

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6622722号
(P6622722)

(45) 発行日 令和1年12月18日 (2019. 12. 18)

(24) 登録日 令和1年11月29日 (2019. 11. 29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68
C 1 2 Q 1/6813 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/6813 Z
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/68 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	G O 1 N 33/68

請求項の数 8 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-571161 (P2016-571161)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成27年5月29日 (2015. 5. 29)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2017-519498 (P2017-519498A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(43) 公表日	平成29年7月20日 (2017. 7. 20)		35
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/054082	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02015/186037		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成27年12月10日 (2015. 12. 10)	(74) 代理人	100095360
審査請求日	平成30年5月25日 (2018. 5. 25)		弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号	14170962.6	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成26年6月3日 (2014. 6. 3)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(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) 【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であって、前記生物学的試料は、肺組織、血液、血漿および血清から選択される、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 タンパク質の量における統計的に有意な増加が肺高血圧症を示している、方法。

【請求項 2】

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 に記載の方法。

【請求項 3】

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 2 に記載の方法。

【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 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 に記載の方法。

【請求項 5】

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、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

対象が肺高血圧症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であって、前記生物学的試料は、肺組織、血液、血漿および血清から選択される、説明書を含む、キット。

20

【請求項 7】

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 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記結合分子が抗体またはその断片である、請求項 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

発明の分野

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。

40

【0003】

肺高血圧症 (P H) は、肺動脈圧の平均値上昇、安静時 > 25 mm H g (運動後 > 30 mm H g) と定義される。群 1 P H 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 mm H g と診断される) 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 (I P A H) 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

50

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】

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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 0 9 】

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 】

【 0 0 1 0 】

発明の要旨

ＣＣＬ２１は、肺高血圧症患者を対照（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。

10

【 0 0 1 1 】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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) ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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

20

を含み；

ベースライン値と比較したＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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。

【 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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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

30

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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。

40

【 0 0 1 4 】

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ＣＣＬ２１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、ＣＣＬ２１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。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ＣＣＬ２１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

50

液、糞便および組織試料から選択される。

【0016】

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（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、TaqMan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（TGGE）、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、ELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、HPLC、および質量分析法から選択される技法を含む。

10

【0017】

本発明は、対象が肺高血圧症予測（pulmonary hypertension predicting）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) CCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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。

20

【0018】

本態様の一部の実施形態では、プローブは、CCL21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CCL21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。

【0019】

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】

【0020】

【図1-1】イマチニブでの処置後のPHのhypoxia/sugenラットモデルにおける肺mRNA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。

30

【図1-2】イマチニブでの処置後のPHのhypoxia/sugenラットモデルにおける肺mRNA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PHのhypoxia/sugenラットモデルにおける肺mRNA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PHのhypoxia/sugenラットモデルにおける肺mRNA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】PH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CCL21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PH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CCL21タンパク質発現および局在化を示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0021】

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。

【0022】

「CCL21」という用語は、他に規定されない限り、例えばENST0000025

50

9607 (Ensembl) において定義されたアミノ酸配列を有するヒト CCL21 を表す。

【0023】

「CCL21」という用語は、他に規定されない限り、例えば ENSP00000259607 (Ensembl) において定義されたヌクレオチド配列を有するヒト CCL21 遺伝子を表す。

【0024】

「CCL21」という用語は、SCYA21; ECL; SLC; CKb9; TCA4; 6Ckine; 6Ckine; exodus - 2; 「ケモカイン (C - Cモチーフ) リガンド21 [ホモ・サピエンス (Homo sapiens) (ヒト)]」; 「C - Cモチーフケモカイン21」; 「ベータケモカイン exodus - 2」; 「Efficient Chemoattractant for Lymphocytes」; exodus - 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 (Cys - Cys)、メンバー21」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)。

【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。

【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。

【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。

【0031】

本明細書では、「結合分子」という用語は、CC L 2 1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CC L 2 1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。

10

【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。本明細書では、「抗体」という用語は、エピトープ、例えば、ヒトCC 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、CH 1、CH 2、およびCH 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。

20

【0033】

本明細書では、「CC 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CC 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。

【0034】

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。

【0035】

「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。

30

【0036】

「患者」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。

【0037】

「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。

【0038】

「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。

40

【0039】

「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。

【0040】

数値xに関する「約」という用語は、例えば、 $x \pm 10\%$ 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

50

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BLOSUM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。

