

(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2017-521091

(P2017-521091A)

(43) 公表日 平成29年8月3日(2017.8.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/49 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/49	A
	G O 1 N 33/49	K
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-512656 (P2017-512656)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月12日 (2015.5.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月16日 (2017.1.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/030420
 (87) 国際公開番号 W02015/175562
 (87) 国際公開日 平成27年11月19日 (2015.11.19)
 (31) 優先権主張番号 61/993, 659
 (32) 優先日 平成26年5月15日 (2014.5.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516342324
 ケルベックス インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 117
 39, グレート リバー, ビルディング
 200, スイート 111, サンライズ
 ハイウェイ 3500
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100103182
 弁理士 日野 真美
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断試験用の胎児有核赤血球 (NRBC) の調製

(57) 【要約】

本開示は、診断試験用の、生物学的サンプルからの胎児有核赤血球 (NRBC) の調製方法に関する。

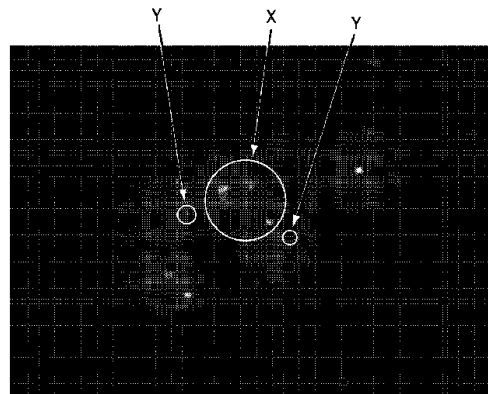


FIG. 4

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物学的サンプルから胎児有核赤血球 (f N R B C) を濃縮する方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルを密度分離にかけて、 f N R B C 含有細胞画分を得るステップ；

(b) ステップ (a) において得た前記 f N R B C 含有細胞画分を、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を用いる磁気活性化細胞ソーティング (M A C S) にかけて、 M A C S でソートした細胞集団を得るステップ；

(c) ステップ (b) において得た、前記 M A C S でソートした細胞集団中の細胞を、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬で蛍光標識して、蛍光標識細胞集団を得るステップ；および

(d) ステップ (c) において得た前記蛍光標識細胞集団を、フローサイトメトリーによってソートして、 f N R B C を選択することによって、 f N R B C が濃縮された細胞集団を得るステップ

を含む方法。

【請求項 2】

ステップ (b) は、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用し、ステップ (c) は、少なくとも 2 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (b) は、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用し、ステップ (c) は、少なくとも 3 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (b) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (b) の前記少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 2 3 5 a 抗体を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (c) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (b) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 2 3 5 a 抗体を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (b) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、核染色剤を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

個々の f N R B C または f N R B C の群を単離するための顕微操作をさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ネガティブ選択ステップを含まない、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (a) において得た前記 f N R B C 含有細胞画分を、ステップ (b) の前にネガティブ選択にかける、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ (b) において得た、前記 M A C S でソートした細胞集団を、ステップ (c) の前にネガティブ選択にかける、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記ネガティブ選択はネガティブ免疫選択である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ネガティブ免疫選択は、

- (a) T リンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 3、C D 4 または C D 8 ；
- (b) B リンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 1 9、C D 2 0 または C D 3 2 ；
- (c) p a n リンパ球マーカー、場合により C D 4 5 ；
- (d) N K 細胞表面マーカー、場合により C D 5 6 ；
- (e) 樹状細胞表面マーカー、場合により C D 1 1 c または C D 2 3 ；および
- (f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、場合により C D 1 4 または C D 3

から選択される 1 つまたは複数の細胞表面マーカーに対する 1 つまたは複数の抗体を利用する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

生物学的サンプルから f N R B C を濃縮する方法であって、

- (a) 前記生物学的サンプルを密度分離にかけて、f N R B C 含有細胞画分を得るステップ；
- (b) ステップ (a) において得た前記 f N R B C 含有細胞画分を、少なくとも 2 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を用いる M A C S にかけて、M A C S でソートした細胞集団を得るステップ；および
- (c) ステップ (b) において得た、前記 M A C S でソートした細胞集団に顕微操作を実行して、個々の f N R B C または f N R B C の群を単離するステップを含む方法。

【請求項 1 6】

ステップ (b) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ステップ (b) の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 2 3 5 a 抗体を含む、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

ネガティブ選択ステップを含まない、請求項 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (a) において得た前記 f N R B C 含有細胞画分を、ステップ (b) の前にネガティブ選択にかける、請求項 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ (b) において得た、前記 M A C S でソートした細胞集団を、ステップ (c) の前にネガティブ選択にかける、請求項 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ネガティブ選択はネガティブ免疫選択である、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ネガティブ免疫選択は、

- (a) T リンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 3、C D 4 または C D 8 ；
- (b) B リンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 1 9、C D 2 0 または C D 3 2 ；
- (c) p a n リンパ球マーカー、場合により C D 4 5 ；
- (d) N K 細胞表面マーカー、場合により C D 5 6 ；
- (e) 樹状細胞表面マーカー、場合により C D 1 1 c または C D 2 3 ；および
- (f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、場合により C D 1 4 または C D 3

3

10

20

30

40

50

から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーに対する1つまたは複数の抗体を利用する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記生物学的サンプルは母体血液である、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記母体血液は、妊娠約4週から約38週の間に取り出される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記母体血液は、妊娠約6週から約20週の間に取り出される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

少なくとも1個のfNRBCの正体を胎児細胞として確認することをさらに含む、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

請求項1から25のいずれか一項に記載の方法によって得られる、または得ることができる、fNRBCが濃縮された細胞集団。

【請求項28】

母体血液から濃縮された、(a)少なくとも2、少なくとも5、もしくは少なくとも10個の、かつ/または(b)最大15、最大25、もしくは最大35個のfNRBCを含有する、FACSでソートした細胞集団。

【請求項29】

(a)少なくとも20、少なくとも50、または少なくとも100の、かつ/または(b)最大150、最大250、または最大350のFACS事象を含有する、請求項28に記載の、FACSでソートした細胞集団。

【請求項30】

固定されていない、請求項27から29のいずれか一項に記載の、細胞集団。

【請求項31】

胎児異常について、請求項27から30のいずれか一項に記載の細胞集団由来の少なくとも1個のfNRBCを分析することを含む、胎児異常を検出する方法。

【請求項32】

請求項1から25のいずれか一項に記載の方法に従って、fNRBCを、前記分析の前に濃縮することをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記胎児異常について単一のfNRBCを分析することを含む、請求項31または32に記載の方法。

【請求項34】

前記胎児異常について一群のfNRBCを分析することを含む、請求項31または32に記載の方法。

【請求項35】

前記分析の前に全ゲノム増幅を実行することを含む、請求項33または34に記載の方法。

【請求項36】

前記分析の前にゲノムのサブセットを増幅することを含む、請求項33または34に記載の方法。

【請求項37】

前記分析は定量PCRを含む、請求項31から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記分析はマイクロアレイ上で実行される、請求項31から36のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 39】

前記 f N R B C を胎児細胞として確認することをさらに含む、請求項 31 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

確認が、ショートタンデムリピート (S T R) 分析、遺伝的フィンガープリンティング、または単一ヌクレオチド多型 (S N P) 分析を実行することを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

確認が、f N R B C D N A を母系 D N A と比較することを含む、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 42】

確認が、f N R B C D N A を、母系 D N A および父系 D N A の両方と比較することを含む、請求項 39 または 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、2014年5月15日出願の米国仮特許出願第61/993659号明細書の優先権の利益を主張し、この出願の内容は、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

2. 背景

胎児に起こり得る染色体異常および遺伝的異常を検出する出生前診断の実践により、両親および保育者は、素因のモニタリングおよび疾患または症状の早期の処置を開始することが可能となる。出生前診断の実践は、胎児の起こり得る染色体異常および遺伝的異常を検出するように確立されているので、両親および保護者による、情報に基づいた決定が可能となる。生命に係わる種々の染色体異常 (異数性 21、18、13、X、Y) のうち、第 21 染色体の全てまたは一部の余分なコピーの存在によって引き起こされるダウン症候群は、精神遅滞の最も一般的な遺伝的原因であり、女性が出生前診断を求める主たる理由となっている (Pierce B. Genetics: A conceptual approach (W.H. Freeman and company, 2008), 3d edition; Driscoll and Gross, 2009, N Engl J Med. 360:2556-62)。報告によると、細胞遺伝学的障害は、生存出生の約 1%、35歳を超える女性の妊娠では 2%、そして第 1 三半期の自然流産ではおおよそ 50% で生じる (Thompson and Thompson Genetics in Medicine, sixth edition, chapter 9)。報告によると、100万人の生存出生集団中の単一遺伝子欠損の発生率は、約 0.36% である (Thompson and Thompson Genetics in Medicine, sixth edition, chapter 9)。

【0003】

血清の P A P P - A (妊娠関連血漿タンパク質 A)、遊離 - H c g (遊離 ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン) の定量化、および頂部透過像の超音波検査を包含する好ましい第 1 三半期スクリーニングによれば、ダウン症候群の検出率が約 90% であるが、有意な 5% の偽陽性率がなおざりになっている (Nicolaidis et al., 2005, Ultrasound Obstet Gynecol 25:221-26)。第 1 三半期のスクリーニング研究のメタアナリシス (Evans et al., 2007, Am J Obstet Gynecol 196:198-05) は、実際には、達成可能な有病正診率 (sensitivity) が、報告されるよりも有意に低い (約 80 ~ 84%) 可能性がある と結論した。

【0004】

染色体異常および単一遺伝子障害の決定的な検出は、柔毛膜柔毛サンプリング、羊水穿刺、または臍帯サンプリングによって得られる胎児組織の核型分析によって可能である。ダウン症候群等の症状の危険性を最小にするために、これらの試験は、一組のスクリーニング基準によって胎児染色体異常のリスクが最も高いと同定された女性になされる。この

10

20

30

40

50

群は、通常、母体年齢が35歳以上であり、かつ妊娠の第1三半期および/または第2三半期中に実行される胎児の超音波検査および/または母体血清マーカースクリーニング試験への応答が異常である妊娠を含む(Nicolaides et al., 2005, *Ultrasound Obstet Gynecol* 25:221-26)。しかしながら、これらの手順は、非常に侵襲性であり、熟練した専門家を必要とし、そして胎児損失(最大1%)および/または母体合併症のリスクが重大である傾向がある(Mujezinovic et al., 2007, *Obstet Gynecol* 110:687-94、Tabor et al., 1986, *Lancet* 1:1287-93、Buscaglia et al., 1996, *Prenat Diagn* 16:375-76)。American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)によるガイドライン(ACOG Practice bulletin Clinical Management Guidelines for Ob-Gyns, No. 7, Jan 2007)は遺伝的異常が予想される全ての母親を試験するように会員に勧めているが、これは、胎児の遺伝的状態の特定の診断に安全に導くことができる非侵襲性の技術の必要が満たされていないことを示している。

10

【0005】

数十年間、非侵襲性の代替法の探索は、通常胎盤閉門を通過して母体循環系中に入る、胎児遺伝物質の単離、同定、および以降の分析に注目していた。1893年の母体血液中の胎児細胞の検出、およびその後の母体血液中の胎児細胞なしの(cell-free)DNAの検出についての先駆的な報告(Purwosunu et al., 2006, *Taiwanese J. Obstet Gynecol* 45(1): 10-20の表1参照)以来、胎児細胞の、または無細胞の胎児遺伝物質の分析に基づく2つの見込みのあるアプローチが、相当な関心を集めてきた。

20

【0006】

「無細胞」胎児DNAは、母体血液中で比較的豊富であり、母体血漿中の総無細胞DNAの5~10%を構成する(Hahn et al., 2011, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13: e16)。次世代シーケンシング技術の出現で実行可能となった無細胞DNAベースの出生前試験は最初に、2011年に米国で商用化され、少なくとも4つのそのようなアッセイが現在商品化されている。現在まで、無細胞DNA試験法は、性別同定、異数性検出、および父系DNA中に存在する突然変異を可能にしているが、より細かい遺伝的分析、例えば微小欠失または微小挿入の検出は可能でない(例えば、Simpson, 2013, *Fertility and Sterility* 99:1124-1134参照)。さらに、稀であるけれども、偽陽性を含む不正確な試験結果が報告されてきた(Simpson, 2013, *Fertility and Sterility* 99(4): 1124-1134、Dugo et al., 2014, *J Prenat Med.* 8(1-2): 31-35参照)。

30

【0007】

無細胞胎児DNAまたはRNAと比較して、無傷の胎児細胞により、染色体異常の検出、および胎児の遺伝的状態のより完全な評価に重要である完全な胎児遺伝物質へのアクセスを実現することができる(Huang et al., 2011, *J Cell Biochem.* 112:1475-85)。いくつかの重大な課題が、信頼性の高い胎児細胞単離法の開発を妨げてきた。単離の主な制限となるのは、母体血液中の循環性胎児有核細胞数の少なさであり、胎児細胞は、母体血液1mLあたり1~2個(Bianchi et al., 1997, *Am J Hum Genet* 61(4): 822-829)から母体血液1mLあたり2~6個(Krabchi et al., 2001, *Clin Genet* 60:145-150)にしか及ばないと推定されている。但し、異数性の妊娠においては、その数は最大6倍大きいことが報告されている(Krabchi et al., 2006, *Clin Genet* 69:145-154、およびBianchi et al., 1997, *Am J Hum Genet* 61(4): 822-829)。この数を大局的に見ると、血中の胎児細胞の、母親細胞に対する比率は、 10^5 中1個から 10^9 中1個と推定され(Purwosunu et al., 2006, *Taiwanese J. Obstet Gynecol* 45(1): 10-20、Simpson, 2013, *Fertility and Sterility* 99(4): 1124-1134参照)、1mLの母体血液中のそれぞれ1~6個の胎児細胞について、おおよそ $4.2 \sim 5.4 \times 10^9$ 個の成体赤血球、 $1.16 \sim 8.3 \times 10^3$ 個の好中球、 $2 \sim 9.5 \times 10^5$ 個の単球、 $1 \sim 4.8 \times 10^6$ 個のリンパ球、 $1.33 \sim 3.33 \times 10^8$ 個の血小板、最大 4.5×10^5 個の好酸球、および最大 2×10^5 個の好塩基球が存在する(web2.iadfw.net/uthman/blood_cells.htmlにてアクセス可能なUthman, Blood Cells and the CBCから得た数)。

40

50

【 0 0 0 8 】

母体血液中の種々の胎児細胞（栄養芽層、リンパ球、有核赤血球、および造血幹細胞； Bianchi, 1999, Br J Haematol 105:574-83参照）のうち、赤芽球としても知られている有核赤血球（NRBC）は、信頼性が高い出生前アッセイに所望される特性の過半数を有する。胎児NRBC（fNRBC）は、寿命および増殖能力に限られており（したがって、ある妊娠から別の妊娠まで持続しない）、単核であり、胎児染色体の代表的な相補体を有しており、そして母体血液中に絶えず存在する（Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Kavanagh et al., 2010, J Chromat B 878:1905-11、Bianchi, 1999, Br J Haematol 105:574-83、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35、Bianchi and Lo, 2010, in Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment, Sixth Edition, Ch. 30, pp. 978-1000 (Milunsky and Milunsky eds.))。胎児赤血球生成の研究により、最初に卵黄嚢（原始赤芽球を産生する原始赤血球生成）中に生じること、続いて胎児肝臓および骨髄（完全（definitive）赤芽球を産生する）中に生じることの2つの異なるプロセスが同定されている（Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85）。原始赤芽球および完全赤芽球の両方が母体循環系において検出される。原始赤芽球は、出産日まで残存する完全型によって次第に置き換えられる主たる第1三半期の細胞型である（Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35）。

10

【 0 0 0 9 】

母体血液中の胎児細胞の最も広範な研究は、複数年の、複数のセンターにまたがった N I F T Y T r i a l であった。これは、胎児異常を診断するために胎児細胞を単離する有用性および実現可能性を評価するように設計された。関係する4つのセンターは、胎児細胞を母体血液から単離して、単離細胞を、染色体特異的プローブによる蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）によって分析しようと試みた（Bianchi et al., 2002, Prenat Diagn 22:609-615）。A、B、C、およびDと表される4つのセンターは全て、母親細胞を枯渇させる予備的ステップとして密度勾配分離を用いて、次いで様々な方法を用いて、FISH用の胎児細胞を得た。センターAでは、密度分離に続いて、細胞固定、抗CD14抗体および抗CD15抗体を用いるMACS、ならびに抗HbF（胎児ヘモグロビン）を用いるFACSによるネガティブ選択が行なわれた。センターBでは、密度勾配分離に続いて、細胞固定、ならびに、ポジティブ選択用の抗HbF抗体、ネガティブ選択用の抗CD45または抗HbA（成体ヘモグロビン）によるFACSを用いる同時ネガティブポジティブ選択が行なわれた。センターCでは、密度勾配分離に続いて、抗CD14抗体および抗CD45抗体を用いるMACS、抗CD71抗体を用いるFACSによるネガティブ選択、ならびに細胞固定が行なわれた。センターDでは、密度勾配分離に続いて、細胞固定、および抗CD71抗体による、MACSを用いるポジティブ選択が行なわれた。男性胎児細胞中のX染色体およびY染色体の一般的な検出率は、症例の僅か41.1%であり、偽陽性率（すなわち、女性胎児細胞中のX染色体およびY染色体の検出）は11.1%であった。異数性の全体的な検出率は74.4%であり、推定偽陽性率は、0.6%から4.1%の間であった。Bianchi et al., 2002, Prenat Diagn 22:609-615参照。MACSベースの方法は、FACSベースの方法よりも良好な回収率および検出を実現するといわれた（Bianchi and Lo, 2010, in Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment, Sixth Edition, Ch. 30, pp. 978-1000 (Milunsky and Milunsky eds.))。N I F T Y T r i a l の寄稿者の1人は、アプローチは、「忍耐を要し、回収率が一定でなく、そして情報無しの割合が許容できなかった」と述べた（Simpson, 2013, Fertility and Sterility 99(4): 1124-1134）。

20

30

40

【 0 0 1 0 】

胎児細胞を単離するために、遠心分離、濾過、横置換法、磁気泳動、レクチン結合、誘電泳動、顕微操作およびレーザー捕捉、ならびに顕微解剖が挙げられる他の種々のアプローチが利用されている。より高速のスループット法、例えば微小電気機械システム（MEMS）およびオートメーション化された細胞濃縮法も利用されている（Kavanagh et al.,

50

2010, J Chromat B 878:1905-11, Kilpatrick et al., 2004, J Obstet Gynecol 190:15-71-81, Seppo et al., 2008, Prenat Diagn 28:815-21, Talasaz et al., 2009, PANS 106:3970-75, 2009, Kumo et al., 2010, 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 3-7 October 2010, Groningen, The Netherlands; pp. 1583-1585, Cheng et al., 2011, J Clin Lab Anal 25:1-7, Choolani et al., 2012, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 26:655-667)。これらもまた、首尾一貫しない結果をもたらしてきた (Simpson, 2013, Fertility and Sterility 99(4): 1124-1134)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

ゆえに、胎児DNAの下流の遺伝的分析を可能にする単純な、信頼性が高い胎児細胞単離技術の必要が依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

3. 概要

本開示は、胎児有核赤血球 (fNRBC) がかなり少数派である混合細胞集団からのfNRBCの濃縮および単離を可能にする単離技術の開発に基づく。したがって、本開示は、fNRBCが高度に濃縮された細胞調製物、およびそのような濃縮細胞集団を生成する方法を提供する。

20

【0013】

本開示は、典型的には液体培地中で実行されて、生物学的サンプル、例えば母体血液、または母体血液のfNRBC濃縮細胞画分からfNRBCを濃縮 (そして、場合によっては単離) するための、ポジティブ選択法の使用に部分的に基づくものである。母体血液は典型的に、妊娠期間のおよそ4週目から始まる期間内に採取される。

【0014】

ポジティブ選択法は、典型的には1つまたは複数のポジティブ免疫選択ベースのステップを含み、生物学的サンプルから他の細胞型、例えば母体リンパ球または赤血球を枯渇させる1つまたは複数の他の方法と共に用いられてよい。そのような他の方法として、ネガティブ選択および細胞密度分離技術が挙げられる。

30

【0015】

典型的には、ネガティブ選択法は、fNRBCに特異的に結合しないが、生物学的サンプル中に存在し得る1つまたは複数の他の細胞型に結合する抗体を利用する1つまたは複数のネガティブ免疫選択ステップを伴う。

【0016】

fNRBCの濃縮細胞が調製されると、調製物それ自体が診断試験にかけられてもよいし、付加的な単離技術 (例えば顕微操作) が、診断試験用に個々のfNRBCを選択するのに利用されてもよい。細胞が胎児細胞であることを確かめるために、fNRBCの1個または複数個が、確認技術、例えばショートタンデムリピート (「STR」) 分析にかけられてよい。

40

【0017】

一部の態様において、本開示は、fNRBCを調製する方法であって、fNRBCを含む生物学的サンプルをポジティブ選択にかけることを含む方法を提供する。ポジティブ選択は好ましくは、ポジティブ免疫選択、および場合により1つまたは複数の付加的なポジティブ選択基準を含む。ポジティブ免疫選択は典型的に、(a) 液体培地中で生物学的サンプルを1つまたは複数のポジティブ免疫選択抗体 (例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のポジティブ免疫選択抗体) と接触させるステップであって、このポジティブ免疫選択抗体は、生物学的サンプルにおいて1つまたは複数の他の細胞型と比較して選択的にfNRBCに結合する、ステップと; (b) 前記ポジティブ免疫選択抗体に結合した細胞を選択するステップとを含む。前述のポジティブ選択ステップが組み込まれ得るポジテ

50

ィブ選択の実例となる実施形態が、節 5 . 3、6、7 . 3、および 7 . 5 に記載される。

【 0 0 1 8 】

ある態様において、少なくとも 1 つのポジティブ免疫選択抗体は、f N R B C 有核前駆体細胞の表面上に存在する抗原と結合するが、成体の赤血球上に存在する C D 7 1 または他の表面抗原と結合しない。一部の実施形態において、ポジティブ免疫選択抗体は 4 B 9 であり、または f N R B C 有核前駆体細胞の表面への結合に関して 4 B 9 と競合する抗体である。ポジティブ選択用の他のマーカーとして、グリコホリン A (C D 2 3 5 a としても知られている)、C D 3 6、C D 7 1、および核染色剤 (例えば、H o e c h s t 3 3 3 4 2、L D S 7 5 1、T O - P R O、D C - R u b y、および D A P I) が挙げられ得る。例えば M A C S を用いるポジティブ選択の後に F A C S を用いるポジティブ選択が続く、複数のポジティブ選択プロセスが用いられてよく、それぞれ、1 つ、2 つ、3 つ、またはさらにそれ以上のポジティブ選択 (例えば、ポジティブ免疫選択) 試薬、例えば先に同定される、マーカーに対する抗体、または核染色剤を利用する。

10

【 0 0 1 9 】

ポジティブ選択は、ネガティブ選択、典型的にはネガティブ免疫選択と共に用いられてよい。ネガティブ免疫選択は、(a) 液体培地中で生物学的サンプルをネガティブ免疫選択抗体と接触させるステップであって、ネガティブ免疫選択抗体は、f N R B C と比較して選択的に生物学的サンプル中の他の細胞と結合する、ステップと ; (b) 前記ネガティブ免疫選択抗体に結合しなかった細胞を選択するステップとを含むことができる。前述のネガティブ選択ステップが組み込まれ得るネガティブ選択の実例となる実施形態が、節 5 . 3、6、7 . 2、および 7 . 5 に記載される。

20

【 0 0 2 0 】

ネガティブ選択は、実行されるならば、ポジティブ選択の前に、後に、またはポジティブ選択と同時に実行されてよい。好ましくは 1 つまたは複数の造血細胞表面マーカーに対する、1 つまたは複数のネガティブ免疫選択抗体が用いられてよい。例示的な細胞表面マーカーとして、以下が挙げられる : (a) T リンパ球細胞表面マーカー、例えば C D 3、C D 4、または C D 8 ; (b) B リンパ球細胞表面マーカー、例えば C D 1 9、C D 2 0、または C D 3 2 ; (c) p a n リンパ球マーカー、例えば C D 4 5 ; (d) N K 細胞表面マーカー、例えば C D 5 6 ; (e) 樹状細胞表面マーカー、例えば C D 1 1 c または C D 2 3 ; および (f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、例えば C D 1 4 または C D 3 3。特定の実施形態において、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、またはさらにそれ以上のネガティブ免疫選択抗体が、1 つ、2 つ、またはそれ以上のネガティブ選択プロセスで用いられる。

30

【 0 0 2 1 】

免疫選択ステップは、例えば抗体がコーティングされた磁気ビーズを用いる、磁気分離、またはフローサイトメトリーを利用してよい。フローサイトメトリー技術は、例えば蛍光活性化細胞ソーターの使用を介して、正確な分離を実現することができ、これは、精巧さ、例えば多色チャンネル、低角度オブチューズ光散乱検出チャンネル (low angle and obtuse light scattering detecting channel)、インピーダンスチャンネルその他の度合いを変えることができるものである。したがって、本明細書中で用いられる用語「フローサイトメトリー」は、蛍光活性化細胞ソーティング (F A C S) を包含する。

40

【 0 0 2 2 】

f N R B C の濃縮を向上させるために、前濃縮プロセス、例えば密度分離が、ポジティブ選択の前に用いられてよい。例示的な前濃縮プロセスが、節 5 . 2 および 7 . 1 に記載される。

【 0 0 2 3 】

f N R B C の濃縮細胞が調製されると、調製物それ自体が診断アッセイにかけられてもよいし、付加的な単離技術 (例えば顕微操作、固体表面上での細胞の捕捉) が、診断試験用に個々の f N R B C または f N R B C のプールを選択するのに利用されてもよい。一部の実施形態において、付加的な単離技術 (例えば顕微操作) は、細胞を濃縮するのに利用

50

される蛍光標識、f N R B C中のヘモグロビンの存在(ソーレー帯フィルターによって検出可能)、およびf N R B Cの形態的特徴を活用してよい(Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35)。顕微操作のための例示的なアプローチが、節5.4および7.6に記載される。

【0024】

本開示はさらに、本明細書中に記載される方法によって単離される個々のf N R B Cまたはf N R B Cの群を含む、本明細書中に記載される方法によって調製される、または得ることができるf N R B Cの調製物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、f N R B Cを含有する、F A C Sでソートされた細胞集団を提供する。例示的な、F A C Sでソートされた集団が、節5.5に記載される。

