

(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2013-541323

(P2013-541323A)

(43) 公表日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C084
G01N 33/53 (2006.01)	C12Q 1/68 Z	
G01N 30/88 (2006.01)	G01N 33/53 D	
A61K 45/00 (2006.01)	G01N 30/88 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-521848 (P2013-521848)  
 (86) (22) 出願日 平成23年7月22日 (2011. 7. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月22日 (2013. 3. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/045018  
 (87) 国際公開番号 W02012/012725  
 (87) 国際公開日 平成24年1月26日 (2012. 1. 26)  
 (31) 優先権主張番号 61/367, 094  
 (32) 優先日 平成22年7月23日 (2010. 7. 23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502072134  
 プレジデント アンド フェロウズ オブ  
 ハーバード カレッジ  
 President and Fello  
 ws of Harvard Colle  
 ge  
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O  
 2138, ケンブリッジ, 17 クィンシ  
 ー ストリート

(74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100085279  
 弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 貪食細胞を用いて疾患または症状のシグネチャを検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、疾患または症状の診断、予後予測、またはモニタリングにおいて、貪食細胞を使用する方法を提供する。本発明はまた、貪食細胞を使用して疾患または症状のマーカーを同定する方法を提供する。

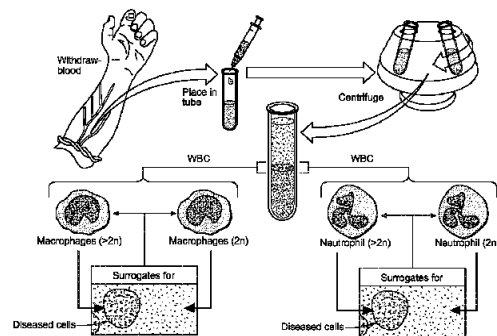


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) DNA量が $2n$ 超である貪食細胞( $>2n$ 貪食細胞)集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、

(b) DNA量が $2n$ である貪食細胞( $2n$ 貪食細胞)集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および

(c) 前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、

前記差異が対象における前記疾患または症状の存在を示す、対象における疾患または症状を診断または診断補助する方法。

10

## 【請求項2】

(a)  $>2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、

(b)  $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および

(c) 前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、

前記差異が対象における前記疾患または症状が発症するリスクを示す、対象における疾患または症状が発症するリスクを評価する方法。

20

## 【請求項3】

(a)  $>2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、

(b)  $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および

(c) 前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、

前記差異が対象における前記疾患または症状の予後を示す、対象における疾患または症状の予後予測または予後予測を補助する方法。

30

## 【請求項4】

(a) 治療前の対象の $>2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、

前記治療前の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、

前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異を同定すること、

(b) 治療後の前記対象の $>2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーについての第3プロファイルを決定すること、

前記治療後の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第4プロファイルを決定すること、

前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異を同定すること、および

40

(c) 第1差異と第2差異との差異を同定することを含み、

前記同定された差異が前記対象における前記疾患または症状に対する治療の有効性を示す、対象における疾患または症状に対する治療の有効性を評価する方法。

## 【請求項5】

(a) 第1時点における対象の $>2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、

第1時点における前記対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、

前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2

50

プロフィールとの第 1 差異を同定すること、

(b) 第 2 時点における前記対象の  $> 2n$  貪食細胞集団から、前記 1 つまたは複数のマーカーについての第 3 プロファイルを決断すること、

第 2 時点における前記対象の  $2n$  貪食細胞集団から、前記 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つについての第 4 プロファイルを決断すること、

前記マーカーのうちの少なくとも 1 つまたは複数について、第 3 プロファイルと第 4 プロファイルとの第 2 差異を同定すること、および

(c) 第 1 差異と第 2 差異との差異を同定することを含み、

前記同定された差異が前記対象における前記疾患または症状の進行または軽減を示す、対象における疾患または症状の進行または軽減をモニターする方法。

10

【請求項 6】

(a) 化合物を投与する前の対象の  $> 2n$  貪食細胞集団から、疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーについての第 1 プロファイルを決断すること、

前記化合物を投与する前の対象の  $2n$  貪食細胞集団から、前記 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つについての第 2 プロファイルを決断すること、

前記マーカーのうちの少なくとも 1 つまたは複数について、第 1 プロファイルと第 2 プロファイルとの第 1 差異を同定すること、

(b) 前記化合物を投与した後の前記対象の  $> 2n$  貪食細胞集団から、前記 1 つまたは複数のマーカーについての第 3 プロファイルを決断すること、

前記化合物を投与した後の前記対象の  $2n$  貪食細胞集団から、前記 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つについての第 4 プロファイルを決断すること、

前記マーカーのうちの少なくとも 1 つまたは複数について、第 3 プロファイルと第 4 プロファイルとの第 2 差異を同定すること、

(c) 第 1 差異と第 2 差異との差異を同定することを含み、

前記同定された差異が、前記化合物が前記対象における前記疾患または症状を改善または治療することができることを示す、対象における疾患または症状を改善または治療することができる化合物を同定する方法。

20

【請求項 7】

前記 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記  $2n$  貪食細胞と比較して前記  $> 2n$  貪食細胞において上方制御または活性化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つが、前記  $2n$  貪食細胞と比較して前記  $> 2n$  貪食細胞において下方制御または抑制されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 プロファイルまたは第 2 プロファイルが、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの欠如を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 3 プロファイルまたは第 4 プロファイルが、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの欠如を含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記 (a) の前に前記  $> 2n$  貪食細胞および  $2n$  貪食細胞を溶解することをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 (a) の前に前記  $> 2n$  貪食細胞および  $2n$  貪食細胞から細胞内容物を抽出することをさらに含む、請求項 1 ~ 6 および請求項 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記 > 2 n 貪食細胞の細胞内容物中に、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうち少なくとも 1 つが存在する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 2 n 貪食細胞の細胞内容物中に、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーが存在しない、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 > 2 n 貪食細胞の細胞内容物が、生存している病気の細胞、死んだ病気の細胞、アポトーシスを起こした病気の細胞、循環腫瘍細胞、感染性因子、胎生細胞、栄養芽細胞、またはこれらの断片を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 > 2 n 貪食細胞が、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうち少なくとも 1 つを発現する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 (c) の同定された差異と前記疾患または症状の 1 つまたは複数の既知のマーカーについてのリポジトリとを比較することをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記リポジトリがデータマイニングにより得られる、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記貪食細胞が、専門貪食細胞、非専門貪食細胞、またはこれらの混合物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記専門貪食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、またはこれらの混合物である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記非専門貪食細胞が、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞、またはこれらの混合物である請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 > 2 n 貪食細胞および 2 n 貪食細胞が、前記対象の体液試料、組織、または細胞から単離される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 > 2 n 貪食細胞および 2 n 貪食細胞が貪食細胞集団から単離される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 > 2 n 貪食細胞および 2 n 貪食細胞が、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せにより貪食細胞集団から単離される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記貪食細胞集団が、前記対象の体液試料、組織、または細胞から単離される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記体液試料が、血液、尿、大便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られた体液、母体血、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚の体液、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血、洗浄液および頸腔部液、間質液、または眼液である、請求項 2 2 または請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記細胞が白血球である、請求項 2 2 または請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

前記貪食細胞集団が抗体を用いて単離される、請求項 2 3 および請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記貪食細胞集団が、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイデックス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せにより単離される、請求項 2 3 および請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 > 2 n 貪食細胞が、前記貪食細胞により分泌される産物を用いて単離される、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 1】

前記 > 2 n 貪食細胞が、前記貪食細胞表面上の細胞表面標的を用いて単離される、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記標的が前記貪食細胞により発現される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記標的が前記貪食細胞により発現されない、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記標的が前記疾患または症状のマーカーである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 > 2 n 貪食細胞が、白血球の細胞膜上に発現される分子受容体と結合するリガンドを用いて単離される、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 3 6】

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

【請求項 3 7】

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

【請求項 3 8】

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、請求項 3 7 に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

前記 RNA が、メッセンジャー RNA ( mRNA )、マイクロ RNA ( miRNA )、核小体低分子 RNA ( snoRNA )、リボソーム RNA ( rRNA )、トランスファー RNA ( tRNA )、低分子干渉 RNA ( siRNA )、ヘテロ核 RNA ( hnRNA )、または低分子ヘアピン型 RNA ( shRNA ) である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

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

【請求項 4 1】

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、リン脂質、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾ - コリングリセロリン脂質、リゾ - エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾ - ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル - CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、スフィンゴシン、リゾ - スフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラスマ

40

50

ローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、またはこれらの誘導体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

前記炭水化物が、単糖類、二糖類、多糖類、オリゴ糖類、またはこれらの誘導体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

前記代謝物が、一次代謝物、二次代謝物、有機代謝物、無機代謝物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド類、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 44】

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記定量的アッセイが、シークエンシング、ダイレクトシークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガー・ジデオキシターミネーションシークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シークエンシング (duplex sequencing)、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理シグネチャシークエンシング、エマルジョン PCR 法、可逆的ダイターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアターム (near-term) シークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成シークエンシング (sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシークエンシング、リバースターミネーターシークエンシング、ナノポアシークエンシング、454 シークエンシング、Solexa Genome Analyzer を用いたシークエンシング、SOLiD (登録商標) を用いたシークエンシング、MS - PET シークエンシング、質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI - TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q - TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI - MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (MALDI - FT - ICR) 法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析、定量的 PCR 法、リアルタイム PCR 法、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せを用いる、請求項 45 に記載の方法。

20

30

40

【請求項 47】

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNA メチル化プロファイル、DNA アセチル化プロファイル、染色体遺伝子量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 48】

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析、シークエンシング解析、電気泳動解析、制限断片長多型 (RFLP) 解析、ノーザンブロット解析、定量的 PCR 法、逆転写 PCR 解析 (RT - PCR)、アレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリ

50

ダイゼーション解析、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA)、一本鎖高次構造多型 (SSCP) 法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、RNAaseミスマッチ解析、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q-TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (MALDI-FT-ICR) 法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、表面プラズモン共鳴法、サザンブロット解析、*in situ*ハイブリダイゼーション法、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) 法、発色性*in situ*ハイブリダイゼーション (CISH) 法、免疫組織化学 (IHC) 法、マイクロアレイ法、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、核型分析、多重ライゲーション依存性プローブ増幅 (MLPA) 法、短蛍光フラグメントの定量的多重PCR (QMPSF) 法、顕微鏡法、メチル化特異的PCR (MSP) アッセイ、ライゲーション仲介PCRによるHpaII小断片濃縮 (HpaII Tiny Fragment Enrichment by Ligation-Mediated PCR) (HELP) アッセイ、放射性酢酸塩標識アッセイ、比色によるDNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降 (ChIP-on-chip) アッセイ、制限酵素ランドマークゲノムスキニング法、メチル化DNA免疫沈降 (MeDIP) 法、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性の分子切断光アッセイ、クロマトグラフィーによる分離、メチル化感受性制限酵素解析、バイサルファイトによる非メチル化シトシンのウラシルへの変換、メチル結合PCR解析、またはこれらの組合せにより決定される、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記核酸プロファイルが、ダイレクトシークエンシング、ランダムショットガンシークエンシング、サンガー・ジデオキシターミネーションシークエンシング、全ゲノムシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、パイロシークエンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シークエンシング (duplex sequencing)、サイクルシークエンシング、一塩基伸長シークエンシング、固相シークエンシング、ハイスループットシークエンシング、大規模並列処理シグネチャシークエンシング、エマルジョンPCR法、可逆的ダイターミネーターによるシークエンシング、ペアドエンドシークエンシング、ニアターム (near-term) シークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ライゲーションによるシークエンシング、ショートリードシークエンシング、一分子シークエンシング、合成シークエンシング (sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシークエンシング、リバスターミネーターシークエンシング、ナノポアシークエンシング、454シークエンシング、Solexa Genome Analyzerを用いたシークエンシング、SOLID (登録商標) を用いたシークエンシング、MS-PETシークエンシング、質量分析法、およびこれらの組合せからなる群より選択されるシークエンシング技術により決定される、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項44に記載の方法。

【請求項51】

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、*in situ*ハイブリダイゼーション法、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (S

E L D I - T O F ) 型質量分析法、四重極飛行時間 ( Q - T O F ) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 ( A P P I - M S ) 法、フーリエ変換質量分析 ( F T M S ) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 ( M A L D I - F T - I C R ) 法、二次イオン質量分析 ( S I M S ) 法、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、表面プラズモン共鳴法、シークエンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記 1 つまたは複数のマーカーのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、立体構造状態、またはこれらの組合せを決定することを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) 法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 ( M A L D I - T O F ) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 ( E S I ) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 ( S E L D I - T O F ) 型質量分析法、四重極飛行時間 ( Q - T O F ) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 ( A P P I - M S ) 法、フーリエ変換質量分析 ( F T M S ) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 ( M A L D I - F T - I C R ) 法、二次イオン質量分析 ( S I M S ) 法、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 5 4】

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、パルスドアンペロメトリー検出器を用いた高速陰イオン交換クロマトグラフィー ( H P A E C - P A D ) 法、液体クロマトグラフィー法、ガスクロマトグラフィー法、蛍光アッセイ、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 ( M A L D I - T O F ) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 ( E S I ) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 ( S E L D I - T O F ) 型質量分析法、四重極飛行時間 ( Q - T O F ) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 ( A P P I - M S ) 法、フーリエ変換質量分析 ( F T M S ) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 ( M A L D I - F T - I C R ) 法、二次イオン質量分析 ( S I M S ) 法、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 4 4 に記載の方法。

30

【請求項 5 5】

前記対象が少なくとも 2 つの疾患または症状を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記対象が哺乳類動物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

前記対象がヒトである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記差異が 1 倍よりも大きい、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記差異が、少なくとも 1 . 0 5 倍、1 . 1 倍、1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または 1 0 倍の差異である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

50

前記疾患または症状が、心血管系の疾患または症状、腎臓関連の疾患または症状、胎児期もしくは妊娠関連の疾患または症状、神経性もしくは精神神経性の疾患または症状、自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状、癌、感染性の疾患または症状、ミトコンドリア病、呼吸器胃腸管系の疾患または症状、生殖器系の疾患または症状、眼部の疾患または症状、筋骨格系の疾患または症状、あるいは皮膚の疾患または症状である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

(a) 疾患または症状を有する対象の > 2 n 貪食細胞から、複数の被分析物についての第 1 プロファイルを決すること、

前記疾患または症状を有する対象の 2 n 貪食細胞から、複数の被分析物についての第 2 プロファイルを決すること、

第 2 プロファイルと比較して第 1 プロファイルに特異的である、第 1 プロファイルと第 2 プロファイルとの第 1 差異セットを同定すること、

(b) 前記疾患または症状を有しないコントロール対象の > 2 n 貪食細胞から、複数の被分析物についての第 3 プロファイルを決すること、

前記疾患または症状を有しないコントロール対象の 2 n 貪食細胞から、複数の被分析物についての第 4 プロファイルを決すること、

第 4 プロファイルと比較して第 3 プロファイルに特異的である、第 3 プロファイルと第 4 プロファイルとの第 2 差異セットを同定すること、

(c) 第 2 差異セットと比較して第 1 差異セットに特異的である、1 つまたは複数の被分析物を同定することを含み、

前記同定された被分析物が前記疾患または症状のマーカーである、疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーを同定する方法。

【請求項 6 2】

(d) 前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒された細胞または組織から、複数の被分析物についての第 5 プロファイルを得ること、

前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒されていない細胞または組織から、複数の被分析物についての第 6 プロファイルを得ること、

第 6 プロファイルと比較して第 5 プロファイルに特異的である、第 5 プロファイルと第 6 プロファイルとの第 3 差異セットを同定すること、および

(e) 第 3 差異セット中に存在する、前記 (c) の 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つを同定することをさらに含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 (a) の前に前記 > 2 n 貪食細胞および 2 n 貪食細胞を溶解することをさらに含む、請求項 6 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 (a) の前に前記 > 2 n 貪食細胞および 2 n 貪食細胞から細胞内容物を抽出することをさらに含む、請求項 6 1 ~ 6 2 および請求項 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 > 2 n 貪食細胞の細胞内容物が、生存している病気の細胞、死んだ病気の細胞、アポトーシスを起こした病気の細胞、循環腫瘍細胞、感染性因子、胎生細胞、栄養芽細胞、またはこれらの断片を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 1 プロファイルまたは第 2 プロファイルが、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの欠如を含む、請求項 6 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記第 3 プロファイルまたは第 4 プロファイルが、前記疾患または症状の 1 つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも 1 つの欠如を含む、請求項 6 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 68】

前記第5プロファイルまたは第6プロファイルが、前記疾患または症状の1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つの欠如を含む、請求項61～62のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 69】

前記貪食細胞が、専門貪食細胞、非専門貪食細胞、またはこれらの混合物である、請求項61～62のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 70】

前記専門貪食細胞が、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球、またはこれらの混合物である、請求項69に記載の方法。

10

## 【請求項 71】

前記非専門貪食細胞が、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞、またはこれらの混合物である、請求項69に記載の方法。

## 【請求項 72】

前記 $> 2n$ 貪食細胞および $2n$ 貪食細胞が、前記対象の体液試料、組織、または細胞から単離される、請求項61～62のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 73】

前記 $> 2n$ 貪食細胞および $2n$ 貪食細胞が貪食細胞集団から単離される、請求項61～62のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 74】

前記 $> 2n$ 貪食細胞および $2n$ 貪食細胞が、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せにより貪食細胞集団から単離される、請求項73に記載の方法。

20

## 【請求項 75】

前記貪食細胞集団が、前記対象の体液試料、組織、または細胞から単離される、請求項72～74のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 76】

前記体液試料が、血液、尿、大便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、嚢胞液、腹水、胸水、妊娠第1三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第2三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第3三半期の妊婦から得られた体液、母体血、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚の体液、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および頸腔部液、間質液、または眼液である、請求項72または請求項75に記載の方法。

30

## 【請求項 77】

前記細胞が白血球である、請求項72または請求項75に記載の方法。

## 【請求項 78】

前記貪食細胞集団が抗体を用いて単離される、請求項73および請求項75～77のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 79】

前記貪食細胞集団が、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せにより単離される、請求項73および請求項75～77のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【請求項 80】

前記 $> 2n$ 貪食細胞が、前記 $> 2n$ 貪食細胞により分泌される産物を用いて単離される、請求項72～74のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 81】

前記 $> 2n$ 貪食細胞が、前記貪食細胞表面上の細胞表面標的を用いて単離される、請求項72～74のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 82】

50

前記標的が前記貪食細胞により発現される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記標的が前記貪食細胞により発現されない、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記標的が前記疾患または症状のマーカーである、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 > 2 n 貪食細胞が、白血球集団の細胞膜上に発現される分子受容体と結合するリガンドを用いて単離される、請求項 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

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

10

【請求項 8 7】

前記被分析物が、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝物、またはこれらの組合せである、請求項 6 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記核酸が、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、または DNA - RNA ハイブリッドである、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 DNA が、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、多重鎖 DNA、相補 DNA、ゲノム DNA、または非コード DNA である、請求項 8 8 に記載の方法。

20

【請求項 9 0】

前記 RNA が、メッセンジャー RNA ( mRNA )、マイクロ RNA ( miRNA )、核小体低分子 RNA ( snoRNA )、リボソーム RNA ( rRNA )、トランスファー RNA ( tRNA )、低分子干渉 RNA ( siRNA )、ヘテロ核 RNA ( hnRNA ) または低分子ヘアピン型 RNA ( shRNA ) である、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記タンパク質が、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リポタンパク質、糖タンパク質、またはホルモンである、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記脂質が、脂肪酸、中性脂肪、リン脂質、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾ - コリングリセロリン脂質、リゾ - エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾ - ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル - CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、スフィンゴシン、リゾ - スフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラスマローゲン、スルファチド、低密度リポタンパク質 ( LDL )、超低密度リポタンパク質 ( VLDL )、高密度リポタンパク質 ( HDL )、スフィンゴイド塩基 - 1 - リン酸、またはこれらの誘導体である、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載の方法。

