

(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2011-521630

(P2011-521630A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 1
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 27/62 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	G O 1 N 27/62 V	
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁)

(21) 出願番号 特願2011-510792 (P2011-510792)  
 (86) (22) 出願日 平成21年5月29日 (2009. 5. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年1月25日 (2011. 1. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2009/000744  
 (87) 国際公開番号 W02009/143624  
 (87) 国際公開日 平成21年12月3日 (2009. 12. 3)  
 (31) 優先権主張番号 61/129, 022  
 (32) 優先日 平成20年5月30日 (2008. 5. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 300066874  
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ・コロンビア  
 カナダ国 V 6 T 1 Z 3 ブリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、アグロノミー・ロード 1 0 3-6 1 9 0、ユニバーシティ・インダストリー・リエゾン・オフィス  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝

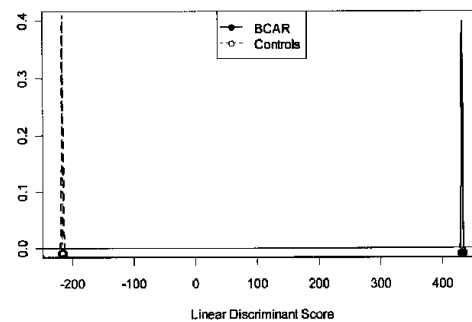
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノミクスまたはプロテオミクス発現プロファイリングを用いて腎同種移植の拒絶反応を診断する方法

(57) 【要約】

被験体の急性同種移植拒絶反応の状態を決定する方法であって、被験体からの生物学的試料において、1もしくは1よりも多くの核酸マーカー、または1もしくは1よりも多くのプロテオミクスマーカーの核酸発現プロファイルを決する段階、前記1または1よりも多くの核酸マーカーの発現プロファイルをコントロールプロファイルと比較する段階、および前記1または1よりも多くの核酸マーカーの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加しているかどうかを決定する段階を含み、前記1または1よりも多くの核酸マーカーの増加が被験体の急性拒絶反応の状態を示す、方法を提供する。

Figure 1A



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体の急性同種移植拒絶反応の状態を決定する方法であって、

a．被験体からの生物学的試料において1または1よりも多くの核酸マーカの核酸発現プロファイルを決める段階であって、核酸マーカは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAXが含まれる群より選ばれる、段階、

b．前記1または1よりも多くの核酸マーカの発現プロファイルを、コントロールプロファイルと比較する段階、ならびに

c．前記1または1よりも多くの核酸マーカの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加しているかどうかを決定する段階

を含み、前記1または1よりも多くの核酸マーカの増加が、被験体の急性拒絶反応の状態を示す、方法。

10

**【請求項 2】**

核酸マーカの群が、SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057\_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1または1よりも多くをさらに含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

コントロールプロファイルが、非拒絶性の同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体から得られる、請求項1記載の方法。

20

**【請求項 4】**

1または1よりも多くの臨床学的変数に関する値を得る段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 5】**

ステップa)で、表2から選ばれる1または1よりも多くの核酸マーカの発現プロファイルを決める段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 6】**

前記1または1よりも多くの核酸マーカの核酸発現プロファイルを、1または1よりも多くのマーカに対応するRNA配列を検出することによって決定する、請求項1記載の方法。

**【請求項 7】**

前記1または1よりも多くの核酸マーカの核酸発現プロファイルをPCRによって決定する、請求項1記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記1または1よりも多くの核酸マーカの核酸発現プロファイルをハイブリダイゼーションによって決定する、請求項1記載の方法。

**【請求項 9】**

ハイブリダイゼーションがオリゴヌクレオチドに対するものである、請求項9記載の方法。

**【請求項 10】**

被験体の急性同種移植拒絶反応の状態を決定する方法であって、

40

a．被験体からの生物学的試料におけるプロテオミクスマーカのプロテオミクス発現プロファイルを決める段階であって、プロテオミクスマーカが、KNG1、AFM、TTN、MS TP9/MST1、P116、C2、MBL2、SERPINA10、F9およびUBR4によってコードされるポリペプチドを含む、段階、

b．プロテオミクスマーカの発現プロファイルを、コントロールプロファイルと比較する段階、ならびに

c．1または1よりも多くのプロテオミクスマーカの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加しているか、または減少しているかどうかを決定する段階

を含み、5またはそれよりも多くのプロテオミクスマーカの増加または減少が、被験体の急性拒絶反応の状態を示す、方法。

50

## 【請求項 1 1】

KNG1またはAFMによってコードされるポリペプチドのレベルが、コントロールと比較して減少しており、かつTTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9、またはUBR4によってコードされるポリペプチドのレベルが、コントロールプロファイルと比較して増加している、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 2】

コントロールプロファイルが、非拒絶性の同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体から得られる、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 3】

1またはそれよりも多くの臨床学的変数に関する値を得る段階をさらに含む、請求項10記載の方法。

10

## 【請求項 1 4】

プロテオミクス発現プロファイルを免疫学的アッセイによって決定する、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 5】

プロテオミクス発現プロファイルをELISAによって決定する、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 6】

プロテオミクス発現プロファイルを質量分析によって決定する、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 7】

プロテオミクス発現プロファイルを、同重体 (isobaric) または同位元素の標識化方法によって決定する、請求項10記載の方法。

20

## 【請求項 1 8】

プロテオミクスマーカーが、LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBGおよびC1Sの1または1よりも多くによってコードされるポリペプチドをさらに含む、請求項10記載の方法。

## 【請求項 1 9】

コントロールが自家 (autologous) コントロールである、請求項1記載の方法。

## 【請求項 2 0】

コントロールが自家コントロールである、請求項10記載の方法。

## 【請求項 2 1】

生物学的試料が血液または血しょうである、請求項1記載の方法。

30

## 【請求項 2 2】

生物学的試料が血液または血しょうである、請求項10記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この出願は2008年5月30日付け出願の米国仮出願61/129,022号の優先権の利益を請求し、その内容を参照することによってここに組み込む。

## 【0002】

## 発明の分野

40

本発明は、ゲノミクス発現プロファイリングまたはプロテオミクス発現プロファイリングを用いる腎同種移植の拒絶反応を診断する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

## 発明の背景

移植は、末期の致命的な臓器不全を有する患者のための主要な療法と考えられている。シクロスポリンおよびタクロリムスのような免疫抑制薬の入手可能性が同種移植レシピエントの生き残りおよび満足な状態を改善する一方、できるだけ初期の、そして正確な同種移植の拒絶反応の識別、および効果的な監視、および免疫抑制性薬物適用の用量を調整することは、まだ同種移植レシピエントの継続的な生存に対する第一に重要なことである。

50

## 【0004】

同種移植の拒絶反応は、ドナー組織によって発現される非自己抗原へのレシピエントの免疫反応から由来し、そして同種移植を受けて数時間または数日で、または数ヶ月から数年までの後に起こることがある。腎臓同種移植拒絶反応は、乏尿、腎機能および軽度のタンパク尿の急性悪化が含まれる特色によって特徴付けられる。腎臓同種移植拒絶反応は、腎症および腎不全につながる可能性がある。

## 【0005】

目下のところ、侵襲的な生検（例は、心内膜心筋、肝臓コア、および腎臓細針吸引生検）が、同種移植拒絶反応の監視および診断のための最も基準になる検査と広く考えられているが、それら自身の危険をとまなう侵襲的な手法である（例は、Mehra MRら、*Curr. Opin. Cardiol.* 2002年3月；17(2)：131-136）。生検結果はまた、サンプリングエラーおよび観察者間の変りやすさのために、肝臓同種移植拒絶反応を等級分けするためのBanff schema（バンフ・スキーマ）のような国際的なガイドラインが利用可能であるにもかかわらず、再現性および解釈の問題を受けることがある（Solezら、2008、*Am J Transplant* 8：753；表1）。同種移植レシピエントは、移植後の最初の年に、生検の手法に複数回さらされることがある。非侵襲性の監視技術が現在使われている（血液クレアチニン濃度の増加）が、血清クレアチニンレベルは腎臓損傷の非特異的な反映である。腎臓損傷は、拒絶反応、感染、または元の病気の再発に由来することさえあり、このように、試験は拒絶反応に特異的でない。

## 【0006】

同種移植拒絶反応の指標には、限局性または全身性の炎症、組織損傷、免疫細胞の同種移植浸潤、移植片上のドナー特異性抗原を認識する炎症性細胞、アロ特異的な抗体、細胞障害性T細胞活性化、組織-および血液-誘導タンパク質の組成および濃度変化、同種移植組織の差動的な（differential）酸化、浮腫、感染、同種移植片および/または周囲組織の壊死などのうちの一つまたは複数によって示されるような、高度の、そして限局性の免疫反応が含まれる。

## 【0007】

同種移植拒絶反応は、「急性」または「慢性」であると説明することができる。急性拒絶反応（急性抗体媒介拒絶反応、AMRまたは活性拒絶反応としても知られる）は、概して、同種移植を受けている被験体の、組織または器官の約6～12ヶ月内の同種移植の拒絶反応であると考えられる。拒絶反応または急性拒絶反応は、ドナー組織上での細胞性の、および体液性の侵襲によって特徴付けることができ、急速な移植片機能不全および組織または器官の不全に導かれる。6～12ヶ月を超えた組織または器官の同種移植の拒絶反応は概して、慢性拒絶反応であると考えられ、そして同種移植を受けた数年後に起こる場合がある。そのような遅いか、または慢性の拒絶反応は、無症状であるか、または完全には解決されなかった急性拒絶反応のエピソードの結果でありうる。後の発症または慢性拒絶反応は、同種免疫反応によって引き金を引かれた進行性の組織改造によって特徴付けることができ、動脈内で段階的な新生内膜形成に導かれることがあり、閉塞性の脈管障害、実質性線維症およびその結果として、移植の失敗および喪失の原因となる。拒絶反応の性質および重症度に応じて、慢性または急性のいずれかの同種移植拒絶反応を経験する、または経験する疑いがある被験体において観察される指標、または臨床学的変数（clinical variables）において重複が存在する可能性がある。

## 【0008】

科学的な、および特許の文献は、このマーカーまたはその挙げることができるあらゆる病状の識別/診断/予測/処置にとって重要な報告に恵まれている。同種移植拒絶のフィールドの中でさえ、無数のマーカーが規定され（しばしば単独で）、そして矛盾する結果が提示される。文献でのこの対立は、人体におけるゲノムの複雑性（予想値は30,000転写単位を超える）、細胞タイプ（予想値は200を超える）、器官および組織、ならびに発現されるタンパク質またはポリペプチド（予想値は80,000を超える）のパラエティに加えて、急性器官拒絶反応の診断に役立つ可能性がある核酸配列、遺伝子、タンパク質、代謝物

10

20

30

40

50

質またはその組合せの数を驚くほどのものにする。個体間の変動は、追加的な障害、ならびに非常に低い濃度で存在している潜在的関心のタンパク質の多くを有する)血しょう(プラズマ)のタンパク質濃度のダイナミックレンジ( $10^{-6}$ から $10^3$   $\mu\text{g/mL}$ までにわたる)、そしてわずか2、3の少ない、最も大量の血しょうタンパク質の圧倒的な量(全体のタンパク質量の約99%を構成)を提示する。

【0009】

PCT刊行物の国際公開第2006/125301号は、移植された組織において差動的に発現される核酸、ならびに腎臓組織拒絶反応を検出するための方法および材料を開示する。

【0010】

米国特許第7235258号は、被験体において一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを検出することによって、被験体における腎臓移植拒絶反応を含めた移植拒絶反応を診断するか、または監視する方法を開示する。これらの方法に役立つオリゴヌクレオチドもまた記述されている。

10

【0011】

Flechnerら [Am. J Transplant 2004 : 4(9) 1475-1489] は、腎臓移植を受けている被験体において種々の遺伝子の差動的な発現を特定するためにDNAまたはマイクロアレイを使用したいくつかの出版物を特定し、そしてまた、腎臓移植の被験体からの末梢血リンパ球および腎臓生検試料の遺伝子発現プロファイルを試験するためのマイクロアレイ分析およびRT-PCRの使用を記述し、差動的に発現された60を超える遺伝子を特定した。

【0012】

Alakulppiら、2007 (Transplantation 83 : 791-798) は、8つの核酸マーカに関するRT-PCRを用いる急性腎臓同種移植拒絶の診断を開示する。Alakulppiら (2008、Transplantation 86 : 1222-8) による更なる調査は、無症状拒絶反応のためのローバスト(頑強)な全血遺伝子発現核酸マーカを特定することができなかった。

20

【0013】

Sarwalら、2003 (N. Engl. J. Med 349 : 125) は、アポトーシスに関係した遺伝子が急性拒絶反応の間、腎臓生検において増加し、NF- $\kappa$ BおよびIFN  $\gamma$  によって駆動されるリンパ球浸潤および活性化を指し示す転写グループが見出されたことを報告した。

【0014】

Muellerら、2007. Am. J. Transplant 7:2712は、細胞障害性Tリンパ球、IFN  $\gamma$  シグナリング、およびマウスとヒトの双方での上皮細胞損傷と関連した腎臓組織で転写物を同定した。

30

【0015】

Mehraら、2008は、T細胞恒常性(homeostatis)および副腎皮質ステロイド感受性を調節する経路が心臓移植の将来の急性拒絶反応と関係することがあると示唆するが、腎移植に関して所見を提供しない。ITGAXの発現は、対処される33の遺伝子の1つである。

【0016】

Fildesらによる総説、2008 (Transplant Immunology 19 : 1-11) は肺移植の後の免疫プロセスでの細胞タイプの役割を議論し、そしてNK細胞タンパク質とのAICL (CLEC2B) 相互作用が急性および慢性の拒絶反応での役割をもつかもしいことを開示する。

40

【0017】

多重のプラットフォームの統合(プロテオミクス、ゲノミクス)が、種々のガンの診断および監視のために提案されたが、しかし、タンパク質およびmRNA発現の間の不一致がこの分野で確認された [Chenら、2002. Mol Cell Proteomics1 : 304-313 ; Nishizukaら、2003、Cancer Research、63 : 5243-5250]。以前の研究は、ゲノミクスおよびプロテオミクスのデータ間の低い相関関係を報告した [Gygi SPら、1999. Mol Cell Biol.、19 : 1720-1730 ; Huberら、2004. Mol Cell Proteomics、3 : 43-55]。

【0018】

いくつかの研究は、腎臓移植レシピエントの尿プロテオームから判断して行われた (Schaubら、2008 Contrib. Nephrol 160 : 65-75において概説された。

50

## 【 0 0 1 9 】

Bottelliら、2008 (J. Am Soc Nephrol 19 : 1904-18) は、傷ついた尿細管細胞の再生の間、マクロファージ刺激タンパク質 (MSP) が上方制御されることを教示し、そしてそれが急性腎臓損傷からの回復を助けるかもしれないことを示唆する。Gorgiら (2009 Transplantation Proceedings 41 : 660-662) は、急性腎臓移植拒絶反応、MBL遺伝子の多形性間の関係を調査し、そして多形性が調査対象集団 (study population) での急性同種移植拒絶反応に対する感受性に関与することができると結論した。Fieneら、2005年 (Eur Heart J 26 : 1660-5) は、低いMBLレベルが心臓移植レシピエントでの急性拒絶反応の発症に関連することを明らかにした。Fildes 2008 (J. Heart Lung Transplant 27 : 1353-1356) は、MBL欠乏症を患う心臓移植レシピエントでは拒絶反応のエピソードがより少なかったことを教示する。FieneもFildesも、腎臓移植に関して所見を与えない。

10

## 【 0 0 2 0 】

Bergerら、2005年 (Am. J. Transplant 5 : 1361-1366) は、より一層高いMBL (マンノース結合性レクチン) が、腎臓移植レシピエントでの拒絶反応のより重篤な型と関係している可能性を教示し、そして移植前のMBLレベルが、腎移植の前のリスク層別化 (risk stratification) に役立つことを示唆する。

## 【 0 0 2 1 】

より一層侵襲的でなく、反復可能で、そしてより一層ローバスタな (より一層サンプリングと解釈エラーに影響されやすい) 同種移植拒絶反応を評価または診断する方法が大いに望ましい。

20

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 2 2 】

本発明は、被験体から得られる一つまたはそれよりも多くの生物学的試料のゲノム発現プロファイリングまたはプロテオミクス発現プロファイリングを用いる腎臓同種移植の拒絶反応を診断する方法に関する。

## 【 0 0 2 3 】

生物学的 (生体) 試料は、血液または血しょうサンプルであることができ、ここに説明する方法のそのようなサンプルの使用は、そのようなサンプルが最小限に侵襲的な様式 (末梢血サンプル、たとえば) で同種移植の生検のための必要条件なしに得られうるため、腎臓同種移植拒絶反応 (急性拒絶反応を含む) の生検ベースの評価および/またはモニタリングに勝る利点を提供する。血液または血しょうサンプルの使用は、それがサンプリングエラーを減らすことができるといふ点で更なる利点を提供し、そしてプロテオミクスまたは核酸のマーカーの検出は、解釈の余地が少なくありうる - 本明細書に記載するように、マーカーが存在するかしないか、あるいはベースライン、コントロール、またはその種の他のものと比較して増加しているか減少しているか、である。

30

## 【 0 0 2 4 】

血液サンプリング (例は、血清クレアチンレベル) を採用する若干の目下の監視技術 (techniques) は、拒絶反応に特異的でないことがあり、ここに記述される核酸またはプロテオミクスマーカーは、血液または血しょうサンプルから得られるとき、急性腎臓同種移植拒絶反応に特異的であり、このようにして、特異性の更なる利益を提供する。

40

## 【 0 0 2 5 】

急性腎臓同種移植拒絶反応の複雑な病理生物学は、ここに同定するマーカーの異質性において反映される。ここに同定するマーカーは、次の、すなわち免疫シグナル伝達、細胞骨格再構築、アポトーシス、T細胞活性化および増殖、細胞性および体液性の免疫反応、急性相炎症経路、などの生物学的プロセスの範囲にわたって分布する。

## 【 0 0 2 6 】

本発明のもう一つの面に従って、被験体の急性同種移植拒絶反応状態を決定する方法が提供され、そしてこの方法は、以下のステップ、すなわちa) 被験体からの生体試料で1または1よりも多くの核酸マーカーの核酸発現プロファイルを決める段階であって、核酸マーカーが、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG

50

49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAXからなる群より選ばれる、段階、b)前記1または1よりも多くの核酸マーカーの発現プロファイルをコントロールプロファイルと比較する段階、およびc)前記1または1よりも多くの核酸マーカーの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加しているかどうかを決定する段階を含み、そこで、前記1または1よりも多くの核酸マーカーの増加は、被験体の急性拒絶反応状態を指し示す。

【0027】

一部の局面において、生体試料は血液または血しょうである。

【0028】

一部の局面において、核酸マーカーの群はさらに、SFERS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057\_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1つまたは1つよりも多くを含む。

10

【0029】

一部の局面において、コントロールプロファイルは、非拒絶性の、同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体から得られる。

【0030】

一部の局面において、方法はさらに、一つ以上の臨床学的変数に関する値を得ることを含む。

【0031】

一部の局面において、方法はさらに、ステップa)で、表2から選ばれる核酸マーカーのうちの1つまたは1つよりも多くの発現プロファイルを決定的ことを含む。

20

【0032】

一部の局面において、1または1よりも多くの核酸マーカーの核酸発現プロファイルは、1または1よりも多くのマーカーに対応するRNA配列を検出することによって決定される。

【0033】

一部の局面において、1または1よりも多くの核酸マーカーの核酸発現プロファイルはPCRで測定される。

【0034】

一部の局面において、1または1よりも多くの核酸マーカーの核酸発現プロファイルはハイブリダイゼーションで測定される。ハイブリダイゼーションはオリゴヌクレオチドに対するものであることができる。

30

【0035】

一部の局面において、コントロールは自家 (autologous) コントロールである。

【0036】

本発明のもう一つの面に従って、被験体の急性同種移植拒絶反応の状態を決定する方法を提供し、この方法は以下のステップ、すなわちa)被験体からの生体試料のプロテオミクスマーカーのプロテオミクス発現プロファイルを決定的段階であり、プロテオミクスマーカーは、KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9およびUBR4の1または1よりも多くによってコードされるポリペプチドを含む、段階、b)プロテオミクスマーカーの発現プロファイルをコントロールプロファイルと比較する段階、およびc)前記1または1よりも多くのプロテオミクスマーカーの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加または減少しているかどうかを決定する段階を含み、そこで5またはそれよりも多くのプロテオミクスマーカーの増加または減少は、被験体の急性拒絶反応状態を示す。

40

【0037】

一部の局面において、生体試料は血液または血しょうである。

【0038】

一部の局面において、KNG1およびAFMのうちの1または1よりも多くによってコードされるポリペプチドのレベルは、コントロールと比較して減少し、そしてTTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9およびUBR4のうちの1または1よりも多くによってコードされるポリペプチドのレベルは、コントロールプロファイルと比較して増加している。

50

## 【0039】

一部の局面において、コントロールプロファイルは、非拒絶性の、同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体から得られる。

## 【0040】

一部の局面において、方法はさらに一つ以上の臨床学的変数に関する値を得ることを含む。

## 【0041】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは免疫学的アッセイで測定される。

## 【0042】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルはELISAで測定される。

## 【0043】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは質量分析で測定される。

## 【0044】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは同重体(isobaric)の、または同位元素の標識化(タグ付け)方法で測定される。

## 【0045】

一部の局面において、プロテオミクスマーカーはさらに、LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBGおよびC1Sの1つまたは1つ以上によってコードされるポリペプチドを含む。

## 【0046】

一部の局面において、コントロールは自家コントロールである。

## 【0047】

本発明のもう一つの面に従って、被験体の急性同種移植拒絶反応状態を決定する方法を提供し、この方法は以下のステップ、すなわちa. 被験体からの生体試料においてプロテオミクスマーカーのプロテオミクス発現プロファイルを決定する段階であり、プロテオミクスマーカーは、タンパク質群コード111、224、23、18、100、116、38、135、125の1または1以上に含まれるポリペプチドを含む、段階、b. プロテオミクスマーカーの発現プロファイルをコントロールプロファイルと比較する段階、およびc. 前記1または1以上のプロテオミクスマーカーの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加または減少しているかどうかについて決定する段階を含み、そこで、5つ以上のプロテオミクスマーカーの増加または減少は、被験体の急性拒絶反応状態を指し示す。

## 【0048】

一部の局面において、タンパク質グループコードはさらに、グループ18、108、222、97、104、26、230、103、69または29の1または1以上を含む。

## 【0049】

一部の局面において、生体試料は血液または血しょうである。

## 【0050】

一部の局面において、KNG1およびAFMの1または1以上によってコードされるポリペプチドのレベルはコントロールと比較して減少し、そしてTTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9およびUBR4の1または1以上によってコードされるポリペプチドのレベルは、コントロールプロファイルと比較して増加している。

## 【0051】

一部の局面において、コントロールプロファイルは、非拒絶性の、同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体から得られる。

## 【0052】

一部の局面において、方法はさらに一以上の臨床学的変数に関する値を得ることを含む。

## 【0053】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは免疫学的アッセイで測定され

10

20

30

40

50

る。

【0054】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルはELISAで測定される。

【0055】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは質量分析で測定される。

【0056】

一部の局面において、プロテオミクス発現プロファイルは同重体または同位元素標識化方法で測定される。

【0057】

一部の局面において、プロテオミクスマーカーはさらに、LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBGおよびC1Sの1または1以上によってコードされるポリペプチドを含む。

【0058】

一部の局面において、コントロールは自家コントロールである。

【0059】

本発明のもう一つの面に従って、核酸マーカーTncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073、ITGAXの1または1以上のための1または1以上のプローブセットを含むアレイを提供する。

【0060】

一部の局面において、アレイはさらに、核酸マーカー、SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEED9、LIMK2、NASP、240057\_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1または1以上のための1または複数の追加のプローブセットを含む。

【0061】

一部の局面において、アレイはさらに、表2の核酸マーカーのために、1または複数の追加のプローブセットを含む。

【0062】

本発明のもう一つの面に従って、プロテオミクスマーカーのKNG1、AFM、TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9およびUBR4の1または1以上のための1または複数の検出試薬を含むアレイを提供する。

【0063】

一部の局面において、アレイはさらに、LBP、VASN、ARNTL2、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C9、LCAT、B2M、SHBGおよびC1Sの1または1以上のための1または複数の追加的な検出試薬を含む。

【0064】

本発明のもう一つの面に従って、被験体において腎臓同種移植拒絶反応を評価、監視または診断する方法を提供し、この方法は以下の、すなわち、a)被験体からの生体試料において表2に提示する少なくとも1つまたは複数の核酸マーカーの発現プロファイルを決定する段階、b)前記少なくとも1つまたは複数のマーカーの発現プロファイルを非拒絶体(non-rejector)プロファイルと比較する段階、およびc)前記少なくとも1つまたは複数のマーカーの発現レベルが、コントロールプロファイルと比較して上方制御されている(増加している)か、または下方制御されている(減少している)かを決定する段階を含み、そこで、前記少なくとも1つまたは複数のマーカーの上方制御または下方制御が拒絶反応の状態を指し示す。

【0065】

一部の態様において、方法はさらに、1または複数の臨床学的変数に関する値を得る段階、およびその1または複数の臨床学的変数をコントロールと比較する段階を含む。コントロールは、非拒絶の、同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体である。一部の態様において、拒絶反応は急性拒絶反応である。一部の態様において、1または複数の核酸マーカーは、表2で提示されるものから選ばれる2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または、24個の核酸マ

ーカーを含む。一部の態様において、核酸マーカーは表5で提示される核酸マーカーの1または1以上を含むことができる。

【0066】

本発明のもう一つの面に従って、被験体で腎臓同種移植拒絶反応を評価または診断するためのキットを提供し、このキットは、表2で提示される少なくとも1つまたは複数のマーカーの特異的な、および定量的な検出のための試薬を、そのような試薬の使用および結果として生じるデータを分析する方法のための指示とともに含む。キットはさらに、マーカーの1以上を現わす遺伝子、転写物または配列単位の1以上への選択的なハイブリダイゼーションのために1以上のオリゴヌクレオチドを含むことができる。被験体の拒絶反応の状態の診断に関する非拒絶反応のカットオフインデックスまたはコントロールを提供するためにキット結果を他のアッセイのものと結合させるために役に立つ指示または他の情報を、キットにおいて提供することができる。

10

【0067】

一部の態様において、キットはさらに、1以上の臨床学的変数に関する値を得ること、およびこの1以上の臨床学的変数をコントロールと比較することのための指示または材料を含むことができる。コントロールは、非拒絶の、同種移植レシピエント被験体または非同種移植レシピエント被験体である。一部の態様において、拒絶反応は急性拒絶反応である。一部の態様において、1以上の核酸マーカーは、表2で提示されるものから選ばれる2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24個の核酸マーカーを含む。一部の態様において、核酸マーカーは、表5において提示される核酸マーカーの1または1以上を含むことができる。

20

【0068】

この発明の概要は必ずしも本発明のすべての特色を説明するわけではない。本発明の他の面、特色および利益は、本発明の特定の態様の以下の説明の検討により、この技術の通常の知識を有する者にとって明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0069】

本発明のこれらの、および他の特色は、次の添付図面に参照がなされる以下の説明からより一層明らかになるであろう。

【0070】

30

【図1A】24個の核酸バイオマーカー（表5で示す）のパネルを使う被験体分類の結果を示す。被験体は、次のものをもつことが測定された。A)24のプロープセット分類子。急性拒絶反応-黒丸、非拒絶反応-白丸。

【図1B】24個の核酸バイオマーカー（表5で示す）のパネルを使う被験体分類の結果を示す。B)より一層明らかにガウスピークおよび下記のサンプルを例示するためのA)の拡大図。急性拒絶反応-黒丸、非拒絶反応-白丸。

【図1C】24個の核酸バイオマーカー（表5で示す）のパネルを使う被験体分類の結果を示す。C)図2と同じフォーマットでデータを表示する、AおよびBと同じデータセット。急性拒絶反応（黒菱形）または非拒絶反応（黒丸）。

【図2】臨床パラメータ（血清クレアチニン、GFR、BUN）のみを用いる被験体分類の結果を示す。被験体は、急性拒絶反応（黒菱形）を有したか、または拒絶反応なし（黒丸）であったことが決定された。

40

【図3】BCARを伴う、およびそれを伴わない被験体間のプロープセットの差動的な発現をマイクロアレイ分析によって検出した。灰色の点はLIMMAだけによって識別されるプロープセットを示し、一方で黒でのものは、LIMMA、ローバストLIMMAおよびSAMの交差によって識別される183のプロープセットを示す。円は、主要な分類子に含まれる24のプロープセットを示す。

【図4】同じ被験体群の分離を示し、すべての群の重心が明らかに分離されていることを証明する主成分分析である。AR-急性拒絶体、NR-非拒絶体、N-通常のコントロール（20の非レシピエント被験体）。主成分によって説明されるようなパーセンテージ変動は、X軸

50

(56%) およびY軸(12%)上に提供される。

【図5】BCARにおいて差動的に発現される183のプロブセットの遺伝子オントロジーおよびネットワーク分析。x軸は $-\log_{10}(p\text{値})$ を示す。A最も著しく富化された(enriched)遺伝子オントロジーのカテゴリー(「生物学的プロセス」)は、p値の増加によって分類された。B最も著しく富化された遺伝子オントロジーカテゴリー〔ジーンGOメタコア生物学的カテゴリー(GeneGO MetaCore Biological Categories)〕は、p値の増加によって分類した。

【図6】分類子の性能。(A)増加性の分類精度で11の共通の最も高い予測的な(common most highly predictive)プロブセットの段階的な包含を示す。Y軸-分類精度、X軸、バイオマーカー。(B)線形判別分析で、11のプロブセットの分類子の性能を、BCAR(生検で確認された急性拒絶反応)を伴う(、実線)および伴わない(、点線)症例の分別において示す。(C)個々の移植前(ベースライン)値と比較して、移植後分類子スコアでの変化。一団の間での違いは拒絶反応時(第1週)のみで有意である( $p=0.0001$ )。Y軸-ベースラインからの変化(平均 $\pm 2se$ )；X軸BL-ベースライン；W1~W12、第1週~第12週。「開始」は、プロブセット分類子がない段階的(tsep-wise)な分析の始まりを示す。

