

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-524251

(P2013-524251A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O 2	4 H O 4 5
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
C O 7 K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁)

(21) 出願番号 特願2013-504253 (P2013-504253)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月13日 (2011.4.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/055768
 (87) 国際公開番号 W02011/128357
 (87) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011.10.20)
 (31) 優先権主張番号 61/323,490
 (32) 優先日 平成22年4月13日 (2010.4.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10159803.5
 (32) 優先日 平成22年4月13日 (2010.4.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511185564
 プロノタ エヌ. ヴェ.
 PRONOTA N. V.
 ベルギー、ビー-9052 ズウェイナールデ、テフノロジーパーク 4
 Technologiepark 4,
 B-9052 Zwijinaarde,
 BELGIUM
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (74) 代理人 100159385
 弁理士 甲斐 伸二
 (74) 代理人 100163407
 弁理士 金子 裕輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠高血圧疾患のバイオマーカー

(57) 【要約】

本願は、妊娠高血圧疾患、特に子癇前症の新たなバイオマーカー；該バイオマーカーの測定に基づく前記疾患の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための方法；並びに、前記バイオマーカーを測定し、及び/又は前記方法を実施するためのキット及びデバイスを開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インスリン様成長因子-結合性タンパク質複合体酸不安定鎖(ALS)、ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン-含有タンパク質12(ADA12)、アンジオゲニン(ANG1)、カルパイン-1触媒サブユニット(CAN1)、マクロファージコロニー刺激因子1レセプター(CSF1R)、C反応性タンパク質(CRP)、絨毛性ソマトマンモトロピンホルモン(CSH)、ジストログリカン(DAG1)、ジペプチダーゼ2(DPEP2)、デスマグレイン-2(DSG2)、細胞外マトリクスタンパク質1(ECM1)、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーメンバー2(ENPP2)、フィブリリン-1(FBLN1)、フィブリリン-2(FBN2)、プロバブルGタンパク質共役レセプター126(GP126)、肝細胞増殖因子-様タンパク質(HGFL)、細胞間接着分子3(ICAM3)、転移-抑制因子KiSS-1(KISS1)、ロイシル-シスチニルアミノペプチダーゼ(LCAP)、ホスファチジルコリン-ステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、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(PGBM)、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ(PGRP2)、ホスファチジルイノシトール-グリカン-特異的ホスホリパーゼD(PHLD)、ペルオキシレドキシニン1(PRX1)、ペルオキシレドキシニン2(PRX2)、レセプター-型チロシン-プロテインホスファターゼS(PTPRS)、ラウンドアバウトホモログ4(ROBO4)、タンパク質S100-A9(S10A9)、血清アミロイドA-4タンパク質(SAA4)、テネニン-X(TENX)、トレフォイル因子3(TFF3)、血管内皮増殖因子レセプター3(VGFR3)の任意の1以上の、バイオマーカー、好ましくは妊娠高血圧疾患のバイオマーカーとしての使用。

10

20

【請求項 2】

ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3の任意の1以上の、妊娠高血圧疾患の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための使用。

【請求項 3】

対象者の妊娠高血圧疾患の診断、予知、予後及び/又はモニタリングの方法であって、該方法の検査段階が、対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定することを含んでなる方法。

30

【請求項 4】

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)で測定した1以上のマーカー量を、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す該1以上のマーカー量についての参照値と比較し；

(iii)(i)で測定した1以上のマーカー量の、前記参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見し；

40

(iv)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者の妊娠高血圧疾患の特定の診断、予知及び/又は予後に帰する

ことを含んでなる、対象者の妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後についての請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定し；

50

(ii)(i)の測定値を使用して、2以上のマーカー量についての対象者プロフィールを確立し；

(iii)(ii)の対象者プロフィールを、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す該2以上のマーカー量についての参照プロフィールと比較し；

(iv)(ii)の対象者プロフィールの、参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見し；

(v)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、妊娠高血圧疾患の特定の診断、予知及び/又は予後に帰する

ことを含んでなる、対象者の妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後についての請求項3に記載の方法。

10

【請求項6】

(i)2以上の一連の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)で測定したサンプル間で前記1以上のマーカー量を比較し；

(iii)(ii)で比較したサンプル間で前記1以上のマーカー量の逸脱又は逸脱無しを発見し；

(iv)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、2以上の一連の時点間での対象者の妊娠高血圧疾患の変化又は妊娠高血圧疾患を発症する確率の変化に帰する

20

ことを含んでなる、妊娠高血圧疾患をモニターするための請求項3に記載の方法。

【請求項7】

(i)2以上の一連の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)の測定値を使用して、前記2以上の一連の時点での2以上のマーカー量についての対象者プロフィールを確立し；

(iii)(ii)で確立した対象者プロフィールを比較し；

(iv)(iii)で比較した対象者プロフィール間での逸脱又は逸脱無しを発見し；

30

(v)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、前記2以上の一連の時点間での対象者の妊娠高血圧疾患の変化又は妊娠高血圧疾患を発症する確率の変化に帰する

ことを含んでなる、妊娠高血圧疾患をモニターするための請求項3に記載の方法。

【請求項8】

(i)第1の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し；

(ii)後続する第2の時点での対象者からのサンプル中で、前記1以上のマーカー量を測定し；

40

(iii)(i)及び(ii)で測定した前記1以上のマーカー量間の差を算出し；

(iv)(iii)で算出した差を、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、前記第1及び第2の時点での前記1以上のマーカー量の差についての参照値と比較し；

(v)(iii)で算出した差の、前記参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見し；

(vi)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者の妊娠高血圧疾患の特定の診断、予知及び/又は予後に帰する

ことを含んでなる、対象者の妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後についての請求項3に記載の方法。

【請求項9】

(i)第1の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP

50

、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)の測定値を使用して、前記第1の時点での前記2以上のマーカー量についての対象者プロフィールを確立し；

(iii)後続する第2の時点での対象者からのサンプル中で、前記2以上のマーカー量を測定し；

(iv)(iii)の測定値を使用して、前記第2の時点での前記2以上のマーカー量についての対象者プロフィールを確立し；

(v)(ii)及び(iv)で確立した前記対象者プロフィール間の差を算出し；

(vi)(v)で算出した差を、前記第1及び第2の時点での前記2以上のマーカー量の差についての、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す参照プロフィールと比較し；

(vii)(v)で算出した差の、前記参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見し；

(viii)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者の妊娠高血圧疾患の特定の診断、予知及び/又は予後に帰する

ことを含んでなる、対象者の妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後についての請求項3に記載の方法。

【請求項10】

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)で測定した前記1以上のマーカー量を、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、前記1以上のマーカー量についての参照値と比較し；

(iii)(i)で測定した前記1以上のマーカー量の、前記参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見し；

(iv)前記発見から、妊娠高血圧疾患の治療的又は予防的処置の必要性の有無を推論することを含んでなる、対象者が妊娠高血圧疾患の治療的又は予防的処置を必要としているのか(例えば、依然として必要としているのか又はもはや必要としていないのかなど)を決定する方法。

【請求項11】

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定し；

(ii)(i)の測定値を使用して、前記2以上のマーカー量についての対象者プロフィールを確立し；

(iii)(ii)の対象者プロフィールを、前記2以上のマーカー量についての、妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す参照プロフィールと比較し；

(iv)(iii)の対象者プロフィールの、前記参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見し；

(v)前記発見から、妊娠高血圧疾患の治療的又は予防的処置の必要性の有無を推論することを含んでなる、対象者が妊娠高血圧疾患の治療的又は予防的処置を必要としているのか(例えば、依然として必要としているのか又はもはや必要としていないのかなど)を決定する方法。

【請求項12】

妊娠高血圧疾患の治療法が抗高血圧治療、中絶及び分娩から選択される、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項13】

10

20

30

40

50

対象者が臨床的に顕性の妊娠高血圧疾患に未だ罹患しておらず、このことにより対象者が臨床的に顕性の妊娠高血圧疾患を発症する確率、見込み又はリスクが予知される、請求項 3 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

妊娠高血圧疾患の発生の妊娠又は分娩後時期及び/又は該発生までに残された時間が予知される、請求項 3 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

妊娠高血圧疾患が子癇前症(PE)である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用又は方法。

【請求項 16】

検査段階が、妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後に有用な 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定することを更に含んでなる、請求項 3 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記他のバイオマーカーが、可溶性 fms-様チロシンキナーゼ-1 (sFlt-1、sVEGFR-1)、エンドグリン、胎盤成長因子及び血管内皮増殖因子(VEGF)からなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

対象者におけるHDPについての 1 以上のリスクファクターの有無及び/又はレベルを決定することを更に含んでなり、好ましくは前記リスクファクターが未経産、多胎妊娠、長い妊娠間隔、以前の妊娠中におけるHDP若しくはPEの病歴又は家族のHDP若しくはPEの病歴、極端な年齢(年齢 < 20歳及び年齢 > 40歳)、肥満、慢性高血圧、慢性腎疾患、片頭痛、頭痛、(妊娠性)真性糖尿病、多嚢胞性卵巣症候群、自己免疫疾患、例えば狼瘡、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス又はMS、血管又は結合組織の疾患、ビタミンD不足、抗リン脂質抗体症候群又は遺伝性栓友病、男性配偶者の前の配偶者がHDP若しくはPEであったという事実、胎児水腫及び未解明の胎児子宮内発育制限から選択される、請求項 3 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の 1 以上のマーカーの量並びに/或いは前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量が、それぞれのバイオマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る結合性物質を用いて測定される、請求項 3 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の 1 以上のマーカーの量並びに/或いは前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量が、イムノアッセイ技術、又は質量分析法、又はクロマトグラフィー法、又は前記方法の組合せを用いて測定される、請求項 3 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

(i) 対象者からのサンプル中の、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の 1 以上のマーカーの量を測定する手段を含んでなり、任意であって好ましくは(ii) 妊娠高血圧疾患の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、前記 1 以上のマーカー量についての参照値、或いは該参照値を確立する手段を含んでなるキット。

【請求項 22】

(a) ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBL

10

20

30

40

50

N1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメント、好ましくは既知量又は既知濃度の前記1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントと；(b)任意であって好ましくは、1以上の他のバイオマーカー、好ましくは既知量又は既知濃度の、妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後に有用な1以上の他のバイオマーカーとを含んでなる、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのアレイ又はマイクロアレイ。

【請求項23】

(a)ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る1以上の結合性物質、好ましくは既知量又は既知濃度の該結合性物質と；(b)任意であって好ましくは、妊娠高血圧疾患の診断、予知及び/又は予後に有用な1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合し得る1以上の結合性物質、好ましくは既知量又は既知濃度の該結合性物質とを含んでなる、結合性物質のアレイ又はマイクロアレイ。

10

【請求項24】

(i)対象者からサンプルを取得する手段と、
(ii)前記サンプル中の、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントの量を測定する手段と、
(iii)前記サンプル中で測定した前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量を視覚化する手段と
を備えてなる、対象者からのサンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量を測定することができる検査デバイス。

20

【請求項25】

前記マーカーがALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PTPRS、ROBO4、S10A9、TENX、TFF3からなる群より選択される、請求項1～24のいずれか1項に記載の発明。

30

【請求項26】

前記マーカーがALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、TENX、TFF3からなる群より選択される、請求項1～24のいずれか1項に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

40

本発明は、対象者の疾患又は病状の、具体的には妊娠高血圧疾患の、更に具体的には子癇前症の診断、予知、予後及び/又はモニタリングに有用なバイオマーカー、特にタンパク質-及び/又はペプチド-ベースのバイオマーカー、並びに関連する方法、使用、キット及びデバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多くの疾患及び病状において、予防的及び/又は治療的処置の好ましい転帰は、疾患又は病状の早期及び/又は正確な予知、診断、予後及び/又はモニタリングと強く相関している。したがって、処置の選択に指針を与える疾患及び病状の早期及び/又は正確な予知、

50

診断、予後及び/又はモニタリングのための追加的で、好ましくは改善された様式に関する継続的な必要性が存在する。

妊娠の間に生じる高血圧疾患は、世界的に母体の罹病及び死亡の主要な原因であり、周産期死亡の増加とも関係している。

妊娠高血圧疾患のうち顕著なものは子癩前症(PE)に属する。子癩前症は、妊婦の約5%~10%で発症する(Solomon及びSeely 2006, *Endocrinol Metab Clin North Am* 35(1): 157-71, vii)。

【0003】

PEは、以前は正常血圧であった妊婦において、妊娠20週を過ぎて新たに発症する高血圧及び蛋白尿と説明され得、これは軽症も重症もあり得る。軽症疾患を有する患者は、妊娠20週後に140/90を超える血圧及び24時間尿に関して300mgタンパク質を超える蛋白尿を示し、通常は、顕著な共存疾患なしで予定日近くに出産する。しかし、PEの約25%は重症化(中枢神経系機能障害の症状及び徴候、肝細胞傷害、尿量減少及び血圧の顕著な上昇(収縮期 > 160mmHg又は拡張期 > 110 mmHg)を含む)する傾向がある。重症PEは、代表的には、第2トリメスターの後期及び第3トリメスターの初期に生じ、母体及び周産期の罹病及び死亡の増加に関係する。

PEの重篤な合併症には、1)溶血、肝酵素上昇及び血小板減少により特徴付けられるHELLP症候群、及び2)痙攣発作によって特徴付けられる子癩が挙げられる。これら病状は共に稀である一方で、予後不良と関係する(Solomon及びSeely 2006, 前出)。

子癩前症はまた、子宮内発育遅延(IUGR)及び在胎不当過小児(SGA)のような胎児合併症と関係する。

【0004】

PEの唯一の治療は出産及び胎盤娩出である。妊娠37週を過ぎると、出産が正当化される。妊娠34週未満では、高血圧の処置及び胎児の精密監視は、基礎となる疾患プロセスを治療することはないが、脳血管障害を予防し、妊娠を延ばし得る。出産はまた、重症PE又は子癩の発症に対しても、出産が正当化される(Sibai及びBarton 2007, *Am J Obstet Gynecol* 196(6):514.e1-9)。

PEの病因及び病態生理はほとんど未解明のままであり、その診断は、現在、疾患が一旦明らかになった後、臨床上の判定基準に専ら基づいている(Robertsら, 2003, *Hypertension* 41(3): 37-45)。しかし、最近のデータは、PEにいたる事象が、早ければ第1トリメスターに知らぬ間に始まり、進行することを示唆している。

【0005】

したがって、信頼に足る早期の予知及び/又は診断は、とりわけPEを含む妊娠高血圧疾患における治療介入の成功に決定的に重要である。結果として、更なる、代替の、好ましくは改善された、妊娠高血圧疾患の診断、予知、予後及び/又はモニタリング用マーカー及びツールの提供が、最も重要であり続けている。

PEの発症を予知する臨床上有用なスクリーニングテストは貧弱である(Conde-Agudeloら, 2004, *Obstet Gynecol* 104: 1367-91)。リスクファクターに関する信頼性も低水準である。なぜならば、(PEについて幾つかのリスクファクターが同定されているが)50%を超える症例は、そうでない、若く、低リスクで未経産の女性で生じているからである。よって、妊娠高血圧疾患、特にPEは、その発生及び疾患進行がほとんど予知不可能のままである。

【0006】

最近の報告により、血管作用性胎盤ペプチド、より具体的には可溶性fms-様チロシンキナーゼ-1(sFlt-1, sVEGFR-1)(Maynardら, 2003, *J Clin Invest* 111(5): 649-58)、エンドグリン(Levineら, 2006, *N Engl J Med* 355: 992-1005)、胎盤成長因子(PlGF)及び血管内皮増殖因子(VEGF)(Poliottiら, 2003; *Obstet Gynecol* 101: 1266-74)の不均衡が、子癩前症の早期予知に有用であり得ることが示唆された。特に、sFlt-1及びエンドグリンは、PE発症の約2~3ヶ月前に過剰に産生される抗-血管形成性ペプチドである。PlGF及びVEGFは、重症PEを後に発症する女性の第2トリメスター期母体血清中で減少することが示

されている血管形成促進性ペプチドである。

Proteogenix Inc.のWO2009/097584A1及びAuckland Uniservices LtdのWO2009/108073A1もまたPEバイオマーカーを開示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、妊娠高血圧疾患、特に子癩前症のバイオマーカーを同定し、その使用を提供することにより、当該分野における上記必要性に取り組むものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本発明者らは、広範な実験及び試験を行った結果、そのレベルが妊娠高血圧疾患、より具体的には子癩前症に関して予知的であり、及び/又はその指標となる33のバイオマーカーを同定した。簡潔のために、妊娠高血圧疾患及び子癩前症を、以下、本明細書を通じて、それぞれHDP及びPEと略す。

【0009】

詳細には、1)妊娠28週以降に臨床的に顕性のPEを発症した10人の妊婦(症例)から妊娠2週及び26週に得たサンプル、及び2)妊娠中にPEを発症しなかった妊婦(コントロール)から妊娠22週及び26週に得たサンプルを用い、本発明者らは、前記サンプル中における下記のタンパク質-及び/又はペプチド-ベースのマーカーの量が、PEを予知し及び/又はPEの指標となる挙動を示すことに気付いた：インスリン様成長因子-結合性タンパク質複合体酸不安定鎖(insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain; ALS)、ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン-含有タンパク質12(disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12; ADA12)、アンジオゲニン(ANG1)、カルパイン-1触媒サブユニット(CAN1)、マクロファージコロニー刺激因子1レセプター(CSF1R)、C反応性タンパク質(CRP)、絨毛性ソマトマンモトロピンホルモン(CSH)、ジストログリカン(DAG1)、ジペプチダーゼ2(DPEP2)、デスモグレイン-2(DSG2)、細胞外マトリクスタンパク質1(ECM1)、エンドグリン(EGLN)、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーメンバー2(ENPP2)、フィブリン-1(FBLN1)、フィブリリン-2(FBN2)、プロバブルGタンパク質共役レセプター-126(probable G-protein coupled receptor 126; GP126)、肝細胞増殖因子-様タンパク質(HGFL)、細胞間接着分子3(ICAM3)、転移-抑制因子KiSS-1(KISS1)、ロイシル-シスチニルアミノペプチダーゼ(LCAP)、ホスファチジルコリン-ステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、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(PGBM)、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ(PGRP2)、ホスファチジイルノシトール-グリカン-特異的ホスホリパーゼD(PHLD)、ペルオキシレドキシシン1(PRD1)、ペルオキシレドキシシン2(PRD2)、レセプター-タイプチロシン-プロテインホスファターゼS(PTPRS)、ラウンドアバウトホモログ4(ROBO4)、タンパク質S100-A9(S10A9)、血清アミロイドA-4タンパク質(SAA4)、テネイシン-X(TENX)、トレフォイル因子3(TFF3)、血管内皮増殖因子レセプター3(VGFR3)。これらタンパク質は、それぞれ、IGFALS、ADAM12、ANG、CAPN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENG、ENPP2、FBLN1、FBN2、GPR126、MST1、ICAM3、KISS1、LNPEP、LCAT、HSPG2、PGLYRP2、GPLD1、PRDX1/2、PTPRS、ROBO4、S100A9、SAA4、TNXB、TFF3及びFLT4遺伝子によってコードされ得る。

【0010】

よって、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3の任意の1以上の、バイオマーカーとして、より具体的にはHDPのバイオマーカーとして、更により具体的にはHDPの診断、予知、予後及び/又はモニタリング用バイオマーカーとしての使用を提供する。好ましくはHDP疾患はPEである。

10

20

30

40

50

ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3の任意の1以上の、HDPの診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための使用もまた提供する。好ましくは、HDP疾患はPEである。

【0011】

更に、対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3の任意の1以上についてのレベルを測定することを含んでなる、対象者のHDPの診断、予知、予後及び/又はモニタリングの方法を提供する。好ましくは、HDP疾患はPEである。

本明細書を通じて使用するよう、対象者からのサンプル中で任意の1以上のバイオマーカーのレベルを測定するとは、詳細には、検査段階が、対象者からのサンプル中で前記1以上のバイオマーカーの量を測定することを含んでなることを意味し得る。疾患及び病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングの方法は、データを対象者から及び/又は対象者について収集する検査段階を一般に含んでなると理解される。

【0012】

1つの実施形態において、好ましくはPEのようなHDPの診断、予知及び/又は予後の方法は、以下の工程：(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)(i)で測定した1以上のマーカーの量を、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記1以上のマーカーの量についての参照値と比較する工程；(iii)(i)で測定した1以上のマーカーの量の、参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見する工程；及び(iv)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者のHDPの特定の診断、予知及び/又は予後に帰する工程を含んでなる。

好ましくはPEのようなHDPの診断、予知及び/又は予後の方法、特に前段落で記載した工程(i)~(iv)を含んでなる方法は、対象者について2以上の一連の時点で実施し得、該一連の時点でのそれぞれの結果を比較し得、そのことによって前記一連の時点でのHDPの診断、予知及び/又は予後間の変化の有無を決定し得る。このように、本方法により、対象者のHDPの診断、予知及び/又は予後の経時的变化をモニターすることが可能になる。

【0013】

本明細書中で教示されるようなバイオマーカーの量は、妊娠の間及び/又は分娩後に変化し得る。したがって、本明細書中で教示される使用及び方法の診断、予知及び/又は予後に関する信頼性を向上させるために、検査する対象者の或る妊娠期間又は分娩後期間に測定した或るマーカーの量は、好ましくは、実質的に同じ妊娠期間又は分娩後期間(例えば、±約3週間以内、好ましくは±約2週間以内、より好ましくは±約1週間以内、なおより好ましくは±約0.5週間以内)に確立した前記マーカーの量についての参照値と比較する。

或るマーカーは、妊娠の間又は分娩後の1以上の時点で評価したとき、診断、予知及び/又は予後に関する値を示し得ることもまた理解される。例えば、マーカーは、実質的に妊娠及び/又は分娩後を通じて評価したとき、又は妊娠の一期間(例えば、第1、第2及び/又は第3トリメスター期)又は分娩後の一期間内で評価したときのみ、又は妊娠又は分娩後の1以上の相当な短期間内(例えば、約10、8、6、4又は2週間以内)で評価したときのみ情報を提供し得る。このような全てのマーカーは、本発明において有用であり、適切である。

【0014】

よって、対象者からのサンプル中のALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、

PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量が、好ましくはPE無しのようなHDP無し(すなわち、健康状態)の予知又は診断を表すか又は好ましくはPEのようなHDPについての良好な予後を表す参照値と比較して上昇又は減少していること(すなわち、逸脱していること)は、それぞれ、対象者がHDPを有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者のHDPについての不良な予後(例えば、PEが悪化するか又はHELLP症候群若しくは子癩に進行するという予後)を示し得る。

例としてのみであり限定されないが、好ましくはPE無しのようなHDP無し(すなわち、健康状態)の予知若しくは診断を表すか又は好ましくはPEのようなHDPについての良好な予後を表す参照値と比較して、対象者からのサンプル中で、(a)ALS、ADA12、CRP、CSH、DAG1、ENPP2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4及びTFF3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量が上昇していること(すなわち、逸脱していること)、及び/又は(b)ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、ICAM3、LCAP、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量が減少していること(すなわち、逸脱していること)は、それぞれ、対象者がHDPを有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者のHDPについての不良な予後(例えば、PEが悪化するか又はHELLP症候群若しくは子癩に進行するという予後)を示し得る。

10

【0015】

実験により示され、そして下記の実施形態で、例としてのみであり限定されないが、好ましくはヒト妊婦において反映されているように：

20

- ALS、CRP、ENPP2、GP126、KISS1、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4並びにTFF3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する上昇は、妊娠約15週と約23又は24週との間、より好ましくは妊娠約18週と約23又は24週との間、尚より好ましくは妊娠約20週と約23又は24週との間、最も好ましくは妊娠約22週で評価し得；及び/又は

- ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、ICAM3、LCAP、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する減少は、妊娠約15週と約23又は24週との間、より好ましくは妊娠約18週と約23又は24週との間、尚より好ましくは妊娠約20週と約23又は24週との間、最も好ましくは妊娠約22週で評価し得；及び/又は

30

- ALS、ADA12、CRP、CSH、DAG1、ENPP2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4並びにTFF3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する上昇は、妊娠約24又は25週と約37週との間、より好ましくは妊娠約24又は25週と約34週との間、尚より好ましくは妊娠約24又は25週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約24又は25週と約28週との間、最も好ましくは妊娠約26週で評価し得；及び/又は

- ANG1、CAN1、CSF1R、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する減少は、妊娠約24又は25週と約37週との間、より好ましくは妊娠約24又は25週と約34週との間、尚より好ましくは妊娠約24又は25週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約24又は25週と約28週との間、最も好ましくは妊娠約26週で評価し得る。

40

【0016】

HDP、好ましくはPEの診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための本方法はまた、対象者の2以上の本明細書中で教示されるようなバイオマーカーを評価し得る。そのように測定される各バイオマーカーは、別々に独立して評価されてもよいし、前記2以上のバイオマーカーの量からバイオマーカープロファイルを作成してもよい。

したがって、(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3

50

、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)(i)の測定値を用いて、2以上のマーカーの量についての対象者プロフィールを確立する工程；(iii)(ii)の対象者プロフィールを、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記2以上のマーカーの量についての参照プロフィールと比較する工程；(iv)(ii)の対象者プロフィールの、参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見する工程；(v)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、HDPの特定の診断、予知及び/又は予後に帰する工程を含んでなる、対象者の好ましくはPEのようなHDPの診断、予知及び/又は予後の方法もまた開示する。

【0017】

この方法を2以上の一連の時点で適用することによりHDPのモニタリングが可能になる。

10

本明細書中で教示されるバイオマーカーの量は、妊娠の間及び/又は分娩後に変化し得る。したがって、本明細書中で教示される使用及び方法の診断、予知及び/又は予後に関する信頼性を向上させるために、検査する対象者の或る妊娠期間又は分娩後期間に確立した2以上のマーカーの量についての対象者プロフィールは、好ましくは、実質的に同じ妊娠期間又は分娩後期間(例えば、±約3週間以内、好ましくは±約2週間以内、より好ましくは±約1週間以内、なおより好ましくは±約0.5週間以内)に確立した前記2以上のマーカーの量についての参照値と比較する。

或るマーカープロフィールは、妊娠の間又は分娩後の1以上の時点で評価したとき、診断、予知及び/又は予後に関する値を示し得ることもまた理解される。例えば、マーカープロフィールは、実質的に妊娠及び/又は分娩後を通じて評価したとき、又は妊娠の一期間(例えば、第1、第2及び/又は第3トリメスター期)又は分娩後の一期間で評価したときのみ、又は妊娠又は分娩後の1以上の相当な短期間内(例えば、約10、8、6、4又は2週間以内)で評価したときのみ情報を提供し得る。このような全てのマーカープロフィール及びこれを構成するマーカーは、本発明において有用であり、適切である。

20

【0018】

よって、対象者からのサンプル中で測定した2以上の本明細書中で教示されるマーカーの量を使用して確立され、そしてALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの、好ましくはPE無しのようなHDP無し(すなわち、健康状態)の予知若しくは診断を表すか又は好ましくはPEのようなHDPについての良好な予後を表す参照プロフィールと比較して上昇又は減少した量(すなわち、逸脱)を含むバイオマーカープロフィールは、それぞれ、対象者がHDPを有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者のHDPについての不良な予後(例えば、PEが悪化するか又はHELLP症候群若しくは子癩に進行するという予後)を示し得る。

30

例としてのみであり限定されないが、対象者からのサンプル中で測定した2以上の本明細書中で教示されるマーカーの量を使用して確立され、そして好ましくはPE無しのようなHDP無し(すなわち、健康状態)の予知若しくは診断を表すか又は好ましくはPEのようなHDPについての良好な予後を表す参照プロフィールと比較して、(a)ALS、ADA12、CRP、CSH、DAG1、ENPP2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4及びTFF3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの上昇した量(すなわち、逸脱)及び/又は(b)ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、ICAM3、LCAP、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの減少量(すなわち、逸脱)を含むバイオマーカープロフィールは、それぞれ、対象者がHDPを有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者のHDPについての不良な予後(例えば、PEが悪化するか又はHELLP症候群若しくは子癩に進行するという予後)を示し得る。

40

【0019】

実験により示され、そして下記の実施形態で、例としてのみであり限定されないが、好

50

ましくはヒト妊婦において反映されているように：

- ALS、CRP、ENPP2、GP126、KISS1、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4並びにTFF3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する上昇を含むバイオマーカープロファイルは、妊娠約15週と約23又は24週との間、より好ましくは妊娠約18週と約23又は24週との間、尚より好ましくは妊娠約20週と約23又は24週との間、最も好ましくは妊娠約22週で評価し得；及び/又は

- ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、ICAM3、LCAP、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する減少を含むバイオマーカープロファイルは、妊娠約15週と約23又は24週との間、より好ましくは妊娠約18週と約23又は24週との間、尚より好ましくは妊娠約20週と約23又は24週との間、最も好ましくは妊娠約22週で評価し得；及び/又は

- ALS、ADA12、CRP、CSH、DAG1、ENPP2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PHLD、PRDX1及び/又はPRDX2、S10A9、SAA4並びにTFF3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する上昇を含むバイオマーカープロファイルは、妊娠約24又は25週と約37週との間、より好ましくは妊娠約24又は25週と約34週との間、尚より好ましくは妊娠約24又は25週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約24又は25週と約28週との間、最も好ましくは妊娠約26週で評価し得；及び/又は

- ANG1、CAN1、CSF1R、DPEP2、DSG2、ECM1、FBLN1、FBN2、HGFL、PGBM、PGRP2、PTPRS、ROBO4、TENX及びVGFR3からなる群より選択されるマーカーの量の参照値に対する減少を含むバイオマーカープロファイルは、妊娠約24又は25週と約37週との間、より好ましくは妊娠約24又は25週と約34週との間、尚より好ましくは妊娠約24又は25週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約24又は25週と約28週との間、最も好ましくは妊娠約26週で評価し得る。

【 0 0 2 0 】

1つの実施形態において、好ましくはPEのようなHDPをモニターする方法(又は好ましくはPEのようなHDPを発症する確率をモニターする方法)は、次の工程：(i)2以上の一連の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)(i)で測定したサンプル間で1以上のマーカーの量を比較する工程；(iii)(ii)で比較したサンプル間で1以上のマーカーの量の逸脱又は逸脱無しを発見する工程；及び(iv)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、2以上の一連の時点間での対象者のHDPの変化(又はHDPを発症する確率の変化)に帰する工程を含んでなる。このように、本方法により、対象者のHDP又はHDPを発症するリスクを経時的にモニターすることが可能になる。

別の1つの実施形態において、好ましくはPEのようなHDPをモニターする方法(又は好ましくはPEのようなHDPを発症する確率をモニターする方法)は、次の工程：(i)2以上の一連の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)(i)の測定値を用いて、2以上の一連の時点での2以上のマーカーの量についての対象者プロファイルを確立する工程；(iii)(ii)で確立した対象者プロファイルと比較する工程；(iv)(iii)で比較した対象者プロファイル間で逸脱又は逸脱無しを発見する工程；及び(v)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、2以上の一連の時点間での対象者のHDPの変化(又はHDPを発症する確率の変化)に帰する工程を含んでなる。このように、本方法により、対象者のHDP又はHDPを発症するリスクを経時的にモニターすることが可能になる。

【 0 0 2 1 】

限定されないが、このような一連の時点は、約2週間以上離れていてもよく、好ましくは約4週間以上離れていてもよく、例えば約6又は8週間離れていてもよく、又は好まし

くは約10週間以上離れていてもよく、例えば約12週間15週間離れていてもよい。

本開示を通じて、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかをモニターする方法により、とりわけ、当該疾患又は病状の発生の予知が可能になるか、或いは該疾患又は病状の進行、悪化、軽減若しくは再発、又は処置又は他の外部若しくは内部の因子、状況若しくはストレス因子などに対する応答をモニターすることが可能になる。有利には、本明細書中で教示されるモニタリング方法は、対象者の医学的処置、好ましくはそのようにモニターされる疾患又は病状の軽減を目的とする医学的処置の経過中に適用され得る。このようなモニタリングは、例えば、患者が退院しても良いのか、治療法の変更を必要としているのか又は更なる入院を必要としているかの決定形成に含まれ得る。本明細書中で意図されるように、疾患又は病状のモニタリングへの言及はまた、対象者が該疾患又は病状を

10

発症する確率、リスク又は見込みのモニタリング、すなわち前記確率、リスク又は見込みの経時的変化のモニタリングを包含する。

同様に、本開示を通じて、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの予知又は予後方法により、とりわけ、当該疾患又は病状の発生の予知又は予後予測が可能になるか、或いは該疾患又は病状の進行、悪化、軽減若しくは再発、又は処置又は他の外部若しくは内部の因子、状況若しくはストレス因子などに対する応答の予知又は予後予測が可能になる。

【0022】

本発明者らは更に、妊娠の間又は分娩後の一連の時点での、本明細書中で教示されるバイオマーカーの評価が、HDP、好ましくはPEの診断、予知及び/又は予後を可能にし得ることに気付いた。例えば、前記一連の時点でのマーカー量間の差が、HDP又はPEを発症しなかった女性の対応する時点で測定した前記マーカー量間の差から逸脱する場合、そのような逸脱は、対象者がHDP若しくはPEを有しているか又は発症するリスクにあることを示し得る。

20

したがって、(i)第1の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)後続する第2の時点での対象者からのサンプル中で、前記1以上のマーカーの量を測定する工程；(iii)(i)及び(ii)で測定した前記1以上のマーカーの量間の差を算出する工程；(iv)(iii)で算出した差を、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記第1及び第2の時点での前記1以上のマーカー量の間の差についての参照値と比較する工程；(v)(iii)で算出した差の、前記参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見する工程；及び(vi)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者のHDPの特定の診断、予知及び/又は予後に帰する工程を含んでなる、対象者の好ましくはPEのようなHDPの診断、予知及び/又は予後の方法もまた提供する。

30

【0023】

(i)第1の時点での対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定する工程；(ii)(i)の測定値を使用して、前記第1の時点での2以上のマーカーの量についての対象者プロフィールを確立する工程；(iii)後続する第2の時点での対象者からのサンプル中で、前記2以上のマーカーの量を測定する工程；(iv)(iii)の測定値を使用して、前記第2の時点での2以上のマーカーの量についての対象者プロフィールを確立する工程；(v)(ii)及び(iv)で確立した対象者プロフィール間の差を算出する工程；(vi)(v)で算出した差を、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記第1及び第2の時点での前記2以上のマーカー量間の差についての参照プロフィールと比較する工程；(vii)(v)で算出した差の、前記参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見する工程；及び(viii)前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者のHDPの特定の診断、予知及び/又は予後に帰する工程を含

40

50

んでなる、対象者の好ましくはPEのようなHDPの診断、予知及び/又は予後の方法もまた開示する。

例えば、前記第1及び第2の時点で対象者において測定された或るマーカー量の間で算出された差(D_S)が、正常な妊娠個体で観察される対応する差(D_N)から逸脱している場合、その逸脱は、対象者がPEのようなHDPを有しているか又は有するリスクにあることを示し得る。限定されないが、 $D_S > D_N$ の場合、又は $D_S < D_N$ の場合、又は $D_S > 0$ である一方で $D_N < 0$ である場合、又は $D_S < 0$ である一方で $D_N > 0$ である場合、逸脱が断定され得る。差は、例えば減算又は微分のような算術演算(例えば、傾き、比)として適切に表され得る。

【0024】

限定されないが、このような一連の時点は、約2週間以上離れていてもよく、好ましくは約4週間以上離れていてもよく、例えば約6又は8週間離れていてもよく、或いは好ましくは約10週間以上離れていてもよく、例えば約12週間又は15週間離れていてもよい。

限定されないが、第1の時点は、妊娠約15週と約23又は24週との間、好ましくは妊娠約18週と約23又は24週との間、より好ましくは妊娠約20週と約23又は24週との間、更により好ましくは妊娠約22週であり得る。第2の時点は、妊娠約24又は25週と約37週との間、好ましくは妊娠約24又は25週と約34週との間、より好ましくは妊娠約24又は25週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約24又は25週と約28週との間、尚より好ましくは妊娠約26週であり得る。

【0025】

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し；(ii)(i)で測定した1以上のマーカー量を、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記1以上のマーカーの量についての参照値と比較し；(iii)(i)で測定した1以上のマーカーの量の、前記参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見し；(iv)前記発見から、好ましくはPEのようなHDPの治療的又は予防的処置の必要性の有無を推論することを含んでなる、対象者が好ましくはPEのようなHDPの治療的又は予防的処置を必要としているか否か(例えば、依然として必要としているのか又はもはや必要としていないのかなど)を決定する方法もまた開示する。

(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の2以上のマーカーの量を測定し；(ii)(i)の測定値を使用して、2以上のマーカーの量についての対象者プロフィールを確立し；(iii)(ii)の対象者プロフィールを、前記2以上のマーカーの量についての、HDPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す参照プロフィールと比較し；(iv)(ii)の対象者プロフィールの、参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見し；(v)前記発見から、好ましくはPEのようなHDPの治療的又は予防的処置の必要性の有無を推論することを含んでなる、対象者が好ましくはPEのようなHDPの治療的又は予防的処置を必要としているか否か(例えば、依然として必要としているのか又はもはや必要としていないのかなど)を決定する方法もまた開示する。

【0026】

本方法によって、対象者がHDPを有しているか若しくは有するリスクにあるか、又はHDPについて不良な予後を有するという結論が可能になる場合、処置が指示され得る。限定されないが、HDPを有する患者は、医療センターへの入院に際して又は入院中に、HDPの処置を継続する必要性について本明細書中で教示されるように試験されてもよく、そして処置はもはや必要とされないか又は或る制限された程度でのみ必要とされるときに退院してもよい。PEのようなHDPの例示的な治療的及び予防的処置は、限定されないが、抗高血圧処置(とりわけ ブロッカー、カルシウムチャンネルブロッカー、血管拡張剤及び/又はDOPAデカルボキシラーゼ阻害剤、例えばメチルドーパ、ラベタロール、アセプトロール、メトプロロール、ピンドロール、プロプラノロール、ニフェジピン、イスラジピン及び/又は

10

20

30

40

50

ヒドラジン及び/又はMgSO₄処置を用いる)、中絶及び分娩誘発又は帝王切開による出産を包含する。

【0027】

本明細書中で教示されるバイオマーカーの評価を含む使用及び方法は、主に、妊娠又は分娩後の雌性胎生動物対象について実施され得る。好ましくは、対象(者)は、哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

本明細書中で教示されるバイオマーカーの評価を含む使用及び方法は、好ましくは、任意の妊娠期間から分娩後約12週までの妊娠中又は分娩後のヒト女性対象者、例えば、限定されないが、

- 妊娠約5週以上、又は妊娠約10週以上、好ましくは妊娠約15週以上、より好ましくは妊娠約20週以上、例えば妊娠約21、22、23若しくは24週、更により好ましくは妊娠約25週以上、例えば妊娠約26、27、28若しくは29週である妊娠ヒト女性対象者；及び/又は

- 妊娠約40週以下、例えば妊娠約39若しくは38週、又は妊娠約37週以下、例えば妊娠約36若しくは35週、又は妊娠約34週以下、例えば妊娠約33、32、31若しくは30週である妊娠ヒト女性対象者；及び/又は

- 妊娠約10週と約40週との間、好ましくは妊娠約15週と約37週との間、好ましくは妊娠約20週と34週との間である妊娠ヒト女性対象者；又は

- 分娩後約12週以下、例えば分娩後約11若しくは10週、又は分娩後約9週以下、例えば分娩後約8若しくは7週、又は分娩後約6週以下、例えば分娩後約5若しくは4週、又は分娩後約3週以下、例えば分娩後約2若しくは1週である分娩後のヒト女性対象者について実施され得る。

【0028】

更に、本実施例は、本明細書中で教示されるバイオマーカーにより、バイオマーカーを評価しているときには臨床的に顕性のHDP又はPEに未だ罹患していない妊娠雌性個体におけるHDP、好ましくはPEの予想される(すなわち、将来の又は来るべき)発生を予知することが可能になることを示す。

よって、本明細書中で教示されるバイオマーカーの評価を含む使用及び方法は、好ましくは、対象者、特に臨床的に顕性の(すなわち、活性な)HDP又はPEを有していない対象者のHDP、好ましくはPEの予知について意図され、用いられ得る。このような予知は、好ましくは、検査した対象者が例えば妊娠又は分娩後の或る期間内又は或る時期に臨床的に顕性のHDP又はPEを発症する確率、見込み又はリスクを示し得る。

【0029】

例えば、本明細書中で教示されるバイオマーカーの評価を含む使用及び方法、特にHD、好ましくはPEの予知が意図される使用及び方法は、ヒト妊婦対象者が、好ましくは、

- 妊娠約37週以下、例えば妊娠約36若しくは35週、又は妊娠約34週以下、例えば妊娠約33、32若しくは31週、又は妊娠約30週以下、例えば妊娠約29、28若しくは27週、又は好ましくは妊娠約26週以下、例えば妊娠約25、24若しくは23週、又はより好ましくは妊娠約22週以下、例えば妊娠約21週、又は好ましくは妊娠約20週以下、例えば妊娠約19、18、17若しくは16週、又は好ましくは妊娠15週以下、例えば、妊娠約14、13、12、11若しくは10週であり；及び/又は

- 妊娠約10週と約37週との間、好ましくは妊娠約15週と約34週との間、より好ましくは妊娠約20週と約30週との間、更により好ましくは妊娠約22週と約26週との間であり；そして

好ましくは活性なHDP又はPEを有さず、例えばHDP又はPEの診断を可能にする臨床上的の症状及び徴候を顕現していない

ヒト妊婦対象者について実施し得る。

【0030】

更に、好ましくはPEのようなHDPが発生する妊娠又は分娩後の時期及び/又は発生までに残された時間を予測する、本明細書中で教示される使用及び方法を開示する。このような使用及び方法は、有利には、バイオマーカーの量又はプロフィールを、HDP発生の既知の

妊娠又は分娩後時期及び/又はHDP発生までに残された既知の時間を表す参照値又は参照プロフィールと比較し得る。HGFL、PTPRS、ROBO4及びVGFR3から選択される任意の1以上のマーカーが、この点に関して、特に有用であり得る。

更に、本方法により早期発生子癇前症(すなわち、臨床所見<妊娠34週)対 予定より早いPE(すなわち、妊娠34週<臨床所見<妊娠37週)対 予定通りのPE(すなわち、臨床所見妊娠37週)を有しているか又は有するリスクにある対象者の識別が可能になる、本明細書中で教示される使用及び方法を開示する。

よって、HDPが早期発生PE又は予定より早いPE又は予定通りのPEである、HDPの診断、予知、予後及び/又はモニタリングに用いられる本使用及び本方法もまた開示する。

【0031】

HDP、好ましくはPEについての本明細書に開示したマーカーの使用は、HDP又はPEを発症するリスクにあることが知られているか又は予想される対象者において、特に有用であり得る。限定されないが、HDP、好ましくはPEに関係するリスクファクターには、未経産、多胎妊娠、長い妊娠間隔、以前の妊娠中におけるHDP若しくはPEの病歴又は家族のHDP若しくはPEの病歴、極端な年齢(年齢<20歳及び年齢>40歳)、肥満、慢性高血圧、慢性腎疾患、片頭痛、頭痛、(妊娠性)真性糖尿病、多嚢胞性卵巣症候群、自己免疫疾患、例えば狼瘡、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス又はMS、血管又は結合組織の疾患、ビタミンD不足、抗リン脂質抗体症候群又は遺伝性栓友病、男性配偶者の前の配偶者がHDP若しくはPEであったという事実、胎児水腫及び未解明の胎児子宮内発育制限が含まれる。

よって、この診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、1以上のこのようリスクファクターを有する対象者及び対象者集団において用いられ得る。1つの実施形態において、この診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、対象者において、好ましくはPEのようなHDPについての1以上のリスクファクターの有無及び/又はレベルを決定することを更に含んでなり得る。

【0032】

本明細書中で教示される予知、診断、予後及び/又はモニタリングのための使用又は方法のいずれかにより、好ましくは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%又は少なくとも80%、例えば 85%若しくは 90%若しくは 95%、例えば約80%~100%又は約85%~95%の感度及び/又は特異性(好ましくは、感度及び特異性)が可能になり得る。

本明細書を通して、「疾患及び/又は病状」への言及は、個々の記載の文脈と一致する限りにおいて、本明細書中で開示される疾患及び病状をいずれも包含し、より具体的には(限定されないが)妊娠高血圧疾患(HDP)、好ましくは子癇前症(PE)を包含する。

【0033】

本明細書中で教示される疾患及び病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための使用及び方法は、当該疾患及び病状を有していると未だ診断されていない対象者で(例えば予防検診で)、又はそのような疾患及び病状を有していると診断された対象者で、又はそれらを有していると疑われる対象者(例えば、1以上の特徴的な徴候及び/又は症状を提示する対象者)で、又はそれらを発症するリスクにある対象者(例えば、遺伝的素因; 1以上の発生上、環境上又は行動上のリスクファクターの存在)で使用し得る。この使用及び方法はまた、疾患及び病状の進行又は重症度の種々のステージを検出するために使用されてもよい。この使用及び方法はまた、予防的若しくは治療的処置又は他の介入に対する、疾患及び病状の応答を検出するために使用されてもよい。この使用及び方法は更に、患者の疾患及び病状の悪化、現状維持、部分回復又は完全回復についての医師の決定(患者の更なる処置若しくは観察又は医療センターからの退院のいずれかに帰結する)を援助するために使用することができる。

また、本明細書中で教示される疾患及び病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための使用及び方法は、集団検診(例えば、一般集団又は1以上の基準、例えば、年齢、家系、職業、それぞれの疾患及び病状のリスクファクターの有無などに基づいて階層化した集団における検診のような集団検診)に用い得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

本明細書中で教示される疾患及び病状、特にHDP、好ましくはPEの予知、診断、予後及び/又はモニタリングのための使用及び方法において、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの測定は、それぞれの疾患及び病状に関連する1以上の更なるバイオマーカー又は臨床パラメータの評価と組み合わせ得る。

よって、対象者からのサンプル中で、1以上のこのような他のマーカーの有無及び/又はレベルを測定することを更に含んでなる、上記で教示される、対象者の好ましくはPEのようなHDPの診断、予知、予後及び/又はモニタリングの方法もまた提供する。具体的には、検査段階が、対象者からのサンプル中で1以上のこのような他のマーカーの有無及び/又は量を測定することを更に含んでなる方法を提供する。任意の既知の又は未知の適切なマーカーを使用することができる。

【 0 0 3 5 】

本明細書を通して、「他の(バイオ)マーカー」への言及は、一般には、本明細書中で開示される疾患及び病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングに有用である他のマーカーを包含する。例としてであって限定されないが、HDP、好ましくはPEの評価に有用なバイオマーカーとしては、可溶性fms-様チロシンキナーゼ-1 (sFlt-1、sVEGFR-1) (Maynardら、2003、前出)、エンドグリン (Levineら、2006、前出)、胎盤成長因子 (PlGF) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) (Poliottiら、2003、前出) が挙げられる。更なるバイオマーカーとしては、Proteogenix Inc. のWO2009/097584A1及びAuckland Uniservices Ltd. のWO2009/108073A1(共に、参照により本明細書中に組み込まれる)に開示のものが挙げられ得る。

このような他のバイオマーカーの有無及び/又は量は各々、別々に独立して評価されてもよいし、このような他のバイオマーカーの有無及び/又は量は、本明細書中で開示される方法において確立される対象者プロフィール又は参照プロフィールに含まれていてもよい。

【 0 0 3 6 】

本発明で使用される参照値は、他のバイオマーカーについて以前に用いられた公知の手順に従って確立され得る。このような参照値は、本明細書中で教示される方法の内でもよい(すなわち、本発明の方法の1工程を構成してもよい)し、本発明の方法の外でもよい(すなわち、本発明の方法の1工程を構成していなくてもよい)。したがって、本明細書中で教示される方法のいずれかは、本明細書中で教示される1以上のマーカーの量についての参照値を確立する工程を含んでなり得る。ここで、該参照値は、(a)本明細書中で教示される疾患又は病状が存在しないことの予知若しくは診断、又はそれらの良好な予後を表すか、或いは(b)本明細書中で教示される疾患又は病状の予知若しくは診断、又はそれらの不良な予後を表す。

【 0 0 3 7 】

更なる観点は、

(a)本明細書中で教示される疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断又はそれらの良好な予後、或いは

(b)本明細書中で教示される疾患若しくは病状の予知若しくは診断又はそれらの不良な予後

を表す、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量についての参照値を確立する方法を提供し、該方法は、

(i)

(i a)それぞれの疾患若しくは病状を有していないか若しくは有するリスクにないか又はそれらについて良好な予後を有する1以上の対象者からの1以上のサンプル中で、或い

10

20

30

40

50

は

(i b)それぞれの疾患若しくは病状を有しているか若しくは有するリスクにあるか又はそれらについて不良な予後を有する 1 以上の対象者からの 1 以上のサンプル中で前記 1 以上のマーカーの量を測定し、

(ii)

(ii a)(i a)で測定した前記 1 以上のマーカーの量を、それぞれの疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照値として保存するか、或いは

(ii b)(i b)で測定した前記 1 以上のマーカーの量を、それぞれの疾患若しくは病状の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照値として保存することを含んでなる。

10

【0038】

そうでなければ、本方法は、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の 1、2 又はそれより多いマーカーの量についての参照プロフィールと、任意に、1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての参照プロフィール(他のバイオマーカーについて以前に用いられた公知の方法に従って確立され得る)とを用い得る。このような参照プロフィールは、本発明の方法の内でもよい(すなわち、本発明の方法の 1 工程を構成してもよい)し、本発明の方法の外でもよい(すなわち、本発明の方法の 1 工程を構成していなくてもよい)。したがって、本明細書中で教示される方法は、本明細書中で教示される任意の 1、2 又はそれより多いマーカーの量についての参照プロフィール、及び任意に、1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての参照プロフィールを確立する工程を含んでなり得る。ここで、該参照プロフィールは、(a)本明細書中で教示される疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断又はそれらについての良好な予後を表すか、或いは(b)本明細書中で教示される疾患若しくは病状の予知若しくは診断又はそれらについての不良な予後を表す。

20

【0039】

更なる観点は、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の 1、2 又はそれより多いマーカーの量と、任意に、本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングに有用な 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とについての、

30

(a)それぞれの疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断又はそれらについての良好な予後、或いは

(b)それぞれの疾患若しくは病状の予知若しくは診断又はそれらについての不良な予後を表す参照プロフィールを確立する方法を提供し、該方法は、

(i)

(i a)それぞれの疾患若しくは病状を有していないか若しくは有するリスクにないか又はそれらについて良好な予後を有する 1 以上の対象者からの 1 以上のサンプル中で、或いは

40

(i b)それぞれの疾患若しくは病状を有しているか若しくは有するリスクにあるか又はそれらについて不良な予後を有する 1 以上の対象者からの 1 以上のサンプル中で本明細書中で教示される前記 1、2 又はそれより多いマーカーの量並びに前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定し、

(ii)

(ii a)(i a)の測定値を使用して、本明細書中で教示される前記 1、2 又はそれより多いマーカーの量並びに前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についてのプロフィールを作成するか、或いは

50

(ii b)(i b)の測定値を使用して、本明細書中で教示される前記1、2又はそれより多いマーカーの量並びに前記1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についてのプロフィールを作成し、

(iii)

(iii a)(ii a)のプロフィールを、それぞれの疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照プロフィールとして保存するか、或いは

(iii b)(ii b)のプロフィールを、それぞれの疾患若しくは病状の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照プロフィールとして保存することを含んでなる。

【0040】

更に、(i)本明細書中で教示される疾患又は病状に罹患していない対象者からの種々の時点でのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定し、(ii)対象者の範囲又は平均値(これが対象者についてのベースライン又は参照値である)を算出することを含んでなる、対象者のベースライン又は参照値を確立する方法を提供する。ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量は、任意の適切な技術、例えば当該分野で公知であり得る技術により測定し得る。

例えば、それぞれのバイオマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る結合性物質を用い得る。結合性物質は、とりわけ、抗体、アプタマー、ホトアプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド類似体又は小分子であり得る。例えば、イムノアッセイ技術若しくは質量分析法若しくはクロマトグラフィー法、又は前記方法の組合せを使用し得る。

【0041】

更に、対象者の本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリング用のキットを開示する。該キットは、(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定する手段；及び任意であって、好ましくは(ii)それぞれの疾患又は病状の既知の診断、予知及び/又は予後を表す前記1以上のマーカーの量についての参照値、又は該参照値を確立する手段を含んでなる。よって、このキットは、手段(i)により、対象者からのサンプル中で前記1以上のマーカーの量を測定し；手段(i)により測定した前記1以上のマーカーの量を、(ii)の参照値又は手段(ii)により確立した参照値と比較し；手段(i)により測定した前記1以上のマーカーの量の、(ii)の参照値からの逸脱又は逸脱無しを発見し；その結果として、逸脱又は逸脱無しの前記発見を、対象者のそれぞれの疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後に帰することを可能にする。

【0042】

更なる実施形態は、対象者の本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリング用のキットを提供し、ここで該キットは、(i)対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1、2又はそれより多いマーカーの量を測定する手段と、(ii)任意に、対象者からのサンプル中で1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定する手段と、任意で

10

20

30

40

50

あって好ましくは(iii)本明細書中で教示される前記1、2又はそれより多くのバイオマーカーの量と、任意に前記1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とについての対象者プロフィールを確立する手段と、任意であって好ましくは(iv)本明細書中で教示される前記1、2又はそれより多くのバイオマーカーの量と、任意に前記1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とについての、それぞれの疾患又は病状の既知の診断、予知及び/又は予後を表す参照プロフィール、又は該参照プロフィールを確立する手段とを含んでなる。よって、このキットは、それぞれ手段(i)及び(ii)により、対象者からのサンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1、2又はそれより多いマーカーの量と任意に1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とを測定し；前記測定値に基づいて、本明細書中で教示される前記1、2、又はそれより多いマーカーの量と前記1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とについての対象者プロフィールを(例えば、キットに含まれる手段又は適切な外部手段を使用して)確立し；対象者プロフィールを、(iv)の参照プロフィール又は手段(iv)により確立した参照プロフィールと比較し；前記対象者プロフィールの、前記参照プロフィールからの逸脱又は逸脱無しを発見し；その結果として、前記逸脱又は逸脱無しの発見を、対象者のそれぞれの疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後に帰することを可能にする。

10

20

【0043】

本キット中の、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定する手段は、それぞれ、本明細書中で教示される前記1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る1以上の結合性物質並びに前記1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合し得る1以上の結合性物質を含み得る。結合性物質は、とりわけ、抗体、アプタマー、ホトアプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド類似体又は小分子であり得る。結合性物質は、有利には、固相又は支持体に固定され得る。本キットは、イムノアッセイ技術若しくは質量分析技術若しくはクロマトグラフィー技術、又は前記技術の組合せを用いてもよい。

30

よって、(a)ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る1以上の結合性物質；(b)好ましくは、既知量又は既知濃度の、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメント(例えば、コントロール、標準物質及び/又は校正物質として使用するため)；(c)好ましくは、前記1以上のマーカーの量についての参照値又は該参照値を確立する手段を含んでなる、本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリング用のキットもまた開示する。前記成分(a)及び/又は(c)は、本明細書中他の箇所で教示されるように、適切に標識化され得る。

40

【0044】

また、(a)ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1、2又はそれより多いマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る1以上の結合性物質；(b)任意に、1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合し得る1

50

以上の結合性物質；(c)好ましくは、既知量又は既知濃度の、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントと、任意に、既知量又は既知濃度の前記1以上の他のバイオマーカー(例えば、コントロール、標準物質及び/又は校正物質として使用するため)；(d)好ましくは、本明細書中で教示される前記1、2又はそれより多いマーカーの量と、任意に前記1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量とについての参照プロフィール、或いは該参照プロフィールを確立する手段を含んでなる、本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知及び/又は予後のためのキットもまた開示する。前記成分(a)、(b)及び/又は(c)は、本明細書中他の箇所で教示されるように、適切に標識化され得る。

10

更に、本明細書中で教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための、本明細書中に記載されるキットの使用を開示する。

【0045】

また、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー、及び任意に、本発明に係る1以上の他のバイオマーカーの測定に有用な試剤及びツールも開示する。

よって、(a)ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメント、好ましくは既知量又は既知濃度の前記1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントと、(b)任意であって好ましくは、1以上の他のバイオマーカー、好ましくは既知量又は既知濃度の前記1以上の他のバイオマーカーとを含んでなる、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのアレイ又はマイクロアレイを開示する。

20

また、(a)ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに特異的に結合し得る1以上の結合性物質、好ましくは既知量又は既知濃度の前記結合性物質と、(b)任意であって好ましくは、1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合し得る1以上の結合性物質、好ましくは既知量又は既知濃度の前記結合性物質とを含んでなる結合性物質のアレイ又はマイクロアレイを開示する。

