

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-513009

(P2017-513009A)

(43) 公表日 平成29年5月25日 (2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

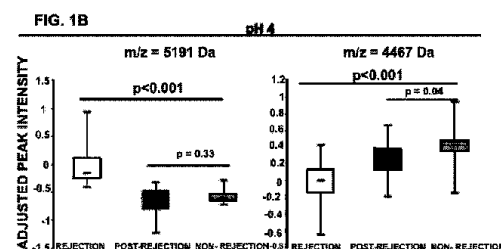
(21) 出願番号 特願2016-561603 (P2016-561603) (86) (22) 出願日 平成27年4月9日 (2015.4.9) (85) 翻訳文提出日 平成28年11月8日 (2016.11.8) (86) 国際出願番号 PCT/US2015/025164 (87) 国際公開番号 W02015/157546 (87) 国際公開日 平成27年10月15日 (2015.10.15) (31) 優先権主張番号 61/977,567 (32) 優先日 平成26年4月9日 (2014.4.9) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トウエルフス フロ ア (74) 代理人 100114775 弁理士 高岡 亮一 (74) 代理人 100121511 弁理士 小田 直 (74) 代理人 100202751 弁理士 岩堀 明代 (74) 代理人 100191086 弁理士 高橋 香元 最終頁に続く
--	---

(54) 【発明の名称】 免疫評価および移植片拒絶の予測のためのタンパク質バイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、対象からの血漿、血清または血液の患者試料を本明細書中で同定されるタンパク質マーカーについてアッセイすることを含む、対象における実質臓器移植片拒絶のスクリーニングおよび検出のための方法を提供する。対照試料と比較した患者試料中に存在するマーカー量の上昇または減少は、拒絶を示し、生検または修飾性治療 (modified treatment) の必要な患者を同定する。本方法は、より費用が嵩み、リスクがあり、侵襲性である生検手順を受ける必要なく、移植片拒絶の危険性において患者についてスクリーニングするために使用することができる。

【選択図】 図 1 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、

(a) 前記患者から得られる試料中の補体 C 4 アナフィラトキシン (C 4 A) の 5 キロダルトン (k D a) 断片の量を測定するステップと；

(b) 前記 C 4 A の 5 k D a 断片の量を対照試料中の量と比較するステップと；

(c) (b) での比較が、前記対照試料と比較して前記患者試料中の前記 C 4 A の 5 k D a 断片の量の増加を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出するステップを含む、方法。

【請求項 2】

10

前記測定が、前記患者から得られる試料を、前記 C 4 A の 5 k D a 断片と特異的に結合する試薬と接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記測定が、アポリポタンパク質 A 1 (A p o A 1) および／または α -1 抗キモトリプシン C 末端断片 (A A C T) の量を測定することをさらに含み、前記検出が、前記比較が前記対照試料と比較した前記患者試料中の A p o A 1 および／または A A C T の前記量の減少を示す場合に、移植片拒絶の起こり易さを検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

20

前記 (b) および (c) の接触および比較が、前記患者試料を、A p o A 1 および A A C T と結合する試薬と接触させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記接触が、前記患者試料を、表 1 で列挙される 2 以上のマーカーを含む一連のマーカーと特異的に結合する試薬と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記一連のマーカーが、表 1 で列挙される 8 以下のマーカーからなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

30

次のマーカー：C 1 プロテアーゼ阻害剤、血清アミロイド A、C-反応性タンパク質、アポリポタンパク質 E、アルファ-1-アンチトリプシン (A 1 A T) が、対照と比較して増加しており、および／または次のマーカー：A A C T、A p o A 1、翻訳後修飾 A p o A 1、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖 H 4、アルファ-2-マクログロブリンが、対照と比較して減少している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

差異が、対照に対する少なくとも 10 % の減少である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

差異が、対照に対する少なくとも 10 % の増加である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記測定が免疫アッセイを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

40

前記測定が質量スペクトルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試薬が、抗体、核酸プローブまたは合成プローブである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記実質臓器移植片拒絶が、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記拒絶の検出が、少なくとも 90 % の感度および少なくとも 90 % の特異性を呈する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

50

患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、

(a) 前記患者から得られる試料を、補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5191ダルトン断片、 α -1抗キモトリプシンC末端断片(AACT)およびアポリポタンパク質A1(ApoA1)からなり；場合によってはさらに補体C1阻害剤(C1nh)、アルファ-1-アンチトリプシン(A1AT)、血清アミロイドA(SAA)、C反応性タンパク質(CRP)、アポリポタンパク質E(ApoE)、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4(ITIH4)および／またはアルファ-2-マクログロブリン(A2M)からなる一連のマーカーと特異的に結合する試薬と接触させるステップと；

(b) 前記試薬と前記試料との間の特異的結合の量を測定するステップと；

(c) 前記(b)における特異的結合の量を対照試料と比較するステップと；

(d) 前記(c)での比較が、前記対照試料と比較してC4Aの5191ダルトン断片の増加またはAACTおよび／またはApoA1の減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出するステップと

を含む方法。

【請求項16】

C4Aの5kDa断片、ApoA1、AACTおよび、場合によってはC1nh、A1AT、SAA、CRP、ApoE、ITIH4およびA2Mから選択される1以上のさらなるマーカーと特異的に結合する抗体を含む、キット。

【請求項17】

前記抗体が固定化される固形支持体をさらに含む、請求項16に記載のキット。

【請求項18】

前記固形支持体がマイクロタイタープレートである、請求項17に記載のキット。

【請求項19】

前記抗体が、前記固形支持体に固定化される抗原への結合を介して固定化される、請求項17に記載のキット。

【請求項20】

前記抗体が、ビーズまたは粒子への結合を介して固定化される、請求項17に記載のキット。

【請求項21】

発色性基質をさらに含む、請求項17に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、その全体の内容が参照により本明細書中に組み込まれる、2014年4月9日に出願された米国特許仮出願第61/977,567号明細書の優先権を主張する。

【0002】

本発明は、全般的に、腎臓同種移植片拒絶を含む移植片拒絶の検出、予測および監視に関する。本発明は、より具体的には、同種移植片拒絶の早期検出のための、血清中で検出することができるタンパク質マーカーの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

損傷がある組織を、同じ種の生体または減少した個体(decreased individuals)の何れかからの健康な組織と入れ替えるための移植は、同種移植と呼ばれる。別の個体からの組織および細胞は通常、哺乳動物免疫系により外来物として認識される。これは、宿主防御の反応を刺激して、外来組織を拒絶する。免疫系は、時折、分子構造の非常に小さな相違を認識し、同種免疫反応を発現し得る。一部の細胞型は、血液細胞など、個体間で非常に類似している。血液型が適合する場合、免疫反応なく赤血球および血漿などの血液製剤を投与することができる。実質的には、哺乳動物細胞は全て、赤血球細胞を除き、それらの細胞表面上で主要組織適合分子を発現する。これらの分子は、免疫系が自己を外来細胞から区別することができる重要な機序である。

【0004】

臓器移植は、腎臓、肝臓、心臓、肺、膵臓および腸の多くの形態の末期疾患に対する根治治療である。ランゲルハンス島および神経細胞などの特殊化した細胞の移植、ならびに四肢または顔面などの複合組織移植がより一般的になりつつある。しかし、これらの手術の成功の長期間の持続は、免疫反応により限定される。ドナーが同一である双生児でない限り、殆どの受容者は免疫抑制薬治療を受けなければならない。最新の免疫抑制療法は、全ての場合において拒絶を防ぐことが可能ではなく、複数の重大な副作用がある。これらの薬物は、生命を脅かす感染、循環器疾患、糖尿病および癌につながり得る。

【0005】

現在、移植された臓器および組織の機能を監視するために多くの方法が使用されている：腎臓に対する血清クレアチニン、肝臓に対する血清トランスアミナーゼ、心臓に対する駆出率、肺に対する酸素飽和度および膵臓移植に対する血清グルコース。残念ながら、これらの試験は、拒絶に対する感度または特異性に乏しい。多くの場合において、臓器拒絶に対する決定的な試験は、侵襲性があり高価な生検である。

【0006】

拒絶の組織学的パターンは各臓器に対して異なり、組織損傷の特徴的なパターンは、「細胞性」対「液性」拒絶について同定することができる。「細胞性」拒絶に対する最良の処置は、Tリンパ球のさらなる増殖を防ぐために標的化される免疫抑制薬の投与であり得、一方で「液性」拒絶は、Bリンパ球を抑制し、移植片を外来物として認識する抗体の血漿をなくす投薬によって処置し得るので、この区別は重要である。一般に、軽度の細胞性拒絶は食い止めることができることが多く、長期間の損傷を引き起こし得ない。液性拒絶は食い止めることがより困難であり、移植片機能が不十分になることにつながるリスクがより高い。移植片拒絶の多くの場合において、細胞性および液性免疫反応の両方の要素が組み合わさっている。移植片拒絶の分類に対する黄金律は同種移植片生検である。

【0007】

現在の免疫抑制ストラテジーでの1年同種移植片機能における顕著な改善にもかかわらず、移植片機能の長期維持における進歩は少ない。薬物毒性または高血圧などの免疫性および非免疫性因子の両方がこの疾患に寄与するという仮説が立てられる。慢性移植片機能不全は、移植片生検での特徴的な組織学的特性に付随して機能が徐々に悪化する、実質臓器移植における現象である。腎臓移植において、これは、慢性拒絶、慢性同種移植片腎症（CAN）または尿細管萎縮（IFTA）を伴う間質性線維症として知られる。心臓移植においては、急性進行型アテローム性動脈硬化症があり、肝臓移植においては、胆管萎縮がある。慢性移植片損傷は、移植片の内部の血管の線維症を特徴とし、無症候性AMRに関連し得る。早期でのこの問題の検出は、プロトコール生検でさえも困難である。

【0008】

腎臓同種移植片拒絶の最新の診断方法は、高感度でもなく、特異的でもない。針生検は侵襲性が高く、患者死亡を伴う。したがって、拒絶を予測し、診断するための非侵襲性の試験を開発することが望まれる。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、一連のタンパク質マーカーおよび、患者の免疫状況の評価のために、および臓器移植片の拒絶を予測するために、これらのマーカーを使用する方法を提供する。本マーカーは、補体C4アナフィラトキシン（C4A）、アポリボタンパク質A1（ApoA1）、 α -1抗キモトリプシンC末端断片（AACT）、C1プロテアーゼ阻害剤（C1inh）、血清アミロイドA（SAA）、C-反応性タンパク質（CRP）、アポリボタンパク質E（ApoE）、アルファ-1-アンチトリプシン（A1AT）、翻訳後修飾ApoA1、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4（ITH4）およびアルファ-2-マクログロブリン（A2M）、その上、これらのタンパク質の断片も含む（表1および4および配列番号1から18参照）。

【0010】

本発明は、高い感度および特異性で達成され得る、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性で拒絶を検出する。ある実施形態において、本方法は、(a)患者から得られる試料中の補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5キロダルトン(kDa)断片の量を測定し；(b)患者試料中のC4Aの5kDa断片の量を対照試料中の量と比較し；(c)比較が、対照試料と比較した患者試料中のC4Aの5kDa断片の増加を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む。別の実施形態において、本方法は、(a)患者から得られる試料を、補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5キロダルトン(kDa)断片と特異的に結合する試薬と接触させ；(b)試薬と患者試料との間の特異的結合の量を測定し；(c)(b)での特異的結合の量を、対照試料に対する試薬の特異的結合の量と比較し；(d)(c)での比較が、対照試料と比較した患者試料中のC4Aの5kDa断片への特異的結合の増加を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む。ある実施形態において、接触は、患者試料をアポリタンパク質A1(ApOA1)および／または α -1抗キモトリプシンC末端断片(AACT)に結合する試薬と接触させることをさらに含み、検出は、比較が対照試料と比較した患者試料中のApOA1および／またはAACTの量の減少を示す場合に移植片拒絶の起こり易さを検出することをさらに含む。ある実施形態において、(b)および(c)の接触および比較は、患者試料をApOA1およびAACTに結合する試薬と接触させることを含む。

10

【0011】

20

別の実施形態において、本発明は、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、(a)患者から得られる試料を表1で列挙される2以上のマーカーを含む一連のバイオマーカーと特異的に結合する試薬と接触させ；(b)試薬と患者試料との間の特異的結合の量を測定し；(c)(b)での特異的結合の量を対照試料に対する試薬の特異的結合の量と比較し；(d)(c)での比較が、対照試料と比較した患者試料中のバイオマーカーへの特異的結合の有意な増加または減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む。いくつかの実施形態において、段階(a)から(c)は、表1で列挙されるマーカーのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15から19種類までに対して行われる。ある実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される8以下のマーカーからなる。別の実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される6以下のマーカーからなる。さらに別の実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される4以下のマーカーからなる。

30

【0012】

次のマーカーに対して、マーカー：C1プロテアーゼ阻害剤(C1-inh)、血清アミロイドA(SAA)、C-反応性タンパク質(CRP)、アポリタンパク質E(ApOE)、アルファ-1-アンチトリプシン(A1AT)への試薬の特異的結合が対照と比較して患者試料で増加する場合、および／または次のマーカー：AACT、ApOA1、翻訳後修飾ApOA1、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4(ITIH4)、アルファ-2-マクログロブリン(A2M)への試薬の特異的結合が対照と比較して減少する場合、移植片拒絶の起こり易さが検出される。典型的な実施形態において、差異は、対照と比較して少なくとも10%の減少または増加である。

