

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する方法であって、

(a) 妊娠約20週～妊娠約37週の妊娠対象からのサンプルを提供する段階；

(b) 該サンプルから微粒子関連ペプチド画分を調製する段階；

(c) 該画分中の複数のタンパク質バイオマーカーを測定する段階；および

(d) 癒着胎盤のリスクが増加した対象からであると該サンプルを分類する分類規則を、(c)の1つまたは複数の測定値に対して実行する段階を含む、前記方法。

【請求項 2】

10

前記タンパク質バイオマーカーが10、9、8、7、6、5、4または3種以下のタンパク質バイオマーカーのパネルを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 表7のバイオマーカーパネル；および

(ii) 表8のタンパク質バイオマーカー

から選択されるバイオマーカーのパネルを含むか、該パネルから本質的になるか、または該パネルからなる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記複数のタンパク質バイオマーカーが、

(i) 表1、表3および表5からの複数のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 表2、表4および表6からの複数のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9からの複数のタンパク質バイオマーカー；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の、2つもしくはそれ以上；または

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質の、2つもしくはそれ以上

を含む、請求項1記載の方法。

20

30

【請求項 5】

前記複数のバイオマーカーを測定する段階が図10A～10C、図11A～11C、図12A～12H、図13A～13H、図14A～14Dおよび図15A～15Bの関連する代替バイオマーカーを測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記妊娠対象が癒着胎盤の1つまたは複数のリスク因子を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

前記妊娠対象が初妊婦、経妊婦、初産婦または経産婦である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプルが血液サンプルである、請求項1記載の方法。

40

【請求項 9】

前記サンプルが血漿または血清である、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；

(v) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー；

(vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC

50

1); ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択される複数の実質的に純粋なタンパク質バイオマーカーまたは代替バイオマーカーを含む、パネル。

【請求項11】

図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bの前記代替バイオマーカーの各々とペアになっている、安定同位体標準物質ペプチド

をさらに含む、請求項10記載のパネル。

10

【請求項12】

ペプチドサンプルを調製する方法であって、

(a) 妊娠約20週~妊娠約37週の妊娠対象からのサンプルを提供する段階;

(b) 微粒子濃縮画分を生成するために、該サンプルをサイズ排除カラムに負荷し、水を移動相として用いカラムから微粒子を溶出することにより、微粒子について該サンプルを濃縮する段階;

(c) 微粒子濃縮画分をプロテアーゼと接触させることにより微粒子濃縮画分から微粒子関連ペプチド画分を調製する段階;

(d) 質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階; および

(e) 質量分析シグナルに基づいて、1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーに対応する1つまたは複数のペプチドを測定する段階

20

を含む、前記方法。

【請求項13】

1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが複数のタンパク質バイオマーカーを含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

タンパク質バイオマーカーが10、9、8、7、6、5、4または3種以下のタンパク質バイオマーカーのパネルを含む、請求項12記載の方法。

【請求項15】

タンパク質バイオマーカーが、

(i) 表7のバイオマーカーパネル; および

(ii) 表8のタンパク質バイオマーカー

から選択されるバイオマーカーのパネルを含むか、該パネルから本質的になるか、または該パネルからなる、請求項12記載の方法。

30

【請求項16】

タンパク質バイオマーカーが、

(i) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の、1つもしくは複数; または

(ii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質の、1つもしくは複数

40

を含む、請求項12記載の方法。

【請求項17】

前記1つまたは複数のペプチドを測定する段階が、図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bのいずれかの代替バイオマーカーを測定することを含む、請求項12記載の方法。

【請求項18】

前記妊娠対象が癒着胎盤の1つまたは複数のリスク因子を有する、請求項12記載の方法。

50

【請求項 19】

前記妊娠対象が初妊婦、経妊婦、初産婦または経産婦である、請求項12記載の方法。

【請求項 20】

血液サンプルが血漿または血清である、請求項12記載の方法。

【請求項 21】

水が脱イオン蒸留水である、請求項12記載の方法。

【請求項 22】

サイズ排除カラムがアガロース固相および水性液相を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 23】

微粒子関連ペプチド画分を調製する段階が、限外ろ過または逆相クロマトグラフィーを用いることをさらに含む、請求項12記載の方法。 10

【請求項 24】

微粒子関連ペプチド画分を調製する段階が、尿素を用いた微粒子濃縮画分の変性、ジチオスレイトールを用いた微粒子濃縮画分の還元、ヨードアセタミンを用いた微粒子濃縮画分のアルキル化、およびトリプシンを用いた微粒子濃縮画分の消化をさらに含む、請求項12記載の方法。

【請求項 25】

微粒子について前記サンプルを濃縮する段階が、胎盤由来エクソソームまたは血管内皮由来エクソソームについて濃縮するために微粒子をさらに精製することを含む、請求項12記載の方法。 20

【請求項 26】

質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階が、液体クロマトグラフィー/トリプル四重極質量分析を含む液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)によって微粒子関連ペプチドを分離することを含む、請求項12記載の方法。

【請求項 27】

質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階が、多重反応モニタリングを含む質量分析を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 28】

前記1つまたは複数のペプチドが、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表7のバイオマーカーパネル；および 30

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表8のタンパク質バイオマーカーから選択される、請求項12記載の方法。

【請求項 29】

1つまたは複数の容器を含むキットであって、各容器が複数の安定同位体標準物質の各々の1つまたは複数を含み、各安定同位体標準物質が、

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー； 40

(v) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー；

(vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)；ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択されるバイオマーカーのパネルからのバイオマーカーに対する代替ペプチドに対応する、前記1つまたは複数の容器を含むキット。

【請求項 30】

1対または複数対のポリペプチドを含む組成物であって、ポリペプチドの各対が、 50

- (i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；
- (ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；
- (iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；
- (iv) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；
- (v) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー；
- (vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)；ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択される1つもしくは複数のタンパク質バイオマーカーまたは1つもしくは複数の代替バイオマーカーを含む、前記組成物。

10

【請求項31】

癒着胎盤のリスクがある第1のグループまたは癒着胎盤のリスクがない第2のグループに分類された1人または複数人の妊娠対象に由来するバイオマーカー測定値の1つまたは複数のデータセットの分析によって生成された1つまたは複数の分類規則を実施するコードを含む、有形の非一時的な形式のコンピュータ可読媒体。

【請求項32】

以下を含むシステム：

(a) コンピュータであって

20

(i) プロセッサと

(ii) プロセッサに結合されたメモリであって、

(1) 1つまたは複数の値を含む、対象からのサンプルの試験データであって、各値が微粒子関連ペプチドの画分中の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの測定値を示し、該1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

30

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

から選択される、

前記対象からのサンプルの試験データ；

(2) 各値が前記測定値を示す1つまたは複数の値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度値を有するように構成されている、該分類規則；ならびに

40

(3) 該試験データに対して該分類規則を実施するためのコンピュータ実行可能命令を含むモジュールを記憶する、前記メモリと

を含む、前記コンピュータ。

【請求項33】

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；および

(ii) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、請求項32記載のシステム。

【請求項34】

50

(a) 試験データをコンパイルするためにコンピュータシステムを使用する段階であって、該コンピュータシステムが、プロセッサおよびプロセッサに結合されたメモリを含み、該メモリが、

(1) 微粒子関連ペプチドの画分中の本開示の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカの1つまたは複数の測定値を示す値を含む、対象からのサンプルの試験データ；

(2) 該1つまたは複数の測定値を含む値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する、プロセッサによって実行される分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度を有するように構成されている、該分類規則

を含むモジュールを記憶する、段階；

10

(b) 前記試験データにアクセスする段階；ならびに

(c) 前記試験データに対して該分類規則を実行する段階を含む、方法。

【請求項35】

妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する方法であって、

(a) 妊娠対象からの血液サンプルから微粒子濃縮画分を調製する段階；

(b) 微粒子濃縮画分中の1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカの定量的測度を決定する段階であって、該1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカが、

(i) 該血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカ；

20

(ii) 該血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカ；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカ；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

30

から選択される、段階；ならびに

(c) 1つまたは複数の定量的測度に基づいて癒着胎盤のリスクを評価する段階を含む、前記方法。

【請求項36】

前記タンパク質バイオマーカが、

(i) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカ；

(ii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカ；

(iii) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の代替バイオマーカ；ならびに

40

(iv) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の代替バイオマーカ

から選択される代替バイオマーカである、請求項35記載の方法。

【請求項37】

1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカの前記定量的測度を決定する段階が、

各捕捉試薬が前記タンパク質バイオマーカの1つに特異的に結合する1つまたは複数の捕捉試薬と、前記サンプルを接触させること、および

該捕捉試薬と前記タンパク質バイオマーカとの結合を検出すること

50

を含む、請求項35記載の方法。

【請求項38】

1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーの前記定量的測度を決定する段階が、免疫アッセイを行うことを含む、請求項37記載の方法。

【請求項39】

免疫アッセイが酵素免疫アッセイ(EIA)、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)および放射免疫アッセイ(RIA)からなる群より選択される、請求項38記載の方法。

【請求項40】

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が分類規則を実行することを含み、該分類規則が癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、かつ該分類規則の実行が少なくとも0.05未満のp値での癒着胎盤または満期産の間の相関をもたらず、請求項35記載の方法。

10

【請求項41】

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が分類規則を実行することを含み、該分類規則が癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、かつ該分類規則の実行が受信者動作特性(ROC)曲線を生成し、該ROC曲線が少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8または少なくとも0.9の曲線下面積(AUC)を有する、請求項35記載の方法。

【請求項42】

分類規則が、1つまたは複数の値に基づき対象を分類し、該1つまたは複数の値が、前置胎盤、以前の帝王切開分娩、子宮内膜切離、体外受精、前の子宮感染症または以前の子宮手術の、少なくとも1つをさらに含む、請求項35記載の方法。

20

【請求項43】

前記分類規則が、カットオフ、多重線形回帰を含む線形回帰、部分的最小二乗回帰、主成分回帰、分類および回帰木をさらに含む再帰的分割プロセスを含む二分決定木、誤差逆伝播法ネットワークを含む人工ニューラルネットワーク、ベイジアン分類器またはフィッシャー分析をさらに含む判別分析、ロジスティック分類器、ならびにサポートベクターマシンを含むサポートベクター分類器を採用する、請求項25〜32のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

分類規則が、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%の感度値、特異度値、陽性的中率または陰性的中率を有するように構成されている、請求項35記載の方法。

30

【請求項45】

前記タンパク質バイオマーカーが、上方制御される場合、閾値レベルを上回っていること、または下方制御される場合、閾値レベルを下回っていることを判定することを、癒着胎盤のリスクを評価する段階が含む、請求項35記載の方法。

【請求項46】

前記閾値レベルが、少なくとも50人、少なくとも100人または少なくとも200人の対照対象から決定された前記タンパク質バイオマーカーの平均値、中央値または最頻値を含む中心傾向の測度からの少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つのzスコアのレベルを表す、請求項45記載の方法。

40

【請求項47】

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が、パネル中の各タンパク質バイオマーカーの前記1つまたは複数の定量的測度を参照標準と比較することを含む、請求項35記載の方法。

【請求項48】

妊娠対象の癒着胎盤のリスクを医療提供者に伝える段階をさらに含む、請求項35記載の方法。

【請求項49】

妊娠対象における癒着胎盤を処置する方法であって、

(a) 請求項1〜9および35〜48のいずれか一項記載の方法によって妊娠対象の癒着胎盤のリスクを評価する段階;ならびに

50

(b) 癒着胎盤のリスクを減少させる、および/または癒着胎盤の新生児合併症を低減させるのに有効な治療的介入を前記対象に施す段階を含む、前記方法。

【請求項50】

前記治療的介入を施す段階が、

(i) 高度の集学的な外科的専門知識および経験を有する医療施設に前記対象を紹介すること;

(ii) 外科的子宮温存を計画すること; ならびに

(iii) 子宮切除帝王切開を行うこと、予防的塞栓術を行うこと、子宮バルーンタンポナーデ、一時的内腸骨閉塞バルーンカテーテル、尿管ステントを挿入すること、メトトレキセートを投与すること、胎盤の一部を原位置に残すこと、および早産を予防するために前記対象に床上安静を指図すること

からなる群より選択される治療的介入を含む、請求項49記載の方法。

【請求項51】

請求項1~9および35~48のいずれか一項記載の方法によって癒着胎盤のリスクの増加を有すると判定された妊娠対象に、癒着胎盤のリスクを低減するのに有効な治療的介入を施す段階を含む、方法。

【請求項52】

癒着胎盤のリスクを低減するようにデザインされた処置の有効量を妊娠対象に施す方法であって、該対象が、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー;

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー;

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー;

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数; ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

から選択されるタンパク質バイオマーカーのパネルのいずれか1つの参照標準と比較して、変化した定量的測度を有する、前記方法。

【請求項53】

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー;

(ii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー;

(iii) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の代替バイオマーカー; ならびに

(iv) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、請求項52記載の方法。

【請求項54】

(a) 100超、1000超、10,000超または100,000超のデータエントリを含むデータセットを生成するために、タンパク質のペプチド断片を含む生物学的サンプルからの100超、1000超、10,000超または100,000超のペプチドの質量を質量分析によって測定する段階;

(b) 1つまたは複数のプロセッサと、該1つまたは複数のプロセッサによる実行のため

10

20

30

40

50

のプログラムを記憶しているメモリとを含むコンピュータシステムを、

(1) 該データエントリの中から、該質量に基づき、

(i) 該生物学的サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) 該生物学的サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

に対応するペプチドを同定すること、

(2) 癒着胎盤のリスクが増加した対象からであると該サンプルを分類する分類規則を、同定されたペプチドの1つまたは複数の測定値に対して、実行すること

において使用する段階

を含む、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、2021年11月11日付で出願された米国仮特許出願第63/278,456号の優先権を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

背景

癒着胎盤は、胎盤が子宮壁の奥深くまで成長しすぎて起こる重篤な妊娠状態である。通常、胎盤は出産後に子宮壁から剥離する。癒着胎盤では、胎盤の一部または全部が付着したままになる。これによって分娩後に重度の失血が起こる可能性がある。また、胎盤が子宮の筋肉に侵入したり(嵌入胎盤)、子宮壁を通して成長したり(穿通胎盤)する可能性もある。

【0003】

癒着胎盤は高リスクの妊娠合併症と考えられている。妊娠中にこの状態が診断された場合、女性は帝王切開分娩の後に子宮摘出術が必要になる可能性が高くなる。

【0004】

おそらく帝王切開分娩の増加のため、癒着胎盤スペクトラムの発生率は、1970年代以来およそ8倍に増加している。帝王切開分娩の発生率は、癒着胎盤のない女性よりも癒着胎盤のある女性の方がはるかに高い。例えば、初回妊娠では、癒着胎盤のない女性の帝王切開分娩の発生率は0.03%であるが、癒着胎盤のある女性では、発生率は100倍高い、つまり3%である。

【0005】

前置胎盤、以前の帝王切開分娩、子宮内膜切離、またはその他の子宮手術などの、主なリスク因子を有する女性は、癒着胎盤スペクトラムの可能性を評価するために、妊娠第二期中期から後期に産科超音波検査を受けるべきである。癒着胎盤スペクトラムが疑われる患者は、集学的な専門知識と経験を有する施設に紹介されるべきである。

【0006】

現在の癒着胎盤の診断には超音波検査が含まれ、その特異度および感度は患者の臨床状態の知識(例えば、癒着胎盤の臨床的疑い、リスク因子の予備知識)に依存している。妊娠

10

20

30

40

50

女性の癒着胎盤を予測および検出する、より感度の高い方法が必要とされている。本明細書において提供されるのは、この必要性に対処する方法および組成物である。

【発明の概要】

【0007】

概要

本明細書において開示されるのは、癒着胎盤の予測および検出に有用な循環微粒子(CMP)関連タンパク質である。いくつかの態様において、CMP関連タンパク質は、妊娠約20週前後から約37週前後までに収集され、癒着胎盤のリスクを評価するために使用され得る。バイオマーカーは、表1~6および表9、図1A~1D、図2A~2C、図3A~3K、図4A~4J、図5A~5C、図6A~6Fの表、ならびに実施例1中の表に示される。同様に提供されるのは、図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bに示される、バイオマーカーの検出に有用な代替である。バイオマーカーのパネルも提示される。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

本明細書に組み入れられ、本明細書の一部を形成する添付の図面は、例示的な態様を示すものであり、その記述とともに、関連技術における当業者が、これらの態様および当業者には明らかであろう他の態様を作出および使用することを可能にするのにさらに役立つ。本発明は、以下の図面と併せてより詳細に記述される。

20

【0009】

【図1A】図1A~1Dは、24週サンプルの中央値を含む表1を示す。マーカーはラッソ(Lasso)回帰($\alpha = 1$)を用いてランク付けされている。上位20位のマーカーが表示されている。この技法は、単離されたマーカーよりはむしろパネル内で相互作用し「協力」し得るタンパク質を、最適化する。個別マーカーは、マルチマーカーパネルにおける有用性の頻度によってランク付けされている。

30

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図1C】図1Aの説明を参照のこと。

【図1D】図1Aの説明を参照のこと。

【図2A】図2A~2Cは、34週サンプルの中央値を含む表2を示す。マーカーはラッソ回帰($\alpha = 1$)を用いてランク付けされている。上位20位のマーカーが表示され、マルチマーカーパネルにおける有用性の度数によってランク付けされている。

40

【図2B】図2Aの説明を参照のこと。

【図2C】図2Aの説明を参照のこと。

【図3A】図3A~3Kは、症例と対照を区別する上位の個別マーカーを選択するアンサンブル特徴選択ルーチンを用いた中央値24週時の上位50位のタンパク質マーカーを含む表3を示す。表1のラッソ回帰の上位20位と重複するタンパク質マーカーは、星印で示されている。個別マーカーは、症例/対照を区別する性能によってランク付けされている。

50

【図3B】図3Aの説明を参照のこと。

【図3C】図3Aの説明を参照のこと。

【図3D】図3Aの説明を参照のこと。

40

【図3E】図3Aの説明を参照のこと。

【図3F】図3Aの説明を参照のこと。

【図3G】図3Aの説明を参照のこと。

【図3H】図3Aの説明を参照のこと。

【図3I】図3Aの説明を参照のこと。

【図3J】図3Aの説明を参照のこと。

【図3K】図3Aの説明を参照のこと。

【図4A】図4A~4Jは、症例と対照を区別する上位の個別マーカーを選択するアンサンブル特徴選択ルーチンを用いた中央値34週時の上位50位のタンパク質マーカーを含む表4を示す。ラッソ回帰の上位20位(表2)と重複するタンパク質マーカーは、星印で示され

50

ている。個別マーカーは、症例/対照を区別する性能によってランク付けされている。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

【図4E】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F】図4Aの説明を参照のこと。

【図4G】図4Aの説明を参照のこと。

【図4H】図4Aの説明を参照のこと。

【図4I】図4Aの説明を参照のこと。

【図4J】図4Aの説明を参照のこと。

10

【図5A】図5A～5Cは、24週マーカーを含む表5を示す。個別マーカーは、症例/対照を区別する性能によってランク付けされている。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図6A】図6A～6Fは、34週マーカーを含む表6を示す。個別マーカーは、症例/対照を区別する性能によってランク付けされている。

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図6C】図6Aの説明を参照のこと。

【図6D】図6Aの説明を参照のこと。

【図6E】図6Aの説明を参照のこと。

20

【図6F】図6Aの説明を参照のこと。

【図7】図7は24週マーカーを含む表7を示す。最高性能のマルチプレックスパネルは、反復相互検証手順の平均AUCによってランク付けされている。

【図8】図8は34週マーカーを含む表8を示す。最高性能のマルチプレックスパネルは、反復相互検証手順の平均AUCによってランク付けされている。

【図9】図9は癒着胎盤の予測的な循環微粒子タンパク質パネルを同定するためのプロトコルの概略図を示す。

【図10A】図10A～10Cは、表1のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。

30

【図10B】図10Aの説明を参照のこと。

【図10C】図10Aの説明を参照のこと。

【図11A】図11A～11Cは、表2のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図11C】図11Aの説明を参照のこと。

【図12A】図12A～12Hは、表3のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図12C】図12Aの説明を参照のこと。

【図12D】図12Aの説明を参照のこと。

【図12E】図12Aの説明を参照のこと。

【図12F】図12Aの説明を参照のこと。

【図12G】図12Aの説明を参照のこと。

【図12H】図12Aの説明を参照のこと。

40

【図13A】図13A～13Hは、表4のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。

【図13B】図13Aの説明を参照のこと。

【図13C】図13Aの説明を参照のこと。

【図13D】図13Aの説明を参照のこと。

【図13E】図13Aの説明を参照のこと。

50

【図 1 3 F】図 13 A の説明を参照のこと。
【図 1 3 G】図 13 A の説明を参照のこと。
【図 1 3 H】図 13 A の説明を参照のこと。
【図 1 4 A】図 14 A ～ 14 D は、表 5 のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。
【図 1 4 B】図 14 A の説明を参照のこと。
【図 1 4 C】図 14 A の説明を参照のこと。
【図 1 4 D】図 14 A の説明を参照のこと。
【図 1 5 A】図 15 A ～ 15 B は、表 6 のバイオマーカーの検出に有用な代替ペプチドを提供する。
【図 1 5 B】図 15 A の説明を参照のこと。
【図 1 6】図 16 A は、第 1 の網掛け部分が実際のタンパク質 AUC を表し、第 2 の網掛け部分が妊娠第二期 (例えば、24 週) のサンプルラベル (癒着胎盤スペクトル 対 対照) を無作為に並べ替えたことによる AUC を表す、タンパク質対並べ替えの密度プロットである。図 16 B は、第 1 の網掛け部分が実際のタンパク質 AUC を表し、第 2 の網掛け部分が妊娠第三期 (例えば、37 週) のサンプルラベル (癒着胎盤スペクトル 対 対照) を無作為に並べ替えたことによる AUC を表す、タンパク質対並べ替えの密度プロットである。
【図 1 7】図 17 は、病的な胎盤癒着に至る妊娠二期および第三期において提唱された、例示的な正準経路、上流制御因子、ならびに分子機能および細胞機能分析の概略図を示す。

10

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

詳細な説明

I. 導入

本明細書において開示されるのは、癒着胎盤の発症リスクの決定および癒着胎盤の処置に有用なバイオマーカーの検出のためのサンプルを調製するのに有用な方法、組成物、システムおよび製造品である。いくつかの態様において、決定は、妊娠女性の血液からの微粒子濃縮画分中に見出される癒着胎盤バイオマーカーの検出を伴う。妊娠第二期および第三期のいずれかまたは両方における癒着胎盤の検出に有用な例示的なバイオマーカーを、表 1、表 2、表 3、表 4、表 5、表 6 および表 9 に提示する。以下で論じられるように、表 7 および表 8 は、癒着胎盤のバイオマーカーパネルを示す。追加のマーカーセットも本明細書において提示される。

30

【0011】

II. 対象

癒着胎盤の予測および処置のためのサンプルを提供するための対象は、妊娠中のヒト女性である。妊娠の段階は、妊娠対象の最後の正常な月経期間の初日から計算することができる。

【0012】

いくつかの態様において、妊娠女性は、妊娠約 20 週～約 37 週であってもよい。いくつかの態様において、妊娠女性は、妊娠約 20 週、妊娠約 21 週、妊娠約 22 週、妊娠約 23 週、妊娠約 24 週、妊娠約 25 週、妊娠約 26 週、妊娠約 27 週、妊娠約 28 週、妊娠約 29 週、妊娠約 30 週、妊娠約 31 週、妊娠約 32 週、妊娠約 33 週、妊娠約 34 週、妊娠約 35 週、妊娠約 36 週、または妊娠約 37 週であってもよい。

40

【0013】

本明細書において記述される方法の妊娠対象は、初産婦 (分娩に至った前児がいない、本明細書では未経産もしくは経産回数 = 0 と互換的にいわれる) または経産婦 (少なくとも妊娠 20 週に至った少なくとも 1 人の前児がいる、本明細書では経産回数 0 超 (> 0)、経産回数 1 以上 (≥ 1) と互換的にいわれる)、初妊婦 (初回妊娠) または経妊婦 (2 回以上の妊娠) を含む 1 つまたは複数のクラスに属することができる。

【0014】

50

いくつかの態様において、妊娠中のヒト対象は無症候性である。いくつかの態様において、対象は癒着胎盤のリスク因子を有し得る。最も一般的なリスク因子は、以前の帝王切開分娩であり、癒着胎盤スペクトラムの発生率は、前の帝王切開分娩の数とともに増加する。系統的レビューでは、癒着胎盤スペクトラム率は、以前の帝王切開分娩が1回の女性の0.3%から、5回またはそれ以上の帝王切開分娩の女性では6.74%に増加した。追加のリスク因子には、母体の高齢、経産、前の子宮手術または掻爬、およびアッシャーマン症候群が含まれる。前置胎盤も別の重大なリスク因子である。

【0015】

III. サンプル調製

本開示の方法で使用するためのサンプルは、妊娠対象から得られた生物学的サンプルである。ある種の態様において、サンプルは、前のセクションにおいて記述した妊娠の段階中に収集される。いくつかの態様において、サンプルは、血液、唾液、涙、汗、鼻汁、尿、羊水または頸腔液サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは血液サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは血漿サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは血清サンプルである。いくつかの態様において、サンプルは異なるマトリックス(例えば、クエン酸緩衝液、またはStreckチューブ)中の血液製剤である。いくつかの態様において、サンプルは凍結貯蔵されている(例えば、-20℃または-80℃)。

【0016】

「微粒子」という用語は、約50～約5000 nmの流体力学的直径を有する細胞外微小小胞または脂質ラフトタンパク質凝集体をいう。したがって、微粒子という用語は、エクソソーム(約50～約100 nm)、微小小胞(約100～約300 nm)、エクソソーム(約50～約1000 nm)、アポトーシス小体(約50～約5000 nm)および同じ寸法の脂質-タンパク質凝集体を包含する。

【0017】

「微粒子関連タンパク質」という用語は、哺乳動物(例えば、ヒト)対象からの微粒子濃縮サンプル中で検出可能なタンパク質またはその断片をいう。したがって、「微粒子関連タンパク質」という用語は、検出時に微粒子と物理的に結合しているタンパク質またはその断片に限定されない。「微粒子関連ペプチド」という用語は、そのようなサンプル中で検出可能なタンパク質断片をいう。

【0018】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の重合体をいう。これにはオリゴペプチド(典型的には10個未満のアミノ酸を有する)、ペプチド(典型的には約10個から約50個のアミノ酸を有する)、およびタンパク質(二次構造、三次構造、または四次構造をとるポリペプチドを含む)が含まれる。文脈に応じて、「タンパク質」という用語は、二次構造を欠くポリペプチドをいうことがある。

【0019】

癒着胎盤のバイオマーカーは、微粒子に由来することができる。微粒子は、サイズ排除クロマトグラフィーによって血液(例えば、血清もしくは血漿)またはその他の生物学的サンプルから単離することができる。移動相/溶出緩衝液は、例えば、PBSなどの緩衝溶液、または非緩衝溶液であることができる。移動相としての水は、非緩衝水、例えば蒸留水、脱イオン水、または蒸留脱イオン水(「ddH₂O」)をいう。高分子量画分を回収して、微粒子濃縮サンプルを得ることができる。次に、微粒子濃縮サンプル内のタンパク質をトリプシンなどのタンパク質分解酵素で消化する前に抽出し、複数のペプチドを含む消化サンプルを得る。次いで、消化されたサンプルは、例えば液体クロマトグラフィーおよび質量分析によって、サンプルのプロテオミクスプロファイルを得るための分析の前に、ペプチド精製、濃縮および/または分画段階に供される。いくつかの態様において、精製/濃縮段階は、逆相クロマトグラフィー(例えば、Millipore Corporation, Billerica, MAからの0.2 μL C18樹脂付きZipTip(登録商標)ピペットチップ)または限外ろ過を含む。いくつかの態様において、分画段階は、移動相Aが20 mMギ酸酢酸(Formic Acetate), pH 9.3を含むDI H₂Oであり; 移動相Bが20 mMギ酸酢酸, pH 9.3を含むアセト

10

20

30

40

50

ニトリル(Optima(商標), LC/MS等級, Fisher Chemical(商標))である高pH逆相オフラインHPLC分画器を用いて96画分に分画することを伴い得る。

【0020】

いくつかの態様において、例えば、質量分析によるタンパク質の検出、サンプル調製の方法は、サンプル中のタンパク質を断片化することを含み得る。断片化は、トリプシンなどのプロテアーゼを用いて行うことができる。トリプシン断片は、その固有の質量を親タンパク質と関連付けることができるため、代替バイオマーカーとして有用に機能し得る。

