

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6644686号  
(P6644686)

(45) 発行日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月10日(2020.1.10)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10	1 0 0 Z
C 1 2 Q	1/6804	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6804	Z
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M

請求項の数 13 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2016-534708 (P2016-534708)	(73) 特許権者	311016949
(86) (22) 出願日	平成26年11月25日 (2014.11.25)		シグマ-アルドリッチ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(65) 公表番号	特表2017-501689 (P2017-501689A)		Sigma-Aldrich Co., LLC
(43) 公表日	平成29年1月19日 (2017.1.19)		アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプリング・ストリート3050番
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/067321	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02015/094609		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成29年11月22日 (2017.11.22)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/909,834	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成25年11月27日 (2013.11.27)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/985,000		
(32) 優先日	平成26年4月28日 (2014.4.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的流体からのマイクロRNA単離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的流体からマイクロRNA (miRNA) を単離するための方法であって、(a) 前記生物学的流体を界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、ここに、前記界面活性剤は、生物学的流体の成分を分離し、前記抗miRNA結合タンパク質試薬は、前記miRNAと会合するmiRNA結合タンパク質と相互作用して免疫沈降したmiRNA複合体を形成し；及び(b) 前記免疫沈降したmiRNA複合体とプロテアーゼを接触させて、精製することなく、前記免疫沈降したmiRNA複合体からmiRNAを放出させることを含む、方法。

【請求項2】

前記生物学的流体が、小胞性miRNA及び非小胞性miRNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記生物学的流体が、血漿または血清である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記界面活性剤が、非イオン性界面活性剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記生物学的流体を、前記界面活性剤及び前記抗miRNA結合タンパク質試薬と同時に接触させる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

10

20

## 【請求項 6】

前記生物学的流体、前記界面活性剤、及び前記抗 *miRNA* 結合タンパク質試薬が、30 分間インキュベートされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記生物学的流体、前記界面活性剤、及び前記抗 *miRNA* 結合タンパク質試薬が、室温でインキュベートされる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記抗 *miRNA* 結合タンパク質試薬は、固体支持体に結合した抗 *Argonaut* 抗体を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記固体支持体が磁気ビーズである、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記プロテアーゼがプロテアーゼ K である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記プロテアーゼとの接触が 10 分間行われる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記プロテアーゼとの接触が室温で行われる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記免疫沈降した *miRNA* 複合体から放出された前記 *mRNA* が、他のタイプの *RNA* を含まない、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本開示は、生物学的流体からのマイクロ *RNA* を単離するための手段に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

マイクロ *RNA* (*miRNA*) は、特定の塩基対形成相互作用を介して、特定のメッセージンジャー *RNA* (*mRNA*) の標的の転写後調節により遺伝子制御ネットワークに影響を与える小さな非コード *RNA* である。*miRNA* は、無細胞形態で、ヒト生体液中に存在することが示されている。これら無細胞の *miRNA* は、小胞ではない、*miRNA* タンパク質複合体中のタンパク質に結合及び保護され、エキソソームまたはマイクロベシクル、もしくはその両方のような膜結合小胞に封入され得る。疾患に与える *miRNA* の重要な機能的役割として核酸分子のこのセットには、容易に入手可能な血清、血漿、尿、または唾液などの生物学的サンプルで、幅広い患者及び疾患が発現する前の対象の、疾患の診断及び予後診断ならびに多種多様な治療応答モニタリングのための候補が含まれる。*miRNA* を単離する現在の方法は、細胞及び組織内で比較的豊富な *miRNA* を対象としており、容易に自動化やスケールアップできないスピニングカラムを使用しており、複雑であり、毒性化合物を含有し、または特異的に小胞もしくは非小胞のいずれかの *miRNA* を分離することができる。さらに、診断または予後診断において、*miRNA* は多くの場合、生物流体中に少量で存在し、現行の骨の折れる分離方法を使用して検出される。従って、生物流体中の *miRNA* のすべて、または、大多数を単離するための簡便、効率的、自動化可能かつスケールアップ可能な方法が必要とされている。

## 【発明の概要】

## 【0003】

本開示の一態様は、生物学的流体からマイクロ *RNA* (*miRNA*) を単離するための方法を提供する。この方法は、界面活性剤及び抗 *miRNA* 結合タンパク質試薬と生物学的流体を接触させることを含み、ここで、界面活性剤は生物学的流体の成分を分離し、

10

20

30

40

50

そして、抗miRNA結合タンパク質試薬は、miRNAと結合するmiRNA結合タンパク質と相互作用して免疫沈降されるmiRNA複合体を形成する。この方法は、更に、免疫沈降したmiRNA複合体からmiRNAを放出することを含む。

【0004】

本開示の別の態様は、生物学的流体からマイクロRNAを単離するためのキットを包含する。キットは、界面活性剤、抗miRNA結合タンパク質試薬、及びmiRNA放出試薬を含む。

【0005】

他の態様及び開示の繰り返しは、下記により詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

10

【0006】

【図1】Tri Reagent (登録商標) BD、または、RNA免疫沈降 (RIP) を使用して、0.2 mlの血漿からmiRNAの単離を比較する2つのグラフを提示する。RIPにより単離されたmiRNA量は、Tri Reagent (登録商標) BDを使用して単離されたmiRNA量の発現量の差として提示されている。(A)は、let-7a-5p、23a-3p、及び191-5pのmiRNAのレベルを図示し、及び(B)は、142-3p及び451aのmiRNAのレベルを図示する。

【0007】

【図2】Ago-RIPまたはQiagenカラム精製キット(Q1、Q2)を使用して、血漿からのmiRNA単離レベルを示す3つのプロットを図示する。単離されたmiRNAの量は、miRのコピー数/溶出量( $\mu$ l)として、let-7a、23a、及び142のmiRNA(A)、191のmiRNA(B)、及び451aのmiRNA(C)について示される。

20

【0008】

【図3】ビオチン化した抗体(b-Ago2またはb-Ago)とストレプトアビジンでのRIPまたは非ビオチン化(Ago2)抗体とプロテインAビーズでのRIPを使用し、血漿から単離されたmiRNAのレベルを示す3つのプロットを図示する。示されている単離されたmiRNA量は、let-7a(A)、23a(B)、及び191(C)のmiRNAについて、miRのコピー数/溶出量( $\mu$ l)として表される。使用した抗体(括弧内のクローン)は、x軸上に記述される。

30

【0009】

【図4】加熱でのmiRNA放出を伴うAgo-RIPを使用して、血漿から単離されたmiRNAのレベルを示す2プロットを提示する。Qは、Qiagenカラム精製を表し；RIP-Qは、免疫沈降に続くQiagenカラム精製を表し；bRIP-Qは、ビオチン化抗体を用いた免疫沈降に続くQiagenカラム精製を表す。(A) Qiagenカラム精製、カラム精製と組み合わせたRIP、及びプロテアーゼK放出を伴うRIPを用いた、合成cel-miR-39-3pのレベルを図示する。スパイクのレベルは、単離時にスパイクしたトータルの合成cel-miR-39-3pとの比率として表される。(B) Qiagenカラム精製、カラム精製と組み合わせたRIP及びプロテアーゼKによるmiRNA放出を伴うRIPを用いて血漿から単離したlet7a miRNAのレベルを図示する。let7aのレベルは、回収したサンプル1 $\mu$ l中のlet7aのコピー数として表される。

40

【0010】

【図5】種々の温度でのプロテアーゼKによるmiRNA放出を伴うAgo-RIPを使用して、血漿から単離したmiRNAのレベルを示す2プロットを提示する。(A)は、プロテアーゼKにより放出されるlet7a miRNAのレベル(各温度での左の棒グラフ)、及びビーズ上で保持されたレベル(各温度での右の棒グラフの棒グラフ)を図示する。let7a miRNAのレベルは、Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kitを用いて単離した、0.2 mlの同一血漿中のトータルのlet7a miRNAの比率として表される。(B)は、プロテアーゼKにより放出され

50

たmiR451a miRNAのレベル(各温度での左の棒グラフ)、及びビーズ上に保持されたレベル(各温度における右の棒グラフ)を示す。右の棒グラフmiR451a miRNAのレベルは、Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kitを用いて単離した、0.2mlの同一血漿中のトータルの、miR451a miRNAとの比率として表される。

【0011】

【図6】市販入手可能なmiRNAの単離法、または、標準的なチューブ内でプロテアーゼKによるmiRNA放出を伴うRIPを使用する単離法を使用して、血漿から単離したlet7a(A)またはmiR451a(B)miRNAのレベルを示す2つのプロットを提示する。E1及びE2は、Exiqon社からのmiRCury RNA Isolation Kit Biofluidsを使用したmiRNAの単離を表す。Q1及びQ2は、Qiagen社からのmiRNeasy Serum/Plasma Kitを使用したmiRNAの分離を表す。RIP-std-Qは、免疫沈降に続くQiagenカラム精製を表す。miRNAのレベルは、0.2mlの血漿から回収されたトータルのコピー数として表される。

10

【0012】

【図7】miRNA単離を市販の方法を用いて血漿から単離した、または、プロテアーゼKによる放出を伴うAgo-RIPを使用して単離した(RIP1~4)、let7a miRNAのレベルを示す2つのプロットを提示する。(A)はトライアル1、及び(B)はトライアル2を示す。E1及びE2は、Exiqon社からのmiRCury RNA Isolation Kit - biofluidsを使用したmiRNA単離を表す。Q1及びQ2は、Qiagen社からのmiRNeasy Serum/Plasma Kitを使用したmiRNAの単離を表す。let7aのレベルは、0.2mlの血漿から回収されたlet7aのトータルのコピー数として表される。

20

【0013】

【図8】プロテアーゼ、及び、RNase阻害剤有り無しで、及び、界面活性剤の事前処理有り無しで、Ago-RIPに続いてプロテアーゼKによるmiRNA放出を使用して、血漿から単離されたmiRNAのレベルを示す2プロットを提示する。+pre、+inh; IGEPAL及び阻害剤を血漿に加え、Ago2-ビーズに添加する前に、~30分間インキュベートした。+pre、-inh; IGEPALは、阻害剤なしで血漿に加えられ、Ago2-ビーズに添加する前に、~30分間インキュベートされた。-pre、+inh; IGEPAL及び阻害剤をAgo2-ビーズと同時に加えた。-pre、-inh; IGEPALを、阻害剤なしで、Ago2-ビーズと同時に血漿に加えた。(A)は、回収されたlet7a miRNAのコピー数を、(B)は、回収されたmiR451a miRNAのコピー数を示す。

30

【0014】

【図9】IGEPAL処理されたmiRNAをトータルの%として表すmiRNAについて、小胞なし(各miRNAの左の棒グラフ)、及び小胞付き(各miRNAの右の棒グラフ)のレベルを示すプロットを提示する。

【0015】

【図10】Ago-RIPに続いてプロテアーゼKによる放出(RIP)を使用して0.2または0.4mlの血漿から、及びExiqon社(E)のmiRCury RNA Isolation Kit - Biofluidsを使用して0.2mlの血漿から、単離したmiRNAのレベルを示す3つのプロットを提示する。(A)は、回収されたlet7a miRNAのコピー数を図示し、(B)は、回収されたmiR191 miRNAのコピー数を図示し、及び(C)は、回収されたmiR451a miRNAのコピー数を図示する。

40

【0016】

【図11】Ago-RIPに続いてプロテアーゼKによる放出を使用して血漿から単離されたlet7aのレベルを示すプロットを提示する。RIPのインキュベーションは、室

50

温で、5、15、30、または60分(5、15、30、60)であった。5、15、または30分インキュベーションされたものは、全て、5回洗浄してプロテアーゼKにより放出させた。60分インキュベートされたものは5、4、3、2、または1回洗浄した(5w、4w、3w、2w、1w)。0.2mlの血漿から回収されたlet7aの合計収量が示されている。

【0017】

【図12A】Ag o - R I PまたはカラムベースのmiRNA単離キットを用いて、血漿から単離されたlet7aのmiRNAのレベルを示す。3つの異なる実験(Exp)が提示される。S1及びS2は、Ag o - R I Pを使用した単離を表し; E1及びE2はExiqon社からのmiRCury RNA Isolation Kit - biofluidsを使用した単離を表し; Q1及びQ2は、Qiagen社からの、miRNeasy Serum/Plasma Kitを使用した単離を表す。

10

【0018】

【図12B】Ag o - R I P、または、カラムベースのmiRNA単離キットを使用して、血漿から単離されたRNU6小核RNAのレベル及びSNORD48小核RNAを提示する。3つの異なる実験を提示する。S1及びS2は、Ag o - R I Pを使用した単離を表す; E1及びE2はExiqon社からのmiRCury RNA Isolation Kit - biofluidsを使用した単離を表し; Q1及びQ2は、Qiagen社からの、miRNeasy Serum/Plasma Kitを使用した単離を表す。

20

【0019】

【図12C】Ag o - R I P、または、カラムベースのmiRNA単離キットを用いて、血漿から単離された、GAPDHのメッセンジャーRNA、RN18SリボソームRNA、及び、RN28SリボソームRNAのレベルを示す。3つの異なる実験が提示される。S1及びS2は、Ag o - R I Pを使用した単離を表し; E1及びE2は、Exiqon社のmiRCury RNA Isolation Kit - Biofluidsを用いた単離を表し; Q1及びQ2は、Qiagen社からの、miRNeasy Serum/Plasma Kitを使用した単離を表す。

【0020】

【図13】抗Ag o 1抗体、抗Ag o 2抗体、または、抗Ag o 1及び抗Ag o 2抗体の両方の組み合わせを使用したAg o - R I Pを介して血漿から単離されたmiRNAのレベルを示すプロットを提示する。

30

【発明を実施するための形態】

【0021】

循環するmiRNAを単離するための効率的で迅速な方法が発見された。実施例に示すように、本開示の方法は、小胞に内包される、及び、小胞に内包されていない循環miRNAを両方同時に単離することができる。都合よく、本開示の方法及びキットは、他の種類のRNAが混入していない純粋なmiRNA調製物の迅速かつ特異的な単離を可能にする。更に、本明細書に開示された方法及びキットは、希釈細胞外液から高収量でのmiRNAの単離を可能にする。また、本発明の方法は、スケールアップ可能で、増大した容量の細胞外の生物学的流体から、miRNAの単離が可能となる。

