

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6562897号  
(P6562897)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int.Cl.

F 1

|              |           |              |         |
|--------------|-----------|--------------|---------|
| C 12 N 15/09 | (2006.01) | C 12 N 15/09 | Z N A Z |
| A 61 K 35/28 | (2015.01) | A 61 K 35/28 |         |
| A 61 P 9/00  | (2006.01) | A 61 P 9/00  |         |
| A 61 P 25/00 | (2006.01) | A 61 P 25/00 |         |
| A 61 P 43/00 | (2006.01) | A 61 P 43/00 | 1 O 5   |

請求項の数 19 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-501590 (P2016-501590)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月12日 (2014.3.12)  
 (65) 公表番号 特表2016-518109 (P2016-518109A)  
 (43) 公表日 平成28年6月23日 (2016.6.23)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2014/024629  
 (87) 國際公開番号 WO2014/159662  
 (87) 國際公開日 平成26年10月2日 (2014.10.2)  
 審査請求日 平成29年3月10日 (2017.3.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/778,591  
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013.3.13)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 510250892  
ユニバーシティ オブ マイアミ  
UNIVERSITY OF MIAMI  
アメリカ合衆国 33136 フロリダ州マイ  
アミ、ノースウェスト・セブンス・アベニ  
ュー 1951番、サード・フロア、スウェイ  
ート 310、オフィス・オブ・テクノロジ  
ー・トランシスファー  
(74) 代理人 100106518  
弁理士 松谷 道子  
(74) 代理人 100123201  
弁理士 富田 慎史  
(74) 代理人 100157956  
弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養上清および生体液からの微小胞の単離および精製のための方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- (a) 骨髄由来の間葉系幹細胞から微小胞を含有する生体液を得るステップ；
  - (b) 細胞デブリを除去するために生体液を清澄化するステップ；
  - (c) 清澄化された生体液にポリエチレングリコールを含む沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ；
  - (d) 沈殿した微小胞を収集するステップ；
  - (e) 沈殿剤を除去するために沈殿した微小胞を洗浄するステップ；および
  - (f) 所望により、保存またはその後の使用のために、該微小胞を溶液中に懸濁し、単離された微小胞の調製物を產生するステップ
- を含む方法であって、微小胞が、創傷治癒、特に皮膚創傷治癒を促進するまたは増強するための治療において使用することができる、方法。

## 【請求項 2】

創傷治癒、特に皮膚創傷治癒を促進するまたは増強するための治療における使用のための単離された微小胞を含む医薬組成物であって、単離された微小胞は請求項1に記載の方法を使用して調製される、医薬組成物。

## 【請求項 3】

内胚葉由来組織、外胚葉由来組織、中胚葉由来組織、血管組織および付属器構造からなる群から選択される、病気の、損傷を与えられた、または欠けている皮膚を有する対象における少なくとも1つの組織を再生することにおける使用のための単離された微小胞を含

10

20

む医薬組成物であって、単離された微小胞は請求項1に記載の方法を使用して調製される、医薬組成物。

【請求項4】

ポリエチレングリコールの平均分子量が6,000Da、8,000Da、10,000Daまたは20,000Daである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

沈殿した微小胞が遠心分離法によって収集される、請求項1または4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

沈殿した微小胞がろ過によって収集される、請求項1、4または5のいずれかに記載の方法。 10

【請求項7】

生体液が、細胞培養液、および培養細胞由来の液体から選択される、請求項1または4-6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

ろ過が、約100kDaの分子量カットオフを有するフィルターを使用することを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

単離された微小胞が約2nm～約5,000nmの範囲にわたる、請求項1または4-8のいずれかに記載の方法。 20

【請求項10】

単離された微小胞が、免疫親和性、HPLC、タンジェンシャルフローろ過、相分離、相分割、およびマイクロフルイディクスからなる群から選択される1つ以上の方法を使用してさらに精製される、請求項1または4-9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

単離された微小胞が有意な炎症応答を引き起こさない、請求項2-3のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項12】

瘢痕形成を低下させるおよび/またはしわ形成を低下させることにおける使用のための単離された微小胞を含む医薬組成物であって、単離された微小胞は請求項1に記載の方法を使用して調製される、医薬組成物。 30

【請求項13】

単離された微小胞が、エキソソーム、エクトソーム(ectosome)、微粒子、ナノ小胞(nanovesicle)、脱粒小胞(shedding vesicle)、アポトーシス小体および膜粒子の1つまたは任意の組合せを含む、請求項1または4-10のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

病気の、損傷を与えられた、または欠けている皮膚が、全層性熱傷および第2度熱傷から選択される、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項15】

処置が必要とされる患者の皮膚創傷を処置することにおける使用のための単離された微小胞を含む医薬組成物であって、単離された微小胞の医薬組成物は、

(a)骨髄由来の間葉系幹細胞から微小胞を含有する生体液を得るステップ；

(b)生体液にポリエチレングリコール(P EG)を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ

を含んで調製される、医薬組成物。 40

【請求項16】

骨髄由来の間葉系幹細胞が起源において同種である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項17】

皮膚創傷が全層性創傷である、請求項1に記載の医薬組成物。 50

**【請求項 1 8】**

皮膚創傷が熱傷である、請求項 1 5 - 1 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

**【請求項 1 9】**

熱傷が第 2 度熱傷および全層性熱傷から選択される、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、医学、細胞生物学、分子生物学、および遺伝学の分野に関する。特に、本発明は、細胞培養上清および生体液から微小胞を単離し、精製するための方法を提供する。  
本発明はまた、創傷治癒を促進するもしくは増強する、組織再生を刺激する、瘢痕組織をリモデルする、免疫反応を調整する、新生物細胞成長および／もしくは移動性を改変する、または正常細胞成長および／もしくは移動性を改変するための微小胞の医薬組成物をも提供する。本発明はまた、診断試薬として使用されることとなる微小胞の組成物および微小胞の組成物を調製するための方法をも提供する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

微小胞は、インビトロおよびインビボにおいて、すべてではないにしても多くの細胞型によって分泌され、たとえば血液、間質液、尿、唾液、および涙などのような生体液中に存在する。微小胞は、細胞の形質膜から形成される脂質二重層を含む小胞であり、サイズが不均一であり、約 2 nm ~ 約 5000 nm の範囲にわたる。微小胞が形成される細胞は、本明細書において「宿主細胞」と呼ばれる。微小胞は、小胞の不均一の集団であり、たとえば、エクソソーム (exosome)、微粒子、微小胞、ナノ小胞 (nanovesicle)、脱粒小胞 (shedding vesicle)、および膜粒子を含む。

**【0 0 0 3】**

微小胞は、それらの膜表面上にそれらの宿主細胞由来の膜タンパク質を持ち、また、たとえば mRNA、miRNA、tRNA、RNA、DNA、脂質、タンパク質、または感染性粒子などのような、宿主細胞由来の微小胞内の分子を含有してもよい。これらの分子は、宿主細胞の中に導入された組換え分子に由来してもよいまたはその組換え分子であってもよい。微小胞は、細胞間コミュニケーションにおいて不可欠な役割を果たし、体内で局部的にかつ末端で作用して、標的細胞と融合することによって細胞において変化を誘発し、微小胞上におよび／または中に輸送された分子を標的細胞に導入することができる。たとえば、微小胞は、抗腫瘍性の逆転、癌、腫瘍免疫抑制、転移、腫瘍 - 間質相互作用、血管新生、および組織再生に関係してきた。微小胞はまた、それらがたとえば心疾患、HIV、および白血病を含むいくつかの疾患のバイオマーカーを運ぶことが示されたので、疾患を診断するために使用されてもよい。

**【0 0 0 4】**

微小胞の重要性にもかかわらず、それらの構造的および機能的完全性を保ちながら、有用な量で微小胞を単離することは、問題のままである。従来の手順は、サンプルから微小胞を単離するために超遠心分離法を利用する。

**【0 0 0 5】**

たとえば、米国特許第 7,807,438 号明細書は、C 型肝炎ウイルス (HCV) の単離のための方法を開示する。方法は、C 型肝炎ウイルスに感染した個人の血漿からの、エキソソームと称される粒子の分離およびこれらのエキソソーム粒子からの RNA の抽出を含む。

**【0 0 0 6】**

他の例では、米国特許出願公開第 20030198642 A1 号明細書は、ワクチン接種ビヒクルのための、抗原提示細胞中の MHC クラス II に富むコンパートメントに由来するエキソソームを開示する。

**【0 0 0 7】**

他の例では、米国特許出願公開第 20060116321 A1 号明細書は、免疫抑制性

10

20

30

40

50

の反応の媒介に使用するための方法および組成物を開示する。組成物は、免疫抑制性の活性を有するエキソソームを含む。そのようなエキソソームは、樹状細胞およびマクロファージなどのような抗原提示細胞を含む、様々な異なる細胞型に由来してもよい。エキソソームの単離に先立って、細胞は、前記エキソソームの免疫抑制性の活性を増強することができる分子を発現するように遺伝的に操作されてもよいおよび／またはサイトカインもしくはサイトカイン阻害剤などのような、1つ以上の薬剤に曝露されてもよく、これらもまたエキソソームの免疫抑制性の活性を増強することができる。本発明はまた、免疫系の望ましくない活性化に関連する疾患および障害の処置のためのそのようなエキソソームの使用にも関する。本発明はまた、免疫抑制性であることが示された、血清から直接単離されたエキソソームを含む。

10

#### 【0008】

超遠心分離法は、微小胞に損傷を与えて、小胞の溶解または破裂をもたらし得る。もし、そのような損傷を与えられた微小胞が導入されたとしたら、微小胞に対する損傷は、身体において副作用を引き起こし得る。

#### 【0009】

他の研究者らは、微小胞を単離するための代替方法を試みた。しかしながら、用いられた代替方法は、微小胞の亜分画をたびたび単離してしまうまたは非効率的である。たとえば、米国特許出願公開第20111003008A1号明細書は、間葉系幹細胞によって分泌され、間葉系幹細胞の少なくとも1つの生物学的特性を含む粒子を開示する。生物学的特性は、心保護または梗塞サイズの低下などのような、間葉系幹細胞条件培地（MSC-CM）の生物学的活性を含んでいてもよい。粒子は、小胞またはエキソソームを含んでいてもよい。

20

#### 【0010】

他の例では、米国特許出願公開第20120070858A1号明細書は、エキソソームの所定のゼータ電位に基づく電荷引力メカニズムにより、酸化鉄（Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>）の超常磁性ナノ粒子を使用して、血小板からエキソソームを単離する方法を開示する。方法は、所定の正電荷と共にあらかじめ合成され〔原文のまま〕、生物学的サンプル中に含有される負に荷電しているエキソソームに結合する酸化鉄ナノ粒子の使用を含む。インキュベーションの間に、カチオン磁性ナノ粒子は、静電的相互作用のためにエキソソームの膜の表面によって吸収される。磁界への材料の曝露は、ナノ粒子に結合したエキソソームを分離することを可能にする。この技術の成功は、フローサイトメトリー〔原文のまま〕によるエキソソームの特徴づけ〔原文のまま〕によって確認された。この方法は、エキソソームが本来の形態学的および構造的特質の改変を受けることなく、単離され、精製されるのを可能にするので、この目的に適していることが示された。

30

#### 【0011】

他の例では、国際公開第2012169970A1号パンフレットは、対流性クロマトグラフィー（conductive chromatography）、流動層、または共沈殿の適用に関連した、抗体、ウイルス、細胞、および細胞小器官などの生体物質の精製における束縛共水和剤（constrained cohydration agent）の使用のための材料および方法を開示する。

40

#### 【0012】

そのため、単離された微小胞が続いて疾患の診断、療法、または研究に使用されてもよい、損傷のない、十分な量の微小胞を単離し、精製する方法を提供する必要性が残っている。

#### 【0013】

本発明は、微小胞の構造的および／または機能的完全性に損傷を与えることなく、生体液から微小胞を単離するための方法を提供する。本発明はまた、それらの構造的および／または機能的完全性に損傷を与えることなく、生体液から、エクトソーム、微粒子、微小胞、ナノ小胞、脱粒小胞、アポトーシス小体、または膜粒子を単離するための方法を提供する。

50

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0014】**

【特許文献1】米国特許第7,807,438号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第20030198642A1号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第20060116321A1号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第2011003008A1号明細書

【特許文献5】米国特許出願公開第20120070858A1号明細書

【特許文献6】国際公開第2012169970A1号パンフレット

**【発明の概要】**

10

**【0015】**

一実施形態では、本発明は、溶媒和の水を移動させることによって細胞培養上清または生体液から微小胞を沈殿させる沈殿剤を利用する、細胞培養上清または生体液から微小胞を単離するおよび／または精製するための方法を提供する。

**【0016】**

20

一実施形態では、本発明は、微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、エクトソームの調製物を得るために、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、微粒子の調製物を得るために、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、ナノ小胞の調製物を得るために、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、脱粒小胞の調製物を得るために、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、膜粒子の調製物を得るために、続いて精製される。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、アポトーシス小体の調製物を得るために、続いて精製される。

**【0017】**

一実施形態では、本発明は、血管新生を促進するまたは増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、患者において血管新生を促進するまたは増強する。

**【0018】**

30

一実施形態では、本発明は、神経細胞再生を促進するまたは増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、患者において神経細胞再生を促進するまたは増強する。

**【0019】**

一実施形態では、本発明は、細胞の増殖を促進するまたは増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、患者において細胞の増殖を促進するまたは増強する。

**【0020】**

一実施形態では、本発明は、細胞の遊走を促進するまたは増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、微小胞の単離調製物が、患者において細胞の遊走を促進するまたは増強する。

**【0021】**

40

一実施形態では、本発明は、創傷治癒を促進するまたは増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、創傷が、全層性熱傷である。一実施形態では、創傷が、第2度熱傷である。

**【0022】**

一実施形態では、本発明は、患者において瘢痕形成を低下させる微小胞の単離調製物を提供する。

**【0023】**

一実施形態では、本発明は、患者の皮膚においてしわ形成を低下させる微小胞の単離調製物を提供する。

**【0024】**

50

一実施形態では、本発明は、患者において疾患の存在および／または進行を診断するために使用される微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、疾患が、転移性黒色腫である。他の実施例では、疾患が、関節リウマチなどのような炎症／自己免疫障害である。一実施形態では、疾患が、移植片対宿主病である。

#### 【0025】

一実施形態では、本発明は、複雑な組織構造の機能的再生および組織化を促進することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、再生不良性貧血を有する患者において造血組織を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、上皮組織、間質性組織、神経組織、血管組織、および付属器構造からなる群から選択される、病気の、損傷を与えられた、または欠けている皮膚を有する患者における少なくとも1つの組織を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、3つすべての胚葉から組織および／または細胞を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。

10

#### 【0026】

一実施形態では、本発明は、患者の免疫系を調整するために使用される微小胞の単離調製物を提供する。

#### 【0027】

一実施形態では、本発明は、患者の中に移植される組織または細胞の生存を増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、患者が、組織または細胞の移植を受ける前に微小胞の単離調製物により処置される。代替の実施形態では、患者が、組織または細胞の移植を受けた後に微小胞の単離調製物により処置される。代替の実施形態では、組織または細胞が、微小胞の単離調製物により処置される。一実施形態では、組織または細胞が、移植に先立って微小胞の単離調製物により処置される。

20

#### 【0028】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞由来のRNA、DNA、およびタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの分子を含有する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、宿主細胞が、RNA、DNA、およびタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの分子を発現するように操作される。一実施形態では、宿主細胞由来のRNA、DNA、およびタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの分子を含有する微小胞の単離調製物が、治療剤として使用される。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0029】

本明細書において組み込まれ、本明細書の一部を形成する添付の図面は、本発明の様々な実施形態を例証し、説明と共に、さらに、本発明の原理について説明し、当業者が本発明を実施し、使用するのを可能にするように果たす。図面において、同様の参照番号は、同一のまたは機能的に類似するエレメントを示す。本発明およびその付随する多くの利点についてのより完全な理解は、それらが、添付の図面に関連して考えられた場合に、以下の詳細な説明への参照によってよりよく理解されるようになるため、容易に得られるであろう。

40

#### 【0030】

【図1】図1は、超遠心分離法によって微小胞を単離するために使用されるプロトコールの図式的な概要を示す図である。

【図2】図2は、本発明の微小胞単離方法の一実施形態を示す図である。

【図3】図3は、本発明の微小胞単離方法の代替の実施形態を示す図である。

【図4】図4は、生体液の清澄化およびろ過による沈殿した微小胞の収集を容易にする本発明の装置の一実施形態を示す図である。

【図5】図5は、パネル中に示される倍率での、実施例1において記載される超遠心法によって単離された（パネルA & B）および本発明の方法に従って単離された（パネルC & D）ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。

50

【図6】図6は、パネル中に示される倍率での、実施例1において記載される超遠心法によって単離された（パネルA & B）および本発明の方法に従って単離された（パネルC & D）ブタ骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。

【図7】図7は、パネル中に示される倍率での、実施例1において記載される超遠心法によって単離された（パネルA & B）および本発明の方法に従って単離された（パネルC & D）マウス骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。

【図8】図8は、本発明の方法に従ってヒト血漿から単離された微小胞の電子顕微鏡写真を示す。パネルA～Cは、パネル中のスケールバーによって示されるように、倍率を徐々に増加させた微小胞を示す。  
10

【図9】図9は、本発明の方法に従ってブタ血漿から単離された微小胞の電子顕微鏡写真を示す。パネルA～Cは、パネル中のスケールバーによって示されるように、倍率を徐々に増加させた微小胞を示す。

【図10】図10は、本発明の方法に従ってヒト尿から単離された微小胞の電子顕微鏡写真を示す。パネルA～Cは、パネル中のスケールバーによって示されるように、倍率を徐々に増加させた微小胞を示す。

【図11】図11は、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の溶解物、ヒト骨髓由来幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離され、超遠心分離法（hMSC MV超遠心分離機）または実施例3において記載される本発明の方法（hMSC PEG沈殿）によって調製された微小胞におけるHSP70、CD63、STAT3、およびリン酸化STAT3の発現を報告するウェスタンプロットを示す図である。実施例3において記載される本発明の方法によって調製された、ヒト血漿およびヒト尿に由来する微小胞もまた、分析した。それぞれ（ヒト血漿PEG沈殿）ならびに（ヒト尿PEG沈殿）。

【図12】図12は、正常ヒト皮膚線維芽細胞（A）、糖尿病性足潰瘍から得られる皮膚線維芽細胞（B）、および圧迫性足潰瘍（pressure foot ulcer）から得られる皮膚線維芽細胞（C）の増殖に対する、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離される微小胞の効果を示すグラフである。超遠心分離法（MV U/C）によって単離された微小胞および本発明の方法（MV PEG）によって単離された微小胞の効果を比較した。PBSまたは微小胞を排除した培養培地により処置した線維芽細胞は、コントロールとして含めた。増殖は、MTTアッセイを使用して決定した。  
30

【図13】図13は、線維芽細胞が、スクランチされた領域へ遊走する能力によって決定されるように、ヒト皮膚線維芽細胞の遊走に対する、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離される微小胞の効果を示す図である。「前処置」と標識されたパネルは、試験処置の追加に先立って細胞が除去された、細胞培養プレートの代表的なエリアを示す。線維芽細胞遊走の効果は、示す濃度で、本発明の方法（PEG沈殿）に従って単離された微小胞および超遠心分離法（超遠心分離機）によって単離された微小胞を使用して試験した。PBSまたは微小胞を排除した培養培地により処置した線維芽細胞は、コントロールとして含めた。  
40