40

【0013】

別の実施形態において、本発明は、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、(a)患者から得られる試料を、補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5191ダルトン断片、 α -1抗キモトリプシンC末端断片(AACT)およびApOA1からなり；場合によってはさらに補体C1阻害剤および／または表1で列挙されるマーカーからなる一連のマーカーと特異的に結合する試薬と接触させ；(b)この試薬と試料との間の特異的結合の量を測定し；(c)(b)での特異的結合の量を対照試料と比較し；(d)(c)での比較が、対照試料と比較したC4Aの5191ダルト

50

ン断片の増加またはA A C Tおよび／またはA p o A 1の減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む方法を提供する。

【0014】

いくつかの実施形態において、前記測定は免疫アッセイを含む。他の実施形態において、測定は質量スペクトルを含む。試薬の代表例としては、抗体、核酸プローブまたは合成プローブが挙げられるが限定されない。プローブまたは抗体は、場合によっては検出可能マーカーで標識し得る。

【0015】

実質臓器移植の例としては、腎臓、肝臓、心臓、脾臓、肺、腸および胸腺が挙げられるが限定されない。ある実施形態において、実質臓器移植片拒絶は、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶である。実質臓器移植片拒絶の他のタイプとしては、慢性拒絶、例えば慢性同種移植片腎症または尿細管萎縮を伴う間質性線維症などが挙げられる。

【0016】

本発明は、C 4 Aの5 k D a断片、A p o A 1、A A C Tおよび、場合によっては表1で列挙される1以上のさらなるマーカーと特異的に結合する抗体を含むキットをさらに提供する。ある実施形態において、本キットは、C 4 A（またはその5 k D a断片）およびA p o A 1（またはアミノ酸148から183のその断片）および／またはA A C T（またはアミノ酸385から422のその断片）に結合する試薬を含む。ある実施形態において、本キットは、A A C Tの5191 D a断片およびA p o A 1と特異的に結合する試薬を含む。ある実施形態において、本キットは、抗体が固定化される固形支持体をさらに含む。固形支持体の例としては、マイクロタイタープレート、ビーズ、膜または当業者にとって公知の他の支持体が挙げられるが限定されない。ある実施形態において、抗体は、固形支持体に固定化される抗原への結合を介して固定化される。ある実施形態において、抗体は、ビーズまたは粒子、例えばルミネックスなどへの結合を介して固定化される。ある実施形態において、本キットは、発色性基質をさらに含む。

【0017】

患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、（a）患者から得られる試料を、補体C 4アナフィラトキシン（C 4 A）と特異的に結合する試薬と接触させ；（b）この試薬と試料との間の特異的結合の量を測定し；（c）（b）での特異的結合の量を対照試料と比較し；（b）での結合の量が対照と比較してより多いことが実質臓器移植片拒絶の起こり易さを示す、段階を含む方法がさらに提供される。

【0018】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清または他の体液中で、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤および／または表1における他の16種類のタンパク質のうち1つを検出することによる、実質臓器同種移植片拒絶に関連がある患者においてペプチドおよび／またはタンパク質プロファイルを同定するための質量スペクトルアッセイであり、このアッセイは、（a）血漿、血清または他の体液中で質量スペクトルにより特異的なペプチドの特異的な量を測定し；（b）（a）でのタンパク質／ペプチドの特異的な量を対照試料と比較し；対照と比較した特異的なペプチドの量がより多いかまたはより少ないことが、実質臓器移植片拒絶の起こり易さを示す、段階を含む。

【0019】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清中で α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤を検出することによる、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶に関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするためのE L I S Aキットであり、本キットは、（a） α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイタープレート；（b） α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤と反応性がある、ポリクローナルまたはモノクロ

ーナル抗体ーアルカリホスファターゼ複合物；（c）p-ニトロフェニル-ホスフェート；および（d）抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤を含む。

【0020】

患者における急性細胞性腎臓同種移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、（a） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤に対するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を提供し；（b）この抗体で被覆されたマイクロタイタープレートを提供し；（c）このマイクロタイタープレートに血清または血漿を添加し；（d） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるアルカリホスファターゼ-抗体複合物をこのマイクロタイタープレートに提供し；（e）p-ニトロフェニル-ホスフェートをこのマイクロタイタープレートに提供し；（f）段階（a）から（e）の結果として起こる反応を標準曲線と比較して、正常個体と比較した α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤のレベルを決定する、段階を含む方法も提供される。

【0021】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清中で α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤を検出することにより急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするためのELISAキットであり、このキットは、（a） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体により被覆されたマイクロタイタープレート；（b） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体ーアルカリホスファターゼ複合物；（c）p-ニトロフェニル-ホスフェート；および（d）抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤を含む。

【0022】

本発明の別の例示的な実施形態は、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤および／または表1に記載のタンパク質を検出することにより、実質臓器同種移植片拒絶と関連がある患者における分子プロファイルについて血漿、血清および／または体液中でスクリーニングするためのLuminexキットであり、このキットは、（a） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤および／または表1で列举される他のタンパク質に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロビーズアレイ；（b） α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤および／または表1で列举される他のタンパク質と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体蛍光色素複合物；（c）および抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤または表1の他のタンパク質を含む。

【0023】

本発明の実施形態は、AACTおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／またはSAAおよび／またはCRPおよび／またはA2Mおよび／またはApoEおよび／またはITH4および／またはA1ATおよび／またはC-inhおよび／またはこれらのポリペプチドの断片の試料中での検出および／または定量的ための、アッセイおよび方法を提供する。本発明の典型的な実施形態は、哺乳動物、特にヒトの、血液、血漿、血清または他の体液などの、生体液試料との使用に適切であるタイプのELISA型のアッセイを利用する。方法論的实施形態は、生体液試料中のAACTおよび／またはC4Aおよび／またはApoA1ポリペプチド、これらのマーカーの断片および／または本明細書中に記載のマーカーの組み合わせの量について試験することを含む。ある一定の実施

形態は、例えば急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルを同定するために、 $\alpha-1$ 抗キモトリプシン、ApoA1、補体C1阻害剤およびC4Aの5191Daペプチドと一緒に試験する。ある一定の実施形態は、1（例えば5191Da C4Aペプチド）または2（例えばC4Aペプチド+ $\alpha-1$ 抗キモトリプシンまたはApoA1）または3（例えば $\alpha-1$ 抗キモトリプシン、ApoA1および5191Da C4Aペプチド）またはこれらのバイオマーカー4種類全てを試験する。

【0024】

本発明のある一定の実施形態において、5191Da C4Aペプチドを精製し、次いで、ELISAテストなどで使用することができる5191Daペプチドに特異的なポリクローナル抗体を産生させるために、この精製ペプチドをウサギなどの動物に注射する。同様に、タンパク質に対するモノクローナル抗体標品は、精製5191Daペプチドをマウスに注射し、脾臓およびリンパ節細胞を回収し、これらの細胞をマウス骨髓腫細胞と融合させ、モノクローナル抗体を産生させるために得られたハイブリドーマ細胞を使用することによって調製され得る。

【0025】

本発明のある例示的な実施形態は、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするために、血漿中で $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤を検出するための方法であって、(a) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤に対するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を提供し；(b) この抗体で被覆されたマイクロタイタープレートを提供し；(c) このマイクロタイタープレートに血清または血漿を添加し；(d) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるアルカリホスファターゼ抗体複合物をこのマイクロタイタープレートに提供し；(e) p-ニトロフェニル-ホスフェートをこのマイクロタイタープレートに提供し；(f) 段階(a)から(e)の結果として起こる反応を標準曲線と比較して、正常個体と比較した $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤のレベルを決定する段階を含む方法である。

【0026】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清中で $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤を検出することによる、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするためのELISAキットであり、このキットは、(a) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイタープレート；(b) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体-アルカリホスファターゼ複合物；(c) p-ニトロフェニル-ホスフェート；および(d) 抗原標準物質としての、 $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191Daペプチドおよび／または補体C1阻害剤を含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】腎臓同種移植片拒絶を検出する候補血漿タンパク質。(1A)拒絶対拒絶後試料を検出するためのバイオマーカー候補を評価する分類および回帰木(ClassificationおよびRegression Tree、CART)分析。(1B)拒絶(群A、n=17)、拒絶後(群B、n=17)および非拒絶(群C、n=48)血漿試料

における、4467Daおよび5191Daバイオマーカー候補の修正強度の箱ひげ図。

(1C) 生検により非拒絶と証明された患者 (n=19) と比較した、拒絶時および拒絶後 (n=16) の拒絶患者に対して生検時に測定した血清クレアチニンレベルの箱ひげ図。

【図1B】腎臓同種移植片拒絶を検出する候補血漿タンパク質。(1A) 拒絶対拒絶後試料を検出するためのバイオマーカー候補を評価する分類および回帰木 (ClassificationおよびRegression Tree、CART) 分析。(1B) 拒絶 (群A、n=17)、拒絶後 (群B、n=17) および非拒絶 (群C、n=48) 血漿試料における、4467Daおよび5191Daバイオマーカー候補の修正強度の箱ひげ図。

(1C) 生検により非拒絶と証明された患者 (n=19) と比較した、拒絶時および拒絶後 (n=16) の拒絶患者に対して生検時に測定した血清クレアチニンレベルの箱ひげ図。

【図1C】腎臓同種移植片拒絶を検出する候補血漿タンパク質。(1A) 拒絶対拒絶後試料を検出するためのバイオマーカー候補を評価する分類および回帰木 (ClassificationおよびRegression Tree、CART) 分析。(1B) 拒絶 (群A、n=17)、拒絶後 (群B、n=17) および非拒絶 (群C、n=48) 血漿試料における、4467Daおよび5191Daバイオマーカー候補の修正強度の箱ひげ図。

(1C) 生検により非拒絶と証明された患者 (n=19) と比較した、拒絶時および拒絶後 (n=16) の拒絶患者に対して生検時に測定した血清クレアチニンレベルの箱ひげ図。

【図2A】 α -1抗キモトリプシンおよびアポリポタンパク質A1 (ApoA1) のC末端断片の同定。(2A) 4467Daバイオマーカー (SELDI-TOF MSにより測定した場合の平均質量) 候補ペプチドを含有するC8高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製分画の、高解像度MALDI-TOF質量スペクトル。モノアイソトピック質量差はSALV (S、セリン; A、アラニン; L、ロイシン; およびV、バリン) の配列ラダーを示す。(2B) α -1-抗キモトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。平均質量 (Da) とともに番号付けしたペプチドを与える。(2C) ヒトApoA1に対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。(2D) 拒絶 (群A、n=17)、拒絶後 (群B、n=17) および非拒絶 (群C、n=48) 血漿試料におけるApoA1のSELDI修正ピーク強度の箱ひげ図。

【図2B】 α -1抗キモトリプシンおよびアポリポタンパク質A1 (ApoA1) のC末端断片の同定。(2A) 4467Daバイオマーカー (SELDI-TOF MSにより測定した場合の平均質量) 候補ペプチドを含有するC8高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製分画の、高解像度MALDI-TOF質量スペクトル。モノアイソトピック質量差はSALV (S、セリン; A、アラニン; L、ロイシン; およびV、バリン) の配列ラダーを示す。(2B) α -1-抗キモトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。平均質量 (Da) とともに番号付けしたペプチドを与える。(2C) ヒトApoA1に対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。(2D) 拒絶 (群A、n=17)、拒絶後 (群B、n=17) および非拒絶 (群C、n=48) 血漿試料におけるApoA1のSELDI修正ピーク強度の箱ひげ図。

【図2C】 α -1抗キモトリプシンおよびアポリポタンパク質A1 (ApoA1) のC末端断片の同定。(2A) 4467Daバイオマーカー (SELDI-TOF MSにより測定した場合の平均質量) 候補ペプチドを含有するC8高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製分画の、高解像度MALDI-TOF質量スペクトル。モノアイソトピック質量差はSALV (S、セリン; A、アラニン; L、ロイシン; およびV、バリン) の配列ラダーを示す。(2B) α -1-抗キモトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。平均質量 (Da) とともに番号付けしたペプチドを与える。(2C) ヒトApoA1に対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。(2D) 拒絶 (群A、n=17)、拒絶後 (群B、n=17) および非拒絶 (群C、n=48) 血漿試料におけるApoA1のSELDI修正ピーク強度の箱ひげ図。

【図 2 D】 α -1 抗キモトリプシンおよびアポリポタンパク質 A 1 (ApoA1) の C 末端断片の同定。(2 A) 4 4 6 7 Da バイオマーカー (SELDI-TOF MS により測定した場合の平均質量) 候補ペプチドを含有する C 8 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 精製分画の、高解像度 MALDI-TOF 質量スペクトル。モノアイソトピック質量差は SALV (S、セリン; A、アラニン; L、ロイシン; および V、バリン) の配列ラダーを示す。(2 B) α -1-抗キモトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。平均質量 (Da) とともに番号付けしたペプチドを与える。(2 C) ヒト ApoA1 に対するモノクローナル抗体を用いた血漿試料の免疫沈降。(2 D) 拒絶 (群 A、 $n=17$)、拒絶後 (群 B、 $n=17$) および非拒絶 (群 C、 $n=48$) 血漿試料における ApoA1 の SELDI 修正ピーク強度の箱ひげ図。