30

40

【請求項 9 3】

前記炭水化物が、単糖類、二糖類、多糖類、オリゴ糖類、またはこれらの誘導体である、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記代謝物が、一次代謝物、二次代謝物、有機代謝物、無機代謝物、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド類、胆汁酸、ビタミン、またはこれらの誘導体である、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載

50

の方法。

【請求項 9 5】

前記プロファイルが、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝物プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 6 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記プロファイルが、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記定量的アッセイが、シーケンシング、ダイレクトシーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガー・ジデオキシターミネーションシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シーケンシング (duplex sequencing)、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理シグネチャシーケンシング、エマルジョン PCR 法、可逆的ダイターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアターム (near-term) シーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成シーケンシング (sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシーケンシング、リバスターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454 シーケンシング、Solexa Genome Analyzer を用いたシーケンシング、SOLiD (登録商標) を用いたシーケンシング、MS-PEP シーケンシング、質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q-TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (MALDI-FT-ICR) 法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイ、定量的 PCR 法、リアルタイム PCR 法、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せを用いる、請求項 9 6 に記載の方法。

10

20

30

【請求項 9 8】

前記核酸プロファイルが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNA メチル化プロファイル、DNA アセチル化プロファイル、染色体遺伝子量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記核酸プロファイルが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析、シーケンシング解析、電気泳動解析、制限断片長多型 (RFLP) 解析、ノーザンブロット解析、逆転写 PCR 解析 (RT-PCR)、定量的 PCR 法、定量的 RT-PCR 法、アレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション解析、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ (HMA)、一本鎖高次構造多型 (SSCP) 法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、RNAase ミスマッチ解析、質量分析法、質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q-TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (MALDI-FT-ICR) 法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、サザン

40

50

プロット解析、*in situ*ハイブリダイゼーション法、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)法、発色性*in situ*ハイブリダイゼーション(CISH)法、免疫組織化学(IHC)法、マイクロアレイ法、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、核型分析、多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)法、短蛍光フラグメントの定量的多重PCR(QMP SF)法、顕微鏡法、メチル化特異的PCR(MSP)アッセイ、ライゲーション仲介PCRによるHpaII小断片濃縮(HpaII Tiny Fragment Enrichment by Ligation-Mediated PCR)(HELP)アッセイ、放射性酢酸塩標識アッセイ、比色によるDNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)アッセイ、制限酵素ランドマークゲノムスキニング法、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)法、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性の分子切断光アッセイ、クロマトグラフィーによる分離、メチル化感受性制限酵素解析、表面プラズモン共鳴法、バイサルファイトによる非メチル化シトシンのウラシルへの変換、メチル結合PCR解析、またはこれらの組合せにより決定される、請求項98に記載の方法。

10

【請求項100】

前記核酸プロファイルが、ダイレクトシーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガー・ジデオキシターミネーションシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シーケンシング(duplex sequencing)、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理シグネチャシーケンシング、エマルジョンPCR法、可逆的ダイターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアターム(near-term)シーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成シーケンシング(sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシーケンシング、リバスターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerを用いたシーケンシング、SOLID(登録商標)を用いたシーケンシング、MS-PETシーケンシング、質量分析法、およびこれらの組合せから選択されるシーケンシング技術により決定される、請求項98に記載の方法。

20

30

【請求項101】

前記タンパク質プロファイルが、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せである、請求項95に記載の方法。

【請求項102】

前記タンパク質活性化プロファイルが、前記1つまたは複数のマーカーのリン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、または立体構造状態を決定することを含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

前記タンパク質プロファイルが、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI-TOF)型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間(SELDI-TOF)型質量分析法、四重極飛行時間(Q-TOF)型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)法、フーリエ変換質量分析(FTMS法)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(MALDI-FT-ICR)法、二次イオン質量分析(SIMS)法、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴法、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せによ

40

50

り決定される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 104】

前記脂質プロファイルが、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（MALDI-TOF）質量分析法、タンデム質量分析法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）型質量分析法、四重極飛行時間（Q-TOF）型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析（APPI-MS）法、フーリエ変換質量分析（FTMS）法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析（MALDI-FT-ICR）法、二次イオン質量分析（SIMS）法、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 101 に記載の方法。

10

【請求項 105】

前記炭水化物プロファイルが、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、パルスドアンペロメトリー検出器を用いた高速陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC-PAD）法、液体クロマトグラフィー法、ガスクロマトグラフィー法、蛍光アッセイ、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（MALDI-TOF）型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）型質量分析法、四重極飛行時間（Q-TOF）型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析（APPI-MS）法、フーリエ変換質量分析（FTMS）法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析（MALDI-FT-ICR）法、二次イオン質量分析（SIMS）法、ラジオイムノアッセイ、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せにより決定される、請求項 101 に記載の方法。

20

【請求項 106】

前記対象が哺乳類動物である、請求項 61～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記対象がヒトである、請求項 106 に記載の方法。

30

【請求項 108】

前記疾患または症状が、心血管系の疾患または症状、腎臓関連の疾患または症状、胎児期もしくは妊娠関連の疾患または症状、神経性もしくは精神神経性の疾患または症状、自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状、癌、感染性の疾患または症状、ミトコンドリア病、呼吸器胃腸管系の疾患または症状、生殖器系の疾患または症状、眼部の疾患または症状、筋骨格系の疾患または症状、あるいは皮膚の疾患または症状である、請求項 61～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記差異が 1 倍よりも大きい、請求項 61～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 110】

前記差異が、少なくとも 1.05 倍、1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、または 10 倍の差異である、請求項 108 に記載の方法。

40

【請求項 111】

前記疾患または症状の少なくとも 1 つの診断パラメーターを決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 112】

前記診断パラメーターが、身体検査、目視検査、生検、スキャニング、組織学検査、放射線検査、画像検査、超音波検査、市販のキットの使用、遺伝検査、免疫学的検査、体液の分析、または神経活動のモニタリングにより決定される、請求項 111 に記載の方法。

50

## 【請求項 113】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、請求項 61 ~ 62 のいずれか 1 項に記載の方法により同定された前記マーカーのうちの少なくとも 1 つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 114】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、AKT2、BAK1、EGFR、ERBB2、ETS2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、PDGFB、RB1、SERPINB2、SNCG、およびSPP1からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 115】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、AKT1、AKT2、BAK2、CDC25A、E2F1、EGFR、ERBB2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、NFKB1、PDGFB、PIK3R1、PNN、RB1、SERPINB2、SERPINB5、SNCG、SPP1、TERT、TIMP3、およびTP53からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 116】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、CASP8、CASP9、COL18A1、ETS2、HTATIP2、MMP9、SRC、およびTWIST1からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 117】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、AKT1、APAF1、ATM、CDC25A、CDKN1A、ETS2、FOS、IL8、ITGA4、ITGA6、ITGAV、JUN、MAP2K1、NFKB1A、PLAU、PLAUR、RAF1、SERPINB2、SYK、TIMP1、TNF、TNFRSF10B、およびTNFRSF1Aからなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 118】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、ACP2、AK2、AKT3、ARL5B、ATP2B3、BGN、BRAF、BTG2、CAMKK2、CAPG、CAPN12、CPLX2、DENND5A、DNA2、FAM104A、FNIP1、GFRA4、GLUD1、GNAQ、GP1BB、HNRPLL、HOXA2、HPS3、I4、ITGAV、KLHL23、LANCL2、LYPD6、MAPKAPK3、MEF2A(EG:4205を含む)、MEF2C、NVL、PCYT1A、PGLYRP4、PLOD1、PPP1CB、PRKAB2、PROS1、PTPRE、RASA4(EG:10156を含む)、RBMS2、RBPJ、STAT5B、THBS1、TRIB1、TRIM2、TSPAN6、およびZDHHC21からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 119】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、B4GALT5、BOP1、CCL2、CCL3、CCL3L1、CCRL2、CD83、CLEC4G、CLIC4、CTSC、CTSO、CXCL10、FCGR3A、FPR3、HBA1、HBB、LRMP、MAP1LC3B2、MS4A4A、MSR1、MYADML、NID1、PF4、PION、RNF217、SAMD9L、SERPING1、およびSPARCからなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 120】

前記 1 つまたは複数のマーカーが、ACOT9、AMPD2、ARHGAP15、BATF2、C3AR1、C5orf41、CCL3、CCL3L1、CD63、CHST11、CHSY1、CLEC4G、CTS2、CXorf21、CYTH4、CYTIP、DLEU2、DNAJA1、DOCK8、DTX3L、DUSP6、EPSTI1、ERF、F2RL1、FYB、GABRB2、GBP5、GLRX、GNB4、ICAM1、

10

20

30

40

50

IFI35、IFIH1、IFNAR2、IL1R1、IRF1、ITGA5、LAP3、LAPTM5、LCP2、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MICAL2、MT1DP、MT1JP、MT1M、MT2A、MYADML、NEK6、NINJ2、NNMT、NT5C3L、NUB1、PDE4B、PLOD1、PML、PRKCB、PSMB9、RCN3、RGS4、RNASE6、RTP4、SAMD9L、SEL1L、SERPING1、SETX、SIGLEC10、SKIL、SLC7A7、SNORA21、SP100、SP110、SP140、SSFA2、STAT2、STK17B、STK3、TDRD7、TMCC1、TMPRSS11E2、TNFRSF1B、TPM1、TRIM21、TXNDC4、UBE2L6、UBE2W、USP18、VAV1、WARS、WIPF1、およびWIP1からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】

前記1つまたは複数のマーカーが、ADAR、ADM、ALAS1、ANKRD22、ARHGAP27、B3GNT5、BCL10、C12orf35、C15orf29、C2orf59、CD177、CEACAM1、CPEB2、DDX58、F2RL1、GDPD3、GNAI3、HIST2H3A、HIST2H3D、HIST2H4A、HMGCRCR、HSPA6、HSPC159、IL4R、IMPA2、KPNB1、KREMEN1、KRT23、LDLR、LOC100130904、LTB4R、MAEA、MARK2、MBOAT2、MPZL3、N4BP1、NBEAL2、NMI、NPEPPS、PARP14、PGM2、PPIF、PXN、RALBP1、ROD1、RPS6KA1、S100P、SERTAD2、SLC9A1、SLPI、SP110、SPTNT1、ST14、TBC1D3、TNFRSF9、TRIM21、UPP1、VPS24、ZBTB34、およびZNF256からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項122】

請求項61～62のいずれか1項に記載の方法により同定されたマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数を検出する複数のマーカー検出薬を含むキット。

【請求項123】

請求項61～62のいずれか1項に記載の方法により同定されたマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数の活性または発現を調節する薬剤を対象に投与することを含む、対象において疾患または症状を治療または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願のデータ

本願は、2010年7月23日に提出された米国特許仮出願第61/367,094号の優先権を主張するものであり、その全体が全ての目的のため、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野

本発明は概して、疾患または症状の診断、予後予測、またはモニタリングにおいて、貪食細胞を使用する方法に関する。本発明はまた、貪食細胞を使用して疾患または症状のマーカーを同定する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

本発明の背景

多くの場合、疾患の早期診断により、その疾患の治療または治癒に成功する可能性が高くなる。しかしながら、現在の診断方法は、主として健康な個体から得られた集団由来の平均値に依存する。疾患を有することが分かっていない個体、または再発性の疾患を有する個体において、疾患または症状の存在についての診断、特に早期診断を可能にする、個

別化された診断方法が必要とされる。

【0004】

白血球は、骨髄中の多能性造血幹細胞として始まり、骨髄系（単球、マクロファージ、好中球、好酸球、および好塩基球）またはリンパ系（Tリンパ球およびBリンパ球、ならびにナチュラルキラー細胞）のいずれかに発生する。骨髄系細胞（例えば、好中球およびマクロファージ）の主要な機能は、感染性生物、不要な損傷した生存細胞、老化細胞、および死細胞（アポトーシスおよびネクローシス）の貪食、ならびに細胞片の除去である。健康な動物の貪食細胞は複製せず、二倍体、すなわち、DNA指数（DNA index）が1である。平均して、各細胞は、 $< 10 \text{ ng}$ のDNA、 $< 20 \text{ ng}$ のRNA、および $< 300 \text{ ng}$ のタンパク質を含有する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の1つの目的は、貪食細胞を用いることにより、疾患または症状に特異的なマーカー、例えば、核酸、タンパク質、炭水化物、および/または脂質などの検出を容易にすることができる診断方法を提供することである。本発明の別の目的は、疾患または症状に特異的なマーカーを同定する方法を提供し、さらに、該マーカーを単独で、または任意の既知のマーカーと組み合わせ、疾患または症状を診断するために使用することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

20

本発明の概要

発明者らは、DNA量のレベルが異なる（すなわち、 $> 2n$ および $2n$ ）貪食細胞を用いることにより、疾患または症状を検出/診断する新規で有用な方法を発明した。ある実施形態では、貪食細胞の2つの亜集団が用いられ、DNA量が $2n$ 超の貪食細胞（ $> 2n$ 貪食細胞）が病気の細胞の代用物として働き、DNA量が $2n$ である貪食細胞（ $2n$ 貪食細胞）がコントロール細胞として働く。

【0007】

ある態様では、本発明は、（a）DNA量が $2n$ 超である貪食細胞（ $> 2n$ 貪食細胞）集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、（b）DNA量が $2n$ である貪食細胞（ $2n$ 貪食細胞）集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および（c）前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、前記差異が対象における前記疾患または症状の存在を示す、対象における疾患または症状を診断または診断補助する方法を提供する。

30

【0008】

別の態様では、本発明は、（a） $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、（b） $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および（c）前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、前記差異が対象における前記疾患または症状が発症するリスクを示す、対象における疾患または症状が発症するリスクを評価する方法を提供する。

40

【0009】

さらに別の態様では、本発明は、（a） $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること、（b） $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること、および（c）前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの差異を同定することを含み、前記差異が対象における前記疾患または症状の予後を示す、対象における疾患または症状を予後

50

予測または予後予測を補助する方法を提供する。

【0010】

さらに別の態様では、本発明は、(a)治療前の対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決断すること；前記治療前の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異を同定すること、(b)治療後の前記対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーについての第3プロファイルを決断すること；前記治療後の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第4プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異を同定すること、および(c)第1差異と第2差異との差異を同定することを含み、前記同定された差異が前記対象における前記疾患または症状に対する治療の有効性を示す、対象における疾患または症状に対する治療の有効性を評価する方法を提供する。

10

【0011】

さらに別の態様では、本発明は、(a)第1時点における対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決断すること；第1時点における前記対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異を同定すること、(b)第2時点における前記対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーについての第3プロファイルを決断すること；第2時点における前記対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第4プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異を同定すること、および(c)第1差異と第2差異との差異を同定することを含み、前記同定された差異が前記対象における疾患または症状の進行または軽減を示す、対象における疾患または症状の進行または軽減をモニターする方法を提供する。

20

【0012】

さらに別の態様では、本発明は、(a)化合物を投与する前の対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決断すること；前記化合物を投与する前の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異を同定すること、(b)前記化合物を投与した後の前記対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーについての第3プロファイルを決断すること；前記化合物を投与した後の前記対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第4プロファイルを決断すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異を同定すること、(c)第1差異と第2差異との差異を同定することを含み、前記同定された差異が、前記化合物が前記対象における疾患または症状を改善または治療することができることを示す、対象における疾患または症状を改善または治療することができる化合物を同定する方法を提供する。

30

40

【0013】

さらに別の態様では、本発明は、(a)疾患または症状を有する対象の $> 2n$ 貪食細胞から、複数の被分析物についての第1プロファイルを決断すること；前記疾患または症状を有する対象の $2n$ 貪食細胞から、複数の被分析物についての第2プロファイルを決断すること；第2プロファイルと比較して第1プロファイルに特異的である、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異セットを同定すること、(b)前記疾患または症状を

50

有しないコントロール対象の  $> 2n$  貪食細胞から、複数の被分析物についての第3プロファイルを決すること；前記疾患または症状を有しないコントロール対象の  $2n$  貪食細胞から、複数の被分析物についての第4プロファイルを決すること；第4プロファイルと比較して第3プロファイルに特異的である、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異セットを同定すること、および(c)第2差異セットと比較して第1差異セットに特異的である、1つまたは複数の被分析物を同定することを含み、前記同定された被分析物が前記疾患または症状のマーカーである、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーを同定する方法を提供する。所望により、前記方法は、(d)前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒された細胞または組織から、複数の被分析物についての第5プロファイルを得ること；前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒されていない細胞または組織から、複数の被分析物についての第6プロファイルを得ること；第6プロファイルと比較して第5プロファイルに特異的である、第5プロファイルと第6プロファイルとの第3差異セットを同定すること、および(e)第3差異セット中に存在する、(c)の1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つを同定することをさらに含む。

10

20

30

40

50

**【0014】**

ある実施形態では、マーカーまたは被分析物は、核酸(例えば、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、またはDNA-RNAハイブリッド)、タンパク質(例えば、アミノ酸、ペプチド、酵素、抗原、抗体、サイトカイン、リボタンパク質、糖タンパク質、またはホルモン)、脂質(例えば、脂肪酸、リン脂質、コレステロール)、炭水化物(例えば、単糖類、二糖類、多糖類)、代謝物(例えば、ビタミン、一次代謝物、二次代謝物)、またはこれらの組合せである。

**【0015】**

ある実施形態では、プロファイルは、核酸プロファイル(例えば、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体遺伝子量プロファイル、遺伝子発現プロファイル)、タンパク質プロファイル(例えば、タンパク質発現、タンパク質活性化)、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝物プロファイル、またはこれらの組合せである。ある実施形態では、プロファイルは、定性的アッセイ、定量的アッセイ、またはこれらの組合せにより決定される。

**【0016】**

ある実施形態では、1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つは、 $2n$  貪食細胞と比較して  $> 2n$  貪食細胞において上方制御または活性化されている。ある実施形態では、1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つは、 $2n$  貪食細胞と比較して  $> 2n$  貪食細胞において下方制御または抑制されている。

**【0017】**

ある実施形態では、第1プロファイル、第2プロファイル、第3プロファイル、第4プロファイル、第5プロファイル、または第6プロファイルには、1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つが欠如している。

**【0018】**

ある実施形態では、差異は、少なくとも1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である。

**【0019】**

ある実施形態において、本発明の方法はまた、貪食細胞(例えば、 $> 2n$  貪食細胞、または  $2n$  貪食細胞)を溶解すること、およびこれらの細胞から細胞内容物を抽出することを含む。ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞の細胞内容物は、生存している病気の細胞、死んだ病気の細胞、アポトーシスを起こした病気の細胞、循環腫瘍細胞、感染性因子、胎生細胞、栄養芽細胞、またはこれらの断片を含む。

**【0020】**

ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞の細胞内容物中に、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーのうち少なくとも1つが存在する。ある実施形態では、 $2n$  貪食細胞の細胞内容物中に、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーは存在しない。ある実施形態では、貪食細胞は、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーのうち少なくとも1つを発現する。ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞は、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーのうち少なくとも1つを発現する。

【0021】

ある実施形態では、本発明の方法はまた、前記(c)の同定された差異と、疾患または症状の1つまたは複数の既知のマーカーについてのリポジトリ(例えば、データマイニングにより得られたデータ)とを比較することを含む。

10

【0022】

ある実施形態では、貪食細胞は、専門貪食細胞(例えば、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、好酸球)、非専門貪食細胞(例えば、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞)、またはこれらの混合物である。

【0023】

ある実施形態では、貪食細胞(例えば、 $> 2n$  貪食細胞、 $2n$  貪食細胞)が、対象の体液試料(例えば、血液、尿)、組織、または細胞(例えば、白血球、胎生細胞)から単離される。ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞および $2n$  貪食細胞が、貪食細胞の集団から単離される。

