

【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 6 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 10 月 21 日 (2021.10.21)

【公表番号】特表 2020-535416 (P2020-535416A)

【公表日】令和 2 年 12 月 3 日 (2020.12.3)

【年通号数】公開・登録公報 2020-049

【出願番号】特願 2020-517365 (P2020-517365)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/536 (2006.01)

G 0 1 N 30/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

G 0 1 N 33/48 P

G 0 1 N 33/53 Y

G 0 1 N 33/536 A

G 0 1 N 30/02 Z

C 1 2 Q 1/68

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 9 月 13 日 (2021.9.13)

【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】

(a) 細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部及び検出可能な信号部を含むプローブと、細胞外小胞体を含む試料とを混合して反応させる段階；

(b) 前記混合試料をサイズ排除クロマトグラフィーカラムに注入して展開させる段階；及び

(c) 前記展開された試料から細胞外小胞体 - プローブ複合体及び遊離プローブを検出する段階を含む、細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 2】

前記プローブは、

細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部及び検出可能な信号部を含む単一物質；又は

細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部を含む物質に、分析可能な一つ以上の信号部を含む物質が結合された複合物質である、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 3】

前記プローブの結合部は、細胞外小胞体の膜表面成分、細胞外小胞体の膜成分及び細胞外小胞体の内部成分からなる群から選択される一つ以上の成分と特異的に結合する、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 4】

前記プローブは、タンパク質、抗体、抗体由来の物質、ペプチド、核酸、核酸アミノ酸複合体、酵素、酵素基質、化学的リガンド及びこれらの混合物からなる群から選択される

一つ以上である、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 5】

前記プローブは、蛍光物質、酵素基質、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸、ビオチン、金属及び放射性同位元素からなる群から選択される一つ以上の信号部を含む、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 6】

前記検出段階は、特定の波長に対する吸光クロマトグラムを検出することにより、細胞外小胞体を定量する段階を含む、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 7】

前記特定の波長は、200 nm ~ 800 nm の範囲で選択される一つ以上の値である、請求項 6 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 8】

前記検出段階は、プローブの信号部を検出してプローブを定量する段階を含む、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 9】

前記プローブの信号部を検出する段階は、分光学的分析、物理化学的分析、量子化学的分析、酵素学的分析、ビオチン分析及び核酸分析からなる群から選択される一つ以上の方法を含む、請求項 8 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 10】

前記試料は、哺乳動物細胞培養培地、バクテリア細胞培養培地、酵母培養培地、組織抽出物、癌組織、血清、血漿、唾液、涙、眼房水、汗、尿、糞、脳脊髄液 (CSF、cerebrospinal fluid)、腹水 (ascites)、羊水 (amniotic fluid)、精液、乳 (milk)、ほこり、淡水、海水、土壌及び発酵食品からなる群から選択される一つ以上であることを特徴とする、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 11】

(a) 細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部及び検出可能な信号部を含むプローブと、細胞外小胞体を含む試料とを混合して反応させる段階；

(b) 前記混合試料をサイズ排除クロマトグラフィーカラムに注入して展開させる段階；及び

(c) 前記サイズ排除クロマトグラフィーカラムから細胞外小胞体 - プローブ複合体を分離する段階；及び

(d) 前記分離された細胞外小胞体 - プローブ複合体からプローブを検出する段階を含む、細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 12】

前記プローブは、細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部及び検出可能な信号部を含む単一物質；又は

細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合する結合部を含む物質に、分析可能な信号部を含む物質が結合された複合物質である、請求項 11 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 13】

前記プローブの結合部は、細胞外小胞体の膜表面成分、細胞外小胞体の膜成分及び細胞外小胞体の内部成分からなる群から選択される一つ以上の成分と特異的に結合する、請求項 11 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 14】

前記プローブは、タンパク質、抗体、抗体由来の物質、ペプチド、核酸、核酸アミノ酸複合体、酵素、酵素基質、化学的リガンド及びこれらの混合物からなる群から選択される一つ以上である、請求項 11 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 15】

前記プローブは、蛍光物質、酵素基質、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸、ビオチン、金属及び放射性同位元素からなる群から選択される一つ以上の信号部を含む、請求項 1

1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 16】

前記検出段階は、特定の波長に対する吸光クロマトグラムを検出することにより、細胞外小胞体を定量する段階を含む、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 17】

前記特定の波長は、200 nm～800 nmの範囲で選択される一つ以上の値である、請求項 16 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 18】