10

【図 3 A】急性細胞性拒絶との関連についての酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるアポリポタンパク質 A 1 (ApoA1) の検証。(3 A) オリジナルコホートのサブセットの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 B) 第二の独立コホートの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 C) 腎臓生検の前-3 から 0 日以内に回収された試料を有した受容者における ApoA1 レベルの箱ひげ図。25 検体の拒絶および 22 検体の非拒絶試料を比較した。非拒絶での平均 ApoA1 レベルは $0.22 \text{ SD} \pm 0.06$ であり、拒絶では $0.13 \text{ SD} \pm 0.04$ であった。ApoA1 のレベルは、生検で非拒絶が証明された受容者と比較して、拒絶時に有意に低かった (P 値 < 0.0001)。(3 D) 全 3 期間 (拒絶前、拒絶および拒絶後) からの血漿試料を有した 14 名の患者に対する個々の ApoA1 の結果を示す線グラフ。(E) 0.167 mg/dL のカットポイント

20

および 76% の感度および 86% の特異性を示す、オリジナルコホートおよび第二コホート両方を合わせたものからの非拒絶試料と拒絶試料を比較する ROC 分析。

【図 3 B】急性細胞性拒絶との関連についての酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるアポリポタンパク質 A 1 (ApoA1) の検証。(3 A) オリジナルコホートのサブセットの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 B) 第二の独立コホートの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 C) 腎臓生検の前-3 から 0 日以内に回収された試料を有した受容者における ApoA1 レベルの箱ひげ図。25 検体の拒絶および 22 検体の非拒絶試料を比較した。非拒絶での平均 ApoA1 レベルは $0.22 \text{ SD} \pm 0.06$ であり、拒絶では $0.13 \text{ SD} \pm 0.04$ であった。ApoA1 のレベルは、生検で非拒絶が証明された受容者と比較して、拒絶時に有意に低かった (P 値 < 0.0001)。(3 D)

30

全 3 期間 (拒絶前、拒絶および拒絶後) からの血漿試料を有した 14 名の患者に対する個々の ApoA1 の結果を示す線グラフ。(E) 0.167 mg/dL のカットポイントおよび 76% の感度および 86% の特異性を示す、オリジナルコホートおよび第二コホート両方を合わせたものからの非拒絶試料と拒絶試料を比較する ROC 分析。

40

【図 3 D】急性細胞性拒絶との関連についての酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるアポリポタンパク質 A 1 (ApoA1) の検証。(3 A) オリジナルコホートのサブセットの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 B) 第二の独立コホートの血漿試料の ELISA 結果の箱ひげ図。(3 C) 腎臓生検の前-3 から 0 日以内に回収された試料

50

を有した受容者におけるA p o A 1レベルの箱ひげ図。25検体の拒絶および22検体の非拒絶試料を比較した。非拒絶での平均A p o A 1レベルは $0.22 \text{ SD} \pm 0.06$ であり、拒絶では $0.13 \text{ SD} \pm 0.04$ であった。A p o A 1のレベルは、生検で非拒絶が証明された受容者と比較して、拒絶時に有意に低かった（ P 値 < 0.0001 ）。(3D)全3期間（拒絶前、拒絶および拒絶後）からの血漿試料を有した14名の患者に対する個々のA p o A 1の結果を示す線グラフ。(E) 0.167 mg/dL のカットポイントおよび76%の感度および86%の特異性を示す、オリジナルコホートおよび第二コホート両方を合わせたものからの非拒絶試料と拒絶試料を比較するROC分析。

【図4】腎臓同種移植片拒絶と診断された患者のA p o A 1レベル（平均 $0.156 + / - 0.77$ ）が、非拒絶（平均 $0.239 + / - 0.16$ ）と比較して有意に低かったことを示す、生検で非拒絶者と証明された者と生検で拒絶者と証明された者との間のA p o A 1比較。（ $P < 0.0024$ ）。

【図5】生検で非拒絶者と証明された者と生検で拒絶者と証明された者との間のA p o A 1比較の感度および特異性。 0.195 のカットポイントを用いて、A p o A 1レベルは、75%の感度および82%の特異性で、79%の確率で拒絶患者を的確に分類した。

【図6】抗体に基づくELISAを用いたアルファ-2マクログロブリンの検証。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本明細書中に記載の発明は、移植片拒絶を、検出し、予測し、監視するために、ヒト血漿中に存在する特異的なタンパク質マーカーを使用することができるという発見に基づく。これらのタンパク質のレベルの変化の評価によって、拒絶のリスクがある患者を判定する。

【0029】

定義

本願において使用される科学および技術用語は全て、別段の指定がない限り、当技術分野で一般に使用される意味を有する。本願で使用される場合、次の語または句は、指定される意味を有する。

【0030】

本明細書中で使用される場合、対象からの「試料」は、血漿、血液、血清、唾液、尿、または他の体液を含有する対象から得られる検体を意味する。

【0031】

本明細書中で使用される場合、「対象」という用語は、何らかのヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ウマ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタ、ニワトリ、両生類、爬虫類、げっ歯類などを含む。典型的な実施形態において、対象または患者はヒトである。

【0032】

本明細書中で使用される場合、「対照」試料は、個々のマーカーの正常測定値または比較のために使用しようとするマーカーのベースライン量の代表である試料を意味する。一般的には、ベースラインは同じ対象または患者から得られる測定値である。試料は、試験のために使用される実際の試料、または対応するマーカーの既知の正常測定値に基づく、参照レベルまたは範囲であり得る。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「補体C4アナフィラトキシン（C4A）の5キロダルトン（kDa）断片」は、分子量がおよそ5kDaであるC4Aの断片を指し、配列番号3に対応する5,051DaのC4A断片および配列番号2に対応する5,191DaのC4A断片を含む。いくつかの実施形態において、C4Aの5kDa断片は5,191Da断片である。

【0034】

本明細書中で使用される場合、「a」または「an」は、明らかな別段の断りがない限り、少なくとも1つを意味する。

【0035】

マーカーおよび方法

本発明は、一連のタンパク質マーカーおよび患者の免疫状況の評価のために、および臓器移植の拒絶を予測するために、これらのマーカーを使用する方法を提供する。マーカーとしては、補体C4アナフィラトキシン(C4A)、アポリポタンパク質A1(ApoA1)、 α -1抗キモトリプシンC末端断片(AACT)、C1プロテアーゼ阻害剤(C1 inh)、血清アミロイドA(SAA)、C-反応性タンパク質(CRP)、アポリポタンパク質E(ApoE)、アルファ-1-アンチトリプシン(A1AT)、翻訳後修飾ApoA1、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4(ITIH4)およびアルファ-2-マクログロブリン(A2M)ならびにこれらのタンパク質の断片(表1および4および配列番号1から18参照)が挙げられる。患者の血漿または他の体液中でのこれらのマーカーのレベルの変化は、同種移植片拒絶を予測する。

【表1】

表1：同種移植片拒絶のマーカー

m/z(Da)	配列番号	正体
2,505	11	アルファ-1-アンチトリプシンC末端断片(A1AT;アミノ酸397-418)
4,125	5	アポリポタンパク質A1断片(ApoA1;アミノ酸148-183)
4,187	13	血漿プロテアーゼC1阻害剤断片(C1 inh;アミノ酸445-478)
4,467	8	アルファ-1-抗キモトリプシンC末端断片(AACT;aa385-422)
5,051	3	補体C4アナフィラトキシン(C4A;アミノ酸698-742)
5,191	2	補体C4アナフィラトキシン(C4A;アミノ酸702-746)
11,694	14	血清アミロイドA(SAA)
19,409	15	C-反応性タンパク質(CRP)
28,077	6	アポリポタンパク質A1(ApoA1)
28,186	6	翻訳後修飾ApoA1
28,336	6	翻訳後修飾ApoA1
28,574	6	翻訳後修飾ApoA1
29,134	6	翻訳後修飾ApoA1
36,747	16	アポリポタンパク質E(ApoE)
50,835	10	アルファ-1-アンチトリプシン(A1AT)
64,932	10	アルファ-1-アンチトリプシン(A1AT)
109,796	17	インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4(ITIH4)
143,718	18	アルファ-2-マクログロブリン(A2Mまたはアルファ-2-M)
188,758	18	アルファ-2-マクログロブリン(A2Mまたはアルファ-2-M)

【0036】

本発明は、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、80%を超える感度および特異性で拒絶の起こり易さを検出し、典型的な実施形態においては、少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性で検出する。ある実施形態において、本方法は、(a)患者から得られる試料中で補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5キロダルトン(kDa)断片の量を測定し;(b)患者試料中のC4Aの5kDa断片の量を対照試料中の量と比較し;(c)比較が、対照試料と比較した患者試料中のC4Aの5kDa断片の増加を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む。別の実施形態において、本方法は、(a)患者から得られる試料を補体C4アナフィラトキシン(C4A)の5キロダルトン(kDa)断片と特異的に結合する試薬と接触させ;(b)試薬と患者試料との間の特異的結合の量を測定し;(c)(b)での特異的結合の量を対照試料中の試薬の特異的結合の

量と比較し；（d）（c）での比較が、対照試料と比較した患者試料中のC4Aの5kDa断片への特異的結合の増加を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む。ある実施形態において、接触は、患者試料をアポリボタンパク質A1（ApoA1）および／または α -1抗キモトリプシンC末端断片（AACT）に結合する試薬と接触させることをさらに含み、検出は、比較が、対照試料と比較した患者試料中のApoA1および／またはAACTの量の減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出することをさらに含む。ある実施形態において、接触および比較は、患者試料をApoA1およびAACTに結合する試薬と接触させることを含む。

【0037】

別の実施形態において、本発明は、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、（a）患者から得られる試料を、表1で列挙される2以上マーカーを含む一連のバイオマーカーと特異的に結合する試薬と接触させ；（b）試薬と患者試料との間の特異的結合の量を測定し；（c）（b）での特異的結合の量を対照試料中の試薬の特異的結合の量と比較し；（d）（c）での比較が、対照試料と比較した患者試料中でのバイオマーカーへの特異的結合の増加または減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する段階を含む。いくつかの実施形態において、段階（a）から（c）は、表1で列挙されるマーカーのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15から19種類以下に対して行われる。ある実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される8以下のマーカーからなる。別の実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される6以下のマーカーからなる。さらに別の実施形態において、一連のマーカーは、表1で列挙される4以下のマーカーからなる。

【0038】

次のマーカー：断片を含め、C4A、C1プロテアーゼ阻害剤（C1-inh）、血清アミロイドA（SAA）、C-反応性タンパク質（CRP）、アポリボタンパク質E（ApoE）、アルファ-1-アンチトリプシン（A1AT）、に対して、マーカーへの試薬の特異的結合が対照と比較して増加する場合、および／または次のマーカー：断片を含め、AACT、ApoA1、翻訳後修飾ApoA1、インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H4（ITIH4）、アルファ-2-マクログロブリン（A2M）への試薬の特異的結合が対照と比較して減少する場合、移植片拒絶の起こり易さが検出される。典型的な実施形態において、差異は、対照と比較して少なくとも10%の減少または増加である。

【0039】

別の実施形態において、本発明は、患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、（a）患者から得られる試料を、補体C4アナフィラトキシン（C4A）の5191ダルトン断片、 α -1抗キモトリプシンC末端断片（AACT）およびApoA1からなる；および場合によってはさらに補体C1阻害剤および／または表1で列挙されるマーカーからなる一連のマーカーと特異的に結合する試薬と接触させ；（b）この試薬と試料との間の特異的結合の量を測定し；（c）（b）での特異的結合の量を対照試料への試薬の特異的結合の量と比較し；および（d）（c）での比較が、対照試料と比較したC4Aの5191ダルトン断片の増加またはAACTおよび／またはApoA1の減少を示す場合、移植片拒絶の起こり易さを検出する、段階を含む方法を提供する。

【0040】

いくつかの実施形態において、測定は免疫アッセイを含む。他の実施形態において、測定は質量スペクトルを含む。他のアッセイ方法としては、蛍光励起細胞分取（FACS）、ウェスタンブロッティングおよびサロゲートDNA鋳型の増幅が挙げられる。試薬の代表例としては、抗体、核酸プローブまたは合成プローブが挙げられるが限定されない。プローブまたは抗体は、場合によっては検出可能マーカーで標識し得る。いくつかの実施形態において、試薬は検出可能マーカーで標識され、および／または発色または蛍光発生基質を用いて観察される。

【0041】

実質臓器移植の例としては、腎臓、肝臓、心臓、脾臓、肺、腸および胸腺が挙げられるが限定されない。ある実施形態において、実質臓器移植片拒絶は、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶である。他のタイプの実質臓器移植片拒絶としては、慢性拒絶、例えば慢性同種移植片腎症または尿細管萎縮を伴う間質性線維症が挙げられる。

