

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成25年8月29日(2013.8.29)

【公表番号】特表2012-533308(P2012-533308A)

【公表日】平成24年12月27日(2012.12.27)

【年通号数】公開・登録公報2012-055

【出願番号】特願2012-520829(P2012-520829)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 H	21/00	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	7/12	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 4 0 B	40/06	
C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 0 7 H	21/00	
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	7/12	

【手続補正書】

【提出日】平成25年7月12日(2013.7.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

尿試料から核酸を得る方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 尿試料を得る段階；

(b) 該尿試料から微小胞画分を得る段階；

(c) 抽出増強操作(extraction enhancement operation)を実施する段階であって、

該抽出増強操作が、

(1) 以下の作用物質のうちの1つもしくは複数の添加：

(i) RNアーゼ阻害剤；

(ii) プロテアーゼ；

(iii) 還元剤；

(iv) デコイ基質、例えば合成RNA；

(v) 可溶性受容体；

(vi) 低分子干渉性RNA；

(vii) RNA結合性分子、例えば抗RNA抗体、シャペロンタンパク質もしくはRNアーゼ阻害性タンパク質；

(ix) RNアーゼ変性物質、例えば高浸透圧溶液、界面活性剤；または

(2) 核酸抽出前の、以下の段階のうちの1つもしくは複数の実施：

(x) 洗浄する段階；

(xi) 該試料からRNアーゼをサイズ分離する段階；

(xii) 物理的变化によって、例えば温度の低下、凍結／解凍サイクルによって、RNアーゼ変性を生じさせる段階；または

(3) 上記の作用物質もしくは段階の任意の組み合わせ

から構成される、段階；および

(d) 該微小胞画分から核酸を抽出する段階。

#### 【請求項2】

前記微小胞画分が、分画遠心法、アフィニティー精製、濾過濃縮、浮遊密度勾配、マイクロ流体分離、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換、およびこれらのいずれかの任意の組み合わせからなる群より選択される手法によって得られる、請求項1記載の方法。

#### 【請求項3】

前記微小胞画分が濾過濃縮によって得られる、請求項1または2記載の方法。

#### 【請求項4】

前記濾過濃縮段階が、前記尿試料を、 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 未満または $0.8\text{ }\mu\text{m}$ の孔径を有するフィルターに通すことを含む、請求項2または3記載の方法。

#### 【請求項5】

前記尿試料または前記微小胞画分を、前記増強抽出操作の実施の前に、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼまたはそれらの組み合わせによって処理する、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項6】

前記抽出増強操作が、核酸を抽出する段階の前の、洗浄段階を任意で伴うRNアーゼ阻害剤の添加を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項7】

前記RNアーゼ阻害剤が、 $[1\times]$ 濃度超；あるいは $[5\times]$ 濃度超または $[5\times]$ 濃度；あるいは $[10\times]$ 濃度超または $[10\times]$ 濃度；あるいは $[25\times]$ 濃度超または $[25\times]$ 濃度；かつ、あるいは $[50\times]$ 濃度超または $[50\times]$ 濃度の濃度を有する、請求項6記載の方法。

#### 【請求項8】

前記RNアーゼ阻害剤がプロテアーゼである、請求項7記載の方法。

#### 【請求項9】

核酸抽出物の質を評価する目的で、抽出物中の18S rRNAおよび28S rRNAの量を決定することによって前記微小胞画分からの前記核酸の質を測定する段階(e)をさらに含む、請求項1記載の方法。

#### 【請求項10】

前記抽出物中の18S rRNAと28S rRNAの量比を決定する段階をさらに含む、請求項9記載の方法。

#### 【請求項11】

前記抽出物中の18S rRNAと28S rRNAの量比が、およそ1:1からおよそ1:2までの範囲内にあり、かつ好ましくはおよそ1:2である、請求項10記載の方法。