10

【0025】

f N R B Cは、例えば多胎妊娠または胎児異常の存在を判定する、胎児診断試験に用いられたい。試験され得る異常の例として、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21、ダウン症候群、圧迫性麻痺の傾向がある神経障害、神経線維腫症、アラジール症候群、軟骨形成不全、ハンチントン舞蹈病、アルファ-マンノース症、ベータ-マンノース症、異染性ロイコジストロフィー、フォンレックリングハウゼン病、結節性硬化症、筋強直性ジストロフィー、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ-サックス病、ベータ-サラセミア、ムコ多糖症、フェニルケトン尿症、シトルリン尿症、ガラクトース血症、ガラクトキナーゼおよびガラクトース4-エピメラーゼ欠乏症、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症、メチルマロン酸尿症、プロピオン酸血症、ファーバー病、フコシドーシス、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、I細胞病、ムコリピドーシスIII、ニーマン-ピック病、シアリドーシス、ウォールマン病、ツェルヴェーガー症候群、シスチン症、第X因子欠乏症、毛細血管拡張性運動失調、ブルーム症候群、ローベルト症候群、色素性乾皮症、脆弱(X)症候群、性染色体異数性、クラインフェルター症候群、ターナー症候群、XXX症候群、ステロイドスルファターゼ欠乏症、線形の皮膚欠損を伴う小眼球症、ペリツェーウス-メルツパッヒャー病、Y染色体上の精巣決定因子、オルニチンカルバモイル転移酵素欠乏症、ブドウ糖6-リン酸脱水素酵素欠乏症、レッシュ-ナイハン症候群、アンダーソン-ファブリ疾患、血友病A、血友病B、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、dup(17)(p11.2p11.2)症候群、16p11.2欠失、16p11.2重複、ミトコンドリア欠損、dup(22)(q11.2q11.2)症候群、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、ウォルフ-ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス-ポイレ症候群、シャルコー-マリー-トゥース病、染色体再配列、染色体欠失、スミス-マゲニス症候群、口蓋心臓顔貌症候群、ディジョージ症候群、1p36欠失、ブリーダー-ヴィリ症候群、無精子症(因子a)、無精子症(因子b)、無精子症(因子c)、脊椎披裂、無脳症、神経管欠損、小頭症、水頭症、腎欠損、カルマン症候群、副腎發育不全、アンゲルマン症候群、嚢胞腎、嚢胞性ヒグローマ、胎児水症、臍ヘルニアおよび胃壁裂、横隔膜ヘルニア、十二指腸閉鎖症、骨格形成異常、口唇裂、口蓋裂、アルギニコハク酸尿、クラッペ病、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症、3-メチルクロトニル補酵素Aカルボキシラーゼ欠乏症、糖原病、副腎過形成、低フォスファターゼ症、胎盤ステロイドスルファターゼ欠乏症、重症合併型免疫不全症候群、T細胞免疫不全、エーラーズ-ダンロー症候群、骨形成不全症、成人多嚢胞性腎疾患、ファンコーニ貧血、表皮水泡症候群、発汗減少症性外胚葉性形成異常、先天性ネフローゼ(フィンランド型)、ならびに多発性内分泌腫瘍が挙げられる。

20

30

40

【0026】

診断アッセイは、核酸(例えば、DNAまたはRNA)アッセイであってもよいし、タンパク質(例えば、抗体ベースの)アッセイであってもよいし、組織学的アッセイであってもよいし、それらの組合せであってもよい。DNAアッセイの例として、FISHアッセイ、PCRアッセイ、およびDNA配列決定アッセイが挙げられる。RNAアッセイの例として、RT-PCRアッセイおよびFISHアッセイが挙げられる。核酸へのアクセスを容易にするために、f N R B Cは、診断試験を実行する前に、溶解されてもよいし、

50

透過性にされてもよい。DNA、RNA、およびタンパク質アッセイは、マイクロアレイ上で実行されてもよい。分子診断試験のための実例となる技術が、節5.7に記載される。

【0027】

診断アッセイは、胎児細胞として診断される細胞または細胞集団の正体を確認するための分子確認技術の前であっても、同時であっても、後であってもよい。例示的な確認技術が節5.6に記載される。

【0028】

本明細書中に記載される方法は、例えば特定の診断を確かめるために、または妊娠の変化もしくは胎児の状態を検出するために、所与の妊娠中に一回または複数回、実行されてよい。

10

【0029】

本開示の方法を実践するのに有用なキットが節5.8に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0030】

4. 図面の簡単な説明

【図1】例示的なfNRBCの単離および下流の分析の研究フローを示す図である。fNRBCの単離について、好ましいワークフローは、節7.1に記載される、細胞密度勾配上での母体血液からの単核細胞の単離、節7.3に記載される、ポジティブ選択（例えば、磁気活性化細胞ソーティングを用いた、4B9ポジティブ細胞の濃縮）の利用（節7.2のネガティブ選択、例えばCD45枯渇ステップが、有っても無くてもよく、これは任意である）、およびCD235⁺、核染色、4B9ポジティブ細胞のソーティングを含む。fNRBCの濃縮後、個々の細胞が、例えば、本明細書中に記載される方法に従って、下流の細胞遺伝学的分析および/または分子分析のために、本出願に記載されるような形態または染色に基づいて、選択されてよい。ワークフローは、節7に概説される組合せプロトコルのいずれかを活用するように適合されてよい。

20

【図2】図2は、図1に概説されるワークフローの特定の実施形態を示す図である。

【図3-1】図3は、fNRBCを母体血液から単離するための、本明細書中に開示される方法を利用した、例示的なFACSデータセットを示す図である。図3Aは、細胞型を区別するために細胞の光散乱特性を用いた、FSC（X軸）およびBSC（Y軸）の相関測定値を示す。図3Bは、リンパ球および単球のサブゲートである。X軸はCD235a染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。上部右側の四分の一区分は、核DC-RubyおよびCD235a⁺PE（グリコホリン-a）ポジティブである事象を含有する。これらの細胞は、下流の分析のために、例えば核酸増幅用のPCRチューブ中に、または顕微操作のスライド上に直接的にソートされてよい。

30

【図3-2】図3は、fNRBCを母体血液から単離するための、本明細書中に開示される方法を利用した、例示的なFACSデータセットを示す図である。図3Cは、CD235a⁺領域のサブゲートである。図3Dは、図3A~図3Cに示される異なるゲーティングレベルにて選択された細胞の例示的な分布を示す。X軸はAF488染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。上部右側の四分の一区分は、核DC-Rubyおよび4B9AF488についてポジティブである事象を含有する。これらの細胞は、下流の分析のために、例えば核酸増幅用のPCRチューブ中に、または顕微操作のスライド上に直接的にソートされてよい。

40

【図4】X染色体およびY染色体ハイブリダイゼーションプローブを用いた蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）によって分析されて、DAPIで対比染色されたfNRBCを示す図である。

【図5】男性胎児を妊娠中の女性の末梢血から単離された細胞を示す図である。細胞は、XプローブおよびYプローブでハイブリダイズされて、核染色剤DAPIで対比染色された。

【図6】男性胎児を妊娠中の女性の末梢血から単離された細胞を示す図である。細胞が、

50

XプローブおよびYプローブでハイブリダイズされて、核染色剤DAPIで対比染色された。

【図7-1】図7Aは、細胞型を区別するために細胞の光散乱特性を用いた、FSC(X軸)およびBSC(Y軸)の相関測定値を示す図である。図7Bは、リンパ球および単球のサブゲートを示す図である。X軸はCD235a染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。上部右側の四分の一区分は、核DC-RubyおよびCD235a PE(グリコホリン-a)ポジティブである事象を含有する。

【図7-2】図7Cは、CD235a+領域のサブゲートを示す表である。X軸はAF488染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。上部右側の四分の一区分は、核DC-Rubyおよび4B9 AF488についてポジティブである事象を含有する。図7Dは、ゲーティングのそれぞれ異なるレベルの統計量を示す図である。

【図8】図8Aは、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)によってソートされた4B9ネガティブ細胞画分の細胞型を区別するために細胞の光散乱特性を用いた、FSC(X軸)およびBSC(Y軸)の相関測定値を示す図である。図8Bは、4B9ネガティブ細胞画分からのリンパ球のFACSサブゲートを示す図である。X軸はAF488染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。

【図9】図9Aは、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)によってソートされた4B9ポジティブ細胞画分の細胞型を区別するために細胞の光散乱特性を用いた、FSC(X軸)およびBSC(Y軸)の相関測定値を示す図である。図9Bは、4B9ポジティブ細胞画分からのリンパ球のFACSサブゲートを示す図である。X軸はAF488染色を表し、Y軸はDC-Ruby染色を表す。

【図10】図10は、男性の血液中の、胎児肝細胞のスライク混合物からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図10Aは、精製された男性ゲノムDNAのFAM分析を示す。図10Bは、女性の胎児肝細胞から精製されたDNAのFAM分析を示す。図10Cは、濃縮後にFACSでソートされた4B9ポジティブ画分のFAM分析を示す。

【図11】図11は、男性の血液中の、胎児肝細胞のスライク混合物からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図11Aは、精製された男性ゲノムDNAのVIC分析を示す。図11Bは、女性の胎児肝細胞から精製されたDNAのVIC分析を示す。図11Cは、濃縮後にFACSでソートされた4B9ポジティブ画分のVIC分析を示す。

【図12】図12は、男性の血液中の、胎児肝細胞のスライク混合物からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図12Aは、精製された男性ゲノムDNAのNED分析を示す。図12Bは、女性の胎児肝細胞から精製されたDNAのNED分析を示す。図12Cは、濃縮後にFACSでソートされた4B9ポジティブ画分のNED分析を示す。

【図13】図13は、男性の血液中の、胎児肝細胞のスライク混合物からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図13Aは、精製された男性ゲノムDNAのPET分析を示す。図13Bは、女性の胎児肝細胞から精製されたDNAのPET分析を示す。図13Cは、濃縮後にFACSでソートされた4B9ポジティブ画分のPET分析を示す。

【図14】図14は、男性の血液中の、胎児肝細胞のスライク混合物の4B9ポジティブ画分からのFAM STR産物の、単離されたキャピラリー電気泳動の図である。パネルは、D10S1248マーカーの2つの主要な寄与因子の対立遺伝子(A、C)および2つの主要でない対立遺伝子(B、D)、ならびにD13S317マーカーの2つの主要な寄与因子の対立遺伝子(F、G)および1つの主要でない対立遺伝子(E)を示す。

【図15-1】図15は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図15Aおよび図15Bは、サンプル細胞のFAM分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図15-2】図15は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図15Cは、母系ゲノムDNAのFAM分析を示す。図15Dは、父系ゲノムDNAのFAM分析を示す。ダッシュ

10

20

30

40

50

およびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図16-1】図16は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図16Aおよび図16Bは、サンプル細胞のVIC分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図16-2】図16は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図16Cは、母系ゲノムDNAのVIC分析を示す。図16Dは、父系ゲノムDNAのVIC分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図17-1】図17は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図17Aおよび図17Bは、サンプル細胞のNED分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルでしか見出されない対立遺伝子を同定する。

【図17-2】図17は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図17Cは、母系ゲノムDNAのNED分析を示す。図17Dは、父系ゲノムDNAのNED分析を示す。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルでしか見出されない対立遺伝子を同定する。

【図18-1】図18は、男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図18Aおよび図18Bは、サンプル細胞のPET分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルでしか見出されない対立遺伝子を同定する。

【図18-2】男性胎児を妊娠して7週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図18Cは、母系ゲノムDNAのPET分析を示す。図18Dは、父系ゲノムDNAのPET分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルでしか見出されない対立遺伝子を同定する。

【図19】図19は、男性胎児を妊娠して9週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図19Aは、母系ゲノムDNAのFAM分析を示す。図19Bは、サンプル細胞のFAM分析を示す。図19Cは、父系ゲノムDNAのFAM分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図20】図20は、男性胎児を妊娠して9週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図20Aは、母系ゲノムDNAのVIC分析を示す。図20Bは、サンプル細胞のVIC分析を示す。図20Cは、父系ゲノムDNAのVIC分析を示す。

【図21】図21は、男性胎児を妊娠して9週の女性の末梢血から単離された4B9細胞からのSTR産物のキャピラリー電気泳動の図である。図21Aは、母系ゲノムDNAのNED分析を示す。図21Bは、サンプル細胞のNED分析を示す。図21Cは、父系ゲノムDNAのNED分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺

10

20

30

40

50

伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルで見出されない対立遺伝子を同定する。

【図 2 2】図 2 2 は、男性胎児を妊娠して 9 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 2 A は、母系ゲノム D N A の P E T 分析を示す。図 2 2 B は、サンプル細胞の P E T 分析を示す。図 2 2 C は、父系ゲノム D N A の P E T 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルで見出されない対立遺伝子を同定する。

【図 2 3 - 1】図 2 3 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 3 A は、母系ゲノム D N A の F A M 分析を示す。図 2 3 B は、サンプル細胞の F A M 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図 2 3 - 2】図 2 3 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 3 C は、サンプル細胞の F A M 分析を示す。図 2 3 D は、父系ゲノム D N A の F A M 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルで見出されない対立遺伝子を同定する。

【図 2 4 - 1】図 2 4 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 4 A は、母系ゲノム D N A の V I C 分析を示す。図 2 4 B は、サンプル細胞の V I C 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図 2 4 - 2】図 2 4 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 4 C は、サンプル細胞の V I C 分析を示す。図 2 4 D は、父系ゲノム D N A の V I C 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図 2 5 - 1】図 2 5 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 5 A は、母系ゲノム D N A の N E D 分析を示す。図 2 5 B は、サンプル細胞の N E D 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図 2 5 - 2】図 2 5 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 5 C は、サンプル細胞の N E D 分析を示す。図 2 5 D は、父系ゲノム D N A の N E D 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【図 2 6 - 1】図 2 6 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 6 A は、母系ゲノム D N A の P E T 分析を示す。図 2 6 B は、サンプル細胞の P E T 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。均一長の短いダッシュによって形成された円は、父親プロファイルで見出されない対立遺伝子を同定する。

【図 2 6 - 2】図 2 6 は、男性胎児を妊娠して 1 2 週の女性の末梢血から単離された 4 B 9 細胞からの S T R 産物のキャピラリー電気泳動の図である。図 2 6 C は、サンプル細胞の P E T 分析を示す。図 2 6 D は、父系ゲノム D N A の P E T 分析を示す。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成された円は、母親プロファイルおよび父親プロ

10

20

30

40

50

ファイルの両方において見出される対立遺伝子を同定する。

【発明を実施するための形態】

【0031】

5. 詳細な説明

5.1. 定義

抗体とは、免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子の可変領域内に位置決めされる少なくとも1つの抗原認識部位によって、標的、例えば炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドその他に特異的に結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書中で用いられる用語は、無傷のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけでなく、その任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）、またはその単鎖、抗体を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他のあらゆる改変された構成をも包含し、例えば、限定されないが、単鎖（s c F v）およびドメイン抗体（例えば、ヒト、ラクダ科動物、またはサメのドメイン抗体）、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v N A R およびビス s c F v が挙げられる（例えば、Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotech 23:1126-1136参照）。抗体は、任意のクラス、例えば I g G、I g A、または I g M（またはそのサブクラス）の抗体が挙げられ、抗体は、任意の特定のクラスである必要もない。その重鎖の定常ドメインの抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは様々なクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンの5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M があり、これらのいくつかはさらに、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、および I g A₂ といったサブクラス（アイソタイプ）に分割され得る。「抗体」はまた、ソーティングおよび検出を容易にするように修飾された前述の各抗体/免疫グロブリンタイプのいずれをも包含し、例えば5.3.5.節に記載されている。

10

20

【0032】

本明細書中で用いられる、抗体の抗原結合部分とは、所与の抗原（例えば標的 X）に特異的に結合する能力を保持する無傷の抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、無傷の抗体の断片によって実行され得る。結合断片の例が、用語「抗原結合部分」内に包含される。

【0033】

生物学的サンプルとは、f N R B C が存在する、または存在すると推測されるサンプルである。特定の実施形態において、生物学的サンプルは、f N R B C が濃縮された母体血液またはその画分（例えば、母体の無核赤血球が枯渇された画分）である。母体血液は典型的に、妊娠の4週目、5週目、6週目、8週目、10週目、12週目、16週目、20週目、24週目、30週目、もしくは38週目に、または前述の実施形態のいずれか2つの間の期間中、例えば4~38週、4~10週、4~16週、4~24週、5~16週、5~24週、5~38週、6~12週、6~16週、6~30週、6~20週、8~38週等の間に1回もしくは複数回、採取される。f N R B C 濃縮用の母体血液を採取するのに最適な妊娠期間は、妊娠約6週~約20週である。この期間中、原始胎児赤血球および完全胎児赤血球の両方が母体循環系中に存在するので、本開示の方法によって濃縮される f N R B C の量が最大にされる。母体血液は、単胎妊娠由来のものであっても多胎妊娠（例えば、双子、三つ子、四つ子）由来のものであってもよく、一方の性別（雄性または雌性）の f N R B C を含んでいても両方の性別の f N R B C を含んでいてもよい。他のタイプの生物学的サンプルは、血漿、柔毛膜柔毛サンプリング（C V S）生検由来の細胞、もしくは経皮的臍帯血サンプリング由来の細胞、またはそれらの画分である。本明細書中で用いられる「生物学的サンプル」は、f N R B C の濃縮または単離に用いられる試薬、例えばバッファ、抗体および核染色剤を含み得る。

30

40

【0034】

抗体に関して本明細書中で用いられる競合とは、第1の抗体がその同種エピトープと結合する結果が、第2の抗体の非存在下での第1の抗体の結合と比較して、第2の抗体の存

50

在下では検出可能に減少するように、第1の抗体またはその抗原結合部分が、第2の抗体またはその抗原結合部分が結合するのに十分に類似した様式でそのエピトープに結合することを意味する。代替的に、第2の抗体がそのエピトープに結合することもまた、第1の抗体の存在下で検出可能に減少することが真であってもよく真である必要もない。すなわち、第1の抗体がそのエピトープに結合するのを第2の抗体が阻害することがなくとも、第2の抗体がそのエピトープに結合するのを第1の抗体が阻害し得る。しかしながら、各抗体が、他の抗体の、その同種のエピトープまたはリガンドと結合することを、同程度であるか、より大きい程度であるか、より小さい程度であるかに拘らず、検出可能に阻害する場合、これらの抗体は互いに、それらの各エピトープの結合について「交差競合」といわれる。競合する抗体または交差競合する抗体の両方が、本開示によって包含される。

10

【0035】

ネガティブ選択とは、混合細胞集団からの、目的の標的細胞以外の細胞の枯渇を指す。ネガティブ選択は、標的細胞には無い（または検出不可能な）マーカーに基づいてよい。ネガティブ選択は、他の基準、例えば、サイズ、形態、または他の物理的特性に基づいてもよい。

【0036】

ネガティブ免疫選択とは、抗体、例えば、目的の標的細胞以外の1つまたは複数の細胞型に選択的に結合するが、標的細胞に特異的に結合しない抗体を利用した細胞の枯渇を指す。

20

【0037】

ネガティブ免疫選択抗体とは、ネガティブ免疫選択に用いられ得る抗体であり、例えば、標的細胞以外の1つまたは複数の細胞型上または細胞型内に存在するが、標的細胞には存在しないマーカーに結合する抗体である。抗体は、細胞表面上のマーカーに結合してもよいし、内部マーカーに結合してもよいが、好ましくは、固定の必要性を回避するように、マーカーは表面マーカーである。

【0038】

ポジティブ選択とは、混合細胞集団からの、目的の標的細胞を含有する細胞の（例えば、濃縮および/または単離目的のための）選択を指す。ポジティブ選択は、標的細胞上または標的細胞内に存在するマーカーに基づいてよい。一部の実施形態において、マーカーは、標的細胞が単離または濃縮されることになる集団（例えば生物学的サンプル）（例えば、標的細胞がfNRCである場合、母体血液または母体血液の画分）中の（標的細胞以外の）1つまたは複数の細胞型には存在しない（または検出不可能である）。更なる実施形態において、マーカーは、標的細胞が単離または濃縮されることになる集団中の目的の標的細胞以外のあらゆる細胞型には存在しない（または検出不可能である）。ポジティブ選択は、他の基準、例えば、サイズ、形態、または他の物理的特性に基づいてもよい。

30

【0039】

ポジティブ免疫選択とは、抗体、例えば、目的の標的細胞上または標的細胞内に存在するマーカーに結合し、これによりポジティブ選択に有用である抗体を利用した細胞の選択を指す。

40

【0040】

ポジティブ免疫選択抗体とは、ポジティブ免疫選択に用いられ得る抗体であり、例えば、標的細胞上または標的細胞内に存在するマーカーに結合する抗体である。一部の実施形態において、抗体は、標的細胞に選択的に結合するが、標的細胞が存在する細胞集団中に存在し得る1つまたは複数の他の細胞型に特異的に結合しない。抗体は、細胞表面上のマーカーに結合してもよいし、内部マーカーに結合してもよいが、好ましくは、固定の必要性を回避するように、マーカーは表面マーカーである。

【0041】

特定の細胞に対する選択的結合とは、混合細胞集団（例えば生物学的サンプル）中の少なくとも1つの細胞型内または細胞型上に存在するが、集団中の他の少なくとも1つの細

50

胞型には存在しない（または検出不可能な）マーカーへの抗体の特異的結合または優先的結合を指す。一例として、細胞型 A、B、C、D、および E を含有する混合細胞集団において、抗体が細胞型 A、または細胞型 A および E にのみ特異的に結合するならば、その抗体は、細胞型 A、または細胞型 A および E にそれぞれ選択的に結合するといわれる。

【0042】

抗体は、他の物質に結合するよりも大きな親和性、結合力をもって、より容易に、かつ/またはより長い持続期間結合するならば、標的に特異的に結合する、または優先して結合する。例えば、fNRBC 上に存在するマーカーに特異的に、または優先して結合する抗体は、このマーカーに、他のマーカーに結合するよりも大きな親和性、結合力をもって、より容易に、かつ/またはより長い持続期間結合する抗体である。特異的結合または優先的結合は、排他的な結合を必ずしも必要とするわけではない（しかし、これを含んでもよい）。通常、「結合」への言及は優先的結合を意味するが、これは必然ではない。

10

【0043】

5.2. 前濃縮

fNRBC の濃縮を向上させるために、以下に記載される、ポジティブ選択ステップ、および場合による選択ステップに先立つ前濃縮ステップが実行されてもよい。例示的な前濃縮プロセスが、以下に記載される。

【0044】

密度分離とは、細胞のサイズ、形状、および密度に応じて、細胞の分離を可能にする技術である。密度勾配は、遠心管において、種々の密度の溶液を積層して、管の底に密度の端部があることによって形成される。細胞は通常、ショ糖または他の不活性炭水化物のゆるやかな勾配上で、比較的低い遠心分離速度でも分離する。

20

【0045】

非連続的密度勾配遠心分離が、末梢血単核細胞を顆粒白血球および赤血球から単離するのに一般的に用いられる。例えば、いわゆる Ficoll 密度分離において、血液全体が FICOLL - PAQUE（登録商標）をおおって積層されてから遠心分離される。赤血球、顆粒白血球、および一部の単核細胞が細胞ペレットに沈降する一方で、残存する単核細胞が、Ficoll 血漿界面に沈降する。Ficoll を利用した例示的な密度分離プロセスが、7.1 節に記載される。

【0046】

代替的に、成体赤血球が、生物学的サンプルからの枯渇のために凝集されてよく、これにより fNRBC を含有する単核細胞画分の濃縮が可能となる。抗凝固処理済み血液が管内で沈降するようにされれば、白血球の前方の赤血球沈殿物、および白血球リッチ血漿層が、1.5 時間以上の後に取り除かれ得る。赤血球は、赤血球の凝集する自然な傾向のため、白血球よりも速く沈殿する。凝集試薬を加えることによって赤血球の沈殿を速めることが可能である。例示的な凝集試薬として、非イオンポリマー、例えば多糖類および合成ポリマーがある。一部の実施形態において、このポリマーは、分子量 60,000 ~ 500,000 のデキストラン、分子量 360,000 のポリビニルピロリドン、および分子量 20,000 のポリオキシエチレン (POE) である。凝集試薬は、生物学的サンプル含有バッファに加えられてもよい。

30

40

【0047】

5.3. fNRBC 濃縮

本開示の方法は、fNRBC の濃縮および/または単離のための 1 つまたは複数のポジティブ選択プロセスを伴い、典型的には、fNRBC に結合する抗体を用いる、少なくとも 1 つのポジティブ免疫選択ステップを伴う。ポジティブ免疫選択は、生物学的サンプルから、fNRBC 以外の 1 つまたは複数の細胞型、例えば母体リンパ球を枯渇させるためにネガティブ選択（例えばネガティブ免疫選択）と一緒に用いられてよい。

【0048】

ポジティブ免疫選択を実践するために、ポジティブ免疫選択抗体が、生物学的サンプルに加えられる。NRBC に結合するのに必要な抗体量は、試験分離および分析を実行する

50

ことによって、実験に基づいて決定され得る。細胞および抗体は、複合体が形成されるのに十分な期間、一般的には少なくとも約5分間、より一般的には少なくとも約10分間、一般的には1時間以下、より一般的には約30分間以下の間、インキュベートされる。

【0049】

生物学的サンプルはさらに、本明細書中に記載される追加のポジティブ選択試薬および/またはネガティブ選択試薬と、同時に、または順次、インキュベートされてよい。

【0050】

細胞は、特定の抗体調製物によって分離される。蛍光色素標識抗体が、FACS分離、免疫磁気選択用の磁性粒子、特に高勾配磁気選別(HGMS)その他に有用である。例示的な磁気分離装置が、国際公開第90/07380号パンフレット、国際出願PCT/US96/00953号明細書、および欧州特許第438,520号明細書に記載されている。

10

【0051】

この選択および/またはネガティブ選択は、他のオートメーション化された方法、例えば限外濾過またはマイクロ流体分離を用いて実行されてよい。

【0052】

5.3.1. ポジティブ選択

本開示のポジティブ選択試薬は、生物学的サンプル中のfNRBCを、当該サンプル中の他の少なくとも1つの細胞型から区別するのに用いられ得るあらゆる試薬であってよい。

20

【0053】

fNRBC濃縮のための好ましいアプローチが、液体培地中で実行されるポジティブ免疫選択法の使用である。典型的に、ポジティブ免疫選択法は、ポジティブ免疫選択抗体を利用する。ある態様において、複数のポジティブ免疫選択抗体が、ポジティブ免疫選択手順に用いられる。

【0054】

したがって、一部の態様において、本開示は、fNRBCを調製する方法であって、fNRBCを含む生物学的サンプルをポジティブ免疫選択にかけることを含み、前記ポジティブ免疫選択は、(a)液体培地中で生物学的サンプルをポジティブ免疫選択抗体と接触させるステップであって、ポジティブ免疫選択抗体は、生物学的サンプル中の1つまたは複数の他の細胞型と比較して選択的にfNRBCに結合する、ステップと；(b)前記ポジティブ免疫選択抗体に結合した細胞を選択するステップとを含む、方法を提供する。

30

【0055】

5.3.2. ポジティブ選択のマーカーおよび抗体

fNRBC用のポジティブ選択マーカーとして、グリコホリンA(CD235aとしても知られている)、「i」抗原、CD36、CD71、および核マーカーが挙げられる。下流の分析が細胞固定を容認する場合(例えばFISH)、胎児ヘモグロビンがポジティブ選択マーカーであってよい。

