

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-522260  
(P2015-522260A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015. 8. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z 4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>G O 1 N 30/88 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	D
	G O 1 N 30/88	E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 157 頁)

(21) 出願番号 特願2015-517468 (P2015-517468)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月14日 (2013. 6. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月5日 (2015. 2. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/046020  
 (87) 国際公開番号 W02013/188846  
 (87) 国際公開日 平成25年12月19日 (2013. 12. 19)  
 (31) 優先権主張番号 61/660, 427  
 (32) 優先日 平成24年6月15日 (2012. 6. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514318389  
 スティリ, ハリー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920  
 37, ラ ホヤ, パセオ ドラド 2  
 452  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患または状態を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、複数の分析成分を伴う試料を、疾患または状態の診断、予後診断、またはモニタリングにおいて使用する方法を提供する。本発明はまた、疾患または状態のマーカーを同定する方法も提供する。本発明は一般に、無細胞体液、食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞から選択される2つ以上の異なる成分の組合せを、疾患または状態の診断、予後診断、またはモニタリングにおいて使用する方法に関する。本発明はまた、組合せを使用して、疾患または状態のマーカーを同定する方法にも関する。

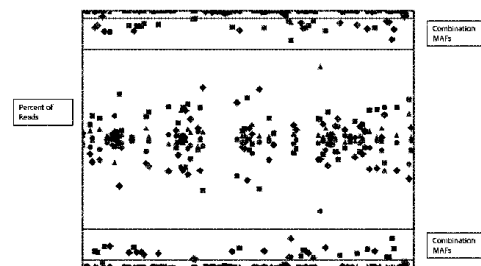


Figure 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助する方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

10

## 【請求項 2】

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

20

30

## 【請求項 3】

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の予後診断を援助する方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

40

## 【請求項 4】

50

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

10

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

20

前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記処置の後で前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a)で同定された前記差異と、b)で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c)における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップと

30

を含む方法。

#### 【請求項5】

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

40

第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団、第1の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、第2の時点において前記対象から単離

50

された循環小胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団、第2の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

#### 【請求項6】

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞(>  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイル

を決定し、前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞(>  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で、前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイル

を決定し、前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップと

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 7】

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであり、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップと

を含む方法。

【請求項 8】

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであり、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップと

を含む方法。

【請求項 9】

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定する

ステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決めるステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップとを含む方法。

10

【請求項10】

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決めるステップと、

20

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $= 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決めるステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

30

【請求項11】

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決めるステップと、

40

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $= 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決めるステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

50

## 【請求項 12】

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを設定するステップと、

10

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを設定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップを含む方法。

## 【請求項 13】

20

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを設定し、

前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを設定し、

30

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを設定し、

40

前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記処置の後で前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第4のプロファイルを設定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステ

50

ップであって、c)における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップとを含む方法。

【請求項14】

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

10

第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $= 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および第1の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイル

20

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイル

30

第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $= 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および第2の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイル

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a)で同定された前記差異と、b)で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c)における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

40

【請求項15】

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離

50



された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

10

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

20

前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップを含む方法。

30

#### 【請求項16】

対象における疾患または状態のための処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

40

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

50

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップとを含む方法。

【請求項17】

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

【請求項18】

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改

10

20

30

40

50

善または処置することが可能であることを示すステップとを含む方法。

【請求項 19】

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップと

を含む方法。

【請求項 20】

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップと

を含む方法。

【請求項 21】

対象における疾患または状態を予後診断するかまたは予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップと

を含む方法。

【請求項 22】

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由

10

20

30

40

50

来する前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの第 2 のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

【請求項 2 3】

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA 量が  $2n$  を超える食細胞 ( $> 2n$  食細胞) の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 1 のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第 1 のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの第 2 のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

【請求項 2 4】

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態を予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA 量が  $2n$  を超える食細胞 ( $> 2n$  食細胞) の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 1 のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第 1 のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの第 2 のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

【請求項 2 5】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記対照と比較して前記試料中で上方調節または活性化されている、請求項 1 から 3 および 10 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記対照と比較して前記試料中で下方調節または阻害されている、請求項 1 から 3 および 10 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記第 1 の対照と比較して前記第 1 の試料中で、または前記第 2 の対照と比較して前記第 2 の試料中で、上方調節または活性化されている、請求項 4 から 6 および 13 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記第 1 の対照と比較して前記第 1 の試料中で、または前記第 2 の対照と比較して前記第 2 の試料中で、下方調節または阻害されている、請求項 4 から 6 および 13 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記第 2 の試料と比較して前

10

20

30

40

50

記第 1 の試料中で上方調節または活性化されている、請求項 7 から 9 および 16 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記第 2 の試料と比較して前記第 1 の試料中で下方調節または阻害されている、請求項 7 から 9 および 16 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記レポジトリーと比較して前記試料中で上方調節または活性化されている、請求項 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記レポジトリーと比較して前記試料中で下方調節または阻害されている、請求項 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 のプロファイルまたは前記第 2 のプロファイルが、前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの非存在を含む、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 3 のプロファイルまたは前記第 4 のプロファイルが、前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの非存在を含む、請求項 4 から 6 および 13 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 35】

前記方法が循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞を含む場合、前記方法は、前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞を溶解させるステップをさらに含む、請求項 1 から 9 および 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記方法が循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞を含む場合、前記方法は、細胞内容物のうちの少なくとも一部を、前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞から抽出するステップをさらに含む、請求項 1 から 9、19 から 21、および 35 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 37】

前記方法が前記無細胞体液を含む場合、前記方法は、前記 1 または複数のマーカーを、前記無細胞体液から抽出するステップをさらに含む、請求項 1 から 9、19 から 21、35、および 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記方法が前記無細胞体液を含む場合、前記無細胞体液は、腎臓通過性核酸を含む、請求項 1 から 9、19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 39】

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記循環罹病細胞、無細胞体液試料、食細胞、または  $> 2n$  食細胞に存在する、請求項 1 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記循環罹病細胞、無細胞体液試料、食細胞、または  $> 2n$  食細胞のいずれにも存在しない、請求項 1 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

50

前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞のうちの1または複数が除核される、請求項1から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

物理的除去、化学的処置、フォトアブレーション、または紫外線照射を使用して、前記細胞が除核される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記物理的除去が、顕微針、光ピンセット、または吸引を使用する、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記レポジトリーが、データマイニングにより得られる、請求項19から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

前記食細胞、 $> 2n$ 食細胞、または $= 2n$ 食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、角化細胞、またはこれらの混合物である、請求項1から44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

前記非食細胞が、T細胞、B細胞、ヌル細胞、好塩基球、またはこれらの混合物である、請求項1から45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

前記循環罹病細胞が、血液細胞、腫瘍細胞、リンパ腫細胞、胎児細胞、アポトーシス細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、前駆細胞、間葉細胞、骨芽細胞、骨細胞、造血幹細胞、泡沫細胞、脂肪細胞、経子宮頸管細胞、循環心筋細胞、循環線維細胞、循環筋細胞、腎臓由来の循環細胞、消化管由来の循環細胞、肺由来の循環細胞、生殖器官由来の循環細胞、中枢神経系由来の循環細胞、循環肝細胞、脾臓由来の循環細胞、胸腺由来の循環細胞、甲状腺由来の循環細胞、内分泌腺由来の循環細胞、副甲状腺由来の循環細胞、下垂体由来の循環細胞、副腎由来の循環細胞、ランゲルハンス島由来の循環細胞、膵臓由来の循環細胞、視床下部由来の循環細胞、前立腺組織由来の循環細胞、乳房組織由来の循環細胞、循環網膜細胞由来の循環細胞、循環眼細胞、循環聴細胞、循環表皮細胞、尿路由来の循環細胞、またはこれらの混合物である、請求項1から46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

前記対照細胞が、正常細胞である、請求項1から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記対照細胞が、循環細胞である、請求項1から48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記循環小胞が、循環微小胞、アポトーシス小体、微粒子、膜結合小胞、多胞体、ナノ小胞、微小粒子、およびARRDC-1媒介微小胞(ARMM)からなる群から選択される、請求項1から49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

前記循環微小胞が、エキソソームまたは尿中エキソソームである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記無細胞体液が、体液から分離される、請求項1から51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

前記体液が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第1三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第2三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第3三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液である、請求

10

20

30

40

50

項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記無細胞体液が、濾過、遠心分離、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイデイクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより分離される、請求項 5 2 および 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記無細胞体液が、前記試料に存在する物質を使用することにより分離される、請求項 5 2 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記物質が、前記疾患または状態のマーカーの産物である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記無細胞体液が、血漿または血清である、請求項 1 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、前記対象の体液、組織、または細胞から単離される、請求項 1 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記体液試料が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記細胞が、白血球である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、抗体を使用して単離される、請求項 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、濾過、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイデイクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより単離される、請求項 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 1 または複数のマーカーが、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの組合せである、請求項 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記核酸が、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、または DNA - RNA ハイブリッドである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補的 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 RNA が、メッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、核小体低分子 RNA (snRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、ヘテロ核 RNA (hnRNA)、または低分子ヘアピン RNA (shRNA) である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

10

20

30

40

50

前記タンパク質が、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リポタンパク質、糖タンパク質、またはホルモンである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾコリングリセロリン脂質、リゾエタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル - C o A、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、スフィンゴシン、リゾスフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラズマローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 ( L D L )、極低密度リポタンパク質 ( V L D L )、高密度リポタンパク質 ( H D L )、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、またはこれらの誘導体である、請求項 6 3 に記載の方法。

10

【請求項 6 9】

前記炭水化物が、単糖、二糖、多糖、オリゴ糖、またはこれらの誘導体である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記代謝産物が、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物、無機代謝産物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、請求項 6 3 に記載の方法。

20

【請求項 7 1】

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 1 から 3、1 0 から 1 2、および 1 9 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 6 5 に記載の方法。

30

【請求項 7 3】

前記第 1 のプロファイルまたは前記第 2 のプロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 4 から 9 および 1 3 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記第 1 のプロファイルまたは前記第 2 のプロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記第 3 のプロファイルまたは前記第 4 のプロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 4 から 6、および 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 6】

前記第 3 のプロファイルまたは前記第 4 のプロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記定量的アッセイが、シークエンシング、標的化シークエンシング、一分子リアルタイムシークエンシング、電子顕微鏡法ベースのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、

50



サンガーシデオキシ終結シーケンシング、エキソンシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョンPCR、マルチプレックスPCR、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerシーケンシング、SOLID (登録商標)シーケンシング、MS-PETシーケンシング、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、定量的PCR、リアルタイムPCR、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せを使用する、請求項72、66、および76のいずれか一項に記載の方法。

10

20

【請求項78】

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析、シーケンシング分析、電気泳動分析、制限断片長多型 (RFLP) 分析、ノーザンブロット分析、定量的PCR、逆転写酵素PCR分析 (RT-PCR)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA)、一本鎖コンフォメーション多型 (SSCP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)、RNアーゼミスマッチ分析、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、表面プラズモン共鳴、サザンブロット分析、in situハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)、色素形成in situハイブリダイゼーション (CISH)、免疫組織化学 (IHC)、マイクロアレイ、比較ゲノムハイブリダイゼーション、核型分析、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅 (MLPA)、短鎖蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR (QMPSF)、顕微鏡法、メチル化特異的PCR (MSP) アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるHpaiI小断片濃縮 (HELP) アッセイ、放射性酢酸標識アッセイ、比色DNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降 (ChIP-on-chip) アッセイ、制限ランドマークゲノム走査、メチル化DNA免疫沈降 (MeDIP)、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性についての分子破壊光アッセイ、クロマトグラフィー分離、メチル化感受性制

30

40

50

限酵素分析、非メチル化シトシンからウラシルへの亜硫酸駆動型転換、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、メチル結合PCR分析、またはこれらの組合せにより決定される、請求項77に記載の方法。

【請求項80】

前記核酸プロファイルが、標的化シーケンシング、一分子リアルタイムシーケンシング、エキソンシーケンシング、電子顕微鏡法ベースのシーケンシング、トランジスター媒介型シーケンシング、直接的シーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガージデオキシ終結シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerシーケンシング、SOLID (登録商標)シーケンシング、MS-PEPシーケンシング、質量分析、およびこれらの組合せからなる群から選択されるシーケンシング法により決定される、請求項77に記載の方法。

10

20

【請求項81】

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項77に記載の方法。

【請求項82】

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、in situハイブリダイゼーション、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴、シーケンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項77に記載の方法。

30

【請求項83】

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記1または複数のマーカーのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、コンフォメーション状態、またはこれらの組合せの決定を含む、請求項77に記載の方法。

40

【請求項84】

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)

50

S)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項77に記載の方法。

【請求項85】

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、パルスドアンペロメトリ検出を用いた高速アニオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、蛍光アッセイ、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項77に記載の方法。

10

【請求項86】

前記対象が、少なくとも2つの疾患または状態を有する、請求項1から85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

前記対象が、少なくとも1つの出生前または妊娠関連の疾患または状態を有する、請求項86に記載の方法。

20

【請求項88】

前記対象が、哺乳動物である、請求項1から87のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項89に記載の方法。

【請求項90】

前記疾患または状態が、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である、請求項1から89のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項91】

前記差異が、1倍を超える差異である、請求項1から90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

前記差異が、少なくとも、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

前記第2のプロファイルと前記第4のプロファイルとが同じである、請求項4から6および13から15のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項94】

疾患または状態についての1または複数のマーカーを同定するための方法であって、

a) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または $> 2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第1のプロファイルを決定し、

前記疾患または状態を有する前記対象に由来する $= 2n$ 食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第2のプロファイルを決定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステッ

50

ブであって、前記第 1 の差異のセットが、前記第 2 のプロファイルと比べて、前記第 1 のプロファイルに特異的であるステップと、

b) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する食細胞の集団または  $> 2n$  食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第 3 のプロファイルを決定し、

前記疾患または状態を有さない前記対照の対象に由来する  $= 2n$  食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第 4 のプロファイルを決定し、

前記第 3 のプロファイルと前記第 4 のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、前記第 2 の差異のセットが、前記第 4 のプロファイルと比べて、前記第 3 のプロファイルに特異的であるステップと、

c) b) において同定された前記差異のセットと比べて、a) において同定された前記差異のセットに特異的な 1 または複数の分析物を同定するステップであって、c) における前記同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法。

【請求項 9 5】

疾患または状態についての 1 または複数のマーカーを同定するための方法であって、

a) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または  $> 2n$  食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第 1 のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第 1 のプロファイルを、前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する分析物のレポジトリーに由来する第 2 のプロファイルと比較するステップと、

c) 前記第 1 のプロファイルと前記第 2 のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、前記差異のセットが、前記第 2 のプロファイルと比べて、前記第 1 のプロファイルに特異的であるステップと、

d) 前記差異のセットに特異的な 1 または複数の分析物を同定するステップであって、前記同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法。

【請求項 9 6】

a) 前記疾患または状態を有する前記対象における前記疾患または状態の影響を受ける細胞または組織に由来する分析物の第 5 のプロファイルを得、

前記疾患または状態を有する前記対象における前記疾患または状態の影響を受けない細胞または組織に由来する分析物の第 6 のプロファイルを得、

前記第 5 のプロファイルと前記第 6 のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであって、前記差異のセットが、前記第 6 のプロファイルと比べて、前記第 5 のプロファイルに特異的であるステップと、

b) d) において同定された前記差異のセットに存在する、c) の前記 1 または複数のマーカーのうち少なくとも 1 つを同定するステップとをさらに含む、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記 1 または複数のマーカーを、前記無細胞体液から抽出するステップをさらに含む、請求項 9 0 から 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

a) の前に、前記食細胞、前記  $> 2n$  食細胞、前記  $= 2n$  食細胞、または前記非食細胞を溶解させるステップをさらに含む、請求項 9 0 から 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 9】

a) の前に、細胞内容物のうちの少なくとも一部を、前記食細胞、前記  $> 2n$  食細胞、前記  $= 2n$  食細胞、または前記非食細胞から抽出するステップをさらに含む、請求項 9 0 から 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記食細胞または前記  $> 2n$  食細胞が、罹病生細胞、死んだ罹病細胞、罹病アポトーシ

10

20

30

40

50

ス細胞、循環腫瘍細胞、感染因子、胎児細胞、トロホプラスト、またはこれらの断片を含む、請求項 90 から 99 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 101】

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記無細胞体液試料、前記食細胞、または前記 > 2 n 食細胞に存在する、請求項 90 から 100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記無細胞体液試料、前記食細胞、または前記 > 2 n 食細胞に存在しない、請求項 90 から 101 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 103】

c) の前記同定された差異を、前記疾患または状態の 1 または複数の既知のマーカーのレポジトリーと比較するステップをさらに含む、請求項 90 から 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記レポジトリーが、データマイニングにより得られる、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 105】

前記食細胞、> 2 n 食細胞、または = 2 n 食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、角化細胞、またはこれらの混合物である、請求項 90 から 104 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 106】

前記非食細胞が、T細胞、B細胞、ヌル細胞、好塩基球、またはこれらの混合物である、請求項 90 から 105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

前記無細胞体液が、体液から分離される、請求項 90 から 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

前記体液試料が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、または眼液である、請求項 107 に記載の方法。

30

【請求項 109】

前記無細胞体液試料が、濾過、遠心分離、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより分離される、請求項 107 および 108 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 110】

前記無細胞体液試料が、前記試料に存在する物質を使用することにより分離される、請求項 109 に記載の方法。

40

【請求項 111】

前記 1 または複数のマーカーが、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの組合せである、請求項 90 から 110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

前記核酸が、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、または DNA-RNA ハイブリッドである、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補的 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、請求項 112 に記載の方法。

50

## 【請求項 114】

前記RNAが、メッセンジャーRNA ( mRNA )、マイクロRNA ( miRNA )、核小体低分子RNA ( snoRNA )、リボソームRNA ( rRNA )、転移RNA ( tRNA )、低分子干渉RNA ( siRNA )、ヘテロ核RNA ( hnRNA )、または低分子ヘアピンRNA ( shRNA )である、請求項 112 に記載の方法。

## 【請求項 115】

前記タンパク質が、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リポタンパク質、糖タンパク質、またはホルモンである、請求項 111 に記載の方法。

## 【請求項 116】

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾコリングリセロリン脂質、リゾエタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル-CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、スフィンゴシン、リゾスフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラズマローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 ( LDL )、極低密度リポタンパク質 ( VLDL )、高密度リポタンパク質 ( HDL )、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、またはこれらの誘導体である、請求項 111 に記載の方法。

10

20

## 【請求項 117】

前記炭水化物が、単糖、二糖、多糖、オリゴ糖、またはこれらの誘導体である、請求項 111 に記載の方法。

## 【請求項 118】

前記代謝産物が、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物、無機代謝産物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、請求項 111 に記載の方法。

30

## 【請求項 119】

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 90 から 118 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 120】

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 119 に記載の方法。

## 【請求項 121】

前記定量的アッセイが、シークエンシング、標的化シークエンシング、一分子リアルタイムシークエンシング、エキソシークエンシング、電子顕微鏡法ベースのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガージデオキシ終結シークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シークエンシング、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理特徴シークエンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR ( COLD-PCR )、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアタームシークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成によるシークエンシング、リアルタイムシークエンシング、リバースターミネーターシークエンシング、ナノポ

40

50

アシークエンシング、454シークエンシング、Solexa Genome Analyzerシークエンシング、SOLiD（登録商標）シークエンシング、MS-PETシークエンシング、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、定量的PCR、リアルタイムPCR、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せを使用する、請求項120に記載の方法。

10

【請求項122】

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項119に記載の方法。

【請求項123】

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、シークエンシング分析、電気泳動分析、制限断片長多型(RFLP)分析、ノーザンプロット分析、定量的PCR、逆転写酵素PCR分析(RT-PCR)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ(HMA)、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)、RNアーゼミスマッチ分析、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、表面プラズモン共鳴、サザンプロット分析、in situハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、色素形成in situハイブリダイゼーション(CISH)、免疫組織化学(IHC)、マイクロアレイ、比較ゲノムハイブリダイゼーション、核型分析、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅(MLPA)、短鎖蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR(QMPSP)、顕微鏡法、メチル化特異的PCR(MSP)アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるHpaII小断片濃縮(HELP)アッセイ、放射性酢酸標識アッセイ、比色DNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)アッセイ、制限ランダムマークゲノム走査、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性についての分子破壊光アッセイ、クロマトグラフィー分離、メチル化感受性制限酵素分析、非メチル化シトシンからウラシルへの亜硫酸駆動型転換、低変性温度での共増幅PCR(COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、メチル結合PCR分析、またはこれらの組合せにより決定される、請求項119に記載の方法。

20

30

40

【請求項124】

前記核酸プロファイルが、標的化シークエンシング、一分子リアルタイムシークエンシング、エキソンシークエンシング、電子顕微鏡法ベースのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガージデオキシ終結シークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シークエンシング、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規

50

模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerシーケンシング、SOLID (登録商標)シーケンシング、MS-PETシーケンシング、質量分析、およびこれらの組合せからなる群から選択されるシーケンシング技法により決定される、請求項119に記載の方法。

10

【請求項125】

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項119に記載の方法。

【請求項126】

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、in situハイブリダイゼーション、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴、シーケンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項119に記載の方法。

20

【請求項127】

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記1または複数のマーカーのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、コンフォメーション状態、またはこれらの組合せの決定を含む、請求項119に記載の方法。

30

【請求項128】

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項119に記載の方法。

40

【請求項129】

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、パルスドアンペロメトリ検出を用いた高速アニオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD)、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、蛍光アッセイ、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリ

50



工変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 130】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 90 から 129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 131】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 130 に記載の方法。

【請求項 132】

前記疾患または状態が、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である、請求項 90 から 131 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 133】

前記差異が、1倍を超える差異である、請求項 90 から 132 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 134】

前記差異が、少なくとも、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である、請求項 133 に記載の方法。

20

【請求項 135】

前記疾患または状態の少なくとも1つの診断パラメータを決定するステップをさらに含む、請求項 1 から 93 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 136】

前記診断パラメータが、身体検査、目視検査、生検、走査、組織検査、放射線医学、画像化、超音波、市販キットの使用、遺伝子検査、免疫学的検査、体液の分析、または神経活動のモニタリングにより決定される、請求項 135 に記載の方法。

【請求項 137】

前記1または複数のマーカーが、AKT2、BAK1、EGFR、ERBB2、ETS2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、PDGFB、RB1、SERPINB2、SNCG、およびSPP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項 1 から 93 および 135 から 136 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 138】

前記1または複数のマーカーが、AKT1、AKT2、BAK2、CDC25A、E2F1、EGFR、ERBB2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、NFKB1、PDGFB、PIK3R1、PNN、RB1、SERPINB2、SERPINB5、SNCG、SPP1、TERT、TIMP3、およびTP53からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項 1 から 93 および 135 から 137 のいずれか一項

40

【請求項 139】

前記1または複数のマーカーが、CASP8、CASP9、COL18A1、ETS2、HTATIP2、MMP9、SRC、およびTWIST1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項 1 から 93 および 135 から 138 のいずれか一項

【請求項 140】

前記1または複数のマーカーが、AKT1、APAF1、ATM、CDC25A、CDKN1A、ETS2、FOS、IL8、ITGA4、ITGA6、ITGAV、JUN、MAP2K1、NFKBIA、PLAU、PLAUR、RAF1、SERPINB2、S

50

YK、TIMP1、TNF、TNFRSF10B、およびTNFRSF1Aからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1から93および135から139のいずれか一項に記載の方法。

【請求項141】

前記1または複数のマーカーが、ACP2、AK2、AKT3、ARL5B、ATP2B3、BGN、BRAF、BTG2、CAMKK2、CAPG、CAPN12、CPLX2、DENND5A、DNA2、FAM104A、FNIP1、GFRA4、GLUD1、GNAQ、GP1BB、HNRPLL、HOXA2、HPS3、INPP4A、ITGAV、KLHL23、LANCL2、LYPD6、MAPKAPK3、MEF2A(EG:4205を含む)、MEF2C、NVL、PCYT1A、PGLYRP4、PLOD1、PPP1CB、PRKAB2、PROS1、PTPRE、RASA4(EG:10156を含む)、RBMS2、RBPJ、STAT5B、THBS1、TRIB1、TRIM2、TSPAN6、およびZDHHC21からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1から93および135から140のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項142】

前記1または複数のマーカーが、B4GALT5、BOP1、CCL2、CCL3、CCL3L1、CCRL2、CD83、CLEC4G、CLIC4、CTSC、CTSO、CXCL10、FCGR3A、FPR3、HBA1、HBB、LRMP、MAP1LC3B2、MS4A4A、MSR1、MYADML、NID1、PF4、PION、RNF217、SAMD9L、SERPING1、およびSPARCからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1から93および135から141のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項143】

前記1または複数のマーカーが、ACOT9、AMPD2、ARHGAP15、BATF2、C3AR1、C5orf41、CCL3、CCL3L1、CD63、CHST11、CHSY1、CLEC4G、CTSZ、CXorf21、CYTH4、CYTIP、DLEU2、DNAJA1、DOCK8、DTX3L、DUSP6、EPSTI1、ERF、F2RL1、FYB、GABRB2、GBP5、GLRX、GNB4、ICAM1、IFI35、IFIH1、IFNAR2、IL1R1、IRF1、ITGA5、LAP3、LAPTM5、LCP2、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MICAL2、MT1DP、MT1JP、MT1M、MT2A、MYADML、NEK6、NINJ2、NNMT、NT5C3L、NUB1、PDE4B、PLOD1、PML、PRKCB、PSMB9、RCN3、RGS4、RNASE6、RTP4、SAMD9L、SEL1L、SERPING1、SETX、SIGLEC10、SKIL、SLC7A7、SNORA21、SP100、SP110、SP140、SSFA2、STAT2、STK17B、STK3、TDRD7、TMCC1、TMPRSS11E2、TNFRSF1B、TPM1、TRIM21、TXNDC4、UBE2L6、UBE2W、USP18、VAV1、WARS、WIPF1、およびWIP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1から93および135から142のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項144】

前記1または複数のマーカーが、ADAR、ADM、ALAS1、ANKRD22、ARHGAP27、B3GNT5、BCL10、C12orf35、C15orf29、C2orf59、CD177、CEACAM1、CPEB2、DDX58、F2RL1、GDPD3、GNAI3、HIST2H3A、HIST2H3D、HIST2H4A、HMGCR、HSPA6、HSPC159、IL4R、IMPA2、KPNB1、KREMN1、KRT23、LDLR、LOC100130904、LTB4R、MAEA、MARK2、MBOAT2、MPZL3、N4BP1、NBEAL2、NMI、NPEPPS、PARP14、PGM2、PPIF、PXN、RALBP1、ROD1、RPS6KA1、S100P、SERTAD2、SLC9A1、SLPI、SP110、SPINT1、ST14、TBC1D3、TNFRSF9、TRIM21、UPP1、VPS24、Z

40

50

B T B 3 4、および Z N F 2 5 6 からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1から93および135から143のいずれか一項に記載の方法。

【請求項145】

前記1または複数のマーカーが、請求項94から134のいずれか一項に記載の方法により同定される前記マーカーのうちの少なくとも1または複数を含む、請求項1から93および135から144のいずれか一項に記載の方法。

【請求項146】

請求項94から134のいずれか一項に記載の方法により同定される前記マーカーのうちの少なくとも1または複数を検出する複数のマーカー検出剤を含むキット。

【請求項147】

対象における疾患または状態を処置または防止する方法であって、前記対象へと、請求項6および15のいずれか一項に記載の方法により同定される化合物を含む組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項148】

前記循環罹病細胞が、感染因子に感染している、請求項1から93および135から145のいずれか一項に記載の方法。

【請求項149】

前記感染因子が、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、感染性タンパク質、または微生物である、請求項148に記載の方法。

【請求項150】

前記方法が食細胞または $> 2n$ 食細胞を含む場合、前記食細胞または $> 2n$ 食細胞が、腎臓通過性核酸を含む、請求項1から93、135から145、および148から149のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

先願の情報

本願は、2012年6月15日に出願した米国仮出願第61/660,427号による優先権を主張する。この出願の内容および開示は、その全体が参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は一般に、無細胞体液、食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞から選択される2つ以上の異なる成分の組合せを、疾患または状態の診断、予後診断、またはモニタリングにおいて使用する方法に関する。本発明はまた、組合せを使用して、疾患または状態のマーカーを同定する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

白血球は、骨髄中で多能性造血幹細胞として出立し、骨髄細胞系列（単球、マクロファージ、好中球、好酸球、および好塩基球）またはリンパ球系列（Tリンパ球およびBリンパ球ならびにナチュラルキラー細胞）に沿って発生する。骨髄細胞系列細胞（例えば、好中球およびマクロファージ）の主要な機能は、感染性生物、有害な損傷を受けた生細胞、老化細胞、および死細胞（アポトーシス性死細胞および壊死性死細胞）に対する食作用のほか、細胞破砕物の除去である。健全な動物に由来する食細胞は、複製されず、二倍体である、すなわち、DNA量が $2n$ である。平均して、各細胞は、 $< 10ng$ のDNA、 $< 20ng$ のRNA、および $< 300ng$ のタンパク質を含有する。非食細胞もまた、二倍体であり、死細胞または感染性生物の内部化に関与しないが、これらもまた、DNA量が $2n$ である。

【0004】

多様な白血球部分集団の生存期間は、数日間（例えば、好中球）～数カ月間（例えば、

10

20

30

40

50

マクロファージ)で変化する。他の細胞型と同様に、白血球も老化し、最終的には死ぬ。それらの老化過程において、ヒト血液由来の食細胞およびヒト組織由来の食細胞(例えば、好中球)は、カスパーゼの活性化、核の濃縮、およびクロマチンの断片化を含む、プログラム細胞死(すなわち、アポトーシス)の全ての古典的なマーカーを呈示する。これらの細胞はまた、それらの細胞膜の細胞外表面上に、多数の「イートミー」フラッグ(例えば、ホスファチジルセリン、糖)も提示する。結果として、死につつある細胞および死細胞、ならびにそれらの細胞下断片は、他の食細胞により、組織および血液から除去される。

#### 【0005】

疾患の早期診断は、このような疾患の処置または治療の奏効の可能性を増大させることが多い。しかし、現行の診断法は、全血液の使用、または血液の異なる成分への分離であって、そのうちの単一の成分が検査のために選ばれる成分への分離に焦点を当てている。この手法は、検出されるシグナルを強化する可能性もあるが、また、潜在的に重要な情報の喪失を結果としてもたらす可能性もある。疾患を有することが公知でない個体、または再発性の疾患を有する個体における、疾患または状態の存在についての診断、とりわけ、早期の診断を可能とする個別化診断法が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明の1つの目的は、無細胞体液、食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞から選択される2つ以上の異なる成分の組合せを使用することにより、疾患特異的マーカーまたは状態特異的マーカー、例えば、核酸、タンパク質、炭水化物、および/または脂質などの検出を容易としうる診断法を提供することである。本発明の別の目的は、疾患特異的マーカーまたは状態特異的マーカーを同定する方法を提供し、このようなマーカーを、単独で、または疾患もしくは状態を診断することが公知の任意のマーカーと共に、さらに使用することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明のいくつかの実施形態は以下である：

#### 実施形態1 .

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助する方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態2 .

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から

10

20

30

40

50

なる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップと

を含む方法。

#### 実施形態3 .

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の予後診断を援助する方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態4 .

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が2nを超える食細胞(>2n食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が2nの食細胞(=2n食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記処置の後で

10

20

30

40

50

前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを設定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップとを含む方法。

実施形態5 .

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞 ( $> 2n$ 食細胞) の集団、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを設定し、

第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞 ( $= 2n$ 食細胞) の集団、第1の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを設定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞 ( $> 2n$ 食細胞) の集団、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを設定し、

第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞 ( $= 2n$ 食細胞) の集団、第2の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを設定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

実施形態6 .

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞 ( $> 2n$ 食細胞) の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循

10

20

30

40

50

環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された対照細胞の集団であり、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞(>  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された非食細胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で、前記対象から単離された対照細胞の集団であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞の集団からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップとを含む方法。

実施形態7 .

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞(>  $2n$ 食細胞)の集団、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞(>  $2n$ 食細胞)の集団、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであり、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップとを含む方法。

実施形態8 .

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

、

10

20

30

40

50

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであり、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップと

を含む方法。

実施形態9。

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップと

を含む方法。

実施形態10。

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、



b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態11.

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態12.

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $> 2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(=  $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態13.

対象における疾患または状態について処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処

10

20

30

40

50

置の前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

前記処置の前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(= $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を實質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

10

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

20

前記処置の後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(= $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記処置の後で前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を實質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップと

30

を含む方法。

実施形態14 .

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第1の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第1の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイル

40

を決定し、第1の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞(= $2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第1の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および第1の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を實質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つの第2のプロファイル

を決定し、前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

50

b) 第2の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第2の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

第2の時点において前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、第2の時点において前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および第2の時点において前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第2の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第4のプロファイルを決定し、

10

前記第3のプロファイルと第4のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

20

実施形態15.

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定し、

30

前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ の食細胞( $=2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第1の対照に由来する、前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルを決定し、

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの差異を同定するステップと、

40

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第3のプロファイルを決定し、

前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$

50

の食細胞 (= 2n 食細胞) の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された非食細胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される成分を含む第 2 の対照に由来する、前記 1 または複数のマーカーのうち少なくとも 1 つの第 4 のプロファイルを設定し、

前記第 3 のプロファイルと第 4 のプロファイルとの差異を同定するステップと、

c) a) で同定された前記差異と、b) で同定された前記差異との差異を同定するステップであって、c) における前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップとを含む方法。

10

#### 実施形態 16 .

対象における疾患または状態のための処置の有効性を評価するための方法であって、

a) 前記処置の前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された食細胞の集団、前記処置の前に前記対象から単離された、DNA 量が 2n を超える食細胞 (> 2n 食細胞) の集団から単離された分析物、前記処置の前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記処置の前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む第 1 の試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 1 のプロファイルを設定するステップと、

20

b) 前記処置の後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された、DNA 量が 2n を超える食細胞 (> 2n 食細胞) の集団から単離された分析物、前記処置の後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された対照細胞の集団から単離された分析物であって、前記対照細胞が、前記疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない分析物からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む第 2 の試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 2 のプロファイルを設定するステップと、

c) 前記第 1 のプロファイルと第 2 のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態についての前記処置の有効性を示すステップとを含む方法。

30

#### 実施形態 17 .

対象における疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法であって、

a) 第 1 の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第 1 の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第 1 の時点において前記対象から単離された、DNA 量が 2n を超える食細胞 (> 2n 食細胞) の集団から単離された分析物、第 1 の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第 1 の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む第 1 の試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 1 のプロファイルを設定するステップと、

40

b) 第 2 の時点において前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、第 2 の時点において前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、第 2 の時点において前記対象から単離された、DNA 量が 2n を超える食細胞 (> 2n 食細胞) の集団から単離された分析物、第 2 の時点において前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および第 2 の時点において前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される 2 つ以上の異なる成分を含む第 2 の試料に由来する、前記疾患または状態の 1 または複数のマーカーの第 2 のプロファイル

50

を決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記対象における前記疾患または状態の進行または後退を示すステップとを含む方法。

実施形態18.

対象における疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物を同定するための方法であって、

a) 前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与する前に前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第1の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記化合物を前記対象へと投与した後で前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む第2の試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第2のプロファイルを決定するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記同定された差異は、前記化合物が、前記対象における前記疾患または状態を改善または処置することが可能であることを示すステップとを含む方法。

実施形態19.

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

実施形態20.

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態21.

対象における疾患または状態を予後診断するかまたは予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液、前記対象から単離された食細胞の集団、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団、前記対象から単離された循環小胞の集団、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態22.

対象における疾患もしくは状態を診断するかまたは対象における疾患もしくは状態の診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の存在を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態23.

対象において疾患または状態を発症する危険性を評価するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象において前記疾患または状態を発症する危険性を示すステップとを含む方法。

#### 実施形態24.

対象における疾患もしくは状態を予後診断するかまたは対象における疾患もしくは状態を予後診断を援助するための方法であって、

a) 前記対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、前記対象から単離され

10

20

30

40

50

た食細胞の集団から単離された分析物、前記対象から単離された、DNA量が $2n$ を超える食細胞( $>2n$ 食細胞)の集団から単離された分析物、前記対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および前記対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む試料に由来する、前記疾患または状態の1または複数のマーカーの第1のプロファイルを決定するステップと、

b) 前記第1のプロファイルと前記疾患または状態の前記マーカーのレポジトリーに由来する前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの第2のプロファイルとの差異を同定するステップであって、前記差異は、前記対象における前記疾患または状態の予後を示すステップとを含む方法。

10

実施形態25.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記対照と比較して前記試料中で上方調節または活性化されている、実施形態1から3および10から12のいずれか一項に記載の方法。

実施形態26.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記対照と比較して前記試料中で下方調節または阻害されている、実施形態1から3および10から12のいずれか一項に記載の方法。

実施形態27.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記第1の対照と比較して前記第1の試料中で、または前記第2の対照と比較して前記第2の試料中で、上方調節または活性化されている、実施形態4から6および13から15のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態28.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記第1の対照と比較して前記第1の試料中で、または前記第2の対照と比較して前記第2の試料中で、下方調節または阻害されている、実施形態4から6および13から15のいずれか一項に記載の方法。

実施形態29.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記第2の試料と比較して前記第1の試料中で上方調節または活性化されている、実施形態7から9および16から18のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態30.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記第2の試料と比較して前記第1の試料中で下方調節または阻害されている、実施形態7から9および16から18のいずれか一項に記載の方法。

実施形態31.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記レポジトリーと比較して前記試料中で上方調節または活性化されている、実施形態19から24のいずれか一項に記載の方法。

実施形態32.

