

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7225089号

(P7225089)

(45)発行日 令和5年2月20日(2023.2.20)

(24)登録日 令和5年2月10日(2023.2.10)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/68

A 6 1 K 38/08 (2019.01)

A 6 1 K 38/08

A 6 1 K 38/55 (2006.01)

A 6 1 K 38/55

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 13 (全41頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-514252(P2019-514252)

(73)特許権者 000002934

(86)(22)出願日 平成29年9月15日(2017.9.15)

武田薬品工業株式会社

(65)公表番号 特表2019-529906(P2019-529906
A)大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1
号

(43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(74)代理人 100114775

(86)国際出願番号 PCT/US2017/051749

弁理士 高岡 亮一

(87)国際公開番号 WO2018/053244

(74)代理人 100121511

(87)国際公開日 平成30年3月22日(2018.3.22)

弁理士 小田 直

審査請求日 令和2年9月14日(2020.9.14)

(74)代理人 100202751

(31)優先権主張番号 62/518,492

弁理士 岩堀 明代

(32)優先日 平成29年6月12日(2017.6.12)

(74)代理人 100208580

(33)優先権主張国・地域又は機関

弁理士 三好 玲奈

米国(US)

(74)代理人 100191086

(31)優先権主張番号 62/395,712

弁理士 高橋 香元

(32)優先日 平成28年9月16日(2016.9.16)

(72)発明者 セクストン, ダニエル, ジェー.

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 接触活性化系に関連する疾患のタンパク質バイオマーカー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 接触活性化系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象から得られた生体サンプルを用意することと、

(ii) 表1から選択される少なくとも1種のタンパク質を含むバイオマーカーのセットのレベルを測定することと、

を含む、サンプルを分析するための方法であって、前記少なくとも1種のタンパク質はインターロイキン36アルファ(IL-1F6)を含み、前記接触活性化系に関連する疾患は遺伝性血管性浮腫(HAE)である、方法。

【請求項2】

前記バイオマーカーのセットは、表1から選択される2~10種のタンパク質からなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記生体サンプルは血清サンプルまたは血漿サンプルである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記HAEはI型HAEまたはII型HAEである、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記バイオマーカーのセットは、

(i) A T P シンターゼサブユニット O (A T P O)、シクロフィリン F およびミトコンドリア熱ショックタンパク質 6 0 (H S P 6 0) からなる群より選択されるミトコンドリアタンパク質；

(ii) 1 4 - 3 - 3 ゼータ / デルタ または 1 4 - 3 - 3 ベータ / アルファ；

(iii) プロテインキナーゼ Y E S、プロテインキナーゼ L Y N および マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 1 4 (M A P K 1 4) からなる群より選択されるプロテインキナーゼ；または

(iv) グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 アルファ / ベータ、A T P 依存性 R N A ヘリカーゼ D D X 1 9 B および 真核生物翻訳開始因子 5 A - 1 からなる群より選択されるタンパク質；

をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記生体サンプルは、1 種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む真空採血管中に採取された生体サンプルである、および / または

ステップ (i i) は、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A)、イムノブロットティングアッセイまたはラテラルフローアッセイを用いて実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象はヒト患者である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象の前記バイオマーカーのセットのレベルが対照となる対象の同じバイオマーカーのセットのレベルから逸脱することが、前記対象が前記接触活性化系に関連する疾患を有することを示す、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象は、前記疾患の治療を受けているヒト患者であり、前記方法は、前記バイオマーカーのセットのレベルに基づいて前記治療の有効性を評価することをさらに含み、前記対象の前記バイオマーカーのセットのレベルが対照となる対象のものから逸脱することが前記治療の有効性を示す、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記対象の前記バイオマーカーのセットのレベルが、対照となる対象の同じバイオマーカーのセットのレベルから逸脱する場合に、前記対象を前記疾患の治療の候補として特定することをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

接触系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象のサンプルを分析するためのキットであって、

(i) 表 1 から選択される第 1 のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な第 1 の結合物質と、

(i i) 表 1 から選択される第 2 のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な第 2 の結合物質と、

を含み、前記第 1 のタンパク質バイオマーカーと前記第 2 のタンパク質バイオマーカーは異なり、前記第 1 のタンパク質バイオマーカーはインターロイキン 3 6 アルファ (I L - 1 F 6) であり、前記接触系に関連する疾患は遺伝性血管性浮腫 (H A E) である、キット。

【請求項 1 2】

前記第 1 の結合物質に結合する第 1 の検出用物質と前記第 2 の結合物質に結合する第 2 の検出用物質とをさらに含む、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 3】

前記第 1 の結合物質は、前記第 1 のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である、および / または前記第 2 の結合物質は、前記第 2 のタンパク質バイオマーカーに対

10

20

30

40

50

して特異的な抗体である、および／または前記第 1 の結合物質および前記第 2 の結合物質は、支持部材上に固定化されている、請求項 11 または 12 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年6月12日に提出された米国仮出願第62/518,492号および2016年9月16日に提出された米国仮出願第62/395,712号の合衆国法典第35編第119条(e)に基づく恩典を主張する。言及されたこれらの出願の各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

背景

血漿接触活性化系は、血漿プロテアーゼの一群を伴う炎症促進性および血液凝固促進性の系である。血漿接触活性化系は、外来性の表面もしくは負に荷電した表面に曝されると第XIIa因子によって、あるいは内皮細胞表面上でプロリルカルボキシペプチダーゼによって、活性化される(Sainz I. M. et al., Thromb. Haemost. (2007) 98, 77-83)。接触系の不適切な活性化または無秩序な活性化は、遺伝性血管性浮腫(HAE)を含む様々な疾患に関連している。

【0003】

20

HAEは、身体の複数の部分(顔、四肢、生殖器、胃腸管および上気道など)に影響を与え得る、腫脹の突発性発作を引き起こす疾患である。HAEの症状はアレルギーまたは腸疝痛の症状に似ていることが多いため、HAEの患者は、重篤な症状または生命を脅かす症状を示すまで特定が困難であることが多い。早期の診断は、急性のHAE発作を伴う緊急事態のより良好な管理を可能にするであろうし、早期の診断はまた、急性のHAEエピソードを防止するか弱めるようにHAE患者を管理するのに役立つであろう(例えば、HAE患者に、HAEエピソードを引き起こす可能性のある刺激への曝露を回避させる)。

【0004】

従って、HAEのバイオマーカーを特定し、特定のタイプのHAEを有する対象または急性のHAE発作を患うリスクがある対象を特定するための信頼できる診断および予後診断の方法を開発することは非常に興味深い。そのようなバイオマーカーはまた、この疾患に対する効果的な新しい治療法を開発を促進し得る、疾患のメカニズムに関する研究にも有益であろう。

30

【発明の概要】

【0005】

本開示の概要

本開示は、接触活性化系に関連する疾患を有する対象から得られた生体サンプルでは健康な個体に比べて異なって存在する、またはそのような疾患の異なる段階(例えば、発作対静止状態)の対象から得られた生体サンプルでは異なって存在する、タンパク質の特定に基づく。

40

【0006】

従って、本開示の一態様は、(i)接触活性化系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象(ヒト対象など)から得られた生体サンプル(例えば、血清サンプルまたは血漿サンプル)を用意することと、(ii)表1から選択される少なくとも1種のタンパク質を含むバイオマーカーのセットのレベルを測定することと、を含むサンプルを分析する方法であって、バイオマーカーのセットが1種のタンパク質からなる場合には前記タンパク質はC4、血漿プレカリクレイン、トロンビン、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)および熱ショックタンパク質90ではない、方法を提供する。一部の実施形態において、接触活性化系に関連する疾患は、I型HA

50

E または I I 型 H A E などの遺伝性血管性浮腫 (H A E) である。

【 0 0 0 7 】

一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、表 1 から選択される 2 ~ 1 0 種のタンパク質からなる。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、A T P シンターゼサブユニット O (A T P O)、シクロフィリン F またはミトコンドリア熱ショックタンパク質 6 0 (H S P 6 0) であってよいミトコンドリアタンパク質である。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、1 4 - 3 - 3 ゼータ / デルタまたは 1 4 - 3 - 3 ベータ / アルファである。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、プロテインキナーゼ Y E S、プロテインキナーゼ L Y N またはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ 1 4 (M A P K 1 4) であってよいプロテインキナーゼである。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 アルファ / ベータである。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、A T P 依存性 R N A ヘリカーゼ D D X 1 9 B (D E A D b o x 1 9 B) である。一部の実施形態において、少なくとも 1 種のタンパク質は、真核生物翻訳開始因子 5 A - 1 (e I F - 5 A - 1) である。

10

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態において、生体サンプルを用意することは、1 種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む真空採血管中に生体サンプルを採取することを含む。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットのレベルを測定することは、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A)、イムノブロットングアッセイまたはラテラルフローアッセイを用いて実施される。

20

【 0 0 0 9 】

一部の実施形態において、方法は、対象のバイオマーカーのセットのレベルが、対照となる対象の同じバイオマーカーのセットのレベルから逸脱する場合に、対象が接触系に関連する疾患を有すると特定することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、対象が疾患を有すると特定された場合に、疾患を治療するための治療薬 (血漿カリクレイン (p K a 1) 阻害剤、ブラジキニン 2 受容体阻害剤、および / または C 1 エステラーゼ阻害剤など) の有効量を対象に投与することをさらに含む。一部の実施形態において、p K a 1 阻害剤は、抗 p K a 1 抗体 (例えば、ラナデルマブ) または阻害性ペプチド (例えば、エカランチド) である。一部の例では、ブラジキニン 2 受容体阻害剤は、阻害性ペプチド (例えば、イカチバント) である。一部の例では、C 1 エステラーゼ阻害剤は、ヒト血漿由来 C 1 エステラーゼインヒビターである。

30

【 0 0 1 0 】

一部の実施形態において、対象は、疾患の治療を受けているヒト患者であり、ここで、方法は、バイオマーカーのセットのレベルに基づいて治療の有効性を評価することをさらに含み、対象のバイオマーカーのセットのレベルが対照となる対象のものから逸脱することは、治療の有効性を示す。一部の実施形態において、方法は、バイオマーカーのセットのレベルに基づいて対象に適している治療を特定することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、バイオマーカーのセットのレベルに基づいて対象を疾患の治療の候補として特定することをさらに含む。

40

【 0 0 1 1 】

本開示は、接触活性化系に関連する疾患 (例えば、H A E) を有する患者を特定することが可能なバイオマーカーを提供する。バイオマーカーのセットのレベルを測定することはまた、そのような疾患の評価および治療において有用であることもある。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、接触系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象のサンプルを分析するためのキットであって、表 1 から選択される第 1 のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な第 1 の結合物質と表 1 から選択される第 2 のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な第 2 の結合物質とを含むキットが提供され、ここで、第 1 のタンパク質バイオマーカーと第 2 のタンパク質バイオマーカーは異なる

50

。一部の例では、第 1 の結合物質および / または第 2 の結合物質は、タンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体である。一部の実施形態において、キットは、第 1 の結合物質に結合する第 1 の検出用物質と第 2 の結合物質に結合する第 2 の検出用物質とをさらに含んでよい。一部の実施形態において、第 1 の結合物質と第 2 の結合物質は、支持部材上に固定化される。

【 0 0 1 3 】

本開示の 1 つ以上の実施形態の詳細が、以下の説明に記載されている。本開示の他の特徴または利点は、以下の図面およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、さらには添付の特許請求の範囲からも、明らかになるであろう。

【 0 0 1 4 】

以下の図面は本明細書の一部を成し、本明細書で提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面のうちの 1 つ以上を参照することによってより良好に理解することができる本開示の特定の態様をさらに示すために含まれている。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】図 1 は、基礎レベルにある H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「基礎」 ; N = 3 3) および H A E 発作中の H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「発作」 ; N = 3 3) ならびに健康な個体 (「正常」 ; N = 2 2) からの血漿サンプルにおいて検出されたタンパク質レベルを示すボックスプロットを提示する。A : 補体タンパク質 4 (C 4) のレベル。B : 健康な個体 (N = 2 2) から得られた血漿サンプル、基礎的状态の H A E (I / I I) (N = 3 3) および発作 H A E (I / I I) (N = 3 3) の血漿におけるプレカリクレインのレベル。R F U は相対蛍光単位である。

【図 2】図 2 は、基礎レベルにある H A E (I 型 / I I 型) を有する患者からの血漿サンプル (「H A E 基礎」 ; N = 9) 、 H A E 発作中の H A E 患者からの血漿サンプル (「H A E 発作」 ; N = 1 0) および健康な個体からの血漿サンプル (「H V」 ; N = 2 8) における F X I I a で活性化した後の血漿カリクレインの生成の速度を示すプロットを提示する。

【図 3】図 3 は、基礎レベルにある H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E B」 ; N = 1 8) および H A E 発作中の H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E A」 ; N = 1 9) ならびに健康な個体 (「正常」 ; N = 2 2) からの血漿サンプルにおいて検出された C 1 - エステラーゼインヒビター (C 1 - I N H) のタンパク質レベルを示すボックスプロットを提示する。A : 矢印で示される外れ値を含めて、各個体からの血漿サンプルにおいて検出された C 1 - I N H を示す。B : 外れ値を省いて、各個体からの血漿サンプルにおいて検出された C 1 - I N H を示す。R F U は相対蛍光単位である。健康な患者からの血漿サンプルにおける平均の C 1 - I N H は $6522 \text{ R F U} \pm 1852$ (標準偏差、S D) である。基礎レベルにある H A E を有する患者からの血漿サンプルにおける平均の C 1 - I N H は $1231 \text{ R F U} \pm 673$ (S D) であり、H A E 発作中の H A E を有する患者からの血漿サンプルにおける平均の C 1 - I N H は $1082 \text{ R F U} \pm 530$ (S D) である。

【図 4 - 1】図 4 は、基礎レベルにある H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E B」) および H A E 発作中の H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E A」) ならびに健康な個体 (「正常」) からの血漿サンプルにおいて検出された、ミトコンドリアの機能に關与するいくつかのタンパク質のレベルを示すボックスプロットを提示する。A : A T P シンターゼサブユニット O のレベル。B : シクロフィリン F のレベル。C : ミトコンドリア熱ショックタンパク質 6 0 (H S P 6 0) 。R F U は相対蛍光単位である。

【図 4 - 2】同上。

【図 5】図 5 は、基礎レベルにある H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E B」 ; N = 3 3) および H A E 発作中の H A E (I 型 / I I 型) を有する患者 (「H A E A」 ; N = 3 3) ならびに健康な個体 (「正常」 ; N = 2 2) からの血漿サンプルにおいて検出された 1 4 - 3 - 3 タンパク質ゼータ / デルタのタンパク質レベルを示すボックス

10

20

30

40

50

プロットを提示する。R F Uは相対蛍光単位である。

【図6】図6は、基礎レベルにあるH A E（I型 / I I型）を有する患者（「H A E B」；N = 33）およびH A E発作中のH A E（I型 / I I型）を有する患者（「H A E A」；N = 33）ならびに健康な個体（「正常」；N = 22）からの血漿サンプルにおけるI L - 1 F 6のタンパク質レベルを示すボックスプロットを提示する。R F Uは相対蛍光単位である。

【図7 - 1】図7は、基礎レベルにあるH A E（I型 / I I型）を有する患者からの血漿サンプル（「H A E 基礎」）、H A E発作中のH A E患者からの血漿サンプル（「H A E 発作」）および健康な個体からの血漿サンプル（「H V」）におけるプロテインキナーゼのレベルを示すグラフを提示する。A：チロシン - プロテインキナーゼ（Y E S）。B：チロシン - プロテインキナーゼL y n（L Y N）。C：マイトジェン活性化プロテインキナーゼ14（M A P K 14）。R F Uは相対蛍光単位である。

10

【図7 - 2】同上。

【図8】図8は、基礎レベルにあるH A E（I型 / I I型）を有する患者からの血漿サンプル（「H A E 基礎」）、H A E発作中のH A E患者からの血漿サンプル（「H A E 発作」）および健康な個体からの血漿サンプル（「H V」）におけるグリコーゲンシンターゼキナーゼ3アルファ / ベータ（G S K - 3アルファ / ベータ）のタンパク質レベルを示すグラフを提示する。R F Uは相対蛍光単位である。

【図9】図9は、基礎レベルにあるH A E（I型 / I I型）を有する患者からの血漿サンプル（「H A E 基礎」）、H A E発作中のH A E患者からの血漿サンプル（「H A E 発作」）および健康な個体からの血漿サンプル（「H V」）におけるA T P依存性R N AヘリカーゼD D X 19 B（D E A D b o x p r o t e i n 19 B）のタンパク質レベルを示すグラフを提示する。R F Uは相対蛍光単位である。