【0041】

肺高血圧症に関するバイオマーカーとしてのCCCL21

10

ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21(CCL21)は、CC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。CCL21は、免疫調節および炎症プロセスに関与するいくつかのCCサイトカイン遺伝子の1つである。CCサイトカインは、2つの隣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。CCL21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、CCL21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、CCL21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CCL21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。

20

【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CCL21発現および/またはCCL21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

30

c) CCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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。

【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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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。

40

【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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量を示しているベースライン値に対するCCL21発現および/または

50

ＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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。

【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ＣＣＬ２１発現の核酸に関してアッセイすることを含む。

【００４６】

ＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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) ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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む；

ベースライン値と比較したＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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、ＣＣＬ２１ 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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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、ＣＣＬ２１ 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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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；

アッセイするステップが生物学的試料をＣＣＬ２１発現の核酸配列に関してアッセイする

10

20

30

40

50

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、挿入および/または置換を含有する分子を含む。

【0053】

本発明によるバイオマーカーは、CC 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。

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

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

10

20

30

40

50

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ＣＣＬ２１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。

【００５７】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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。

10

【００５８】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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。

【００５９】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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

30

を含み；

アッセイするステップが生物学的試料をＣＣＬ２１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；肺高血圧症が突発性肺動脈高血圧症である、方法。

【００６０】

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ＣＣＬ２１発現の修飾核酸配列に関してまたは修飾ＣＣＬ２１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。

40

【００６１】

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。

【００６２】

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

50

イン、C y 3 および / または C y 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 , 4 3 2 , 2 7 2 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 & Development, 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。

10

【 0 0 6 3 】

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 P C R 増幅によって達成され得る。

【 0 0 6 4 】

20

本発明によるポリヌクレオチドバイオマーカーの化学修飾は、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ーは、特に、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 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、一対の非標識 P C R 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 (M G B) 非蛍光クエンチャー (N F Q) からなる。

【 0 0 6 5 】

生物学的試料

30

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。

【 0 0 6 6 】

「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。

【 0 0 6 7 】

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。

40

【 0 0 6 8 】

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

50

してアッセイするステップ；および

c) CCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21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、CCL21 mRNAから増幅されたcDNAである。

10

【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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21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、CCL21 mRNAから増幅されたcDNAである。

20

【0070】

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CCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量を示しているベースライン値に対するCCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量と比較して、CCL21発現および/またはCCL21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

30

を含み；

アッセイするステップが生物学的試料をCCL21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CCL21リボ核酸(RNA)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、CCL21 mRNAから増幅されたcDNAである。

【0071】

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、

40

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CCL21発現および/またはCCL21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) CCL21発現および/またはCCL21タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象におけるCCL21発現および/またはCCL21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CCL21発現および/またはCCL21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

50

ＣＣＬ２１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。

【００７２】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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

【００７３】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１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。

。

【００７４】

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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量を示しているベースライン値に対するＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１タンパク質の量と比較して、ＣＣＬ２１発現および／またはＣＣＬ２１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

30

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（PDE）5阻害剤、グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激薬、エンドセリン受容体アンタゴニスト（ERA）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。

【００７５】

検出（またはアッセイ）方法

40

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。

【００７６】

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（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、TaqMan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（TGGE）、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、ELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、HPLC、および質量分析法

50

から選択される技法を含む。

【0077】

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mRNA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in situハイブリダイゼーション(Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999))；RNAse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(RT-PCR)(Weis et al., Trends in Genetics 8:263-264 (1992))を含む。

10

【0078】

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。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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【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改変を一般に触媒する。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（HRPO）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. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York 73: 147-166に報告されている。

【0084】

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（OPD）または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））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（HRPO）；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（AP）；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-Gal）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。

【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CCCL21タンパク質の検出に関して、Mesoscale Discovery（登録商標）（MSD）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。MSDの電気化学発光検出テクノロジーは、MULTI-ARRAYおよびMULTI-SPOT（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SULFO-TAG（商標）標識を使用する。

【0087】

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、ELISA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

；

10

20

30

40

50

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。

10

【 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 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。

20

【 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

30

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 】

40

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 ;

50

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。
【 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
10 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
20 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 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 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
20 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
30 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
30 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 つのプロープ ; および

b) プロープを使用して、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、プロープは、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プおよび / 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。
40

【 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、D N A ポリメラーゼ、R N A 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、プロープは、C C L 2 1 タンパク質またはその断片に結合する能力
50