前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記レポジトリーと比較して前記試料中で下方調節または阻害されている、実施形態19から24のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態33.

前記第1のプロファイルまたは前記第2のプロファイルが、前記疾患または状態の前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの非存在を含む、実施形態1から32のいずれか一項に記載の方法。

実施形態34.

前記第3のプロファイルまたは前記第4のプロファイルが、前記疾患または状態の前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つの非存在を含む、実施形態4から6およ

50

び 13 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 35 .

前記方法が循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞を含む場合、前記方法は、前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞を溶解させるステップをさらに含む、実施形態 1 から 9 および 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 36 .

前記方法が循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞を含む場合、前記方法は、細胞内容物のうちの少なくとも一部を、前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞から抽出するステップをさらに含む、実施形態 1 から 9、19 から 21、および 35 のいずれか一項に記載の方法。

10

実施形態 37 .

前記方法が前記無細胞体液を含む場合、前記方法は、前記 1 または複数のマーカーを、前記無細胞体液から抽出するステップをさらに含む、実施形態 1 から 9、および 19 から 21、35、および 36 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 38 .

前記方法が前記無細胞体液を含む場合、前記無細胞体液は、腎臓通過性核酸を含む、実施形態 1 から 9、および 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態 39 .

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記循環罹病細胞、無細胞体液試料、食細胞、または $> 2n$ 食細胞に存在する、実施形態 1 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 40 .

前記疾患または状態の前記 1 または複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記循環罹病細胞、無細胞体液試料、食細胞、または $> 2n$ 食細胞のいずれにも存在しない、実施形態 1 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 41 .

前記循環罹病細胞、前記疾患または状態の影響を受けない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞のうちの 1 または複数が除核される、実施形態 1 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態 42 .

物理的除去、化学的処置、フォトアブレーション、または紫外線照射を使用して、前記細胞が除核される、実施形態 41 に記載の方法。

実施形態 43 .

前記物理的除去が、顕微針、光ピンセット、または吸引を使用する、実施形態 42 に記載の方法。

実施形態 44 .

前記レポジトリーが、データマイニングにより得られる、実施形態 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態 45 .

前記食細胞、 $> 2n$ 食細胞、または $= 2n$ 食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、角化細胞、またはこれらの混合物である、実施形態 1 から 44 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 46 .

前記非食細胞が、T細胞、B細胞、ヌル細胞、好塩基球、またはこれらの混合物である、実施形態 1 から 45 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 47 .

前記循環罹病細胞が、血液細胞、腫瘍細胞、リンパ腫細胞、胎児細胞、アポトーシス細

50



胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、前駆細胞、間葉細胞、骨芽細胞、骨細胞、造血幹細胞、泡沫細胞、脂肪細胞、経子宮頸管細胞、循環心筋細胞、循環線維細胞、循環筋細胞、腎臓由来の循環細胞、消化管由来の循環細胞、肺由来の循環細胞、生殖器官由来の循環細胞、中枢神経系由来の循環細胞、循環肝細胞、脾臓由来の循環細胞、胸腺由来の循環細胞、甲状腺由来の循環細胞、内分泌腺由来の循環細胞、副甲状腺由来の循環細胞、下垂体由来の循環細胞、副腎由来の循環細胞、ランゲルハンス島由来の循環細胞、膵臓由来の循環細胞、視床下部由来の循環細胞、前立腺組織由来の循環細胞、乳房組織由来の循環細胞、循環網膜細胞由来の循環細胞、循環眼細胞、循環聴細胞、循環表皮細胞、尿路由来の循環細胞、またはこれらの混合物である、実施形態 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 4 8 .

前記対照細胞が、正常細胞である、実施形態 1 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 4 9 .

前記対照細胞が、循環細胞である、実施形態 1 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 0 .

前記循環小胞が、循環微小胞、アポトーシス小体、微粒子、膜結合小胞、多胞体、ナノ小胞、微小粒子、および A R R D C - 1 媒介微小胞 ( A R M M ) からなる群から選択される、実施形態 1 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 1 .

前記循環微小胞が、エキソソームまたは尿中エキソソームである、実施形態 5 0 に記載の方法。

実施形態 5 2 .

前記無細胞体液が、体液から分離される、実施形態 1 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 3 .

前記体液が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液である、実施形態 5 2 に記載の方法。

実施形態 5 4 .

前記無細胞体液が、濾過、遠心分離、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより分離される、実施形態 5 2 および 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 5 .

前記無細胞体液が、前記試料に存在する物質を使用することにより分離される、実施形態 5 2 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 6 .

前記物質が、前記疾患または状態のマーカーの産物である、実施形態 5 5 に記載の方法。

実施形態 5 7 .

前記無細胞体液が、血漿または血清である、実施形態 1 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 8 .

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、前記対象の体液、組織、または細胞から単離される、実施形態 1 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5 9 .

前記体液試料が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、

10

20

30

40

50

胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液である、実施形態 5 8 に記載の方法。

実施形態 6 0 .

前記細胞が、白血球である、実施形態 5 8 に記載の方法。

実施形態 6 1 .

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、抗体を使用して単離される、実施形態 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

実施形態 6 2 .

前記食細胞、 $> 2n$  食細胞、 $= 2n$  食細胞、または非食細胞が、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、濾過、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスルーブット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより単離される、実施形態 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 3 .

前記 1 または複数のマーカーが、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの組合せである、実施形態 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 4 .

前記核酸が、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、または DNA - RNA ハイブリッドである、実施形態 6 3 に記載の方法。

20

実施形態 6 5 .

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補的 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、実施形態 6 4 に記載の方法。

実施形態 6 6 .

前記 RNA が、メッセンジャー RNA ( mRNA )、マイクロ RNA ( miRNA )、核小体低分子 RNA ( snoRNA )、リボソーム RNA ( rRNA )、転移 RNA ( tRNA )、低分子干渉 RNA ( siRNA )、ヘテロ核 RNA ( hnRNA )、または低分子ヘアピン RNA ( shRNA ) である、実施形態 6 4 に記載の方法。

30

実施形態 6 7 .

前記タンパク質が、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リボタンパク質、糖タンパク質、またはホルモンである、実施形態 6 3 に記載の方法。

実施形態 6 8 .

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾコリングリセロリン脂質、リゾエタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル - CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、スフィンゴシン、リゾスフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラズマローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 ( LDL )、極低密度リポタンパク質 ( VLDL )、高密度リポタンパク質 ( HDL )、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、またはこれらの誘導体である、実施形態 6 3 に記載の方法。

40

実施形態 6 9 .

前記炭水化物が、単糖、二糖、多糖、オリゴ糖、またはこれらの誘導体である、実施形態 6 3 に記載の方法。

50

## 実施形態 7 0 .

前記代謝産物が、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物、無機代謝産物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、実施形態 6 3 に記載の方法。

## 実施形態 7 1 .

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 1 から 3、1 0 から 1 2、および 1 9 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 実施形態 7 2 .

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 6 5 に記載の方法。

10

## 実施形態 7 3 .

前記第 1 のプロファイルまたは前記第 2 のプロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 4 から 9 および 1 3 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 実施形態 7 4 .

前記第 1 のプロファイルまたは前記第 2 のプロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 6 5 に記載の方法。

## 実施形態 7 5 .

前記第 3 のプロファイルまたは前記第 4 のプロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 4 から 6、および 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 実施形態 7 6 .

前記第 3 のプロファイルまたは前記第 4 のプロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 7 5 に記載の方法。

## 実施形態 7 7 .

前記定量的アッセイが、シークエンシング、標的化シークエンシング、一分子リアルタイムシークエンシング、電子顕微鏡法ベースのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガージデオキシ終結シークエンシング、エキソシークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シークエンシング、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理特徴シークエンシング、エマルジョン PCR、マルチプレックス PCR、低変性温度での共増幅 PCR (COLD-PCR)、可逆性色素ターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアタームシークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成によるシークエンシング、リアルタイムシークエンシング、リバースターミネーターシークエンシング、ナノポアシークエンシング、4 5 4 シークエンシング、Solexa Genome Analyzer シークエンシング、SOLID (登録商標) シークエンシング、MS-PEP シークエンシング、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析、低変性温度での共増幅 PCR (COLD-PCR

30

40

50

)、マルチプレックスPCR、定量的PCR、リアルタイムPCR、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せを使用する、実施形態72、66、および76のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態78.

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態77に記載の方法。

#### 実施形態79.

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、シーケンシング分析、電気泳動分析、制限断片長多型(RFLP)分析、ノーザンブロット分析、定量的PCR、逆転写酵素PCR分析(RT-PCR)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ(HMA)、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)、RNアーゼミスマッチ分析、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、表面プラズモン共鳴、サザンブロット分析、*in situ*ハイブリダイゼーション、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)、色素形成*in situ*ハイブリダイゼーション(CISH)、免疫組織化学(IHC)、マイクロアレイ、比較ゲノムハイブリダイゼーション、核型分析、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅(MLPA)、短鎖蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR(QMP SF)、顕微鏡法、メチル化特異的PCR(MSP)アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるHpaII小断片濃縮(HELP)アッセイ、放射性酢酸標識アッセイ、比色DNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)アッセイ、制限ランドマークゲノム走査、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性についての分子破壊光アッセイ、クロマトグラフィー分離、メチル化感受性制限酵素分析、非メチル化シトシンからウラシルへの亜硫酸駆動型転換、低変性温度での共増幅PCR(COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、メチル結合PCR分析、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態77に記載の方法。

#### 実施形態80.

前記核酸プロファイルが、標的化シーケンシング、一分子リアルタイムシーケンシング、エキソンシーケンシング、電子顕微鏡法ベースのシーケンシング、トランジスター媒介型シーケンシング、直接的シーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガージデオキシ終結シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR(COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solera Genome Analyzerシーケンシング、SOLID(登録商標)シーケンシング、MS-PETシーケンシング、

10

20

30

40

50

質量分析、およびこれらの組合せからなる群から選択されるシーケンシング法により決定される、実施形態 77 に記載の方法。

実施形態 81 .

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 77 に記載の方法。

実施形態 82 .

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、*in situ* ハイブリダイゼーション、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (SELDI - TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q - TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI - MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI - FT - ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴、シーケンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 77 に記載の方法。

10

実施形態 83 .

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記 1 または複数のマーカーのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリストイル化状態、コンフォメーション状態、またはこれらの組合せの決定を含む、実施形態 77 に記載の方法。

20

実施形態 84 .

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (SELDI - TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q - TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI - MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI - FT - ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 77 に記載の方法。

30

実施形態 85 .

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、パルスドアンペロメトリ検出を用いた高速アニオン交換クロマトグラフィー (HPAEC - PAD)、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、蛍光アッセイ、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (SELDI - TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q - TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI - MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI - FT - ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 77 に記載の方法。

40

実施形態 86 .

前記対象が、少なくとも 2 つの疾患または状態を有する、実施形態 1 から 85 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 87 .

50

前記対象が、少なくとも1つの出生前または妊娠関連の疾患または状態を有する、実施形態86に記載の方法。

実施形態88 .

前記対象が、哺乳動物である、実施形態1から87のいずれか一項に記載の方法。

実施形態89 .

前記哺乳動物が、ヒトである、実施形態89に記載の方法。

実施形態90 .

前記疾患または状態が、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である、実施形態1から89のいずれか一項に記載の方法。

10

実施形態91 .

前記差異が、1倍を超える差異である、実施形態1から90のいずれか一項に記載の方法。

実施形態92 .

前記差異が、少なくとも、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である、実施形態91に記載の方法。

20

実施形態93 .

前記第2のプロファイルと前記第4のプロファイルとが同じである、実施形態4から6および13から15のいずれか一項に記載の方法。

実施形態94 .

疾患または状態についての1または複数のマーカーを同定するための方法であって、

a) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または $> 2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第1のプロファイルを決定し、

前記疾患または状態を有する前記対象に由来する $= 2n$ 食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第2のプロファイルを決定し、

30

前記第1のプロファイルと第2のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであって、前記第1の差異のセットが、前記第2のプロファイルと比べて、前記第1のプロファイルに特異的であるステップと、

b) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する食細胞の集団または $> 2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第3のプロファイルを決定し、

前記疾患または状態を有さない前記対照の対象に由来する $= 2n$ 食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第4のプロファイルを決定し、

前記第3のプロファイルと前記第4のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、前記第2の差異のセットが、前記第4のプロファイルと比べて、前記第3のプロファイルに特異的であるステップと、

40

c) b)において同定された前記差異のセットと比べて、a)において同定された前記差異のセットに特異的な1または複数の分析物を同定するステップであって、c)における前記同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法。

実施形態95 .

疾患または状態についての1または複数のマーカーを同定するための方法であって、

a) 前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または $> 2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第1のプロファイルを決定するステップと、

50

b) 前記第1のプロファイルを、前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する分析物のレポジトリーに由来する第2のプロファイルと比較するステップと、

c) 前記第1のプロファイルと前記第2のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、前記差異のセットが、前記第2のプロファイルと比べて、前記第1のプロファイルに特異的であるステップと、

d) 前記差異のセットに特異的な1または複数の分析物を同定するステップであって、前記同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法。

実施形態96.

a) 前記疾患または状態を有する前記対象における前記疾患または状態の影響を受ける細胞または組織に由来する分析物の第5のプロファイルを得、

前記疾患または状態を有する前記対象における前記疾患または状態の影響を受けない細胞または組織に由来する分析物の第6のプロファイルを得、

前記第5のプロファイルと前記第6のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであって、前記差異のセットが、前記第6のプロファイルと比べて、前記第5のプロファイルに特異的であるステップと、

b) d)において同定された前記差異のセットに存在する、c)の前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つを同定するステップとをさらに含む、実施形態95に記載の方法。

実施形態97.

前記1または複数のマーカーを、前記無細胞体液から抽出するステップをさらに含む、実施形態90から96のいずれか一項に記載の方法。

実施形態98.

a)の前に、前記食細胞、前記 $> 2n$ 食細胞、前記 $= 2n$ 食細胞、または前記非食細胞を溶解させるステップをさらに含む、実施形態90から97のいずれか一項に記載の方法。

実施形態99.

a)の前に、細胞内容物のうち少なくとも一部を、前記食細胞、前記 $> 2n$ 食細胞、前記 $= 2n$ 食細胞、または前記非食細胞から抽出するステップをさらに含む、実施形態90から98のいずれか一項に記載の方法。

実施形態100.

前記食細胞または前記 $> 2n$ 食細胞が、罹病生細胞、死んだ罹病細胞、罹病アポトーシス細胞、循環腫瘍細胞、感染因子、胎児細胞、トロホプラスト、またはこれらの断片を含む、実施形態90から99のいずれか一項に記載の方法。

実施形態101.

前記疾患または状態の前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記無細胞体液試料、前記食細胞、または前記 $> 2n$ 食細胞に存在する、実施形態90から100のいずれか一項に記載の方法。

実施形態102.

前記疾患または状態の前記1または複数のマーカーのうち少なくとも1つが、前記無細胞体液試料、前記食細胞、または前記 $> 2n$ 食細胞に存在しない、実施形態90から101のいずれか一項に記載の方法。

実施形態103.

c)の前記同定された差異を、前記疾患または状態の1または複数の既知のマーカーのレポジトリーと比較するステップをさらに含む、実施形態90から102のいずれか一項に記載の方法。

実施形態104.

前記レポジトリーが、データマイニングにより得られる、実施形態97に記載の方法。

実施形態105.

前記食細胞、 $> 2n$ 食細胞、または $= 2n$ 食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、

10

20

30

40

50

樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、角化細胞、またはこれらの混合物である、実施形態 90 から 104 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 106 .

前記非食細胞が、T細胞、B細胞、ヌル細胞、好塩基球、またはこれらの混合物である、実施形態 90 から 105 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 107 .

前記無細胞体液が、体液から分離される、実施形態 90 から 106 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 108 .

前記体液試料が、血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、または眼液である、実施形態 107 に記載の方法。

10

実施形態 109 .

前記無細胞体液試料が、濾過、遠心分離、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せにより分離される、実施形態 107 および 108 のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態 110 .

前記無細胞体液試料が、前記試料に存在する物質を使用することにより分離される、実施形態 109 に記載の方法。

実施形態 111 .

前記 1 または複数のマーカーが、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの組合せである、実施形態 90 から 110 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 112 .

前記核酸が、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、または DNA - RNA ハイブリッドである、実施形態 111 に記載の方法。

実施形態 113 .

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補的 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、実施形態 112 に記載の方法。

30

実施形態 114 .

前記 RNA が、メッセンジャー RNA ( mRNA )、マイクロ RNA ( miRNA )、核小体低分子 RNA ( snoRNA )、リボソーム RNA ( rRNA )、転移 RNA ( tRNA )、低分子干渉 RNA ( siRNA )、ヘテロ核 RNA ( hnRNA )、または低分子ヘアピン RNA ( shRNA ) である、実施形態 112 に記載の方法。

実施形態 115 .

前記タンパク質が、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リボタンパク質、糖タンパク質、またはホルモンである、実施形態 111 に記載の方法。

40

実施形態 116 .

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾコリングリセロリン脂質、リゾエタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル - CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基 -

50



1 - リン酸、スフィンゴシン、リゾスフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラズマローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 (LDL)、極低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、またはこれらの誘導体である、実施形態 111 に記載の方法。

実施形態 117 .

前記炭水化物が、単糖、二糖、多糖、オリゴ糖、またはこれらの誘導体である、実施形態 111 に記載の方法。

実施形態 118 .

前記代謝産物が、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物、無機代謝産物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、実施形態 111 に記載の方法。

10

実施形態 119 .

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 90 から 118 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 120 .

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態 119 に記載の方法。

実施形態 121 .

前記定量的アッセイが、シークエンシング、標的化シークエンシング、一分子リアルタイムシークエンシング、エキソンシークエンシング、電子顕微鏡法ベースのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガージデオキシ終結シークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シークエンシング、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理特徴シークエンシング、エマルジョン PCR、低変性温度での共増幅 PCR (COLD-PCR)、マルチプレックス PCR、可逆性色素ターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアタームシークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成によるシークエンシング、リアルタイムシークエンシング、リバースターミネーターシークエンシング、ナノポアシークエンシング、454シークエンシング、Solexa Genome Analyzerシークエンシング、SOLID (登録商標)シークエンシング、MS-PEPシークエンシング、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロ

20

30

40

実施形態 122 .

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態 119 に記載の方法。

実施形態 123 .

50

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、シーケンシング分析、電気泳動分析、制限断片長多型（RFLP）分析、ノーザンブロット分析、定量的PCR、逆転写酵素PCR分析（RT-PCR）、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ（HMA）、一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）、RNアーゼミスマッチ分析、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間（MALDI-TOF）質量分析、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間（SELDI-TOF）質量分析、四重極飛行時間（Q-TOF）質量分析、大気圧光イオン化質量分析（APPI-MS）、フーリエ変換質量分析（FTMS）、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（MALDI-FT-ICR）質量分析、二次イオン質量分析（SIMS）、表面プラズモン共鳴、サザンブロット分析、*in situ*ハイブリダイゼーション、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）、色素形成*in situ*ハイブリダイゼーション（CISH）、免疫組織化学（IHC）、マイクロアレイ、比較ゲノムハイブリダイゼーション、核型分析、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅（MLPA）、短鎖蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR（QMPSF）、顕微鏡法、メチル化特異的PCR（MSP）アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるHpaII小断片濃縮（HELP）アッセイ、放射性酢酸標識アッセイ、比色DNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降（ChIP-on-chip）アッセイ、制限ランドマークゲノム走査、メチル化DNA免疫沈降（MeDIP）、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性についての分子破壊光アッセイ、クロマトグラフィー分離、メチル化感受性制限酵素分析、非メチル化シトシンからウラシルへの亜硫酸駆動型転換、低変性温度での共増幅PCR（COLD-PCR）、マルチプレックスPCR、メチル結合PCR分析、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態119に記載の方法。

#### 実施形態124.

前記核酸プロファイルが、標的化シーケンシング、一分子リアルタイムシーケンシング、エキソンシーケンシング、電子顕微鏡法ベースのシーケンシング、トランジスター媒介型シーケンシング、直接的シーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガージデオキシ終結シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR（COLD-PCR）、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerシーケンシング、SOLID（登録商標）シーケンシング、MS-PETシーケンシング、質量分析、およびこれらの組合せからなる群から選択されるシーケンシング技法により決定される、実施形態119に記載の方法。

#### 実施形態125.

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、実施形態119に記載の方法。

#### 実施形態126.

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、*in situ*ハイブリダイゼーション、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

C)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴、シーケンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態119に記載の方法。

実施形態127。

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記1または複数のマーカのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、コンフォメーション状態、またはこれらの組合せの決定を含む、実施形態119に記載の方法。

実施形態128。

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態119に記載の方法。

実施形態129。

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、パルスドアンペロメトリ検出を用いた高速アニオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、蛍光アッセイ、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、実施形態119に記載の方法。

実施形態130。

前記対象が、哺乳動物である、実施形態90から129のいずれか一項に記載の方法。

実施形態131。

前記哺乳動物が、ヒトである、実施形態130に記載の方法。

実施形態132。

前記疾患または状態が、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である、実施形態90から131のいずれか一項に記載の方法。

実施形態133。

前記差異が、1倍を超える差異である、実施形態90から132のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

実施形態 134 .

前記差異が、少なくとも、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である、実施形態 133 に記載の方法。

実施形態 135 .

前記疾患または状態の少なくとも1つの診断パラメータを決定するステップをさらに含む、実施形態 1 から 93 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 136 .

前記診断パラメータが、身体検査、目視検査、生検、走査、組織検査、放射線医学、画像化、超音波、市販キットの使用、遺伝子検査、免疫学的検査、体液の分析、または神経活動のモニタリングにより決定される、実施形態 135 に記載の方法。

10

実施形態 137 .

前記1または複数のマーカーが、AKT2、BAK1、EGFR、ERBB2、ETS2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、PDGFB、RB1、SERPINB2、SNCG、およびSPP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態 1 から 93 および 135 から 136 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 138 .

前記1または複数のマーカーが、AKT1、AKT2、BAK2、CDC25A、E2F1、EGFR、ERBB2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、NFKB1、PDGFB、PIK3R1、PNN、RB1、SERPINB2、SERPINB5、SNCG、SPP1、TERT、TIMP3、およびTP53からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態 1 から 93 および 135 から 137 のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態 139 .

前記1または複数のマーカーが、CASP8、CASP9、COL18A1、ETS2、HTATIP2、MMP9、SRC、およびTWIST1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態 1 から 93 および 135 から 138 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 140 .

前記1または複数のマーカーが、AKT1、APAF1、ATM、CDC25A、CDKN1A、ETS2、FOS、IL8、ITGA4、ITGA6、ITGAV、JUN、MAP2K1、NFKBIA、PLAU、PLAUR、RAF1、SERPINB2、SYK、TIMP1、TNF、TNFRSF10B、およびTNFRSF1Aからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態 1 から 93 および 135 から 139 のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態 141 .

前記1または複数のマーカーが、ACP2、AK2、AKT3、ARL5B、ATP2B3、BGN、BRAF、BTG2、CAMKK2、CAPG、CAPN12、CPLX2、DENND5A、DNA2、FAM104A、FNIP1、GFRA4、GLUD1、GNAQ、GP1BB、HNRPLL、HOXA2、HPS3、INPP4A、ITGAV、KLHL23、LANCL2、LYPD6、MAPKAPK3、MEF2A(EG:4205を含む)、MEF2C、NVL、PCYT1A、PGLYRP4、PLOD1、PPP1CB、PRKAB2、PROS1、PTPRE、RASA4(EG:10156を含む)、RBMS2、RBPJ、STAT5B、THBS1、TRIB1、TRIM2、TSPAN6、およびZDHHC21からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態 1 から 93 および 135 から 140 のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態 142 .

前記1または複数のマーカーが、B4GALT5、BOP1、CCL2、CCL3、CCL3L1、CCRL2、CD83、CLEC4G、CLIC4、CTSC、CTSO、

50

CXCL10、FCGR3A、FPR3、HBA1、HBB、LRMP、MAP1LC3B2、MS4A4A、MSR1、MYADML、NID1、PF4、PION、RNF217、SAMD9L、SERPING1、およびSPARCからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態1から93および135から141のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態143 .

前記1または複数のマーカーが、ACOT9、AMPD2、ARHGAP15、BATF2、C3AR1、C5orf41、CCL3、CCL3L1、CD63、CHST11、CHSY1、CLEC4G、CTS2、CXorf21、CYTH4、CYTIP、DLEU2、DNAJA1、DOCK8、DTX3L、DUSP6、EPSTI1、ERF、F2RL1、FYB、GABRB2、GBP5、GLRX、GNB4、ICAM1、IFI35、IFIH1、IFNAR2、IL1R1、IRF1、ITGA5、LAP3、LAPTM5、LCP2、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MICAL2、MT1DP、MT1JP、MT1M、MT2A、MYADML、NEK6、NINJ2、NNMT、NT5C3L、NUB1、PDE4B、PLOD1、PML、PRKCB、PSMB9、RCN3、RGS4、RNASE6、RTP4、SAMD9L、SEL1L、SERPING1、SETX、SIGLEC10、SKIL、SLC7A7、SNORA21、SP100、SP110、SP140、SSFA2、STAT2、STK17B、STK3、TDRD7、TMCC1、TMPRSS11E2、TNFRSF1B、TPM1、TRIM21、TXNDC4、UBE2L6、UBE2W、USP18、VAV1、WARS、WIPF1、およびWIP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態1から93および135から142のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態144 .

前記1または複数のマーカーが、ADAR、ADM、ALAS1、ANKRD22、ARHGAP27、B3GNT5、BCL10、C12orf35、C15orf29、C2orf59、CD177、CEACAM1、CPEB2、DDX58、F2RL1、GDPD3、GNAI3、HIST2H3A、HIST2H3D、HIST2H4A、HMGCR、HSPA6、HSPC159、IL4R、IMPA2、KPNB1、KREMN1、KRT23、LDLR、LOC100130904、LTB4R、MAEA、MARK2、MBOAT2、MPZL3、N4BP1、NBEAL2、NMI、NPEPPS、PARP14、PGM2、PPIF、PXN、RALBP1、ROD1、RPS6KA1、S100P、SERTAD2、SLC9A1、SLPI、SP110、SPINT1、ST14、TBC1D3、TNFRSF9、TRIM21、UPP1、VPS24、ZBTB34、およびZNF256からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、実施形態1から93および135から143のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態145 .

前記1または複数のマーカーが、実施形態94から134のいずれか一項に記載の方法により同定される前記マーカーのうち少なくとも1または複数を含む、実施形態1から93および135から144のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態146 .

実施形態94から134のいずれか一項に記載の方法により同定される前記マーカーのうち少なくとも1または複数を検出する複数のマーカー検出剤を含むキット。

#### 実施形態147 .

対象における疾患または状態を処置または防止する方法であって、前記対象へと、実施形態6および15のいずれか一項に記載の方法により同定される化合物を含む組成物を投与するステップを含む方法。

#### 実施形態148 .

前記循環罹病細胞が、感染因子に感染している、実施形態1から93および135から145のいずれか一項に記載の方法。

#### 実施形態149 .

10

20

30

40

50

前記感染因子が、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、感染性タンパク質、または微生物である、実施形態 148 に記載の方法。

実施形態 150 .

前記方法が食細胞または  $> 2n$  食細胞を含む場合、前記食細胞または  $> 2n$  食細胞が、腎臓通過性核酸を含む、実施形態 1 から 93、135 から 145、および 148 から 149 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、CD2陽性末梢血液細胞による母体基準試料中および組合せ試料中の、潜在的なインフォマティブマーカーのセット、および相対リード百分率による関連対立遺伝子頻度を描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。三角：母体試料の基準対立遺伝子の百分率；丸：母体試料の代替的対立遺伝子のパーセント；四角：組合せ試料の基準対立遺伝子のパーセント；およびダイヤモンド：組合せ試料の代替的対立遺伝子のパーセント。

10

【0009】

【図2】図2は、母体基準試料中および組合せ試料中の、潜在的なインフォマティブマーカーのセット、および相対リード百分率による関連対立遺伝子頻度を描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。三角：母体試料の基準対立遺伝子のパーセント；丸：母体試料の代替的対立遺伝子のパーセント；四角：組合せ試料の基準対立遺伝子のパーセント；およびダイヤモンド：組合せ試料の代替的対立遺伝子のパーセント。

20

【0010】

【図3】図3は、潜在的なインフォマティブマーカーのセット、および循環無細胞体液 (ccff: circulating cell-free fluid) 試料と母体基準試料との間で比較した、相対リード百分率による関連対立遺伝子頻度を描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

【0011】

【図4】図4は、T細胞試料中の、潜在的なインフォマティブマーカーのセット、および相対リード百分率による関連対立遺伝子頻度を描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

30

【0012】

【図5】図5は、循環無細胞体液 (ccff) に、1%の単球試料を加えた組合せ試料中の、潜在的なインフォマティブマーカーのセット、および相対リード百分率による関連対立遺伝子頻度を描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

【0013】

【図6】図6は、母体血液の循環無細胞体液画分中の、インフォマティブマーカーの出現を、母体T細胞内のインフォマティブマーカーの欠如と比較して描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。

40

【0014】

【図7】図7は、無細胞体液に加えて、母体血液に由来する単球も含有する組合せ試料中の、インフォマティブマーカーの出現を、T細胞を含有する母体基準試料中のインフォマティブマーカーの欠如と比較して描示する。x軸に沿って、マーカーを描示し、y軸に沿って、異なる対立遺伝子についてのリードパーセントを描示する。

【0015】

【図8】図8は、母体だけの試料中および組合せ試料中の、例示的なインフォマティブマ

50

ーカーを描述する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

【0016】

【図9】図9は、母体だけの試料中および組合せ試料中の、例示的なインフォマティブマーカ―を描述する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

【0017】

【図10】図10は、母体だけの試料中および組合せ試料中の、例示的な非インフォマティブマーカ―を描述する。三角：基準対立遺伝子；丸：代替的対立遺伝子。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本明細書で別段に定義されない限り、本出願で使用される科学用語および技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載される、細胞培養および組織培養、分子生物学、細胞生物学およびがん生物学、神経生物学、神経化学、ウイルス学、免疫学、微生物学、薬理学、遺伝学、ならびにタンパク質化学および核酸化学との関連で使用される用語法、およびこれらの技法は、当技術分野において周知であり、一般に使用されている用語法および技法である。

10

【0019】

本出願で言及される上記の刊行物、特許、および特許出願公開、ならびに他の任意の刊行物、特許、および特許出願公開の全ては、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。利益相反の場合は、その具体的な定義を含む本明細書により管理する。

【0020】

本明細書を通して、「～を含む (comprise)」という語、または「～を含む (comprises)」または「～を含む (comprising)」など、その変化形は、言明された整数 (または成分) または整数 (または成分) の群の包含を含意するが、他の任意の整数 (または成分) または整数 (または成分) の群の除外は含意しないことが理解される。

20

【0021】

文脈により別段であることが明確に指示されない限り、単数形である「ある (a)」、 「ある (an)」、および「その」は、複数形を含む。

【0022】

「～を含む」という用語は、「～を含むがこれらに限定されない」を意味するのに使用される。「～を含む」および「～を含むがこれらに限定されない」は、互換的に使用される。

30

【0023】

「患者」、「対象」、または「個体」は、互換的に使用され、ヒトまたは非ヒト動物を指す。これらの用語は、ヒト、霊長動物、家畜動物 (例えば、ウシ、ブタ)、ペット動物 (例えば、イヌ、ネコ)、および齧歯動物 (例えば、マウスおよびラット) などの哺乳動物を含む。

【0024】

本明細書で使用される対照の対象とは、アッセイされる疾患または状態を有すると診断されていない任意の個体を指す。「正常対照」、「健常対照」、および「非罹病細胞」という用語も同様に、アッセイされる状態または疾患を有さず、したがって、測定される状態または障害についてのベースラインを決定するのに使用されうる供給源 (例えば、対象、対照の対象、細胞系) から採取された試料 (例えば、細胞、血清、組織) を意味する。また、対照の対象、正常対照、および健常対照は、得られ、基準として使用されるデータを含む、すなわち、複数の異なる対象について何度も繰り返し使用されうることも理解される。言い換えれば、例えば、対象試料を、対照試料と比較する場合、対照試料に由来するデータは、異なる実験のセットにおいて得られている可能性があるろう、例えば、多数の健常対象から得られる平均である可能性があり、対象についてのデータが得られる時点において実際には得られない可能性があるろう。

40

【0025】

50

本明細書で用いられる「診断」という用語は、患者が所与の疾患または状態を患っているのかどうかを当業者が推定および/または決定しうる方法を指す。当業者は、1または複数の診断指標、例えば、その存在、非存在、量、または量の変化が、状態の存在、重症度、または非存在を示すマーカーに基づいて診断を下すことが多い。

【0026】

本明細書で用いられる「予後診断」という用語は、疾患または状態の再発を含む、疾患または状態の進行の可能性を指す。

【0027】

国際出願第PCT/US09/31395号、同第PCT/US11/45009号、同第PCT/US11/44969号、同第PCT/US11/44973号、同第PCT/US11/44991号、同第PCT/US11/45002号、同第PCT/US11/44996号、および同第PCT/US11/45018号の開示は、全ての目的で参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0028】

本明細書で記載される各実施形態は、本明細書で記載される他の任意の実施形態と組み合わせることができる。

【0029】

本発明の方法についての記載

供給源の組合せに由来するプロファイルを使用することにより、当業者は、検査のために成分を試料から分離する工程で通常失われるデータを捕捉することが可能である。同時に、組み合わせられる分析成分は、使用されるマーカーについて濃縮される。したがって、本発明の方法では、不要な「ノイズ」がシグナルへと導入されない。対象特異的なプロファイルの比較を使用する実施形態はまた、特定の疾患または状態についての集団由来の平均プロファイルへの依存も廃する。集団由来の平均プロファイルを使用すれば、対象における特定の疾患または状態の検出または診断へと過誤が導入されうる。したがって、本発明の方法は、検出、診断、および処置を個体へと個別化することを可能とする。

20

【0030】

本発明の方法は、特異度、感度、および精度が高く、体液試料中、細胞内、または組織に存在する疾患特異的マーカーまたは状態特異的マーカーを検出することが可能である。一部の実施形態では、本発明の方法により、特異度、感度、および精度が、現行の方法と比較して改善された。本発明の方法はまた、例えば、患者試料を、個別の成分であって、そのうちの1つだけが検査のために選ばれる成分へと回収および分離する場合に、貴重なシグナルを失う問題も軽減する。したがって、ある特定の態様では、本発明は、疾患または状態を早期に、すなわち、疾患を従来の診断技法、例えば、画像化技法により診断される前に検出するための非侵襲的アッセイを提供し、したがって、このような疾患または状態を伴う個体に対する介入、防止、および処置のための必要および戦略に関する意思決定を改善するための基盤を提供する。

30

【0031】

本発明は、疾患または状態の関連マーカー（例えば、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物）のプロファイル（例えば、遺伝子/タンパク質/脂質/炭水化物の発現プロファイル、遺伝子型決定、遺伝子コピー数、遺伝子量、DNAメチル化など）を比較することにより、疾患または状態を診断するかまたはその診断を援助するための方法を提供する。比較のために使用される1つのプロファイルは、対象に由来する2つ以上の異なる成分（例えば、無細胞体液、食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞）の組合せを含む試料に由来するプロファイルでありうる。代替的に、比較のために使用されるプロファイルは、例えば、対象に由来する無細胞体液、食細胞、DNA量が $2n$ を超える（ $>2n$ 食細胞）食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞から単離された分析物を含む試料に由来するプロファイルでありうる。例えば、食細胞および無細胞体液に由来する分析物を含む試料であれば、分析物（例えば、核酸またはタンパク質）を食細胞から単離し（例えば、細胞を溶解させ、アフィニティーベースの技法を使用して分析物を単離することにより）、か