【図14】図14は、線維芽細胞が、スクランチされた領域へ遊走する能力によって決定されるように、糖尿病性足潰瘍から得られたヒト皮膚線維芽細胞の遊走に対する、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離される微小胞の効果を示す図である。「前処置」と標識されたパネルは、試験処置の追加に先立って細胞が除去された、細胞培養プレートの代表的なエリアを示す。線維芽細胞遊走の効果は、示す濃度で、本発明の方法（PEG沈殿）に従って単離された微小胞および超遠心分離法（超遠心分離機）によって単離された微小胞を使用して試験した。PBSまたは微小胞を排除した培養培地により処置した線維芽細胞は、コントロールとして含めた。

【図15】図15は、ヒト皮膚線維芽細胞の中への本発明の微小胞の取込みを示す図である。Hoechst 33342色素を使用して分析した細胞核は、「Hoechst 3  
50

3342」と標識したパネルに示す。vibrant色素を使用して分析した細胞は、「Vibrant-Dio」と標識したパネルに示す。PKH色素を使用して分析した微小胞は、「PKH標識MV」と標識したパネルに示す。3つすべての色素から得られた画像を重ねたパネルは、「合成物」と標識したパネルにおいて見られる。

【図16】図16は、ヒト皮膚線維芽細胞の中への本発明の微小胞の取込みを示す図である。Hoechst 33342色素を使用して分析した細胞核は、「Hoechst 33342」と標識したパネルに示す。vibrant色素を使用して分析した細胞は、「Vibrant-Dio」と標識したパネルに示す。PKH色素を使用して分析した微小胞は、「PKH標識MV」と標識したパネルに示す。3つすべての色素から得られた画像を重ねたパネルは、「合成物」と標識したパネルにおいて見られる。10

【図17】図17は、関節リウマチに罹患している患者から得られた血漿から本発明の方法に従って単離された微小胞（ヒト血漿MV PEG沈殿）；骨髓由来間葉系幹細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞（ヒトhMSC MV PEG沈殿）；骨髓由来間葉系幹細胞により条件付けられた培地から超遠心分離法を介して単離された微小胞（ヒトhMSC MV超遠心分離法）；PBSコントロール；および排除培地コントロール（MVを排除したhMSC条件培地）により処置したヒト皮膚線維芽細胞の溶解物のウェスタンプロットを示す図である。

【図18】図18は、プライマー1を使用して増幅されたRNA由来の、SK-MEL28細胞（レーン3）；プライマー2を使用して増幅されたRNA由来の、SK-MEL28細胞（レーン4）；プライマー1を使用して増幅されたRNA由来の、SK-MEL28細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞（レーン5）；プライマー2を使用して増幅されたRNA由来の、SK-MEL28細胞（レーン6）；プライマー1を使用して増幅されたDNA由来の、SK-MEL28細胞（レーン7）；プライマー2を使用して増幅されたDNA由来の、SK-MEL28細胞（レーン8）；プライマー1を使用して増幅されたDNA由来の、SK-MEL28細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞（レーン9）；およびプライマー2を使用して増幅されたDNA由来の、SK-MEL28細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞（レーン10）における、T1799A突然変異を含有するBRAFのエクソン15を含有する領域の存在を示す図である。2030

【図19】図19は、SK-MEL28細胞の溶解物およびSK-MEL28細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞の溶解物におけるV600E BRAFの存在を示す図である。

【図20】図20は、ヒト皮膚線維芽細胞の中への、緑色蛍光タンパク質（GFP）発現マウスから得られた骨髓由来幹細胞を使用して条件付けられた培養培地から本発明の方法に従って単離された微小胞の取込みを示す図である。Hoechst 33342色素を使用して分析した細胞核は、「Hoechst 33342」と標識したパネルに示す。vibrant色素を使用して分析した細胞は、「Vibrant-Dio」と標識したパネルに示す。GFP標識微小胞は、「GFP」と標識したパネルに示す。3つすべての色素から得られた画像を重ねたパネルは、「合成物」と標識したパネルにおいて見られる。40

【図21】図21は、ヒト皮膚線維芽細胞の中への、GFP発現マウスから得られた骨髓由来幹細胞を使用して条件付けられた培養培地から本発明の方法に従って単離された微小胞の取込みを示す図である。Hoechst 33342色素を使用して分析した細胞核は、「Hoechst 33342」と標識したパネルに示す。vibrant色素を使用して分析した細胞は、「Vibrant-Dio」と標識したパネルに示す。GFP標識微小胞は、「GFP」と標識したパネルに示す。3つすべての色素から得られた画像を重ねたパネルは、「合成物」と標識したパネルにおいて見られる。

【図22】図22は、創傷の5日後の、（A）未処置動物；（B）本発明の方法に従って自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞；（C）食塩水；および（D）超遠心分離法によって自己由来骨髓由来間葉系幹細胞から単離

された微小胞由来の全層性創傷の組織学的切片を示す図である。

【図23】図23は、創傷の7日後の、(A)超遠心分離法によって自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞；(B)本発明の方法に従って自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞により処置された動物；および(C)未処置動物上の第二度熱傷の写真を示す。(D)は、創傷の7日後の、超遠心分離法によって自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞により処置された動物における全層性創傷を示す。矢印は、7日目の、超遠心分離法によって単離された微小胞により処置された全層性創傷における膿瘍形成を示す(40×)。これは、本発明の方法に従って調製された微小胞により処置された全層性創傷において観察されなかった。

10

【図24】図24は、本発明の方法に従って自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞により処置された動物由来の、創傷の28日後の第二度創傷の組織学的スライドを示す。

【図25】図25は、食塩水により処置した動物由来の、創傷の28日後の、第2度創傷の組織学的スライドを示す。

【図26】図26は、本発明の方法に従って自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞により処置された動物由来の、創傷の28日後の全層性創傷の組織学的スライドである。

【図27】図27は、本発明の方法に従って自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地から単離された微小胞により処置された動物由来の、創傷の28日後の全層性創傷の組織学的スライドを示す。Aは、新しい神経成長(矢印)および血管新生(円)を示す。Bは、新しい神経成長(矢印)を示す。Cは、新しい血管成長(矢印)を示す。

20

【図28】図28は、自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けられた培地に由来する微小胞により処置した動物における創傷の7日後の全層性創傷の組織学的スライドである。

【図29】図29は、GFP標識骨髓の投与後の、照射動物におけるキメラ現象の存在または非存在を示す図である。

【図30】図30パネルAおよびBは、ガンマ線照射後の毛の成長に対するMSC処置の効果を示す図である。パネルCは、GFP標識骨髓の投与後の、照射動物におけるキメラ現象の非存在を示す。

30

【図31】図31は、血管新生のインビトロアッセイを使用する、血管形成に対する、本発明の方法を使用して得られた骨髓由来微小胞の効果を示す図である。上部の3枚のパネルは、本発明の方法を使用して得られた骨髓由来微小胞により処置されたHUVEC細胞の培養物の、落射蛍光顕微鏡を使用して得られた代表的な画像である(「骨髓穿刺液MV」)。下部の3枚のパネルは、ビヒクルコントロールにより処置されたHUVEC細胞の培養物の、落射蛍光顕微鏡を使用して得られた代表的な画像である(「ビヒクルコントロール」)。

【図32】図32は、細胞成長のインビトロアッセイを使用する、細胞成長または増殖に対する、本発明の方法を使用して得られた骨髓由来微小胞の効果を示す図である。パネルAは、処置の3日後に、本発明の方法を使用して得られた骨髓由来微小胞(「骨髓MV」)またはPBS(「PBS」)により処置された正常成人線維芽細胞の培養物の、落射蛍光顕微鏡を使用して得られた代表的な画像を示す。パネルBは、処置の3日後に、本発明の方法を使用して得られた骨髓由来微小胞(「骨髓MV」)またはPBS(「PBS」)により処置された正常成人線維芽細胞の培養物中の平均細胞数を示す。

40

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0031】

限定ではなく、本開示を分かりやすくするために、本発明の詳細な説明を、本発明のある特徴、実施形態、または適用を説明するまたは例証する以下のサブセクションに分ける。

50

## 【0032】

本発明の微小胞を単離するための方法

一実施形態では、微小胞が、微小胞を含有する生体液から単離され、

a ) 微小胞を含有する生体液を得るステップ、

b ) 細胞デブリを除去するために生体液を清澄化するステップ、

c ) 清澄化された生体液に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ

、

d ) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および

e ) 保存またはその後の使用のために、洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。 10

## 【0033】

一実施形態では、生体液が、遠心分離法によって清澄化される。代替の実施形態では、生体液が、ろ過によって清澄化される。

## 【0034】

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。代替の実施形態では、沈殿した微小胞が、ろ過によって収集される。

## 【0035】

一実施形態では、微小胞が、微小胞を含有する生体液から単離され、

a ) 微小胞を含有する生体液を得るステップ、

20

b ) 細胞デブリを除去するために生体液を清澄化するステップ、

c ) 清澄化された生体液に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ

、

d ) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、

e ) 洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップ、ならびに

f ) 核酸、炭水化物、脂質、小分子、および / またはタンパク質内容物を分析するために微小胞をプロセシングするステップを含む。 25

## 【0036】

一実施形態では、生体液が、遠心分離法によって清澄化される。代替の実施形態では、生体液が、ろ過によって清澄化される。 30

## 【0037】

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。代替の実施形態では、沈殿した微小胞が、ろ過によって収集される。

## 【0038】

一実施形態では、本発明は、本発明の方法に従って生体液から微小胞を単離するための試薬およびキットを提供する。

## 【0039】

生体液は、末梢血、血清、血漿、腹水、尿、脳脊髄液（CSF）、痰、唾液、骨髓、滑液、眼房水、羊水、耳垢、母乳、気管支肺胞洗浄液、精液（前立腺液を含む）、カウパー腺液または尿道球腺液（pre-ejaculatory fluid）、女性の射精液、汗、糞便、毛、涙、囊胞体液、胸膜液および腹膜滲出液、胸腔液、リンパ液、び汁、乳び、胆汁、間質液、月経分泌物、膿、皮脂、嘔吐物、腔分泌物、粘膜の分泌物、水様便（stool water）、胰液、鼻腔（sinus cavity）からの洗浄液、気管支肺吸引液、または他の洗浄液であってもよい。 40

## 【0040】

生体液はまた、胚盤胞腔、臍帯血、または母体の血行路に由来してもよく、これらは胎児または母体起源のものでありうる。生体液はまた、組織サンプルまたは生検材料に由来してもよい。

## 【0041】

生体液は、植物細胞の培養物の植物細胞に由来してもよい。生体液は、酵母細胞または 50

酵母細胞の培養物に由来してもよい。

【0042】

一実施形態では、生体液が、細胞培養培地である。一実施形態では、細胞培養培地が、本発明の方法に従う微小胞の単離に先立って、組織および／または細胞を使用して条件付けられる。

【0043】

用語「条件付けられた」または「条件培地」は、細胞もしくは組織の集団またはその組み合わせを成長させ、細胞もしくは組織の集団またはその組み合わせが培地に因子を与える培地を指す。あるそのような使用において、細胞もしくは組織の集団またはその組み合わせは、培地から除去され、細胞が産生する因子が残る。一実施形態では、産生される因子が、微小胞である。10

【0044】

培地は、当業者によって選択される任意の適した方法を介して条件付けられてもよい。たとえば、培地は、欧州特許出願公開第1780267A2号明細書において記載される方法に従って培養されてもよい。

【0045】

一実施形態では、微小胞が、微小胞の単離に先立ってあらかじめ処置された細胞または組織から単離される。前処置は、たとえば、特定の培地、少なくとも1つの添加剤、増殖因子、血清がない培地、またはその組み合わせを含有する培地における培養を含んでいてもよい。その代わりに、前処置は、添加剤（たとえばインターロイキン、VEGF、転写因子の誘発因子、転写因子、ホルモン、神経伝達物質、医薬化合物、マイクロRNA）、形質転換剤（たとえばリポソーム、ウイルス、トランスフェクトされた薬剤など）と細胞または組織を接触させることを含んでいてもよい。その代わりに、前処置は、物理的条件の変化（たとえば低酸素、寒冷ショック、熱ショック）に細胞または組織を曝露することを含んでいてもよい。20

【0046】

一実施形態では、微小胞が、微小胞の単離に先立ってあらかじめ処置された細胞または組織を使用して条件付けられた培地から単離される。前処置は、たとえば、特定の培地、少なくとも1つの添加剤、増殖因子、血清がない培地、またはその組み合わせを含有する培地における培養を含んでいてもよい。その代わりに、前処置は、添加剤（たとえばインターロイキン、VEGF、転写因子の誘発因子、転写因子、ホルモン、神経伝達物質、医薬化合物、マイクロRNA）、形質転換剤（たとえばリポソーム、ウイルス、トランスフェクトされた薬剤など）と細胞または組織と接触させることを含んでいてもよい。その代わりに、前処置は、変化させた物理的条件（たとえば低酸素、寒冷ショック、熱ショック）に細胞または組織を曝露することを含んでいてもよい。30

【0047】

一実施形態では、生体液が、植物由来の抽出物である。代替の実施形態では、生体液が、植物細胞の培養物由来の細胞培養培地である。代替の実施形態では、生体液が、酵母抽出物である。代替の実施形態では、生体液が、酵母細胞の培養物由来の細胞培養培地である。40

【0048】

本発明の方法は、任意の温度で実行されていてもよいが、当業者は、ある生体液が分解し得、また、生体液が分解する温度未満の温度でサンプルが維持される場合、そのような分解が低下することを容易に認識することができる。一実施形態では、本発明の方法が、4で実行される。代替の実施形態では、本発明の方法の少なくとも1つのステップが、4で実行される。

【0049】

ある実施形態では、生体液が、本発明の方法にかけられる前に希釈されてもよい。サンプルの粘性が、微小胞の許容され得る収量を得るのに大きすぎる場合、希釈は、サンプルの粘性を低下させるために、粘性の生体液に必要とされてもよい。希釈は、1：2希釈で50

あってもよい。その代わりに、希釈は、1：3希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：4希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：5希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：6希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：7希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：8希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：10希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：20希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：30希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：40希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：50希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：60希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：70希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：80希釈であってもよい。その代わりに、希釈は、1：90希釈であってもよい。10

その代わりに、希釈は、1：100希釈であってもよい。

#### 【0050】

生体液は、任意の希釈剤により希釈されてもよい、ただし、希釈剤が、微小胞の機能的なおよび／または構造的な完全性に影響を与えないことを条件とする。当業者は、適した希釈剤を容易に選択し得る。希釈剤は、たとえばリン酸緩衝食塩水、細胞培養培地、およびその他同種のものであってもよい。

#### 【0051】

一実施形態では、生体液が、細胞デブリを除去するために遠心力の適用によって清澄化される。生体液に適用される遠心力は、生体液からあらゆる細胞、溶解した細胞、および組織デブリを除去するのに十分であるが、適用される遠心力は、微小胞を除去するには、大きさ、継続期間、またはその両方が不十分である。生体液は、清澄化を容易にするために希釈を必要としてもよい。20

#### 【0052】

生体液を清澄化するために使用される遠心力の継続期間および大きさは、たとえば生体液、生体液のpH、単離された微小胞の所望の純度、単離された微小胞の所望のサイズ、微小胞の所望の分子量、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される多くの因子に従って変動してもよい。一実施形態では、2000×gの遠心力が、30分間、生体液に適用される。

#### 【0053】

清澄化された生体液は、微小胞を沈殿させるために沈殿剤と接触させる。一実施形態では、沈殿剤が、微小胞を囲み、溶媒和の水を移動させる任意の薬剤であってもよい。そのような沈殿剤は、ポリエチレングリコール、デキストラン、および多糖からなる群から選択されてもよい。30

#### 【0054】

代替の実施形態では、沈殿剤が、微小胞の凝集を引き起こしてもよい。

#### 【0055】

代替の実施形態では、沈殿剤が、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ナトリウムイオン、アンモニウムイオン、鉄イオン、硫酸アンモニウムなどのような有機溶媒、およびアルギメントなどのような凝集剤からなる群から選択される。

#### 【0056】

清澄化された生体液は、微小胞を沈殿させるのに十分な時間、沈殿剤と接触させる。微小胞を沈殿させるのに十分な時間は、たとえば生体液、生体液のpH、単離された微小胞の所望の純度、単離された微小胞の所望のサイズ、微小胞の所望の分子量、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される多くの因子に従って変動してもよい。一実施形態では、微小胞を沈殿させるのに十分な時間が、6時間である。40

#### 【0057】

一実施形態では、清澄化された生体液が、4で、微小胞を沈殿させるのに十分な時間、沈殿剤と接触させる。

#### 【0058】

生体液から微小胞を沈殿させるために使用される沈殿剤の濃度は、たとえば生体液、生50

体液の pH、単離された微小胞の所望の純度、単離された微小胞の所望のサイズ、微小胞の所望の分子量、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される多くの因子に従って変動してもよい。

#### 【0059】

一実施形態では、沈殿剤が、ポリエチレングリコールである。本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの分子量は、約 200 Da ~ 約 10,000 Da であってもよい。一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの分子量が、10,000 Da を超えてよい。分子量の選択は、たとえば生体液の粘性、微小胞の所望の純度、微小胞の所望のサイズ、使用される生体液、およびその他同種のものを含む様々な因子によって影響を及ぼされてもよい。

10

#### 【0060】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの分子量が、約 200 Da ~ 約 8,000 Da であってもよいまたはおよそ 200、300、400、600、1000、1500、4000、6000、もしくは 8000 のいずれかである。

#### 【0061】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの分子量が、約 6000 Da である。

#### 【0062】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの平均分子量が、約 8000 Da である。

20

#### 【0063】

本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの濃度は、約 0.5 % w / v ~ 約 100 % w / v であってもよい。本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの濃度は、たとえば生体液の粘性、微小胞の所望の純度、微小胞の所望のサイズ、使用される生体液、およびその他同種のものを含む様々な因子によって影響を及ぼされてもよい。

#### 【0064】

ある実施形態では、ポリエチレングリコールが、約 5 % ~ 25 % w / v の濃度の本発明の濃度において使用される。ある実施形態では、濃度が、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、もしくは 15 % またはこれらの値のいずれか 2 つの間の範囲である。

30

#### 【0065】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの濃度が、約 8.5 % w / v である。

#### 【0066】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの濃度が、約 6 % w / v である。

#### 【0067】

一実施形態では、6000 Da の平均分子量を有するポリエチレングリコールが、8.5 % w / v の濃度で使用される。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、0.4 M 塩化ナトリウム中で希釈される。

40

#### 【0068】

一実施形態では、本発明の方法において使用されるポリエチレングリコールの濃度が、ポリエチレングリコールの平均分子量に反比例する。たとえば、一実施形態では、4000 Da の平均分子量を有するポリエチレングリコールが、20 % w / v の濃度で使用される。代替の実施形態では、8000 Da の平均分子量を有するポリエチレングリコールが、10 % w / v の濃度で使用される。代替の実施形態では、20000 Da の平均分子量を有するポリエチレングリコールが、4 % w / v の濃度で使用される。