【0056】

マーカー、グリコホリンA、「i」抗原、CD36、CD71、および胎児ヘモグロビンを発現する細胞は、このマーカーに対する抗体を用いて選択(例えば、ソート、または濃縮)されてよい。

40

【0057】

母体赤血球と対照的に、fNRBCは有核であり、核色素、例えばHoechst 33342、LDS751、TO-PRO、DC-Ruby、およびDAPIを用いて選択され得る。

【0058】

一部の実施形態において、fNRBCは、モノクローナル抗体4B9を用いて選択される。抗体4B9を産生するハイブリドーマは、受託番号DSM ACC 2666 fNRBCの下で、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

50

smen and Zellkulturen GmbHに寄託されている (Hollmannらの米国特許第7, 858, 757号明細書および米国特許第8, 563, 312号明細書参照)。他の実施形態において、fNRBCは、fNRBCの表面への結合に関して4B9と競合する抗体を用いて選択される。一例として、モノクローナル抗体4B8は、fNRBCへの結合に関して4B9と競合する (Hollmannらの米国特許第7, 858, 757号明細書および米国特許第8, 563, 312号明細書参照)。

【0059】

fNRBCに結合する更なる抗体は、Hollmannらに記載される方法を用いて作製され得る。fNRBCへの結合に関して4B9と競合する能力は、競合アッセイを用いて試験され得る。競合アッセイの一例において、4B9抗体が、その標的抗原を (例えば、胎児肝細胞から) 単離するのに用いられ、標的抗原は、固体表面上、例えばマイクロウエルプレート上に付着する。ELISAバッファ中の段階希釈液中のビオチン化非標識4B9または候補競合抗体 (「試験」抗体) の亜飽和量の混合物がウエルに加えられて、プレートが穏やかな振盪と共に1時間インキュベートされる。プレートは洗浄され、ELISAバッファ中に希釈されたHRPコンジュゲートされたストレプトアビジンが各ウエルに加えられ、プレートは1時間インキュベートされる。プレートが洗浄され、結合した抗体が、基質 (例えば、TMB、Bioflex Laboratories Inc.、Md.、Owings Mills) の添加によって検出される。反応は、停止バッファ (例えば、BioFX Stop Reagents、Bioflex Laboratories Inc.、Md.、Owings Mills) の添加によって終了され、吸光度が、マイクロプレートリーダー (例えば、VERSAmax、Molecular Devices、Calif.、Sunnyvale) を用いて、650nmにて測定される。これ以外にも、抗原を単離する代わりに、fNRBC全体が用いられてもよい。一手法において、第1の蛍光色素 (例えばFITC) にコンジュゲートされた1マイクログラム/mlの4B9が、 1×10^5 個の胎児肝細胞を含有するマイクロタイターウエルに加えられる。第2の蛍光色素 (例えばフィコエリトリン) にコンジュゲートされた試験抗体は、10マイクログラム/mlから0.001マイクログラム/mlの濃度によって滴定される (1~2個の5段階希釈液)。平均蛍光強度が、両方の抗体について測定される。試験抗体が基準抗体と同じ濃度かそれよりも低い濃度で加えられた場合に、基準抗体のMFIが少なくとも50%引き下げられれば、試験抗体は4B9と競合するといわれる。一部の実施形態において、MFIは、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%引き下げられる。競合アッセイについての他のフォーマットが、当該技術において知られており、利用されてよい。

10

20

30

40

50

【0060】

5.3.3. ネガティブ選択

典型的に、本開示のネガティブ選択法は、fNRBCを認識しない1つまたは複数の試薬を利用する。ある態様において、試薬は、ネガティブ免疫選択抗体である。

【0061】

したがって、ネガティブ免疫選択は、(a) 液体培地中で生物学的サンプルをネガティブ免疫選択抗体と接触させるステップであって、ネガティブ免疫選択抗体は、fNRBCと比較して選択的に生物学的サンプル中の他の細胞に結合する、ステップと; (b) 前記ネガティブ免疫選択抗体に結合しなかった細胞を選択するステップとを含むことができる。ネガティブ選択は、実行されるならば、ポジティブ免疫選択の前に、後に、またはポジティブ免疫選択と同時に実行されてよい。

【0062】

5.3.4. ネガティブ選択マーカーおよび抗体

ネガティブ選択試薬は、生物学的サンプル中のfNRBC以外の細胞をfNRBCから分離するのに用いられ得るあらゆる試薬であってよい。

【0063】

試薬は、好ましくは、母親細胞、すなわち成熟細胞の細胞表面上に存在するが、fNR

BCの細胞表面上に存在しない抗原に結合する抗体である。別の実施形態において、ネガティブ免疫選択抗体は、抗CD45抗体を含む。好ましくは1つまたは複数の造血細胞表面マーカーに対する、1つまたは複数のネガティブ免疫選択抗体が用いられてよい。例示的な細胞表面マーカーとして、以下が挙げられる：(a) Tリンパ球細胞表面マーカー、例えばCD3、CD4、またはCD8；(b) Bリンパ球細胞表面マーカー、例えばCD19、CD20、またはCD32；(c) panリンパ球マーカー、例えばCD45；(d) NK細胞表面マーカー、例えばCD56；(e) 樹状細胞表面マーカー、例えばCD11cまたはCD23；および(f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、例えばCD14またはCD33。特定の実施形態において、少なくとも2つ、3つ、4つ、または5つのネガティブ免疫選択抗体が用いられる。

10

【0064】

5.3.5. 抗体標識化

好都合にも、本開示のポジティブ選択プロセスおよびネガティブ選択プロセスに用いられる抗体および核染色剤は、他の細胞型からのfNRBCの選択および分離を可能にするように修飾されてよい。修飾された抗体は、ソーティングおよび検出を可能にするあらゆる分子または物質、例えば、磁気ビーズまたは蛍光色素を備えてよい。特定の実施形態において、抗体は、比色分子、蛍光部分、化学発光部分、抗原、酵素、検出可能なビーズ（磁気ビーズまたは高電子密度（例えば金）ビーズ等）、または別の分子に結合する分子（例えば、ビオチンまたはストレプトアビジン）に結合する。

20

【0065】

蛍光色素は、蛍光活性化細胞ソーターに用いられてよい。多色分析が、FACSと共に、または免疫磁気分離およびフローサイトメトリーの組合せで、利用されてよい。多色分析は、複数の表面抗原に基づく細胞の分離を目的とするものである。多色分析に用いられる蛍光色素として、フィコピリタンパク質、例えばフィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオレセインおよびTexasレッドが挙げられる。ネガティブの呼称は、染色のレベルが、アイソタイプ適合ネガティブコントロールの輝度以下であることを示す。薄暗いの呼称は、染色のレベルが、ネガティブ染色のレベルに近くてもよいが、アイソタイプ適合コントロールよりも明るいことを示す。本開示のポジティブ免疫選択抗体は、好ましくは、fNRBCが存在する生物学的サンプル、例えば母体血液中に存在し得るfNRBCに関しては「明るい」と呼称し、1つまたは複数の他の細胞型に関しては「ネガティブ」または「薄暗い」と呼称する。本開示のネガティブ免疫選択抗体は、好ましくは、fNRBCが存在する生物学的サンプル、例えば母体血液中に存在し得るfNRBCに関しては「ネガティブ」または「薄暗い」と呼称し、1つまたは複数の他の細胞型に関しては「明るい」と呼称する。

30

【0066】

一実施形態において、免疫選択抗体は、磁性試薬、例えば超常磁性微粒子（微粒子）に直接的に、または間接的にコンジュゲートする。磁性粒子への直接的なコンジュゲート形成は、当該技術において知られているように、種々の化学連結基の使用によって達成される。抗体は、側鎖アミノ基またはスルフヒドリル基、およびヘテロ機能架橋試薬によって微粒子に結合し得る。実体に連結するための多数のヘテロ機能化合物が利用可能である。好ましい連結基として、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SDPDP)または4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)があり、抗体上に反応性スルフヒドリル基、および磁性粒子上に反応性アミノ基を有する。

40

【0067】

これ以外にも、免疫選択抗体は、磁性粒子に間接的に結合する。抗体は、ハプテンに直接的にコンジュゲートし、ハプテン特異的な第2のステージ抗体が、粒子にコンジュゲートする。適切なハプテンとして、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、FITC、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、ビオチンその他が挙げられる。タンパク質へのハプテンのコンジュゲート法が、当該技術分野において知られており、そのようなコンジュゲート

50

用のキットが市販されている。

【0068】

蛍光標識として、ローダミン、ランタニドリン光体、フルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、GFP（GFPは「緑色蛍光タンパク質」を表す）、ダンシル、ウンベリフェロン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド、ならびにフルオレサミンが挙げられ得る。

【0069】

酵素による標識として、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（「G6PDH」）、アルファ-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、およびペルオキシダーゼが挙げられ得る。

【0070】

化学発光標識または化学ルミネッサ、例えばイソルミノール、ルミノール、およびジオキセタン。

【0071】

他の検出可能な部分として、ビオチン、ジゴキシゲニン、または5-プロモデオキシウリジン等の分子が挙げられる。

【0072】

一部の実施形態において、免疫選択抗体が、選択または検出のために直接的に修飾されずに、一次抗体として用いられる。例えば磁気ビーズまたは蛍光色素への付着によって修飾されている二次抗体が、一次抗体に結合した細胞を選択または検出するために用いられてもよい。

【0073】

5.3.6. 選択技術

免疫選択ステップは、例えば抗体がコーティングされた磁気ビーズを用いる、磁気分離、またはフローサイトメトリーを利用してよい。フローサイトメトリー技術は、例えば蛍光活性化細胞ソーターの使用を介して、正確な分離を実現することができ、これは、精巧さ、例えば多色チャンネル、低角度オブチュズ光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルその他の程度を変えることができるものである。

【0074】

種々の態様において、磁気分離（例えばMACS）およびフローサイトメトリー（例えばFACS）の両方が、fRNBCの濃縮に用いられる。MACSおよびFACSはそれぞれ、ネガティブ選択に用いられてもよいし、ポジティブ選択に用いられてもよいし、両方に用いられてもよい。一部の実施形態において、MACSによるポジティブ選択および/またはネガティブ選択が、FACSによるネガティブ選択および/またはポジティブ選択の前に利用される。したがって、本開示は、（A）MACSによるネガティブ選択、（B）MACSによるポジティブ選択、（C）FACSによるネガティブ選択、および（D）FACSによるポジティブ選択のあらゆる組合せを含む、fNRBCを濃縮する方法を提供する。実施形態の例示的な組合せが、（1）A、次にB、次にD；（2）A、次にD；（3）A、次にB、次に同時にC+D；（4）A、次に同時にC+D；（5）B、次にD；および（6）B、次に同時にC+Dである。前述の選択ステップはそれぞれ、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の試薬、例えば抗体、および、ポジティブ選択の場合には核染色剤を利用してよい。

【0075】

好都合にも、抗体は、標識、例えば磁気ビーズおよび蛍光色素とコンジュゲートされて、他の細胞型からのfNRBCの分離が簡略化される。蛍光色素が、蛍光活性化細胞ソーターに用いられてよい。多色分析が、FACSと共に、または免疫磁気分離およびフローサイトメトリーの組合せで、利用されてよい。多色分析は、複数の表面抗原に基づく細胞の分離を目的とするものである。多色分析に用いられる蛍光色素として、フィコピリタン

10

20

30

40

50

パク質、例えばフィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオレセインおよび T e x a s レッドが挙げられる。ネガティブの呼称は、染色のレベルが、アイソタイプ適合ネガティブコントロールの輝度以下であることを示す。薄暗いの呼称は、染色のレベルが、ネガティブ染色のレベルに近くてもよいが、アイソタイプ適合コントロールよりも明るくてもよいことを示す。本開示のポジティブ免疫選択抗体は、好ましくは、f N R B C が存在する生物学的サンプル、例えば母体血液中に存在し得る f N R B C に関しては「明るい」と呼称し、1つまたは複数（一部の実施形態において、全て）の他の細胞型に関しては「ネガティブ」または「薄暗い」と呼称する。本開示のネガティブ免疫選択抗体は、好ましくは、f N R B C が存在する生物学的サンプル、例えば母体血液中に存在し得る f N R B C に関しては「ネガティブ」または「薄暗い」と呼称し、1つまたは複数の他の細胞型に関しては「明るい」と呼称する。

10

【0076】

一実施形態において、免疫選択抗体は、磁性試薬、例えば超常磁性微粒子（微粒子）に直接的に、または間接的にコンジュゲートする。磁性粒子への直接的なコンジュゲート形成は、当技術分野において知られているように、種々の化学連結基の使用によって達成される。抗体は、側鎖アミノ基またはスルフヒドリル基、およびヘテロ機能架橋試薬によって微粒子に結合し得る。実体に連結するための多数のヘテロ機能化合物が利用可能である。好ましい連結基として、3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (S P D P) または 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (S M C C) があり、抗体上に反応性スルフヒドリル基、および磁性粒子上に反応性アミノ基を有する。

20

【0077】

これ以外にも、免疫選択抗体は、磁性粒子に間接的に結合する。抗体は、ハプテンに直接的にコンジュゲートし、ハプテン特異的な第2のステージ抗体が、粒子にコンジュゲートする。適切なハプテンとして、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、F I T C、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、ビオチンその他が挙げられる。タンパク質へのハプテンのコンジュゲート法が、当技術分野において知られており、そのようなコンジュゲート用のキットが市販されている。

【0078】

ポジティブ免疫選択法を実行するために、ポジティブ免疫選択抗体が、生物学的サンプルに加えられる。N R B C に結合するのに必要な抗体量は、試験分離および分析を実行することによって、実験に基づいて決定され得る。細胞および抗体は、複合体が形成されるのに十分な期間、一般的には少なくとも約5分間、より一般的には少なくとも約10分間、一般的には1時間以下、より一般的には約30分間以下の間、インキュベートされる。

30

【0079】

生物学的サンプルはさらに、本明細書中に記載される付加的なポジティブ免疫選択抗体および/またはネガティブ免疫選択抗体とインキュベートされてよい。標識細胞は、特定の抗体調製物に従って分離される。蛍光色素標識抗体が、F A C S 分離、免疫磁気選択用の磁性粒子、特に高勾配磁気選別 (H G M S) その他に有用である。例示的な磁気分離装置が、国際公開第90/07380号パンフレット、国際出願P C T / U S 96/00953号明細書、および欧州特許第438,520号明細書に記載されている。

40

【0080】

ポジティブ免疫選択および/またはネガティブ免疫選択は、他のオートメーション化された方法、例えば限外濾過またはマイクロ流体分離を用いて実行されてよい。

【0081】

本開示の方法は、好ましくは、液相での1つまたは複数のポジティブ免疫選択ステップにより、そして、可溶性フォーマットの、すなわち固体表面上に固定されていない1つまたは複数のポジティブ免疫選択抗体により実行される。本開示の方法は、ポジティブ抗体および/または免疫選択抗体が固体表面に結合されている、1つまたは複数のステップを組み込むように適合され得る。細胞捕捉用の、固体表面上への4 B 9 の固定は、例えば、

50

2011年11月14日に出願され、2013年5月16日に米国特許出願公開第2013/0122492号明細書として公開された米国特許出願公開第13/295,532号明細書に記載されており、この出願の内容は、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0082】

5.4. 下流の単離技術

ポジティブ選択（そして、場合によってはネガティブ選択）の後、fNRBCが、固体表面（例えば、ポジティブ免疫選択抗体結合細胞を捕捉するために4B9または二次抗体等のポジティブ免疫選択抗体を有する）上での捕捉、または物理的技術、例えば顕微操作によって単離され得る。

10

【0083】

ポジティブ免疫選択抗体に付着した検出可能な部分が、胎児NRBCを同定して単離するのに用いられてよい。顕微操作は、顕微鏡下で、または他の視覚強化もしくは視覚支援により実行されてよい。顕微操作は、オートメーション化されたプロセスにより、またはマニュアルの顕微操作装置を用いて、実行されてよい。例えば、顕微操作は、単一のfNRBCまたは複数のfNRBCを選択することも単離することもできる。例えば、1、5、10または20個の細胞の群が、顕微操作によって単離されて、1、5、10または20個の細胞の個々のサンプルチューブ内に入れられてよい。一部の実施形態において、1~20個の細胞、例えば、1~5個の細胞、1~10個の細胞、5~20個の細胞、または5~10個の細胞の、1、2、3、4、または5つの群が、顕微操作によって単離される。

20

【0084】

一部の実施形態において、付加的な単離技術（例えば顕微操作）は、細胞を濃縮するのに利用される蛍光標識、fNRBC中のヘモグロビンの存在（ソーレー帯フィルターによって検出可能）、およびfNRBCの形態的特徴を活用してよい（Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35）。

【0085】

5.5. fNRBCの集団

本開示はさらに、本明細書中に記載される方法によって調製される、または得ることができるfNRBCの調製物を提供する。例示的な調製物として、fNRBCを含む細胞の集団が挙げられる。

30

【0086】

一部の実施形態において、細胞の集団は、6節に記載されるワークフローのいずれによっても、母体血液、例えば妊娠約4週から約38週の間、または妊娠約6週から約20週の間採取された母体血液から得られる、または得ることができる。一部の実施形態において、ワークフローは、ポジティブ濃縮および/またはネガティブ濃縮の、間に入るMACSステップの有無に拘らず、密度勾配分離およびフローサイトメトリー（例えばFACS）を伴う。

【0087】

ある態様において、集団はおおよそ10、25、50、100、200、300、500もしくは1,000個の細胞、またはFACS「事象」を含み、あるいは集団は、同様に、前述の値のいずれかの対間、例えばおおよそ25~200、おおよそ50~500、おおよそ10~300、おおよそ50~1,000個の細胞、またはFACS「事象」等の範囲であるいくつかの細胞またはFACS「事象」を含む。好ましくは、細胞の少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、もしくは少なくとも20%はfNRBCであり、またはFACS「事象」の少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、もしくは少なくとも20%は、fNRBCに相当する。一部の実施形態において、集団中のfNRBC、またはfNRBCに相当するFACS「事象」のパーセンテージは、同様に、前述の値のいずれか2つ

40

50

の間、例えば、2%～20%、5%～10%、5%～20%、3%～15%等の範囲である。

【0088】

fNRBCは、原始fNRBCであっても、完全fNRBCであっても、両方の混合物であってもよい。一部の実施形態において、原始fNRBCと完全fNRBCの比率は、妊娠約6週から約20週の間母体血液で見られる比率である。fNRBCは、抗体、例えば本明細書中に記載されるポジティブ免疫選択抗体の1つもしくは複数に結合されていてもよいし、抗体を有さなくてもよい。そのような抗体を有さないfNRBCは、例えば、ポジティブ免疫選択抗体を細胞から剥がすことによって調製され得る。

【0089】

fNRBCが母体血液サンプルから調製される場合、集団中の残存細胞は典型的に、妊娠期間中の母体血液中に存在する1つまたは複数の細胞型である。母親細胞は、抗体、例えば本明細書中に記載されるネガティブ免疫選択抗体の1つまたは複数に結合されてもよいし、さらにポジティブ免疫選択抗体の1つまたは複数に結合されてもよいし、抗体を有さなくてもよい。そのような抗体を有さない母親細胞は、例えば、あらゆる結合抗体を細胞から剥がすことによって調製され得る。

【0090】

5.6. fNRBCの確認

例えば、ショートタンデムリピート(STR)分析、制限酵素断片長多型(RFLP)分析、または単一ヌクレオチド多型(SNP)分析を用いて遺伝的プロファイルを得ることを含む遺伝的フィンガープリント法が、本明細書中に記載される方法によって単離されるfNRBCを胎児細胞と確認するために用いられ得る。単離細胞から得たプロファイルを、母親細胞、および場合により父親細胞から得たプロファイルと比較することによって、単離細胞が胎児細胞であることが確認され得る。遺伝的プロファイルを得る適切なキットが市販されている。例えば、fNRBCが何であることを確認するために用いられ得るPromegaのPowerPlex(登録商標)Fusion STRキットおよびAffymetrixのGenome-Wide Human SNP Array 6.0がそれぞれ、STRプロファイルおよびSNPプロファイルを得るのに用いられ得る。一部の実施形態において、全ゲノム増幅(WGA)が、分析に利用可能な遺伝物質の量を増大させるのに用いられる。

【0091】

5.7. 下流の分析

調製物は、例えば多胎妊娠または胎児異常の存在を判定する、胎児診断試験に用いられ得る。試験され得る異常の例として、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21、ダウン症候群、圧迫性麻痺の傾向がある神経障害、神経線維腫症、アラジール症候群、軟骨形成不全、ハンチントン舞蹈病、アルファ-マンノース症、ベータ-マンノース症、異染性ロイコジストロフィー、フォンレックリングハウゼン病、結節性硬化症、筋強直性ジストロフィー、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ-サックス病、ベータ-サラセミア、ムコ多糖症、フェニルケトン尿症、シトルリン尿症、ガラクトース血症、ガラクトキナーゼおよびガラクトース4-エピメラーゼ欠乏症、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症、メチルマロン酸尿症、プロピオン酸血症、ファーバー病、フコシドーシス、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、I細胞病、ムコリピドーシスIII、ニーマン-ピック病、シアリドーシス、ウォールマン病、ツェルヴェーガー症候群、シスチン症、第X因子欠乏症、毛細血管拡張性運動失調、ブルーム症候群、ローベルト症候群、色素性乾皮症、脆弱(X)症候群、性染色体異数性、クラインフェルター症候群、ターナー症候群、XXX症候群、ステロイドスルファターゼ欠乏症、線形の皮膚欠損を伴う小眼球症、ペリツェウス-メルツパッヒャー病、Y染色体上の精巢決定因子、オルニチンカルバモイル転移酵素欠乏症、ブドウ糖6-リン酸脱水素酵素欠乏症、レッシュ-ナイハン症候群、アンダーソン-ファブリ疾患、血友病A、血友病B、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、dup(17)(p11.2p11.2)症候群、16

10

20

30

40

50

p 1 1 . 2 欠失、1 6 p 1 1 . 2 重複、ミトコンドリア欠損、dup (2 2) (q 1 1 . 2 q 1 1 . 2) 症候群、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、ウォルフ - ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス - ボイレン症候群、シャルコー - マリー - ツース病、染色体再配列、染色体欠失、スミス - マゲニス症候群、口蓋心臓顔貌症候群、ディジョージ症候群、1 p 3 6 欠失、ブラダー - ヴィリ症候群、無精子症 (因子 a)、無精子症 (因子 b)、無精子症 (因子 c)、脊椎披裂、無脳症、神経管欠損、小頭症、水頭症、腎欠損、カルマン症候群、副腎發育不全、アンゲルマン症候群、嚢胞腎、嚢胞性ヒグローマ、胎児水症、臍ヘルニアおよび胃壁裂、横隔膜ヘルニア、十二指腸閉鎖症、骨格形成異常、口唇裂、口蓋裂、アルギニノコハク酸尿、クラッペ病、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症、3 - メチルクロトニル補酵素 A カルボキシラーゼ欠乏症、糖原病、副腎過形成、低フォスファターゼ症、胎盤ステロイドスルファターゼ欠乏症、重症合併型免疫不全症候群、T 細胞免疫不全、エーラーズ - ダンロー症候群、骨形成不全症、成人多嚢胞性腎疾患、ファンコーニ貧血、表皮水泡症候群、発汗減少症性外胚葉性形成異常、先天性ネフローゼ (フィンランド型)、ならびに多発性内分泌腫瘍が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

診断アッセイは、核酸 (例えば、DNA または RNA) アッセイであってもよいし、タンパク質 (例えば、抗体ベースの) アッセイであってもよいし、組織学的アッセイであってもよいし、それらの組合せであってもよい。DNA アッセイの例として、FISH アッセイ、PCR アッセイ、および DNA 配列決定アッセイが挙げられる。RNA アッセイの例として、RT - PCR アッセイおよび FISH アッセイが挙げられる。核酸へのアクセスを容易にするために、fNRC は、診断試験を実行する前に、溶解させてもよいし、透過性にさせてもよい。DNA、RNA、およびタンパク質アッセイは、マイクロアレイ上で実行されてもよい。実例となる方法が、以下に記載される。

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態において、単細胞または 2 から 4 個もしくはそれ以上の細胞の群が、全ゲノム増幅 (WGA) によって増幅されて、分析に十分な核酸が提供されてよい。5 個以上の胎児 NRC を含有する細胞の群であれば、全ゲノム増幅 (WGA) を用いずに分析され得る。WGA は、個体の細胞または細胞の群の全ゲノムの増幅を指す。例えば、全ゲノムは、単細胞 (すなわち、単細胞全ゲノム増幅 (SCWGA)) の遺伝物質を用いて増幅され得る。

【 0 0 9 4 】

染色体異常、単一遺伝子異常、対立遺伝子変異、および単一ヌクレオチド多型 (SNP) が、本開示の方法によって生成された溶解胎児 NRC 由来の染色体または核酸を用いて、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル (MALBAC)、制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析、および DNA 配列決定を含む種々の方法のいずれによっても検出可能である。PCR 技術は、単純な PCR 増幅技術であっても、定量 PCR であっても、リアルタイム PCR であっても、逆転写酵素 PCR 技術であってもよい。他の有用な遺伝的分析技術として、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH)、および DNA マイクロアレイでの分析が挙げられる。例えば、胎児 NRC は、出生前染色体マイクロアレイで分析されてよい。

【 0 0 9 5 】

ハプロタイプは、一染色体上に一緒に、かつ隣接する位置に起こる対立遺伝子の組合せである。ハプロタイプは、単一遺伝子座上に、またはいくつかの遺伝子座に見出される。ハプロタイプは、染色体全体の至る所に起こり得る。ハプロタイプは、いかなる数の組換え事象を含んでいてもよい。ハプロタイプは、一組の関連する単一ヌクレオチド多型を指してもよい。

【 0 0 9 6 】

正常な (例えば、野生型の) ヌクレオチド配列から単一ヌクレオチド (例えば、A、T、C、または G) の変異があった場合に、単一ヌクレオチド多型 (SNP) が生じる。例

えば、単一ヌクレオチド多型が、対立遺伝子変異をもたらし得る。所与の対立遺伝子が、単一ヌクレオチド多型によって、または複数のヌクレオチド変化によって定義され得る。

【0097】

制限酵素断片長多型(RFLP)は、DNAの相同配列における差異である。この多型は、特定の制限酵素または制限酵素の組合せを用いて、DNAの消化後に見出される断片長の差異によって検出され得る。RFLPは、ゲル電気泳動またはサザンブロットによって判定され得る。

【0098】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)は、蛍光プローブを、蛍光プローブの核酸配列に相補的な、固定された核酸配列の一部に結合させることによって実行される。FISHは、より大きな核酸配列内で核酸配列が出現する特定の位置にて、RNAまたはDNA内の標的核酸配列に蛍光タグを付けるために用いられ得る。例えば、FISHは、染色体上の標的配列にタグを付けるために用いられ得る。蛍光プローブは、蛍光顕微鏡を用いて見ることができる。

