

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-519498

(P2017-519498A)

(43) 公表日 平成29年7月20日 (2017.7.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-571161 (P2016-571161)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月29日 (2015.5.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月2日 (2017.2.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/054082
 (87) 国際公開番号 WO2015/186037
 (87) 国際公開日 平成27年12月10日 (2015.12.10)
 (31) 優先権主張番号 14170962.6
 (32) 優先日 平成26年6月3日 (2014.6.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

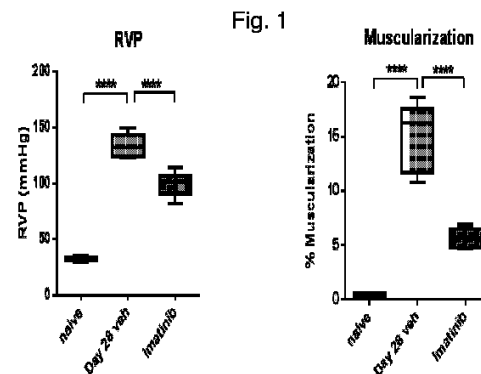
(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺高血圧症バイオマーカー

(57) 【要約】

肺高血圧症は、血管リモデリングと関連しており、右心不全をもたらす、様々な起源の進行性疾患である。蓄積している証拠は、肺高血圧症の病因および進行における免疫細胞および炎症性ケモカインの重要な役割を示している。CCL21を肺高血圧症に関する抗リモデリング有効性バイオマーカーとして同定した。CCL21は、肺高血圧症患者を対照対照から識別することにおいて高度に感受性かつ特異的であることが見出された。CCL21は、肺高血圧症において上方制御され、抗リモデリング剤での処置で下方制御された。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

b) 前記生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

を含み ;

前記ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示している、方法。

【請求項 2】

肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測する方法であって、前記患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、前記患者が前記肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる増加した見込みを示している、方法。

【請求項 3】

肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 前記患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 前記患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含む、方法。

【請求項 4】

前記アッセイするステップが前記生物学的試料を C C L 2 1 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸が C C L 2 1 リボ核酸 (R N A) またはその断片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アッセイするステップが前記生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記生物学的試料が血液、血清、血漿、尿、唾液、糞便および組織試料から選択される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記アッセイするステップがノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)、T a q M a n に基づくアッセイ、直接配列決定、動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、プライマー伸長法、オリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ、温度勾配ゲル電気泳動 (T G G E)、変性高速液体クロマトグラフィー、高解像度融解分析、D N A ミスマッチ結合タンパク質アッセイ、キャピラリー電気泳動、サザンブロット、免疫測定法、免疫組織化学的検査、E L I S A、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、H P L C、および質量分析法から選択される技法

10

20

30

40

50

を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

対象が肺高血圧症予測を有するかどうかを決定することにおける使用のためのまたは肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測することにおける使用のためのキットであって、

a) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在を検出する能力がある少なくとも 1 つのプローブ ; および

b) 前記プローブを使用して、前記患者からの生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在に関してアッセイするための説明書を含む、キット。

10

【請求項 10】

前記プローブが、C C L 2 1 発現の核酸配列の一領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または C C L 2 1 タンパク質もしくはその断片に結合する能力がある結合分子から選択される、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記結合分子が抗体またはその断片である、請求項 9 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

20

本発明は、呼吸器疾患におけるバイオマーカーの分野におけるものであり、特に、肺高血圧症に関するバイオマーカーとしての C C L 2 1 発現の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

肺高血圧症は、予後不良と関連しており、右心不全をもたらす様々な起源の進行性疾患である。その全ての異型を含めると、この疾患は、世界中で最大一億人に影響すると推定されている¹。2008年の4th World Symposium on Pulmonary Hypertensionで合意された肺高血圧症の現在の分類によれば、慢性肺高血圧症の5つのカテゴリーが存在する。

30

【0003】

肺高血圧症(PH)は、肺動脈圧の平均値上昇、安静時 $>25\text{ mmHg}$ (運動後 $>30\text{ mmHg}$)と定義される。群1 PHは、増加した肺血管抵抗が前毛細血管細小血管症(前毛細血管楔入圧 $<15\text{ mmHg}$ として診断される)による疾患にさらに細分され得る。この群内に、突発性肺動脈高血圧症(IPAH)および家族性肺動脈高血圧症、随伴性肺動脈高血圧症、静脈/毛細管併発を有する肺動脈高血圧症、および新生児の持続性肺高血圧症が見出される。群2が左心疾患による肺高血圧症を含む一方、群3は、肺疾患/低酸素血症(例えばCOPD)と関連している肺高血圧症を含み、群4は、慢性血栓塞栓性障害と関連している肺高血圧症を含む²。

【0004】

40

肺高血圧症の根底にある病理の理解の進歩および診断におけるいくつかの改善および新規な治療の発達にもかかわらず、肺高血圧症の領域にわたる重要な未だ対処されていない医学的必要性ならびに容認できない罹患率および死亡率がなおある。

【0005】

肺高血圧症のサブカテゴリーは、それらの根底にある原因において異なる。しかしながら、それらは全て、過剰な肺の血管収縮および異常な血管リモデリング、ユニークな叢状病変によって特徴付けられる。炎症および酸化ストレスと関連している内皮機能不全ならびに血管平滑筋細胞(SMC)増殖は、肺動脈高血圧症の顕著な特色である³⁻⁵。これらの構造的変化は、静止状態から増殖性、アポトーシス-抵抗性細胞表現型への切り換えを示唆している^{6、7}。血管リモデリングは、肺血管抵抗の慢性的上昇、右心不全および

50

死につながる。

【0006】

いくつかの研究は、肺動脈高血圧症病態生理における免疫機構の役割も示唆した⁸。炎症細胞および著しいケモカイン産生がリモデリングされた肺動脈内で検出され、血管ストロマ細胞は、炎症性刺激に感受性であることが示された⁹。さらに、上昇した循環サイトカインレベルがIPAHにおいて測定された¹⁰、¹¹。肺動脈高血圧症を有する患者の最大3分の1は、様々な血管自己抗原に対する循環自己抗体を有する¹²、¹³。これは、TおよびBリンパ球からなる適応免疫系が関与していることを示唆しており、実際に、血管周囲TおよびBリンパ球が肺血管肺動脈高血圧症病変において検出された¹⁴。慢性炎症性障害および自己免疫疾患に関する研究は、病原性抗体およびT細胞が、局所的に標的器官においても、三次リンパ組織(tLT)と通例称される高度に組織化された異所性リンパ濾胞で産生され得ることを示唆している¹⁵。慢性肺疾患におけるtLTの役割はその重要性が、特に、慢性閉塞性肺疾患において¹⁶、突発性肺線維症¹⁷において、および閉塞性細気管支炎¹⁸、つい最近では、肺動脈高血圧症において¹⁹増している。二次リンパ組織の異所性形成は、ナイーブTおよびB細胞の局所的誘引によって開始される。したがって、恒常性ケモカイン、ならびに成熟DC、ナイーブT細胞、およびB細胞²⁰などのCCR7発現細胞を誘引する、CCL21などのリンパ球生存因子の局所的産生は、異所性リンパ組織の形成における決定的な事象である可能性がある。CCL21発現は、特に、IPAHを有する患者からの外植された肺におけるtLTにおいて最近検出された¹⁹。

【0007】

現在のガイドラインは、死亡リスク層別化に関するバイオマーカーとしての脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)またはプロBNPのN末端断片(NT-プロBNP)の使用を推奨している。ナトリウム利尿ペプチドは、肺高血圧症の最初の血液由来マーカーであった。Nagaya et alは、BNPの血漿レベルが肺高血圧症における予後の重要性を有することを示した最初の人物である²¹。BNPレベルは、症候性先天性心疾患を有する成人患者における死亡率を予測し²²、BNPはまた、療法応答の独立予測因子であった。肺動脈高血圧症を有する患者における遡及研究では、NT-プロBNP(BNP合成の副産物)の連続的測定は、生存と関連していた²³。NT-プロBNP値のlog変換は、98%の特異性および60%の感受性で有害事象のリスクがある肺動脈高血圧症を有する患者を同定した²⁴。

【0008】

しかしながら、BNPまたはNT-プロBNPは、心筋ストレイン、心臓の過剰な伸張、および増加した心拍数のマーカーであり、肺高血圧症病態生理の駆動を司る、肺における末端肺動脈の変化を直接反映しない。心臓および右心室におけるリモデリング変化は、特に、肺動脈リモデリングに続くと考えられている。したがって、効果が疾患進行の結果として右心において可視化され得る前に、代替の非侵襲的循環バイオマーカーを使用して肺動脈リモデリングを評価しモニターすることに大きな関心が持たれる。

【0009】

病態機構、疾患の重症度または処置応答を特異的に示すバイオマーカーは、肺高血圧症の管理のための理想的なツールであり、また、将来の臨床治験の遂行の成功を促進するであろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の要旨

CCL21は、肺高血圧症患者を対照対照(matched controls)から識別するための高度に特異的かつ感受性のバイオマーカーであることがここで見出された。

【0011】

したがって、本発明は、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であ

10

20

30

40

50

って、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

b) 生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ
を含み ;

ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量 (statistical significant increased amount) が肺高血圧症を示している、方法を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

本発明は、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニスト
を投与するステップ

20

を含む方法も提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる増加した見込みを示している、方法も提供する。

【 0 0 1 4 】

30

これらの態様の一部の実施形態では、アッセイするステップは、生物学的試料を C C L 2 1 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み、例えば、核酸は、C C L 2 1 リボ核酸 (R N A) またはその断片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択される。一部の他の実施形態では、アッセイするステップは、生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む。