**【請求項 1 2】**

以下の段階を含む、請求項5記載の方法：

前記微小胞試料をDNアーゼで処理して、該試料中の該微小胞の外側または表面に位置する任意のDNAのすべてまたは実質的にすべてを除去する段階；

該試料からRNAを抽出する段階；および

抽出された該RNAを分析する段階。

**【請求項 1 3】**

微小胞から核酸を得るためのキットであって、1つまたは複数の容器中に、

( a ) RNアーゼ阻害剤；プロテアーゼ；還元剤；デコイ基質；可溶性受容体；低分子干渉性RNA；RNA結合性分子；RNアーゼ変性物質；およびこれらのいずれかの任意の組み合わせからなる群より選択される、核酸抽出増強物質；

( b ) DNアーゼ、RNアーゼまたはその両方；ならびに

( c ) 溶解用緩衝液

を含む、キット。

**【請求項 1 4】**

尿試料から単離された1つまたは複数の微小胞からの核酸抽出物であって、該抽出物中において18S rRNAおよび28S rRNAが検出可能である、核酸抽出物。

**【請求項 1 5】**

前記抽出物中において検出可能である18S rRNAと28S rRNAの量比が、およそ1:1からおよそ1:2までの範囲内にあり、かつ好ましくはおよそ1:2である、請求項14記載の核酸抽出物。

**【請求項 1 6】**

前記尿試料が、10mg / ml未満のタンパク質濃度を有し、かつ前記抽出物が、RNAインテグリティナンバー (RNA Integrity Number) 5超または5を有し、かつ好ましくは20mlの尿試料からの前記核酸収量が、50pg / ml超もしくは50pg / mlである、請求項14または15記載の核酸抽出物。

**【手続補正2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0 0 1 5

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0 0 1 5】**

1つのさらなる局面において、本発明は、生物試料からの核酸抽出物の質を評価する新規の方法であって、以下の段階を含む方法である：(a) 生物試料を提供する段階；(b) 該生物試料由来の核酸の抽出物を得る段階；(c) 該抽出物中の、SEQ NO：1～29から選択されるヌクレオチド配列を有するセグメントを含むポリヌクレオチド分子の量を測定する段階；および(d) 該ポリヌクレオチド分子の量を標準と比較して、該核酸抽出物の質を評価する段階。この新規の方法は、任意の生物試料、例えば、体液、特に尿、血清または血漿を含み、好ましくはヒトなどの哺乳動物に由来するものに対して実施することができる。この新規の方法は、前記の新規の核酸抽出物または新規の抽出方法の任意のものと併せて用いることができる。特に、核酸抽出物の質を評価するために用いられる標準は、5個超の生物試料からの核酸抽出物中の、SEQ NO：1～29から選択されるヌクレオチド配列を有するセグメントを含むポリヌクレオチド分子の量を測定することによって導き出してもよい。

**[本発明1001]**

真核生物の生物試料から単離された1つまたは複数の微小胞からの核酸抽出物であって、該抽出物中において18S rRNAおよび28S rRNAが検出可能である、核酸抽出物。

**[本発明1002]**

前記生物試料が体液である、本発明1001の核酸抽出物。

**[本発明1003]**

前記体液が尿である、本発明1002の核酸抽出物。

[本発明1004]

前記体液が血清または血漿である、本発明1002の核酸抽出物。

[本発明1005]

前記生物試料が哺乳動物由来である、本発明1001～1004のいずれかの核酸抽出物。

[本発明1006]

前記生物試料がヒト由来である、本発明1005の核酸抽出物。

[本発明1007]

前記抽出物中において検出可能である18S rRNAと28S rRNAの量比が、およそ1:1からおよそ1:2までの範囲内にあり、かつ好ましくはおよそ1:2である、本発明1001～1006のいずれかの核酸抽出物。

[本発明1008]

前記生物試料が、10mg / ml未満のタンパク質濃度を有する体液、例えば尿であり、かつ前記抽出物が、RNAインテグリティナンバー (RNA Integrity Number) 5超または5を有する、本発明1007の核酸抽出物。

[本発明1009]

前記生物試料が、10mg / ml超のタンパク質濃度を有する体液、例えば血清または血漿であり、かつ前記抽出物が、RNAインテグリティナンバー3超または3を有する、本発明1007の核酸抽出物。

[本発明1010]

20mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1008の核酸抽出物。

[本発明1011]

1mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1009の核酸抽出物。

[本発明1012]