【0024】

ある実施形態では、抗体、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せなどの標準的な/既知の細胞分離/単離/精製技術を用いて、体液、組織、または細胞から貪食細胞(例えば、 $> 2n$  貪食細胞および $2n$  貪食細胞)が単離、あるいは $2n$  貪食細胞から $> 2n$  貪食細胞が分離される。ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞により分泌される産物を用いることによって、または $> 2n$  貪食細胞の表面上の細胞表面標的(例えば、受容体タンパク質、前記疾患または症状のマーカー)を用いることによって、 $> 2n$  貪食細胞を単離することも可能である。ある実施形態では、前記標的は、 $> 2n$  貪食細胞により発現される。他の実施形態では、前記標的は、 $> 2n$  貪食細胞により発現されない。ある実施形態では、 $> 2n$  貪食細胞および $2n$  貪食細胞は、白血球の細胞膜上に発現される分子受容体と結合するリガンドを用いて単離される。

20

30

【0025】

本発明はまた、本発明の方法で使用することができるマーカー、および本発明の方法により同定され得るマーカーを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】疾患または症状を診断または診断補助するための本発明の方法のある実施形態の概略図である。この実施形態では、診断される個体から血液試料が採取される。遠心分離ステップの後、白血球を前記血液試料から単離し、2つの貪食細胞集団、すなわち、DNA量が $2n$ 超である貪食細胞( $> 2n$  貪食細胞)(例えば、マクロファージまたは好中球)およびDNA量が $2n$ である貪食細胞( $2n$  貪食細胞)(例えば、マクロファージまたは好中球)にさらに分離する。 $> 2n$  貪食細胞は病気の細胞の代用物として働き、 $2n$  貪食細胞はコントロール細胞として働く。

40

【図2】疾患または症状に特異的なマーカー(例えば、DNAマーカー、RNAマーカー、タンパク質マーカー、および脂質マーカー)が貪食細胞により獲得される経路案の概略図である。血中貪食細胞は、循環している、生存している病気の細胞、アポトーシスを起こした病気の細胞、および/または断片化した病気の細胞を貪食する。その結果、これらの病気の細胞/断片内に含まれる疾患または症状に特異的なマーカー(例えば、DNA、RNA、タンパク質、または脂質)もまた貪食細胞により内部に取り込まれ、これらの貪

50

食細胞が、これらの特異的マーカーを含有および/または発現する  $> 2n$  貪食細胞となる。一方、これらの病気の細胞/断片を内部に取り込んでいない貪食細胞はこれらのマーカーを含有または発現せず、DNA量が  $2n$  のままである。

【図3】本発明の方法のある実施形態の一般的なフローチャートの概略図である。

【図4】疾患または症状の1つまたは複数のマーカーを同定するための本発明の方法のある実施形態の概略図である。Dは、疾患または症状を有する患者の病気の組織/細胞を表し、NDは、該患者の病気ではない組織/細胞を表す。M<sub>D (N > 2)</sub>は、疾患または症状を有する患者から採取されたDNA量が  $2n$  超であるマクロファージを表し、M<sub>D (N = 2)</sub>は、該患者から採取されたDNA量が  $2n$  であるマクロファージを表す。M<sub>C (N > 2)</sub>は、前記疾患または症状を有しないコントロール対象から採取されたDNA量が  $2n$  超であるマクロファージを表し、M<sub>C (N = 2)</sub>は、該コントロール対象から採取されたDNA量が  $2n$  超であるマクロファージを表す。

10

【図5】患者の  $> 2n$  貪食細胞により選択的に獲得/発現された、疾患または症状に特異的なマーカーを同定するための本発明の方法のある実施形態の概略図である。

【図6】アレイから得られた発現プロファイルと比較することにより疾患または症状を診断/検出するための本発明の方法のある実施形態の概略図である。

【図7】ヘキスト33342で予め染色したヒト白血球の蛍光標示式細胞分取(FACS)プロファイルを示す図である。結果は、白血球が、  $> 2n$  貪食細胞の集団および  $2n$  貪食細胞の集団に分離されたことを示す。各細胞集団は、約  $10^6$  個の細胞を有する。

20

【発明を実施するための形態】

【0027】

本明細書中で特に定義しない限り、本願において使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載の細胞培養および組織培養、分子生物学、細胞生物学および癌生物学、神経生物学、神経化学、ウイルス学、免疫学、微生物学、薬理学、遺伝学、ならびにタンパク質化学および核酸化学に関して用いられる用語、およびこれらの技術は、当技術分野において周知であり、一般に用いられるものである。

【0028】

上記の全て、および本出願において引用されたすべての参考文献、特許、および特許出願公開は、具体的に参照により本明細書に組み込まれる。矛盾が生じる場合は、定義を含めて本明細書に従うものとする。

30

【0029】

本明細書を通して、単語「含む (comprise)」、または「含む (comprises)」もしくは「含んでいる (comprising)」などの変形は、明示的な整数 (もしくは成分) または整数群 (もしくは成分群) を包含することを意図するが、その他の整数 (もしくは成分) または整数群 (もしくは成分群) を排除することを意図するのではないことが理解されるであろう。

【0030】

「a」、「an」および「the」の単数形は、文脈で明確に指示されない限り、複数形を含むものである。

40

【0031】

用語「含む」は、「含むが限定されない」という意味で使用される。「含んでいる」および「含んでいるが限定されない」が、互換的に使用される。

【0032】

「患者」、「対象」、または「個体」は、互換的に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。これらの用語には、ヒト、霊長類、家畜動物 (例えば、ウシ、ブタ)、愛玩動物 (例えば、イヌ、ネコ)、およびげっ歯類 (例えば、マウスおよびラット) などの哺乳類が含まれる。

【0033】

本明細書において、コントロール対象は、アッセイされる疾患または症状を有すると診

50

断されていない任意の個体を指す。同様に、用語「正常コントロール」、「健常コントロール」、および「病気でない細胞」は、アッセイされる症状または疾患を有せず、したがって測定される症状または障害のベースラインを決定するために使用することができる供給源（例えば、対象、コントロール対象、株化細胞）から採取された試料（例えば、細胞、血清、組織）を意味する。コントロール対象、正常コントロール、および健常コントロールは、標準として獲得および使用されるデータ、すなわち、複数の異なる対象に対して繰返し使用することができるデータを含むことも理解されよう。言い換えれば、例えば、対象試料をコントロール試料と比較した場合、コントロール試料のデータが異なる実験から得られたものであってもよく、例えば、対象のデータが取得されたときに実際に得られたものではない、多数の健康な対象から得られた平均値であってもよい。

10

**【0034】**

本明細書における用語「診断」は、患者が所与の疾患または症状を患っているかどうかを、当業者が評価および/または判断できる方法を指す。多くの場合、当業者は、1つまたは複数の診断指標、例えば、マーカーに基づいて診断を行い、その存在、欠如、量、または量の変化により、症状の存在、重症度、または欠如が示される。

**【0035】**

本明細書における用語「予後」は、疾患または症状の再発を含む、疾患または症状の進行の可能性を指す。

**【0036】**

国際出願第PCT/US2009/031395号の開示は、全ての目的のため参照により本明細書に組み込まれる。

20

**【0037】**

本発明の方法の説明

本発明は、同一個体から採取されたDNA量が異なる（ $> 2n$ 対 $2n$ ）貪食細胞間で、疾患または症状に関連するマーカー（例えば、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝物）のプロファイル（例えば、遺伝子/タンパク質/脂質/炭水化物発現プロファイル、遺伝子型、遺伝子コピー数、遺伝子量、DNAメチル化など）を比較することによって、疾患または症状を診断または診断補助する方法を提供する。

**【0038】**

本発明はまた、疾患または症状を発症するリスクを評価する方法、疾患を予後予測する方法、疾患の進行または軽減をモニターする方法、治療の有効性を評価する方法、あるいは疾患または症状を改善もしくは治療することができる化合物を同定する方法を提供する。

30

**【0039】**

このような対象特異的プロファイルの比較により、対象における特定の疾患または症状の検出または診断に誤りをもたらす可能性がある、特定の疾患または症状についての集団由来の平均プロファイルへの依存が排除される。本発明の方法により、個体に個別化された、検出、診断、および治療が可能となる。

**【0040】**

本発明の方法により、(i)高い特異性、感受性、および精度を有し、体液試料、細胞、または組織内に存在する疾患または症状に特異的なマーカーの検出が可能となり、(ii)内在的（例えば、年齢、性別、民族的背景、健康状態など）および時間的なマーカー発現の変動の結果として個体間で発生することが知られている「ベースラインの不等性」が排除される。したがって、ある態様では、本発明により、疾患または症状を早期に（すなわち、疾患が、従来診断技術、例えば、画像化技術により診断可能になる前に）検出するための非侵襲的アッセイが提供され、その結果、このような疾患または症状を有する個体の介入治療、予防、および治療を行う必要性および方策に関連する意思決定を改善するための基礎が提供される。

40

**【0041】**

本発明の方法は、身体検査、目視検査、生検、スキャニング、組織学検査、放射線検査

50

、画像検査、超音波検査、市販のキットの使用、遺伝子検査、免疫学的検査、体液の分析、または神経活動のモニタリングなどの任意の既知の診断方法と共に用いることができる。

#### 【0042】

本発明の方法で用いることができる貪食細胞としては、様々な種類の物質（例えば、アポトーシスを起こした細胞、感染性因子、死細胞、生存細胞、無細胞DNA、無細胞RNA、無細胞タンパク質）を摂取可能である全ての種類の細胞が挙げられる。ある実施形態では、貪食細胞は、好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞、泡沫細胞、マスト細胞、または好酸球などの専門貪食細胞である。ある実施形態では、貪食細胞は、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、または間葉細胞などの非専門貪食細胞である。他の実施形態では、貪食細胞は、様々な種類の貪食細胞の混合物であってもよい。

10

#### 【0043】

本明細書における「 $> 2n$ 貪食細胞」は、DNA量が $2n$ 超である貪食細胞を指し、「 $2n$ 貪食細胞」は、DNA量が $2n$ である貪食細胞を指す。本発明によれば、体液中に存在する、生存している/死につつある/死んだ病気の細胞（および、その細胞内断片）、および/または疾患特異的な無細胞性の核酸、タンパク質、炭水化物、および/または脂質を貪食する貪食細胞もある。このような貪食によりこれらの疾患マーカーが貪食細胞の内部に取り込まれ、その結果、これらの貪食細胞のDNA量が $2n$ よりも多くなる。一方、体液中に存在する、生存している/死につつある/死んだ病気の細胞もしくは断片、および/または疾患特異的な無細胞性の核酸、タンパク質、脂質、および/または炭水化物を貪食していない貪食細胞もある。この貪食細胞群のDNA量は、 $2n$ のままである。ある実施形態では、疾患特異的マーカー（例えば、疾患特異的変異を有するDNA）が、 $> 2n$ 貪食細胞により発現されることがある。例えば、病気の細胞の変異DNAが、 $> 2n$ 貪食細胞の正常DNAに組み込まれる。その後、 $> 2n$ 貪食細胞の「組み込まれた」DNAがRNAへ転写されてタンパク質へ翻訳されることにより、病気の細胞を貪食していない貪食細胞（すなわち、 $2n$ 貪食細胞）とは異なる表現型がもたらされる。他の実施形態では、内部に取り込まれた疾患特異的マーカーは、 $> 2n$ 貪食細胞により発現されない。マーカーは、 $> 2n$ 貪食細胞の膜上へ移行されてもよく、 $> 2n$ 貪食細胞によって分泌されてもよい。

20

#### 【0044】

本明細書において、疾患または症状のマーカーの「プロファイル」は、マーカーに関する任意の情報を広く指すことがある。この情報は、定性的情報（例えば、存在または欠如）、または定量的情報（例えば、レベル、コピー数、または量）のいずれであってもよい。ある実施形態では、マーカーのプロファイルによりこのマーカーの欠如が示されることがある。プロファイルは、核酸（例えば、DNAまたはRNA）プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝物プロファイル、またはこれらの組合せであってもよい。本明細書における「マーカー」は、一般に、貪食細胞で差次的に検出可能であり、疾患または症状の存在の指標となる被分析物を指す。貪食細胞において定量的または定性的に被分析物を区別することができる場合、この被分析物は、差次的に検出可能である。

30

40

#### 【0045】

本発明の方法は、様々な疾患または症状に適用可能である。例示的な疾患または症状は、心血管系の疾患または症状、腎臓関連の疾患または症状、胎児期もしくは妊娠関連の疾患または症状、神経性もしくは精神神経性の疾患または症状、自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状、癌、感染性の疾患または症状、ミトコンドリア病、呼吸器胃腸管系の疾患または症状、生殖器系の疾患または症状、眼部の疾患または症状、筋骨格系の疾患または症状、あるいは皮膚の疾患または症状である。

#### 【0046】

本明細書における用語「心血管系の疾患または症状」は、心臓または血管系（動脈および静脈）を冒す任意の症状を指す。心血管系の疾患の例には、これらに限定されないが、

50

心筋梗塞、冠動脈疾患、経皮的冠動脈形成術（P T C A）、冠動脈バイパス手術（C A B G）、再狭窄、末梢動脈疾患、脳卒中、腹部大動脈瘤、頭蓋内動脈瘤、大動脈アテローム硬化性脳卒中、心原性脳卒中、早発性心筋梗塞、心不全、肺塞栓症、急性冠症候群（A C S）、狭心症、心肥大、動脈硬化症、心筋炎、汎心炎、心内膜炎、高血圧、鬱血性心不全、アテローム性硬化症、脳血管疾患、心臓の健康状態の低下、虚血性心疾患、心膜炎、心原性ショック、アルコール性心筋症、先天性心疾患、虚血性心筋症、高血圧性心筋症、弁膜性心筋症、炎症性心筋症、全身性代謝疾患に伴う二次性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、不整脈原性右室心筋症、拘束性心筋症、非圧縮型心筋症、心臓弁膜症、高血圧性心疾患、心筋虚血性発作、不安定狭心症、心筋破裂、心原性ショック、塞栓症、深部静脈血栓症、不整脈、不整脈原性右室心筋症、糖尿病性心筋症、僧房弁逆流症、僧房弁逸脱症、末梢血管疾患、動脈疾患、頸動脈疾患、深部静脈血栓症、静脈疾患、脳血管性疾患、動脈瘤、左室肥大、高血圧性腎疾患、高血圧性網膜疾患、脈管炎、左主部病変、動脈血管疾患、静脈血管疾患、微小循環血栓症、一過性脳血管障害、虚血肢、動脈瘤、血栓症、表在性静脈血栓症、および深部静脈血栓症が含まれる。

10

#### 【0047】

本明細書における用語「腎臓関連の疾患または症状」は、腎臓または腎臓系を冒す任意の疾患または症状を指す。腎臓関連の疾患の例には、これらに限定されないが、慢性腎臓疾患、原発性腎臓疾患、非糖尿病性腎臓疾患、糸球体腎炎、間質性腎炎、糖尿病性腎臓疾患、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、急速進行性糸球体腎炎、腎線維症、アルポート症候群、インスリン依存型糖尿病性（I D D M）腎炎、メサングウム増殖性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、半月体形成性糸球体腎炎、間質性腎線維症、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、p a u c i - i m m u n e型急速進行性糸球体腎炎、I g A腎症、多発性嚢胞腎、デント病、腎シスチン蓄積症（n e p h r o c y t i n o s i s）、ハイマン腎炎、常染色体優性（成人性）多発性嚢胞腎、常染色体劣性（小児性）多発性嚢胞腎、急性腎障害、ネフローゼ症候群、腎虚血、ポドサイト疾患または障害、タンパク尿症、糸球体疾患、膜性糸球体腎炎、巣状分節性糸球体腎炎、子癇前症、子癇症、腎臓病変、膠原血管病、良性起立性（体位性）タンパク尿症、I g M腎症、膜性腎症、サルコイドーシス、糖尿病、薬剤が原因の腎臓損傷、ファブリー病、アミノ酸尿、ファンコーニ症候群、高血圧性腎硬化症、間質性腎炎、鎌状赤血球症、ヘモグロビン尿症、ミオグロビン尿症、ウェゲナー肉芽腫症、1型糖原貯蔵障害、慢性腎臓疾患、慢性腎不全、低糸球体濾過率（G F R）、腎血管硬化症、ループス腎炎、A N C A陽性p a u c i - i m m u n e型半月体形成性糸球体腎炎、慢性移植腎症、腎毒性、腎臓毒性、腎臓壊死、腎臓損傷、糸球体および尿細管の傷害、腎臓機能不全、腎炎症候群、急性腎不全、慢性腎不全、近位尿細管機能不全、急性腎移植拒絶反応、慢性腎臓移植拒絶反応、非I g Aメサングウム増殖性糸球体腎炎、感染後糸球体腎炎、任意の種類の腎障害を伴う血管炎、任意の遺伝性腎臓疾患、任意の間質性腎炎、腎臓移植不全、腎臓癌、その他の症状（例えば、高血圧、糖尿病、および自己免疫疾患）を伴う腎臓疾患、デント病、腎シスチン蓄積症（n e p h r o c y t i n o s i s）、ハイマン腎炎、原発性腎臓疾患、虚脱性糸球体症、デンス・デポジット病、クリオグロブリン血症関連糸球体腎炎、ヘノッホ・シェーンライン病、感染後糸球体腎炎、細菌性心内膜炎、顕微鏡的多発血管炎、チャグ・シュトラウス症候群、抗G B M抗体介在性の糸球体腎炎、アミロイドーシス、単クローン性免疫グロブリン沈着症、細線維性糸球体腎炎、イムノタクトイド糸球体症、虚血性尿細管傷害、薬剤誘発性尿細管間質性腎炎、中毒性尿細管間質性腎炎、感染性尿細管間質性腎炎、細菌性腎盂腎炎、ポリオーマウイルスまたはH I Vの感染に起因するウイルス感染性尿細管間質性腎炎、代謝誘導性尿細管間質性疾患、混合性結合組織病、円柱腎症、尿酸結晶もしくはシュウ酸結晶または薬剤誘発性結晶の沈着に起因する結晶性腎障害、急性細胞性尿細管間質性同種移植片拒絶反応、リンパ腫または移植後リンパ増殖性疾患に起因する腫瘍性浸潤性疾患、閉塞性腎臓疾患、血管疾患、血栓性微小血管症、腎血管硬化症、アテローム塞栓性疾患、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎、カルシニューリン阻害剤誘導性血管疾患、急性細胞性血管同種移植片拒絶反応、急性液性同種移植片拒絶反応、早期腎機能低下

20

30

40

50

症（ERFD）、末期腎疾患（ESRD）、腎静脈血栓症、急性尿細管壊死、急性間質性腎炎、既存の慢性腎臓病、腎動脈狭窄症、虚血性腎症、尿毒症、薬剤誘導性および毒物誘導性の慢性尿細管間質性腎炎、逆流腎症、腎結石、グッドパスチャー症候群、および水腎症が含まれる。