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。

【0098】

他の結合分子は、フィブロネクチンIII型ドメインに基づく足場（例えば、フィブロネクチンIII型の10番目のモジュール（10Fn3ドメイン））を有する分子、アドネクチン（Adnectins（登録商標））、アンキリン由来反復モジュールを含む分子、Affibody（登録商標）分子、Anticalins（登録商標）分子、Affilin（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】

【0099】

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。

【0100】

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、ケタミンおよびメデト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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

nキットを使用して、1 μ g 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。

10

【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)。

20

【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	フィブロンネクチン 1	25661	1.5	
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	40
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。

【 0 1 0 8 】

この研究では、第 0 日の Sug en 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、100 mg / 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(3 μ m)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10~100 μ m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、Cxc112、Cxc113、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相関の評価

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)と閉塞血管の数回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

40

50

。

【 0 1 1 4 】

【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

【 0 1 1 5 】

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

40

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。

【 0 1 1 6 】

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 人の肺高血圧症患者からの対照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

50

、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、COL18A1、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。

40

【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コンセント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。

【0123】

CCL21を以下のプロトコルを使用して、Ventana Discovery XT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、EZpre

50

p 溶液を使用して脱ろうし、高 pH 8 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 1 2 時間インキュベートした。二次抗体は、3 7 で 2 0 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 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。

【 0 1 2 4 】

10

C C L 2 1 タンパク質を上皮下 / 上皮および肺泡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 P H 患者からの P A H 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

本発明は、以下の態様を包含し得る。

[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 CCL21 発現および / または CCL21 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

20

c) CCL21 発現および / または CCL21 タンパク質の量を、肺高血圧症を有さない対象における CCL21 発現および / または CCL21 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 CCL21 発現および / または CCL21 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。

[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 CCL21 発現および / または CCL21 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 CCL21 発現および / または CCL21 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。

30

[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 CCL21 発現および / または CCL21 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 CCL21 発現および / または CCL21 タンパク質の量を示しているベースライン値に対する CCL21 発現および / または CCL21 タンパク質の量と比較して、CCL21 発現および / または CCL21 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

40

を含む、方法。

[4]

前記アッセイするステップが前記生物学的試料を CCL21 発現の核酸配列に関してアッセイすることを含む、上記 [1] から [3] のいずれか一項に記載の方法。

[5]

前記核酸が CCL21 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、上記 [4] に記載の方法。

[6]

50

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、上記 [1] から [3] のいずれか一項に記載の方法。

[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、上記 [1] から [6] のいずれか一項に記載の方法。

[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、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を含む、上記 [1] から [7] のいずれか一項に記載の方法。

10

[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 つのプロープ ; および

20

b) 前記プロープを使用して、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。

[1 0]

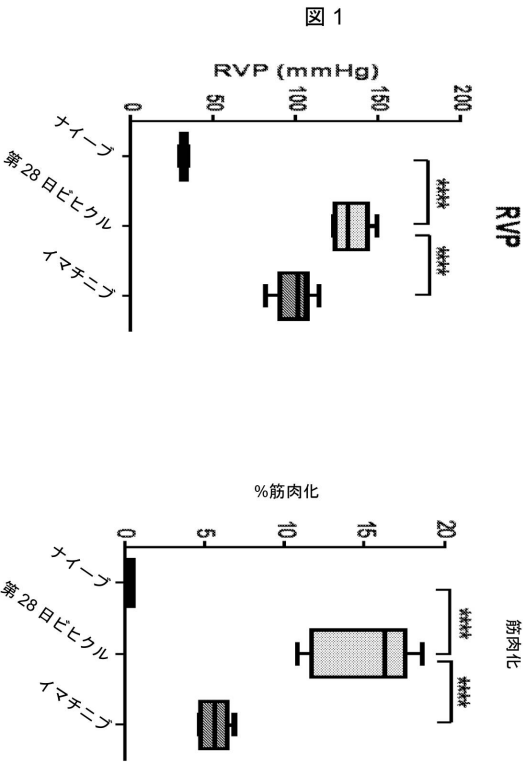
前記プロープが、C C L 2 1 発現の核酸配列の一領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、または C C L 2 1 タンパク質もしくはその断片に結合する能力がある結合分子から選択される、上記 [9] に記載のキット。

[1 1]