40

50



つ、分析物（例えば、核酸またはタンパク質）を無細胞体液からも単離し、分析物を組み合わせ、プロファイルを作成するのに有用な試料を創出することにより作り出すことができよう。言及を容易にするため、本明細書では、2つ以上の異なる成分（例えば、無細胞体液、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞、またはこれらから単離された分析物）の組合せを含む試料を、「組合せ試料」と称する場合がある。一部の実施形態では、組合せ試料は、食細胞の集団、 $> 2n$ 食細胞の集団、循環小胞の集団、または循環罹病細胞の集団それぞれの代わりに、食細胞の集団、 $> 2n$ 食細胞の集団、循環小胞の集団、または循環罹病細胞の集団の溶解物を含む場合もあり、これらの溶解物の画分または一部を含む場合もある。一部の実施形態では、組合せ試料は、食細胞の集団、 $> 2n$ 食細胞の集団、循環小胞の集団、または循環罹病細胞の集団のそれぞれの代わりに、食細胞の集団、 $> 2n$ 食細胞の集団、循環小胞の集団、または循環罹病細胞の集団の溶解物から単離された分析物を含む場合もあり、これらの溶解物から単離された分析物の画分または一部を含む場合もある。一部の実施形態では、組合せ試料は、無細胞体液自体ではなくて、無細胞体液から単離された分析物を含む場合もあり、無細胞体液から単離された分析物の一部または画分を含む場合もある。対照プロファイルは、同じ個体から採取された、食細胞、DNA量が $2n$ である（ $= 2n$ 食細胞）食細胞、非食細胞、または疾患もしくは状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞に由来しうる。代替的に、対照プロファイルは、疾患または状態のマーカーのレポジトリーに由来するプロファイルでもありうる。本発明の文脈では、「疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞」とは、循環罹病細胞と比較される細胞の集団を指し、疾患または状態の影響を受ける細胞を有意に少量含む。一部の実施形態では、「疾患または状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞」とは、疾患または状態の影響を受ける細胞を少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%含まない細胞である。一部の実施形態では、本発明の方法で使用されうる対照細胞は、胎児性物質を少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%含まない対照細胞など、胎児性物質（例えば、核酸、タンパク質、および本明細書に記載される任意の分析物）を実質的に含まない。

10

20

#### 【0032】

本発明はまた、疾患もしくは状態を発症する危険性を評価するか、前記疾患を予後診断するか、前記疾患の進行もしくは後退をモニタリングするか、処置の有効性を評価するか、または前記疾患もしくは状態を改善もしくは処置することが可能な化合物を同定するための方法も提供する。

30

#### 【0033】

一部の実施形態では、疾患または状態のマーカーを実質的に含まない全血液の1または複数の成分を、全血液試料から単離することができる。これら実施形態では、マーカーを実質的に含まない全血液の1または複数の成分を、対照試料（例えば、対照プロファイルを決断するための）として使用することができ、全血液試料の残りの部分を、分析試料（例えば、分析プロファイルを決断するための）として使用することができる。例えば、非食細胞の集団を、全血液試料から単離して、対照プロファイルを決断するのに使用しうるのに対し、全血液試料の残りの部分は、分析プロファイルを決断するのに使用する。

40

#### 【0034】

本発明の方法は、身体検査、目視検査、生検、走査、組織検査、放射線医学、画像化、超音波、市販キットの使用、遺伝子検査、免疫学的検査、体液の分析、または神経活動のモニタリングなど、任意の公知の診断法と共に使用することができる。

#### 【0035】

本発明の方法で使用されうる食細胞は、多様な種類の物質（例えば、アポトーシス細胞、感染因子、死細胞、生細胞、無細胞DNA、無細胞RNA、無細胞タンパク質）を取り込むことが可能な全ての種類の細胞を含む。一部の実施形態では、食細胞は、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、または角化細胞である

50

。一部の実施形態では、食細胞は、異なる種類の食細胞の混合物でありうる。一部の実施形態では、食細胞は、活性化食細胞、例えば、活性化マクロファージまたは活性化好中球でありうる。一部の実施形態では、食細胞は、組織球、例えば、ランゲルハンス細胞である。

#### 【0036】

本明細書で使用される「 $> 2n$ 食細胞」とは、DNA量が $2n$ を超える食細胞を指すのに対し、「 $= 2n$ 食細胞」とは、DNA量が $2n$ である食細胞を指す。本発明によれば、一部の食細胞は、体液に存在する罹病細胞/死につつつある罹病細胞/死んだ罹病細胞(およびこれらの細胞下断片)、ならびに/または無細胞の疾患特異的核酸、タンパク質、炭水化物、および/もしくは脂質を貪食する。このような食作用は、これらの疾患マーカーの、食細胞への内部化をもたらし、したがって、これらの食細胞のDNA量は、 $2n$ を超えるであろう。これに対し、一部の食細胞は、体液に存在する罹病細胞/死につつつある罹病細胞/死んだ罹病細胞もしくは断片、ならびに/または無細胞の疾患特異的核酸、タンパク質、脂質、および/もしくは炭水化物を貪食していない。この群の食細胞のDNA量は、依然として $2n$ である。一部の実施形態では、疾患特異的マーカー(例えば、疾患特異的突然変異を伴うDNA)は、 $> 2n$ 食細胞を介して発現しうる。例えば、罹病細胞の突然変異したDNAは、 $> 2n$ 食細胞の正常DNAへと組み込まれる。 $> 2n$ 食細胞の「組み込み」DNAの、その後におけるRNAへの転写およびRNAのタンパク質への翻訳は、罹病細胞を取り込んでいない食細胞(すなわち、 $= 2n$ 食細胞)とは異なる表現型を生成させる。他の実施形態では、内部化された疾患特異的マーカーは、 $> 2n$ 食細胞を介して発現しない。マーカーは、 $> 2n$ 食細胞の膜へと移行する場合もあり、 $> 2n$ 食細胞を介して分泌される場合もある。

#### 【0037】

本発明の方法で使用されうる循環罹病細胞は、疾患もしくは状態の影響を受けるかまたは感染因子に感染する可能性がある全ての種類の循環細胞を含む。循環細胞とは、体液に存在する細胞を指す。循環細胞は、必ずしも全身または循環系内を循環しうるわけではない。例えば、循環細胞は、滑液中、または脳脊髄液中、またはリンパ液中などに局所的に存在しうる。循環罹病細胞はまた、疾患もしくは状態の影響を受けるかまたは感染因子に感染した組織または器官から剥離する場合もある。

#### 【0038】

本発明の方法で対照細胞として使用されうる細胞は、全ての種類の正常細胞、または健康細胞、または疾患もしくは状態を実質的に含まない細胞、または感染因子を実質的に含まない細胞を含む。対照細胞とは、正常状態または非疾患状態を表す循環細胞または非循環細胞(例えば、生検細胞)であって、それらと循環罹病細胞上の測定値を比較して、1または複数の疾患関連マーカーが、循環罹病細胞と対照細胞との間において、異なるレベルで存在するのかどうかを決定するための循環細胞または非循環細胞でありうる。対照細胞の性質は、特定のアッセイについてのデザイン上の選択の問題である可能性があり、患者自身の正常組織から導出または決定される可能性がある。

#### 【0039】

一部の実施形態では、循環罹病細胞は、血液細胞、腫瘍細胞、リンパ腫細胞、胎児細胞、アポトーシス細胞、上皮細胞、内皮細胞、幹細胞、前駆細胞、間葉細胞、骨芽細胞、骨細胞、造血幹細胞、泡沫細胞、脂肪細胞、経子宮頸管細胞、循環心筋細胞、循環線維細胞、循環がん幹細胞、循環筋細胞、腎臓由来の循環細胞、消化管由来の循環細胞、肺由来の循環細胞、生殖器官由来の循環細胞、中枢神経系由来の循環細胞、循環肝細胞、脾臓由来の循環細胞、胸腺由来の循環細胞、甲状腺由来の循環細胞、内分泌腺由来の循環細胞、副甲状腺由来の循環細胞、下垂体由来の循環細胞、副腎由来の循環細胞、ランゲルハンス島由来の循環細胞、膵臓由来の循環細胞、視床下部由来の循環細胞、前立腺組織由来の循環細胞、乳房組織由来の循環細胞、循環網膜細胞由来の循環細胞、循環眼細胞、循環聴細胞、循環表皮細胞、または尿路由来の循環細胞である。他の実施形態では、循環罹病細胞は、異なる種類の循環罹病細胞の混合物でありうる。

## 【0040】

本発明の方法で使用されうる循環罹病細胞は、多様な疾患または状態の影響を受ける可能性がある。例示的な疾患または状態は、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である。

## 【0041】

本発明の方法で使用されうる循環罹病細胞は、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、原虫、感染性タンパク質、または微生物などの感染因子に感染しうる。

10

## 【0042】

一部の実施形態では、本発明の方法において有用な細胞（例えば、循環罹病細胞、疾患または状態の影響を受けていない対照細胞、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、 $= 2n$ 食細胞、または非食細胞）は、除核されている。細胞は、例えば、物理的除去（例えば、顕微針、光ピンセット、または吸引を介して）、化学的処置、フォトアブレーション、または紫外線照射を使用することにより除核することができる。

## 【0043】

本明細書で使用される「循環小胞」とは、細胞由来の膜結合小胞を指す。循環小胞は必ずしも、全身または循環系内を循環しうるわけではない。例えば、循環小胞は、滑液中、または脳脊髄液中、またはリンパ液中などに局所的に存在しうる。一部の実施形態では、循環小胞は、循環微小胞、アポトーシス小体、微粒子（micro-particles）、膜結合小胞、多胞体、ナノ小胞、微小粒子（microparticles）、およびARRDC-1媒介微小胞（ARMM）からなる群から選択される。さらなる実施形態では、循環微小胞は、エキソソームまたは尿中エキソソームである。

20

## 【0044】

一部の実施形態では、組合せ試料は、対象から単離された無細胞体液、対象から単離された食細胞の集団、対象から単離された $> 2n$ 食細胞の集団、対象から単離された循環小胞の集団、および対象から単離された循環罹病細胞の集団からなる群から選択される2つ以上の異なる成分を含む。一部の実施形態では、組合せ試料は、対象から単離された無細胞体液から単離された分析物、対象から単離された食細胞の集団から単離された分析物、対象から単離された $> 2n$ 食細胞の集団から単離された分析物、対象から単離された循環小胞の集団から単離された分析物、および対象から単離された循環罹病細胞の集団から単離された分析物を含む。

30

## 【0045】

本明細書で使用される、疾患または状態のマーカーの「プロファイル」とは、マーカーに関する任意の情報を広く指す場合がある。この情報は、定性的な（例えば、存在または非存在の）場合もあり、定量的な（例えば、レベル、コピー数、または遺伝子量の）場合もある。一部の実施形態では、マーカーのプロファイルは、このマーカーの非存在を示しうる。プロファイルは、核酸（例えば、DNAまたはRNA）プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せでありうる。本明細書で用いられる「マーカー」とは一般に、食細胞内で示差的に検出可能であり、疾患または状態の存在を示す分析物を指す。分析物は、食細胞内で定量的または定性的に識別されうる場合に、示差的に検出可能である。

40

## 【0046】

本発明の方法は、多様な疾患または状態に適用することができる。例示的な疾患または状態は、心血管の疾患もしくは状態、腎関連の疾患もしくは状態、出生前もしくは妊娠関連の疾患もしくは状態、神経もしくは神経精神の疾患もしくは状態、自己免疫もしくは免疫関連の疾患もしくは状態、がん、感染性の疾患もしくは状態、小児科疾患、小児科障害、もしくは小児科状態、ミトコンドリア障害、呼吸器消化管の疾患もしくは状態、生殖器

50

の疾患もしくは状態、眼の疾患もしくは状態、筋骨格の疾患もしくは状態、または皮膚の疾患もしくは状態である。

【0047】

本明細書で使用される「心血管疾患または状態」という用語は、心または血管（動脈および静脈）系に影響を与える任意の状態を指す。心血管疾患の例は、心筋梗塞、冠動脈疾患、経皮的冠動脈形成術（PTCA）、冠動脈バイパス術（CABG）、再狭窄症、末梢動脈疾患、脳卒中、腹部大動脈瘤、頭蓋内動脈瘤、大動脈アテローム性動脈硬化性脳卒中、心原性脳卒中、早発型心筋梗塞、心不全、肺塞栓、急性冠症候群（ACS）、狭心症、心肥大、動脈硬化、心筋炎、汎心炎、心内膜炎、高血圧、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化、脳血管疾患、心健康の低下、虚血性心疾患、心膜炎、心原性ショック、アルコール性心筋症、先天性心疾患、虚血性心筋症、高血圧性心筋症、弁膜症性心筋症、炎症性心筋症、全身性代謝性疾患に続発する心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、不整脈源性右室心筋症、高速型心筋症、緻密化障害心筋症、心弁性心疾患、高血圧性心疾患、心筋虚血性発作、不安定狭心症、心筋破裂、心原性ショック、塞栓症、深部静脈血栓症、不整脈、不整脈源性右室心筋症、糖尿病性心筋症、僧房弁逆流、僧房弁逸脱、末梢血管疾患、動脈疾患、頸動脈疾患、深部静脈血栓症、静脈疾患、脳血管疾患、動脈瘤（arterial aneurysm）、左室肥大、高血圧性腎疾患、高血圧性網膜疾患、血管炎、左主幹部疾患、動脈血管疾患、静脈血管疾患、微小循環血栓症、一過性脳血管発作、肢虚血、動脈瘤（aneurysm）、血栓症、表在性静脈血栓症、および深部静脈血栓症を含むがこれらに限定されない。

10

20

【0048】

本明細書で使用される「腎関連疾患または状態」という用語は、腎臓または腎臓系に影響を与える任意の疾患または状態を指す。腎関連疾患の例は、慢性腎疾患、原発性腎疾患、非糖尿病性腎疾患、糸球体腎炎、間質性腎炎、糖尿病性腎疾患、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、急速進行性糸球体腎炎、腎線維症、アルポート症候群、IDD腎炎、メサングウム増殖性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、腎間質性（interstitial）線維症、巣状分節状糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化型疾患、微量免疫型急速進行性糸球体腎炎、IgA腎症、多発性嚢胞腎、デント病、腎シスチン蓄積症（nephrocytosis）、ハイマン腎炎、常染色体優性（成人型）多発性嚢胞腎、常染色体劣性（小児型）多発性嚢胞腎、急性腎損傷、ネフローゼ症候群、腎虚血症、有足細胞疾患または有足細胞障害、タンパク尿症、糸球体疾患、膜性糸球体腎炎、巣状分節状糸球体腎炎、子癇前症、子癇、腎病変、膠原血管病、良性起立性（体位性）タンパク尿症、IgM腎症、膜性腎症、サルコイドーシス、糖尿病、薬物に起因する腎損傷、ファブリー病、アミノ酸尿症、ファンコーニ症候群、高血圧性腎硬化症、間質性腎炎、鎌状赤血球病、ヘモグロビン尿症、ミオグロビン尿症、ウェゲナー肉芽腫症、1型糖原病、慢性腎疾患、慢性腎不全、糸球体濾過量（GFR）低下症、腎血管硬化症、ループス腎炎、ANCA陽性微量免疫型半月体形成性糸球体腎炎、慢性移植腎症、腎臓毒性、腎毒性、腎壊死、腎損傷、糸球体尿細管傷害、腎機能不全、腎炎症候群、急性腎不全、慢性腎不全、近位尿細管機能不全、急性腎移植拒絶、慢性腎移植拒絶、非IgAメサングウム増殖性糸球体腎炎、感染後糸球体腎炎、任意の種類の腎障害を伴う血管炎、任意の遺伝性腎疾患、任意の間質性腎炎、腎移植不全、腎臓がん、他の状態（例えば、高血圧、糖尿病、および自己免疫疾患）と関連する腎疾患、デント病、腎シスチン蓄積症（nephrocytosis）、ハイマン腎炎、原発性腎疾患、虚脱性糸球体症、デンスデポジット病、寒冷グロブリン血症関連糸球体腎炎、ヘノッホ-シェーンライン病、感染後糸球体腎炎、細菌性心内膜炎、顕微鏡的多発血管炎、チャグ-ストラウス症候群、抗GBM抗体介在型糸球体腎炎、アミロイドーシス、単クローン性免疫グロブリン沈着症、線維性糸球体腎炎、イムノタクトイド糸球体症、虚血性尿細管傷害、薬物誘導性尿細管間質性腎炎、毒性尿細管間質性腎炎、感染性尿細管間質性腎炎、細菌性腎盂腎炎、ポリオーマウイルス感染またはHIV感染から生じるウイルス感染性尿細管間質性腎炎、代謝誘導性尿細管間質性疾患、混合性結合疾患、円柱腎症、尿酸結晶もしくはシュウ酸結晶または薬物誘導性結晶の沈着から生じる結晶腎症、急性細

30

40

50

胞性尿細管間質性同種移植片拒絶、リンパ腫または移植後リンパ増殖性疾患から生じる腫瘍性浸潤性疾患、腎臓の閉塞性疾患、血管疾患、血栓性微小血管症、腎血管硬化症、アテローム塞栓性疾患、混合性結合組織疾患、結節性多発動脈炎、カルシニューリン阻害剤誘導性血管疾患、急性細胞性血管性同種移植片拒絶、急性体液性同種移植片拒絶、早期腎機能低下症（ERFD）、末期腎疾患（ESRD）、腎静脈血栓症、急性尿細管壊死、急性間質性腎炎、確立された慢性腎疾患、腎動脈狭窄症、虚血性腎症、血尿症、薬物毒素誘導性慢性尿細管間質性腎炎、逆流腎症、腎臓結石、グッドパスチャー症候群、および水腎症を含むがこれらに限定されない。

#### 【0049】

本明細書で使用される「出生前または妊娠関連疾患または状態」という用語は、妊婦、胚、または胎児に影響を及ぼす任意の疾患、障害、または状態を指す。出生前状態または妊娠関連状態はまた、妊娠と関連するかまたは妊娠の結果として直接的もしくは間接的に生じる、任意の疾患、障害、または状態を指す場合もある。これらの疾患または状態は、任意および全ての出生時欠損症、先天性状態、または遺伝性疾患または状態を含みうる。出生前疾患または妊娠関連疾患の例は、Rh血液型不適合、新生児の溶血性疾患、ベータ-サラセミア、性決定、妊娠決定、遺伝性メンデル型遺伝病、染色体異常、胎児染色体異数性、胎児染色体トリソミー、胎児染色体モノソミー、8番染色体トリソミー、13番染色体トリソミー（パトー症候群（Syndrom））、16番染色体トリソミー、18番染色体トリソミー（エドワード症候群）、21番染色体トリソミー（ダウン症候群）、X染色体連鎖型障害、X染色体トリソミー（XXX症候群）、X染色体モノソミー（ターナー症候群）、XXY症候群、XYY症候群、XYY症候群、XXXYY症候群、XXYY症候群、XYYY症候群、XXXXX症候群、XXXXXY症候群、XXXYY症候群、XXYYY症候群、脆弱X症候群、胎児発育遅延、嚢胞性線維症、異常ヘモグロビン症、胎児死、胎児アルコール症候群、鎌状赤血球貧血、血友病、クラインフェルター症候群、dup(17)(p11.2p1.2)症候群、子宮内膜症、ペリツェウス-メルツバッハー病、dup(22)(q11.2q11.2)症候群、キャッツアイ症候群、ネコ泣き症候群、ウォルフ-ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス-ポイレン症候群、シャルコー-マリー-トゥース病、易圧迫麻痺性を伴う神経障害、スミス-マゲニス症候群、神経線維腫症、アラジール症候群、口蓋心臓顔面症候群、ディジョージ症候群、ステロイドスルファターゼ欠損症、プラダー-ウィリー症候群、カルマン症候群、線状皮膚欠損を伴う小眼球症、副腎低形成、グリセロールキナーゼ欠損症、ペリツェウス-メルツバッハー病、Y染色体上の精巢決定因子、無精子症（因子a）、無精子症（因子b）、無精子症（因子c）、1p36欠失、フェニルケトン尿症、テイ-サックス病、副腎過形成、ファンコーニ貧血、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ筋ジストロフィー、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィー、ロバートソン型転座、アンゲルマン症候群、結節性硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、開放性二分脊椎、神経管欠損症、腹壁欠損症、胎内発育不全、先天性サイトメガロウイルス、軟骨形成不全、マルファン症候群、先天性甲状腺機能低下症、先天性トキソプラズマ病、ピオチニダーゼ欠損症、ガラクトース血症、メーブルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、中鎖アシルCo-Aデヒドロゲナーゼ欠損症、出生時構造欠損症、心臓欠損、四肢の異常、内反足、無脳症、無嗅脳症/全前脳胞症、脳水腫、無眼球症/小眼球症、無耳/小耳、大血管転移症、ファロー四徴症、左心低形成症候群、大動脈縮窄症、口唇裂を伴わない口蓋裂、口蓋裂を伴うかまたは伴わない口唇裂、瘻を伴うかまたは伴わない食道閉鎖症/狭窄症、小腸閉鎖症/狭窄症、肛門直腸閉鎖症/狭窄症、尿道下裂、半陰陽、腎欠損、嚢胞腎、軸前多指、肢欠損、横隔膜ヘルニア、失明、白内障、視覚問題、聴覚喪失、難聴、X染色体連鎖型副腎白質萎縮症、レット症候群、リソソーム病、脳性麻痺、自閉症、無舌症、色素欠乏症、眼白子症、眼皮膚白皮症、妊娠糖尿病、アーノルド-キアリ奇形、CHARGE症候群、先天性横隔膜ヘルニア、短指（brachydactylia）症、無虹彩症、裂足裂手症、虹彩異色症、ドーニアン耳症、エーラスダンロス症候群、表皮水疱症、ゴーム病、橋本症候群、胎児水症、緊張低下症、クリッペル-フェイル症候群、筋ジストロフィー、骨形成不全症、早老症、スミスレムリオピッツ症候群（syndrom）、彩視症

10

20

30

40

50

、X染色体連鎖型リンパ増殖性疾患、臍ヘルニア、腹壁破裂、子癇前症、子癇、早期分娩、早産、流産、子宮内発育遅延、子宮外妊娠、妊娠悪阻、つわり、または分娩誘導奏効の可能性を含むがこれらに限定されない。

【0050】

本明細書で使用される「神経または神経精神疾患または状態」という用語は、神経系に影響を与える任意の疾患または状態を指す。神経または神経精神疾患または状態の例は、頭部外傷、脳卒中、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、くも膜下出血、頭蓋内(intra cranial)出血、一過性虚血性発作、血管性認知症、大脳皮質基底核神経節変性症、脳炎、てんかん、ランドロー-クレフナー症候群、水頭症、偽性脳腫瘍、視床疾患、髄膜炎、脊髄炎、運動障害、特発性振戦、脊髄疾患、脊髄空洞症、アルツハイマー病(早発型)、アルツハイマー病(遅発型)、多発脳梗塞性認知症、ピック病、ハンチントン病、パーキンソン病、パーキンソン症候群、認知症、前頭側頭型認知症、大脳皮質基底核変性症、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、レビー小体病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ダンディー-ウォーカー症候群、フリードライヒ運動失調症、マシャド-ジョゼフ病、偏頭痛、統合失調症、気分障害、およびうつ病、レビー小体型認知症(DLB)、前頭側頭型認知症(FTD)、多様な形態の血管性認知症(VD)、皮質下血管性認知症(ピンスワンガー病)、自閉症、発育遅滞、運動ニューロン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、神経損傷または脳損傷、脳低酸素症、脳性麻痺(CP)、記憶障害、運動障害、大脳皮質基底核神経節変性症、多系統萎縮症の形態、脳卒中関連障害、脳血管発作、痙攣を伴う照射後脳症、脳血管性パーキンソニズム、視床脳血管発作、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、アルコール関連認知症、意味認知症、運動失調、非定型パーキンソニズム、ジストニア、進行性核上性麻痺、特発性振戦、軽度認知機能障害、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、神経障害、ピック病、コンゴレッド親和性血管障害、クロイツフェルト-ヤコブ病、エイズ認知症複合、うつ病、不安障害、恐怖症、ベル麻痺、てんかん、脳炎、神経筋障害、神経腫瘍性障害、脳腫瘍、神経血管障害、神経免疫障害、神経耳科疾患、脊髄損傷を含む神経外傷、神経障害性疼痛を含む疼痛、小児神経障害および神経精神障害、睡眠障害、トゥレット症候群、大脳皮質基底核神経節変性症、アルコール関連認知症、意味認知症、多発脳梗塞性認知症と合併したアルツハイマー病、レビー小体認知症と合併したアルツハイマー病、レビー小体認知症と合併したパーキンソン病、レビー小体認知症と合併したアルツハイマー病およびパーキンソン病、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害と合併した前頭側頭型認知症、注意欠陥多動性障害、統合失調症、強迫性障害、精神遅滞、自閉症スペクトル障害、オプソクロノスミオクロノス症候群(OMS)、痙攣、構音障害、学習障害(すなわち、読書障害または算術障害)、国語力欠損または作業素質欠損、注意欠陥障害、アミロイド病、プリオン病、タウオパシー、アルファ-シヌクレイノパシー、コカイン、ニコチン、アルコール、食物、エクスタシー、チャット、カフェイン、アヘン、ヘロイン、マリファナ、アンフェタミン、メタンフェタミン、または賭博のうちの少なくとも1つにより引き起こされる中毒状態などの中毒状態、およびファブリー病を含むがこれらに限定されない。

【0051】

本明細書で使用される「自己免疫または免疫関連疾患または状態」という用語は、免疫系の機能に影響を与える任意の疾患または状態を指す。自己免疫または免疫関連疾患または状態の例は、抗リン脂質症候群、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、自己免疫性血管炎、セリアック病、自己免疫性甲状腺炎、輸血後免疫化、母体-胎児間不適合性、輸血反応、IgA欠損症などの免疫欠損症、分類不能型免疫欠損症、薬物誘導性ループス、糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病、若年発症型糖尿病、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、多発性硬化症、免疫欠損症、アレルギー、喘息、乾癬、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、慢性皮膚疾患、筋萎縮性側索硬化症、化学療法誘導性損傷、移植片対宿主病、骨髄移植拒絶、強直性脊椎炎、アトピー性湿疹、天疱瘡、ベーチェット病、慢性疲労症候群、線維筋痛症、化学療法誘導性損傷、重症筋無力症、糸球体腎炎、アレルギー性網膜炎、全身性硬化症、亜急性皮膚性エリテマトーデス、凍傷状エリテマトーデスを含

10

20

30

40

50

む皮膚性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、自己免疫性腎炎、自己免疫性血管炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性心臓炎、自己免疫性脳炎、自己免疫介在性血液疾患、l c - S S c (強皮症の限局皮膚硬化形態)、d c - S S c (強皮症のびまん皮膚硬化形態)、自己免疫性甲状腺炎 (A T)、グレーブス病 (G D)、重症筋無力症、多発性硬化症 (M S)、強直性脊椎炎、移植拒絶、免疫老化、リウマチ性疾患 / 自己免疫疾患、混合性結合組織疾患、脊椎関節症、乾癬、乾癬性関節炎、筋炎、強皮症、皮膚筋炎、自己免疫性血管炎、混合性結合組織疾患、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、ヒトアジュバント病、骨関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、特発性炎症性筋障害、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、免疫介在性腎疾患、中枢神経系または末梢神経系の脱髄性疾患、特発性脱髄性多発性神経障害、ギラン - バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、肝胆道疾患、感染性慢性活動性肝炎または自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸症、ウィップル病、自己免疫性皮膚疾患または免疫介在性皮膚疾患、水疱性皮膚疾患、多形紅斑、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食品過敏症、蕁麻疹、免疫性肺疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、過敏性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶または移植片対宿主病、乾癬性関節炎、乾癬、皮膚炎、多発性筋炎 / 皮膚筋炎、毒性表皮剥離症、全身性強皮症および全身性硬化症、炎症性腸疾患と関連する応答、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸器逼迫症候群、成人型呼吸器逼迫症候群 (A R D S)、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、大腸炎、糸球体腎炎、アレルギー性状態、湿疹、喘息、T細胞の浸潤および慢性炎症性応答を伴う状態、アテローム性動脈硬化、自己免疫性心筋炎、白血球接着欠損症、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカインおよびTリンパ球を媒介する急性過敏症および遅発性過敏症と関連する免疫応答、結核、サルコイドーシス、ウェゲナー肉芽腫症を含む肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎 (A N C Aを含む)、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、自己免疫性溶血性貧血 (A I H A) を含む免疫性溶血性貧血、悪性貧血、赤芽球癆 (P R C A)、因子V I I I欠損症、A型血友病、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球漏出を伴う疾患、中枢神経系 (C N S) 炎症性障害、多臓器損傷症候群、重症筋無力症、抗原 - 抗体複合体介在型疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、ランバート - イートン筋無力症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス - ジョンソン症候群、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、自己免疫性多腺性内分泌障害、ライター病、スティッフマン症候群、巨細胞性動脈炎、免疫複合体性腎炎、I g A腎症、I g M多発性神経障害またはI g M介在性神経障害、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、血栓性血小板減少性紫斑病 (T T P)、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性精巣炎および自己免疫性卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫疾患、原発性甲状腺機能低下症、自己免疫性甲状腺炎を含む自己免疫性内分泌疾患、慢性甲状腺炎 (橋本甲状腺炎)、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、自己免疫性多腺性症候群 (または多腺性内分泌障害症候群)、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、リンパ性間質性肺炎 (H I V)、N S I Pと対比した閉塞性細気管支炎 (非移植性)、ギラン - バレー症候群、大血管炎 (リウマチ性多発筋痛および巨細胞 (高安) 動脈炎を含む)、中血管炎 (川崎病および結節性多発動脈炎を含む)、強直性脊椎炎、ベルガー病 (I g A腎症)、急性進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病 (グルテン性腸症)、寒冷グロブリン血症、および筋萎縮性側索硬化症 (A L S) を含むがこれらに限定されない。

#### 【0052】

本明細書で使用される「がん」という用語は、それらの大半が周囲の組織に浸潤する可能性があり、異なる部位へと転移しうる多様な種類の悪性新生物を指す (例えば、全ての目的で参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、「PDR Medical Dictionary」、1版 (1995年) を参照されたい)。「新生物」および「腫瘍」という用語は、細胞増殖により正常組織より急速に成長し、増殖を誘発した刺激が除去された後でも成長し続ける異常組織を指す。このような異常組織は、正常組織との構造的組織化および機能

10

20

30

40

50

的な協同の部分的または完全な欠如を示し、良性（すなわち、良性腫瘍）の場合もあり、悪性（すなわち、悪性腫瘍）の場合もある。がんの一般的範疇の例は、癌腫（すなわち、例えば、乳がん、前立腺がん、肺がん、および結腸がんの一般的な形態など、上皮細胞に由来する悪性腫瘍）、肉腫（すなわち、結合組織または間葉細胞に由来する悪性腫瘍）、リンパ腫（すなわち、造血細胞に由来する悪性の腫瘍）、白血病（すなわち、血細胞に由来する悪性腫瘍造）、胚細胞腫瘍（すなわち、全能細胞に由来する腫瘍。成人では、精巣または卵巣において見出されることが極めて多く；胎児、乳児、および幼児では、体内の正中線上、特に、尾てい骨の先端部で見出されることが極めて多い）、芽球性腫瘍（すなわち、典型的には未成熟組織または胚組織に類似する悪性腫瘍）などを含むがこれらに限定されない。本発明に包含されることを意図される新生物の種類の中には、神経組織、造血組織、乳、皮膚、骨、前立腺、卵巣、子宮、子宮頸部、肝臓、肺、脳、喉頭、胆嚢、膵臓、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、免疫系、頭頸部、結腸、胃、気管支、および/または腎臓のがんと関連する新生物が含まれるがこれらに限定されない。

10

## 【0053】

本明細書で使用される「感染性疾患または状態」という用語は、感染因子から生じる任意の疾患または状態を指す。感染因子は、細菌、ウイルス、真菌、原虫、感染性タンパク質、寄生性微生物、および他の寄生虫を含むがこれらに限定されない。感染性疾患または状態の例は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染、原虫感染、寄生虫感染、肝炎（例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、およびE型肝炎）、ヘルペス、インフルエンザ、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染、AIDS、炭疽病、肺炎（細菌性またはウイルス性）、蜂巣炎、ヒトパラインフルエンザ、風邪、在郷軍人病（レジオネラ症）、コレラ、クロイツフェルト-ヤコブ病（CJD）、変異型クロイツフェルト-ヤコブ病（vCJD）、致死性家族性不眠症（FFI）、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインクラウ（GSS）症候群、クラミジア感染症、水痘、エボラ出血熱、デング熱、ランブル鞭毛虫症、ライム病、マラリア、麻疹、ムンプス、風疹、百日咳、淋病、ブドウ球菌感染、連鎖球菌感染、肺炎球菌感染、狂犬病、*helicobacter pylori*感染、呼吸器合胞体ウイルス感染、ロッキー山発疹熱、SARS、敗血症、結核、および西ナイル熱を含むがこれらに限定されない。

20

## 【0054】

ウイルスは、動物DNAウイルスまたは動物RNAウイルスを含むがこれらに限定されない。本明細書で使用されるRNAウイルスは、Picornaviridae科（例えば、ポリオウイルス）、Reoviridae科（例えば、ロタウイルス）、Togaviridae科（例えば、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、風疹ウイルス）、Orthomyxoviridae科（例えば、インフルエンザウイルス）、Paramyxoviridae科（例えば、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、パラインフルエンザウイルス）、Rhabdoviridae科（例えば、狂犬病ウイルス）、Coronaviridae科、Bunyaviridae科、Flaviviridae科、Filoviridae科、Arenaviridae科、Bunyaviridae科、およびRetroviridae科（例えば、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV））などのウイルス科を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用されるDNAウイルスは、Papovaviridae科（例えば、パピローマウイルス）、Adenoviridae科（例えば、アデノウイルス）、Herpesviridae科（例えば、単純ヘルペスウイルス）、およびPoxviridae科（例えば、天然痘ウイルス）などのウイルス科を含むがこれらに限定されない。

30

40

## 【0055】

細菌は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、抗酸細菌などを含むがこれらに限定されない。グラム陽性菌は、*Actinomedura*属、*Actinomyces israelii*、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*

50



e、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Corynebacterium* 属、*Enterococcus faecalis*、*Listeria monocytogenes*、*Nocardia*、*Propionibacterium acnes*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epiderm*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pneumoniae* などを含むがこれらに限定されない。グラム陰性菌は、*Afipia felis*、*Bacteriodes*、*Bartonella bacilliformis*、*Bortadella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia recurrentis*、*Bruceella*、*Calymmatobacterium granulomatis*、*Campylobacter* 属、*Escherichia coli*、*Francisella tularensis*、*Gardnerella vaginalis*、*Haemophilus aegyptius*、*Haemophilus ducreyi*、*Haemophilus influenzae*、*Helicobacter pylori*、*Legionella pneumophila*、*Leptospira interrogans*、*Neisseria meningitidis*、*Porphyromonas gingivalis*、*Providencia stuarti*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella enteridis*、*Salmonella typhi*、*Serratia marcescens*、*Shigella boydii*、*Streptobacillus moniliformis*、*Streptococcus pyogenes*、*Treponema pallidum*、*Vibrio cholerae*、*Yersinia enterocolitica*、*Yersinia pestis* などを含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される抗酸細菌は、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium tuberculosis* などを含むがこれらに限定されない。他の3つの範疇に収まらない他の細菌は、*Bartonella henselae*、*Chlamydia psittaci*、*Chlamydia trachomatis*、*Coxiella burnetii*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Rickettsia akari*、*Rickettsia prowazekii*、*Rickettsia rickettsii*、*Rickettsia tsutsugamushi*、*Rickettsia typhi*、*Ureaplasma urealyticum*、*Diplococcus pneumoniae*、*Ehrlichia chafensis*、*Enterococcus faecium*、髄膜炎菌などを含むがこれらに限定されない。

【0056】

本明細書で使用される真菌は、*Aspergillus* 属、*Candida* 属、*Candida albicans*、*Coccidioides immitis*、*Cryptococcus* 属、およびこれらの組合せを含むがこれらに限定されない。

【0057】

本明細書で使用される寄生性微生物は、*Balantidium coli*、*Cryptosporidium parvum*、*Cyclospora cayatanensis*、*Encephalitozoa*、*Entamoeba histolytica*、*Enterocytozoon bienersi*、*Giardia lamblia*、*Leishmania* 属、*Plasmodium* 属、*Toxoplasma gondii*、*Trypanosoma* 属、台形状アメーバなどを含むがこれらに限定されない。他の寄生虫は、蠕虫（例えば、寄生蠕虫（helminth））、特に線形動物門（線虫、例えば、鞭虫、鉤虫、蟯虫、回虫、糸状虫など）、および条虫綱（例えば、条虫）を含むがこれらに限定されない寄生蠕虫（parasitic worm）を含む。

【0058】

本明細書で使用される感染性タンパク質は、プリオン（例えば、PrP<sup>Sc</sup> 形態、CJ 50

Dプリオン、vCJDプリオン、FFIプリオン、およびGSSプリオン)を含む。

【0059】

本明細書で使用される「小児科疾患、小児科障害、または小児科状態」という用語は、乳児もしくは小児に影響を与えるか、または発達期もしくは小児期において始まる任意の疾患または障害を指す。小児科疾患、小児科障害、および小児科状態の例は、自閉症、川崎病、先天性難聴、小児がん、I型糖尿病、先天性心臓欠損、ファロー四徴症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、骨形成不全症、クラッペ(Krabe)病、ボンペ病、ゴーシェ病、ファブリー病、ウォルフ-パーキンソン-ホワイト症候群、ヒルシュスプルング病、クローン病、イーグル-パレット症候群、嚢胞性線維症、過敏性腸症候群、および脳性麻痺を含むがこれらに限定されない。小児科状態の例はまた、発育しつつある胎児の遺伝子属性も含む。例えば、小児科状態は、知能、眼の色、毛髪の色、および筋肉型を含むがこれらに限定されない。