【0021】

ある種の態様において、微粒子は胎盤由来エクソソームまたは内皮由来エクソソームである。そのようなエクソソームは、これらの由来細胞の表面マーカーに対する、抗体などの、捕捉剤を用いて単離することができる。例えば、胎盤由来エクソソームは、PLAP (胎盤アルカリホスファターゼ)、Klotho、CD34、CD44または白血病抑制因子(LIF)に対する抗体を用いて単離することができる。内皮由来エクソソームは、ICAMまたはVCAMに対する抗体を用いて単離することができる。

【0022】

IV. 検出方法

バイオマーカーは、当技術分野において公知の任意の方法によって検出および定量化することができる。これには、非限定的に、免疫アッセイ、クロマトグラフィー、質量分析、電気泳動および表面プラズモン共鳴が含まれる。

【0023】

バイオマーカーの検出には、無傷のタンパク質の検出、または断片などのタンパク質の代替物の検出が含まれる。例示的な断片を図10Aから図15Bに示す。

【0024】

免疫アッセイ法は、例えば、放射免疫アッセイ、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、サンドイッチアッセイおよびウエスタンブロット、免疫沈降、免疫組織化学、免疫蛍光、抗体マイクロアレイ、ドットブロッキング、ならびにFACSを含む。

【0025】

クロマトグラフィー法は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー/ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および例えばHPLCを含めて逆相クロマトグラフィーを含む。

【0026】

1. 質量分析

いくつかの態様において、微粒子関連タンパク質のレベルの検出(例えば、存在の検出を含む)は、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)ベースのプロテオミクス分析を用いて行われる。例示的な態様において、本方法は、サンプルをサイズ排除クロマトグラフィーに供し、高分子量画分を(例えば、サイズ排除クロマトグラフィーにより)回収して微粒子濃縮サンプルを得ることを伴う。いくつかの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーは、アガロース固相および水性液相を含んだサイズ排除カラムを含む。次いで、微粒子濃縮サンプルを(例えば、カオトロピック剤、変性剤、還元剤および/またはアルキル化剤を用いて)破壊し、放出された内容物をタンパク質分解に供する。次いで、複数のペプチドを含有する破壊されたマイクロソーム調製物を、質量分析によるペプチド分析の前に、本明細書において記述されるタンデムカラムシステムを用いて処理し、サンプルのプロテオミクスプロファイルを提供する。本明細書において開示される方法は、以前の方法に関連したタンパク質濃縮/精製、緩衝液交換および液体クロマトグラフィー段階の必要性を回避する。

【0027】

サンプル中のタンパク質は質量分析によって検出することができる。質量分析計は、典型的には、分析物をイオン化するイオン源、および質量を決定するための1つまたは複数の質量分析計を含む。質量分析計はタンデム質量分析計と一緒に使用することもできる。

イオン化法には、特にエレクトロスプレー法またはレーザー脱離法が含まれる。質量分析計には、四重極、イオントラップ、飛行時間型装置、および磁気または電気セクター装置が含まれる。ある種の態様において、質量分析計は、ある質量のイオンを選択するための第1の質量分析計および選択されたイオンを分析するための第2の質量分析計を使用するタンデム質量分析計(例えば「MS-MS」)である。タンデム質量分析計の一例はトリプル四重極装置であり、第1および第3の四重極は質量フィルタとして機能し、中間の四重極は衝突セルとして機能する。質量分析はまた、液体クロマトグラフィーまたはガスクロマトグラフィーなどの上流の分離技法と組み合わせることもできる。そのため、例えば、液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析を組み合わせたものは「LC-MS-MS」ということができる。

10

【0028】

本明細書において記述される分析に有用な質量分析計は、非限定的に、ThermoFisher ScientificのAltis(商標)四重極、Quantis(商標)四重極、Quantiva(商標)またはFortis(商標)トリプル四重極、Shimadzuの8050または8060トリプル四重極、WatersのXevo TQ-XS(商標)トリプル四重極、Perkin ElmerのQSight(商標) Triple Quad LC/MS/MS、Thermo Fisher ScientificのNanospray Flex(商標)イオン源(Ion Source)を備えたThermo Orbitrap Mass Spectrometer Tribrid Eclipseなどを含む。

【0029】

一般に、(例えば、タンデム質量分析、MS/MSにおいて;またはポストソース分解、TOF MSにおいて)ペプチドの質量に関する、また好ましくは、選択されたペプチドの断片化および/または(部分的)アミノ酸配列に関する正確な情報を提供できる任意の質量分析(MS)技法を、本明細書において開示される方法および組成物において用いることができる。いくつかの態様において、任意のMS技法は、ペプチドの質量に関するプロセス情報を提供することができ、この質量は100超、1000超、10,000超、100,000超の生物学的サンプル由来ペプチドを含む。適当なペプチドMSおよびMS/MS技法およびシステムは、当技術分野において公知であり(例えば、Chapman, ed., Humana Press 2000によるMethods in Molecular Biology, vol. 146: 「Mass Spectrometry of Proteins and Peptides」; Kassel & Biemann (1990) Anal. Chem. 62:1691-1695; Methods Enzymol 193: 455-79; またはBurlingame, ed., Academic Press 2005によるMethods in Enzymology, vol. 402: 「Biological Mass Spectrometry」を参照のこと)、本明細書において開示される方法を実践する際に用いることができる。したがって、いくつかの態様において、開示される方法は、1つまたは複数のペプチドを測定するために定量的MSを行う段階を含む。そのような定量的方法は、自動化形式(Villanueva, et al., Nature Protocols (2006) 1(2):880-891)または半自動化形式で行うことができる。特定の態様において、MSは、液体クロマトグラフィー装置(LC-MS/MSもしくはLC-MS)またはガスクロマトグラフィー装置(GC-MSもしくはGC-MS/MS)に機能的に連結することができる。

20

30

【0030】

選択反応モニタリングは、第1の質量分析計で関心対象のタンパク質(前駆体)を選択し、衝突セルでタンパク質を産物断片に断片化し、第2の質量分析計で1つまたは複数の断片を検出する質量分析法である。前駆体と生成イオンのペアはSRM「遷移」と呼ばれる。この方法は通常トリプル四重極装置で行われる。タンパク質の複数の断片が分析される場合、この方法はMultiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry (「MRM-MS」)といわれる。

40

【0031】

通常、タンパク質サンプルはトリプシンなどのタンパク質分解酵素で消化されて、ペプチド断片を産生する。これらのペプチドの一部の重同位体標識類似体は標準物質として合成される。これらの標準物質は安定同位体標準物質または「SIS」といわれる。SISペプチドをプロテアーゼ処理したサンプルと混合する。この混合物をトリプル四重極質量分析

50

に供する。SIS標準物質と標的ペプチドの娘イオンに対応するペプチドは、時間領域または質量領域のいずれかで高精度に検出される。通常、親イオンの存在を明確に同定するために複数の娘イオンが使用され、定量化には娘イオンのうちの1つ、通常は最も豊富なものが使用される。SISペプチドは注文に応じて合成することもでき、例えば、Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)またはBiognosys AG(Zurich, Switzerland)などの、供給業者から市販のキットとして入手することもできる。

【0032】

本明細書において用いられる場合、「多重反応モニタリング(MRM)」または「選択反応モニタリング(SRM)」という用語は、存在量が少ない分析物の定量化に特に有用なMSベースの定量化方法をいう。SRM実験では、事前定義された前駆イオンとその断片の1つまたは複数がトリプル四重極装置の2つの質量フィルタにより選択され、正確な定量化のために経時的にモニターされる。複数のSRM前駆イオンと断片イオンのペアは、異なる前駆体/断片のペアを素早く切り替えてMRM実験を行うことにより、クロマトグラフィーの時間スケールで同じ実験内で測定することができる。一連の遷移(前駆体/断片イオンペア)と標的分析物(例えば、ペプチドまたは小分子、例えば化学的実体、ステロイド、ホルモン)の保持時間との組み合わせにより、決定的なアッセイを構成することができる。1回のLC-MS実験中に多数の分析物を定量化することができる。MRMまたはSRMに関して「スケジュールされた」または「動的」という用語は、特定の分析物の遷移が予想される保持時間前後の時間枠でのみ取得されるアッセイの変形をいい、保持時間は分析物の物理的性質に依存する特性であるため、1回のLC-MS実験で検出および定量化できる分析物の数を大幅に増やし、試験の選択性に寄与する。単一の分析物を2つ以上の遷移でモニターすることもできる。最後に、アッセイには、関心対象の分析物に対応する標準物質(例えば、分析物ペプチドのものと同一アミノ酸配列を有するペプチド)を含めることができるが、安定同位体が含まれることによって異なる。安定同位体標準物質(SIS)を正確なレベルでアッセイに組み込み、対応する未知分析物を定量化するのに用いることができる。さらなるレベルの特異度は、未知の分析物とそれに対応するSISの共溶出により、およびそれらの遷移の特性(例えば、分析物の2つの遷移のレベルの比率と、それに対応するSISの2つの遷移の比率の類似性)により寄与される。

【0033】

したがって、MRM-MSによるタンパク質標的の検出は、典型的にはペプチド断片と比較される安定同位体標準物質ペプチドの検出による、タンパク質の1つまたは複数のペプチド断片の検出を伴う。典型的には、SIS自体は、元の消化された断片として衝突セル内で断片化され、これらの断片の1つまたは複数が質量分析計によって検出される。

【0034】

バイオマーカーペプチド分析に適した質量分析アッセイ、装置およびシステムは、非限定的に、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF) MS; MALDI-TOFポストソース分解(PSD); MALDI-TOF/TOF; 表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF) MS; エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS) n (n はゼロより大きい整数である); ESI 3Dまたはリニア(2D)イオントラップMS; ESIトリプル四重極MS; ESI四重極直交TOF(Q-TOF); ESIフーリエ変換MSシステム; シリコン上の脱離/イオン化(DIOS); 二次イオン質量分析(SIMS); 大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS) n ; イオン移動度分光分析(IMS); 誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS); APPI-MS/MS; およびAPPI-(MS) n を含むことができる。タンデムMS(MS/MS)配置におけるペプチドイオンの断片化は、例えば衝突誘起解離(CID)などの、当技術分野において公知の技法を用いて達成することができる。本明細書において記述されるように、質量分析によるバイオマーカーの検出および定量化は、特にKuhn et al. (2004) Proteomics 4:1175-1186によって記述されるような、多重反応モニタリング(MRM)を伴うことができる。LC-MS/MS分析中のスケジュールされた多重反応モニタリング(スケジュールされたMRM)モード取得によりペプチド定量化の感度および精度が増

強される。Anderson and Hunter (2006) Mol. Cell. Proteomics 5(4):573-588。質量分析ベースのアッセイは、例えば、本明細書において記述されるタンデムカラムシステムなどの、上流のペプチドまたはタンパク質の分離または分画の方法と有利に組み合わせることができる。

【0035】

バイオマーカーの発見に有用な、別の態様において、分画したサンプルをナノフローHPLC (例えば、Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific)、続いてThermo Orbitrap質量分析計(Tribrid Eclipse)により分析する。イオン源は、ペプチド分離用のナノカラム(PicoFrit, 100 μm $\times$ 250 mm $\times$ 15 μm tip, New Objective)を加熱するためのカラムオープン(PRSO-V2, Sonation)を装えたNanospray Flex(商標)イオン源(Thermo Fisher Scientific)であることができる。ペプチドはトラップカラムに取り込まれることができ、その後に移動相によって分離ナノカラムに送られる。

10

【0036】

V. バイオマーカー

本明細書において用いられる場合、「バイオマーカー」という用語は生体分子をいい、その存在、形態または量が2つの状態の間で統計的に有意な差を示す。したがって、バイオマーカーは、単独でまたは組み合わせで、対象を複数のグループのうちの1つに分類するのに有用である。バイオマーカーは、天然に存在するものであっても、または天然に存在しないものであってもよい。例えば、バイオマーカーは、天然に存在するタンパク質または天然に存在しないタンパク質断片であってもよい。タンパク質の断片は、そのタンパク質の代理ペプチドもしくは代替ペプチドとして、または独立型のバイオマーカーとして機能することができる。

20

【0037】

本明細書において提供されるのは、実質的に純粋な形態の1つまたは複数の癒着胎盤バイオマーカーを含む物質の組成物である。バイオマーカーは、容器中で混合することができ、または、例えば、異なるアドレス指定可能な位置で固体支持体に付着させることにより、物理的に分離することができる。本明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの化学的実体は、それが組成物中のその種類の主要な化学的実体である場合、「実質的に純粋」である。これには、組成物中のその種類の化学的実体の50%超、80%超、90%超または95%超に相当する化学的実体が含まれる。化学的実体が組成物中のその種類の化学的実体の98%超、99%超、99.5%超、99.9%超、または99.99%超に相当する場合、その化学的実体は「本質的に純粋」である。本質的に純粋な化学的実体は、実質的に純粋でもある。

30

【0038】

1. タンパク質バイオマーカー

本明細書において提供されるのは、癒着胎盤のリスク増加に関連する1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーである。妊娠第二期における癒着胎盤を推定するための例示的バイオマーカーを、表1 (24週 $\pm$ 2週)、表3 (24週 $\pm$ 2週)および表5 (24週 $\pm$ 2週)に示す。妊娠第三期における癒着胎盤を推定するためのバイオマーカーを、表2 (35週 $\pm$ 2週)、表4 (35週 $\pm$ 2週)および表6 (35週 $\pm$ 2週)に示す。これらの表のバイオマーカーについて収集されたデータは、妊娠24週 $\pm$ 2週または妊娠35週 $\pm$ 2週の妊娠対象のものであるが、バイオマーカーは、この範囲外の妊娠年齢での評価に関連する可能性がある。以下で論じられるように、表7および表8は、それぞれ、約24週前後および約35週前後の癒着胎盤を推定するためのバイオマーカーのパネルを提示する。いくつかの態様において、癒着胎盤のリスク増加に関連する1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーは、複数のタンパク質バイオマーカーを含む。

40

【0039】

図面中の表は、UniProtエントリ番号およびエントリ名、タンパク質名、遺伝子名、生物(全てホモサピエンス(homo sapiens))、一次遺伝子名および遺伝子同義名を提供する。図1A~1D、図2A~2C、図3A~3K、図4A~4J、図5A~5C、図6A~6F、およ

50

び図10A～10C、図11A～11C、図12A～12H、図13A～13H、図14A～14D、図15A～15Bの表1、2、3、4、5、6、7および8の内容は、それらのタンパク質名、遺伝子名(一次および同義)および/またはペプチド配列を含めて、それらが本明細書において提供されたかのように、その全体が本明細書の詳細な説明に組み入れられる。詳細な説明に含める目的で、表9は、癒着胎盤の予測に有用な、本開示の例示的なバイオマーカーを提供する(タンパク質名および同義語が提供される)。

【0040】
(表9) 例示的なバイオマーカー

イスミン-2
スルフヒドリルオキシダーゼ1
熱ショック同族71 kDAタンパク質
ヒストンH4
補体成分C6
B細胞受容体重鎖可変領域
MS-C1重鎖可変領域
ヘモグロビンサブユニットガンマ-2
フィブリノゲン様タンパク質1

10

20

30

40

50

軟骨酸性タンパク質1	
ITIH4タンパク質、インター-アルファ-トリプシン阻害因子重鎖H4	
ヘモグロビンサブユニットガンマ-1 (ガンマ-1-グロビン) (Hb F Aガンマ) (ヘモグロビンガンマ-1鎖) (ヘモグロビンガンマ-A鎖)	
特徴付けられていないタンパク質DKFZp686A0568	
セルロブラスミン、フェロキシダーゼ	
妊娠特異的ベータ-1-糖タンパク質4、PS-ベータ-G-4、PSBG-4、 妊娠特異的糖タンパク質4 (妊娠特異的ベータ-1糖タンパク質9、PS-ベータ-G-9、PSBG-9、 妊娠特異的糖タンパク質9)	
C3/CSコンバターゼ、補体因子B、補体因子B Ba断片、 補体因子B Bb断片	10
Ig重鎖可変領域	
免疫グロブリン重鎖可変 3-20	
ミオシン反応性免疫グロブリンカップ鎖可変領域	
コフィリン-1 (18 kDaリン酸化タンパク質、p18) (コフィリン、非筋肉アイソフォーム) ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1、EC 3.4.19.12 (脱ユビキチン化酵素1、 hUBP) ユビキチンチオエステラーゼ1) (ユビキチン特異的プロセッシングプロテアーゼ1) イスミン-2 (トロンボスポンジンおよびAMOPドメイン含有イスミン様タンパク質1) (トロンボスポンジン1型ドメイン含有タンパク質3)	
テネイシンC (ヘキサブラキオン)、アイソフォームCRA_a	
Ig様ドメイン含有タンパク質	20
免疫グロブリンラムダ可変 8-61	
免疫グロブリンラムダ可変 可変10-54	
免疫グロブリンラムダ可変 7-46	
免疫グロブリンラムダ可変 2-18	
免疫グロブリンラムダ可変 3-9	
免疫グロブリン重鎖可変 可変3-64	
免疫グロブリン重鎖可変 4-4	
免疫グロブリンカップ可変 2D-29	
免疫グロブリンカップ可変 1D-8	
免疫グロブリンカップ可変 3D-11	
免疫グロブリン重鎖可変 1-45	
免疫グロブリンカップ可変 6D-21	30
免疫グロブリン重鎖可変 6-1	
免疫グロブリン重鎖可変 2-26	
免疫グロブリン重鎖可変 3-73	
免疫グロブリン重鎖可変 3-74	
イスミン-2 (トロンボスポンジンおよびAMOPドメイン含有イスミン様タンパク質1) (トロンボスポンジン1型ドメイン含有タンパク質3)	
亜鉛フィンガータンパク質655 (Vav相互作用クルッペル様タンパク質)	
スルフヒドリルオキシダーゼ1 hQSOX、EC 1.8.3.2 (クイエシンQ6)	
リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体1、 LYVE-1 (細胞表面保持配列結合タンパク質1、CRSBP-1) (細胞外リンクドメイン含有タンパク質1) (ヒアルロン酸受容体)	40

熱ショック同族71 kDaタンパク質、EC 3.6.4.10 (熱ショック70 kDaタンパク質8) (リポ多糖関連タンパク質1、LAP-1、LPS関連タンパク質1)	
骨髄プロテオグリカン、BMPG (プロテオグリカン2) [以下に切断: 好酸性顆粒主要塩基性タンパク質、EMBP、MBP (妊娠関連主要塩基性タンパク質)]	
セルロブラスミン、フェロキシダーゼ	
アミロライド感受性アミノキシダーゼ [銅含有]、DAO、ジアミノキシダーゼ、 EC 1.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質1) (アミノキシダーゼ銅ドメイン含有 タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノキシダーゼ、KAO)	
ヒストンH4	
C3/CSコンバターゼ、補体因子B、補体因子B Ba断片、補体因子B Bb断片	10
ルミカン(ケラタン硫酸プロテオグリカンルミカン、KSPGルミカン)	
カドヘリン-5 (7B4抗原) (血管内皮カドヘリン、VE-カドヘリン) {CD抗原CD144}	
B細胞受容体重鎖可変領域	
特徴付けられていないタンパク質 DKFZp686A0568	
染色体構造維持タンパク質4 SMCタンパク質4、 SMC 4 (染色体関連ポリペプチドC、hCAP-C) (XCAP-C相同体)	
アルファ-2-マクログロブリン、アルファ-2-M (C3およびPZP様アルファ-2-マクログロブリンドメイン含有タンパク質5)	
フルクトース二リン酸アルドラーゼA、EC 4.1.2.13 (肺がん抗原NY-LU-1) (筋肉型アルドラーゼ)	20
アフミン、アルファ-アルブミン アルファ-A1b	
血清パラオキシナーゼ/アリールエステラーゼ1、PON 1、EC 3.1.1.2、EC 3.1.1.81、EC 3.1.8.1 (芳香族エステラーゼ1、A-エステラーゼ1) (K-45) (血清アリールジアルキルホスファターゼ1)	
伸長因子1-アルファ1、EF-1-アルファ-1 (伸長因子Tu、EF-Tu) (真核生物伸長因子1 A-1、 eEF1A-1) (白血球受容体クラスタメンバー7)	
血漿セリンプロテアーゼ阻害因子、先体セリンプロテアーゼ阻害因子 プラスミノゲン活性化因子阻害因子3 短縮名: PA1-3 短縮名: PA13プロテインC阻害因子 短縮名: PCIセルピン(Serpin) AS	
補体成分C6	
補体受容体2型、Cr2 (補体C3d受容体) (エプスタイン・バーウイルス受容体、 EBV受容体) (CD抗原CD21)	
アルファ-マンノシダーゼ2、EC 3.2.1.114 (ゴルジアルファマンノシダーゼII、 AMan II、Man II) (マンノシダーゼアルファクラス2Aメンバー1) (マンノシル-オリゴ糖1, 3-1, 6-アルファマンノシダーゼ)	30
アンジオテンシン1-10	
ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (ガンマ-2-グロビン) (Hb F Gガンマ) (ヘモグロビンガンマ-2鎖) (ヘモグロビンガンマ-G鎖)	
アルファ-1B糖タンパク質(アルファ-1-B糖タンパク質)	
cDNA FU51742、インター-アルファ-トリプシン阻害因子重鎖H4に非常に類似	
特徴付けられていないタンパク質	
ホスホグリセリン酸キナーゼ1、EC 2.7.2.3 (細胞遊走誘導遺伝子10タンパク質) (プライマー認識タンパク質2、PRP 2)	
ミオシン反応性免疫グロブリン重鎖可変領域	
C3/CSコンバターゼ	40

内皮プロテインC受容体、活性化プロテインC受容体、APC受容体内皮細胞プロテインC受容体、CD抗原：CD201	
MS-C1重鎖可変領域	
インター-アルファ(グロブリン)阻害因子H4 (血漿カリクレイン-感受性糖タンパク質)	
テネイシン-X、ヘキサブラキオン様タンパク質	
ネオゲニン(免疫グロブリンスーパーファミリーDCCサブクラスメンバー2)	
Ge-グロブリン、グループ特異的成分ビタミンD結合タンパク質	
基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質パールカン	
セルピン全て	
cDNA FLJ26301 fis、クローンDMC07540	10
60 kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリア、EC 5.6.1.7 (60 kDaシャペロニン)(シャペロニン60、CPN60) (熱ショックタンパク質60、HSP-60、Hsp60 (HuCHA60) (ミトコンドリアマトリックスタンパク質P1) (P60リンパ球タンパク質)	
特徴付けられていないタンパク質DKFZp686115196	
Ig重鎖可変領域	
EGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質1 (細胞外タンパク質S1-5) (フィブリン様タンパク質) (フィブリン-3、FIBL-3)	
推定上の脂肪酸結合タンパク質5様タンパク質3 (脂肪酸結合タンパク質5偽遺伝子3)	
ヒストンH2Bタイプ1-K、H2B K (HIRA-相互作用タンパク質1)	20
インスリン様成長因子結合タンパク質3、IBP-3、IGF-結合タンパク質3、IGFBP-3	
フィブリン-1, FIBL-1	
ICOSリガンド、87相同体2、B7-H2、87様タンパク質GIS0、87関連タンパク質1、B7RP-1 CD 抗原：CD275	
ネオゲニン(免疫グロブリンスーパーファミリーDCCサブクラスメンバー2)	
IgG L鎖	
Ig様ドメイン含有タンパク質	
スルフヒドリルオキシダーゼ1、hQSOX EC 1.8.3.2 (クイエシンQ6)	
イスミン-2 (トロンボスポンジンおよびAMOPドメイン含有イスミン様タンパク質1) (トロンボスポンジンI型ドメイン含有タンパク質3)	
クリオクリスタルグロブリンCC 1カップ軽鎖可変領域	30
ヘパリン補因子2 (ヘパリン補因子II、HC-11) (プロテアーゼ阻害因子ロイセルピン-2、HLS2) (セルピンD1)	
おそらく非機能的な免疫グロブリンカップ可変1-37	
テネイシンC (ヘキサブラキオン)、アイソフォームCRA a アイソフォームCRA a	
cDNA ; FLJ92374 ; ホモサピエンス (Homo sapiens) C型レクチンドメインファミリー3、メンバーB (CLEC3B)、mRNAに非常に類似	
ユビキチンカルボキシル-末端ヒドロラーゼ1、EC 3.4.19.12 (脱ユビキチン化酵素1、hUBP) (ユビキチンチオエステラーゼ1) (ユビキチン特異的プロセッシングプロテアーゼ1)	
亜鉛フィンガータンパク質655 (Vav相互作用クルッペル様タンパク質)	
ミオシン反応性免疫グロブリン重鎖可変領域	
アルブミン、アルブミン、アイソフォームCRA k	40

10

20

30

40

50

プロ低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1、LRP-1 (アルファ-2-マクログロブリン受容体、A2MR) (アポリポタンパク質E受容体、APOER) (CD抗原CD91) [以下に切断: 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 85 kDa サブユニット、LRP-85; 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 515 kDa サブユニット、LRP-515; 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1細胞内 ドメイン、LRPICD]	
Ig重鎖可変領域	
フィコリン-2 (37 kDaエラスチン結合タンパク質) (コラーゲン/フィブリノゲンドメイン含有タンパク質 2) (EBP-37) (フィコリン-B) (フィコリン-ベータ) (ヒューコリン) (L-フィコリン) (血清レクチンp35)	
ヘモグロビンサブユニットシーター-1 (ヘモグロビンシーター-I鎖) (シーター-1-グロビン)	10
アポリポタンパク質A-II、アポ-A11、アポA-11 (アポリポタンパク質A2) [以下に切断: プロアポリポタンパク質A-II、プロアポA-11; 切断型アポリポタンパク質A-II (アポリポタンパク質A-11 (1-76))]	
プレキシンドメイン含有タンパク質2 (腫瘍内皮マーカー7-関連タンパク質)	
V4-4タンパク質	
Ig重鎖可変領域	
アルファ-2-HS-糖タンパク質、アルファ-2-Z-グロブリンBa-アルファ-2-糖タンパク質フェチュイン-A	
免疫グロブリンイプシロン重鎖、免疫グロブリンイプシロン重鎖ND	
アミロライド感受性アミノキシダーゼ[銅含有]、DAO、ジアミノキシダーゼ、 EC1.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質1) (アミノキシダーゼ銅ドメイン含有 タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノキシダーゼ、KAO)	20
Out at firstタンパク質相同体、HCV NS5Aトランス活性化タンパク質13標的タンパク質2	
ケラチン、I型細胞骨格17 (39.1) (サイトケラチン-17、CK-17) (ケラチン-I7、K17)	
免疫グロブリンラムダ可変10-54	
MS-C2軽鎖可変領域、MS-C4軽鎖可変領域1mp	
熱ショック70 kDaタンパク質IA (熱ショック70 kDaタンパク質1、HSP70-1、HSP70.1)	
基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質パールカン	
補体亜成分C1r	
細胞外スーパーオキシドジスムターゼ[Cu-Zn]	
MS-C1重鎖可変領域	
アルファグロビン鎖	
アルファ-2-マクログロブリン、アルファ-2-M (C3およびPZP様アルファ-2-マクログロブリンドメイン含有タンパク質5)	30
ラクトトランスフェリン、ラクトフェリン、成長阻害タンパク質12、タララクトフェリン	
アポリポタンパク質(a)、Apo(a)、Lp(a)	
アンジオテンシノゲン、セルピンA8	
ミオシン軽鎖ポリペプチド6 (17 kDaミオシン軽鎖、LC1 7) (ミオシン軽鎖3、MLC-3) (ミオシン軽鎖アルカリ3、ミオシン軽鎖A3) (平滑筋および非筋肉ミオシン軽鎖アルカリ6)	
E3 SUMOタンパク質リガーゼZBED1、EC2.3.2.- (DNA複製関連要素結合因子) (推定上のAc様転位因子) (亜鉛フィンガーBEDドメイン含有タンパク質1) (dREF相同体)	
免疫グロブリンカッパ可変2D-29	
ミオシン反応性免疫グロブリン軽鎖可変領域	40

