

(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2005-500834

(P2005-500834A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 2 4
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	4 B O 2 9
GO 1 N 33/58	GO 1 N 33/58	4 B O 6 3
// C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 15/00	F
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-508727 (P2003-508727)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月28日 (2002.6.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年12月22日 (2003.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/007179
 (87) 国際公開番号 W02003/002763
 (87) 国際公開日 平成15年1月9日 (2003.1.9)
 (31) 優先権主張番号 01115946.4
 (32) 優先日 平成13年6月29日 (2001.6.29)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 502412190
 ジルスーラブ ゲーエムベーハー
 S I R S - L a b G m b H
 ドイツ連邦共和国 D-07745 イエ
 ナ ヴィンツェルラーエル ストラーセ
 2 a
 Winzerlaer Strasse
 2 a D-07745 Jena Ger
 many
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症または敗血症関連症候群の診断のためのバイオチップの使用

(57) 【要約】

本出願は、細胞のストレス反応、炎症反応および免疫反応に特異的であるか、ストレス反応、炎症反応および免疫反応に関連するか、急性期の応答の際に誘導されるか、またはそれらの任意の組合せであって、かつ敗血症または敗血症関連症候群の診断用に担体に固定化されるプローブ核酸および/またはプローブタンパク質、を含む核酸および/またはタンパク質チップの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のストレス反応、炎症反応および免疫反応に特異的であるか、ストレス反応、炎症反応および免疫反応に関連するか、急性期の応答の際に誘導されるか、またはそれらの任意の組合せであって、かつ敗血症もしくは敗血症関連症候群の診断用に担体に固定化されるプローブ核酸および/またはプローブタンパク質、を含む核酸および/またはタンパク質チップの使用。

【請求項 2】

プローブ核酸は、敗血症および感染に対する生体の応答に関連する、免疫メディエータ、転写因子、急性期タンパク質、補体成分、接着分子、細胞特異マーカー、アポトーシス、

10

【請求項 3】

ハウスキーピングの遺伝子または分子から選択される、遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

プローブ核酸および/またはプローブタンパク質は担体上の所定の領域に固定化される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 5】

前記領域は互いに間隔が空いている、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

担体はガラスのスライド、マイクロタイタープレートもしくはナノタイタープレートである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

試験しようとするヒトもしくは動物から得られた標識 mRNA、標識 cDNA または標識タンパク質を、チップのプローブ核酸および/またはプローブタンパク質とハイブリッド形成させ、ハイブリッド形成パターンを測定する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 8】

ハイブリッド形成した標識 mRNA、cDNA またはタンパク質の濃度が測定される、請求項 7 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症または敗血症関連症候群の診断のための核酸および/またはタンパク質チップの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

敗血症ならびにその続発症の敗血症ショックおよび多臓器不全は、術後集中治療室における死亡の最も多い原因である。

40

敗血症（血液中毒と呼ばれることも多い）は、最も悪性度の高いタイプの感染である。基本的に、生体が元の感染部位に感染を限定することができなければ、どのような感染でも敗血症になる可能性がある。そして細菌の構成成分ならびに内在性のメディエータのいずれもが、感染部位から遠く離れた種々の臓器に損傷を与える可能性がある。数時間以内に多臓器不全を伴う生命に関わる状態に発展しうる。敗血症についての 40% ~ 60% の死亡率は過去数十年にわたり不変であり続けている。病院の全患者の約 5% ~ 10% が感染により容態が悪化する。ドイツ国だけでも、年間 80,000 人の患者においてそのような感染から敗血症がもたらされている。

50

【 0 0 0 3 】

国際的に有数の研究者らにより、治療についての新たなアプローチの失敗の主たる原因は敗血症の診断の遅れと不明確さにあることが多いとされている。早期診断および患者の宿主応答の特徴分析の改善によってのみ、より早くより有効な治療が可能であろう。

【 0 0 0 4 】

適切な治療法を即座に開始するために、敗血症および敗血症関連症候群の診断を極めて迅速に実施しうることが特に必要であり、さらに、患者由来の大量の試料をごく短時間で分析することが必要である。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

10

【 0 0 0 5 】

従って、本発明の根底にある技術的な課題は、上記のような利点を備えつつ敗血症および敗血症関連症候群を診断することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

このような技術的な課題は、細胞のストレス反応、炎症反応および免疫反応に特異的であるか、ストレス反応、炎症反応および免疫反応に関連するか、急性期の応答の際に誘導されるか、またはそれらの任意の組合せであって、かつ敗血症または敗血症関連症候群の診断用に担体に（具体的には整然と格子状パターンに）固定化されるプローブ核酸および/またはプローブタンパク質、を含む核酸および/またはタンパク質チップ（バイオチップ）の使用により解決される。

20

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 0 7 】

本発明によれば、「診断」という用語は、個々の敗血症および敗血症関連症候群の経過のモニタリング、重症度の検出および個別の予後の判断をも含む。

本発明について用いられる「プローブ核酸および/またはプローブタンパク質」という用語は、核酸のみ、タンパク質のみ、そして核酸とタンパク質との共存をも意味する。

【 0 0 0 8 】

本発明によれば、「核酸」という用語は一般に任意の種類かつ任意の供給源のDNAおよびRNAを表す。DNA分子については、細胞内mRNAまたは単離mRNAから生成可能なcDNAを使用することができる。

30

【 0 0 0 9 】

本発明は、数千スポットに及ぶ核酸を備えた核酸チップが使用可能な、非常に新しい研究領域である核酸チップ技術に関する。この目的に達するために、核酸を担体に整然と格子状パターンに固定化する。被験DNAまたはRNA（標的核酸または試料）を通常（例えば蛍光色素を用いて）標識し、チップに供する。標的核酸が、担体に結合され被験DNAまたはRNAに相補的な配列を有するプローブ核酸とハイブリッド形成する場合、通常の方法で（例えばCCDカメラにより、もしくはレーザースキャナにより）前記格子状パターン内の該当する部位にシグナルが検出される。

【 0 0 1 0 】

40

言い換えれば、上述のチップ技術は、担体に整然と格子状パターンに固定化されたプローブ核酸とRNAまたはDNA分子とをハイブリッド形成させることにより同時に一群の分子の発現を分析することが可能であるという知見に基づいている。

【 0 0 1 1 】

本発明について、核酸チップを引用して以下に詳細に説明するが、それらに限定されると理解されるべきではない。本発明は、プローブタンパク質が担体に整然と格子状パターンに固定化されたタンパク質チップにも適用可能である。被験試料中のタンパク質を、プローブタンパク質との相互作用により検出可能である。これは通常の方法で実施可能である。当業者には、タンパク質チップを作製し適宜使用するための化学物質、材料および方法も周知であり、あるいは、以下に核酸チップに関して述べる詳細に照らしてタンパク質チ