20

【図10】図10は、基礎レベルにあるH A E（I型 / I I型）を有する患者からの血漿サンプル（「H A E 基礎」）、H A E発作中のH A E患者からの血漿サンプル（「H A E 発作」）および健康な個体からの血漿サンプル（「H V」）における真核生物翻訳開始因子5 A - 1（e I F - 5 A - 1）のタンパク質レベルを示すグラフを提示する。R F Uは相対蛍光単位である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

30

詳細な説明

接触活性化系は、血液凝固の内因性経路を開始させ、炎症促進性ペプチドであるブラジキニンの遊離を介して炎症を促進する。ハーゲマン因子としても知られている第X I I因子（F X I I）は、血液凝固の内因性経路ならびにカリクレイン - キニン系の活性化において役割を担うセリンプロテアーゼである。F X I Iは、負に荷電した表面（例えば、ポリアニオン性の表面、ガラス、ポリホスフェート、エラグ酸）によって活性化されて、活性形態であるF X I I aを生じる。活性化されたF X I I aは、プレカリクレインを切断する能力を有し、活性型p K a 1を生じさせる。その後、活性化されたp K a 1はF X I Iを切断してF X I I aにすることができ、F X I I aがさらに多くのp K a 1を生じさせ、これがさらなるF X I Iをさらに活性化してF X I I aにする、正のフィードバックループがもたらされる。活性化されたp K a 1はまた、高分子量キニノーゲン（H M W K）を切断してブラジキニンを遊離させることもできる。H A Eなど、接触系の活性化に関連する疾患では、ブラジキニンのレベルの増加が、浮腫性H A E発作をもたらす血管拡張と炎症を誘発し得る。例えば、接触活性化系によって媒介されるような疾患を特定するために、そのような疾患を有するかそのような疾患を有するリスクがある対象を特定するために、使用できる新規のバイオマーカーを特定することが望ましい。

40

【0017】

本開示は、プロテオーム解析による、接触活性化系に関連する疾患（例えば、基礎的状态のものまたは発作）を有する対象から得られた生体サンプルでは健康な個体に比べて異なって存在するタンパク質の特定に少なくとも部分的に基づく。特定の細胞経路またはブ

50

ロセスに属するタンパク質（例えば、ミトコンドリアの機能に関与するタンパク質）およびタンパク質ファミリー（例えば、7メンバータンパク質ファミリー（7 member protein family））に属するタンパク質が、健康な個体と比較した場合に、疾患を有する対象からのサンプルにおいて類似する傾向（例えば、上昇または低下したレベル）を有する、ということが予想外に観察された。

【0018】

従って、本明細書で提供されるのは、タンパク質バイオマーカーのセットの存在を検出するかそのレベルを測定することによって、接触活性化系に関連する疾患（例えば、HAE）を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象からの生体サンプルを分析するための方法である。そのような方法は、例えば、接触活性化系に関連する疾患（例えば、HAE）のリスクがある患者を特定するのに、治療の候補を選択するのに、疾患の進行もしくは病状をモニタリングするのに、疾患に対する治療の有効性を評価するのに、治療の過程を決定するのに、対象に疾患の発作のリスクがあるかどうかを評価するのに、疾患もしくは障害が接触活性化系に関連しているかどうかを特定するのに、および/または研究目的（例えば、新しい治療法の開発のために利用される可能性がある、疾患のメカニズムおよび/またはその疾患に関与する生物学的経路/プロセスの研究を含む）に、有用である可能性がある。

【0019】

接触活性化系のタンパク質バイオマーカー

本明細書で説明される方法およびキットは、HAEを有する対象からのサンプルでは健康な対象からのサンプルと比べて異なって存在することが、および/またはそのような疾患の異なる段階（例えば、基礎的状态対発作）の対象からのサンプルでは異なって存在することが、見出されたタンパク質の特定に少なくとも部分的に基づく。本明細書で 사용되는場合、用語「タンパク質バイオマーカー」または「タンパク質バイオマーカーのセット」は、異なる対象群からのサンプルでは異なるレベルで存在するタンパク質またはタンパク質のセットを指す（例えば、接触系に関連する疾患を有する対象対健康な対象（例えば、疾患を有さない対象）、または疾患を有するが静止段階にある対象対疾患の発作中の対象）。そのようなバイオマーカー/バイオマーカーのセットは、診断/予後診断の用途および（例えば研究を目的とする）非臨床用途の両方で使用されてよい。

【0020】

一部の実施形態において、タンパク質バイオマーカーは、接触活性化系に関連する疾患（例えば、HAE）を有する対象からのサンプルでは、健康な対象からのサンプルにおける同じタンパク質バイオマーカーのレベルに比べて上昇したレベルで存在してよい。一部の実施形態において、タンパク質バイオマーカーは、接触活性化系に関連する疾患（例えば、HAE）を有する対象からのサンプルでは、健康な対象からのサンプルにおけるバイオマーカーのレベルに比べて低下したレベルで存在してよい。さらに他の例では、タンパク質バイオマーカーは、本明細書で説明されるような疾患の発作中の対象から得られたサンプルでは、疾患の静止状態の間の対象と比べて上昇したレベルで存在してよい。あるいは、タンパク質バイオマーカーは、本明細書で説明されるような疾患の発作中の対象から得られたサンプルでは、疾患の静止状態の間の対象と比べて低下したレベルで存在してよい。

【0021】

一部の実施形態において、1種以上のバイオマーカーを含むタンパク質バイオマーカーのセットは、本明細書で説明される方法で分析されてよい。タンパク質バイオマーカーのセットが2種以上のバイオマーカーを含む場合、それらのバイオマーカーの全てが、疾患を有する対象において、健康な対象と比べて上昇したレベルまたは低下したレベルで存在してよい。あるいは、タンパク質バイオマーカーのセットは、疾患を有する対象では健康な対象と比べて上昇している少なくとも1種のバイオマーカーと、疾患を有する対象では健康な対象と比べて低下している少なくとも1種のバイオマーカーと、を含んでよい。

【0022】

10

20

30

40

50

同様に、疾患の発作中の対象と疾患の静止状態にある対象とを区別するためのタンパク質バイオマーカーのセット、バイオマーカーのセットは、その全てが第1の疾患段階（例えば、発作）において第2の疾患段階（例えば、静止状態）と比べて上昇または低下している複数のバイオマーカーを含んでよい。あるいは、バイオマーカーのセットは、第1の疾患段階において第2の疾患段階と比べて上昇している少なくとも1種のバイオマーカーと、第1の疾患段階において第2の疾患段階と比べて低下している少なくとも1種のバイオマーカーと、を含んでよい。

【0023】

以下の表1は、接触活性化系に関連する疾患について対象または対象からの生体サンプルを評価するために本明細書で説明される方法によって評価することができるマーカーを提示する。

10

【0024】

一部の実施形態において、本明細書で説明される方法のうちのいずれかで測定および分析されるバイオマーカーのセットは、表1から選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、または11種以上）のタンパク質を含む。バイオマーカーのセットが単一のタンパク質を含む場合、そのタンパク質は、補体タンパク質4（C4）、C1インヒビター、プレカリクレイン、熱ショックタンパク質90、組織型プラスミノーゲンアクチベーターおよびトロンビンのいずれでもない可能性がある。一部の例では、本明細書で説明される方法で測定および分析されるタンパク質バイオマーカーのセットは、補体タンパク質4（C4）、C1インヒビター、プレカリクレイン、熱ショックタンパク質90、組織型プラスミノーゲンアクチベーターおよびトロンビンのうちのいずれか1つの組み合わせを含まない。

20

【0025】

実施例1で説明されるように、ミトコンドリアの機能に關与するいくつかのタンパク質は、HAEを有する対象からのサンプルでは健康な対象に比べて異なって存在する、ということが予想外に見出された。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、表1に列挙されるようなミトコンドリアタンパク質を1種以上含む。一部の実施形態において、ミトコンドリアタンパク質バイオマーカーのセットは、ATPシンターゼサブユニットO（ATPO）、ミトコンドリア熱ショックタンパク質60（HSP60）、シクロフィリンF（シクロフィリンDまたはペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼFとも呼称される；EC：5.2.1.8）またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0026】

やはり実施例1で説明されるように、関連するタンパク質ファミリーに属するいくつかのタンパク質は、HAEを有する対象からのサンプルでは健康な対象に比べて異なって存在する、ということも見出された。一部の実施形態において、バイオマーカーは、14-3-3ゼータ/デルタまたは14-3-3ベータ/アルファである。一部の実施形態において、バイオマーカーは、チロシンプロテインキナーゼYES、チロシンプロテインキナーゼLYNまたはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ14（MAPK14）などのプロテインキナーゼまたはそれらの組み合わせである。一部の実施形態において、バイオマーカーは、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3アルファ/ベータ（GSK-3アルファ/ベータ）である。一部の実施形態において、バイオマーカーは、ATP依存性RNAヘリカーゼDDX19B（DEAD box protein DDX19B）である。一部の実施形態において、バイオマーカーは、真核生物翻訳開始因子5A-1（eIF-5A-1）である。また、これらのタンパク質バイオマーカーの任意の組み合わせも本開示の範囲内に属する。

40

【0027】

表1：接触系の活性化のバイオマーカー

【表 1】

タンパク質	q	p	H	C統計量	C統計量 確率	プールの 分散の手法の 場合のt検定	発作／ 正常	基礎／ 正常	発作／ 基礎
Complement C4	6.81E-09	5.20E-12	5.20E+01	0.998	6.70E-02	2.07E-33	0.10	0.16	0.62
Interleukin-36 alpha (IL-1F6)	1.07E-08	1.63E-11	4.97E+01	0.986	9.80E-05	1.53E-13	0.19	0.24	0.78
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1)	7.80E-04	6.91E-05	1.92E+01	0.947	2.19E-05	2.93E-05	1.36	1.41	0.96
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP 60)	3.00E-07	1.12E-09	4.12E+01	0.938	5.22E-05	1.16E-06	2.88	3.77	0.76
14-3-3 protein family	4.09E-07	2.75E-09	3.94E+01	0.938	4.65E-05	6.79E-03	2.32	2.77	0.83
ATP-dependent RNA helicase DDX19B (DEAD-box protein 19B)	3.00E-07	1.14E-09	4.12E+01	0.936	4.27E-05	2.21E-05	1.82	2.03	0.89
Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)	4.09E-07	3.61E-09	3.89E+01	0.934	2.23E-05	1.89E-03	1.65	1.88	0.88
Tyrosine-protein kinase Lyn (LYN)	4.09E-07	3.59E-09	3.89E+01	0.934	9.56E-05	9.58E-07	3.16	3.80	0.83
Glycogen synthase kinase-3 alpha/beta (GSK-3 alpha/beta)	4.09E-07	3.75E-09	3.88E+01	0.933	2.50E-05	7.34E-05	2.18	2.45	0.89
Tyrosine-protein kinase (YES)	4.09E-07	3.37E-09	3.90E+01	0.933	3.79E-05	9.96E-04	1.36	1.54	0.88
Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK- 1)	5.06E-07	6.18E-09	3.78E+01	0.929	1.28E-05	1.78E-05	1.89	2.05	0.92
Cytochrome P450 3A4	5.06E-07	5.69E-09	3.80E+01	0.928	1.27E-05	1.27E-05	1.66	1.89	0.88
Protein kinase C alpha type (PKC-A)	5.06E-07	5.99E-09	3.79E+01	0.927	2.80E-05	8.36E-06	3.79	4.40	0.86
Tyrosine-protein kinase Lyn, isoform B (LYNB)	5.06E-07	5.93E-09	3.79E+01	0.927	4.92E-05	3.73E-08	3.09	3.59	0.86
Complement C2	5.41E-07	7.02E-09	3.75E+01	0.922	3.90E-06	8.45E-14	0.61	0.68	0.90
Tyrosine-protein kinase CSK (CSK)	8.54E-07	1.17E-08	3.65E+01	0.920	2.35E-05	4.67E-04	3.34	3.93	0.85
Sorting nexin-4	9.51E-07	1.38E-08	3.62E+01	0.919	2.89E-05	5.03E-05	2.36	2.62	0.90
Small ubiquitin-related modifier 3 (SUMO3)	2.11E-05	1.19E-06	2.73E+01	0.918	6.75E-06	1.70E-09	1.50	1.72	0.87
Protein disulfide- isomerase A3	1.12E-06	1.78E-08	3.57E+01	0.917	2.52E-05	2.87E-04	1.58	1.75	0.90
MAP kinase-activated protein kinase 2	1.28E-06	2.52E-08	3.50E+01	0.915	1.40E-05	6.75E-05	2.31	2.53	0.91

10

20

30

40

50

(MAPK2)									
Tyrosine-protein kinase BTK (BTK)	1.12E-06	1.89E-08	3.56E+01	0.914	1.98E-05	2.34E-03	3.20	3.77	0.85
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (FBLN3)	4.01E-04	3.34E-05	2.06E+01	0.913	1.26E-05	2.87E-07	1.26	1.25	1.01
Cyclin-dependent kinase 8:Cyclin-C complex (CDK8/cyclin C)	1.30E-06	2.68E-08	3.49E+01	0.913	2.29E-05	2.56E-04	1.31	1.41	0.93
Pyruvate kinase PKM (M2-PK)	1.28E-06	2.50E-08	3.50E+01	0.912	1.86E-05	6.82E-05	2.70	3.01	0.89
14-3-3 protein theta	3.13E-03	3.45E-04	1.59E+01	0.910	2.55E-05	1.35E-03	1.19	1.26	0.94
Tyrosine-protein kinase Fer (FER)	1.62E-06	4.21E-08	3.40E+01	0.908	4.12E-05	7.68E-04	2.79	3.15	0.89
Tyrosine-protein kinase Fyn (FYN)	1.49E-06	3.74E-08	3.42E+01	0.908	1.22E-04	1.20E-04	1.88	2.08	0.91
Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP70 protein 8)	5.62E-03	6.99E-04	1.45E+01	0.906	2.28E-05	3.88E-06	1.23	1.29	0.95
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D (PPID)	1.98E-06	5.60E-08	3.34E+01	0.906	7.48E-05	6.23E-04	3.32	3.68	0.90
RAC-alpha/beta/gamma serine/threonine-protein kinase (PKB a/b/g)	1.49E-06	3.75E-08	3.42E+01	0.906	2.77E-05	2.07E-03	1.74	2.08	0.84
Calcineurin	1.68E-06	4.48E-08	3.38E+01	0.905	6.52E-05	4.21E-03	1.79	2.06	0.87
Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 (NG36)	4.47E-03	5.26E-04	1.51E+01	0.900	4.74E-05	2.68E-04	0.73	0.73	0.99
Xaa-Pro aminopeptidase 1 (XPNPEP1)	1.40E-06	3.10E-08	3.46E+01	0.899	4.41E-05	8.70E-04	1.79	2.42	0.74
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (ERAB)	1.75E-06	4.80E-08	3.37E+01	0.897	3.39E-05	8.61E-03	1.88	2.37	0.79
Serine/threonine-protein kinase PAK 6 (PAK6)	3.10E-06	1.05E-07	3.21E+01	0.896	6.78E-05	1.07E-04	3.55	3.55	1.00
Chloride intracellular channel protein 1 (NCC27)	2.88E-06	8.80E-08	3.25E+01	0.896	1.97E-05	3.38E-03	2.21	2.57	0.86
Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2 adapter protein)	1.28E-06	2.49E-08	3.50E+01	0.895	1.31E-04	6.14E-04	2.66	3.23	0.82
Sphingosine kinase 1	2.91E-06	9.55E-08	3.23E+01	0.894	3.34E-05	1.32E-04	2.45	2.80	0.88
Methionine aminopeptidase 1 (METAP1)	2.91E-06	9.34E-08	3.24E+01	0.894	7.58E-05	3.97E-03	1.90	2.19	0.87
Complement C1r subcomponent	3.10E-06	1.06E-07	3.21E+01	0.893	3.05E-05	9.79E-09	1.72	1.62	1.06