【0048】

本明細書における用語「胎児期もしくは妊娠関連の疾患または症状」は、妊婦、胚、または胎児が罹患する、任意の疾患、障害、または症状を指す。胎児期または妊娠関連の症状はまた、妊娠に関連して、または妊娠の結果として、直接的または間接的に生じる、任意の疾患、障害、または症状を指す場合もある。これらの疾患または症状には、任意の全ての先天性欠損、先天性の症状、または遺伝性の疾患もしくは症状が含まれることがある。胎児期または妊娠関連の疾患の例には、これらに限定されないが、Rh血液型不適合、新生児の溶血性疾患、ベータサラセミア、性別判定、妊娠判定、遺伝性メンデル遺伝疾患、染色体異常、胎児染色体異数性、胎児染色体トリソミー、胎児染色体モノソミー、8番染色体トリソミー、13番染色体トリソミー（パトー症候群）、16番染色体トリソミー、18番染色体トリソミー（エドワーズ症候群）、21番染色体トリソミー（ダウン症）、X染色体連鎖疾患、X染色体トリソミー（XXX症候群）、X染色体モノソミー（ターナー症候群）、XXY症候群、XYY症候群、XYY症候群、XXXY症候群、XXYY症候群、XYYY症候群、XXXXX症候群、XXXXXY症候群、XXXXYY症候群、XXYYY症候群、脆弱X症候群、胎児発育遅延、嚢胞性線維症、ヘモグロビン症、胎児死亡、胎児アルコール症候群、鎌状赤血球貧血、血友病、クラインフェルター症候群、17番染色体（p11.2p1.2）重複症候群、子宮内膜症、ペリツェウス・メルツバッハー病、22番染色体（q11.2q11.2）重複症候群、猫の目症候群、猫鳴き症候群、ウォルフ・ハーシュホーン症候群、ウィリアムズ・ビューレン症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、圧迫性麻痺傾向を伴うニューロパチー、スミス・マゲニス症候群、神経線維腫症、アラジール症候群、口蓋心顔面症候群、ディジョージ症候群、ステロイドスルファターゼ欠損症、ブラダー・ヴィリ症候群、カルマン症候群、線状皮膚欠損を伴う小眼球症、副腎低形成、グリセロールキナーゼ欠損症、ペリツェウス・メルツバッハー病、Y染色体の精巣決定因子、無精子症（a因子）、無精子症（b因子）、無精子症（c因子）、1p36欠失、フェニルケトン尿症、テイ・サックス疾患、副腎過形成、ファンコーニ貧血、脊髄性筋萎縮症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ハンチントン病、筋緊張性ジストロフィー、ロバートソン転座、エンジェルマン症候群、結節性硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、開放性二分脊椎、神経管欠損、腹壁欠損、胎内発育遅延、先天性サイトメガロウイルス感染症、軟骨無形性症、マルファン症候群、先天性甲状腺機能低下症、先天性トキソプラズマ症、ピオチナーゼ欠損症、ガラクトース血症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、中位鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症、構造的先天性欠損、心臓欠損、四肢異常、内反足、無脳症、無嗅脳症/全前脳胞症、水頭症、無眼球症/小眼球症、無耳症/小耳症、大血管転位症、ファロー四徴症、左心低形成症候群、大動脈縮窄、口唇裂を伴わない口蓋裂、口蓋裂を伴うまたは伴わない口唇裂、瘻孔を伴うまたは伴わない食道の閉鎖/狭窄、小腸の閉鎖/狭窄、肛門直腸の閉鎖/狭窄、尿道下裂、半陰陽、腎無形性、嚢胞性腎、軸前側多指症、肢欠損、横隔膜ヘルニア、盲目症、白内障、視覚障害、聴力損失、難聴、X連鎖副腎白質ジストロフィー、レット症候群、リソソーム病、脳性麻痺、自閉症、無舌症、白子症、眼白子症、眼皮膚白皮症、妊娠糖尿病、アーノルド・キアリ奇形、チャージ症候群、先天性横隔膜ヘルニア、短指症、無虹彩症、裂手裂足症、異色症、ドワーニアン耳症（Dwarnian ear）、エーラス・ダンロス症候群、表皮水疱症、ゴーラム病、橋本症候群、胎児水腫、緊張低下症、クリッペル・ファイル症候群、筋ジストロフィー、骨形成不全症、早老症、スミス・レムリ・オピッツ症候群、色視症（chromateloopsia）、X連鎖リンパ増殖性疾患、臍帯ヘルニア、腹壁破裂、子癇前症、子癇症、早期産、早産、流産、子宮内胎児発育遅延、子宮外妊娠、妊娠垂阻、つわり、または誘発分娩の成功尤度が含まれる。

【0049】

10

20

30

40

50

本明細書における用語「神経性もしくは精神神経性の疾患または症状」は、神経系を冒す任意の疾患または症状を指す。神経性もしくは精神神経性の疾患または症状の例には、これらに限定されないが、頭部外傷、脳卒中、脳卒中、虚血性脳卒中、出血性卒中、くも膜下出血、頭蓋内出血、一過性虚血性発作、血管性認知症、大脳皮質基底核神経節変性症、脳炎、てんかん、ランドー・クレフナー症候群、水頭症、偽性脳腫瘍、視床疾患、髄膜炎、脊髄炎、運動障害、本態性振戦、脊髄疾患、脊髄空洞症、アルツハイマー病（早発性）、アルツハイマー病（遅発性）、多発梗塞性認知症、ピック病、ハンチントン病、パーキンソン病、パーキンソン症候群、認知症、前頭側頭型認知症、大脳皮質基底核変性症、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、レビー小体病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ダンディー・ウォーカー症候群、フリードライヒ運動失調症、マシャド・ジョセフ病、偏頭痛、統合失調症、気分障害および鬱病、レビー小体型認知症（DLB）、前頭側頭型認知症（FTD）、様々な形態の血管性認知症（VD）、皮質下血管性認知症（ピンスワンガー病）、自閉症、発達遅延、運動ニューロン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、神経もしくは脳の損傷、脳低酸素症、脳性麻痺（CP）、記憶障害、運動障害、大脳皮質基底核神経節変性症、様々な形態の多系統萎縮症、脳卒中関連疾患、脳血管障害、痙攣を伴う放射線照射後脳症、血管性パーキンソニズム、視床脳血管障害、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、アルコール関連認知症、意味性認知症、運動失調症、非定型パーキンソニズム、ジストニア、進行性核上性麻痺、本態性振戦、軽度認知障害、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、ニューロパチー、ピック病、コンゴレッド親和性血管障害、クロイツフェルト・ヤコブ病、エイズ認知症複合症、鬱病、不安障害、恐怖症、ベル麻痺、てんかん、脳炎、神経筋障害、神経腫瘍学的疾患、脳腫瘍、神経血管性障害、神経免疫学的障害、神経耳科疾患、脊椎損傷を含む神経外傷、神経因性疼痛を含む疼痛、小児性神経障害および精神神経障害、睡眠障害、トゥレット症候群、大脳皮質基底核神経節変性症、アルコール関連認知症、意味性認知症、多発梗塞性認知症を合併したアルツハイマー病、レビー小体認知症を合併したアルツハイマー病、レビー小体認知症を合併したパーキンソン病、レビー小体認知症を合併したアルツハイマー病およびパーキンソン病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーを合併した前頭側頭型認知症、注意欠陥多動性障害、統合失調症、強迫性障害、精神遅滞、自閉症スペクトラム障害、オプソクロオス・ミオクロオス症候群（OMS）痙攣、構音障害、学習障害（すなわち、読みまたは計算）、言語能力または言語運用能力の欠陥、注意欠陥障害、アミロイド病、プリオン病、タウオパチー、シヌクレイン病、コカイン、ニコチン、アルコール、食物、エクスタシー、チャット、カフェイン、アヘン、ヘロイン、マリファナ、アンフェタミン、メタンフェタミンまたはギャンブルのうちの少なくとも1つに起因する中毒症状、およびファブリー病が含まれる。

#### 【0050】

本明細書における用語「自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状」は、免疫系の機能に悪影響を及ぼす任意の疾患または症状を指す。自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状の例には、これらに限定されないが、抗リン脂質抗体症候群、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、自己免疫性血管炎、セリアック病、自己免疫性甲状腺炎、輸血後免疫付与、母体胎児間不適合、輸血反応、IgA欠損症などの免疫不全症、分類不能型免疫不全症、薬剤誘発性ループス、糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病、若年発症糖尿病、若年性リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、多発性硬化症、免疫不全、アレルギー、喘息、乾癬、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性皮膚疾患、筋萎縮性側索硬化症、化学療法誘発性損傷、移植片対宿主病、骨髄移植拒絶反応、強直性脊椎炎、アトピー性湿疹、天疱瘡、ベーチェット病、慢性疲労症候群線維筋痛症、化学療法誘発性損傷、重症筋無力症、糸球体腎炎、アレルギー性網膜炎、全身性硬化症、亜急性皮膚エリテマトーデス、凍瘡状エリテマトーデスを含む皮膚エリテマトーデス、シェーグレン症候群、自己免疫性腎炎、自己免疫性血管炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性心臓炎、自己免疫性脳炎、自己免疫介在性の血液疾患、lc-SSc（限局皮膚硬化型強皮症）、dc-SSc（びまん皮膚硬化型強皮症）、自己免疫性甲状腺炎（AT）、グレーブス病（GD）、重症筋無力症、多発性硬化症（MS）、強直性脊椎炎、移植拒絶反応、免疫老化、リウマチ性

10

20

30

40

50

/自己免疫性疾患、混合性結合組織病、脊椎関節症、乾癬、乾癬性関節炎、筋炎、強皮症、皮膚筋炎、自己免疫性血管炎、混合性結合組織病、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、ヒト・アジュバント病、変形性関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、特発性炎症性ミオパチー、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、免疫介在性の腎臓疾患、中枢神経系または末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発ニューロパチー、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、肝胆道系疾患、感染性または自己免疫性の慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、自己免疫介在または免疫介在性の皮膚疾患、水疱性皮膚症、多形紅斑、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、じん麻疹、肺の免疫疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、過敏性肺臓炎、移植関連疾患、移植片拒絶反応または移植片対宿主病、乾癬性関節炎、乾癬、皮膚炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、全身性強皮症および硬化症、炎症性腸疾患関連反応、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、成人性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、髄膜炎、脳炎、ぶどう膜炎、大腸炎、糸球体腎炎、アレルギー性病態、湿疹、喘息、T細胞浸潤および慢性炎症性反応を伴う症状、アテローム性硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着異常症、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカイン介在性およびTリンパ球介在性の急性過敏および遅延性過敏を伴う免疫反応、結核、サルコイドーシス、ウェゲナー肉芽腫症を含む肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎 (ANCAを含む)、再生不良性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) を含む免疫性溶血性貧血、悪性貧血、赤芽球癆 (PRCA)、第V I I I因子欠損、A型血友病、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球漏出を伴う疾患、中枢神経系 (CNS) 炎症性疾患、多臓器損傷症候群、重症筋無力症、抗原抗体複合体介在性の疾患、抗糸球体基底膜抗体疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、ランバート・イートン筋無力症候群、レイノー症候群、シェーングレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、自己免疫性多発性内分泌腺症、ライター病、スティッフマン症候群、巨細胞性動脈炎、免疫複合体腎炎、I g A腎症、I g M多発ニューロパチーまたはI g M介在性のニューロパチー、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性精巣炎および自己免疫性卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫性疾患、原発性甲状腺機能低下症、自己免疫性甲状腺炎を含む自己免疫性内分泌疾患、慢性甲状腺炎 (橋本病甲状腺炎)、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーヴス病、自己免疫性多腺性症候群 (または、多腺性内分泌障害症候群)、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、リンパ性間質性肺炎 (H I V性)、閉塞性細気管支炎 (非移植性) 対N S I P、ギラン・バレー症候群、大血管炎 (リウマチ性多発筋痛および巨細胞性 (高安) 動脈炎を含む)、中血管炎 (川崎病および結節性多発動脈炎を含む)、強直性脊椎炎、ベルジェ病 (I g A腎症)、急速進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアック病 (グルテン性腸疾患)、クリオグロブリン血症、および筋委縮性側索硬化症 (ALS) が含まれる。

#### 【0051】

本明細書における用語「癌」は、様々な種類の悪性新生物を指し、そのほとんどは、周囲の組織に浸潤することができ、様々な部位へ転移することがある (例えば、その全体が全ての目的のため参照により本明細書に組み込まれる、PDR Medical Dictionary、1st edition (1995) を参照のこと)。用語「新生物」および「腫瘍」は、細胞増殖によって正常よりも速く成長し、増殖を開始させた刺激が除去された後も成長を続ける異常組織を指す (同文献)。このような異常組織は、構造的な組織化および正常組織との機能的な協調が、部分的にまたは完全に失われており、これは良性 (すなわち、良性腫瘍) であっても、悪性 (すなわち、悪性腫瘍) であってもよい。癌の一般的な分類の例としては、これらに限定されないが、癌腫 (すなわち、例えば、一般的な乳癌、前立腺癌、肺癌、および結腸癌などの上皮細胞由来の悪性腫瘍)、肉腫 (すなわち、結合組織または間葉細胞由来の悪性腫瘍)、リンパ腫 (すなわち、造血細胞由来

の悪性病変)、白血病(すなわち、造血細胞由来の悪性病変)、胚細胞性腫瘍(すなわち、全能性細胞由来の腫瘍。成人では、精巣または卵巣で最も多く見られ、胎児、乳児、および幼児では、身体正中で、特に尾骨の先端で最も多く見られる)、および芽細胞性腫瘍(すなわち、未成熟組織または胚性組織に類似する、通常は悪性である腫瘍)などが挙げられる。本発明に包含されることが意図される新生物の種類の場合としては、これらに限定されないが、神経組織癌、造血性組織癌、乳腺癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、肝臓癌、肺癌、脳癌、喉頭癌、胆嚢癌、膵臓癌、直腸癌、副甲状腺癌、甲状腺癌、副腎癌、免疫系の癌、頭頸部癌、結腸癌、胃癌、気管支癌、および/または腎臓癌と関連する新生物が挙げられる。

#### 【0052】

本明細書における疾患または症状の「治療」は、臨床的結果を含む、有益な結果または所望の結果を得るための手段を講じることを指す。有益な結果または所望の臨床的結果としては、疾患または症状と関連する1つまたは複数の症状の緩和または改善が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0053】

本明細書において、対象に化合物または薬剤を「投与すること」またはその「投与」は、当業者に周知の様々な方法のうちの一つを用いて実行してもよい。例えば、化合物または薬剤を、静脈内投与、動脈投与、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、眼投与、舌下投与、経口投与(摂取により)、鼻腔内投与(吸入により)、髄腔内投与、脳内投与、および経皮投与(例えば、皮膚導管を介した吸収により)してもよい。化合物または薬剤を、再充填可能または生分解性の高分子製デバイスもしくはその他のデバイス、例えばパッチおよびポンプにより適切に導入してもよく、化合物または薬剤を持続放出、放出遅延、または制御放出させる製剤により適切に導入してもよい。例えば、1回の投与、複数回の投与、および/または1回または複数回の長期間にわたる投与を実行してもよい。ある態様では、投与には、自己投与を含む直接投与、および薬品を処方する行為を含む間接投与の両方が含まれる。例えば、本明細書において、薬品を自己投与するように指導する医師、または他人に薬品を投与してもらうよう患者に指導する医師、および/または薬品の処方箋を患者に与える医師は、患者に薬品を投与している。ある実施形態では、例えば摂取により経口的に、または、例えば注射により静脈内に、化合物または薬剤が患者に投与される。ある実施形態では、経口投与された化合物または薬剤は、徐放性製剤または放出遅延製剤であるか、または、このような持続放出または放出遅延をもたらすデバイスを使用して投与される。

#### 【0054】

ある実施形態では、本発明の方法で使用されるマーカーは、 $2n$  貪食細胞と比べて  $> 2n$  貪食細胞で上方制御または活性化されている。ある実施形態では、本発明の方法で使用されるマーカーは、 $2n$  貪食細胞と比べて  $> 2n$  貪食細胞で下方制御または抑制されている。種々の疾患または症状が、種々のマーカーの上方制御(もしくは、活性化)、または下方制御(もしくは、抑制)と関連していることがある。本明細書における「上方制御または上方制御された」は、マーカーの発現レベル(例えば、遺伝子発現またはタンパク質発現)、遺伝子コピー数、遺伝子量、およびその他の定性的または定量的に検出可能な状態の増大を指すことがある。同様に、「下方制御または下方制御された」は、マーカーの発現レベル、遺伝子コピー数、遺伝子量、およびその他の定性的または定量的に検出可能な状態の増大を指すことがある。本明細書における「活性化または活性化された」は、マーカーの活性状態、例えば、リン酸化状態、DNAメチル化状態、またはDNAアセチル化状態を指すことがある。同様に、「抑制または抑制された」は、マーカーの抑制状態または不活性化状態、例えば、脱リン酸化状態、ユビキチン化状態、DNA脱メチル化状態を指すことがある。

#### 【0055】

ある実施形態では、本発明の方法はまた、様々なプロファイルを判定する前、(i)  $> 2n$  貪食細胞および  $2n$  貪食細胞を溶解するステップ、(ii) 溶解した  $> 2n$  貪食細胞

10

20

30

40

50

および溶解した 2n 貪食細胞から細胞内容物を抽出するステップ、のうちの少なくとも 1 つを含む。ある実施形態では、> 2n 貪食細胞の細胞内容物は、生存している病気の細胞、死んだ病気の細胞、アポトーシスを起こした病気の細胞、循環腫瘍細胞、感染性因子、胎生細胞、栄養芽細胞、またはこれらの断片など、> 2n 貪食細胞に貪食された様々な種類の物質を含む。ある実施形態では、疾患または症状の少なくとも 1 つまたは複数のマーカーが > 2n 貪食細胞の細胞内容物中に存在する。ある実施形態では、2n 貪食細胞の細胞内容物中にはマーカーが存在しない。

**【0056】**

ある実施形態では、本発明の方法は、疾患または症状に特異的なマーカーについて同定された差異を、当技術分野において周知の少なくとも 1 つのマーカーのリポジトリと比較することを含む。このような比較により、疾患または症状の存在をさらに確認することができる。ある実施形態では、既知マーカーのリポジトリをデータマイニングによって得ることがある。本明細書における用語「データマイニング」は、データベースの既知データから導かれる新規なデータのパターン、関係、または相関を見出し、将来的に利用可能な情報を抽出するプロセスを指す。一般に、データについてデータマイニングを実行するように（例えば、入力されたデータを分類するように）コンピュータベースのシステムをトレーニングし、その後、このシステムを新規に入力されたデータとともに用いて、トレーニングデータに基づく決定を行うことができる。このようなシステムとしては、これらに限定されないが、エキスパートシステム、ファジー論理、非線形回帰分析、多変量解析、決定木分類器、およびベイズの信念ネットワークが挙げられる。

10

20

**【0057】**

ある実施形態では、> 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞は、体液試料、組織、または細胞から単離される。例示的な体液試料は、全血、尿、大便、唾液、リンパ液、脳脊髄液、滑液、囊胞液、腹水、胸水、妊娠第 1 三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第 2 三半期の妊婦から得られた体液、妊娠第 3 三半期の妊婦から得られた体液、母体血、羊水、絨毛膜絨毛試料、着床前胚の体液、母体尿、母体唾液、胎盤試料、胎児血液、洗浄液および頸腔部液、間質液、または眼液であってもよい。ある実施形態では、> 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞は、白血球から単離される。ある実施形態では、> 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞は、貪食細胞集団から分離される。

**【0058】**

本発明の方法では、細胞分離 / 単離 / 精製の方法を使用して、対象の体液試料、細胞、または組織から細胞集団が単離される。当業者は、任意の既知の細胞分離 / 単離 / 精製技術を用いて、体液から > 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞を単離、または 2n 貪食細胞から > 2n 貪食細胞を分離することができる。例示的な技術としては、これらに限定されないが、抗体の使用、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取、濾過、密度勾配遠心分離法、溶出、マイクロフルイディクス、磁気分離技術、蛍光磁気分離技術、ナノ構造、量子ドット、ハイスループット顕微鏡プラットフォーム、またはこれらの組合せが挙げられる。

30

**【0059】**

ある実施形態では、> 2n 貪食細胞により分泌される産物を用いて > 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞が単離される。ある実施形態では、貪食細胞表面上の細胞表面標的（例えば、受容体タンパク質）を用いて > 2n 貪食細胞および 2n 貪食細胞が単離される。ある実施形態では、細胞表面標的は、> 2n 貪食細胞により貪食されたタンパク質である。ある実施形態では、細胞表面標的は、> 2n 貪食細胞によりその細胞膜上に発現される。ある実施形態では、細胞表面標的は、細胞膜へ移行されるが > 2n 貪食細胞により発現されたものではない外因性タンパク質である。ある実施形態では、細胞表面標的は、検出される疾患または症状のマーカーである。

40

**【0060】**

本明細書に記載の方法のある態様では、プロファイルされる被分析物としては、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝物、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。本明

50

細書に記載の方法のある態様では、マーカーとしては、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、代謝物、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。本明細書における用語「核酸」には、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNA-RNAハイブリッド、およびヌクレオチド類似体を用いて生成されたDNAまたはRNAの類似体が含まれることが意図される。核酸分子は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、二本鎖DNA、一本鎖DNA、多重鎖DNA、相補DNA、ゲノムDNA、非コードDNA、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA（miRNA）、核小体低分子RNA（snRNA）、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、ヘテロ核RNA（hnRNA）、または低分子ヘアピン型RNA（shRNA）であってもよい。