【 0 0 1 5 】

これらの態様の一部の他の実施形態では、生物学的試料は、血液、血清、血漿、尿、唾液、糞便および組織試料から選択される。

【 0 0 1 6 】

40

これらの態様の一部の他の実施形態では、アッセイするステップは、ノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 、T a q M a n に基づくアッセイ、直接配列決定、動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション (dynamic allele-specific hybridization) 、プライマー伸長法 (primer extension assay) 、オリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ、温度勾配ゲル電気泳動 (T G G E) 、変性高速液体クロマトグラフィー、高解像度融解分析、D N A ミスマッチ結合タンパク質アッセイ、キャピラリー電気泳動、サザンブロット、免疫測定法、免疫組織化学的検査、E L I S A 、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、H P L C 、および質量分析法から選択される技法を含む。

【 0 0 1 7 】

本発明は、対象が肺高血圧症予測 (pulmonary hypertension predicting) を有するか

50

どうかを決定することにおける使用のためのまたは肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に应答することになる見込みを予測することにおける使用のためのキットであって、

a) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在を検出する能力がある少なくとも 1 つのプローブ ; および

b) プローブを使用して、患者からの生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在に関してアッセイするための説明書を含むキットも提供する。

【 0 0 1 8 】

本態様の一部の実施形態では、プローブは、C C L 2 1 発現の核酸配列の一領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または C C L 2 1 タンパク質もしくはその断片に結合する能力がある結合分子から選択される。

【 0 0 1 9 】

本態様の一部の実施形態では、結合分子は、抗体またはその断片である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 - 1 】 イマチニブでの処置後の P H の h y p o x i a / s u g e n ラットモデルにおける肺 m R N A 発現プロファイルからの候補バイオマーカーを示す図である。

【 図 1 - 2 】 イマチニブでの処置後の P H の h y p o x i a / s u g e n ラットモデルにおける肺 m R N A 発現プロファイルからの候補バイオマーカーを示す図である。

【 図 1 - 3 】 イマチニブでの処置後の P H の h y p o x i a / s u g e n ラットモデルにおける肺 m R N A 発現プロファイルからの候補バイオマーカーを示す図である。

【 図 1 - 4 】 イマチニブでの処置後の P H の h y p o x i a / s u g e n ラットモデルにおける肺 m R N A 発現プロファイルからの候補バイオマーカーを示す図である。

【 図 2 】 P H 患者および対照 (年齢、民族性、ジェンダー比が対応した) からの血清および血漿試料におけるヒト C C L 2 1 タンパク質レベルを示す図である。

【 図 3 】 肺移植を受けている P H 患者からのヒト肺切片における免疫組織化学的検査による C C L 2 1 タンパク質発現および局在化を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 1 】

発明の詳細な説明

定義

本明細書を解釈する目的で、以下の定義が当てはまることになり、適切な場合はいつでも、単数形で使用された用語は、複数形も含むことになり、逆の場合も同様である。追加の定義が詳細な説明にわたって記載される。

【 0 0 2 2 】

「 C C L 2 1 」 という用語は、他に規定されない限り、例えば E N S T 0 0 0 0 0 2 5 9 6 0 7 (E n s e m b l) において定義されたアミノ酸配列を有するヒト C C L 2 1 を表す。

【 0 0 2 3 】

「 C C L 2 1 」 という用語は、他に規定されない限り、例えば E N S P 0 0 0 0 0 2 5 9 6 0 7 (E n s e m b l) において定義されたヌクレオチド配列を有するヒト C C L 2 1 遺伝子を表す。

【 0 0 2 4 】

「 C C L 2 1 」 という用語は、 S C Y A 2 1 ; E C L ; S L C ; C K b 9 ; T C A 4 ; 6 C k i n e ; 6 C k i n e ; e x o d u s - 2 ; 「 ケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 2 1 [ホモ・サピエンス (Homo sapiens) (ヒト)] 」 ; 「 C - C モチーフケモカイン 2 1 」 ; 「 ベータケモカイン e x o d u s - 2 」 ; 「 E f f i c i e n t C h e m o a t t r a c t a n t f o r L y m p h o c y t e s 」 ; e x o d u s - 2 ; 「 二次リンパ組織ケモカイン 」 ; 「 小誘導性サイトカインサブファミリー A (C y s - C y s) 」

10

20

30

40

50

、メンバー 2 1」と同義語である。

【0025】

本明細書では、「遺伝子」という用語は、遺伝子およびその全ての現在既知の変異体（バリエーション）を意味する。

【0026】

本明細書では、「レベル」という用語は、本発明によるバイオマーカーのRNAおよび/またはDNAおよび/またはタンパク質コピー数を表す。典型的には、療法下の患者から得られた生物学的試料におけるバイオマーカーのレベルは、健常な対象から得られた同様の試料における同じバイオマーカーのレベルとは異なっている（すなわち増加しているまたは減少している）。

10

【0027】

「アッセイすること（assaying）」、「アッセイすること（to assay）」、「検出」、「検出すること（detecting）」および「検出すること（to detect）」という用語は、1つまたは複数のバイオマーカーの存在または非存在を同定することを表す。「測定」、「測定すること（measuring）」および「測定すること（to measure）」という用語は、1つまたは複数のバイオマーカーの存在、非存在または量を同定することを表す。

【0028】

本明細書では、「ベースライン値」は、肺高血圧症を示さない「正常な」健常な対象からの比較可能な試料（例えば、試験された組織と同じ型の組織からの）におけるCCL21発現（例えばmRNA）またはCCL21ポリペプチド（またはタンパク質）のレベル（量）を一般に表す。必要に応じて、正常な対象からの同じ組織のプールまたは集団が使用され得、ベースライン値は、測定値の平均値（average）または平均値（mean）とすることができる。適したベースライン値は、過度の実験なく当業者によって決定され得る。適したベースライン値は、値から編集されたデータベースにおいて入手可能であり得る、かつ/または公開されたデータ、もしくは患者の組織の遡及研究、および本発明の方法を実行する当業者に明らかであろう他の情報に基づいて決定され得る。適したベースライン値は、基準値の外にある測定されたレベルが診断上の見通しから異常であり、肺高血圧症を予測すると受け入れられ得るように、適切な信頼区間を提供する統計的ツールを使用して選択され得る。

20

【0029】

本明細書では、値の「有意な」増加は、ランダム変動による変化の5パーセント未満の可能性の確率値を一般的に有する、適切であり、当技術分野で周知である統計的方法を使用して決定される、再現可能であるまたは統計的に有意である差異を表し得る。一般に、統計的に有意な値は、「正常な」健常な対照対象における値からの少なくとも2標準偏差である。適した統計的検定は、当業者に明白となる。例えば、ベースライン値と比較したタンパク質の量の有意な増加は、約50%、2倍以上とすることができる。

30

【0030】

本明細書では、「相同体」または「相同の」という用語は、共通の進化上の祖先を共有するまたは野生型との少なくとも50%の配列同一性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド変異体を表す。

40

【0031】

本明細書では、「結合分子」という用語は、CCL21ポリペプチドに特異的に結合する任意のタンパク質またはペプチドを意味する。「結合分子」は、抗体および免疫学的に機能性の断片などのその断片を含むが、これらに限定されない。本明細書では、抗体または免疫グロブリン鎖の「免疫学的に機能性の断片」という用語は、その部分がどのように得られるかまたは合成されるかにかかわらず、全長鎖に存在するアミノ酸の少なくともいくつかを欠くが、なおCCL21を特異的に結合する能力がある抗体の部分（抗原-結合部分）を含む結合タンパク質の種である。

【0032】

「抗体」という用語は、インタクトな免疫グロブリンまたはその機能性の断片を表す。

50

本明細書では、「抗体」という用語は、エピトープ、例えば、ヒト C C L 2 1 上に見出されるエピトープを特異的に結合するかつ認識する免疫グロブリン遺伝子またはその断片からのフレームワーク領域を含むポリペプチドを意味する。「抗体」という用語は、単鎖抗体全体、およびその抗原 - 結合断片を含めた、抗体全体（モノクローナル、キメラ、ヒト化およびヒト抗体などの）を含む。「抗体」という用語は、可変領域を単独で、または以下のポリペプチドエレメント：抗体分子のヒンジ領域、C H 1、C H 2、および C H 3 ドメインの全てまたは部分と組み合わせて含み得る、抗原 - 結合抗体断片、単鎖抗体を含む。

【 0 0 3 3 】

本明細書では、「C C L 2 1 に結合する能力がある」結合分子は、 1×10^{-6} M 以下、または 1×10^{-7} M 以下、または 1×10^{-8} M 以下、または 1×10^{-9} M 以下、 1×10^{-10} M 以下の K_D で C C L 2 1 に結合する結合分子を表すことが意図されている。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書では、「対象」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。

【 0 0 3 5 】

「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳類および非哺乳類を含む。

【 0 0 3 6 】

「患者」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。

20

【 0 0 3 7 】

「肺高血圧症アンタゴニスト」という用語は、肺高血圧症を阻害する、処置する、予防する、治癒させる任意の分子を意味する。

【 0 0 3 8 】

「処置する」、「処置すること」、「処置」、「予防する」、「予防すること」または「予防」という用語は、対象が障害または他のリスク因子を発達することになるリスクを低下させる治療的処置、予防的処置および適用を含む。処置および/または予防は、障害の完全な治癒を必要とせず、症状または根底にあるリスク因子の低下または少なくとも疾患の進行の減速を包含する。

【 0 0 3 9 】

「含むこと (comprising)」という用語は、「含むこと (including)」および「なること (consisting)」を意味し、例えば、X を「含む (comprising)」組成物は、X から排他的になり得るまたは例えば、X + Y のように追加的な何かを含み得る。