30

【0046】

また、自宅又は臨床設定での使用のためのポータブルデバイス(例えば、ベッドサイドデバイス)として構成された、上記で教示されるキットもまた開示する。

よって、関連する1つの観点は、(i)対象者からサンプルを取得する手段、(ii)前記サンプル中で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカーの量を測定する手段、及び(iii)サンプル中で測定した前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量を視覚化する手段を含んでなる、対象者からのサンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量を測定し得るポータブル検査デバイスを提供する。

40

1つの実施形態において、(ii)及び(iii)の手段は同じであり得、よって(i)対象者からサンプルを取得する手段；及び(ii)前記サンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントの量を測定し、サンプル中で測定した前記1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントの量を視覚化する手段を含んでなる、対象者からのサンプル中の前記1

50

以上のマーカー及び/又はそのフラグメントの量を測定し得るポータブル検査デバイスを提供する。

【 0 0 4 7 】

1つの実施形態において、前記視覚化手段は、サンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量が或る閾値レベルを上回っているのか若しくは下回っているのか、及び/又はサンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量が(本明細書中で教示される疾患又は病状の既知の診断、予知及び/又は予後を表す)前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量についての参照値から逸脱しているのか否かを表示することができる。よって、このポータブル検査デバイスもまた、適切には、前記参照値又は該参照値を確立する手段を含んでなり得る。

10

1つの実施形態において、閾値レベルは、該閾値レベルを上回るか又は下回る(マーカーと疾患及び病状とに依存)サンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量が、対象者がそれぞれの疾患又は病状を有しているか又は有するリスクにあることを示すか、又はそれらについての対象者の不良な予後を示し、前記閾値レベルを下回るか又は上回る(マーカーと疾患及び病状とに依存)サンプル中の前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量が、対象者が本明細書中で教示される疾患又は病状を有していないか又は有するリスクにないことを示すか、又はそれらについての対象者の良好な予後を示すように、選択される。

【 0 0 4 8 】

1つの実施形態において、ポータブル検査デバイスは、本明細書中で教示される疾患若しくは病状が存在しないことの予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照値を含んでなるか、或いは該参照値を確立する手段を含んでなり、対象者からのサンプル中でALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントの量が前記参照値と比較して上昇又は減少していること(マーカーと疾患及び病状とに依存)が、対象者がそれぞれの疾患若しくは病状を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又はそれらについての対象者の不良な予後を示す。別の1つの実施形態において、ポータブル検査デバイスは、本明細書で教示される疾患若しくは病状の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照値を含んでなるか、或いは該参照値を確立する手段を含んでなり、対象者からのサンプル中で本明細書中で教示される前記1以上のマーカー及び/又はフラグメントの量が前記参照値に匹敵していることが、対象者がそれぞれの疾患及び病状を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又はそれらについての対象者の不良な予後を示す。

20

30

1つの更なる実施形態において、ポータブル検査デバイスの測定(場合によっては、及び視覚化)手段は、近位端及び遠位端を有する固体支持体を含んでなり得、該固体支持体は、- 近位端近傍のサンプル適用ゾーン；- サンプル適用ゾーンに対して遠位の反応ゾーン；及び- 反応ゾーンに対して遠位の検出ゾーン；- 任意に、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントを含んでなるコントロール標準を含んでなり、このことにより、該固体支持体は適用ゾーンに適用された流体サンプルの、近位端から遠位端への向きのフローを導くキャピラリ特性を有し；該固体支持体は、- 任意に、より粘性のサンプルのキャピラリフローを向上させる流体供給源を含んでなる。

40

【 0 0 4 9 】

反応ゾーンは、検出剤に接合した、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3か

50

らなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに対する特異的結合性分子の1以上のバンドを含んでなり得、この特異的結合性分子接合体は、流体のキャピラリフローと共に移動することができるように、固体支持体上に配置され；検出ゾーンは、固体支持体上に固定されたマーカー特異的分子の集合を含んでなる1以上の捕捉バンドを含んでなる。

反応ゾーンは、閾値量のマーカー特異的結合性分子接合体が検出ゾーンに移動することを防止するに十分な量で、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上のマーカー及び/又はそのフラグメントに対する特異的結合性分子の1以上の捕捉バンドを追加的に含んでなり得る。或いは、前記デバイスは、捕捉したマーカー特異的結合性分子接合体の量を閾値の値と比較する手段を追加的に含んでなる。

【0050】

他の観点では、本明細書中で開示されるマーカーが、特に(ただし限定されないが)HDP、好ましくはPEを含む本明細書中で教示される疾患及び病状における治療的及び/又は予防的介入の価値のある標的であり得ることに気付いたことに関連する。

よって、また、下記のいずれもを本明細書中で開示する：

(1) 医薬として、好ましくは本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置に用いる医薬として使用するための、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を変調(modulate)することができる物質；

(2) 本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置用医薬の製造のための、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を変調することができる物質の使用；又は本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置のための、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を変調することができる物質の使用；

(3) 治療又は予防有効量の、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を変調することができる物質を対象者に投与することを含んでなる、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置を必要とする対象者において該疾患又は病状を処置する方法；

【0051】

(4) 前記物質が、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を減少又は増大させることができる、上記(1)~(3)のいずれか1つに記載の主題；

(5) 前記物質が、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質に特異的に結合することができる、上記(1)~(4)のいずれか1つに記載の主題；

(6) 前記物質が抗体又はそのフラグメント若しくは誘導體；ポリペプチド；ペプチド；ペプチド類似体；アプタマー；ホトアプタマー；又は化学物質、好ましくは有機分子、より好ましくは有機小分子である、上記(1)~(5)のいずれか1つに記載の主題；

(7) 前記物質が、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質の発現を減少又は阻害することができる、好ましくは前記物質がアンチセンス剤；リボザイム；又はRNA干渉を引き起こすことができる物質である、上記(1)~(4)のいずれか1つに記載の主題；

(8) 前記物質が、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を減少又は阻害することができる、好ましくは前記物質が、天然型の上記(1)で規定した1以上のタンパク質より優勢なネガティブ活性を有する上記(1)で規定した前記1以上のタンパク質ポリペプチドの組換えの又は単離された欠失構築物である、上記(1)~(4)のいずれか1つに記載の主題；

【0052】

10

20

30

40

50

(9) 試験物質の群から、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置に有用である可能性がある候補物質を選択するためのアッセイであって、試験される物質が、上記(1)で規定した前記1以上の核酸又はタンパク質のレベル及び/又は活性を変調、例えば増大又は減少、好ましくは減少させることができるかどうかを決定することを含んでなるアッセイ；

(10) 選択された候補物質を、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの非ヒト動物モデル(好ましくは非ヒト哺乳動物モデル)への投与用組成物の製造に使用すること、及び該動物モデルにおけるその予防的及び/又は治療的効果のモニタリングを更に含んでなる、上記(9)に記載のアッセイ；

(11) 上記(10)に記載されるアッセイによって単離された物質；

(12) 予防及び/又は治療有効量の、上記(1)~(8)のいずれか又は(10)に記載の1以上の物質又はその医薬的に受容可能なN-オキシド形態、付加塩、プロドラッグ若しくは溶媒和物を含んでなり、1以上の医薬的に受容可能なキャリアを更に含んでなる医薬組成物又は製剤；

(13) 前記1以上の物質と前記1以上の医薬的に受容可能なキャリアとを混合することを含んでなる、上記(12)に記載の医薬組成物又は製剤を製造する方法。

上記(1)~(13)のいずれか1つに記載の前記病状又は疾患は、特にHDPから選択され得、好ましくはPEであり得る。

【0053】

よって、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択される任意の1以上の核酸又はタンパク質(例えば、遺伝子のような核酸、又はタンパク質)に特異的に結合し得る物質を選択する方法(スクリーニングアッセイ)であって、(a)1以上、好ましくは複数の試験結合性物質を提供し；(b)(a)の試験結合性物質から、前記1以上の核酸又はタンパク質に結合するものを選択し；そして(c)(b)で選択した試験結合性物質から、1以上の任意の他の意図していないか又は望んでいない標的に結合するものを対抗選択する(すなわち、除去する)ことを含んでなる、方法もまた企図される。

試験結合性物質と前記1以上の核酸又はタンパク質との間の結合は、有利には、該1以上の核酸又はタンパク質を試験結合性物質と、そのような結合を導くに一般的な条件下に接触させる(すなわち、1つに合わせるか、曝露するか、又はインキュベートする)ことによって試験され得る。例えば(限定されないが)、試験結合性物質と前記1以上の核酸又はタンパク質との結合は、適切にはインビトロで試験され得；又は該1以上の核酸又はタンパク質を含み、試験結合性物質に曝されるか又は試験結合性物質を発現するように構成された宿主細胞又は宿主生物中で試験され得る。

【0054】

限定されないが、結合性物質又は変調性物質は、インビトロ、細胞中、器官中及び/又は生物中で、前記1以上の核酸又はタンパク質と結合することができるか又は該1以上の核酸又はタンパク質の活性及び/又はレベルを変調することができてよい。

上記(9)及び(10)のいずれかに記載のスクリーニングアッセイにおいて、試験変調性物質による前記1以上の核酸又はタンパク質の活性及び/又はレベルの変調は、有利には、該1以上の核酸又はタンパク質(例えば、遺伝子又はタンパク質)を当該試験変調性物質と、そのような変調を導くに一般的な条件下に接触させる(すなわち、1つに合わせるか、曝露するか、又はインキュベートする)ことによって試験され得る。例示であって、限定されないが、前記1以上の核酸又はタンパク質の活性及び/又はレベルの変調が、該1以上の核酸又はタンパク質への試験変調性物質の結合に起因する場合、前記条件は、そのような結合を導くに一般的な条件であり得る。例えば(限定されないが)、試験変調性物質による前記1以上の核酸又はタンパク質の活性及び/又はレベルの変調は、適切にはインビトロで試験され得；又は該1以上の核酸又はタンパク質を含み、試験変調性物質に曝されるか又は試験変調性物質を発現するように構成された宿主細胞又は宿主生物中で試験され

10

20

30

40

50

得る。

【 0 0 5 5 】

また、以下も企図される：

- 医薬として、好ましくは本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置に用いる医薬として使用するための、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3(例えば、遺伝子のような核酸、又はポリペプチド若しくはタンパク質)の任意の1以上；
- 本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置用医薬の製造のための前記1以上の核酸又はタンパク質の使用；
- 本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置のための前記1以上の核酸又はタンパク質の使用；
- 治療又は予防有効量の前記1以上の核酸又はタンパク質を対象者に投与することを含んでなる、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの処置を必要とする対象者において該疾患又は病状を処置する方法；

10

ここで、特に、前記病状又は疾患は、HDPから選択され得、好ましくはPEであり得る。

【 0 0 5 6 】

本明細書中に開示される観点及び実施形態(例えば、使用、方法、キット、デバイス、試薬など)において、任意の1以上のマーカー、核酸又はタンパク質は、更に好ましい代替形態では、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PTPRS、ROBO4、S10A9、TENX、TFF3からなる群より選択され得る。

20

なお更に好ましい代替形態、特に観点及び実施形態が子癇前症(PE)に関連する場合には、任意の1以上のマーカー、核酸又はタンパク質は、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、TENX、TFF3からなる群より選択され得る。本発明の上記及び更なる観点及び好適な実施形態は、以下の章及び添付の特許請求の範囲に記載される。添付の特許請求の範囲の請求項1～26の主題は、本明細書に具体的に組み込まれる。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 7 】

【 図 1 】 図 1 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

【 図 2 】 図 2 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

【 図 3 】 図 3 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

40

【 図 4 】 図 4 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

【 図 5 】 図 5 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

【 図 6 】 図 6 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウィスカープロットを説明する。

【 図 7 】 図 7 は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対 コントロール(す

50

なわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウイスキープロットを説明する。

【図8】図8は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウイスキープロットを説明する。

【図9】図9は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウイスキープロットを説明する。

【図10】図10は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウイスキープロットを説明する。

【図11】図11は、症例(すなわち、妊娠中、後にPEを発症した女性)対コントロール(すなわち、妊娠中、後にPEを発症しなかった女性)における、妊娠22週及び26週でのそれぞれのマーカーの量についてのボックスプロット及びウイスキープロットを説明する。

【図12】図12は、症例におけるそれぞれのマーカーの量(Y-軸)とPEの発生(症状発現/診断)の時期(X-軸)との相関を説明する。

【図13】図13は、症例におけるそれぞれのマーカーの量(Y-軸)とPEの発生(症状発現/診断)の時期(X-軸)との相関を説明する。

【図14】図14：本発明による検査ストリップの平面図(A)及び側面図(B)。

【図15】図15：本発明による検査カートリッジの平面図。

【図16】図16A~Bは、幾つかの検査パッドを含んでなる本発明による試剤ストリップのそれぞれ側面図及び上面図を示す。

【図17】図17は症例及びコントロールの集団を説明する。 妊娠22週：第1の血漿サンプルを取得； 妊娠26週：第2の血漿サンプルを取得； 症例内でPEが臨床的に診断されたときの妊娠期間； 出産時の妊娠期間

【発明を実施するための形態】

【0058】

詳細な説明

本明細書中で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈がそうでないことを明示していなければ、単数及び複数の両方の指示対象を含む。

本明細書中使用する場合、用語「含んでなる」及び「から構成される」は、「含む」又は「含有する」と同義であり、非排他的(inclusive)又は非限定的(open-ended)であって、追加の、言及していない部材、要素又は方法工程を排除しない。この用語はまた、「からなる」及び「から本質的になる」を包含する。

端点による数値範囲への言及は、それぞれの範囲内に含まれる全ての数及び端数(fractions)並びに記載された端点を含む。

本明細書中で使用する用語「約」は、パラメータ、量、期間などのような測定可能な値に言及する場合、そのばらつき/変動が開示発明における実施に適切である限りにおいて、特定値のばらつき及び特定値からの変動、詳細には $\pm 10\%$ 以下、好ましくは $\pm 5\%$ 以下、より好ましくは $\pm 1\%$ 以下、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ 以下の特定値のばらつき及び特定値からの変動を包含することを意味する。修飾語「約」が言及する値はまた、それ自体具体的に開示され、好ましいものとしても開示されていると理解すべきである。

【0059】

用語「1以上」、例えばメンバー群からの1以上のメンバーは、それ自体明確であるが、更なる例証のために、この用語は、とりわけ、前記メンバーの任意の1つ、又は前記メンバーの任意の2以上、例えば前記メンバーの任意の3、4、5、6又は7などを、前記メンバーの全てを上限として包含する。

本明細書中で引用した全ての文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

特に明記しない限り、本発明の開示に使用される全ての用語(技術用語及び科学用語を含む)は、本発明が属する分野における通常の知識を有する者が一般的に理解する意味を

10

20

30

40

50

有する。更なるガイダンスのために、本発明の教示をより良く理解するための用語の定義が含まれ得る。

【0060】

本発明者らは、ALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3の任意の1以上を、価値あるバイオマーカーとして、特に妊娠高血圧疾患(HDP)、好ましくは子癇前症(PE)についての価値あるバイオマーカーとして認識した。

用語「バイオマーカー」は、当該分野において広く知られており、対象者におけるその定性的及び/又は定量的評価が対象者の表現型及び/又は遺伝子型の1以上の観点に関して、例えば所与の疾患又は病状についての対象者の状況に関して、予見的であるか又は情報を提供する(例えば、予知的、診断的及び/又は予後的である)生体分子及び/又はその検出可能部分を広く指称し得る。好ましくは、本発明において意図されるバイオマーカーは、ペプチド-、ポリペプチド-及び/又はタンパク質-ベースである。用語「バイオマーカー」及び「マーカー」は、本明細書中で互換的に使用され得る。

10

【0061】

本明細書中での「本明細書中で教示される疾患及び/又は病状」への言及又は類似の言及は、当該記載の文脈と一致する限りにおいて、本明細書中に開示される任意の疾患及び病状を包含し、特に(ただし限定されないが)、妊娠高血圧疾患、好ましくは子癇前症を含む。

20

妊娠高血圧疾患(HDP)は、妊娠の間及び/又は分娩後(例えば、分娩後12週まで)の、高血圧を伴う疾患及び病状の異種集合を含む。

HDPは、便宜上、以下のとおり分類され得る：

- I. 妊娠により誘導される高血圧
 - a. 蛋白尿も(全身性)浮腫もなし
 - b. 蛋白尿又は(全身性)浮腫あり(すなわち、子癇前症)
 - i. 軽症
 - ii. 重症
 - c. 子癇
- II. 併発高血圧(慢性高血圧)
- III. 妊娠により悪化する高血圧(妊娠悪化型高血圧)
 - a. 混合型子癇前症
 - b. 間投型子癇

30

【0062】

最近の研究は、もはや、PEを軽症又は重症として分類せず、代わりにPE群を、妊娠期間に基づいて、好ましくは：a. 早期発生(すなわち、臨床症状発現<妊娠34週)；b. 予定より早い(preterm)(すなわち、妊娠34週<臨床症状発現<妊娠37週)；c. 予定通り(term)(すなわち、臨床症状発現 妊娠37週)と特定し得る。

そうでなければ、HPDは、既存の又は妊娠によると分類され得、母体又は胎児の症状、徴候又は検査結果が必要としている場合にはそれぞれのカテゴリーに「子癇前症を伴う」と付け加える。

40

【0063】

非蛋白尿性妊娠高血圧は、便宜上、4時間以上離して、例えば約4時間～約168時間離して2回別々に測定した場合の収縮期BP 140mmHg及び/又は拡張期BP 90mmHgの血圧として定義され得る。高血圧が妊娠前に測定されていたか又は妊娠20週前に測定される場合、通常は、慢性高血圧と呼ばれ得る。以前は正常血圧であった女性において妊娠20週後に高血圧が測定される場合、妊娠-誘導高血圧と呼ばれ得る。代表的には、妊娠-誘導高血圧は分娩後12週間以内に解消する。少なくとも140/90mmHgの血圧が測定されるが、6時間を越えて持続しないときには、一過性高血圧と呼ばれ得る。

蛋白尿性妊娠高血圧は、前段落で定義されるとおりであるが、更に24時間蓄尿中300mg

50

以上の総タンパク質を伴う。

【0064】

HDPはまた、当該分野で妊娠性高血圧、軽症子癇前症、妊娠-誘導高血圧、特異妊娠高血圧、妊娠中毒症などと通常呼ばれる疾患及び病状を包含する。

用語「妊娠期間」及び類似表現は、当該分野で広く知られ、通常、雌性体の最終月経期の第1日目から週単位で測定した期間をいう。正常妊娠のヒト妊娠期間は約38~42週、好ましくは約40週である。

「子癇前症」(PE)は、一般に、蛋白尿若しくは浮腫又はその両方を伴う高血圧によって特徴付けられる妊娠関連の疾患又は病状を指称する。PEはまた、糸球体機能障害、脳浮腫、肝臓浮腫、凝血異常及び/又は他の合併症を伴い得る。

PEは、便宜上、下記の徴候及び症状の組合せとして定義され得る：

(1) 妊娠20週後の収縮期血圧(BP) 140mmHg及び/又は拡張期BP 90mmHg(一般には、4時間以上離して、例えば約4~約168時間離して2回測定)

(2) 新たな蛋白尿の発生(尿検査時にディップスティックにより1+、24時間蓄尿中300mg以上のタンパク質、又はタンパク質/クレアチニン比 0.3を有する1つのランダム尿サンプル)、及び

(3) 分娩後12週までの高血圧及び蛋白尿の解消。

【0065】

重症PEは、便宜上、下記のように定義される：

(1) 収縮期BP 160mmHg又は拡張期BP 110mmHg(一般には、4時間以上離して、例えば約4~約168時間離して2回測定)、又は

(2) 24時間蓄尿中の3.5g以上の測定値若しくはディップスティックにより少なくとも3+タンパク質を有する2つのランダム尿標本により特徴付けられる蛋白尿。

PEにおいて、高血圧及び蛋白尿は、一般に、互いに7日以内に生じる。重症PEでは、重症高血圧、重症蛋白尿又はHELLP症候群(溶血、肝酵素上昇、血小板減少)又は子癇が同時に生じること、一時には1つの症状だけ生じることもある。

場合によっては、重症PEは、痙攣の発症、すなわち子癇に至ることがある。子癇はまた、幾つかの器官又は組織、例えば肝臓(例えば、肝細胞損傷、門脈周囲壊死)及び中枢神経系(例えば、大脳浮腫及び大脳出血)に対する機能障害又は損傷を含むことがある。

よって、HDPはまた、当該分野においてPEと一般に指称される、とりわけ軽症PE、重症PE及び更なる合併症を伴うPE、子癇及びHELLP症候群を含む疾患及び病状を包含する。

【0066】

用語「予知(する)」、「診断(する)」及び「予後予測する」又は「予後」は、医療及び臨床の実務において一般的な表現であり、十分に理解されている。句 所与の疾患又は病状の「診断、予知及び/又は予後の方法」はまた、前記疾患又は病状を「診断、予知及び/又は予後予測する方法」、又は前記疾患又は病状の「診断、予知及び/又は予後をなす(又は決定する若しくは確立する)方法」などのような句と互換であり得ると理解されるべきである。

更なる説明のためには、限定されないが、「予知(する)」とは、一般に、(未だ)疾患又は病状を有していない対象者における当該疾患又は病状の事前の宣言、指摘又は予告をいう。例えば、対象者における疾患又は病状の予知は、対象者が例えば或る期間内に又は或る年齢までに前記疾患又は病状を発症する確率、見込み又はリスクを示し得る。前記確率、見込み又はリスクは、とりわけ、絶対値、範囲又は統計量として示されてもよいし、適切なコントロール対象者又は対象者集団(例えば、一般的な正常又は健常対象者又は対象者集団)に関して相対的に示されてもよい。よって、対象者が疾患又は病状を発症する確率、見込み又はリスクは、有利には、適切なコントロール対象者又は対象者集団に関して、増減として又は何倍増若しくは減として示されてもよい。本明細書中で使用する場合、用語 対象者における本明細書中で教示される病状又は疾患の「予知」はまた、特に、対象者が当該病状又は疾患について「陽性の」予知を有すること、すなわち、対象者が当該病状又は疾患を有するリスクにある(例えば、リスクが、コントロール対象者又は対象者

10

20

30

40

50

集団に関して有意に増加している)ことを意味し得る。用語「対象者における本明細書中で教示される疾患又は病状「無しの予知」は、特に、対象者が当該疾患又は病状について「陰性の」予知を有すること、すなわち、対象者の当該疾患又は病状を有するリスクは、コントロール対象者又は対象者集団に関して有意には増加していないことを意味し得る。

【0067】

用語「診断(する)」とは、一般に、症状及び徴候に基づいて及び/又は種々の診断手順の結果から(例えば、診断する疾患又は病状に特徴的な1以上のバイオマーカーの存否及び/又は量を知得することから)対象者において疾患又は病状を認識、決定又は結論付けるプロセス又は行為をいう。本明細書中で使用する場合、対象者における本明細書中で教示される疾患又は病状の「診断」は、特に、対象者が当該疾患又は病状を有していること、よって対象者が当該疾患又は病状を有していると診断されることを意味し得る。対象者における本明細書中で教示される疾患又は病状「無しの診断」は、特に、対象者が当該疾患又は病状を有していないこと、よって対象者が当該疾患又は病状を有していないと診断されることを意味し得る。対象者は、当該疾患又は病状を連想させる1以上の従来症状又は徴候を示すにも関わらず、当該疾患又は病状を有していないと診断され得る。

用語「予後予測する」又は「予後」とは、一般に、疾患又は病状の進行及び回復の見通し(例えば、確率、期間及び/又は程度)についての予見をいう。本明細書中で教示される疾患又は病状の良好な予後は、一般に、好ましくは受容可能な期間内での、当該疾患又は病状からの満足のいく部分的な又は完全な回復の予見を包含し得る。当該疾患又は病状の良好な予後は、より通常には、好ましくは或る期間内での、当該疾患又は病状が更に悪化(worsening又はaggravating)しないとの予見を包含し得る。本明細書中で教示される疾患又は病状の不良な予後は、一般に、低水準の回復及び/又は不満足に遅い回復の予見を包含し得、当該疾患又は病状の回復が実質的にないことや当該疾患又は病状の更なる悪化の予見さえも包含し得る。

【0068】

本明細書中で使用する用語「対象者」又は「患者」は、代表的には、ヒトを指称するが、非-ヒト動物、好ましくは温血動物、より好ましくは胎生動物、更により好ましくは哺乳動物、例えば非-ヒト霊長類、げっ歯類、イヌ科動物、ネコ科動物、ウマ科動物、ヒツジ科動物、ブタ科動物などへの言及も包含し得る。特に、雌性対象者、より具体的には妊娠中又は分娩後の雌性対象者が意図される。

本明細書中で使用する用語「サンプル」又は「生物学的サンプル」には、対象者から得られた任意の生物学的標本が含まれる。サンプルには、全血、血漿、血清、赤血球、白血球(例えば、末梢血単核細胞)、唾液、尿、糞便(すなわち、大便)、涙、汗、皮脂、乳頭吸引液、管洗浄液、腫瘍滲出物、滑液、脳脊髄液、リンパ、細針吸引液、羊水、任意の他の体液、細胞溶解物、細胞分泌物、炎症液(inflammation fluid)、精液及び膻分泌物が含まれ得るが、これらに限定されない。好適なサンプルとしては、本明細書中で教示される任意の1以上のマーカータンパク質を検出可能な量で含んでなるものが挙げられ得る。好適な実施形態において、サンプルは、全血又はその分画成分(例えば、血漿、血清、又は細胞ペレット)であり得る。好ましくは、サンプルは、対象者からサンプルを取り出すか又は単離することが可能である最小限の侵襲法により容易に取得できる。また、サンプルとしては、組織サンプル及び生検、組織ホモジネートなどが挙げられ得る。好ましくは、本明細書中で教示される任意の1以上のマーカーのレベルを検出するために使用するサンプルは血漿である。用語「血漿」は、一般には、通常その中に血球(赤血球、白血球、血小板など)が懸濁されており、栄養素、糖類、タンパク質、ミネラル、酵素などを含有するが、細胞を含有しない、血液の実質的に無色の水状流体を指称する。

【0069】

分子若しくは分析物(例えば、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド)又は2以上の分子又は分析物(例えば、2種以上のタンパク質、ポリペプチド又はペプチド)の群は、該分子若しくは分析物又は該分子若しくは分析物の群の有無及び/又は量が、好ましくは他の分子及び分析物を実質的に排除して、サンプル中で検出又は決定されるとき、サンプル中

で「測定」される。

用語「量(quantity又はamount)」及び「レベル」は、同義であり、当該分野において広く十分に理解される。本明細書中で使用するこの用語は、特に、サンプル中の分子若しくは分析物の絶対的な定量又はサンプル中の分子若しくは分析物の相対的な定量、すなわち、別の値(例えば、本明細書中で教示される参照値)に対するか若しくはバイオマーカーのベースライン発現を示す或る範囲の値に対する相対的な定量をいい得る。これらの値又は範囲は、1人の患者又は一群の患者から取得することができる。

【0070】

サンプル中の分子又は分析物の絶対量は、有利には、重量若しくはモル量として表し得るか、又はより一般的には濃度として、例えば重量/体積若しくはモル/体積として表し得る。

10

サンプル中の分子又は分析物の相対量は、有利には、前記別の値(例えば本明細書中で教示される参照値)に対する増減として表し得るか又は何倍増若しくは何倍減として表し得る。第1及び第2のパラメータ(例えば、第1及び第2の量)の間の相対的比較の実施は、先ず、前記第1及び第2のパラメータの絶対値を決定してもよいが、そうしないでも済む。例えば、或る測定法は、前記第1及び第2のパラメータについて定量可能な読取値(例えば、シグナル強度)を生成することができるが、前記読取値は前記パラメータの値の関数であり、該読取値を直接比較して第1のパラメータ対第2のパラメータについての相対値を生成することができ、実際、読取値を先ずそれぞれのパラメータの絶対値に変換する必要はない。

20

【0071】

本明細書中で使用する場合、任意の1つのマーカー(バイオマーカー)、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に対する言及は、当該分野でそれぞれの呼称で通常知られているマーカー、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に対応する。この用語は、それが見出される任意の生物、特に動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、なおより好ましくは哺乳動物(ヒト及び非-ヒト哺乳動物を含む)、更により好ましくはヒトのマーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチドを包含する。この用語は、特に、天然型配列を有するマーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチド、すなわち、その一次配列が天然に見出されるか又は天然に由来するマーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチドのものと同じであるものを包含する。当業者は、異なる種間での遺伝的分岐(genetic divergence)に起因して、当該種間で天然型配列が異なり得ることを理解する。更に、天然型配列は、或る種の中での通常の遺伝的多様性(バラツキ)に起因して、同種の異なる個体群の間又は中で異なり得る。また、天然型配列は、転写後又は翻訳後修飾に起因して、同種の異なる個体群の間又は中でさえ異なり得る。マーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチドの任意のこのような変形体又はイソフォームが本発明において意図される。したがって、天然に見出されるか又は天然に由来するマーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチドの全ての配列を「天然型」とみなす。この用語は、生物、器官、組織又は細胞の一部を形成するとき、生物学的サンプルの一部を形成するとき及びこの様な供給源から少なくとも部分的に単離されたときのマーカー、核酸、タンパク質及びポリペプチドを包含する。この用語はまた、組換え又は合成手段により製造されたときのタンパク質及びポリペ