小胞体シャペロンBiP、熱ショックタンパク質70ファミリータンパク質5、HSP70ファミリータンパク質5。78 kDaグルコース調節タンパク質、GRP-78、結合免疫グロブリンタンパク質、BiP	
セルロプラスミン	
パンテテイナーゼ、EC 3. 5. 1. 92 (パンテテインヒドロラーゼ) (Tiff66) (血管非炎症性分子1、パニン-1)	
免疫グロブリンカッパ可変5-2 (Igカッパ鎖V領域EV15)	
ラウンドアバウト相同体4 (マジックラウンドアバウト)	
リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体1、LYVE-1 (細胞表面保持配列結合タンパク質1、CRSBP-1) (細胞外リンクドメイン含有タンパク質1) (ヒアルロン酸受容体)	10
L-セレクトリン(CD62抗原様ファミリーメンバーL) (白血球接着分子1、LAM-1) (白血球表面抗原Leu-8) (白血球-内皮細胞接着分子1、LECAM 1) (リンパ節ホーミング受容体) (TQ 1) (gp90-MEL) (CD抗原CD62L)	
アクチン関連タンパク質2/3複合体サブユニット5 (Arp2/3複合体16 kDaサブユニット、p16-ARC)	
アネキシンA2 (アネキシンII) (アネキシン-2 ((カルパクチンI重鎖) (カルパクチン-1重鎖) (クロモビンジン-8) (リポコルチンII) (胎盤抗凝固タンパク質IV、PAP-IV) (タンパク質I) (p36)	
ミオシン-6 (ミオシン重鎖6) (ミオシン重鎖、心筋アルファアイソフォーム、MyHC-アルファ)	
ビンキュリン(メタビンキュリン、MV)	
補体受容体2型、Cr2 (補体C3d受容体) (エプスタイン・バーウイルス受容体、EBV受容体) (CD抗原CD21)	20
亜鉛フィンガータンパク質655 (Vav相互作用クルッペル様タンパク質)	
セルロプラスミン	
補体受容体2型、Cr2 (補体C3d受容体) (エプスタイン・バーウイルス受容体、EBV受容体) (CD抗原CD21)	
アクチン関連タンパク質2/3複合体サブユニット5 (Arp2/3複合体 16 kDaサブユニット、p16-ARC)	
ビンキュリン(メタビンキュリン、MV)	
セルロプラスミン	
アネキシンA2 (アネキシンII) (アネキシン-2 ((カルパクチンI重鎖) (カルパクチン-1重鎖) (クロモビンジン-8) (リポコルチンII) (胎盤抗凝固タンパク質IV、PAP-IV) (タンパク質I) (p36)	30
免疫グロブリンラムダ可変10-54	
ミエロペルオキシダーゼ	
アミロライド感受性アミノキシダーゼ[銅含有]、DAO、ジアミノキシダーゼ、EC1.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質1) (アミノキシダーゼ銅ドメイン含有タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノキシダーゼ、KAO)	
インスリン様成長因子結合タンパク質5、IBP-5、IGF結合タンパク質5、IGFBP-5	
ミオシン調節軽鎖ポリペプチド9 (20 kDaミオシン軽鎖、LC20) (MLC-2C) (ミオシンRLC) (ミオシン調節軽鎖2、平滑筋アイソフォーム) (ミオシン調節軽鎖9) (ミオシン調節軽鎖MRLC1)	
チューブリンベータ-1鎖	
ベーターパルビン、アフィキシン	40

ブリッジングインテグレーター2 (乳がん関連タンパク質1)
MHCクラスI抗原
精巣上体分泌精子結合タンパク質
V4-3 タンパク質
補体成分8サブユニットベータ、補体成分c8ベータ鎖
V5-4 タンパク質
チューブリンベータ-1鎖
免疫グロブリンラムダ可変10-54
精巣上体分泌精子結合タンパク質
ミエロペルオキシダーゼ
インスリン様成長因子結合タンパク質5、IBP-5、IGF結合タンパク質5、IGFBP-5
アミロライド感受性アミノキシダーゼ[銅含有]、DAO、ジアミノキシダーゼ、EC1.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質1) (アミノキシダーゼ銅ドメイン含有タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノキシダーゼ、KAO)
補体成分8サブユニットベータ、補体成分c8ベータ鎖
MHCクラスI抗原
ベーターパルビン、アフィキシン
V5-4 タンパク質
V4-3 タンパク質
ミオシン調節軽鎖ポリペプチド9 (20 kDaミオシン軽鎖、LC20) (MLC-2C) (ミオシンRLC) (ミオシン調節軽鎖2、平滑筋アイソフォーム) (ミオシン調節軽鎖9) (ミオシン調節軽鎖MRLC1)
ブリッジングインテグレーター2 (乳がん関連タンパク質1)

10

20

30

40

50

【0041】

各バイオマーカーには、代替マーカーとして機能するタンパク質からの1つまたは複数のペプチド断片も提供される。代替マーカーは、本明細書において記述されるモデルの目的でタンパク質の尺度として用いることができる。したがって、いくつかの態様において、タンパク質バイオマーカーの1つまたは複数のペプチド断片の検出は、タンパク質バイオマーカーを検出するのに役立つ。バイオマーカーの代用物として有用なペプチドを図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bに示す。

【0042】

バイオマーカーは、妊娠女性から採取したサンプル(例えば、血液)から単離された微粒子からのタンパク質の新規配列決定を用いて検出することができる。タンパク質は、質量分析、例えば、シングルまたはダブル(MS/MS)質量分析によって配列決定することができる。親タンパク質(表1~6および表9; または表7および8のパネルにおいて提供されるものなどの)も親タンパク質のペプチド断片(図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bにおいて上述されるものなどの)もともに、癒着胎盤のバイオマーカーとして有用である。したがって、いくつかの態様において、命名されたタンパク質バイオマーカーの検出は、代用物、例えば、タンパク質の1つまたは複数の断片による検出を包含する。

【0043】

質量分析によって検出されたタンパク質、例えばペプチドは、対照と比較して上方制御されている(量が増加している)ものまたは下方制御されている(量が減少している)ものを同定するために分析される。統計的に有意な示差発現を示すタンパク質は、親タンパク質を同定するためにさらに分析される。そのようなタンパク質は、SwissProtなどのタンパク質データベースにおいて同定することができる。

【0044】

ある種の態様において、バイオマーカーは、ペプチドバイオマーカーがペプチドの安定同位体標準物質とペアになっている組成物中にある。いくつかの態様において、組成物は、ペプチドバイオマーカーおよびペプチドの安定同位体標準物質の1つのペア、または各対がペプチドバイオマーカーおよびペプチドの安定同位体標準物質を含む複数のペアを含み得る。ペプチドバイオマーカーは、本明細書においてさらに詳細に記述されるように、代替バイオマーカーを含み得る。そのような組成物は、多重反応モニタリング質量分析における検出に有用である。

【0045】

質量分析の目的では、タンパク質はそのまま検出することも、または断片化、例えばLCMSを通じてもしくは多重反応モニタリング(MRM)において検出することもできる。そのような場合、タンパク質は分析前にタンパク質分解的に断片化することができる。タンパク質分解的断片化は化学的断片化および酵素的断片化の両方を含む。化学的断片化は、例えば、臭化シアンによる処理を含む。酵素的断片化は、例えば、トリプシン、キモトリプシン、LysC、ArgC、GluC、LysNおよびAspNなどのプロテアーゼによる消化を含む。これらのタンパク質断片、または質量分析で生成されるそれらの断片化された形態の検出は、完全なタンパク質の代用として機能することができる。

【0046】

2. バイオマーカーパネル

ある種の態様において、バイオマーカーはパネルとして分析される。パネルは、予測または推論を行うアルゴリズムにおいて用いられる複数のバイオマーカーである。本明細書において用いられる場合、同定されたバイオマーカーの群を含むパネルは、少なくともそれらの同定されたバイオマーカーを含む。同定されたバイオマーカーの群からなるパネルは、同定されたバイオマーカーのみを含む。同定されたバイオマーカーの群から本質的になるパネルは、同定されたバイオマーカーおよび1つまたは2つだけの他のバイオマーカーを含む。例えば、4つの同定されたバイオマーカーから本質的になるパネルは、合計で最大6つのバイオマーカーを含むことができる。パネルは概念的なグループとして、物質の組成物(例えば、精製されたバイオマーカーを含む)として、または抗体などの捕捉試薬に付着し、バイオマーカーにさらに結合した固体支持体などの、物品として存在することができる。固体支持体は、例えば、ビーズなどの1つもしくは複数の固体粒子、またはバイオマーカーがアレイ形式で付着したチップであることができる。

【0047】

24週前後の癒着胎盤を評価するためのバイオマーカーの例示的パネルを表7に示す。

【0048】

34週前後の癒着胎盤を評価するためのバイオマーカーの例示的パネルを表8に示す。

【0049】

VI. データ分析

本明細書において用いられる場合、「分析」という用語は、入力を出力に変換する任意のアルゴリズムをいう。分析は、非限定的に、統計分析、機械学習分析およびニューラルネット分析を含む。「データ」という用語は、さまざまなデータソースから受信したデータ、データに関連付けられたメタデータ、および/またはデータとメタデータの両方の組み合わせを含み得る。

【0050】

A. 測定

配列決定読み出しのある位置へのマッピングなどの、測定の変数は、数値および単語の任意の組み合わせであることができる。測度は、名義(例えば、名称もしくはカテゴリ)、順序(例えば、カテゴリの階層的順序)、間隔(順序のメンバー間の距離)、比率(意味のある「0」と比較した間隔)、またはセット内の物の数をカウントする基数の測定を含めて、任意の尺度であることができる。名義尺度の測定の変数は、名称またはカテゴリ、例えば、配列決定読み出しが分類されるカテゴリを示す。順序尺度の測定の変数は、「1位」、「2位」、「3位」などの順位をもたらす。比率尺度の測定値は、例えば、頻度、平均

、中央値、標準偏差、または分位数などの統計的測定値と同様に、予め定義された尺度での任意の測度、読み出しの絶対数、正規化または推定された数を含む。定量化を伴う測定値は、通常、比率尺度レベルで決定される。

【0051】

B. 分析

いくつかの態様において、分析は、統計的に意味のある結果を提供するのに十分に多数のサンプルの統計分析である。この目的のために、当技術分野において公知の任意の統計的方法を用いることができる。例示的な方法、またはツールとしては、非限定的に、相関、ピアソン相関、スピアマン相関、カイ二乗、平均値の比較(例えば、対応のあるT検定、独立したT検定、ANOVA) 回帰分析(例えば、単純回帰、多重回帰、線形回帰、非線形回帰、ロジスティック回帰、多項式回帰、ステップワイズ回帰、リッジ回帰、ラッソ回帰、エラスティックネット回帰)またはノンパラメトリック分析(例えば、ウィルコクソン順位和検定、ウィルコクソン符号順位検定、符号検定)が挙げられる。そのようなツールは、MATLAB、JMP Statistical SoftwareおよびSASなどの市販の統計パッケージに含まれている。そのような方法は、特定のバイオマーカープロファイルを特定の状態に分類するために使用できるモデルまたは分類子をもたらす。

10

【0052】

統計学および機械学習では、ラッソ(最小絶対縮小選択演算子、LassoまたはLASSOとも)は、結果となる統計モデルの予測精度および解釈可能性を高めるために、変数選択と正則化の両方を行う回帰分析方法である。

20

【0053】

統計分析は、操作者が実施すること、または機械学習によって実施することでもできる。

【0054】

カットオフなどの、ある種の分類器は、ヒトによる検査によって実行することができる。多変量分類器などの他の分類器は、分類アルゴリズムを実行するためにコンピュータを必要とすることがある。

【0055】

1. 機械学習

いくつかの変形では、分析は、線形および非線形モデル、例えば、CART (分類および回帰ツリー(Classification And Regression Trees))などのプロセス、誤差逆伝播法ネットワークなどの人工ニューラルネットワーク、判別分析(例えば、ベイジアン分類器またはフィッシャー分析)、ロジスティック分類器、およびサポートベクトル分類器(例えば、サポートベクターマシン)を含む機械学習技法の実施を伴い得る。

30

【0056】

モデルともいわれる、分類規則、アルゴリズムは、1つまたは別のグループに分類された対象に由来するバイオマーカー測定値のデータセットの分析を行う機械学習技法を含めて、数学的分析により生成することができる。いくつかの態様において、1つまたは複数の分類規則またはアルゴリズムは、以下: カットオフ、多重線形回帰を含む線形回帰、部分的最小二乗回帰、主成分回帰、分類ツリーおよび回帰ツリーをさらに含む再帰的分割プロセスを含む二分決定木、誤差逆伝播法ネットワークを含む人工ニューラルネットワーク、ベイジアン分類器またはフィッシャー分析をさらに含む判別分析、ロジスティック分類器、ならびにサポートベクターマシンを含むサポートベクター分類器の1つまたは複数を採用し得る。いくつかの変形では、バイオマーカー測定値のこれらのデータセットは、100超、1000超、10,000超または100,000超のデータエントリを含み得る。いくつかの変形では、1つまたは別のグループに分類された対象に由来するバイオマーカー測定値のデータセットの分析を行う機械学習技法は、対象からの試験データにアクセスし、試験データに対して1つまたは複数の分類規則を実行し得る。

40

【0057】

診断試験は、感度(真陽性である陽性として分類される割合)および特異度(真陰性であ

50

る陰性として分類される割合)によって特徴付けられる。診断試験の相対的な感度および特異度は、トレードオフを伴うことがあり、感度が高いと特異度が低くなることを意味し得るが、特異度が高いと感度が低くなることを意味し得る。これらの相対値は、受信者動作特性(ROC)曲線で表示することができる。バイオマーカーなどの、一連の変数の診断力は、ROC曲線の曲線下面積(AUC)によって反映される。

【0058】

いくつかの態様において、本開示の分類器は、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の感度値、特異度値、陽性的中率または陰性的中率を有する。本開示の分類器は、少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9または少なくとも0.95のAUCを有する。

10

【0059】

分類は、バイオマーカーの測定値が、選択されたカットオフレベルもしくは値または閾値レベルもしくは値を、上回っていることまたは下回っていることに基づくことができる。ある種の態様において、カットオフ値は、複数の陽性および陰性参照サンプル、例えば、各タイプの少なくとも10、20、50、100または200サンプル(例えば、対照対象および試験対象からのサンプル)においてバイオマーカーレベルを測定することによって得られる。カットオフ値は、陰性サンプルの平均値、中央値または最頻値などの、中心傾向の尺度に関して確立することができる。この中心傾向の尺度からの偏差の尺度を用いて、カットオフを設定することができる。例えば、カットオフは分散または標準偏差に基づいて設定することができる。例えば、カットオフはZスコア、すなわち、正常サンプルの平均を上回る標準偏差数、例えば1標準偏差、2標準偏差、3標準偏差または4標準偏差に基づくことができる。例えば、カットオフ値は、診断試験が少なくとも80%、90%、95%、98%、99%、99.5%または99.9%の感度値、特異度値および/または陽性的中率を有するように選択することができる。

20

【0060】

数値的に、リスクの増加は癒着胎盤の場合には1.0超、好ましくは1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9または3.0超のオッズ比と関連している。

【0061】

VII. 癒着胎盤のリスクを評価する方法

30

本明細書において用いられる状態の「リスクの増加」という語句は、対象が、対象の一般集団よりもその状態を発症する可能性が高いことを示す。したがって、例えば、「癒着胎盤のリスクが増加」している対象は、1つまたは複数の人口統計学的因子またはリスク因子を共有する集団と任意で比較して、同じ妊娠段階の対象の一般集団よりも癒着胎盤を発症する可能性が高い。これらは、例えば、年齢、前置胎盤、以前の帝王切開分娩、子宮内膜切離、体外受精、前の子宮感染症または他の子宮手術を含み得る。例えば、妊娠24週前後または妊娠34週前後のある女性は、妊娠24週前後または妊娠34週前後の一般集団または対照集団の女性よりも癒着胎盤を発症するリスクが高いことを試験が示し得る。

【0062】

分類には、統計分析および/または機械学習によって決定される分類規則、アルゴリズムまたはモデルを採用することができる。いくつかの態様において、分類規則は、1つまたは複数の値に基づき得る。1つまたは複数の値は、対象の一般集団と比較した対象の1つまたは複数の人口統計学的因子またはリスク因子を含み得る。1つまたは複数の値は、1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの測定された値も含み得る。

40

【0063】

A. 癒着胎盤の評価

本明細書において提供されるのは、妊娠20週から妊娠約37週の間のどこかで癒着胎盤のリスクを評価する方法、例えば、妊娠中のヒト女性を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する方法である。本方法は、表1、表2、表3、表4、表5、表6、または表9の1つまたは複数のバイオマーカーの測度を決定する段階、および測度を癒着胎盤のリスクに関

50

連付ける段階を伴うことができる。例えば、決定において表1、表2、表3、表4、表5、表6または表9のいずれか1つまたは複数からの2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれ以上、あるいは2、3、4、5、6、7、8、9または10個以下のバイオマーカーを含むパネルを使用することができる。一般に、バイオマーカーの対照量(例えば、健康な妊娠女性または癒着胎盤でない妊娠女性)と比較して差を示し、その差が統計的に有意である、バイオマーカーの量は、癒着胎盤のリスクの増加と関連している。その差は上方制御または下方制御であることができ、これを実践者は容易に判定することができる。あるいは、判定は、非線形および/または超次元の方法を採用し得る分類アルゴリズムに基づいてもよい。

【0064】

いくつかの態様において、癒着胎盤のリスクの決定を補助するために経路を調べることができる。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数の正準経路が、妊娠第二期の癒着胎盤症例において差次的に発現されるタンパク質によって大きな比率を占められ得る。そのような経路は、エリスロポエチンシグナル伝達経路; および鉄ホメオスタシスシグナル伝達経路(実施例1の表1.7を参照のこと)のうちの1つまたは複数であり得る。

【0065】

いくつかの態様において、ある種の標的が活性化または阻害され、癒着胎盤のリスクの決定を補助するために調べられ得る。例示的な標的を実施例1の表1.8に示す。

【0066】

いくつかの態様において、鉄の取り扱いおよび赤血球機能に関する細胞機能および分子機能が大きな比率を占め、癒着胎盤のリスクの決定を補助するために調べられ得る。例示的な標的を実施例1の表1.9に示す。

【0067】

いくつかの態様において、イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)のうちの1つまたは複数が、癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。いくつかの態様において、本開示のバイオマーカーパネルは、イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)のうちの1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ全てを含む。いくつかの態様において、これらのマーカーの1つまたは複数が、妊娠第二期において癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。

【0068】

いくつかの態様において、ISM2、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質のうちの1つまたは複数が、癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。いくつかの態様において、本開示のバイオマーカーパネルは、ISM2、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質のうちの1つ、2つ、3つまたは4つ全てを含む。いくつかの態様において、これらのマーカーの1つまたは複数が、妊娠第三期において癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。

【0069】

他の態様において、決定はバイオマーカーのパネル、例えば表7または8に提供されるものの使用に基づく。

【0070】

B. 癒着胎盤 - 妊娠第二期の評価

本明細書において提供されるのは、妊娠第二期(例えば、妊娠24週前後)の間の癒着胎盤のリスクを評価する方法、例えば、妊娠中のヒト女性を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する方法である。本方法は、表1、表3、表5、または表9の1つまたは複数のバイオマーカーの測度を決定する段階、および測度を癒着胎盤のリスクに関連付ける段階を伴うことができる。例えば、決定において表からの2、3、4、5、6、7、8、9もしくは

10

20

30

40

50

10個またはそれ以上、あるいは2、3、4、5、6、7、8、9または10個以下のバイオマーカーを含むパネルを使用することができる。一般に、バイオマーカーの対照量(例えば、健常な妊娠女性または癒着胎盤でない妊娠女性)と比較して差を示し、その差が統計的に有意である、バイオマーカーの量は、癒着胎盤のリスクの増加と関連している。その差は上方制御または下方制御であることができ、これを実践者は容易に判定することができる。あるいは、判定は、非線形および/または超次元の方法を採用し得る分類アルゴリズムに基づいてもよい。

【0071】

バイオマーカーパネルは、表7に示されるバイオマーカーパネルのいずれかで構成されることができる。バイオマーカーパネルは、表7に示されるバイオマーカーパネルのいずれかから本質的になることができる。バイオマーカーパネルは、表7に示されるバイオマーカーパネルのいずれかからなることができる。いくつかの態様において、ISM2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)のうちの1つまたは複数、癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。

10

【0072】

C. 癒着胎盤 - 妊娠第三期の評価

本明細書において提供されるのは、妊娠第三期(例えば、妊娠35週前後)の間の癒着胎盤のリスクを評価する方法、例えば、妊娠中のヒト女性を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する方法である。本方法は、表2、表4、表6、または表9の1つまたは複数のバイオマーカーの測度を決定する段階、および測度を癒着胎盤のリスクに関連付ける段階を伴うことができる。例えば、決定において表からの2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれ以上、あるいは2、3、4、5、6、7、8、9または10個以下のバイオマーカーを含むパネルを使用することができる。一般に、バイオマーカーの対照量(例えば、健常な妊娠女性または癒着胎盤でない妊娠女性)と比較して差を示し、その差が統計的に有意である、バイオマーカーの量は、癒着胎盤のリスクの増加と関連している。その差は上方制御または下方制御であることができ、これを実践者は容易に判定することができる。あるいは、判定は、非線形および/または超次元の方法を採用し得る分類アルゴリズムに基づいてもよい。

20

【0073】

バイオマーカーパネルは、表8に示されるバイオマーカーパネルのいずれかで構成されることができる。バイオマーカーパネルは、表8に示されるバイオマーカーパネルのいずれかから本質的になることができる。バイオマーカーパネルは、表8に示されるバイオマーカーパネルのいずれかからなることができる。

30

【0074】

いくつかの態様において、ISM2、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質のうちの1つまたは複数、癒着胎盤を対照と区別するのに有用である。

【0075】

VIII. 癒着胎盤のリスクの増加時に対象を処置する方法

40

癒着胎盤に罹患している、または癒着胎盤のリスクが増加している妊娠対象を処置する方法は、妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する段階、ならびに癒着胎盤の処置、癒着胎盤のリスクの低減および/または癒着胎盤の新生児合併症の低減に有用な1つまたは複数の治療的介入を施す段階を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の治療的介入を施すことは、癒着胎盤のリスクを低減するようにデザインされた1つまたは複数の処置の有効量を施すことを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の処置は、子宮切除帝王切開を行うこと、早産を予防するために対象に床上安静を推奨すること、予防的塞栓術を行うこと、胎盤の一部を原位置に残すこと、子宮バルーンタンポナーデに興味を持たせること、メトトレキセートを投与すること、1つまたは複数の一時的内腸骨閉塞バルーンカテーテルを挿入すること、1つまたは複数の尿管ステントを挿入することな

50

どを含み得る。

【0076】

癒着胎盤スペクトラムが疑われる患者は、上記の治療的介入または当分野における標準の治療的介入のいずれかにおいて高度の集学的な外科的専門知識および経験を有する施設に紹介されるべきである。

【0077】

将来の生殖能力が望まれる場合には子宮温存のための外科的計画が計画され、または生殖能力が望まれない場合には子宮摘出術の計画もしくは子宮摘出術を行うことが着手される。

【0078】

これにより、専門家/外科医および適切に設備の整った施設(すなわち、血液バンクの支援)へのアクセスを確保するのに適した計画を可能にすることができる。

【0079】

IX. キットおよび他の製造品

別の態様において、本明細書において提供されるのは、癒着胎盤、特に、癒着胎盤のリスク増加に関するサンプルバイオマーカーの検出に有用な製造品、例えば試薬キットである。タンパク質バイオマーカーを検出できる試薬は、抗体を含むが、これに限定されることはない。タンパク質バイオマーカーを検出できる抗体はまた、典型的には、それぞれの標的への試薬の結合を示す検出可能な反応を触媒することができるフルオロフォアまたは酵素などの分子に直接的または間接的に連結される。

【0080】

いくつかの態様において、キットは、血漿からの微粒子濃縮サンプルの迅速な調製のための低容量(例えば、1 ml、3 ml、5 ml、10 ml)垂直カラム中の高分子量ゲルろ過組成物(例えば、SEPHAROSEなどのアガロース)を含むサンプル処理材料をさらに含む。例えば、微粒子濃縮サンプルは、凍結し、さらに処理するために分析実験室に輸送する前に臨床現場で調製することができる。

【0081】

いくつかの態様において、キットは、癒着胎盤、特に、癒着胎盤のリスクを評価するため説明書をさらに含む。本明細書において用いられる場合、「説明書」という用語は、対象からのサンプル中の関心対象のタンパク質の(発現レベルの決定を含む)存在を検出するために、キットに含まれる試薬を使用するための指示をいう。関心対象のタンパク質は、癒着胎盤の1つまたは複数のバイオマーカーを含み得る。

【0082】

別の態様において、キットは、各容器がペプチドバイオマーカー、例えば、バイオマーカータンパク質のプロテアーゼ(例えば、トリプシン)消化から産生されるペプチドに対応する1つまたは複数の安定同位体標準物質(SIS)ペプチドを含んだ、1つまたは複数の容器を含む。別の態様において、SISペプチドの大部分または全てがバイオマーカーペプチドに対応する。別の態様において、キットは、SISペプチドが対応するバイオマーカーペプチドをさらに含む。

【0083】

別の態様において、癒着胎盤のタンパク質バイオマーカーと、複数のそれらのバイオマーカーについて、対応する安定同位体標準物質ペプチドを含む物質組成物が提供される。これは、微粒子から単離されたタンパク質を含むサンプルと、安定同位体標準物質ペプチドとを組み合わせることによって調製することができる。

【0084】

X. システム

本明細書において提供されるのは同様に、プロセッサおよびメモリを含むコンピュータを含むシステムである。コンピュータは、サンプルから測定された、本明細書において提供される1つまたは複数のバイオマーカーの1つまたは複数の測定値をメモリに受信するように構成されることができる。メモリは、実行されると、サンプルを癒着胎盤のリスク

10

20

30

40

50

があると、または癒着胎盤のリスクがないと分類するコンピュータ可読命令を含むことができる。コンピュータシステムは、通信インターフェースを用いてコンピュータネットワークに動作可能に接続することができる。ネットワークは、インターネット、インターネットおよび/またはエクストラネット、またはインターネットと通信するイントラネットおよび/もしくはエクストラネットであることができる。場合によっては、ネットワークは電気通信ネットワークおよび/またはデータネットワークである。ネットワークは、クラウドコンピューティングなどの分散コンピューティングを可能にし得る1つまたは複数のコンピュータサーバを含むことができる。システムは、非限定的に、デジタル加入者回線(DSL)、ケーブルモデム、ファイバー、ワイヤレス、衛星、および電力線ブロードバンド(BPL)を含む高速伝送ネットワークなどの、通信ネットワークを通じて第2のコンピュータと接続された第1のコンピュータを含むことができる。したがって、癒着胎盤のリスクが増加していると、または癒着胎盤のリスクが増加していないとサンプルの分類を提供する結果は、送信コンピュータから、医療提供者のオフィスにあるような遠隔受信コンピュータに、またはスマートフォンなどのモバイルデバイスに送信することができる。

10

【実施例】

【0085】

実施例1:

母体EDTA血漿サンプルは、妊婦健診を受け、妊娠第二期および第三期においてそれぞれ妊娠約26 (+/- 2)週および約35 (+/- 2)週の中央値にて病院で分娩を予定していた18歳超の患者から採取した。妊娠の日付は妊娠12週以下の時点で超音波検査により確認された。サンプルは分注し、セ氏-80度で貯蔵した。国際産婦人科連合(「FIGO」)により定義される悪性度1のPAS 27例、悪性度2のPAS 7例および悪性度3のPAS 1例を含め、本明細書において「PAS」といわれる癒着胎盤スペクトラム35例および対照70例を分析した(表1.1)。

20

【0086】

(表1.1) PASに対するFIGO臨床的および組織学的基準

	臨床的基準	組織学的基準
悪性度1	付着胎盤の用手除去の試みは、機械的または外科的手段を必要とする大量出血をもたらす	絨毛組織と子宮筋層の間に脱落膜がない広がった領域を有する 子宮摘出術検体
悪性度2	巨視的所見: 血管過多、胎盤膨隆、「えくぼ徴候」	子宮摘出術検体は、筋線維内の胎盤絨毛を示している
悪性度3	子宮表面を通じて侵入していること +/- 他の骨盤構造への侵入が見られる 悪性度2および胎盤絨毛の巨視的所見	絨毛組織が子宮漿膜を破っていることを示す 子宮摘出術検体

30

40

【0087】

症例は、2019年FIGO PAS分類(表1.1)に一致する臨床的または組織学的悪性度1～3のPASを有し、妊娠23週超で出産し、LIFECODESバイオバンクに登録された対象と定義された。見込み症例は、2007年から2020年までの記録に対して次の単語検索を用いて電子医療記録内で最初に特定された: 手術報告や退院概要では「adhere-」、および病理報告では「-creta」、「hyst-」または「前置(previa)」が使用された。各見込み症例の医療記録は、施設の集学的PASチーム内の2人の産科医によって独立に検討された。臨床的悪性度と組織学的悪性度のうち高い方の悪性度を、割り当てられた悪性度として指定した。組み入れ状態または割り当てられたPAS悪性度のいずれかに不一致がある場合