10

20

30

40

50

Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1 (UFC1)	2.71E-06	8.07E-08	3.27E+01	0.892	2.99E-05	1.17E-05	1.52	1.75	0.87
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (STAT1)	4.07E-06	1.50E-07	3.14E+01	0.890	4.75E-05	5.44E-05	2.20	2.27	0.97
Alpha-enolase	4.07E-06	1.43E-07	3.15E+01	0.889	2.61E-05	2.18E-04	1.81	2.03	0.89
Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	4.07E-06	1.47E-07	3.15E+01	0.889	1.06E-04	3.14E-03	1.82	2.09	0.87
Translationally-controlled tumor protein (TCTP)	4.07E-06	1.52E-07	3.14E+01	0.888	5.11E-05	1.24E-03	1.93	2.24	0.86
Mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3)	5.47E-06	2.13E-07	3.07E+01	0.887	6.69E-05	6.78E-05	1.53	1.57	0.97
beta-adrenergic receptor kinase 1 (BARK1)	4.53E-06	1.73E-07	3.11E+01	0.887	5.28E-05	3.47E-04	2.07	2.34	0.88
Mitogen-activated protein kinase 1 (MK01)	5.68E-06	2.25E-07	3.06E+01	0.886	1.11E-04	2.67E-04	1.82	1.89	0.97
Mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2)	6.40E-06	2.64E-07	3.03E+01	0.881	2.66E-05	2.80E-04	2.05	2.29	0.89
cAMP-regulated phosphoprotein 19 (ARP19)	7.11E-06	3.10E-07	3.00E+01	0.879	5.17E-05	5.74E-04	1.72	1.82	0.94
Ribosome maturation protein SBDS (SBDS)	7.50E-06	3.32E-07	2.98E+01	0.879	5.76E-05	5.27E-04	2.00	2.23	0.90
Dynein light chain roadblock-type 1 (DLRB1)	6.94E-06	2.91E-07	3.01E+01	0.879	4.10E-04	8.47E-03	1.87	2.36	0.79
Bcl-2-like protein 1	7.96E-06	3.65E-07	2.96E+01	0.876	5.45E-05	2.85E-04	1.23	1.38	0.89
14-3-3 protein beta/alpha	1.02E-05	4.73E-07	2.91E+01	0.876	4.66E-05	3.93E-03	1.77	2.00	0.88
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (IF4G2)	5.89E-06	2.38E-07	3.05E+01	0.875	6.94E-05	1.18E-03	2.49	3.33	0.75
Dual specificity protein phosphatase 3 (DUS3)	7.96E-06	3.60E-07	2.97E+01	0.875	3.39E-03	9.30E-03	1.53	1.92	0.80
Coiled-coil domain-containing protein 80 (URB)	1.05E-05	5.01E-07	2.90E+01	0.874	5.64E-05	4.13E-06	1.37	1.26	1.09
Heat shock protein beta-1 (HSP 27)	1.08E-05	5.29E-07	2.89E+01	0.873	4.77E-05	4.69E-05	2.49	2.66	0.94
Cofilin-1 (Cofilin-1)	1.05E-05	5.04E-07	2.90E+01	0.872	5.73E-05	7.02E-05	1.49	1.63	0.92
3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDPK1)	1.24E-05	6.34E-07	2.85E+01	0.871	9.29E-05	2.61E-03	2.00	2.29	0.87
Interleukin-17B (IL-17B)	1.31E-05	6.82E-07	2.84E+01	0.871	5.83E-02	1.63E-02	0.88	0.89	0.99

10

20

30

40

50

Nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B)	1.15E-05	5.70E-07	2.88E+01	0.870	3.16E-05	2.79E-05	1.76	2.08	0.84
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)	1.22E-05	6.16E-07	2.86E+01	0.869	2.48E-05	3.68E-04	1.84	2.13	0.86
Plasma prekallikrein	2.50E-05	1.45E-06	2.69E+01	0.863	7.37E-06	4.30E-09	0.77	0.78	0.98
Tyrosine-protein kinase Tec (TEC)	2.26E-05	1.29E-06	2.71E+01	0.863	2.25E-04	4.14E-03	1.58	1.68	0.94
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1 (MED-1)	9.52E-04	8.72E-05	1.87E+01	0.862	5.43E-05	4.05E-04	0.84	0.82	1.03
Platelet glycoprotein VI (GPVI)	2.05E-05	1.14E-06	2.74E+01	0.862	3.53E-05	8.61E-04	1.65	1.94	0.85
Heat shock protein HSP 90-alpha/beta (HSP 90a/b)	2.05E-05	1.13E-06	2.74E+01	0.862	1.26E-04	2.24E-03	1.63	1.87	0.87
Protein kinase C beta type (splice variant beta-II) (PKC-B-II)	1.37E-06	2.92E-08	3.47E+01	0.858	1.35E-04	2.25E-03	3.42	3.99	0.86
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 (NMT1)	2.86E-05	1.71E-06	2.66E+01	0.857	2.72E-04	2.26E-04	1.68	1.77	0.95
Beta-Ala-His dipeptidase (CNDP1)	1.68E-03	1.64E-04	1.74E+01	0.856	4.30E-04	5.57E-04	0.68	0.63	1.08
Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	2.86E-05	1.72E-06	2.65E+01	0.855	1.48E-04	1.66E-03	1.98	2.36	0.84
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclophilin A)	2.99E-05	1.82E-06	2.64E+01	0.855	7.84E-05	2.10E-05	1.44	1.54	0.94
Thrombopoietin (Tpo)	9.68E-04	8.94E-05	1.86E+01	0.855	1.15E-04	3.11E-04	1.28	1.40	0.91
Protein amnionless (AMNLS)	4.20E-05	2.66E-06	2.57E+01	0.851	2.64E-05	2.53E-09	0.75	0.76	0.99
Drebrin-like protein (DBNL)	7.00E-05	4.75E-06	2.45E+01	0.848	1.18E-04	3.14E-03	1.34	1.46	0.92
Lactadherin (MFGM)	5.96E-05	4.00E-06	2.49E+01	0.848	1.06E-05	2.60E-08	0.62	0.59	1.05
Alpha-2-macroglobulin	5.24E-05	3.48E-06	2.51E+01	0.848	6.07E-05	4.39E-07	0.66	0.65	1.02
HemK methyltransferase family member 2 (HEMK2)	5.00E-05	3.25E-06	2.53E+01	0.848	2.84E-03	1.38E-02	1.38	1.51	0.91
Angiotensinogen	4.99E-05	3.20E-06	2.53E+01	0.847	8.71E-04	4.91E-09	0.64	0.61	1.04
Transgelin-2 (Transgelin-2)	3.13E-04	2.51E-05	2.12E+01	0.847	3.22E-03	1.63E-02	1.38	1.60	0.86
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (PTP-1C)	8.07E-05	5.67E-06	2.42E+01	0.844	1.52E-04	3.90E-03	1.69	1.84	0.92
Protein kinase C theta type (KPCT)	5.08E-05	3.34E-06	2.52E+01	0.844	2.32E-04	1.83E-03	1.66	1.90	0.87
Calpain I	9.12E-05	6.47E-06	2.39E+01	0.839	1.64E-04	1.32E-03	1.48	1.65	0.90
Epidermal growth factor receptor	9.97E-05	7.31E-06	2.37E+01	0.836	5.63E-05	1.37E-06	0.81	0.81	1.01

10

20

30

40

50

(ERBB1)									
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (PRKACA)	1.52E-05	8.14E-07	2.80E+01	0.836	8.71E-03	4.02E-02	1.70	2.68	0.63
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, liver)	9.97E-05	7.27E-06	2.37E+01	0.834	3.32E-04	1.84E-04	1.75	1.90	0.92
Integrin alpha-1; beta-1 complex (Integrin a1b1)	1.32E-04	9.80E-06	2.31E+01	0.833	3.72E-04	2.64E-03	1.50	1.59	0.94
Fibroblast growth factor 17 (FGF-17)	8.04E-05	5.59E-06	2.42E+01	0.832	2.84E-04	1.12E-06	0.86	0.85	1.02
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90b)	3.51E-05	2.20E-06	2.61E+01	0.831	3.46E-04	3.72E-04	1.47	1.57	0.93
Inhibitor of growth protein 1 (ING1)	1.73E-04	1.32E-05	2.25E+01	0.830	3.83E-04	4.08E-03	1.58	1.66	0.95
Hsp90 co-chaperone Cdc37 (CDC37)	1.92E-04	1.50E-05	2.22E+01	0.828	6.35E-03	1.64E-02	1.36	1.51	0.90
Complement factor D	1.90E-04	1.47E-05	2.23E+01	0.826	1.15E-04	8.86E-07	1.22	1.24	0.98
Serotransferrin (Transferrin)	1.69E-04	1.27E-05	2.26E+01	0.823	3.65E-05	2.11E-07	0.86	0.84	1.02
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog (DRG-1)	2.99E-04	2.38E-05	2.13E+01	0.818	9.38E-03	6.18E-03	1.55	1.70	0.91
Adapter molecule crk (CRK)	7.67E-05	5.27E-06	2.43E+01	0.813	1.77E-03	6.63E-03	1.33	1.76	0.76
Methionine aminopeptidase 2 (AMPM2)	3.32E-04	2.71E-05	2.10E+01	0.812	1.25E-03	6.28E-04	1.50	1.63	0.92
Tissue-type plasminogen activator (tPA)	4.00E-04	3.30E-05	2.06E+01	0.809	9.44E-04	4.59E-04	1.68	1.77	0.95
Importin subunit beta-1 (IMB1)	2.17E-04	1.71E-05	2.20E+01	0.806	3.15E-02	3.92E-02	1.49	2.15	0.69
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta (CAMK2D)	5.25E-04	4.53E-05	2.00E+01	0.805	2.20E-03	9.71E-03	1.43	1.59	0.90
Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF sR2)	7.51E-04	6.59E-05	1.93E+01	0.802	1.02E-03	8.79E-05	0.82	0.83	0.99
Histone deacetylase 8 (HDAC8)	2.21E-03	2.35E-04	1.67E+01	0.802	1.82E-03	4.83E-02	1.15	1.19	0.96
Carbonic anhydrase 13	4.49E-04	3.77E-05	2.04E+01	0.801	3.99E-03	2.50E-02	1.64	2.31	0.71
ATP synthase subunit O, mitochondrial (ATPO)	3.00E-07	1.05E-09	4.14E+01	0.800	4.56E-03	2.45E-03	3.76	4.34	0.87
Dual specificity mitogen-activated protein kinase 3 (MP2K3)	4.48E-03	5.30E-04	1.51E+01	0.799	1.20E-04	7.84E-06	1.22	1.31	0.93

10

20

30

40

50

Histone H2A.z	3.19E-04	2.58E-05	2.11E+01	0.795	7.40E-04	2.46E-03	1.69	1.42	1.19
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRCN1)	1.28E-06	2.55E-08	3.50E+01	0.794	3.95E-03	9.74E-03	3.83	3.97	0.97
Beta-2-microglobulin	2.21E-03	2.37E-04	1.67E+01	0.793	5.16E-04	8.62E-05	1.21	1.20	1.01
Hemoglobin	8.67E-04	7.75E-05	1.89E+01	0.791	4.41E-02	3.34E-03	0.33	0.35	0.93
Bone morphogenetic protein receptor type-1A (BMPRI1A)	1.26E-03	1.17E-04	1.81E+01	0.787	3.72E-04	9.16E-06	0.75	0.72	1.05
Neurogenic locus notch homolog protein 1 (Notch 1)	1.57E-03	1.51E-04	1.76E+01	0.787	6.95E-05	1.22E-06	0.86	0.85	1.01
Thrombin	1.54E-03	1.47E-04	1.76E+01	0.786	3.40E-04	2.07E-02	0.52	0.55	0.95
Kallistatin	1.70E-03	1.73E-04	1.73E+01	0.786	2.01E-04	8.12E-06	0.83	0.85	0.98
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13 (ATS13)	1.70E-03	1.71E-04	1.73E+01	0.785	5.40E-04	3.41E-05	0.73	0.74	1.00
Lactoperoxidase (PERL)	1.69E-03	1.67E-04	1.74E+01	0.784	6.52E-04	8.40E-05	0.67	0.73	0.91
Eukaryotic translation initiation factor 4H (eIF-4H)	1.52E-05	8.01E-07	2.81E+01	0.783	4.09E-04	3.20E-05	2.17	3.32	0.65
Macrophage mannose receptor 1	2.17E-03	2.28E-04	1.68E+01	0.782	7.38E-04	2.04E-04	1.21	1.17	1.03
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (MDM2)	4.79E-04	4.06E-05	2.02E+01	0.781	3.63E-03	6.30E-03	1.14	1.30	0.88
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (Mn SOD)	2.03E-03	2.09E-04	1.69E+01	0.779	1.07E-03	1.24E-04	0.81	0.79	1.02
C-type lectin domain family 1 member B (CLC1B)	1.70E-03	1.70E-04	1.74E+01	0.779	8.59E-04	4.74E-04	1.45	1.62	0.90
Interleukin-17 receptor D (IL-17 RD)	2.36E-03	2.54E-04	1.66E+01	0.777	3.10E-03	6.05E-04	0.87	0.87	1.00
E3 ubiquitin-protein ligase CHIP (CHIP)	2.17E-03	2.29E-04	1.68E+01	0.775	5.84E-02	4.07E-02	1.36	1.58	0.86
Hepatocyte growth factor receptor (Met)	3.13E-03	3.49E-04	1.59E+01	0.772	7.58E-04	1.26E-04	0.84	0.83	1.01
Sex hormone-binding globulin (SHBG)	3.87E-03	4.40E-04	1.55E+01	0.770	1.80E-04	5.82E-07	0.41	0.43	0.96
Caspase-3	2.36E-03	2.55E-04	1.65E+01	0.770	2.33E-02	2.29E-02	1.37	1.72	0.80
Cathepsin L2 (Cathepsin V)	3.87E-03	4.44E-04	1.54E+01	0.769	3.64E-04	1.50E-05	0.70	0.74	0.94
Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isoform (NCAM-120)	3.68E-03	4.13E-04	1.56E+01	0.769	6.59E-04	1.22E-04	0.80	0.80	0.99
Insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP-6)	5.63E-03	7.10E-04	1.45E+01	0.766	8.96E-04	5.00E-04	1.17	1.17	0.99
Interleukin-19 (IL-19)	5.62E-03	6.92E-04	1.46E+01	0.763	4.61E-04	7.78E-05	0.83	0.80	1.04
C-type lectin domain family 4 member K (CLC4K)	5.14E-03	6.16E-04	1.48E+01	0.761	9.87E-03	4.73E-03	0.91	0.91	1.01
Tropomyosin alpha-4	4.09E-07	2.95E-09	3.93E+01	0.761	5.91E-04	1.08E-04	4.21	4.39	0.96

10

20

30

40

50

chain (Tropomyosin 4)									
Fibronectin Fragment 3 (FN1.3)	5.45E-03	6.66E-04	1.46E+01	0.759	1.65E-03	6.75E-04	1.35	1.34	1.01
14-3-3 protein zeta/delta	1.12E-06	1.79E-08	3.57E+01	0.758	2.43E-03	8.35E-04	2.22	2.28	0.97
Dipeptidyl peptidase 2 (DPP2)	9.74E-03	1.38E-03	1.32E+01	0.757	3.56E-03	6.71E-04	0.86	0.85	1.01
Phosphoglycerate mutase 1	7.04E-03	9.14E-04	1.40E+01	0.757	1.11E-02	1.20E-02	2.49	2.56	0.97
Interleukin-1 receptor type 2 (IL-1 sRII)	7.08E-03	9.34E-04	1.40E+01	0.756	4.01E-04	8.44E-05	0.83	0.81	1.03
Sclerostin (SOST)	7.82E-03	1.06E-03	1.37E+01	0.755	1.33E-03	3.73E-04	1.60	1.40	1.15
Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP-1)	7.08E-03	9.34E-04	1.40E+01	0.755	3.37E-03	4.27E-04	0.37	0.40	0.94
Roundabout homolog 3 (ROBO3)	6.83E-03	8.81E-04	1.41E+01	0.755	6.67E-02	1.54E-02	0.81	0.77	1.04
Fatty acid-binding protein, heart (FABP)	5.14E-03	6.21E-04	1.48E+01	0.754	1.78E-02	7.60E-03	1.47	1.58	0.93
Properdin	6.55E-03	8.40E-04	1.42E+01	0.754	1.25E-03	1.28E-04	1.18	1.25	0.95
Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3)	7.08E-03	9.26E-04	1.40E+01	0.754	5.66E-03	2.36E-03	0.80	0.77	1.04
Histone H2B type 2-E (H2B2E)	4.32E-03	5.04E-04	1.52E+01	0.752	2.11E-03	1.46E-03	1.58	1.36	1.17
Serine protease HTRA2, mitochondrial (HTRA2)	2.73E-03	2.98E-04	1.62E+01	0.751	2.18E-03	1.83E-03	1.21	1.38	0.88
Netrin receptor UNC5D (UNC5H4)	8.30E-03	1.14E-03	1.36E+01	0.751	1.18E-03	3.14E-04	0.79	0.76	1.04
Haptoglobin	9.47E-03	1.32E-03	1.33E+01	0.749	1.17E-03	3.40E-04	3.10	2.62	1.18
Carbonic anhydrase 6	8.15E-03	1.11E-03	1.36E+01	0.746	1.97E-03	2.88E-05	0.54	0.49	1.09
Complement C4b	4.58E-03	5.46E-04	1.50E+01	0.741	6.25E-03	3.06E-03	1.54	1.86	0.83
Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6)	9.57E-03	1.34E-03	1.32E+01	0.740	1.01E-03	1.85E-04	0.80	0.72	1.10
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha (CAMK2A)	9.10E-03	1.26E-03	1.34E+01	0.728	1.44E-02	2.92E-02	1.13	1.29	0.88
PIK3CA/PIK3R1 (PIK3CA/PIK3R1)	9.13E-03	1.27E-03	1.33E+01	0.710	2.31E-02	2.42E-02	1.17	1.37	0.85
NudC domain-containing protein 3 (NUDC3)	7.45E-03	1.00E-03	1.38E+01	0.708	2.69E-02	2.03E-02	1.10	1.28	0.86

