関する。本方法及びキットにおいて使用される層の数及び各層の能力、例えば、結合能、通過画分率、又は他の測定項目は使用することができる試料サイズの総体積に影響する。一つの層又は各層が高い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて多くの層を使用することができ、一つの層又は各層が低い結合能を有するほど本方法及び／又はキットにおいて少ない層を使用することができる。さらに、試料の粘度と組成も使用することができる試料サイズの総体積に影響する。例えば、試料が血漿である幾つかの実施形態ではＥＸ０５１法及びキットにおいて使用される膜の各層につき約１ｍｌの試料が処理される。

【００２１】
幾つかの実施形態では膜上溶解に使用される薬剤はＱＩＡｚｏｌである。幾つかの実施形態ではそのＱＩＡｚｏｌは約７００ｕｌの体積で使用される。
【００２２】
これらの方法及び／又はキットのいずれかにおける微細小胞画分の精製は、イオン交換技術を用いて実施される。幾つかの実施形態ではそのイオン交換技術は本明細書において提供される実施例に示されている技術から選択されるものである。
【００２３】
１つの態様では、生体試料から核酸を抽出するための方法は（ａ）生体試料を提供すること、（ｂ）捕捉面と前記生体試料を前記捕捉面上又は前記捕捉面中での微細小胞画分の保持に充分な条件下で接触させること、（ｃ）前記微細小胞が前記捕捉面上又は前記捕捉面中にある間に前記微細小胞画分を溶解すること、及び（ｄ）前記微細小胞画分から前記核酸を抽出することを含む。あるいは、生体試料から核酸を抽出するための方法はステップ（ｂ）の後に前記捕捉面から前記微細小胞画分を溶出すること、前記溶出微細小胞画分を収集すること、及び前記溶出微細小胞画分から前記核酸を抽出することをさらに含む。任意により回転濃縮器で前記溶出微細小胞画分を濃縮して濃縮微細小胞画分を獲得することができ、その後に前記濃縮微細小胞画分から前記核酸を抽出する。
【００２４】
１つの実施形態では前記捕捉面は正に帯電している。別の実施形態では前記捕捉面は負に帯電している。さらに別の実施形態では前記捕捉面は中性である。幾つかの実施形態では前記捕捉面は１層より多い層を含む。幾つかの実施形態では１枚より多い膜がＥＸ０５１法及びキットにおいて使用され、例えば、２枚以上の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚の膜が使用される。幾つかの実施形態では３枚より多い膜が使用される。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる種類の膜である。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ種類の膜である。幾つかの実施形態では複数の層の膜が少なくとも２つの異なる種類の膜の組合せである。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ材料から構成される。幾つかの実施形態では各層の膜が帯電している。幾つかの実施形態では少なくとも１層が帯電していない。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が同じ電荷を有する。幾つかの実施形態では各層の膜が異なる電荷を有する。
【００２５】
１つの実施形態では前記捕捉面はビーズである。例えば、そのビーズは磁気を有する。あるいは、そのビーズは磁気を有しない。さらに別の実施形態ではそのビーズは親和性リガンドで官能化される。
【００２６】
前記捕捉面が膜であることが好ましい。１つの態様ではその膜は再生セルロースを含む。例えば、その膜は３～５ｕｍの範囲の孔径を有する。別の態様ではその膜はポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）を含む。例えば、その膜は２０ｎｍ～０．８ｕｍの範囲の孔径を有する。別の態様ではその膜は正に帯電している。
【００２７】
幾つかの態様では前記膜は官能化されている。例えば、前記膜は第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている。
【００２８】
１つの実施形態では前記捕捉面は互いに直接的に隣接する３枚の膜を備える。
【００２９】
前記生体試料が血漿、血清、尿、脳脊髄液又は細胞培養上清であることが好ましい。
【００３０】
幾つかの態様では本明細書に記載される方法及び／又はキットは前記生体試料をローディングバッファーと接触させることをさらに含む。そのローディングバッファーはｐＨ４～８の範囲にある。１つの態様ではそのローディングバッファーは中性のｐＨを有する。

【００３１】
本明細書に記載される方法及び／又はキットは微細小胞からの核酸の抽出をもたらす。抽出される核酸がＲＮＡであることが好ましい。抽出されたＲＮＡはメッセンジャーＲＮＡ、リボソーマルＲＮＡ、トランスファーＲＮＡ、小ＲＮＡ、例えば、マイクロＲＮＡ、非コードＲＮＡ、及び他のあらゆる短鎖ＲＮＡ、及び／又はＲＮＡ断片、又はそれらのあらゆる組合せを含み得る。
【００３２】
幾つかの実施形態では本方法及び／又はキットは生体試料から種々の核酸を除去するために使用される。例えば、ＥＸＯ５０及び／又はキットは、非限定的な例として通過画分から相反性ＲＮＡを単離するための生体試料からの小胞結合ＲＮＡの除去を含む、生体試料からの種々のＲＮＡの除去のために使用される。
【００３３】
次に本発明の様々な態様及び実施形態を詳細に説明する。本発明の範囲から逸脱することなくそれらの詳細の改変を行うことができることが理解される。さらに、別途文脈から必要とされない限り、単数形の用語は複数形のものを含み、複数形の用語は単数形のものを含むものとする。
【００３４】
確認される全ての特許、特許出願、及び特許出願公開は、例えば、そのような刊行物中に記載される方法であって、本発明との関係で使用される可能性がある方法の説明及び開示を目的として、参照により本明細書おいて明示的に援用される。これらの刊行物はそれらの刊行物の開示のためにだけ本願の出願日より前に提供される。この点に関して何事も、本発明者が先行発明によって、又は他のいかなる理由によってもそのような開示に先行するという資格がないことを認めたと解釈されるべきではない。これらの文書の日付に関する全ての声明又は内容に関する全ての説明は本出願者に利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付又は内容の正確性に関するどのような承認も構成するものではない。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１Ａ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図１Ａは、超遠心分離と０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）吸引濾過（フィルター及び濾過液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットを示す。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１Ｂ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図１Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図２Ａ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかにＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ突然変異を２ｍＬの血漿と１２ｍＬの血漿の中に検出することができるかを示す一連のグラフである。超遠心分離と０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）により抽出された２ｍＬと１２ｍＬの血漿から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅのコピー数を評価した。
【図２Ｂ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかにＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ突然変異を２ｍＬの血漿と１２ｍＬの血漿の中に検出することができるかを示す一連のグラフである。超遠心分離と０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）により抽出された２ｍＬと１２ｍＬの血漿から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅのコピー数を評価した。

【図２Ｃ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかにＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ突然変異を２ｍＬの血漿と１２ｍＬの血漿の中に検出することができるかを示す一連のグラフである。超遠心分離と０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）により抽出された２ｍＬと１２ｍＬの血漿から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅのコピー数を評価した。

【図３Ａ】スピンカラムフォーマットの３～５ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロースフィルター（ザルトリウス）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図３Ａは、超遠心分離と３～５ｕｍ正帯電Ｑ再生セルローススピンカラム濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットを示す。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。図３Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図３Ｂ】スピンカラムフォーマットの３～５ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロースフィルター（ザルトリウス）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図３Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図４Ａ】自家製スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ負帯電Ｓ　ＰＥＳフィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図４Ａは、超遠心分離と０．８ｕｍ負帯電Ｓ　ＰＥＳスピンカラム濾過により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図４Ｂ】自家製スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ負帯電Ｓ　ＰＥＳフィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図４Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図５Ａ】自家製スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図５Ａは、超遠心分離と０．８ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳスピンカラム濾過により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒でのピークが１８Ｓである。

【図５Ｂ】自家製スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図５Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図６】０．８ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳシリンジフィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示すグラフである。０．８ｕｍ負帯電Ｓ　ＰＥＳシリンジフィルター（Ｐａｌｌ）を使用して血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。超遠心分離、０．８ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）及び０．８ｕｍ負帯電Ｓ　ＰＥＳシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）により抽出された４ｍＬの血漿から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲ

ＮＡのレベルを分析した。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図７Ａ】帯電ナイロンシリンジフィルターを使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図７Ａは、超遠心分離と負帯電ナイロンシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図７Ｂ】帯電ナイロンシリンジフィルターを使用していかに血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図７Ｂは同じ試料に対して定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図８Ａ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかに尿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図８Ａは、超遠心分離と０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過（フィルター及び濾過液）により１０ｍＬの正常対照の尿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図８Ｂ】吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルター（ミリポア）を使用していかに尿微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図８Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図９】スピンカラムフォーマットの負帯電Ｓ再生セルロースフィルター（サーモ・サイエンティフィック）を使用して抽出された試料血漿試料においていかにｑＲＴ－ＰＣＲが阻害されるかを示すグラフである。超遠心分離、３～５ｕｍ正帯電Ｑ再生セルローススピンカラム濾過及び３～５ｕｍ負帯電Ｓ再生セルローススピンカラム濾過を用いて抽出された４ｍＬの血漿試料に対して定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてＧＡＰＤＨのレベルを分析した。ｃＤＮＡ合成の前に全てのＲＮＡ試料を１：１０及び１：１００に希釈した。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１０Ａ】酸性ｐＨ中で微細小胞がいかに安定であるかを示す一連のグラフである。図１０Ａは、遠心分離により１．９ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約４０００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１０Ｂ】酸性ｐＨ中で微細小胞がいかに安定であるかを示す一連のグラフである。図１０Ｂは同じ試料に対して定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１１Ａ】塩基性ｐＨ中で微細小胞がいかに安定ではないかを示す一連のグラフである。図１１Ａは、遠心分離により１．９ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。そのピークは約１５０ｎｔで示されるはずであった。しかしながら、技術的な間違いのためにそのピークは約０ｎｔで示されている。加えて、技術的な間違いのために約１５００ｎｔと約３７００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。その代わりに１８Ｓと２８Ｓのピークはそれぞれ約１９００ｎｔと約４７００ｎｔで示されるはずであった。

【図１１Ｂ】塩基性ｐＨ中で微細小胞がいかに安定ではないかを示す一連のグラフである。図１１Ｂは同じ試料に対して定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図１２Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性がいかに緩衝液のｐＨ及び／又は緩衝液の濃度及び／又は緩衝液の種類によって影響を受けるかを示す（同じ濃度であるが、同じ官能基濃度ではない緩衝液を比較する）一連のグラフである。図１２Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過（フィルター及び濾過液）により４．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのジエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ９（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのジエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ９（平衡化及び洗浄緩衝液）。図１２Ａでは凡例が平衡化及び洗浄緩衝液だけによって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図１２Ｂ】図１２Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図１３Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性がいかに緩衝液のｐＨ及び／又は緩衝液の濃度及び／又は緩衝液の種類によって影響を受けるかを示す（同じ濃度であるが、同じ官能基濃度ではない緩衝液を比較する）一連のグラフである。図１３Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過により３．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのトリエタノールアミン（ＴＥＡ）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．０（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８．５（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。図１３Ａでは凡例が平衡化及び洗浄緩衝液だけによって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。

【図１３Ｂ】図１３Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表

示されている。
【図１４Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性がいかに緩衝液のｐＨ及び緩衝液の濃度によって影響を受けるかを示す（同じ官能基濃度であるが、同じ全体の濃度ではない緩衝液を比較する）一連のグラフである。図１４Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過により３．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１１７ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ１．９（２×負荷緩衝液）と５８．５ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１１７ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．１（２×負荷緩衝液）と５８．５ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・２００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（２×負荷緩衝液）と１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。図１４Ａでは凡例が平衡化及び洗浄緩衝液だけによって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１５Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性がいかに緩衝液の濃度によって影響を受けるかを示す一連のグラフである。図１５Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過により３．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・５００ｍＭのビストリスプロパン、９００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．４（２×負荷緩衝液）と２５０ｍＭのビストリスプロパン、４５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。図１５Ａでは凡例が平衡化及び洗浄緩衝液だけによって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１５Ｂ】図１５Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１６Ａ】いかに微細小胞が安定であり、総ＲＮＡ収量が低濃度から高濃度の塩によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１６Ａは、遠心分離により１．９ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次のＮａＣｌ濃度：０．１５ＭのＮａＣｌ、０．３ＭのＮａＣｌ、０．６ＭのＮａＣｌ、１．２ＭのＮａＣｌ及び２．４ＭのＮａＣｌを有する５０ｍＭのビストリスプロパン、ｐＨ６．５の緩衝液に微細小胞ペレットを再懸濁し、溶解前に２０分間保温した。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡで

ある。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１６Ｂ】いかに微細小胞が安定であり、総ＲＮＡ収量が低濃度から高濃度の塩によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１６Ｂは同じ試料に対して定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１７Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性がいかに負荷緩衝液の塩濃度によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１７Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過（フィルター及び濾過液）により３．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１．０５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．６ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、２．２５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１．２ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、４．６５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、２．４ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）。溶出前に濾過試料を洗浄しなかった。図１７Ａでは凡例が平衡化緩衝液だけによって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。図１７Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１７Ｂ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性がいかに負荷緩衝液の塩濃度によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１７Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１８Ａ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性がいかに負荷緩衝液又は洗浄緩衝液の塩濃度によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１８Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過により３．８ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。次の緩衝液セットを使用して濾過試料を単離した：・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、１．０５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．６ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、２．２５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１．２ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；・１００ｍＭのビストリスプロパン、４．６５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、２．４ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。図１８Ａでは凡例が平衡化及び洗浄緩衝液だけのＮａＣｌ濃度によって試料を特定している。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４２秒と約５０秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図１８Ｂ】帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性がいかに負荷緩衝液又は洗浄緩衝液の塩濃度によって影響を受けないかを示す一連のグラフである。図１８Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図１９】ＲＮＡ溶解緩衝液がいかに帯電フィルターを使用して単離された微細小胞から

のＲＮＡ収量に影響するかを示すグラフである。超遠心分離と正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過により抽出された４ｍＬの血漿から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いてｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを分析した。Ｑｉａｚｏｌ又はＰｒｏｍｅｇａ溶解緩衝液を使用して濾過試料を単離した。相対量の値が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２０Ａ】帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌがいかにＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図２０Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ　ＰＥＳ吸引濾過により２ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。２倍の体積のＱｉａｚｏｌ溶解緩衝液を使用してフィルター試料を単離した。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。２つ目のＱｉａｚｏｌ溶出試料に関して技術的困難が存在した。内部標準は代わりに約１８秒に存在し、小ＲＮＡのピークは２５秒に存在する。

【図２０Ｂ】帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌがいかにＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図２０Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２１Ａ】帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌがいかにＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図２１Ａは、超遠心分離と正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。２倍の体積のＱｉａｚｏｌ溶解緩衝液を使用して濾過試料を単離した。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図２１Ｂ】帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌがいかにＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図２１Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２２Ａ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２２Ａは、超遠心分離と２０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図２２Ｂ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２２Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルを示している。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２３Ａ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２３Ａは、超遠心分離と２０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図２３Ｂ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２３Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルを示している。サイクル閾値（Ｃｔ）

が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図２４Ａ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター（Ｔｉｓｃｈ）を使用していかに微細小胞性ｍｉＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２４Ａは、超遠心分離と２０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過により２ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図２４Ｂ】２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター（Ｔｉｓｃｈ）を使用していかに微細小胞性ｍｉＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２４Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析された成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図２５Ａ】微細小胞の捕捉がいかにＲＮＡ依存的であるかを示す一連のグラフである。幾つかのＲＮＡは他のものと比べてより効率的にフィルターに捕捉される（ＧＡＰＤＨ対ｍｉＲ－４５１）。このことは、ＲＮＡがタンパク質及び／又は微細小胞によって保護されているかどうかと微細小胞のサイズに依存し得る。図２５Ａは、中性ＰＥＳシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）により２ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図２５Ｂ】微細小胞の捕捉がいかにＲＮＡ依存的であるかを示す一連のグラフである。幾つかのＲＮＡは他のものと比べてより効率的にフィルターに捕捉される（ＧＡＰＤＨ対ｍｉＲ－４５１）。このことは、ＲＮＡがタンパク質及び／又は微細小胞によって保護されているかどうかと微細小胞のサイズに依存し得る。図２５Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図２６Ａ】３０ｎｍと５０ｎｍのＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２６Ａは、超遠心分離と３０ｎｍ（５ｕｍ又は０．０５ｕｍのグラスファイバー（ＧＦ）プレフィルター）と５０ｎｍ（５ｕｍのＧＦプレフィルター）の中性ＰＥＳシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）により２ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図２６Ｂ】３０ｎｍと５０ｎｍのＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２６Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図２７Ａ】スピンカラムフォーマットの０．２ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２７Ａは、超遠心分離と中性０．２ｕｍ　ＰＥＳ遠心濾過（フィルター及び濾過液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約４２００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図２７Ｂ】スピンカラムフォーマットの０．２ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフであ

る。図２７Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２８Ａ】０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２８Ａは、超遠心分離と中性０．８ｕｍ　ＰＥＳシリンジ濾過（フィルター及び濾過液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図２８Ｂ】０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２８Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。

【図２９Ａ】スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２９Ａは、超遠心分離と中性０．８ｕｍ　ＰＥＳ遠心濾過（フィルター及び濾過液）により４ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。全試料体積の半分だけから０．８ｕｍ濾過液試料を単離した。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約４２００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図２９Ｂ】スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用していかに微細小胞性ＲＮＡを単離することができるかを示す一連のグラフである。図２９Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。「０．８ｕｍフィルター」試料及び「超遠心分離」試料のＣｔ値が調節されて部分的な単離だけを説明している。

【図３０Ａ】中性ＰＥＳフィルター上で微細小胞を単離するときに溶解緩衝液の種類がいかに微細小胞性ＲＮＡの収量に影響するかを示すグラフである。図３０は、中性ＰＥＳシリンジ濾過により６ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。Ｑｉａｚｏｌ（Ｑｉａｇｅｎ）、ＲＬＴ（Ｑｉａｇｅｎ）、又はｍｉＣＵＲＹ（Ｅｘｉｑｏｎ）を使用して濾過試料を溶解した。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図３０Ｂ】中性ＰＥＳフィルター上で微細小胞を単離するときに溶解緩衝液の種類がいかに微細小胞性ＲＮＡの収量に影響するかを示すグラフである。図３０は、中性ＰＥＳシリンジ濾過により６ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。Ｑｉａｚｏｌ（Ｑｉａｇｅｎ）、ＲＬＴ（Ｑｉａｇｅｎ）、又はｍｉＣＵＲＹ（Ｅｘｉｑｏｎ）を使用して濾過試料を溶解した。相対的蛍光単位（ＦＵ）が時間（秒）に対してプロットされている。２５秒でのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約４１秒と約４７秒でのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。

【図３１Ａ】Ｑｉａｚｏｌを使用する追加の溶出がいかに２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター上での微細小胞性ＲＮＡの単離においてＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図３１Ａは、中性ＰＥＳシリンジ濾過により６ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。２倍の体積のＱｉａｚｏｌを使用して濾過試料を溶解した。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでの

ピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約４２００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図３１Ｂ】Ｑｉａｚｏｌを使用する追加の溶出がいかに２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター上での微細小胞性ＲＮＡの単離においてＲＮＡ収量をあまり改善しないかを示す一連のグラフである。図３１Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルを示している。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図３２Ａ】中性フィルター上で微細小胞を単離するときに洗浄ステップがいかに微細小胞の安定性及び／又は微細小胞性ＲＮＡの収量に影響するかを示す一連のグラフである。図３２Ａは、中性ＰＥＳシリンジ濾過により６ｍＬの正常対照の血漿から抽出された微細小胞性総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。濾過試料を０ｍＬ、２０ｍＬ、又は５０ｍＬの１０ｍＭのリン酸ナトリウム、２ｍＭのリン酸カリウム、２．７ｍＭのＫＣｌ、１３７ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４の緩衝液で洗浄した。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約４２００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図３２Ｂ】中性フィルター上で微細小胞を単離するときに洗浄ステップがいかに微細小胞の安定性及び／又は微細小胞性ＲＮＡの収量に影響するかを示す一連のグラフである。図３２Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図３３Ａ】いかにＲＮＡがシリンジフォーマットの２０ｎｍ　ＰＥＳフィルターに詰まり、容易に溶離できないかを示す一連のグラフである。大きなＲＮＡ（例えば、ＧＡＰＤＨ）ほど小さなＲＮＡ（ｌｅｔ－７ａ）よりも溶離しにくい。図３３Ａは、Ｑｉａｚｏｌ中での再懸濁とその後のＲＮＡ単離により、又は２０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過後のＱｉａｚｏｌ中での溶出とその後のＲＮＡ単離により単離された１０ｎｇの対照総ＲＮＡの品質、濃度、及びサイズ分布を比較するバイオアナライザープロットである。相対的蛍光単位（ＦＵ）がサイズ（ｎｔ）に対してプロットされている。２５ｎｔでのピークが内部標準である。最も高いピークが小ＲＮＡである。約１９００ｎｔと約３９００ｎｔでのピークがそれぞれ１８Ｓと２８Ｓである。
【図３３Ｂ】いかにＲＮＡがシリンジフォーマットの２０ｎｍ　ＰＥＳフィルターに詰まり、容易に溶離できないかを示す一連のグラフである。大きなＲＮＡ（例えば、ＧＡＰＤＨ）ほど小さなＲＮＡ（ｌｅｔ－７ａ）よりも溶離しにくい。図３３Ｂは同じ試料から定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて分析されたｍＲＮＡのレベルと成熟ｍｉＲＮＡのレベルを示す。サイクル閾値（Ｃｔ）が平均値±ＳＤとして表示されている。
【図３４】ビーズを使用する微細小胞単離とＲＮＡ抽出の概略的フローチャートの図式表現である。
【図３５】様々な種類の磁気ビーズを使用する微細小胞の単離を示すグラフである。
【図３６】様々な種類の磁気ビーズを使用する微細小胞の回収を示すグラフである。
【図３７】磁気ビーズを使用する微細小胞単離とＲＮＡ抽出のフローチャートの図式表現である。
【図３８】選択されたｍＲＮＡ標的についてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験されたＴＥＡ処理エポキシビーズとイミダゾール処理エポキシビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。
【図３９】ＴＥＡ処理エポキシビーズとイミダゾール処理エポキシビーズを使用して単離された微細小胞からの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率を示すグラフである。
【図４０】選択されたマイクロＲＮＡ標的についてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験されたＴＥＡ処理エポキシビーズとイミダゾール処理エポキシビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。
【図４１】ＴＥＡ処理エポキシビーズとイミダゾール処理エポキシビーズを使用して単離

された微細小胞からの選択されたマイクロＲＮＡ標的の回収率を示すグラフである。
【図４２】選択されたｍＲＮＡについてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験された非磁気ビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。Ｘ：陽イオン性、Ｒ：陰イオン性。
【図４３】非磁気陽イオン／陰イオン交換樹脂を使用して単離された微細小胞からの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率を示すグラフである。
【図４４】マイクロＲＮＡについてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験された非磁気ビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。Ｘ：陽イオン性、Ｒ：陰イオン性。
【図４５】マイクロＲＮＡ陽イオン／陰イオン交換樹脂に対する回収分析を示すグラフである。
【図４６】選択されたｍＲＮＡについてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験された対照ビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。
【図４７】対照ビーズを使用して単離された微細小胞からの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率を示すグラフである。
【図４８】マイクロＲＮＡについてＲＴ－ｑＰＣＲ（閾値＝０．１）を用いて試験された対照ビーズによる微細小胞単離を示すグラフである。
【図４９】対照ビーズを使用して単離された微細小胞からのマイクロＲＮＡ標的の回収率を示すグラフである。
【図５０】微細小胞単離とＲＮＡ抽出についてのビーズの力価測定を示す図式表現である。
【図５１Ａ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｂ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｃ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｄ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｅ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｆ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５１Ｇ】ＲＮ７ＳＬ（図５１Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５１Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５１Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５１Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５１Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５１Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５１Ｇ）についてＲＴ－ｑＰＣＲを使用する微細小胞の捕捉の評価を示す一連のグラフである。
【図５２】個々のビーズとビーズ混合物との間のＣｔ比較（全ての標的について２：１の

ビーズ／微細小胞（Ｂ／Ｅ）比）を示すグラフである。
【図５３】２：１のＢ／Ｅ比での個々のビーズとビーズ混合物との間の回収率の比較を示すグラフである。
【図５４】磁気ビーズ（ＭＢ）を使用する微細小胞単離とＲＮＡ抽出を示す図式表現である。
【図５５Ａ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｂ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｃ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｄ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｅ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｆ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５５Ｇ】ＲＮ７ＳＬ（図５５Ａ）、ＧＡＰＤＨ（図５５Ｂ）、ＲＮａｓｅＰ（図５５Ｃ）、Ｂ２Ｍ（図５５Ｄ）、ＧＵＳＢ（図５５Ｅ）、ＨＰＲＴ１（図５５Ｆ）、及びＬｅｔ－７ａ（図５５Ｇ）について血漿滴定を使用する固定されたビーズ対微細小胞比（Ｂ／Ｅ）での微細小胞回収の評価を示す一連のグラフである。
【図５６】０．４ｍＬ、１ｍＬから４ｍＬまでの５：１のＢ／Ｅ比での血漿滴定における様々な標的の回収率の比較を示すグラフである。
【図５７】微細小胞単離でのＭＢ結合の経時的試験を示すグラフである。
【図５８】エポキシビーズ微細小胞間結合についての経時的試験（１分、５分、１５分、３０分、及び６０分）を示すグラフである。
【図５９】ビーズ微細小胞間結合の経時的試験（Ｂ／Ｅ＝５：１、０．４ｍＬの血漿）を示すグラフである。
【図６０】ビーズ微細小胞間結合の経時的試験（Ｂ／Ｅ＝５：１、０．４ｍＬの血漿）を示すグラフである。
【図６１】微細小胞エポキシＭＢ間結合についての価値検査試験を示すグラフである。
【図６２】収集画分における選択されたＲＮＡ標的の平均Ｃｔ（エポキシビーズのみ）を示すグラフである。
【図６３】選択されたＲＮＡ標的の回収率（％）（エポキシビーズのみ）を示すグラフである。
【図６４】ＥＸＯ５０カラムを示す一連の概略図である。左のパネルはフィルターホルダーの外側を示している。中央のパネルは断面を示しており、その断面はフィルターホルダー内の内部チューブの配置を示している。右上のパネルは、フィルターホルダーの底部で

内部チューブ（膜の上）と外部フリット（カラムの底）との間の位置に保持される膜フィルターを示す。右下のパネルは液体を通過させる外部フリットの構成を示している。
【図６５】ＥＸＯ５０カラムの収集チューブとの組立の完成を示す一連の写真である。左と中央の写真に示されている収集チューブは５０ｍＬのコニカルチューブである。右の写真はＥＸＯ５０フィルターホルダーの上面図を示している。
【図６６】同じ緩衝液条件を使用しているときの様々な官能化膜を示すグラフである。Ｙ軸はＸ軸に記載されている様々な官能化膜を使用して単離された微細小胞から抽出された選択されたｍＲＮＡ標的のＣｔ値を示す。それらの官能化膜はＱ、Ｓ、Ｄ、ＩＤＡ、アルデヒド、及びＤＥ８１である。
【図６７】ＥＸＯ５０カラムの結合能を示すグラフである。ＥＸＯ５０カラムに体積を増加させて（０．５ｍｌ、１．０ｍｌ、２．０ｍｌ、４．０ｍｌ、８．０ｍｌ、及び１６ｍｌ）血漿を添加した。選択されたｍＲＮＡ標的のＣｔ値について抽出されたＲＮＡを評価した。グラフは０．５ｍｌ～４．０ｍｌの体積で発現シグナルの直線的増加が生じたことを示している。
【図６８】生体試料（血漿）の体積の増加と比例したコピー数の検出により示されるＥＸＯ５０カラムの結合能を示すグラフである。
【図６９】３層の膜を有するカラムの負荷容量を示すグラフである。各体積の第１セットの棒の値は血漿試料より検出された発現を表し、各体積の第２セットの棒の値は最初の微細小胞画分の捕捉の後の通過画分から検出された発現を表す。通常の試料負荷ステップに関して通過画分由来のコピー数のパーセンテージは$2^{\Delta CT}$を使用して計算された。
【図７０】膜上で捕捉された微細小胞に由来する特定のｍＲＮＡ標的のＲＮＡ検出により判定される、４ｍｌの血漿由来の微細小胞の全てを捕捉するために必要とされる膜の層の数を示すグラフである。
【図７１】負荷されたＥＸＯ５０カラムの膜上及び膜中に捕捉されたエキソソームを示す走査電子顕微鏡写真である。
【図７２】生体試料用の広範囲の負荷緩衝液の種類がＥＸＯ５０法に適合することを示すグラフである。Ｙ軸は試験されたｍＲＮＡ標的のＣｔ値を表す。繰返し実験が示されている。
【図７３】ＥＸＯ５０法は低ｐＨ緩衝液条件に耐えることを示すグラフである。Ｙ軸は試験されたｍＲＮＡ標的のＣｔ値を表す。繰返し実験が示されている。
【図７４】ＥＸＯ５０法は緩衝液系中の様々な濃度の界面活性剤、例えばＳＤＳ、ツイーン２０、及びトリトンＸ－１００にも耐えることを示すグラフである。Ｙ軸は試験されたｍＲＮＡ標的のＣｔ値を表す。
【図７５】抽出時にシリカカラム結合緩衝液に様々なエタノール濃度を使用することにより、ＥＸＯ５０により単離された総ＲＮＡが大画分と小画分に分離され得ることを示す一連のバイオアナライザープロットを示すグラフである。
【図７６】ＥＸＯ５０によって精製されたＲＮＡがＰＣＲで増幅可能なＲＮＡであること、すなわち、増幅とＰＣＲ処理に適切であることを示すグラフである。試験されたｍＲＮＡ標的の発現は増幅ベースのｑＰＣＲにより検出された。
【図７７】ｍＲＮＡとｍｉＲＮＡを単離するためにエタノール用量設定を最適にすることができることを示すグラフである。
【図７８】ＥＸＯ５０によって（３０００、１５００、及び１５０ｎｇの乾燥重量の）市販の癌エキソソームからｍＲＮＡの１００％が精製されることを示すグラフである。抽出された（直接溶解）総ＲＮＡをＥＸＯ５０単離（ＥＸＯ５０）及び通過画分からの抽出（ＥＸＯ通過画分）と比較する。
【図７９】どんな追加の処理ステップも含まないＥＸＯ５０法で非常にわずかなＤＮＡが単離されることを示すグラフである。ターボＤＮａｓｅ又はＲＮａｓｅＡとの保温をＥＸＯ５０と比較する。陰性対照はＲＴ－（逆転写酵素無し）によって表される。繰返し単離が示されている。
【図８０】ＥＸＯ５０が多数の試料の並行処理に対して頑健であることを示すグラフであ

る。単離の一つ一つのステップのピペッティングのために３分の遅れを加えて８回のＥＸＯ５０の複製実験を実施した。単離複製実験間の個々のアッセイの標準偏差は０．５Ｃｔ未満である。

【図８１Ａ】異なる大陸にある異なる検査室において異なる操作者とＰＣＲ化学試薬によって実施された２つの投入体積（０．２ｍｌ及び２ｍｌ）についてのＥＸＯ５０分析を示す一連のグラフである。（Ａ）ＭＵＣ；（Ｂ）ＭＳＰ；（Ｃ）ＣＭＨ；（Ｄ）ＭＥＭ；（Ｅ）ＩＮＤ；（Ｆ）ＬＡＸ；（Ｇ）ＳＡＮ；（Ｈ）ＡＵＳ。実験を三回一組で実施した。

【図８１Ｂ】異なる大陸にある異なる検査室において異なる操作者とＰＣＲ化学試薬によって実施された２つの投入体積（０．２ｍｌ及び２ｍｌ）についてのＥＸＯ５０分析を示す一連のグラフである。（Ａ）ＭＵＣ；（Ｂ）ＭＳＰ；（Ｃ）ＣＭＨ；（Ｄ）ＭＥＭ；（Ｅ）ＩＮＤ；（Ｆ）ＬＡＸ；（Ｇ）ＳＡＮ；（Ｈ）ＡＵＳ。実験を三回一組で実施した。

【図８１Ｃ】異なる大陸にある異なる検査室において異なる操作者とＰＣＲ化学試薬によって実施された２つの投入体積（０．２ｍｌ及び２ｍｌ）についてのＥＸＯ５０分析を示す一連のグラフである。（Ａ）ＭＵＣ；（Ｂ）ＭＳＰ；（Ｃ）ＣＭＨ；（Ｄ）ＭＥＭ；（Ｅ）ＩＮＤ；（Ｆ）ＬＡＸ；（Ｇ）ＳＡＮ；（Ｈ）ＡＵＳ。実験を三回一組で実施した。

【図８２】同じ血漿とＰＣＲ化学試薬を使用して新規使用者によって異なる検査室において実施されたＥＸＯ５０分析を示す一連のグラフである。

【図８３】ミニスピンカラムフォーマットにＥＸＯ５０を適応させることができることを示すグラフである。標的ｍＲＮＡについてＥＸＯ５０ミニスピンカラムと超遠心分離との間でＣｔ値を比較した。

【図８４】２つの異なる投入試料体積について超遠心分離と比較したミニチュア再生セルロースカラム中の様々な官能化膜を示すグラフである。

【図８５】微細小胞の超遠心分離単離法（左）とＥＸＯ５０単離法（右）を示す２枚の走査電子顕微鏡写真である。

【図８６】ＥＸＯ５０と超遠心分離により血漿から抽出されたＲＮＡのプロファイルが類似のＲＮＡサイズ分布を有することを示す２つのバイオアナライザープロットである。（Ａ）第１癌患者；（Ｂ）第２癌患者。

【図８７】自己組立てカラム、ＥＸＯ５０及び超遠心分離による血漿からのＲＮＡ抽出の比較を示す１つのグラフである。繰返し実験を実施した。

【図８８】超遠心分離、直接溶解、及びＥＸＯ５０による２００ｕｌの血漿からのＲＮＡ抽出の比較を示す１つのグラフである。ＥＸＯ５０通過画分からのＲＮＡ抽出も分析した。

【図８９】ＥＸＯ５０キットとｍｉＲＮｅａｓｙによる２００ｕｌの血漿からのＲＮＡ抽出、及びＥＸＯ５０キットと超遠心分離による４ｍｌの血漿からのＲＮＡ抽出の比較を示す１つのグラフである。

【図９０】超遠心分離と比較してＥＸＯ５０は黒色腫由来の突然変異であるＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅを含むＲＮＡを単離することを示す１つのグラフである。

【図９１】ＥＸＯ５０カラムからの溶出後のＲＮＡ単離によってＥＸＯ５０処理と同量のＲＮＡが産出されることを示す１つのグラフである。

【図９２】微細小胞画分の単離、微細小胞性核酸の解離、及び２つの別個のプロトコルを使用するＲＮＡとＤＮＡの抽出のためのＥＸ０５２プロトコルを示す概略図である。

【図９３】微細小胞画分の単離、微細小胞性核酸の解離、及び単一のプロトコルを使用するＲＮＡとＤＮＡの抽出のためのＥＸ０５２．２プロトコルを示す概略図である。

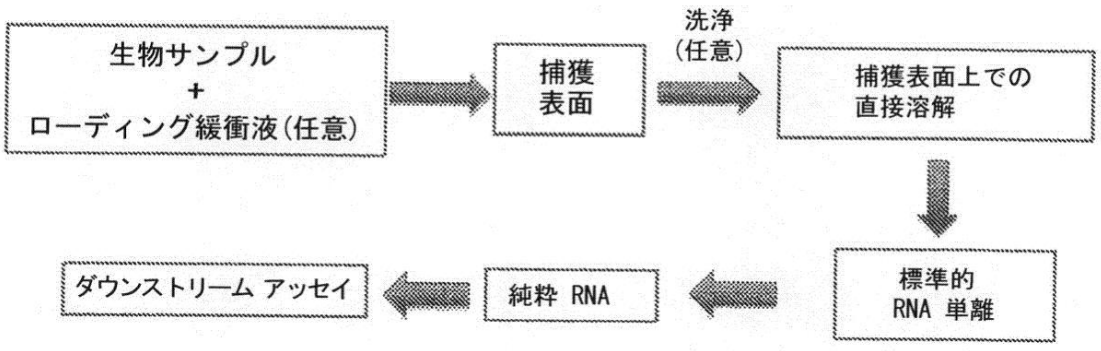
【図９４】野生型ＢＲＡＦのＲＮＡとＤＮＡの検出により示される、一回の抽出において微細小胞性ＲＮＡと微細小胞性ＤＮＡを単離するための相分離におけるクロロホルム濃度の効果を示すグラフである。

【図９５】ＧＡＰＤＨのＲＮＡとＤＮＡの検出により示される、一回の抽出において微細小胞性ＲＮＡと微細小胞性ＤＮＡを単離するための相分離におけるクロロホルム濃度の効果を示すグラフである。

【図９６】相分離におけるｐＨの調節がＤＮＡの抽出と検出に影響することを示すグラフ

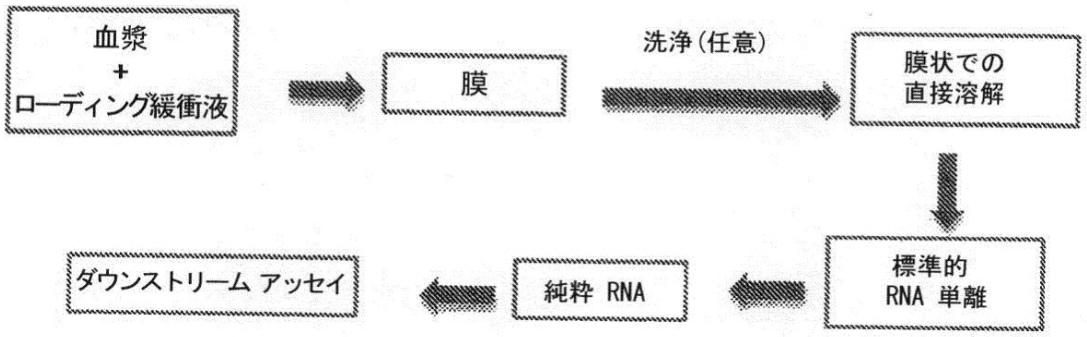
である。
【図９７】微細小胞性ＲＮＡの抽出と検出に対する脳脊髄液（ＣＳＦ）の試料体積の用量設定の効果を示すグラフである。
【図９８】超遠心分離単離法とＥＸＯ６０単離法に由来する微細小胞性ＲＮＡ標的の検出の比較を示すグラフである。
【図９９】異なる患者ＣＳＦ試料について超遠心分離単離法とＥＸＯ６０単離法に由来する微細小胞性ＲＮＡ標的の検出の比較を示すグラフである。患者試料は患者ＩＤによって指名される。様々な試料体積を利用した。（*）は検死試料を示す。
【図１００】異なる微細小胞性ＲＮＡ単離方法及び抽出方法に対するＣＳＦ試料体積（０．２５ｍｌ、０．５ｍｌ、１．０ｍｌ及び２．０ｍｌ）の効果を示すグラフである。ＵＣ（超遠心分離）、ｕＣＳＣ（尿濾過法）、及びＥＸＯ６０。
【図１０１】ＥＸＯ７０プロトコルを使用する２つの異なる尿試料からの抽出に由来するＲＮＡプロファイルを尿循環幹細胞（ｕＣＳＣ）法と比較して示す一連のバイオアナライザープロットである。
【図１０２】ＥＸＯ７０による単離及び抽出後のＲＮＡ検出の尿ＣＳＣ法と比較した相関を示すグラフである。
【図１０３】ＥＸＯ７０又はｕＣＳＣ法による単離及び抽出後の様々なＲＮＡ標的の検出を示す２つのグラフである。単離された微細小胞画分（ＥＸＯ７０又はｕＣＳＣ）及び単離後の通過画分又は上清画分（ＥＸＯ７０フロー又はｕＣＳＣフロー）からＲＮＡを抽出し、分析した。（Ａ）ｍＲＮＡ標的；（Ｂ）ｍｉＲＮＡ標的。
【図１０４】４試料種の４種のｍＲＮＡのＣＴ（Ｙ軸）を示すグラフである。全ての点は２回の微細小胞単離の各々の実験的複製物の平均である。「ＳＪＣＲＨ」は小児患者由来の血漿であり、「ＤＡＯＹ」は髄芽腫細胞株であり、「ＤＡＯＹ　ＭＥＤ」はそれらの細胞の培地に由来する微細小胞である。市販の血漿は何の結果ももたらさなかった。
【図１０５】１００μＬの細胞培養上清から全てのｍＲＮＡを単離するＥＸＯ５０の能力を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
本発明は、微細小胞を面に捕捉することでそれらの微細小胞を単離し、後にそれらの微細小胞を溶解してそれらの中に含まれる核酸、特にＲＮＡを解離する方法を提供する。微細小胞は細胞の外側に向かって真核細胞により放出される、又は原形質膜から出芽する。これらの膜小胞は大きさが不均一であり、約１０ｎｍから約５０００ｎｍまでの範囲の直径を有する。細胞が放出した直径が０．８μｍ未満の全ての膜小胞が本明細書において集合的に「微細小胞」と呼ばれる。これらの微細小胞には微小胞、微小胞様粒子、プロスタソーム、デキソソーム、テキソソーム、エクトソーム、オンコソーム、アポトーシス小体、レトロウイルス様粒子、及びヒト内在性レトロウイルス（ＨＥＲＶ）粒子が含まれる。細胞内多胞体のエキソサイトーシスにより放出される小微小胞（直径が約１０～１０００ｎｍであり、より多くの場合に３０～２００ｎｍである）が当技術分野において「微細小胞」と呼ばれる。
【００３７】
微細小胞を単離する現在の方法には超遠心分離、限外濾過、例えば、１００ｋＤフィルターの使用、重合体沈殿技術、及び／又はサイズベース濾過が含まれる。しかしながら、診断目的を含む様々な用途において使用するための微細小胞の単離、及び所望によりそれらの中に含まれる核酸、好ましくは微細小胞性ＲＮＡの抽出に関して効率的及び効果的である代替方法の必要性が存在する。
【００３８】
幾つかの実施形態では本発明は、微細小胞を面に捕捉することでそれらの微細小胞を単離し、後にそれらの微細小胞を溶解してそれらの中に含まれる核酸、特にＲＮＡを解離する方法を提供する。幾つかの実施形態では本発明は、微細小胞を面に捕捉することでそれらの微細小胞を単離し、後にその捕捉面から完全な微細小胞を溶出する方法を提供する。