【図7】BCAR陽性のサンプルの少なくとも3分の2およびBCAR陰性サンプルの3分の2で見出されたすべての144のタンパク質群コードを示すVolcano(ボルケーノ)プロットである。丸で囲まれた点は、その血しょう濃度がBCAR有りまたは無しの被験体間で有意に異なった( $p<0.05$ )18のタンパク質群を示す。

【図8】血しょうタンパク質バイオマーカーに基づくBCARを伴うか、または伴わない患者の分離を示す線形判別分析である。実線/「X」-BCAR被験体；点線/「|」-コントロール(非拒絶体)被験体。

【図9】前進選択(forward-selection)の段階的な判別分析(SDA)によって選ばれるタンパク質群の段階的な包含を図示する推定された分類精度である。Y軸-分類精度、X軸-PGCコード。「開始」は図6に関するものと同様である。

【図10】表2に挙げる、急性腎臓同種移植拒絶反応の診断に役立つ核酸マーカーの標的配列(シーケンス)(配列番号1~183)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0071】

詳細な説明

本発明は、組織または器官の同種移植、特に腎臓同種移植を受けた被験体において拒絶反応を診断する方法を提供する。

【0072】

本発明は、被験体における同種移植拒絶反応の評価、予測または診断に関連するゲノミクスおよびプロテオミクス発現プロファイルを提供する。ゲノミクスおよびプロテオミクス発現プロファイルにおける要素のいくつかは、既存の技術において個別に知られているかもしれないが、ゲノミクス、T細胞、プロテオミクスまたは代謝物質マーカーの特定のセットの変えられた発現レベル(コントロールと比較して増加または減少したもの)の特定の組合せは、被験体において評価または診断または同種移植拒絶反応に役立つ新しい組合せを含む。

【0073】

同種移植片は、同じ種の2つの遺伝的に異なる被験体間で移植される器官または組織である。同種移植片を受ける被験体は「レシピエント」である一方、同種移植片を提供する被験体は「ドナー」である。組織または器官同種移植片は、あるいはまた「移植」、「移植片」、「同種移植片」、「ドナー組織」または「ドナー器官」または類似した用語として称することができる。異なる種の2つの被験体間の移植片は、異種移植片である。

【0074】

被験体は、同種移植拒絶反応を監視するための補助として文献でよく知られるさまざまな徴候または臨床的変数を呈しうる。同種移植の生検に加えて、無数の臨床的変数が、同

10

20

30

40

50

種移植拒絶反応があるか、あるいはもつ疑いがある被験体を評価する際に使われうる。これらの臨床的変数からの情報は次いで、拒絶反応が起こっているかどうか、そしてそれがどれくらい速く進行するかを決定する試みにおいて、臨床医、医者、獣医または他の臨床分野における業務者によって用いられ、被験体の免疫抑制性薬物治療の修飾を可能にする。臨床的変数の例は表1に提示する。

【0075】

臨床的変数（随意に、生検が付随する）は、目下主流な医療の臨床医が利用できる唯一の実用的なツールであるが、図2に例示するように、拒絶および非拒絶被験体の間をきれいに区別することが必ずしもできない。著しく左および右の被験体は、拒絶または非拒絶の被験体として正しく分類されるが、被験体の大半は中央の範囲に表わされ、そしてそれらの状態は不明である。これは同種移植拒絶の評価における臨床的変数の価値を否定するものではないが、その代わりに、他の方法がない場合に使われる際のそれらの制限を示すものである。

【0076】

（表1）同種移植拒絶の評価において用いられる可能性のある臨床的変数

臨床的変数の名称	腎臓/心臓 / 肝臓/すべて	変数の説明
一次診断	すべて	移植に至る診断
二次診断	すべて	移植に至る診断
「移植手法-生体関連、 生体未関連、または死体」		
血液型	すべて	血液型
血液 Rh	すべて	血液 Rh
身長 (cm)	すべて	身長 (cm)
体重 (kg)	すべて	体重 (kg)
BMI	すべて	計算式 : 体重 / (身長) <sup>2</sup>
肝腹水	すべて	
HLA A1	すべて	
HLA A2	すべて	
HLA B1	すべて	
HLA B2	すべて	
HLA DR1	すべて	
HLA DR2	すべて	
CMV	すべて	ウイルス状態
CMV 日	すべて	ウイルス状態の日
HIV	すべて	ウイルス状態
HBV	すべて	ウイルス状態
HBV 日	すべて	ウイルス状態の日
HbsAb	すべて	ウイルス状態

HbcAb (合計)	すべて	ウイルス状態
HBvDNA	すべて	ウイルス状態
HCV	すべて	ウイルス状態
HCV 遺伝子型	すべて	C型肝炎遺伝子型
HCV 遺伝子型サブ	すべて	「C型肝炎遺伝子型、サブタイプ」
EBV	すべて	ウイルス状態
帯状疱疹	すべて	ウイルス状態
透析開始日	すべて	透析開始日
透析タイプ	すべて	透析タイプ
細胞毒性の現在のレベル	すべて	
細胞毒性の現在の日付	すべて	
細胞毒性のピークのレベル	すべて	
細胞毒性のピークの日付	すべて	
フラッシュ (Flush) 溶液	すべて	移植で用いるフラッシュ溶液のタイプ
冷却時間 1	すべて	
冷却時間 2	すべて	
再加温時間 1	すべて	
再加温時間 2	すべて	
HTLV 1	すべて	
HTLV 2	すべて	
HCV RNA	すべて	
24hr 尿	すべて	24時間尿量
収縮期血圧	すべて	血圧読取値
拡張期血圧	すべて	血圧読取値
24 Hr 尿	すべて	24時間尿
ナトリウム	すべて	血液検査
カリウム	すべて	血液検査
塩素	すべて	血液検査
総 CO2	すべて	血液検査
アルブミン	すべて	血液検査
タンパク質	すべて	血液検査
カルシウム	すべて	血液検査
無機リン酸	すべて	血液検査
マグネシウム	すべて	血液検査
尿酸	すべて	血液検査
グルコース	すべて	血液検査
ヘモグロビンA1C	すべて	血液検査
CPK	すべて	血液検査
副甲状腺ホルモン	すべて	血液検査

10

20

30

40

ホモシステイン	すべて	血液検査	
尿中タンパク質	すべて	尿検査	
クレアチニン	すべて	血液検査	
BUN	すべて	血液検査	
ヘモグロビン	すべて	血液検査	
血小板数	すべて	血液検査	
WBC数	すべて	血液検査	
プロトロンビン時間	すべて	血液検査	10
部分トロンボプラスチン時間	すべて	血液検査	
INR	すべて	血液検査	
ガンマ GT	すべて	血液検査	
AST	すべて	血液検査	
アルカリホスファターゼ	すべて	血液検査	
アミラーゼ	すべて	血液検査	
総ビリルビン	すべて	血液検査	
直接ビリルビン	すべて	血液検査	20
LDH	すべて	血液検査	
ALT	すべて	血液検査	
トリグリセリド	すべて	血液検査	
コレステロール	すべて	血液検査	
HDL コレステロール	すべて	血液検査	
LDL コレステロール	すべて	血液検査	
FEV1	すべて	肺機能検査	
FVC	すべて	肺機能検査	30
総フェリチン	すべて	血液検査	
TIBC	すべて	血液検査	
飽和トランスフェリン	すべて	血液検査	
フェリチン	すべて	血液検査	
血管造影	心臓	心機能検査	
血管内超音波検査	心臓	心機能検査	
ドプタミン負荷心エコー	心臓	心機能検査	
シクロスポリンWB	すべて	免疫抑制レベル	40
シクロスポリン2 hr	すべて	免疫抑制レベル	
タクロリムスWB	すべて	免疫抑制レベル	
シロリムスWB	すべて	免疫抑制合計一日量	
ソルメドロール	すべて	免疫抑制合計一日量	
プレドニゾン	すべて	免疫抑制合計一日量	
プレドニゾン ALT	すべて	免疫抑制合計一日量	
タクロリムス	すべて	免疫抑制合計一日量	

シクロスポリン	すべて	免疫抑制合計一日量	
イムラン	すべて	免疫抑制合計一日量	
ミコフェノール酸モフェチル	すべて	免疫抑制合計一日量	
シロリムス	すべて	免疫抑制合計一日量	
OKT3	すべて	免疫抑制合計一日量	
ATG	すべて	免疫抑制合計一日量	
ALG	すべて	免疫抑制合計一日量	
バシリキシマブ	すべて	免疫抑制合計一日量	10
ダクリズマブ	すべて	免疫抑制合計一日量	
ガンシクロビル	すべて	抗ウイルス合計一日量	
ラミブジン	すべて	抗ウイルス合計一日量	
リボビロン	すべて	抗ウイルス合計一日量	
インターフェロン	すべて	抗ウイルス合計一日量	
C型肝炎ウイルスRNA	すべて	HCV値の存在についてのテスト()	
CMV 抗原血症	すべて	抗ウイルスおよびウイルス	
バルガンシクロビル	すべて	抗ウイルス合計一日量	20
好中球数	すべて	血液検査	
Cペプチド	すべて	血液検査	
ペグインターフェロン	すべて	抗ウイルス合計一日量	
GFR	すべて	糸球体濾過率	
合併症事象	すべて	合併症タイプ	
生検スコア	腎臓	境界線 1A, 1B, 2A, 2B, 3 超急性	
生検スコア	肝臓	門脈炎症、胆管 炎症ダメージ、静脈内皮 炎症、各々1から2までスコア	30
ドナー血液型	すべて	ドナー血液型	
ドナー血液 Rh	すべて	ドナー Rh	
ドナーHLA A1	すべて	ドナーHLA A1	
ドナーHLA A2	すべて	ドナーHLA A2	
ドナーHLA B1	すべて	ドナーHLA B1	
ドナーHLA B2	すべて	ドナーHLA B2	40
ドナーHLA DR1	すべて	ドナーHLA DR1	
ドナーHLA DR2	すべて	ドナーHLA DR2	
ドナーCMV	すべて	ドナーCMV	
ドナーHIV	すべて	ドナーHIV	
ドナーHBV	すべて	ドナーHBV	
ドナーHbsAb	すべて	ドナーHbsAb	
ドナーHbcAb (合計)	すべて	ドナーHbcAb (合計)	

ドナーHbdna	すべて	ドナーHbdna
ドナーHCV	すべて	ドナーHCV
ドナーEBV	すべて	ドナーEBV

## 【 0 0 7 7 】

同種移植拒絶の予測、診断および評価の多因子の性質は、同種移植拒絶の予測、診断または評価の必要性のたとえ1つでも満たす単一のバイオマーカーの可能性を排除するために、この技術で考慮される。複数のマーカーを含む戦略は、この多因子の性質を考慮することができる。あるいはまた、複数のマーカーは、被験体で同種移植拒絶の予測、診断および/または評価を手直しするために、より一層侵襲性でない（例えば生検が不要な）臨床的変数と組み合わせて評価されうる。

10

## 【 0 0 7 8 】

同種移植拒絶の予測、診断および評価のために使われる方法にかかわらず、早いほどよい - それは器官または組織機能を保ち、そしてより一層全体的な有害な影響を防ぐという観点からである。同種移植拒絶の「治癒」は存在せず、存在するのは、被験体を適切に免疫が抑制された状態に維持すること、または場合によっては、拒絶反応があまりに速く進行したか、または免疫抑制薬の干渉療法で正すにはあまりに重度である場合には、器官の置き換えしかない。

20

## 【 0 0 7 9 】

タンパク質もしくはポリペプチドのデータセット、代謝物質濃度データセット、または核酸発現データセットに対して、複数の数学的および/または統計分析法を適用すると、重要なマーカーの変動するサブセットを指し示し、どの方法が「最高か」または「より一層正確か」について不確実性を導くことがある。数学に関係なく、根底にある生物学はデータセットにおいて同じである。複数の数学的および/または統計方法をマイクロアレイデータセットに適用し、そして普通のマーカーのために各々の統計的に有意なサブセットを評価することによって、不確実性は減らされ、そしてマーカーの臨床的に関連した中心的な群を特定することができる。

30

## 【 0 0 8 0 】

「マーカー」、「生物学的マーカー」または「バイオマーカー」は、互換的に使うことができ、そして概して生物学的サンプル（生体試料）での検出可能な（そして、場合によっては定量化可能な）分子または化合物を指す。マーカーは、同種移植片の移植後の被験体において、下方制御（減少）、上方制御（増加）、あるいは事実上不変である場合がある。マーカーは、「ゲノミック」マーカー（あるいは「核酸マーカー」とも称される）と言及する場合、核酸（DNAまたはRNA）、遺伝子、または転写物、あるいは転写物の部分またはフラグメント（断片）を含むことができ、「プロテオミクス」マーカーに関しては、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、アイソフォーム、またはそれらの断片または部分、あるいは選ばれた分子、それらの前駆体、中間体または分解生成物（例は、脂肪酸、アミノ酸、糖類、ホルモン、またはその断片またはサブユニット）を含みうる。一部の使用方法では、これらの用語は、被験体の生体試料での、特定のタンパク質、ペプチド、核酸またはポリヌクレオチド、または代謝物質のレベルまたは量（絶対的な用語において、または別のサンプルまたは標準的な値と比較して）または2つのタンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチドまたは代謝物質のレベルの間の比率に言及されうる。レベルは、濃度、たとえば、ミリリットルあたりのマイクログラムとして；比色強度で、たとえば、光の特定の波長で透明である0.0および不透明な1.0として、これに従って実験的なサンプルにランクを付け、特定の波長での光の透過または吸収に基づいて数値スコアを与え；または、当技術分野において知られるような、マーカーを定量化するための他の手段に関連して、表すことができる。一部の例では、比率は単位のない値として表されうる。「マーカー」はまた、ベースライン値の控除の後、比率または正味の値にも言及することができる。方向性（増加または減少/上昇または下降）の指標を伴って、あるいは伴わずに、マーカーは「

30

40

50

倍率変化」としても表されうる。マーカーの発現の増加または減少は、「下方制御」または「上方制御」、あるいは被験体の刺激、生理的事象、条件に応じた増加または減少の類似した指標として称されうる。マーカーは第1の生体試料で存在する場合があります、そして第2の生体試料で不在である場合があります、あるいはまた、マーカーは両者間に統計的に有意な違いを有して両者に存在しうる。生体試料のマーカーの存在、欠如または相対的なレベルの発現は、マーカーを定量化するか、または評価するのに用いられるアッセイの性質に依存することができ、そしてそのような発現の様式は当業者に精通されている。

#### 【0081】

同種移植を拒絶する被験体の発現のレベルが、ある被験体のもの、または拒絶していない被験体から採取されるサンプルのものと実質的に異なるとき、マーカーは差動的に発現されているとして説明されうる。差動的に発現されたマーカーは、正常またはコントロールサンプルの発現と比較して過剰発現し、または過小発現することができる。

10

#### 【0082】

「プロファイル」は、1または複数のマーカーの一組、およびそれらの存在、不存在、相対的なレベルまたは存在量（一つまたは複数のコントロールと比較して）である。たとえば、代謝物質プロファイルは、代謝物マーカーの存在、不在、相対的なレベルまたは存在量のデータセットである。プロテオミクスプロファイルは、プロテオミクスマーカーの存在、不在、相対的なレベルまたは存在量のデータセットである。ゲノムまたは核酸は、発現された核酸（例は、転写物、mRNA、ESTまたはその種の他のもの）の存在、不存在、相対的なレベルまたは存在量のデータセットのプロファイルを描く。プロファイルは、あるいは発現プロファイルと呼ばれる場合がある。

20

#### 【0083】

生体試料でのマーカーの増加または減少、または定量化は、遺伝子産物もしくは転写物、または特定の配列を含む核酸分子、ポリペプチドもしくはタンパク質、代謝物質その他の存在および/または相対的な存在量を測定するためにこの技術で既知の任意のいくつかの方法でも測定しうる。マーカーのレベルは、絶対値として、またはベースライン値と比較して測定することができ、そして被験体のマーカーのレベルはカットオフインデックス（例は、非拒絶カットオフインデックス）と比較される。あるいはまた、マーカーの相対的な存在量は、コントロールと比較して測定することができる。コントロールは臨床的に正常な被験体（例は、同種移植を受けなかったもの）であってもよく、拒絶反応を以前に示さなかった、または拒絶反応を示していない同種移植レシピエントであってもよい。

30

#### 【0084】

一部の態様において、コントロールは自家コントロール、たとえば、同種移植片移植を受ける前に被験体から得られるサンプルまたはプロファイルであることができる。一部の態様において、一つの時間点（時点）（移植の前、その後、または前および後）に得られるプロファイルは、以前に同じ被験体から得られた1もしくは1よりも多くのプロファイルと比較されうる。時間とともに同じ被験体から同じ生体試料を繰り返しサンプリングすることによって、マーカーレベルまたは発現を時間経過で示す複合プロファイルを提供することができる。連続したサンプルを被験体から得ることもでき、そして各々についてプロファイルを得て、一つ以上のマーカーの増加または減少の過程を時間とともに追跡することができる。例えば、初めのサンプルまたはサンプル群を移植の前に採取し、後続のサンプルを、毎週、隔週、毎月、隔月で、または適切な別の規則的間隔で採取して、以前に採取したサンプルからのプロファイルと比較することができる。サンプルはまた、薬物、たとえば、免疫抑制薬の投与の前、その間、そしてその後でも採取することができる。

40

#### 【0085】

技術、方法、ツール、アルゴリズム、試薬、および、特定のマーカーまたはマーカー群のセットを検出および/または定量化するために使用することができるアッセイの他の必要な局面は変動する。重要なのは、マーカーまたはマーカー群のセットを検出するのに用いる特定の方法でなく、検出するためのマーカーが何かである。文献に反映されているように、相当なバリエーションが可能である。一旦検出または定量化すべきマーカーまたは

50

マーカー群のセットが特定されれば、適切な試薬の供給で、任意のいくつかの技術はよく適しているかもしれない。特定されるマーカーのセットを備えているとき、この技術の熟練の者はここに明らかにされる方法を実行するために適切なアッセイを選ぶことができる〔たとえば、核酸マーカーのためのPCRに基づくまたはマイクロアレイに基づくアッセイ、ELISA、タンパク質または抗体マイクロアレイまたは類似した免疫学的アッセイ、または一部の例において、iTRAQ、iCATまたはSELDIプロテオミクス質量分析に基づく方法の使用〕。

#### 【0086】

本発明は、被験体における同種移植拒絶の評価または診断に関連した核酸発現プロファイルおよびプロテオミクス発現プロファイルを提供する。ゲノクスまたはT細胞発現プロファイルまたはプロテオミクス発現プロファイルでの要素のいくつかが既存の技術で個々に知られることがある一方、ゲノクスまたはプロテオミクスのマーカーの特定のセットの変化発現レベル（コントロールと比較して増加または減少）の特定の組合せは、被験体での同種移植拒絶の評価または診断に役立つ新しい組合せを含む。

10

#### 【0087】

183のプロープセットが、特異的に検出（ハイブリダイゼーションおよびラベルの検出によって）され、そして発現された核酸の発現レベルの定量を可能にさせることが見出された。183の個々の発現された転写物または核酸を表す183のこのセット（表2にリストされる）のうち、24のプロープセットのサブセット（表5）が検出され、定量化され、そして非拒絶の移植（NR）と比較してARサンプルで統計的に有意な倍率変化を示すことが見出された。図10は、表2および5にリストされるプロープセットによって特定された核酸の一部分の核酸配列情報を提供する。図10でのシーケンス（配列番号1-183）は、示された遺伝子への特異的なハイブリダイゼーションのために（例は、マイクロアレイ、プロット、または他のハイブリダイゼーションベースのアッセイにおいて）、または示された遺伝子の特異的な増幅のためのプライマーまたはプライマー群の設計のために（例は、PCR、RT-PCRまたは他の増幅ベースのアッセイによって）、プロープとして有用でありうる。

20

#### 【0088】

18の重要なタンパク質群コードが、多重系 iTRAQ 方法論を使用してARおよびNRの被験体で差動的な相対レベル（対照サンプルと比較して）をもつことが見出された（表7）。これらのタンパク質群コードは、TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4およびF9の1または1以上によってコードされるプロテオミクスマーカーを含む。下記に説明するように、これらのポリペプチドをコードする核酸配列、およびこれらのポリペプチドのアミノ酸配列に特に言及する、アクセッション番号をここに提供する。示されたタンパク質群コードの各々のメンバーのためのユニークな識別子（International Protein Index accession numbers）は表7に見られる。これらの配列の1以上の部分を含むポリペプチドは、特異的にプロテオミクスマーカーの1以上を検出する抗体の調製のために役立つことがあり、あるいはまた、配列は、トリプシン消化および配列に対して生成されるペプチドのフラグメント（断片）の比較によっての質量スペクトルでの分析に、またはそのような配列を含むデータベースに支配されるサンプルでの1以上のプロテオミクスマーカーを特定するのに用いられうる。

30

40

#### 【0089】

核酸の検出または決定、そして、場合によっては定量化は、制限されないが、配列特異的ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、RT-PCR、マイクロアレイなどを含む当該技術分野において既知の組換えDNA技術を用いるいくつかの方法またはアッセイのうちの任意の1つによって成し遂げることができる。そのようなアッセイには、配列特異的ハイブリダイゼーション、プライマー伸長法、または侵襲性開裂（invasive cleavage）が含まれる。さらにまた、各々のタイプの反応の生成物を分析し/検出するための多数の方法がある（たとえば、蛍光、ルミネセンス（発光）、質量測定、電気泳動、その他）。さらにまた、反応は、溶液中で、または、ガラススライド、チップ、ビーズなどの

50

固体支持体上で起こりうる。

【0090】

マイクロアレイまたはバイオチップで使用するための、または、PCRに基づくアッセイでの使用のためにプライマーを選ぶまたは設計するためのプローブを設計および選定する方法は、当該技術分野において公知である。一旦、マーカーまたはマーカー群が特定されると、および、核酸の配列がたとえば当該配列を含むデータベースと照合するか提供された適切な配列（たとえば、本明細書に提供される配列表）を有することによって決定されると、当業者はそのような情報を用いて、適切なプローブまたはプライマーを選び、選択されたアッセイを実行する。

【0091】

当業者に既知の組換えDNA技術の一般原則を述べる標準的参考資料は、たとえば、以下のものを含む。すなわち、Ausubel（オースベル）ほか、Current Protocols In Molecular Biology、John Wiley & Sons（ジョン・ワイリー・アンド・サン社）、ニューヨーク（1998および2001の補遺）、Sambrookほか、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press（コールドスプリングハーバー研究所プレス）、Plainview, New York（1989）、Kaufman（コーフマン）ほか、編、Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine、CRC Press（CRCプレス社）、Boca Raton（ボカラトン）（1995）、McPherson（マクファーソン）編、Directed Mutagenesis: A Practical Approach、IRLプレス、Oxford（オックスフォード）（1991）。

【0092】

タンパク質、タンパク質複合体またはプロテオミクスマーカーは、当該技術分野で公知であるいろいろな方法によって、特異的に特定および/または定量化することができ、単独あるいは組み合わせて使われうる。免疫学的すなわち抗体に基づく技術には、酵素結合抗体免疫測定法（ELISA）、標識免疫検定法（RIA）、ウエスタンブロッティング、免疫蛍光、マイクロアレイ、いくつかのクロマトグラフィー技術（すなわち、免疫親和性クロマトグラフィー）、フローサイトメトリー、免疫沈降および同様の他のものなどを含む。そのような方法は、関心対象のタンパク質またはタンパク質複合体と関係した特定のエピトープまたはエピトープ群の組合せに対する抗体または抗体群の特異性に基づく。非免疫性の方法には、タンパク質またはタンパク質複合体それ自体の物理的な特徴に基づくものが含まれる。そのような方法の例には、電気泳動、いくつかのクロマトグラフィー技術（たとえば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、迅速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）、アフィニティ（親和性）クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィーなど）、質量分析、配列決定、プロテアーゼダイジェスト（消化）、などが含まれる。そのような方法は、タンパク質またはタンパク質複合体のアミノ酸補足物（complement）およびアミノ酸の特定の配列に由来する質量、電荷、疎水性または親水性に基づく。例示的な方法の例としては、たとえば、PCT国際公開WO 2004/019000、WO 2000/00208、米国特許第6670194号明細書において記述されるものが含まれる。免疫学的および非免疫性の方法は、タンパク質またはタンパク質複合体を特定するか、特徴づけるために組み合わせられてもよい。さらにまた、各々のタイプの反応の生成物を分析/検出するための多数の方法がある（たとえば、蛍光、発光、質量測定、電気泳動、その他）。さらにまた、反応は、溶液中で、またはガラスのスライド、チップ、ビーズなどの固体支持体上で起こすことができる。

【0093】

タンパク質アレイまたは抗体アレイまたは他の免疫学に基づくアッセイで使用するために抗体を生産する方法は、当該技術分野で公知である。一旦、マーカーまたはマーカー群が特定され、そしてタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列が、データベースと照合することによって、または提供された適切な配列（たとえば、本明細書に提供する配列表）を有することによって特定されると、当業者は、そのような情報を使って、一つ以上の適切な抗体を調製し、そして選択されたアッセイを実行することができる。

【0094】

10

20

30

40

50

バイオマーカーを対象とするモノクローナル抗体の調製のために、抗体分子を生産するために提供される任意の技術を使うことができる。そのような技術には、制限されないが、ハイブリドーマまたはトリオマ (trioma) [例えば、Kohler (コーラー) および Milstein (ミルスタイン)、1975、Nature (ネイチャー) 256: 495-497; Gustafsson (グスタフソン) ほか、1991、Hum. Antibodies Hybridomas 2: 26-32)、ヒトB細胞ハイブリドーマまたはEBVハイブリドーマ (例えば、Kozborほか、1983、Immunology Today 4:72; Cole (コール) ほか、1985、In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (アランR. リース社)、pp. 77-96) が含まれる。ヒトまたはヒト化抗体は、ヒトハイブリドーマを用いることによって [Cote (コート) ほか、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (米国科学アカデミー会報) 80: 2026-2030]、またはインビトロでEBVウイルスでヒトB細胞を形質転換することによって [Cole (コール) ほか、1985、In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (アランR. リース社)、pp. 77-96] 得ることができる。適切な生物活性のヒト抗体分子をコードする配列と、特定のバイオマーカーに対し特異的なマウス抗体分子をコードする配列をスプライシングすることによって行われる、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術 [Morrison (モリソン) ほか、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Neuberger (ニューベルガー) ほか、1984、Nature 312: 604-608; Takeda (タケダ) ほか、1985、Nature 314: 452-454] を用いることができ、そのような抗体は、本発明の範囲内である。単鎖抗体の生産のために記述される技術 (米国特許第4,946,778号明細書) は、バイオマーカー-特異的抗体を生産するのに適合させることができる。本発明の追加的な態様は、バイオマーカータンパク質に対する望ましい特異性を有する単クローンFab断片の迅速で簡単な識別を可能にするFab発現ライブラリーの構築のために記述される技術を利用する [Huse (ヒューズ) ほか、1989、Science 246: 1275-1281]。非ヒト抗体は、既知の方法 (例えば、米国特許第5,225,539号明細書) によって「ヒト化する」ことができる。

#### 【0095】

バイオマーカーのイディオタイプを含む抗体断片は、当該技術分野で公知である技術によって作製することができる。たとえば、そのような断片は、制限されないが、抗体分子のペプシン消化によって作製することができるF(ab')<sub>2</sub>断片、F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を減らすことによって作製することができるFab'断片、抗体分子をパバインと還元剤で処理することによって作製することができるFab断片、およびFv断片を含む。合成抗体、例えば、化学合成によって作製される抗体もまた、本発明において有用でありうる。

#### 【0096】

本明細書に記述され、そして関連した技術において当業者に公知である標準的な参考資料は、免疫学および非免疫性の技術の両方を記述し、特定のサンプルタイプ、抗体、タンパク質または分析に対するそれらの適合性を記述する。たとえば、免疫学および当業者に公知である免疫学的方法を採用するアッセイの一般原則を述べる標準的な参考資料には、以下が含まれる：たとえば、Harlow (ハーロー) および Lane (レーン)、Antibodies (抗体): A Laboratory Manual (研究所マニュアル)、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (コールドスプリングハーバー研究所プレス社)、コールドスプリングハーバー、N. Y. (1999); ハーローおよびレーンは、Using Antibodies (抗体の使用): 研究所マニュアル。コールドスプリングハーバー研究所プレス社、ニューヨーク; Coligan ほか、編、Current Protocols in Immunology、ジョン・ワイリー・アンド・サン、ニューヨーク、NY (1992-2006); および Roitt (ロアット) ほか、Immunology、第3版、Mosby-Year Book Europe Limited、ロンドン (1993)。たとえば、ペプチド合成技術の一般原則および当業者に公知である方法を述べる標準的な参考資料は以下を含む：たとえば、Chan (チャン) ほか、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis (Fmoc固相ペプチド合成)、Oxford University Press (オックスフォード大学出版部)、オックスフォード、イギリス、2005; Peptide and Protein Drug Analysis (ペプチドおよびタンパク質の薬物分析)、編 Reid, R. (リード, R.), Marcel Dekker, Inc. (マルセル・デカー社)、2000; Ep

itope Mapping (エピトープ・マッピング)、編Westwood (ウェストウッド) ほか、オックスフォード大学出版部、オックスフォードで、英国、2000; Sambrook ほか、分子クローニング: 研究所マニュアル、第3版、コールドスプリングハーバー・プレス社、コールドスプリングハーバー、NY 2001; および Ausubel (オースベル) ほか、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons、NY、1994年)。