#### 【0069】

50

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心力の適用によって収集される。遠心力は十分であり、微小胞がペレットを形成するのに十分な継続期間、適用されるが、微小胞に損傷を与えるのには不十分である。

#### 【0070】

生体液から微小胞を沈殿させるために使用される遠心力の継続期間および大きさは、たとえば生体液、生体液のpH、単離された微小胞の所望の純度、単離された微小胞の所望のサイズ、微小胞の所望の分子量、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される多くの因子に従って変動してもよい。一実施形態では、沈殿した微小胞は、60分間、 $10000 \times g$ の遠心力の適用によって収集される。

#### 【0071】

沈殿した微小胞は、任意の液体により洗浄されてもよい、ただし、液体が、微小胞の機能的なおよび/または構造的な完全性に影響を与えないことを条件とする。当業者は、適した液体を容易に選択し得る。液体は、たとえばリン酸緩衝食塩水、細胞培養培地、およびその他同種のものであってもよい。

#### 【0072】

一実施形態では、洗浄ステップが、沈殿剤を除去する。一実施形態では、微小胞が、 $100 \text{ kDa}$ 分子量カットオフを有するろ過デバイスを使用して、遠心ろ過を介して洗浄される。

#### 【0073】

単離された微小胞は、任意の液体により懸濁されてもよい、ただし、液体が、微小胞の機能的なおよび/または構造的な完全性に影響を与えないことを条件とする。当業者は、適した液体を容易に選択し得る。液体は、たとえばリン酸緩衝食塩水、細胞培養培地、およびその他同種のものであってもよい。

#### 【0074】

一実施形態では、単離された微小胞は、さらにプロセシングされてもよい。さらなるプロセシングは、特定のサイズの微小胞の単離であってもよい。その代わりに、さらなるプロセシングは、特定のサイズ範囲の微小胞の単離であってもよい。その代わりに、さらなるプロセシングは、特定の分子量の微小胞の単離であってもよい。その代わりに、さらなるプロセシングは、特定の分子量範囲の微小胞の単離であってもよい。その代わりに、さらなるプロセシングは、特定の分子を持つまたは含有する微小胞の単離であってもよい。

#### 【0075】

一実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $1000 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $500 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $400 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $300 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $200 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $100 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $50 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $20 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2 \text{ nm} \sim$ 約 $10 \text{ nm}$ のサイズを有する微小胞の調製物を単離するためにさらにプロセシングされる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 6 】**

一実施形態では、後続の精製が、免疫親和性、HPLC、タンジェンシャルフローろ過、相分離／分割、およびマイクロフルイディクスからなる群から選択される方法を使用して実行される。

**【 0 0 7 7 】**

一実施形態では、単離された微小胞が、微小胞上に持つまたは微小胞内に含有される分子を分析するためにさらにプロセシングされる。分析される分子は、核酸、炭水化物、脂質、小分子、イオン、代謝物質、タンパク質、およびその組み合わせからなる群から選択される。

**【 0 0 7 8 】**

培養細胞を使用して条件付けられた細胞培養培地を含む生体液：一実施形態では、微小胞が、培養細胞を使用して条件付けられた培地から得られる。任意の培養細胞または細胞の集団は、本発明の方法において使用されてもよい。細胞は、幹細胞、初代細胞、細胞株、組織もしくは器官外植片、またはその任意の組み合わせであってもよい。細胞は、起源において同種、自己由来、または異種であってもよい。

10

**【 0 0 7 9 】**

一実施形態では、細胞が、骨髄穿刺液に由来する細胞である。一実施形態では、骨髄穿刺液に由来する細胞が、骨髄由来間葉系幹細胞である。一実施形態では、骨髄穿刺液に由来する細胞が、単核細胞である。一実施形態では、骨髄穿刺液に由来する細胞が、単核細胞および骨髄由来間葉系幹細胞の混合物である。

20

**【 0 0 8 0 】**

一実施形態では、骨髄由来間葉系幹細胞が、約4日間までの期間、プラスチック組織培養フラスコ中で骨髄穿刺液を培養し、その後、非付着細胞を除去するために洗浄することによって、骨髄穿刺液から単離される。

**【 0 0 8 1 】**

一実施形態では、単核細胞が、フィコール勾配を使用する低密度遠心分離法および界面で単核細胞を収集することによって、骨髄穿刺液から単離される。

**【 0 0 8 2 】**

一実施形態では、本発明の方法に従う微小胞の単離に先立って、細胞が、細胞インキュベーターにおいて、適切な温度および気体混合物（典型的に、哺乳動物細胞について37、5%CO<sub>2</sub>）で培養される、成長させられる、または維持される。培養条件は、それぞれの細胞型について広く変動し、当業者によって容易に決定される。

30

**【 0 0 8 3 】**

一実施形態では、1つまたは1つを超える培養条件が、変動する。一実施形態では、この変動が、様々な表現型をもたらす。

**【 0 0 8 4 】**

一実施形態では、細胞が、微小胞単離手順を始めるためにそれらの培養培地中に血清を必要とする場合、細胞培養培地は、微小胞なしの血清が補足され、次いで、条件付けされることになっている細胞に追加される。微小胞は、条件付けられた細胞培養培地から収集される。血清は、たとえば超遠心分離法、ろ過、沈殿、およびその他同種のものなどのような、任意の適した方法によって排除されてもよい。培地、血清濃度、および培養条件の選択は、たとえば、培養されている細胞型、微小胞の所望の純度、培養細胞の所望の表現型、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される様々な因子によって影響を及ぼされる。一実施形態では、微小胞単離手順のために条件付けられる細胞培養培地が、細胞が微小胞単離手順に先立って成長させられる同じタイプの細胞培養培地である。

40

**【 0 0 8 5 】**

一実施形態では、微小胞単離手順を始めるために、細胞培養培地が除去され、無血清培地が、条件付けされることになっている細胞に追加される。次いで、微小胞は、条件付けされた無血清培地から収集される。培地および培養条件の選択は、たとえば、培養されて

50

いる細胞型、微小胞の所望の純度、培養細胞の所望の表現型、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される様々な因子によって影響を及ぼされる。一実施形態では、無血清培地が、無血清培地中での細胞の生存を促進するまたは増強する、少なくとも1つのさらなる因子により補足される。そのような因子は、たとえば、細胞に栄養のサポートを提供してもよいまたは細胞のアポトーシスを阻害してもよいもしくは予防してもよい。

#### 【0086】

細胞は、細胞が培養培地の中に微小胞を分泌するのを可能にするのに十分な期間、培養培地中で培養される。細胞が培養培地の中に微小胞を分泌するのを可能にするのに十分な期間は、たとえば、培養されている細胞型、微小胞の所望の純度、培養細胞の所望の表現型、微小胞の所望の収量、およびその他同種のものを含む、当業者によって容易に認識される様々な因子によって影響を及ぼされる。

10

#### 【0087】

次いで、微小胞は、本発明の方法によって培養培地から除去される。

#### 【0088】

一実施形態では、微小胞単離手順に先立って、細胞が、抗炎症化合物、抗アポトーシス性化合物、線維症の阻害剤、血管新生を増強することができる化合物、免疫抑制化合物、細胞の生存を促進する化合物、化学療法薬、細胞の遊走を増強することができる化合物、神経性化合物、および増殖因子からなる群から選択される、少なくとも1つの薬剤により処置される。

20

#### 【0089】

一実施形態において、細胞が微小胞が収集される培地中で培養されるが、細胞は、抗炎症化合物、抗アポトーシス性化合物、線維症の阻害剤、血管新生を増強することができる化合物、免疫抑制化合物、細胞の生存を促進する化合物、および増殖因子からなる群から選択される、少なくとも1つの薬剤により処置される。

#### 【0090】

一実施形態では、抗炎症化合物が、米国特許第6,509,369号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

#### 【0091】

一実施形態では、抗アポトーシス性化合物が、米国特許第6,793,945号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

30

#### 【0092】

一実施形態では、線維症の阻害剤が、米国特許第6,331,298号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

#### 【0093】

一実施形態では、血管新生を増強することができる化合物が、米国特許出願公開第2004/0220393号明細書または米国特許出願公開第2004/0209901号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

#### 【0094】

一実施形態では、免疫抑制化合物が、米国特許出願公開第2004/0171623号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

40

#### 【0095】

一実施形態では、細胞の生存を促進する化合物が、米国特許出願公開第2010/0104542号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

#### 【0096】

一実施形態では、増殖因子が、とりわけ、TGF-1、2、および3を含むTGF-ファミリー、骨形態形成タンパク質(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12、および-13)、線維芽細胞増殖因子-1および-2、血小板由来増殖因子-AA、-AB、および-BB、血小板に富む血漿、インスリン増殖因子(IGF-I、II)増殖分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、-15)、血管内皮細胞由来

50

増殖因子(VEGF)、ブレイオトロフィン、エンドセリンのメンバーからなる群から選択される、少なくとも1つの分子であってもよい。他の医薬化合物は、たとえばニコチンアミド、低酸素誘発性因子1-アルファ、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、GLP-1およびGLP-2ミメティボディ、ならびにII、エキセンディン-4、ノダル(nodar)、ノギン、NGF、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、テネイシン-C、トロポエラスチン、トロンビン由来のペプチド、カテリシジン、デフェンシン、ラミニン、フィブロネクチンおよびビトロネクチンなどのような、接着性細胞外マトリックスタンパク質の細胞結合ドメインおよびヘパリン結合ドメインを含有する生物学的ペプチド、ならびにたとえば、米国特許出願公開第2004/0209901号明細書および米国特許出願公開第2004/0132729号明細書において開示される化合物などのようなMAPK阻害剤を含むことができる。

#### 【0097】

一実施形態では、微小胞が、骨髓由来間葉系幹細胞の培養物を使用して条件付けられた細胞培養培地を含む生体液から単離され、

- a) 骨髓由来間葉系幹細胞の集団を得、細胞を1:4の希釈でフラスコに接種するステップ、
- b) 細胞が80~90%コンフルエントになるまで、培地中で細胞を培養するステップ、
- c) 細胞デブリを除去するために培地を除去し、清澄化するステップ、
- d) 清澄化された培養培地に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ、
- e) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および
- f) 保存またはその後の使用のために、洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。

#### 【0098】

一実施形態では、微小胞が、骨髓由来单核細胞の培養物を使用して条件付けられた細胞培養培地を含む生体液から単離され、

- a) 骨髓由来单核細胞の集団を得、細胞を1:4の希釈でフラスコに接種するステップ、
- b) 細胞が80~90%コンフルエントになるまで、培地中で細胞を培養するステップ、
- c) 細胞デブリを除去するために培地を除去し、清澄化するステップ、
- d) 清澄化された培養培地に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ、
- e) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および
- f) 保存またはその後の使用のために、洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。

#### 【0099】

一実施形態では、骨髓由来間葉系幹細胞が、95%の加湿空気および5%CO<sub>2</sub>中、37で、20%ウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミンにより補足された-MEMを含む培地の中で培養される。

#### 【0100】

一実施形態では、骨髓由来单核細胞が、95%の加湿空気および5%CO<sub>2</sub>中、37で、20%ウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミンにより補足された-MEMを含む培地の中で培養される。

#### 【0101】

一実施形態では、培地が、遠心分離法によって清澄化される。

#### 【0102】

一実施形態では、沈殿剤が、6000の平均分子量を有するポリエチレングリコールである。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、約8.5w/v%の濃度で使用される。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、0.4Mの最終濃度を有する塩化ナト

10

20

30

40

50

リウム溶液中で希釈される。

**【0103】**

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。

**【0104】**

一実施形態では、単離された微小胞が、リン酸緩衝食塩水を使用し、100kDa分子量カットオフを有する膜を使用して、遠心ろ過を介して洗浄される。

**【0105】**

血漿を含む生体液：一実施形態では、微小胞が、血漿から得られる。血漿は、健康な個人またはその代わりに特定の疾患表現型を有する個人から得られてもよい。

**【0106】**

一実施形態では、微小胞が、血漿を含む生体液から単離され、  
 a ) 血漿を得、細胞培養培地により血漿を希釈するステップ、  
 b ) 希釈された血漿に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ、  
 c ) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および  
 d ) 保存またはその後の使用のために洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。

**【0107】**

一実施形態では、血漿が、培養培地により1:10に希釈される。

**【0108】**

一実施形態では、培養培地が、-MEMである。

**【0109】**

一実施形態では、沈殿剤が、6000の平均分子量を有するポリエチレングリコールである。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、約8.5w/v%の濃度で使用される。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、0.4Mの最終濃度を有する塩化ナトリウム溶液中で希釈される。

**【0110】**

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。

**【0111】**

一実施形態では、単離された微小胞が、リン酸緩衝食塩水を使用し、100kDa分子量カットオフを有する膜を使用して、遠心ろ過を介して洗浄される。

**【0112】**

骨髄穿刺液を含む生体液：一実施形態では、微小胞が、骨髄穿刺液から得られる。一実施形態では、微小胞が、骨髄穿刺液の細胞画分から得られる。一実施形態では、微小胞が、骨髄穿刺液の非細胞画分から得られる。

**【0113】**

一実施形態では、微小胞が、骨髄穿刺液から培養された細胞から得られる。一実施形態では、骨髄穿刺液から培養された細胞は、微小胞が単離される細胞培養培地を条件付けるために使用される。

**【0114】**

一実施形態では、微小胞が、骨髄穿刺液を含む生体液から単離され、  
 a ) 骨髄穿刺液を得、非細胞部分および細胞部分に骨髄穿刺液を分離するステップ、  
 b ) 非細胞部分を希釈するステップ、  
 c ) 細胞デブリを除去するために、希釈された非細胞部分を清澄化するステップ、  
 d ) 希釈された非細胞部分に沈殿剤を追加することによって、非細胞部分中に微小胞を沈殿させるステップ、  
 e ) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および  
 f ) 保存またはその後の使用のために、洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。

10

20

30

40

50

**【0115】**

一実施形態では、非細胞部分が、培養培地により1：10に希釈される。

**【0116】**

一実施形態では、培養培地が、-MEMである。

**【0117】**

一実施形態では、希釈された非細胞部分が、遠心分離法によって清澄化される。

**【0118】**

一実施形態では、沈殿剤が、6000の平均分子量を有するポリエチレングリコールである。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、約8.5w/v%の濃度で使用される。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、0.4Mの最終濃度を有する塩化ナトリウム溶液中で希釈される。10

**【0119】**

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。

**【0120】**

一実施形態では、単離された微小胞が、リン酸緩衝食塩水を使用し、100kDa分子量カットオフを有する膜を使用して、遠心ろ過を介して洗浄される。

**【0121】**

一実施形態では、細胞部分が、細胞を単離し、収集するためにさらにプロセシングされる。一実施形態では、細胞部分が、骨髄由来間葉系幹細胞を単離し、収集するためにさらにプロセシングされる。一実施形態では、細胞部分が、骨髄由来单核細胞を単離し、収集するためにさらにプロセシングされる。一実施形態では、細胞部分が、培地を条件付けるために使用され、微小胞が後にこれに由来してもよい。20

**【0122】**

一実施形態では、微小胞が、細胞部分から単離される。細胞部分は、微小胞の単離に先立って、ある期間、インキュベートされてもよい。その代わりに、細胞部分が収集された直後に、微小胞は、細胞部分から単離されてもよい。

**【0123】**

一実施形態では、細胞部分がまた、抗炎症化合物、抗アポトーシス性化合物、線維症の阻害剤、血管新生を増強することができる化合物、免疫抑制化合物、細胞の生存を促進する化合物、化学療法薬、細胞の遊走を増強することができる化合物、神経性化合物、および増殖因子からなる群から選択される、少なくとも1つの薬剤により処置される。30

**【0124】**

一実施形態では、抗炎症化合物が、米国特許第6,509,369号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

**【0125】**

一実施形態では、抗アポトーシス性化合物が、米国特許第6,793,945号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

**【0126】**

一実施形態では、線維症の阻害剤が、米国特許第6,331,298号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。40

**【0127】**

一実施形態では、血管新生を増強することができる化合物が、米国特許出願公開第2004/0220393号明細書または米国特許出願公開第2004/0209901号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

**【0128】**

一実施形態では、免疫抑制化合物が、米国特許出願公開第2004/0171623号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。

**【0129】**

一実施形態では、細胞の生存を促進する化合物が、米国特許出願公開第2010/0104542号明細書において開示される化合物から選択されてもよい。50

## 【0130】

一実施形態では、増殖因子が、とりわけ、TGF-1、2、および3を含むTGF-ファミリー、骨形態形成タンパク質(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12、および-13)、線維芽細胞増殖因子-1および-2、血小板由来増殖因子-AA、-AB、および-BB、血小板に富む血漿、インスリン増殖因子(IGF-I、II)増殖分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、-15)、血管内皮細胞由来増殖因子(VEGF)、ブレイオトロフィン、エンドセリンのメンバーからなる群から選択される、少なくとも1つの分子であってもよい。他の医薬化合物は、たとえばニコチンアミド、低酸素誘発性因子1-アルファ、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、GLP-1およびGLP-2ミメティボディ、ならびにII、エキセンディン-4、ノダル、ノギン、NGF、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、テネイシン-C、トロポエラスチン、トロンビン由来のペプチド、カテリシジン、デフェンシン、ラミニン、フィブロネクチンおよびビトロネクチンなどのよう、接着性細胞外マトリックスタンパク質の細胞結合ドメインおよびヘパリン結合ドメインを含有する生物学的ペプチド、ならびにたとえば、米国特許出願公開第2004/0209901号明細書および米国特許出願公開第2004/0132729号明細書において開示される化合物などのようなMAPK阻害剤を含むことができる。

## 【0131】

一実施形態では、細胞部分が、低酸素条件下で培養される。

## 【0132】

一実施形態では、細胞部分が、熱ショックを受ける。

## 【0133】

尿を含む生体液：一実施形態では、微小胞が、尿から得られる。尿は、健康な個人またはその代わりに特定の疾患表現型を有する個人から得られてもよい。

## 【0134】

一実施形態では、微小胞が、尿を含む生体液から単離され、

- a ) 尿サンプルを得るステップ、
- b ) 細胞デブリを除去するために尿を清澄化するステップ、
- c ) 清澄化された尿に沈殿剤を追加することによって、微小胞を沈殿させるステップ、
- d ) 沈殿した微小胞を収集し、沈殿剤を除去するためにその物質を洗浄するステップ、および
- e ) 保存またはその後の使用のために洗浄された微小胞を溶液中に懸濁するステップを含む。

## 【0135】

一実施形態では、尿が、遠心分離法によって清澄化される。

## 【0136】

一実施形態では、沈殿剤が、6000の平均分子量を有するポリエチレングリコールである。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、約8.5w/v%の濃度で使用される。一実施形態では、ポリエチレングリコールが、0.4Mの最終濃度を有する塩化ナトリウム溶液中で希釈される。

## 【0137】

一実施形態では、沈殿した微小胞が、遠心分離法によって収集される。

## 【0138】

一実施形態では、単離された微小胞が、リン酸緩衝食塩水を使用し、100kDa分子量カットオフを有する膜を使用して、遠心ろ過を介して洗浄される。

## 【0139】

本発明の代替の実施形態では、生体液が、ろ過によって清澄化される。代替の実施形態では、沈殿した微小胞が、ろ過によって収集される。代替の実施形態では、ろ過によって、生体液が清澄化され、沈殿した微小胞が収集される。