前記検出段階は、プローブの信号部を検出してプローブを定量する段階を含む、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 19】

前記プローブの信号部を検出する段階は、分光学的分析、物理化学的分析、量子化学的分析、酵素学的分析、バイオチン分析、放射線分析及び核酸分析からなる群から選択される一つ以上の方法を含む、請求項 18 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【請求項 20】

前記試料は、哺乳動物細胞培養培地、バクテリア細胞培養培地、酵母培養培地、組織抽出物、癌組織、血清、血漿、唾液、涙、眼房水、汗、尿、糞、脳脊髄液（CSF、cerebrospinal fluid）、腹水（ascites）、羊水（amniotic fluid）、精液、乳（milk）、ほこり、淡水、海水、土壌及び発酵食品からなる群から選択される一つ以上であることを特徴とする、請求項 1 記載の細胞外小胞体の分析方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明の前記プローブは、細胞外小胞体を構成する成分のうち、一つ以上の物質と特異的に結合するタンパク質、抗体、抗体由来の物質、ペプチド、核酸、核酸アミノ酸複合体、酵素、酵素基質、化学的リガンド及びそれらの混合物からなる群から選択できるが、これに限定されない。前記プローブは細胞外小胞体の構成成分と特異的に結合すると同時に、検出段階で検出可能な物質でもある。本発明の一実施例によれば、細胞外小胞体の内部成分であるエステル分解酵素（esterase）の基質の一つであるVPD450又はCFDA-SEをプローブとして使用した。前記基質は、細胞外小胞体のうちエステル分解酵素と特異的に結合すると同時に、酵素活性によって蛍光物質に変換することができて、別の標識無しで蛍光信号の検出が可能である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

【図 1】図 1 は、本発明による細胞外小胞体分析方法の模式図である。

【図 2】図 2 は、本発明の一実施例による大腸癌細胞株SW480における標本細胞外小胞体の分離模式図及び分離した結果である。

【図 3】図 3 は、本発明の一実施例による蛍光物質で標識されたマウス抗体（Normal mouse IgG）と標本細胞外小胞体の結合様相を確認したUV（a）及び蛍光（b）クロマトグラムである。

【図 4】図 4 は、本発明の一実施例による蛍光物質で標識されたCD63抗体（anti-CD63 an

tibody)と標本細胞外小胞体の結合様相を確認したUV(a)及び蛍光(b)クロマトグラムである。

【図5】図5は、本発明の一実施例による蛍光物質で標識されたCD81抗体(anti-CD63 antibody)と標本細胞外小胞体の結合様相を確認したUV(a)及び蛍光(b)クロマトグラムである。

【図6】図6は、本発明の一実施例による標本細胞外小胞体から蛍光標識されたCD63抗体の特異性を確認した蛍光クロマトグラムである。

【図7】図7は、本発明の一実施例による起源が異なる細胞外小胞体からCD81細胞外小胞体マーカーの発現様相を確認したUV(a)及び蛍光(b)クロマトグラムである。

【図8】図8は、本発明の一実施例によるTNFα(Tumor necrosis factor alpha)が、大腸癌細胞から分泌される細胞外小胞体のICAM1タンパク質発現に及ぼす影響を分析したUV(a)及び蛍光(b、c)クロマトグラムある。

【図9】図9は、本発明の一実施例による蛍光標識されたCD63抗体を利用して、大腸癌細胞培養液から細胞外小胞体の分離過程なしに細胞外小胞体を確認した蛍光クロマトグラムである。

【図10】図10は、本発明の一実施例による蛍光標識されたCD81抗体を利用して、大腸癌細胞培養液から細胞外小胞体の分離過程なしに細胞外小胞体を確認したUV(a)及び蛍光(b)クロマトグラムである。

【図11】図11は、本発明の一実施例による蛍光標識されたCD81抗体を利用して、培養時間を異にした大腸癌細胞培養液から細胞外小胞体の分離過程なしに試料内の細胞外小胞体をナノ粒子の濃度(a)及びUV(b)、蛍光(c)クロマトグラムで分析した結果である。

【図12】図12は、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性VPD450(violet proliferation dye450)と、標本細胞外小胞体内エステル分解酵素活性を利用した細胞外小胞体の分析を示したUV(a)及び蛍光(b、c)クロマトグラムである。

【図13】図13は、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性VPD450(violet proliferation dye450)と、細胞外小胞体内エステル分解酵素活性を利用して、大腸癌細胞培養液から細胞外小胞体の分離過程なしに試料内の細胞外小胞体をUV(a)及び蛍光(b)クロマトグラムで分析した結果である。