30

40

【0072】

例示のヒトの本明細書中で教示されるマーカー、核酸、タンパク質又はポリペプチドは、下記に示すNCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)又はSwissprot/Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)アクセッション番号で記載されるとおりであり得る。当業者はまた、幾つかの場合において、前記配列が、本明細書中で教示されるマーカー、核酸、タンパク質又はポリペプチドの前駆体(例えばプレタンパク質)のものであり、プロセッシングされて成熟分子から切り離される部分を含み得ることを理解し得る。当業者は更に、1以上のイソフォームのみが下記に列挙され得るが、全てのイソフォームが意図されていると理解し得る。他に特定されていなければ、下記の項目(entries)は、次の形式で示されてい

50

る：名称(コード；1以上の代表的なアミノ酸配列(例えば、イソフォーム)のGenbankアクセッション番号、Genbank配列バージョン「v.」)：

【0073】

インスリン様成長因子-結合性タンパク質複合体酸不安定鎖(ALS；NP_004961，v.1)。NP_004961で記載されている配列を下記に再掲する：

MALRKGG LALALLLLS WVALGPRSLEGADPGTPGEAEGPACPAACVCSYDDADELSVFCSSRNLTRLPDGVPGGTQALW
LDGNNLSSVPPAAAFQNLSSLGFLNLQGGQLGSLEPQALLGLENLCHLHLERNQLRSLALGTFHAHTPALASLGLSNNRLSR
LEDGLFEGLGSLWDLNLGWNSLAVLPDAAFRLGSLRELVLAGNRLAYLQPALFSGLAELRELDLSRNALRAIKANVFVQ
LPRLQKLYLDRNLI AAVAPGAFLGLKALRWLDLSHNRVAGLLEDTFPGLLGLRVLRLSHNAIASLRPRTFKDLHFLEELQ
LGHNRI RQLAERSFEGLGQLEVLTDHNQLQEVKAGAFGLTNVAVMNLSGNCLRNLPEQVFRGLGKHLHSLHLEGSC LGR
IRPHTFTGLSGLRRLFLKDNGLVGLIEEQSLWGLAELELDLTSNQLTHLPHRLFQGLGKLEYLLLSRNRLAELPADALGP
LQRAFWLDVSHNRLEALPNSLLAPLGRRLRYLSLRNNSLRFTFPQPGLERLWLEGNPWDCGCPKALRDFALQNP S AVPR
FVQAI CEGDDCQPPAYTYNNITCASPEVVGDLDRDLSEAHFAPC(配列番号33)

10

【0074】

ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン-含有タンパク質12(ADA12；NP_003465，v.3；NP_067673，v.2)

アンジオゲニン(ANG1；NP_001091046，v.1；NP_001136，v.1)

カルpain-1触媒サブユニット(CAN1；NP_005177，v.2)

マクロファージコロニー-刺激因子1レセプター(CSF1R；NP_005202，v.2)

C反応性タンパク質(CRP；NP_000558，v.2)

20

絨毛性ソマトマンモトロピンホルモン(CSH；NP_001308，v.1；NP_066271，v.1；NP_072166，v.1；NP_072167，v.1)

ジストログリカン(DAG1；NP_001159400，v.1；NP_004384，v.3)

ジベプチダーゼ2(DPEP2；NP_071750，v.1)

デスマグレイン-2(DSG2；NP_001934，v.2)

細胞外マトリクスタンパク質1(ECM1；NP_004416，v.2；NP_073155，v.2)

【0075】

エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼファミリーメンバー2(ENPP2；NP_001035181，v.1；NP_001124335，v.1；NP_006200，v.3)

フィブリリン-1(FBLN1；NP_001987，v.2；NP_006476，v.2；NP_006477，v.2；NP_006478，v.2)

30

フィブリリン-2(FBN2；NP_001990，v.2.)

プロバブルGタンパク質共役レセプター126(GP126；NP_001027566，v.1；NP_001027567，v.1；NP_065188，v.4；NP_940971，v.1)

肝細胞増殖因子-様タンパク質(HGFL；NP_066278，v.3.)

細胞間接着分子3(ICAM3；NP_002153，v.2)

転移-抑制因子KiSS-1(KISS1；NP_002247，v.3)

ロイシル-シスチニルアミノペプチダーゼ(LCAP；NP_005566，v.2；NP_787116，v.2)

ホスファチジルコリン-ステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT；NP_000220，v.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(PGBM；NP_005520，v.4)

40

【0076】

N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ(PGRP2；NP_443122，v.3)

ホスファチジルイノシトール-グリカン-特異的ホスホリパーゼD(PHLD；NP_001494，v.2；NP_803436，v.1)

ペルオキシレドキシシン1(PRD1；NP_002565，v.1；NP_859047，v.1；NP_859048，v.1)

ペルオキシレドキシシン2(PRD2；NP_005800，v.3)、

レセプター-タイプチロシン-プロテインホスファターゼS(PTPRS；NP_002841，v.3；NP_570924，v.2；NP_570925，v.2)

ラウンドアウトホモログ4(ROBO4；NP_061928，v.4)

タンパク質S100-A9(S10A9；NP_002956，v.1)

50

血清アミロイドA-4タンパク質(SAA4 ; NP_006503 , v.1)

テネイン-X (TENX ; NP_061978 , v.6 ; NP_115859 , v.2)

トレフォイル因子3 (TFF3 ; Swissprot/Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)アクセシ
ョン番号Q07654 , 配列バージョン1)

血管内皮増殖因子レセプター3 (VGFR3 ; NP_002011 , v.2 ; NP_891555 , v.2)

【0077】

例示のヒトの本明細書中で教示される他のマーカーは、下記のアクセシ
ョン番号で記載されるとおりであり得る。当業者はまた、幾つかの場合において、前記配列が、マーカー
の前駆体(例えばプレタンパク質)のものであり、プロセッシングされて成熟分子から切り
離される部分を含み得ることも理解し得る。他に特定されていなければ、下記の項目は
、次の形式で示されている：名称(コード；1以上の代表的なアミノ酸配列(例えば、イソ
フォーム)のSwissprot/Uniprotアクセション番号、Swissprot/Uniprot配列バージョン
「v.」)：

10

可溶性fms-様チロシンキナーゼ-1 (sFlt-1 , sVEGFR-1 ; P17948 , v.2 , イソフォームP17
948-2)

エンドグリン(ENG ; Genbankアクセション番号NP_000109 , v.1 ; NP_001108225 , v.1)

胎盤成長因子(PLGF ; P49763 , v.2 ; Genbankアクセション番号NP_002623 , v.2)

血管内皮増殖因子(VEGFA ; P15692 , v.2 ; 例えば、Genbankアクセション番号NP_00102
0537 , v.2(VEGFAイソフォームa))。

【0078】

20

本明細書中で生体分子、例えばマーカー(バイオマーカー)、ペプチド、ポリペプチド
又はタンパク質への言及は、そのフラグメントもまた包含し得る。よって、本明細書中
での任意の1つのマーカー又は生体分子(又はその量)の測定への言及は、マーカー又は生体
分子、例えば、成熟の及び/又はプロセッシングを受けた可溶性/分泌型形態(例えば、血漿
循環形態)のマーカー又は生体分子並びに/或いはその1以上のフラグメントの測定を包含
し得る。

例えば、任意のマーカー若しくは生体分子及び/又はその1以上のフラグメントは、測
定量が一纏めに測定した種の合計量に対応するように、一纏りで測定され得る。別の例
では、任意のマーカー若しくは生体分子及び/又はその1以上のフラグメントは、各々個別
に測定され得る。好ましくは、前記フラグメントは、血漿循環形態(すなわち、細胞結合
型でも膜結合型でもない形態)であり得る。理論に拘束されないが、このような循環形態
は、天然のプロセッシングにより全長のマーカー又は生体分子から誘導され得るか、又はサ
ンプル中で生じる既知の分解プロセスに起因し得る。或る状況では、循環形態はまた、血
漿中を循環していることが見出されている全長のマーカー又は生体分子であることもでき
る。よって、この「循環形態」は、サンプル中を循環している、すなわち該サンプルの細
胞画分にも膜画分にも結合していない任意のマーカー若しくは生体分子又は任意のプロセ
ッシングを受けた可溶形態のマーカー若しくは生体分子、又は前記のいずれかのフラグメン
トであり得る。

30

【0079】

文脈からそうでないことが明らかでなければ、本明細書中で任意の生体分子、例えば
マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質への言及は、それが見出される任意の
生物、特に、好ましくは動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、なお好ま
しくは哺乳動物(ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む)、更により好ましくはヒトに由来するも
のを包含する。

40

更に、文脈からそうでないことが明らかでなければ、本明細書中で任意のマーカー、
ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントへの言及は、一般に、前記
マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びフラグメントの改変形態、例えば
発現後修飾(例えば、リン酸化、グリコシル化、脂質化、メチル化、システイン化、スル
ホン化、グルタチオン化、アセチル化、メチオニンからメチオニンスルホキシド又はメチ
オニンスルホンへの酸化などを含む)を有する形態もまた包含し得る。

50

【0080】

1つの実施形態において、任意のマーカ-、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質及びそのフラグメント又は本発明で使用する他のバイオマーカ-及びそのフラグメントは、ヒトであり得る。すなわち、その一次配列は、天然に存在するヒトのマーカ-、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の対応する一次配列又はそれらの中に存在する対応する一次配列と同じであり得る。よって、この関係で限定詞「ヒト」は、それぞれのマーカ-、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又はフラグメントの、起源又は供給源よりむしろ一次配列に関する。例えば、このようなマーカ-、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又はフラグメントは、ヒト対象者のサンプル中に存在していてもよいし、該サンプルから単離されてもよく、又は他の手段(例えば、組換え発現、無細胞翻訳又は非生物学的ペプチド合成)により取得してもよい。

10

用語 タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの「フラグメント」は、一般に、N-末端及び/又はC-末端が欠失又は短縮化された形態の前記タンパク質、ポリペプチド又はペプチドをいう。この用語は、任意の機序、限定されないが、前記ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の、例えばオルタナティブ翻訳、エキソ-及び/又はエンド-タンパク質分解並びに/或いは分解、例えばインピボ又はインピトロでの、例えば物理的、化学的及び/又は酵素的タンパク質分解によって生じるフラグメントを包含する。限定されないが、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのフラグメントは、前記タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5%、又は少なくとも約10%、例えば 20%、30%又は 40%、例えば 50%、例えば 60%、70%又は 80%、更には 90%又は 95%を表し得る。

20

【0081】

例えば、フラグメントには、対応する全長タンパク質の 5連続アミノ酸、又は 10連続アミノ酸、又は 20連続アミノ酸、又は 30連続アミノ酸、例えば 40連続アミノ酸、例えば 50連続アミノ酸、例えば 60、70、80、90、100、200、300、400、500又は 600連続アミノ酸の配列が含まれ得る。

1つの実施形態において、フラグメントは、対応する成熟全長タンパク質又はその可溶性形態若しくは血漿循環形態と比較して、N-末端及び/又はC-末端が1~約20アミノ酸、例えば、1~約15アミノ酸、又は1~約10アミノ酸、又は1~約5アミノ酸だけ短縮化されていてもよい。

30

【0082】

1つの実施形態において、或るタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのフラグメントは、サンプルから有利には検出可能なペプチドを取得するように、前記タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのインピトロタンパク質分解により獲得されてもよい。例えば、このようなタンパク質分解は、適切な物理的、化学的及び/又は酵素的物質、例えば、プロテイナーゼ、好ましくはエンドプロテイナーゼ、すなわちタンパク質、ポリペプチド又はペプチド鎖で内部切断するプロテアーゼにより行われてもよい。適切なエンドプロテイナーゼの非限定的なリストには、セリンプロテイナーゼ(EC 3.4.21)、スレオニンプロテイナーゼ(EC 3.4.25)、システインプロテイナーゼ(EC 3.4.22)、アスパラギン酸プロテイナーゼ(EC 3.4.23)、メタロプロテイナーゼ(EC 3.4.24)及びグルタミン酸プロテイナーゼが含まれる。例示の非限定的エンドプロテイナーゼとしては、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、Lysobacter enzymogenesエンドプロテアーゼLys-C、Staphylococcus aureusエンドプロテアーゼGlu-C(エンドペプチダーゼV8)又はClostridium histolyticumエンドプロテイナーゼArg-C(クロストリパイン)が挙げられる。更なる公知の酵素又は未同定の酵素も使用し得る；当業者は、所望のペプチド形態を獲得するために、切断特異性及び頻度に基づいて、適切なプロテアーゼを選択することができる。好ましくは、タンパク質分解は、トリプシン型のエンドペプチダーゼ(EC 3.4.21.4)、好ましくはトリプシン、例えば(限定されないが)ウシ膵臓、ヒト膵臓、ブタ膵臓からのトリプシン調製物、組換えトリプシン、Lys-アセチル化トリプシン、溶液状のトリプシン、固体支持体に固定化したトリプシンなどにより行い得る。トリプシンは、とりわけ高い切断特異性及び効率に起因

40

50

して特に有用である。本発明はまた、任意のトリプシン-様プロテアーゼ、すなわち、トリプシンのものに類似する特異性を有するプロテアーゼの使用を企図する。他に、化学試剤をタンパク質分解に使用してもよい。例えば、CNBrはMetで切断することができ；BNPS-skatoleはTrpで切断することができる。処理条件、例えば、タンパク質濃度、酵素又は化学試剤濃度、pH、緩衝液、温度、時間は、用いる酵素又は化学試剤に依存して、当業者が決定することができる。

【 0 0 8 3 】

よって、上記のようなALS、ADA12、ANG1、CAN1、CSF1R、CRP、CSH、DAG1、DPEP2、DSG2、ECM1、ENPP2、FBLN1、FBN2、GP126、HGFL、ICAM3、KISS1、LCAP、LCAT、PGBM、PGRP2、PHLD、PRDX1、PRDX2、PTPRS、ROBO4、S10A9、SAA4、TENX、TFF3、VGFR3からなる群より選択されるマーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のいずれかの単離フラグメントもまた提供される。このようなフラグメントは、生物学的サンプル中の前記マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の存在及び量についての有用な情報をもたらす得る。このことにより、前記フラグメントの検出が関心事になる。よって、前記マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の本明細書中に開示されるフラグメントは有用なバイオマーカーである。

好適なフラグメントは、表1に列挙した配列番号1～32に記載の配列(これらは、それぞれのマーカーに関する情報を提供するために実施例で使用した)を含んでなってもよいし、該配列から本質的になってもよいし、又は該配列からなってもよい。

【 0 0 8 4 】

10

20

【表 1】

表 1.

コード	配列	配列番号	開始点*
ALS	ADPGTPGEAEGPACPAACVCSYDDDADELSVFCSSR	3	28
ADA12	QGKDLEKVKQR	1	230
ANGI	LTSPCKDINTFIHGKQR	2	58
CAN1	PTELSNPQFIVDGATR	4	88
CSF1R	IPVIEPSVPELVVKPGATVTELR	5	20
CRP	FGQTDMSR	6	17
CSH	VQTVPLSR	7	27
DAG1	HWPSEPSEAVR	8	30
DPEP2	QVYQKGLQDVNLR	9	98
DSG2	AWITAPVALR	10	50
ECM1	SEGGFTATGQR	11	21
ENG	ETVHCDLQVGPGR	12	26
ENPP2	SMYDPVFDATFHLR	13	232
FBLN1	DVLLLEACCADGHR	14	30
FBN2	CNCNSGYEPDASGR	15	793
GP126	THFGVLMDLPR	16	841
HGFL	SPLNDFQVLR	17	21
ICAM3	QPAVEEPAEVTATVLSR	18	164
KISS1	EKVASVGNSR	19	23
LCAP	ATNGKLFPAQIR**	20	155
LCAT	QPQAWKDR	21	218
PGBM	SIVPQGGSHSLR	22	1686
PGRP2	AGLLRPDYALLGHR	23	510
PHLD	CGLSTHVEIGHR	24	24
PRDX1/2	QITVNDLPVGR	25	140
PTPRS	PTLSVQQTPEGSLAR	26	836
ROBO4	QDSPPQILVHPQDQLFQGGPAR	27	28
S10A9	TCKMSQLER	28	2
SAA4	SFFKEALQGVGDMGR	29	23
TENX	AEGTTGLAPAGQTSESRP	30	3683
TFF3	EEYVGLSANQCAVPAKDR	31	22
VGFR3	QQQDLMPQCR	32	478

* 開始点は、それぞれのタンパク質中でペプチドが始まる位置を示す。

** 妊娠特異的形態の真の N 末端

【 0 0 8 5 】

特定の成分(例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はそのフラグメント)に言及するときの用語「単離(された)」は、一般に、その成分が、その天然環境の 1 以上の他の成分から分離して存在していること - 例えば、該他の成分から分離されているか又は該他の成分から分離して調製されていること - をいう。例えば、単離されたヒト又は動物タンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はフラグメントは、それが天然に存在するヒト又は動物の身体から分離して存在する。

本明細書中で使用する用語「単離(された)」は、好ましくは、修飾語「精製(された)」も包含し得る。本明細書中で使用する場合、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はそのフラグメントに言及する場合の用語「精製(された)」は、絶対的な純粋性を要求しない。代わりに、この用語は、そのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はフラグメントが、他のタンパク質との比較での豊富さ(簡便には、質量若しくは重量又は濃度で表現される)が生物学的サンプル中より大きい別個の環境にあることをいう。別個の環境とは、単一の媒体、例えば単一の溶液、ゲル、沈殿物、凍結乾燥物などをいう。精製されたペプチド、ポリペプチド又はフラグメントは、例えば、実験室での又は組換えの合

成、クロマトグラフィー、調製用電気泳動、遠心分離、沈澱、アフィニティー精製などを含む公知の方法により取得してもよい。

【0086】

精製されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はフラグメントは、別個の環境のタンパク質含量の、好ましくは 10重量%、より好ましくは 50重量%、例えば 60重量%、尚より好ましくは 70重量%、例えば 80重量%、更により好ましくは 90重量%、例えば 95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%を構成し得、100重量%を構成しさえしてもよい。タンパク質含量は、例えば、Lowry法(Lowryら, 1951. J Biol Chem 193: 265)により、任意にHartree 1972(Anal Biochem 48: 422-427)により記載された方法により決定してもよい。また、ペプチド又はポリペプチドの純度は、ク

10

ーマシーブルー染色又は好ましくは銀染色を使用して、還元又は非還元条件下でSDS-PAGEにより決定してもよい。

更に、検出可能な標識を含んでなる、単離された、本明細書中で教示されるマーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメンを開示する。これは、そのようなフラグメントの素早い検出を容易にする。本明細書を通して使用される用語「標識」は、検出可能で好ましくは定量可能な読取値又は特性を提供するために使用することができる、興味対象の実体、例えばペプチド若しくはポリペプチド又は特異的結合性物質に付着することができるか又はこれらの一部となることができる任意の原子、分子、成分又は生体分子をいう。標識は、質量分析的、分光学的、光学的、比色定量的、磁氣的、光化学的、生化学的、免疫化学的又は化学的手段により適切に検出可能であり得る。標識としては

20

【0087】

(限定されないが)、染料；放射性標識、例えば³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I；高電子密度試剤；酵素(例えば、イムノアッセイで通常使用される西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ)；結合性成分、例えばビオチン-ストレプトアビジン；ハプテン、例えばジゴキシゲニン；発光性、リン光性又は蛍光性成分；質量タグ(mass tag)；及び単独又は蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)により発光スペクトルを抑制若しくはシフトさせることができる成分との組合せでの蛍光染料が挙げられる。

例えば、標識は質量改変標識であり得る。好ましくは、質量改変標識には、ペプチドの1以上のアミノ酸における、対応する非標識ペプチドに関して明確に区別できる安定アイソトープの存在が含まれ得る。質量-標識ペプチドは、質量分析適用において、陽性コン

30

トロール、標準物質及び較正物質として特に有用である。具体的には、1以上の明確に区別できるアイソトープを含むペプチドは、化学的にはそっくりであり、クロマトグラフィー及び電気泳動で同様に分離し、また同様にイオン化及びフラグメント化する。しかし、適切な質量分析機では、このペプチド及び任意に、選択されたそのフラグメント化イオンは、識別可能なm/z比を示し、このため判別することができる。識別可能な安定アイソトープ対の例としては、HとD、¹²Cと¹³C、¹⁴Nと¹⁵N、又は¹⁶Oと¹⁸Oが挙げられる。通常、本発明において分析する生物学的サンプルのペプチド及びタンパク質は、実質的に、自然界で高い普及率(prevalence)を有する一般的なアイソトープ、例えばH、¹²C、¹⁴N及び¹⁶Oのみを含有し得る。この場合、質量-標識ペプチドは、天然での普及率が低い1以上の一般的でないアイソトープ、例えば、D、¹³C、¹⁵N及び/又は¹⁸Oで標識されてもよい。生物学的

40

的サンプルのペプチド又はタンパク質が1以上の一般的でないアイソトープを含む場合には、質量-標識ペプチドがそれぞれの一般的なアイソトープを含んでなり得ることも考えられる。

アイソトープ標識した合成ペプチドは、とりわけ、1以上のアイソトープ標識アミノ酸基質を使用して該ペプチドを合成若しくは組換え産生することにより、又は非標識ペプチドを化学的若しくは酵素的に修飾して1以上の明確に区別できるアイソトープを導入することによって取得してもよい。例示としてであって限定されないが、D-標識ペプチドは、市販の重水素化L-メチオニンCH₃-S-CD₂CD₂-CH(NH₂)-COOH又は重水素化アルギニンH₂NC(=NH)-NH-(CD₂)₃-CD(NH₂)-COOHの存在下で合成又は組換え産生されてもよい。標識ペプチドの合成又は組換え産生のために、重水素化形態又は¹⁵N-若しくは¹³C-含有形態が存在する

50

任意のアミノ酸が考えられ得ることが理解される。別の1つの非限定例において、ペプチドは、 $H_2^{16}O$ 又は $H_2^{18}O$ 中でトリプシンで処理されてもよく、これは前記ペプチドの $COOH$ -末端への2つの酸素(それぞれ ^{16}O 又は ^{18}O)の組込みを導く(例えば、US 2006/105415)。

【0088】

したがって、検出可能な標識を任意に含んでなる本明細書中に教示される任意の(単離された)マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントの、前記マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントの定性的又は定量的検出アッセイ(測定方法)における、特に対象者の本明細書中に教示される疾患又は病状の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための方法における、(陽性)コントロール、標準物質又は校正物質としての使用もまた企図される。マーカー、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドは、任意の形態で、とりわけ沈殿物、真空乾燥物、凍結乾燥物として、溶液中で液体若しくは凍結物として、又は固相上、例えば固相クロマトグラフィーマトリクス若しくはガラス若しくはプラスチック若しくは他の適切な表面上に共有結合的若しくは非共有結合的に固定されて(例えば、ペプチドのアレイ及びマイクロアレイの一部として)供給され得る。ペプチドは容易に調製され得、例えば、天然の供給源から単離されてもよいし、組換え的又は合成的に製造されてもよい。

更に、本明細書中に教示される任意の1以上の(単離された)マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントに特異的に結合し得る結合性物質を開示する。また、本明細書中に教示される1つの(単離された)マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントのみに特異的に結合し得る結合性物質も開示する。本明細書を通じて意図される結合性物質としては、とりわけ、抗体、アダプター、ホトアダプター、タンパク質、ペプチド、ペプチド類似体又は小分子を挙げることができる。

【0089】

本明細書を通して使用される用語「特異的に結合する」は、物質(本明細書中で「特異的-結合性物質」とも指称される)が、ランダムな若しくは無関係な他の分子を実質的に排除し、任意に構造的に関連する他の分子をも実質的に排除して、1以上の所望の分子又は分析物に、例えば1以上の興味対象のタンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド又はそのフラグメントに結合することを意味する。用語「特異的に結合する」は、物質がその意図する標的に排他的に結合することを必ずしも要求しない。例えば、物質は、結合条件下での当該意図する標的についての親和性が、非標的分子についての親和性より少なくとも約2倍大きい、好ましくは少なくとも約5倍大きい、より好ましくは少なくとも約10倍大きい、尚より好ましくは少なくとも約25倍大きい、更により好ましくは少なくとも約50倍大きい、尚更により好ましくは少なくとも約100倍又はそれ以上に大きい場合に、興味対象のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はそのフラグメントに特異的に結合するといってもよい。

好ましくは、物質は、意図する標的に、 $K_A = 1 \times 10^6 M^{-1}$ 、より好ましくは $K_A = 1 \times 10^7 M^{-1}$ 、尚より好ましくは $K_A = 1 \times 10^8 M^{-1}$ 、更により好ましくは $K_A = 1 \times 10^9 M^{-1}$ 、尚更により好ましくは $K_A = 1 \times 10^{10} M^{-1}$ 又は $K_A = 1 \times 10^{11} M^{-1}$ (ここで、 $K_A = [SBA_T] / [SBA][T]$ 、SBAは特異的結合性物質を示し、Tは意図する標的を示す)の結合親和定数(K_A)で結合し得る。 K_A の決定は、当該分野で公知の方法により、例えば、平衡透析及びScatchardプロット分析を用いて行うことができる。

本明細書を通して使用する特異的-結合性物質は、とりわけ、抗体、アダプター、ホトアダプター、タンパク質、ペプチド、ペプチド類似体又は小分子を含み得る。

【0090】

本明細書中で使用する場合、用語「抗体」はその最も広義の意味で使用され、一般には任意の免疫学的結合性物質をいう。この用語は、具体的には、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多価(例えば、二価、三価又はそれ以上の価)及び/又は多特異性抗体(例えば、二特異性又はそれ以上の特異性の抗体)、並びに所望の生物学的活性(特に、興味対象の抗原に特異的に結合する能力)を示す限りにおいて抗体フラグメント及びそのようなフラグメントの多価及

び/又は多特異性複合物を包含する。用語「抗体」は、免疫化を含んでなる方法により生成される抗体を含むのみならず、興味対象の抗原上のエピトープに特異的に結合し得る少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで作製される任意のポリペプチド、例えば組換え発現ポリペプチドもまた含む。よって、この用語は、インビトロで作製されるかインビボで産生されるかに関わらず、前記のような分子に適用される。

抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMクラスのいずれかであり得、好ましくはIgGクラス抗体であり得る。抗体は、ポリクローナル抗体、例えば抗血清又はそれから精製された(例えばアフィニティー精製された)免疫グロブリンであり得る。抗体は、モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体の混合物であり得る。モノクローナル抗体は、特定の抗原又は抗原内の特定のエピトープをより高い選択性及び再現性で標的することができる。例としてであって限定されないが、モノクローナル抗体は、Kohlerら、1975(Nature 256: 495)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製してもよく、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号のような)により作製してもよい。モノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリから、例えばClacksonら、1991(Nature 352: 624-628)及びMarksら、1991(J Mol Biol 222: 581-597)により記載される技術を用いて単離されてもよい。

10

【0091】

抗体結合性物質は抗体フラグメントであり得る。「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の、抗原-結合性領域又は可変領域を含有する部分を含んでなる。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv及びscFvフラグメント；ダイアボディ；リニア抗体；単鎖抗体分子；及び抗体フラグメントから形成された多価及び/又は多特異性抗体、例えばダイボディ、トリボディ及びマルチボディが挙げられる。上記呼称Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFvなどは、当該分野において確立された意味を有するものとする。

20

用語 抗体は、任意の動物種、好ましくは脊椎動物種(例えばトリ及び哺乳動物を含む)を起源とする抗体又は該動物種に由来する1以上の部分を含んでなる抗体を包含する。限定されないが、抗体はニワトリ、シチメンチョウ、ガン若しくはガチョウ、アヒル若しくはカモ、ホロホロ鳥、ウズラ又はキジであり得る。限定されないが、抗体はまた、ヒト、ネズミ(例えば、マウス、ラットなど)、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ(例えば、Camelus bactrianus及びCamelus dromaderius)、ラマ(例えば、Lama paccos、Lama glama又はLama vicugna)又はウマであり得る。