10

20

30

【 0 0 2 8 】

タンパク質バイオマーカーの有用性

本開示の一態様は、接触活性化系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象（例えば、ヒト患者）から得られたサンプルを、そのサンプルにおける本明細書で説明されるようなバイオマーカーのセットのレベルを測定することによって分析するための方法に関する。そのようなアッセイ法から得られた結果は、診断および/または予後診断の用途ならびに他の非臨床用途（研究用途など）に有用であろう。

40

【 0 0 2 9 】

(i) 生体サンプルの分析

本明細書で説明される方法は、対象から得られた生体サンプルを用意することを伴う。本明細書で使用される場合、「生体サンプル」は、対象からの組織（例えば、血液、血漿またはタンパク質）を含む組成物を指す。サンプルには、対象から採取された最初の未処理サンプルならびにその後処理された（例えば、部分的に精製または保存された）形態の両方が包含される。例示的なサンプルには、血液、血漿、涙、または粘液が包含される。一部の実施形態において、サンプルは、血清サンプルまたは血漿サンプルなどの体液サンプルである。一部の実施形態では、例えば疾患の進行を評価するか治療の有効性を評価するために、複数（例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ以上）の生

50

体サンプルが経時的に、または特定の時間間隔で、対象から採取されてよい。

【 0 0 3 0 】

生体サンプルは、当技術分野において公知である任意の手段を用いて対象から得ることができる。一部の実施形態において、サンプルは、サンプル（例えば、血液サンプル）を真空採取管（例えば、真空採血管）中に採取することによって対象から得られる。一部の実施形態において、真空採取管は、例えばサンプル採取中のエキスピボでの接触系の活性化を低減または防止するために、1種以上のプロテアーゼ阻害剤を含む。そのようなプロテアーゼ阻害剤は、液体調合物中に含まれてよい。一部の実施形態において、プロテアーゼ阻害剤は、少なくとも1種のセリンプロテアーゼ阻害剤と少なくとも1種のシステインプロテアーゼ阻害剤とを含む。そのような真空採取管は当技術分野において公知である。例えば、PCT出願第US2016/046681号を参照のこと。任意選択で、真空採血管は、1種以上の抗凝固剤をさらに含んでもよい。

10

【 0 0 3 1 】

用語「患者」、「対象」または「個体」は、互換的に使用されてよく、本明細書で説明されるような分析を必要とする対象を指す。一部の実施形態において、対象は、ヒトであるか、またはヒト以外の哺乳動物である。一部の実施形態において、対象は、接触活性化系に関連する疾患もしくは障害（例えば、HAE）の疑いがあるか、またはそのリスクがある。そのような対象は、その疾患に関連する1つ以上の症状を示す可能性がある。あるいは、またはさらに、そのような対象は、その疾患についての1つ以上のリスク因子（例えば、その疾患に関連する遺伝的因子（例えば、C1-INHにおける遺伝的欠陥））を保有する可能性がある。

20

【 0 0 3 2 】

あるいは、本明細書で説明される分析を必要とする対象は、その疾患の患者であってよい。そのような対象は、現在その疾患の発作に襲われていてよい、または過去にその疾患に苦しんだことがあってよい（例えば、現在は疾患の静止状態にある）。一部の例では、対象は、その疾患の治療（例えば、C1エステラーゼインヒビター（C1-INH）、血漿カリクレイン阻害剤またはブラジキニン阻害剤を伴う治療）を受けていてよいヒト患者である。他の例では、そのようなヒト患者は、そのような治療を受けていなくてよい。

【 0 0 3 3 】

接触活性化系に関連する疾患の例としては、限定されるものではないが、カリクレイン媒介性障害、例えば、ブラジキニン媒介性障害（遺伝性血管性浮腫（HAE）など）、非ヒスタミン依存性特発性血管性浮腫、関節リウマチ、クローン病、ループス、アルツハイマー病、敗血症性ショック、火傷、脳虚血/再灌流傷害、脳浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、黄斑浮腫、血管炎、動脈血栓症または静脈血栓症、心室補助装置もしくはステントに関連する血栓症、血栓症を伴うヘパリン起因性血小板減少症、血栓塞栓性疾患、および不安定狭心症を伴う冠動脈心疾患、浮腫、眼疾患、痛風、腸管の腸疾患（intestinal bowel disease）、口腔粘膜炎、神経障害性疼痛、炎症性疼痛、脊柱管狭窄症 - 変性脊椎疾患、術後イレウス、大動脈瘤、変形性関節症、遺伝性血管性浮腫、肺塞栓症、脳卒中、頭部外傷または腫瘍周囲脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈（MCA）虚血性イベント（脳卒中）、（例えば、血管形成術後の）再狭窄、全身性エリテマトーデス腎炎、自己免疫疾患、炎症性疾患、心血管疾患、神経疾患、タンパク質のミスフォールディングに関連する疾患、血管新生に関連する疾患、高血圧性腎症および糖尿病性腎症、アレルギー性疾患および呼吸器疾患（例えば、アナフィラキシー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、急性呼吸窮迫症候群、嚢胞性線維症、持続的な鼻炎）、ならびに組織損傷（例えば、火傷または化学損傷）が挙げられる。

30

40

【 0 0 3 4 】

一部の実施形態において、接触活性化系に関連する疾患または状態は、遺伝性血管性浮腫（HAE）である。遺伝性血管性浮腫（HAE）は、「クインケ浮腫」、C1エステラーゼインヒビター欠損症、C1インヒビター欠損症、および遺伝性血管神経性浮腫（HAN）としても知られている。HAEは、例えば四肢、顔、生殖器、胃腸管および気道に

50

影響を与え得る、重度の腫脹（血管性浮腫）の再発エピソードを特徴とする。H A E の症状には、例えば、腕、脚、唇、目、舌および／もしくは喉における腫脹；喉の腫脹および突然の嘔声を伴う可能性がある気道閉塞；明白な原因の無い腹部痙攣のエピソードの繰り返し；ならびに／または重篤になる可能性があり且つ腹部痙攣、嘔吐、脱水症、下痢、疼痛および／もしくはショックにつながる可能性がある腸の腫脹が包含される。H A E を有する個体の約 3 分の 1 が、有縁性紅斑と呼称される、かゆみを伴わない発疹を発作中に発症する。

【 0 0 3 5 】

気道の腫脹は、生命を脅かす可能性があり、一部の患者では死をもたらす。死亡率は 1 5 ～ 3 3 % と推定されている。H A E は、1 年あたり約 1 5 , 0 0 0 ～ 3 0 , 0 0 0 件の救急来院をもたらす。

10

【 0 0 3 6 】

外傷またはストレス（例えば、歯科処置、病気（例えば、風邪およびインフルエンザなどのウイルス性疾患）、月経、および手術）は、血管性浮腫の発作を引き起こし得る。H A E の急性発作を防止するために、患者は、以前に発作を引き起こしたことがある特定の刺激を回避しようと努めることができる。しかし、多くの場合、発作は、既知の誘因なしに起こる。典型的には、H A E の症状は、小児期に初めて現れ、思春期の間に悪化する。平均で、無処置の個体は 1 ～ 2 週間ごとに発作を起こし、大部分のエピソードは、約 3 ～ 4 日間続く（ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema）。発作の頻度と期間は、遺伝性血管性浮腫を有する人々の間で（たとえ同じ家族の人々の間であっても）大きく異なる。

20

【 0 0 3 7 】

I 型、I I 型および I I I 型として知られている 3 つのタイプの H A E が存在する。5 0 , 0 0 0 人に 1 人が H A E に罹患し、I 型が症例の約 8 5 % を占め、I I 型が症例の約 1 5 % を占め、I I I 型は非常に稀であると推定されている。I I I 型は、最も新しく記述された形態であり、当初は女性にのみ生じると考えられていたが、男性が罹患した家族が確認されている。

【 0 0 3 8 】

H A E は常染色体優性パターンで遺伝し、そのため、罹患者は、1 人の罹患した親からその変異を受け継ぐ可能性がある。また、遺伝子の新たな変異が生じる可能性もあり、従って、H A E は、家族にこの障害の病歴が無い人々において発生する可能性もある。症例の 2 0 ～ 2 5 % は新たな自然突然変異から生じると推定されている。

30

【 0 0 3 9 】

S E R P I N G 1 遺伝子における変異は、I 型および I I 型の遺伝性血管性浮腫を引き起こす。S E R P I N G 1 遺伝子は、炎症の抑制に重要である C 1 インヒビタータンパク質を産生するための指示を与える。C 1 インヒビターは、炎症を促進する特定のタンパク質の活性をブロックする。I 型の遺伝性血管性浮腫を引き起こす変異は、血中の C 1 インヒビターのレベルを低下させる。対照的に、I I 型を引き起こす変異は、異常に機能する C 1 インヒビターの産生をもたらす。機能を有する C 1 インヒビターのレベルが適切でない場合、過剰量のブラジキニンが生成される。ブラジキニンは、血管壁を通した体組織中への体液の漏出を増加させることによって炎症を促進する。体組織における体液の過剰な蓄積は、I 型および I I 型の遺伝性血管性浮腫を有する個体において見られる腫脹のエピソードを引き起こす。

40

【 0 0 4 0 】

F 1 2 遺伝子における変異は、I I I 型の遺伝性血管性浮腫の一部の症例と関連している。F 1 2 遺伝子は、凝固第 X I I 因子を産生するための指示を与える。血液凝固（凝血）において決定的な役割を果たすことに加えて、第 X I I 因子はまた、炎症の重要な刺激因子でもあり、ブラジキニンの産生に関与する。F 1 2 遺伝子における特定の変異は、活性が増加した第 X I I 因子の産生をもたらす。結果として、より多くのブラジキニンが生成され、血管壁の漏出性が増し、これが、腫脹のエピソードにつながる。I I I 型の遺伝

50

性血管性浮腫の他の症例の原因は不明のままである。これらの症例では、まだ同定されていない1つ以上の遺伝子における変異がこの障害の原因である可能性がある。

【0041】

HAEは、アレルギーまたは他の医学的状態に起因する血管性浮腫の他の形態と同様に発現し得るが、HAEは、原因と治療の点で大きく異なる。HAEがアレルギーと誤診された場合、最も一般的には抗ヒスタミン薬、ステロイドおよび/またはエピネフリンで治療されるが、これらは通常、HAEには無効である(但し、エピネフリンは、生命を脅かす反応に対して用いることができる)。誤診はまた、腹部の腫脹を有する患者に対する不必要な試験開腹をもたらしたこともあり、一部のHAE患者では、腹痛が、心因性のものであると誤って診断されたことがある。

10

【0042】

C1インヒビター療法ならびにHAEのための他の療法は、Kaplan, A. P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925において説明されている。

【0043】

HAE発作の急性治療は、可能な限り迅速に浮腫の進行を停止させるために施される。静脈内投与される、ドナー血液由来のC1インヒビター濃縮物は、急性治療の1つである。しかし、この治療は、多くの国では利用できない。C1インヒビター濃縮物が利用できない緊急事態においては、新鮮凍結血漿(FFP)を代替として用いることができるが、これは、新鮮凍結血漿(FFP)もC1インヒビターを含むためである。

20

【0044】

ヒト血液由来の精製されたC1インヒビターが1979年からヨーロッパで使用されている。いくつかのC1インヒビター治療が米国で現在利用可能であり、2つのC1インヒビター製品がカナダで現在利用可能である。低温殺菌されているベリナートP(CSL Behring)は、急性発作に関して2009年にFDAによって承認された。ナノ濾過されているシンライズ(登録商標)は、予防に関して2008年にFDAによって承認された。ルチン/ルコネスト(Pharming)は、ヒト血液由来病原体に起因する感染症伝播のリスクを保有しない、開発中の組換えC1インヒビターである。

【0045】

急性HAE発作の治療はまた、疼痛緩和のための投薬および/または静脈内輸液も含み得る。

30

【0046】

他の治療法は、C1インヒビターの合成を刺激し得るか、またはC1インヒビターの消費を低減し得る。ダナゾールなどのアンドロゲン薬は、C1インヒビターの産生を刺激することによって発作の頻度と重症度を低下させることができる。

【0047】

ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)は、腹部発作を引き起こし得る。H. pyloriを処置するための抗生物質は、腹部発作を低減するであろう。

【0048】

より新しい治療は、接触カスケードを攻撃する。エカランチド(KALBITOR(登録商標))は、血漿カリクレインを阻害し、米国で承認されている。イカチバント(フィラジル(登録商標)、Shire)は、ブラジキニンB2受容体を阻害し、ヨーロッパと米国で承認されている。

40

【0049】

HAEの診断は、例えば、家族の病歴および/または血液検査に頼ることができる。I型、II型およびIII型のHAEに関連する検査所見は、例えば、Kaplan, A. P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925において説明されている。I型HAEでは、C4のレベルと同様に、C1インヒビターのレベルが低下しているが、C1qのレベルは正常である。II型HAEでは

50

、C 1 インヒビターのレベルは正常であるか増加している。しかし、C 1 インヒビターの機能が異常である。C 4 のレベルは低下しており、C 1 q のレベルは正常である。I I I 型では、C 1 インヒビター、C 4 および C 1 q のレベルが全て正常である可能性がある。本開示は、H A E 患者からのサンプルでは健康な個体に比べて異なるレベルを有する、さらなるタンパク質（表 1）の特定に少なくとも部分的に基づく。これらのタンパク質のバイオマーカーのセットのレベルの測定を利用して、対象が疾患（H A E など）を有するかどうかを特定することができる。一部の実施形態において、方法は、患者が H A E 発作を起こしたことがあるかどうか、または H A E 発作を起こしているかどうか、を判定するために利用されてよい。

【 0 0 5 0 】

10

H A E の症状は、例えば、質問表（例えば、患者、臨床医または家族が回答する質問表）を利用して評価することができる。そのような質問表は、当技術分野において公知であり、例えば、視覚的アナログスケールを含む。例えば、M c M i l l a n , C . V . e t a l . P a t i e n t . 2 0 1 2 ; 5 (2) : 1 1 3 - 2 6 を参照のこと。

【 0 0 5 1 】

本明細書で説明される生体サンプルは、生体サンプルにおいて本明細書で説明されるようなバイオマーカーのセットのレベルを測定することによる分析に供されてよい。本明細書で開示されるバイオマーカーのレベル（例えば、量）またはバイオマーカーのレベルの変化は、本明細書で説明されるアッセイおよび/または当技術分野で公知のアッセイを用いて評価されてよい。本明細書で説明されるバイオマーカーのうちの 1 種以上は、従来の方法を用いて分析されてよい。一部の実施形態において、バイオマーカーのレベルは、生体サンプル中のタンパク質を直接検出することによって評価または測定される。あるいは、またはさらに、タンパク質のレベルは、例えば、そのタンパク質の活性のレベルを検出すること（例えば、酵素アッセイ）により、生体サンプルにおいて間接的に評価または測定されてよい。

20

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態において、バイオマーカーは、イムノアッセイを用いて測定される。イムノアッセイの例としては、限定されるものではないが、イムノプロットティングアッセイ（ウェスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）（例えば、サンドイッチ E L I S A）、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光を利用した検出アッセイ、磁気イムノアッセイ、ラテラルフローアッセイおよび関連技術が挙げられる。本明細書で提示されるバイオマーカーを検出するための、さらなる好適なイムノアッセイは、当業者には明らかであろう。しかし、本開示はイムノアッセイに限定されないということ、および抗体、または抗原に結合する抗体のフラグメント、を利用しない検出アッセイ（質量分析など）もまた、本明細書で提示されるような接触系のバイオマーカーの検出および/または定量化に有用であるということが当業者には明らかであろう。発色基質に依存するアッセイもまた、本明細書で提示されるような接触系のバイオマーカーの検出および/または定量化に有用である可能性がある。

30

【 0 0 5 3 】

接触系のバイオマーカー（本明細書で提示されるものなど）の検出および/または定量化のために使用される検出アッセイのタイプは、いくつかのパラメータを挙げると、そのアッセイが使用されることになる特定の状況（例えば、臨床用途または研究用途）に、および検出されるバイオマーカーの種類と数に、および同時に実行される患者のサンプルの種類と数に、依存するであろう。