40

【0022】

miRNAのレベルは、癌、心血管疾患ならびに他の多数の疾患及び発生過程(統合失調症、アルツハイマー病、獲得免疫と自然免疫の双方についての免疫細胞の発生や調節、幹細胞の維持及び多分化能、神経系の発生、糖尿病を含む内分泌疾患、膵臓の発生、脆弱X症候群、皮膚の創傷治癒、細胞周期の進行、移植組織の拒絶反応、低酸素症、骨格筋分化)と関連している。さらに、miRNAはウイルスでも発現しており、それらのmiRNAの標的遺伝子が同定されている。したがって、本開示の方法及びキットは、血液、血清、または血漿などの容易に入手可能な生物学的サンプルを使用して、疾患または疾患状態を診断するアッセイのためのmiRNA調製に使用することができる。

50

## 【 0 0 2 3 】

## I . 方法

本開示は、生物学的流体からマイクロRNA (miRNA) を単離するための方法を包含する。この方法は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬を生物学的流体に接触させることを含む。界面活性剤は、生物学的流体の成分を分離し、そして、抗miRNA結合タンパク質試薬は、miRNAと結合するmiRNA結合タンパク質(単数若しくは複数)と相互作用して、免疫沈降されるmiRNA複合体を形成する。この方法は、更に、免疫沈降したmiRNA複合体からmiRNAを放出することを含む。

## 【 0 0 2 4 】

本明細書に具体的に開示した方法は、miRNAを単離する。下記の実施例12に記載する通り、他のタイプの小さなRNA(核内低分子RNAまたは核小体低分子RNAなど)は、開示された方法により単離されず、そして、より大きいRNA分子(例えば、メッセンジャーRNA、またはリボソームRNAなど)も、開示された方法では単離されない。

## 【 0 0 2 5 】

## ( a ) 生物学的流体

本開示の方法は、対象から得られる生物学的流体サンプルの細胞外を循環するmiRNAの単離を含む。本明細書で使用する用語「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。対象は、胎児、未成年、または成人であってもよい。対象は、雄又は雌であってもよい。適切な動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、及び魚類などの脊椎動物が含まれる。適切な哺乳動物の例としては、げっ歯類、愛玩動物、家畜、及び霊長類が挙げられるが、制限はない。げっ歯類の非限定の例としては、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ及びモルモットが挙げられる。適切な愛玩動物としては、ネコ、イヌ、ウサギ、ハリネズミ、フェレットが挙げられるが、それに限定されない。家畜の非限定的な例としては、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラマ、及びアルパカが挙げられる。適当な霊長類としては、オマキザル、チンパンジー、キツネザル、マカク、マーモセット、タマリン、クモザル、リスザル、及び、ベルベットモンキーがあげられるが、それに限定されない。鳥類の非限定的な例としては、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びガチョウが挙げられる。例示的な対象はヒトである。

## 【 0 0 2 6 】

用語「生物学的流体」は、任意の対象から単離されたすべての生物学的流体及び排泄物を参照することができる。生物学的流体の非限定の例は、血液及びその画分、血清、血漿、尿、排泄物、精液、精液流体、精漿、前立腺液、プレ射精液(カウパー液)、胸水、涙、唾液、痰、汗、生検液、腹水、脳脊髄液、羊水、リンパ液、骨髄、子宮頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜の分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、乳房分泌物、卵巣嚢胞の分泌物、組織液、腫瘍吸引物及び組織液サンプルを挙げることができる。いくつかの実施形態では、生物学的流体は血清である。他の実施形態において、生物学的流体は血漿である。

## 【 0 0 2 7 】

対象から血漿または血清サンプルを得る方法は、当該分野で公知である。例えば、カテーテルの有り無しでの静脈穿刺は、血液サンプルを採取して血清を調製するために使用することができる。血液サンプルから血漿及び血清を調製する方法は、当該分野で公知である。更に、一般的に血液サンプルは、下記に記載されるように処理される血漿または血清の十分な量を供給するのに十分多い。血漿または血清サンプルは、サンプルを採取した直後に処理してもよい。或いは、血漿または血清サンプルは、後に処理するために凍結することができる。

## 【 0 0 2 8 】

生物学的流体サンプルは、新たにサンプルを収集することにより、対象から得ることができる。或いは、生物学的流体サンプルは、以前に収集されて保存されたサンプルから得ることができる。例えば、生物学的流体が血漿または血清である場合、貯蔵及び保存された採血サンプルからサンプルを得ることができる。いくつかの実施形態では、サンプルは

10

20

30

40

50

新たにサンプルを採取することにより得られる。他の実施形態では、サンプルは、以前に収集されて貯蔵されたサンプルから得られる。

【0029】

いくつかの実施形態では、生物学的流体サンプルは、希釈されない。他の実施形態では、生物学的流体サンプルは、miRNAの単離の前に希釈される。希釈の程度は、miRNA、サンプル中の生物学的流体のタイプ、対象、対象の疾患状態、miRNAを測定するために使用されるアッセイのタイプ、及び、miRNAを測定するために使用されるアッセイで使用される試薬を含むが、それに限定されない多くの因子に依存し得る。一実施形態では、生物学的流体サンプルは、元のサンプル容積の1/2程度から、約50,000倍の範囲まで希釈剤量を添加することにより希釈される。希釈剤は、miRNAの単離、または、後続の処理工程で使用される他の方法を妨害しない任意の流体であってもよい。適切な希釈剤の非限定的な例としては、脱イオン水、蒸留水、生理食塩水、リンゲル液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、SSC (standard saline citrate)、及びHEPES緩衝生理食塩水を含む。

【0030】

(b) 界面活性剤

生物学的流体は、界面活性剤 (surface active agent) (あるいは、「surfactant」または「detergent」と称される) と接触させる。本明細書で使用する用語「界面活性剤」は、循環miRNAを含むことができる生物学的流体の成分を分離することが可能な任意の薬剤を記載するために使用できる。循環miRNAを含むことができる生物学的流体成分の非限定的な例としては、リポタンパク質、エキソソーム、微小胞、エクソソーム、アポトーシス小体、及び他の細胞外小胞などの細胞外小胞が挙げられる。

【0031】

当業者により理解されるように、生物学的流体の成分を分離することができる任意の界面活性剤は、本開示の免疫沈降したmiRNA複合体の形成に干渉しないことを条件として、本開示の方法において使用することができる。例えば、界面活性剤は、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、双性イオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、またはそれらの組み合わせであり得る。本発明の界面活性剤の同一性は、循環するmiRNA、抗miRNA結合タンパク質試薬、及び単離されたmiRNAを含むことが可能な生物学的流体中の生物学的流体成分の同一性に依存して変化し得る。

【0032】

いくつかの実施形態では、界面活性剤は、アニオン性界面活性剤である。好適なアニオン性界面活性剤としては、アミンドデシルベンゼンスルホネート；カプリレス硫酸アンモニウム；クメンシルホン酸アンモニウム；ジヒドロキシステアリン酸アンモニウム；ドデシルベンゼンスルホン酸アンモニウム；ラウレス硫酸アンモニウム；ラウレス-12硫酸アンモニウム；ラウレス-30硫酸アンモニウム；ラウリルサルコシン酸アンモニウム；ラウリル硫酸アンモニウム；スルホコハク酸ラウリルアンモニウム；リグノシルホン酸アンモニウム；ミレス硫酸アンモニウム；ナフタレンシルホン酸アンモニウム；アンモニウムノノキシノール-20スルフェート；アンモニウムノノキシノール-30スルフェート；アンモニウムノノキシノール-4スルフェート；アンモニウムノノキシノール-6スルフェート；アンモニウムノノキシノール-9スルフェート；オレイル硫酸アンモニウム；ペルフルオロオクタノール酸アンモニウム；ステアリン酸アンモニウム；キシレンスルホン酸アンモニウム；ナフタレンスルホン酸ブチル；リン酸ブチル；ドデシルベンゼンスルホン酸カルシウム；カルシウムステアロイルラクチレート；カルシウムテトラプロピレンベンゼンスルホネート；カプリルレス-9-カルボン酸；リン酸セチル；クメンシルホン酸；DEA-セチルホスフェート；DEA-ドデシルベンゼンスルホネート；DEA-ラウリルスルフェート；デセス-4ホスフェート；ジアンモニウムラウリルスルホコハク酸；ジアンモニウムステアリルスルホスクシナメート；ジアミルナトリウムスルホコハク酸；ジシクロヘキシルナトリウムスルホコハク酸；ジヘキシルナトリウムスルホコハク酸；ジイ

ソブチルナトリウムスルホコハク酸；ジラウレス - 7クエン酸；ジメチコノール；ジノ  
 キシノール - 4ホスフェート；ジオクチルアンモニウムスルホコハク酸；ジオクチルナ  
 トリウムスルホコハク酸；ジナトリウムセテアリルスルホスクシナメート；ジナトリウムコ  
 カミドMEA - スルホコハク酸；ジナトリウムコカミドPEG - 3スルホコハク酸；ジナ  
 トリウムデセス - 6スルホコハク酸；ジナトリウムデシルジフェニルエーテルジスルホネ  
 ート；ジナトリウムドデシルオキシプロピルスルホスクシナメート；ジナトリウムイソデ  
 シルスルホコハク酸；ジナトリウムラネス - 5スルホコハク酸；ジナトリウムラウラミド  
 DEA - スルホコハク酸；ジナトリウムラウラミドMEA - スルホコハク酸；ジナトリウ  
 ムラウレススルホコハク酸；ジナトリウムラウリルスルホコハク酸；ジナトリウムミリス  
 タミドMEA - スルホコハク酸；ジナトリウムオレアミドMEA - スルホコハク酸；ジナ  
 トリウムオレアミドPEG - 2スルホコハク酸；ジナトリウムオレス - 3スルホコハク酸  
 ；ジナトリウムPEG - 4コカミドMIPAスルホコハク酸；ジナトリウムリシノレアミ  
 ドMEA - スルホコハク酸；ジナトリウムステアリルスルホスクシナメート；ジナトリウ  
 ムウンデシレンアミドMEA - スルホコハク酸；ジトリデシルナトリウムスルホコハク酸  
 ；ドデセニルコハク酸無水物；ドデシルジフェニルエーテルジスルホン酸；ドデシルジフ  
 ェニルオキシドジスルホン酸；ドデシルベンゼンスルホン酸；グリセリルジオレエートS  
 E；グリセリルジステアレートSE；グリセリルリシノレエートSE；グリセリルステア  
 レートシトレート；グリセリルステアレートSE；グリコールステアレートSE；ヘキシ  
 ルホスフェート；イソプロピルホスフェート；イソプロピルアミンドデシルベンゼンスル  
 ホネート；イソステアレス - 2ホスフェート；イソトリデセス - 3ホスフェート；イソト  
 リデセス - 6ホスフェート；ラウレス - 1ホスフェート；ラウレス - 12カルボン酸；ラ  
 ウレス - 3ホスフェート；ラウレス - 4ホスフェート；ラウレス - 6ホスフェート；ラウ  
 レス - 7シトレート；ラウレス - 9ホスフェート；ラウリルホスフェート；リチウムラウ  
 リルスルフェート；マグネシウムラウレススルフェート；マグネシウムPEG - 3コカミ  
 ドスルフェート；MEA - ラウレスホスフェート；MEA - ラウリルスルフェート；MI  
 PA - ラウレススルフェート；MIPA - ラウリルスルフェート；ミリストイルサルコシ  
 ン；ナフタレン - ホルムアルデヒドスルホネート；ノノキシノール - 10ホスフェート；  
 ノノキシノール - 12ホスフェート；ノノキシノール - 3ホスフェート；ノノキシノール  
 - 4 - ホスフェート；ノノキシノール - 4スルフェート；ノノキシノール - 6 - ホスフェ  
 ート；ノノキシノール - 7ホスフェート；ノノキシノール - 8ホスフェート；ノノキシノ  
 ール - 9ホスフェート；ノニルノノキシノール - 10ホスフェート；ノニルノノキシノ  
 ール - 15ホスフェート；ノニルノノキシノール - 7ホスフェート；オレス - 10カルボン  
 酸；オレス - 10ホスフェート；オレス - 3カルボン酸；オレス - 4ホスフェート；オレ  
 ス - 5ホスフェート；オレス - 6カルボン酸；オレス - 7ホスフェート；PEG - 2ジラ  
 ウレートSE；PEG - 2ジオレエートSE；PEG - 2ジステアレートSE；PEG -  
 2ラウレートSE；PEG - 2オレエートSE；PEG - 2ステアレートSE；PEG -  
 9ステアラミドカルボン酸；セチルリン酸カリウム；デセス - 4リン酸カリウム；カリウ  
 ムドデシルベンゼンスルホネート；カリウムイソステアレス - 2ホスフェート；カリウム  
 ラウロイルサルコシネート；カリウムラウリルスルフェート；オレイン酸カリウム；カリ  
 ウムオレイン酸スルフェート；ペルフルオロオクタ酸カリウム；カリウムリシノール酸  
 スルフェート；PPG - 2ラウレートSE；PPG - 2オレエートSE；PPG - 2ステ  
 アレートSE；PPG - 5 - セテス - 10ホスフェート；プロピレングリコールラウレ  
 ートSE；プロピレングリコールオレエートSE；プロピレングリコールリシノレエートS  
 E；プロピレングリコールステアレートSE；PVM/MAコポリマー；ナトリウム2 -  
 エチルヘキシルホスフェート；ナトリウム2 - エチルヘキシルスルフェート；ナトリウム  
 オレフィンスルホネート；ナトリウムアリルオキシヒドロキシプロピルスルホネート；ナ  
 トリウムベヘノイルラクチレート；プトキシエトキシ酢酸ナトリウム；ブチルナフタレン  
 スルホン酸ナトリウム；ナトリウムブチルオレエートスルフェート；ナトリウムブチルオ  
 レエートスルホネート；；ナトリウムカプロイルラクチレート；ナトリウムカプリルス  
 ルホネート；ナトリウムセチルスルフェート；コール酸ナトリウム；クメンスルホン酸ナ