【００３９】
微細小胞は、全ての細胞により分泌され、全てのヒト生体液に存在する豊富な高品質の核酸源である。微細小胞中のＲＮＡは原発腫瘍、転移及び周囲の微小環境のトランスクリプトームのリアルタイムでのスナップショットを提供する。したがって、アッセイによる微細小胞のＲＮＡプロファイルの正確な評価によって疾患のコンパニオン診断とリアルタイムモニタリングがもたらされる。この開発は、遅く、長々しく、変わりやすく、そして診断環境に適していない現在のエキソソーム単離の標準法のために立ち往生している。
【００４０】
ＥＸＯ５０血漿エキソソームＲＮＡ単離方法及び／又はキットと呼ばれる本明細書において提供される単離抽出方法及び／又はキットは、微細小胞を結合する親和性膜を使用するスピンカラムベースの精製処理を用いる。本開示の方法及びキットは、一本のカラムに対して０．２から最大で４ｍＬの体積を使用して多数の臨床試料を並行して処理する能力を可能にする。単離されたＲＮＡは非常に純粋であり、溶解されるまで小胞膜によって保護されており、ＥＸＯ５０膜から完全な小胞を溶出することができる。ＥＸＯ５０法は血漿投入物から全てのｍＲＮＡを取り除くことが可能であり、超遠心分離又は直接溶解と比較するとｍＲＮＡ／ｍｉＲＮＡの収量について同等以上である。対照的に、ＥＸＯ５０法及び／又はキットはｍｉＲＮＡの微細小胞結合画分を濃縮し、それらの方法及び／又はキットは大量の投入物質に合わせて容易に規模拡大可能である。この規模拡大能力のために興味深い少量の転写物についての研究が可能になる。他の市販の製品との比較において、本開示の方法及びキットは本明細書において提供される実施例によって実証される特有の性能を提供する。
【００４１】
ＥＸＯ５０法及びキットは次の普遍的手法を用いて生体試料から核酸、例えば、ＲＮＡを単離及び抽出する。まず、微細小胞画分を膜フィルターに結合し、そしてそのフィルターを洗浄する。その後、試薬を使用して膜上溶解と核酸、例えば、ＲＮＡの解離を実施する。その後、ＰＬＧチューブを使用してクロロホルム抽出を実施し、続いてエタノール調整を実施する。その後、その核酸、例えば、ＲＮＡをシリカカラムに結合し、洗浄し、その後に溶出する。
【００４２】
生体試料から微細小胞性ＲＮＡを単離するために捕捉面方法を使用する概略的フロースルーの模式図が下に示されている。
【００４３】
【化１】



【００４４】
血漿試料から微細小胞性ＲＮＡを単離するために膜方法を使用する概略的フロースルーの模式図が下に示されている。
【００４５】

【化２】

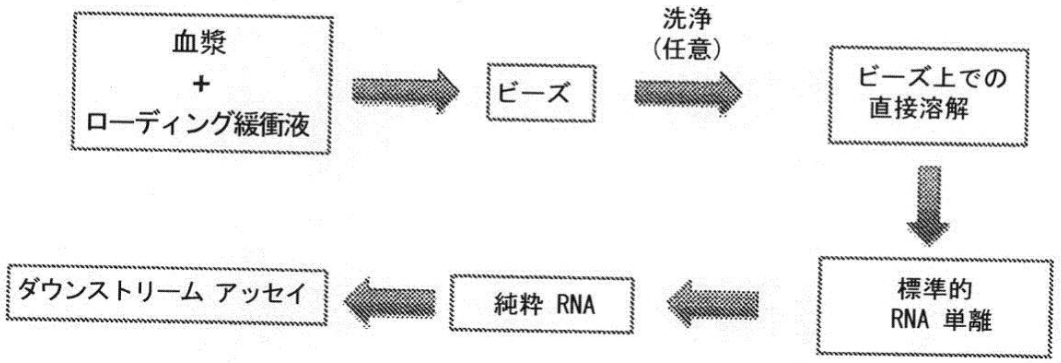


【００４６】

血漿試料から微細小胞性ＲＮＡを単離するためにビーズ方法を使用する概略的フロースルーの模式図が下に示されている。

【００４７】

【化３】

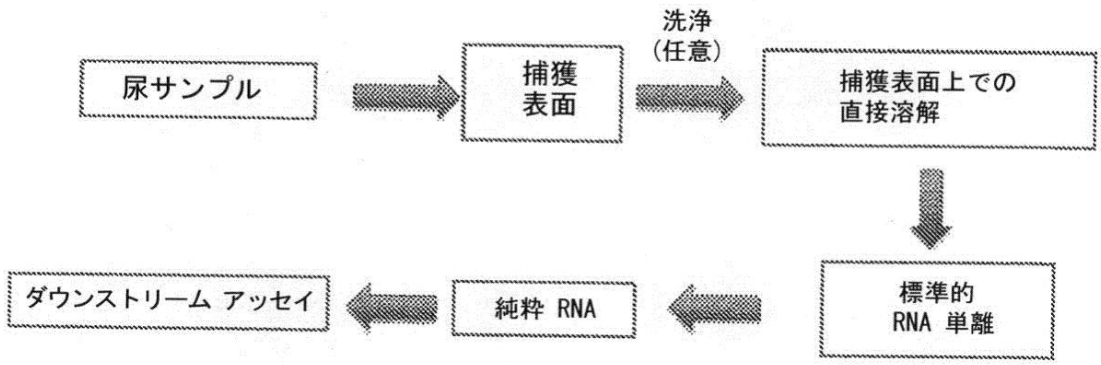


【００４８】

尿試料から微細小胞性ＲＮＡを単離するために捕捉面方法を使用する概略的フロースルーの模式図が下に示されている。

【００４９】

【化４】



【００５０】

本明細書において提供される実施例によって示されるように、捕捉面、例えば、ビーズ又はフィルター（本明細書において膜とも呼ばれる）のフォーマットは本明細書において提供される方法の生体試料から微細小胞を効率的に捕捉する能力に影響しない。また、捕捉面の表面電荷は本明細書において提供される方法の微細小胞を効率的に捕捉する能力に影響しない。加えて、それらの実施例は結合及び洗浄緩衝液のイオン強度が本明細書において提供される方法においては限定的な重要性しか有しないことを示している。

【００５１】

広範囲の面が本明細書において提供される方法に従って微細小胞を捕捉することができるが、全ての面が微細小胞を捕捉するわけではない（何も捕捉しない面もある）。

【００５２】

本開示は使い捨てプラスチック部材と遠心分離装置を使用して生体試料又は臨床試料から微細小胞を単離及び濃縮するための器具についても説明する。例えば、その器具は捕捉面（すなわち、膜フィルター）、外部フリットと内部チューブの間にその捕捉面を固定するホルダー、及び収集チューブを備えるカラムを備える。その外部フリットは液体の通過を可能にする大きな網状構造体を備え、好ましくはカラムの一端に存在する。その内部チューブは捕捉面を所定の位置に保持し、好ましくはわずかに円錐状の形状である。その収集チューブは市販のもの、すなわち、５０ｍｌのファルコンチューブであってよい。カラムは回転に適切であることが好ましく、すなわち、サイズが標準的な遠心分離機及び微量遠心分離機に適合する。

【００５３】

捕捉面が膜である実施形態では生体試料から微細小胞画分を単離するための器具は少なくとも１枚の膜を含む。幾つかの実施形態ではその器具は１枚、２枚、３枚、４枚、５枚、又は６枚の膜を備える。その器具が３枚の膜を備えることが好ましい。その器具が１枚より多い膜を備える実施形態ではそれらの膜は全てカラムの一端において互いに直接的に隣接する。その器具が１枚より多い膜を備える実施形態ではそれらの膜は全て互いに同一であり、すなわち、同じ電荷を有し、及び／又は同じ官能基を有する。

【００５４】

本明細書において提供される実施例１～３２によって示されるように、緩衝液成分の選択、緩衝液のｐＨ、及び溶解緩衝液の選択は本明細書において提供される方法の微細小胞を効率的に捕捉し、且つ、それらに含まれる核酸、特にＲＮＡを解離する能力に影響する。幾つかの実施形態ではその溶解緩衝液はフェノールベースの溶解緩衝液である。例えば、その溶解緩衝液はＱＩＡｚｏｌ（登録商標）溶解試薬（Ｑｉａｇｅｎ）である。

【００５５】

本明細書において提供される実施例１～３２は、微細小胞よりも小さい孔径を通過させる濾過による捕捉が本明細書において提供される方法による捕捉の主要な機序ではないことも示している。しかしながら、フィルター孔径はそれでも非常に重要であり、それは、例えば、ｍＲＮＡが２０ｎｍフィルターに詰まり、回収され得ないのに対してマイクロＲＮＡは容易に溶離し得るから、及び、例えば、フィルター孔径は利用可能な面捕捉領域における重要なパラメーターであるからである。

【００５６】

本明細書において提供される実施例１～３２は、臨床的有用性の点でより適切なフォーマットである（磁気又は非磁気）ビーズを使用する微細小胞単離の実用可能性も示している。正に帯電しているビーズ、負に帯電しているビーズ、及び中性のビーズの全てが好適な微細小胞捕捉効率を示すことが結果から示された。この観察は、それらのビーズが微細小胞の表面上の様々なリガンドに対して作用することができ、そうして１つの微細小胞が様々な（複数の）力を介して様々な（官能化されている）粒子によって捕捉され得ることを示唆している。

【００５７】

本明細書において提供される方法は様々な捕捉面のうちのいずれかを使用する。幾つかの実施形態ではその捕捉面は本明細書においてフィルター又は膜フィルターとも呼ばれる

膜である。幾つかの実施形態ではその捕捉面は市販の膜である。幾つかの実施形態ではその捕捉面は帯電している市販の膜である。幾つかの実施形態ではその捕捉面は中性である。幾つかの実施形態ではその捕捉面はＰＡＬＬ社のＭｕｓｔａｎｇ（登録商標）イオン交換膜、ザルトリウスＡＧ社のＶｉｖａｐｕｒｅ（登録商標）Ｑ膜、Ｓａｒｔｏｂｉｎｄ Ｑ又はＶｉｖａｐｕｒｅ（登録商標）Ｑ Ｍａｘｉ Ｈ、ザルトリウスＡＧ社のＳａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）Ｄ、ザルトリウスＡＧ社のＳａｒｔｏｂｉｎｄ （Ｓ）、ザルトリウスＡＧ社のＳａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）Ｑ、ザルトリウスＡＧ社のＳａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）ＩＤＡ、ザルトリウスＡＧ社のＳａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）アルデヒド、シグマ社のＷｈａｔｍａｎ（登録商標）ＤＥ８１、ＥＭＤミリポア社のＦａｓｔ Ｔｒａｐウイルス精製カラム、サーモ・サイエンティフィック*ピアース強陽イオン及び陰イオン交換スピンカラムから選択される。

【００５８】

捕捉面が帯電している実施形態ではその捕捉面は０．６５ｕｍ正帯電Ｑ ＰＥＳ吸引濾過、３～５ｕｍ正帯電Ｑ ＲＣスピンカラム濾過、０．８ｕｍ正帯電Ｑ ＰＥＳ自家製スピンカラム濾過、０．８ｕｍ正帯電Ｑ ＰＥＳシリンジ濾過、０．８ｕｍ負帯電Ｓ ＰＥＳ自家製スピンカラム濾過、０．８ｕｍ負帯電Ｓ ＰＥＳシリンジ濾過、及び５０ｎｍ負帯電ナイロンシリンジ濾過からなる群より選択される帯電フィルターであり得る。その帯電フィルターがシリンジ濾過器具内に収納されていないことが好ましく、それはこれらの実施形態ではＱｉａｚｏｌ／ＲＮＡがフィルターから抜け出しにくいからである。その帯電フィルターがカラムの一端に収納されていることが好ましい。

【００５９】

捕捉面が膜である実施形態ではその膜は様々な適切な材料から作製され得る。幾つかの実施形態ではその膜は（例えば、ミリポア社又はＰＡＬＬ社の）ポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）である。幾つかの実施形態ではその膜は（例えば、ザルトリウス社又はピアース社の）再生セルロース（ＲＣ）である。

【００６０】

幾つかの実施形態ではその捕捉面は正に帯電している膜である。幾つかの実施形態ではその捕捉面はＱ膜であり、その膜は正に帯電している膜であり、且つ、第四級アミンを有する陰イオン交換体である。例えば、そのＱ膜は第四級アンモニウムＲ－CH_2－N^+（CH_3）$_3$で官能化されている。幾つかの実施形態ではその捕捉面は負に帯電している膜である。幾つかの実施形態ではその捕捉面はＳ膜であり、その膜は負に帯電している膜であり、且つ、スルホン酸基を有する陽イオン交換体である。例えば、そのＳ膜はスルホン酸Ｒ－CH_2－SO_3^-で官能化されている。幾つかの実施形態ではその捕捉面はＤ膜であり、その膜はジエチルアミン基Ｒ－CH_2－NH^+（C_2H_5）$_2$を有する弱塩基性陰イオン交換体である。幾つかの実施形態ではその捕捉面は金属キレート膜である。例えば、その膜はＩＤＡ膜であり、ミノ二酢酸－Ｎ（CH_2COOH^-）$_2$で官能化されている。幾つかの実施形態ではその捕捉面は微孔性膜であり、アルデヒド基－ＣＨＯで官能化されている。他の実施形態ではその膜はジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）セルロースを有する弱塩基性陰イオン交換体である。全ての帯電膜が本明細書において提供される方法での使用に適切であるわけではなく、例えば、再生セルロース強酸性陽イオン交換体（「ＲＣ／ＳＡＣＥ」）膜スピンカラムを使用して単離されたＲＮＡはＲＴ－ｑＰＣＲ阻害を示し、したがって、ＰＣＲ関連下流アッセイに不適切であった。

【００６１】

捕捉面が帯電している実施形態では正に帯電しているフィルターを使用して微細小胞を単離することができる。捕捉面が帯電している実施形態ではその捕捉面は負に帯電している再生セルロースＳフィルターではないことが好ましく、それはこの実施形態がＰＣＲ阻害の原因になるからである。対照的に、負に帯電しているＰＥＳフィルターはこの現象を示さない。

【００６２】

捕捉面が帯電している実施形態では微細小胞の捕捉時のｐＨはｐＨ７以下である。幾つ

かの実施形態ではそのｐＨは４より高く、８以下である。

【００６３】

捕捉面が正に帯電しているＱフィルターである実施形態では緩衝液系はｐＨ６．５～７．０の２５０ｍＭのビストリスプロパンを含む洗浄緩衝液を含む。捕捉面が正に帯電しているＱフィルターである実施形態では溶解緩衝液はＱｉａｚｏｌである。捕捉面が正に帯電しているＱフィルターである実施形態では溶解緩衝液は１倍の体積で存在する。捕捉面が正に帯電しているＱフィルターである実施形態では溶解緩衝液は１倍より多い体積で存在する。

【００６４】

捕捉面が中性である実施形態ではその捕捉面は２０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過（Ｔｉｓｃｈ及びＥｘｏｍｉｒ）、３０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過（Ｓｔｅｒｌｉｔｅｃｈ）、５０ｎｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過（Ｓｔｅｒｌｉｔｅｃｈ）、０．２ｕｍ中性ＰＥＳ自家製スピンカラム濾過（Ｐａｌｌ）、０．８ｕｍ中性ＰＥＳ自家製スピンカラム濾過（Ｐａｌｌ）及び０．８ｕｍ中性ＰＥＳシリンジ濾過（Ｐａｌｌ）からなる群より選択されるフィルターである。捕捉面が中性である実施形態ではその中性捕捉面がシリンジフィルター内に収納されていないことが好ましい。

【００６５】

捕捉面が中性である実施形態では溶解緩衝液はＱｉａｚｏｌである。捕捉面が中性である実施形態では溶解緩衝液は１倍の体積で存在する。捕捉面が中性である実施形態では溶解緩衝液は１倍より多い体積で存在する。捕捉面が中性である実施形態では本方法は洗浄ステップを含む。

【００６６】

膜の孔径は膜の材料に応じて３μｍから２０ｎｍまでの範囲である。例えば、捕捉面が市販のＰＥＳ膜である実施形態では膜は２０ｎｍの孔径（Ｅｘｏｍｉｒ）、０．６５μｍの孔径（ミリポア）又は０．８μｍの孔径（Ｐａｌｌ）を有する。捕捉面が市販のＲＣ膜である実施形態では膜は３～５μｍの範囲の孔径を有する（ザルトリウス、ピアース）。

【００６７】

捕捉面の表面電荷は正、負、又は中性であり得る。幾つかの実施形態ではその捕捉面は正に帯電しているビーズ又は複数のビーズである。幾つかの実施形態ではその捕捉面は負に帯電しているビーズ又は複数のビーズである。幾つかの実施形態ではその捕捉面は中性のビーズ又は複数のビーズである。幾つかの実施形態ではその捕捉面は帯電基で表面修飾されていない中性フィルター、例えば、ＰＥＳ膜である。

【００６８】

幾つかの実施形態では本明細書において提供される方法は負荷緩衝液及び洗浄緩衝液を含む様々な緩衝液を含む。幾つかの実施形態では負荷緩衝液及び洗浄緩衝液は高イオン強度又は低イオン強度を有し得る。幾つかの実施形態では塩濃度、例えば、ＮａＣｌ濃度は０Ｍから２．４Ｍまでであり得る。それらの緩衝液は様々な成分を含み得る。幾つかの実施形態ではそれらの緩衝液は次の成分：トリス、ビストリス、ビストリスプロパン、イミダゾール、クエン酸、メチルマロン酸、酢酸、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン（ＴＥＡ）及びリン酸ナトリウムのうちの１つ以上を含む。本明細書において提供される方法では負荷緩衝液及び洗浄緩衝液のｐＨが重要である。血漿試料が負荷前に５．５以下のｐＨに設定されるとフィルターが詰まる傾向があり（遠心時に血漿が全くカラムを通過しない）、ｐＨが高いほど微細小胞性ＲＮＡの回収が微細小胞の不安定性のために低くなる。微細小胞からのＲＮＡ回収は中性のｐＨにおいて最適である。幾つかの実施形態では使用される緩衝液は１×濃度、２×濃度、３×濃度、又は４×濃度である。例えば、負荷緩衝液又は結合緩衝液は２×濃度であるが、一方で洗浄緩衝液は１×濃度である。

【００６９】

幾つかの実施形態では本方法は例えば生体試料を捕捉面と接触させた後に１回以上の洗浄ステップを含む。幾つかの実施形態ではより純粋な微細小胞画分を得るために界面活性

剤を洗浄緩衝液に添加して非特異的結合（すなわち、混入汚染物質、細胞小片、及び循環タンパク質複合体又は核酸）の除去を容易にする。使用に適切な界面活性剤にはドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、ツイーン２０、ツイーン８０、トリトンＸ－１００、ノニデットＰ－４０（ＮＰ－４０）、ブリッジ３５、ブリッジ５８、オクチルグルコシド、オクチルチオグリコシド、ＣＨＡＰＳ又はＣＨＡＰＳＯが含まれるが、これらに限定されない。

【００７０】

幾つかの実施形態では遠心分離に使用される器具、例えば、スピンカラム、又は吸引系に使用される器具、例えば、吸引フィルターホルダー、又は加圧濾過に使用される器具、例えば、シリンジフィルターの内部に捕捉面、例えば、膜が収納される。好ましい実施形態ではスピンカラム又は吸引系に捕捉面が収納される。

【００７１】

核酸の抽出前の生体試料からの微細小胞の単離は、次の理由：１）微細小胞からの核酸の抽出により、液体試料内で疾患特異的微細小胞又は腫瘍特異的微細小胞を他の微細小胞から分けて単離することによって得られた疾患特異的核酸又は腫瘍特異的核酸を選択的に分析する機会が提供されること、２）核酸含有微細小胞は、最初に微細小胞を単離せずに直接的に液体試料から核酸を抽出することにより得られる収率／完全性と比べて高い完全性を有する核酸種を有意に高い収率で産生すること、３）例えば低レベルで発現する核酸を検出するための規模拡大可能性、つまり、本明細書に記載される方法及び／又はキットを使用してより大きな体積の試料から微細小胞を濃縮することにより、感度を上昇させることができること、４）タンパク質、脂質、細胞小片、細胞及び他の潜在的な混入汚染物質及び生体試料内に自然に見つかるＰＣＲ阻害物質が核酸抽出ステップの前に除外される点で抽出される核酸がより純粋又はより高品質／完全であること、及び５）単離された微細小胞画分が出発試料の体積よりも小さい体積なることができ、それにより小容量カラムフィルターを使用してこれらの画分又はペレットから核酸を抽出することが可能になるので、核酸抽出方法においてより多くの選択肢を利用することができること、のために有利である。

【００７２】

生体試料から微細小胞を単離する幾つかの方法が当技術分野において記載されている。例えば、分画遠心分離法がＲａｐｏｓｏらの論文（Ｒａｐｏｓｏら、１９９６年）、Ｓｋｏｇらの論文（Ｓｋｏｇら、２００８年）及びＮｉｌｓｓｏｎらの論文（Ｎｉｌｓｓｏｎら、２００９年）に記載されている。イオン交換クロマトグラフィー法及び／又はゲル浸透クロマトグラフィー法が米国特許第６８９９８６３号明細書及び第６８１２０２３号明細書に記載されている。ショ糖密度勾配法又はオルガネラ電気泳動法が米国特許第７１９８９２３号明細書に記載されている。磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）法がＴａｙｌｏｒ及びＧｅｒｃｅｌ　Ｔａｙｌｏｒの論文（Ｔａｙｌｏｒ及びＧｅｒｃｅｌ－Ｔａｙｌｏｒ、２００８年）に記載されている。ナノ膜限外濾過濃縮法がＣｈｅｒｕｖａｎｋｙらの論文（Ｃｈｅｒｕｖａｎｋｙら、２００７年）に記載されている。パーコール勾配単離法がＭｉｒａｎｄａらの刊行物（Ｍｉｒａｎｄａら、２０１０年）に記載されている。さらに、マイクロ流体デバイスによって対象の体液から微細小胞を特定及び単離することができる（Ｃｈｅｎら、２０１０年）。核酸バイオマーカーの研究開発並びに商業用途において、高品質の核酸を生体試料から一貫した信頼できる実用的な方法で抽出することが望ましい。

【００７３】

したがって、本発明の目的は体液などの生体試料からの核酸含有粒子の迅速で簡便な単離と単離された粒子からの高品質の核酸の抽出のための方法を提供することである。本発明の方法は検査室又は臨床背景での使用、又はフィールドでの使用のために小型の器具又は器械への適用及び組込みに適切であり得る。

【００７４】

本明細書において提供される実施例ではエキソソーム・ダイアグノスティック社により

開発された血液採取ＳＯＰを使用するＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から通常の健常対照に由来するヒト血漿を得た。簡単に説明すると、血液をＫ２　ＥＤＴＡチューブに採取し、完全に転倒させてよく混合した。その後、それらのチューブを１３００×ｇで１０分間遠心分離にかけて血液細胞と血漿を分離した。その後、血漿を取出し、０．８μｍフィルターに通して濾過して細胞小片と血小板を除去した。その後、全ての血漿試料のアリコットを１ｍｌの凍結保存用バイアルに作製し、使用するまで－８０℃で保存した。

【００７５】

ＲＮＡ単離の前に平衡緩衝液を通すことにより膜を調整した。融解した血漿試料を負荷緩衝液で希釈した。微細小胞を吸着する膜にその希釈された血漿試料をゆっくりと通した。その後、その膜を洗浄緩衝液で洗浄して弱い力で結合しているあらゆる血漿成分を除去した。その後、溶解試薬をその膜に通して微細小胞を溶解した。ｍｉＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＲＮＡを単離した。

【００７６】

ＲＮＡ６０００ピコチップを使用する２１００バイオアナライザー（アジレント）を用いて品質と濃度についてＲＮＡを評価した。抽出されたＲＮＡの相対量は、アプライドバイオシステムズ社由来の選択的ヒト遺伝子発現アッセイ（Ｔａｑｍａｎアッセイ）を使用するＲＴ－ｑＰＣＲにより測定された。

【００７７】

本明細書において提供される実施例は血漿試料を使用したが、当業者はこれらの方法が様々な生体試料に適用可能であることを理解する。他の適切な生体試料には尿、脳脊髄液、血液成分、例えば、血漿及び血清を含む血液、痰、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、気道液、腸管液、及び泌尿管液、涙液、唾液、乳汁、リンパ系由来の液、精液、臓器内系液、腹水、腫瘍嚢胞液、羊水、細胞培養上清及びそれらの組合せが含まれる。

【００７８】

本開示の方法及びキットはヒト対象由来の試料との使用に適切である。本開示の方法及びキットは例えばげっ歯類、非ヒト霊長類、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、及び／又は家畜（例えば、ニワトリ）などの非ヒト対象由来の試料との使用に適切である。

【００７９】

幾つかの実施形態では微細小胞の単離、精製又は濃縮の前に前処理ステップを実施して大きい望まれない粒子、細胞及び／又は細胞小片及び生体試料中に存在する他の混入汚染物質を除去する。それらの前処理ステップは１回以上の遠心分離ステップ（例えば、分画遠心分離）又は１回以上の濾過ステップ（例えば、限外濾過）、又はそれらの組合せにより達成され得る。１回より多い遠心分離前処理ステップを実施する場合、生体試料をまず低速で遠心分離し、次に高速で遠心分離してよい。所望によりさらに適切な遠心分離前処理ステップを実行してよい。あるいは、又は１回以上の遠心分離前処理ステップに加えて生体試料を濾過してよい。例えば、生体試料をまず２０，０００ｇで１時間遠心分離して大きい望まれない粒子を除去してよく、次にその試料を例えば０．８μｍフィルターにより濾過することができる。

【００８０】

幾つかの実施形態では生体試料を捕捉面と接触させる前、又は接触させた後に１回以上の遠心分離ステップを実施して微細小胞を分離し、且つ、その生体画分から単離された微細小胞を濃縮する。例えば、試料は２０，０００ｇ、４℃で１時間遠心分離される。大きい望まれない粒子、細胞、及び／又は細胞小片を除去するために約１００～５００ｇ、好ましくは約２５０～３００ｇの低速で試料を遠心分離してよい。あるいは、又は加えて、より速い速度で試料を遠心分離してよい。適切な遠心分離速度は最大で約２００，０００ｇまでであり、例えば、約２，０００ｇから約２００，０００ｇ未満までである。約１５，０００ｇより上であり、且つ、約２００，０００ｇ未満である速度、又は約１５，０００ｇより上であり、且つ、約１００，０００ｇ未満である速度、又は約１５，０００ｇより上であり、且つ、約５０，０００ｇ未満である速度が好ましい。約１８，０００ｇから約４０，０００ｇ又は約３０，０００ｇまでの速度、及び約１８，０００ｇから約２５，

０００ｇまでの速度がより好ましい。約２０，０００ｇの遠心分離速度が特に好ましい。概して遠心分離に適切な時間は約５分から約２時間まで、例えば、約１０分から約１．５時間まで、又はより好ましくは約１５分から約１時間までである。約０．５時間の時間が好ましくあり得る。時には生体試料を約２０，０００ｇで約０．５時間の遠心分離にかけることが好ましい。しかしながら、それより上の速度と時間があらゆる組合せで適切に使用され得る（例えば、約１８，０００ｇから約２５，０００ｇまで、又は約３０，０００ｇから約４０，０００ｇまでで約１０分間から約１．５時間、又は約１５分間から約１時間、又は約０．５時間、など）。遠心分離ステップ又は複数の遠心分離ステップを外界温度より下の温度、例えば、約０～１０℃、好ましくは約１～５℃、例えば、約３℃又は約４℃で実行してよい。

【００８１】

幾つかの実施形態では生体試料を捕捉面と接触させる前、又は接触させた後に１回以上の濾過ステップを実施する。約０．１～約１．０μｍの範囲、好ましくは約０．８μｍ又は０．２２μｍのサイズを有するフィルターを使用してよい。多孔性が減少した複数のフィルターを使用する連続濾過により濾過を実施してもよい。

【００８２】

幾つかの実施形態ではクロマトグラフィーステージの間に処理される試料の体積を減らすために生体試料を捕捉面と接触させる前、又は接触させた後に１回以上の濃度ステップを実施する。濃縮は微細小胞の沈降を引き起こすために高速、例えば、１０，０００ｇと１００，０００ｇの間での試料の遠心分離によるものであり得る。これは一連の分画遠心分離からなり得る。得られたペレット中の微細小胞はその後の処理ステップのためにより小さい体積で適切な緩衝液の中に再構成され得る。濃縮ステップを限外濾過により実施してもよい。実際にはこの限外濾過は生体試料を濃縮するし、微細小胞画分の追加的精製も実施する。別の実施形態では濾過は限外濾過、好ましくは接線流限外濾過である。接線流限外濾過は、所定のカットオフ閾値の膜によって分けられている２つの区画（濾過分と濃縮分）に溶液を濃縮及び分画することからなる。その分離は、濃縮分区画に流動を印加し、且つ、この区画と濾過分区画との間に経膜圧力を印加することにより実行される。限外濾過を実施するために様々なシステム、例えば、ラセン膜（ミリポア、Ａｍｉｃｏｎ）、平膜又は中空糸（Ａｍｉｃｏｎ、ミリポア、ザルトリウス、Ｐａｌｌ、ＧＦ、Ｓｅｐｒａｃｏｒ）を使用することができる。本発明の範囲内では１０００ｋＤａより下のカットオフ閾値、好ましくは１００ｋＤａと１０００ｋＤａの間、又はさらにより好ましくは１００ｋＤａと６００ｋＤａの間のカットオフ閾値を有する膜の使用が有利である。

【００８３】

幾つかの実施形態では生体試料を捕捉面と接触させる前、又は接触させた後に１回以上のサイズ排除クロマトグラフィーステップ又はゲル浸透クロマトグラフィーステップを実施する。ゲル浸透クロマトグラフィーステップを実施するため、シリカ、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、エチレングリコール・メタクリレート共重合体又はそれらの混合物、例えば、アガロース・デキストラン混合物から選択される担体を使用することが好ましい。例えば、そのような担体にはＳＵＰＥＲＤＥＸ（登録商標）２００ＨＲ（ファルマシア）、ＴＳＫ　Ｇ６０００（ＴｏｓｏＨａａｓ）又はＳＥＰＨＡＣＲＹＬ（登録商標）Ｓ（ファルマシア）が含まれるが、これらに限定されない。

【００８４】

幾つかの実施形態では生体試料を捕捉面と接触させる前、又は接触させた後に１回以上の親和性クロマトグラフィーステップを実施する。幾つかの微細小胞がある特定の表面分子を特徴とすることもあり得る。微細小胞は細胞原形質膜の出芽から形成するのでこれらの微細小胞はそれらの起源となった細胞で見出される同じ表面分子のうちの多くを多くの場合に共有する。本明細書において使用される場合、「表面分子」は微細小胞の表面上又は微細小胞の膜中又は膜上に見出される抗原、タンパク質、脂質、炭水化物、及びマーカーを集合的に指す。これらの表面分子は、例えば、受容体、腫瘍関連抗原、膜タンパク質修飾（例えば、グリコシル化構造体）を含み得る。例えば、腫瘍細胞から出芽する微細小

胞は多くの場合にそれらの細胞表面上に腫瘍関連抗原を提示する。したがって、特定のドナー細胞種由来の微細小胞の特定の集団の単離、特定、及び又は濃縮のために本明細書において提供される方法と組み合わせて親和性クロマトグラフィー又は親和性排除クロマトグラフィーを活用することもできる（Ａｌ－Ｎｅｄａｗｉら、２００８年；Ｔａｙｌｏｒ及びＧｅｒｃｅｌ－Ｔａｙｌｏｒ、２００８年）。例えば、（悪性又は非悪性）腫瘍性微細小胞は腫瘍関連表面抗原を担持し、これらの特定の腫瘍関連表面抗原を介して検出、単離、及び／又は濃縮され得る。一例ではその表面抗原は上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）であり、長い直腸結腸起源、乳房起源、前立腺起源、頭頚部起源、及び肝臓起源の腫瘍に由来する微細小胞に特異的である（Ｂａｌｚａｒら、１９９９年；Ｗｅｎｔら、２００４年）。さらに、腫瘍特異的微細小胞はある特定の表面マーカー、例えば、ＣＤ８０及びＣＤ８６の欠如を特徴とすることもあり得る。これらの事例では腫瘍特異的マーカーのさらなる分析のためにこれらのマーカーを有する微細小胞が例えば親和性排除クロマトグラフィーにより排除され得る。親和性クロマトグラフィーは、例えば、様々な担体、樹脂、ビーズ、抗体、アプタマー、アプタマー類似体、分子インプリント重合体、又は微細小胞上の所望の表面分子を特異的に標的とする当技術分野において知られている他の分子を使用することによって達成され得る。

【００８５】

任意により微細小胞精製及び／又は核酸抽出の効率又は特質を評価するための内部対照として機能させるために微細小胞単離又は核酸抽出の前に対照粒子を試料に添加することができる。本明細書に記載される方法及び／又はキットは微細小胞画分の他に効率的な単離及び対照粒子に備えている。これらの対照粒子は、Ｑβバクテリオファージ、ウイルス粒子、又は天然で生じたか、若しくは組換えＤＮＡ技術により設計されたものであり得る対照核酸（例えば、少なくとも１つの対照標的遺伝子）を含む他のあらゆる粒子を含む。幾つかの実施形態では対照粒子の量は試料への添加前にわかっている。対照標的遺伝子はリアルタイムＰＣＲ分析を用いて定量され得る。対照標的遺伝子の定量は微細小胞精製処理又は核酸抽出処理の効率又は特質を決定するために使用され得る。

【００８６】

対照粒子が本明細書において「Ｑβ粒子」と呼ばれるＱβバクテリオファージであることが好ましい。本明細書に記載される方法及び／又はキットにおいて使用されるＱβ粒子は天然のウイルス粒子又は組換え若しくは遺伝子操作ウイルスであり得、後者ではウイルス粒子の少なくとも１つの成分（例えば、ゲノム又はコートタンパク質の一部）が当技術分野において知られている組換えＤＮＡ技術又は分子生物学技術によって合成される。Ｑβはレヴィウイルス科のメンバーであり、４つのウイルスタンパク質であるコートタンパク質、成熟タンパク質、溶解タンパク質、及びＲＮＡ複製酵素をコードする３つの遺伝子からなる直鎖状一本鎖ＲＮＡゲノムを特徴とする。平均的な微細小胞へ類似したそのサイズのためにＱβは、本明細書に記載されるように微細小胞の単離に用いられる同じ精製方法を使用して生体試料から容易に精製され得る。加えて、Ｑβウイルスの一本鎖遺伝子構造の低い複雑性が増幅ベースの核酸アッセイにおける対照としてのそのウイルスの使用に有利である。Ｑβ粒子は試料中のＱβ粒子の量の定量のために検出又は測定される対照標的遺伝子又は対照標的配列を含む。例えば、その対照標的遺伝子はＱβコートタンパク質遺伝子である。生体試料へのＱβ粒子の添加後に本明細書に記載される抽出方法及び／又はキットを用いてＱβ粒子由来の核酸を生体試料由来の核酸と共に抽出する。Ｑβ対照標的遺伝子の検出は、例えば、目的のバイオマーカー（すなわち、ＢＲＡＦ）と共に同時にＲＴ－ＰＣＲ分析により判定され得る。対照標的遺伝子の少なくとも２、３、又は４つの既知の１０倍希釈濃度からなる検量線を使用してコピー数を決定することができる。添加されたＱβ粒子の検出コピー数と量を比較して単離処理及び／又は抽出処理の特質を判定することができる。

【００８７】

好ましい実施形態では核抽出の前にＱβ粒子を尿試料に添加する。例えば、限外濾過の前、及び／又は事前濾過ステップの後にＱβ粒子を尿試料に添加する。

【００８８】
幾つかの実施形態では５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、１，０００又は５，０００コピーのＱβ粒子が体液試料に添加される。好ましい実施形態では１００コピーのＱβ粒子が体液試料に添加される。Ｑβ粒子のコピー数は標的細胞に感染するＱβバクテリオファージの能力に基づいて算出され得る。したがって、Ｑβ粒子のコピー数はＱβバクテリオファージのコロニー形成単位に相関する。
【００８９】
核酸抽出
本発明は微細小胞の改善された単離、精製、又は濃縮のための捕捉面の使用に関する。本明細書において開示される方法は非常に濃縮された微細小胞画分を前記微細小胞からの高品質の核酸の抽出のために提供する。本明細書に記載される方法及び／又はキットによって得られる核酸抽出法は、高い特性の核酸抽出法が必要とされる、又は好ましい様々な用途に有用であり得、例えば、疾患又は健康状態の診断、予後予測、又はモニタリングにおける使用に有用であり得る。
【００９０】
微細小胞内の核酸がバイオマーカーとしての役割を有することが近年の研究により明らかにされている。例えば、国際公開第２００９／１０００２９号パンフレットはＧＢＭ患者血清中の微細小胞から抽出した核酸の医療診断、予後予測及び治療評価のための使用を何にもまして記載している。国際公開第２００９／１０００２９号パンフレットもヒト尿中の微細小胞から抽出した核酸の同じ目的のための使用について記載している。微細小胞から抽出した核酸の使用が生検の必要性を回避する可能性があると考えられており、微細小胞生物学の巨大な診断能力を強調する（Ｓｋｏｇら、２００８）。
【００９１】
単離された微細小胞の品質又は純度が抽出された微細小胞性核酸の品質に直接的に影響することがあり得、その抽出された微細小胞性核酸の品質が次に疾患の診断、予後予測、及び／又はモニタリングのためのバイオマーカーアッセイの効率と感度に直接的に影響する。臨床分野における正確で感度の高い診断検査の重要性を考慮すると、生体試料から非常に濃縮された微細小胞画分を単離するための方法が必要である。この必要性に対処するため、本発明は生体試料からの高品質の核酸の抽出のために生体試料から微細小胞を単離するための方法を提供する。本明細書において示されるように、非常に濃縮された微細小胞画分が本明細書に記載される方法及び／又はキットによって生体試料から単離され、その後に高品質の核酸がそれらの非常に濃縮された微細小胞画分から抽出される。これらの高品質の抽出された核酸は疾患又は他の健康状態の診断、予後予測、及び／又はモニタリングを支援するためのバイオマーカーの存在又は不在の判定又は評価に有用である。
【００９２】
本明細書において使用される場合、「生体試料」という用語はＤＮＡ、ＲＮＡ及びタンパク質などの生体物質を含む試料を指す。幾つかの実施形態では生体試料は対象に由来する体液を適切に含み得る。それらの体液は対象の身体のあらゆる部分、好ましくは末梢部位から単離される液体であり得、例えば、血液、血漿、血清、尿、痰、脊髄液、脳脊髄液、胸膜液、乳頭吸引液、リンパ液、気道液、腸管液、及び泌尿管液、涙液、唾液、乳汁、リンパ系由来の液、精液、臓器内系液、腹水、腫瘍嚢胞液、羊水及び細胞培養上清、及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。幾つかの実施形態では生体試料としての使用にとって好ましい体液は尿である。他の実施形態では好ましい体液は血清である。さらに他の実施形態では好ましい体液は血漿である。他の実施形態では好ましい体液は脳脊髄液である。約０．１ｍｌ～約３０ｍｌの試料体積の液体が使用され得ることが適切である。液体の体積は幾つかの因子、例えば、使用される液体の種類に依存し得る。例えば、血清試料の体積は約０．１ｍｌ～約４ｍｌ、好ましくは約０．２ｍｌ～４ｍｌであり得る。血漿試料の体積は約０．１ｍｌ～約４ｍｌ、好ましくは０．５ｍｌ～４ｍｌであり得る。尿試料の体積は約１０ｍｌ～約３０ｍｌ、好ましくは約２０ｍｌであり得る。生体試

料は糞便試料又は盲腸試料、又はそれらから単離された上清も含み得る。

【００９３】

「対象」という用語は核酸含有粒子を有することが示されている、又は期待されている全ての動物を含むものとする。特定の実施形態ではその対象は哺乳類動物、ヒト又は非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、他の家畜、又はげっ歯類（例えば、マウス、ウサギ、モルモット等）である。ヒト対象は観察可能な異常、例えば、疾患を有しない正常なヒトであり得る。ヒト対象は観察可能な異常、例えば、疾患を有するヒトであり得る。その観察可能な異常はそのヒト自身によって、又は医療従事者によって観察され得る。「対象」、「患者」、及び「個体」という用語は本明細書において互換的に使用される。

【００９４】

本明細書において使用される場合、「核酸」という用語はＤＮＡとＲＮＡを指す。それらの核酸は一本鎖又は二本鎖であり得る。幾つかの例では、核酸はＤＮＡである。幾つかの例では、核酸はＲＮＡである。ＲＮＡにはメッセンジャーＲＮＡ、トランスファーＲＮＡ、リボソーマルＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、及びＨＥＲＶエレメントが含まれるが、これらに限定されない。

【００９５】

本明細書において使用される場合、「高品質」という用語は核酸抽出に関連して１８Ｓと２８ＳのｒＲＮＡを好ましくは約１：１～約１：２、より好ましくは、約１：２の比率で検出することができる抽出を意味する。本明細書に記載される方法及び／又はキットによって得られる高品質核酸抽出法が低タンパク質生体試料（例えば、尿）について５以上のＲＮＡインテグリティ・ナンバー、又は高タンパク質生体試料（例えば、血清）について３以上のＲＮＡインテグリティ・ナンバー、及び２０ｍｌの低タンパク質生体試料又は１ｍｌの高タンパク質生体試料から５０ｐｇ／ｍｌ以上の核酸収量も有することが理想的である。

【００９６】

ＲＮＡ分解が、例えば、遺伝子発現及びｍＲＮＡの分析並びに小ＲＮＡ及びマイクロＲＮＡなどのノンコーディングＲＮＡの分析における抽出されたＲＮＡの下流評価に悪影響を及ぼし得るので、高品質ＲＮＡ抽出法が望ましい。本明細書に記載される新規の方法及び／又はキットによって生体試料から単離された微細小胞から高品質の核酸を抽出することが可能になり、それらの微細小胞内の核酸の正確な分析を実施することができる。

【００９７】

生体試料からの微細小胞の単離の後にその単離又は濃縮された微細小胞画分から核酸を抽出することができる。これを達成するため、幾つかの実施形態では微細小胞を最初に溶解してよい。微細小胞の溶解と核酸の抽出は当技術分野において知られている様々な方法により達成され得る。１つの実施形態では溶解ステップと抽出ステップは市販のＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓキットを使用して達成され得る。別の実施形態では溶解ステップと抽出ステップは市販のＱｉａｇｅｎ　ｍｉＲＮｅａｓｙキットを使用して達成され得る。さらに別の実施形態では核酸抽出は当技術分野において知られている標準的技法及び技術に従ってフェノール：クロロホルムを使用して達成され得る。そのような方法は微細小胞内に含まれる核酸を捕捉するために核酸結合カラムを活用してもよい。核酸が一旦結合したところでそれらの核酸と結合カラムとの間の相互作用を破壊し、それによって核酸をうまく溶出するのに適切な緩衝液又は溶液を使用して核酸を溶出することができる。

【００９８】

幾つかの実施形態ではそれらの核酸抽出方法は生体試料からの高品質核酸抽出を妨害する有害因子を除去又は軽減するステップも含む。そのような有害因子は、様々な生体試料が様々な種類の有害因子を含み得るという点で不均一である。幾つかの生体試料では過剰なＤＮＡなどの因子がそのような試料からの核酸抽出法の特質に影響を及ぼし得る。他の試料では過剰な内在性ＲＮａｓｅなどの因子がそのような試料からの核酸抽出法の特質に影響を及ぼし得る。これらの有害因子を除去するために多数の薬剤と方法を使用してよい

。これらの方法と薬剤は本明細書において「抽出増強操作」と集合的に呼ばれる。幾つかの例では、その抽出増強操作は生体試料への核酸抽出増強剤の添加を含み得る。内在性ＲＮａｓｅなどの有害因子を除去するため、本明細書において定義される抽出増強剤はＳｕｐｅｒａｓｅ－Ｉｎ（Ａｍｂｉｏｎ社より市販）又はＲＮａｓｅＩＮｐｌｕｓ（Ｐｒｏｍｅｇａ社より市販）などのＲＮａｓｅ阻害剤、又は同様に機能する他の薬剤；プロテアーゼ（ＲＮａｓｅ阻害剤として機能し得る）；ＤＮａｓｅ；還元剤；合成ＲＮＡ及び／又はキャリアーＲＮＡなどのデコイ基質；ＲＮａｓｅに結合し得る可溶性受容体；低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）；抗ＲＮＡ抗体、塩基性タンパク質又はシャペロンタンパク質などのＲＮＡ結合分子；高モル浸透圧濃度溶液、界面活性剤、又はそれらの組合せなどのＲＮａｓｅ変性物質を含み得るが、これらに限定されない。