50

チップに適した化学物質、材料および方法を開発することも可能である。

【0012】

本発明の好適な実施形態では、プローブ核酸は、感染に対する生体の応答に関連する、免疫メディエータ、転写因子、急性期タンパク質、補体成分、接着分子、細胞特異マーカー、アポトーシス、ハウスキーピングの遺伝子または分子から選択される、遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片である。これらのプローブ核酸を用いて、敗血症および敗血症関連症候群の診断を、上記の要求に関して好都合な方法で実行可能である。

【0013】

本明細書中で使用する「断片」という用語は、遺伝子より短いが該遺伝子の特性は備えたままであり、野生型のタンパク質と基本的に同じ化学的および/または物理的性質、特に機能上の性質を有するタンパク質を生じる核酸配列を指す。 10

【0014】

敗血症または敗血症関連症候群の診断に関して、敗血症および感染に対する生体の応答に関連する、免疫メディエータ、転写因子、急性期タンパク質、補体成分、接着分子、細胞特異マーカー、アポトーシス、ハウスキーピングの遺伝子ならびに分子から選択される、遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片を用いることは、上記の要求に関して特に好都合である。

【0015】

本発明の好適な実施形態では、バイオチップは、血液凝固系の分子および/または感染物質から選択される少なくとも1つの遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片をさらに含む。 20

【0016】

免疫メディエータの例は、成長因子(PDGF、など)、インスリン様成長因子(ILGF)、IL-1~IL-18のようなインターロイキンなどの炎症誘発性および抗炎症性サイトカイン、ケモカイン[血小板第4因子(PF4)、インターフェロン誘導タンパク質10(IP-10)、成長関連タンパク質Gro-β、および、エオタキシン、Mip-1、Mip-1、RANTESなど]、成長因子受容体、サイトカイン受容体、サイトカイン誘導性の分子、ケモカイン受容体ならびにその他の細胞増殖関連抗原である。 30

【0017】

転写因子は、EGR、NFATおよびNFκBタンパク質、ならびにAP-1およびCREBタンパク質ファミリーはもちろん、転写モジュレータでもありうる。その他の急性期タンパク質には、C-反応性タンパク質および組織因子1はもちろん、サイトカイン、サイトカイン受容体、サイトカイン誘導性の分子、ケモカイン、ケモカイン受容体、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、転写因子および転写モジュレータがある。

【0018】

補体成分の例は、H因子、FHL-1およびFHRをコードする遺伝子である。細胞特異性のマーカーには、CD抗原分子および接着分子、T細胞受容体遺伝子ならびにT細胞受容体に関連する遺伝子があり、例えばCD3、CD14、CD11e/CD18、CD28、CD143の各タンパク質、T細胞のサブタイプに関するCD4およびCD8、マクロファージのCD14、B細胞のIgMのような細胞特異性マーカーをコードする遺伝子、細胞周期に関する遺伝子、エイコサノイドシグナル伝達に関する遺伝子および成長因子受容体である。 40

【0019】

ハウスキーピング遺伝子の代表例は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アクチンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼである。敗血症および感染に対する生体の応答に関連するその他の分子には、細胞周期に関する遺伝子、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素および転写因子があり、例えばヒトCalc遺伝子の種々の転写物、すなわちプロカルシトニン、カタカルシンN末端ペプチド、カタカルシ 50

ンおよびカルシトニン遺伝子関連ペプチドをコードする転写物、ならびにその産物がある。

【0020】

炎症は、微生物のような感染物質により引き起こされることが非常に多い。炎症の原因（例えば微生物）を対象とする適切な治療のためには、該微生物について可能な限り多くの情報を得ることが望ましい。従って、そのような情報を得るために、該微生物のタンパク質または遺伝子を本発明により使用されるバイオチップの担体に固定することが可能である。

【0021】

本発明のバイオチップは、上述のプローブのうちの1つまたは最大で該プローブ全てを含む任意の組合せを備え得る。当業者は、評価すべき疾患の種類に応じてプローブを容易に選択可能である。

【0022】

上記の核酸チップおよびタンパク質チップ、特に上述の特定のプローブ核酸を備えたチップは、敗血症および敗血症関連症候群の診断において複数の利点を有する。利点の1つは、特に上記に明示したプローブ核酸を用いることにより非常に簡単かつ迅速な方法で診断を実施しうることである。測定を正確に実施可能である。さらに、感染物質および/または感染物質を原因とする生体の反応を、遺伝子、遺伝子断片および/またはタンパク質を検出することにより直接測定可能である。上記のバイオチップを用いることにより、敗血症および敗血症関連症候群の診断を標準化することが可能である。発現遺伝子または所定の遺伝子のパターンは、診断だけでなく早期発見、治療中のモニタリング、および重症度の検出に有用である。加えて、本発明で用いられるバイオチップにより、疾患の経過、すなわち敗血症および敗血症関連症候群の進行ならびにその治療の成功について調査することができる。

【0023】

本発明によるバイオチップの使用に関し、調べようとするDNAまたはRNAを例えば蛍光色素により標識してチップに供することが可能である。調べようとするDNAまたはRNAと、相補的な配列を有し担体に結合されたプローブ分子とのハイブリッド形成を、例えばCCDカメラまたはレーザースキャナなどの通常的手段により、格子内の該当する部位に検出することができる。

【0024】

本発明で使用されるバイオチップにより自動分析が可能であり、さらに、被験試料の量が定量的に測定可能であり、これにより敗血症または敗血症関連症候群の経過について、特にその治療の成功についてのより正確な情報を得ることが可能である。

【0025】

上述したように、上記の特異性を備えたプローブ核酸および/またはプローブタンパク質を担体上に固定化する。これは、核酸のみ、タンパク質のみ、または核酸とタンパク質の両方のいずれかが担体に結合されることを意味する。

【0026】

本発明で使用されるバイオチップによれば、プローブは具体的には上記のチップ技術において一般に実施されるように担体に整然と格子状パターンに固定化される。整然とした格子状パターンには、プローブを例えばスポットとして備える担体上の領域がある。核酸チップおよびタンパク質チップは、一般に担体上の複数の領域を備えて提供される。この場合、全領域が同一のプローブを備えること、または領域が異なるプローブ（すなわち核酸プローブおよび/またはタンパク質プローブ）を備えることも可能である。

【0027】

本発明に従って使用されるバイオチップの好適な実施形態において、プローブ核酸および/またはプローブタンパク質は担体上の所定の領域に固定化される。これは、プローブが固定化されるであろう領域が事前に分かっていることを意味する。また、特定のプローブが担体に固定化される位置が該チップの使用（例えば被験試料による処理）前に分かって