【0042】

患者における実質臓器移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、(a) 患者から得られる試料を、補体C4アナフィラトキシン(C4A)と特異的に結合する試薬と接触させ；(b) この試薬と試料との間の特異的結合の量を測定し；(c) (b) の特異的結合の量を対照試料と比較し；(b)での結合の量が対照と比較してより多いことが実質臓器移植片拒絶の起こり易さを示す、段階を含む方法がさらに提供される。

10

【0043】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清または他の体液中で $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤および／または表1における他の16種類のタンパク質のうち1つを検出することによって、実質臓器同種移植片拒絶と関連がある患者におけるペプチドおよび／またはタンパク質プロファイルを同定するための質量スペクトルアッセイであり、このアッセイは、(a) 血漿、血清または他の体液中で質量スペクトルにより特異的なペプチドの特異的な量を測定し；(b) (a)でのタンパク質／ペプチドの特異的な量を対照試料と比較し；対照と比較して特異的なペプチドの量がより多いかまたはより少ないことが実質臓器移植片拒絶の起こり易さを示す、段階を含む。

20

【0044】

患者における急性細胞性腎臓同種移植片拒絶の起こり易さを検出するための方法であって、(a) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤に対するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を提供し；(b) この抗体で被覆されたマイクロタイタープレートを提供し；(c) このマイクロタイタープレートに血清または血漿を添加し；(d) $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるアルカリホスファターゼ抗体複合物をマイクロタイタープレートに提供し；(e) p-ニトロフェニル-ホスフェートをこのマイクロタイタープレートに提供し；(f) 段階(a)から(e)の結果として起こる反応を標準曲線と比較して、正常個体と比較した $\alpha-1$ 抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤のレベルを決定する、段階を含む方法も提供される。

30

【0045】

本発明の実施形態は、AACTおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／またはSAAおよび／またはCRPおよび／またはA2Mおよび／またはApoEおよび／またはITH4および／またはALATおよび／またはC-inhおよび／またはこれらのポリペプチドの断片の、試料中での検出および／または定量的ためのアッセイおよび方法を提供する。本発明の典型的な実施形態は、哺乳動物、特にヒトの、血液、血漿、血清または他の体液などの、生体液試料との使用に適切であるタイプのELISA型のアッセイを利用する。方法論的实施形態は、生体液試料中のAACTおよび／またはC4Aおよび／またはApoA1ポリペプチド、これらのマーカーの断片および／または本明細書中に記載のマーカーの組み合わせの量について試験することを含む。ある一定の実施形態は、例えば急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルの同定のために、 $\alpha-1$ 抗キモトリプシン、ApoA1、補体C1阻害剤およびC4Aの5191Daペプチドと一緒に試験する。ある一定の実施形態は、1（例えば5191Da C4Aペプチド）または2（例えばC4Aペプチド+ $\alpha-1$ 抗キモトリプシンまたはApoA1）または3（例えば $\alpha-1$ 抗キモトリプシン、ApoA1および5191Da C4Aペプチド）またはこれらのバイオマーカー全4種類を試験する。

40

【0046】

本発明のある一定の実施形態において、5191Da C4Aペプチドを精製し、次い

50

で、E L I S Aテストなどで使用することができる5191Daペプチドに特異的なポリクローナル抗体を産生させるために、この精製ペプチドをウサギなどの動物に注射する。同様に、タンパク質に対するモノクローナル抗体標品は、精製5191Daペプチドをマウスに注射し、脾臓およびリンパ節細胞を回収し、これらの細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させ、モノクローナル抗体を産生させるために得られたハイブリドーマ細胞を使用することによって調製され得る。

【0047】

ある例示的な本発明の実施形態は、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするために、血漿中で α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤を検出するための方法であって、(a) α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤に対するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を提供し；(b) この抗体で被覆されたマイクロタイタープレートを提供し；(c) このマイクロタイタープレートに血清または血漿を添加し；(d) α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるアルカリホスファターゼ抗体複合物をこのマイクロタイタープレートに提供し；(e) p-ニトロフェニル-ホスフェートをこのマイクロタイタープレートに提供し；(f) 段階(a)から(e)の結果として起こる反応を標準曲線と比較して、正常個体と比較した α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤のレベルを決定する、段階を含む方法である。

【0048】

マーカーの量は、これが、対照中に存在する量と統計学的に有意な量、異なる場合、増加または減少しているとみなされる。いくつかの実施形態において、差異は少なくとも10%の増加または減少であり；他の実施形態において、差異は、少なくとも20%、30%、40%、50%以上である。他の実施形態において、参照範囲は、正常、対照試料中に存在するマーカーの量に対して特定され、試験試料のマーカー量がそのマーカーに対する参照範囲の外側である場合、拒絶が起こり易い。典型的な実施形態において、試料は血漿試料である。血清、尿および唾液を含め、他の体液を試料のために使用し得る。

【0049】

マーカーの次の組み合わせが本発明の方法での使用のために企図される：C4A、ApoA1；C4A、AACT；C4A、A1AT；C4A、C1-inh；C4A、SAA；C4A、CRP；C4A、ApoE；C4A、ITIH4；C4A、A2M；ApoA1、A1AT；ApoA1、C1-inh；ApoA1、SAA；ApoA1、CRP；ApoA1、ApoE；ApoA1、ITIH4；ApoA1、A2M；AACT、A1AT；AACT、C1-inh；AACT、SAA；AACT、CRP；AACT、ApoE；AACT、ITIH4；AACT、A2M；A1AT、C1-inh；A1AT、SAA；A1AT、CRP；A1AT、ApoE；A1AT、ITIH4；A1AT、A2M；C1-inh、SAA；C1-inh、CRP；C1-inh、ApoE；C1-inh、ITIH4；C1-inh、A2M；SAA、CRP；SAA、ApoE；SAA、ITIH4；SAA、A2M；CRP、ApoE；CRP、ITIH4；CRP、A2M；ApoE、ITIH4；ApoE、A2M；ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、AACT；C4A、ApoA1、A1AT；C4A、ApoA1、C1-inh；C4A、ApoA1、SAA；C4A、ApoA1、CRP；C4A、ApoA1、ApoE；C4A、ApoA1、ITIH4；C4A、ApoA1、A2M；C4A、AACT、A1AT；C4A、AACT、C1-inh；C4A、AACT、SAA；C4A、AACT、CRP；C4A、AACT、ApoE；C4A、AACT、ITIH4；C4A、AACT、A2M；C4A、A1AT、C1-inh；C4A、A1AT、SAA；C4A、A1AT、CRP；C4A、A1AT、ApoE；C4A、A1AT、ITIH

4 ; C 4 A、A 1 A T、A 2 M ; C 4 A、C 1 - i n h、S A A ; C 4 A、C 1 - i n h
 、C R P ; C 4 A、C 1 - i n h、A p o E ; C 4 A、C 1 - i n h、I T I H 4 ; C 4
 A、C 1 - i n h、A 2 M ; C 4 A、S A A、C R P ; C 4 A、S A A、A p o E ; C 4
 A、S A A、I T I H 4 ; C 4 A、S A A、A 2 M ; C 4 A、C R P、A p o E ; C 4 A
 、C R P、I T I H 4 ; C 4 A、C R P、A 2 M ; C 4 A、A p o E、I T I H 4 ; C 4
 A、A p o E、A 2 M ; C 4 A、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1、A A C T、A 1 A T
 ; A p o A 1、A A C T、C 1 - i n h ; A p o A 1、A A C T、A p o E ; A p o A 1
 、A A C T、I T I H 4 ; A p o A 1、A A C T、A 2 M ; A p o A 1、A 1 A T、C 1
 - i n h ; A p o A 1、A 1 A T、S A A ; A p o A 1、A 1 A T、C R P ; A p o A 1
 、A 1 A T、A p o E ; A p o A 1、A 1 A T、I T I H 4 ; A p o A 1、A 1 A T、A 2 M ; A p o A 1、C 1 - i n h、S A A ; A p o A 1、C 1 - i n h、C R P ; A p o
 A 1、C 1 - i n h、A p o E ; A p o A 1、C 1 - i n h、I T I H 4 ; A p o A 1、
 C 1 - i n h、A 2 M ; A p o A 1、S A A、C R P ; A p o A 1、S A A、A p o E ;
 A p o A 1、S A A、I T I H 4 ; A p o A 1、S A A、A 2 M ; A p o A 1、C R P、
 A p o E ; A p o A 1、C R P、I T I H 4 ; A p o A 1、C R P、A 2 M ; A p o A 1
 、A p o E、I T I H 4 ; A p o A 1、A p o E、A 2 M ; A p o A 1、I T I H 4、A
 2 M ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h ; A A C T、A 1 A T、A p o E ; A A C T、
 A 1 A T、I T I H 4 ; A A C T、C 1 - i n h、S A A ; A A C T、C 1 - i n h、C
 R P ; A A C T、C 1 - i n h、A p o E ; A A C T、C 1 - i n h、I T I H 4 ; A A
 C T、C 1 - i n h、A 2 M ; A A C T、S A A、C R P ; A A C T、S A A、A p o E
 ; A A C T、S A A、I T I H 4 ; A A C T、S A A、A 2 M ; A A C T、C R P、A p
 o E ; A A C T、C R P、I T I H 4 ; A A C T、C R P、A 2 M ; A A C T、A p o E
 、I T I H 4 ; A A C T、A p o E、A 2 M ; A A C T、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T
 、C 1 - i n h、S A A ; A 1 A T、C 1 - i n h、C R P ; A 1 A T、C 1 - i n h、
 A p o E ; A 1 A T、C 1 - i n h、I T I H 4 ; A 1 A T、C 1 - i n h、A 2 M ; A
 1 A T、S A A、C R P ; A 1 A T、S A A、A p o E ; A 1 A T、S A A、I T I H 4
 ; A 1 A T、S A A、A 2 M ; A 1 A T、C R P、A p o E ; A 1 A T、C R P、I T I
 H 4 ; A 1 A T、C R P、A 2 M ; A 1 A T、A p o E、I T I H 4 ; A 1 A T、A p o
 E、A 2 M ; A 1 A T、I T I H 4、A 2 M ; C 1 - i n h、S A A、C R P ; C 1 - i
 n h、S A A、A p o E ; C 1 - i n h、S A A、I T I H 4 ; C 1 - i n h、S A A、
 A 2 M ; C 1 - i n h、C R P、A p o E ; C 1 - i n h、C R P、I T I H 4 ; C 1 -
 i n h、C R P、A 2 M ; C 1 - i n h、A p o E、I T I H 4 ; C 1 - i n h、A p o
 E、A 2 M ; C 1 - i n h、I T I H 4、A 2 M ; S A A、C R P、A p o E ; S A A、
 C R P、I T I H 4 ; S A A、C R P、A 2 M ; S A A、A p o E、I T I H 4 ; S A A
 、A p o E、A 2 M ; S A A、I T I H 4、A 2 M ; C R P、A p o E、I T I H 4 ; C
 R P、A p o E、A 2 M ; C R P、I T I H 4、A 2 M ; A p o E、I T I H 4、A 2 M
 ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、A 1 A T ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、C 1 - i
 n h ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、S A A ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、C R P
 ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、A p o E ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、I T I H
 4 ; C 4 A、A p o A 1、A A C T、A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、C 1 - i
 n h ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、S A A ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、C R P
 ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、A p o E ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、I T I H
 4 ; C 4 A、A p o A 1、A 1 A T、A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、C 1 - i n h、S A
 A ; C 4 A、A p o A 1、C 1 - i n h、C R P ; C 4 A、A p o A 1、C 1 - i n h、
 A p o E ; C 4 A、A p o A 1、C 1 - i n h、I T I H 4 ; C 4 A、A p o A 1、C 1
 - i n h、A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、S A A、C R P ; C 4 A、A p o A 1、S A A
 、A p o E ; C 4 A、A p o A 1、S A A、I T I H 4 ; C 4 A、A p o A 1、S A A、
 A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、C R P、A p o E ; C 4 A、A p o A 1、C R P、I T I
 H 4 ; C 4 A、A p o A 1、C R P、A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、A p o E、I T I H
 4 ; C 4 A、A p o A 1、A p o E、A 2 M ; C 4 A、A p o A 1、I T I H 4、A 2 M