【0092】

当業者は、抗体が1以上のアミノ酸の欠失、付加及び/又は置換(例えば、保存的置換)を、その変更がそれぞれの抗原の結合を保存する限り、含み得ることを理解する。抗体はまた、その構成要素たるアミノ酸残基の1以上の天然又は人工的改変(例えば、グリコシル化など)を含み得る。

30

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体並びにそれらのフラグメントの製造方法は当該分野で周知であり、組換え抗体又はそのフラグメントの製造方法も同様である(例えば、Harlow及びLane、「Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow及びLane、「Using Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; 「Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques」, Zola編, CRC Press 1987, ISBN 0849364760; 「Monoclonal Antibodies: A Practical Approach」, Dean & Shepherd編, Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: 「Antibody Engineering: Methods and Protocols」, Lo編, humana Press 2004, ISBN 1588290921を参照)。

40

【0093】

用語「アプタマー」とは、標的分子(例えば、ペプチド)に特異的に結合することができる、一本鎖又は二本鎖のオリゴ-DNA、オリゴ-RNA又はオリゴ-DNA/RNA或いはそれらの任意のアナログをいう。有利には、アプタマーは、その標的に関して、かなり高い特異性及び親和性を提示することができる(例えば、 $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ オーダーの K_A)。アプタマーの作製は、とりわけ、米国特許第5,270,163号; Ellington & Szostak 1990(Nature 346: 818-822)

50

; Tuerk & Gold 1990 (Science 249: 505-510); 又は「The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications」, Klussmann 編, Wiley-VCH 2006, ISBN 3 527310592 (参照により本明細書中に組み込む) に記載されている。用語「ホトアプタマー」とは、標的分子と共有結合又は架橋することができる 1 以上の光反応性官能基を含有するアプタマーをいう。用語「ペプチド類似体」とは、対応するペプチドのトポロジーアナログ (topological analogue) である非-ペプチド物質をいう。ペプチドのペプチド類似体を合理的に設計する方法は、当該分野で公知である。例えば、硫酸化 8-マーペプチド CCK 26-33 に基づく 3 つのペプチド類似体及び 11-マーペプチドであるサブスタンス P に基づく 2 つのペプチド類似体の合理的設計並びに関連するペプチド類似体の設計原理は、Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134) に記載されている。

10

用語「小分子」とは、医薬に一般的に使用される有機分子に匹敵するサイズを有する化合物、好ましくは有機化合物をいう。この用語は、生物学的巨大分子 (例えば、タンパク質、核酸など) を包含しない。好適な小有機分子は、サイズが約 5000Da まで、例えば、約 4000Da まで、好ましくは 3000Da まで、より好ましくは 2000Da まで、更により好ましくは約 1000Da まで、例えば、約 900、800、700、600 まで又は約 500Da までの範囲である。

【0094】

よって、(任意に提示キャリアに付着されていてもよい) 本明細書中で教示される任意の 1 以上の (単離された) マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントを用いて (すなわち、免疫抗原として用いて)、動物、例えば非-ヒト動物 (例えば、実験動物又は家禽) を免疫する方法も開示する。免疫及び免疫血清からの抗体試剤の調製は、それ自体周知であり、本明細書の他の箇所で言及した文献に記載されている。免疫する動物には、任意の動物種、好ましくは温血種、より好ましくは脊椎動物種 (例えばトリ及び哺乳動物を含む) が包含され得る。限定されないが、抗体はニワトリ、シチメンチョウ、ガン若しくはガチョウ、アヒル若しくはカモ、ホロホロ鳥、ウズラ又はキジであり得る。限定されないが、抗体はまた、ヒト、ネズミ (例えば、マウス、ラットなど)、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ、ラマ又はウマであり得る。用語「提示キャリア」又は「キャリア」は、一般に、第 2 の分子に結合したとき、通常は追加の T 細胞エピトープの提供を通して、該第 2 の分子に対する免疫応答を増強する免疫原性分子を指称する。提示キャリアは、(ポリ)ペプチド性構造であってもよいし、非-ペプチド性構造、例えば、とりわけグリカン、ポリエチレングリコール、ペプチド模擬体、合成ポリマーなどであってもよい。例示の非限定的キャリアには、ヒト B 型肝炎ウイルスコアタンパク質、多重 C3d ドメイン、破傷風毒素フラグメント C 又は酵母 Ty 粒子が含まれる。

20

30

本明細書中で教示される免疫により取得されたか又は取得され得る免疫血清は、本明細書中で開示される任意の 1 以上の (単離された) マーカー、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質及びそのフラグメントに特異的に結合する抗体試剤を生じさせるに特に有用であり得る。

【0095】

サンプル中における、マーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び/又はそのフラグメント、任意に 1 以上のバイオマーカー又はそのフラグメントの有無 (例えば、読取値は、存在 対 存在しない; 又は、検出可能な量 対 検出不可能な量 である) 及び/又は量 (例えば、読取値は、絶対量又は相対量、例えば、絶対濃度又は相対濃度 である) を測定するために、任意の既存の、利用可能な又は従来 of 分離法、検出法及び定量法を本発明において使用することができる (サンプル中でこのように測定されるべき任意の興味対象の分子又は分析物 (本明細書中で教示される任意の 1 以上のマーカー、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質及びそのフラグメントを含む) を、下記でまとめてバイオマーカーと呼ぶこともある)。

40

例えば、このような方法には、イムノアッセイ法、質量分析法若しくはクロマトグラフィー法又はそれらの組合せが含まれ得る。

【0096】

用語「イムノアッセイ」とは、一般に、サンプル中の 1 以上の興味対象の分子又は分析

50

物を検出するためのものとして知られる方法をいう。ここで、興味対象の分子又は分析物に関するイムノアッセイの特異性は、特異的結合性物質(一般には抗体)と興味対象の分子又は分析物との間の特異的結合により与えられる。イムノアッセイ技術には、直接ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、間接ELISA、サンドウィッチELISA、競合ELISA、マルチプレックスELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ELISPOT技術及び当該分野で公知の他の類似技術が含まれるが、これらに限定されない。これらイムノアッセイ法の原理は、当該分野で公知である(例えばJohn R. Crowther, 「The ELISA Guidebook」, 第1版, Humana Press 2000, ISBN 0896037282)。

更なる説明としてであって限定されないが、直接ELISAは、サンプル中の標的抗原に結合しそのことにより該標的抗原を定量する、マイクロウェルプレートのような固体支持体に固定化された標識一次抗体を利用する。間接ELISAは、標的抗原に結合する非標識一次抗体と、抗原に結合した一次抗体を認識し、その定量を可能にする二次標識抗体とを使用する。サンドウィッチELISAでは、標的抗原は、抗原内の1つの抗原性部位に結合する固定化「捕捉」抗体を用いてサンプルから捕捉され、こうして捕捉された抗原が、非結合分析物の除去後に、前記抗原内の別の抗原性部位に結合する「検出」抗体を用いて検出される。ここで、検出抗体は、上記のように、直接標識されていてもよいし、間接的に検出可能であってもよい。競合ELISAは、一次抗体又は標的抗原のいずれかであり得る標識「競合物質」を使用する。一例では、固定された非標識一次抗体をサンプルとインキュベートし、この反応を平衡に到達させた後、標識標的抗原を加える。標識標的抗原は、一次抗体の結合性部位がサンプルの非標識標的抗原によって未だ占められていない限り、該一次抗体に結合する。よって、結合した標識抗原の検出量は、サンプル中の非標識抗原の量と逆相関する。マルチプレックスELISAは、単一区画(例えば、マイクロプレートウェル)内で、通常、複数のアレイアドレスで、2以上の分析物の同時検出を可能にする(更なるガイドランスについては、例えば、Nielsen & Geierstanger 2004. J Immunol Methods 290: 107-20、及びLingら, 2007. Expert Rev Mol Diagn 7: 87-98を参照)。理解されるように、ELISA技術における標識は、通常、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)接合により、エンドポイントは、代表的には、比色、化学発光又は蛍光、磁気、圧電、焦電などである。

【0097】

ラジオイムノアッセイ(RIA)は競合-ベースの技術であり、既知量の放射活性標識(例えば、 ^{125}I -又は ^{131}I -標識)標的抗原と該抗原に対する抗体との混合、次いでサンプル由来の非標識又は「非放射性(cold)」抗原の添加、及び置き換わった標識抗原の量の測定を含む(ガイドランスのために、例えば「An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques」, Chard T編, Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198を参照)。

一般に、ペプチドの質量、好ましくは選択したペプチドの断片化及び/又は(部分的)アミノ酸配列に関する正確な情報を取得することができる任意の質量分析(MS)技術(例えば、タンデム質量分析ではMS/MS; 又はポストソース分解ではTOF MS)が本発明において有用である。適切なペプチドMS及びMS/MS技術及びシステムは、それ自体周知であり(例えば、Methods in Molecular Biology, vol. 146: 「Mass Spectrometry of Proteins and Peptides」, Chapman編, Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. Methods Enzymol 193: 455-79; 又はMethods in Enzymology, vol. 402: 「Biological Mass Spectrometry」, Burlingame編, Academic Press 2005, ISBN 9780121828073を参照)、本発明において使用し得る。バイオマーカーペプチド分析に適切なMSアレンジメント、装置及びシステムとしては、限定されないが、マトリクス-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0より大きい整数); ESI 3D又はリニア(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; シリコン上での脱離/イオン化(desorption/ionization on silicon; 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;

10

20

30

40

50

大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS) ; APPI-MS/MS ; 及びAPPI-(MS)ⁿが挙げられ得る。タンデムMS(MS/MS)アレンジメントでのペプチドイオン断片化は、例えば衝突誘起脱離(CID)のような当該分野において確立された様式を用いて達成され得る。質量分析によるバイオマーカーの検出及び定量には、多重反応モニタリング(MRM)、例えば、とりわけKuhnら, 2004(Proteomics 4: 1175-86)により記載されたものが含まれ得る。MSペプチド分析法は、有利には、例えば下記に記載されるクロマトグラフィー法その他の方法のような、上流のペプチド又はタンパク質の分離法又は断片化法と組み合わせられ得る。

【0098】

クロマトグラフィーもまた、バイオマーカーの測定に使用することができる。本明細書中で使用する場合、用語「クロマトグラフィー」は、当該分野でそう呼ばれ、広範に利用可能である、化学物質の分離方法を包含する。好適なアプローチでは、クロマトグラフィーとは、液体又は気体の移動している流れ(「移動相」)により運ばれる化学物質(分析物)の混合物が、静止した液相又は固相(「静止相」)の周囲又は上部を流れるにつれ、該分析物が前記移動相と前記静止相との間で差分分布(differential distribution)する結果として成分に分離されるプロセスをいう。静止相は、通常、微粉化固体、フィルター材料のシート、又は固体表面上の液体の薄膜などであり得る。クロマトグラフィーはまた、例えば、アミノ酸、タンパク質、タンパク質のフラグメント又はペプチドなどのような、生物学的起源の化学化合物の分離に広く適用可能である。

本発明において使用するクロマトグラフィーは、好ましくはカラムクロマトグラフィー(すなわち、静止相がカラム中に堆積又は詰められている)、好ましくは液体クロマトグラフィー、より好ましくはHPLCであり得る。クロマトグラフィーの詳細は当該分野で周知であるが、更なるガイダンスのためには、例えばMeyer M., 1998, ISBN: 047198373X、及び「Practical HPLC Methodology and Applications」, Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993を参照。例示のクロマトグラフィータイプとしては、限定されないが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、順相HPLC(NP-HPLC)、逆相HPLC(RP-HPLC)、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)、例えばカチオン又はアニオン交換クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)(ゲル濾過クロマトグラフィー又はゲル透過クロマトグラフィーを含む)、等電点電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、例えばイムノ-アフィニティー、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0099】

クロマトグラフィー(一次元、二次元又はそれ以上の次元のクロマトグラフィーを含む)は、更なるペプチド分析法、例えば本明細書中の他の箇所に記載される下流の質量分析との組合せで、ペプチド断片化法として使用し得る。

本開示においてバイオマーカーの測定のために、上記の分析方法のいずれかと任意に組み合わせ、更なるペプチド又はポリペプチドの分離法、同定法又は定量法を使用し得る。このような方法としては、限定されないが、化学抽出分配、等電点電気泳動(IEF)(キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)、キャピラリー等速電気泳動(CITP)、キャピラリー通電クロマトグラフィー(CEC)などを含む)、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)、ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)、フリーフロー電気泳動(FFE)などが挙げられる。

【0100】

本明細書中で教示される種々の観点及び実施形態は、更に、サンプル中で測定された任意の1以上のバイオマーカーの量と前記1以上のバイオマーカーの量についての参照値との比較に基づき得る。ここで、前記参照値は本明細書中で教示される疾患又は病状の既知の予知、診断及び/又は予後を表す。

例えば、独特な参照値は、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状を有するリスク(例えば、異常に上昇したリスク)の予知 対 前記疾患又は病状を有するリスク無し又は通常のリスクの予知を表し得る。別の1つの例では、独特な参照値は、前記疾患及び病状を

10

20

30

40

50

有する異なる程度のリスクの予知を表し得る。

更なる1つの例では、独特な参照値は、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の診断 対 前記疾患又は病状無しの診断(例えば、健常の又は前記疾患若しくは病状から回復したことの診断など)を表すことがある。別の1つの例では、独特な参照値は、種々の重篤度の前記疾患又は病状の診断を表し得る。

更に別の1つの例では、独特な参照値は、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状についての良好な予後 対 前記疾患又は病状についての不良な予後を表し得る。更なる1つの例では、独特な参照値は、前記疾患又は病状について様々に(varyingly)好ましい又は好ましくない予後を表し得る。

【0101】

このような比較には、一般に、比較する値又はプロフィール間の少なくとも1つの差異の有無及び任意に該差異のサイズを決定する任意の手段が含まれ得る。比較には、測定値の目視検査、算術又は統計学的比較が含まれ得る。値又はバイオマーカープロフィールが少なくとも1つの標準を含むとき、当該値又はバイオマーカープロフィールにおける差異を決定するための比較はまた、バイオマーカーの測定値が内部標準物質の測定値と関連するように、これら標準物質の測定値を含み得る。

任意の1以上のバイオマーカーの量についての参照値は、他のバイオマーカーについて以前に使用された公知の手順に従って確立され得る。

例えば、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後についての任意の1以上のバイオマーカーの量の参照値は、前記疾患又は病状の前記特定の診断、予知及び/又は予後により特徴付けられる(すなわち、疾患又は病状の前記診断、予知及び/又は予後が当てはまる)一団体又は団体集団からのサンプル中の前記1以上のバイオマーカーの量を決定することによって確立され得る。このような集団は、限定されないが、2、10、100、又は数百以上でさえある個体を含んでなり得る。

【0102】

よって、例示として、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の診断 対 該疾患又は病状無しの診断についての任意の1以上のバイオマーカーの量の参照値は、それぞれ前記疾患又は病状を有している又は有していないと(例えば、臨床的徴候及び症状、イメージング、ECGなどのような他の適切な確定的手段に基づいて)診断された一団体又は団体集団からのサンプル中で前記1以上のバイオマーカーの量を決定することによって確立され得る。

1つの実施形態において、本明細書中で意図される参照値は、任意の1以上のバイオマーカーの絶対量を伝え得る。別の1つの実施形態において、検査した対象者からのサンプル中の任意の1以上のバイオマーカーの量は、参照値との直接比較で(例えば、増減又は何倍増若しくは減に関して)決定され得る。有利には、このことにより、任意の1以上のバイオマーカーのそれぞれの絶対量を先ず決定する必要なく、対象者からのサンプル中の前記1以上のバイオマーカーの量と参照値とを比較すること(換言すれば、参照値に関する、対象者からのサンプル中の任意の1以上のバイオマーカーの相対量を測定すること)が可能になり得る。

患者サンプル中のバイオマーカーの発現レベル又は存在は、時に、症状の変化(症状の出現、悪化又は改善)無しに変動、すなわち、顕著に増加又は減少し得る。そのような事象において、マーカー変化は、症状の変化に先行し、症状変化より高感度の尺度になる。治療的介入をより早く開始することができ、症状の悪化を待っているより効果的であり得る。より良性の状態での早期介入は自宅で安全に実施され得る。このことは、緊急治療室での重度に悪化した患者の治療からの大幅な改善である。

【0103】

よって、このような場合において、種々の時点で同じ患者の任意の1以上のバイオマーカーのレベルを測定することにより、該患者の状態の連続モニタリングが可能になり、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状に関する患者の病状の悪化又は改善の予知が導かれ得る。本明細書に示される自宅又は臨床検査キット又はデバイスは、この連続モニタ

10

20

30

40

50

リングに使用することができる。このような検査のための所与の疾患状態に関連する任意の1以上のバイオマーカーのレベルの1以上の参照値又は範囲は、例えば、当該対象者において、事前に又はモニタリングプロセスの間に或る一定期間にわたって決定することができる。或いは、これら参照値又は範囲は、高度に類似する疾患表現型を有する幾人かの患者(例えば、健常対象者又は興味対象の疾患又は病状を有していない対象者)のデータセットより確立することができる。任意の1以上のバイオマーカーのレベルの、前記参照値又は範囲からの突然の逸脱は、(しばしば重篤な)症状を現実を感じるか又は観察する前に、(例えば自宅又は病院で)患者の病状の悪化を予知することができる。

したがって、或る患者における、本明細書中で教示される任意の1以上のバイオマーカーのレベルの有意な変化(これは臨床状態の変化(悪化又は改善)を暗示する)を決定する方法又はアルゴリズムもまた開示する。加えて、本発明は、対象者が本明細書中で教示される所与の疾患又は病状から回復しつつあるか又は既に回復したという診断の確立を可能にする。

1つの実施形態において、本方法は、そのような参照値を確立する工程を含み得る。1つの実施形態において、本キット及びデバイスは、本明細書で教示される所与の疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後についての、本明細書中で教示される任意の1以上のバイオマーカー量の参照値を確立する手段を含み得る。この手段は、例えば、前記疾患又は病状の前記特定の診断、予知及び/又は予後により特徴付けられる1以上の個体からの1以上のサンプル(例えば、別個の又はプールしたサンプル)を含んでなり得る。

【0104】

本明細書中で教示される種々の観点及び実施形態は、更に、対象者からのサンプル中で測定される任意の1以上のバイオマーカーの量と所与の参照値との間の逸脱又は逸脱無しを発見を必要とする。

第1の値の第2の値からの「逸脱(deviation)」は、一般に、いずれの方向の変化(例えば、増加：第1の値 > 第2の値；又は減少：第1の値 < 第2の値)も、いずれの程度の変化も包含し得る。

例えば、逸脱は、限定されないが、比較がなされる第2の値に対し、第1の値の少なくとも約10%(約0.9倍以下)又は少なくとも約20%(約0.8倍以下)又は少なくとも約30%(約0.7倍以下)又は少なくとも約40%(約0.6倍以下)又は少なくとも約50%(約0.5倍以下)又は少なくとも約60%(約0.4倍以下)又は少なくとも約70%(約0.3倍以下)又は少なくとも約80%(約0.2倍以下)又は少なくとも約90%(約0.1倍以下)の減少を包含し得る。

例えば、逸脱は、限定されないが、比較がなされる第2の値に対し、第1の値の少なくとも約10%(約1.1倍以上)又は少なくとも約20%(約1.2倍以上)又は少なくとも約30%(約1.3倍以上)又は少なくとも約40%(約1.4倍以上)又は少なくとも約50%(約1.5倍以上)又は少なくとも約60%(約1.6倍以上)又は少なくとも約70%(約1.7倍以上)又は少なくとも約80%(約1.8倍以上)又は少なくとも約90%(約1.9倍以上)又は少なくとも約100%(約2倍以上)又は少なくとも約150%(約2.5倍以上)又は少なくとも約200%(約3倍以上)又は少なくとも約500%(約6倍以上)又は少なくとも約700%(約8倍以上)などの増加を包含し得る。

【0105】

好ましくは、逸脱とは、統計学的に有意な観察された変化をいい得る。例えば、逸脱とは、所与の集団における参照値の許容誤差範囲(例えば、標準偏差若しくは標準誤差、或いはそれらの所定倍、例えば $\pm 1 \times SD$ 若しくは $\pm 2 \times SD$ 又は $\pm 1 \times SE$ 若しくは $\pm 2 \times SE$ で表される)から外れる観察された変化をいい得る。逸脱とはまた、所与の集団における値により規定される参照範囲から外れる(例えば、当該集団における値の40%、50%、60%、70%、75%若しくは80%若しくは85%若しくは90%若しくは95%又は100%さえを含んでなる範囲から外れる)値をいい得る。

1つの更なる実施形態では、観察された変化が所与の閾値又はカットオフを超える場合、逸脱と結論付けられ得る。このような閾値又はカットオフは、診断法、予知法及び/又は予後法の選択された感度及び/又は特異性、例えば、少なくとも50%又は少なくとも60%又は少なくとも70%又は少なくとも80%又は少なくとも85%又は少なくとも90%又は少

10

20

30

40

50

なくとも95%の感度及び/又は特異性を提供するように、当該分野で周知のように選択し得る。

【0106】

例えば、1つの実施形態において、本明細書中で教示される所与の疾患若しくは病状無しの予知若しくは診断を表すか又は前記疾患若しくは病状についての良好な予後を表す参照値と比べて、対象者からのサンプル中における任意の1以上のバイオマーカの量の上昇 - 好ましくは少なくとも約1.1倍又は少なくとも約1.2倍、より好ましくは少なくとも約1.3倍、更により好ましくは少なくとも約1.4倍、なおより好ましくは少なくとも約1.5倍の上昇、例えば約1.1倍～3倍の上昇又は約1.5倍～2倍の上昇 - は、対象者が前記疾患若しくは病状を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者における前記疾患若しくは病状についての不良な予後を示すか、或いは対象者が前記疾患若しくは病状を有していないか若しくは有するリスクにないことを示すか、又は対象者における前記疾患若しくは病状についての良好な予後を示す。

対象者からのサンプル中における任意の1以上のバイオマーカの量と本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の或る診断、予知及び/又は予後を表す参照値との間に逸脱を発見したとき、逸脱は、対象者における前記疾患又は病状の診断、予知及び/又は予後が該参照値によって表されるものとは異なるとの結論を示すか、又は該結論に帰され得る。

対象者からのサンプル中における任意の1以上のバイオマーカの量と本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の或る診断、予知及び/又は予後を表す参照値との間に逸脱を発見しないとき、逸脱が無いことは、対象者における前記疾患又は病状の診断、予知及び/又は予後が該参照値によって表されるものと実質的に同じであるという結論を示すか、又は該結論に帰され得る。

【0107】

上記の考察は、バイオマーカプロフィールに同様に適用される。

2以上の異なるバイオマーカが対象者において決定されるとき、それぞれの有無及び/又は量は、測定された各バイオマーカについての値がその一部をなすバイオマーカプロフィールとして一緒に表され得る。本明細書中で使用する場合、用語「プロフィール」は、興味対象の病状と、例えば本明細書中で教示される所与の疾患及び病状の特定の診断、予知及び/又は予後と関係する独特な特徴又は特性を表す任意のデータセットを含む。この用語は、一般に、とりわけ核酸プロフィール、例えば遺伝子型プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上の遺伝子の遺伝子型を表す遺伝子型データセット)、遺伝子コピー数プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上の遺伝子の増幅又は欠失を表す遺伝子コピー数データのセット)、遺伝子発現プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上の遺伝子のmRNAレベルを表す遺伝子発現データのセット)、DNAメチル化プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上の遺伝子のDNAメチル化レベルを表すメチル化データのセット)、並びにタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのプロフィール、例えばタンパク質発現プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上のタンパク質のレベルを表すタンパク質発現データのセット)、タンパク質活性化プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上のタンパク質の活性化又は不活化を表すデータのセット)、タンパク質修飾プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上のタンパク質の修飾を表すデータのセット)、タンパク質切断プロフィール(興味対象の病状と関係する1以上のタンパク質のタンパク質分解性切断を表すデータのセット)、並びにこれらの任意の組合せを包含する。

【0108】

バイオマーカプロフィールは、多くの方法で作成され得、比のような方法又は他のより複雑な関係付け方法若しくはアルゴリズム(例えば、ルール-ベースの方法)を用いる、測定可能なバイオマーカ又はバイオマーカの性状の組合せであり得る。バイオマーカプロフィールは、少なくとも2つの測定値を含んでなる。ここで、測定値は、同じ又は異なるバイオマーカに対応させることができる。バイオマーカプロフィールはまた、少なくとも3、4、5、10、20、30又はそれより多い測定値を含んでなり得る。1つの実

施形態において、バイオマーカープロファイルは、数百の測定値又は数千の測定値さえ含んでなる。

よって、例えば、独特な参照プロファイルは、所与の疾患又は病状を有するリスク(例えば、異常に上昇したリスク)の予知 対 前記疾患又は病状を有するリスク無し又は通常のリスクの予知を表し得る。別の1つの例では、独特な参照プロファイルは、前記疾患又は病状を有するリスクの種々の程度の予知を表し得る。

更なる1つの例では、独特な参照プロファイルは、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の診断 対 前記疾患又は病状無しの診断(例えば、健常の又は前記疾患若しくは病状から回復したことの診断など)を表すことができる。別の1つの例では、独特な参照プロファイルは、種々の重症度の前記疾患又は病状の診断を表し得る。

更に別の1つの例では、独特な参照プロファイルは、本明細書中で教示される疾患又は病状についての良好な予後 対 前記疾患又は病状についての不良な予後を表し得る。更なる1つの例では、独特な参照プロファイルは、前記疾患又は病状についての様々に好ましいか又は好ましくない予後を表し得る。

【0109】

本発明において使用する参照プロファイルは、他のバイオマーカーについて以前に使用された公知の手順に従って確立され得る。

例えば、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後についての任意の2以上のバイオマーカーの量の参照プロファイルは、前記疾患又は病状の前記特定の診断、予知及び/又は予後によって特徴付けられる(すなわち、前記疾患又は病状の前記診断、予知及び/又は予後が当てはまる)一団体又は団体集団からのサンプル中でプロファイルを決断することにより確立し得る。このような集団は、限定されないが、2、10、100又は数百以上の個体さえ含んでなり得る。

よって、例示として、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の診断 対 該疾患又は病状無しの診断についての参照プロファイルは、それぞれ前記疾患又は病状を有していると診断されたか又は有していないと診断された一団体又は団体集団からのサンプル中でバイオマーカープロファイルを決断することによって確立し得る。

1つの実施形態において、本方法は、そのような参照プロファイルを確立する工程を含み得る。1つの実施形態において、本キット及びデバイスは、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の特定の診断、予知及び/又は予後についての参照プロファイルを確立する手段を含み得る。このような手段は、例えば、前記疾患又は病状の前記特定の診断、予知及び/又は予後によって特徴付けられる1以上の個体からの1以上のサンプル(例えば、別個の又はプールされたサンプル)を含んでなり得る。

【0110】

更に、当該分野で公知の多パラメータ分析を、必要な変更を加えて用いて、値及びそれから作成されるプロファイルの群間(例えば、サンプルのバイオマーカープロファイルと参照のバイオマーカープロファイルとの間)の逸脱を決断し得る。

サンプルプロファイルと本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の或る診断、予知及び/又は予後を表す参照プロファイルとの間に逸脱を発見すると、逸脱は、対象者における前記疾患又は病状の診断、予知及び/又は予後が参照プロファイルによって表されるものとは異なるという結論を示しているか又は該結論に帰され得る。

サンプルプロファイルと本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の或る診断、予知及び/又は予後を表す参照プロファイルとの間に逸脱を発見しないとき、逸脱が無いことは、対象者における前記疾患又は病状の診断、予知及び/又は予後が参照プロファイルによって表されるものと実質的に同じであるという結論を示しているか又は該結論に帰され得る。

【0111】

本発明は更に、患者サンプル中の任意の1以上のバイオマーカーのレベルを検出する手段を含んでなる、本明細書中で教示される疾患又は病状のいずれかの診断、予知、予後及び/又はモニタリング用のキット又はデバイスを提供する。より好適な実施形態において

、本発明のキットは、臨床セッティング又は家庭で使用することができる。本発明によるキットは、前記疾患若しくは病状の診断に、前記疾患若しくは病状に罹患している対象者の或る薬剤での処置の有効性のモニタリングに又は対象者における前記疾患若しくは病状の発生についての予防検診に使用することができる。

キット又はデバイスは、臨床セッティングにおいてはベッドサイドデバイスの形態であり得、或いは緊急救命チームのセッティングにおいては、例えば救急車その他の救急救命移動手段の装備若しくはチーム装備の一部として又は応急処置キットの一部としてであり得る。診断キット又はデバイスは、医師、応急救助者(first-aid helper)又は看護師を補助して、観察下の患者が本明細書中で教示される疾患又は病状を発症しているかどうかを決定することができ、その後、適切な行為又は処置を行うことができる。