10

20

30

40

50

トリウム；ナトリウムデセススルフェート；ナトリウムデシルジフェニルエーテルスルホ  
 ネート；ナトリウムデシルスルフェート；デオキシコール酸ナトリウム；ジブチルナフタ  
 レンスルホン酸ナトリウム；ジドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム；ナトリウムスル  
 ホコハク酸ジイソオクチル；ジイソプロピルナフタレンスルホン酸ナトリウム；ナトリウ  
 ムジラウレス - 7 シトレート；ナトリウムスルホコハク酸ジノニル；ナトリウムドデシル  
 ジフェニルエーテルジスルホネート；ナトリウムドデシルジフェニルオキシドジスルホネ  
 ート；ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム；ナトリウムグリセリルトリオレエートス  
 ルフェート；ナトリウムヘキサデシルジフェニルジスルホネート；ナトリウムヘキサデシ  
 ルジフェニルオキシドジスルホネート；ナトリウムヘキシルジフェニルオキシドジスルホ  
 ネート；ナトリウムイソチオネート；ナトリウムイソデシルスルフェート；ナトリウムイ  
 ソオクチルスルフェート；ナトリウムイソステアロイルラクチレート；ナトリウムイソト  
 リデセス - 15 スルフェート；ナトリウムラクテート；ナトリウムラウラミド D E A - ス  
 ルホコハク酸；ナトリウムラウレスホスフェート；ナトリウムラウレススルフェート；ナ  
 トリウムラウレススルホコハク酸；ナトリウムラウレス - 10 ホスフェート；ナトリウム  
 ラウレス - 11 カルボキシレート；ナトリウムラウレス - 12 - スルフェート；ナトリウ  
 ムラウレス - 13 - アセテート；ナトリウムラウレス - 13 - カルボキシレート；ナトリ  
 ムラウレス - 3 - カルボキシレート；ナトリウムラウレス - 4 カルボキシレート；ナト  
 リウムラウレス - 4 - ホスフェート；ナトリウムラウレス - 6 カルボキシレート；ナトリ  
 ムラウレス - 7 - カルボキシレート；ナトリウムラウレス - 7 - スルフェート；ナトリ  
 ムラウレス - 8 - スルフェート；ナトリウムラウロイルグルタメート；ナトリウムラウ  
 ロイルラクチレート；ナトリウムラウロイルラクチレート；ナトリウムラウロイルメチル  
 アミノプロピオネート；ナトリウムラウロイルサルコシネート；ナトリウムラウリルホス  
 フェート；ナトリウムラウリルスルフェート；ナトリウムラウリルスルホアセテート；ナ  
 トリウムリグネート；ナトリウムリグノスルホネート；ナトリウムメタリルスルホネート  
 ；ナトリウムメチルラウロイルタウレート；ナトリウムメチルミリストイルタウレート；  
 ナトリウムメチルオレオイルタウレート；ナトリウムメチルパルミトイルタウレート；ナ  
 トリウムメチルステアロイルタウレート；ナトリウムメチルナフタレンスルホネート；ナ  
 トリウム m - ニトロベンゼンスルホネート；ナトリウムミレススルフェート；ナトリウム  
 ミリストイルグルタメート；ナトリウムミリストイルサルコシネート；ナトリウムミリス  
 チルスルフェート；ナトリウムノノキシノールスルフェート；ナトリウムノノキシノール  
 - 10 - スルフェート；ナトリウムノノキシノール - 10 - スルホコハク酸；ナトリウム  
 ノノキシノール - 15 - スルフェート；ナトリウムノノキシノール - 4 スルフェート；ナ  
 トリウムノノキシノール - 5 スルフェート；ナトリウムノノキシノール - 6 ホスフェート  
 ；ナトリウムノノキシノール - 6 - スルフェート；ナトリウムノノキシノール - 8 - スル  
 フェート；ナトリウムノノキシノール - 9 - ホスフェート；ナトリウムノノキシノール -  
 9 スルフェート；ナトリウムオクトキシノール - 2 - エタンスルホネート；ナトリウムオ  
 クトキシノール - 3 スルフェート；ナトリウムオクチルスルフェート；ナトリウムオクチ  
 ルフェノキシエトキシエチルスルホネート；ナトリウムオレイン酸スルフェート；ナトリ  
 ムオレス - 7 - ホスフェート；ナトリウムオレイルホスフェート；ナトリウムオレイル  
 スルフェート；ナトリウムオレイルスルホスクシナメート；ナトリウムパルミトイルサル  
 コシネート；ナトリウムフェニルスルホネート；ナトリウムプロピルオレエートスルフェ  
 ート；ナトリウムステアロイルラクチレート；ナトリウムステアリルスルホスクシナメ  
 ート；ナトリウムトリデセススルフェート；ナトリウムトリデセス - 3 - カルボキシレ  
 ート；ナトリウムトリデセス - 6 - カルボキシレート；ナトリウムトリデセス - 7 - カルボキ  
 シレート；ナトリウムトリデシルスルフェート；ナトリウムトリデシルベンゼンスルホネ  
 ート；ナトリウムキシレンスルホネート；ステアロイルサルコシン；T E A - ラウロイル  
 グルタメート；T E A - ラウリルスルフェート；テトラナトリウムジカルボキシエチルス  
 テアリルスルホスクシナメート；T I P A - ラウレススルフェート；トリセテアレス - 4  
 - ホスフェート；トリセテス - 5 - ホスフェート；トリデセス - 2 - ホスフェート；トリ  
 デセス - 3 - ホスフェート；トリデセス - 5 - ホスフェート；トリデシルホスフェート；

10

20

30

40

50

及び、トリラウレス - 4 - ホスフェート；及びトリオクチルホスフェートが挙げられるが、それに限定されない。

【 0 0 3 3 】

他の実施形態では、界面活性剤は、カチオン性界面活性剤である。好適なカチオン性界面活性剤の例としては、アルキルトリメチルアンモニウムブロミド；ベンザルコニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド；ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムクロリド；ベンジルドデシルジメチルアンモニウムブロミド；ベンジルトリメチルアンモニウムテトラクロロヨウ素酸塩；セチルトリメチルアンモニウムブロミド（C T A B）；ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド；ドデシルエチルジメチルアンモニウムブロミド；ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド；ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド；エチルヘキサデシルジメチルアンモニウムブロミド；ジラード試薬T；ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド；ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド；N、N'、N'-ポリオキシエチレン（10）-N-タロウ-1、3-ジアミノプロパン；トンゾニウムブロミド；及び、トリメチル（テトラデシル）アンモニウムブロミドが挙げられるが、それに限定されない。

【 0 0 3 4 】

更に、他の実施形態においては、界面活性剤は、双性イオン性界面活性剤である。好適な双性イオン性界面活性剤としては、3-[（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（CHAPS）；3-[（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（CHAPSO）；3-（4-ヘプチル）フェニル-3-ヒドロキシプロピル）ジメチルアンモニオプロパンスルホネート（C7BzO）；3-（N、N-ジメチルオクチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩（SB3-8）；3-（デシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩（SB3-10；カプリリルスルホベタイン）；3-（ドデシルジメチルアンモニオ）プロパンスルホネート分子内塩（SB3-12）；3-（N、N-ジメチルテトラデシルアンモニオ）プロパンスルホネート（SB3-14）；3-（N、N-ジメチルパルミチルアンモニオ）プロパンスルホネート（SB3-16）；3-（N、N-ジメチルオクタデシルアンモニオ）プロパンスルホネート（SB3-18）；3-[N、N-ジメチル（3-ミリストイルアミノプロピル）アンモニオ]プロパンスルホネート（ASB-14）が挙げられるが、それに限定されない。実施形態に依存する、他の好適な双性イオン性界面活性剤は、アセチル化レシチン；アプリコットアミドプロピルベタイン；ババアミドプロピルベタイン；ベヘニルベタイン；ビス2-ヒドロキシエチルタロウグリシネート；C12-14アルキルジメチルベタイン；カノールアミドプロピルベタイン；カプリル/カプリリルアミノプロピルベタイン；カプリロアミドプロピルベタイン；セチルベタイン；ココミドプロピルベタイン；ココミドプロピルジメチルアミノヒドロキシプロピル加水分解コラーゲン；N-[3-ココミド]-プロピル]-N、N-ジメチルベタイン、カリウム塩；ココミドプロピルヒドロキシスルタン；ココミドプロピルスルホベタイン；ココミノ酪酸；ココミノプロピオン酸；ココアンホジプロピオン酸；ココ-ベタイン；ココジメチルアンモニウム-3-スルホプロピルベタイン；ココイミノジグリシネート；ココイミノジプロピオネート；ココノオレアミドプロピルベタイン；ココイルサルコシニアミドDEA；DEA-ココアンホジプロピオネート；ジヒドロキシエチルタロウグリシネート；ジメチコンプロピルPG-ベタイン；N、N-ジメチル-N-ラウリル酸-アミドプロピル-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；N、N-ジメチル-N-ミリスチル-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；N、N-ジメチル-N-パルミチル-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；N、N-ジメチル-N-ステアルアミドプロピル-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；N、N-ジメチル-N-ステアリル-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；N、N-ジメチル-N-タロウ-N-（3-スルホプロピル）-アンモニウムベタイン；ジナトリウムカプロアンホジアセテート；ジナトリウムカプロアンホジプロ

10

20

30

40

50

ピオネート；ジナトリウムカプリロアンホジアセテート；ジナトリウムカプリロアンホジ  
 プロピオネート；ジナトリウムココアンホジアセテート；ジナトリウムココアンホジプロ  
 ピオネート；ジナトリウムイソステアロアンホジプロピオネート；ジナトリウムラウレス  
 - 5 - カルボキシアンホジアセテート；ジナトリウムラウルイミノジプロピオネート；ジ  
 ナトリウムラウロアンホジアセテート；ジナトリウムラウロアンホジプロピオネート；ジ  
 ナトリウムオクチル b - イミノジプロピオネート；ジナトリウムオレアンホジアセテート  
 ；ジナトリウムオレアンホジプロピオネート；ジナトリウム P P G - 2 - イソデセス - 7  
 - カルボキシアンホジアセテート；ジナトリウムダイズアンホジアセテート；ジナトリウ  
 ムステアロアンホジアセテート；ジナトリウムタロウアンホジプロピオネート；ジナトリ  
 ムタロウアンホジアセテート；ジナトリウムタロウイミノジプロピオネート；ジナトリ  
 ムコムギ胚芽両性ジアセテート；N、N - ジステアリル - N - メチル - N - ( 3 - スル  
 ホプロピル ) - アンモニウムベタイン；エルカミドプロピルヒドロキシスルタン；エチル  
 ヘキシルジプロピオネート；エチルヒドロキシメチルオレイルオキサゾリン；エチル P E  
 G - 1 5 コカミンスルフェート；水素化レシチン；加水分解タンパク質；イソステアルア  
 ミドプロピルベタイン；ラウルアミドプロピルベタイン；ラウルアミドプロピルジメチル  
 ベタイン；ラウルアミノプロピオン酸；ラウロアンホジプロピオン酸；ラウロイルリシン  
 ；ラウリルベタイン；ラウリルヒドロキシスルタン；ラウリルスルタン；リンオレアミド  
 プロピルベタイン；リソレシチン；乳脂質アミドプロピルベタイン；ミリストアミドプロピ  
 ルベタイン；オクチルジプロピオネート；オクチルイミノジプロピオネート；オレアミド  
 プロピルベタイン；オレイルベタイン；2 - ( ヘプタデエセニル ) - 4、4 ( 5 H ) - オ  
 キサゾールジメタノール；パリルミトアミドプロピルベタイン；パリルミトアミンオキシ  
 ド；リシンオレアミドプロピルベタイン；リシンオレアミドプロピルベタイン / I P D I  
 コポリマー；セサミドプロピルベタイン；ナトリウム C 1 2 - 1 5 アルコキシプロピルイ  
 ミノジプロピオネート；ナトリウムカプロアンホアセテート；ナトリウムカプリロアンホ  
 アセテート；ナトリウムカプリロアンホヒドロキシプロピルスルホネート；ナトリウムカ  
 プリロアンホプロピオネート；ナトリウムカルボキシメチルタロウポリプロピルアミン；  
 ナトリウムココミノプロピオネート；ナトリウムココアンホアセテート；ナトリウムココ  
 アンホヒドロキシプロピルスルホネート；ナトリウムココアンホプロピオネート；ナトリ  
 ムジカルボキシエチルココホスホエチルイミダゾリン；ナトリウム水素化タロウジメチ  
 ルグリシネート；ナトリウムイソステアロアンホプロピオネート；ナトリウムラウルイミ  
 ノジプロピオネート；ナトリウムラウロアンホアセテート；ナトリウムオレアンホヒドロ  
 キシプロピルスルホネート；ナトリウムオレアンホプロピオネート；ナトリウムステアロ  
 オアンホアセテート；ナトリウムタロウアンホプロピオネート；ダイズアミドプロピルベ  
 タイン；ステアリルベタイン；タロウアミドプロピルヒドロキシスルタン；タロウアンホ  
 ポリカルボキシプロピオン酸；トリナトリウムラウロアンホ P G - アセテートホスフェー  
 トクロリド；ウンデシレンアミドプロピルベタイン；及びコムギ胚芽アミドプロピルベタ  
 インを含む。

【 0 0 3 5 】

他の実施形態において、界面活性剤は、好ましくは、非イオン性界面活性剤である。適  
 切な非イオン性界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレン ( 1 0 ) セチルエーテル ( 40  
 B R I J ( 登録商標 ) 5 6 ) ；ポリオキシエチレン ( 2 0 ) セチルエーテル ( B R I J ( 登録商  
 標 ) 5 8 ) ；ポリオキシエチレングリコールドデシルエーテル ( B R I J ( 登録商  
 標 ) 3 5 ) ；ポリオキシエチレン ( 9 ) p - t - オクチルフェノール ( N O N I D E T ( 登録商  
 標 ) P - 4 0 ) ；ポリオキシエチレン ( 4 - 5 ) p - t - オクチルフェノール ( T  
 R I T O N ( 登録商標 ) X - 4 5 ) ；ポリオキシエチレン ( 7 - 8 ) p - t - オクチルフ  
 エノール ( T R I T O N ( 登録商標 ) X - 1 1 4 ) ；ポリオキシエチレン ( 9 - 1 0 ) p  
 - t - オクチルフェノール ( T R I T O N ( 登録商標 ) X - 1 0 0 ) ；ポリオキシエチレ  
 ン ( 9 - 1 0 ) ノニルフェノール ( T R I T O N ( 登録商標 ) N - 1 0 1 ) ；ポリオキシ  
 エチレン ( 2 0 ) ソルビトールモノラウレート ( T W E E N ( 登録商標 ) 2 0 ) ；ポリオ  
 キシエチレン ( 2 0 ) ソルビトールモノパルミテート ( T W E E N ( 登録商標 ) 4 0 ) ；