; C4A、AACT、A1AT、C1-inh; C4A、AACT、A1AT、SAA;
 C4A、AACT、A1AT、CRP; C4A、AACT、A1AT、ApoE; C4A
 、AACT、A1AT、ITIH4; C4A、AACT、A1AT、A2M; C4A、A
 ACT、C1-inh、SAA; C4A、AACT、C1-inh、CRP; C4A、A
 ACT、C1-inh、ApoE; C4A、AACT、C1-inh、ITIH4; C4
 A、AACT、C1-inh、A2M; C4A、AACT、SAA、CRP; C4A、A
 ACT、SAA、ApoE; C4A、AACT、SAA、ITIH4; C4A、AACT
 、SAA、A2M; C4A、AACT、CRP、ApoE; C4A、AACT、CRP、
 ITIH4; C4A、AACT、CRP、A2M; C4A、AACT、ApoE、ITI
 H4; C4A、AACT、ApoE、A2M; C4A、AACT、ITIH4、A2M; 10
 C4A、A1AT、C1-inh、SAA; C4A、A1AT、C1-inh、CRP;
 C4A、A1AT、C1-inh、ApoE; C4A、A1AT、C1-inh、ITI
 H4; C4A、A1AT、C1-inh、A2M; C4A、A1AT、SAA、CRP;
 C4A、A1AT、SAA、ApoE; C4A、A1AT、SAA、ITIH4; C4A
 、A1AT、SAA、A2M; C4A、A1AT、CRP、ApoE; C4A、A1AT
 、CRP、ITIH4; C4A、A1AT、CRP、A2M; C4A、A1AT、Apo
 E、ITIH4; C4A、A1AT、ApoE、A2M; C4A、A1AT、ITIH4
 、A2M; C4A、C1-inh、SAA、CRP; C4A、C1-inh、SAA、A
 poE; C4A、C1-inh、SAA、ITIH4; C4A、C1-inh、SAA、
 A2M; C4A、C1-inh、CRP、ApoE; C4A、C1-inh、CRP、I 20
 TIH4; C4A、C1-inh、CRP、A2M; C4A、C1-inh、ApoE、
 ITIH4; C4A、C1-inh、ApoE、A2M; C4A、C1-inh、ITI
 H4、A2M; C4A、SAA、CRP、ApoE; C4A、SAA、CRP、ITI
 H4; C4A、SAA、CRP、A2M; C4A、SAA、ApoE、ITIH4; C4A
 、SAA、ApoE、A2M; C4A、SAA、ITIH4、A2M; C4A、CRP、
 ApoE、ITIH4; C4A、CRP、ApoE、A2M; C4A、CRP、ITI
 H4、A2M; C4A、ApoE、ITIH4、A2M; ApoA1、AACT、A1AT
 、C1-inh; ApoA1、AACT、A1AT、SAA; ApoA1、AACT、A
 1AT、CRP; ApoA1、AACT、A1AT、ApoE; ApoA1、AACT、
 A1AT、ITIH4; ApoA1、AACT、A1AT、A2M; ApoA1、AAC 30
 T、C1-inh、SAA; ApoA1、AACT、C1-inh、CRP; ApoA1
 、AACT、C1-inh、ApoE; ApoA1、AACT、C1-inh、ITI
 H4; ApoA1、AACT、C1-inh、A2M; ApoA1、AACT、SAA、A
 poE; ApoA1、AACT、SAA、ITIH4; ApoA1、AACT、SAA、
 A2M; ApoA1、AACT、CRP、ApoE; ApoA1、AACT、CRP、I
 TIH4; ApoA1、AACT、CRP、A2M; ApoA1、AACT、ApoE、
 ITIH4; ApoA1、AACT、ApoE、A2M; ApoA1、AACT、ITI
 H4、A2M; ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA; ApoA1、A1AT、
 C1-inh、CRP; ApoA1、A1AT、C1-inh、ApoE; ApoA1、
 A1AT、C1-inh、ITIH4; ApoA1、A1AT、C1-inh、A2M; 40
 ApoA1、A1AT、SAA、CRP; ApoA1、A1AT、SAA、ApoE; A
 poA1、A1AT、SAA、ITIH4; ApoA1、A1AT、SAA、A2M; A
 poA1、A1AT、CRP、ApoE; ApoA1、A1AT、CRP、ITIH4;
 ApoA1、A1AT、CRP、A2M; ApoA1、A1AT、ApoE、ITI
 H4; ApoA1、A1AT、ApoE、A2M; ApoA1、A1AT、ITIH4、A2
 M; ApoA1、C1-inh、SAA、CRP; ApoA1、C1-inh、SAA、
 ApoE; ApoA1、C1-inh、SAA、ITIH4; ApoA1、C1-inh
 、SAA、A2M; ApoA1、C1-inh、CRP、ApoE; ApoA1、C1-
 inh、CRP、ITIH4; ApoA1、C1-inh、CRP、A2M; ApoA1
 、C1-inh、ApoE、ITIH4; ApoA1、C1-inh、ApoE、A2M 50

; ApoA1、C1-inh、ITIH4、A2M; ApoA1、SAA、CRP、ApoE; ApoA1、SAA、CRP、ITIH4; ApoA1、SAA、CRP、A2M
 ; ApoA1、SAA、ApoE、ITIH4; ApoA1、SAA、ApoE、A2M
 ; ApoA1、SAA、ITIH4、A2M; ApoA1、CRP、ApoE、ITIH4
 ; ApoA1、CRP、ApoE、A2M; ApoA1、CRP、ITIH4、A2M
 ; ApoA1、ApoE、ITIH4、A2M; AACT、A1AT、C1-inh、SAA; AACT、A1AT、C1-inh、CRP; AACT、A1AT、C1-inh
 、ApoE; AACT、A1AT、C1-inh、ITIH4; AACT、A1AT、C1-inh、A2M; AACT、A1AT、SAA、ApoE; AACT、A1AT、S
 A
 A、ITIH4; AACT、A1AT、CRP、ApoE; AACT、A1AT、CRP
 、ITIH4; AACT、A1AT、ApoE、ITIH4; AACT、A1AT、ApoE、A2M; AACT、A1AT、ITIH4、A2M; AACT、C1-inh、S
 AA、CRP; AACT、C1-inh、SAA、ApoE; AACT、C1-inh、SAA、ITIH4; AACT、C1-inh、SAA、A2M; AACT、C1-in
 h、CRP、ApoE; AACT、C1-inh、CRP、ITIH4; AACT、C1-inh、CRP、A2M; AACT、C1-inh、ApoE、ITIH4; AACT
 、C1-inh、ApoE、A2M; AACT、C1-inh、ITIH4、A2M; AACT、SAA、CRP、ApoE; AACT、SAA、CRP、ITIH4; AACT
 、SAA、CRP、A2M; AACT、SAA、ApoE、ITIH4; AACT、SAA、ApoE、A2M; AACT、SAA、ITIH4、A2M; AACT、CRP、A
 poE、ITIH4; AACT、CRP、ApoE、A2M; AACT、CRP、ITIH4、A2M; AACT、ApoE、ITIH4、A2M; A1AT、C1-inh、S
 AA、CRP; A1AT、C1-inh、SAA、ApoE; A1AT、C1-inh、SAA、ITIH4; A1AT、C1-inh、SAA、A2M; A1AT、C1-in
 h、CRP、ApoE; A1AT、C1-inh、CRP、ITIH4; A1AT、C1-inh、CRP、A2M; A1AT、C1-inh、ApoE、ITIH4; A1AT
 、C1-inh、ApoE、A2M; A1AT、C1-inh、ITIH4、A2M; A1AT、SAA、CRP、ApoE; A1AT、SAA、CRP、ITIH4; A1AT
 、SAA、CRP、A2M; A1AT、SAA、ApoE、ITIH4; A1AT、SAA、ApoE、A2M; A1AT、SAA、ITIH4、A2M; A1AT、CRP、A
 poE、ITIH4; A1AT、CRP、ApoE、A2M; A1AT、CRP、ITIH4、A2M; A1AT、ApoE、ITIH4、A2M; C1-inh、SAA、CR
 P、ApoE; C1-inh、SAA、CRP、ITIH4; C1-inh、SAA、CRP、A2M; C1-inh、SAA、ApoE、ITIH4; C1-inh、SAA、
 ApoE、A2M; C1-inh、SAA、ITIH4、A2M; C1-inh、CRP、ApoE、ITIH4; C1-inh、CRP、ApoE、A2M; C1-inh、C
 RP、ITIH4、A2M; C1-inh、ApoE、ITIH4、A2M; SAA、CRP、ApoE、ITIH4; SAA、CRP、ApoE、A2M; SAA、CRP、I
 TIH4、A2M; SAA、ApoE、ITIH4、A2M; CRP、ApoE、ITIH4、A2M; C4A、ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh; C4A、Ap
 oA1、AACT、A1AT、SAA; C4A、ApoA1、AACT、A1AT、CRP; C4A、ApoA1、AACT、A1AT、ApoE; C4A、ApoA1、AAC
 T、A1AT、ITIH4; C4A、ApoA1、AACT、A1AT、A2M; C4A、ApoA1、AACT、C1-inh、SAA; C4A、ApoA1、AACT、C1
 -inh、CRP; C4A、ApoA1、AACT、C1-inh、ApoE; C4A、ApoA1、AACT、C1-inh、ITIH4; C4A、ApoA1、AACT、C
 1-inh、A2M; C4A、ApoA1、AACT、SAA、CRP; C4A、ApoA1、AACT、SAA、ApoE; C4A、ApoA1、AACT、SAA、ITIH
 4; C4A、ApoA1、AACT、SAA、A2M; C4A、ApoA1、AACT、

CRP、ApoE；C4A、ApoA1、AACT、CRP、ITIH4；C4A、ApoA1、AACT、CRP、A2M；C4A、ApoA1、AACT、ApoE、ITIH4；C4A、ApoA1、AACT、ApoE、A2M；C4A、ApoA1、AACT、ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA；C4A、ApoA1、A1AT、C1-inh、CRP；C4A、ApoA1、A1AT、C1-inh、ApoE；C4A、ApoA1、A1AT、C1-inh、ITIH4；C4A、ApoA1、A1AT、C1-inh、A2M；C4A、ApoA1、A1AT、SAA、CRP；C4A、ApoA1、A1AT、SAA、ApoE；C4A、ApoA1、A1AT、SAA、ITIH4；C4A、ApoA1、A1AT、SAA、A2M；C4A、ApoA1、A1AT、CRP、ApoE；C4A、ApoA1、A1AT、CRP、ITIH4；C4A、ApoA1、A1AT、CRP、A2M；C4A、ApoA1、A1AT、ApoE、ITIH4；C4A、ApoA1、A1AT、ApoE、A2M；C4A、ApoA1、A1AT、ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、C1-inh、SAA、CRP；C4A、ApoA1、C1-inh、SAA、ApoE；C4A、ApoA1、C1-inh、SAA、ITIH4；C4A、ApoA1、C1-inh、SAA、A2M；C4A、ApoA1、C1-inh、CRP、ApoE；C4A、ApoA1、C1-inh、CRP、ITIH4；C4A、ApoA1、C1-inh、CRP、A2M；C4A、ApoA1、C1-inh、ApoE、ITIH4；C4A、ApoA1、C1-inh、ApoE、A2M；C4A、ApoA1、C1-inh、ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、SAA、CRP、ApoE；C4A、ApoA1、SAA、CRP、ITIH4；C4A、ApoA1、SAA、CRP、A2M；C4A、ApoA1、SAA、ApoE、ITIH4；C4A、ApoA1、SAA、ApoE、A2M；C4A、ApoA1、SAA、ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、CRP、ApoE、ITIH4；C4A、ApoA1、CRP、ApoE、A2M；C4A、ApoA1、CRP、ITIH4、A2M；C4A、ApoA1、ApoE、ITIH4、A2M；C4A、AACT、A1AT、C1-inh、SAA；C4A、AACT、A1AT、C1-inh、CRP；C4A、AACT、A1AT、C1-inh、ApoE；C4A、AACT、A1AT、C1-inh、ITIH4；C4A、AACT、A1AT、C1-inh、A2M；C4A、AACT、A1AT、SAA、CRP；C4A、AACT、A1AT、SAA、ApoE；C4A、AACT、A1AT、SAA、ITIH4；C4A、AACT、A1AT、SAA、A2M；C4A、AACT、A1AT、CRP、ApoE；C4A、AACT、A1AT、CRP、ITIH4；C4A、AACT、A1AT、CRP、A2M；C4A、AACT、A1AT、ApoE、ITIH4；C4A、AACT、A1AT、ApoE、A2M；C4A、AACT、A1AT、ITIH4、A2M；C4A、AACT、C1-inh、SAA、CRP；C4A、AACT、C1-inh、SAA、ApoE；C4A、AACT、C1-inh、SAA、ITIH4；C4A、AACT、C1-inh、SAA、A2M；C4A、AACT、C1-inh、CRP、ApoE；C4A、AACT、C1-inh、CRP、ITIH4；C4A、AACT、C1-inh、CRP、A2M；C4A、AACT、C1-inh、ApoE、ITIH4；C4A、AACT、C1-inh、ApoE、A2M；C4A、AACT、C1-inh、ITIH4、A2M；C4A、AACT、SAA、CRP、ApoE；C4A、AACT、SAA、CRP、A2M；C4A、AACT、SAA、ApoE、ITIH4；C4A、AACT、SAA、ApoE、A2M；C4A、AACT、SAA、ITIH4、A2M；C4A、AACT、CRP、ApoE、ITIH4；C4A、AACT、CRP、ApoE、A2M；C4A、AACT、CRP、ITIH4、A2M；C4A、AACT、ApoE、ITIH4、A2M；C4A、A1AT、C1-inh、SAA、CRP；C4A、A1AT、C1-inh、SAA、ITIH4；C4A、A1AT、C1-inh、SAA、A2M；C4A、A1AT、C1-inh、CRP、ApoE；C4A、A1AT、C1-inh、CRP、ITIH4；C4A

