

(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2020-502545

(P2020-502545A)

(43) 公表日 令和2年1月23日(2020.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
CO 7 K 14/81 (2006.01)	CO 7 K 14/81	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 159 頁)

(21) 出願番号	特願2019-553597 (P2019-553597)	(71) 出願人	518120083
(86) (22) 出願日	平成29年12月18日 (2017.12.18)		サングイ バイオ ビーティーワイ. エ
(85) 翻訳文提出日	令和1年8月14日 (2019.8.14)		ルティーディー
(86) 国際出願番号	PCT/AU2017/000282		オーストラリア 2095 エヌエスダブ
(87) 国際公開番号	W02018/112500		リュウ マンリー カンガルー ストリー
(87) 国際公開日	平成30年6月28日 (2018.6.28)		ト 63
(31) 優先権主張番号	62/436,875	(74) 代理人	100097456
(32) 優先日	平成28年12月20日 (2016.12.20)		弁理士 石川 徹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	ベンジャミン ロス ハーバート
(31) 優先権主張番号	62/482,582		オーストラリア 2121 エヌエスダブ
(32) 優先日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		リュウ ノース エッピング ダグラス
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アベニュー 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼインヒビターを用いる血液プロファイリング

(57) 【要約】

本開示は、全血、赤血球濃縮血液試料、又は赤血球成分から血液タンパク質プロファイルを作成する方法に関する。本方法は、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートする前及びプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートした後のタンパク質レベルの比較、又はプロテアーゼインヒビターの存在下におけるインキュベーションの後及びプロテアーゼインヒビターの非存在下におけるインキュベーションの後のタンパク質レベルの比較を含む。該タンパク質プロファイルは、結腸直腸癌及び子癰前症を含む対象の疾患及び障害のモニタリング及び診断に使用される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 血液試料を採取すること；
 - b.) 該血液試料由来の赤血球成分を採取すること；
 - c.) 該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；
 - d.) 該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；
 - e.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに
 - f.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定すること
- を含み、

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該赤血球成分を該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後にレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、前記方法。

【請求項2】

タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 血液試料又は血液試料由来の赤血球成分を採取すること；
 - b.) 該血液試料又は該赤血球成分由来の第一の部分及び第二の部分を選択すること；
 - c.) 該血液試料又は該赤血球成分由来の第二部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；
 - d.) 該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること(ここで、該第一の部分は該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない)；並びに
 - e.) 該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定すること
- を含み、

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、前記方法。

【請求項3】

血液試料と赤血球成分の両方が採取される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 疾患又は障害を有さない対象に由来する血液試料を採取すること；
 - b.) 該血液試料由来の赤血球成分を採取すること；
 - c.) 該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；
 - d.) 該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；
 - e.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに
 - f.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定すること
- を含み、

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を含む、前記方法。

【請求項5】

疾患タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 疾患又は障害を有する対象から、請求項1～3の1つ又は複数に従って作成される第一のタンパク質プロファイルを得ること；

b.)該疾患又は障害を有さない対象から、請求項4に従って作成される第二のタンパク質プロファイルを得ること(ここで、該第二のタンパク質プロファイルは、該第一のタンパク質プロファイルが得られた同じ赤血球成分から得られる);及び

c.)該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差を比較することを含み、

ここで、作成された疾患タンパク質プロファイルが、該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の間で差がある1種以上のタンパク質を含む、前記方法。

【請求項6】

前記赤血球成分が全血又は単離赤血球から採取される、請求項1～5の1つ又は複数記載の方法。

【請求項7】

前記赤血球成分が赤血球又は赤血球膜である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベルが測定される、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項9】

3種以上のタンパク質のレベルが測定される、請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼインヒビター、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、又は10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項11】

前記赤血球成分を、少なくとも2つのプロテアーゼインヒビターを含むプロテアーゼインヒビターカクテルと接触させる、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項12】

前記赤血球成分をプロテアーゼインヒビターカクテルA8127sと接触させる、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項13】

前記1種以上のプロテアーゼインヒビターが、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及びアミノペプチダーゼインヒビターからなる群から選択される、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項14】

前記1種以上のタンパク質のレベルの変化が、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Spe rmans)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項15】

前記1種以上のタンパク質のレベルの変化が0倍～5倍の倍数変化である、請求項1～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項16】

前記疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と前記疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差が、スチューデ

10

20

30

40

50

ントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される、請求項5～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項17】

前記疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と前記疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差が該レベルの変化の増加又は該レベルの変化の減少である、請求項5～7の1つ又は複数記載の方法。

【請求項18】

前記対象がヒト又は非ヒト動物である、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項19】

前記1種以上のタンパク質のレベルが1以上の抗体を用いて測定される、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項20】

前記1種以上のタンパク質が、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、細胞外マトリックス成分、糖タンパク質、炎症性タンパク質、及び酵素からなる群から選択される、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項21】

前記1種以上のタンパク質が、表1に掲載されているタンパク質又は表2に掲載されているタンパク質からなる群から選択される、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項22】

前記疾患又は障害が子癇前症である、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項23】

前記疾患タンパク質プロファイルが、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSG、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癇前症タンパク質プロファイルである、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記疾患又は障害が結腸直腸癌である、請求項1～17の1つ又は複数記載の方法。

【請求項25】

前記疾患タンパク質プロファイルが、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである、請求項24記載の方法。

【請求項26】

対象における疾患又は障害をモニタリングする方法であって：

a.) 該疾患又は障害を有する対象から、第一の時点における第一の血液試料及び第二の時点における第二の血液試料を採取すること；

b.) 該疾患又は障害についての請求項5に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルを該第一の血液試料及び第二の血液試料中で測定すること；並びに

c.) 該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差を決定すること
を含み、

ここで、該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該疾患又は障害の変化を示す、前記方法。

【請求項27】

対象における治療の効果をモニタリングする方法であって：

a.) 該対象から、第一の時点で請求項1～3の1つ又は複数に従って作成される第一のタンパク質プロファイルを得ること及び第二の時点で請求項1～4の1つ又は複数に従って作成される第二のタンパク質プロファイルを得ること；並びに

b.) 該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること
を含み、

ここで、該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質レベルの変化と該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該治療の効果を示す、前記方法。

【請求項 28】

前記第一の時点が治療前であり、前記第二の時点が治療後である、請求項27記載の方法。

10

【請求項 29】

前記第一の時点が治療前であり、前記第二の時点が治療中である、請求項27記載の方法。

【請求項 30】

前記第一の時点及び前記第二の時点が治療中である、請求項27記載の方法。

【請求項 31】

前記第一の時点が治療中であり、前記第二の時点が治療後である、請求項27記載の方法。

【請求項 32】

前記第一の時点及び前記第二の時点が治療後である、請求項27記載の方法。

20

【請求項 33】

前記対象が同じ治療を受けたことがある、請求項27記載の方法。

【請求項 34】

前記対象が異なる治療を受けたことがある、請求項27記載の方法。

【請求項 35】

前記血液試料が少量の血液試料である、請求項27～34の1つ又は複数記載の方法。

【請求項 36】

前記対象が、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、及び1日に5回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

前記対象が、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、及び1週間に7回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、請求項35記載の方法。

30

【請求項 38】

前記対象が毎日モニタリングされる、請求項35記載の方法。

【請求項 39】

前記対象が、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、及び4週間に1回からなる群から選択される回数モニタリングされる、請求項35記載の方法。

【請求項 40】

疾患又は障害を診断する方法であって：

40

a.) 請求項3に従って作成される少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルを得ること；

b.) 対象に由来する血液試料を採取すること；

c.) 該血液試料由来の赤血球成分を採取すること；

d.) 該赤血球成分の少なくとも第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；

e.) 該赤血球成分の第一の部分における疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルを測定すること；

f.) 該赤血球成分の第一の部分における少なくとも1種のタンパク質と該赤血球成分の第

50

二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を決定すること;並びに

g.)該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること

を含み、

ここで、該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較した該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの同じ又は同様の変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、前記方法。

【請求項41】

10

対象における疾患又は障害を診断する方法であって:

a.)請求項1~3の1つ又は複数に従って作成される該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;及び

b.)該少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を請求項5に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の該少なくとも1種のタンパク質のレベル変化と比較すること

を含み、

ここで、該疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と同じ又は同様の該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、前記方法。

20

【請求項42】

対象における疾患又は障害を診断する方法であって:

a.)該対象についての請求項1~3の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;

b.)請求項4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;及び

c.)該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を請求項4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること

30

を含み、

ここで、該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と請求項4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、前記方法。

【請求項43】

血液試料のタンパク質プロファイルを作成するためのキットであって:

a.)赤血球成分を採取するための少なくとも1つの試薬;

b.)1種以上のプロテアーゼインヒビター;及び

c.)該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬

40

を含む、前記キット。

【請求項44】

前記キットが対象由来の血液試料を採取するための少なくとも1つの試薬をさらに含む、請求項43記載の方法。

【請求項45】

前記1種以上のタンパク質のレベルを測定するための試薬が1以上の抗体である、請求項43記載の方法。

【請求項46】

前記1種以上のタンパク質を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬が酵素結

50

合免疫吸着アッセイ(ELISA)装置である、請求項45記載の方法。

【請求項47】

前記1種以上のプロテアーゼインヒビターがプロテアーゼインヒビターカクテルを含む、請求項43記載の方法。

【請求項48】

前記プロテアーゼインヒビターカクテルがA8127sである、請求項47記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、(1)2016年12月20日に提出された「プロテアーゼインヒビターを用いる血液プロファイリング(Blood Profiling with Protease Inhibitors)」と題する米国仮出願第62/436,875号、(2)2017年4月6日に提出された「プロテアーゼインヒビターを用いる血液プロファイリング(Blood Profiling with Protease Inhibitors)」と題する米国仮出願第62/482,582号、及び(3)2017年6月22日に提出された「プロテアーゼインヒビターを用いる血液プロファイリング(Blood Profiling with Protease Inhibitors)」と題する米国仮出願第62/523,489号からの優先権の恩典を主張する。上記の関連出願の各々は、その全体が、引用により本明細書中に組み込まれる。

【0002】

さらに、以下の出願:(1)2015年10月7日に提出された「血液の調製及びプロファイリング(Blood Preparation and Profiling)」と題する豪州出願第2015904075号;(2)2016年10月6日に提出された「血液の調製及びプロファイリング(Blood Preparation and Profiling)」と題する国際出願PCT/AU2016/000341号、及び(3)2015年12月22日に提出された「赤血球を用いる治療法(Therapeutic Methods Using Erythrocytes)」と題する豪州出願第2015905309号の各々は、その全体が、引用により本明細書中に組み込まれる。さらに、本開示において参照される他の参考文献又は刊行物もまた、その全体が、引用により本明細書中に組み込まれる。

【0003】

(技術分野)

本開示は、全体として、血液学の分野に関する。本開示は、血液中でのタンパク質プロファイリング並びに例えば、サイトカイン及び/又はケモカインプロファイルを含む血液タンパク質プロファイルを、赤血球濃縮血液試料及び/又は赤血球成分から作成及び/又は生成する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

(背景)

血液のタンパク質プロファイリングは、様々な目的のために使用されている。例えば、末梢血単核細胞(PBMC)及び血清/血漿中の指標タンパク質のプロファイリングは、疾患の診断において一般に使用されている。さらに、血液内のタンパク質プロファイルをモニタリングすることは、治療に対する応答性をモニタリングする手段と寛解又は退行の指標とを提供することにより、より効果的な治療的介入を導くのを助けることができる。

【0005】

サイトカイン、ケモカイン、及び成長因子などの血液中被見られる生物学的マーカーは、炎症、免疫応答、及び修復に対する洞察を提供することができる。例えば、血液中の炎症促進性及び/又は抗炎症性サイトカイン及びケモカインレベルの検出及び定量は、免疫状態を測定するために利用されている。これらのサイトカイン及びケモカインは、特定の病態を診断し、疾患を発症する素因を決定し、かつ/又は予後転帰を予測するために使用することができる。しかしながら、様々な疾患の生物学的マーカーとして役立つこととなるタンパク質の同定は、時間がかかり、かつ多大な労力を必要とすることがある。

【0006】

10

20

30

40

50

典型的には、血液中の様々なタンパク質の検出及び定量は、分離血清/血漿、及び/又はPBMCを用いて実施することができる。血液の豊富な細胞成分であり、かつ典型的には、その体積の40%~50%を占める赤血球(Erythrocyte)/赤血球(RBC)は、とりわけ、血液の現在の処理及びアッセイ方法を複雑化すると考えられているので、血液タンパク質解析を実施する前にルーチンに除去され、廃棄される。また、RBCは、血液の全体的なタンパク質プロファイルに対して顕著な寄与をすると考えられていない。さらに、血液タンパク質をアッセイするために血漿/血清及びPBMCのようなあまり豊富でない血液成分に依存することは、例えば、血液タンパク質プロファイルの誤りを増大させ、様々な状況下でタンパク質及び/又はタンパク質レベルの差を検出する能力を制限する可能性がある。当業者によってこれまで十分には理解されていない血液試料由来のタンパク質のタンパク質プロファイリング及び他の評価においてRBCを使用する利点がある。

10

【0007】

本開示は、本明細書に開示されるこれらの及びその他の問題を解決することを対象としている。本開示はまた、本明細書における考察から明らかになるように、従来技術の欠点の少なくとも1つを克服及び/又は改善することを対象としている。本開示はまた、RBCを使用する1以上の利点の指摘を対象としている。

【発明の概要】

【0008】

(開示の概要)

本開示は、血液タンパク質プロファイルを用いて、前述の問題のいくつかを解決することを対象としており、驚くことに、RBCが実質的なレベルでいくつかの異なるタンパク質(例えば、サイトカイン、ケモカイン、及び/又は成長因子)の供給源であることを見出した。さらに、本発明者らは、とりわけ、赤血球試料へのプロテアーゼインヒビターの添加が疾患又は障害を有する人に由来する試料中の様々なタンパク質のレベルを調節するが、疾患又は障害を有さない人に由来する赤血球試料中のタンパク質のレベルを同様には調節しないことを見出した。したがって、本発明者らは、とりわけ、様々なプロテアーゼインヒビターと接触させたRBCにおけるタンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化を評価することにより、全血、濃縮赤血球試料、及び/又は赤血球成分からタンパク質プロファイルを作成するための新規のかつ有用な実験技法を作り出した。この新規のかつ有用な実験技法は、タンパク質を検出し、かつ/又は疾患もしくは障害を有する人と健常個体を識別する能力を高めることにより、血液からタンパク質プロファイルを作成し、かつ/又は疾患もしくは障害を検出するために現在の技法よりも改良されたものである。本開示は、とりわけ、プロテアーゼインヒビターを用いて、全血、赤血球濃縮試料、赤血球濃縮画分、及び/又は赤血球成分からタンパク質プロファイルを作成するための改善された方法、キット、及び/又はシステムを提供し、それにより、限定されないが、タンパク質検出の誤りの減少並びに関連血液試料中でのタンパク質検出及び示差発現の増大を含む、1以上の利点を提供する。

20

30

【0009】

本開示のある非限定的な実施態様が本明細書に開示されている。

【0010】

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、血液試料を採取すること;該血液試料由来の赤血球成分を採取すること;該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;並びに該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定することを含み、ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該赤血球成分を該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後にレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。

40

【0011】

50

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、血液試料又は血液試料由来の赤血球成分を採取すること；該血液試料又は該赤血球成分由来の第一の部分及び第二の部分の採取すること；該血液試料又は該赤血球成分由来の第二の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること（ここで、該第一の部分は該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない）；並びに該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定することを含み、ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、血液試料と赤血球成分の両方が採取される。

10

【0012】

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有さない対象に由来する血液試料を採取すること；該血液試料由来の赤血球成分を採取すること；該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定することを含み、ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を含む、方法に対するものである。

20

【0013】

ある実施態様は、疾患タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有する対象から、他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される第一のタンパク質プロファイルを得ること；該疾患又は障害を有さない対象から、他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される第二のタンパク質プロファイルを得ること（ここで、該第二のタンパク質プロファイルは、第一のタンパク質プロファイルが得られた同じ赤血球成分から得られる）；及び該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差を比較することを含み、ここで、作成された疾患タンパク質プロファイルが、該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の間で差がある1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。

30

【0014】

いくつかの実施態様において、赤血球成分は、全血又は単離赤血球から採取される。他の実施態様において、赤血球成分は、赤血球又は赤血球膜である。他の実施態様において、2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベルを測定する。ある実施態様において、3種以上のタンパク質のレベルを測定する。ある他の実施態様において、赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼインヒビター、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、又は10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、赤血球成分を、少なくとも2つのプロテアーゼインヒビターを含むプロテアーゼインヒビターカクテルと接触させる。ある実施態様において、赤血球成分を、プロテアーゼインヒビターカクテルA8127sと接触させる。いくつかの実施態様において、1種以上のプロテアーゼインヒビタ

40

50

ーは、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及びアミノペプチダーゼインヒビターからなる群から選択される。他の実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルの変化は、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される。ある実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルの変化は、0倍～5倍の倍数変化である。さらに他の実施態様において、該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差は、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される。さらに他の実施態様において、該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差は、該レベルの変化の増加又は該レベルの変化の減少である。ある他の実施態様において、対象はヒト又は非ヒト動物である。いくつかの実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルは1以上の抗体を用いて測定される。他の実施態様において、1種以上のタンパク質は、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、細胞外マトリックス成分、糖タンパク質、炎症性タンパク質、及び酵素からなる群から選択される。ある実施態様において、1種以上のタンパク質は、表1に掲載されているタンパク質又は表2に掲載されているタンパク質からなる群から選択される。いくつかの実施態様において、疾患又は障害は子癇前症である。ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSG、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癇前症タンパク質プロファイルである。他の実施態様において、疾患又は障害は結腸直腸癌である。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである。

【0015】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害をモニタリングする方法であって、該疾患又は障害を有する対象から、第一の時点における第一の血液試料及び第二の時点における第二の血液試料を採取すること；該疾患又は障害についての他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルを該第一の血液試料及び第二の血液試料中で測定すること；並びに該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差を決定することを含み、ここで、該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該疾患又は障害の変化を示す、方法に対するものである。

【0016】

ある実施態様は、対象における治療の効果をモニタリングする方法であって、該対象から、第一の時点で他の実施態様の1つ又は複数に従って作成された第一のタンパク質プロファイル及び第二の時点で他の実施態様の1つ又は複数に従って作成された第二のタンパク質プロファイルを得ること；並びに該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較することを含み、ここで、該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該治療の効果を示す、方法に対するものである。ある実施態様において、該第一の時点は治療前であり、該第二の時点は治療後である。いくつかの実施態様において、該第一の時点は治療前であり、該第二の時点は治療中である。他の実施態様において、該第一の時点及び該第二の時点は治療中である。さらに他の実施態様において、該第一の時点は治療中であり、該第二の時点は治

療後である。他の実施態様において、該第一の時点及び該第二の時点は治療後である。さらに他の実施態様において、該対象は同じ治療を受けたことがある。他の実施態様において、該対象は異なる治療を受けたことがある。ある実施態様において、該血液試料は、少量の血液試料である。他の実施態様において、該対象は、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、及び1日に5回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる。さらに他の実施態様において、該対象は、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、及び1週間に7回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる。ある実施態様において、該対象は毎日モニタリングされる。いくつかの実施態様において、該対象は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、及び4週間に1回からなる群から選択される回数モニタリングされる。

10

【0017】

ある実施態様は、疾患又は障害を診断する方法であって、他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルを得ること；対象に由来する血液試料を採取すること；該血液試料由来の赤血球成分を採取すること；該赤血球成分の少なくとも第一の部分の1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該赤血球成分の第一の部分における疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルを測定すること；該赤血球成分の第一の部分における少なくとも1種のタンパク質と該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を決定すること；並びに該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較することを含み、ここで、該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較して同じ又は同様の該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。

20

【0018】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害を診断する方法であって、他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；並びに少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較することを含み、ここで、該疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と同じ又は同様の該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。

30

【0019】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害を診断する方法であって、対象についての他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；疾患又は障害を有さない対象についての他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；及び該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該疾患又は障害を有さない対象についての他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較することを含み、ここで、該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象についての他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。

40

50

【0020】

ある実施態様は、血液試料のタンパク質プロファイルを作成するためのキットであって、赤血球成分を得るための少なくとも1つの試薬；1種以上のプロテアーゼインヒビター；及び該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬を含む、キットに対するものである。ある実施態様において、該キットは、対象由来の血液試料を採取するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。他の実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルを測定するための試薬は1以上の抗体である。さらに他の実施態様において、1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)装置である。他の実施態様において、1種以上のプロテアーゼインヒビターは、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む。さらに他の実施態様において、プロテアーゼインヒビターカクテルはA8127sである。

10

【0021】

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；該赤血球濃縮試料を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；及び1種以上のタンパク質の存在を該赤血球濃縮試料中で検出することを含み、ここで、作成されるタンパク質プロファイルが該赤血球濃縮試料中で検出される1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。

【0022】

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；該赤血球濃縮試料中の赤血球及び血漿を単離すること；該赤血球を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該赤血球中の1種以上のタンパク質のレベル及び該血漿中の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに該血漿中の1種以上のタンパク質のレベルに対する該赤血球中の1種以上のタンパク質のレベルを含むタンパク質比を計算することを含み、ここで、作成されるタンパク質プロファイルが少なくとも2:1のタンパク質比を有する1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、1種以上のタンパク質は、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、及び少なくとも20:1からなる群から選択されるタンパク質比を有する。

20

30

【0023】

ある実施態様は、タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；該赤血球濃縮試料中の赤血球を1種以上のプロテアーゼインヒビターを含有する培地中でインキュベートすること；及び1種以上のタンパク質を該培地中で検出することを含み、ここで、作成されるタンパク質プロファイルが該培地中で検出される1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。

【0024】

ある実施態様において、本方法は、赤血球濃縮試料又は培地中で検出される1種以上のタンパク質のレベルを測定することをさらに含む。いくつかの実施態様において、2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、もしくは10種以上のタンパク質、11種以上のタンパク質、12種以上のタンパク質、13種以上のタンパク質、14種以上のタンパク質、もしくは15種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、10種以上のタンパク質、11種以上のタンパク質、12種以上のタンパク質、13種以上のタンパク質、14種以上のタンパク質、もしくは15種以上のタンパク質のレベルを測定する。いくつかの実施態様において、3種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は3種以上のタンパク質のレベルを測定する。他の実施態様において、赤血

40

50

球濃縮試料を、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、又は10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、赤血球濃縮試料を3種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、該赤血球濃縮試料を3種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させ、かつ2種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は2種以上のタンパク質のレベルを測定する。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料を2種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させ、かつ3種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は3種以上のタンパク質のレベルを測定する。ある実施態様において、1種以上のプロテアーゼインヒビターは、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、及びアスパラギン酸プロテアーゼインヒビターからなる群から選択される。

10

【0025】

他の実施態様において、対象はヒト又は非ヒト動物である。さらに他の実施態様において、1以上の抗体を用いて、1種以上のタンパク質の存在が検出されるか又は1種以上のタンパク質のレベルが測定される。ある他の実施態様において、1種以上のタンパク質は、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、及び細胞外マトリックス成分、並びに酵素からなる群から選択される。他の実施態様において、1種以上のタンパク質は、表1に掲載されているタンパク質又は表2に掲載されているタンパク質からなる群から選択される。いくつかの実施態様において、血液試料は、フローサイトメトリー、磁気ビーズ分離、遠心分離、セルロースカラム、及びデキストラン沈降からなる群から選択される1以上の方法によって白血球除去される。いくつかの実施態様において、赤血球は、デキストラン沈降によって白血球除去される。

20

【0026】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害をモニタリングする方法であって、本明細書に開示される他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを第一の時点及び第二の時点における該対象から得ること；並びに該第一の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと該第二の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較することを含み、ここで、該第二の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較した該第一の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルにおける1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が該疾患又は障害の変化を示す、方法に対するものである。

30

【0027】

ある実施態様は、対象における治療をモニタリングする方法であって、他の実施態様の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを治療前及び治療後の対象から得ること；並びに該治療前の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較することを含み、ここで、該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較した該治療前の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルにおける1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が該対象に対する該治療の効果を示す、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、治療を全く受けたことがない対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療を受けた後の該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される。いくつかの実施態様において、治療を実質的に全く又はほとんど受けたことがない対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療を受けた後の該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される。いくつかの実施態様において、ある時点における治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、異なる時点での該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される。他の実施態様において、対象は同じ治療を受けたことがある。他の実施態様において、対象は実質的

40

50

に同じ治療又は同様の治療を受けたことがある。さらに他の実施態様において、対象は異なる治療を受けたことがある。いくつかの実施態様において、血液試料は、少量の血液試料である。いくつかの実施態様において、対象は、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、及び1日に5回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる。他の実施態様において、対象は、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、及び1週間に7回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる。ある実施態様において、対象は毎日モニタリングされる。他の実施態様において、対象は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、及び4週間に1回からなる群から選択される回数モニタリングされる。

【0028】

ある実施態様は、疾患タンパク質プロファイルを作成する方法であって、疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；該赤血球濃縮試料の第一の部分（第一の部分）を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分（第二の部分）の該1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較することを含み、ここで、作成される疾患タンパク質プロファイルが、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較して、該赤血球濃縮試料の該第一の部分における異なるレベルを有する1種以上のタンパク質を含む、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較した該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルの差は、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman's)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される。いくつかの実施態様において、2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベルが測定される。ある実施態様において、3種以上のタンパク質のレベルが測定される。いくつかの実施態様において、該疾患又は障害は子癇前症である。他の実施態様において、該疾患タンパク質プロファイルは、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSF、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癇前症タンパク質プロファイルである。さらに他の実施態様において、該疾患又は障害は癌である。他の実施態様において、該疾患タンパク質プロファイルは、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである。

【0029】

ある実施態様は、疾患又は障害を診断する方法であって、対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；少なくとも該赤血球濃縮試料の第一の部分（第一の部分）を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分（第二の部分）の該1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較することを含み、ここで、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較した該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベルの差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、該1種以上のタンパク質のレベルに差がないことは、対象が疾患又は障害を有さないことを示す。

【0030】

ある実施態様は、対象が疾患又は障害を有するかどうかを決定する方法であって、該対象由来の血液試料を採取すること；該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；少なくとも該赤血球濃縮試料の第一の部分に1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分の該1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較することを含み、ここで、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較して該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルに差がないことが、該対象が該疾患又は障害を有さないことを示す、方法に対するものである。

10

【0031】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害を診断する方法であって、本明細書に提供される方法に従って作成される該対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；及び該少なくとも1つのタンパク質プロファイルを少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルと比較することを含み、ここで、該少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルと同様である該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の1種以上のタンパク質の存在又はレベルが、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。いくつかの実施態様において、得られる少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルは、本明細書に提供される方法の1つ又は複数に従って作成される。

20

【0032】

ある実施態様は、対象における疾患又は障害を診断する方法であって、本明細書に提供される方法に従って作成される該対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；該疾患又は障害を有さない1以上の対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；及び該対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイルを該疾患又は障害を有さない1以上の対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較することを含み、ここで、該疾患又は障害を有さない1以上の対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルと比較した該対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法に対するものである。

30

【0033】

ある実施態様は、血液試料のタンパク質プロファイルを作成するためのキットであって、血液試料を白血球除去し、赤血球濃縮試料を産生するための少なくとも1つの試薬；1種以上のプロテアーゼインヒビター；並びに該赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための少なくとも1つの試薬を含む、キットに対するものである。いくつかの実施態様において、該キットは、対象から血液試料を採取するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。他の実施態様において、1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬は、1以上の抗体である。さらに他の実施態様において、1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)装置である。

40

【0034】

概要で論じられた実施態様と同様に、他の実施態様が、本明細書、図面、及び特許請求の範囲に開示されている。概要は、各々の及び全ての実施態様を網羅することを意図するものではなく；組合せ又はバリエーションが本開示とともに企図される。

【図面の簡単な説明】

【0035】

(図面の簡単な説明)

50

本開示の実施態様は、添付の図面を参照しながら、ほんの一例として記載されている。

【図 1】図 1A~1TTは、少量の全血中の様々なタンパク質のレベルを示す一連のグラフである。

【図 2】図 2A~2AAは、指穿刺(FT)又は静脈穿刺(V)によって健常対象から採取された全血試料から単離赤血球中の様々なタンパク質のレベルを示す一連のグラフである。

【図 3】図 3A~3Gは、塩化リチウムと接触させた赤血球中の様々なタンパク質のレベルを示す一連のグラフである。

【図 4】図 4A~4VVは、健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者からの単離赤血球中の様々なタンパク質のレベルの差を示す一連のグラフである。

【図 5】図 5A~5Cは、腫瘍患者から単離された血漿中のレベルに対する赤血球中の様々なタンパク質のレベルの比を示すチャートである。

【図 6】図 6A~6RRは、健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者からの単離赤血球由来の様々なタンパク質のレベルを示す一連のグラフである。

【図 7】図 7A~7Zは、RBCから放出されたタンパク質の濃度(黒色のカラム)及びインキュベーション後に細胞に残存しているタンパク質の濃度(灰色のカラム)に対するプロテアーゼインヒビター(PI)の効果を示す一連のグラフである。

【図 8】図 8A~8ZZは、健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者からの単離赤血球由来のタンパク質の濃度に対するプロテアーゼインヒビター(PI)の効果を示す一連のグラフである。

【図 9】図 9A~9FFは、健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者からの単離赤血球由来のタンパク質の濃度に対するプロテアーゼインヒビター(PI)の効果を示す一連のグラフである。

【図 10】図 10A~10Dは、健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者由来の赤血球から放出されたサイトカインの累積データに対するプロテアーゼインヒビター(PI)の効果を示す一連のグラフである。

【図 11】図 11A~11Dは、プロテアーゼインヒビター(PI)の存在下又は非存在下で健常個体、健常妊婦、子癇前症妊婦、及び腫瘍患者由来の赤血球から放出されたサイトカインの累積データの差を示す一連のグラフである。

【図 12】図 12A~12VVは、健常個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 13】図 13A~13VVは、健常個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 14】図 14A~14AAは、健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 15】図 15A~15AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対する個々のプロテアーゼインヒビター及びプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 16】図 16A~16AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 17】図 17A~17AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から放出されたサイトカインと比較した健常個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 18】図 18A~18AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から放出されたサイトカインと比較した健常個体由来の赤血球から放出されたサイトカインの倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 19】図 19A~19VVは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインと比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインの倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 20】図 20A~20LLは、健常個体由来の赤血球から放出された他のタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビター及びプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す

10

20

30

40

50

一連のグラフである。

【図 2 1】図21A～21LLは、健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインと比較した健常個体由来の赤血球から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 2】図22A～22VVは、リンパ腫を有する個体と比較した健常個体由来の全血溶解物から得られる赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 3】図23A～23VVは、リンパ腫を有する個体と比較した健常個体由来の単離赤血球から得られる赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 4】図24A～24VVは、変形性関節症を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 5】図25A～25VVは、子癇前症を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 6】図26A～26VVは、子宮内発育不全を伴う子癇前症を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 7】図27A～27VVは、潰瘍性大腸炎を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 8】図28A～28VVは、十二指腸潰瘍を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたサイトカインに対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 2 9】図29A～29LLは、リンパ腫を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球から放出された他のタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 0】図30A～30NNは、変形性関節症を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球から放出された他のタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 1】図31A～31NNは、潰瘍性大腸炎を有する個体と比較した健常個体由来の赤血球から放出された他のタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 2】図32は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 3】図33は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 4】図34は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 5】図35は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 6】図36は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 7】図37は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 8】図38は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

【図 3 9】図39は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を示す一連のグラフである。

10

20

30

40

50

【図58】図58は、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の濃度に対するプロテアーゼ

50

【図 75】 図75は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク

50

質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 7 6】図76は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 7 7】図77は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 7 8】図78は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 7 9】図79は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 0】図80は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 1】図81は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 2】図82は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 3】図83は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 4】図84は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 5】図85は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 6】図86は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【図 8 7】図87は、結腸直腸癌を有する健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質と比較した健常個体由来の赤血球膜から放出されたタンパク質の倍数変化に対するプロテアーゼインヒビターカクテルの効果を示す一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0036】

(定義)

本出願で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、別途文脈によって明確に指示されない限り、複数の指示物を含む。例えば、「細胞溶解物(a cell lysate)」という用語は、複数の細胞溶解物(cell lysates)を含む。

【0037】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」という用語は、「含む(including)」を意味する。「含む(comprising)」という単語のバリエーション、例えば、「含む(comprise)」及び「含む(comprises)」は、それに応じて変化した意味を有する。したがって、例えば、工程「A」及び「B」を「含む」方法は、もっぱら工程「A」及び「B」からなり得るか、又は1以上のさらなる工程(例えば、工程「A」、「B」、及び「C」)を含み得る。

10

20

30

40

50

【0038】

詳細な説明において使用される主題の見出しは、参照の容易さ又は読者のために含まれており、本開示又は特許請求の範囲の全体を通して見られる主題を制限するために使用されるべきではない。主題の見出しは、請求項の範囲又は請求項の限定を解釈する際に使用されるべきではない。

【0039】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ウシ、ウマ、ヒツジ、霊長類、鳥類、及び齧歯類種を含む経済的に、社会的に、又は研究に重要な動物を含む。それゆえ、「対象」は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物などの哺乳動物であり得る。

【0040】

本明細書で使用される場合、「抗体(antibody)」及び「抗体(antibodies)」という用語は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む)、IgA(IgA1及びIgA2を含む)、IgD、IgE、又はIgM、並びにIgY、単鎖全抗体を含む全抗体、並びにこれらの抗原結合断片を含む。抗原結合抗体断片には、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、及びVL又はVHドメインのいずれかを含む断片が含まれるが、これらに限定されない。抗体は、動物起源に由来し得る。単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域を、単独で又は以下のもの:ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインの全体もしくは部分と組み合わせて含み得る。また、可変領域とヒンジ領域とCH1、CH2、及びCH3ドメインの組合せも含まれる。抗体は、生体分子と特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、並びにヒトモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体であり得る。

【0041】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸から構成されるポリマーを指す。

【0042】

本明細書で使用される場合、「プロテアーゼ」、「ペプチダーゼ」、又は「プロテイナーゼ」という用語は、タンパク質のペプチド結合を加水分解によって破壊し、切断し、又はタンパク質分解する酵素を指す。プロテアーゼには、特定のタンパク質基質(例えば、特定のタンパク質)に特異的であり、かつ/又はそれを特異的に切断するもの、1種類のタンパク質基質に特異的であるもの(例えば、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、もしくはアスパラギン酸プロテアーゼ)、又は複数の種類のタンパク質基質に特異的であるもの(例えば、システイン及びセリンプロテアーゼ)が含まれ得る。プロテアーゼには、タンパク質基質に非特異的であるか、又はそれを非特異的に切断するもの(例えば、ペプシン、プロテイナーゼK、エラスターゼ、エキソプロテアーゼ、エンドプロテアーゼなど)も含まれ得る。

【0043】

本明細書で使用される場合、「プロテアーゼインヒビター」という用語は、プロテアーゼ酵素の触媒(例えば、タンパク質分解)活性を遮断し又は低下させる物質(例えば、タンパク質又は化学物質)を指す。プロテアーゼインヒビターは、プロテアーゼが、所与のタンパク質のペプチド結合を切断する能力を、典型的には、プロテアーゼの活性部位を遮断して、それが基質に接近するのを妨げることにより遮断し得る。非限定的な例として、プロテアーゼインヒビターには、非特異的プロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA)、特異的プロテアーゼインヒビター(セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及びアミノペプチダーゼインヒビターを含む)、又は二重特異性、多特異性、もしくは汎特異性プロテアーゼインヒビター(セリン及びシステインプロテアーゼインヒビターを含む)が含まれ得る。

【0044】

本明細書で使用される場合、「タンパク質プロファイル」という用語は、試料中に存在するタンパク質及び/又はタンパク質断片を指す。試料は、細胞を含んでいても、含んで

10

20

30

40

50

いなくてもよい。試料が細胞を含む場合、タンパク質又はタンパク質断片は、細胞内に及び/又は部分的にもしくは完全に細胞表面に存在し得る。必要条件ではないが、タンパク質プロファイルは、試料中のタンパク質及び/又はタンパク質断片についての定量的情報も提供し得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「血液試料」という用語は、血液及び/又は血液成分を少なくとも一部含む試料を指す。血液試料は、1以上の対象から直接的に又は1以上の対象由来の血液の既存のコレクションから得ることができる。血液試料は、いくつかの方法によって、例えば、身体部分(例えば、腕、脚、耳)の静脈穿刺(例えば、翼状針及びバキューテナー、直針及びバキューテナー、並びに翼状針及びシリンジ)、又は穿刺(例えば、指穿刺、踵穿刺、もしくは耳穿刺)によって、ヒト対象から採取することができる。血液試料は、いくつかの方法によって、例えば、身体部分(例えば、尾部、腕、脚(例えば、大腿部)、鼻、顔、耳、胸部、首/喉、舌、心臓)の静脈穿刺(例えば、針及びシリンジ)又は穿刺(例えば、指穿刺、踵穿刺、耳穿刺、もしくは尾部穿刺)によって、非ヒト哺乳動物対象から採取することができる。血液試料は、いくつかの方法によって、例えば、身体部分(例えば、翼、喉、又は心臓)の静脈穿刺(例えば、針及びシリンジ)によって、他の非ヒト動物(例えば、ニワトリ又は鳥)から採取することができる。

10

【0046】

本明細書で使用される場合、「血液細胞」又は「血液試料中に存在する細胞」という用語は、赤血球及び白血球を含む、試料中の細胞を指すが、血小板を除外する又は実質的に除外する。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「赤血球濃縮試料」、「赤血球試料」、又は「RBC濃縮画分」という用語は、RBCの割合が濃縮前の血液試料のものと比較して増加している試料又は試料の成分を指す。RBCの割合は、例えば、別々の試料を提供するために、試料からRBCではない細胞型を除去すること(例えば、白血球の除去(白血球除去)及び/もしくは血小板の除去)により、並びに/又は試料中の他の細胞型からRBCを取り出すことにより増加させることができる。赤血球濃縮試料は、培地、血漿/血清、上清、及び/又は細胞洗浄液からも構成され得る。RBC濃縮画分は、全血液細胞数の99.5%超、99.6%超、99.7%超、99.75%超、99.8%超、99.85%超、99.9%超、99.5%超、約100%の赤血球、又は100%の赤血球を含み得る。

30

【0048】

本明細書で使用される場合、「赤血球成分」という用語は、全/無傷赤血球及び赤血球の成分又は要素を指す。例えば、ある実施態様において、赤血球成分は赤血球である。他の実施態様において、赤血球成分は赤血球膜である。赤血球は、例えば、全血又は赤血球濃縮試料から採取することができる。赤血球膜は、全血、赤血球濃縮試料、及び/又は単離赤血球から採取及び/又は産生することができる。

【0049】

本明細書で使用される場合、「瞬間凍結」という用語は、一般的に、急速期間内で(例えば、数ミリ秒、1~2秒、1~5秒、1~10秒、1~15秒、1~20秒、10~20秒、10~30秒、30~60秒、1分未満、又は2分未満の期間で)、その凝固点未満の温度まで血液細胞(例えば、RBC)及び/又は血漿/血清を凍結させることを指す。

40

【0050】

本明細書で使用される場合、「白血球除去」は、別々の白血球除去試料を提供するために、例えば、血液試料もしくは血液試料成分から白血球を除去することによるか、又は血液試料もしくは血液試料成分から他の血液成分を取り出すことにより、血液試料又は血液試料成分中の白血球の割合を低下させることを指す。いくつかの実施態様において、白血球除去には、血小板除去が含まれる。

【0051】

本明細書で使用される場合、「血小板除去」は、別々の血小板除去試料を提供するため

50

に、例えば、血液試料もしくは血液試料成分から血小板を除去することによるか、又は血液試料もしくは血液試料成分から他の血液成分を単離することにより、血液試料又は血液試料成分中の血小板の割合を低下させることを指す。

【0052】

本明細書で使用される場合、「細胞上清」は、細胞の集団が、所定の温度又は所定の温度範囲で、所定の期間、例えば：30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、又は120時間よりも長い間、インキュベート又は培養される細胞培養培地を意味するものと理解される。

【0053】

本明細書で使用される場合、「細胞洗浄液」は、細胞洗浄液が一般に細胞培養用の培地として使用されない限り、細胞の集団をすすぐために使用されており、かつ上で定義されている細胞上清とは異なる液体を意味するものと理解される。したがって、「細胞洗浄液」を作製するために使用される流体は、30分、20分、15分、10分、5分、4分、3分、2分、1分、又は30秒：未満の期間、細胞集団と混合することができる。

【0054】

本明細書で使用される場合、「培地(media)」又は「培地(medium)」は、血液試料内の細胞、血液試料から単離された細胞、又は血液試料から単離された細胞から産生された細胞成分の生存能力を維持する能力を有する組成物を指す。培地(media)は、細胞の成長及び増殖を刺激するか、又は細胞を特定の及び/もしくは既存の成長状態に維持することができる。培地(media)の非限定的な例としては、等張塩溶液、平衡化塩溶液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ハンクス平衡化塩溶液(HBSS)、アール平衡化塩溶液(EBSS)、ロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)、最小必須培地(MEM)、改良型最小必須培地(IMEM)、イーグル最小必須培地(EMEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、及びイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)が挙げられる。

【0055】

本明細書で使用される場合、「少量」という用語は、1ミリリットル以下である血液の量を指す。少量は、1 μ L~100 μ L、100 μ L~200 μ L、200 μ L~300 μ L、300 μ L~400 μ L、400 μ L~500 μ L、500 μ L~600 μ L、600 μ L~700 μ L、700 μ L~800 μ L、800 μ L~900 μ L、及び900 μ L~1000 μ Lであり得る。いくつかの実施態様において、少量は、50 μ L~100 μ L、100 μ L~150 μ L、150 μ L~200 μ L、200 μ L~250 μ L、250 μ L~300 μ L、300 μ L~350 μ L、350 μ L~400 μ L、400 μ L~450 μ L、450 μ L~500 μ L、500 μ L~550 μ L、550 μ L~600 μ L、600 μ L~650 μ L、650 μ L~700 μ L、700 μ L~750 μ L、750 μ L~800 μ L、800 μ L、~850 μ L、850 μ L~900 μ L、900 μ L~950 μ L、950 μ L~1000 μ Lである。いくつかの実施態様において、少量は、1 μ L~10 μ L、10 μ L~20 μ L、20 μ L~30 μ L、30 μ L~40 μ L、40 μ L~50 μ L、50 μ L~60 μ L、60 μ L~70 μ L、70 μ L~80 μ L、80 μ L~90 μ L、又は90 μ L~100 μ Lである。他の実施態様において、少量は、0.1 μ L~0.5 μ L、0.5 μ L~1 μ L、1 μ L~5 μ L、5 μ L~10 μ L、10 μ L~15 μ L、15 μ L~20 μ L、20 μ L~25 μ L、25 μ L~30 μ L、30 μ L~35 μ L、35 μ L~40 μ L、40 μ L~45 μ L、45 μ L~50 μ L、50 μ L~55 μ L、55 μ L~60 μ L、60 μ L~65 μ L、65 μ L~70 μ L、70 μ L~75 μ L、75 μ L~80 μ L、80 μ L~85 μ L、85 μ L~90 μ L、90 μ L~95 μ L、又は95 μ L~100 μ Lである。いくつかの実施態様において、少量は、5 μ L~10 μ L、5 μ L~15 μ L、5 μ L~20 μ L、5 μ L~25 μ L、5 μ L~30 μ L、5 μ L~35 μ L、5 μ L~40 μ L、5 μ L~45 μ L、5 μ L~50 μ L、5 μ L~55 μ L、5 μ L~60 μ L、5 μ L~65 μ L、5 μ L~70 μ L、5 μ L~75 μ L、5 μ L~80 μ L、5 μ L~85 μ L、5 μ L~90 μ L、5 μ L~95 μ L、又は5 μ L~100 μ Lである。他の実施態様において、少量は、0.1 μ L、0.5 μ L、1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L、10 μ L、11 μ L、12 μ L、13 μ L、14 μ L、15 μ L、16 μ L、17 μ L、18 μ L、19 μ L、20 μ L、21 μ L、22 μ L、23 μ L、24 μ L、25 μ L、26 μ L、27 μ L、28 μ L、29 μ L、30 μ L、31 μ L、32 μ L、33 μ L、34 μ L、35 μ L、36 μ L、37 μ L、38 μ L、39 μ L、40 μ L、41 μ L、42 μ L、43 μ L、44 μ L、45 μ L、46 μ L、47 μ L、48 μ L、49 μ L、又は50 μ Lである。

【0056】

本明細書で使用される場合、「検出可能なレベル」又は「検出のレベル」という用語は、試料(例えば、血液試料)中の所望の分子、例えば、タンパク質の存在を示す及び/又は示唆する組成物又は薬剤の能力を指す。赤血球濃縮試料において、例えば、タンパク質の検出可能なレベルは、検出に利用可能なタンパク質の増加のために増加し得る。この増加は、例えば、タンパク質の検出を妨害する及び/又は減少させるタンパク質-分子相互作用(例えば、タンパク質-タンパク質、タンパク質-膜、タンパク質-核酸)の破壊を介する1以上の理由によるものであり得る。

【0057】

本明細書で使用される場合、タンパク質の「レベルの変化(change in level)」又は「レベルの変化(change in the level)」という用語は、当業者であれば、同じ、実質的に同じ、同様の、又は実質的に同様のタンパク質レベルであると考えない検出可能なタンパク質のレベルの増加又は減少を指す。したがって、当業者であれば、検出可能なタンパク質のレベルの増加又は減少を、例えば、観測(例えば、クロマトグラフィー)、統計検定(例えば、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、もしくはスペルマン(Sperman's)の順位相関)、又は測定されるタンパク質レベルの関連性のある倍数変化(例えば、統計的に有意な倍数変化(例えば、0を上回る倍数変化、0.5を上回る倍数変化、1を上回る倍数変化、もしくは1.5を上回る倍数変化))の計算の結果によって、統計的に有意であると認識するであろう。

【0058】

本明細書で使用される場合、タンパク質のレベルに「変化がない」又は「差がない」という用語は、タンパク質レベルが増加も減少もしていない(例えば、タンパク質レベルが同じである)こと、又は当業者であれば、タンパク質レベルが同じもしくは実質的に同様であると考えるほどにわずかなタンパク質レベルの増加もしくは減少を指す。したがって、当業者であれば、検出可能なタンパク質のレベルの増加又は減少を、観測(例えば、クロマトグラフィー)、統計検定(例えば、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、もしくはスペルマン(Sperman's)の順位相関)、又は測定されるタンパク質レベルの関連性のある倍数変化(例えば、統計的に有意な倍数変化(例えば、0.5を下回る倍数変化、1.0を下回る倍数変化、もしくは1.5を下回る倍数変化))の計算の結果によって、統計的に有意でないと認識するであろう。

【0059】

本明細書で使用される場合、「異なるレベルの変化」又は「レベルの変化の差」は、別の試料又は対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化と同じでない、実質的に同じでない、同様でない、又は実質的に同様でない1つの試料又は対象(例えば、疾患又は障害を有さない対象と比較した疾患又は障害を有する対象)における1種以上のタンパク質のレベルの変化を指す。例えば、1種以上のタンパク質のレベルの変化の差には:別の対象における同じタンパク質レベルの減少と比較したある対象におけるタンパク質レベルの増加;別の対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化と比較したある対象におけるより大きいもしくはより小さい程度の1種以上のタンパク質のレベルの変化(例えば、異なる対象におけるタンパク質レベルの増加もしくは減少よりも大きいもしくは小さいある対象におけるタンパク質レベルの増加もしくは減少);又は別の対象におけるレベルの変化がないことと比較したある対象におけるレベルの変化(例えば、他の対象におけるタンパク質レベルの有意な増加もしくは減少がないことと比較したある対象におけるタンパク質レベルの増加もしくは減少)が含まれ得る。レベルの変化の差は、データ可視化(例えば、チャートもしくはグラフ)又は統計解析(例えば、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、もしくはスペルマン(Sperman's)の順位相関)を含む、解析法によって決定することができる。

【0060】

本明細書で使用される場合、RBCからのタンパク質の「放出」は、活性のある又は不活性な機構によって、(i)RBCの細胞内領域又は内部からRBCの表面及び/又は細胞外もしくは外部領域(例えば、血漿、血清、及び/又は培地)に移動したか、或いは(ii)RBCの細胞外又

は外部領域から(例えば、血漿、血清、及び/又は培地から)RBCの表面並びに/又は細胞外領域もしくは外部に移動したタンパク質を指す。いくつかの実施態様において、該タンパク質は、細胞表面タンパク質結合相互作用(例えば、受容体、共有結合、非共有結合、及び/又は接着)によって、RBCの表面に結合し得る。他の実施態様において、該表面結合タンパク質は、RBCの細胞外又は外部領域に(例えば、血漿、血清、及び/又は培地に)もう一度放出され得る。

【0061】

本明細書で使用される場合、「治療」は、疾患、障害、もしくは疾病、及び/又はこれらに関連する症状の1以上の症状の予防、軽減、又は改善を含む、疾患、障害、もしくは疾病の予防、管理、軽減、又は改善において使用し得る1以上の療法、プロトコル、方法、及び/又は薬剤を指す。ある実施態様において、「治療(treatment)」及び「治療(treatments)」という用語は、疾患、障害、又は疾病の予防、管理、軽減、及び/又は改善において有用な生物療法、支持療法、及び/又は他の療法を指す。

10

【0062】

本明細書で使用される場合、「実質的に同様」又は「実質的に同じ」という語句は、当業者であれば、2つの値(例えば、タンパク質濃度/レベル又はレベルの変化(例えば、倍数変化))の差が、該値によって測定される生物学的特徴との関連において、ほとんど又は全く生物学的に及び/又は統計的に有意でないと考えるような、2つの数値間の十分に高い類似度を意味する。例えば、2つの値の差は、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、又は約5%未満であり得る。

20

【0063】

本明細書で使用される場合、「キット」という用語は、本明細書に記載される実施態様の1つ又は複数を実施するのに有用な構成要素を有する送達系を指す。非限定的な例として、該キットは:血液を収集する方法、プロテアーゼを阻害する方法、タンパク質検出を増大させる方法、凝固を防止する方法、血液を安定化する方法、赤血球成分を採取する方法、RBCの濃縮方法、非RBC血液成分の除去/分離方法、血液もしくはその成分を瞬間凍結させる方法、細胞を溶解させる方法、細胞を洗浄する方法、細胞を培養する方法、特定の標的タンパク質を細胞内及び/もしくは細胞外で検出する方法、又はこれらの組合せを含み得る。いくつかの実施態様において、キットは、以下のもの:対象から血液試料を採取するための装置(例えば、シリンジ、針、翼状針、チューブ、針ホルダー、採血セット、輸送装置、バキュテナー、hemaPEN(商標));対象から乾燥血液試料を採取するための装置(例えば、濾紙、カード、HemaSpot(商標));液体血液試料から赤血球画分、白血球画分、及び/又は血小板画分を採取するための装置(例えば、抗体がコーティングされた磁気ビーズ);プロテアーゼインヒビター;カチオン塩;抗凝固剤;プロテアーゼインヒビター;タンパク質変性剤;などうちの1つ又は複数を含み得る。そのような送達系は、ある場所から別の場所への反応試薬の貯蔵、輸送、もしくは送達を可能にするシステム(例えば、適切な容器中のラベル、参照試料、補助材料など)及び/又は補助材料(例えば、バッファー、アッセイを実施するための説明文書など)を含み得る。例えば、キットは、関連する反応試薬及び/又は補助材料を含有する1以上の筐体、例えば、箱を含み得る。「キット」という用語は、小分けされたキットと組み合わされたキットの両方を含む。

30

40

【0064】

本明細書で使用される場合、「小分けされたキット」という用語は、全キット構成要素のサブ部分を含有する2以上の別々の容器を含む送達系を指す。容器は、意図されたレシピエントに、一緒に又は別々に送達され得る。全キット構成要素のサブ部分を含有する2以上の別々の容器を含む送達系は、「小分けされたキット」という用語の意味に含まれる。

【0065】

本明細書で使用される場合、「組み合わされたキット」は、単一の容器中(例えば、所望の構成要素の各々を収納する単一の箱の中)に反応アッセイの構成要素を含有する送達系を指す。

50

【0066】

本明細書における従来技術の文書、又はその文書から派生したもしくはその文書に基づいた本明細書における意見の記載はいずれも、該文書又は派生意見が関連分野の共通した一般知識の一部であるという承認ではない。

【0067】

(詳細な説明)

血液中のタンパク質レベルをプロファイリングするための現在使用されている技法は、通常、分析を血清/血漿及び/又はPBMICに制限している。RBCは血液処理及び/又は血液タンパク質測定を妨害すると考えられているので、RBCは、タンパク質プロファイルの作成前の血液処理の間に、ルーチンに除去され、廃棄される。

10

【0068】

本発明者らは、RBCがタンパク質マーカーの重要な供給源を提供するという予期しない発見及び赤血球濃縮試料とプロテアーゼインヒビターとの接触が疾患又は障害を有する対象におけるタンパク質マーカーの検出可能なレベルを調節する一方で、該疾患又は障害を有さない対象由来の赤血球試料におけるタンパク質レベルを変化させないままにするか又は示差調節するという予期しない発見をした。したがって、現在の技術の欠点は、RBCが本明細書に記載される様々なタンパク質マーカーの供給源を提供するとこれまで認識されておらず、したがって、タンパク質プロファイリングからのRBCの排除が不十分かつ/又は不正確な評価を提供するという点で確認されている(2015年10月7日に出願された「血液の調製及びプロファイリング(Blood Preparation and Profiling)」と題する豪州出願AU2015904075号及び2016年10月6日に出願された「血液の調製及びプロファイリング(Blood Preparation and Profiling)」と題する国際出願PCT/AU2016/000341号も参照)。さらに、現在の技術は、血液試料中のプロテアーゼインヒビターの存在に応答した赤血球タンパク質マーカーのレベルの非特異的及び/又は特異的变化に基づく疾患又は障害を有する対象と疾患又は障害を有さない対象の簡単な及び/又は迅速な描写に適していない。本開示は、血液タンパク質プロファイリングの欠点を是正し、疾患又は障害を有する対象におけるタンパク質レベル/検出を調節するためにプロテアーゼインヒビターと接触させたRBCの解析を組み込んでいる血液からタンパク質プロファイルを作成するための新規のかつ有用な実験技法を提供する。本明細書に提供される新規のかつ有用な実験技法は、診断、予後予測、及び/又は治療用途を有する。

20

30

【0069】

以下の説明は、当業者がそれを実施することができる程度に十分詳細に、本開示の例示的な実施態様を示している。記載されている様々な実施態様の特徴又は限定は、本開示の他の実施態様又は本開示全体を必ずしも限定するものではない。したがって、以下の詳細な説明は、特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定するものではない。

【0070】

(赤血球(RBC)におけるタンパク質プロファイリング)

本開示は、RBCを含む血液試料、赤血球濃縮試料、赤血球成分、及び/又は血液試料成分からタンパク質プロファイルを生成する方法であって、プロテアーゼインヒビターを使用することを含む、方法である。いくつかの実施態様において、RBCの数は、血液試料又は血液試料成分中に存在する血液細胞の総数の0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%、又は99.95%超を占める。

40

【0071】

(血液試料)

提供されている方法において対象から採取される血液試料は、本明細書に定義されている通りであり(例えば、「血液試料」を参照)、対象又は既存の血液コレクション(例えば、1以上の対象から以前に得られた血液及び/又は保存された血液)から採取することができる。該血液試料は、当業者に利用可能な例示的な手段を用いて、対象から採取することができる(例えば、世界保健機関、「血液、血液成分、及び血漿派生物の採取、処理、及

50

び品質管理のための要件(Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives)」、世界保健機関の技術レポートシリーズ、第840号、1994年、付録2を参照)。非限定的な例として、該血液試料は、静脈血、毛細管血、動脈血、又はこれらの組合せを用いて、対象から採取することができる。

【0072】

ある実施態様において、少量の血液試料は、対象又は既存の血液コレクションから採取される。少量は、例えば、穿刺(例えば、指穿刺、踵穿刺、耳穿刺、又は尾部穿刺)によるものを含む、様々な方法によって、対象から採取することができる。いくつかの実施態様において、少量の血液試料は、指穿刺、踵穿刺、もしくは耳穿刺、又は乾燥血液スポットによって(例えば、ヒトから)採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、尾部穿刺によって(例えば、マウス又はラットから)採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、指穿刺によって採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、踵穿刺によって(例えば、乳児から)採取される。さらに他の実施態様において、少量の血液試料は、耳穿刺によって採取される。さらなる実施態様において、少量の血液試料は、尾部穿刺によって採取される。

10

【0073】

いくつかの実施態様において、少量は、本明細書に定義されている通りである(例えば、「少量」を参照)。他の実施態様において、少量は、 $1\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ 、 $5\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 、又は $5\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ である。他の実施態様において、少量は、 $5\mu\text{L}\sim 20\mu\text{L}$ 又は $5\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ である。さらに他の実施態様において、少量は、 $5\mu\text{L}$ である。他の実施態様において、少量は、 $1\mu\text{L}$ である。

20

【0074】

少量の血液試料の採取は、対象への害(例えば、疼痛、失血、血中濃度の遅い回復)を減少させるので、少量の血液試料の採取は、より多い量の血液試料と比較して、例えば、対象のより頻繁なサンプリングを可能にする。例えば、包括的な血液分析は、動物を屠殺しなければならないほど多くの血液を必要とするので、典型的な現在の方法を用いて、小動物(例えば、ラット、マウス)からの頻繁な採血は達成可能ではない。同様に、失血による害を防ぐために、乳児からは、穿刺(例えば、踵穿刺)によってしか頻繁に安全にサンプリングすることができない。本明細書に提供されるある実施態様において、少量の血液試料が採取される。ある実施態様において、少量の血液試料は、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、又は1日に5回以上の頻度で採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、又は1週間に7回以上採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、毎日採取される。さらに他の実施態様において、少量の血液試料は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は4週間に1回採取される。ある実施態様において、少量の血液試料は、1カ月に1回採取される。

30

【0075】

(濃縮赤血球試料又は画分)

いくつかの実施態様において、本方法は、赤血球濃縮試料、赤血球濃縮画分、又は赤血球からタンパク質プロファイルを作成又は生成すること、及び赤血球濃縮試料、赤血球濃縮画分、又は赤血球中の1種以上のタンパク質のレベルを決定することを含む。赤血球濃縮試料及び赤血球濃縮画分は、例えば、白血球除去及び/又は血小板除去によって、血液試料から産生することができる。それに加えて又はその代わりに、RBCを試料から取り出して、赤血球濃縮試料又は赤血球濃縮画分を産生することができる。

40

【0076】

白血球除去及び血小板除去のための様々な方法が利用可能である(例えば、Wenz, B.の文献、「白血球除去の方法(Methods for leukodepletion)」、「白血球除去した血液製剤の臨床的利益(Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products)」、pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg所収; Novotny V.及びBrand, A.の文献、「白血球除去血

50

及び血小板輸血(Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions)」、「現代の輸血医学(Modern Transfusion Medicine)」、pp 117-121, 1995, CRC Press社所収; White及びJenningsの文献、「血小板プロトコル:研究及び臨床実験手順(Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures)」、1999, Academic Pressを参照)。白血球除去のための好適な技法の非限定的な例としては、フローサイトメトリー、デキストラン沈降、フィコール/パーコール密度勾配遠心分離などが挙げられる。

【0077】

本開示は、赤血球濃縮試料を産生すること及び該赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在を検出するか又は該タンパク質のレベルを測定することにより、血液試料中の1種以上のタンパク質の検出又は測定感度を増大させる方法も提供する。ある実施態様において、血液とデキストランの比は、1:1~2:1、1:1~3:1、1:1~4:1、1:1~5:1、1:1~6:1、1:1~7:1、1:1~8:1、1:1~9:1、又は1:1~10:1である。他の実施態様において、血液とデキストランの比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、又は10:1である。さらに他の実施態様において、血液とデキストランの比は、2:1である。さらなる実施態様において、血液とデキストランの比は、4:1である。

【0078】

非限定的な例として、赤血球濃縮試料又は赤血球濃縮画分は、血液試料中に存在していた白血球数の90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、又は99.9%超の白血球除去によって生成される。この文脈における「白血球除去」は、別々の白血球除去(RBC濃縮)画分を提供するために、該血液試料から白血球を直接除去することにより、及び/又は該試料からRBCを取り出すことにより達成することができる。いくつかの実施態様において、白血球除去には血小板除去が含まれる。

【0079】

それに加えて又はその代わりに、赤血球濃縮試料又は赤血球濃縮画分は、血液試料中に存在していた血小板数の90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、又は99.9%超の血小板除去によって生成される。この文脈における「血小板除去」は、別々の血小板除去(RBC濃縮)画分を提供するために、該血液試料から血小板を直接除去することにより、及び/又は該試料からRBCを取り出すことにより達成することができる。

【0080】

いくつかの実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球濃縮画分は、99.75%超、99.8%超、99.9%超、99.95%超、約100%、又は100%の赤血球を(RBC濃縮画分内に存在する血液細胞の総数の成分として)含むことができる。

【0081】

所与の濃縮試料又は赤血球濃縮画分におけるRBCのパーセンテージは、例えば、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡法、他の抗体ベースの技法などを含む、当業者に利用可能な方法を用いて評価することができる。

【0082】

(赤血球膜)

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、赤血球膜及び/又は赤血球ゴーストからタンパク質プロファイルを作成又は生成することを含む。赤血球膜は、細胞質タンパク質の一部(例えば: 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%超)が除去されているRBCを指す。細胞質タンパク質を、例えば、赤血球(単離されたものと全血中で発見されるものの両方)の溶解、洗浄、及び遠心分離によって除去することができる。赤血球細胞を、例えば、低張性溶血(例えば、Bramley TA、Coleman R、Finean JB.の文献、様々なオスモル濃度の培地中での低張性溶解によって調製されたヒト赤血球ゴーストの化学的、酵素学的、及び透過性特性(Chemical, enzymological and permeability properties of human erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis in media of different osmolarities). Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 241(3) 1971を参照)、凍結解凍サイクルなどを含む、いくつかの方法によって溶解させて、赤血球膜を採取することができる。凍結解凍サイクルを適当な回数(例えば、少な

くとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、又は少なくとも5回)繰り返して、赤血球膜と関連する所望のレベルの(例えば、細胞質タンパク質を95%含まない)細胞質材料を獲得することができる。赤血球膜を、溶解赤血球の遠心分離(例えば、16,000g)によって採取することができるので、赤血球が該試料のわずかな又は最小の成分であるとしても、該膜を赤血球を含む試料から単離することができる。

【0083】

(少量の赤血球濃縮試料)

本開示は、少量の赤血球濃縮血液試料からタンパク質プロファイルを作成する方法も提供する。少量は、当技術分野で利用可能であり、かつ当業者によってその後の赤血球濃縮試料におけるタンパク質検出又はタンパク質測定の方法に適しているときみなされるような方法(例えば、下のタンパク質プロファイリングを参照)によって赤血球濃縮血液試料から採取することができる。少量は、本明細書に定義されている通りである(例えば、「少量」を参照)。非限定的な例として、他の実施態様において、少量は、0.1 μ L~0.5 μ L、0.5 μ L~1 μ L、1 μ L~5 μ L、5 μ L~10 μ L、5 μ L~20 μ L、5 μ L~30 μ L、5 μ L~40 μ L、5 μ L~50 μ L、5 μ L~60 μ L、5 μ L~70 μ L、5 μ L~80 μ L、5 μ L~90 μ L、又は5 μ L~100 μ Lであり得る。いくつかの実施態様において、少量は、5 μ L~100 μ Lである。他の実施態様において、少量は、5 μ L~50 μ L又は5 μ L~20 μ Lである。さらに他の実施態様において、少量は、5 μ L~10 μ Lである。ある実施態様において、少量は、5 μ Lである。

【0084】

(RBCを含む全血)

他の実施態様は、RBCを含む全血試料の解析を含む。これらの実施態様において、該全血試料は、試料内の血液細胞型の相対比率を変更することなく、又は実質的に変更することなく、かつ血漿/血清を分離することなく、タンパク質プロファイルについて解析される。

【0085】

全血試料は、当業者に利用可能な例示的な手段を用いて採取することができる(例えば、世界保健機関、「血液、血液成分、及び血漿派生物の採取、処理、及び品質管理のための要件(Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives)」、世界保健機関の技術レポートシリーズ、第840号、1994年、付録2を参照)。方法は、本明細書の実施例にも提示されている。

【0086】

非限定的な例として、全血試料は、静脈血、毛細管血、動脈血、又はこれらの組合せを用いて採取することができる。

【0087】

いくつかの実施態様において、全血の解析を含む本開示の方法は、乾燥血液スポット(DBS)サンプリングを用いて実施することができる。DBSサンプリングの非限定的な利点としては、以下のもの:試料の安定性、最少量の要求(例えば、スポット当たり30~100 μ L)、試料収集(例えば、指、つま先、又は踵の穿刺)及び輸送の容易さのうちの1つ又は複数が挙げられる。本開示で使用するために得られたDBS試料は、例えば、冷蔵下及び/又は周囲温度で数カ月から数年間、安定性を維持することができる。