#### 【0097】

被験体の拒絶反応の状態は、「拒絶体」(Rまたは「急性拒絶体」またはAR)として、または「非拒絶体」(NR)として記載することができ、そして非拒絶体のカットオフインデックスに対するマーカーの濃度の比較によって決定される。「非拒絶体カットオフインデックス」は、被験体が拒絶反応の状態を有するとして分類されるものを超える、またはその外側の、数値またはスコアである。非拒絶体カットオフインデックスは、代替的に、「コントロール値」、「コントロールインデックス」として、または単に「コントロール」と呼ぶことができる。非拒絶体カットオフインデックスは、コントロール被験体集団の個々のマーカーの濃度であり、そして測定される各々のマーカーについて個別に考慮されてもよく;あるいはまた、非拒絶体カットオフインデックスは、マーカーの濃度の組合せであることができ、そして診断用に提供される被験体のサンプルにおけるマーカーの濃度の組み合わせと比較されうる。コントロール被験体集団は、正常または健康なコントロール集団であることができ、あるいは同種移植レシピエント集団で、同種移植片に拒絶反応を示さなかったか、または示していないものでありうる。コントロールまたはコントロールのプールは、一定、例えば、静的値によって表されることができ、または累積的、すなわちそれを得るのに用いられサンプル集団がサイトごとにもしくは時間とともに変わる可能性があり、そして追加的なデータポイントを組み込みうる。たとえば、中央データ貯蔵所、たとえば、集約的ヘルスケア情報システムなどは、種々のサイト(病院、臨床検査室など)で得られたデータを受け取って保存することができ、単一の病院、コミュニケリニックで、エンドユーザー(すなわち個々の開業医、医学クリニックまたはセンターなど)が本発明の方法を用いるために、この累積的なデータセットを提供することができる。いくつかの態様において、カットオフインデックスは、ゲノムカットオフインデックス(被験体のゲノム発現プロファイリングのために)、プロテオミクスカットオフインデックス(被験体のプロテオミクスプロファイリングのために)などであるとしてさらに特徴付けることができる。

#### 【0098】

「生体試料」は概して、被験体由来の体液または組織または器官のサンプルを意味する。たとえば、生体試料は、体液、たとえば、血液、血清、血漿、リンパ液、尿または唾液などでよい。組織または器官のサンプル、たとえば、非液体組織サンプルなどは、消化され、抽出され、またはさもなければ液状形態にすることができ - そのような組織または器官の例には、培養細胞、血球、皮膚、肝臓、心臓、腎臓、すい臓、ランゲルハンス島、骨髄、血液、血管、心臓弁、肺、腸、腸、脾臓、膀胱、ペニス、顔、手、骨、筋肉、脂肪、角膜などが含まれる。複数の生体試料は任意の単一の時点で収集することができる。生体試料または試料群は、同種移植の前、移植時、または移植後を含む任意の時点で被験体から採取することができる。生体試料は、「核酸」、たとえば、「デオキシリボ核酸」(「DNA」)または「リボ核酸」(「RNA」もしくは「mRNA」)、またはそれらの組合せなどを単鎖か二本鎖形のいずれかで含むことができる。核酸はまた、「転写物」と称されうる。

#### 【0099】

同種移植が拒絶されているかどうかを決定するために、被験体が同種移植を受ける前、または同種移植を受けた後いつでも、ここに説明する方法を採用することができる。たとえば、同種移植を受けた後の任意の時点で被験体から得られるサンプルは、表2または7にリストされる1または1以上の核酸マーカーまたはプロテオミクスマーカーに関するレベルの変化(増加または減少)の存在について評価しうる。場合によっては、サンプルは同種移植を受けて1、2、3、4、5、6、7、8時間、またはそれよりも長い時間の後に、被験体が

ら得ることができる。場合によっては、サンプルは、同種移植を受けて1またはそれよりも多くの日（例は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、またはそれよりも多くの日）の後に被験体から得ることができる。一部の例では、サンプルは同種移植を受けた後2から7日まで（例は、5から7日まで）で得ることができ、そして表2または7にリストされる核酸マーカーまたはプロテオミクスマーカーの存在について評価することができる。

#### 【0100】

「被験体」または「患者」という語は概して、ヒトおよび他の霊長類、コンパニオンアニマル（ペット）、動物園および家畜の動物を含む哺乳類および他の動物を意味し、制限されないが、ネコ、イヌ、齧歯動物、ネズミ、マウス、ハムスター、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、家禽、その他が含まれる。被験体は、同種移植片拒絶反応の予測、評価または診断のために試験されるもの、または試験されたものを含む。被験体は、他の方法、本明細書に記述される方法、または現在の臨床診療の方法などを用いて以前に評価または診断されてもよく、または一般的な集団（コントロール被験体）の一部として選択されてもよい。

10

#### 【0101】

被験体におけるマーカーの倍率変化は、コントロールと比較して少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0またはそれよりも多くであってよく、またはそれらの間の任意の量でもあってよい。倍率変化は、コントロール値と比較した減少または増加を表しうる。

20

1以上とは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、またはそれ以上を含む。

#### 【0102】

「下方制御」または「下方制御される」は、互換的に使うことができ、たとえば、遺伝子、核酸、代謝物質、転写物、タンパク質またはポリペプチドなどのマーカーのレベルの減少を意味しうる。「上方制御」、あるいは、「上方制御される」は互換的に使うことができ、たとえば、遺伝子、核酸、代謝物質、転写物、タンパク質またはポリペプチドなどのマーカーのレベルの増加を意味しうる。また、たとえば、シグナル伝達経路または代謝経路などの経路は、上方制御または下方制御されうる。

30

#### 【0103】

一旦被験体が任意の方法（ゲノミクス、プロテオミクス、またはそれらの組合せ）によって、急性拒絶体として、または急性拒絶体になる危険があると同定されると、治療的処置が、同種移植に対する被験体の免疫反応を変えるために履行されうる。被験体は、より頻繁に臨床的値を追加的にモニタリングされるか、より一層感度の高いモニタリング方法を使用されてもよい。その上、被験体には、被験体の免疫反応を減少させるか、または増やすために、免疫抑制薬剤を投与することができる。たとえ、同種移植片拒絶反応を妨げるために被験体の免疫反応を抑える必要があるとしても、日和見性感染に対して保護するために免疫機能の適切なレベルも必要である。被験体に投与されうる種々の薬剤が既知である。たとえば以下を参照：Goodman（グッドマン）とGilman（ギルマン）の、The Pharmacological Basis of Therapeutics、11版。Ch 52、pp 1405-1431およびその中の引用；LL Brunton、JS Lazo（ラゾー）、KL Parker（パーカー）編。当業者に既知の医学生理学および薬理学の一般原則を示す標準的な参考資料は、以下のものを含む。すなわち、Fauciほか、編、Harrison's（ハリソンの）Principles Of Internal Medicine、第14版、McGraw-Hill Companies, Inc.（1998）である。他の予防的および治療上の戦略は医学文献において概説される - たとえば、Djamaliほか、2006. Clin J Am Soc Nephrol 1 : 623-630 参照。

40

#### 【0104】

ゲノム核酸発現プロファイリング

50

被験体における急性同種移植片拒絶反応を診断する方法は、本発明によって提供されるように、1)被験体由来の生体試料において少なくとも1または複数のマーカーの発現プロファイルを決する工程であって、該マーカーが、表2に示される群から選択される、工程；2)少なくとも1または複数のマーカーの発現プロファイルを非拒絶体プロファイルと比較する工程；および3)少なくとも1または複数のマーカーの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して上方制御（増加）されるか、または下方制御（減少）されるかどうかを決する工程を含み、ここで、少なくとも1または複数の該マーカーの上方制御または下方制御が、拒絶反応の状態を示す。

【0105】

本発明はまた、被験体における腎臓同種移植片拒絶反応を予測し、評価し、または診断する方法を提供し、当該方法は、本発明に示されるとおり、1)表2に示される群から選択される少なくとも1または複数のマーカーの増加または減少を測定する工程；および2)被験体の「拒絶反応の状態」を決する工程を含み、ここで、被験体の「拒絶反応の状態」の決定は、コントロールマーカー発現プロファイルに対する被験体のマーカー発現プロファイルの比較に基づく。

10

【0106】

本明細書で用いられる「遺伝子発現データ」、「遺伝子発現プロファイル」、または「マーカー発現プロファイル」という語句は、生物学的サンプルにおける遺伝子または遺伝子群のセットの発現の相対的または絶対的なレベルに関する情報を意味している。遺伝子の発現のレベルは、遺伝子によってコードされたmRNAなどのRNAのレベルに基づいて決定されうる。あるいは、発現のレベルは、遺伝子によってコードされたポリペプチドまたはその断片のレベルに基づいて決定されうる。

20

【0107】

本明細書で用いられる「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、または「ヌクレオチドポリマー」は、当業者に容易に理解されるように、RNA、DNAまたはRNAおよびDNAの両方、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含む、核酸の合成または混合されたポリマーを含むことができ、かつ化学的または生化学的に修飾されうるか、または非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含みうる。そのような修飾には、たとえば、類似体、ヌクレオチド間修飾、たとえば、非荷電連結（例えば、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）、荷電連結（例えば、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等）、ペンダント部分（例えば、ポリペプチド）、および修飾された連結（例えば、アルファアノマーポリヌクレオチド等）を有する一つ以上の天然に存在するヌクレオチドの標識、メチル化、置換が含まれる。また、水素結合および他の化学的相互作用により指定された配列に結合するそれらの能力に関してポリヌクレオチドに似た合成分子が含まれる。

30

【0108】

オリゴヌクレオチドは、可変的な長さの核酸を含み、それは特定の核酸の検出および/または増幅のための、プローブ、プライマーとして、およびマイクロアレイの製造において、役に立ちうる。オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、PNA、またはたとえば米国特許第5,948,902号明細書に記載されるような他のポリヌクレオチド部分を含むことができる。そのようなDNAまたはRNAの鎖は、活性化されたモノマーの、不溶性の支持体と連結されうる伸長鎖への連続した付加（5'から3'または3'から5'）によって合成されうる。多数の方法が、以降の個々の使用のためのオリゴヌクレオチドの合成について、またはたとえばアレイ内の不溶性の支持体の一部として、当技術分野において公知である（Lashkari DA.ほか、PNAS（1995）92（17）：7912-5；McGall G.ほか、PNAS（1996）93（24）：13555-60；Albert TJ.ほか、Nucleic Acid Res.（2003）31（7）：e35；Gao X.ほか、Biopolymers（2004）73（5）：579-96；およびMoorcroft（モーアクロフト）MJ.ほか、Nucleic Acid Res.（2005）33（8）：e75、ならびにそれらにおける参考文献）。概して、オリゴヌクレオチドは使われている方法に応じてさまざまな状況の下で、活性化および保護されたモノマーの段階的添加を通して合成される。その後、特定の保護基は更なる伸長を可能にするため

40

50

に除去することができ、その後および一旦合成が完了したならば、望ましければ、すべての保護基を除去し、オリゴヌクレオチドを、完全な鎖の精製のためにそれらの固体支持体から取り出してもよい。

【0109】

「遺伝子」は、特定の機能的な産物をコードし、かつ翻訳されずかつ転写されない配列をコード領域（コードに対して5'および3'）ならびにエクソンおよび/またはイントロンの近くに含みうる特定の染色体の特定の位置にあるヌクレオチドの規則正しい配列である。そのような非コード配列は、配列の転写および翻訳、または、たとえばイントロンのスプライシングに必要とされる調節配列を含むことができ、あるいは関心対象の突然変異が発生する以外の、まだそれらに帰属されていない何らかの機能を有する可能性がある。

10

【0110】

「マイクロアレイ」、「アレイ」または「チップ」という用語は、規定の場所で基材の表面に結合された、複数の規定された核酸プローブを意味している。基材は、固体基材でありうる。マイクロアレイは概して、当技術分野において、たとえば、米国特許第5,143,854号〔Pirrung（ピラング）〕、Fodor（フォーダー）に対する5,424,186、5,445,934、5,744,305、および5,800,992、ならびにWinkler（ウインクラー）に対する5,677,195および6,040,193、そして、フォーダーほか1991（Science、251：767-777）において記述されている。これら参照文献の各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0111】

「ハイブリダイゼーション」は、一つ以上のポリヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドが順序づけられた様式（配列特異的）で相互に作用して、水素結合によって安定化される複合体を形成する反応 - 「ワトソン-クリック」塩基対合とも呼ばれる - を含む。変形塩基対合はまた、非標準水素結合を通して起こることがあり、フーグスティーン塩基対合を含む。一部の熱力学的、イオン性またはpHの条件下で、特にリボ核酸の三重らせんが起こる場合がある。これらおよび他の変形水素結合または塩基対合が当技術分野において公知であり、たとえば、参照により本明細書に組み入れられるLehninger（レーニンジャー）-Principles of Biochemistry、第3版〔Nelson（ネルソン）およびCox（コックス）、編、Worth Publishers（ワース・パブリッシャーズ）、ニューヨーク。〕に見出すことができる。

30

【0112】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で実行することができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーは、任意の2つの核酸分子がお互いにハイブリダイズする容易さまたは難しさを決定しうる。ストリンジェンシーは、たとえば、ハイブリダイゼーションが起こる温度を上げることによって、ハイブリダイゼーションが起こるイオン（塩）濃度を減少させることによって、またはそれらの組合せによって、増大させることができる。ストリンジェントな条件下では、互いに少なくとも60%、65%、70%、75%またはそれ以上同一な核酸分子は、互いにハイブリダイズしたまま残るが、同一性の割合が低い分子は通常はハイブリダイズしたまま残ることができない。

40

【0113】

2つの核酸の間のハイブリダイゼーションは、逆平行構成で起こり得 - これは「アニーリング」と呼ばれる - 、対合した核酸は相補的と説明される。ハイブリダイゼーションが鎖のうちの1本である第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間で起こることが可能である場合、二本鎖ポリヌクレオチドは「相補的」でありうる。一般に認められた塩基対合則に従って、1つのポリヌクレオチドがもう一つと相補的である程度は相同性

50

と呼ばれ、互いに水素結合すると予想される対向する鎖における塩基の割合に関して定量化可能である。

【0114】

概して、配列特異的ハイブリダイゼーションにはハイブリダイゼーションプローブが関与し、それは定義された配列に特異的にハイブリダイズすることができる。そのようなプローブはわずかに1個または数個のヌクレオチドが異なっている配列を区別するように設計することができ、このようにして、高度な特異性を提供する。検出および配列判別を連関させる戦略は、「分子ビーコン」の使用であり、それによって、ハイブリダイゼーションプローブ（分子ビーコン）は、3' および/または5' にレポーターおよびクエンチャー分子、ならびに、介在配列にとっての適した結合標的の不在によりプローブがヘアピンループを形成するように、3' および5' に相補的な配列をもつ。このヘアピンループは、密接に接近するようレポーターおよびクエンチャーを保ち、蛍光放出を減らす、フルオロフォア（レポーター）のクエンチングをもたらす。しかし、分子ビーコンが標的にハイブリダイズした場合、フルオロフォアおよびクエンチャーは十分に離れて、蛍光がフルオロフォアから発せられることを可能にする。

10

【0115】

ハイブリダイゼーションで使われるプローブは、二本鎖DNA、一本鎖DNAおよびRNAオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸を含むことができる。ハイブリダイゼーション条件および特異的なプローブにハイブリダイズするマーカーを特定する方法は、当技術分野で記述されている - 例えば、Brown (ブラウン) T. 「Hybridization Analysis of DNA Blots」 Current Protocols in Molecular Biology. FM Ausubel (オースベル) ほか、編、Wiley & Sons (ワイリー・アンド・サン社) (2003). doi: 10.1002/0471142727.mb0210s21 参照。本発明に使用するのに適したハイブリダイゼーションプローブは、約10~約400ヌクレオチド、あるいは約20~約200ヌクレオチド、または約30~約100ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは修飾された核酸を含む。

20

【0116】

特異的な配列は、プライマーまたはプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、このハイブリダイゼーションをその後検出することにより確認される。

【0117】

「プライマー」は、短いポリヌクレオチドを含み、通常、標的を用いたハイブリダイズによって関心対象のサンプル中に存在する標的または「テンプレート」と結合して、その後標的と相補的なポリヌクレオチドの重合を進める、遊離3'-OH基を含む。「ポリメラーゼ連鎖反応」(「PCR」)は、「上流」および「下流」のプライマーからなる「プライマーの対」または「プライマーのセット」、およびDNAポリメラーゼ、および典型的には熱的に安定なポリメラーゼ酵素などの重合の触媒を使用して、標的ポリヌクレオチドからコピーが複製される反応である。PCRのための方法は、当技術分野において周知であり、たとえば、Beverly (ベヴァリー) SM. Enzymatic Amplification of RNA by PCR (RT-PCR) in Current Protocols in Molecular Biology [分子生物学の現在のプロトコルのPCR (RT-PCR) によるRNAの酵素の増幅]。FMオースベルほか、編、ワイリー・アンド・サン社 (2003)。doi: 10.1002/0471142727.mb1505s56において教示されている。複製されたコピーの合成は、標識またはタグ、たとえば、蛍光分子、ビオチンまたは放射性分子をもつヌクレオチドの組み込みを含むことができる。複製されたコピーはその後、従来の方法を用いてこれらのタグによって検出することができる。

30

40

【0118】

プライマーを、サザンまたはノーザンブロット分析などのハイブリダイゼーション反応において、プローブとして使うこともできる〔たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. Molecular Cloning (分子クローニング): 研究所マニュアル 第2版、コールドスプリングハーバー研究所、コールドスプリングハーバー研究所プレス、コールドスプリングハーバー、N.Y., 1989参照〕。

【0119】

50

本明細書で用いられる「プローブセット」（または時には「プライマーセット」）は、サンプルにおいて核酸分子（核酸マーカー）の存在を検出するのに用いることができる一群のオリゴヌクレオチドを意味し、検出は定量的または半定量的でありうる。検出は、たとえば、PCRおよびRT-PCRにおけるような増幅を通して、またはマイクロアレイ上でのハイブリダイゼーションを通して、または一本鎖または二重鎖核酸の選択的な酵素分解に基づくアッセイにおけるような選択的な破壊および保護を通して行われうる。プローブセット中のプローブは、一つ以上の蛍光性、放射性、または他の検出可能な部分（酵素を含む）を用いて標識することができる。プローブが所望の遺伝子を選択的に検出するのに十分に大きい限り、プローブは任意のサイズで良い - 一般に、約15から約25ヌクレオチドまで、または約30ヌクレオチドまでのサイズ範囲が十分なサイズである。プローブセットは、溶液中にあってよく、例えば、多重PCRに用いられるものである。あるいは、アレイまたはマイクロアレイにおける場合のように、プローブセットは固体表面に付着することができる。プローブセットは全長遺伝子、全長遺伝子のスプライスバリエーション、転写単位、または遺伝子もしくは転写単位のフラグメントの発現レベルを検出することができる。プローブセットはサンプルに存在する核酸マーカーを同定する。

#### 【 0 1 2 0 】

本発明の一部の態様において、TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448\_a\_at、CAMK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442\_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057\_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6のうちの一つ以上が包含される核酸マーカーのセットによって表される核酸の検出のためのプローブセットが提供される。そのようなプローブセットは、被験体の拒絶反応状態を決定することに役立つ。プローブセットは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448\_a\_at、CAMK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442\_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057\_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6のうちの一つ以上に対応する核酸配列の特異的増幅（例えば、PCRまたはRT-PCR）用の、一つ以上のプライマー対を包含しうる。本発明の別の態様において、プローブセットは、マイクロアレイの一部である。本発明の別の態様では、核酸マーカーには、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAXの1または1以上が含まれる。マーカーはさらに以降に詳細に説明する。

#### 【 0 1 2 1 】

配列の区別および検出のための多数の他の方法が当技術分野において既知であることが理解され、その一部はさらに詳細に以下で記述される。アレイ化したプライマー伸長ミニ配列決定、タグマイクロアレイおよび配列特異的伸長などの反応をマイクロアレイ上で実行できることも理解される。そのようなアレイベースの遺伝子型解析プラットフォームの一つは、マイクロスフェアベースのタグイット（tag-it）ハイスループットアレイである（Bortolin S.ほか、2004、Clinical Chemistry 50：2028-36）。この方法は、PCRによってゲノムDNAを増幅し、その後広くタグを付けられたプライマーを用いた配列特異的プライマー伸長が続く。産物を次いで、タグイットアレイ上で選別し、Luminex（ルミネックス）xMAPシステムを使用して検出する。

#### 【 0 1 2 2 】

配列内のヌクレオチドの、任意の数字表示が特定の配列に関するものであることは、当業者に理解される。また、同じ位置は、配列に番号付けする方法および選択される配列に応じて異なる数字表示が割り当てられうる。さらに、挿入または欠失のような配列の変化は、変異部位およびその周辺の特定のヌクレオチドの相対的な位置、次いで数字表示を変更しうる。たとえば、アクセッション番号AC124566、AF211864、AI035495、AI326085、AK089167、AK131133、AK155816、AK170432、BC042840およびBC057200によって表される配列は、すべてヒトITGAXヌクレオチド配列を表すが、一部の配列の違い、およびそれらの間の番号付けの違いを有しうる。もう一つの例として、アクセッション番号NP\_115925、NP\_444509、P20702、NP\_776169、NP\_000878、NP\_001706、NP\_04223、AAA59180、AAA51620に

10

20

30

40

50

よって表される配列は、すべてヒトITGAXポリペプチド配列を表すが、それらの間で、一部の配列の違いおよび番号付けの違いを有しうる。他の核酸マーカ―は変異体を示す場合があり、以下に説明する。

#### 【0123】

関心対象の遺伝子の一つ以上の核酸配列が提供された場合、上記の遺伝子の任意のものを含む関心対象の任意の遺伝子の発現の特異的検出のためのプローブ、プライマーまたはプローブセットの選定および/または設計は、関連する技術分野の当業者の能力の範囲内である。さらに、いくつかのプローブ、プライマーまたはプローブセットのうちの任意のもの、あるいは複数のプローブ、プライマーまたはプローブセットは、関心対象の遺伝子を検出するのに用いられ、たとえば、アレイは単一の遺伝子転写物のために複数のプローブを含むことができる - 本明細書に記載される本発明の局面は、例示されたいかなる特定のプローブにも限定されない。

10

#### 【0124】

配列同一性または配列類似性は、DNASISの中で提供されるような、ヌクレオチド配列比較プログラム（DNAもしくはRNA配列、またはその断片もしくは部分用）またはアミノ酸配列比較プログラム（タンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド配列、またはその断片もしくは部分用）を使用して決定されうる（たとえば、しかし限定されるものではないが、以下のパラメータを使用する：GAPペナルティ5、トップ斜線の数5、固定されたGAPペナルティ10、k-ダブル（tuple）2、フローティングギャップ10およびウィンドウサイズ5）。しかしながら、比較のための配列整列の他の方法は、当技術分野において周知である。たとえば、Smith（スミス）およびWaterman（ウォーターマン）のアルゴリズム（1981、Adv. Appl. Math. 2:482）、Needleman（ニードルマン）およびWunsch（ブンスユ）（J. Mol. Biol. 48:443、1970）、Pearson（ピアソン）& Lipman（リップマン）（1988、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2444）、およびこれらのアルゴリズム（例は、GAP、BESTFIT、FASTA、およびBLAST）のコンピューター化された実施、または手動の整列および目視検査。

20

#### 【0125】

関心対象の核酸または遺伝子、ポリペプチドまたは配列が同定され、および配列（または遺伝子、ポリペプチド、配列、もしくは同様のもの）の部分または断片が提供された場合、類似または実質的に類似である他の配列は、上記で説明したプログラムを使用して同定されうる。たとえば、マイクロアレイまたはプローブ配列を構築する場合、マイクロアレイ実験により「ヒット」（特定の場所でのプローブが、サンプル中の一つ以上の核酸とハイブリダイズする）が確認された場合に（マイクロアレイの製造者または生産者のいずれかにより、または製造者により提供されるデータベース - たとえばHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayの製造者であるAffymetrixのNetAffxデータベース - から）プローブの配列が明らかになるような、配列および位置が公知である。配列供給源の同一性が提供されない場合、それは一つ以上のデータベースの配列ベース検索においてプローブの配列を用いて決定されうる。プロテオミクスアッセイ、たとえばiTRAQによって特定されるペプチドまたはペプチド断片に関して、このペプチドまたは断片の配列を、上述のアミノ酸配列のデータベースに照合するために用いることができる。そのようなデータベースの例はNational Centre for Biotechnology Information（国立バイオテクノロジー情報センター）によって維持されるもの、あるいはSwiss Institute of Bioinformatics（スイスインスティテュート・オブ・バイオインフォマティクス）、Sanger Centre（サンガー・センター）、またはEuropean Bioinformatics Institute（欧州バイオインフォマティクス研究所）、例えばInternational Protein Index（インターナショナル・プロテイン・インデックス、IPI）、によって維持されるものを含む。

30

40

#### 【0126】

タンパク質またはポリペプチド、核酸またはその断片または部分は、その配列が同じ系統的種、属、科または目で見つかる他のものと区別することができる場合に、特異的に特定されると考えることができる。そのような区別は、配列の比較によって特定することが

50

できる。配列または配列群の比較は、BLASTアルゴリズムを使用して行われうる〔Altschul (アルチュール) ほか、1009. J. Mol. Biol. 215 : 403-410〕。BLAST検索はクエリ配列と特定の配列または配列群との、または配列のより大きなライブラリーまたはデータベース (例えば、GenBankまたはGenPept) との比較を可能にし、そして100%の同一性を示す配列だけでなく、より低い程度の同一性を有する配列も同定する。たとえば、複数のアイソフォーム (たとえば、別々の遺伝子、もしくは遺伝子由来核酸転写物の異なるスプライシング、または翻訳後プロセシングのいずれかから生じる) を有するタンパク質に関し、1つのアイソフォームに存在し、かつ一つ以上の他のアイソフォームには存在しないまたは検出されない構造、配列またはモチーフの特異的な検出によって、アイソフォームが同じまたは異なる種に由来する他のアイソフォームから区別される場合、アイソフォームは特異的に同定することができる。

10

## 【0127】

本発明の方法へのアクセスは、たとえば、個々のマーカー試験を実施する臨床検査室または他の試験施設によってエンドユーザーに提供されうる - 生物学的サンプルが個々の試験および分析が実施される施設に提供されて、予測方法が適用される ; あるいは、開業医が臨床検査室からのマーカー値を受け取って、現場での実行またはインターネットに基づく実行を用いて本発明の予測方法にアクセスしうる。

## 【0128】

たとえば、複数の中央値、標準誤差、標準偏差などの統計的パラメータの決定、ならびに本明細書に記述する他の統計分析が公知であり、かつ当業者の技術の範囲内である。本明細書に開示されるように、特定の係数、値または指数の使用は単に例示であり、本発明の種々の局面の限定を束縛することを意図しない。

20

## 【0129】

たとえば、マイクロアレイ実験、または複合的なRT-PCR実験から得られた遺伝子発現データの多数のものの解釈は、膨大な作業である場合があるが、体系的な特長に光を当てる方法でデータを系統立てるように設計されたアルゴリズムおよび統計ツールを用いることにより、大いに容易化される。視覚化ツールも、たとえば、異なる発現を色の様々な強さおよび色相によって表すゆえに有用である〔Eisen (アイゼン) ほか、1998、Proc Natl Acad Sci 95 : 14863-14868〕。利用できるアルゴリズムおよび統計ツールは、アレイおよび結果として生じるデータセットの複雑さの増加、および処理速度の増加、コンピュータメモリの増加、およびこれらのコストの相対的減少とともに、高度化されてきている。

30

## 【0130】

核酸またはタンパク質発現プロファイルの数学的および統計的な分析は、いくつかのもの - 経路または生物システムの領域における同調的な調節を示す遺伝子グループの識別、2つ以上の生物学的サンプル間の類似点および違いの識別、被験体における特定の事象間またはプロセス間を区別する遺伝子発現プロファイルの特徴の特定など - を成し遂げうる。これは、治療レジメンの有効性または治療レジメンにおける変更を評価すること、特定の病状の進行をモニタリングまたは検出すること、2つの病状間、そうでなければ臨床的に類似した (またはほとんど同一の) 病状間を区別することなどを含みうる。

## 【0131】

クラスタリング法が既知であり、マイクロアレイデータセット、たとえば、階層的クラスタリング、自己組織化マップ、k-平均法または確定的アニーリングに適用されている。〔アイゼンほか、1998、Proc Natl Acad Sci USA 95 : 14863-14868 ; Tamayo (タマヨ)、P.ほか1999. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 2907-2912 ; Tavazoie、S.ほか1999. Nat Genet 22 : 281-285 ; Alon、U.ほか1999. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 6745-6750)。そのような方法は、同調的な調節を示す、遺伝子発現プロファイルにおける遺伝子の群を特定するために役立つ可能性があり、また、その他の機能は不明な、同調的な調節を示す他の遺伝子と同じ経路またはシステムに関与すると思われる新規な遺伝子の同定に役立つ可能性もある。

40

## 【0132】

50

生物学的サンプルにおける核酸またはプロテオミクス発現のパターンは、その機能的な状態および同一性の特徴的かつ理解しやすい分子像を提供することもできる。関連した遺伝子発現パターンを有する2つの異なるサンプルはしたがって、互いに生物学的および機能的に類似している可能性があり、逆に核酸またはプロテオミクス発現のパターンにおいて有意な違いを示す2つのサンプルは、示された複雑な発現パターンによって区別されるだけでなく、例えば同種移植拒絶反応などの特定の病理学的状態または他の生理学的状態の指標である遺伝子産物または転写物の診断サブセットを示しうる。

【0133】

マイクロアレイデータセットに対する複数の数学的および/または統計的分析法の適用は、重要なマーカーの変動するサブセットを示す可能性があり、どの方法が「最良」または「より正確」であるかについて、不確実性がもたらされる。数学に関係なく、根底にある生物学はデータセットにおいて同じものである。複数の数学的および/または統計的方法をマイクロアレイデータセットに適用し、全体と比較して共通のマーカーについて各々の統計的に有意なサブセットを評価することによって、不確実性は低下し、そして臨床的に関連した中心的なマーカーグループが特定される。

10

【0134】

ゲノム発現プロファイリングマーカー

【0135】

本発明は、急性腎臓同種移植拒絶を含む、同種移植拒絶の評価または診断に役立つ核酸マーカーのコア（中心的な）グループを提供し、これは、表2に提示する核酸マーカーの1または1以上を含み、そして、TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448\_a\_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442\_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057\_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1または1以上を含んでよい。