30

【 0 0 4 0 】

数値 x に関する「約」という用語は、例えば、 $x + 10\%$ を意味する。2つのアミノ酸配列間の百分率配列同一性への言及は、整列した場合、アミノ酸のその百分率が2つの配列を比較することにおいて同じであることを意味する。このアラインメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で既知のソフトウェアプログラム、例えば Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30の節7.7.18に報告されているものを使用して決定され得る。好ましいアラインメントは、12のギャップオープンペナルティおよび2のギャップ伸長ペナルティ、62の B L O S U M マトリックスを有するアフィンギャップ探索を使用した Smith - Waterman 相同性探索アルゴリズムによって決定される。Smith - Waterman 相同性探索アルゴリズムは、Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489に開示されている。

40

【 0 0 4 1 】

肺高血圧症に関するバイオマーカーとしての C C L 2 1

ケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 2 1 (C C L 2 1) は、C C ケモカインファミリーに属する小型サイトカインである。C C L 2 1 は、免疫調節および炎症プロセスに関与するいくつかの C C サイトカイン遺伝子の1つである。C C サイトカインは、2つの隣

50

接するシステインによって特徴付けられるタンパク質である。他のケモカインと同様に、この遺伝子によってコードされるタンパク質は、造血を阻害し、走化性を刺激する。このタンパク質は、胸腺細胞およびT細胞、特にナイーブT細胞に関して*in vitro*で走化性であるが、B細胞、マクロファージ、または好中球に関して走化性ではない。それは、TおよびBリンパ球上で発現されるケモカイン受容体7に関する高親和性機能性リガンドである^{2 5}。CCCL21は、二次リンパ器官へのリンパ球のホーミングを媒介することにおける役割を果たすと考えられている。つい最近、CCCL21発現は、突発性肺動脈高血圧症を有する患者からの外植された肺におけるtLTにおける二次リンパ組織の異所性形成において検出された^{1 9}。この研究では、CCCL21は、ヒトとラット試料の両方において研究された。ラットおよびヒトCCCL21タンパク質配列は、67%同一であり、これは、2つの種間の高度な相同性を示している。

10

【0042】

診断および処置の方法

本発明は、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

- a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ；
 - b) 生物学的試料をCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ；および
 - c) CCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ
- を含み；
- ベースライン値と比較したCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示している、方法を提供する。

20

【0043】

本発明は、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料をCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較したCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる増加した見込みを示している、方法も提供する。

30

【0044】

さらに、本発明は、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

- a) 患者から得られた生物学的試料をCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ；および
 - b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象におけるCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の量を示しているベースライン値に対するCCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の量と比較して、CCCL21発現および/またはCCCL21タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ
- を含む方法を提供する。

40

【0045】

本発明の実施形態では、アッセイするステップは、生物学的試料をCCCL21発現の核酸に関してアッセイすることを含む。

【0046】

CCCL21遺伝子発現の結果は、ポリヌクレオチド(または核酸)とすることができる。ポリヌクレオチドまたは核酸は、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドおよびその任意の修飾ヌクレオシドであってよい少なくとも2つの核酸モノマーの鎖を含む分子である。DNA分子ならびにゲノムおよびcDNA配列、mRNAおよびスプライシングされていないまたは部分的にスプライシングされた転写物およびスプライシング産物など

50

のRNA分子が特に含まれる。

【0047】

一実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

b) 生物学的試料をCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ; および

c) CC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

を含み;

ベースライン値と比較したCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており; アッセイするステップが生物学的試料をCC L 2 1発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み、核酸がリボ核酸(RNA)またはその断片および相補的デオキシリボ核酸(cDNA)またはその断片から選択される、方法。好ましくは、核酸は、CC L 2 1 mRNAから増幅されたcDNAである。

【0048】

別の実施形態では、肺動脈高血圧症を有する患者が肺動脈高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料をCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較したCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる増加した見込みを示しており; アッセイするステップが生物学的試料をCC L 2 1発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み、核酸がリボ核酸(RNA)またはその断片および相補的デオキシリボ核酸(cDNA)またはその断片から選択される、方法。好ましくは、核酸は、CC L 2 1 mRNAから増幅されたcDNAである。

【0049】

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料をCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象におけるCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量を示しているベースライン値に対するCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量と比較して、CC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含み;

アッセイするステップが生物学的試料をCC L 2 1発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み、核酸がリボ核酸(RNA)またはその断片および相補的デオキシリボ核酸(cDNA)またはその断片から選択される、方法。好ましくは、核酸は、CC L 2 1 mRNAから増幅されたcDNAである。

【0050】

本発明の他の実施形態では、アッセイするステップは、生物学的試料をCC L 2 1タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む。

【0051】

本発明によるCC L 2 1タンパク質(またはポリペプチド)は、ヒトCC L 2 1遺伝子の(完全なまたは不完全な)転写および翻訳によって得られたポリペプチドを含む。

【0052】

ポリペプチド変異体も本発明に含まれる。変異ポリペプチドは、野生型ヒトCC L 2 1遺伝子の転写および翻訳によってまたはその遺伝子の野生型ポリリボヌクレオチド転写物の翻訳によって得られた野生型ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の欠失、挿入お

10

20

30

40

50

よび / または置換を含有する分子を含む。

【 0 0 5 3 】

本発明によるバイオマーカーは、C C L 2 1 ポリペプチド (またはタンパク質) の断片または分解産物とすることができる。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

;

b) 生物学的試料をC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

を含み ;

ベースライン値と比較したC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており ; アッセイするステップが生物学的試料をC C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む、方法。

【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって

、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

;

b) 生物学的試料をC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

を含み ;

ベースライン値と比較したC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており ; アッセイするステップが生物学的試料をC C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み ; 肺高血圧症が突発性肺動脈高血圧症である、方法。

【 0 0 5 6 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に回答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料をC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較したC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に回答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップが生物学的試料をC C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む、方法。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に回答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料をC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較したC C L 2 1 発現および / またはC C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に回答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップが生物学的試料をC C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み ; 肺高血圧症が突発性肺動脈高血圧症である、方法。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含み ;

アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含む、方法。

10

【 0 0 5 9 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

20

を含み ;

アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み ; 肺高血圧症が突発性肺動脈高血圧症である、方法。

【 0 0 6 0 】

本発明の他の実施形態では、アッセイするステップは、生物学的試料を C C L 2 1 発現の修飾核酸配列に関してまたは修飾 C C L 2 1 タンパク質もしくはその断片に関してアッセイすることを含む。

【 0 0 6 1 】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの修飾は、当技術分野で周知である。修飾は、それぞれ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの 1 つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸残基上で行われ得る。代わりに、または上記の化学修飾と組み合わせて、モノマー間の連結が、修飾され得る。さらなる既知の修飾は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドバイオマーカーへのタグまたは標識のコンジュゲーションを含む。

30

【 0 0 6 2 】

ポリヌクレオチドの化学修飾は、アルキル、アシルまたはアミノ基による水素の置換、糖部分または糖間結合 (すなわちホスホロチオエート) の改変、放射性ヌクレオチド (すなわち ³²P) でのヌクレオチドの標識化、蛍光タグ (すなわちローダミン、フルオレセイン、Cy 3 および / または Cy 5、化学発光タグ、発色性タグまたは他の標識 (すなわちジゴキシゲニンまたはビオチンおよび磁性粒子) などのタグまたは標識化分子とのコンジュゲーションを含むが、これらに限定されない。糖部分、プリンおよびピリミジン複素環の修飾ならびにその複素環類似体および互変異性体も本明細書に含まれる。例示的な例は、ジアミノプリン 8 - オキソ - N⁶ - メチルアデニン、7 - デアザキサンチン、7 - デアザグアニン、N⁴, N⁴ - エタノシトシン、N⁶, N⁶ - エタノ - 2, 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、5 - (C³ - C⁶) - アルキニルシトシン、5 - フルオロウラシル、5 プロモウラシル、2 - ヒドロキシ - 5 メチル - 4 - トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンおよび米国特許第 5, 432, 272 号明細書 ; Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980 ; Freier and Altmann, Nucl. Acid Res., 1997, 25(22), 4429-43 ; Toulme', J.J., Nature Biotechnology 19:17-18 (2001) ; Manoharan M.; Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139 (1999) ; Freier S. M., Nucleic acid Research, 25:4429-4443 (1997) ; Uhlman E., Drug Discovery & Deve

40

50

lopment, 3: 203-213 (2000); Herdewin P., Antisense & Nucleic acid Drug Dev., 10: 297-310 (2000)において報告された例である。

【0063】

様々な標識化およびコンジュゲーション技法が当業者に既知である。ポリヌクレオチドまたは核酸標識化は、例えば、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化または標識プライマーを使用したPCR増幅によって達成され得る。

【0064】

本発明によるポリヌクレオチドバイオマーカの化学修飾は、放射性同位体標識化および/または蛍光剤標識化を好ましくは含む。より好ましくは、本発明によるポリヌクレオチドバイオマーカは、特に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってコピー数が増幅された場合、蛍光タグを含む(例えば、TaqMan(登録商標)Gene Expressionアッセイは、一对の非標識PCRプライマーおよび5'末端のFAM(商標)またはVIC(登録商標)色素標識を有するTaqMan(登録商標)プローブおよび3'末端のマイナーグループバインダー(MGB)非蛍光クエンチャー(NFQ)からなる。

10

【0065】

生物学的試料

本発明の実施形態では、生物学的試料は、血液、血清、血漿、尿、唾液、糞便および組織試料から選択される。

【0066】

「提供」される試料は、アッセイを行う人物(または機械)によって得られ得る、またはそれは、別のものによって得られ、アッセイを実行する人物(または機械)に運ばれていても良い。