【００９９】

例えば、抽出増強操作は核酸抽出前に生体試料及び／又は単離された微細小胞画分へのＲＮａｓｅ阻害剤の添加を含み得る。好ましくは、そのＲＮａｓｅ阻害剤は体積が１μｌ以上の試料に対して０．０２７ＡＵ（１×）より高い濃度を有し、あるいは１μｌ以上の試料に対して０．１３５ＡＵ（５×）以上の濃度を有し、あるいは１μｌ以上の試料に対して０．２７ＡＵ（１０×）以上の濃度を有し、あるいは１μｌ以上の試料に対して０．６７５ＡＵ（２５×）以上の濃度を有し、あるいは１μｌ以上の試料に対して１．３５ＡＵ（５０×）以上の濃度を有し、その１×濃度は０．０２７ＡＵ以上のＲＮａｓｅ阻害剤が１μｌ以上の体液から単離された微細小胞を処理するために使用される酵素条件を指し、５×濃度は０．１３５ＡＵ以上のＲＮａｓｅ阻害剤が１μｌ以上の体液から単離された微細小胞を処理するために使用される酵素条件を指し、１０×プロテアーゼ濃度は０．２７ＡＵ以上のＲＮａｓｅ阻害剤が１μｌ以上の体液から単離された粒子を処理するために使用される酵素条件を指し、２５×濃度は０．６７５ＡＵ以上のＲＮａｓｅ阻害剤が１μｌ以上の体液から単離された微細小胞を処理するために使用される酵素条件を指し、５０×プロテアーゼ濃度は１．３５ＡＵ以上のＲＮａｓｅ阻害剤が１μｌ以上の体液から単離された粒子を処理するために使用される酵素条件を指す。好ましくはそのＲＮａｓｅ阻害剤はプロテアーゼであり、その場合に１ＡＵは分当たり１μｍｏｌのチロシンに相当するフォリン陽性アミノ酸とペプチドを放出するプロテアーゼ活性である。

【０１００】

これらの増強剤はそれらの機能を様々な方法で、例えば、ＲＮａｓｅ活性の阻害（例えば、ＲＮａｓｅ阻害剤）を介して、タンパク質の広範な分解（例えば、プロテアーゼ）を介して、又はＲＮＡに結合し、保護するシャペロンタンパク質（例えば、ＲＮＡ結合タンパク質）を介して発揮し得る。全ての例においてそのような抽出増強剤は、単離された粒子からの高品質核酸の抽出を防ぐ、又は妨げる生体試料中の有害因子又は単離された粒子と結合している有害因子のうちの幾らか、又は全てを除去又は少なくとも軽減する。

【０１０１】

幾つかの実施形態では抽出された１８Ｓと２８ＳのｒＲＮＡの定量を用いて核酸抽出の特質を決定することができる。

【０１０２】

核酸バイオマーカーの検出

幾つかの実施形態では抽出される核酸はＲＮＡを含む。この例ではさらなる増幅の前にそのＲＮＡを相補性ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）に逆転写することが好ましい。そのような逆転写は単独で、又は増幅ステップと組み合わせて実施され得る。逆転写と増幅ステップを組み合わせる方法の一例は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）であり、その逆転写ポリメラーゼ連鎖反応は定量的であるように、例えば、米国特許第５６３９６０６号明細書に記載される定量的ＲＴ－ＰＣＲにさらに改変されてよく、その米国特許明細書はこの教示に関して参照により本明細書に援用される。その方法の別の例は２つの別個のステップを含み、最初の逆転写はＲＮＡをｃＤＮＡに変換し、２番目のステップは定量的ＰＣＲを用いてｃＤＮＡの量を定量する。後続の実施例において示されるように、本明細書において開示される方法を用いて核酸含有粒子から抽出されるＲＮＡは、限定されないが、リ

ボソーマル１８Ｓ及び２８Ｓ　ｒＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、トランスファーＲＮＡ、疾患又は健康状態に関連する転写物、及び健康状態の診断、予後予測及びモニタリングにとって重要なバイオマーカーをはじめとする多種多様な転写物を含む。

【０１０３】

例えば、ＲＴ－ＰＣＲ分析は各反応のＣｔ値（サイクル閾値）を決定する。ＲＴ－ＰＣＲでは陽性反応が蛍光シグナルの蓄積によって検出される。Ｃｔ値は、その蛍光シグナルが閾値を超える（すなわち、バックグラウンドレベルを超える）ために必要とされるサイクル数として定義される。Ｃｔレベルは試料中の標的核酸の量又は対照核酸の量に反比例する（すなわち、Ｃｔレベルが低いほど試料中の対照核酸の量が多い）。

【０１０４】

別の実施形態では、限定されないが、ＲＴ－ＰＣＲをはじめとする当技術分野において認識されている様々な技術のうちのいずれかを用いて対照核酸のコピー数を測定することができる。当技術分野において知られている方法を用いて、例えば、校正曲線、又は検量線を作成及び利用することにより対照核酸のコピー数を決定することができる。

【０１０５】

幾つかの実施形態では１つ以上のバイオマーカーが遺伝子異常のうちの１つ又は遺伝子異常のコレクションであり得、それは核酸含有粒子内の核酸の量並びに核酸の異型を指すために本明細書において使用される。具体的には遺伝子異常には、限定されないが、遺伝子（例えば、癌遺伝子）又は一団の遺伝子の過剰発現、遺伝子（例えば、ｐ５３又はＲＢなどの腫瘍抑制遺伝子）又は一団の遺伝子の過少発現、遺伝子又は一団の遺伝子のスプライシング変異体の代替的産生、遺伝子コピー数変異体（ＣＮＶ）（例えば、ＤＮＡ二重微小染色体）（Ｈａｈｎ、１９９３）、核酸修飾（例えば、メチル化、アセチル化及びリン酸化）、一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）、染色体再構築（例えば、逆位、欠失及び重複）、及び遺伝子又は一団の遺伝子の突然変異（挿入、欠失、重複、ミスセンスヌクレオチド変異、ナンセンスヌクレオチド変異、同義ヌクレオチド変異又は他のあらゆるヌクレオチド変異）が含まれ、それらの突然変異は多くの場合に最終的には遺伝子産物の活性と機能に影響を及ぼし、代替的転写スプライシング変異体及び／又は遺伝子発現レベルの変化、又は前述のもののいずれかの組合せを引き起こす。

【０１０６】

単離された粒子に存在する核酸の分析は定量的及び／又は定性的である。定量的分析について、単離された粒子内の目的の特定の核酸の量（発現レベル）は相対的にしても絶対的にしても当技術分野において知られている方法（下に記載）により測定される。定性的分析について、単離された微細小胞内の目的の特定の核酸の種類は野生型にしても変異体にしても当技術分野において知られている方法により特定される。

【０１０７】

本発明は、（ｉ）対象の診断支援、（ｉｉ）対象における疾患又は他の健康状態の進行又は再発のモニタリング、又は（ｉｉｉ）疾患又は他の健康状態の治療を受けている、又は考えている対象への治療効力の評価の支援のための高品質の核酸の抽出のために生体試料から微細小胞を単離する新規の方法の様々な使用法も含み、その方法から得られた核酸抽出法の中に１つ以上のバイオマーカーの存在又は不在を判定し、それらの１つ以上のバイオマーカーがそれぞれ疾患又は他の健康状態の診断、進行又は再発、又は治療効力と関連する。

【０１０８】

生体試料からの微細小胞の単離用のキット

本発明の１つの態様は本明細書において開示される方法において使用するためのキットにさらに関する。そのキットは微細小胞を生体試料から同じくその生体試料中に存在する望まれない粒子、小片、及び小分子と分けるのに充分である捕捉面器具を備える。本発明は所望により単離と後続の任意の核酸抽出処理における前記の試薬を使用するための指示書も含む。

【実施例】

【０１０９】
本明細書において提供される実施例は遠心分離及び／又は濾過の目的のために使用される様々な膜及び器具を使用するが、微細小胞の効率的な捕捉とそれらに含まれる核酸、特に、ＲＮＡの解離を可能にするあらゆる捕捉面及び／又は収納器具と共にこれらの方法が使用され得ることが理解されるべきである。
【０１１０】
実施例１：吸引フォーマットの０．６５ｕｍ正帯電Ｑ　ＰＥＳフィルターを使用して血漿微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。
正常対照血漿をＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。血液をＫ２　ＥＤＴＡチューブに採取し、完全に転倒させてよく混合した。それらのチューブを１３００×ｇで１０分間遠心分離にかけて血液細胞と血漿を分離した。その後、その血漿を０．８μｍ混合セルロースエステルフィルター（ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）により濾過して細胞小片と血小板を除去し、１ｍＬのアリコットに分割した。必要とされるまでアリコットを－８０℃で凍結した。
【０１１１】
超遠心分離又はＦａｓｔ　Ｔｒａｐアデノウイルス精製及び濃縮キット（ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。
【０１１２】
超遠心分離法において、８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットを移し、室温で５分間保温した。保温の後にその血漿を１ｍＬのＰＢＳ（１０ｍＭのリン酸ナトリウム、２ｍＭのリン酸カリウム、２．７ｍＭのＫＣｌ、１３７ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に希釈した。１２０，０００ｇ、８℃で８０分間の超遠心分離により微細小胞を沈殿させた。その微細小胞ペレットを４２μＬのＰＢＳと８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓの中で洗浄し、室温で２０分間保温した。その微細小胞ペレットを７００ｕｌのＱｉａｚｏｌ試薬（Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、カリフォルニア州、米国）の中で溶解した。
【０１１３】
０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールし、５ｍＬのＰＢＳで希釈し、そして１ｍＬの１０×結合緩衝液（ミリポア）と混合した。血漿試料を適用する前に吸引により２５ｍＬの平衡化緩衝液（ミリポア）を通過させてフィルターを調整した。その後、吸引によりそのフィルターに血漿試料を通過させた。さらなる分析のために濾過液を貯留した。そのフィルターを吸引により２０ｍＬの洗浄緩衝液で洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。２．２５ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、そして約５滴のＱｉａｚｏｌを吸引により引いてそのフィルターを通過させて散布した。その後、そのフィルターを室温で５分間保温し、吸引による溶出を行った。
【０１１４】
８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む２本の５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に濾過液試料を移し、室温で５分間保温した。１２０，０００ｇ、８℃で８０分間の超遠心分離により微細小胞を沈殿させた。微細小胞ペレットを４２μＬのＰＢＳと８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓの中で洗浄し、室温で２０分間保温した。それらの微細小胞ペレットを７００ｕｌのＱｉａｚｏｌ試薬（Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、カリフォルニア州、米国）の中で溶解した。
【０１１５】
超遠心分離試料及び濾過（フィルター及び濾過液）試料について、製造業者の推奨に従

ってｍｉＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して微細小胞性ＲＮＡを単離した。ＲＮＡ６０００ピコチップを使用する２１００バイオアナライザー（アジレント、パロアルト、カリフォルニア州、米国）を用いてＲＮＡの品質と濃度について評価した（図１Ａ）。スーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）及びＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡ逆転写キット（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）を製造業者のプロトコルに従って使用してそれぞれ微細小胞性ＲＮＡの総体積の３分の２及び９分の２をｃＤＮＡに変換した。

【０１１６】

濾過（フィルター及び濾過液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用してｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨとＲＮａｓｅＰについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：１５画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＲＮ７ＳＬについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬフォワードＣＡＡＡＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＡＴＣＡ（配列番号１）、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬリバースＧＧＣＴＧＧＡＧＴＧＣＡＧＴＧＧＣＴＡＴ（配列番号２）、２５０ｎＭのＲＮ７ＳＬプローブＴＧＧＧＡＴＣＧＣＧＣＣＴＧＴ（配列番号３）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：１５画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａについて、２×ＴａｑｍａｎユニバーサルＰＣＲマスターミックス、２０×ＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡアッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡ逆転写キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は１サイクルの５０℃で２分、１サイクルの９５℃で１０分、４０サイクルの９５℃で１０分及び６０℃で１分からなった。図１Ｂを参照のこと。

【０１１７】

実施例２：ミリポアＦａｓｔ　Ｔｒａｐウイルス精製カラムを使用する黒色腫患者由来の血漿試料におけるＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ突然変異の検出

ＩＲＢによって承認されたプロトコルに従い、且つ、実施例１に記載されるようにルードヴィヒ・マクシミリアン大学から黒色腫血漿を得た。

【０１１８】

超遠心分離又はＦａｓｔ　Ｔｒａｐアデノウイルス精製及び濃縮キット（ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過を用いて２ｍＬ及び１２ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１１９】

超遠心分離法において、８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に２ｍＬと３本×４ｍＬの血漿を移し、室温で５分間保温した。保温の後にその２ｍＬと４ｍＬずつの血漿をそれぞれ３ｍＬと１ｍＬのＰＢＳの中に希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１２０】

０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過法において、２ｍＬと１２ｍＬの血漿をそれぞれ２．５ｍＬと１５ｍＬのＰＢＳで希釈し、それぞれ５００ｕｌ及び３ｍＬの１０×結合緩衝液（ミリポア）と混合した。血漿試料を適用する前に吸引により２５ｍ

Ｌの平衡化緩衝液（ミリポア）を通過させてフィルターを調整した。その後、吸引によりそのフィルターに血漿試料を通過させた。さらなる分析のために濾過液を貯留した。それらのフィルターを吸引により２０ｍＬの洗浄緩衝液で洗浄した。さらなる分析のために洗浄液を貯留した。実施例１に記載されるようにフィルターを溶解した。

【０１２１】

２ｍＬと１２ｍＬの血漿濾過液試料をそれぞれ１本と６本の５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に移した。洗浄液試料をそれぞれ４本の５ｍＬのポリアロマーチューブに移した。それらのポリアロマーチューブを８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤と共に室温で５分間保温した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１２２】

超遠心分離試料及び濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。

【０１２３】

超遠心分離試料及び濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１２Ａを参照のこと。スーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）を製造業者のプロトコルに従って使用して微細小胞性ＲＮＡの総体積の７分の６をｃＤＮＡに変換した。

【０１２４】

濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡのＢＲＡＦ突然変異を検出する能力を比較するため、野生型と突然変異型のＢＲＡＦ　ｍＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＢＲＡＦ突然変異アッセイはＡＲＭＳ（増幅屈折性変異システム）アレル特異的ＰＣＲを用いる。そのアッセイはアストラゼネカ（チェシャー、英国）より改作された。その突然変異アッセイはＢＲＡＦ　Ｔ１７９９Ａの増幅に特異的なプライマー（１７９８又は１８００の位置に存在する追加の突然変異に応じてＶ６００Ｅ、Ｖ６００Ｋ又はＶ６００Ｄを検出する）を含む。２×Ｔａｑｍａｎユニバーサル ＰＣＲマスターミックス、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＷＴフォワードＡＡＡＡＡＴＡＧＧＴＧＡＴＴＴＴＧＧＴＣＴＡＧＣＴＡＣＡＧＴ（配列番号４）、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＭＴ　ＡＲＭＳフォワードＡＡＡＡＡＴＡＧＧＴＧＡＴＴＴＴＧＧＴＣＴＡＧＣＴＡＣＡＴＡ（配列番号５）、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＪＳ　Ｅ１５リバースＴＧＧＡＴＣＣＡＧＡＣＡＡＣＴＧＴＴＣＡＡ（配列番号６）、２５０ｎＭのＢＲＡＦ　ＡＺ　Ｅ１５プローブＧＡＴＧＧＡＧＴＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＡＧ（配列番号７）及び前記ｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は１サイクルの５０℃で２分、１サイクルの９５℃で１０分、５０サイクルの９５℃で１０分及び６０℃で１分からなった。図２を参照のこと。

【０１２５】

実施例３：再生セルローススピンカラム

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１２６】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１２７】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０１２８】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１ｍＬのアリコットをプールし、４４４ｕｌの１０×負荷緩衝液（ザルトリウス）で希釈した。血漿試料を適用する前に５ｍＬの１×洗浄緩衝液

（ザルトリウス）を５００×ｇで５分間の回転により通すことによりフィルターを調整した。その後、５００×ｇで５分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。そのフィルターを５００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの洗浄緩衝液（ザルトリウス）で２回洗浄した。さらなる分析のために最初の洗浄液を貯留した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の回転により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして５００×ｇで５分間の回転により溶出を行った。

【０１２９】

濾過液試料と洗浄液試料をそれぞれ１本と４本の５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に移した。それらのポリアロマーチューブを８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤と共に室温で５分間保温した。洗浄ポリアロマーチューブを５００ｕｌのＰＢＳで希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１３０】

超遠心分離試料及び濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図３Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１３１】

濾過（フィルター、濾過液、及び洗浄液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図３Ｂを参照のこと。

【０１３２】

実施例４：スピンカラム（自家製カラム）内のＰａｌｌ社Ｍｕｓｔａｎｇ　Ｓ膜

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１３３】

超遠心分離又は自家製スピンカラム器具を使用するＭｕｓｔａｎｇ　Ｓ（Ｐａｌｌ、ポート・ワシントン、ニューヨーク州、米国）０．８ｕｍ負帯電Ｓポリエーテルスルホン遠心濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１３４】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０１３５】

０．８ｕｍ負帯電Ｓポリエーテルスルホン遠心濾過法において、スピンカラムのケース内に３層のカットフィルター層を配置し、バイトンＯリングで密封することによりスピンカラムを作製した。超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールし、２×負荷緩衝液（１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８）で希釈した。血漿試料を適用する前に５００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの平衡化緩衝液（５０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８）を通すことによりフィルターを調整した。その後、２００×ｇで２分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。そのフィルターを２００×ｇで２分間の回転により１８ｍＬの洗浄緩衝液（５０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８）で洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１分間の回転により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして１００×ｇで２分間、続いて２，０００×ｇで２分間の回転により溶出を行った。

【０１３６】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡ

を単離し、品質と濃度を評価した。図４Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１３７】

濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図４Ｂを参照のこと。

【０１３８】

実施例５：スピンカラム内のＰａｌｌ社Ｍｕｓｔａｎｇ膜Ｑ

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１３９】

超遠心分離又は自家製スピンカラム器具を使用する０．８ｕｍ　Ｍｕｓｔａｎｇ　Ｑ（Ｐａｌｌ）正帯電Ｑポリエーテルスルホン遠心濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１４０】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０１４１】

０．８ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン遠心濾過法において、実施例４に記載されるようにスピンカラムを作製した。超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールし、５ｍＬのＰＢＳで希釈し、１ｍＬの１０×負荷緩衝液（１Ｍのトリス、１ＭのＮａＣｌ、０．１ＭのＭａＣｌ$_2$、ｐＨ８）と混合した。血漿試料を適用する前に５００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの平衡化緩衝液（０．１Ｍのトリス、０．１ＭのＮａＣｌ、０．０１ＭのＭａＣｌ$_2$、ｐＨ８）を通すことによりフィルターを調整した。その後、２００×ｇで２分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。そのフィルターを２００×ｇで２分間の回転により１８ｍＬの洗浄緩衝液（０．１Ｍのトリス、０．２ＭのＮａＣｌ、０．０１ＭのＭｇＣｌ$_2$、ｐＨ８）で洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の回転により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして１００×ｇで２分間、続いて２，０００×ｇで２分間の回転により溶出を行った。

【０１４２】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図５Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１４３】

濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図５Ｂを参照のこと。

【０１４４】

実施例６：シリンジフィルター内のＰａｌｌ社Ｍｕｓｔａｎｇ膜Ｑ又はＳ

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１４５】

超遠心分離又はＭｕｓｔａｎｇ　Ｑ（Ｐａｌｌ）０．８ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホンシリンジ濾過又はＭｕｓｔａｎｇ　Ｓ（Ｐａｌｌ）０．８ｕｍ負帯電Ｓポリエーテルスルホンシリンジ濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１４６】
超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０１４７】
０．８ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホンシリンジ濾過法及び０．８ｕｍ負帯電Ｓポリエーテルスルホンシリンジ濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の２本の１ｍＬのアリコットをプールし、５ｍＬのＰＢＳで希釈し、１ｍＬの１０×負荷緩衝液（Ｑ：２００ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４；Ｓ：２００ｍＭのリン酸、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）と混合した。血漿試料を適用する前にシリンジにより２０ｍＬの適切な平衡化緩衝液（Ｑ：２０ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４；Ｓ：２０ｍＭのリン酸、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を通すことでフィルターを調整した。その後、シリンジによりその血漿試料をそれらのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。それらのフィルターをシリンジにより２０ｍＬの適切な洗浄緩衝液（Ｑ：２０ｍＭのトリス、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４；Ｓ：２０ｍＭのリン酸、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で洗浄した。その後、残留液をそれらのフィルターから除去し、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。７００ｕｌのＱｉａｚｏｌをそれらの膜に適用し、シリンジにより散布した。その後、それらのフィルターを室温で５分間保温し、そしてシリンジにより溶出した。
【０１４８】
濾過液試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０１４９】
超遠心分離試料及び濾過（フィルター及び濾過液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。
【０１５０】
濾過（フィルター及び濾過液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図６を参照のこと。
【０１５１】
実施例７：負帯電ナイロン（シリンジフィルター）
正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。
【０１５２】
超遠心分離又は５０ｎｍ負帯電ナイロンシリンジ濾過（Ｓｔｅｒｌｉｔｅｃｈ、ケント、ワシントン州、米国）を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。
【０１５３】
超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０１５４】
５０ｎｍ負帯電ナイロンシリンジ濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールした。シリンジによりその血漿試料をそのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。そのフィルターをシリンジにより２０ｍＬのＰＢＳで洗浄した。その後、シリンジにより残留液をそのフィルターから除去した。溶解のために７００ｕｌのＱｉａｚｏｌをそれらの膜に適用し、シリンジにより散布した。その後、そのフィルターを室温で２０秒間保温し、そしてシリンジにより溶出した。
【０１５５】
８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマ

ン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に濾過液を移し、室温で５分間保温した。保温の後にその濾過液を１ｍＬのＰＢＳで希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１５６】

超遠心分離試料及び濾過（フィルター及び濾過液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図７Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１５７】

濾過（フィルター及び濾過液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図７Ｂを参照のこと。

【０１５８】

実施例８：尿試料からの微細小胞性ＲＮＡの単離

正常対照尿を自社で獲得し、細胞小片を除去するために０．８μｍ混合セルロースエステルフィルター（ミリポア）により濾過した。その濾過された尿を必要とされるまで４℃で保存した。

【０１５９】

１００Ｋ遠心分離フィルターユニット濃縮（ミリポア）又はＦａｓｔ　Ｔｒａｐアデノウイルス精製及び濃縮キット（ミリポア）０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過を用いて１０ｍＬの尿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１６０】

１００Ｋ遠心分離フィルターユニット濃縮において、１０ｍＬの尿を１００Ｋ遠心分離フィルターユニットに移し、４，５００×ｇで５分間の回転により濃縮した。その後、その濃縮された微細小胞試料を７００ｕｌのＱｉａｚｏｌの中で溶解した。

【０１６１】

０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過法において、１００Ｋ遠心分離フィルターユニット濃縮に使用された同じ対象に由来する１０ｍＬの尿を８ｍＬのＰＢＳで希釈し、２ｍＬの１０×結合緩衝液（ミリポア）と混合した。そのフィルターを実施例１に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、洗浄し、そして溶解した。

【０１６２】

８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む４本の５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に濾過液試料を移し、室温で５分間保温した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１６３】

超遠心分離試料及び濾過（フィルター及び濾過液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図８Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１６４】

濾過（フィルター及び濾過液）及び１００Ｋ遠心分離フィルターユニット濃縮により単離された尿微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図８Ｂを参照のこと。

【０１６５】

実施例９：表面荷電（Ｓ阻害）

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１６６】
超遠心分離又は改変型３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過又は改変型３ｕｍ負帯電Ｓ再生セルロース遠心濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。
【０１６７】
超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０１６８】
３ｕｍ正帯電Ｑ再生遠心濾過法及び３ｕｍ負帯電Ｓ再生セルロース遠心濾過法において、２４フィルター層のうちの２１層を取り外すことによりスピンカラムをそれぞれ改変した。超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールした。
【０１６９】
超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。ｃＤＮＡ合成の前にＲＮＡを１：１０及び１：１００に希釈した。スーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）を製造業者のプロトコルに従って使用して微細小胞性ＲＮＡの総体積の５分の３、１：１０ＲＮＡ希釈物、及び１：１００ＲＮＡ希釈物をｃＤＮＡに変換した。
【０１７０】
ＲＮＡレベルでのＲＴ－ＰＣＲの阻害がどのようなものでも存在するか判定するため、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡの希釈物を比較した。ＧＡＰＤＨに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：１５画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は実施例１に記載される通りであった。図９を参照のこと。
【０１７１】
ＲＮＡレベルでのＲＴ－ＰＣＲのどんな阻害も存在しない場合には各１：１０希釈物は、超遠心分離及び３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース濾過において示されるように、３．３Ｃｔの増加を生じただろう。しかしながら、３ｕｍ負帯電Ｓ再生セルロース濾過については希釈により平均Ｃｔ値が減少し、ＲＮＡレベルでのＲＴ－ＰＣＲ阻害を示した。
【０１７２】
負荷前に血漿試料が５．５以下に設定されたｐＨであるときにフィルターが目詰まりする傾向が有り、血漿がカラムを通過しないことが観察された。
【０１７３】
実施例１０：微細小胞は酸性ｐＨ中で安定である。
正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。
【０１７４】
遠心分離を用いて１．９ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。ペレットを次の緩衝液中に二つ一組で再懸濁した：
・５０ｍＭのメチルマロン酸、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ２．５
・５０ｍＭのメチルマロン酸、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ３．５
・５０ｍＭの酢酸、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ４．５
・１０ｍＭのリン酸ナトリウム、２ｍＭのリン酸カリウム、２．７ｍＭのＫＣｌ、１３７ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４。
【０１７５】
具体的には１人の対象に由来する１６本の１ｍＬの血漿のアリコットをプールした。１．９ｍＬのプールした血漿を８本の２．０ｍＬのエッペンドルフチューブに移し、２１，１３０×ｇ、８℃で３０分間の回転により沈殿させた。微細小胞ペレットを１５０ｕｌの

適切な緩衝液に再懸濁し、室温で２０分間保温した。その後、その微細小胞ペレットを７００ｕｌのＱｉａｚｏｌ試薬（Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、カリフォルニア州、米国）の中で溶解した。

【０１７６】

実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１０Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１７７】

酸性ｐＨ中での血漿微細小胞の安定性を判定するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１０Ｂを参照のこと。

【０１７８】

実施例１１：微細小胞は塩基性ｐＨ中で安定ではない。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１７９】

塩基性ｐＨ中での血漿微細小胞の安定性を判定するため、微細小胞ペレットを次の緩衝液に再懸濁した：

・５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７

・５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８

・５０ｍＭのジエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ９

・５０ｍＭエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ１０。

【０１８０】

血漿微細小胞性ＲＮＡの単離と分析を実施例１０に記載されるように実施した。図１１Ａ及び１１Ｂを参照のこと。

【０１８１】

実施例１２：帯電膜上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性は緩衝液のｐＨ及び／又は緩衝液の濃度及び／又は緩衝液の種類によって影響を受ける。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１８２】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて４．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０１８３】

超遠心分離法において、５人の対象に由来する血漿の１ｍＬのアリコットをプールした。８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に４．８ｍＬのプールした血漿を移し、室温で５分間保温した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１８４】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な緩衝液の種類とｐＨを用いて平衡化緩衝液、負荷緩衝液、及び洗浄緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）、

・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）、又は

・１００ｍＭのジエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ９（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのジエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ９（平衡化及び洗浄緩衝

液）。
【０１８５】
まず、超遠心分離法において使用された同じ５人の対象に由来する血漿の３本の１ｍＬのアリコットをプールした。４．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、４．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。正確を期するためにそれぞれの希釈された血漿試料のｐＨを評価した。血漿試料を適用する前に５００×ｇで５分間の回転により５ｍＬの適切な平衡化緩衝液を通すことによりフィルターを調整した。その後、５００×ｇで５分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。そのフィルターを５００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの適切な洗浄緩衝液で２回洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の遠心分離により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして５００×ｇで５分間の回転により溶出を行った。
【０１８６】
濾過液試料をそれぞれ実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０１８７】
超遠心分離試料及び濾過（フィルター及び濾過液）試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１２Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。
【０１８８】
微細小胞性ＲＮＡの濾過に好ましいｐＨを決定し、且つ、濾過（フィルター及び濾過液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。
【０１８９】
図１２Ｂに示されるように、ｐＨ及び／又は緩衝液の種類はＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｌｅｔ－７ａ、及びｍｉＲ－１５０に関して有意な効果を濾過試料に対して有する。１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）の緩衝液セットがフィルター試料にとって好ましい。ｐＨ及び／又は緩衝液の種類はｍｉＲ－１６に関して有意な効果を濾過試料に対して有しない。さらに、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、及びＲＮａｓｅＰのＲＮＡのレベルはフィルター試料と超遠心分離試料に関して同様である。平均Ｃｔ値は好ましいフィルター試料と比較して超遠心分離試料ではｌｅｔ－７ａについて０．９Ｃｔ低く、ｍｉＲ－１５０について０．７Ｃｔ高かった。平均Ｃｔ値は好ましいフィルター試料と比較して超遠心分離試料ではｍｉＲ－１６について２．３Ｃｔ低かった。このことは微細小胞内のマイクロＲＮＡのパッケージングの差異に起因する可能性が非常に高い。幾つかのマイクロＲＮＡが血漿中のリボ核タンパク質複合体内に見つかっており、正帯電濾過によって必ずしも捕捉されないのだろう。
【０１９０】
実施例１３：帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性は緩衝液のｐＨ及び／又は緩衝液の濃度及び／又は緩衝液の種類によって影響を受ける。
正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。
【０１９１】
超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて３．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。
【０１９２】
超遠心分離法において、４人の対象に由来する血漿の１ｍＬのアリコットをプールした

。８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に３．８ｍＬのプールした血漿を移し、室温で５分間保温した。保温の後にその血漿を１．２ｍＬのＰＢＳに希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０１９３】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な緩衝液の種類とｐＨを用いて平衡化緩衝液、負荷緩衝液、及び洗浄緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのトリエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリエタノールアミン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．０（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８．５（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ８．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０１９４】

まず、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の８本の１ｍＬのアリコットをプールした。３．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、３．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。正確を期するためにそれぞれの希釈された血漿試料のｐＨを評価した。血漿試料を適用する前に５００×ｇで５分間の回転により５ｍＬの適切な平衡化緩衝液を通すことによりフィルターを調整した。その後、５００×ｇで５分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。そのフィルターを５００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの適切な洗浄緩衝液で２回洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の遠心分離により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして５００×ｇで５分間の回転により溶出を行った。

【０１９５】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１３Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０１９６】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましいｐＨと緩衝液の種類を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライ

マーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１３Ｂを参照のこと。

【０１９７】

次の緩衝液セットが好ましい：１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；及び１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０１９８】

実施例１４：帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び／又は微細小胞の安定性は緩衝液のｐＨ及び緩衝液の濃度によって影響を受ける。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０１９９】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて３．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２００】

超遠心分離試料を実施例１３に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２０１】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な緩衝液の種類とｐＨを用いて平衡化緩衝液、負荷緩衝液、及び洗浄緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：

・１１７ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ１．９（２×負荷緩衝液）と５８．５ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（平衡化及び洗浄緩衝液）
・１１７ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．１（２×負荷緩衝液）と５８．５ｍＭのビストリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）
・２００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（２×負荷緩衝液）と１００ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０２０２】

まず、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の６本の１ｍＬのアリコットをプールした。３．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、３．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。正確を期するためにそれぞれの希釈された血漿試料のｐＨを評価した。それらのフィルターを実施例１３に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、洗浄し、そして溶解した。

【０２０３】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１４Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２０４】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましいｐＨと緩衝液の種類を決定し、且つ、濾過及

び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１４Ｂを参照のこと。

【０２０５】

次の緩衝液セットが好ましい：１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）；及び１００ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．８（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０２０６】

実施例１５：帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性は緩衝液の濃度によって影響を受ける。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２０７】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて３．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２０８】

超遠心分離試料を実施例１３に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２０９】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な緩衝液濃度を用いて平衡化緩衝液、負荷緩衝液、及び洗浄緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：

・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・５００ｍＭのビストリスプロパン、９００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．４（２×負荷緩衝液）と２５０ｍＭのビストリスプロパン、４５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０２１０】

まず、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の２本の１ｍＬのアリコットをプールした。３．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、３．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。正確を期するためにそれぞれの希釈された血漿試料のｐＨを評価した。それらのフィルターを実施例１３に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、洗浄し、そして溶解した。

【０２１１】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１５Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２１２】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましい緩衝液濃度を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１５Ｂを参照のこと。

【０２１３】

実施例１６：微細小胞は安定であり、総ＲＮＡの収量は低濃度から高濃度の塩によって影響を受けない。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た

。
【０２１４】
ＮａＣｌ中での血漿微細小胞の安定性を判定するため、微細小胞ペレットを次のＮａＣｌ濃度を有する５０ｍＭのビストリスプロパン、ｐＨ６．５の緩衝液の中に二つ一組で再懸濁した：
・０．１５ＭのＮａＣｌ
・０．３ＭのＮａＣｌ
・０．６ＭのＮａＣｌ
・１．２ＭのＮａＣｌ
・２．４ＭのＮａＣｌ。
【０２１５】
具体的には１人の対象に由来する血漿の２０本の１ｍＬのアリコットをプールし、１．９ｍＬのプールした血漿を１０本の２．０ｍＬのエッペンドルフチューブに移した。血漿微細小胞を実施例１０に記載されるように沈殿させ、再懸濁し、そして溶解した。
【０２１６】
実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１６Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。
【０２１７】
様々な塩濃度における血漿微細小胞の安定性を判定するため、ＧＡＰＤＨ、ＨＰＲＴ１、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用してｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨ、ＲＮａｓｅＰ、及びＨＰＲＴ１について、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＲＮ７ＳＬについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬフォワードＣＡＡＡＡＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＡＴＣＡ（配列番号１）、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬリバースＧＧＣＴＧＧＡＧＴＧＣＡＧＴＧＧＣＴＡＴ（配列番号２）、２５０ｎＭのＲＮ７ＳＬプローブＴＧＧＧＡＴＣＧＣＧＣＣＴＧＴ（配列番号３）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ｍｉＲ－１６及びｌｅｔ－７ａについて、２×ＴａｑｍａｎユニバーサルＰＣＲマスターミックス、２０×ＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡアッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡ逆転写キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は実施例１に記載されるように実施された。図１６Ｂを参照のこと。
【０２１８】
実施例１７：帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性は負荷緩衝液の塩濃度によって影響を受けない。
正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。
【０２１９】
超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて３．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。
【０２２０】
超遠心分離試料を実施例１３に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。
【０２２１】
３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な塩濃度を用いて平衡化緩衝

液と負荷緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：
・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、１．０５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．６ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、２．２５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１．２ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）
・１００ｍＭのビストリスプロパン、４．６５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、２．４ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化緩衝液）。

【０２２２】
まず、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の４本の１ｍＬのアリコットをプールした。３．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、３．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。血漿試料を適用する前に１００×ｇで５分間の回転により５ｍＬの適切な平衡化緩衝液を通すことによりフィルターを調整した。その後、１００×ｇで５分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。洗浄しないで微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の遠心分離により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして２００×ｇで２分間、続いて５０００×ｇで２分間の回転により溶出を行った。

【０２２３】
８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む２本の５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に３．８ｍＬの血漿濾過液試料をそれぞれ移し、室温で５分間保温した。保温の後に各濾過液アリコットを１．２ｍＬのＰＢＳに希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０２２４】
超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１７Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２２５】
前記濾過方法において血漿試料を負荷するために好ましい塩濃度を決定し、且つ、濾過（フィルター及び濾過液）及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＨＰＲＴ１、ＲＮ７ＳＬ、ＢＲＡＦ、ｍｉＲ－１６、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用してｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨ及びＨＰＲＴ１について、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＲＮ７ＳＬについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬフォワードＣＡＡＡＡＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＡＴＣＡ（配列番号１）、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬリバースＧＧＣＴＧＧＡＧＴＧＣＡＧＴＧＧＣＴＡＴ（配列番号２）、２５０ｎＭのＲＮ７ＳＬプローブＴＧＧＧＡＴＣＧＣＧＣＣＴＧＴ（配列番号３）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応

を実施した。ＢＲＡＦについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＷＴフォワードＡＡＡＡＡＴＡＧＧＴＧＡＴＴＴＴＧＧＴＣＴＡＧＣＴＡＣＡＧＴ（配列番号４）、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＪＳ　Ｅ１５リバースＴＧＧＡＴＣＣＡＧＡＣＡＡＣＴＧＴＴＣＡＡ（配列番号６）、２５０ｎＭのＢＲＡＦ　ＡＺ　Ｅ１５プローブＧＡＴＧＧＡＧＴＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＡＧ（配列番号７）、及びスーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ｍｉＲ－１６及びｌｅｔ－７ａについて、２×ＴａｑｍａｎユニバーサルＰＣＲマスターミックス、２０×ＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡアッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びＴａｑｍａｎマイクロＲＮＡ逆転写キットにより逆転写されたｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は実施例１に記載されるように実施された。図１７Ｂを参照のこと。

【０２２６】

実施例１８：帯電フィルター上での微細小胞の捕捉及び微細小胞の安定性は負荷緩衝液又は洗浄緩衝液の塩濃度によって影響を受けない。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２２７】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて３．８ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２２８】

超遠心分離試料を実施例１３に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２２９】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過法において、様々な塩濃度を用いて平衡化緩衝液と負荷緩衝液を試験した。次の緩衝液セットを使用した：

・１００ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．１５ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、１．０５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、０．６ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、２．２５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、１．２ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）

・１００ｍＭのビストリスプロパン、４．６５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６（２×負荷緩衝液）と５０ｍＭのビストリスプロパン、２．４ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．５（平衡化及び洗浄緩衝液）。

【０２３０】

まず、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の４本の１ｍＬのアリコットをプールした。３．８ｍＬのプールした血漿を各緩衝液セットについて別々の５０ｍＬのコニカルチューブに分け、３．８ｍＬの適切な２×負荷緩衝液と混合した。血漿試料を適用する前に１００×ｇで５分間の回転により５ｍＬの適切な平衡化緩衝液を通すことによりフィルターを調整した。その後、１００×ｇで５分間の回転によりその血漿試料をそのフィルターに通した。さらなる分析のために濾過液を貯留した。そのフィルターを１００×ｇで５分間の回転により１８ｍＬの適切な洗浄緩衝液で洗浄した。その後、微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の遠心分離により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして２００×ｇで２分間、続いて５０００×ｇで２分間の回転により溶出を行った。

【０２３１】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図１８Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２３２】

前記濾過方法において血漿試料を洗浄するために好ましい塩濃度を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＨＰＲＴ１、ＢＲＡＦ、ｍｉＲ－１６、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１７に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１８Ｂを参照のこと。

【０２３３】

実施例１９：ＲＮＡ溶解緩衝液は帯電フィルターを使用して単離された微細小胞からのＲＮＡ収量に影響する。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２３４】

超遠心分離又はＦａｓｔ　Ｔｒａｐアデノウイルス精製及び濃縮キット（ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過法において、Ｑｉａｚｏｌ（Ｑｉａｇｅｎ）又はＰｒｏｍｅｇａ溶解試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）のどちらかを用いて微細小胞性ＲＮＡを溶解した。

【０２３５】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２３６】

Ｑｉａｚｏｌ（Ｑｉａｇｅｎ）で溶解される０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過用に４ｍＬの血漿を調製し、そのフィルターを実施例１に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、洗浄し、そして溶解した。

【０２３７】

超遠心分離試料及びＱｉａｚｏｌで溶解される０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離した。

【０２３８】

Ｐｒｏｍｅｇａ溶解試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解される０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールし、４ｍＬの２×負荷緩衝液（２０ｍＭのトリス、ｐＨ７）と混合した。血漿試料を適用する前に吸引により２５ｍＬの平衡化緩衝液（ミリポア）を通過させてフィルターを調整した。その後、吸引によりそのフィルターに血漿試料を通過させた。そのフィルターを吸引により２０ｍＬの洗浄緩衝液（１０ｍＭのトリス、ｐＨ７）で洗浄した。その後、微細小胞をＰｒｏｍｅｇａ溶解試薬で溶解した。２．２５ｍＬのＰｒｏｍｅｇａ溶解試薬をその膜に適用し、そして約５滴のＰｒｏｍｅｇａ溶解試薬を吸引により引いてそのフィルターを通過させて散布した。その後、そのフィルターを室温で５分間保温し、吸引による溶出を行った。微細小胞性ＲＮＡを単離するため、０．２７倍の体積の１００％イソプロパノールを溶解液に添加し、ピペットにより混合し、スピンカラムに移し、そしてその溶解液の全てが適用されるまで１３，０００×ｇで３０秒間遠心分離した。その後、そのカラムを１３，０００×ｇで３０秒間の回転により５００ｕｌのＲＮＡ洗浄溶液（Ｐｒｏｍｅｇａ）で２回洗浄した。最後の３００ｕｌのＲＮＡ洗浄溶液をそのカラムに１３，０００×ｇで２分間の回転により適用した。膜を乾燥するため、そのカラムを１３，０００×ｇで２分間の遠心分離にかけた。ＲＮＡを２０ｕｌのH_2Oで１．５ｍＬのエッペンドルフチューブに溶出し、室温で１分間保温し、そして１０，０００×ｇで１分間遠心分離した。

【０２３９】

全ての微細小胞性ＲＮＡ試料について、実施例１に記載されるように品質と濃度を評価

した。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２４０】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましい溶解緩衝液を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図１９を参照のこと。

【０２４１】

実施例２０：帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌはＲＮＡ収量を有意に改善しない。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２４２】

超遠心分離又はＦａｓｔ　Ｔｒａｐアデノウイルス精製及び濃縮キット（ミリポア、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２４３】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２４４】

０．６５ｕｍ正帯電Ｑポリエーテルスルホン吸引濾過用に４ｍＬの血漿を調製し、そのフィルターを実施例１に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、そして洗浄した。フィルター微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。２．２５ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、そして約５滴のＱｉａｚｏｌを吸引により引いてそのフィルターを通過させて散布した。その後、そのフィルターを室温で５分間保温し、吸引による溶出を行った。追加の２．２５ｍＬのＱｉａｚｏｌを使用して溶解を繰り返した。微細小胞性ＲＮＡ用にそれら２つの溶解液を別々に単離した。

【０２４５】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図２０Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２４６】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましく、且つ、必要な溶解緩衝液の体積数を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図２０Ｂを参照のこと。

【０２４７】

実施例２１：帯電フィルター上で微細小胞を単離するときに２つ目の体積のＱｉａｚｏｌはＲＮＡ収量を有意に改善しない。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２４８】

超遠心分離又は３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２４９】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２５０】