10

20

30

40

50

ポリオキシエチレン(20)ソルビトールモノオレート(TWEEN(登録商標)80)  
 );ジメチルデシルホスフィンオキシド(APO-10);ジメチルドデシルホスフィン  
 オキシド(APO-12);シクロヘキシル-n-エチル-D-マルチド;シクロ  
 ヘキシル-n-ヘキシル-D-マルチド;シクロヘキシル-n-メチル-マルチ  
 シド;n-デカノイルスクロース;n-デシル-D-グルコピラノシド;n-デシ  
 ル-マルチピラノシド;n-デシル-D-チオマルチド;n-ドデカノイルス  
 クロース;デカエチレングリコールモノドデシルエーテル;N-デカノイル-N-メチル  
 グルカミン;n-デシル-D-グルコピラノシド;デシル-D-マルチピラノシド;  
 n-ドデカノイル-N-メチルグルカミド;n-ドデシル-D-マルチド;n-ドデ  
 シル-D-マルチド;ヘプタン-1、2、3-トリオール;ヘプタエチレングリコー  
 ルモノデシルエーテル;ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル;ヘプタエチレ  
 ングリコールモノテトラデシルエーテル;n-ヘキサデシル-D-マルチド;ヘキサ  
 エチレングリコールモノドデシルエーテル;ヘキサエチレングリコールモノヘキサデシル  
 エーテル;ヘキサエチレングリコールモノオクタデシルエーテル;ヘキサエチレングリコ  
 ールモノテトラデシルエーテル;メチル6-O-(N-ヘプチルカルバモイル)-D  
 -グルコピラノシド;ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル;N-ノナノイル-  
 N-メチルグルカミン;N-ノナノイル-N-メチルグルカミン;オクタエチレングリコ  
 ールモノデシルエーテル;オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル;オクタエチ  
 レングリコールモノヘキサデシルエーテル;オクタエチレングリコールモノオクタデシル  
 エーテル;オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル;オクチル-グルコシ  
 ド;オクチル-チオグルコシド;オクチル-D-グルコピラノシド;オクチル-D  
 -1-チオグルコピラノシド;ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル;ペンタエ  
 チレングリコールモノドデシルエーテル;ペンタエチレングリコールモノヘキサデシルエ  
 ーテル;ペンタエチレングリコールモノヘキシルエーテル;ペンタエチレングリコールモ  
 ノオクタデシルエーテル;ペンタエチレングリコールモノオクチルエーテル;ポリエチレ  
 ングリコールジグリシジルエーテル;ポリエチレングリコールエーテル;ポリオキシエチ  
 レン10トリデシルエーテル;ポリオキシエチレン(100)ステアレート;ポリオキシ  
 エチレン(20)イソヘキサデシルエーテル;ポリオキシエチレン(20)オレイルエ  
 ーテル;ポリオキシエチレン(40)ステアレート;ポリオキシエチレン(50)ステアレ  
 ート;ポリオキシエチレン(8)ステアレート;ポリオキシエチレンビス(イミダゾリル  
 カルボニル);ポリオキシエチレン(25)プロピレングリコールステアレート;キラヤ  
 属樹皮からのサポニン;テトラデシル-D-マルチド;テトラエチレングリコールモ  
 ノデシルエーテル;テトラエチレングリコールモノドデシルエーテル;テトラエチレング  
 リコールモノテトラデシルエーテル;トリエチレングリコールモノデシルエーテル;ト  
 リエチレングリコールモノドデシルエーテル;トリエチレングリコールモノヘキサデシル  
 エーテル;トリエチレングリコールモノオクチルエーテル;トリエチレングリコールモノ  
 テトラデシルエーテル;チロキサポール;n-ウンデシル-D-グルコピラノシド;(オ  
 クチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール(IGEPAAL(登録商標)CA-630)  
 );ポリオキシエチレン(5)ノニルフェニルエーテル(IGEPAAL(登録商標)CO-  
 520);及びポリオキシエチレン(150)ジノニルフェニルエーテル(IGEPAAL  
 (登録商標)DM-970)を含むが、それに限定されない。一実施形態において、界面  
 活性剤は、ポリオキシエチレン(5)ノニルフェニルエーテル(IGEPAAL(登録商標)  
 )CO-520)である。別の実施形態において、界面活性剤は、ポリオキシエチレン(  
 150)ジノニルフェニルエーテル(IGEPAAL(登録商標)DM-970)である。  
 一実施形態では、界面活性剤は、好ましくは、(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエ  
 タノール(IGEPAAL(登録商標)CA-630)である。

#### 【0036】

当業者に理解されるように、生物学的流体に追加した界面活性剤の量は変更可能であり、  
 循環するmiRNAを含むことができる生物学的流体中の生物学的流体成分の同一性により  
 変更する。いくつかの実施形態では、生物学的流体中の界面活性剤の最終濃度は、約

10

20

30

40

50

0.001～約10%の範囲であり得る。一実施形態では、界面活性剤の濃度は、約0.001～約0.01%の範囲であり得る。別の実施形態では、界面活性剤の濃度は、約0.01%～約0.1%の範囲であり得る。さらに別の実施形態では、界面活性剤の濃度は、約0.1%～約1%の範囲であり得る。別の実施形態では、界面活性剤の濃度は、約1%から約5%の範囲であり得る。さらなる実施形態では、界面活性剤の濃度は、約5%～約10%の範囲とすることができる。

【0037】

(c) 抗miRNA結合タンパク質試薬

生物学的流体は抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させる。抗miRNA結合タンパク質試薬は、循環するmiRNAと会合したmiRNA結合タンパク質に、結合可能な任意の薬剤であり得る。循環miRNAと会合するmiRNA結合タンパク質は、miRNAと直接結合することができ、または、miRNAを含むRNA-タンパク質複合体と間接的に会合することができる。循環miRNAに会合できるmiRNA結合タンパク質の非限定的な例としては、アルゴノート、ダイサー、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)トランス活性化応答RNA結合タンパク質(TRBP:)、インターフェロン誘発性タンパク質キナーゼのタンパク質アクチベーター(PACT)、SMN複合体、脆弱X精神遅滞タンパク質(FMRP)、チューダーブドウ球菌ヌクレアーゼドメイン含有タンパク質(チューダ-SN)、推定されるDNAヘリカーゼMOV10、及び、RNA認識モチーフを含有するタンパク質TNRC6B、または、RISC複合体の他の成分、またはRISC複合体と一時的または持続的に会合する他の成分を含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、生物学的流体は、好ましくは抗アルゴノート試薬と接触させる。アルゴノートタンパク質の非限定的な例には、Ag01、Ag02、Ag03、及びAg04を挙げることができる。一実施形態において、生物学的流体は、抗Ag01試薬と接触させる。別の実施形態において、生物学的流体は、抗Ag02試薬と接触させる。更に別の実施形態において、生物学的流体は、抗Ag03試薬と接触させる。更なる実施形態において、生物学的流体は、抗Ag04試薬と接触させる。別の実施形態では、生物学的流体は、好ましくは、複数のアルゴノートタンパク質と結合することができる試薬と接触させる。例えば、生物学的流体は、抗Ag01及び抗Ag02試薬と接触させることができる。更に別の実施形態では、生物学的流体は、好ましくは、Ag01、Ag02、Ag03、及びAg04を結合することができる試薬と接触させる。

【0039】

抗miRNA結合タンパク質試薬は、エピトープ結合剤であってもよい。標的分子に応じて、適切なエピトープ結合剤の非限定的な例は、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、二本鎖DNA配列、修飾核酸、核酸模倣物、リガンド、リガンドのフラグメント、受容体、受容体断片、ポリペプチド、ペプチド、補酵素、共役因子、アロステリック分子、及びイオンからなるグループから選択される試薬が挙げられる。

【0040】

いくつかの実施形態では、エピトープ結合剤は、抗体である。使用することができる抗体の非限定的な例としては、ポリクローナル抗体、腹水、Fab断片、Fab'の断片、モノクローナル抗体、単鎖抗体、単ドメイン抗体、ヒト化抗体、及び抗体のエピトープ結合部位を含む他のフラグメントが挙げられる。

【0041】

いくつかの実施形態では、生物学的流体は、抗アルゴノート抗体と接触させる。一実施形態において、生物学的流体は、抗Ag01抗体と接触させる。別の実施形態において、生物学的流体は、抗Ag02抗体と接触させる。更に別の実施形態において、生物学的流体は、抗Ag03抗体と接触させる。別の実施形態において、生物学的流体は、抗Ag04抗体と接触させる。更なる実施形態において、生物学的流体は、抗Ag01、抗Ag02、抗Ag03、または抗Ag04抗体から選択される2つの抗Ag0抗体と接触させる。例えば、生物学的流体は、抗Ag01及び抗Ag02抗体と接触させる。更なる実施形

10

20

30

40

50

態において、生物学的流体は、抗Ago1、抗Ago2、抗Ago3、または抗Ago4から選択される3つの抗Agoの抗体と接触させる。更に別の実施形態では、生物学的流体は、4つのすべての抗Ago抗体と接触させる。更なる実施形態では、生物学的流体は、複数のアルゴノータンパク質を認識することができる抗体と接触させる。そのような抗体は、1つ、2つ、3つ、または4つのアルゴノータンパク質を認識することができる。一実施形態では、生物学的流体は、4つ全てのヒトアルゴノータンパク質を認識することができる抗アルゴノート抗体と接触させる。

#### 【0042】

生物学的流体を開示の抗miRNA結合タンパク質試薬に接触させて、免疫沈降したmiRNA複合体を形成する。そのようなとき、生物学的流体が固定された抗miRNA結合タンパク質試薬と接触したとき、抗miRNA結合タンパク質試薬は、通常、免疫沈降したmiRNA複合体を形成するために固体支持体に結合している。固体支持体は、抗miRNA結合タンパク質試薬の付着または会合のための適切な別個の個々の部位を含むように変更することができる材料であり得る。固体支持体材料の非限定的な例としては、ガラス、修飾化または機能化ガラス；アクリル樹脂、ポリスチレン、及び、スチレンと他物質とのコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、又は、テフロンJ、ナイロン、ニトロセルロース、ポリサッカライドを含むプラスチック；樹脂；シリカ、または、ケイ素、及び修飾ケイ素、炭素、金属、無機ガラス、及びプラスチックを含むシリカを基礎とする物質が挙げられる。固体支持体のサイズ及び形状は、本発明の範囲から逸脱することなく変更することができる。固体支持体は、平面であっても、  
固体支持体は、ウェル、すなわち、364個のウェルを有するプレートであってもよく、  
或いは、固体支持体は、ビーズまたはスライドであってもよい。いくつかの実施形態では、  
固体支持体は、複数壁を有するプレートのウェルである。他の実施形態では、固体支持体は、  
ピペットチップの内面である。更に他の実施形態では、固体支持体は、好ましくは、  
ビーズである。いくつかの実施形態では、固体支持体は、好ましくは、磁気ビーズである。

#### 【0043】

当業者により理解されるように、抗miRNA結合タンパク質試薬は、様々な方法で固体支持体に結合させることができる。抗miRNA結合タンパク質試薬及び固体支持体は、2つのその後の結合のために化学的官能基で誘導体化することができる。例えば、固体支持体は、アミノ基、カルボキシル基、オキソ基、またはチオール基を含む化学官能基で誘導体化することができるが、それに限定されない。これらの官能基を使用して、抗miRNA結合タンパク質試薬は直接的に官能基を用いて、または間接的にリンカーを用いて結合させることができる。或いは、抗miRNA結合タンパク質試薬は、また、非共有結合的に固体支持体に結合させることができる。例えば、ストレプトアビジンでコーティングされた固体支持体に共有結合で結合することができるビオチン化した抗miRNA結合タンパク質試薬を調製することができ、その結果、結合を生成する。固体支持体に抗miRNA結合タンパク質試薬を結合させる更なる方法は、当該技術分野で公知であり、そして、「Current Protocols in Molecular Biology」 Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003、または、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY、第三版、2001、などに公開された実験室マニュアルに記載されている。いくつかの実施形態では、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ固体支持体に共有結合で結合することができるビオチン化した抗miRNA結合タンパク質試薬が調製され、その結果、結合をもたらす。下記のセクションI(d)に記載する通り、抗miRNA結合タンパク質試薬は、本開示の方法では、生物学的流体を接触させる前に、固体支持体に結合させることができる。あるいは、本開示の生物学的流体は、抗miRNA結合タンパク質試薬と固体支持体を同時に接触させることができ、ここで、抗miRNA結合タンパク質

10

20

30

40

50

試薬は、固体支持体に結合する。本開示の生物学的流体は、また、固体支持体を生物学的流体に接触させる前に、抗miRNAの結合タンパク質試薬と接触させることができ、ここで、抗miRNA結合タンパク質試薬は、固体支持体に結合する。当業者が認識し得る通り、抗miRNA結合タンパク質試薬の量及び濃度は、抗miRNA結合タンパク質試薬の同一性、使用される生物学的流体の容量、生物学的流体中のmiRNAの濃度、及び、他の因子間でのmiRNA結合タンパク質に依存して変更することができ、変化し、そして、実験的に決定することができる。抗miRNA結合タンパク質試薬が精製した抗体である場合、約0.5～約10µgの抗体は、各0.2mLの血漿または血清サンプルのために使用することができる。

【0044】

(d) 生物学的流体の接触、及び、miRNAの単離

本開示の方法では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬を接触させる。当業者が認識する通り、生物学的流体は、本発明の範囲から逸脱することなく他の種々の薬剤を接触させることができる。例えば、生物学的流体は、miRNAの単離の間に、ジスルフィド結合の形成を遮断し、リボヌクレアーゼ活性を阻害するチオール還元剤を接触させることができる。好適なチオール還元剤としては、ジチオトレイトール(DTT)、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミン、及び、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)が挙げられる。生物学的流体は、また、消泡剤を接触させることができる。消泡剤の例としては、Antifoam 204、及び、Antifoam O-30、Antifoam A、Antifoam B、Antifoam C、Antifoam Y-30、及び、Sag 471が挙げられる。生物学的流体は、また、miRNA及びmiRNA-タンパク質複合体を保持するためにRNA及びタンパク質分解阻害剤と接触させることができる。