【0088】

DBSの好適な方法は、当業者に十分に利用可能である(例えば、McDadeらの文献; Demography 2007, 44: 899-925; De Jesusらの文献, Clin Chem 2009, 55:1; 158-164; Sharmaらの文献, Drug Testing and Analysis, 2014, 6(5), 399-414を参照)。

【0089】

ここでもほんの非限定的な例として、簡潔に述べると、全血は、適切な器具(例えば、滅菌された外科用ブレード又は使い捨てランセット)を用いて、関心のある対象(例えば、指、踵、又はつま先の穿刺)から採取し、例えば、メンブレン又は紙(例えば、濾紙カード)上にスポットすることができる。定量的解析については、測定された血液量を適用することができる。その後、血液を、例えば、室温及び/又は窒素流及び/又は制御された湿度

下で乾燥させることができる。乾燥時間は、通常、少なくとも一部は、試料量によって決まる。DBSメンブレン又は紙は、周囲温度で保存するか又は冷蔵保存することができ、かつ湿気を避けるために適切に包装することができる。その後、DBSは、好適な時点で(例えば、抽出溶媒又は同様のものを用いて)、解析用に抽出することができる。

【0090】

(さらなる血液コンパートメントの解析)

濃縮RBC試料、RBC画分、又はRBCを含む全血試料のタンパク質プロファイリングに加えて、本開示の方法は、1以上のさらなる血液コンパートメントのタンパク質プロファイル解析を実施することをさらに含むことができる。

【0091】

例えば、タンパク質プロファイル解析は、血漿、血清、血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つ又は複数)、及びこれらの組合せから選択される1以上のさらなる血液コンパートメントに対して実施することができる。

【0092】

解析用のさらなる血液コンパートメントは、利用可能な技法を用いて調製することができる。例えば、細胞成分は、フローサイトメトリー、磁気ビーズ分離、遠心分離などによって単離することができる。血漿/血清分離技法も当技術分野で利用可能である。多くの標準的な教科書及びプロトコルが入手可能であり、かつこれらの目的のために広く使用されており、非限定的な例として:世界保健機関、「血液、血液成分、及び血漿派生物の採取、処理、及び品質管理のための要件(Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives)」、世界保健機関の技術レポートシリーズ、第840号、1994年、付録2; Wenz, B.の文献、「白血球除去の方法(Methods for leukodepletion)」、「白血球除去した血液製剤の臨床的利益(Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products)」、pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg所収; Novotny V.及びBrand, A.の文献、「白血球除去血及び血小板輸血(Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions)」、「現代の輸血医学(Modern Transfusion Medicine)」、pp 117-121, 1995, CRC Press社所収; White及びJenningsの文献、「血小板プロトコル:研究及び臨床実験手順(Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures)」、1999, Academic Pressを参照されたい。

【0093】

(溶解物解析)

いくつかの実施態様において、本開示の方法は、細胞溶解物からタンパク質プロファイルを生成することを含む。

【0094】

ほんの非限定的な例として、本開示の方法のうちの1つ又は複数に従って調製される濃縮RBC試料又はRBC画分を処理して、1種以上のタンパク質のレベルが決定される溶解物を提供することができる。該溶解物は、全血、血漿、血清、血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つ又は複数)、及びこれらの組合せから選択される1以上の他の血液コンパートメントから産生することもできる。

【0095】

それに加えて又はその代わりに、RBCではない、又は最小量のRBC(例えば、10%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくは0.5%未満のRBC)を含有する、血液の他の細胞成分を処理して、1種以上のタンパク質のレベルが決定される溶解物を提供することができる。

【0096】

本開示の方法における使用のための細胞溶解物は、例えば、液体ホモジナイゼーション

、機械的破壊、凍結/解凍サイクル、高周波音波、手動研磨、化学的透過処理、酵素的透過処理、及びストレプトリシンを用いる透過処理などを含む好適な手段を用いて産生することができる。

【0097】

いくつかの実施態様において、細胞溶解物は、1回、2回、3回、4回、5回、又は5回より多くの凍結/解凍サイクルによって調製される。この技法は、凝固点で血液試料又はその成分を安定化し、タンパク質内容物の溶解及び解析前の保存を可能にする手段を提供するという潜在的な利点を提供する。典型的には、瞬間凍結は、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-75℃、-80℃、-90℃、-100℃、-120℃、-140℃、-160℃、-180℃、-190℃、-195℃、もしくは-196℃又はそれ未満の温度で実施することができる。さらに他の実施態様において、瞬間凍結は、-5℃、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-75℃、-80℃、-90、-100℃、-120℃、-104℃、-160℃、-180℃、-190℃、-200℃未満の温度で実施される。さらに他の実施態様において、瞬間凍結は、-190℃、-191℃、-192℃、-193℃、-194℃、-195℃、-196℃、-197℃、-198℃、又は-199℃未満の温度で実施される。全血試料、RBC濃縮試料、RBC濃縮画分、及び/又は他の異なる細胞成分を瞬間凍結させて、細胞を安定化することができる。これは、例えば、処理中に存在するRBC及び/又は他の細胞型からのタンパク質の隔離及び/又は放出を低下させるか又は防止することができる。

【0098】

(細胞洗浄液及び上清の解析)

いくつかの実施態様において、本開示の方法は、細胞洗浄液及び/又は細胞上清からタンパク質プロファイルを生成することを含む。

【0099】

細胞洗浄液及び/又は細胞上清は、RBCを含む血液試料又は血液試料成分から産生することができる。いくつかの実施態様において、RBCの数は、該血液試料又は該血液試料成分中に存在する血液細胞の総数の0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%、又は99.95%超を占める。

【0100】

いくつかの実施態様において、細胞洗浄液は、RBC濃縮細胞を洗浄することにより、及び/もしくは全血、血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つもしくは複数)、又はこれらの組合せから選択される1以上の細胞血液コンパートメントを別々に洗浄することにより産生することができる。

【0101】

いくつかの実施態様において、細胞上清は、RBC濃縮細胞をインキュベート又は培養することにより、及び/或いは血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つもしくは複数)、又はこれらの組合せから選択される1以上の細胞血液コンパートメントを別々にインキュベート又は培養することにより産生することができる。細胞上清は、その後、細胞から分離し、インキュベート又は培養された細胞によって(細胞内に及び/又は細胞表面から)放出されるタンパク質について解析することができる。任意に、該上清の除去後に残りの細胞を洗浄し、タンパク質プロファイルを生成するために使用することができる。細胞洗浄液を細胞上清と組み合わせて、タンパク質プロファイルを生成することができ、又はその代わりに、個々のタンパク質プロファイルを細胞洗浄液及び細胞上清から別々に生成することができる。これにより、望ましい場合、2つの個々のプロファイルの比較が可能になる。

【0102】

10

20

30

40

50

一連の細胞上清は、上記のような細胞を一定期間培養し、一連の上清を様々な時点で収集することにより産生することができる。該上清をタンパク質内容物について解析して、複数の時点にわたるタンパク質プロファイル解析を提供することができる。任意に、インキュベーション又は培養条件(例えば、培地の内容物、温度など)は、上清のサンプリングの時点間で変化させることができる。任意に、1以上の時点で上清を除去した後に残りの細胞を洗浄し、タンパク質プロファイルを生成するために使用することができる。細胞洗浄液を、所定の時点(例えば、同一の時点)の細胞上清と組み合わせて、タンパク質プロファイルを生成することができる。或いは、個々のタンパク質プロファイルを個々の細胞洗浄液及び個々の細胞上清から生成することができる。或いは、複数の時点からの細胞洗浄液をプールし、解析して、タンパク質プロファイルを生成することができる。同様に、複数の時点からの細胞上清をプールし、解析して、タンパク質プロファイルを生成することができる。

10

【0103】

RBC濃縮細胞をインキュベートもしくは培養するのに及び/又は他の細胞性血液コンパートメントを別々にインキュベートもしくは培養するのに好適な例示的なプロトコル及び/又は培地は、当業者に利用可能である(例えば、Koller、Palsson、Masters(編)、「ヒト細胞培養:第IV巻、初代造血細胞(Human Cell Culture: Vol IV. Primary Hematopoietic cells)」、2006、Springer Science and Business Media; Mirty及びHughes(編)、2001、「ヒト細胞培養プロトコル、第3版(Human Cell Culture Protocols, Third edition)」、2011、Humana Pressを参照)。方法は、本明細書の実施例にも提示されている。

20

【0104】

細胞洗浄は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、等張塩溶液、成長培地、培養培地、又はこれらの組合せなどの好適な培地を用いて実施することができる。

【0105】

本開示の方法における細胞洗浄液、細胞培養培地、又は細胞インキュベーション培地として使用するための好適な培地の非限定的な例としては、等張塩溶液、平衡化塩溶液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ハanks平衡化塩溶液(HBSS)、アール平衡化塩溶液(EBSS)、ロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)、最小必須培地(MEM)、改良された最小必須培地(IMEM)、イーグル最小必須培地(EMEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、及びイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、又はこれらの組合せが挙げられる。いくつかの実施態様において、該培地は、RBCを成長又は増殖しない状態で維持するためのPBS又はHBSSである。他の実施態様において、該培地は、RBCの成長又は増殖を刺激するためのRPMIである。

30

【0106】

(血液安定化剤及び抗凝固剤)

特定の機械的特徴に限定されるものではないが、RBCは、様々なタンパク質(例えば、サイトカイン及びケモカイン)を隔離及び放出する能力を有し得ると仮定され、かつRBCによるタンパク質放出(或いは、隔離)の程度は、血液の収集及び処理中に起こる様々な要因によって影響されると考えられる。

【0107】

いくつかの実施態様において、ある実施態様において使用される血液試料又はその成分は、血液安定化剤と混合することができる。RBCを安定化する能力を有する薬剤は、処理中のRBCからのタンパク質の隔離及び/又は放出を低下させるか又は防止するために有用である。

40

【0108】

血液細胞安定化剤は、対象から血液試料を収集する時に及び/又はその後の血液試料もしくはその成分の処理中に、血液試料と混合することができる。非限定的な例として、血液安定化剤は、血液試料が対象から採取されてから、1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、10秒、20秒、30秒、1分、2分、3分、4分、5分、10分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、7.5時間、又は10時間以内に、血液試料又はその成分と混合することが

50

できる。

【0109】

好適な血液安定化剤の非限定的な例としては、プロテアーゼインヒビター、抗凝固剤、RNA安定化剤(例えば、RNALater - Thermo Fisher Scientific)、タンパク質変性剤、又はこれらの組合せが挙げられる。ある実施態様において、血液安定化剤は、プロテアーゼインヒビターではない。

【0110】

例示的な実施態様において、血液安定化剤は、抗凝固剤である。抗凝固剤は、対象から血液試料を収集する時に(例えば、血液試料が収集される器もしくは容器は、抗凝固剤を含有し得る)、及び/又はその後の血液試料もしくはその成分の処理中に、抗凝固剤と混合することができる。

10

【0111】

好適な抗凝固剤の非限定的な例としては、ヘパリン、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、EDTA二ナトリウム塩、EDTA四ナトリウム塩、EDTA二カリウム塩、EDTA二アンモニウム塩、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸(EGTA)、EDTA三ナトリウム塩、EDTA三カリウム塩、エチレングリコール-0,0-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N,N-四酢酸、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N,N,N-三酢酸三ナトリウム塩、クエン酸塩、酸-クエン酸塩-デキストロース、クエン酸水素二アンモニウム、酒石酸二アンモニウム、ワルファリン、N-(2-ビス(カルボキシメチル)アミノエチル)-N-(2-ヒドロキシエチル)グリシン塩二水和物、クエン酸、クエン酸一ナトリウム塩、クエン酸二ナトリウム塩、クエン酸三ナトリウム塩、クエン酸一カリウム塩、クエン酸三カリウム塩、プロテインC/プロテインS、ニトリロ三酢酸、酒石酸カリウムナトリウム、D-酒石酸水素カリウム、L-酒石酸一ナトリウム塩、L-酒石酸二ナトリウム塩、L-酒石酸二カリウム塩、ストレプトキナーゼ、硫酸プロタミン、トリス(カルボキシメチル)アミン、抗トロンビンIII、フェンプロクモン、ヒルジン、ニクマロン、クマディン、グリコサミノグリカン、イブプロフェン、アセチルサリチル酸、インドメタシン、プロスタグランジン、スルフィンピラゾン、ウロキナーゼ、ヒルログ、組織プラスミノゲン活性化因子、クマリン、又はこれらの組合せが挙げられる。

20

【0112】

抗凝固剤は、例えば、RBC濃縮画分の解析に加えて、白血球(leukocyte)(白血球(white blood cell))、血小板、及び/又は血漿のうちの1つ又は複数のタンパク質プロファイリングが望ましい場合の使用に有益であり得る。抗凝固剤は、血液の全タンパク質成分(すなわち、血漿成分を除く血液細胞の混合集団)のタンパク質プロファイリングを実施することが望ましい場合の使用にも有益であり得る。

30

【0113】

他の実施態様において、本開示の方法において使用される血液試料は、例えば、タンパク質プロファイリングが、RBC、濃縮RBC、又は全血試料に対して実施されることになっている場合、抗凝固剤と混合しなくてもよい。そのような場合、抗凝固活性を有さない又はわずかな量の抗凝固活性しか有さない他の安定化剤を血液試料又はその成分と混合してもよい。

40

【0114】

他の実施態様において、本開示の方法において使用される血液試料又はその成分は、凍結(例えば、瞬間凍結)によるか又は乾燥(例えば、乾燥血液スポット)によって安定化することができる。

【0115】

(プロテアーゼインヒビターの使用)

ある実施態様において、本方法は、全血試料、赤血球濃縮試料、又は赤血球成分(例えば、赤血球もしくは赤血球膜)を、該試料又は成分中の1種以上のタンパク質のレベルを調節する1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させることを含む。赤血球濃縮試料又は赤血球成分は、例えば、該赤血球濃縮試料又は赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼ

50

インヒビターを含有する培地(例えば、PBS、HBSS、EBSS、RPMI、MEM、IMEM、EMEM、DMEM、IMDM)中でインキュベートすることにより、1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させることができる。該血液試料又は成分は、疾患もしくは障害を有する対象及び/又は疾患もしくは障害を有さない対象(例えば、健常対象)から採取することができる。例えば、該血液試料又は成分は、疾患又は障害を有さない対象由来の血液試料又は成分中の1種以上のタンパク質のレベルの調節と比較して、疾患又は障害を有する対象由来の試料又は成分中の1種以上のタンパク質のレベルを示差調節する1種以上のプロテアーゼインヒビターに接触させることができる。

【0116】

多くのプロテアーゼインヒビターは、本明細書に提供される方法において、個々に、又は当業者によって決定される方法での使用のための好適なプロテアーゼインヒビターと組み合わせて使用することができる。例えば、赤血球成分由来のタンパク質のレベルに対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果(例えば、増加もしくは減少の程度、又は顕著な増加もしくは減少の欠如)を決定することにより、当業者は、タンパク質レベルの望ましい調節に基づいて、特定のプロテアーゼインヒビターを使用することを選択することができる。本方法での使用に好適なプロテアーゼインヒビターには、いくつかの実施態様において、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及びアミノペプチダーゼインヒビターを含む、様々なプロテアーゼファミリー由来のプロテアーゼを阻害するものが含まれ得る。プロテアーゼインヒビターは、特定のプロテアーゼ、もしくは特定のプロテアーゼファミリーの阻害に特異的であるか、又は一般的な/共通のタンパク質分解機構を阻害する非特異的なもの(例えば、EDTA)であり得る。プロテアーゼインヒビターには、複数のプロテアーゼファミリー由来のプロテアーゼを阻害するもの、例えば、セリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼの両方を阻害するプロテアーゼインヒビター(例えば、ロイペプチン、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、扁平上皮細胞癌抗原-1(SCCA-1))も含まれ得る。プロテアーゼインヒビターには、内在性であるもの(例えば、内在性タンパク質)又は合成されたもの(例えば、化学合成されたもの)が含まれ得る。

【0117】

提供される方法での使用に好適なセリンプロテアーゼインヒビターには、例えば、 α -1-アンチキモトリプシン、C1インヒビター(C1INH)、 α -1-アンチトリプシン、アンチトロピンIII、 α -1-アンチプラスミン、プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1(PAI-1)、膵臓トリプシンインヒビター、SCCA-1、セリンプロテアーゼ活性を阻害するセルピンスーパーファミリーの他のメンバー、アプロチニン、キモスタチン、ロイペプチン、アンチパイン二塩酸塩、PMSF(Thermo Fisher Scientific)、ジイソプロピルフルオロホスフェート(DSF)、E-64(N-(N-L-3-trans-カルボニル)-L-ロイシル)-アグマチン)、Pefabloc(登録商標) SC(Roche/Sigma-Aldrich)、TLCK(CAS 131918-97-3)、カテスピシン(cathespain)(例えば、カテプシンA及びG)インヒビター、トリプシンインヒビターなどが含まれ得る。

【0118】

本明細書に提供される方法での使用に好適なシステイン(チオール)プロテアーゼインヒビターには、例えば、カスパーゼインヒビター、カルパインインヒビター(例えば、カルパインインヒビターI、カルパインインヒビターII、カルパスタチン)、カテプシン(例えば、カテプシンB、C、F、H、K、S、L、O、S、V、X、及びW)(例えば、パパイン)インヒビター(例えば、シスタチン(例えば、ステフィン、シスタチン、キニノーゲン)、サイロピン、セルピン、E-64(N-(N-L-3-trans-カルボニル)-L-ロイシル)-アグマチン)、SCCA-1、キモスタチン、アンチパイン二塩酸塩、N-エチルマレイミド、ロイペプチン、 α 2-マクログロブリン、PMSFなどが含まれ得る。

【0119】

本明細書に提供される方法での使用に好適なメタロプロテアーゼ(メタロプロテイナーゼ)インヒビターには、例えば、ベスタチン、ホスホラミドン、 α 2-マクログロブリン、メタロプロテイナーゼの組織インヒビター(例えば、TIMP1~TIMP4)、EDTA、2,2'-ビピリ

ジルReagentPlus(登録商標)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩脱水和物、1,10-フェナントロリン-水和物、ホスホラミドン二ナトリウム塩、並びに他の合成インヒビター(例えば、ヒドロキサメート系、チオール系、ピリミジン系、ヒドロキシプロン(hydroxypnone)系、リン系、及びテトラサイクリン系、並びにメタロエンドペプチダーゼインヒビター(例えば、ホスホラミドン、SCH 39370)などが含まれ得る。

【0120】

本明細書に提供される方法での使用に好適なアスパラギン酸/アスパルチルプロテアーゼインヒビターには、例えば、 α 2-マクログロブリン、ペプスタチン、ペプスタチンA、カテプシン(例えば、カテプシンD及びE)インヒビターなどが含まれ得る。

【0121】

本明細書に提供される方法での使用に好適なアミノペプチダーゼインヒビターには、例えば、ベスタチン塩酸塩、アクチノニン、アルファメニンA、アスプスタチン、アマスタチン塩酸塩、アルファメニンB、エベラクトンA、エピアマスタチン塩酸塩、アミノペプチダーゼNインヒビター、ベスタチンメチルエステル、l-グルタミン酸 γ -(7-アミド-4-メチルクマリン)、CHR 2797、カプトプリル、フマギリン、HFI 142、SC 57461Aなどが含まれ得る。

【0122】

また、本明細書に提供される方法での使用に好適なものは、プロテアーゼインヒビターカクテル(PIC)である。ある実施態様において、プロテアーゼインヒビターカクテルはA8127sであり、これは、アンチパイン二塩酸塩、ベスタチン、E-64、ロイペプチン、ペプスタチン、ホスホラミドン、Pefabloc SC、EDTA- Na_2 、及びアプロチニンを含む。他の実施態様において、PIC、例えば、cOmplete(登録商標)プロテアーゼインヒビターカクテル錠(Roche)、プロテアーゼインヒビターカクテル粉末(Sigma Aldrich、カタログ番号SRE0055)、SIGMAFASTプロテアーゼインヒビター錠(Sigma Aldrich、カタログ番号S8820)、プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma Aldrich、カタログ番号P8340)、動物成分不含プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma Aldrich、カタログ番号13786)、Haltプロテアーゼ及びホスフェートインヒビターカクテル(Thermo Fisher)、Abcamのプロテアーゼインヒビター(Abcam)、プロテアーゼインヒビターカクテル(Promega)などを本明細書に提供される方法で 사용할 ことができる。さらに、プロテアーゼインヒビターカクテルをカスタマイズして、対象となるタンパク質(例えば、タンパク質プロファイル中のタンパク質)のレベルの変化に対する個々のプロテアーゼインヒビターの効果を決定することにより、対象となるタンパク質のレベルの変化を増強することができる。プロテアーゼインヒビターを、例えば、特定の疾患タンパク質プロファイルについて、測定されているタンパク質の発現に対するその効果に基づいて、特定のプロテアーゼインヒビターカクテルに含めることも、そこから除くこともできる。

【0123】

いくつかの実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、上記のプロテアーゼインヒビターの組合せ(例えば、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及び/又はアミノペプチダーゼインヒビターの組合せ)と接触させる。いくつかの実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1種以上のセリンプロテアーゼインヒビター、1種以上のシステインプロテアーゼインヒビター、1種以上のメタロプロテアーゼインヒビター、1種以上のアスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及び/又は1種以上のアミノペプチダーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1種以上のセリンプロテアーゼインヒビター及び1種以上のシステインプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1種以上のセリンプロテアーゼインヒビター及び1種以上のメタロプロテアーゼインヒビターと接触させる。いくつかの実施態

10

20

30

40

50

30

40

50

又は赤血球成分を、セリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼの両方を阻害する1種以上のプロテアーゼインヒビター、1以上のメタロプロテアーゼ、及び1以上のアスパラギン酸プロテアーゼと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、セリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼの両方、1以上のメタロプロテアーゼ、1以上のアスパラギン酸プロテアーゼ、及び1以上のアミノペプチダーゼを阻害する1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。ある実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1以上の特定のプロテアーゼインヒビター(例えば、セリン、システイン、メタロプロテアーゼ、アスパルチルプロテアーゼ、又はアミノペプチダーゼインヒビター)及び1以上の非特異的プロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA)と接触させる。いくつかの実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む上記のプロテアーゼインヒビターの1つ又は複数と接触させる。ある実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、プロテアーゼインヒビターカクテルA8127sと接触させる。

10

【0125】

いくつかの上記のプロテアーゼインヒビターを、ある実施態様において、組み合わせて使用することができる。例えば、いくつかの実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼインヒビター、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、10種以上のプロテアーゼインヒビター、11種以上のプロテアーゼインヒビター、12種以上のプロテアーゼインヒビター、13種以上のプロテアーゼインヒビター、14種以上のプロテアーゼインヒビター、15種以上のプロテアーゼインヒビター、16種以上のプロテアーゼインヒビター、17以上のインヒビター、18種以上のプロテアーゼインヒビター、19種以上のプロテアーゼインヒビター、又は20種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させることができる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、2種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、3種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。さらに他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、4種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。いくつかの他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、5種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、6種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。いくつかの他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、7種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。さらに他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、8種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。さらに他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、9種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、15種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。さらに他の実施態様において、全血試料、赤血球濃縮試料、及び/又は赤血球成分を、20種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる。

20

30

40

【0126】

(カチオン塩の使用)

ある実施態様は、赤血球濃縮試料を、該試料中の1種以上のタンパク質の検出可能なレベルを増大させる及び/又は増強する少なくとも1つのカチオン塩と接触させることをさらに含む。カチオン塩は、当業者によって決定される、本方法での使用に好適である1つ又は複数であり得る。カチオン塩は、いくつかの実施態様において、一価又は多価(例えば

50

、二価、三価)金属イオン塩である。他の実施態様において、カチオン塩は、アンモニウム塩である。

【0127】

本方法での使用に好適な一価の金属カチオン塩には、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩など、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なナトリウム塩には、例えば、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、重リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム、及びプロピオン酸ナトリウムなど、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なカリウム塩には、例えば、塩化カリウム、クエン酸カリウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、重炭酸カリウム、亜硝酸カリウム、過硫酸カリウム、亜硫酸カリウム、硫酸カリウム、重亜硫酸カリウム、リン酸カリウム、酢酸カリウム、クエン酸カリウム、グルタミン酸カリウム、グアニル酸二カリウム、グルコン酸カリウム、リンゴ酸カリウム、アスコルビン酸カリウム、ソルビン酸カリウム、コハク酸カリウム、酒石酸カリウム、及びこれらの組合せが含まれ得る。好適なリチウム塩には、例えば、塩化リチウム、臭化リチウム、炭酸リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、酢酸リチウム、乳酸リチウム、クエン酸リチウム、アスパラギン酸リチウム、グルコン酸リチウム、リンゴ酸リチウム、アスコルビン酸リチウム、オロト酸リチウム、コハク酸リチウム、又はこれらの組合せが含まれる。

【0128】

本方法での使用に好適な二価金属カチオン塩には、例えば、カルシウム塩、カリウム塩、ベリリウム塩、ストロンチウム塩、バリウム塩、ラジウム塩、鉄(第一鉄)塩など、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なカルシウム塩には、例えば、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、乳酸カルシウム、クエン酸カルシウム、炭酸カルシウム、酢酸カルシウム、リン酸カルシウム、アルギン酸カルシウム(calcium alginate)、ステアリン酸カルシウム、ソルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウムなど、又はこれらの組合せが含まれる。好適なマグネシウム塩には、例えば、フッ化マグネシウム、塩化マグネシウム、臭化マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、亜硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、硝酸マグネシウム、ホウ酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、クエン酸マグネシウム、グルコン酸マグネシウム、マレイン酸マグネシウム、コハク酸マグネシウム、リンゴ酸マグネシウム、タウリン酸マグネシウム、オロト酸マグネシウム、グリシン酸マグネシウム、ナフテン酸マグネシウム、アセチルアセトン酸マグネシウム、ギ酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、ヘキサフルオロケイ酸マグネシウム、サリチル酸マグネシウム、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なベリリウム塩には、例えば、リン酸ベリリウム、酢酸ベリリウム、酒石酸ベリリウム、クエン酸ベリリウム、グルコン酸ベリリウム、マレイン酸ベリリウム、コハク酸ベリリウム、リンゴ酸ナトリウムベリリウム、アルファブロモカンファースルホン酸ベリリウム、アセチルアセトン酸ベリリウム、ギ酸ベリリウム、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なストロンチウム塩には、例えば、塩化ストロンチウム、リン酸ストロンチウム、硫酸ストロンチウム、炭酸ストロンチウム、酸化ストロンチウム、硝酸ストロンチウム、酢酸ストロンチウム、酒石酸ストロンチウム、クエン酸ストロンチウム、グルコン酸ストロンチウム、マレイン酸ストロンチウム、コハク酸ストロンチウム、リンゴ酸ストロンチウム、L型及び/もしくはD型アスパラギン酸ストロンチウム、フマル酸ストロンチウム、L型及び/もしくはD型グルタミン酸ストロンチウム、グルタル酸ストロンチウム、乳酸ストロンチウム、L-トレオン酸ストロンチウム、マロン酸ストロンチウム、ラネリン酸ストロンチウム(有機金属キレート)、アスコルビン酸ストロンチウム、酪酸ストロンチウム、クロドロン酸ストロンチウム、イバンドロン酸ストロンチウム、サリチル酸ストロンチウム、アセチルサリチル酸ストロンチウム、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なバリウム塩には、例えば、水酸化バリウム、フッ化バリウ

ム、塩化バリウム、臭化バリウム、ヨウ化バリウム、硫酸バリウム、硫化バリウム(S)、炭酸バリウム、過酸化バリウム、酸化バリウム、硝酸バリウム、酢酸バリウム、酒石酸バリウム、クエン酸バリウム、グルコン酸バリウム、マレイン酸バリウム、コハク酸バリウム、リンゴ酸バリウム、グルタミン酸バリウム、シュウ酸バリウム、マロン酸バリウム、ナフテン酸バリウム、アセチルアセトン酸バリウム、ギ酸バリウム、安息香酸バリウム、p-t-ブチル安息香酸バリウム、アジピン酸バリウム、ピメリン酸バリウム、スベリン酸バリウム、アゼル酸バリウム、セバシン酸バリウム、フタル酸バリウム、イソフタル酸バリウム、テレフタル酸バリウム、アントラニル酸バリウム、マンデル酸バリウム、サリチル酸バリウム、チタン酸バリウム、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なラジウム塩には、例えば、フッ化ラジウム、塩化ラジウム、臭化ラジウム、ヨウ化ラジウム、酸化ラジウム、窒化ラジウム、又はこれらの組合せが含まれ得る。好適なラジウム塩には、例えば、フッ化ラジウム、塩化ラジウム、臭化ラジウム、ヨウ化ラジウム、酸化ラジウム、窒化ラジウムなどが含まれた。好適な鉄(第一鉄)塩には、例えば、硫酸第一鉄、酸化第一鉄、酢酸第一鉄、クエン酸第一鉄、クエン酸アンモニウム第一鉄、グルコン酸第一鉄、シュウ酸第一鉄、フマル酸第一鉄、マレイン酸第一鉄、リンゴ酸第一鉄、乳酸第一鉄、アスコルビン酸第一鉄、エリスロビン酸第一鉄(ferrous erythroate)、グリセリン酸第一鉄、及びピルビン酸第一鉄など、又はこれらの組合せが含まれ得る。

10

【0129】

ある実施態様において、カチオン塩は、赤血球濃縮試料中のpH変化を防止及び/又は最小化することができるものである(例えば、塩化物又は炭酸塩)。したがって、ある実施態様において、カチオン塩は、炭酸塩である。さらなる実施態様において、カチオン塩は、細胞膜(例えば、RBC膜)への損傷を防止又は最小化することもできる。ある実施態様において、カチオン塩は、塩化物塩である。他の実施態様において、カチオン塩は、塩化カルシウム、塩化カリウム、塩化ストロンチウム、塩化バリウム、塩化ラジウム、又はこれらの組合せである。さらに他の実施態様において、カチオン塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化ルビジウム、塩化セシウム、塩化リチウム、又はこれらの組合せである。他の実施態様において、カチオン塩は、塩化リチウムである。他の実施態様において、カチオン塩は、塩化ナトリウムであり得る。ある実施態様において、カチオン塩は、炭酸カルシウム、炭酸カリウム、炭酸ストロンチウム、炭酸バリウム、又は炭酸ラジウムであり得る。さらに他の実施態様において、カチオン塩は、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビジウム、炭酸セシウム、炭酸リチウム、又はこれらの組合せである。さらに他の実施態様において、カチオン塩は、炭酸リチウムである。他の実施態様において、カチオン塩は、炭酸ナトリウムである。

20

30

【0130】

一価又は二価金属カチオン塩以外の塩を本方法で 사용할ことができ、これには、三価塩又は他の多価塩、例えば、アルミニウム、シリコン、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、コバルト、ニッケル、銅、マンガン、亜鉛、錫、及び銀など、又はこれらの組合せなどが含まれる。

【0131】

アンモニウム塩は、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ホウ酸アンモニウム、臭化アンモニウム、カルバミン酸アンモニウム、硫酸アンモニウムセリウム(IV)、クロム酸アンモニウム、二クロム酸アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム、フッ化アンモニウム、ギ酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、二塩基性リン酸アンモニウムナトリウム四水和物、チオ硫酸アンモニウム、及びアンモニウムジルコニウムなど、又はこれらの組合せを含む好適なアンモニウム塩とともに本方法で使用することもできる。

40

【0132】

ある実施態様において、カチオン塩は、塩化アンモニウムである。他の実施態様において、カチオン塩は、炭酸アンモニウムである。

【0133】

50

ある実施態様において、赤血球濃縮試料を上記のカチオン塩の1以上の組合せと接触させて、該試料中の1種以上のタンパク質の検出可能なレベルを増大させる及び/又は増強する。いくつかの実施態様において、赤血球濃縮試料を少なくとも1つのカチオン塩と接触させる。他の実施態様において、赤血球濃縮試料を少なくとも2つのカチオン塩と接触させる。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料を少なくとも3つのカチオン塩と接触させる。

【0134】

ある実施態様において、血液試料を上記のカチオン塩の1以上の組合せと接触させて、該血液試料の赤血球濃縮前に、該試料中の1種以上のタンパク質の検出可能なレベルを増加させる及び/又は増強する。いくつかの実施態様において、血液試料を少なくとも1つのカチオン塩と接触させる。他の実施態様において、血液試料を少なくとも2つのカチオン塩と接触させる。さらに他の実施態様において、血液試料を少なくとも3つのカチオン塩と接触させる。

【0135】

本明細書における塩(例えば、ナトリウム含有塩)への言及は、該塩の無水形態及び水和形態を含む。

【0136】

ある実施態様において、全血試料を上記のカチオン塩の少なくとも1つと接触させて、タンパク質プロファイルを作成する。全血試料は、当業者に利用可能な方法を用いて、静脈血、毛細管血、動脈血、又はこれらの組合せから採取することができる。

【0137】

他の実施態様において、血漿、血清、血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つ又は複数)、及びこれらの組合せから選択される1以上のさらなる血液コンパートメントを上記のカチオン塩の少なくとも1つに接触させて、タンパク質プロファイルを作成する。解析用のさらなる血液コンパートメントは、利用可能な技法(例えば、フローサイトメトリー、磁気ビーズ分離、遠心分離など)を用いて調製することができる。

【0138】

(タンパク質の検出及びプロファイリング)

本開示は、RBC成分を含む血液試料(例えば、RBC濃縮試料、RBC濃縮画分、又は全血試料)からタンパク質プロファイルを作成する方法を提供する。そのようなプロファイルの作成は、限定されないが、炎症、免疫応答、及び/もしくは細胞修復を含む生物学的プロセス、並びに/又は病態についての洞察を提供することができる。

【0139】

本開示の方法によるタンパク質プロファイルの生成において検出又は測定し得るタンパク質の種類に特定の制限を付与するものではないが、非限定的な例としては、シグナル伝達分子、例えば、ケモカイン、サイトカイン、他の炎症性タンパク質、糖タンパク質、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、及び細胞外マトリックス成分、並びに酵素が挙げられる。例えば、成長因子には、例えば、皮膚細胞の成長、増殖、治癒、又は分化を刺激するもの(例えば、上皮成長因子(EGF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、遊走刺激因子(MSF))、神経細胞/神経系の成長、増殖、治癒、又は分化を刺激するもの(例えば、ニューレグリン(例えば、ニューレグリン1~4)及びニューロトロフィン(例えば、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、ニューロトロフィン4(NT-4)))、結合組織及び間葉細胞の成長、増殖、治癒、又は分化を刺激するもの(例えば、線維芽細胞成長因子(FGF))、血管細胞の成長、増殖、治癒、又は分化を刺激するもの(例えば、血小板由来成長因子(PDGF)、胎盤成長因子(PGF)、血管内皮成長因子(VEGF))、血液細胞の成長、増殖、治癒、又は分化を刺激するもの(例えば、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロフ

ァージコロニー刺激因子(GM-CSF))、並びに細胞増殖を刺激するもの(例えば、インスリン様成長因子(IGF-1)、インスリン様成長因子-2(IGF-2))が、多面的成長因子(例えば、形質転換成長因子-ベータ(TGF- β)、形質転換成長因子-ベータ(TGF- α)、腫瘍壊死因子(TNF))とともに含まれ得る。

【0140】

受容体には、細胞内受容体(例えば、核内受容体(例えば、転写因子)、細胞質内受容体(例えば、ステロイド)、及び小胞体(例えば、IP₃)受容体、細胞表面受容体(例えば、イオンチャネル結合型、G-タンパク質結合型、酵素結合型、トール(toll)開口型、及びリガンド開口型受容体、インテグリン)、可溶性受容体(例えば、可溶性サイトカイン受容体)、並びにスカベンジャー受容体(例えば、SR-A1、SR-A2、SCARA1-SCARA5、SCARB1-SCARB3、CD68、dSR-C1、LOX-1、sPD-1、sCTLA-4)が含まれ得る。ホルモンには、脂質由来のもの(例えば、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタシリン(prostacyclin)、トロンボキサン);アミノ酸由来のもの(例えば、エピネフリン、メラトニン、チロキシン);ペプチド(例えば、アミリン、アディポネンクチン(adiponectin)、アンジオテンシノーゲン、カルシトニン、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン(FSH)、グレリン、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、インスリン、インスリン様成長因子(IGF)など);並びにステロイド(例えば、アンドロゲン、エストロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン、及びセコステロイドなど)が含まれ得る。細胞内シグナル伝達物質又は変換物質には、タンパク質及びタンパク質キナーゼのファミリー(例えば、Ras及びSrcファミリー)、並びにWntシグナル伝達ファミリータンパク質が含まれ得る。神経伝達物質には、アミノ酸、ペプチド(例えば、 β -エンドルフィン、オピオイド)、モノアミン、微量アミン、プリン、及びガス状伝達物質が含まれ得る。核内転写因子には、DNA転写のモジュレーター(例えば、fos、myc、N-myc)、及びmRNA転写のモジュレーター、及び細胞分裂の抑制因子(例えば、p53、pRb)が含まれ得る。酵素には、オキシドレダクターゼ(例えば、アルコール、アルデヒド、アミノ酸、硫黄、ジフェノール、及びペルオキシダーゼなど)、NADH、NADPH、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、キナーゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、及びリガーゼが含まれ得る。数多くあるケモカイン及びサイトカインには、例えば、下の表1及び表2に掲載されているものが含まれ得る。

【0141】

ある実施態様において、本方法は、下の表1及び2に掲載されている単一のタンパク質もしくはタンパク質の組合せからなるか又はそれらを含むタンパク質プロファイルを作成することを含む。該プロファイルは、RBC成分を含む血液試料(例えば、赤血球濃縮試料、RBC濃縮画分、又は全血試料)から生成することができる。さらなるプロファイルは、限定されないが、血漿、血清、血小板、白血球、濃縮血小板画分、濃縮白血球画分、血小板濃縮血漿、白血球濃縮血漿、血小板と白血球の混合物、特定の白血球(例えば、Tリンパ球(例えば、CD4+ Tリンパ球、CD8+ Tリンパ球)、Bリンパ球、NK細胞、単球、好中球、好酸球、好塩基球などのうちの1つ又は複数)、及びこれらの組合せを含む、他の細胞コンパートメントから生成することができる。

表1:本開示の方法によって生成されるタンパク質プロファイルに含まれ得る個々のタンパク質の非限定的な例。該タンパク質プロファイルは、掲載されているタンパク質の1つもしくは複数を含むか又はそれらからなり得る。

【表 1】

単一のタンパク質(頭字語)	単一のタンパク質(正式名)
塩基 FGF	塩基性線維芽細胞成長因子
CTACK (CCL27)	皮膚T細胞誘引ケモカイン
エオタキシン1	CCL11 #1
G-CSF (GCSF)	顆粒球コロニー刺激因子
GM-CSF (CSF2)	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HGF	肝細胞成長因子
IFN- α 2	インターフェロンアルファサブタイプ α 2
IFN- γ	インターフェロンガンマ
IL-10	インターロイキン10
IL-12 (IL-12p70)	インターロイキン12 p35 及び p40 ヘテロ二量体
IL-13	インターロイキン13
IL-12p40	インターロイキン12 p40 サブユニット
IL-15	インターロイキン15
IL-16	インターロイキン16
IL-17A	インターロイキン17A
IL-18	インターロイキン18
IL-1 α	インターロイキン1 アルファ
IL-1 β	インターロイキン1 ベータ
IL-2	インターロイキン2
IL-2ra	インターロイキン2 受容体アルファ鎖
IL-3	インターロイキン3
IL-5	インターロイキン5
IL-6	インターロイキン6
IL-7	インターロイキン7
IL-9	インターロイキン9
IP-10 (CXCL10)	インターフェロンガンマ誘導タンパク質10
LIF	白血病抑制因子
M-CSF (CSF1)	マクロファージコロニー刺激因子
MIG (CXCL9)	IFN γ によって誘導されるモノカイン、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド9
MIP-1 α (CCL3)	マクロファージ炎症性タンパク質-1アルファ
MIP-1 β (CCL4)	マクロファージ炎症性タンパク質-1アルファ
PDGF-BB	血小板由来成長因子B鎖ホモ二量体
SDF-1 α (CXCL12)	間質細胞由来因子1
TNF- α (カケキシン)	腫瘍壊死因子アルファ
TNF- β (リンボトキシン)	腫瘍壊死因子-ベータ
TRAIL	TNF関連アポトーシス誘導リガンド
VEGF	血管内皮成長因子
IL-8	インターロイキン8
MCP-1 (CCL2)	単球走化性タンパク質-1
MGSA	ゲノム安定性の維持タンパク質 A
PGE-2	プロスタグランジンE2
RANTES (CCL5)	活性化調節性正常T細胞発現分泌
MIF (MMIF)	マクロファージ遊走抑制因子
GRO- α (CXCL1)	成長調節型癌遺伝子 α
CRP	C-反応性タンパク質
DDT (MIF-2)	D-ドパクロムトートメラーゼ
IGF-1	インスリン様成長因子1
sEGFR	上皮成長因子受容体
sHER-2/neu (CD340)	受容体チロシン-タンパク質キナーゼ erbB-2
sIL-6Ra	インターロイキン-6 受容体
レプチン	
オステオポンチン	
PECAM-1 (CD31)	血小板内皮細胞接着分子前駆体

10

20

30

40

PDGF-AB/BB	血小板由来成長因子AB/血小板由来成長因子BB
プロラクチン	プロラクチン
sTIE-1	Ig及びEGF相同性ドメインを有するチロシキナーゼ-1
sTIE-2	Ig及びEGF相同性ドメインを有するチロシキナーゼ-2
sVEGFR-1	血管内皮成長因子受容体-1
sVEGFR-2	血管内皮成長因子受容体-2
APRIL/TNFSF13	増殖誘導リガンド/腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー13
BAFF/TNFSF13B	B細胞活性化因子/腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー13B
TNFRSF8 (CD30)	TNF受容体スーパーファミリーメンバー8
sCD163	分化抗原群163
CHI3L1	キチナーゼ-3様1
gp130/sIL-6Rβ	糖タンパク質130/インターロイキン-6受容体ベータ
IL-11	インターロイキン-11
IL-19	インターロイキン-19
IL-20	インターロイキン-20
IL-22	インターロイキン-22
IL-26	インターロイキン-26
IL-27(p28)	インターロイキン-27(p28)
IL-28A/IFN-λ2	インターロイキン-28/インターフェロンガンマ2
IL-29/IFN-λ1	インターロイキン-29/インターフェロンガンマ1
IL-32	インターロイキン-32
IL-34	インターロイキン-34
IL-35	インターロイキン-35
TNFSF14/ LIGHT	腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14/リンボトキシンと相同であり、誘導性発現を示し、Tリンパ球上で発現される受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーターへの結合をHSV糖タンパク質Dと競合する/
MMP-1	マトリックスメタロプロテイナーゼ-1
MMP-2	マトリックスメタロプロテイナーゼ-2
MMP-3	マトリックスメタロプロテイナーゼ-3
オステオカルシン	
ペントラキシン-3	
sTNF-R1	腫瘍壊死因子受容体 1
sTNF-R2	腫瘍壊死因子受容体 2
TSLP	胸腺間質性リンポポエチン
TWEAK/TNFSF12	TNF関連アポトーシス弱誘導因子/腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー12
4-1BB (CD137)	
CTLA-4 (CD152)	細胞傷害性T-リンパ球関連タンパク質 4
Lag-3 (CD223)	リンパ球活性化遺伝子 3
CD27	
HVEM/TNFRSF14 (CD270)	ヘルペスウイルス侵入メディエーター/腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14
BTLA (CD272)	B-及びT-リンパ球関連
PD-1 (CD279)	プログラム細胞死タンパク質 1
CD28	
GITR/TNFRSF18 (CD357)	グルコシルコイド誘導性TNFRファミリー関連遺伝子/腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー18
B7-1 (CD80)	
TIM3	T-細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン 3

10

20

30

40

表2: 本開示の方法によって生成されるタンパク質プロファイルに含まれ得るタンパク質ペアの非限定的な例。該タンパク質プロファイルは、掲載されているタンパク質の1つもしくはは複数を含むか又はそれらからなり得る。

【表 2】

タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
塩基性FGF	CTACK	CTACK	エオタキシン1	エオタキシン1	G-CSF	G-CSF	GM-CSF
塩基性FGF	Eotaxin 1	CTACK	G-CSF	エオタキシン1	GM-CSF	G-CSF	HGF
塩基性FGF	G-CSF	CTACK	GM-CSF	エオタキシン1	HGF	G-CSF	IFN- α 2
塩基性FGF	GM-CSF	CTACK	HGF	エオタキシン1	IFN- α 2	G-CSF	IFN- γ
塩基性FGF	HGF	CTACK	IFN- α 2	エオタキシン1	IFN- γ	G-CSF	IL-10
塩基性FGF	IFN- α 2	CTACK	IFN- γ	エオタキシン1	IL-10	G-CSF	IL-12
塩基性FGF	IFN- γ	CTACK	IL-10	エオタキシン1	IL-12	G-CSF	IL-13
塩基性FGF	IL-10	CTACK	IL-12	エオタキシン1	IL-13	G-CSF	IL-12p40
塩基性FGF	IL-12	CTACK	IL-13	エオタキシン1	IL-12p40	G-CSF	IL-15
塩基性FGF	IL-13	CTACK	IL-12p40	エオタキシン1	IL-15	G-CSF	IL-16
塩基性FGF	IL-12p40	CTACK	IL-15	エオタキシン1	IL-16	G-CSF	IL-17A
塩基性FGF	IL-15	CTACK	IL-16	エオタキシン1	IL-17A	G-CSF	IL-18
塩基性FGF	IL-16	CTACK	IL-17A	エオタキシン1	IL-18	G-CSF	IL-1 α
塩基性FGF	IL-17A	CTACK	IL-18	エオタキシン1	IL-1 α	G-CSF	IL-1 β
塩基性FGF	IL-18	CTACK	IL-1 α	エオタキシン1	IL-1 β	G-CSF	IL-2
塩基性FGF	IL-1 α	CTACK	IL-1 β	エオタキシン1	IL-2	G-CSF	IL-2ra
塩基性FGF	IL-1 β	CTACK	IL-2	エオタキシン1	IL-2ra	G-CSF	IL-3
塩基性FGF	IL-2	CTACK	IL-2ra	エオタキシン1	IL-3	G-CSF	IL-5
塩基性FGF	IL-2ra	CTACK	IL-3	エオタキシン1	IL-5	G-CSF	IL-6
塩基性FGF	IL-3	CTACK	IL-5	エオタキシン1	IL-6	G-CSF	IL-7
塩基性FGF	IL-5	CTACK	IL-6	エオタキシン1	IL-7	G-CSF	IL-9
塩基性FGF	IL-6	CTACK	IL-7	エオタキシン1	IL-9	G-CSF	IP-10
塩基性FGF	IL-7	CTACK	IL-9	エオタキシン1	IP-10	G-CSF	LIF
塩基性FGF	IL-9	CTACK	IP-10	エオタキシン1	LIF	G-CSF	M-CSF
塩基性FGF	IP-10	CTACK	LIF	エオタキシン1	M-CSF	G-CSF	MIG
塩基性FGF	LIF	CTACK	M-CSF	エオタキシン1	MIG	G-CSF	MIP-1 α
塩基性FGF	M-CSF	CTACK	MIG	エオタキシン1	MIP-1 α	G-CSF	MIP-1 β
塩基性FGF	MIG	CTACK	MIP-1 α	エオタキシン1	MIP-1 β	G-CSF	PDGF-BB
塩基性FGF	MIP-1 α	CTACK	MIP-1 β	エオタキシン1	PDGF-BB	G-CSF	SDF-1 α
塩基性FGF	MIP-1 β	CTACK	PDGF-BB	エオタキシン1	SDF-1 α	G-CSF	TNF- α
塩基性FGF	PDGF-BB	CTACK	SDF-1 α	エオタキシン1	TNF- α	G-CSF	TNF- β
塩基性FGF	SDF-1 α	CTACK	TNF- α	エオタキシン1	TNF- β	G-CSF	TRAIL
塩基性FGF	TNF- α	CTACK	TNF- β	エオタキシン1	TRAIL	G-CSF	VEGF
塩基性FGF	TNF- β	CTACK	TRAIL	エオタキシン1	VEGF	G-CSF	IL-8
塩基性FGF	TRAIL	CTACK	VEGF	エオタキシン1	IL-8	G-CSF	MCP-1
塩基性FGF	VEGF	CTACK	IL-8	エオタキシン1	MCP-1	G-CSF	MGSA
塩基性FGF	IL-8	CTACK	MCP-1	エオタキシン1	MGSA	G-CSF	PGE-2
塩基性FGF	MCP-1	CTACK	MGSA	エオタキシン1	PGE-2	G-CSF	RANTES
塩基性FGF	MGSA	CTACK	PGE-2	エオタキシン1	RANTES	G-CSF	MIF
塩基性FGF	PGE-2	CTACK	RANTES	エオタキシン1	MIF	G-CSF	GRO- α
塩基性FGF	RANTES	CTACK	MIF	エオタキシン1	GRO- α	G-CSF	CRP
塩基性FGF	MIF	CTACK	GRO- α	エオタキシン1	CRP	G-CSF	DDT
塩基性FGF	GRO- α	CTACK	CRP	エオタキシン1	DDT		
塩基性FGF	CRP	CTACK	DDT				
塩基性FGF	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
GM-CSF	HGF	HGF	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- γ	IFN- γ	IL-10
GM-CSF	IFN- α 2	HGF	IFN- γ	IFN- α 2	IL-10	IFN- γ	IL-12
GM-CSF	IFN- γ	HGF	IL-10	IFN- α 2	IL-12	IFN- γ	IL-13
GM-CSF	IL-10	HGF	IL-12	IFN- α 2	IL-13	IFN- γ	IL-12p40
GM-CSF	IL-12	HGF	IL-13	IFN- α 2	IL-12p40	IFN- γ	IL-15
GM-CSF	IL-13	HGF	IL-12p40	IFN- α 2	IL-15	IFN- γ	IL-16
GM-CSF	IL-12p40	HGF	IL-15	IFN- α 2	IL-16	IFN- γ	IL-17A

10

20

30

40

GM-CSF	IL-15	HGF	IL-16	IFN- α 2	IL-17A	IFN- γ	IL-18
GM-CSF	IL-16	HGF	IL-17A	IFN- α 2	IL-18	IFN- γ	IL-1 α
GM-CSF	IL-17A	HGF	IL-18	IFN- α 2	IL-1 α	IFN- γ	IL-1 β
GM-CSF	IL-18	HGF	IL-1 α	IFN- α 2	IL-1 β	IFN- γ	IL-2
GM-CSF	IL-1 α	HGF	IL-1 β	IFN- α 2	IL-2	IFN- γ	IL-2ra
GM-CSF	IL-1 β	HGF	IL-2	IFN- α 2	IL-2ra	IFN- γ	IL-3
GM-CSF	IL-2	HGF	IL-2ra	IFN- α 2	IL-3	IFN- γ	IL-5
GM-CSF	IL-2ra	HGF	IL-3	IFN- α 2	IL-5	IFN- γ	IL-6
GM-CSF	IL-3	HGF	IL-5	IFN- α 2	IL-6	IFN- γ	IL-7
GM-CSF	IL-5	HGF	IL-6	IFN- α 2	IL-7	IFN- γ	IL-9
GM-CSF	IL-6	HGF	IL-7	IFN- α 2	IL-9	IFN- γ	IP-10
GM-CSF	IL-7	HGF	IL-9	IFN- α 2	IP-10	IFN- γ	LIF
GM-CSF	IL-9	HGF	IP-10	IFN- α 2	LIF	IFN- γ	M-CSF
GM-CSF	IP-10	HGF	LIF	IFN- α 2	M-CSF	IFN- γ	MIG
GM-CSF	LIF	HGF	M-CSF	IFN- α 2	MIG	IFN- γ	MIP-1 α
GM-CSF	M-CSF	HGF	MIG	IFN- α 2	MIP-1 α	IFN- γ	MIP-1 β
GM-CSF	MIG	HGF	MIP-1 α	IFN- α 2	MIP-1 β	IFN- γ	PDGF-BB
GM-CSF	MIP-1 α	HGF	MIP-1 β	IFN- α 2	PDGF-BB	IFN- γ	SDF-1 α
GM-CSF	MIP-1 β	HGF	PDGF-BB	IFN- α 2	SDF-1 α	IFN- γ	TNF- α
GM-CSF	PDGF-BB	HGF	SDF-1 α	IFN- α 2	TNF- α	IFN- γ	TNF- β
GM-CSF	SDF-1 α	HGF	TNF- α	IFN- α 2	TNF- β	IFN- γ	TRAIL
GM-CSF	TNF- α	HGF	TNF- β	IFN- α 2	TRAIL	IFN- γ	VEGF
GM-CSF	TNF- β	HGF	TRAIL	IFN- α 2	VEGF	IFN- γ	IL-8
GM-CSF	TRAIL	HGF	VEGF	IFN- α 2	IL-8	IFN- γ	MCP-1
GM-CSF	VEGF	HGF	IL-8	IFN- α 2	MCP-1	IFN- γ	MGSA
GM-CSF	IL-8	HGF	MCP-1	IFN- α 2	MGSA	IFN- γ	PGE-2
GM-CSF	MCP-1	HGF	MGSA	IFN- α 2	PGE-2	IFN- γ	RANTES
GM-CSF	MGSA	HGF	PGE-2	IFN- α 2	RANTES	IFN- γ	MIF
GM-CSF	PGE-2	HGF	RANTES	IFN- α 2	MIF	IFN- γ	GRO- α
GM-CSF	RANTES	HGF	MIF	IFN- α 2	GRO- α	IFN- γ	CRP
GM-CSF	MIF	HGF	GRO- α	IFN- α 2	CRP	IFN- γ	DDT
GM-CSF	GRO- α	HGF	CRP	IFN- α 2	DDT		
GM-CSF	CRP	HGF	DDT				
GM-CSF	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
IL-10	IL-12	IL-12	IL-13	IL-13	IL-12p40	IL-12p40	IL-15
IL-10	IL-13	IL-12	IL-12p40	IL-13	IL-15	IL-12p40	IL-16
IL-10	IL-12p40	IL-12	IL-15	IL-13	IL-16	IL-12p40	IL-17A
IL-10	IL-15	IL-12	IL-16	IL-13	IL-17A	IL-12p40	IL-18
IL-10	IL-16	IL-12	IL-17A	IL-13	IL-18	IL-12p40	IL-1 α
IL-10	IL-17A	IL-12	IL-18	IL-13	IL-1 α	IL-12p40	IL-1 β
IL-10	IL-18	IL-12	IL-1 α	IL-13	IL-1 β	IL-12p40	IL-2
IL-10	IL-1 α	IL-12	IL-1 β	IL-13	IL-2	IL-12p40	IL-2ra
IL-10	IL-1 β	IL-12	IL-2	IL-13	IL-2ra	IL-12p40	IL-3
IL-10	IL-2	IL-12	IL-2ra	IL-13	IL-3	IL-12p40	IL-5
IL-10	IL-2ra	IL-12	IL-3	IL-13	IL-5	IL-12p40	IL-6
IL-10	IL-3	IL-12	IL-5	IL-13	IL-6	IL-12p40	IL-7
IL-10	IL-5	IL-12	IL-6	IL-13	IL-7	IL-12p40	IL-9
IL-10	IL-6	IL-12	IL-7	IL-13	IL-9	IL-12p40	IP-10
IL-10	IL-7	IL-12	IL-9	IL-13	IP-10	IL-12p40	LIF
IL-10	IL-9	IL-12	IP-10	IL-13	LIF	IL-12p40	M-CSF
IL-10	IP-10	IL-12	LIF	IL-13	M-CSF	IL-12p40	MIG
IL-10	LIF	IL-12	M-CSF	IL-13	MIG	IL-12p40	MIP-1 α
IL-10	M-CSF	IL-12	MIG	IL-13	MIP-1 α	IL-12p40	MIP-1 β
IL-10	MIG	IL-12	MIP-1 α	IL-13	MIP-1 β	IL-12p40	PDGF-BB
IL-10	MIP-1 α	IL-12	MIP-1 β	IL-13	PDGF-BB	IL-12p40	SDF-1 α
IL-10	MIP-1 β	IL-12	PDGF-BB	IL-13	SDF-1 α	IL-12p40	TNF- α

10

20

30

40

IL-10	PDGF-BB	IL-12	SDF-1 α	IL-13	TNF- α	IL-12p40	TNF- β
IL-10	SDF-1 α	IL-12	TNF- α	IL-13	TNF- β	IL-12p40	TRAIL
IL-10	TNF- α	IL-12	TNF- β	IL-13	TRAIL	IL-12p40	VEGF
IL-10	TNF- β	IL-12	TRAIL	IL-13	VEGF	IL-12p40	IL-8
IL-10	TRAIL	IL-12	VEGF	IL-13	IL-8	IL-12p40	MCP-1
IL-10	VEGF	IL-12	IL-8	IL-13	MCP-1	IL-12p40	MGSA
IL-10	IL-8	IL-12	MCP-1	IL-13	MGSA	IL-12p40	PGE-2
IL-10	MCP-1	IL-12	MGSA	IL-13	PGE-2	IL-12p40	RANTES
IL-10	MGSA	IL-12	PGE-2	IL-13	RANTES	IL-12p40	MIF
IL-10	PGE-2	IL-12	RANTES	IL-13	MIF	IL-12p40	GRO- α
IL-10	RANTES	IL-12	MIF	IL-13	GRO- α	IL-12p40	CRP
IL-10	MIF	IL-12	GRO- α	IL-13	CRP	IL-12p40	DDT
IL-10	GRO- α	IL-12	CRP	IL-13	DDT		
IL-10	CRP	IL-12	DDT				
IL-10	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
IL-15	IL-16	IL-16	IL-17A	IL-17A	IL-18	IL-18	IL-1 α
IL-15	IL-17A	IL-16	IL-18	IL-17A	IL-1 α	IL-18	IL-1 β
IL-15	IL-18	IL-16	IL-1 α	IL-17A	IL-1 β	IL-18	IL-2
IL-15	IL-1 α	IL-16	IL-1 β	IL-17A	IL-2	IL-18	IL-2ra
IL-15	IL-1 β	IL-16	IL-2	IL-17A	IL-2ra	IL-18	IL-3
IL-15	IL-2	IL-16	IL-2ra	IL-17A	IL-3	IL-18	IL-5
IL-15	IL-2ra	IL-16	IL-3	IL-17A	IL-5	IL-18	IL-6
IL-15	IL-3	IL-16	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-18	IL-7
IL-15	IL-5	IL-16	IL-6	IL-17A	IL-7	IL-18	IL-9
IL-15	IL-6	IL-16	IL-7	IL-17A	IL-9	IL-18	IP-10
IL-15	IL-7	IL-16	IL-9	IL-17A	IP-10	IL-18	LIF
IL-15	IL-9	IL-16	IP-10	IL-17A	LIF	IL-18	M-CSF
IL-15	IP-10	IL-16	LIF	IL-17A	M-CSF	IL-18	MIG
IL-15	LIF	IL-16	M-CSF	IL-17A	MIG	IL-18	MIP-1 α
IL-15	M-CSF	IL-16	MIG	IL-17A	MIP-1 α	IL-18	MIP-1 β
IL-15	MIG	IL-16	MIP-1 α	IL-17A	MIP-1 β	IL-18	PDGF-BB
IL-15	MIP-1 α	IL-16	MIP-1 β	IL-17A	PDGF-BB	IL-18	SDF-1 α
IL-15	MIP-1 β	IL-16	PDGF-BB	IL-17A	SDF-1 α	IL-18	TNF- α
IL-15	PDGF-BB	IL-16	SDF-1 α	IL-17A	TNF- α	IL-18	TNF- β
IL-15	SDF-1 α	IL-16	TNF- α	IL-17A	TNF- β	IL-18	TRAIL
IL-15	TNF- α	IL-16	TNF- β	IL-17A	TRAIL	IL-18	VEGF
IL-15	TNF- β	IL-16	TRAIL	IL-17A	VEGF	IL-18	IL-8
IL-15	TRAIL	IL-16	VEGF	IL-17A	IL-8	IL-18	MCP-1
IL-15	VEGF	IL-16	IL-8	IL-17A	MCP-1	IL-18	MGSA
IL-15	IL-8	IL-16	MCP-1	IL-17A	MGSA	IL-18	PGE-2
IL-15	MCP-1	IL-16	MGSA	IL-17A	PGE-2	IL-18	RANTES
IL-15	MGSA	IL-16	PGE-2	IL-17A	RANTES	IL-18	MIF
IL-15	PGE-2	IL-16	RANTES	IL-17A	MIF	IL-18	GRO- α
IL-15	RANTES	IL-16	MIF	IL-17A	GRO- α	IL-18	CRP
IL-15	MIF	IL-16	GRO- α	IL-17A	CRP	IL-18	DDT
IL-15	GRO- α	IL-16	CRP	IL-17A	DDT		
IL-15	CRP	IL-16	DDT				
IL-15	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
IL-1 α	IL-1 β	IL-1 β	IL-2	IL-2	IL-2ra	IL-2ra	IL-3
IL-1 α	IL-2	IL-1 β	IL-2ra	IL-2	IL-3	IL-2ra	IL-5
IL-1 α	IL-2ra	IL-1 β	IL-3	IL-2	IL-5	IL-2ra	IL-6
IL-1 α	IL-3	IL-1 β	IL-5	IL-2	IL-6	IL-2ra	IL-7
IL-1 α	IL-5	IL-1 β	IL-6	IL-2	IL-7	IL-2ra	IL-9
IL-1 α	IL-6	IL-1 β	IL-7	IL-2	IL-9	IL-2ra	IP-10
IL-1 α	IL-7	IL-1 β	IL-9	IL-2	IP-10	IL-2ra	LIF
IL-1 α	IL-9	IL-1 β	IP-10	IL-2	LIF	IL-2ra	M-CSF
IL-1 α	IP-10	IL-1 β	LIF	IL-2	M-CSF	IL-2ra	MIG

10

20

30

40

IL-1 α	LIF	IL-1 β	M-CSF	IL-2	MIG	IL-2ra	MIP-1 α
IL-1 α	M-CSF	IL-1 β	MIG	IL-2	MIP-1 α	IL-2ra	MIP-1 β
IL-1 α	MIG	IL-1 β	MIP-1 α	IL-2	MIP-1 β	IL-2ra	PDGF-BB
IL-1 α	MIP-1 α	IL-1 β	MIP-1 β	IL-2	PDGF-BB	IL-2ra	SDF-1 α
IL-1 α	MIP-1 β	IL-1 β	PDGF-BB	IL-2	SDF-1 α	IL-2ra	TNF- α
IL-1 α	PDGF-BB	IL-1 β	SDF-1 α	IL-2	TNF- α	IL-2ra	TNF- β
IL-1 α	SDF-1 α	IL-1 β	TNF- α	IL-2	TNF- β	IL-2ra	TRAIL
IL-1 α	TNF- α	IL-1 β	TNF- β	IL-2	TRAIL	IL-2ra	VEGF
IL-1 α	TNF- β	IL-1 β	TRAIL	IL-2	VEGF	IL-2ra	IL-8
IL-1 α	TRAIL	IL-1 β	VEGF	IL-2	IL-8	IL-2ra	MCP-1
IL-1 α	VEGF	IL-1 β	IL-8	IL-2	MCP-1	IL-2ra	MGSA
IL-1 α	IL-8	IL-1 β	MCP-1	IL-2	MGSA	IL-2ra	PGE-2
IL-1 α	MCP-1	IL-1 β	MGSA	IL-2	PGE-2	IL-2ra	RANTES
IL-1 α	MGSA	IL-1 β	PGE-2	IL-2	RANTES	IL-2ra	MIF
IL-1 α	PGE-2	IL-1 β	RANTES	IL-2	MIF	IL-2ra	GRO- α
IL-1 α	RANTES	IL-1 β	MIF	IL-2	GRO- α	IL-2ra	CRP
IL-1 α	MIF	IL-1 β	GRO- α	IL-2	CRP	IL-2ra	DDT
IL-1 α	GRO- α	IL-1 β	CRP	IL-2	DDT		
IL-1 α	CRP	IL-1 β	DDT				
IL-1 α	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
IL-3	IL-5	IL-5	IL-6	IL-6	IL-7	IL-7	IL-9
IL-3	IL-6	IL-5	IL-7	IL-6	IL-9	IL-7	IP-10
IL-3	IL-7	IL-5	IL-9	IL-6	IP-10	IL-7	LIF
IL-3	IL-9	IL-5	IP-10	IL-6	LIF	IL-7	M-CSF
IL-3	IP-10	IL-5	LIF	IL-6	M-CSF	IL-7	MIG
IL-3	LIF	IL-5	M-CSF	IL-6	MIG	IL-7	MIP-1 α
IL-3	M-CSF	IL-5	MIG	IL-6	MIP-1 α	IL-7	MIP-1 β
IL-3	MIG	IL-5	MIP-1 α	IL-6	MIP-1 β	IL-7	PDGF-BB
IL-3	MIP-1 α	IL-5	MIP-1 β	IL-6	PDGF-BB	IL-7	SDF-1 α
IL-3	MIP-1 β	IL-5	PDGF-BB	IL-6	SDF-1 α	IL-7	TNF- α
IL-3	PDGF-BB	IL-5	SDF-1 α	IL-6	TNF- α	IL-7	TNF- β
IL-3	SDF-1 α	IL-5	TNF- α	IL-6	TNF- β	IL-7	TRAIL
IL-3	TNF- α	IL-5	TNF- β	IL-6	TRAIL	IL-7	VEGF
IL-3	TNF- β	IL-5	TRAIL	IL-6	VEGF	IL-7	IL-8
IL-3	TRAIL	IL-5	VEGF	IL-6	IL-8	IL-7	MCP-1
IL-3	VEGF	IL-5	IL-8	IL-6	MCP-1	IL-7	MGSA
IL-3	IL-8	IL-5	MCP-1	IL-6	MGSA	IL-7	PGE-2
IL-3	MCP-1	IL-5	MGSA	IL-6	PGE-2	IL-7	RANTES
IL-3	MGSA	IL-5	PGE-2	IL-6	RANTES	IL-7	MIF
IL-3	PGE-2	IL-5	RANTES	IL-6	MIF	IL-7	GRO- α
IL-3	RANTES	IL-5	MIF	IL-6	GRO- α	IL-7	CRP
IL-3	MIF	IL-5	GRO- α	IL-6	CRP	IL-7	DDT
IL-3	GRO- α	IL-5	CRP	IL-6	DDT		
IL-3	CRP	IL-5	DDT				
IL-3	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
IL-9	IP-10	IP-10	LIF	LIF	M-CSF	M-CSF	MIG
IL-9	LIF	IP-10	M-CSF	LIF	MIG	M-CSF	MIP-1 α
IL-9	M-CSF	IP-10	MIG	LIF	MIP-1 α	M-CSF	MIP-1 β
IL-9	MIG	IP-10	MIP-1 α	LIF	MIP-1 β	M-CSF	PDGF-BB
IL-9	MIP-1 α	IP-10	MIP-1 β	LIF	PDGF-BB	M-CSF	SDF-1 α
IL-9	MIP-1 β	IP-10	PDGF-BB	LIF	SDF-1 α	M-CSF	TNF- α
IL-9	PDGF-BB	IP-10	SDF-1 α	LIF	TNF- α	M-CSF	TNF- β
IL-9	SDF-1 α	IP-10	TNF- α	LIF	TNF- β	M-CSF	TRAIL
IL-9	TNF- α	IP-10	TNF- β	LIF	TRAIL	M-CSF	VEGF
IL-9	TNF- β	IP-10	TRAIL	LIF	VEGF	M-CSF	IL-8
IL-9	TRAIL	IP-10	VEGF	LIF	IL-8	M-CSF	MCP-1
IL-9	VEGF	IP-10	IL-8	LIF	MCP-1	M-CSF	MGSA