３ｕｍ正帯電Ｑ再生セルロース遠心濾過用に４ｍＬの血漿を調製し、そのフィルターを実施例１に記載されるように平衡化し、血漿試料を負荷し、そして洗浄した。フィルター

微細小胞をＱｉａｚｏｌで溶解した。１ｍＬのＱｉａｚｏｌをその膜に適用し、１００×ｇで１秒間の回転により散布した。その後、そのフィルターを室温で１０分間保温し、そして５００×ｇで５分間の回転により溶出を行った。追加の１ｍＬのＱｉａｚｏｌを使用して溶解を繰り返した。微細小胞性ＲＮＡ用にそれら２つの溶解液を別々に単離した。

【０２５１】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図２１Ａを参照のこと。実施例１に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２５２】

微細小胞性ＲＮＡの濾過にとって好ましく、且つ、必要な溶解緩衝液の体積数を決定し、且つ、濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、及びｌｅｔ－７ａに特異的なプライマーとプローブを使用して実施例１に記載されるようにｍＲＮＡと（マイクロＲＮＡを含む）ノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。図２１Ｂを参照のこと。

【０２５３】

実施例２２：微細小胞性ＲＮＡは２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用して単離され得る。

実施例１に記載されるように正常対照血漿を自社で獲得した。

【０２５４】

超遠心分離又はＥｘｏＭｉｒキット（Ｂｉｏｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、オースチン、テキサス州、米国）２０ｎｍ中性ポリエーテルスルホンシリンジ濾過を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２５５】

超遠心分離法において、８μＬのＲＮａｓｉｎ　Ｐｌｕｓ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ社、マジソン、ウィスコンシン州、米国）ＲＮａｓｅ阻害剤を含む５ｍＬのポリアロマーチューブ（ベックマン・コールター社、マイアミ、フロリダ州、米国）に同じ対象に由来する４ｍＬの血漿を移し、室温で５分間保温した。保温の後にその血漿を１ｍＬのＰＢＳで希釈した。実施例１に記載されるように微細小胞を沈殿させ、溶解した。

【０２５６】

２０ｎｍ中性ポリエーテルスルホンシリンジ濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ対象に由来する４ｍＬを２００ｕｌのプロテアーゼＫ（６００ｍＡＵ／ｍｌ超、Ｑｉａｇｅｎ）で１５分間にわたって室温で処理した。保温の後にその血漿をシリンジによりフィルタースタック（０．８ｕｍの中性混合セルロースエステルフィルター（ミリポア）＋２０ｎｍの中性ポリエーテルスルホンフィルター（Ｂｉｏｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））に通した。そのフィルタースタックをシリンジにより２０ｍＬのＰＢＳで洗浄した。その後、０．８ｕｍの中性混合セルロースエステルフィルターを廃棄し、残留液をシリンジにより２０ｎｍの中性ポリエーテルスルホンフィルターだけから除去した。溶解のために７００ｕｌのＱｉａｚｏｌをそのフィルターに適用し、シリンジにより散布した。その後、そのフィルターを室温で２０秒間保温し、そしてシリンジにより溶出した。

【０２５７】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図２２Ａを参照のこと。スーパースクリプトＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）を製造業者のプロトコルに従って使用して微細小胞性ＲＮＡの総体積の７分の６をｃＤＮＡに変換した。

【０２５８】

濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、１８Ｓ、ＢＲＡＦ、ＨＥＲＶ　Ｋ、及びＰＯに特異的なプライマーとプローブを使用してｍＲＮＡとノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＧＡ

ＰＤＨ、１８Ｓ、及びＰＯについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＲＮ７ＳＬについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬフォワードＣＡＡＡＡＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＡＴＣＡ（配列番号１）、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬリバースＧＧＣＴＧＧＡＧＴＧＣＡＧＴＧＧＣＴＡＴ（配列番号２）、２５０ｎＭのＲＮ７ＳＬプローブＴＧＧＧＡＴＣＧＣＧＣＣＴＧＴ（配列番号３）、及びｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＢＲＡＦについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＷＴフォワードＡＡＡＡＡＴＡＧＧＴＧＡＴＴＴＴＧＧＴＣＴＡＧＣＴＡＣＡＧＴ（配列番号４）、９００ｎＭのＢＲＡＦ　ＪＳ　Ｅ１５リバースＴＧＧＡＴＣＣＡＧＡＣＡＡＣＴＧＴＴＣＡＡ（配列番号６）、２５０ｎＭのＢＲＡＦ　ＡＺ　Ｅ１５プローブＧＡＴＧＧＡＧＴＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＡＧ（配列番号７）、及びｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＨＥＲＶ　Ｋについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＨＥＲＶ　ＫフォワードＡＣＣＣＡＡＣＡＧＣＴＣＣＧＡＡＧＡＧＡ（配列番号８）、９００ｎＭのＨＥＲＶ　ＫリバースＣＣＣＣＡＣＡＴＴＴＣＣＣＣＣＴＴＴ（配列番号９）、ＨＥＲＶ　ＫプローブＣＧＡＣＣＡＴＣＧＡＧＡＡＣＡＧ（配列番号１０）、及びｃＤＮＡの１：２０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は実施例１に記載される通りであった。図２２Ｂを参照のこと。

【０２５９】

実施例２３：微細小胞性ＲＮＡは２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用して単離され得る。

正常対照血漿を実施例１に記載されるようにＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ社から得た。

【０２６０】

超遠心分離又は２０ｎｍ中性ポリエーテルスルホンシリンジ濾過（Ｔｉｓｃｈ、ノース・ベンド、オハイオ州、米国）を用いて４ｍＬの血漿の微細小胞性ＲＮＡの単離を実施した。

【０２６１】

超遠心分離試料を実施例１に記載されるように調製し、沈殿させ、そして溶解した。

【０２６２】

２０ｎｍ中性ポリエーテルスルホンシリンジ濾過法において、超遠心分離法において使用された同じ４人の対象に由来する血漿の１本の１ｍＬのアリコットをプールし、シリンジによりフィルターに通した。そのフィルターをシリンジにより２０ｍＬのＰＢＳで洗浄した。その後、シリンジにより残留液を除去した。溶解のために７００ｕｌのＱｉａｚｏｌをそのフィルターに適用し、シリンジにより散布した。その後、そのフィルターを室温で２０秒間保温し、そしてシリンジにより溶出した。

【０２６３】

超遠心分離試料及び濾過試料について、実施例１に記載されるように微細小胞性ＲＮＡを単離し、品質と濃度を評価した。図２３Ａを参照のこと。実施例２２に記載されるようにｃＤＮＡを合成した。

【０２６４】

濾過及び超遠心分離により単離された微細小胞性ＲＮＡを比較するため、ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、及びＲＮａｓｅＰに特異的なプライマーとプローブを使用してｍＲＮＡとノンコーディングＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨとＲＮａｓｅＰについて、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、２０×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現アッセイ（アプライドバイオシステムズ、フォスターシティー、カリフォルニア州、米国）、及びｃＤＮＡの１：１０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。ＲＮ７ＳＬについ

て、２×Ｔａｑｍａｎ遺伝子発現マスターミックス、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬフォワード（配列番号１）、９００ｎＭのＲＮ７ＳＬリバース（配列番号２）、２５０ｎＭのＲＮ７ＳＬプローブ（配列番号３）、及びｃＤＮＡの１：１０画分を含む２０ｕｌの体積で増幅反応を実施した。増幅条件は実施例１に記載される通りであった。図２３Ｂを参照のこと。

【０２６５】

実施例２４：２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター（Ｔｉｓｃｈ）を使用する微細小胞性ｍｉＲＮＡの単離

２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター（Ｔｉｓｃｈ）を使用して微細小胞性ｍｉＲＮＡを単離することができる。図２４を参照のこと。

【０２６６】

実施例２５：微細小胞の捕捉に対するＲＮＡの効果

微細小胞の捕捉はＲＮＡ依存的である。幾つかのＲＮＡは他のものと比較して（ＧＡＰＤＨ対ｍｉＲ－４５１）より効率的にフィルター上に捕捉される。これは、ＲＮＡがタンパク質及び／又は微細小胞によって保護されているかどうか、及び微細小胞のサイズに左右され得る。図２５を参照のこと。

【０２６７】

実施例２６：中性フィルターを使用する微細小胞性ＲＮＡの単離

３０ｎｍと５０ｎｍのＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用して微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。図２６を参照のこと。

【０２６８】

スピンカラムフォーマットの０．２ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用して微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。図２７を参照のこと。

【０２６９】

０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルターを使用して微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。図２８を参照のこと。

【０２７０】

スピンカラムフォーマットの０．８ｕｍ　ＰＥＳ中性フィルター（Ｐａｌｌ）を使用して微細小胞性ＲＮＡを単離することができる。図２９を参照のこと。

【０２７１】

中性ＰＥＳフィルター上で微細小胞を単離するときに微細小胞性ＲＮＡの収量は溶解緩衝液の種類によって影響を受ける。図３０を参照のこと。

【０２７２】

Ｑｉａｚｏｌを使用する追加の溶出は２０ｎｍ　ＰＥＳ中性シリンジフィルター上での微細小胞性ＲＮＡの単離においてＲＮＡ収量をあまり改善しない。図３１を参照のこと。

【０２７３】

中性フィルター上で微細小胞を単離するときに洗浄ステップが微細小胞の安定性及び／又は微細小胞性ＲＮＡの収量に影響する。図３２を参照のこと。

【０２７４】

ＲＮＡがシリンジフォーマットの２０ｎｍ　ＰＥＳフィルターに詰まり、容易に溶離できない。大きなＲＮＡ（例えば、ＧＡＰＤＨ）ほど小さなＲＮＡ（ｌｅｔ－７ａ）よりも溶離しにくい。図３３を参照のこと。

【０２７５】

実施例２７：ビーズを使用する微細小胞性ＲＮＡの単離

本明細書において提供される試験によって、微細小胞性ＲＮＡの単離のために帯電ビーズ又は中性（磁気）ビーズを使用することの実用可能性が示されている。これらの試験は、電荷又は官能基、結合緩衝液及び洗浄緩衝液、ビーズ負荷量／濃度、及び／又は保温時間の多種多様な条件の下でビーズを使用する親和性捕捉を実証している。ビーズを使用する微細小胞単離とＲＮＡ抽出の概略的フローチャートが図３４に示されている。

【０２７６】

様々な種類の磁気ビーズのスクリーニング：次の４種類の磁気ビーズを本明細書に記載される試験において評価した。

【０２７７】

【表１】

スフェロテック・ビーズの名称	寸法	カタログ番号	重量/体積	本試験において使用された量
ジメチルアミノ磁気粒子	3.6um	DM-30-10	2.5%	5 mg ($1x10^8$ ビーズ)
ジェファミン磁気粒子	3.39um	JAM-30-10	2.5%	5 mg ($1x10^8$ ビーズ)
アミノ架橋磁気粒子	1～2um	AMX-10-10	2.5%	1.5 mg ($1x10^9$ ビーズ)
カルボキシル磁気粒子、架橋型	1.22um	CMX-10-10	2.5%	1.5 mg ($1x10^9$ ビーズ)

【０２７８】

これらの種類のビーズのそれぞれを使用して得られる微細小胞の単離と回収が図３５及び３６に示されている。アミン（ＪＡＭ）官能化ビーズとカルボキシル（ＣＭＸ）官能化ビーズの両方がＲＴ－ｑＰＣＲで評価されると大半の標的で同様に微細小胞を捕捉することが結果より示された。

【０２７９】

第四級アミンビーズを使用する微細小胞性ＲＮＡの単離：次の正に帯電しているアミンが第一級アミン又は第二級アミンよりも効率的に微細小胞を捕捉し得ることを予期してエポキシビーズをイミダゾールで処理してイミダゾリウムカチオンを生成するか、又はＴＥＡで処理して正に帯電している第四級アミンを生成する。本試験において使用された方法の概略が図３７に提示されている。次の種類のアミン磁気ビーズを評価した。

【０２８０】

【表２】

ビーズ（スフェロテック）の名称	カタログ番号	寸法	推定ビーズ数/mL	総ビーズ数
エポキシビーズ（自社でイミダゾール処理）	EPM-05	0.5um	$8.5x10^{10}$	$3.8x10^9$
エポキシビーズ（自社でＴＥＡ処理）	EPM-05	0.5um	$8.5x10^{10}$	$3.8x10^9$

【０２８１】

ＲＴ－ｑＰＣＲを用いて微細小胞の捕捉を評価した。簡単に説明すると、次のステップを実施した：Ｑｉａｚｏｌｅ法による捕捉された微細小胞の溶解と総ＲＮＡの抽出；Ｑｉａｇｅｎ　ｍｉＲＮｅａｓｙキット／ＭｉｎＥｌｕｔｅカラム（２０ｕＬ）を使用する総ＲＮＡの精製；バイオアナライザー（１ｕＬ）でのＲＮＡプロファイルの検査；ＶＩＬＯＲＴキット（１２ｕＬ）とマイクロＲＴキット（４ｕＬ）を使用するＲＴ反応；２ｕＬのｃＤＮＡを使用する次の標的に対するリアルタイムＰＣＲ：ＶＩＬＯ産物（ＧＡＰＤＨ（新しいアッセイキット）、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、Ｂ２Ｍ、ＧＵＳＢ、ＨＰＲＴ１）及びマイクロＲＴ産物（ｍｉＲ１６、ｍｉＲ１５０、Ｌｅｔ－７ａ）。選択されたｍＲＮＡ標的を使用して検査された微細小胞単離の結果が図３８に示されており、単離された微細小胞からの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率が図３９に示されている。選択されたマイクロＲＮＡ標的を使用して検査された微細小胞単離の結果が図４０に示されており、単

離された微細小胞からの選択されたマイクロＲＮＡ標的の回収率が図４１に示されている。

【０２８２】

再現性試験：ＴＥＡ処理ビーズを使用する微細小胞単離の再現性が本明細書に記載される試験において評価された。簡単に説明すると、ＴＥＡビーズ、０．４ｍＬの血漿プールＢＨ１１、ｑｉａｚｏｌｅ溶解及び総ＲＮＡ抽出（ｍｉＲＮｅａｓｙキット）を用いて三回一組の微細小胞単離を実施した。結果の概要が下の表に示されている。

【０２８３】

【表３】

データの概要：ＴＥＡビーズを使用する三回一組の微細小胞単離

	平均Ｃｔ値			変動係数（％ＣＶ）		
	ＵＣ対照	ＴＥＡビーズ	上清	ＵＣ対照	ＴＥＡビーズ	上清
RN7SL	18.39	19.08	18.90	0.21	0.41	1.62
GAPDH	29.20	30.23	29.76	0.73	0.21	1.78
RNaseP	27.51	27.56	28.52	0.98	1.30	2.80
B2M	23.80	24.65	27.70	2.79	9.05	17.57
GUSB	36.11	38.37	36.00	2.62	0.26	1.41
HPRT	34.26	36.95	34.28	0.81	0.35	3.09
miR16	23.27	21.63	24.00	2.80	2.82	3.72
miR150	26.75	29.62	27.22	1.40	0.86	1.78
let-7a	30.23	29.89	32.10	3.83	1.84	3.40

【０２８４】

ＴＥＡビーズは微細小胞単離においてイミダゾールビーズよりも１倍から２倍好適であるように見えることが予備試験結果により示された。上清とビーズ抽出との間での微細小胞性ＲＮＡの分布の遺伝子依存的パターンがＲＴ－ｑＰＣＲの結果により示された。

・ＧＡＰＤＨとＲＮ７ＳＬ：１：１の分布に近い
・ＲＮａｓｅＰ：上清よりもビーズにおいて２．１～２．８倍多い
・Ｂ２Ｍ：上清よりもビーズにおいて６．６～７．３倍多い
・ｍｉＲ１６：上清よりもビーズにおいて３．３～６．５倍多い
・Ｌｅｔ－７ａ：上清よりもビーズにおいて４．６～７．１倍多い
・ＧＵＳＢ：ビーズよりも上清において２～３倍多い
・ＨＰＲＴ１：ビーズよりも上清において３倍多い
・ｍｉＲ１５０：ビーズよりも上清において３～４倍多い

【０２８５】

理論に束縛されるものではないが、そのデータは電荷、極性等のような様々な面（膜）特性を担持する複数のクラスの微細小胞が存在する可能性があることを示唆している。それぞれの種類の微細小胞はその膜特性に加えて様々なＲＮＡ発現パターンも同様に担持し得る。

【０２８６】

他のビーズを使用する微細小胞単離の確認：他の第四級アミン又はスルホネート官能化非磁気イオン交換ビーズを使用する微細小胞単離を確認するように本明細書に記載される試験をデザインした。次のビーズを評価した：商業生産された（ハミルトン）第四級アミン（陽イオン）樹脂のＰＲＰ－Ｘ４００及びスルホネート（陰イオン交換）樹脂のＲＣＸ３０。各ビーズ種の特性が下の表に要約されている。

【０２８７】

【表４】

試験した陽イオン交換樹脂

製品名（ハミルトン）	寸法	ハミルトンカタログ番号	ストック（重量／体積）	本試験において使用された量
ＰＲＰ－Ｘ４００（スルホネート）	12～20um	79591	0.2g/2mL	20mg
ＰＲＰ－Ｘ４００（スルホネート）	12～20um	79591	0.2g/2mL	50mg

試験した陰イオン交換樹脂

製品名（ハミルトン）	寸法	ハミルトンカタログ番号	重量/体積	本試験において使用された量
ＲＣＸ－３０（第四級アミン）	7um	79706	0.2g/2mL	8mg
ＲＣＸ－３０（第四級アミン）	7um	79706	0.2g/2mL	20mg

【０２８８】

選択されたｍＲＮＡ標的を使用する非磁気ビーズによる微細小胞単離の結果が図４２に示されており、その図においてＸは陽イオンであり、Ｒは陰イオンである。これらの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率が図４３に示されている。選択されたマイクロＲＮＡ標的を使用する非磁気ビーズによる微細小胞単離の結果が図４４に示されており、その図においてＸは陽イオンであり、Ｒは陰イオンである。これらの選択されたマイクロＲＮＡ標的の回収率が図４５に示されている。

【０２８９】

まとめると、選択されたｍＲＮＡ標的及びマイクロＲＮＡ標的に対するＲＴ－ｑＰＣＲから分析されるように、陽イオン交換樹脂から微細小胞が検出されないことが結果により示された。陰イオン交換樹脂は試験されたＲＮＡ標的についてＴＥＡ処理磁気ビーズと同様に微細小胞を捕捉する。上清とビーズ抽出との間での微細小胞性ＲＮＡの分布の遺伝子依存的パターンが観察された。

・ＧＡＰＤＨ、ＧＵＳＢ、ＲＮ７ＳＬ、ＨＰＲＴ：１：１の分布に近い
・ＲＮａｓｅＰ：上清よりもビーズにおいて２．５倍多い
・Ｂ２Ｍ：上清よりもビーズにおいて１０～１５倍多い
・ｍｉＲ１６：上清よりもビーズにおいて約２倍多い
・Ｌｅｔ－７ａ：上清よりもビーズにおいて約３．５倍多い
・ｍｉＲ１５０：ビーズよりも上清において３～４倍多い

【０２９０】

選択された対照ビーズへの微細小胞の結合の評価：本明細書に記載される試験において様々な対照ビーズへのバックグラウンドレベルの結合を評価した。これらの試験において未処理エポキシビーズと非官能化ポリステレン（polysterene）ビーズを使用した。特に次のビーズを試験した。

【０２９１】

【表５】

試験された対照ビーズ

ビーズ（スフェロテック）の名称	カタログ番号	寸法	推定ビーズ数/ｍＬ	含まれるビーズ数
エポキシビーズ（Ｂ－エポキシ）	EPM-05	0.5um	$8.5x10^{10}$	$3.8x10^{9}$
ポリスチレンビーズ（Ｂ－ＰＭ）	PM-20	2.49um	$8.5x10^{10}$	$3.8x10^{9}$

【０２９２】

選択されたｍＲＮＡ標的を使用する対照ビーズによる微細小胞単離の結果が図４６に示されており、これらの選択されたｍＲＮＡ標的の回収率が図４７に示されている。選択されたマイクロＲＮＡ標的を使用する対照による微細小胞単離の結果が図４８に示されており、これらの選択されたマイクロＲＮＡ標的の回収率が図４９に示されている。

【０２９３】

まとめると、同様の微細小胞単離パターンが両方の陰イオン交換体（ハミルトンＴＥＡ樹脂及び自家製ＴＥＡ修飾ビーズ）について観察された。スルホネート交換体（陽イオン交換樹脂）はＲＴ－ｑＰＣＲにより評価されたように非常に低い微細小胞回収率を示した。理論に束縛されるものではないが、このことは少ない微細小胞捕捉及び／又は陽イオン樹脂から浸出したＲＴ－ｑＰＣＲ阻害物質に起因する可能性がある。しかしながら、カルボキシルビーズ（陽イオン）を使用する予備試験はスルホネート樹脂のような効果を示さなかった。したがって、非常に低い微細小胞回収率は陽イオン交換体の一般的問題ではない可能性がある。上清とビーズ抽出との間の微細小胞性ＲＮＡの分布の遺伝子依存的パターンが結果により示された。重ねて理論に束縛されるものではないが、そのデータは電荷、極性、タンパク質（抗原）、炭水化物等のような様々な面（膜）特性を担持する複数のクラスの微細小胞が存在する可能性があることを示唆している。観察された差示的なＲＮＡ発現はそれらの微細小胞の起源と間接的に関連する可能性がある。

【０２９４】

実施例２８：捕捉効率とＲＮＡ収量についてのビーズ力価測定の効果

本明細書に記載される試験において、固定された血漿体積（０．４ｍＬ）とビーズの量を増やして０．０５：１から２０：１まで拡大した微細小胞に対するビーズの比率（本明細書においてＢ：Ｅ比とも呼ばれる）を用いて４種類のビーズを評価した。次の表はこれらの試験において微細小胞性ＲＮＡ単離に使用された磁気ビーズの特性を提示している。

【０２９５】

【表６】

ﾋﾞｰｽﾞ表示	ﾋﾞｰｽﾞ(ｽﾌｪﾛﾃｯｸ)の名称	製造業者	面特性	ｶﾀﾛｸﾞ番号	寸法	推定ﾋﾞｰｽﾞ数/mL	添加されたﾋﾞｰｽﾞの量（uL）	含まれるﾋﾞｰｽﾞ数	SA率
A	TEA処理ﾋﾞｰｽﾞ	ｽﾌｪﾛﾃｯｸ	疎水性/第四級ｱﾐﾝ	EPM-05	0.5um	$8.5x10^{10}$	45uL(1mg)	$3.8x10^{9}$	2.5:1
B	ｴﾎﾟｷｼﾋﾞｰｽﾞ	ｽﾌｪﾛﾃｯｸ	親水性/反応性	EPM-05	0.5um	$2.0x10^{11}$	20uL(1mg)	$4.0x10^{9}$	2.5:1
C	ﾎﾟﾘｽﾁﾚﾝﾋﾞｰｽﾞ	ｽﾌｪﾛﾃｯｸ	疎水性	PM-20	2.49um	$1.6x10^{9}$	200uL(5mg)	$3.2x10^{8}$	5:1
D	MyOneﾄｼﾙ活性化型	ﾗｲﾌ･ﾃｯｸ(ﾀﾞｲﾅﾋﾞｰｽﾞ)	疎水性/反応性	655.01D	1um	$1.0x10^{11}$	40uL(4mg)	$8.0x10^{9}$	10:1

【０２９６】

本試験におけるビーズの力価測定はビーズＡ及びＢについて０．０５：１、０．２５：１、１：１、２．５：１から５：１までの、ビーズＣについて０．１：１、０．５：１、２：１、５：１、から１０：１までの、及びビーズＤについて０．２：１、１：１、４：１、１０：１から２０：１までのＢ／Ｅ（＝微細小胞のカットＳＡに対するビーズＳＡの比率）を生じる。標準対照は０．４ｍＬの血漿を使用する超遠心分離であった。本試験において使用された方法の概略が図５０に示されている。

【０２９７】

微細小胞の捕捉の評価をＲＴ－ｑＰＣＲにより実施した。リアルタイムＰＣＲを次の７つの標的：ＶＩＬＯ産物（ＧＡＰＤＨ、ＲＮ７ＳＬ、ＲＮａｓｅＰ、Ｂ２Ｍ、ＧＵＳＢ及びＨＰＲＴ１）及びマイクロＲＴ産物（Ｌｅｔ－７ａ）について実施し、超遠心分離の結果を１００％として使用して回収率を計算した。各標的についてＢ：Ｅ比の関数としての回収率（％）が図５１Ａ～５１Ｇに示されている。

【０２９８】

個々のビーズとビーズ混合物との間のＣｔ比較が図５２に示されており、その図においてビーズ／微細小胞比は全ての標的について２：１であった。ビーズ混合物のＣｔ値はビーズＣ（ＰＭ）と類似しており、すなわち、ｌｅｔ－７ａ標的を除いて個々のビーズよりも著しく高かった。理論に束縛されるものではないが、このことはビーズＣの阻害効果である可能性が非常に高い。

【０２９９】

個々のビーズとビーズ混合物との間の回収率の比較が図５３に示されており、その図においてビーズ／微細小胞比は全ての標的について２：１であった。ビーズ混合物の回収率（％）はビーズＣと類似しており、すなわち、ｌｅｔ－７ａを除いて全ての標的について個々のビーズよりも著しく低かった。理論に束縛されるものではないが、ビーズ混合物での低い回収率はビーズＣの阻害効果である可能性が非常に高い。各標的についての回収率（％）の概要が下の表に示されている。

【０３００】

【表７】

標的	ビーズ	B／E比												
		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
RN7SL	A	100%	4%			18%		46%		67%		63%		
	B	100%	8%			28%		58%		73%		67%		
	C	100%		39%			38%		11%			5%	3%	
	D	100%			32%			47%			55%		81%	72%
GAPDH		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	3%			14%		37%		62%		70%		
	B	100%	6%			25%		53%		48%		54%		
	C	100%		27%			8%		2%			1%	0%	
	D	100%			25%			29%			33%		48%	45%
RNaseP		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	5%			18%		52%		77%		92%		
	B	100%	8%			35%		67%		52%		72%		
	C	100%		38%			58%		33%			15%	8%	
	D	100%			33%			38%			43%		57%	61%
B2M		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	2%			13%		31%		49%		52%		
	B	100%	5%			21%		43%		54%		54%		
	C	100%		26%			9%		1%			0%	0%	
	D	100%			23%			34%			40%		59%	53%
GUSB		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	0%			18%		22%		69%		68%		
	B	100%	5%			0%		77%		78%		52%		
	C	100%		24%			4%		0%			0%	0%	
	D	100%			17%			31%			23%		27%	61%
HPRT		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	3%			6%		17%		38%		38%		
	B	100%	3%			10%		30%		37%		32%		
	C	100%		11%			4%		0%			0%	0%	
	D	100%			7%			14%			15%		46%	17%
let-7a		0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	10	20
	A	100%	5%			30%		79%		116%		114%		
	B	100%	10%			34%		73%		83%		76%		
	C	100%		47%			98%		115%			93%	98%	
	D	100%			35%			40%			53%		76%	64%

【０３０１】

まとめると、（ビーズＡ及びＢを使用して試験された）前の試験において選択された２．５：１のビーズ／微細小胞比は（ＲＮＡｓｅＰ、ＧＡＰＤＨを除く）大半の遺伝子について飽和レベルを達成することが選択されたＲＮＡ標的に対するビーズ力価測定試験により示された。微細小胞は様々な面特性（荷電、中性、疎水性等）を有するビーズによって捕捉されることが結果より示された。理論に束縛されるものではないが、このことは、電荷、極性等のような様々な面（膜）特性を担持する複数のクラスの微細小胞が存在する可能性があるという以前の仮説と一致する。それぞれの種類の微細小胞はその膜特性に加えて様々なＲＮＡ発現パターンも同様に担持し得る。

【０３０２】

ビーズＣ（ＰＭ）はｌｅｔ－７ａを除いて試験された全ての標的に対して阻害的のようであった。その阻害はＲＴレベル（ｌｅｔ－７ａについてはマイクロＲＴキット）又は微細小胞捕捉での阻害である可能性がる。Ａ、Ｂ、Ｃ、及びＤビーズの混合物がビーズＣと

同様に挙動し、阻害がビーズＣから受け継がれていることを示唆した。このことは微細小胞の捕捉において作用する阻害の可能性も低下させる。阻害の起源は４種類のビーズの混合物からのＣの単なる除外によって確認され得る。

【０３０３】

実施例２９：固定された微細小胞に対するビーズの比率を使用する血漿体積の滴定

本明細書に記載される試験において、固定されたビーズ：微細小胞比率における微細小胞回収率を評価するために４種類のビーズを使用して血漿滴定を評価した。使用したビーズの特性が下の表に示されている。

【０３０４】

【表８】

	ﾋﾞｰｽﾞ(ｽﾌｪﾛﾃｯｸ)の名称	ｶﾀﾛｸﾞ番号	寸法	推定ﾋﾞｰｽﾞ数/mL	添加されたﾋﾞｰｽﾞの量(uL)	含まれるﾋﾞｰｽﾞ数	SA率(ｴｷｿｿｰﾑ対ﾋﾞｰｽﾞ)
A	TEA処理ﾋﾞｰｽﾞ(B-TEA)	TEA-EPM-05	0.5um	$8.5x10^{10}$	45uL(1mg)	$3.8x10^{9}$	2.5:1
B	ｴﾎﾟｷｼﾋﾞｰｽﾞ(B-ｴﾎﾟｷｼ)	EPM-05	0.5um	$2.0x10^{11}$	20uL(1mg)	$3.2x10^{9}$	2.5:1
C	ﾎﾟﾘｽﾁﾚﾝﾋﾞｰｽﾞ(B-PM)	PMS-30	3.69um	$4.9x10^{8}$	288uL(7.5mg)	$1.4x10^{8}$	5:1
D	MyOneﾄｼﾙ活性化型	655.01D	1um	$1.0x10^{11}$	40uL(4mg)	$4.0x10^{9}$	10.5:1

【表９】

ビーズＡの滴定におけるカバー範囲	ビーズＢの滴定におけるカバー範囲	ビーズＣの滴定におけるカバー範囲	ビーズＤの滴定におけるカバー範囲
：５：１（４５ｕＬ）	：５：１（２０ｕＬ）	：５：１（２８８ｕＬ）	：５：１（４０ｕＬ）

【０３０５】

１×ＰＢＳ中の０．４、１、４ｍＬの血漿を使用する超遠心分離を対照として用いた。下の表に示されるようにビーズアリコットを調製した。

【０３０６】

【表１０】

	血漿プール（ｍＬ）	0.4	1	4
５：１のＳＡビーズ／エキソソーム率において	ビーズＡ（ｕＬ）	45(2.5:1)	112.5*	450
	ビーズＢ（ｕＬ）	20(2.5:1)	50*	200
	ビーズＣ（ｕＬ）	288(5:1)	720	
	ビーズＤ（ｕＬ）	40(10:1)	100	400
	Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄの混合物	393		

*注記：ビーズＡの１ｍＬとビーズＢの１ｍＬのチューブが磁気分離機から落ち、両方の試料で幾らかのビーズの喪失が生じた。

【０３０７】

これらの試験において使用された方法の概略が図５４に示されている。各標的の平均Ｃｔ値が図５５Ａ～５５Ｇに示されている。５：１のビーズ：微細小胞比率における様々な標的の回収率の比較と０．４ｍＬ、１ｍＬから４ｍＬまでの血漿滴定が図５６に示されている。回収率（％）の結果の概要が下の表に示されている。

【０３０８】

【表１１】

		回収率（%）						
	総RNA収量 (pg/uL)	RN7SL	GAPDH	RNaseP	B2M	GUSB	HPRT	let-7a
A-0.4	631	58.49 (67%)	43.16 (62%)	48.97 (77%)	52.15 (49%)	24.16 (69%)	46.74 (38%)	67.58 (116%)
A-1	1052	50.81	51.25	59.76	61.47	51.64	62.45	51.19
A-4	3249	50.15	48.77	71.13	71.41	39.34	36.93	102.66
B-0.4	630	47.42 (73%)	43.73 (48%)	47.44 (52%)	55.70 (54%)	24.74 (78%)	48.24 (37%)	63.78 (83%)
B-1	898	45.83	40.86	50.18	48.78	47.52	42.43	49.59
B-4	3062	65.51	50.97	74.39	71.93	46.07	37.31	96.06
C-0.4	593	50.69 (5%)	34.71 (1%)	56.58 (15%)	36.36 (0%)	17.22 (0%)	27.77 (0%)	72.06 (93%)
C-1	973	55.56	36.42	56.70	41.47	20.39	34.28	72.61
D-0.4	202	56.20 (81%)	39.98 (48%)	55.19 (57%)	48.44 (59%)	17.71 (27%)	54.84 (46%)	52.65 (76%)
D-1	818	52.61	44.66	47.60	51.65	37.20	39.60	36.86
D-4	3484	93.34	52.89	78.24	75.66	42.05	33.14	81.05
UC-0.4(1)	616							
UC-0.4(2)	269							
C-1	961							
C-4	520							

【０３０９】

まとめると、固定されたビーズ／微細小胞比（５：１）における血漿滴定により中程度

の再現性が０．４、１、及び４ｍＬの血漿体積の範囲において示された。

【０３１０】

実施例３０：血漿中でのビーズ微細小胞間結合の経時的試験

本明細書に記載される試験において、０．４ｍＬの血漿に由来する微細小胞への（５：１のビーズ：微細小胞比率における）結合についてエポキシ磁気ビーズ（ＥＰＭ－３０）を評価した。下の表はこれらの試験において微細小胞単離に使用された磁気ビーズを提示している。

【０３１１】

【表１２】

ﾋﾞｰｽﾞ表示	ﾋﾞｰｽﾞ(ｽﾌｪﾛﾃｯｸ)の名称	製造業者	面特性	ｶﾀﾛｸﾞ番号	寸法	添加されたﾋﾞｰｽﾞ	含まれるﾋﾞｰｽﾞ数
A	ｴﾎﾟｷｼﾋﾞｰｽﾞ	ｽﾌｪﾛﾃｯｸ	親水性/反応性	EPM-20	2.85um	218uL(5.5mg)	$2.4x10^8$

【０３１２】

これらの試験において使用された方法の概略が図５７に示されている。０．４ｍＬの血漿と混合されたＥＰＭ－３０ビーズの５本のアリコット（Ｂ／Ｅ＝５：１）を（ローター上で）４℃で保温し、１分、５分、１５分、３０分、及び６０分の時点で停止した。ビーズを分離し、１×ＢＢで洗浄し、続いてＱｉａｚｏｌ溶解とｍｉＲＮｅａｓｙキットを使用する総ＲＮＡ単離を実施した。選択されたｍＲＮＡ標的及びｌｅｔ－７ａマイクロＲＮＡに対してＲＴ－ｑＰＣＲを実施した。標準対照は０．４ｍＬの血漿を使用する超遠心分離であった。

【０３１３】

エポキシビーズ微細小胞間結合についての経時的試験における１分、５分、１５分、３０分及び６０分の時点における様々な標的の平均Ｃｔ値が図５８に示されており、同時点における各標的の回収率（％）の値が図５９に示されている。ビーズ微細小胞間結合時間の関数としての回収率（％）が図６０に示されている。

【０３１４】

３０分（ＨＰＲＴ及びｌｅｔ－７ａについては１５分）の保温によりＥＧＦＲを除く全ての標的について最高の微細小胞性ＲＮＡ検出がもたらされることが結果により示された。シグナルは６０分で低下し始めた。ＥＧＦＲが検出されたが、非常に弱いシグナルであった（５分の時点で約４．４％の回収率）。一つ一つの種類のビーズ（エポキシ）が（これまでに観察されたように）（回収率（％）において）同様に挙動するようである。

【０３１５】

１つのビーズ種に捕捉された微細小胞が他の種類のビーズに結合した微細小胞と同一であるが、異なる親和性／相互作用を介して結合しているのか評価するように将来の試験をデザインする。

【０３１６】

実施例３１：エポキシビーズへの微細小胞の結合についての追加の試験

完全に捕捉されていないとしたら上清中の残りの微細小胞が追加の新しいビーズによってさらに捕捉され得るかどうか評価するように、及びエッペンドルフチューブへのバックグラウンドレベルの微細小胞の吸着を評価するように本明細書に記載される試験をデザインした。これらの試験の概略が図６１に示されている。簡単に説明すると、これらの試験は次のステップ：

・２本のエポキシビーズアリコット（Ｂ／Ｅ比＝５）に対する連続的な１回の血漿（０．４ｍＬ、１ｍＬの１×ＢＢ中に事前混合）結合の実施。ビーズ結合微細小胞（両方のアリコットに対して）並びに上清中に存在する遊離未結合微細小胞のモニタリング。

・空のエッペンドルフチューブへの事前混合血漿（０．４ｍＬ）の添加によるモックビー

ズ結合の実施。チューブ結合微細小胞並びに上清中に存在する遊離未結合微細小胞のモニタリング。
・ビーズ／チューブに結合した微細小胞の量、又は上清中に遊離状態の微細小胞の量がＲＴ－ｑＰＣＲ（注記：ｑＰＣＲは単一標的アッセイとして実施された）により選択されたＲＮＡ標的の量として測定及び表現された
を用いて実施された。

【０３１７】

収集画分（エポキシビーズのみ）における様々なＲＮＡ標的の平均Ｃｔ値が図６２に示されており、これらのＲＮＡ標的の回収率（％）が図６３に示されている。

【０３１８】

ＥＧＦＲの標準物又はＢＲＡＦの標準物のどちらにも高い直線性の（Ｒ２＞０．９９）曲線が測定され、どちらの標的についても信頼できるＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを意味した。連続的ビーズ結合試験の結果より、微細小胞は主に（９０～１２４％）第１ビーズアリコットに捕捉され、１０％未満が第２ビーズアリコットに捕捉されることが示された。しかしながら、なお７～５９％の微細小胞が上清中に存在しており、それらの微細小胞はビーズ結合について不活性であるか、又は最適条件にないかのどちらかであることが示唆される。モックビーズ結合の結果より、微細小胞は主に上清中に存在すると考えられ、微細小胞のわずかに０．０５～０．５１％がチューブに吸着されることが示された。ＥＧＦＲ微細小胞の捕捉は問題を残したままであるが、様々なビーズをスクリーニングし、検査するための将来の試験が実施される。

【０３１９】

本明細書において提供される試験によって、臨床的有用性の点でより適切なフォーマットである（磁気又は非磁気）ビーズを使用する微細小胞単離の実用可能性が示されている。正に帯電しているビーズ、負に帯電しているビーズ、及び中性のビーズ全てが好適な微細小胞捕捉効率を示すことが結果より示された。この観察は、それらのビーズが微細小胞の表面上の様々なリガンドに対して作用することができ、そうして様々な（複数の）力を介して様々な（官能化されている）粒子によって１つの微細小胞が捕捉され得ることを示唆している。

【０３２０】

実施例３２：ＥＸＯ５０微細小胞単離とＲＮＡ抽出

この実施例はＥＸＯ５０スピンカラムと微細小胞単離、その後のＲＮＡ抽出、及びＲＮＡ調製物の標的発現分析のためのプロトコルを説明する。この例において説明される方法を、所望により特定の実施例に記載されるように幾つかの変更を加えて次の実験に使用した。

【０３２１】

ＥＸＯ５０スピンカラムは本明細書においてＥＸＯ５０と呼ばれ、膜フィルター（好ましくは、Ｑ官能化）を備える。そのカラムは外部フリットと内部チューブとの間にその膜フィルターを保持するカラムホルダーも含み得る（図６４）。そのカラムは収集チューブの中に配置される（図６５）。その膜フィルターに生体試料を添加した後にそのカラムを回転し、通過画分を廃棄する。洗浄緩衝液を膜に添加し、そのカラムを回転し、そして通過画分を廃棄する。必要であれば洗浄ステップを繰り返してよい。その後、溶解緩衝液、すなわち、Ｑｉａｚｏｌを微細小胞の溶解とその後の微細小胞性ＲＮＡの溶離のために膜に添加する。そのカラムを再度回転して微細小胞性ＲＮＡを回収する。クロロホルム抽出とエタノール調整により、及び／又はシリカカラムを使用し、単離されたＲＮＡをそのシリカカラムから溶出してＲＮＡ抽出を実施することができる。

【０３２２】

後の定量的ＰＣＲによるＲＮＡ標的の検出を活用して微細小胞単離及び／又はＲＮＡ抽出の特性を判定する。微細小胞画分から一旦ＲＮＡが抽出されたところで例えばｍＲＮＡについてはスーパースクリプトＩＩ（登録商標）ＶＩＬＯ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用することで、又は短鎖ＲＮＡについてはｍｉスク

リプトＩＩ　ＲＴキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用することでそのＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写する。特異的ＲＮＡ標的プライマーと所望によりプローブを使用して定量的ＰＣＲ又はＴａｑｍａｎ分析を実施してＣｔ値を決定する。二回一組又は三回一組で発現分析を実施する。

【０３２３】

発現分析のために様々なＲＮＡ標的を選択した。大ＲＮＡ（すなわち、リボソーマルＲＮＡ及びメッセンジャーＲＮＡ）と小ＲＮＡ（すなわち、ｍｉＲＮＡ）の両方を検出した。検出されたリボソーマルＲＮＡの例には１８Ｓと２８Ｓが含まれる。標的メッセンジャーＲＮＡにはハウスキーピング遺伝子、例えばＨＰＲＴ１、ＧＡＰＤＨが含まれた。他のメッセンジャーＲＮＡには癌特異的遺伝子、例えば、野生型（ｗｔ）ＢＲＡＦ、突然変異型ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅが含まれた。標的ｍｉＲＮＡの例にはｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ１６が含まれる。幾つかの実験では対照粒子に由来する標的遺伝子、例えば、Ｑβ（すなわち、Ｑβコートタンパク質）を評価した。

【０３２４】

実施例３３：様々な膜フィルターの分析

微細小胞の単離に適切な膜フィルターは帯電していることが好ましい。下の表は微細小胞の単離に適切な様々な種類の膜フィルターを提示している。

【０３２５】

【表１３】

試料番号	膜	分離方法	官能基
(1)＋(7)	再生セルロース、 ３μm超の孔径 （「ＲＣ／ＷＢＡＥ」）	弱塩基性 陰イオン交換体	ジエチルアミン $R-CH_2-NH^+(C_2H_5)_2$
(2)＋(8)	再生セルロース、 ３μm超の孔径 （「ＲＣ／ＳＡＣＥ」）	強酸性 陽イオン交換体	スルホン酸 $R-CH_2-SO_3^-$
(3)＋(9)	再生セルロース、 ３μm超の孔径 （「ＲＣ／ＳＢＡＥ」）	強塩基性 陰イオン交換体	第四級アンモニウム $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$
(4)＋(10)	金属キレート膜、 ３～５μmの孔径 （「ＭＣＭ」）	金属キレート膜	イミノ二酢酸 $-N(CH_2COOH)_2$
(5)＋(11)	再生セルロース結合膜、 ０．４５μmの孔径 （「ＲＣＣＭ」）	多孔性膜	アルデヒド－ＣＨＯ
(6)＋(12)	ＤＥＡＥセルロース紙 （「ＤＥＡＥ」）	弱塩基性 陰イオン交換体	ＤＥＡＥセルロース紙