10

【0060】

本明細書で使用される疾患または状態「を処置すること」とは、臨床結果を含む良性的結果または所望の結果を得るためのステップを踏むことを指す。良性的臨床的結果または所望の臨床的結果は、疾患または状態と関連する1または複数の症状の緩和または改善を含むがこれらに限定されない。

【0061】

本明細書で使用される、対象へ化合物もしくは薬剤「を投与すること」または対象への化合物もしくは薬剤「の投与」は、当業者に公知の様々な方法のうちの1つを使用して実行することができる。例えば、化合物または薬剤は、静脈内投与、動脈内投与、皮内投与、筋内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、眼内投与、舌下投与、経口(摂取による)投与、鼻腔内(吸入による)投与、髄腔内投与、脳内投与、および経皮(例えば、皮腺管を介する吸収による)投与することができる。化合物または薬剤はまた、化合物または薬剤の持続放出、徐放、または制御放出をもたらす充填式デバイス、生体分解性ポリマーデバイス、または他のデバイス、例えば、パッチおよびポンプ、または処方物により適切に導入することもできる。投与はまた、例えば、1回、複数回、および/または1もしくは複数の持続期間にわたり実施することもできる。一部の態様では、投与は、自己投与を含む直接的投与、および薬物の処方行為を含む間接的投与の両方を含む。例えば、本明細書で用いられる通り、薬物を自己投与するかもしくは薬物を別の人に投与してもらうように患者に指導する医師、および/または患者に薬物の処方を施す医師は、薬物を患者に投与している。一部の実施形態では、化合物または薬剤を経口投与、例えば、対象へと摂取により投与するか、または静脈内投与、例えば、対象へと注射により投与する。一部の実施形態では、経口投与される化合物または薬剤は、持続放出处方物もしくは徐放処方物により投与するか、またはこのような徐放もしくは持続放出のためのデバイスを使用して投与する。

20

30

【0062】

ある特定の実施形態では、本発明の方法で使用される組合せ試料中のマーカーは、食細胞、 $= 2n$ 食細胞、非食細胞、または疾患もしくは状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞と比較して上方調節または活性化される。異なる疾患または状態は、異なるマーカーの上方調節(または活性化)と関連する場合もあり、異なるマーカーの下方調節(または阻害)と関連する場合もある。本明細書で使用される「上方調節または上方調節された」とは、マーカーの発現レベル(例えば、遺伝子発現またはタンパク質発現)、遺伝子コピー数、遺伝子量、および他の定性的または定量的な検出可能状態の上昇を指す場合がある。同様に、「下方調節または下方調節された」とは、マーカーの発現レベル、遺伝子コピー数、遺伝子量、および他の定性的または定量的な検出可能状態の上昇を指す場合がある。ある特定の実施形態では、本発明の方法で使用される組合せ試料中のマーカーは、食細胞、 $= 2n$ 食細胞、非食細胞、または疾患もしくは状態の影響を受ける細胞を実質的に含まない対照細胞と比較して下方調節または阻害される。異なる疾患または状態は、異なるマーカーの上方調節(または活性化)と関連する場合もあり、異なるマーカー

40

50

の下方調節（または阻害）と関連する場合もある。本明細書で使用される「活性化または活性化された」とは、マーカーの活性状態、例えば、リン酸化状態、DNAメチル化状態、またはDNAアセチル化状態を指す場合がある。同様に、「阻害または阻害された」とは、マーカーの抑制状態または不活化状態、例えば、脱リン酸化状態、ユビキチン化状態、DNA脱メチル化状態を指す場合がある。

#### 【0063】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、マーカーを無細胞体液から抽出または濃縮するステップを含みうる。本明細書では、任意の公知の抽出法および濃縮法を使用することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法はまた、多様なプロファイルを決定する前に、以下のステップ：i) = 2n 食細胞、非食細胞、または対照細胞を溶解させるステップ；および ii) 細胞内容物を、溶解させた細胞から抽出するステップのうち少なくとも1つも含む。本明細書では、任意の公知の細胞溶解法および細胞抽出法を使用することができる。ある特定の実施形態では、疾患または状態の少なくとも1または複数のマーカーは、組合せ試料に存在する。ある特定の実施形態では、マーカーは、非食細胞、= 2n 食細胞、または対照細胞の細胞内容物に存在しない。

10

#### 【0064】

ある特定の実施形態では、本発明の方法はまた、多様なプロファイルを決定する前に、以下のステップ：i) 食細胞、> 2n 食細胞、または = 2n 食細胞を溶解させるステップ；および ii) 細胞内容物を、溶解させた食細胞、> 2n 食細胞、または = 2n 食細胞から抽出するステップのうち少なくとも1つをも含む。ある特定の実施形態では、食細胞または > 2n 食細胞の細胞内容物は、罹病生細胞、死んだ罹病細胞、罹病アポトーシス細胞、循環腫瘍細胞、感染因子、胎児細胞、トロホプラスト、またはこれらの断片など、それらが貪食した多様な種類の物質を含む。ある特定の実施形態では、疾患または状態の少なくとも1または複数のマーカーは、食細胞または > 2n 食細胞の細胞内容物に存在する。

20

#### 【0065】

ある特定の実施形態では、本発明の方法はまた、多様なプロファイルを決定する前に、以下のステップ：i) 循環小胞を溶解させるステップ；および ii) 内容物を、溶解させた循環小胞から抽出するステップのうち少なくとも1つをも含む。ある特定の実施形態では、循環小胞の内容物は、タンパク質および核酸など、多様な種類の物質を含む。ある特定の実施形態では、疾患または状態の少なくとも1または複数のマーカーは、循環小胞の内容物に存在する。

30

#### 【0066】

ある特定の実施形態では、本発明の方法はまた、多様なプロファイルを決定する前に、以下のステップ：i) 循環罹病細胞を溶解させるステップ；および ii) 内容物を、溶解させた循環罹病細胞から抽出するステップのうち少なくとも1つをも含む。ある特定の実施形態では、疾患または状態の少なくとも1または複数のマーカーは、循環罹病細胞の内容物に存在する。

#### 【0067】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、疾患特異的マーカーまたは状態特異的マーカーの同定された差異を、当技術分野で公知の少なくとも1つのマーカーのレポジトリーと比較するステップをさらに含む。このような比較により、疾患または状態の存在をさらに確認することができる。一部の実施形態では、既知のマーカーのレポジトリーは、データマイニングにより得ることができる。本明細書で用いられる「データマイニング」という用語は、新たなデータのパターン、関係、または相関を、データベースの公知のデータから見出し、将来において実際的な情報を抽出する工程を指す。典型的に、データマイニングを実行する、例えば、入力されたデータを分類し、次いで、その後、新たな入力されたデータと共に使用して、トレーニングデータに基づき決定を下すように、コンピュータベースのシステムをデータ上でトレーニングすることができる。これらのシステムは、エキスパートシステム、ファジー論理、非線形回帰分析、多変量分析、決定木分類子、およ

40

50

びベイズ信念ネットワークを含むがこれらに限定されない。

【0068】

ある特定の実施形態では、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、循環小胞、循環罹病細胞、対照細胞、および $= 2n$ 食細胞は、体液試料、組織、または細胞から単離される。例示的な体液試料は、全血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、囊胞液、腹水、胸水、妊娠第1三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第2三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第3三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液でありうる。一部の実施形態では、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、および $= 2n$ 食細胞は、白血球から単離される。

10

【0069】

ある特定の実施形態では、無細胞体液は、体液試料に由来する。例示的な体液試料は、全血液、尿、糞便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、囊胞液、腹水、胸水、妊娠第1三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第2三半期の妊婦から得られる液体、妊娠第3三半期の妊婦から得られる液体、母体血液、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚に由来する液体、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および子宮頸腔部液、間質液、口腔内スワブ試料、痰、気管支洗浄液、パップスメア試料、または眼液でありうる。一部の実施形態では、無細胞体液は、抽出、遠心分離、および濾過など、当技術分野で公知の方法を介して、細胞を体液試料から分離することにより得る。

20

【0070】

一部の実施形態では、組合せ試料中の使用のための成分は、細胞を体液から除去することにより得ることができる。一部の実施形態では、組合せ試料中の使用のための成分は、体液中の細胞を破壊すること（例えば、溶解させること）により得ることができる。これらの実施形態は、組合せで、例えば、ある細胞集団を除去し、かつ、他の細胞集団を破壊することにより採択することができる。一部の実施形態では、例えば、赤血球、血清、およびT細胞を除去し、かつ、残りを組合せ試料として使用することにより組合せ試料を創出するのに、全血液試料を使用することができる。

【0071】

ある特定の実施形態では、DNA量が $2n$ である細胞を含む組織試料または体液試料は、静脈または動脈を穿刺することにより得られる体液の非細胞画分を分離（例えば、遠心分離を介する）した後における血液の回収、組織生検、気管支肺胞洗浄、鼻腔内洗浄、眼内洗浄、腹腔内洗浄、腔内洗浄、膀胱内洗浄、直腸内洗浄、脊髄液の微細針吸引、滑液吸引などの後で得られる。無細胞体液は、静脈または動脈を穿刺することにより得られる体液の細胞画分を分離（例えば、遠心分離を介する）した後における血液の回収、組織生検、気管支肺胞洗浄液、鼻腔内洗浄液、眼内洗浄液、腹腔内洗浄液、腔内洗浄液、膀胱内洗浄液、直腸内洗浄液、脊髄液の微細針吸引、滑液吸引などの後で得られる。

30

【0072】

本発明の方法では、細胞分離法/細胞単離法/細胞精製法を使用して、細胞集団を、対象の体液試料、細胞、または組織から単離する。当業者は、任意の公知の細胞分離技法/細胞単離技法/細胞精製技法を使用して、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、罹病細胞、対照細胞、および $= 2n$ 食細胞を体液から単離することもでき、または $> 2n$ 食細胞を $= 2n$ 食細胞から分離することもできる。例示的な技法は、抗体、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、濾過、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、またはこれらの組合せの使用を含むがこれらに限定されない。

40

【0073】

本発明の方法では、細胞分離法/細胞単離法/細胞精製法を使用して、循環罹病細胞の集団を、対象の体液試料、細胞、または組織から単離する。循環罹病細胞は、体液中に希

50

少または低量でありうる。したがって、濃縮技法（例えば、磁気濃縮）を使用して、循環罹病細胞を、単離する前に濃縮することができる。当業者は、任意の公知の細胞分離技法／細胞単離技法／細胞精製技法を使用して、循環罹病細胞を体液から単離することができる。例示的な技法は、抗体、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分取、濾過、勾配ベースの遠心分離、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技法、蛍光磁気分離技法、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット型顕微鏡ベースのプラットフォーム、マイクロ流体技法、光ファイバーアレイ走査技法、レーザー走査サイトメトリー技法、多光子生体フローサイトメトリー、光音響フローメトリー、細胞表面抗原を標的化するナノ粒子、検出可能な分泌生成物を伴う循環罹病細胞の染色、またはこれらの組合せの使用を含むがこれらに限定されない。循環罹病細胞は、サイズ、密度、電荷、遊走特性、および特殊な細胞型（例えば、循環黒色腫細胞内のメラニン細胞顆粒）のいくつかの特性の差異など、正常循環細胞と比較して異なる物理的特性を有しうる。当業者は、このような異なる特性に基づき、任意の公知の細胞分離技法／細胞単離技法／細胞精製技法を使用して、循環罹病細胞を単離することができる。例えば、浮遊密度の差異を使用して、循環罹病細胞（例えば、循環腫瘍細胞）を、勾配遠心分離を介して、正常血液細胞から分離することができる。濾過ベースの手法を使用して、それらのサイズの、正常循環細胞と比較した増大に基づき、循環罹病細胞（例えば、循環腫瘍細胞）を単離することができる。抗体ベースの単離法を使用して、正常循環血液細胞には存在しない上皮細胞表面マーカーを発現させる循環罹病細胞を捕捉することができる。例えば、上皮細胞接着分子（E p C A M）に対する抗体の、磁気ビーズへのコンジュゲーションの後で、捕捉された細胞の磁界を介する精製を使用して、循環腫瘍細胞を、乳がんを伴う患者、前立腺がんを伴う患者、および結腸がんを伴う患者の血液から濃縮することができる。ある特定の実施形態では、循環罹病細胞（例えば、経子宮頸管細胞）は、Rare Celllect（商標）デバイス（Genetic Technologies）または類似のデバイスにより回収することができる。

#### 【0074】

ある特定の実施形態では、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、罹病細胞、対照細胞、および $= 2n$ 食細胞は、細胞により分泌される生成物を使用することにより単離する。ある特定の実施形態では、食細胞、 $> 2n$ 食細胞、罹病細胞、対照細胞、および $= 2n$ 食細胞は、細胞表面上の細胞表面標的（例えば、受容体タンパク質）を使用することにより単離する。一部の実施形態では、細胞表面標的は、 $> 2n$ 食細胞により貪食されたタンパク質である。一部の実施形態では、細胞表面標的は、細胞がそれらの細胞膜上に発現させる。一部の実施形態では、細胞表面標的は、細胞膜上に移行するが、細胞（例えば、 $> 2n$ 食細胞）は発現させない外因性タンパク質である。一部の実施形態では、細胞表面標的は、検出される、疾患または状態のマーカーである。

#### 【0075】

ある特定の実施形態では、循環小胞は、クロマトグラフィーによる単離、アフィニティー単離、または超遠心分離を使用して単離する。

#### 【0076】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、分析物は、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの任意の組合せを含む。本明細書に記載される方法のある特定の態様では、マーカーは、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝産物、またはこれらの任意の組合せを含む。本明細書で使用される「核酸」という用語は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNA-RNAハイブリッド、およびヌクレオチド類似体を使用して作り出されるDNAまたはRNAの類似体を含むことを意図する。核酸分子は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、二本鎖DNA、一本鎖DNA、多重鎖DNA、相補的DNA、ゲノムDNA、非コードDNA、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA（miRNA）、核小体低分子RNA（snRNA）、リボソームRNA（rRNA）、転移RNA（tRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、ヘテロ核RNA（hnRNA）、または低分子ヘアピンRNA（shRNA）でありうる。一部の実施形態では、核酸は、腎臓通過性核酸

である。腎臓通過性核酸は、尿中に排出される細胞外核酸である。例えば、米国特許公開第20100068711号および米国特許公開第20120021404号を参照されたい。

【0077】

本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、塩基性のアミノ基および酸性のカルボキシル基の両方を含有する有機化合物を含む。この用語には、天然アミノ酸（例えば、L-アミノ酸）、修飾アミノ酸および非天然アミノ酸（例えば、D-アミノ酸および -アミノ酸）のほか、生物学的には遊離形態または組合せ形態で生じるが、通常タンパク質中では生じないことが公知のアミノ酸が含まれる。天然タンパク質構成アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、およびバリンを含む。非天然タンパク質構成アミノ酸は、アルギニノコハク酸 (arginosuccinic acid)、シトルリン、システイン硫酸、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、ホモシステイン、ホモセリン、オルニチン、3-モノヨードチロシン、3,5-ジヨードチロシン (3,5-diiodotryosine)、3,5,5-トリヨードサイロニン、および3,3',5,5'-テトラヨードサイロニンを含む。修飾アミノ酸または非天然アミノ酸は、D-アミノ酸、ヒドロキシリシン、4-ヒドロキシプロリン、N-Cbz保護アミノ酸、2,4-ジアミノ酪酸、ホモアルギニン、ノルロイシン、N-メチルアミノ酪酸、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、 -フェニルプロリン、tert-ロイシン、4-アミノシクロヘキシルアラニン、N-メチル-ノルロイシン、3,4-デヒドロプロリン、N,N-ジメチルアミノグリシン、N-メチルアミノグリシン、4-アミノピペリジン-4-カルボン酸、6-アミノカプロン酸、trans-4-(アミノメチル)-シクロヘキサカルボン酸、2-(アミノメチル)-安息香酸、3-(アミノメチル)-安息香酸、および4-(アミノメチル)-安息香酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、1-アミノシクロプロパンカルボン酸、および2-ベンジル-5-アミノペンタン酸を含む。

10

20

【0078】

本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、ペプチド結合により連結された2つ以上のアミノ酸からなる化合物を含む。ペプチドは、分子量が10,000ドルトン未満、5,000ドルトン未満、または2,500ドルトン未満でありうる。「ペプチド」という用語はまた、ペプチド成分と、シュードペプチドまたはペプチド模倣体残基または他の非アミノ酸成分などの非ペプチド成分との両方を含有する化合物も含む。このようなペプチド成分と非ペプチド成分との両方を含有する化合物はまた、「ペプチド類似体」とも称する場合がある。

30

【0079】

本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、直鎖状に配列され、隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間でペプチド結合により一体に接合されたアミノ酸からなる化合物を含む。本発明の方法で使用されるタンパク質は、アミノ酸、ペプチド、抗体、抗体断片、サイトカイン、リポタンパク質、または糖タンパク質を含むがこれらに限定されない。

40

【0080】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体を含む）、多重エピトープ特異性を伴う抗体組成物、多特異性抗体（例えば、二特異性抗体、ダイアボディー、および単鎖分子、ならびに抗体断片（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>、およびFv）を含む。異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、「Basic and Clinical Immunology」、8版、Daniel P. Sties、Abba I. Terr、およびTristram G. Parslow（編）、Appleton & Lange、Norwalk、Conn.、1994年、71頁および6章を参照されたい。

【0081】

本明細書で使用される「サイトカイン」という用語は、免疫系の細胞の活性をモジュレ

50

ートする分泌タンパク質またはそれらの活性断片もしくは突然変異体を指す。サイトカインの例は、限定なしに述べると、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、腫瘍壊死因子、免疫細胞前駆体のコロニー刺激因子などを含む。

#### 【0082】

本明細書で使用される「リポタンパク質」という用語は、遊離コレステロールおよびアポリポタンパク質を会合させた両親媒性のリン脂質の表層により取り囲まれた疎水性のコレステリルエステルおよびトリグリセリドのコアを含む、負に帯電した組成物を含む。リポタンパク質は、それらのサイズ、脂質およびタンパク質の相対量により決定される、それらの密度を特徴としうる（例えば、極低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL））。リポタンパク質はまた、特定の修飾（例えば、酸化、アセチル化、または糖化）の存在または非存在も特徴としうる。

10

#### 【0083】

本明細書で使用される「糖タンパク質」という用語は、1または複数のオリゴ糖または多糖を、ペプチドまたはタンパク質へと共有結合的に接合させたグリコシドを含む。例示的な糖タンパク質は、限定なしに述べると、免疫グロブリン、主要組織適合性複合体のメンバー、コラーゲン、ムチン、糖タンパク質IIb / IIIa、糖タンパク質41（gp41）および糖タンパク質120（gp120）、濾胞刺激ホルモン、アルファ-胎児型タンパク質、エリスロポエチン、トランスフェリン、アルカリホスファターゼ、およびレクチンを含む。

20

#### 【0084】

本明細書で使用される「脂質」という用語は、一般に両親媒性であり、かつ、生体適合性である合成化合物または自然発生化合物を含む。脂質は典型的に、親水性成分および疎水性成分を含む。例示的な脂質は、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチド、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾコリングリセロリン脂質、リゾエタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、スルファチド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル-CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、スフィンゴシン（shingosine）、リゾスフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラズマローゲン、スルファチド、セラミド、低密度リポタンパク質（LDL）、極低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、またはこれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。

30

#### 【0085】

本明細書で使用される「炭水化物」という用語は、酸素原子、水素原子、および炭素原子を含有する化合物、典型的には、 $(CH_2O)_n$  [式中、nは、整数である]を含むがこれらに限定されない。例示的な炭水化物は、単糖、二糖、多糖、またはオリゴ糖を含むがこれらに限定されない。

40

#### 【0086】

本明細書で使用される「代謝産物」という用語は、代謝において使用される任意の分子を含む。代謝産物は、代謝過程における生成物、基質、または中間体でありうる。この用語には、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物、または無機代謝産物が含まれる。代謝産物は、限定なしに述べると、アミノ酸、ペプチド、アシルカルニチン、単糖、脂質およびリン脂質、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、ならびに糖脂質およびリン脂質を含む。例示的な代謝産物は、スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィ

50

ンゴミエリン、スフィンゴシルホスホリルコリン ( sphingosylphosphorylcholin )、ジヒドロスフィンゴシン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、リソホスファチジルコリン ( lysophosphatidylcholine )、リソホスファチジルイノシトール、リソホスファチジルセリン、プラスメニルホスファチジルコリン、プラスマニルホスファチジルコリン ( plasmalymphosphatidylcholine )、タンパク質構成アミノ酸、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、非対称型ジメチルアルギニン、対称型ジメチルアルギニン、グルタミン、アスパラギン、ニトロチロシン、ヒドロキシプロリン、キヌレニン、3 - ヒドロキシキヌレニン、非タンパク質構成アミノ酸、オルニチン、シトルリン、アシルカルニチン、カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチン、ヒドロキシルアシルカルニチン、ジカルボキシルアシルカルニチン、還元性単糖、ヘキソース、ペントース、デオキシヘキソース、クレアチニン、クレアチン、スペルミジン / スペルミン、プトレシン、ドーパミン、セロトニン、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ロイコトリエン ( leukatriene )、トロンボキサン、胆汁酸、ステロール、コレステロール、ビタミンおよび共因子、薬物、ならびに薬物代謝産物でありうる。

10

#### 【 0 0 8 7 】

本発明の一部の実施形態では、試料は、細胞または DNA、RNA、タンパク質、および / もしくは脂質などの分析物のための 1 または複数の安定化剤を含みうる。例えば、試料は、DNA 安定化剤、RNA 安定化剤、および / またはタンパク質安定化剤を含みうる。安定化剤は、当技術分野で周知であり、例えば、DNアーゼ阻害剤、RNアーゼ阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤、またはこれらの同等物を含む。

20

#### 【 0 0 8 8 】

本発明の一部の実施形態では、疾患または状態の少なくとも 1 または複数のマーカーのプロファイルを比較する。この比較は、定量的な場合もあり、定性的な場合もある。定量的測定値は、本明細書に記載されるアッセイのうちのいずれかを使用して求めることができる。例えば、シーケンシング、直接的シーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガージデオキシ終結シーケンシング、標的化シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理特徴シーケンシング、エマルジョン PCR、低変性温度での共増幅 PCR ( C O L D - P C R )、可逆性色素ターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアタームシーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、S o l e x a Genome Analyzerシーケンシング、S O L i D ( 登録商標 ) シーケンシング、MS - P E Tシーケンシング、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間 ( M A L D I - T O F ) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 ( E S I ) 質量分析、表面増強レーザー脱離 / イオン化飛行時間 ( S E L D I - T O F ) 質量分析、四重極飛行時間 ( Q - T O F ) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 ( A P P I - M S )、フーリエ変換質量分析 ( F T M S )、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 ( M A L D I - F T - I C R ) 質量分析、二次イオン質量分析 ( S I M S )、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 分析、定量的 PCR、リアルタイム PCR、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せである。

30

40

#### 【 0 0 8 9 】

定量的比較は、t 検定、ANOVA、クルスカール - ワリス ( Kruskal-Wallis ) 検定、ウ

50



イルコクソン検定、マン・ホイットニー検定、およびオッズ比などの統計学的分析を含みうる。定量的差異は、プロファイルの間のマーカーのレベルの差異またはプロファイルの間に存在するマーカーの数の差異、およびこれらの組合せを含みうる。マーカーのレベルの例は、限定なしに述べると、遺伝子発現レベル、核酸レベル、タンパク質レベル、脂質レベルなどでありうる。定性的差異は、活性化および不活化、タンパク質分解、核酸分解、および共有結合的修飾を含みうるがこれらに限定されない。

#### 【0090】

本発明のある特定の実施形態では、プロファイルは、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝産物プロファイル、またはこれらの組合せである。プロファイルは、定性的にまたは定量的に決定することもできる。

10

#### 【0091】

核酸プロファイルは、限定なしに述べると、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せでありうる。

#### 【0092】

核酸プロファイルは、遺伝子型決定、一塩基多型、遺伝子突然変異、遺伝子コピー数、DNAメチル化状態、DNAアセチル化状態、染色体量を検出することが当技術分野で公知の任意の方法により決定することができる。例示的な方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、シーケンシング分析、電気泳動分析、制限断片長多型（RFLP）分析、ノーザンブロット分析、定量的PCR、逆転写酵素PCR分析（RT-PCR）、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション分析、比較ゲノムハイブリダイゼーション、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ（HMA）、一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）、RNアーゼミスマッチ分析、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間（MALDI-TOF）質量分析、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間（SELDI-TOF）質量分析、四重極飛行時間（Q-TOF）質量分析、大気圧光イオン化質量分析（APPI-MS）、フーリエ変換質量分析（FTMS）、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（MALDI-FT-ICR）質量分析、二次イオン質量分析（SIMS）、表面プラズモン共鳴、サザンブロット分析、*in situ*ハイブリダイゼーション、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）、色素形成*in situ*ハイブリダイゼーション（CISH）、免疫組織化学（IHC）、マイクロアレイ、比較ゲノムハイブリダイゼーション、核型分析、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅（MLPA）、短鎖蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR（QMPSF）、顕微鏡法、メチル化特異的PCR（MSP）アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるHpaI小断片濃縮（HELP）アッセイ、放射性酢酸標識アッセイ、比色DNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降（ChIP-on-chip）アッセイ、制限ランドマークゲノム走査、メチル化DNA免疫沈降（MeDIP）、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性についての分子破壊光アッセイ、クロマトグラフィー分離、メチル化感受性制限酵素分析、非メチル化シトシンからウラシルへの亜硫酸駆動型転換、低変性温度での共増幅PCR（COLD-PCR）、マルチプレックスPCR、メチル結合PCR分析、またはこれらの組合せを含むがこれらに限定されない。

20

30

40

#### 【0093】

本明細書で使用される「シーケンシング」という用語は、広義において使用され、当技術分野で公知の任意の技法であって、限定なしに述べると、伸長産物またはベクター挿入配列の少なくとも一部を含む、核酸の少なくとも一部における、少なくともいくつかの連続ヌクレオチドの順序の同定を可能とする技法を指す。例示的なシーケンシング技法は、標的化シーケンシング、一分子リアルタイムシーケンシング、電子顕微鏡法ペー

50

スのシークエンシング、トランジスター媒介型シークエンシング、直接的シークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガージデオキシ終結シークエンシング、エキソシークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動、二重鎖シークエンシング、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理特徴シークエンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR (COLD-PCR)、マルチプレックスPCR、可逆性色素ターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアタームシークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成によるシークエンシング、リアルタイムシークエンシング、リバースターミネーターシークエンシング、ナノポアシークエンシング、454シークエンシング、Solexa Genome Analyzerシークエンシング、SOLID (登録商標)シークエンシング、MS-PETシークエンシング、質量分析、およびこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、シークエンシングは、例えば、ABI PRISM (登録商標) 377 DNA Sequencer、ABI PRISM (登録商標) 310、3100、3100-Avant、3730、もしくは3730xI Genetic Analyzer、ABI PRISM (登録商標) 3700 DNA Analyzer、またはApplied Biosystems SOLiD (商標) System (全てApplied Biosystems製)、Genome Sequencer 20 System (Roche Applied Science)、あるいは質量分析器であるがこれらに限定されない測定器を使用してシークエンシング産物を検出することを含む。ある特定の実施形態では、シークエンシングは、エマルジョンPCRを含む。ある特定の実施形態では、シークエンシングは、例えば、大規模並列処理特徴シークエンシング (MPSS) であるがこれらに限定されないハイスループットシークエンシング技法を含む。

10

20

#### 【0094】

本発明のさらなる実施形態では、タンパク質プロファイルは、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せでありうる。一部の実施形態では、タンパク質活性化プロファイルは、タンパク質のリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリストイル化状態、またはコンフォメーション状態を決定することを含みうる。

30

#### 【0095】

タンパク質プロファイルは、タンパク質発現レベル、タンパク質のリン酸化状態、タンパク質のユビキチン化状態、タンパク質のミリストイル化状態、またはタンパク質のコンフォメーション状態を検出するための、当技術分野で公知の任意の方法により検出することができる。一部の実施形態では、タンパク質プロファイルは、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、in situハイブリダイゼーション、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 質量分析、四重極飛行時間 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴、シークエンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定することができる。

40

#### 【0096】

本発明の一部の実施形態では、脂質プロファイルは、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC

50

)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定することができる。当技術分野では、生物学的試料中の脂質含量を分析するためのさらなる方法が公知である(例えば、Kangら(1992年)、Biochim. Biophys. Acta.、1128巻:267頁; Weylandtら(1996年)、Lipids、31巻:977頁; J. Schillerら(1999年)、Anal. Biochem.、267巻:46頁; Kangら(2001年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、98巻:4050頁; Schillerら(2004年)、Prog. Lipid Res.、43巻:499頁を参照されたい)。脂質分析の1つの例示的な方法は、脂質を生物学的試料から抽出し(例えば、0.005%のブチル化ヒドロキシトルエン(BHT; 抗酸化剤として)を含有する(2:1; vol/vol)クロロホルム-メタノールを使用して)、脂肪酸メチルエステルを調製し(例えば、14%のBF<sub>3</sub>-メタノール試薬を使用して)、脂肪酸メチルエステルを定量化する(例えば、HPLC、TLCにより、市販のガスクロマトグラフ、質量分析器、および/またはガスクロマトグラフ/質量分析器の組合せを使用するガスクロマトグラフィー-質量分析により)ことである。脂肪酸の質量は、多様な分析された脂肪酸の面積を、一定濃度の内部基準の面積と比較することにより決定する。

10

20

30

40

50

#### 【0097】

本発明の一部の実施形態では、炭水化物プロファイルは、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定することができる。

#### 【0098】

本発明の一部の実施形態では、代謝産物プロファイルは、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)質量分析、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間(SELDI-TOF)質量分析、四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、フーリエ変換質量分析(FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(MALDI-FT-ICR)質量分析、二次イオン質量分析(SIMS)、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップベースのアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定することができる。

#### 【0099】

本明細書で使用される通り、本発明の方法により検出される異なるプロファイルの間の「差異」は、異なる遺伝子コピー数、異なるDNA発現レベル、異なるRNA発現レベル、異なるタンパク質発現レベル、異なる脂質発現レベル、または異なる炭水化物発現レベ

ル、異なるDNAメチル化状態、異なるDNAアセチル化状態、および異なるタンパク質修飾状態を指す場合がある。差異は、1倍を超える差異でありうる。一部の実施形態では、差異は、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である。一部の実施形態では、差異は、1~10、2~10、5~10、10~20、または10~100倍の間の任意の倍数の差異である。

#### 【0100】

一部の実施形態では、差異は、示差的遺伝子発現(DGE: differential gene expression)、例えば、非食細胞と対比した食細胞のDGE、または=2n食細胞と対比した>2n食細胞のDGEである。DGEは、 $X = \log_2(Y_P) - \log_2(Y_{NP})$ として測定することができる。DGEは、組合せ試料と、=2n食細胞、非食細胞、対照細胞との間、またはマーカーのレポジトリーの間で有意に異なるという条件で、任意の数でありうる。例えば、遺伝子発現の2倍の増大であれば、 $X = \log_2(Y_P) - \log_2(Y_{NP}) = \log_2(Y_P / Y_{NP}) = \log_2(2) = 1$ として表しうるのに対し、遺伝子発現の2分の1の減少であれば、 $X = \log_2(Y_P) - \log_2(Y_{NP}) = \log_2(Y_P / Y_{NP}) = \log_2(1/2) = -1$ として表すことができるであろう。下方調節される遺伝子のXが<0であるのに対し、上方調節される遺伝子のXは>0である。例えば、Efron、J Am Stat Assoc、104巻:1015~1028頁(2009年)を参照されたい。

10

#### 【0101】

マーカーを検出するアッセイの一般原理は、マーカー(例えば、DNA、RNA、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質、代謝産物などのうちの1または複数)を含有しうる試料または反応混合物およびプローブを、適切な条件下で、かつ、マーカーとプローブとが相互作用および結合し、これにより、反応混合物中で取り出し、かつ/または検出しうる複合体を形成することを可能とするのに十分な時間にわたり調製することを伴う。これらのアッセイは、様々な様式で行うことができる。

20

#### 【0102】

例えば、このようなアッセイを行う1つの方法は、マーカーまたはプローブを、基質ともまた称する固相支持体へとアンカリングし、反応の終了時において、固相上にアンカリングされた標的のマーカー/プローブ複合体を検出するステップを伴うであろう。このような方法の一実施形態では、対象に由来する試料であって、マーカーの存在および/または濃度についてアッセイされる試料を、担体または固相支持体へとアンカリングすることができる。別の実施形態では、プローブを固相へとアンカリングし、対象に由来する試料を、アッセイのアンカリングされていない成分として反応させうる逆の状況も可能である。

30

#### 【0103】

アッセイ成分を固相へとアンカリングするための多くの方法が確立されている。これらは、限定なしに述べると、ビオチンとストレプトアビジンとのコンジュゲーションを介して固定化されるマーカー分子またはプローブ分子を含む。このようなビオチン化されたアッセイ成分は、当技術分野で公知の技法(例えば、ビオチン化キット; Pierce Chemicals、Rockford、IL)を使用して、ビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製し、ストレプトアビジンでコーティングされた96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェル内に固定化することができる。ある特定の実施形態では、アッセイ成分を固定化させた表面は、あらかじめ調製し、保存することができる。

40

#### 【0104】

このようなアッセイに適する他の担体または固相支持体は、マーカーまたはプローブが属するクラスの分子に結合することが可能な任意の物質を含む。周知の支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑

50

糲岩、および磁鉄鉱を含むがこれらに限定されない。

【0105】

上述の手法によりアッセイを行うために、固定化されていない成分を、第2の成分がアンカリングされた固相へと添加する。反応が完了した後、複合体化しなかった成分は、形成された任意の複合体が、固相上の固定化を維持するような条件下で除去する（例えば、洗浄することにより）ことができる。固相へとアンカリングされたマーカー/プローブ複合体の検出は、本明細書で概括される多数の方法で達成することができる。

【0106】

ある特定の例示的な実施形態では、プローブは、それがアンカリングされていないアッセイ成分である場合、アッセイの検出およびリードアウトを目的として、本明細書で論じられ、当業者に周知の、検出可能な標識で直接的または間接的に標識することができる。

10

【0107】

また、例えば、蛍光エネルギー移動の技法（例えば、米国特許第5,631,169号および同第4,868,103号を参照されたい）を活用することにより、マーカー/プローブ複合体の形成を、いずれの成分（マーカーまたはプローブ）もさらに操作または標識することなく、直接的に検出することも可能である。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光により励起されると、それにより発せられる蛍光エネルギーが、第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識により吸収され、これにより、吸収されたエネルギーに起因して蛍光発光することが可能となるように選択される。代替的に、「ドナー」タンパク質分子は単に、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを使用することもできる。「アクセプター」分子標識が、「ドナー」の標識から差別化されるように、異なる波長の光を発する標識を選ぶ。標識間のエネルギー移動の効率は、分子を隔てる距離と関係するので、分子間の空間的関係を評価することができる。分子間で結合が生じる状況では、アッセイ内の「アクセプター」分子標識の蛍光発光が最大となるものとする。FET結合イベントは、当技術分野で周知の標準的な蛍光光度分析の検出手段を介して（例えば、蛍光光度計を使用して）簡便に測定することができる。

20

【0108】

別の実施形態では、マーカーを認識するプローブの能力の決定は、リアルタイムのBiomolecular Interaction Analysis (BIA)（例えば、Sjolander, S.およびUrbaniczky, C. 1991年、Anal. Chem., 63巻: 2338~2345頁; ならびにSzaboら、1995年、Curr. Opin. Struct. Biol., 5巻: 699~705頁を参照されたい）などの技術を活用することにより、いずれのアッセイ成分（プローブまたはマーカー）も標識することなく達成することができる。本明細書で使用される「BIA」または「表面プラズモン共鳴」とは、相互作用体のうちのいずれも標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を研究するための技術（例えば、BIACore）である。結合表面における質量の変化（change）（結合イベントを示す）により、表面近傍における光の屈折率の変化（alteration）（表面プラズモン共鳴（SPR）による光学現象）が結果としてもたらされることから、生物学的分子間のリアルタイムの反応の指標として使用しうる、検出可能なシグナルが結果としてもたらされる。

30

40

【0109】

代替的に、別の実施形態では、類似の診断アッセイおよび予後診断アッセイを、液相中の溶質としてのマーカーおよびプローブにより行うこともできる。このようなアッセイでは、示差的遠心分離、クロマトグラフィー、電気泳動、および免疫沈降を含むがこれらに限定されない、多数の標準的技法のうちのいずれかにより、複合体化したマーカーおよびプローブを、複合体化しなかった成分から分離する。示差的遠心分離では、それらの異なるサイズおよび密度に基づく複合体の異なる沈降平衡による一連の遠心分離ステップ（例えば、RivasおよびMinton（1993年）、Trends Biochem. Sci., 18巻: 284頁を参照されたい）を介して、マーカー/プローブ複合体を、複合体化しなかったアッセイ成分から分離することができる。また、標準的なクロマトグラフィー技法も、複合体化し