10

20

30

40

IL-9	IL-8	IP-10	MCP-1	LIF	MGSA	M-CSF	PGE-2
IL-9	MCP-1	IP-10	MGSA	LIF	PGE-2	M-CSF	RANTES
IL-9	MGSA	IP-10	PGE-2	LIF	RANTES	M-CSF	MIF
IL-9	PGE-2	IP-10	RANTES	LIF	MIF	M-CSF	CRP
IL-9	RANTES	IP-10	MIF	LIF	GRO- α	M-CSF	DDT
IL-9	MIF	IP-10	GRO- α	LIF	CRP		
IL-9	GRO- α	IP-10	CRP	LIF	DDT		
IL-9	CRP	IP-10	DDT				
IL-9	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
MIG	MIP-1 α	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 β	PDGF-BB	PDGF-BB	SDF-1 α
MIG	MIP-1 β	MIP-1 α	PDGF-BB	MIP-1 β	SDF-1 α	PDGF-BB	TNF- α
MIG	PDGF-BB	MIP-1 α	SDF-1 α	MIP-1 β	TNF- α	PDGF-BB	TNF- β
MIG	SDF-1 α	MIP-1 α	TNF- α	MIP-1 β	TNF- β	PDGF-BB	TRAIL
MIG	TNF- α	MIP-1 α	TNF- β	MIP-1 β	TRAIL	PDGF-BB	VEGF
MIG	TNF- β	MIP-1 α	TRAIL	MIP-1 β	VEGF	PDGF-BB	IL-8
MIG	TRAIL	MIP-1 α	VEGF	MIP-1 β	IL-8	PDGF-BB	MCP-1
MIG	VEGF	MIP-1 α	IL-8	MIP-1 β	MCP-1	PDGF-BB	MGSA
MIG	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	MGSA	PDGF-BB	PGE-2
MIG	MCP-1	MIP-1 α	MGSA	MIP-1 β	PGE-2	PDGF-BB	RANTES
MIG	MGSA	MIP-1 α	PGE-2	MIP-1 β	RANTES	PDGF-BB	MIF
MIG	PGE-2	MIP-1 α	RANTES	MIP-1 β	MIF	PDGF-BB	GRO- α
MIG	RANTES	MIP-1 α	MIF	MIP-1 β	GRO- α	PDGF-BB	CRP
MIG	MIF	MIP-1 α	GRO- α	MIP-1 β	CRP	PDGF-BB	DDT
MIG	GRO- α	MIP-1 α	CRP	MIP-1 β	DDT		
MIG	CRP	MIP-1 α	DDT				
MIG	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
SDF-1 α	TNF- α	TNF- α	TNF- β	TNF- β	TRAIL	TRAIL	VEGF
SDF-1 α	TNF- β	TNF- α	TRAIL	TNF- β	VEGF	TRAIL	IL-8
SDF-1 α	TRAIL	TNF- α	VEGF	TNF- β	IL-8	TRAIL	MCP-1
SDF-1 α	VEGF	TNF- α	IL-8	TNF- β	MCP-1	TRAIL	MGSA
SDF-1 α	IL-8	TNF- α	MCP-1	TNF- β	MGSA	TRAIL	PGE-2
SDF-1 α	MCP-1	TNF- α	MGSA	TNF- β	PGE-2	TRAIL	RANTES
SDF-1 α	MGSA	TNF- α	PGE-2	TNF- β	RANTES	TRAIL	MIF
SDF-1 α	PGE-2	TNF- α	RANTES	TNF- β	MIF	TRAIL	GRO- α
SDF-1 α	RANTES	TNF- α	MIF	TNF- β	GRO- α	TRAIL	CRP
SDF-1 α	MIF	TNF- α	GRO- α	TNF- β	CRP	TRAIL	DDT
SDF-1 α	GRO- α	TNF- α	CRP	TNF- β	DDT		
SDF-1 α	CRP	TNF- α	DDT				
SDF-1 α	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
VEGF	IL-8	IL-8	MCP-1	MCP-1	MGSA	MGSA	PGE-2
VEGF	MCP-1	IL-8	MGSA	MCP-1	PGE-2	MGSA	RANTES
VEGF	MGSA	IL-8	PGE-2	MCP-1	RANTES	MGSA	MIF
VEGF	PGE-2	IL-8	RANTES	MCP-1	MIF	MGSA	GRO- α
VEGF	RANTES	IL-8	MIF	MCP-1	GRO- α	MGSA	CRP
VEGF	MIF	IL-8	GRO- α	MCP-1	CRP	MGSA	DDT
VEGF	GRO- α	IL-8	CRP	MCP-1	DDT		
VEGF	CRP	IL-8	DDT				
VEGF	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2	タンパク質#1	タンパク質#2
PGE-2	RANTES	RANTES	MIF	MIF	GRO- α	GRO- α	CRP
PGE-2	MIF	RANTES	GRO- α	MIF	CRP	GRO- α	DDT
PGE-2	GRO- α	RANTES	CRP	MIF	DDT		
PGE-2	CRP	RANTES	DDT				
PGE-2	DDT						
タンパク質#1	タンパク質#2						
CRP	DDT						

【 0 1 4 2 】

ある実施態様において、1種以上、2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上、8種以上、9種以上、10種以上、11種以上、12種以上、13種以上、14種以上、15種

10

20

30

40

50

【 0 1 4 3 】

50

る。他の実施態様において、赤血球濃縮試料中で、19種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は19種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は19種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、20種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は20種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は20種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、21種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は21種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は21種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、22種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は22種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は22種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、23種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は23種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は23種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、24種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は24種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は24種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、25種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は25種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は25種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、26種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は26種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は26種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、27種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は27種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は27種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、28種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は28種以上のタンパク質のレベルもしくはレベルの変化が測定されるか、28種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は28種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、29種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は29種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は29種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。さらに他の実施態様において、赤血球濃縮試料又は赤血球成分から、30種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は30種以上のタンパク質のレベルが測定されるか、又は30種以上のタンパク質のレベルの変化が測定される。

【0144】

タンパク質プロファイルは、例えば、本開示の方法の1つ又は複数に従って調製される溶解物、細胞洗浄液、細胞上清、又はこれらの組合せにおける1種以上のタンパク質の存在を検出することにより、作成又は生成することができる。検出されたタンパク質を定量(例えば、レベルを測定)して、タンパク質プロファイルを作成又は生成することができる。他の実施態様において、タンパク質プロファイルは、1種以上のタンパク質のレベルの変化を測定することにより、本明細書に提供される方法に従って作成することができ、この場合、該タンパク質プロファイルは、レベルの変化を有する1種以上のタンパク質及び/又は1種以上のタンパク質のレベルの変化の測定値を含み得る。

【0145】

単一の又は混合された血液細胞集団及び血漿/血清中のタンパク質の検出及び/又は定量的方法は、当業者に利用可能である。好適な方法の非限定的な例としては、抗体ベースの方法、一般的に、フローサイトメトリー、ELISA、ラテラルフロー、免疫染色、免疫蛍光、免疫電気泳動(例えば、ウェスタンブロットを含む)などが挙げられる。或いは、タンパク質は、質量分析、分光法、クロマトグラフィー、電気泳動、ビシンコニン酸アッセイ(BCA)、酵素アッセイなどを用いて検出及び/又は定量することができる。ここでもほんの一例として、タンパク質定量法は、米国特許第7,501,286号、第8,530,182号、及び米国特許公開第2013028838号に記載されている。方法は、本明細書の実施例にも提示されている。

【0146】

本開示は、血漿中の同じ1種以上のタンパク質のレベルに対する赤血球中の1種以上のタンパク質のレベルを含むタンパク質比を計算することにより、赤血球濃縮試料又は赤血球成分からタンパク質プロファイルを作成する方法も提供する。該タンパク質比は、RBC及び血漿中の測定されたタンパク質濃度を標準化し、その後、RBC中のタンパク質の濃度を血漿中のタンパク質の濃度で割ることにより計算することができる。RBC及び血漿中のタンパク質の濃度は、全血中の1ミリリットル当たりのそれらの相対濃度(例えば、全血中の%)を計算することにより標準化される。

【0147】

ある実施態様において、血漿中の1種以上のタンパク質のレベルに対する赤血球中の1種以上のタンパク質のレベルを含むタンパク質比は、少なくとも2:1、少なくとも10:1、少なくとも20:1、少なくとも30:1、少なくとも40:1、少なくとも50:1、少なくとも60:1、少なくとも70:1、少なくとも80:1、少なくとも90:1、少なくとも100:1、少なくとも110:1、少なくとも120:1、少なくとも130:1、少なくとも140:1、少なくとも150:1、少なくとも160:1、少なくとも170:1、少なくとも180:1、少なくとも190:1、又は少なくとも200:1である。他の実施態様において、該タンパク質比は、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも11:1、少なくとも12:1、少なくとも13:1、少なくとも14:1、少なくとも15:1、少なくとも16:1、少なくとも17:1、少なくとも18:1、少なくとも19:1、少なくとも20:1、少なくとも21:1、少なくとも22:1、少なくとも23:1、少なくとも24:1、少なくとも25:1、少なくとも26:1、少なくとも27:1、少なくとも28:1、少なくとも29:1、少なくとも30:1、少なくとも31:1、少なくとも32:1、少なくとも33:1、少なくとも34:1、少なくとも35:1、少なくとも36:1、少なくとも37:1、少なくとも38:1、少なくとも39:1、又は少なくとも40:1である。

【0148】

(疾患のプロファイリング及び評価)

本開示は、血液試料(例えば、全血試料又は赤血球濃縮血液試料又は赤血球濃縮画分)の疾患タンパク質プロファイルを作成するための本明細書における方法を提供する。ある実施態様において、疾患プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない試料と比較した、プロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球濃縮試料又は赤血球成分と関連する1種以上のタンパク質の存在及び/又はレベルに差がある疾患又は障害について作成することができる。その代わりに又はそれに加えて、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象由来の赤血球濃縮試料又は赤血球成分(例えば、プロテアーゼインヒビターと接触させた試料)と比較した、疾患又は障害を有する対象由来のプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球濃縮試料又は赤血球成分と関連する1種以上のタンパク質の存在及び/又はレベルに差がある疾患又は障害について作成することができる。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する対象のタンパク質プロファイル由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と疾患又は障害を有さない対象のタンパク質プロファイル由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化に差がある疾患又は障害について作成することができる。非限定的な例として、疾患プロファイルは、表1に記載されているタンパク質の1つもしくは複数、又は表2に記載されているタンパク質の1以上の組合せの存在又はレベルに差がある疾患又は障害について作成することができる。

【0149】

ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する1以上の対象から本明細書に提供される方法に従って少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること並びにプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化とプロテアーゼインヒビターと接触させていない赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化を比較することにより作成される。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、本方法に従って疾患又は障害を有さない1以上の対象から少なくとも1つのタンパク質プロ

ファイルを得ること及び疾患又は障害を有する1以上の対象から本方法に従って得られる少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の1種以上のタンパク質の存在又はレベルを比較することにより作成される。ある実施態様において、少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する対象から得られる。他の実施態様において、少なくとも1つのプロファイルは、疾患又は障害を有さない対象から得られる。さらなる実施態様において、少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する対象から得られ、少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象から得られる。他の実施態様において、血液試料は、疾患又は障害を有する1以上の対象から採取され、プールされる。他の実施態様において、血液試料は、疾患又は障害を有さない1以上の対象から採取され、プールされる。タンパク質プロファイルは、疾患もしくは障害を有する1以上の対象、及び/又は疾患もしくは障害を有さない1以上の対象のプール血液試料から本方法に従って得ることができる。タンパク質プロファイルは、疾患タンパク質プロファイルを含むタンパク質を決定する前の時点で、該タンパク質プロファイル中の1種以上のタンパク質の存在又はレベルを比較することにより得ることができる。

10

【0150】

いくつかの実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の赤血球濃縮試料又は赤血球成分と比較して、プロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の赤血球濃縮試料又は赤血球成分中で異なる存在、レベル、又はレベルの変化を有する1種以上のタンパク質から構成される。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、本方法に従って作成され、かつ疾患又は障害を有さない対象由来の赤血球濃縮試料又は赤血球成分と比較して、疾患又は障害を有する対象由来の赤血球濃縮試料又は赤血球成分中で異なる存在、レベル、又はレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む。当業者は、タンパク質の存在及び/又はレベルの統計的に関連性のある差を決定する解析を用いて、タンパク質が異なる(例えば、変化した(changed)もしくは変化した(altered))存在及び/もしくはレベル(例えば、より高いもしくはより低いレベル)、又は異なるレベルの変化(例えば、倍数変化)を有するかどうかを決定することができる。

20

【0151】

ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料中に存在しない、1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料(例えば、全血試料もしくは赤血球濃縮試料)又は赤血球成分中に存在する1種以上のタンパク質を含む。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料又は赤血球成分中に存在する、1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料又は赤血球成分中に存在しない1種以上のタンパク質を含む。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料又は赤血球成分と比較して、プロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料又は赤血球成分中でより高いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料と比較して、プロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料又は赤血球成分中でより低いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。

30

40

【0152】

さらに他の実施態様において、本方法に従って作成される疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象と比較して、疾患又は障害を有する対象において異なるレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む。他の実施態様において、疾患又は障害を有する対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化は、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの減少と比較したレベルの増加である。さらに他の実施態様において、疾患又は障害を有する対象における1種以上のタンパク質の

50

レベルの変化は、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの増加と比較したレベルの減少である。他の実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルの変化の増加又は減少の度合いは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化の増加又は減少の度合いと比較して、疾患又は障害を有する対象においてより大きい。他の実施態様において、1種以上のタンパク質のレベルの変化の増加又は減少の度合いは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化の増加の度合いと比較して、疾患又は障害を有する対象においてより小さい。他の実施態様において、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化と比較して、疾患又は障害を有する対象における1種以上のタンパク質のレベルの有意な変化はない。さらに他の実施態様において、疾患又は障害を有する対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化と比較して、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの有意な変化はない。

10

【0153】

他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、上記の組合せを含み一例えば、それは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料又は赤血球成分中の1種以上のタンパク質のレベルと比較して、プロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料又は赤血球成分中でより高いレベルを有する1種以上のタンパク質及びより低いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、プロテアーゼインヒビターと接触させていない対象由来の血液試料又は赤血球成分中の1種以上のタンパク質のレベルと比較して、プロテアーゼインヒビターと接触させた疾患又は障害を有する対象由来の血液試料又は赤血球成分中で異なるレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。

20

【0154】

他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する対象に存在するが、該疾患又は障害を有さない対象に存在しない1種以上のタンパク質を含む。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有する対象に存在しないが、該疾患又は障害を有さない対象に存在する1種以上のタンパク質を含む。いくつかの他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質と比較して、疾患又は障害を有する対象においてより高いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質と比較して、疾患又は障害を有する対象においてより低いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、上記の組合せ一例えば、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質と比較して、疾患又は障害を有する対象においてより高いレベルを有する1種以上のタンパク質及びより低いレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質と比較して、疾患又は障害を有する対象において異なるレベルを有する1種以上のタンパク質を含む。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、疾患又は障害を有さない対象における1種以上のタンパク質のレベルの変化と比較して、疾患又は障害を有する対象において異なるレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む。

30

40

【0155】

ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルは、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSG、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癰前症タンパク質プロファイルである。

【0156】

本開示は、本明細書に提供される方法によって作成される疾患タンパク質プロファイル

50

を用いて、対象が疾患又は障害を有するかどうかを決定する方法も提供する。本明細書に提供される方法のうちの1つによって作成された少なくとも1つのタンパク質プロファイルを対象から得ることができる。対象のタンパク質プロファイルは、2種のタンパク質プロファイル(例えば、タンパク質の存在、タンパク質レベル、又はタンパク質レベルの変化)の類似性について、本明細書に提供される方法によって作成される疾患タンパク質プロファイルと比較することができる。対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの類似性は、該対象が該疾患又は障害を有することを示し得る。ある実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質、少なくとも2種のタンパク質、少なくとも3種のタンパク質、少なくとも4種のタンパク質、少なくとも5種のタンパク質、少なくとも6種のタンパク質、少なくとも7種のタンパク質、少なくとも8種のタンパク質、少なくとも9種のタンパク質、少なくとも10種のタンパク質、少なくとも11種のタンパク質、少なくとも12種のタンパク質、少なくとも13種のタンパク質、少なくとも14種のタンパク質、少なくとも15種のタンパク質、少なくとも16種のタンパク質、少なくとも17種のタンパク質、少なくとも18種のタンパク質、少なくとも19種のタンパク質、少なくとも20種のタンパク質、少なくとも21種のタンパク質、少なくとも22種のタンパク質、少なくとも23種のタンパク質、少なくとも24種のタンパク質、少なくとも25種のタンパク質、少なくとも26種のタンパク質、少なくとも27種のタンパク質、少なくとも28種のタンパク質、少なくとも29種のタンパク質、又は少なくとも30種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質と比較して、対象のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも3種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも5種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも10種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも15種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも20種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、疾患タンパク質プロファイルと比較して、対象のタンパク質のプロファイル中の少なくとも30種のタンパク質に類似性がある。

10

20

30

【0157】

ある実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルは、同じ又は同様の存在、レベル、又はレベルの変化を有しており、対象が疾患又は障害を有し得ることを示している。1種以上のタンパク質の同じ又は実質的に同じレベル又はレベルの変化は、例えば、同じである(例えば、当業者によって決定されたとき、関連性のある統計解析の範囲内にある)タンパク質レベルから、例えば、統計解析又は閾値倍差により、当業者によって異なるものと決定されるよりも少ないタンパク質レベル(例えば、2倍未満異なるタンパク質レベル)の範囲に及び得る。いくつかの実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は同じである。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は実質的に同様である。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化の差は、当業者に利用可能な統計法(例えば、0.05以下のp-値を伴うスチューデントのT-検定)によって決定されたとき、実質的に同様である。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、当業者に利用可能であるか又は当業者によって決定される所定の参照範囲(例えば、健常な又は通常のタンパク質濃度範囲)との比較によって決定される。他の実施態様において

40

50

、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルは、0.5倍未満異なる。ある他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルは、1倍未満異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルは、1.5倍未満異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルは、2倍未満異なる。

【0158】

他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルは、タンパク質の異なる存在、レベル、又はレベルの変化を有しており、対象が疾患又は障害を有さないことを示す。ある実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルは、1種以上の異なるタンパク質を含む。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルは、1種以上のタンパク質の異なる又は実質的に異なるレベルを有する。1種以上のタンパク質の異なる又は実質的に異なるレベル又はレベルの変化は、例えば、異なる(例えば、当業者によって決定されたとき、関連性のある統計解析の範囲内でない)タンパク質レベルから、例えば、統計解析又は閾値倍差により、当業者によって同様であると決定されるよりも大きいタンパク質レベル(例えば、2倍よりも大きく異なるタンパク質レベル)の範囲に及び得る。いくつかの実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は実質的に異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化の差は、当業者に利用可能な統計法(例えば、0.05以上のp-値を伴うスチューデントのT-検定)によって決定されたとき、実質的に異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化の差は、当業者に利用可能であるか又は当業者によって決定される所定の参照範囲(例えば、健常な又は通常のタンパク質濃度範囲)との比較によって決定される。ある実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、0倍～5倍異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、0.5倍よりも大きく異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、1.0倍よりも大きく異なる。ある他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、1.5倍よりも大きく異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、2.0倍よりも大きく異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、2.5倍よりも大きく異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、3.0倍よりも大きく異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、3.5倍よりも大きく異なる。さらに他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、4.0倍よりも大きく異なる。さらなる実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、4.5倍よりも大きく異なる。他の実施態様において、対象のタンパク質プロファイルと疾患タンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、5.0倍よりも大きく異なる。

10

20

30

40

50

【0159】

(治療評価)

本開示は、本明細書に提供される方法によって作成されるタンパク質プロファイルを用いて、対象における治療をモニタリングする方法も提供する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法に従って作成されるタンパク質プロファイルは、治療前及び治療後の対象から得られ、該タンパク質プロファイルは、この2つの間の(例えば、タンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化の)差について比較される。他の実施態様において、本明細書に提供される方法によって作成されるタンパク質プロファイルは、治療前及び治療中の対象から得られ、該タンパク質プロファイルは、この2つの間の差について比較される。さらに他の実施態様において、本明細書に提供される方法によって作成されるタンパク質プロファイルは、治療中及び治療後の対象から得られ、該タンパク質プロファイルは、この2つの間の差について比較される。他の実施態様において、本明細書に提供される方法によって作成されるタンパク質プロファイルは、治療終了後及び後続の治療終了後の時点の対象から得られ、該タンパク質プロファイルは、この2つの間の差について比較される。

10

【0160】

ある実施態様において、治療を受けている対象は、1以上の治療又はいくつかの治療を受けていてもよい。他の実施態様において、該対象は、特定の治療を受けたことがあり、かつ/又は特定の治療を受けている。ある実施態様において、治療前に得られるタンパク質プロファイルは、治療を全く受けたことがない対象から得られてもよく、治療後の対象のタンパク質プロファイルと比較される。他の実施態様において、タンパク質プロファイルは、治療の過程で得られ、その場合、治療中のある時点で得られた対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療中の異なる時点で得られた対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される。ある実施態様において、治療前及び治療後のタンパク質プロファイルは、治療の過程で同じ治療を受けている対象から得られる。他の実施態様において、治療前及び治療後のタンパク質プロファイルは、治療の過程で異なる治療を受けている対象(例えば、治療を切り替えた対象)から得られる。治療後の対象のタンパク質プロファイルと比較した治療前に得られる対象のタンパク質プロファイル(例えば、タンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化)の差は、治療が対象に対する効果を有したことを示し得る。治療中の異なる時点で得られる対象のタンパク質プロファイルの差は、治療が対象に対する効果を有したことを示し得る。治療中及び治療後に得られる対象のタンパク質プロファイルの差は、治療が対象に対する効果を有したことを示し得る。

20

30

【0161】

ある実施態様において、治療前及び治療後のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質、少なくとも2種のタンパク質、少なくとも3種のタンパク質、少なくとも4種のタンパク質、少なくとも5種のタンパク質、少なくとも6種のタンパク質、少なくとも7種のタンパク質、少なくとも8種のタンパク質、少なくとも9種のタンパク質、少なくとも10種のタンパク質、少なくとも11種のタンパク質、少なくとも12種のタンパク質、少なくとも13種のタンパク質、少なくとも14種のタンパク質、少なくとも15種のタンパク質、少なくとも16種のタンパク質、少なくとも17種のタンパク質、少なくとも18種のタンパク質、少なくとも19種のタンパク質、少なくとも20種のタンパク質、少なくとも21種のタンパク質、少なくとも22種のタンパク質、少なくとも23種のタンパク質、少なくとも24種のタンパク質、少なくとも25種のタンパク質、少なくとも26種のタンパク質、少なくとも27種のタンパク質、少なくとも28種のタンパク質、少なくとも29種のタンパク質、又は少なくとも30種のタンパク質に差がある。

40

【0162】

ある実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも3種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク

50

質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも5種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも10種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも15種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも20種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療前のタンパク質プロファイル中の少なくとも30種のタンパク質に差がある。ある実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも3種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも5種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも10種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも15種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも20種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療中の別の時点のタンパク質プロファイルと比較した治療中のある時点のタンパク質プロファイル中の少なくとも30種のタンパク質に差がある。ある他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも3種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも5種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも10種のタンパク質に差がある。さらに他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも15種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも20種のタンパク質に差がある。他の実施態様において、治療後のタンパク質プロファイルと比較した治療中のタンパク質プロファイル中の少なくとも30種のタンパク質に差がある。

10

20

30

【0163】

ある実施態様において、治療前に得られる対象のタンパク質プロファイルは、治療後に得られるタンパク質プロファイルと異なるタンパク質を含み、治療が対象に対する効果を有した可能性があることを示す。他の実施態様において、治療前に得られる対象のタンパク質プロファイルは、治療後に得られるタンパク質プロファイルと比較して、1種以上のタンパク質の異なるレベルを有し、治療が対象に対する効果を有した可能性があることを示す。1種以上のタンパク質のレベルの差は、先に記載されているように、当業者によって適切に決定されることができる(例えば、統計解析を用いて、又はタンパク質レベルを測定及び比較して、タンパク質の存在又はレベルの統計的に有意な差を決定する)。1種以上のタンパク質の異なるレベルは、例えば、1倍差よりも大きいレベルを含み得る。ある実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、1倍超、1.5倍超、2倍超、2.5倍超、3倍超、3.5倍超、4倍超、4.5倍超、5倍超、5.5倍超、6倍超、6.5倍超、7倍超、7.5倍超、8倍超、8.5倍超、9倍超、9.5倍超、又は10倍超である。いくつかの実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、1.5倍超である。他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質

40

50

のレベルの差は、2倍超である。他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、2.5倍超である。さらに他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、3倍超である。さらに他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、4倍超である。他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、5倍超である。他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、6倍超である。さらに他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、7倍超である。他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、8倍超である。さらに他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、9倍超である。さらに他の実施態様において、治療前及び治療後の対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベルの差は、10倍超である。

10

【0164】

ある実施態様において、対象の治療をモニタリングするために、少量の血液試料を採取して、治療前及び治療後のタンパク質プロファイルを作成する。少量の血液試料は、対象から頻繁にサンプリングすることを可能にし、結果的に、これまで達成できなかった頻度での治療モニタリングを可能にする。いくつかの実施態様において、少量の血液試料は、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、又は1日に5回以上の頻度で採取することができる。他の実施態様において、少量の血液試料は、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、又は1週間に7回以上採取される。他の実施態様において、少量の血液試料は、毎日採取される。さらに他の実施態様において、少量の血液試料は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は4週間に1回採取される。ある実施態様において、少量の血液試料は、1カ月に1回採取される。

20

【0165】

本開示は、本明細書に提供される方法によって作成されるタンパク質プロファイルを用いて、対象における治療の有効性を決定する方法も提供する。ある実施態様において、少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療を受けた対象から得られる。他の実施態様において、少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療を受けていない対象から得られ、治療を受けた対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルは、治療を受けていない対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される。他の実施態様において、該タンパク質プロファイルは、治療を受けていない1以上の対象から採取される血液試料を用いて作成され、該血液試料はプールされる。他の実施態様において、タンパク質プロファイルは、治療を受けた対象から採取される1以上の血液試料を用いて作成され、血液試料はプールされる。タンパク質プロファイルは、治療を受けていない1以上の対象のプール血液試料及び/又は治療を受けていない対象由来の1以上の血液試料から作成することができる。他の実施態様において、1以上のタンパク質プロファイルは、治療を受けていない1以上の対象から得られ、かつ/又は1種以上のタンパク質プロファイルは、治療を受けた対象から得られ、かつ統計解析は、当技術分野で利用可能な手段によって実施されて、(存在及び/もしくはレベルの統計的に有意な差によって)治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルを含むタンパク質を決定し、かつ/又は健常個体由来の参照範囲は、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと比較される。治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルは、これら2つのタンパク質プロファイルを比較する前の時点で作成することができる。

30

40

【0166】

治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルと比較した、治療を受けた対象のタンパク質プロファイル間の1種以上のタンパク質の存在、レベル、又はレベルの変化の類

50

似性は、治療の有効性を示し得る。ある実施態様において、少なくとも1種のタンパク質、少なくとも2種のタンパク質、少なくとも3種のタンパク質、少なくとも4種のタンパク質、少なくとも5種のタンパク質、少なくとも6種のタンパク質、少なくとも7種のタンパク質、少なくとも8種のタンパク質、少なくとも9種のタンパク質、少なくとも10種のタンパク質、少なくとも11種のタンパク質、少なくとも12種のタンパク質、少なくとも13種のタンパク質、少なくとも14種のタンパク質、少なくとも15種のタンパク質、少なくとも16種のタンパク質、少なくとも17種のタンパク質、少なくとも18種のタンパク質、少なくとも19種のタンパク質、少なくとも20種のタンパク質、少なくとも21種のタンパク質、少なくとも22種のタンパク質、少なくとも23種のタンパク質、少なくとも24種のタンパク質、少なくとも25種のタンパク質、少なくとも26種のタンパク質、少なくとも27種のタンパク質、少なくとも28種のタンパク質、少なくとも29種のタンパク質、又は少なくとも30種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、少なくとも1種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、少なくとも3種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、少なくとも5種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、少なくとも10種のタンパク質に類似性がある。さらに他の実施態様において、少なくとも15種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、少なくとも20種のタンパク質に類似性がある。他の実施態様において、少なくとも30種のタンパク質に類似性がある。

10

【0167】

ある実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルは、存在する同じ1種以上のタンパク質を有し、治療が有効であった可能性があることを示す。他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルは、1種以上のタンパク質の同じ又は実質的に同様のレベル又はレベルの変化を有し、治療が有効であった可能性があることを示す。1種以上のタンパク質の同じ又は実質的に同様のレベル又はレベルの変化には、例えば、同じである(例えば、当業者によって決定されたとき、関連性のある統計解析の範囲内にある)タンパク質のレベル又はレベルの変化から、当業者によって、例えば、統計解析又は所定の閾値倍差(例えば、2倍未満の差)により、十分に異なると決定されるタンパク質レベルが含まれ得る。いくつかの実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は同じである。さらに他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は実質的に同様である。他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質レベル又はレベルの変化の差は、当業者に利用可能な統計法(例えば、0.05以下のp-値を伴うスチューデントのT-検定)によって決定される。さらに他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化の差は、当業者に利用可能であるか又は当業者によって決定される所定の参照範囲(例えば、健常な又は通常の濃度範囲)との比較によって決定される。他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、0.5倍未満異なる。他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、1倍未満異なる。さらに他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、1.5倍未満異なる。さらに他の実施態様において、治療を受けた対象のタンパク質プロファイルと治療を受けていない対象のタンパク質プロファイルの1種以上のタンパク質のレベル又はレベルの変化は、2倍未満異なる。

20

30

40

50

【0168】

(対象)

ある実施態様は、対象由来の血液試料又はその成分のタンパク質プロファイルを決定することに関する。

【0169】

対象は、血液が赤血球を含む動物(例えば、哺乳動物、鳥、魚、爬虫類、又は両生類)であり得る。好適な対象の非限定的な例としては、ウシ、ウマ、ヒツジ、霊長類、鳥類、及び齧歯類種が挙げられる。それゆえ、いくつかの実施態様において、対象は、ヒト又は非ヒト動物であり得る。他の実施態様において、対象は、マウス、ラット、ハムスター、フェレット、アレチネズミ、ウサギ、サル、チンパンジー、ウマ、ポニー、ロバ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、ネコ、又はイヌであり得る。

10

【0170】

(キット)

本開示は、本明細書に記載される方法を実施するために必要な構成要素を含むキットも提供する。

【0171】

非限定的な例として、該キットは:血液の収集、プロテアーゼの阻害、血液凝固の防止、血液の安定化、RBCの濃縮、赤血球成分の採取、非RBC血液成分の除去/分離、血液又はその成分の瞬間凍結、細胞の溶解、細胞の洗浄、細胞の培養、細胞内及び/もしくは細胞外での特定の標的タンパク質の検出、特定のタンパク質のレベルの測定、並びに/又はこれらの組合せのための手段を含み得る。ある実施態様において、該キットは、血液試料を白血球除去し、赤血球濃縮試料を産生するための少なくとも1つの試薬及び少量の赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための少なくとも1つの試薬を含む。ある実施態様において、1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬は、ELISA装置である。他の実施態様において、該キットは、対象から血液試料を採取するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。

20

【0172】

いくつかの実施態様において、本開示によるキットは、以下のもの:対象から血液試料を採取するための装置(例えば、シリンジ、針、翼状針、チューブ、針ホルダー、採血セット、輸送装置、バキュテナー、hemaPEN(商標))、対象から乾燥血液試料を採取するための装置(例えば、濾紙、カード、HemaSpot(商標));液体血液試料から赤血球画分、白血球画分、及び/又は血小板画分を採取するための装置(例えば、抗体がコーティングされた磁気ビーズ);プロテアーゼインヒビター;抗凝固剤;タンパク質変性剤;など並びにこれらの組合せのうちの1つ又は複数を含み得る。

30

【実施例】

【0173】

(実施例)

これから、本開示を、限定するものと決してみなされるべきではない、具体的な実施例を参照しながら説明することにする。

40

【0174】

(実施例1.わずかな血液量でのタンパク質レベルの測定)

血漿中の相当量でのそのレベルと比較した赤血球中の高レベルの様々なタンパク質の発見により、例えば、少量の全血及び/又はRBCを用いて、タンパク質マーカーを同定することができることが示唆された。数多くのタンパク質のレベルを少量の全血及びRBCで解析した。

【0175】

全血を、指穿刺により、健常ボランティア(n=1)から、EDTA溶液(3mg/mL)中に直接収集した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を-80℃で保存し、-80℃で3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。赤血球を3

50

回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。溶解後、全血を、5 μ Lの全血(45 μ LのPBS中)、10 μ Lの全血(40 μ LのPBS中)、15 μ Lの全血(35 μ LのPBS中)、20 μ Lの全血(30 μ LのPBS中)、又は25 μ Lの全血(25 μ LのPBS中)でのマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

10

【0176】

様々な希釈(1:10、1:5、1:3.3、1:2.5、1:2)の全血中の表示されたタンパク質の濃度が図1A~1TTに示されている(未希釈の濃度に計算し直されている)。全血の解析により、いくつかのタンパク質が存在すること、及びこれらのタンパク質が様々な希釈でも存在することが明らかになった。しかしながら、解析されたタンパク質の多くについて、希釈線形性はなかった。これは、全血に特有のものではなく; BioPlexなどのLuminexプラットフォームでの血漿の解析においても観察される(希釈によって、より多くのタンパク質が通常検出される)。これらの結果は、タンパク質を(5 μ Lに至るまでの)少量の全血でモニタリングすることができることを示している。全血中の数多くのタンパク質の検出の容易さは、(例えば、指先から採取される)非常にわずかな血液量をタンパク質レベルの解析用に収集し、使用することができることを示している。

20

【0177】

(実施例2. 指先血試料と静脈血試料中のタンパク質の存在)

わずかな血液量でのタンパク質の検出をさらに調べるために、指穿刺での数多くのタンパク質のレベルを、利用可能な方法によって収集された静脈血でのそのレベルと比較した。

30

【0178】

全血を、健常ボランティアから、静脈穿刺によるか又は指穿刺によって($n > 12$)、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)又はEDTA溶液(3mg/mL)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を-80 $^{\circ}$ Cで保存し、-80 $^{\circ}$ Cでの3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。血漿及び赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を収集した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。この後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で2回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数し(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)、その後、解析まで凍結させた(-80 $^{\circ}$ C)。

40

【0179】

赤血球を3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。溶解後、赤血球溶解物を4億細胞/mL相当までPBSに希釈した。その後、これらの溶解物をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。1つのマルチプレックスアッセイを利用

50

した。これは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネル(Bio-Plex Pro 27-プレックス、Bio-Rad)であった。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0180】

静脈血及び指先血から単離された血漿、又は静脈血及び指先血から単離された赤血球の溶解物中の表示されたタンパク質の濃度は、図2A～2AAに示されている。有意差($p < 0.05$)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。指先血と静脈血を比較したとき、血漿中のタンパク質のレベルと赤血球中のタンパク質のレベルの間に一貫した傾向があった。例えば、IL-6の濃度は、静脈血漿中の濃度とは対照的に、指先から単離された血漿中で有意により高い濃度であった。この同じ傾向は、赤血球で観察され、有意により高いレベルのタンパク質が指先血から単離された細胞で観察された。この傾向は、例えば、IL-2、RANTES、及びIP-10を含む、いくつかのタンパク質について観察された。例えば、IL-1 β 、IL-8、及びTNF- α を含む、いくつかのタンパク質について、より高い濃度が、指先血から単離された血漿及び赤血球中で観察された。

【0181】

赤血球について、生物学的変動(標準偏差)は、静脈試料よりも指先試料で小さかった(例えば、MIP-1 β 、G-CSF)。これは、指先から収集された赤血球の解析が静脈血の解析よりも再現性が高いことを示唆した。正反対のことが、血漿中のいくつかのタンパク質について観察され、この場合、静脈血漿は指先血よりも変動が小さかった(例えば、IL-7、PDGF-bb)。これらの結果は、頻繁な血液収集を使用し得る、指先由来の赤血球の単離及び解析の正当性を裏付けた。

【0182】

(実施例3. カチオン塩を用いるRBCにおけるタンパク質プロファイル)

赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。この後、上部の白血球に富む層及び下部の赤血球画分を分離し、白血球を廃棄した。下部の赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で2回洗浄した。上清を廃棄し、赤血球ペレットをPBS又は100mM LiClを含有するPBSのいずれかに再懸濁させた。

【0183】

赤血球を3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。溶解後、赤血球溶解物を4億細胞/mL相当までPBSに希釈した。赤血球溶解物を、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネル(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)で解析した。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0184】

図3A～図3Gに見られるように、塩化リチウムは、該アッセイで該タンパク質のうちのい

10

20

30

40

50

くつかのレベルを増大させ、かつ/又は増強した。

【0185】

(実施例4. 子癇前症又は癌を有する個体と比べた健常個体由来のRBCにおけるタンパク質プロファイル)

疾患又は障害を有する個体と比較した健常個体の血液中のタンパク質のレベルの差を測定した。全血を：1) 健常ボランティア、2) 健常妊婦、3) 子癇前症妊婦、及び4) 癌患者を含む、4群の人々から収集した(表1参照)。健常妊娠対照を、妊娠期間に応じて、子癇前症試料とマッチさせた。血液を、各々のボランティアから、静脈穿刺($n \geq 3$)によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。

(表1. 参加者の概要)

【表3】

対象	疾病	関連情報
OBS-101	リンパ腫	化学療法及び放射線療法
OBS-102	リンパ腫	化学療法
OBS-103	癌(具体的な型は不明)	化学療法
PE-001	子癇前症	第3期
PE-002	子癇前症	第3期
PE-003	子癇前症	第3期

【0186】

血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を -80°C で保存し、 -80°C での3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。

【0187】

血漿及び赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を収集した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。この後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で2回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数し(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)、その後、解析まで凍結させた(-80°C)。

【0188】

赤血球を3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。溶解後、赤血球溶解物を4億細胞/mL相当までPBSに希釈した。その後、これらの溶解物及び血漿試料(未希釈)をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャーソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA

)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0189】

図4A～図4VVは、全血(約 5×10^9 細胞/mL) 1mL当たりの相対濃度に計算し直した参加者の群由来の血漿及び赤血球(4億細胞/mL)の溶解物中の表示されたタンパク質の濃度を示している。有意差($p < 0.05$)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。健常(非妊娠)個体の血液中のタンパク質レベルを癌患者と比較し、健常妊娠個体の血液中のタンパク質レベルを子癇前症の妊娠個体の血液中のタンパク質レベルと比較した。図5A～図5Cは、血漿と対比した赤血球中のタンパク質の濃度の倍数差を示している。

【0190】

タンパク質の収集物において、健常対照個体におけるタンパク質レベルと疾患又は障害を有する個体におけるタンパク質レベルの間に有意差があった。例えば、IL-2は、健常群中よりも癌群から収集された赤血球中で有意に少なく(約10倍少なく)、ケモカインCTACKは、健常妊娠群よりも子癇前症群から収集された赤血球中で有意に多かった。さらに、48種のサイトカインのうちの28種は、血漿レベルを実質的に超える(2:1よりも大きい)RBC中のタンパク質のレベルを有し、倍数変化は2:1から～280:1(RBC:血漿比)の範囲に及んだ。中央値RBC-血漿比は5.9:1であった。試験の結果は、赤血球が、疾患のバイオマーカーを同定するための有用なツールであり得ることを示している。さらに、血漿と併せた赤血球の解析は、例えば、血漿単独でのタンパク質レベルには明らかな差がないが、赤血球(例えば、bFGF)で、又は赤血球と血漿の間で同定可能な差がある場合、現在取得不可能である病態に関するより多くの情報を提供し得る。

【0191】

(実施例5. 子癇前症又は癌を有する個体と比べた健常個体由来のRBCにおけるタンパク質プロファイル及びRBCタンパク質放出)

赤血球によって放出されるタンパク質のレベルを、健常個体及び疾患又は障害を有する個体で評価した。全血を：1) 健常ボランティア、2) 健常妊婦、3) 子癇前症妊婦、及び4) 癌患者を含む、4群の人々から収集した(表2)。

(表2. 参加者の概要)

【表4】

対象	疾病	関連情報
OBS-101	リンパ腫	化学療法及び放射線療法
OBS-102	リンパ腫	化学療法
OBS-103	癌(具体的な型は不明)	化学療法
PE-001	子癇前症	第3期
PE-002	子癇前症	第3期
PE-003	子癇前症	第3期

【0192】

健常な妊娠対照試料を、妊娠期間に応じて、子癇前症試料とマッチさせた。血液を、各々のボランティアから、静脈穿刺($n \geq 3$)によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を -80°C で保存し、 -80°C での3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。

【0193】

赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のため

に、この溶液を室温で30分間放置した。この後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で2回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数した(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。その後、赤血球を4億細胞/mLまでPBSに希釈し、37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートした。インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離(500g、5分)により単離した。試料を-80℃で保存し、解析前に3回の凍結/解凍サイクルを受けさせた。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、製造元の指示に従って、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0194】

図6A～図6RRは、参加者群由来の赤血球馴化PBS中の表示されたタンパク質の濃度を示している。馴化PBSは、37℃で24時間の赤血球インキュベーションの後に産生された。有意差(p<0.05)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。健常対照個体と疾患群の個体のタンパク質レベルに有意差があった。例えば、健常対照と比較したとき、健常個体よりも有意に少ないIL-1 α 及びGCS-Fが、癌を有する人々から単離された赤血球から放出され、健常個体よりも有意に多いIL-12(p40)及びエオタキシンが、癌患者から単離された赤血球から放出された。同様に、少数のサイトカイン、例えば、MIFは、健常妊娠群と子癩前症を有する群の間で有意に異なっていた。

【0195】

これらの結果は、赤血球のセクレトームの解析が疾患のバイオマーカーを同定及び追跡するための有用な診断ツールであり得ることを示唆した。赤血球の分泌(赤血球タンパク質放出)の解析は、病態に関するさらなる情報を提供し得る。

【0196】

(実施例6. RBC中に存在するタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターの効果)

全血を静脈収集によってEDTAバキューテナー中に収集した。血漿を遠心分離後に収集し、上記のようにFACS又はデキストラン沈降のどちらかを用いて、細胞を単離した。単離された細胞及び全血を遠心分離(2000g、10分)によってペレット化し、規定の濃度にまで再懸濁させた。試料を-80℃で凍結させ、凍結/解凍サイクルに3回供して、細胞を溶解させた。試料をHu 27-プレックスBioPlexで解析した。さらに、RBCによって放出又は分泌されたタンパク質を解析した。先に記載されているように、全血を静脈収集によってEDTAバキューテナー中に収集し、RBCをデキストラン沈降によって単離した。単離されたRBCを分注して、100uLのPBS又はPBS+プロテアーゼインヒビター(PI)(1 $\times$)中、2000万細胞にし、細胞を、37℃、5%CO₂で、24時間インキュベートした。インキュベーション後、上清と細胞を遠心分離によって分離し、試料を-80℃で凍結させ、3回の凍結/解凍サイクルに供して、細胞を溶解させた。試料をHu 27-プレックスBioPlexで解析した。

【0197】

RBC培養中のプロテアーゼインヒビターの添加により、タンパク質の放出又は分泌が変化した(37℃で24時間)。

【0198】

インキュベーション条件は、次の通りであった：

1.RBC+PBS(100uLのPBS中、2000万個のRBC)

2.RBC+PBS+プロテアーゼインヒビター(PI)(100uLのPBS+PI中、2000万個のRBC)

【0199】

図7A~7Zに示された一連のグラフは、RBCから放出又は分泌されたタンパク質の濃度(黒色のカラム)及び放出又は分泌後に細胞に残存するタンパク質の濃度(灰色のカラム)に対するプロテアーゼインヒビター(PI)の効果を示している。培養溶液中のプロテアーゼインヒビターの包含の結果として、典型的には、放出又は分泌と細胞溶解物の両方について、検出濃度がより低くなったが、例外もあった(すなわち、MIP-1b)。データは、平均±標準偏差(SD)として提示されている。

【0200】

(実施例7.子癇前症又は癌を有する個体と比べた健常個体由来のRBC中のタンパク質レベルに対するプロテアーゼインヒビターの効果)

赤血球によって放出されるタンパク質のレベルを健常個体由来の赤血球及び疾患又は障害を有する個体由来の赤血球で評価した。全血を：1)健常ボランティア、2)健常妊婦、3)子癇前症妊婦、及び4)癌患者を含む、4群の人々から収集した(表3)。

(表3.参加者の概要)

【表5】

対象	疾病	関連情報
OBS-101	リンパ腫	化学療法及び放射線療法
OBS-102	リンパ腫	化学療法
OBS-103	癌(具体的な型は不明)	化学療法
PE-001	子癇前症	第3期
PE-002	子癇前症	第3期
PE-003	子癇前症	第3期

【0201】

健常な妊娠対照試料を、妊娠期間に応じて、子癇前症試料とマッチさせた。血液を、各々のボランティアから、静脈穿刺($n \geq 3$)によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を -80°C で保存し、 -80°C での3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。

【0202】

全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。その後、赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。この後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で2回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数した(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。その後、赤血球を4億細胞/mLまでPBSに希釈し、 37°C 及び5% CO_2 で24時間インキュベートした。

【0203】

1つの例において、全血試料を2つのアリコートに分け、1つのアリコートを、表4に示される各々の群(健常ボランティア、健常妊娠、子癇前症、癌)について、一晚のインキュベーションの間、プロテアーゼインヒビターカクテル(1×)のミニcompleteプロテアーゼインヒビターカクテル錠、Roche)で処理した。その後、赤血球を、デキストラン沈降を用いて、全血から単離した。別の例において、赤血球をデキストラン沈降によって全血からま

ず単離し、赤血球画分を2つのアリコートに分け、表4に示される各々の群(健常ボランティア、健常妊娠、子癇前症、癌)について、一晚のインキュベーションの間、プロテアーゼインヒビターカクテル(1×、ミニcOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテル錠、Roche)で処理した。

(表4.実験条件)

【表6】

RBC (2億細胞/mL)	PBS	プロテアーゼ インヒビター
条件1 (なし)	✓	×
条件2 (PI)	✓	✓

10

【0204】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離(500g、5分)により単離した。試料を-80℃で保存し、解析前に3回の凍結/解凍サイクルを受けさせた。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、製造元の指示に従って、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

20

【0205】

図8A～図8ZZ及び図9A～図9FFは、参加者群由来のプロテアーゼインヒビターの存在下又は非存在下のいずれかの赤血球馴化PBSにおける表示されたタンパク質の濃度を示している。馴化PBSは、37℃で24時間の赤血球インキュベーションの後に産生された。有意差($p < 0.05$)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。タンパク質レベルがプロテアーゼインヒビターの存在下で一般に減少する健常対象由来の血液試料(図7A～7Zを参照)とは対照的に、子癇前症又は癌を有する対象の血液試料をプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートしたとき、タンパク質のレベルは同様であるか又は増大する傾向があった。これらの結果は、どちらかの血液試料をプロテアーゼインヒビターと接触させ、かつタンパク質レベルの変化を検出/測定することにより、健常血液試料と罹患血液試料を識別し得ることを示唆している。

30

40

【0206】

図10A～図10D及び図11A～図11Dは、参加者群由来のプロテアーゼインヒビターの存在下又は非存在下のいずれかの赤血球馴化PBSにおけるサイトカイン解析の累積蛍光データ(log2)を示している。馴化PBSは、37℃で24時間の赤血球インキュベーションの後に産生された。有意差($p < 0.05$)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。これらのデータは、子癇前症の女性から単離された赤血球が、プロテアーゼインヒビターで処理したとき、それが存在しないときと比較して、有意により多いサイトカインを放出したことを示している(図10Cを参照)。比較すると、健常な妊娠していない参加者について(図10Aを参照)又は健常な妊娠している参加者について(図10Bを参照)、プロテアーゼインヒビターありの場合とプロテアーゼインヒビターなしの場合で、有意差は観察されなかった。同様に、

50

健常な非妊娠個体と健常な妊娠個体の間で、プロテアーゼインヒビター処理によるサイトカインのレベルに有意差があり(図10B)、健常な参加者と癌患者の間に有意性の傾向があった(図11D)。これらの結果は、血液試料を処理するためのプロテアーゼインヒビターの使用が健常群と罹患群の識別に役立ち得るということを示唆している。

【0207】

(実施例8. 健常個体由来の赤血球由来のタンパク質に対する特定のプロテアーゼインヒビターの効果)

健常ボランティア由来の血液試料を用いて、赤血球由来のタンパク質に対する特定のプロテアーゼインヒビターの効果を評価した。全血を、健常ボランティアから、静脈穿刺($n \geq 3$)によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を -80°C で保存した。

【0208】

赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離($1500g$ 、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム($0.15M$)に再懸濁させた。その後、デキストラン($0.15M$ 塩化ナトリウム中、 $6\%w/v$)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。その後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、 $500g$ 、5分)中で1回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数した(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。その後、赤血球を4億細胞/mLまでPBSに希釈し、 37°C 及び $5\%CO_2$ で24時間インキュベートした。また、一部の試料を、PBSインキュベーション中、表5に示されたプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートした。

(表5. プロテアーゼインヒビター)

【表7】

試料ID	プロテアーゼインヒビター	濃度	特異性
1	なし	-	-
2	cOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)	1x	セリン、システイン、及びメタロプロテアーゼ
3	アンチパイン二塩酸塩	$50 \mu\text{g/mL}$	パパイン、トリプシン、カテプシンA及びB
4	ベスタチン	$40 \mu\text{g/mL}$	アミノペプチダーゼ
5	E-64	$10 \mu\text{g/mL}$	システインプロテアーゼ
6	ロイペプチン	$5 \mu\text{g/mL}$	セリン及びシステインプロテアーゼ
7	ペプスタチン	$0.7 \mu\text{g/mL}$	アスパラギン酸プロテアーゼ
8	ホスホラミドン	$330 \mu\text{g/mL}$	メタロエンドペプチダーゼ
9	Pefabloc SC	1 mg/mL	セリンプロテアーゼ
10	EDTA- Na_2	0.5 mg/mL	メタロプロテアーゼ
11	アプロチニン	$2 \mu\text{g/mL}$	セリンプロテアーゼ
12	A8127s プロテアーゼインヒビターカクテル	1x	セリン、システイン、及びアスパラギン酸プロテアーゼ、アミノペプチダーゼ、メタロプロテアーゼ

【0209】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離($500g$ 、5分)によって単離し、その後、 -80°C で保存した。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、I

L-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II、Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

10

【0210】

健常参加者由来のプロテアーゼインヒビターカクテル又は個々のプロテアーゼインヒビターとともに37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS中のタンパク質について、倍数変化を決定した。p<0.05の場合、値は、未処理の対照と有意に異なる(*は、p=0.05~0.01の場合；**は、p=0.01~0.001の場合；***は、p<0.001の場合)。1よりも大きい倍数変化を有する値は、タンパク質が、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされていないもの(対照)と比較して、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされた試料においてより高い濃度を有することを示し、1未満の倍数変化を有する値は、タンパク質が、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされた試料において、そうでないもの(対照)と比較してより低い濃度を有することを示した。有意差(p<0.05)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。

20

(表6. プロテアーゼインヒビターによる赤血球中のタンパク質の倍数変化)

【表 8】

タンパク質	プロテアーゼインヒビター試料ID									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
IFN- α 2	0.64**		3.81**	0.53*		0.46*				1.50*
IL-1 α	1.28***	1.43*		1.14*						
IL-18		2.01*	1.45**							
MIF	0.59***		0.83*	1.42**		1.39*			0.82*	0.77**
TNF- β	1.22***								0.93**	
TRAIL	1.45**		1.69*							
IL-2ra						0.81**				
CTACK		7.39*				1.61*		2.31*		
GRO-a	1.13**				1.08***					
IL-16						0.84*		0.59*		
MCP-3	1.83***	4.07*		1.24*						
MIG	1.07**									1.07*
SDF-1 α					1.55*					
HGF			9.10***	0.43**		0.47*				
IL-3	1.73***	6.06*				1.45*				
M-CSF	1.24**	2.35*								
β -NGF	1.13**			1.16*						
SCF	1.13***	2.55*								
IL-12p40	1.38***	2.17*	1.11*	1.34*						
LIF	1.09*									
IL-9							0.64**			
IL-15		3.85**								
IL-17	1.34**	3.50*								
IL-1ra										
IL-10				0.46*			0.50**		0.45*	1.32*
エオタキシン								0.63**		
MCP-1	0.93**			0.66*		0.81*			0.70*	
MIP-1 β		3.99*								
bFGF	1.16*									
G-CSF										1.66**
GM-CSF	1.20*	1.37*			1.07*					
VEGF				0.44*		0.47*	0.60**			
IL-2	1.40*	9.01*							0.06*	

【0211】

個々のプロテアーゼインヒビターの使用は、対照細胞(プロテアーゼインヒビターなし)と比較したとき、赤血球から放出される種々のサイトカインの濃度を変化させた(表6を参照)。複数のプロテアーゼインヒビターが同じサイトカインの濃度を変化させたが、この変化の方向は変動した。例えば、ベスタチン及びペプスタチンは、赤血球からのタンパク質の放出に対する様々なプロテアーゼインヒビターの複雑な効果の最高の例である。赤血球をアミノペプチダーゼインヒビターであるベスタチンとともにインキュベートすると、放出されるIFN- α 2、IL-18、MIF、TRAIL、HGF、及びIL12-p40の濃度が変化する。アスパラギン酸プロテアーゼのペプスタチンも、IFN- α 2、MIF、及びHGFの濃度に影響を及ぼす。しかしながら、これらの例の各々において、ペプスタチンは、ベスタチンの正反対の効果をもたらした。同様に、HGFの濃度は、赤血球をベスタチンとともにインキュベートした後、劇的に増加したが、HGF濃度は、赤血球をペプスタチンとともにインキュベートした後、顕著に減少した(表6)。特定のプロテアーゼインヒビターと複数のサイトカインの濃度との間のこの相互作用の複雑な性質から、サイトカインの非特異的タンパク質分解の阻害を上回るものが、プロテアーゼインヒビターを媒介するタンパク質濃度効果を生じさせているという有力な証拠がもたらされた。

【0212】

赤血球からのタンパク質の放出に対するプロテアーゼインヒビターの組合せの効果を決定するために、タンパク質プロファイルをプロテアーゼインヒビターカクテルとともにイ

ンキュベートされた健常赤血球から得た。プロテアーゼインヒビターカクテルA8127sは、表5の個々のプロテアーゼインヒビター(アンチパイン二塩酸塩50 $\mu\text{g/mL}$; ペスタチン40 $\mu\text{g/mL}$; E-64 10 $\mu\text{g/mL}$; ロイペプチン5 $\mu\text{g/mL}$; ペプスタチン0.7 $\mu\text{g/mL}$; ホスホラミドン330 $\mu\text{g/mL}$; Pefabloc SC 1mg/mL; EDTA- Na_2 0.5mg/mL; アプロチニン2 $\mu\text{g/mL}$)を組み合わせるにより作製され、該プロテアーゼインヒビターの各々は、健常赤血球からのサイトカイン放出に対して個々に顕著な効果を有していた(表6及び図12A~図12VV)。健常赤血球をA8127s及びcOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)とともにインキュベートした。A8127sは、IL-17、エオタキシン、GM-CSF、PDGF-bb、INF- α 2、IL-2ra、CTACK、MCP-3、MIG、及びIL-3の統計的に有意な変化をもたらしたが(図13A~図13VV)、cOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテルは、本実験ではサイトカイン濃度に対する有意な変化をもたらさなかった。

【0213】

全体として、このデータは、プロテアーゼインヒビターが健常個体から単離される赤血球から放出されるサイトカインの濃度の有意な変化をもたらすことを示した。個々のプロテアーゼとサイトカイン濃度の変化との間の複雑な関係性から、そのような効果がサイトカインの非特異的タンパク質分解の阻害にのみ関連する可能性が低いことが示された。さらに、市販のインヒビターカクテル(Roche cOmplete)とA8127sプロテアーゼインヒビターカクテルの比較から、A8127sが健常参加者から単離される赤血球から放出されるサイトカインの濃度/プロファイルの有意な変化をもたらす能力がより高いことが示された。

【0214】

(実施例9. 赤血球膜由来のタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターの効果)

プロテアーゼインヒビターが赤血球膜からのタンパク質の放出に対する効果を有するかどうかを決定するために、赤血球膜を単離赤血球及び全血から採取し、その後、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートした。全血を、健常ボランティアから、静脈穿刺によって、EDTAバキュテナー(k_2EDTA バキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を解析前に -80°C で保存した。

【0215】

全血のアリコートを集し、 -80°C で凍結させた。赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて、残りの新鮮全血から単離した。全血を遠心分離(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)を細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。その後、上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で1回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数し(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)、細胞のアリコートを -80°C で凍結させた。

【0216】

赤血球膜の単離のために、全血と単離赤血球の両方の凍結アリコートを3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。溶解物のアリコート(100 μL 当たり4000万個の赤血球に相当する容量)を1:20比(溶解物:PBS)でPBSに添加した。その後、赤血球膜を溶液からの遠心分離(16,000g、20分、 4°C)によって単離した。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜をPBS中で4億細胞/mLまで希釈し、 37°C 及び5% CO_2 で24時間インキュベートした。また、一部の試料を表5のプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートした。

【0217】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離(16,000g、20分、 4°C)により単離した。試料を解析まで -80°C で保存した。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。27-プレックスヒトサイトカインパネルは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、I

L-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャーソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0218】

図14A～図14AAは、プロテアーゼインヒビターカクテル(A8127s及びcOmplete(Roche))の存在下又は非存在下のいずれかで、馴化PBS中でインキュベートされる赤血球膜中のいくつかのタンパク質の濃度を示している。このデータは、より少ない赤血球数でさえ、顕著な数のサイトカインが、(全血と濃縮赤血球溶解物の両方に由来する)赤血球膜馴化PBS中に容易に検出可能なレベルでなおも存在することを示した。1mL当たり4億個という赤血球の濃度は、1mL当たりわずか80 μ Lの全血に相当した(新鮮全血1mL当たり 5×10^9 個の赤血球という規定濃度を仮定する)。実験をわずか200 μ Lの4億細胞/mL溶液で実施したので、上で観察されたサイトカイン濃度を検出するためにわずか16 μ Lの全血の出発試料で十分であるということになる。

【0219】

(実施例10. 癌コホート由来の赤血球タンパク質に対するプロテアーゼインヒビターの効果)

多くのタンパク質の存在又はレベルの変化によって、種々の疾患が特徴付けられる。特に、癌は、特に、タンパク質、炎症性タンパク質(例えば、サイトカイン)の示差レベルを伴う疾患である。したがって、結腸直腸癌及びリンパ腫を有する人に由来する赤血球由来のタンパク質の濃度を調べた。

【0220】

全血を、ボランティアから、静脈穿刺によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を解析前に-80 $^{\circ}$ Cで保存した。赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて単離した。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄した。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させた。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加した。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置した。上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離した。該赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で1回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数した(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。その後、赤血球を4億細胞/mLまでPBSに希釈し、37 $^{\circ}$ C及び5%CO $_2$ で24時間インキュベートした。また、一部の試料を、PBSインキュベーション中、表5の個々のプロテアーゼインヒビター、市販のプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche)、又はA8127sプロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートした。A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルは、アンチパイン二塩酸塩(50 μ g/mL);ベスタチン(40 μ g/mL);E-64(10 μ g/mL);ロイペプチン(5 μ g/mL);ペプスタチン(0.7 μ g/mL);ホスホラミドン(330 μ g/mL);Pefabloc SC(1mg/mL);EDTA-Na $_2$ (0.5mg/mL);及びアプロチニン(2 μ g/mL)を含んでいた。

【0221】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離(500g、5分)により単離した。試料を-80 $^{\circ}$ Cで保存した。その後、馴化PBS試料を、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネル(Bio-Plex Pro 27-プレックス、Bio-Rad)で解析した。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセ

イをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0222】

(10.1 結腸直腸癌)

図15A～図15AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から放出された表示されたタンパク質の濃度を示しており、ここで、該赤血球は、個々のプロテアーゼインヒビター又は市販のプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche)とともにインキュベートされたものであった。有意差($p < 0.05$)は、スチューデントのT-検定を用いて決定された。個々のプロテアーゼインヒビターは、対照(プロテアーゼインヒビターなし)と比較したとき、結腸直腸癌参加者由来の赤血球から放出される種々のサイトカインの濃度を变化させた。個々のプロテアーゼインヒビターは、放出されるサイトカインのプロファイルを非常に様々な様式で变化させた。例えば、赤血球をアンチパイン二塩酸塩(パパイン、トリプシン、及びカテプシンのインヒビター)で処理すると、放出されるIFN- γ 、IL-12(p70)、IL-15、IL-17、IL-13、IL-7、IP-10、PDGF-bb、及びIL-2の濃度が増大し、一方、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MIP-1 α 、G-CSF、及びIL-6の濃度が減少した。対照的に、Pefabloc SC(セリンプロテアーゼインヒビター)は、IL-13及びIL-7のみの放出濃度を増大させ、一方、IL-1 β 、IL-8、IL-9、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、MIP-1 α 、G-CSF、及びIL-6の濃度を減少させた。特定のプロテアーゼインヒビターと複数のサイトカインの放出との間の相互作用の複雑な性質から、サイトカインの非特異的タンパク質分解の阻害を上回るものが、タンパク質レベルに対するプロテアーゼインヒビター媒介性効果を生じさせているという有力な証拠がもたらされた。図16A～図16AAは、結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球から市販のプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche)又はA8127sのいずれかを含む有する馴化PBS中に放出されたタンパク質の濃度を示している。cOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテルは、対照試料と比較したとき、IL-2の濃度を有意に変化させただけであった。対照的に、A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルによる赤血球の阻害は、対照試料と比較したとき、IL-1 β 、IL-15、及びGM-CSFの濃度を有意に変化させた。このデータは、結腸直腸癌患者から単離された赤血球をプロテアーゼインヒビターに曝露させると、馴化PBS中に放出されるサイトカインの濃度に対する有意な変化がもたされることを示した。さらに、cOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテルとA8127sプロテアーゼインヒビターカクテルの比較により、A8127sカクテルは、結腸直腸癌参加者から単離される赤血球由来の放出されるサイトカインのプロファイルの有意な変化をもたらす能力がより高いことが示された。