【０３２６】

上の表に記載される膜のそれぞれの微細小胞を単離する能力を評価した。具体的にはＲＮＡ標的シグナル（Ｃｔ値）の評価が微細小胞単離の特質を定量するための手段として決定された。次の膜：再生セルロース膜、例えば、再生セルロースで補強されている強化安定セルロース膜、金属キレート膜、再生セルロース結合膜、及びＤＥＡＥセルロース紙を使用して微細小胞を単離した。試験された各膜の分離方法が上の表に示されている。実施例３２に記載されるカラムに類似するそれらの様々な膜を含有するカラムに生体試料を添加した。通過画分を廃棄し、溶解緩衝液を使用して例えば膜上で微細小胞を溶解した。その後、シリカカラムを使用して微細小胞性ＲＮＡを抽出した。ｍＲＮＡ標的遺伝子であるＧＡＰＤＨ、ＨＰＲＴ、及び野生型（ｗｔ）ＢＲＡＦ、並びにｍｉＲＮＡ標的遺伝子であ

るｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ及びｈｓａ－ｍｉＲ１６の検出をｑＰＣＲ分析によって判定した（図６６）。各特異的標的遺伝子に対して各膜フィルターについて得られたＣｔ値の比較より、生体試料からの微細小胞の単離を成功するそれらの膜のそれぞれの能力が示された。各膜の全ての緩衝液条件は同一であった。

【０３２７】

図６６に示されるように、それらの膜の全てがＲＮＡ抽出とＲＮＡ標的の少なくとも１つの検出に充分な微細小胞を単離することができた。しかしながら、ＲＣ／ＳＢＡＥ膜、ＲＣ／ＷＢＡＥ膜、及びＲＣＣＭ膜は試験された他の膜よりも好適に挙動した。ＲＣ／ＳＢＡＥ官能化膜は全ての他の膜と比較して最も好適に挙動した。具体的にはアッセイされたｍＲＮＡ標的とｍｉＲＮＡ標的のそれぞれについて、他のあらゆる膜による微細小胞画分と比較してＲＣ／ＳＢＡＥ膜により単離された微細小胞に由来するＲＮＡ調製物からより低いＣｔ値が得られた。次の例に記載されるＥＸＯ５０カラムの捕捉面はＲＣ／ＳＢＡＥ膜から構成される。

【０３２８】

正に帯電している（陰イオン性）イオン交換膜が生理的ｐＨにおいて小胞を精製したことがこれらの結果により示される。しかしながら、負帯電イオン交換は生理的ｐＨにおいて小胞を非効率的に精製した。

【０３２９】

図７１は走査電子顕微鏡観察により検出されたＥＸＯ５０膜に結合した微細小胞を示している。矢印は捕捉された微細小胞を示している。

【０３３０】

実施例３４：ＥＸＯ５０膜の投入容量

次に膜に添加した投入血漿体積の量を滴定することによりＲＣ／ＳＢＡＥ膜の投入容量を評価した。試料投入体積の増加、例えば、０．５ｍｌ、１．０ｍｌ、２．０ｍｌ、４．０ｍｌ、８．０ｍｌ、及び１６ｍｌの血漿がＲＣ／ＳＢＡＥ膜に加えられた。実施例３２に記載されるように微細小胞画分を単離し、微細小胞性ＲＮＡを抽出した。ｍＲＮＡ遺伝子であるｗｔＢＲＡＦとＨＰＲＴ１、及びｍｉＲＮＡであるｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ１６、及び１８Ｓを検出するためにｑＰＣＲ分析を実施した。図６７に示されるように、０．５ｍｌと４．０ｍｌの間の試料からｍＲＮＡ遺伝子とｍｉＲＮＡ遺伝子の両方のｑＰＣＲシグナルが直線的に増加した（すなわち、Ｃｔ値の直線的減少）。しかしながら、４．０ｍｌを超える試料（すなわち、８．０ｍｌ及び１６ｍｌ）は検出されたシグナルに追加的な増加を示すことができなかった。これらの結果は４ｍｌを超える試料体積はどのような増加も示すことが無いことを示している。図６８においてＥＸＯ５０により単離された微細小胞画分から抽出されたＲＮＡに由来するコピー数を通過画分に由来するコピー数と比較した。この実験により、微細小胞が通過画分に存在し、且つ、通過画分に由来するＲＮＡシグナルが検出されるような膜を飽和する最大試料投入体積が特定される。例えば、４．０ｍｌを超える投入体積は４．０ｍｌの試料から検出されるシグナルと比較されると直線的に増加したシグナルを示さなかった。これらの結果と一致して、通過画分から検出されるシグナルは４．０ｍｌを超える体積と共に増加した。

【０３３１】

様々な標的遺伝子の相対的発現レベルを第１ＥＸＯ５０カラムにおける生体試料の最初の負荷単離と第２ＥＸＯ５０カラムにおける通過画分との間で比較した。生体試料をＥＸＯ５０に添加し、実施例３２に記載されるように微細小胞単離、ＲＮＡ抽出及び標的遺伝子分析を実施した。その後、第１ＥＸＯ５０カラム由来の通過画分を、第１ＥＸＯ５０カラムに対する一次生体試料に使用されたのと同じ方法を用いる微細小胞単離、ＲＮＡ抽出、及び標的遺伝子分析のために第２ＥＸＯ５０カラムに負荷した。様々な体積の一次生体試料（０．５ｍｌ～１６ｍｌの血漿）を検査した。標的遺伝子にはｍＲＮＡ標的であるｗｔＢＲＡＦ、ＧＡＰＤＨ、及びＨＰＲＴ１、並びにｍｉＲＮＡであるｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ１６、並びにリボソーマルＲＮＡ１８Ｓが含まれる。各標的遺伝子の発現レベルを最初の負荷ステップの対応する標的遺伝子の検出された発現レベルに対して正規化した。図６９

に示されるように、０．５ｍｌと４．０ｍｌの間の試料に由来する通過画分はどの標的遺伝子についても非常にわずかな発現しか有さず、ＥＸＯ５０がその生体試料に由来する微細小胞の全てを効率的に捕捉したことを示した。対照的に、８．０ｍｌ及び１６ｍｌの試料に由来する通過画分は幾つかの標的遺伝子については少なくとも１０％の発現上昇の検出を示し、他の標的遺伝子については最大で２００％の発現上昇の検出を示した。これらの結果は、より大きい試料投入体積に由来する通過画分はなお第２ＥＸＯ５０カラムから単離される微細小胞を含んでいたことを示しており、それにより８ｍｌ及び１６ｍｌの試料体積から微細小胞が完全に取り除かれないことを示している。さらに、これらの結果は、０．５ｍｌと４ｍｌの間の生体試料に由来する微細小胞の全てを単離するためには２回の単離ステップと溶解ステップは必要ではないことを示している。

【０３３２】

実施例３５：試料を取り出すための膜層の数の決定

４．０ｍｌの血漿試料から微細小胞性ＲＮＡを完全に取り出すために膜層の数を評価した。１層から６層のＲＣ／ＳＢＡＥをＥＸＯ５０カラムの中で互いに隣接させて配置した。微細小胞性ＲＮＡを実施例３２に記載されるように試料及び通過画分から抽出し、分析した。評価された標的遺伝子はｗｔＢＲＡＦとＧＡＰＤＨであった。

【０３３３】

図７０に示されている結果は、通過画分（濾過分）データポイントから検出されたシグナルによって示されるように、１層及び２層は試料から微細小胞の全てを捕捉するには不充分であったことを示している。しかしながら、４層以上を有するカラムは投入データポイントに由来するシグナルにどのような増加も示さなかったが、一方で通過画分（濾過分）からはあらゆるシグナルが完全に取り除かれた。したがって、これらの結果は、充分な微細小胞の捕捉を確実にするには３層が最適であり、一方で層の数を４以上に増加することは微細小胞の捕捉についてどのような追加的利益も生み出さないことを示している。

【０３３４】

実施例３６：微細小胞単離のためのＥＸＯ５０緩衝液の条件

ＥＸＯ５０カラム及び実施例３２に記載される方法を使用する最適な微細小胞単離のために様々な緩衝液条件を評価した。そのカラムへの負荷のために各試料に添加される様々な負荷緩衝液を評価した。試験されたそれらの緩衝液には

・１６０ｍＭのトリス、１４２ｍＭのCl^-、ｐＨ７．０
・１９２ｍＭイミダゾール、１５９ｍＭのCl^-、ｐＨ６．５～６．８
・３００ｍＭのビストリス、２１１ｍＭのCl^-、ｐＨ６．３～６．４
・４０ｍＭのクエン酸、１２４ｍＭのNa^+、ｐＨ６．７～６．９
・５０ｍＭのリン酸、２６５ｍＭのNa^+、１８５ｍＭのCl^-、ｐＨ７．０～７．２
・８０ｍＭのビストリスプロパン、１４ｍＭのCl^-、ｐＨ６．７

が含まれた。

【０３３５】

図７２に示されるように、全ての緩衝液によって微細小胞の単離が成功し、ＲＮＡ標的であるＢＲＡＦ、ＧＡＰＤＨ、及びＨＰＲＴが検出された。

【０３３６】

様々なｐＨ条件も評価した。試料を負荷するためにｐＨ２．０、ｐＨ４．７５、ｐＨ１０．２５、及びｐＨ１３．０の２×ＰＢＳで緩衝液を調製した。洗浄緩衝液は１×であった。ＥＸＯ５０カラムへの負荷時に試料に１０００コピーのＱβを添加した。ｐＨを上昇させた緩衝液により最適な緩衝液条件はｐＨ２～１０．２５の間であることが示されたが、一方で非常に塩基性の緩衝液によりあまり効率的でない微細小胞単離が生じた（図７３）。単離に最適な範囲はｐＨ４～８の間である。

【０３３７】

処理が様々な強度の界面活性剤を有する緩衝液に対して耐性であることを示すために様々な量の界面活性剤を使用して緩衝液を試験した。図７４は、結合緩衝液と洗浄緩衝液の両方の中の０．００１％までのＳＤＳ界面活性剤、０．０１％までのトリトンＸ－１００

界面活性剤、及び０．１％までのツイーン界面活性剤が微細小胞の単離とその後の微細小胞性ＲＮＡの抽出分析に成功したことを示している。

【０３３８】

実施例３７：ＥＸＯ５０　ＲＮＡの調製

図７６に示されている結果は、ＥＸＯ５０により精製されたＲＮＡがＰＣＲで増幅可能なＲＮＡであること、すなわち、増幅とＰＣＲ処理に適切であること、及びＥＸＯ５０が超遠心分離と同量及び同品質のＲＮＡを大量の血漿から単離することを示している。ＥＸＯ５０又は超遠心分離のどちらかにより４ｍｌの血漿試料を処理した。ＲＮＡ標的（ｗｔＢＲＡＦ、ＧＡＰＤＨ、Ｑβ、ｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ１６）の単離と検出の比較によって、ＥＸＯ５０が超遠心分離により得られるものと同様の品質を有するＲＮＡを精製することが示された。幾つかの標的遺伝子に関して、Ｃｔシグナルの増加によって示されるようにＥＸＯ５０によりＲＮＡの品質が改善されたことが示された。

【０３３９】

さらに、ＥＸＯ５０は微細小胞からｍＲＮＡを高いパーセンテージで精製する。例えば、ＥＸＯ５０は市販の癌エキソソーム又は癌細胞培養上清に由来するｍＲＮＡの１００％を精製する。投入量を増加した結腸癌細胞株由来の市販の癌エキソソーム（１５０、１５００、及び３０００ｎｇ）をＥＸＯ５０又は直接溶解（Ｑｉａｇｅｎ　ｍｉＲＮｅａｓｙ　ＲＮＡ単離キットを使用）によって処理した。図７８に示されている結果は、ＥＸＯ５０処理の通過画分がｍＲＮＡの検出を示さなかった（ＲＰＬ０についてＣｔシグナル無し、及びＧＡＰＤＨについて非常に高いＣｔシグナル）ことを示しており、したがってｍＲＮＡの１００％がその試料の微細小胞画分からうまく抽出されたことを示している。

【０３４０】

ＥＸＯ５０　ＲＮＡ調製物は非常にわずかな混入ＤＮＡも含む。逆転写されていないＲＮＡ調製物（－ＲＴ）からのある特定の標的のバックグラウンドレベルの検出は、幾らかのバックグラウンドレベルの混入ＤＮＡが存在することを示している（図７９）。ＥＸＯ５０　ＲＮＡ調製物をＲＮａｓｅＡで消化し、それにより標的遺伝子のＣｔシグナルの喪失が示され、その調製物がたいていはＲＮＡと非常にわずかな混入ＤＮＡを含むことが示された。ＲＮａｓｅ消化ＲＮＡ調製物のｑＰＣＲ分析は、その試料が逆転写されていないときに検出されるものと同様の非常に低いバックグラウンドレベルのＢＲＡＦを示した。逆転写されていないＤＮａｓｅ消化試料におけるシグナルの喪失によって示されるように、ＤＮａｓｅの添加によってそのバックグラウンドＤＮＡシグナルが取り除かれることが示された。

【０３４１】

実施例３８：ＥＸＯ５０操作性実験

ＥＸＯ５０は多数の試料の並行処理に対して頑健である。ＥＸＯ５０を使用して８本の４ｍｌの血漿試料を並行処理し、各試料が単離の一つ一つのステップのピペッティングのために３分の遅れを加えた。したがって、１つの試料を通常通り処理し（０分）、各ステップの間に３分を入れて２つ目の試料を処理し（３分）、各ステップの間に６分を入れて３つ目の処理を処理し（６分）、等々、各ステップの間に２１分を入れて８つ目の試料を処理した。各ステップの間に２１分を入れても標的であるＧＡＰＤＨ、ｗｔＢＲＡＦ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４２－３ｐ、及びｈｓａ－ｍｉＲ－９２ａについて検出されたＣｔ値に有意な差はなかった（図８０）。単離複製実験間の個々のアッセイの標準偏差は０．５Ｃｔ未満であった。この実験は、ＥＸＯ５０処理が単離効率を変化させることなく多数の複製試料を処理することを可能にし、ステップ当たり２１分ものピペッティング時間が考慮されていることを示している。

【０３４２】

ＥＸＯ５０処理の使いやすさ及び結果の再現性を評価するために様々な研究拠点における様々な使用者によるＥＸＯ５０処理の操作性を、様々なｑＰＣＲ分析試薬を使用して現場での実験において比較した。本実験において使用された試料は９００本の単一採取血液に由来する血漿のプールを含んだ。その試料をドライアイス保冷して、幾つかは異なる大

陸にある８箇所の異なる検査室に送付した。各検査室は三つ一組で２ｍｌ又は０．２ｍｌの血漿を使用してＥＸＯ５０処理を実施した。２種類のｍＲＮＡ（すなわち、ｗｔＢＲＡＦ、ＧＡＰＤＨ）と２種類のｍｉＲＮＡ（すなわち、ｍｉＲ－１６及びｌｅｔ－７ａ）に対するＲＴ－ｑＰＣＲ分析を実施し、結果を図８１において比較した。全ての検査室においてＥＸＯ５０法は再現性を有し、ＰＣＲ産出量は０．２ｍＬから２ｍＬまでの血漿投入量に応じて直線的に増減する。同じＰＣＲプライマーを使用する新規使用者が非常に類似した出力ＰＣＲシグナルを示した（図８１）。これらの結果は使用者及び研究拠点と無関係の再現性についてのＥＸＯ５０の頑健性を示している。

【０３４３】

実施例３９：ＥＸＯ５０ミニスピン－カラムフォーマット

ＥＸＯ５０フォーマットをミニスピンカラムフォーマットにも適合させてその再現性と規模拡大性を評価した。ＥＸＯ５０ミニフォーマットはミニチュアＲＣ／ＳＢＡＥ膜を備える。ミニチュアＲＣ／ＷＢＡＥ膜及びミニチュアＲＣ／ＳＡＣＥ膜も比較のために試験した。２ｍｌ及び０．２ｍｌの血漿試料を試験した。標準緩衝液である１００ｍＭのリン酸緩衝液、３７０ｍＭのＮａＣｌの結合緩衝液（２×）；５０ｍＭのリン酸緩衝液、１８５ｍＭのＮａＣｌの洗浄緩衝液（１×）を使用した。ミニフォーマットの結果を超遠心分離とも比較した。標的ｍＲＮＡと標的ｍｉＲＮＡの検出により、ミニチュアＲＣ／ＳＢＡＥ膜はミニチュアＲＣ／ＳＡＣＥ膜及びミニチュアＲＣ／ＷＢＡＥ膜と比較して最良のＣｔシグナルを有することが示された（図８４）。ＥＸＯ５０ミニフォーマット（ＲＣ／ＳＢＡＥ膜）と超遠心分離との間の比較が図８３に示されている。

【０３４４】

実施例４０：他の方法とのＥＸＯ５０の比較

標準的超遠心分離処理は生体試料の事前濾過、すなわち、血漿の０．８μｍフィルターへの事前濾過を含む。その後、濾過液を超遠心分離機に負荷し、１００，０００×ｇ超で１～３時間回転する。上清を除去し、微細小胞を含むペレットを溶解する。その後、シリカカラム、すなわち、市販のＲＮＡ単離カラム（Ｑｉａｇｅｎ）上で製造業者のプロトコルを用いて微細小胞性ＲＮＡを精製する。

【０３４５】

超遠心分離又はＥＸＯ５０により抽出されたＲＮＡのバイオアナライザープロファイルの比較はＲＮＡサイズ分布に関して同様であった（図８６）。ＥＸＯ５０は小ＲＮＡも大ＲＮＡも単離することが示された。微細小胞性ＲＮＡの分離はエタノール分画により達成された。ｒＲＮＡ（すなわち、大ＲＮＡ）のピークは２Ｋｂと４Ｋｂにおいて明らかに視認できた。単離された小ＲＮＡの大多数が５０～２００塩基対の間であった。

【０３４６】

超遠心分離、ＥＸＯ５０、及び自己組立て膜捕捉システムの間の比較が図８７に示されている。その自己組立て膜捕捉システムもＱ官能化膜を備える。各カラムについて２つの独立した技術的複製抽出が示されている。白抜きの円（ｍｉＲ－１６及びｍｉＲ－９２ａ）は遊離循環タンパク質結合ｍｉＲＮＡとして存在することが知られている。本明細書において示される結果はＥＸＯ５０と自己組立てＱ膜が微細小胞性ＲＮＡ標的のＣｔシグナルを増加させることを示している。

【０３４７】

０．２ｍｌの血漿も使用して同様の比較実験を実施し、超遠心分離、直接溶解、及びＥＸＯ５０を比較した。図８８に示されるように、ＥＸＯ５０もほとんど全ての遺伝子について直接溶解よりも好適に挙動した。ＥＸＯ５０通過画分は幾らかのｍｉＲＮＡシグナルがなお通過画分に検出されたことを示している。

【０３４８】

しかしながら、４ｍｌの血漿までの試料体積の増加により、超遠心分離と比較して、検出されるＣｔシグナルがＥＸＯ５０によって増加したことが示された（図８９）。

【０３４９】

実施例４１：癌突然変異のＥＸＯ５０検出

重要なことに、ＥＸＯ５０が黒色腫患者に由来する２ｍｌの血漿試料から癌突然変異の検出に成功したことが示された。超遠心分離（ＵＣ）又はＥＸＯ５０により試料を処理した。野生型ＢＲＡＦ（ｗｔＢＲＡＦ）のｑＰＣＲ分析によりコピー数を決定し、突然変異型ＢＲＡＦ（ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅ）のコピー数と比較した。図９０に示されるように、超遠心分離とＥＸＯ５０は両方ともｗｔＢＲＡＦのコピーを検出することができた。しかしながら、ＥＸＯ５０だけが突然変異型ＢＲＡＦ　Ｖ６００Ｅの存在を検出することができた。これらの結果は、ＥＸＯ５０は微細小胞性ＲＮＡから癌突然変異を検出することができたが、一方で超遠心分離は癌突然変異の存在を明らかにすることができなかったことを示している。

【０３５０】

実施例４２：ＥＸ０５１溶出ステップ

この実施例は、本明細書においてＥＸ０５１とも呼ばれるＲＮＡの溶解と抽出の前にフィルター膜から微細小胞を単離するための任意の溶出ステップを示している。具体的には膜から完全な単離された微細小胞を単離するために洗浄／溶出ステップによりＥＸＯ５０カラムから微細小胞を単離した。１０ｍｌの洗浄／溶出緩衝液をそのカラムに２回添加した。幾つかの事例では２回目と比べて異なるＮａＣｌ濃度を１回目に使用し、一方で幾つかの事例では同一のＮａＣｌ濃度を使用した。例えば、１８５ｍＭ、１０００ｍＭ、及び２０００ｍＭのＮａＣｌ緩衝液を１回目の洗浄に使用した。２回目の洗浄については１８５ｍＭ、１０００ｍＭ、及び２０００ｍＭのＮａＣｌ緩衝液を使用した。それらのカラムを５，０００×ｇで１分間回転した。ＥＸＯ５０と比較する、様々な溶出プロトコルを使用した様々な遺伝子（すなわち、ＧＡＰＤＨ、ＢＲＡＦ、Ｋｒａｓ等）のＣｔ値の比較により、ＥＸ０５１のＲＮＡ単離はＥＸＯ５０のＲＮＡ単離と同等であることが示された（図９１）。

【０３５１】

ＥＸ０５１から溶出された微細小胞の走査電子顕微鏡観察により５０～２００ｎｍまでのサイズの微細小胞が示された（図８５）。比較すると、超遠心分離により単離された微細小胞は単離された微細小胞中に、ＲＮＡの溶解と抽出、ＲＮＡの純度、及びＲＮＡ調製物からＲＮＡ配列を検出／増幅する能力に影響を与える可能性があり得るより多くの繊維タンパク質構造体様物質を示した。ＥＸ０５１単離は、ＵＣ法を用いて得られた精製物質と類似しているが、原材料とは類似していない粒子を含んだ。ＥＸ０５１法由来の通過画分は精製された小胞物質とは異なる大量の粒子をなお含んだ。

【０３５２】

追加の濃縮ステップをＥＸ０５１プロトコルと共に活用することができる。様々なサイズカットオフ値を有する様々な回転濃縮器（例えば、ＶｉｖａＳｐｉｎ２０カラム）を使用した。例えば、１０，０００ＭＷ、５０，０００ＭＷ、及び１００，０００ＭＷカットオフ濃縮器を使用した。溶離液を５分間回転した。濃縮分体積が大きすぎる（２００μｌ超）場合にその濃縮分を所望の体積、すなわち、２００μｌ未満になるまで５分ずつ回転した。濃縮された溶離液を穏やかに再懸濁して濃縮器の上部チャンバー（フィルター側）から移した。１×洗浄緩衝液を使用してその濃縮された溶離液を２００μＬの総体積までにした。これで、溶解し、ＲＮＡ抽出する準備がそれらの試料に整った。濃縮回転速度と回数は、ＲＮＡ収量又はその後のＲＮＡ発現分析から得られるＣｔ値に重大な変化を与えることなく微細小胞溶離液を濃縮するために８００×ｇから４５００×ｇまでの範囲であった。

【０３５３】

実施例４３：ＤＮＡのＥＸ０５２単離

ＥＸＯ５０カラムを使用して血漿からＤＮＡの全てを単離することもできる。ＲＮＡに加えてＤＮＡ単離のためにＥＸＯ５０カラムを活用するための２つの方法が図９２（ＥＸ０５２）及び図９３（ＥＸ０５２．２）に示されている。具体的にはそれらの２つの処理であるＥＸ０５２とＥＸ０５２．２の間の差異は、使いやすさ、プロトコルの合理化、及び再現性の向上のためにＥＸ０５２．２ではＲＮＡとＤＮＡの抽出が１つのチューブに組

み合わされていることである。図９４はＥＸＯ５０ＲＮＡ＋ＤＮＡ（ＥＸ０５２．２）において１．５Ｃｔという獲得値を示している。図９５は、相分離時のクロロホルム量の増加がＤＮＡを水相に逆添加し、そうしてそのＤＮＡが通常のＥＸＯ５０法によって共単離されることを示している。相分離時のｐＨレベルのさらなる最適化も図９６に示されているようにＤＮＡを調製物に加える。

【０３５４】

したがって、ＥＸ０５２及びＥＸ０５２．２において示されているように、ＥＸＯ５０法を使用して血漿試料から全てのＤＮＡを単離することができる。ＤＮＡは相分離後にＱＩＡｚｏｌ溶解の下部の疎水性相から回収される。ＥＸＯ５０法はＥＸ０５２法（例えば、ＥＸ０５２又はＥＸ０５２．２）と組み合わされて同じ試料体積について同様のレベルでＲＮＡとＤＮＡを分離し、ＲＮＡとＤＮＡが互いに分離され得る。本開示のこれらの方法は市販の単離キット、例えば、Ｑｉａｇｅｎと同量又はより多くのｍＲＮＡとさらにより多くのｍｉＲＮＡを捕捉する。

【０３５５】

実施例４４：ＣＳＦからのＥＸＯ６０微細小胞単離とＲＮＡ抽出

この実施例は本明細書においてＥＸＯ６０と呼ばれる処理においてＥＸＯ５０ＲＣ／ＳＢＡＥ膜含有カラムを使用して脳脊髄液（ＣＳＦ）から微細小胞性ＲＮＡを単離及び抽出することができることを示している。

【０３５６】

患者由来のＣＳＦ試料の体積を増加させて（０．５ｍｌ、１ｍｌ、２ｍｌ、及び４ｍｌ）滴定実験を実施した。凍結前にＣＳＦ試料を０．８ｕｍフィルターにより事前濾過した。ＣＳＦを実施例３２に記載されるようにそのカラムに通して処理した。ｑＰＣＲ分析の結果が図９７に示されており、標的遺伝子（ｍＲＮＡとｍｉＲＮＡの両方）のＣｔシグナルが試料体積と共に直線的に増加したことを示している。この実験はＥＸＯ６０によってＣＳＦ試料からの微細小胞の単離に成功したことを示している。

【０３５７】

様々な患者試料及び供給源からＥＸＯ６０と超遠心分離を比較する追加実験を実施した。ＥＸＯ６０単離由来の通過画分と超遠心分離からの上清も評価して微細小胞抽出の特質を決定した。評価された遺伝子はｍＲＮＡ標的のＧＡＰＤＨ及びＨＩＦ１Ａであり、ｍｉＲＮＡ標的のｈｓａ－ｍｉＲ－１６及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２４－３ｐであった。図９９に示されるように、微細小胞性ＲＮＡがうまく単離され、超遠心分離から得られる結果と同様であった。

【０３５８】

図１００に示されるように、ＥＸＯ６０はサイズ濾過又は超遠心分離に基づく方法よりも好適にＣＳＦからＲＮＡを単離する。ＥＸＯ６０について、７０％ＥｔＯＨを使用してＲＮＡを抽出し、一方でｕＣＳＣ抽出は３０％イソプロパノールを使用し、ＵＣ抽出は６０％ＥｔＯＨを使用した。ＥＸＯ６０は少なくとも０．２～２ｍＬのＣＳＦ投入量の範囲において直線的なＰＣＲ産出量を示した。ＥＸＯ６０の通過画分にはわずかに幾らかのｍｉＲ－１６　ｍｉＲＮＡが見いだされ、ＧＡＰＤＨとＨＩＦ１ＡのｍＲＮＡは見いだされなかった。ｕＣＳＣ抽出については対照的に、ｍｉＲ－１６はカラム画分においてのみ見出され、ＧＡＰＤＨとＨＩＦ１Ａ及び幾らかのｍｉＲ－１６が通過画分に見出された。ＵＣ抽出により、ｍＲＮＡとｍｉＲＮＡの大半が上清中に残ることが示された。ペレット画分にＨＩＦ１ａは見いだされず、わずかに幾らかのＧＡＰＤＨが見出された。

【０３５９】

実施例４５：尿からのＥＸＯ７０微細小胞単離とＲＮＡ抽出

本明細書においてＥＸＯ７０と呼ばれる方法である微細小胞性ＲＮＡのＥＸＯ５０ベース単離を濾過ベースの単離（ｕＣＳＣ）と比較するように本明細書において提示される試験をデザインした。２０ｍｌの尿試料を使用して各単離方法を実行した。ＥＸＯ７０単離について、実施例３２に従うが、ｍＲＮＡのみの捕捉のために３０％ＥｔＯＨを使用してＲＮＡを抽出及び抽出した。ｕＣＳＣ単離について実施例３２に従ってＲＮＡを抽出及び

単離した。

【０３６０】

図１０１に示されるように、ＥＸＯ７０と濾過により単離されたＲＮＡは、エタノール調整が大ＲＮＡだけを単離するように調節されると同様のＲＮＡサイズ分布を示した。それらの試験は両方の方法が同じ強度を有するＰＣＲシグナルを生じることも示した。

【０３６１】

図１０２、１０３Ａ及び１０３Ｂに示されるように、ＥＸＯ７０由来の通過画分の新しいｕＣＳＣカラムへの負荷がｍＲＮＡシグナルについてずっと高いＣｔ値（約８Ｃｔ値）を生じた。これは通過画分において１％未満のシグナルだけが残されていることを意味している。したがって、１％のｍＲＮＡとｍｉＲＮＡが通過画分に残されているので、ＥＸＯ７０は９９％を超える効率でｍＲＮＡとｍｉＲＮＡを捕捉した。

【０３６２】

ＥＸＯ７０カラムに負荷されたｕＣＳＣ由来の通過画分は４人の患者のうちの２人においてｍＲＮＡのシグナルをほとんどから全く生ぜず、検出可能なシグナルが有る場合にはそれはオンカラムデータポイントよりも約１５Ｃｔ値高かった。１％未満のｍＲＮＡシグナルがＥＸＯ７０とｕＣＳＣの両方の尿通過画分に残される。

【０３６３】

実施例４６：細胞上清試料におけるＥＸＯ５０微細小胞単離

ＥＸＯ５０法及びキットの細胞上清試料との使用を試験するように本明細書において提示される試験をデザインした。それらの試料を上の実施例３２に示されるように処理した。

【０３６４】

図１０４及び１０５に見られるように、ＥＸＯ５０によりヒト細胞培養上清から小胞性ＲＮＡが単離された。Ｇｌｉ３６細胞株上清を有する様々な濃度の２×結合緩衝液（ＢＢ）を図１０５に示されるように使用した。

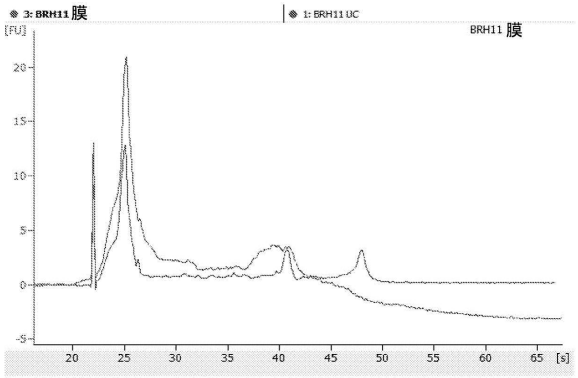
【０３６５】

他の実施形態

本発明の詳細な説明と併せて本発明を記載してきたが、前記の説明は本発明の範囲を例示することを意図されており、本発明の範囲を限定することを意図されておらず、本発明の範囲は添付されている特許請求の範囲によって規定される。他の態様、利点、及び修正点が後続の特許請求の範囲の範囲内である。

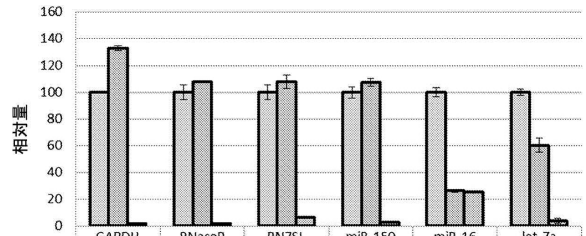
【図１Ａ】

FIGURE 1A



【図１Ｂ】

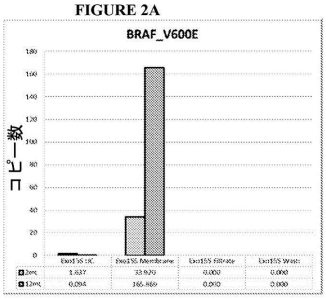
FIGURE 1B



	GAPDH	RNaseP	RN7SL	miR-150	miR-16	let-7a
UC	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
膜	132.754	107.874	108.051	107.499	26.269	60.298
ろ液	1.744	1.417	6.344	2.584	25.329	3.607

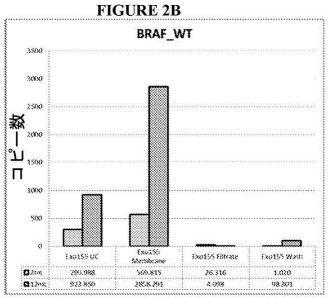
【図２Ａ】

FIGURE 2A



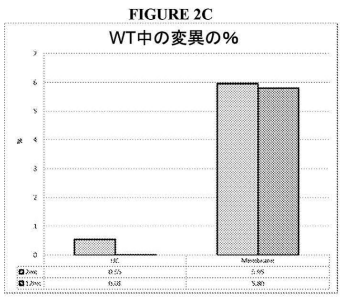
【図２Ｂ】

FIGURE 2B



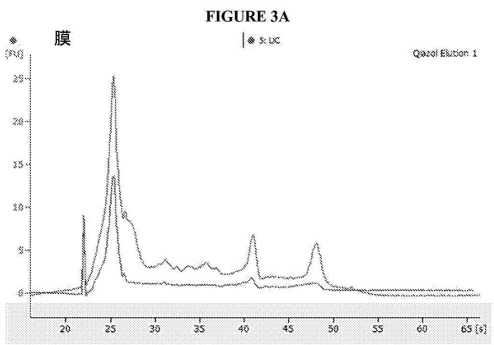
【図２Ｃ】

FIGURE 2C



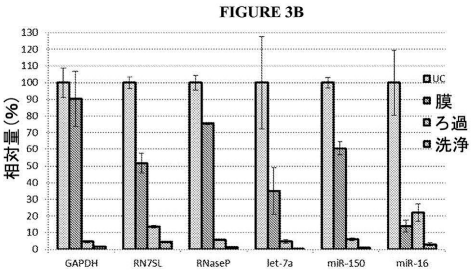
【図３Ａ】

FIGURE 3A



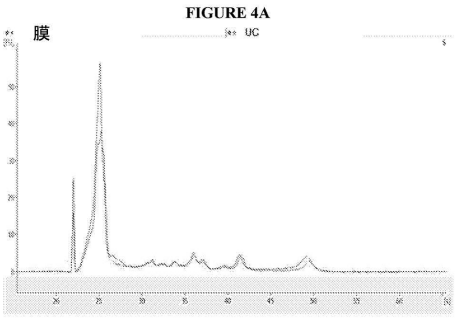
【図３Ｂ】

FIGURE 3B



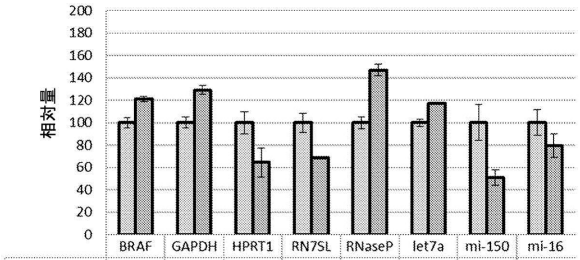
【図４Ａ】

FIGURE 4A



【図４Ｂ】

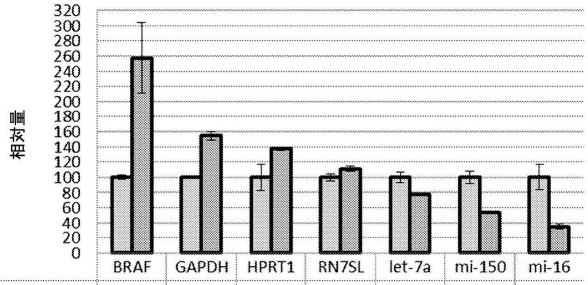
FIGURE 4B



	BRAF	GAPDH	HPRT1	RN7SL	RNaseP	let7a	mi-150	mi-16
UC	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
S膜	120.858	129.059	64.490	68.486	146.911	117.100	51.255	79.516

【図５Ｂ】

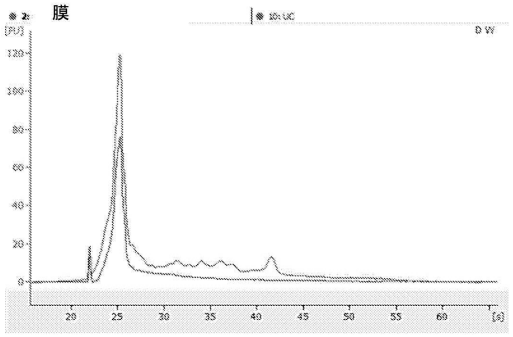
FIGURE 5B



	BRAF	GAPDH	HPRT1	RN7SL	let-7a	mi-150	mi-16
UC	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
膜	257.565	154.637	137.493	110.776	77.273	54.104	34.977

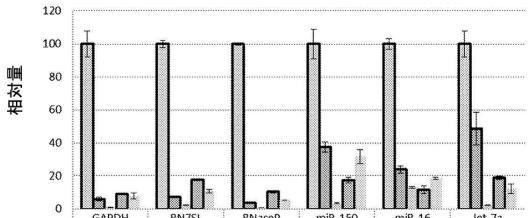
【図５Ａ】

FIGURE 5A



【図６】

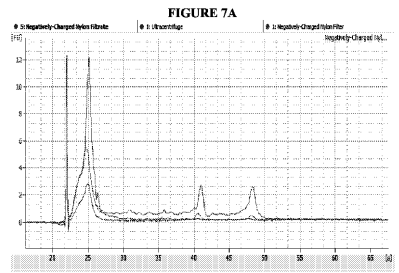
FIGURE 6



	GAPDH	RN7SL	RNaseP	miR-150	miR-16	let-7a
UC	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
PALL Q 膜	6.115	7.479	3.682	37.505	23.920	48.704
PALL Q ろ液	0.899	2.286	0.918	3.596	13.153	2.322
PALL S 膜	9.078	17.700	10.494	17.459	11.635	18.909
PALL S ろ液	7.953	10.897	5.484	31.791	18.657	12.320

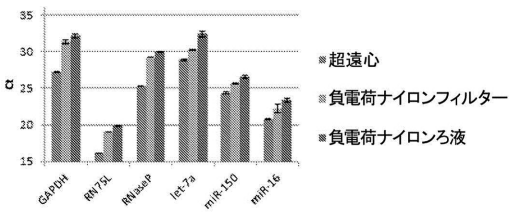
【図７Ａ】

FIGURE 7A



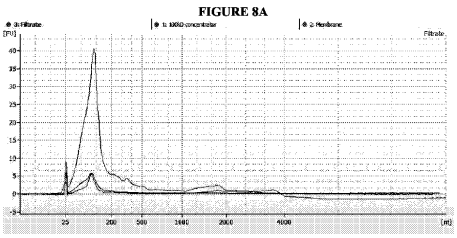
【図７Ｂ】

FIGURE 7B



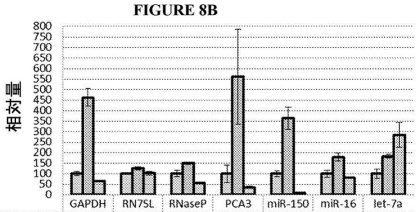
【図８Ａ】

FIGURE 8A



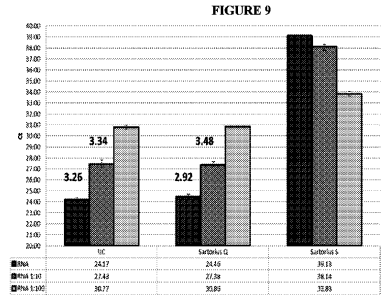
【図８Ｂ】

FIGURE 8B

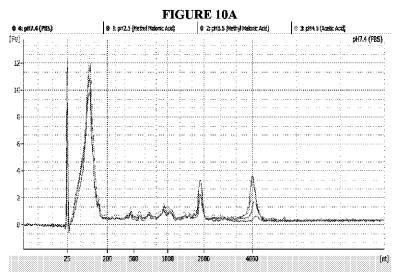


	GAPDH	RN7SL	RNaseP	PCA3	miR-150	miR-16	let-7a
100Kコンセントレータ	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
膜	463.87	125.81	150.40	561.51	364.09	178.98	182.63
ろ液	64.05	102.72	57.40	35.80	10.21	82.72	284.33