【0045】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、miRNAを単離するのに適したpHを維持するために使用することができる。非限定的な例として、緩衝剤は、トリズマ酢酸塩、EDTA、トリス、グリシン、及びクエン酸塩が挙げられるが、それに限定されない。

【0046】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、界面活性剤と生物学的流体を接触させて生物学的流体の成分を分離した後に、抗miRNA結合タンパク質試薬と生物学的流体を接触させて、免疫沈降したmiRNA複合体を形成することを含む。他の実施形態では、生物学的流体を界面活性剤と抗miRNA結合タンパク質試薬に同時に接触させる。

【0047】

いくつかの実施形態では、生物学的流体の未希釈サンプルは、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬を接触させる。他の実施形態では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬を接触させる前に希釈される。生物学的流体の希釈は、上記セクションI(a)に記載される。

【0048】

生物学的流体、界面活性剤、及び抗miRNA結合タンパク質試薬間の接触は、一般的に、免疫沈降したmiRNA複合体の形成を可能にするインキュベーション期間を含む。生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させることができ、そして、約1、5、10、15、30、45、60、90、120、240、480分、若しくはそれ以上インキュベートされる。いくつかの実施形態では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、そして、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または約15分インキュベートされる。他の実施形態では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または、約30分間インキュベートされる。更に他の実施形態では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、そして、約20、25、30、35、40、45、5

10

20

30

40

50

0、55、60、65、70、75、80、85、または、約90分インキュベートされる。他の実施形態では、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、約90、120、240、480分若しくはそれ以上インキュベートされる。一実施形態では、生物学的流体は、好ましくは、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させ、約20、25、30、35、40、45、50、55、または、約60分インキュベートされる。

【0049】

生物学的流体は、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29もしくは約30 またはそれ以上の温度で、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触させることができる。いくつかの実施形態では、生物学的流体は、約0、1、2、3、4、5、または約6 の温度で、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触される。他の実施形態では、生物学的流体は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または約15 の温度で、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触される。他の実施形態では、生物学的流体は、約11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または約25 の温度で、界面活性剤及び抗miRNAの結合タンパク質試薬を接触させる。更に、他の実施形態では、生物学的流体は、約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または約30 の温度で、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬と接触される。

【0050】

一般的には、生物学的流体は、界面活性剤及び抗miRNA結合タンパク質試薬を攪拌しながら接触させる。更に、一般的に、複合体を形成した後、免疫沈降したmiRNA複合体を単離するために、生物学的流体を除去し、免疫沈降したmiRNA複合体を洗浄することができる。

【0051】

(e) miRNAの放出

本開示の方法に基づき、miRNAは、免疫沈降したmiRNA複合体から放出される。そのようなタンパク質複合体からmiRNAのような核酸を放出する方法は、当該分野で公知であり、核酸-タンパク質複合体におけるプロテアーゼ消化、及びタンパク質の変性を含んでもよい。いくつかの実施形態では、miRNAは、タンパク質変性により、免疫沈降したmiRNA複合体から放出される。例えば、グアニジニウムチオシアネート-フェノール-クロロホルム溶液と免疫沈降したmiRNA複合体を組み合わせることにより、miRNAを免疫沈降したmiRNA複合体から放出させることができる。放出されたmiRNAは、その後、沈殿により、またはスピンカラムクロマトグラフィーを用いて精製することができる。

【0052】

他の実施形態において、miRNAは、好ましくは、プロテアーゼ消化により免疫沈降したmiRNA複合体から放出される。用語「プロテアーゼ」、「プロテイナーゼ」、及び「ペプチダーゼ」は、本明細書中で交換可能に使用され、そして、共有結合であるペプチド結合の加水分解を触媒する酵素群を指す。プロテアーゼ酵素は、当技術分野で公知であり、酸プロテアーゼ及びセリンプロテアーゼを含むことができる。いくつかの実施形態では、本開示の方法におけるmiRNAを放出するために使用することができるプロテアーゼは、酸プロテアーゼである。一実施形態では、本開示の方法におけるmiRNAを放出するために使用することができる酸プロテアーゼは、ペプシンである。

【0053】

他の実施形態では、本開示の方法におけるmiRNAを放出するために使用することができるプロテアーゼは、酸プロテアーゼである。セリンプロテアーゼの6個の属は同定され、その内最大の2つは、キモトリプシン様、及びサブチリシン様属である。サブチラーゼは、数多く知られている。広く研究されているいくつかのサブチラーゼは、サブチリシ

10

20

30

40

50

NDY、サブチリシンカールスバーグ、サブチリシンBPN' (また、ナガーゼと呼ばれる)、腸間膜ペプチダーゼ (mesentericopeptidase) を含む様々なバシルス属から、並びに、トリチラチウムアルブミンバー (Tritirachium album Limber) から得られるプロテイナーゼK、及びサーモアクチノミセス・ブルガリス (Thermoactinomyces vulgaris) から得られるテルミターゼを含む。本発明の特定の実施形態では、プロテイナーゼKは、プロテアーゼ酵素として好ましいものである。しかし、例えば、ナガーゼのような他のプロテアーゼ酵素も、特定の実施形態で使用することができる。プロテアーゼ酵素は、miRNAが放出されるように、免疫沈降したmiRNA複合体中のタンパク質を少なくとも部分的に分解をする多数のプロテアーゼのいずれかとすることができる。いくつかの実施形態では、本開示の方法におけるmiRNAを放出するために使用することができるプロテアーゼは、好ましくは、プロテアーゼKである。

10

**【0054】**

本質的に、miRNAは、プロテアーゼ酵素と複合体を接触させることにより免疫沈降したmiRNA複合体から放出される。当業者により理解されるように、miRNAを放出するために使用されるプロテアーゼの量は、プロテアーゼ、免疫沈降したmiRNA複合体の量、プロテアーゼ分解中の温度、分解のために使用される緩衝液条件及び分解の期間、その他の要素などに依存して変化し得る。一般的に、免疫沈降したmiRNA複合体は、約0.3単位の酵素活性から約30単位の酵素活性まで接触させることができる。特定の実施形態では、免疫沈降したmiRNA複合体と接触させるプロテアーゼの量は、約0.3~約1単位、約1~約3単位、約3~約10単位、または約10~約30単位の範囲とすることができる。

20

**【0055】**

いくつかの実施形態では、実施例1に記載の通り、室温でプロテアーゼ部分解を使用する。本明細書で使用する場合、用語「室温」は、約10~約30の温度を表すために用いられる。

**【0056】**

免疫沈降したmiRNA複合体は、約0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、もしくは約30分、またははそれ以上の間プロテアーゼと一緒にインキュベートすることができる。いくつかの実施形態では、免疫沈降したmiRNA複合体は、約0.5、1、2、3、4、または約5分間、プロテアーゼと一緒にインキュベートされる。他の実施形態では、免疫沈降したmiRNA複合体は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または、約15分間、プロテアーゼと一緒にインキュベートされる。更に他の実施形態では、免疫沈降したmiRNA複合体は、約15、16、17、18、19、20、25、もしくは約30分間、またはそれ以上、プロテアーゼと一緒にインキュベートされる。

30

**【0057】**

放出されたmiRNAは、更に精製することなく下流操作での使用に適切であり得る。或いは、放出されたmiRNAは、下流操作での使用のために更に精製することができる。スピンカラムクロマトグラフィーまたは濾過技術のような核酸精製の方法は、当技術分野で公知であり、例えば、「Current Protocols in Molecular Biology」 Ausubel et al.、John Wiley & Sons、New York、2003、または、Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Sambrook & Russell、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY、3rd edition、2001などの、公開された実験室マニュアルに記載された方法に従う。

40

**【0058】**

放出されたmiRNAの下流操作の用途は、異なる場合がある。放出されたmiRNA

50

の非限定的の用途としては、定量リアルタイムPCR、マイクロアレイ解析、配列決定、制限断片長の多型(RFLP)分析、単一ヌクレオチドの多型(SNP)分析、マイクロサテライト分析、短いタンDEM反復(STR)分析、及び比較ゲノムハイブリダイゼーション(CG H)が挙げられる。

【0059】

II. キット

本発明は、更に、界面活性剤、抗miRNA結合タンパク質試薬、及び本開示の方法において使用することができる他の試薬を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、生物学的流体からmiRNAを単離するために提供され、ここに、キットが抗miRNA結合タンパク質試薬及び界面活性剤を含む。抗miRNA結合タンパク質試薬及び界面活性剤は、上記のセクション(I)に記載の通りであり得る。いくつかの実施形態において、キットにおける抗miRNA結合タンパク質試薬は、固体支持体に結合した抗Ag o抗体である。特定の実施形態では、固体支持体は、ビーズ、磁気ビーズ、またはマルチウォールを有するプレートのウェルであり得る。更に他の実施形態では、固体支持体は、ピペットチップの内面であってもよい。いくつかの実施形態では、キット内の界面活性剤は、IGE PALである。キットは、更に、免疫沈降したmiRNA複合体からmiRNAを放出するための手段を含んでもよい。いくつかの実施形態では、キットは、免疫沈降したmiRNA複合体からmiRNAを放出するため、プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼKを含む。

【0060】

定義

特に別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語の意味は、一般的に、本発明が属する当業者により理解される意味を有する。下記の参考文献は、本発明で使用される用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第二版、1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 及び、Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される通り、下記の用語は、特に指示のない限り、それらに属する意味を有する。

【0061】

それらの本開示または好ましい態様(単数若しくは複数)の要素を導入するとき、冠詞「a」、「an」、「the」及び「said」は、1つ若しくはそれ以上の要素が存在することを意味する。用語「含有する(comprising)」、「含む(including)」及び「有する(having)」は、包括的であり、そして、列挙された要素以外の追加の要素が存在し得ることを意味することを意図している。

【0062】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA」または「miRNA」は、生物学的サンプル中で検出することができ、5~40ヌクレオチド長の小さな非コードRNA配列を意味する。いくつかのmiRNAは、ヘアピン構造の前駆体から、例えば酵素ダイサーにより処理されて、例えば約18~25ヌクレオチド、好ましくは21~23ヌクレオチドの成熟miRNAに誘導される。マイクロRNAの変異体は、例えば、異なる動物種間では一般的である。また、miRNAの5'及び3'末端での変異は一般的であり、そして、成熟過程の間、ダイサーなどの酵素による不正確な切断の結果であり得る。これらの変異体は、機能またはmiRNA(単数若しくは複数)を検出能が損なわれていない、miRNAの配列に許容される変異の範囲を示す。別タイプの変異体は、miRNA(それらはヒトゲノムと一致しないので、非鋳型である)の3'末端に非鋳型ヌクレオチド(単数

10

20

30

40

50

若しくは複数)をダイサー処理後に付加したものである。最も一般的な変異体は、3'末端に付加した余分なAまたはUを有するmiRNA配列である。

【0063】

本明細書で使用する用語「生物学的流体」又は「生体流体」は、互換的に使用でき、そして、対象から単離された流体を指す。

【0064】

用語「生物学的流体」、「生物学的流体サンプル」または、「生物学的サンプル」は、互換的に使用することができ、そして、任意の対象から単離された全ての生物学的流体及び排泄物を指す。本発明の文脈において、そのようなサンプルとしては、血液及びその画分、血清、血漿、尿、排泄物、精液、精液流体、精漿、前立腺液、プレ射精液(カウパー液)、胸水、涙、唾液、痰、汗、生検液、腹水、脳脊髄液、羊水、リンパ液、骨髓液、子宮頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜の分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、乳房分泌物、卵巣嚢腫の分泌物、及び組織液サンプルを含むが、それに限定されない。

10

【0065】

「単離された」ポリヌクレオチドは、本来の供給源に付随している少なくとも1つの夾雑物から同定され、分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、本来見られる形態または状態ではない。単離された核酸分子は、したがって、本来の細胞中に存在する特定の核酸分子とは区別される。

【0066】

様々な変更が本発明の範囲から逸脱することなく、上記の動物、細胞及び方法において実施できるので、上記の説明及び下記の実施例に含まれる全ての事項は、例示として、かつ限定的な意味で解釈されるべきである。

20

【実施例】

【0067】

下記の実施例は、本開示を提示するために含まれる。当業者は、下記の実施例で開示した技術は、本開示の実施において十分に機能するために本発明者らにより発見された技術を表していることを認識すべきである。当業者は、しかしながら、本開示に照らして、多くの変更が本開示で実施され、そして本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく同様の、または、類似の結果を得ることができることを理解すべきであり、従って、全ての記載された事項は、例示として、かつ限定的な意味で解釈されるべきである。

30

【0068】

実施例1：一般的なmiRNA単離手順。

循環するmiRNAを単離するために使用する代表的な手順は、小胞会合のmiRNAを放出するために、界面活性剤の存在下でRNA免疫沈降(RIP)を実施することを含む。この手順において、miRNAは、フェノール、カオトロップ、またはカラム精製を使用することなく他のRNA、血漿タンパク質などの他の細胞成分から分離され、そして、40~70分間で完了する。

【0069】

手順は3段階より成る：

- 1) 血漿成分を、界面活性剤で処理する；
- 2) miRNA/タンパク質複合体を免疫沈降し；及び
- 3) mRNAを、免疫沈降したmiRNA複合体から放出する。

40

【0070】

プロテインA(Sigma-Aldrich社、GE28-9670-56)、プロテインG(Sigma-Aldrich社、GE28-9670-66)、またはストレプトアビジン(Sigma-Aldrich社、GE28-9857-38)ビーズは、20µLの磁気ビーズ(10%スラリー)を、0.1mLのRIP洗浄緩衝液(50mMのTris-HCl(pH7.4)、0.05%のIGEPAL(登録商標)CA-630)に移し、一度RIP洗浄緩衝液でビーズを洗浄し、溶液からビーズを分離するための磁気スタンドを用いることにより、抗Ago抗体でコートされる。2.5~10µgの非ビ

50

オチン化、または、ビオチン化抗Ago (Sigma - Aldrich社、SAB4800048)、抗Ago2 (Sigma - Aldrich社、SAB4200085)、または、抗Ago1 (Sigma - Aldrich社、SAB4200084)抗体を添加する前に、洗浄した磁気ビーズを0.1mlのRIP洗浄緩衝液に再懸濁した。ビーズ及び抗体を室温で約30分間回転しながらインキュベートした。次いで、ビーズを、磁気スタンドを用いて溶液から分離した。抗体ビーズは、その後、0.5mlのRIP洗浄緩衝液で2回洗浄した。