50

た分子を、複合体化しなかった分子から分離するのに活用することができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーでは、サイズに基づき、かつ、カラムフォーマットの適切なゲル濾過樹脂を活用することにより分子を分離する、例えば、比較的大型の複合体を、比較的小型の複合体化しなかった成分から分離することができる。同様に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー樹脂を活用することにより、マーカー/プローブ複合体の、複合体化しなかった成分と比較して相対的に異なる電荷特性を利用して、複合体を、複合体化しなかった成分から差別化することができる。当業者には、このような樹脂およびクロマトグラフィーの技法が周知である（例えば、Heegaard（1998年）、J. Mol. Recognit.、11巻：141頁；HageおよびTweed（1997年）、J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.、12巻：499頁を参照されたい）。また、ゲル電気泳動も、複合体化したアッセイ成分を、結合していない成分から分離するのに活用することができる（例えば、Ausubelら編、「Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1987年、1999年を参照されたい）。この技法では、タンパク質複合体または核酸複合体を、例えば、サイズまたは電荷に基づき分離する。電気泳動過程での結合相互作用を維持するために、非変性ゲルマトリックス材料および還元性薬剤の非存在下にある条件が典型的に好ましい。当業者には、特定のアッセイおよびその成分に適切な条件が周知であろう。

10

#### 【0110】

ある特定の例示的な実施形態では、生物学的試料中のマーカーに対応するmRNAのレベルは、当技術分野で公知の方法を使用して、*in situ*フォーマットにより、かつ/または*in vitro*フォーマットにより決定することができる。多くの発現検出法では、単離RNAを使用する。*in vitro*法では、RNAを、血液細胞から精製するために、mRNAの単離について選択しない任意のRNA単離技法を活用することができる（例えば、Ausubelら編、「Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1987年、1999年を参照されたい）。加えて、例えば、Chomczynski（1989年、米国特許第4,843,155号）による一ステップRNA単離工程など、当業者に周知の技法を使用して、多数の細胞および/または試料をたやすく処理することもできる。

20

#### 【0111】

単離されたmRNAは、サザン分析またはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションアッセイまたは増幅アッセイで使用することができる。ある特定の例示的な実施形態では、mRNAレベルを検出するための診断法は、単離されたmRNAを、検出される遺伝子によりコードされるmRNAとハイブリダイズしうる核酸分子（プローブ）と接触させるステップを伴う。核酸プローブは、例えば、全長cDNAの場合もあり、少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さであり、厳密な条件下において、本発明のマーカーをコードするmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドなど、それらの一部の場合もある。本明細書では、本発明の診断アッセイにおける使用に適する他のプローブについても記載する。mRNAの、プローブとのハイブリダイゼーションにより、問題のマーカーが発現していることが示される。

30

40

#### 【0112】

1つのフォーマットでは、mRNAを固体表面上に固定化し、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動させ、mRNAを、ゲルからニトロセルロースなどの膜へと移すことにより、プローブと接触させる。代替的なフォーマットでは、例えば、遺伝子チップアレイ内で、プローブ（複数可）を固体表面上に固定化させ、mRNAをプローブ（複数可）と接触させる。当業者は、公知のmRNA検出法を、本発明のマーカーによりコードされるmRNAのレベルの検出における使用にたやすく適合させることができる。

#### 【0113】

試料中の、本発明のマーカーに対応するmRNAのレベルを決定するための代替的な方

50

法は、例えば、RT-PCR（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に示される実験的実施形態）、COLD-PCR（Liら（2008年）、Nat. Med.、14巻：579頁）、リガーゼ連鎖反応（Barany、1991年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻：189頁）、自己持続配列複製（Guatelliら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻：1874頁）、転写増幅系（Kwohら（1989年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：1173頁）、Qベータレプリカーゼ（Lizardiら（1988年）、Bio/Technology、6巻：1197頁）、ローリングサークル複製（米国特許第5,854,033号）、または他の任意の核酸増幅法による核酸増幅の工程の後で、当業者に周知の技法を使用する、増幅された分子の検出を伴う。これらの検出スキームはとりわけ、このような分子が極めて少数で存在する場合に核酸分子を検出するのに有用である。本明細書で使用される増幅プライマーとは、遺伝子の5'領域または3'領域（それぞれのプラス鎖およびマイナス鎖、またはこの逆）にアニールし、中間の短鎖領域を含有することが可能な核酸分子の対であると定義される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチドの長さであり、約50~200ヌクレオチドの長さの領域を挟む。適切な条件下で、かつ、適切な試薬を伴い、このようなプライマーは、プライマーにより挟まれるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能とする。

10

## 【0114】

in situ法では、mRNAを、検出の前に試料（例えば、体液（例えば、血液細胞））から単離する必要はない。このような方法では、細胞試料または組織試料を、公知の組織学的方法を使用して調製/処理する。次いで、試料を、支持体、典型的には、スライドガラス上に固定化し、次いで、マーカーをコードするmRNAとハイブリダイズするプローブと接触させる。

20

## 【0115】

マーカーの絶対発現レベルに基づき決定を下すことに対する代替法として述べると、決定は、標準化された発現マーカーのレベルに基づきうる。発現レベルは、その発現を、マーカーではない遺伝子、例えば、構成的に発現するハウスキーピング遺伝子の発現と比較することを介してマーカーの絶対発現レベルを補正することにより標準化する。標準化に適する遺伝子は、アクチン遺伝子または上皮細胞特異的遺伝子などのハウスキーピング遺伝子を含む。この標準化により、1つの供給源に由来する患者試料中の発現レベルの、別の供給源に由来する患者試料との比較、例えば、個体に由来する組合せ試料を、個体に由来する=2n食作用性血液細胞または非食作用性血液細胞と比較することが可能となる。

30

## 【0116】

本発明の一実施形態では、マーカーに対応するタンパク質またはポリペプチドを検出する。ある特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドを検出するための薬剤は、検出可能な標識を伴う抗体など、ポリペプチドに結合することが可能な抗体でありうる。プローブまたは抗体に関して本明細書で使用される「標識された」という用語は、検出可能な物質を、プローブまたは抗体へとカップリングすること（すなわち、物理的に連結すること）によるプローブまたは抗体の直接的標識のほか、直接的に標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識も包含することを意図する。間接的標識の例は、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンにより検出しうるような、DNAプローブのビオチンによる末端標識を含む。抗体は、ポリクローナル抗体の場合もあり、モノクローナル抗体の場合もある。無傷抗体またはその断片（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>）を使用することができる。1つのフォーマットでは、抗体または抗体断片を、発現したタンパク質を検出する、ウェスタンブロットまたは免疫蛍光技法などの方法において使用することができる。このような使用では一般に、抗体またはタンパク質を固体支持体上に固定化することが好ましい。適する固相支持体または担体は、抗原または抗体に結合することが可能な任意の支持体を含む。周知の支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、磁鉄鉱などを含む。

40

50

## 【0117】

様々なフォーマットを利用して、試料が、所与の抗体に結合するタンパク質を含有するかどうかを決定することができる。このようなフォーマットの例は、競合的イムノアッセイおよび非競合的イムノアッセイ、酵素イムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、抗原捕捉アッセイ、二抗体サンドイッチアッセイ、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、平面アレイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、蛍光アッセイなどを含むがこれらに限定されない。ラジオイムノアッセイおよび酵素結合イムノアッセイを含むイムノアッセイは、本発明の方法において有用である。当業者は、公知のタンパク質/抗体検出法を、本発明のマーカを発現させる細胞（例えば、血液細胞などの体液細胞）であるのかどうかの決定における使用にたやすく適合させることができる。

10

## 【0118】

当業者には、抗体または抗原への結合に適する他の多くの担体が公知であり、このような支持体を、本発明を伴う使用に適合させることが可能であろう。例えば、細胞（例えば、血液細胞などの体液細胞）から単離されたタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロースなどの固相支持体へと固定化させることができる。次いで、支持体を、適切な緩衝液で洗浄した後、検出可能に標識された抗体による処置にかけることができる。次いで、固相支持体を、緩衝液で再度洗浄して、結合しなかった抗体を除去することができる。次いで、固体支持体上に結合した標識の量を、従来手段で検出することができる。

20

## 【0119】

ある特定の例示的な実施形態では、診断、予後診断、疾患を発症する危険性の評価、処置の有効性の評価、疾患の進行または後退のモニタリング、および疾患を改善または処置することが可能な化合物の同定のためのアッセイが提供される。これらの方法のための例示的な方法は、体液試料を被験対象から得るステップと、生物学的試料中のマーカの存在を検出するように、体液試料を、疾患または状態のマーカ、例えば、マーカ核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）、マーカペプチド（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）、マーカ脂質（例えば、コレステロール）、またはマーカ代謝産物（例えば、クレアチニン）のうちの1または複数を検出することが可能な化合物または薬剤と接触させるステップとを伴う。一実施形態では、マーカmRNAまたはマーカゲノムDNAを検出するための薬剤は、マーカmRNAまたはマーカゲノムDNAとハイブリダイズすることが可能な、標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、全長マーカ核酸またはその一部でありうる。本明細書では、本発明の診断アッセイにおける使用に適する他のプローブについても記載する。

30

## 【0120】

本明細書で使用される疾患または状態を改善または処置することが可能な化合物は、限定なしに述べると、症状もしくは予後を改善するか、疾患もしくは状態の進行を防止するか、疾患もしくは状態の後退を促進するか、または疾患もしくは状態を消失させることが可能な任意の物質を含みうる。

## 【0121】

本発明の方法はまた、マーカ遺伝子内の遺伝子変化を検出し、これにより、変化した遺伝子を伴う対象に、がんに関連する疾患および/もしくは障害、ならびに/または感染因子、ならびに/または本明細書に記載される、がんなど、マーカタンパク質の活性もしくは核酸の発現の誤調節を特徴とする1もしくは複数の他の障害を発症する危険性があるのかどうかを決定するのに使用することができる。ある特定の実施形態では、方法は、対象に由来する無細胞体液試料中に、マーカペプチドをコードする遺伝子および/またはマーカ遺伝子の完全性に影響を及ぼす変化を特徴とする遺伝子変化の存在または非存在を検出するステップを含む。例えば、このような遺伝子変化は、1) 1または複数のヌクレオチドの、1または複数のマーカ遺伝子からの欠失；2) 1または複数のヌクレオチドの、1または複数のマーカ遺伝子への付加；3) 1または複数のマーカ遺伝子

40

50



の1または複数のヌクレオチドの置換、4) 1または複数のマーカー遺伝子の染色体再配列; 5) 1または複数のマーカー遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルの変化; 6) ゲノムDNAのメチル化パターンなど、1または複数のマーカー遺伝子の異常な改変; 7) 1または複数のマーカー遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在; 8) 1または複数のマーカータンパク質の非野生型レベル; 9) 1または複数のマーカー遺伝子の対立遺伝子の喪失; および10) 1または複数のマーカータンパク質の不適切な翻訳後修飾のうち少なくとも1つの存在を確認することにより検出することができる。本明細書に記載される通り、当技術分野では、1または複数のマーカー遺伝子の変化を検出するために使用しうる多数のアッセイが公知である。

#### 【0122】

ある特定の実施形態では、変化の検出は、リアルタイムPCR、COLD-PCR (Lira (2008年)、*Nat. Med.*、14巻: 579頁)、アンカーPCR、再帰的PCRもしくはRACE PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応(PCR: polymerase chain reaction) (例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第5,854,033号を参照されたい)、または、代替的に、ライゲーション連鎖反応(LCR) (例えば、Landegranら(1988年)、*Science*、241巻: 1077頁; ProdromouおよびPearl(1992年)、*Protein Eng.*、5巻: 827頁; ならびにNakazawaら(1994年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、91巻: 360頁を参照されたい) (これらのうちの後者は、マーカー遺伝子内の点突然変異を検出するのに特に有用でありうる(Abravayaら(1995年)、*Nucleic Acids Res.*、23巻: 675頁を参照されたい)におけるプローブ/プライマーの使用を伴う。この方法は、対象に由来する無細胞体液試料を回収するステップと、核酸(例えば、ゲノム核酸、mRNA、またはこれらの両方)を試料から単離するステップと、核酸試料を、マーカー遺伝子と特異的にハイブリダイズする1または複数のプライマーと、マーカー遺伝子(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で接触させるステップと、増幅産物の存在もしくは非存在を検出するか、または増幅産物のサイズを検出し、長さを対照試料と比較するステップとを含みうる。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載される突然変異を検出するために使用される技法のうちのいずれかを伴う、予備的な増幅ステップとして所望の使用でありうるということが予期される。

#### 【0123】

代替的な増幅法は、自己持続配列複製(Guatelliら、(1990年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、87巻: 1874頁)、転写増幅系(Kwohら、(1989年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86巻: 1173頁)、Qベータレプリカーゼ(Lizardiら(1988年)、*Bio-Technology*、6巻: 1197頁)、または他の任意の核酸増幅法、その後、当業者に周知の技法を使用する増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームはとりわけ、このような分子が極めて少数で存在する場合に核酸分子を検出するのに有用である。

#### 【0124】

代替的な実施形態では、試料に由来する1または複数のマーカー遺伝子内の突然変異は、制限酵素の切断パターンの変化により同定することができる。例えば、試料DNAおよび対照DNAを単離し、任意選択で増幅し、1または複数の制限エンドヌクレアーゼで消化し、ゲル電気泳動により断片長サイズを決定し、比較する。試料DNAと対照DNAとの間の断片長サイズの差異により、試料DNA内の突然変異が示される。さらに、配列特異的リボザイム(例えば、米国特許第5,498,531号を参照されたい)を、リボザイム切断部位の発生または喪失により特異的突然変異の存在について査定するのに使用することもできる。

#### 【0125】

他の実施形態では、本明細書に記載されるマーカーのうち1または複数における遺伝子突然変異は、試料核酸および対照核酸、例えば、DNAまたはRNAを、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイとハイブリダイズさせることに

10

20

30

40

50

より同定することができる (Croninら (1996年)、Human Mutation、7巻: 244頁; Kozalら (1996年)、Nature Medicine、2巻: 753頁)。例えば、マーカー核酸内の遺伝子突然変異は、Cronin, M. T.ら、前出において記載されている光発生DNAプローブを含有する二次元アレイにおいて同定することができる。略述すると、連鎖的な重複プローブの直線状アレイを作製することにより、試料中および対照中のDNAの長い連なりを走査して、配列の間の塩基変化を同定するのに、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを使用することができる。このステップにより、点突然変異の同定が可能となる。このステップに続いて、検出される全ての変異体または突然変異と相補的な、より小型の、特化したプローブアレイを使用することにより、特異的突然変異の特徴づけを可能とする、第2のハイブリダイゼーションアレイを使用する。各突然変異アレイは、一方が野生型遺伝子と相補的であり、他方が突然変異体遺伝子と相補的な、パラレルプローブセットからなる。

10

**【0126】**

さらに別の実施形態では、当技術分野で公知の様々なシーケンシング反応のうちのいずれかを使用して、マーカー遺伝子を直接的にシーケンシングし、試料マーカー遺伝子の配列を、対応する野生型 (対照) 配列と比較することにより、突然変異を検出することができる。シーケンシング反応の例は、MaxamおよびGilbert ((1977年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74巻: 560頁) またはSanger ((1977年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74巻: 5463頁) により開発された技法に基づくシーケンシング反応を含む。また、診断アッセイ ((1995年)、Biotechniques、19巻: 448頁) を実行する場合に、質量分析によるシーケンシング (例えば、PCT国際公開第WO94/16101号; Cohenら (1996年)、Adv. Chromatogr.、36巻: 127~162頁; およびGriffinら (1993年)、Appl. Biochem. Biotechnol.、38巻: 147頁を参照されたい) を含む、様々な自動式シーケンシング手順のうちのいずれかを活用しうることも想定されている。

20

**【0127】**

マーカー遺伝子内の突然変異を検出するための他の方法は、切断剤からの保護を使用して、RNA/RNAヘテロ二重鎖内またはRNA/DNAヘテロ二重鎖内のミスマッチ塩基を検出する方法 (Myersら (1985年)、Science、230巻: 1242頁) を含む。一般に、当技術分野の「ミスマッチ切断」の技法は、野生型マーカー配列を含有する (標識された) RNAまたはDNAを、組織試料から得られる、潜在的に突然変異体のRNAまたはDNAとハイブリダイズさせることにより形成される、ヘテロ二重鎖をもたらしことから始まる。二本鎖の二重鎖を、対照鎖と試料鎖との間の塩基対のミスマッチに起因して存在する一本鎖領域など、二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処置する。例えば、RNA/DNA二重鎖は、RNAアーゼで処置し、DNA/DNAハイブリッドは、S1ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチ領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態では、ミスマッチ領域を消化するために、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二重鎖を、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで処置し、かつ、ピペリジンで処置することができる。ミスマッチ領域を消化した後、次いで、結果として得られる物質を、変性ポリアクリルアミドゲル上で、サイズにより分離して、突然変異の部位を決定する。例えば、Cottonら (1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻: 4397頁; Saleebaら (1992年)、Methods Enzymol.、217巻: 286頁を参照されたい。一実施形態では、対照DNAまたはRNAを、検出のために標識することができる。

30

40

**【0128】**

さらに別の実施形態では、ミスマッチ切断反応では、二本鎖DNA内のミスマッチ塩基対を認識する1または複数のタンパク質 (いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素) を、細胞の試料から得られるマーカーcDNA内の点突然変異を検出し、マッピングするための、規定された系内で利用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチにおけるAを切断し、HeLa細胞に由来するチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにおけるTを切断する (Hsuら (1994年)、Carcinogenesis、15巻

50

: 1657頁)。例示的な実施形態によれば、マーカー配列、例えば、野生型マーカー配列に基づくプローブは、被験細胞（複数可）に由来するcDNAまたは他のDNA産物とハイブリダイズする。二重鎖を、DNAミスマッチ修復酵素で処置し、存在する場合は、電気泳動プロトコルなどにより切断産物を検出することができる。例えば、米国特許第5,459,039号を参照されたい。

#### 【0129】

他の実施形態では、マーカー遺伝子内の突然変異を同定するのに、電気泳動の移動度の変化が使用されるであろう。例えば、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)を使用して、突然変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動の移動度の差異を検出することができる(Oritaら(1989年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻:2766頁、また、Cotton(1993年)、Mutat. Res.、285巻:125頁;およびHayashi(1992年)、Genet. Anal. Tech. Appl.、9巻:73頁も参照されたい)。試料マーカー核酸および対照マーカー核酸の一本鎖DNA断片を変性させ、復元させることになろう。一本鎖核酸の二次構造は、配列により変化し、結果として得られる電気泳動の移動度の変化は、一塩基の変化の検出もなお可能とする。DNA断片は、標識することもでき、標識されたプローブで検出することもできる。アッセイの感度は、二次構造の、配列の変化に対する感受性が大きいRNA(DNAではない)を使用することにより増強することができる。一実施形態では、対象の方法では、ヘテロ二重鎖分析を活用して、電気泳動の移動度の変化に基づいて、二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離する(Keenら(1991年)、Trends Genet.、7巻:5頁)。

10

20

#### 【0130】

さらに別の実施形態では、突然変異体断片または野生型断片の、変性剤の勾配を含有するポリアクリルアミドゲル内の移動は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis)(Myersら(1985年)、Nature、313巻:495頁)を使用してアッセイする。DGGEを分析法として使用する場合は、例えば、PCRを介して、約40bpの溶融温度の高いGCに富むDNAによるGCクランプを付加することによりDNAを修飾して、完全には変性しないことを確保することになろう。さらなる実施形態では、変性剤濃度勾配の代わりに温度勾配を使用して、対照DNAと試料DNAとの移動度の差異を同定する(RosenbaumおよびReissner(1987年)、Biophys. Chem.、265巻:12753頁)。

30

#### 【0131】

点突然変異を検出するための他の技法の例は、選択的なオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的な増幅、または選択的なプライマー伸長を含むがこれらに限定されない。例えば、公知の突然変異を中央部に配置したオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、次いで、完全なマッチが見出される場合に限りハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、標的DNAとハイブリダイズさせることができる(Saikiら(1986年)、Nature、324巻:163頁; Saikiら(1989年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻:6230頁)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドをハイブリダイズ膜へと接合させ、標識された標的DNAとハイブリダイズさせると、PCR増幅された標的DNAまたは多数の異なる突然変異とハイブリダイズする。

40

#### 【0132】

代替的に、選択的なPCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と共に使用することもできる。特異的増幅のプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中央部に対象の突然変異を保有する場合(増幅が示差的ハイブリダイゼーションに依存するように)(Gibbsら(1989年)、Nucl. Acids Res.、17巻:2437頁)もあり、一方のプライマーの3'末端に対象の突然変異を保有する場合(Prossner(1993年)、Tibtech、11巻:238頁)もあり、適切な条件下で、ミスマッチを防止するか、またはポリメラーゼ伸長を低減しうる。加えて、突然変異の領域内に新規の制限部位を導入して、切断ベースの検出を創出することも所望でありうる(Gaspariniら(

50

1992年)、Mol. Cell Probes、6巻:1頁)。ある特定の実施形態ではまた、増幅のためにTaqリガーゼを使用して、増幅を実施しうる(Barany(1991年)、Proc.

Natl. Acad. Sci. USA、88巻:189頁)ことも予期される。このような場合には、ライゲーションは、5'側配列の3'端において完全なマッチが存在する場合に限り生じることから、増幅の存在または非存在を探索することにより特異的部位における公知の突然変異の存在を検出することが可能となるであろう。

### 【0133】

一部の実施形態では、本発明は、1または複数の疾患または状態のマーカーを同定するための方法であって、a)前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または $>2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第1のプロファイルを決定し;前記疾患または状態を有する対象に由来する $=2n$ 食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第2のプロファイルを決定し;第1のプロファイルと第2のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、第1の差異のセットが、第2のプロファイルと比べて、第1のプロファイルに特異的であるステップと;b)前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する食細胞の集団または $>2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第3のプロファイルを決定し;前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する $=2n$ 食細胞の集団または非食細胞の集団に由来する分析物の第4のプロファイルを決定し;第3のプロファイルと第4のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、第2の差異のセットが、第4のプロファイルと比べて、第3のプロファイルに特異的であるステップと;c)b)において同定された差異のセットと比べて、a)において同定された差異のセットに特異的な1または複数の分析物を同定するステップであり、c)において同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、1または複数の疾患または状態のマーカーを同定するための方法であって、a)前記疾患または状態を有する対象に由来する無細胞体液、および前記疾患または状態を有する対象に由来する食細胞の集団または $>2n$ 食細胞の集団を含む試料に由来する分析物の第1のプロファイルを決定するステップと;b)第1のプロファイルを、前記疾患または状態を有さない対照の対象に由来する分析物のレポジトリーに由来する第2のプロファイルと比較するステップと;c)第1のプロファイルと第2のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、差異のセットが、第2のプロファイルと比べて、第1のプロファイルに特異的であるステップと;d)差異のセットに特異的な1または複数の分析物を同定するステップであり、同定された分析物が、前記疾患または状態のマーカーであるステップとを含む方法を提供する。さらなる実施形態では、方法は、e)前記疾患または状態を有する対象における前記疾患または状態の影響を受ける細胞または組織に由来する分析物の第5のプロファイルを得;前記疾患または状態を有する対象における前記疾患または状態の影響を受けない細胞または組織に由来する分析物の第6のプロファイルを得;第5のプロファイルと第6のプロファイルとの間の差異のセットを同定するステップであり、差異のセットが、第6のプロファイルと比べて、第5のプロファイルに特異的であるステップと;f)d)において同定された差異のセットに存在する、c)の1または複数のマーカーのうちの少なくとも1つを同定するステップとをさらに含む。一部の実施形態では、本発明は、疾患または状態の処置において使用されうる1または複数のマーカーを同定するための方法を提供する。例えば、本発明の方法により同定されるマーカー(例えば、タンパク質または遺伝子)を、治療剤の分子標的として使用することができる。本発明の方法により同定されるマーカーはまた、本発明の他の方法のうちのいずれか、例えば、疾患または状態の進行または後退をモニタリングするための方法でも使用することができる。ある特定の実施形態では、1または複数の本発明の方法により同定されるマーカーは、治療的潜在力を有しうる。例えば、マーカーが、疾患または状態を有する対象に由来する循環罹病細胞内で上方調節される(または下方調節される)ものとして同定される場合、前記マーカーを下方調節すること(上方調節すること)が可能な化合

10

20

30

40

50

物または薬剤は、前記疾患または状態の処置において有用でありうる。同様に、遺伝子/タンパク質/脂質/炭水化物の発現プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子突然変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せも、これらの実施形態において有用でありうる。

#### 【0134】

生物学的試料中の、本発明のマーカ-に対応する分析物(例えば、DNA、RNA、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質など)の存在または非存在を検出するための例示的な方法は、体液試料(例えば、血液)を、被験対象から得るステップと、体液試料を、1または複数のマーカ-を検出することが可能な化合物または薬剤と接触させるステップとを伴う。本明細書に記載される検出法を使用して、生物学的試料中の1または複数のマーカ-を、*in vitro*において検出しうるほか、*in vivo*においても検出することができる。例えば、mRNAを検出するための*in vitro*技法は、ノーザンハイブリダイゼーションおよび*in situ*ハイブリダイゼーションを含む。本発明のマーカ-に対応するポリペプチドを検出するための*in vitro*技法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光を含む。ゲノムDNAを検出するための*in vitro*技法は、サザンハイブリダイゼーションを含む。さらに、本発明のマーカ-に対応するポリペプチドを検出するための*in vivo*技法は、対象へと、ポリペプチドを指向する、標識された抗体を導入するステップを含む。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置を標準的な画像化技法により検出しうる、放射性マーカ-で標識することができる。各マーカ-はまた、分析物でもあるため、本明細書に記載される、マーカ-の存在または非存在を検出する任意の方法はまた、分析物の存在または非存在を検出するのにも使用することができる。

10

20

#### 【0135】

本発明の方法において有用なマーカ-は、上記で同定されたマーカ-のうちのいずれか1つにおける任意の突然変異を含みうる。突然変異部位および突然変異配列は、例えば、このような情報のデータベースまたはレポジトリ、例えば、Human Gene Mutation Database ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk))、Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP; [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP))、およびOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM)のウェブサイト([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim))により同定することができる。

30

#### 【0136】

本発明の方法において有用なマーカ-は、疾患または状態と関連することが公知な任意のマーカ-を含みうる。本発明において使用されうるマーカ-は、特異的疾患または状態と関連するものとして十分に特徴づけられている任意のマーカ-の場合もあり、本発明の方法により同定された任意のマーカ-の場合もある。

#### 【0137】

一部の実施形態では、マーカ-は、AKT2、BAK1、EGFR、ERBB2、ETS2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、PDGFB、RB1、SERPINB2、SNCG、およびSPP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、1または複数のマーカ-は、AKT1、AKT2、BAK2、CDC25A、E2F1、EGFR、ERBB2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、NFKB1、PDGFB、PIK3R1、PNN、RB1、SERPINB2、SERPINB5、SNCG、SPP1、TERT、TIMP3、およびTP53からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、1または複数のマーカ-は、CASP8、CASP9、COL18A1、ETS2、HTATIP2、MMP9、SRC、およびTWIST1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、1または複数のマーカ-は、AKT1、APAF1、ATM、CDC25A、CDKN1A、ETS2、FOS、IL8、ITGA4、ITGA6、

40

50

ITGAV、JUN、MAP2K1、NFKBIA、PLAU、PLAUR、RAF1、SERPINB2、SYK、TIMP1、TNF、TNFRSF10B、およびTNFRSF1Aからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、マーカーは、ACP2、AK2、AKT3、ARL5B、ATP2B3、BGN、BRAAF、BTG2、CAMKK2、CAPG、CAPN12、CPLX2、DENND5A、DNA2、FAM104A、FNIP1、GFRA4、GLUD1、GNAQ、GP1BB、HNRPLL、HOXA2、HPS3、INPP4A、ITGAV、KLHL23、LANCL2、LYPD6、MAPKAPK3、MEF2A(EG:4205を含む)、MEF2C、NVL、PCYT1A、PGLYRP4、PLOD1、PPP1CB、PRKAB2、PROS1、PTPRE、RASA4(EG:10156を含む)、RBM S2、RBPJ、STAT5B、THBS1、TRIB1、TRIM2、TSPAN6、およびZDHHC21からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、マーカーは、B4GALT5、BOP1、CCL2、CCL3、CCL3L1、CCRL2、CD83、CLEC4G、CLIC4、CTSC、CTSO、CXC L10、FCGR3A、FPR3、HBA1、HBB、LRMP、MAP1LC3B2、MS4A4A、MSR1、MYADML、NID1、PF4、PION、RNF217、SAMD9L、SERPING1、およびSPARCからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、マーカーは、ACOT9、AMPD2、ARHGAP15、BATF2、C3AR1、C5orf41、CCL3、CCL3L1、CD63、CHST11、CHSY1、CLEC4G、CTS Z、CXorf21、CY TH4、CYTIP、DLEU2、DNAJA1、DOCK8、DTX3L、DUSP6、EPSTI1、ERF、F2RL1、FYB、GABRB2、GBP5、GLRX、GNB4、ICAM1、IFI35、IFIH1、IFNAR2、IL1R1、IRF1、ITGA5、LAP3、LAPTM5、LCP2、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MICAL2、MT1DP、MT1JP、MT1M、MT2A、MYADML、NE K6、NINJ2、NNMT、NT5C3L、NUB1、PDE4B、PLOD1、PML、PRKCB、PSMB9、RCN3、RGS4、RNASE6、RTP4、SAMD 9L、SEL1L、SERPING1、SETX、SIGLEC10、SKIL、SLC 7A7、SNORA21、SP100、SP110、SP140、SSFA2、STAT 2、STK17B、STK3、TDRD7、TMCC1、TMPRSS11E2、TNF RSF1B、TPM1、TRIM21、TXNDC4、UBE2L6、UBE2W、US P18、VAV1、WARS、WIPF1、およびWIP1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、マーカーは、ADAR、ADM、ALAS1、ANKRD22、ARHGAP27、B3GNT5、BCL10、C12orf35、C15orf29、C2orf59、CD177、CEACAM1、CPEB 2、DDX58、F2RL1、GDPD3、GNAI3、HIST2H3A、HIST2 H3D、HIST2H4A、HMGCR、HSPA6、HSPC159、IL4R、IM PA2、KPNB1、KREMEN1、KRT23、LDLR、LOC10013090 4、LTB4R、MAEA、MARK2、MBOAT2、MPZL3、N4BP1、NB EAL2、NMI、NPEPPS、PARP14、PGM2、PPIF、PXN、RAL BP1、ROD1、RPS6KA1、S100P、SERTAD2、SLC9A1、SL PI、SP110、SPINT1、ST14、TBC1D3、TNFRSF9、TRIM 21、UPP1、VPS24、ZBTB34、およびZNF256からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。

【0138】

一部の実施形態では、マーカーは、ACTN4、BC020163、CMIP、CNN 2、EDNRB、GPM6B、KIT、MGC40222、NAMPT、PRAME、R PL18、RPL21、RPS15、TMEM80、TRIB2、TTC3、およびVD AC1からなる群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む。一実施形態では、マーカーは、ACTN4、BC020163、CMIP、CNN2、EDNRB、G

PM6B、KIT、MGC40222、NAMPT、PRAME、RPL18、RPL21、RPS15、TMM80、TRIB2、TTC3、およびVDAC1である。これらのマーカーは、黒色腫の診断、予後診断、もしくはモニタリング、または異なる種類の皮膚病変の間の弁別、例えば、黒色腫と母斑との間の弁別において有用である（例えば、Wachsmanら、「Noninvasive genomic detection of melanoma」、Br J Dermatol.、2011年4月、164巻（4号）：797～806頁を参照されたい）。

【0139】

一部の実施形態では、出生前または妊娠関連疾患または状態のための本発明の方法において有用なマーカーは、例えば、米国特許第7,655,399号、同第7,651,838号、同第6,660,477号、同第6,172,198号、同第5,594,637号、同第5,514,598号、同第6,258,540号、同第6,664,056号、同第7,235,359号および同第7,645,576号、米国特許出願公開第20090162842号、同第20090155776号、同第20070207466号、同第20060019278号、同第20040086864号、同第20020045176号、同第20010051341号、同第20020192642号、同第20040009518号、同第20040203037号、同第20050282185号、同第20060252071号、同第20070275402号、同第20080153090号、同第20090170102号、同第20090061425号、同第20020045176号、同第20040137452号、同第20050164241号、同第20060019278号、同第20060252068号、同第20060252071号、同第20060257901号、同第20070141625号、同第20070218469号、同第20070275402号、同第20090155776号、同第20090162842号、同第20090170102号、同第20090317797号、同第20100120056号、同第20100120076号および同第20100137263号、ならびに国際特許出願公開第WO/2006/026020号、同第WO/2002/068685号、同第WO/2005/111626号、同第WO/2009/055487号、同第WO/2009/001392号および同第WO/2008/014516号において開示されているマーカーを含む。

【0140】

一部の実施形態では、神経または神経精神疾患または状態のための本発明の方法において有用なマーカーは、例えば、米国特許第7,723,117号、同第6,867,236号、米国特許出願公開第20060115854号、同第20060115855号、同第20060166283号、同第20060234301号、同第20060259990号、同第20060259991号、同第20070162983号、同第20070264197号、同第20080026405号、同第20080038730号、同第20080051334号、同第20080152589号、同第20080220013号、同第20080261226号、同第20080269103号、同第20080286263号、同第20090041862号、同第20090239241号、同第20090275046号、同第20090318354号、同第20090324611号、同第20100009352号、同第20100021929号、同第20100028356号、同第20100055722号、同第20100062463号、同第20100075891号、同第20100105623号、同第20100124756号、同第20100159486号、同第20100167937号、同第20100169988号、同第20100167320号、同第20100112587号、同第20100098705号、同第20100068705号、同第20100009356号、同第20090305265号、同第20100124746号、同第20100092983号、同第20070148661号、同第20070141625号、同第20100120050号、同第20090155230号、同第20090274709号、国際特許出願公開第WO/2004/040016号、同第WO/2004/071269号、同第WO/2005/033341号、同第WO/2005/0525

10

20

30

40

50

92号、同第WO/2005/103712号、同第WO/2005/114222号、同第WO/2006/020269号、同第WO/2006/048778号、同第WO/2006/050475号、同第WO/2006/061609号、同第WO/2006/105907号、同第WO/2006/133423号、同第WO/2006/134390号、同第WO/2007/098585号、同第WO/2007/119179号、同第WO/2008/010660号、同第WO/2008/014314号、同第WO/2008/028257号、同第WO/2008/046509号、同第WO/2008/046510号、同第WO/2008/046511号、同第WO/2008/046512号、同第WO/2008/063369号、同第WO/2008/085035号、同第WO/2008/095261号、同第WO/2008/100596号、同第WO/2008/120684号、同第WO/2008/125651号、同第WO/2008/127317号、同第WO/2008/132464号、同第WO/2009/000520号、同第WO/2009/001392号、同第WO/2009/068591号、同第WO/2009/074331号、同第WO/2009/100131号、同第WO/2010/005750号、同第WO/2010/011506号、同第WO/2010/019553号、同第WO/2010/059242号、同第WO/2010/061283号、同第WO/2010/063009号、同第WO/2010/066000号、同第WO/2009/121152号、同第WO/2009/121951号、同第WO/2009/097450号、同第WO/2009/092382号、同第WO/2009/075579号、同第WO/2009/058168号、同第WO/2009/053523号、同第WO/2009/034470号、同第WO/2009/032722号、同第WO/2009/014639号、同第WO/2009/003142号、同第WO/2010/041046号、同第WO/2007/131345号、同第WO/2008/003826号および同第WO/2009/07556号において開示されているマーカ-を含む。

10

20

30

40

50

【0141】

一部の実施形態では、心血管疾患または状態のための本発明の方法において有用なマーカ-は、例えば、米国特許第7,670,769号、同第7,445,886号、同第7,432,107号、同第7,157,235号、および同第7,009,038号、米国特許出願公開第20100167320号、同第20100112587号、同第20100098705号、同第20100068705号、同第20100009356号、同第20090305265号、同第20100124746号、同第20100092983号、同第20070148661号、同第20070141625号、同第20100120050号、同第20090155230号および同第20090274709号、ならびに国際特許出願公開第WO/2009/121152号、同第WO/2009/121951号、同第WO/2009/097450号、同第WO/2009/092382号、同第WO/2009/075579号、同第WO/2009/058168号、同第WO/2009/053523号、同第WO/2009/034470号、同第WO/2009/032722号、同第WO/2009/014639号、同第WO/2009/003142号、同第WO/2010/041046号、同第WO/2007/131345号、同第WO/2008/003826号および同第WO/2009/075566号において開示されているマーカ-を含む。

【0142】

一部の実施形態では、腎関連疾患または状態のための本発明の方法において有用なマーカ-は、例えば、米国特許第7,488,584号、同第7,459,280号、同第7,294,465号および同第7,662,578号、米国特許出願公開第20100143951号、同第20100124746号、同第20100120056号、同第20100120041号、同第20100081142号、同第20090155230号および同第20090239242号、国際特許出願公開第WO/2010/059996号、同第WO/2010/054389号、同第WO/2010/048347号、