10

【0099】

PCRは、2つのプライマーを用いて、特定の核酸配列の1つまたは複数のコピー(すなわち、アンプリコン)を増幅するのに用いられる。PCR法は容易に利用可能であり、遺伝病を診断するのに一般的に用いられている。

【0100】

定量PCR(qPCR)は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づくものであり、核酸配列の総コピー数または相対コピー数を増幅すると同時に定量化するのに用いられる。qPCRの一例として、リアルタイムPCRがある。リアルタイムPCRにおいて、PCRに由来する核酸コピー数または相対数が、リアルタイムで検出される。qPCRによって生成されるコピーの数または相対数は、蛍光色素によって発生するシグナルを用いて検出かつ定量化され得る。

20

【0101】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は、RNA分子をDNAコピー(cDNA)に転写してこのDNAを増幅することによって、RNA分子を検出する、または特定のRNA配列(例えばmRNA)の発現レベルを判定するために用いられ得る方法である。RT-PCRは、ワンステッププロセスまたはツーステッププロセスによって実行され得る。

30

【0102】

アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(アレイCGH)は、ゲノム全体のスケールで起こる染色体コピー数変異を判定するのに用いられるマイクロアレイ技術である。アレイCGHは、試験ゲノムを正常な(例えば野生型)ゲノムと比較して、比較的小さな(例えば200塩基対)構造変異ですらも検出する。例えば、アレイCGHは、欠失、増幅、切断点、または異数性を検出することができる。アレイCGHはまた、発癌の素因を検出するのに用いられ得る。

【0103】

多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル(MALBAC)は、全ゲノム増幅法である。MALBACは、単細胞の全ゲノム増幅に用いられ得る。MALBACは、準線形的にゲノムを増幅し、かつあるDNA配列の優先増幅を回避するのに用いられ得る。MALBACにおいて、アンプリコンが相補的な端部を有し、これらがアンプリコン中にループを形成するので、アンプリコンの指数関数的コピーを妨げ得る。アンプリコンループは、増幅バイアスを妨げ得る。MALBACは、単一のfNRBCを用いて胎児異常を診断するのに適用されてもよいし、単一のfNRBCを用いて発癌の胎児素因を同定するのに用いられてもよい。

40

【0104】

次世代シーケンシング(NGS)は、胎児異常を検出するのに用いられ得る一群の高スループット配列決定技術である。NGS(例えば大規模並列シーケンシング)は、単細胞

50

と同じくらい小さな細胞サンプルを用いて、核酸配列の大きなストレッチまたは全ゲノムを配列決定する。例えば、NGSにおいて、多くの比較的小さな核酸配列が、小さなセグメントのライブラリ由来のゲノムDNA (gDNA) サンプルから同時に配列決定(すなわち、リード)され得る。リードはその後、再構成されて、染色体の大きな核酸配列または完全な核酸配列が同定され得る。例えば、NGSにおいて、500,000もの配列決定操作が同時にランされ得る。NGSは、単細胞の、全ゲノム増幅(WGA)の形態である。例えば、従来のPCRを伴う場合、MALBACがNGSに用いられ得る。

【0105】

大規模並列処理特徴シーケンシング(MPSS)は、NGSの一例である。MPSSは、17~20塩基対のシグネチャプライマー配列からのmRNA転写物を識別する。MPSSは、サンプル中のmRNA転写物を同定し、かつこれを定量するのに利用され得る(Brenner et al., 2000, Nature biotechnology 18(6): 630-634, 2000)。

10

【0106】

ポロニーシーケンシングは、NGSの別の例である。ポロニーシーケンシングは、何百万もの固定化DNA配列を同時に読むのに用いられ得る。ポロニーシーケンシングは、非常に正確である(エラー率が低い)ことが見出されたマルチプレックス配列決定技術である(Shendure et al., 2004, Nature Reviews Genetics 5(5): 335-344, 2004, Shendure et al., 2008, Nature Biotech 26(10): 1135-1145)。

【0107】

454パイロシーケンシングは、NGSの別の例である。454パイロシーケンシングは、ルシフェラーゼを利用して、発生期のDNAに加えられる個々のヌクレオチドを検出するものである。454パイロシーケンシングは、油溶液中の水の小滴内に含有されるDNAを増幅する。水の各小滴が、プライマーコーティングされたビーズに付着した1つのDNAテンプレートを含有する(Vera et al., 2008, Molecular Ecology 17(7): 1636-1647)。

20

【0108】

Illuminaシーケンシングは、NGSの別の例である。Illuminaシーケンシングにおいて、DNA分子およびプライマーが、スライドに付着する。DNA分子は、ポリメラーゼによって増幅されて、DNAコロニー(DNAクラスタ)が形成される(Shendure et al., 2008, Nature Biotech 26(10): 1135-1145, Meyer et al., 2010, Cold Spr Hbr Protocols 2010(6): pdb-prot 5448)。

30

【0109】

オリゴヌクレオチドのライゲーションおよび検出によるシーケンシング(SOLIDシーケンシング)は、NGSの別の例である。SOLIDシーケンシングは、ライゲーションによるシーケンシング法である。SOLIDシーケンシングは、何千もの小さな配列リードをランダムに同時に生成して、配列決定用の固体支持体上にDNA断片を固定する(Shendure et al., 2008, Nature Biotech 26(10): 1135-1145, Meyer et al., 2009, New Biotechnology 25(4): 195-203)。

【0110】

Ion Torrent半導体シーケンシングは、NGSの別の例である。Ion Torrent半導体シーケンシングは、DNA重合中に放出される水素イオンを検出する、合成による配列決定法である。デオキシリボヌクレオチド三リン酸が、配列決定されるべきテンプレートDNA鎖を含有するマイクロウェル中に導入される。dNTPが、リーディングテンプレートヌクレオチドと相補的である場合、dNTPは相補的なDNA鎖中に組み込まれて、水素イオンが放出される(Quail et al., 2012, BMC Genomics 13(1): 341)。

40

【0111】

DNAナノボールシーケンシングは、NGSの別の例である。DNAナノボールシーケンシングは、生物、例えば新たに発見された生物等の全ゲノム配列を決定するのに用いられ得る。ゲノムDNAの小断片が、ローリングサークル複製を用いて増幅されて、DNA

50

ナノボールが形成される。DNA配列はその後、蛍光プローブをガイドとして用いてライゲーションされ得る (Ansorge et al., 2009, *New Biotechnology* 25(4): 195-203、Drmanac et al., 2010, *Science* 327(5961): 78-81)。

【0112】

Heliscope単分子シーケンシングは、NGSの別の例である。Heliscope単分子シーケンシングは、ライゲーションまたはPCR増幅を必要としない直接配列決定アプローチである。DNAが切断されて、ポリA尾部が付けられてから、オリゴ(dT)によりフロー細胞の表面にハイブリダイズされる。何十億もの分子がその後、同時に配列決定され得る (Pushkarev et al., 2009, *Nature Biotechnology* 27(9): 847-850)。

10

【0113】

単分子リアルタイム(SMRT)シーケンシングは、NGSの別の例である。SMRTシーケンシングは、合成による配列決定アプローチである。DNAが、ゼロモード導波管(ZMW)と呼ばれる小さなウェル様コンテナ中で合成される。ZMWの底部に付着した未修飾ポリメラーゼが、溶液中に自由に流れる蛍光標識ヌクレオチドと協働して、DNAを配列決定するのに用いられる。ヌクレオチドがDNA鎖中に組み込まれると、蛍光標識がヌクレオチドから切り離される (Flusberg et al., 2010, *Nature methods* 7(6): 461-465)。

【0114】

ウルトラディープシーケンシングは、多くのテンプレートコピーから核酸配列が決定される回数に言及する。ウルトラディープシーケンシングは、稀な突然変異を含有するかもしれない比較的小さな標的核酸配列を増幅することによって、稀な遺伝的突然変異を同定するのに用いられ得る。

20

【0115】

DNAマイクロアレイは、複数の遺伝子の発現レベルを同時に測定するのに用いられ得る。DNAマイクロアレイはまた、ゲノムの遺伝子型複数領域に用いられ得る。例えば、出生前染色体マイクロアレイ(CMA)が、コピー数変異、例えば染色体の異数性を検出するのに用いられ得る。出生前CMAは、染色体の全てまたは一部の欠失または重複を検出し得る。

【0116】

5.8.キット

本開示はさらに、本開示のポジティブ免疫選択法に有用な1つまたは複数の抗体であって、先の5.3.2節に記載されるような抗体を含むキットを提供する。一部の実施形態において、キットは抗体4B9を含む。抗体は、検出可能な部分、例えば、ビオチンまたは蛍光部分に付着し得る。抗体がビオチン化されるならば、キットはアビジンコンジュゲートされた検出試薬(すなわち、抗体)を含んでいてもよい。

30

【0117】

キットはまた、1つまたは複数のネガティブ免疫選択抗体、例えば先の5.3.4節に記載される標的に対する抗体を含んでいてもよい。ネガティブ免疫選択抗体は好ましくは、ポジティブ免疫選択抗体に付着する検出可能部分と区別可能である検出可能部分に付着する。

40

【0118】

キットはまた、fNRBCのより良好な選択のための核染色剤を含んでいてもよい。

【0119】

fNRBCの濃縮用抗体を用いるのに有用なバッファ等は、当該技術において周知であり、エンドユーザによって調製されてもよいし、キットの構成要素として提供されてもよい。キットはまた、ポジティブコントロール組織サンプルおよびネガティブコントロール組織サンプル、例えば、ポジティブコントロールとしての胎児肝細胞および/またはネガティブコントロールとしての成体血液もしくは成体血液の細胞成分を含有する固体支持体を含んでいてもよい。

50

【 0 1 2 0 】

キットはまた、胎児細胞診断に適した1つまたは複数の試薬、例えば先の5.7節に記載される診断法を実行するのに適した試薬を含んでいてもよい。例示的な実施形態において、試薬として、例えばPCRもしくは配列決定用の、プライマー、および/または、場合により、例えば胎児細胞異常の検出用の、プローブが挙げられる。

【 0 1 2 1 】

6. 例示的なワークフロー

図1および図2は、fNRBCの濃縮および/または単離のための一部の例示的なワークフローを示す。本開示の方法は、図1もしくは図2に表される完全なワークフロー、またはfNRBCを濃縮または単離するのに適したワークフローからのステップの組合せを伴ってもよい。

10

【 0 1 2 2 】

図1を参照すると、例示的なワークフローが、前濃縮ステップ(3)から始まり、濃縮(4)が続く。前濃縮は、5.2節または7.1節の方法に従って実行され得る。濃縮は、例えば5.3節、7.2節、および7.3節に記載される、磁気細胞ソーティングを用いたポジティブ選択および/またはネガティブ選択を伴ってよい。結果として生じた細胞集団は、(i)直接的にソートされ(4b)、かつ分析され(7)、(ii)顕微操作されて、個々のfNRBCもしくはfRNBCのプールが単離され(4a)、かつ分析され(7)、(iii)蛍光染色され(5)、フローサイトメトリーにかけられ(6)、直接的にソートされ(6b)、かつ分析(7)され、または(iv)フローサイトメトリーにかけられ(6)、顕微操作されて、個々のfNRBCもしくはfNRBCのプールが単離され(6a)、分析される(7)。顕微操作は、7.6節に記載されるように実行されてよい。分析は、fNRBCの、胎児のものであるかの確認(例えば、5.6節に記載される)を試験すること、および/または下流の分析、例えば、多胎妊娠または胎児異常(例えば、5.7節に記載される)について試験することを伴ってよい。fNRBCゲノムは、確認および/または下流の分析の前に、全ゲノム増幅にかけられてよい。同じ核酸サンプル(細胞から直接抽出されたもの、または増幅、例えば全ゲノム増幅後のもの)は、確認および下流の分析の両方に用いられてよい。前濃縮(3)および濃縮(4)は、7節に記載される例示的なプロトコルのいずれの組合せ#1~#18も使用することができる。フローサイトメトリーを伴うワークフローについて、濃縮された(例えば、磁氣的にソートされた)細胞集団は、フローサイトメトリーの前に、例えば7節に記載されるように、蛍光染色されてよい。染色は、直接的に標識された免疫選択抗体および/または核色素(例えば、5.3.5節に記載される)を利用してもよいし、標識されている二次抗体を利用してもよい。一部の実施形態において、磁気ソーティングに用いられる一次抗体を標識するのに二次抗体が用いられる。一部の実施形態において、一次抗体は4B9である。一部の実施形態において、フローサイトメトリーは、fNRBCの選択用の少なくとも2つまたは少なくとも3つの試薬、例えば、以下のいずれか2つまたは3つ全てを利用する：4B9抗体、抗CD235a抗体、および核染色剤。ポジティブ選択が用いられるならば、モノクローナル抗体4B9は、ポジティブ選択試薬として用いられ得る。ネガティブ選択が用いられるならば、抗CD45抗体は、ネガティブ選択試薬として用いられ得る。

20

30

40

【 0 1 2 3 】

また、図1を参照すると、別の例示的なワークフローが、前濃縮ステップ(3)から始まり、蛍光染色(5)およびフローサイトメトリー(6)が続く。フローサイトメトリーの後に直接ソーティング(6b)および分析(7)が続いてもよいし、個々のfNRBCまたはfRNBCのプールを単離する顕微操作(6a)および分析(7)が続いてもよい。顕微操作は、7.6節に記載されるように実行されてよい。分析は、fNRBCの、胎児のものであるかの確認(例えば、5.6節に記載される)を試験すること、および/または下流の分析、例えば、多胎妊娠または胎児異常(例えば、5.7節に記載される)について試験することを伴ってよい。fNRBCゲノムは、確認および/または下流の分析の前に、全ゲノム増幅にかけられてよい。同じ核酸サンプル(細胞から直接抽出されたも

50

の、または増幅、例えば全ゲノム増幅後のもの)は、確認および下流の分析の両方に用いられてよい。フローサイトメトリーの前に、前濃縮された細胞集団は、例えば本節に記載されるように、蛍光染色されてよい。染色は、直接的に標識された免疫選択抗体および/または核色素(例えば、5.3.5節に記載される)を利用してもよいし、標識されている二次抗体を利用してもよい。一部の実施形態において、フローサイトメトリーは、fNRBCの選択用の少なくとも2つまたは少なくとも3つの試薬、例えば、以下のいずれか2つまたは3つ全てを利用する: 4B9抗体、抗CD235a抗体、および核染色剤。

【0124】

図2を参照すると、例示的なワークフローが、例えば7.1節に記載される、Ficol11分離ステップから始まり、例えば5.3節、7.2節、および7.3節に記載される、磁気細胞ソーティング(ネガティブおよび/またはポジティブ)が続く、(A)FISH、(B)個々のfNRBCもしくはfRNBCのプールを単離する顕微操作、または(C)fNRBCをソートするFACSが続く。FACSの後に顕微操作が続いてもよい。顕微操作(B)は、7.6節に記載されるように実行されてよい。顕微操作の後、選択されたfNRBCは、胎児のものであるか確認されてよく(例えば、5.6節に記載される)、かつ/または下流の分析、例えば、多胎妊娠または胎児異常(例えば、5.7節に記載される)についての試験にかけられてよい。fNRBCゲノムは、確認および/または下流の分析の前に、全ゲノム増幅にかけられてよい。同じ核酸サンプル(細胞から直接抽出されたもの、または増幅、例えば全ゲノム増幅後のもの)は、確認および下流の分析の両方に用いられてよい。Ficol11分離および磁気細胞ソーティングステップは、7節に記載される例示的なプロトコルのいずれの組合せ#1~#18も利用することができる。FACSソーティングを伴うワークフローについて、磁氣的にソートされた細胞集団は、FACSの前に、例えば7節に記載されるように、蛍光染色されてよい。染色は、直接的に標識された免疫選択抗体および/または核色素(例えば、5.3.5節に記載される)を利用してもよいし、標識されている二次抗体を利用してもよい。ある態様において、二次抗体が、FACS分析のための磁気ソーティングに用いられる一次抗体を標識するのに用いられる。一部の実施形態において、一次抗体は、4B9である。一部の実施形態において、FACSソーティングは、fNRBCの選択用の少なくとも2つまたは少なくとも3つの試薬、例えば、以下のいずれか2つまたは3つ全てを利用する: 4B9抗体、抗CD235a抗体、および核染色剤。磁気ソーティングがポジティブ選択に用いられるならば、モノクローナル抗体4B9は、ポジティブ選択試薬として用いられ得る。磁気ソーティングがネガティブ選択に用いられるならば、抗CD45抗体は、ネガティブ選択試薬として用いられ得る。

【0125】

fNRBCの分析を伴う前述の各ワークフローの一部の実施形態において、fNRBCゲノムは、染色体コピー数について分析される。染色体コピー数は、FISHによって分析されてもよいし、細胞から増幅されたDNAの定量によって、例えば、全ゲノム増幅または定量PCRによって分析されてもよい。

【0126】

7. 例示的なプロトコル

7.1節の密度分離プロトコル、7.2節のネガティブ選択プロトコル、および/または7.3節のポジティブ選択プロトコルの種々の組合せが、fNRBCおよび母親細胞、例えば母体血液を含むサンプルからNRBCを濃縮するのに用いられる。例えば、以下のプロトコルの組合せが、本開示の範囲内である。濃縮の後、濃縮されたNRBCは、更なる分析のために、例えば7.4節に記載される蛍光染色にかけられてよい。分析の前に、NRBCはさらに、FACSによって、例えば図1および図2に示されるワークフローを利用することによって、濃縮されてよい。

【0127】

組合せ#1: 密度分離プロトコル#1とポジティブ選択プロトコル#1。

【0128】

- 組合せ # 2 : 密度分離プロトコル # 1 とポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 2 9 】
- 組合せ # 3 : 密度分離プロトコル # 2 とポジティブ選択プロトコル # 1。
【 0 1 3 0 】
- 組合せ # 4 : 密度分離プロトコル # 2 とポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 3 1 】
- 組合せ # 5 : 密度分離プロトコル # 3 とポジティブ選択プロトコル # 1。
【 0 1 3 2 】
- 組合せ # 6 : 密度分離プロトコル # 3 とポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 3 3 】 10
- 組合せ # 7 : 密度分離プロトコル # 1 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 1。
【 0 1 3 4 】
- 組合せ # 8 : 密度分離プロトコル # 1 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 3 5 】
- 組合せ # 9 : 密度分離プロトコル # 2 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 1。
【 0 1 3 6 】
- 組合せ # 1 0 : 密度分離プロトコル # 2 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 3 7 】 20
- 組合せ # 1 1 : 密度分離プロトコル # 3 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 1。
【 0 1 3 8 】
- 組合せ # 1 2 : 密度分離プロトコル # 3 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 2。
【 0 1 3 9 】
- 組合せ # 1 3 : 密度分離プロトコル # 1 とポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 0 】 30
- 組合せ # 1 4 : 密度分離プロトコル # 2 とポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 1 】
- 組合せ # 1 5 : 密度分離プロトコル # 3 とポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 2 】
- 組合せ # 1 6 : 密度分離プロトコル # 1 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 3 】
- 組合せ # 1 7 : 密度分離プロトコル # 2 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 4 】 40
- 組合せ # 1 8 : 密度分離プロトコル # 3 と、ネガティブ選択プロトコル # 1 と、ポジティブ選択プロトコル # 3。
【 0 1 4 5 】

7 . 1 . 密度分離

7 . 1 . 1 . 密度分離プロトコル # 1

以下の例示的な密度分離プロトコル # 1 は、本開示の方法に用いるのに適している :

1 . ある量の密度分離媒体を、多孔質バリアが管内に配置された遠心管、例えば *Leucosep* (登録商標) 管に加える。多孔質バリアの下方において管を媒体で満たすために、管を、例えば $230 \times g$ にて 1 分間、遠心分離する。管に加える媒体の量は、遠心分離後の多孔質バリアの下方における管の部分を満たすのに十分な量であるべきである。遠

心分離後、もし残っていれば、多孔質バリアよりも上方にある媒体は全て捨てる。多孔質バリアの無い遠心管が、本開示の方法において密度分離に用いられてもよいが、多孔質バリアを有する遠心管を用いれば、サンプルが媒体と混合するのが妨げられ、不連続勾配が維持され、かつ分離が向上する。

2. ある量の血液を遠心管に加える。血液を処理して、例えば血液を、2 mM EDTA を含有するリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2等のバッファで希釈して、分離の向上を補助してよい。ゆえに、遠心管に加える血液を処理してよく、例えばバッファで希釈する。

3. 管を遠心分離して、例えば管を1000 x gにて20分間遠心分離することによって、多孔質バリアの上方に、プラズマ層および濃縮された細胞画分を形成させる。

4. 多孔質バリアの上方にある全て(血漿、PBMCその他)を第2の遠心管に移す。

5. 洗浄バッファ、例えば、PBS + 2 mM EDTA、pH 7.2を第2の遠心管に加えて混合する。その後、第2の遠心管を、例えば450 x gにて10分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

6. ペレットを乱すことなく、上澄みを完全に吸引除去する。

7. ペレットを洗浄バッファで再懸濁させる。

8. 再懸濁したペレットを遠心分離して細胞を再びペレット化させる。

9. ペレットを乱すことなく、上澄みを完全に吸引除去する。

【0146】

洗浄ステップ5~9は、密度分離媒体および血漿を濃縮細胞から取り除いて、以降の処理ステップの収率を向上させることができる。

【0147】

7.1.2. 密度分離プロトコル#2

ステップ2の後にリンスステップ2.1を加えることによって改変された密度分離プロトコル#1が、密度分離プロトコル#2である：

2.1 ステップ2において遠心管に加えられた血液を含有したコンテナに洗浄バッファを加えてから、洗浄バッファを遠心管に加える。

【0148】

このリンスステップ2.1は、fNRBCの収率を増大させることができる。

【0149】

7.1.3. 密度分離プロトコル#3

ステップ4を以下のステップ4と入れ替えることによって改変された密度分離プロトコル#2が、密度分離プロトコル#3である：

4. 血漿層を遠心管から取り除いて、捨てる。多孔質バリアの上方に残留する液体を第2の遠心管に移す。

【0150】

洗浄ステップ5~9の前に血漿層を取り除いて、より純粋な濃縮細胞集団を提供することができる。

【0151】

7.2. ネガティブ選択

本開示の一部の実施形態において、fNRBCおよび母親細胞を含むサンプルが、母親細胞のサンプルを枯渇させるネガティブ選択にかけられる。一部の実施形態において、ネガティブ選択は、抗CD45抗体に結合したマイクロビーズによる磁気活性化細胞ソーティング(MACS)を利用する。

【0152】

7.2.1. ネガティブ選択プロトコル#1

以下の例示的なネガティブ選択プロトコル#1が、本開示の方法に用いるのに適している：

1. 密度分離プロトコル#1~#3のいずれか1つに由来する最終ペレットを、MACSランニングバッファ、例えばautoMACS(登録商標)Running Buffer

10

20

30

40

50

er (Miltenyi Biotec) で再懸濁させる。

2. サンプルを、例えば $450 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

3. 上澄みを完全に吸引除去する。

4. 細胞ペレットを MACS ランニングバッファ中に再懸濁させる。

5. CD45 マイクロビーズ (すなわち、抗 CD45 抗体に付着したマイクロビーズ) をサンプルに加え、混合してインキュベートすることで CD45 マイクロビーズを母親細胞に結合させる。

6. MACS ランニングバッファをサンプルに加えて混合する。その後、サンプルを、例えば $450 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。上澄みを完全に吸引除去する。

10

7. ペレットを MACS ランニングバッファ中に再懸濁させる。

8. MACS カラムをメーカーの説明書に従って用いて、細胞を磁氣的にソートして、CD45 ネガティブ画分および CD45 ポジティブ細胞画分を得る。

【0153】

ステップ 1 ~ 3 は、残留洗浄バッファを細胞から取り除く。洗浄ステップ 6 は、結合していない CD45 マイクロビーズをサンプルから取り除く。

【0154】

7.3. ポジティブ選択

本開示の一部の実施形態において、fNRBC および母親細胞を含むサンプルが、抗体 4B9 を用いたポジティブ選択にかけられる。

20

【0155】

7.3.1. ポジティブ選択プロトコル # 1

以下の例示的なポジティブ選択プロトコル # 1 が、本開示の方法に用いるのに適している：

1. ネガティブ選択プロトコル # 1 によって得られた fNRBC を含む懸濁液から始めるならば、懸濁液を、例えば $450 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して細胞をペレット化させて、上澄みを完全に吸引除去する。密度分離プロトコル # 1 ~ # 3 のいずれかに由来する細胞ペレットから始めるならば、ステップ 2 から始める。

2. ペレットを MACS ランニングバッファ中に再懸濁させる。

30

3. FcR ブロッキング試薬、例えば FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) を加えて、よく混合する。FcR ブロッキング試薬は、非特異的な Fc レセプタ介在性の抗体結合を遮断する。

4. ビオチン化された 4B9 を加える；インキュベートすることで、ビオチン化された 4B9 を fNRBC に結合させる。

5. MACS ランニングバッファをサンプルに加える；例えば $300 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

6. 上澄みを完全に吸引除去する。

7. MACS ランニングバッファをサンプルに加えて、サンプルを、例えば $450 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

40

8. 上澄みを完全に吸引除去する。

9. ペレットを MACS ランニングバッファ中に再懸濁させる。

10. FcR ブロッキング試薬をサンプルに加えて、ステップ 11 における非特異的な Fc レセプタ介在性の抗体結合を遮断する。

11. 抗ビオチンマイクロビーズをサンプルに加える；インキュベートすることで、マイクロビーズは、ビオチン化された 4B9 に結合することができる。

12. MACS ランニングバッファをサンプルに加えて、混合する。その後、サンプルを、例えば $450 \times g$ にて 10 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。上澄みを完全に吸引除去する。

13. MACS ランニングバッファをサンプルに加える。

50

14. MACSカラムをメーカーの説明書に従って用いて、細胞を磁氣的にソートして、4B9ポジティブ画分および4B9ネガティブ画分を得る。

【0156】

ステップ5～8は、結合していないビオチン化4B9をサンプルから取り除く。洗浄ステップ12は、結合していない抗ビオチンマイクロビーズをサンプルから取り除く。

【0157】

7.3.2. ポジティブ選択プロトコル#2。

ビオチン化4B9を、非コンジュゲート型4B9と入れ替え、かつ抗ビオチンマイクロビーズを抗IgMマイクロビーズと入れ替えることによって改変されたポジティブ選択プロトコル#1が、ポジティブ選択プロトコル#2である。

10

【0158】

7.3.3. ポジティブ選択プロトコル#3

非コンジュゲート型4B9 (IgMモノクローナル抗体) とインキュベートし、洗浄して非結合型4B9抗体を取り除き、4B9でコーティングされた細胞をヤギ抗マウスIgMマイクロビーズと結合させてから洗浄し、結果として生じた細胞を再懸濁させて遠心分離することによって、4B9⁺細胞が選択される。遠心分離の後、上澄みを破棄して、ペレットをPBS等のバッファ中に再懸濁させる。