、A1AT、C1-inh、CRP、A2M；C4A、A1AT、C1-inh、ApoE、ITIH4；C4A、A1AT、C1-inh、ApoE、A2M；C4A、A1AT、C1-inh、ITIH4、A2M；C4A、A1AT、SAA、CRP、ApoE；C4A、A1AT、SAA、CRP、ITIH4；C4A、A1AT、SAA、CRP、A2M；C4A、A1AT、SAA、ApoE、ITIH4；C4A、A1AT、SAA、ApoE、A2M；C4A、A1AT、SAA、ITIH4、A2M；C4A、A1AT、CRP、ApoE、ITIH4；C4A、A1AT、CRP、ApoE、A2M；C4A、A1AT、CRP、ITIH4、A2M；C4A、A1AT、ApoE、ITIH4、A2M；C4A、C1-inh、SAA、CRP、ApoE；C4A、C1-inh、SAA、CRP、ITIH4；C4A、C1-inh、SAA、CRP、A2M；C4A、C1-inh、SAA、ApoE、ITIH4；C4A、C1-inh、SAA、ApoE、A2M；C4A、C1-inh、SAA、ITIH4、A2M；C4A、C1-inh、CRP、ApoE、ITIH4；C4A、C1-inh、CRP、ApoE、A2M；C4A、C1-inh、CRP、ITIH4、A2M；C4A、C1-inh、ApoE、ITIH4、A2M；C4A、SAA、CRP、ApoE、ITIH4；C4A、SAA、CRP、ApoE、A2M；C4A、SAA、CRP、ITIH4、A2M；C4A、SAA、ApoE、ITIH4、A2M；C4A、CRP、ApoE、ITIH4、A2M；ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh、SAA；ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh、CRP；ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh、ApoE；ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh、ITIH4；ApoA1、AACT、A1AT、C1-inh、A2M；ApoA1、AACT、A1AT、SAA、CRP；ApoA1、AACT、A1AT、SAA、ApoE；ApoA1、AACT、A1AT、SAA、ITIH4；ApoA1、AACT、A1AT、SAA、A2M；ApoA1、AACT、A1AT、CRP、ApoE；ApoA1、AACT、A1AT、CRP、ITIH4；ApoA1、AACT、A1AT、CRP、A2M；ApoA1、AACT、A1AT、ApoE、ITIH4；ApoA1、AACT、A1AT、ApoE、A2M；ApoA1、AACT、A1AT、ITIH4、A2M；ApoA1、AACT、C1-inh、SAA、CRP；ApoA1、AACT、C1-inh、SAA、ApoE；ApoA1、AACT、C1-inh、SAA、ITIH4；ApoA1、AACT、C1-inh、SAA、A2M；ApoA1、AACT、C1-inh、CRP、ApoE；ApoA1、AACT、C1-inh、CRP、ITIH4；ApoA1、AACT、C1-inh、CRP、A2M；ApoA1、AACT、C1-inh、ApoE、ITIH4；ApoA1、AACT、C1-inh、ApoE、A2M；ApoA1、AACT、C1-inh、ITIH4、A2M；ApoA1、AACT、SAA、CRP、ApoE；ApoA1、AACT、SAA、CRP、ITIH4；ApoA1、AACT、SAA、CRP、A2M；ApoA1、AACT、SAA、ApoE、ITIH4；ApoA1、AACT、SAA、ApoE、A2M；ApoA1、AACT、SAA、ITIH4、A2M；ApoA1、AACT、CRP、ApoE、ITIH4；ApoA1、AACT、CRP、ApoE、A2M；ApoA1、AACT、CRP、ITIH4、A2M；ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA、CRP；ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA、ApoE；ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA、ITIH4；ApoA1、A1AT、C1-inh、SAA、A2M；ApoA1、A1AT、C1-inh、CRP、ApoE；ApoA1、A1AT、C1-inh、CRP、ITIH4；ApoA1、A1AT、C1-inh、CRP、A2M；ApoA1、A1AT、C1-inh、ApoE、ITIH4；ApoA1、A1AT、C1-inh、ApoE、A2M；ApoA1、A1AT、C1-inh、ITIH4、A2M；ApoA1、A1AT、SAA、CRP、ApoE；ApoA1、A1AT、SAA、CRP、ITIH4；ApoA1、A1AT、SAA、CRP、A2M；ApoA1、A1AT、SAA、ApoE、

I T I H 4 ; A p o A 1、A 1 A T、S A A、A p o E、A 2 M ; A p o A 1、A 1 A T
 、S A A、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1、A 1 A T、C R P、A p o E、I T I H 4
 ; A p o A 1、A 1 A T、C R P、A p o E、A 2 M ; A p o A 1、A 1 A T、C R P、
 I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1、A 1 A T、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A p o A
 1、C 1 - i n h、S A A、C R P、A p o E ; A p o A 1、C 1 - i n h、S A A、C
 R P、I T I H 4 ; A p o A 1、C 1 - i n h、S A A、C R P、A 2 M ; A p o A 1、
 C 1 - i n h、S A A、A p o E、I T I H 4 ; A p o A 1、C 1 - i n h、S A A、A
 p o E、A 2 M ; A p o A 1、C 1 - i n h、S A A、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1
 、C 1 - i n h、C R P、A p o E、I T I H 4 ; A p o A 1、C 1 - i n h、C R P、
 A p o E、A 2 M ; A p o A 1、C 1 - i n h、C R P、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 10
 1、C 1 - i n h、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1、S A A、C R P、A p
 o E、I T I H 4 ; A p o A 1、S A A、C R P、A p o E、A 2 M ; A p o A 1、S A
 A、C R P、I T I H 4、A 2 M ; A p o A 1、S A A、A p o E、I T I H 4、A 2 M
 ; A p o A 1、C R P、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i
 n h、S A A、C R P ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、A p o E ; A A C
 T、A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、I T I H 4 ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h
 、S A A、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h、C R P、A p o E ; A A C T、
 A 1 A T、C 1 - i n h、C R P、I T I H 4 ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h、C
 R P、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h、A p o E、I T I H 4 ; A A C T、
 A 1 A T、C 1 - i n h、A p o E、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、C 1 - i n h、I T 20
 I H 4、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、S A A、C R P、A p o E ; A A C T、A 1 A T
 、S A A、C R P、I T I H 4 ; A A C T、A 1 A T、S A A、C R P、A 2 M ; A A C
 T、A 1 A T、S A A、A p o E、I T I H 4 ; A A C T、A 1 A T、S A A、A p o E
 、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、S A A、I T I H 4、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、C
 R P、A p o E、I T I H 4 ; A A C T、A 1 A T、C R P、A p o E、A 2 M ; A A C
 T、A 1 A T、C R P、I T I H 4、A 2 M ; A A C T、A 1 A T、A p o E、I T I H
 4、A 2 M ; A A C T、C 1 - i n h、S A A、C R P、A p o E ; A A C T、C 1 - i
 n h、S A A、C R P、I T I H 4 ; A A C T、C 1 - i n h、S A A、C R P、A 2 M
 ; A A C T、C 1 - i n h、S A A、A p o E、I T I H 4 ; A A C T、C 1 - i n h、
 S A A、A p o E、A 2 M ; A A C T、C 1 - i n h、S A A、I T I H 4、A 2 M ; A 30
 A C T、C 1 - i n h、C R P、A p o E、I T I H 4 ; A A C T、C 1 - i n h、C R
 P、A p o E、A 2 M ; A A C T、C 1 - i n h、C R P、I T I H 4、A 2 M ; A A C
 T、C 1 - i n h、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A A C T、S A A、C R P、A p o
 E、I T I H 4 ; A A C T、S A A、C R P、A p o E、A 2 M ; A A C T、S A A、C
 R P、I T I H 4、A 2 M ; A A C T、S A A、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A A C
 T、C R P、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、C R P
 、A p o E ; A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、C R P、I T I H 4 ; A 1 A T、C 1 -
 i n h、S A A、C R P、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、A p o E、I T I
 H 4 ; A 1 A T、C 1 - i n h、S A A、A p o E、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、
 S A A、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、C R P、A p o E、I T I H 4 40
 ; A 1 A T、C 1 - i n h、C R P、A p o E、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、C R
 P、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T、C 1 - i n h、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; A
 1 A T、S A A、C R P、A p o E、I T I H 4 ; A 1 A T、S A A、C R P、A p o E
 、A 2 M ; A 1 A T、S A A、C R P、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T、S A A、A p o
 E、I T I H 4、A 2 M ; A 1 A T、C R P、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; C 1 - i
 n h、S A A、C R P、A p o E、I T I H 4 ; C 1 - i n h、S A A、C R P、A p o
 E、A 2 M ; C 1 - i n h、S A A、C R P、I T I H 4、A 2 M ; C 1 - i n h、S A
 A、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; C 1 - i n h、C R P、A p o E、I T I H 4、A
 2 M ; S A A、C R P、A p o E、I T I H 4、A 2 M ; ; ; 1 ^s t 3 p l u s : ; A 1
 A T、C 1 - i n h ; A 1 A T、S A A ; A 1 A T、C R P ; A 1 A T、A p o E ; A 1 50

AT、ITIH4；A1AT、A2M；C1-inh、SAA；C1-inh、CRP；
 C1-inh、ApoE；C1-inh、ITIH4；C1-inh、A2M；SAA、
 CRP；SAA、ApoE；SAA、ITIH4；SAA、A2M；CRP、ApoE；
 CRP、ITIH4；CRP、A2M；ApoE、ITIH4；ApoE、A2M；IT
 IH4、A2M；A1AT、C1-inh、SAA；A1AT、C1-inh、CRP；
 A1AT、C1-inh、ApoE；A1AT、C1-inh、ITIH4；A1AT、
 C1-inh、A2M；A1AT、SAA、CRP；A1AT、SAA、ApoE；A1
 AT、SAA、ITIH4；A1AT、SAA、A2M；A1AT、CRP、ApoE；
 A1AT、CRP、ITIH4；A1AT、CRP、A2M；A1AT、ApoE、IT
 IH4；A1AT、ApoE、A2M；A1AT、ITIH4、A2M；C1-inh、
 SAA、CRP；C1-inh、SAA、ApoE；C1-inh、SAA、ITIH4
 ；C1-inh、SAA、A2M；C1-inh、CRP、ApoE；C1-inh、C
 RP、ITIH4；C1-inh、CRP、A2M；C1-inh、ApoE、ITIH
 4；C1-inh、ApoE、A2M；C1-inh、ITIH4、A2M；SAA、C
 RP、ApoE；SAA、CRP、ITIH4；SAA、CRP、A2M；SAA、Ap
 oE、ITIH4；SAA、ApoE、A2M；SAA、ITIH4、A2M；CRP、
 ApoE、ITIH4；CRP、ApoE、A2M；CRP、ITIH4、A2M；Ap
 oE、ITIH4、A2M；A1AT、C1-inh、SAA、CRP；A1AT、C1
 -inh、SAA、ApoE；A1AT、C1-inh、SAA、ITIH4；A1AT
 、C1-inh、SAA、A2M；A1AT、C1-inh、CRP、ApoE；A1A
 T、C1-inh、CRP、ITIH4；A1AT、C1-inh、CRP、A2M；A
 1AT、C1-inh、ApoE、ITIH4；A1AT、C1-inh、ApoE、A
 2M；A1AT、C1-inh、ITIH4、A2M；A1AT、SAA、CRP、Ap
 oE；A1AT、SAA、CRP、ITIH4；A1AT、SAA、CRP、A2M；A
 1AT、SAA、ApoE、ITIH4；A1AT、SAA、ApoE、A2M；A1A
 T、SAA、ITIH4、A2M；A1AT、CRP、ApoE、ITIH4；A1AT
 、CRP、ApoE、A2M；A1AT、CRP、ITIH4、A2M；A1AT、Ap
 oE、ITIH4、A2M；C1-inh、SAA、CRP、ApoE；C1-inh、
 SAA、CRP、ITIH4；C1-inh、SAA、CRP、A2M；C1-inh、
 SAA、ApoE、ITIH4；C1-inh、SAA、ApoE、A2M；C1-in
 h、SAA、ITIH4、A2M；C1-inh、CRP、ApoE、ITIH4；C1
 -inh、CRP、ApoE、A2M；C1-inh、CRP、ITIH4、A2M；C
 1-inh、ApoE、ITIH4、A2M；SAA、CRP、ApoE、ITIH4；
 SAA、CRP、ApoE、A2M；SAA、CRP、ITIH4、A2M；SAA、A
 poE、ITIH4、A2M；CRP、ApoE、ITIH4、A2M；A1AT、C1
 -inh、SAA、CRP、ApoE；A1AT、C1-inh、SAA、CRP、IT
 IH4；A1AT、C1-inh、SAA、CRP、A2M；A1AT、C1-inh、
 SAA、ApoE、ITIH4；A1AT、C1-inh、SAA、ApoE、A2M；
 A1AT、C1-inh、SAA、ITIH4、A2M；A1AT、C1-inh、CR
 P、ApoE、ITIH4；A1AT、C1-inh、CRP、ApoE、A2M；A1
 AT、C1-inh、CRP、ITIH4、A2M；A1AT、C1-inh、ApoE
 、ITIH4、A2M；A1AT、SAA、CRP、ApoE、ITIH4；A1AT、
 SAA、CRP、ApoE、A2M；A1AT、SAA、CRP、ITIH4、A2M；
 A1AT、SAA、ApoE、ITIH4、A2M；A1AT、CRP、ApoE、IT
 IH4、A2M；C1-inh、SAA、CRP、ApoE、ITIH4；C1-inh
 、SAA、CRP、ApoE、A2M；C1-inh、SAA、CRP、ITIH4、A
 2M；C1-inh、SAA、ApoE、ITIH4、A2M；C1-inh、CRP、
 ApoE、ITIH4、A2M；SAA、CRP、ApoE、ITIH4、A2M。