## 【0140】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、生体液および／または沈殿した微小胞のいずれかのろ過が、外力の適用を必要とした。外力は、重力、標準重力、または遠心力のいずれかであってもよい。その代わりに、外力は、吸引力であってもよい。

#### 【0141】

一実施形態では、本実施形態は、ろ過によって生体液の清澄化を容易にするための装置を提供する。一実施形態では、本発明は、ろ過によって沈殿した微小胞の収集を容易にするための装置を提供する。一実施形態では、本発明は、ろ過による生体液の清澄化および沈殿した微小胞の収集を容易にするための装置を提供する。一実施形態では、装置がまた、微小胞を洗浄する。

#### 【0142】

10

一実施形態では、装置が、図4において示される装置である。この実施形態では、生体液が、内部のチャンバーに追加される。内部のチャンバーは、内部のチャンバーにおける微小胞よりも大きなサイズを有するいかなる粒子をも保持しながら、微小胞が通過するのを可能にするポアサイズを有する第1のフィルターを有する。一実施形態では、内部のチャンバーのフィルターのポアサイズが、 $1\text{ }\mu\text{m}$ である。この実施形態では、生体液が内部のチャンバーからフィルターを通過する場合、 $1\text{ }\mu\text{m}$ を超える粒子が内部のチャンバーにおいて保持され、他のすべての粒子は、内部のチャンバーの底および第2のフィルターの間の領域に集まる。

#### 【0143】

20

第2のフィルターは、微小胞を通過させないポアサイズを有する。一実施形態では、内部のチャンバーの第2のフィルターのポアサイズが、 $0.01\text{ }\mu\text{m}$ である。この実施形態では、生体液が第2のフィルターを通過する場合、微小胞が、内部のチャンバーの底および第2のフィルターの間の領域において保持され、残りの粒子および体液はすべて、装置の底に集まる。

#### 【0144】

当業者は、装置が、たとえば、所望のサイズの微小胞を選択するために、様々なポアサイズの2つを超えるフィルターを有することができるることを容易に認識することができる。

#### 【0145】

一実施形態では、沈殿剤が、内部のチャンバーにおける生体液に追加される。一実施形態では、生体液が第1のフィルターを通過した後、沈殿剤が、ろ液に追加される。

30

#### 【0146】

本発明の装置によって利用されるろ過膜は、任意の適した材料から作製されてもよい、ただし、ろ過膜は、生体液と反応しないまたは生体液内の構成成分と結合しないことを条件とする。たとえば、ろ過膜は、たとえばポリエーテルスルホン、ナイロン6、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ゼータ修飾ガラスマイクロファイバー、硝酸セルロース、酢酸セルロース、ポリフッ化ビニリデン、再生セルロースなどのような低結合性材料(*low bind material*)から作製されてもよい。

#### 【0147】

本発明の微小胞

40

一実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $5000\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $1000\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $500\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $400\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $300\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $200\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 $2\text{ nm}$ ～約 $100\text{ nm}$ のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の

50

微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 2 nm ~ 約 50 nm のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 2 nm ~ 約 20 nm のサイズを有する。代替の実施形態では、本発明の微小胞が、電子顕微鏡法によって決定される、約 2 nm ~ 約 10 nm のサイズを有する。

【 0148 】

一実施形態では、本発明の微小胞が、少なくとも 100 kDa の分子量を有する。

【 0149 】

本発明の方法に従って単離される微小胞は、療法に使用されてもよい。その代わりに、本発明の方法に従って単離される微小胞は、診断試験に使用されてもよい。その代わりに、本発明の微小胞は、細胞または組織を改変するまたは操作するために使用されてもよい。  
10 本発明の微小胞が細胞または組織を改変するまたは操作するために使用される場合、微小胞は、細胞または組織を改変するまたは操作するであろう RNA、DNA、脂質、炭水化物、タンパク質、薬、小分子、代謝物質、またはその組み合わせにより、添加され、標識されてもよい。その代わりに、微小胞は、RNA、DNA、脂質、炭水化物、タンパク質、薬、小分子、代謝物質、またはその組み合わせを発現するおよび / または含有する細胞または組織から単離されてもよい。

【 0150 】

診断試験における本発明の微小胞の使用

本発明の微小胞は、たとえば状態もしくは疾患または疾患のステージもしくは進行などのよう、特定の表現型を同定するバイオマーカーを検出する診断試験において使用することができる。基となる細胞 (cell - of - origin) に特異的な微小胞由来のバイオマーカーまたはマーカーは、疾患、状態、疾患ステージ、および状態のステージについての処置レジメンを決定するために使用することができ、また、処置効能を決定するために使用することもできる。基となる細胞に特異的な微小胞由来のマーカーはまた、未知の起源の疾患の状態を同定するために使用することもできる。  
20

【 0151 】

本明細書において使用されるように、用語「バイオマーカー」は、生物学的状態の指標を指す。それは、正常な生物学的プロセス、病原性のプロセス、または治療的介入に対する薬理的な応答の指標として、客観的に測定され、評価される特質である。微小胞の 1 つ以上のバイオマーカーは、表現型を特徴付けるために評価することができる。バイオマーカーは、DNA または RNA などのよう、代謝物質、核酸、ペプチド、タンパク質、脂質、抗原、炭水化物、またはプロテオグリカンとすることができます。RNA は、mRNA、miRNA、snORNA、snRNA、rRNA、tRNAs、siRNA、hnRNA、または shRNA とすることができます。  
30

【 0152 】

対象における表現型は、対象から生物学的サンプルを得、サンプル由来の 1 つ以上の微小胞を分析することによって特徴付けることができる。たとえば、対象または個人についての表現型の特徴付けは、疾患もしくは状態を検出すること（前駆症状の早期検出を含む）、疾患もしくは状態の予後診断、診断、もしくはセラノーシス (theranosis) を決定すること、または疾患もしくは状態のステージもしくは進行を決定することを含んでいてもよい。表現型の特徴付けはまた、特異的疾患、状態、疾患ステージ、および状態ステージに対する適切な処置または処置効能、疾患進行、特に疾患再発、転移性の伝播、もしくは疾患回帰の予測および見込み分析を同定することを含むこともできる。表現型はまた、癌または腫瘍などのよう、臨床的に別個のタイプまたはサブタイプの状態または疾患とすることもできる。表現型決定はまた、生理学的状態の決定または移植後などのよう器官障害もしくは器官拒絶反応の評価とすることもできる。本明細書において記載される産物およびプロセスは、個々の基準に基づく対象の評価を可能にし、これは、処置における、より効率的でより経済的な決定という利点を提供することができる。  
40

【 0153 】

表現型は、米国特許第 7,897,356 号明細書において列挙される任意の表現型と

50

することができる。表現型は、腫瘍、新生物、または癌とすることができます。本明細書において記載される産物またはプロセスによって検出されるまたは評価される癌は、乳癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、過形成性ポリープ、腺腫、結腸直腸癌、高度異形成、低度異形成、前立腺肥大症、前立腺癌、黒色腫、膀胱癌、脳癌（膠芽腫など）、造血器悪性腫瘍、肝細胞がん、子宮頸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、食道癌、消化管間質性腫瘍（GIST）、腎細胞がん（RCC）、または胃癌を含むが、これらに限定されない。結腸直腸癌は、C�Dukes BまたはDukes C～Dとすることができます。造血器悪性腫瘍は、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞リンパ腫-DLBCL、B細胞リンパ腫-DLBCL-胚中心様、B細胞リンパ腫-DLBCL-活性化B細胞様、およびバーキットリンパ腫とすることができます。表現型はまた、バレット食道などのような前悪性の状態であってもよい。

#### 【0154】

表現型はまた、炎症疾患、免疫疾患、または自己免疫疾患とすることができます。たとえば、疾患は、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）、骨盤炎症、脈管炎、乾癬、糖尿病、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病、関節リウマチ、乾癬、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、橋本甲状腺炎、グレーブス病、強直性脊椎炎、シェーゲレン症候群、CREST症候群、強皮症、リウマチ性疾患、器官拒絶反応、移植片対宿主病、原発性硬化性胆管炎、または敗血症であってもよい。

#### 【0155】

表現型はまた、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、不安定plaquer、卒中、または虚血などの心臓血管系疾患とすることもできる。心臓血管系疾患または状態は、高血圧、狭窄症、血管閉塞、または血栓症のイベントとすることができます。

#### 【0156】

表現型はまた、多発性硬化症（MS）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）、統合失調症、双極性障害、うつ、自閉症、プリオント病、ピック病、認知症、ハンチントン病（HD）、ダウン症候群、脳血管疾患、ラズムッセン脳炎、ウイルス性髄膜炎、精神神経全身性エリテマトーデス（NPSLE）、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルトヤコブ病、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病、伝達性海綿状脳症、虚血再灌流損傷（たとえば卒中）、脳外傷、微生物感染症、または慢性疲労症候群などのような神経疾患とすることもできる。表現型はまた、線維筋痛、慢性神経因性疼痛、または末梢神経因性疼痛などの状態であってもよい。

#### 【0157】

表現型はまた、細菌、ウイルス、酵母感染症などの伝染病であってもよい。たとえば、疾患または状態は、ホイップル病、プリオント病、肝硬変、メチシリン抵抗性黄色ブドウ球菌、HIV、肝炎、梅毒、髄膜炎、マラリア、結核、またはインフルエンザであってもよい。HIVまたはHCV様粒子などのウイルスタンパク質は、ウイルス性の状態を特徴付けるためにエキソソームにおいて評価することができます。

#### 【0158】

表現型はまた、周生期または妊娠関連性の状態（たとえば子癪前症または早産）、鉄代謝に関する代謝性疾患または状態などの代謝性疾患または状態とすることもできる。代謝性疾患または状態はまた、糖尿病、炎症、または周生期の状態とすることもできる。

#### 【0159】

たとえば、表現型は、ウェスタンプロット、ELISA、PCR、およびその他同種のものなどの任意の適したアッセイ方法を介して検出されてもよい。アッセイ方法は、1つを超える表現型の多重分析を実行するために組み合わせられてもよい。本発明の微小胞に適用されてもよいアッセイ方法の例は、国際公開第2009092386A3号パンフレットおよび国際公開第2012108842A1号パンフレットにおいて開示される。

#### 【0160】

10

20

30

40

50

バイオマーカーがRNAである場合、RNAは、米国特許第8,021,847号明細書において開示される方法によって本発明の微小胞から単離されてもよい。

【0161】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第7,897,356号明細書において開示される疾患についての診断試験において利用される。

【0162】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,211,653号明細書において開示される方法に従って癌についての診断試験において利用される。

【0163】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,216,784号明細書において開示される方法に従って癌についての診断試験において利用される。 10

【0164】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,278,059号明細書において開示される方法に従って前立腺癌についての診断試験において利用される。

【0165】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,343,725号明細書において開示される方法に従って癌生存についての予後診断のための診断試験において利用される。

【0166】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,349,568号明細書において開示される方法に従って癌生存についての予後診断のための診断試験において利用される。 20

【0167】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,349,560号明細書において開示される方法に従って急性リンパ性白血病についての診断試験において利用される。

【0168】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,349,561号明細書において開示される方法に従って急性リンパ性白血病についての診断試験において利用される。

【0169】

一実施形態では、本発明の微小胞が、C型肝炎ウイルスについての診断試験において利用される。一実施形態では、C型肝炎ウイルスRNAが、患者におけるC型肝炎ウイルスの存在について試験するために、米国特許第7,807,438号明細書において記載される方法に従って本発明の微小胞から抽出される。 30

【0170】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,349,574号明細書において開示される方法に従って癌療法に対する患者の応答を決定するための診断試験において利用される。

【0171】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20120058492A1号明細書において開示される方法に従って悪性腫瘍を診断するための診断試験において利用される。 40

【0172】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20120238467A1号明細書において開示される方法に従って癌または有害な妊娠転帰を診断するための診断試験において利用される。

【0173】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20120214151A1号明細書において開示される方法に従って尿中のHIVについての診断試験において利用される。

【0174】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20120309041A1号明細書において開示される方法に従って心血管系イベントについての診断試験において利用される。

**【0175】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2012110099A1号パンフレットにおいて開示される方法に従って心血管系イベントについての診断試験において利用される。

**【0176】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2012126531A1号パンフレットにおいて開示される方法に従って心血管系イベントについての診断試験において利用される。 10

**【0177】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2013110253A3号パンフレットにおいて開示される方法に従って心血管系イベントについての診断試験において利用される。

**【0178】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2012135844A2号パンフレットにおいて開示される方法に従って黒色腫についての診断試験において利用される。

**【0179】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、バイオマーカーB R A F の存在について、本発明の方法に従って単離される微小胞を試験することによって、転移性黒色腫についての診断試験において利用される。B R A F の存在は、ウェスタンプロットを介してまたはその代わりにP C Rによって決定されてもよい。一実施形態では、転移性黒色腫試験が、野生型および悪性B R A F を検出することができる。一実施形態では、転移性黒色腫試験が、悪性B R A F のスプライス変異体を検出することができる。 20

**【0180】**

一実施形態では、転移性黒色腫についての診断試験において利用される微小胞が、図3において概説されるステップを含む方法を使用して単離される。

**【0181】**

一実施形態では、微小胞が、転移性黒色腫の存在について診断されることを望む患者から得られる。一実施形態では、微小胞が、患者の血漿から得られる。 30

**【0182】**

一実施形態では、転移性黒色腫の存在が、下記の2つのプライマーセットのうちの1つを使用してP C Rを介して決定される：

配列1：

フォワード：A G A C C T C A C A G T A A A A A T A G G T G A

リバース：C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C

增幅産物長：70

配列2：

フォワード：G A A G A C C T C A C A G T A A A A A T A G G T G 40

リバース：C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C

增幅産物長：82

**【0183】**

他の実施形態では、転移性黒色腫の存在が、マウス抗B R A F V 6 0 0 E 抗体（N e w E a s t B i o s c i e n c e s 、 M a l v e r n 、 P A ）を使用してウェスタンプロットを介して決定される。

**【0184】**

療法における本発明の微小胞の使用

本発明の微小胞は、疾患を処置するための療法として使用することができる。

**【0185】**

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20030198642A1号明細書において記載される方法に従ってワクチンとして使用される。

【0186】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20060116321A1号明細書において記載される方法に従って患者の免疫応答を調整するまたは抑制するために使用される。

【0187】

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第06007529A3号パンフレットにおいて記載される方法に従って患者の免疫応答を調整するまたは抑制するために使用される。 10

【0188】

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2007103572A3号パンフレットにおいて記載される方法に従って患者の免疫応答を調整するまたは抑制するために使用される。

【0189】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,288,172号明細書において記載される方法に従って患者の免疫応答を調整するまたは抑制するために使用される。

【0190】

一実施形態では、本発明の微小胞が、国際公開第2011000551A1号パンフレットにおいて記載される方法に従って癌のための療法として使用される。 20

【0191】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許出願公開第20120315324A1号明細書において記載される方法に従って癌または炎症疾患のための療法として使用される。

【0192】

一実施形態では、本発明の微小胞が、米国特許第8,343,485号明細書において記載される方法に従って血管傷害のための療法として使用される。

【0193】

一実施形態では、本発明の微小胞が、細胞に分子を送達するために使用される。分子の送達は、疾患を処置するまたは予防するのに有用であってもよい。一実施形態では、送達が、国際公開第04014954A1号パンフレットにおいて記載される方法に従うものである。代替の実施形態では、送達が、国際公開第2007126386A1号パンフレットにおいて記載される方法に従うものである。代替の実施形態では、送達が、国際公開第2009115561A1号パンフレットにおいて記載される方法に従うものである。代替の実施形態では、送達が、国際公開第2010119256A1号パンフレットにおいて記載される方法に従うものである。

【0194】

一実施形態では、本発明の微小胞が、創傷治癒を促進するまたは増強するために使用される。一実施形態では、創傷が、全層性熱傷である。一実施形態では、創傷が、第2度熱傷である。 40

【0195】

一実施形態では、本発明の微小胞が、患者における血管新生を促進するまたは増強するために使用される。

【0196】

一実施形態では、本発明の微小胞が、患者における神経細胞再生を促進するまたは増強するために使用される。

【0197】

一実施形態では、本発明の微小胞が、患者における瘢痕形成を低下させるために使用される。

【0198】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明の微小胞が、患者の皮膚におけるしわ形成を低下させるために使用される。

【0199】

一実施形態では、本発明の微小胞が、患者における複雑な組織再生を調整するために使用される。

【0200】

一実施形態では、本発明は、複雑な組織構造の機能的再生および組織化を促進することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、再生不良性貧血を有する患者において造血組織を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、上皮組織、間質性組織、神経組織、血管組織、および付属器構造からなる群から選択される、病気の、損傷を与えられた、または欠けている皮膚を有する患者における少なくとも1つの組織を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、本発明は、3つすべての胚葉から組織および/または細胞を再生することができる微小胞の単離調製物を提供する。

10

【0201】

一実施形態では、本発明は、患者の免疫系を調整するために使用される微小胞の単離調製物を提供する。

【0202】

一実施形態では、本発明は、患者の中に移植される組織または細胞の生存を増強する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、患者が、組織または細胞の移植を受ける前に微小胞の単離調製物により処置される。代替の実施形態では、患者が、組織または細胞の移植を受けた後に微小胞の単離調製物により処置される。代替の実施形態では、組織または細胞が、微小胞の単離調製物により処置される。一実施形態では、組織または細胞が、移植に先立って微小胞の単離調製物により処置される。

20

【0203】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞由来のRNA、DNA、脂質、炭水化物、代謝物質、タンパク質、およびその組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの分子を含有する微小胞の単離調製物を提供する。一実施形態では、宿主細胞が、RNA、DNA、脂質、炭水化物、代謝物質、タンパク質およびその組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの分子を発現するように操作される。一実施形態では、宿主細胞由来のRNA、DNA、脂質、炭水化物、代謝物質、タンパク質およびその組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの分子を含有する微小胞の単離調製物が、治療剤として使用される。

30

【0204】

本発明はさらに例証されるが、以下の実施例によって限定されない。

【実施例】

【0205】

実施例1：超遠心分離法による細胞培養培地からの微小胞の単離

この実施例は、微小胞が細胞培養培地または任意の生体液から単離される、典型的な方法を例証する。細胞培養培地から微小胞を単離するための方法の概要は、図1において示される。要約すると、細胞は、微小胞なしの血清により補足された培地において培養される（血清は、超遠心分離法、ろ過、沈殿などによって微小胞を排除してもよい）。ある期間、細胞を培養した後に、培地を取り出し、コニカルチューブに移し、4で10分間、 $400 \times g$ で遠心分離して、細胞をペレットにする。次に、上清を新しいコニカルチューブに移し、4で30分間、 $2000 \times g$ で遠心分離して、細胞および細胞デブリをさらに除去する。これに、もう1回の遠心分離法ステップを続けてもよい（たとえば、さらに細胞デブリを排除するおよび/またはより大きな微小胞を除去するために、30分間、 $10000 \times g$ ）。結果として生じた上清は、超遠心チューブに移し、均等な重量であることを確かめるために秤量し、4で70分間、 $70000 \times g$ で超遠心分離して、微小胞をペレットにする。