50

は、審査委員会が判定した。PASという診断が下されたと特定された対象は、組み入れのためLIFECODESバイオバンクと相互参照された。対照はPASの診断を受けていない対象と定義し、無作為に2:1でマッチさせた。症例と対照は、サンプリングの妊娠期間(+1週)と胎児の数でマッチさせた。除外基準は、現在のがん診断、免疫調節薬の使用または胎児染色体異常の記録と定義した。単変量解析はカイ二乗検定で行い、連続変数はSAS 9.4を用いウィルコクソン検定で比較した。全ての検定は両側検定であり、統計的有意性を定義するには $P < 0.05$ を用いた。

【0088】

対照と比較して、症例は母体年齢が高く、出産時に前置胎盤を患っている可能性が高かった。PAS症例のうち20例(57.1%)には出産時に前置胎盤も帝王切開の病歴もなかった。PAS症例のうち23例(65.7%)は組織学的基準よりはむしろ臨床的基準によって判定された。注目すべきは、悪性度1のPAS症例のうち、分娩前に超音波検査で検出されたのはわずか11%であったのに対し、悪性度2と3のPAS症例ではそれぞれ57%と100%であったことである(表1.2)。

【0089】

(表1.2) PAS症例の特徴と悪性度判定。+データは中央値(+IQR)またはn (%)として表示

10

20

30

40

50

	症例 ⁺ n = 35	対照 ⁺ n = 70	p値
母体年齢(yrs)	36.9 (+ 2.9)	32.9 (+ 2.7)	<0.01
前の帝王切開の数			0.33
0	23 (65.7)	55 (78.6)	
1	7 (20.0)	10 (14.3)	
>2	5 (14/3)	5 (7.1)	
分娩時の前置胎盤	8 (22.9)	6 (8.6)	<0.01
超音波によって 診断されたPAS		N/A	
悪性度 1 (n=27)	3 (11.1)		
悪性度 2 (n=7)	4 (57.1)		
悪性度 3 (n=1)	1 (100.0)		
PAS悪性度と判定			
悪性度 1	27 (77.1)		
臨床的	21		
組織学的	0		
両者一致	6		
悪性度 2	7 (20.0)		
臨床的	2		
組織学的	1		
両者一致	4		
悪性度 3	1 (2.9)		
臨床的	0		
組織学的	0		
両者一致	1		

【 0 0 9 0 】

循環微粒子(「CMP」)を各サンプルで濃縮するため、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いてCMPを分離した。症例または対照の状態に依存しない研究番号のみで特定される匿名化されたEDTA血漿サンプルを無作為に分類し、ドライアイスでNX Prenatal, Inc.(Houston, TX)に輸送し、そこでSECによりCMPタンパク質の濃縮が行われ、NeXosome溶出試薬を用い均一濃度で溶出された。これにはAmericanBio, Inc.(Canton, MA)が製造したNeXosome分離カラムを要した。簡単に説明すると、これらのカラムはCytiva(Marlborough, MA)のセファロース4B-CL (4%アガロース、粒子サイズ45~165 μm)でAmericanBioにより総充填量10 mLに充填され、NX Prenatalに配送された。NX Prenatalが受け取ったら、カラムは使用まで2~8℃で貯蔵した。CMP分離のためにカラムを使用する前に、カラムを室温に平衡化させ(終夜)、その後、NeXosome溶出試薬で洗浄した。EDTA血漿サンプルを解凍し、0.5 mLの血漿をアプライし、NeXosome分離カラムに取り込ませた。血漿サンプルは、カラムに適用する前にろ過、希釈、または前処理されなかった。サンプルをカラムに取り込んだ後、NeXosome溶

出試薬を添加し、0.5 mLのカラム画分を回収した。溶出画分は2つのピークを生成した。CMPはカラム空隙容量に捕捉され、豊富に存在する可溶性タンパク質のピークから分離された。サンプルを無作為化スキームにしたがって処理した。各CMP含有画分(各画分の0.5 mLアリコート)を各個々のサンプル内でプールし、Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific)を用いて、総タンパク質測定を行った。その後、各個々のCMP分離物プールから200 µgの総タンパク質を含有するアリコートを2 mL微量遠心チューブ(VWR, Radnor, PA)に移し、全てのCMP分離物の処理が完了するまで-80°Cで貯蔵した。その後、全てのCMP分離物をプロテオミクス分析のためドライアイスでBGI Americas Corporation(Cambridge, MA)に輸送した。

【0091】

10

合計158個の血漿濃縮エクソソームサンプルをLC-MS/MS分析用に個別に処理した。100 µLの濃縮エクソソームを、pH 8.5の9 M尿素および0.5% Rapigest (SKU: 186001861, Waters(商標))を含んだ700 µLの溶解緩衝液と混合した。サンプルを30分間、水浴で超音波処理し、その後に遠心分離機中10分間高速(14,000 rpm)で回転させた。サンプル溶解後、サンプルのタンパク質濃度をBCAアッセイ(カタログ番号: A53225, ThermoFisher Scientific)により測定した。

【0092】

50 µgの各サンプルを溶解物から採取し、溶解緩衝液で同じ容量に正規化した。サンプルを10 mM DTT中60°Cで25分間還元した後、還元されたサンプルを暗所環境において20 mM IAM (ヨードアセトアミド)中、室温で20分間アルキル化した。100 mM DTTを添加することによりサンプル中の過剰なIAMをクエンチした。酵素消化のために、最終尿素濃度が1.6 M、および最終pH 8に希釈されるように各サンプルにDI水およびpH 8.5のHEPE緩衝液を添加した。1 µgのTry/LysC (カタログ番号: A41007, ThermoFisher Scientific)を各サンプルに添加した。サンプルを37°Cで12時間、終夜インキュベートした。翌日、さらに1 µgのTryp/LysCを各サンプルに添加し、それらをさらに4時間インキュベートして酵素消化を完了した。

20

【0093】

10% TFAを消化サンプル(ペプチド)に添加して、最終濃度1% TFAをもたらした-pHを試験したところ、サンプルは酸性であった。次に、酸性化したサンプルを脱塩のために10 mg SEK PAKカラム(カタログ番号: 60108-302, ThermoFisher Scientific)に通した。各サンプルの脱塩ペプチドの20%を取り出し、一緒にプールしてペプチドの複合「ライブラリ」を作成した。次いで、ライブラリサンプルを、高pH、逆相、オフラインHPLC分画装置(Vanquish(商標), ThermoFisher Scientific)を用いて96画分に分画した。移動相Aは20 mMギ酸酢酸(formic acetate), pH 9.3を含むDI H₂Oで構成され; 移動相Bは20 mMギ酸酢酸, pH 9.3を含むアセトニトリル(Optima(商標), LC/MS等級, Fisher Chemical(商標))で構成された。分離の勾配を表1.3に示す。次いで、96画分を24個の画分にまとめ、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)分析の準備を整えた。

30

【0094】

(表1.3) 高pH逆相HPLC分画勾配情報

40

時間[min]	流速[ml/min]	%B
0.00	0.500	2.0
1.00	0.500	6.0
12.00	0.500	20.0
30.00	0.500	28.0
50.00	0.500	65.0
53.00	0.500	98.0
57.00	0.500	98.0
59.00	0.500	2.0
60.00	0.500	2.0

10

【 0 0 9 5 】

分画したサンプルは全てナノフローHPLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific)によって分析し、続いてThermo Orbitrap質量分析計(Tribrid Eclipse)によって分析した。ナノスプレイFlex(商標)イオン源(Thermo Fisher Scientific)には、ペプチド分離のためにナノカラム(PicoFrit, 100 μm×250 mm×15 μmチップ, New Objective)を加熱するためのカラムオープン(PRSO-V2, Sonation)が装備されていた。ナノLC法は、水アセトニトリルをベースにしており、0.300 μL/分の流速で150分間の長さであった。各サンプル注入で、全てのペプチドがトラップカラム(カタログ番号: 160454, Thermo Fisher)に最初に結合され、その後に移動相によって分離ナノカラムに送られた。使用した勾配の詳細を表1.4に示す。

20

【 0 0 9 6 】

(表 1 . 4) 高pH逆相HPLC分画勾配情報

時間[min]	流速[ml/min]	%B
0.00	0.500	2.0
1.00	0.500	6.0
12.00	0.500	20.0
30.00	0.500	28.0
50.00	0.500	65.0
53.00	0.500	98.0
57.00	0.500	98.0
59.00	0.500	2.0
60.00	0.500	2.0

30

40

【 0 0 9 7 】

DDAライブラリの構築では、DIAライブラリ固有のDDA、Eclipse上でのMS2ベースの質量分析法を用いて、ナノカラムから溶出された分画ペプチドの配列を決定した。完全なMSスペクトルでは、375 m/z~1500 m/zのスキャン範囲で120,000 の分解能を用いた。dd-MS(MS2)では、15,000の分解能を用い、分離ウィンドウは1.6 Daであった。MS1およびMS2の両方の取得には「標準」AGC標的および「自動」最大イオン注入

50

セグメント2 (800 – 1200 m/z, IW 25 m/z, 重複 1 m/z)	
799.5 – 825.5	999.5 – 1025.5
824.5 – 850.5	1024.5 – 1050.5
849.5 – 875.5	1049.5 – 1075.5
874.5 – 900.5	1074.5 – 1100.5
899.5 – 925.5	1099.5 – 1125.5
924.5 – 950.5	1024.5 – 1150.5
949.5 – 975.5	1049.5 – 1175.5
974.5 – 1000.5	1074.5 – 1200.5

10

【0100】

最初のプロセスは、高分解能質量分析計から生成されたサンプルデータに基づいている。DDAデータはMaxQuant内のAndromeda検索エンジンにより同定され、スペクトルライブラリ構築のための結果の同定にはSpectronaut(商標)が使用された。MaxQuantはDDAデータの同定に使用され、その後のDIA分析のためのスペクトルライブラリとして機能した。分析パイプラインは生データを入力ファイルとして使用し、対応するパラメータとヒトデータベース(UP000005640)を設定した後、同定と定量分析を行った。同定されたペプチドは、最終スペクトルライブラリを構築するために1%以下のFDRを満たした。このDIAデータセットでは、Spectronaut(商標)を採用してスペクトルライブラリ情報を構築し、デコンボリューションおよび抽出を完了した後に、mProphetアルゴリズムを用いて分析品質管理(1% FDR)を完了し、信頼性の高い定量結果を得た。GO、COGおよびPathway機能アノテーション分析と時系列分析も、上記のパイプラインにおいて行われた。線形混合効果モデルを中核アルゴリズムとするMStatsを用いて、事前定義された比較グループにしたがってDIA定量結果データを処理した後に、モデルに基づいて有意性検定を行った。その後、示差的タンパク質スクリーニングを実行し、2以上の倍変化と0.05未満の調整P値を有意差として定義した。定量的比較結果に基づいて、比較グループ間の示差的タンパク質を同定した;最後に、示差的タンパク質の機能増強分析、タンパク質間相互作用(PPI)検査および細胞内局在分析を実行した。次に、サンプル分類分析を以下に述べるように実施した。

20

30

【0101】

正則化(L1)回帰を用いてPASを分類し、同定された全タンパク質のスーパーセットからCMPタンパク質候補の限定セットを定義した。CMPタンパク質候補の限定セットから推定パネルを選択するために、ロジスティック回帰を用いた交差検証手順を選択した。サンプルを無作為にトレーニングセットと検証セットに分けた(80% 対 20%)。トレーニングセットのタンパク質を次に、アンサンブル特徴選択手順を用いて、赤池情報量基準(AIC)によりランク付けした。上位10個のタンパク質を次に、Rバージョン3.6.3のglmultiパッケージにパスし、そこでトレーニングセットを5倍の相互検証に供した。サンプルサイズが限られているため、過剰適合を避けるために、モデルの予測因子を5つ以下に制限した。次に、最大の曲線下面積(AUC)および最小のAUC標準偏差を有するモデルを、セット・サイドの外部検証セットに対して試験した。次に、この外部検証セットのAUCとAUC標準偏差を記録し、ワークフローを合計1000回繰り返した(図9)。次に、モデルを平均AUCとAUCの平均標準偏差でランク付けした。次に、無作為に並べ替えられたサンプルラベルでワークフローを繰り返した。次に、観察されたデータと並べ替えられたデータの予測統計を比較した。

40

50

【0102】

妊娠第二期および第三期におけるPASリスクの分類因子として機能するCMPタンパク質のパネルを確立するために、正則化(L1)回帰を用いた2段階の反復ワークフローと、それに続くロジスティック回帰を用いた交差検証手順を用いた。2段階のワークフローは、無作為な偶然性を模擬的に再現するために、無作為に並べ替えられたサンプルラベルでも繰り返された。妊娠第二期のサンプルでは、観察された(例えば、第1の網掛け部分)パネルと並べ替えられた(例えば、第2の網掛け部分)パネルの全ての曲線下面積(AUC)の平均は、有意に異なっていた(0.72 対 0.45; $p < 2.20 \times 10^{-16}$; 図16A)。最高性能のマーカーパネルは、平均AUC 0.83でPASを対照から区別した。このパネルのCMPタンパク質には、イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)が含まれた。妊娠第三期サンプル内では、観察された(例えば、第1の網掛け部分)パネルと並べ替えられた(例えば、第2の網掛け部分)パネルの全てのAUCの平均も、有意に異なっていた(0.60 対 0.52; $p = 2.79 \times 10^{-5}$; 図16B)。最高性能のパネルは、平均AUC 0.78でPASを対照から区別した。このパネルのCMPタンパク質には、ISM2、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質が含まれた。さらに、妊娠第二期の全てのAUCの平均は、妊娠第三期のそれよりも有意に高かった($p = 1.59 \times 10^{-12}$)。

10

【0103】

差次的発現分析においてPAS状態により差次的に発現されると同定されたタンパク質の生物学的機能を決定するために、Ingenuity Pathway Analysisも適用した。Ingenuity Knowledge Baseの参照セットを使ったコア分析を用いた。ネットワーク分析および制御分析には、直接的および間接的な関係を考慮した。IPAは、機能アノテーション、標準経路およびネットワーク分析、ならびに上流制御因子分析を可能にする、機能的にアノテーションされた分析物の精選されたバイオインフォマティクスリポジトリである。有意に($P < 0.05$)大きな比率を占めた標準経路、上流制御因子、ならびに分子機能および細胞機能が同定された。2つまたはそれ以上の重複ヒットを含む関連した経路および生物学的機能のみが含まれ、活性化状態(活性化、阻害)が予測された上流制御因子のみが含まれた。重複率は、差次的に発現されたタンパク質と標的経路の間の重複のパーセントとして計算された。

20

30

【0104】

差次的発現分析においてPAS状態により差次的に発現されると同定されたタンパク質の生物学的機能を決定するために、Ingenuity Pathway Analysisも適用した。これにより、標準経路、上流制御因子、ならびに分子機能および細胞機能の有意な過剰提示が明らかにされた。妊娠第二期では、PASのプロテオミクス変化により、鉄ホメオスタシスシグナル伝達やエリスロポエチンシグナル伝達を含むいくつかの標準経路の有意な過剰提示がもたらされた(表1.7)。

【0105】

(表1.7) 妊娠第二期癒着胎盤の症例において差次的に発現されるタンパク質により有意に過剰提示される標準経路

40

Ingenuity 標準経路	$-\log(p\text{値})$	重複率	分子
エリスロポエチンシグナル伝達経路	4.33	0.0169	HBA1/HBA2, HBB, HBG1
鉄ホメオスタシスシグナル伝達経路	4.64	0.0216	HBA1/HBA2, HBB, HBG1

【0106】

マスター上流制御因子には、有意に活性化されると予測される7つの標的および有意に

50

阻害されると予測される6つの標的が含まれていた(表1.8)。

【0107】

(表1.8) 妊娠第二期癒着胎盤データセット内の標的分子のマスター上流制御因子の選択

マスター制御因子	分子タイプ	予測される活性化状態	重複のp値	データセット内の標的分子
シグナルペプチダーゼ	複合体	活性化	0.0000173	ALB, ANGPTL2, GRN, HBA1/HBA2, HBB, NID1, VNN1
GNRHR	Gタンパク質共役受容体	活性化	0.000143	GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
DRD3	Gタンパク質共役受容体	活性化	0.000148	GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
ARAF	キナーゼ	活性化	0.000408	GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
Gタンパク質アルファ	グループ	活性化	0.000471	GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
F10	ペプチダーゼ	活性化	0.000649	ANGPTL2, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
BDKRB2	Gタンパク質共役受容体	活性化	0.000826	GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
MAP2K7	キナーゼ	阻害	0.000139	ALB, ANGPTL2, HBA1/HBA2, HBB, HBG1
CDK5R1	キナーゼ	阻害	0.000269	ANGPTL2, GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
SERPINB1	その他	阻害	0.000691	ANGPTL2, GRN, HBA1/HBA2, HBB, NID1, VNN1

10

20

30

【0108】

IPA分子および細胞機能分析により、妊娠第二期の癒着胎盤分析からの差次的に発現された分子ヒットに基づいて、有意に過剰提示された43の選択の注釈付き機能が明らかにされた(表1.9)。鉄の取り扱いと赤血球の機能に関する細胞機能および分子機能は、標準的な鉄ホメオスタシスおよびエリスロポエチンシグナル伝達経路と一致した。

【0109】

(表1.9) 妊娠第二期癒着胎盤において変化したタンパク質のうち過剰提示された分子機能および細胞機能の選択

40

50

疾患または機能の注釈	p値	分子
ハイツ小体貧血	1.59E-07	HBA1/HBA2, HBB
ミネラル欠乏症	2.90E-07	ALB, HBA1/HBA2, HBB
妊娠鉄欠乏性貧血	4.77E-07	HBA1/HBA2, HBB
難治性鉄欠乏症	4.77E-07	HBA1/HBA2, HBB
遺伝性高胎児ヘモグロビン血症	1.59E-06	HBB, HBG1
酸素の輸送	2.38E-06	HBA1/HBA2, HBB
過酸化水素の生合成	1.99E-05	ALB, HBA1/HBA2, HBB
過酸化水素の異化作用	3.01E-05	HBA1/HBA2, HBB
溶血	3.59E-05	ALB, HBA1/HBA2, HBB
食細胞の脱顆粒	9.34E-05	ALB, GRN, HBB, VNN1
骨髄細胞の脱顆粒	9.86E-05	ALB, GRN, HBB, VNN1
家族性溶血性貧血	1.29E-04	HBA1/HBA2, HBB
末梢血管疾患	1.49E-04	ALB, GRN, HBA1/HBA2, HBB
血小板の凝集	1.60E-04	ALB, ANGPTL2, HBB
赤血球増加症	1.90E-04	GRN, HBA1/HBA2, HBB
受容体媒介エンドサイトーシス	2.10E-04	ALB, HBA1/HBA2, HBB
活性酸素種の合成	2.30E-04	ALB, GRN, HBA1/HBA2, HBB
網赤血球の量	3.26E-04	HBA1/HBA2, HBB
エンドサイトーシス	4.02E-04	ALB, GRN, HBA1/HBA2, HBB
好中球の脱顆粒	9.46E-04	GRN, HBB, VNN1
上皮組織の形成	9.64E-04	GRN, NID1
高血圧	1.02E-03	ALB, ANGPTL2, HBA1/HBA2, HBG1
虚血性脳卒中	1.11E-03	ALB, GRN
活性酸素種の生成	1.54E-03	GRN, HBA1/HBA2, HBB
スーパーオキシドの生成	1.95E-03	HBA1/HBA2, HBB
骨髄細胞の量	5.34E-03	GRN, HBA1/HBA2, HBB
酸素の消費	5.88E-03	HBA1/HBA2, HBB
骨髄細胞の細胞運動	5.88E-03	ALB, ANGPTL2, GRN
活性酸素種の発生	6.20E-03	ALB, HBA1/HBA2
自然免疫応答	7.24E-03	GRN, VNN1
血液の凝固	1.01E-02	HBB, HBG1
重度の炎症性障害	1.05E-02	GRN, HBG1
一酸化窒素の合成	1.18E-02	ALB, ANGPTL2
炎症性応答	1.48E-02	ANGPTL2, GRN, VNN1
好中球の細胞運動	1.73E-02	ALB, GRN
アポトーシス	2.49E-02	ALB, GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
金属イオンの量	2.73E-02	GRN, HBA1/HBA2
上皮組織の異常形態	2.75E-02	GRN, NID1
出血	2.95E-02	ALB, GRN
血管系の発達	3.62E-02	ANGPTL2, GRN, NID1
子癇前症	3.73E-02	ANGPTL2, HBG1
慢性炎症性障害	3.77E-02	ALB, GRN, HBA1/HBA2
上皮組織の発達	4.45E-02	GRN, NID1

10

20

30

40

50

疾患または機能の注釈	p値	分子
上皮組織の形成	9.64E-04	GRN, NID1
高血圧	1.02E-03	ALB, ANGPTL2, HBA1/HBA2, HBG1
虚血性脳卒中	1.11E-03	ALB, GRN
活性酸素種の生成	1.54E-03	GRN, HBA1/HBA2, HBB
スーパーオキシドの生成	1.95E-03	HBA1/HBA2, HBB
骨髄細胞の量	5.34E-03	GRN, HBA1/HBA2, HBB
酸素の消費	5.88E-03	HBA1/HBA2, HBB
骨髄細胞の細胞運動	5.88E-03	ALB, ANGPTL2, GRN
活性酸素種の発生	6.20E-03	ALB, HBA1/HBA2
自然免疫応答	7.24E-03	GRN, VNN1
血液の凝固	1.01E-02	HBB, HBG1
重度の炎症性障害	1.05E-02	GRN, HBG1
一酸化窒素の合成	1.18E-02	ALB, ANGPTL2
炎症性応答	1.48E-02	ANGPTL2, GRN, VNN1
好中球の細胞運動	1.73E-02	ALB, GRN
アポトーシス	2.49E-02	ALB, GRN, HBA1/HBA2, HBB, VNN1
金属イオンの量	2.73E-02	GRN, HBA1/HBA2
上皮組織の異常形態	2.75E-02	GRN, NID1
出血	2.95E-02	ALB, GRN
血管系の発達	3.62E-02	ANGPTL2, GRN, NID1
子癇前症	3.73E-02	ANGPTL2, HBG1
慢性炎症性障害	3.77E-02	ALB, GRN, HBA1/HBA2
上皮組織の発達	4.45E-02	GRN, NID1

10

20

30

【0110】

妊娠第二期のデータと同様に、IPAコア分析により、PASでの妊娠第三期における標準経路、上流制御因子、ならびに分子機能および細胞機能の有意な過剰提示が明らかになった。PASでの妊娠第三期のプロテオミクス変化の標準経路分析により、特にIL-15が関与する免疫および細胞外シグナル伝達経路を含む経路の有意な過剰提示が明らかになった(表1.10)。

【0111】

(表1.10) 妊娠第三期の変化の標準経路分析

Ingenuity標準経路	-log(p値)	重複率	分子
自然免疫細胞と適応免疫細胞との間のコミュニケーション	2.9	0.00431	IGHV3-20, IGKV3D-11, IGKV4-1, IGLV2-18
B細胞受容体シグナル伝達	3.54	0.00634	IGHV3-20, IGKV3D-11, IGKV4-1, IGLV2-18
インテグリンシグナル伝達	3.72	0.0141	ARPC5, ILK, PARVB
IL-15シグナル伝達	3.84	0.00758	IGHV3-20, IGKV3D-11, IGKV4-1, IGLV2-18

40

50

【 0 1 1 2 】

マスター上流制御因子には、有意に活性化されると予測される3 つおよび有意に阻害されると予測される2つが含まれていた(表1.11)。

【 0 1 1 3 】

(表 1 . 1 1) 妊娠第三期癒着胎盤データセット内の標的分子のマスター上流制御因子の選択

マスター制御因子	分子タイプ	予測される活性化状態	重複のp値	データセット内の標的分子
DVL1	その他	活性化	0.000188	GAPDH, HSPG2, ILK, MPO, PARVB
ヒストン h3	グループ	活性化	0.00121	ARPC5, GAPDH, HSPG2, ILK, MPO
ADCY	グループ	活性化	0.00168	ARPC5, GAPDH, HSPG2, PARVB
RGS (2,4,7,16,18)	グループ	阻害	0.0000907	GAPDH, HSPG2, ILK, MPO, SPP2

10

【 0 1 1 4 】

分子および細胞機能分析により、PASにおける妊娠第三期分析からの差次的に発現された分子ヒットに基づいて、有意に過剰提示された24の選択の注釈付き機能が明らかにされた(表1.12)。

【 0 1 1 5 】

(表 1 . 1 2) 妊娠第三期癒着胎盤において変化したタンパク質のうち過剰提示された分子機能および細胞機能の選択

20

30

40

50

疾患または機能の注釈	p値	分子
古典的補体経路	0.0000102	IGKV4-1, C1QB, IGKV3D-11
受容体媒介エンドサイトーシス	0.000487	IGKV4-1, HSPG2, IGKV3D-11
細胞運動	0.00278	IGKV4-1, MPO, HSPG2, GAPDH, IGKV3D-11, PARVB, ILK
アクチン細胞骨格の再構成	0.00342	PARVB, ILK
細胞の付着	0.0035	HSPG2, ILK
心筋細胞のアポトーシス	0.00764	MPO, GAPDH
細胞浸潤	0.0079	MPO, GAPDH, ILK
白血球遊走	0.0087	IGKV4-1, MPO, IGKV3D-11, ILK
結合組織細胞の遊走	0.00895	HSPG2, ILK
血小板の凝集	0.00908	MPO, ILK
細胞の脱顆粒	0.00916	SPP2, ARPC5, MPO
DNA損傷	0.0159	MPO, GAPDH
細胞膜の構成	0.0165	ARPC5, ILK
上皮細胞株の細胞死	0.0213	MPO, GAPDH
腎臓細胞株の細胞死	0.0213	GAPDH, ILK
家族性心臓病	0.0242	HSPG2, ILK
急性呼吸器障害	0.0258	MPO, GAPDH
免疫介在性炎症疾患	0.0267	MPO, C1QB, GAPDH, ILK
好中球の脱顆粒	0.0286	ARPC5, MPO
好中球の細胞運動	0.0288	MPO, ILK
免疫細胞の接着	0.0305	MPO, ILK
細胞骨格の構成	0.0322	ARPC5, GAPDH, PARVB, ILK
妊娠障害	0.0337	MPO, GAPDH, ILK
細胞遊走	0.0376	IGKV4-1, MPO, HSPG2, IGKV3D-11, ILK

10

20

30

40

50

【0116】

これらの細胞および分子機能と、IPAによって明らかにされた標準経路との間には、特に免疫シグナル伝達および細胞骨格および細胞増殖機能に関して、ある程度の一致が見られた。

【0117】

例示的な態様

以下の例示的な態様を本明細書において提供する。

【0118】

セットI:

態様I-1。

ペプチドサンプルを調製する方法であって、

(a) 妊娠24週または34週前後の妊娠対象からの血液、血清または血漿サンプルを提供する段階;

(b) 微粒子濃縮画分を生成するために、該サンプルをサイズ排除カラムに負荷し、水を移動相として用いカラムから微粒子を溶出することにより該サンプルを微粒子について濃縮する段階;

(c) プロテアーゼと接触させることにより微粒子濃縮画分から微粒子関連ペプチド画分を調製する段階;

(d) 質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階; ならびに

(e) 質量分析シグナルに基づいて、

(i) 該血液サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表1、表3または表5のタン

パク質バイオマーカー；および

(ii) 該血液サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカーから選択される1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの各々に対応する1つまたは複数のペプチドを測定する段階を含む、前記方法。

【0119】

態様I-2。

前記1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが複数のタンパク質バイオマーカーである、態様I-1の方法。

【0120】

態様I-3。

前記バイオマーカーが10、9、8、7、6、5、4または3種以下のタンパク質バイオマーカーのパネルを含む、態様I-1の方法。

【0121】

態様I-4。

前記バイオマーカーが、

(i) 前記血液サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表7のバイオマーカーパネル；および

(ii) 前記血液サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表8のタンパク質バイオマーカーから選択されるバイオマーカーのパネルを含むか、該パネルから本質的になるか、または該パネルからなる、態様I-1の方法。

【0122】

態様I-5。

前記1つまたは複数のペプチドを測定する段階が、図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14D、図15A~15Bのいずれかの代替バイオマーカーを測定することを含む、態様I-1の方法。