20

【0067】

多くの適した試料型は、当業者に明白となろう。本発明の一実施形態では、試料は、全血、血漿、または血清(凝固因子が除去された血漿)などの血液試料である。例えば、末梢もしくは静脈血漿または血清が使用され得る。別の実施形態では、試料は、尿、汗、またはタンパク質が場合によって血流からその中に除去された別の体液である。尿の場合、例えば、タンパク質は、分解されている可能性があるので、本発明のタンパク質の診断上の断片は、スクリーニングされ得る。別の実施形態では、例えば、試料は、生検後に回収される肺組織である。試料を得、分析のためにそれらを調製するための方法は、通例であり、当技術分野で周知である。

30

【0068】

一実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ

b) 生物学的試料をCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ; および

c) CC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

40

を含み;

ベースライン値と比較したCC L 2 1発現および/またはCC L 2 1タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており; アッセイするステップが生物学的試料をCC L 2 1発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み; 核酸がリボ核酸(RNA)またはその断片および相補的デオキシリボ核酸(cDNA)またはその断片から選択され;

生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ましくは、核酸は、CC L 2 1 mRNAから増幅されたcDNAである。

【0069】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応

50

答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に应答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み ; 核酸がリボ核酸 (R N A) またはその断片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択され、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ましくは、核酸は、C C L 2 1 m R N A から増幅された c D N A である。

【 0 0 7 0 】

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含み ;

アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み ; 核酸がリボ核酸 (R N A) またはその断片および C C L 2 1 リボ核酸 (R N A) 相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択され、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ましくは、核酸は、C C L 2 1 m R N A から増幅された c D N A である。

【 0 0 7 1 】

別の実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ ;

b) 生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ

を含み ;

ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており ; アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。

【 0 0 7 2 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に应答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に应答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。

【 0 0 7 3 】

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含み ;

アッセイするステップが生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法

10

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

20

を含み、

肺高血圧症アンタゴニストがカルシウムチャネルブロッカー、ホスホジエステラーゼ (P D E) 5 阻害剤、グアニル酸シクラーゼ (s G C) 刺激薬、エンドセリン受容体アンタゴニスト (E R A) およびプロスタサイクリンアゴニストから選択される、方法が提供される。

【 0 0 7 5 】

検出 (またはアッセイ) 方法

当業者に既知のまたは明白ないろいろな方法が遺伝子またはタンパク質発現プロファイリングを実行するために用いられ得る。

【 0 0 7 6 】

30

一部の実施形態では、アッセイするステップは、ノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)、T a q M a n に基づくアッセイ、直接配列決定、動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、プライマー伸長法、オリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ、温度勾配ゲル電気泳動 (T G G E)、変性高速液体クロマトグラフィー、高解像度融解分析、DNA ミスマッチ結合タンパク質アッセイ、キャピラリー電気泳動、サザンブロット、免疫測定法、免疫組織化学的検査、E L I S A、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、H P L C、および質量分析法から選択される技法を含む。

【 0 0 7 7 】

40

一般に、遺伝子発現プロファイリングの方法は、2つの大きい群に分けられ得る : ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法、およびポリヌクレオチドの生化学的検出または配列決定に基づく他の方法。試料における m R N A 発現の定量化のための当技術分野で既知の最も通例使用される方法は、ノーザンブロットングおよび i n s i t u ハイブリダイゼーション (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 10 6:247-283 (1999)) ; R N A s e プロテクションアッセイ (Hod, Biotechniques 13:852-854 (1992)) ; および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) (Weis et al., Trends in Genetics 8:263-264 (1992)) を含む。

【 0 0 7 8 】

代わりに、DNA 二本鎖、RNA 二本鎖、および DNA - RNA ハイブリッド二本鎖または DNA - タンパク質二本鎖を含めた特定の二本鎖を認識し得る抗体が用いられ得る。

50

mRNAまたはタンパク質の発現を決定するための様々な方法は、遺伝子発現プロファイリング、定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) を含めたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、Affymetrix GeneChipテクノロジー、遺伝子発現の連続分析 (SAGE) (Velculescu et al., Science 270:484-487 (1995); およびVelculescu et al., Cell 88:243-51 (1997))、MassARRAY、大規模並列シグネチャー配列決定 (MPSS) による遺伝子発現解析 (Brenner et al., Nature Biotechnology 18:630-634 (2000)) を使用することによってなど、製造者のプロトコールに従って市販の機器によって行われ得るマイクロアレイ解析、プロテオミクス、免疫組織化学的検査 (IHC) などを含むが、これらに限定されない。好ましくは、mRNAが定量化される。かかるmRNA分析は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の技法を使用して、またはマイクロアレイ解析によって好ましくは行われる。PCRが用いられる場合、PCRの好ましい形は、定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) である。

10

【0079】

免疫組織化学的検査方法も本発明のバイオマーカーの発現レベルを検出するのに適している。したがって、各マーカーに特異的な抗体または抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、最も好ましくはモノクローナル抗体が発現を検出するために使用される。抗体は、例えば、放射性標識、蛍光標識、ビオチンなどのハプテン標識、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素で抗体自体を直接標識化することによって検出され得る。代わりに、非標識一次抗体が、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を含む標識二次抗体と組み合わせて使用される。免疫組織化学的検査プロトコールおよびキットは、当技術分野で周知であり、市販されている。

20

【0080】

発現レベルは、例えば、免疫測定法またはプロテオミクス技法の様々な型を使用してタンパク質レベルでも決定され得る。

【0081】

免疫測定法では、標的の診断上のタンパク質マーカーは、マーカーに特異的に結合する抗体を使用することによって検出される。抗体は、典型的には、検出可能な部分で標識化されることになる。以下のカテゴリー：35S、14C、125I、3H、および131Iなどのラジオアイソトープに一般に分類され得る多数の標識が利用可能である。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al. (1991) Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubsに報告されている技法を使用して、放射性同位体で標識化され得、放射能は、シンチレーション測定を使用して測定され得る。

30

【0082】

希土類キレート (ユウロピウムキレート) またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリンおよびTexas Redなどの蛍光標識が利用可能である。蛍光標識は、例えば、上記の「Current Protocols in Immunology」において開示された技法を使用して、抗体にコンジュゲートされ得る。蛍光は、蛍光計を使用して定量化され得る。

40

【0083】

様々な酵素-基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号明細書は、これらのいくつかの総説を提供している。酵素は、様々な技法を使用して測定され得る発色性基質の化学的変化を一般に触媒する。例えば、酵素は、基質の色変化を触媒し得、これは、分光光度的に測定され得る。代わりに、酵素は、基質の蛍光または化学発光を改変し得る。蛍光の変化を定量化するための技法が上に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起状態になり、次いで、(例えば、ケミルミノメーターを使用して) 測定され得る光を放射し得るまたは蛍光アクセプターにエネルギーを供与する。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ (例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第4,737,456号明細書)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラ

50

ジンジオン (dihydrophthalazinedion)、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P O) などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ (例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素)、複素環オキシダーゼ (ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどを含む。酵素を抗体にコンジュゲートするための技法は、O' Sullivan et al. (1981) Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. L angone & H. Van Vunakis), Academic press, New York 73: 147-166に報告されている。

【0084】

10

酵素-基質組合せの例は、例えば：水素ペルオキシダーゼが色素前駆体 (例えば、オルトフェニレンジアミン (O P D) または 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩 (T M B)) を酸化する、基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P O)；発色性基質としてパラニトロフェニルリン酸を有するアルカリホスファターゼ (A P)；および発色性基質 (例えば、p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシダーゼ) または蛍光発生基質 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシダーゼを有する β -D-ガラクトシダーゼ (β -D-G a l) を含む。

【0085】

多数の他の酵素-基質組合せは、当業者に入手可能である。これらの一般的な総説に関して、米国特許第 4, 275, 149号明細書および米国特許第 4, 318, 980号明細書を参照されたい。

20

【0086】

免疫測定技法の他のバージョンでは、抗体は、標識化される必要はなく、その存在は、抗体に結合する標識抗体を使用して検出され得る。血漿および血清試料中のヒト C C L 2 1タンパク質の検出に関して、M e s o s c a l e D i s c o v e r y (登録商標) (M S D) プラットフォーム上での特別仕様の免疫測定法が使用された。M S Dの電気化学発光検出テクノロジーは、M U L T I - A R R A Yおよび M U L T I - S P O T (登録商標) マイクロプレートの電極表面で惹起された電気化学的刺激で光を放射する S U L F O - T A G (商標) 標識を使用する。

【0087】

30

したがって、診断上の免疫測定法は、本明細書では、例えば、競合的結合アッセイ、E L I S A などの直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイを含めた任意のアッセイフォーマットであってよい。

【0088】

一実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって、
a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ；
b) 生物学的試料を C C L 2 1発現および/または C C L 2 1タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ；および
c) C C L 2 1発現および/または C C L 2 1タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1発現および/または C C L 2 1タンパク質の量を示しているベースライン値と比較するステップ
を含み；
ベースライン値と比較した C C L 2 1発現および/または C C L 2 1タンパク質の統計的に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており；アッセイするステップが生物学的試料を P C R または R T - P C R によって C C L 2 1発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み；核酸がリボ核酸 (R N A) またはその断片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択され；生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ましくは、核酸は、C C L 2 1 m R N A から増幅された c D N A である。

40

50

【 0 0 8 9 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に
答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料を C C
L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ
を含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質
の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に
答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップが生物学的試料を P C R または R T -
P C R によって C C L 2 1 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含み ; 核酸がリボ
核酸 (R N A) またはその断片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断
片から選択され ; 生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ま
しくは、核酸は、C C L 2 1 m R N A から増幅された c D N A である。

10

【 0 0 9 0 】

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンバ
ク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および

b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L
2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または
C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンバ
ク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニスト
を投与するステップ