#### 【0071】

miRNAの単離方法の第1工程において、0.2mlの血漿、8µlの25% IGE PAL CA - 630液 (Sigma - Aldrich社、I8896; 40µlの25% IGE PAL/mlの血漿、最終濃度1%にするため); 2µlのプロテアーゼ阻害剤カクテル (PIC; Sigma - Aldrich社、P8340; 10µl/mlの血漿); 及び0.8µlのRNase阻害剤 (Sigma - Aldrich社、R1158; 4µl/ml血漿)を、調製したAgo抗体ビーズに加えた。更に、血漿は、ビーズを調製する間に界面活性剤及び阻害剤で処理してもよく、事前処理された血漿は、その後、抗体ビーズに添加された。

10

#### 【0072】

第2工程において、室温で1時間、または、4で一晩、サンプルを回転させながらインキュベートすることにより、miRNA/タンパク質複合体を免疫沈降させた。ビーズを1mlの洗浄RIP緩衝液で5回洗浄し、上清液からビーズを分離するために磁気スタンドを用いて収集した。ビーズは簡単に遠心分離し、磁気スタンドに戻して残余の上清を除去することができる。

20

#### 【0073】

第3の工程において、抗体ビーズと会合する沈降したmiRNAは、Sigma - Aldrich社のImprint RNA Immunoprecipitation Kit (RIP)用の技術書類に記載されている通りに、TRI Reagent (登録商標) BD、または、QIAzol溶解試薬での抽出に続いて酢酸アンモニウム及び線状アクリルアミド (linear acrylamide) によるイソプロパノール沈殿、により、タンパク質複合体及びビーズから放出され、又は、Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kitで精製された。或いは、好ましくは、miRNAは、プロテイナーゼK分解により放出された。20µlのプロテイナーゼKミックス (14µlの水、2µlの10xプロテイナーゼK放出緩衝液、及び4µlのP4850プロテイナーゼK)は、工程2からビーズに添加し、そして、Vortex genie 2のミキサーの設定4で、10分間、室温でインキュベートした。10xプロテイナーゼK放出緩衝液は、100mMのTris (pH8.0); 15mMのMgCl<sub>2</sub>; 500mMのKCl; 100mMのDTT; 及び1%のIGE PALを含む。インキュベート後、直ちに、ビーズを磁気スタンド上に配置して除去し、新しいチューブに遊離miRNAを含む上清液を移した。上清液中のプロテイナーゼKを、5分間、95でサンプルをインキュベートすることにより不活性化した。特定のmiRNAは、10µlのポリAテーリング反応当たり、各miRNA調製液の5µLを使用して、Sigma - Aldrich社のMysticq RT-qPCRアッセイで検出した。合成miRNA、すなわち、miRBaseに記載されている成熟miRNAと同じ配列を有する一本鎖のRNAは、0.02mg/mlの線状アクリルアミド (linear acrylamide) 中で、260nmにおけるストック溶液の吸光度に基づいて既知のコピー数に希釈し、血漿から調製したmiRNAと並行してアッセイし、そして、絶対定量のための標準として使用した。

30

40

#### 【0074】

実施例2：血漿からのmiRNAの免疫沈降は、Tri試薬単独よりも効率的である。

RNA免疫沈降 (RIP) を使用して、血漿からのmiRNA分離の効率は、TRI Reagent (登録商標) BD (Sigma - Aldrich社) を使用したmiRN

50

Aの分離と比較した。TRI Reagent (登録商標) BDは、血清、血漿又は全血のような血液製剤からRNA、DNA及びタンパク質を同時に単離するのに使用する試薬である。

【0075】

TRI Reagent (登録商標) BDを用いたmiRNAの単離は、製造業者の指示に従い実施した。要するに、0.2mlの血漿をTRI Reagent (登録商標) BDと混合し、そしてmiRNAを、相分離のためにクロロホルムを用いて抽出した後に、酢酸アンモニウム及び線状アクリルアミド (linear acrylamide) の存在下でイソプロパノール沈殿させ、及び分析のためRNAを洗浄した。RIPを使用したmiRNAの単離は、20µlのプロテインA磁気ビーズに結合した2.5µgの抗Ago2抗体を用いて実施した。miRNAは、直接的な血漿抽出に関しては、TRI Reagent (登録商標) BDでの抽出及び酢酸アンモニウム及び線状アクリルアミド (linear acrylamide) の存在下でのイソプロパノール沈殿により、ビーズから回収した。

10

【0076】

調製したサンプル中のlet-7a-5p、miR23a-3p、miR191-5p、miR142-3p、及びmiR451aのmiRNAレベルは、定量的なリアルタイムRT-PCRにより決定した。血漿からのmiRNAのRIPは、TRI Reagent (登録商標) BDよりも、約5～約600倍効果的に高かった(図1)。

【0077】

実施例3. RIP収量は市販キットの収量と類似する。

RNA免疫沈降(RIP)を用いる血漿からのmiRNA単離の効率を、Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)を用いるmiRNAの単離と比較した。Qiagen社のmiRNeasyは、選択的にDNAまたはRNAに結合するシリカ樹脂を含むスピンカラムを採用しており、0.2mlの血清または血漿からのmiRNAの単離が推奨されている。

20

【0078】

Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kitを用いたmiRNAの単離は、製造者の指示に従って実施した。要するに、0.2ml血漿をQIAzol試薬と混合させ、そして、miRNAは、提供されたスピンカラムを使用して水層から精製した。RIPを使用したmiRNAの単離は、2.5µgの抗Ago2抗体が結合した20µlのプロテインA磁気ビーズで実施した。miRNAはQIAzol試薬を有するビーズから放出され、そして直接的な血漿抽出に関して、Qiagen社のキットを用いて精製した。

30

【0079】

調製された試料中のlet-7a、miR23a、miR191、miR142、及びmiR451aのmiRNAレベルは、定量リアルタイムのRT-PCRにより決定した。RIPを使用するmiRNAの収量は、Qiagen社のキットのみ使用したmiRNAの収量と同様であった(図2)。

【0080】

実施例4. ビオチン化及び非ビオチン化抗Ago抗体並びにストレプトアビジンビーズを使用したRIPの比較。

プロテインA及びプロテインGビーズの両方は、血漿において非常に豊富にあるヒトIgGを結合する。IgGとの共単離を避けるために、抗Ago(クローン2A8)及び、抗Ago2(クローン11A9)抗体を、ストレプトアビジンビーズでのRIPのために、Pierce EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチン(Thermo Scientific社)でビオチン化した。Ago-RIPは、2.5µgのビオチン化抗-Ago2(b-Ago2)もしくは抗-Ago(b-Ago)抗体と20µlのストレプトアビジンの磁気ビーズ、または2.5µgの非ビオチン化抗-Ago2抗体と20µlのプロテインAビーズを用いて実施した。ビオチン化抗Ago2(b-A

40

50

g o 2 ) 抗体及びストレプトアビジンビーズでの R I P は、プロテイン A ビーズを有する抗 A g o 2 抗体による R I P と同様の m i R N A の収量を与えた ( 図 3 参照 ) 。 ビオチン化抗 A g o での R I P は、非ビオチン化抗 A g o とプロテイン A ビーズと比較して、有意に低い m i R N A 収量をもたらした。

#### 【 0 0 8 1 】

実施例 5 . R I P を使用して単離した m i R N A の加熱は、収量に悪影響を与える。

R I P の後に m i R N A を放出させる手段としてヌクレアーゼフリーの水での加熱を検討した。 A g o - R I P は、プロテイン A 磁気ビーズ上で 2 . 5 μ g の非ビオチン化抗 A g o 若しくは抗 A g o 2 抗体のいずれかと 0 . 2 m l の血漿を用いて、または、ストレプトアビジン磁気ビーズ上でビオチン化抗 A g o 若しくは抗 A g o 2 抗体のいずれかと 0 . 2 m l の血漿を用いて実施した。 1 4 μ l のヌクレアーゼフリーの水をビーズに加え、そして、これらの混合物を 4 0 、 5 0 、 または 6 0 で 2 分間加熱した後にビーズを除去した。 R I P 後の加熱による m i R N A 放出は、 Q i a g e n 社の m i R N e a s y S e r u m / P l a s m a K i t で精製した m i R N A 、 及び Q i a g e n 社のキットで血漿から直接精製した m i R N A と比較した。合成 c e l - m i R - 3 9 - 3 p ( 1 . 4 e 8 コピー数 ) は、 Q i a g e n 社製品での調製用に Q I A z o l を添加した後、または、 R I P 後ビーズに加えられた水にスパイクした。

#### 【 0 0 8 2 】

合成 c e l - m i R - 3 9 - 3 p のスパイクは、ビーズ上の R I P 生成物を用いた 6 0 、 2 分後条件では検出されなかった ( 図 4 ) 。 内因性 m i R N A も、 4 0 、 5 0 または 6 0 、 2 分後の条件で検出されなかった。同様の結果が、 m i R 2 3 a 、 m i R 1 4 2 、 m i R 1 9 1 、 及び m i R 4 5 1 a で観察された。サンプルを 5 0 または 6 0 に加熱したとき、 l e t 7 a m i R N A も失われた。 m i R N A の損失は、 R N a s e の R I P に伴うキャリアオーバー汚染に起因する可能性が高い。何故ならば、血液は、非常に高いレベルの R N a s e を含むことが知られているからである。

#### 【 0 0 8 3 】

実施例 6 . プロテナーゼ K 分解を用いた m i R N A の放出。

プロテイナーゼ K 分解は、 A g o - R I P 後、 m i R N A を放出するための手段として試験した。 R I P は、 0 . 2 m l の血漿と、 2 0 μ l のストレプトアビジン磁気ビーズに結合した 2 . 5 μ g のビオチン化抗 A g o 2 抗体を用いて実施した。 R I P 後、ビーズは 4 μ l のプロテイナーゼ K ( S i g m a - A l d r i c h 社 P 4 8 5 0 ) を含む分解緩衝液 ( 2 0 μ l の 1 0 m M T r i s - H C L 、 p H : 8 . 0 、 1 . 5 m M M g C l 2 、 5 0 m M K C l 、 1 0 m M D T T 、 0 . 1 % の I G E P A L ) で、室温若しくは 3 7 ° C で 1 0 分間攪拌して、または 6 5 ° C で 2 分間攪拌してインキュベートした。ビーズを除去後、プロテイナーゼ K を 9 5 ° C 、 5 分間で不活性化し、そして、 5 μ l の各々のプロテイナーゼ K の分解物を 1 0 μ l のポリ A - テーリング反応物に加え、 S i g m a - A l d r i c h 社の M y s t i C q R T - q P C R アッセイで特定の m i R N A を検出した。比較のために、同時調製した R I P 後のビーズを Q I A z o l 溶解試薬で抽出し、 m i R N e a s y S e r u m / P l a s m a を用いて精製した ( 「トータル」を 1 0 0 % に設定 ) 。 R I P - プロテイナーゼ K から m i R N A レベルを、 R I P から m i R N A レベル ( m i R N A は R N e a s y キットを用いて放出された ) と比較して表した。

#### 【 0 0 8 4 】

室温でのプロテイナーゼ K 分解を使用した m i R N A の放出は、より高い温度での放出よりも多くの m i R N A をもたらした ( 図 5 ) 。 全ての場合において、トータルの m i R N A のかなりの量が失われた。損失は、サンプル中の残留 R N a s e に起因する可能性が最も高いものであった。

#### 【 0 0 8 5 】

同様の実験をプロテイナーゼ K の代わりに、 p H 2 、 3 または 4 の緩衝液中でペプシン消化を用いて実施し、 m i R N A を放出させた。ペプシンを用いた m i R N A の放出により、 1 % 未満の m i R N A を回収した ( データは示されていない ) 。

10

20

30

40

50

## 【0086】

実施例7．生物流体からのmiRNA抽出のための他の方法とRIPの比較。

miRNAは、実質的に実施例6に記載する通り、ビオチン化抗Ago2及びストレプトアビジン磁気ビーズ並びにプロテイナーゼKを用いて単離される。比較のために、miRNAは、また、Exiqon社からのmiRCur(登録商標)RNA Isolation Kit-biofluidsを用いて、または、Qiagen社からのmiRNeasy Serum/Plasma Kitを用いて、直接的に血漿から精製した(図6)。これらのデータは、Exiqon社のキットを用いて精製したRNAからの、let7aのmiRNA収量が、Qiagen社のキットを用いて精製したものよりも3~4倍高いことを示した。Ago-RIPとプロテイナーゼKによる放出を使用して調製したmiRNA収量は、ほとんどの実験においてExiqon社のキット及びQiagen社のキットの間であった。let7aの結果を図6及び図7に示すが、miR23a、miR142、及びmiR191の結果も同様であった。一方、miR451aの収量は、Ago-RIP及びExiqon社のキットで同様であった。miR451aは、成熟miRNAに処理するためのAgo2スライサー活性を必要とし、従って、Ago2複合体でのみ発生することができる。その他のmiRNAは、Ago2に加えてAgo1、Ago3またはAgo4に会合することができる。用いられる抗体はAgo2に特異的であるため、他のすべての成熟したmiRNAの単離よりも効率的にmiR451aは分離する。

10

## 【0087】

実施例8．プロテアーゼ阻害剤及びRNase阻害剤有り無しでのRIP。

Ago-RIPは、プロテアーゼ阻害剤及びRNase阻害剤の存在下(+inh)、または、非存在下(-inh)で、miRNAを単離するために使用され、そしてmiRNAは、プロテアーゼKを用いてビーズから放出された。阻害剤の存在下で行われるAgo-RIPは、阻害剤で処理しなかったサンプルよりも多くのlet7a miRNAをもたらした。同様の結果がmiR191について見出された。miR451aには有意な差異はなかった(図8)。

20

## 【0088】

阻害剤の有り無しでのIGEPALによる血清の前処理も実施し(+pre)、そして、抗体ビーズの添加と同時に、阻害剤の有り無しでIGEPALを添加した場合(-pre)と比較した。結果は、プロテアーゼ及びRNase阻害剤による血清の前処理は、同時処置の場合と比較して、let7aまたは、miR451aのいずれの収量も改善しなかったことを示す(図8)。