【0123】

態様I-6。

前記妊娠対象が癒着胎盤の1つまたは複数のリスク因子を有する、態様I-1の方法。

【0124】

態様I-7。

前記妊娠対象が初妊婦、経妊婦、初産婦または経産婦である、態様I-1の方法。

【0125】

態様I-8。

前記血液サンプルが血漿または血清である、態様I-1の方法。

【0126】

態様I-9。

水が脱イオン蒸留水(「ddH₂O」)である、態様I-1の方法。

【0127】

態様I-10。

サイズ排除クロマトグラフィーが、アガロース固相および水性液相を用いて行われる、態様I-1の方法。

【0128】

態様I-11。

前記調製する段階が、限外ろ過または逆相クロマトグラフィーを使用することをさらに含む、態様I-1の方法。

【0129】

態様I-12。

前記調製する段階が、尿素を用いた変性、ジチオスレイトールを用いた還元、ヨードアセタミンを用いたアルキル化、およびサイズ排除クロマトグラフィー後のトリプシンを用いた消化をさらに含む、態様I-1の方法。

【0130】

態様I-13。

微粒子が、胎盤由来エクソソームまたは血管内皮由来エクソソームを濃縮するためにさらに精製される、態様I-1の方法。

【0131】

態様I-14。

質量分析が、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)、例えば、液体クロマトグラフィー/トリプル四重極質量分析を含む、態様I-1の方法。 10

【0132】

態様I-15。

質量分析が多重反応モニタリングを含む、態様I-1の方法。

【0133】

態様I-16。

前記ペプチドが、

(i) 前記血液サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表7のバイオマーカーパネル; および

(ii) 前記血液サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表8のタンパク質バイオマーカー 20

から選択される、態様I-1の方法。

【0134】

態様I-17。

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー;

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー;

(iii) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー; および

(iv) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー

から選択される複数の実質的に純粋なタンパク質バイオマーカーまたは代替バイオマーカーを含む、パネル。 30

【0135】

態様I-18。

前記代替バイオマーカーの各々とペアになっている安定同位体標準物質ペプチドをさらに含む、態様I-17のパネル。

【0136】

態様I-19。

1つまたは複数の容器を含むキットであって、各容器が複数の安定同位体標準物質の各々の1つまたは複数を含み、各安定同位体標準物質が、

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー;

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー 40

(iii) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー; および

(iii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー

から選択されるバイオマーカーのパネルからのバイオマーカーに対する代替ペプチドに対応する、前記1つまたは複数の容器を含むキット。

【0137】

態様I-20。

1対または複数対のポリペプチドを含む組成物であって、各対が、

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー;

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー

(iii) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー; および 50

(iii) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカーから選択されるタンパク質バイオマーカーまたは代替バイオマーカーを含む、前記組成物。

【0138】

態様I-21。

本明細書において記述される方法によって生成された分類規則を実施するためのコードを含む、有形の非一時的な形式のコンピュータ可読媒体。

【0139】

態様I-22。

以下を含むシステム：

(a) コンピュータであって、

(i) プロセッサと

(ii) プロセッサに結合されたメモリであって、

(1) 画分中の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの測度を示す値を含む、対象からのサンプルの試験データであって、該タンパク質バイオマーカーが、

(i) 該サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) 該サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー

から選択される、

前記対象からのサンプルの試験データ；

(2) 測定値を含む値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度を有するように構成されている、該分類規則；ならびに

(3) 該試験データに対して該分類規則を実施するためのコンピュータ実行可能命令を含むモジュールを記憶する、前記メモリと

を含む、前記コンピュータ。

【0140】

態様I-23。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(iii) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；および

(iii) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカーから選択される代替バイオマーカーである、態様I-22のシステム。

【0141】

態様I-24。

(a) プロセッサと、プロセッサに結合されたメモリとを含むコンピュータシステムであって、メモリが、

(1) 画分中の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの測度を示す値を含む、対象からのサンプルの試験データであって、該タンパク質バイオマーカーが、

(i) サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー

から選択される、

前記対象からのサンプルの試験データ；

(2) 測定値を含む値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する、プロセッサによって実行される分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度を有するように構成されている、該分類規則；

を含むモジュールを記憶している、

前記コンピュータシステムで

(b) テキストデータにアクセスする段階; ならびに

(c) 前記試験データに対して前記分類規則を実行する段階を含む、方法。

【0142】

態様I-25。

妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する方法であって、

(a) 妊娠対象からの血液サンプルから微粒子濃縮画分を調製する段階;

(b) 画分中の1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーの測度を決定する段階であって、タンパク質バイオマーカーが、

(i) 該血液サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー; および

(ii) 該血液サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー

から選択される、段階;

(c) 1つまたは複数の測度に基づいて癒着胎盤のリスクを評価する段階を含む、前記方法。

【0143】

態様I-26。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(iii) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー; および

(iii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、態様I-25の方法。

【0144】

態様I-27。

定量的測度を決定する段階が、各捕捉試薬が前記タンパク質バイオマーカーの1つに特異的に結合する、1つまたは複数の捕捉試薬と前記サンプルを接触させること、および前記タンパク質バイオマーカーにおける捕捉試薬間の結合を検出することを含む、態様I-25の方法。

【0145】

態様I-28。

免疫アッセイを行うことを含む、態様I-27の方法。

【0146】

態様I-29。

免疫アッセイが酵素免疫アッセイ(EIA)、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)および放射免疫アッセイ(RIA)からなる群より選択される、態様I-28の方法。

【0147】

態様I-30。

前記評価する段階が分類規則を実行することを含み、この規則は癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、該分類規則の実行が少なくとも0.05未満のp値での癒着胎盤または満期産の間の相関をもたらす、態様I-25の方法。

【0148】

態様I-31。

前記評価する段階が分類規則を実行することを含み、この規則は癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、該分類規則の実行が受信者動作特性(ROC)曲線を生成し、ROC曲線が少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8または少なくとも0.9の曲線下面積(AUC)を有する、態様I-25の方法。

【0149】

態様I-32。

分類規則が対象を分類する値が、前置胎盤、以前の帝王切開分娩、子宮内膜切離、体外

10

20

30

40

50

受精、前の子宮感染症または以前の子宮手術の少なくとも1つをさらに含む、態様I-25の方法。

【0150】

態様I-33。

分類規則がカットオフ、線形回帰(例えば、多重線形回帰(MLR)、部分最小二乗(PLS)回帰、主成分回帰(PCR))、二分決定木(例えば、CART - 分類および回帰木などの再帰的分割プロセス)、誤差逆伝播法ネットワークなどの人工ニューラルネットワーク、判別分析(例えば、ベイジアン分類器またはフィッシャー分析)、ロジスティック分類器、ならびにサポートベクター分類器(例えば、サポートベクターマシン)を採用する、前記態様のいずれかの方法。

10

【0151】

態様I-34。

分類規則が、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%の感度、特異度、陽性的中率または陰性的中率を有するように構成されている、態様I-25の方法。

【0152】

態様I-35。

前記タンパク質バイオマーカーが(上方制御される場合)閾値レベルを上回っていること、または(下方制御される場合)閾値レベルを下回っていることを判定することを、癒着胎盤のリスクの増加を評価する段階が含む、態様I-25の方法。

20

【0153】

態様I-36。

閾値レベルが、少なくとも50人、少なくとも100人または少なくとも200人の対照対象から決定されたタンパク質の中心傾向の測度(例えば、平均値、中央値または最頻値)からの少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つのzスコアのレベルを表す、態様I-35の方法。

【0154】

態様I-37。

前記評価する段階が、パネル中の各タンパク質の測度を参照標準と比較することを含む、態様I-25の方法。

30

【0155】

態様I-38。

妊娠対象の癒着胎盤のリスクを医療提供者に伝えることをさらに含む、態様I-25の方法。

【0156】

態様I-39。

妊娠対象における癒着胎盤を処置する方法であって、

(a) 態様I-25～I-38のいずれか一項の方法によって妊娠対象の癒着胎盤のリスクを評価する段階; ならびに

(b) 癒着胎盤のリスクを減少させる、および/または癒着胎盤の新生児合併症を低減させるのに有効な治療的介入を該対象に施す段階を含む、前記方法。

40

【0157】

態様I-40。

処置することが、

(i) 高度の集学的な外科的専門知識および経験を有する医療施設に前記対象を紹介すること;

(ii) 外科的子宮温存; ならびに

(iii) 子宮切除帝王切開を行うこと、予防的塞栓術を行うこと、子宮バルーンタンポナーデ、一時的内腸骨閉塞バルーンカテーテル、尿管ステントを挿入すること、メトトレキ

50

セートを投与すること、胎盤の一部を原位置に残すこと、および早産を予防するために前記対象に床上安静を指図すること

からなる群より選択される治療的介入を含む、態様I-39の方法。

【0158】

態様I-41。

本明細書において記述される方法によって癒着胎盤のリスクの増加を有すると判定された妊娠対象に、癒着胎盤のリスクを低減するのに有効な治療的介入を施す段階を含む、方法。

【0159】

態様I-42。

癒着胎盤のリスクを低減するようにデザインされた処置の有効量を妊娠対象に施す方法であって、対象が、

(i) 血液サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) 血液サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー

から選択されるタンパク質バイオマーカーのパネルのいずれか1つの参照標準と比較して変化した定量的測度を有する、

前記方法。

【0160】

態様I-43。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；および

(ii) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、態様I-42の方法。

【0161】

態様I-44。

(a) 100超、1000超、10,000超または100,000超のデータエントリを含むデータセットを生成するために、タンパク質のペプチド断片を含む生物学的サンプルからの100超、1000超、10,000超または100,000超のペプチドの質量を質量分析によって測定する段階；

(b) 1つまたは複数のプロセッサ、および該1つまたは複数のプロセッサによる実行のためのプログラムを記憶しているメモリを含むコンピュータシステムで、

(1) 該データエントリの中から、該質量に基づき、

(i) 該生物学的サンプルが妊娠約24週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) 該生物学的サンプルが妊娠約34週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

に対するペプチドを同定する段階、

(2) 同定されたペプチドの測度に対して分類規則を実行する段階であって、分類規則が、癒着胎盤のリスクが増加した対象からであると該サンプルを分類する、段階を含む、方法。

【0162】

セットII:

【0163】

態様II-1。

妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する方法であって、

(a) 妊娠約20週～妊娠約37週の妊娠対象からのサンプルを提供する段階；

(b) 該サンプルから微粒子関連ペプチド画分を調製する段階；

(c) 該画分中の複数のタンパク質バイオマーカーを測定する段階；および

10

20

30

40

50

(d) 癒着胎盤のリスクが増加した対象からであると該サンプルを分類する分類規則を、(c)の1つまたは複数の測定値に対して実行する段階を含む、前記方法。

【0164】

態様II-2。

前記タンパク質バイオマーカが10、9、8、7、6、5、4または3種以下のタンパク質バイオマーカのパネルを含む、態様II-1の方法。

【0165】

態様II-3。

前記タンパク質バイオマーカが、

(i) 表7のバイオマーカパネル; および

(ii) 表8のタンパク質バイオマーカ

から選択されるバイオマーカのパネルを含むか、該パネルから本質的になるか、または該パネルからなる、態様II-1の方法。

【0166】

態様II-4。

前記複数のタンパク質バイオマーカが、

(i) 表1、表3および表5からの複数のタンパク質バイオマーカ;

(ii) 表2、表4および表6からの複数のタンパク質バイオマーカ;

(iii) 表9からの複数のタンパク質バイオマーカ;

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の、2つもしくはそれ以上; または

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質の、2つもしくはそれ以上

を含む、態様II-1の方法。

【0167】

態様II-5。

前記複数のバイオマーカを測定する段階が図10A~10C、図11A~11C、図12A~12H、図13A~13H、図14A~14Dおよび図15A~15Bの関連する代替バイオマーカを測定することを含む、態様II-1の方法。

【0168】

態様II-6。

前記妊娠対象が癒着胎盤の1つまたは複数のリスク因子を有する、態様II-1の方法。

【0169】

態様II-7。

前記妊娠対象が初妊婦、経妊婦、初産婦または経産婦である、態様II-1の方法。

【0170】

態様II-8。

前記サンプルが血液サンプルである、態様II-1の方法。

【0171】

態様II-9。

前記サンプルが血漿または血清である、態様II-1の方法。

【0172】

態様II-10。

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカ;

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカ;

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカ;

(iv) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカ;

10

20

30

40

50

(v) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー;

(vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1); ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択される複数の実質的に純粋なタンパク質バイオマーカーまたは代替バイオマーカーを含む、パネル。

【0173】

態様II-11。

図10A～10C、図11A～11C、図12A～12H、図13A～13H、図14A～14Dおよび図15A～15Bの前記代替バイオマーカーの各々とペアになっている、安定同位体標準物質ペプチド

をさらに含む、態様II-10のパネル。

【0174】

態様II-12。

ペプチドサンプルを調製する方法であって、

(a) 妊娠約20週～妊娠約37週の妊娠対象からのサンプルを提供する段階;

(b) 微粒子濃縮画分を生成するために、該サンプルをサイズ排除カラムに負荷し、水を移動相として用いカラムから微粒子を溶出することにより、微粒子について該サンプルを濃縮する段階;

(c) 微粒子濃縮画分をプロテアーゼと接触させることにより微粒子濃縮画分から微粒子関連ペプチド画分を調製する段階;

(d) 質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階; および

(e) 質量分析シグナルに基づいて、1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーに対応する1つまたは複数のペプチドを測定する段階

を含む、前記方法。

【0175】

態様II-13。

1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが複数のタンパク質バイオマーカーを含む、態様II-12の方法。

【0176】

態様II-14。

タンパク質バイオマーカーが10、9、8、7、6、5、4または3種以下のタンパク質バイオマーカーのパネルを含む、態様II-12の方法。

【0177】

態様II-15。

タンパク質バイオマーカーが、

(i) 表7のバイオマーカーパネル; および

(ii) 表8のタンパク質バイオマーカー

から選択されるバイオマーカーのパネルを含むか、該パネルから本質的になるか、または該パネルからなる、態様II-12の方法。

【0178】

態様II-16。

タンパク質バイオマーカーが、

(i) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の、1つもしくは複数; または

(ii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質の、1つも

10

20

30

40

50

しくは複数
を含む、態様II-12の方法。

【0179】

態様II-17。

前記1つまたは複数のペプチドを測定する段階が、図10A～10C、図11A～11C、図12A～12H、図13A～13H、図14A～14Dおよび図15A～15Bのいずれかの代替バイオマーカーを測定することを含む、態様II-12の方法。

【0180】

態様II-18。

前記妊娠対象が癒着胎盤の1つまたは複数のリスク因子を有する、態様II-12の方法。

【0181】

態様II-19。

前記妊娠対象が初妊婦、経妊婦、初産婦または経産婦である、態様II-12の方法。

【0182】

態様II-20。

血液サンプルが血漿または血清である、態様II-12の方法。

【0183】

態様II-21。

水が脱イオン蒸留水である、態様II-12の方法。

【0184】

態様II-22。

サイズ排除カラムがアガロース固相および水性液相を含む、態様II-12の方法。

【0185】

態様II-23。

微粒子関連ペプチド画分を調製する段階が、限外ろ過または逆相クロマトグラフィーを用いることをさらに含む、態様II-12の方法。

【0186】

態様II-24。

微粒子関連ペプチド画分を調製する段階が、尿素を用いた微粒子濃縮画分の変性、ジチオスレイトールを用いた微粒子濃縮画分の還元、ヨードアセタミンを用いた微粒子濃縮画分のアルキル化、およびトリプシンを用いた微粒子濃縮画分の消化をさらに含む、態様II-12の方法。

【0187】

態様II-25。

微粒子について前記サンプルを濃縮する段階が、胎盤由来エクソソームまたは血管内皮由来エクソソームについて濃縮するために微粒子をさらに精製することを含む、態様II-12の方法。

【0188】

態様II-26。

質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階が、液体クロマトグラフィー/トリプル四重極質量分析を含む液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)によって微粒子関連ペプチドを分離することを含む、態様II-12の方法。

【0189】

態様II-27。

質量分析によって微粒子関連ペプチドを分離する段階が、多重反応モニタリングを含む質量分析を含む、態様II-12の方法。

【0190】

態様II-28。

前記1つまたは複数のペプチドが、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表7のバイオマーカーパネル；お

10

20

30

40

50

よび

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表8のタンパク質バイオマーカーから選択される、態様II-12の方法。

【0191】

態様II-29。

1つまたは複数の容器を含むキットであって、各容器が複数の安定同位体標準物質の各々の1つまたは複数を含み、各安定同位体標準物質が、

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー；

(v) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー；

(vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)；ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択されるバイオマーカーのパネルからのバイオマーカーに対する代替ペプチドに対応する、前記1つまたは複数の容器を含むキット。

【0192】

態様II-30。

1対または複数対のポリペプチドを含む組成物であって、ポリペプチドの各対が、

(i) 表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー；

(v) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー；

(vi) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)；ならびに

(vii) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)およびIg様ドメイン含有タンパク質から選択される1つもしくは複数のタンパク質バイオマーカーまたは1つもしくは複数の代替バイオマーカーを含む、前記組成物。

【0193】

態様II-31。

癒着胎盤のリスクがある第1のグループまたは癒着胎盤のリスクがない第2のグループに分類された1人または複数人の妊娠対象に由来するバイオマーカー測定値の1つまたは複数のデータセットの分析によって生成された1つまたは複数の分類規則を実施するコードを含む、有形の非一時的な形式のコンピュータ可読媒体。

【0194】

態様II-32。

以下を含むシステム：

(a) コンピュータであって

(i) プロセッサと

(ii) プロセッサに結合されたメモリであって、

(1) 1つまたは複数の値を含む、対象からのサンプルの試験データであって、各値が微粒子関連ペプチドの画分中の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの測定値を示し、該1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーが、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタ

10

20

30

40

50

ンパク質バイオマーカー；

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

から選択される、

前記対象からのサンプルの試験データ；

(2) 各値が前記測定値を示す1つまたは複数の値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度値を有するように構成されている、該分類規則；ならびに

(3) 該試験データに対して該分類規則を実施するためのコンピュータ実行可能命令を含むモジュールを記憶する、前記メモリと

を含む、前記コンピュータ。

【0195】

態様II-33。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー；および

(ii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、態様II-32のシステム。

【0196】

態様II-34。

(a) 試験データをコンパイルするためにコンピュータシステムを使用する段階であって、該コンピュータシステムが、プロセッサおよびプロセッサに結合されたメモリを含み、該メモリが、

(1) 微粒子関連ペプチドの画分中の本開示の1つまたは複数のタンパク質バイオマーカーの1つまたは複数の測定値を示す値を含む、対象からのサンプルの試験データ；

(2) 該1つまたは複数の測定値を含む値に基づき、対象を癒着胎盤のリスクが増加していると分類する、プロセッサによって実行される分類規則であって、少なくとも75%、少なくとも85%または少なくとも95%の感度を有するように構成されている、該分類規則

を含むモジュールを記憶する、段階；

(b) 前記試験データにアクセスする段階；ならびに

(c) 前記試験データに対して該分類規則を実行する段階

を含む、方法。

【0197】

態様II-35。

妊娠対象における癒着胎盤のリスクを評価する方法であって、

(a) 妊娠対象からの血液サンプルから微粒子濃縮画分を調製する段階；

(b) 微粒子濃縮画分中の1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーの定量的測度を決定する段階であって、該1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーが、

(i) 該血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 該血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

10

20

30

40

50

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー;

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数; ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

から選択される、段階; ならびに

(c) 1つまたは複数の定量的測度に基づいて癒着胎盤のリスクを評価する段階を含む、前記方法。

10

【0198】

態様II-36。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A~10C、図11A~11Cまたは図12A~12Hの代替バイオマーカー;

(ii) 図13A~13H、図14A~14Dまたは図15A~15Bの代替バイオマーカー;

(iii) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の代替バイオマーカー; ならびに

(iv) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の代替バイオマーカー

20

から選択される代替バイオマーカーである、態様II-35の方法。

【0199】

態様II-37。

1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーの前記定量的測度を決定する段階が、

各捕捉試薬が前記タンパク質バイオマーカーの1つに特異的に結合する1つまたは複数の捕捉試薬と、前記サンプルを接触させること、および

該捕捉試薬と前記タンパク質バイオマーカーとの結合を検出することを含む、態様II-35の方法。

30

【0200】

態様II-38。

1つまたは複数の微粒子関連タンパク質バイオマーカーの前記定量的測度を決定する段階が、免疫アッセイを行うことを含む、態様II-37の方法。

【0201】

態様II-39。

免疫アッセイが酵素免疫アッセイ(EIA)、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)および放射免疫アッセイ(RIA)からなる群より選択される、態様II-38の方法。

【0202】

態様II-40。

40

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が分類規則を実行することを含み、該分類規則が癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、かつ該分類規則の実行が少なくとも0.05未満のp値での癒着胎盤または満期産の間の相関をもたらす、態様II-35の方法。

【0203】

態様II-41。

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が分類規則を実行することを含み、該分類規則が癒着胎盤のリスクがあると前記対象を分類し、かつ該分類規則の実行が受信者動作特性(ROC)曲線を生成し、該ROC曲線が少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8または少なくとも0.9の曲線下面積(AUC)を有する、態様II-35の方法。

【0204】

50

態様II-42。

分類規則が、1つまたは複数の値に基づき対象を分類し、該1つまたは複数の値が、前置胎盤、以前の帝王切開分娩、子宮内膜切離、体外受精、前の子宮感染症または以前の子宮手術の、少なくとも1つをさらに含む、態様II-35の方法。

【0205】

態様II-43。

前記分類規則が、カットオフ、多重線形回帰を含む線形回帰、部分的最小二乗回帰、主成分回帰、分類および回帰木をさらに含む再帰的分割プロセスを含む二分決定木、誤差逆伝播法ネットワークを含む人工ニューラルネットワーク、ベイジアン分類器またはフィッシャー分析をさらに含む判別分析、ロジスティック分類器、ならびにサポートベクターマシンを含むサポートベクター分類器を採用する、態様II-25～32の方法。

【0206】

態様II-44。

分類規則が、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%の感度値、特異度値、陽性的中率または陰性的中率を有するように構成されている、態様II-35の方法。

【0207】

態様II-45。

前記タンパク質バイオマーカーが、上方制御される場合、閾値レベルを上回っていること、または下方制御される場合、閾値レベルを下回っていることを判定することを、癒着胎盤のリスクを評価する段階が含む、態様II-35の方法。

【0208】

態様II-46。

前記閾値レベルが、少なくとも50人、少なくとも100人または少なくとも200人の対照対象から決定された前記タンパク質バイオマーカーの平均値、中央値または最頻値を含む中心傾向の測度からの少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つのzスコアのレベルを表す、態様II-45の方法。

【0209】

態様II-47。

前記癒着胎盤のリスクを評価する段階が、パネル中の各タンパク質バイオマーカーの前記1つまたは複数の定量的測度を参照標準と比較することを含む、態様II-35の方法。

【0210】

態様II-48。

妊娠対象の癒着胎盤のリスクを医療提供者に伝える段階をさらに含む、態様II-35の方法。

【0211】

態様II-49。

妊娠対象における癒着胎盤を処置する方法であって、

(a) 態様II-1～9および35～48のいずれか1つの方法によって妊娠対象の癒着胎盤のリスクを評価する段階; ならびに

(b) 癒着胎盤のリスクを減少させる、および/または癒着胎盤の新生児合併症を低減させるのに有効な治療的介入を前記対象に施す段階を含む、前記方法。

【0212】

態様II-50。

前記治療的介入を施す段階が、

(i) 高度の集学的な外科的専門知識および経験を有する医療施設に前記対象を紹介すること;

(ii) 外科的子宮温存を計画すること; ならびに

(iii) 子宮切除帝王切開を行うこと、予防的塞栓術を行うこと、子宮バルーンタンポナ

10

20

30

40

50

ーデ、一時的内腸骨閉塞バルーンカテーテル、尿管ステントを挿入すること、メトトレキセートを投与すること、胎盤の一部を原位置に残すこと、および早産を予防するために前記対象に床上安静を指図すること

からなる群より選択される治療的介入を含む、態様II-49の方法。

【0213】

態様II-51。

態様II-1～9および35～48のいずれか1つの方法によって癒着胎盤のリスクの増加を有すると判定された妊娠対象に、癒着胎盤のリスクを低減するのに有効な治療的介入を施す段階を含む、方法。

【0214】

態様II-52。

癒着胎盤のリスクを低減するようにデザインされた処置の有効量を妊娠対象に施す方法であって、該対象が、

(i) 血液サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；

(ii) 血液サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

から選択されるタンパク質バイオマーカーのパネルのいずれか1つの参照標準と比較して、変化した定量的測度を有する、前記方法。

【0215】

態様II-53。

前記タンパク質バイオマーカーが、

(i) 図10A～10C、図11A～11Cまたは図12A～12Hの代替バイオマーカー；

(ii) 図13A～13H、図14A～14Dまたは図15A～15Bの代替バイオマーカー；

(iii) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の代替バイオマーカー；ならびに

(iv) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の代替バイオマーカー

から選択される代替バイオマーカーである、態様II-52の方法。

【0216】

態様II-54。

(a) 100超、1000超、10,000超または100,000超のデータエントリを含むデータセットを生成するために、タンパク質のペプチド断片を含む生物学的サンプルからの100超、1000超、10,000超または100,000超のペプチドの質量を質量分析によって測定する段階；

(b) 1つまたは複数のプロセッサと、該1つまたは複数のプロセッサによる実行のためのプログラムを記憶しているメモリとを含むコンピュータシステムを、

(1) 該データエントリの中から、該質量に基づき、

(i) 該生物学的サンプルが妊娠約20週の時点で採取される、表1、表3または表5のタンパク質バイオマーカー；および

(ii) 該生物学的サンプルが妊娠約37週の時点で採取される、表2、表4または表6

10

20

30

40

50

のタンパク質バイオマーカー；

(iii) 表9のタンパク質バイオマーカー；

(iv) イスミン-2 (ISM2)、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)、ヒストンH4 (H4)、ヘモグロビンサブユニットガンマ-2 (HBG2)および/または軟骨酸性タンパク質1 (CRAC1)の1つまたは複数；ならびに

(v) イスミン-2 (ISM2)、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ1 (UBP1)、免疫グロブリンラムダ可変10-54 (LVX54)および/またはIg様ドメイン含有タンパク質の1つまたは複数

に対応するペプチドを同定すること、

(2) 癒着胎盤のリスクが増加した対象からであると該サンプルを分類する分類規則を、同定されたペプチドの1つまたは複数の測定値に対して、実行すること

において使用する段階を含む、方法。

【0217】

本明細書において用いられる場合、特に明記しない限り、以下の意味が適用される。単語「してもよい(may)」は、強制的な意味(すなわち、mustを意味する)というよりはむしろ、許容的な意味(すなわち、可能性を有することを意味する)で用いられる。単語「含む(include)」、「含む(including)」および「含む(includes)」などは、限定されることなく、含むことを意味する。単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの要素」への言及は、「1つまたは複数」などの1つまたは複数の要素に対する他の用語および語句の使用にもかかわらず、2つ以上の要素の組み合わせを含む。語句「少なくとも1つ」は、「1つまたは複数(one or more)」、「1つまたは複数(one or a plurality)」および「複数(a plurality)」を含む。用語「または」は、他に示されない限り、非排他的であり、すなわち、「および」および「または」の両方を包含する。修飾語と一連のものとの間の用語「のいずれか」は、修飾語が一連のもの各メンバーを修飾することを意味する。したがって、例えば、語句「1、2、または3の少なくともいずれか」は、「少なくとも1、少なくとも2、または少なくとも3」を意味する。用語「から本質的になる」は、主張される組み合わせの基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない列挙された要素および他の要素の包含をいう。特に明記しない限り、値に関する「約」という用語は、その値の90%~110%またはその値の95%~105%をいう。

【0218】

説明および図面は、本発明を開示された特定の形態に限定することを意図するものではなく、逆に、その意図は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨および範囲内に入る全ての修正、均等物および代替物を網羅することであることを理解されたい。本発明のさまざまな局面のさらなる修正および代替の態様は、この説明を考慮すれば当業者には明らかであろう。したがって、この説明および図面は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実施する一般的な方法を当業者に教示する目的のためのものである。本明細書において示され説明される本発明の形態は、態様の例として解釈されるべきであることを理解されたい。本発明のこの説明の恩典を得た後に当業者にいずれも明らかになるように、要素および材料は、本明細書において図示および記述された要素および材料に置き換えられてもよく、部品およびプロセスは逆にされても省略されてもよく、本発明の特定の特徴は独立して利用されてもよい。以下の特許請求の範囲に記述される本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書において記述される要素に変更を加えることができる。本明細書において用いられる見出しは、構成上の目的のためだけのものであり、説明の範囲を限定するために用いられることを意味しない。