40

50

**【0206】**

この上清は、続いて、廃棄し、ペレットは氷冷PBS中に再懸濁する。その溶液は、4で70分間、 $70000 \times g$ で超遠心分離して、微小胞をペレットにする。微小胞濃縮ペレットは、わずかな体積（およそ $50 \sim 100 \mu l$ ）の適切なバッファー（たとえばPBS）中に再懸濁する。

**【0207】**

実施例2：本発明の方法による細胞培養培地からの微小胞の単離

この実施例は、微小胞が本発明の方法によって細胞培養培地から単離される方法を示す。培養細胞を有する培地から微小胞を単離するための方法の概要は、図2および3において示される。要約すると、細胞は、微小胞なしの血清により補足された培地において培養される（血清は、超遠心分離法、ろ過、沈殿などによって微小胞を排除してもよい）。ある期間、細胞を培養した後に、培地を取り出し、コニカルチューブに移し、4で10分間、 $400 \times g$ で遠心分離して、細胞をペレットにする。次に、上清を新しいコニカルチューブに移し、4で30分間、 $2000 \times g$ で遠心分離して、細胞および細胞デブリをさらに除去する。これに、もう1回の遠心分離法ステップを続けてもよい（たとえば、さらに細胞デブリを排除するおよびより大きな粒子を除去するために、30分間、 $1000 \times g$ ）。

10

**【0208】**

次いで、微小胞は、8.5%w/v PEG 6000および0.4M NaClを使用して4で沈殿させる。この混合物を30分間、4で $10000 \times g$ で回転させる。上清は除去し、ペレットは、適切なバッファー（たとえばPBS）中に再懸濁する。それは、即時の下流の反応に使用されてもよいまたはさらに精製されてもよい。さらなる精製手順は、遠心フィルター（たとえば $100 \text{ kDa}$ のMWCO）、免疫親和性、HPLC、タンジェンシャルフローろ過、相分離／分割、マイクロフルイディクスなどの使用を含むことができる。

20

**【0209】**

実施例3：本発明の方法による骨髄幹細胞を使用して条件付けられた培養培地からの微小胞の単離

正常ドナーヒト骨髄は、AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.allcells.com>) から得た。MSCは、標準的なプラスチック付着方法によって単離した。骨髄単核細胞は、メーカーのプロトコール (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) に従って、Ficoll-Paque Premium (密度： $1.077 \text{ g/ml}$ ) を使用する低密度遠心分離法によって単離した。単核細胞は、界面で収集し、2%FBS (Atlanta Biologics, Atlanta, GA) を補足したリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で3回洗浄し、アルファ-最小必須培地 (-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) および20% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Lonza, Alendale, NJ)、ならびに1%グルタミン (Lonza) からなるMSC培地中に再懸濁した。

30

**【0210】**

MSCまたは単核細胞のいずれかの最初の培養物は、組織培養処置皿 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中に $2 \sim 3 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で接種し、95%の加湿空気および5% CO<sub>2</sub>中37で細胞インキュベーターに置いた。48~72時間後に、非付着細胞を除去し、培養フラスコをPBSにより一度すぎ、新鮮な培地をフラスコに追加した。細胞は、80%コンフルエンスに達するまで成長させ、次いで、トリプシン-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA) によって継代した。細胞は、5層多重フラスコ (BD Biosciences) の中に1:4の比で分けた。その代わりに、凍結保存されたMSCを37で解凍し、95%の加湿空気および5% CO<sub>2</sub>中37で20%微小胞なしウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミンを補足した -MEM 中で直ちに培養した。それ

40

50

らを上記と同様に増やした。

**【0211】**

細胞を、80～90%コンフルエンスに達するまで、多重フラスコ中で成長させた。フラスコをPBSにより2回すすぎ、1%ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミンを補足した-MEMを追加した。24時間後、条件培地を50mLコニカル遠心分離チューブ(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL)に移し、4で10分間、400×gで直ちに遠心分離して、あらゆる非付着細胞をペレットにした。上清を新しい50mLコニカル遠心分離チューブに移し、4で30分間、2000×gで遠心分離して、細胞および細胞デブリをさらに除去した。

**【0212】**

上清を収集し、250mL滅菌ポリプロピレン使い捨て容器(Corning, Corning, NY)中に置いた。上清に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量6000(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)ならびに塩化ナトリウム(最終濃度0.4M)を追加した。その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を50mLコニカル遠心分離チューブに移し、30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルターユニット(公称分子量限界100kDa)(Millipore, Billerica, MA)に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した(およそ200μl)。タンパク濃度は、マイクロBSAタンパク質アッセイキット(Pierce, Rockford, IL)によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70度で保管したまたは下流の使用(たとえばタンパク質、RNA、およびDNA抽出)のためにプロセシングした。

**【0213】**

実施例4：本発明の方法による血漿からの微小胞の単離

およそ6～8mLの血液(ヒトおよびブタ)を静脈穿刺を介して収集し、BD Vacutainer plastic EDTA lavender tube(BD Biosciences, San Jose, CA)の中に置いた。静脈穿刺チューブを室温で30分間、400×gで遠心分離した。血漿を取り出し(およそ3～4mL)、新しい50mLコニカル遠心分離チューブ(Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL)の中に置いた。滅菌アルファ-MEM(Mediatech Inc., Manassas, VA)を1:10(血漿対培地)の比で追加した。

**【0214】**

その溶液に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量6000(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO)ならびに塩化ナトリウム(最終濃度0.4M)を追加した。その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルターユニット(公称分子量限界100kDa)(Millipore, Billerica, MA)に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した(およそ200～400μl)。タンパク濃度は、マイクロBSAタンパク質アッセイキット(Pierce, Rockford, IL)によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70度で保管したまたは下流の使用(たとえばタンパク質、RNA、およびDNA抽出)のためにプロセシングした。

**【0215】**

10

20

30

40

50

### 実施例 5：本発明の方法による骨髄穿刺液からの微小胞の単離

ブタ骨髄を腸骨稜から単離した。皮膚領域は、ポビドンヨード7.5%およびイソプロパノール70%により注意深くきれいにした。11ゲージ3mmトロカール(Ranafac、Avon、MA)を腸骨稜の中に挿入した。骨髄サンプルの凝固を予防するために吸引シリンジに5000~1000ユニットのヘパリンを添加した。およそ20~25mlの骨髄を吸引し、その溶液を50mlコニカル遠心分離チューブに移した。その代わりに、正常ドナーヒト骨髄(およそ50ml)を、AllCells LLC(Emergencyville、CA、http://www.allcells.com)から得た。

#### 【0216】

50mlコニカルチューブを室温で30分間、400×gで遠心分離した。上清(非細胞部分)を収集し(50ml当たりおよそ10~12ml)、新しい50mlコニカル遠心分離チューブ(Thermo Fisher Scientific Inc、Weston、FL)の中に置いた。滅菌アルファ-最小必須培地(-MEM)(Mediatech Inc.、Manassas、VA)を1:10(骨髄上清対培地)の比で追加した。その溶液を新しい50mlコニカルチューブに移し、4で30分間、2000×gで遠心分離した。上清を新しい50mlコニカルチューブに移し、この溶液に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量60000(Sigma Aldrich、Saint Louis、MO)ならびに塩化ナトリウム(最終濃度0.4M)を追加した。

#### 【0217】

その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルターユニット(公称分子量限界100kDa)(Millipore、Billerica、MA)に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した(およそ200~400μl)。タンパク濃度は、マイクロBSAタンパク質アッセイキット(Pierce、Rockford、IL)によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70度で保管したまたは下流の使用(たとえばタンパク質、RNA、およびDNA抽出)のためにプロセシングした。

#### 【0218】

細胞部分を収集し、間葉系幹単離または骨髄全部の単離のためにプロセシングした。

#### 【0219】

### 実施例 6：本発明の方法による尿からの微小胞の単離

およそ500mlの清浄採取ヒト尿を単離し、50mlコニカルチューブ(Thermo Fisher Scientific Inc、Weston、FL)の中に置いた。

#### 【0220】

50mlコニカルチューブを4で30分間、400×gで遠心分離した。上清を取り出し、新しい50mlコニカル遠心分離チューブ(Thermo Fisher Scientific Inc、Weston、FL)の中に置いた。その溶液を新しい50mlコニカルチューブに移し、4で30分間、2000×gで遠心分離した。上清を新しい50mlコニカルチューブに移し、この溶液に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量60000(Sigma Aldrich、Saint Louis、MO)ならびに塩化ナトリウム(最終濃度0.4M)を追加した。

#### 【0221】

その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心

10

20

30

40

50

フィルターユニット（公称分子量限界 100 kDa）（Millipore、Billerica、MA）に移し、30分間 5000 × g で遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間 5000 × g でもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した（およそ 200 ~ 400 μl）。タンパク濃度は、マイクロ BSA タンパク質アッセイキット（ Pierce、Rockford、IL）によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70 度で保管したまたは下流の使用（たとえばタンパク質、RNA、およびDNA 抽出）のためにプロセシングした。

#### 【0222】

実施例 7：本発明の方法による骨髄細胞の長期培養物由来の微小胞の単離

骨髄は、吸引液から得（実施例 1 を参照されたい）、赤血球は、0.1 mM EDTA (Stem Cell Technologies、Vancouver、BC) を含有する 0.8% 塩化アンモニウム溶液を使用して溶解した。有核細胞は、5 分間、400 × g でウシ胎児血清（Atlanta Biologicals、Atlanta、GA）クッシュョン下でペレットにした。有核細胞は、5 分間、400 × g でペレットにすることによって McCoy's 5a 培地（Mediatech Inc.、Manassas、VA）中で洗浄した。細胞を  $1 \times 10^6$  細胞 / ml の密度で培養培地中に再懸濁し、25、75、または 225 cm<sup>2</sup> フラスコ（Corning、Corning、NY）中で平板培養した。

#### 【0223】

培養培地は、McCoy の 5a 培地、1% 重炭酸ナトリウム（Life technologies、Carlsbad、CA）、0 ~ 4% MEM 非必須アミノ酸（Life technologies）、0 ~ 8% MEM 必須アミノ酸（Life technologies）、1% L-グルタミン（Lonza、Allendale、NJ）、0.1 μM ヒドロコルチゾン（Life technologies）、1% ペニシリン / ストレプトマイシン（Lonza）、12 ~ 5% ウシ胎仔血清（Atlanta Biologicals）、および 12 ~ 5% ウマ血清（Stem Cell Technology）からなった。培養物は 33 および 5% CO<sub>2</sub> でインキュベートした。供給は、培養の最初の 9 週間、いかなる培地をも取り出すことなく、培地のもとの体積の半分を追加して毎週実行した。培養物を 9 週間を超えて成長させた場合、培養培地の体積をもとの体積まで低下させ、もとの体積の半分の新鮮な培地を毎週追加した。

#### 【0224】

およそ 9 週間の培養の後に、もとの培地を取り出し、保管した。細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）により 2 回洗浄し、McCoy の 5a 培地、1% 重炭酸ナトリウム、0 ~ 4% MEM 非必須アミノ酸、0 ~ 8% MEM 必須アミノ酸（Life technologies）、1% L-グルタミン（Lonza、Allendale、NJ）、および 1% ペニシリン / ストレプトマイシン（Lonza）からなる培地の中で 24 時間インキュベートした。

#### 【0225】

24 時間後、上清を 50 mL コニカル遠心分離チューブ（Thermo Fisher Scientific Inc、Weston、FL）に移し、4°で 10 分間、400 × g で直ちに遠心分離して、あらゆる非付着細胞をペレットにした。保管していたもとの培地を細胞に追加して戻した。上清を新しい 50 mL コニカル遠心分離チューブに移し、4°で 30 分間、2000 × g で遠心分離して、細胞および細胞デブリをさらに除去した。

#### 【0226】

上清を収集し、250 mL 滅菌ポリプロピレン使い捨て容器（Corning、Corning、NY）中に置いた。上清に、8.5 w/v % の、RNA アーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量 6000 (Sigma Aldrich、Saint Louis、MO) ならびに塩化ナトリウム（最終濃度 0.4 M）を追加した。その溶液を振動させながら一晩、4°の低温室に置いた。その溶液を 50 mL コニカル

10

20

30

40

50

遠心分離チューブに移し、30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水(PBS)中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルタユニット(公称分子量限界100kDa)(Millipore、Billerica、MA)に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルタユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した(およそ200μl)。タンパク濃度は、マイクロBSAタンパク質アッセイキット(Pierce、Rockford、IL)によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70度で保管したまたは下流の使用(たとえばタンパク質、RNA、およびDNA抽出)のためにプロセシングした。

10

### 【0227】

#### 実施例8：本発明の微小胞の分析

微小胞のサンプルは、電子顕微鏡法によって分析した。透過型電子顕微鏡法(TEM)については、微小胞のそれぞれの検体を、20分間、ホルムバールコーティング150メッシュ銅製グリッド(Electron Microscopy Sciences、Fort Washington、PA)上にロードした。グリッドの水気を切り、5分間、数滴の2%グルタルアルデヒド上で浮かせ、次いで、再留水(DDOH)中で洗浄し、その後、数滴の4%水性酢酸ウラニルで染色し、DDOH中で複数回洗浄した。グリッドは、Philips CM10電子顕微鏡において80kVで検査した。

### 【0228】

20

図5は、実施例1において記載される超遠心法によって(パネルA&B)および実施例3において記載される本発明の方法に従って(パネルC&D)単離されたヒト骨髄由来間葉系幹細胞に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。図6は、実施例1において記載される超遠心法によって(パネルA&B)および実施例3において記載される本発明の方法に従って(パネルC&D)単離されたブタ骨髄由来間葉系幹細胞に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。図7は、実施例1において記載される超遠心法によって(パネルA&B)および実施例3において記載される本発明の方法に従って(パネルC&D)単離されたマウス骨髄由来間葉系幹細胞に由来する微小胞の電子顕微鏡写真を示す。

### 【0229】

30

図5～7は、超遠心単離による微小胞と、本発明の方法によって単離された微小胞との差異を示す。本発明の方法に従って単離された微小胞は、より滑らかな境界線を有し、しわがなく、より「インタクトに」見える。

### 【0230】

図8は、本発明の方法に従ってヒト血漿から単離された微小胞の電子顕微鏡写真を示す。PEG単離により実現された形状およびサイズの不均一性は、すべてのタイプの微小胞が単離されたことを示唆する。同様の不均一性は、本発明の方法に従って単離された、ブタ血漿(図9)およびヒト尿(図10)由来の微小胞において観察された。

### 【0231】

40

微小胞のサンプルにおけるタンパク質発現を分析するために、細胞および微小胞をRIPアッファー(Cell signaling technology、Danvers、MA)中に溶解し、タンパク濃度は、microBSAアッセイキット(Pierce、Rockford、IL)によって推定した。およそ20マイクログラムの溶解物を、それぞれのレーンにロードし、膜を一晩、ウサギ抗63抗体(SBI Biosciences、Mountain View、CA)、ウサギ抗hsp70(SBI Biosciences)、ウサギSTAT3(Cell signaling technology)、および/またはウサギホスホ-STAT3(Cell signaling technology)のいずれかによってプロープした(1:1000)。

### 【0232】

エキソソームマーカー(HSP70およびCD63)の存在により、本発明の方法がエキソソームを単離することができるることを確認した。さらに、エキソソームはまた、転

50

写因子S T A T 3および活性化リン酸化形態ホスホ-S T A T 3を含有した。図11を参照されたい。

#### 【0233】

実施例9：線維芽細胞増殖および遊走に対する本発明の微小胞の効果

創傷治癒を促進するまたは増強する本発明の微小胞の能力を研究するために、微小胞が皮膚線維芽細胞の増殖を刺激する能力を試験した。正常ヒト成人皮膚線維芽細胞をL i f e T e c h n o l o g y (C a r l s b a d, C A)から得た。慢性創傷患者線維芽細胞（圧迫性足潰瘍および糖尿病性足潰瘍）を、標準的なケアおよび高度創傷ケア処置にもかかわらず、治癒の証拠を伴わない2年間の継続期間の創傷から、I R Bにより承認されたプロトコール（IND# B B I N D 1 3 2 0 1）下で収集した。正常および慢性創傷線維芽細胞を、24ウェル組織培養プレート（B D B i o s c i e n c e s, S a n J o s e, C A）上で、ウェル当たり $5 \times 10^3$ 細胞で平板培養した。MTT細胞増殖アッセイを0日目および3日目に実行した。微小胞を0日目に追加した。PEG単離微小胞および超遠心単離微小胞の両方は、3日後の両正常および慢性創傷線維芽細胞の増加性の成長において、ほぼ等価であった。リン酸緩衝食塩水（P B S）および微小胞を排除した条件M S C 培地は、成長をほとんど示さなかった。図12を参照されたい。

#### 【0234】

同時培養実験では、正常成人線維芽細胞および糖尿病性足潰瘍由来の線維芽細胞を24ウェルプレート中に接種した。それぞれのウェルに、100%培養密度（ウェル当たりおよそ $1 \times 10^5$ 細胞）を実現するように接種した。細胞増殖の影響を予防するために、スクラッチの2時間前に、培地を、10 μg / m lでマイトマイシンを含有する新鮮な無血清培養培地と置き換えた。次いで、幅が0.4~0.5 mmのスクラッチを残すために、コンフルエント単層を1 m l滅菌ピペットチップにより搔き傷を付けた。次いで、培養培地を直ちに除去した（あらゆる取り除かれた細胞と共に）。除去した培地を、微小胞（PEGもしくは超遠心分離機由来の）を含有する新鮮な培養培地（10% F B S）、P B S、または微小胞を排除したM S C 条件培地と交換した。スクラッチしたエリアは、スクラッチの直後および処置の3日後に、デジタル化された画像を収集することによってモニターした。デジタル化された画像は、倒立IX81 O ly m p u s顕微鏡（O ly m p u s America, Center Valley, P A, <http://www.olympusamerica.com>）およびORCA-AG Hamamatsuデジタルカメラ（Hamamatsu Photonics K. K., Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan, <http://www.hamamatsu.com>）により撮った。処置の3日後に、本発明の方法に従って単離された微小胞は、最も優れた遊走（本質的に創傷を閉じる）を示し、超遠心分離機に由来する微小胞が続いた。コントロール（P B S）および微小胞を排除したM S C 条件培地（排除）は、遊走をほとんど示さなかった。図13を参照されたい。

#### 【0235】

図14は、糖尿病性足潰瘍に由来する細胞遊走線維芽細胞に対する微小胞の効果を示す。図13における結果と同様に、本発明の方法に従って単離された微小胞は、最も優れた遊走を誘起し、実施例1において記載される超遠心法を使用して単離された微小胞が続いた。コントロール（P B S）および微小胞を排除したM S C 条件培地（排除）は、遊走をほとんど示さなかった。

#### 【0236】

実施例10：細胞の中への本発明の微小胞の取込み

本発明の方法に従って条件培地から単離されたヒトM S C 微小胞は、メーカーの説明書（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）に従ってリン脂質細胞リンカーモノクロマット（PKH-26（赤））により標識した。正常皮膚線維芽細胞は、メーカーの説明書に従ってVybrant-Dio（Life technology）により標識した。正常皮膚線維芽細胞は、フィブロネクチン（Sigma-Aldrich）コーティング4ウェルNunc\* Lab-Tek\* II Chamber Slides（Ther