20

【0136】

183のプローブセットを、検出し、定量化して、適用される3件の中程度（moderated）のt検定のすべてで拒絶（AR）サンプルおよび非拒絶移植（NR）コントロールを比較して、偽発見率（FDR）が1%以下を有し、統計的に有意な差を示すことが見出され、そして問題の遺伝子または転写物の増加/上方制御または減少/下方制御を示すことができる。これらのプローブセットは特異的に検出し（ラベルのハイブリダイゼーションおよび検出によって）、および発現された核酸の発現レベルの定量化を可能にする。183の個別の発現された転写物または核酸を示す183のこのセット（表2にリストされる）のうち、24のプローブセットのサブセット（表5）を検出し、定量化して、適用される3件の中程度のt検定のすべてで非拒絶移植（NR）コントロールと比較してARサンプルでの統計的に有意な倍率変化を示すことが見出され、問題の遺伝子または転写物の増加/上方制御または減少/下方制御が示されうる。これらの24のプローブセットのうち、少なくとも18は、特定の遺伝子（知られた、または知られるが記述されていない）遺伝子または転写物を検出する。図10は、表2および5にリストされるプローブセットによって特定される一部分の核酸の核酸配列情報を提供する。

30

【0137】

一部の態様において、本発明は、急性腎臓同種移植拒絶を含む、同種移植拒絶の評価、監視、予測または診断のための方法を提供し、それは、表2にリストされ、そして示された遺伝子記号によって言及される群より選ばれるマーカーまたはプローブセットの少なくとも1以上の発現レベルを測定することを含む。これらのプローブセットは、遺伝子記号によって参照される個々の、およびユニークな遺伝子または遺伝子フラグメントの発現レベルに関係し、それを特異的に測定することができる。

40

【0138】

表2または5で示される遺伝子またはマーカーは、同種移植拒絶プロセスでの生物学的役割をもち、治療的な標的を表すことができる。

【0139】

50

別の態様において、本発明は、腎臓同種移植拒絶を含む急性同種移植拒絶の評価または診断に役立つ一群の核酸マーカーを提供し、それは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448\_a\_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442\_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057\_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1または1以上を含む。

【0140】

別の態様において、本発明は、24のグループから選ばれるマーカーのサブセットを提供し、それは急性腎臓同種移植拒絶を含む同種移植拒絶の評価、監視、予測または診断に有用であることができ、それには、1または1以上のTncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAXが含まれる。

10

【0141】

別の態様において、本発明は、24のグループから選ばれるマーカーのサブセットを提供し、それは、急性腎臓同種移植拒絶を含む同種移植拒絶の評価、監視、予測または診断に役立つことができ、それには、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAX、ならびにSFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057\_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6の1または1以上が含まれる。1または1以上には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13またはそれより多くが含まれる。

【0142】

実施例1~3の結果は、上記の態様-24の核酸分類子(classifier)セット(TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073、ITGAX;SFRS16、NFYC、NCOA3、PGS1、NEDD9、LIMK2、NASP、240057\_at、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1およびSLC6A6)が、非拒絶の被験体から急性拒絶被験体を見分けるのに役立つことを例示する。24のセットの1または1以上のどんな組合せでも、非拒絶被験体から急性拒絶被験体を見分けるのに役立つ。11の核酸マーカー(TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073およびITGAX)の交差している(intersecting)セットはまた、非拒絶被験体から、急性拒絶被験体を見分けるのに役立つ。

20

【0143】

(表2)ARおよびNRの被験体の間でおよそ1.39から1.4倍の違い(またはより大きい)を示す、差別的に発現されたプローブセット。標的配列は、コンセンサスの部分または原型シーケンサー(exemplar sequencer)であり、それからプローブ配列が選ばれた(Affymetrix(商標)NetAffx(商標)Annotation database(アノテーションデータベース)Update Release(アップデートリリース)25、2008年3月)。コンセンサスまたは原型配列は、GeneChip(ジーンチップ)U133 2.0プローブセットが測定する転写物を示すためにアレイの設計の時に用いる配列である。コンセンサス(共通)配列は、配列データを整列させ、および組み合わせる、ベースコーリングアルゴリズム(base-calling algorithms)から生じる。原型配列は各遺伝子のための代表的なcDNA配列である。

30

アプライメントID プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
1552264_a_at	MAPK1	マイトジェン活性化 プロテインキナーゼ 1	NM_002745 NM_138957	0.73	1.66	アップ	0.00749	1
1552542_s_at	TAGAP	T-細胞活性化 GTPアーゼ活性化 タンパク質	NM_054114 NM_138810 NM_152133	0.95	1.93	アップ	0.00996	2
1553186_x_at	RASEF	RASおよびEF-ハンド ドメイン含有	NM_152573	1.12	2.18	アップ	0.00760	3
1553297_a_at	CSF3R	コロニー刺激因子 3受容体(顆粒球)	NM_000760 NM_156038 NM_156039 NM_172313	0.81	1.76	アップ	0.00574	4
1554691_a_at	PACSLN2	プロテインキナーゼ C およびニューロンでの カゼインキナーゼ基質2	NM_007229	0.74	1.67	アップ	0.00574	5
1555420_a_at	KLF7	クルップェル様因子7 (遍在性)	NM_003709	1.08	2.11	アップ	0.00638	6
1555467_a_at	CUGBP1	CUG三塩基反復、 RNA結合タンパク質1	NM_001025596 NM_006560 NM_198700	0.79	1.73	アップ	0.00363	7

10

20

30

40

アフィニクス プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO.)
1555797_a_at	ARPC5	アクチン関連タンパク質2/3 複合体、サブユニット5、 16kDa	NM_005717	0.76	1.70	アップ	0.00711	8
1555852_at	1555852_at	---	---	0.90	1.87	アップ	0.00721	9
1555950_a_at	CD55	CD55分子、補体のための 崩壊促進因子 (クロマーマ血液型)	NM_000574	0.85	1.80	アップ	0.00703	10
1557924_s_at	ALPL	アルカリホスファターゼ、 肝臓/骨/腎臓	NM_000478	0.77	1.71	アップ	0.00758	11
1558448_a_at	1558448_a_at	CDNA FLJ35687 fis、 クローンSPLEN2019349	---	0.79	1.73	アップ	0.00677	12
1563509_at	1563509_at	MRNA; cDNA DKFZp3130229 (クローン DKFZp3130229から)	---	0.84	1.79	アップ	0.00219	13
1565484_x_at	EGFR	上皮細胞増殖因子 受容体(赤芽球性 白血病ウイルス(v-erb-b) ガン遺伝子相同体、 鳥類)	NM_005228 NM_201282 NM_201283 NM_201284	-1.23	2.35	ダウン	0.00562	14
1565599_at	1565599_at	クローン 23712 mRNA 配列	---	0.49	1.40	アップ	0.00760	15
1565717_s_at	FUS	融合(悪性脂肪肉腫に おいて(12;16)に 関与する)	NM_001010850 NM_004960	1.04	2.06	アップ	0.00375	16
1568609_s_at	FAM91A2/FLJ39 739/LOC727820	配列類似性を有する ファミリー91、メンバー A2 仮説上の FLJ39739 仮説上のタンパク質 LOC727820	NM_207400 XM_001125827 XM_934503	0.87	1.83	アップ	0.00703	17
1569003_at	TMEM49	膜貫通タンパク質 49	NM_030938	0.95	1.94	アップ	0.00769	18

アブイメトリクス プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
200709_at	FKBP1A	FK506 結合タンパク質 1A, 12kDa	NM_000801 NM_054014	0.59	1.50	アップ	0.00775	19
200739_s_at	SUMO3	mif ツー3相同体3の SMT3サブドメイン ( <i>S. cerevisiae</i> )	NM_006936	0.59	1.50	アップ	0.00711	20
200796_s_at	MCL1	骨髄系細胞白血病 配列I(BCL2- 関連)	NM_021960 NM_182763	1.32	2.50	アップ	0.00269	21
200797_s_at	MCL1	骨髄系細胞白血病 配列II(BCL2- 関連)	NM_021960 NM_182763	0.60	1.52	アップ	0.00872	22
200805_at	LMAN2	レクチン、マンノース結合性 2	NM_006816	0.72	1.64	アップ	0.00265	23
200852_x_at	GNB2	グアニヌスチレオチド 結合タンパク質(G プロテイン)、ベータ ポリペプチド2	NM_005273	0.53	1.44	アップ	0.00872	24
200904_at	HLA-E	主要組織適合 抗原、クラス I, E	NM_005516	0.66	1.58	アップ	0.00760	25
200959_at	FUS	融合(悪性脂肪肉腫 において(12;16)に 関与する)	NM_001010850 NM_004960	0.74	1.67	アップ	0.00254	26
201043_s_at	ANP32A	酸性(ロイシンに富む) 核リン酸化タンパク質 32ファミリー、メンバーA	NM_006305	0.81	1.75	アップ	0.00087	27
201090_x_at	TUBA1B	チューブリン、アルファ1b	NM_006082	0.63	1.55	アップ	0.00468	28
201440_at	DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala- Asp) ボックスポリペプチド 23	NM_004818	0.54	1.46	アップ	0.00826	29
201473_at	JUNB	jun Bタンパク質	NM_002229	0.76	1.69	アップ	0.00638	30
201531_at	ZFP36	亜鉛フィンガータンパク質 36, C3Hタイプ、相同体 (マウス)	NM_003407	0.86	1.81	アップ	0.00265	31

アフィリエイトID グループセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
201651_s_at	PACSIN2	プロテインキナーゼ C およびニューロンにおける カゼインキナーゼ基質2	NM_007229	0.68	1.60	アップ	0.00891	32
201729_s_at	KIAA0100	KIAA0100	NM_014680	0.59	1.51	アップ	0.00711	33
201861_s_at	LRRFIP1	ロイシンに富む反復(FLLI 中) 相互作用タンパク質	NM_004735	1.11	2.16	アップ	0.00222	34
201950_x_at	CAPZB	キャッピングタンパク質 (アクチンフィラメント) 筋肉Z-ライン、ベータ	NM_004930	0.70	1.62	アップ	0.00872	35
201954_at	ARPC1B/LOC653 888	アクチン関連タンパク質 2/3複合体、サブユニット 1B、41kDa アクチン関連タンパク質 2/3複合体サブユニット1B に類似(ARP2/3複合体 41kDaサブユニット) (p41-ARC)	NM_005720 XM_936251	0.68	1.60	アップ	0.00219	36
201970_s_at	NASP	核自己抗原 精子タンパク質(ヒストン 結合性)	NM_002482 NM_152298 NM_172164	0.52	1.43	アップ	0.00917	37
202150_s_at	NEDD9	神経前駆細胞 発現性、 発生の下方制御9	NM_006403 NM_182966	0.49	1.40	アップ	0.00879	38
202180_s_at	MVP	主要なゾールタンパク質	NM_005115 NM_017458	0.82	1.77	アップ	0.00703	39
202216_x_at	NFYC	核転写因子Y、ガンマ	NM_014223	0.55	1.46	アップ	0.00775	40
202423_at	MYST3	MYSTヒストン アセチルtransferase (単球性白血病)3	NM_001099412 NM_001099413 NM_006766	0.52	1.43	アップ	0.00798	41
202510_s_at	TNFAIP2	腫瘍壊死因子、 アルファ誘導プロテイン2	NM_006291	0.86	1.81	アップ	0.00465	42

アブイミトリクス プロローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO.)
202531_at	IRF1	インターフェロン調節 因子1	NM_002198	0.85	1.81	アップ	0.00998	43
202897_at	SIRPA	シグナル調節タンパク質 アルプア	NM_001040022 NM_001040023 NM_080792	0.99	1.99	アップ	0.00219	44
202910_s_at	CD97	CD97分子	NM_001025160 NM_001784 NM_078481	0.93	1.90	アップ	0.00760	45
202951_at	STK38	セリン/スレオニンキナーゼ 38	NM_007271	0.78	1.71	アップ	0.00879	46
203233_at	IL4R	インターロイキン4受容体	NM_000418 NM_001008699	0.92	1.90	アップ	0.00912	47
203239_s_at	CNOT3	CCR4-NOT 転写複合体、 サブユニット3	NM_014516	0.69	1.61	アップ	0.00857	48
203254_s_at	TLN1	タリン1	NM_006289	0.83	1.78	アップ	0.00434	49
203471_s_at	PLEK	プレクストリン	NM_002664	0.80	1.74	アップ	0.00879	50
203509_at	SORL1	ソレーリン関連受容体、 L(DLRクラス)A繰返し 含有	NM_003105	0.68	1.60	アップ	0.00652	51
203591_s_at	CSF3R	コロニー刺激因子 3受容体(顆粒球)	NM_000760 NM_156038 NM_156039 NM_172313	0.88	1.85	アップ	0.00638	52
203624_at	SFRS17A	スプライシング因子、アル ギニン/セリンに富む17A	NM_005088	0.72	1.65	アップ	0.00972	53
203748_x_at	RBMS1	RNA結合モチーフ、 単鎖 相互作用タンパク質1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.80	1.74	アップ	0.00219	54
204166_at	SBNO2	ストロベリノーチチ相同体2 (Drosophila)	NM_001100122 NM_014963	0.80	1.74	アップ	0.00314	55
204978_at	SFRS16	スプライシング因子、 アルギニン/セリンに富む16	NM_007056	0.76	1.70	アップ	0.00552	56

アフィリエイト グループセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
205220_at	GPR109B	Gタンパク質共役 受容体109B	NM_006018 XM_001134375	1.15	2.22	アップ	0.00552	57
205285_s_at	FYB	FYN 結合タンパク質 (FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	0.62	1.53	アップ	0.00872	58
205539_at	AVIL	アドヒリン	NM_006576	0.92	1.89	アップ	0.00087	59
205921_s_at	SLC6A6	溶質キャリアヤーファミリー-6 (神経伝達物質 トランスポーター、タウリン)、 メンバ-6	NM_003043	0.65	1.57	アップ	0.00756	60
206130_s_at	ASGR2	アシアロ糖タンパク質 受容体2	NM_001181 NM_080912 NM_080913 NM_080914	0.83	1.78	アップ	0.00419	61
206323_x_at	OPHN1	オリゴブレニン	NM_002547	0.57	1.48	アップ	0.00922	62
207127_s_at	HNRPH3	ヘテロ核 リボヌクレオタンパク質H3 (2H9)	NM_012207 NM_021644	0.64	1.56	アップ	0.00749	63
207266_x_at	RBMS1	RNA結合モチーフ、 単鎖 相互作用タンパク質1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.92	1.89	アップ	0.00222	64
207446_at	TLR6	トール様受容体6	NM_006068	0.78	1.72	アップ	0.00470	65
207643_s_at	TNFRSF1A	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、 メンバ-1A	NM_001065	0.77	1.71	アップ	0.00288	66
207782_s_at	PSEN1	プレセニン1 (アルツハイマー病3)	NM_000021	0.70	1.63	アップ	0.00971	67
208018_s_at	HCK	造血性細胞キナーゼ	NM_002110	0.87	1.83	アップ	0.00930	68
208120_x_at	FKSG49/LOC730 444	FKSG49仮定上の タンパク質LOC730444	XM_001125803	0.56	1.47	アップ	0.00356	69
208488_s_at	CRI	補体成分 (3b/4b)受容体1 (Knops血液型)	NM_000573 NM_000651 XM_001126036	0.78	1.72	アップ	0.00749	70
208702_x_at	APLP2	アミロイドペプター(A4) 前駆体様タンパク質2	NM_001642	0.76	1.69	アップ	0.00870	71

アプライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO.)
208772_at	ANKHD1/MASK- BP3	アンキリン反復およびKH ドメイン含有1 MASK-4E-BP3 代替リーディングフレーム 遺伝子	NM_017747 NM_017978 NM_020690 NM_024668	0.85	1.81	アップ	0.00775	72
208811_s_at	DNAJB6	DnaJ (Hsp40)相同体、 サブファミリーB、メンバー6	NM_005494 NM_058246	0.82	1.77	アップ	0.00777	73
208885_at	LCPI1	リンパ球サイトゾル タンパク質1(L-プロラスチン)	NM_002298	0.77	1.70	アップ	0.00912	74
208919_s_at	NADK	NAD キナーゼ	NM_023018	0.81	1.76	アップ	0.00872	75
208922_s_at	NXF1	核RNA輸送 因子1	NM_001081491 NM_006362	0.64	1.56	アップ	0.00703	76
209060_x_at	NCOA3	核受容体 コアアクチベーター3	NM_006534 NM_181659	0.83	1.77	アップ	0.00652	77
209083_at	CORO1A	コロニン、アクチン結合 タンパク質、1A	NM_007074	0.82	1.77	アップ	0.00760	78
209286_at	CDC42EP3	CDC42 エフェクタータンパク 質(Rho GTPase結合性)3	NM_006449	0.91	1.88	アップ	0.00222	79
209868_s_at	RBMS1	RNA結合モティーフ、 単鎖 相互作用タンパク質1	NM_002897 NM_016836 NM_016839	0.88	1.84	アップ	0.00337	80
210184_at	ITGAX	インテグリン、アルファX (補体 成分3受容体4 サブユニット)	NM_000887 XM_001127869	0.65	1.57	アップ	0.00392	81
210190_at	STX11	シンタキシン11	NM_003764	1.00	1.99	アップ	0.00684	82
210191_s_at	PHTF1	推定上のホメオドメイン 転写因子1	NM_006608	0.90	1.87	アップ	0.00972	83
210483_at	MGC31957	仮説上のタンパク質 MGC31957	---	0.59	1.51	アップ	0.00652	84

10

20

30

40

アライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
210484_s_at	MGC31957/TNF RSF10C	腫瘍壊死因子 受容体スーパーファミリー、 メンバー10c、細胞内 ドメインを有さない デユイ 仮説上のタンパク質 MGC31957	NM_003841	0.89	1.85	アップ	0.00262	85
210514_x_at	HLA-G	HLA-G 組織適合 抗原、クラスI, G	NM_002127	0.58	1.50	アップ	0.00875	86
210563_x_at	CFLAR	CASP8およびFADD様 アダプターシグナルレセプター	NM_003879	0.83	1.78	アップ	0.00722	87
210569_s_at	SIGLEC9	シアル酸結合性Ig 様レクチン9	NM_014441	0.67	1.59	アップ	0.00087	88
210686_x_at	SLC25A16	溶質輸送体ファミリー25 (ミトコンドリアキヤリヤー; グレーブス病 自己抗原)、メンバー 16	NM_152707	0.74	1.67	アップ	0.00179	89
210754_s_at	LYN	v-src-1チマダチ 肉腫ウイルス関連 ガン遺伝子相同体	NM_002350	0.71	1.64	アップ	0.00758	90
210787_s_at	CAMKK2	カルシウム/カルモジュリン 依存性プロテイン キナーゼキナーゼ2、 ペータ	NM_006549 NM_153499 NM_153500 NM_172214 NM_172215 NM_172216 NM_172226	0.62	1.54	アップ	0.00560	91
210992_x_at	FCGR2C	IgGのFcフラグメント、 低アフィニティIc、 (CD32)のための受容体	NM_001005410 NM_001005411 NM_001005412 NM_201563	0.83	1.77	アップ	0.00522	92
211058_x_at	TUBA1B	チューブリン、アルファ1b	NM_006082	0.57	1.48	アップ	0.00761	93

アライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO.)
211072_x_at	TUJBA1B	チューブリン、アルブテリ	NM_006082	0.60	1.51	アップ	0.00409	94
211251_x_at	NFYC	核転写 因子Y、ガンマ	NM_014223	0.49	1.40	アップ	0.00888	95
211395_x_at	FCGR2C	IgGのFcフラグメント、 低アフィニティIc、 (CD32)のための受容体	NM_001005410 NM_001005411 NM_001005412 NM_201563	0.84	1.79	アップ	0.00562	96
211454_x_at	FKSG49	FKSG49	---	0.75	1.69	アップ	0.00087	97
211521_s_at	PSCD4	プレクスリン相同性、 Sec7およびコイルドコイル ドメイン4	NM_013385	0.69	1.61	アップ	0.00219	98
211571_s_at	VCAN	バーシカン	NM_004385	1.47	2.77	アップ	0.00470	99
211750_x_at	TUJBA1C	チューブリン、アルブテリ	NM_032704	0.61	1.52	アップ	0.00840	100
211787_s_at	EIF4A1	真核生物翻訳 開始因子4A、 アイソフォーム1	NM_001416	0.58	1.50	アップ	0.00715	101
211794_at	FYB	FYN 結合性タンパク質 (FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	0.79	1.73	アップ	0.00711	102
211795_s_at	FYB	FYN 結合性タンパク質 (FYB-120/130)	NM_001465 NM_199335	1.02	2.03	アップ	0.00756	103
211797_s_at	NFYC	核転写 因子Y、ガンマ	NM_014223	0.81	1.76	アップ	0.00760	104
211823_s_at	PXN	パキシリン	NM_002859 XM_001132665	0.65	1.57	アップ	0.00356	105
211974_x_at	RBPJ	免疫グロブリンカンパニー 領域のための組換え シグナル結合性 タンパク質	NM_005349 NM_015874 NM_203283 NM_203284	0.70	1.63	アップ	0.00179	106

10

20

30

40

アプライメントID プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
211996_s_at	DKFZp547E087/L OC23117/LOC44 0345/LOC440353 /LOC613037/LOC 728888	KIAA0220様タンパク質 仮説上の遺伝子 LOC288846 仮説上のタンパク質 LOC440345 核孔複合体 相互作用性タンパク質 プロテインKIAA0220に 類似の偽遺伝子	NR_002555 NR_002603 XM_496136 XM_931802 XM_931808 XM_931814 XM_931818 XM_931827 XM_931837 XM_931840 XM_933834 XM_933869 XR_015786 XR_015889	0.88	1.84	アップ	0.00711	107
212036_s_at	PNN	pinn(ピニン)、デスマゾーム 関係タンパク質	NM_002687	1.34	2.53	アップ	0.00688	108
212550_at	STAT5B	シグナル伝達物質および 転写のアクチベーター 5B	NM_012448	0.66	1.58	アップ	0.00760	109
212639_x_at	TUBA1B	チューブリン、アルファ1b	NM_006082	0.65	1.56	アップ	0.00369	110
212680_x_at	PPP1R14B	タンパク質ホスファターゼ1、 調節性(インヒビター) サブユニット14B	NM_138689	0.77	1.71	アップ	0.00519	111
212708_at	MSL-1	雄性特異的 致死-1相同体	NM_001012241 XM_932082 XM_932097 XM_932107 XM_943695 XM_943702	0.80	1.74	アップ	0.00826	112
212974_at	DENND3	DENN/MADDドメイン 含有3	NM_014957	0.91	1.87	アップ	0.00564	113
213505_s_at	SFRS14	スプライシング因子、 アルギニン/セリンに富む14	NM_001017392 NM_014884	0.55	1.46	アップ	0.00998	114

アブイメトリクス プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
213596_at	CASP4	カスパーゼ4, アポトーシス 関連システイン ペプチダーゼ	NM_001225 NM_033306 NM_033307	1.00	2.00	アップ	0.00996	115
213646_x_at	TUBA1B	チューブリン, アルファ1b	NM_006082	0.63	1.55	アップ	0.00468	116
214369_s_at	RASGRP2	RASグアニル放出性 タンパク質2(カルシウム およびDAG-調節)	NM_001098670 NM_001098671 NM_005825 NM_153819	0.67	1.59	アップ	0.00703	117
215210_s_at	DLST/DLSTP	ジヒドロリポアマドS- スクニルトランス フェラーゼ(2-オキソグル タラート複合体のE2成分) ジヒドロリポアマドS- スクニルトランス フェラーゼ偽遺伝子 (2-オキソグルタラート 複合体のE2成分)	NM_001933	0.48	1.39	アップ	0.00826	118
215236_s_at	PICALM	ホスファチジルイノシトール 結合性クラスリン 集合タンパク質	NM_001008660 NM_007166	1.21	2.31	アップ	0.00869	119
215415_s_at	LYST	リソソーム輸送 レギュレーター	NM_000081 NM_001005736	0.74	1.67	アップ	0.00369	120
215646_s_at	VCAN	バニカン	NM_004385	1.39	2.61	アップ	0.00761	121
215760_s_at	SBNO2	ストロベリーノッチ 相同体2(Drosophila)	NM_001100122 NM_014963	0.80	1.74	アップ	0.00339	122
215832_x_at	PICALM	ホスファチジルイノシトール 結合性クラスリン 集合タンパク質	NM_001008660 NM_007166	0.71	1.63	アップ	0.00879	123
215990_s_at	BCL6	B細胞CLL/リンパ腫6(亜鉛 フィンガータンパク質51)	NM_001706 NM_138931	1.64	3.13	アップ	0.00439	124

10

20

30

40

アライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
216236_s_at	SLC2A14/SLC2A3	溶質輸送体ファミリー2 (促進性グルコーストランスポーター)、メンバー3 溶質輸送体ファミリー2 (促進性グルコーストランスポーター)、メンバー14	NM_006931 NM_153449	0.90	1.86	アップ	0.00959	125
216950_s_at	FCGR1A	IgGのFcフラグメント、 高親和性 <sub>1a</sub> 、受容体 (CD64)	NM_000566	1.44	2.70	アップ	0.00653	126
216985_s_at	STX3	シタキシン3	NM_004177	0.92	1.89	アップ	0.00996	127
217436_x_at	LOC730399/LOC731974	仮説上のタンパク質 LOC730399 仮説上のタンパク質 LOC731974	XR_015561 XR_015670	0.60	1.51	アップ	0.00777	128
217475_s_at	LIMK2	LIMドメインキナーゼ2	NM_001031801 NM_005569 NM_016733	0.78	1.71	アップ	0.00468	129
217507_at	SLC11A1	溶質輸送体ファミリー11 (プロトン共役二価金属 イオントランスポーター)、 メンバー1	NM_000578	1.09	2.13	アップ	0.00864	130
217728_at	S100A6	S100カルシウム結合性 タンパク質A6	NM_014624	0.84	1.79	アップ	0.00745	131
217992_s_at	EFHD2	EFハンドドメインファミリー、 メンバーD2	NM_024329	0.77	1.70	アップ	0.00879	132
218157_x_at	CDC42SE1	CDC42 小エフェクター1	NM_001038707 NM_020239	0.72	1.65	アップ	0.00591	133
218380_at	NLRP1	NLRファミリー、パイリン ドメイン含有1	NM_001033053 NM_014922 NM_033004 NM_033006 NM_033007	0.75	1.68	アップ	0.00333	134

アライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
219100_at	OBFC1	オリゴヌクレオチド/ オリゴ糖結合性折れ目 (fold)含有1	NM_024928	0.69	1.62	アップ	0.00998	135
219183_s_at	PSCD4	プレクストリン相同性、 Sec7およびコイルドコイル ドメイン4	NM_013385	0.80	1.74	アップ	0.00574	136
219394_at	PGS1	ホスファチジルグリセロ リン酸シタターゼ1	NM_024419	1.02	2.03	アップ	0.00293	137
220046_s_at	CCNL1	サイクリンL1	NM_020307	1.05	2.08	アップ	0.00919	138
220305_at	MGC3260	仮説上のタンパク質 MGC3260	NM_024030	0.97	1.96	アップ	0.00219	139
220326_s_at	FLJ10357	仮説上のタンパク質 FLJ10357	NM_018071	0.91	1.88	アップ	0.00909	140
221432_s_at	SLC25A28	溶質輸送体ファミリー-25、 メンバー-28	NM_031212	0.56	1.47	アップ	0.00671	141
221695_s_at	MAP3K2	マイトジェン活性化 プロテインキナーゼ キナーゼキナーゼ2	NM_006609 XM_001128799	0.89	1.85	アップ	0.00995	142
222244_s_at	TUG1	タウリン上方制御遺伝子 1	NR_002323	0.57	1.48	アップ	0.00711	143
222435_s_at	UBE2J1	ユビキチン結合 酵素E2, J1(UBC6 相同体、酵母)	NM_016021	0.97	1.96	アップ	0.00658	144
222955_s_at	FAM45A/FAM45 B/LOC731832	配列類似性を有する ファミリー-45、メンバー-B  配列類似性を有する ファミリー-45、メンバー-A  配列類似性を有する ファミリー-45、メンバー-A に類似	NM_018472 NM_207009 XM_001130983	0.66	1.58	アップ	0.00814	145
223009_at	C11orf59	染色体11 読み枠59	NM_017907	0.63	1.55	アップ	0.00760	146

アプライメントID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO.)
223578_x_at	PRO1073	PRO1073 プロテイン	---	0.84	1.79	アップ	0.00991	147
223591_at	RNF135	リングフィンガー タンパク質135	NM_032322 NM_197939	0.72	1.64	アップ	0.00879	148
224254_x_at	224254_x_at	---	---	0.88	1.84	アップ	0.00499	149
224566_at	TncRNA	栄養膜由来 非翻訳領域RNA	NR_002802	1.33	2.52	アップ	0.00536	150
224807_at	GRAMD1A	GRAMドメイン 含有1A	NM_020895	0.74	1.67	アップ	0.00219	151
224909_s_at	PREX1	ホスファチジル イノシトール3,4,5- 三リン酸依存性 RAC交換体1	NM_020820	0.94	1.91	アップ	0.00468	152
225673_at	MYADM	ミエロイド関連 分化マーカー	NM_001020818 NM_001020819 NM_001020820 NM_001020821 NM_138373	0.88	1.84	アップ	0.00749	153
226266_at	PGSI	ホスファチジルグリセロ リン酸シクターゼ1	NM_024419	0.91	1.88	アップ	0.00552	154
226334_s_at	AHSA2	AHA1、ヒートショック90kDa タンパク質ATPアーゼ 相同体2の アクチベーター(酵母)	NM_152392	1.01	2.01	アップ	0.00468	155
226872_at	RFX2	調節因子X、2 (HLAクラスII発現に 影響)	NM_000635 NM_134433	0.81	1.76	アップ	0.00879	156
227396_at	PTPRJ	プロテインチロシン ホスファターゼ、受容体 タイプ、J	NM_001098503 NM_002843	0.86	1.82	アップ	0.00814	157
227490_at	WDFY2	WD繰返しおよびFYVE ドメイン含有2	NM_052950	0.51	1.43	アップ	0.00342	158
227510_x_at	PRO1073	PRO1073 プロテイン	---	1.16	2.24	アップ	0.00265	159
227697_at	SOCS3	サイトカインシグナル伝達 のサブプレッサー3	NM_003955	1.12	2.18	アップ	0.00470	160