30

## 【0089】

実施例9．界面活性剤の有り無しでのmiRNA回収量。

miRNAの単離に関して界面活性剤の効果を決定するために、Ago-RIPは、IGEPAL界面活性剤の存在下または非存在下で、10µgのビオチン化抗Ago2抗体/ストレプトアビジン磁気ビーズを使用して(0.2mlの血漿を用いて)実施した。これは、界面活性剤の非存在下で単離されたいずれのmiRNAも、遊離型であり(即ち、小胞内に存在せず)、そして界面活性剤の存在下で単離されたいずれのものも、小胞性であると仮定した。トータルmiRNAは、IGEPALで処理した血漿から回収されたmiRNAのレベルであり、それを100%に設定した。(miRNAが小胞と会合していない)遊離型のmiRNAは、IGEPALで処理されなかった血漿から回収されたmiRNAのレベルであった。小胞会合のmiRNAは、全miRNAサンプル中のmiRNAのレベルから遊離型miRNAサンプル中の該miRNAのレベルを差し引いたものとして計算された。図9は、let7a、miR23a、miR142、及びmiR451aのmiRNAの遊離型、及び、小胞会合のレベルを示す。これらの結果は、界面活性剤処理が、いくつかのmiRNAをRIPにより血漿から効果的に回収するのに望ましい場合があることを示している。

40

## 【0090】

50

実施例10. RIPはスケールアップ可能である。

RIPは、0.2mlの血漿及び10µgのビオチン化抗Ago2/ストレプトアビジンビーズまたは、0.4mlの血漿及び20µgのビオチン化抗Ago2/ストレプトアビジンビーズに続いてプロテイナーゼK分解による放出を用いて実施される。比較のために、miRNAは、Exiqon社のmiRCury RNA Isolation Kit - biofluidsにより、0.2mlの同一血漿から単離した。それぞれの調製法で回収したlet7a、miR191、及びmiR451aのトータルの収量は、図10に示されている。Ago-RIPにより、2倍の血漿(即ち、0.4ml対0.2ml)は、試験されたmiRNAの1.5-2倍をもたらしたが、一方カラムベースのキット(Exiqon社、及び、Qiagen社からのものなど)は、容量が制限されており、せいぜい0.2mlの血漿の使用が推奨される。

10

【0091】

実施例11. RIPのための最小インキュベート及び洗浄時間。

RIPは、0.2mlの血漿及び5µgのビオチン化抗Ago2/ストレプトアビジンビーズを用いて実施し、5、15、30、または60分間、室温で回転させながらインキュベートした。5、15または30分間インキュベートされたものは、インキュベートが完了した後、全て5回洗浄した。60分間インキュベートされたものは、RIP洗浄緩衝液で、5、4、3、2、1回洗浄した。全て、プロテイナーゼKで放出される。let7aの収量は、図11に示されている。結果は、最大のmiRNA回収のためには使用した条件(例えば、抗体及びビーズの種類及び量)下で、15分超のインキュベート時間が必要であることを示すが、Sigma-Aldrich社のMysticqアッセイ(ポリAテーリング、RT、qPCR)を使用したmiRNA検出の前に、1回のみ洗浄が必要とされる。同様の結果が、miR122、miR191、及びmiR451aについて得られた。

20

【0092】

実施例12. RIPは、miRNAに特異的である。

次の実施例は、Ago-RIPが、miRNAに対して特異的であるかどうか、または、Ago-RIPが、また、他のRNAを単離するかどうかを決定するために実施された。単離は、Ago-RIP(S)、Exiqon社のmiRCury RNA Isolation Kit - biofluids(E)、または、Qiagen社のmiRNeasy Serum/Plasma Kit(Q)を用いて、0.2mlの新鮮な血漿(実験1及び2)、または、0.2mlの冷凍血漿(実験3)から実施した。実験1は、2.5µgのビオチン化抗Ago2抗体/20µlのストレプトアビジンビーズを用いて実施した。実験2及び3は、2.5µgのビオチン化抗Ago2抗体/20µlのストレプトアビジンビーズを用いて実施した。実施例6で上述したように、プロテイナーゼK分解は、実質的にビーズからmiRNAを放出するために使用された。特定のmiRNA(例えば、let7a)、及び、特定の小核または核小体のRNA(例えば、RNU6、または、SNORD48)は、Mysticq RT-qPCRのアッセイを用いて検出し、及びより長いmRNAまたはrRNA(例えば、GAPDH、RN18S、RN28S)は、KiCqStart(登録商標)RT-qPCR(Sigma-Aldrich社)のアッセイを用いて検出した。HeLa細胞からのトータルRNA(TRI Reagent(登録商標)BDを用いて単離した)は、定量標準として使用した。

30

40

【0093】

予想されるように、例えば、let7aなどのmiRNAは、Ago-RIP、または、いずれかのカラムベースのキットを使用して単離した(図12A参照)。しかし、他の低分子RNA、または、より高分子のRNAは、Ago-RIPにより単離されなかったが、Exiqon社、及び、Qiagen社のキットにより単離された。図12B及び図12Cに示す通り、RNU6、SNORD48、GAPDH、RN18S、または、RN28SのRNAsは、ほとんど、或いは全くAgo-RIPを使用して単離できなかったが、これら他のタイプのRNAは、Exiqon社、及び、Qiagen社のキットを用

50

いて単離された。したがって、Ago-RIPは、具体的にはmiRNAのみを分離する。

【0094】

実施例13．抗Ago1及び抗Ago2抗体の両方の使用は、RIPの収量を増加させる。

異なるmiRNAは異なるAgoタンパク質に会合するので、特定のmiRNAの収量は、異なるAgoタンパク質に対する抗体を併用することにより改善される可能性がある。従って、miRNAは、10µgの抗Ago1抗体/20µlのプロテインAビーズ、10µgの抗Ago2抗体/20µlのプロテインAビーズ、または、各タイプの抗体ビーズの1:1混合物20µlを使用して、0.2mlの血漿から単離された。実質的に実施例3で上述した通り、ビーズからのmiRNAの放出は、QIAzol溶解試薬を用いて行い、Qiagen社のキットで精製した。特定のmiRNA(例えば、let7a、miR142-3p、miR122、miR191、及びmiR451a)は、MysticqRT-qPCRアッセイを用いて検出した。

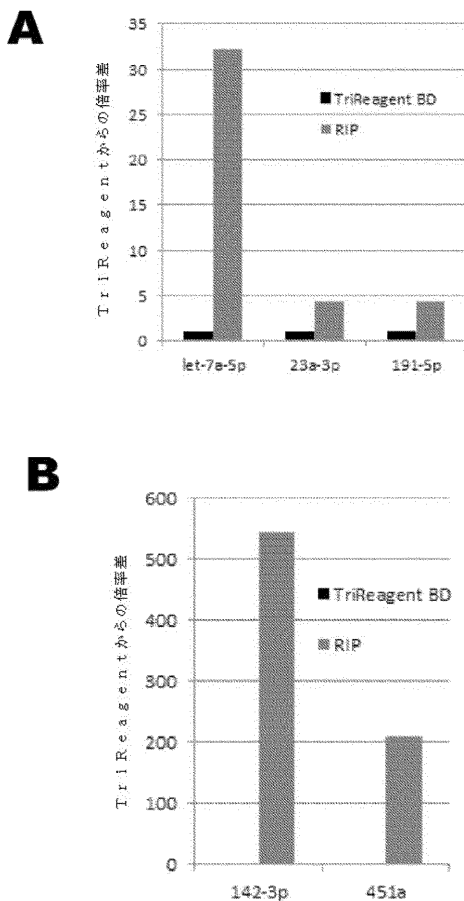
10

【0095】

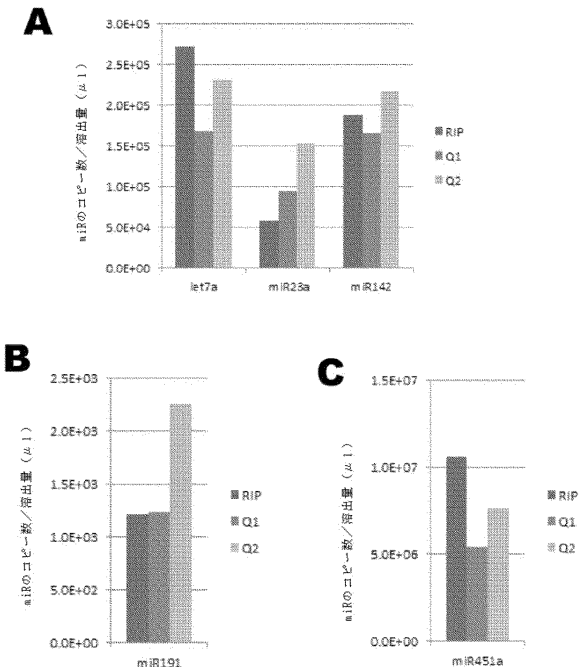
図13に示すように、抗体を一緒に用いるときの収量は、各抗体を別々に使用したときの合計とほぼ同じであった。ほとんどのmiRNAに対しては、抗Ago2の使用は、抗Ago1の使用よりも大きい収量をもたらした。しかし、抗Ago1を使用した場合、より多くのmiR122が回収され、それは、Turchinovich et al., 2012, RNA Biology 9(8):1066-75の報告と一致していた。また、実施例7で前述したように、miR451aは、抗Ago2のみを用いて回収された。