20

を含み、

アッセイするステップが生物学的試料を P C R または R T - P C R によって C C L 2 1 発
現の核酸配列に関してアッセイすることを含み ; 核酸がリボ核酸 (R N A) またはその断
片および相補的デオキシリボ核酸 (c D N A) またはその断片から選択され ; 生物学的試
料が血液または血漿または血清から選択される、方法。好ましくは、核酸は、C C L 2 1
m R N A から増幅された c D N A である。

【 0 0 9 1 】

別の実施形態では、対象が肺高血圧症を有するかどうかを決定するための方法であって

、

a) 肺高血圧症を有すると疑われる対象から得られた生物学的試料を用意するステップ
;

30

b) 生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関
してアッセイするステップ ; および

c) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さな
い対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベ
ースライン値と比較するステップ
を含み ;

ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的
に有意な増加した量が肺高血圧症を示しており ; アッセイするステップが生物学的試料を
免疫測定法または E L I S A によって C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッ
セイすることを含み、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。

40

【 0 0 9 2 】

別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に
答することになる見込みを予測する方法であって、患者から得られた生物学的試料を免疫
測定法または E L I S A によって C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の
レベルに関してアッセイするステップを含み、ベースライン値と比較した C C L 2 1 発現
および / または C C L 2 1 タンパク質の増加したレベルが、患者が肺高血圧症アンタゴニ
ストでの処置に
答することになる増加した見込みを示しており ; アッセイするステップ
が生物学的試料を C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み
、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。

50

【 0 0 9 3 】

さらに別の実施形態では、肺高血圧症を有する患者を処置する方法であって、

- a) 患者から得られた生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質のレベルに関してアッセイするステップ ; および
- b) 患者が、肺高血圧症を有さない対象における C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の量と比較して、C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の統計的に有意な増加した量を有する場合、治療有効量の肺高血圧症アンタゴニストを投与するステップ

を含み ;

アッセイするステップが生物学的試料を免疫測定法または E L I S A によって C C L 2 1 タンパク質またはその断片に関してアッセイすることを含み、生物学的試料が血液または血漿または血清から選択される、方法。

【 0 0 9 4 】

本発明のキット

本発明は、対象が肺高血圧症予測を有するかどうかを決定することにおける使用のためのまたは肺高血圧症を有する患者が肺高血圧症アンタゴニストでの処置に応答することになる見込みを予測することにおける使用のためのキットであって、

- a) C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在を検出する能力がある少なくとも 1 つのプローブ ; および

- b) プローブを使用して、患者からの生物学的試料を C C L 2 1 発現および / または C C L 2 1 タンパク質の存在に関してアッセイするための説明書

を含むキットを提供する。

【 0 0 9 5 】

一実施形態では、プローブは、C C L 2 1 の発現を定量化するための、遺伝子特異的もしくは遺伝子選択的プローブおよび / またはプライマーなどの、C C L 2 1 発現の核酸配列の一領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドから選択される。

【 0 0 9 6 】

キットは、試料、特に固定パラフィン包埋組織試料からの R N A の抽出のための試薬および / または R N A 増幅のための試薬を任意選択でさらに含み得る。キットは、様々な試薬 (典型的には濃縮された形での) 、例えば、既製のマイクロアレイ、緩衝液、適切なヌクレオチド三リン酸 (例えば、d A T P 、 d C T P 、 d G T P および d T T P ; または r A T P 、 r C T P 、 r G T P および U T P) 、逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼのうちの 1 つまたは複数をそれぞれ有する容器 (方法の自動実行における使用に適したマイクロタイタープレートを含めた) を含み得る。

【 0 0 9 7 】

別の実施形態では、プローブは、C C L 2 1 タンパク質またはその断片に結合する能力がある結合分子である。好ましくは、結合分子は、抗体またはその断片である。

【 0 0 9 8 】

他の結合分子は、フィブロネクチン I I I 型ドメインに基づく足場 (例えば、フィブロネクチン I I I 型の 1 0 番目のモジュール (1 0 F n 3 ドメイン)) を有する分子、アドネクチン (A d n e c t i n s (登録商標)) 、アンキリン由来反復モジュールを含む分子、A f f i b o d y (登録商標) 分子、A n t i c a l i n s (登録商標) 分子、A f f i l i n (登録商標) 分子およびタンパク質エピトープミメティックとすることができる。

【 実施例 】

【 0 0 9 9 】

本発明は、限定的であると解釈されるべきではない以下の例によってさらに例証される。

【 0 1 0 0 】

1. Hypoxia / Sugenラットモデル遺伝子チッププロファイリング

PHのラットHypoxia / Sugenモデルを使用して、実験PHおよび未処置ラット肺を用いたラット肺試料間の比較トランスクリプトームプロファイリングを実行した。

【0101】

全ての動物手順をBritish Home Office regulations (Scientific Procedures) Act of 1986, UKに従って行った。

【0102】

Sugen (250 mg; SU5416; Sigma-Aldrich (登録商標)) をビヒクル (脱イオン水中の12.5 ml; 0.5% (wt/vol) カルボキシルメチルセルロースナトリウム、0.9% (wt/vol) NaCl、0.4% (vol/vol) ポリソルベート、0.9% (vol/vol) ベンジルアルコール) に溶解し、15分間超音波処理し、次いでボルテックスした。第0日に、動物を麻酔し、秤量し、皮下注入によってSugen 20 mg/kgを与えた。動物を低酸素チャンバーに置き、O₂レベルをゆっくりと10%まで減少させた。対照動物は、大気 (21% O₂) 中に残し、研究のための正常酸素圧対照として役立たせた。2週間後、全ての動物を低酸素チャンバーから移動した。第4週後、動物をセボフルラン麻酔下で心エコー測定に供し、完全に回復するまで密接にモニターした。動物は、ケタミンおよびメドミジン麻酔の混合物下で右心室圧 (RVP) の測定のためにRVカテーテル処置を受けた。スケジュール1による安楽死後、肺の左葉を除去し、膨張させ、10%ホルマリン中で固定し、組織学的分析のためにパラフィンに包埋した。右肺の葉を転写プロファイリングのためにスナップ凍結した。

10

20

【0103】

TT2組織バッグ (K Bioscience (登録商標) Cat#520021) に採取した、凍結したラット肺試料をCovaris CryoPrep CP02を使用して粉砕した。粉砕された肺試料からの全RNAを製造者のプロトコール (Qiagen (商標)) に従って、RNeasy Miniキットによって抽出した。ゲノムDNAをDNase I (Turbo DNase kit, Invitrogen) での処置によって除去した。RNAの正確な定量化をNanoDrop ND-1000分光光度計で決定した。RNAの質を、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 上でのマイクロフルイディクスに基づく電気泳動によって18Sおよび28S rRNAを分析することによって評価した。

30

【0104】

マイクロアレイ調製および分析に関して、Affymetrix One-Round In Vitro Transcription RNA Amplificationキットを使用して、1 µgの全RNAを増幅した。相補的DNA (cDNA) をオリゴ (dT) およびT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列を含有するプライマーで合成した。次いで、二本鎖cDNAを精製し、ビオチン化cRNAを得るための鋳型として使用した。増幅されたcRNAの量および質をNanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) およびAgilent Bioanalyzerを使用して評価した。ビオチン化cRNAを断片化し、Affymetrix Rat GeneChipアレイ230_2にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、GeneChipアレイを洗浄し、染色し、GeneChip Scanner 3000 7Gを使用してスキャンした。Affymetrix GeneChip Operating Softwareを画像取得のために使用した。分析をGeneSpring GX 11.5.1ソフトウェア (Agilent Technologies Inc., USA) を使用して行った。データ標準化を、Robust Multichip Analysis (RMA) アルゴリズムおよび

40

50

全ての試料の中央値へのベースライン変換を使用して達成した。

【0105】

分泌タンパク質（血液試料中で検出される可能性がある）をコードし、リモデリングプロセスと関連している差次的に発現される遺伝子（ > 1.5 倍、 p 値 0.05 、 T 検定）をさらなる検証のために最終候補リストに載せた（表 1）。リモデリングと関連している遺伝子を以下の情報源から照合した：MetaCore pathway データベース（<http://thomsonreuters.com/metacore> formerly GeneGO）、Ingenuity Pathway Analysis データベース（IPA）（<http://www.ingenuity.com/products/ipa>）、Gene Prospector tool in Gene Navigator（<http://hugenavigator.net/HuGENavigator>）。血液中で分泌されるまたは検出されるとアノテートされた遺伝子を以下の情報源を使用して見出した：Ingenuity Pathway Analysis データベース（IPA）（<http://www.ingenuity.com/products/ipa>）および専売のデータセット（SECTrans）。