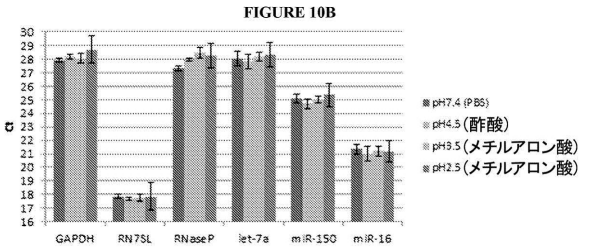
【図９】



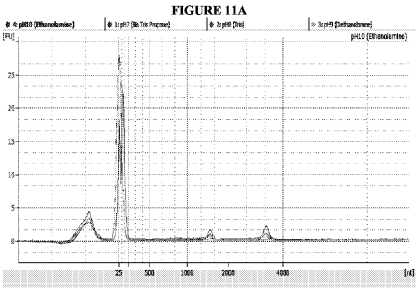
【図１０Ａ】



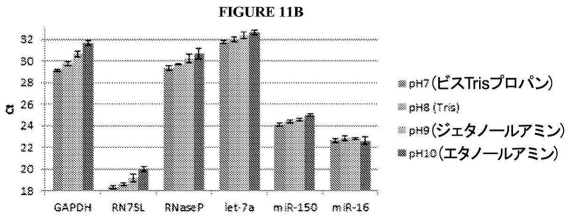
【図１０Ｂ】



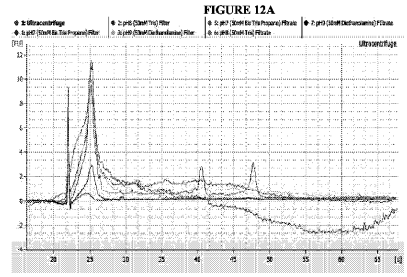
【図１１Ａ】



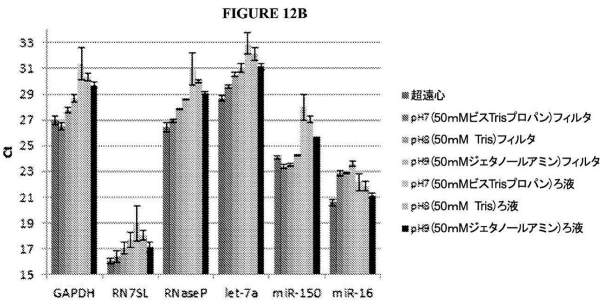
【図１１Ｂ】



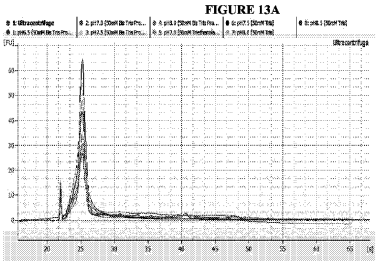
【図１２Ａ】



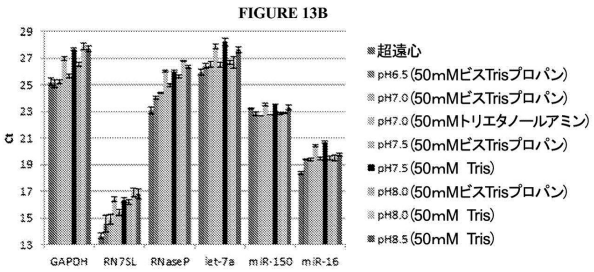
【図１２Ｂ】



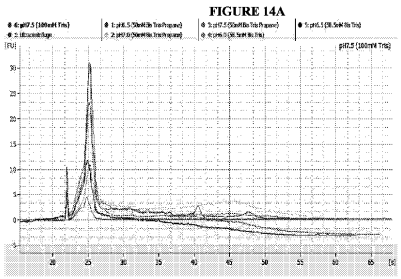
【図１３Ａ】



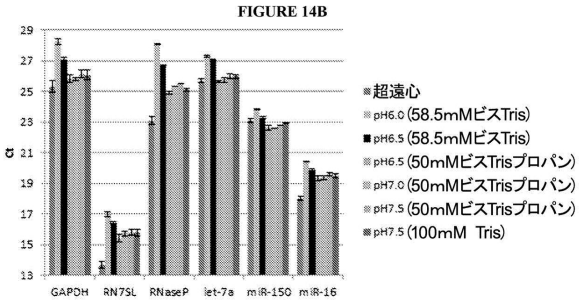
【図１３Ｂ】



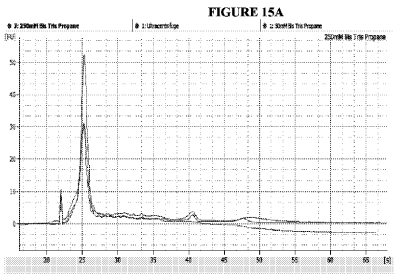
【図１４Ａ】



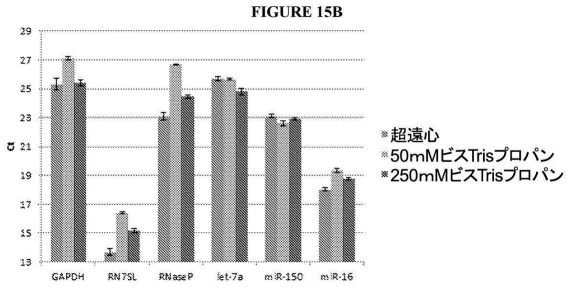
【図１４Ｂ】



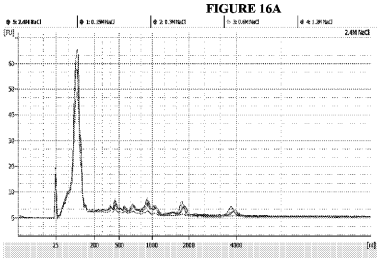
【図１５Ａ】



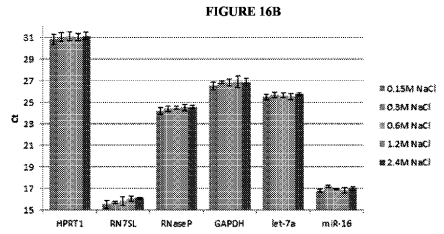
【図１５Ｂ】



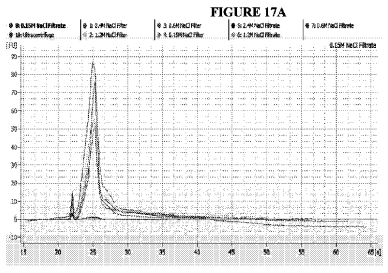
【図１６Ａ】



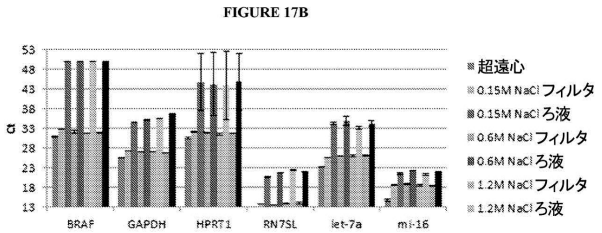
【図１６Ｂ】



【図１７Ａ】

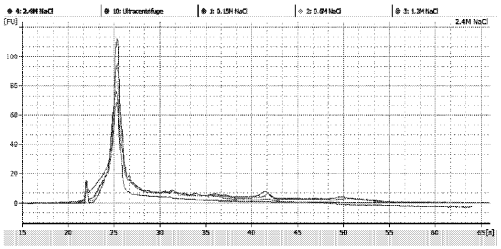


【図１７Ｂ】



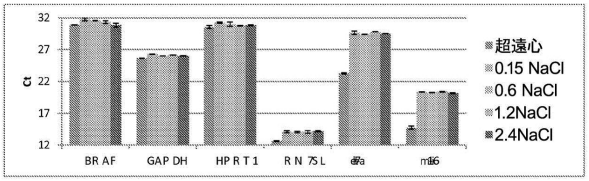
【図１８Ａ】

FIGURE 18A



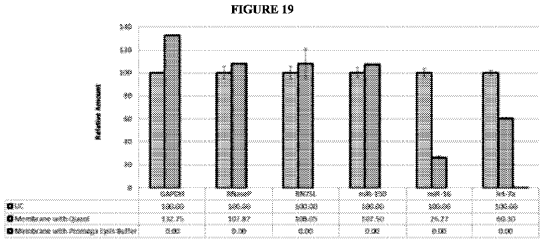
【図１８Ｂ】

FIGURE 18B



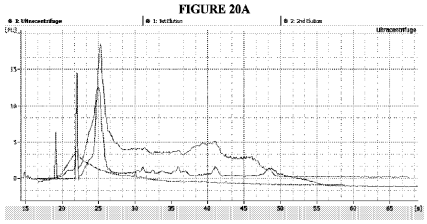
【図１９】

FIGURE 19



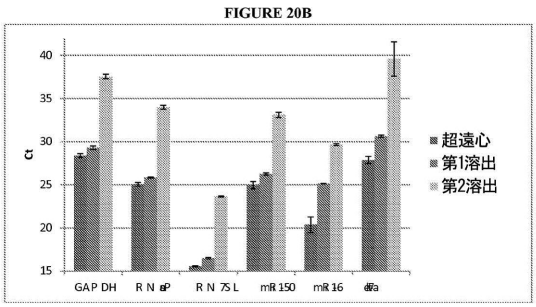
【図２０Ａ】

FIGURE 20A



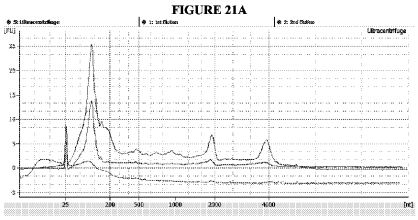
【図２０Ｂ】

FIGURE 20B



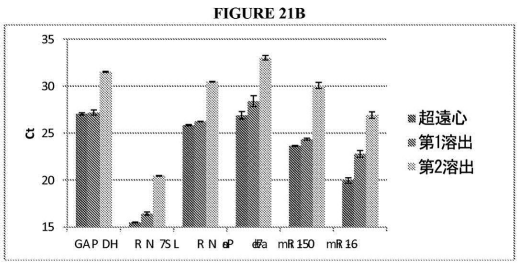
【図２１Ａ】

FIGURE 21A



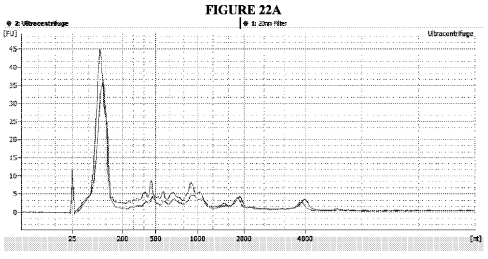
【図２１Ｂ】

FIGURE 21B

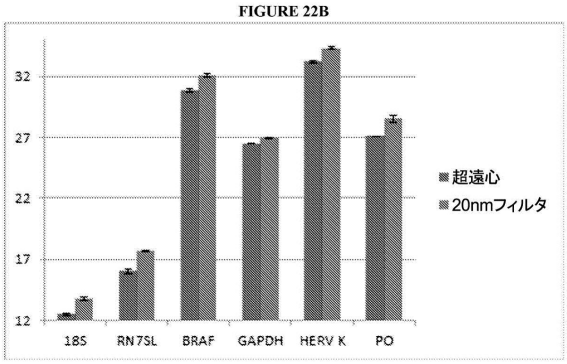


【図２２Ａ】

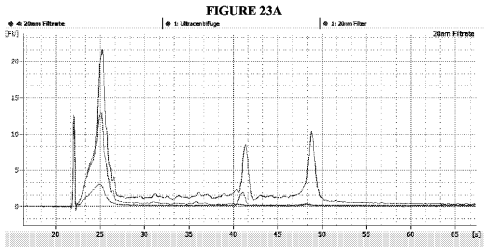
FIGURE 22A



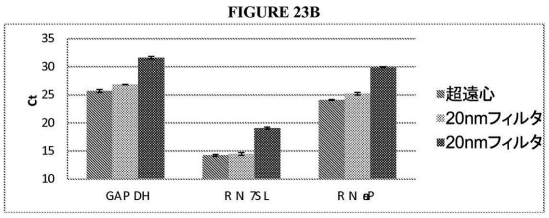
【図２２Ｂ】



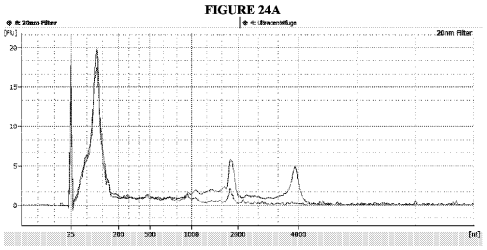
【図２３Ａ】



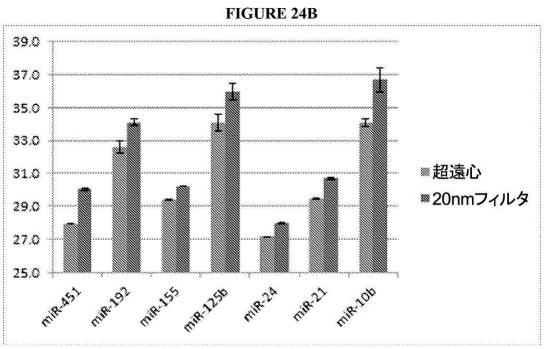
【図２３Ｂ】



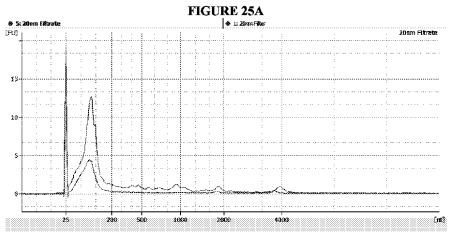
【図２４Ａ】



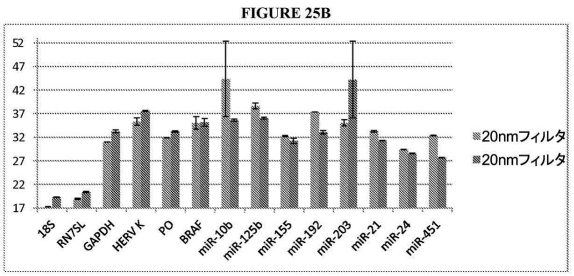
【図２４Ｂ】



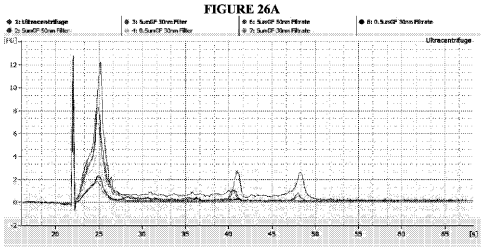
【図２５Ａ】



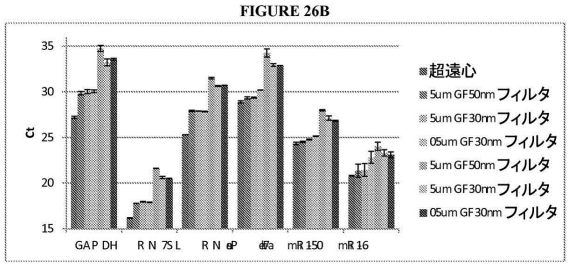
【図２５Ｂ】



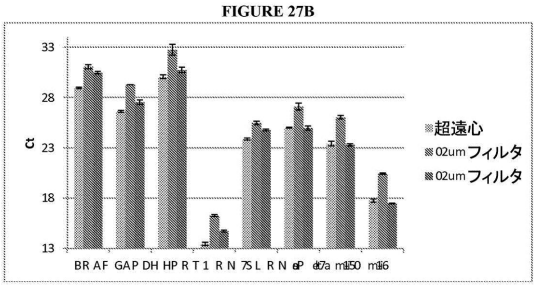
【図２６Ａ】



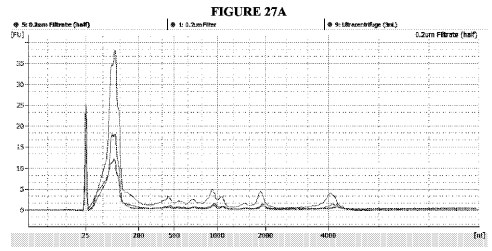
【図２６Ｂ】



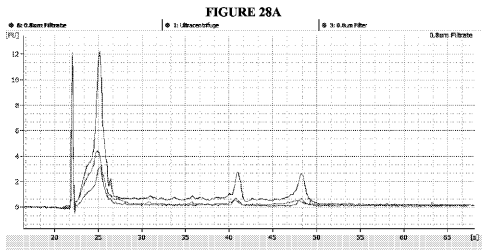
【図２７Ｂ】



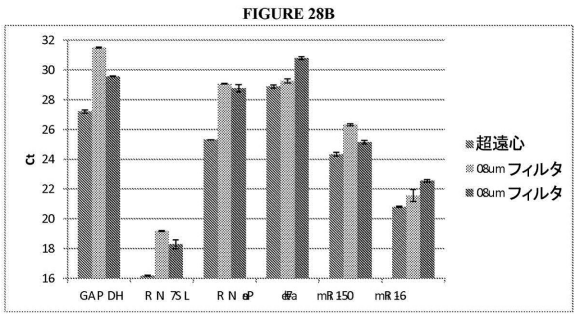
【図２７Ａ】



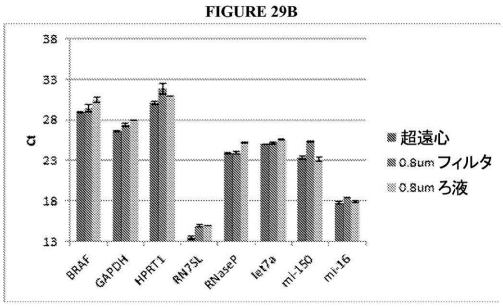
【図２８Ａ】



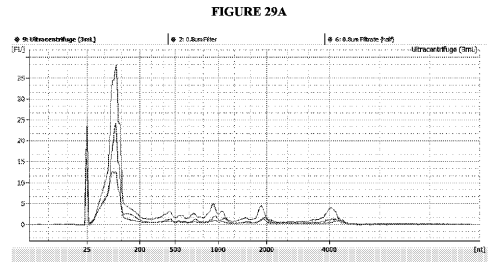
【図２８Ｂ】



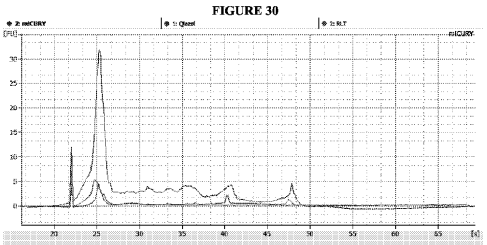
【図２９Ｂ】



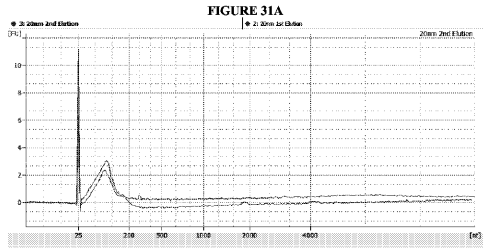
【図２９Ａ】



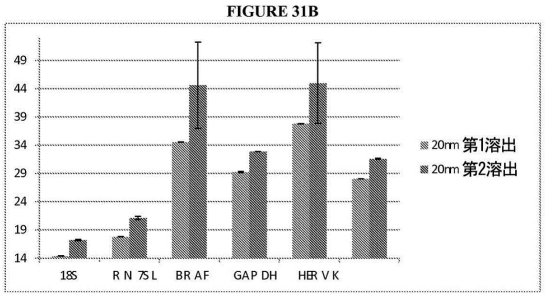
【図３０】



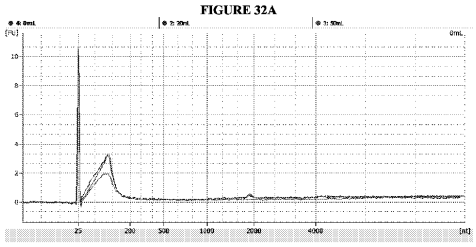
【図３１Ａ】



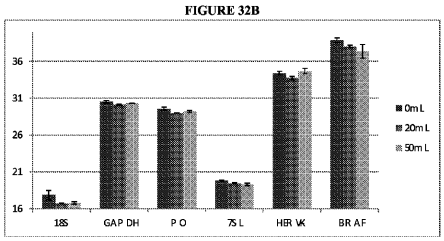
【図３１Ｂ】



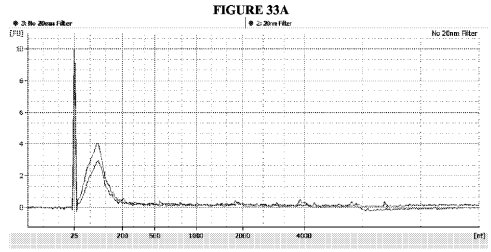
【図３２Ａ】



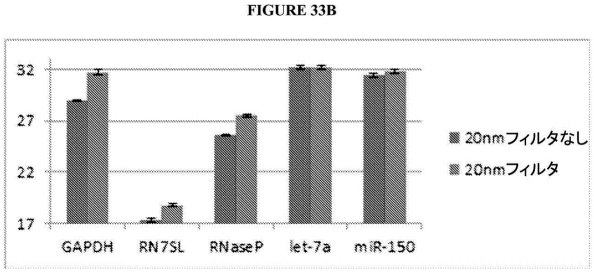
【図３２Ｂ】



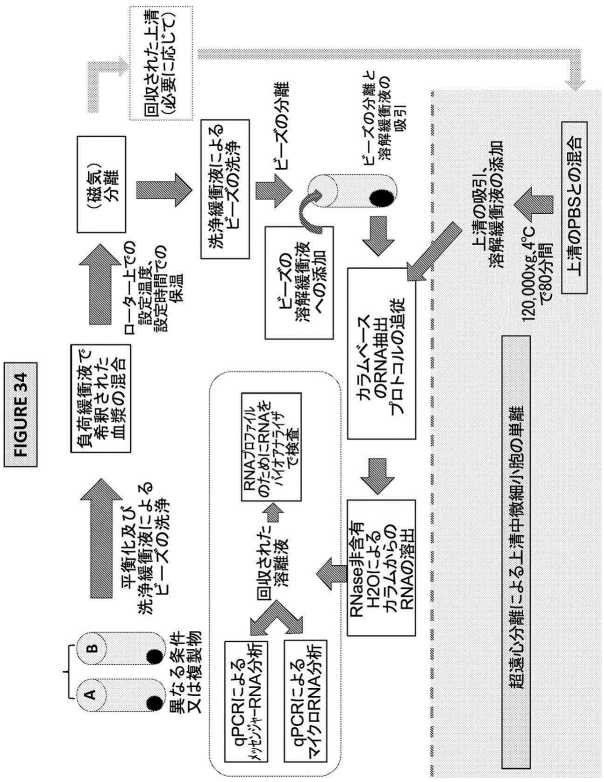
【図３３Ａ】



【図３３Ｂ】

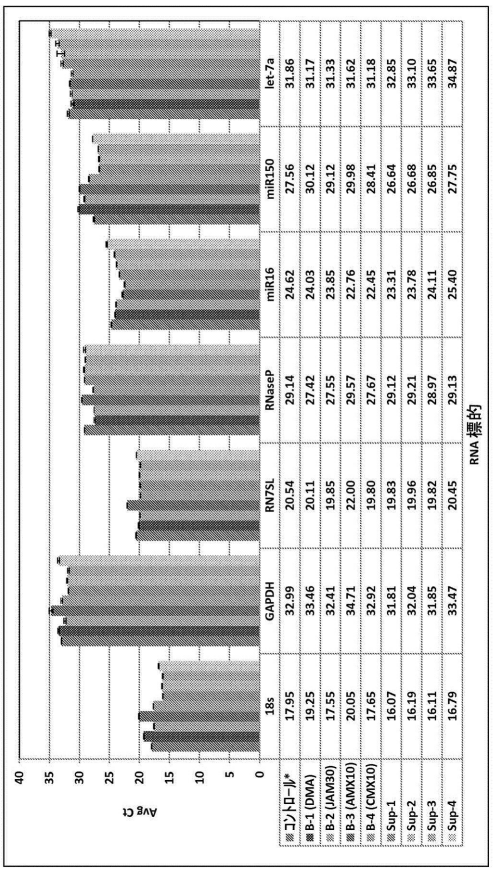


【図３４】



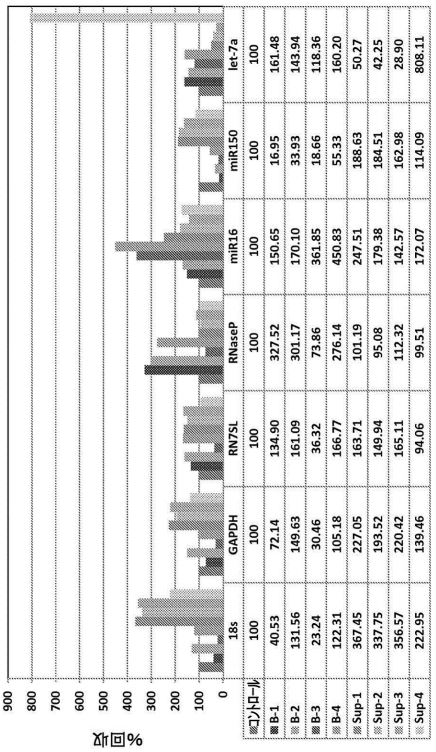
【図３５】

FIGURE 35



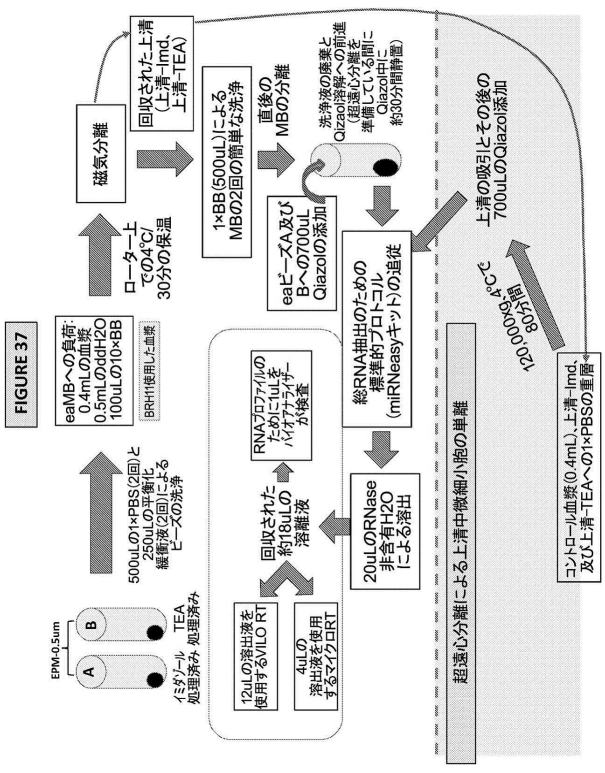
【図３６】

FIGURE 36



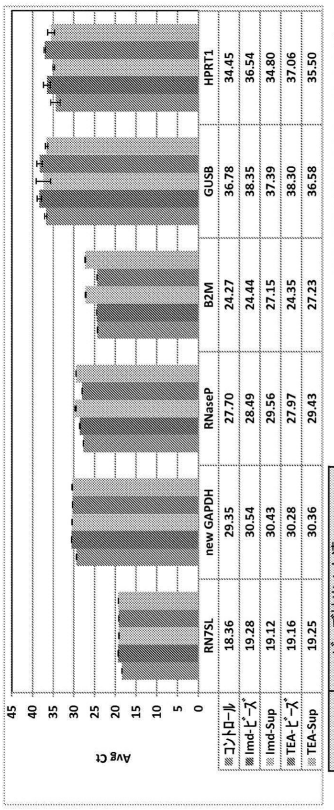
【図３７】

FIGURE 37



【図３８】

FIGURE 38

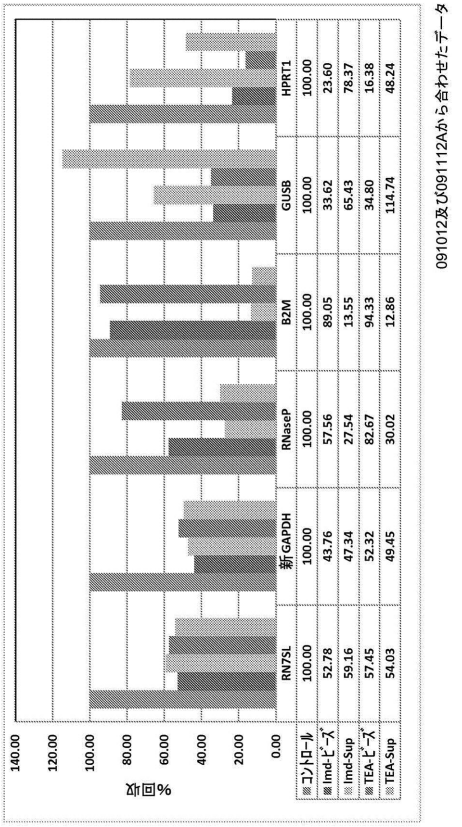


091012及び091112Aから合わせたデータ

	ビーズ抽出	上清
	イミダゾール	TEA
GAPDH（新）	0.92	1.06
RN7SL	0.89	1.06
RNaseP	2.09	2.75
B2M	6.57	7.33
GUSB	0.51	0.30
HPRT1	0.30	0.34

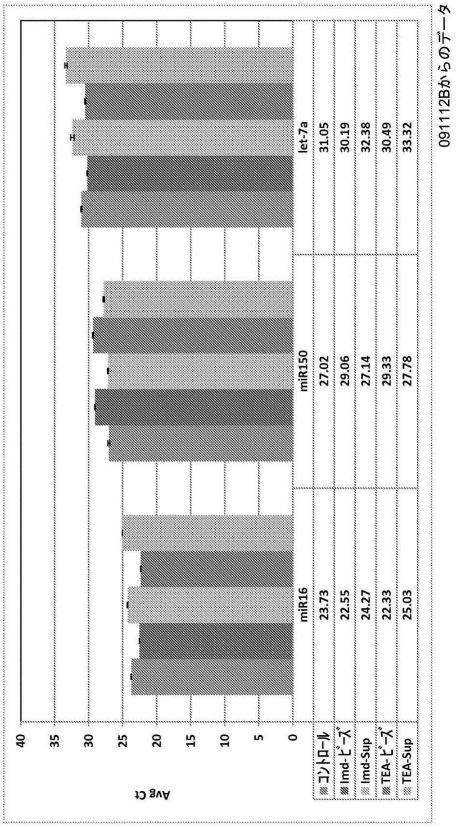
【図３９】

FIGURE 39



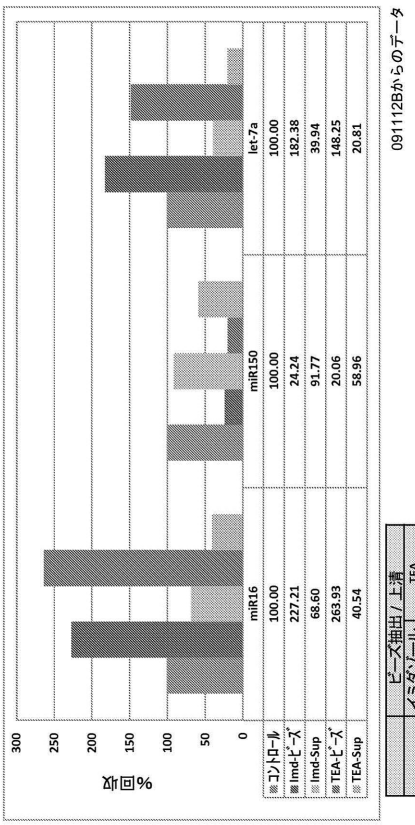
【図４０】

FIGURE 40



【図４１】

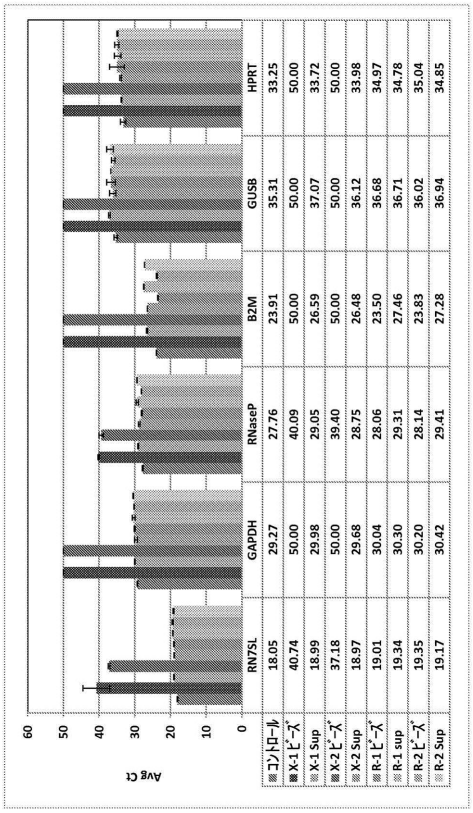
FIGURE 41



	ビーズ抽出 / 上清	
	イミダゾール	TEA
miR16	3.31	6.51
miR150	0.26	0.34
let-7a	4.57	7.12

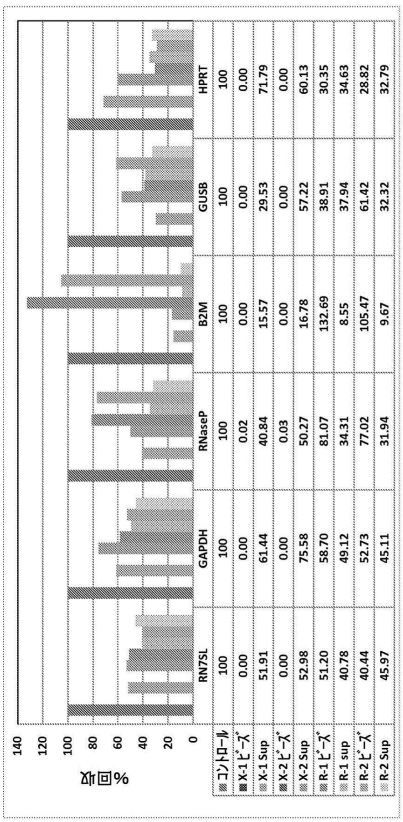
【図４２】

FIGURE 42



【図４３】

FIGURE 43

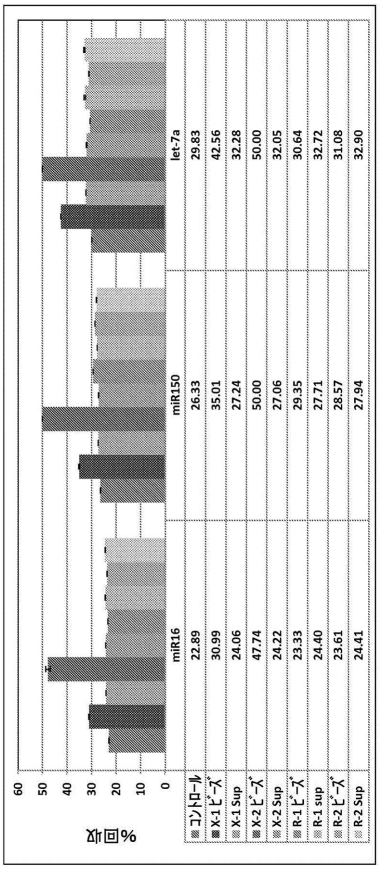


ビーズ上清間のRNA分配

	X-1	X-2	R-1	R-2
RN7SL	0.00	0.00	1.26	0.88
GAPDH	0.00	0.00	1.19	1.17
RNaseP	0.00	0.00	2.36	2.41
B2M	0.00	0.00	15.52	10.91
GUSB	0.00	0.00	1.03	1.90
HPRT	0.00	0.00	0.88	0.88

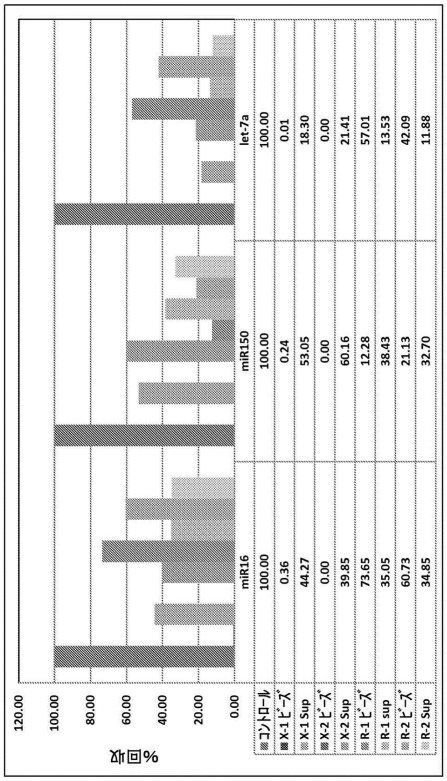
【図４４】

FIGURE 44



【図４５】

FIGURE 45

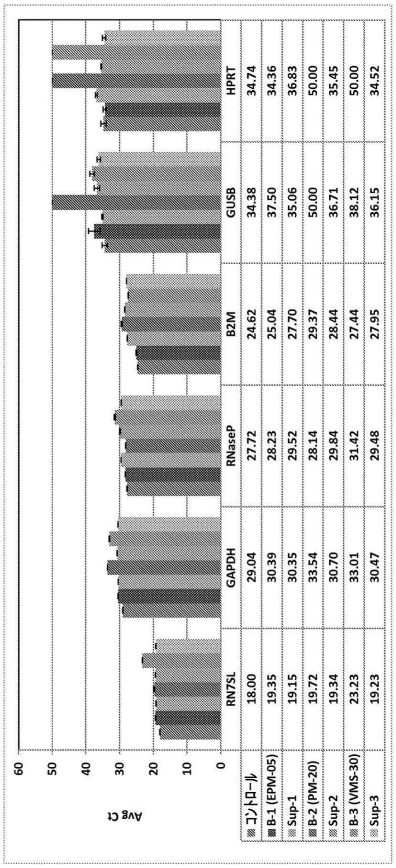


ビーズ上清間のRNA分配

	X400-1	X400-2	RCX-1	RCX-2
miR16	0.01	0.00	2.10	1.74
miR150	0.00	0.00	0.32	0.65
let-7a	0.00	0.00	4.21	3.54

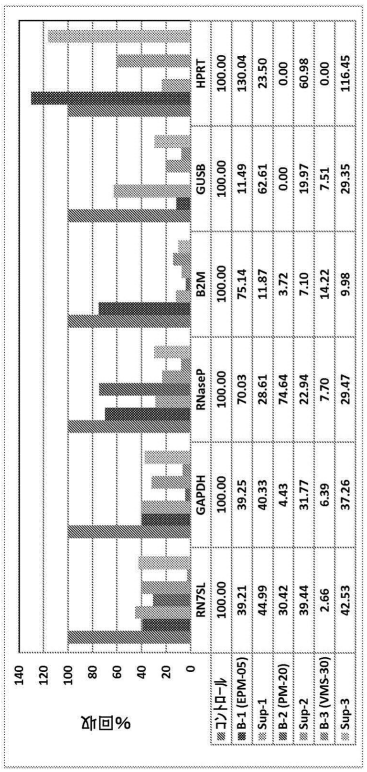
【図４６】

FIGURE 46



【図４７】

FIGURE 47



	RN7SL	GAPDH	RNaseP	B2M	GUSB	HPRT
コントロール	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
B-1 (EPM-05)	39.21	39.25	70.03	75.14	11.49	130.04
Sup-1	44.99	40.33	28.61	11.87	62.61	23.50
B-2 (PM-20)	30.42	4.43	74.64	3.72	0.00	0.00
Sup-2	39.44	31.77	22.94	7.10	19.97	60.98
B-3 (VMS-30)	2.66	6.39	7.70	14.22	7.51	0.00
Sup-3	42.53	37.26	29.47	9.98	29.35	116.45

ビーズ/上清間のRNA分配

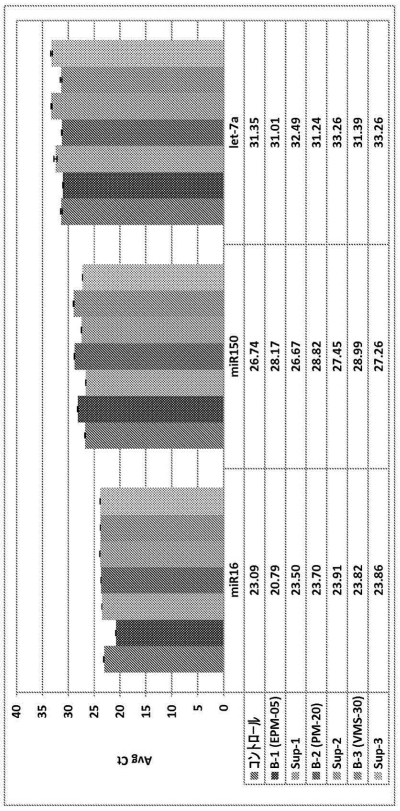
	B-1	B-2	B-3
RN7SL	0.87	0.77	0.06
GAPDH	0.97	0.14	0.17
RNaseP	2.45	3.25	0.26
B2M	6.33	0.52	1.42
GUSB	0.18	0.00	0.26
HPRT	5.53	0.00	0.00

ビーズ/上清間の遺伝的RNAの正規化分配(%)

	B-1	Sup-1	B-2	Sup-2	B-3	Sup-3
RN7SL	46.57	53.43	43.54	56.46	5.88	94.12
GAPDH	49.32	50.68	12.25	87.75	14.64	85.36
RNaseP	71.00	29.00	76.49	23.51	20.72	79.28
B2M	86.36	13.64	34.39	65.61	58.76	41.24
GUSB	15.50	84.50	0.01	99.99	20.37	79.63
HPRT	84.70	15.30	0.00	100.00	0.00	100.00

【図４８】

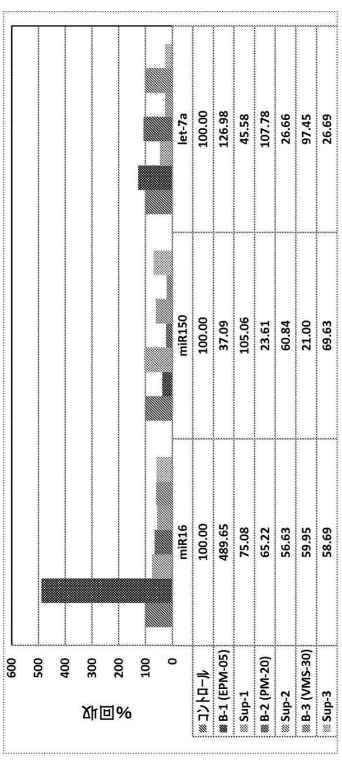
FIGURE 48



	miR16	miR150	let-7a
コントロール	23.09	26.74	31.35
B-1 (EPM-05)	20.79	28.17	31.01
Sup-1	23.50	26.67	32.49
B-2 (PM-20)	23.70	28.82	31.24
Sup-2	23.91	27.45	33.26
B-3 (VMS-30)	23.82	28.99	31.39
Sup-3	23.86	27.26	33.26

【図４９】

FIGURE 49



	miR16	miR150	let-7a
コントロール	100.00	100.00	100.00
B-1 (EPM-05)	489.65	37.09	126.98
Sup-1	75.08	105.06	45.58
B-2 (PM-20)	65.22	23.61	107.78
Sup-2	56.63	60.84	26.66
B-3 (VMS-30)	59.95	21.00	97.45
Sup-3	58.69	69.63	26.69

ビーズと上清間の正規化RNA量(%)

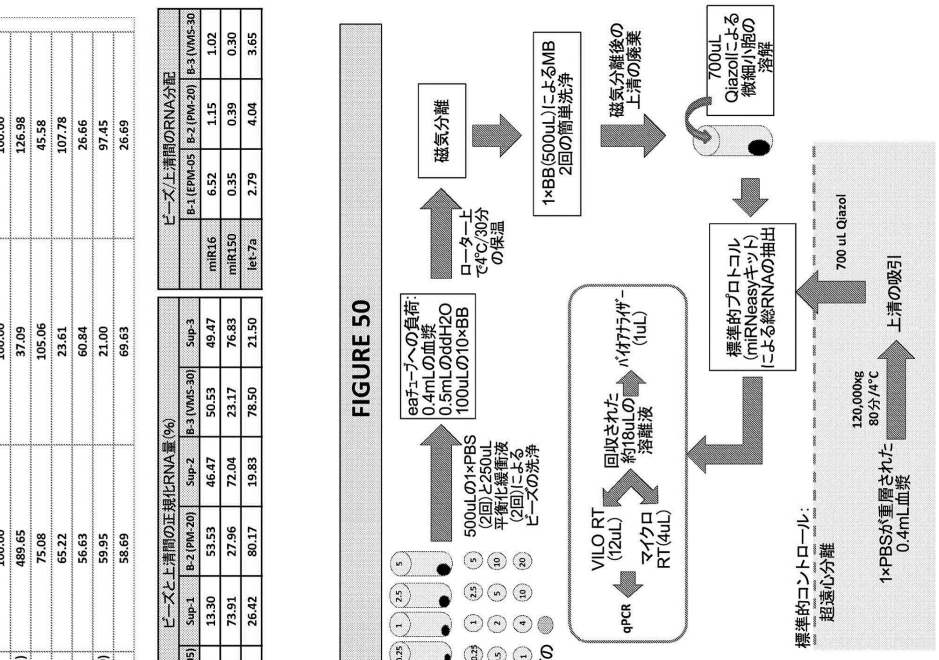
	B-1 (EPM-05)	Sup-1	B-2 (PM-20)	Sup-2	B-3 (VMS-30)	Sup-3
miR16	86.70	13.30	53.53	46.47	50.53	49.47
miR150	26.09	73.91	27.96	72.04	23.17	76.83
let-7a	73.58	26.42	80.17	19.83	78.50	21.50

ビーズ/上清間のRNA分配

	B-1 (EPM-05)	B-2 (PM-20)	B-3 (VMS-30)
miR16	6.52	1.15	1.02
miR150	0.35	0.39	0.30
let-7a	2.79	4.04	3.65