10

20

30

40

50

mo Fisher Scientific Inc、Weston、FL)上で平板培養した(ウェル当たり $5 \times 10^3$ 細胞)。細胞は、メーカーの説明書に従って核色素 Hoechst 33342(Life technology)により染色した。Di o 標識線維芽細胞は、24時間、PKH-26 標識微小胞により処置した。画像は、倒立IX 81 Olympus 顕微鏡およびORCA-AG Hamamatsu デジタルカメラにより撮った。正常皮膚線維芽細胞(緑色脂質膜色素Di oにより染色)は、核周囲の場所における、PEG沈殿によって単離されたPKH-26 標識ヒトMSC MVの取込みを実証した。図15および16を参照されたい。図16において、微小胞は、核周囲の場所において見られる。

## 【0237】

10

## 実施例11：関節リウマチについての診断としての本発明の微小胞の使用

正常皮膚線維芽細胞を、6ウェル組織培養プレート(BD Biosciences)において $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で平板培養した。線維芽細胞は、一晩、血清を欠乏させ、PBS(コントロール)、10マイクログラムの関節リウマチに罹患している患者から得られた血漿から本発明の方法に従って単離された微小胞(ヒト血漿MV PEG沈殿)；骨髄由来間葉系幹細胞により条件付けられた培地から本発明の方法に従って単離された微小胞(ヒトhMSC MV PEG沈殿)；骨髄由来間葉系幹細胞により条件付けられた培地から超遠心分離法を介して単離された微小胞(ヒトhMSC MV超遠心分離法)；PBSコントロール；および排除培地コントロール(MVを排除したhMSC条件培地)のいずれかにより処置した。線維芽細胞において観察されたSTAT3リン酸化の量は、本発明の方法に従って単離された微小胞においてより多かった。図17を参照されたい。

20

## 【0238】

## 実施例12：転移性黒色腫についての診断としての本発明の微小胞の使用

BRAFは、B-Rafと呼ばれるタンパク質を作製するヒト遺伝子である。ヒト癌に関連するBRAF遺伝子の30を超える突然変異が同定されてきた。発明者らは、転移性黒色腫に関連づけられるBRAFの突然変異形態を増幅するために、PCRプライマーを設計した。突然変異は、BRAFにおけるエクソン15におけるT1799A突然変異である。これは、バリン(V)のコドン600でのグルタミン酸(E)による置換に至る(以降V600Eと称す)。この突然変異の存在は、BRAF阻害剤ベムラフェニブによる処置が必要とされる。

30

## 【0239】

ATCC(Washington DC、Maryland)から得られるSK-Mel28細胞株は、BRAFにおけるエクソン15においてT1799A突然変異を有することが知られている。本発明の方法に従って単離した微小胞は、EMEM(ATCC)+10%血清(Atlanta biologics、Atlanta、Georgia)における3日間のインキュベーションによって条件付けた培地から得た。

## 【0240】

単離した微小胞は、Qiagen(Hilden、Germany)のAll Prep DNA/RNAキットを使用して、DNAおよびRNA単離のためにプロセシングした。SK-MEL28細胞および微小胞由来のおよそ50ngのRNAは、iScript(商標) Reverse Transcription Supermix(Biorad、Hercules、CA)を使用して逆転写した。2μlの一定分量を、メーカーの説明書に従って、Platinum(登録商標) PCR SuperMix(Life technology)を利用してPCRに使用した。そのうえ、SK-MEL28細胞および微小胞由来の80ngのDNAは、メーカーの説明書に従って、Platinum(登録商標) PCR SuperMixを利用してPCRに使用した。PCR産物は、3%アガロースゲル上に流し、Bioradのgel-docシステムによって視覚化した。結果を図18に示す。

40

## 【0241】

50

使用したプライマーは

配列1：

フォワード：A G A C C T C A C A G T A A A A A T A G G T G A

リバース：C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C

増幅産物長：70

配列2：

フォワード：G A A G A C C T C A C A G T A A A A A T A G G T G

リバース：C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C

増幅産物長：82

#### 【0242】

10

そのうえ、微小胞のサンプルは、R I P A バッファー中に溶解し、タンパク濃度は、microB S A アッセイキットによって推定した。およそ50マイクログラムを、それぞれのレーンにロードし、膜は、マウス抗B R A F V 6 0 0 E 抗体 (New East B i o s c i e n c e s、M a l v e r n、P A) によって一晩、プロープした (1:1000)。二次抗体、ヤギ抗マウス (P i e r c e) は、1時間、1:10000希釈で適用した。ウェスタンプロットは、S K M E L 2 8 細胞およびM V 溶解物におけるB R A F V 6 0 0 E の検出を示す。

#### 【0243】

20

実施例13：本発明の方法によるG F P 標識骨髄由来間葉系幹細胞の培養物を使用して条件付けられた培地からの微小胞の単離

ヒトユビキチンCプロモーターの指示下で高感度緑色蛍光タンパク質 (G F P ) を発現するホモ接合性トランスジェニックマウス (C 5 7 B L / 6 - T g (U B C - G F P ) 3 0 S c h a / J ) は、J a c k s o n L a b o r a t o r i e s (B a r H a r b o r、M a i n e) から得た。これらのマウスは、すべての組織においてG F P を発現することが知られている。

#### 【0244】

30

G F P マウス (およそ3~4週齢) は、C O<sub>2</sub> による窒息によって安楽死させた。肢は、腰の上および足関節よりも下でカットした。後肢を摘出し、皮膚、筋肉、およびすべての結合組織を除去した。次いで、骨を氷冷滅菌 1 × P B S の皿に置き、P B S 中で数回洗浄した。それぞれの骨の端をはさみで切った。温めた培地 (20%ウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミンを補足した-M E M) を有する10c c シリンジを骨幹に通過させ、150mmプレートの中にすべての骨髄を抽出した。これを数回繰り返して、骨髄がすべて取り出されたことを確実にした。細胞混合物は、細胞を引き離すために数回ピベッティングし、細胞浮遊液は、大きな細胞の塊または骨片を除去するために、細胞ストレーナ (70μmサイズ) (B D B i o s c i e n c e s、S a n J o s e、C A) に通過させた。

#### 【0245】

40

最初の培養物は、組織培養処置皿 (B D B i o s c i e n c e s、S a n J o s e、C A) 中に 2 ~ 3 × 1 0<sup>5</sup> 細胞 / c m<sup>2</sup> で接種し、95%の加湿空気および5% C O<sub>2</sub> 中 3 7 で細胞インキュベーター中に置いた。72~96時間後に、非付着細胞を除去し、培養フラスコをP B S により一度すぎ、新鮮な培地をフラスコに追加した。細胞は、80%コンフルエンスに達するまで成長させ、次いで、トリプシン-E D T A (L i f e t e c h n o l o g i e s、C a r l s b a d、C A) によって継代した。細胞は1:4の比で分けた。

#### 【0246】

40

その代わりに、凍結保存されたG F P マウス-M S C を 3 7 で解凍し、95%の加湿空気および5% C O<sub>2</sub> 中 3 7 で 2 0 %ウシ胎児血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミンを補足した-M E M 中で直ちに培養した。それらを上記と同様に増やした。

#### 【0247】

50

細胞を、100%コンフルエンスに達するまで、フラスコ中で成長させた（およそ1週間）。上清を50mLコニカル遠心分離チューブ（Thermo Fisher Scientific Inc、Weston、FL）に移し、4で10分間、400×gで直ちに遠心分離して、あらゆる非付着細胞をペレットにした。上清を新しい50mLコニカル遠心分離チューブに移し、4で30分間、2000×gで遠心分離して、細胞および細胞デブリをさらに除去した。

#### 【0248】

上清を収集し、250mL滅菌ポリプロピレン使い捨て容器（Corning、Corning、NY）中に置いた。上清に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレングリコール平均分子量6000（Sigma Aldrich、Saint Louis、MO）ならびに塩化ナトリウム（最終濃度0.4M）を追加した。その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を50mLコニカル遠心分離チューブに移し、30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水（PBS）中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルターユニット（公称分子量限界100kDa）（Millipore、Billerica、MA）に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した（およそ200～400μl）。タンパク濃度は、マイクロBSAタンパク質アッセイキット（Pierce、Rockford、IL）によって決定し、濃縮微小胞溶液は、-70度で保管したまたは下流の使用（たとえばタンパク質、RNA、およびDNA抽出）のためにプロセシングした。

#### 【0249】

微小胞の細胞取込みを決定するために、正常ヒト皮膚線維芽細胞は、メーカーの説明書に従ってVybrant-Dio（Life technology）により標識した。正常皮膚線維芽細胞は、フィブロネクチン（Sigma-Aldrich）コーティング4ウェルNunc<sup>\*</sup> Lab-Tek<sup>\*</sup> II Chamber Slides（Thermo Fisher Scientific Inc）上で平板培養した（ウェル当たり $5 \times 10^3$ 細胞）。細胞は、メーカーの説明書に従って核色素Hoechst 33342（Life technology）により染色した。Dil標識線維芽細胞は、24時間、GFP発現マウスマサウスから単離された微小胞により処置した。画像は、倒立IX81 Olympus顕微鏡およびORCA-AG Hamamatsuデジタルカメラにより撮った。図20および21を参照されたい。重要なことには、これらの画像は、GFPを含有する微小胞が細胞によって取込まれたことを示す。

#### 【0250】

実施例14：創傷治癒を促進するまたは増強するための療法としての本発明の微小胞の使用

全層性創傷は、10mmパンチ生検機器を使用して、ブタの背中に作った。微小胞は、実施例1において記載される方法（「従来の」超遠心分離法による方法）に従ってまたは実施例3において記載される方法のいずれかによって、自己由来骨髄由来間葉系幹細胞を使用して条件付けた培養培地から単離した。30マイクログラムの微小胞を、創傷時にならびに1日目および2日に局所的な注射によって創傷に投与した。コントロールは、食塩水により処置したまたは空気への曝露により治癒させた。5日後、動物を安楽死させ、創傷を検査した。

#### 【0251】

図22は、創傷の5日後の創傷の組織像を示す。5日目に、本発明の方法に従って（すなわち、実施例3において記載される方法に従って）単離したマイクロ小胞により処置した創傷は、食塩水コントロール、空気曝露コントロール、および超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した創傷よりも、小さく見えた。超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した創傷は、本発明の方法に従って調製した微小胞により処置したもの

10

20

30

40

50

および両方のコントロールと比較して、炎症応答の増強を示した。

#### 【0252】

他の研究では、第二度熱傷創傷は、100まで加熱した黄銅の棒を使用して、ブタの背中に作った。微小胞は、実施例1において記載される方法（「従来の」超遠心分離法による方法）に従ってまたは実施例3において記載される方法のいずれかによって、自己由来骨髓由来間葉系幹細胞を使用して条件付けた培養培地から単離した。30マイクログラムの微小胞を、創傷時にならびに1日目および2日目に局所的な注射によって創傷に投与した。コントロールは、食塩水により処置したまたは空気への曝露により治癒させた。

#### 【0253】

実験の過程にわたって（熱傷後28日目まで）、超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した創傷は、本発明の方法に従って（すなわち、実施例3において記載される方法に従って）調製した微小胞により処置したものよりも、有意に炎症性であった。図23を参照されたい。同様に、超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した創傷は、食塩水コントロールおよび空気曝露コントロールよりも有意に炎症性であった。本発明の方法に従って調製した微小胞により処置した火傷は、コントロールよりも有意に炎症性であるようには見えなかった。10

#### 【0254】

図23は、超遠心分離法によって調製した微小胞、本発明の方法に従って調製した微小胞、および空気曝露コントロールにより処置した創傷の間の、創傷後7日目の炎症における差異を示す。顕微鏡で、膿瘍形成は、超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した全層性創傷および火傷の両方において見られた。超遠心分離法によって調製した微小胞で注目された炎症は、炎症カスケードを容易に刺激することができる、損傷を受けた微小胞によるものと思われる。本発明の微小胞はまた、さらなる粒子を含むことによって、さらなる利点を与え得る。20

#### 【0255】

図24は、熱傷の28日後の、本発明の方法によって単離した微小胞により処置した第二度ブタ火傷を示す。基質の出現と共に、コラーゲンの有意なリモデリングがある。これらの発見は、コラーゲンII型形成を伴う皮膚リモデリングを示す。皮膚表皮の誘発もまたあり、真皮に十分に固定されたように見える、厚くなった表皮をもたらす。これらの発見は瘢痕形成において観察されず、皮膚の再生とより一致している。瘢痕上に形成される表皮は、瘢痕真皮に十分に固定できることにより、再度の損傷を容易に受けやすい。30

#### 【0256】

図25は、熱傷の28日後の、食塩水により処置した第二度ブタ火傷を示す。平らになつた表皮を伴う最小限の皮膚の再生がある。有意な乳頭間隆起形成の欠乏は、固定が不十分な表皮を大いに暗示するものである。これらの発見は、継続的な損傷の危険性を伴う瘢痕形成をよりはっきりと示す。

#### 【0257】

図26は、損傷の28日後の、本発明の方法に従って単離した微小胞により処置した全層性ブタ創傷を示す。微小胞の適用によっておそらく刺激された、リモデリング真皮への神経の内方成長（矢印によって示す）がある。神経成長は、血管新生性の応答（円で囲まれたエリア）を伴う。神経は、発達した構造であるように見え、単純な軸索発芽によるものではない。これは珍しい発見であり、いまだかつて報告されておらず、また、コントロール創傷または超遠心分離法によって調製した微小胞により処置した創傷においても観察されなかった。これらの観察は、表皮、間質、血管、および神経組織を含むすべての胚葉から成熟したエレメントを生成する能力を伴う複雑な組織再生を大いに示すものである。次いで、これらの方法は、外胚葉、内胚葉、および中胚葉由来組織の外傷、炎症、新生物、および変性障害を含む、多数の状態の処置に広く適用可能であるように思われる。40

#### 【0258】

図27は、損傷の28日後の、本発明の方法によって単離した微小胞により処置した全層性ブタ創傷を示す。この図は、図26において説明される観察をより大きな倍率で示す50

。 A ) では、神経成長は、血管新生性の応答に関する経路をたどるように見える。神経成長が発生学的な発達において血管新生に続くことがよく知られているので、この発見は興味深い。さらに、これらの発見は、組織再生を示す。 B ) は、より高倍率での神経を示す。 C ) は、神経成長に隣接する血管新生をよりいっそう示す。

#### 【 0 2 5 9 】

骨形成は、ブタ全層性創傷モデルにおいてすべての処置グループ（コントロールおよび微小胞処置）において見られた。図 2 8 を参照されたい。動物は、合計 1 . 4 4 m g の微小胞を受けた（半分は本発明の方法に従って調製し、半分は超遠心分離法によって調製した）。次いで、すべての創傷において骨の形成を刺激する全身性の効果があるように見えた。骨形成は、より炎症性の創傷においてより生じる傾向があり、局所的な炎症媒介物質の相乗効果および微小胞の全身性の効果を示唆した。  
10

#### 【 0 2 6 0 】

実施例 1 5 : 骨髄を再配置し、複雑な構造を再生するための療法としての本発明の微小胞の使用

C 5 7 / C J 6 ( G F P - ) マウスは、それらの宿主骨髄前駆体を除去するために、2 サイクルの 4 0 0 c G y ガンマ線照射を致死的に照射した。照射の後に、マウスは、アブレイティブフラクショナルエルビウム : Y A G レーザーによりおよそ 2 c m<sup>2</sup> のエリアを処置した。レーザー処置の後に、プラスチックチャンバーを皮膚に付着させ、同系 G F P + トランスジェニックマウスから得られた骨髄由来細胞をチャンバーに追加した。 G F P + 骨髄細胞は、新たに摘出した全骨髄細胞、系列ネガティブ選択骨髄細胞、間葉系幹細胞、および骨髄完全培養細胞（本出願において記載される）を含んだ。ほんの少数の動物においてしか、キメラ現象を実現することができず、細胞の投与の 4 ~ 6 週間後に循環 G F P + 細胞によって検出された。図 2 9 を参照されたい。驚いたことに、多くの動物が、ドナー骨髄移植の証拠を伴うことなく、生存した。全体的に（細胞を与えたすべてのグループにおいて）、細胞を受けた 3 0 % の動物が生存した。異なるグループの中で、生存率は、系列ネガティブ選択細胞（4 5 %）および新鮮な骨髄細胞（3 0 %）を受けた動物について最も高かった。細胞を受けなかったコントロール照射動物は、1 0 0 % の死亡率を有した。サイトカインは、同様に致死的に照射された動物を救出せず、これらの生存動物において実証することができた機能的ドナー骨髄移植はなかった。送達された細胞によって分泌される微小胞が、宿主骨髄の回復を担い、これらの動物の生存に至る可能性が高い。  
20  
30  
発明者らは、新鮮な骨髄（系列ネガティブ細胞を含む）および間葉系幹細胞が、この効果を達成し得る十分な量の微小胞を產生することを実証した。

#### 【 0 2 6 1 】

他の研究では、C 5 7 / C J 6 ( G F P - ) マウスは、それらの毛の成長を阻害し、それらの骨髄を部分的に除去するために、2 サイクルの 4 0 0 c G y ガンマ線照射を致死的に照射した。照射の後に、マウスの背中をそり、次いで、マウスは、アブレイティブフラクショナルエルビウム : Y A G レーザーによりおよそ 2 c m<sup>2</sup> のエリアを処置した。レーザー処置の後に、プラスチックチャンバーを皮膚に付着させ、同系 G F P + トランスジェニックマウスから得られた骨髄由来細胞をチャンバーに追加した。 G F P + 骨髄細胞は、新たに摘出した骨髄細胞、系列ネガティブ選択骨髄細胞、間葉系幹細胞、および骨髄完全培養細胞（本出願において記載される）を含んだ。どの動物においても、キメラ現象を実現することができず、細胞の投与の 4 ~ 6 週間後に循環 G F P + 細胞によって検出することができなかつた。図 3 0 を参照されたい。レーザー処置のみを受けた動物は、毛の成長を全く～まさに最小限の短く切り株のようなものしか有しなかつた。図 3 0 ( A )。骨髄細胞を与えた動物では、有意で、長く永続的な毛の成長があつた。図 3 0 ( A & B )。これらの発見は、G F P + 系列ネガティブ選択細胞および全新鮮 G F P + 骨髄細胞により処置されたマウスにおいて非常に劇的であつた。毛の成長は、2 週間検出することができ、数か月間、成長し続けることができた。皮膚生検材料を新しい毛が成長しているエリアで採取したが、G F P + 細胞は検出されなかつた。骨髄細胞の機能的な移植もまた、F A C S 分析によっていかなる動物においても検出することができなかつた。図 3 0 ( C )。図  
40  
50

29における実施例と同様に、サイトカインは、毛の成長を回復させるのにこの効果を有することは実証されなかった。送達された細胞によって分泌される微小胞が、毛の成長の刺激を担う可能性が高い。