10

【0106】

【表 1】

表 1-未処置対照(naïve control)と比較した、Hypoxia Sugen 処置動物の肺試料において差次的に発現される遺伝子

	ラット遺伝子 記号	ラット遺伝子タイトル	ラット Entrez 遺伝子 ID	倍変化
1	Cyp1b1	シトクロム P450、ファミリー1、サブ ファミリーb、ポリペプチド 1	25426	46.4
2	Grem1	グレムリン 1、システインノットスー パーファミリー、相同体(アフリカツメ ガエル(<i>Xenopus laevis</i>))	50566	8.4
3	Chia	キチナーゼ、酸性	113901	4.2
4	Ccl2	ケモカイン(C-C モチーフ)リガンド 2	24770	3.4
5	Serpine1	セリン(またはシステイン)ペプチダー ゼ阻害剤、クレード E、メンバー1	24617	3.2
6	Spp1	分泌リンタンパク質(phosphoprotein)1	25353	3.1
7	Il1r2	インターロイキン 1 受容体、II 型	117022	3.1
8	Frzb	frizzled 関連タンパク質	295691	3.0
9	Il6	インターロイキン 6	24498	2.9
10	Cxcl13	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 13	498335	2.7
11	Esm1	内皮細胞特異的分子 1	64536	2.7
12	Mmrn1	マルチメリン(multimerin)1	500152	2.6
13	Ccl21	ケモカイン(C-C モチーフ)リガンド 21	298006	2.6
14	Cthrc1	コラーゲン三重らせん反復含有 1	282836	2.6
15	Plaur	プラスミノゲン活性化因子、ウロキ ナーゼ受容体	50692	2.5
16	Tfpi2	組織因子経路阻害剤 2	286926	2.4
17	C6	補体成分 6	24237	2.3
18	Dmp1	象牙質マトリックス酸性リンタンパク 質 1	25312	2.3
19	Ptgs2	プロスタグランジン-エンドペルオキシ ドシンターゼ 2	29527	2.3
20	Arhgap1	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 1	311193	2.3
21	LOC1003631 45	スタビリン 1	100363145	2.2
22	Aqp1	アクアポリン 1	25240	2.2
23	Fst	フォリスタチン	24373	2.1
24	Reln	リーリン	24718	2.1
25	Acp5	酸性ホスファターゼ 5、酒石酸抵抗性	25732	2.1
26	Col18a1	コラーゲン、XVIII 型、アルファ 1	85251	2.1
27	Lpar6	リゾホスファチジン酸受容体 6	691774	2.0
28	Nos3	一酸化窒素シンターゼ 3、内皮細胞	24600	2.0

10

20

30

40

29	Cxcr4	ケモカイン(C-X-C モチーフ)受容体 4	60628	1.9	10
30	Chi3l1	キチナーゼ 3 様 1	89824	1.9	
31	Adamts4	トロンボスポンジン 1 型モチーフを有する ADAM メタロペプチダーゼ、 4	66015	1.8	
32	Gdf15	増殖分化因子 15	29455	1.8	
33	Tac1	タキキニン 1	24806	1.8	
34	Col1a1	コラーゲン、I 型、アルファ 1	29393	1.8	
35	Angpt2	アンジオポエチン 2	89805	1.8	
36	Olr1	酸化低密度リポタンパク質(レクチン様)受容体 1	140914	1.8	
37	Timp1	TIMP メタロペプチダーゼ阻害剤 1	116510	1.8	
38	Serpine2	セリン(またはシステイン)ペプチダーゼ阻害剤、クレード E、メンバー 2	29366	1.8	
39	Eln	エラスチン	25043	1.8	20
40	Vcan	バーシカン	114122	1.7	
41	Adora2b	アデノシン A2B 受容体	29316	1.7	
42	Cxcl10	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 10	245920	1.7	
43	Gstp1	グルタチオン S-トランスフェラーゼ pi 1	24426	1.6	
44	Mmp14	マトリックスメタロペプチダーゼ 14(膜挿入)	81707	1.6	
45	Hmox1	ヘムオキシゲナーゼ(デサイクリング)1	24451	1.6	
46	Ctsk	カテプシン K	29175	1.6	
47	Il1r1	インターロイキン 1 受容体、I 型	25663	1.6	
48	Pthlh	副甲状腺ホルモン様ホルモン	24695	1.6	
49	Axl	Axl 受容体チロシンキナーゼ	308444	1.6	30
50	Gch1	GTP シクロヒドロラーゼ 1	29244	1.6	
51	Inhba	インヒビンベータ-A	29200	1.5	
52	Cxcl12	ケモカイン(C-X-C モチーフ)リガンド 12(ストロマ細胞由来因子 1)	24772	1.5	
53	Hp	ハプトグロビン	24464	1.5	
54	Fn1	フィブロネクチン 1	25661	1.5	40
55	Il6st	インターロイキン 6 シグナルトランスデューサー	25205	1.5	
56	Il1rn	インターロイキン 1 受容体アンタゴニスト	60582	1.5	
57	Des	デスミン	64362	1.5	
58	Vegfa	血管内皮増殖因子 A	83785	-1.5	
59	Ace	アンジオテンシン I 変換酵素(ペプチジル-ジペプチダーゼ A)1	24310	-1.6	

【 0 1 0 7 】

2 . イマチニブでの処置後の突発性肺動脈高血圧症の Hypoxia Sug en ラットモデルにおける候補バイオマーカー mRNA レベルの評価

全ての動物手順を上記のように行った。

【0108】

この研究では、第0日のSugenの初回用量の投与、およびその後の低酸素チャンバーでの14日の期間後、ラットにさらなる2週間毎日、100mg/kgのイマチニブまたはビヒクル対照を投与した。

【0109】

スケジュール1による安楽死後、組織学的分析のために肺の左葉を除去し、気道膨張によって、膨張させ、10%ホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋した。組織切片(3μm)をフォンビルブランド因子(vWF)およびα-平滑筋アクチン(α-SMA)に対する抗体で染色した。スライドをDMLBおよび共焦点顕微鏡、デジタルカメラ、およびIM50イメージングソフトウェア(Leica Microsystems、London、UK)を使用して調べた。肺小血管(vWF染色によって示された10~100μm直径)を、筋肉化を示している周囲のα-SMA陽性染色の程度に関して評価した。右肺の葉を候補バイオマーカーmRNA発現測定のためにスナップ凍結した。全RNAを抽出し、上の節で述べた品質制御を行った。

10

【0110】

cDNAをキット製造者のプロトコールに従ってHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit(Invitrogen)を使用して合成した。QPCRを、TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)を使用して、ABI Prism 7900HT配列検出システム(Applied Biosystems、USA)上で行った。TaqManアッセイをApplied Biosystems(登録商標)から購入した。相対的発現を10の異なるハウスキーピング遺伝子の組合せに標準化した。データをSDS RQ Manager、ソフトウェア(Applied Biosystems、バージョン2.4)を使用して分析した。各遺伝子に関する標準化された遺伝子発現値($2^{-\Delta C_t}$)をプロットし、two-way ANOVA in GraphPad Prism 6.02を使用して分析した。

20

【0111】

表1に列挙された全ての転写物の発現をビヒクルまたはイマチニブで処置された動物からの肺試料において評価した。以下の6つの遺伝子転写物がラットHy/Su肺において上方制御され、イマチニブでの処置で下方制御されることが見出された: Ccl21、Col18a1、Cxcl12、Cxcl13、Dmp1、Frzb(図1)。さらに、第28日にイマチニブまたはビヒクルで処置された群および対照未処置動物からの肺試料におけるCCL21 mRNA発現レベルを測定し、未処置対照と比較したビヒクル処置動物の肺におけるCCL21 mRNAレベルの増加およびイマチニブでの処置後の減少を観察した(図3、上のグラフ)。これらの群からの肺試料におけるCCL21発現レベルは、右心室圧と動脈筋肉化の両方と有意に相関した($P < 0.0001$)

30

【0112】

したがって、上記の遺伝子の転写物レベルが、治療薬投与の結果として肺高血圧症を有する動物の肺において抗リモデリング剤に応答して下方制御されると結論づけた。

【0113】

3. 長期的なラットHypoxia/Sugenにおける血管リモデリング読取りとの候補バイオマーカーmRNA関連の評価

40

全ての動物手順を上記のように行った。この研究では、第0日のSugenの初回用量の投与および低酸素チャンバーにおける21日の期間後、ラットは、上昇した右心室圧および動脈筋肉化を発達した。スケジュール1による安楽死後、肺の左葉を組織学的分析のために、右葉をmRNA分析のために除去した。以下の研究時点からの肺試料における6つ全ての候補バイオマーカーmRNA発現レベルを測定した: 第3週、第5週、第8週および第14週ならびに未処置動物(各群においてn=6)。ピアソン相関を使用して、候補バイオマーカーmRNA発現と筋肉化の百分率、右心室圧(RVP)と閉塞血管の数間の相関の有意性を評価した。これらの群からの肺試料において評価された全てのマーカー

50

の転写物発現は、3つの血管リモデリング読取りのうちの少なくとも2つと有意に相関した：動脈筋肉化の百分率、閉塞血管の百分率および右心室圧（表2）。したがって、評価された候補バイオマーカーの転写物が血管リモデリングの程度を示していると結論づけた。

【0114】

【表2】

表2:血管リモデリング読取りとの候補バイオマーカー転写物発現レベルの相関。

転写物	R 値筋肉化 (muscularisation)	R 値筋肉化
CCL21	0.7102	<0.0001
Cxcl12	0.626	<0.0001
Frzb	0.6292	<0.0001
Cxcl13	0.6164	<0.0001
Col18a1	0.4072	0.0152
Dmp1	0.3933	0.0194

10

転写物	R 値内腔閉塞	P 値内腔閉塞
CCL21	0.7344	<0.0001
Cxcl12	0.5331	0.0008
Frzb	0.4921	0.0023
Cxcl13	0.3482	0.0374
Col18a1	0.347	0.0381
Dmp1	0.1549	0.3671

20

転写物	R 値 RVP	R 値 RVP
CCL21	0.7164	<0.0001
Cxcl12	0.6611	<0.0001
Frzb	0.7078	<0.0001
Cxcl13	0.7183	<0.0001
Col18a1	0.4877	0.0091
Dmp1	0.4796	0.0031

30

【0115】

4. PH患者および対照の血清および血漿試料における候補バイオマーカータンパク質レベルの評価

候補バイオマーカーの循環タンパク質レベルが対照と比較して血清および血漿PH患者試料において上昇しているかどうかを決定するために、CCL21、CXCL12、CXCL13およびCol18a1に関する免疫測定法を開発し、30人のPH患者ならびに25人の年齢、民族性およびジェンダー比対照におけるこれらの循環レベルを測定した。