10

#### 【0061】

本明細書における用語「アミノ酸」には、塩基性アミノ基および酸性カルボキシル基の両方を含有する有機化合物が含まれる。天然アミノ酸（例えば、L-アミノ酸）、修飾アミノ酸および異常アミノ酸（例えば、D-アミノ酸および -アミノ酸）、ならびに生物学的には遊離型または結合型で存在することが知られているが、タンパク質中には通常存在しないアミノ酸がこの用語の範囲に含まれる。天然タンパク質中に存在するアミノ酸としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、およびバリンが挙げられる。非天然タンパク質のアミノ酸としては、アルギノコハク酸、シトルリン、システイン硫酸、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、ホモシステイン、ホモセリン、オルニチン、3-モノヨードチロシン、3,5-ジヨードチロシン、3,5,5-トリヨードチロシ、および3,3',5,5'-テトラヨードチロシンが挙げられる。修飾アミノ酸または異常アミノ酸としては、D-アミノ酸、ヒドロキシリシン、4-ヒドロキシプロリン、N-Cbz-保護アミノ酸、2,4-ジアミノ酪酸、ホモアルギニン、ノルロイシン、N-メチルアミノ酪酸、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、フェニルプロリン、tert-ロイシン、4-アミノシクロヘキシルアラニン、N-メチル-ノルロイシン、3,4-デヒドロプロリン、 -ジメチルアミノグリシン、N-メチルアミノグリシン、4-アミノピペリジン-4-カルボン酸、6-アミノカプロン酸、trans-4-(アミノメチル)-シクロヘキサンカルボン酸、2-,3-,4-(アミノメチル)-安息香酸、1-アミノシクロペンタンカルボン酸、1-アミノシクロプロパンカルボン酸、および2-ベンジル-5-アミノペンタン酸が挙げられる。

20

30

#### 【0062】

本明細書における用語「ペプチド」には、ペプチド結合によって連結される2つまたは複数のアミノ酸からなる化合物が含まれる。ペプチドの分子量は、10,000ダルトン未満、5,000ダルトン未満、または2,500ダルトン未満であってもよい。用語「ペプチド」にはまた、ペプチド成分と、擬似ペプチド残基もしくはペプチド模倣残基またはその他の非アミノ酸成分などの非ペプチド成分との両方を含有する化合物が含まれる。ペプチド成分と非ペプチド成分の両方を含有するこのような化合物はまた、「ペプチド類似体」と呼ばれることがある。

40

#### 【0063】

本明細書における用語「タンパク質」には、直鎖状に配列され、隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間のペプチド結合により連結されるアミノ酸からなる化合物が含まれる。本発明の方法で用いられるタンパク質としては、これらに限定されないが、アミノ酸、ペプチド、抗体、抗体断片、サイトカイン、リボタンパク質、または糖タンパク質が挙げられる。

#### 【0064】

本明細書における用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体を含む）、多重エピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、二特異性抗体、および一本鎖分子、およ

50

び抗体断片（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>、およびFv）が含まれる。様々な種類の抗体の構造と特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 71ページおよび第6章を参照のこと。

【0065】

本明細書における用語「サイトカイン」は、免疫系細胞の活性を調節する分泌タンパク質またはその活性断片もしくは変異体を指す。サイトカインの例としては、これらに限定されないが、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、腫瘍壊死因子、および免疫細胞前駆体のコロニー刺激因子などが挙げられる。

10

【0066】

本明細書における用語「リポタンパク質」には、遊離コレステロールおよびアポリポタンパク質が結合した両親媒性リン脂質の表面層で取り囲まれた、疎水性コレステリルエステルとトリグリセリドとのコアを含む負に帯電した組成物が含まれる。リポタンパク質は、そのサイズにより決定される、脂質とタンパク質との相対量である密度（例えば、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL））によって特徴づけられてもよい。リポタンパク質はまた、特定の修飾（例えば、酸化、アセチル化、または糖化）の有無によって特徴づけられてもよい。

20

【0067】

本明細書における用語「糖タンパク質」には、ペプチドまたはタンパク質に共有結合した1つまたは複数のオリゴ糖または多糖を有する配糖体が含まれる。例示的な糖タンパク質としては、これらに限定されないが、免疫グロブリン、主要組織適合複合体のメンバー、コラーゲン、ムチン、糖タンパク質IIb/IIa、糖タンパク質-41（gp41）および糖タンパク質-120（gp120）、濾胞刺激ホルモン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、エリスロポエチン、トランスフェリン、アルカリホスファターゼ、およびレクチンを挙げることができる。

【0068】

本明細書における用語「脂質」には、一般に両親媒性で生体適合性の、合成化合物または天然化合物が含まれる。脂質は、通常、親水性成分および疎水性成分を含む。例示的な脂質としては、これらに限定されないが、脂肪酸、中性脂肪、リン脂質、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、糖脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、コリングリセロリン脂質、エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リゾ-コリングリセロリン脂質、リゾ-エタノールアミングリセロリン脂質、ホスファチジン酸、リゾ-ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、スルファチド、遊離脂肪酸、プロスタグランジン、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、アシル-CoA、アシルカルニチン、オキシステロール、セラミド、カルジオリピン、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、スフィンゴシン、リゾ-スフィンゴミエリン、ガングリオシド、プラスマローゲン、スルファチド、セラミド、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、スフィンゴイド塩基-1-リン酸、またはこれらの誘導体が挙げられる。

30

40

【0069】

本明細書における用語「炭水化物」には、これらに限定されないが、酸素原子、水素原子、および炭素原子を含有する化合物、通常は(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>（nは整数）が含まれる。例示的な炭水化物としては、これらに限定されないが、単糖類、二糖類、多糖類、またはオリゴ糖類が挙げられる。

【0070】

本明細書における用語「代謝物」には、代謝において使用される任意の分子が含まれる

50

。代謝物は、代謝プロセスにおける産物、基質、または中間産物であってもよい。一次代謝物、二次代謝物、有機代謝物、または無機代謝物がこの用語の範囲に含まれる。代謝物としては、これらに限定されないが、アミノ酸、ペプチド、アシルカルニチン、単糖類、脂質およびリン脂質、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド類、胆汁酸、ならびに糖脂質およびリン脂質が挙げられる。例示的な代謝物は、スフィンゴ脂質、グリコスフィンゴ脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴシルホスホリルコリン、ジヒドロスフィンゴシン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルセリン、プラスメニルホスファチジルコリン、プラスマニルホスファチジルコリン、タンパク質を構成するアミノ酸、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、非対称性ジメチルアルギニン、対称性ジメチルアルギニン、グルタミン、アスパラギン、ニトロチロシン、ヒドロキシプロリン、キヌレニン、3 - ヒドロキシキヌレニン、タンパク質を構成しないアミノ酸、オルニチン、シトルリン、アシルカルニチン、カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチン、ヒドロキシルアシルカルニチン、ジカルボキシルアシルカルニチン、還元単糖類、ヘキソース、ペントース、デオキシヘキソース、クレアチニン、クレアチン、スベルミジン、スベルミン、プトレシン、ドーパミン、セロトニン、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ロイコトリエン、トロンボキサン、胆汁酸、ステロール、コレステロール、ビタミンおよび補因子、薬物、ならびに薬物代謝物であってもよい。

10

20

30

40

#### 【0071】

本発明のある実施形態では、疾患または症状の少なくとも1つまたは複数のマーカーのプロファイルが比較される。この比較は、定量的であっても定性的であってもよい。定量的な測定は、本明細書に記載の任意のアッセイを用いて行うことができる。例えば、シーケンシング、ダイレクトシーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガー・ジデオキシターミネーションシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シーケンシング (duplex sequencing)、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理シグネチャシーケンシング、エマルジョンPCR法、可逆的ダイターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアターム (near-term) シーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成シーケンシング (sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerを用いたシーケンシング、SOLiD (登録商標)を用いたシーケンシング、MS-PEPシーケンシング、質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q-TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析、定量的PCR法、リアルタイムPCR法、蛍光アッセイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、またはこれらの組合せである。

#### 【0072】

定量的比較としては、t検定、分散分析 (ANOVA)、クラスカル・ウォリス検定、

50

ウィルコクソン検定、マン・ホイットニー検定、およびオッズ比などの統計解析を挙げることができる。定量的な差異としては、プロファイル間のマーカーレベルの差異、またはプロファイル間のマーカー存在数の差異、およびこれらの組合せを挙げることができる。マーカーレベルの例は、これらに限定されないが、遺伝子発現レベル、核酸レベル、タンパク質レベル、および脂質レベルなどであってもよい。定性的な差異としては、これらに限定されないが、活性化および不活化、タンパク質分解、核酸分解、ならびに共有結合修飾を挙げることができる。

【0073】

本発明のある実施形態では、プロファイルは、核酸プロファイル、タンパク質プロファイル、脂質プロファイル、炭水化物プロファイル、代謝物プロファイル、またはこれらの組合せである。プロファイルは、定性的または定量的に決定され得る。

10

【0074】

核酸プロファイルは、これらに限定されないが、遺伝子型プロファイル、一塩基多型プロファイル、遺伝子変異プロファイル、遺伝子コピー数プロファイル、DNAメチル化プロファイル、DNAアセチル化プロファイル、染色体遺伝子量プロファイル、遺伝子発現プロファイル、またはこれらの組合せであってもよい。

【0075】

核酸プロファイルは、遺伝子型、一塩基多型、遺伝子変異、遺伝子コピー数、DNAメチル化状態、DNAアセチル化状態、染色体遺伝子量を検出するための当技術分野において周知の任意の方法によって決定することができる。例示的な方法には、これらに限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析、シーケンシング解析、電気泳動解析、制限断片長多型(RFLP)解析、ノーザンブロット解析、定量的PCR法、逆転写PCR解析(RT-PCR)、アレルト異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション解析、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、ヘテロ二重鎖移動度アッセイ(HMA)、一本鎖高次構造多型(SSCP)法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法、RNAaseミスマッチ解析、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI-TOF)型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間(SELDI-TOF)型質量分析法、四重極飛行時間(Q-TOF)型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)法、フーリエ変換質量分析(FTMS)法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(MALDI-FT-ICR)法、二次イオン質量分析(SIMS)法、表面プラズモン共鳴法、サザンブロット解析、*in situ*ハイブリダイゼーション法、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)法、発色性*in situ*ハイブリダイゼーション(CISH)法、免疫組織化学(IHC)法、マイクロアレイ法、比較ゲノムハイブリダイゼーション法、核型分析、多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)法、短蛍光フラグメントの定量的多重PCR(QMPSP)法、顕微鏡法、メチル化特異的PCR(MSP)アッセイ、ライゲーション仲介PCRによるHpaII小断片濃縮(HpaII Tiny Fragment Enrichment by Ligation-Mediated PCR)(HELP)アッセイ、放射性酢酸塩標識アッセイ、比色によるDNAアセチル化アッセイ、マイクロアレイと組み合わせたクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)アッセイ、制限酵素ランドマークゲノムスキニング法、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)法、DNAアデニンメチルトランスフェラーゼ活性の分子切断光アッセイ、クロマトグラフィーによる分離、メチル化感受性制限酵素解析、バイサルファイトによる非メチル化シトシンのウラシルへの変換、メチル結合PCR解析、またはこれらの組合せが含まれる。

20

30

40

【0076】

本明細書における用語「シーケンシング」は、広い意味で使用され、核酸の少なくとも一部(これらに限定されないが、伸長産物またはベクターインサートの少なくとも一部を含む)において少なくともいくつかの連続するヌクレオチドの順序を同定することを可

50

能にする、当技術分野において周知の任意の技術を指す。例示的なシーケンシング技術としては、ダイレクトシーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガー・ジデオキターミネーションシーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動法、ゲル電気泳動法、二重鎖シーケンシング (duplex sequencing)、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理シグネチャシーケンシング、エマルジョンPCR法、可逆的ダイターミネーターによるシーケンシング、ペアドエンドシーケンシング、ニアターム (near-term) シーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、一分子シーケンシング、合成シーケンシング (sequencing-by-synthesis)、リアルタイムシーケンシング、リバーターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerを用いたシーケンシング、SOLiD (登録商標)を用いたシーケンシング、MS-PETシーケンシング、質量分析法、およびこれらの組合せが挙げられる。ある実施形態では、シーケンシングには、例えば、これらに限定されないが、ABI PRISM (登録商標) 377 DNAシーケンサー、ABI PRISM (登録商標) 310、3100、3100-Avant、3730、または3730xIジェネティック・アナライザー、ABI PRISM (登録商標) 3700 DNAアナライザー、またはアプライド・バイオシステムズ SOLiD (商標) システム (全て Applied Biosystems 社製)、ゲノムシーケンサー 20 システム (Roche Applied Science 社)、または質量分析計などの機器を使用してシーケンシング産物を検出することが含まれる。ある実施形態では、シーケンシングには、エマルジョンPCRが含まれる。ある実施形態では、シーケンシングには、ハイスループットシーケンシング技術、例えば、これに限定されないが、大規模並列処理シグネチャシーケンシング (MPSS) が含まれる。

#### 【0077】

本発明のさらなる実施形態では、タンパク質プロファイルは、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せであってもよい。ある実施形態では、タンパク質活性化プロファイルには、リン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、またはタンパク質の立体構造状態を決定することが含まれていてもよい。

#### 【0078】

タンパク質プロファイルは、タンパク質発現レベル、タンパク質リン酸化状態、タンパク質ユビキチン化状態、タンパク質ミリスチル化状態、またはタンパク質立体構造状態を検出するための当技術分野において周知の任意の方法により検出することができる。ある実施形態では、タンパク質プロファイルを、免疫組織化学分アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、in situハイブリダイゼーション法、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間 (SELDI-TOF) 型質量分析法、四重極飛行時間 (Q-TOF) 型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS) 法、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (MALDI-FT-ICR) 法、二次イオン質量分析 (SIMS) 法、ラジオイムノアッセイ、顕微鏡法、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、表面プラズモン共鳴法、シーケンシング、ウェスタンブロットアッセイ、またはこれらの組合せによって決定することができる。

#### 【0079】

本発明のさらなる実施形態では、タンパク質プロファイルは、タンパク質発現プロファイル、タンパク質活性化プロファイル、またはこれらの組合せであってもよい。ある実施形態では、タンパク質活性化プロファイルには、リン酸化状態、ユビキチン化状態、ミリスチル化状態、またはタンパク質の立体構造状態を決定することが含まれていてもよい。

本発明のある実施形態では、脂質プロファイルを、クロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、サイズ排除クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法、ガスクロマトグラフィー法、質量分析法、タンデム質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（MALDI-TOF）型質量分析法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）型質量分析法、四重極飛行時間（Q-TOF）型質量分析法、大気圧光イオン化質量分析（APPI-MS）法、フーリエ変換質量分析（FTMS）法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析（MALDI-FT-ICR）法、二次イオン質量分析（SIMS）法、ラジオミムノアッセイ、マイクロ流体チップをベースにしたアッセイ、蛍光の検出、化学発光の検出、またはこれらの組合せによって決定することができる。生体試料中の脂質含量を分析するための別の方法は、当技術分野において周知である（例えば、Kang et al. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* 1128:267; Weylandt et al. (1996) *Lipids* 31:977; J. Schiller et al. (1999) *Anal. Biochem.* 267:46; Kang et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4050; Schiller et al. (2004) *Prog. Lipid Res.* 43:499を参照のこと）。脂質分析の1つの例示的な方法としては、（例えば、0.005%のブチル化ヒドロキシトルエン（BHT、抗酸化剤として）を含有するクロロホルム・メタノール（2:1、体積/体積）を用いて）生体試料から脂質を抽出し、（例えば、14%BF<sub>3</sub>メタノール試薬を用いて）脂肪酸メチルエステルを調製し、（例えば、HPLC、TLCにより、市販のガスクロマトグラフ、質量分析計、および/またはガスクロマトグラフ/質量分析計の組み合わせを用いたガスクロマトグラフィー質量分光法によって）脂肪酸メチルエステルの定量化を行うことが挙げられる。脂肪酸の質量は、種々の分析された脂肪酸の領域を、一定濃度の内部標準の領域と比較することにより決定される。

#### 【0080】

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

#### 【0081】

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

#### 【0082】

10

20

30

40

50

本明細書において、本発明の方法により検出される種々のプロファイル間の「差異」とは、異なった遺伝子コピー数、DNA、RNA、タンパク質、脂質、または炭水化物の異なった発現レベル、異なったDNAメチル化状態、異なったDNAアセチル化状態、および異なったタンパク質修飾状態を指すことがある。差異は、1倍よりも大きい差異であってもよい。ある実施形態では、差異は、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍の差異である。ある実施形態では、差異は、1~10倍の間、2~10倍の間、5~10倍の間、10~20倍の間、または10~100倍の間の任意の差異である。

#### 【0083】

マーカーを検出するためのアッセイの一般的な原理としては、マーカー（例えば、1つまたは複数のDNA、RNA、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質、および代謝物など）、およびプローブを含有していてもよい試料または反応混合物を、適切な条件下にて、該マーカーおよびプローブが相互作用して結合するのに十分な時間で調製して、反応混合物中に取り出しおよび/または検出が可能である複合体を形成することが挙げられる。このようなアッセイは、様々な方法で実施することができる。

10

#### 【0084】

例えば、このようなアッセイを実施する1つの方法としては、マーカーまたはプローブを、基材とも呼ばれる固相支持体上に固定して、固相上に固定された標的マーカー/プローブ複合体を反応終了時に検出することが挙げられる。このような方法のある実施形態では、担体または固相支持体上に、マーカーの存在および/または濃度についてのアッセイが行われる対象からの試料を固定してもよい。別の実施形態では、逆の状態も可能であり、その場合、プローブを固相に固定し、対象からの試料をこのアッセイの未固定成分として反応させてもよい。

20

#### 【0085】

アッセイ成分を固相へ固定するための多くの方法が確立されている。これらには、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合によって固定化されるマーカーまたはプローブ分子が含まれるが、これらに限定されない。このようなビオチン化アッセイ成分は、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から当技術分野において周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemical社、ロックフォード、イリノイ州）を用いて調製し、ストレプトアビジンでコートした96ウェルプレート（Pierce Chemical社）のウェル中に固定化することができる。ある実施形態では、固定化アッセイ成分を有する表面を予め作製し、保存しておくことができる。

30

#### 【0086】

このようなアッセイに適切なその他の担体または固相支持体としては、マーカーまたはプローブが属する種類の分子を結合することができる任意の材質が挙げられる。周知の支持体または担体としては、これらに限定されないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、ならびにマグネタイトが挙げられる。

40

#### 【0087】

上記手法を用いたアッセイを実施するために、第二の成分が固定された固相に非固定化成分が添加される。反応完了後、形成された複合体がいずれも固相上に固定化されたままとなる条件下で、複合体を形成していない成分を（例えば、洗浄することにより）除去してもよい。固相に固定化されたマーカー/プローブ複合体の検出は、本明細書で概説する多数の方法によって行うことができる。

#### 【0088】

ある例示的な実施形態では、プローブが固定化されていないアッセイ成分である場合、プローブは、アッセイの検出および読み取りの目的で、本明細書で検討され当業者に周知である標識により、直接的または間接的に標識されることがある。

#### 【0089】

50

任意の成分（マーカーまたはプローブ）をさらに処置または標識することなく、例えば、蛍光エネルギー転移技術（例えば、米国特許第5,631,169号および同第4,868,103号を参照のこと）を利用することにより、マーカー/プローブ複合体の形成を直接的に検出することも可能である。第一の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光で励起された場合に、放出された蛍光エネルギーが第二の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、吸収されたエネルギーによって該分子が次に蛍光を発することができるように選択される。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は、単にトリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用してよい。標識は、「アクセプター」分子の標識を「ドナー」の標識と区別することができるように、異なる波長の光を発するものが選択される。標識間のエネルギー転移の効率が分子を隔てる距離と関連していることから、分子間の空間的な関係を評価することができる。分子間で結合が生じる状況では、このアッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光発光が最大となるはずである。FET結合事象は、当技術分野において周知の標準的な蛍光定量的検出手段により（例えば、蛍光光度計を用いて、簡便に測定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0090】