10

20

30

40

50

【図 1 C】

番号	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (通名)
12	sp:Q69891.HBG1	HBG1_HUMAN	ヘモグロビンサブユニット α -1 (ガンマ-1) (アンメイト-1) (Hb F 1 α サブユニット) (ヘモグロビンF 1 α サブユニット) (ヘモグロビンはエム-140)	HBBG1_HBG02979	ホモサピエンス (ヒト)	HBBG1
13	tr:Q69891.GS5238		特異化されていない タンパク質Q697686A0568	DNF7sp86A0568	ホモサピエンス (ヒト)	
14	sp:Q69891.GS5238		セルロブラスミン, フェロキシダーゼ	CP	ホモサピエンス (ヒト)	
15	sp:Q00838.PSG4	PSG4_HUMAN	妊娠特異的ペーテーター 糖タンパク質4, PS-ベータ-4, PSB-4, 妊娠特異的糖タンパク質4 (妊娠特異的ペーテーター 糖タンパク質4, PS-4, PSB-4, 妊娠特異的糖タンパク質4)	PSGA.CG04, PSG9	ホモサピエンス (ヒト)	PSG4 CG04, PSG9

【図 1 D】

番号：中央値と標準偏差、 マーカーはランク1回値 ($\alpha = 1$) を用いてランク付けされている	エントリー	エンタリ名	ランク1回値	遺伝子名	生物	遺伝子名 (塩基)	遺伝子名(別名)
16	G262627.1666172 G262627.1666172		C3(C5)コンパターゼ、 核膜因子B、 核膜因子B 配座片、 核膜因子B 配座片		ホモサチエンス (ヒト)		
17	G262627.1666172 G262627.1666172		1α,25(OH) ₂ D ₃ 受容体	lgH	ホモサチエンス (ヒト)		
18	sp:ADACDH42.24922 g	HVE20_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变区-20	IGHV3-20	ホモサチエンス (ヒト)	IGHV3-20	
19	G262627.1666172 G262627.1666172		ミトコンドリア 免疫グロブリン カプシド(膜可変領域)		ホモサチエンス (ヒト)		
20	sp:P23538.COF1 P23538	COF1_HUMAN	コファリン1 (8-10kD)調節タンパク質 (p80 コファリン、 調節タンパクフォーム)	CFI1, CFI	ホモサチエンス (ヒト)	CFI1	CFI

【図 2 A】

種2: 中央産34歳サンプル。 マーカ―はランソノ固着 ($n = 1$) を用いたラン付けされている	エントリ	エントリ名	ラン付け番号	遺伝子名	生物	遺伝子名 (別名)
1	49-0547482.URP1	USP1_HUMANA	USP1_HUMANA N	USP1	ホモサピエンス (ヒト)	USP1
2	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
3	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
4	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
5	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
6	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
7	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503
8	49-049474.UM2	UM2_HUMAN	UM2_HUMAN N	ISM2, TALL, TH503, PSC03137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2 TALL, TH503

【図 2 B】

番号	中核遺伝子番号(シナプソーム番号)	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (別名)
9	9p-A0A0759B5.1.V139	9p-A0A0759B5.1	UV29_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可变 3-9	IGHV3-9	ホモサピエンス (ヒト)	
10	9p-A0A0759KQ5.1.V026	9p-A0A0759KQ5.1	IGH06_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变 3-64	IGHV3-64	ホモサピエンス (ヒト)	
11	9p-A0A0759ER1.1.V140	9p-A0A0759ER1.1	IGH06_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变 4-4	IGHV4-4	ホモサピエンス (ヒト)	
12	9p-A0A0759K52.1.V029	9p-A0A0759K52.1	KVD29_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可变 20-29	IGHV2D-29	ホモサピエンス (ヒト)	
13	9p-A0A0759KX0.1.V070	9p-A0A0759KX0.1	KVD08_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可变 19-8	IGHV1D-8	ホモサピエンス (ヒト)	
14	9p-A0A0640R28.1.V011	9p-A0A0640R28.1	KVD11_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可变 3D-11	IGHV3D-11	ホモサピエンス (ヒト)	
15	9p-A0A0640MS14.1.V114	9p-A0A0640MS14.1	IGHV15_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变 1-45	IGHV1-45	ホモサピエンス (ヒト)	
16	9p-A0A0640K735.1.V027	9p-A0A0640K735.1	KVD21_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可变 6D-21	IGHV6D-21	ホモサピエンス (ヒト)	
17	9p-A0A0640L117.1.V001	9p-A0A0640L117.1	IGH601_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变 6-1	IGHV6-1	ホモサピエンス (ヒト)	
18	9p-A0A0640L112.1.V025	9p-A0A0640L112.1	IGH226_HUMAN	免疫グロブリン重鎖可变 2-26	IGHV2-26	ホモサピエンス (ヒト)	

【図 2 C】

表2: 中央値が連続的 上位50位のタンパク質マーカー		エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名(別名)
5	sp-P11142 HSP70 *	P11142	HSP70_HUMAN N	HSPA8 HSC70 HSP70 HSP410	HSPA8	ホモサピエンス (ヒト)	HSPA8	
6	sp-P13727 PRG2	P13727	PRG2_HUMAN N	PRG2 MRP	PRG2	ホモサピエンス (ヒト)	PRG2	
7	sp-P15801 AOC1 *	P15801	AOC1_HUMAN N	AOC1 ABP1 DAO1	AOC1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1 DAO1
8	sp-P15801 AOC1	P15801	AOC1_HUMAN N	AOC1 ABP1 DAO1	AOC1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1 DAO1

【図 3 B】

表3: 中央値が連続的 上位50位のタンパク質マーカー		エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名(別名)
5	sp-P11142 HSP70 *	P11142	HSP70_HUMAN N	HSPA8 HSC70 HSP72 HSP410	HSPA8	ホモサピエンス (ヒト)	HSPA8	HSC70 HSP70 HSP410
6	sp-P13727 PRG2	P13727	PRG2_HUMAN N	PRG2 MRP	PRG2	ホモサピエンス (ヒト)	PRG2	MRP
7	sp-P15801 AOC1 *	P15801	AOC1_HUMAN N	AOC1 ABP1 DAO1	AOC1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1 DAO1
8	sp-P15801 AOC1	P15801	AOC1_HUMAN N	AOC1 ABP1 DAO1	AOC1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1 DAO1

*表1にも見られるマーカー

【図 3 A】

表3: 中央値が連続的 上位50位のタンパク質マーカー		エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名(別名)
1	sp-P01917 BSM2 *	P01917	BSM2_HUMAN	BSM2 TAIL1 T45D3 PRS0117	BSM2	ホモサピエンス (ヒト)	BSM2	TAIL1 THS03
2	sp-P01917 BSM2	P01917	BSM2_HUMAN	BSM2 TAIL1 T45D3 PRS0117	BSM2	ホモサピエンス (ヒト)	BSM2	TAIL1 THS03
3	sp-P01917 BSM2	P01917	BSM2_HUMAN	BSM2 TAIL1 T45D3 PRS0117	BSM2	ホモサピエンス (ヒト)	BSM2	TAIL1 THS03
4	sp-P01917 BSM2	P01917	BSM2_HUMAN	BSM2 TAIL1 T45D3 PRS0117	BSM2	ホモサピエンス (ヒト)	BSM2	TAIL1 THS03

*表1にも見られるマーカー

【図 3 D】

表3：中央核線以遠時の 上位50位のタンパク質マーカー		エントリー	エントリー名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
13	E2A023.A2M6 E2A023.A2M6			B細胞受容体重鎖可变領域		ホモサピエンス (ヒト)		
14	E2A023.A2M6 E2A023.A2M6			特異化されていない タンパク質のE2A023.A2M6	D6F2A86A0588	ホモサピエンス (ヒト)		
15	sp-Q9N1E3.SMC4	Q9N1E3	SMC4_HUMAN	染色体構造維持タンパク質4, SMCタンパク質4, SMC-4 (染色体構造維持タンパク質, Ndc80) (OOP-2相同体)	SMC4, C24C, SMC4L1	ホモサピエンス (ヒト)	SMC4	C24C, SMC4L1
16	sp-P04075.A2M6	P04075	A2M6_HUMAN	アルファマクログロブリン, A2M6 (C2結合型アルファマクログロブリン, ドメイン含有タンパク質5)	A2M, CPAMD5, P0407	ホモサピエンス (ヒト)	A2M	CPAMD5
17	sp-P04075.A2M6	P04075	A2M6_HUMAN	フルクトースミニラーゼ, アルドラーゼ, EC 4.1.2.13 (糖の6-リン酸化) (糖の6-リン酸化)	A2M6, A2M6	ホモサピエンス (ヒト)	A2M6	A2M6

【圖 3 E】

	第3：中央銀行連名の 上巻紙のランバウ裏マーカー	エントリ	エントリス	ランバウ裏名	通帳子名	生物	通帳子名 (注)	通帳子名(別名)
13	10P082769A00M	E2ZJG9	PON1_HUMAN N	アファミン、 アルファアラブミン、 アルファAlb	AfM_Alb2, AlbA	赤毛サビエンス (ヒト)	PON1	PON
19	10P082769P0N1	E2ZJG9	PON1_HUMAN N	血漿バウオキナーゼ/ アルカルエステラーゼI、 PON-1 EC 3.1.1.81, EC 3.1.8.1 (血清エステラーゼ) ル-エストラーゼII (K+4S) (血清アリールアルコール ホスファターゼII)	血漿バウオキナーゼ/ アルカルエステラーゼI、 PON-1 EC 3.1.1.81, EC 3.1.8.1 (血清エステラーゼ) ル-エストラーゼII (K+4S) (血清アリールアルコール ホスファターゼII)	赤毛サビエンス (ヒト)	PON1	PON
20	10P082769EFJA1	E2ZJG9	EFJA1_HUMAN N	伸延因子-アルファI、 ヒトアルファアミリン (伸延因子) (膜タンパク質) (4-1、 4F1-I) (白血球浸出液 クラスタンパク質)	EEFJA1, EEFJA, EFJA, LENG7	赤毛サビエンス (ヒト)	EEFJA1	EEFJA, EFJA, LENG7

【図 3 F】

表3: 中央機関と連携の 上位50名のタンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名(別名)
21	3629554.0936		血清セリンプロテアーゼ 阻害因子、 免疫因子 ブラシミン/ナグシ阻害因子 阻害因子3 知能名: PAI-3 知能名: 阻害名: 阻害名: PAI3 阻害因子 PAI3プロテイン阻害因子 阻害名: 阻害名: PAIセルヒン(Serpri) AS	SERPINA5, PGI, PLAINH3, PRCC1	ホモサピエンス (ヒト)		
22	3745056.4705054		精液受容体群、 D2 (精液D受容体) (エラスチン・バー ウィルズ受容体、 EBM受容体、 (D2阻害(D21)	精液受容体	ホモサピエンス (ヒト)		
23	36720023.02	PR2A3	CPA_HUMAN	CR2 CDR	ホモサピエンス (ヒト)	CR2	CR2
24	3674576.0944	3.674576	MA2A1_HUMAN AN	MAN2A1 MANA2	ホモサピエンス (ヒト)	MAN2A1	MANA2

【 図 3 G 】

第3: 中央部4連鎖の上65.50%のタンパク質マーカ	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (注4)	遺伝子名 (原名)
25	2505558		アングリオテンシン-10	AGT	ホモサピエンス (ヒト)		
26	2605552	HBC2_HUMAN	ヘモグロビン サブユニットガンマ2 (ガンマ-2- globin) (Hb F (成人)) (ヘモグロビン Fのα鎖) (ヘモグロビンをコードする遺伝子)	HBB2	ホモサピエンス (ヒト)	HBB2	
27	2705552	A1BG_HUMAN	アルファ1B-糖タンパク質 (アルファ1B-糖タンパク質)	A1BG	ホモサピエンス (ヒト)	A1BG	
28	2805558		αM1, F1537, E1 インター-αアルファ-1-トリプシン阻害因子 量産時に非常に類似		ホモサピエンス (ヒト)		
29	2905558		特異的付着膜でないタンパク質		ホモサピエンス (ヒト)		
30	3005558	PGK1_HUMAN	ホスホグリセリン酸 キナーゼ1, EC 2.7.1.3 (糖質分解経路遺伝子) (タンパク質) (糖質分解タンパク質2, ppg. 2)	PGK1	ホモサピエンス (ヒト)	PGK1	PGKA

【図 3 H】

番号	遺伝子名(英名)	遺伝子名(和名)	生物	遺伝子名	タンパク質名	エントリ名	エントリ
31	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	免疫グロブリン重鎖可変領域 マウシン反応性			
32	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	C/EBPコンバーゼ			
33	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	内訳プロテインの受容体、 活性モプロテインの受容体、 AP受容体、 内訳細胞プロテインの受容体、 Q. 抗体: Q201			
34	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	KAC-CL1 骨髄可変領域			
35	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	ホモサピエンス (ヒト)	インターアルファ (クロブリン)脂質分子H4 (脂質分子H4) 脂質分子H4 脂質分子H4			

【圖 3 I】

図3: 中央値が顕著の上位6位のタンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (生物)
36	16252.025.1E03		チキシン、ヘキサグラモニン、糖タンパク質	TNXB1, TNXB, TNXB, TNXB, TNXB2, X8	ホモサピエンス (ヒト)	
37	96-Q02859.NE01	NE01_HUMAN	ネオアニー(免疫グロブリンスーパーファミリー-002サブクラスメンバー)	NEO1, IGKC2, NGN	ホモサピエンス (ヒト)	NEO1 IGKC2, NGN
38	1549999.006.0F0406		Gc-グロブリン、グループ特異的脂肪酸、ヒタモン(糖タンパク質)	HEL-551	ホモサピエンス (ヒト)	
39	1667295.006.1E03		基底神経細胞ペリオン、糖タンパク質、コアラタンパク質、パーロカン	HSPQ2	ホモサピエンス (ヒト)	
40	99-Q08017.SPA1:	SPA11_HUMAN	セルピンA11	セルピンA11	ホモサピエンス (ヒト)	セルピンA11
41	1549999.006.1E03		cDNA FLJ83011 f.1a、クローニングID:7540		ホモサピエンス (ヒト)	

【図 3 J】

表3. 中央銀行提供の 上場50社のタンパク質マーカー	エンリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名(別名)
42	上場50社	sp.P10809.CH20	CH20_HUMAN (60 kDaシヤペロニン) (シヤペロニン-60, ORP60) (熱ショックタンパク質60, HSP-60, Hsp60, Hsc60) (ミトコンドリア マトリックスタンパク質P1) (90kDリン酸化タンパク質)	HSPD1 HSP60	ホモサピエンス (ヒト)	HSPD1	HSP60
43	上場50社	上場50社	糖質付与されてない タンパク質ORP58H15196	DWFZ680H15196	ホモサピエンス (ヒト)		
44	上場50社	上場50社	1重鎖可変領域	IGH	ホモサピエンス (ヒト)		
45	上場50社	sp.Q12805.FHLN3	IGH重鎖可变領域 細胞外タンパク質 タンパク質 (細胞外タンパク質-5) フィブリノゲン結合タンパク質 (フィブリノゲン, FIBL-2)	EEMF21 FHLN3 FBNL	ホモサピエンス (ヒト)	EEMF21	FBNL3 FBNL
46	上場50社	sp.A856411.FBL513	細胞膜タンパク質 細胞膜タンパク質 (細胞膜タンパク質-5) (細胞膜タンパク質-5) (細胞膜タンパク質-5) (細胞膜タンパク質-5)	FABP513 FABP513	ホモサピエンス (ヒト)	FABP513	FABP513

【図 3 K】

表3: 中央神経系神経の上流50位のタンパク質マーカー		エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名(別名)
47	3a-C60815-H2BK	P22689	H2BK_HUMAN	ヒストンH2BKタイプI、 H2B K (H2A-相互作用するヘリクス)	H2BC12 H2BTF, HIRBP1, HST1+ZBK	ホモサピエンス (ヒト)	H2BC12	H2BTF, HIRBP1, HST1+ZBK
				イヌリン様長鎖糖タンパク質、 H2B結合タンパク質、 H2B-3	IGFBP3 IBP3	ホモサピエンス (ヒト)	IGFBP3	IBP3
				フィブリノゲン1 FIBLN1	FILM1 PP2L3	ホモサピエンス (ヒト)	FILM1	
49	5a-P23147-FILN1	P22689	FILN1_HUMAN					
50	5a-Q5544-ICOSL			ICOSリガンド、87細胞膜2、 87糖タンパク質G5Q、 87膜タンパク質1、 B7RP-1 D、H2B-2	ICOSLG, B7H2, B7RP1, ICOSL, KGAD53	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 4 A】

表4：中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
1	sp.Q92859.NEO 1	Q92859 NEO1_HUMAN	ネオグニン(免疫グロブリン スーパーファミリー002 サブクラスメンバー2)	NEO1,NGN	ホモサピエンス (ヒト)	NEO1	IGDCC2, NGN
2	tr.S6C4.Q9.S6C4 Q9		IgG L鎖		ホモサピエンス (ヒト)		
3	tr.A0A0G2J1RQ.6 A0A0G2J1RQ.6		Ig糖ドメイン含有タンパク質		ホモサピエンス (ヒト)		
4	sp.O00391.QSO X1	QSOX1_HUMAN Q00391	スルフィドヒドロキシターゼ1, hSODX, EG 1.8.3.2 (クイエシン6)	QSOX1, QSCN6, UNQ2520PRO6013	ホモサピエンス (ヒト)	QSOX1	QSCN6
5	sp.Q6H9L.7.NSM 2	Q6H9L ISM2_HUMAN	イスマミン-2 (トロポスポンジ おおよびAMPドメイン含有 イスマミン様タンパク質1) (トロポスポンジ型 ドメイン含有タンパク質3)	ISM2, TAILL1, THSD3, PSECO137	ホモサピエンス (ヒト)	ISM2	TAILL1, THSD3
6	tr.B1N7B8.B1N 7B8		クリオクリスタルグロブリン C01 カップ神経可変領域		ホモサピエンス (ヒト)		

* 表1にも見られるマーカー
** 表2にも見られるマーカー

【図 4 B】

表4：中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
7	sp.P05546.HEP2 N	P05546 HEP2_HUMAN	ヘパリン補因子2 (プロテアーゼ阻害因子 ロイセルビン-2, HL32) (セルビン01)	SERPIND1, HCF2	ホモサピエンス (ヒト)	SERPIND1	HCF2
8	tr.A0A075B6S9. A0A075B6S9		おそらく非特異的な 免疫グロブリンカンパリ同義1-37	IGKV1-37	ホモサピエンス (ヒト)		
9	tr.A0A024R884. A0A024R884		チネジシロ (ヘキサグラキオン), アイソフォームA0RA_3	TNC	ホモサピエンス (ヒト)		
10	tr.B2R382.B2R5 82		gDMA, FL092374 ホモサピエンス Q型レクチン ドメインファミリー-3, メンバ-B (QLE3B), HMMに非常に類似		ホモサピエンス (ヒト)		
11	sp.Q94782.U33P 1	Q94782 UBP1_HUMAN	ユビキチンカルボキシル-末端 ヒドロラーゼ1, EG 3.4.19.12 (酪ユビキチン化酵素1, NUBP) (ユビキチンオエステラーゼ1) (ユビキチン特異的プロセッシング プロテアーゼ1)	USP1	ホモサピエンス (ヒト)	USP1	
12	sp.Q6P988.NOT UM	Q6P988 ZNF655_HUMAN	亜鉛フィンガータンパク質655 (Zn655)相互作用クルッセル様 タンパク質	ZNF655, VIK	ホモサピエンス (ヒト)	ZNF655	VIK

* 表1にも見られるマーカー
** 表2にも見られるマーカー

【図 4 C】

表4：中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
13	tr.Q9JUL3.Q9J L93		ミオシン反応性免疫グロブリン 重鎖可変領域		ホモサピエンス (ヒト)		
14	tr.Q9JKR2.C9JK R2		アルブミン、アルブミン、 アイソフォームORA k 967	ALB, ORF 名称hCG_14 967	ホモサピエンス (ヒト)		
15	sp.Q07954.LRP1 Q07954	LRP1_HUMAN LRP1_A2MR, APR	プロ低密度リポタンパク質受容体 (アルファ2-マクログロブリン 受容体, A2MR) (アポリポタンパク質受容体, APOER) (Gf抗原0391) [以下に切断: 低密度リポタンパク質受容体関連 タンパク質1 85 kDaサブユニット, LRP-5; 低密度リポタンパク質 受容体関連タンパク質1 515 kDa サブユニット, LRP-5/6; 低密度リポタンパク質受容体関連 タンパク質(細胞内ドメイン, LRP10)]	LRP1	ホモサピエンス (ヒト)	LRP1	A2MR, APR
16	tr.A0A2U18975. A0A2U18975		Ig重鎖可変領域	IgH1	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 4 D】

表4：中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
17	sp.Q15485.FCN 2	Q15485 FCN2_HUMAN	フィコリン-2 (37 kDa エラスチン結合タンパク質) (コラーゲン/フィブリノゲン ドメイン含有タンパク質2) (EBP-37) (フィコリン-8) (フィコリンペーダー) (ヒューコリン) (L-フィコリン) (血腫レクチンg35)	FCN2, FCN1	ホモサピエンス (ヒト)	FCN2	FCN1
18	sp.P02042.HBD P09105	P09105 HBAT_HUMAN	ヘモグロビンサブユニット シーター1 (ヘモグロビンシー ター1鎖) (シーターグロビン)	HBQ1	ホモサピエンス (ヒト)	HBQ1	
19	sp.P02652.APO A2	P02652 APOA2_HUMAN	アポリポタンパク質A-II, アポリ A-II (アポリポタンパク質A2) [以下に切断: プロアポリポタンパク質A-II, アポリポタンパク質A-II, 切断型アポリポタンパク質A-II (アポリポタンパク質A-II (n-16))]	APOA2	ホモサピエンス (ヒト)	APOA2	
20	sp.Q6UX71.PX DC2	Q6UX71 PXDC2_HUMAN	プレキシンドメイン含有 タンパク質2 (腫瘍基底マーカー 7-関連タンパク質)	PLXDC2, TEM7R, UNQ2514PRO6003	ホモサピエンス (ヒト)	PLXDC2	TEM7R

【図 4 E】

表4: 中央値0.4週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エン트리	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
21	tr.A2MYD1.A2 MYD1		V4-4 タンパク質	V4-4	ホモサピエンス (ヒト)		
22	tr.A0A0681.KQ2 A0A0681.KQ2		18重鎖可変領域		ホモサピエンス (ヒト)		
23	tr.P02765.FETU A		アルファ-2-HS-糖タンパク質、 アルファ-2-糖ロプリン 8u-アルファ-2-糖タンパク質 フェチュイン-A	AHSG, FETUA	ホモサピエンス (ヒト)		
24	sp.P0DOX4.IGE		免疫グロブリンγ1サブユニット、 免疫グロブリンγ1サブユニット 重鎖00		ホモサピエンス (ヒト)		
25	sp.P19801.AOC 1	AOC1_HUM AN	アミロイド線状性アミン オキシダーゼ[銅含有]、DAO、 ジアミノオキシダーゼ、 EC1.4.3.22 (アミロライド結合 タンパク質1) (アミン オキシダーゼ) (ドメイン含有 タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノオキシダーゼ、KAO)	AOC1 ABP1, DAO1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1, DAO1
26	sp.Q86UD1.OA F		Out at firstタンパク質相同体、 HCV NS5Aトランス活性化 タンパク質1重鎖タンパク質2	OAF, NS5A1P.3TP2	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 4 F】

表4: 中央値0.4週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エン트리	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
27	sp.Q04695.K1C 17	K1C17_HUM AN	セラチン、I型細胞骨格17 (3B.1) (サイトケラチン-17, CK-17) (ケラチン-17, K17)	KRT17	ホモサピエンス (ヒト)	KRT17	
28	sp.A0A075B64. LVX54	LVX54_HUM AN	免疫グロブリンγ1サブユニット可変10-54 領域	IGLV10-54	ホモサピエンス (ヒト)	IGLV10-54	
29	tr.A0A109PP82. A0A109PP82		MS-02重鎖可変領域、 MS-04重鎖可変領域Imp		ホモサピエンス (ヒト)		
30	sp.P0DMV8.HS 71A	HS71A_HUM AN	熱ショック70 kDaタンパク質1A (熱ショック70 kDaタンパク質1、 HSP70-1, HSP70.1)	HSPA1A HSP7 2, HSPA1, HSX70	ホモサピエンス (ヒト)	HSPA1A	HSP72, HSPA1, HSX70
31	sp.P08160.PGB M		基底膜特異的ヘパリン 硫酸プロテオグリカン コアタンパク質、バールカン	HSPG2	ホモサピエンス (ヒト)		
32	tr.A0A3B3SR2. A0A3B3SR2		補体成分C1r	C1R	ホモサピエンス (ヒト)		
33	sp.P08294.SOD E		細胞外スーパーオキシド ジスムターゼ[0u-Zn]	SOD3	ホモサピエンス (ヒト)		
34	tr.A0A125U0U7 A0A125U0U7		MS-C1 重鎖可変領域		ホモサピエンス (ヒト)		
35	tr.U3PXP0.U3P XP0		アルファグロビン鎖	HBA2	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 4 G】

表4: 中央値0.4週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エン트리	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
36	sp.P01023.A2M G	A2MG_HUM AN	アルファ-2-マクログロブリン、 アルファ-2-M (G3およびG2) アラクトグロブリン ドメイン含有タンパク質5)	A2M CPAMD5 , FWP007	ホモサピエンス (ヒト)	A2M	CPAMD5
37	sp.P02788.TRF1 L		ラクトランスラフェリン、 ラクトフェリン、 成長関連タンパク質12、 アラクトラフェリン	LTF, GIG12, LF	ホモサピエンス (ヒト)		
38	sp.P08519.APO A		アポリポタンパク質 (a)、Apo (a)、 Lp (a)	LPA	ホモサピエンス (ヒト)		
39	sp.P01019.ANG T		アンジオテンジノゲン、 セルヒンA8	ANGT, SERPIN A8	ホモサピエンス (ヒト)		
40	sp.P06060.MYL 6	MYL6_HUM AN	ミオン軽鎖αベータド6 (17 kDa ミオン軽鎖、LC17) (ミオン軽鎖3、MLC-3) (ミオン軽鎖αベータド3、 ミオン軽鎖α3) (平滑筋および非筋間ミオン 軽鎖αベータド6)	MYL6 SERPIN A8	ホモサピエンス (ヒト)	MYL6	

【図 4 H】

表4: 中央値0.4週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エン트리	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
41	sp.O96006.ZBE D1	ZBED1_HUM AN	E3 SUMOタンパク質 リガーゼZBED1、E2.3.2 - (DMSA修飾関連系結合因子) (推定上の6-ヒスチジン) (連続フィニシングド ドメイン含有タンパク質1) (GREF相同体)	ZBED1 ALTE, DREF, DKREF, KIAA0785, TRAMP	ホモサピエンス (ヒト)	ZBED1	ALTE, DREF, DKREF, KIAA0785, TRAMP
42	sp.A0A075B6S2.A0A07 5B6S2	KVD29_HUM AN	免疫グロブリンγ1サブユニット可変20-29 領域	IGKV2D-29	ホモサピエンス (ヒト)	IGKV2D-29	
43	tr.Q9JUL77.Q9U L77		ミオン反応性免疫グロブリン 重鎖可変領域		ホモサピエンス (ヒト)		
44	sp.P11021.BIP		小胞体チャペロンBiP、 熱ショックタンパク質70 ファミリータンパク質5、 HSP70ファミリータンパク質5、 70 kDaグルコース調節タンパク質、 GRP-78、結合免疫グロブリン タンパク質、BiP	HSPA5, GRP78	ホモサピエンス (ヒト)		
45	tr.H7C5R1.H7C 5R1		セルロブラミン	CP	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 4 I】