40

【 0 0 5 4 】

E L I S A は、当技術分野において公知であり（例えば、C r o w t h e r , J o h n R (2 0 0 9)、 「 T h e E L I S A G u i d e b o o k」、第 2 編、H u m a n a P r e s s および L e q u i n R (2 0 0 5)、 「 E n z y m e i m m u n o a s s a y (E I A) / e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y (E L I S A)」、C l i n . C h e m . 5 1 (1 2) : 2 4 1 5 - 8 を参照のこと）

50

、例示的な E L I S A が本明細書で説明されている。E L I S A を実施するためのキットも当技術分野において公知であり、市販されている（例えば、L i f e T e c h n o l o g i e s および B D B i o s c i e n c e s の E L I S A キットを参照のこと）。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、イムノアッセイを用いてタンパク質バイオマーカー（複数可）のレベルを測定する。本明細書で説明されるイムノアッセイは、バイオマーカーのセットのタンパク質に特異的に結合する第 1 の結合物質が支持部材上に固定化されるサンドイッチ E L I S A のフォーマットであってよい。次いで、支持部材が、結合物質とサンプル中のタンパク質との間での複合体の形成を可能にする条件の下で好適な時間、本明細書で説明されるような生体サンプルと共にインキュベートされてよい。次いで、そのような複合体が、タンパク質、結合物質 - タンパク質複合体、または結合物質、に結合する検出用物質を用いて検出されてよい。検出用物質は、直接または間接的にシグナルを放出できる標識にコンジュゲートされてよい。シグナルの強度が、サンプル中のタンパク質のレベルを表す。一部の実施形態では、検出用物質が検出され、そのレベルが、サンプル中のタンパク質のレベルを表す。

10

【 0 0 5 6 】

所望のタンパク質に特異的に結合する任意の結合物質が、生体サンプル中のタンパク質のレベルを測定するために本明細書で説明される方法およびキットにおいて使用されてよい。一部の実施形態において、結合物質は、所望のタンパク質に特異的に結合する抗体である。一部の実施形態において、結合物質は、所望のタンパク質に特異的に結合するアプタマー抗体である。一部の実施形態において、サンプルは、異なるタンパク質に結合する 2 種以上の結合物質と、同時または順次に、接触させられてよい（例えば、多重分析；例えば S O M A S c a n（商標）アッセイ（S O M A L o g i c））。生体サンプルは、適切な条件の下で結合物質と接触させられる。一般に、「接触」なる用語は、結合物質を、結合物質とサンプル中のタンパク質（存在する場合）との間での複合体の形成に十分である好適な時間、生体サンプルまたは作用物質と触れさせることを指す。一部の実施形態において、接触は、生体サンプルまたは作用物質が支持膜の表面を横断する毛管現象によって実施される。

20

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、イムノアッセイは、単一のイムノアッセイのフォーマットを含む、低スループットプラットフォームで実施されてよい。例えば、低スループットプラットフォームを用いて、診断方法のために、疾患および／もしくは治療の進行のモニタリングのために、ならびに／または疾患もしくは障害が特定の治療の恩恵を受け得るかどうかの予測のために、生体サンプル（例えば、生体組織、組織抽出物）中のタンパク質の存在と量を測定してよい。

30

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態では、支持部材に結合物質を固定化する必要がある可能性がある。結合物質を固定化するための方法は、結合物質の性質および支持部材の材料などの要因に左右されるであろうし、特定のパuffaを必要とする可能性がある。そのような方法は、当業者には明白であろう。例えば、本明細書で説明されるような生体サンプル中のバイオマーカーのセットは、やはり本明細書で説明されるキットおよび／または検出装置のうちのいずれかを用いて測定されてよい。

40

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用される場合、用語「測定すること」または「測定」あるいは「検出すること」または「検出」は、サンプル中の物質の存在、不存在、数量または量（有効量であってよい）を評価すること（そのような物質の定性的または定量的な濃度レベルの導出を包含する）、あるいは対象の値または分類を評価すること、を意味する。

【 0 0 6 0 】

アッセイ（例えば、ウェスタンブロットアッセイ）は、市販されている定量的イメージングシステム（例えば、L I C O R イメージング技術）の使用をさらに伴ってよい（例え

50

ば、LI-COR BiosciencesのOdyssey (登録商標) CLx 赤外線イメージングシステムを参照のこと)。一部の実施形態では、電気化学発光検出アッセイ、または電気化学発光とパターン化アレイ技術の組み合わせに依存するアッセイ、が使用される (例えば、Meso Scale Discovery (MSD) のECLまたはMULTI-ARRAY技術アッセイ (ECL or MULTI-ARRAY technology assay))。

【0061】

本明細書で説明される方法のいずれにおいても、バイオマーカーのセットのタンパク質のレベルは、対照サンプルまたは参照用サンプルにおけるタンパク質のレベルと比較されてよい。

【0062】

本明細書で説明される方法とキット (やはり本明細書で説明されるタンパク質バイオマーカーのセットのうちのいずれかを伴う) は、接触活性化系に関連する疾患 (本明細書で説明されるものなど) の評価に適用されてよい。

【0063】

(iii) 診断および/または予後診断の用途

対象からのサンプルにおいて検出された表1に提示されるタンパク質のレベルは、接触活性化系に関連する疾患 (例えば、HAE) を診断するための、そのような疾患の進行をモニタリングするための、疾患に対する治療の有効性を評価するための、特定の治療に適している患者を特定するための、および/または対象における疾患の発作を予測するための、信頼性の高いバイオマーカーとして使用できる。

【0064】

従って、対象から得られた生体サンプルにおけるバイオマーカーのセットのレベルに基づいた接触活性化系に関連する疾患のための診断および予後診断の方法が本明細書で説明される。一部の実施形態では、生体サンプルが取得された対象 (例えば、ヒト患者) が、血漿カリクレインに関連する疾患 (例えば、HAE) または自己免疫疾患 (RA、UCおよびクローン病など) などの接触活性化系に関連する疾患を有するかどうか、またはそのリスクがあるかどうか、を評価するために、本明細書で説明される方法のうちのいずれかを用いて測定されたバイオマーカーのレベルを利用することができる。

【0065】

一部の実施形態では、その後、バイオマーカーのレベルは、サンプル中のタンパク質の量を示す値を決定するために参照用サンプルまたは対照サンプルと比較されてよい。一部の実施形態では、バイオマーカーについての値は、サンプル中のタンパク質のレベルをサンプル中の別のタンパク質 (例えば、内部対照または内部標準) のレベルと比較することによって得られる。そのようなバイオマーカーの値は、内部対照または内部標準に対して正規化された値であってよい。バイオマーカーの値は、対象が接触活性化系に関連する疾患を有するかどうか、またはそのリスクがあるかどうか、を判定するために基準値と比較されてよい。基準値は、標的疾患を有さない対象 (例えば、ヒト対象) における対応するバイオマーカーのレベルを表してよい。一部の実施形態では、バイオマーカーのレベルまたは値が基準レベルまたは基準値よりも高い場合に、対象は、接触活性化系に関連する疾患を有する、またはそのリスクがある、と特定されてよい。一部の実施形態では、バイオマーカーのレベルまたは値が基準レベルまたは基準値よりも低い場合に、対象は、接触活性化系に関連する疾患を有する、またはそのリスクがある、と特定されてよい。

【0066】

一部の実施形態において、バイオマーカーのレベルは、それからの逸脱が、対象が接触系に関連する疾患を有することを示す可能性がある、そのタンパク質についての所定の閾値と比較されてよい。所定の閾値は、標的疾患を有する患者におけるバイオマーカーのレベルと標的疾患を有さない患者におけるバイオマーカーのレベルとを区別するバイオマーカーの値を表してよい。

【0067】

一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、2種以上のタンパク質を含み、

10

20

30

40

50

それらのうちの少なくとも１種について、上昇したレベルは対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示し、それらのうちの少なくとも１種について、低下したレベルは対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示す。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、２種以上のタンパク質を含み、その各々について、上昇したレベルは、対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示す。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、２種以上のタンパク質を含み、その各々について、低下したレベルは、対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示す。

【００６８】

一部の実施形態において、対照サンプルまたは参照用サンプルは、健康な個体から得られた生体サンプルである。一部の実施形態において、対照サンプルまたは参照用サンプルは、既知量の評価されるタンパク質を含む。一部の実施形態において、対照サンプルまたは参照用サンプルは、対照となる対象から得られた生体サンプルである。

10

【００６９】

本明細書で使用される場合、対照となる対象は、健康な個体（すなわち、タンパク質（複数可）のレベルが測定される時点において標的疾患（例えば、接触系に関連する疾患）を有さないことが明らかである個体、またはその疾患の病歴を有さない個体）であってよい。対照となる対象はまた、好ましくは本明細書で説明される方法によって分析される対象と一致する特徴（例えば、年齢、性別、民族等）を有するであろう、健康な対象の集団を表してもよい。

【００７０】

20

対照レベルは、所定のレベルまたは閾値であってよい。そのような所定のレベルは、標的疾患を有さないかそのリスクがない対象の集団におけるそのタンパク質のレベル（例えば、健康な対象の集団における平均レベル）を表してよい。それはまた、標的疾患を有する対象の集団におけるそのタンパク質のレベルを表してもよい。

【００７１】

所定のレベルは、様々な形をとることができる。例えば、それは、中央値または平均値などの単一のカットオフ値であってよい。一部の実施形態では、そのような所定のレベルは、比較群（１つの定義された群が標的疾患を有することが分かっており且つ別の定義された群が標的疾患を有さないことが分かっている比較群など）に基づいて確立されてよい。あるいは、所定のレベルは範囲（例えば、対照集団におけるそのタンパク質のレベルを表す範囲）であってよい。

30

【００７２】

本明細書で説明されるような対照レベルは、通例の技術によって決定できる。一部の例では、対照レベルは、従来する方法（例えば、本明細書で説明されるような試験サンプルにおいてそのタンパク質のレベルを得るのと同じアッセイ）を、やはり本明細書で説明されるような対照サンプルに対して実施することによって得ることができる。他の例では、そのタンパク質のレベルを対照集団のメンバーから得てよく、その結果を、例えば計算プログラムにより、分析して、対照集団におけるそのタンパク質のレベルを表す対照レベル（所定のレベル）を得てよい。

【００７３】

40

候補対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルを本明細書で説明されるような基準値と比較することによって、その候補対象が接触系に関連する疾患（例えば、HAE）を有するかどうか、またはそのリスクがあるかどうか、について判定することができる。例えば、候補対象のサンプルにおけるバイオマーカー（複数可）のレベルが基準値から逸脱する（例えば、基準値に比べて増加している）場合には、その候補対象は、疾患を有するかそのリスクがあると特定される可能性がある。基準値が、標的疾患を有する対象の集団におけるバイオマーカーのレベルの値の範囲を表す場合、候補者のサンプルにおけるバイオマーカーの値がその範囲内にあることは、その候補対象が標的疾患を有するかそのリスクがあることを示す。

【００７４】

50

本明細書で使用される場合、「上昇したレベル」または「基準値を上回るレベル」は、バイオマーカーのレベルが基準値（対照サンプルにおけるバイオマーカーのレベルの所定の閾値など）よりも高いということを意味する。対照レベルは、本明細書で詳細に説明されている。バイオマーカーの上昇したレベルには、基準値を、例えば1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%または500%以上、上回るバイオマーカーのレベルが包含される。一部の実施形態では、試験サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、参照用サンプルにおけるバイオマーカーのレベルよりも少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍または10000倍以上、高い。

【0075】

本明細書で使用される場合、「低下したレベル」または「基準値を下回るレベル」は、バイオマーカーのレベルが基準値（対照サンプルにおけるバイオマーカーの所定の閾値など）よりも低いということを意味する。対照レベルは、本明細書で詳細に説明されている。バイオマーカーの低下したレベルには、基準値よりも、例えば1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%または500%以上、低いバイオマーカーのレベルが包含される。一部の実施形態では、試験サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、参照用サンプルにおけるバイオマーカーのレベルよりも少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍または10000倍以上、低い。

【0076】

一部の実施形態において、候補対象は、pKa1媒介性障害（例えば、HAE）または自己免疫疾患（RA、UCおよびクローン病など）などの接触活性化系に関連する疾患の症状を有するヒト患者である。例えば、対象は、浮腫；完全に、または主に、末梢性である腫脹；蕁麻疹；感染症の証拠が存在しない場合の発赤、疼痛および腫脹；非ヒスタミン媒介性浮腫；腫脹の再発性発作；またはそれらの組み合わせを有する。他の実施形態では、対象は、サンプルが採取される時点ではpKa1媒介性障害の症状を有さないか、pKa1媒介性障害の症状の病歴を有さないか、HAEなどのpKa1媒介性障害の病歴を有さない。さらに他の実施形態では、対象は、抗ヒスタミン療法、コルチコステロイド療法またはその両方に対して抵抗性である。

【0077】

本明細書で説明される方法で特定された対象は、本明細書で説明されるように、pKa1阻害剤での治療など、好適な治療を受けてよい。

【0078】

バイオマーカーのレベルとそのような疾患との間の相関関係を考えれば、本明細書で説明されるアッセイ法とキットはまた、接触系に関連する疾患（本明細書で説明されるものなど）に対する治療の有効性の評価に適用することもできる。例えば、複数の生体サンプル（例えば、血液サンプルまたは血漿サンプル）が、治療の前後に、あるいは治療過程の間に、治療が実施される対象から採取されてよい。バイオマーカーのレベルは、本明細書で説明されるようなアッセイ法のうちのいずれかによって測定されてよく、それに応じてバイオマーカーの値（例えば、量）が決定されてよい。例えば、バイオマーカーの上昇したレベルが、対象が標的疾患を有することを示し、且つ治療後に、または治療の経過と共に、バイオマーカーのレベルが低下するのであれば（先に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルと比較した、後に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベル）、それは、その治療が有効であることを示す。別の例として、バイオマーカーの低

10

20

30

40

50

下したレベルが、対象が標的疾患を有することを示し、且つ治療後に、または治療の経過と共に、バイオマーカーのレベルが上昇するのであれば（先に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルと比較した、後に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベル）、それは、その治療が有効であることを示す。一部の例では、治療は、有効量の治療薬（血漿カリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニスト、または C 1 エステラーゼインヒビター（C 1 - I N H）など）を伴う。治療薬の例としては、ラナデルマブ、エカランチド、イカチバントおよびヒト血漿由来 C 1 - I N H が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 9 】

対象が治療に反応しないと特定されれば、より高い用量および / または投与頻度の治療薬が、特定された対象に投与される。一部の実施形態では、治療薬の投与量または投与頻度は、治療に反応する、またはさらなる治療を必要としない、と特定された対象において維持、低減または中止される。あるいは、最初の治療に反応しないと見出された対象に、異なる治療が適用されてよい。

【 0 0 8 0 】

他の実施形態では、バイオマーカーまたはバイオマーカーのセットの値はまた、障害が接触系に関連していることを、またはその障害は、例えば p K a 1 阻害剤によって、治療できる可能性があることを、特定するために利用することもできる。この方法を実施するために、標的疾患を有する対象から採取されたサンプル（例えば、血液サンプルまたは血漿サンプル）におけるバイオマーカーのレベルが、好適な方法（例えば、ウェスタンブロットアッセイまたは E L I S A アッセイなどの本明細書で説明されるもの）によって測定されてよい。バイオマーカーのレベルが基準値から逸脱する（例えば、上昇または低下している）のであれば、それは、その疾患を治療するのに p K a 1 阻害剤が有効である可能性があることを示す。疾患が p K a 1 阻害剤に感受性である（p K a 1 阻害剤によって治療できる）と特定された場合には、方法は、その疾患を有する対象に有効量の p K a 1 阻害剤（抗 p K a 1 抗体または阻害性ペプチド（例えば、ラナデルマブ、エカランチド）など）、ブラジキニン 2 受容体阻害剤（例えば、イカチバント）および / または C 1 - I N H（例えば、ヒト血漿由来 C 1 - I N H）を投与することをさらに含んでよい。

【 0 0 8 1 】

また、接触系に関連する疾患の重症度またはその病状を評価する方法も本開示の範囲内に属する。例えば、本明細書で説明されるように、H A E は、その間に対象が疾患の症状を経験しない静止状態（基礎的状态）にある可能性がある。H A E 発作は、典型的には、2 ~ 5 日続き得る、例えば手、足、顔、胃腸管、生殖器および咽頭（咽喉）における、疼痛および腫脹を対象が経験する可能性がある再発エピソードである。一部の実施形態において、1 種以上のバイオマーカーのレベルは、対象が H A E 発作を経験することになるかどうか、経験中であるかどうか、または間もなく経験することになるかどうかを示す。一部の実施形態において、方法は、H A E を有する対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルを、同じ対象から得られたサンプル（例えば、基礎的状态にある同じ対象から得られたサンプルまたは H A E 発作中の同じ対象から得られたサンプル）におけるそのバイオマーカーのレベルと比較することを伴う。