アプライトックス プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
228216_at	228216_at	転写遺伝子座	---	0.91	1.88	アップ	0.00982	161
228582_x_at	228582_x_at	転写遺伝子座	---	1.20	2.30	アップ	0.00591	162
228793_at	JMJD1C	十文字ドメイン 含有1C	NM_004241 NM_032776	1.31	2.48	アップ	0.00870	163
229120_s_at	CDC42SE1	CDC42 小エプエクター1	NM_001038707 NM_020239	0.92	1.89	アップ	0.00362	164
230735_at	230735_at	転写遺伝子座	---	0.93	1.91	アップ	0.00652	165
232555_at	232555_at	CDNA FLJ11431 fis, クローンHEMBA1001094	---	0.89	1.86	アップ	0.00362	166
233303_at	233303_at	ホモ・サピエンス、クローン IMAGE:4295366, mRNA	---	1.20	2.30	アップ	0.00872	167
234640_x_at	234640_x_at	CDNA: FLJ22614 fis, クローンHS105089	---	1.86	3.64	アップ	0.00425	168
235167_at	DKFZp547E087	仮説上の遺伝子 LOC283846	XM_496136 XM_931802 XM_931808 XM_931814 XM_931818 XM_931827 XM_931837 XM_931840	1.56	2.94	アップ	0.00326	169
236155_at	ZCCHC6	亜鉛フィンガー、CCHC ドメイン含有6	NM_024617	1.07	2.10	アップ	0.00823	170
236528_at	236528_at	転写遺伝子座	---	1.14	2.20	アップ	0.00677	171
237442_at	237442_at	---	---	1.03	2.05	アップ	0.00562	172
237544_at	237544_at	転写遺伝子座	---	1.07	2.10	アップ	0.00711	173
238320_at	TncRNA	栄養膜由来 非コードRNA	NR_002802	1.34	2.54	アップ	0.00023	174
238712_at	238712_at	転写遺伝子座	---	0.78	1.71	アップ	0.00917	175

10

20

30

40

アプライドク プローブセットID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	RefSeq アクセッション番号	log2 (倍率変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	FDR 値	代表配列 (SEQ ID NO:)
239021_at	239021_at	転写遺伝子座、 XP_530714.1と中程度類似 仮説上のタンパク質 XP_530714 [Pan trogodytes (チンパンジー)]	---	1.19	2.28	アップ	0.00891	176
240057_at	240057_at	転写遺伝子座	---	0.52	1.43	アップ	0.00703	177
241774_at	241774_at	転写遺伝子座	---	1.20	2.29	アップ	0.00891	178
242907_at	242907_at	---	---	1.16	2.23	アップ	0.00494	179
244356_at	244356_at	転写遺伝子座	---	1.17	2.25	アップ	0.00254	180
244556_at	LCP2	リンパ球細胞質 タンパク質2(76kDaの SH2ドメイン含有白血球 タンパク質)	NM_005565	0.87	1.83	アップ	0.00777	181
244752_at	ZNF438	亜鉛フィンガータンパク質438	NM_182755	0.67	1.59	アップ	0.00468	182
37028_at	PPP1R15A	プロテインホスファターゼ1、 調節性(インヒビター) サブユニット15A	NM_014330	0.52	1.43	アップ	0.00470	183

10

20

30

40

表6に示される代表的配列は、対応するプローブセットのための標的配列に言及する。標的配列は、ARおよびNRの被験体サンプルで差動的に発現されることが見出される発現された核酸マーカーの一部を含む。標的配列は全長遺伝子の配列、または発現された核酸マーカーを、たとえば、適切なデータベースでのBLAST検索で、たとえばここに説明したようなものによって得るのに用いられうる。

【0144】

本発明のゲノクスバイオマーカーに関係した生物学的経路

50

## 【0145】

大規模遺伝子発現分析法、たとえばマイクロアレイによって、相互作用（インタラクシオン）（しばしば2以上の分離の程度を有する）をもつ遺伝子のグループと一緒に発現され、そして共通の調節エレメントをもつかもしれないことを示した。そのような協調的な調節の他の例は、当技術分野で知られていて、例えば、イーストのジオーキシーのシフトを参照（DiRisiほか、1997、Science 278：680-686；アイゼンほか、1998、Proc Natl Acad Sci 95：14863-14868）。

## 【0146】

末梢血液サンプルを用いたマイクロアレイ分析法は、移植片拒絶の間に誘い出される生物学的プロセスを立証するのに用いられるかもしれないが、BCARの核酸マーカーの識別はまた、前の例でも示された。これらのマーカーは、高い交差検定特異性でサンプルを正しく分類することが示された。拒絶の間、差動的に発現される遺伝子の生物学的機能（表2）は、免疫シグナル伝達、細胞骨格再構築、およびアポトーシスに関連したプロセスの3つの主要な生物学的カテゴリーを含み、そしてサイトカインで活性化されたJak-Stat経路、インターフェロンシグナリング、およびリンパ球活性化、増殖、走化性および付着性の関与を強調する。

## 【0147】

4つの哺乳類のJakファミリーキナーゼの上方制御が、拒絶する被験体において、ならびにBCARを有する患者のSTAT3、STAT5およびSTAT6で同定された - Jakチロシンキナーゼ-Stat転写因子経路は免疫性細胞発生、増殖および機能に関与していることが知られている。急性拒絶反応は古典的には細胞障害性T細胞によって媒介される事象のものとして知られているかもしれないが、これらのデータは、Th2/STAT6プロセスもまた重要であることを証明する。インターフェロン（IFN）シグナリングに関与する遺伝子もBCARで上方制御され、インターフェロン誘導可能なグアニル酸結合タンパク質（GBP）、インターフェロン-反応因子1（IRF1）およびSTAT1を含む。2つのMHCクラスI遺伝子、HLA-EおよびHLA-Gは、免疫調節機能をもつことが知られ、そしてAR被験体で増加する。

## 【0148】

T細胞活性化および増殖はアクチンリモデリング（再建）に関係することが知られている。MHC-ペプチド/TCR関与（engagement）に関して、アクチン細胞骨格は関与の部位で束になり、そして免疫シナプスを形成するために必須であり、このバンドリング（束）は、SLP-76、およびADAP、CDC42EP、ならびにアクチンバンドリングタンパク質LCP-2のような構造タンパク質によって媒介されることが知られている。アクチン細胞骨格は、タリンおよびパキシリンのようなタンパク質を通して、インテグリン受容体複合体に対してリンクするように再建される。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、AR被験体で上方制御される。AVIL（Advillin、アドピリン）は、最も高く差動的に発現する遺伝子の1つであり、Ca<sup>2+</sup>調節されたアクチン結合タンパク質で、そしてアクチン調節タンパク質のゲルソリン/ピリンファミリーのメンバーであるとして知られるものをコードする。

## 【0149】

アポトーシス細胞死は、このデータセットで検出される別の中心テーマであり、カスパーゼ4、プレセニン1、NACHTロイシンリッチ繰返し、およびPYD含有1（NLRP1）、および腫瘍壊死因子受容体1（TNF-R1）によって表された。ANP32A（酸性核リン酸化タンパク質32ファミリー、メンバー-a）は、高度に差動的に発現された核酸マーカーであり、そしてこの遺伝子はプロアポトーシスの機能をもつと知られているタンパク質をコードし、そしてこのデータセットにおいて例示されるように、AR被験体での急性拒絶反応とリンクする。AR被験体の末梢血液サンプルで検出されるアポトーシスのサインはこのように、T細胞活性化（TNF-R1は、T細胞共受容体である）および器官から出てきた細胞の活性化によって誘導された細胞死（AICD）の組合せを表しうる。興味深いことに、SIGLEC-9（シアル酸結合Ig様レクチン9）は、最も高く差動的に発現された遺伝子の別のものであり、炎症の間に上方制御され、そしてアポトーシスの誘導を通してT細胞および他の白血球を負に調節することが知られる血中白血球上で発現される細胞接着分子をコードする。

## 【 0 1 5 0 】

CAMKK2 (カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ2、ベータ) 遺伝子の産物は、セリン/スレオニンプロテインキナーゼファミリーに属するタンパク質をコードし、そしてカルシウム媒介シグナリングで役割を果たす。6つの別個のアイソフォームをコードする7つの転写物変異体が、この遺伝子に関して同定されている。CAMKK2ベータは、遍在して発現され、そして転写因子NfκBの活性化を調節することが知られる。追加的なスプライズバリエーションが説明されているが、しかしそれらの全長の性質は決定されていない。同定されたアイソフォームは自己リン酸化を経て、他のキナーゼもリン酸化する。ヒトのCAMKK2のヌクレオチド配列は知られている (例は、GenBankアクセッション番号AB018081、CH473973)。

10

## 【 0 1 5 1 】

FKBP1A (FK506結合タンパク質1A、12kDa) 遺伝子の産物は、イムノフィリンタンパク質ファミリーのメンバーであるタンパク質をコードし、それはタンパク質折り畳みおよび輸送に関する免疫調節および基本的な細胞プロセスでの役割を果たす。ヒトのFKBP1Aのヌクレオチド配列は知られている (例は、AB241120、AB241121、AB241122、AF483488、AF483489、A1847849、AK002777、AK010693、AK019362、AK085599、AK141261、AK145400、AK145986、AK151047、AK154751、AK168333、AK169186、AK169242、AL928719、BC004671、BG074872、BY065108、CH466551、U65098、U65099、U65100、X60203)。

## 【 0 1 5 2 】

HLA-G (HLA-G組織適合抗原、クラスI、G) 遺伝子の産物は、HLAクラスIの重鎖パラログに属し、重鎖および軽鎖からなるヘテロ二量体であるタンパク質をコードする。ヒトのHLA-Gのヌクレオチド配列は知られている (例は、AB088083、AB103589)。

20

## 【 0 1 5 3 】

ITGAX (インテグリン、アルファX (補体成分3レセプター4サブユニット) 遺伝子の産物は、アルファ鎖およびベータ鎖から構成されるヘテロ二量体の内在性膜タンパク質をコードする。ヒトのITGAXのヌクレオチド配列は知られている (例は、AC124566、AF211864、A1035495、A1326085、AK089167、AK131133、AK155816、AK170432、BC042840、BC057200)。

## 【 0 1 5 4 】

JUNB (jun Bプロトオンコジーン) 遺伝子の産物はaをコードする。ヒトのJUNBのヌクレオチド配列は知られている (例は、BC053234、BX548032、EC268690)。

30

## 【 0 1 5 5 】

LIMK2 (LIMドメインキナーゼ2) 遺伝子の産物は、タンパク質のLIM-ドメイン含有ファミリーに属するタンパク質をコードする。LIMK2は、アクチン細胞骨格の調節に関与している。ヒトのLIMK2のヌクレオチド配列は知られている (例は、NC\_000022.9 NT\_011520.11)。

## 【 0 1 5 6 】

LMAN2 (レクチン、マンノース結合2) 遺伝子の産物は、小胞体およびゴルジ体でのシャペロンタンパク質および膜貫通カーゴ受容体として機能することが知られている細胞内レクチンをコードする。ヒトのLMAN2のヌクレオチド配列は知られている (例は、X76392)。

40

## 【 0 1 5 7 】

NASP (核自己抗原性精子タンパク質 (ヒストン結合)) 遺伝子の産物は、分裂細胞の核にヒストンを輸送することに関与するタンパク質をコードする。複数のアイソフォームが、この遺伝子の転写物の変異体によってコードされる。ヒトのNASPのヌクレオチド配列は知られている (例は、BC081913、CH474008)。

## 【 0 1 5 8 】

NCOA3 [核受容体コアアクチベーター (活性化補助因子) 3] 遺伝子の産物は、それらの転写活性化因子の機能を増強するために核ホルモン受容体と相互作用する核受容体活性化補助因子をコードする。ヒトNCOA3のヌクレオチド配列は知られている (例は、AF322224、B

50

C088343、CH474005)。

【0159】

NEDD9 (神経前駆細胞発現性、発生的に下方制御9) 遺伝子の産物は、細胞接着に関連したチロシンキナーゼベースのシグナリングのために中心的な調整役割を演ずるドッキングタンパク質をコードする。ヒトのNEDD9のヌクレオチド配列は知られている(例は、AC167669、AF009366、AK030985、AK033729、AK046357、AK054179、AK083374、BB458177、BC004696、BC053713、CH466546、CT025639、D10919)。

【0160】

NFYC (核転写因子Y、ガンマ) 遺伝子の産物は、三量体複合体の1つのサブユニットをコードし、いろいろな遺伝子でのプロモーター領域においてCCAATのモチーフに高い特異性で結合する高度に保存された転写因子を形成する。ヒトのNFYCのヌクレオチド配列は知られている(例は、BC045364、BC065645、BC155102、CR388024、CT027763)。

10

【0161】

PGS1 (ホスファチジルグリセロリン酸シンターゼ1) 遺伝子の産物は、ホスファチジルトランスフェラーゼであり、代謝経路に参加するタンパク質をコードする。ヒトのPGS1のヌクレオチド配列は知られている(例は、AC061992、AK024529、AK225030、AL359590、BC008903、BC015570、BC025951、BC035662、BC108732、CH471099、CR594011、CR749720、DQ892813、DQ896059)。

【0162】

RBMS1 (RNA結合モチーフ、単鎖相互作用性タンパク質1) 遺伝子の産物は、一本鎖DNA/RNAを結合するタンパク質の小さなファミリーのメンバーであるタンパク質をコードする。ヒトのRBMS1のヌクレオチド配列は知られている(例は、AB009975)。

20

【0163】

SFRS16 [スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ16] 遺伝子の産物は、たとえばmRNAプロセシングまたはRNAスプライシング等のプロセスに参加する可能性のあるタンパク質をコードする。ヒトのSFRS16のためのヌクレオチド配列は知られている(例は、AC011489、AF042800、AF 042802、AF 042803、AF 042804、AF 042805、AF 042806、AF 042807、AF 042808、AF 042809、AF 042810、AK074590、AK094681、AL080189、AY358944、BC013178、BC080554、BC131496、CH471126、CR604154)。

【0164】

SLC6A6 [溶質キャリアーファミリー8 (神経伝達物質輸送体、タウリン) メンバー6] 遺伝子の産物は、アミノ酸輸送または神経伝達物質輸送での役割をもつ可能性のあるタンパク質をコードする。ヒトのSLC6A6のヌクレオチド配列は知られている(例は、NC\_006602、NW\_876271)。

30

【0165】

TncRNA (栄養膜由来ncRNA) と名付けられた短い非コードRNAは、NEAT1の3プライムエンドから始まり、そして栄養膜でもっぱら発現される。TncRNAはCIITAの活性の抑制を通してマウスのMHCクラスII発現を抑えることが知られており、TP53 (p53) の標的である可能性があり、アポトーシスまたは細胞周期制御における関与が示唆される。ヒトのTncRNAのヌクレオチド配列は知られている(例は、AF001892、AF001893、AF080092、AF508303、AK027191、AP000769、AP000944、CR611820、CR618687、U60873)。

40

【0166】

ZNF438 (亜鉛フィンガータンパク質438) 遺伝子の産物は、亜鉛フィンガーモチーフ含有タンパク質のファミリーに属し、そして免疫グロブリンのDNA依存的な転写の調節での役割を果たすことができるタンパク質をコードする。ヒトのZNF438のヌクレオチド配列は知られている(例は、AF428258、AF440405、AK057323、AK131357、AK292730、AL359532、AL591707、AL596113、AL833056、BC101622、BC104757、CH471072、DQ356011、DQ356012)。

【0167】

PRO1073 (MALAT1、転移関連肺腺癌転写物1) 遺伝子の産物は、細胞周期進行に関与しう

50

るタンパク質をコードする。ヒトのPRO1073のヌクレオチド配列は知られている（例は、A E017126、NP\_875465）。

【0168】

プローブセット1558448\_a\_atは、アフィメトリックス（Affymetrix（商標））NetAffx（商標）アノテーション（Annotation）データベースにおいて注釈がついていないが、しかし標的配列は、NCBI Blast（ブラスト）によれば、IMAGE（イメージ）クローン5215251の一部である。IMAGEクローン5215251は特徴付けされていない。IMAGEクローン5215251のヌクレオチド配列は知られている（例は、GenBankアクセス番号BC0324515.1）。

【0169】

プローブセット208120\_x\_atはAffymetrix™ NetAffx™ Annotationデータベースで注釈がついていないが、しかし、NCBI Blastによれば、標的配列は遺伝子FKSG63の一部である。FKSG63は特徴づけられていない。FKSG63のヌクレオチド配列は知られている（例えば、GenBankアクセス番号AF338192）。

10

【0170】

Affymetrix™ NetAffx™ Annotationデータベースで注釈がついていないプローブセット237442\_isは、10番染色体上での配列を含み、遺伝子APBB1IP〔アミロイドベータ（A4）前駆体タンパク質結合ファミリーBメンバー1相互作用性タンパク質〕の一部である可能性がある核酸マーカーを同定する。APBB1IPのヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセス番号A160287.18）。

【0171】

プローブセット240057\_atはAffymetrix™ NetAffx™ Annotationデータベースで注釈がついておらず、そしてNCBI Blastによれば、ESTの一部である。ヒトのESTのヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセス番号AP000763.5）。

20

【0172】

プローブセット217436\_x\_atは、Affymetrix™ NetAffx™ Annotationデータベースにおいて「仮説上のタンパク質」をコードするとして注釈がついているが、NCBI Blastでホモサピエンスの主要組織適合遺伝子複合体、クラスI、G、mRNA（cDNAクローンIMAGE：4694038）、部分的なcdsの一部であると見出された。ヒトHLA-I、Gのヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセス番号BC020891.1）。

【0173】

FKSG49は、Affymetrix™ NetAffx™ Annotationデータベースで注釈がついていない。ヒトのFKSG49のヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセス番号AC113404.3）。

30

【0174】

FKSG49、FKSG49/LOC730444、および1558448\_a\_atの具体的な生物学的役割は未知であるが、ARサンプルでのそれらの同定および上方制御は急性拒絶反応の核酸マーカーとしてのそれらの適合性を示している。

【0175】

同種移植拒絶反応の診断のためのプロテオミクスプロファイリング

【0176】

プロテオミクスプロファイリングはまた、同種移植拒絶を診断するために使うことができる。プロテオミクスプロファイリングは、単独で、またはゲノミクス発現プロファイリングまたは代謝物質プロファイリングと組み合わせて使うことができる。

40

【0177】

一部の態様において、本発明は、被験体における、急性腎臓同種移植拒絶を含む同種移植拒絶の評価または診断の方法を提供し、それには、1)被験体からの生体試料において1または1以上のプロテオミクスマーカーの発現プロファイルを決定する段階であり、プロテオミクスマーカーは、TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4とF9によってコードされるポリペプチドを包含するグループから選ばれる、段階；2)1または1以上（

50

複数)のプロテオミクスマーカの発現プロファイルを非拒絶体プロファイルと比較する段階; および3)1または複数のプロテオミクスマーカの発現レベルがコントロールプロファイルと比較して増加しているか、または減少しているかどうか決定する段階を含み、そこで、1または複数のプロテオミクスマーカの増加または減少は急性の拒絶の状態を示す。これらのマーカはさらに、以降に詳細に説明する。

#### 【0178】

本発明はまた、本発明によって提供されるように、被験体において、急性腎臓同種移植拒絶を含む、同種移植拒絶を評価または診断する方法を提供し、それには、1) TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4、およびF9によってコードされるポリペプチドを包含するグループから選ばれる1または複数のプロテオミクスマーカの増加または減少を測定すること; および2)被験体の「拒絶の状態」を定めることを含み、ここでは、被験体の「拒絶の状態」の決定は、コントロールプロテオミクスマーカ発現プロファイルに対する被験体のプロテオミクスマーカ発現プロファイルの比較に基づく。

10

#### 【0179】

本発明の一部の態様では、1または複数のプロテオミクスマーカは、KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10およびUBR4である。

#### 【0180】

タンパク質同定と定量のための無数の方法が現在利用でき、たとえば、グリコペプチド捕獲〔Zhang (チャン)ほか、2005。Mol Cell Proteomics 4: 144-155〕、多次元的なタンパク質識別技術(Mud-PIT) Washburn (ウォッシュバーン)ほか、2001 Nature Biotechnology (19: 242-247)、そして表面強化されたレーザー脱着イオン化(SELDI-TOF)〔Hutches (ハッチズ)ほか、1993。Rapid Commun Mass Spec 7: 576-580〕である。加えて、複数のタンパク質サンプルの定量化を可能にするいくつかの同位元素の標識化(ラベルをつける)方法、例えば相対的および絶対的なタンパク質定量化のための同重体(等圧)のタグ(iTRAQ)〔Ross (ロス)ほか、2004、Mol Cell Proteomics 3: 1154-1169〕; 同位元素コード化されたアフィニティタグ(ICAT)〔Gygi (ギジ)ほか、1999、Nature Biotechnology 17: 994-999〕、同位元素コード化されたタンパク質標識化(ICPL)〔Schmidt (シュミット)ほか、2004。Proteomics (プロテオミクス) 5: 4-15〕、そしてN末端同位元素タグ付け(NIT) (Fedjaevほか、2007、Rapid Commun Mass Spectrom 21: 2671-2679; Namほか、2005。J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 826: 91-107)等は、それらの高い処理量性能、バイオマーカースクリーニング/同定研究に特に役立つ特色に適する様式を提供する。

20

30

#### 【0181】

多重の(multiplexed) iTRAQ方法論は、同種移植レシピエントでプラズマプロテオミクスマーカの同定のために使用された。iTRAQは、Ross (ロス)ら、2004 (Mol Cell Proteomics 3: 1154-1169)によって初めて記述された。手短かに言うと、被験体血しょうサンプル(コントロールと同種移植レシピエント)は、14の最も大量のタンパク質について枯渇させ、iTRAQ-MALDI-TOF/TOFによって量的に分析し、少なくとも1つのBCAR陽性およびBCAR陰性のサンプルでの460のタンパク質グループコードが同定された。144のタンパク質グループコードは、11のBCAR陽性サンプルの中から少なくとも8つにおいて、および21のコントロールの少なくとも14において検出された。表7は、18の有意なタンパク質グループのコードが特定されたことを示す。

40

#### 【0182】

このようにして、単一の候補バイオマーカーはARおよびNRの被験体を明確に区別しえないが、一緒に、KNG1、AFM、TTN、MSTP9/MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10およびUBR4を含むプロテオミクスマーカのセットは、満足な分類(63%の感度と86%の特異性)を成し遂げた。以下に、および加えた例において説明するように、タンパク質グループのコードのメンバーとして特定されたプロテオミクスマーカのアイソフォームのアミノ酸配列は知られており、そしてここに記載するアクセッション番号によって特異的に特定されうる

50

(GenBank、GenPept、IPIまたは同様の他のもの)。

【0183】

iTRAQが、ペプチドを検出するのに用いられる1つの例示的な方法である一方、ここに記述する他の方法、たとえばELISAのような免疫学的ベースの方法が役に立つ場合もある。あるいは、特異抗体を、一つ以上のタンパク質、アイソフォーム、前駆体、ポリペプチド、ペプチド、それらの一部またはその断片(フラグメント)に対して作成し、これら特異抗体を、サンプルで一つ以上のプロテオミクスマーカーの存在を見つけるのに用いる。適切なペプチドを選び、抗血清の生産のために動物(例えばマウス、ウサギまたはその他のもの)を免疫化し、モノクローナル抗体の生産のためにハイブリドーマを生産しスクリーニングする方法は、この技術で知られており、本明細書において開示する参考文献に記載されている。

10

【0184】

プロテオミクス発現プロファイリングマーカー(「プロテオミクスマーカー」)

【0185】

1またはそれより多くの前駆体、スプライスバリエーション、アイソフォームは単一の遺伝子によってコードされる。遺伝子、ならびにコードされるアイソフォーム、前駆体およびバリエーションの例は、それぞれのProtein Group Code (PGC)の下で、表7に提供する。

【0186】

TTNによってコードされるポリペプチド(タイチン、コネクチン、TMD、CMH9、CMD1G、CMPD4、EOMFC、HMERF、LGMD2J、FLJ26020、FLJ26409、FLJ32040、FLJ34413、FLJ39564、FLJ43066、DKFZp451N061)は、心臓および骨格筋の領域で発現される筋タンパク質である。TTNをコードするヌクレオチド配列は知られている(例えばGenBankアクセッション番号AC009948.3、AF321609.2、NM\_133437.2、NM\_133432.2、NM\_003319.3、NM\_133378.3、NM133379.2)。TTNのためのアミノ酸配列は知られている(例えばGenPeptアクセッション番号NP\_597676.2、NP\_596870.2、NP\_597681.2NP\_003310.3、NP\_596869.3、Q4ZG20、Q8WZ50、Q6ZP81、Q8WZ42.2)。

20

【0187】

KNG1によってコードされるポリペプチド(キニノゲン1、BDK)は、血しょうカリクレインのアセンブリーで役割をもつ可能性があり、そして選択的スプライシングによって生成する高いおよび低い分子量のアイソフォームをもつ。KNG1をコードするヌクレオチド配列は知られている(例えばGenBankアクセッション番号NM\_000893.2、NM001102416.1、AC109780.7、AI133186.1、BC060039.1)。KNG1のためのアミノ酸配列は知られている(例はGenPeptアクセッション番号NP\_000884.1、NP\_001095886.1、AAH600396.1、P01042.2、Q05CF8)。

30

【0188】

LBPにコードされるポリペプチド(リボ多糖類結合タンパク質)は、細菌感染に対する急性相免疫学的反応で役割を担う可能性がある。LBPをコードするヌクレオチド配列は知られている(例は、GenBankアクセッション番号NM\_004139.2、AF013512.1、AF106067/1、M35533.1、DQ891394.2)。LBPのためのアミノ酸配列は知られている(例えばGenPeptアクセッション番号NP\_004130.2、AAC39547.1、AAD21962.1、AAA59493.1、ABM85360.1、P18428.3、Q8TCF0)。

40

【0189】

VASNによってコードされるポリペプチド[vasorin(バソリン)]は、脈管平滑筋細胞で見出されるTGFベータ結合タンパク質である。VASNをコードするヌクレオチド配列は知られている(例えばGenBankアクセッション番号NM\_138440.2、CH471112.2、AY166584.1)。VASNのためのアミノ酸配列は知られている(例えばGenPeptアクセッション番号NP\_612449.2、EAW85311.1、Q6EMK4.1、AAO27704.1)。

【0190】

ARNTL2によってコードされるポリペプチド(アリアル炭化水素受容体核トランスロケータ様2、BMAL2、MOP9)は転写因子の基本的なヘリックス・ループ・ヘリックスファミリ

50

ーのメンバーであり、それは概日リズムを含む種々の生理学的プロセスでの役割をもつ可能性がある。ARNTL2をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_020183.3、AC068794.25、AB03992.1）。ARNTL2のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_064568.3、Q8WYA1.2、BAB01485.4）。

**【 0 1 9 1 】**

AFM〔afamin（アフアミン）、ALB2、ALBA、ALF、MGC125338、MGC125339、AFM〕によってコードされるポリペプチドは、アルブミン遺伝子ファミリーの血清輸送タンパク質である。AFMをコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_001133.2、AC108157.3、AK290556.1）。AFMのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_001124.1、BAF83245.1、P43652.1、Q4W5C5）。

10

**【 0 1 9 2 】**

MSTP9によってコードされるポリペプチドは、推定上の大食細胞刺激タンパク質（脳レスキュー因子1）、および肝細胞増殖因子様タンパク質の相同体である。MSTP9をコード化するヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号AF083416.1、AF116647.1、AY192149.1、U28055.1）。MSTP9のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号Q2TV78.2、AAP20103.12、AAC35412.1）。

**【 0 1 9 3 】**

MST1によってコードされるポリペプチド（大食細胞刺激性1、MSP、HGFL、NF15S2、D3F15S2）は、炎症性腸疾患での役割をもつ可能性がある。MST1をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM020998.3、AC099668.2、AK222893.1、M74178.1）。MST1のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_066278.3、P26928.2、Q13208、Q49A61、Q53GN8、BAD96613.1、AAA50165.1）。

20

**【 0 1 9 4 】**

PI16によってコードされるポリペプチド（ペプチダーゼインヒビター16、PSPBP、CRISP9、MSMBBP、MGC45378、DKFZp586B1817）は、前立腺の分泌タンパク質と相互作用しうる血液タンパク質である。PI16をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_153370.2、AL122034.29、AK075470.1、AK124589.1、AK302193.1、AK312785.1、BC022399.1）。PI16のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_699201.2、Q6UXB8.1、BAC11640.1、BAG35648.1、AAH22399.2）。

30

**【 0 1 9 5 】**

SERPINA5によってコードされるポリペプチド（セルピンペプチダーゼインヒビター、クレイダメンバー5、PAI3、PCI、PROCI、プロテインCインヒビター）は、活性化プロテインCの血しょうタンパク質インヒビターである。SERPINA5をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_000624.4、AF361796.1、AK096131.1、BC018915.2、U35464.1）。SERPINA5のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_000615.3、P05154.2AAB60386.1、AAH08915.1、BAG53218.1）。

**【 0 1 9 6 】**

CFDによってコードされるポリペプチド（補体因子D、アジプシン）は、ペプチダーゼのトリプシン因子のメンバーである。CFDをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_001928.2、AC112706.2、AJ313463.1、BC034529.1、BC057807.1、M84526.1）。CFDのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_001919.2、P00746.5、Q6FHW3、AAA35527.1、AAH570807.1、CAC48304.1）。

40

**【 0 1 9 7 】**

USH1Cによってコードされるポリペプチドは、アッシャータンパク質複合体のアセンブリーで機能する足場（スカフォールド）タンパク質である。USH1Cをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_005709.3、NM\_15367

50

6.3、kAC124799.5、AB006955.1、AF039699.1、AK000936.1、BK000147.1)。USH1Cのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_005700.2、NP\_710142.1、AAC18049.1、BAG62565.1、DAA00086.1、Q7RTU8、Q9H758、Q9Y6N9.3）。