【0159】

7.4. 染色

本開示の一部の実施形態において、本開示に従って調製されたfNRBCを含むサンプルが蛍光染色されて、例えばFACSによる、視覚化、ソーティング、および/または単離されたfNRBCの選出が可能となる。

20

【0160】

7.4.1. 染色プロトコル#1

以下の例示的な染色プロトコル#1が、fNRBCを含むサンプルを蛍光染色するのに用いられ得る：

1. 先の組合せ#1～#18のいずれか1つに従って調製された4B9ポジティブ画分を、例えば400×gにて10分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

2. 上澄みを吸引除去する。

3. 蛍光マスター混合物をサンプルに加えてインキュベートする。マスター混合物は、先に記載されるプロトコルのいずれかに従って濃縮されたfNRBCを検出するのに適した標識マーカ、例えばストレプトアビジンAlexa 488および/またはヤギ抗マウスIgM Alexa 488、ならびに核マーカ、例えばHoechstを含有する。

30

4. バッファ、例えば0.5%BSAを含有する1×PBSをサンプルに加えて、細胞を洗浄する。

5. サンプルを、例えば400×gにて10分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

6. 上澄みを吸引除去する。

7. ペレットを適切なバッファ、例えば1×PBS中に再懸濁させる。

40

【0161】

7.4.2. 染色プロトコル#2

以下の例示的な染色プロトコル#2もまた、fNRBCを含むサンプルを蛍光染色するのに用いられ得る：

1. 先の組合せ#1～#18のいずれか1つに従って調製された4B9ポジティブ画分を、例えば400×gにて10分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

2. ペレットをバッファ、例えば1×PBS中に再懸濁させる。

3. FcRブロッキング試薬を加えて、ステップ4における非特異的なFcレセプタ介在性の抗体結合を遮断する。

4. 非コンジュゲート型4B9をサンプルに加える；サンプルをインキュベートするこ

50

とで、4 B 9 は f N R B C に結合することができる。

5 . 蛍光マスター混合物をサンプルに加えてインキュベートする。マスター混合物は、f N R B C を検出するのに適した標識マーカー、例えば C D 2 3 5 a - P E および / またはヤギ抗マウス I g M A l e x a 4 8 8、ならびに核マーカー、例えば D C ルビーを含有する。

6 . バッファ、例えば 1 × P B S をサンプルに加えて、細胞を洗浄する。

7 . サンプルを、例えば 3 0 0 × g にて 5 分間、遠心分離して、細胞をペレット化させる。

8 . 上澄みを吸引除去する。

9 . ペレットを適切なバッファ、例えば 1 × P B S 中に再懸濁させる。

10

【 0 1 6 2 】

先のプロトコルにおいて用いられる適切な試薬の容量および濃度、温度、混合時間、遠心分離時間、遠心分離力、ならびに具体的な試薬が、当業者によって選択され得る。同様に、当業者であれば、プロトコルの基本的な操作を変更することなく、洗浄ステップが加えられても、先のプロトコルから省略されてもよいことを理解するであろう。

【 0 1 6 3 】

7 . 5 . 下流の分析のための調製

f N R B C を含有する元の生物学的サンプル、または先に記載される方法ステップのいずれかによって f N R B C が濃縮されたサンプルは、f N R B C を濃縮または単離するための更なる処理にかけられてよい。

20

【 0 1 6 4 】

適切には、オートメーション化された細胞分離技術が用いられる。そのような技術の例として、限定されないが、蛍光活性化細胞ソーティング (F A C S)、フローサイトメトリー、限外濾過、マイクロフルイディクス、またはこれらの方法の 2 つ以上のあらゆる組合せが挙げられる。F A C S は、f N R B C をさらに濃縮または単離するために、F A C S 機器メーカーによって提供される標準的な手順および説明書を用いて実行されてよい。本明細書中に記載される方法に従って f N R B C を単離するのに用いられ得る例示的な F A C S ゲーティング、および結果として生じたデータセットが、図 3 および図 7 に示される。

【 0 1 6 5 】

30

f N R B C はまた、マニュアルの方法、例えば顕微操作によって単離されてもよい。当該技術において知られている、または以下の 7 . 6 節に記載される顕微操作技術を用いて、個々の f N R B C が選出または単離され得る。

【 0 1 6 6 】

濃縮の後、細胞は、下流の分析、例えばゲノム D N A のショートタンデムリピート (S T R) 分析、D N A フィンガープリント法、染色体コピー数の分析、ならびに / または胎児細胞であることの確認、胎児異常もしくは疾患の診断、および胎児特性の試験のための他の方法にかけられてもよい。

【 0 1 6 7 】

7 . 6 . 顕微操作による細胞選出

40

細胞の単離のために、市販のマイクロマニピュレータが、逆位相コントラスト顕微鏡に取り付けられる。顕微鏡は、種々の対物レンズ、蛍光フィルター、カメラ、モニタ、およびジョイスティックで操作されるマイクロマニピュレータプラットフォームが装備される。顕微操作は、3本の直線軸 (X、Y および Z 方向) で構成される。

【 0 1 6 8 】

ポジティブ選択された画分から得られ、かつ種々の抗体で蛍光染色された細胞が、予めクリーニングされた顕微鏡のスライド上に置かれて、キャピラリー先端部にある開口部の直径が f N R B C のサイズに構成された滅菌キャピラリー管によって単離される。蛍光染色は、胎児細胞を認識する、4 B 9 (Zimmermann et al., 2013, Exp Cell Res 319:2700-2707)、抗 C D 3 4、抗 C D 7 1、抗グリコホリン A、および抗 i 抗原 (Huang et al.,

50

2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35、Calabrese et al., 2012, Clin Genet. 82(2):131-9) から選択される 1 つまたは複数の抗体に対応してよい。例えば F I S H を実行するために、細胞が固定されるならば、報告によると非常に特異的な原始胎児赤芽球識別子である抗イプシロングロビン (Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35、Choolani et al., 2001, Blood 98:554-7) が用いられてよい。

【 0 1 6 9 】

蛍光染色ステップ中に用いられる各抗体は、それ専用の、顕微鏡の特異的な蛍光フィルターに対応し、接眼レンズを通して視覚化され、かつ/または波長に依存してモニタリングされる。

10

【 0 1 7 0 】

蛍光マーカに加えて、f N R B C の選択基準は、ヘモグロビン含有量 (S o r e t フィルターによって検出可能である) および形態的特徴であってもよい。原始 f N R B C は、核に対する細胞質の比率が高く、かつサイズが比較的大きい (Huang et al., 2011, J Cell Biochem. 112:1475-85、Choolani et al., 2003, Mol Hum Repro 9:227-35) という顕著な形態的特徴を有する。

【 0 1 7 1 】

所望の形態、核対細胞比、および蛍光染色パターンを有する細胞が、マイクロマニピュレータによって手動で選び出されて、下流の分析用の 0 . 2 m l P C R チューブ内に入れられる。

20

【 0 1 7 2 】

記載される例示的なプロトコルは、以下の表 1 に示される f N R B C を含有する濃縮細胞集団を得るために用いられた。

【 0 1 7 3 】

【表 1】

表 1							
サンプル	サンプル容量 (mL)	単離プロトコル ¹	染色プロトコル ²	FACS 事象数	4B9+FACS 事象数	顕微操作によって選出した単細胞	顕微操作によって選出した複数細胞 ³
1	19	DS #2、PS #2	SP#2	202,370	60		
2	18	DS #3、PS #2	SP#2	135,626	240		2x5
3	15	DS #3、PS #2	SP#2	1,077,876			1x5、1x6
4	19	DS #3、PS #2	SP#2	1,423,135			
5	12	DS #3、PS #2	SP#2	135,093	14		
6	17	DS #3、PS #2	SP#2	336,668	105	6	
7	19	DS #3、PS #2	SP#2	803,085	130	7	
8	19	DS #3、PS #2	SP#2	102,029	50		
9	19	DS #3、PS #2	SP#2	504,344	249		
10	15	DS #3、PS #2	SP#2	488,828	100		
11	21	DS #3、PS #2	SP#2	46,148	42	15	1x3

1 DS は、密度分離プロトコルである;NS は、ネガティブ選択プロトコルである;PS は、ポジティブ選択プロトコルである
 2 SP は、染色プロトコルである
 3 A×B は、B 個の細胞の A セットを選出したことを意味する

30

40

【 0 1 7 4 】

(実施例 1)

8 . 密度分離 + M A C S によって母体血液から単離した f N R B C の F I S H 分析

50

男性胎児を妊娠した5から16週目の40人の女性から得た母体末梢血サンプルを、密度分離プロトコル#3およびポジティブ選択プロトコル#2に従って処理して、fNRBCを含有する磁気細胞分離「スープ」(MCSS)を得た。細胞をスライドに固定して、FISHを用いて分析し、X染色体およびY染色体を同定した。

【0175】

スライドを顕微鏡下で見て、1サンプルにつき、Y染色体を有する少なくとも5個の細胞を手動でカウントした。各サンプル中に存在するY染色体を有する細胞の平均数を判定する目的で、40サンプルのうち10サンプルをランダムに選択した。スライド全体を顕微鏡下でスキャンして、Yプローブをそれぞれ手動でカウントした。10サンプルのそれぞれにおいてカウントしたfNRBC数を表2に示す。平均で、1サンプルあたり2.4個のfNRBCがカウントされた。

10

【0176】

【表2】

表2		
サンプル	妊娠期間(週)	同定したfNRBCの数
1	10	59
2	11	20
3	10	35
4	9	29
5	14	24
6	7	22
7	12	20
8	11	14
9	9	12
10	5	8

20

【0177】

X染色体およびY染色体についてプロービングしたサンプル8由来の細胞の顕微鏡写真を図4に示す。

30

【0178】

密度分離およびMACSを用いて母体血液から単離した胎児細胞の他の説明用のFISH画像を、図5および図6に示す。

【0179】

(実施例2)

9. 胎児肝臓中のfNRBCの特徴付け

フレッシュな、または凍結した単核胎児肝細胞を、妊娠期間の範囲が様々なドナーから得、液体窒素中に保存した。細胞は、対応する分析証明書のある承認IRBドナープログラム下で、外部ソースにより処理された。

【0180】

フレッシュな単核男性細胞を、ネガティブコントロールとして種々のドナーから得た。

40

【0181】

胎児肝臓単核細胞および男性単核細胞を、密度勾配分離を用いて処理した。一部の研究においては、fNRBCを含有する密度勾配画分の後に、MACSを用いた4B9によるポジティブ選択が続き、MACSでソートした4B9ポジティブ画分を、FACSによってソートした。他の研究においては、fNRBCを含有する密度勾配画分は、間に入るMACS選択プロセスなしで、FACSによりソートした。FACSソーティングに先立ち、4B9およびヤギ抗マウスIgM二次抗体、抗CD235a、ならびにDC-Rubyを用いて、細胞を蛍光染色した。

【0182】

50

FACSソーティングは、様々なゲート領域（リンパ球および単球、CD235a⁺、ならびにトリプルポジティブ（DCRuby⁺、4B9⁺、CD235a⁺）細胞）についての事象数、親画分に対する割合（%）、および総数に対する割合（%）を分析した。両方のサンプル型について観察したトリプルポジティブな事象の数は、以下の通りである：胎児肝細胞は、ソートした総事象の20～45パーセントの範囲であり、男性細胞は0.02～0.10パーセントの範囲であった。

【0183】

細胞を、対応する蛍光フィルターを備える顕微鏡でソートして視覚化した。胎児肝臓および男性単核細胞の分析により、細胞形態、核対細胞比、および蛍光染色パターンに基づく細胞の特徴付け、ならびにfNRBCを含有する、FACSでソートした細胞集団の品質管理措置（quality control measure）の確立が可能となった。

10

【0184】

（実施例3）

10. 密度分離 + MACS + FACS によって混合細胞集団から単離した胎児肝臓 fNRBC の STR 分析

本実施例は、スパイク実験を介して、本開示の方法が fNRBC の濃縮を可能にすることを実証する。

【0185】

10.1. 混合細胞集団からの 4B9⁺ 濃縮細胞集団の調製

女性の 4000 個の胎児肝細胞を、密度勾配遠心分離を介した単核細胞単離の前に、無関係な男性対象由来の正常な男性血液 25 mL 中に加えた。

20

【0186】

PBMC を、密度勾配遠心分離プロトコル # 2 によって調製した。結果として生じた細胞集団を、ポジティブ選択プロトコル # 2 に従ってポジティブ選択にかけた。

【0187】

細胞を、ヤギ抗マウス IgM Alexa Fluor 488 および DC-Ruby で染色してから、Sony SH800 細胞ソーターを用いる蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）によってソートした。

【0188】

図 8 A は、4B9 ネガティブ細胞画分の FSC および BSC の相関測定値を示しており、細胞型の分化が示される。図 8 B は、4B9 ネガティブ細胞画分由来の FSC 対 BSC に基づくリンパ球ゲートの細胞亜集団を示しており、有核細胞型および 4B9 細胞型が観察される。4B9 陽性細胞画分が、図 9 A および図 9 B に表される。図 9 B は、上部右側の四分の一区分の有核 4B9 陽性細胞を示す。無核の 4B9 陽性細胞が、下部右側の四分の一区分に位置する。

30

【0189】

図 9 B 中の上部の四角内にゲートインした事象（4B9 ポジティブ：43.53%）を、STR 分析用の 0.2 mL PCR チューブ中にソートして、この領域内に位置する細胞型を同定した。

【0190】

10.2. 4B9⁺ 細胞画分の下流の分析

23 個の STR 遺伝子座および性特異的アメロゲニン多型遺伝子座の蛍光検出用の PowerPlex（登録商標）Fusion（Promega, WI）5 色キットを用いて、4B9⁺ 画分の STR（ショートタンデムリピート）分析を実行した。

40

【0191】

図 10 ~ 図 13 は、男性ゲノム DNA、胎児肝臓ゲノム DNA、および 4B9 ポジティブソーテッド画分の電気泳動図であり、FAM、VIC、NED、および PET についての、標識遺伝子座のピークが示される。

【0192】

図 10 ~ 図 13 に示される各チャンネル（それぞれ FAM、VIC、NED、および P

50

ET)において、男性ゲノムDNA、胎児肝臓ゲノムDNA、および4B9ポジティブ画分について、STRプロファイルを得た。

【0193】

図10～図13中の4B9ポジティブ画分(下側のパネル)は、単離、濃縮、およびFACSソーティングの後に、単離した細胞の大部分が胎児起源のものであったことを証明する。4B9ポジティブ画分についてのプロファイルは、男性肝プロファイルおよび胎児肝プロファイルの両方で構成された；しかしながら、主要な寄与因子は、胎児プロファイルであった。

【0194】

細胞のこの混合集団のプロファイルは、2つの異なる寄与因子に由来する大ピークおよび小ピークを含有した。対立遺伝子の存在、およびそれらのピークの以降の高さに基づいて、主要な寄与因子と主要でない寄与因子とを判定した。

10

【0195】

図14は、4B9ポジティブ画分由来のFAMチャンネルからの2つのマーカを表す。ここで、マーカーD10S1248が4つの対立遺伝子(A、B、C、およびD)を含有することが観察された。対立遺伝子AおよびCが4つのピークの中で最も高く、かつ胎児起源である一方、対立遺伝子BおよびDが、4つのピークの中で最も低く、かつ男性起源である(図10参照)。マーカーD13S317は、3つの対立遺伝子(E、F、およびG)しか含有しない。ここで、男性肝細胞および胎児肝細胞は、Fにて共通の対立遺伝子を共有し、最も高いピークがもたらされた。2番目に高いピークは胎児起源のGであり、最も低いピークは男性起源のEである。ゆえに、図14は、胎児プロファイルが4B9ポジティブ画分由来のプロファイルの主要な寄与因子であったことを証明する。

20

【0196】

加えて、図10は、性特異的遺伝子座AMELを含有し、これは、男性サンプルについて単一のX、ならびに女性サンプルについてXおよびYを含有する。4B9画分はY遺伝子座の存在を示さず、4B9ポジティブ画分の大部分が胎児細胞であり、男性細胞ではなかったことが重ねて強調される。

【0197】

本実施例は、少数の胎児肝細胞を、有意に多数の雄性細胞中にスパイクした場合に、本明細書中に記載される単離法および濃縮法を用いて回収した細胞の大部分が胎児細胞であることを証明する。

30

【0198】

(実施例5)

11. 種々のプロトコルによって母体血液から単離したfNRBCのSTR分析

11.1. 密度分離+MACSによって母体血液から単離したfNRBCのSTR分析

男性胎児または女性胎児のいずれかを妊娠した4から14週目の40人の女性から得た母体末梢血サンプルを、密度分離プロトコル#1、ネガティブ選択プロトコル#1、およびポジティブ選択プロトコル#1に従って処理して、各サンプルについてMCSSをもたらした。サンプルを、染色プロトコル#1に従って染色した。その後、4B9タグ付き細胞は、各MCSSから選出してプールし、23個のSTR遺伝子座および性特異的AMELゲニン多型遺伝子座の蛍光検出用のPowerPlex(登録商標)Fusion(Promega, WI)STRキットを用いて分析し、胎児性であることを確かめた。胎児の対立遺伝子を、サンプルの100%で同定した。

40

【0199】

図15～図18は、妊娠期間が7週目の、男性胎児を妊娠した女性から得た母体末梢血から処理したサンプルのSTR分析を示す。細胞を、ヤギ抗マウスIgM AF 488、Streptavidin 488、およびHoechstによるポジティブ選択後に蛍光染色した。手動で選出した10個のプール細胞の2セットをSTR分析に用いた。図15～図18に示される電気泳動図の4つのチャンネルのそれぞれにおいて、4つのSTRプロファイルがある。全部にわたって、4つのプロファイルは以下の通りである：単離

50

した4B9ポジティブ画分AおよびB(それぞれ)、母系ゲノムDNA、ならびに父系ゲノムDNA。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成した円は、母親プロフィールと父親プロフィール間で共有される単離4B9ポジティブ画分において見出された対立遺伝子を示す。均一長の短いダッシュによって形成した円は、単離4B9ポジティブ画分において見出された、父親プロフィールでしか見出されない対立遺伝子を示す。

【0200】

11.2.密度分離+MACS+FACSによって母体血液から単離したfNRBCのSTR分析

11.2.1.密度分離プロトコル#2、ポジティブ選択プロトコル#2、およびFACSによって単離したfNRBC

STR分析を、密度分離プロトコル#2、ポジティブ選択プロトコル#2、およびFACSによって、ネガティブ選択なしで処理した、妊娠女性由来の母体血液サンプルに実行した。図19~図22は、妊娠期間が9週目の、男性胎児を妊娠した女性から得た母体末梢血から処理したサンプルのSTR分析を示す。細胞を、ヤギ抗マウスIgM、CD235a、およびDC-Rubyによるポジティブ選択後に蛍光染色し、FACSでソートし、手動で選出し、STR分析用に一緒にプールした。合計8個の細胞を選出した。図19~図22の全部にわたって、3つのプロフィールが示される:母体ゲノムDNA、単離4B9ポジティブ画分、および父系ゲノムDNA。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成した円は、母親プロフィールと父親プロフィール間で共有される単離4B9ポジティブ画分において見出された対立遺伝子を示す。均一長の短いダッシュによって形成した円は、単離4B9ポジティブ画分において見出された、父親プロフィールでしか見出されない対立遺伝子を示す。

10

20

【0201】

11.2.2.密度分離プロトコル#3、ポジティブ選択プロトコル#2、およびFACSによって単離したfNRBC

STR分析を、密度分離プロトコル#3、ポジティブ選択プロトコル#2、およびFACSによって、ネガティブ選択なしで処理した、妊娠女性由来の母体血液サンプルに実行した。図23~図26は、妊娠期間が12週目の、男性胎児を妊娠した女性から得た母体末梢血から処理したサンプルのSTR分析を示す。細胞を、ヤギ抗マウスIgM、CD235a、およびDC-Rubyによるポジティブ選択後に蛍光染色し、FACSでソートし、STR分析用の0.2ml PCRチューブ中に直接ソートした。合計35事象をソートした。チューブA~Cは10事象を含有し、チューブDは5事象を含有した。図23~図26の全部にわたって、4つのプロフィールが示される:母系ゲノムDNA、4B9ポジティブ画分から単離した2つの別々の反応物(それぞれチューブCおよびD)、および父系ゲノムDNA。ダッシュおよびドットを交互に並べることによって形成した円は、母親プロフィールと父親プロフィール間で共有される単離4B9ポジティブ画分において見出された対立遺伝子を示す。均一長の短いダッシュによって形成した円は、単離4B9ポジティブ画分において見出された、父親プロフィールでしか見出されない対立遺伝子を示す。

30

【0202】

(実施例6)

12.単離したNRBCのフィンガープリンティング分析

母体末梢血の100サンプルを、密度選択プロトコル#3およびポジティブ選択プロトコル#2に従って処理して、MCSSをもたらした。MCSSの細胞を、染色プロトコル#2に従って染色した。その後、4B9タグ付き細胞を、FACSによって他の細胞および残渣から単離した。DC-Ruby、CD235a、および4B9のトリプルポジティブな細胞を、スライド上にソートした。単細胞を顕微操作によって選出し、形態および蛍光に基づいてグレード分けした。

40

【0203】

全体で、235個の細胞を、WGA、および単一ヌクレオチド多型プロフィールに基づ

50

くフィンガープリンティング分析用の100母体血液サンプルから選択した。また、母親細胞を、WGAおよびフィンガープリンティング分析にもかけた。フィンガープリンティング分析は、母体血液から単離した235個の細胞中230個（すなわち、細胞の97.3%）を胎児細胞と確認し、そして少なくとも1つの胎児細胞を、各母体血液サンプルから単離したと確認した。

【0204】

13. 特定の実施形態

本開示は、以下の具体的な実施形態によって例示される。

1. 胎児有核赤血球（NRBC）を調製する方法であって、fNRBCを含む生物学的サンプルをポジティブ免疫選択にかけることを含み、前記ポジティブ免疫選択は、

(a) 液体培地中で生物学的サンプルを第1の抗体と接触させるステップであって、第1の抗体は、生物学的サンプル中の他の細胞（例えば、1つまたは複数の他の細胞型）と比較して選択的にfNRBCに結合する、ステップと；

(b) 前記第1の抗体に結合した細胞を選択するステップとを含む、方法。

2. 生物学的サンプルをネガティブ免疫選択にかけることをさらに含み、前記ネガティブ免疫選択は、

(a) 液体培地中で生物学的サンプルを第2の抗体と接触させるステップであって、第2の抗体は、fNRBCと比較して選択的に生物学的サンプル中の他の細胞と結合する、ステップと；

(b) 前記第2の抗体に結合しなかった細胞を選択するステップとを含む、実施形態1の方法。

3. ポジティブ免疫選択は、ネガティブ免疫選択の前に実行される、実施形態2の方法。

4. ネガティブ免疫選択は、ポジティブ免疫選択の前に実行される、実施形態2の方法。

5. ポジティブ免疫選択およびネガティブ免疫選択は、同時に実行される、実施形態2の方法。

6. 第1の抗体は、fNRBC有核前駆細胞の表面上に存在する抗原と結合するが、成体の赤血球上に存在するCD71または他の表面抗原と結合しない、実施形態1から5のいずれか1つの方法。

7. 第1の抗体は4B9であるか、またはfNRBC有核前駆細胞の表面への結合に関して4B9と競合する抗体である、実施形態6の方法。

8. 複数の第1の抗体が用いられる、実施形態1から7のいずれか1つの方法。

9. ポジティブ免疫選択は、オートメーション化された方法を用いて実行される、実施形態1から8のいずれか1つの方法。

10. オートメーション化された方法は、細胞ソーティング、限外濾過、またはマイクロ流体分離である、実施形態9の方法。

11. 第2の抗体は：

(a) Tリンパ球細胞表面マーカー、場合によりCD3、CD4またはCD8；

(b) Bリンパ球細胞表面マーカー、場合によりCD19、CD20、またはCD32；

(c) panリンパ球マーカー、場合によりCD45；

(d) NK細胞表面マーカー、場合によりCD56；

(e) 樹状細胞表面マーカー、場合によりCD11cまたはCD23；および

(f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、場合によりCD14またはCD33

から選択される細胞表面マーカーに対するものである、実施形態2から10のいずれか1つの方法。

12. 複数の第2の抗体が用いられる、実施形態2から11のいずれか1つの方法。

13. 複数の第2の抗体は、以下の細胞表面マーカーの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、または5つに対する抗体を含む、実施形態12の方法：CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD45、CD56、CD11c、CD23、CD14、CD32、およびCD33。

14. ネガティブ免疫選択は、オートメーション化された方法を用いて実行される、実施形態2から13のいずれか1つの方法。

15. オートメーション化された方法は、細胞ソーティング、限外濾過、またはマイクロ流体分離である、実施形態11の方法。

16. 密度分離法を用いてfNRBCを濃縮することをさらに含む、実施形態1から15のいずれか1つの方法。

17. 密度分離法は、前記ポジティブ免疫選択の前に実行される、実施形態16の方法。

18. 顕微操作によってfNRBCを単離することをさらに含む、実施形態1から17のいずれか1つの方法。

19. 顕微操作は、ポジティブ免疫選択の後に実行される、実施形態18の方法。

20. 生物学的流体は、血液、血漿、尿、または柔毛膜柔毛サンプリング(CVS)生検もしくは経皮的臍帯血サンプリング由来の細胞の懸濁液を含む、実施形態1から19のいずれか1つの方法。

21. 生物学的サンプルは、母体血液を含む、実施形態20の方法。

22. 母体血液は、妊娠約5週目から約38週目の妊娠中の対象から採取された母体血液サンプル由来である、実施形態21の方法。

23. 実施形態1から22のいずれか1つの方法によって調製される、または得ることができるfNRBCの調製物。

24. fNRBCに診断アッセイを実行することをさらに含む、実施形態1から22のいずれか1つの方法。

25. fNRBCを診断する方法であって、実施形態23のfNRBCの調製物に診断アッセイを実行することを含む方法。

26. 診断アッセイは、多胎妊娠の存在を判定するためのものである、実施形態24または25の方法。

27. 診断アッセイは、胎児異常の存在を判定するためのものである、実施形態24または25の方法。

28. 胎児異常は、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21、ダウン症候群、圧迫性麻痺の傾向がある神経障害、神経線維腫症、アラジール症候群、軟骨形成不全、ハンチントン舞蹈病、アルファ-マンノース症、ベータ-マンノース症、異染性ロイコジストロフィー、フォンレックリングハウゼン病、結節性硬化症、筋強直性ジストロフィー、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ-サックス病、ベータ-サラセミア、ムコ多糖症、フェニルケトン尿症、シトルリン尿症、ガラクトース血症、ガラクトキナーゼおよびガラクトース4-エピメラーゼ欠乏症、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症、メチルマロン酸尿症、プロピオン酸血症、ファーバー病、フコシドーシス、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、I細胞病、ムコリピドーシスIII、ニーマン-ピック病、シアリドーシス、ウォールマン病、ツェルヴェーガー症候群、シスチン症、第X因子欠乏症、毛細血管拡張性運動失調、ブルーム症候群、ローベルト症候群、色素性乾皮症、脆弱(X)症候群、性染色体異数性、クラインフェルター症候群、ターナー症候群、XXX症候群、ステロイドスルファターゼ欠乏症、線形の皮膚欠損を伴う小眼球症、ペリツェーウス-メルツパッヒャー病、Y染色体上の精巣決定因子、オルニチンカルバモイル転移酵素欠乏症、ブドウ糖6-リン酸脱水素酵素欠乏症、レッシュ-ナイハン症候群、アンダーソン-ファブリ疾患、血友病A、血友病B、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、dup(17)(p11.2p11.2)症候群、16p11.2欠失、16p11.2重複、ミトコンドリア欠損、dup(22)(q11.2q11.2)症候群、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、ウォルフ-ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス

10

20

30

40

50

- ボイレン症候群、シャルコー - マリー - ツース病、染色体再配列、染色体欠失、スミス - マゲニス症候群、口蓋心臓顔貌症候群、ディジョージ症候群、1 p 3 6 欠失、ブラーダ - ヴィリ症候群、無精子症（因子 a）、無精子症（因子 b）、無精子症（因子 c）、脊椎披裂、無脳症、神経管欠損、小頭症、水頭症、腎欠損、カルマン症候群、副腎發育不全、アンゲルマン症候群、嚢胞腎、嚢胞性ヒグローム、胎児水症、臍ヘルニアおよび胃壁裂、横隔膜ヘルニア、十二指腸閉鎖症、骨格形成異常、口唇裂、口蓋裂、アルギニノコハク酸尿、クラッペ病、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症、3 - メチルクロトニル補酵素 A カルボキシラーゼ欠乏症、糖原病、副腎過形成、低フォスファターゼ症、胎盤ステロイドスルファターゼ欠乏症、重症合併型免疫不全症候群、T 細胞免疫不全、エーラース - ダンロー症候群、骨形成不全症、成人多嚢胞性腎疾患、ファンコーニ貧血、表皮水泡症候群、発汗減少症性外胚葉性形成異常、先天性ネフローゼ（フィンランド型）、ならびに多発性内分泌腫瘍である、実施形態 27 の方法。

10

29. 診断アッセイは核酸アッセイである、実施形態 24 から 28 のいずれか 1 つの方法。

30. 核酸アッセイは DNA アッセイであり、場合により、DNA アッセイはマイクロアレイ上で実行される、実施形態 29 の方法。

31. 核酸アッセイは、FISH、PCR、または DNA 配列決定アッセイである、実施形態 29 または 30 の方法。

32. 核酸アッセイは RNA アッセイであり、場合により、RNA アッセイは、マイクロアレイ上で実行される、実施形態 29 の方法。

20

33. RNA アッセイは、RT-PCR アッセイまたは FISH アッセイである、実施形態 32 の方法。

34. 診断試験を実行する前に、fNRBC を溶解させ、または透過性にさせることをさらに含む、実施形態 29 から 33 のいずれか 1 つの方法。

35. 診断アッセイはタンパク質検出アッセイであり、場合により、タンパク質検出アッセイはマイクロアレイ上で実行される、実施形態 24 から 28 のいずれか 1 つの方法。

36. タンパク質は抗体を用いて検出される、実施形態 35 の方法。

37. 診断アッセイは組織学的アッセイである、実施形態 24 から 28 のいずれか 1 つの方法。

38. 診断試験用の胎児有核赤血球（NRBC）の調製方法であって、

30

(a) 場合により、それぞれが胎児細胞表面を有する 1 個または複数個の fNRBC、およびそれぞれが母親細胞表面を有する複数の母親細胞を含む生物学的流体を提供するステップと；

(b) 密度分離法によって複数の母親細胞の第 1 の部分から 1 個または複数個の fNRBC を濃縮することによって、1 個または複数個の fNRBC および残存する第 1 の数の母親細胞を含む第 1 の懸濁液を生成するステップと；

(c) 第 1 の懸濁液を、第 1 の分離可能な粒子に結合した第 1 の抗体とインキュベートするステップであって、第 1 の抗体は、母親細胞の母親細胞表面上に存在するが、fNRBC の胎児細胞表面上に存在しない第 1 の抗原と、第 1 の抗体が第 1 の抗原と結合する条件下で結合して、第 1 の粒子 - 細胞複合体を生成する、ステップ、ならびに第 1 の粒子 - 細胞複合体を第 1 の懸濁液から分離して取り除くことによって、1 個または複数個の fNRBC および残存する第 2 の数の母親細胞を含む第 2 の懸濁液を生成するステップと；

40

(d) 第 2 の抗体を第 2 の懸濁液に加えるステップであって、第 2 の抗体は、fNRBC の胎児細胞表面上に存在する第 2 の抗原と結合し、第 2 の抗原は、母親細胞表面上に存在しない、ステップ、第 2 の懸濁液を、第 2 の抗体が第 2 の抗原と結合する条件下でインキュベートして、第 2 の抗体 - 細胞複合体を生成するステップ、ならびに第 2 の懸濁液から第 2 の抗体 - 細胞複合体を分離することによって、診断試験用の 1 個または複数個の fNRBC を含む第 3 の懸濁液を生成するステップとを含む調製方法。

39. 第 1 の抗体は抗 CD45 抗体を含む、実施形態 38 に従う、fNRBC の調製方

50

法。

40. 第2の抗体は、fNRBC有核前駆細胞の細胞表面上に存在する表面抗原と結合するが、成体の赤血球上に存在するCD71または他の表面抗原と結合しない、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

41. 第2の抗体は4B9である、実施形態40に従う、fNRBCの調製方法。

42. fNRBCの細胞成分を染色することをさらに含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

43. fNRBCの細胞成分は、直接的に、または間接的に染色される、実施形態42に従う、fNRBCの調製方法。

44. 顕微操作によって1個または複数個のfNRBCを単離することをさらに含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

45. オートメーション化された分離技術によってfNRBCを単離し、またはさらに濃縮することをさらに含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

46. オートメーション化された分離は、細胞ソーティング、限外濾過、およびマイクロ流体分離技術からなる群から選択される方法によって実行される、実施形態45に従う、fNRBCの調製方法。

47. fNRBCは、1個または複数個の原始赤芽球を含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

48. fNRBCは、1個または複数個の完全赤芽球を含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

49. 生物学的流体は、血液、血漿、尿、または柔毛膜柔毛サンプリング(CVS)生検もしくは経皮的臍帯血サンプリング由来の細胞の懸濁液を含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

50. 生物学的流体は母体血液を含む、実施形態44に従う、fNRBCの調製方法。

51. 母体血液は、妊娠約5週目から約38週目の妊娠中の対象から採取された血液サンプル由来である、実施形態50に従う、fNRBCの調製方法。

52. 第2の抗体は、検出可能な標識が標識されている、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

53. 検出可能な標識は、蛍光標識、酵素標識、放射性同位元素標識、または化学反応性の連結剤を含む、実施形態52に従う、fNRBCの調製方法。

54. 濃縮したfNRBCを溶解させて、1つまたは複数の核酸を含む溶解fNRBCを生成することと、1つまたは複数の核酸配列を分析することと、それらによって胎児異常または対立遺伝子変異を示す核酸配列の有無を判定することとをさらに含む、実施形態40に従う、fNRBCの調製方法。

55. 多胎妊娠の存在を判定することをさらに含む、実施形態40に従う、fNRBCの調製方法。

56. 1つまたは複数の核酸配列の分析は、染色体異常を検出することを含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

57. 胎児異常は単一遺伝子の異常を含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

58. 胎児異常は単一ヌクレオチド多型(SNP)を含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

59. 1つまたは複数の核酸配列の分析は、FISH、PCR、またはDNA配列決定法によって実行される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

60. 1つまたは複数の核酸配列の分析は、定量PCR、リアルタイムPCR、または逆転写酵素PCRによって実行される、実施形態59に従う、fNRBCの調製方法。

61. 1つまたは複数の抽出された核酸の分析は、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)によって実行される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

62. 1つまたは複数の抽出された核酸の分析は、多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル(MALBAC)によって実行される、実施形態54に従う、fNRBC

10

20

30

40

50

Cの調製方法。

63. 胎児異常は、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21、ダウン症候群、圧迫性麻痺の傾向がある神経障害、神経線維腫症、アラジール症候群、軟骨形成不全、ハンチントン舞蹈病、アルファ-マンノース症、ベータ-マンノース症、異染性ロイコジストロフィー、フォンレックリングハウゼン病、結節性硬化症、筋強直性ジストロフィー、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ-サックス病、ベータ-サラセミア、ムコ多糖症、フェニルケトン尿症、シトルリン尿症、ガラクトース血症、ガラクトキナーゼおよびガラクトース4-エピメラーゼ欠乏症、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症、メチルマロン酸尿症、プロピオン酸血症、ファーバー病、フコシドーシス、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、I細胞病、ムコリピドーシスIII、ニーマン-ピック病、シアリドーシス、ウォールマン病、ツェルヴェーガー症候群、シスチン症、第X因子欠乏症、毛細血管拡張性運動失調、ブルーム症候群、ローベルト症候群、色素性乾皮症、脆弱(X)症候群、性染色体異数性、クライフェルター症候群、ターナー症候群、XXX症候群、ステロイドスルファターゼ欠乏症、線形の皮膚欠損を伴う小眼球症、ペリツェウス-メルツパッヒャー病、Y染色体上の精巢決定因子、オルニチンカルバモイル転移酵素欠乏症、ブドウ糖6-リン酸脱水素酵素欠乏症、レッシュ-ナイハン症候群、アンダーソン-ファブリ疾患、血友病A、血友病B、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、dup(17)(p11.2p11.2)症候群、16p11.2欠失、16p11.2重複、ミトコンドリア欠損、dup(22)(q11.2q11.2)症候群、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、ウォルフ-ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス-ボイレン症候群、シャルコー-マリー-トゥース病、染色体再配列、染色体欠失、スミス-マゲニス症候群、口蓋心臓顔貌症候群、ディジョージ症候群、1p36欠失、ブラダー-ヴィリ症候群、無精子症(因子a)、無精子症(因子b)、無精子症(因子c)、脊椎披裂、無脳症、神経管欠損、小頭症、水頭症、腎欠損、カルマン症候群、副腎發育不全、アンゲルマン症候群、嚢胞腎、嚢胞性ヒグローマ、胎児水症、臍ヘルニアおよび胃壁裂、横隔膜ヘルニア、十二指腸閉鎖症、骨格形成異常、口唇裂、口蓋裂、アルギニノコハク酸尿、クラッペ病、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症、3-メチルクロトニル補酵素Aカルボキシラーゼ欠乏症、糖原病、副腎過形成、低フォスファターゼ症、胎盤ステロイドスルファターゼ欠乏症、重症合併型免疫不全症候群、T細胞免疫不全、エーラーズ-ダンロー症候群、骨形成不全症、成人多嚢胞性腎疾患、ファンコーニ貧血、表皮水泡症候群、発汗減少症性外胚葉性形成異常、先天性ネフローゼ(フィンランド型)、ならびに多発性内分泌腫瘍からなる群から選択される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

64. 単離したfNRBC中のタンパク質または代謝産物の有無を検出することをさらに含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

65. 単離したfNRBC中のタンパク質または代謝産物のレベルを検出することをさらに含む、実施形態38に従う、fNRBCの調製方法。

66. 1つまたは複数の核酸の分析は、次世代シーケンシング技術またはウルトラディープシーケンシングを含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

67. 1つまたは複数の核酸はDNAマイクロアレイで分析される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

68. 1つまたは複数の核酸は出生前染色体マイクロアレイで分析される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

69. 胎児異常は制限酵素断片長多型(RFLP)によって検出される、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

70. 胎児異常は微小欠失または微小重複を含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

71. fNRBCは、正常なテロメア長範囲と比較して長さが増加または減少したテロメアを含む、実施形態54に従う、fNRBCの調製方法。

72. 1つまたは複数の核酸の分析は、fNRBCの核酸のストレッチを配列決定する

ことを含む、実施形態 5 4 に従う、f N R B C の調製方法。

7 3 . f N R B C の核酸のストレッチは、次世代シーケンシング技術または大規模並列シーケンシングによって配列決定される、実施形態 7 2 に従う、f N R B C の調製方法。

7 4 . 胎児異常は発癌の素因である、実施形態 5 4 に従う、f N R B C の調製方法。

7 5 . 癌は、乳癌、脳癌、肝癌、急性リンパ芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、腺癌、腺腫、副腎癌、基底細胞癌、骨癌、気管支癌、急性または慢性のリンパ球性腫瘍または顆粒球性腫瘍、急性脊髄性白血病、子宮頸部形成異常、慢性骨髄性白血病、結腸癌、類表皮癌、島細胞腫瘍、カポージ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、平滑筋腫、悪性高カルシウム血症、悪性黒色腫、マルファン症候群の腫瘍、ユーイング肉腫、胆嚢癌、胆石腫瘍、巨細胞腫瘍、多形性膠芽腫、毛様細胞腫瘍、頭部癌、過形成、奇形腫、過形成性角膜神経腫瘍、上皮内癌、腸神経節細胞腫、髓様癌、転移性皮膚癌、肺癌、リンパ腫、悪性カルチノイド、粘膜神経腫、菌状息肉腫、脊髄異形成症候群、骨髄腫、頸部癌、神経芽細胞腫、骨原性肉種、骨肉腫、卵巣腫瘍、膵臓癌、神経組織癌、甲状腺癌、局所的な皮膚病変、副甲状腺癌、クロム親和性細胞腫、真性赤血球増加症、原発性脳腫瘍、前立腺癌、直腸癌、腎細胞腫瘍、網膜芽腫、横紋筋肉腫、精上皮腫、皮膚癌、小細胞肺腫瘍、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃癌、細網細胞肉腫、およびウィルム腫瘍からなる群から選択される、実施形態 5 4 に従う、f N R B C の調製方法。

10

7 6 . 胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法であって、

(a) 場合により、それぞれ胎児細胞表面を有する 1 個または複数個の f N R B C 、およびそれぞれ母親細胞表面を有する複数の母親細胞を含む生物学的流体を提供するステップと；

20

(b) 密度分離法によって複数の母親細胞の第 1 の部分から 1 個または複数個の f N R B C を濃縮することによって、1 個または複数個の f N R B C および残存する第 1 の数の母親細胞を含む第 1 の懸濁液を生成するステップと；

(c) 第 1 の懸濁液を、第 1 の回収可能な粒子に結合した第 1 の抗体とインキュベートするステップであって、第 1 の抗体は、母親細胞の細胞表面上に存在するが、f N R B C の細胞表面上に存在しない第 1 の抗原と、第 1 の抗体が第 1 の抗原と結合する条件下で結合して、第 1 の粒子 - 細胞複合体を生成する、ステップ、ならびに第 1 の粒子 - 細胞複合体を第 1 の懸濁液から分離して取り除くことによって、1 個または複数個の f N R B C および残存する第 2 の数の母親細胞を含む第 2 の懸濁液を生成するステップと；

30

(d) 第 2 の回収可能な粒子に結合した第 2 の抗体を第 2 の懸濁液に加えるステップであって、第 2 の抗体は、f N R B C の細胞表面上に存在する第 2 の抗原と結合し、抗原は、母親細胞の細胞表面上に存在しない、ステップ、第 2 の懸濁液を、第 2 の抗体が第 2 の抗原と結合する条件下でインキュベートして、第 2 の粒子 - 細胞複合体を生成するステップ、第 2 の懸濁液から第 2 の粒子 - 細胞複合体を分離するステップ、ならびに第 2 の粒子 - 細胞複合体から細胞を放出させて再懸濁させることによって、1 個または複数個の f N R B C を生成するステップと；

(e) 物理的技術によって f N R B C の 1 個または複数個を単離するステップとを含む方法。

7 7 . 第 2 の抗体は、f N R B C 有核前駆細胞の細胞表面上に存在する表面抗原と結合するが、成体の赤血球上に存在する C D 7 1 または他の表面抗原と結合しない、実施形態 7 6 に従う、胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法。

40

7 8 . 第 2 の抗体は 4 B 9 である、実施形態 7 6 に従う、胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法。

7 9 . 第 1 の抗体は抗 C D 4 5 抗体を含む、実施形態 7 6 に従う、胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法。

8 0 . f N R B C の細胞成分を染色することをさらに含む、実施形態 7 6 に従う、胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法。

8 1 . 物理的技術は顕微操作である、実施形態 7 6 に従う、胎児有核赤血球 (N R B C) を単離する方法。

50

82. 胎児異常を検出する方法であって、

(a) 場合により、それぞれが胎児細胞表面を有する1個または複数のfNRBC、およびそれぞれが母親細胞表面を有する複数の母親細胞を含む生物学的流体を提供するステップと；

(b) 密度分離法によって複数の母親細胞の第1の部分から1個または複数のfNRBCを濃縮することによって、1個または複数のfNRBCおよび残存する第1の数の母親細胞を含む第1の懸濁液を生成するステップと；

(c) 第1の懸濁液を、第1の回収可能な粒子に結合した第1の抗体とインキュベートするステップであって、第1の抗体は、母親細胞の細胞表面上に存在するが、fNRBCの細胞表面上に存在しない第1の抗原と、第1の抗体が第1の抗原と結合する条件下で結合して、第1の粒子-細胞複合体を生成する、ステップ、ならびに第1の粒子-細胞複合体を第1の懸濁液から分離して取り除くことによって、1個または複数個のfNRBCおよび残存する第2の数の母親細胞を含む第2の懸濁液を生成するステップと；

(d) 第2の回収可能な粒子に結合した第2の抗体を第2の懸濁液に加えるステップであって、第2の抗体は、fNRBCの細胞表面上に存在する第2の抗原と結合し、第2の抗原は、母親細胞の細胞表面上に存在しない、ステップ、第2の懸濁液を、第2の抗体が第2の抗原と結合する条件下でインキュベートして、第2の粒子-細胞複合体を生成するステップ、第2の懸濁液から第2の粒子-細胞複合体を分離するステップ、ならびに第2の粒子-細胞複合体から細胞を放出させて再懸濁させることによって、1個または複数個のfNRBCを含む第3の懸濁液を生成するステップと；

(e) 1個または複数個のfNRBCを分析することによって、胎児異常の有無を判定するステップとを含む方法。

83. 第2の抗体は、fNRBC有核前駆細胞の細胞表面上に存在する表面抗原と結合するが、成体の赤血球細胞上に存在するCD71または他の表面抗原と結合しない、実施形態82に従う、胎児異常を検出する方法。

84. 第2の抗体は4B9である、実施形態82に従う、胎児異常を検出する方法。

85. 第1の抗体は抗CD45抗体を含む、実施形態82に従う、胎児異常を検出する方法。

86. fNRBCの細胞成分を染色することをさらに含む、実施形態82に従う、胎児異常を検出する方法。

87. 胎児異常は、トリソミー13、トリソミー18、トリソミー21、ダウン症候群、圧迫性麻痺の傾向がある神経障害、神経線維腫症、アラジール症候群、軟骨形成不全、ハンチントン舞蹈病、アルファ-マンノース症、ベータ-マンノース症、異染性ロイコジストロフィー、フォンレックリングハウゼン病、結節性硬化症、筋強直性ジストロフィー、嚢胞性線維症、鎌状赤血球症、テイ-サックス病、ベータ-サラセミア、ムコ多糖症、フェニルケトン尿症、シトルリン尿症、ガラクトース血症、ガラクトキナーゼおよびガラクトース4-エピメラーゼ欠乏症、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症、メチルマロン酸尿症、プロピオン酸血症、ファーバー病、フコシドーシス、ガングリオシドーシス、ゴーシェ病、I細胞病、ムコリピドーシスIII、ニーマン-ピック病、シアリドーシス、ウォールマン病、ツェルヴェーガー症候群、シスチン症、第X因子欠乏症、毛細血管拡張性運動失調、ブルーム症候群、ローベルト症候群、色素性乾皮症、脆弱(X)症候群、性染色体異数性、クラインフェルター症候群、ターナー症候群、XXX症候群、ステロイドスルファターゼ欠乏症、線形の皮膚欠損を伴う小眼球症、ペリツェーウス-メルツパッヒャー病、Y染色体上の精巢決定因子、オルニチンカルバモイル転移酵素欠乏症、ブドウ糖6-リン酸脱水素酵素欠乏症、レッシュ-ナイハン症候群、アンダーソン-ファブリ疾患、血友病A、血友病B、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、dup(17)(p11.2p11.2)症候群、16p11.2欠失、16p11.2重複、ミトコンドリア欠損、dup(22)(q11.2q11.2)症候群、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、ウォルフ-ヒルシュホーン症候群、ウィリアムス

10

20

30

40

50

- ボイレン症候群、シャルコー - マリー - ツース病、染色体再配列、染色体欠失、スミス - マゲニス症候群、口蓋心臓顔貌症候群、ディジョージ症候群、1 p 3 6 欠失、ブラーダ - ヴィリ症候群、無精子症（因子 a）、無精子症（因子 b）、無精子症（因子 c）、脊椎披裂、無脳症、神経管欠損、小頭症、水頭症、腎欠損、カルマン症候群、副腎發育不全、アンゲルマン症候群、嚢胞腎、嚢胞性ヒグローム、胎児水症、臍ヘルニアおよび胃壁裂、横隔膜ヘルニア、十二指腸閉鎖症、骨格形成異常、口唇裂、口蓋裂、アルギニノコハク酸尿、クラッペ病、ホモシスチン尿症、メーブルシロップ尿症、3 - メチルクロトニル補酵素 A カルボキシラーゼ欠乏症、糖原病、副腎過形成、低フォスファターゼ症、胎盤ステロイドスルファターゼ欠乏症、重症合併型免疫不全症候群、T 細胞免疫不全、エーラース - ダンロー症候群、骨形成不全症、成人多嚢胞性腎疾患、ファンコーニ貧血、表皮水泡症候群、発汗減少症性外胚葉性形成異常、先天性ネフローゼ（フィンランド型）、ならびに多発性内分泌腫瘍からなる群から選択される、実施形態 8 2 に従う、胎児異常を検出する方法。

8 8 . 生物学的サンプルから胎児有核赤血球（f N R B C）を濃縮する方法であって、
（ a ）生物学的サンプルを密度分離にかけて、f N R B C 含有細胞画分を得るステップと；

（ b ）ステップ（ a ）において得た f N R B C 含有細胞画分を、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を用いる磁気活性化細胞ソーティング（M A C S）にかけて、M A C S でソートした細胞集団を得るステップと；

（ c ）ステップ（ b ）において得た、M A C S でソートした細胞集団中の細胞を、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬で蛍光標識して、蛍光標識細胞集団を得るステップと；

（ d ）ステップ（ c ）において得た蛍光標識細胞集団を、フローサイトメトリーによってソートして、f N R B C を選択することによって、f N R B C が濃縮された細胞集団を得るステップと

を含み、

実施形態 8 8 の方法は、場合によりさらに、

（ e ）場合により、物理的方法、例えば顕微操作によって、個々の f N R B C または f N R B C の群を単離するステップと；

（ f ）場合により、例えば遺伝的フィンガープリンティングによって、f N R B C が胎児であることを確認するステップと
である、ステップ（ e ）および / または（ f ）を含む、方法。

8 9 . ステップ（ b ）は、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択剤を利用し、ステップ（ c ）は、少なくとも 2 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用し、場合により、ステップ（ b ）における少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、ステップ（ c ）における少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬と同じ標的を選択する（例えば、両方が同じ標的に対する抗体である）、実施形態 8 8 の方法。

9 0 . ステップ（ b ）は、少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用し、ステップ（ c ）は、少なくとも 3 つの f N R B C ポジティブ選択試薬を利用し、場合により、ステップ（ b ）における少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、ステップ（ c ）における少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬と同じ標的を選択する（例えば、両方が同じ標的に対する抗体である）、実施形態 8 8 の方法。

9 1 . ステップ（ b ）の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、実施形態 8 8 から 9 0 のいずれか 1 つの方法。

9 2 . ステップ（ b ）の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 2 3 5 a 抗体を含む、実施形態 8 8 から 9 1 のいずれか 1 つの方法。

9 3 . ステップ（ c ）の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、実施形態 8 8 から 9 2 のいずれか 1 つの方法。

9 4 . ステップ（ b ）の少なくとも 1 つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 2 3 5 a 抗体を含む、実施形態 8 8 から 9 3 のいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

95. ステップ (b) の少なくとも1つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、核染色剤を含む、実施形態 88 から 94 のいずれか1つの方法。

96. 個々の f N R B C または f N R B C の群を単離するための顕微操作をさらに含む、実施形態 88 から 95 のいずれか1つの方法。

97. ネガティブ選択ステップを含まない、実施形態 88 から 96 のいずれか1つの方法。

98. ステップ (a) において得た f N R B C 含有細胞画分を、ステップ (b) の前にネガティブ選択にかける、実施形態 88 から 96 のいずれか1つの方法。

99. ステップ (b) において得た、M A C S でソートした細胞集団を、ステップ (c) の前にネガティブ選択にかける、実施形態 88 から 96 のいずれか1つの方法。

100. ネガティブ選択は、ネガティブ免疫選択である、実施形態 98 または 99 の方法。

101. ネガティブ免疫選択は、

(a) Tリンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 3、C D 4 または C D 8 ;

(b) Bリンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 19、C D 20、または C D 32 ;

(c) p a n リンパ球マーカー、場合により C D 45 ;

(d) N K 細胞表面マーカー、場合により C D 56 ;

(e) 樹状細胞表面マーカー、場合により C D 11c または C D 23 ; および

(f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、場合により C D 14 または C D 3

3 から選択される1つまたは複数の細胞表面マーカーに対する1つまたは複数の抗体を利用する、実施形態 100 の方法。

102. 生物学的サンプルから f N R B C を濃縮する方法であって、

(a) 生物学的サンプルを密度分離にかけて、f N R B C 含有細胞画分を得るステップと ;

(b) ステップ (a) において得た f N R B C 含有細胞画分を、少なくとも2つの f N R B C ポジティブ選択試薬を用いる M A C S にかけて、M A C S でソートした細胞集団を得るステップと ;

(c) ステップ (b) において得た、M A C S でソートした細胞集団に顕微操作を実行して、個々の f N R B C または f N R B C の群を単離するステップとを含む方法。

103. ステップ (b) の少なくとも1つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、モノクローナル抗体 4 B 9 を含む、実施形態 102 の方法。

104. ステップ (b) の少なくとも1つの f N R B C ポジティブ選択試薬は、抗 C D 235 a 抗体を含む、実施形態 102 または 103 の方法。