【 0 0 8 2 】

（ i i i ）非臨床用途

さらに、本明細書で説明されるバイオマーカーのセットのうちのいずれかのレベルは、研究目的で使用されてよい。接触活性化系に関連する疾患が多数特定されているが、他の疾患が、類似するメカニズムによって媒介される、または類似するコンポーネントを伴う、という可能性がある。一部の実施形態において、本明細書で説明される方法は、疾患を接触活性化系に、または接触活性化系のコンポーネントに、関連すると特定するために使用されてよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される方法は、疾患のメカニズム（例えば、疾患の発症に関与する新規の生物学的経路またはプロセスの発見）または進行を研究するために使用されてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態において、本明細書で説明されるようなバイオマーカーのセットのレベルは、接触活性化系に関連する疾患のための新しい治療法の開発において利用されてよい。例えば、新しい治療（例えば、臨床試験）を受けている対象から得られたサンプルにおいてバイオマーカーのセットのレベルが測定されてよい。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットのレベルは、新しい治療法の有効性、あるいは新しい治療の前の、新しい治療の間の、または新しい治療の後の、対象における疾患の進行、を示す可能性がある。

【 0 0 8 4 】

タンパク質バイオマーカーのセットを測定するためのキットおよび検出装置

10

本開示はまた、本明細書で説明されるようなバイオマーカーのセットのレベルの測定における使用のためのキットおよび検出装置も提供する。そのようなキットまたは検出装置は、タンパク質バイオマーカー（表 1 に列挙されるものなど）に特異的に結合する結合物質を含んでよい。例えば、そのようなキットまたは検出装置は、表 1 から選択される 2 つの異なるタンパク質バイオマーカーに対して特異的である少なくとも 2 種の結合物質を含んでよい。一部の例では、キットまたは検出装置は、本明細書で説明されるタンパク質バイオマーカーのセットの全てのメンバーに対して特異的な結合物質を含む。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態において、結合物質のうちの 1 つ以上は、バイオマーカーのセットのタンパク質に特異的に結合する抗体である。一部の実施形態において、1 種以上の結合物質は、バイオマーカーのセットのタンパク質に特異的に結合するアプタマー（ペプチドアプタマーまたはオリゴヌクレオチドアプタマーなど）である。

20

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態において、キットは、バイオマーカーのセットのタンパク質（複数可）への結合物質の結合を検出するための検出用物質（例えば、結合物質に結合する抗体）をさらに含む。検出用物質は、標識にコンジュゲートされてよい。一部の実施形態において、検出用物質は、結合物質のうちの少なくとも 1 つに特異的に結合する抗体である。一部の実施形態において、結合物質は、検出用物質が識別し得るタグであって検出用物質が直接または間接的に結合し得るタグを含む。

【 0 0 8 7 】

30

一部の実施形態において、支持部材は、ニトロセルロースメンブレン、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）メンブレンまたは酢酸セルロースメンブレンなどのメンブレンである。一部の例では、イムノアッセイは、ウェスタンブロットアッセイのフォーマットまたはラテラルフローアッセイのフォーマットであってよい。

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態において、支持部材は、ELISA プレートなどのマルチウェルプレートである。一部の実施形態において、本明細書で説明されるイムノアッセイは、ハイスループットプラットフォームで実施されてよい。一部の実施形態では、マルチウェルプレート（例えば、24 ウェル、48 ウェル、96 ウェルまたは 384 ウェル以上のプレート）が、ハイスループットイムノアッセイのために使用されてよい。個々のイムノアッセイが、各ウェルで同時に実施されてよい。従って、一般的には、アッセイのスループットを高めるために、プレートリーダーを使用して複数のウェルを同時に測定することが望ましい。一部の実施形態では、複数のウェル（例えば、4 ウェル、16 ウェル、24 ウェル、48 ウェル、96 ウェルまたは 384 個以上のウェル）を同時に画像化することが可能なプレートリーダーが、このプラットフォームのために使用されてよい。例えば、市販されているプレートリーダー（例えば、Perkin Elmer (Waltham, MA) から入手可能な plate::vision system）が使用されてよい。このプレートリーダーは、動的蛍光分析（kinetic-based fluorescence analysis）が可能である。plate::vision system は、高い集光効率の光学系を有し、96 ウェルの同時分析のために設計された特別な光学系を有す

40

50

る。さらなる好適なパラレルプレートリーダーには、SAFIRE (Tecan, San Jose, CA)、FLIPRETETRA (登録商標) (Molecular Devices, Union City, CA)、FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) および CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA) が包含されるが、これらに限定されない。

【0089】

キットまたは検出装置において、結合物質のうちの1つ以上が、支持部材（例えば、メンブレン、ビーズ、スライド、またはマルチウェルプレート）上に固定化されてよい。免疫アッセイのための適切な支持部材の選択は、サンプルの数および第二の作用物質にコンジュゲートされた標識から放出されるシグナルを検出する方法などの様々な要因に左右されるであろう。

10

【0090】

キットはまた、本明細書で説明されるような1種以上のバッファ（限定されるものではないがコーティングバッファ、ブロッキングバッファ、洗浄バッファおよび/または停止バッファ）を含んでもよい。

【0091】

一部の実施形態において、キットは、本明細書で説明される方法のうちのいずれかに従った使用のための説明書を含んでよい。含まれる説明書は、ヒト患者などの対象から採取された生体サンプルにおいてバイオマーカーのセットのタンパク質のレベルを測定するためのキットに含まれる構成要素の使用法の説明を含んでよい。

20

【0092】

キットの使用に関する説明書は一般に、本明細書で説明されるアッセイ法を実施するための、各構成要素の量および好適な条件についての情報を含む。キット中の構成要素は、単位用量、バルクのパッケージ（例えば、複数用量のパッケージ）、または単位用量未満の用量 (sub-unit dose) であってよい。本開示のキット中に提供される説明書は、典型的には、ラベルまたは添付文書（例えば、キット中に含まれる紙のシート）に記載された説明書であるが、機械で読み取り可能な説明書（例えば、磁気または光学記憶ディスクに保持された説明書）も許容される。

【0093】

ラベルまたは添付文書は、そのキットが、バイオマーカーのセットのタンパク質のレベルを評価するために使用されるということを示す。説明書は、本明細書で説明される方法のうちのいずれかを実施するために提供されてよい。

30

【0094】

本開示のキットは、好適なパッケージ内に含まれる。好適なパッケージには、バイアル、ボトル、ジャー、柔軟なパッケージ（例えば、密封されたマイラーまたはプラスチック袋）等が包含されるが、これらに限定されない。また、吸入器、経鼻投与装置（例えば、噴霧器）または注入装置（ミニポンプなど）などの特定の装置と組み合わせて使用するためのパッケージも企図される。キットは、無菌アクセスポート (sterile access port) を有してよい（例えば、容器は、静脈内輸液バッグ (intravenous solution bag)、または皮下注射針で貫通可能な栓を有するバイアル、であってよい）。容器はまた、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、静脈内輸液バッグ、または皮下注射針で貫通可能な栓を有するバイアル、であってよい）。

40

【0095】

キットは、任意選択で、判断用の情報（対照サンプルおよび/または標準サンプルもしくは参照用サンプルなど）などの追加的な構成要素を提供してもよい。通常、キットは、容器と、容器上の、または容器に付随する、ラベルまたは添付文書（複数可）と、を含む。一部の実施形態において、本開示は、上述のキットの内容物を含む製品を提供する。

【0096】

接触活性化系に関連する疾患の治療

50

本明細書で説明される方法を用いて特定された、接触活性化系に関連する疾患のリスクがあるかそれに罹患している対象は、任意の適切な治療薬で治療されてよい。一部の実施形態において、提供される方法は、説明される方法（例えば、バイオマーカーのセットのレベルの測定）のアウトプットに基づいて対象に対する治療を選択することを含む。

【0097】

一部の実施形態において、方法は、アッセイ（例えば、バイオマーカーの検出）のアウトプットに基づいた対象への投与のための治療薬（例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体阻害剤および / または C 1 エステラーゼ阻害剤）の選択または投与のうちの一方または両方を含む。

【0098】

一部の実施形態において、治療薬は、対象に 1 回以上投与される。一部の実施形態では、血漿カリクレイン阻害剤が対象に投与される。一部の実施形態において、カリクレイン阻害剤は、ペプチド、小分子阻害剤、カリクレイン抗体またはそのフラグメントである。一部の実施形態では、ブラジキニン B 2 受容体のアンタゴニストが対象に投与される。一部の実施形態では、C 1 - I N H が対象に投与される。

【0099】

治療薬（例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体阻害剤および / または C 1 - I N H）は、接触活性化系と関わる疾患または状態の治療のための併用療法の一部として別の療法と一緒に与えられてよい。併用療法（例えばカリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストまたは C 1 - I N H 補充薬（*r e p l a c e m e n t a g e n t*））のうちの 1 つ以上との併用療法、例えばカリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストまたは C 1 - I N H 補充薬のうちの 1 つ以上および別の療法との併用療法）は、複数の異なる構成で提供されてよい。第 1 の薬は、他の療法の実施の前または後に投与されてよい。いくつかの状況では、第 1 の薬と別の療法（例えば、治療薬）は同時に、または時間的に近接して（例えば、同じ治療セッション中など、短時間の注射間隔で）、与えられる。第 1 の薬と他の療法はまた、より長い時間間隔で与えられてもよい。

【0100】

治療薬

血漿カリクレイン結合物質（例えば結合タンパク質、例えばポリペプチド、例えば阻害性ポリペプチド、例えば抗体、例えば阻害性抗体、または他の結合物質（例えば小分子））は、様々な疾患および状態（例えば、血漿カリクレイン活性と関わる疾患および状態）に対して有用な治療薬である。例えば、一部の実施形態では、血漿カリクレイン活性と関わる疾患および状態は、遺伝性血管性浮腫（H A E）である。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤などの血漿カリクレイン結合物質は、接触活性化系に関連する疾患のリスクがあるかそれに罹患している対象に投与される。

【0101】

カリクレイン（組織カリクレインおよび / または血漿カリクレインのいずれか）のいくつかの有用なタンパク質系阻害剤は、クニツドメイン（*K u n i t z d o m a i n*）を含む。本明細書で使用される場合、「クニツドメイン」は、少なくとも 5 1 個のアミノ酸を有するポリペプチドドメインであって少なくとも 2 つ（好ましくは 3 つ）のジスルフィドを含むポリペプチドドメインである。このドメインは、第 1 と第 6 のシステイン、第 2 と第 4、および第 3 と第 5 のシステインがジスルフィド結合を形成するように折り畳まれ（例えば、5 8 個のアミノ酸を有するクニツドメインでは、システインは、以下に提示される B P T I 相同配列の番号に従ったアミノ酸 5、1 4、3 0、3 8、5 1 および 5 5 に対応する位置に存在する可能性があり、ジスルフィドは、位置 5 と 5 5、1 4 と 3 8、および 3 0 と 5 1 のシステイン同士の間で形成され得る）、あるいは、2 つのジスルフィドが存在する場合には、それらは、それらのシステインの対応するサブセット間で形成され得る。それぞれのシステイン間の間隔は、以下に提示される B P T I 配列の番号付けに従った以下の 5 ~ 5 5、1 4 ~ 3 8 および 3 0 ~ 5 1 に対応する位置間の間隔の 7、

10

20

30

40

50

5、4、3、2、1または0アミノ酸以内である可能性がある。BPTI配列は、任意の一般的なクニツドメインにおける特定の位置を指すための基準として使用できる。関心のあるクニツドメインとBPTIとの比較は、合致するシステインの数が最大になる最も良好に一致したアライメントを特定することによって実施できる。

【0102】

BPTIのクニツドメインの(高分解能での)3D構造は公知である。X線構造の1つは、「6PTI」としてBrookhaven Protein Data Bankに寄託されている。いくつかのBPTIホモログ(Eigenbrot et al., Protein Engineering (1990) 3(7):591-598; Hynes et al., Biochemistry (1990) 29:10018-10022)の3D構造が公知である。少なくとも81種のクニツドメインの配列が公知である。公知のヒトにおけるホモログには、組織因子経路インヒビター(TFPI)としても知られているLACIの3つのクニツドメイン(Wun et al., J. Biol. Chem. (1988) 263(13):6001-6004; Girard et al., Nature (1989) 338:518-20; Novotny et al., J. Biol. Chem. (1989) 264(31):18832-18837)、インター-トリプシンインヒビターAPP-Iの2つのクニツドメイン(Kido et al., J. Biol. Chem. (1988) 263(34):18104-18107)、コラーゲンのクニツドメイン、TFPI-2の3つのクニツドメイン(Sprecher et al., PNAS USA (1994) 91:3353-3357)、肝細胞増殖因子アクチベーターインヒビター1型(hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1)のクニツドメイン、肝細胞増殖因子アクチベーターインヒビター2型(Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2)のクニツドメイン、米国特許出願公開第2004-0152633号に記載されるクニツドメインが包含される。LACIは、3つのクニツドメインを含む分子量が39 kDaのヒト血清リン糖タンパク質(phosphoglycoprotein)である(表2中のアミノ酸配列)。

【0103】

表2：例示的な天然のクニツドメイン

【表2】

LACI (配列 番号 1)	1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedeehtiit dtelpplklM 51 HSFCFAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFSLEEC 101 KKMCTRDnan riiktttlqge <u>kpdfCfleed</u> <u>pgiCrgyitr</u> <u>yfyngqtkqC</u> 151 <u>erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn</u> gfqvdnygtq lnavnsltp 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkygC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm シグナル配列(1-28)は大文字であり、且つ下線を引かれている LACI-K1 (50-107)は大文字である LACI-K2 (121-178)は下線を引かれている LACI-K3 (211-270)は太字である				
BPTI (配列 番号 2)	1	2	3	4	5
	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678				
	RPDFC <u>LEPPYT</u> GPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA				

10

20

30

40

50

【 0 1 0 4 】

上記のクニツドメインは、L A C I - K 1 (残基 5 0 ~ 1 0 7)、L A C I - K 2 (残基 1 2 1 ~ 1 7 8) および L A C I - K 3 (2 1 3 ~ 2 7 0) と呼称される。L A C I の c D N A 配列は、Wun et al. (J . B i o l . C h e m . (1 9 8 8) 2 6 3 (1 3) : 6 0 0 1 - 6 0 0 4) で報告されている。Girard et al. (N a t u r e (1 9 8 9) 3 3 8 : 5 1 8 - 2 0) では、3つのクニツドメインのそれぞれの P 1 残基が変更された変異研究が報告されている。L A C I - K 1 は、第 V I I a 因子 (F . V I I a) が組織因子と複合体を形成している場合に F . V I I a を阻害し、L A C I - K 2 は第 X a 因子を阻害する。

【 0 1 0 5 】

例示的なクニツドメインを含むタンパク質には以下のものが包含される (括弧内は S W I S S - P R O T アクセス番号である) :

【 化 1 】

A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),
ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),

ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),
IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),
AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

【 0 1 0 6 】

様々な方法を用いて配列データベースからクニツドメインを特定できる。例えば、クニツドメインの公知のアミノ酸配列、コンセンサス配列、またはモチーフ (例えば、P r o S i t e M o t i f) を、例えば H M M (隠れマルコフモデル) の P f a m データベースに対して B L A S T を用いて (例えば、P f a m 検索のためにデフォルトのパラメータを用いて ; S M A R T データベースに対して ; または P r o D o m データベースに対して)、G e n B a n k 配列データベース (N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a M D) に対して検索することができる。例えば、P f a m R e l e a s e 9 の P f a m アクセス番号 P F 0 0 0 1 4 は、数多くのクニツドメイン、およびクニツドメインを特定するための H M M、を提

10

20

30

40

50

供する。Pfamデータベースの説明は、Sonhammer et al. Proteins (1997) 28(3): 405 - 420に見出すことができ、HMMの詳細な説明は、例えば、Gribskov et al. Meth. Enzymol. (1990) 183: 146 - 159; Gribskov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 4355 - 4358; Krogh et al. J. Mol. Biol. (1994) 235: 1501 - 1531; および Stultz et al. Protein Sci. (1993) 2: 305 - 314に見出すことができる。HMMのSMARTデータベース(Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE)は、Schultz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 5857 および Schultz et al. Nucl. Acids Res (2000) 28: 231で説明されている通りである。SMARTデータベースは、HMMer 2 検索プログラムの隠れマルコフモデルによるプロファイリングによって特定されたドメインを含む(R. Durbin et al. (1998) 「Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids」 Cambridge University Press)。このデータベースはまた、注釈付きであり、モニタリングされている。ProDomタンパク質ドメインデータベースは、相同ドメインの自動編集からなる(Corpet et al. Nucl. Acids Res. (1999) 27: 263 - 267)。ProDomの現在のバージョンは、SWISS-PROT 38 および TREMBL タンパク質データベースの再帰的PSI-BLAST検索(Altschul et al. Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389 - 3402; Gouzy et al. Computers and Chemistry (1999) 23: 333 - 340)を使用して構築されている。このデータベースは、各ドメインのコンセンサス配列を自動的に生成する。Prositeは、クニツドメインをモチーフとして収載しており、クニツドメインを含むタンパク質を特定する。例えば、Falquet et al. Nucleic Acids Res. (2002) 30: 235 - 238を参照のこと。