家庭用検査キットにより、患者は、医師、応急救助者又は病院の救急救命部に連絡することができる読取り値を得られ、その後適切な行為をとることができる。このような家庭用検査デバイスは、本明細書中で教示される疾患若しくは病状のいずれかの病歴を有するか又は該疾患若しくは病状に罹患するリスクにある人々に特に重要である。

【0112】

本発明による代表的なキット又はデバイスは以下のエレメント：

a)対象者からサンプルを取得する手段

b)サンプル中で、本明細書中で教示される任意の1以上のマーカーの量を測定し、前記サンプル中の1以上のマーカーの量が或る閾値のレベル又は値を下回っているのか又は上回っているのかを視覚化する(対象者が本明細書中で教示される所与の疾患又は病状に罹患しているのか否かを示す)手段又はデバイスを含んでなる。

本発明の実施形態のいずれかにおいて、キット又はデバイスは、c)医師、病院の救急救命部又は応急処置所に直接連絡し、対象者が前記疾患又は病状に罹患しているのか否かを示す手段を追加的に含んでなることができる。

用語「閾値のレベル又は値」又は「参照値」は、同義語として互換的に使用され、本明細書で定義されるとおりである。この用語はまた、高度に類似する疾患状態を有する個々の患者又は患者群において決定される或る範囲のベースライン(例えば「乾燥重量」)値であり得る。

【0113】

本明細書中で規定されるキットはいずれも、対象者自身又は医師による使用のために、ベッドサイドデバイスとして使用することができる。

本発明のキットにおいて、対象者からサンプルを取得する手段(a)は、当該分野で公知である、対象者からサンプルを取得する任意の手段であり得る。例えば血液サンプルを取得するための例は当該分野で公知であり、任意の種類指又は皮膚プリック又はランセットベースのデバイスであり得る。これらは、基本的には、皮膚に穴を開け、皮膚から血液小滴を放出させる。尿サンプルを使用するとき、対象者からサンプルを取得する手段は、当該分野で公知の家庭用妊娠検査で使用されるもののような吸収ストリップの形態であり得る。同様に、唾液サンプルは、当該分野で公知の綿球(mount swab)を用いて取得し得る。採血デバイス又は他の採取デバイスの例は、例えば、米国特許第4,802,493号、同4,966,159号、同第5,099,857号、同6,095,988号、同5,944,671号、同4,553,541号、同3,760,809号、同5,395,388号、同5,212,879号、同5,630,828号、同5,133,730号、同4,653,513号、同5,368,047号、同5,569,287号、同4,360,016号、同5,413,006号及び米国出願公開2002/11565、同2004/0096959、同2005/143713、同2005/137525、同2003/0153900、同2003/0088191、WO9955232、WO2005/049107、WO2004/060163、WO02/056751、WO02/100254、WO2003/022330、WO2004/066822、WO97/46157、WO2004/039429又はEP0364621、EP0078724、EP1212138、EP0081975又はEP0292928に示されている。サンプルを提供又は取得する方法は、限定されない。

【0114】

本発明のキットにおいて、サンプル中の任意の1以上のマーカーの量を測定する手段又

はデバイス(b)は、サンプル中の前記1以上のマーカの量を特異的に検出することができる任意の手段又はデバイスであることができる。例は、固相、例えば当該分野で周知の側方流動ストリップ又はディップスティックデバイスなどに付着させた前記1以上のマーカについての特異的結合性分子を含んでなるシステムである。生化学アッセイを実施するための1つの非限定的例は、膜の洗浄を必要としない組合せである検査-ストリップ及び標識抗体を使用することである。検査ストリップは、例えば妊娠検査キット(該キットでは、抗-hCG抗体が支持体上に存在し、hCGと複合体化して、尿のフローによって固定化第2抗体上へ運ばれて、視覚化される)の分野で周知である。このような家庭用検査デバイス、システム又はキットの他の非限定的例は、例えば以下のものに見出すことができる：米国特許第6,107,045号、同6,974,706号、同5,108,889号、同6,027,944号、同6,482,156号、同6,511,814号、同5,824,268号、同5,726,010号、同6,001,658号又は米国出願公開2008/0090305又は2003/0109067。

10

【0115】

1つの好適な実施形態において、本発明は側方流動デバイス又はディップスティックを提供する。このようなディップスティックは、一方の端部(ここにサンプルが適用される)から他方の端部(ここでサンプル中の分析物の存在を測定する)へのキャピラリフローによるサンプルの移動を可能にする検査ストリップを含んでなる。

別の1つの実施形態において、本発明は試剤ストリップを含んでなるデバイスを提供する。このような試剤ストリップは、サンプルで湿らせたとき分析物の存在下で色変化を生じ及び/又はサンプル中のタンパク質の濃度を示す1以上の検査パッドを含んでなる。

20

本発明のキットの1つの好適な実施形態において、サンプル(b)中のタンパク質の量を測定する手段又はデバイス(1)は、近位端(2)及び遠位端(3)を有する固体支持体(7)であり、該固体支持体は、以下：

- 近位端近傍のサンプル適用ゾーン(4)、
- サンプル適用ゾーン(4)に対して遠位の反応ゾーン(5)、及び
- 反応ゾーン(5)に対して遠位の検出ゾーン(6)

を含んでなり、該支持体は、適用ゾーンに適用された流体サンプルの近位端から遠位端への向きのフローを導くキャピラリ特性を有し、

- 任意に、前記手段又はデバイスは、例えばコンテナ、点滴ピペット又はバイアル中に、粘性サンプルがストリップを通してより容易に流動することを可能にする流体の供給源も含んでなる。

30

【0116】

反応ゾーン(5)は、検出剤(例えばコロイド金)に接合した任意の1以上のマーカについての結合性分子の1以上のバンド(10)を含んでなる。ここで、該結合性分子接合体は、流体のキャピラリフローと共に移動することができるように、固体支持体上に配置する(すなわち、固定されていない)。検出ゾーン(6)は、固体支持体に固定された任意の1以上のマーカについての結合性分子の集団を含有する1以上の捕捉バンド(11)を含んでなる。

サンプルは、サンプル適用ゾーン(4)に適用されると、キャピラリフローにより反応ゾーン(5)へ向かって移動する。サンプル中に存在する任意の1以上のマーカが標識された結合性分子接合体と反応し、そうして形成された複合体がキャピラリフローにより検出ゾーン(6)へ運ばれる。検出ゾーン(6)は、その上に結合性分子が不可逆的に固定されており、複合体を捕捉し固定化する。これにより、接合体の局所的な濃縮を生じ、視覚化が可能になる。

40

本明細書に記載される2つのゾーン(5及び6)(一方のゾーンは非固定接合体を有し、他方のゾーンは固定された捕捉抗体を有する)は、一般に、重ならない。それらは、固体支持体の(バンドの無い)介在ギャップ有り又は無しで、隣接して配置され得る。バンドは、固体支持体上に、試剤を移動させる必要があるかないかに依存して、任意の手段、例えば吸収、吸着、被覆、共有結合又は乾燥により配置され得る。

【0117】

50

サンプル中における任意の1以上のマーカのレベルが或る所定の閾値レベル又は値より高くなる時のみシグナルを生成する半定量検査ストリップを得るためには、固定されていない接合体化結合性分子を含んでなる反応ゾーン(5)はまた、前記1以上のマーカについての所定量の固定された捕捉抗体も含んでなり得る。これにより、サンプル中に存在する或る量(事前に決定した閾値レベル又は値に対応する)の前記1以上のマーカを捕捉して除去することが可能になる。次いで、(あれば)残存する量の、接合体化又は標識化された結合性分子に結合した前記任意の1以上のマーカが、検出ゾーン(6)に移動する。この場合、反応ゾーン(6)は、標識化結合性分子-バイオマーカ複合体だけを受容し、サンプル中における前記1以上のバイオマーカのレベルが所定の閾値レベル又は値より高いときにのみ、その後シグナルを生成する。

10

サンプル中における任意の1以上のマーカの量が或る閾値レベル又は値を下回っているか又は上回っているかを決定する別の可能性は、サンプル中に存在する全ての前記1以上のマーカを捕捉する一次捕捉抗体を、固相に結合したとき或るシグナル又は色を発生する標識二次抗体と組み合わせて使用することである。次いで、色又はシグナルの強度は、シグナル強度が或る閾値シグナルを上回ったとき検査は陽性であることを示す参照の色又はシグナルチャートと比較され得る。或いは、色又はシグナルの量又は強度は、例えば光吸収センサ又は光照射メータを含んでなる電子デバイスで測定することができ、これにより、生成されたシグナル強度又は色吸収の数値が得られる。数値は、次いで、閾値を下回っていれば陰性結果の形で、閾値を上回っていれば陽性結果の形で対象者に提示され得る。この実施形態は、患者における前記1以上のマーカのレベルを経時的にモニターするときに特に適切である。

20

【0118】

参照値又は範囲は、例えば、対象者が所与の疾患又は病状を有していない期間に、家庭用デバイスを用いて決定することができる。これにより、患者に、任意の1以上のマーカについての自身のベースラインレベルが示される。よって、家庭用検査デバイスの定期的使用により、対象者に、ベースラインレベルと比較したときの前記1以上のマーカのレベルの突然の変化を注意喚起することができ、医師への連絡を可能にする。

或いは、参照値は、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状に罹患している対象者において決定することができる。この参照値は、任意の1以上のマーカについての個人的な「リスクレベル」、すなわち前記疾患又は病状に曝されているか又は間もなく曝されることを示す前記1以上のマーカのレベルを示す。このリスクレベルは、疾患進行のモニタリング又は処置効果の評価のために興味深い。

30

更に、参照値又はレベルは、高度に類似する疾患状態又は表現型を有する(例えば全員が本明細書中で教示される疾患若しくは病状を有しないか又は全員が前記疾患若しくは病状を有する)対象者における測定結果の組合せにより確立することができる。

【0119】

その原理が本発明による家庭用検査デバイスに使用され得る当該分野で公知の半定量検査の非限定的例は、Sanitoetsが販売しているHIV/AIDS検査又は前立腺ガン検査である。家庭用前立腺検査は、全血中4 ng/mlより高い血中PSAレベルを検出する初期の半定量検査として意図された迅速検査である。代表的な家庭用自己検査キットは、以下の構成要素を含んでなる：血液サンプルが適用され、タンパク質レベルが或る閾値レベルを上回るとシグナルを生じる検査デバイス；サンプル適用ゾーンからシグナル検出ゾーンへの分析物(すなわち興味対象のタンパク質)の移行を助ける、例えば点滴ピペット中の、或る量の希釈剤；任意に、血液標本採集用の空ピペット；指穿刺デバイス；任意に、穿刺領域を清浄するための滅菌綿棒；及びキットの使用指示書。

40

類似の検査もまた、例えば乳ガン検出用及び心臓リスクの家庭検査を考慮したCRP-タンパク質レベル検出用に知られている。後者の検査は、検査結果の検査機関への送付を包含し、そこで結果が技術専門家又は医療専門家により解釈される。このような患者病状の電話又はインターネットベースの診断は、当然のことながら、ほとんどのキットで可能であり、推奨される。なぜならば、検査結果の解釈はしばしば、検査の実施より重要であるか

50

らである。サンプル中に存在するタンパク質のレベルの数値を提供する上記のような電子デバイスを使用するとき、この値は、当然のことながら、電話、携帯電話、衛星電話、電子メール、インターネットその他の通信手段で容易に通信でき、対象者が本明細書中で教示される疾患及び病状に罹患しているか又は罹患するリスクにあり得ることを病院、医師又は応急処置チームに警告することができる。このようなシステムの非限定的例は、米国特許第6,482,156号に開示されている。

【0120】

下記の説明で、本発明の特定の実施形態を例証する図面への言及がなされる；図面は、限定を意図するものではない。当業者は、当業者の共通の実務に従って、デバイス及び代わりの成分及び特徴を適応させ得る。

図14A及びBは、本発明の検査ストリップの1つの好適な実施形態を示す。ストリップ(1)は近位端(2)及び遠位端(3)を含む。サンプル適用ゾーン(4)は近位端(2)に設けられ、反応ゾーン(5)はそれに隣接し、検出ゾーン(6)は遠位端(3)近傍にある。サンプルは、固体支持体(7)上、適用ゾーン(4)に置かれ、毛管作用により検出ゾーン(6)へ移され得る。サンプル適用ゾーン(4)の領域を除き、固体支持体(7)の片面又は両面を覆う保護層(8)を備えていてもよい。この保護層は、サンプル及びストリップの化学成分を汚染及び蒸発から保護する。固体支持体(7)のサンプル適用ゾーン(4)と毛管接触する1以上の吸収パッド(9)が、必要に応じて、サンプルを吸収及び放出し得る；このパッド(9)は、代表的には、サンプル適用ゾーン(4)と同じか又は反対の固体支持体(7)表面に配置される。図14Bにおいて、吸収パッド(9)はサンプル適用ゾーン(4)の一部である。1以上の他の吸収パッド(9')が、固体支持体(7)の検出ゾーン(6)に毛管接触して、いずれの捕捉バンド(11)、(14)に対しても遠位に配置され得る。これらパッド(9')は、固体支持体を通して流体を吸収し得る；このパッド(9')は、代表的には、サンプル適用ゾーン(4)と同じか又は反対の固体支持体(7)表面に配置される。固体支持体(7)は、毛管作用特性を有する任意の適切な材料から作製され得、上記と同じ特性を有し得る。これは、水和すると毛管作用による流体フローによって固体支持体を横切って移動することができる物質(例えば、任意の1以上のマーカについての非固定化結合性分子)を支持することもできるべきである。

【0121】

固体支持体(7)はまた、反応ゾーン(5)中、サンプル適用ゾーン(4)に対して遠位に位置する、任意の1以上のマーカについての結合性分子接合体のバンド(10)を含んでなり得る。サンプル中の前記任意の1以上のマーカは、毛管作用によりこのバンド(10)に向かって運ばれ、そこで、不可逆的に固定された結合性分子接合体と反応する。

結合性分子接合体には、検出が容易となるように、検出剤が結合又は付着していてもよい。ラポ検出剤の例としては、限定されないが、発光標識；色素のような比色標識；蛍光標識；又は電気活性剤(例えば、フェロシアン化物)のような化学標識；酵素；放射活性標識；又は高周波標識が挙げられる。より一般的には、検出剤は粒子である。本発明の実施に有用な粒子の例としては、限定されないが、コロイド金粒子；コロイドイオウ粒子；コロイドセレン粒子；コロイド硫酸バリウム粒子；コロイド硫酸鉄粒子；ヨウ素酸金属粒子；ハロゲン化銀粒子；シリカ粒子；コロイド金属(含水)酸化物粒子；コロイド硫化金属粒子；コロイドセレン化鉛粒子；コロイドセレン化カドミウム粒子；コロイド金属リン酸塩粒子；コロイド金属フェライト粒子；有機層又は無機層で被覆した上記コロイド粒子のいずれか；タンパク質又はペプチド分子；リボソーム；又はポリスチレンラテックスビーズのような有機ポリマーラテックス粒子が挙げられる。好ましい粒子は、コロイド金粒子である。コロイド金は、G. Frens, 1973 Nature Physical Science, 241:20(1973)に概説される方法のような任意の従来手段により作られ得る。代替法は、米国特許第5,578,577号、同第5,141,850号；同第4,775,636号；同第4,853,335号；同第4,859,612号；同第5,079,172号；同第5,202,267号；同第5,514,602号；同第5,616,467号；同第5,681,775号に記載され得る。

【0122】

固体支持体(7)は、検出ゾーン(6)に1以上の捕捉バンド(11)を更に含んでなる。捕捉バンドは、そこに不可逆的に固定された任意の1以上のマーカーについての結合性分子の集団を含んでなる。反応ゾーン(5)で形成されたマーカー-結合性分子接合体の複合体は、検出ゾーン(6)に向かって移動し、そこで、前記バンド(11)が移動中の複合体を捕捉して濃縮する。こうして、肉眼によるか又は読取り機を用いるかのいずれかでの視覚化が可能になる。反応ゾーン(5)及び検出ゾーン(6)に存在する結合性分子は、前記1以上のマーカーの同じ部分と反応してもよいし、前記1以上のマーカーの異なる部分と反応してもよい。

1以上のコントロールバンド(12)が固体支持体(7)上に存在してもよい。例えば、非固定化ペプチド(12)がサンプル適用ゾーン(4)に存在し得る。このペプチドは、任意の1以上のマーカーについての結合性分子のいずれのバンド(13)及び(14)とも交差反応しない。サンプルを適用すると、該サンプルは反応ゾーン(5)に向かって移動する。そこには、抗-ペプチド抗体接合体が配置されており(13)、ペプチド-抗体複合体が形成される。該複合体は、検出ゾーン(6)に向かって移動し、そこには抗-ペプチド抗体の捕捉バンド(14)が固体支持体上に固定されており、これが該複合体を濃縮して視覚化を可能にする。コントロール捕捉バンド(14)は、任意の1以上のマーカーについての捕捉バンド(11)とは別個に位置し、したがって、陽性反応は、アッセイが正しく機能したときに、検出反応とは別個に観察することができる。

【0123】

本発明によるコントロールの特別な利点は、それが内部コントロールであること-すなわち、任意の1以上のマーカーについての測定結果と比較し得るコントロールが、個々の固体支持体上に存在することである。したがって、本発明によるコントロールは、例えば、固体支持体における変動性を補正するために使用し得る。このような補正は、例えば支持体の統計学的サンプリングに基づく外部コントロールでは実行不可能であろう。加えて、ロット毎、試行毎(run-to-run)の異なる支持体間の変動が、本発明によるコントロール結合性物質及びコントロール物質の使用によって最小化され得る。更に、非特異結合の影響が低減し得る。これら補正は全て、外部の、支持体上にないコントロールでは実施することが困難である。

アッセイの間、サンプルからの任意の1以上のマーカーと結合性分子接合体とは、固体支持体(7)上で結合して濃縮する。この結合により、固体支持体(7)の背景色を超えて視覚化され得る化合物の濃縮が生じる。この化合物は、反応及び検出ゾーンに結合した抗体、検出剤、その他の粒子を含む上記化合物の結合から形成され得る。実施される特定のアッセイに基づいて、反応及び検出ゾーンは、線形又は非線形であり得る適切なダイナミックレンジを達成するように選択して提供され得る。

【0124】

アッセイを実施するための固体支持体(7)は、例えば図15に示すカートリッジ(20)内に収容され得る。カートリッジは、1以上の開口部を除き、好ましくは防水性である。固体支持体(7)は、近位端(2)の適用ゾーン(4)を提供するようにカートリッジの開口部(21)を通じて曝され、遠位端(3)近くの検出ゾーン(6)の読取りが可能となるように別の開口部(22)を通じて曝されている。カートリッジ(20)は、読取りデバイスとの通信用のセンサコード(23)を備え得る。

サンプル中の任意の1以上のマーカーの存在及び/又は濃度は、前記1以上のマーカーについての結合性分子が固定されているチップを使用する表面プラズモン共鳴(SPR)、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)、蛍光消光、蛍光偏光測定又は当該分野で公知のその他の手段により測定することができる。記載された結合アッセイのいずれも、サンプル中の任意の1以上のマーカーの存在及び/又は濃度を決定するために使用することができる。そうするために、使用する結合アッセイに適切に、任意の1以上のマーカーについての結合性分子をサンプルと反応させ、前記1以上のマーカーの濃度を測定する。アッセイを検証及び較正するため、種々の濃度の1以上の標準マーカー及び/又は該1以上のマーカーについての結合性分子を使用するコントロール反応を実

10

20

30

40

50

施することができる。固相アッセイを用いる場合、インキュベーション後、洗浄工程を行って未結合のマーカを除去する。所与の標識に適切なように結合マーカを測定する(例えば、シンチレーションカウンティング、蛍光、抗体-色素など)。定性的な結果が望ましい場合、コントロール及び異なる濃度は必要ないかもしれない。当然のことながら、前記1以上のマーカ及び結合性分子の役割は、切り替わり得る；当業者は、結合性分子が種々の濃度のサンプルに適用されるように方法を適合させ得る。

【0125】

本発明において意図される結合性分子は、任意の1以上のマーカに特異的に結合する任意の物質である。本発明による有用な結合性分子の例としては、限定されないが、抗体、ポリペプチド、ペプチド、脂質、糖質、核酸、ペプチド-核酸、小分子、小有機分子、又は他の薬剤候補が挙げられる。結合性分子は、天然化合物又は合成化合物であり得、例えば合成小分子、動物、植物、細菌又は真菌細胞の抽出物並びに前記細胞からの条件付け培地に含有される化合物を含み得る。或いは、結合性分子は、前記1以上のマーカについての結合部位を有する工学的に操作されたタンパク質であり得る。本発明の1つの観点によれば、結合性分子は、 10^{-6} Mより良好な親和性で前記1以上のマーカに特異的に結合する。適切な結合性分子は、前記1以上のマーカの標準サンプルとの結合から決定することができる。結合性分子と前記任意の1以上のマーカとの間の結合を決定する方法は、当該分野で公知である。本明細書中で使用する場合、用語「抗体」には、限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化又はキメラ抗体、工学的に操作した抗体及びタンパク質への結合に十分な生物学的に機能的な抗体フラグメント(例えばscFv、ナノボディ、Fvなど)が含まれる。この抗体は、例えばマウス、ラット、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体のような前記1以上のマーカに対する市販の抗体であり得る。

結合性分子は、別の物質(例えばプローブ結合性パートナー)での検出を可能にするタグで標識され得る。このタグは、例えば、ビオチン、ストレプトアビジン、his-タグ、mycタグ、マルトース、マルトース結合性タンパク質又は結合性パートナーを有する当該分野で公知の任意の種類タグであり得る。プローブ：結合性パートナーの組合せに利用できる組の例は、任意であり、例えばビオチン：ストレプトアビジン、his-タグ：金属イオン(例えば Ni^{2+})、マルトース：マルトース結合性タンパク質を含む。

【0126】

サンプル中の任意の1以上のマーカの存在を決定するための簡便で正確な比色試剤ストリップ及び方法を更に開示する。より具体的には、本発明はまた、試剤ストリップを含んでなるデバイスに関する。本試剤ストリップは、サンプル中の任意の1以上のマーカの存在を測定するための少なくとも1つの検査パッドを備えた固体支持体を含んでなる。該検査パッドは、好ましくは、前記1以上のマーカと相互作用して測定可能な応答、好ましくは視覚的に又は装置により測定可能な応答を生成することができる試剤組成物が組み込まれたキャリアマトリクスを含んでなる。試剤ストリップは、任意のサイズ及び形状で製造されてもよいが、一般に試剤ストリップは縦長である。固体支持体は、任意の適切な材料から構成されてもよく、好ましくは酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリカーボネート又はポリスチレンのような堅固な材料から作られる。一般には、キャリアマトリクスは、尿サンプルが毛管力により該キャリアマトリクスを移動して試剤組成物に接触し、検出可能又は測定可能な色変化を生じさせることを可能にする吸収性材料である。キャリアマトリクスは、興味対象のアッセイを実施するために必要な化学試剤を組み込むことができる任意の物質であり得る(ただし、キャリアマトリクスが該化学試剤に対して実質的に不活性であり、液体の検査サンプルの可溶成分に関して多孔性又は吸収性である限りにおいて)。表現「キャリアマトリクス」とは、水その他の生理学的流体に不溶であり、水その他の生理学的流体に曝されたとき構造的完全性を維持する吸水性又は非吸水性のマトリクスをいう。適切な吸水性マトリクスとしては、濾紙、スポンジ材料、セルロース、木、織布及び不織布などが挙げられる。非吸水性マトリクスとしては、グラスファイバー、高分子フィルム及び成形膜又は細孔膜が挙げられる。他の適切なキャリアマトリクスとしては、親水性無機粉体、例えばシリカゲル、アルミナ、珪藻土

10

20

30

40

50

など；粘土質物質；布；親水性天然高分子材料、特にセルロースビーズのようなセルロース材料、及び特に濾紙又はクロマトグラフィー用紙のような繊維含有紙；架橋ゼラチン、酢酸セルロース、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリエステル、ポリアクリレート、ポリウレタン、架橋デキストラン、アガロース及び他の架橋及び非架橋水不溶性親水性ポリマーのような合成ポリマー又は改変された天然に存在するポリマーが挙げられる。疎水性で非吸収性の物質は、本発明のキャリアマトリクスとしての使用に適切ではない。

【0127】

キャリアマトリクスは、種々の化学組成物又は化学組成物の混合物からなることができる。マトリクスはまた、硬度及び柔軟性と組み合わせた平滑性及び粗さに関して変化し得る。しかし、あらゆる場合で、キャリアマトリクスは、親水性又は吸収性材料を含んでなる。キャリアマトリクスは、最も有利には、吸水性濾紙又は非吸水性高分子フィルムから構築される。好適なキャリアマトリクスは、セルロース誘導材料(例えば、紙、好ましくは濾紙)を含む親水性で吸水性のマトリクス、又は高分子フィルム(例えば、ポリウレタン又は架橋ゼラチン)を含む非吸水性マトリクスである。サンプル中の任意の1以上のマーカールと反応したとき色変化を生じる試剤組成物を、キャリアマトリクス中に均一に組み込むことができる。キャリアマトリクスは、試剤組成物をキャリアマトリクス全体を通して均一に保持する一方で、検査サンプルの所定成分によるキャリアマトリクス浸透性を維持する。適切な試剤組成物の例として、例えば、抗体-ベース技術の場合には、前記1以上のマーカールについての結合性分子を挙げてもよく、酵素的検出の場合にはpH緩衝液を挙げてもよい。試剤組成物は、好ましくは、固体支持体の少なくとも一方の端部に付着した検査パッド上で、乾燥されて安定化される。試剤組成物が吸着し乾燥している検査パッドは、好ましくは、最小の背景色を示す膜材料から作られる。好ましくは、検査パッドは、背景色を最小にするために、酸又は塩基で洗浄した材料から構築され得る。別の1つの実施形態において、試剤ストリップ上で乾燥されている試剤組成物は、検査パッドの脆性を減少させる湿潤剤を更に含んでなる。好適な湿潤剤の非限定的例としては、TritonX-100、Biote rg、グリセロール、Tweenなどが挙げられる。試剤組成物は、当該分野で公知の任意の方法によって試剤ストリップに適用することができる。例えば、検査パッドを作っているキャリアマトリクスは、当該分野で公知の技術に従って、試剤組成物の溶液中に浸漬して乾燥させてもよい。本発明による試剤ストリップは、尿サンプル中の1より多い分析物についてアッセイするために複数の検査パッドを備えて提供され得る。

【0128】

本発明による試剤ストリップ101の可能な実施形態を図16A~Bに模式的に示す。ストリップ101は近位端102及び遠位端103を備える。その上に試剤組成物が提供される種々の検査パッド109、109'、109''が、試剤ストリップの固体支持体107上、近位端102に提供される。ストリップは、十分に大量の(任意に血液又は唾液などのような粘性サンプルのキャピラリフローを改善する生理学的流体で希釈された)サンプルで湿らせることができるように設計されなければならない。

本明細書中で規定される試剤ストリップは、以下のように使用される。簡潔には、本発明の試剤ストリップの1以上の検査パッド領域をサンプル中に浸漬させるか、又は少量のサンプルを試剤ストリップに、検査パッド領域上に適用する。視覚的に又は反射率測定により分析することができる発色が、短時間のうちに、通常0.5~10分以内に、試剤ストリップ上で起こる。任意の1以上のマーカールとの反応に際しての検査パッド上の試剤領域の色変化は、好ましくは、患者サンプル中の前記1以上のマーカールの濃度に正比例する。検査パッド上で発色する色強度は、視覚的に又は例えば反射率ベースの読取機により決定されてもよい。検査パッド領域での発色を参照色と比較して、サンプル中に存在する前記1以上のマーカールの量についての推定値を決定する。検査パッド上で発色する色強度を、補正因子の適用により決定した或る範囲の前記1以上のマーカールの濃度に対応する少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの標準色斑と比較する。

【0129】

本発明による試剤ストリップ101の可能な実施形態を図16A~Bに模式的に示す。ストリップ101は近位端102及び遠位端103を備える。その上に試剤組成物が提供される種々の検査パッド109、109'、109''が、試剤ストリップの固体支持体107上、近位端102に提供される。ストリップは、十分に大量の(任意に血液又は唾液などのような粘性サンプルのキャピラリフローを改善する生理学的流体で希釈された)サンプルで湿らせることができるように設計されなければならない。