表4: 中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
46	sp.Q95497.VNN1 1	VNN1_HUM AN	ハンテグライナーゼ, E6.3.5.1.92 (ハンテグライニントドローゼ) (11F66) (血管非炎症性分子1, ハニニン)	VNN1	ホモサピエンス (ヒト)	VNN1	
47	sp.P06315.KV50 2	KV502_HUM AN	免疫グロブリンカッパH司変5-2 (Igカッパ鎖V領域EV15)	IGKV5-2	ホモサピエンス (ヒト)	IGKV5-2	
48	sp.Q8WZ75.ROB4 5	ROB4_HU MAN	ラウンドアバウト相合体4 (マシクカララウンドアバウト)	ROB4_UNQ4 21.PP03674	ホモサピエンス (ヒト)	ROB4	
49	sp.Q9Y577.LYVEI 7	Q9Y5Y AN	リンパ管内皮ヒアルロン酸 変容体1, LYVE-1 (細胞表面保持 配対結合タンパク質1, Q8BP-1) (細胞外リンクトメイン含有 タンパク質1) (ヒアルロン酸変容体)	LYVEI_CRSBP 1, HAR, XLKDI, UNQ230/PRO2 63	ホモサピエンス (ヒト)	LYVEI	CRSBP1, HAR, XLKDI

【図 4 J】

表4: 中央値34週時の 上位50位の タンパク質マーカー	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
50	sp.P14151.LXA M1	LYAM1_HU MAN	L-セレクチン(CD2抗原様 ファミリーメンバー) (白血球接着分子1, LAM-1) (白血球表面抗原Lam-8) (白血球-内皮細胞接着分子1, LECAM 1) (リンパ樹細胞-ミニング変容体) (D11) (d98-MEL) (CD抗原CD2L)	SELL_LNHR, LYAM1	ホモサピエンス (ヒト)	SELL	LNHR, LYAM1

【図 5 A】

表5: 24週マーカー	細胞内 位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
1	細胞質	Q15511	ARPC5_HU MAN	アクチン関連タンパク質2/3 複合体サブユニット5 (Arp2/3複合体16 kDa サブユニット, p16-ARPC)	ARPC5_ARC 16	ホモサピエンス (ヒト)	ARPC5	ARC16
2	細胞質	sp.P07355.XA2_HUMAN	ANXA2_HUMAN	アネキシンA2 (アネキシン11) (アネキシン-2) (カルパチン1重鎖) (カルパチン-1重鎖) (クロモビンジン-8) (リポルジン11) (脂質抗原タンパク質IV, pArp-10) (タンパク質1) (g36)	ANXA2_AN X2, ANXA2L4, CALIH, LPC2D	ホモサピエンス (ヒト)	ANXA2	ANX2, ANX2L4, CALIH, LPC2D
3	核	sp.P13533.MYH6_HUMAN	MYH6_HUMAN	ミオシン-6 (ミオシン重鎖6) (ミオシン重鎖, 心筋アルファアイソフォーム, MYC-アルファ)	MYH6_MYH CA	ホモサピエンス (ヒト)	MYH6	MYHCA
4	細胞質	sp.P18206.VINC_HUMAN	VINC_HUMAN	ビンキュリン (メタビンキュリン, MV)	VCL	ホモサピエンス (ヒト)	VCL	

【図 5 B】

表5: 24週マーカー	細胞内 位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
5	細胞外	sp.P20023.CR2_HUMAN	CR2_HUMAN	補体受容体2型, Cr2 (補体C3受容体) (エプスタイン・バーウイルス 受容体, EB受容体) (CD抗原CD21)	CR2_C3DR	ホモサピエンス (ヒト)	CR2	C3DR
6	細胞外	sp.Q8N720.ZNF655_HUMAN	ZNF655_HUMAN	亜鉛フィンガータンパク質655 (ZnF相互作用クルッセル様 タンパク質)	ZNF655_VIK	ホモサピエンス (ヒト)	ZNF655	VIK
7	細胞質	tr.H7C5R1.H7C5R1_HUMAN	CP	セルロブラスミン	CP	ホモサピエンス (ヒト)		
8	細胞質	sp.P20023.CR2_HUMAN	CR2_HUMAN	補体受容体2型, Cr2 (補体C3受容体) (エプスタイン・バーウイルス 受容体, EB受容体) (CD抗原CD21)	CR2_C3DR	ホモサピエンス (ヒト)	CR2	C3DR
9	細胞質	sp.O15511.ARC5_HUMAN	ARPC5_HUMAN	アクチン関連タンパク質2/3 複合体サブユニット5 (Arp2/3複合体16 kDa サブユニット, p16-ARPC)	ARPC5_ARC 16	ホモサピエンス (ヒト)	ARPC5	ARC16
10	細胞質	sp.P18206.VINC_HUMAN	VCL	ビンキュリン, メタビンキュリン, MV	VCL	ホモサピエンス (ヒト)		

【図 5 C】

表5: 24週マーカー		細胞内位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
11	tr H7G81 H7C5H1_HUMAN	細胞質			セルロプラスミン	CP	ホモサピエンス (ヒト)		
12	sp P07355 ANXA2_HUMAN	細胞質	P07355	ANXA2_HUMAN	アネキシンA2 (アネキシン1D (アネキシン-2 (カルバクチン1重鎖) (カルバクチン-8) (クロモビリンジン-8) (リポコルチン1D) (胎盤胚芽膜タンパク質14, PBP-10) (タンパク質1) (d38)	ANXA2, ANXA2, ANXA2, CALIH, LPC2D	ホモサピエンス (ヒト)	ANXA2	ANX2, ANX2L4, CALIH, LPC2D

【図 6 B】

表6: 34週マーカー		細胞内位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
5	sp P24844 MYL9_HUMAN	ミトコンドリア	P24844	MYL9_HUMAN	ミオシン調節繊維ポリペプチド9 (20 kDa ミオシン繊維, LC20) (MLC-20) (ミオシンRLC) (ミオシン調節繊維2, 平滑筋アイソフォーム) (ミオシン調節繊維9) (ミオシン調節繊維MLC1)	MYL9, MLC2, MRLC1, MYRL2	ホモサピエンス (ヒト)	MYL9	MLC2, MRLC1, MYRL2
6	sp Q9H4B7 TUBB1_HUMAN	細胞質	Q9H4B7	TUBB1_HUMAN	チューブリンベータ-1鎖	TUBB1	ホモサピエンス (ヒト)	TUBB1	
7	sp Q9HBI1 PARVB_HUMAN	ミトコンドリア	Q9HBI1	PARVB_HUMAN	ベータ-バルビン、アフィキシン	PARVB, CGL-56	ホモサピエンス (ヒト)	PARVB	
8	sp Q9UBW5 BIN2_HUMAN	核	Q9UBW5	BIN2_HUMAN	ブリッジングインテグレーター2 (乳がん関連タンパク質1)	BIN2, BRAP1	ホモサピエンス (ヒト)	BIN2	BRAP1

【図 6 A】

表6: 34週マーカー		細胞内位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
1	sp A0A075B64 L_VX54_HUMAN	細胞外	A0A075B64	LYX54_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可変10-54	IGLV10-54	ホモサピエンス (ヒト)	IGLV10-54	
2	sp P05164 FERM1_HUMAN	細胞外			ミエロペルオキシダーゼ	MPO	ホモサピエンス (ヒト)		
3	sp P19801 AOC1_HUMAN	細胞外	P19801	AOC1_HUMAN	アミロライド感受性アミノキシダーゼ (銅含有1, D00, シアミンオキシダーゼ, E01.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質1) (アミノオキシダーゼ鎖ドメイン含有タンパク質1) (ヒスタミナーゼ) (腎臓アミノオキシダーゼ, K40)	AOC1, ABP1, DAO1	ホモサピエンス (ヒト)	AOC1	ABP1, DAO1
4	sp P24593 BP5_HUMAN	細胞外	P24593	IBP5_HUMAN	インスリン様成長因子結合タンパク質5, IBP-5, IGF結合タンパク質5, IGFBP-5	IGFBP5, IBP5	ホモサピエンス (ヒト)	IGFBP5	IBP5

【図 6 C】

表6: 34週マーカー		細胞内位置	エントリ	エントリ名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主名)	遺伝子名 (別名)
9	tr A0A12BM51A0A12BM51_HUMAN	ミトコンドリア			HLA-A	HLA-A	ホモサピエンス (ヒト)		
10	tr A0A384MDQ7 A0A384MDQ7_HUMAN	細胞外			精巣上体分泌精子結合タンパク質		ホモサピエンス (ヒト)		
11	tr A2MYC9 A2MYC9_HUMAN	ミトコンドリア			V4-3タンパク質	V4-3	ホモサピエンス (ヒト)		
12	tr F5G901 F5G901_HUMAN	細胞外			糖体成分8サブユニットベータ、糖体成分C8ベータ鎖	CSB	ホモサピエンス (ヒト)		
13	tr IQSNV79 IQSNV79_HUMAN	ミトコンドリア			V5-4タンパク質	V5-4	ホモサピエンス (ヒト)		
14	sp Q9H4B7 TUBB1_HUMAN	細胞質	Q9H4B7	TUBB1_HUMAN	チューブリンベータ-1鎖	TUBB1	ホモサピエンス (ヒト)	TUBB1	
15	sp A0A075B64 L_VX54_HUMAN	細胞外	A0A075B64	LYX54_HUMAN	免疫グロブリンラムダ可変10-54	IGLV10-54	ホモサピエンス (ヒト)	IGLV10-54	

10

20

30

40

50

【図 6 D】

表6-34選マーカー		細胞内位置	エン트리	エントリー名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
表6-34選マーカー	16	細胞外			精巣上体分泌精子結合タンパク質		ホモ サビエンス (ヒト)		
	17	細胞外			ミエロペルオキシダーゼ	MPO	ホモ サビエンス (ヒト)		
	18	細胞外	P24593	IBP5_HUMAN	インスリン様成長因子結合タンパク質6、IBP-5、IGF結合タンパク質5、IGBP-5		ホモ サビエンス (ヒト)	IGFBP5	IBP5
	19	細胞外	P15801	AOC1_HUMAN	アミロライド感受性アミノキシダーゼ [腸管]、DMO、ジアミノオキシダーゼ、 EC1.4.3.22 (アミロライド結合タンパク質) (アミノキシダーゼ側ドメイン含有タンパク質) (ヒスタミナーゼ) (精巣アミノキシダーゼ、M40)	AOC1, ABP1, DAO1	ホモ サビエンス (ヒト)	AOC1	ABP1, DAO1

【図 6 F】

表6-34選マーカー		細胞内位置	エン트리	エントリー名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
表6-34選マーカー	25	ミトコンドリア HUMAN	P24844	MYL9_HUMAN	ミオシン調節軽鎖 ポリペプチド9 (20 kDa) ミオシン軽鎖、LC20 (MLC-20) (ミオシンRLC) (ミオシン調節軽鎖2、平滑筋アイソフォーム) (ミオシン調節軽鎖9) (ミオシン調節軽鎖RLC1)	MYL9, MLC2, MYRL1, MYRL2	ホモ サビエンス (ヒト)	MYL9	MLC2, MYRL1, MYRL2
	26	核	Q8UBW5	BIN2_HUMAN	ブリッジングインテグレーター-2 (乳がん関連タンパク質1)	BIN2, BRAP1	ホモ サビエンス (ヒト)	BIN2	BRAP1

【図 6 E】

表6-34選マーカー		細胞内位置	エン트리	エントリー名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
表6-34選マーカー	20	細胞外			補体成分サブユニット ペーパー 補体成分C8ベータ鎖	C8B	ホモ サビエンス (ヒト)		
	21	ミトコンドリア			HLA-A		ホモ サビエンス (ヒト)		
	22	ミトコンドリア	Q9H81	PARVB_HUMAN	ペーパーバルビン、アフィキシン	PARVB, C	ホモ サビエンス (ヒト)	PARVB	
	23	ミトコンドリア			V5-4 タンパク質	V5-4	ホモ サビエンス (ヒト)		
表6-34選マーカー	24	ミトコンドリア			V4-3 タンパク質	V4-3	ホモ サビエンス (ヒト)		

【図 7】

表7 - 中央値24選サンプル、パイオマーカーパネル		細胞内位置	エン트리	エントリー名	タンパク質名	遺伝子名	生物	遺伝子名 (主な)	遺伝子名 (別名)
表7 - 中央値24選サンプル、パイオマーカーパネル	25	ミトコンドリア HUMAN	P24844	MYL9_HUMAN	ミオシン調節軽鎖 ポリペプチド9 (20 kDa) ミオシン軽鎖、LC20 (MLC-20) (ミオシンRLC) (ミオシン調節軽鎖2、平滑筋アイソフォーム) (ミオシン調節軽鎖9) (ミオシン調節軽鎖RLC1)	MYL9, MLC2, MYRL1, MYRL2	ホモ サビエンス (ヒト)	MYL9	MLC2, MYRL1, MYRL2
	26	核	Q8UBW5	BIN2_HUMAN	ブリッジングインテグレーター-2 (乳がん関連タンパク質1)	BIN2, BRAP1	ホモ サビエンス (ヒト)	BIN2	BRAP1

10

20

30

40

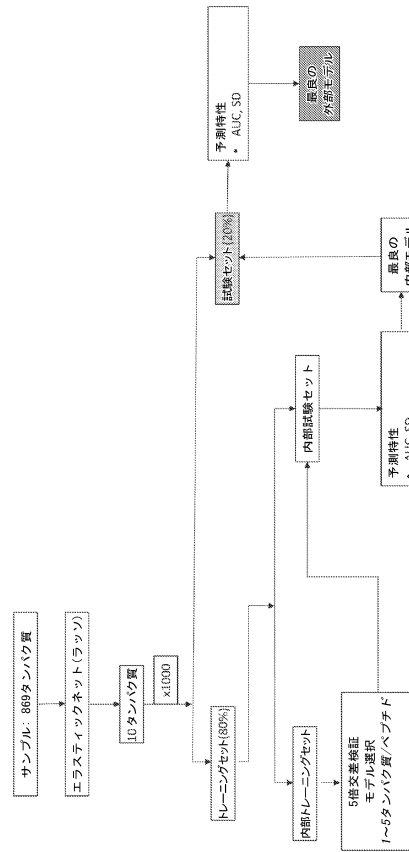
50

【圖 8】

01-2-2-1	01-2-2-2	01-2-2-3	01-2-2-4	01-2-2-5	01-2-2-6	01-2-2-7	01-2-2-8	01-2-2-9	01-2-2-10	01-2-2-11	01-2-2-12	01-2-2-13	01-2-2-14	01-2-2-15	01-2-2-16	01-2-2-17	01-2-2-18	01-2-2-19	01-2-2-20	01-2-2-21	01-2-2-22	01-2-2-23	01-2-2-24	01-2-2-25	01-2-2-26	01-2-2-27	01-2-2-28	01-2-2-29	01-2-2-30	01-2-2-31	01-2-2-32	01-2-2-33	01-2-2-34	01-2-2-35	01-2-2-36	01-2-2-37	01-2-2-38	01-2-2-39	01-2-2-40	01-2-2-41	01-2-2-42	01-2-2-43	01-2-2-44	01-2-2-45	01-2-2-46	01-2-2-47	01-2-2-48	01-2-2-49	01-2-2-50	01-2-2-51	01-2-2-52	01-2-2-53	01-2-2-54	01-2-2-55	01-2-2-56	01-2-2-57	01-2-2-58	01-2-2-59	01-2-2-60	01-2-2-61	01-2-2-62	01-2-2-63	01-2-2-64	01-2-2-65	01-2-2-66	01-2-2-67	01-2-2-68	01-2-2-69	01-2-2-70	01-2-2-71	01-2-2-72	01-2-2-73	01-2-2-74	01-2-2-75	01-2-2-76	01-2-2-77	01-2-2-78	01-2-2-79	01-2-2-80	01-2-2-81	01-2-2-82	01-2-2-83	01-2-2-84	01-2-2-85	01-2-2-86	01-2-2-87	01-2-2-88	01-2-2-89	01-2-2-90	01-2-2-91	01-2-2-92	01-2-2-93	01-2-2-94	01-2-2-95	01-2-2-96	01-2-2-97	01-2-2-98	01-2-2-99	01-2-2-100	01-2-2-101	01-2-2-102	01-2-2-103	01-2-2-104	01-2-2-105	01-2-2-106	01-2-2-107	01-2-2-108	01-2-2-109	01-2-2-110	01-2-2-111	01-2-2-112	01-2-2-113	01-2-2-114	01-2-2-115	01-2-2-116	01-2-2-117	01-2-2-118	01-2-2-119	01-2-2-120	01-2-2-121	01-2-2-122	01-2-2-123	01-2-2-124	01-2-2-125	01-2-2-126	01-2-2-127	01-2-2-128	01-2-2-129	01-2-2-130	01-2-2-131	01-2-2-132	01-2-2-133	01-2-2-134	01-2-2-135	01-2-2-136	01-2-2-137	01-2-2-138	01-2-2-139	01-2-2-140	01-2-2-141	01-2-2-142	01-2-2-143	01-2-2-144	01-2-2-145	01-2-2-146	01-2-2-147	01-2-2-148	01-2-2-149	01-2-2-150	01-2-2-151	01-2-2-152	01-2-2-153	01-2-2-154	01-2-2-155	01-2-2-156	01-2-2-157	01-2-2-158	01-2-2-159	01-2-2-160	01-2-2-161	01-2-2-162	01-2-2-163	01-2-2-164	01-2-2-165	01-2-2-166	01-2-2-167	01-2-2-168	01-2-2-169	01-2-2-170	01-2-2-171	01-2-2-172	01-2-2-173	01-2-2-174	01-2-2-175	01-2-2-176	01-2-2-177	01-2-2-178	01-2-2-179	01-2-2-180	01-2-2-181	01-2-2-182	01-2-2-183	01-2-2-184	01-2-2-185	01-2-2-186	01-2-2-187	01-2-2-188	01-2-2-189	01-2-2-190	01-2-2-191	01-2-2-192	01-2-2-193	01-2-2-194	01-2-2-195	01-2-2-196	01-2-2-197	01-2-2-198	01-2-2-199	01-2-2-200	01-2-2-201	01-2-2-202	01-2-2-203	01-2-2-204	01-2-2-205	01-2-2-206	01-2-2-207	01-2-2-208	01-2-2-209	01-2-2-210	01-2-2-211	01-2-2-212	01-2-2-213	01-2-2-214	01-2-2-215	01-2-2-216	01-2-2-217	01-2-2-218	01-2-2-219	01-2-2-220	01-2-2-221	01-2-2-222	01-2-2-223	01-2-2-224	01-2-2-225	01-2-2-226	01-2-2-227	01-2-2-228	01-2-2-229	01-2-2-230	01-2-2-231	01-2-2-232	01-2-2-233	01-2-2-234	01-2-2-235	01-2-2-236	01-2-2-237	01-2-2-238	01-2-2-239	01-2-2-240	01-2-2-241	01-2-2-242	01-2-2-243	01-2-2-244	01-2-2-245	01-2-2-246	01-2-2-247	01-2-2-248	01-2-2-249	01-2-2-250	01-2-2-251	01-2-2-252	01-2-2-253	01-2-2-254	01-2-2-255	01-2-2-256	01-2-2-257	01-2-2-258	01-2-2-259	01-2-2-260	01-2-2-261	01-2-2-262	01-2-2-263	01-2-2-264	01-2-2-265	01-2-2-266	01-2-2-267	01-2-2-268	01-2-2-269	01-2-2-270	01-2-2-271	01-2-2-272	01-2-2-273	01-2-2-274	01-2-2-275	01-2-2-276	01-2-2-277	01-2-2-278	01-2-2-279	01-2-2-280	01-2-2-281	01-2-2-282	01-2-2-283	01-2-2-284	01-2-2-285	01-2-2-286	01-2-2-287	01-2-2-288	01-2-2-289	01-2-2-290	01-2-2-291	01-2-2-292	01-2-2-293	01-2-2-294	01-2-2-295	01-2-2-296	01-2-2-297	01-2-2-298	01-2-2-299	01-2-2-300	01-2-2-301	01-2-2-302	01-2-2-303	01-2-2-304	01-2-2-305	01-2-2-306	01-2-2-307	01-2-2-308	01-2-2-309	01-2-2-310	01-2-2-311	01-2-2-312	01-2-2-313	01-2-2-314	01-2-2-315	01-2-2-316	01-2-2-317	01-2-2-318	01-2-2-319	01-2-2-320	01-2-2-321	01-2-2-322	01-2-2-323	01-2-2-324	01-2-2-325	01-2-2-326	01-2-2-327	01-2-2-328	01-2-2-329	01-2-2-330	01-2-2-331	01-2-2-332	01-2-2-333	01-2-2-334	01-2-2-335	01-2-2-336	01-2-2-337	01-2-2-338	01-2-2-339	01-2-2-340	01-2-2-341	01-2-2-342	01-2-2-343	01-2-2-344	01-2-2-345	01-2-2-346	01-2-2-347	01-2-2-348	01-2-2-349	01-2-2-350	01-2-2-351	01-2-2-352	01-2-2-353	01-2-2-354	01-2-2-355	01-2-2-356	01-2-2-357	01-2-2-358	01-2-2-359	01-2-2-360	01-2-2-361	01-2-2-362	01-2-2-363	01-2-2-364	01-2-2-365	01-2-2-366	01-2-2-367	01-2-2-368	01-2-2-369	01-2-2-370	01-2-2-371	01-2-2-372	01-2-2-373	01-2-2-374	01-2-2-375	01-2-2-376	01-2-2-377	01-2-2-378	01-2-2-379	01-2-2-380	01-2-2-381	01-2-2-382	01-2-2-383	01-2-2-384	01-2-2-385	01-2-2-386	01-2-2-387	01-2-2-388	01-2-2-389	01-2-2-390	01-2-2-391	01-2-2-392	01-2-2-393	01-2-2-394	01-2-2-395	01-2-2-396	01-2-2-397	01-2-2-398	01-2-2-399	01-2-2-400	01-2-2-401	01-2-2-402	01-2-2-403	01-2-2-404	01-2-2-405	01-2-2-406	01-2-2-407	01-2-2-408	01-2-2-409	01-2-2-410	01-2-2-411	01-2-2-412	01-2-2-413	01-2-2-414	01-2-2-415	01-2-2-416	01-2-2-417	01-2-2-418	01-2-2-419	01-2-2-420	01-2-2-421	01-2-2-422	01-2-2-423	01-2-2-424	01-2-2-425	01-2-2-426	01-2-2-427	01-2-2-428	01-2-2-429	01-2-2-430	01-2-2-431	01-2-2-432	01-2-2-433	01-2-2-434	01-2-2-435	01-2-2-436	01-2-2-437	01-2-2-438	01-2-2-439	01-2-2-440	01-2-2-441	01-2-2-442	01-2-2-443	01-2-2-444	01-2-2-445	01-2-2-446	01-2-2-447	01-2-2-448	01-2-2-449	01-2-2-450	01-2-2-451	01-2-2-452	01-2-2-453	01-2-2-454	01-2-2-455	01-2-2-456	01-2-2-457	01-2-2-458	01-2-2-459	01-2-2-460	01-2-2-461	01-2-2-462	01-2-2-463	01-2-2-464	01-2-2-465	01-2-2-466	01-2-2-467	01-2-2-468	01-2-2-469	01-2-2-470	01-2-2-471	01-2-2-472	01-2-2-473	01-2-2-474	01-2-2-475	01-2-2-476	01-2-2-477	01-2-2-478	01-2-2-479	01-2-2-480	01-2-2-481	01-2-2-482	01-2-2-483	01-2-2-484	01-2-2-485	01-2-2-486	01-2-2-487	01-2-2-488	01-2-2-489	01-2-2-490	01-2-2-491	01-2-2-492	01-2-2-493	01-2-2-494	01-2-2-495	01-2-2-496	01-2-2-497	01-2-2-498	01-2-2-499	01-2-2-500	01-2-2-501	01-2-2-502	01-2-2-503	01-2-2-504	01-2-2-505	01-2-2-506	01-2-2-507	01-2-2-508	01-2-2-509	01-2-2-510	01-2-2-511	01-2-2-512	01-2-2-513	01-2-2-514	01-2-2-515	01-2-2-516	01-2-2-517	01-2-2-518	01-2-2-519	01-2-2-520	01-2-2-521	01-2-2-522	01-2-2-523	01-2-2-524	01-2-2-525	01-2-2-526	01-2-2-527	01-2-2-528	01-2-2-529	01-2-2-530	01-2-2-531	01-2-2-532	01-2-2-533	01-2-2-534	01-2-2-535	01-2-2-536	01-2-2-537	01-2-2-538	01-2-2-539	01-2-2-540	01-2-2-541	01-2-2-542	01-2-2-543	01-2-2-544	01-2-2-545	01-2-2-546	01-2-2-547	01-2-2-548	01-2-2-549	01-2-2-550	01-2-2-551	01-2-2-552	01-2-2-553	01-2-2-554	01-2-2-555	01-2-2-556	01-2-2-557	01-2-2-558	01-2-2-559	01-2-2-560	01-2-2-561	01-2-2-562	01-2-2-563	01-2-2-564	01-2-2-565	01-2-2-566	01-2-2-567	01-2-2-568	01-2-2-569	01-2-2-570	01-2-2-571	01-2-2-572	01-2-2-573	01-2-2-574	01-2-2-575	01-2-2-576	01-2-2-577	01-2-2-578	01-2-2-579	01-2-2-580	01-2-2-581	01-2-2-582	01-2-2-583	01-2-2-584	01-2-2-585	01-2-2-586	01-2-2-587	01-2-2-588	01-2-2-589	01-2-2-590	01-2-2-591	01-2-2-592	01-2-2-593	01-2-2-594	01-2-2-595	01-2-2-596	01-2-2-597	01-2-2-598	01-2-2-599	01-2-2-600	01-2-2-601	01-2-2-602	01-2-2-603	01-2-2-604	01-2-2-605	01-2-2-606	01-2-2-607	01-2-2-608	01-2-2-609	01-2-2-610	01-2-2-611	01-2-2-612	01-2-2-613	01-2-2-614	01-2-2-615	01-2-2-616	01-2-2-617	01-2-2-618	01-2-2-619	01-2-2-620	01-2-2-621	01-2-2-622	01-2-2-623	01-2-2-624	01-2-2-625	01-2-2-626	01-2-2-627	01-2-2-628	01-2-2-629	01-2-2-630	01-2-2-631	01-2-2-632	01-2-2-633	01-2-2-634	01-2-2-635	01-2-2-636	01-2-2-637	01-2-2-638	01-2-2-639	01-2-2-640	01-2-2-641	01-2-2-642	01-2-2-643	01-2-2-644	01-2-2-645	01-2-2-646	01-2-2-647	01-2-2-648	01-2-2-649	01-2-2-650	01-2-2-651	01-2-2-652	01-2-2-653	01-2-2-654	01-2-2-655	01-2-2-656	01-2-2-657	01-2-2-658	01-2-2-659	01-2-2-660	01-2-2-661	01-2-2-662	01-2-2-663	01-2-2-664	01-2-2-665	01-2-2-666	01-2-2-667	01-2-2-668	01-2-2-669	01-2-2-670	01-2-2-671	01-2-2-672	01-2-2-673	01-2-2-674	01-2-2-675	01-2-2-676	01-2-2-677	01-2-2-678	01-2-2-679	01-2-2-680	01-2-2-681	01-2-2-682	01-2-2-683	01-2-2-684	01-2-2-685	01-2-2-686	01-2-2-687	01-2-2-688	01-2-2-689	01-2-2-690	01-2-2-691	01-2-2-692	01-2-2-693	01-2-2-694	01-2-2-695	01-2-2-696	01-2-2-697	01-2-2-698	01-2-2-699	01-2-2-700	01-2-2-701	01-2-2-702	01-2-2-703	01-2-2-704	01-2-2-705	01-2-2-706	01-2-2-707	01-2-2-708	01-2-2-709	01-2-2-710	01-2-2-711	01-2-2-712	01-2-2-713	01-2-2-714	01-2-2-715	01-2-2-716	01-2-2-717	01-2-2-718	01-2-2-719	01-2-2-720	01-2-2-721	01-2-2-722	01-2-2-723	01-2-2-724	01-2-2-725	01-2-2-726	01-2-2-727	01-2-2-728	01-2-2-729	01-2-2-730	01-2-2-731	01-2-2-732	01-2-2-733	01-2-2-734	01-2-2-735	01-2-2-736	01-2-2-737	01-2-2-738	01-2-2-739	01-2-2-740	01-2-2-741	01-2-2-742	01-2-2-743	01-2-2-744	01-2-2-745	01-2-2-746	01-2-2-747	01-2-2-748	01-2-2-749	01-2-2-750	01-2-2-751	01-2-2-752	01-2-2-753	01-2-2-754	01-2-2-755	01-2-2-756	01-2-2-757	01-2-2-758	01-2-2-759	01-2-2-760	01-2-2-761	01-2-2-762	01-2-2-763	01-2-2-764	01-2-2-765	01-2-2-766	01-2-2-767	01-2-2-768	01-2-2-769	01-2-2-770	01-2-2-771	01-2-2-772	01-2-2-773	01-2-2-774	01-2-2-775	01-2-2-776	01-2-2-777	01-2-2-778	01-2-2-779	01-2-2-780	01-2-2-781	01-2-2-782	01-2-2-783	01-2-2-784	01-2-2-785	01-2-2-786	01-2-2-787	01-2-2-788	01-2-2-789	01-2-2-790	01-2-2-791	01-2-2-792	01-2-2-793	01-2-2-794	01-2-2-795	01-2-2-796	01-2-2-797	01-2-2-798	01-2-2-799	01-2-2-800	01-2-2-801	01-2-2-802	01-2-2-803	01-2-2-804	01-2-2-805	01-2-2-806	01-2-2-807	01-2-2-808	01-2-2-809	01-2-2-810	01-2-2-811	01-2-2-812	01-2-2-813	01-2-2-814	01-2-2-815	01-2-2-816	01-2-2-817	01-2-2-818	01-2-2-819	01-2-2-820	01-2-2-821	01-2-2-822	01-2-2-823	01-2-2-824	01-2-2-825	01-2-2-826	01-2-2-827	01-2-2-828	01-2-2-829	01-2-2-830	01-2-2-831	01-2-2-832	01-2-2
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	--------