【0198】

C2によってコードされるポリペプチド（補体成分2、C2、DKFZp779M0311）は、古典的な補体経路での役割をもつ血清グリコプロテインである。C2をコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_000063.4、NM\_001145903.1、AF019413.1、AK096258.1、BC029781.1、BX537504.1、M26301.1、X04481.1）。C2のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_000054.2、NP\_001139375.1、AAA35604.1、CAA28169.1、CAD97767.1）。

10

【0199】

MBL2によってコードされるポリペプチド（マンノース結合性レクチン2、MBL、MBP、MBP1、COLEC1、HSMBPC、MGC116832、MGC116833）は、血清で見出される可溶性マンノース結合性レクチンである。MBL2をコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_000242.2、AB025350.1、AF360991.1、BC096181.2）。MBL2のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_000233.1、BAB17020.1、AAK52907.1、AAH96182.3、P11226.2、Q5SQS3、Q9HCS8）。

【0200】

SERPINA10によってコードされるポリペプチド（セルピンペプチダーゼインヒビタークレイドAメンバー（ember）10、ZPI、PDI）は、活性化された凝固因子XおよびXIを抑制するセルピンである。SERPINA10をコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_001100607.1、NM\_016186.2、CH471061.1、AF181467.1、BC022261.1、CR606434.1）。SERPINA10のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_001094077.1、NP\_057270.1、EAW81564.1、AAD53962.1、CAD62339.1、Q9UK55.1）。

20

【0201】

LCATによってコードされるポリペプチド（レシチン-コレステロールアセチルトランスフェラーゼ）は、細胞外コレステロールエステル化酵素であり、コレステロール輸送に影響を及ぼす。LCATをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_000229.1、AC040162.5、BC014781.1、X06537.1）。LCATのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_000299.1、P04180.1、Q53XQ3、Q9Y5N3、AAH14781.1、CAB56610.1）。

30

【0202】

B2Mによってコードされるポリペプチド（ $\beta$ -2-ミクログロブリン）は、大部分の有核細胞の表面上で主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス1重鎖に関連して見出される血清タンパク質である。B2Mをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_004048、BU658737.1、BC032589.1とA1686916.1）。B2Mのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号P61769、AAA51811、CAA23830）。

【0203】

SHBGによってコードされるポリペプチド（性ホルモン結合グロブリン、アンドロゲン-結合タンパク質、ABP、テストステロン結合性 $\beta$ -グロブリン、TEBG）は、性ステロイドを結合する血しょうグリコプロテインである。SHBGをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号AK302603.1、NM\_001040.2）。SHBGのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号P04728.2、CAA34400.1、NP001031.2）。

40

【0204】

C1Sによってコードされるポリペプチド（補体成分1、Sサブコンポーネント）は、セリンプロテアーゼおよびヒトの補体C1の成分である。C1Sをコードしているヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_001734.3、NM\_201442.2、AB009

50

076.1、AK025309.1、J04080.1、M18767.1)。C1Sのためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_001725.1、NP\_958850.1、BAA86864.1、AAA51852.1、AAA51853.1）。

【0205】

UBR4によってコードされるポリペプチド〔ユビキチンタンパク質リガーゼD3成分n-recognin（リコグニン）4、p600；ZUBR1；RBAF600；FLJ41863；KIAA0462；KIAA1307；RP5-1126H10.1〕は、若干の腫瘍ウイルスと関係した足場非依存性（anchorage-independent）増殖の調節での役割をもちうる。UBR4をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_020765.2、AL137127.7、AA748129.1、AB007931.1、BC096758.1）。UBR4のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_065816.2、CAI19268.1、BAA32307.1、AAH96758.1、Q5T4S7.1、Q6ZUC7、Q96HY5）。

10

【0206】

F9にコードされるポリペプチド（凝固第XI因子）は、活性チモージェンとして血液で見出されるビタミンK依存的な凝固因子である。F9をコードするヌクレオチド配列は知られている（例えばGenBankアクセッション番号NM\_000133.3、A01819.1、AB186358.1、A13997.1、M11390.1）。F9のためのアミノ酸配列は知られている（例えばGenPeptアクセッション番号NP\_1000124.1、CAA00205.1、BAD89383.1、P00740.2、Q14316、CAA01140.1、AAA52023.1）。

【0207】

表7およびその中で提供されるIPIアクセッション番号はさらに、示されたタンパク質グループコードのメンバーの特定のアイソフォームのアミノ酸配列情報を得ることができるデータベースの記録を示す。

20

【0208】

発現データの大きな量の解釈は、たとえば、iTRAQタンパク質またはプロテオミクス実験から得られるが、組織的特徴をハイライトするようにデータを編成するように設計されたアルゴリズムと統計ツールを用いることにより大いに容易にされる。視覚化ツールも、たとえば、色の様々な強さと色によって区別的な発現を意味するために価値がある。利用可能なアルゴリズムと統計ツールは、アレイと結果として生じるデータセットの複雑さの増加と共に、また、処理の速度、コンピュータメモリの増加、およびそれらのコストの相対的な減少を伴って、洗練されてきている。

30

【0209】

タンパク質またはポリペプチド発現プロファイルの数学的および統計分析は、いくつかのものを成し遂げうる - それらは、経路または生体系のドメインで協調的な調節を示す遺伝子のグループの識別、2つ以上の生体試料との類似点と違いの識別、被験体における特定のイベントまたはプロセスを区別する遺伝子発現プロファイルの特徴の識別などである。これには、治療法または治療法における変更の有効性を評価すること、特定の病態の発症をモニターまたは検出すること、2つの臨床的に類似した（またはほとんど同一の）病態間を区別することなどが含まれうる。

【0210】

そのような抗体、ならびに「チップ」またはアレイ上でのそれらの包含と同様に、またはアッセイにおいて、そのような抗体を選び、製造するための方法とそのようなチップ、アレイまたはアッセイを用いる方法はここに参照され、または言及される。

40

【0211】

他の態様

【0212】

核酸プロファイリングはまた、代謝物質（「メタボロミクス」）またはプロテオミクスプロファイリングとの組合せで使われうる。被験体のゲノムでの軽微な変化、例えば、単一のヌクレオチド変化もしくは多形、またはゲノムの発現（例えば示差的遺伝子発現）は、被験体の小分子代謝物質プロファイルにおいて急速な反応を招く場合がある。小分子代謝物質は、環境変化に迅速に反応し、有意な代謝物質変化が秒から分までの環境変化内で

50

明白になりうるが、対照的に、タンパク質または遺伝子の発現の変化は、明白になるために、数時間あるいは数日かかりうる。臨床学的変数のリストは、たとえば、コレステロール、ホモシステイン、ブドウ糖、尿酸、マロンジアルデヒドおよびケトン体を含む。小分子代謝物質の他の非限定的な例は表3にリストされる。

【0213】

(表3) 被験体集団から得られた血清サンプルのNMRスペクトルで同定および定量化された代謝物質

化合物名	
グルコース	乳酸塩
グルタミン	アラニン
グリシン	プロリン
グリセロール	バリン
タウリン	リジン
クエン酸塩	セリン
ロイシン	オルニチン
クレアチニン	チロシン
フェニルアラニン	ピルビン酸塩
ヒスチジン	カルニチン
グルタミン酸塩	酢酸塩
イソロイシン	アスパラギン
ベタイン	3-ヒドロキシ酪酸塩
クレアチン	プロピレングリコール
2-ヒドロキシ酪酸塩	ギ酸塩
メチオニン	コリン
アセトン	

10

20

【0214】

種々技術と方法を、被験体の代謝物質プロファイルを得るために使うことができる。試料調製の詳細は、用いる方法によって、また、関心対象の代謝物質について、異なりうる - たとえば、脂質、脂肪酸および他の一般に十分に水溶性でない分子の代謝物質プロファイルを得ることは、残渣の有機溶剤での抽出ならびに/または乾燥および再可溶化の一つ以上のステップを含むかもしれないが、サンプルにおけるアミノ酸および小さくて通常は水溶性である分子の代謝物質プロファイルを得ることは、2~10kDaの低分子量カットオフでサンプルのろ過を含みうる。マーカーを検出および/または定量化するいくつかの例示的な方法がここに示される一方、他は当業者に知られていて、この出願で記述される方法と用途ですぐに使用可能である。

30

【0215】

被験体の代謝物質プロファイルを得るのに用いられうる(単独に又は組合わせでどちらでも)技術と方法のいくつかの例は、核磁気共鳴(NMR)、ガスクロマトグラフィー(GC)、質量分析と組み合わせたガスクロマトグラフィー(GC-MS)、質量分析、フーリエ変換MS(FT-MS)、高速液体クロマトグラフィーまたはその種の他のものを含むが、これに限定されるものではない。たとえば、試料調製のための例示的な方法と代謝物質プロファイルを得るための技術はHuman Metabolome Projectのウェブサイトで見つけることができる[Wishart(ウィシャート)DSほか、2007。Nucleic Acids Research 35:D521-6]。

40

【0216】

当業者に知られている代謝物質プロファイリングに役立つそのような方法の一般原則を述べている標準的な参照文献は、たとえば、Handbook of Pharmaceutical Biotechnology、[SC Gad(ガド)編] John Wiley & Sons, Inc.(ジョン・ワイリー社)、Hoboken(ホーボーケ)、NJ、(2007)、Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology [R BertholfとR. Winecker(編)] ジョン・ワイリー社、ホーボーケ、NJ、(2007)

50

、H. Friebolinによる、Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy、ワイリー-VCH第4版(2005)を含む。

【0217】

本発明の方法へのアクセスは、たとえば個々のマーカーテストを実行している臨床検査室または他のテスト施設によってエンドユーザーに提供されうる - 生体試料は個々のテストと分析が実行される施設に提供され、そして予測的方法が適用される；あるいは、医学的業務者が臨床検査室からマーカー値を受け取り、ローカルな履行またはインターネットベースの履行を用いて本発明の予測的方法にアクセスすることができる。

【0218】

キット

10

【0219】

本発明はまた、被験体の拒絶の状態を評価または診断するためのキットを提供する。キットは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、SFRS16、1558448\_a\_at、CAMKK2、NFYC、NCOA3、LMAN2、PGS1、NEDD9、237442\_at、FKSG49/LOC730444、LIMK2、UNB、NASP、PRO1073、240057\_at、ITGAX、LOC730399/LOC731974、FKBP1A、HLA-G、RBMS1とSLC6A6が包含されるグループから選ばれる1以上の核酸マーカーの特異的で定量的な検出のために試薬を、そのような試薬の使用および結果として生じるデータを分析する方法のための指示とともに含むことができる。一部の態様において、核酸マーカーは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073とITGAXである。キットは、被験体の拒絶の状態を予測または診断するために、単独で使うことができ、あるいはそれは、臨床学的変数を測定する他の方法または適切であると考えられうる他のアッセイと併せて使うことができる。キットは、たとえば、マーカーに選択的にハイブリダイズすることができる標識化オリゴヌクレオチドを含むことができる。キットは、たとえば、マーカーの領域を増幅するために(例は、PCRによって)使用可能なオリゴヌクレオチドを更に含むことができる。非拒絶カットオフインデックスを被験体の拒絶の状態の予測または診断に提供するために、キット結果を他のアッセイのものと結合するのに役に立つ指示または他の情報を提供することもできる。

20

【0220】

本発明はまた核酸アレイを提供する。アレイは二次元アレイであってよく、少なくとも10の異なる核酸分子(例えば、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも100、または少なくとも200の異なる核酸分子)を含むことができる。各核酸分子は、ハイブリダイゼーションによって核酸マーカーを特異的に識別するのに十分な任意の長さをもつことができる。たとえば、各核酸分子は、長さで10~250ヌクレオチドの間(例えば、12~200、14~175、15~150、16~125、18~100、20~75、または25~50ヌクレオチドの間、またはその間の任意の量)でありうる。たとえば、ここに提供するアレイの核酸分子は、表2で提示される核酸マーカーの1または1以上をハイブリダイゼーションし、特異的に識別する配列を含むことができる。そのような配列の例は、配列番号1~183を含む。

30

【0221】

本発明はまた、被験体の拒絶の状態を評価または診断するためのキットを提供する。キットは、TTN、KNG1、LBP、VASN、ARNTL2、AFM、MSTP9、MST1、PI16、SERPINA5、CFD、USH1C、C2、MBL2、SERPINA10、C9、LCAT、B2M、SHBG、C1S、UBR4とF9が包含されるグループから選ばれる1以上のプロテオミクスマーカーの特異的な、そして定量的な検出のために試薬を、そのような試薬および結果として生じるデータを分析する方法の使用のための指示とともに含むことができる。一部の態様において、1または複数のプロテオミクスマーカーは、KNG1、AFM、TTN、MSTP9、MST1、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、F9とUBR4である。たとえば、キットは、プロテオミクスマーカーに特異的な抗体またはその断片(一次抗体)を、検出可能なラベルを組み込むことができる1以上の二次抗体とともに含んでよく、そのような抗体が、ELISAのようなアッセイにおいて使われうる。あるいはまた、抗体またはその断片は、固形の表面、例えば、抗体アレイに固定することができる。キットは、被験体の拒絶の状態を予測または診断するために単独で使うことができ、あるいはそれは

40

50

臨床学的変数を測定する他の方法または適切であると考えられうる他のアッセイと併せて使うことができる。非拒絶カットオフインデックスを被験体の拒絶の状態の予測または診断に提供するために、キットの結果を他のアッセイのものと結合するのに役立つ指示または他の情報を提供することもできる。

【0222】

本発明はまた、プログラム可能なプロセッサに同種移植を拒絶しているかどうかを判定させるための指示とともに構成されるコンピュータで読取り可能な記憶媒体を提供する。同種移植が拒否されているかどうか（被験体の拒絶状態）を決定する方法をここに説明し、そしてプロセッサは、信号（例えば、光放出、強さの変化または蛍光の頻度、またはその種の他のもの、サンプル中に存在する核酸またはプロテオミクスマーカの相対的な量を表す）を受け、そしてコントロールと比較して核酸またはプロテオミクスマーカのレベルを評価し、そしてレベルが増加または減少しているかどうかを決定するための指示を含む。プロセッサはさらに、示された核酸またはプロテオミクスのマーカの増加および/または減少のパターンを解釈し、そして被験体の拒絶状態についての情報をユーザー（たとえば医者）に提供するための指示を備えることができる。検出された信号からベースラインのノイズまたは他の常態でない信号を除去するための指示および情報がまた含まれうる。指示はコンピュータで読取り可能な記憶媒体上に提供することができ、コンピュータシステムと通信するために、高水準な手続き型の、またはオブジェクト指向のプログラミング言語で実行されうる。あるいはまた、そのような指示は、アセンブリーまたは機械言語で実行することができる。言語はさらにコンパイラ型言語またはインタープリタ型言語であってよい。

10

20

【0223】

核酸検出信号は機器（例えば、チップまたはアレイ読み取り装置）を使って得ることができ、そして組織拒絶の決定は別のプロセッサ（例えば、コンピュータ）を使って行うことができる。あるいはまた、プログラム可能なプロセッサをもつ単一の機器が、これらおよび/または他の機能を組み合わせることができ、そして検出信号を得、そして被験体の拒絶状態の決定を生じさせるために信号を処理することができる。処理のステップ（工程）は、検出信号を集めるステップと同時（例えば、「リアルタイム」）に実行することができる。

【0224】

そのような抗体を選択および製造するための、ならびに「チップ」もしくはアレイ上、またはアッセイにおける、それらの包含のための方法、そしてそのようなチップ、アレイまたはアッセイを用いる方法は、ここに参照または言及されている。

30

【0225】

方法

被験体および標本

【0226】

この研究のすべての被験体は、St. Paul's Hospital（セントポール病院）またはVancouver General Hospital（バンクーバー総合病院）、Vancouver（バンクーバー）、UBC、Canada（カナダ国）で2005～2007年の間に腎臓移植を受け、および適切な同意が得られた。免疫抑制は、主にタクロリムスおよび/またはプレドニゾロンと併せたミコフェノール酸モフェチル（MMF）に基づいた。被験体の年齢、性、民族性および原疾患は、以下の、表4にまとめる。全血はPAXgene<sup>TM</sup>（PAX遺伝子）（商標）チューブを用い、移植前（ベースライン）および移植後0.5、1、2、3、4、8、12、および26週、6ヵ月おきに3年目まで、そして拒絶が疑われた時に採取した。尿サンプルは、同じ時点について得られた。PAXgene<sup>TM</sup>全血サンプルはまた、移植患者から代表的な年齢および性を使って病気のない、コントロール被験体の一団から採取された。すべてのサンプルを分析のための選択まで-80 に保存した。33の被験体がゲノムマーカー研究に含まれ、そしてこれらの33のうちの32がプロテオミクスマーカー研究に含められた。

40

【0227】

50

(表4) 腎臓移植被験体の人口統計学

	ARを有する 被験体 (n=11)	ARを有しない 被験体 (n=22)
平均年齢(標準偏差)	41.85 (11.98)	48.97 (10.57)
性別(n, %男性)	8 (72.73%)	14 (63.64%)
民族性(n,%)		
コーカサス人種	9 (81.82%)	15 (68.18%)
北米インディアン	1 (9.09%)	2 (9.09%)
アジア人	0 (0%)	2 (9.09%)
インディアン亜大陸	1 (9.09%)	2 (9.09%)
その他	0 (0%)	1 (4.55%)
原疾患(n, %)		
慢性腎不全、原因不明	4 (36.36%)	2 (9.09%)
皮質または尿細管壊死	1 (9.09%)	1 (4.55%)
タイプII関係糖尿病性腎症	1 (9.09%)	1 (4.55%)
巣状糸球体硬化症-成体	3 (27.27%)	4 (18.18%)
多嚢胞腎、成体型(優性)	0 (0%)	5 (22.73%)
IgA腎症(免疫蛍光によって証明された)	2 (18.18%)	1 (4.55%)
その他	0 (0%)	8 (36.36%)
ドナー		
生存	3 (27.3%)	8 (38.1%)
死亡	8 (72.7%)	13 (61.9%)

10

20

30

40

50

## 【0228】

すべての腎臓移植被験体の臨床データを検討した。サンプルを、急性拒絶反応、境界拒絶、または有意な併存症（感染、病気再発、または他の併存症のイベント）がなかった非拒絶の被験体から選んだ。均質な表現型を確実にし、そしてこの分析のために生物学的な可変性を最小にするために、患者を、それらが75歳未満である場合、資格があると考え、移植の前に免疫抑制を受けず、移植前免疫学的脱感作を受けず、死亡または非HLA同一の生きたドナーからの腎臓移植を受け、陰性のAHG-CDC抗ドナーT細胞クロスマッチをもち、ATGまたはOKT3での枯渇性抗体誘導療法（depleting antibody induction therapy）を受けず、経口投薬を受けることができ、即座の移植片機能をもち、そして感染、病気再発および他の主要な併存症のイベントの臨床または研究的証拠をもたなかった。生検は、バンフ（Banff）基準を使って診断し、記録された（Solezほか、2008 Am J Transplant 8:753; 表1）。この研究のための一団は、最初の週以内の11の急性拒絶反応（AR）被験体、および最初の週以内の22の非拒絶（NR）被験体からなった（生検で確認された急性拒絶反応、BCAR）。すべてのNR被験体について、データを第1、2、3、4週およびベースライン（BL）で利用できた。1人のAR被験体はベースラインサンプルをもち、そして3人の被験体はそれぞれ、第1、2および4週のサンプルをもち、そしていくつかの被験体には、第8および12週の追加的な時点についてのデータがあった。2人のAR患者は、3日目に拒絶があった。分析のために、これらの拒絶は、第1週グループで考えられた。20の健康な個体からの20の正常なサンプルを、正常なものについての結果を算出するために含める。このようにして、分析は53個体からのサンプルを含み、そのうちの33個は、3ヶ月の移植後期間の間に異なる時点のサンプルを提供した患者であった。

## 【0229】

研究は、移植後最初の3ヶ月の間にBCARを伴うか、または伴わない被験体において異なる遺伝子発現を比較するために閉じた一団のケース-コントロールの設計を採用した。移植後最初の12週の間診断されるBCAR（ケース）を伴う患者は、観察の同期間の間に臨床上のまたはBCAR（コントロール）の証拠をもたなかったものと、1:2で合った。すべての

拒絶エピソードは、慣習的な臨床上の、および研究上のパラメータによって診断され、生検によって確かめられ、そして腎臓同種移植病理学の実用分類のためのバンフ基準に従って等級付けた。バンフカテゴリ-2および4（抗体媒介または急性/活性な細胞性拒絶）を有意であると見なした。境界線上の変化を有する被験体（カテゴリ-3）は、別々に分析した。すべてのベースラインの個体群統計学および引き続いてのデータは移植プログラム電子データベースで記録され、そしてフォローアップにとっての損失は調査の期間の間にはなかった。

#### 【0230】

免疫抑制：免疫抑制は、0および4日目に、タクロリムス0.075mg/kgのb.i.dとミコフェノラート1000mgのb.i.dとともに、20mgのi.v.でのバシリキシマブからなった。薬物濃度は、タンデム（直列型）質量分析で測定し、タクロリムス用量は、移植後最初の月の間の8~12ng/mL、2ヵ月めの間の6~9ng/ml、そしてその後4~8ng/mlの12時間トラフレベル（12-hour trough level）を成し遂げるように調整された。最初の移植および非感作被験体は、移植の日にメチルプレドニゾン125mgのivを、および1日目に1mg/kgの経口プレドニゾン、そして移植後3日目でゼロまで減少するように受けた。第2の、またはその後の移植片のレシピエントには、プレドニゾン用量はゆっくりと段階的に、3ヵ月後の隔日10mgの維持量にまで減少させた。拒絶エピソードは、3~5日間、毎日メチルプレドニゾン500mgのi.v.で処理した。ステロイド耐性拒絶は、7~10日間毎日OKT3 5mgのi.v.またはALG 15mg/kgのi.v.で処置した。

#### 【0231】

血しょう（プラズマ）収集および枯渇：予定の時点および拒絶が疑われる時に採取した移植レシピエントからの全血サンプル、ならびに、相当する年齢および性の正常な無病コントロールからの同様の血液サンプルを、EDTAチューブに引き入れ、処理の前に氷上に保存した。血しょうを分離して、2時間以内の間-80 で保存し、それから分析のために選ばれるまで液体窒素へ移しておいた。血しょうサンプルは、それから室温に解凍され、pH 7.6の10mMのリン酸塩緩衝化塩類溶液（PBS）で5倍希釈し、スピン-X遠心分離チューブフィルタでろ過した。希釈された血しょうは、14の最も大量の血しょうタンパク質：HAS、IgG、フィブリノゲン、トランスフェリン、IgA、IgM、ハプトグロビン、2-マクログロブリン、1-酸グリコプロテイン、1-アンチトリプシン、アポリポプロテイン（Apolipoprotein）I、Apolipoprotein-II、補体C3および低密度リポタンパク質（主にApolipoprotein B）を除去することができる5mLのトリ抗体アフィニティカラム（Genway Biotech；サンディエゴ、CA）上に、325  $\mu$ Lサンプルループを介して注入した。通過画分を収集し、TCAを10%の終濃度まで加えることによって沈殿を起こさせ、16~18時間4 でインキュベートした。タンパク質沈殿物を1時間4 の3200gで遠心分離によって回収し、氷冷アセトンで3回洗い（EMD；Gibbstown、NJ）、そして45：45：10の飽和尿素（J.T.ベーカー；Phillipsburg、NJ）、0.05MのTEABバッファ（シグマアルドリッチ；セントルイス、MO）、そして、0.2%のSDS（シグマアルドリッチ；セントルイス、MO）からなる200~300  $\mu$ LのiTRAQバッファで再水和させた（re-hydrated）。各々のサンプルは、それから-80 で保存した。

#### 【0232】

##### RNA抽出およびマイクロアレイ分析

RNA抽出は、全RNAを分離するためにPAXgene（商標）Blood RNAキット〔カタログ#762134〕を使用して解凍された検体に対して行われた。4~10  $\mu$ gのRNAが2.5mlの全血から通常分離され、そしてRNAの質をAgilent BioAnalyzerを使うことで確かめた。1.5  $\mu$ gのRNA、RIN（RNA integrity number）>5およびA240/A280>1.9を有するサンプルをドライアイス上でパックし、Affymetrixマイクロアレイ分析のためにMicroarray Core（MAC）研究所、Children's Hospital、ロサンゼルス、CAにオーバーナイトクーリエによって出荷した。マイクロアレイ分析は、CAP/CLIA公認のMAC研究所で、単一の技術者によって行われた。発生期の（nascent）RNAが、二重鎖cDNA合成のために使われた。cDNAは次いでAffymetrix cDNA Synthesis Kit〔Affymetrix Inc.（アフィメトリクス社）、Santa Clara、CA〕を用いて標識化し、断片化し、ハイブリダイゼーションカクテルと混合し、GeneChip Human

Genome U133 Plus 2.0アレイ上へハイブリダイズさせた。アレイは、プールされた正常な全血からの内部RNAコントロールを有する48のバッチで、Affymetrixシステムを用いてスキャンされた。マイクロアレイは、アフィメトリクスのバージョン1.16.0およびaffyPLMのバージョン1.14.0 BioConductorパッケージを使用して品質の問題についてチェックした〔Bolstad, B. (ボルスタット、B.)、Low Level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization. 2004、カリフォルニア大学バークレー校; Irizarryほか、2003. Biostatistics 4(2):249-64〕。より一層低い品質を有するアレイは、同じ時点からの異なるRNAアリコートを用いて繰り返された。Affymetrix™ NetAffx™ AnnotationデータベースUpdate Release 25 (2008年3月)が、マイクロアレイ結果の識別と分析のために使われた。

10

### 【0233】

#### 遺伝子発現分析

マイクロアレイ分析は、54,000のプローブセットを伴い、サンプルにつき1つのCelファイルを生じ、それは38,500を超えるよく立証されたヒト遺伝子からの47,000を超える転写物および変異体を分析する。すべてのCelファイルは、最終的な分析の前に前処理された。前処理ステップは以下の通りであった：(1)遺伝子チップ結果の品質管理、(2)背景強度の調整、(3)一緒にすべてのデータの正常化、(4)プローブレベルデータのプローブセット強度値への要約、および(5)サンプルにわたって十分に高い強度を示さなかったプローブセットを除去するためのプローブセットのフィルタリング。

### 【0234】

品質管理は、Affyのバージョン1.16.0とaffyPLMのバージョン1.14.0のBioConductorパッケージを使用して問題(issue)を使い実行した。低い品質を有するサンプルを繰り返した。CelファイルはRMA正規化し(ボルスタットほか、Bioinformatics、2003. 19(2):p. 185-93)、およびAffy BioConductorパッケージ、バージョン1.16.0(ボルスタット、2004、前記)を用いてlog<sub>2</sub>変換した。生(raw)の発現フィルタは、416の試料の少なくとも3つにおいて、2<sup>6</sup>=64の信号強度を有する21,771のプローブセットを残した。フィルタリングステップは次いで、正規化において使われた全体の416のサンプル上で少なくとも3つのサンプルにおいて少なくとも6のlog<sub>2</sub>発現値を有するプローブセットを含むのに用いた。前処理工程において含まれるサンプルの全体的な数は416であり、これらのうちの33は移植被験体からのものであり、これらのサンプルは最終的な分析に使われた。

20

30

### 【0235】

トリプシン消化およびiTRAQラベリング：総タンパク質濃度はピシンコニン酸アッセイ(分析評価)(BCA)(シグマアルドリッチ、セントルイス、MO USA)を使って決定し、そして各々のサンプルから100 μgの総タンパク質を得た。各サンプルを次いで、-20 °Cで100容量のHPLC級のアセトンの追加によって沈殿させ(シグマアルドリッチ、Seelze、ドイツ)、そして-20 °Cで16~18時間インキュベートした。タンパク質沈殿物を10分間16,110gでの遠心分離によって回収し、50mMのTEAB(シグマアルドリッチ;セントルイス、MO)、そして0.2%の電気泳動級のSDS(Fisher Scientific;Fair Lawn,NJ)のバッファで溶解した。各々のサンプルでのタンパク質は、3.3mMでTCEPで還元し(シグマアルドリッチ;セントルイス(MO))、60分間の60 °Cでインキュベートした。システインを、6.7mM最終濃度でメチルメタンチオスルホナートでブロックし、そして10分間の室温でインキュベートした。

40

### 【0236】

還元させ、およびブロックしたサンプルは、次いで配列決定等級の修飾されたトリプシン(プロメガ;マディソン、WI)で消化し、そして16~18時間37 °Cでインキュベートした。トリプシン消化されたペプチドサンプルは、次に急速減圧で乾燥し(Thermo Savant;ホルブルック、NY)、そしてメーカーのプロトコルに従ってiTRAQ試薬でラベル化した(アプライドバイオシステム;フォスターシティ、CA)。ラベルをつけられたサンプルはプールされ、濃縮リン酸でpH 2.5~3.0に酸性化された(ACP Chemicals Inc;モントリオール、QC、カナダ)。

50

## 【0237】

2D-LCクロマトグラフィー：iTRAQラベル化ペプチドは、VISION（ビジョン）ワークステーション（アプライドバイオシステム；フォスターシティー、CA）上で300の孔を有する5 $\mu$ mビーズを詰めた4.6mmの内径（ID）および長さ100mmのポリスルホエチル（Polysulphoethyl）Aカラム（PolyLC社、コロンビア、MD USA）を使う強い陽イオン交換クロマトグラフィー（SCX）を用いて分離した。使われる移動相は、10mMの第一リン酸カリウム（シグマアルドリッチ；セントルイス、MO）および25%のアセトニトリル（EMD Chemicals；Gibbstown、NJ）pH 2.7から構成されるバッファA、ならびに0.5Mの塩化カリウム（シグマアルドリッチ・セントルイス、MO、USA）の追加を除いてAと同じバッファBであった。500 $\mu$ Lのフラクションは、2つの線形プロファイルに分けられる80分の勾配上に集められ：1) バッファBの5%から35%までによる0~30分、および2) バッファBの35%から100%までによる30~80分である。UV痕跡によって見つけられるほとんどのペプチドを有する20から30までのフラクションを選び、そしてそれらの容量を、ナノ逆相クロマトグラフィーについての調製において150 $\mu$ Lに減少させた。ペプチドは、C18 PepMapガードカラム（300 $\mu$ m ID $\times$ 5mm、5 $\mu$ m、100、LC Packings、アムステルダム）上に画分を負荷し、水/アセトニトリル/TFA98：2：0.1（v/v）からなる移動相Aで50 $\mu$ L/分で15分間洗うことによって脱塩された。捕捉カラムをそれから、ペプチドが高解像度クロマトグラフィーのためにMagic C18 ナノLCカラム（15cm、5 $\mu$ m孔サイズ、100、Michrom Bioresources社、オーバーンCA、USA）上に負荷される200nL/分にて、ナノフローストリームに変えた。ペプチドは、以下の勾配によって抽出された：5%から15%までのB（アセトニトリル/水/TFA98：2：0.1（v/v））による0~45分；15%から40%までのBを用い45~100分、および40%から75%までのBを用いる100~105分。溶離剤を、MALDI ABI 4800プレート上に、Probotマイクロフラクションコレクター（LC Packings、アムステルダム、オランダ）を使用して直接スポットした。50% ACN、0.1% TFA中の3mg/mLの $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（シグマアルドリッチ、セントルイス、MO USA）のマトリックス溶液を、次いでスポットにつき0.75 $\mu$ Lで加えた。