【0223】

次に、結腸直腸癌を有する人の赤血球から放出されたタンパク質に対するその効果と比較した、健常個体由来の赤血球から放出されたタンパク質に対するプロテアーゼインヒビターの効果の差を評価した。表5の個々のプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされた赤血球由来のタンパク質の濃度が図17A～図17AAに示されている。このデータは、プロテアーゼインヒビターカクテルを特定の病態に対して最適化することができる方法を提供する。サイトカインIL-8、IL-15、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、及びIL-6は、結腸直腸癌参加者由来のA8127sとともにインキュベートされた赤血球で統計的に有意な変化を有すると確認された。個々のプロテアーゼインヒビターのデータは、Pefabloc SCが、IL-8、IL-15、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、及びIL-6について同じ様式で、健常参加者及び結腸直腸癌参加者に影響を及ぼすことを示した。それゆえ、A8127sプロテアーゼカクテルからのPefabloc SCの除去は、健常者のサイトカインプロファイルと結腸直腸癌のサイトカインプロファイルの間で観察される差を増大させることができる。

【0224】

図18A～図18AAは、赤血球をプロテアーゼインヒビターカクテル(A8127s及びcOmplete(Roche))とともにインキュベートしたときの結腸直腸癌参加者と比べた健常個体由来の赤血球におけるタンパク質濃度の倍数変化を示している。この結果は、赤血球とプロテアーゼ

インヒビターとのインキュベーションが、健常参加者と結腸直腸癌参加者の両群由来の赤血球馴化PBSのサイトカインプロファイルに有意な変化をもたらすことを示した。A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルは、未処理の試料と比較したとき、健常参加者と結腸直腸癌参加者の両方について、サイトカインレベルの最大数の統計的に有意な変化をもたらした。この結果は、A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルがcOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテルよりも有意なサイトカインプロファイルの変化をもたらすことを示した先の健常個体でのデータと一致していた。

【0225】

健常コホート及び結腸直腸癌コホートから単離された試料は、プロテアーゼインヒビターに対するそれらの応答の仕方が異なっていた。結腸直腸癌患者由来の無傷赤血球をA8127sプロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートしたとき、有意に変化するいくつかのサイトカイン—IL-8、IL-15、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、及びIL-6があった。対照的に、無傷赤血球を健常参加者から単離し、A8127sとともにインキュベートしたとき、有意な変化は検出されなかった。これは、A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルとともに又は該カクテルなしでインキュベートされた無傷赤血球が結腸直腸癌に特有であるサイトカインプロファイルを同定するのに有益であり得ることを示した。表7は、各々のプロテアーゼインヒビターカクテルを用いて健常参加者及び結腸直腸癌参加者で有意に変化したサイトカインの数をまとめたものである。

(表7.赤血球をプロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートした後に濃度が有意に変化したタンパク質の数)

【表9】

無傷赤血球分泌			
健常		結腸直腸癌	
cOmplete PI カクテル	A8127s	cOmplete PI カクテル	A8127s
1	5	2	9

【0226】

健常コホート及び結腸直腸癌コホート由来の赤血球膜から放出されたタンパク質も、プロテアーゼインヒビターの存在下及び非存在下で濃度差を示した。赤血球膜の単離のために、全血の凍結アリコート3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。この後、溶解物のアリコート(100 μ L当たり1億2000万個の赤血球に相当する容量)をPBSに1:20比(溶解物:PBS)で添加した。その後、赤血球膜を溶液からの遠心分離(16,000g、20分、4°C)によって単離した。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜を12億細胞/mLまでPBSに希釈し、37°C及び5%CO₂で24時間インキュベートした。プロテアーゼインヒビターとインキュベートしていない健常参加者又は結腸直腸癌を有する参加者由来の赤血球膜と比較した、プロテアーゼインヒビターとともに37°Cで24時間インキュベートした後の12億細胞/mLの(全血溶解物から単離された)赤血球膜馴化PBS中のタンパク質の倍数変化。p<0.05の場合、値に有意差がある(*)。データは、平均±標準偏差である。図19A~19Vは、8つのサイトカインが、健常個体由来の赤血球膜と比較した結腸直腸癌を有する個体由来の赤血球膜でプロテアーゼインヒビターカクテルA8127sに対する示差応答を有することを示した。

【0227】

さらなるタンパク質の濃度を、健常個体及び結腸直腸癌を有する人由来のプロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされた赤血球で解析した。sEGFR、FGF-塩基性、G-CSF、HGF、sHER-2/neu、sIL-6Ra、レプチン、オステオポンチン、PECAM-1、PDGF-AB/BB、プロラクチン、SCF、sTIE-2、sVEGFR-1、及びsVEGFR-2についてアッセイする16-プレックスヒト癌バイオマーカーパネル1、並びにAPRIL/TNFSF13、BAFF/TNFSF13B、sCD30/TNFRF8

、sCD163、キチナーゼ-3様1、gp130/sIL-6R β 、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-2、sIL-6R α 、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-19、IL-20、IL-22、IL-26、IL-27(p28)、IL-28A/IFN- λ 2、IL-29/IFN- λ 1、IL-32、IL-34、IL-35、LIGHT/TNFSF14、MMP-1、MMP-2、MMP-3、オステオカルシン、オステオポンチン、ペントラキシン-3、sTNF-R1、sTNF-R2、TSLP、及びTWEAK/TNFSF12についてアッセイする37-プレックスヒト炎症性サイトカインパネル(Bio-Plex癌バイオマーカー16-プレックスパネル及び炎症37-プレックスパネル、Bio-Rad)を使用した。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II、Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標)200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

10

【0228】

図20A~20LLは、健常参加者(n=3)又は結腸直腸癌を有する参加者(n=2)についてのプロテアーゼインヒビターもプロテアーゼインヒビターカクテルもなしで37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS中のタンパク質の濃度を示している。p<0.05の場合、値に有意差があった(*)。データは、平均±標準偏差として提示されている。このデータは、プロテアーゼインヒビターが、赤血球から放出される様々なホルモン、可溶性受容体、タンパク質、及びサイトカインの濃度に対する効果を有することを示した。高濃度の分子、例えば、オステオポンチン、キチナーゼ3-様1、及びMMP-1が、PBS中、37℃で24時間インキュベートされた健常個体から単離された赤血球から放出された(図20A~20LL)。赤血球へのプロテアーゼインヒビターカクテルの添加は、タンパク質濃度の変化をもたらした。例えば、sCD30/TNFSF8、IL-19、及びLIGHT/TNFSF14は、対照(プロテアーゼインヒビターなし)と比較して、A8127sインキュベーションの場合に有意に多かった(図20A~20LL)。プロテアーゼインヒビターインキュベーション後の観察された変化は、健常参加者から単離された赤血球と結腸直腸癌を有する参加者から単離された赤血球で異なっていた。例えば、オステオポンチンの濃度は、健常群由来の赤血球のA8127sインキュベーションの場合に有意に増大したが、結腸直腸癌群では、同じ条件下で変化しなかった。逆に、IL-27(p28)の濃度は、A8127sの場合に結腸直腸癌群で有意に減少したが、健常群では変化しなかった。1つのコホートがプロテアーゼインヒビターの存在下で有意に変化したタンパク質濃度を有する一方、もう1つのコホートでは、タンパク質濃度が反対の方向に動くか、又は変化しないという傾向が10個のタンパク質で生じた。

20

30

【0229】

次に、赤血球膜から放出されるタンパク質が、プロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートされた赤血球膜と比較して、赤血球で濃度差を示すかどうかを健常個体について評価した。赤血球膜を採取するために、全血の凍結アリコート(3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。この後、溶解物のアリコート(100 μ L当たり1億2000万個の赤血球に相当する容量)をPBSに1:20比(溶解物:PBS)で添加した。その後、赤血球膜を溶液からの遠心分離(16,000g、20分、4℃)によって単離した。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜を12億細胞/mLまでPBSに希釈し、37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートした。一部の試料を、PBSインキュベーション期間中、プロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete又はA8127s)で処理した。健常参加者(n=3)又は結腸直腸癌を有する参加者(n=2)由来のプロテアーゼインヒビターもプロテアーゼインヒビターカクテルもなしで37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS(無傷赤血球)又は12億細胞/mLの赤血球膜馴化PBS(赤血球膜)中のタンパク質の濃度。p<0.05の場合、値に有意差があった(*)。データは、平均±標準偏差として提示されている。

40

【0230】

図21A~21LLに見られるように、健常参加者由来の無傷赤血球と赤血球膜のタンパク質プロファイルにはっきりとした違いがあった。対照(プロテアーゼインヒビターなし)において、赤血球膜によって放出されるタンパク質の濃度は、無傷赤血球によって放出される

50

タンパク質の濃度よりも、16個のタンパク質については有意に高く、6個のタンパク質について有意に低かった。プロテアーゼインヒビターが無傷細胞と赤血球膜の両方で馴化PBSのタンパク質プロファイルをどのように変化させるのかにも違いがあった。例えば、PDGF-AB/BBは、対照と比較して、A8127sとともにインキュベートされた赤血球膜で有意に低かったが、無傷細胞群では変化しなかった。同様の傾向は、とりわけ、プロラクチン、gp130/sIL-6Rb、BAFF/TNFSF13B、MMP-2、及びTWEAK/TNFSF12について観察された(図21A~21LLを参照)。他の例において、プロテアーゼインヒビターカクテルの包含は、無傷赤血球の馴化PBS中のタンパク質の濃度を有意に変化させたが、赤血球膜からのタンパク質の放出には影響を及ぼさなかった。この例には、オステオポンチン、sVEGR-1、IL-19、MMP-1、及びペントラキシン-3が含まれる。この結果は、プロテアーゼインヒビターに対する応答及び馴化PBS中のタンパク質の濃度を調節する機構が無傷赤血球と比較して赤血球膜で実質的に変化することを示した。

10

【0231】

(10.2 リンパ腫)

癌を有する人由来の赤血球成分から放出されるタンパク質の濃度に対するプロテアーゼインヒビターの効果をさらに調べるために、健常個体及びリンパ腫を有する個体の赤血球膜由来のタンパク質の濃度の変化を評価した。赤血球膜の単離のために、全血及び赤血球の凍結アリコート3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらし、その後、溶解物のアリコート(100 µL当たり1億2000万個の赤血球に相当する容量)をPBSに1:20比(溶解物:PBS)で添加した。その後、赤血球膜を溶液からの遠心分離(16,000g、20分、4℃)によって単離した。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜を12億細胞/mLまでPBSに希釈し、37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートした。一部の試料を、PBSインキュベーション期間中、プロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete又はA8127s)で処理した。

20

【0232】

図22A~22VVは、全血溶解物から単離された赤血球膜由来のタンパク質のレベルの変化を示しており、一方、図23A~23VVは、プロテアーゼインヒビターカクテルの存在下で単離赤血球から採取された赤血球膜由来のタンパク質のレベルの変化を示している。12億細胞/mLの全血溶解物又は濃縮赤血球溶解物から単離された赤血球膜馴化PBSを、プロテアーゼインヒビターとともに又はプロテアーゼインヒビターなしで、健常参加者又はリンパ腫を有する参加者由来の赤血球とともに37℃で24時間インキュベートした。p<0.05の場合、値に有意差があった(*)。データは、平均±標準偏差である。このデータから、(無傷赤血球で示されたような)サイトカインの放出に対するプロテアーゼインヒビターの効果が単離された赤血球膜でも有効であると結論付けることができる。A8127sは、健常参加者由来の濃縮赤血球膜を除く全ての群において最大数のサイトカイン変化をもたらした。これは、A8127sが市販のプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche cOmplete)よりも有意なサイトカインプロファイルの変化をもたらすことを示す以前のデータと一致していた。

30

【0233】

とりわけ、健常群及びリンパ腫群から単離された試料は、プロテアーゼインヒビターインキュベーションに対するそれらの応答の仕方が異なっていた。リンパ腫患者由来の赤血球膜をA8127sとともにインキュベートしたときに有意に変化したいくつかのサイトカインもあった。対照的に、赤血球膜を健常参加者から単離し、同じ方法で処理したとき、有意な変化は検出されなかった。全血から単離された赤血球膜について、サイトカインIL-8、IL-6、IP-10、IL-3、及びSCFは、このように挙動した。同様に、濃縮赤血球から単離された赤血球膜中のサイトカインIL-12p70、IL-17、IL-4、MCP-1、GM-CSF、IFN-α2、IL-1α、IL-18、M-CSF、SCGF-B、IL-12p40は、同じパターンに従った。これは、濃縮赤血球溶解物から単離された赤血球膜がリンパ腫に特有であるサイトカインプロファイルを同定するのに有益であり得ることを示している。

40

【0234】

このデータは、IL-4、IFN-α2、IL-18、SCGF-b、及びLIFを健常試料とリンパ腫試料の識

50

別のためのパネルとして一緒に使用し得ることも示した。サイトカインは、A8127sとともにインキュベートした後のリンパ腫試料で統計的に変化しているだけでなく、(インキュベートされていない対照からA8127sとのインキュベーションへの)倍数変化の傾向も、健常個体由来の試料と比較して、リンパ腫試料で異なっている。表8は、使用されたプロテアーゼインヒビターカクテルによって健常参加者とリンパ腫参加者の両方由来の赤血球膜で有意に変化したサイトカインの数をまとめたものである。

(表8. 各々の試料群についてのインキュベートしていない対照と比較した各々のプロテアーゼインヒビター(PI)カクテルとともにインキュベートした後の統計的に有意に($p < 0.05$)変化したサイトカインの数)

【表 10】

赤血球膜 (全血由来)				赤血球膜 (RBC溶解物由来)			
健常		リンパ腫		健常		リンパ腫	
cOmplete PI カクテル	A8127s	cOmplete PI カクテル	A8127s	cOmplete PI カクテル	A8127s	cOmplete PI カクテル	A8127s
5	17	3	11	4	2	5	12

【0235】

(実施例11. 炎症性疾患コホート由来の赤血球成分に対するプロテアーゼインヒビターの効果)

プロテアーゼインヒビターが様々な炎症性疾患を有する個体に由来する赤血球成分由来のタンパク質に対する示差効果を有するかどうかをさらに調べるために、様々な炎症性疾患を有する個体から採取された赤血球又は赤血球膜をプロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートし、タンパク質レベルの変化を評価した。

【0236】

全血を、ボランティアから、静脈穿刺によって、EDTAバキュテナー(k_2 EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集した。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理した。マルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を -80°C で保存し、 -80°C での3回の凍結解凍サイクルに供して、解析前の完全な細胞溶解を確実にもたらした。

【0237】

収集後、全血を分注し、 -80°C で凍結させた。赤血球膜の単離のために、全血の凍結アリコート3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらした。この後、溶解物のアリコート($100\mu\text{L}$ 当たり1億2000万個の赤血球に相当する容量)をPBSに1:20比(溶解物:PBS)で添加した。その後、赤血球膜を溶液からの遠心分離($16,000g$ 、20分、 4°C)によって単離した。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜を12億細胞/mLまでPBSに希釈し、 37°C 及び5% CO_2 で24時間インキュベートした。一部の試料をプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche; A8127s)とともにインキュベートした。A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルは、アンチパイン二塩酸塩($50\mu\text{g/mL}$);ベスタチン($40\mu\text{g/mL}$); E-64($10\mu\text{g/mL}$);ロイペプチン($5\mu\text{g/mL}$);ペプスタチン($0.7\mu\text{g/mL}$);ホスホラミドン($330\mu\text{g/mL}$); Pefabloc SC(1mg/mL); EDTA- Na_2 (0.5mg/mL);及びアプロチニン($2\mu\text{g/mL}$)から構成されている。

【0238】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離($16,000g$ 、20分、 4°C)により単離した。試料を -80°C で保存し、解析前に3回の凍結/解凍サイクルを受けさせた。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスサイトカインアッセイで解析した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、及びVEGFについてアッセイする27-プレックスヒトサイトカインパネルであり、第二のものは、IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LI

10

20

30

40

50

F、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAILについてアッセイする21-プレックスヒトサイトカインパネルであった(Bio-Plex Pro 27-プレックス及び21-プレックス、Bio-Rad)。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャーソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。

【0239】

健常個体の赤血球膜に対するプロテアーゼインヒビターの効果を、変形性関節症を有する個体(図24A～24VV);子癇前症を有する個体(図25A～25VV);子宮内発育不全を伴う子癇前症を有する個体(図26A～26VV);潰瘍性大腸炎を有する個体(図27A～27VV);及び十二指腸潰瘍と感染症を有する個体(図28A～28VV)由来の赤血球膜に対する効果と比較した。プロテアーゼインヒビターなしの健常参加者又は変形性関節症(OA)、子癇前症(PE)、子癇前症と子宮内発育不全(PE+IUGR)、潰瘍性大腸炎(UC)、及び十二指腸潰瘍と感染症(DU)を有する参加者由来の赤血球膜と比較したプロテアーゼインヒビターとともに37℃で24時間インキュベートした後の12億細胞/mLの(全血溶解物から単離された)赤血球膜馴化PBS中のタンパク質の倍数変化。 $p<0.05$ の場合、値に有意差があった(*)。データは、平均±標準偏差である。

【0240】

このデータは、赤血球膜とプロテアーゼインヒビターとのインキュベーションが、健常参加者及び疾患参加者由来の赤血球膜馴化PBSのサイトカインプロファイルの際立った変化をもたらすことを示した。このデータは、A8127sが対照及びcompleteプロテアーゼインヒビターカクテルと比較してより大きいサイトカインレベルの変化をもたらすことも示した(図24A～図28VV)。

【0241】

健常群及び疾患群から単離された試料は、プロテアーゼインヒビターインキュベーションに対するそれらの応答の仕方が異なっていた。図24A～図28VVは、A8127sが、健常試料と比較した疾患試料でサイトカイン濃度に影響を及ぼした様式に明白な差を示すいくつかのサイトカインの例を特定している。例えば、IFN- α 2濃度は、プロテアーゼインヒビターで処理した健常群由来の赤血球膜で低下したが、変形性関節症群で大幅に増大した。同様に、IP-10は、プロテアーゼインヒビターインキュベーションありの健常妊娠コホート由来の赤血球膜で増大したが、子癇前症コホートで減少した。検討された疾患の各々は、プロテアーゼインヒビターインキュベーション後に健常コホート由来の赤血球膜と疾患コホート由来の赤血球膜との間で示差応答を示すいくつかのサイトカインを示した。表9は、有意な示差効果を示した各々の病態についてのサイトカインの総数をまとめたものである。

(表9. 健常参加者群と疾患参加者群との間でプロテアーゼインヒビターインキュベーションに関連する示差濃度変化を示す各々の病態についてのサイトカインの総数)

【表11】

病態	健常と疾患の間でA8127sに対する示差応答を有する サイトカインの数
変形性関節症 (OA)	16
子癇前症 (PE)	7
子癇前症 (PE + IUGR)	6
潰瘍性大腸炎 (UC)	16
十二指腸潰瘍及び感染症 (DU)	5

【0242】

プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートされた様々な疾患を有する個体由来の赤血球膜を、病態に關与するさらなるタンパク質についてアッセイした。赤血球膜を、健常個体、並びにリンパ腫、変形性關節症、及び潰瘍性大腸炎を有する個体から採取した。2つのマルチプレックスアッセイを利用した。第一のものは、sEGFR、FGF-塩基性、G-CSF、HGF、sHER-2/neu、sIL-6Ra、レプチン、オステオポンチン、PECAM-1、PDGF-AB/BB、プロラクチン、SCF、sTIE-2、sVEGFR-1、及びsVEGFR-2についてアッセイする16-プレックスヒト癌バイオマーカーパネル1であり、第二のものは、APRIL/TNFSF13、BAFF/TNFSF13B、sCD30/TNFRF8、sCD163、キチナーゼ-3様1、gp130/sIL-6R β 、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-2、sIL-6R α 、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-19、IL-20、IL-22、IL-26、IL-27(p28)、IL-28A/IFN- λ 2、IL-29/IFN- λ 1、IL-32、IL-34、IL-35、LIGHT/TNFSF14、MMP-1、MMP-2、MMP-3、オステオカルシン、オステオポンチン、ペントラキシン-3、sTNF-R1、sTNF-R2、TSLP、及びTWEAK/TNFSF12についてアッセイする37-プレックスヒト炎症性サイトカインパネルであった(Bio-Plex癌バイオマーカー16-プレックスパネル及び炎症37-プレックスパネル、Bio-Rad)。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施した。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャーソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析した。プロテアーゼインヒビターなしの健常参加者又はリンパ腫、変形性關節症(OA)、及び潰瘍性大腸炎(UC)を有する参加者由来のものと比較した、プロテアーゼインヒビターとともに37℃で24時間インキュベートした後の12億細胞/mLの(全血溶解物から単離された)赤血球膜馴化PBS中のタンパク質の倍数変化。p<0.05の場合、値に有意差があった(*)。データは、平均±標準偏差である。

【0243】

このデータは、プロテアーゼインヒビターが、健常参加者群(図29A～図31NN)において、かつリンパ腫(図29A～図29LL)、変形性關節症(図30A～図30NN)、及び潰瘍性大腸炎(図31A～図31NN)参加者群においても同様に、いくつかのタンパク質の放出を変化させることを示した。プロテアーゼインヒビターの効果は、タンパク質間と疾患群間の両方で変動した。例えば、リンパ腫参加者群では、A8127sとともにインキュベートされた赤血球膜中のPECAM-1について、有意な減少が観察されたが、健常群では有意な変化が検出されなかった。同様に、プロラクチンは、プロテアーゼインヒビターとともにインキュベートした後、有意に減少したが、健常群では有意に変化しなかった。統計的に有意でないものの、キチナーゼ3様1、IL-26、及びIL-35については、健常群とリンパ腫群との間で、A8127sインキュベーション後の倍数変化の示差傾向が観察され、その場合、それぞれのタンパク質の濃度は健常群で増大し、リンパ腫群で減少し、そしてその逆も同様であった。

【0244】

検討された疾患の各々は、プロテアーゼインヒビターインキュベーション後に健常コホートと疾患コホートとの間で示差応答を示すいくつかのタンパク質を有した。変形性關節症を有する参加者では、ペントラキシン-3及びキチナーゼ3様1を含む、12種のサイトカインが示差応答を示した。同様に、潰瘍性大腸炎を有する参加者では、IL-20、IL-27(p28)、及びBAFF/TNFSF13Bを含む、26種のサイトカインが示差応答を示した。上記の情報をを用いて、健常コホートと罹患コホートを識別するために、診断パネルを開発することができる。

【0245】

(実施例12. 癌コホート由来の赤血球成分由来の細胞チェックポイントレギュレータータンパク質に対するプロテアーゼインヒビターの効果)

発癌のような病態に特に關係があるとされるタンパク質の濃度及び濃度の変化を、プロテアーゼインヒビターの存在下及び非存在下において、赤血球及び赤血球膜で検討する。全血を健常ボランティア又は癌を有するボランティアから収集する。血液を、各々のボランティアから、静脈穿刺によって、EDTAバキュテナー(k₂EDTAバキュテナー、BD Biosciences)中に直接収集する。血液の画分を収集し、収集から4時間以内に室温で処理する。マ

ルチプレックス解析(BioPlex解析)のために、試料を解析前に-80℃で保存する。収集後、全血のアリコートをして-80℃で凍結させる。赤血球を、次のように、デキストラン沈降を用いて、残りの全血から単離する。全血を遠心分離し(1500g、10分)、上部の血漿層を廃棄する。残りの細胞ペレットを等量の塩化ナトリウム(0.15M)に再懸濁させる。その後、デキストラン(0.15M塩化ナトリウム中、6%w/v)をこの細胞懸濁液に1:4比(デキストラン:細胞懸濁液)で添加する。チューブの底への赤血球沈降のために、この溶液を室温で30分間放置する。上部の白血球に富む層を廃棄し、下部の赤血球画分を単離する。赤血球画分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、500g、5分)中で1回洗浄し、残りの赤血球ペレットを計数する(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。その後、赤血球を4億細胞/mLまでPBSに希釈し、37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートする。一部の試料を、PBSインキュベーション中、表5の個々のプロテアーゼインヒビター、市販のプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche)、又はA8127sプロテアーゼインヒビターカクテルでも処理する。A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルは、アンチパイン二塩酸塩(50 µg/mL);ベスタチン(40 µg/mL); E-64(10 µg/mL);ロイペプチン(5 µg/mL);ペプスタチン(0.7 µg/mL);ホスホラミドン(330 µg/mL); Pefabloc SC(1mg/mL); EDTA-Na₂(0.5mg/mL);及びアプロチニン(2 µg/mL)を含む。

10

【0246】

赤血球膜の単離のために、全血の凍結アリコートを3回の凍結解凍サイクルに供して、完全な細胞溶解を確実にもたらす。この後、溶解物のアリコート(100 µL当たり1億2000万個の赤血球に相当する容量)をPBSに1:20比(溶解物:PBS)で添加した。その後、赤血球膜を遠心分離によって溶液から単離する(16,000g、20分、4℃)。その後、上部の画分を廃棄し、その後、得られた膜を12億細胞/mLまでPBSに希釈し、37℃及び5%CO₂で24時間インキュベートする。一部の赤血球膜試料をプロテアーゼインヒビターカクテル(cOmplete、Roche; A8127s)で処理する。

20

【0247】

インキュベーション後、得られた馴化PBSを遠心分離(16,000g、20分、4℃)によって単離する。試料を-80℃で保存する。その後、馴化PBS試料をマルチプレックスアッセイで解析する。CD137(4-1BB)、CD152(CTLA-4)、CD223(Lag-3)、CD27、CD270(HVEM)、CD272(BTLA)、CD279(PD-1)、CD28、CD357(GITR)、CD80(B7-1)、TIM3をアッセイする14-プレックスヒト免疫-腫瘍学チェックポイントパネル(ProcartaPlex 14-プレックスヒト免疫-腫瘍学チェックポイントパネル、Affymetrix eBioscience)を使用する。該アッセイを、自動化磁気洗浄ステーション(BioPlex Pro II, Bio-Rad)を洗浄工程に用いて、製造元の指示に従って実施する。該アッセイをLuminex(登録商標) 200(商標)システム(Bio-Rad)で実行し、蛍光値を収集した。各々のサイトカインの校正曲線を、BioPlexマネージャーソフトウェア(ver. 5.0, Bio-Rad, USA)を用いる5パラメータロジスティック曲線回帰によって解析する。

30

【0248】

個々のプロテアーゼインヒビターとともに37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS中のタンパク質の濃度を、健常参加者又は癌を有する参加者由来の赤血球で測定する。このデータは、健常個体由来のものと比較した、癌を有する個体由来の赤血球中のタンパク質濃度の変化を示している(図32~45)。さらに、個々のプロテアーゼインヒビターは、タンパク質濃度に対する様々な効果を有する。そのような情報を用いて、癌を有する個体由来の赤血球成分中のタンパク質濃度に対してより大きい度合いの効果があるようにプロテアーゼインヒビターカクテルをカスタマイズすることができる。例えば、タンパク質濃度に対するプロテアーゼインヒビターの効果を示すデータに基づいて、特定の個々のプロテアーゼインヒビターをプロテアーゼインヒビターカクテルに添加するか又はプロテアーゼインヒビターカクテルから除去することができる。プロテアーゼインヒビターカクテルを最適化して、健常プロファイルと癌プロファイルの間の統計的に有意な差を強調/最大化することができる。

40

【0249】

50

プロテアーゼインヒビターもプロテアーゼインヒビターカクテルもなしで37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS(無傷赤血球)及び12億細胞/mLの赤血球膜馴化PBS(赤血球膜)中のタンパク質の濃度を、健常参加者又は癌を有する参加者由来の赤血球成分中で測定する。 $p < 0.05$ の場合、値は有意に異なる(*)。データは、平均±標準偏差として提示されている。様々な癌チェックポイントタンパク質が赤血球及び赤血球膜から放出される(図46~59)。このデータは、プロテアーゼインヒビターが、健常個体及び癌を有する個体の赤血球及び赤血球膜から放出された様々な癌チェックポイントタンパク質の濃度に対する効果を有することをさらに示している(図46~59)。さらに、プロテアーゼインヒビターインキュベーション後の観察された変化は、健常参加者から単離された赤血球成分と結腸直腸癌を有する参加者から単離された赤血球成分の間で異なる。

10

【0250】

プロテアーゼインヒビターとともに37℃で24時間インキュベートした後の4億細胞/mLの赤血球馴化PBS及び12億細胞/mLの(全血溶解物から単離された)赤血球膜馴化PBS中のタンパク質の倍数変化を、健常参加者又は癌を有する参加者由来の赤血球成分におけるプロテアーゼインヒビターインキュベーションなしと比較する。 $p < 0.05$ の場合、値は有意に異なる(*)。データは、平均±標準偏差である。このデータは、赤血球及び赤血球膜とプロテアーゼインヒビターとのインキュベーションが、健常参加者群と癌参加者群の両方由来の赤血球馴化及び赤血球膜馴化PBS由来の癌チェックポイントタンパク質のプロファイルに対する有意な変化をもたらすことを示している(図60~73及び図74~87)。健常群から単離された試料と癌群から単離された試料は、プロテアーゼインヒビターインキュベーションに対するそれらの応答の仕方が異なる。癌患者由来の赤血球又は赤血球膜を、例えば、A8127sプロテアーゼインヒビターカクテルとともにインキュベートしたとき、有意に変化するいくつかのチェックポイントタンパク質がある(図60~73及び図74~87)。対照的に、該プロテアーゼインヒビターは、健常個体由来の赤血球及び赤血球膜における同じチェックポイントタンパク質の発現に対して異なる効果を有する(図60~73及び図74~87)。

20

【0251】

上記のデータを用いて、健常コホートと癌コホートを識別するために、診断パネルを開発することができる。

【0252】

(実施例13.他の例示的で非限定的な実施態様)

30

特許請求された主題のさらなる利点は、特許請求された主題の特定の実施態様を記載している以下の例から明白である。

1. タンパク質プロファイルを作成する方法であって:

- a.) 血液試料を採取すること;
- b.) 該血液試料由来の赤血球成分を採取すること;
- c.) 該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;
- d.) 該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;
- e.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;並びに
- f.) 該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定することを含み、

40

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該赤血球成分を該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後にレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、方法。

2. タンパク質プロファイルを作成する方法であって:

- a.) 血液試料又は血液試料由来の赤血球成分を採取すること;
- b.) 該血液試料又は該赤血球成分由来の第一の部分及び第二の部分を選択すること;
- c.) 該血液試料又は該赤血球成分由来の第二の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;
- d.) 該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び第二の部分由来の1種以上のタンパク

50

質のレベルを測定すること(ここで、該第一の部分は該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない);並びに

e.)該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定すること
を含み、

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該血液試料又は該赤血球成分の第一の部分及び該血液試料又は該赤血球成分の第二の部分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を有する1種以上のタンパク質を含む、方法。

3.血液試料と赤血球成分の両方が採取される、例2記載の方法。

4.タンパク質プロファイルを作成する方法であって:

10

a.)疾患又は障害を有さない対象に由来する血液試料を採取すること;

b.)該血液試料由来の赤血球成分を採取すること;

c.)該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;

d.)該赤血球成分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;

e.)該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させた赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;並びに

f.)該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を決定すること

を含み、

ここで、作成されたタンパク質プロファイルが、該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる前及び接触させた後の該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化を含む、方法。

20

5.疾患タンパク質プロファイルを作成する方法であって:

a.)疾患又は障害を有する対象から、例1~3の1つ又は複数に従って作成される第一のタンパク質プロファイルを得ること;

b.)該疾患又は障害を有さない対象から、例4に従って作成される第二のタンパク質プロファイルを得ること(ここで、該第二のタンパク質プロファイルは、該第一のタンパク質プロファイルが得られた同じ赤血球成分から得られる);及び

c.)該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差を比較すること

30

を含み、

ここで、作成される疾患タンパク質プロファイルが、該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の間で差がある1種以上のタンパク質を含む、方法。

6.該赤血球成分が全血又は単離赤血球から採取される、例1~5の1つ又は複数記載の方法

。

7.該赤血球成分が赤血球又は赤血球膜である、例6記載の方法。

8.2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベルが測定される、例1~7の1つ又は複数記載の方法。

40

9.3種以上のタンパク質のレベルが測定される、例8記載の方法。

10.該赤血球成分を、1種以上のプロテアーゼインヒビター、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、又は10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる、例1~7の1つ又は複数記載の方法。

11.該赤血球成分を、少なくとも2つのプロテアーゼインヒビターを含むプロテアーゼインヒビターカクテルと接触させる、例1~7の1つ又は複数記載の方法。

50

12. 該赤血球成分をプロテアーゼインヒビターカクテルA8127sと接触させる、例1~7の1つ又は複数記載の方法。
13. 該1種以上のプロテアーゼインヒビターが、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター、及びアミノペプチダーゼインヒビターからなる群から選択される、例1~7の1つ又は複数記載の方法。
14. 該1種以上のタンパク質のレベルの変化が、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される、例1~7の1つ又は複数記載の方法。 10
15. 該1種以上のタンパク質のレベルの変化が0倍~5倍の倍数変化である、例1~7の1つ又は複数記載の方法。
16. 該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差が、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される、例5~7の1つ又は複数記載の方法。
17. 該疾患又は障害を有する対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化と該疾患又は障害を有さない対象由来の1種以上のタンパク質のレベルの変化の差が該レベルの変化の増加又は該レベルの変化の減少である、例5~7の1つ又は複数記載の方法。 20
18. 該対象がヒト又は非ヒト動物である、例1~17の1つ又は複数記載の方法。
19. 該1種以上のタンパク質のレベルが1以上の抗体を用いて測定される、例1~17の1つ又は複数記載の方法。
20. 該1種以上のタンパク質が、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、細胞外マトリックス成分、糖タンパク質、炎症性タンパク質、及び酵素からなる群から選択される、例1~17の1つ又は複数記載の方法。
21. 該1種以上のタンパク質が、表1に掲載されているタンパク質又は表2に掲載されているタンパク質からなる群から選択される、例1~17の1つ又は複数記載の方法。
22. 該疾患又は障害が子癇前症である、例1~17の1つ又は複数記載の方法。 30
23. 該疾患タンパク質プロファイルが、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSG、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癇前症タンパク質プロファイルである、例22記載の方法。
24. 該疾患又は障害が結腸直腸癌である、例1~17の1つ又は複数記載の方法。
25. 該疾患タンパク質プロファイルが、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである、例24記載の方法。
26. 対象における疾患又は障害をモニタリングする方法であって：
- a.) 該疾患又は障害を有する対象から、第一の時点における第一の血液試料及び第二の時点における第二の血液試料を採取すること； 40
- b.) 該疾患又は障害についての例5に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルを該第一の血液試料及び第二の血液試料中で測定すること；並びに
- c.) 該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差を決定すること
- を含み、
- ここで、該第一の血液試料及び第二の血液試料中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該疾患又は障害の変化を示す、方法。
27. 対象における治療の効果をモニタリングする方法であって：
- a.) 該対象から、第一の時点で例1~3の1つ又は複数に従って作成される第一のタンパク 50

質プロファイルを得ること及び第二の時点で例1~4の1つ又は複数に従って作成される第二のタンパク質プロファイルを得ること;並びに

b.)該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること

を含み、

ここで、該第一のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質レベルの変化と該第二のタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が該治療の効果を示す、方法。

28.該第一の時点が治療前であり、該第二の時点が治療後である、例27記載の方法。

29.該第一の時点が治療前であり、該第二の時点が治療中である、例27記載の方法。

30.該第一の時点及び該第二の時点が治療中である、例27記載の方法。

31.該第一の時点が治療中であり、該第二の時点が治療後である、例27記載の方法。

32.該第一の時点及び該第二の時点が治療後である、例27記載の方法。

33.該対象が同じ治療を受けたことがある、例27記載の方法。

34.該対象が異なる治療を受けたことがある、例27記載の方法。

35.該血液試料が少量の血液試料である、例27~34の1つ又は複数記載の方法。

36.該対象が、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、及び1日に5回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、例34記載の方法。

37.該対象が、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、及び1週間に7回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、例35記載の方法。

38.該対象が毎日モニタリングされる、例35記載の方法。

39.該対象が、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、及び4週間に1回からなる群から選択される回数モニタリングされる、例35記載の方法。

40.疾患又は障害を診断する方法であって:

a.)請求項3に従って作成される少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルを得ること;

b.)対象に由来する血液試料を採取すること;

c.)該血液試料由来の赤血球成分を採取すること;

d.)該赤血球成分の少なくとも第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;

e.)該赤血球成分の第一の部分における疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルを測定すること;

f.)該赤血球成分の第一の部分における少なくとも1種のタンパク質と該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を決定すること;並びに

g.)該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること

を含み、

ここで、該疾患タンパク質プロファイル中の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較した該赤血球成分の第一の部分及び該赤血球成分の第二の部分における少なくとも1種のタンパク質のレベルの同じ又は同様の変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

41.対象における疾患又は障害を診断する方法であって:

a.)例1~3の1つ又は複数に従って作成される該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;及び

b.)該少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を例5に従って作成される疾患タンパク質プロファイル由来の該少なくとも1種

10

20

30

40

50

のタンパク質のレベル変化と比較すること
を含み、

ここで、該疾患タンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化に対する該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの同じ又は同様の変化が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

42. 対象における疾患又は障害を診断する方法であって：

- a.) 該対象についての例1~3の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；
 - b.) 例4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること；及び
 - c.) 該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化を例4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と比較すること
- を含み、

ここで、該対象についての少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化と例4に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル由来の少なくとも1種のタンパク質のレベルの変化の差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

43. 血液試料のタンパク質プロファイルを作成するためのキットであって：

- a.) 赤血球成分を採取するための少なくとも1つの試薬；
 - b.) 1種以上のプロテアーゼインヒビター；及び
 - c.) 該赤血球成分由来の1種以上のタンパク質のレベルを測定するための少なくとも1つの試薬
- を含む、キット。

44. 該キットが対象由来の血液試料を採取するための少なくとも1つの試薬をさらに含む、例43記載の方法。

45. 1種以上のタンパク質のレベルを測定するための試薬が1以上の抗体である、例43記載の方法。

46. 1種以上のタンパク質を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬が酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 装置である、例45記載の方法。

47. 該1種以上のプロテアーゼインヒビターがプロテアーゼインヒビターカクテルを含む、例43記載の方法。

48. 該プロテアーゼインヒビターカクテルがA8127sである、例47記載の方法。

49. タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；
- b.) 該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；
- c.) 該赤血球濃縮試料の第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；及び
- d.) 該赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在を検出すること

を含み、

ここで、作成される該タンパク質プロファイルが該赤血球濃縮試料中で検出される1種以上のタンパク質を含む、方法。

50. タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；
- b.) 該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；
- c.) 該赤血球濃縮試料中の赤血球及び血漿を単離すること；
- d.) 該赤血球を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；
- e.) 該赤血球中の1種以上のタンパク質のレベル及び該血漿中の1種以上のタンパク質のレベルを測定すること；並びに
- e.) 該赤血球中の1種以上のタンパク質のレベル対該血漿中の1種以上のタンパク質のレ

ベルを含むタンパク質比を計算すること、
を含み、

ここで、作成される該タンパク質プロファイルが少なくとも2:1のタンパク質比を有する1種以上のタンパク質を含む、方法。

51. 該1種以上のタンパク質が、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも10:1、少なくとも15:1、及び少なくとも20:1からなる群から選択されるタンパク質比を有する、例49記載の方法。

52. タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

- a.) 疾患又は障害を有する対象由来の血液試料を採取すること；
 - b.) 該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；
 - c.) 該赤血球濃縮試料中の赤血球を1種以上のプロテアーゼインヒビターを含有する培地中でインキュベートすること；及び
 - d.) 1種以上のタンパク質を該培地中で検出すること、
- を含み、

ここで、作成されるタンパク質プロファイルが該培地中で検出される1種以上のタンパク質を含む、方法。

53. 該赤血球濃縮試料中で検出される該1種以上のタンパク質のレベルを測定することをさらに含む、例48又は例51記載の方法。

54. 2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、もしくは10種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベル、11種以上のタンパク質、12種以上のタンパク質、13種以上のタンパク質、14種以上のタンパク質、もしくは15種以上のタンパク質のレベルが測定される、例48～52の1つ又は複数記載の方法。

55. 3種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は3種以上のタンパク質のレベルが測定される、例53記載の方法。

56. 該赤血球濃縮試料を、2種以上のプロテアーゼインヒビター、3種以上のプロテアーゼインヒビター、4種以上のプロテアーゼインヒビター、5種以上のプロテアーゼインヒビター、6種以上のプロテアーゼインヒビター、7種以上のプロテアーゼインヒビター、8種以上のプロテアーゼインヒビター、9種以上のプロテアーゼインヒビター、又は10種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる、例48～54の1つ又は複数記載の方法。

57. 該赤血球濃縮試料を3種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させる、例55記載の方法。

58. 該赤血球濃縮試料を3種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させ、かつ2種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は2種以上のタンパク質のレベルを測定する、例55記載の方法。

59. 該赤血球を2種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させ、かつ3種以上のタンパク質の存在を検出するか、又は3種以上のタンパク質のレベルを測定する、例55記載の方法。

60. 該1種以上のプロテアーゼインヒビターが、セリンプロテアーゼインヒビター、システインプロテアーゼインヒビター、メタロプロテアーゼインヒビター、及びアスパラギン酸プロテアーゼインヒビターからなる群から選択される、例48～58の1つ又は複数記載の方法。

61. 該対象がヒト又は非ヒト動物である、例48～59の1つ又は複数記載の方法。

62. 該1種以上のタンパク質の存在が検出されるか、又は1種以上のタンパク質のレベルが1以上の抗体を用いて測定される、例48～60の1つ又は複数記載の方法。

63. 該1種以上のタンパク質が、ケモカイン、サイトカイン、成長因子、受容体、細胞内シグナル伝達物質、ホルモン、核内転写因子、神経伝達物質、及び細胞外マトリックス成分

10

20

30

40

50

、並びに酵素からなる群から選択される、例48～60の1つ又は複数記載の方法。

64. 該1種以上のタンパク質が、表1に掲載されているタンパク質又は表2に掲載されているタンパク質からなる群から選択される、例48～60の1つ又は複数記載の方法。

65. 該血液試料が、フローサイトメトリー、磁気ビーズ分離、遠心分離、セルロースカラム、及びデキストラン沈降からなる群から選択される1以上の方法によって白血球除去される、例48～60の1つ又は複数記載の方法。

66. 該血液試料がデキストラン沈降によって白血球除去される、例64記載の方法。

67. 対象における疾患又は障害をモニタリングする方法であって：

a.) 例48～60の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイル

を第一の時点及び第二の時点における該対象から得ること；並びに
b.) 該第一の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを該第二の
時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較すること
を含み、

ここで、該第二の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較した該第一の時点における該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルにおける1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が該疾患又は障害の変化を示す。

68. 対象における治療をモニタリングする方法であって：

a.) 例48～60の1つ又は複数に従って作成される少なくとも1つのタンパク質プロファイルを治療前及び治療後の対象から得ること；並びに

b.) 該治療前の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較すること、
を含み、

ここで、該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較した該治療前の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルにおける1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が該対象に対する該治療の効果を示す、方法。

69. 治療を全く受けたことがない対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルが治療を受けた該対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される、例67記載の方法。

70. ある時点での治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルが異なる時点での該治療後の対象の少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較される、例67記載の方法。

71. 該対象が同じ治療を受けたことがある、例69記載の方法。

72. 該対象が異なる治療を受けたことがある、例69記載の方法。

73. 該血液試料が少量の血液試料である、例66～71の1つ又は複数記載の方法。

74. 該対象が、1日に1回以上、1日に2回以上、1日に3回以上、1日に4回以上、及び1日に5回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、例66～72の1つ又は複数記載の方法。

75. 該対象が、1週間に1回以上、1週間に2回以上、1週間に3回以上、1週間に4回以上、1週間に5回以上、1週間に6回以上、及び1週間に7回以上からなる群から選択される回数モニタリングされる、例66～72の1つ又は複数記載の方法。

76. 該対象が毎日モニタリングされる、例66～72の1つ又は複数記載の方法。

77. 該対象が、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、及び4週間に1回からなる群から選択される回数モニタリングされる、例66～72の1つ又は複数記載の方法。

78. 疾患又は障害タンパク質プロファイルを作成する方法であって：

a.) 疾患又は障害を有する1以上の対象由来の血液試料を採取すること；

b.) 該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること；

c.) 該赤血球濃縮試料の第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること；

d.) 該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分の該

10

20

30

40

50

1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;及び

e.)該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較することを含み、

ここで、作成される疾患タンパク質プロファイルが、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較して、該赤血球濃縮試料の該第一の部分における異なるレベルを有する1種以上のタンパク質を含む、方法。

79.該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較した該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルの差のレベルが、スチューデントのT検定、ANOVA検定、混合効果モデル、マン・ホイットニー検定、ウィルコクソンの順位和、及びスペルマン(Sperman's)の順位相関からなる群から選択される統計解析によって決定される、例77記載の方法。

80. 2種以上のタンパク質、3種以上のタンパク質、4種以上のタンパク質、5種以上のタンパク質、6種以上のタンパク質、7種以上のタンパク質、8種以上のタンパク質、9種以上のタンパク質、又は10種以上のタンパク質のレベルが測定される、例77又は例78記載の方法。

81. 3種以上のタンパク質のレベルが測定される、例79記載の方法。

82.該疾患又は障害が子癇前症である、例80記載の方法。

83.該疾患タンパク質プロファイルが、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-1ra、MCP-1、G-CSG、GM-CSF、IL-6、IFN α 2、IL-1a、IL-18、MIF、IL-2ra、及びHGFからなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む子癇前症タンパク質プロファイルである、例81記載の方法。

84.該疾患又は障害が癌である、例80記載の方法。

85.該疾患タンパク質プロファイルが、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-13、MIF、エオタキシン、RANTES、IL-7、IP-10、PDGF、及びIL-12p40からなる群から選択される1種以上のタンパク質を含む癌タンパク質プロファイルである、例83記載の方法。

86.疾患又は障害を診断する方法であって:

a.)対象由来の血液試料を採取すること;

b.)該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること;

c.)少なくとも該赤血球濃縮試料の第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;

d.)該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分の該1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;及び

e.)該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較すること,を含み、

ここで、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較した該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベルの差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

87.該1種以上のタンパク質のレベルに差がないこと、該対象が該疾患又は障害を有さないことを示す、例85記載の方法。

88.対象が疾患又は障害を有するかどうかを決定する方法であって:

a.)該対象由来の血液試料を採取すること;

b.)該血液試料の少なくとも一部を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生すること;

c.)少なくとも該赤血球濃縮試料の第一の部分を1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させること;

d.)該赤血球濃縮試料の該第一の部分における1種以上のタンパク質のレベル及び該1種以上のプロテアーゼインヒビターと接触させていない該赤血球濃縮試料の第二の部分の該1種以上のタンパク質のレベルを測定すること;並びに

e.)該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルを該赤血

球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較することを含み、

ここで、該赤血球濃縮試料の該第二の部分における該1種以上のタンパク質のレベルと比較して該赤血球濃縮試料の該第一の部分における該1種以上のタンパク質のレベルに差がないことが、該対象が該疾患又は障害を有さないことを示す、方法。

89. 対象における疾患又は障害を診断する方法であって:

a.) 例48~60の1つ又は複数に従って作成される該対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;及び

b.) 該少なくとも1つのタンパク質プロファイルを少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルと比較すること

を含み、

ここで、該少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルと同様である該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の1種以上のタンパク質の存在又はレベルが、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

90. 得られる該少なくとも1つの疾患タンパク質プロファイルが例30~33の1つ又は複数に従って作成される、例88記載の方法。

91. 対象における疾患又は障害を診断する方法であって:

a.) 例48~60の1つ又は複数に従って作成される該対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを得ること;

b.) 該疾患又は障害を有さない1以上の対象由来の少なくとも1つのタンパク質プロファイルを採用すること;及び

c.) 該対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイルを該疾患又は障害を有さない1以上の対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイルと比較すること

を含み、

ここで、該疾患又は障害を有さない1以上の対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルと比較した該対象から得られる該少なくとも1つのタンパク質プロファイル中の該1種以上のタンパク質の存在又はレベルの差が、該対象が該疾患又は障害を有することを示す、方法。

92. 血液試料のタンパク質プロファイルを作成するためのキットであって:

a.) 血液試料を白血球除去して、赤血球濃縮試料を産生するための少なくとも1つの試薬;

b.) 1種以上のプロテアーゼインヒビター;及び

c.) 該赤血球濃縮試料中の1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための少なくとも1つの試薬を含む、キット。

93. 該キットが対象由来の血液試料を採用するための少なくとも1つの試薬をさらに含む、例91記載の方法。

94. 1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬が1以上の抗体である、例91記載の方法。

95. 1種以上のタンパク質の存在を検出するか又はそのレベルを測定するための試薬が酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)装置である、例93記載の方法。

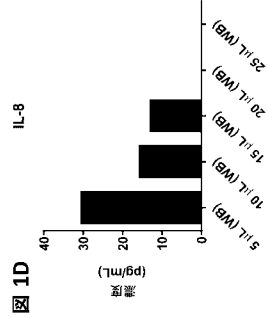
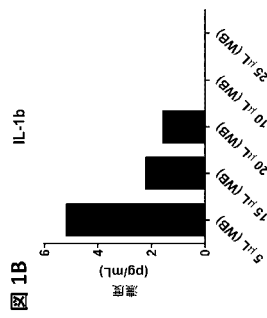
10

20

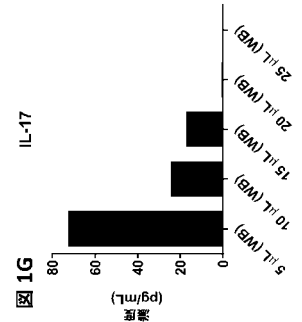
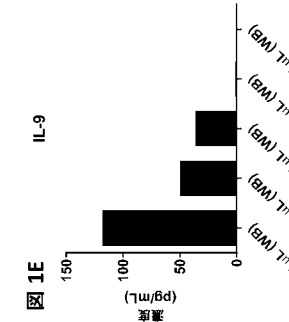
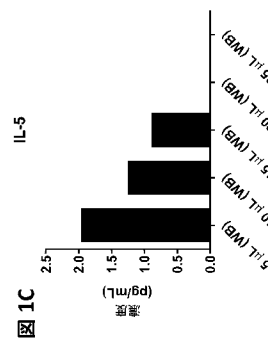
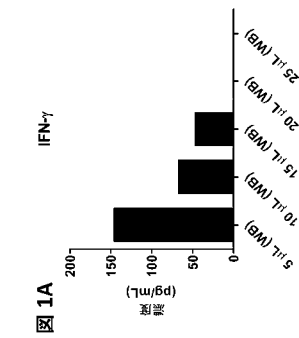
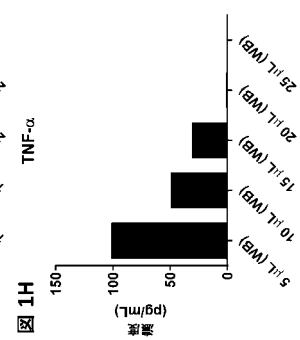
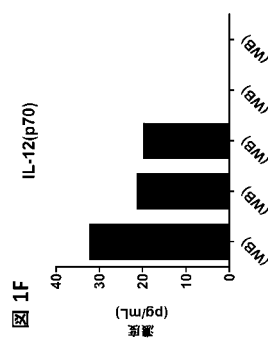
30

40

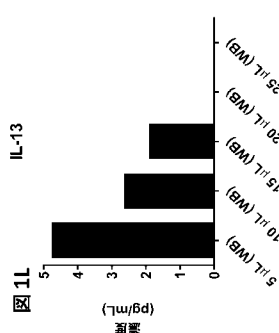
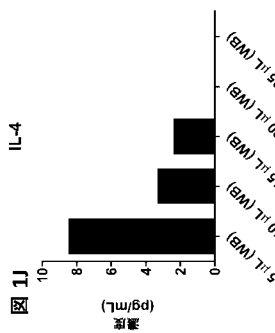
【図 1 A - D】



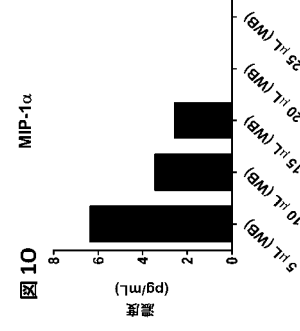
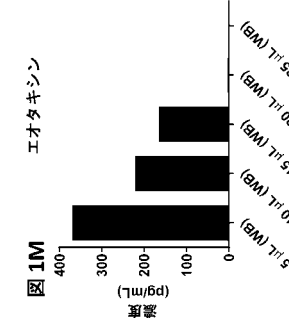
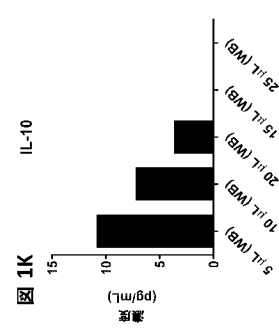
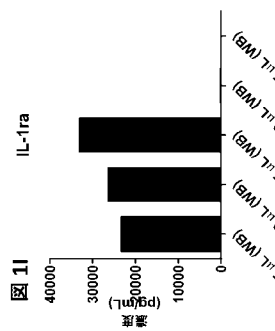
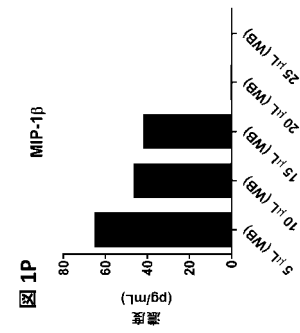
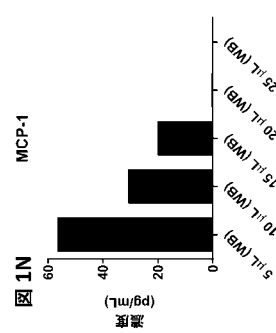
【図 1 E - H】



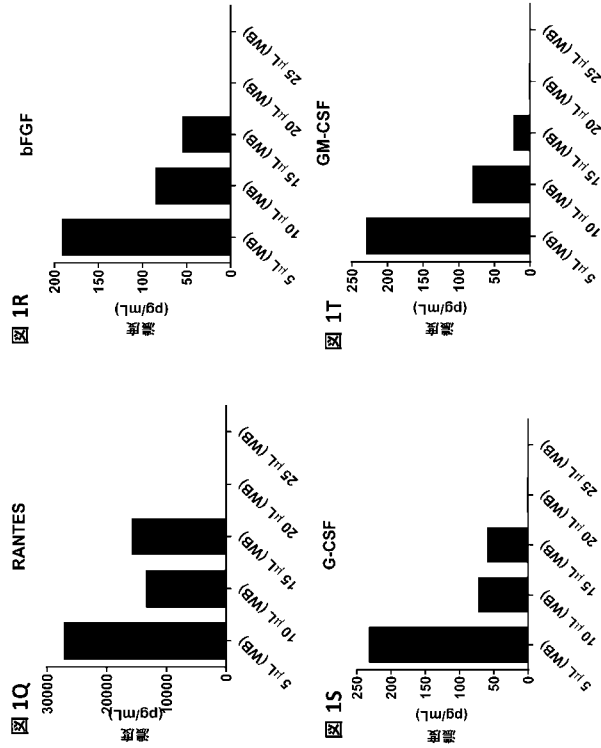
【図 1 I - L】



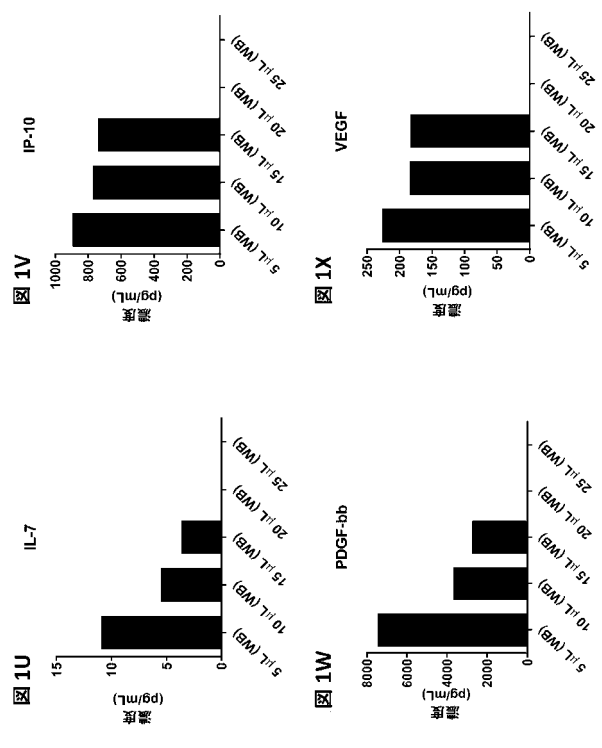
【図 1 M - P】



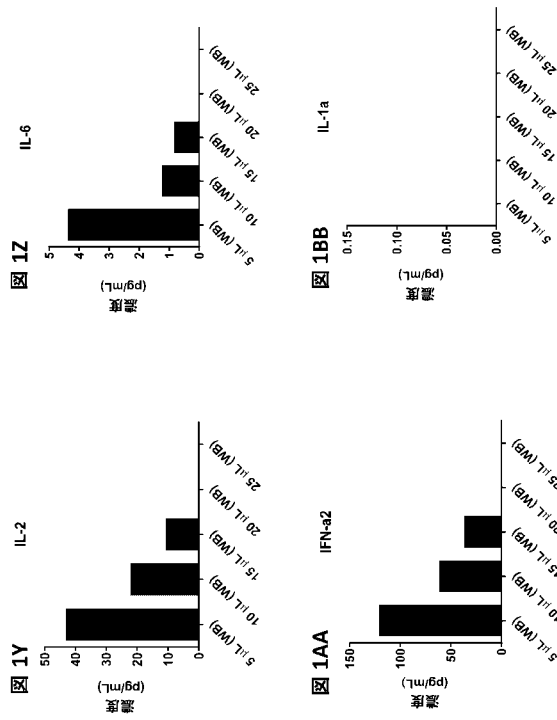
【図 1 Q - T】



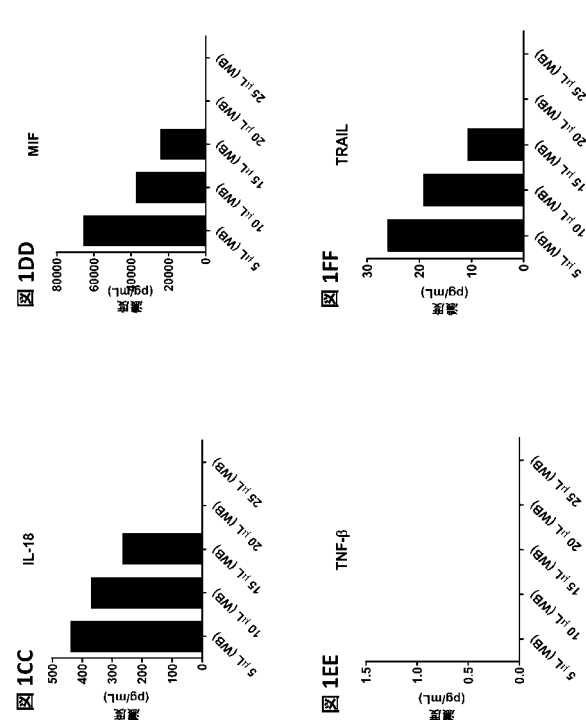
【図 1 U - X】



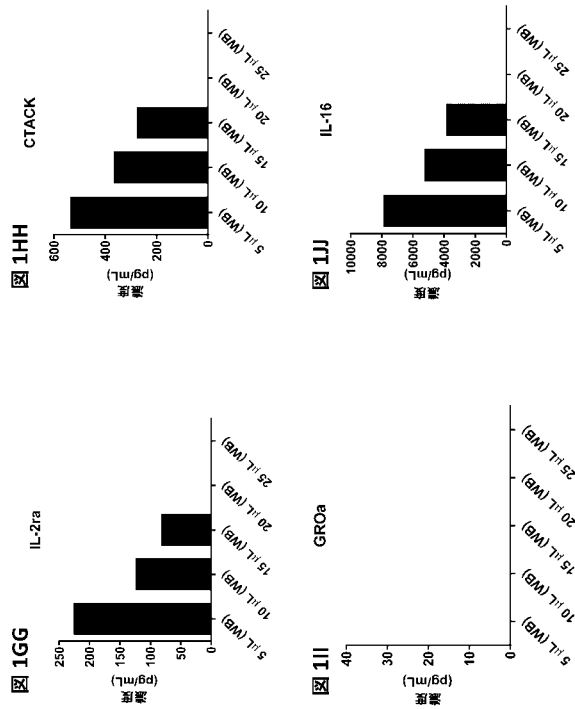
【図 1 Y - B B】



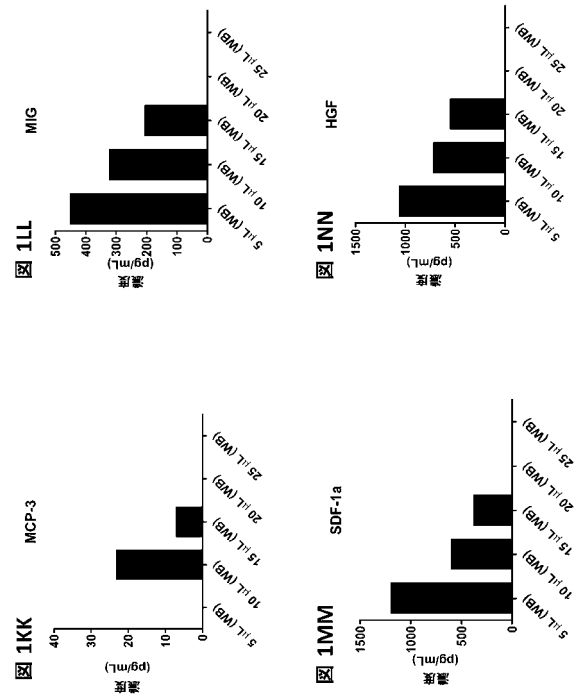
【図 1 C C - F F】



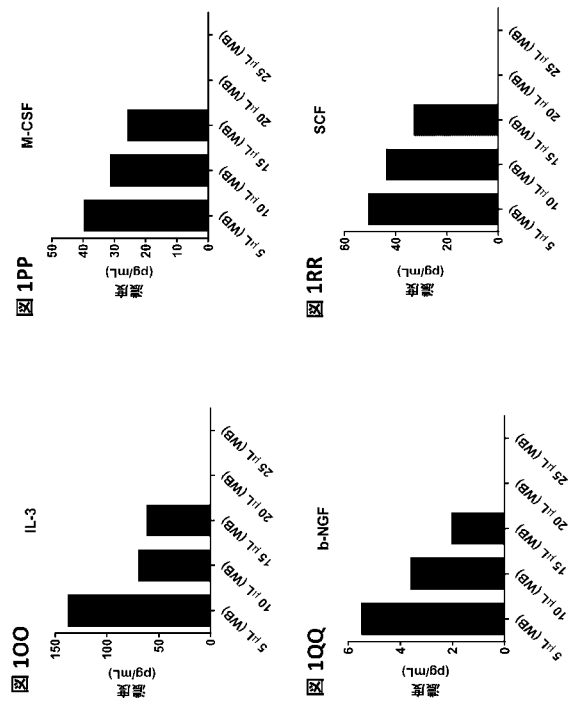
【図 1 G G - J J】



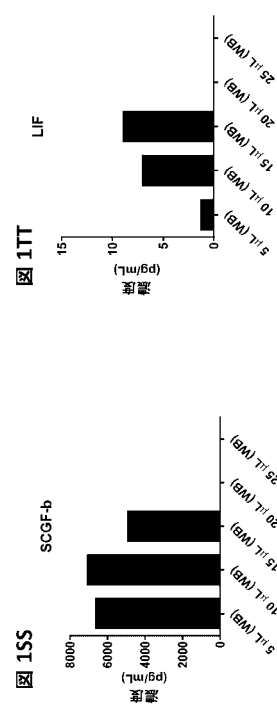
【図 1 K K - N N】



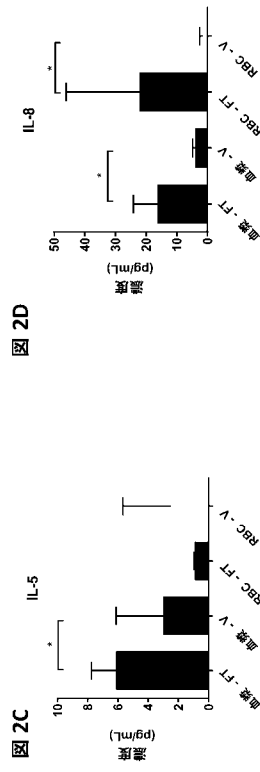
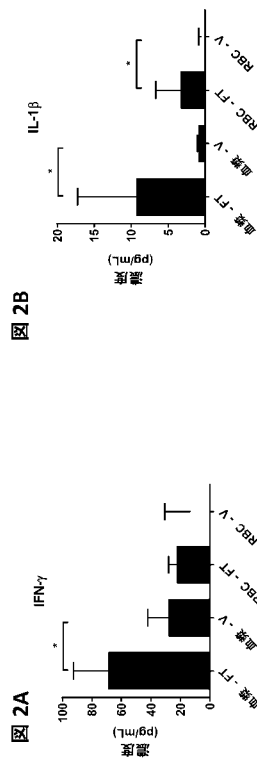
【図 1 O O - R R】