10

20

30

40

50

いることをも意味する。この利点により、敗血症および敗血症関連症候群の診断の標準化と自動化とが可能となる。さらに、測定が非常に簡単かつ迅速になされる。

【0028】

本発明に従って使用されるバイオチップのさらに好適な実施形態において、該領域は互いに間隔が空いている。これにより、非常に好都合な方法で、より良好かつ正確な結果、さらには敗血症および敗血症関連症候群の診断の自動化と標準化とが可能となる。

【0029】

プローブの整然とした格子状パターンは、平行に列をなした領域の形式に配置される。そのような担体の例はマイクロタイタープレートであり、ウェルがプローブの領域に相当し一般に平行に列をなして配置されている。この実施形態によれば、炎症の測定の自動化と標準化とが非常に好都合な方法で達成される。

10

【0030】

好適な実施形態において、担体はガラスのスライドである。ガラスのスライドは好ましい光学特性を有し、さらに、固体であるが蛍光性では無いという利点を有し、そのためこれらの特性により迅速かつ正確な炎症の測定に特に有用である。

【0031】

本発明に従って使用されるバイオチップの作製方法の1つを以下に説明する。

バイオチップを製造するために、プローブ(特に核酸)をスポット溶液に溶解してから通常のスポット工程を用いて担体にスポットすることが可能である。スポット溶液としては、クエン酸ナトリウム生理食塩水(SSC)緩衝液が広く用いられる。50%のジメチルスルホキシドを添加することも可能である。

20

【0032】

例えば核酸および/またはタンパク質のプローブの、担体への結合は、共有結合または静電(イオン)結合のいずれかによって達成可能である。

核酸の共有結合の場合、例えばアルデヒド基を有する化合物が担体の表面にコーティングされる。核酸は、アルデヒド基と反応してシッフ塩基すなわち共有結合を形成しうる一次アミノ基を含んでいる。

【0033】

特に核酸の静電結合の場合、核酸は通常負に荷電しているという事実が利用される。担体の表面に正の電荷を供することにより、負に荷電した核酸と正に荷電した担体表面との間に、電荷の相互作用による結合が形成されうる。この目的のために、正の電荷を提供する化合物によりコーティングされた(例えばポリ-L-リシン(Lysine)および/またはアミノシランでコーティングされた)ガラス表面が用いられる。このような活性化スライドは当業界でよく知られている。

30

【0034】

必要であれば、UV照射により核酸と担体との架橋結合を形成することもできる。

敗血症および敗血症関連症候群の診断用にバイオチップを使用するために、試験しようとするヒトもしくは動物由来の標識されたmRNA、cDNAまたはタンパク質をバイオチップのプローブ核酸および/またはプローブタンパク質とハイブリッド形成させることができ、ハイブリッド形成パターンを前記のようにして測定可能である。被験試料は、血液試料(特に静脈血)、組織試料、器官または生物体由来の末梢血液細胞から単離可能である。該試料を直接使用しても、さらに精製して血液細胞集団を得てもよい。血液細胞を溶解することも可能であり、RNAを通常の方法で単離することが可能である。mRNAをさらに精製してもよく、標準的な手法によりmRNAからcDNAを合成することも可能である。

40

【0035】

都合のよいことに、cDNA試料は分画化された細胞または精製mRNAから得られる。さらに、核酸試料はPCRにより生成された断片由来でもよい。これらの試料は、特に強力なシグナルが発生するという利点を示す。

【0036】

50

試料として使用する c D N A または m R N A をマーカーで標識することができる。試料をバイオチップのプローブとハイブリッド形成させた後で検出可能な任意の物質をマーカーとして使用することができる。そのようなマーカーの例は蛍光色素である。標識 c D N A または標識 m R N A を、通常の方法でバイオチップのプローブとハイブリッド形成させることができる。タンパク質分析を、標準的なタンパク質アレイ技術に従って実施可能である。

【0037】

以降、本発明によるバイオチップの使用について、核酸を引例としてより詳細に説明するが、当然ながら本発明は核酸に限定されるものではなく、タンパク質にも適用可能である。

10

【0038】

ヒトまたは動物由来の被験細胞は、血液試料および末梢血単核細胞から、F i c o l l H y p a q u e (登録商標)遠心法のような標準的手法または L y m p h o p r e p (登録商標)により単離可能である。加えて、組織、器官、または患者の血漿およびその他の生物学的供給源から単離された感染物質のような生物体を使用可能である。単離細胞を用いて、単球、T細胞サブタイプまたはB細胞サブタイプなどの特定の細胞のサブタイプを濃縮することが可能である。

【0039】

細胞を精製するために、細胞を F A C S 選別、磁気選別などの標準的手順または特定のサブタイプの細胞を溶解することによりさらに濃縮することが可能である。細胞、組織、または生物体から、フェノール/クロロホルム、R N A z o l (登録商標)もしくは T r i z o l (登録商標)を用いた抽出などの標準的手法によっても全 R N A またはその画分を単離することができる。

20

【0040】

単離 R N A をさらに精製して m R N A とし、コード領域の分子数を高めてもよい。これは、例えば磁気ビーズを用いたオリゴ d T 選別またはその他の手法により実施可能である。

【0041】

c D N A の合成は、標準的手法により実現することも可能である。遺伝子特異的なプライマーとオリゴ d T プライマーとを組み合わせ、またはオリゴ d T プライマーは用いずに、生物材料をポリメラーゼ連鎖反応による温度サイクルに供して変換 c D N A をさらに増幅してもよい。

30

【0042】

D N A アレイを作製するために、B o r o f l o a t (登録商標) 33 ガラスのスライドなどの担体を、D N A を固定化する活性を有する基を含む、シランなどの、D N A を固定化するのに有用なポリマーの薄層でコーティングすることができる。

【0043】

標識された相補的 R N A または標識された相補的 c D N A と、担体に固定化された核酸とのハイブリッド形成は、標準的手順に従って実施可能である。

被験試料に含まれている核酸およびタンパク質の標識は、例えば、R T P C R もしくはこれに類する反応により C y 3 もしくは C y 5 で標識されたデオキシヌクレオチドを c D N A に組み込む反応などの通常の方法により実施可能である。

40

【0044】

シグナルの検出は、例えば S c a n A r r a y (登録商標) 2000 を用いた走査により実施可能である。

遺伝子または遺伝子群のデータおよび定量的発現パターンを、例えば適当なソフトウェアを用いた生物情報解析 (b i o c o m p u t i n g) によりコンピュータを用いてさらに解析および評価することができる。このために、コンピュータプログラムを用いて、特定の遺伝子または遺伝子群の発現規模の発現と炎症反応の重症度との関係を、実験パラメータまたは血行動態パラメータの評価を用いて決定するようにして規定することが可能である。該プログラムを用いて、疾患の重症度または進行の経過を判断し予見することが可能