10

20

## 【0238】

プロテオミクス方法論：プロテオミクス分析は、iTRAQ-MALDI-TOF/TOF方法論を使って実行した。多重化iTRAQ技術の能力は、実験的なラン（稼動）につき4つのサンプルの同時処理を可能にする。異なる実験的なランにわたる解釈可能な結果を確実にするために、参照サンプルを、すべてのiTRAQのランにおいて3つの患者サンプルと共に処理した。参照サンプルは16名の健康な個体からの血しょうのプールからなり、一貫してiTRAQ試薬114でラベル化した。患者サンプルは、試薬115、116および117の間でランダムにラベル化した。各iTRAQのランは、参照サンプルと比較して3つの患者サンプルのタンパク質の識別および定量化を可能にした。

30

## 【0239】

質量分析およびデータ処理：各実験について、ペプチドをMALDIプレート上へスポットし、4800 MALDI TOF/TOFアナライザーで分析し（アプライド・バイオシステム；フォスターシティー、CA）、4000シリーズ・エクスペローラ・バージョン3.5ソフトウェアを使用して制御した。質量分析計は、1keVのMS/MS衝突エネルギーで、正イオンモードでセットした。最高1400のショット/スペクトルを各MS/MSランごとに集め、35から40時間までにわたる全体の質量時間（mass time）が生じた。ペプチド識別と定量は、統合Paragon（パラゴン）<sup>TM</sup>サーチアルゴリズム（アプライド・バイオシステム）とPro Group（プロ・グループ）<sup>TM</sup>アルゴリズムを用いProteinPilot（プロテインパイロット）<sup>TM</sup>ソフトウェアv2.0（アプライド・バイオシステム/MDS Sciex、フォスターシティー、CA USA）によって行った。データベース検索は、サンプル中に存在するポリペプチドを識別するために、International Protein Index（インターナショナル・プロテイン・インデックス）（IPI HUMAN v3.39）に対して実行した〔Kersey（カージー）ほか、2004。プロテオミクス4：1985-8〕。前駆体耐性を150ppmにセットし、そしてiTRAQ断片寛容性を0.2Daにセットした。識別パラメーターは、尿素変性と生物学的修飾に対するIDフォーカスにセットした特別な因子と共に、トリプシン開裂、MMTSによるシステインアルキル化にセットした。検出タンパク

40

50

質の閾値は85%の信頼区間でセットした。

【0240】

Pro Group<sup>TM</sup>アルゴリズム (アプライド・バイオシステム) は、Paragon<sup>TM</sup>Algorithmからペプチドの証拠を、サンプルにおけるタンパク質の包括的な概要へと組み立てた。各々のiTRAQランからの特定されたタンパク質のセットは、重複を避けるために、タンパク質グループに組織化した。相対的なタンパク質レベル (それぞれ、114と比較してラベル115、116と117のレベル) は、対応するペプチド比率を用いるProtein Pilotによって、各タンパク質について個々のペプチドのログ比率の加重平均に基づいてタンパク質グループごとに推定した。各ログ比率の重さはError Factor (誤り要因)、定量におけるエラーの推定の逆数で、プログループアルゴリズムによって計算される。これらの重みつき平均を次いで、線形空間に再度変換し、プログループアルゴリズムにおいてAuto Bias (オートバイアス) コレクションのオプションを用いた実験的な偏りについて修正した。次の場合から起こるペプチド比率は、対応する平均タンパク質比率の計算から除外される。すなわち、共有ペプチド (すなわち、同じペプチド配列が、1よりも多いタンパク質によって請求される)、前駆体重複を有するペプチド (すなわち、特定されたペプチドを産生するスペクトルが、異なるタンパク質によっても請求されるが、無関係なペプチド配列を有する)、低い信頼性を有するペプチド (すなわち、ペプチドID信頼性 < 1.0%)、iTRAQ修飾をもたないペプチド、特定された試薬対の1つのメンバーだけを有するペプチド、およびピーク対の全てについて信号対雑音比の合計が9未満であるペプチド比率である。すべての (非ブランクの) ペプチド比率が0または9999であるとき (試薬対の1つのメンバーだけが特定されたことを示す)、対応するタンパク質のための平均比率は0または9999として示される。これらに関するさらなる情報および各々のタンパク質に割り当てられる他の定量的尺度およびバイアス訂正は、ProteinPilot Softwareドキュメンテーションにおいて与えられる。

10

20

【0241】

iTRAQ実験での各々のタンパク質グループが1よりも多くの特定されたタンパク質からなることがあるが、3つのiTRAQ比率の単一のセットが、特定されたペプチドのその対応するリストに基づく全体のグループに指定された。Protein Group Code Algorithm (PGCA) と呼ばれるインハウス (in-house) アルゴリズムが、すべてのiTRAQ実験にわたるタンパク質グループをリンクするために採用された。PGCAは、識別コードを各iTRAQラン内のすべてのタンパク質グループへ、および共通のコードを類似したタンパク質グループへ割り当てる。後者のコードは、タンパク質グループコード (PGC) と呼ばれ、次いで異なるiTRAQランにわたるタンパク質にマッチするのに用いられた。このプロセスは、すべての実験的なランにわたる関連したタンパク質およびタンパク質ファミリーのために共通の識別子の命名を確実にする。

30

【0242】

統計分析

【0243】

マイクロアレイ実験のための統計分析は、SASバージョン9.1、Rバージョン2.6.1およびBioConductorバージョン2.1を使って実行した [Gentleman, R., ほか, Genome Biology (ゲノム生物学), 2004, 5: p. R80]。Affy BioConductorパッケージで利用できるように、ローバスタなマルチアレイアベレージ (Multi-array Average (RMA)) (上記ボルスタット, 2003) の技術がバックグラウンド修正、正規化および要約のために使われた。雑音最小化が次いで実行され、少なくとも3つのサンプルにわたり一貫して50より少ない発現値を有するプローブセットがノイズ (雑音) と考えられ、そして更なる分析から除かれた。残りのプローブセットは、3つの異なる中程度のT-テストを使って分析された。方法の2つは、eBayesと組み合わせられたMicroarrayデータ (limma) BioConductorパッケージ-ローバスタ適合、およびeBayesと組み合わせられた最小二乗適合のために、Linear Modelsで利用できる。第3の統計分析法は、Statistical Analysis of Microarrays (SAM) であり、同じBioConductorパッケージで利用できる。遺伝子は、それが、すべての3つの方法での

40

50

間違った発見率 (FDR)  $< 0.01$  をもつ場合、統計的に有意であると考えられた [Smyth (スマイス)、G.、Limma: linear models for microarray data, in Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor、R. Gentleman、ほか、編者。2005、Springer: ニューヨーク]。倍率変化および最大のFDR値 [3つの方法から最も高いFDR] は、表2で提示される。

#### 【0244】

核酸マーカーは、統計的に有意なプローブセット上で前進選択 (forward selection) を用いる Stepwise Discriminant Analysis (SDA) を適用することによって特定した。線形判別分析 (LDA) は、最適な診断品質を有するマーカーの最小限の、または小さなサブセットを生じさせるために「分類子マーカー」としてバイオマーカーパネルを訓練およびテストするのに用いられた。分類子構築の全プロセスの11倍のクロスバリデーション (相互検証) は、バイオマーカーパネルに基づく主要な分類子の性能を評価するのに用いた。サンプルは、11の互いに素なセットにランダムに分けられ、各々は、BCARを有する被験体および有さない2人の被験体からの1つのサンプルからなり、全体的な調査の1対2 (one-to-two) の分布を反映する。11の互いに素なセットの各々のために、新しい分類子を、主要な分類子と同様に構築し: 差動的に発現したプローブセットのリストの識別は、3つの中程度の t 検定に基づき、次いで前進選択の判別分析が続いた。11の分類子の各々の分類の正確さ (感度および特異性) は次に、各々の分割 (fold) で抜き出される3つのサンプルに基づいて測定された。主要な分類子のための感度および特異性は、11倍のクロスバリデーションサンプルにわたり性能を平均することによって推定した。

#### 【0245】

プロテオミクスのための統計分析: 差動的な相対レベルの時間評価にて1つのタンパク質を、ローバストの中程度の t 検定を使って [経験上の Bayes (ベイズ)、eBayes; スマイスほか、2004 Stat Appl Genet Mol Biol 3: Article 3]、各々の分析されたグループ内の少なくとも3分の2で、PGCAによって割り当てられたタンパク質グループコードを用いて検出された一組のタンパク質の上で、実行した。eBayesアプローチを使うことは、調査でのサンプルサイズが少ないとき、人工的な低いサンプルの分散推定によって生じる偽陽性の数を減少させる。そのうえ、そのローバストのバージョンは、より一層少ない分析的重さ (analytical weight) を統計的アウトライヤー (異常値) であるタンパク質レベルに割り当てる。これは、手順を、古典的な、非ローバストなテストよりも、データの大半からそれる観察に対してあまり感受性でないものとする。BCAR陽性と陰性の間で著しく異なる (すなわち、 $p$  値  $< 0.05$  を有する) 平均相対濃度 (プールのコントロールのレベルと比較して) を有するタンパク質グループコードが、潜在的なマーカーとして特定された。

#### 【0246】

プロテオミクスバイオマーカーパネルタンパク質を、次いで潜在的マーカーの特定されたリストに基づき前進選択の段階的な判別分析 (SDA) を使って決定した。SDAアルゴリズムは、潜在的マーカーのリストから一回に1つのタンパク質グループコードを組み込む。第一のステップで、それはリーブワンアウト (leave-one-out) のクロスバリデーションに基づきサンプルを最も良好に分類するタンパク質グループコードを特定する。2回目のステップでは、それが、先に特定されたコードと一緒に、リーブワンアウトのクロスバリデーションにおいてサンプルを最も良好に分類する第2のタンパク質グループコードを特定する。すべてのタンパク質グループコードが順番に組み込まれるまで、または  $(n-2)$  ステップが実行されるまで ( $n$  は利用可能なサンプルの数)、この手順を繰り返す。プロテオミクスバイオマーカーパネルは、SDAアルゴリズムによって選ばれる最初の  $k$  タンパク質グループコードによって規定され、ここで、 $k=k_0+k_m$  は最大のクロスバリデーション精度が初めて達成される ( $k_0$ ) ステップ、そして  $k_m$  のさらなるステップのために維持される。各クロスバリデーションで、サンプル分類は、0.5に設定される各グループについて事前確率 (prior probabilities) を用いる線形判別分析 (LDA) を使って実行する。LDAにおいて、患者サンプル (群) および/またはプールされたコントロールにおいて未検出の各タンパク質についての相対的な濃度を、各々のグループ (BCAR陽性および陰性) での残り

のトレーニングサンプルから算出される平均的相対濃度を使って帰属させた。

【0247】

インターナルバリデーション（プロテオミクスデータ）：統計的バリデーションは、バイオマーカーパネル選定の全体のプロセスのリーブワンアウトのクロスバリデーションによって実行された。より一層詳しくは、リーブワンアウトのクロスバリデーションの各々のステップで、1つのサンプルが分類（テストセット）について抜き出され、そして残りのサンプルが分類子（トレーニングセット）を造るのに用いられる。全体のバイオマーカーの選定プロセスが次いで、トレーニングセットに関して実行され、すなわち、SDAによってバイオマーカーパネル選定を通して各グループにおいてサンプルの少なくとも2/3で検出されるタンパク質グループコードの選定からである。結果として生じるプロテオミクスバイオマーカーパネルに基づく分類子は、LDAを使って造られ、そしてテストセット上でテストされる（上記で説明するように、事前の（priors）、および失われた（missing）値が処理された）。すべてのサンプルがテストセットとして一度使われるまで、このプロセスは繰り返される。全体的な特異性および感度は、各々のランの分類精度に基づいて推定される。すべての統計的分析は、Rバージョン2.7.0（統計コンピューティングのためのRプロジェクト）を使って履行された。

10

【0248】

技術的なバリデーション：9つのプロテオミクスバイオマーカーのパネルからの2つのタンパク質は、商業上利用可能なキットを使用し、メーカーの指示に従って酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）（ELISA）によってバリデーションのために選ばれた：肝細胞増殖因子様タンパク質相同体（R&D DHG00）およびE3ユビキチンタンパク質リガーゼUBR4（DiaPharma-DPGR032A）。

20

【0249】

本発明は、以下の実施例においてさらに例示する。しかし、これらの実施例は、例示の目的のためだけのものであり、いかなる方法によってでも本発明の範囲を制限するのに用いられてはならないことを理解すべきである。

【実施例】

【0250】

実施例1：臨床的に診断するバイオマーカーの比較

【0251】

合計33名の被験体をこの調査に含め、移植の最初の週以内の急性拒絶反応を伴う11名の患者、および移植に次いで少なくとも6ヵ月の間拒絶反応がなかった22名の患者を含む。33名の移植された患者は、腎移植に続いて3ヵ月臨床的に安定していた。160の遺伝子を表す合計183のプローブセットが、ARとNR被験体の間で統計学的に著しく、そして一貫して差動的に発現されると見出された（表2）。プローブセットが代表するシーケンスは、図10に示される。非拒絶患者からのサンプルとは別に、移植の後の最初の週以内の急性拒絶反応による被験体からのサンプルを集めた。

30

【0252】

表5にリストする核酸マーカーのパネルを使ってテスト被験体を分類することによって、被験体を拒絶者（AR）または非拒絶者（NR）に分けた（図1A～C）。

40

【0253】

比較として、臨床パラメータだけを使う一組の被験体の独立した分類は、ARとNRの被験体の分離を可能にしたが、2つのグループ間の境界は図1A～Cで例示される被験体のセットのために示されるほど明白でなく、それは、AR被験体とNR被験体の何らかの重複が観察されたからである（図2）。

【0254】

（表5）急性グラフ（graph）拒絶反応に関係する主要分類子（24個の核酸マーカー）

アフィメトリクス プローブセット ID	遺伝子記号	遺伝子タイトル	log2 (倍率 変化)	倍率 変化	方向 (AR 対 NR)	SEQ ID NO:
238320_at	++TncRNA	栄養膜由来 非コードRNA	1.34	2.54	アップ	150
211454_x _at	++FKSG49	FKSG49	0.75	1.69	アップ	69
244752_at	++ZNF438	亜鉛フィンガータンパク質438	0.67	1.59	アップ	182
204978_at	SFRS16	スプライシング因子、 アルギニン/セリンに富む16	0.76	1.70	アップ	56
1558448_ a_at	++1558448_a _at	CDNA FLJ35687 fis, クローン SPLEN2019349	0.79	1.73	アップ	12
210787_s _at	++CAMKK2	カルシウム/カルモジュリン 依存性プロテイン キナーゼキナーゼ2、ベータ	0.62	1.54	アップ	91
211251_x _at	NFYC	核転写 因子Y、ガンマ	0.49	1.40	アップ	40
209060_x _at	NCOA3	核受容体 コアクチベーター3	0.83	1.77	アップ	77
200805_at	++LMAN2	レクチン、マンノース結合性 2	0.72	1.64	アップ	23
226266_at	PGS1	ホスファチジルグリセロリン酸 シンターゼ1	0.91	1.88	アップ	137
202150_s _at	NEDD9	神経前駆細胞 発現、 発生的下方 制御9	0.49	1.40	アップ	38
237442_at	++237442_at	---	1.03	2.05	アップ	172
208120_x _at	++FKSG49/LO C730444	FKSG49 仮説上の タンパク質 LOC730444	0.56	1.47	アップ	69
217475_s _at	LIMK2	LIMドメインキナーゼ2	0.78	1.71	アップ	129
201473_at	++JUNB	jun B プロトオンコジーン	0.76	1.69	アップ	30
201970_s _at	NASP	核自己抗原 精子タンパク質 (ヒストン結合性)	0.52	1.43	アップ	37
227510_x _at	++PRO1073	PRO1073 プロテイン	1.16	2.24	アップ	147
240057_at	240057_at	転写遺伝子座	0.52	1.43	アップ	177
210184_at	++ITGAX	インテグリン、アルファX (補体成分3受容体4 サブユニット)	0.65	1.57	アップ	81
217436_x _at	LOC730399/L OC731974	仮説上のタンパク質 LOC730399 仮説上のタンパク質 LOC731974	0.60	1.51	アップ	128
200709_at	FKBP1A	FK506 結合性タンパク質 1A, 12kDa	0.59	1.50	アップ	19
210514_x _at	HLA-G	HLA-G 組織適合性 抗原、クラスI, G	0.58	1.50	アップ	86
203748_x _at	RBMS1	RNA結合性モチーフ、 単鎖 相互作用性タンパク質1	0.80	1.74	アップ	54
205921_s _at	SLC6A6	溶質輸送体ファミリー6 (神経伝達物質 トランスポーター、タウリン)、 メンバー6	0.65	1.57	アップ	60

10

20

30

40

++サンプル外性能 (out-of-sample performance) を評価するために交差検定プロセスに

50

において同定された11のプローブセットの交差

【0255】

実施例2:

【0256】

被験体：観察の期間の間に腎臓移植を受けた305の被験体のうち、27(8.9%)は、移植後最初の3ヵ月の間に1aのパンフ等級を有するBCARを発症した一方、更なる24(7.9%)には、境界線上の変化だけをもった。生検に関する等級1aの拒絶を有する合計11/27(40.74%)の被験体(範囲:3~10日、平均:6日)は、即座の移植片機能および感染症または他の交絡する(confounding)併存症事象をの不存在によるケース選択基準を満たし、境界線上の変化を生検に関して有する5/24(20.83%)の被験体(範囲:5~7日、平均:6日)もそうであった。即座の移植片機能をもつ更なる22の被験体は、移植の後の少なくとも6ヵ月間、臨床的でないもの、またはBCARがなく、そして交絡する臨床的な併存症事象もなく、適合するコントロールとして選ばれ、および20名の正常なコントロールの被験体はコンパレータグループとして働いた。人口統計学の詳細は表4に示す。移植片機能は移植後最初の週にBCARのケースにおいてかなり劣っていた( $27 \pm 10$ 対 $42 \pm 13$ ml/分/ $1.73M^2$ 、 $P=0.004$ )が、3ヶ月目までには双方のケースおよびコントロールにおいて同等であり( $48 \pm 11$ 対 $51 \pm 8$ ml/分/ $1.73M^2$ 、 $P=0.359$ )、そして観察の12ヵ月の間を通して、良好な同種移植機能で臨床的に安定なままであった(12ヶ月目で $54 \pm 13$ 対 $53 \pm 15$ ml/分/ $1.73M^2$ 、 $P=0.859$ )。

10

【0257】

マイクロアレイ発現：末梢血液サンプルは、BCARを急性拒絶反応のための生検の時点で有するケースの各々から、そしてそれぞれのケースと同一の時点でのBCARを伴わないそれぞれのコントロールから選ばれ、そして正常なコンパレータからのサンプルと比較した。FDR<0.01でのBCARを伴うか、または伴わない患者からのサンプルのマイクロアレイ分析は、LIMMAを使って差動的に表された合計239のプローブセット、ローバストのLIMMAで575のプローブセット、およびSAMを用いて2677のプローブセットを特定した。3つの方法の交わりは、すべての3つの分析法に関して症例(BCAR)とコントロール(BCARでない)の間で差動的に発現された183のプローブセットのより一層制限されたセットを見出した。183の著しく差動的に発現されたプローブセットのうち、182はBCARを有する被験体において過剰発現し、一方1つ(上皮細胞増殖因子受容体EGFRをコードする1565484\_x\_at)は過小発現した(図3)。

20

30

【0258】

これらのプローブセットに基づく監視されていない(unsupervised)双方向階層的クラスター分析および主成分分析は、正常な被験体、BCARを有する患者およびBCARを有さないもの間で別個の分離を示した。主成分分析(図4)は被験体グループの分離を例示し(A、R、NRとN)、そしてすべてのグループの中心軌跡(centroid)が明らかに分けられることを示している。境界線上の変化を有する被験体からのサンプルが導入されたとき、それらは、BCARを有するおよび有さないこれらの症例とコントロールの間で不均一に分布した。およそ160の遺伝子を表す183の差動的に発現されたプローブセットに包含される生物学的プロセスを図5に示す。プローブセットが共有された重なり合うネットワークの組合せは、免疫反応、シグナル伝達、および細胞骨格再構築に関連したプロセスの関係を意味する3つの主要な生物学的カテゴリーを同定した。遺伝子-遺伝子およびタンパク質-タンパク質のネットワークの分析[Ekins(エキンズ)ほか、2007。Methods Mol Biol 356:319-50]は、サイトカインで活性化されたJak-Stat経路、インターフェロンシグナリング、リンパ球活性化、増殖、走化性、およびアポトーシスが183の差動的に発現されたプローブセット中に顕著に現れたことを明らかにした。

40

【0259】

分類子の選定：多くの遺伝子がBCARと高度に関係したが、共直線性はすべてがこのイベントのために分類子を開発するのに必要であるというわけではないことを意味した。前進選択判別分析はしたがって、最初に立証された183の差動的に発現されたプローブセット

50

のうちからより一層簡素な分類子からなる線形判別関数を同定するために採用された。この分類子、およびそれらのそれぞれの遺伝子の範囲内で特定される主要な24のプロープセットは表5で示される。

【0260】

実施例3：核酸バイオマーカーのクロスバリデーション

【0261】

同じ還元的なプロセスを用いる全体の遺伝子セットを、この分類子のローバストネス（頑丈さ）を強化し、サンプル外の（out-of-sample）性能を推定するために採用した。このプロセスによって生産される11の核酸マーカーセットのリストは、103のプロープセットの平均を含み、そしてもともとの183のプロープセットのうち、最も著しく差動的に発現するものが6つ（TncRNA、FKSG49、AVIL、SIGLEC9、ANP32A、SLC25A16）が各リストで存在した。前進選択（Forward selection）の判別分析は、87のプロープセットの一群（union）を有する11の分類子のグループを同定した。表5に表すこれら11のプロープセットは、最初の24のプロープセット分類子の範囲内に含まれた。クロスバリデーションは、BCARを伴うまたは伴わないサンプルの同定について73%の全体的な平均感受性および91%の特異性を与えた。

10

【0262】

最終的な11のプロープセット（核酸マーカー）分類子の性能を図6に示す。11の核酸マーカーのセットは、TncRNA、FKSG49、ZNF438、1558448\_a\_at、CAMKK2、LMAN2、237442\_at、FKSG49/LOC730444、JUNB、PRO1073とITGAXを含んだ。

20

【0263】

診断の正確さは、連続したプロープセットの添加とともに急速に改善し（図6A）、そして完全な11のプロープセット分類子のための線形判別スコアは、BCARを伴うおよび伴わないサンプルのはっきりした分離を示した（図6B）。最後に、移植後最初の3ヵ月にわたる縦のモニタリングは、BCAR時に分類子スコアの著しい増加を示し（ $p=0.001$ ）、その後、拒絶エピソードの処置および解消の後、ベースライン値へ復帰した。BCARを経験しなかった被験体においては比較可能な増加は起こらず、そしてこれらのカーブ間の有意差が移植後他のどの時間にもなかった（図6C）。

【0264】

11のクロスバリデーション分析は、ARのための72.7%（感度）およびNRのための90.9%（特異性）の平均予測精度を示し（表6）、表5で提示されリストされる24のバイオマーカーのパネルの予測精度の推定である。表5での「++」の指定は、サンプル外性能を推定するためにクロスバリデーションプロセスにて特定される11のプロープセットの交わるセットでの核酸マーカーを示す。

30

【0265】

（表6）核酸マーカーの交差検定の感受性および特異性結果

	感受性	特異性
分割 1	100%	100%
分割 2	0%	100%
分割 3	100%	100%
分割 4	100%	100%
分割 5	100%	100%
分割 6	100%	100%
分割 7	100%	100%
分割 8	100%	100%
分割 9	0%	100%
分割 10	100%	50%
分割 11	0%	50%

10

## 【 0 2 6 6 】

実施例4：プロテオミクスバイオマーカーの同定およびバリデーション

20

## 【 0 2 6 7 】

合計305の被験体は、観察期間の間に腎臓移植を受け、それらのうち27名（8.8%）は移植後最初の3ヵ月の間のBCAR 1aを発症した。これらの中の11は、ケース選定規準を満たし、即座の移植片機能を伴い、移植後最初の4週以内（範囲：3～10日、平均：6日）にBCAR 1aであり、そして感染症またはその他の交絡させる併存症の事象を伴わなかった。合計32の移植被験体に関し、即座の移植片機能をもつ更なる21の被験体が、移植後の少なくとも6ヵ月間に臨床的またはBCARを伴わず、そして交絡させる臨床的な併存症の事象がなく、コントロールとして選択された。BCARの発生率を除き、すべての患者は、良好な同種移植機能を観察の12ヵ月の期間を通して有し、臨床的に安定であった。さらに6つのBCAR陰性サンプルがインターナル（内部）のバリデーションのために選択され、BCARを伴わない3人の患者から一つずつ、そして新しい患者からの3つを発見調査に含めた。

30

## 【 0 2 6 8 】

免疫親和性クロマトグラフィー（Genway Biotech；サンディエゴ、CA）による14の最も大量のタンパク質〔アルブミン、フィブリノゲン、トランスフェリン（transferin）、IgG、IgA、IgM、ハプトグロビン、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、 $\alpha$ 1-酸性グリコプロテイン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、アポリポプロテイン（Apolipoprotein）I、Apolipoprotein-II、補体C3およびApolipoprotein B〕の減少の後、全体のタンパク質量の5%未満が残った。残留するタンパク質は、配列決定等級の修飾されたトリプシン（プロメガ；マディソン、WI）でトリプシン消化され、そしてiTRAQ試薬を用い、メーカー（アプライドバイオシステム；フォスターシティ、CA）のプロトコルにより、ラベル化し、そして腎臓急性拒絶反応の血しょうプロテオミクスマーカーを同定するために調べた。合計460のタンパク質グループコードが、少なくとも1つのBCAR陽性のサンプルおよび1つのBCAR陰性サンプルで特定され、そして、それらの間で、144のタンパク質グループコードが、11のBCAR陽性のサンプル中少なくとも8つで、そして21のコントロール中少なくとも14で検出され、そして、グループにつき3分の2の選定規準をパスした。ローバステBayesによる144のタンパク質グループコードの分析は、その濃度が2つのグループの間で著しく異なった（ $p < 0.05$ ）合計18のタンパク質グループコードを特定した（図7）。18の重要なタンパク質グループコードのための結果は、表7に示す。

40

## 【 0 2 6 9 】

前進選択の段階的判別分析（SDA）は、プロテオミクスバイオマーカーパネルを構成す

50

る9つのタンパク質グループコードのサブセットを特定した(表7の青太字体)。BCARを伴わない患者と比較して伴う患者において、バイオマーカーパネルPGCsのうちの7つは上方制御され(TTN、MSTP9、PI16、C2、MBL2、SERPINA10、UBR4)、そして2つは下方制御された(KNG1およびAFM)。図8は、前進選択の各ステップでタンパク質グループコードによって成し遂げられる限界(marginal)分類性能を図示する。x軸は、前のステップにおいて選ばれるタンパク質グループコードに加わるために各ステップで選ばれるタンパク質グループコードを示す。y軸は、各々連続し、より一層大きなパネルによって成し遂げられる分類精度を示す。タンパク質グループコードがパネルに加えられるにしたがって、予測精度の限界増加は急速に安定し、そして3つのタンパク質さえ最大精度を成し遂げるのに十分であった(図8)。

10

【0270】

(表7)異なる相対濃度をp値<0.05にて有する血しょうタンパク質。カラムAR対NRにおいて同定されたタンパク質群は、血しょうプロテオミクスバイオマーカーパネルを構成する。カラム“PGC”はPGCAによって指定されたコードを含む。各群におけるすべてのタンパク質のアクセッション番号およびタンパク質名、対応する遺伝子、ローバスト(robust)-eBayes検定によって算出されたp-値、倍率変化およびそれらの方向(上方または下方制御)をBCAR陽性において陰性に対して、残りのカラムにおいて与える。

アクセッション#	PGC	遺伝子記号	タンパク質名	P-値	Adj. P-値	倍率変化	AR対NR
IPI00759754.1	**111	TTN	タイチンのアイソフォーム1	0.00003	0.0045	1.21	アップ*
IPI00749039.2		TTN	タイチンアイソフォームN2-A				
IPI00179357.2		TTN	タイチンのアイソフォーム7				
IPI00023283.3		TTN	タイチンのアイソフォーム2				
IPI00759542.1		TTN	タイチンのアイソフォーム8				
IPI00759637.1		TTN	タイチンのアイソフォーム4				
IPI00759613.1		TTN	タイチンのアイソフォーム5				
IPI00375499.2		TTN	タイチンアイソフォームnovex-2				
IPI00375498.2		TTN	タイチンアイソフォームnovex-1				
IPI00455173.4		TTN	タイチンのアイソフォーム3				
IPI00412307.8		TTN	2268 kDaタンパク質				
IPI00436021.3	TTN	タイチン(フラグメント)					
IPI00884109.1		-	細胞性タイチンアイソフォームPEVK変異体3(フラグメント)				
IPI00789376.1	**18	KNG1	KNG1プロテイン	0.00149	0.1108	1.18	ダウン
IPI00797833.3		KNG1	キニノーゲン1				
IPI00032328.2		KNG1	キニノーゲン1前駆体のアイソフォームHMW				
IPI00215894.1		KNG1	キニノーゲン1前駆体のアイソフォームLMW				
IPI00032311.4	108	LBP	リポ多糖結合性タンパク質前駆体	0.00641	0.2024	1.22	アップ