同第WO/2010/048497号、同第WO/2010/054167号、同第WO/2010/048346号、同第WO/2010/046137号、同第WO/2010/025434号、同第WO/2010/018185号、同第WO/2010/012306号、同第WO/2009/122387号、同第WO/2009/083950号、同第WO/2009/080780号、同第WO/2009/060035号、同第WO/2009/059259号、同第WO/2008/154238号、同第WO/2008/089936号、同第WO/2008/084331号、同第WO/2008/042012号、同第WO/2007/131345号、同第WO/2005/012907号、同第WO/2004/024098号、同第WO/2003/019193号、同第WO/2007/112999号、同第WO/2007/082733号、同第WO/2006/073941号、同第WO/2010/068686号、同第WO/2010/022210号および同第WO/2009/127644号において開示されているマーカーを含む。

10

#### 【0143】

一部の実施形態では、自己免疫または免疫関連疾患または状態のための本発明の方法において有用なマーカーは、例えば、7,604,948、7,670,764、6,986,995、および6,631,330、米国特許出願公開第20070141625号、同第20090263474号、同第20100075891号、同第20100104579号、同第20100105086号、同第20100131286号、同第20090176217号、同第20090202469号、同第20020119118号、同第20090258025号、同第20100137393号、同第20100120629号、同第20090318392号、同第20090196927号、同第20090023166号、同第20080227709号、同第20080039402号、同第20080026378号、同第20070224638号、同第20070218519号、同第20060210562号、同第20050266432号、同第20050164233号、同第20050130245号、同第20090130683号、同第20090110667号、同第20090054321号、同第20090023166号および同第20080274118号、ならびに国際特許出願公開第WO/2009/043848号、同第WO/2010/053587号、同第WO/2010/046503号、同第WO/2010/039714号、同第WO/2009/100342号、同第WO/2009/053537号、同第WO/2009/017444号、同第WO/2008/156867号、同第WO/2008/147938号、同第WO/2008/129296号、同第WO/2008/137835号、同第WO/2008/082519号、同第WO/2008/064336号、同第WO/2008/043782号、同第WO/2008/043725号、同第WO/2007/047907号、同第WO/2006/125117号、同第WO/2006/114661号、同第WO/2006/020899号、同第WO/2005/114222号、同第WO/2005/007836号、同第WO/2004/076639号、同第WO/2004/050704号および同第WO/2001/014881号において開示されているマーカーを含む。

20

30

40

#### 【0144】

本発明はまた、本発明の方法により同定されるマーカーのうちの少なくとも1または複数を検出するマーカー検出剤を含むキットも提供する。本発明はまた、対象における疾患または状態を処置または防止する方法であって、前記対象へと、活性もしくは発現をモジュレートするか、または本発明の方法により同定されるマーカーのうちの少なくとも1もしくは複数の機能を破壊する薬剤を投与するステップを含む方法も提供する。

#### 【0145】

記載してきた本発明の実施形態は、本発明の原理の適用のうちのいくつかを例示するものであるに過ぎないことを理解されたい。当業者は、本発明の真の精神および範囲から逸脱しない限りにおいて、本明細書に示される教示に基づき、多数の改変を施すことができ

50

る。

【0146】

以下の実施例は、本発明を代表するものとして示される。本開示および付属の特許請求の範囲の視点から、これらの同等な実施形態および他の同等な実施形態が明らかとなるので、これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものとしてはみなされないものとする。

【実施例】

【0147】

DNA含量が2nの食細胞を非食細胞から分離し、発現プロファイルを分析するための代表的な方法I

1. WBC試料を含む血液試料を、血漿およびバフィーコートへと分離する。WBC試料を受け入れるように、プレートをアビジンでコーティングする。 10

【0148】

2. 非食作用性血液細胞（例えば、T細胞）に対するビオチン化された抗体を、ウェルへと添加し、RTで30分間にわたりインキュベートし、ウェルを洗浄する。

【0149】

3. 磁気ビーズを添加する。

【0150】

4. WBC血液試料を添加する。

【0151】

5. 37（30分間～1時間）でインキュベートする。 20

【0152】

6. 食細胞によるビーズに対する食作用およびアビジン-ビオチン-抗体の非食細胞に対する結合の後、プレートを磁石の上に置き、洗浄する（磁気ビーズを内部化した食細胞および抗体に結合した非食細胞は滞留し、他の全ての細胞は、洗い流されることになる）。

【0153】

7. 磁石を取り除き、食細胞を回収し、DNAが2nに等しい食細胞およびDNAが2nを超える食細胞へと分離する。非食細胞およびDNAが2nに等しい食細胞を、DNAが2nに等しい細胞と称する。

【0154】

（実施例2）

食細胞を非食細胞から分離するための代表的な方法II

1. WBC試料を含む血液試料を、血漿およびバフィーコートへと分離する。 30

【0155】

2. スライドガラス上のWBCをCytospinにかける。

【0156】

3. 細胞をアセトン/メタノール中で固定する（-20で5分間にわたり）。

【0157】

4. ヘマトキシリンエオシン染料および抗T細胞抗体で染色する。

【0158】

5. レーザー捕捉顕微鏡法（LCM）を使用して、T細胞（非食作用性）およびマクロファージ（食作用性）を単離する。DNAが2nに等しい食細胞とDNAが2nを超える食細胞へと分離する。非食細胞およびDNAが2nに等しい食細胞を、DNAが2nに等しい細胞と称する。 40

【0159】

（実施例3）

食細胞を非食細胞から分離するための代表的な方法III

1. 血漿を全血液から分離する。

【0160】

2. 抗体とコンジュゲートさせた磁気ビーズを使用して、非食細胞（例えば、T細胞） 50

および食細胞（例えば、好中球および/またはマクロファージおよび/または単球）を全血液から単離する。DNAが2nに等しい食細胞とDNAが2nを超える食細胞へと分離する。非食細胞およびDNAが2nに等しい食細胞を、DNAが2nに等しい細胞と称する。

（実施例4）

食細胞を非食細胞から分離し、発現プロファイルを分析するための代表的な方法IV

【0161】

1. WBC試料を含む血液試料を、血漿およびパフィーコートへと分離する。WBCを、特定の細胞部分集団（例えば、好中球、マクロファージ、単球、T細胞など）に対して特異的な蛍光抗体およびDNA染料（例えば、Hoechst 33342、ヨウ化プロピジウム）で染色する。

10

【0162】

2. 細胞を分取する（例えば、FACSにより）。

【0163】

（実施例5）

発現プロファイルを分析するための代表的な方法

1. 対象から単離された無細胞体液、対象から単離された食細胞、対象から単離された $>2n$ 食細胞、対象から単離された循環小胞、および対象から単離された循環罹病細胞から選択される2つ以上の異なる成分を組み合わせることにより、組合せ試料を創出する。

【0164】

2. 組合せ試料、ならびに対象から単離された $=2n$ 食細胞、対象から単離された非食細胞、および対象から単離された対照細胞から選択される成分を伴う対照試料からRNAを単離する。cDNAまたはcRNAを調製し、組合せ試料と対照試料との間で遺伝子プロファイルを差別化するのに使用する（例えば、がん遺伝子アレイ）。

20

【0165】

3. 組合せ試料および対照試料からDNAを単離する。DNAアレイを実行し、組合せ試料から得られるプロファイルと対照試料から得られるプロファイルとを比較する。

【0166】

4. 組合せ試料および対照試料からタンパク質を単離する。ヒト腫瘍が過剰発現させる公知のタンパク質（例えば、前立腺がんにおけるPSAおよびPSMA；結腸がんにおけるCEA；および卵巣がんにおけるCA125）に対する抗体を使用して、ウェスタンブロットを実行し、組合せ試料から得られるプロファイルと対照試料から得られるプロファイルとを比較する。

30

【0167】

5. 組合せ試料および対照試料から脂質を単離する。例えば、HPLCを使用して、組合せ試料と対照試料との間で脂質の量および質を比較する。

【0168】

（実施例6）

妊娠の一部は、胎児における遺伝子異常の存在により複雑化し、これらの異常を検出し特徴づけることが可能なアッセイの開発に、多大な臨床的関心の焦点が当てられてきた。最も一般的な問題には、染色体のうちの1または複数が正常を外れた量で存在する、染色体異数性の存在がある。異数性の発生は、母体の年齢に伴い頻度が増大し、13、18、および21番染色体の二倍体数からの逸脱、または男性もしくは女性の胎児における異常数のX染色体を伴う、潜在的に存続可能な妊娠を包含する。これらの異数体状態の検出は、羊水穿刺または絨毛膜絨毛検査（CVS）により回収される胎児細胞の直接的な分析を介して、かつ、胎児ゲノムDNAについての、従来の細胞遺伝学的核型分析またはアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、定量的PCR（qPCR）またはシーケンシングを使用することができるが、これらの手法は、胎児または母体の死亡の危険性、および細胞回収による外傷の帰結としての流産を伴う。加えて、これらの侵襲的な細胞回収手順は、妊娠第1三半期の後期に適用される場合に限り有効であり、危険性のある

40

50

妊娠についての早期の良好な決定を可能とするためには、早期の遺伝子型決定が好ましい。

【0169】

侵襲的検査の死亡危険性を回避するために、母体血液中に低レベルで存在する、分解された胎児ゲノムDNAであって、循環無細胞胎児DNA (ccff DNA) としてもまた公知である、胎児ゲノムDNAの配列組成を分析することにより、胎児異数性を検出する非侵襲的手順が開発されている。しかし、これらの手順は、手順が依拠する観察可能なシグナルを増大させるのに、無傷母体ゲノムDNAの、血液の細胞成分からの除外に依拠する。これに対し、他の方法では、細胞画分だけを使用するが、これらの方法は、高レベルの母体細胞汚染を有しうる (Bianchiら、Proc Natl Acad Sci USA、87巻(9号) : 3279 ~ 3283頁(1990年) ; Bianchiら、Am J Hum Genet.、61巻(4号) : 822 ~ 829頁(1997年))。

10

【0170】

上述の方法とは対照的に、かつ、本発明の方法の原理実証として、cff DNAに依拠する手順および細胞画分単独に依拠する手順の効力を保有する例示的な方法が開発された。ここでの手法は、胎盤内および他の区画内の胎児細胞に対する食作用によりスカベンジングされる胎児ゲノムマーカ含有することが予測される無細胞体液および食作用性血液細胞を明示的に含む。母体試料に存在する胎児DNAの証拠は、母体に存在せず、厳密な母体DNA試料を、母体DNAと胎児DNAとの組合せ試料と比較する場合に新奇なDNA配列である、父体マーカの存在により提供される。実際は、父体マーカは、ヒトゲノムの選択されたセグメントであって、多型部位を含有するセグメント内のDNAシーケンシング分析により見ることができる。多型部位は、一塩基多型 (SNP : single nucleotide polymorphism) であることが多く、これにより対立遺伝子が識別される。この種のマーカは、母体が、SNP配列についてホモ接合性であり、父体が変異体SNPを胎児へと引き渡している場合にインフォマティブである。例えば、母体が、特定のSNP位置においてA/Aヌクレオチドを保有し、父体がその同じSNP位置においてG/Gヌクレオチドを保有する場合、SNPのG対立遺伝子は、試料中の胎児DNAの相対量を示す比率で見出されるであろう。シーケンシング技法を使用すると、「A」を保有する分子(母体由来の物質)の数を、「G」分子(胎児由来の物質)の数と比較することにより、胎児性物質の比率を計算することができる。この根本原理を使用して試料中の胎児DNA量を計算するための例示的なアッセイは、例えば、それらの各々が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Chiuら、Proc Natl Acad Sci USA、105巻 : 20458 ~ 63頁(2008年) ; Ehrichら、Am J Obstet Gynecol、204巻 : 205号、e201 ~ 211頁(2011年) ; およびSehnertら、Clin Chem、57巻 : 1042 ~ 9頁(2011年)において記載されている。6つ以上のインフォマティブSNPを伴う組合せ試料中で胎児DNAの存在を正確に検出する信頼レベルが、99.9%を超えたことを示す研究において、Tynanら(J Mol Diagn.、13巻(4号) : 382 ~ 9頁(2011年))により例示されている通り、胎児DNA量の計算は正確である。母体がホモ接合性である場合は、胎児画分が直接変異体画分として認められるのに対し、母体がヘテロ接合性である場合は、胎児の対立遺伝子画分が、母体へと付加され、胎児がホモ接合性である場合に観察される比を歪ませる可能性がある。示されるデータ中には、これらの場合が疑いなく存在するが、分析を簡略化するために分析しなかった。

20

30

40

【0171】

潜在的なインフォマティブSNPのバイアスのないパネルを作成するために、全ての集団が、基準SNPと代替的SNPとを同様の比率で保有し、マイナー対立遺伝子頻度 (MAF : minor allele frequency) が40%を超えるような判断基準を選択した。これらの品質を有するSNPのカatalogは、市販されている (Durbinら、Nature、467巻(7319号) : 1061 ~ 1073頁(2010年) ; およびMcVeanら、Nature、491巻 : 56 ~ 65頁(2012年))。MAFとは、所与の遺伝子につ

50

いて最も希少な対立遺伝子が集団内で生じる頻度である。胎児画分中のヘテロ接合体を見出す可能性を増大させるために、40%を超える一方で、同時に、母体画分中に豊富なホモ接合体を有し、これにより、インフォマティブSNPを見出す可能性を増大させるMAFを標的とした。167のマーカによる初期のセットを分析のために選び出した。任意の母体 - 胎児組合せ試料（例えば、食細胞と組み合わせた無細胞体液）についての既往の分析に基づき、SNPパネルのうちの10～20%は、インフォマティブであることが予測される。167のSNPマーカを含有し、部分的に分解されたDNAからの増幅の可能性が最大となるような、小型の十分なサイズ（80～120bp）であるPCRプライマーをデザインした。SNPのリストならびにそれらのゲノム参照およびそれらを増幅するのに使用されたプライマー配列を、表1に提示する。

【表 1 - 1】

表 1:SNP およびゲノム参照

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs293743 6.G.A	chr5:313 25718- 3132572 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAGAAAGGTATCATCTGAAGTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT AGAACTACTTACTTTTACTTATTA GGA
rs694663 4.A.G	chr7:790 93092- 7909310 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GATTTTAAAATGAAAATTGAAGA AGTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GTTGTTCTTTGGTCTGTAAAAT
rs106092 2.T.C	chr18:72 2398- 722408	ACACTGACGACATGGTTCTACATT AGTACCAGAACCACTGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTTACCTGATTTTAATCATCAGAT
rs117348 33.A.G	chr4:101 108065- 1011080 75	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CAGGTATTCATCATTCACTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTTCCCCTGTTCTTAAGTG
rs104903 92.G.T	chr2:186 658561- 1866585 71	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TCAGCTTATGCTGATGATAATC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AAATAGTTTTAGTAATGAAGTTA GCA
rs187257 5.G.A	chr3:113 804975- 1138049 85	ACACTGACGACATGGTTCTACATT AAATGACCTGGATTGATCAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TTTTGTCCTTGACTAAATGAATCT
rs424177 9.A.G	chr4:184 600597- 1846006 07	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TTGGATGCAATTGCTCAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CTGTTTAGACATCCATGCA

10

20

30

40

【表 1 - 2】

標的の GenBank ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs195871 6.A.G	chr14:20 528317- 2052832 7	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GAACTTCAAATTTTCTTCTTTG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GGGTTGACCTACATGTC
rs308572 4.TCA.T	chr3:156 255511- 1562555 23	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TGAGCTTTACAAATAAACATACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TCCCAGTGCTAATTAACAA
rs588067 8.TC.T	chr6:146 756123- 1467561 34	ACACTGACGACATGGTTCTACAG CTGCCTTAAGTAGGAAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGCTTTGTCAGAATTCCC
rs107411 30.T.C	chr10:27 475440- 2747545 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AAACAGATACCTCCTATTTTGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC AAGGCTAGACTAAAAGGAAAA
rs230564 1.G.A	chr12:69 646910- 6964692 0	ACACTGACGACATGGTTCTACATT CATTCTTTGGGAGTAAATGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TGTATCACTAGCTACTAAATCAA AA
rs104220 1.G.A	chr3:151 546037- 1515460 47	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAACCTCAGAAAATTTGCATT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AAACAGAAAAGTGCCTATTTAAG
rs3806.G. A	chr13:10 3330714 - 1033307 24	ACACTGACGACATGGTTCTACAG CGTATTCTAAAATAGGAAACAAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TAGTGGATGAAAACATGCATT

10

20

30

40

【表 1 - 3】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs930783 4.A.C	chr4:764 53846- 7645385 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TATTTAAGAATTTTCTGTTTAAAT GC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGGGTAAATCCCATTTAGA
rs691925 4.T.C	chr6:136 599400- 1365994 10	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATAAGCTGAAAGGCCAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TGACCCATCTGAGTCTATC
rs1338.T. C	chr10:27 475689- 2747569 9	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTAAAAGGCTGAAAGGAATA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GTTTTCATAAAGTGCAATAAACA
rs299927 8.C.T	chr10:44 053581- 4405359 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GGAGGAAAGCTCATGTAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGTCTACCCTTTGTTCTTAC
rs600291 04.G.A	chr2:186 658052- 1866580 62	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ATCACGTAAAGGCAAATGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GAAGTTGAAGTACTTTTCGATA
rs186206 6.G.A	chr2:186 671908- 1866719 18	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GAAAATTTAGCAAGAAGACTAAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GAAACTGAAACCTCATCAC
rs451816 8.G.A	chr3:978 06612- 9780662 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TTCAAATTTTCATGCAATGGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GTCATTAAGTGGGTATTTGTA
rs108167	chr9:111	ACACTGACGACATGGTTCTACAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG

10

20

30

40



【表 1 - 4】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
67.G.A	782666- 1117826 76	CATTCTGTATGTAAGGCC	GAAGTTCAAATTTGACAGC
rs713834 5.G.A	chr12:10 4290853 - 1042908 63	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AAACTGATGGAAGCAATGAAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TAGGTAAGTCTGCTTGAAC
rs691703 3.G.A	chr6:426 27430- 4262744 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATAACCTTTGTATTGCAGCC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TACATGTAACGAATTGTCTTTG
rs115032 519.T.C	chr6:300 02877- 3000288 7	ACACTGACGACATGGTTCTACACT ATTGCCTGGATCCCAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGCTTAGGCTTTCAGATTTTAC
rs374756 2.A.G	chr12:42 854201- 4285421 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CGGATTTCAATGTCATAGTTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TACATCTGCCAGTGCTC
rs224085 9.A.G	chr3:427 87465- 4278747 5	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AATTTGTTGAGCCCGAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT ATTTCAGGTTTTGGCCAGA
rs105028 7.T.C	chr12:27 954503- 2795451 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GCATAGCAATGTAAAAGGAAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CTCATTTCATAATGCCTCCTTA
rs157361	chr12:12	ACACTGACGACATGGTTCTACAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG

10

20

30

40

【表 1 - 5】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
2.T.C	047425- 1204743 5	CATCACCAATGTTCCAA	AGGGTTCCAAACATACTG
rs123038 1.A.G	chr5:962 54205- 9625421 5	ACACTGACGACATGGTTCTACATT ATCAAGAAGGCCAGGAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG ACCATTCAATTTGGAATGCT
rs988030 7.C.A	chr3:169 74606- 1697461 6	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TAAGAAAATGAAACGTACCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCCTTCACTCAAATTCCT
rs380098 9.A.G	chr7:141 360581- 1413605 91	ACACTGACGACATGGTTCTACAA ACCATTACTTGACAGAAAGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTGAAGCCTCACCTTTTAT
rs283943 63.G.A	chr3:334 28295- 3342830 5	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TCTGATAAAAATGACCCTACTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC ACCTAAGTTTACAATGAAGG
rs733766 7.G.A	chr13:97 489453- 9748946 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GAAATTAATACTGATAAAGACTA TCAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT TAGTCTTATCTTTCGCAAAACATA
rs580505 65.ATTT .A	chr9:889 37847- 8893786 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GAAGATAAGTTTACTGAATTCAT AAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TCCTAGTGGAACTTAATAAAATA AGT
rs373411 0.T.C	chr5:137 01532-	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTTCAGTAAACCAGAAACC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGAACATAGCTGGTTTACA

10

20

30

40

【表 1 - 6】

標的の GenBan k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	1370154 2		
rs593093 3.C.T	chrX:13 5431354 - 1354313 64	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ACCCCTGTTTCATACCC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TCAGCTTCAGTACTATGAGG
rs831618 T.G	chr11:33 728610- 3372862 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAG ATCCAGCTAACTTTGCATA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GGTACAGGATTCTAAGCT
rs210477 2.T.A	chr9:117 808781- 1178087 91	ACACTGACGACATGGTTCTACAC AATTCGTATTCAGTAGCCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCTGAGCCACTGGAAATA
rs226999 1.A.G	chr7:790 90132- 7909014 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CTTTTGTAATTGTAGGCATTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GGGATAGATTCAGCTACT
rs376660 1.C.T	chr1:100 388231- 1003882 41	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GATAACTTATTTAAGATGCCTTA AAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AATTCTATCTAGGAAATAAGTTCT ATGA
rs428463 2.C.G	chr16:70 606551- 7060656 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AGTATGGGGATTTTAGCATG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CTTCTGTAAGTACCCTTC
rs938924 8.T.C	chr6:135 282652-	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AACATCAGATGAGGTCATC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GTTGGCTGTTTATGGTTT

10

20

30

40

【表 1 - 7】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	1352826 62		
rs105497 5.T.C	chr3:940 6832- 9406842	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CACTAACCAACTCCTAGAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CAGTGGCTCCAATAGTG
rs643887 4.G.A	chr3:124 739888- 1247398 98	ACACTGACGACATGGTTCTACAC AGACTGACCGTCAAAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGCTTAACAACCTCCACTG
rs832068. G.A	chr3:977 54143- 9775415 3	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TTCCGGGGAAGGTTTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CCTCACTTCTTTGTTTGC
rs840388. T.G	chr5:340 18886- 3401889 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CTGGAAAATTACCAAGGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CGCAAATTCTAAATCTTAAACA
rs702395 4.G.A	chr9:218 16754- 2181676 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GATGCCTTAATTTTGGGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CAGAATTTAAGTTAAATTTAAATT ATCCT
rs780882 3.T.C	chr7:129 989874- 1299898 84	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AACAAGGTGGACTTCTG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CTGTAAGCAAGTCCATGA
rs353507 55.T.G	chr10:12 3549687 - 1235496	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AACAAAGCCAATGATTTCC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AAAACCTCCAAGTACTGCC

10

20

30

40

【表 1 - 8】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	97		
rs380298 O.A.G	chr11:57 06307- 5706317	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GTTAGGATTCACCTCACCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTGGCCCATAGTTTATCTTTC
rs2942.G. A	chr6:146 755136- 1467551 46	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ACGTGAAGACCAATGAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCTTGGTGCTGGTATCT
rs6921.T. A	chr8:103 838872- 1038388 82	ACACTGACGACATGGTTCTACAC AGACATTTCTTAAAAGTTACCGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTTGAACCTTCATGGCATA
rs113318 1.C.A	chr2:554 02268- 5540227 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AGTTTTCAATCAAATACTTATTCA G	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCGAATTTTGCATAGAAGTAGA
rs383713 4.CT.C	chr7:272 21061- 2722107 2	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TTTCCAAATGTTGCAAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT TTCTTTTGCCATTAGTTGAT
rs241410 5.A.G	chr15:51 868369- 5186837 9	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTCATTTGCCAAAATAACAATA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AATAGTATGTAATAAGATTTCAA AAGT
rs730511 5.A.G	chr12:72 372858- 7237286 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CACTGTACCCAGTACATC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG ATCATTGACCACTTTATGGT
rs217714	chr7:224	ACACTGACGACATGGTTCTACAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA

10

20

30

40

【表 1 - 9】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
2.G.A	59320- 2245933 0	GGATCCATGTTGACAGA	CAGCATTGGATTGCTCA
rs240047 8.T.C	chr5:147 510862- 1475108 72	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TTCTTGAATGCCATAAAGTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GCTTTAAATCCTTTGGACA
rs689504 9.T.G	chr5:522 48869- 5224887 9	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CCAAGAATACATTTAGCATCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTGATTTTCCATCCTAGATAA
rs8128.A. C	chr1:115 110679- 1151106 89	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CTTAAACATCAATGGTTTTGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CAATTTAGCAGGTAGAAGAAAA
rs382897 7.G.A	chr7:295 19494- 2951950 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GACTGGATACCGCTTCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC GGCTTCTGAATAAGGATG
rs121022 03.A.G	chr15:51 791555- 5179156 5	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AGATTTAAAGGTCTGAATGATCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AAGCATGCTGTCAAATTT
rs797455 9.A.T	chr12:50 23955- 5023965	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATCTACTAGCATTGGTCC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGTTTATCTGGCTTTGGTG
rs268681 7.C.A	chr7:479 68923- 4796893	ACACTGACGACATGGTTCTACATC CCCGAAATCCATCATC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CATGAACCCTGTTCTTAATT

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	3		
rs188421 4.C.T	chr14:37 149132- 3714914 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AAATTTTATTTTCATGTTTCCTACTT G	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TAGGTATTTTAAAACATTGTTTAA AACA
rs105395 9.C.A	chr9:114 359620- 1143596 30	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TACAGTCCCTTCCAACCTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTGGCTATCCTACTAATAGTGA
rs378019 0.A.G	chr9:139 099069- 1390990 79	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTGTTGAAAGAATCAGCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TGGATGTATTCATAAGACCATG
rs101950 3.G.A	chr5:962 54813- 9625482 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ACAGATAAGTTTTAGAAAGACTC AA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTGCTCCAAAGTGGATTG
rs108830 98.C.G	chr10:10 0218191 - 1002182 01	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AAGCTTCCTACCTACCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CCTATTTGAGCTAGAACAAA
rs697994 5.G.A	chr7:823 86121- 8238613 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AGCAATTTGATTTATTTCTTTTGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TAAAGGTGAAGAATTACATGAAA AT
rs147147 897.CTA .C	chr16:70 192457- 7019246	ACACTGACGACATGGTTCTACACT CCTTCTAGACATTTCTTGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TAACAAGCCAACCAGAAC

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	9		
rs469250 0.A.C	chr4:311 47268- 3114727 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TGGGCTATTCCCAACTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GACTGGTCCATTATCTGAG
rs472703 8.G.C	chr7:148 979912- 1489799 22	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GGAAAGTTTCTACTTTGCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CAAAGTCCATTAACAACACTAC
rs8692.C. T	chr16:84 211479- 8421148 9	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GCACCGAAAGCATCATA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GTTTATCATGCCTAAGGGA
rs595084 81.C.T	chr3:153 839955- 1538399 65	ACACTGACGACATGGTTCTACAA ACGGGTTACTAATTACGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TCCTATGTACCGTCCTG
rs201131 957.TTC. T	chr6:879 93564- 8799357 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TGCACCAATTGTAATGAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT AGTCTGAAGAAATCTAACAGGAT
..G.GT	chr15:52 102326- 5210233 7	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TCCTTTAATTAGTTTATGGCTTCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTAAATGGGTGAAAGGG
rs7096.G. A	chr9:115 234607- 1152346 17	ACACTGACGACATGGTTCTACACT GCTAGTGCTGCTTTAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AAGATCTAATTGGCTTTTATTAGC

10

20

30

40



【表 1 - 1 2】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
..GTC.G	chr12:10 311906- 1031191 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CCCACCTTGTCCTCCAAAAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AAGGTATCAATCCTTGGTTT
rs104869 85.G.A	chr7:823 86078- 8238608 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ACTTCACCCTTAAATAAAGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GCTGGTCTTACCCTAGT
rs931606. G.A	chr4:794 43846- 7944385 6	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TCCCCTTCAAATAGGACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGTCAAATTCAATTCCTCCTAG
..G.GA	chr11:10 8345511 - 1083455 22	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CTTGGTGCAGTCTTCTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AAGAACTTTGAGTCAGCC
rs30169. T.G	chr5:137 19018- 1371902 8	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TCTGGACTCACCCTAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TTCAGATGTCCATTAAATTTGC
rs487088 7.G.A	chr8:125 061891- 1250619 01	ACACTGACGACATGGTTCTACATT CTTTTCTTCTTTAGGGGAAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GTGATAGCATAACCTGG
rs113318 2.C.T	chr2:554 02221- 5540223 1	ACACTGACGACATGGTTCTACATT AGGTATCTGTTCTGCTTGAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCTGAATAAGTATTTGATTGAAA AC

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs360040 74.G.A	chr2:186 665428- 1866654 38	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GCAGAAGAATGTCAACTTTTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGGTCTGACATGTAATCTACTT
rs114154 393.T.C	chr6:309 99993- 3100000 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAG ACCTGTTTCATAGGCAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGAAGTCCATTCCAGGG
rs104748 1.G.A	chr5:522 49472- 5224948 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CAGAAATGTATTTTAAAGAATTTC AG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GTAGATTCCAATGAACCATAATG
rs229325 0.G.A	chr3:334 34827- 3343483 7	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAACAAATGATTTGATTTACCTGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC ACCAAATTAATCAGGTTTACAG
rs108491 74.T.C	chr12:50 25090- 5025100	ACACTGACGACATGGTTCTACAG ACTGGTTGATTCTTCTGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CCAAACTCATAACAACAAC
rs701192 8.G.A	chr8:284 21981- 2842199 1	ACACTGACGACATGGTTCTACACT CATACAAATAAGAATTGGTAGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TCATCAGGGGCAAGTTA
rs373369 0.G.C	chr5:140 569523- 1405695 33	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AGGCATTTCTTACTAGAATCC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AGGCAATGAATTTAAAGTCAATA
rs129933 1.A.G	chr3:106 965488-	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GTCTTAAGACAGGAAGCTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CTGATTCCAGTCATAGCTC

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	1069654 98		
rs227871 1.C.T	chr2:470 85394- 4708540 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GTTCCCTTTCGGATGAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GTTATTTTGAGCAGATGGTT
rs116928 15.G.A	chr2:684 15763- 6841577 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CTCGCTGTACTAAAGGAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TGAAATTTAAAGGCTAGGAAAGA
rs116485 895.T.C	chr4:691 76794- 6917680 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CTTCTGATGTAATCCTCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC AAGGAAATGGGGTTCTTT
rs216103 6.G.T	chr2:186 659355- 1866593 65	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTGGAAGAACTTTTGAATAAGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT GGCAGTTTCATTAAGTGG
rs172292 01.T.C	chr2:186 656952- 1866569 62	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AATACTTAAGTATGTAGTCAAGTT AATTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CCTGTATCGATAAGTTTCAA
rs223085 4.T.C	chr13:10 3275382 - 1032753 92	ACACTGACGACATGGTTCTACAG ATGATGGAAACCTGCTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CCACTTTATCACCTCATAAATCT
rs464755 4.A.G	chr9:978 62697-	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAAGTTCCTGGAATTTTCCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTTTGAGGTATGAGCAAAGT

10

20

30

40

【表 1 - 15】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	9786270 7		
rs704697. T.C	chr11:33 724776- 3372478 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GGGTTAAATAAGAAGTTGATGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CATAGGGACTTTGCCTC
rs30168. G.A	chr5:137 19085- 1371909 5	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TTGGCAAATTTAATGGACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TGGACATAATCATAGAAACTGA
rs559382 53.A.G	chr2:186 661669- 1866616 79	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTTTGATCAGACCATGAAAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG ACAAGACTTGCTTTAATGC
rs109312 00.C.A	chr2:186 664959- 1866649 69	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GAAACAAATCATTTTCTATGCAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AGTAGAAAATTGCCAGTCT
rs6928.C. G	chr22:22 115000- 2211501 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAC AGATACAAAGCAGTTTCAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC AGGTTTACCTAAAGCTTGTT
rs228202 2.T.C	chr13:41 374182- 4137419 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CTAAACAGAATTTGGAAACCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTTTGCAATCTTGAAGCTT
rs161378 0.G.T	chr1:144 865846- 1448658	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TGGAAACATGACTCAGTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TAACTTCTACAGTCAGGGC

10

20

30

40

【表 1 - 1 6】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー	
	56			
rs789346 2.A.G	chr10:28 228861- 2822887 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GAAAGAACGCCAACAAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TCATTGAAAACCTTGCAAG	10
rs227514 5.G.A	chr14:35 242824- 3524283 4	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TGTACCTGTCTTTTACTATGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GAAAACAAGGAAAATGGGA	20
rs9225.C. T	chr2:470 86108- 4708611 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CCCTCCTTAAGCATTGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG ATGCTCAAAGTATGATTTCAC	20
rs113007 2.T.C	chr9:146 15931- 1461594 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AGAAATACTTCAGTCCAACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT ATGTATTCTGGATAACTGAAAAC A	30
rs732774. C.T	chr13:52 523804- 5252381 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GATCAATGTCAGTAGATTATTTAA AA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GGATTGTAATCGGTTTTATCG	
rs135930 0.G.A	chr1:144 922579- 1449225 89	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTTCCTTGAGGTTCTGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CTGAATTCAGATTCTTCAAG	40
rs254978 2.G.T	chr5:962 30996- 9623100 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ACCTCCTAGTGGTTTTGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CAGCGATAAGTTCATG	

【表 1 - 17】

標的の GenBan k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs928912 2.C.G	chr3:118 867043- 1188670 53	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GGGATTTAAATTTTCAGGATG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GAAACTTGGTAAGGATCTTC
rs476631 0.G.A	chr12:50 22037- 5022047	ACACTGACGACATGGTTCTACAG CTACTGACCGATGTTTAAAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AGTCACTAGGTTTTCTGTTTT
rs461754 8.A.G	chr11:16 133409- 1613341 9	ACACTGACGACATGGTTCTACACT ACTTACCTGGTTTGTATGTTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC GCTCATGATCCCAATTTT
rs100579 08.T.G	chr5:102 884929- 1028849 39	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTAAACTGAATTTCAAGATGC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTTAGATACATAATAAAATTCGA GCTA
rs729017 75.T.C	chr1:164 7810- 1647820	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AGTCCTCAACTGACCCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GAAGAACAGGATAAAGCTC
rs225554 6.C.T	chr5:962 49111- 9624912 1	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GGAAGGAAAGGTTATCAAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GAAGATGGGTCCAATTTTC
rs254853 8.T.A	chr5:962 32138- 9623214 8	ACACTGACGACATGGTTCTACACT CCCTGTTTAGGATGACTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTTCCTGTATTGAGTCGG
rs177083. C.T	chr2:324 47714- 3244772	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TGACCTGCTAAAGAAATACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG ATAAAGGCCAAGGAACAG

10

20

30

40

【表 1 - 18】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	4		
rs687614 3.A.G	chr5:173 80266- 1738027 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GAAAACTGCTTTTCATTAGCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA ATACCATGTCTGCCTGT
rs984117 4.T.C	chr3:167 184874- 1671848 84	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATGAATACAATGGCAAATAATAA T	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGGATTTTCAAGATGCAAAG
rs116571 982.G.A	chr6:310 23144- 3102315 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AGACTTGAACCCTATTAGAAAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG AATACATGTAGCTTACATGGC
rs4898.T. C	chr7:823 86202- 8238621 2	ACACTGACGACATGGTTCTACATT CTTCACCTTTAGTCAGGTTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TCATCTAAACCAATGGCAAG
rs202026 726.T.TA	chr3:869 90606- 8699061 7	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAGTATGTTGCATTTTAAAAGAAT TAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC ACCTTTTAGAAAAGGATAAGTAA T
rs115377 48.A.G	chr15:31 668690- 3166870 0	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TTGCTGACTGTTCCATA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GGGTAATCCTGATTTCAAAA
rs14026. G.A	chr2:554 04790- 5540480 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTAGCTTAATGCCAACTTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GAAACAACCATCTTTATCTTTTG

10

20

30

40

【表 1 - 19】

標的の GenBan k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs178013 8.A.G	chr10:38 501650- 3850166 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AAGTGAAGACTCCTTCTACC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA GTTAAACTATTGTTTAAAAGCCT T
rs380095 1.T.G	chr7:997 58132- 9975814 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATCGAAGTACTCAGCCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CGATTTGGGGICTTCAT
rs123038 2.T.A	chr5:962 54350- 9625436 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ACCATTTGGTTTAAAGCCTTAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GCAGATTCGACTTCATTT
rs201009 141.CCT. C	chr7:272 21060- 2722107 2	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TTTCCAAATGTTGCAAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT TTCTTTTGCCATTAGTTGAT
rs235091 7.T.C	chr8:625 76972- 6257698 2	ACACTGACGACATGGTTCTACATC TAATCTGAAATAATTAACCTTT CTAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CATAGCCATGAATAAAGGG
rs114783 926.A.G	chr6:310 26430- 3102644 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AGGTCACTAGCATTAGCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTTGGGAGCATAGACTTT
rs36261. G.A	chr19:83 27240- 8327250	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GCAACTGGACAGATCTG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC ATTTGTTTTAATTGGACCCTTTT
rs108515 00.T.C	chr15:51 783816-	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TTACCTTTTCAATGCATCTTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT ATGATTCCAGCAATTCAGA