#### 【0262】

実施例16：血管新生を促進したるは刺激し、線維芽細胞増殖を促進するまたは刺激するための本発明の微小胞の使用

骨髓穿刺液微小胞の単離：およそ25mlの新鮮な全骨髓を、Allicells, Inc. (Alameda, CA) から得た。骨髓は、新しい50mlコニカル遠心分離チューブに注意深く置き、室温で30分間、400×gで遠心分離した。上清を注意深く取り出し（およそ15ml）、新しい50mlコニカル遠心分離チューブ（Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL）に置き、4で30分間、2000×gで遠心分離した。上清をもう一度注意深く取り出し、新しい50mlコニカル遠心分離チューブに置き、これに、滅菌アルファ-最小必須培地（-MEM）（Mediatech Inc., Manassas, VA）を1:10（骨髓上清対培地）の比で追加した。その溶液に、8.5w/v%の、RNアーゼおよびプロテアーゼなしのポリエチレンギリコール平均分子量6000（Sigma Aldrich, Saint Louis, MO）ならびに塩化ナトリウム（最終濃度0.4M）を追加した。その溶液を振動させながら一晩、4の低温室に置いた。その溶液を30分間、4で10000×gで遠心分離した。上清をデカントし、微小胞濃縮ペレットをリン酸緩衝食塩水（PBS）中に再懸濁した。微小胞濃縮溶液をamicon ultra-15遠心フィルターユニット（公称分子量限界100kDa）（Millipore, Billerica, MA）に移し、30分間5000×gで遠心分離した。フィルターユニットをリン酸緩衝食塩水により洗浄し、30分間5000×gでもう一度遠心分離した。濃縮サンプルをフィルターデバイスの底から回収した（およそ200~400μl）。

血管新生アッセイ：血管新生は、内皮管形成アッセイ（Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY）を使用して測定した。凍結保存された初代ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）（Invitrogen Life Technologies）を、2%低血清成長サブリメント（Invitrogen Life Technologies）を補足したMedium 200PRF中で6日間、75cm<sup>2</sup>組織培養のフラスコにおいて成長させた。次いで、細胞は、サブリメントなしの培地を含有する24ウェル組織培養プレートにおいて3×10<sup>4</sup>の密度で平板培養した。HUVEC細胞を、骨髓微小胞（およそ100μg）により続いて処置した。PBSは、ビヒクルコントロールとして使用した。処置した細胞を、37および5%CO<sub>2</sub>で6時間インキュベートした。2μg/mlの濃度のカルセインAM蛍光色素を、管形成の可視化のために使用した。蛍光画像は、倒立IX81 Olympus顕微鏡（Olympus America, Center Valley, PA）により撮った。骨髓MVは、ビヒクル（PBS）コントロールと比較して、有意な管形成能力を示した（図31を参照されたい）。

成長アッセイ：正常成人線維芽細胞を、アッセイのために、成長培地（5%FBS、1%グルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシン）において24ウェルプレート（10000細胞/ウェル）上で平板培養した。一晩のインキュベーションの後に、3つのウェルを無作為に選択し、細胞をNucBlue Live Ready Probes Reagent（Invitrogen Life technologies）により染色した（0日目）。蛍光画像は、EVOS FL Auto Cell Imaging System（Invitrogen Life technologies）を使用して撮った。線維芽細胞に、骨髓由来微小胞（およそ100μg）またはPBS（ビヒクルコントロール）を含有する新鮮な培地を再供給し、3日後（3日目）に、細胞を染色し、画像化した。骨髓由来微小胞処置線維芽細胞は、数があよそ3倍（0日目と比較して）およびビヒクルコントロールよりも有意な大きな速度で増加した（図32、パネルAおよび図32、パネルB）。

10

20

30

40

50

## 【0263】

本発明の様々な態様が、実施例および好ましい実施形態に対する参照によって上記に例証されたが、本発明の範囲が前述の説明ではなく、特許法の法則の下で適切に解釈される以下の請求項によって定められることを認識されたい。

【図1】

1/32

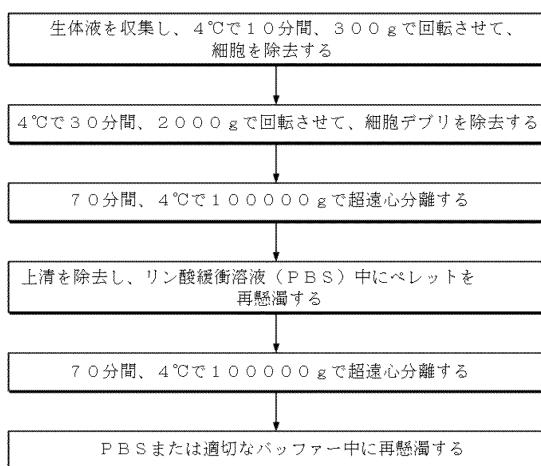


FIG. 1

【図2】

2/32

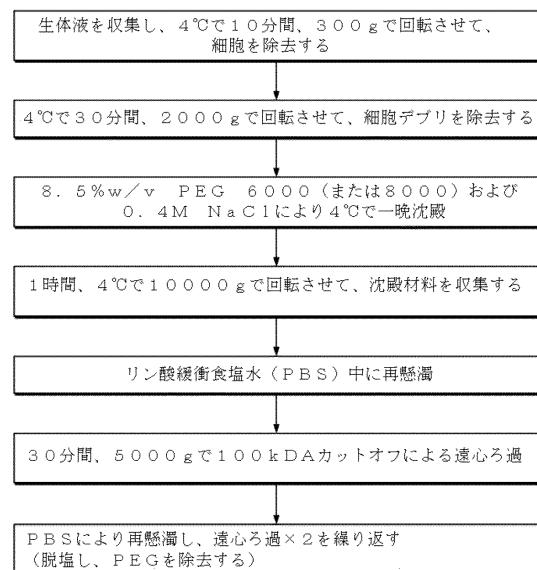


FIG. 2

【図3】

3/32

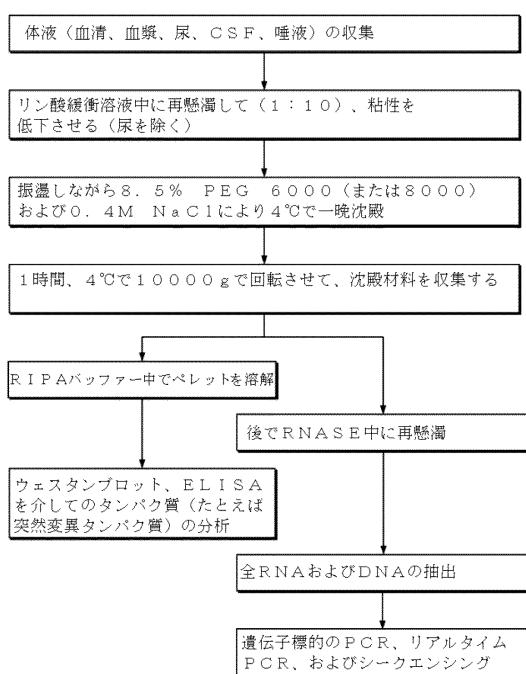


FIG. 3

【図4】

4/32

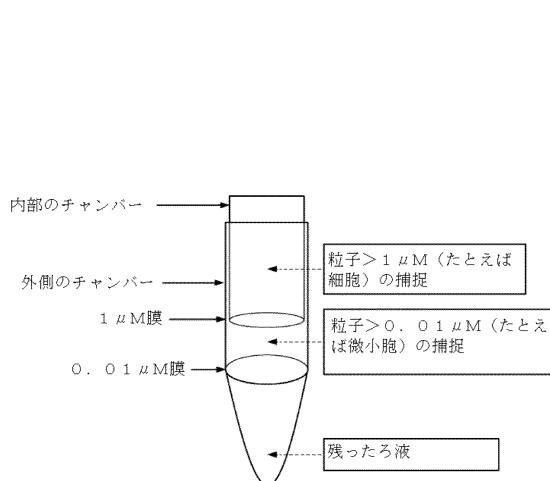
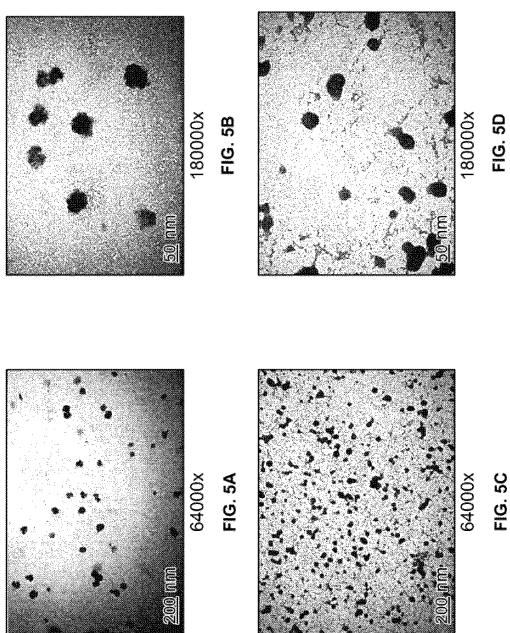


FIG. 4

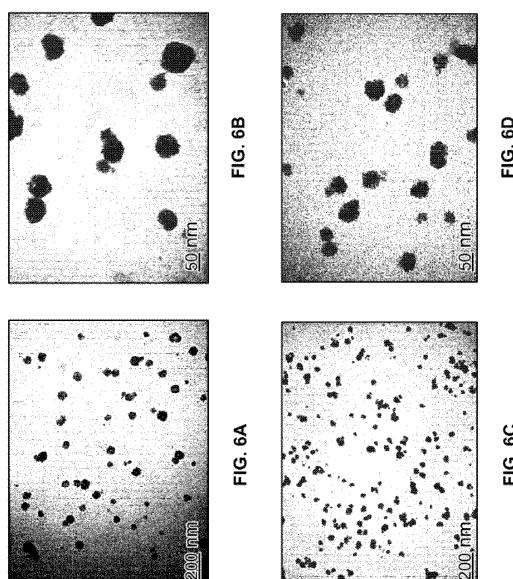
【図5】

5/32



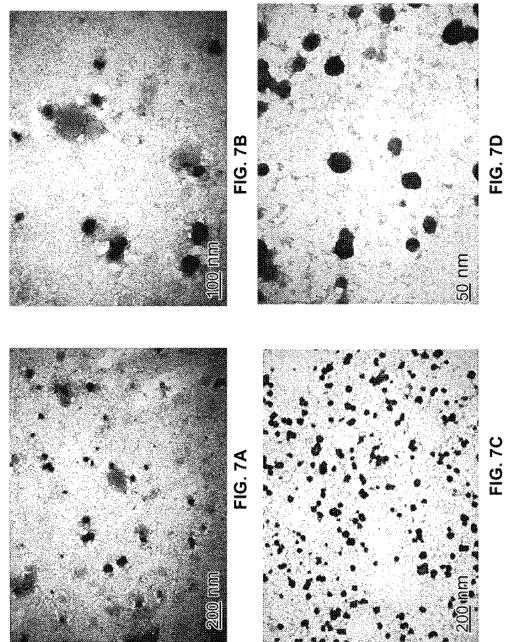
【図6】

6/32



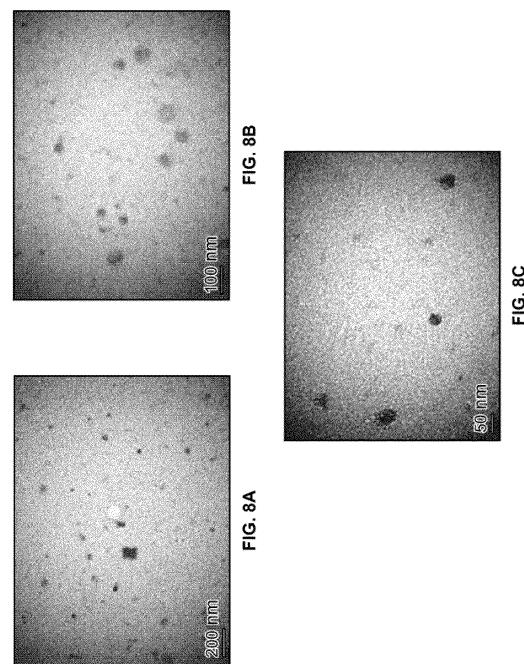
【図7】

7/32



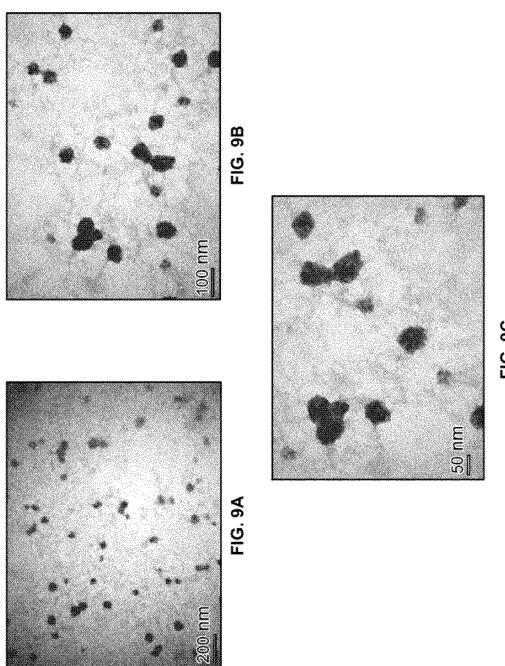
【図8】

8/32



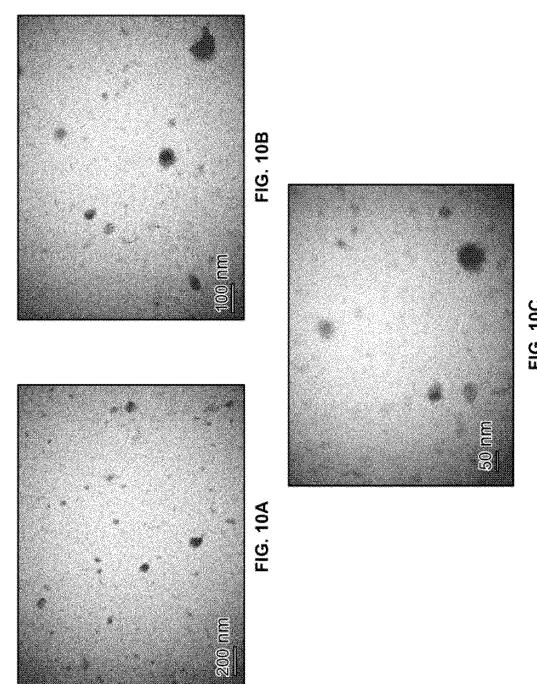
【図9】

9/32

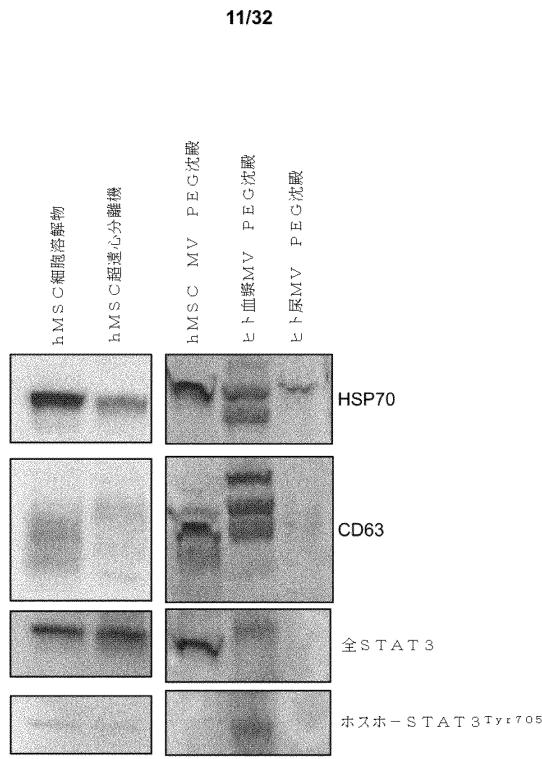


【図10】

10/32



【図 1 1】



**FIG. 11**

【 図 1 2 】

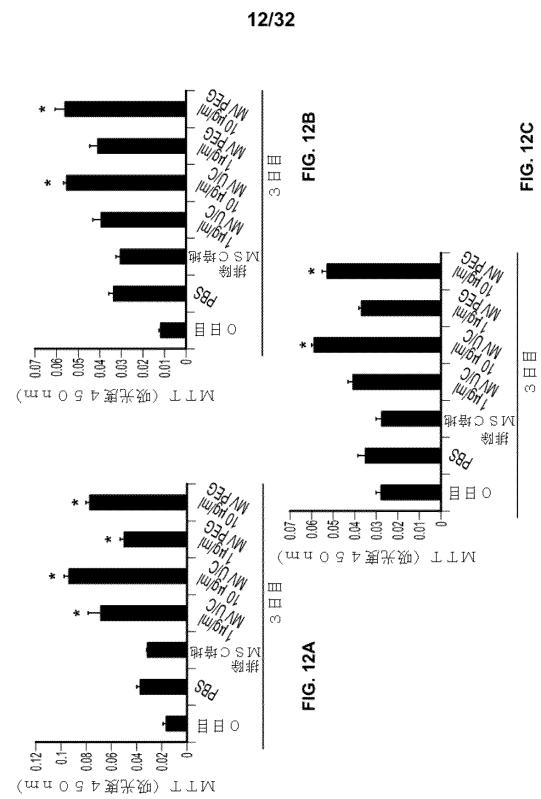


FIG. 12B

FIG. 12C

【 図 1 3 】

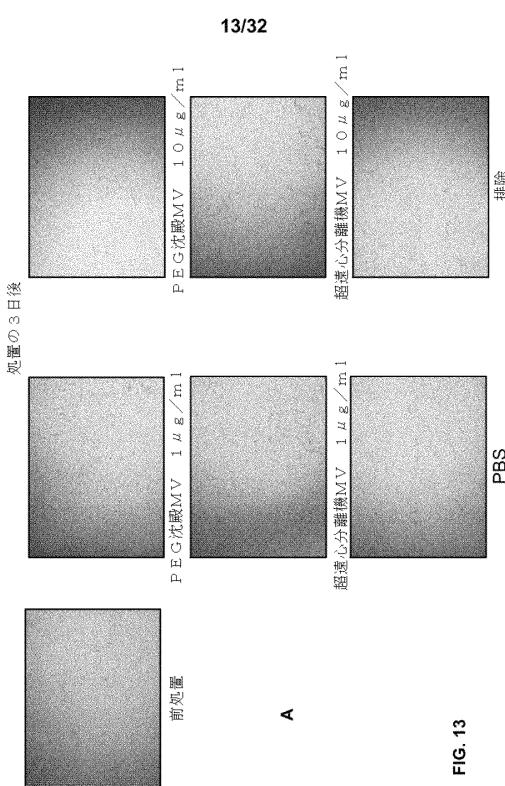


FIG. 13

【 図 1 4 】

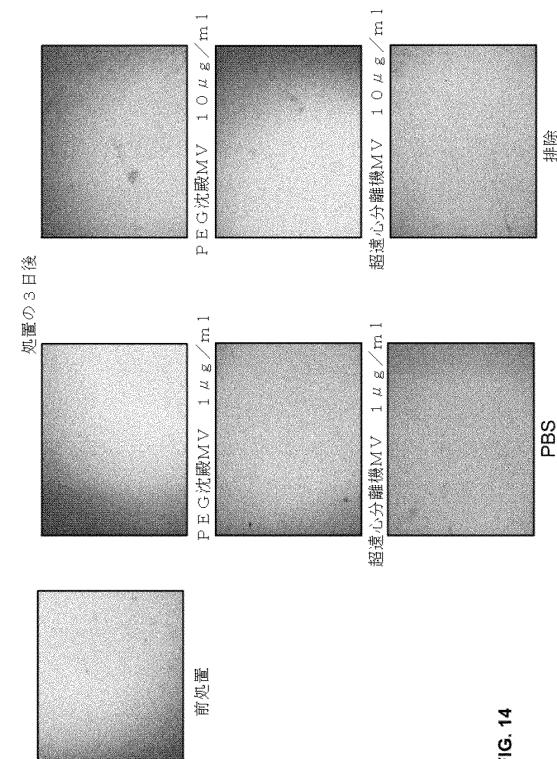
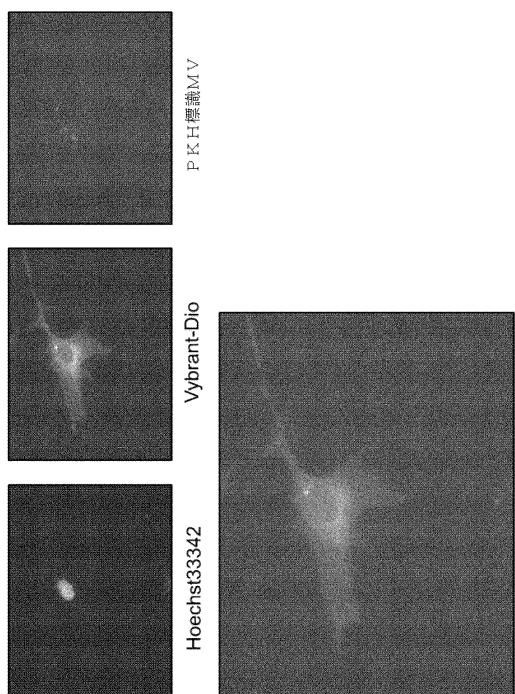