【0107】

クニツドメインは、2つのループ領域(「結合ループ」)内のアミノ酸を主に用いて標的プロテアーゼと相互作用する。第1のループ領域は、BPTIのアミノ酸13~20に対応する残基の間あたりにある。第2のループ領域は、BPTIのアミノ酸31~39に対応する残基の間あたりにある。クニツドメインの例示的なライブラリーでは、第一および/または第二のループ領域内の1つ以上のアミノ酸位置が変更される。カリクレインと相互作用するクニツドメインについてスクリーニングする場合、または親和性が改善されたバリエーションを選択する場合、特に有用な変更される位置には、BPTIの配列に関して位置13、15、16、17、18、19、31、32、34および39が含まれる。これらの位置のうちの少なくともいくつかは、標的プロテアーゼと密接に接触していると予想される。また、他の位置(例えば、三次元構造中で前述の位置に隣接する位置)を変更するのも有用である。

【0108】

クニツドメインの「フレームワーク領域」は、クニツドメインの一部である残基として定義されるが、具体的には第1と第2の結合ループ領域内の残基(すなわち、BPTIのアミノ酸13~20およびBPTIのアミノ酸31~39に対応する残基周辺)は除外される。逆に、結合ループ内にない残基は、より広い範囲のアミノ酸置換(例えば、保存的置換および/または非保存的置換)を許容する可能性がある。

【0109】

一実施形態において、これらのクニツドメインは、ヒトリボタンパク質関連凝固インヒビター(lipoprotein-associated coagulation inhibitor)(LACI)のクニツドメイン1を含むループ構造のバリエーション型

である。L A C I は、パラダイムクニツドメインである明確に定義された内部のペプチドループ構造を3つ含む (Girard, T. et al., Nature (1989) 338: 518 - 520)。本明細書で説明されるL A C I のクニツドメイン1のバリエーションがスクリーニングされ、単離されており、これらは、向上した親和性と特異性を伴ってカリクレインと結合する (例えば、米国特許第5, 795, 865号および同第6, 057, 287号を参照のこと)。これらの方法はまた、カリクレイン (例えば、血漿カリクレイン) と相互作用する他のクニツドメインを取得するために他のクニツドメインのフレームワークに対して適用することもできる。カリクレイン結合アッセイおよびカリクレイン阻害アッセイを用いて決定されるように、カリクレインの機能の有用なモジュレーターは、典型的には、カリクレインと結合する、および/またはカリクレインを阻害する。

10

【0110】

一部の態様では、血漿カリクレイン阻害剤は、血漿カリクレインの活性型に結合する。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、血漿カリクレイン (例えば、ヒト血漿カリクレインおよび/またはマウスカリクレイン) に結合し、これを阻害する。例示的なポリペプチド系血漿カリクレイン薬は、それぞれの全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5, 795, 865号、米国特許第5, 994, 125号、米国特許第6, 057, 287号、米国特許第6, 333, 402号、米国特許第7, 628, 983号、および米国特許第8, 283, 321号、米国特許第7, 064, 107号、米国特許第7, 276, 480号、米国特許第7, 851, 442号、米国特許第8, 124, 586号、米国特許第7, 811, 991号および米国特許出願公開第20110086801号に開示されている。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、阻害性ポリペプチドまたは阻害性ペプチドである。一部の実施形態において、阻害性ペプチドは、エカランチド (DX - 88またはK A L B I T O R (登録商標)とも呼称される; 配列番号3) である。一部の実施形態において、カリクレイン阻害剤は、配列番号3のアミノ酸3 ~ 60の約58アミノ酸の配列、または配列番号3の60アミノ酸の配列を有するDX - 88ポリペプチド、を含むか、からなる。

20

【0111】

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys A
la Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro
Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn
Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
Lys Met Cys Thr Arg Asp (配列番号3)。

30

【0112】

血漿カリクレイン阻害剤は、完全長抗体 (例えば、IgG (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (例えば、IgA1、IgA2)、IgDおよびIgE) であってよい、または抗原結合フラグメント (例えば、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメントまたはscFvフラグメント) だけを含んでよい。結合タンパク質は、2つの重鎖免疫グロブリンと2つの軽鎖免疫グロブリンを含んでよい、または単鎖抗体であってよい。血漿カリクレイン阻害剤は、ヒト化抗体、CDR移植抗体、キメラ抗体、脱免疫化抗体 (deimmunized antibody) またはインビトロ生成抗体 (in vitro generated antibody) などの組換えタンパク質であってよく、任意選択で、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンの配列に由来する定常領域を含んでもよい。一実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、モノクローナル抗体である。

40

【0113】

例示的な血漿カリクレイン結合タンパク質は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20120201756号に開示されている。一部の実施形態において、カリクレイン結合タンパク質は、M162 - A04、M160 - G12、M

50

142 - H08、X63 - G06、X101 - A01 (DX - 2922とも呼称される)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01 (本明細書ではDX - 2930またはラナデルマブとも呼称される)、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04からなる群より選択される抗体の軽鎖および/または重鎖を有する抗体 (例えば、ヒト抗体) である。一部の実施形態において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、M162 - A04、M160 - G12、M142 - H08、X63 - G06、X101 - A01 (本明細書ではDX - 2922とも呼称される)、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X81 - B01、X67 - D03、X67 - G04、X115 - B07、X115 - D05、X115 - E09、X115 - H06、X115 - A03、X115 - D01、X115 - F02、X124 - G01、X115 - G04、M29 - D09、M145 - D11、M06 - D09およびM35 - G04と競合するか、またはこれらと同じエピトープに結合する。一部の実施形態において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、ラナデルマブである。参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20110200611号および米国特許出願公開第20120201756号を参照のこと。

10

【0114】

血漿カリクレイン阻害抗体の例はラナデルマブである。ラナデルマブの重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列が以下に提示されるが、CDR領域は、太字で特定され、下線を引かれている。

20

【0115】

ラナデルマブの重鎖可変領域の配列 (配列番号4)

EVQLLES GGG LVQP GGS LRL SCAAS GFTFS HYIMMWVR
QA PGKGLEWVSG IYSSGGITVY ADSVKGRFTI SRDNS
KNTLY LQMNS LRAED TAVYYCAYRR IGVPRRDEFD IW
GQGTMVTV SS

【0116】

ラナデルマブの軽鎖可変領域の配列 (配列番号5)

DIQMTQSPS TLSASV GDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQ
K PGKAPKLLIY KASTLES GVP SRFSGSGSGT EFTLTI
SSLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEI

30

【0117】

一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、本明細書で説明される血漿カリクレイン阻害剤に対して約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有してよい。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、本明細書で説明される血漿カリクレイン阻害剤に対してHCおよび/またはLCのフレームワーク領域 (例えば、HCおよび/またはLCのFR1、2、3および/または4) における約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有してよい。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、本明細書で説明される血漿カリクレイン阻害剤に対してHCおよび/またはLCのCDR (例えば、HCおよび/またはLCのCDR1、2および/または3) における約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有してよい。一部の実施形態において、血漿カリクレイン阻害剤は、本明細書で説明される血漿カリクレイン阻害剤に対して定常領域 (例えば、CH1、CH2、CH3および/またはCL1) における約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有してよい。

40

【0118】

一部の態様では、小分子が、血漿カリクレインの活性型と結合し、これを阻害する。

50

【 0 1 1 9 】

ブラジキニン B 2 受容体阻害剤

一部の実施形態では、ブラジキニン B 2 受容体阻害剤（例えば、アンタゴニスト）が対象に投与される。例示的なブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストには、ブラジキニン B 2 受容体への天然ブラジキニンの結合をブロックする 10 個のアミノ酸を含むペプチド模倣薬であるイカチバント（フィラジル（登録商標））が包含される。

【 0 1 2 0 】

C 1 - I N H 補充薬

一部の実施形態では、C 1 - I N H 補充薬などの C 1 エステラーゼインヒビター（C 1 - I N H）が対象に投与される。例示的な C 1 - I N H 補充薬は公的に利用可能であり、これらには、例えば、ヒト血漿由来 C 1 - I N H（例えば、ペリナート（登録商標）およびシンライズ（登録商標））が包含される。

【 0 1 2 1 】

さらに詳述しなくとも、上記の説明に基づいて、当業者は本開示を最大限に利用できると考えられる。従って、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解釈されるべきであり、いかなる形で本開示の他の部分を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される刊行物は全て、本明細書で参照される目的または主題に関して参照により組み込まれる。

【実施例】

【 0 1 2 2 】

実施例

実施例 1：H A E 患者からのサンプルでは健康な個体に比べて異なって存在するタンパク質の特定

健康な個体（N = 22；「正常」サンプルと呼称される）から、ならびに疾患の静止状態の間の H A E（I 型 / II 型）を有する患者（N = 33；「基礎」と呼称される）および発作中の H A E（I 型 / II 型）を有する患者（N = 33；「発作」と呼称される）から、血漿サンプルを採取した。翼状針、プラスチック製カテーテルおよびプラスチック製採取管を用いた静脈穿刺によって血液を採取する厳密な血液採取プロトコルに従った。最初の採血管はセラムチューブであったが、これは廃棄された。プロテアーゼ阻害剤カクテルと抗凝固剤とを含む第 2 の採血管（P 100 チューブ）をプロテオーム解析のために使用した。P 100 チューブに採取された血液を、採取から 1 時間以内に処理して血漿にし、いくつかのアリコートに分け、- 70 °C で凍結した。

【 0 1 2 3 】

1, 310 種の異なるヒトタンパク質の相対存在量を検出することが可能な多重アッセイ（S O M A s c a n（商標）アッセイ；S o m a L o g i c；B o u l d e r, C O）を用いて血漿サンプルを分析した。このアッセイでは、3 つの異なるサンプルのタイプ（健康な個体、静止状態にある H A E を有する患者、および H A E 発作を起こしている患者）について 1, 310 種のタンパク質のそれぞれのシグナルレベルが比較された。

【 0 1 2 4 】

K r u s k a l - W a l l i s 分散分析を用いて、データに対して統計分析を実施した。これは、同じサンプルサイズまたは異なるサンプルサイズを有してよい 3 つ以上の群の分布を試験するノンパラメトリック法である。中央値の任意の相違を除いて、スケール分布（s c a l e d d i s t r i b u t i o n）が全ての群で同一であるという仮定の場合には、帰無仮説は、全ての群の中央値が等しいということであり、対立仮説は、1 つの群の母集団中央値が少なくとも 1 つの他の群の母集団中央値とは異なるということである。統計量が有意性を示さない場合には、サンプル間に確率的優越性は認められない。しかし、中央値に有意性がある場合には、少なくとも 1 つのサンプルは、別のサンプルを確率的に優越する。

【 0 1 2 5 】

0.01 未満の偽陽性率（q 値）で健康な個体と比較して H A E 患者（基礎的状态また

10

20

30

40

50

は発作)の間で異なるタンパク質レベルおよびt検定(p 値 <0.05 、プールした分散の手法(means of pooled variance))を表1に列挙する。タンパク質は、受信者動作特性曲線(ROC)解析からのC統計値に従ってランク付けされており、ここで、1.0に接近するC統計値は、HAE(I/II)の陽性検出に対して最も高い特異性と感度を有する。I型HAEの患者は、総C1インヒビタータンパク質(C1-INH)が正常量の少なくとも50%(通常、30%未満)であると特定されている(David-Lorton, M. J. *Drugs Dermatol.* (2015) 14:151-157)。II型HAEの患者は、機能不全のC1-INHタンパク質をもたらすSERPING1遺伝子における変異を有し、機能を有するC1-INHが正常量の少なくとも50%であると特定されている。本研究では、HAE患者は、I型HAEを有しているのかII型HAEを有しているのかについては判定されなかった。

10

【0126】

表1に示されるように、152種のタンパク質が、HAE患者(発作または基礎的状态)から得られた血漿サンプルと健康な個体から得られた血漿サンプルとの間で統計的に異なるレベル($P<0.05$)を有しており、HAEを有する個体とこの疾患を有さない個体とを区別するために評価され得るバイオマーカーとなるということが見出された。プロテオーム解析により、健康な個体からのサンプルに比べて、HAE患者からの血漿サンプルでは2倍超高いレベル($P<0.050$)を有する58種のタンパク質およびHAE患者からの血漿サンプルでは2倍超低いレベル($P<0.05$)を有する12種のタンパク質が特定された。0.93より大きいC統計値を有する10種のタンパク質が特定された。これらのタンパク質(例えば、高いC統計値(例えば、0.9超)を有するもの)は、単独で、あるいは組み合わせて、HAEおよび接触系に関連する他の疾患についての、信頼性の高いバイオマーカーとして使用できる。

20

【0127】

HAE患者からの血漿サンプルは、健康な個体からの血漿よりも有意に低い量の補体タンパク4(「C4」)を含んでいた(図1のパネルA)。低いC4レベルは、HAE(I/II)の臨床診断において使用されている(Davis-Lorton, M. J. *Drugs Dermatol.* (2015) 14:151-157)。さらに、健康な個体からのサンプルに比べてHAE患者からのサンプルではプレカリクレインの量の僅かな減少が観察された(図1のパネルB)。プレカリクレインの量もまた、HAE患者では正常レベルに比べて減少していることが以前に示されている。本明細書で説明される方法を用いて観察された、健康な個体のものに対してのHAE患者におけるC4とpKa1の存在量の変化は、これらの方法が、疾患の発症に関連するタンパク質レベルの変化を検出することができるということを示す。

30

【0128】

HAE患者および健康な個体からの血漿サンプルはまた、血漿カリクレインの生成についても評価された。簡単に説明すると、クエン酸添加血漿サンプルをFXIIaで活性化した後、コントリプシンインヒビターでFXIIaをクエンチした。HAE患者からのサンプルでは正常レベルに比べて血漿カリクレインの速度が僅かに減少した(図2)。

【0129】

本研究では、HAEを有する33名の対象のうち15名が、検出される血漿C1-INHの量を増加させるであろうC1-INH(シンライズ(登録商標))で予防的治療を受けていた。しかし、C1-INHでの予防的治療を受けていないHAE患者では、総C1-INHが正常血漿サンプルに比べて減少していた(図3のパネルA)。図3のパネルAにおいて矢印で示されるように、1名の対象からの血漿サンプルは、基礎的状态および発作状態において、上昇したレベルのC1-INHを含んでいた。この外れ値のサンプルを省くと、データは、HAE患者における血漿C1-INHの明らかな低下を示した(図3のパネルB)。

40

【0130】

プロテオームデータはまた、HAEの病理生物学への新しい洞察も提供した。例えば、

50

H A E 患者からの血漿サンプルでは上昇していると特定されたタンパク質のサブセットは、ミトコンドリアの機能に関連している（図4のパネルA～C）。A T P シンターゼサブユニットO（A T P O）は、呼吸鎖の電子伝達複合体によって生み出されるミトコンドリア膜を横切るプロトン勾配の存在下でA D P からA T P を産生する必須のミトコンドリア膜タンパク質（F₁F₀ A T P シンターゼまたは複合体Vとしても知られている）である。同様に、シクロフィリンF（シクロフィリンDまたはミトコンドリアのペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼFとしても知られている；E C：5.2.1.8）もまた、ミトコンドリア膜タンパク質である。60 k D a ミトコンドリア熱ショックタンパク質（H S P 60）のレベルもまた、H A E 患者からの血漿サンプルでは上昇していることが見出された。