50

である。加えて、該プログラムにより治療方法および治療介入の進行と効果とを観察することも可能である。

【0045】

タンパク質アレイも適宜実施可能である。ただし、捕捉と視覚化のために、タンパク質/タンパク質相互作用が使用されうる。

本発明の使用の好適な実施形態に従って、ハイブリッド形成した標識 mRNA、cDNA またはタンパク質の濃度が測定される。言い換えれば、このことは被験試料中の核酸またはタンパク質のレベルが定量的に測定され、ひいては敗血症または敗血症関連症候群の経過を観察して例えばそれらの治療が成功しているかどうかを見ることが容易になることを意味する。治療が成功している場合、試料中の核酸またはタンパク質の発現レベルは減少し、それに応じて検出シグナルが低下する。

10

【0046】

ハイブリッド形成した核酸またはタンパク質の検出は、例えばレーザー走査または CCD 機器により実施可能であり、多要因生物情報解析により、ある遺伝子、またはある遺伝子もしくはタンパク質の発現レベルと該疾患の重症度との関連を規定することが可能である。敗血症のような急性反応および炎症反応の重症度を、例えば APACHE II スコアリングのような臨床評価により規定することが可能である。

【0047】

好適な実施形態において、本発明により使用されるバイオチップを、急性炎症または慢性炎症について、より好ましくは敗血症または敗血症関連症候群を原因とする炎症を測定するために使用することができる。これらの疾患を検出するために、本発明のバイオチップは特に有用であり、迅速かつ正確な測定を可能にする。

20

【0048】

具体的には、特定の患者群における炎症応答の重症度は、該疾患の経過、重症度または進行度を評価するための周知の実験パラメータおよび血行動態パラメータを判定することにより、測定可能である。解析は、例えば APACHE II スコアのような適切な評価システムにより実施可能である。

【0049】

以降に実施例を参照して本発明をより詳細に説明するが、当然ながら実施例は単に発明を例示するためのものであり、発明を限定するものではない。

30

【実施例1】

【0050】

(本発明によるバイオチップの使用)

APACHE II スコアにより分類された敗血症患者から静脈穿刺により全血を採取した。さらに健康なヒトボランティアから血液を採取した。これらの試料は、標準的な手法により RNA を安定化するために用いられる溶液の入った市販の真空採血管中に回収した。供給業者のプロトコールに従って RNA を単離し、標準的なプロトコール (<http://www.Microarrays.org/pdfs/YeastPolyAIsolation.pdf>) に従って mRNA を単離した。逆転写酵素を用いて Cy3 および Cy5 標識ヌクレオチドを組み込むことにより、cDNA を標識した (<http://www.Microarrays.org/pdfs/HumanRNALabel.pdf>)。

40

【0051】

敗血症または敗血症関連症候群との関連性に従って、75000個のヒトクローンを含む cDNA ライブラリー (ドイツ連邦共和国ベルリン所在の RZPD 社) から約 1000 クローンを選択した。これら 1000 クローン由来の PCR 産物を、OmniGrid (登録商標) スポット装置 (ジーンマシズ (Genemachines) 社) を用いてポリ L リシンでコーティングされたガラスのスライド (テレケム (Telechem) 社) にスポットした。

【0052】

上記の被験標識分子を、(<http://www.Microarrays.org/pdfs/Hybridization.pdf>) に記載のようにして活性化担体表面に固定化された cDNA とハイブリッド形成させるために

50

使用した。次いでプロトコール (<http://www.Microarrays.org/pdfs/ArrayWashing.pdf>) に従って洗浄した。GenePix (登録商標) 4000 (アクソン (Axon) 社) スキャナを用いて、ハイブリッド形成した蛍光標識分子を指示書に従って検出した。データを、敗血症患者から得た試料と健康なヒトボランティアから得た試料との間で比較し、AIDAアレイ評価ソフトウェア (ライテスト (raytest) 社) を用いてデータを解析し、上方制御または下方制御を受けた遺伝子を決定した。続いてデータマイニング手法を適用し差次的遺伝子発現と敗血症または敗血症関連症候群の重症度との関連を判断した。上記のバイオチップを使用することにより、差次的遺伝子発現の解析から敗血症または敗血症関連症候群の診断、重症度の定量化、および治療に対する応答の測定について確立することが可能であることを示し得た。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/002763 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07179
- (22) International Filing Date: 28 June 2002 (28.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01115946.4 29 June 2001 (29.06.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): SIRS-Lab GmbH [DE/DE]; Winzerler Strasse 2a, D-07745 Jena (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ZIPFEL, Peter, Franz [DE/DE]; Lauensteinweg 4, D-07745 Jena (DE); SALUZ, Hans-Peter [DE/DE]; Dorfstrasse 22, D-07646 Oberbornitz (DE); RUSSWURM, Stefan [DE/DE]; An der Leutra 4, D-07743 Jena (DE); REINHART, Konrad [DE/DE]; Philosophenweg 17, D-07743 Jena (DE).
- (74) Agents: STÖRLE, Christian et al.; Patentanwälte, Geyer, Fehners & Partners, Perlamerstrasse 31, D-80687 Munich (DE).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, IJ, MC, NI, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/002763 A1

(54) Title: USE OF A BIOCHIP FOR THE DIAGNOSIS OF SEPSIS OR SEPSIS RELATED SYNDROME

(57) Abstract: The application relates to the use of a nucleic acid and/or protein chip comprising probe nucleic acids and/or probe proteins, which are specific for cellular stress, inflammatory and immune reactions, associated with stress, inflammatory and immune reactions, induced during acute phase responses or any combination thereof and which are immobilised on a carrier for the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome.

5

Use of a biochip for the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome

10

The invention relates to the use of a nucleic acid and/or a protein chip for the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome.

15 Sepsis and its sequelae of septic shock and multi-organ failure are the most common causes of death in operative intensive care units.

Sepsis – also commonly referred to as blood poisoning – is the most aggressive form of an infection. Basically, any infection can lead to sepsis if the body is not able to limit the infection to its place of origin. Then both the components of the bacteria as well as endogenous mediators can damage various organs, even far from the site of the infection. Within only a few hours a life-threatening condition with multiple organ failure can develop. The 40% to 60% mortality rate for sepsis has remained unchanged over the past decades. Approximately 5% - 10% of all hospital patients become ill with an infection. In Germany alone, such infections lead to sepsis in 80.000 patients per year.

25 Leading international researchers claim that the main reason for the failure of new approaches in treatment lies often in a delayed and unspecific diagnosis of sepsis. An earlier and more effective treatment will be possible only through early diagnosis and an improved characterization of a patient's host response.