【0116】

ヒト末梢血試料を承認された倫理審査委員会適用に従って入手し、取り扱った。30人

40

50

の肺高血圧症患者からの対応血清および血漿試料を収集した。世界保健機関（WHO）分類システム（Dana Point 2008）²に従って、30人のPH患者のうち、24.8%は、群1に属し、28.4%は、群2に属し、10%は、群2および3に属し、33.3%は、群3に属し、3.5%は、群4に属した。

【0117】

MSD Coated Customプレートを使用した免疫測定法を製造者の推奨に従って実行した。簡潔に述べると、プレートを25 μ l / ウェルで専売のDiluent 2でインキュベートし、粘着性のカバーフィルムで密封し、プレート振盪機（300 ~ 1000 rpm）上で室温において30分間インキュベートした。CCL21 Recombinantタンパク質（R&D systems（登録商標）、cat # DY366、Part 841709）を1%BSA（Gibco、cat # 15260-037）/PBS（Gibco、cat # 14190）中で復元し、10,000 pg/mlで加え、1:5連続希釈をゼロ標準（0 pg/ml）としての第8ポイントで、Diluent 2で行った。

【0118】

標準、試料、およびアッセイ対照をDiluent 2を有するMSDプレートに25 μ l / ウェルで加えた。プレートを密封し、プレート振盪機（300 ~ 1000 rpm）上で2時間室温においてインキュベートした。次いで、ウェルを洗浄緩衝液（PBS中の0.05% Tween-20、pH 7.4、Sigma（商標）、cat # P3563-10PAK）で3回洗浄した。

【0119】

CCL21検出および捕獲抗体（MSD Coated Custom Plateと共に供給された、Human CCL21/6Ckine DuoSet ELISA development system、R&D Systems（登録商標）、cat # DY366、Parts 841707および841708）を1 μ g/mlの最終濃度でR&D system（登録商標）DuoSetプロトコールに従って、復元した。検出抗体溶液を洗浄されたプレートに加えた。プレートを密封し、室温で振盪しながら2時間インキュベートした。最終洗浄ステップ後、リバースピペッティングを使用して、150 μ lの2 $\times$ Read Buffer T（等体積のH₂Oで希釈された）を加え、プレートをMSD機器SECTOR Imager 6000を使用して読んだ。

【0120】

統計的分析のために、対応のないt検定をGraphPad prism 6を使用して行った。受信者動作特性（ROC）曲線分析をGraphPad Prism 6を使用して行った。ソフトウェアによって得られた曲線下面積（AUC）は、バイオマーカーの特異性および選択性を反映している。1のAUCは、2つの集団を識別することにおいて100%感受性かつ特異的なバイオマーカーを示す。

【0121】

CCL21が血清と血漿試料の両方において対照対照と比較してPH患者において上方制御されたが、CCL18a1、CXCL12または13（データは示さず）は上方制御されなかったことを見出した（図2）。データセットの受信者動作特性（ROC）曲線分析は、CCL21循環レベルが、血清試料において0.91および血漿試料において0.89の曲線下面積（AUC）で（図2）、高感受性および特異性で患者を対照から識別することができることを示した。したがって、CCL21が対照対照と比較してPH患者の血清および血漿試料において上方制御され、高感受性/特異性で患者を対照から識別することができる結論づけた。

【0122】

5. PH患者からのヒトIHC CCL21タンパク質データ

PHからのホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を、承認されたインフォームド Consentおよび機関の合意の下で肺移植を受けている患者からUniversity of Cambridgeから入手した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

C C L 2 1 を以下のプロトコールを使用して、V e n t a n a D i s c o v e r y X T 上での免疫組織化学的検査によって検出した。簡潔に述べると、切片を、E Z p r e p 溶液を使用して脱ろうし、高pH8抗原回復をV e n t a n a c c 1 試薬を使用して行った。C C L 2 1 をヤギ抗ヒトC C L 2 1 抗体 (R & D s y s t e m (登録商標) A F 3 6 6 、 3 . 3 3 u g / m l) を使用して検出した - 抗体を室温で12時間インキュベートした。二次抗体は、37 で20分インキュベートした、1 / 2 0 0 に希釈されたビオチン化ウサギ抗ヤギ (D A K O E 0 4 6 6) であった。ビオチン化二次抗体を、D A B M a p キットを使用して検出した。(V e n t a n a 6 5 0 - 0 1 0)。切片を、H a r r i s ヘマトキシリンを使用して対比染色し、カバーガラスをかけた。画像をA p e r r i o X T スライドスキャナーを使用してスキャンし、D e f i n i e n s T i s s u e S t u d i o を使用して分析した。

10

【 0 1 2 4 】

C C L 2 1 タンパク質を上皮下 / 上皮および肺胞マクロファージならびにリンパ管を有する領域における進行型PH患者からのPAH病変 (図3 (A ~ D)) において検出した。したがって、C C L 2 1 が疾患病変の部位で発現されると結論づけた。

【 0 1 2 5 】

【表 3】

参考文献

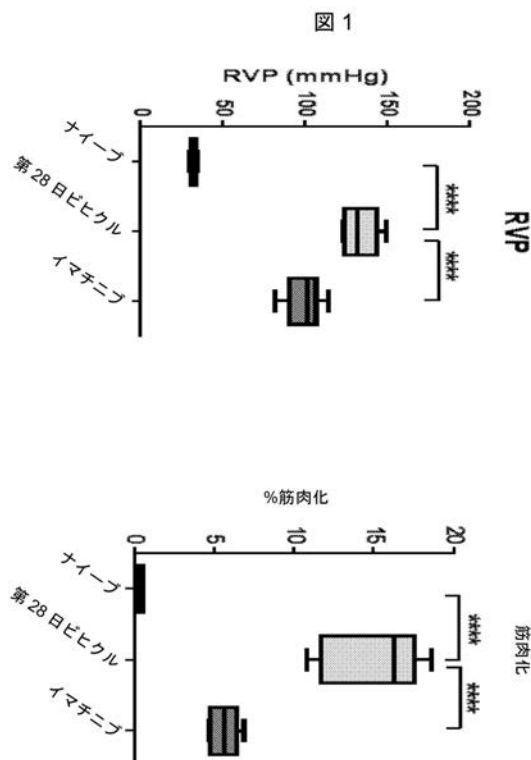
1. Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Wilkins, M.R. & Grimminger, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology* **8**, 443-455 (2011).
2. Galie, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* **34**, 1219-1263 (2009).
3. Dewachter, L. *et al.* Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**, 1025-1033 (2006). 10
4. Fike, C.D., Slaughter, J.C., Kaplowitz, M.R., Zhang, Y. & Aschner, J.L. Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **295**, L881-888 (2008).
5. Price, L.C. *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **141**, 210-221 (2012). 20
6. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation* **122**, 4306-4313 (2012).
7. Voelkel, N.F., Gomez-Arroyo, J., Abbate, A., Bogaard, H.J. & Nicolls, M.R. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *The European respiratory journal* **40**, 1555-1565 (2012).
8. Kherbeck, N. *et al.* The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clinical reviews in allergy & immunology* **44**, 31-38 (2013). 30
9. Perros, F. *et al.* Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* **29**, 937-943 (2007).
10. Humbert, M. *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **151**, 1628-1631 (1995).

11. Soon, E. *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **122**, 920-927 (2010).
12. Tamby, M.C. *et al.* Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **60**, 765-772 (2005).
13. Terrier, B. *et al.* Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **177**, 1128-1134 (2008). 10
14. Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B. & Voelkel, N.F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* **144**, 275-285 (1994).
15. Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J. & Randall, T.D. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in immunology* **20**, 26-42 (2008).
16. Brusselle, G.G., Demoor, T., Bracke, K.R., Brandsma, C.A. & Timens, W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *The European respiratory journal* **34**, 219-230 (2009). 20
17. Marchal-Somme, J. *et al.* Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* **176**, 5735-5739 (2006).
18. Sato, M. *et al.* The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol* **182**, 7307-7316 (2009).
19. Perros, F. *et al.* Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **185**, 311-321 (2012). 30
20. Aloisi, F. & Pujol-Borrell, R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* **6**, 205-217 (2006).
21. Nagaya, N. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* **102**, 865-870 (2000).
22. Giannakoulas, G. *et al.* Usefulness of natriuretic Peptide levels to predict mortality in adults with congenital heart disease. *The American journal of cardiology* **105**, 869-873 (2010). 40

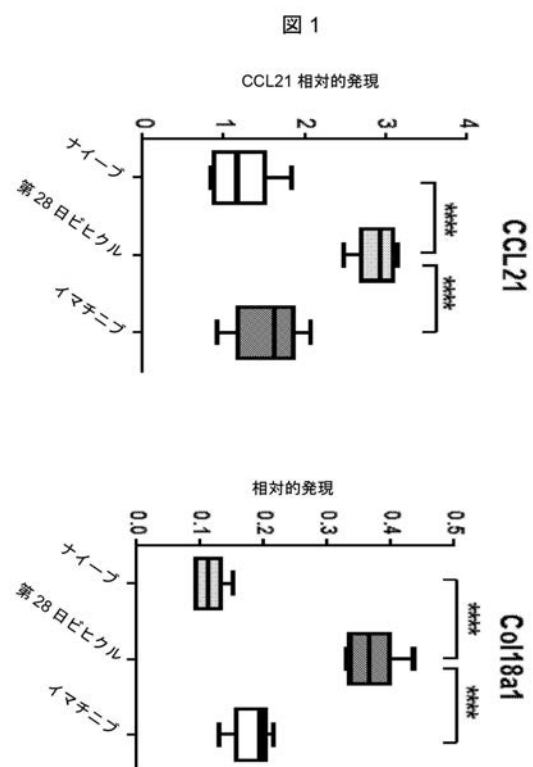
23. Galie, N. *et al.* Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* **117**, 3010-3019 (2008).
24. Mauritz, G.J. *et al.* Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology* **108**, 1645-1650 (2011).
25. Yoshida, R. *et al.* Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7118-7122 (1998).