表8 - 中央値34週サンプル。バイオマーカーパネル

【圖 9】



【図 10 A】

[illegible]

【図 10 B】

[illegible]

【図 12 A】

[illegible]

*表1にも見られるマーカ-

【図 12 B】

[illegible]

*表1にも見られるマーカ-

【図 12 C】

[illegible]

【図 12 D】

[illegible]

【図 1 2 E】

[illegible]

【図 12 F】

[illegible]

【図 12 G】

[illegible]

【図 12 H】

[illegible]

【図 13 A】

[illegible]

*表2にも見られるマーカー

【図 13 B】

[illegible]

表2にも見られるマーカ-

【図 13 C】

[illegible]

【図 13 D】

[illegible]

【図 13 E】

[illegible]

【図 13 G】

[illegible]

【図 13 F】

[illegible]

【図 13 H】

[illegible]

【図 14 A】

[illegible]

【図 14 B】

[illegible]

【図 14 C】

[illegible]

【図 14 D】

[illegible]

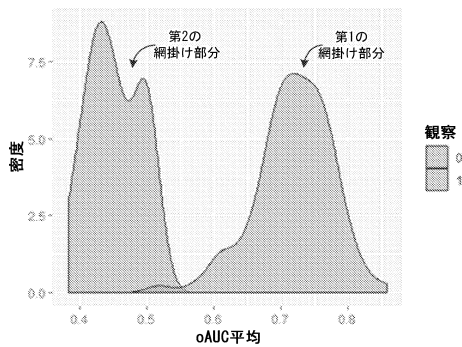
【図 15 A】

[illegible]

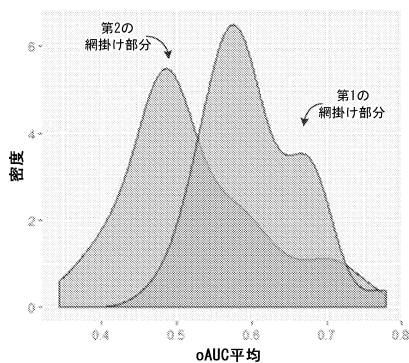
【図 15 B】

[illegible]

【図 16】

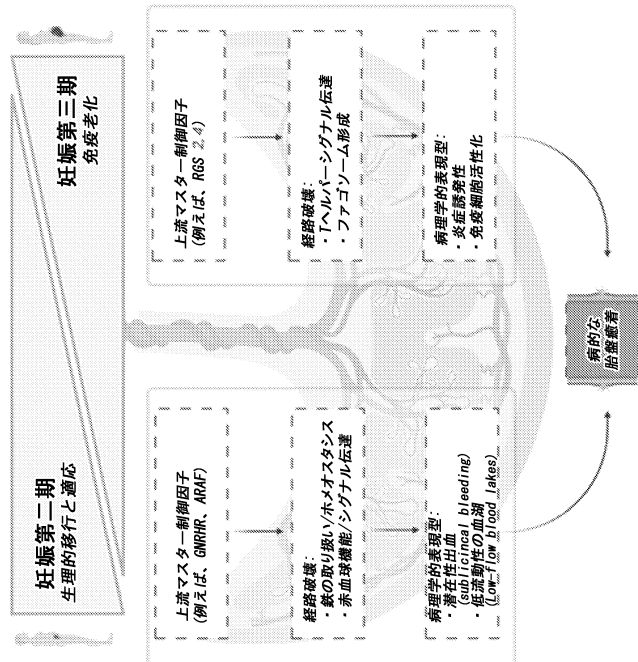


A



B

【図 17】



【手続補正書】
【提出日】令和6年7月23日(2024.7.23)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】

2024546438000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/79835
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed. b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.		
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 49-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

--- See Extra Pages ---

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.: 1-4, 6-8, 12-16, 18-28, 35, 37-48 and 54, limited to a biomarker panel of Table 7

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N 33/68 (2023.01) IPC - ADD. A61P 15/06 (2023.01) INV. G01N 33/689 CPC - ADD. G01N 33/6848, G01N 2800/368, G01N 2800/50 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2021/0270840 A1 (NX PRENATAL INC.) 02 September 2021 (02.09.2021) para [0008]; [0016]; [0021]; [0042]; [0085]; [0086]; [0076]; [0081]; [0083]; [0088];	12-14, 19-24, 28-27, 43/(26-27) 1-4, 6-9, 15-16, 18, 25, 28, 35, 37-42, 43/(25, 28), 44-48, 54
Y	WO 2021/150672 A2 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 29 July 2021 (29.07.2021) pg 30, ln 29 - pg 31, ln 2; pg 86, ln 6 - pg 86, ln 2	1-4, 6-9, 18, 35, 37-42, 44-48, 54
Y	US 2013/0237442 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 12 September 2013 (12.09.2013) abstract; para [0025]	3-4, 15-16, 35, 37-42, 44-48, 54
Y	US 2021/0050112 A1 (NX PRENATAL INC.) 18 February 2021 (18.02.2021) para [0016]	25, 43/25, 48
Y	WO 2016/019176 A1 (COOPER et al.) 04 February 2016 (04.02.2016) abstract; para [0003]; [0020]; [0099]; [0266]	3-4, 15, 28, 43/28
Y	US 2007/0161125 A1 (ROSENFELD et al.) 12 July 2007 (12.07.2007) abstract; para [0368]	3, 15
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 May 2023		Date of mailing of the international search report MAY 12 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group I+, Claims 1-9, 12-28, 35-48, 54, directed to a method of preparing a peptide sample and assessing the risk of placenta accreta in a pregnant subject. The method will be searched to the extent that the method encompasses wherein the protein biomarkers comprise a panel of biomarkers selected from: (i) a biomarker panel of Table 7 (note, these are the first claimed biomarkers for the inventive method). The first named invention was determined based on the first claimed biomarker panel (Table 7, claim 3) for the inventive method embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-4, 6-9, 12-18, 18-28, 35, 37-48, 54 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the method encompasses wherein the protein biomarkers comprise a panel of biomarkers selected from: (i) a biomarker panel of Table 7. Additional method(s) comprising additional biomarker(s) and/or surrogate biomarker(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected method(s) comprising additional biomarker(s) and/or surrogate biomarker(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a method comprising wherein the protein biomarkers comprise a panel of biomarkers selected from: (i) a biomarker panel of Table 8 (claims 1-4, 6-9, 12-16, 18-28, 35, 37-48, 54).

10

Group II+, claims 10-11, 29-30, directed to a panel and composition of biomarkers and a kit. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The panel, composition and kit may be searched, for example, to encompass (i) a protein biomarker of Table 1, comprising ISMN2 for an additional fee and election as such. It is believed that claim 10 reads on this exemplary invention. Additional panel(s), composition(s) and kit(s) comprising additional biomarker(s), surrogate(s) and/or plurality of biomarker(s) (e.g., pairs) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected panel(s), composition(s) and kit(s) comprising additional biomarker(s), surrogate(s) and/or plurality of biomarker(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a panel, composition and kit comprising (i) a protein biomarker of Table 1, comprising sulphydryl oxidase 1 (QSOX1) (claim 10).

20

Group III+, claims 31-34, directed to a computer system, computer readable medium in tangible, non-transitory form and a method of using said computer system. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The computer system, computer readable medium and method of use may be searched, for example, to encompass wherein the protein biomarker is selected from: (i) a protein biomarker of Table 1, comprising ISMN2 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 31-32, 34 read on this exemplary invention. Additional computer system(s), computer readable medium and method(s) of use comprising additional biomarker(s), and/or surrogate(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected computer system(s), computer readable medium and method(s) of use comprising additional biomarker(s), and/or surrogate(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a computer system, computer readable medium and method of use wherein the protein biomarker is selected from: (i) a protein biomarker of Table 1, comprising sulphydryl oxidase 1 (QSOX1) (claims 31-32, 34).

Group IV+, claims 52-53, directed to a method of administering to a pregnant subject an effective amount of a treatment designed to reduce the risk of placenta accreta, wherein the subject has an altered quantitative measure as compared to a reference standard of any one of a panel of protein biomarkers. Group IV+ will be searched upon payment of additional fees. The method may be searched, for example, to encompass (i) a protein biomarker of Table 1, comprising ISMN2 for an additional fee and election as such. It is believed that claim 52 reads on this exemplary invention. Additional method(s) comprising additional biomarker(s), and/or surrogate(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected method(s) comprising additional biomarker(s), and/or surrogate(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be method wherein the protein biomarker is selected from: (i) a protein biomarker of Table 1, comprising sulphydryl oxidase 1 (QSOX1) (claim 52).

30

The inventions listed as Groups I+, II+, III+ and IV+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a method of preparing a peptide sample and assessing the risk of placenta accreta in a pregnant subject, that is not required by Groups II+, III+ and IV+.
Group II+ has the special technical feature of a panel and composition of biomarkers and a kit, that is not required by Groups I+, III+ and IV+.
Group III+ has the special technical feature of a computer system, computer readable medium in tangible, non-transitory form and a method of using said computer system, that is not required by Groups I+, II+, and IV+.

Group IV+ has the special technical feature of a method of administering to a pregnant subject an effective amount of a treatment designed to reduce the risk of placenta accreta, wherein the subject has an altered quantitative measure as compared to a reference standard of any one of a panel of protein biomarkers, that is not required by Groups I+, II+ and III+.

40

Common technical features

Groups I+, II+, III+ and IV+ share the technical features of including:
one or more biomarker peptides or polypeptides.

However, these shared technical features are made obvious by prior art, as discussed below.

— See Extra Pages —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group I+ inventions additionally share the technical features of including:

a method of assessing the risk of placenta accreta in a pregnant subject, comprising:

- (a) providing a sample from a pregnant subject between about 20 weeks of pregnancy to about 37 weeks of pregnancy;
- (b) preparing a microparticle-associated peptide fraction from the sample;
- (c) measuring a plurality of protein biomarkers in the fraction; and
- (d) executing a classification rule on one or more measurement values of (c), wherein the classification rule classifies the sample as being from a subject at increased risk of placenta accreta;

10

a method of preparing a peptide sample, comprising:

- (a) providing a sample from a pregnant subject between about 20 weeks of pregnancy to about 37 weeks of pregnancy;
- (b) enriching the sample for microparticles by loading the sample on a size-exclusion column and eluting the microparticles from the column using water as a mobile phase, to produce a microparticle-enriched fraction;
- (c) preparing a microparticle-associated peptide fraction from the microparticle-enriched fraction by contacting the microparticle-enriched fraction with a protease;
- (d) separating the microparticle-associated peptides by mass spectrometry; and
- (e) measuring, based on a mass spectrometry signal, one or more peptides corresponding to one or more protein biomarkers;

a method of assessing risk of placenta accreta in a pregnant subject, the method comprising:

- (a) preparing a microparticle-enriched fraction from a blood sample from a pregnant subject;
- (b) determining a quantitative measure of one or more microparticle-associated protein biomarkers in the microparticle-enriched fraction, wherein the one or more microparticle-associated protein biomarkers are selected from:
 - (i) a protein biomarker wherein the blood sample is collected at about 20 weeks of pregnancy;
 - (ii) a protein biomarker, wherein the blood sample is collected at about 37 weeks of pregnancy; and
- (c) assessing risk of placenta accreta based on the one or more quantitative measures.

20

However, these shared technical features are made obvious by US 2021/0270840 A1 to NX Prenatal Inc. (hereinafter 'NX') WO 2021/150672 A2 to Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc. (hereinafter 'Beth Israel'), in view of WO 2016/018176 A1 to Cooper et al. (hereinafter 'Cooper').

NX teaches a method of preparing a peptide sample, comprising:

- (a) providing a sample from a pregnant subject between about 20 weeks of pregnancy to about 37 weeks of pregnancy (para [0008] - "In some embodiments, the sample is taken from the pregnant subject within 18 to 24 weeks of gestation");
- (b) enriching the sample for microparticles by loading the sample on a size-exclusion column and eluting the microparticles from the column using water as a mobile phase, to produce a microparticle-enriched fraction (para [0008] - "In some embodiments, the microparticle-enriched fraction is prepared using size-exclusion chromatography. In some embodiments, the size-exclusion chromatography comprises elution with water. In some embodiments, the size-exclusion chromatography is performed with an agarose solid phase and an aqueous liquid phase");
- (c) preparing a microparticle-associated peptide fraction from the microparticle-enriched fraction by contacting the microparticle-enriched fraction with a protease (para [0085] - "The microparticle-enriched sample is then extracted before digestion with a proteolytic enzyme such as trypsin to obtain a digested sample comprising a plurality of peptides");
- (d) separating the microparticle-associated peptides by mass spectrometry; and
- (e) measuring, based on a mass spectrometry signal, one or more peptides corresponding to one or more protein biomarkers (para [0085] - "The digested sample is then subjected to a peptide purification/concentration step before liquid chromatography and mass spectrometry to obtain a proteomic profile of the sample").

30

NX further teaches a method of assessing a pregnant subject, comprising: (a) providing a sample from a pregnant subject between about 20 weeks of pregnancy to about 37 weeks of pregnancy (para [0008] - "In some embodiments, the sample is taken from the pregnant subject within 18 to 24 weeks of gestation"); (b) preparing a microparticle-associated peptide fraction from the sample (para [0008] - "preparing a microparticle-enriched fraction from a blood sample from the pregnant subject"); (c) measuring a plurality of protein biomarkers in the fraction (para [0008] - "preparing a microparticle-enriched fraction from a blood sample from the pregnant subject; (b) determining a quantitative measure of a panel of microparticle-associated proteins in the fraction"); and (d) executing a classification rule on one or more measurement values of (c) (para [0016] - "executing a classification rule of a classification system which rule, based on values including the quantitative measures"), but does not explicitly teach assessing the risk of placenta accreta or wherein the classification rule classifies the sample as being from a subject at increased risk of placenta accreta.

Beth Israel teaches assessing changes in proteins associated with risk of developing placenta accreta (pg 30, ln 29 - pg 31, ln 2 - "The invention is based, at least in part, on the discovery of circulating proteins with altered expression in the plasma of women with placenta accreta spectrum... Accordingly, such markers, as well as the others described herein, can be assayed to identify pregnant women having or at risk of developing PAS"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the method taught by NX to measure changes in proteins associated with placenta accreta taught by Beth Israel in order to determine a subject's risk of developing placenta accreta.

NX and Beth Israel do not teach the biomarker sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1).

40

— See Extra Pages —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Cooper teaches a method of diagnosing pregnancy complications comprising measuring the levels of QSOX1 (abstract - "Methods, compositions, kits, algorithms, systems, specialized computer, software, business methods and reagents are provided for diagnosing, prognosing, monitoring, characterizing, determining the severity of preeclampsia, confirming the presence of preeclampsia or confirming the absence of preeclampsia in a female subject"; para [0020] - "The methods herein comprise measuring the level of a plurality of different biomarkers (e.g., such as those selected from the list in Figures 5A-5F (or Table 2)) in a sample derived from a subject, generating an index using the levels of the different index, and using the index as a means to confirm the presence of preeclampsia, absence of preeclampsia, and/or severity of preeclampsia"; para [0003] - "Preeclampsia (PE) is a serious multisystem complication of pregnancy with adverse effects for mothers and babies"; para [0286] - "Table 2: A listing of various PE biomarkers... sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1)"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the QSOX1 biomarker of Cooper could be combined with the method of NX and Beth Israel, for improved performance of the diagnostic method.

Group II+ inventions additionally share the technical features of including:

a panel comprising a plurality of substantially pure protein biomarkers or surrogate biomarkers;

a kit comprising one or a plurality of containers, wherein each container comprises one or more of each of a plurality of Stable Isotopic Standards, wherein each stable isotopic standard corresponds to a surrogate peptide for a biomarker from a panel of biomarkers;

a composition comprising one or a plurality of pairs of polypeptides, wherein each pair of polypeptides comprise one or more protein biomarkers or one or more surrogate biomarkers.

However, these shared technical features are made obvious by NX.

NX teaches a panel and a composition comprising a plurality of substantially pure protein biomarkers or surrogate biomarkers (para [0008] - "In some embodiments, the panel comprises at least three proteins selected from the triplexes of Table 7.", and a kit comprising one or more of each of a plurality of Standards, wherein each standard corresponds to a peptide for a biomarker from a panel of biomarkers (para [0008] - "In some embodiments, the determining comprises comparing the measure of each protein in the panel to a reference standard."; para [0040] - "As used herein, "detection of a protein" and "determining a quantitative measure of one or more proteins" encompasses any means, including, detection by an MS method that detects fragments of a protein. The data disclosed in the tables and figures was obtained by MRM-MS, which detects proteins by selecting peptide fragments of a parent protein for detection."; para [0076] - "In another embodiment, a kit of reagents capable of one or both of spontaneous preterm birth biomarkers and term birth biomarkers in a sample is provided."; para [0078] - "In some embodiments, the kits further comprise instructions for assessing risk of spontaneous preterm birth. As used herein, the term "instructions" refers to directions for using the reagents contained in the kit for detecting the presence (including determining the expression level) of a protein(s) of interest in a sample from a subject."). NX does not expressly teach Stable Isotopic Standards, wherein each stable isotopic standard corresponds to a surrogate peptide for a biomarker. However, since NX teaches identification and analysis of peptides by MS, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the reference standards could comprise Stable Isotopic Standards in containers traditionally used in kits. Additionally, since use of surrogate biomarkers was well known in the art, it would have been obvious that some protein biomarkers could be identified by use of surrogate peptides.

Group III+ inventions additionally share the technical features of including:

a computer readable medium in tangible, non-transitory form comprising code implementing one or more classification rules generated by analysis of one or more datasets of biomarker measurements derived from one or more pregnant subjects classified into a first group at risk for placenta accreta or a second group not at risk of placenta accreta;

a system comprising:

(a) a computer comprising:

(i) a processor; and

(ii) a memory, coupled to the processor, the memory storing a module comprising:

(1) test data for a sample from a subject including one or more values, wherein each value indicates a measurement of one or more protein biomarkers in a fraction of microparticle-associated peptides, wherein the one or more protein biomarkers are selected from:

(i) a protein biomarker wherein the blood sample is collected at about 20 weeks of pregnancy;

(ii) a protein biomarker, wherein the blood sample is collected at about 37 weeks of pregnancy; and

(2) a classification rule which, based on the one or more values wherein each value indicates the measurement, classifies the subject as being at increased risk of placenta accreta, wherein the classification rule is configured to have a sensitivity value of at least 75%, at least 85% or at least 95%; and

(3) computer executable instructions for implementing the classification rule on the test data;

a method comprising:

(a) using a computer system to compile test data, the computer system comprising a processor and a memory, coupled to the processor, the memory storing a module comprising:

(1) test data for a sample from a subject including values indicating one or more measurement values of one or more protein biomarkers of the disclosure in a fraction of microparticle-associated peptides;

(2) a classification rule to be executed by the processor, which, based on values including the one or more measurement values, classifies the subject as being at increased risk of placenta accreta, wherein the classification rule is configured to have a sensitivity of at least 75%, at least 85% or at least 95%;

(b) accessing the test data; and

(c) executing the classification rule on the test data.

— See Extra Pages —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/79835

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

However, these shared technical features are made obvious by NX in view of Beth Israel.

NX teaches a system comprising:

(a) a computer comprising:

(i) a processor; and

(ii) a memory, coupled to the processor, the memory storing a module comprising:

(1) test data for a sample from a subject including one or more values, wherein each value indicates a measurement of one or more protein biomarkers in a fraction of microparticle-associated peptides, wherein the one or more protein biomarkers are selected from:

(i) a protein biomarker of Table 1, Table 3, or Table 5,

wherein the blood sample is collected at about 20 weeks of pregnancy;

(ii) a protein biomarker of Table 2, Table 4, or Table 6,

wherein the blood sample is collected at about 37 weeks of pregnancy;

(iii) a protein biomarker of Table 9;

(iv) one or more of isthmin-2 (ISM2), sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1), histone H4 (H4), hemoglobin subunit gamma-2 (HBG2) and/or cartilage acidic protein 1 (CRAC1); and

(v) one or more of isthmin-2 (ISM2), ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UBP1), immunoglobulin lambda variables 10-54 (LVX54) and/or Ig-like domain-containing protein; and

(2) a classification rule which, based on the one or more values wherein each value indicates the measurement, classifies the subject as being at increased risk, wherein the classification rule is configured to have a sensitivity value of at least 75%, at least 85% or at least 95%; and

(3) computer executable instructions for implementing the classification rule on the test data (para [0021] - "In another aspect provided herein is a computer system comprising: (a) a processor; and (b) a memory, coupled to the processor, the memory storing a module comprising: (i) test data for a sample from a subject including values indicating a quantitative measure of a plurality of protein biomarkers in the fraction, wherein the proteins are selected from the proteins of Tables 1, 2, 4, 5, 7, 8, or 9; (ii) a classification rule which, based on values including the measurements, classifies the subject as being at risk of pre-term birth, wherein the classification rule is configured to have a sensitivity of at least 75%, at least 85% or at least 95%; and (iii) computer executable instructions for implementing the classification rule on the test data"; para [0059] - "In some embodiments, the pregnant human subject is in early pregnancy (e.g., from 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20, but earlier than 21 weeks of gestation... In some embodiments, the pregnant human subject is in late pregnancy (e.g., from 31, 32, 33, 34, 35, 36 or 37, but earlier than 38 weeks of gestation)", but does not explicitly teach assessing the risk of placenta accreta.

Beth Israel teaches assessing changes in proteins associated with risk of developing placenta accreta (pg 30, In 29 - pg 31, In 2 - "The invention is based, at least in part, on the discovery of circulating proteins with altered expression in the plasma of women with placenta accreta spectrum... Accordingly, such markers, as well as the others described herein, can be assayed to identify pregnant women having or at risk of developing PAS"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the method taught by NX to measure changes in proteins associated with placenta accreta taught by Beth Israel in order to determine a subject's risk of developing placenta accreta.

Group IV+ inventions additionally share the technical features of including:

a method of administering to a pregnant subject an effective amount of a treatment designed to reduce the risk of placenta accreta, wherein the subject has an altered quantitative measure as compared to a reference standard of any one of a panel of protein biomarkers.

However, these shared technical features are obvious over Beth Israel, in view of US 2021/0017598 A1 to Mirvie, Inc. (hereinafter "Mirvie"), and NX, further in view of US 2013/0237442 A1 to The Trustees of the University of Pennsylvania (hereinafter "Pennsylvania"), further in view of US 2007/0161125 A1 to Rosenfeld et al. (hereinafter "Rosenfeld").

Beth Israel teaches a method of administering to a pregnant subject an effective amount of a treatment designed to reduce the risk of placenta accreta, wherein the subject has an altered quantitative measure as compared to a reference standard (pg 56, In 33 - pg 57, In 2 - "Panels comprising biomarkers of the invention are used to identify pregnant women who have PAS. In other embodiments, a panel of the invention is used to characterize a subject's PAS by determining the molecular profile of the PAS. In certain embodiments, panels of the invention are used to select a course of treatment for a subject"; pg 8, In 31-34 - "A marker is differentially present if the mean or median level of the biomarker present in the sample is statistically different from the level present in a reference. A reference level may be, for example, the level present in a sample obtained from a healthy control subject or the level obtained from the subject at an earlier timepoint, i.e., prior to treatment") but does not explicitly teach wherein the biomarker is any one of a panel of protein biomarkers selected from:

(i) a protein biomarker of Table 1, Table 3, or Table 5, wherein the blood sample is collected at about 20 weeks of pregnancy;

(ii) a protein biomarker of Table 2, Table 4, or Table 6, wherein the blood sample is collected at about 37 weeks of pregnancy;

(iii) a protein biomarker of Table 9;

(iv) one or more of isthmin-2 (ISM2), sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1), histone H4 (H4), hemoglobin subunit gamma-2 (HBG2) and/or cartilage acidic protein 1 (CRAC1); and

(v) one or more of isthmin-2 (ISM2), ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UBP1), immunoglobulin lambda variables 10-54 (LVX54) and/or Ig-like domain-containing protein.

--- See Extra Pages ---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/78835

Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Mirvie teaches the differential expression of HBG2 in patient samples as a biomarker of pregnancy complications (abstract - "A method for identifying or monitoring a presence or susceptibility of a pregnancy-related state of a subject may comprise assaying a cell-free biological sample derived from said subject to detect a set of biomarkers, and analyzing the set of biomarkers with a trained algorithm to determine the presence or susceptibility of the pregnancy-related state"; para [0226] - "An analysis for differentially expressed genes between the pre-term case samples and pre-term control samples was performed... A set of genes that are predictive for pre-term birth (PTB) are listed in Table 5"; note Table 5 lists HBG2). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the differential expression of HBG2 as taught by Mirvie to the method taught by NX in order to assess a subject's risk of a pregnancy-related state. Mirvie does not explicitly teach the biomarker is ISM2 or histone H4.

10

Pennsylvania teaches a method of diagnosing an abnormal pregnancy comprising measuring the expression of ISM2 (abstract - "Methods and compositions are provided for diagnosing an abnormal early pregnancy in a mammalian subject by contacting a biological sample of the subject with a reagent that enables measurement of certain biomarker targets"; para [0025] - "In still another embodiment, the additional biomarker is Isthmin2 (ISM2)"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the measurement of ISM2 as taught by Pennsylvania to the method made obvious by NX in view of Mirvie in order to assess a subject's risk of an abnormal pregnancy. Pennsylvania does not explicitly teach the biomarker is histone H4.

Rosenfeld teaches a method of detecting pregnancy-related disorders comprising assessing the expression of histone H4 (abstract - "the invention concerns a comprehensive proteomic analysis of human amniotic fluid (AF) and cervical vaginal fluid (CVF), and the correlation of characteristic changes in the normal proteome with various pathologic maternal/fetal conditions, such as intra-amniotic infection, pre-term labor, and/or chromosomal defects. The invention further concerns the identification of biomarkers and groups of biomarkers that can be used for non-invasive diagnosis of various pregnancy-related disorders, and diagnostic assays using such biomarkers"; para [0368] - "A comparison of PTL versus IAI showed 33 proteins with statistically significant ($p < 0.05$) differential abundance (Table 10). The differential presence of these proteins ranged from +45-fold to -8.7-fold. Twenty one proteins including... Histone H4... were significantly more abundant in IAI."). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the measurement of histone H4 as taught by Rosenfeld to the method made obvious by NX in view of Mirvie, further in view of Pennsylvania, in order to assess a subject's risk of developing a pregnancy-related disorder.

20

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I+, II+, III+ and IV+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

continuation of item 4 above: claims 49-51 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

30

40

フロントページの続き

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,N
E,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,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,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,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. M A T L A B

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 マケルラス トーマス エフ.

アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州 ボストン フランシス ストリート 75 ザ ブ
リガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド内

(72)発明者 ローゼンブラット ケビン ピー.

アメリカ合衆国 40207 ケンタッキー州 ルイビル ブラウンズボロ ロード 4350 スイー
ト 110 エヌエックス プリネイタル インコーポレイテッド内

(72)発明者 ブローマン ブライアン ディー.

アメリカ合衆国 40207 ケンタッキー州 ルイビル ブラウンズボロ ロード 4350 スイー
ト 110 エヌエックス プリネイタル インコーポレイテッド内

(72)発明者 グルナニ プレム ピー.

アメリカ合衆国 40207 ケンタッキー州 ルイビル ブラウンズボロ ロード 4350 スイー
ト 110 エヌエックス プリネイタル インコーポレイテッド内

F ターム (参考)	2G041	CA01 EA04 FA10 FA12 HA01
	2G045	AA25 CA25 CA26 DA36 FB03