30 It is in particular necessary that the diagnosis of sepsis and also sepsis related syndrome can be carried out very quickly in order to start with the appropriate therapy soon and, furthermore, it is necessary to analyse a huge number of samples from patients in a very short time.

35

Thus, the technical problem underlying the present invention is to diagnose sepsis and sepsis related with the aforementioned advantages.

40 This technical problem is solved by the use of a nucleic acid and/or a protein chip (biochip) comprising probe nucleic acids and/or probe proteins, which are specific for cellular stress, inflammatory and immune reactions, associated with stress, inflammatory and immune reactions, induced during acute phase responses or any combination thereof and which are

WO 03/012763

2

PCT/EP02/07179

immobilised on a carrier, in particular in an orderly grid pattern, for the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome.

5 According to the present invention, the term "diagnosis" does also comprise the monitoring of the course, the detection of the severity and the determination of the individual prognosis each of sepsis and sepsis related syndrome.

10 The term "probe nucleic acids and/or probe proteins" as used according to the present invention refers to nucleic acids only, proteins only and also to the simultaneous presence of nucleic acids and proteins.

15 According to the present invention, the term "nucleic acids" generally designates DNA and RNA of any kind and from any source. As DNA molecules cDNA can be used which can be generated from cellular or isolated mRNA.

20 The present invention relates to the nucleic acid chip technology, which is a very new research area, wherein the nucleic acid chips having up to several thousand spots of nucleic acid can be used. To this end, nucleic acids are immobilised on a carrier in an orderly grid pattern. The DNA or RNA to be examined (target nucleic acids or sample) is generally labelled, e.g. by using a fluorescent dye, and applied to the chip. In the case of hybridization of target nucleic acids to the probe nucleic acids bound to the carrier and having complementary sequences with the DNA or RNA to be examined a signal is detected at a corresponding position within that grid pattern, for example through a CCD camera or by a laser scanner, in a usual way.

25 In other words, the afore-described chip technology is based on the knowledge that the expression of a panel of molecules can be analysed simultaneously by hybridizing RNA or DNA molecules to probe nucleic acids immobilised on a carrier in an orderly grid pattern.

30 The present invention is described hereinafter in detail by referring to nucleic acid chips, but it should be understood that it is not limited thereto. The present invention can also be applied to protein chips where probe proteins are immobilised in an orderly grid pattern on a carrier. Proteins in the sample to be investigated can be detected by interaction with the probe proteins. This can be carried out in a usual way. The skilled artisan also knows chemicals, materials and methods to prepare protein chips and to use it accordingly, or chemicals, materials and methods suitable for protein chips can be developed in view of the details given hereinafter in connection with nucleic acid chips.

35 In a preferred embodiment of the present invention, the probe nucleic acids is a gene, gene-product, splice variant of said gene and/or fragment of said gene selected from immune

WO 03/002763

3

PCT/EP02/07179

mediators, transcription factors, acute phase proteins, complement components, adhesion molecules, markers for cell specificity, apoptosis, housekeeping genes, or molecules associated with body response to infection. With these probe nucleic acids, the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome can be carried out in an advantageous way regarding the

5 aforementioned requirements.

The term "fragment" as used herein refers to nucleic acid sequences which are shorter than the gene but still have the characteristics of said gene leading to a protein having basically the same chemical and/or physical properties, in particular functional properties, as the wild type

10 protein.

For the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome, it is in particular advantageous regarding the aforementioned requirements to use a gene, gene product, splice variant of said gene and/or fragment of said gene selected from each of immune mediators, transcription

15 factors, acute phase proteins, complement components, adhesion molecules, markers for cell specificity, apoptosis, housekeeping genes, as well as molecules associated with body response to infection and sepsis.

In a preferred embodiments of the present invention, the biochip further comprises at least one

20 gene, gene product, splice variant of said gene and/or fragment of said gene selected from molecules of the coagulation system and/or infectious agents.

Examples of the immune mediators are growth factors, such as PDGF- α , - β , insulin like growth factor (ILGF), pro- and anti-inflammatory cytokines, such as interleukines, like IL-1 to IL-18, chemokines like platelet factor-4 (PF-4), γ -interferon induced protein 10 (IP 10), growth related

25 proteins Gro- α , - β and - γ , eotaxin, Mip-1 α , Mip-1 β , RANTES, growth factor receptors, cytokine receptors, cytokine induced molecules, chemokine receptors and other cell growth-related antigens.

The transcription factors can be EGR-, NFAT- and NFkB-proteins, and members of the AP-1 and CREB protein family as well as transcription modulators.

30

Other acute phase proteins include C-reactive proteins and tissue factor 1 as well as cytokines, cytokine receptors, cytokine-induced molecules, chemokines, chemokine receptors, kinases, phosphatases, transcription factors and transcription modulators.

35

Examples of the complement components are factor H, FHL-1 and FHR encoding genes.

WO 03/012763

4

PCT/EP02/07179

Markers for cell specificity include CD and adhesion molecules, T cell receptor genes and genes associated with the T cell receptor, such as CD3, CD14, CD11e/CD18, CD28, CD143 proteins, genes coding for cell specific markers such as CD4 and CD8 for T cell subtypes, CD14 for macrophages, IgM for B cells, genes of the cell cycle, genes of the eicosanoid signalling pathway and growth factor receptors.

Representatives of housekeeping genes are glucose-6-phosphate-dehydrogenase, actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.

10 The additional molecules associated with body response to infection and sepsis include genes of the cell cycle, kinases, phosphatases and transcription factors, for example the various transcripts of the human *Calc* genes, representing transcripts coding for procalcitonin, katalalcin N-terminal peptide, katalalcin as well as the calcitonin gene related peptide and products thereof.

15 Inflammation is very often caused by infectious agents like microbes. For a suitable therapy directed against the cause of the inflammation, e. g. the microbes, it is desirable to obtain as much information as possible regarding the microbes. Thus, proteins or genes of the microbes can be fixed on the carrier of the biochip used according to the present invention to obtain such information.

20 The biochip according to the present invention can contain one of the afore mentioned probes or any combination up to all mentioned probes. The selection of the probes can be easily determined by a person skilled in the art depending on the kind of disease to be evaluated.

25 The nucleic acid chip and the protein chip as described above in particular with the specific probe nucleic acids as mentioned above have a plurality of advantages in the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome. One advantage is that, in a very easy and fast way, the diagnosis can be carried out, in particular by using the explicitly aforementioned probe nucleic acids. The determination can be done in an accurate manner. Furthermore, the infectious agent and/or the reactions of the body caused by an infectious agent can be measured directly by detecting genes, gene fragments and/or proteins. By using the biochips as described above, the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome can be standardised. The pattern of expressed or defined genes is useful not only for the diagnosis, but also for the early detection, for monitoring during therapy and for the detection of the severity. In addition, the biochip used in the present invention allows a survey of the progression of the disease, the progress of sepsis and sepsis related syndrome and the success of their treatment.