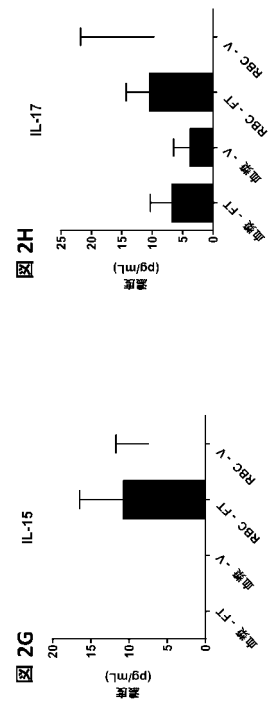
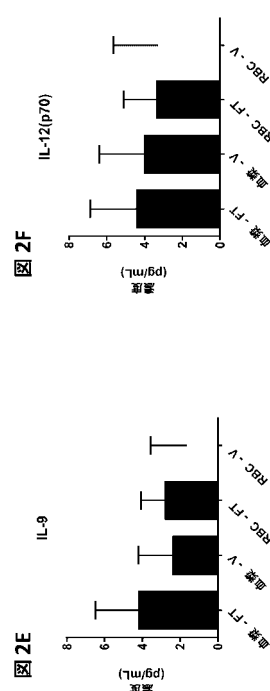
【図 1 S S - T T】



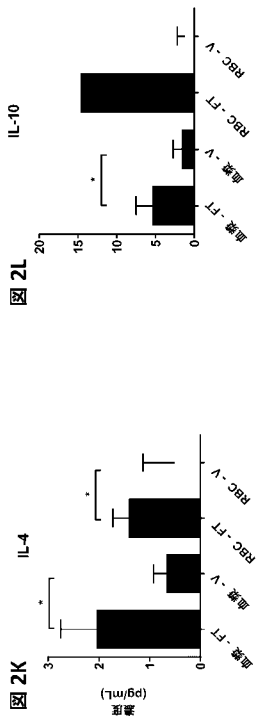
【図 2 A - D】



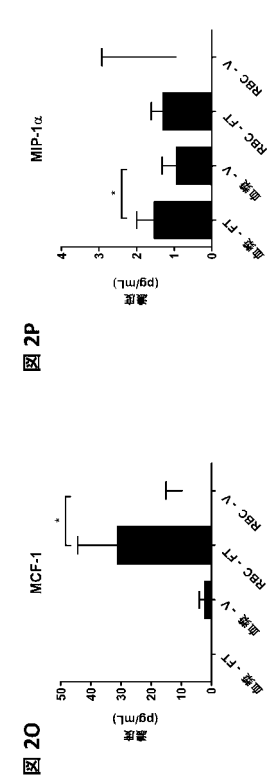
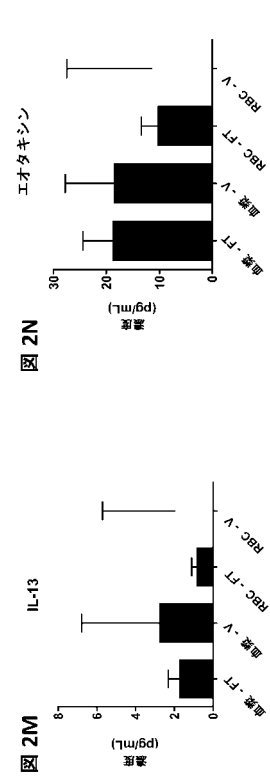
【図 2 E - H】



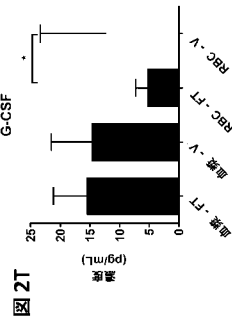
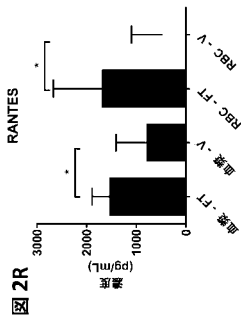
【図 2 I - L】



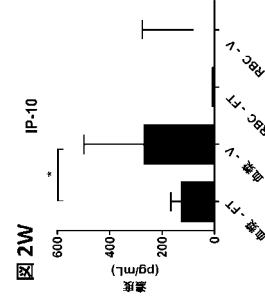
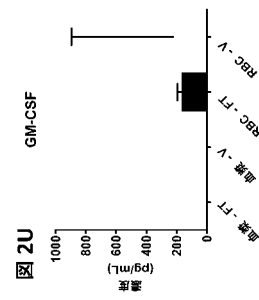
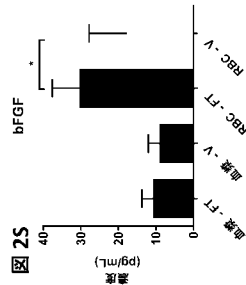
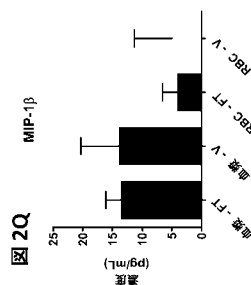
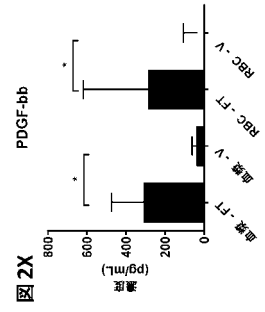
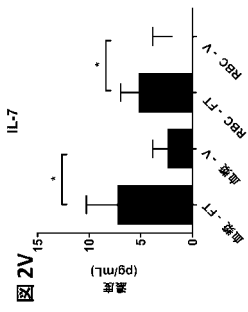
【図 2 M - P】



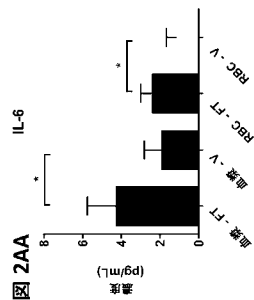
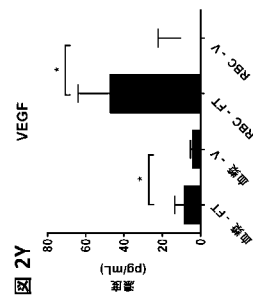
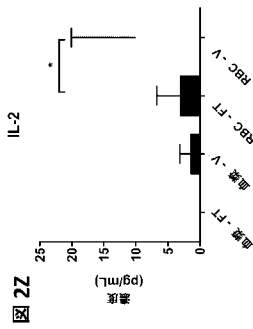
【図 2 Q - T】



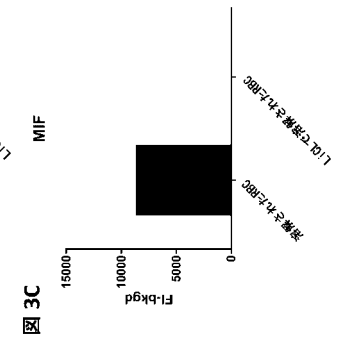
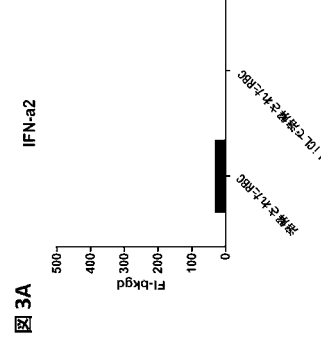
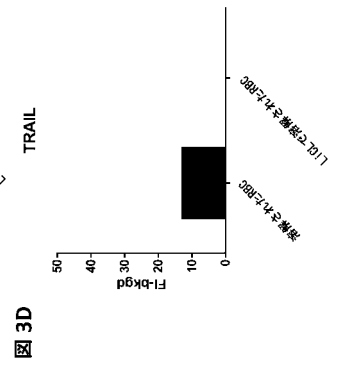
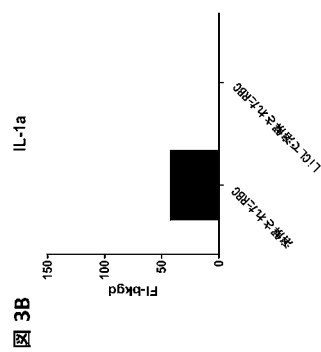
【図 2 U - X】



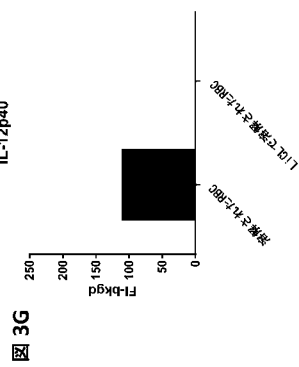
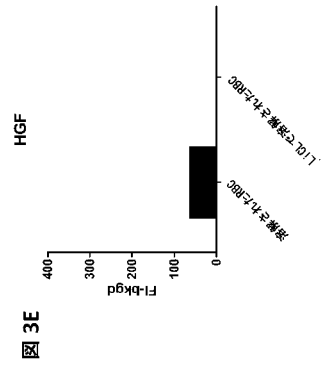
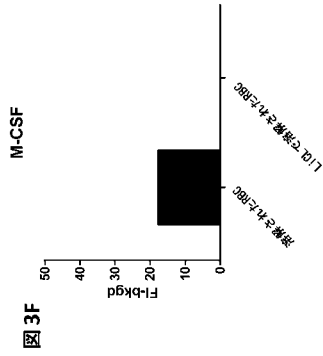
【図 2 Y - A A】



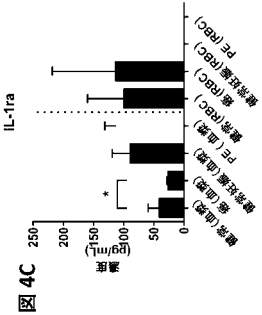
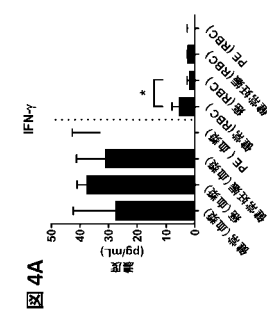
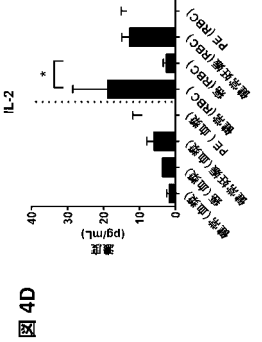
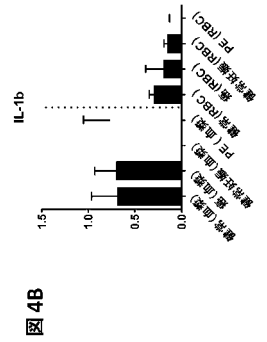
【図 3 A - D】



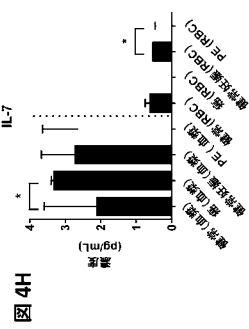
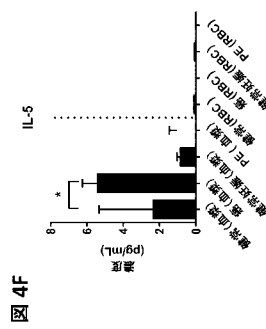
【図 3 E - G】



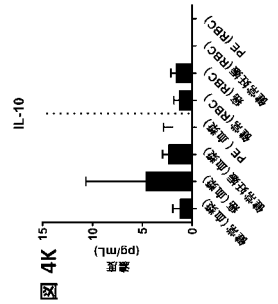
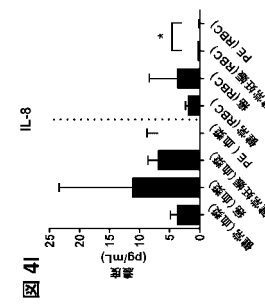
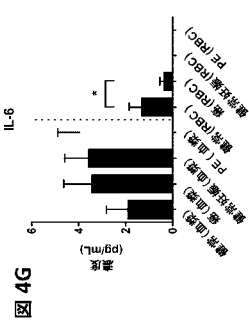
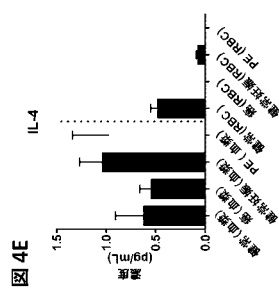
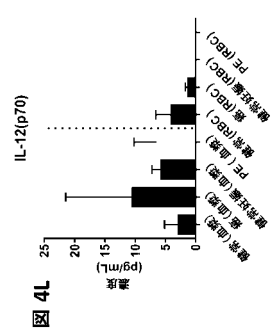
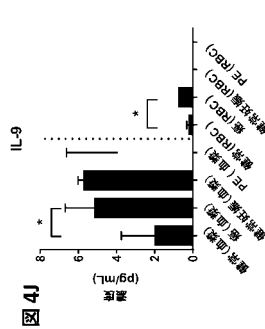
【図 4 A - D】



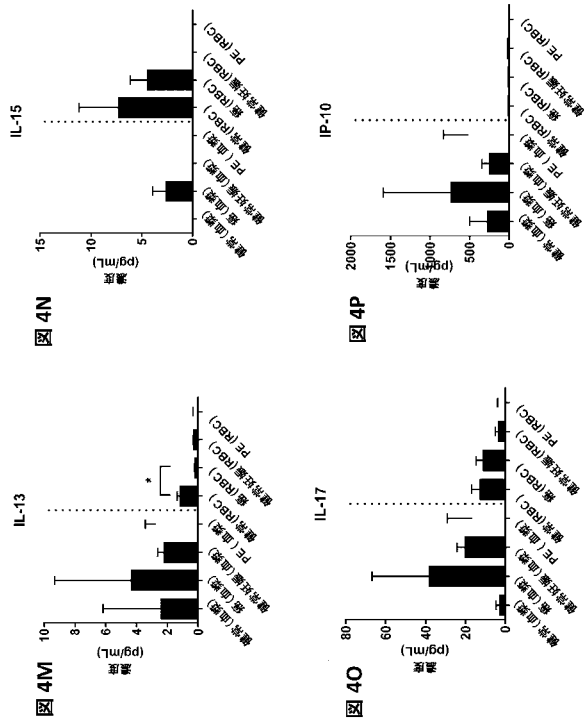
【図 4 E - H】



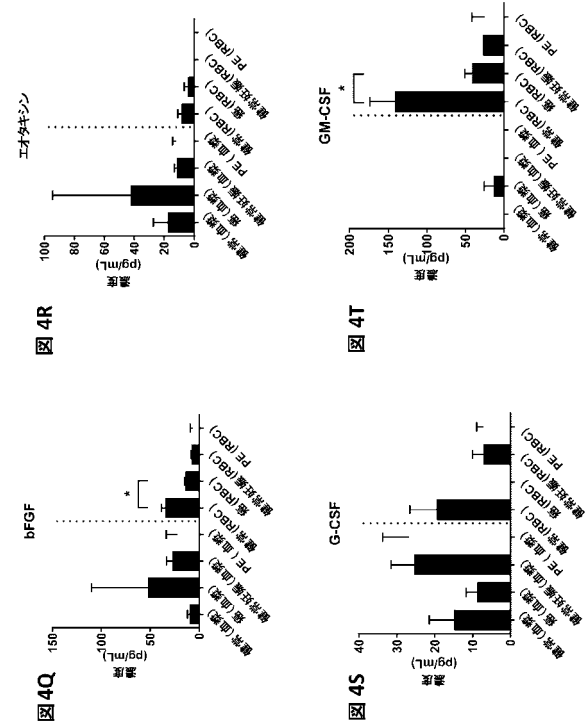
【図 4 I - L】



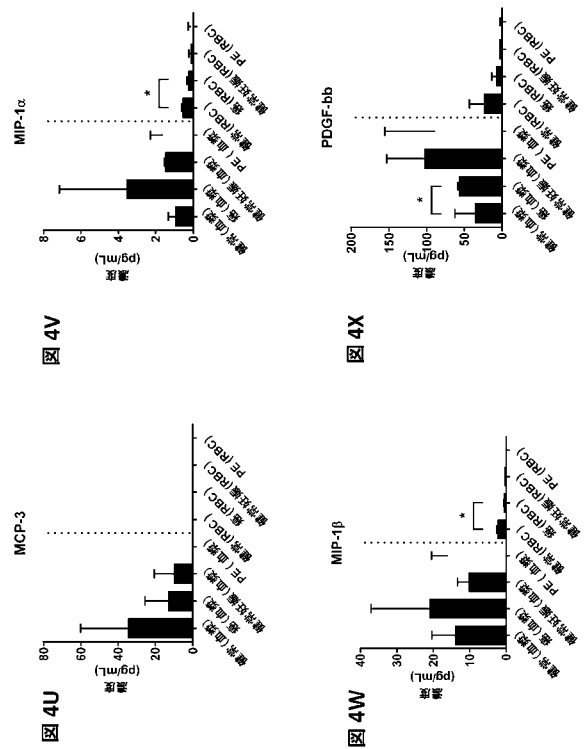
【図 4 M - P】



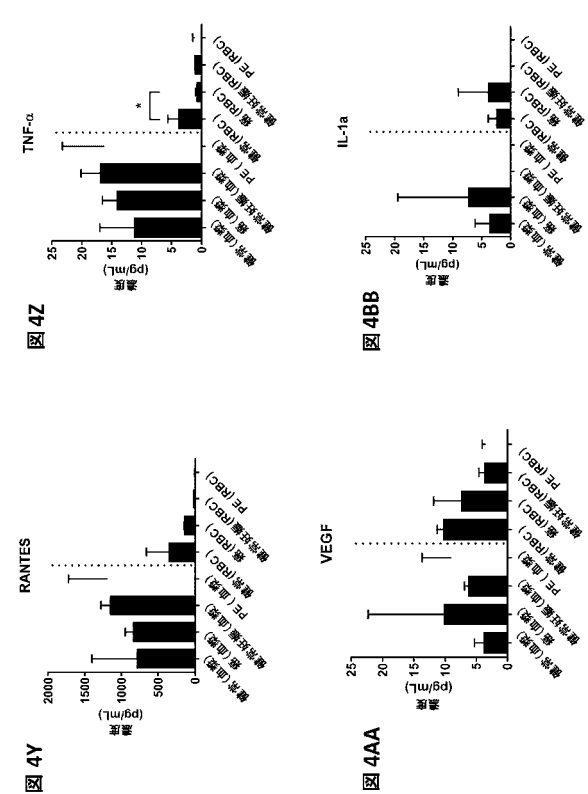
【図 4 Q - T】



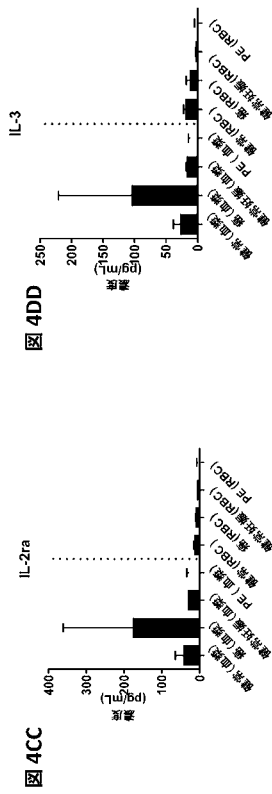
【図 4 U - X】



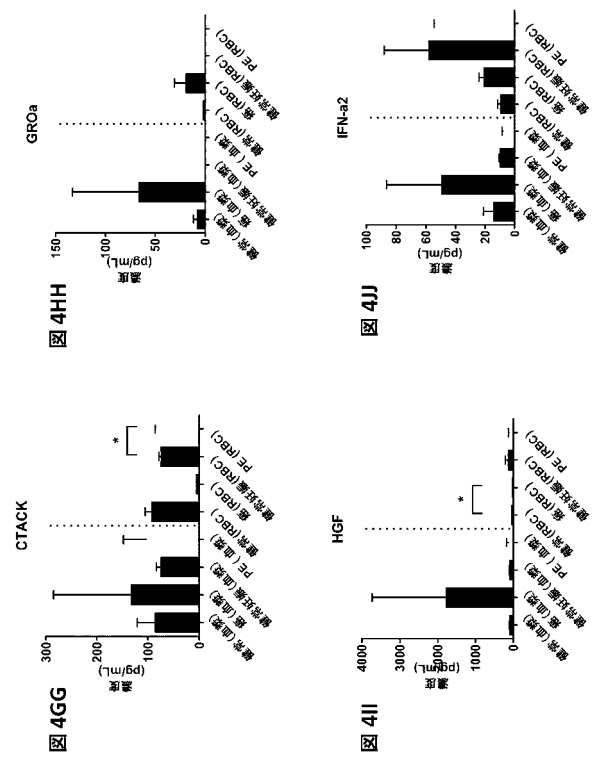
【図 4 Y - B B】



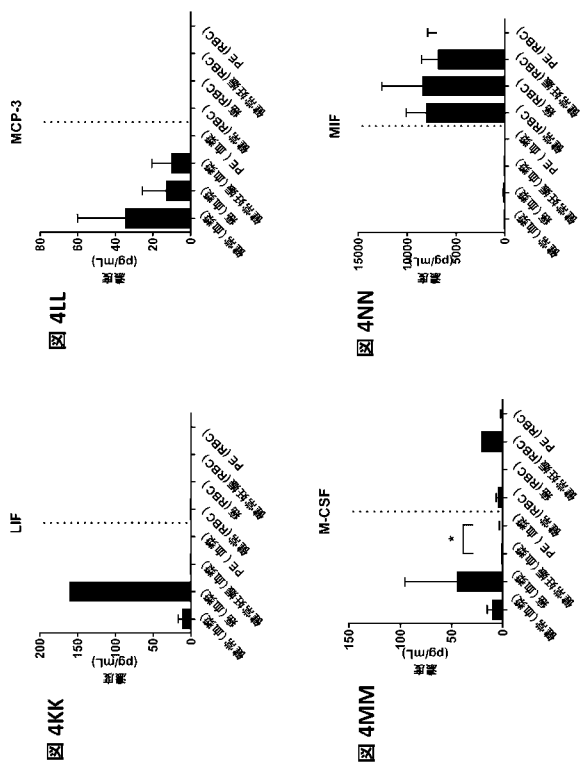
【図 4 C C - F F】



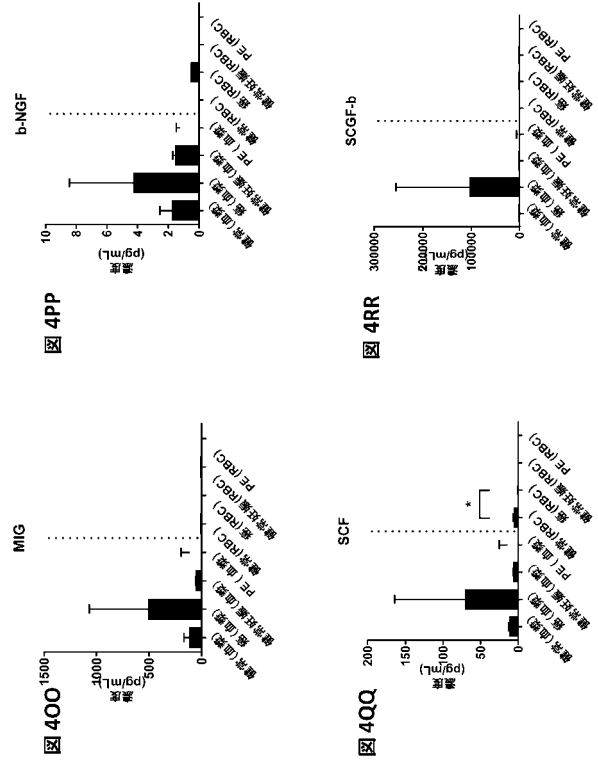
【図 4 G G - J J】



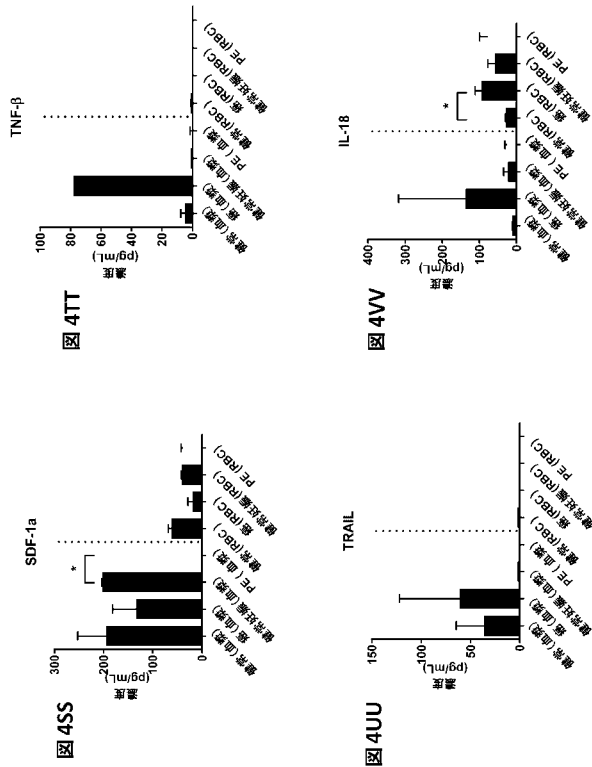
【図 4 K K - N N】



【図 4 O O - R R】



【図 4 S S - V V】



【図 5 A】

図 5A

分析物	血液 *		RBCs *		倍率変化		
	対照の 数	pg/全血1mL		対照の 数		pg/全血1mL	
		濃度	SD			濃度	SD
炎症促進性							
IFN-α2	3	24.4	18.9	3	251.5	32.4	14.97
IFN-γ	3	18.6	1.9	3	18.3	12.2	0.96
IL-1α	3	3.6	6.2	3	35.9	44.3	156.39
IL-1β	3	0.3	0.1	3	1.9	1.5	7.28
IL-5	3	2.7	0.4	0	-	-	-
IL-8	3	5.5	6.2	2	31.9	41.8	1.93
IL-9	3	2.6	0.8	2	7.8	2.5	2.10
IL-12(p70)	3	5.2	5.6	3	15.3	5.6	6.11
	3	1.3	0.7	3	53.6	20.3	62.29
IL-17	3	19.1	14.4	3	132.8	26.2	9.75
IL-18	3	67.0	91.9	3	1209.7	535.3	79.51
MIF	3	45.5	47.2	3	8348.1	4259.3	280.31
TNF-α	3	7.0	1.3	2	8.5	6.0	0.83
TNF-β	1	77.24	-	0	-	-	-
TRAIL	3	29.9	31.2	0	-	-	-

【図 5 B】

図 5B

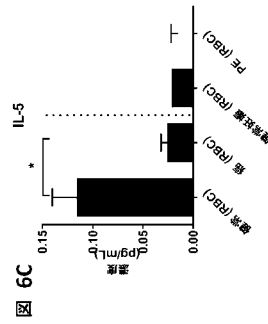
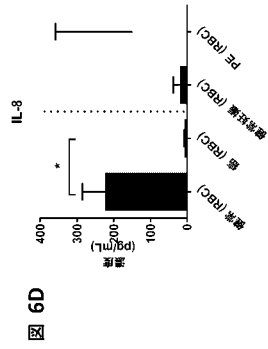
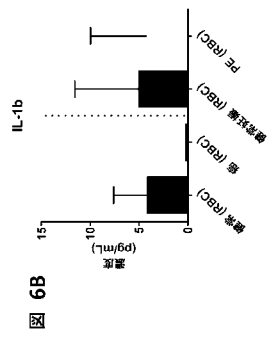
分析物	血液 *				RBCs *				倍率変化
	対照の 数	pE/ 全血mL		対照の 数	pE/ 全血mL				
		濃度	SD		濃度	SD			
炎症促進性									
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87/35		
IL2+ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63		
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-		
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47		
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42		
ケモカイン									
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81		
エオタキシン	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67		
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10/11		
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12/29		
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95/56		
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-		
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-		
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3/76		
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87		
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4/10		
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82		

【図 5 C】

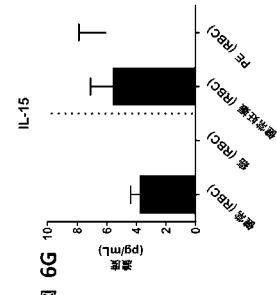
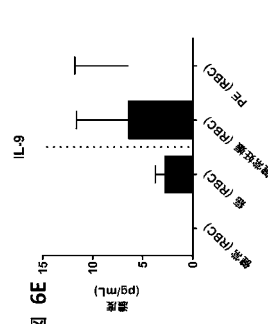
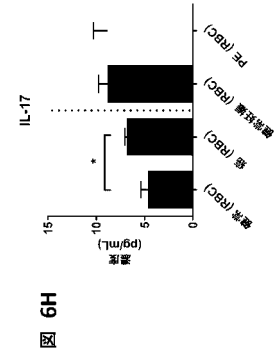
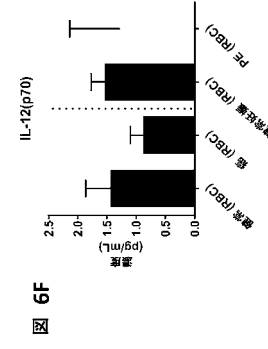
図 5C

分析物	血糖・				RBCs*			倍率変化
	対照の 数	濃度	pE/ 全血mL		対照の 数	pE/ 全血mL		
			濃度	SD		濃度	SD	
炎症促進性								
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87.35	
IL2-ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63	
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-	
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47	
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42	
ケモカイン								
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81	
エオタキシン	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67	
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10.11	
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12.29	
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95.56	
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-	
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-	
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3.76	
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87	
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4.10	
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82	

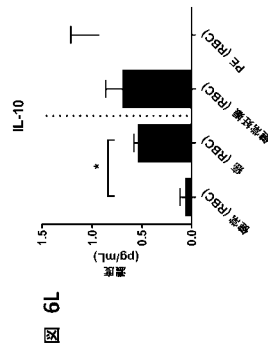
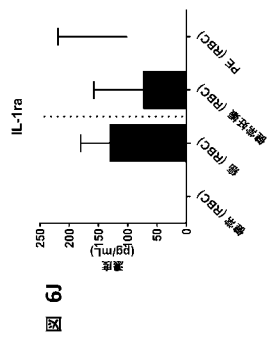
【図 6 A - D】



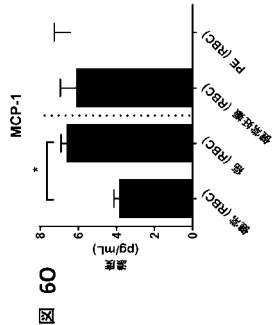
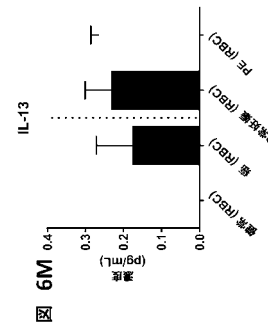
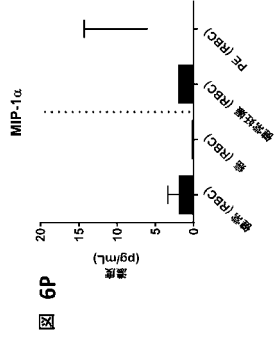
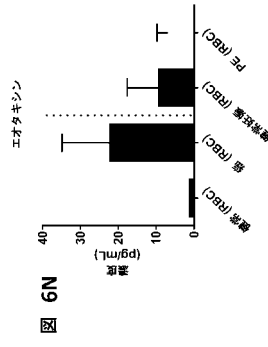
【図 6 E - H】



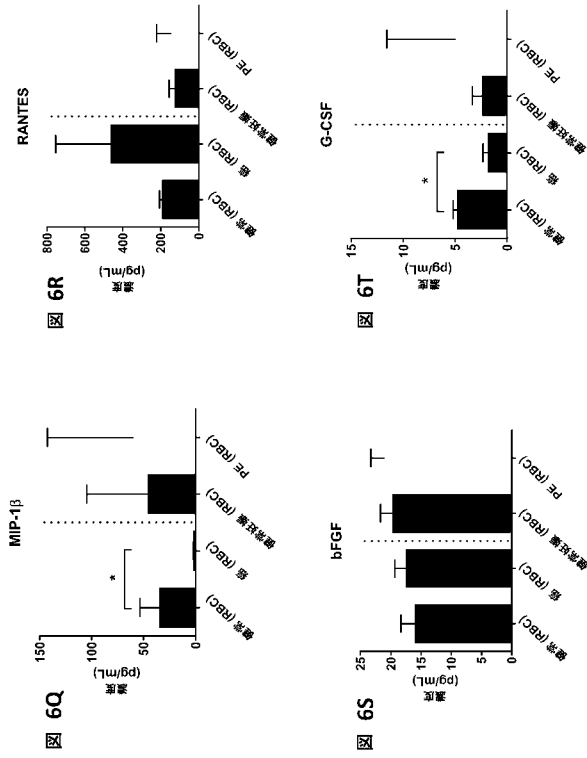
【図 6 I - L】



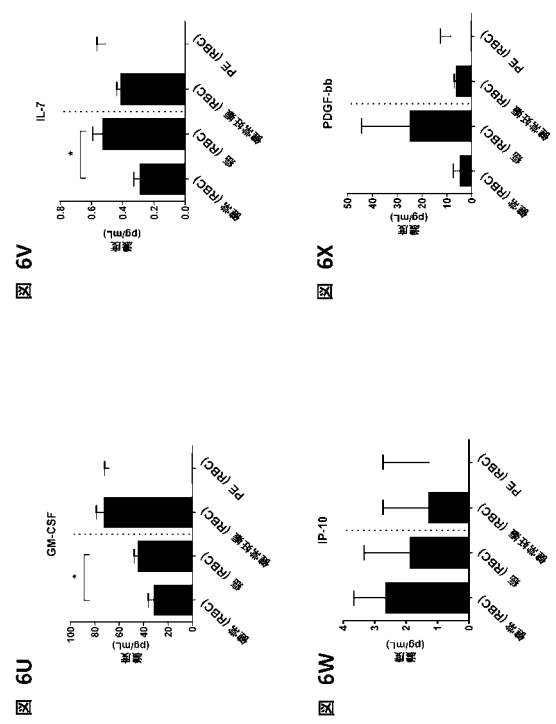
【図 6 M - P】



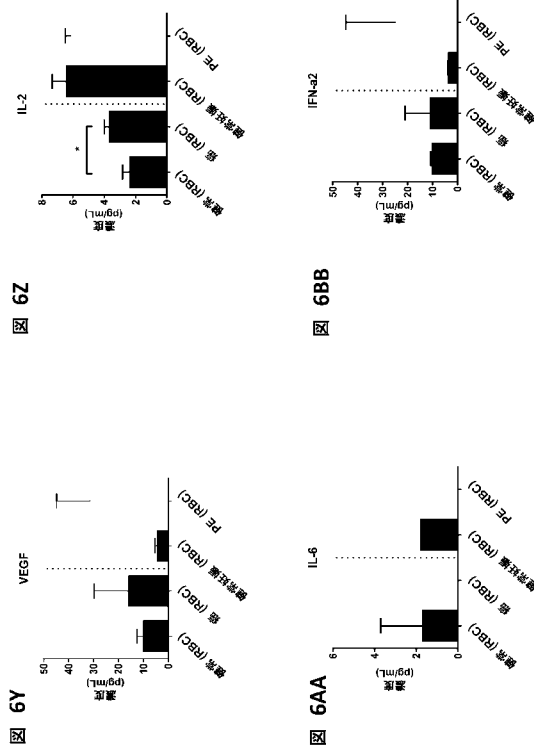
【図 6 Q - T】



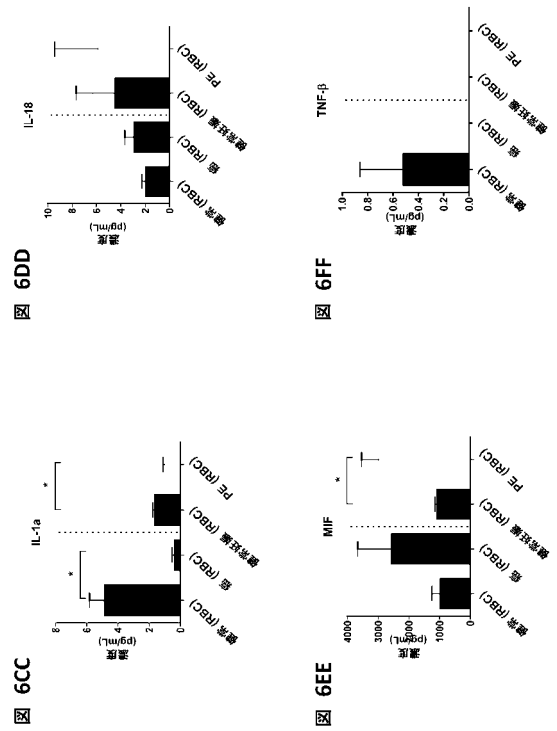
【図 6 U - X】



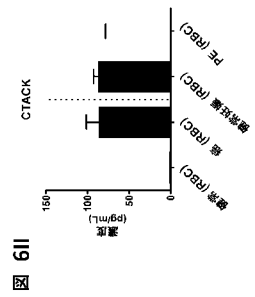
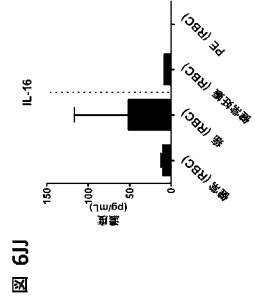
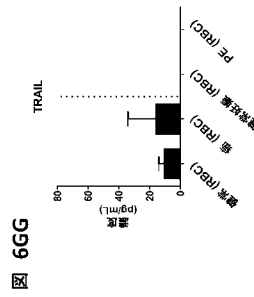
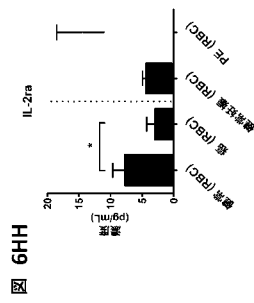
【図 6 Y - BB】



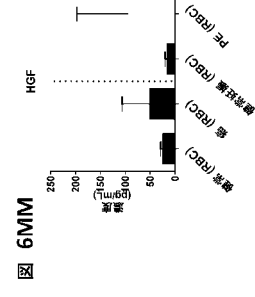
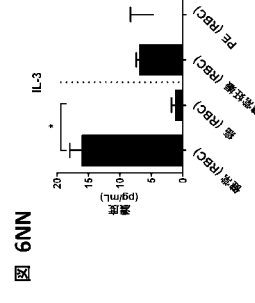
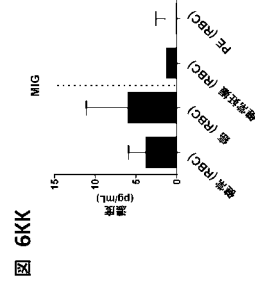
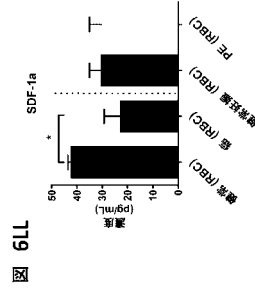
【図 6 CC - FF】



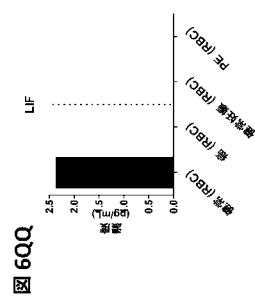
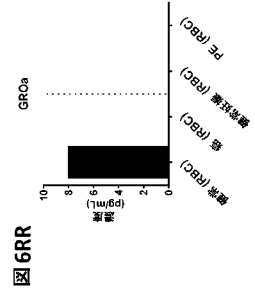
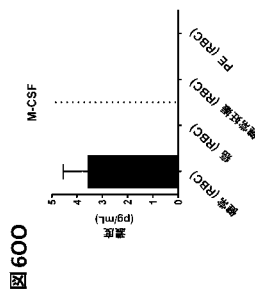
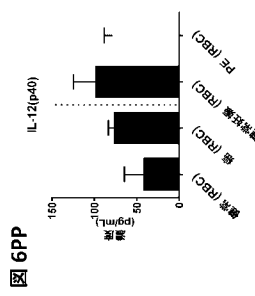
【図 6 G G - J J】



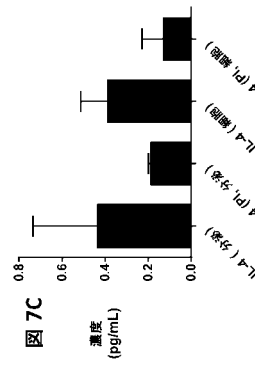
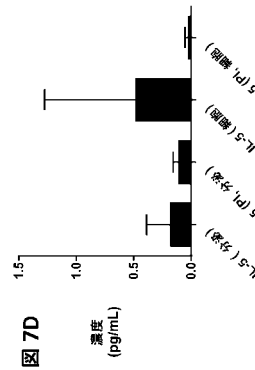
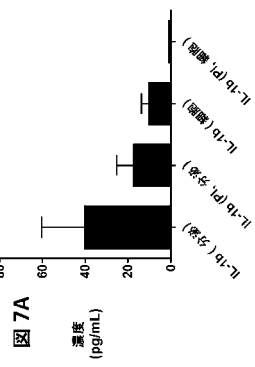
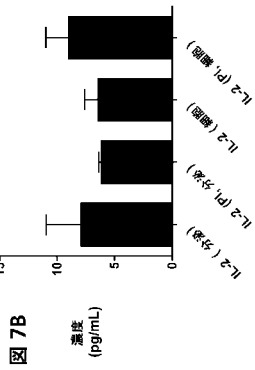
【図 6 K K - N N】



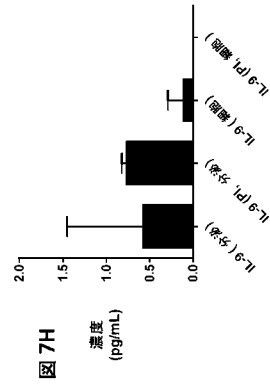
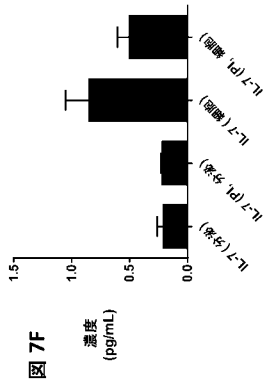
【図 6 O O - R R】



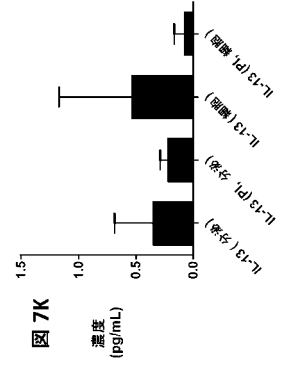
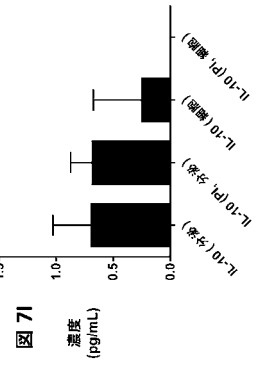
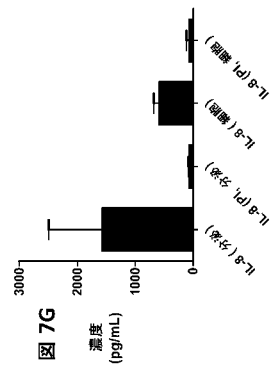
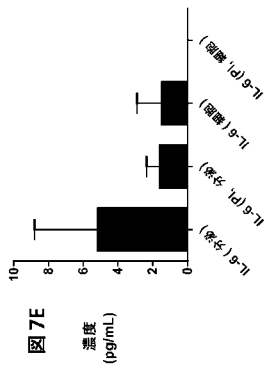
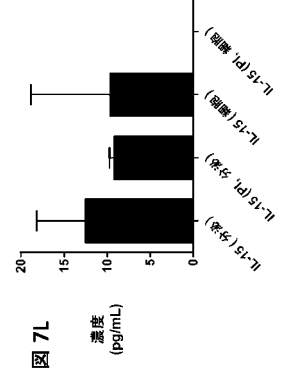
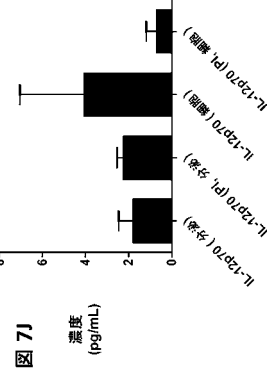
【図 7 A - D】



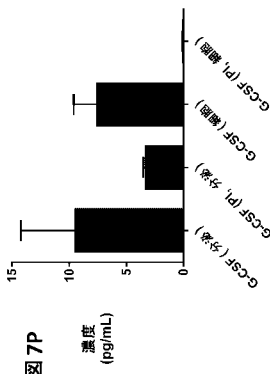
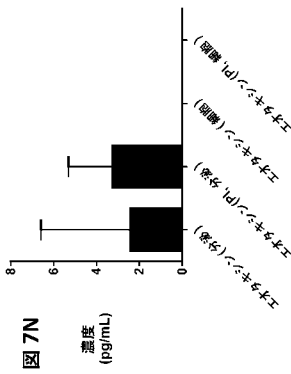
【図 7 E - H】



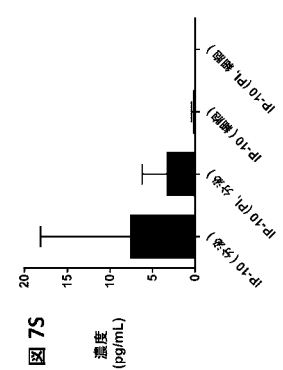
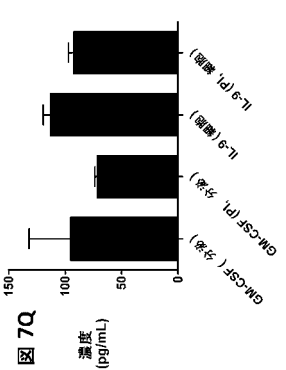
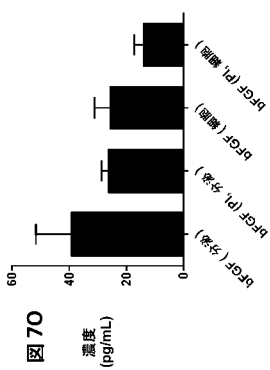
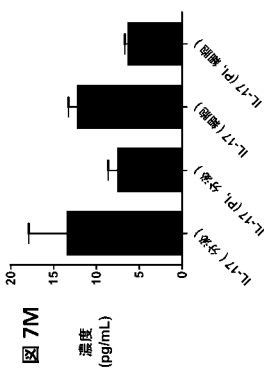
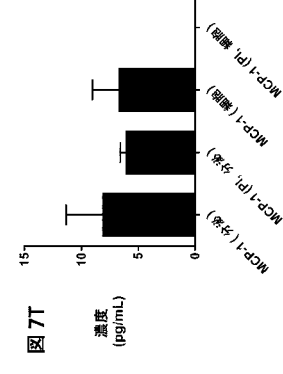
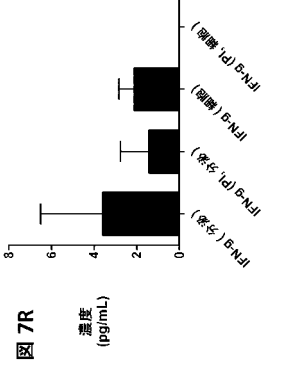
【図 7 I - L】



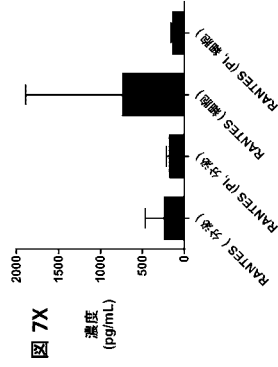
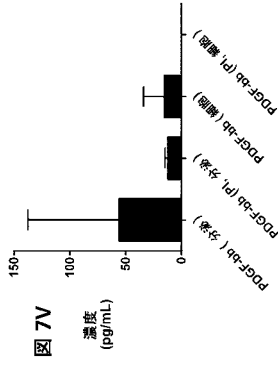
【図 7 M - P】



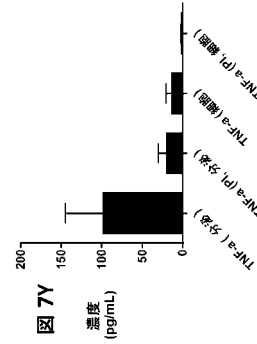
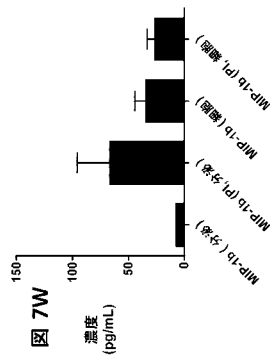
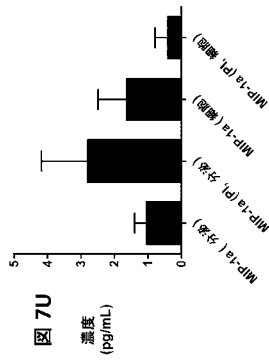
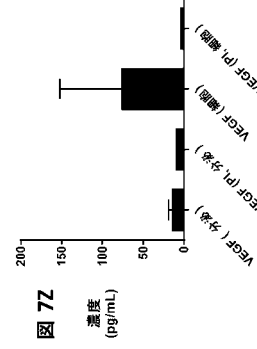
【図 7 Q - T】



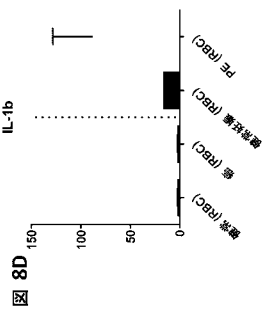
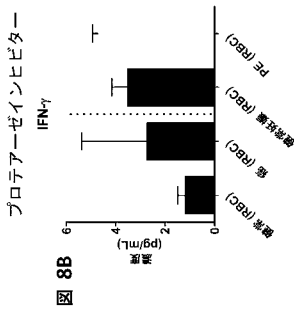
【図 7 U - X】



【図 7 Y - Z】

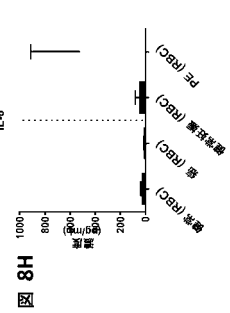
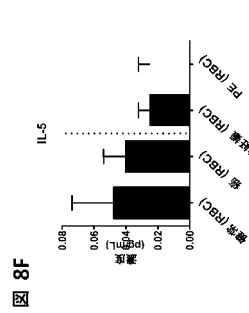


【図 8 A - D】

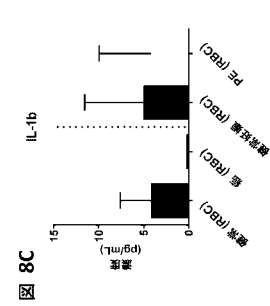
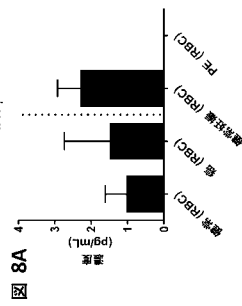


【図 8 E - H】

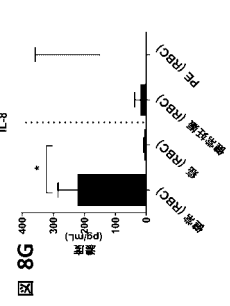
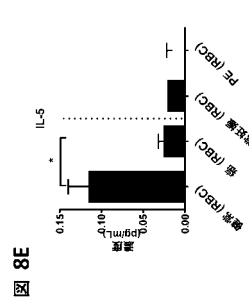
プロテアーゼインヒビター



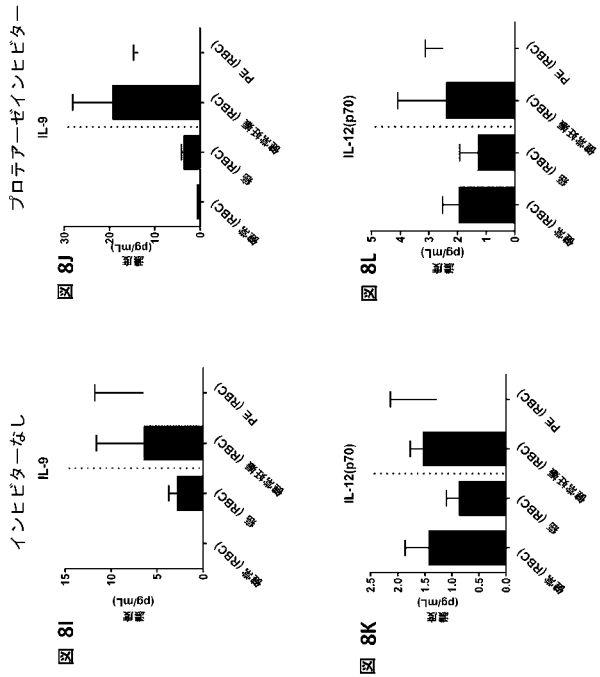
インヒビターなし



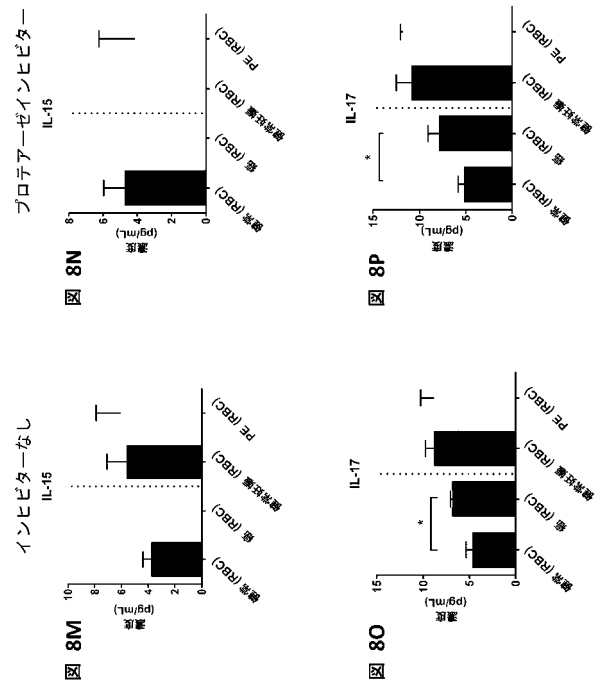
インヒビターなし



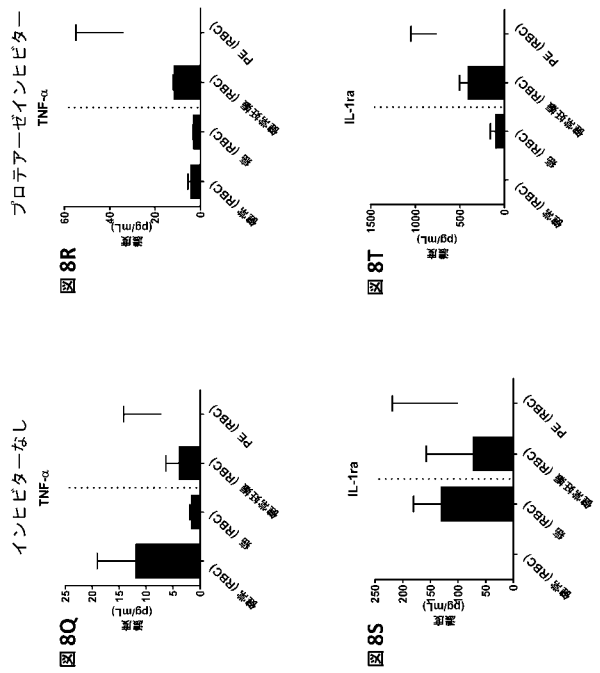
【図 8 I - L】



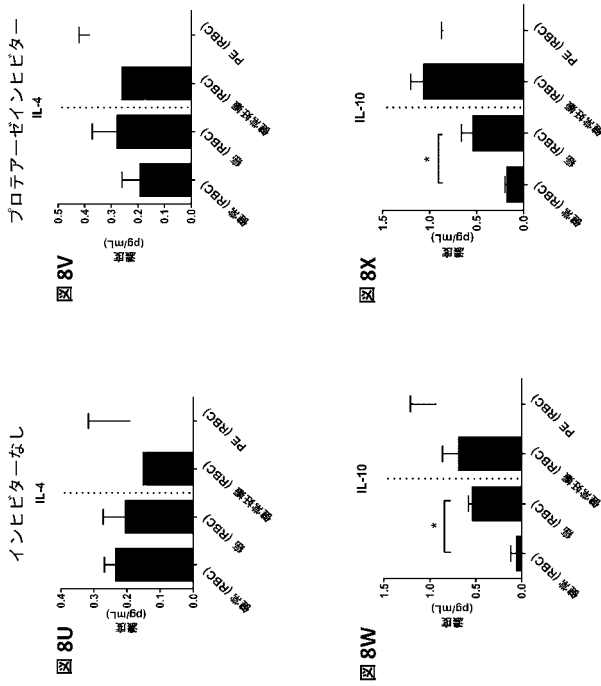
【図 8 M - P】



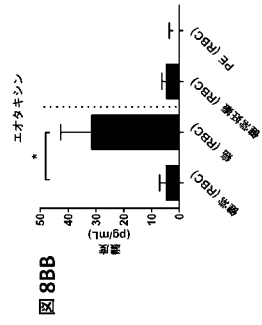
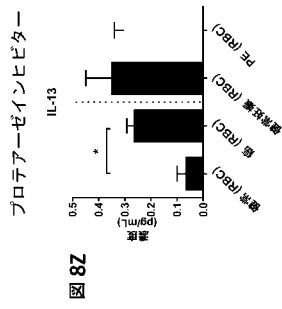
【図 8 Q - T】



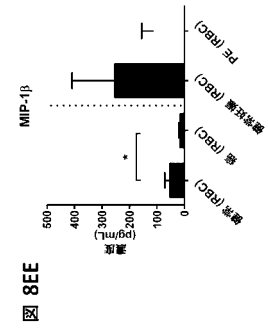
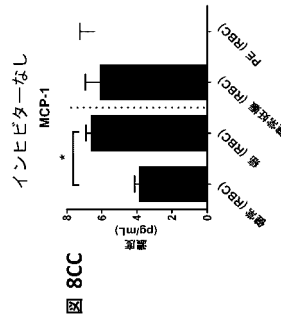
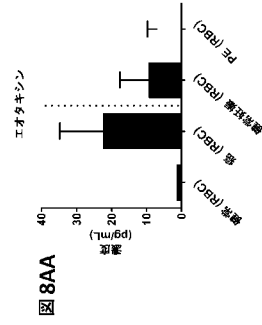
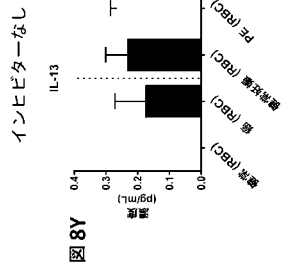
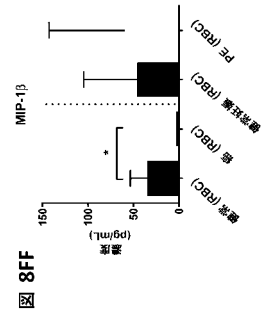
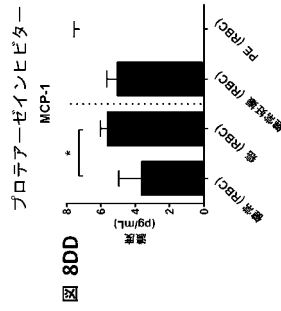
【図 8 U - X】



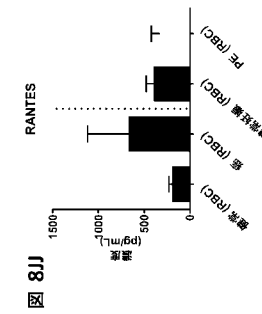
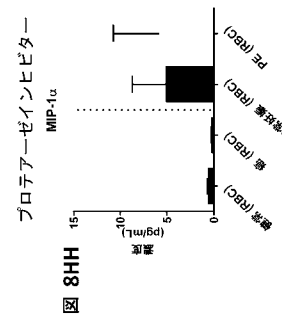
【図 8 Y - B B】



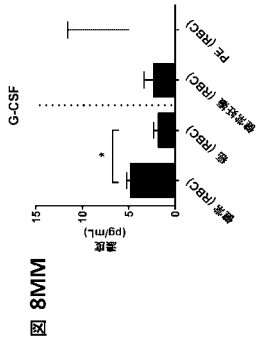
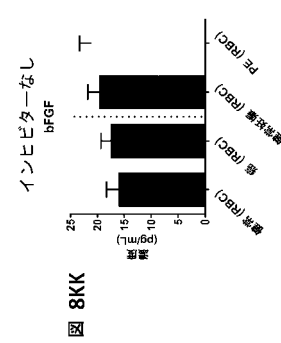
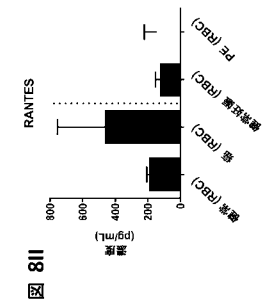
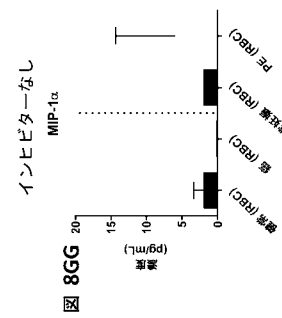
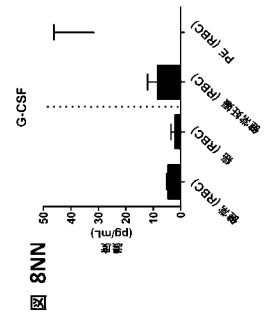
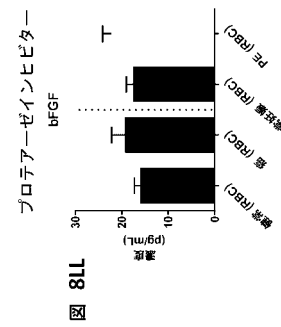
【図 8 C C - F F】



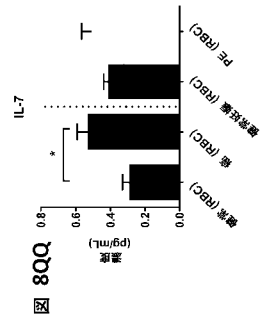
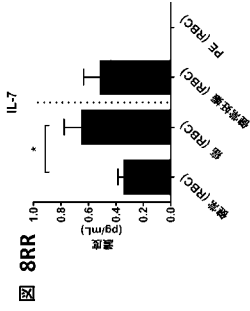
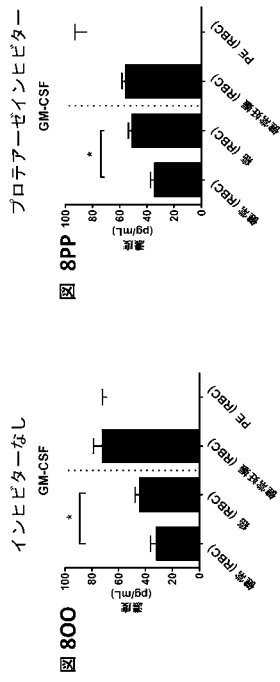
【図 8 G G - J J】



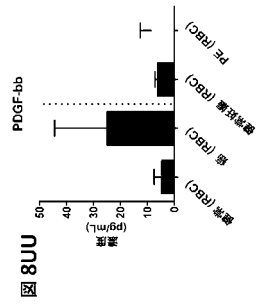
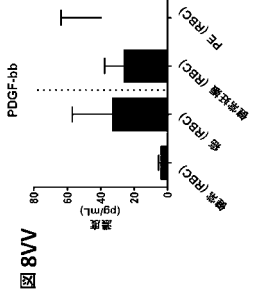
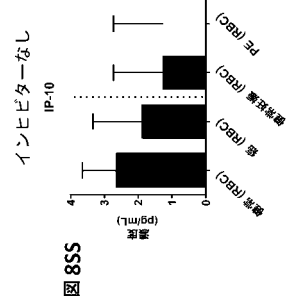
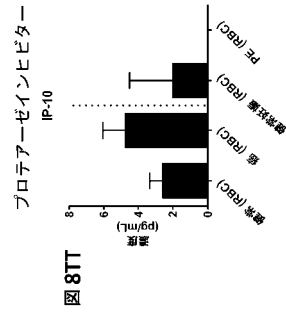
【図 8 K K - N N】



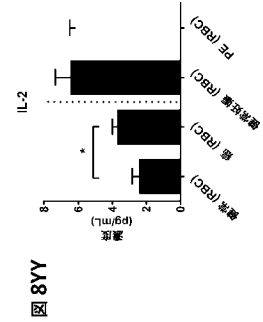
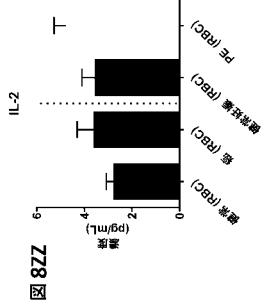
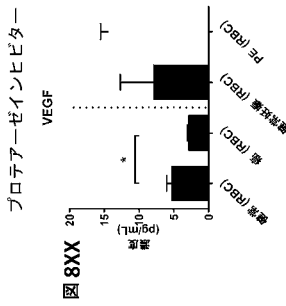
【図 800-RR】