真核生物の生物試料から単離された1つまたは複数の微小胞由来の核酸のプロファイルであって、該プロファイルにおいて18S rRNAおよび28S rRNAが検出可能である、核酸のプロファイル。

[本発明1013]

前記生物試料が体液である、本発明1012のプロファイル。

[本発明1014]

前記体液が尿である、本発明1013のプロファイル。

[本発明1015]

前記体液が血清または血漿である、本発明1013のプロファイル。

[本発明1016]

前記生物試料が哺乳動物由来である、本発明1012～1015のいずれかのプロファイル。

[本発明1017]

前記生物試料がヒト由来である、本発明1016のプロファイル。

[本発明1018]

18S rRNAと28S rRNAの量比が、およそ1:1からおよそ1:2までの範囲内にあり、かつ好ましくはおよそ1:2である、本発明1012～1018のいずれかのプロファイル。

[本発明1019]

前記生物試料が、10mg / ml未満のタンパク質濃度を有する体液、例えば尿であり、かつ前記核酸が、RNAインテグリティナンバー5超または5を有する、本発明1018のプロファイル。

[本発明1020]

前記生物試料が、10mg / ml超のタンパク質濃度を有する体液、例えば血清または血漿であり、かつ核酸抽出物が、RNAインテグリティナンバー3超または3を有する、本発明1018のプロファイル。

[本発明1021]

20mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1019のプロファイル。

[本発明1022]

1mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1020のプロファイル。

[本発明1023]

真核生物の生物試料から単離された微小胞からの核酸抽出物の質を評価する方法であつて、以下の段階を含む方法：

(a) 微小胞からRNAを抽出する段階；および

(b) 該抽出物中の18S rRNAおよび28S rRNAの量を決定することによって該RNAの質を測定する段階。

[本発明1024]

前記生物試料が体液である、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記体液が尿である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記体液が血清または血漿である、本発明1024の方法。

[本発明1027]

前記生物試料が哺乳動物由来である、本発明1023～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

前記生物試料がヒト由来である、本発明1027の方法。

[本発明1029]

18S rRNAと28S rRNAの量比が、およそ1:1からおよそ1:2までの範囲内にあり、かつ好ましくはおよそ1:2である、本発明1023～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

前記生物試料が、10mg / ml未満のタンパク質濃度を有する体液、例えば尿であり、かつ前記核酸が、RNAインテグリティナンバー5超または5を有する、本発明1029のプロファイル。

[本発明1031]

前記生物試料が、10mg / ml超のタンパク質濃度を有する体液、例えば血清または血漿であり、かつ前記核酸抽出物が、RNAインテグリティナンバー3超または3を有する、本発明1029のプロファイル。

[本発明1032]

20mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1030のプロファイル。

[本発明1033]

1mlの生物試料からの核酸収量が50pg / ml超または50pg / mlである、本発明1031のプロファイル。

[本発明1034]

生物試料から核酸を得る方法であつて、以下の段階を含む方法：

(a) 生物試料を得る段階；

(b) 該生物試料に対して抽出増強操作 (extraction enhancement operation) を実施する段階；および

(c) 該生物試料から核酸を抽出する段階。

[本発明1035]

前記抽出増強操作が、

(a) 前記生物試料への以下の作用物質のうちの1つもしくは複数の添加：

(i) RNアーゼ阻害剤；

(ii) プロテアーゼ；

(iii) 還元剤；  
(iv) デコイ基質、例えば合成RNA；  
(v) 可溶性受容体；  
(vi) 低分子干渉性RNA；  
(vii) RNA結合性分子、例えば抗RNA抗体、シャペロンタンパク質もしくはRNアーゼ阻害性タンパク質；  
(ix) RNアーゼ変性物質、例えば高浸透圧溶液、界面活性剤；または  
(b) 核酸抽出前の、以下の段階のうちの1つもしくは複数の実施：  
(x) 洗浄する段階；  
(xi) 試料からRNアーゼをサイズ分離する段階；  
(xii) 物理的变化によって、例えば温度の低下、凍結／解凍サイクルによって、RNアーゼ変性を生じさせる段階；または  
(c) (a)の作用物質もしくは(b)の段階の任意の組み合わせを含む、本発明1034の方法。