WO 03/002763

5

PCT/EP02/07179

For using the biochip according to the present invention, DNA or RNA to be examined can be labelled, for example by a fluorescent dye, and applied to the chip. The hybridization of the DNA or RNA to be examined to the probe molecules bound to the carrier having complementary sequences can be detected at the corresponding position within the grid through usual means, for example a CCD camera or by a laser scanner.

The biochip used according to the present invention allows an automative analysis and, furthermore, the amount of samples to be investigated can be determined quantitatively, which makes it possible to give more accurate information on the course of sepsis or sepsis related syndrome and in particular on the success of their treatment.

As already mentioned above, the probe nucleic acids and/or the probe proteins having the aforementioned specificities are immobilised on the carrier. This means that either nucleic acids only, proteins only or nucleic acids together with proteins are bound to the carrier.

According to the biochip used in the present invention, the probes are in particular immobilised on the carrier in an orderly grid pattern as usually carried out in the chip technology as described above. An orderly grid pattern includes areas on the carrier containing the probes for example as a spot. Nucleic acid chips and protein chips are generally provided with a plurality of areas on the carrier. In this case, all areas can have the same probe or the areas can have different probes, i. e. nucleic acid probes and/or protein probes.

In a preferred embodiment of the biochip used according to the present invention, the probe nucleic acids and/or probe proteins are immobilised on the carrier in predetermined areas. This means that the area on which the probes shall be immobilised, is known in advance. It also means that the location on which a specific probe is immobilised on the carrier is known before the chip is used, for example treated with the samples to be investigated. This advantageously allows a standardisation and automation of the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome. Furthermore, the determination is carried out in a very easy and fast way.

In a further preferred embodiment of the biochip used according to the present invention, the areas are spaced from each other. This provides, in a very advantageous manner, better and more accurate results and, furthermore, an automation and standardisation of the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome is possible.

Preferably, the orderly grid pattern of the probes is arranged in the form of parallel rows of the areas. Examples of such a carrier are microtiter plates, where the wells represent the areas for the probes, and which are generally arranged in parallel rows. According to this embodiment, an

WO 03/012763

6

PCT/EP02/07179

automation and standardisation of the determination of inflammation is achieved in an advantageous manner.

5 In a preferred embodiment, the carrier is a glass slide. It has favourable optical characteristics and, furthermore, it has the advantages of being solid, and not fluorescent so that it is in particular useful for the fast and accurate determination of inflammation due to these properties.

10 One method for the preparation of the biochip used according to the present invention shall be described hereinafter.

For the fabrication of the biochip, probes, in particular nucleic acids, can be solved in spotting solutions and thereafter they can be spotted on the carrier by a usual spotting process. As a 15 spotting solution, saline sodium citrate (SSC) buffer is widely used. It can be supplemented with 50 % dimethyl sulfoxide.

15 The binding of the probes, e. g. of the nucleic acids and/or the proteins, to the carrier can be achieved, either by covalent bounds or electrostatical (ionical) bounds.

20 For covalent binding of nucleic acids, for example compounds providing aldehyde groups are coated on the surface of the carrier. Nucleic acids contain primary amino groups which can react with the aldehyde group to form a Schiff base, i.e. a covalent bond.

25 For the electrostatical binding in particular of nucleic acids, use is made of the fact that they are generally negatively charged. By providing positive charges on the surface of the carrier, binding between the negatively charged nucleic acids and the positively charged surface of the carrier can be achieved by an interaction of the charges. For this purpose, glass surfaces coated with compounds providing positive charges, e. g. coated with poly-L-lysine and/or aminosilane are used. Such activated slides are well known in the art.

30 If necessary, cross linking of the nucleic acids with the carrier can be achieved by UV radiation.

35 For the use of the biochip for the diagnosis of sepsis and sepsis related syndrome, labelled mRNA, cDNA or proteins derived from humans or animals to be examined can be hybridised to the probe nucleic acids and/or probe proteins of the biochip and the hybridization pattern can be determined as already described above. Samples to be investigated can be isolated from peripheral blood cells from blood samples, in particular from venous blood, tissue samples, organs or organisms. The samples can be either used directly or can be further purified to obtain sub-groups of hematologic cell population. The blood cells can be lysed and the RNA

WO 03/012763

7

PCT/EP02/07179

can be isolated in the usual way. The mRNA may be further purified and cDNA can be synthesized from mRNA according to standard procedures.

Advantageously, the sample cDNA is derived from fractionated cells or from purified mRNA. Furthermore, the sample nucleic acid can be derived from PCR generated fragments. These samples show the advantage that particularly strong signals are provided.

The cDNA or mRNA used as samples can be labelled with a marker. Any substance can be used as marker which can be detected after hybridization of the samples to the probes of the biochip. Examples of such markers are fluorescent dyes. The labelled cDNA or labelled mRNA can be hybridised to the probes of the biochip in the usual way. Protein analysis can be performed by standard protein arrays technologies accordingly.

Hereinafter, the use of the biochip according to the present invention is described in more detail with reference to nucleic acids but it should be understood that the present invention is not limited to nucleic acids but can also be applied to proteins.

Cells from humans or animals to be investigated can be isolated from blood samples and peripheral blood mononuclear cells by standard procedures such as Ficoll Hypaque centrifugation or by Lymphoprep. In addition, tissues, organs or organisms such as infectious agents isolated from the patient plasma and from other biological sources can be used. The isolated cells can be used to enrich specific cell subtypes such as monocytes, T cell subtypes or B cell subtypes.

In order to purify the cells, they can be further enriched by standard protocols such as FACS sorting, magnet sorting or by lysing specific subtypes of cells. From the cells, tissues, or organisms, total RNA or fractions thereof can be isolated also by standard procedures, such as extraction by means of phenol/chloroform, RNAzol or Trizol.

The isolated RNA may be further purified to mRNA to enrich the number of coding molecules. This can be performed, for example, by oligo-dT selection by means of magnetic beads or by other procedures.

The synthesis of cDNA can also be achieved according to standard procedures. The converted cDNA may be further enriched by temperature cycling of the biological material by polymerase chain reaction using gene specific primers in combination with or in absence of oligo-dT primers.

WO 03/012763

8

PCT/EP02/07179

For preparing a DNA array a carrier such as a Borofloat-33 glass slide can be coated by a thin layer of polymer useful for immobilising the DNA, such as a silane, containing reactive groups for the immobilisation of the DNA.