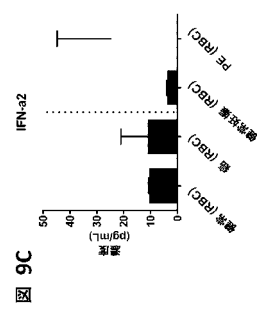
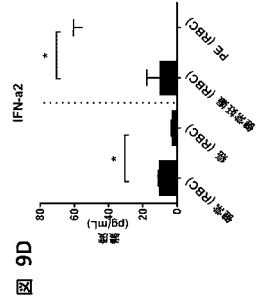
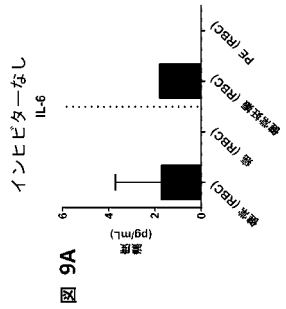
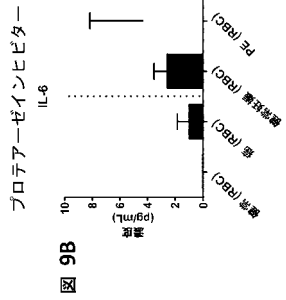
【図 8SS-VV】



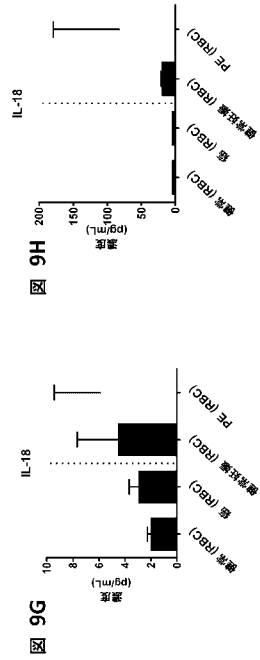
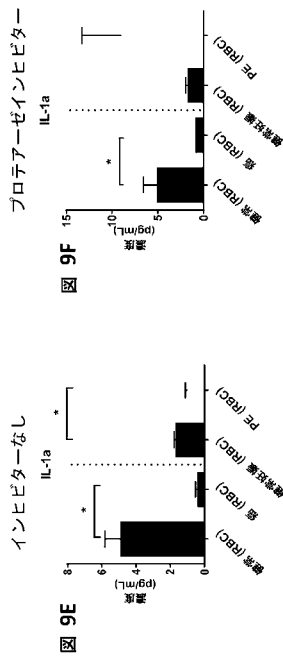
【図 8WW-ZZ】



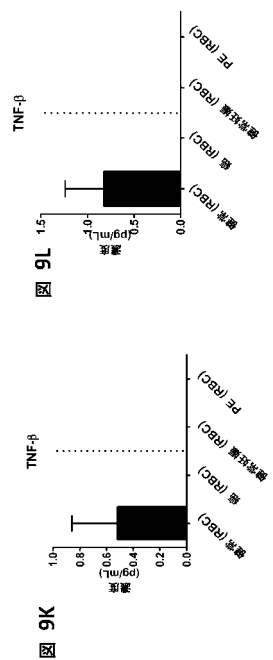
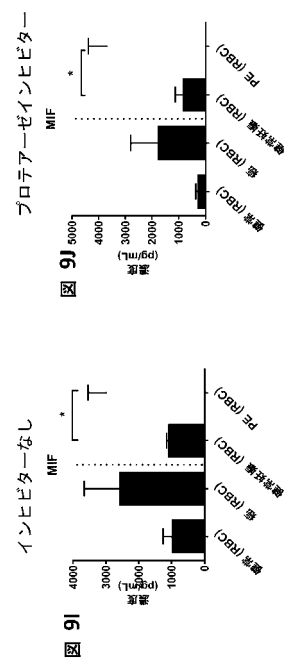
【図 9A-D】



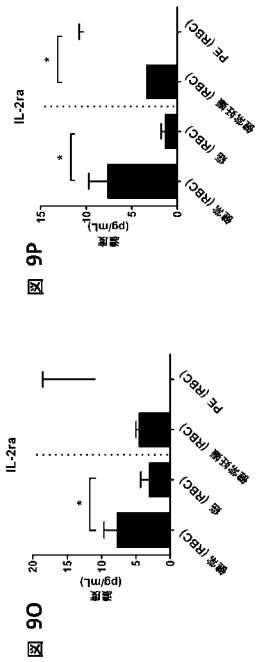
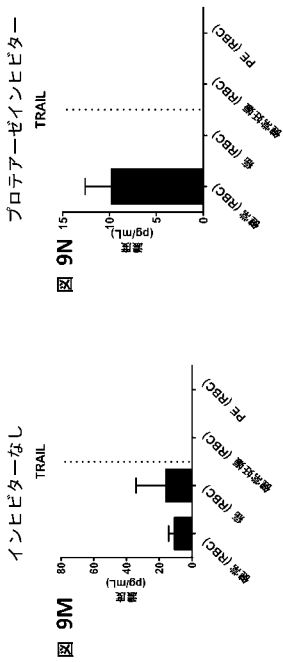
【図 9 E - H】



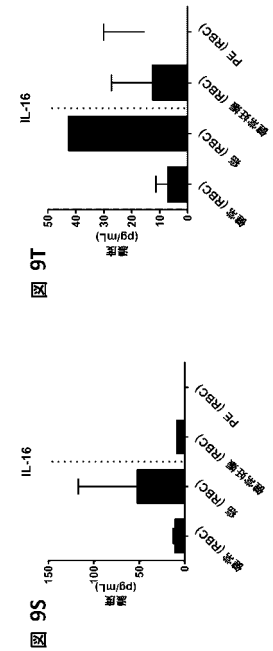
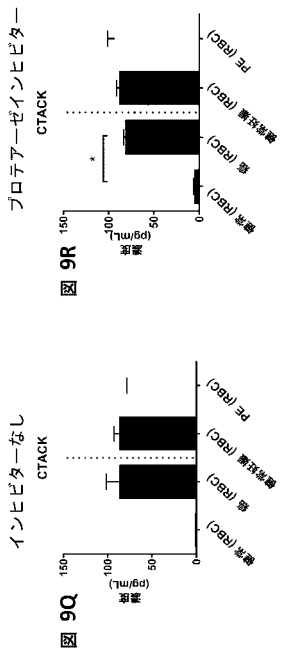
【図 9 I - L】



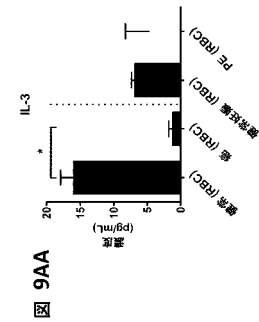
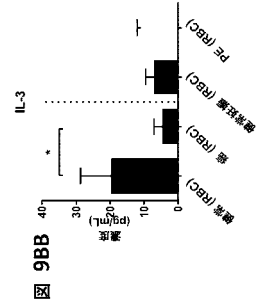
【図 9 M - P】



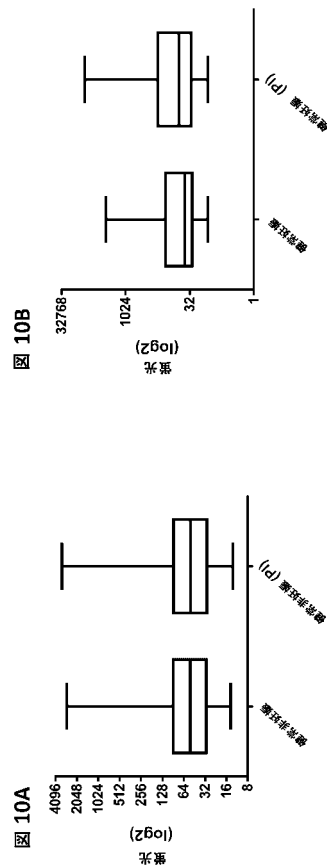
【図 9 Q - T】



【図 9 Y-B B】



【図 10 A - B】



P 值: 0.05

【図 1 2 G - L】

図 12G

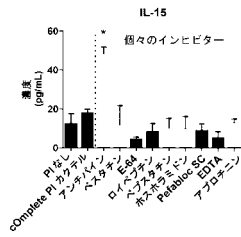


図 12H

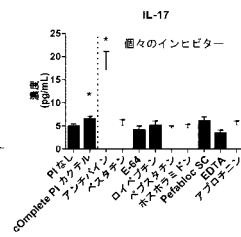


図 12M

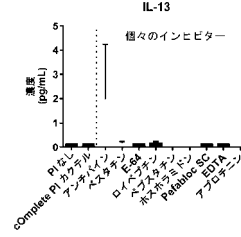


図 12N

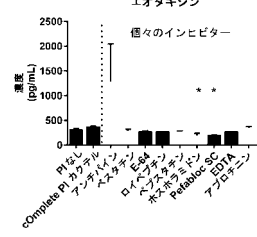


図 12I

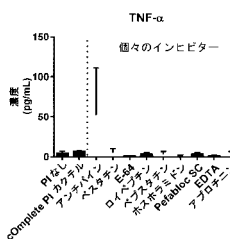


図 12J

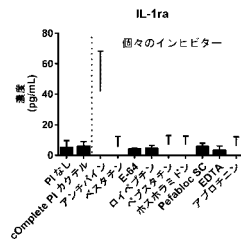


図 12O

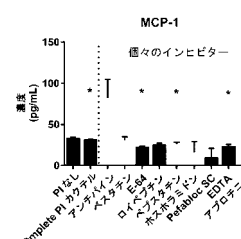


図 12P

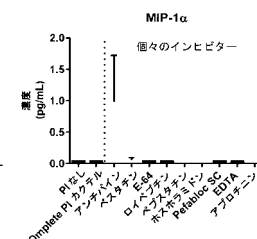


図 12K

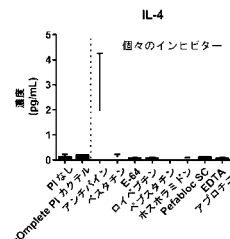


図 12L

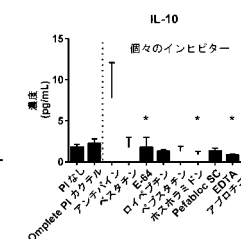


図 12Q

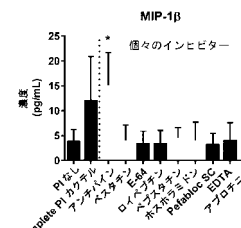
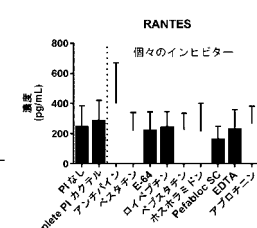


図 12R



【図 1 2 S - X】

図 12S

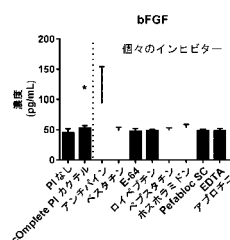


図 12T

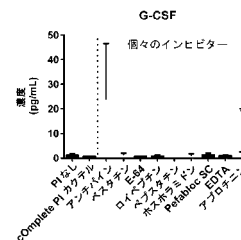


図 12Y

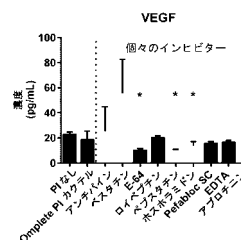


図 12Z

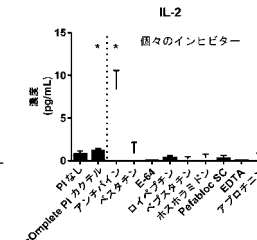


図 12U

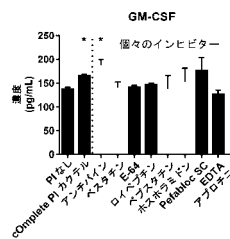


図 12V

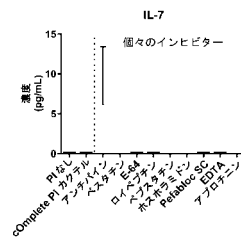


図 12AA

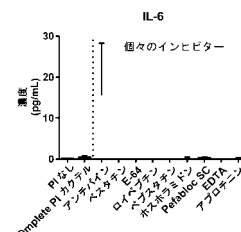


図 12BB

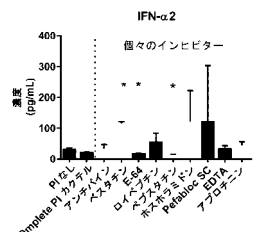


図 12W

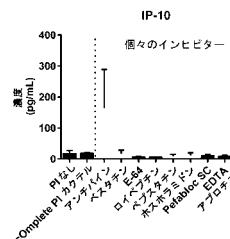


図 12X

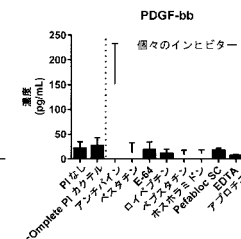


図 12CC

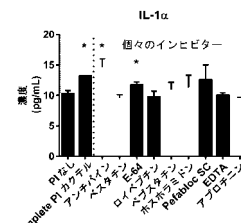
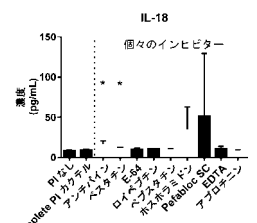


図 12DD



【図 1 2 Y - D D】

【図 1 2 E E - J J】

図 12EE

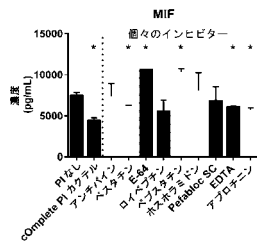


図 12FF

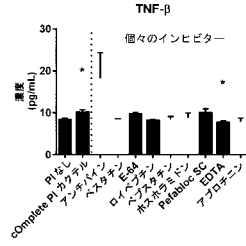


図 12KK

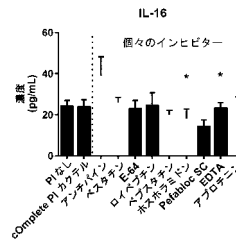


図 12LL

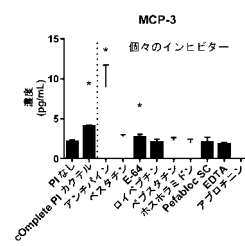


図 12GG

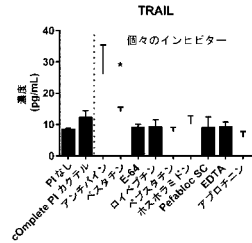


図 12HH

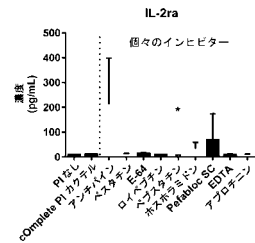


図 12MM

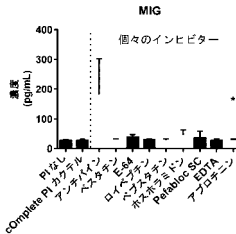


図 12NN

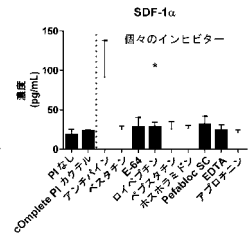


図 12JJ

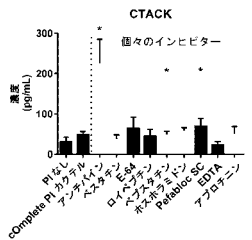


図 12JJ

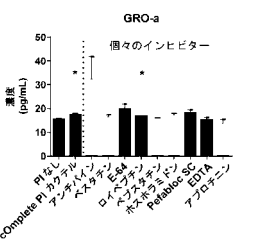


図 12OO

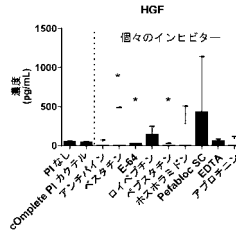
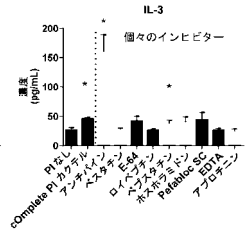


図 12PP



【図 1 2 Q Q - V V】

図 12QQ

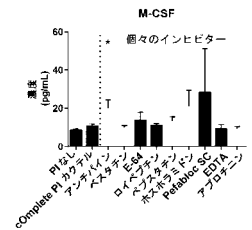


図 12RR

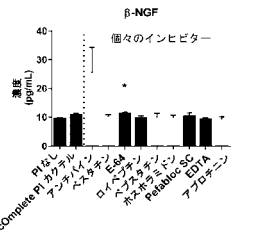


図 13A

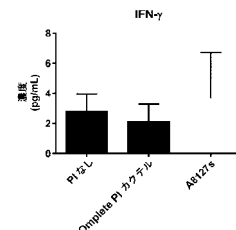


図 13B

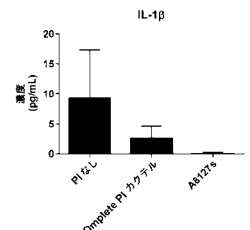


図 12SS

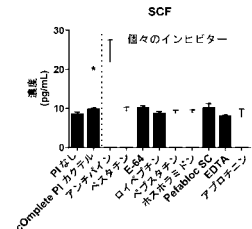


図 12TT

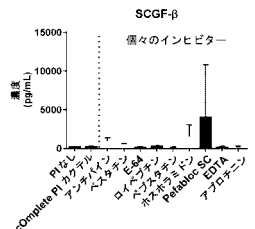


図 13C

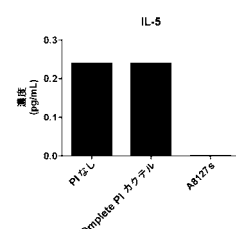


図 13D

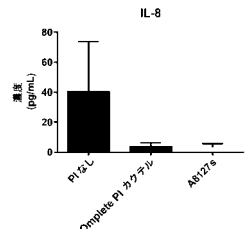


図 12UU

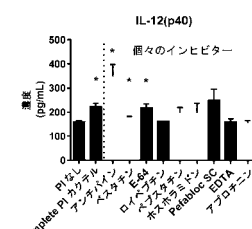


図 12VV

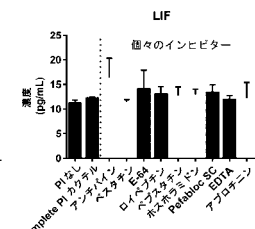


図 13E

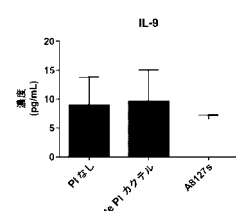
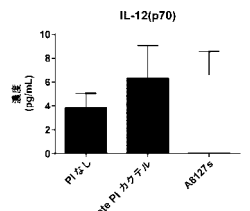
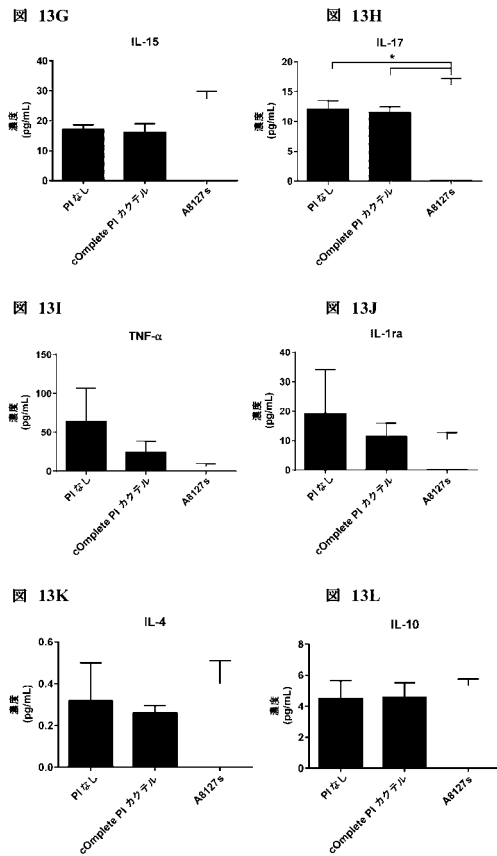


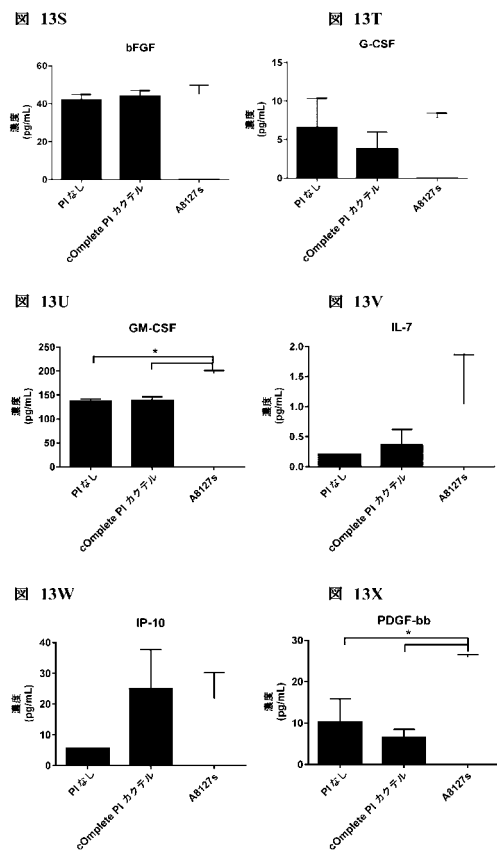
図 13F



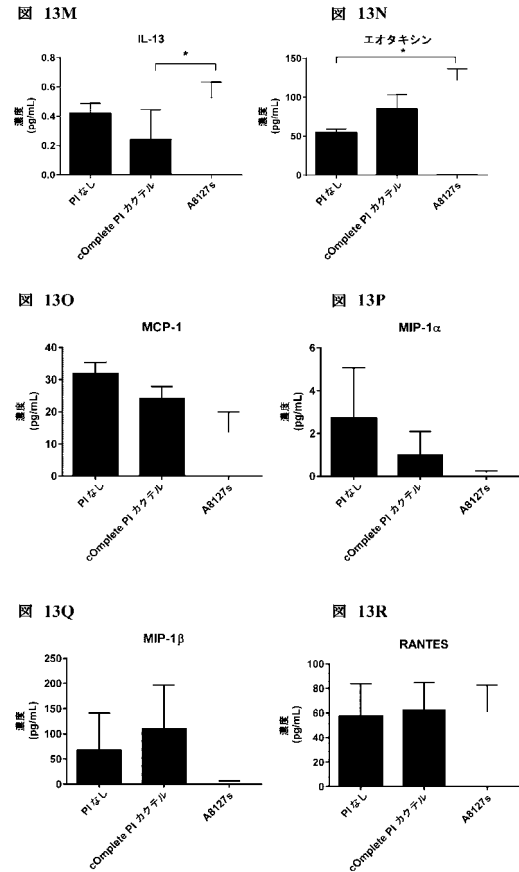
【図 1 3 G - L】



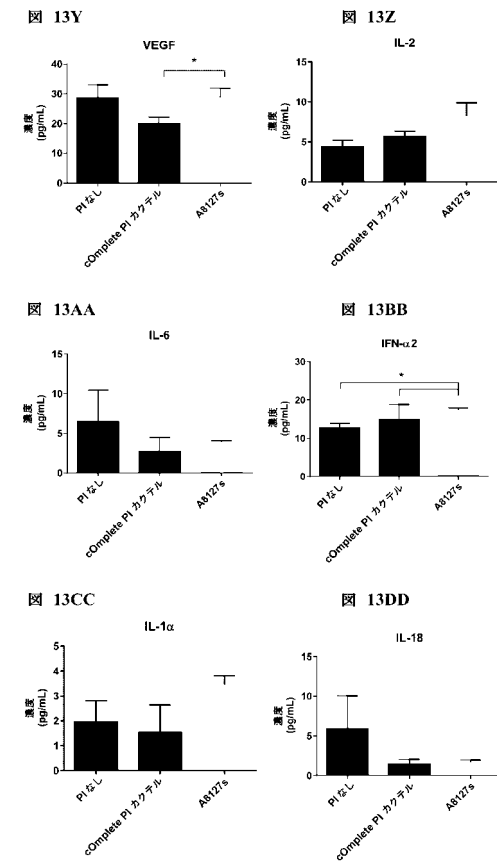
【図 1 3 S - X】



【図 1 3 M - R】



【図 1 3 Y - D D】



【図 13 E E - J J】

図 13EE

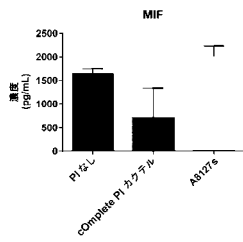


図 13FF

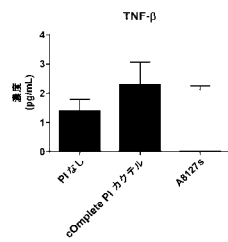


図 13KK

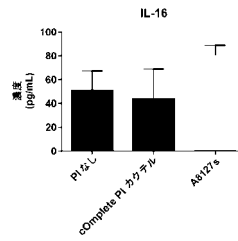


図 13LL

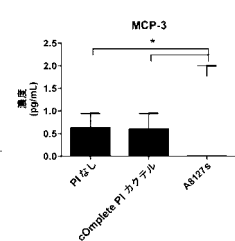


図 13GG

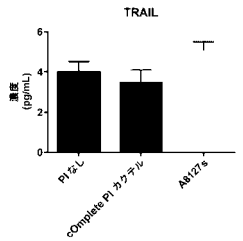


図 13HH

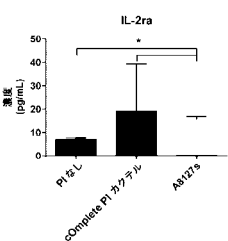


図 13MM

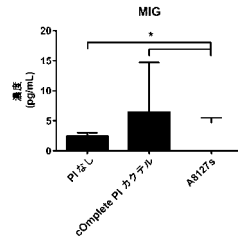


図 13NN

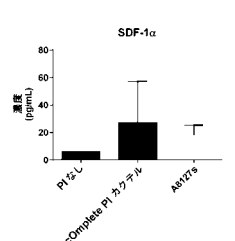


図 13II

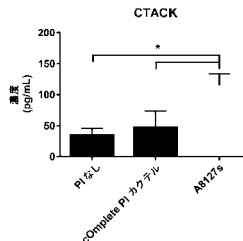


図 13JJ

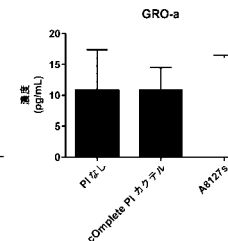


図 13OO

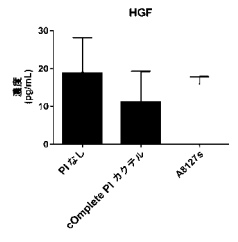
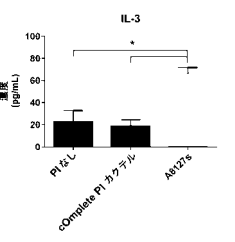


図 13PP



【図 13 Q Q - V V】

図 13QQ

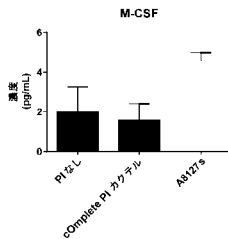


図 13RR

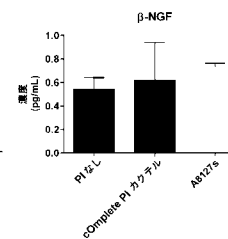


図 14A

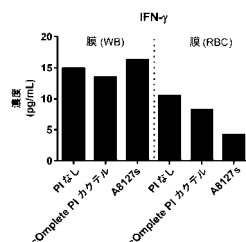


図 14B

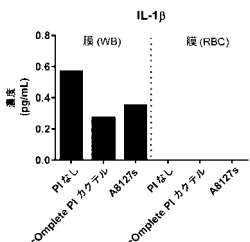


図 13SS

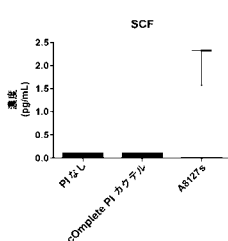


図 13TT

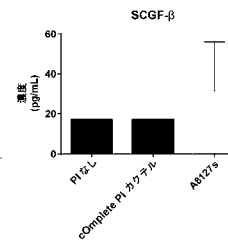


図 14C

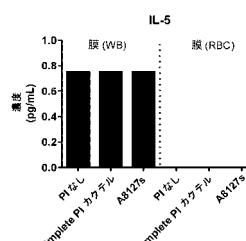


図 14D

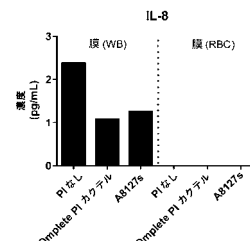


図 13UU

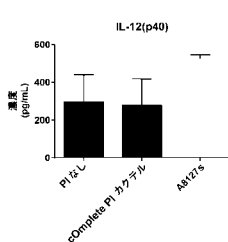


図 13VV

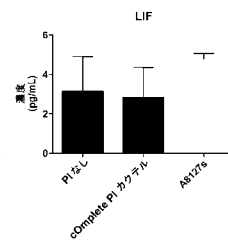


図 14E

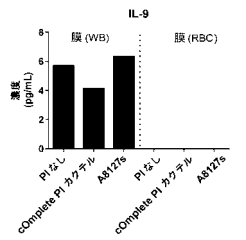
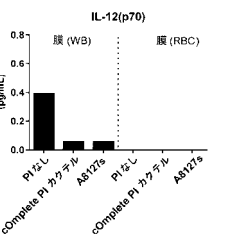
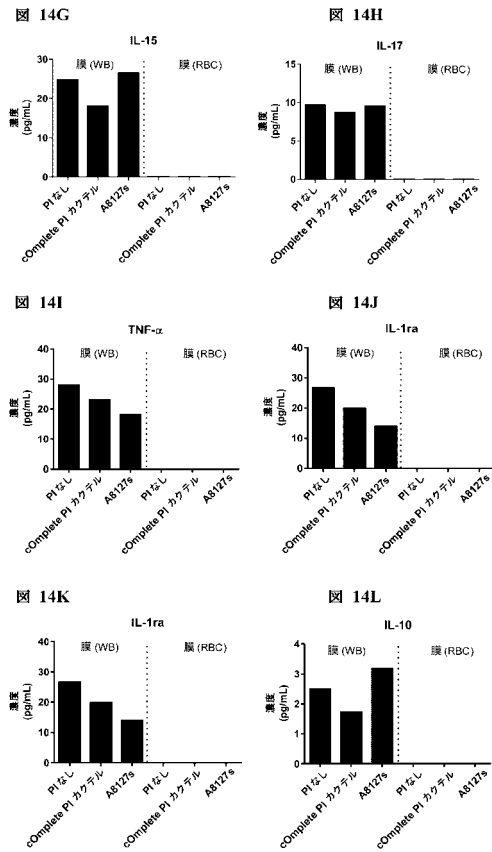


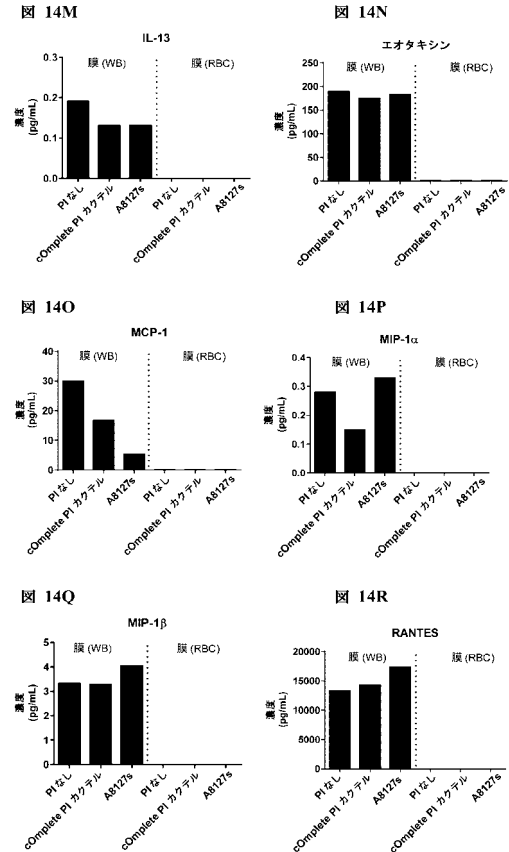
図 14F



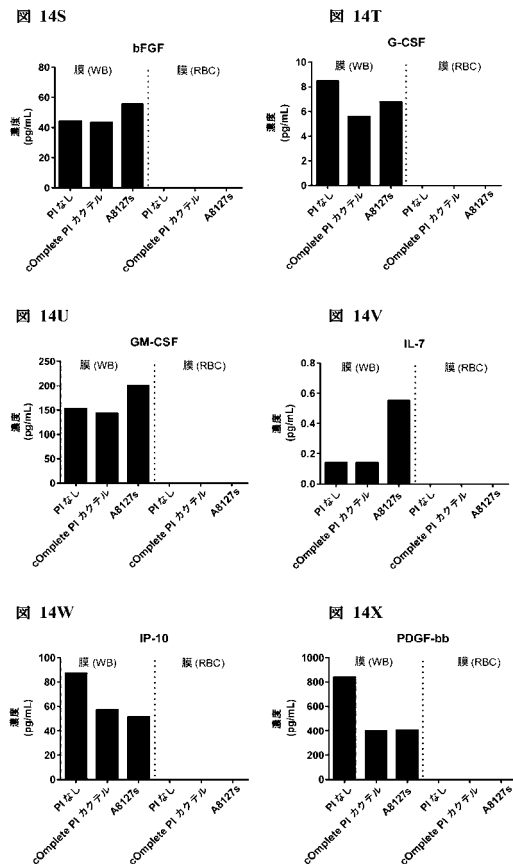
【図 14 G - L】



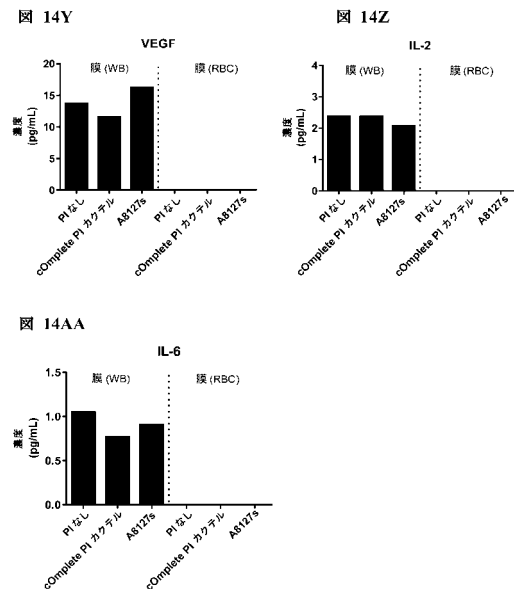
【図 14 M - R】



【図 14 S - X】



【図 14 Y - A A】



【図 15 A - F】

図 15A

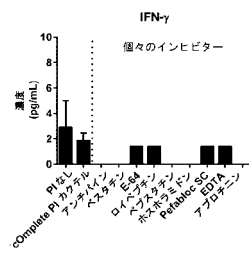


図 15B

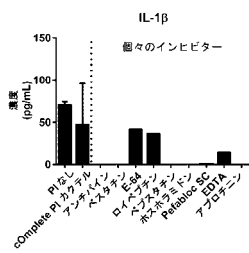


図 15G

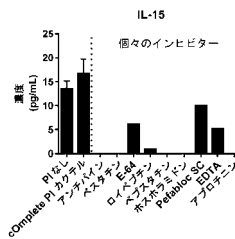


図 15H

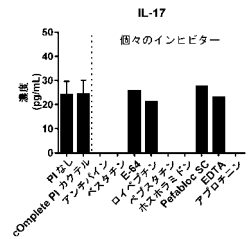


図 15C

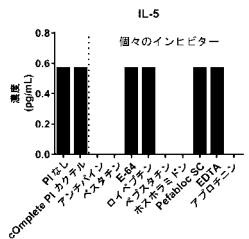


図 15D

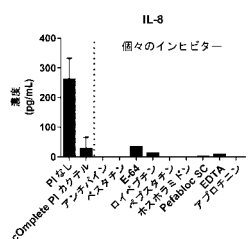


図 15I

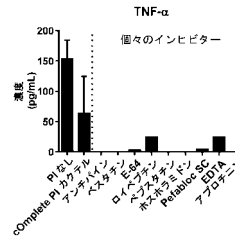


図 15J

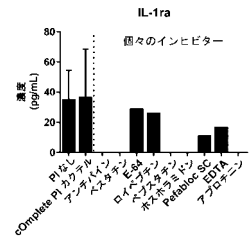


図 15E

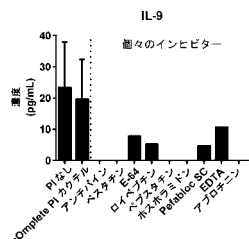


図 15F

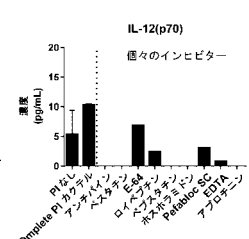


図 15K

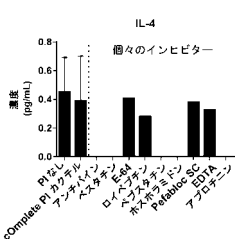
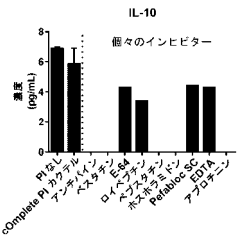


図 15L



【図 15 M - R】

図 15M

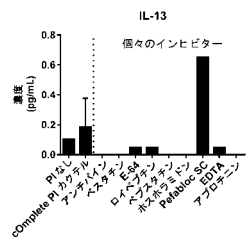


図 15N

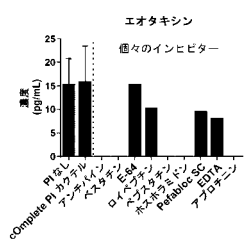


図 15S

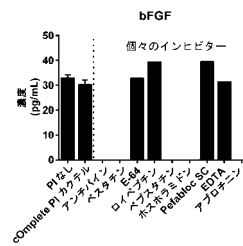


図 15T

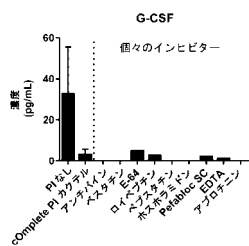


図 15O

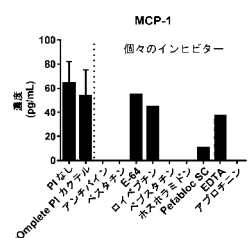


図 15P

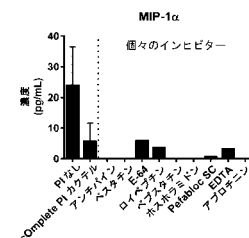


図 15U

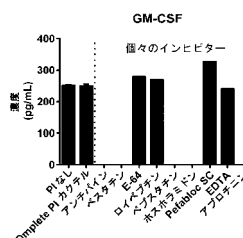


図 15V

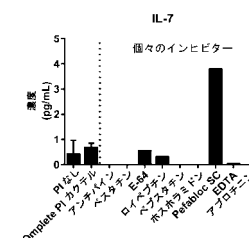


図 15Q

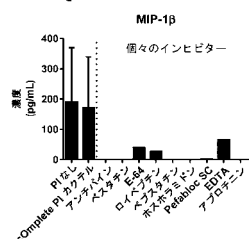


図 15R

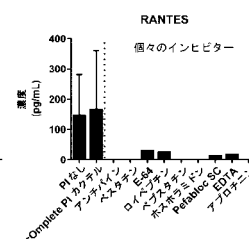


図 15W

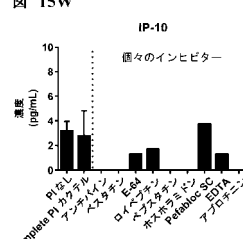
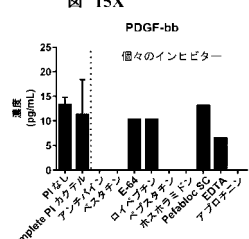
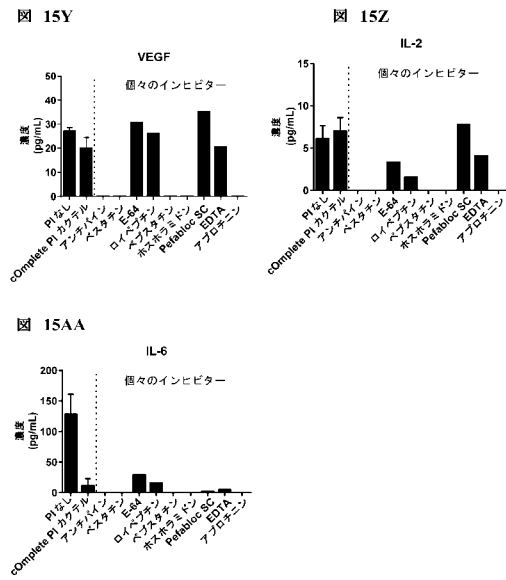


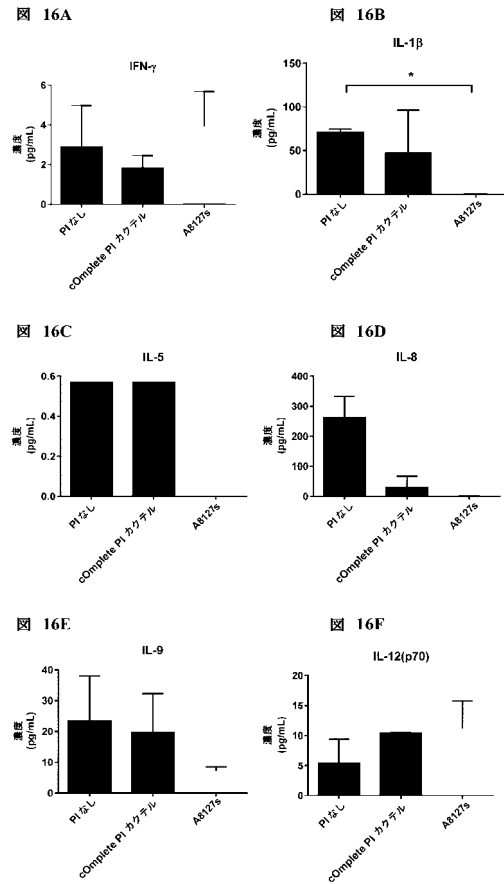
図 15X



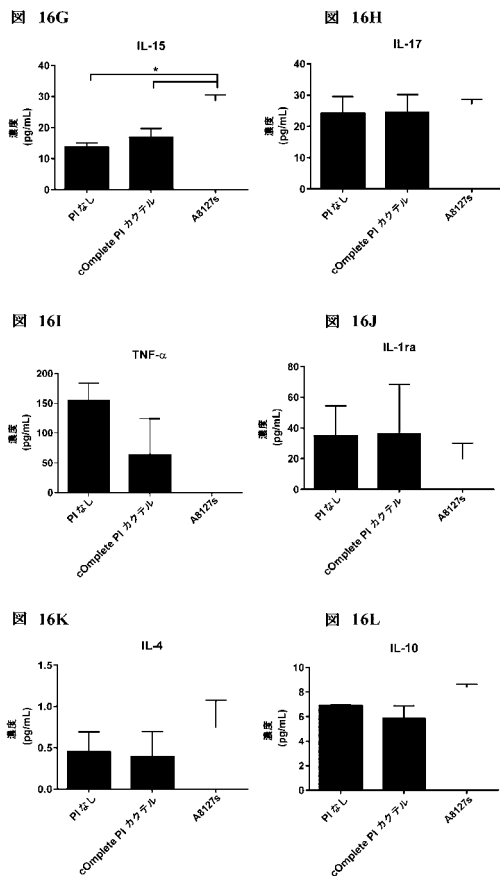
【図 15 Y - A A】



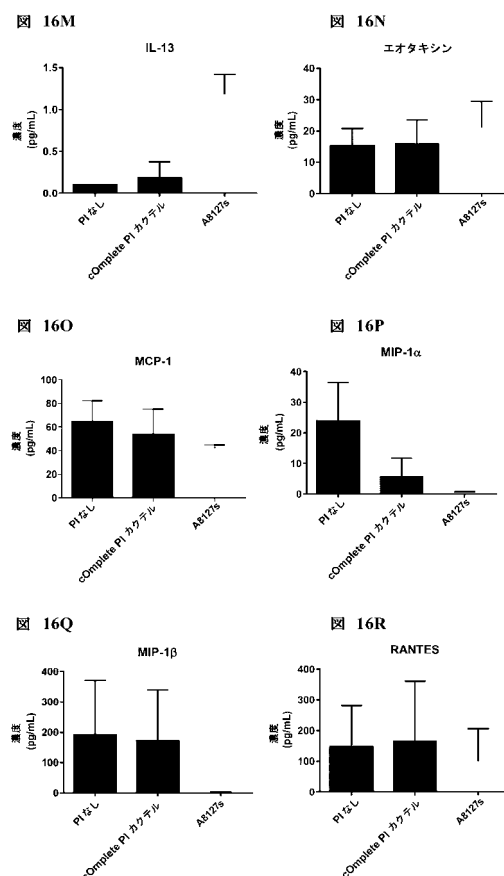
【図 16 A - F】



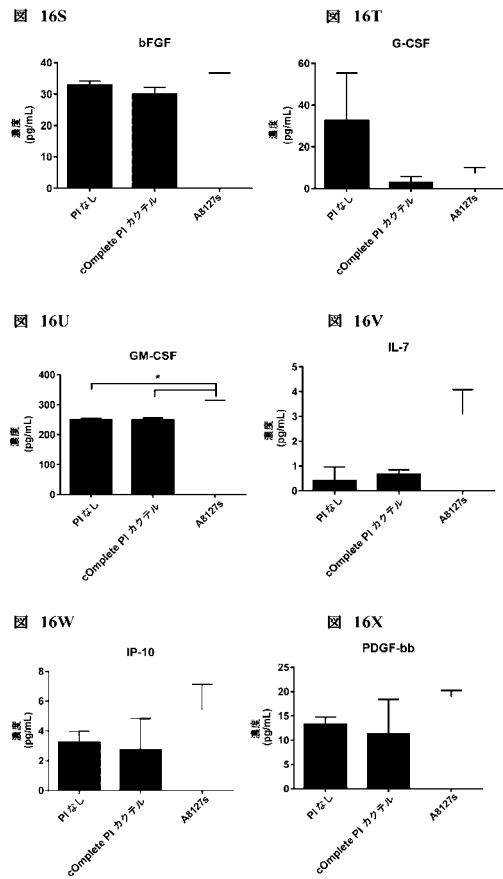
【図 16 G - L】



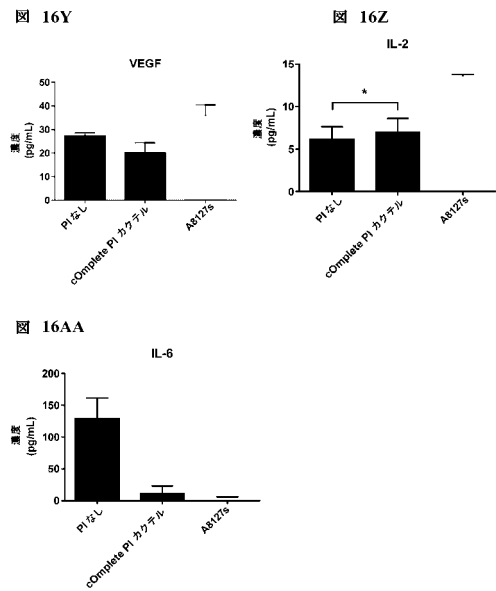
【図 16 M - R】



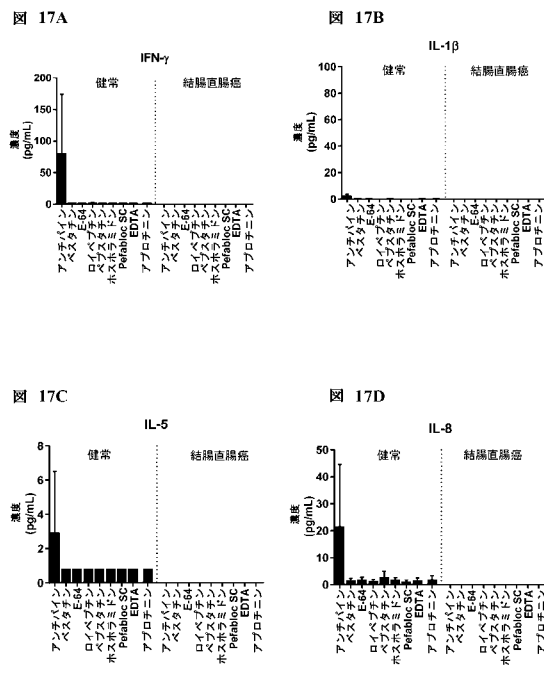
【図 16 S - X】



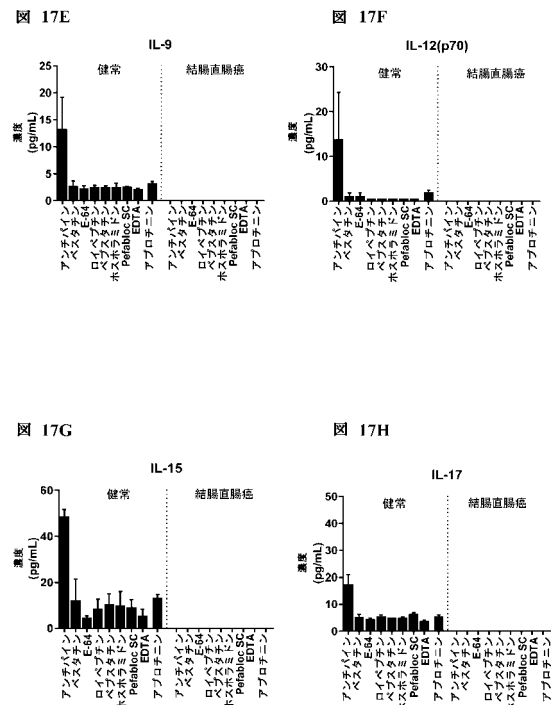
【図 16 Y - A A】



【図 17 A - D】



【図 17 E - H】



【図 17 I - L】

図 17I

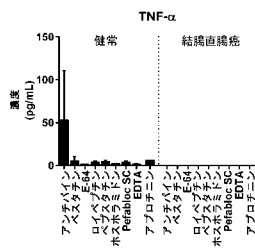


図 17J

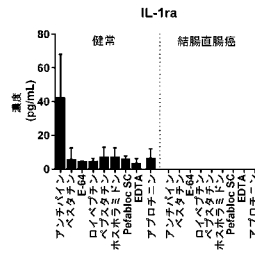


図 17M

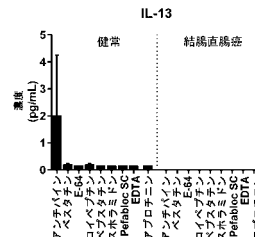


図 17N

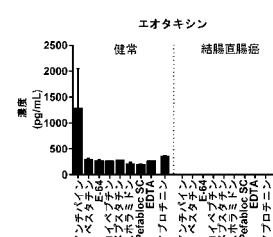


図 17K

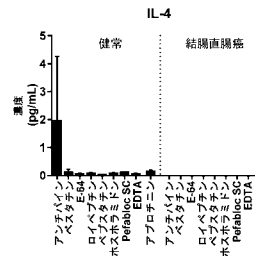


図 17L

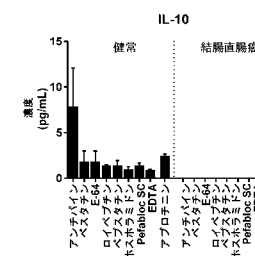


図 17O

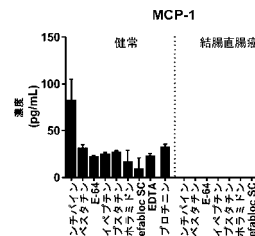
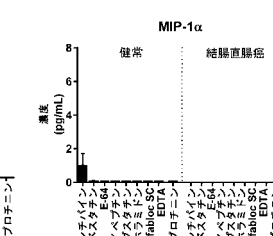


図 17P



【図 17 Q - T】

図 17Q

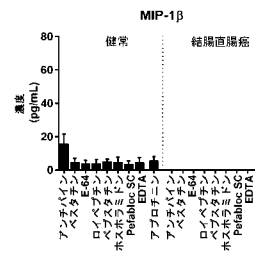


図 17R

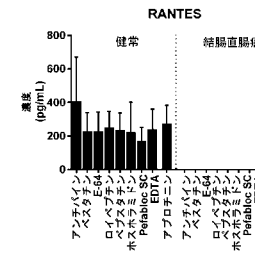


図 17U

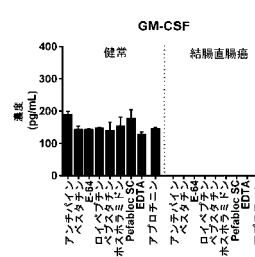


図 17V

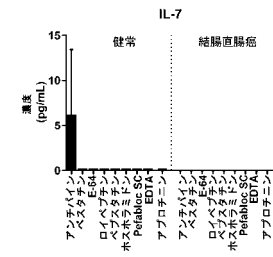


図 17S

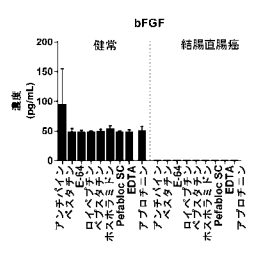


図 17T

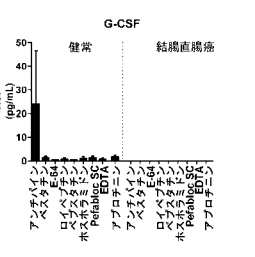


図 17W

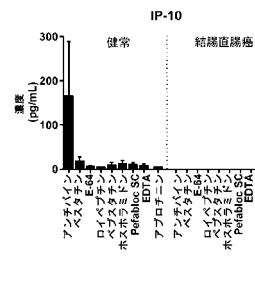
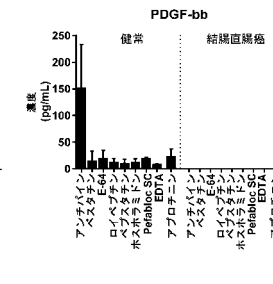


図 17X



【図 17 U - X】

【図 17 Y - A A】

図 17Y

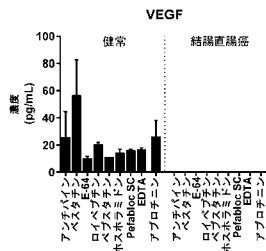


図 17Z

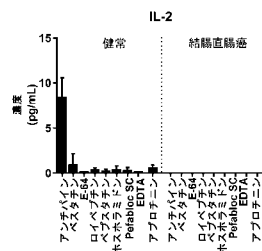
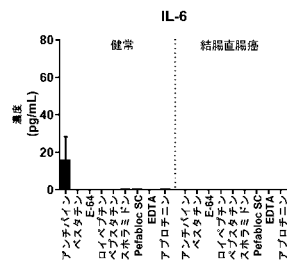


図 17AA



【図 18 A - F】

図 18A

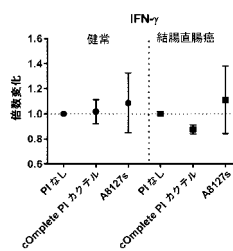


図 18B

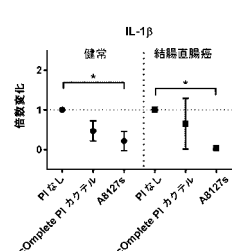


図 18C

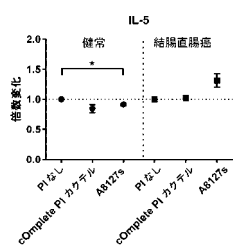


図 18D

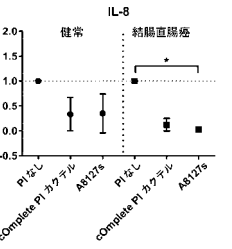


図 18E

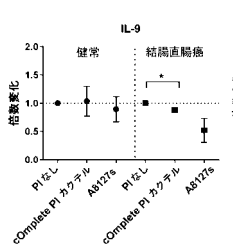
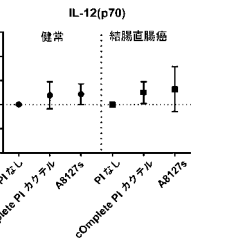


図 18F



【図 18 G - L】

図 18G

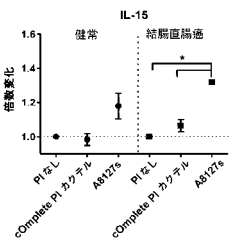


図 18H

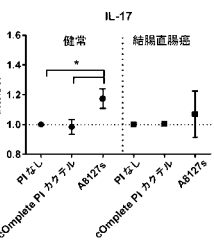


図 18M

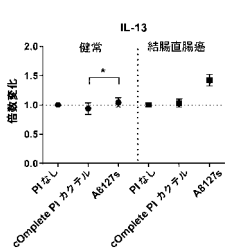


図 18N

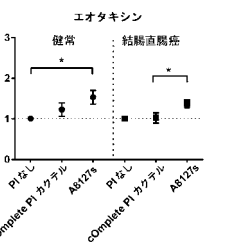


図 18I

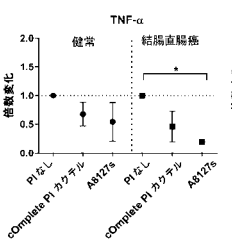


図 18J

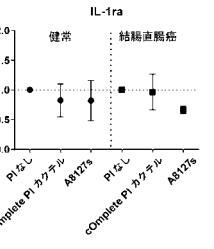


図 18O

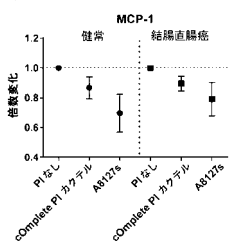


図 18P

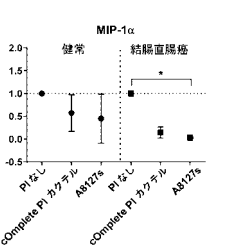


図 18K

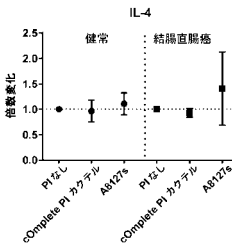


図 18L

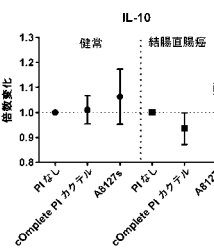


図 18Q

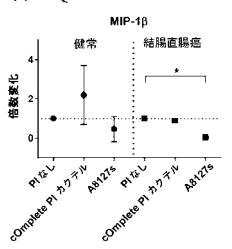
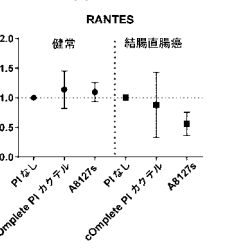


図 18R



【図 18 M - R】

【図 19 M - R】

図 19M

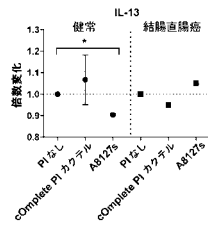


図 19N

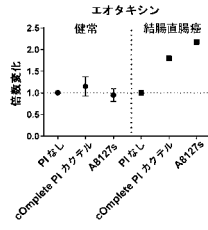


図 19S

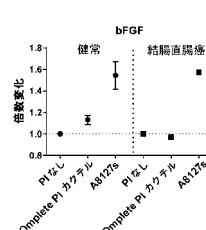


図 19T

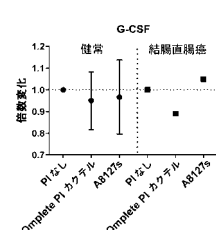


図 19O

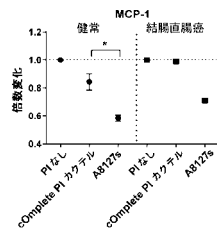


図 19P

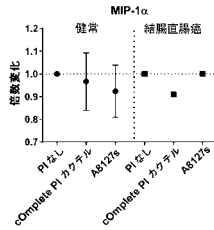


図 19U

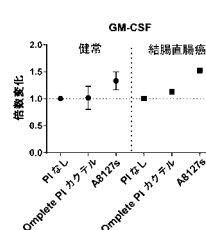


図 19V

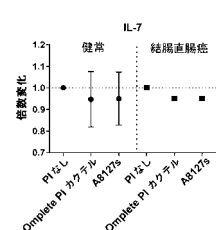


図 19Q

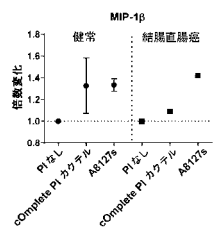


図 19R

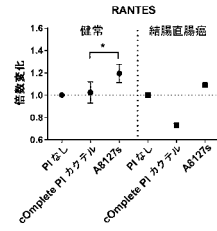


図 19W

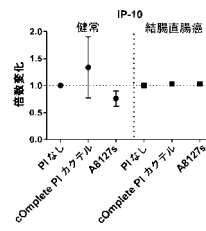
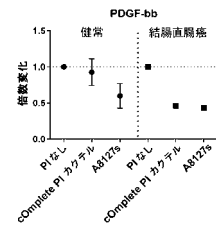


図 19X



【図 19 Y - D D】

図 19Y

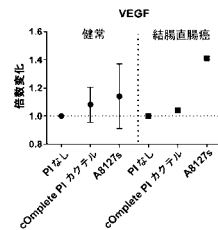


図 19Z

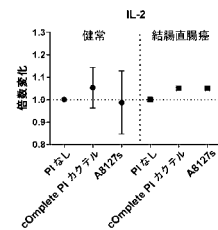


図 19EE

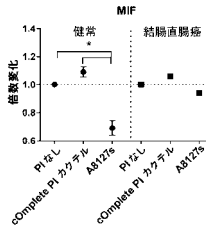


図 19FF

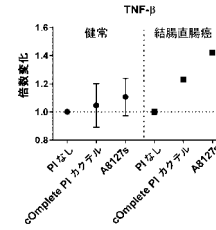


図 19AA

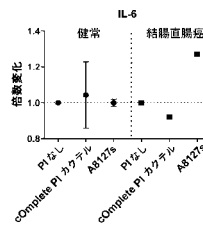


図 19BB

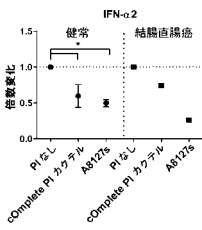


図 19GG

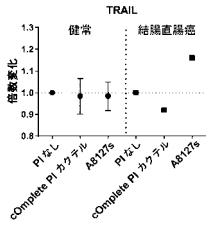


図 19HH

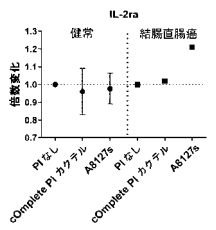


図 19CC

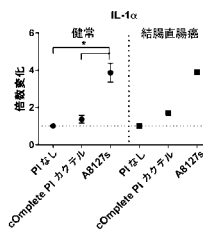


図 19DD

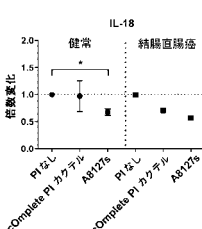


図 19II

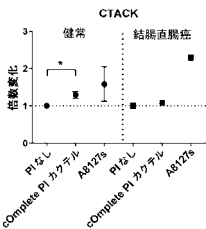
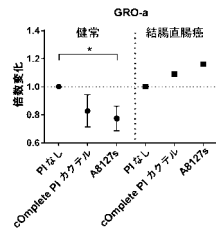


図 19JJ



【図 19 EE - J J】

【図 19 K K - P P】

図 19KK

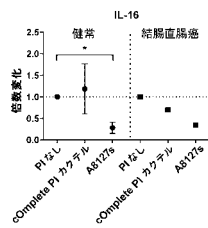


図 19LL

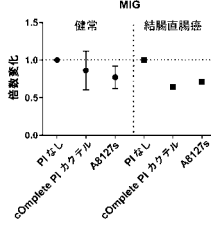


図 19QQ

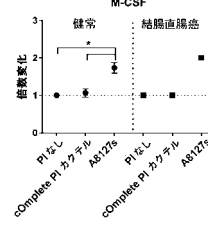


図 19RR

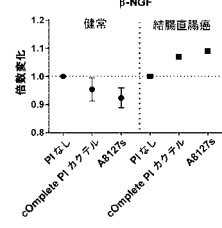


図 19MM

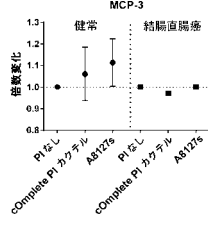


図 19NN

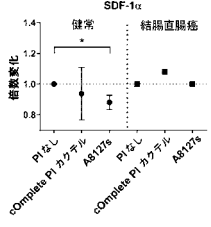


図 19SS

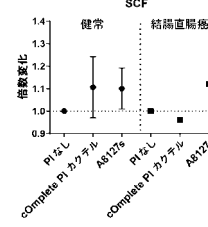


図 19TT

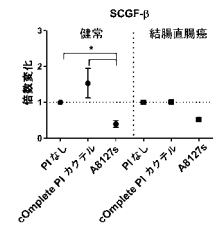


図 19OO

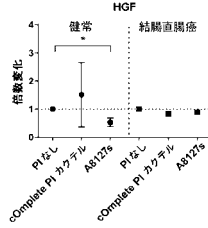


図 19PP

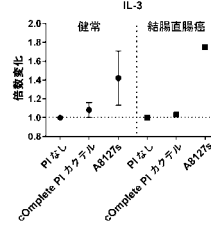


図 19UU

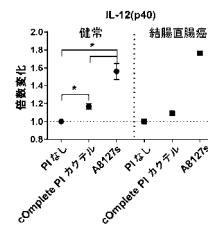
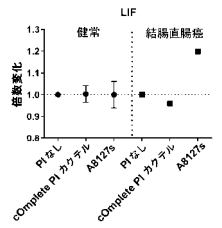