20

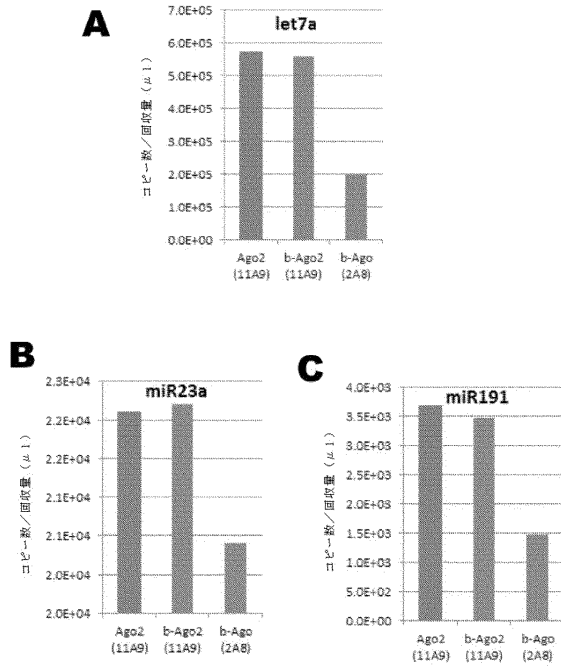
【図1】



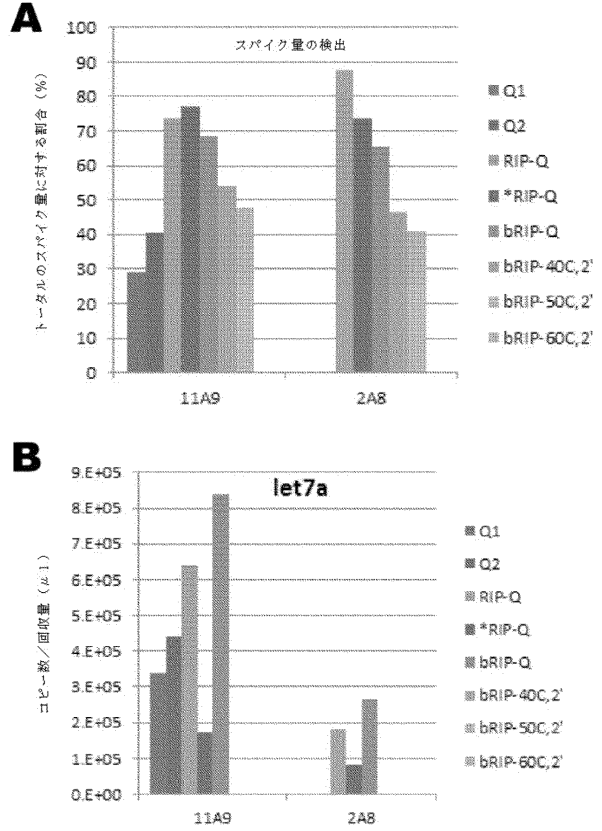
【図2】



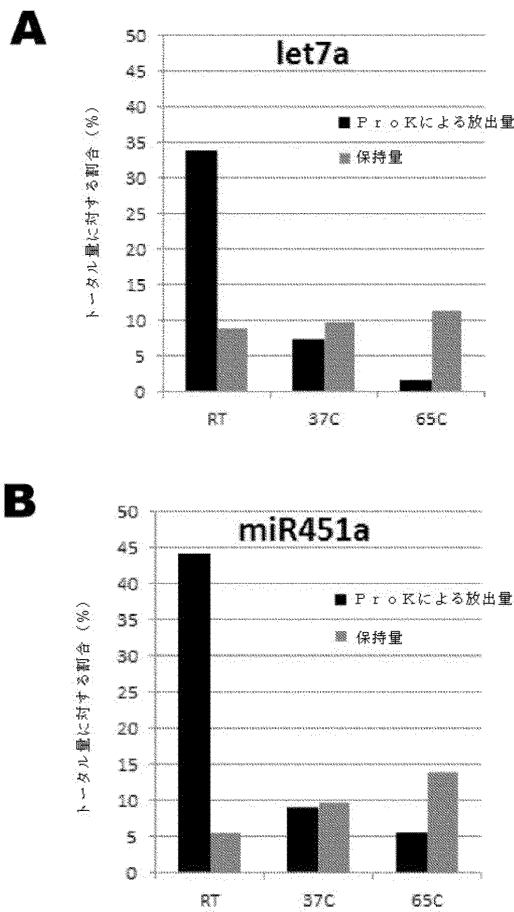
【 図 3 】



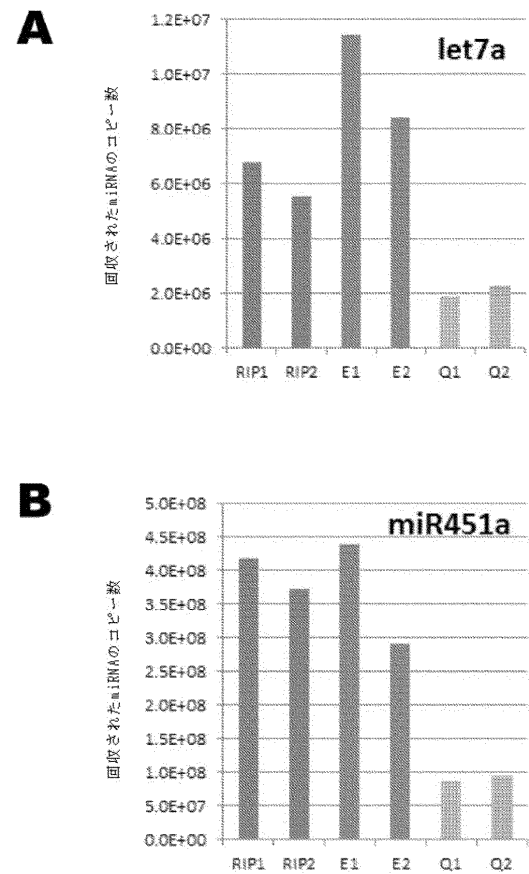
【 図 4 】



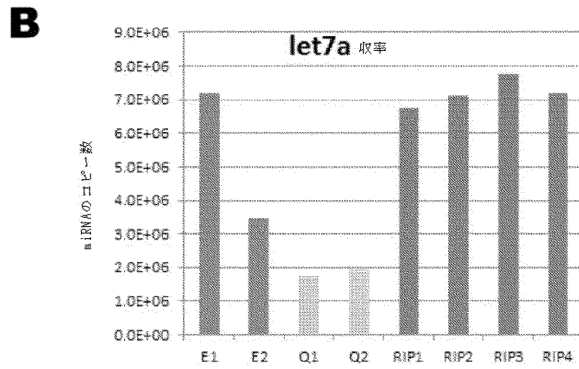
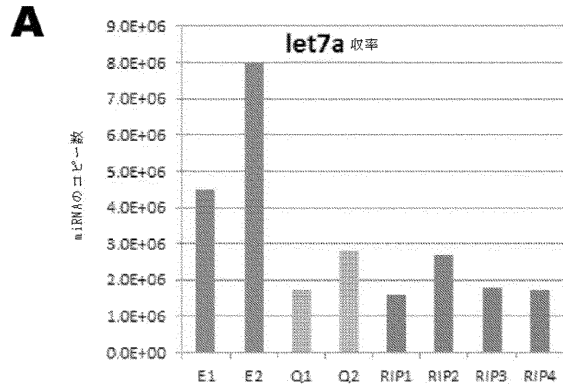
【 図 5 】



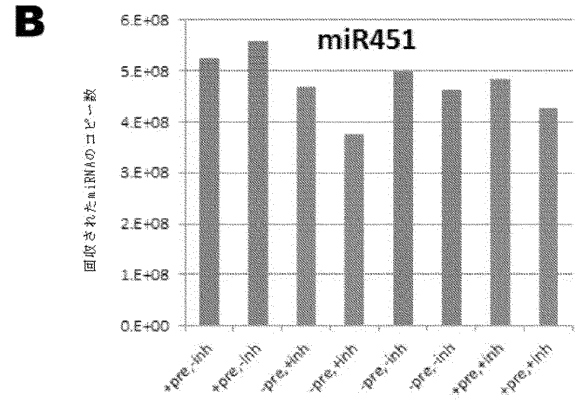
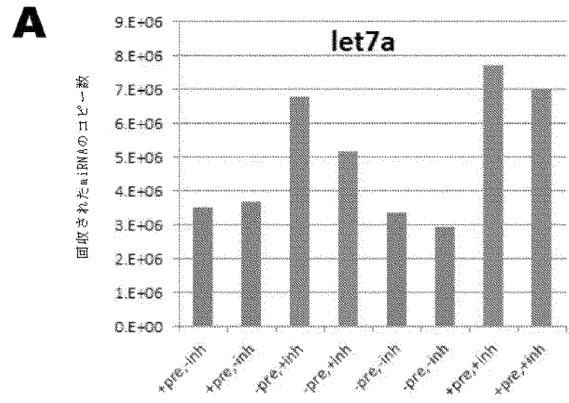
【 図 6 】



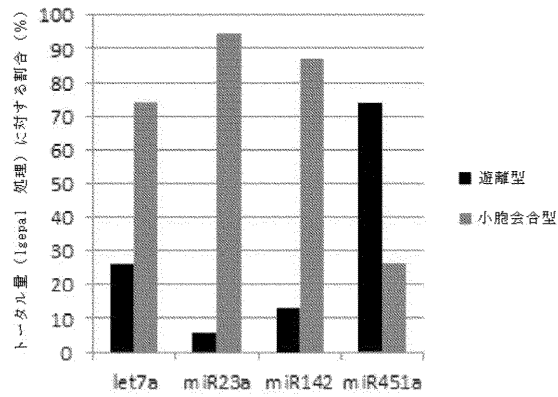
【 図 7 】



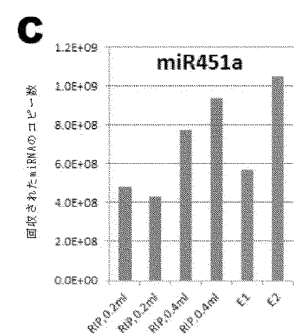
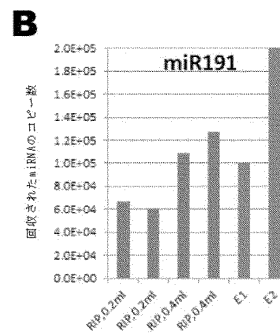
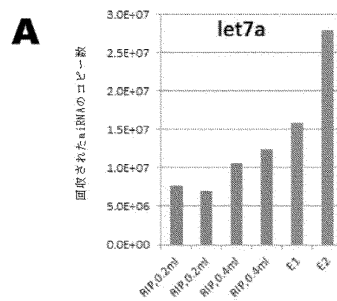
【 図 8 】



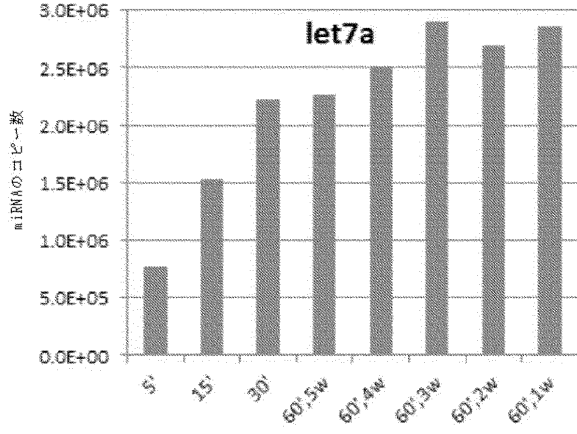
【 図 9 】



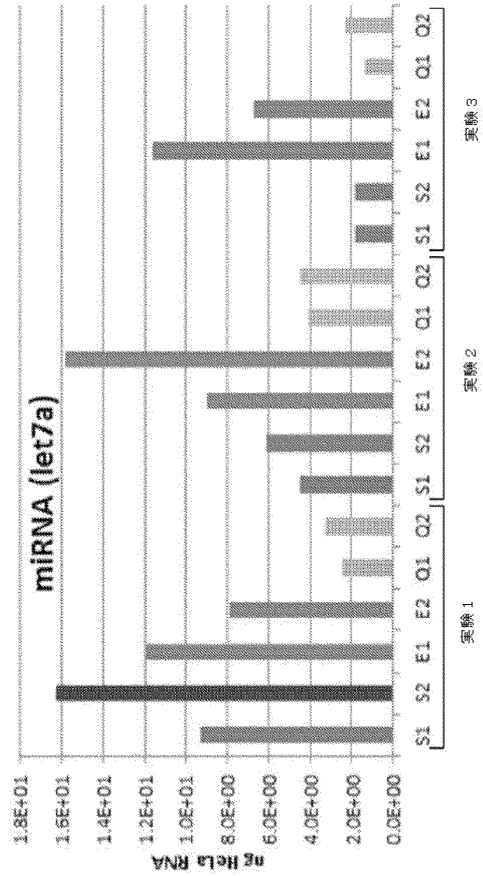
【 図 10 】



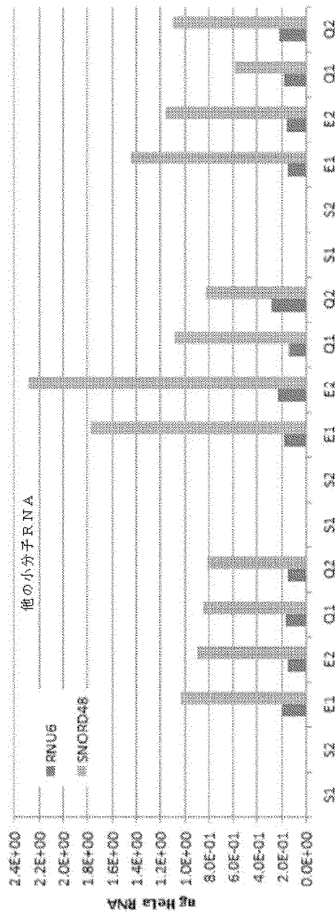
【 1 1 】



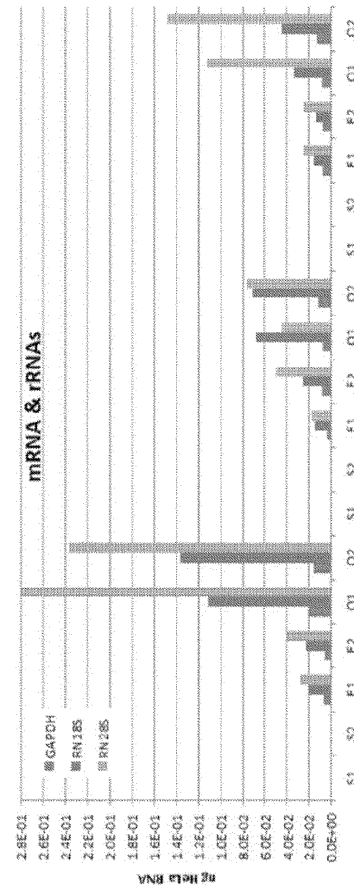
【 1 2 A 】



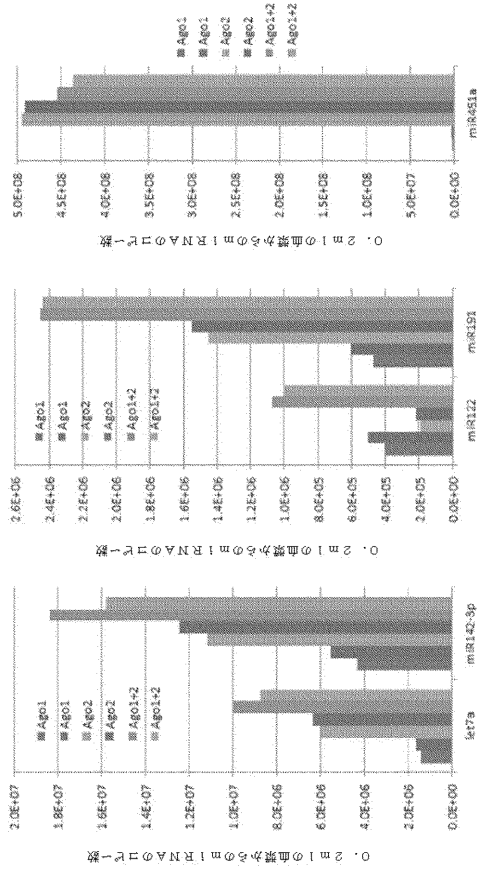
【 1 2 B 】



【 1 2 C 】



【 図 13 】



## フロントページの続き

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 キャロル・クリーダー

アメリカ合衆国63103ミズーリ州セントルイス、スプルース・ストリート3050番、シグマ  
- アルドリッチ・カンパニー・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/039395(WO, A1)

特開2009-148243(JP, A)

Nucleic Acids Res., 2012年, vol.40, no.19, pp.9850-9862

Methods Mol. Biol., 2013年 5月, vol.1024, pp.97-107

Methods Mol. Biol., 2011年, vol.703, pp.247-263

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68 - 1/6897

G01N 33/53 - 33/98

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed

专利名称(译)	从生物流体中分离微量RNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP6644686B2</a>	公开(公告)日	2020-02-12
申请号	JP2016534708	申请日	2014-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	西格玛-奥吉奇公司		
申请(专利权)人(译)	Sigma - Aldrich公司公司有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	Sigma - Aldrich公司公司有限责任公司		
[标]发明人	キャロルクリーダー		
发明人	キャロル・クリーダー		
IPC分类号	C12N15/10 C12Q1/6804 G01N33/53		
CPC分类号	C07H1/08 C12Q1/6804 C12Q2600/178 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C12Q2522/101 C12Q2565/113 C12N15/1013 C12N15/113 C12Q1/6806 C12Y304/21014		
FI分类号	C12N15/10.100.Z C12Q1/6804.Z G01N33/53.M		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/909834 2013-11-27 US 61/985000 2014-04-28 US		
其他公开文献	JP2017501689A5 JP2017501689A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本公开提供了从生物流体中分离miRNA的方法和试剂盒。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6644686号 (P6644686)
(45) 発行日 令和2年2月12日 (2020.2.12)		(24) 登録日 令和2年1月10日 (2020.1.10)
(51) Int. Cl. C12N 15/10 (2006.01) C12Q 1/6804 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)	F I C12N 15/10 I O O Z C12Q 1/6804 Z G01N 33/53 M	
請求項の数 13 (全 30 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-534708 (P2016-534708)	(73) 特許権者 311016949	
(86) (22) 出願日 平成26年11月25日 (2014.11.25)	シグマ-アルドリッチ・カンパニー・リミ	
(65) 公表番号 特表2017-501689 (P2017-501689A)	テッド・ライアビリティ・カンパニー	
(43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)	Sigma-Aldrich Co.,	
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/067321	LLC	
(87) 国際公開番号 W02015/094609	アメリカ合衆国63103ミズーリ州セン	
(87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)	ト・ルイス・スプリング・ストリート30	
審査請求日 平成29年11月22日 (2017.11.22)	50番	
(31) 優先権主張番号 61/909,834	(74) 代理人 100081422	
(32) 優先日 平成25年11月27日 (2013.11.27)	弁理士 田中 光雄	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100084146	
	弁理士 山崎 宏	
(31) 優先権主張番号 61/985,000	(74) 代理人 100122301	
(32) 優先日 平成26年4月28日 (2014.4.28)	弁理士 富田 憲史	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 生物学的流体からのマイクロRNA単離		