- 5 The hybridization of the labelled complementary RNA or a labelled complementary cDNA to the nucleic acids immobilised on the carrier can be performed according to standard protocols.

- The labelling of the nucleic acids and the proteins contained in the sample to be investigated can be performed in the usual way such as incorporation reactions, for example incorporation of
10 Cy3- or Cy5- labelled deoxynucleotides into cDNA by means of RTPCR or related reactions.

The signal detection can be performed by scanning for example with a ScanArray 2000.

- The data and the quantitative expression pattern of the gene or the collection of genes can be
15 further analysed and evaluated, for example, electronically by biocomputing using the appropriate software. For this, a computer program can be used to define a correlation of the expression of magnitude of expression of a specific gene or a group of genes with the severity of the inflammatory reactions as determined by assessing laboratory parameters or hemodynamic parameters. Such a program can be used to determine and predict the course of
20 the severity or progression of the disease. In addition, it allows to follow the progress and effects of a therapeutic approach and intervention.

Protein arrays can be performed accordingly. However, for catching and visualisation, protein/protein-interactions can be used.

- 25 According to a preferred embodiment of the use of the present invention, the concentration of the hybridised labelled mRNA, cDNA or protein is determined. This means, in other words, that the level of nucleic acids or proteins in the sample to be investigated is determined quantitatively, which in turn allows easily to follow the course of sepsis or sepsis related
30 syndrome, for example to see whether or not the treatment of them is successful. If it is successful, the level of expressed nucleic acids or proteins in the sample decreases, and accordingly the detected signal is lowered.

- The detection of the hybridised nucleic acid or proteins can be carried out, for example, by laser
35 scanning or CCD equipment, and multi factorial bioinformation analysis can be included to define an association of certain genes or the expression level of certain genes or proteins with the severity of that disease. Severity of acute and inflammatory reactions such as sepsis can be defined, for example, by clinical evaluation such as APACHE II scoring.

WO 03/002763

9

PCT/EP02/07179

In a preferred embodiment, the biochip used according to the present invention can be used in relation to acute or chronic inflammation and, more preferably, for determining inflammation caused by sepsis or sepsis related syndromes. For detecting these diseases, the biochip according to the present invention is in particular useful and allows a fast and accurate
5 determination.

Particularly, the severity of the inflammatory response in a particular set of patients can be determined by assessing well known laboratory and hemodynamic parameters to assess the course, the severity or progression of the disease. The analysis can be performed, for example,
10 by relevant score systems such as APACHE II score.

The invention will be described hereinafter in more detail with reference to the example but it is to be understood that the example is intended only to illustrate the invention but not to limit it thereto.
15

Example 1: Use of a biochip according to the present invention

Whole blood was collected by venal puncture from sepsis patients who are grouped according to the APACHE II score. In addition blood was collected from healthy human volunteers. These
20 samples were collected in commercially available vacutainers, which contain a solution used to stabilize RNA according to standard procedures. RNA was isolated according to the protocol of the supplier and mRNA was isolated according to standard protocols (<http://www.Microarrays.org/pdfs/YeastPolyAIsolation.pdf>). The cDNA was labeled by incorporating Cy3 and Cy5 labeled nucleotides by using reverse transcriptase
25 (<http://www.Microarrays.org/pdfs/HumanRNALabel.pdf>).

Approximately 1000 clones were chosen from a cDNA library containing 75000 human clones (RZPD, Berlin) according to sepsis or sepsis related syndrome relevance. PCR products from these 1000 clones were spotted on poly-L-lysine coated glass slides (Telechem) by using the
30 Omnigrid spotting machine (Genemachines).

The above-described labeled molecules to be investigated were used for hybridization to the cDNAs immobilized on the activated carrier surface as described at (<http://www.Microarrays.org/pdfs/Hybridization.pdf>). Washing was exactly followed according to the protocol (<http://www.Microarrays.org/pdfs/ArrayWashing.pdf>). The Genepix 4000 (Axon) scanner was used to detect the fluorescent labeled hybridized molecules according to the instruction manual. Data were compared between material obtained with sepsis patients and healthy human volunteers and the AIDA Array Evaluation software (raytest) was used for data

WO 03/012763

10

PCT/EP02/07179

analysis to determine up- or down regulated genes. The following data mining approaches were applied in order to determine the correlation of differential gene expression and the severity of sepsis or sepsis related syndrome. By using the above-described biochip it could be demonstrated that analysis of differential gene expression enabled the establishing of
5 diagnoses, quantifying the severity of sepsis or sepsis related syndrome and the measurement the response to therapy.

WO 03/012763

11

PCT/EP02/07179

5

Claims

- 10 1. Use of a nucleic acid and/or a protein chip comprising probe nucleic acids and/or probe proteins, which are specific for cellular stress, inflammatory and immune reactions, associated with stress, inflammatory and immune reactions, induced during acute phase responses or any combination thereof and which are immobilised on a carrier for the diagnosis of sepsis or sepsis related syndrome.
- 15 2. Use according to claim 1, wherein the probe nucleic acid is a gene, gene product, splice variant of said gene and/or fragment of said gene selected from immune mediators, transcription factors, acute phase proteins, complement components, adhesion molecules, markers for cell specificity, apoptosis, housekeeping genes or molecules associated with body response to infection and sepsis.
- 20 3. Use according to any of the preceding claims, wherein the probe nucleic acid further comprises at least one gene, gene product, splice variant of said gene and/or fragments of said gene selected from molecules of the coagulation system and/or infectious agents.
- 25 4. Use according to any of the preceding claims, wherein the probe nucleic acids and/or probe proteins are immobilised on the carrier in predetermined areas
5. Use according to claim 4, wherein the areas are spaced from each other.
- 30 6. Use according to any of the preceding claims, wherein the carrier is a glass slide, a microtiter or nanotiter plate.
- 35 7. Use according to any of the preceding claims, wherein labelled mRNA, labelled cDNA or labelled proteins obtained from humans or animals to be investigated are hybridised to the probe nucleic acid and/or probe proteins of the chip and the hybridization pattern is determined.
- 40 8. Use according to claim 7, wherein the concentration of the hybridised labelled mRNA, cDNA or protein is determined.