[本発明1036]

前記生物試料が体液である、本発明1034または本発明1035の方法。

[本発明1037]

前記体液が尿である、本発明1036の方法。

[本発明1038]

前記体液が血清または血漿である、本発明1036の方法。

[本発明1039]

派生物を前記生物試料から得て、核酸を抽出する段階の前に前記抽出増強操作に供する、本発明1034～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

前記派生物が前記生物試料由来の微小胞画分を含む、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記微小胞画分が、分画遠心法、アフィニティー精製、濾過濃縮、浮遊密度勾配、マイクロ流体分離、クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換、およびこれらのいずれかの任意の組み合わせからなる群より選択される手法によって得られる、本発明1040の方法。

[本発明1042]

前記微小胞画分が濾過濃縮法によって得られる、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記生物試料を、0.8 μm未満または0.8 μmの孔径を有するフィルターに通す、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記生物試料または前記派生物を、前記増強抽出操作の実施の前に、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼまたはそれらの組み合わせによって処理する、本発明1034～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

前記抽出増強操作が、核酸を抽出する段階の前の、前記生物試料へのまたは派生物へのRNアーゼ阻害剤の添加を含む、本発明1032～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

前記RNアーゼ阻害剤が、[1×]濃度超；あるいは[5×]濃度超または[5×]濃度；あるいは[10×]濃度超または[10×]濃度；あるいは[25×]濃度超または[25×]濃度；かつ、あるいは[50×]濃度超または[50×]濃度の濃度を有する、本発明1045の方法。

[本発明1047]

前記RNアーゼ阻害剤がプロテアーゼである、本発明1045または本発明1046の方法。

[本発明1048]

微小胞から核酸を得るためのキットであって、1つまたは複数の容器中に、

- (a) 核酸抽出増強物質；
- (b) DNアーゼ、RNアーゼまたはその両方；および
- (c) 溶解用緩衝液

を含む、キット。

[本発明1049]

前記キットを使用するための説明書をさらに含む、本発明1048のキット。

[本発明1050]

前記核酸抽出増強物質が、

- (a) RNアーゼ阻害剤；
- (b) プロテアーゼ；
- (c) 還元剤；
- (d) デコイ基質；
- (e) 可溶性受容体；
- (f) 低分子干渉性RNA；
- (g) RNA結合性分子；
- (h) RNアーゼ変性物質；または

(i) これらのいずれかの任意の組み合わせ

からなる群より選択される、本発明1048または本発明1049のキット。

[本発明1051]

微小胞由来のRNAを分析する方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 微小胞の試料を得る段階；
- (b) 該試料をDNアーゼで処理して、該試料中の該微小胞の外側または表面に位置する任意のDNAのすべてまたは実質的にすべてを除去する段階；
- (c) 該試料からRNAを抽出する段階；および
- (d) 抽出された該RNAを分析する段階。

[本発明1052]

前記微小胞を生物試料から単離する、本発明1051の方法。

[本発明1053]

前記生物試料が体液である、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記体液が尿である、本発明1053の方法。

[本発明1055]

前記体液が血清または血漿である、本発明1053の方法。

[本発明1056]

前記生物試料が哺乳動物由来である、本発明1051～1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

前記生物試料がヒト由来である、本発明1056の方法。

[本発明1058]

- (a) 対象由来の尿試料から微小胞画分を単離する段階；
- (b) 該微小胞画分中のバイオマーカーの有無を検出する段階

を含む、対象を診断、モニタリングまたは治療するための方法であって、

該バイオマーカーが、(i) 1種の核酸、(ii) 核酸の発現のレベル、(iii) 核酸変異体、および(iv) これらのいずれかの任意の組み合わせからなる群より選択され；かつ該バイオマーカーが、疾患もしくは他の医学的病状の有無、または治療選択肢の実行可能性と関連づけられる、方法。

[本発明1059]

前記バイオマーカーがmRNA転写物である、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記mRNA転写物が、NPHS2(ポドシン)、LGALS1(ガレクチン-1)、HSPG2(ヘパリン硫