別の実施形態では、プローブがマーカーを認識する能力の測定は、リアルタイム生体分子相互作用解析(BIA)(例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C, 1991, Anal. Chem. 63: 2338-2345、および Szabo et al, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705を参照のこと)などの技術を利用することにより、いずれのアッセイ成分(プローブまたはマーカー)も標識することなく行うことができる。本明細書における「BIA」または「表面プラズモン共鳴」とは、相互作用物のいずれをも標識せずに、リアルタイムで生体分子特異的相互作用の研究を行うための技術である(例えば、BIACore)。結合表面における質量の変化(結合事象の指標)によって表面付近での光の屈折率が変化し(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)、生体分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる検出可能なシグナルが生じる。

#### 【0091】

あるいは、別の実施形態では、類似の診断アッセイおよび予後アッセイを、液相中の溶質としてマーカーおよびプローブを用いて実施することができる。このようなアッセイでは、数多くの標準的な技術のうちの任意の技術によって、複合体を形成したマーカーとプローブが、複合体を形成していない成分から分離される。前記技術としては、これらに限定されないが、分画遠心分離法、クロマトグラフィー法、電気泳動法、および免疫沈降法が挙げられる。分画遠心分離法では、サイズおよび密度の違いに基づいた複合体の沈降係数の相違により、一連の遠心分離により、マーカー/プローブ複合体を複合体を形成していないアッセイ成分から分離することができる(例えば、Rivas and Minton(1993) Trends Biochem. Sci. 18: 284を参照のこと)。標準的なクロマトグラフィー技術も、複合体を形成していない分子から複合体を形成した分子を分離するために用いることができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーは、サイズに基づいて分子を分離するものであり、適切なゲル濾過樹脂をカラムの形態で用いることにより、例えば、複合体を形成していない相対的に小さな成分から相対的に大きな複合体を分離することが可能である。同様に、複合体を形成していない成分と比較したマーカー/プローブ複合体の荷電特性の相対的差異を利用して、例えばイオン交換クロマトグラフィー樹脂を用いて、複合体を形成していない成分から複合体を分離することができる。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は、当業者に周知である(例えば、Heegaard(1998) J. Mol. Recognit. 11: 141; Hage and Tweed(1997) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 12: 499を参照のこと)。ゲル電気泳動も、未結合成分から複合体を形成したアッセイ成分を分離するために利用することができる(例えば、Ausubel et al, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987 1

999を参照のこと)。この技術では、タンパク質または核酸の複合体が、例えば、サイズまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセスの間、結合相互作用を維持するために、通常は非変性ゲルマトリックス材料が好ましく、還元剤が存在しない条件が好ましい。特定のアッセイに対する適切な条件およびその成分は、当業者に周知であるだろう。

#### 【0092】

ある例示的な実施形態では、マーカーに対応するmRNAのレベルを、当技術分野において周知の方法を用いて、生体試料中で*in situ*方式および/または*in vitro*方式のいずれかにより決定することができる。発現検出方法の多くが単離されたRNAを用いる。*in vitro*の方法では、mRNAの単離に対しては選択されない任意のRNA単離技術を、血液細胞からのRNAの精製に利用することができる(例えば、A 10  
usubel et al, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999を参照のこと)。さらに、例えば、ChomczynskiのシングルステップRNA単離プロセス(1989年、米国特許第4,843,155号)などの当業者に周知の技術を用いて、大量の細胞および/または試料を容易に処理することができる。

#### 【0093】

単離されたmRNAは、これらに限定されないが、サザン解析またはノーザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析、およびプローブアレイを含む、ハイブリダイゼーションアッセイまたは増幅アッセイに用いることができる。ある例示的な実施形態では、mRNAレベ 20  
ルを検出するための診断方法としては、単離されたmRNAを、被検出遺伝子によってコードされたmRNAとハイブリダイズすることができる核酸分子(プローブ)に接触させることが挙げられる。核酸プローブは、例えば、完全長cDNA、あるいは少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチド長であり、本発明のマーカーをコードするmRNAまたはゲノムDNAとストリンジентな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分であるオリゴヌクレオチドなど、完全長cDNAの一部であってもよい。本発明の診断アッセイに用いるその他の適切なプローブについては、本明細書に記載される。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションは、対象とするマーカーが発現していることを示すものである。

#### 【0094】

ある方式では、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動し、このmRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に転写することによって、mRNAを固相表面上に固定化してプローブと接触させる。別の方式では、例えば遺伝子チップアレイにおいて、プローブを固相表面上に固定化して、mRNAをこのプローブと接触させる。当業者は、既知のmRNA検出方法を適合させて、本発明のマーカーによってコードされるmRNAのレベルの検出に用いることができる。

#### 【0095】

試料中の本発明のマーカーに対応するmRNAのレベルを測定するための別の方法としては、例えば、RT-PCR(米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に記載の実施例)、COLD-PCR(Li et al.(2008)Nat 40  
.Med.14:579)、リガーゼ連鎖反応(Barany,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,88:189)、自家持続配列複製法(Guattelli et al.,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:1874)、転写増幅システム(Kwoh et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:1173)、Qレプリカーゼ法(Lizardi et al.(1988)Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製法(米国特許第5,854,033号)による核酸増幅プロセス、またはその他の任意の核酸増幅方法が挙げられ、続いて、当業者に周知の技術を用いて増幅分子が検出される。これらの検出方法は、核酸分子の検出において、このような分子の存在数が非常に少ない場合に特に有用である。本明細書において、増幅プライマーは、遺 50

伝子の5'領域または3'領域(それぞれ、プラス鎖およびマイナス鎖、または逆も同様)にアニールすることができ、中間に短い領域を含む一对の核酸分子と定義される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。適切な条件下で適切な試薬を用いて、このようなプライマーにより、プライマーに隣接するヌクレオチド配列を含む核酸分子が増幅される。

#### 【0096】

*in situ*法では、検出の前に試料(例えば、体液(例えば、血液細胞))からmRNAを単離する必要がない。このような方法では、細胞試料または組織試料は、既知の組織学的方法を用いて調製/処理される。次に、この試料を、支持体(通常はスライドガラス)上に固定化して、マーカーをコードするmRNAとハイブリダイズ可能なプローブと接触させる。

10

#### 【0097】

マーカーの絶対的発現レベルに基づいて決定する変法として、標準化されたマーカー発現レベルに基づいて判定してもよい。発現レベルの標準化は、マーカーの発現を、例えば、恒常的に発現しているハウスキーピング遺伝子など、マーカーではない遺伝子の発現と比較することにより、マーカーの絶対的発現レベルを補正することによって行われる。標準化に適した遺伝子としては、アクチン遺伝子などのハウスキーピング遺伝子、または上皮細胞特異的遺伝子が挙げられる。この標準化により、ある供給源由来の患者試料中の発現レベルを別の供給源由来の患者試料と比較することが可能となり、例えば、個体の $2n$ 貪食血液細胞をその個体の $2n$ 貪食血液細胞と比較することができる。

20

#### 【0098】

本発明のある実施形態では、マーカーに対応するタンパク質またはポリペプチドが検出される。ある実施形態では、タンパク質またはポリペプチドを検出するための薬剤は、ポリペプチドに結合することができる抗体、例えば、検出可能な標識を有する抗体などであってもよい。本明細書における用語「標識された」は、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング(すなわち、物理的に連結)させることによりプローブまたは抗体を直接的に標識すること、および直接的に標識された別の試薬との反応性によってプローブまたは抗体を間接的に標識することを包含することを意図している。間接的な標識の例には、蛍光標識された二次抗体を用いて一次抗体を検出すること、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できるよう、ビオチンによりDNAプローブを末端標識することが含まれる。抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。完全長の抗体またはその断片(例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>)を用いてもよい。ある方式では、発現タンパク質を検出するためのウェスタンブロットまたは免疫蛍光法などの方法において、抗体または抗体断片を用いることができる。このような使用では、抗体またはタンパク質のいずれかを固形支持体上に固定化することが一般に好ましい。適切な固相支持体または担体としては、抗原または抗体に結合することができる任意の支持体が挙げられる。既知の支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、およびマグネタイトなどが挙げられる。

30

40

#### 【0099】

種々の方式を用いて、試料が所与の抗体と結合するタンパク質を含有するかどうかを判定することができる。このような方式の例としては、これらに限定されないが、競合的イムノアッセイおよび非競合的イムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、抗原捕捉アッセイ、二抗体サンドイッチアッセイ、ウェスタンブロット解析、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、平面アレイ、比色アッセイ、化学発光アッセイ、および蛍光アッセイなどが挙げられる。ラジオイムノアッセイおよび酵素結合イムノアッセイを含むイムノアッセイは、本発明の方法において有用である。当業者は、既知のタンパク質/抗体検出方法を容易に適合させて、細胞(例えば、血液細胞などの体液細胞)が本発明のマーカーを発現するかの判定に用いることができる。

50

## 【0100】

当業者であれば、抗体または抗原を結合させるためのその他の多くの適切な担体を理解しており、そのような支持体を本発明での使用に適合させることができるであろう。例えば、細胞（例えば、血液細胞などの体液細胞）から単離されたタンパク質をポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、ニトロセルロースなどの固相支持体上へ固定してもよい。次に、この支持体を適切なバッファーで洗浄し、続いて検出可能なように標識された抗体を用いて処理することができる。次に、この固相支持体をバッファーで再度洗浄し、未結合の抗体を除去することができる。次に、固相支持体上に結合した標識の量を、従来の手段で検出することができる。

## 【0101】

ある例示的な実施形態では、診断、予後予測、疾患を発症するリスクの評価、治療の有効性の評価、疾患の進行または軽減のモニタリング、および疾患の改善または治療が可能な化合物の同定のためにアッセイが提供される。これらの方法の例示的な方法としては、試験対象から体液試料を得ること、および体液試料を、疾患または症状の1つまたは複数のマーカー、例えば、マーカー核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）、マーカーペプチド（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）、マーカー脂質（例えば、コレステロール）、またはマーカー代謝物（例えば、クレアチニン）を検出することができる化合物または薬剤と接触させてマーカーの存在を生体試料中で検出することが挙げられる。ある実施形態では、マーカーmRNAまたはゲノムDNAを検出するための薬剤は、マーカーmRNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズすることができる標識核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、完全長マーカー核酸、またはその一部であってもよい。本発明の診断アッセイに用いられるその他の適切なプローブは、本明細書に記載される。

## 【0102】

本明細書において、疾患または症状を改善または治療することが可能な化合物としては、これらに限定されないが、症状または予後を改善、疾患または症状の進行を防止、疾患または症状の軽減を促進、あるいは疾患または症状を除去することができる任意の物質を挙げることができる。

## 【0103】

さらに別の態様では、本発明は、(a)化合物を投与する前の対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーについての第1プロファイルを決定すること；前記化合物を投与する前の対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第2プロファイルを決定すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異を特定すること、(b)前記化合物を投与した後の前記対象の $> 2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーについての第3プロファイルを決定すること；前記化合物を投与した後の前記対象の $2n$ 貪食細胞集団から、前記1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つについての第4プロファイルを決定すること；前記マーカーのうちの少なくとも1つまたは複数について、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異を特定すること、(c)第1差異と第2差異との差異を同定することを含み、前記同定された差異が、前記化合物が前記対象における前記疾患または症状を改善または治療することを示す、対象における疾患または症状を改善または治療することができる化合物を同定する方法を提供する。

## 【0104】

さらに別の態様では、本発明は、(a)疾患または症状を有する対象の $> 2n$ 貪食細胞から、複数の被分析物についての第1プロファイルを決定すること；前記疾患または症状を有する対象の $2n$ 貪食細胞から、複数の被分析物についての第2プロファイルを決定すること；第2プロファイルと比較して第1プロファイルに特異的である、第1プロファイルと第2プロファイルとの第1差異セットを同定すること、(b)前記疾患または症状を有しないコントロール対象の $> 2n$ 貪食細胞から、複数の被分析物についての第3プロファイル

10

20

30

40

50

から、複数の被分析物についての第4プロファイルを決定すること；第4プロファイルと比較して第3プロファイルに特異的である、第3プロファイルと第4プロファイルとの第2差異セットを同定すること、および(c)第2差異セットと比較して第1差異セットに特異的である、1つまたは複数の被分析物を同定することを含み、前記同定された被分析物が前記疾患または症状のマーカーである、疾患または症状の1つまたは複数のマーカーを同定する方法を提供する。所望により、前記方法は、(d)前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒された細胞または組織から、複数の被分析物についての第5プロファイルを得ること；前記疾患または症状を有する対象の前記疾患または症状に冒されていない細胞または組織から、複数の被分析物についての第6プロファイルを得ること；第6プロファイルと比較して第5プロファイルに特異的である、第5プロファイルと第6プロファイルとの第3差異セットを同定すること、および(e)第3差異セット中に存在する、(c)の1つまたは複数のマーカーのうちの少なくとも1つを同定することをさらに含む。

10

20

30

40

50

**【0105】**

本発明のマーカーに対応する被分析物(例えば、DNA、RNA、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、または脂質など)の有無を、生体試料において検出するための例示的な方法としては、試験対象から体液試料(例えば、血液)を採取すること、および該体液試料を1つまたは複数のマーカーを検出することができる化合物または薬剤と接触させることが挙げられる。本明細書に記載の検出方法を用いて、生体試料中の1つまたは複数のマーカーを、*in vitro*および*in vivo*で検出することができる。例えば、mRNAの検出のための*in vitro*技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよび*in situ*ハイブリダイゼーションが挙げられる。本発明のマーカーに対応するポリペプチドの検出のための*in vitro*技術としては、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、および免疫蛍光法が挙げられる。ゲノムDNAの検出のための*in vitro*技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、本発明のマーカーに対応するポリペプチドの検出のための*in vivo*技術としては、該ポリペプチドに対する標識抗体を対象に導入することが挙げられる。例えば、標準的なイメージング技術によって対象内での存在および局在を検出することができる放射性マーカーで、抗体を標識することができる。各々のマーカーもまた被分析物であるので、マーカーの有無を検出するための本明細書に記載の任意の方法を用いて被分析物の有無を検出することも可能である。

**【0106】**

本発明の方法において有用なマーカーとしては、上記マーカーのいずれか1つにおける任意の変異を挙げることができる。変異部位および配列は、例えば、Human Gene Mutation Database([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk))、Single Nucleotide Polymorphism Database([dbSNP](http://dbSNP.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)、[www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP))、およびOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)ウェブサイト([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim))など、変異部位および配列の情報のデータベースおよびリポジトリにより同定することができる。

**【0107】**

本発明の方法において有用なマーカーとしては、疾患または症状と関連があることが知られている任意のマーカーを挙げることができる。本発明において使用することができるマーカーは、特定の疾患または症状と関連があるものとして特徴が明らかである任意のマーカー、または本発明の方法により同定された任意のマーカーであってもよい。

**【0108】**

ある実施形態では、マーカーは、AKT2、BAK1、EGFR、ERBB2、ETS2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、PDGFB、RB1、SERPINB2、SNCG、およびSPP1からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。

ある実施形態では、1つまたは複数のマーカーは、AKT1、AKT2、BAK2、CDC25A、E2F1、EGFR、ERBB2、FOS、JUN、MAP2K1、MMP2、NFKB1、PDGFB、PIK3R1、PNN、RB1、SERPINB2、SERPINB5、SNCG、SPP1、TERT、TIMP3、およびTP53からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、1つまたは複数のマーカーは、CASP8、CASP9、COL18A1、ETS2、HTATIP2、MMP9、SRC、およびTWIST1からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、1つまたは複数のマーカーは、AKT1、APAF1、ATM、CDC25A、CDKN1A、ETS2、FOS、IL8、ITGA4、ITGA6、ITGAV、JUN、MAP2K1、NFKBIA、PLAU、PLAUR、RAF1、SERPINB2、SYK、TIMP1、TNF、TNFRSF10B、およびTNFRSF1Aからなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、マーカーは、ACP2、AK2、AKT3、ARL5B、ATP2B3、BGN、BRAFA、BTG2、CAMKK2、CAPG、CAPN12、CPLX2、DENND5A、DNA2、FAM104A、FNIP1、GFRA4、GLUD1、GNAQ、GP1BB、HNRPLL、HOXA2、HPS3、I4、ITGAV、KLHL23、LANCL2、LYPD6、MAPKAPK3、MEF2A(EG:4205を含む)、MEF2C、NVL、PCYT1A、PGLYRP4、PLOD1、PPP1CB、PRKAB2、PROS1、PTPRE、RASA4(EG:10156を含む)、RBMS2、RBPJ、STAT5B、THBS1、TRIB1、TRIM2、TSPAN6、およびZDHHC21からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、マーカーは、B4GALT5、BOP1、CCL2、CCL3、CCL3L1、CCR2、CD83、CLEC4G、CLIC4、CTSC、CTSO、CXCL10、FCGR3A、FPR3、HBA1、HBB、LRMP、MAP1LC3B2、MS4A4A、MSR1、MYADML、NID1、PF4、PION、RNF217、SAMD9L、SERPING1、およびSPARCからなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、マーカーは、ACOT9、AMPD2、ARHGAP15、BATF2、C3AR1、C5orf41、CCL3、CCL3L1、CD63、CHST11、CHSY1、CLEC4G、CTSZ、CXorf21、CYTH4、CYTIP、DLEU2、DNAJA1、DOCK8、DTX3L、DUSP6、EPSTI1、ERF、F2RL1、FYB、GABRB2、GBP5、GLRX、GNB4、ICAM1、IFI35、IFIH1、IFNAR2、IL1R1、IRF1、ITGA5、LAP3、LAPTM5、LCP2、MAP1LC3B、MAP1LC3B2、MICAL2、MT1DP、MT1JP、MT1M、MT2A、MYADML、NEK6、NINJ2、NNMT、NT5C3L、NUB1、PDE4B、PLOD1、PML、PRKCB、PSMB9、RCN3、RGS4、RNASE6、RTP4、SAMD9L、SEL1L、SERPING1、SETX、SIGLEC10、SKIL、SLC7A7、SNORA21、SP100、SP110、SP140、SSFA2、STAT2、STK17B、STK3、TDRD7、TMCC1、TMPRSS11E2、TNFRSF1B、TPM1、TRIM21、TXNDC4、UBE2L6、UBE2W、USP18、VAV1、WARS、WIPF1、およびWIPPI1からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態では、マーカーは、ADAR、ADM、ALAS1、ANKRD22、ARHGAP27、B3GNT5、BCL10、C12orf35、C15orf29、C2orf59、CD177、CEACAM1、CPEB2、DDX58、F2RL1、GDPD3、GNAI3、HIST2H3A、HIST2H3D、HIST2H4A、HMGCR、HSPA6、HSPC159、IL4R、IMPA2、KPNB1、KREMEN1、KRT23、LDLR、LOC100130904、LTB4R、MAEA、MARK2、MBOAT2、MPZL3、N4BP1、NBEAL2、NMI、NPEPPS、PARP14、PGM2、PPIF、PXN、RALBP1、ROD1、RPS6KA1、S100P、SERTAD2、SLC9A1、SLPI、SP

110、SPINT1、ST14、TBC1D3、TNFRSF9、TRIM21、UPP1、VPS24、ZBTB34、およびZNF256からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子を含む。

【0109】

ある実施形態では、本発明の方法において有用である胎児期もしくは妊娠関連の疾患または症状のマーカーとしては、例えば、米国特許第7,655,399号、同第7,651,838号、同第6,660,477号、同第6,172,198号、同第5,594,637号、同第5,514,598号、同第6,258,540号、同第6,664,056号、同第7,235,359号、および同第7,645,576号、米国特許出願公開第20090162842号、同第20090155776号、同第20070207466号、同第20060019278号、同第20040086864号、同第20020045176号、同第20010051341号、同第20020192642号、同第20040009518号、同第20040203037号、同第20050282185号、同第20060252071号、同第20070275402号、同第20080153090号、同第20090170102号、同第20090061425号、同第20020045176号、同第20040137452号、同第20050164241号、同第20060019278号、同第20060252068号、同第20060252071号、同第20060257901号、同第20070141625号、同第20070218469号、同第20070275402号、同第20090155776号、同第20090162842号、同第20090170102号、同第20090317797号、同第20100120056号、同第20100120076号、および同第20100137263号、および国際特許出願公開第2006/026020号、同第2002/068685号、同第2005/111626号、同第2009/055487号、同第2009/001392号、および同第2008/014516号において開示されるマーカーが挙げられる。