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月28日(2003.1.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

敗血症および感染に対する生体の応答に関連する、免疫メディエータ、転写因子、急性期タンパク質、補体成分、接着分子、細胞特異マーカー、アポトーシス、ハウスキーピングの遺伝子および分子から選択される、遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片であり、かつ敗血症もしくは敗血症関連症候群の診断用に担体に固定化されるプローブ核酸を含む核酸チップの使用。

【請求項2】

プローブ核酸は、血液凝固系の分子および/または感染物質から選択される少なくとも1つの遺伝子、遺伝子産物、前記遺伝子のスプライス・バリエーションおよび/または前記遺伝子の断片をさらに含む、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

プローブ核酸は担体上の所定の領域に固定化される、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】

前記領域は互いに間隔が空いている、請求項3に記載の使用。

【請求項5】

担体はガラスのスライド、マイクロタイタープレートもしくはナノタイタープレートである、請求項1～4のいずれか一項に記載の使用。

【請求項6】

試験しようとするヒトもしくは動物から得られた標識mRNAまたは標識cDNAを、チップのプローブ核酸とハイブリッド形成させ、ハイブリッド形成パターンを測定する、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用。

【請求項7】

ハイブリッド形成した標識mRNAまたはcDNAの濃度が測定される、請求項6に記載の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 02/07179
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 40434 A (INVITROGEN) 12 August 1999 (1999-08-12) claims 28,30	1-8
X	ROWE C A ET AL: "AN ARRAY IMMUNOSENSOR FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF CLINICAL ANALYTES" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 71, no. 2, 15 January 1999 (1999-01-15), pages 433-439, XP000825701 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-8
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2002		Date of mailing of the international search report 11/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/07179

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUHNERT PETER ET AL: "Diagnostic use of macro-arrays for Escherichia coli-specific virulence gene probes." JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, vol. 38, no. 3, November 1999 (1999-11), page 236 XP002218728 European Meeting on Molecular Diagnostics; Scheveningen, The Hague, Netherlands; October 13-16, 1999 ISSN: 0167-7012 abstract ---	1-8
Y	KUESTER HELMUT ET AL: "Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation." LANCET (NORTH AMERICAN EDITION), vol. 352, no. 9136, 17 October 1998 (1998-10-17), pages 1271-1277, XP002218729 ISSN: 0099-5355 the whole document ---	1-8
Y	HELLER R A ET AL: "Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, no. 94, pages 2150-2155, XP002076789 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-8
Y	WO 98 53103 A (CLONTECH LABORATORIES, INC) 26 November 1998 (1998-11-26) page 9, line 11 -page 13, line 19 page 87; table 5 page 120; table 8 page 6, line 13 -page 9, line 10; examples 1,6 page 149, line 25 -page 150, line 2 --- -/-	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/07179

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HYLAND KENDRA ET AL: "Immune gene expression from porcine jejunal tissue in response to acute infection by Salmonella choleraesuis." FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 4, 7 March 2001 (2001-03-07), page A364 XP001041970 Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology on Experimental Biology 2001; Orlando, Florida, USA; March 31-April 04, 2001 ISSN: 0892-6638 the whole document</p>	1-8
Y	<p>NADADUR S S ET AL: "A pulmonary rat gene array for screening altered expression profiles in air pollutant-induced lung injury." INHALATION TOXICOLOGY, (2000 DEC) 12 (12) 1239-54, XP001042142 the whole document</p>	1-8
A	<p>MANSER I D ET AL: "How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 12, no. 2, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 215-218, XP004257645 ISSN: 0952-7915 the whole document</p>	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/07179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9940434	A	12-08-1999	AU 2583899 A	23-08-1999
			CA 2318175 A1	12-08-1999
			EP 1060395 A1	20-12-2000
			JP 2002502977 T	29-01-2002
			US 2002164656 A1	07-11-2002
			WO 9940434 A1	12-08-1999
			WO 9853103	A
AU 742342 B2	20-12-2001			
AU 7593398 A	11-12-1998			
EP 0988398 A1	29-03-2000			
JP 2002504812 T	12-02-2002			
WO 9853103 A1	26-11-1998			
US 6352829 B1	05-03-2002			
US 6077673 A	20-06-2000			

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 M 1/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ツィフェル、ペーター フランツ
 ドイツ連邦共和国 D - 0 7 7 4 5 イェナ ラウエンシュタインベーク 4

(72) 発明者 ザルーツ、ハンス - ペーター
 ドイツ連邦共和国 D - 0 7 6 4 6 オーベルボドニッツ ドルフシュトラッセ 2 2

(72) 発明者 ラスブルム、シュテファン
 ドイツ連邦共和国 D - 0 7 7 4 3 イェナ アン デル ロイトラ 4

(72) 発明者 ラインハルト、コンラート
 ドイツ連邦共和国 D - 0 7 7 4 3 イェナ フィロソフェンベーク 1 7

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB50 BB51 CA25 DA13 DA14 FA11 FB02 FB12 GC15
 JA01
 4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA12 HA08 HA12 HA20
 4B029 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR50 QR56
 QR72 QR77 QR82 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	使用生物芯片诊断败血症或败血症相关综合征		
公开(公告)号	JP2005500834A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003508727	申请日	2002-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	斯尔思实验室有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jirusu - 拉普有限公司		
[标]发明人	ツイフェルペーターフランツ ザルーツハンスペーター ラスブルムシュテファン ラインハルトコンラート		
发明人	ツイフェル、ペーター フランツ ザルーツ、ハンスペーター ラスブルム、シュテファン ラインハルト、コンラート		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6837 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6837		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.F C12N15/00.A C12M1/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA20 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	2001115946 2001-06-29 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请涉及与急性期反应诱导的应激反应，炎症和免疫反应相关的细胞应激反应，炎症反应和免疫反应，或其中任何一种。以及固定在载体上的探针核酸和/或探针蛋白，用于诊断败血症或败血症相关综合征。

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 January 2005 (09.01.2005)

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/JP02/07179

(22) International Filing Date: 28 June 2002 (28.06.2002)

(23) Filing Language: English


(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 29 June 2001 (29.06.2001) EP 0111946.6

(71) Applicant (for all designated States except US): SIRS-Lab GmbH (DE/DE); Wankmühl Strasse 2a, D-07745 Jena (DE)

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): ZWIFEL, Peter, Evans (DE/DE); Lauenrodtweg 4, D-07745 Jena (DE); SALLIZ, Hans-Peter (DE/DE); Dordstrasse 22, D-07080 Ochsleben, (DE); RUSSEWIRTH, Stefan (DE/DE); Av. des Fontes 4, D-07723 Jena (DE); REINHART, Konrad (DE/DE); Plathschloßweg 17, D-07743 Jena (DE).

(74) Agents: STORF, Christian et al.; Promontorio, Geyer, Polster & Partner, Postfachstrasse 31, D-96087 Mühlhausen (DE)




(10) International Publication Number
WO 03/002763 A1

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PR, RU, RW, SD, SE, SG, SI, SK, SL, ST, SV, TD, TN, TR, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO (national), GCL, GL, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW; Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR); OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



03/002763 A1

(54) Title: USE OF A BIOPHILIP FOR THE DIAGNOSIS OF SEPSIS OR SEPSIS RELATED SYNDROME