【0050】

対照と比較した増加が拒絶を示すマーカーの例としては、C4A、CRP、SAA、C

1-inh、A1ATおよびApoEが挙げられる。対照と比較した減少が拒絶を示すマーカーとしては、AACT、ApoA1、ITIH4およびA2Mが挙げられる。

【0051】

ある実施形態において、測定はクロマトグラフィーまたは分光法を含む。クロマトグラフィーは、ガスまたは液体クロマトグラフィーであり得る。分光法は質量スペクトルであり得る。マーカー検出の他の既知の方法も企図され、関心のある個々のマーカーの特徴に基づいて選択し得る。使用し得る他のアッセイの例としては、免疫アッセイおよび電気化学検出が挙げられる。試験試料の測定値は、試験試料中に存在するマーカーの量を対照試料中のマーカーの量と、またはマーカーの既知の正常レベルと比較するなど、対照と直接比較し得る。あるいは、いくつかの実施形態において、マーカー量を同じ対象に対するベースライン量と比較する。

10

【0052】

次の特許文書：米国特許第7,666,596号明細書、米国特許出願公開第2009/0304705号明細書；米国特許第7,691,569号明細書；米国特許第7,645,575号明細書；国際公開第2009/101083号パンフレット；国際公開第2009/045104号パンフレット；米国特許出願公開第2009/0022730号明細書；国際公開第2007/104537号パンフレット；国際公開第2008/027428号パンフレット；米国特許出願公開第2008/0038746号明細書；国際公開第2007/138011号パンフレット；国際公開第2007/121922号パンフレット；米国特許出願公開第2007/0202085号明細書；米国特許第7,235,358号明細書；米国特許出願公開第2007/0037166号明細書；米国特許出願公開第2006/0088836号明細書；米国特許第7,026,121号明細書；国際公開第2004/042346号；米国特許第7,192,716号明細書；米国特許出願公開第2003/0104371号明細書；および国際公開第01/81916号は、移植片拒絶の分子診断に関する。次の特許公開は、移植片拒絶に対する遺伝子型および表現型試験に関する：米国特許出願公開第20077235358号明細書；国際公開第2006029184号パンフレット；米国特許出願公開第20070082356号明細書；欧州特許第000253514号明細書；欧州特許第000953220号明細書；米国特許出願公開第2004000584728号明細書；国際公開第2005077980号パンフレット；米国特許出願公開第2004000557234号明細書；国際公開第02075306号パンフレット；米国特許出願公開第2006000641625号明細書；および米国特許出願公開第20050152893号明細書。

20

30

【0053】

キット

本明細書中に記載の方法での使用に対して、キットもまた本発明の範囲内である。このようなキットは、各容器が本方法でしようとする個別の要素のうち1つを含む、バイアル、チューブなどの1以上の容器を受け入れるために区画化される、担体、包装または容器を含み得る。本キットの、プローブ、抗体および他の試薬は、凍結、凍結乾燥を含む何らかの適切な形態で、またはTBSまたはPBSなどの医薬的に許容可能な緩衝液中で、提供され得る。本キットはまた、緩衝液（すなわち、TBS、PBS）、ブロッキング剤（脱脂乳、正常血清、Tween-20界面活性剤、BSAまたはカゼインを含む溶液）および／または検出試薬（すなわち、ヤギ抗マウスIgGビオチン、ストレプトアビジン-HRP複合物、アロフィコシアニン、B-フィコエリスリン、R-フィコエリスリン、ペルオキシダーゼ、蛍光（すなわちDyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647）および／または染色キット（すなわち、ABC染色キット、Pierce））などでの、インビトロまたはインビボでの試薬の利用に必要とされる他の試薬も含み得る。本キットは、例えば液体またはガスクロマトグラフィー、分光法、電気化学アッセイ、フローサイトメトリー分析、ELISA、免疫プロット（すなわちウエスタンブロット）、免疫細胞化学、免疫組織化学など、上述の一般に利用されるアッセイにおいて、抗体、プローブおよび他の試

40

50

薬を使用するための、他の試薬および／または説明書も含み得る。

【0054】

ある実施形態において、本キットは、精製型で試薬を提供する。別の実施形態において、試薬は、単独で、またはアビジン複合検出試薬（すなわち抗体）と一緒に、の何れかで、ビオチン化型で提供される免疫試薬である。別の実施形態において、本キットは、抗原を直接検出するために使用され得る蛍光標識された免疫試薬を含む。これらの系の何れかを使用するために必要とされる緩衝液などは当技術分野で周知であり、エンドユーザーにより調製され得るか、またはキットの構成成分として提供され得る。本キットは、陽性および陰性対照タンパク質および／または組織試料を含有する固形支持体も含み得る。例えば、スポッティングまたはウェスタンブロット型アッセイを行うためのキットは、SDS-PAGEまたは実験試料用のさらなるスペースとともに予め固定した対照試料を含有するナイロンもしくは他のメンブレンでの使用のための対照細胞または組織溶解液を含み得る。

10

【0055】

本発明のキットは、一般的には、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジおよび使用のための説明がある添付文書を含め、上述の容器および商業的および使用者の立場から所望される材料を含む1以上の他の容器を含む。さらに、ラベルは、具体的な適用について組成物が使用されることを示すために容器上で提供され得、上述のものなど、使用のための指示も示し得る。指示およびまたは他の情報もまた、キットとともに含まれる添付文書に含まれ得る。

20

【0056】

本発明は、C4Aの5kDa断片、ApoA1、AACTおよび、場合によっては、表1で列举される1以上のさらなるマーカーと特異的に結合する抗体を含むキットをさらに提供する。ある実施形態において、本キットは、C4A（またはその5kDa断片）およびApoA1（またはアミノ酸148から183でのその断片）および／またはAACT（またはアミノ酸385から422でのその断片）に結合する試薬を含む。ある実施形態において、本キットは、AACTおよびApoA1の5191Da断片と特異的に結合する試薬を含む。ある実施形態において、本キットは、抗体が固定化される固形支持体をさらに含む。固形支持体の例としては、マイクロタイタープレート、ビーズ、膜または当業者にとって公知の他の支持体が挙げられるが限定されない。ある実施形態において、抗体は、固形支持体に固定化される抗原への結合を介して固定化される。ある実施形態において、抗体は、ルミネックスなどのビーズまたは粒子への結合を介して固定化される。ある実施形態において、本キットは発色性基質をさらに含む。

30

【0057】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清中で α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤を検出することによって、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするためのELISAキットであり、このキットは、(a) α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイタープレート；(b) α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体-アルカリホスファターゼ複合物；(c) p-ニトロフェニル-ホスフェート；および(d) 抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／または本明細書中で開示される5191ペプチドおよび／または補体C1阻害剤を含む。

40

【0058】

本発明の別の例示的な実施形態は、血漿または血清中で α -1抗キモトリプシンおよび／またはApoA1および／またはC4Aおよび／または補体C1阻害剤を検出すること

50

によって、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある患者における血漿分子プロファイルについてスクリーニングするためのE L I S Aキットであり、このキットは、(a) α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイタープレート；(b) α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体-アルカリホスファターゼ複合物；(c) p-ニトロフェニル-ホスフェート；および(d) 抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤を含む。

【0059】

本発明の別の例示的な実施形態は、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤および／または表1に記載のタンパク質を検出することによって、実質臓器同種移植片拒絶と関連がある患者における分子プロファイルについて血漿、血清および／または生体液中でスクリーニングするためのL u m i n e xキットであり、このキットは、(a) α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤および／または表1で列挙される他のタンパク質に特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体で被覆されたマイクロビーズアレイ；(b) α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤および／または表1で列挙される他のタンパク質と反応性があるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体蛍光色素複合物；(c) および抗原標準物質としての、 α -1抗キモトリプシンおよび／またはA p o A 1および／またはC 4 Aおよび／または補体C 1阻害剤または表1の他のタンパク質を含む。

【0060】

実施例

次の実施例は、本発明を例示し、これをなし、使用することにおいて当業者を支援するために与えられる。この実施例は、何ら本発明の範囲を限定するものではない。

【0061】

実施例1：アポリポタンパク質A 1および α -1抗キモトリプシンのC末端断片は急性腎臓同種移植片拒絶と関連がある血漿バイオマーカーである。

この実施例は、ケース対照アプローチおよびS E L D I - T O F - M Sを使用して、腎臓同種移植片拒絶と関連がある血漿タンパク質の同定を明らかにする。各拒絶患者から、2検体の血漿試料（一方は生検日に近く、他方は生検後）を比較した。生検によって確認済みの非拒絶患者を対照としてさらに分析した。生検により拒絶（ $n = 40$ ）および非拒絶（ $n = 70$ ）が確認された患者のオリジナルおよび第二コホートのサブセットにおいて候補バイオマーカーアポリポタンパク質A 1（A p o A 1）を検証するために、抗体に基づく定量的E L I S Aを行った。22個のタンパク質／ペプチドが、拒絶と拒絶後試料との間で有意差を示した。ペプチド5191Daおよび4467Daは、100%の感度および94%の特異性で拒絶を検出した。4467Daペプチドは、 α -1抗キモトリプシンのC末端断片として同定され、28kDaタンパク質はA p o A 1として判定された。両タンパク質レベルは、拒絶後と比較して、拒絶時に有意に低かった。非拒絶患者のタンパク質レベルは、拒絶後試料と同様であった。A p o A 1 E L I S Aの結果から、非拒絶と比較して、拒絶時に有意に低いA p o A 1レベル（オリジナルコホートに対して $p = 0.001$ および第二コホートに対して $p = 4.14E-11$ ）が示され、これはS E L D I 知見と一致する。 α -1抗キモトリプシンと一緒に、A p o A 1および5191Daペプチド（C 4 Aの断片）は、血漿分子プロファイルを提供し、これは、急性細胞性腎臓同種移植片拒絶と関連がある。

【0062】

方法

試験計画および患者集団。書面での同意を得て、U n i v e r s i t y o f C a l

i f o r n i a L o s A n g e l e s I n s t i t u t i o n a l R e v i e w
B o a r dにより承認された免疫モニタリング研究に腎臓移植患者を登録した。16名の腎臓移植片受容者は、生検により確認されたACRの17例の「独立」エピソードが付随する、34検体の血液検体を提供した。1名の受容者には十分に間隔があいた（4か月）2回の拒絶エピソードがあり、中間血清クレアチニンは正常であったので、発明者らは、2回目の拒絶を独立した事象とみなした。生検により非拒絶と証明された患者も選択した（ $n = 48$ ）。生検は全て正当な理由により行われ、血清クレアチニン上昇または遅延型移植片機能後に採取した。656日で起こった1例を除き、拒絶生検は移植後最初の100日以内に起こった（中央値＝移植後27日）。急性拒絶をスコア化するために、バンフ分類を使用した（35、36）。ACRがある2例の生検もAMRのエビデンスを示し、C4d陽性であった。2回の時点で拒絶患者を調べた：陽性生検の日が一番近い時点で拒絶検体（群A）を選択し（中央値＝－1日、範囲：－16から＋8日）；および拒絶後試料（群B）は、生検日後14日が一番近い時点で選択した（中央値＝28日、範囲：14から180日）。17検体の拒絶試料（群A）のうち12検体を生検前8日以内に回収し、生検後8日以内に17検体のうち5検体を得た。拒絶後試料（群B）の場合、生検後60日以内に17検体のうち16検体を回収し、生検後180日で17検体のうちの1検体を回収した。陰性生検（中央値＝1日、範囲：－35から＋44日）が一番近い時点で1回、非拒絶血漿試料（対照として定義、群C）を選択した。表2は、試験集団の人口統計学データを例示し、年齢、性別、人種、移植数またはヒト白血球抗原不一致の度合いに関して有意差がないことを示す。死亡および生存ドナーのパーセンテージは、U. S. O r g a n P r o c u r e m e n t T r a n s p l a n t N e t w o r kの全国データと同様であった。

10

20

【表 2】

表 2: 患者の人口統計的特徴

	拒絶患者 (n=16)	非拒絶者 (n=48)	<i>P</i> ^a	
パラメーター				
年齢(歳: 平均±SD)	48.7±12.2	49.5±13.9	0.84	
性別(男性/女性)	14/2	32/16	0.20	
人種			0.74 ^b	
アジア系	19%	5%		
黒人系	25%	20%		
白人系	44%	54%		10
その他	12%	21%		
再移植			0.74	
初回同種移植片	81%	76%		
再移植	19%	24%		
多臓器移植			0.16	
+膵臓	11%	2%		
+肝臓	0%	2%		
HLA 不一致 (平均±SD)	2.7±0.7	2.2±1.3	0.15	
ドナーのタイプ			0.21	20
死体	56%	74%		
生体	44%	26%		
誘導			0.74 ^c	
抗 IL2R α	74%	72%		
ATG	22%	21%		
組み合わせ	4%	7%		
生検に対する採血時 (日数: 中央値/範囲)			0.37	
拒絶試料	-1/-16~8			
拒絶後試料	28/14~147			
非拒絶試料		1/-35~44		30