10

【0131】

H A E のバイオマーカーとして使用され得る、プロテオーム解析において特定されたさらなるタンパク質は、14-3-3ゼータ/デルタ（14-3-3）タンパク質である。図5に示されるように、14-3-3ゼータ/デルタタンパク質のレベルは、H A E 患者からの血漿では健康な個体に比べて上昇していた。14-3-3ゼータ/デルタタンパク質は、7メンバータンパク質ファミリーのうちの1つであり、14-3-3ベータ/アルファを含め、7メンバータンパク質ファミリーの他のメンバーも、H A E 患者からの血漿では上昇していることが見出された（表1）。14-3-3タンパク質は、遍在的に発現し、植物および哺乳動物の間で高度に保存されており、代謝、転写、アポトーシス、タンパク質輸送および細胞周期調節に関与するシグナル伝達経路の調節に関与する（A g h a z a d e h e t a l . D r u g D i s c o v . T o d a y（2015））。これらのタンパク質の血漿レベルまたは血清レベルの変化は、関節リウマチ（M a k s y m o w y c h e t a l . C l i n . E x p . R h e u m a t o l .（2014）32：S35-S39）、高安動脈炎と巨細胞性動脈炎を含む大血管炎（C h a k r a v a r t i e t a l . A r t h r i t i s R h e u m a t o l .（2015）67：1913-1921）、癌（M a t t a e t a l . E x p e r O p i n . T h e r . T a r g e t s（2012）16：515-523）、パーキンソン病（S l o n e e t a l . N e u r o b i o l . D i s .（2015）79：1-13）およびアルツハイマー病（S t e i n a c k e r e t a l . S e m i n . C e l l D e v . B i o l .（2011）22：696-704）などの疾患の発生と関連付けられてきた。本明細書に記載される結果は、14-3-3ゼータ/デルタタンパク質のレベルがH A E 患者からの血漿では健康な志願者からの血漿に比べて上昇していることを初めて特定するものである。

20

30

【0132】

健康な個体に比べてH A E を有する患者からの血漿では逸脱すると特定された、さらなるタンパク質には、I L - 1 F 6（インターロイキン36アルファとしても知られている）；プロテインキナーゼ：チロシンプロテインキナーゼY E S、チロシンプロテインキナーゼL Y Nおよびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ14（M A P K 14）；グリコーゲンシンターゼキナーゼ3アルファ/ベータ（G S K 3アルファ/ベータ）；A T P 依存性R N A ヘリカーゼD D X 19 B（D E A D b o x p r o t e i n 19 B）；なら

びに真核生物翻訳開始因子5 A - 1（e I F - 5 A - 1）が含まれる（表1）。図6に示されるように、I L - 1 F 6のレベルがH A E 患者からの血漿サンプルでは有意に低かったのに対し、図7～10に示されるように、チロシンプロテインキナーゼY E S、チロシンプロテインキナーゼL Y N、M A P K 14、G S K 3アルファ/ベータ、D E A D b o x p r o t e i n 19 Bおよびe I F - 5 A - 1はそれぞれ、H A E 患者からの血漿サンプルでは有意に上昇していた。

40

【0133】

プロテオーム解析により、H A E を有する患者と健康な個体との間で異なるレベルで存在する、150種を超えるタンパク質が特定された。本明細書で特定されたタンパク質のいずれも、例えば、接触活性化系に関連する疾患（例えば、H A E）のリスクがある患者

50

を特定するための、治療の候補を選択するための、疾患の進行もしくは病状をモニタリングするための、疾患に対する治療の有効性を評価するための、治療の過程を決定するための、疾患もしくは障害が接触活性化系に関連しているかどうかを特定するための、および/または研究目的（例えば、新しい治療法の開発のために利用される可能性がある疾患のメカニズムの研究を含む）の、方法において、接触活性化系に関連する疾患のバイオマーカーとして（個別に、または組み合わせて（バイオマーカーのセットで））使用されてよい。

【 0 1 3 4 】

他の実施形態

本明細書で開示される特徴は全て、任意の組み合わせで組み合わせられてよい。本明細書で開示される特徴はそれぞれ、同じ目的、同等の目的または類似の目的を果たす代替的な特徴で置き換えられてよい。従って、特に明記しない限り、開示される特徴はそれぞれ、一般的な一連の同等または類似の特徴の一例に過ぎない。

10

【 0 1 3 5 】

以上の説明から、当業者は、本開示の本質的な特徴を容易に確認でき、それらの趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な用途および条件に適合させるために本開示の様々な変更および改変を行うことができる。従って、他の実施形態も特許請求の範囲内に属する。

【 0 1 3 6 】

均等物および範囲

当業者であれば、本明細書で説明される本開示の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識する、またはただの通例に過ぎない実験法を用いてそれらを確認することができるであろう。本開示の範囲は、上記の説明に限定されることを意図されず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載される通りである。

20

【 0 1 3 7 】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、そうでないと示されていない限り、あるいは文脈から明らかでない限り、1つまたは複数の意味し得る。群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または説明は、そうでないと示されていない限り、あるいは文脈から明らかでない限り、群のメンバーの1つ、2つ以上または全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、所与の産物またはプロセスにおいて使用されるか、あるいは所与の産物またはプロセスに関連する場合に、成立するとみなされる。本開示は、群のまさに1つのメンバーが所与の産物またはプロセスに存在するか、所与の産物またはプロセスにおいて使用されるか、あるいは所与の産物またはプロセスに関連する、実施形態を包含する。本開示は、群のメンバーの2つ以上または全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、所与の産物またはプロセスにおいて使用されるか、あるいは所与の産物またはプロセスに関連する、実施形態を包含する。

30

【 0 1 3 8 】

さらに、本開示は、列挙される請求項のうちの1つ以上からの1つ以上の限定、要素、条項および説明用語が別の請求項に導入された、全ての変形、組み合わせおよび置換を包含する。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項が、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項に見出される1つ以上の限定を含むように改変されてよい。要素がリストとして（例えば、マーカッシュグループ形式で）提示されている場合、要素の各サブグループも開示されており、任意の要素（複数可）が、そのグループから削除されてよい。一般に、本開示または本開示の態様が特定の要素および/または特徴を含むと言及される場合、本開示または本開示の態様の特定の実施形態は、そのような要素および/または特徴からなるか、本質的にそれらからなる、ということが理解されるべきである。簡潔にするために、それらの実施形態は、本明細書では、それらの言葉によって具体的には記載されていない。用語「含む（comprising）」および「含む（containing）」は、オープンであることを意図され、追加の要素またはステップを含めることを許容する、ということも留意されるべきである。範囲が与えられている場合、端点が含まれる。

40

50

さらに、別段の指示がない限り、あるいは文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、本開示の種々の実施形態において、記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈が明らかにそうではないことを示さない限り、範囲の下限の10分の1の単位まで、想定し得る。

【0139】

本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、学术论文および他の刊行物に言及するが、これらは全て、参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれた参考文献のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合、本明細書が優先されるものとする。さらに、先行技術に含まれる本開示の特定の実施形態はいずれも、請求項のうちの1つ以上から明示的に除外され得る。そのような実施形態は、当業者に公知であると見なされるため、その除外が本明細書に明示的に記載されていない場合でも、それらは除外され得る。本開示の特定の実施形態はいずれも、先行技術の存在に関連するか否かにかかわらず、任意の理由で、任意の請求項から除外され得る。

10

【0140】

当業者であれば、本明細書で説明される特定の実施形態に対する多くの均等物を認識する、またはただの通例に過ぎない実験法を用いてそれらを確認することができるであろう。本明細書で説明される本実施形態の範囲は、上記の説明に限定されることを意図されず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載される通りである。当業者は、以下の特許請求の範囲で定義されるような本開示の趣旨または範囲から逸脱することなく、この説明に対する様々な変更および改変を行ってよい、ということを理解するであろう。

20

30

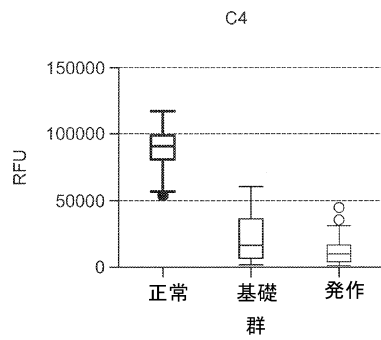
40

50

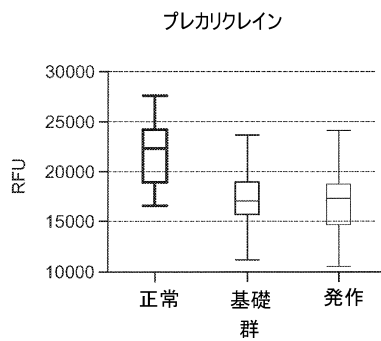
【図面】

【図 1】

A

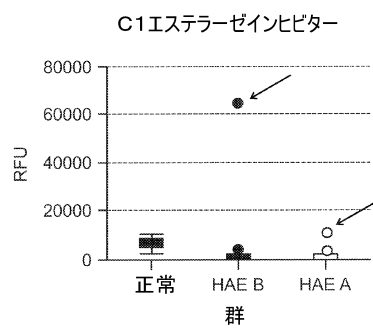


B

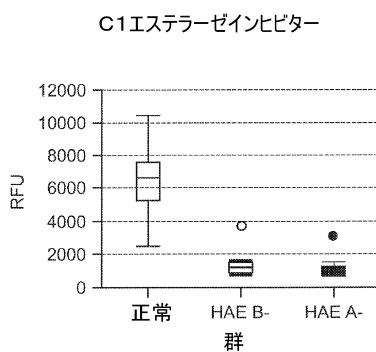


【図 3】

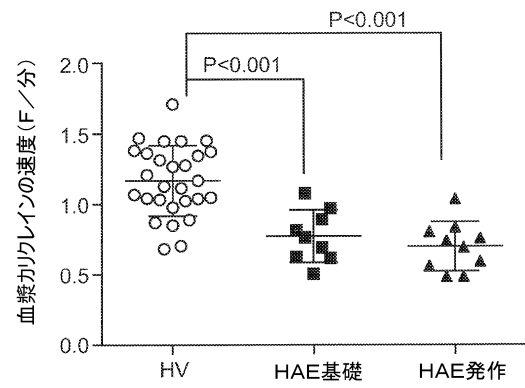
A



B



【図 2】

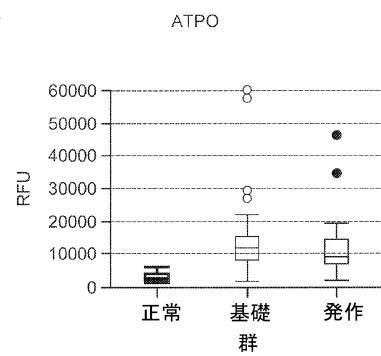


10

20

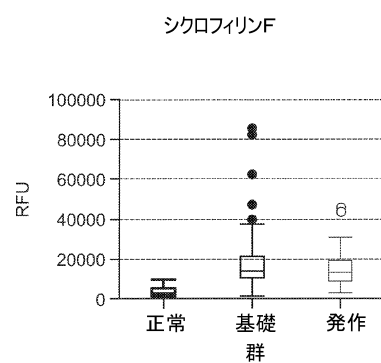
【図 4 - 1】

A



30

B

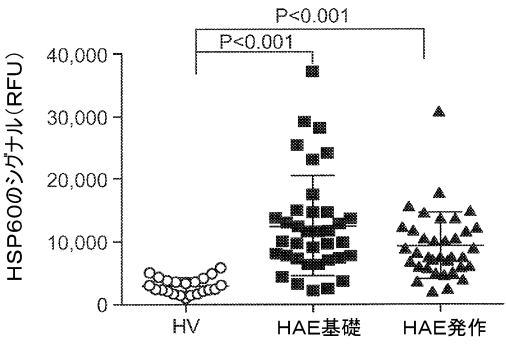


40

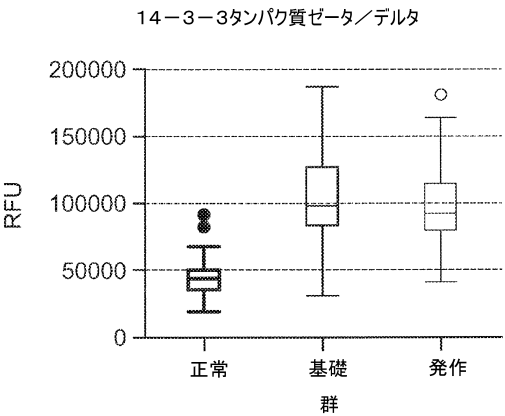
50

【図 4 - 2】

C

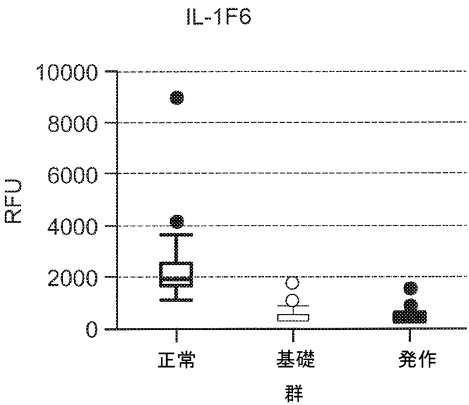


【図 5】

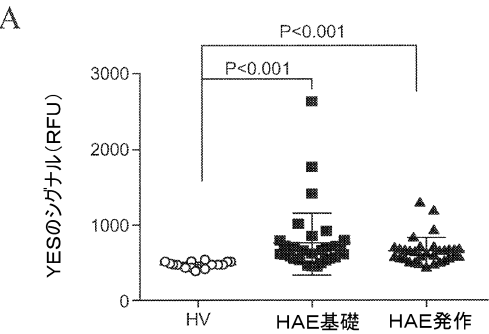


10

【図 6】

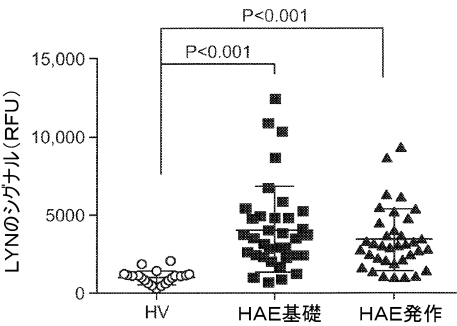


【図 7 - 1】



20

B

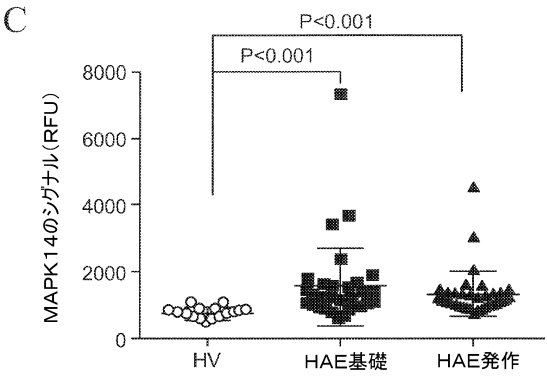


30

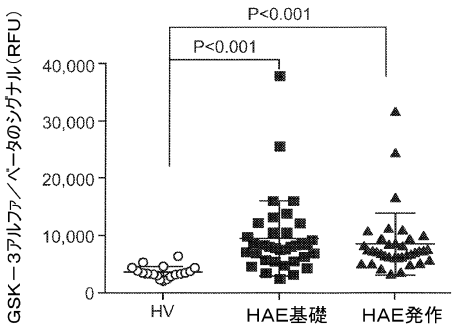
40

50

【図 7 - 2】

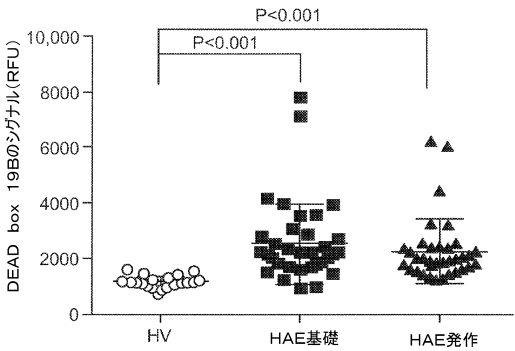


【図 8】

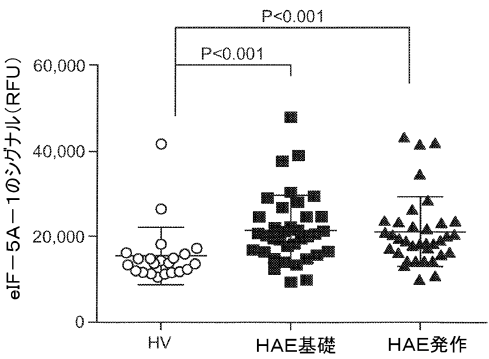


10

【図 9】



【図 10】



20

【配列表】

0007225089000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/10		
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/14		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		D

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 7 6 , メルローズ , 5 9 マーヴィン ロード

(72)発明者 ヴィスワナサン, マリーニ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 2 0 , アクトン , 1 2 ファームステッド ウェイ

(72)発明者 フォーセット, ライアン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 7 6 , メルローズ , 2 9 バーチ ヒル ロード

(72)発明者 ガウル, トゥリプティ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 8 0 3 , パーリントン , 5 5 ネットワーク ドライブ

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 1 1 8 2 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 2 5 7 8 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 6 1 1 8 3 (W O , A 1)

特表 2 0 1 2 - 5 0 1 1 8 4 (J P , A)

特開 2 0 0 1 - 1 7 4 4 6 3 (J P , A)

OHSAWA, Isao et al. , Clinical and Laboratory Characteristics That Differentiate Hereditary Angioedema in 72 Patients with Angioedema , Allergology International , 2014年 , Vol.63 , pp.595-602

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)