図 19VV



【図 20 A - F】

図 20A

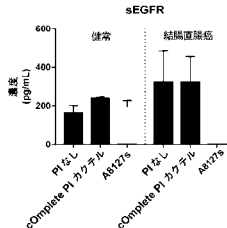


図 20B

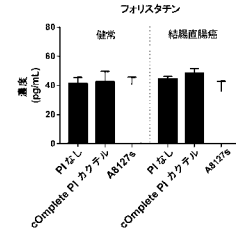


図 20G

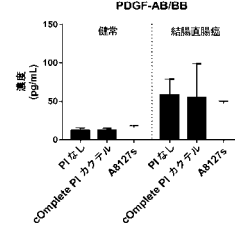


図 20H

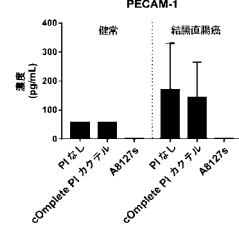


図 20C

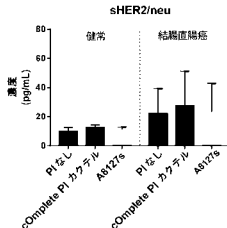


図 20D

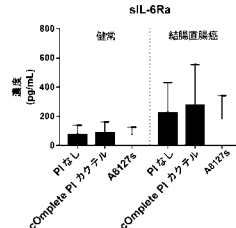


図 20I

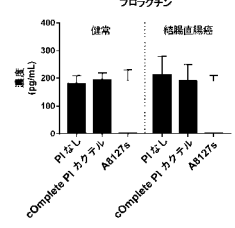


図 20J

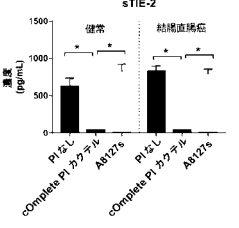


図 20E

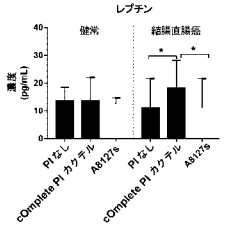


図 20F

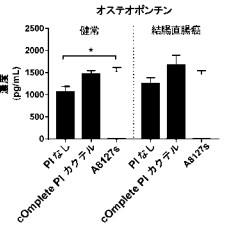


図 20K

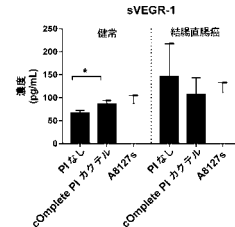
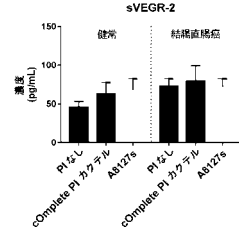


図 20L



【図 20 G - L】

【図 20M-R】

図 20M

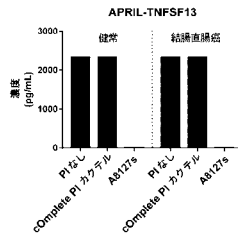


図 20N

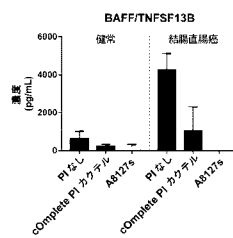


図 20S

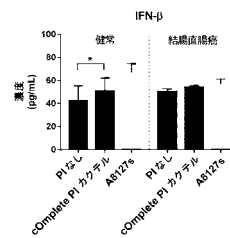


図 20T

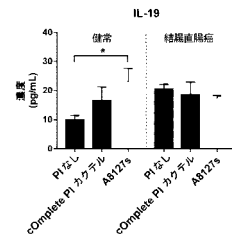


図 20O

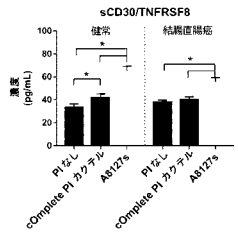


図 20P

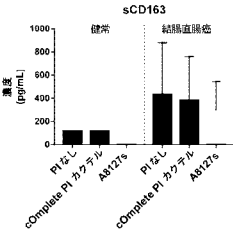


図 20U

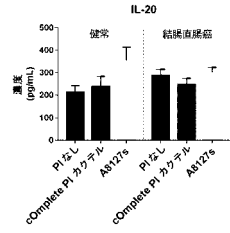


図 20V

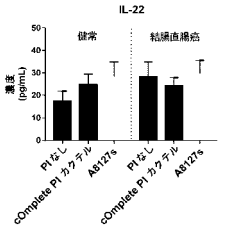


図 20Q

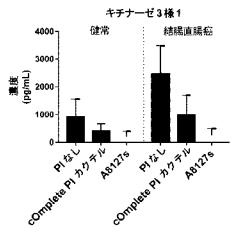


図 20R

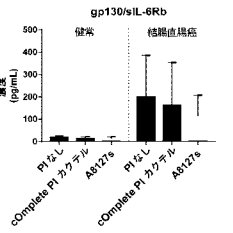


図 20W

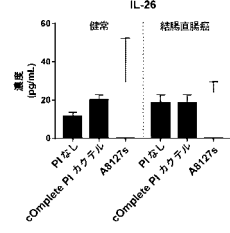
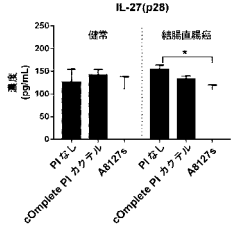


図 20X



【図 20Y-DD】

図 20Y

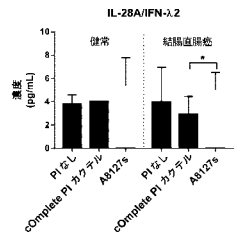


図 20Z

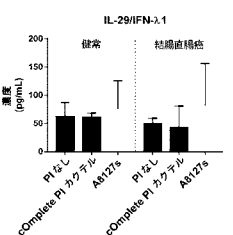


図 20EE

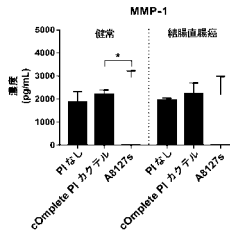


図 20FF

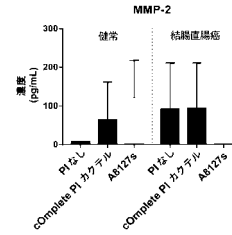


図 20AA

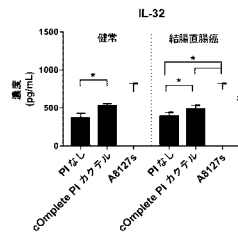


図 20BB

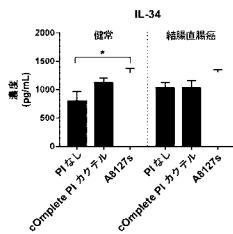


図 20GG

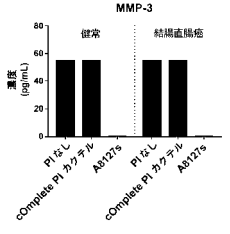


図 20HH

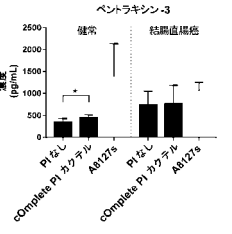


図 20CC

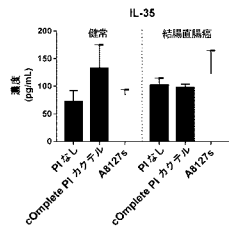


図 20DD

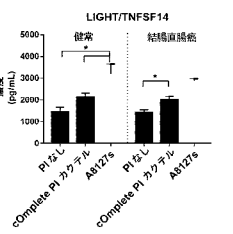


図 20II

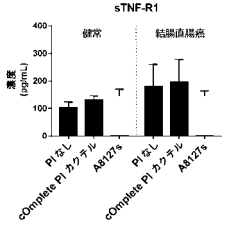
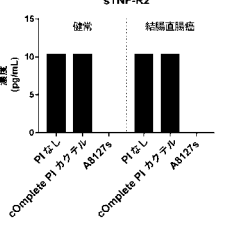


図 20JJ



【図 20KK-L L】

図 20KK

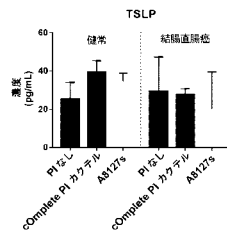
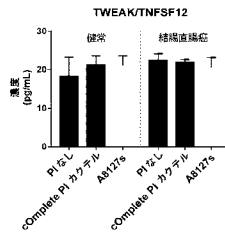


図 20LL



【図 21A-F】

図 21A

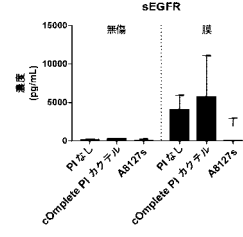


図 21B

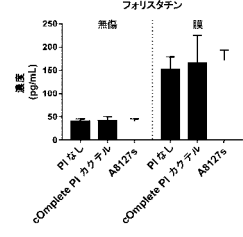


図 21C

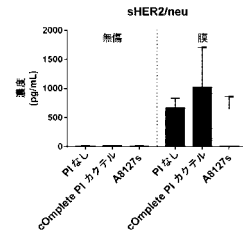


図 21D

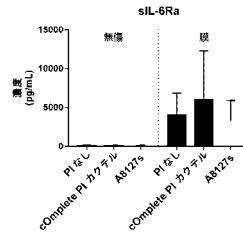


図 21E

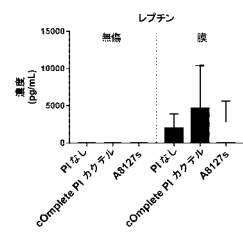
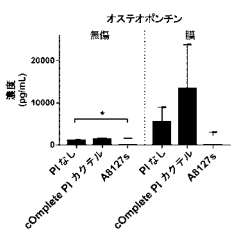


図 21F



【図 21G-L】

図 21G

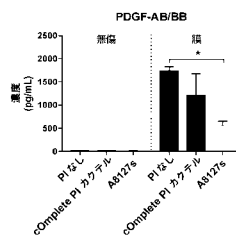


図 21H

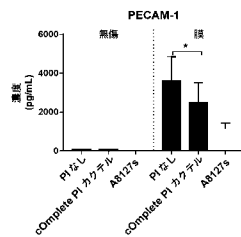


図 21M

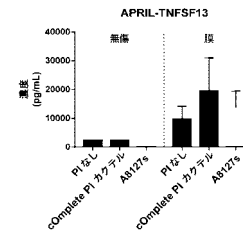


図 21N

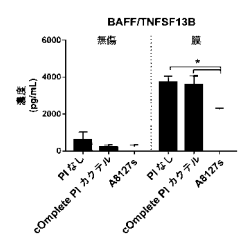


図 21I

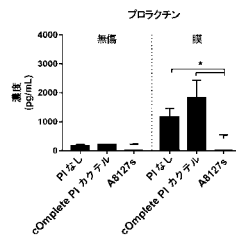


図 21J

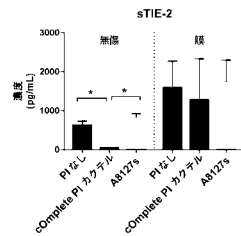


図 21O

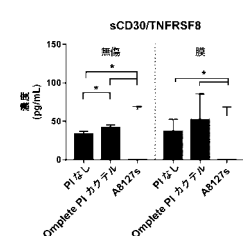


図 21P

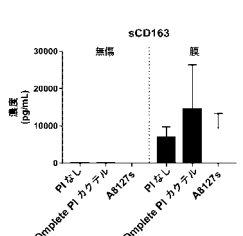


図 21K

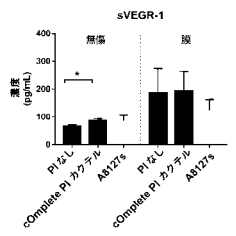


図 21L

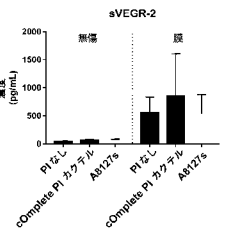


図 21Q

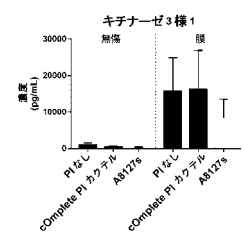
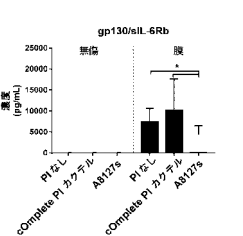


図 21R



【図 2 1 S - X】

図 21S

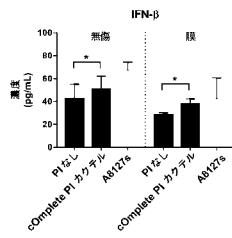


図 21T

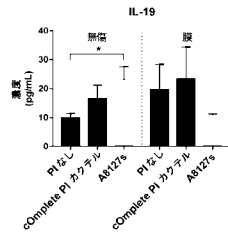


図 21Y

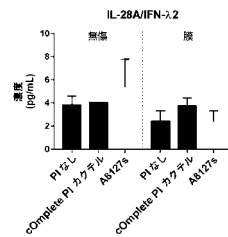


図 21Z

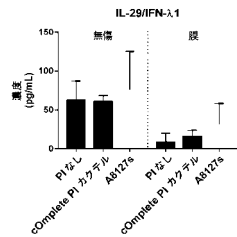


図 21U

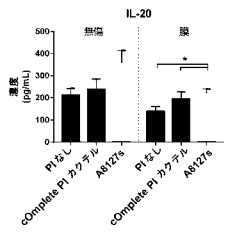


図 21V

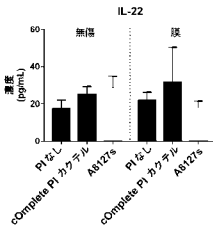


図 21AA

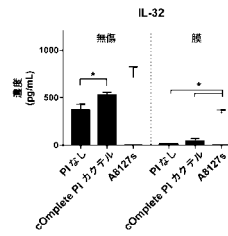


図 21BB

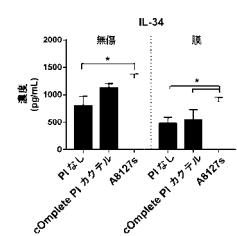


図 21W

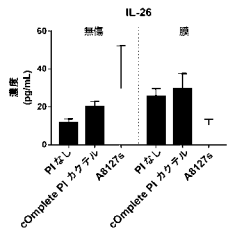


図 21X

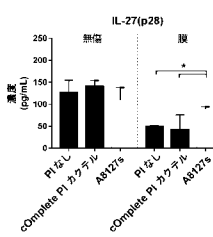


図 21CC

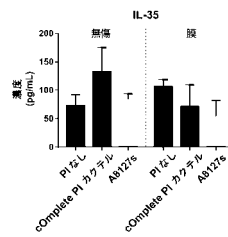
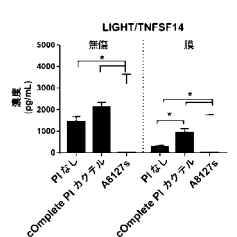


図 21DD



【図 2 1 E E - J J】

図 21EE

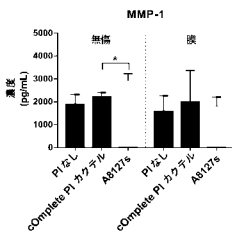


図 21FF

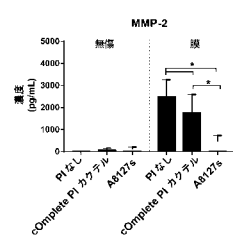


図 21KK

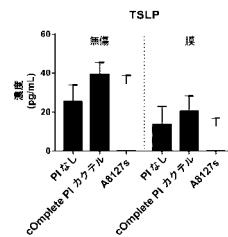


図 21LL

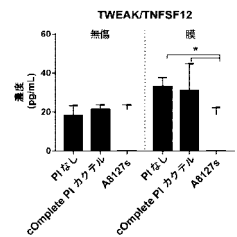


図 21GG

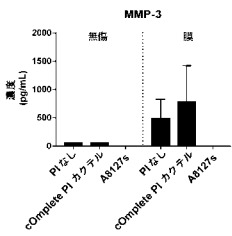


図 21HH

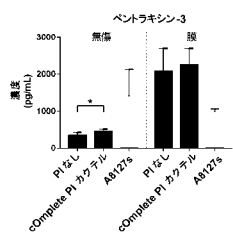


図 21II

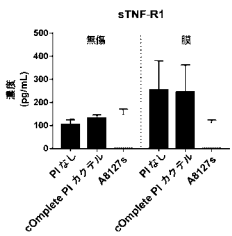
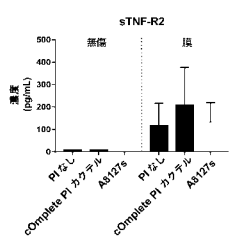


図 21JJ



【図 2 1 K K - L L】

【図 2 2 A - F】

図 22A

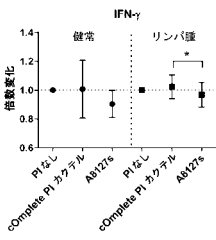


図 22B

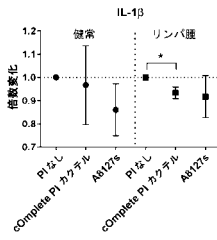


図 22G

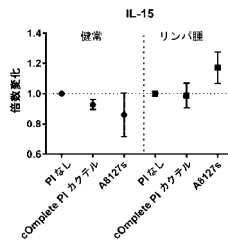


図 22H

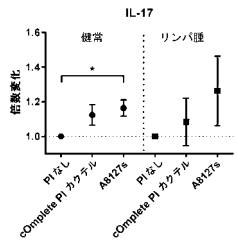


図 22C

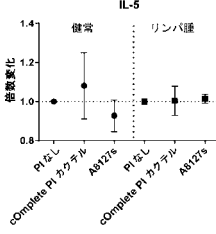


図 22D

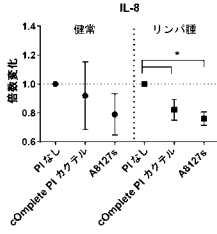


図 22I

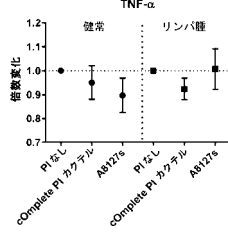


図 22J

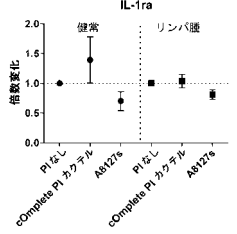


図 22E

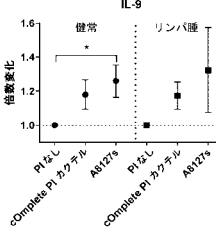


図 22F

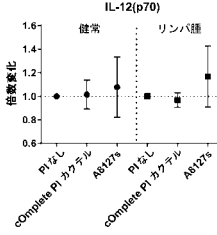


図 22K

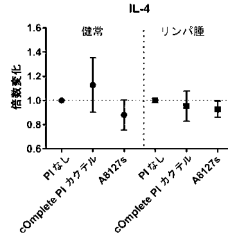
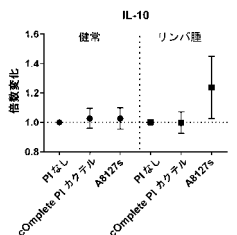


図 22L



【図 2 2 M - R】

図 22M

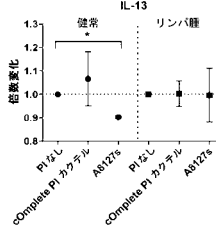


図 22N

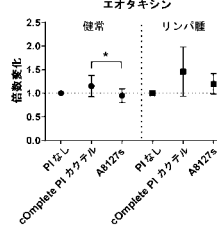


図 22S

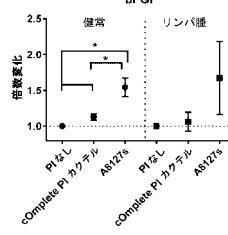


図 22T

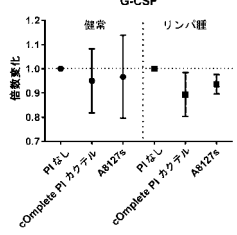


図 22O

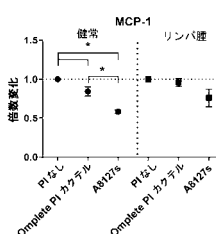


図 22P

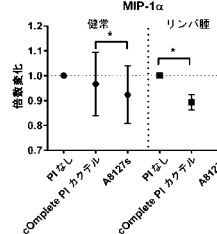


図 22U

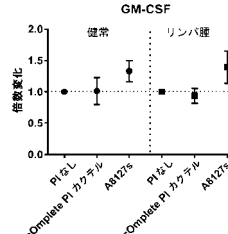


図 22V

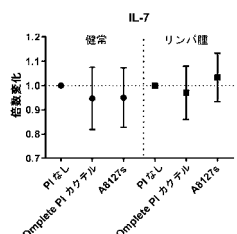


図 22Q

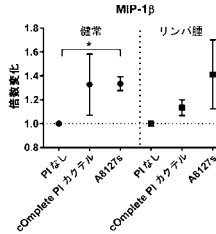


図 22R

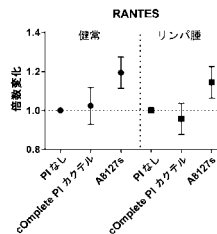


図 22W

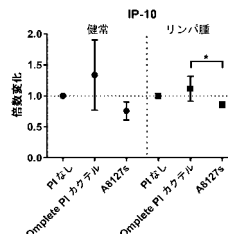
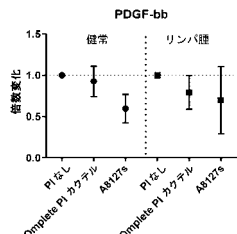


図 22X



【図 2 2 S - X】

【図 2 2 Y - D D】

図 22Y

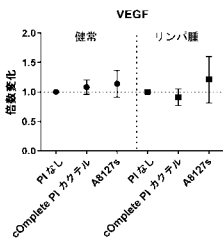


図 22Z

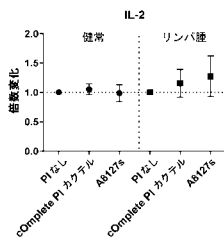


図 22EE

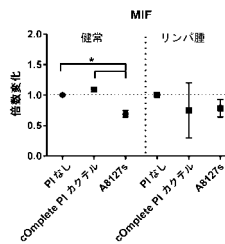


図 22FF

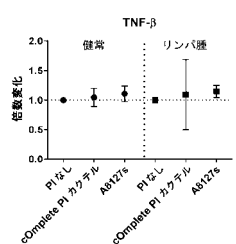


図 22AA

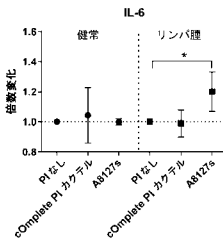


図 22BB

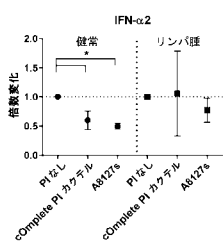


図 22GG

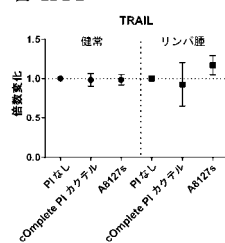


図 22HH

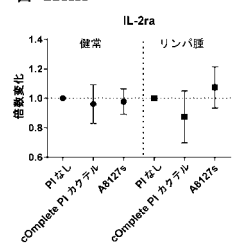


図 22CC

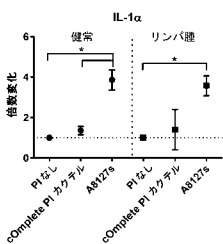


図 22DD

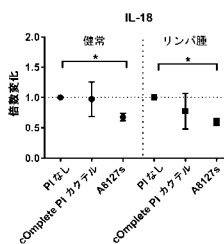


図 22II

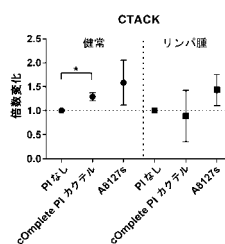
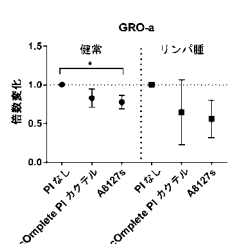


図 22JJ



【図 2 2 K K - P P】

図 22KK

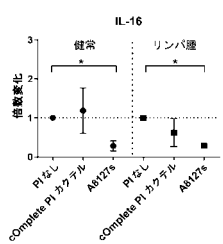


図 22LL

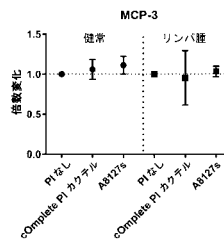


図 22QQ

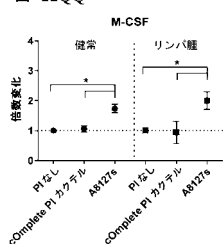


図 22RR

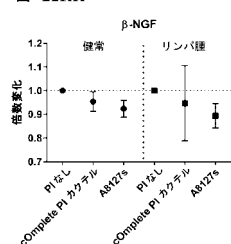


図 22MM

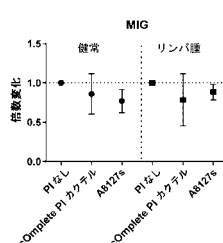


図 22NN

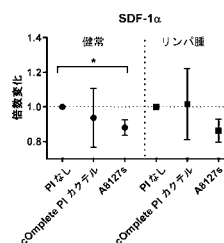


図 22SS

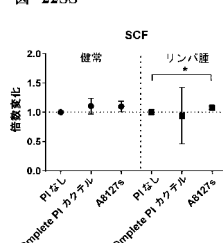


図 22TT

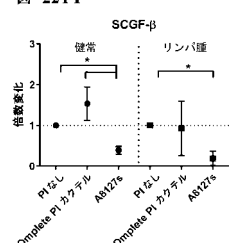


図 22OO

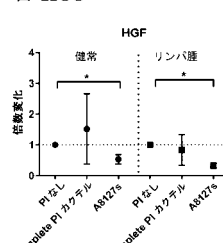


図 22PP

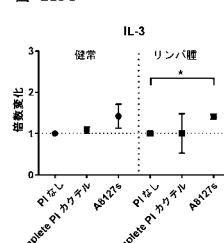


図 22UU

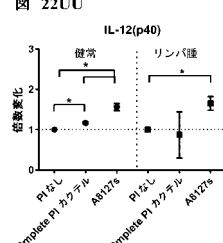
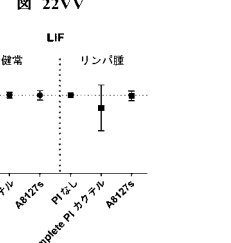
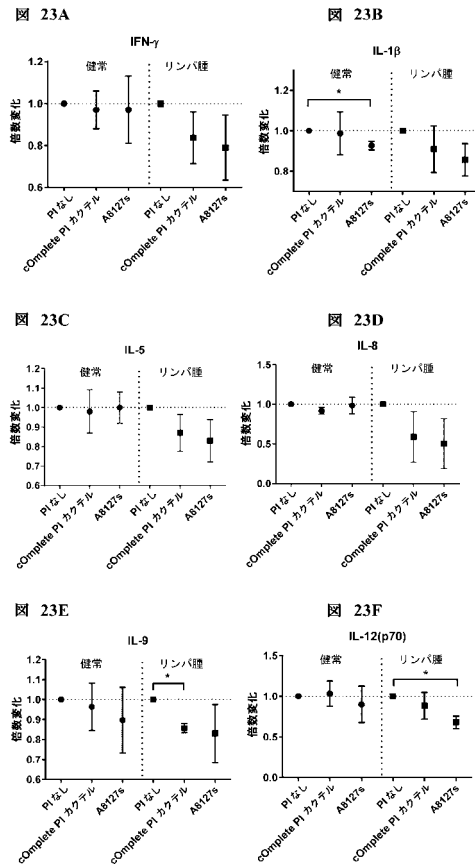


図 22VV

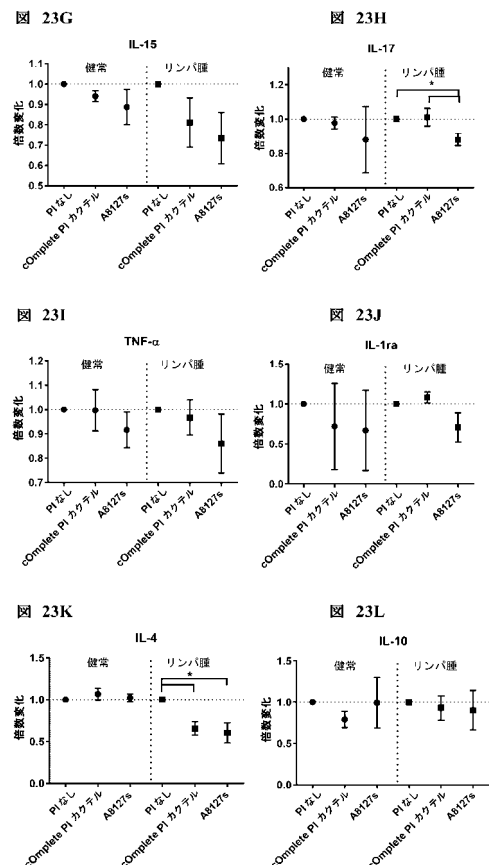


【図 2 2 Q Q - V V】

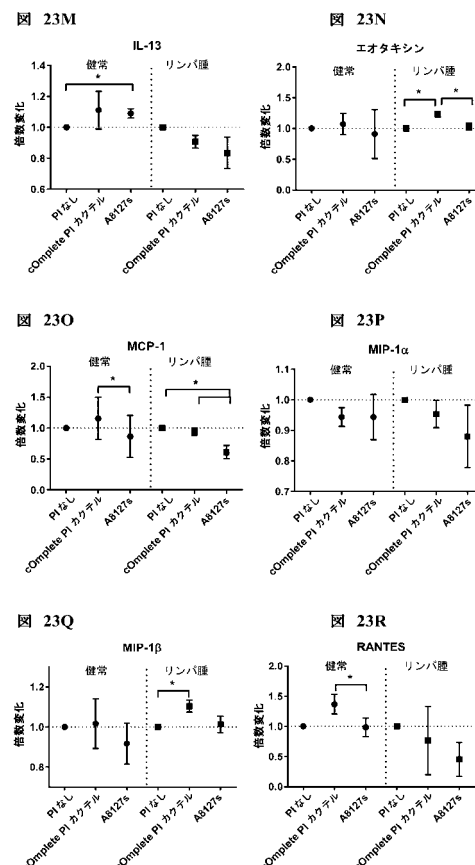
【図 2 3 A - F】



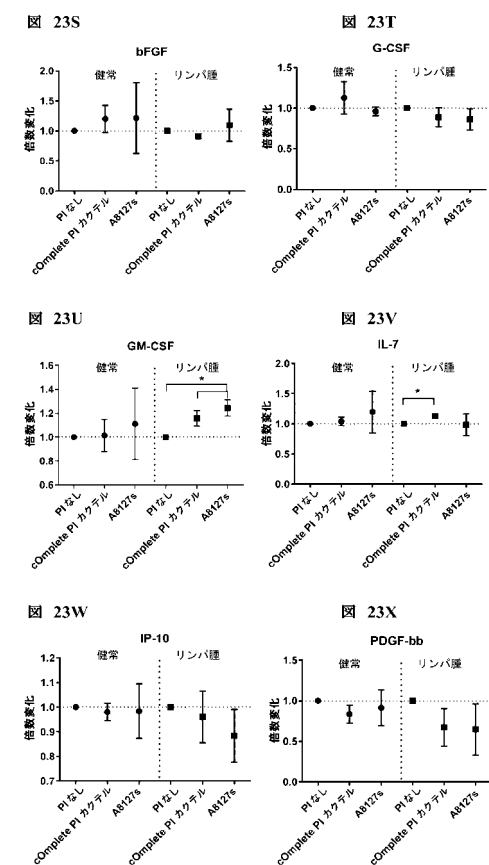
【図 2 3 G - L】



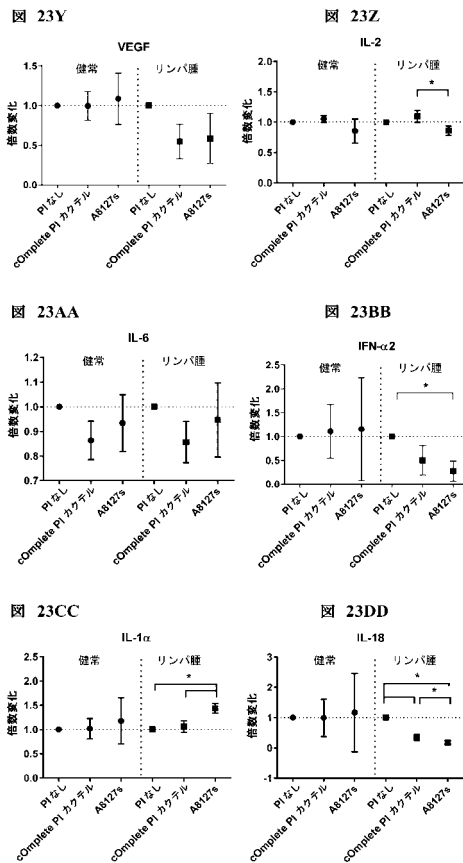
【図 2 3 M - R】



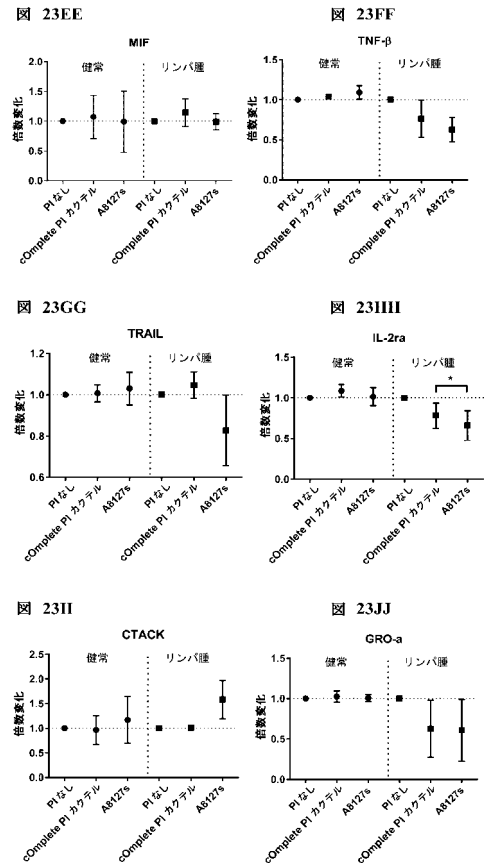
【図 2 3 S - X】



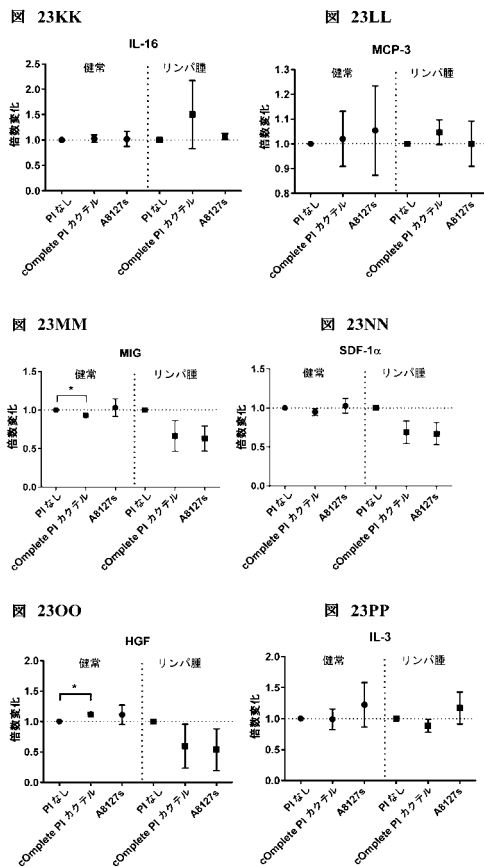
【図 2 3 Y - D D】



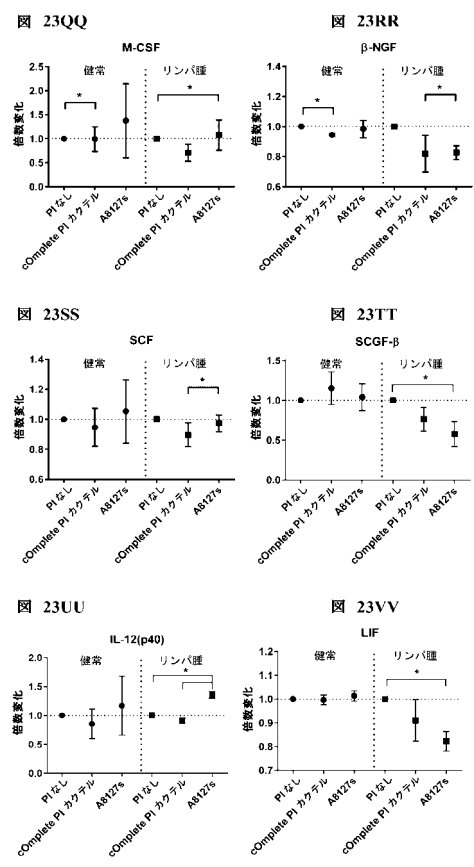
【図 2 3 E E - J J】



【図 2 3 K K - P P】



【図 2 3 Q Q - V V】



【図 2 4 A - F】

図 24A

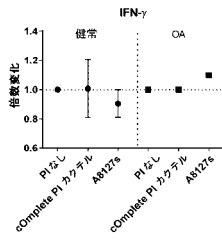


図 24B

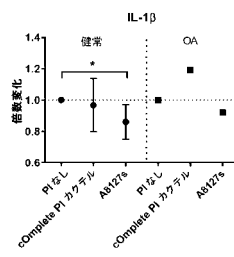


図 24G

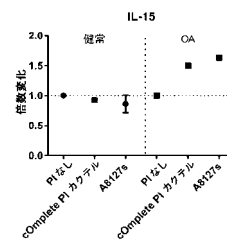


図 24H

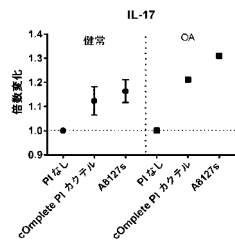


図 24C

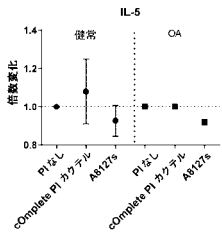


図 24D

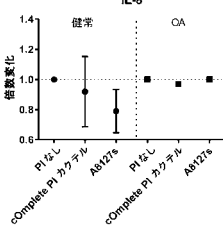


図 24I

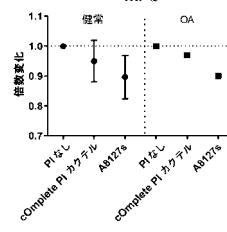


図 24J

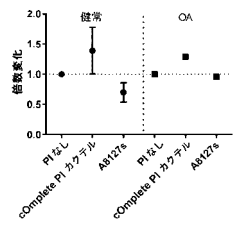


図 24E

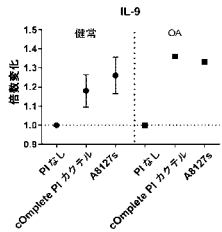


図 24F

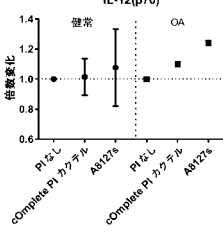


図 24K

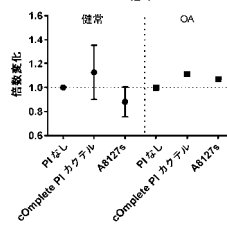
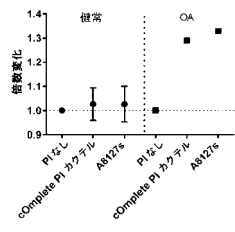


図 24L



【図 2 4 M - R】

図 24M

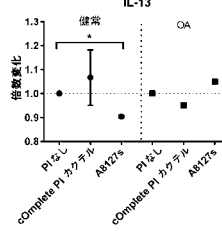


図 24N

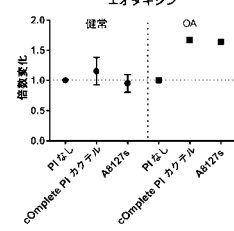


図 24S

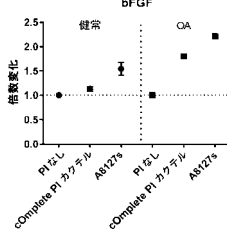


図 24T

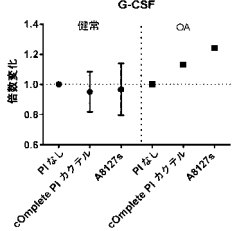


図 24O

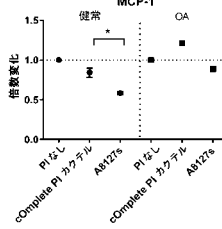


図 24P

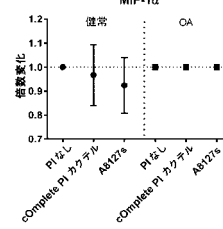


図 24U

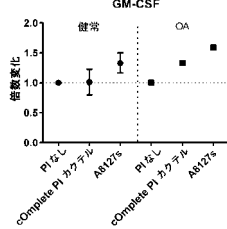


図 24V

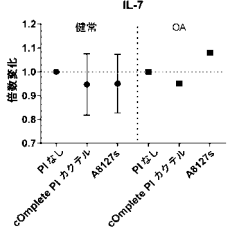


図 24Q

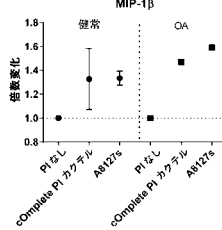


図 24R

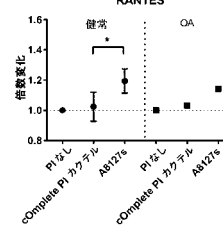


図 24W

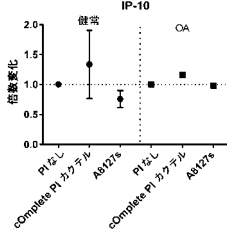
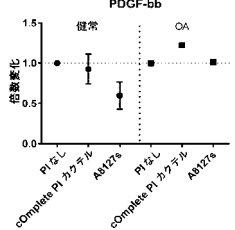


図 24X



【図 2 4 S - X】

【図 2 4 Y - D D】

図 24Y

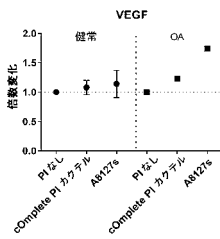


図 24Z

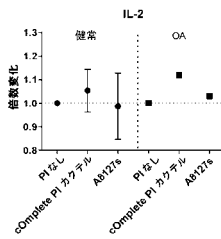


図 24EE

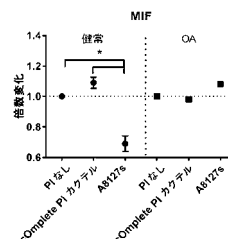


図 24FF

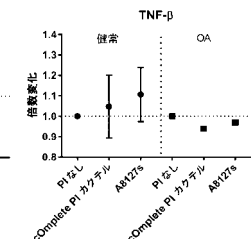


図 24AA

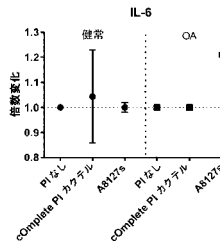


図 24BB

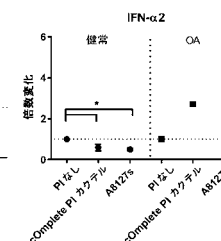


図 24GG

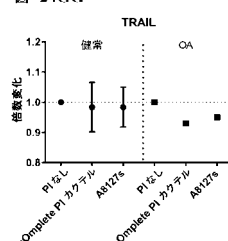


図 24HH

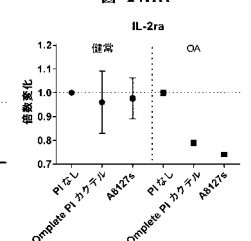


図 24CC

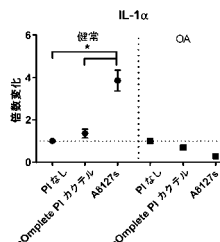


図 24DD

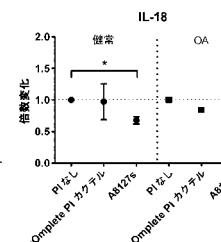


図 24II

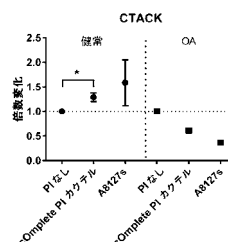
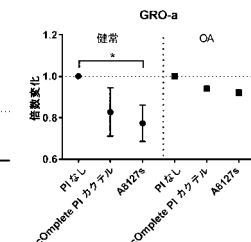


図 24JJ



【図 2 4 K K - P P】

図 24KK

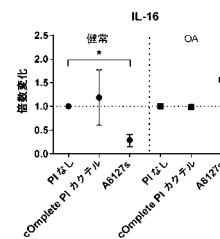


図 24LL

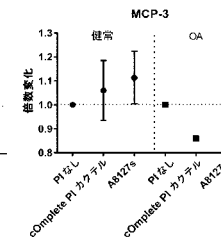


図 24QQ

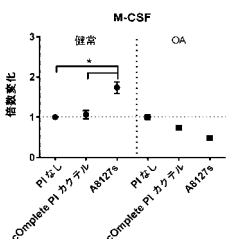


図 24RR

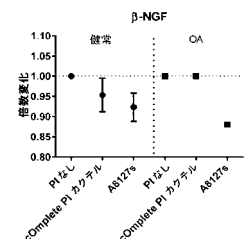


図 24MM

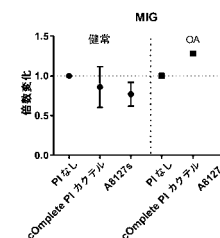


図 24NN

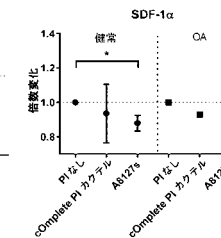


図 24SS

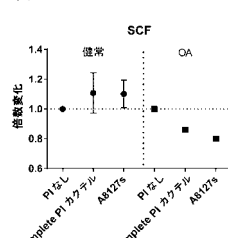


図 24TT

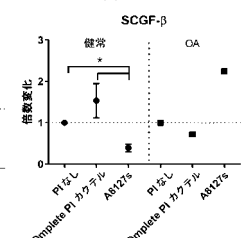


図 24OO

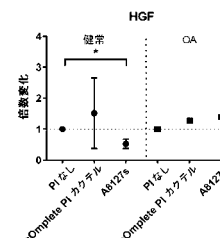


図 24PP

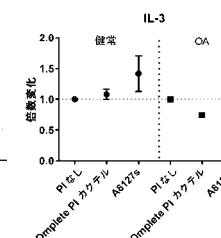


図 24UU

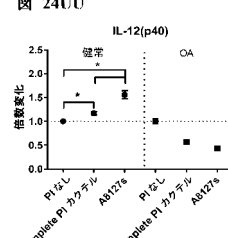
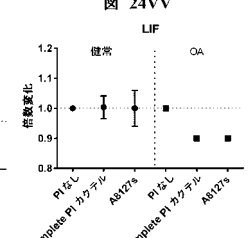


図 24VV



【図 2 4 Q Q - V V】

【図 2 5 A - F】

図 25A

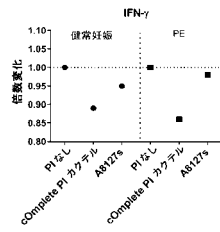


図 25B

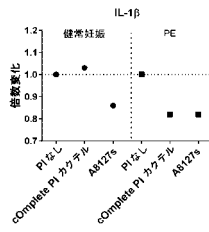


図 25G

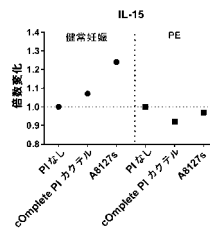


図 25H

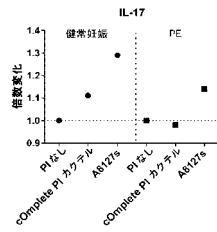


図 25C

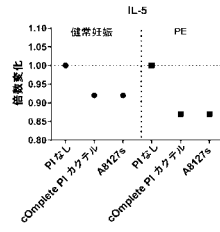


図 25D

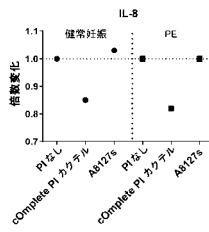


図 25I

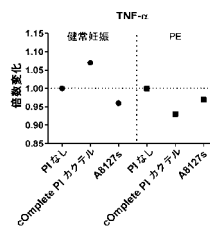


図 25J

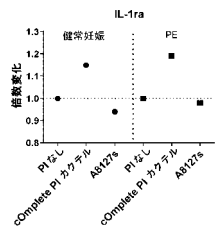


図 25E

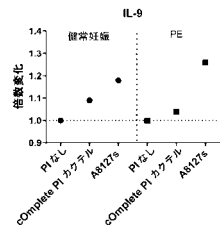


図 25F

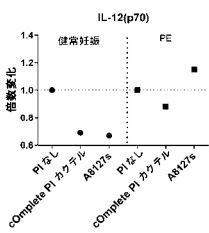


図 25K

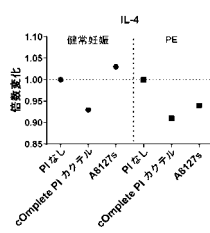
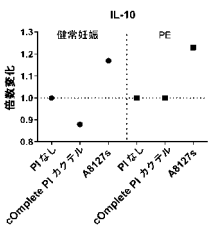


図 25L



【図 2 5 M - R】

図 25M

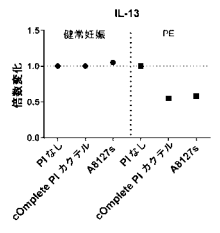


図 25N

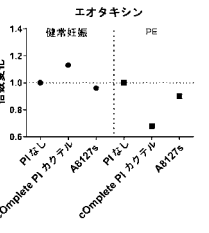


図 25S

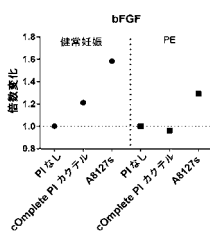


図 25T

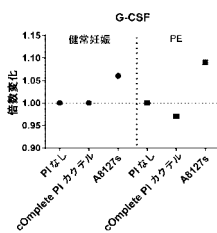


図 25O

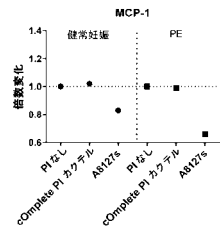


図 25P

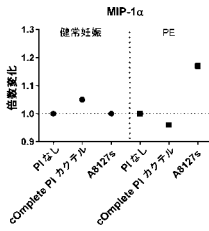


図 25U

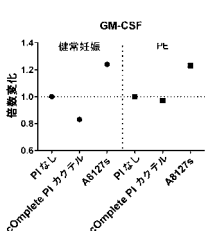


図 25V

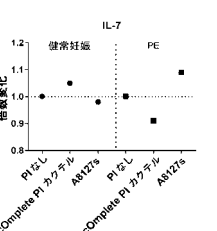


図 25Q

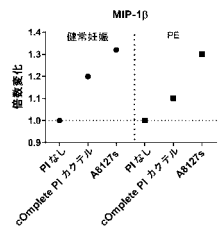


図 25R

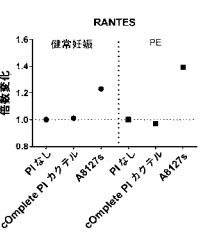


図 25W

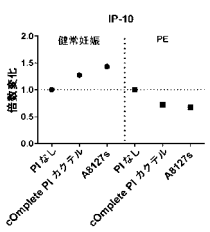
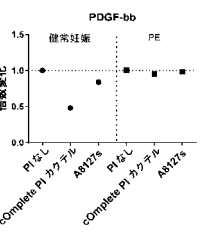


図 25X



【図 2 5 S - X】

【図 2 5 Y - D D】

図 25Y

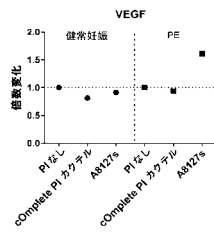


図 25Z

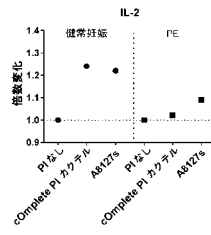


図 25EE

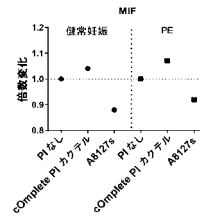


図 25FF

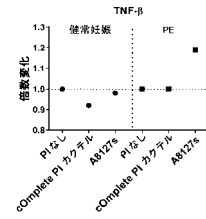


図 25AA

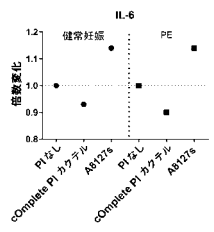


図 25BB

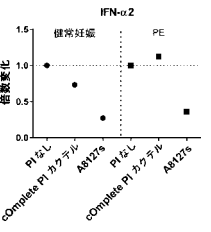


図 25GG

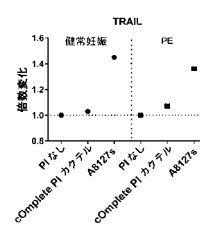


図 25HH

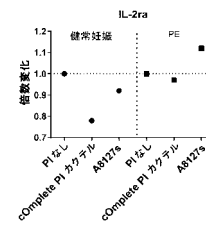


図 25CC

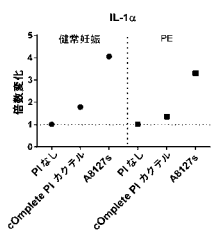


図 25DD

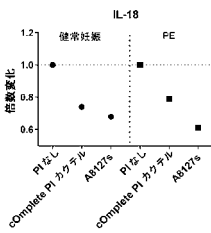


図 25II

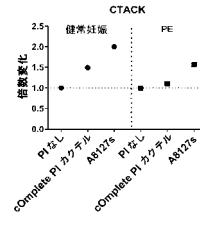
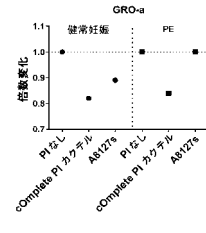


図 25JJ



【図 2 5 K K - P P】

図 25KK

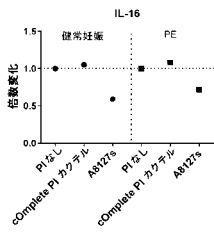


図 25LL

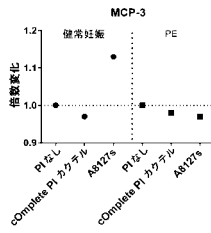


図 25QQ

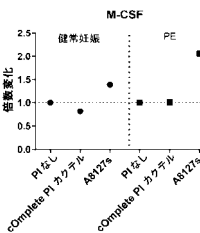


図 25RR

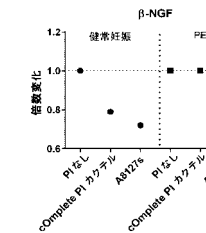


図 25MM

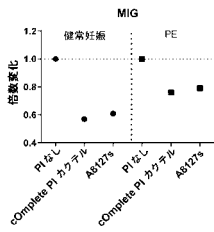


図 25NN

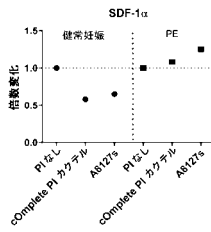


図 25SS

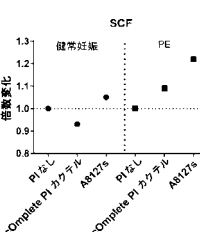


図 25TT

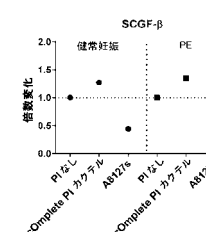


図 25OO

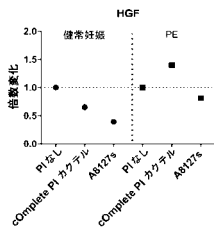


図 25PP

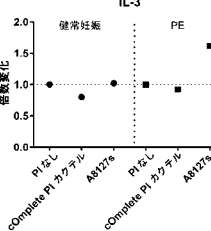


図 25UU

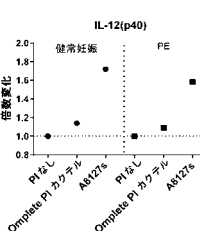
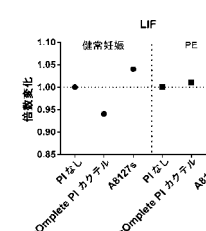


図 25VV



【図 2 5 Q Q - V V】

【図 2 6 A - F】

図 26A

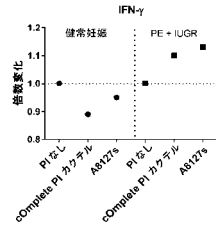


図 26B

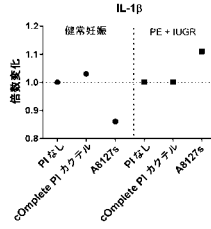


図 26G

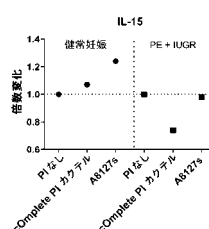


図 26H

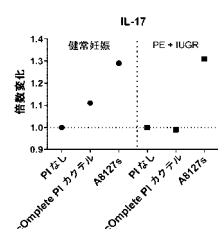


図 26C

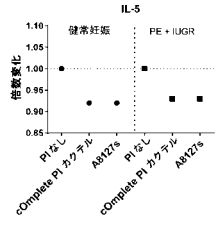


図 26D

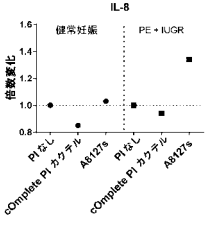


図 26I

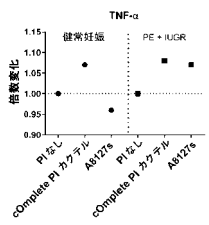


図 26J

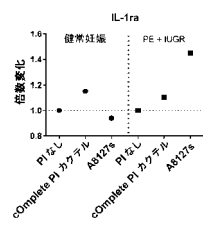


図 26E

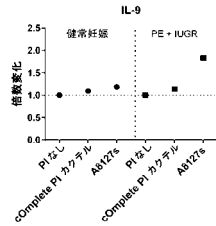


図 26F

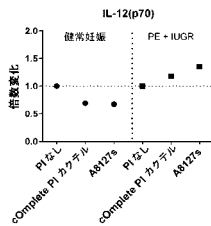


図 26K

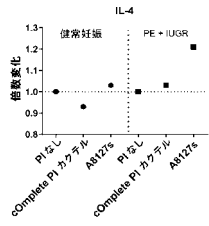
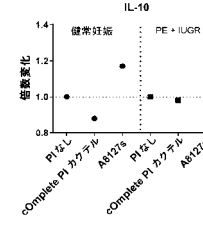


図 26L



【図 2 6 M - R】

図 26M

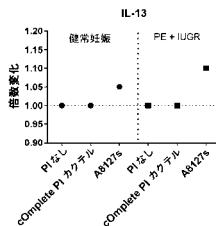


図 26N

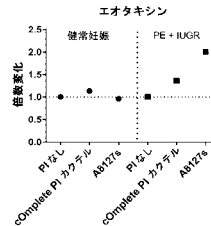


図 26S

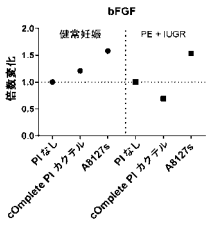


図 26T

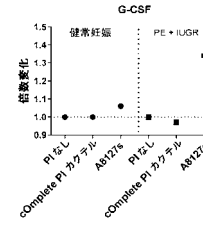


図 26O

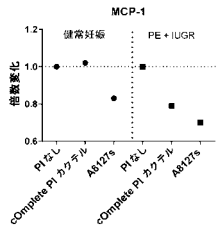


図 26P

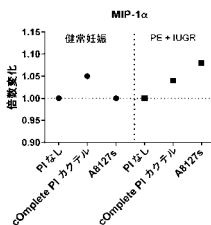


図 26U

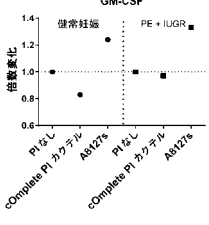


図 26V

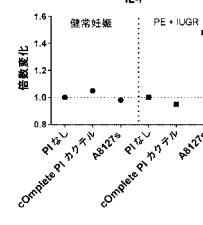


図 26Q

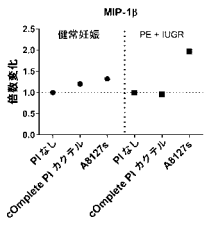


図 26R

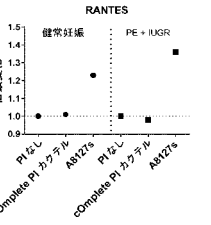


図 26W

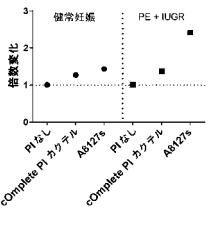
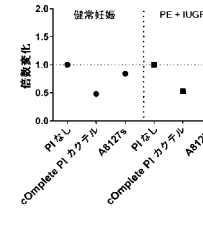


図 26X



【図 2 6 S - X】

【図 2 6 Y - D D】

図 26Y

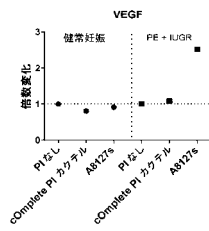


図 26Z

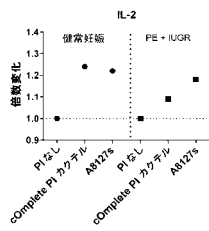


図 26EE

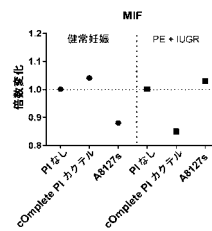


図 26FF

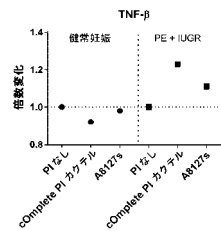


図 26AA

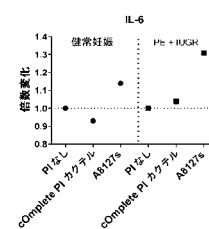


図 26BB

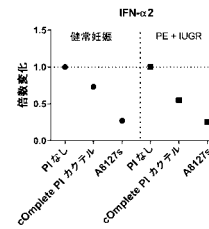


図 26GG

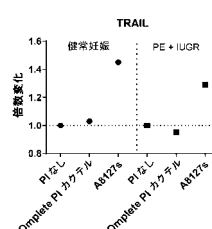


図 26HH

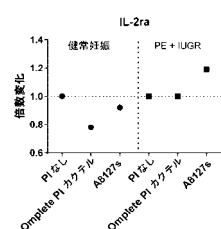


図 26CC

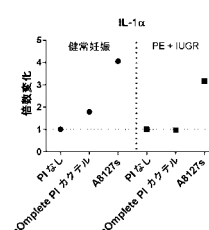


図 26DD

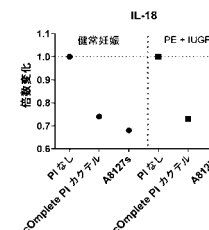


図 26II

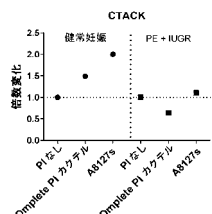
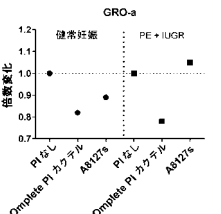


図 26JJ



【図 2 6 K K - P P】

図 26KK

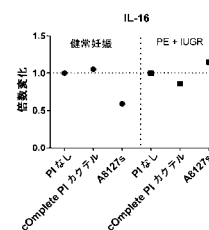


図 26LL

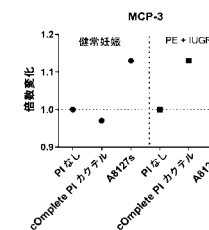


図 26QQ

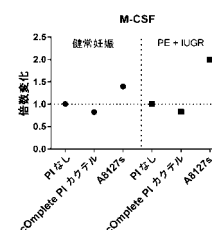


図 26RR

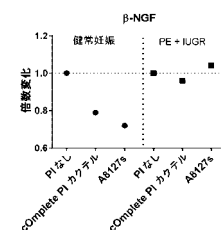


図 26MM

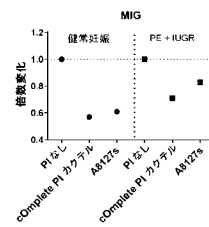


図 26NN

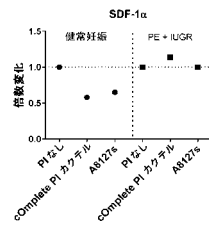


図 26SS

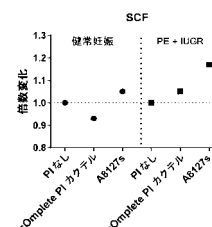


図 26TT

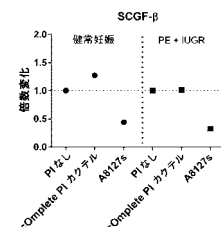


図 26OO

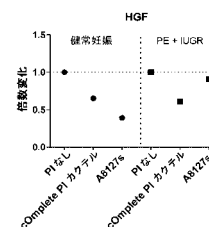


図 26PP

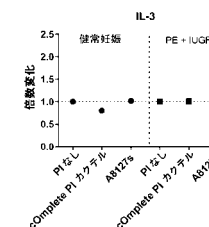


図 26UU

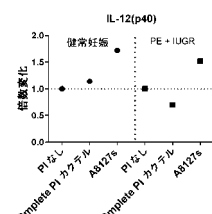
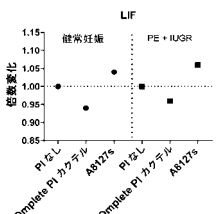