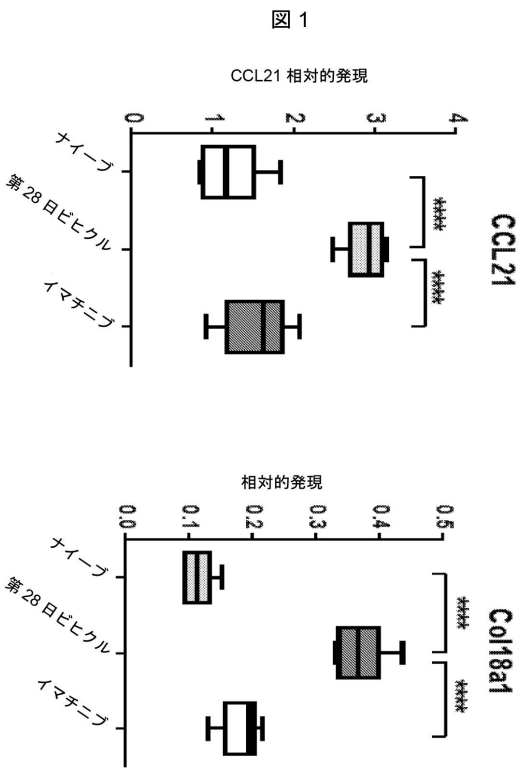
前記結合分子が抗体またはその断片である、上記 [9] に記載のキット。

30

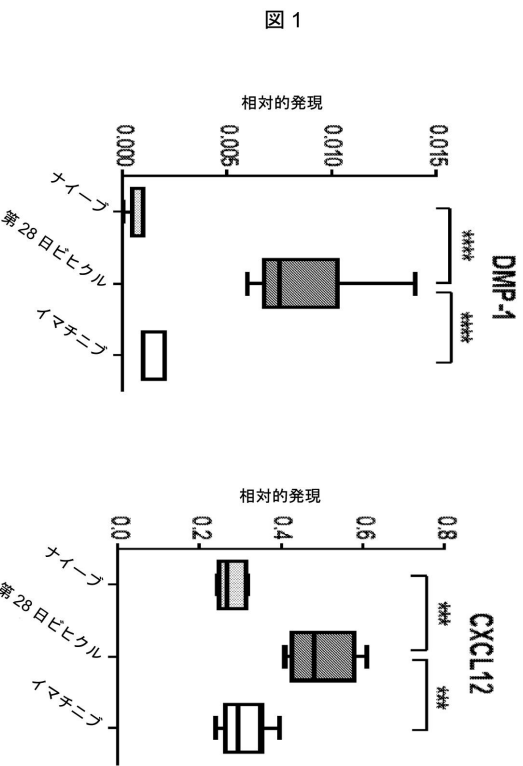
【 図 1 - 1 】



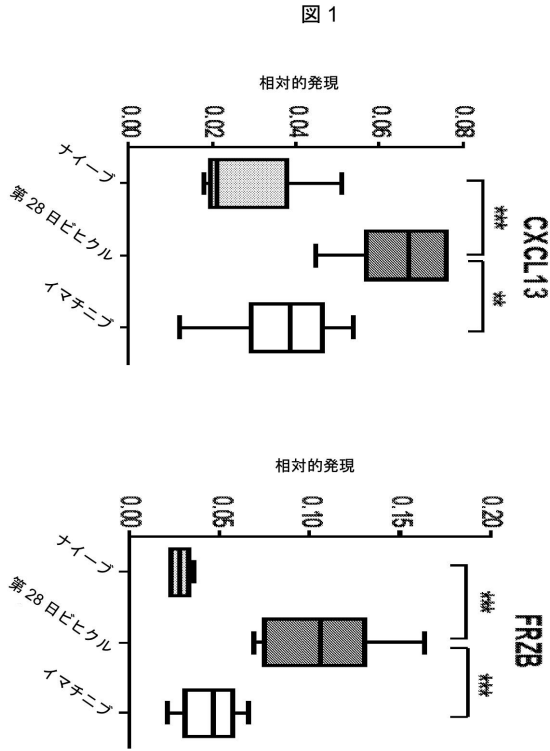
【 図 1 - 2 】



【 図 1 - 3 】

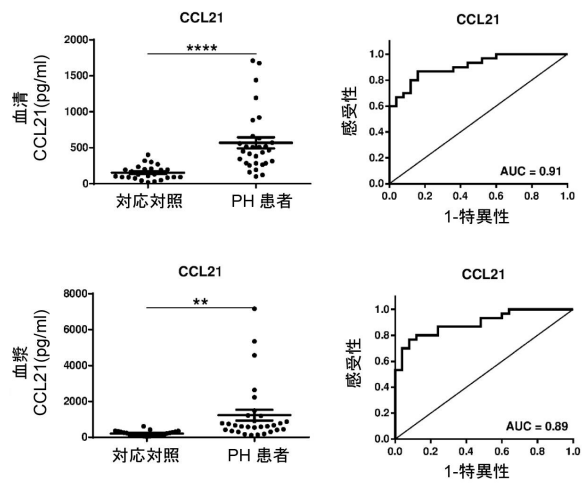


【 図 1 - 4 】



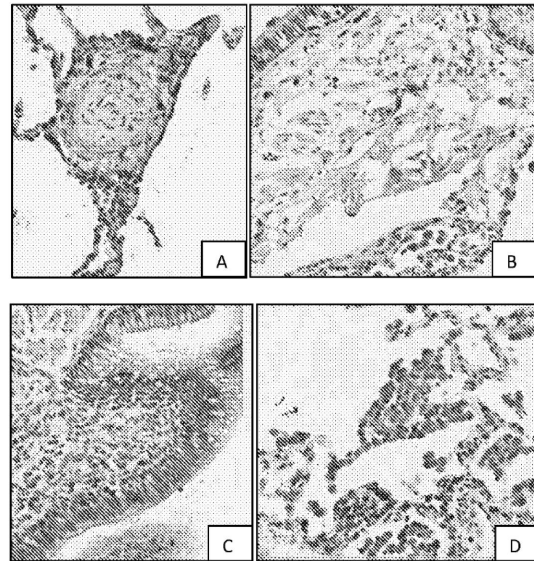
【 図 2 】

図 2



【 図 3 】

図 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 Z

(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 ツューハー - 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 ホワイテーカー, 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

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 4 8 1 0 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 1 2 3 7 3 0 (W O , A 1)
特開 2 0 0 6 - 2 3 0 2 4 1 (J P , A)
Am. J. Respir. Crit. Care. Med, 2 0 1 2 年, vol. 185, iss. 3, p. 311-321
Am. J. Respir. Crit. Care. Med, 2 0 1 2 年, vol. 186, p. 210-212

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C 1 2 Q
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	肺动脉高压生物标志物		
公开(公告)号	JP6622722B2	公开(公告)日	2019-12-18
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		
当前申请(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 C12Q1/6813 G01N33/53 G01N33/68 C12N15/09		
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 C12Q1/6813.Z G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/68 C12N15/09.Z		