【図５０】

FIGURE 50



【図５１Ａ】

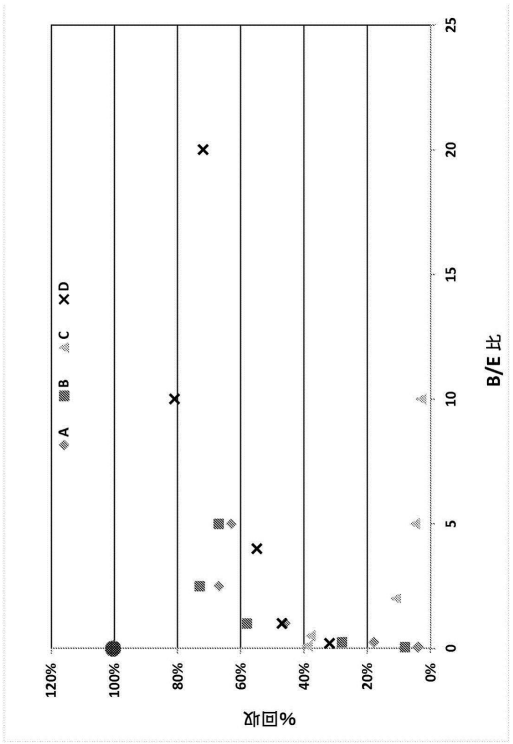


FIGURE 51A

【図５１Ｂ】

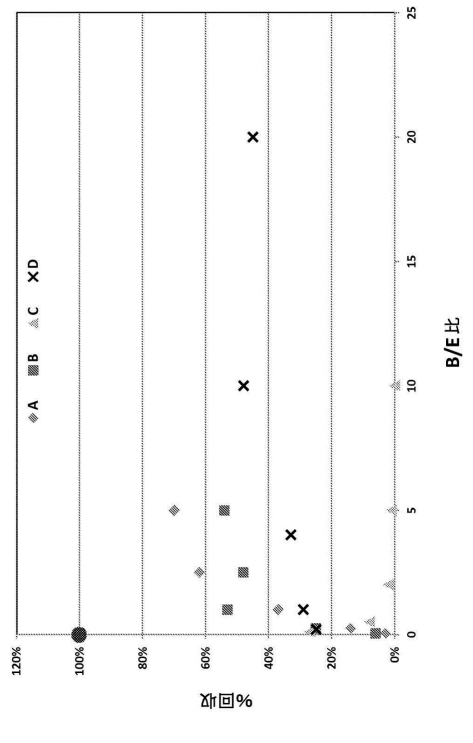


FIGURE 51B

【図５１Ｃ】

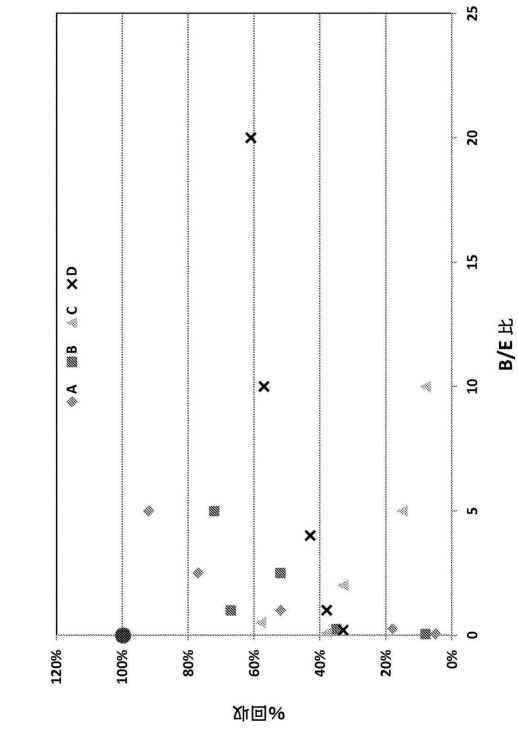


FIGURE 51C

【図５１Ｄ】

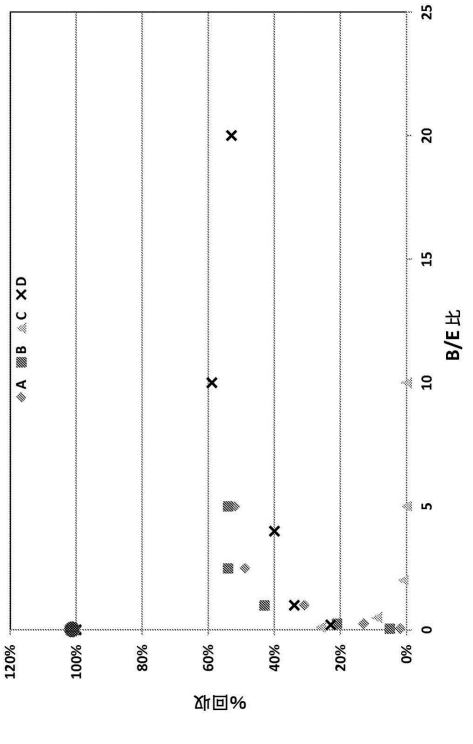


FIGURE 51D

【図５１Ｅ】

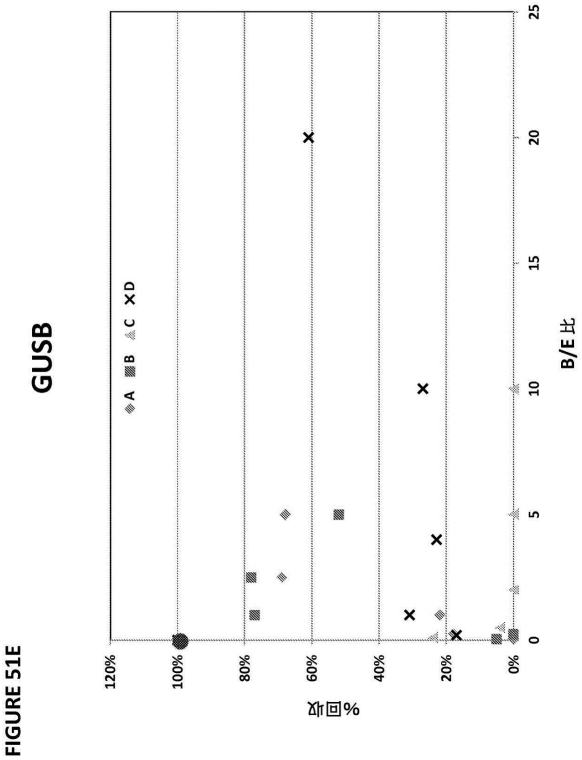


FIGURE 51E

【図５１Ｆ】

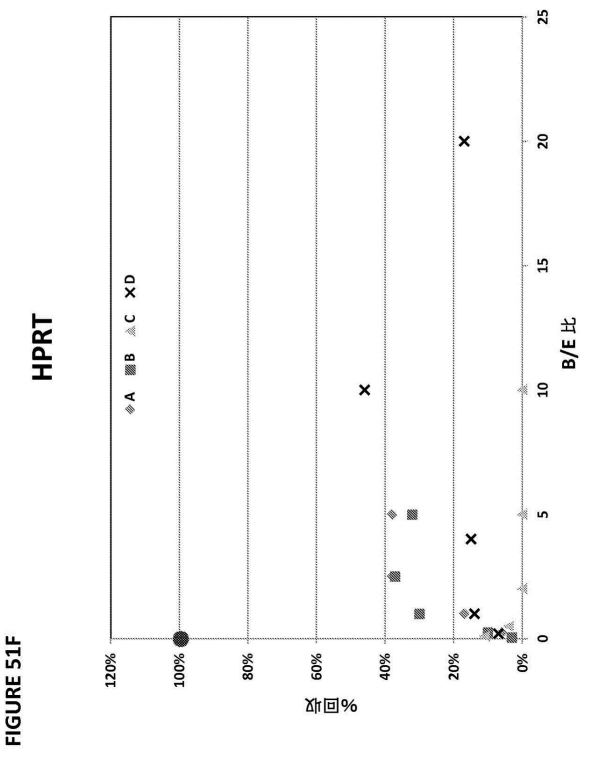


FIGURE 51F

【図５１Ｇ】

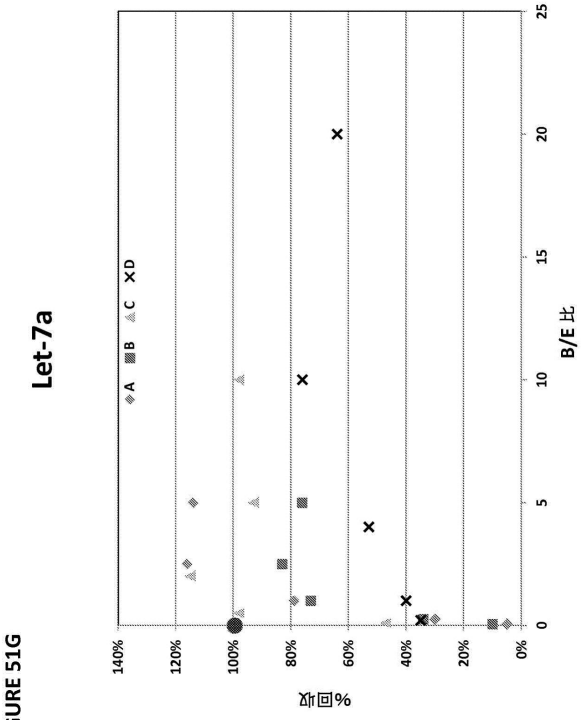
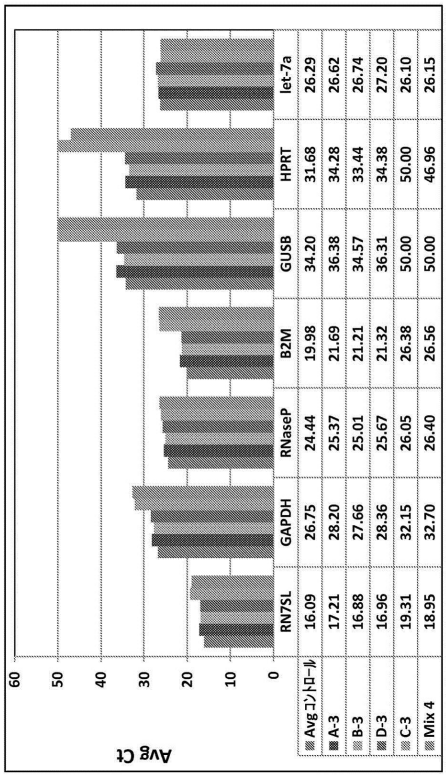


FIGURE 51G

【図５２】

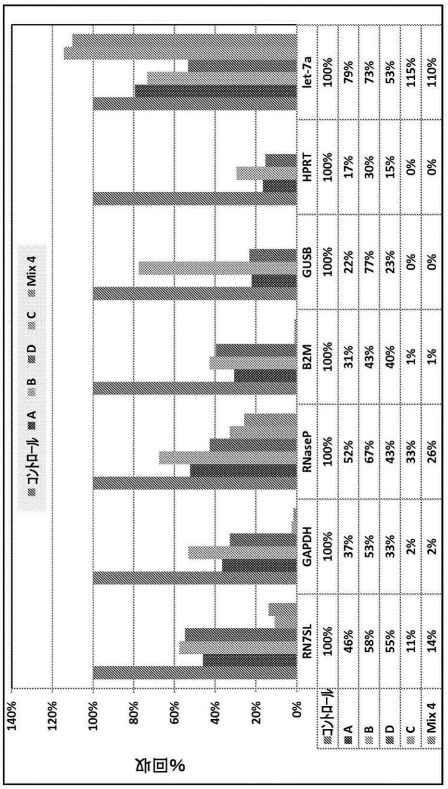


Avgコントロール	16.09	26.75	24.44	19.98	34.20	31.68	26.29
A-3	17.21	28.20	25.37	21.69	36.38	34.28	26.62
B-3	16.88	27.66	25.01	21.21	34.57	33.44	26.74
D-3	16.96	28.36	25.67	21.32	36.31	34.38	27.20
C-3	19.31	32.15	26.05	26.38	50.00	50.00	26.10
Mix 4	18.95	32.70	26.40	26.56	50.00	46.96	26.15
	RN7SL	GAPDH	RNaseP	B2M	GUSB	HPRT	let-7a

FIGURE 52

【図５３】

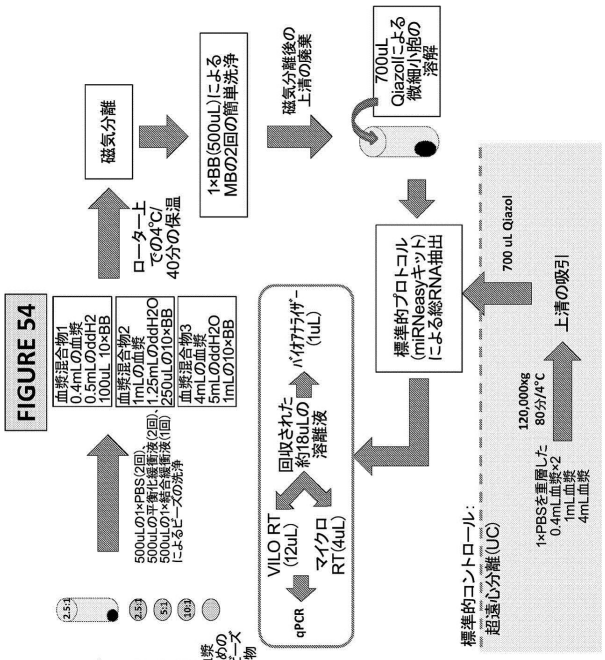
FIGURE 53



	RN7SL	GAPDH	RNaseP	B2M	GUSB	HPRT	let-7a
コントロール	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
A	46%	37%	52%	31%	22%	17%	79%
B	58%	53%	67%	43%	77%	30%	73%
D	55%	33%	43%	40%	23%	15%	53%
C	11%	2%	33%	1%	0%	0%	115%
Mix 4	14%	2%	26%	1%	0%	0%	110%

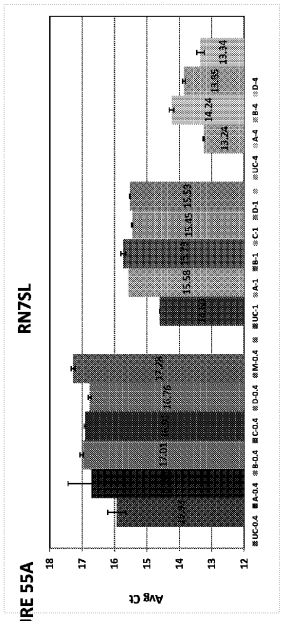
【図５４】

FIGURE 54



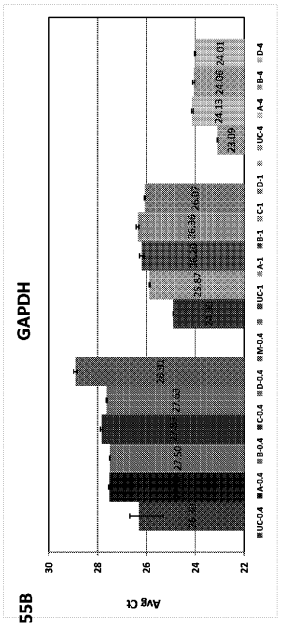
【図５５Ａ】

FIGURE 55A



【図５５Ｂ】

FIGURE 55B



【図５５Ｃ】

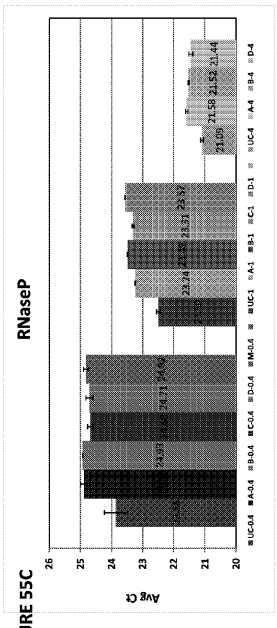


FIGURE 55C

【図５５Ｄ】

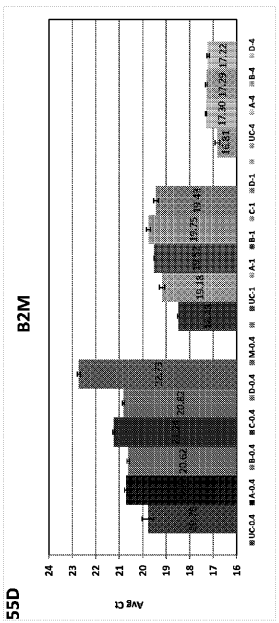


FIGURE 55D

【図５５Ｅ】

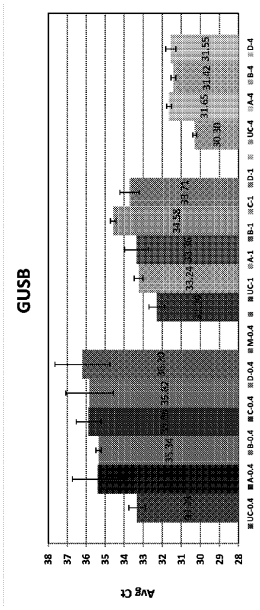


FIGURE 55E

【図５５Ｆ】

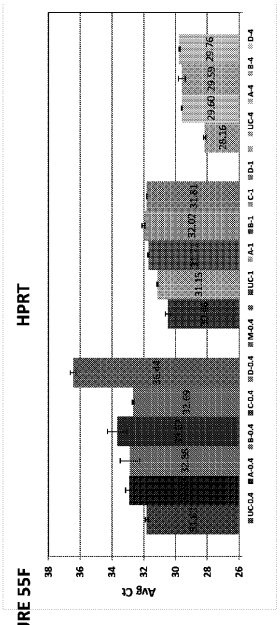


FIGURE 55F

【図５５Ｇ】

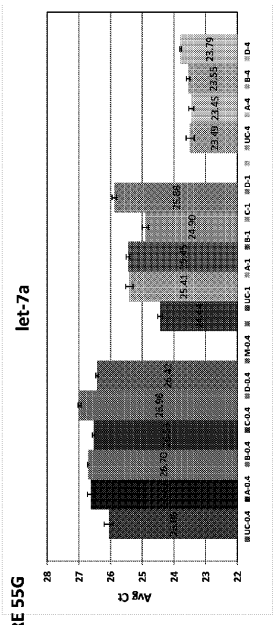
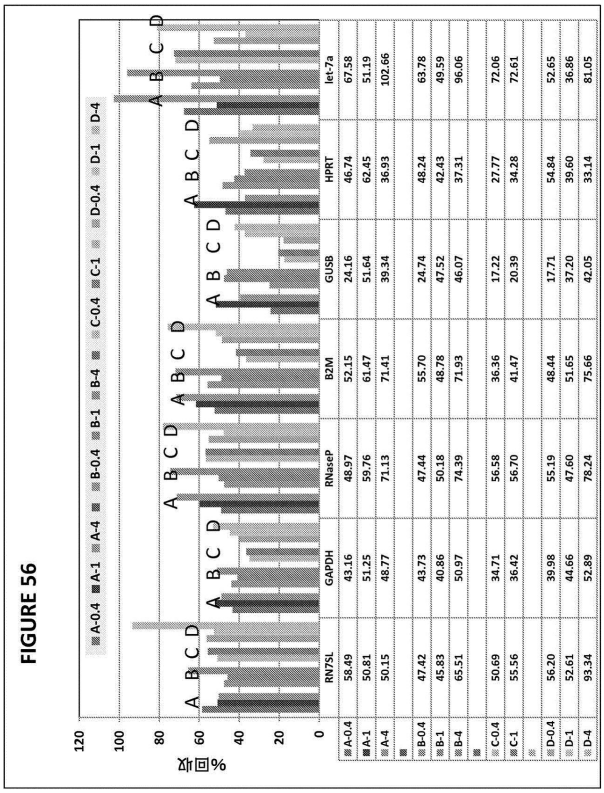


FIGURE 55G

【図５６】



	RN7SL	GAPDH	RNaseP	B2M	GUSB	HPRT	let-7a
A-0.4	58.49	43.16	48.97	52.15	24.16	46.74	67.58
A-1	50.81	51.25	59.76	61.47	51.64	62.45	51.19
A-4	50.15	48.77	71.13	71.41	39.34	36.93	102.66
B-0.4	47.42	43.73	47.44	55.70	24.74	48.24	63.78
B-1	45.83	40.86	50.18	48.78	47.52	42.43	49.59
B-4	65.51	50.97	74.39	71.93	46.07	37.31	96.06
C-0.4	50.69	34.71	56.58	36.36	17.22	27.77	72.06
C-1	55.56	36.42	56.70	41.47	20.39	34.28	72.61
D-0.4	56.20	39.98	55.19	48.44	17.71	54.84	52.65
D-1	52.61	44.66	47.60	51.65	37.20	39.60	36.86
D-4	93.34	52.89	78.24	75.66	42.05	33.14	81.05

FIGURE 56

【図５７】

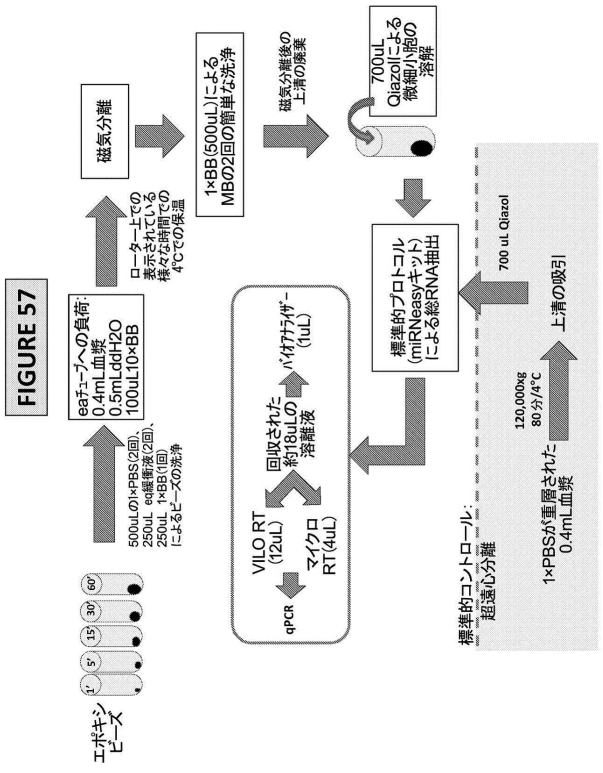
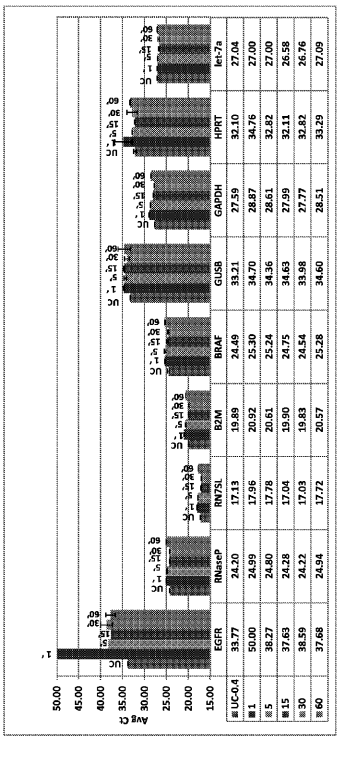


FIGURE 57

【図５８】

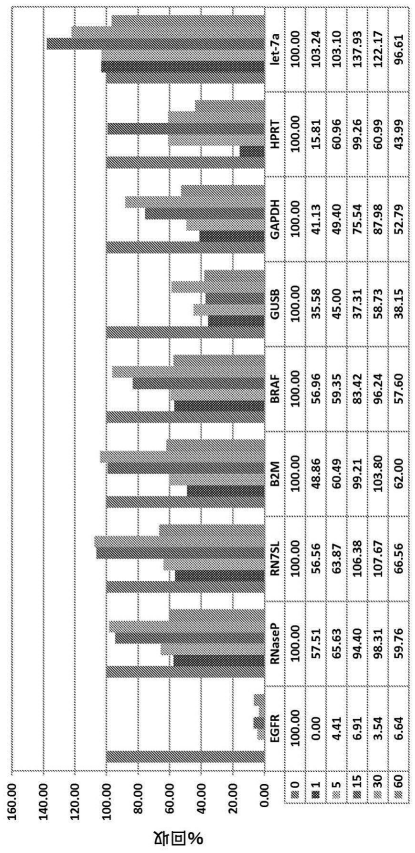


	EGFR	RNaseP	RN7SL	B2M	BRAF	GUSB	GAPDH	HPRT	let-7a
UC-0.4	33.77	24.20	17.13	19.89	24.49	33.21	27.59	32.10	27.04
1	50.00	24.99	17.96	20.92	25.30	34.70	28.87	34.76	27.00
5	38.27	24.80	17.78	20.61	25.24	34.36	28.61	32.82	27.00
15	37.63	24.28	17.04	19.90	24.75	34.63	27.99	32.11	26.58
30	38.59	24.22	17.03	19.83	24.54	33.98	27.77	32.82	26.76
60	37.68	24.94	17.72	20.57	25.28	34.60	28.51	33.29	27.09

FIGURE 58

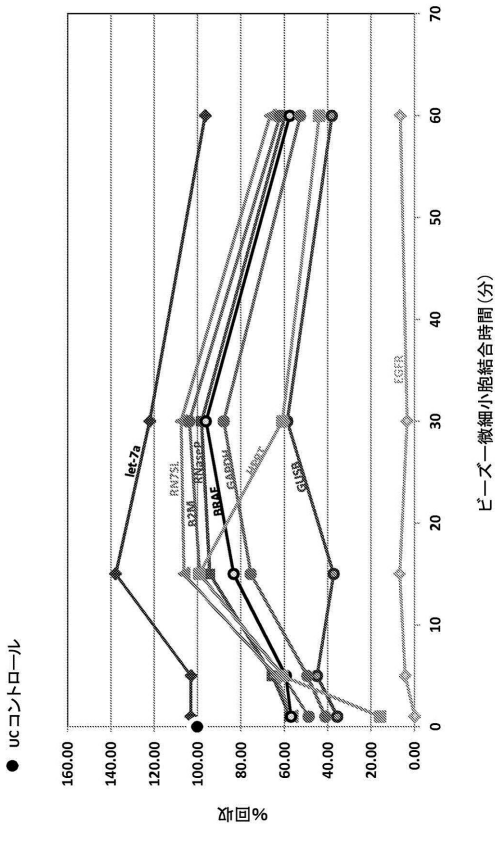
【図５９】

FIGURE 59



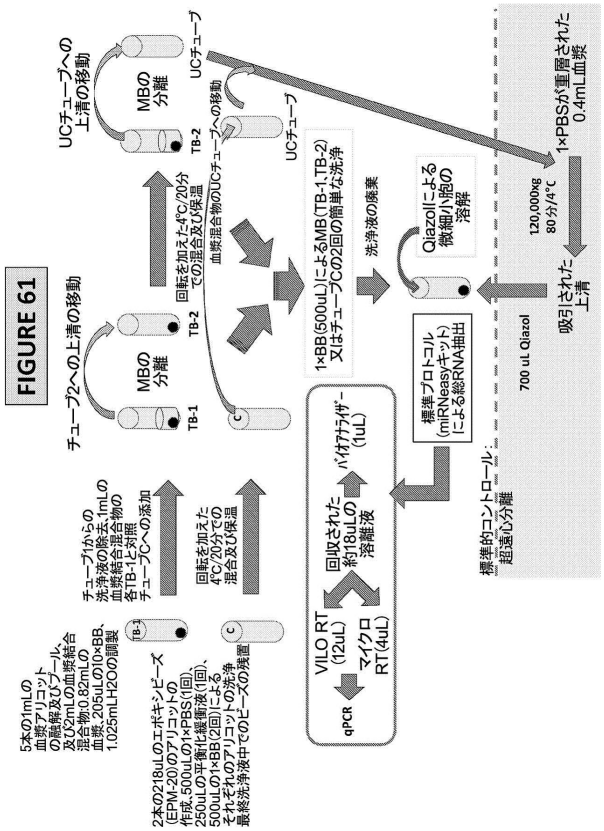
【図６０】

FIGURE 60



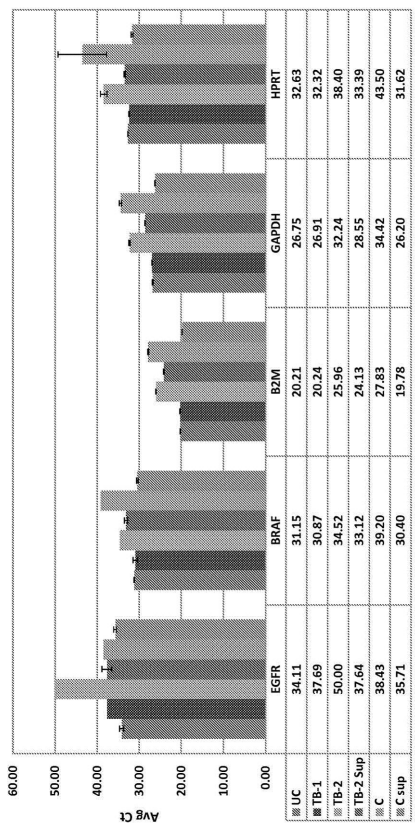
【図６１】

FIGURE 61



【図６２】

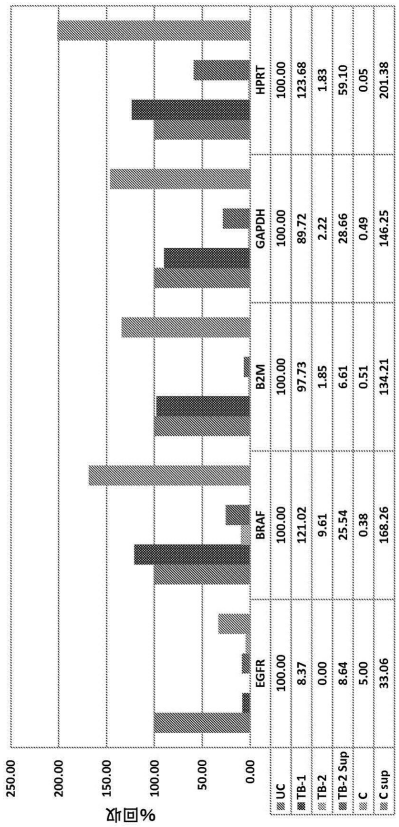
FIGURE 62



UC: 超遠心コントロール
TB-1: 1st ビーズアリコートに結合した微細小胞
TB-2: 2nd ビーズアリコートに結合した微細小胞
TB-2 Sup: 2nd ビーズアリコートからの上清に存在する微細小胞
C: ビーズなしのコントロール(チューブ壁に吸着した微細小胞)
C Sup: 非吸着微細小胞のコントロール(上清に存在)