10

20

30

40



【表 1 - 2 0】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	5178382 6		
rs593093 2.T.C	chrX:13 5431232 - 1354312 42	ACACTGACGACATGGTTCTACAT ATTCAGGTTTCCCCATCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT TCTAACAAGGAAGTCATCTTT
rs102264 37.C.T	chr7:129 984986- 1299849 96	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GCATAACTGCTTTCTTTTCTAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT CGTAGTTCAGCTGTTCA
rs7512.G. C	chr17:10 583710- 1058372 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAG CAAACTGAGTATGTTTACTTTA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGACATACCAAATGGAAATAAG
rs116830 8.A.G	chr12:66 742179- 6674218 9	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CTGTTTGATAATTTGTTGCAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TAGGTGGTGGTAAATGTTTTG
rs426088 0.T.C	chr8:690 20492- 6902050 2	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GTTTCTTATCCCAAACATCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TTGCTCCGAAGATTTGTT
rs180124 9.A.G	chr13:52 515350- 5251536 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATCGCTAGAAATGGTTAAAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TTGGACCATTTAGAAATAACCAC
rs35382. A.G	chr5:598 21539-	ACACTGACGACATGGTTCTACAA ATCCTAATAGATCATCTAATTGTT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGTTTATTGAGTGCAGATGTC

10

20

30

40

【表 1 - 2 1】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	5982154 9	TATC	
rs8042.T. A	chr8:284 31196- 2843120 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GACAGCTAGGTCTGTCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT GTAACAGTAAAATGGGGAAAG
rs104435 2.G.T	chr4:311 47870- 3114788 0	ACACTGACGACATGGTTCTACAA CAGACCAGAAGAAATTGTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CCTAAGATTATTTAGGTCTTTAGA TT
rs174793 0.C.G	chr1:144 916744- 1449167 54	ACACTGACGACATGGTTCTACAG GTAGTAGATAACTGTTCCACT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA TGGGGTAATCATTITGACTG
rs216191 6.G.A	chr2:171 073883- 1710738 93	ACACTGACGACATGGTTCTACAA GCTCAACTCACCAGTAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT ACCAAGGCATTCAACAAG
rs221384 2.A.G	chr6:112 423806- 1124238 16	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TAGTACATGGATCATTGAGTAGA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TGTTAGGGCAAGTCCAG
rs207020 3.G.A	chr16:70 303576- 7030358 6	ACACTGACGACATGGTTCTACAG TGCAGCATACTTACCCA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG GATTGACATGGCCTACC
rs116072 190.A.C	chr6:310 23182- 3102319	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AGACTTGAACCCTATTAGAAAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CTTAGGAATACATGTAGCTTACA

10

20

30

40

【表 1 - 2 2】

標的の GenBank k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
	2		
rs756213 7.A.G	chr2:186 625766- 1866257 76	ACACTGACGACATGGTTCTACACT CGTTTTCTTTTAGGACATACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC ATTATCCTGTACATCTGCC
rs101410 87.G.C	chr14:37 147337- 3714734 7	ACACTGACGACATGGTTCTACAG AAGATGGATTCCCTAGGT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CCATCTGAGTTTTAAACGA
rs3453.T. C	chr21:35 819059- 3581906 9	ACACTGACGACATGGTTCTACACT CACTACTGCAAATGCAT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CCATGTACTGTTCTAAGCT
rs434970 6.T.C	chr5:147 516594- 1475166 04	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AGGACGAATGACAGGAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA AGACAAGCTCCGAAGAAT
rs546577. A.C	chr9:104 172932- 1041729 42	ACACTGACGACATGGTTCTACAA AACCTATTAATTCATCTGTTTTAA CC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG CGTTTGACAGAATTGGT
rs694001 8.G.C	chr6:136 599389- 1365993 99	ACACTGACGACATGGTTCTACAC ATAAGCTGAAAGGCCAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC GAAAGATACATTTGAACATGAC
rs615757 44.G.GT	chr1:419 72271- 4197228 2	ACACTGACGACATGGTTCTACATT TCCTTTTGTACGTCAGACT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CTTGCAATGTTGGTATGGTA

10

20

30

40

【表 1 - 2 3】

標的の GenBan k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
rs195871 5.G.A	chr14:20 528203- 2052821 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TAAAGAACTTCTGGAACCTTTC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC TAGTAAAATAAACTCGGTCCT
rs185245 0.C.A	chr12:16 397730- 1639774 0	ACACTGACGACATGGTTCTACATC AGTGCACTAACCAACA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTT CTTTCTGATCAGCATCTTG
rs105248 0.T.C	chr1:115 591054- 1155910 64	ACACTGACGACATGGTTCTACAT AAAATCTATTGTTGCTTAGTGGTG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TTCTGTTCCATGTACGATT
rs252884 3.G.T	chr7:224 78203- 2247821 3	ACACTGACGACATGGTTCTACAG ATTTTCTAGATGAAGCTGAAAC	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTTCCAAGACTAGGAGTT
rs974110. A.G	chr6:661 12405- 6611241 5	ACACTGACGACATGGTTCTACAC CTGCAAGGATAATCTTTCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TGCATCTGTTCAACAATA
rs256499 0.T.C	chr5:538 16778- 5381678 8	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GGACATCAGTACTAATTTTAGTAG A	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTT TAATACAGGCCAACAGC
rs359524 02.A.AC TC	chr5:147 516910- 1475169 23	ACACTGACGACATGGTTCTACAT GGGATTTCTTTGTCACATCT	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTG TCCACCAATGGGTTTAG
rs257376.	chr7:106	ACACTGACGACATGGTTCTACAG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC

10

20

30

40

【表 1 - 2 4】

標的の GenBan k ID	標的の 区間	タグを伴う左側プライマー	タグを伴う右側プライマー
G.A	799993- 1068000 03	GACCTTGCATGGAAATTA	ATACTTTTGCTTCATGCAG
rs840385. T.C	chr5:340 20354- 3402036 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TGAACTTAAACTTCAGGGG	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTA CAGAAGTCATTTGCAAAGAA
rs316214. G.C	chr5:964 97634- 9649764 4	ACACTGACGACATGGTTCTACAA TGCAAAGCAAGGGTATTTAA	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTC CTGTAATTATCTAATAAATTGGCT TAA

10

20

## 【 0 1 7 2】

それらを、試料量が限定的なマルチプレックス構成におけるPCRにより増幅しうるように、プーリングに適合的であるようなプライマーをデザインした。大規模並列処理シーケンシングは、MAFが、組合せ試料中の胎児性物質の画分が、1%以下の場合でもなお、信頼できる形で検出されうような、高度なリード深度をもたらす。

## 【 0 1 7 3】

10 mlの末梢血液を、3例の妊婦ボランティア（第2期）の各々から、標準的なEDTA血液回収試験管へと回収した。製造元の指示書に従い、Rosette Sep（商標）Human T Cell Enrichment Cocktail（Stem Cell Technologies；15061）およびRosette Sep（商標）Human Monocyte Enrichment Cocktail（Stem Cell Technologies；15068）を使用して、T細胞リンパ球および単球を、5 mlずつの血液から単離した。血漿上清を、高速で10分間ずつ2回にわたり、ペレットへと遠心分離し、残留細胞を除去し、ボランティア1例当たり2つずつの試料へと分けた。CD14の発現により規定される1%の再懸濁させた単球を、血漿試料へと添加して、組合せ試料を創出する。単球をCD14の発現で規定することにより、細胞集団はまた、マクロファージおよび好中球など、他の食細胞もを含有することが可能となる。第2の血漿試料は、無細胞対照として使用した。DNAは、組合せ試料および無細胞対照試料からは、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit（Qiagen；55114）を使用して精製し、T細胞リンパ球からは、DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen；69506）を使用して精製した。T細胞リンパ球から精製されたDNA濃度は、Qubit（登録商標）dsDNA BR Assay Kit（Life Technologies；Q32853）を使用して測定した。DNAを抽出した後、表1に列挙したプライマーを使用して、ライブラリーの調製を実施し、Illumina MiSeq（商標）シーケンサー上で、大規模並列処理シーケンシングを実施した。

30

40

## 【 0 1 7 4】

50

実施される手順の概要は以下の通りである。

【0175】

20mlの血液を、3例の第2期の妊婦ボランティアの各々から、EDTA試験管内に集める。

【0176】

血液を、以下：a) 5mLのRosetteSEP T細胞；b) 10mlのRosetteSEP単球；およびc) 5mlのRosetteSEP単球に従い、15または50mlの円錐管へとピペティングする。

【0177】

10 $\mu$ lの0.5M EDTAを、試験管a)およびc)へと添加し、20 $\mu$ lの0.5M EDTAを、試験管b)へと添加する。

10

【0178】

250 $\mu$ lのAbカクテル（ヒト細胞型を指向する抗体の混合物）を、試験管a)およびc)へと添加し、500 $\mu$ lのAbカクテルを、試験管b)へと添加する。

【0179】

室温で10分間にわたりインキュベートする。

【0180】

密度分離媒体を含有する等容量（元の試料と）のSEP緩衝液で希釈する。

【0181】

SepMate試験管内の15mlのficollの上方に血液を積層させる。

20

【0182】

1200 $\times$ gで10分間にわたりスピンのする。

【0183】

上清を、未使用の50mLの円錐管3本へと注ぎ込む。1本の試験管を氷上に取り置き、100%と表示する。

【0184】

残りの試験管2本において、500 $\times$ gで10分間にわたり遠心分離することにより、細胞をペレット化する。

【0185】

上清を、未使用の50mlの円錐管へとデカントし、残りの試験管2本に由来する上清を、単一の試験管へと組み合わせ、血漿と表示する。

30

【0186】

T細胞ペレットを5mlのPBS中に再懸濁させ、単球ペレットを、10mlのリン酸緩衝生理食塩液（PBS）中に再懸濁させる。氷上に取り置く。

【0187】

血漿を最高速度で10分間にわたりスピンして、残留細胞をペレット化する。

【0188】

上清を、未使用の50mlの試験管へとデカントし、最高速度で10分間にわたりスピンを繰り返す。

【0189】

上清を、未使用の50mlの試験管へとデカントする。複数回にわたり倒立させることにより混合する。

40

【0190】

血漿上清を、各々5mlずつ、50mlの試験管3本へと分ける。試験管を0%、1%、および5%と表示する。

【0191】

複数回にわたりボルテックスをかけ、倒立させることにより、単球を十分に混合する。50 $\mu$ lを1%の血漿試験管へとピペティングし、250 $\mu$ lを5%の血漿試験管へとピペティングする。

【0192】

50

c c f f キット (担体 RNA を伴う) を使用して、以下の試料： 1 ) 1 0 0 % の単球； 2 ) 5 % の単球； 3 ) 1 % の単球； および 4 ) 0 % の単球に対して、DNA の抽出を実施する。

【 0 1 9 3 】

D N e a s y B l o o d & T i s s u e K i t ( Q i a g e n ; 6 9 5 0 6 ) を使用して、ペレット化された細胞の以下の試料： 1 ) 単球ペレットおよび 2 ) T 細胞ペレットについて、DNA の抽出を実施する。

【 0 1 9 4 】

M A F マルチプレックス P C R の単位複製配列を、以下の通りに作り出す。上記で記載した M A F プライマーから、4 8 のマルチプレックスプライマープールを作り出す。プライマーを混合し、プール中に 1 μ M へと希釈する。P C R 条件を、A c c e s s A r r a y ( 商 標 ) S y s t e m f o r I l l u m i n a S e q u e n c i n g S y s t e m s U s e r G u i d e ( F l u i d i g m ) から、下記で記載される通りに変更する。

10

【表 4】

10 倍濃度の Fast Start High fidelity Reaction Buffer (Roche)	0.5 μL
25mM の MgCl <sub>2</sub> (Roche)	0.9 μL
5mM の dNTP ミックス	0.2 μL
5U/μL の Fast Start High Fidelity Enzyme Blend (Roche)	0.05 μL
PCR 用認定水	1.12 μL
DNA 試料	0.83 μL
Total Master ミックス	約 4 μL
プライマーミックス (1μM)	1 μL

20

30

【 0 1 9 5 】

試料を、3 8 4 ウェルヘッドを伴う A B I 9 7 0 0 サーマサイクラー上で、下記のサーモサイクルプロファイルにかける。

40

【表 5】

50°Cで2分間にわたる 70°Cで20分間にわたる 95°Cで10分間にわたる 上記の3ステップを 10サイクル	
95°Cで15秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる 上記の3ステップを2 サイクル	10
95°Cで15秒間にわたる 80°Cで30秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる 上記の4ステップを8 サイクル	20
95°Cで15秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる 上記の3ステップを2 サイクル	
95°Cで15秒間にわたる 80°Cで30秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる 上記の4ステップを8 サイクル	30
95°Cで15秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる 上記の3ステップを5 サイクル	
95°Cで15秒間にわたる 80°Cで30秒間にわたる 60°Cで30秒間にわたる 72°Cで1分間にわたる	40

## 【0196】

試料に由来するマルチプレックス反応物を、単一の試験管へとプールし、PCRグレードの水中で1:100に希釈する。Access Array (商標) System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm) に従い、Fluidigm Barcode インデックスを接合させる。



【表 6】

10 倍濃度の Fast Start High Fidelity Reaction Buffer (Roche)	2.0 $\mu\text{L}$	
25mM の $\text{MgCl}_2$ (Roche)	3.6 $\mu\text{L}$	
5mM の dNTP ミックス	1.0 $\mu\text{L}$	10
5 U/ $\mu\text{L}$ の Fast Start High Fidelity Enzyme Blend (Roche)	0.2 $\mu\text{L}$	
PCR 用認定水	6.8 $\mu\text{L}$	
Total Master ミックス	約 14 $\mu\text{L}$	20
プライマーミックス (1 $\mu\text{M}$ ) (Fluidigm)	4 $\mu\text{L}$	
希釈されプールされた PCR 多重鎖	2 $\mu\text{L}$	
合計	20 $\mu\text{L}$	30

95°Cで 10 分間にわたる  
 下記の 3 ステップを  
 16 サイクル  
 95°Cで 15 秒間にわたる  
 60°Cで 30 秒間にわたる  
 72°Cで 1 分間にわたる  
  
 72°Cで 3 分間にわたる  
 4°Cで 5 分間にわたる

## 【0197】

試料を 3 連でバーコード処理し、それらを  $3 \times 15 \mu\text{L}$  でプールする。Agencourt AmpPure XP ビーズを使用して、プールを、1 : 1 のミックスで精製し、 $30 \mu\text{L}$  中に溶出させる。試料を Qubit (登録商標) Fluorometric Quantitation (Life Technologies) により定量化し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Genomics) 上で、プライマー二量体について点検する。シーケンシング調製物のために、試料を  $10 \text{ nM}$  の濃度へと標準化する。

## 【0198】

10

20

30

40

50

ライブラリーの精製および作製：Illumina MiSeq (商標) manual for library generationに従い、プールされ、バーコード処理され、精製された試料を調製する。10 nMの試料を、10  $\mu$ Lで2 nMへと希釈し、10  $\mu$ Lの0.2 N NaOHを添加する。試料を室温で5分間にわたりインキュベートし、980  $\mu$ LのHTI緩衝液を添加して、20 pMのライブラリーを作り出す。ライブラリーを、HTI緩衝液中に12.5 pMへとさらに希釈し、1%のphiXスパイクをロードする。

#### 【0199】

シーケンシング：600  $\mu$ Lの各試料を、12.5 pMで、Access Array (商標) System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm)に従い調製されたFL1プライマーと共に、Illumina MiSeq (商標)にかける。FL1プライマーを、500 nMで、シーケンシングのためのIllumina MiSeq (商標) 試薬カートリッジへとロードし、アダプタートリミングをアダプターリード2 - TGTAGAACCATGTCGTおよびアダプターリード1 - AGACCAAGTCTCTGCTとする2 x 151のリードを使用して試料を分析する。

10

#### 【0200】

控えめな推定により、データは、インフォマティブな16の組合せ試料特異的MAF、すなわち、母体はホモ接合性であるが、胎児はヘテロ接合性であったSNPを示す(図1、表2)。この値は、理論的な10% (16 / 167)の予測(Tynanら、J Mol Diagn., 13巻(4号): 382~9頁(2011年))に極めて近いことから、試料中の胎児性含量が確認される。また、16のインフォマティブMAFの存在も、Tynanら、J Mol Diagn., 13巻(4号): 382~9頁(2011年)において確立された99.9%の信頼レベルを上回る。したがって、組合せ試料中の胎児DNA量が確認された。図1および2は、母体試料中および組合せ試料中の各対立遺伝子のリードパーセントに対してプロットした、2つアッセイに由来する潜在的なインフォマティブ対立遺伝子を示す。インフォマティブMAFの大まかな推定は、グラフの上部および下部における枠囲いされた区域により見ることができる。一般に、インフォマティブMAFは、組合せ試料中の対立遺伝子が、メジャー頻度およびマイナー頻度を示す場合に認められる。これらの差異の有意性は、当技術分野で公知の多数の統計学的分析により決定する(例えば、平均値または他の統計学的測定値から5標準偏差の値)ことができる。図2は特に、50%マークの近傍におけるデータの緊密なクラスタリングを示すことから、標準偏差の小ささが裏付けられる。さらに、図5は、無細胞体液またはT細胞試料単独(それぞれ、図3および4)と比較した場合の組合せ試料(無細胞体液に1%の単球を加えた)間のデータの改善を示す。図6および7は、インフォマティブマーカーだけを示すように簡略化されており、組合せ試料により、単球を伴わない無細胞体液試料より「クリーン」なデータがもたらされることを裏付ける。図8および9は、例示的なインフォマティブマーカーを示す。いずれの図も、基準対立遺伝子のリードが100%であり、代替的対立遺伝子のリードが100%である母体だけの試料、および代替的対立遺伝子のリードを含有する(かつ、必然的に、値が合計されて100%となるように、基準対立遺伝子のリードが少ない)組合せ試料を  
40  
描示する。これに対し、図10に描示される例示的な非インフォマティブマーカーのリードは、母体だけの試料および組合せ試料のいずれにおいても、基準対立遺伝子が約50%であり、代替的対立遺伝子が約50%である。加えて、組合せ試料中の再現性は、対応する無細胞体液試料中の再現性より良好である(表3)。表3におけるアッセイ1とアッセイ2との間の差異は、アッセイ2では、性能の低いマーカーを除去し、アッセイ2ではまた、計算百分率(基準マーカーおよび代替的マーカーだけではなく、ある位置における全てのベースコーリングを含む)による閾値効果に起因して、1つのマーカーの棄却も行ったためでありうる。

20

30

40

#### 【0201】

無細胞循環DNAと母体DNAの間には、定性的サイズの差異が存在することが提起

50

されている (Fanら、Clin Chem.、56巻(8号) : 1279 ~ 86頁(2010年))。このサイズの差異の性質は、DNAが産生される経路から生じうる。胎児循環無細胞DNAは、ほぼ遊離胎児細胞のアポトーシスを介して作り出され、アポトーシス小体内で保存されるヌクレオソームの長さで血漿に存在すると考えられる。これに対し、母体循環無細胞DNAは、アポトーシスおよび壊死のほか、自食作用および有糸分裂異変から産生される細胞の混合物である可能性が高い。高次のアポトーシス過程において産生されるDNAは、他の細胞死経路において産生されるDNAほど分解されない状態で存在しうる。非アポトーシス性細胞死において産生されるDNAは、DNAを損傷させる反応性酸素分子種を含む、様々な有害細胞下成分へと曝露される。理論に束縛されることを望まずに述べると、母体循環無細胞DNAの相対的分解の増大は、循環無細胞DNAからの異数性の検出を目的とする増幅ベースのアッセイにおけるノイズに寄与しうる。したがって、無細胞体液、食細胞、循環小胞、および循環罹病細胞から選択される2つ以上の異なる成分の組合せを使用する方法は、高品質の母体DNAに寄与し、シグナルのばらつきを低減することが可能である。

【表 2 - 1】

表 2:16 のインフォマティブマーカー

試料	染色体	位置	Ref. 対立 遺伝 子	Alt. 対立 遺伝 子	A の力 ウント	C の力 ウント	G の力 ウント	T の力 ウント
母体	3 番染色体	113804978	G	A	187335	10	464	23
組合せ	3 番染色体	113804978	G	A	126447	6	10980	29
母体	6 番染色体	42627433	G	A	223746	111	704	144
組合せ	6 番染色体	42627433	G	A	262863	294	13527	292
母体	3 番染色体	42787468	A	G	111491	15	401	21
組合せ	3 番染色体	42787468	A	G	269893	39	14459	327
母体	5 番染色体	13701535	T	C	4	83731	0	35
組合せ	5 番染色体	13701535	T	C	0	31414	0	2162
母体	9 番染色体	115234610	G	A	172747	24	655	98
組合せ	9 番染色体	115234610	G	A	116353	40	3831	192
母体	5 番染色体	13719021	T	G	100	4	166680	7
組合せ	5 番染色体	13719021	T	G	240	65	311800	11697
母体	8 番染色体	125061894	G	A	19879	16	103	4
組合せ	8 番染色体	125061894	G	A	45848	21	4760	25
母体	4 番染色体	69176797	T	C	67	599	16	130431
組合せ	4 番染色体	69176797	T	C	93	3729	40	120555
母体	5 番染色体	13719088	G	A	280520	36	1267	40
組合せ	5 番染色体	13719088	G	A	226691	50	8320	130
母体	13 番染色体	41374185	T	C	0	82	2	38046
組合せ	13 番染色体	41374185	T	C	18	4788	16	66696
母体	2 番染色体	32447717	C	T	99	1212	16	280044
組合せ	2 番染色体	32447717	C	T	143	21563	15	217092
母体	5 番染色体	17380269	A	G	18	0	12863	1

10

20

30

40

【表 2 - 1】

組合せ	5 番染色体	17380269	A	G	1725	0	14276	7
母体	7 番染色体	99758135	T	G	278	19	313255	28
組合せ	7 番染色体	99758135	T	G	429	114	455545	20924
母体	17 番染色体	10583713	G	C	306	13	418048	10
組合せ	17 番染色体	10583713	G	C	277	11325	310119	20
母体	12 番染色体	66742182	A	G	20	4	44686	2
組合せ	12 番染色体	66742182	A	G	998	0	26251	2

10

Ref. 対立遺伝子とは、基準対立遺伝子であり、Alt.対立遺伝子とは、代替的対立遺伝子であり、A カウント、C カウント、G カウント、および T カウントは、試料中の 4 つの DNA 塩基の各々のリードの数を表す。

【表 3】

表 3:結果の比較(4 例の試料)

20

	アッセイ 1		アッセイ 2	
	無細胞体液と対比した T 細胞	組合せ試料(無細胞試料+1%の単球試料)と対比した T 細胞	無細胞体液と対比した T 細胞	組合せ試料(無細胞試料+1%の単球試料)と対比した T 細胞
インフォマティブマーカーの数	14	8	38	33
胎児 DNA 量の平均推定値	5.8%	5.6%	10.7%	6.05%
胎児 DNA 推定値の標準偏差	2.54%	2.07%	4.3%	1.75%

30

## 【0202】

本明細書における原理実証は、例えば、胎児異数性の診断が、対象の染色体（例えば、21 番染色体）に照らして重みづけされたインフォマティブ MAF SNP の適切なパネルを選択し、リード深度の計算を介して胎児性含量を決定し、対照基準と比較することにより達成しうることを示す。

40

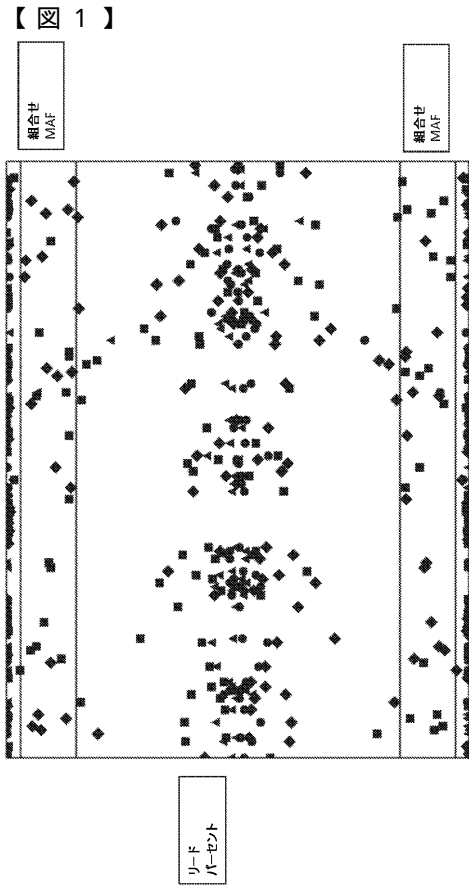


Figure 1

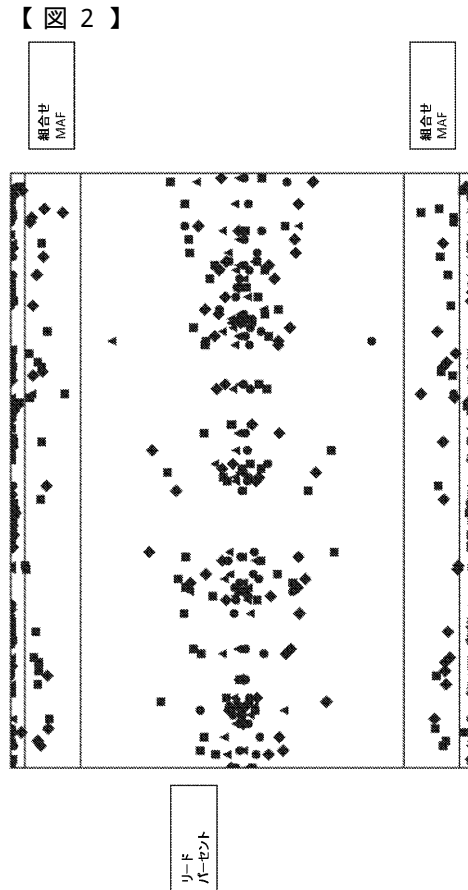


Figure 2

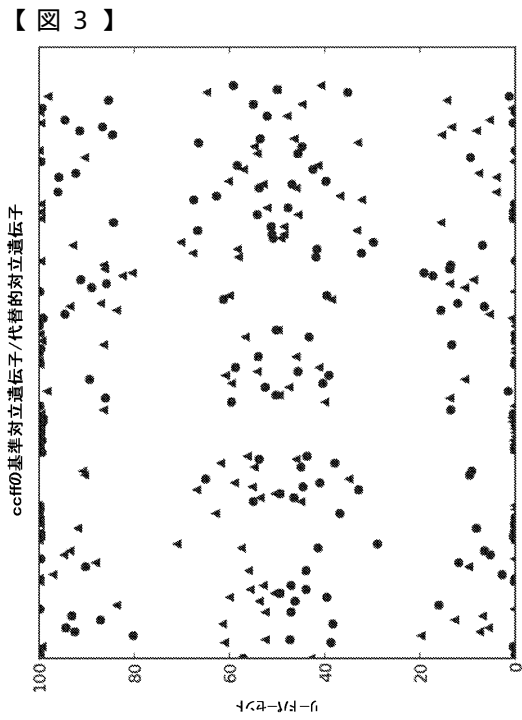


Figure 3

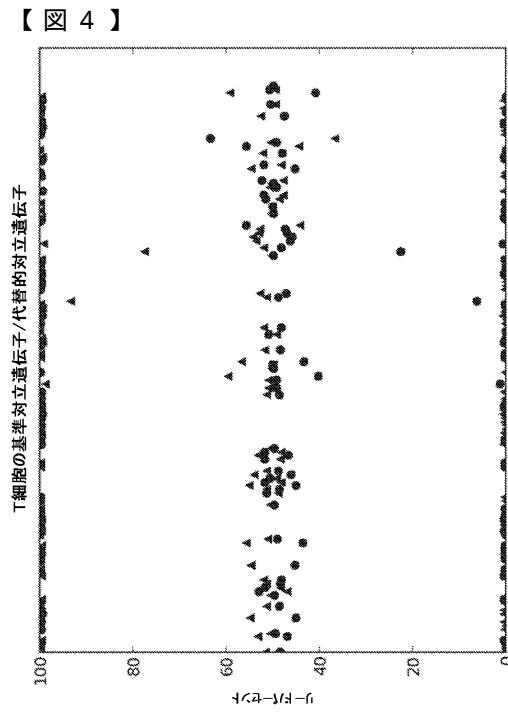


Figure 4

【 図 5 】

1%の単球を加えたccffの基準対立遺伝子/代替的対立遺伝子

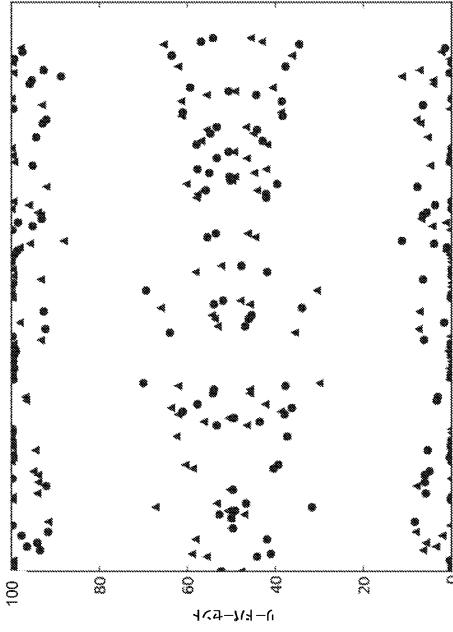


Figure 5

【 図 6 】

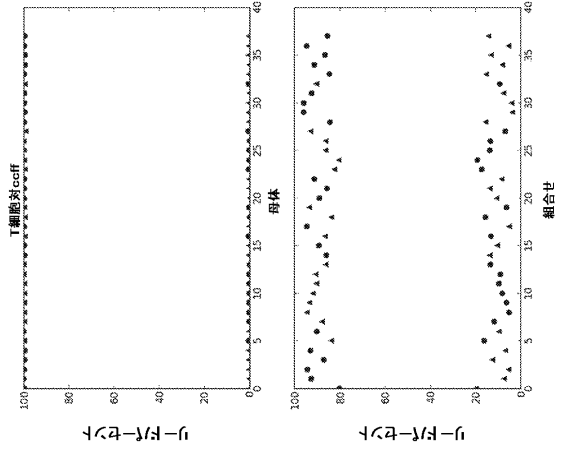


Figure 6

【 図 7 】

T細胞対ccff+発露で1%の単球

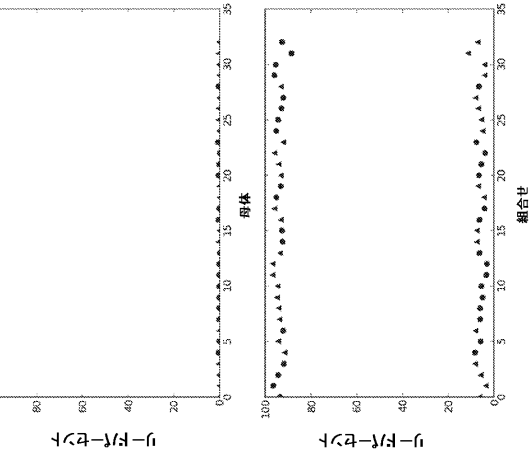


Figure 7

【 図 8 】

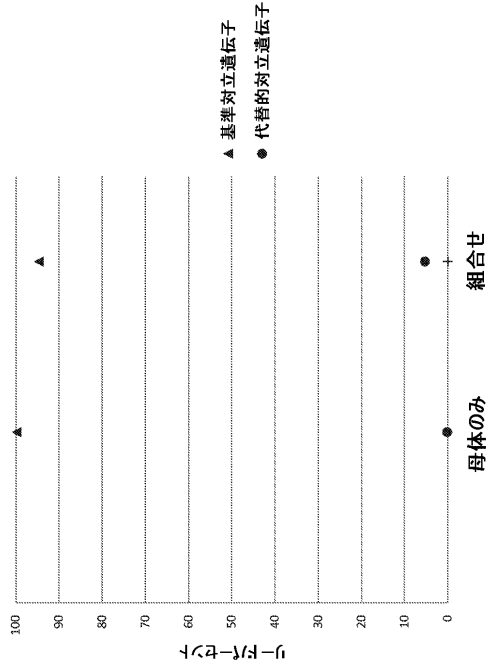


Figure 8

【 図 9 】

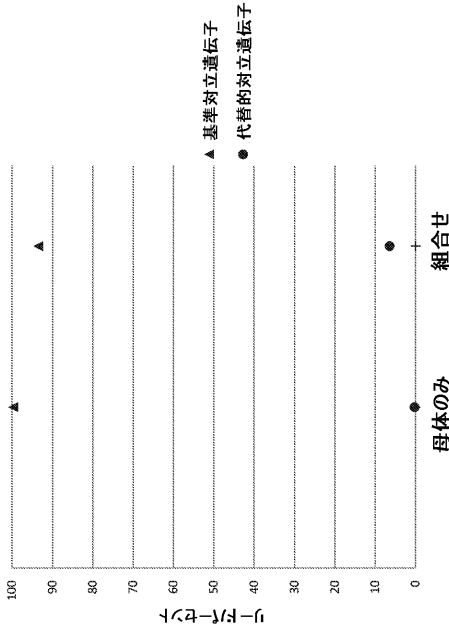


Figure 9

【 図 10 】

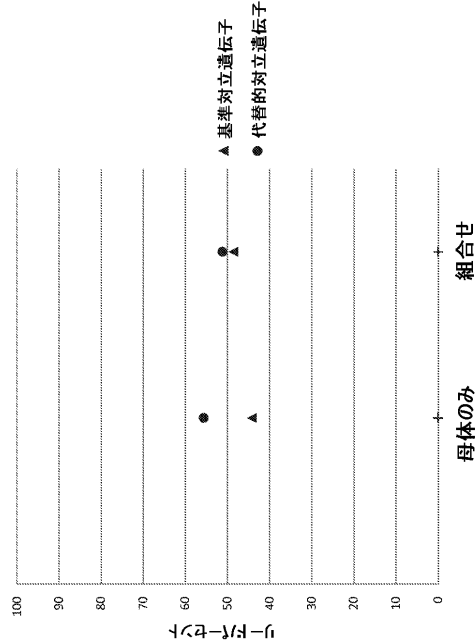


Figure 10

【 配列表 】

2015522260000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年2月13日 (2015.2.13)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 0 1

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 0 1 】

先願の情報

本願は、2012年6月15日に出願した米国仮出願第61/660,427号による優先権を主張する。この出願の内容および開示は、その全体が参考として援用される。

配列表

本願は、EFS-WebによってASCII形式で提出された配列表であって、その全体が参考として援用される配列表を含む。このASCIIコピーは、2013年8月23日に作成され、108034-0015-WO1\_\_SL.txtとの名称であり、サイズは77,604バイトである。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 1 7 1

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 1 7 1 】

潜在的なインフォマティブSNPのバイアスのないパネルを作成するために、全ての集



団が、基準SNPと代替的SNPとを同様の比率で保有し、マイナー対立遺伝子頻度 (MAF: minor allele frequency) が40%を超えるような判断基準を選択した。これらの品質を有するSNPのカatalogは、市販されている (Durbinら、Nature、467巻 (7319号) : 1061~1073頁 (2010年) ; およびMcVeanら、Nature、491巻 : 56~65頁 (2012年) )。MAFとは、所与の遺伝子について最も希少な対立遺伝子が集団内で生じる頻度である。胎児画分中のヘテロ接合体を見い出す可能性を増大させるために、40%を超える一方で、同時に、母体画分中に豊富なホモ接合体を有し、これにより、インフォマティブSNPを見い出す可能性を増大させるMAFを標的とした。167のマーカによる初期のセットを分析のために選び出した。任意の母体 - 胎児組合せ試料 (例えば、食細胞と組み合わせた無細胞体液) についての既往の分析に基づき、SNPパネルのうちの10~20%は、インフォマティブであることが予測される。167のSNPマーカを含有し、部分的に分解されたDNAからの増幅の可能性が最大となるような、小型の十分なサイズ (80~120bp) であるPCRプライマーをデザインした。SNPのリストならびにそれらのゲノム参照およびそれらを増幅するのに使用されたプライマー配列を、表1に提示する。

【表 1 - 1】

表 1:SNP およびゲノム参照

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs293743 6.G.A	chr5:313 25718- 3132572 8	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAGAAAGGT ATCATCTGAAGTT	1	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTAGAACTACTT ACTTTTACTTATTAGGA	170
rs694663 4.A.G	chr7:790 93092- 7909310 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGATTTTAAA ATGAAAATTGAAGAAG TA	2	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGTTGTTCTTT GGTCTGTAAAAT	171
rs106092 2.T.C	chr18:72 2398- 722408	ACACTGACGACATGGT TCTACATTAGTACCAG AACCACTGC	3	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTTACCTGAT TTAATCATCAGAT	172
rs117348 33.A.G	chr4:101 108065- 1011080 75	ACACTGACGACATGGT TCTACAACAGGTATTC ATCATTCACTC	4	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTTCCCCTGT TCTTAAGTG	173
rs104903 92.G.T	chr2:186 658561- 1866585 71	ACACTGACGACATGGT TCTACAATCAGCTTATG CTGATGATAATC	5	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAAATAGTTTT AGTAATGAAGTTAGCA	174
rs187257 5.G.A	chr3:113 804975- 1138049 85	ACACTGACGACATGGT TCTACATTAATGACCT GGATTGATCAG	6	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTTTTGTCTTT GACTAAATGAATCT	175
rs424177 9.A.G	chr4:184 600597- 1846006 07	ACACTGACGACATGGT TCTACAATTGGATGCA ATTGCTCAG	7	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACTGTTTAGAC ATCCATGCA	176