【図14a】図14aは、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性VPD450(violet proliferation dye450)とスピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して、蛍光物質が結合された標本細胞外小胞体をUV及び蛍光(b)クロマトグラムで分析した方法を示す。

【図14b】図14bは、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性VPD450(violet proliferation dye450)とスピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して、蛍光物質が結合された標本細胞外小胞体をUV及び蛍光(b)クロマトグラムで分析した結果である。

【図15a】図15aは、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性CFDA-SE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)とスピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して、蛍光物質が結合された標本細胞外小胞体をUV及び蛍光(b)クロマトグラムで分析した方法を示す。

【図15b】図15bは、本発明の一実施例によるエステル分解酵素活性により、蛍光を示す膜透過性CFDA-SE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)とスピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して、蛍光物質が結合された標本細胞外小胞体をUV及び蛍光(b)クロマトグラムで分析した結果である。

【図16a】図16aは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール(Biotin-cholesterol)と反応させた標本細胞外小胞体を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した方法を示す。

【図 16 b】図 16 bは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた標本細胞外小胞体を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した結果である。

【図 17 a】図 17 aは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた大腸癌細胞培養液を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した方法を示す。

【図 17 b】図 17 bは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた大腸癌細胞培養液を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した結果である。

【図 18 a】図 18 aは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた、ヒトの尿 (b)、ヒトの血清 (c) を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した方法を示す。

【図 18 b】図 18 bは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた、ヒトの尿 (b) を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した結果である。

【図 18 c】図 18 cは、本発明の一実施例によるビオチンコレステロール (Biotin-cholesterol) と反応させた、ヒトの血漿 (c) を、スピン式サイズ排除クロマトグラフィーを利用して分離したビオチンコレステロール細胞外小胞体複合体の量を分析した結果である。

【図 19 a】図 19 aは、本発明の一実施例による Dil (Lipophilic dye) と反応させた標本細胞外小胞体を、HPLCを利用して分析した方法を示す。

【図 19 b】図 19 bは、本発明の一実施例による Dil (Lipophilic dye) と反応させた標本細胞外小胞体を、HPLCを利用して分析した蛍光クロマトグラムである。

【図 20 a】図 20 aは、本発明の一実施例による Dil (Lipophilic dye) と反応させた大腸菌由来の細胞外小胞体を、HPLCを利用して分析した方法を示す。

【図 20 b】図 20 bは、本発明の一実施例による Dil (Lipophilic dye) と反応させた大腸菌由来の細胞外小胞体を、HPLCを利用して分析した蛍光クロマトグラムである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

実施例 9 . スピン式サイズ排除クロマトグラフィーと、コレステロールブローブを利用した体液内細胞外小胞体の分析

前記実施例 8 で確認した通り、細胞外小胞体の精製なしに、細胞培養液内の細胞外小胞体を分析することができ、前記の方法をヒトの体液に適用した。具体的には、図 18 (a) の模式図に示した通り、ヒトの尿又はヒトの血漿とビオチン標識されたコレステロール (Biotin-cholesterol) を混合して、各群を 37 °C で 30 分間反応させた後、試料内の細胞外小胞体と結合していないビオチンコレステロールを除去するために、前記の各混合溶液をスピン式セファクリル S500 カラムにローディングして、700 × g、5 分間遠心分離して、溶出液を回収した。対照群にビオチンコレステロール単一群又は各生物学的試料の単一群を、前記と同じ方法でカラムにローディングした後、スピンを通じて溶出液を回収した。前記溶出液内のビオチンの量を定量するために、溶出液を 96 ウェルプレート (microplate) に入れた後、試料内の物質をプレートに吸着させて固定した。この後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ (streptavidin - peroxidase) と反応させて洗浄した後、プレートに残

存するペルオキシダーゼ酵素活性による化学発光（chemiluminescence）を測定した（図18（b、c））。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

その結果、ビオチンコレステロール単一群及び生物学的試料の単一群では、化学発光が極めて低いか又はなかったが、生物学的試料（尿、血漿）とビオチン・コレステロールを混合して反応させた群では、高い化学発光を観察することができた。これは、ビオチンコレステロール分子が生物学的試料内の細胞外小胞体の脂質二重層に挿入されて、細胞外小胞体と一緒にスピン式前処理サイズ排除クロマトグラフィーカラムから溶出され、これを通じて複数の様々な体液内に存在する細胞外小胞体の総量の測定に活用することができることがわかった。