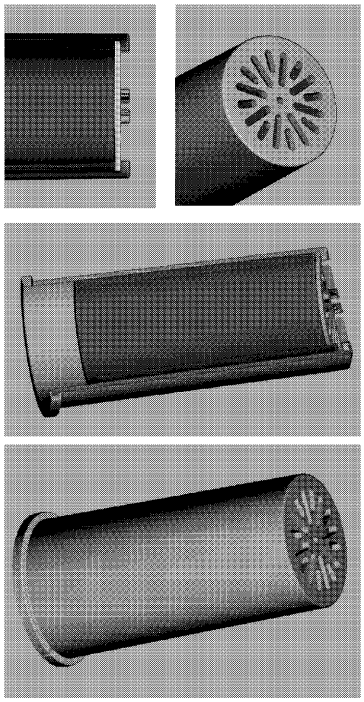
【図６３】

FIGURE 63



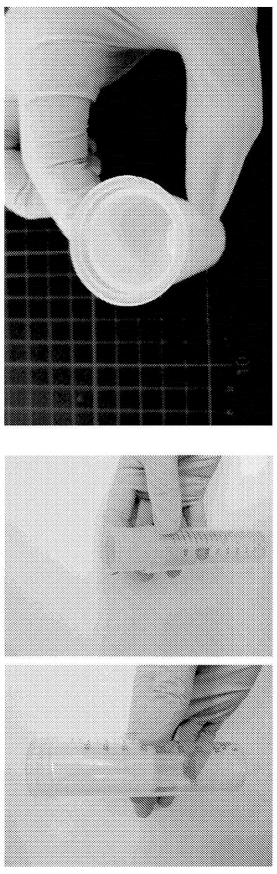
【図６４】

Figure 64



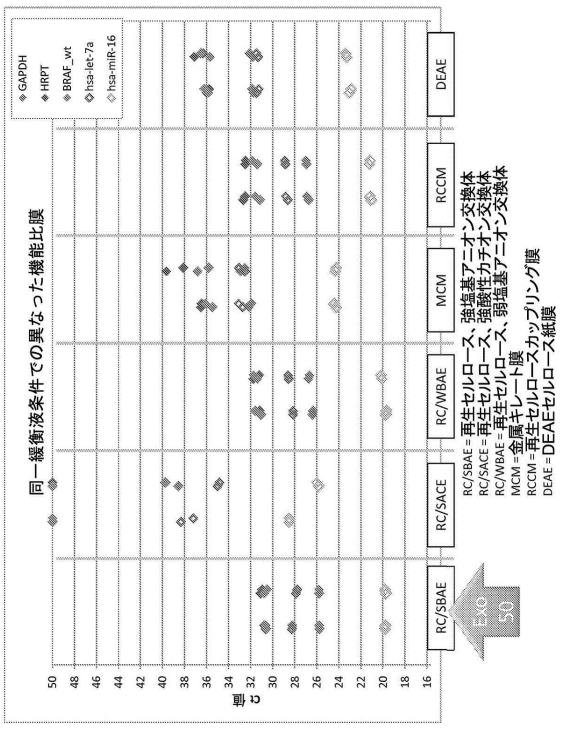
【図６５】

Figure 65
EXO50 スピン カラム



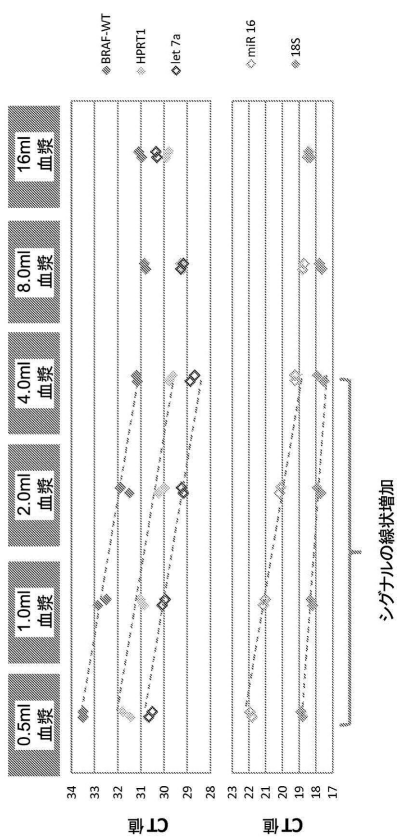
【図６６】

Figure 66



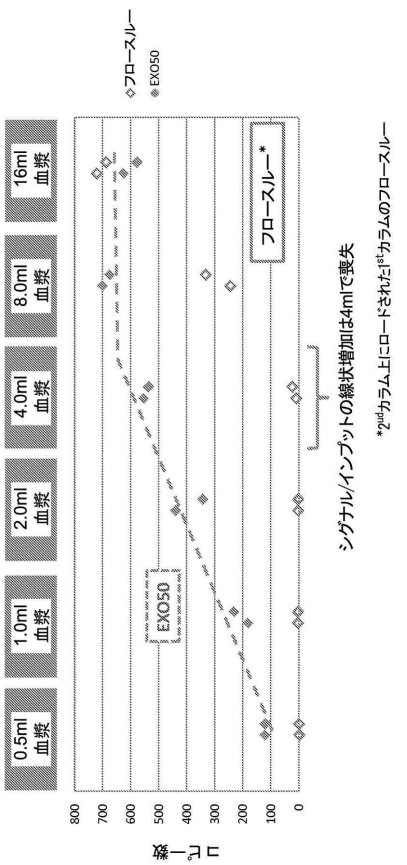
【図６７】

Figure 67



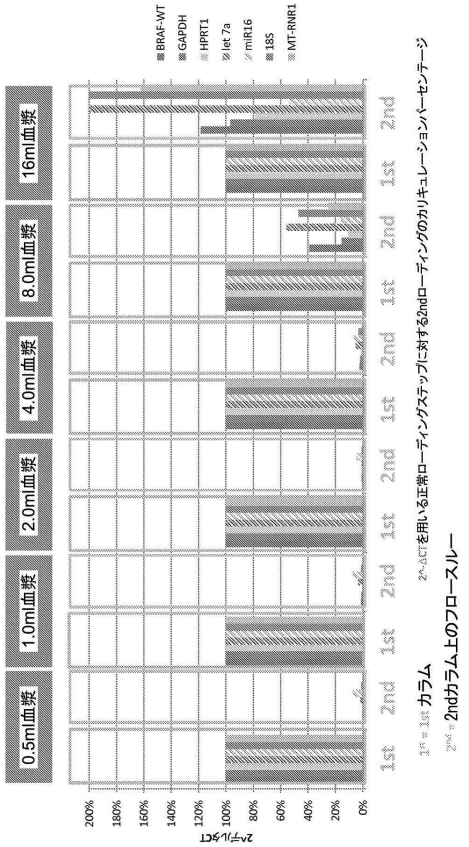
【図６８】

Figure 68



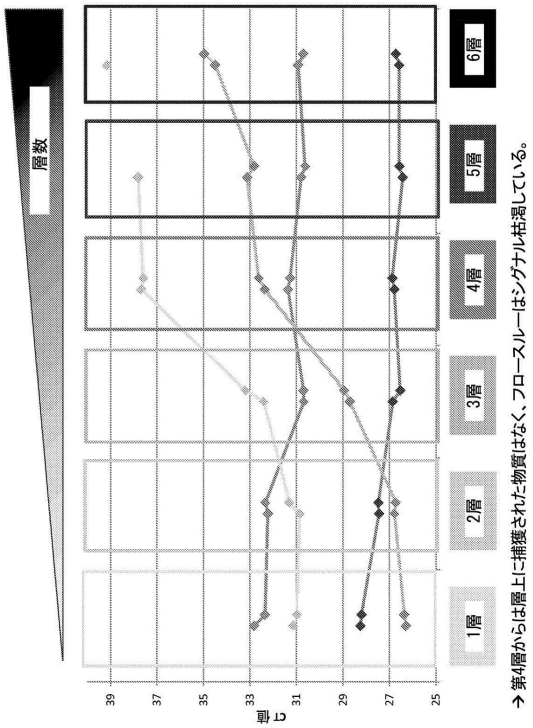
【図６９】

Figure 69



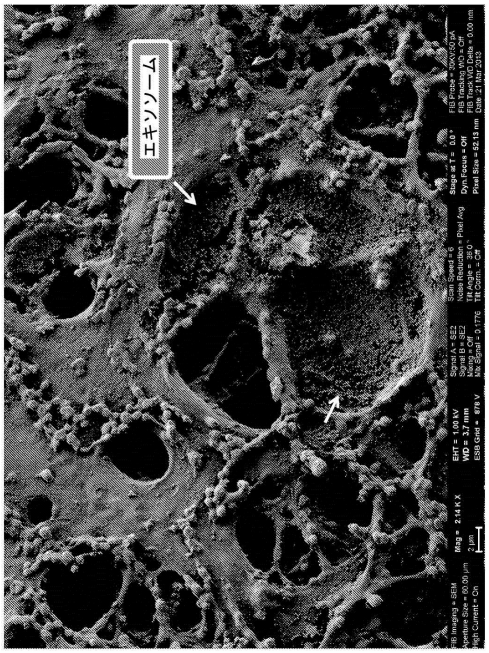
【図７０】

Figure 70



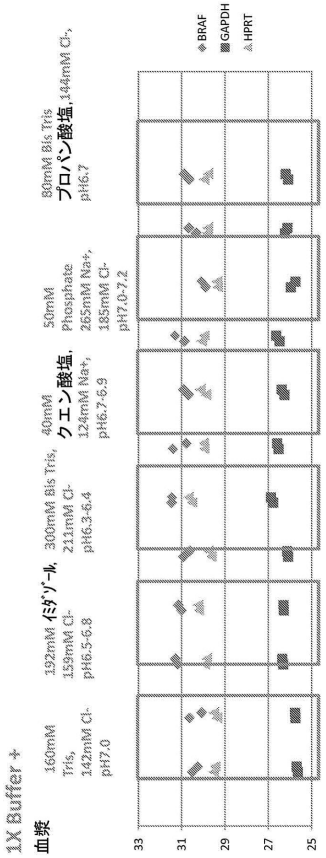
【図７１】

Figure 71



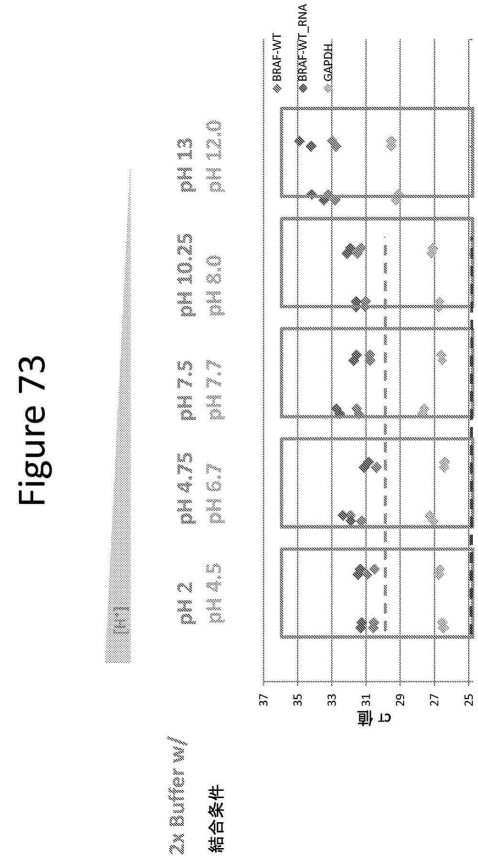
【図７２】

Figure 72



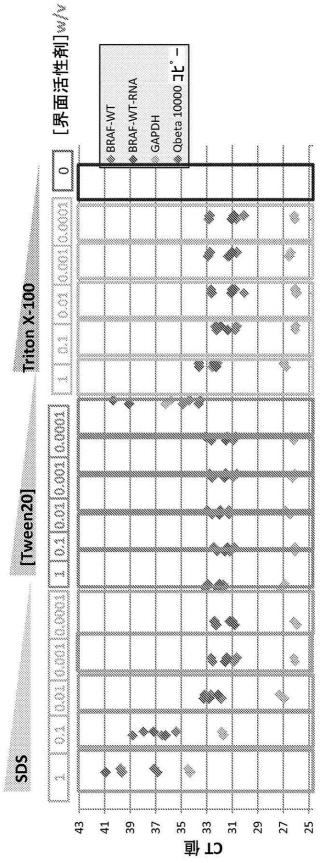
【図７３】

Figure 73



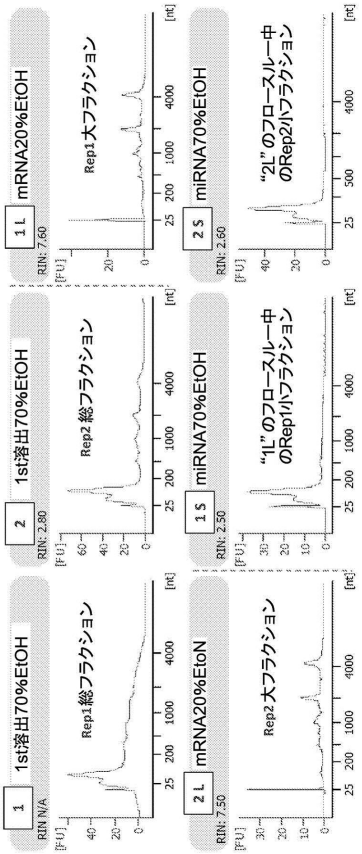
【図７４】

Figure 74



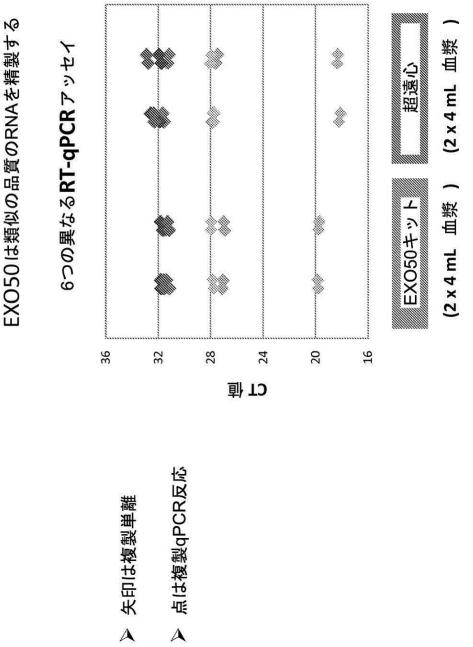
【図７５】

Figure 75



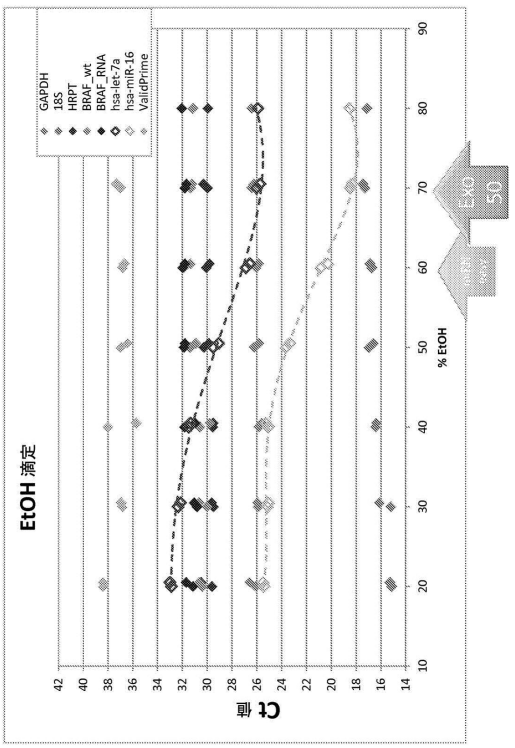
【図７６】

Figure 76



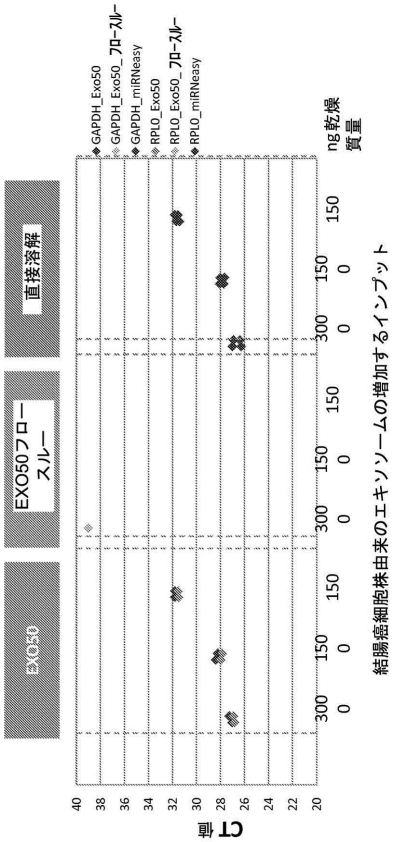
【図７７】

Figure 77



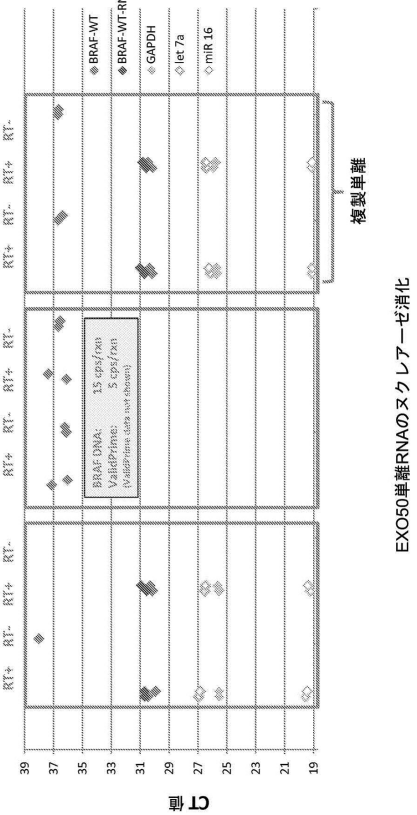
【図７８】

Figure 78



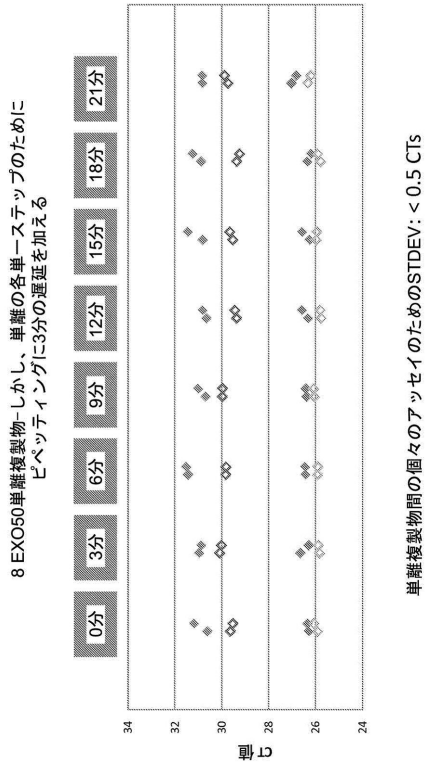
【図７９】

Figure 79



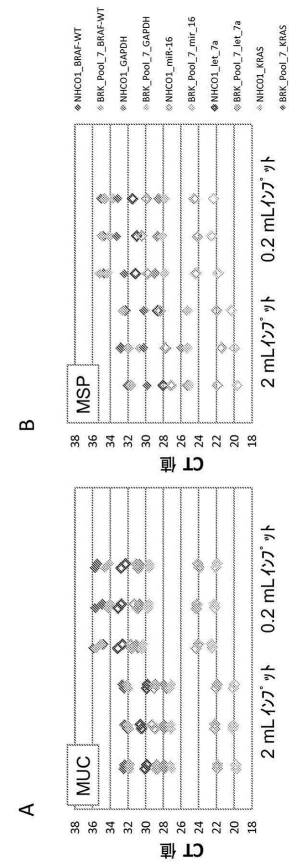
【図８０】

Figure 80



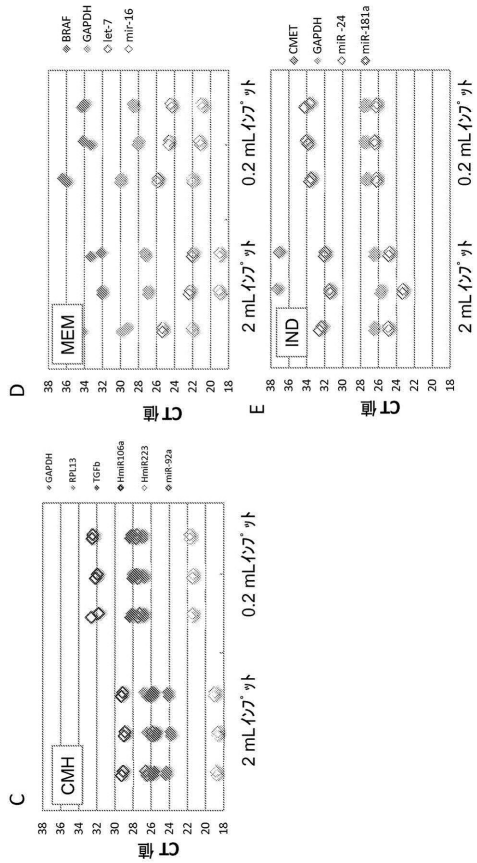
【図８１Ａ】

Figure 81



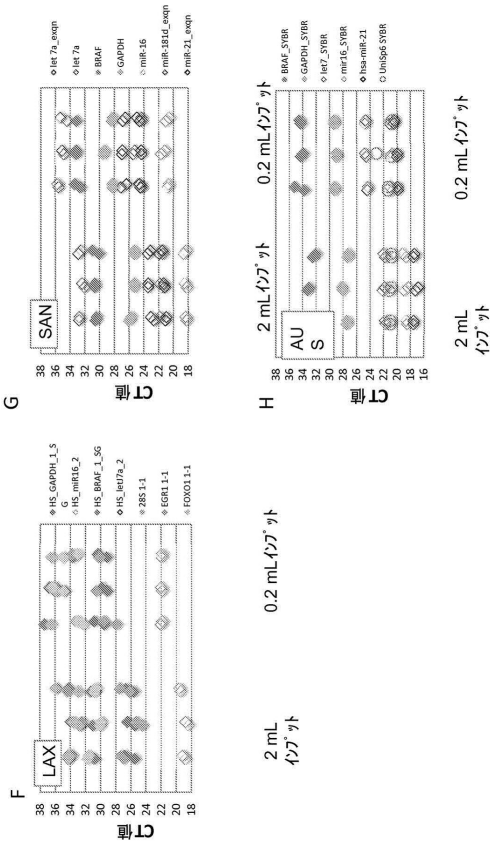
【図８１Ｂ】

Figure 81 Continued



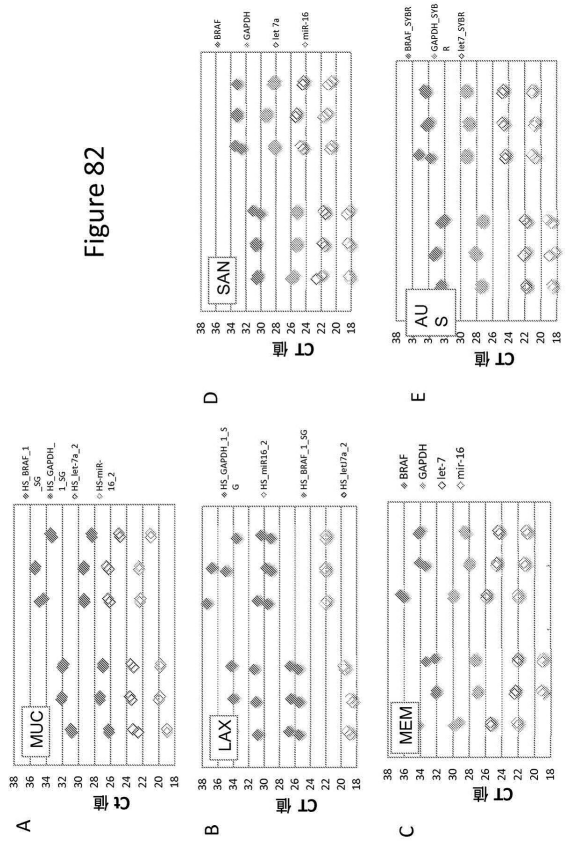
【図８１Ｃ】

Figure 81 continued



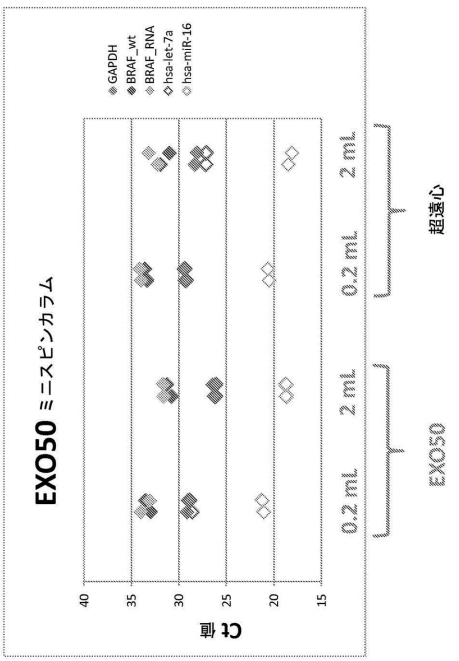
【図８２】

Figure 82



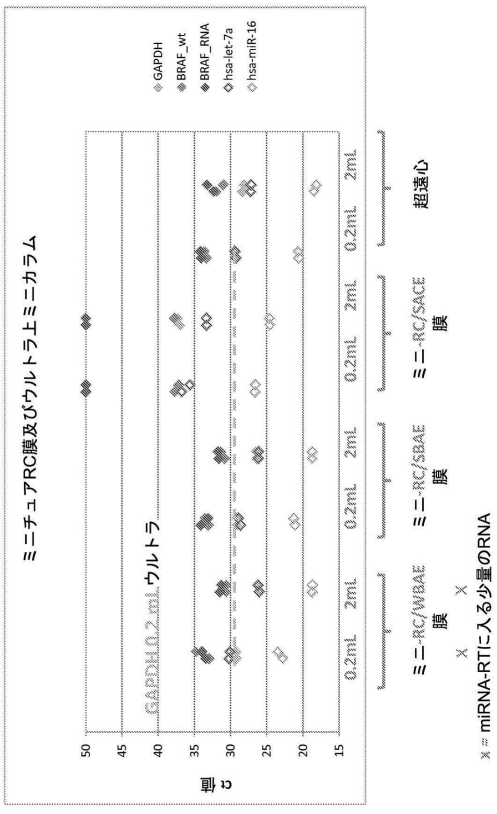
【図８３】

Figure 83

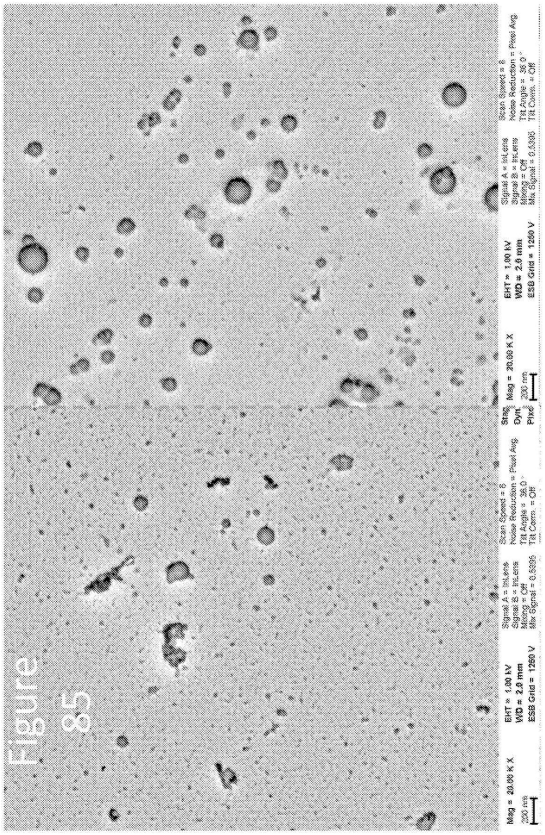


【図８４】

Figure 84

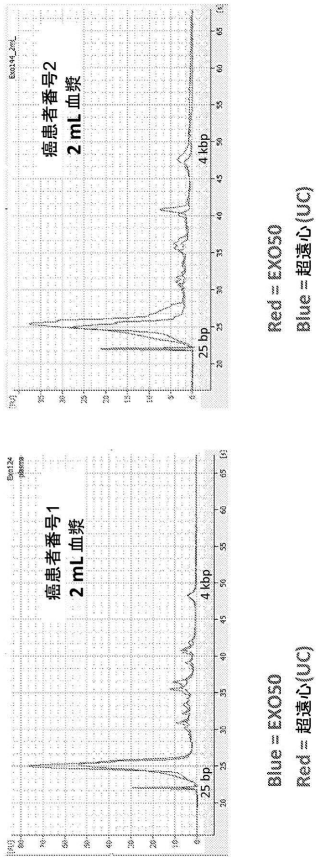


【図８５】



【図８６】

Figure 86

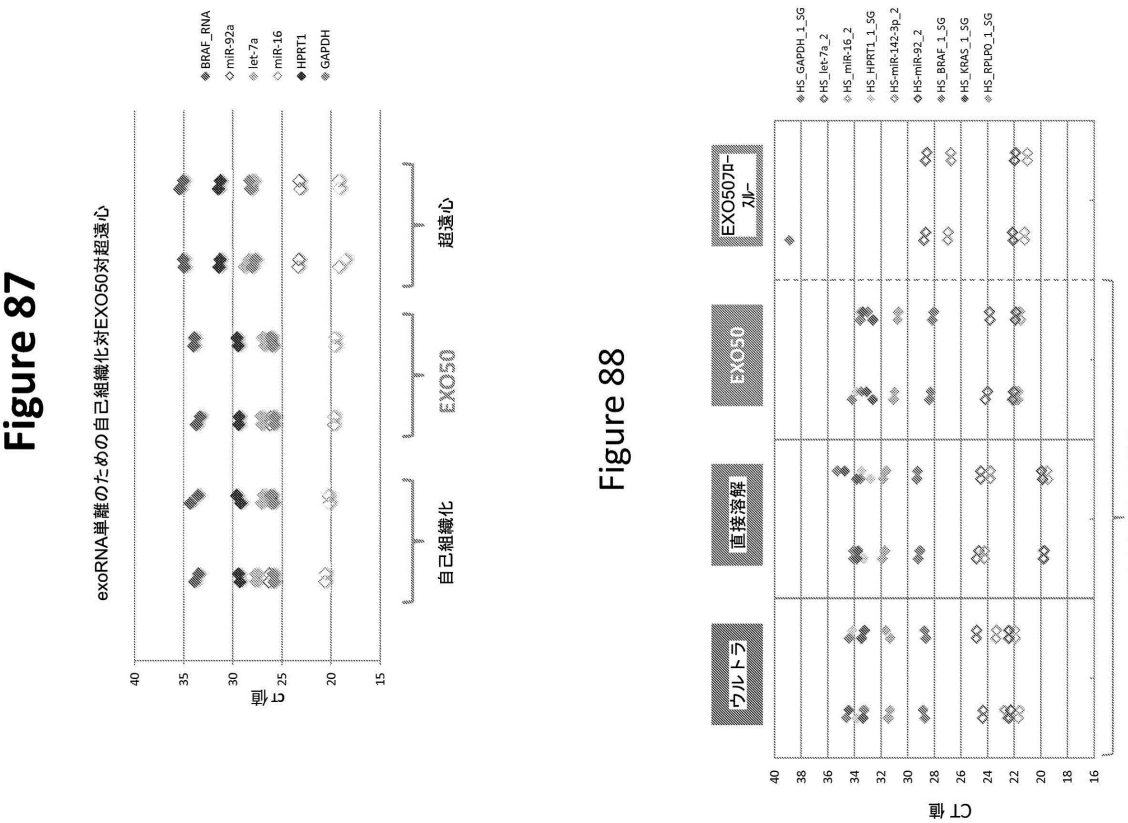


【図８７】

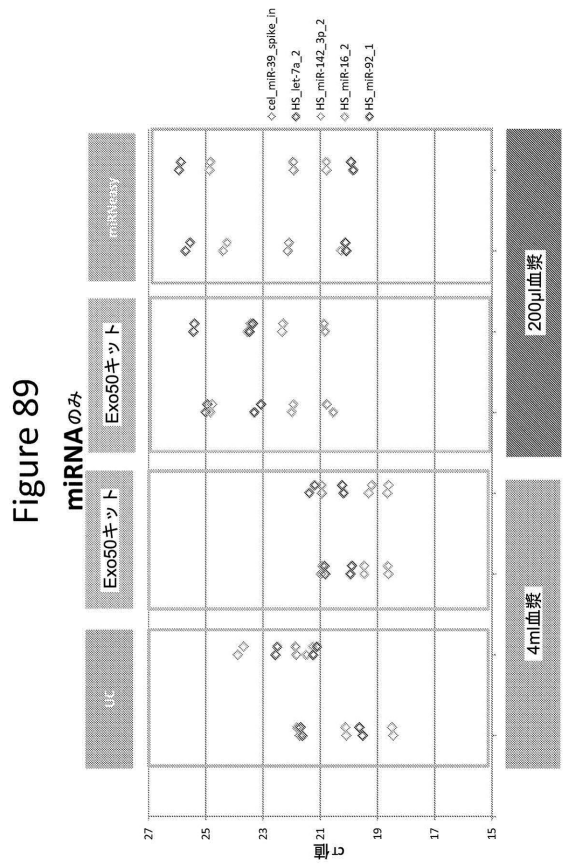
Figure 87

【図８８】

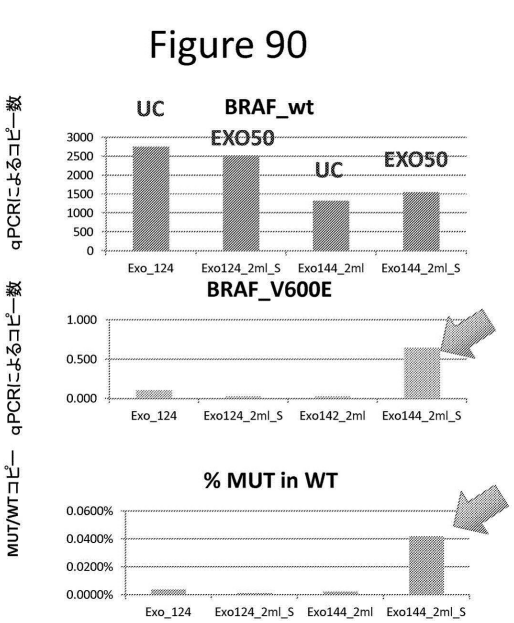
Figure 88



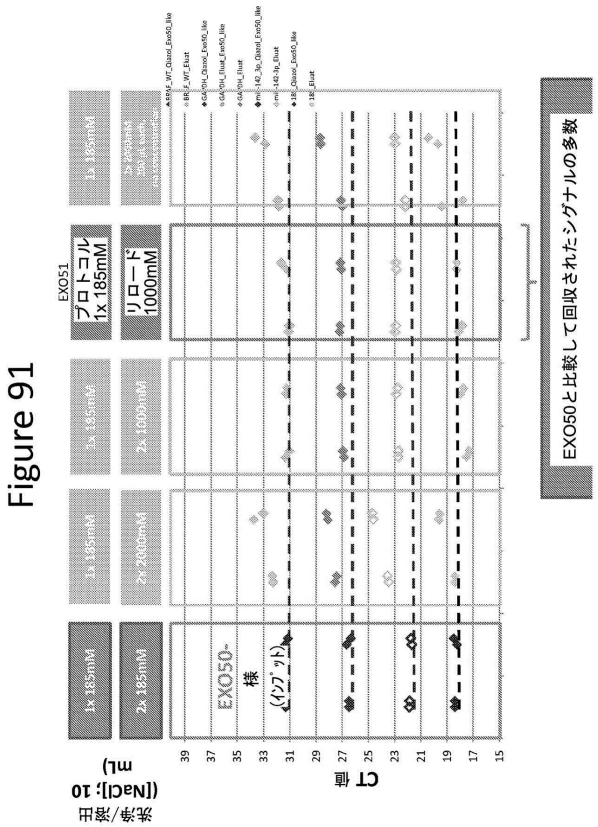
【図８９】



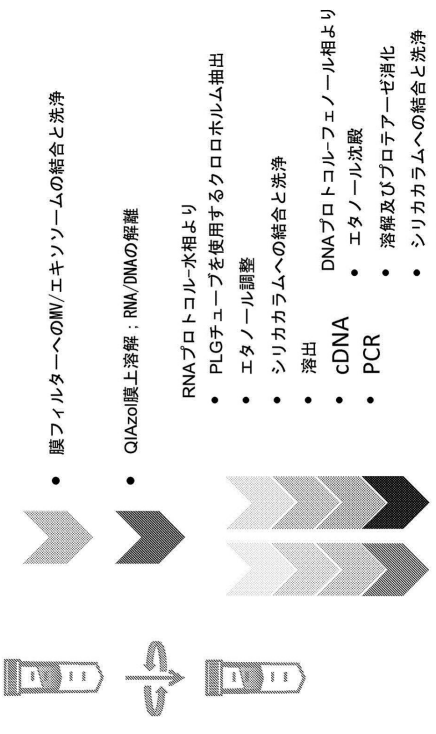
【図９０】



【図９１】

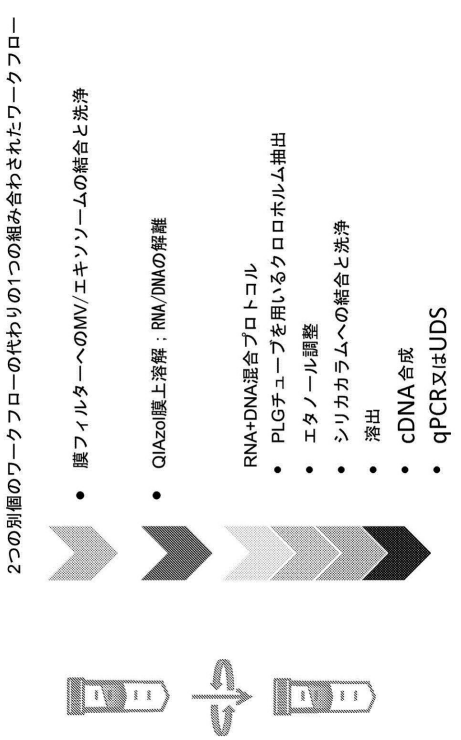


【図９２】



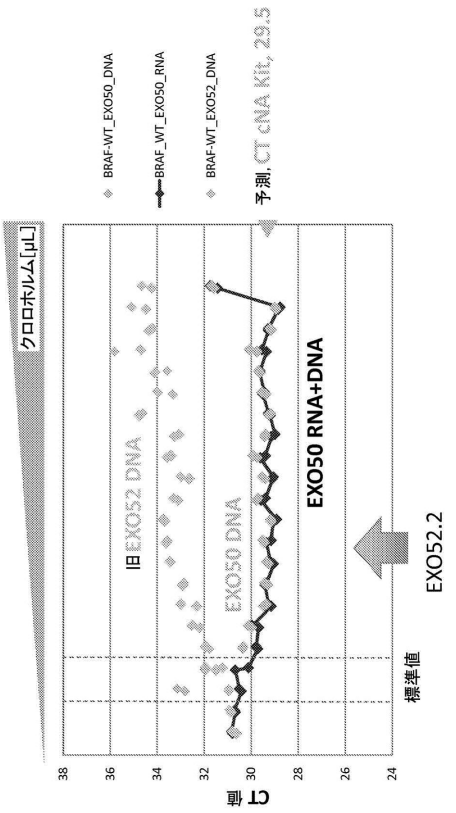
【図９３】

Figure 93



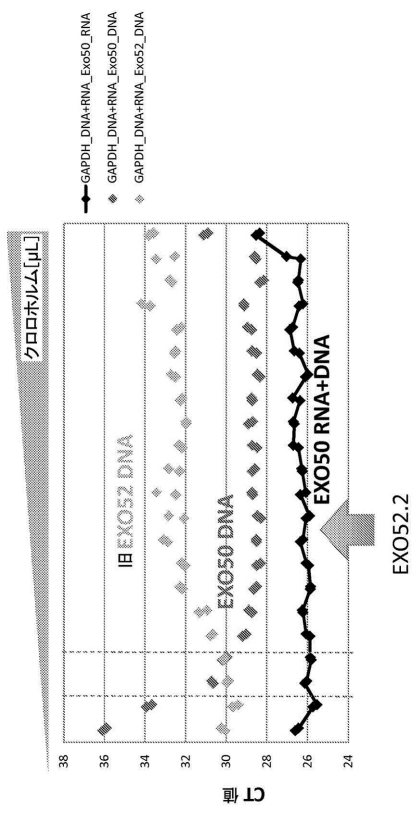
【図９４】

Figure 94



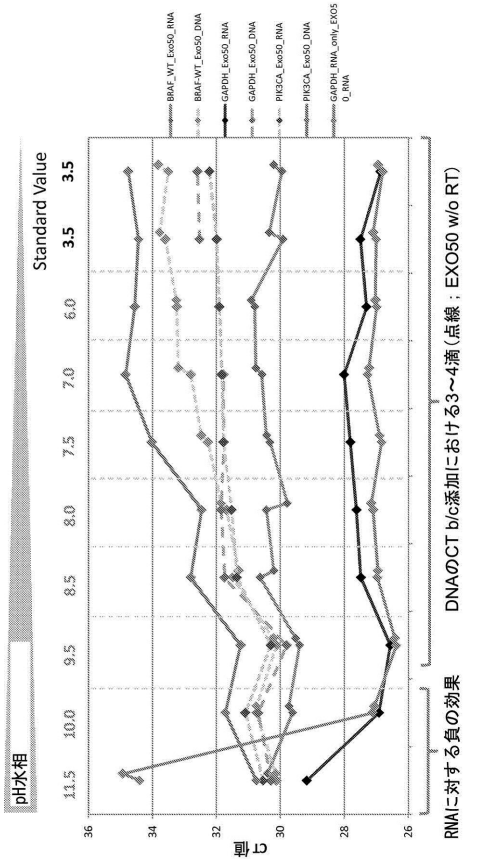
【図９５】

Figure 95



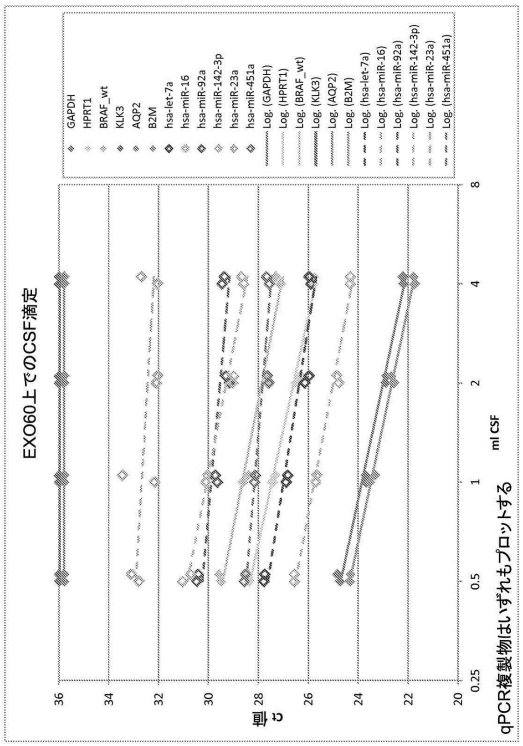
【図９６】

Figure 96



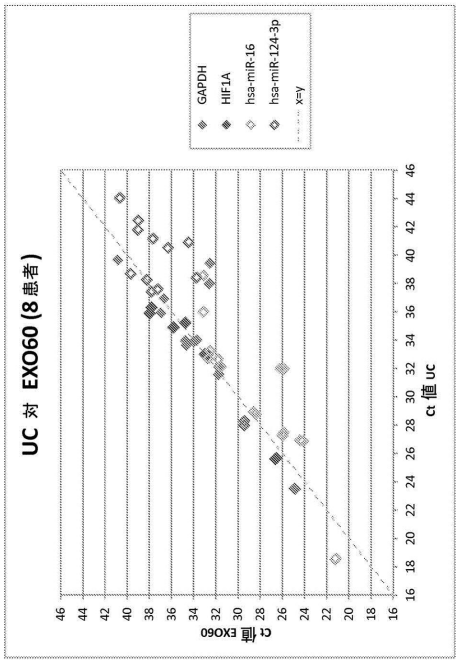
【図９７】

Figure 97



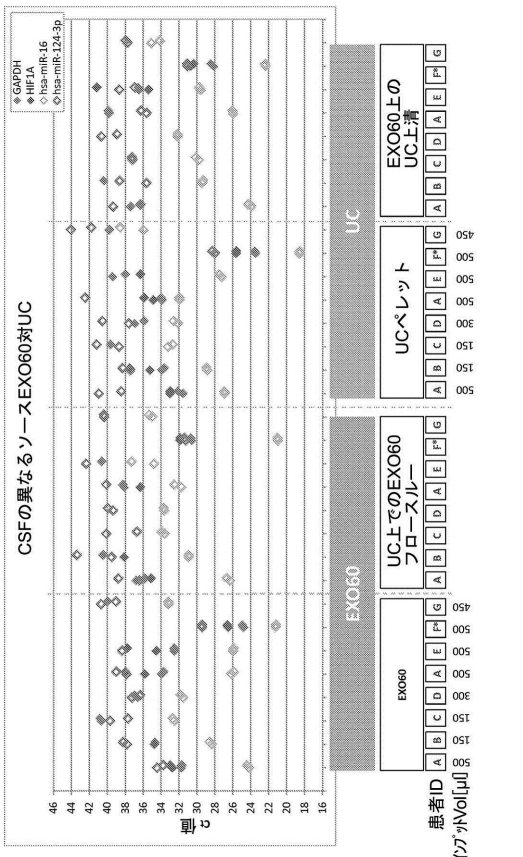
【図９８】

Figure 98



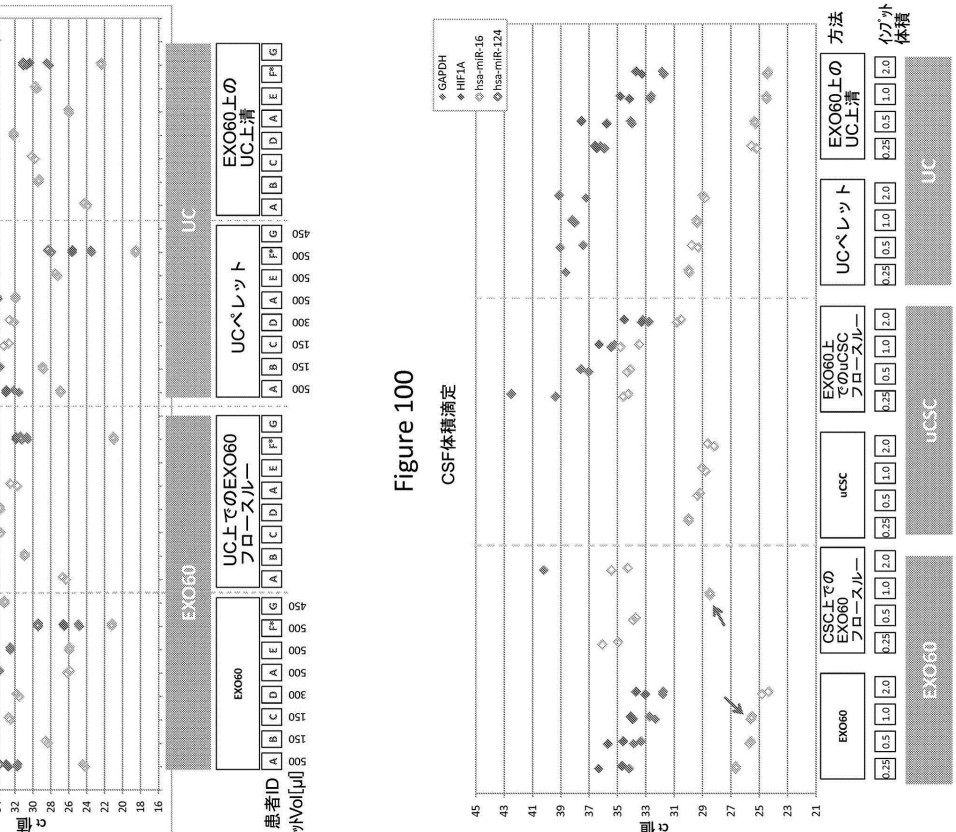
【図９９】

Figure 99



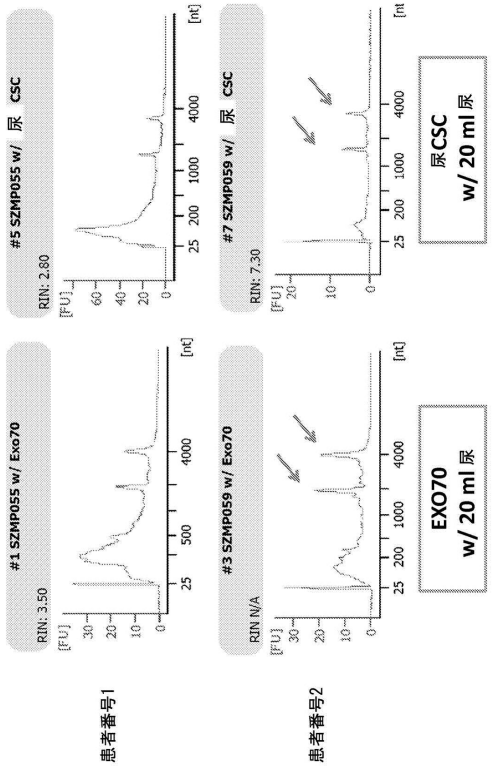
【図１００】

Figure 100



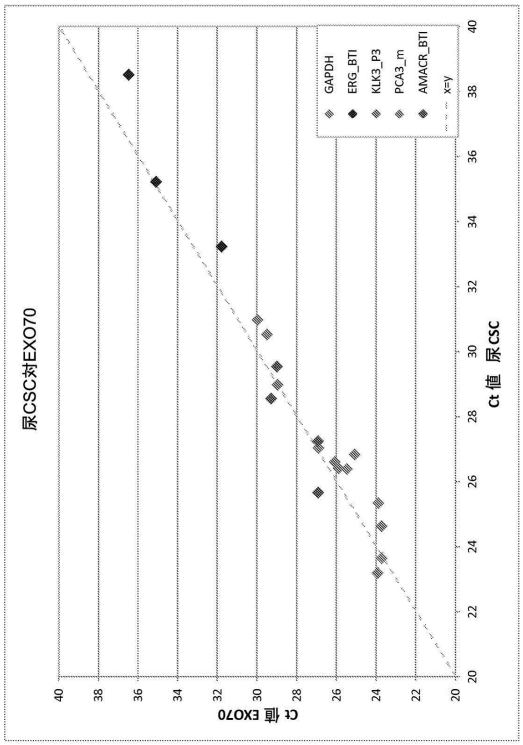
【図１０１】

Figure 101



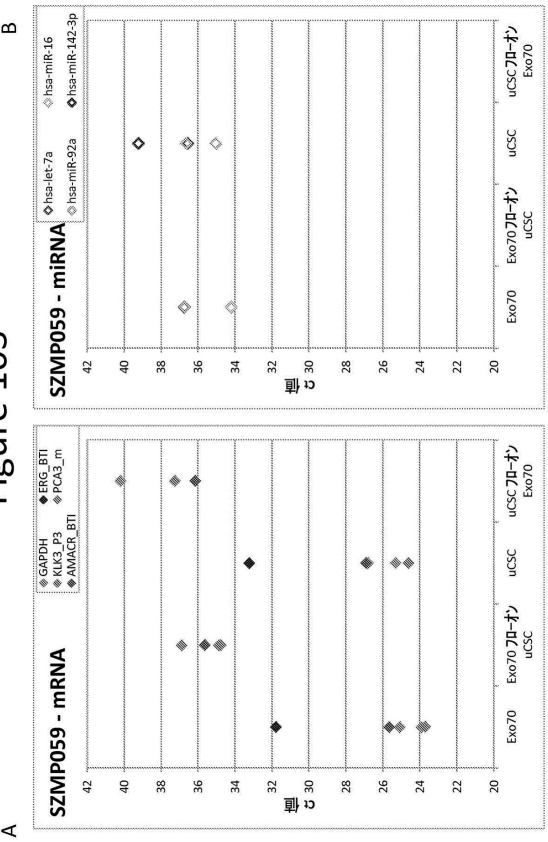
【図１０２】

Figure 102



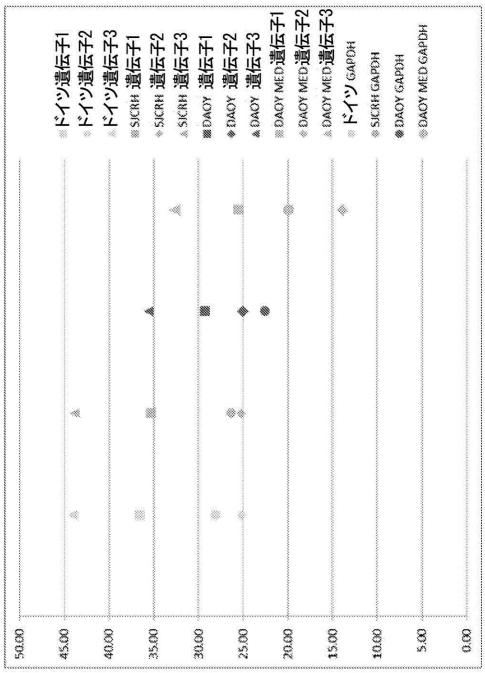
【図１０３】

Figure 103



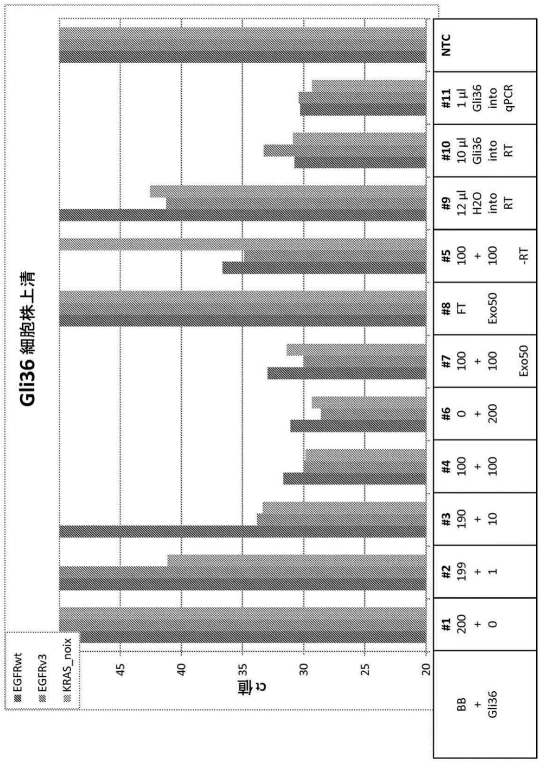
【図１０４】

Figure 104



【図１０５】

Figure 105



【配列表】

0006449781000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100134784
弁理士 中村 和美
(72)発明者 ダニエル エンダール
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００３２, ニューヨーク, ブロードウェイ ３９６０, ザ ラスカー バイオメディカル リサーチ ビルディング, スイート ５４０
(72)発明者 アパルナ ラマチャンドラン
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００３２, ニューヨーク, ブロードウェイ ３９６０, ザ ラスカー バイオメディカル リサーチ ビルディング, スイート ５４０
(72)発明者 ハオホゥオン ヤン
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００３２, ニューヨーク, ブロードウェイ ３９６０, ザ ラスカー バイオメディカル リサーチ ビルディング, スイート ５４０
(72)発明者 エミリー バーグホフ
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００３２, ニューヨーク, ブロードウェイ ３９６０, ザ ラスカー バイオメディカル リサーチ ビルディング, スイート ５４０
(72)発明者 タイ－フェン ウェイ
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００３２, ニューヨーク, ブロードウェイ ３９６０, ザ ラスカー バイオメディカル リサーチ ビルディング, スイート ５４０
(72)発明者 ミゲル ナアホルム
ドイツ連邦共和国, ８２１３１ ガウティング, プロイジングシュトラーセ ２１
(72)発明者 ヨハン カール オロフ スコグ
アメリカ合衆国, ニューヨーク １００６９, ニューヨーク, ウエスト シックスティサード ストリート ４００, アパートメント ＃４０７

審査官 金田 康平

(56)参考文献 国際公開第２０１２／１７４２８２（WO, A2）
国際公開第２０１２／０８７２４１（WO, A1）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）