FIG. 14

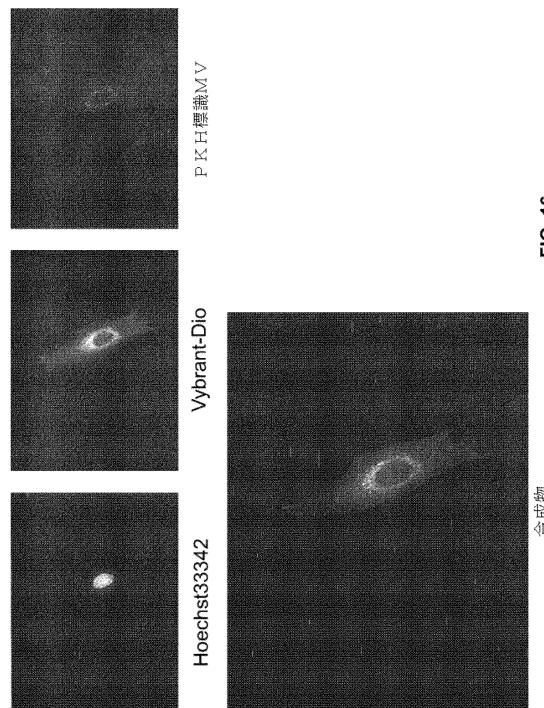
【図 15】

15/32



【図 16】

16/32



【図 17】

17/32



MVを排除した hMSC 条件培地

hMSC MV 超遠心分離法

hMSC MV PEG沈殿

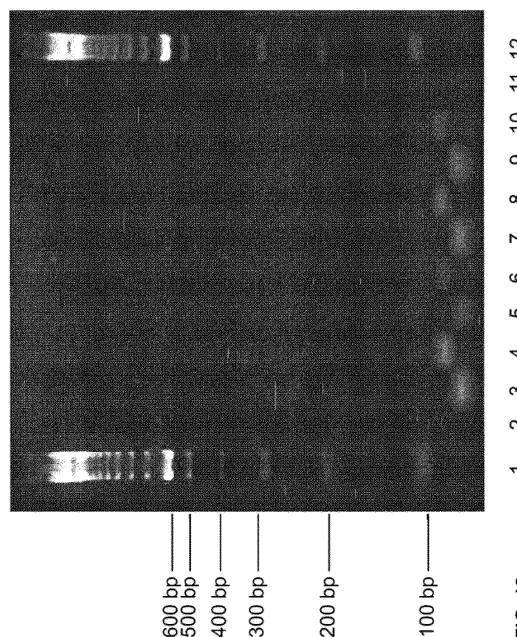
ヒト血漿MV PEG沈殿

実験番号：STAT3121705

FIG. 17

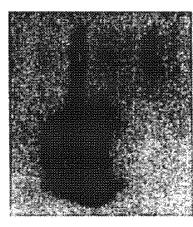
【図 18】

18/32



【図19】

19/32



SK-MEL28細胞溶解物

BR-  
RAF-V600E

FIG. 19

【図20】

20/32

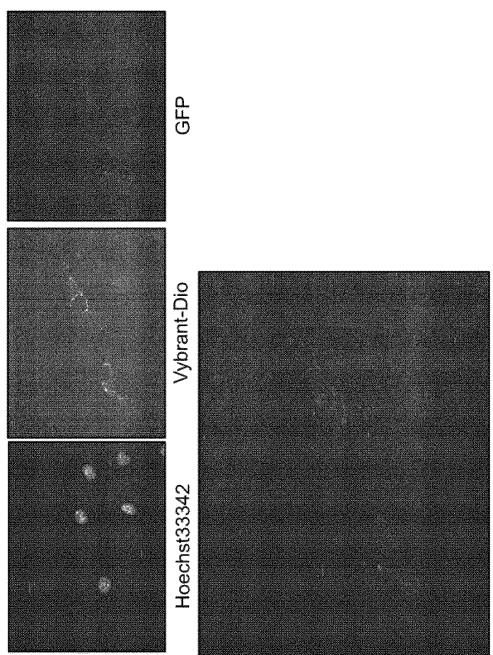
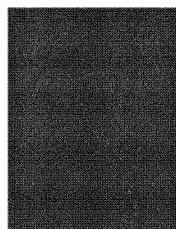
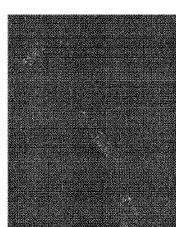


FIG. 20

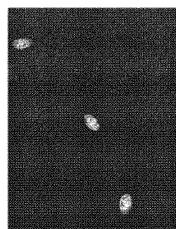
合成物

【図21】

21/32

GFP発現MSCに  
由来するMV

Vybrant-Dio



Hoechst33342

FIG. 21

【図22】

22/32



FIG. 22A



FIG. 22B



FIG. 22A



FIG. 22C

【図23】

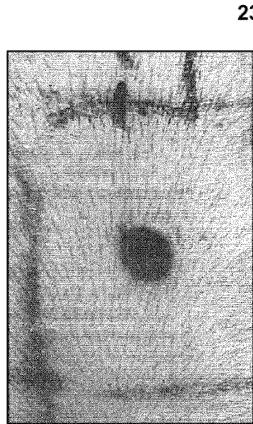


FIG. 23B

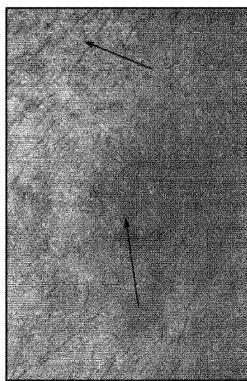


FIG. 23D

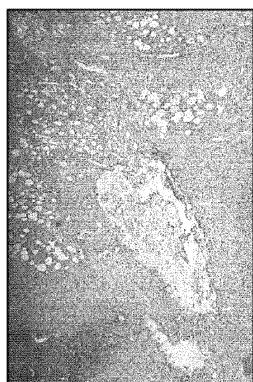


FIG. 23A

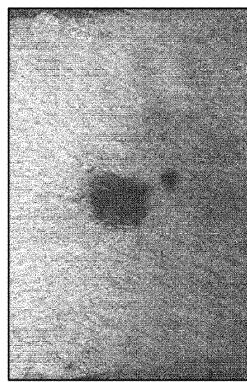


FIG. 23C

【図24】

24/32

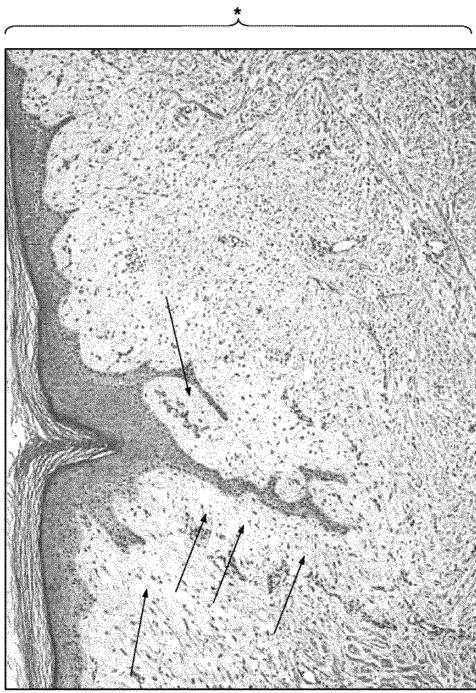


FIG. 24

【図25】

25/32

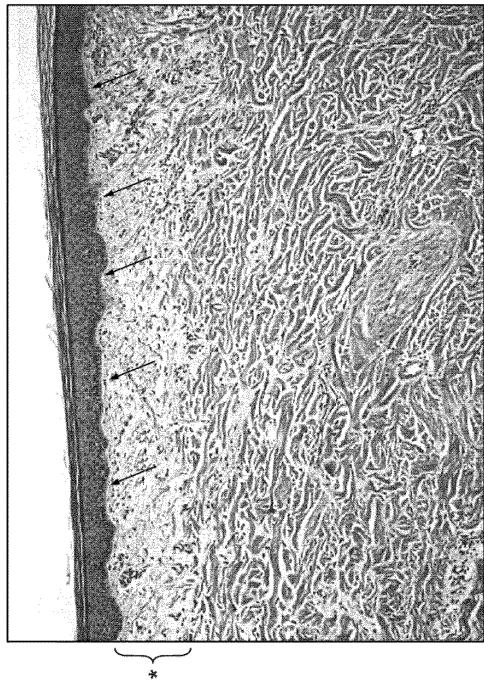


FIG. 25

【図26】

26/32

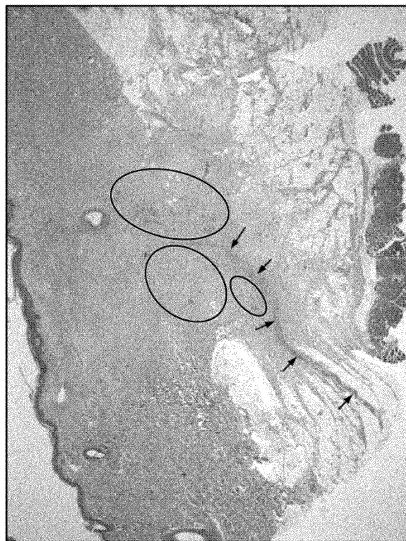


FIG. 26

図5：28日目の、発明者らの方法によつて調製されたMVIにより処置された全層性創傷（12・5×）  
 矢印は、リモデリングしている創傷の中への新しい神経成長を示す。  
 神経成長は血管新生に関連する一因で悪化したエリアにおいて強調する。  
 これらの結果は組織再生を大いに示すものである。  
 これはまだかつて観察されていない。  
 コントロールまたは超速心分離MVI処置創傷において観察されなかつた。

【図 27】

27/32

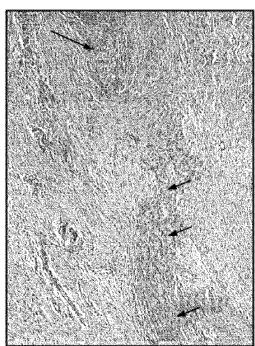


FIG. 27B

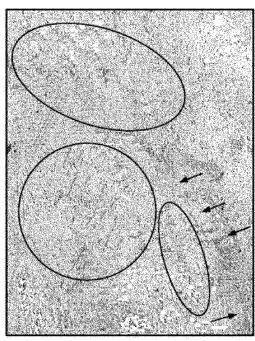


FIG. 27A

【図 28】

28/32

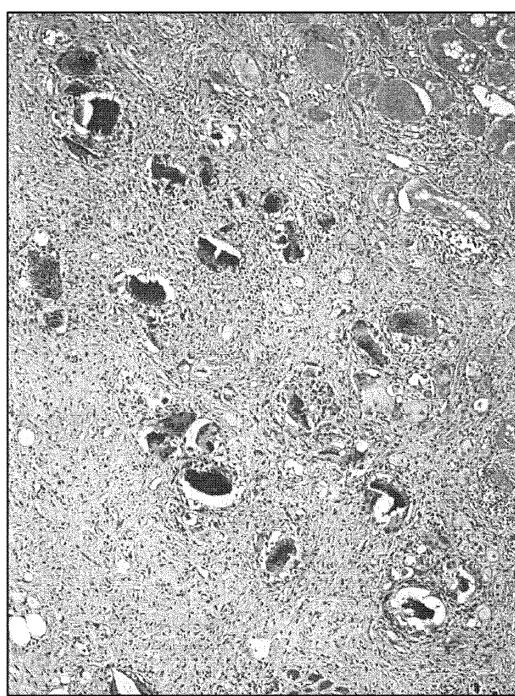


FIG. 28

【図 29】

29/32

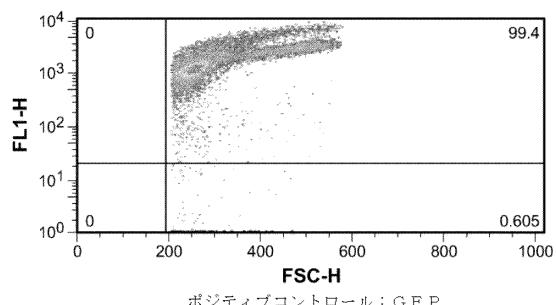


FIG. 29A

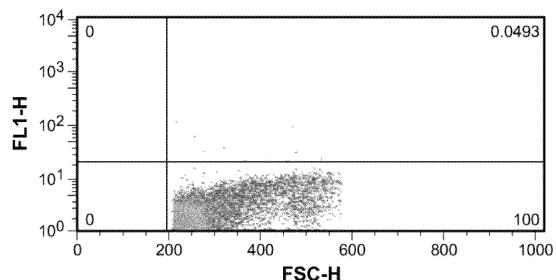


FIG. 29B

【図 30】

30/32



FIG. 30A



FIG. 30B

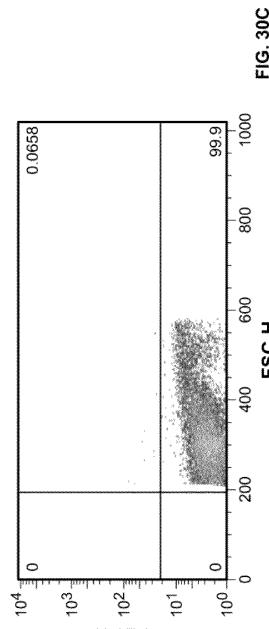
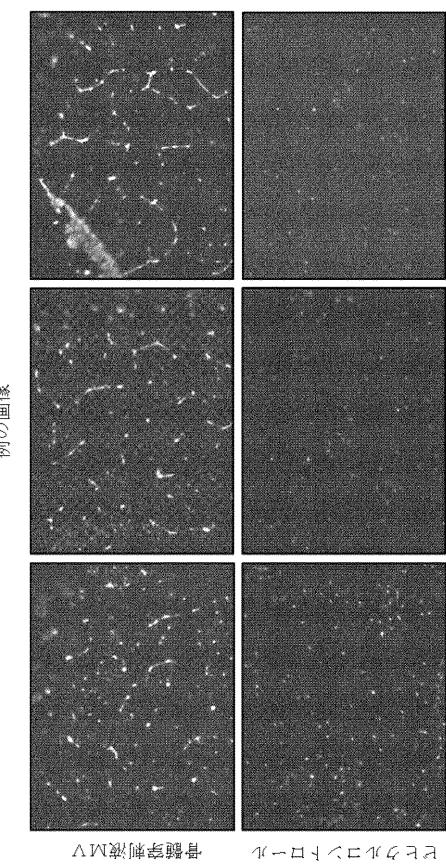


FIG. 30C

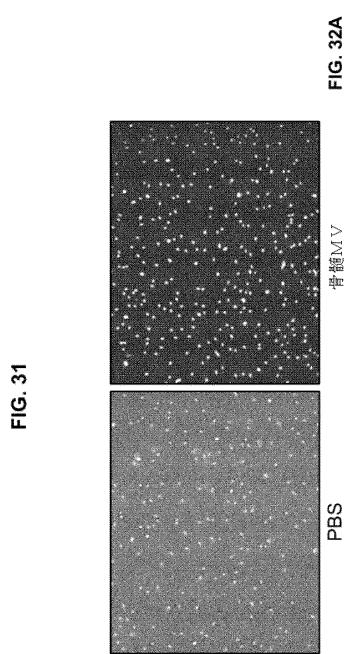
【図 3 1】

31/32



【図 3 2】

32/32



【配列表】

0006562897000001.app

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. |        | F I       |         |             |
|--------------|--------|-----------|---------|-------------|
| A 6 1 P      | 17/02  | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 1 0 7 |
| A 6 1 P      | 7/06   | (2006.01) | A 6 1 P | 17/02       |
| A 6 1 L      | 27/36  | (2006.01) | A 6 1 P | 7/06        |
| A 6 1 P      | 35/00  | (2006.01) | A 6 1 L | 27/36 1 0 0 |
| C 0 7 K      | 14/435 | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00       |
| C 1 2 N      | 5/0775 | (2010.01) | C 0 7 K | 14/435      |
|              |        |           | C 1 2 N | 5/0775      |

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 エバンジェロス・ブイ・バディアバス

アメリカ合衆国33136フロリダ州マイアミ、ノースウェスト・テヌス・アベニュー1400番  
、ス威ート1214

(72)発明者 アーサラン・キュー・シャピール

アメリカ合衆国33136フロリダ州マイアミ、ノースウェスト・テヌス・アベニュー1400番  
、ス威ート1214

(72)発明者 スティーブン・シー・デイビス

アメリカ合衆国33136フロリダ州マイアミ、ノースウェスト・テヌス・アベニュー1400番  
、ス威ート1214

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表2011-513217(JP, A)

国際公開第2012/020307(WO, A1)

特表2010-514433(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0093885(US, A1)

国際公開第2013/022786(WO, A1)

国際公開第2012/002760(WO, A1)

国際公開第2013/188832(WO, A1)

Infection and Immunity, 1987年, 55(1), p.111-117

ExoQuick-TM Exosome Precipitation Solution Cat.# EXOTCxxA-1 User Manual, System Bi  
osciences, 2013年 2月21日

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 35 / 0 0 - 35 / 7 6 8

C 1 2 N