105. ネガティブ選択ステップを含まない、実施形態 102 から 104 のいずれか1つの方法。

106. ステップ (a) において得た f N R B C 含有細胞画分を、ステップ (b) の前にネガティブ選択にかける、実施形態 102 から 104 のいずれか1つの方法。

107. ステップ (b) において得た、M A C S でソートした細胞集団を、ステップ (c) の前にネガティブ選択にかける、実施形態 102 から 104 のいずれか1つの方法。

108. ネガティブ選択は、ネガティブ免疫選択である、実施形態 106 または 107 の方法。

109. ネガティブ免疫選択は、

(a) Tリンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 3、C D 4 または C D 8 ;

(b) Bリンパ球細胞表面マーカー、場合により C D 19、C D 20、または C D 32 ;

(c) p a n リンパ球マーカー、場合により C D 45 ;

(d) N K 細胞表面マーカー、場合により C D 56 ;

40

10

20

30

40

50

(e) 樹状細胞表面マーカー、場合により C D 1 1 c または C D 2 3 ; および

(f) マクロファージまたは単球細胞表面マーカー、場合により C D 1 4 または C D 3 3

から選択される 1 つまたは複数の細胞表面マーカーに対する 1 つまたは複数の抗体を利用する、実施形態 1 0 8 の方法。

1 1 0 . 生物学的サンプルは母体血液である、実施形態 8 8 から 1 0 9 のいずれか 1 つの方法。

1 1 1 . 母体血液は、妊娠約 4 週から約 3 8 週の間に取り出される、実施形態 1 1 0 の方法。

1 1 2 . 母体血液は、妊娠約 6 週から約 2 0 週の間に取り出される、実施形態 1 1 1 の方法。

1 1 3 . 実施形態 8 8 から 1 1 2 のいずれか 1 つの方法によって得られる、または得ることができる、f N R B C が濃縮された細胞集団。

1 1 4 . 母体血液から濃縮された、(a) 少なくとも 2、少なくとも 5、もしくは少なくとも 1 0 個の、かつ/または (b) 最大 1 5、最大 2 5、もしくは最大 3 5 個の f N R B C を含有する、F A C S でソートした細胞集団。

1 1 5 . (a) 少なくとも 2 0、少なくとも 5 0、または少なくとも 1 0 0 の、かつ/または (b) 最大 1 5 0、最大 2 5 0、または最大 3 5 0 の F A C S 事象を含有する、実施形態 1 1 4 の、F A C S でソートした細胞集団。

1 1 6 . 固定されていない、実施形態 1 1 3 から 1 1 5 のいずれか 1 つの細胞集団。

1 1 7 . 胎児異常について、実施形態 1 1 3 から 1 1 6 のいずれか 1 つの細胞集団由来の少なくとも 1 個の f N R B C を分析することを含む、胎児異常を検出する方法。

1 1 8 . 実施形態 1 から 1 1 2 のいずれか 1 つの方法に従って、f N R B C を、前記分析の前に濃縮することをさらに含む、実施形態 1 1 7 の方法。

1 1 9 . 胎児異常について単一の f N R B C を分析することを含む、実施形態 1 1 7 または 1 1 8 の方法。

1 2 0 . 胎児異常について一群の f N R B C を分析することを含む、実施形態 1 1 7 または 1 1 8 の方法。

1 2 1 . 前記分析の前に全ゲノム増幅を実行することを含む、実施形態 1 1 9 または 1 2 0 の方法。

1 2 2 . 前記分析の前にゲノムのサブセットを増幅することを含む、実施形態 1 1 9 または 1 2 0 の方法。

1 2 3 . 分析は定量 P C R を含む、実施形態 1 1 7 から 1 2 2 のいずれか 1 つの方法。

1 2 4 . 分析はマイクロアレイ上で実行される、実施形態 1 1 7 から 1 2 2 のいずれか 1 つの方法。

1 2 5 . f N R B C を胎児細胞として確認することをさらに含む、実施形態 1 1 7 から 1 2 4 のいずれか 1 つの方法。

1 2 6 . 確認が、ショートタンDEMリピーT (S T R) 分析、遺伝的フィンガープリンティング、または単一ヌクレオチド多型 (S N P) 分析を実行することを含む、実施形態 1 2 5 の方法。

1 2 7 . 確認が、f N R B C D N A を母系 D N A と比較することを含む、実施形態 1 2 5 または 1 2 6 の方法。

1 2 8 . 確認が、f N R B C D N A を、母系 D N A および父系 D N A の両方と比較することを含む、実施形態 1 2 5 または 1 2 6 の方法。

【 0 2 0 5 】

種々の特定の実施形態が例示され、かつ説明されてきたが、種々の変更が、本開示の本質および範囲から逸脱することなくなされてもよいことが理解されるであろう。

【 0 2 0 6 】

1 4 . 参考文献の引用

本出願において引用される全ての刊行物、特許、特許出願、および他の文献は、個々の

10

20

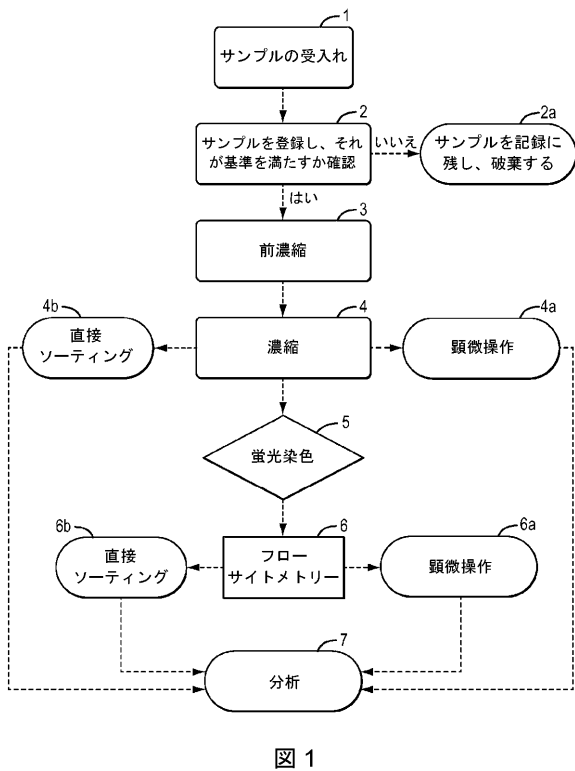
30

40

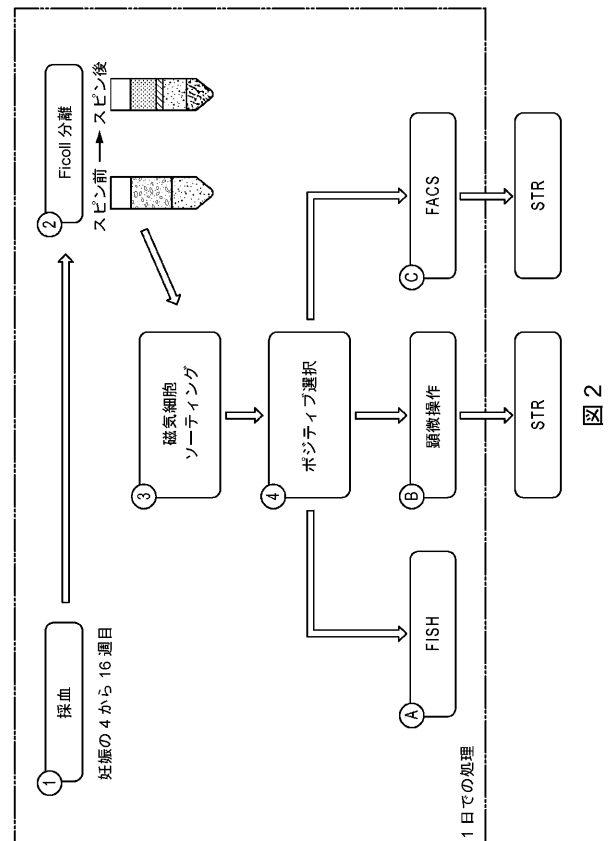
50

刊行物、特許、特許出願、または他の文献が、全ての目的について、参照によって組み込まれることが個々に示されている場合と同じ範囲まで、全ての目的について、それらの全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。本明細書中に組み込まれる参考文献の1つまたは複数の教示と本開示との間に矛盾がある場合には、本明細書の教示が意図される。

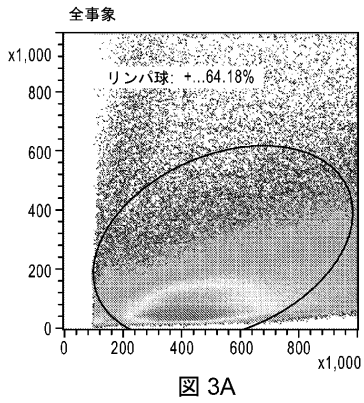
【 図 1 】



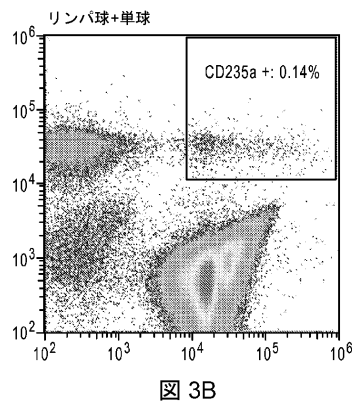
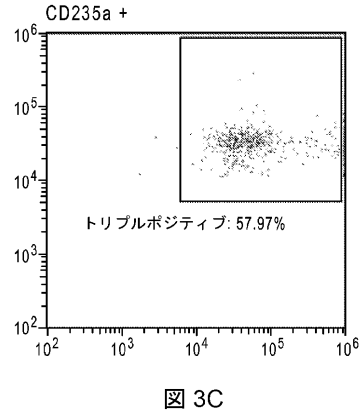
【 図 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

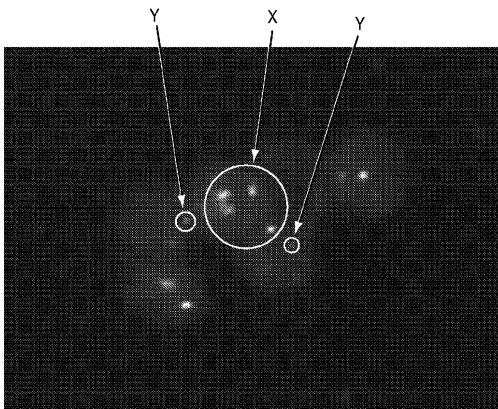


ゲートおよび統計量

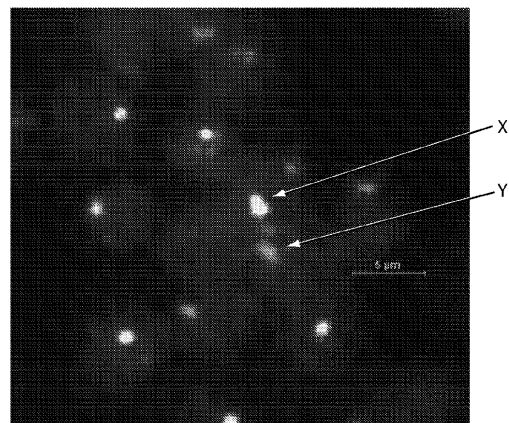
名称	事象	親面分に対する割合(%)	総数に対する割合(%)
□ 全事象	1,009,737	0.00%	100.00%
□ リンパ球+単球	648,019	64.18%	64.18%
□ CD235a +	878	0.14%	0.09%
□ トリプルポジティブ	509	57.97%	0.05%

図 3D

【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

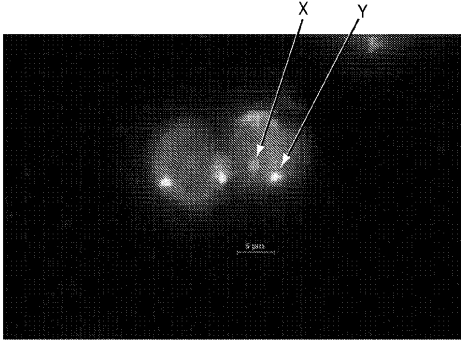


図 6

【 図 7 - 1 】

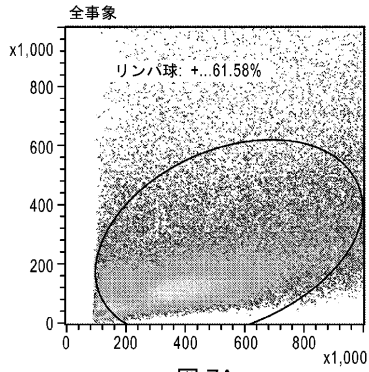


図 7A

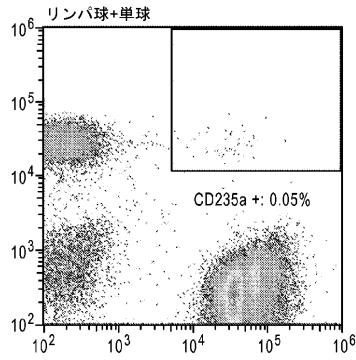


図 7B

【 図 7 - 2 】

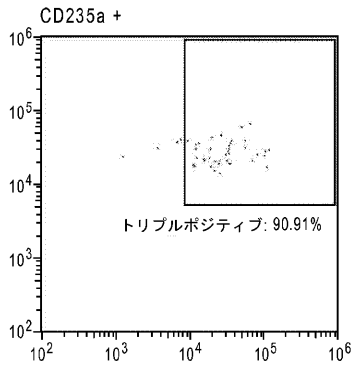


図 7C

【 図 8 】

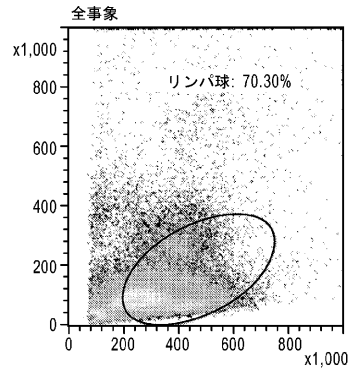


図 8A

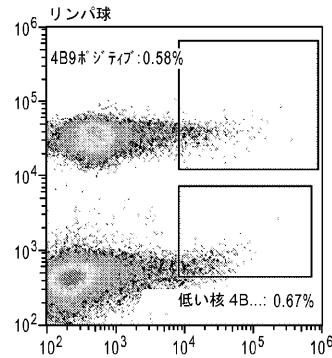
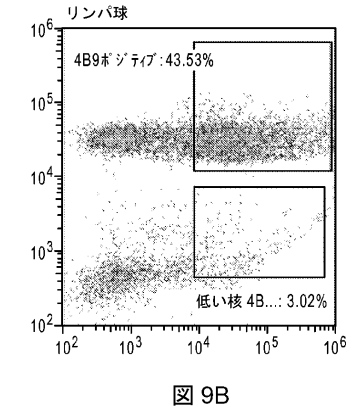
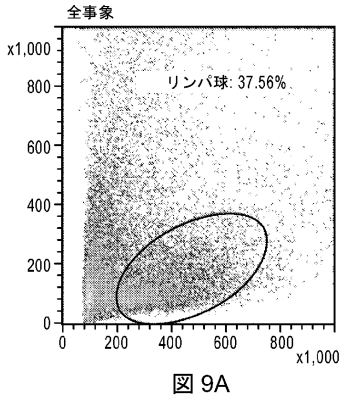


図 8B

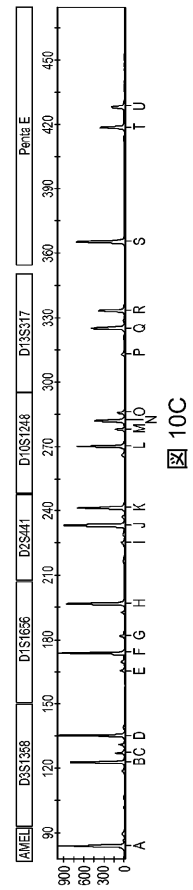
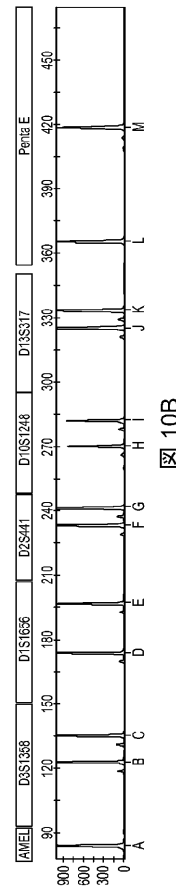
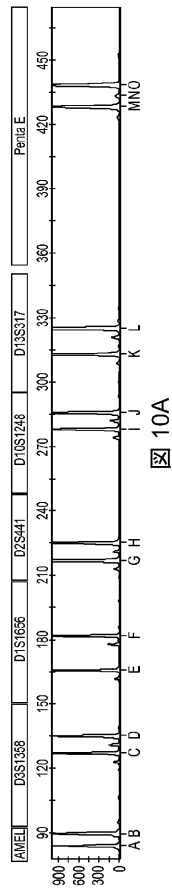
名称	事象	親画分に対する割合(%)	総数に対する割合(%)
□ 全事象	151,921	0.00%	100.00%
□ リンパ球+単球	93,554	61.58%	61.58%
□ CD235a +	44	0.05%	0.03%
□ トリプルポジティブ	40	90.91%	0.03%

図 7D

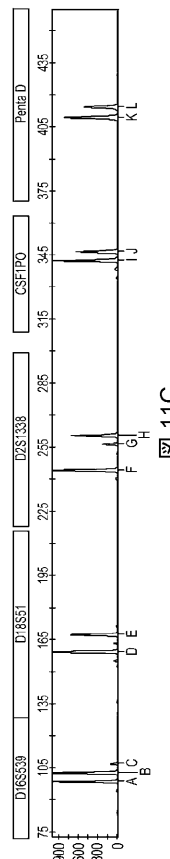
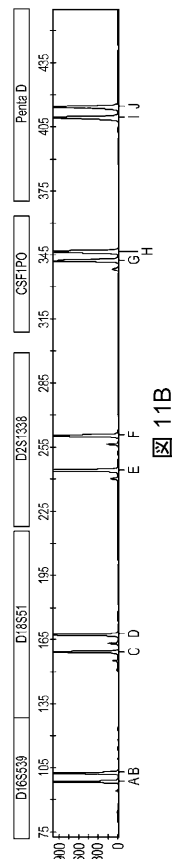
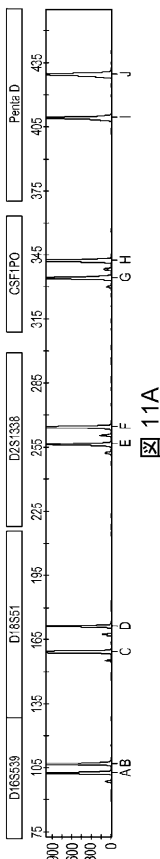
【 図 9 】



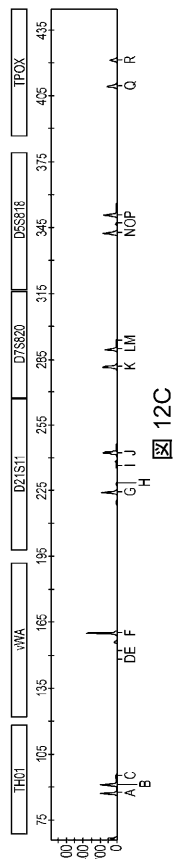
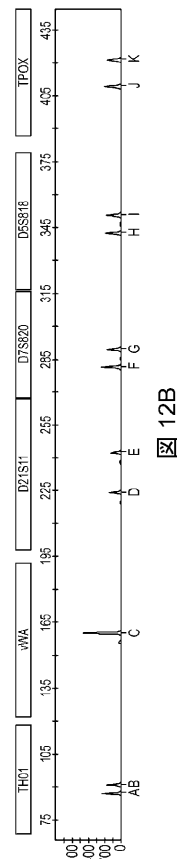
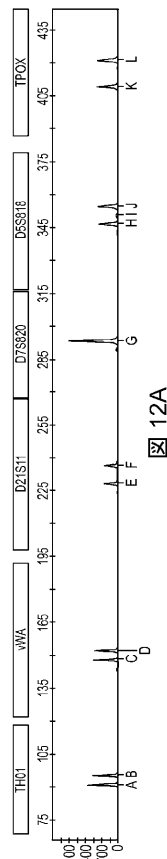
【 図 10 】