10

20

【0110】

ある実施形態では、本発明の方法において有用である神経性もしくは精神神経性の疾患または症状のマーカーとしては、例えば、米国特許第7,723,117号、同第6,867,236号、米国特許出願公開第20060115854号、同第20060115855号、同第20060166283号、同第20060234301号、同第20060259990号、同第20060259991号、同第20070162983号、同第20070264197号、同第20080026405号、同第20080038730号、同第20080051334号、同第20080152589号、同第20080220013号、同第20080261226号、同第20080269103号、同第20080286263号、同第20090041862号、同第20090239241号、同第20090275046号、同第20090318354号、同第20090324611号、同第20100009352号、同第20100021929号、同第20100028356号、同第20100055722号、同第20100062463号、同第20100075891号、同第20100105623号、同第20100124756号、同第20100159486号、同第20100167937号、同第20100169988号、同第20100167320号、同第20100112587号、同第20100098705号、同第20100068705号、同第20100009356号、同第20090305265号、同第20100124746号、同第20100092983号、同第20070148661号、同第20070141625号、同第20100120050号、同第20090155230号、同第20090274709号、国際特許出願公開第2004/040016号、同第2004/071269号、同第2005/033341号、同第2005/052592号、同第2005/103712号、同第2005/114222号、同第2006/020269号、同第2006/048778号、同第2006/050475号、同第2006/061609号、同第2006/105907号、同第2006/133423号、同第2

30

40

50

006/134390号、同第2007/098585号、同第2007/119179号、同第2008/010660号、同第2008/014314号、同第2008/028257号、同第2008/046509号、同第2008/046510号、同第2008/046511号、同第2008/046512号、同第2008/063369号、同第2008/085035号、同第2008/095261号、同第2008/100596号、同第2008/120684号、同第2008/125651号、同第2008/127317号、同第2008/132464号、同第2009/000520号、同第2009/001392号、同第2009/068591号、同第2009/074331号、同第2009/100131号、同第2010/005750号、同第2010/011506号、同第2010/019553号、同第2010/059242号、同第2010/061283号、同第2010/063009号、同第2010/066000号、同第2009/121152号、同第2009/121951号、同第2009/097450号、同第2009/092382号、同第2009/075579号、同第2009/058168号、同第2009/053523号、同第2009/034470号、同第2009/032722号、同第2009/014639号、同第2009/003142号、同第2010/041046号、同第2007/131345号、同第2008/003826号、および同第2009/07556号において開示されるマーカが挙げられる。

10

#### 【0111】

ある実施形態では、本発明の方法において有用である心血管系の疾患または症状のマーカとしては、例えば、米国特許第7,670,769号、同第7,445,886号、同第7,432,107号、同第7,157,235号、および同第7,009,038号、米国特許出願公開第20100167320号、同第20100112587号、同第20100098705号、同第20100068705号、同第20100009356号、同第20090305265号同、第20100124746号、同第20100092983号、同第20070148661号、同第20070141625号、同第20100120050号、同第20090155230号、および同第20090274709号、および国際特許出願公開第2009/121152号、同第2009/121951号、同第2009/097450号、同第2009/092382号、同第2009/075579号、同第2009/058168号、同第2009/053523号、同第2009/034470号、同第2009/032722号、同第2009/014639号、同第2009/003142号、同第2010/041046号、同第2007/131345号、同第2008/003826号、および同第2009/075566号において開示されるマーカが挙げられる。

20

30

#### 【0112】

ある実施形態では、本発明の方法において有用である腎臓関連の疾患または症状のマーカとしては、例えば、米国特許第7,488,584号、同第7,459,280号、同第7,294,465号、および同第7,662,578号、米国特許出願公開第20100143951号、同第20100124746号、同第20100120056号、同第20100120041号、同第20100081142号、同第20090155230号、および同第20090239242号、国際特許出願公開第2010/059996号、同第2010/054389号、同第2010/048347号、同第2010/048497号、同第2010/054167号、同第2010/048346号、同第2010/046137号、同第2010/025434号、同第2010/018185号、同第2010/012306号、同第2009/122387号、同第2009/083950号、同第2009/080780号、同第2009/060035号、同第2009/059259号、同第2008/154238号、同第2008/089936号、同第2008/084331号、同第2008/042012号、同第2007/131345号、同第2005/012907号、同第2004/024098号、同第2003/019193号、同第2007/112999号、同第2007/08

40

50

2733号、同第2006/073941号、同第2010/068686号、同第2010/022210号、および同第2009/127644号において開示されるマーカーが挙げられる。

【0113】

ある実施形態では、本発明の方法において有用である自己免疫もしくは免疫関連の疾患または症状のマーカーとしては、例えば、第7,604,948号、第7,670,764号、第6,986,995号、および第6,631,330号、米国特許出願公開第20070141625号、同第20090263474号、同第20100075891号、同第20100104579号、同第20100105086号、同第20100131286号、同第20090176217号、同第20090202469号、同第20020119118号、同第20090258025号、同第20100137393号、同第20100120629号、同第20090318392号、同第20090196927号、同第20090023166号、同第20080227709号、同第20080039402号、同第20080026378号、同第20070224638号、同第20070218519号、同第20060210562号、同第20050266432号、同第20050164233号、同第20050130245号、同第20090130683号、同第20090110667号、同第20090054321号、同第20090023166号、および同第20080274118号、および国際特許出願公開第2009/043848号、同第2010/053587号、同第2010/046503号、同第2010/039714号、同第2009/100342号、同第2009/053537号、同第2009/017444号、同第2008/156867号、同第2008/147938号、同第2008/129296号、同第2008/137835号、同第2008/082519号、同第2008/064336号、同第2008/043782号、同第2008/043725号、同第2007/047907号、同第2006/125117号、同第2006/114661号、同第2006/020899号、同第2005/114222号、同第2005/007836号、同第2004/076639号、同第2004/050704号、および同第2001/014881号において開示されるマーカーが挙げられる。

10

20

【0114】

本発明はまた、本発明の方法によって同定される少なくとも1つまたは複数のマーカーを検出するマーカー検出剤を含むキットを提供する。本発明はまた、本発明の方法により同定される少なくとも1つまたは複数のマーカーの活性または発現を調節する薬剤を対象に投与することを含む、対象において疾患または症状を治療または予防する方法を提供する。

30

【0115】

記載される本発明の実施形態は、単に本発明の原理のいくつかの応用を説明する例にすぎないこと理解されたい。当業者であれば、本明細書の教示に基づいて、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、数多くの変更を行うことが可能である。

【0116】

以下の実施例は、本発明を代表するものとして示すものである。これらの実施形態およびその他の対応する実施形態が、本発明の開示、図面、および添付の請求項に照らして明らかであることから、これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

40

【実施例】

【0117】

実施例1：DNA量が2nである貪食細胞とDNA量が2n超である貪食細胞への白血球の選別

ヘキスト33342で染色し、FACSにより選別して、ヒト血液（ドナー）から白血球を単離した。図7は、このアプローチにより、2つの所望の貪食細胞集団のそれぞれについて、 $10^6$ 個の白血球を同定、選別、および回収することができることを示す。

50

## 【0118】

実施例2：貪食細胞を分離し、発現プロファイルを解析するための代表的な方法

白血球を、1つまたは複数の貪食細胞（例えば、好中球、マクロファージ、または単球）に対して特異的な蛍光抗体で染色し、DNA結合性色素（例えば、ヨウ化プロピジウム）で染色する。

## 【0119】

細胞を2n貪食細胞および>2n貪食細胞に選別する（FACS）。

## 【0120】

2n貪食細胞および>2n貪食細胞のそれぞれからRNAを単離する。cDNA、cRNAを調製し、これらを用いて2n貪食細胞および>2n貪食細胞の遺伝子プロファイル（例えば、癌遺伝子アレイ）を区別する。

10

## 【0121】

2n貪食細胞および>2n貪食細胞のそれぞれからDNAを単離する。DNAアレイを行い、2n貪食細胞および>2n貪食細胞から得られたプロファイルを比較する。

## 【0122】

2n貪食細胞および>2n貪食細胞のそれぞれからタンパク質を単離する。ヒト腫瘍で過剰発現される既知のタンパク質（例えば、前立腺癌におけるPSAおよびPSMA、結腸癌におけるCEA、ならびに卵巣癌におけるCA125）に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行い、2n貪食細胞および>2n貪食細胞から得られたプロファイルを比較する。

20

## 【0123】

2n貪食細胞および>2n貪食細胞のそれぞれから脂質を単離する。例えばHPLCを用いて、その量および質を比較する。

## 【0124】

実施例3

プロファイリング実験

血中貪食細胞の単離

患者から血液試料を採取する。血液（約5mL）を、50μLの0.5M EDTAを含有する50mLチューブへ移す（EDTAの最終濃度=約4.8mM）。チューブを穏やかにボルテックス攪拌し、25mLのRBC溶解バッファー（Norgen社）を添加する。チューブを再度穏やかにボルテックス攪拌し、溶液の色が明赤色に変わるまで室温にてインキュベートし（3~5分間）、2,000rpmにて3分間遠心分離する。上清を注意深く吸引した後、40mLのCa/Mgフリー0.1M PBS（2%FBS、2mM EDTA、および20mMグルコースを含有）で白血球を洗浄し、次に、細胞（ $10^6$ 個/mL）を、（i）生細胞透過性DNA染色液ヘキスト33342（4μg/mL、 $E_m = 483\text{nm}$ ）、（ii）循環単球/マクロファージによって発現されるヒトF4/80抗原を認識する抗ヒト単球/マクロファージモノクローナル抗体（Alexa Fluor（登録商標）647複合体、 $E_m = 668\text{nm}$ ）、および（iii）ヒト循環好中球を認識する抗ヒト好中球モノクローナル抗体（RPE標識複合体、 $E_m = 578\text{nm}$ ）を含有する細胞染色溶液と共にインキュベートする（暗所で4、30分間）。次に、細胞を洗浄し、好中球（ $N_n = 2$ ）、好中球（ $N_n > 2$ ）、単球/マクロファージ（ $M/M_n = 2$ ）、および単球/マクロファージ（ $M/M_n > 2$ ）に選別する（BD FACS Aria）。

30

40

## 【0125】

遺伝子プロファイリング

ヒト全ゲノム遺伝子プロファイリングを実施する。ヒト腫瘍細胞、または好中球（ $N_n = 2$ 、 $N_n > 2$ ）および単球/マクロファージ（ $M/M_n = 2$ 、 $M/M_n > 2$ ）から得られたRNA試料に対して、GeneChip（登録商標）ヒトゲノムU133プラス2.0アレイ（Affymetrix社）を使用する。このアレイでは、38,500の十分に特徴づけられたヒト遺伝子を含む、47,000を超える転写産物およびバリエーション

50

の発現レベルが解析される。一般的には、上述のアレイを用いてヒト遺伝子の発現プロファイルを決めるために、抽出したRNAが使用される。アレイの再現性を確実にするために、各試料を3連 (triplicate) でプロファイル化し、繰り返し実験を1回行う。マイクロアレイデータは、以下に記載するように、癌誘導関連遺伝子についてフィルタリングし、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて確認する。

#### 【0126】

癌誘導関連遺伝子の上方制御/下方制御

Triazol (Invitrogen社) を用いてRNAを単離し、このキットに付属のカートリッジを用いて精製する。RNAの質および量は、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies社、パロアルト、カリフォルニア州) およびDegradometerソフトウェアバージョン1.41 (ワールドワイドウェブ: dnaarrays.org) を用いて評価する。これらの実験結果は、腫瘍の存在により乱された分子経路を見分ける際の手助けとなる。

#### 【0127】

マイクロアレイ実験の解析

得られた大規模/ハイスループット分子発現データの解析は、(i) DNA量が2超である貪食細胞において異なって発現する遺伝子を同定する能力、(ii) 同定された遺伝子をアノテートする能力、および(iii) アノテートされた遺伝子を特定の腫瘍によって特異的に発現される遺伝子へ割り当てる能力に大いに依存する。マイクロアレイデータの統計的解析は、例えば、「試料解析/比較」メニュー中のこの種の遺伝子リスト構築に容易に対応するdChipパッケージを用いて行うことができる。Affymetrix GeneChipsを用いる場合、1つまたは複数のGeneChipsおよび関連する方法を適用して、マイクロアレイ生データの質を確認する (Gautier et al. (2004) Bioinformatics 20:307)。さらに、種々のバックグランド補正および標準化の手順を利用して、(発現値を得るための) プロブセットの標準化および集計のために最適なプロトコルを得る (Huber et al. (2002) Bioinformatics 18 (Suppl. 1): S96、Wu et al. (2004) Journal of the American Statistical Association 99:909、Seo and Hoffman (2006) BioMed Central Bioinformatics 7:395)。図5に示すように、二段階フィルトレーション (two-step filtration) アプローチにおいて、発明者らは、 $P_{n=2}$  の遺伝子プロファイルと  $P_{n>2}$  の遺伝子プロファイルと比較して、発現された遺伝子のリストを構築し、次に  $P_{n=2}$  遺伝子プロファイルをフィルタリングした後に、これらの遺伝子と各腫瘍細胞株に対して同定された腫瘍特異的遺伝子とを比較する。例えば、(i) 乳癌患者から血液を採取し、(ii) ( $>2n$  および  $2n$ ) 好中球を単離して、これらのプロファイルを3連 (triplicate) で測定し、(iii) 同定された各遺伝子の (3個の試料の) 平均値および対応する標準誤差 (SE) を各グループ ( $N_{n>2}$ 、および  $N_{n=2}$ ) に対して計算し、(iv) 次に、この2つのグループの遺伝子発現プロファイルを比較し、ウェルチの改良2標本t検定に準じて、絶対値で2倍以上の対数の変化 (absolute  $>2$ -fold log change) ( $N_{n>2} / N_{n=2}$ ) に基づいて発現遺伝子のリスト (L-1) を同定し、(v)  $N_{n=2}$  の遺伝子発現プロファイルおよび (腫瘍および正常乳腺組織生検から得られる) 乳癌の遺伝子発現プロファイルを比較し、発現遺伝子のリスト (L-2) を同定し、(vi) L-1 および L-2 の遺伝子を比較し (dChipの「試料解析/比較/比較の統合」、共通の遺伝子をフィルタリングすることにより、 $N_{n>2}$  によって獲得/発現された乳癌特異的遺伝子シグネチャを同定する。

#### 【0128】

タンパク質プロファイリング

各種細胞からの総タンパク質50~100マイクログラムを変性し、トリス-(2-カ

10

20

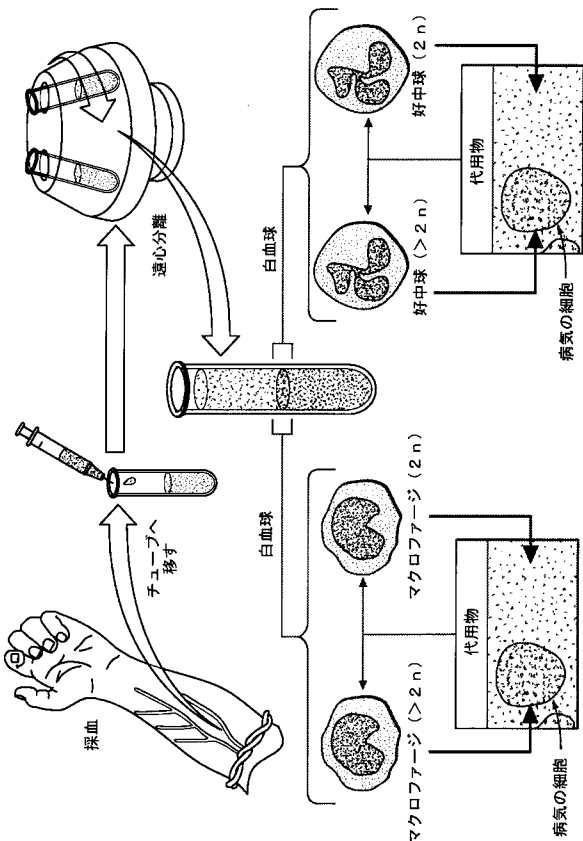
30

40

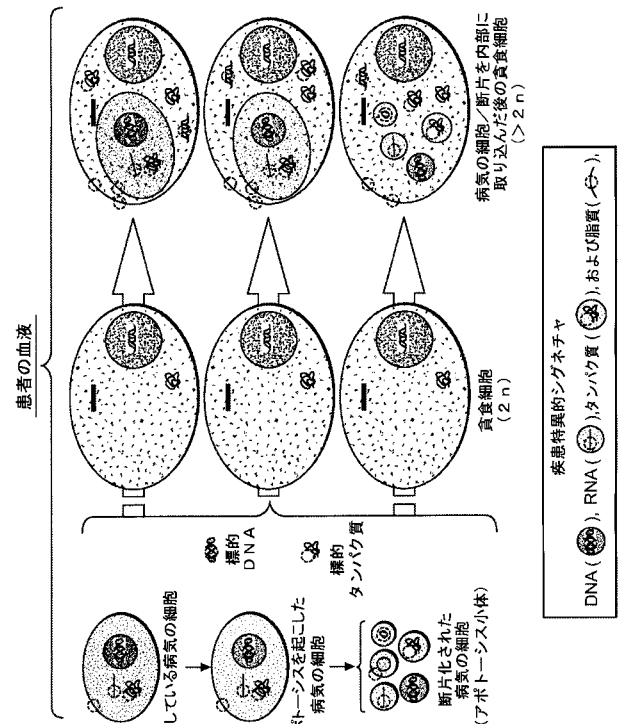
50

ルポキシエチル)ホスフィントリプシン(1mM)および0.02%ドデシル硫酸ナトリウムを用いて、60℃にて1時間還元する。続いてシステインをブロックし、総タンパク質をトリプシンで37℃にて12~16時間消化する。得られたペプチドを、1時間、(113~119および121にタグを有する) iTRAQで標識する(比較する細胞型の数に応じて、4種類または8種類)。標識後、別々にタグ付けされた試料を1つにまとめ、強カチオン交換カラム(Applied Biosystems社、4.6×100μm 多孔性)を備えたAgilent 1200シリーズHPLCシステムへ注入する。次に、96個の回収した画分を14個の画分へプールし、各画分を、逆相条件下にてLC Packings Ultimate HPLCシステム(LC Packings社、15cm×75μm 分析カラム)へ注入し、2回目の分画を行う。LC Packings Probotを使用して逆相画分を標的プレート上に直接スポットし、質量分析(Applied Biosystems 4800 Plus Proteomic s Analyzer)によって分析する。データの取得後にProteinPilotソフトウェアパッケージ(Applied Biosystems/MDS Sciex社)を用いてスペクトルを処理し、ProteinPilot(商標)ソフトウェアを用いて各種細胞における個々のタンパク質をその相対的発現レベルと共に同定する。