【表 1 - 2】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs195871 6.A.G	chr14:20 528317- 2052832 7	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGAACTTCAA ATTTTCTTCTTTG	8	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGGGTTGACCT ACATGTC	177
rs308572 4.TCA.T	chr3:156 255511- 1562555 23	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTGAGCTTTA CAAATAAACATACA	9	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATCCCAGTGCT AATTAAACAA	178
rs588067 8.TC.T	chr6:146 756123- 1467561 34	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCTGCCTTAAG TAGGAAGA	10	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTGCTTTGTCA GAATTCCC	179
rs107411 30.T.C	chr10:27 475440- 2747545 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAAACAGATA CCTCCTATTTTGA	11	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCAAGGCTAGA CTAAAAGGAAAA	180
rs230564 1.G.A	chr12:69 646910- 6964692 0	ACACTGACGACATGGT TCTACATTCATTCCTTTG GGAGTAAATGA	12	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTGTATCACTA GCTACTAAATCAAAA	181
rs104220 1.G.A	chr3:151 546037- 1515460 47	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAACCTCAG AAAATTTGCATT	13	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAAACAGAAA AGTGCCTATTTAAG	182
rs3806.G. A	chr13:10 3330714- 1033307 24	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCGTATTCTAA AATAGGAAACAAG	14	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATAGTGGATGA AAACATGCATT	183
rs930783	chr4:764	ACACTGACGACATGGT	15	TACGGTAGCAGAGACT	184

【表 1 - 3】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
4.A.C	53846- 7645385 6	TCTACAGTATTTAAGA ATTTTCTGTTTAAATGC		TGGTCTGTGGGTAAAT CCCATTTAGA	
rs691925 4.T.C	chr6:136 599400- 1365994 10	ACACTGACGACATGGT TCTACACATAAGCTGA AAGGCCAG	16	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATGACCCATCT GAGTCTATC	185
rs1338.T. C	chr10:27 475689- 2747569 9	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTAAAAGG CTGAAAGGAATA	17	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGTTTTTCATAA AGTGCAATAAACA	186
rs299927 8.C.T	chr10:44 053581- 4405359 1	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGGAGGAAAG CTCATGTAA	18	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGTCTACCCT TTGTTCTTAC	187
rs600291 04.G.A	chr2:186 658052- 1866580 62	ACACTGACGACATGGT TCTACATATCACGTAA AGGCAAATGT	19	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGAAGTTGAAG TACTTTTCGATA	188
rs186206 6.G.A	chr2:186 671908- 1866719 18	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGAAAATTTA GCAAGAAGACTAAC	20	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGAAACTGAA ACCTCATCAC	189
rs451816 8.G.A	chr3:978 06612- 9780662 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAGTTCAAAATTT CATGCAATGGT	21	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGTCATTAAG TGGGTATTTGTA	190
rs108167 67.G.A	chr9:111 782666-	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCATTCTGTAT	22	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGAAGTTCAA	191

【表 1 - 4】

標的の <u>GenBan</u> <u>k ID</u>	標的の区 <u>間</u>	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	1117826 76	GTAAGGCC		ATTTGACAGC	
rs713834 5.G.A	chr12:10 4290853- 1042908 63	ACACTGACGACATGGT TCTACATAAACTGATG GAAGCAATGAAT	23	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTAGGTA CTCA GCTTGAAAC	192
rs691703 3.G.A	chr6:426 27430- 4262744 0	ACACTGACGACATGGT TCTACACATAACCTTTG TATTGCAGCC	24	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATACATGTAAC GAATTGTCTTTG	193
rs115032 519.T.C	chr6:300 02877- 3000288 7	ACACTGACGACATGGT TCTACACTATTGCCTGG ATCCCAT	25	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGCTTAGGCT TTCAGATTTTAC	194
rs374756 2.A.G	chr12:42 854201- 4285421 1	ACACTGACGACATGGT TCTACACCGGATTTCAA TGTCATAGTTC	26	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTACATCTGCC AGTGCTC	195
rs224085 9.A.G	chr3:427 87465- 4278747 5	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAATTTGTTGA GCCCGAC	27	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTATTT CAGGTT TTGGCCAGA	196
rs105028 7.T.C	chr12:27 954503- 2795451 3	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGCATAGCAA TGTA AAAAGGAAT	28	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACTCATT CATA ATGCCTCCTTA	197
rs157361 2.T.C	chr12:12 047425- 1204743	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCATCACCAA TGTTCCAA	29	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAGGGTTCCAA ACATACTG	198

【表 1 - 5】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	5				
rs123038 1.A.G	chr5:962 54205- 9625421 5	ACACTGACGACATGGT TCTACATTATCAAGAA GGCCAGGAA	30	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGACCATTTCATT TGGAATGCT	199
rs988030 7.C.A	chr3:169 74606- 1697461 6	ACACTGACGACATGGT TCTACATCTAAGAAAA TGAAACGTACCT	31	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCCTTCACTC AAATTTCT	200
rs380098 9.A.G	chr7:141 360581- 1413605 91	ACACTGACGACATGGT TCTACAAACCATTACTT GACAGAAAGG	32	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTGAAGCCTC ACCTTTTAT	201
rs283943 63.G.A	chr3:334 28295- 3342830 5	ACACTGACGACATGGT TCTACAATCTGATAAA ATGACCCTACTC	33	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCACCTAAGTTT ACAATGAAGG	202
rs733766 7.G.A	chr13:97 489453- 9748946 3	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGAAATTAAT ACTGATAAAGACTATC AG	34	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTTAGTCTTAT CTTTCGCAAAACATA	203
rs580505 65.ATTT .A	chr9:889 37847- 8893786 0	ACACTGACGACATGGT TCTACATGAAGATAAG TTTACTGAATTCATAAA	35	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTCCTAGTGGA ACTTAATAAAATAAGT	204
rs373411 0.T.C	chr5:137 01532- 1370154 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTCAGTAA ACCAGAAACC	36	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTGAACATAGC TGGTTTACA	205

【表 1 - 6】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs593093 3.C.T	chrX:135 431354- 1354313 64	ACACTGACGACATGGT TCTACATACCCCTGTTT CATACCC	37	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTCAGCTTCAG TACTATGAGG	206
rs831618 T.G	chr11:33 728610- 3372862 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAGATCCAGCTA ACTTTGCATA	38	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGGTACAGGAT TCTAAGCT	207
rs210477 2.T.A	chr9:117 808781- 1178087 91	ACACTGACGACATGGT TCTACACAATTTTCGTAT TCAGTAGCCT	39	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCTGAGCCAC TGAAATA	208
rs226999 1.A.G	chr7:790 90132- 7909014 2	ACACTGACGACATGGT TCTACACCTTTTGTAAAT TGTAGGCATTC	40	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGGGATAGATT CAGCTACT	209
rs376660 1.C.T	chr1:100 388231- 1003882 41	ACACTGACGACATGGT TCTACATGATAACTTAT TTTAAGATGCCTTAAA A	41	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAATTCTATCT AGGAAATAAGTTCTAT GA	210
rs428463 2.C.G	chr16:70 606551- 7060656 1	ACACTGACGACATGGT TCTACATAGTATGGGG ATTTTAGCATG	42	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCTTCTGTACT GACCCTTC	211
rs938924 8.T.C	chr6:135 282652- 1352826 62	ACACTGACGACATGGT TCTACATAACATCAGA TGAGGTCACT	43	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGTTGGCTGTT TATGGTTT	212
rs105497	chr3:940	ACACTGACGACATGGT	44	TACGGTAGCAGAGACT	213

【表 1 - 7】

標的の GenBan k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
5.T.C	6832- 9406842	TCTACACCACTAACCA ACTCCTAGAT		TGGTCTACAGTGGCTCC AATAGTG	
rs643887 4.G.A	chr3:124 739888- 1247398 98	ACACTGACGACATGGT TCTACACAGACTGACC GTCAAAGA	45	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGCTTAACAA CTCCACTG	214
rs832068. G.A	chr3:977 54143- 9775415 3	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTTCCGGGGA AGGTTTT	46	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACCTCACTTCT TIGTTTGC	215
rs840388. T.G	chr5:340 18886- 3401889 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAACCTGGAAAT TACCAAGGC	47	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCGCAAATTCT AAATCTTAAAACA	216
rs702395 4.G.A	chr9:218 16754- 2181676 4	ACACTGACGACATGGT TCTACATGATGCCTTAA TTTTGGGG	48	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCAGAATTTAA GTAAATTTAAATTATC CT	217
rs780882 3.T.C	chr7:129 989874- 1299898 84	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAACAAGGTG GACTTCTG	49	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCTGTAAGCAA GTCCATGA	218
rs353507 55.T.G	chr10:12 3549687- 1235496 97	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAACAAAGCC AATGATTTCC	50	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAAAACCTCCA AGTACTGCC	219
rs380298 0.A.G	chr11:57 06307- 5706317	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGTIAGGATTC ACTCACCA	51	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTGGCCCATA GTTTATCTTTC	220



【表 1 - 8】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs2942.G. A	chr6:146 755136- 1467551 46	ACACTGACGACATGGT TCTACACACGTGAAGA CCAATGAG	52	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCTTGGTGCT GGTATCT	221
rs6921.T. A	chr8:103 838872- 1038388 82	ACACTGACGACATGGT TCTACACAGACATTTCT TAAAAGTTACCGT	53	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTTGAAC TTC ATGGCATA	222
rs113318 1.C.A	chr2:554 02268- 5540227 8	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAGTTTTCAAT CAAATACTTATTCAG	54	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCGAATTTTG CATAGAAGTAGA	223
rs383713 4.CT.C	chr7:272 21061- 2722107 2	ACACTGACGACATGGT TCTACATCTTTCCAAAT GTTGCAAGA	55	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTTTCTTTTGCC ATTAGTTGAT	224
rs241410 5.A.G	chr15:51 868369- 5186837 9	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTCATTTGCC AAAATAACAATA	56	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAATAGTATGT AATAAGATTTCAAAAG T	225
rs730511 5.A.G	chr12:72 372858- 7237286 8	ACACTGACGACATGGT TCTACACCACTGTACCC AGTACATC	57	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGATCATTGACC ACTTTATGGT	226
rs217714 2.G.A	chr7:224 59320- 2245933 0	ACACTGACGACATGGT TCTACACGGATCCATGT TGACAGA	58	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACAGCATTGGA TTGCTCA	227
rs240047	chr5:147	ACACTGACGACATGGT	59	TACGGTAGCAGAGACT	228

【表 1 - 9】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
8.T.C	510862- 1475108 72	TCTACATCTTCTTGAAT GCCATAAAGTA		TGGTCTGGCTTTAAATC CTTTGGACA	
rs689504 9.T.G	chr5:522 48869- 5224887 9	ACACTGACGACATGGT TCTACAACCAAGAATA CATTTAGCATCT	60	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTGATTTTCC ATCCTAGATAA	229
rs8128.A. C	chr1:115 110679- 1151106 89	ACACTGACGACATGGT TCTACAACCTAAACATC AATGGTTTTTGG	61	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACAATTTAGCA GGTAGAAGAAAA	230
rs382897 7.G.A	chr7:295 19494- 2951950 4	ACACTGACGACATGGT TCTACATGACTGGATA CCGCTTCT	62	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCGGCTTCTGAA TAAGGATG	231
rs121022 03.A.G	chr15:51 791555- 5179156 5	ACACTGACGACATGGT TCTACATAGATTTAAA GGTCGAATGATCT	63	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAAGCATGCTG TCAAATTT	232
rs797455 9.A.T	chr12:50 23955- 5023965	ACACTGACGACATGGT TCTACACATCTACTAGC ATTGGTCC	64	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGTTTATCTT GGCTTTGGTG	233
rs268681 7.C.A	chr7:479 68923- 4796893 3	ACACTGACGACATGGT TCTACATCCCCGAAATC CATCATC	65	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCATGAACCCT GTTCCTAATT	234
rs188421 4.C.T	chr14:37 149132- 3714914	ACACTGACGACATGGT TCTACATAAATTTTATT TCAIGTTTCCTACTTG	66	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATAGGTATTTT AAAACATTGTTTAAAA	235

【表 1 - 1 0】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	2			CA	
rs105395 9.C.A	chr9:114 359620- 1143596 30	ACACTGACGACATGGT TCTACAATACAGTCCCT TCCAACTC	67	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTGGCTATCC TACTAATAGTGA	236
rs378019 0.A.G	chr9:139 099069- 1390990 79	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTGTTGAA AGAATCAGCT	68	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATGGATGTATT CATAAGACCATG	237
rs101950 3.G.A	chr5:962 54813- 9625482 3	ACACTGACGACATGGT TCTACATACAGATAAG TTTTAGAAAGACTCAA	69	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTGCTCCAAA GTGGATTG	238
rs108830 98.C.G	chr10:10 0218191- 1002182 01	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAAGCTTCCTA CCTACCA	70	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCCTATTTGAG CTAGAACAAA	239
rs697994 5.G.A	chr7:823 86121- 8238613 1	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAGCAATTTG ATTTATTTCTTTTGG	71	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTAAAGGTGA AGAATTACATGAAAAT	240
rs147147 897.CTA .C	chr16:70 192457- 7019246 9	ACACTGACGACATGGT TCTACACTCCTTCTAGA CATTCTTGC	72	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTAACAAGCCA ACCAGAAC	241
rs469250 0.A.C	chr4:311 47268- 3114727 8	ACACTGACGACATGGT TCTACAATGGGCTATTC CCAACTT	73	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGACTGGTCCA TTATCTGAG	242

【表 1 - 1 1】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs472703 8.G.C	chr7:148 979912- 1489799 22	ACACTGACGACATGGT TCTACATGGAAAGTTTT CTACTTTGCT	74	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCAAAGTTCCA TTAACAACTAC	243
rs8692.C. T	chr16:84 211479- 8421148 9	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGCACCGAAA GCATCATA	75	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGTTTATCATG CCTAAGGGA	244
rs595084 81.C.T	chr3:153 839955- 1538399 65	ACACTGACGACATGGT TCTACAAACGGGTTAC TAATTACGG	76	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTCCTATGTAC CGTCCTG	245
rs201131 957.TTC. T	chr6:879 93564- 8799357 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAGTGCACCAATT GTAATGAG	77	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTAGTCTGAAGA AATCTAACAGGAT	246
..G.GT	chr15:52 102326- 5210233 7	ACACTGACGACATGGT TCTACAATCCTTTAATT AGTTTATGGCTTCA	78	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTAAATGGGT GAAAGGG	247
rs7096.G. A	chr9:115 234607- 1152346 17	ACACTGACGACATGGT TCTACACTGCTAGTGCT GCTTTAC	79	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAAGATCTAAT TGGCTTTTATTAGC	248
..GTC.G	chr12:10 311906- 1031191 8	ACACTGACGACATGGT TCTACACCCCACTTGTC CCAAAAT	80	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAAGGTATCA ATCCTTGGTTT	249
rs104869	chr7:823	ACACTGACGACATGGT	81	TACGGTAGCAGAGACT	250

【表 1 - 1 2】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
85.G.A	86078- 8238608 8	TCTACACACTTCACCCT TAAATAAAGC		TGGTCTTGCTGGTCTTA CCCTAGT	
rs931606. G.A	chr4:794 43846- 7944385 6	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTCCCCTCA AATAGGACA	82	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGTCAAATTC AATTCCTCCTAG	251
..G.GA	chr11:10 8345511- 1083455 22	ACACTGACGACATGGT TCTACAACCTTGGTGCA GTCTTCTA	83	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAAGAACTTTG AGTCAGCC	252
rs30169. T.G	chr5:137 19018- 1371902 8	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTCTGGACTC ACCACTAT	84	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTTCAGATGTC CATTAAATTTC	253
rs487088 7.G.A	chr8:125 061891- 1250619 01	ACACTGACGACATGGT TCTACATTCTTTTCTTC TTTAGGGGAAG	85	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGTGATAGCAT AACCTGG	254
rs113318 2.C.T	chr2:554 02221- 5540223 1	ACACTGACGACATGGT TCTACATTAGGTATCTG TTCTGCTTGAT	86	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCTGAATAAG TATTTGATTGAAAAC	255
rs360040 74.G.A	chr2:186 665428- 1866654 38	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGCAGAAGAA TGCAACTTTTA	87	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGGTCTGACA TGTAATCTACTT	256
rs114154 393.T.C	chr6:309 99993- 99993	ACACTGACGACATGGT TCTACAGACCTGTTTCA	88	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTGAAGTCCAT	257

【表 1 - 1 3】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	3100000 3	TAGGCAC		TCCAGGG	
rs104748 1.G.A	chr5:522 49472- 5224948 2	ACACTGACGACATGGT TCTACACCAGAAATGT ATTTTAAAGAATTCAG	89	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGTAGATTCCA ATGAACCATAATG	258
rs229325 0.G.A	chr3:334 34827- 3343483 7	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAACAAATG ATTTGATTTACCTGA	90	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCACCAAATTA TCAGGTTTACAG	259
rs108491 74.T.C	chr12:50 25090- 5025100	ACACTGACGACATGGT TCTACAGACTGGTTGAT TCTTCTGC	91	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCCAAATCAT ACAACAAC	260
rs701192 8.G.A	chr8:284 21981- 2842199 1	ACACTGACGACATGGT TCTACACTCATACAAAT AAGAATTGGTAGC	92	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATCATCAGGGG CAAGTTA	261
rs373369 0.G.C	chr5:140 569523- 1405695 33	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAGGCATTTCT TACTAGAATCC	93	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAGGCAATGA ATTTAAAGTCAATA	262
rs129933 1.A.G	chr3:106 965488- 1069654 98	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGTCTTAAGA CAGGAAGCTA	94	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCTGATTCCAG TCATAGCTC	263
rs227871 1.C.T	chr2:470 85394- 4708540 4	ACACTGACGACATGGT TCTACATGTTCCCTTTC GGATGAG	95	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGTTATTTTGA GCAGATGGTT	264

【表 1 - 1 4】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs116928 15.G.A	chr2:684 15763- 6841577 3	ACACTGACGACATGGT TCTACAACCTCGCTGTAC TAAAGGAT	96	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATGAAATTAAA AGGCTAGGAAAGA	265
rs116485 895.T.C	chr4:691 76794- 6917680 4	ACACTGACGACATGGT TCTACACCTTCCTGATG TAATCCTCA	97	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCAAGGAAATG GGGTTCTTT	266
rs216103 6.G.T	chr2:186 659355- 1866593 65	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTGGAAGAA CTTTTGAATAAGT	98	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTGGCAGTTTC ATTAAGTGG	267
rs172292 01.T.C	chr2:186 656952- 1866569 62	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAATACTTAA GTATGTAGTCAAGTTA ATTT	99	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCCTGTATCGA TAAGTTTCAA	268
rs223085 4.T.C	chr13:10 3275382- 1032753 92	ACACTGACGACATGGT TCTACAGATGATGGAA ACCTGCTC	100	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACCACTTTATC ACCTCATAAATCT	269
rs464755 4.A.G	chr9:978 62697- 9786270 7	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAAGTTCCT GGAATTTTCCA	101	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTTTGAGGTA TGAGCAAAGT	270
rs704697 T.C	chr11:33 724776- 3372478 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGGGTAAAT AAGAAGTTGATGA	102	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCATAGGGACT TTGCCTC	271
rs30168.	chr5:137	ACACTGACGACATGGT	103	TACGGTAGCAGAGACT	272

【表 1 - 15】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
G.A	19085- 1371909 5	TCTACAGTTGGCAAATT TAATGGACA		TGGTCTATGGACATAAT CATAGAAACTGA	
rs559382 53.A.G	chr2:186 661669- 1866616 79	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTTGTGATCA GACCATGAAAG	104	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGACAAGACTTG CTTTAATGC	273
rs109312 00.C.A	chr2:186 664959- 1866649 69	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGAAACAAAT CATTTTCTATGCAT	105	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAGTAGAAAA TTGCCAGTCT	274
rs6928.C. G	chr22:22 115000- 2211501 0	ACACTGACGACATGGT TCTACACAGATACAAA GCAGTTTCAGA	106	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCAGGTTTACCT AAAGCTTGTT	275
rs228202 2.T.C	chr13:41 374182- 4137419 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAACAAACAGA ATTGGAAACCA	107	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTTTGCAATC TTGAAGCTT	276
rs161378 0.G.T	chr1:144 865846- 1448658 56	ACACTGACGACATGGT TCTACATCTGGAAACA TGACTCAGTT	108	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTAACTTCTAC AGTCAGGGC	277
rs789346 2.A.G	chr10:28 228861- 2822887 1	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGAAAGAACG CCAACAAC	109	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATCATTGAAAA CCTTGTC AAG	278
rs227514 5.G.A	chr14:35 242824-	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTGTACCTGT	110	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGAAAACAAG	279



【表 1 - 1 6】

標的の GenBan k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	3524283 4	CTTTTACTATGA		GAAAATGGGA	
rs9225.C. T	chr2:470 86108- 4708611 8	ACACTGACGACATGGT TCTACACCCCTCCTTAA GCATTGT	111	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGATGCTCAAAG TATGATTTCAC	280
rs113007 2.T.C	chr9:146 15931- 1461594 1	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAGAAATACT TCAGTCCAACA	112	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTATGTATTCT GGATAACTGAAAACA	281
rs732774. C.T	chr13:52 523804- 5252381 4	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGATCAATGT CAGTAGATTATTTAAA A	113	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGGATTGTAAT CGGTTTTATCG	282
rs135930 0.G.A	chr1:144 922579- 1449225 89	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTTCCTTGA GGTTCCTGA	114	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCTGAATTCAG ATTCTTCAAG	283
rs254978 2.G.T	chr5:962 30996- 9623100 6	ACACTGACGACATGGT TCTACATACCTCCTAGT GGTTTGG	115	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACAGCGATAA GTTCCATG	284
rs928912 2.C.G	chr3:118 867043- 1188670 53	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGGGATTTAA ATTTCCAGGATG	116	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGAAACTTGGT AAGGATCTTC	285
rs476631 0.G.A	chr12:50 22037- 5022047	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCTACTGACC GATGTTTAAAA	117	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAGTCACTAGG TTTTCTGTTTT	286

【表 1 - 17】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs461754 8.A.G	chr11:16 133409- 1613341 9	ACACTGACGACATGGT TCTACACTACTTACCTG GTTTGTATGTTA	118	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCGCTCATGATC CCAATTTT	287
rs100579 08.T.G	chr5:102 884929- 1028849 39	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTAAACTG AATTTCAAGATGC	119	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTTAGATACA TAATAAAATTCGAGCT A	288
rs729017 75.T.C	chr1:164 7810- 1647820	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAGTCCTCAA CTGACCCA	120	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGAAGAACAG GATAAAGCTC	289
rs225554 6.C.T	chr5:962 49111- 9624912 1	ACACTGACGACATGGT TCTACATGGAAGGAAA GGTTATCAAGA	121	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGAAGATGGG TCCAATTTTC	290
rs254853 8.T.A	chr5:962 32138- 9623214 8	ACACTGACGACATGGT TCTACACTCCCTGTTTA GGATGACTA	122	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTCCTGTAT TTGAGTCGG	291
rs177083. C.T	chr2:324 47714- 3244772 4	ACACTGACGACATGGT TCTACAGTGACCTGCTA AAGAAATACA	123	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGATAAAGGCC AAGGAACAG	292
rs687614 3.A.G	chr5:173 80266- 1738027 6	ACACTGACGACATGGT TCTACATGAAAAGTGT CTTTCATTAGCT	124	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAATACCATGTC TGCCTGT	293
rs984117 4.T.C	chr3:167 184874-	ACACTGACGACATGGT TCTACACATGAATACA	125	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGIGGATTTTCA	294

【表 1 - 1 8】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	1671848 84	ATGGCAAATAATAAT		AGATGCAAAG	
rs116571 982.G.A	chr6:310 23144- 3102315 4	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAGACTTGAA CCCTATTAGAAAA	126	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGAATACATGTA GCTTACATGGC	295
rs4898.T. C	chr7:823 86202- 8238621 2	ACACTGACGACATGGT TCTACATTCTTCACCTT TAGTCAGGTTA	127	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATCATCTAAAC CAATGGCAAG	296
rs202026 726.T.TA	chr3:869 90606- 8699061 7	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAGTATGTT GCATTTTAAAAGAATT AT	128	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCACCTTTTAGA AAAGGATAAGTAAT	297
rs115377 48.A.G	chr15:31 668690- 3166870 0	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTTGCTGACT GTTCCATA	129	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGGGTAATCCT GATTTCAAAA	298
rs14026. G.A	chr2:554 04790- 5540480 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTAGCTTAAT GCCAACTTT	130	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGAAACAACC ATCTTTATCTTTTG	299
rs178013 8.A.G	chr10:38 501650- 3850166 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAAGTGAAGA CTCCTTCTACC	131	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAGTTAAACTAT TGTTTTAAAAGCCTT	300
rs380095 1.T.G	chr7:997 58132- 9975814	ACACTGACGACATGGT TCTACACATCGAAGTA CTCAGCCA	132	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCGATTGGGG TCTTCAT	301

【表 1 - 19】

標的の <u>GenBank</u> <u>k ID</u>	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	2				
rs123038 2.T.A	chr5:962 54350- 9625436 0	ACACTGACGACATGGT TCTACATAACCATTTGGT TTAAGCCTTAC	133	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGCAGATTCGA CTTCATTT	302
rs201009 141.CCT. C	chr7:272 21060- 2722107 2	ACACTGACGACATGGT TCTACATCTTTCCAAAT GTTGCAAGA	134	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTTTCTTTTGCC ATTAGTTGAT	303
rs235091 7.T.C	chr8:625 76972- 6257698 2	ACACTGACGACATGGT TCTACATCTAATCTGAA ATAATTAACCTTTCT AT	135	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCATAGCCATG AATAAAGGG	304
rs114783 926.A.G	chr6:310 26430- 3102644 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAGGTCACTA GCATTAGCA	136	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTTGGGAGCA TAGACTTT	305
rs36261. G.A	chr19:83 27240- 8327250	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGCAACTGGA CAGATCTG	137	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCATTTGTTTTA ATTGGACCCTTTT	306
rs108515 00.T.C	chr15:51 783816- 5178382 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAGTTACCTTTTC AATGCATCTTC	138	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTATGATTCCAG CAATTCAGA	307
rs593093 2.T.C	chrX:135 431232- 1354312 42	ACACTGACGACATGGT TCTACATATTCAGGTTT CCCCATCT	139	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTTCTAACAAG GAAGTCATCTTT	308

【表 1 - 20】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs102264 37.C.T	chr7:129 984986- 1299849 96	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGCATAACTG CTTCTTTTCTAT	140	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTCGTAGTTCA GCTGTTCA	309
rs7512.G. C	chr17:10 583710- 1058372 0	ACACTGACGACATGGT TCTACAGCAAACTGA GTATGTTTACTTTA	141	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTGACATACCA AATGGAAATAAG	310
rs116830 8.A.G	chr12:66 742179- 6674218 9	ACACTGACGACATGGT TCTACACCTGTTGATA ATTTGTTGCAT	142	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATAGGTGGTGG TAAATGTTTTG	311
rs426088 0.T.C	chr8:690 20492- 6902050 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGTTTCTTATC CCAAAACATCA	143	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTTGCTCCGAA GATTTGTT	312
rs180124 9.A.G	chr13:52 515350- 5251536 0	ACACTGACGACATGGT TCTACACATCGCTAGA AATGGTTAAAC	144	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATTGGACCATT TAGAAATAACCAC	313
rs35382. A.G	chr5:598 21539- 5982154 9	ACACTGACGACATGGT TCTACAAATCCTAATA GATCATCTAATTGTTA TC	145	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGTTTATTGA GTGCAGATGTC	314
rs8042.T. A	chr8:284 31196- 2843120 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGACAGCTAG GTCTGTCT	146	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTGTAACAGTAA AATGGGGAAAG	315
rs104435	chr4:311	ACACTGACGACATGGT	147	TACGGTAGCAGAGACT	316

【表 1 - 2 1】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
2.G.T	47870- 3114788 0	TCTACAACAGACCAGA AGAAATTGTC		TGGTCTACCTAAGATTA TTTAGGTCTTTAGATT	
rs174793 0.C.G	chr1:144 916744- 1449167 54	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGTAGTAGAT AACTGTTCCACT	148	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTATGGGGTAATC ATTTTGACTG	317
rs216191 6.G.A	chr2:171 073883- 1710738 93	ACACTGACGACATGGT TCTACAAGCTCAACTC ACCAGTAC	149	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTACCAAGGCAT TCAACAAG	318
rs221384 2.A.G	chr6:112 423806- 1124238 16	ACACTGACGACATGGT TCTACAATAGTACATG GATCATTGAGTAGA	150	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTGTTAGGGCA AGTCCAG	319
rs207020 3.G.A	chr16:70 303576- 7030358 6	ACACTGACGACATGGT TCTACAGTGCAGCATA CTTACCCA	151	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGGATTGACATG GCCTACC	320
rs116072 190.A.C	chr6:310 23182- 3102319 2	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAGACTTGAA CCCTATTAGAAAA	152	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCTTAGGAATA CATGTAGCTTACA	321
rs756213 7.A.G	chr2:186 625766- 1866257 76	ACACTGACGACATGGT TCTACACTCGTTTTCTT TTAGGACATACA	153	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCATTATCCTGT ACATCTGCC	322
rs101410 87.G.C	chr14:37 147337-	ACACTGACGACATGGT TCTACAGAAGATGGAT	154	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCCATCTGAGT	323

【表 1 - 2 2】

標的の GenBank k ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	3714734 7	TCCCTAGGT		TTTAAACGA	
rs3453.T. C	chr21:35 819059- 3581906 9	ACACTGACGACATGGT TCTACACTCACTACTGC AAATGCAT	155	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACCATGTACTG TTCTAAGCT	324
rs434970 6.T.C	chr5:147 516594- 1475166 04	ACACTGACGACATGGT TCTACATAGGACGAAT GACAGGAA	156	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTAAGACAAGCT CCGAAGAAT	325
rs546577. A.C	chr9:104 172932- 1041729 42	ACACTGACGACATGGT TCTACAAAACCTATTA ATTCATCTGTTTAAACC	157	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGCGTTTGACAG AATTGGT	326
rs694001 8.G.C	chr6:136 599389- 1365993 99	ACACTGACGACATGGT TCTACACATAAGCTGA AAGGCCAG	158	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCGAAAGATAC ATTTGAACATGAC	327
rs615757 44.G.GT	chr1:419 72271- 4197228 2	ACACTGACGACATGGT TCTACATTTCTTTTGT ACGTCAGACT	159	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCTTGCAATGT TGGTATGGTA	328
rs195871 5.G.A	chr14:20 528203- 2052821 3	ACACTGACGACATGGT TCTACAATAAAGAACT TCTGGAACCTTTC	160	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCTAGTAAAATA AACTCGGTCACT	329
rs185245 0.C.A	chr12:16 397730- 1639774	ACACTGACGACATGGT TCTACATCAGTGCACTA ACCAACA	161	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTCTTTCTGATC AGCATCTTG	330

【表 1 - 2 3】

標的の GenBank ID	標的の区 間	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
	0				
rs105248 O.T.C	chr1:115 591054- 1155910 64	ACACTGACGACATGGT TCTACATAAAATCTATT GTTGCTTAGTGGTG	162	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTTCTGTTCCA TGTACGATT	331
rs252884 3.G.T	chr7:224 78203- 2247821 3	ACACTGACGACATGGT TCTACAGATTTTCTAGA TGAAGCTGAAAC	163	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTTCCAAGAC TAGGAGTT	332
rs974110. A.G	chr6:661 12405- 6611241 5	ACACTGACGACATGGT TCTACACCTGCAAGGA TAATCTTTCT	164	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGIGCATCTGTT CACCAATA	333
rs256499 O.T.C	chr5:538 16778- 5381678 8	ACACTGACGACATGGT TCTACATGGACATCAG TACTAATTTTAGTAGA	165	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTTTTAATACAGG CCAACAGC	334
rs359524 02.A.AC TC	chr5:147 516910- 1475169 23	ACACTGACGACATGGT TCTACATGGGATTTCTT TGTCACTATCT	166	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTGTCCACCAATG GGTTTAG	335
rs257376. G.A	chr7:106 799993- 1068000 03	ACACTGACGACATGGT TCTACAGGACCTTGCAT GGAAATTA	167	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCATACTTTTGC TTCATGCAG	336
rs840385. T.C	chr5:340 20354- 3402036 4	ACACTGACGACATGGT TCTACAATGAACTTAA AACTTCAGGGG	168	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTACAGAAGTCAT TTGCAAAGAA	337



【表 1 - 2 4】

標的の <u>GenBank</u> <u>ID</u>	標的の区 <u>間</u>	タグを伴う左側プライマー	配列番号	タグを伴う右側プライマー	配列番号
rs316214. G.C	chr5:964 97634- 9649764 4	ACACTGACGACATGGT TCTACAATGCAAAGCA AGGGTATTTAA	169	TACGGTAGCAGAGACT TGGTCTCCTGTAATTAT CTAATAAATTGGCTTAA	338

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0199

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0199】

シーケンシング：600 μLの各試料を、12.5 pMで、Access Array (商標) System for Illumina Sequencing Systems User Guide (Fluidigm) に従い調製されたFL1プライマーと共に、Illumina MiSeq (商標) にかける。FL1プライマーを、500 nMで、シーケンシングのためのIllumina MiSeq (商標) 試薬カートリッジへとロードし、アダプタートリミングをアダプターリード2 - TGTAGAACCATGTCGT (配列番号339) およびアダプターリード1 - AGACCAAGTCTCTGCT (配列番号340) とする2 × 151のリードを使用して試料を分析する。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US13/46020
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/53; C40B 30/04 (2013.01) USPC - 435/7.2; 506/9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12Q 1/68, 02; G01N 33/00, 53, 577; C40B 30/04 (2013.01) USPC: 435/6.11, 6.1, 4, 7.24, 7.21, 7.2, 7.1, 7.92, 7.4, 29; 506/9 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; DialogPRO; PubMed; diagnos*, prognos*, efficac*, profile, marker, biomarker, acellular, cell-free, bodily fluid, circulating, ctDNA, *cirDNA, *cfDNA, phagocyte, neutrophil, monocyte, macrophage, mast cell, dendritic cell, microvesicle, lysing		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0053073 A1 (KASSIS, AI), March 1, 2012; abstract; paragraphs [0008]-[0018], [0027]-[0034], [0156]	1-24, 25/1-25/3, 25/10-25/12, 26/1-26/3, 26/10-26/12, 27/4-27/6, 27/13-27/15, 28/4-28/6, 28/13-28/15, 29/7-29/9, 29/16-29/18, 30/7-30/9, 30/16-30/18, 31/19-31/24, 32/19-32/24, 34/4-34/6, 34/13-34/15, 35/1-35/9, 35/19-35/21, 38/1-9, 38/19-21, 44/19-44/24, 71/1-71/3, 71/10-71/12, 71/19-71/24, 73/4-9, 73/13-18, 93-96, 147/6, 147/15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 November 2013 (05.11.2013)		Date of mailing of the international search report <b>12 NOV 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/46020

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO2012012693 A2 (KASSIS, AI), January 26, 2012; abstract; paragraphs [0007]-[0022], [0027]-[0034]	1-24, 25/1-25/3, 25/10-25/12, 26/1-26/3, 26/10-26/12, 27/4-27/6, 27/13-27/15, 28/4-28/6, 28/13-28/15, 29/7-29/9, 29/16-29/18, 30/7-30/9, 30/16-30/18, 31/19-31/24, 32/19-32/24, 34/4-34/6, 34/13-34/15, 35/1-35/9, 35/19-35/21, 38/1-9, 38/19-21, 44/19-44/24, 71/1-71/3, 71/10-71/12, 71/19-71/24, 73/4-9, 73/13-18, 94-96, 147/6, 147/15
A	WEILAND, M et al. Small RNAs Have A Large Impact: Circulating microRNAs As Biomarkers For Human Diseases. Epub. RNA Biology. June 1, 2012, Vol. 9, No. 6, pp 850-859.	1-9
A	CARPAGANO, GE et al. Microsatellite Alterations And Cell-Free DNA Analysis: Could They Increase the Cytology Sensitivity In The Diagnosis Of Malignant Pleural Effusion? Epub. Rejuvenation Research. 02 May 2012, Vol. 15, No. 3, pp 265-273.	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/46020

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 33, 36, 37, 39-43, 45-70, 72, 74-92, 97-146, 148-150  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 スティリ , ハリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 , ラ ホヤ , パセオ ドラド 2 4 5 2

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 CA12 CA20 HA11 HA12 HA15  
 4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ52 QQ53 QR08 QR55 QR62 QR66  
 QS17 QS24 QS25 QS26 QS28 QS32 QS33 QS34 QS36 QX02