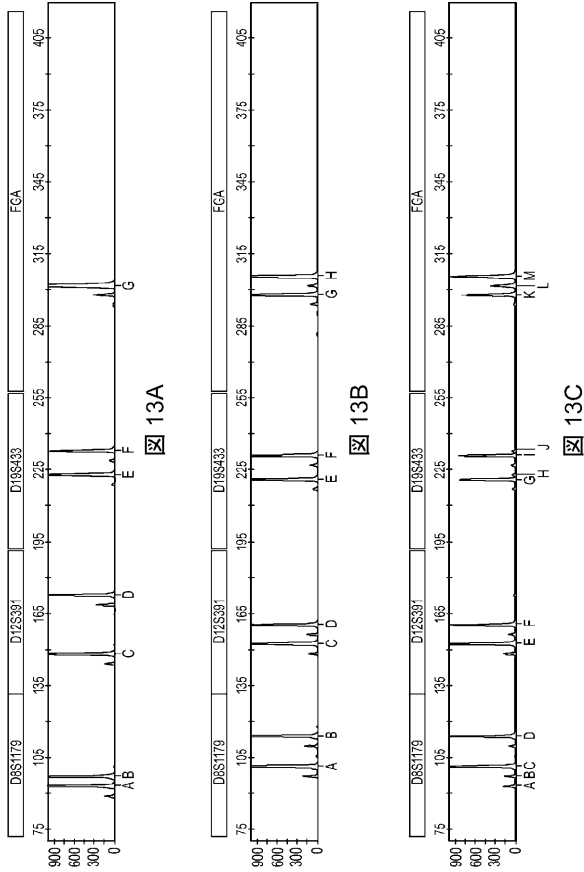
【 図 11 】



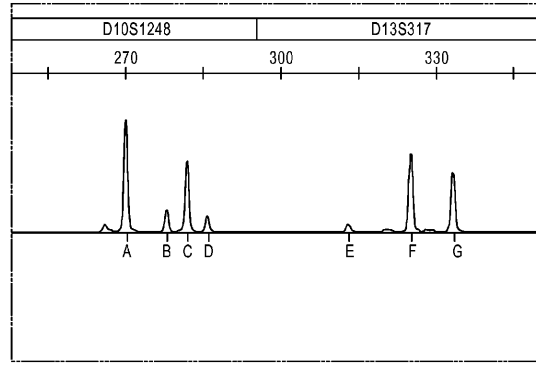
【 図 12 】



【 13 】

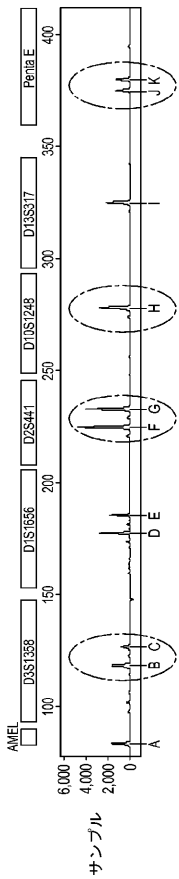


【 14 】

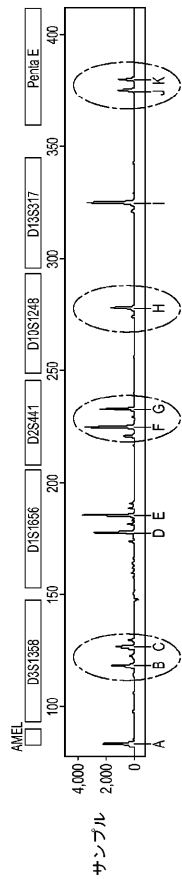


14

【 15 - 1 】

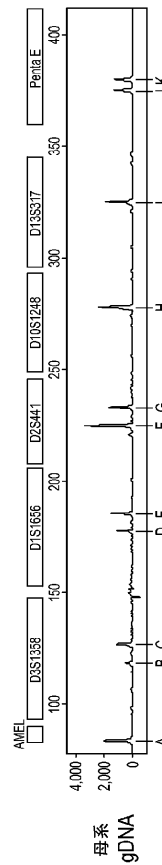


15A

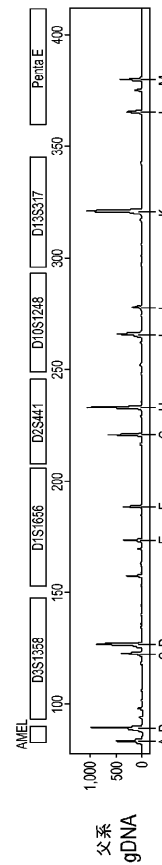


15B

【 15 - 2 】



15C



15D

【 図 16 - 1 】

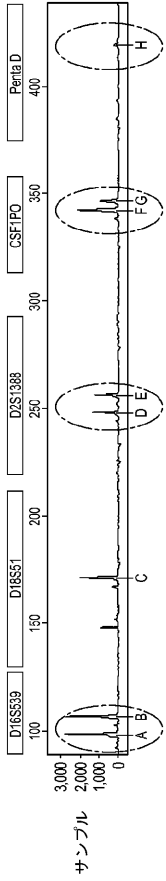


図 16A

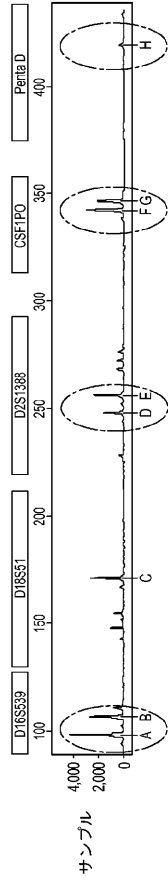


図 16B

【 図 16 - 2 】

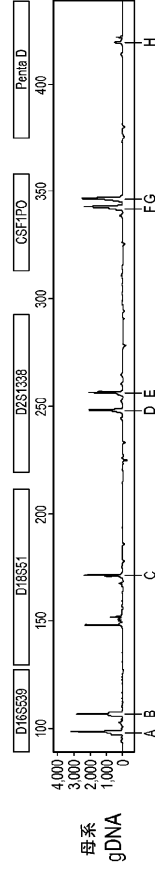


図 16C

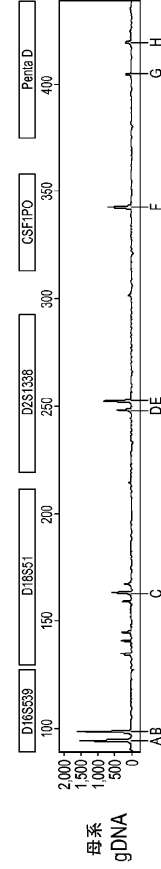


図 16D

【 図 17 - 1 】

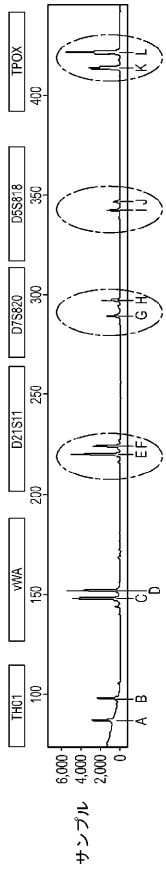


図 17A

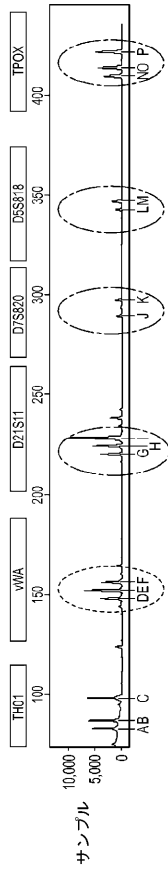


図 17B

【 図 17 - 2 】

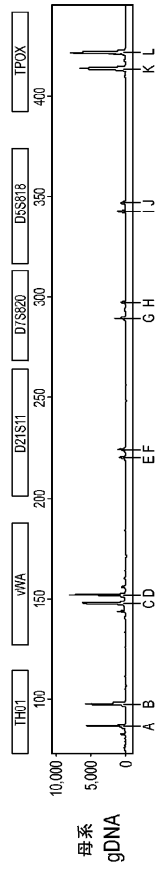


図 17C

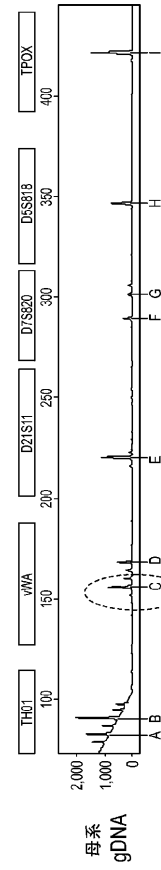


図 17D

【 図 18 - 1 】

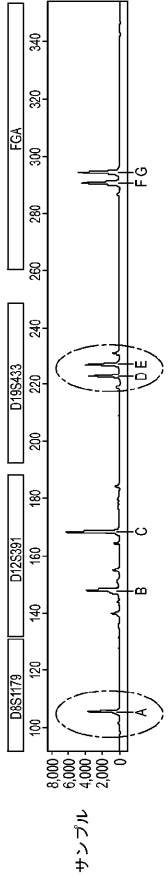


図 18A

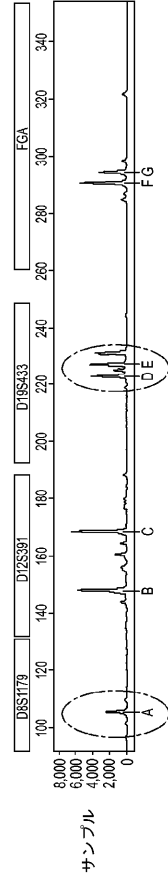


図 18B

【 図 18 - 2 】

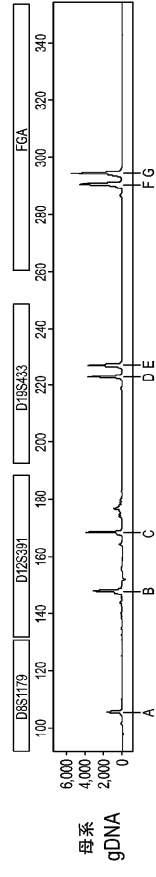


図 18C

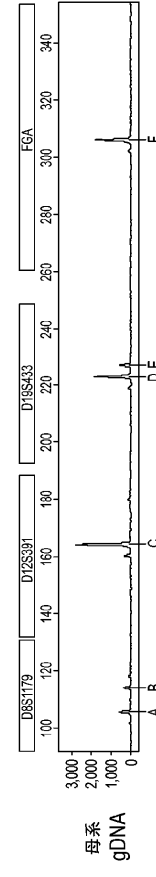


図 18D

【 図 19 】

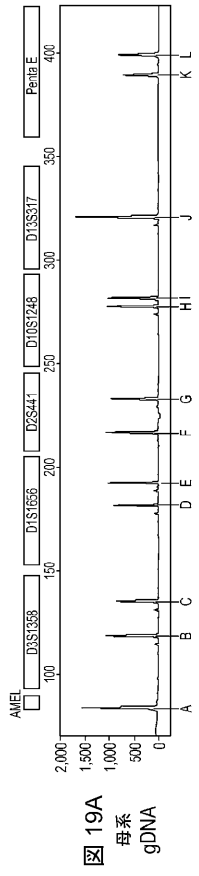


図 19A

母系 gDNA

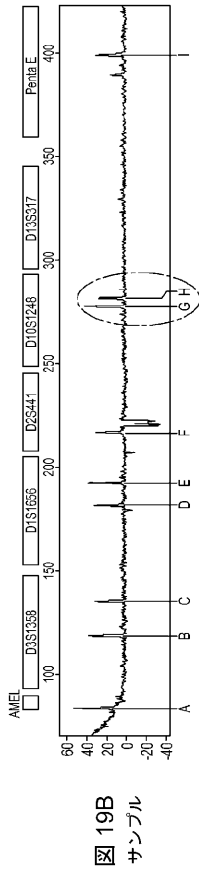


図 19B

サンプル

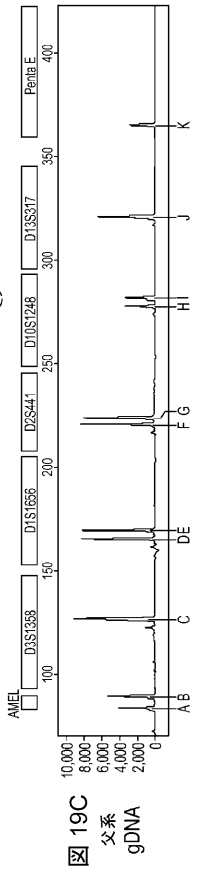


図 19C

父系 gDNA

【 図 20 】

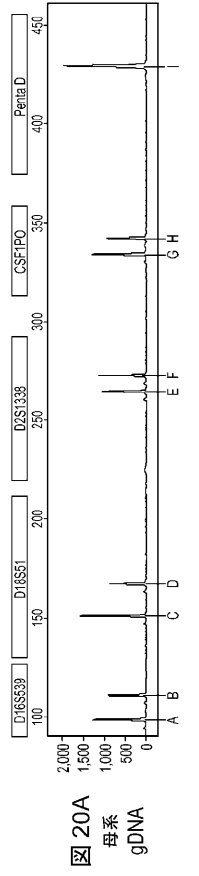


図 20A

母系 gDNA



図 20B

サンプル

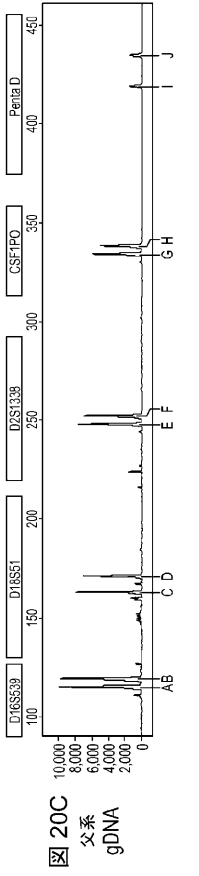
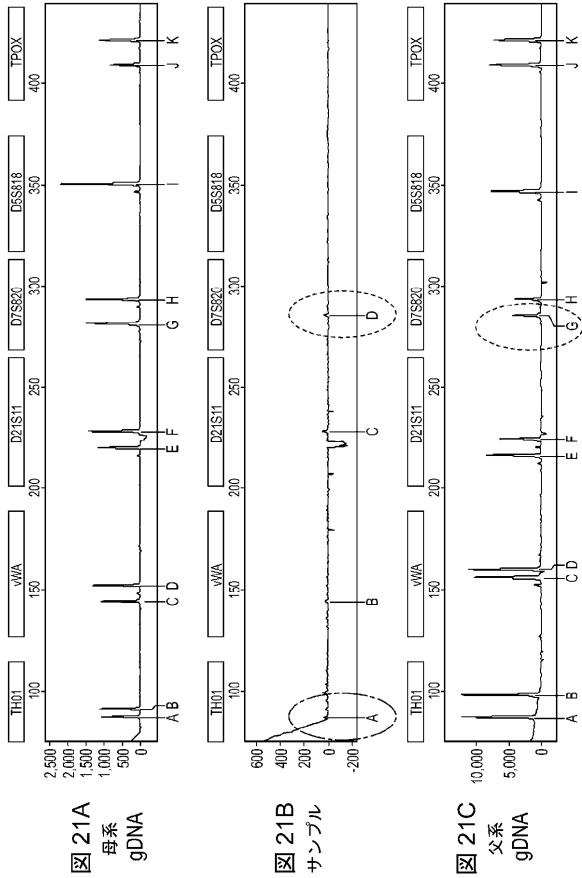


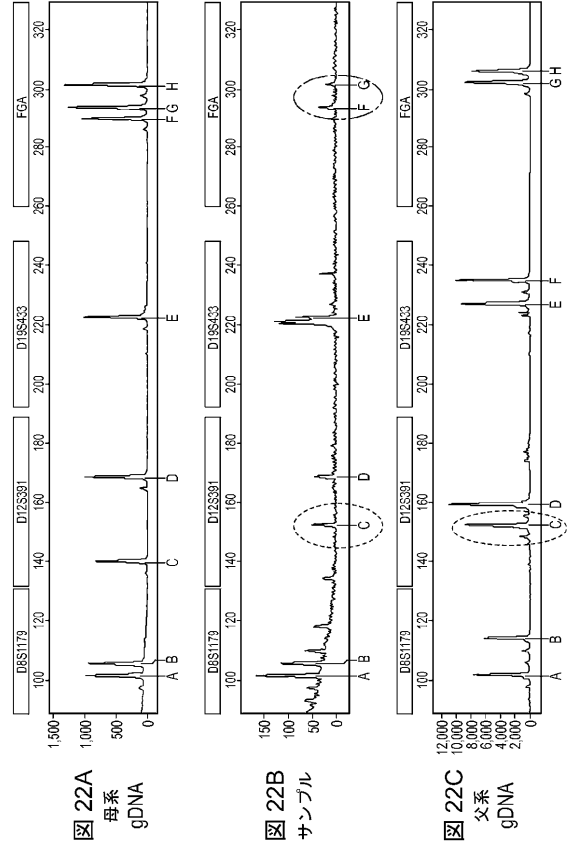
図 20C

父系 gDNA

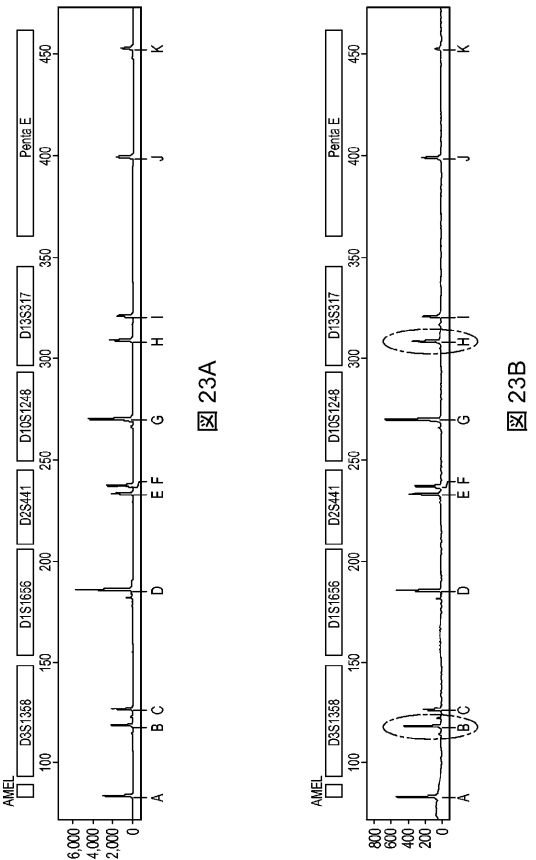
【 図 2 1 】



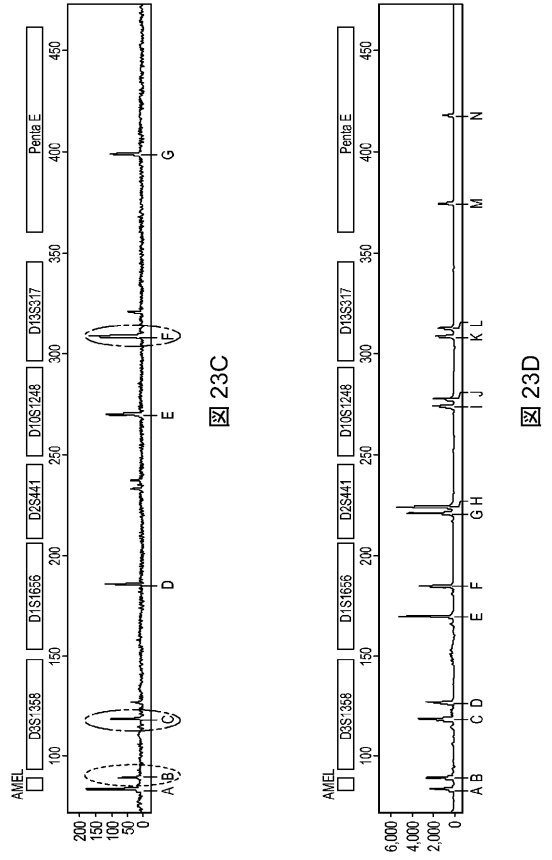
【 図 2 2 】



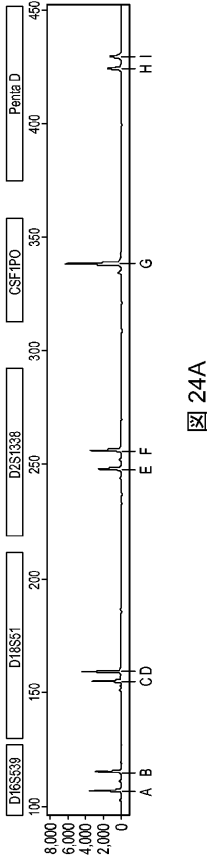
【 図 2 3 - 1 】



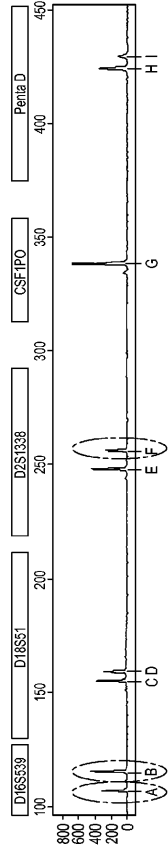
【 図 2 3 - 2 】



【 2 4 - 1 】

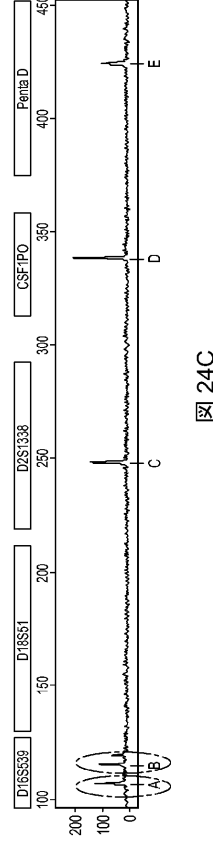


24A

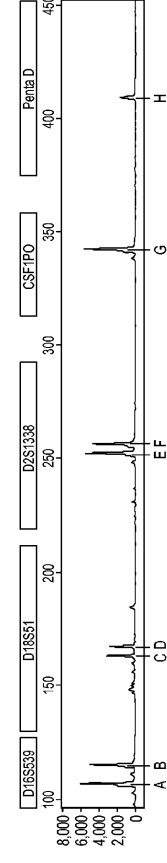


24B

【 2 4 - 2 】

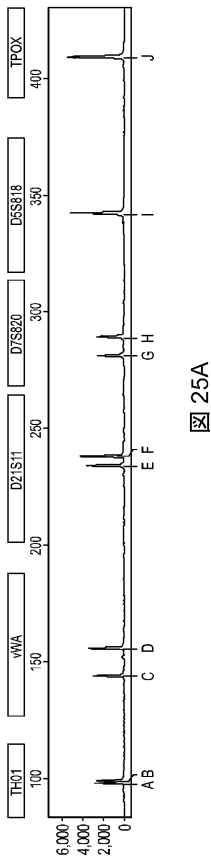


24C

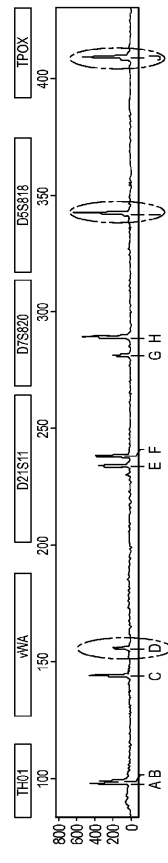


24D

【 2 5 - 1 】

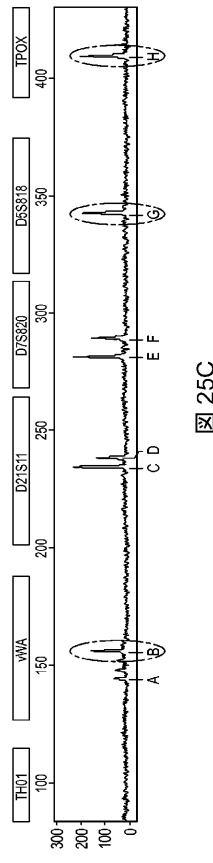


25A

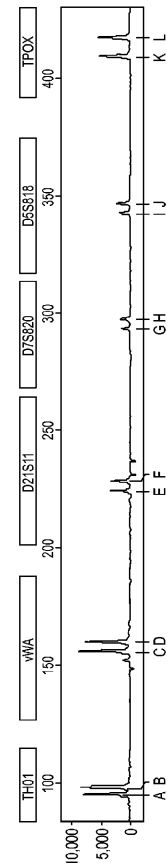


25B

【 2 5 - 2 】

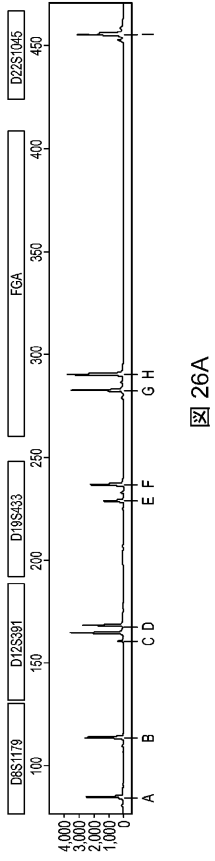


25C

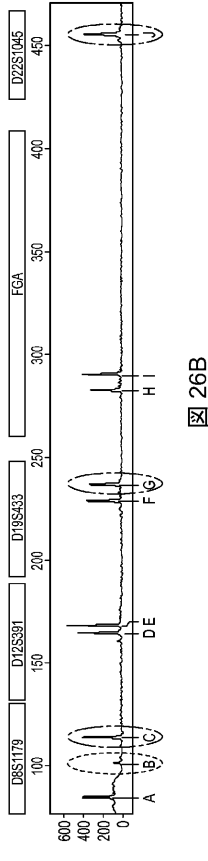


25D

【 26 - 1 】

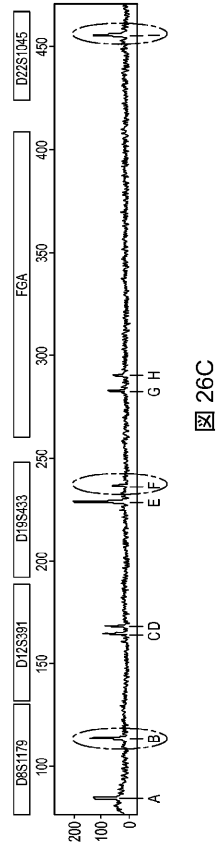


26A

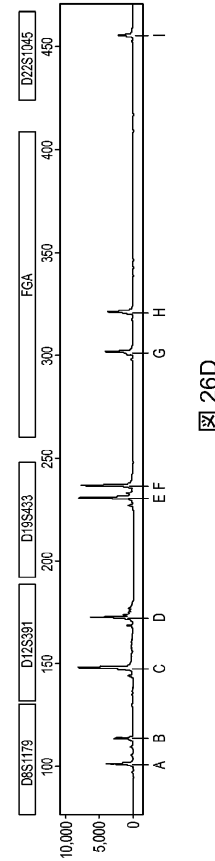


26B

【 26 - 2 】



26C



26D

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/030420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C12N5/00 C12Q1/68 C12N5/078 G01N33/80 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12N C12Q 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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PURWOSUNU Y ET AL: "Clinical Potential for Noninvasive Prenatal Diagnosis Through Detection of Fetal Cells in Maternal Blood", TAIWANESE JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, ELSEVIER (SINGAPORE) PTE LTD, HONG KONG BRANCH, HONG KONG, HK, vol. 45, no. 1, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 10-20, XP026304744, ISSN: 1028-4559, DOI: 10.1016/S1028-4559(09)60184-4 [retrieved on 2006-03-01] whole document, in particular p. 14, col. 1, par. 1 . col. 2, bridging par. ----- -/--	1-14, 23-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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		Date of mailing of the international search report
9 July 2015		05/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chrétien, Eva Maria

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/030420**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-14(completely); 23-26(partially)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/030420

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIANCHI D W ET AL: "ISOLATION OF FETAL DNA FROM NUCLEATED ERYTHROCYTES IN MATERNAL BLOOD", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 87, no. 9, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 3279-3283, XP000226739, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.87.9.3279 whole document, in particular p. 3279, col. 2, par. 4 - p. 3280, col. 1, par. 1; p. 3282, col. 1, par. 1 - col. 2, bridging par.</p> <p>-----</p>	1-14, 23-26
A	<p>MARY ANN DEMARIA ET AL: "Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342", CYTOMETRY, vol. 25, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 37-45, XP055200753, whole document, in particular 38, col. 2, par. 1 - p. 39, col. 1, par. 3; p. 41, col. 1, par. 1 - p. 42, col. 1, bridging par.; p. 43, col.1, par. 1 - col. 2, par. 3; table 2; fig. 3</p> <p>-----</p>	1-14, 23-26
A	<p>ZHENG Y L ET AL: "Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples", PRENATAL DIAGNOSIS, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 15, no. 10, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 897-905, XP009168364, ISSN: 0197-3851 whole document, in particular p. 898, col. 2, par. 2 - p. 899, col. 2, par. 1; p. 900, col. 2, par. 3 - p. 901, col. 2, par. 1; table 2</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14, 23-26

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/030420

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BÜSCH J ET AL: "Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis", PRENATAL DIAGNOSIS, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 14, no. 12, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 1129-1140, XP002513168, ISSN: 0197-3851, DOI: 10.1002/PD.1970141206	1-3,5, 7-14, 23-26
Y	whole document, in particular p. 1130, col. 1, par. 1 - p. 1131, col. 1, bridging par.; p. 1139, col. 1, par. 1; fig. 1; table 1	4,6
Y	----- US 2013/122492 A1 (KHOSRAVI JAVAD [CA] ET AL) 16 May 2013 (2013-05-16) cited in the application whole document, in particular claims 1-10	4,6
A	----- JI YI WANG ET AL: "Fetal nucleated erythrocyte recovery: Fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection", CYTOMETRY, vol. 39, no. 3, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 224-230, XP055201215, ISSN: 0196-4763, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(20000301)39:3<224:AID-CYT08>3.0.CO;2-J whole document, in particular p. 225, col. 1, par. 3 - p. 226, col. 1, bridging par.; p. 229, col. 1, par. 2 - p. 230, col. 1, bridging par.; table 1	1-14, 23-26
A	----- SEKIZAWA ET AL: "Fetal cell recycling: Diagnosis of gender and RhD genotype in the same fetal cell retrieved from maternal blood", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 181, no. 5, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 1237-1242, XP005691139, ISSN: 0002-9378, DOI: 10.1016/S0002-9378(99)70115-8 whole document, in particular abstract, table 1	1-14, 23-26
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/030420

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/076653 A1 (UNIV QUEENSLAND [AU]; IRWIN DARRYL LUKE [AU]; FINDLAY IAN [AU]) 10 September 2004 (2004-09-10) the whole document -----	1-14, 23-26

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/030420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013122492 A1	16-05-2013	AU 2012339755 A1	12-06-2014
		CA 2855895 A1	23-05-2013
		CN 104364389 A	18-02-2015
		EP 2780468 A2	24-09-2014
		US 2013122492 A1	16-05-2013
		US 2015133332 A1	14-05-2015
		WO 2013074520 A2	23-05-2013
WO 2004076653 A1	10-09-2004	AT 449164 T	15-12-2009
		EP 1613743 A1	11-01-2006
		NZ 542698 A	30-11-2007
		WO 2004076653 A1	10-09-2004

International Application No. PCT/ US2015/ 030420

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14(completely); 23-26(partially)

A method of enriching for fNRBCs from a biological sample, comprising a step of density separation followed by magnetic activated cell sorting (MACS) using at least one positive selection marker followed by flow cytometry of fluorescently labeled cells using at least one positive selection marker to obtain a population of cells enriched for fNRBCs.

2. claims: 15-22(completely); 23-26(partially)

A method of enriching for fNRBCs from a biological sample, comprising a step of density separation followed by MACS using at least two positive selection markers followed by micromanipulation on the MACS-sorted cell population to isolate individual or groups of fNRBCs.

3. claims: 27(completely); 30(partially)

A cell population enriched in fNRBCs obtained or obtainable by the method of any one of claim 1 to 25

4. claims: 28, 29(completely); 30(partially)

A FACS-sorted cell population containing (a) at least 2, at least 5 or at least 10 and/or (b) up to 15, up to 25, or up to 35 fNRBCs enriched from maternal blood.

5. claims: 31-42

A method of detecting a fetal abnormality

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 M

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ベンナニ, ハッサン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 7 4 6 , ディックス ヒルズ, サガモア レーン 1 5

(72) 発明者 ケルナー, レオナルド エイチ .
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 7 5 8 , マサベクア, アルハンブラ ロード 6 1

F ターム (参考) 2G045 AA02 AA25 CA02 FA37
4B063 QA01 QA11 QA19 QQ03 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR58 QR62
QS25 QS28 QS34 QX02
4B065 AA90X AC20 BA30 BD14 BD39 CA46

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017521091A5	公开(公告)日	2018-06-21
申请号	JP2017512656	申请日	2015-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	科尔贝恩科斯公司		
[标]发明人	ベンナニハッサン ケルナーレオナルドエイチ		
发明人	ベンナニ,ハッサン ケルナー,レオナルド エイチ.		
IPC分类号	C12N5/078 C12Q1/68 G01N33/49 G01N33/53		
FI分类号	C12N5/078 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/49.A G01N33/49.K G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA25 2G045/CA02 2G045/FA37 4B063/QA01 4B063/QA11 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD14 4B065/BD39 4B065/CA46		
代理人(译)	小林 浩 日野麻美 铃木康仁		
优先权	61/993659 2014-05-15 US		
其他公开文献	JP2017521091A		

摘要(译)

本公开涉及从生物样品制备胎儿有核红细胞 (NRBC) 以用于诊断测试的方法。