10

【 図 1 - 1 】

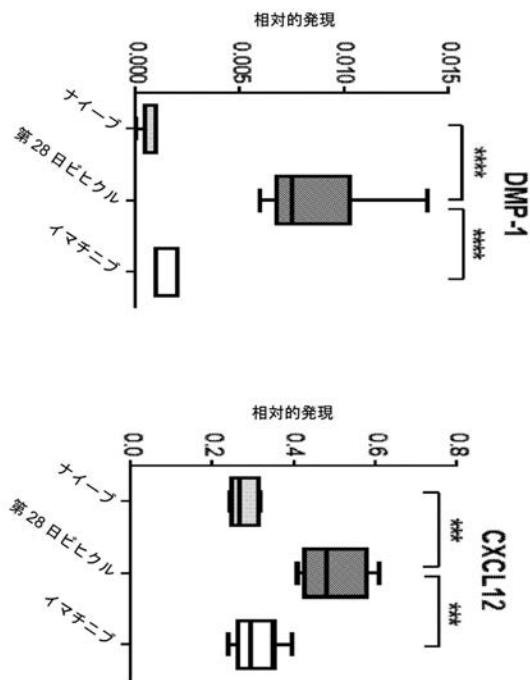


【 図 1 - 2 】



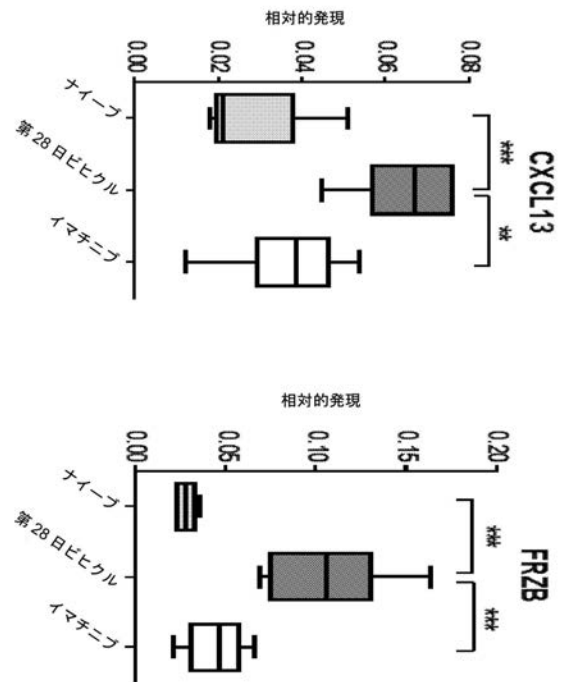
【図 1 - 3】

図 1



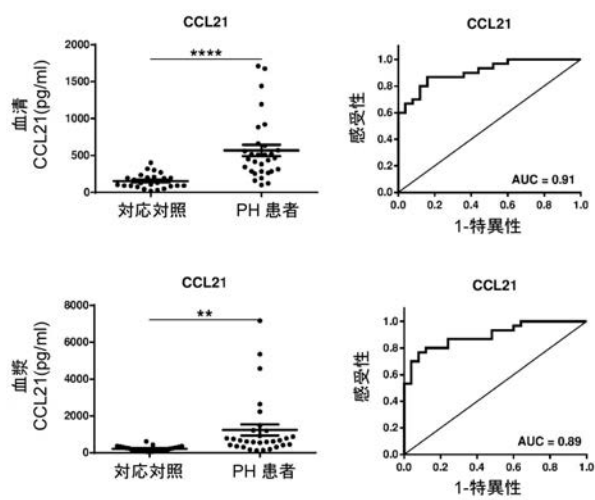
【図 1 - 4】

図 1



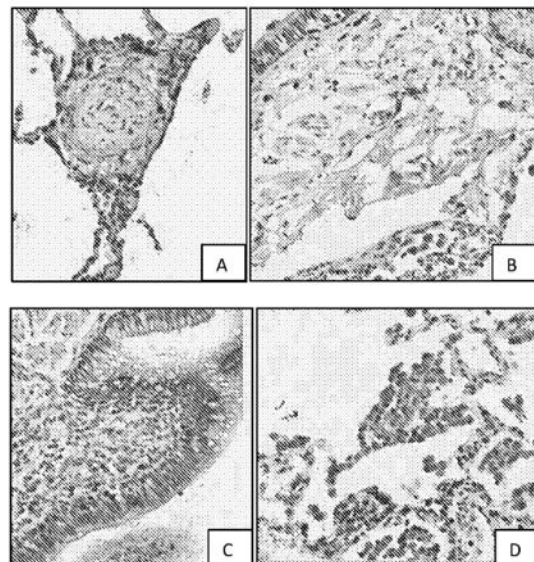
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/054082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 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)

C12Q 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/123730 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; JONES PETER L [US]; TAICHMAN DARREN [US]) 8 October 2009 (2009-10-08) claims 1-4; table 5	1-8
Y	FRÉDÉRIC PERROS ET AL: "Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 185, no. 3, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 311-321, XP055150971, ISSN: 1073-449X, DOI: 10.1164/rccm.201105-0927OC page 316, column 2, paragraph 2; figure 3 ----- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 2015

Date of mailing of the international search report

04/08/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitt, Anja

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/054082

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PETER DORFMÜLLER ET AL: "Progress in Pulmonary Arterial Hypertension Pathology: Relighting a Torch Inside the Tunnel", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 186, no. 3, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 210-212, XP055151113, ISSN: 1073-449X, DOI: 10.1164/rccm.201206-1049ED page 210, column 2, paragraph 3 -----	1-8
X	US 2012/328567 A1 (BUSHNELL STEVEN [US] ET AL) 27 December 2012 (2012-12-27) paragraphs [0060], [0175] - [0177] paragraphs [0230] - [0235]; claim 21 -----	9-11
Y	US 2006/019272 A1 (GERACI MARK W [US] ET AL) 26 January 2006 (2006-01-26) claims 1-16 -----	1-8
A	ROXANE PAULIN ET AL: "G-protein-coupled receptors and pulmonary arterial hypertension (PAH)", DRUG DISCOVERY TODAY: DISEASE MODELS, vol. 9, no. 3, 1 September 2012 (2012-09-01), pages e109-e117, XP055151146, ISSN: 1740-6757, DOI: 10.1016/j.ddmod.2012.06.003 figure 2 -----	1-8
A	E. SOON ET AL: "Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension", CIRCULATION, vol. 122, no. 9, 31 August 2010 (2010-08-31), pages 920-927, XP055151148, ISSN: 0009-7322, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762 the whole document -----	1-11
A	WO 2011/080050 A2 (NOVARTIS AG [CH]; BARROFF MICHAEL [CH]; EWERT STEFAN [CH]; JAEGER UTE) 7 July 2011 (2011-07-07) claims 55-58 -----	2,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/054082

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009123730 A1	08-10-2009	US 2012010095 A1 US 2012295797 A1 WO 2009123730 A1	12-01-2012 22-11-2012 08-10-2009
US 2012328567 A1	27-12-2012	AU 2012239961 A1 CA 2832565 A1 EP 2694975 A1 JP 2014513289 A US 2012328567 A1 WO 2012139058 A1	24-10-2013 11-10-2012 12-02-2014 29-05-2014 27-12-2012 11-10-2012
US 2006019272 A1	26-01-2006	NONE	
WO 2011080050 A2	07-07-2011	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/68 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/68

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

(72) 発明者 ローランズ, マリアンナ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, メイン ストリート 7 0 0
 , ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 テッシェ, クレメンス アン ジャンヌ マリー
 スイス国 ツェーハー - 4 0 0 2 バーセル, ポストファッハ, ノバルティス インスティテューツ
 フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド, ノバルティス ファーマ アーゲー

(72) 発明者 ホワイテカー, ポール アンドリュー
 イギリス国 ロイストン ケンブリッジシャイア エスジー 8 0 ディーピー, クロイドン, ハイ
 ストリート 3 4 , サウス ハウス

F ターム (参考) 2G045 AA25 CA26 CB03 CB04 CB07 DA36 DA77 FB01 FB02 FB03
 FB06
 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR56 QR62
 QS10 QS14 QS25 QS34 QS39 QX02
 4C084 AA17 NA05 ZA42 ZA59 ZC02

专利名称(译)	肺动脉高压生物标志物		
公开(公告)号	JP2017519498A	公开(公告)日	2017-07-20
申请号	JP2016571161	申请日	2015-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ローランズマリアンナ テッシェクレメンスアンジャンヌマリー ホワイテーカーポールアンドリュウ		
发明人	ローランズ,マリアンナ テッシェ,クレメンス アン ジャンヌ マリー ホワイテーカー,ポール アンドリュウ		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61P11/00 A61P9/12 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/6863 G01N33/6884 G01N2333/521 G01N2800/12 G01N2800/321 G01N2800/52 A61P9/12 A61P11/00		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K45/00 A61P11/00 A61P9/12 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA42 4C084/ZA59 4C084/ZC02		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 鈴木康仁		
优先权	2014170962 2014-06-03 EP		
其他公开文献	JP2017519498A5 JP6622722B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肺动脉高压与血管重塑有关，是各种原因导致右心衰竭的进行性疾病。越来越多的证据表明免疫细胞和炎症趋化因子在肺动脉高压的发病机制和进展中发挥重要作用。CCL 21被确定为肺动脉高压的抗重塑有效生物标志物。发现CCL 21在区分肺动脉高压患者和相应的对照时具有高度敏感性和特异性。CCL 21在肺动脉高压中上调，在用抗重塑剂治疗中下调。