酸プロテオグリカン) ; CUBN (キュビリン) 、LRP2 (メガリン) 、AQP1 (アクアポリン1) 、CA4 (カルボニックアンヒドラーーゼ4) 、CLCN5 (塩素チャンネルタンパク質5) 、BDKR1 (ブラジキニンB1受容体) 、CALCR (カルシトニン受容体) 、SCNN1D (アミロライド感受性ナトリウムチャンネルサブユニット) 、SLC12A3 (サイアザイド感受性ナトリウムクロライド共輸送体) 、AQP2 (アクアポリン2) 、ATP6V1B1 (V-ATPアーゼB1サブユニット) 、SLC12A1 (RiboAmpで増幅した (RiboAmped) mRNAのRT-PCRによる腎臓特異的Na-K-Clシンポーター) からなる群より選択される、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記mRNA転写物がAQP2 (アクアポリン2) またはATP6V1B1 (V-ATPアーゼB1サブユニット) である、本発明1060の方法。

[本発明1062]

前記バイオマーカーおよび前記疾患または前記他の医学的病状が、  
(a) NPHS2 (ポドシン) および糸球体疾患、例えばステロイド抵抗性腎炎症候群；  
(b) CUBN (キュビリン) およびタンパク尿、例えばイマースルンド-グレスベック症候群；  
(c) AQP2 (アクアポリン2) および尿崩症  
からなる群より選択される、本発明1058の方法。

[本発明1063]

SEQ ID NO: 1～29からなる群より選択される第2のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一である第1のヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1064]

前記ポリヌクレオチド分子がデオキシリボヌクレオチドである、本発明1063の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1065]

前記ポリヌクレオチド分子がリボヌクレオチドである、本発明1063の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1066]

本発明1063の単離された核酸分子を含む、ベクター。

[本発明1067]

本発明1063の単離された核酸分子を含む、宿主細胞。

[本発明1068]

SEQ ID NO: 1～29から選択されるヌクレオチド配列のセグメントを含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1069]

ポリヌクレオチド分子がデオキシリボヌクレオチドである、本発明1068の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1070]

前記ポリヌクレオチド分子がリボヌクレオチドである、本発明1068の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1071]

本発明1068の単離された核酸分子を含む、ベクター。

[本発明1072]

本発明1068の単離された核酸分子を含む、宿主細胞。

[本発明1073]

SEQ ID NO: 1～29のいずれか1つにおける任意の13ヌクレオチドの配列と同一である少なくとも13ヌクレオチドの配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1074]

前記ポリヌクレオチド分子がデオキシリボヌクレオチドである、本発明1073の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1075]

前記ポリヌクレオチド分子がリボヌクレオチドである、本発明1079の単離されたポリヌクレオチド分子。

[本発明1076]

本発明1073の単離された核酸分子を含む、ベクター。

[本発明1077]

本発明1073の単離された核酸分子を含む、宿主細胞。

[本発明1078]

生物試料からの核酸抽出物の質を評価する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 生物試料を提供する段階；

(b) 該生物試料由来の核酸の抽出物を得る段階；

(c) 該抽出物中の、SEQ NO：1～29から選択されるヌクレオチド配列を有するセグメントを含むポリヌクレオチド分子の量を測定する段階；および

(d) 該ポリヌクレオチド分子の量を標準と比較して、該核酸抽出物の質を評価する段階。

[本発明1079]

前記生物試料が体液である、本発明1078の方法。

[本発明1080]

前記体液が尿である、本発明1078の方法。

[本発明1081]

前記体液が血清または血漿である、本発明1078の方法。

[本発明1082]

前記生物試料が哺乳動物由来である、本発明1078～1081のいずれかの方法。

[本発明1083]

前記生物試料がヒト由来である、本発明1082の方法。

[本発明1084]

前記抽出物が本発明1001の抽出物である、本発明1078の方法。

[本発明1085]

本発明1034の方法によって前記抽出物を得る、本発明1078の方法。

[本発明1086]

前記標準が、5個超の生物試料からの核酸抽出物中の、SEQ NO：1～29から選択される前記ヌクレオチド配列を有するセグメントを含むポリヌクレオチド分子の量を測定することによって導き出される、本発明1078の方法。