20

30

40

IPI00395488.2		VASN	バソリン前駆体					
IPI00827866.1		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム7					
IPI00142781.3		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム1					
IPI00163662.3		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム2					
IPI00465306.3	222	ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム5	0.00666	0.2024	1.14	アップ	10
IPI00788724.2		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム6					
IPI00789255.2		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム3					20
IPI00795339.2		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム4					
IPI00827897.1		ARNTL2	アリアル炭化水素受容体 核トランスロケーター様 タンパク質2の アイソフォーム8					
IPI00019943.1	**23	AFM	アフアミン前駆体	0.00679	0.2024	1.29	ダウン	
IPI00873854.1		MSTP9	64 kDa タンパク質					30
IPI00292218.4		MST1	肝細胞増殖因子 様タンパク質前駆体					
IPI00384647.1	**224	MST1	肝細胞増殖因子 様タンパク質相同体	0.00863	0.2143	1.09	アップ	
IPI00718805.1		MSTP9	脳レスキュー因子1					
IPI00816378.1		-	21 kDa タンパク質					
IPI00847702.2		MST1	14 kDa タンパク質					
IPI00301143.5	**135	PI16	ペプチダーゼインヒビター16 前駆体のアイソフォーム1	0.01286	0.2738	1.25	アップ	
IPI00845506.1		PI16	ペプチダーゼインヒビター16 前駆体のアイソフォーム2					
IPI00007221.1	97	SERPIN A5	血しょうセリンプロテアーゼ インヒビター前駆体	0.01925	0.2870	1.22	ダウン	40

IPI00165972.3		CFD	補体因子D ブレブプロタンパク質					
	104		Harmonin(ハーモニン) (アッシュヤー症候群 タイプ1Cタンパク質) (自己免疫性の腸疾患 関連抗原AIE-75) (抗原NY-CO-38/NY-CO-37) (PDZ-73タンパク質)(腎臓 ガン抗原NY- REN-3)。アイソフォーム3	0.02044	0.2870	1.43	アップ	
IPI00218195.3		USH1C	ハーモニンアイソフォームb3					10
IPI00412105.2		USH1C	ハーモニンのアイソフォーム4					
IPI00478105.4		USH1C	ハーモニンのアイソフォーム3					
IPI00478519.3		USH1C	29 kDa タンパク質					
IPI00790818.1		USH1C	60 kDa タンパク質					
IPI00872537.1		USH1C						
IPI00303963.1	**38	C2	補体C2前駆体 (フラグメント)	0.01939	0.2870	1.09	アップ	
IPI00643506.3		C2	補体成分2					
IPI00004373.1	**116	MBL2	マンノース結合性プロテイン C前駆体	0.02119	0.2870	1.3678	アップ	
IPI00007199.4	**125	SERPIN A10	プロテインZ依存性 プロテアーゼインヒビター 前駆体	0.02335	0.2899	1.2317	アップ	20
IPI00022395.1	26	C9	補体成分 C9前駆体	0.02917	0.2962	1.1321	アップ	
IPI00022331.1	230	LCAT	ホスファチジルコリン- ステロールアシルトランス フェラーゼ前駆体	0.03031	0.2962	1.1822	ダウン	
IPI00868938.1		-	ベータ2ミクログロブリン					
IPI00796379.1	103	B2M	B2Mタンパク質	0.03179	0.2962	1.2735	アップ	
IPI00004656.2		B2M	ベータ2ミクログロブリン					
IPI00219583.1	69	SHBG	性ホルモン結合性グロブリン 前駆体の アイソフォーム2	0.03180	0.2962	1.1924	ダウン	30
IPI00023019.1		SHBG	性ホルモン結合性グロブリン 前駆体の アイソフォーム1					
IPI00749179.2		C1S	特徴付けられていない タンパク質C1S					
IPI00017696.1	29	C1S	補体C1s サブコンポーネント前駆体	0.04030	0.3532	1.0817	アップ	
IPI00385294.2		C1S	推定上の特徴付けられて いないタンパク質 DKFZp686M10257					
IPI00791987.1		C1S	17 kDa タンパク質					40
IPI00877989.1		C1S	タンパク質					
IPI00878772.1		C1S	19 kDa タンパク質					

IPI00843999.2		UBR4	E3ユビキチンタンパク質リガ ーゼUBR4のアイソフォーム1				
IPI00640981.3		UBR4	E3ユビキチンタンパク質リガ ーゼUBR4のアイソフォーム4				
IPI00296176.2		F9	凝固因子IX 前駆体				
IPI00180305.7	**100	UBR4	E3ユビキチンタンパク質リガ ーゼUBR4のアイソフォーム5	0.04317	0.3574	1.0943	アップ
IPI00646605.3		UBR4	E3ユビキチンタンパク質リガ ーゼUBR4のアイソフォーム3				
IPI00746934.2		UBR4	E3ユビキチンタンパク質リガ ーゼUBR4のアイソフォーム2				
IPI00816532.1		F9	凝固因子IX (フラグメント)				

10

## 【0271】

\*「AR対NR」に関する「アップ」は、NR被験体と比較して、特定されたタンパク質グループコードの1以上のメンバーがAR被験体において増加することを示す。NR被験体と比較して、「AR対NR」に関する「ダウン」は、特定されたタンパク質グループコードの1以上のメンバーがAR被験体において減少することを示す。

## 【0272】

\*\* は、SDAによって選んだタンパク質グループコードを示す。NR被験体と比較して、示されたタンパク質グループコードのメンバーの1以上が、AR被験体において、増加または減少する（最も右のカラムで示される）。

20

## 【0273】

アクセッション#は、インターナショナルプロテインインデックス（IPI）アクセッション番号であり、方法のセクションで示されるように、対応するポリペプチドのアミノ酸配列はIPIデータベースから入手可能である。

## 【0274】

インターナルバリデーションにおいて、プロテオミクスバイオマーカーパネルの能力を推定し、新しいサンプルを分類するために2つのアプローチを取った。最初に、LDAを用いるリーワンアウトのクロスバリデーションは、概説された発見戦略と関係して63%の感受性および86%の特異性を推定した。第2には、バイオマーカーパネルで9つのタンパク質グループコードに基づく分類子が、LDAを用いて造られ、そして6つの新しいNRサンプル上でテストされた。これらの6つのサンプルからの4つが正しく分類された。

30

## 【0275】

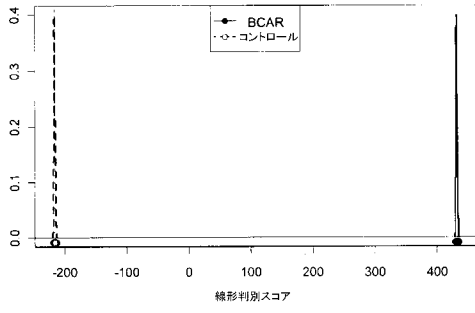
まるで各々の個々の出版物が、ここに参照することによって組み込まれるように具体的に、そして個々に指し示され、そしてまるでそれがここに詳細に述べられたかのように、すべての言及はここに参照することによって組み込まれる。ここでの参考文献の言及は、そのような参考文献が本発明に対する先行技術であるという告白として、何ら解釈も、考えられもしない。

## 【0276】

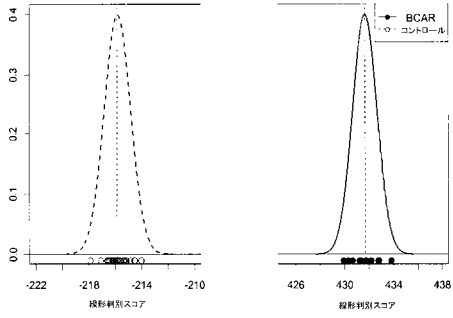
本発明の1以上の目下の好ましい態様は、一例として記述された。本発明は、実質上記に説明し、および例および図を参照したような、すべての態様、修飾および変形を含む。多数の変形および修飾が、請求の範囲において定められるような本発明の範囲から離れないで行うことができることは、この技術に熟達せる者にとって明らかである。そのような修飾の例には、実質同じやり方で同じ結果を成し遂げるために、本発明の任意の面についての既知の等価物の置換を含む。

40

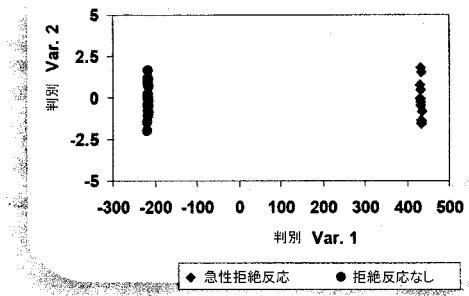
【図 1 A】



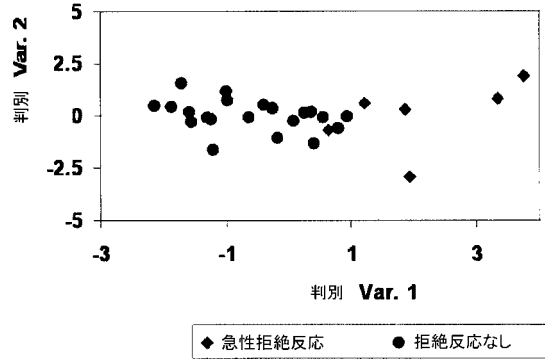
【図 1 B】



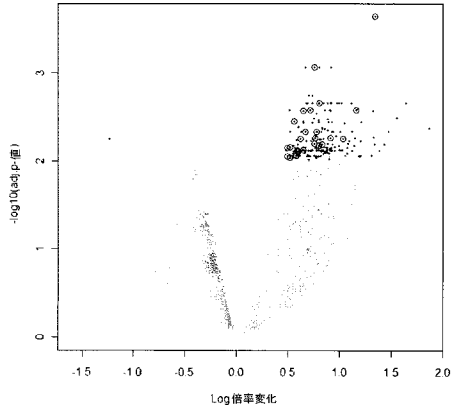
【図 1 C】



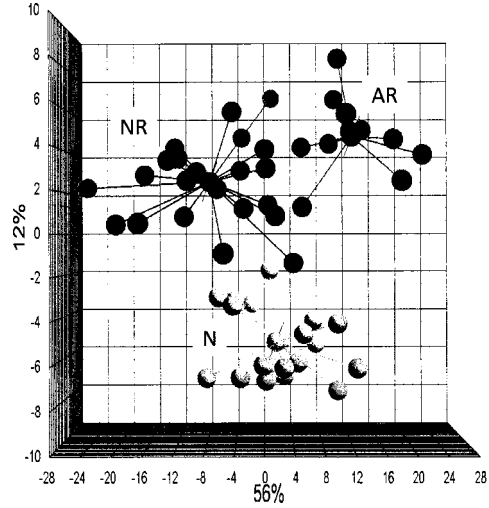
【図 2】



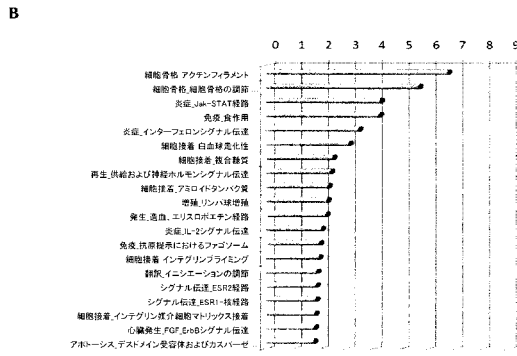
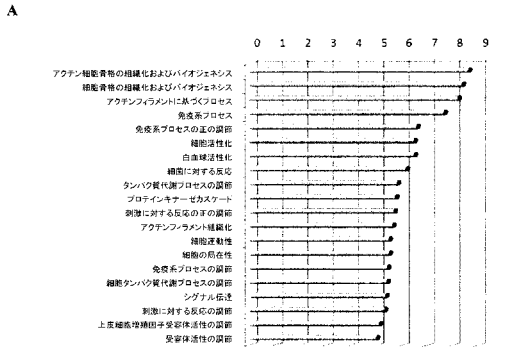
【図 3】



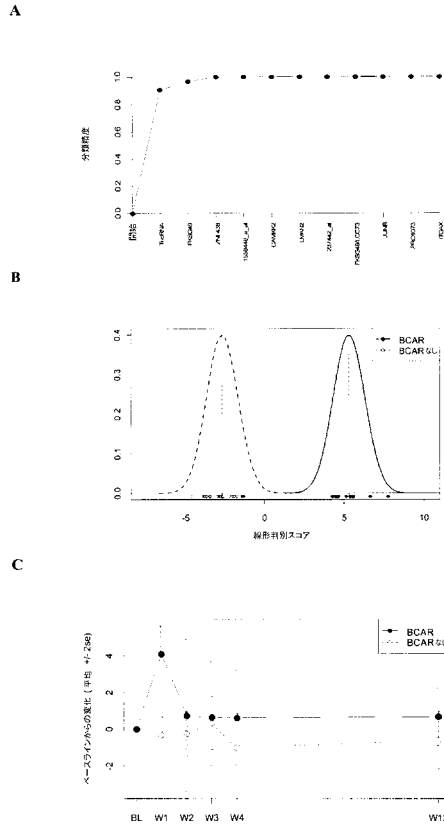
【図 4】



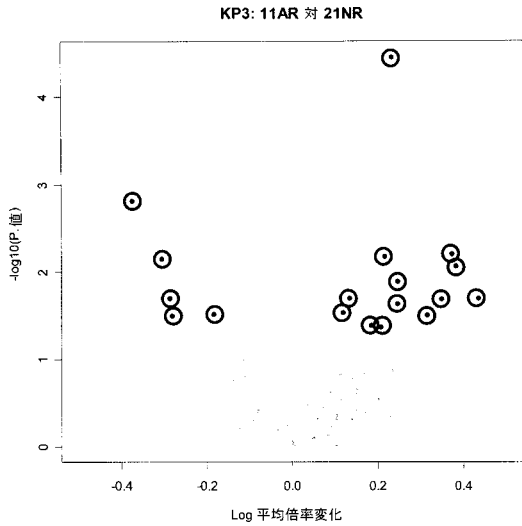
【 図 5 】



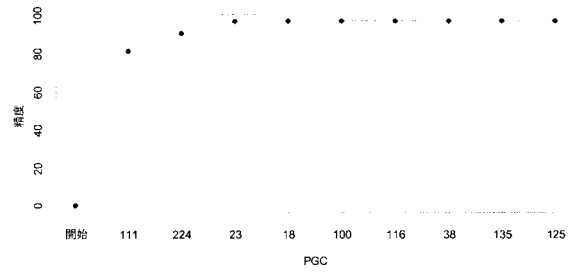
【 図 6 】



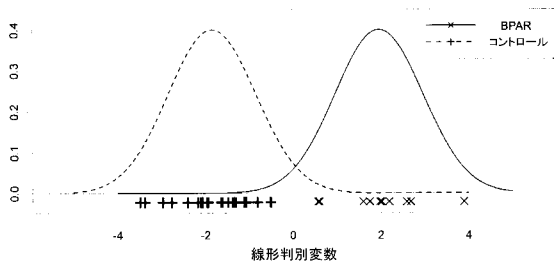
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】













【 図 1 0 - 2 1 】

SEQ ID NO:	プローブセット ID	標的配列
167	233303_at	cttaccattgctctgatacttcttcaatttttttttttggaaatccagaaaaagtgtatttagaacacact aacctccacaaactaactgacagatmmnmnagranctgtgaaatgtaagatfctgaatgaaatgaa ccattgagccctggacatgcaaccgaaacatctgtaattaaaatattggccatagctactatttttggc ccataagatatttttcaactttttttaaagtgattattatgctatcccaagtgatctgacatgaagacttt tccaccttaactactctgtgaggagcttgg
168	234640_x_at	ctgtcttcttctgactgagatctcagtttggctgtgattttcatagtcocgtagctacactgtctgttct ctgactgatacctgttggctgtgattttcatagtcocgtatctactgttctgttctgactgatttcca gttttggctgtgattttcatagtcocgtatctactgttctgttctgactgatttctgttctgttctgt gattttcatagtcocgtatctactgttctgttctgtgactgattttctgttctgttctgttctgttct cgtactgatacctgttctgttctgtgactgattttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgt cgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgt agtttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgt
169	235167_at	gatagggtactactgagttgactgctccagctgaaagaaagccctgcaactatcagcgttaaacattgc ttatgcaaaaattgagactgctcattacagctatctcaaatctcctaaatgctcctgggtgattgattactt ttactctgctatgaaataactgaaactggttaattataaagaaagaggtttaaactgctcaccagctccaca aggctggagagcctcagaactatggtgaaagcaagaggaacaaagagatcttccatgcaagcagcagc caagagacagctgcaagaaactcctttataaacatcagattttagttagatctatcactacagagaaac agtttggaaaacctgcccctgattctaccctaccgctcccccaccagacacatgggatttggga actacaactcaagtaaatgggtgggacgcaacaaactatcgttggatg
170	236155_at	gacactgtgatttgaatcagcccaacttactagttgtgtgactctcaagttatgcaactctctgtctca gttctcttttggcaattgggtctcaactcagcagctattgaaagattagttgaaacaaactgctgaaattc cagcactgacacatctcaactcaataatcaactgcccctgttactgtgactgaaacaaactgctgaaattc ctctcaactatagcaacaaataatgaaatttcaactaaagtatagagattgttgcacacagtgataaa ctgtatttctgtaagttaangtctggttttagatgcaactttactgtagaagactcagaaacaaatgtttt tctatttcaacttccactcttttttggtaagaaactcagaaacaaanaaaaaaacaaactctct gtctatttcaact
171	236528_at	gcatctgctcatagcaaggtcttaaaatgctgaaataagcaaaagattttcaagttgtgattgcccagf ggcaatcacaacagagaaggtgactgtcttctgtttttttaggtgagggcacttttctctatgaccagatca gtcttccattcagagtagccctctttgagtagctgtagaccctaaatggatgataatcttctgctgagatm gctgctcaactcctcagcaatattgattttaaattatataattttaccagcaacccagagtaggcccctc taccagatattgcaactcagttgattgctcagctgtagaagattgtgactcttggctataagcaactttttta aacctttcccaactaggtttagtctattatcagctctcaingattactactgttactttgaactatagattt gtttctcagttactgctgttt
172	237442_at	gcagcagattccattctcctcagctggagcaaaagaaacagaaagagagagagagagagagagagagag atcagcagctgagaaggtgttncatgattttagtttagttagttatgtagcacaacaaagcagagcctgct atcacaagaagagtagaagacagagccctgctgactcagtgaggaagaaagaaatcagagacagttat tatttctctgatttccagcactcgaattgtttgttctgtgctgagatataagaaataacagacagcctct gcatlaaagaaatcccaagctctcagctatcagcaacttcaactgattttaaagatgaaatacaactatctc atcttggcccctcaagttctgtgctgtgctgactatgttgaattacaagtagatatacagctgtgctacaagat tttgaaactgaaacaaactcagctctgcttactttta
173	237544_at	atgagttaccctctgatacttactttagagagcactcaaacatttctcagcaactctcactcaacttctctc tattgtaactgagccacttatactcagctcctcaaacacttctttttagcttattatagtgagtagact tttagagatttttctcagagcagcaggaactccatatttcttcaagaaatggtcttcaagtagactttt caagagacccagaaagctcctcctccttagtagtagtaaacatccagaaatagagacttcaaacct accctaacacgttttaaaagagccatgaaagatcaaacaaactgatttccagtaacttaactgtcttcaag aagccttctttaaaggaactgccaagctcagacttaactcaatgctcaccagc
174	238320_at	aaactgaaagcctaacctgcaactgtttgacttcaaacctgtgggtgattcagggcattctctcctcaaccca gcctccttccaccagagaccactgctcagctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg tgtacagcgtgggtagaccacacagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg tgtacagcgtgggtagaccacacagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg cctacatctgattatgctgcttggcttctcaactctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg nannnccatanngtctncaagaattttcaactctnctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg nacatggcannatctgctgagagaamntctcagagnaatctcggcagcagctgtaattctca atattgtagaccaccacccttccactcagagaggtgcttccactgga

【 図 1 0 - 2 2 】

SEQ ID NO:	プローブセット ID	標的配列
175	238712_at	actagtgtagctgacacccaatttgaagaaagcagagagatcaaacagaactgctgctgggtgtctcagg agctgctacacaggaacccctgagctatcgaacagcagcaggaactatgcttctcttctcagaatgacat tgcagatgcaaaccttggctgcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agctcttggagctgagctgcaaacagatgcttcttctctctctctctctctctctctctctctctctctct atgattaaagaaatattaggctcagagagctgtctgctcagaagctgcaagaaactttraccacact agactctcaactagatgaagaaacttctcactgagattgagactgctctgctcaggaagc
176	239021_at	ctctgagtagcaaaactgctgaaagcctcagctggagaaatgctcagctgagctgctgctgctgctgctg gcccagc cgcagctgctcctggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc cactgctcagctggagagctggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc cttctggagc ggcccagctccagctgagagctggcctcttcttcttctgagctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
177	240057_at	tcagataaagcaaacctcagcctcaagcccccaggaactctatggggcagagagcgttgaatttggctg taggaatttagaagaattgaggtctctctcaatatttctcccaagctgatactctcaataatttctactata agcacaagctgactgactgctgagcagctgctgactcaatgaattgataataactcaactctctctcaaaa agtaataactcttcttcaaaaagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc aggaacacagctgctgcaacgacacgcaacaaagctgacttctgctgagctgagctgagctgagctgagcagcagc cgcacacagcagctgagcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc gtgctg
178	241774_at	ggcagtagcagaaatgagcagctgaaatagagactctgagctgagctgaaatgagctgagctgagctgagc gcccattggaatttttctcagctgatttagatgaaactgatacctcaactacagactgagctgagctgagc cctctttagttagtctaaagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc gctacacagcagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc gaaacactacacagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc tactgaaataactttagcagcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt tactgagatacaacactctctctctcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
179	242907_at	gtacatcagatacaacactctctctctcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt cactt tctt agttattgctt tctt
180	244356_at	tagttaggagctg aatgattgctt ntactgattttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagttagt aaccagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc ggccttggctgagcaaaaataactcaaacctggagcaactcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt ttatgtagatgacaataattgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc gggaagggtaactgcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
181	244556_at	ctctcaagctgcttctcagagcaactgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc gctcctgaaagcctcaaaagaggggtgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc tggagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc aagcaacttatttaggaccgtagcccaactctgatttctcagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc ctgactgctgagcaacaaatgattgagcagcagctgagctgagctgagctgagctgagctgagctgagc
182	244752_at	gacctcaagcttctcagagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaag aaaatmaagcaagctgtagctgcaaaaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtag atctctcagctcagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagca aactcagctgagcaagctgtagctgcaaaaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactg ggctttagcagcccaagctgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactgtagcaagcaactg
183	37028_at	ttagactcctcaaaagccagaaagctgctcctcagagagctgctcctcagctgctcctcagctgctcctc ggcggccagc atcaccagc cctcagcaacactttagcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc cagacagc cagctgagc

- 【 手続 補正書 】
- 【 提出日 】平成23年2月10日 (2011.2.10)
- 【 手続 補正 1 】
- 【 補正対象書類名 】明細書
- 【 補正対象項目名 】配列表
- 【 補正方法 】追加
- 【 補正の内容 】
- 【 配列表 】

201152163000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2009/000744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>C40B 30/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/483</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>G01N 33/543</i> (2006.01), <i>G01N 33/68</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>C40B 30/00</i> (2006.01), <i>G01N 33/483</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>G01N 33/543</i> (2006.01), <i>G01N 33/68</i> (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, Delphion, Scopus, NCBI PubMed database, Google Patents. Key Words: Allograft, Rejection, Genomic, Proteomic, expression profiling, Biomarkers, TncRNA, FKSG49, ZNF438, 1558448_a_at, CAMKK2, LMAN2, 237442_at, JUNB, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	COLOMBO, G. et al. Treatment with alpha-melanocyte stimulating hormone preserves calcium regulatory proteins in rat heart allografts. <i>Brain, Behavior, and Immunity</i> . August 2008; Volume 22(6), pages 817-823. ISSN: 0889-1591. Abstract.	1-9
X	SARKAR, S. et al. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon- $\gamma$ in human islets. <i>Diabetes</i> . January 2007; Volume 56(1), pages 72-79. ISSN: 0012-1797. Whole document.	1-9
X	CA2600168 A1 (KIENLE, S. et al.) 5 March 2008. Whole document.	10-22
A	US5939270 (HAUNSØ, S. et al.) 17 August 1999.	
[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	"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
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 10 August 2009 (10-08-2009)	Date of mailing of the international search report 24 August 2009 (24-08-2009)	
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer  Adnan Ali 819-934-7930	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2009/000744**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - on paper
    - in electronic form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed.
    - filed together with the international application in electronic form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2009/000744

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FAMULSKI, K. et al. Changes in the transcriptome in allograft rejection: IFN- $\gamma$ -induced transcripts in mouse kidney allografts. American Journal of Transplantation. June 2006; Volume 6(6), pages 1342-1354. ISSN:1600-6135.	
A	SARWAL, M. et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. The New England Journal of Medicine. 10 July 2003; Volume 349(2), pages 125-138. ISSN: 0028-4793.	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2009/000744

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
CA 2600168 A1	05-03-2008	EP 1905846 A2	02-04-2008
		EP 1905846 A3	09-07-2008
		GB 0617429D0	18-10-2006
		US 2008153092A1	26-06-2008
US 5939270	17-08-1999 AU 702368 B2	AU 1414695 A	18-02-1999
		CA 2179886 A1	10-07-1995
		DK 145393D0	29-06-1995
		EP 0736042 A1	23-12-1993
		JP 10504097 T	09-10-1996
		WO 9517425 A2	14-04-1998
		WO 9517425 A3	29-06-1995
		WO 9517425 A3	05-10-1995

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 キーオン ポール

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 デルタ 第28 アベニュー 5717

(72)発明者 シェーラー アンドレアス

フィンランド国 コンティオラハティ パジュティエ 3エイ

(72)発明者 ガンサー オリバー

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト 第2 アベニュー 2-2960

(72)発明者 パルショウ ロバート

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ケベック ストリート 6306

(72)発明者 エヌジー レイモンド

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ホーソーン レーン 6352

(72)発明者 ムイ アリス

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バーナビー ウェッジウッド ストリート 7983

(72)発明者 マクマスター ロバート

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー 第8 アベニュー ウェスト 4654

(72)発明者 マクマナス ブルース

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト 第3 アベニュー 3009

(72)発明者 コーエン フリュー ガブリエラ

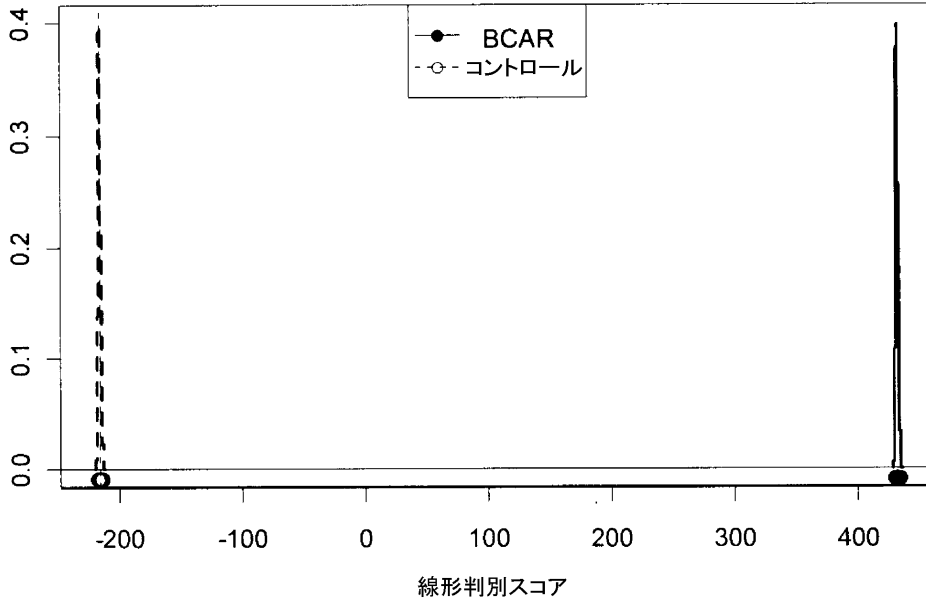
カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ラーキン ドライブ 110-6309

(72)発明者 メレディス アンナ

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ビーチー ストリート 2304 -  
989

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA01 FA12 GA06 GA09 LA07  
4B024 AA11 CA01 CA12 HA08 HA12  
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50 QR55  
QR62 QR72 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02

【要約の続き】



专利名称(译)	使用基因组学或蛋白质组表达谱分析诊断肾同种异体移植排斥的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011521630A</a>	公开(公告)日	2011-07-28
申请号	JP2011510792	申请日	2009-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	キーオンポール シェーラーアンドレアス ガンサーオリバー バルショウロバート エヌジーレイモンド ムイアリス マクマスターロバート マクマナスブルース コーエンフリーユガブリエラ メレディスアンナ		
发明人	キーオン ポール シェーラー アンドレアス ガンサー オリバー バルショウ ロバート エヌジー レイモンド ムイ アリス マクマスター ロバート マクマナス ブルース コーエン フリーユ ガブリエラ メレディス アンナ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N27/62 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6842 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N2800/245 G01N2800/60 Y10T436/143333		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N27/62.V C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA01 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/GA09 2G041/LA07 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/129022 2008-05-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种确定受试者中急性同种异体移植排斥状态的方法，包括来自受试者的生物样品中的一种或多种核酸标记物或一种或多种蛋白质组学标记物核酸确定表达谱，将所述一种或多种核酸标志物的表达谱与对照谱进行比较，并与所述对照谱相比增加所述一种或多种核酸标志物的表达水平提供一种方法，其中确定一种或多种核酸标记物是否升高表明受试者的急性排斥状态。