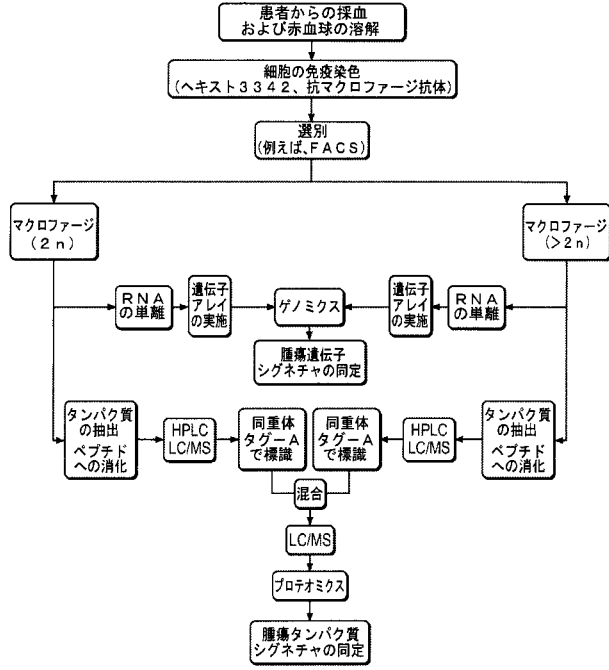
【 図 1 】



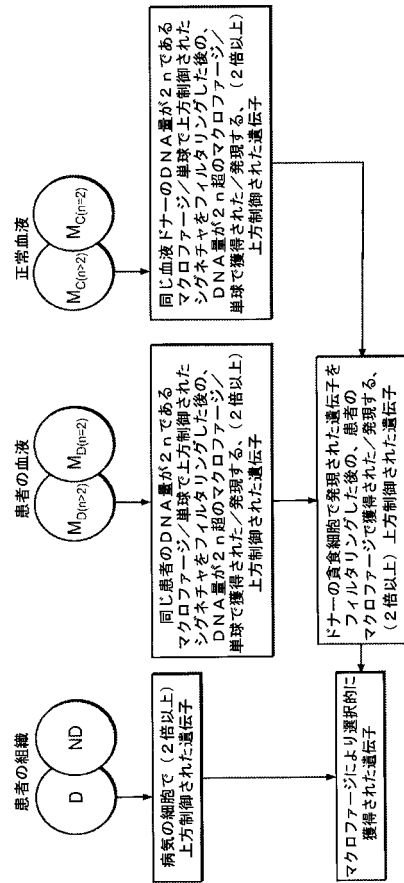
【 図 2 】



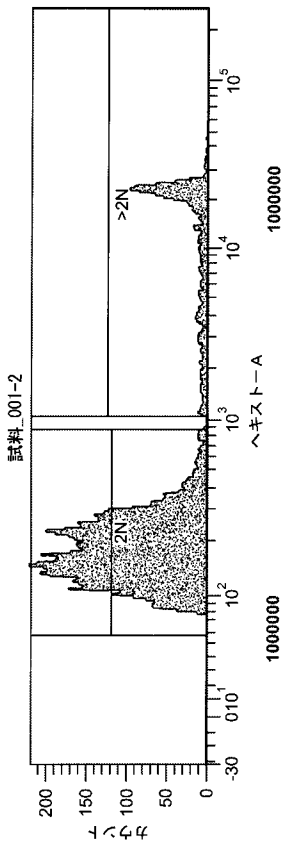
【 図 3 】



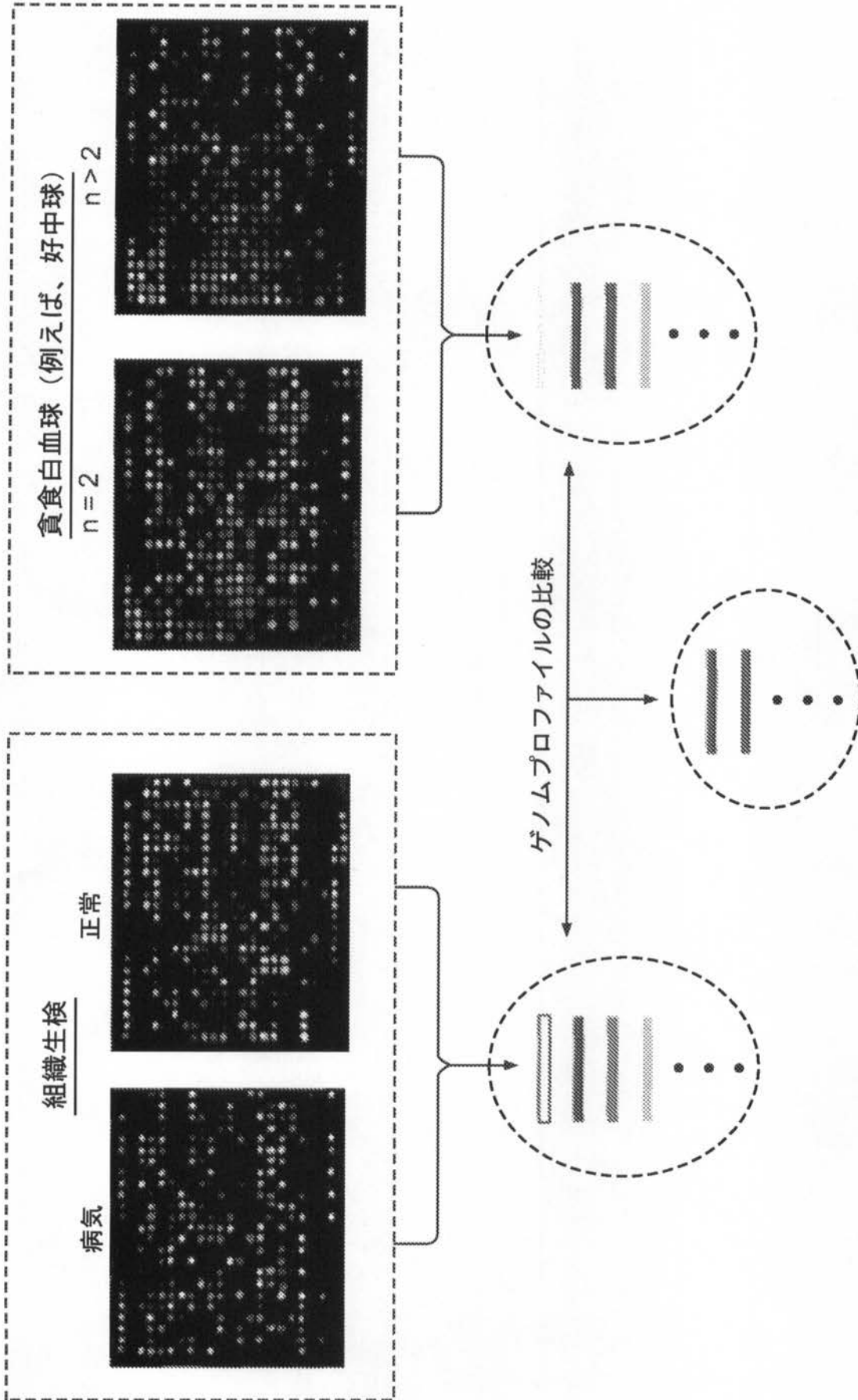
【 図 4 】



【 図 7 】



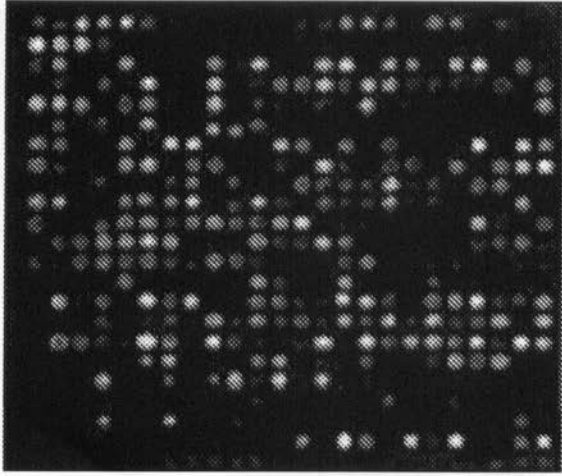
【図5】



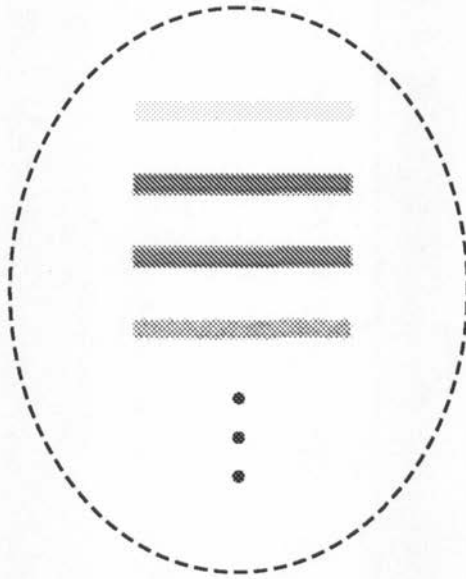
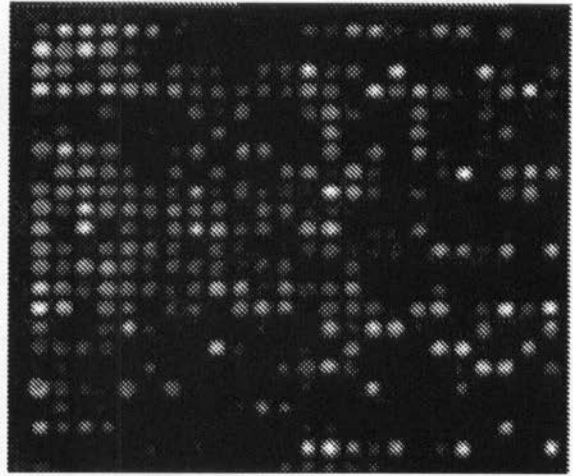
【図6】

貪食白血球（例えば、マクロファージ）

$n = 2$



$n > 2$



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/45018
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/53 (2011.01) USPC - 435/6.1, 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/53 (2011.01) USPC - 435/6.1, 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/6.11, 435/6.12, 435/6.13, 435/6.14, 435/91.2, 435/7.21, 435/7.23, 435/7.24, 435/7.92: keyword search, as below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Thompson Innovation (core patent databases from 01.01.1981 to 02.09.2012), Google Scholar -- Search Terms: phagocytic, phagocyte, monocytic, monocyte, macrophage, neutrophil, leukocyte, white blood cell, 2n, >2n, hyperdiploid, dna, genomic, genetic, nucleic acid, indicative, diagnostic, diagnosis		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2009/092068 A1 (KASSIS) 23 July 2009 (23.07.2009) para [16]; [17]; [18]; [19]; [23]-[25]; [38]; [187]; [148]; [121]; [122]; [143]; [92]; [59]; [93]; [94]; [96]; [109]; [131]; [96]; [116]; [108]; [99]; [57]; [25]; [63]; [213]; [140]-[147]; [207] Table 6; claim 14;	1, 7-9, 11, 16, 17, 19-25, 36-60, 111, 112, 114-115 18
Y	US 2004/0265932 A1 (HENSLEE et al.) 30 December 2004 (30.12.2004) abstract; para [0052]	18
A	US 2010/0056523 A1 (HEERDING et al.) 4 March 2010 (04.03.2010) abstract; para [0005]	114, 115
A	US 2010/0184031 A1 (RAES et al.) 22 July 2010 (22.07.2010)	1, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112, 114, 115
X,P	US 2011/0033839 A1 (KASSIS) 10 February 2011 (10.02.2011) abstract; para [0021]; [0023]; [0024]; [0055]; [0059]; [0063]; [0065]; [0094]; [0095]; [0097]; [100]; [0101]; [0109]; [0110]; [0112]; [0114]; [0123]; [0124]; [0129]; [0133]	1, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112, 114, 115
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 February 2012 (16.02.2012)		Date of mailing of the international search report <b>06 MAR 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45018

**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.: 12-15, 26-35, 75-85, 88-94 and 113  
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:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112 and 114-121, directed to a method for diagnosing or aiding in the diagnosis of a disease or condition in a subject, comprising: a) determining a first profile of one or more markers of a disease or condition from a population of phagocytic cells having a DNA content more than 2n; b) determining a second profile of at least one of the one or more markers from a population of phagocytic cells having a DNA content of 2n; and c) identifying the difference between the first and second profiles of at least one or more markers, wherein the difference is indicative of the presence of the disease or condition in the subject; wherein the first invention is limited to a marker comprising the first gene listed: AKT2 (applicants may opt for additional genes to be searched by specifying the gene, and paying an additional invention search fee for each elected gene. Note that not all claims will be searched under the first invention, as claims 116-121 will not be searched under the first invention because they do not include AKT2).

- Please see extra sheet for continuation -

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112 and 114-121, limited to AKT2, namely, Claims 1, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112, 114 and 115.

**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/US 11/45018

**Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)**

Methods of identifying markers expressed by phagocytic cells in the diagnosis prognosis, or monitoring of diseases or conditions are disclosed.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45018

## Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group II+: claims 2, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112 and 114-121, directed to a method for assessing the risk of developing a disease or condition in a subject comprising: a) determining a first profile of one or more markers of a disease or condition from a population of phagocytic cells having a DNA content more than 2n; b) determining a second profile of at least one of the one or more markers from a population of phagocytic cells having a DNA content of 2n; and c) identifying the difference between the first and second profiles of at least one or more markers, wherein the difference is indicative of the risk of developing said disease or condition; wherein the first invention is limited to a marker comprising the first gene listed: AKT2 (applicants may opt for additional genes to be searched by specifying the gene, and paying an additional invention search fee for each elected gene. Note that not all claims will be searched under the first invention, as claims 116-121 will not be searched under the first invention because they do not include AKT2).

Group III+: claims 3, 7-9, 11, 16-25, 36-60, 111, 112 and 114-121, directed to a method for prognosing or aiding in the prognosis of a disease or condition in a subject, comprising: a) determining a first profile of one or more markers of a disease or condition from a population of phagocytic cells having a DNA content more than 2n; b) determining a second profile of at least one of the one or more markers from a population of phagocytic cells having a DNA content of 2n; and c) identifying the difference between the first and second profiles of at least one or more markers, wherein the difference is indicative of the prognosis of said disease or condition in the subject; wherein the first invention is limited to a marker comprising the first gene listed: AKT2 (applicants may opt for additional genes to be searched by specifying the gene, and paying an additional invention search fee for each elected gene. Note that not all claims will be searched under the first invention because they do not include AKT2).

Group IV+: claims 4-25, 36-60, 111, 112, 114-121, directed to a method for assessing the efficacy of a treatment for a cardiovascular disease, identifying a compound capable of ameliorating or treating said disease or monitoring the progression of said disease, comprising: a) determining a first profile of one or more markers of the disease or condition from a population of phagocytic cells having more than 2n nucleic acid content; determining a second profile of at least one or more markers from a population of phagocytic cells having a normal DNA content, or a population of non-phagocytic cells; identifying a difference between the first and second profiles of at least one or more of said markers; b) determining a third profile of the one or more markers from a population of phagocytic cells having more than 2n nucleic acid content; determining a fourth profile of at least one or more markers from a population of phagocytic cells having a normal DNA content, or a population of non-phagocytic cells; identifying a difference between the third and fourth profiles of at least one or more of said markers; and c) determining a difference between the first difference and the second difference, wherein the identified difference is indicative of the efficacy of a treatment, or progression or regression of the disease; wherein the first invention is limited to a marker comprising the first gene listed: AKT2 (applicants may opt for additional genes to be searched by specifying the gene, and paying an additional invention search fee for each elected gene. Note that not all claims will be searched under the first invention, as claims 116-121 will not be searched under the first invention because they do not include AKT2).

Group V: claims 61-74, 86, 87, 95-110, 122 and 123, directed to a method for identifying one or more markers of a disease or condition comprising: a) i) determining a first profile of analytes from phagocytic cells with more than 2n nucleic acid content from a subject having said disease, ii) determining a second profile of analytes from normal phagocytic cells from the subject, and iii) identifying a first set of differences between the first and second profiles; b) i) determining a third profile of analytes from cells with more than 2n nucleic acid content from a subject not having said disease, ii) determining a second profile of analytes from normal phagocytic cells from the subject not having the disease, and iii) identifying a second set of differences between the first and second profiles; and d) identifying one or more analytes specific to the first set of differences relative to the second set of differences, the identified analytes being markers of the disease or condition.

The inventions listed as Groups I+ - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

- Please see next extra sheet -

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/45018

Continuation of: First Extra Sheet: Lack of Unity of Invention

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to phagocyte markers of disease, and methods relating to said markers comprising: a) determining a first profile of one or more markers of a disease or condition from a population of phagocytic cells having a DNA content more than 2n; b) determining a second profile of at least one of the one or more markers from a population of phagocytic cells having a DNA content of 2n; and c) identifying the difference between the first and second profiles of at least one or more markers. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2010/0151467 A1 to Wohlgemuth et al., which discloses wherein libraries of candidates that are differentially expressed in leukocytes which are disease specific ("the identification of differentially expressed target and fingerprint genes isolated from purified populations of monocytes manipulated in various in vitro paradigms has been proposed for the diagnosis and monitoring of a range of cardiovascular diseases"; para [0012], [0251]), wherein the leukocytes from a disease state may have more genetic material than those which are not diseased (Diagnostic nucleotide sets may be developed and validated for use in diagnosis and monitoring of EBV... In one aspect, the diagnostic nucleotide set is a leukocyte nucleotide set. Alternatively, EBV nucleotide sequences are added to a leukocyte nucleotide set, for use in diagnosing EBV. Disease criteria correspond with diagnosis of EBV, and, in patients who are EBV-sero-positive, presence (or prospective occurrence) of EBV-related illnesses such as mononucleosis, and EBV-associated lymphoma. Diagnostic nucleotide sets are useful for diagnosis of EBV, and prediction of occurrence of EBV-related illnesses; para [0413], wherein a person of skill in the art would have recognized that the addition of the viral genetic material by infection would have produced cells having a DNA content of greater than 2n). It further would, therefore, have been obvious to a person skilled in the art that the development of a diagnostic nucleotide set, as taught by Wohlgemuth, particularly a set based on "differentially expressed target and fingerprint genes" would have been required to use a comparison of expression in infected versus non-infected cells (thus establishing two profiles, one of each cell type) in order to establish a difference in expression. Wohlgemuth also teaches wherein the leukocytes may include phagocytes (monocytes), further wherein the libraries may be assembled from sequences that are differentially expressed in diseased leukocytes versus normal leukocytes, or activated or resting leukocytes relative to other cell types (para [0256]). Wohlgemuth additionally teaches the use of expression profiles for a subset of identified genes in the identification of tissue samples, and the monitoring of drug effects (para [0012]). Wohlgemuth further teaches methods of identifying markers (para [0013], [0014]), and wherein the markers may be identified in phagocytic cells, and may be markers of cardiovascular disease, as well as wherein the markers may be differentially expressed in diseased versus normal phagocytic cells of a diseased subject, or in the cells of a diseased subject versus a control subject (para [0251] - [0256]). Therefore, the inventions of Groups I+ - V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	15/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/08
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
		A 6 1 P	19/00

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カシス アミン アイ

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州 チェスナット ヒル サウス ストリート  
2 8

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ42 QQ53 QR55 QR62 QS25 QS34 QS39 QX02  
4C084 AA17 MA52 MA66 NA14 ZA012 ZA182 ZA332 ZA362 ZA592 ZA662  
ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB082 ZB212 ZB262 ZB322

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013541323A5</a>	公开(公告)日	2014-09-25
申请号	JP2013521848	申请日	2011-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会		
申请(专利权)人(译)	哈佛大学校董委员会		
[标]发明人	カシスアミンアイ		
发明人	カシス アミン アイ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N30/88 A61K45/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P25/00 A61P25/18 A61P37/06 A61P35/00 A61P31/00 A61P43/00 A61P11/00 A61P1/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P21/00 A61P17/00 A61P19/00		
CPC分类号	A61P1/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/08 A61P17/00 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P27/02 A61P31/00 A61P35/00 C12Q1/6809 G01N33/56966 C12Q2527/125 C12Q2563/173 C12Q2565/626 C12Q2600/112 C12Q2600/118 G01N33/5308 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/56972 G01N33/6848 G01N2500/10 G01N2570/00 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N30/88.E A61K45/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P25/00 A61P25/18 A61P37/06 A61P35/00 A61P31/00 A61P43/00.105 A61P11/00 A61P1/00 A61P15/00 A61P27/02 A61P21/00 A61P17/00 A61P19/00		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA182 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	61/367094 2010-07-23 US		
其他公开文献	JP2013541323A		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种在诊断，预后预测或疾病或病症监测中使用吞噬细胞的方法。本发明还提供了使用吞噬细胞鉴定疾病或症状标志物的方法。