試剤ストリップは、支持体ストリップに塗布されているか又は検査パッド中に組み込まれた蛍光色素又は赤外色素を更に含んでなり得る。これにより、検出可能又は測定可能な応答のための検出系を有する装置中での試剤ストリップの適切な配置が確実になる。

別の1つの実施形態において、本発明はまた、サンプル中の任意の1以上のマーカの存在を測定する検査パッドに関する。好ましくは、検査パッドは、前記1以上のマーカと相互作用して測定可能な応答、好ましくは視覚的に又は装置により測定可能な応答を生成することができる試剤組成物が組み込まれたキャリアマトリクスを含んでなる。別の1つの好適な実施形態において、本発明は、試剤ストリップ上、好ましくは本明細書中で規定する試剤ストリップ上での使用のための、本明細書中で規定する検査パッドを提供する。

本キット中の特異的結合性物質、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、バイオマーカーなどは、種々の形態、例えば、凍結乾燥形態、溶液中の遊離形態又は固相上に固定化された形態であり得る。これらは、例えば、マルチウェルプレート中に又はアレイ若しくはマイクロアレイとして提供されてもよいし、或いは別個に及び/又は個別に包装されていてもよい。これらは、本明細書中で教示されるように適切に標識されていてもよい。前記キットは、例えば、イムノアッセイ、ELISAアッセイ、質量分析アッセイなどのような本発明のアッセイ法の実施に特に適切であり得る。

【0130】

用語「変調する(modulate)」は、一般に、定性的又は定量的な変更、変化又は変動をいい、具体的には、変調されるものの増大(例えば、活性化)又は減少(例えば、阻害)の両方を包含する。この用語はあらゆる程度の変調を包含する。

例えば、変調は、決定可能又は測定可能な変量をもたらす場合、該変調がない参照状況と比較して、前記変量の値の、少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、例えば少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約50%、例えば少なくとも約75%、更により好ましくは少なくとも約100%、例えば少なくとも約150%、200%、250%、300%、400%又は少なくとも約500%増加を包含し得る；又は、変調は、該変調がない参照状況と比較して、前記変量の値の、少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、少なくとも約30%、例えば少なくとも約40%、少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%、例えば少なくとも約96%、97%、98%、99%又は100%さへの減少又は低減を包含し得る。

好ましくは、意図する標的(例えば、本明細書中で教示される任意の1以上のマーカ、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質)の活性及び/又はレベルの変調は、特異的又は選択的であり得る。すなわち、意図する標的の活性及び/又はレベルは、ランダムな非関連(意図していない、望んでいない)標的の活性及び/又はレベルを実質的に変更することなく変調し得る。

標的の「活性」への言及は、一般に、例えば細胞、組織、器官又は生物内での、標的の生物学的活性の任意の1以上の観点、例えば、限定されないが、生化学的活性、酵素の活性、シグナル伝達活性及び/又は構造的活性の任意の1以上の観点を包含する。

【0131】

標的の治療的又は予防的標的化に関しては、標的の「レベル」への言及は、好ましくは、例えば細胞、組織、器官又は生物内での、標的の量及び/又は利用可能性(例えば、生物学的活性を遂行するための利用可能性)を包含し得る。

例えば、標的のレベルは、標的の発現を変調し及び/又は発現した標的を変調することによって変調され得る。標的の発現の変調は、例えば、標的をコードする異種核RNA(hnRNA)、前駆体mRNA(プレ-mRNA)、mRNA又はcDNAのレベルで達成又は観察され得る。例としてであって限定されないが、標的発現の減少は、当該分野において公知の方法により、例えば細胞、組織、器官又は生物を、アンチセンス剤(例えば、アンチセンスDNA又はRNAオリゴヌクレオチド)、アンチセンス剤をコードする構築物、又はRNA干渉剤(例えば、siRNA又はshRNA)、又はリボザイム若しくはリボザイムをコードするベクターなどでトランスフェ

10

20

30

40

50

クトするか(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなどによる)又は形質転換する(例えば、ウイルスベクターを用いる)ことによって達成され得る。例としてであって限定されないが、標的発現の増加は、当該分野において公知の方法により、例えば細胞、組織、器官又は生物を、該細胞、組織、器官又は生物中で適切な発現レベルをもたらす調節性配列の制御下に該標的をコードする組換え核酸でトランスフェクトするか(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなどによる)又は形質転換する(例えば、ウイルスベクターを用いる)ことによって達成され得る。例としてであって限定されないが、標的レベルは、標的の形成(例えば、フォールディング、又は複合体の形成を導く相互作用)及び/又は標的の安定性(例えば、複合体に結合するか又は複合体から解離する複合体成分の性向)、分解若しくは細胞局在などの変更を介して変調され得る。

10

【0132】

用語「アンチセンス」は、一般に、遺伝子発現に干渉するように設計され、意図する標的核酸配列に特異的に結合し得る分子をいう。アンチセンス剤は、代表的には、標的配列に特異的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドアナログを包含し、代表的には、標的核酸に対応するゲノムDNA、hnRNA、mRNA又はcDNA(好ましくはmRNA又はcDNA)内の配列に相補的又は実質的に相補的である核酸配列を含むか、該核酸配列から本質的になるか又は該核酸配列からなり得る。本発明において適切なアンチセンス剤は、代表的には、それぞれの標的に高ストリンジェンシー条件でハイブリダイズすることが可能であり得、標的に生理学的条件下で特異的にハイブリダイズし得る。

用語「リボザイム」は、一般に、ポリヌクレオチドを触媒的に切断し得る核酸分子、好ましくはオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドアナログをいう。好ましくは、「リボザイム」は、所与の標的タンパク質のmRNAを切断しその翻訳を減少させることができ得る。本明細書中で企図される例示のリボザイムとしては、限定されないが、ハンマーヘッドタイプリボザイム、ヘアピンタイプのリボザイム、デルタタイプリボザイムなどが挙げられる。リボザイム及びその設計に関する教示については、例えば、米国特許第5,354,855号、同第5,591,610号、Pierceら, 1998(Nucleic Acids Res 26: 5093-5101)、Lieberら, 1995(Mol Cell Biol 15: 540-551)及びBenselerら, 1993(J Am Chem Soc 115: 8483-8484)を参照。

20

「RNA干渉」又は「RNAi」技術は、当該分野において慣用されており、本明細書中で意図される適切なRNAi剤としては、とりわけ、当該分野において公知の短鎖干渉性核酸(siRNA)、短鎖干渉性RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロ-RNA(miRNA)及び短鎖ヘアピンRNA(shRNA)分子が挙げられる。RNAi分子及びその設計に関する教示については、とりわけ、Elbashirら, 2001(Nature 411: 494-501)、Reynoldsら, 2004(Nat Biotechnol 22: 326-30)、<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>、Wang及びMu 2004(Bioinformatics 20: 1818-20)、Yuanら, 2004(Nucleic Acids Res 32(Web Server issue): W130-4)、M Sohail 2004(「Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application」, 第1版, CRC, ISBN 0849321417)、U Schepers 2005(「RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C.elegans, Drosophila, and Mammals」, 第1版, Wiley-VCH, ISBN 3527310207)並びにDR Engelke及びJJ Rossi 2005(「Methods in Enzymology, Volume 392: RNA Interference」, 第1版, Academic Press, ISBN 0121827976)を参照。

30

40

【0133】

本明細書で使用する用語「医薬的に許容可能な」は、当該分野と一致し、医薬組成物の他の成分と相溶性であり、そのレシピエントに対して有害でないことを意味する。

本明細書で使用する場合、「キャリア」又は「賦形剤」には、あらゆる溶剤、希釈剤、緩衝剤(例えば、中性緩衝化生理食塩水又はリン酸緩衝化生理食塩水)、可溶化剤、コロイド、分散媒体、ビヒクル、充填剤、キレート剤(例えば、EDTA又はグルタチオン)、アミノ酸(例えば、グリシン)、タンパク質、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色料、香味料、芳香化剤、増粘剤、デポー効果を達成する薬剤、コーティング剤、抗菌剤、防腐剤、抗酸化剤、毒性制御剤、吸収遅延剤などが挙げられる。医薬活性物質のた

50

めのこのような媒体及び薬剤の使用は、当該分野において周知である。当該活性物質と非相溶性である場合を除き、治療組成物における任意の従来の媒体又は薬剤の使用が企図され得る。

本活性物質(薬剤)は単独で又は本明細書中で教示される疾患及び病状用の当該分野において公知の任意の治療薬との組合せ(「併用療法」)で使用され得る。本明細書中で企図される併用療法は、少なくとも1つの本発明の活性物質及び少なくとも1つの他の医薬的又は生物学的に活性な成分の投与を含み得る。前記の活性物質及び医薬的又は生物学的に活性な成分は、同一の又は異なる医薬製剤で、同時に又は逐次に(任意の順序で)投与され得る。

【0134】

任意に投与すべき1以上の他の活性化化合物との組合せで使用される本活性物質(薬剤)の投薬量又は使用量は、個々の症例に依存し、慣例により最適効果を達成するために個々の状況に適合させる。よって、それは、治療すべき疾患の性質及び重篤度、性別、年齢、体重、全身の健康状態、食事、投与の態様及び時間、治療すべきヒト若しくは動物の個々の応答性、投与経路、使用する化合物の作用の効力、代謝安定性及び期間、治療が急性若しくは慢性であるのか予防的であるのか、又は他の活性化化合物が本発明の薬剤に加えて投与されるのかどうかに依存する。

限定されないが、疾患のタイプ及び重篤度に依存して、代表的な一日投薬量は、上記の因子に依存して約1 µg/kg体重~100mg/kg体重又はそれ以上の範囲であり得る。数日又はそれより長期の繰り返し投与に関しては、病状に依存して、疾患症状の所望の抑制が生じるまで処置は維持される。本発明の活性物質の好適な投薬量は、約0.05mg/kg体重~約10mg/kg体重の範囲であり得る。よって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg又は10mg/kg(又はそれらの任意の組合せ)の1以上の投薬が患者に対して行われ得る。このような投薬は、断続的に、例えば毎週、2週又は3週ごとに行われ得る。

本明細書で使用する場合、「処置を必要とする対象者」のような句は、本明細書中で教示される所与の疾患又は病状の処置の利益を享受する対象者を含む。このような対象者は、前記病状と診断されている対象者、該病状に罹患し易いか又は発症し易い対象者及び/又は該病状を予防すべき対象者を含むが、これらに限定されない。

【0135】

用語「処置する」又は「処置」は、既発の疾患又は病状の治療的処置及び(望まない苦痛の発生の見込みを抑制するか又は小さくすること、例えば本明細書中で教示される疾患又は病状の罹患及び進行の見込みを抑制することを目的とする)予防的又は抑制的手段の両方を包含する。有益な結果又は望ましい臨床的結果としては、限定されないが、1以上の症状又は1以上の生物学的マーカーの軽減、疾患の程度の低減、安定化した(すなわち、悪化しない)疾患状態、疾患進行の遅延又は緩徐化、疾患状態の寛解又は緩和などが挙げられ得る。「処置」はまた、処置を受けていない場合に予測される生存と比較して生存を延長させることを意味することがある。

用語「予防有効量」は、研究者、獣医師、医師又は臨床家により求められるように対象者において疾患の発生を阻害するか又は遅延させる活性化化合物又は医薬剤の量をいう。本明細書で使用する用語「治療有効量」は、研究者、獣医師、医師又は臨床家により求められる対象者における生物学的又は医学的応答(これは、とりわけ、治療すべき疾患又は病状の症状の軽減を含み得る)を誘発する活性化化合物又は医薬剤の量をいう。本化合物の治療的及び予防的に有効な用量を決定する方法は、当該分野において公知である。

上記の観点及び実施形態は以下の非限定的な実施例によって更に支持される。

【実施例】

【0136】

実施例

実施例1:PEの新たなバイオマーカーの発見のためのMASSTERMIND発見プラットフォーム
MASSTERMIND実験セットアップ

バイオマーカー発見のために、本発明者らは、以前に公表したCOFRADIC™技術プラット

10

20

30

40

50

フォーム(とりわけ、WO 02/077016及びGevaertら, 2003, Nat Biotechnol 21(5): 566-9に実質的に記載されたもの)を使用するタンパク質レベルの質量分析による検出を用いて、タンパク質発現の変化を分析した。

市販のアフィニティー-ベースクロマトグラフィーカラム(例えばAgilent Technologies)を使用して、全ての血漿サンプルから最も豊富なタンパク質を枯渇させた。ウェスタンブロット分析を使用して、アルブミン及び免疫グロブリンG(IgG)の枯渇効率を検証した。サンプルは、MASstermind分析用に、標準のN-末端COFRADIC手順に従って調製した。サンプル及びコントロールは、全てのトリプシン切断ペプチドのC末端での¹⁸O/¹⁶Oのトリプシン媒介組込みによって区別して標識した。N-末端ペプチドの選別後、NanoLC分離及びその後のMALDI標的の上への直接スポットティングを行った。MALDI-TOF/TOF装置を使用してMSスペクトルを作成した。社内で開発したバイオインフォマティクスツール(例えば、ピーク認識及び脱同位体(deisotoping)、分析物と参照との間の比の決定、クラスタリング、サンプル間整列(inter-sample alignment)及び広範なサンプル品質制御のためのツール)を用いて、MSスペクトルを分析した。一旦、全てのサンプルを整列させ、品質を制御した後に、統計分析を開始した。

【0137】

MASSTERMIND統計分析

2つの集団を弁別する差別的特徴(又はペプチド)について選択するために、2つの異なる統計尺度を適用した:一基準分類(one-rule classifier)及びマイクロアレイの有意性分析(Significance Analysis of Microarrays; SAM)分析。概念上、差別的特徴を見出す最も単純な機械学習技術は、一基準分類(oneR)である。この方法では、形式「比 < Xであれば、クラス = A、そうでなければクラス = B」という単純なルールが各特徴について作成される。データについてのこのルールの性能は、leave-one-out cross-validationにより決定される。この分析で低い誤差率を示す特徴は、首位のバイオマーカー候補である。SAM (Tusherら, 2001, PNAS 98: 5116-5121)は、False Discovery Rate (FDR)を制御しつつ、最も差別的な特徴を選択する方法である。この方法は、元来は、マイクロアレイ実験での使用のために開発され、Pronotaのデータマトリクスに適用可能であることが証明されている。一基準分類に優るこの方法の主たる利点は、これが、両クラス間の比の差が減少し始め、実験からのランダムノイズが候補マーカーの実際のレベルを不明瞭にし始めたとき、依然として有用な傾向を取り出すことが可能であることである。SAMは、2クラスのサンプル間の特徴の比の相対的差異を算出する。このスコアの有意性を推定するため、全サンプルのクラス割当の順序を変えて再スコア付けすることによって帰無分布を推定する。これにより、偶然によって同定されたタンパク質又は遺伝子産物の割合であるfalse discovery rate(FDR)の信頼性のある推定が得られる。MSシグナルの強度及び欠測値(missing value)について最適に説明するため、異なるデータサブセットに対して、これら値についての種々のカットオフを用いて完全なSAM分析を行った。全ての結果を最終報告にまとめた。

【0138】

実施例2: PEにおいて有用なマーカーの同定

研究計画は、妊娠後期に子癇前症(PE)を発症する運命にある妊婦(症例)と、妊娠後期にPEを発症しない女性(コントロール)との区別を可能にする、タンパク質-ベースのバイオマーカーを同定することを目的とした。

血漿サンプルは、妊婦から、妊娠中の2つの異なる時点(妊娠22週及び26週)で取得した。すなわち、個体あたり2サンプルを得た(図17)。サンプリング時点で、症例において、後のPEの何らかの臨床徴候は未だ存在しない。

適用したMASstermind発見研究は、全てのサンプルを、本研究で使用するほとんどのサンプルの混合物を構成する共通参照(common reference)と比較する、いわゆる「参照設計(Reference design)」であった。

4つのサンプル群を規定した:群1(PEを運命付けられた妊娠22週の女性、n=10)、群2(PEを運命付けられた妊娠26週の女性、n=10)、群3(妊娠22週のコントロール妊婦、n=5)

、及び群 4 (妊娠26週のコントロール妊婦、n=5)。群 1 及び 2 のサンプルは同じ個体から取得した(すなわち、対応関係あり)。群 3 及び 4 のサンプルは異なる個体から取得した(すなわち、1つを除き対応関係なし)。2、3のサンプルを、バイオマーカー候補選択に適用した統計学的分析から排除し、群 1、2、3 及び 4 についてそれぞれn=9、10、5 及び 4 とした。

データ分析は集団差について調べた。すなわち、集団は全体として扱い、SAM及びoneR 統計学的方法を用いて、コントロール群とPE群との間のマーカーの平均量間の差を探索した。

群 1 + 2 対 群 3 + 4 ; 群 1 対 群 3 + 4 ; 群 2 対 群 3 + 4 ; 群 3 対 群 4 ; 群 3 対 群 1 + 2 + 3 + 4 ; 群 2 及び群 1 の対応関係ありの比較(長期間のトレンド)を含む種々の比較を行った。これらに対して、PE選択性、妊娠選択性及び診断までの時間(time-to-diagnosis)プロフィールの考慮に関するマニュアル選択を補充した。

【0139】

PEを運命付けられた女性と正常女性との間で異なって挙動し、PEの診断、予知、予後及び/又はモニタリングに有用であるマーカーについてのデータを、図 1 ~ 13に示す。データは、上記表 1 に列挙したペプチドの評価に基づいた。1 より多いペプチドが1つのマーカーについて特定される場合、それらは、保持されペプチドと類似する挙動を示した。

本明細書中で同定されたバイオマーカーは、種々の有用な挙動を示した。幾つかのマーカーは、考慮した妊娠の2つの時点で、PE群において、コントロールと比較してアップレギュレートされたか又はダウンレギュレートされた。この効果は、妊娠とは独立していることもあり得(例えば、HGFL)、妊娠トレンドに重ね合わさっていることもあり得る(例えば、ANG1)。幾つかのマーカーは、考慮した妊娠の2つの時点の一方で、PE群の一方において、コントロールと比較してアップレギュレートされたか又はダウンレギュレートされた(例えば、FBN2)。幾つかのマーカーは、考慮した妊娠の2つの時点の一方で、コントロールの一方において、PE群と比較してアップレギュレートされたか又はダウンレギュレートされた(例えば、PGRP2)。幾つかのマーカーは、妊娠の2つの時点を検討すると、同じ個体において、一貫するアップレギュレーション又はダウンレギュレーションを示した(すなわち、長期的な(longitudinal)トレンド/傾き)(例えば、LCAP)。幾つかのマーカーは、興味深い診断までの時間挙動を示した; これら症例については、図12及び13において、実際のPE診断の前に、タンパク質発現を時間(#週)の関数としてプロットしている。幾つかのマーカーは上記挙動の組合せを示した。

【0140】

実施例 3 : MASSTERCLASS標的化タンパク質量

下記で、サンプル中の標的化タンパク質量の1つの例示的方法を説明する。

MASSTERCLASS実験セットアップ

MASSTERclassアッセイは最終段階(end-stage)のペプチド定量系として安定なアイソトープ希釈物を用いる標的化タンデム質量分析を使用する(多重反応モニタリング(MRM)及び単一反応モニタリング(SRM)とも呼ばれる)。標的化ペプチドは、興味対象の特異タンパク質に特異的(すなわち、プロテオタイプック(proteotypic))である。すなわち、測定されるペプチド量は、元のサンプル中のタンパク質の量に直接関係する(例えば、表 1 中のペプチドを参照)。複合サンプル中のバイオマーカー定量に必要とされる特異性及び感度に到達するためには、ペプチド分画を最終段階の定量工程より前に行う。

【0141】

適切なMASSTERCLASSアッセイは、以下の工程を含み得る:

- 血漿/血清サンプル
- ProteoPrepスピンカラム(Sigma Aldrich)を使用する、抗-アルブミン抗体及び抗-IgG抗体でのアフィニティー捕捉を用いるヒトアルブミン及びIgGの涵濁(タンパク質レベルでの複雑性の低減)
- 既知量のアイソトープ標識ペプチドのスパイキング。このペプチドは、興味対象のプロテオタイプックペプチドと同じアミノ酸配列を有する(代表的には、1つのアイソトー

10

20

30

40

50

ブ標識アミノ酸がその中に組み込まれて、質量差を生じている)。分子質量に基づく最終段階の定量工程の間を除きプロセス全体の間、該標識ペプチドは、内因性ペプチドと同一の化学的及びクロマトグラフィー的挙動を有する。

- トリプシン消化物。涸渴血清/血漿サンプル中のタンパク質を、トリプシンを用いてペプチドに消化する。この酵素は、リジン又はアルギニンのC-末端側にプロリンが存在する場合を除き、リジン及びアルギニンのC-末端でタンパク質を切断する。消化の前に、タンパク質を煮沸により変性させる。これによって、タンパク質分子は、37℃にて16時間のインキュベーションの間、トリプシン活性がより接近可能になる。

【0142】

- 第1のペプチド-ベース分画：フリーフロー電気泳動(FFE; BD Diagnostic)は、連続層流中を移動している荷電分子が該流れに垂直な電界により分離される、ゲルフリー流体分離技術である。電界により、pH勾配中で荷電粒子の等電点(pI)に従う分離が引き起こされる。モニターするペプチドを含有する画分のみを、更なる分画及びLC-MS/MS分析のために選択する。興味対象の各ペプチドがFFEチャンバーから特異的な分画数(合成ペプチドホモログを用いたタンパク質アッセイ開発の間に決定される)で溶出する。特定の画分又は画分プール(複合化)を次レベルの分画に進める。

- 第2のペプチド-ベース分画：フェニルHPLC(XBridge Phenyl; Waters)は、ペプチドを、ペプチド配列中に存在するアミノ酸の疎水性及び芳香性に従って分離する。バックエンド(back-end)C18分離との直交性は、上昇したpH値(pH10)でカラムを稼動することによって達成される。Gilarら, 2005, J Sep Sci 28(14): 1694-1703により証明されているように、pHは、RP-HPLCにおけるペプチド選択性を変化させる遥かに最も強烈なパラメータである。興味対象の各ペプチドは、フェニルカラムから、合成ペプチドホモログを用いるタンパク質アッセイ開発の間に決定される特定の保持時間で溶出する。サンプル分離のバッチ処理前に9つの標準ペプチドの混合物を分離する外部コントロール系の使用により、保持時間シフトを補正するための画分採集の調整が可能になる。分画の程度は、サンプル中のタンパク質濃度及び該サンプルの複雑性に依存する。

【0143】

- 逆相(C18)nanoLC(PepMap C18; Dionex)及びMRM(4000 QTRAP; ABI)/SRM(Vantage TSQ; Thermo Scientific)モードを用いるMS/MS：タンデム質量分析での更なる分離を含むLC-MS/MSベースの定量。質量分析計の供給頭部(source head)に接続したエレクトロスプレーニードルに、LCカラムを接続する。物質がカラムから溶出するにつれ、分子はイオン化し、ガス相で質量分析計に入る。質量対荷電の比(m/z)に基づいて、モニターするペプチドが特異的に選択されて、第1の四重極子(Q1)を通る。次いで、選択されたペプチドは、衝突小室として使用する第2の四重極子(Q2)でフラグメント化される。次いで、得られるフラグメントが第3の四重極子(Q3)に入る。(アッセイ開発の間に決定される)装置セッティングに依存して、特定ペプチドフラグメント(いわゆる、トランジッション(transition))のみが検出のために選択される。

- モニターするペプチドのm/zとこのペプチドのモニターするフラグメントのm/zとの組合せは、トランジッションと呼ばれる。このプロセスは、1回の実験の間に複数のトランジッションについて行うことができる。内因性ペプチド(分析物)及びその対応するアイソトープ標識合成ペプチド(内部標準物質)の両方が、同じ保持時間で溶出し、同じLC-MS/MS実験で測定される。

- MASSTERCLASSの読取値は、分析物に特異的なピーク下面積と合成アイソトープ標識アナログ(内部標準物質)に特異的なピーク下面積との間の比によって規定される。読取値は、サンプル中の元々のタンパク質濃度に直接関連する。したがって、読取値は、種々のサンプル間及びサンプル群間で比較することができる。

【0144】

標的化ペプチド定量のための代表的なMASSTERCLASSプロトコルは下記のとおりであり得る：

- 結合/平衡緩衝液として20mM NH₄HCO₃を使用した以外は、製造業者のプロトコルに従

10

20

30

40

50

って、25 μ Lの血漿を、ヒトアルブミン及びIgGの涸濁に供する(ProteoPrepスピンカラム ; Sigma Aldrich)。

- 涸濁サンプル(225 μ L)を15分間95 °Cにて変性させ、氷上で直ぐに冷却する。
- 500fmolのアイソトープ標識ペプチド(カスタムメイド「Heavy AQUA」ペプチド ; Thermo Scientific)をサンプル中にスパイクする。
- 20 μ gトリプシンをサンプルに加え、16時間37 °Cにて消化する。
- 消化サンプルを先ず溶媒 A (0.1%ギ酸)中で1/8希釈し、次いで250amol / μ Lのアイソトープ標識された興味対象の全ペプチド(カスタムメイド「Heavy AQUA」ペプチド ; Thermo Scientific)を含有する同じ溶媒中で1/20希釈した。

- 逆相NanoLCをMRM/SRMモードのオンラインMS/MSと併せて使用して20 μ Lの最終希釈物を分離した :

10

- カラム : PepMap C18、75 μ m I.D. x 25cm L, 100 μ m 孔径、5 μ m粒子サイズ
- 溶媒 A : 0.1%ギ酸
- 溶媒 B : 80%アセトニトリル、0.1%ギ酸
- 勾配 : 30分 ; 2% ~ 55% 溶媒 B
- MRMモードのMS/MS : 方法は、分析物及び合成標識ペプチドのトランジションを含む。

- 使用したトランジションは、タンパク質アッセイ開発の間に実験的に決定して選択した。

- 興味対象のペプチドの決定した保持時間の3分前から始まり該保持時間の3分後に終わる期間、興味対象のトランジションの各々を測定した。これにより、確実に、各ピークが少なくとも15のデータ点を有した。

20

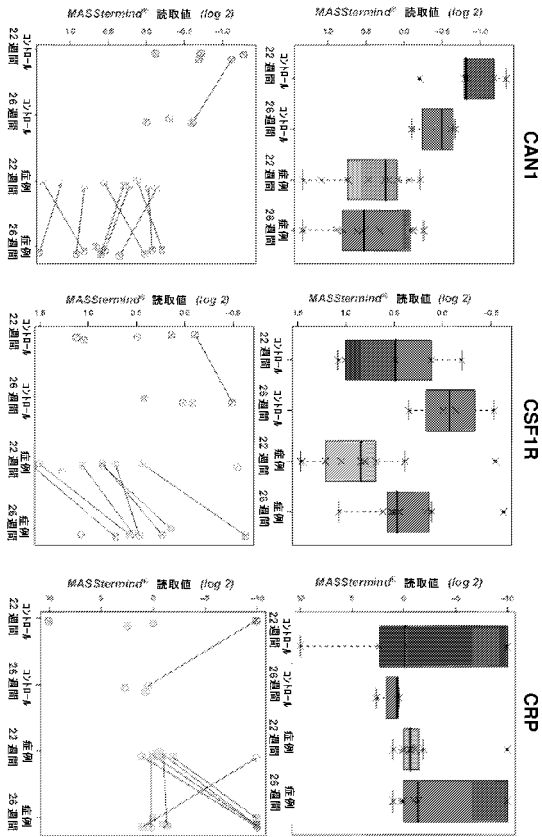
【 0 1 4 5 】

- LCQuanソフトウェア(Thermo Scientific)を使用して生データを分析し定量した : 同じC18保持時間での分析物ピーク下面積及び内部標準物質ピーク下面積を、自動ピーク検出により決定した。これらを手作業で照合した。

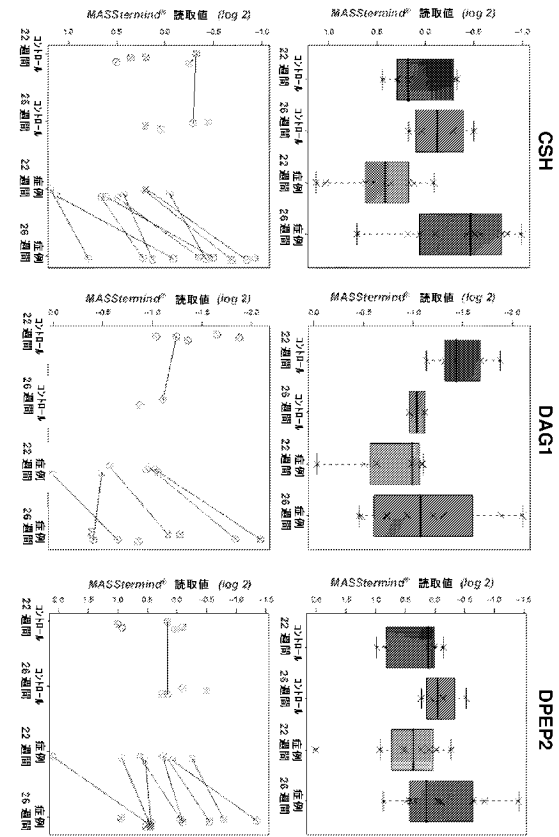
- MASSterclass読取値は、分析物ピーク面積と内部標準物質ピーク面積との比により規定した。測定した比は、ペプチドの示差量(differential quantitation)である。換言すれば、比は、規格化したペプチド濃度である。ペプチド濃度は、質量分析計で測定された比に比例する。