図 26VV



【図 2 6 Q Q - V V】

【図 27 A - F】

図 27A

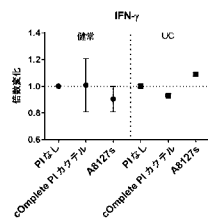


図 27B

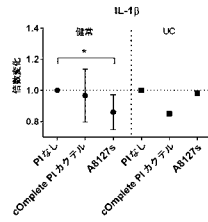


図 27G

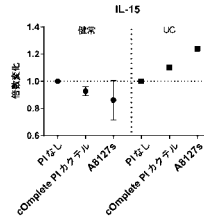


図 27H

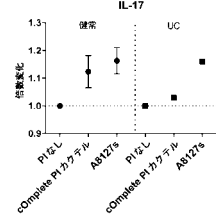


図 27C

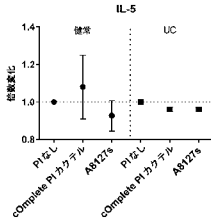


図 27D

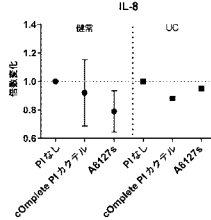


図 27I

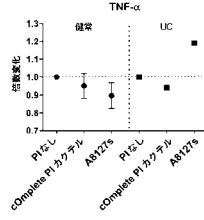


図 27J

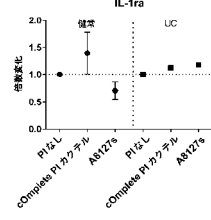


図 27E

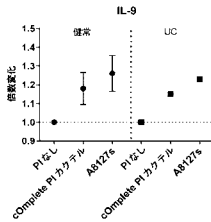


図 27F

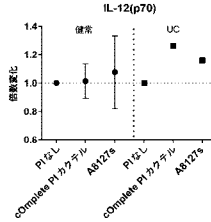


図 27K

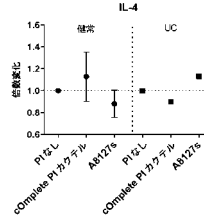
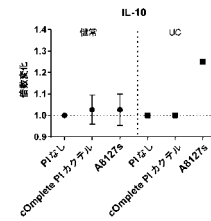


図 27L



【図 27 M - R】

図 27M

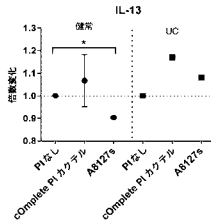


図 27N

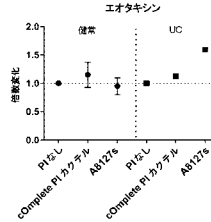


図 27S

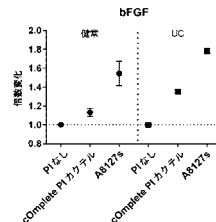


図 27T

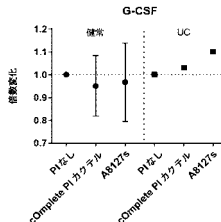


図 27O

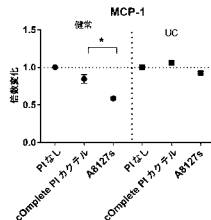


図 27P

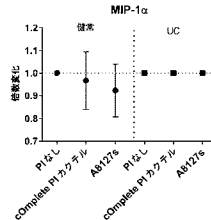


図 27U

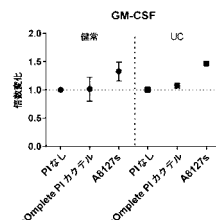


図 27V

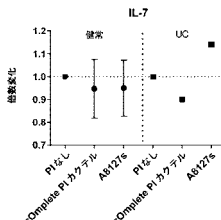


図 27Q

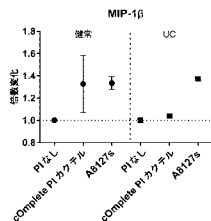


図 27R

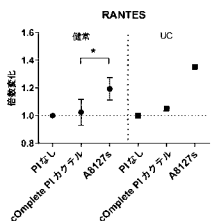


図 27W

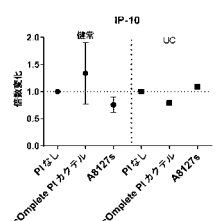
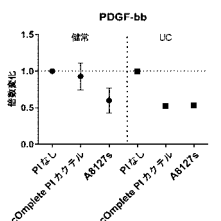


図 27X



【図 27 G - L】

【図 27 Y - D D】

図 27Y

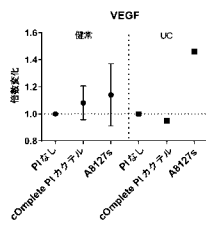


図 27Z

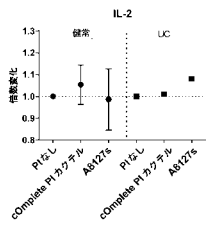


図 27EE

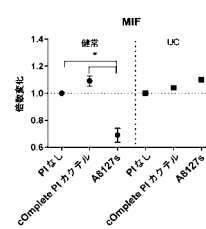


図 27FF

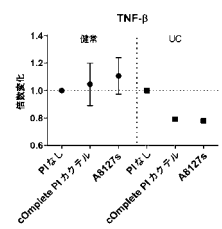


図 27AA

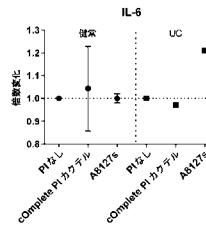


図 27BB

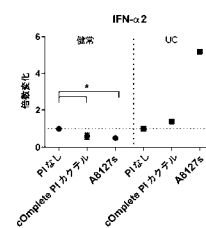


図 27GG

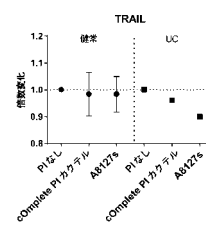


図 27HH

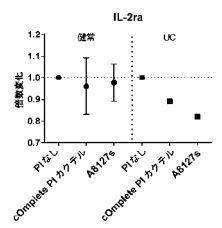


図 27CC

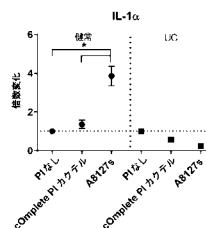


図 27DD

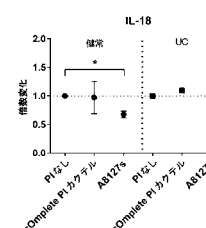


図 27II

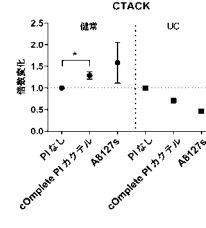
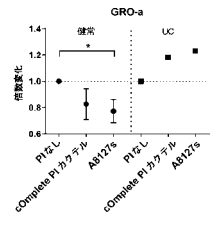


図 27JJ



【図 27 K K - P P】

図 27KK

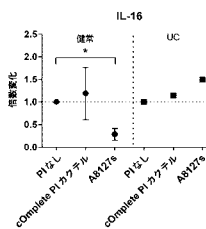


図 27LL

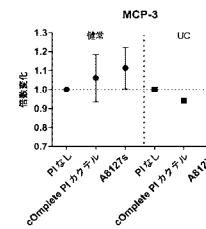


図 27QQ

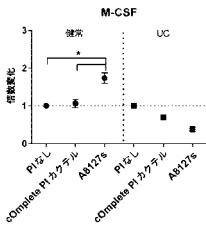


図 27RR

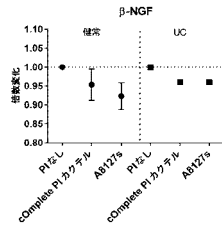


図 27MM

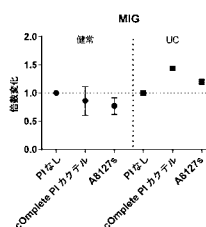


図 27NN

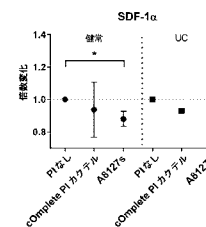


図 27SS

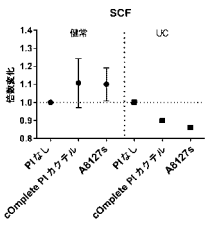


図 27TT

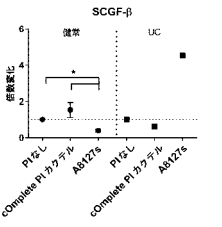


図 27OO

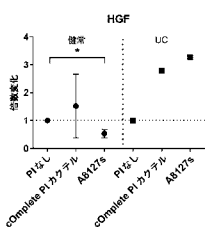


図 27PP

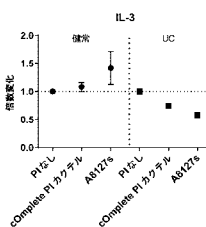


図 27UU

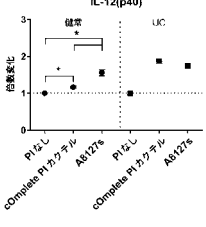
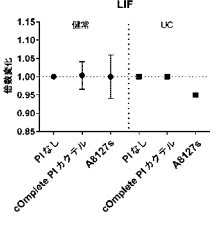


図 27VV



【図 27 Q Q - V V】

【図 28 A - F】

図 28A

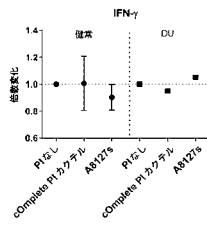


図 28B

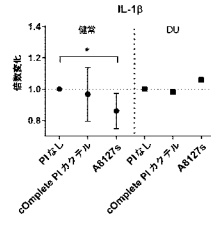


図 28G

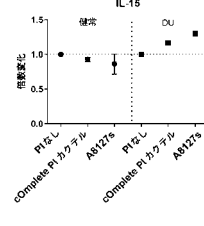


図 28H

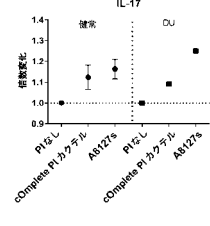


図 28C

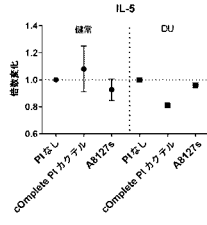


図 28D

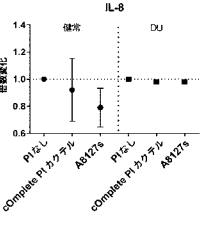


図 28I

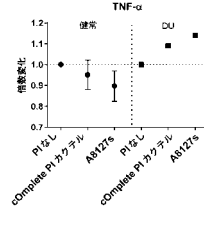


図 28J

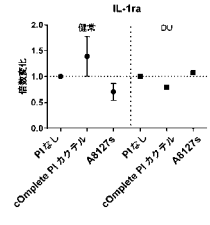


図 28E

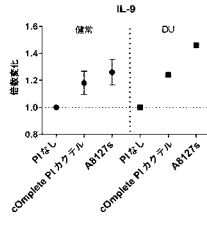


図 28F

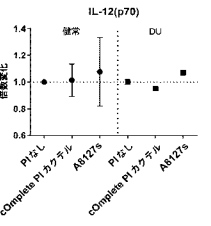


図 28K

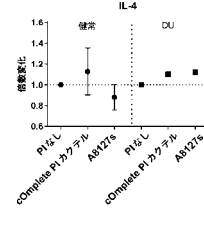
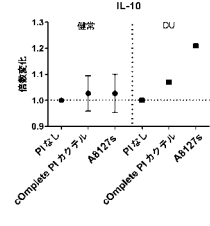


図 28L



【図 28 M - R】

図 28M

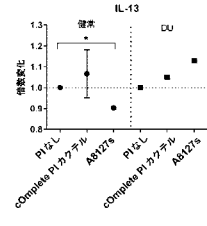


図 28N

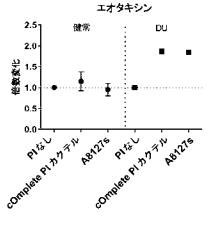


図 28S

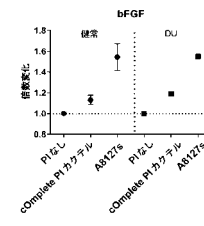


図 28T

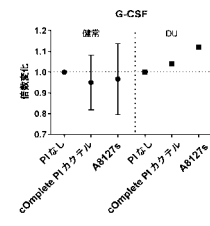


図 28O

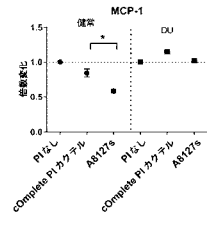


図 28P

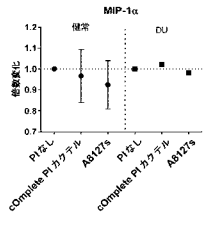


図 28U

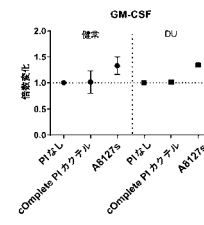


図 28V

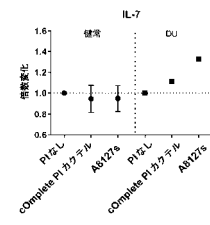


図 28Q

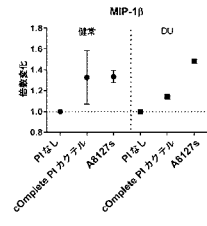


図 28R

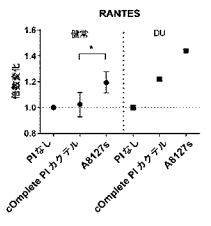


図 28W

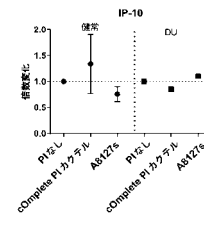
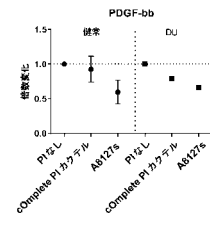


図 28X



【図 28 S - X】

【図 28 Y - D D】

図 28Y

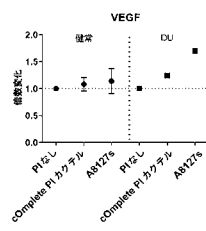


図 28Z

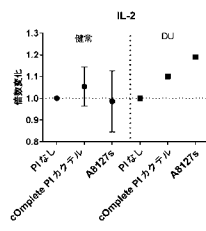


図 28EE

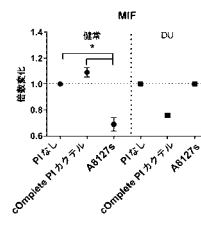


図 28FF

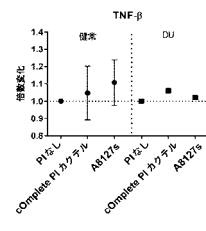


図 28AA

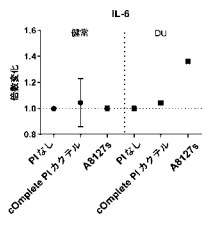


図 28BB

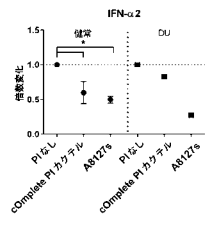


図 28GG

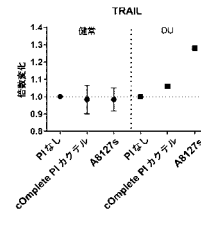


図 28HH

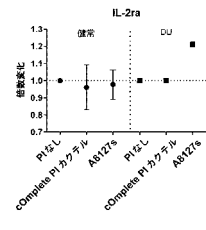


図 28CC

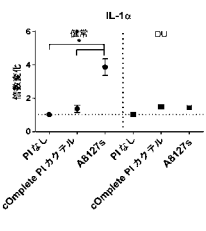


図 28DD

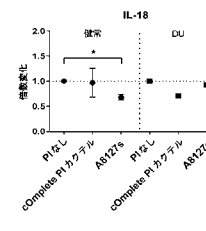


図 28II

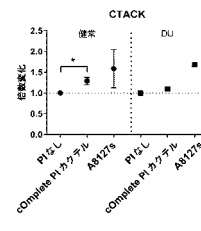
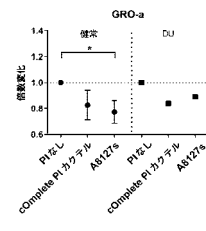


図 28JJ



【図 28 K K - P P】

図 28KK

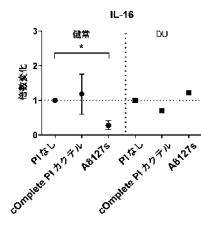


図 28LL

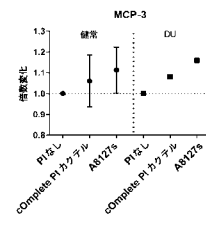


図 28QQ

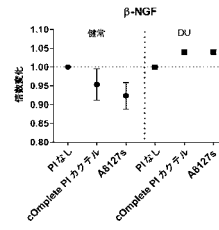


図 28RR

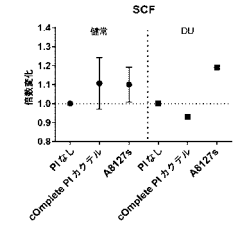


図 28MM

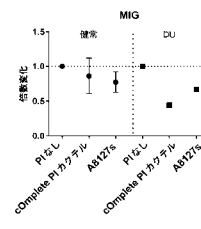


図 28NN

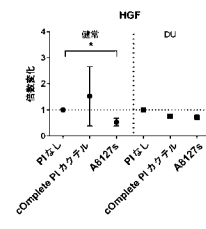


図 28SS

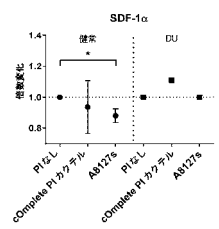


図 28TT

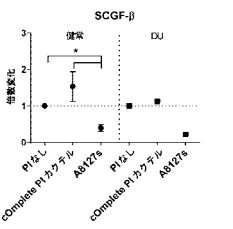


図 28OO

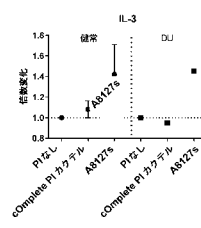


図 28PP

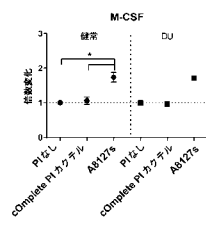


図 28UU

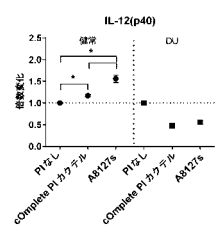
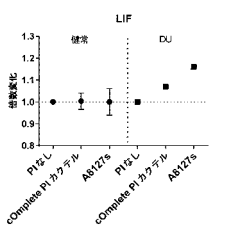


図 28VV



【図 28 Q Q - V V】

【図 29A - F】

図 29A

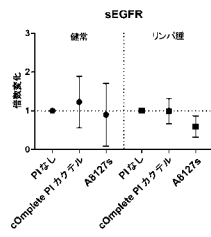


図 29B

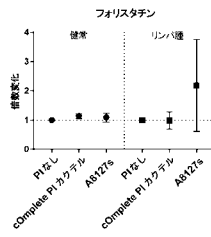


図 29G

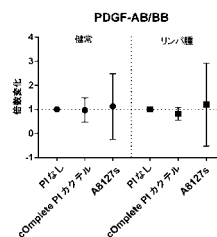


図 29H

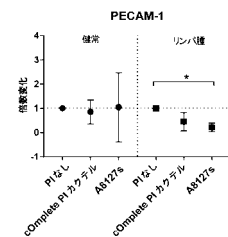


図 29C

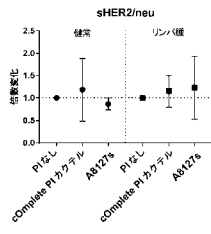


図 29D

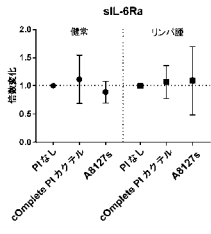


図 29I

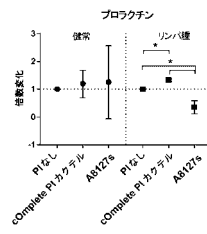


図 29J

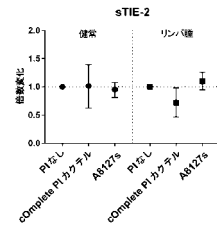


図 29E

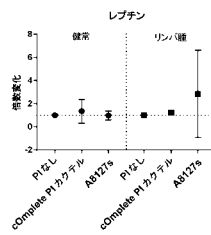


図 29F

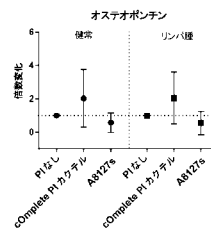


図 29K

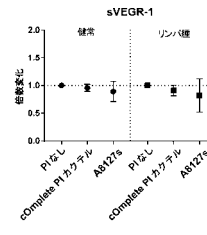
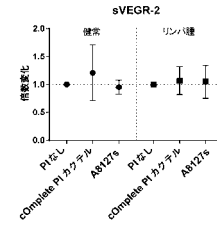


図 29L



【図 29M - R】

図 29M

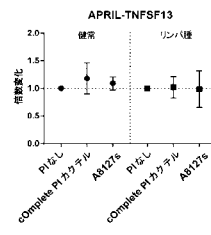


図 29N

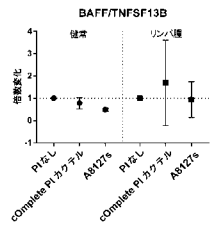


図 29S

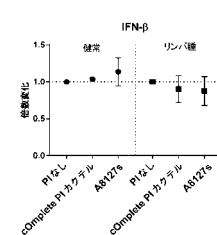


図 29T

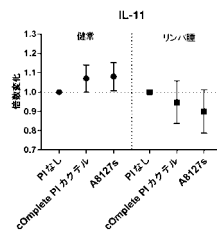


図 29O

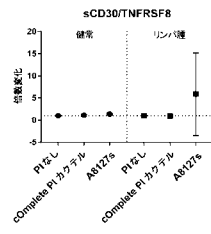


図 29P

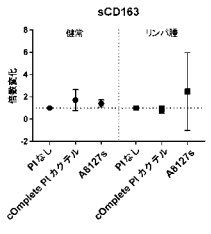


図 29U

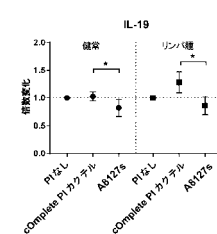


図 29V

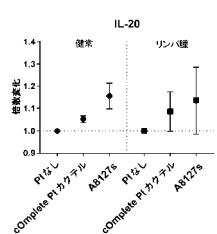


図 29Q

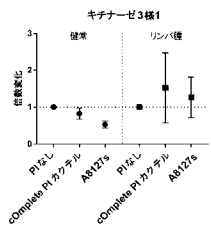


図 29R

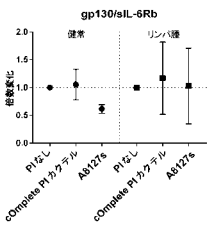


FIG. 29W

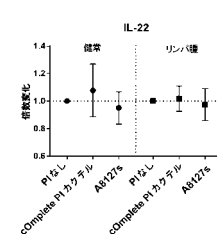
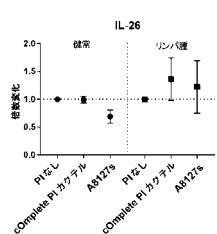


FIG. 29X



【図 29 Y - D D】

図 29Y

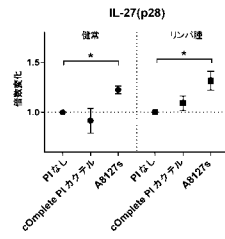


図 29Z

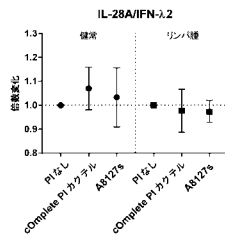


図 29EE

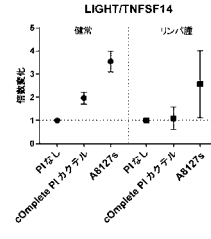


図 29FF

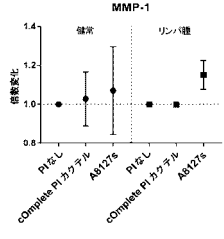


図 29AA

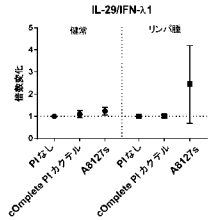


図 29BB

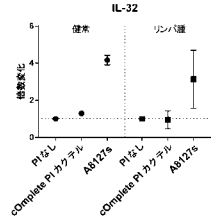


図 29GG

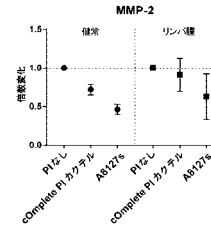


図 29HH

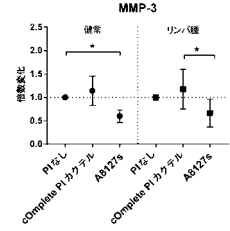


図 29CC

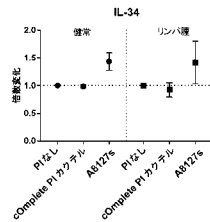


図 29DD

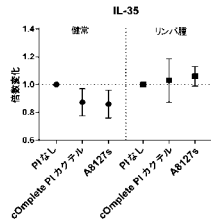


図 29II

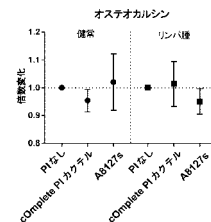
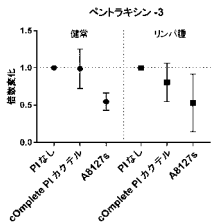


図 29JJ



【図 29 K K - L L】

図 29KK

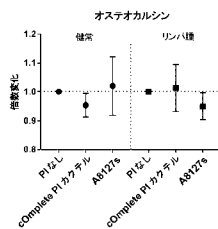
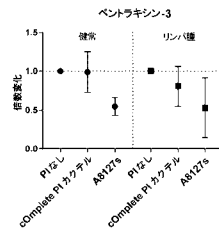


図 29LL



【図 30 A - F】

図 30A

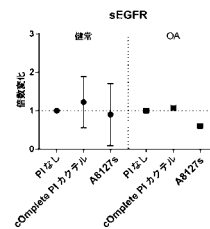


図 30B

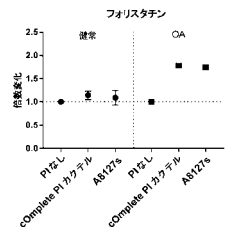


図 30C

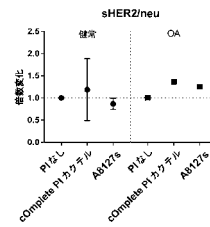


図 30D

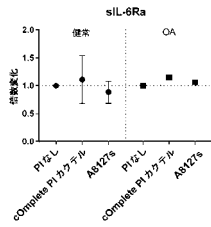


図 30E

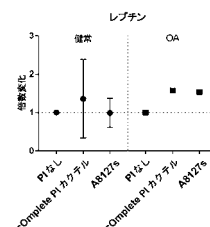
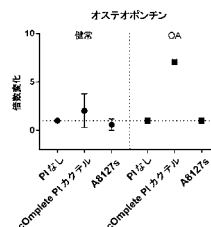


図 30F



【図 30G-L】

図 30G

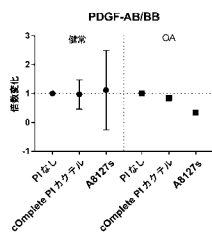


図 30H

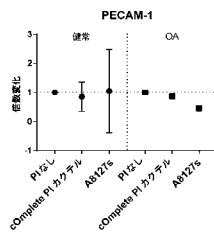


図 30M

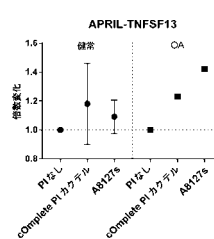


図 30N

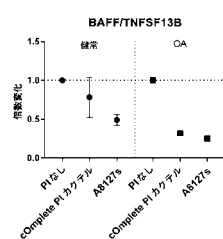


図 30I

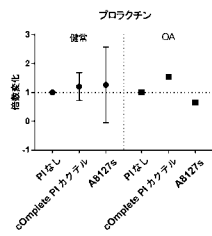


図 30J

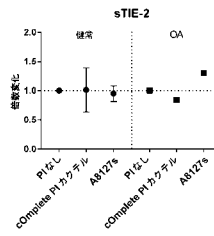


図 30O

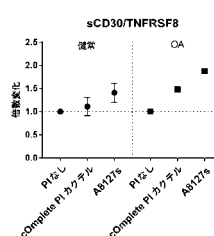


図 30P

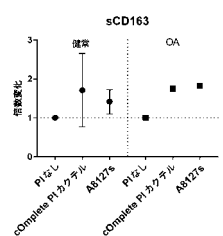


図 30K

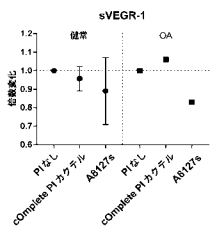


図 30L

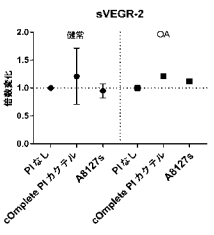


図 30Q

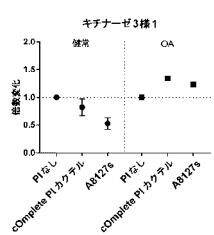
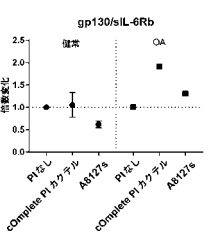


図 30R



【図 30S-X】

図 30S

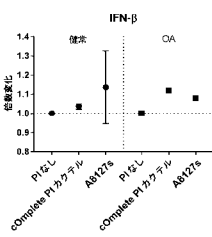


図 30T

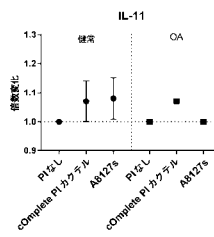


図 30Y

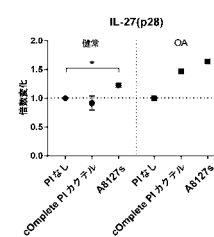


図 30Z

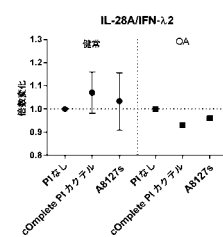


図 30U

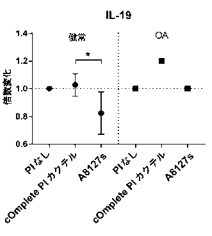


図 30V

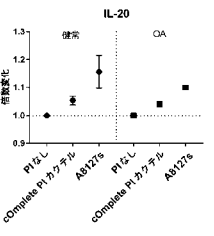


図 30AA

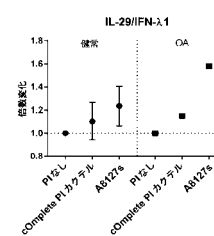


図 30BB

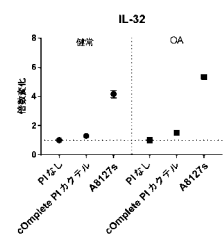


図 30W

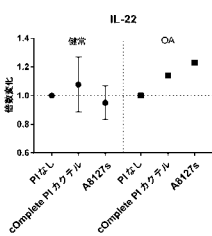


図 30X

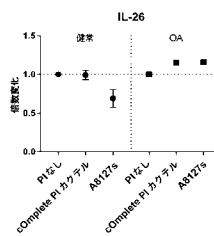


図 30CC

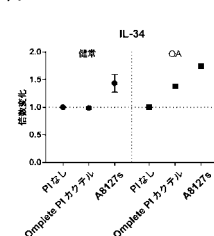
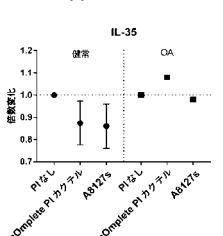


図 30DD



【図 30Y-D D】

【図 30EE-JJ】

図 30EE

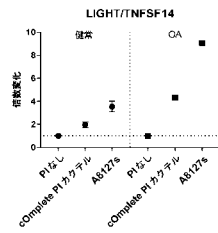


図 30FF

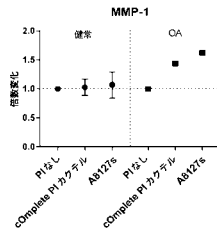


図 30KK

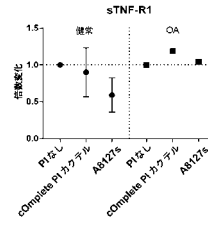


図 30LL

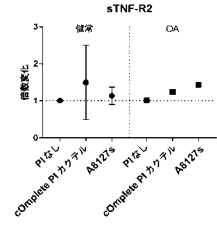


図 30GG

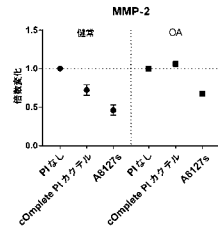


図 30HH

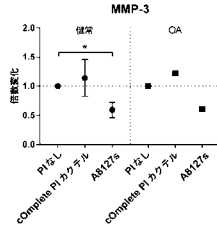


図 30MM

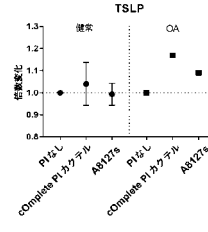


図 30NN

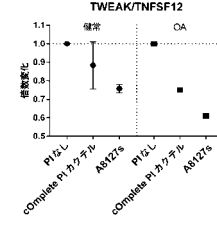


図 30II

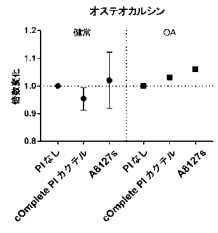
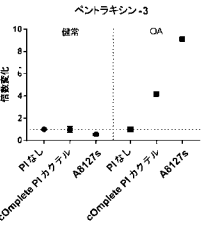


図 30JJ



【図 31A-F】

図 31A

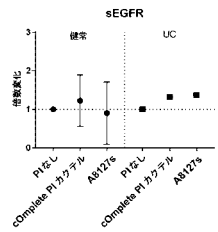


図 31B

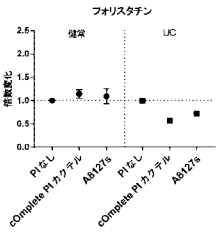


図 31G

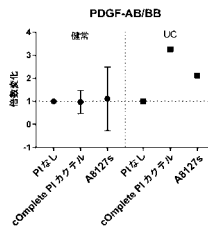


図 31H

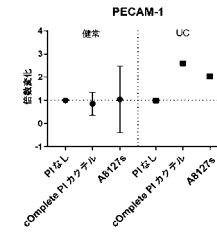


図 31C

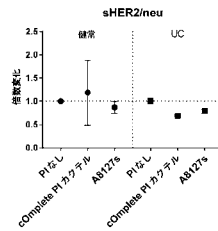


図 31D

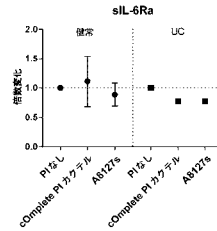


図 31I

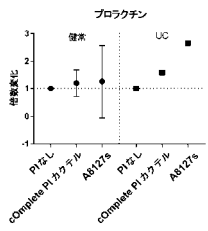


図 31J

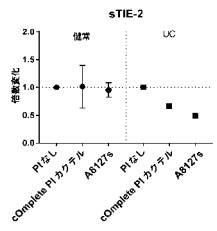


図 31E

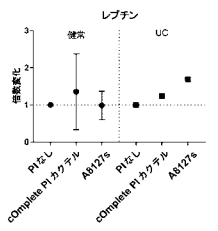


図 31F

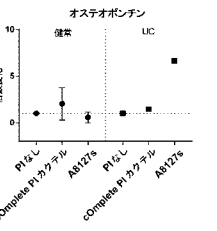


図 31K

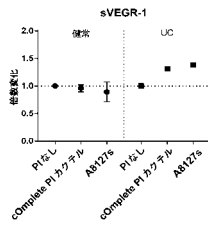
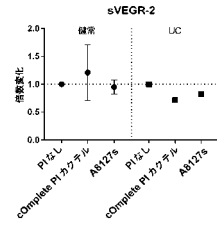


図 31L



【図 31G-L】

【図 3 1 M - R】

図 31M

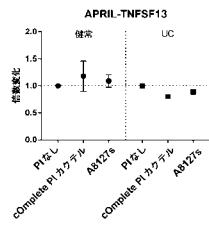


図 31N

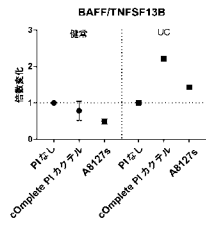


図 31S

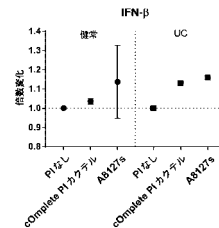


図 31T

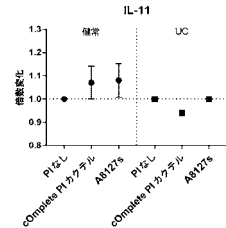


図 31O

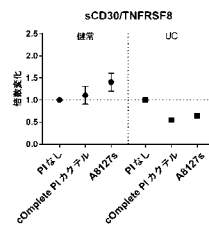


図 31P

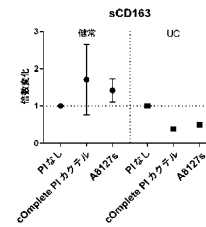


図 31U

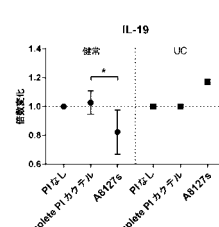


図 31V

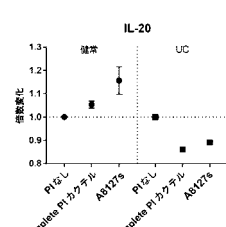


図 31Q

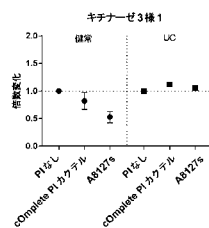


図 31R

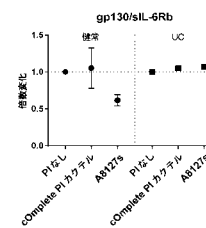


図 31W

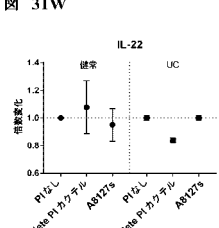
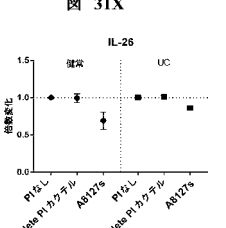


図 31X



【図 3 1 Y - D D】

図 31Y

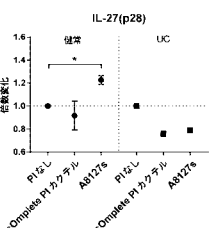


図 31Z

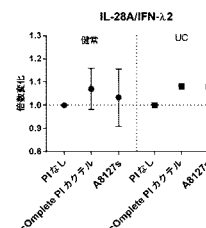


図 31EE

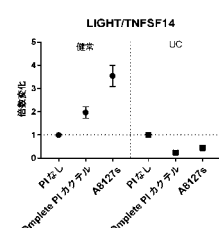


図 31FF

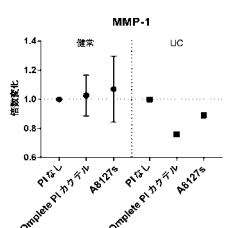


図 31AA

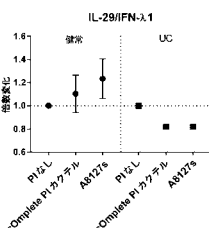


図 31BB

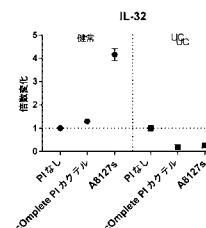


図 31GG

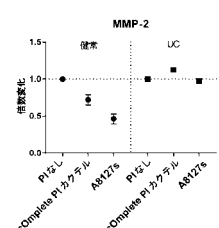


図 31HH

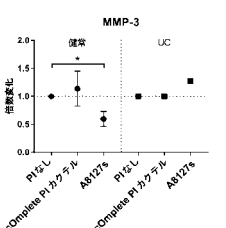


図 31CC

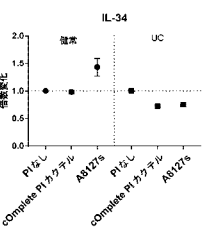


図 31DD

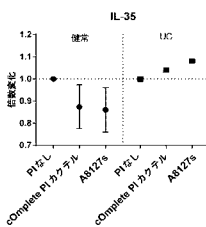


図 31II

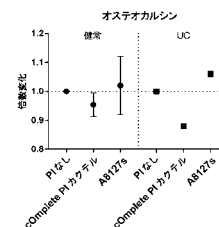
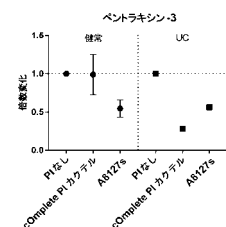


図 31JJ



【図 3 1 K K - N N】

図 31KK

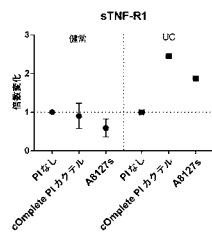


図 31LL

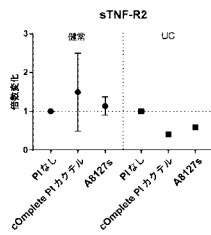


図 31MM

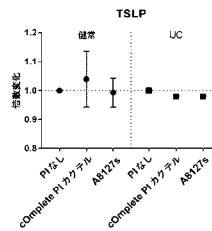
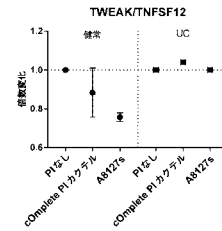
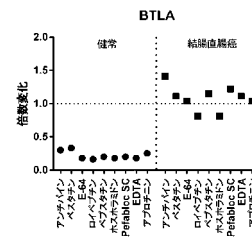


図 31NN



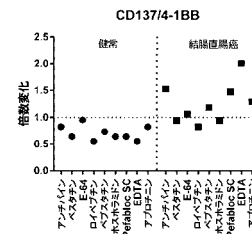
【図 3 2】

図 32



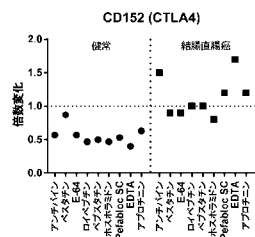
【図 3 3】

図 33



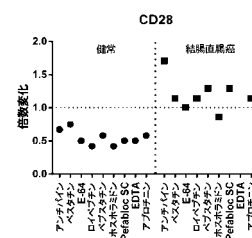
【図 3 4】

図 34



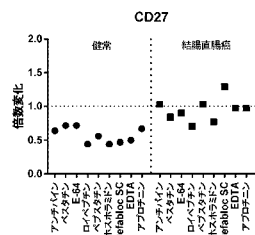
【図 3 6】

図 36



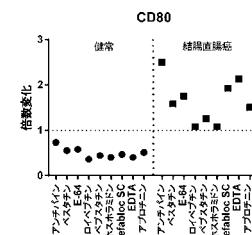
【図 3 5】

図 35

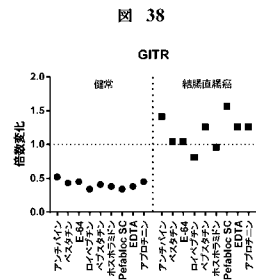


【図 3 7】

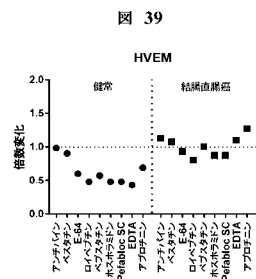
図 37



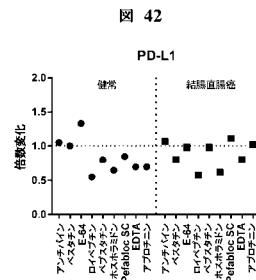
【図 38】



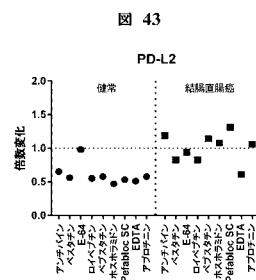
【図 39】



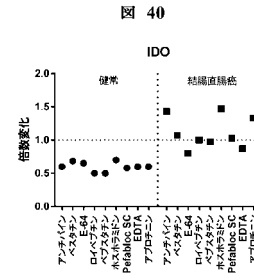
【図 42】



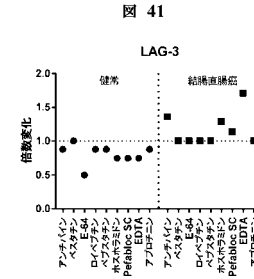
【図 43】



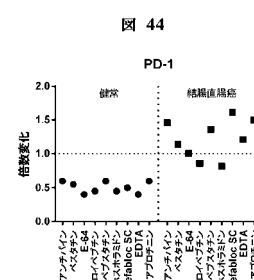
【図 40】



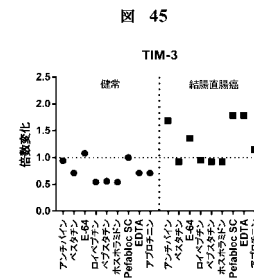
【図 41】



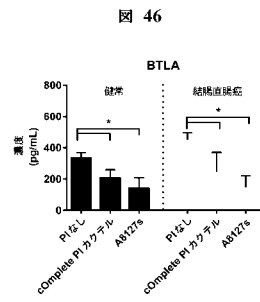
【図 44】



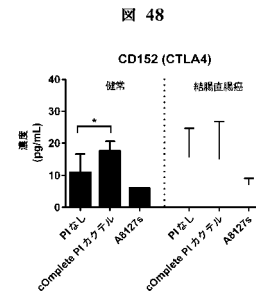
【図 45】



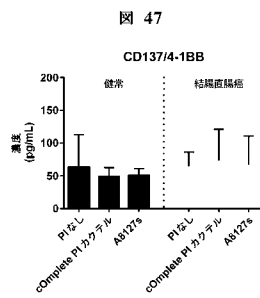
【図 46】



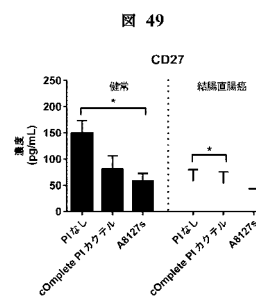
【図 48】



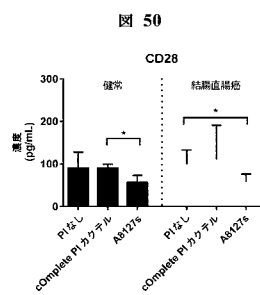
【図 47】



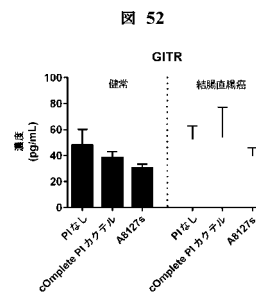
【図 49】



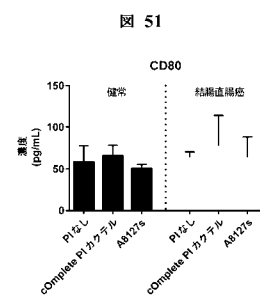
【図 50】



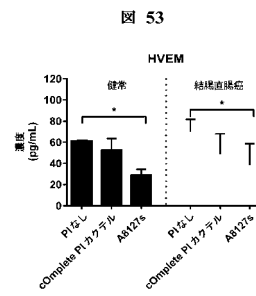
【図 52】



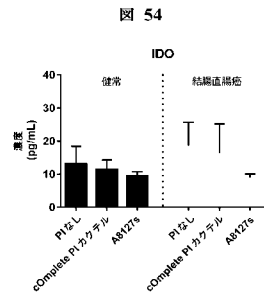
【図 51】



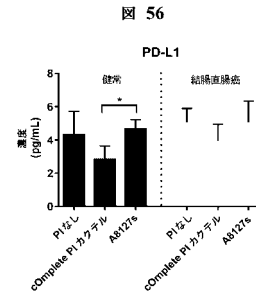
【図 53】



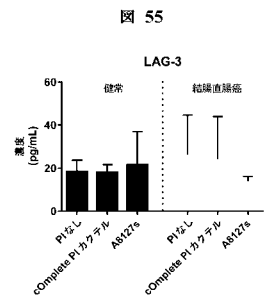
【図 5 4】



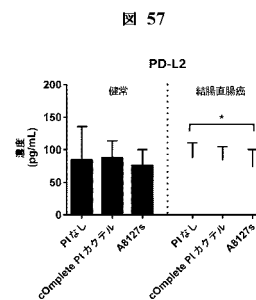
【図 5 6】



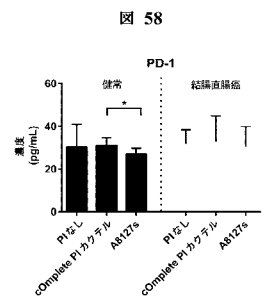
【図 5 5】



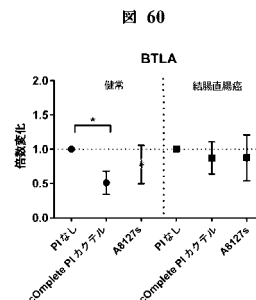
【図 5 7】



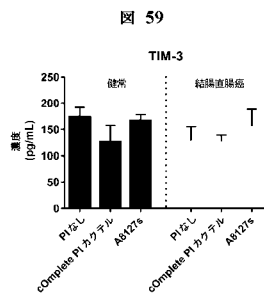
【図 5 8】



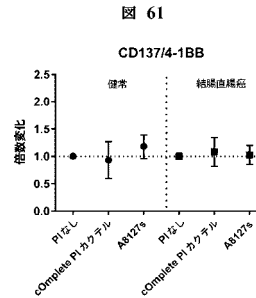
【図 6 0】



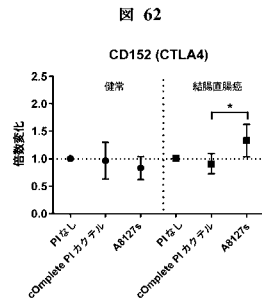
【図 5 9】



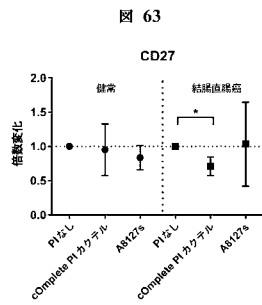
【図 6 1】



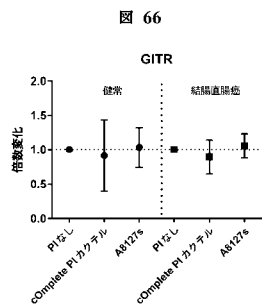
【図 6 2】



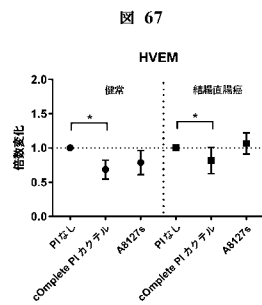
【図 6 3】



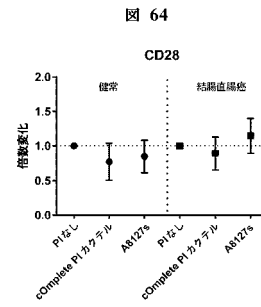
【図 6 6】



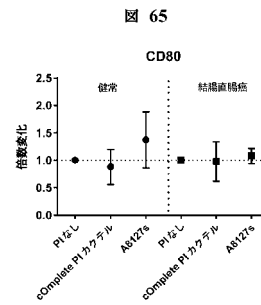
【図 6 7】



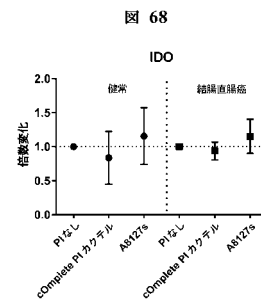
【図 6 4】



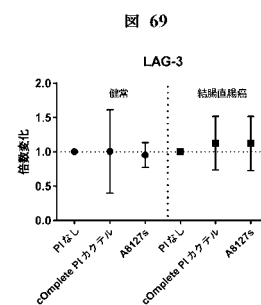
【図 6 5】



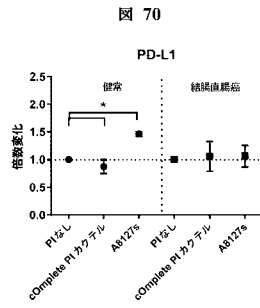
【図 6 8】



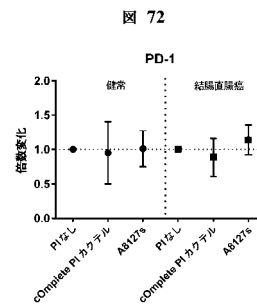
【図 6 9】



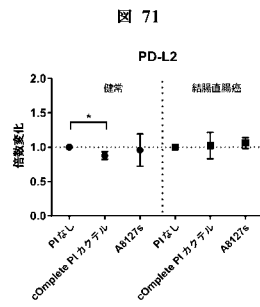
【図 70】



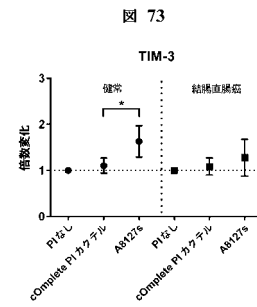
【図 72】



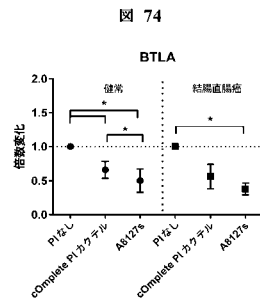
【図 71】



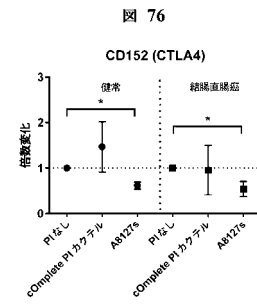
【図 73】



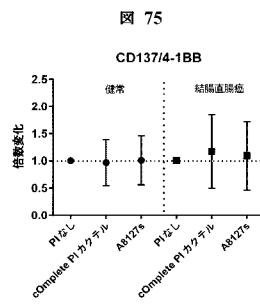
【図 74】



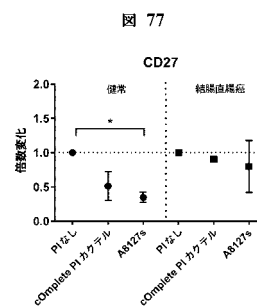
【図 76】



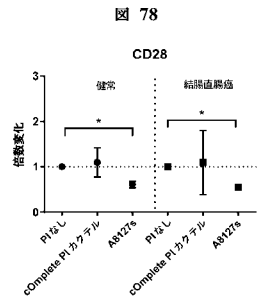
【図 75】



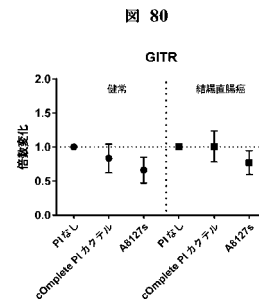
【図 77】



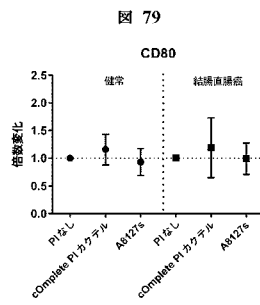
【図 78】



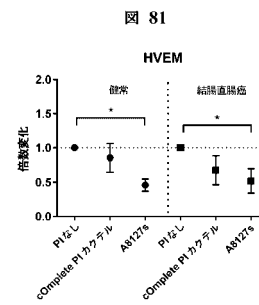
【図 80】



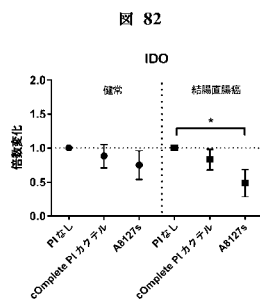
【図 79】



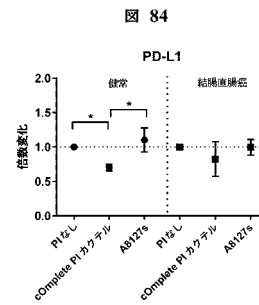
【図 81】



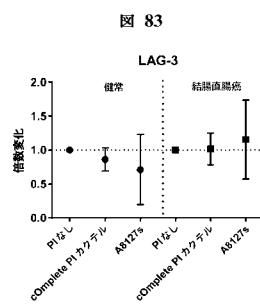
【図 82】



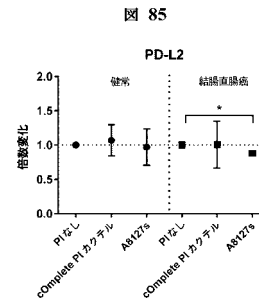
【図 84】



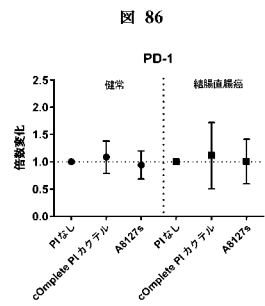
【図 83】



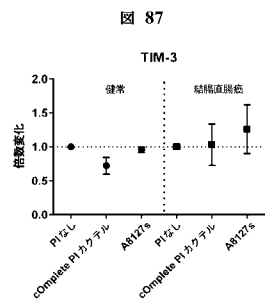
【図 85】



【図 8 6】



【図 8 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/000282
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/37 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PATENW, EPODOC, WPIAP: C12Q 1/37, G01N 33 (IPC CPC); red blood, erythrocyte, whole blood, profile, biomarker, proteome, proteinase, inhibitor and similar terms. CAplus, Medline, Biosis: red blood cell, erythrocyte, protease inhibitor, profile, biomarker, proteome and similar terms Applicant/Inventor search: PatentScope, PubMed, AusPat and internal IPAustralia databases.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 February 2018		Date of mailing of the international search report 28 February 2018
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Gareth Cook AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61399359629

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2017/000282
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ayache S <i>et al</i> , "Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels", <i>American Journal of Clinical Pathology</i> , 2006, 126(2):174-184 abstract, pages 175 to 176, whole of document	2, 8, 9, 13-15, 18-20, 43-47
X	Li L <i>et al</i> , "Development and characterization of dried blood spot materials for the measurement of immunoreactive trypsinogen", <i>Journal of Medical Screening</i> , 2006, 13(2):79-84 abstract, page 80, whole of document	2, 3, 6, 7, 10, 11, 13-15, 18-20
X	Olivieri E <i>et al</i> , "The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes", <i>Electrophoresis</i> , 2001, 22(3):560-565 abstract, page 560 to 563, whole of document	2, 3, 6, 7, 10, 11, 13-15, 18-20
X	D'Amici GM <i>et al</i> , "Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage", <i>Journal of Proteome Research</i> , 2007, 6(8):3242-3255 abstract, page 3252, whole of document	2, 3, 6-11, 13, 15, 18, 20
X	Bowyer PW <i>et al</i> , "Global profiling of proteolysis during rupture of Plasmodium falciparum from the host erythrocyte", <i>Molecular and Cellular Proteomics</i> , 2011, 10(5):M110.001636 [retrieved from internet 22 February 2018] <URL: http://www.mcponline.org/content/10/5/M110.001636.short > abstract, pages 2, 3, 9, 11, figure 5, Supplemental figures, whole of document	1, 2, 6-10, 13-15, 18-20
X	WO 2011/127056 A2 (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 13 October 2011 pages 36 to 38	43-47
X	WO 2008/134526 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION INC) 06 November 2008 pages 37 to 39	43-47
X	US 2009/0054741 A1 (MCALEER) 26 February 2009 claims 1 and 11, paragraph [0056], whole of document	26
X	WO 2009/111595 A2 (RIDGE DIAGNOSTICS INC) 11 September 2009 pages 12 to 18, claims 1 to 4 and 21 to 24, whole of document	26
A	WO 2012/166055 A1 (SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE LTD) 06 December 2012 whole of document	
P,X	WO 2017/106899 A2 (SANGUI BIO PTY LTD) 29 June 2017 pages 49 to 51, whole of document	2, 3, 6-11, 13-15, 18-20
P,X	WO 2017/059477 A1 (SANGUI BIO PTY LTD) 13 April 2017 pages 67 to 70, figure 16, whole of document	2, 3, 6-11, 13-15, 18-20
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2017/000282

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:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☒ Claims Nos.: **21**
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:
See Supplemental Box
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

See Supplemental Box for Details

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2017/000282
Supplemental Box	
Continuation of Box II Claim 21 does not comply with Rule 6.2(a) because it relies on reference to Tables contained in the description. Continuation of Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups: (1) Claims 1 to 42 are directed to methods of producing a protein profile from whole blood, or a portion thereof such as red blood cells wherein the protein profile is the difference in levels of one or more proteins between a part of the sample which has been contacted with one or more protease inhibitors and a part of the sample which has not been contacted with one or more protease inhibitors, or the difference in levels of one or more proteins before and after the sample has been contacted with one or more protease inhibitors. (2) Claims 43 to 48 are directed to a kit (claims 44 to 48 incorrectly referring to a method), the kit being suitable for producing a protein profile of a blood sample comprising at least one reagent suitable for obtaining a red blood cell component, one or more protease inhibitors and at least one reagent to measure the levels of one or more proteins of the red blood cell component. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. While both groups relate to producing a protein profile from a blood sample, the kit is not claimed in such a way that it can only be used to produce a protein profile through the methods of invention (1). Producing protein profiles of blood components, include red blood cells, is well known in the art, protease inhibitors are routinely used when taking blood samples to stabilise and limit degradation of the blood sample. Any common features between the two groups is generic in the art. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a priori</i>. Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2017/000282	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2011/127056 A2	13 October 2011	WO 2011127056 A2	13 Oct 2011
WO 2008/134526 A2	06 November 2008	WO 2008134526 A2	06 Nov 2008
		US 2010184049 A1	22 Jul 2010
US 2009/0054741 A1	26 February 2009	US 2009054741 A1	26 Feb 2009
		CN 101185000 A	21 May 2008
		EP 1875248 A2	09 Jan 2008
		US 2012190132 A1	26 Jul 2012
		US 2013183681 A1	18 Jul 2013
		WO 2006123253 A2	23 Nov 2006
WO 2009/111595 A2	11 September 2009	WO 2009111595 A2	11 Sep 2009
		CA 2717763 A1	11 Sep 2009
		CA 2718273 A1	17 Sep 2009
		CA 2740736 A1	22 Apr 2010
		CA 2744151 A1	27 May 2010
		CN 102016907 A	13 Apr 2011
		CN 102037355 A	27 Apr 2011
		CN 102257157 A	23 Nov 2011
		CN 102301234 A	28 Dec 2011
		CN 102301234 B	17 Jun 2015
		EP 2272044 A2	12 Jan 2011
		EP 2329260 A2	08 Jun 2011
		EP 2337866 A2	29 Jun 2011
		EP 2337866 B1	30 Jul 2014
		EP 2356453 A2	17 Aug 2011
		HK 1165554 A1	06 May 2016

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2017/000282	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		JP 2012506053 A	08 Mar 2012
		JP 5540000 B2	02 Jul 2014
		JP 2011520095 A	14 Jul 2011
		JP 5658571 B2	28 Jan 2015
		JP 2011518318 A	23 Jun 2011
		JP 5663314 B2	04 Feb 2015
		JP 2012509480 A	19 Apr 2012
		JP 5767973 B2	26 Aug 2015
		US 2010136700 A1	03 Jun 2010
		US 8440418 B2	14 May 2013
		US 2010100333 A1	22 Apr 2010
		US 2011245092 A1	06 Oct 2011
		US 2011269633 A1	03 Nov 2011
		US 2014128273 A1	08 May 2014
		US 2014257708 A1	11 Sep 2014
		US 2016342757 A1	24 Nov 2016
		WO 2009114627 A2	17 Sep 2009
		WO 2010045490 A2	22 Apr 2010
		WO 2010059709 A2	27 May 2010
WO 2012/166055 A1	06 December 2012	WO 2012166055 A1	06 Dec 2012
		SG 195180 A1	30 Dec 2013
		US 2015111238 A1	23 Apr 2015
WO 2017/106899 A2	29 June 2017	WO 2017106899 A2	29 Jun 2017
WO 2017/059477 A1	13 April 2017	WO 2017059477 A1	13 Apr 2017
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/523,489

(32)優先日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(72)発明者 エリザベス カーステン

オーストラリア 2 1 5 2 エヌエスダブリュー ノースミード キャンプベル ストリート 2
0 / 1 4 - 1 6

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA56 EA50