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	JP2017519498A JP2017519498A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肺动脉高压是一种与血管重塑相关的各种起源的进行性疾病，会导致右心功能障碍。越来越多的证据表明免疫细胞和炎性趋化因子在肺动脉高压的发病机理和进展中起着重要作用。我们已将CCL21确定为抗肺动脉高压的重塑功效生物标志物。发现CCL21在区分肺动脉高压患者和匹配的对照中具有很高的敏感性和特异性。在肺动脉高压中，CCL21上调，而抗重塑剂治疗则下调CCL21。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)		(11) 特許番号 特許第6622722号 (P6622722)	
(45) 発行日 令和1年12月18日 (2019. 12. 18)		(24) 登録日 令和1年11月29日 (2019. 11. 29)			
(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 Q 1 / 68 (2018. 01)		C 1 2 Q 1 / 68			
C 1 2 Q 1 / 6813 (2018. 01)		C 1 2 Q 1 / 6813		Z	
G O 1 N 33 / 53 (2006. 01)		G O 1 N 33 / 53		M	
G O 1 N 33 / 68 (2006. 01)		G O 1 N 33 / 53		D	
C 1 2 N 15 / 09 (2006. 01)		G O 1 N 33 / 68			
請求項の数 8 (全 33 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号 特願2016-571161 (P2016-571161)		(73) 特許権者 504389991 ノバルティス アーゲー			
(86) (22) 出願日 平成27年5月29日 (2015. 5. 29)		スイス国 バザール リヒトシュトゥラーセ 3 5			
(65) 公表番号 特表2017-519498 (P2017-519498A)		(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩			
(43) 公表日 平成29年7月20日 (2017. 7. 20)		(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二			
(86) 国際出願番号 PCT / J2015 / 054082		(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄			
(87) 国際公開日 W02015 / 186037		(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁			
(87) 国際公開日 平成27年12月10日 (2015. 12. 10)					
(31) 審査請求日 平成30年5月25日 (2018. 5. 25)					
(32) 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・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)					
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 肺高血圧症バイオマーカー					