30

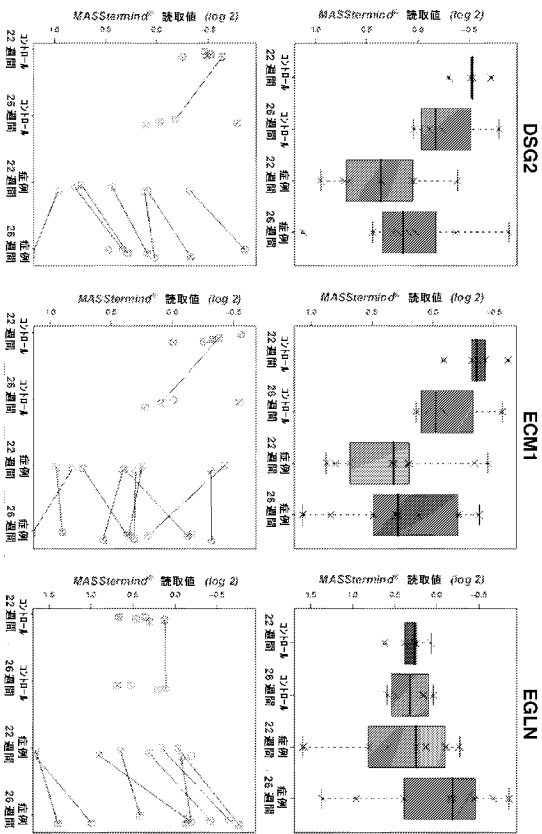
【 図 2 】



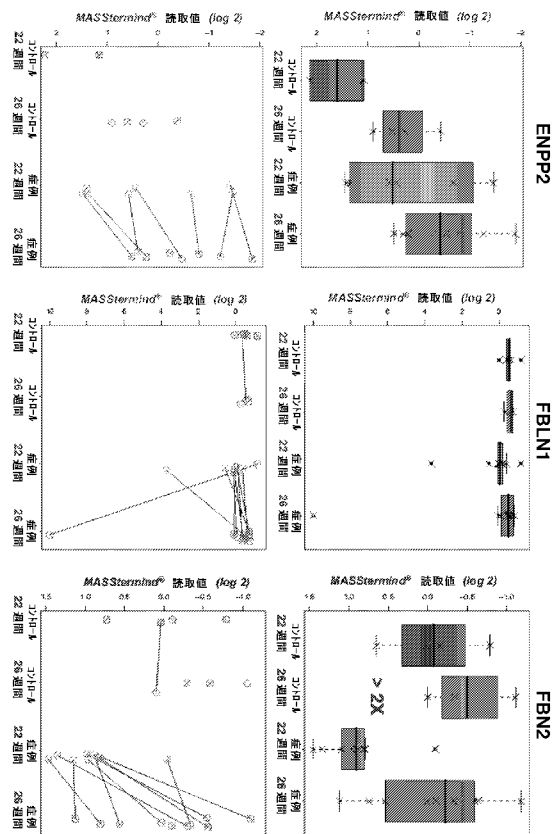
【 図 3 】



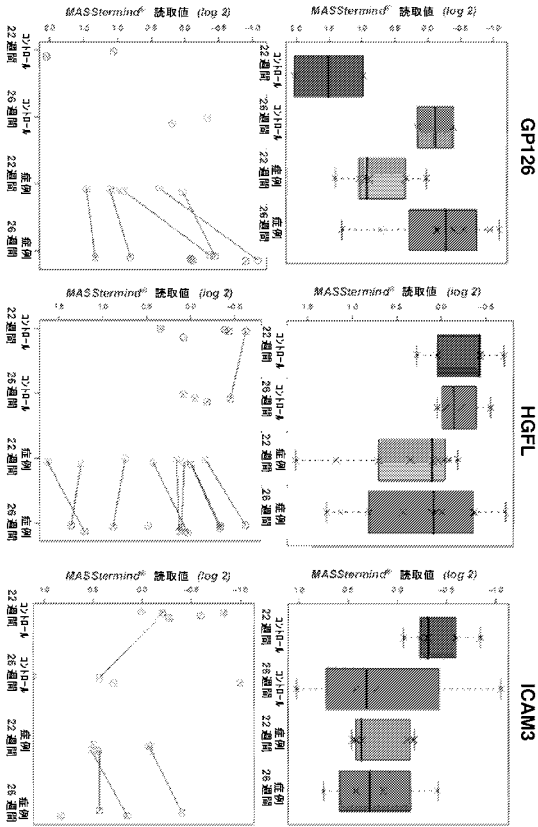
【 図 4 】



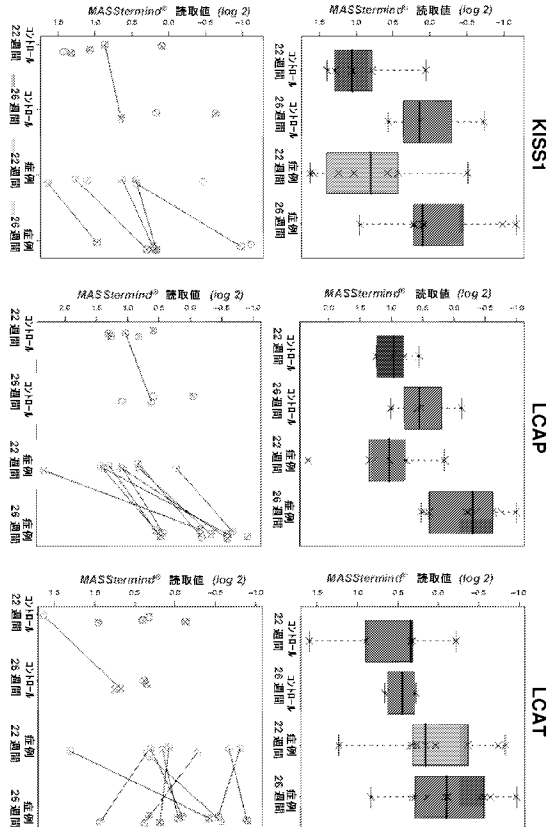
【 図 5 】



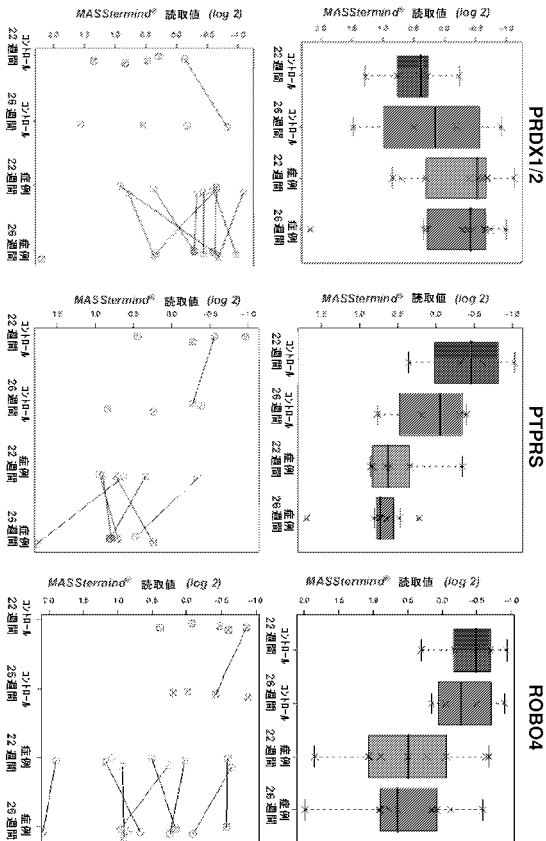
【 6 】



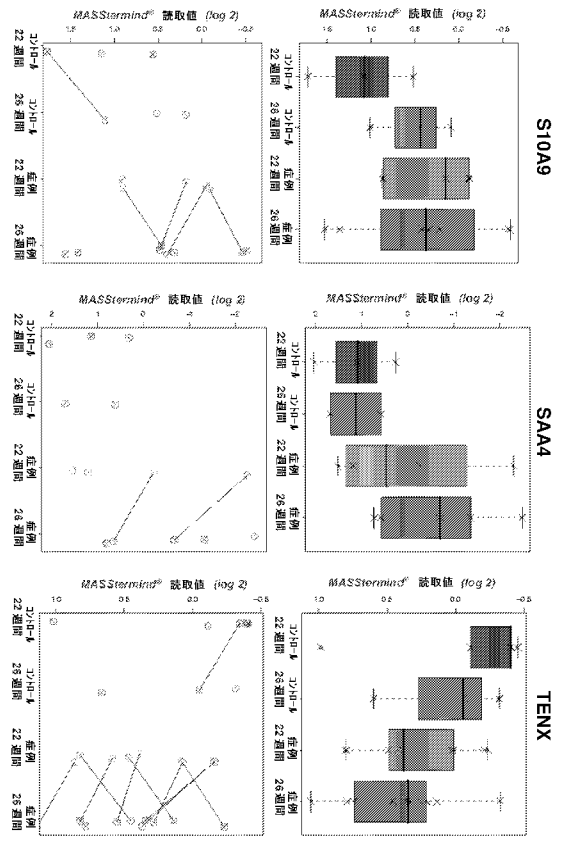
【 7 】



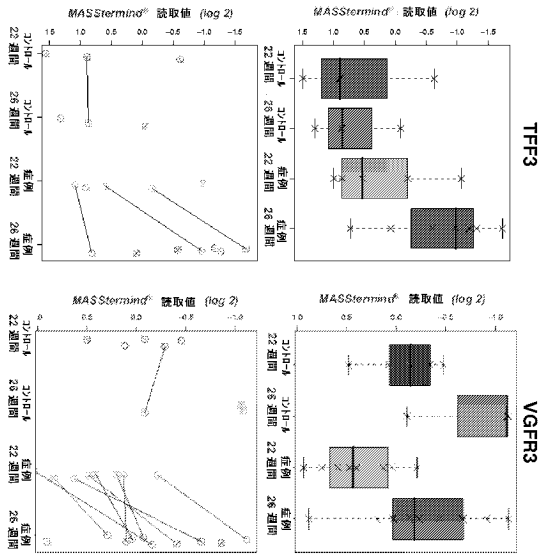
【 9 】



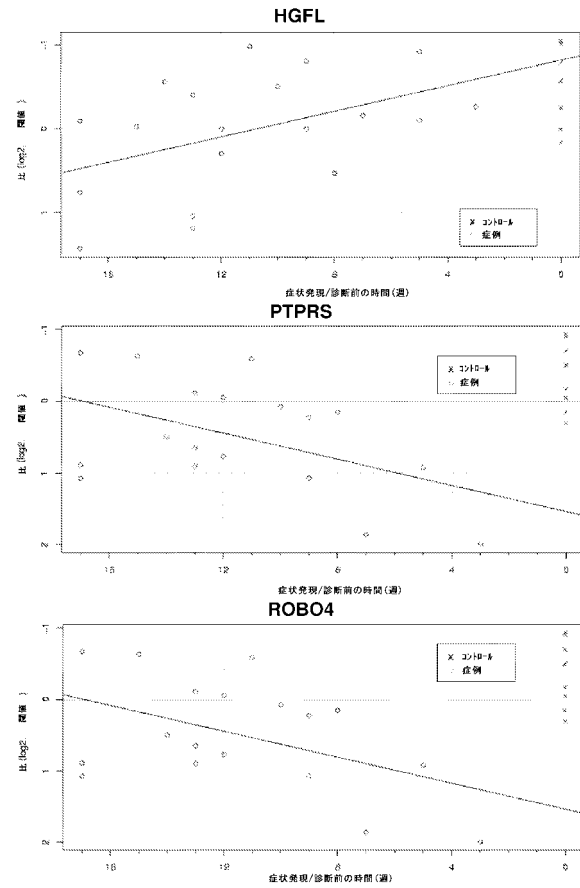
【 10 】



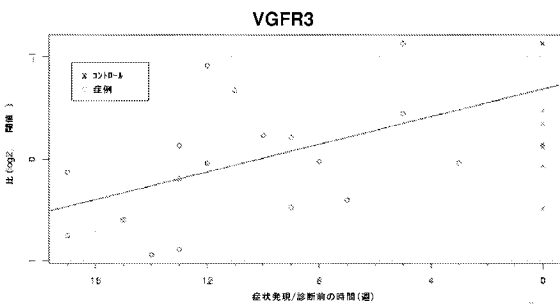
【 図 1 1 】



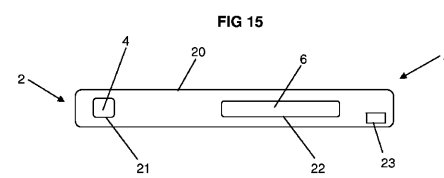
【 図 1 2 】



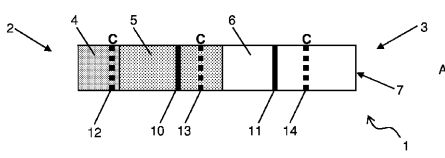
【 図 1 3 】



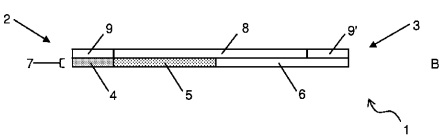
【 図 1 5 】



【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】



【 図 1 6 A 】

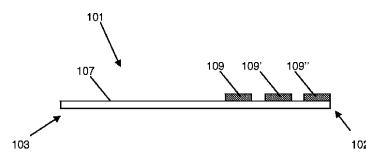


Figure 16 A

【 図 1 6 B 】

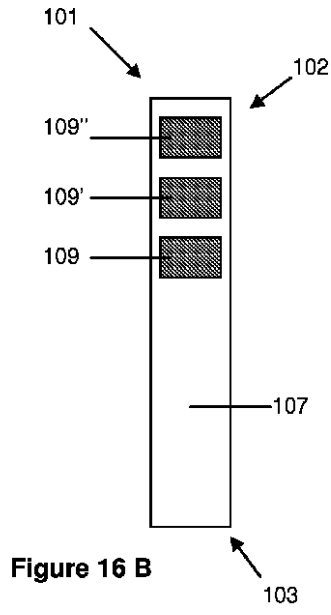
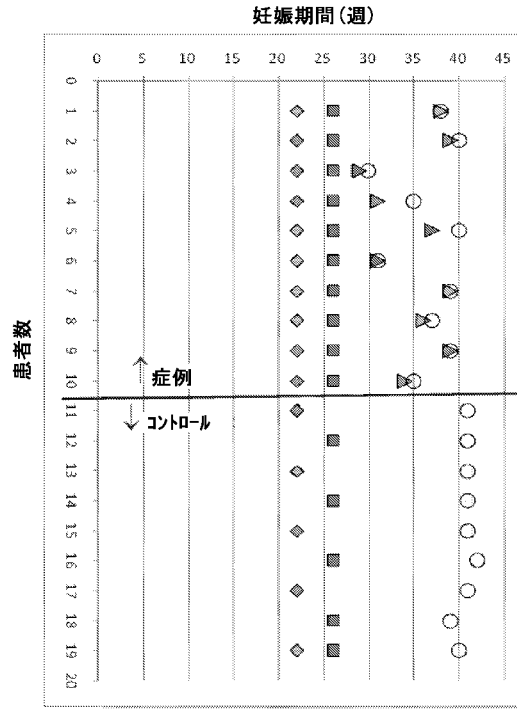
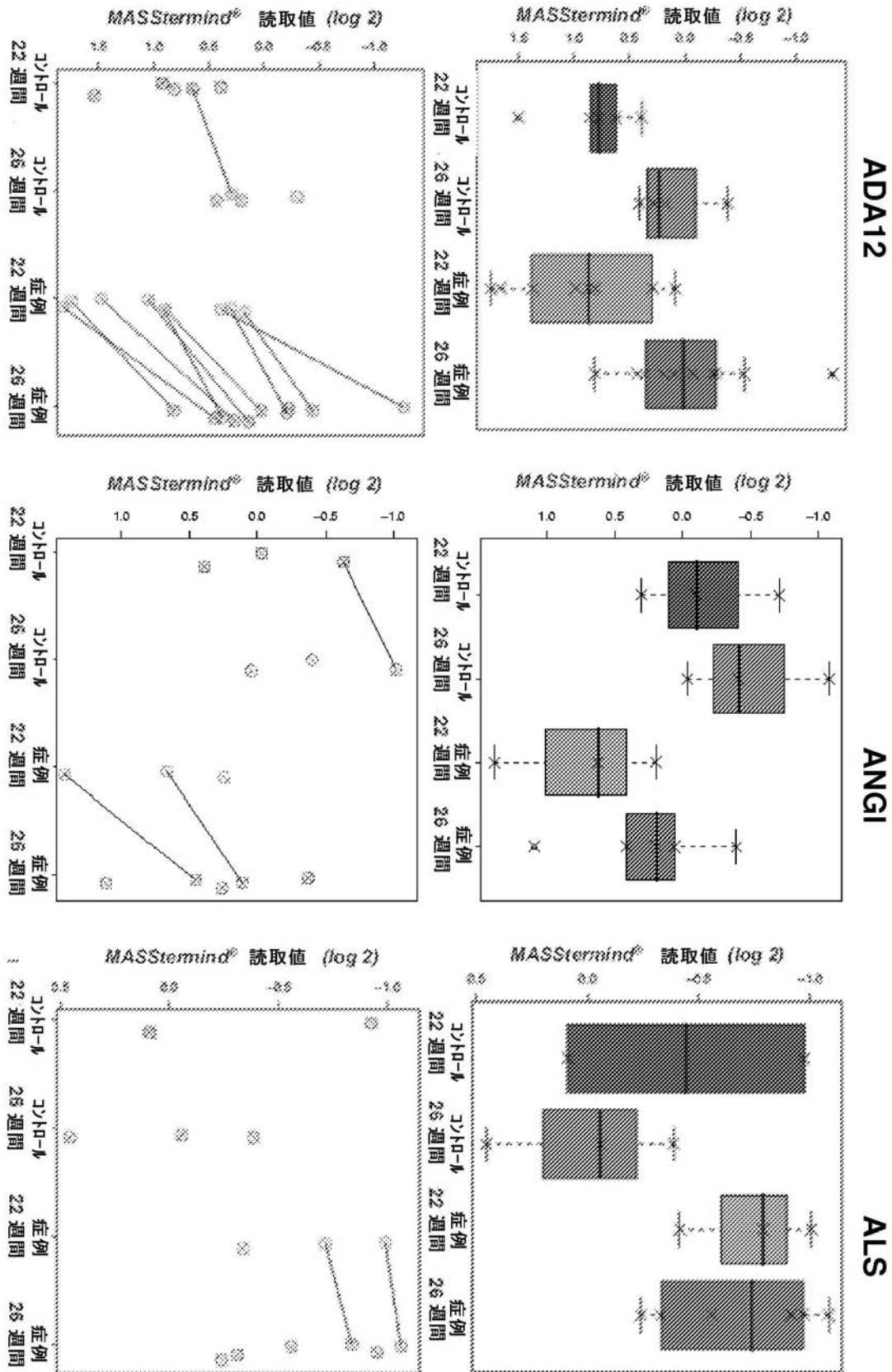


Figure 16 B

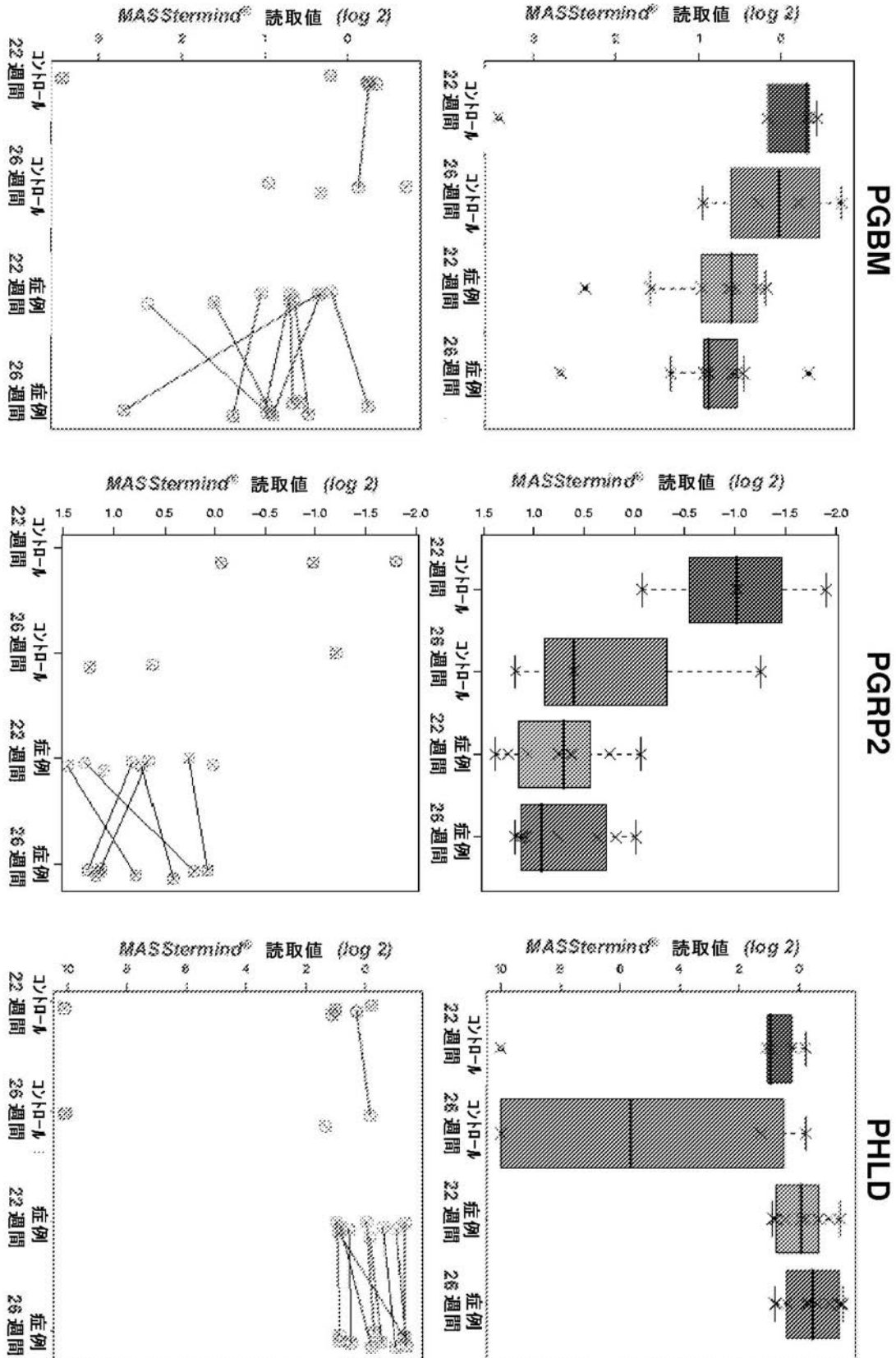
【 図 1 7 】



【 図 1 】



【 図 8 】



【 配列表 】

201352425100001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/055768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/178605 A1 (MOR GUILLERMO G [US] ET AL MOR GIL G [US] ET AL) 2 August 2007 (2007-08-02) paragraphs [0011], [0 20], [119] examples 1-3; tables 2, 4 claims 1-58	1-26
X	WO 2009/097584 A1 (PROTEOGENIX INC [US]; NAGALLA SRINIVASA [US]; RASANEN JUHA [FI]; GRAVE) 6 August 2009 (2009-08-06) cited in the application the whole document	1-26
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 5 July 2011		Date of mailing of the international search report 17/10/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Martin

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/055768

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEWITT ET AL: "Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 ternary complex formation in pregnancy", JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 159, no. 2, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 265-274, XP055001958, ISSN: 0022-0795, DOI: 10.1677/joe.0.1590265 the whole document -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2011/055768**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

1-26(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2011/ 055768

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-26(partially)

Concerns methods and means related to ALS (insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile chain) as a biomarker for hypertensive disorders of pregnancy and particularly preeclampsia.

2-32. claims: 1-26(partially)

Concern methods and means related to ADA12, ANGI, CAN1, CSF1 R, CRP, CSH, DAG1, DPEP2, DSG2, ECM1, ENPP2, FBLN1, FBN2, GP126, HGFL, ICAM3, KISS1, LCAP, LCAT, PGBM, PGRP2, PHLD, PRDX1, PRDX2, PTPRS, ROB04, S10A9, SAA4, TENX, TFF3, VGFR3 as a biomarker for hypertensive disorders of pregnancy and particularly preeclampsia.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/055768

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2007178605	A1	02-08-2007	CA 2640695 A1	16-08-2007
			EP 1979750 A2	15-10-2008
			WO 2007092353 A2	16-08-2007

WO 2009097584	A1	06-08-2009	US 2010016173 A1	21-01-2010

フロントページの続き

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

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 カス, クーネン

ベルギー、ビー - 2 9 7 0 スヒルデ、ブラボラーン 1 1

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA05 EA04 EA12 FA12 FA25 GA09 HA01 JA02 LA08

2G045 AA25 DA36 FB03

4H045 AA10 BA60 EA50 FA50

专利名称(译)	妊娠期高血压病的生物标志物		
公开(公告)号	JP2013524251A	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2013504253	申请日	2011-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	Puronotaenuve 普罗诺塔股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Puronota NV.Ve的.		
[标]发明人	カスケーネン		
发明人	カス,ケーネン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N37/00 G01N27/62 C07K17/00		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2800/368 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N27/62.V C07K17/00.ZNA		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA05 2G041/EA04 2G041/EA12 2G041/FA12 2G041/FA25 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA02 2G041/LA08 2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB03 4H045/AA10 4H045/BA60 4H045/EA50 4H045/FA50		
代理人(译)	清稻本潤一 富田雅美		
优先权	61/323490 2010-04-13 US 2010159803 2010-04-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请是妊娠高血压疾病，特别是先兆子痫的新的生物标记；基于该生物标记的测量来诊断，预测，预后和/或监测该疾病的方法；以及测量该生物标记，和/或公开了用于执行该方法的套件和设备。 [选择图]无

コード	配列	配列番号	開始点*
ALS	ADPGTPGEAEGPACPAACVCSYDDDADELSVFCSSR	3	28
ADA12	QGKDLKVKQR	1	230
ANGI	LTSPCKDINTFIHGKNR	2	58
CAN1	PTLSNPQFIVDGATR	4	88
CSF1R	IPVIEPSVPELVVKPGATVTELR	5	20
CRP	FGQTDMSR	6	17
CSH	VQTVPLSR	7	27
DAG1	HWPSEPSEAVR	8	30
DPEP2	QVYQKGLQDVNLR	9	98
DSG2	AWITAPVALR	10	50
ECM1	SEGGFATGQR	11	21
ENG	ETVHCIDLQPVGPER	12	26
ENPP2	SMYDPVFDFHFLR	13	232
FBLN1	DVLLAEACDGHHR	14	30
FBN2	CNCNSGYEPDASGR	15	793
GP126	THFGVLMDLPR	16	841
HGFL	SPLNDFQVLR	17	21
ICAM3	QPAVEEPAEVTATVLSR	18	164
KISS1	EKVASVGNRSR	19	23
LCAP	ATNGKLPWAQIR**	20	155
LCAT	QPQAWKDR	21	218
PGBM	SIVPQGGSHSLR	22	1686
PGRP2	AGLLRPDYALLGHR	23	510
PHLD	CGLSTHVEIGHR	24	24
PRDX1/2	QITVNDLPVGR	25	140
PTPRS	PTLSVQQTPEGSLAR	26	836
ROBO4	QDSPPQILVHPQDQLFQGGPGPAR	27	28
S10A9	TCKMSQLER	28	2
SAA4	SFFKEALQGVGDMGR	29	23
TENX	AEGTTGLAPAGQTSEESRP	30	3683
TFF3	EEYVGLSANQCAVPAKDR	31	22
VGFR3	QQQDLMPQCR	32	478