フィッシャーの直接確立検定からのカテゴリー変数に対する^a*P*値および *t* 検定からの連続変数に対する *P* 値

^b 人種(黒人対その他)。

^c 誘導(ATG 対何らかの抗 IL2R α)。

ATG、アンチサイモグロブリン; IL2R α、インターロイキン-2 受容体アルファ鎖; SD、標準偏差; HLA、ヒト白血球抗原。

【0063】

生検により腎臓同種移植片拒絶が証明されている受容者の第二コホート (n = 27) を選択し、再び 2 検体の血漿試料を試験した (拒絶および拒絶後時点)。生検は全て正当な理由により行われ、血清クレアチニン上昇または遅延型移植片機能後に採取した。ACR 陽性生検のうち 2 検体は AMR のエビデンスもあり、一方で生検のうち 4 検体が、AMR のみのエビデンスしかなかった。生検 - 7 日以内の時点で拒絶検体 (n = 27) を選択した (中央値 = -1 日、範囲 = -7 から 0 日)。平均拒絶エピソードは、移植後 122 日であった。27 例の生検のうち 20 例が最初の 3 か月以内であり、27 例のうち 5 例が最初の 9 か月以内であり、27 例のうち 2 例が 1 年超経過後であった。

【0064】

生検後 8 日超で拒絶後試料を選択した (中央値 = 32 日、範囲 = 8 から 573 日)。拒絶後試料に対して、27 例のうち 20 例を生検後 3 か月以内に回収し、27 例のうち 3 例を 6 か月以内に回収し、27 例のうち 1 例を 9 か月で回収し、27 例のうち 3 例を生検後

1年で回収した。さらに、生検により非拒絶が証明されている試料51例のコホートを陰性生検に最も近い時間に選択した(中央値=8日、範囲=-22から581日)。生検により証明されている非拒絶試料の場合、51例のうち38例を生検後3か月以内に回収し、51例のうち5例を6か月以内に回収し、51例のうち4例を生検後9か月以内に回収し、51例のうち4例を1年後に回収した。非拒絶者のこの群からの生検は全て、正当な理由で行われ、血清クレアチニン上昇または遅延型移植片機能の後に採取した。

【0065】

両コホートに対して、維持免疫抑制には、カルシニューリン阻害剤(タクロリムスまたはシクロスポリン)、抗増殖剤(ミコフェノール酸モフェチルまたはシロリムス)およびプレドニゾンが含まれた。移植前感作の証拠がない一部のケースにおいて、ステロイドを取り除いた。

10

【0066】

血漿アルブミンおよび免疫グロブリン-G枯渇および陰イオン交換分画化

BDバキュテナーACD溶液Aチューブ(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)中で血液試料を回収した。血漿を分離し、保存した。抗体スピンカラム(Qproteome, Qiagen, Valencia, CA)を使用して、ヒト血清アルブミンおよび免疫グロブリン-Gを枯渇させた。Complete Mini(エチレンジアミンテトラ酢酸)プロテアーゼ阻害剤(Roche, Palo Alto, CA)を添加した。AcroPrep Mustang Q(親水性ポリエーテルスルホン膜)陰イオン交換樹脂96-ウェルプレート(Pall, East Hills, NY)を使用して、枯渇化血漿をpH9、pH6およびpH4分画に分離した。

20

【0067】

ProteinChipアレイ調製

ProteinChipアレイ(CM10およびQ10)を結合のために予め平衡化した。pH分画をアレイに結合させ、3つ組で分析した。6検体のプールヒト血清(Sigma, St. Louis, MO)試料を各アレイセット上で内部対照として使用した。試料アレイ処理後、マトリックスを適用した:飽和シナピン酸(SPA, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France)または20%飽和アルファーシアノー4-ヒドロキシ桂皮酸(CHCA, LaserBio Labs)の何れか。Biomek2000液体操作ロボット(Beckman, Fullerton, CA)をマトリックススポッティングのために使用した。

30

【0068】

質量スペクトルデータ分析

SPA-スポットを行ったアレイ(150および170のレーザーエネルギー)を読み取る前に、Ciphergen ProteinChipソフトウェア3.2を用いたProteinChip Biology System(PBS-III)質量分析計を高質量範囲で校正した。CHCA-スポットアレイ(120および135のレーザーエネルギー)の校正のために、ペプチド混合物を使用した。各スポットからの質量スペクトルは、240のレーザーショットの平均であった。Ciphergen Express Clientソフトウェア3.0において全スペクトルを予備的に分析して、発現差マッピング分析によってクラスターを作成した。クラスターは、同じ質量/電荷(m/z)比を有するピークの群であり、複数のスペクトルにまたがり同じタンパク質またはペプチドとして処理される。各スペクトルからのピーク強度を使用して、相対的タンパク質/ペプチド量を測定した。総イオン電流を使用して、シグナルを正規化した。ピーク高の再現性は、既に公開されたもの(37)と同様であり、15%から30%のCVを示した。

40

【0069】

タンパク質同定

proTOF2000オルトガノル(orthoganol)-TOF質量分析計(Parkin Elmer, San Jose, CA)を用いてMALDI-TOF-MS

50

を行った。高速液体クロマトグラフィー系はProminence 2000 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD)であった。全プロトコールおよび試薬は製造者の示唆に従った。

【0070】

4467Daペプチド

このペプチドがあるQ分画を逆相C8カラム (Axxiom, Moorpark, CA) に載せた。C8分画をThermo-Finnigan LTQ-FTエレクトロスプレー質量分析計 (Waltham, MA) において衝突誘発解離MS/MS分画化に供した。NCBI BlastによってMS/MSデータを検索した。 α -1-抗キモトリプシンに対するポリクローナル抗体 (Lab Vision Corporation, Fremont, CA) を用いて免疫沈降を行い、続いてMALDI分析を行った。

10

【0071】

28kDaタンパク質

ドデシル硫酸ナトリウム-PAGEにより高レベルのタンパク質があるプール試料分画を分離した。ProteoSilver Plusキット (Sigma) を用いてゲルを染色した。28kDa付近のバンドを切り出し、ゲル中でトリプシン消化を行った。MALDIによってペプチドを分析した。オンラインタンパク質断片データベース検索を用いて、インタクトなトリプシン質量をMASCOOTで検索した。ヒトApoA1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行い、続いてMALDI分析を行った。

20

【0072】

統計学的分析

ノンパラメトリック (2項) およびパラメトリック (混合効果および線形回帰) モデルを使用して、重要なピークを同定した。0.05未満の両側P値を有意とみなし、ボンフェローニ補正を必要に応じて使用した。CART分析を行って、候補バイオマーカーのサブセットを選択し、拒絶を正しく分類するそれらの能力を決定した。選択したタンパク質/ペプチドピークの修正強度をCARTトレーニング (training) において予測因子変数として使用した。統計学的計算のために、Rソフトウェアパッケージ (バージョン3.1、r-project.org) を使用した。従来のロジスティック回帰分析を行い、STATAデータ分析および統計ソフトウェアを用いてROCプロットを作成した。正しく分類された最大値によってカットポイントを選択した。統計学的分析の詳細を補足資料で与える (Supplemental Digital Content 1, links.lww.com/TP/A465参照; この資料のオンラインバージョンとともにZiegler, M. E. ら、2011, Transplantation 92 (4): 10.1097として公開)。

30

【0073】

血漿ApoA1レベルの定量的ためのELISA

製造者のプロトコールに従い、総ヒトアポリポタンパク質A1 ELISAアッセイ (Alerchek, Portland, ME) を使用した。対照血漿試料とともに試料を2つ組で試験した。SoftMax Pro 5.4ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いてSpectraMax M2プレートリーダー上で分析を行った。

40

【0074】

結果

拒絶と拒絶後試料との間の血漿タンパク質/ペプチドレベルの変動

拒絶と拒絶後群との間のスペクトルにわたるピーク強度差を分析した。全部で653ピーククラスターを検出したが、これには、pH 4分画の235ピーク、pH 6分画の186ピークおよびpH 9分画の232ピークが含まれた。

【0075】

二項モデルを用いて同じ患者からの拒絶および拒絶後試料のピーク強度を分析した。拒

50

絶試料において、81ピーク強度（表S1A、Supplemental Digital Content 1、links.lww.com/TP/A465参照）が有意に上昇し、一方で63ピーク（表S1B、Supplemental Digital Content 1参照）が有意に低下した。各条件における総ピーク数に対するボンフェローニ補正後、線形混合モデルにより、24ピーク（表S2、Supplemental Digital Content 1、links.lww.com/TP/A465）において拒絶と拒絶後試料との間で有意差があった。二項モデルおよび線形混合モデルの両方によって、22個の有意なタンパク質ピークが検出された（表3）。

【表3】

表3:線形混合モデルおよび二項モデルの両方により見出された有意なピーク

	条件 ^a	タンパク質ピーク m/z (Da)	混合モデル に対する P	二項モデル に対する P	タンパク質強 度比 ^a (>1.5)
1	4CL	4467	3.06E-04	0.004	B/A
2		4125	1.35E-04	0.011	A/B
3		5191	1.15E-11	0.000	A/B
4	4SH	50,835	5.04E-06	0.003	A/B
5		143,718	3.62E-05	0.001	B/A
6	6CL	4564	4.41E-05	0.030	A/B
7		4933	1.80E-04	0.030	A/B
8		5191	1.10E-06	0.002	A/B
9	6SH	59,256	2.24E-04	0.025	B/A
10		60,334	3.72E-04	0.025	B/A
11		63,615	5.74E-04	0.000	B/A
12		123,329	2.10E-04	0.025	B/A
13	9CL	5051	3.29E-05	0.001	A/B
14		5083	6.40E-05	0.020	A/B
15		5190	8.58E-07	0.020	A/B
16		5265	1.21E-05	0.001	A/B
17	9SH	28,186	2.18E-04	0.002	B/A
18		28,336	1.42E-04	0.007	B/A
19		28,574	3.00E-04	0.007	B/A
20		29,134	1.40E-04	0.026	B/A
21		109,796	1.05E-04	0.007	B/A
22		188,758	2.59E-04	0.026	B/A

^a「条件」下で、数は、pH 分画を指す。「比率」は、タンパク質強度が拒絶(A)または拒絶後(B)患者においてより高いか否かを示す。

C、アルファ-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸;S、シナピン酸;L、低レーザーエネルギー;H、高レーザーエネルギー;m/z、質量対電荷比。

【0076】

17例の独立した拒絶事象を分類および回帰木(ClassificationおよびRegression Tree、CART)分析に適用し、拒絶と拒絶後試料とを最良に区別する、2つのピーク(4467Daおよび5191Da)の組み合わせを生成させた(図1A)。拒絶試料全てが正しく検出され、一方で不正に検出されたのは1例の拒絶後試料のみであり;これは、100%の感度および94%の特異性を示す。5191Daピークの強度が拒絶中に有意に上昇し($P<0.001$)、一方で4467Daピークは拒絶中に有意に低下した($P<0.004$) (図1B)。ROCプロットから、カットポイントが生成され、これらはCART分析により見出されたものと同様であった。

【0077】

非拒絶群(群C)とこれらの2つのタンパク質のピーク強度を比較した(図1B)。群BとCとの間で5191Daピーク強度の有意な差はなかった($P=0.33$)。しかし

、拒絶（群A）において、非拒絶（群C）を超えて5191Daピークが上昇した（ $P < 0.001$ ）。4467Daピーク強度は、非拒絶（群C）と比較して、拒絶（群A）中で低く（ $P < 0.001$ ）、非拒絶（群C）は、拒絶後試料よりも僅かに高いだけだった（群B、 $P = 0.04$ ）。

【0078】

5191Daおよび4467Daタンパク質ピークのレベルが拒絶の診断に顕著に関連したにもかかわらず、それらの強度は、拒絶のバンフグレードを区別することができなかったと思われる。数が限定されるため、拒絶は軽度（ $\leq$ バンフ1A、 $n = 10$ ）または重度（ $\geq$ バンフ1B、 $n = 7$ ）の何れかとして分類した。この2つの群は、個々に、拒絶の複合ケースに対して先に挙げられるものと同じ強度パターン（対非拒絶）を示した（データは示さない）。

10

【0079】

タンパク質プロファイリングのために使用した血漿試料のうち、血液試料血清クレアチニンレベルは、17例の拒絶試料のうち16例および48例の対照のうち19例で利用可能であった。拒絶後と拒絶中回収試料との間の血清クレアチニンレベルに有意差はなかった。拒絶後試料におけるクレアチニンレベル（中央値=1.9）が全患者において拒絶時と比較して実際に低かったにもかかわらず（中央値=2.2）、この差は統計学的に有意ではなかった。クレアチニン回復は、拒絶のタイプ、拒絶治療およびドナーの状態を含む多くの要因ゆえに、よりゆっくりであり得る。

20

【0080】

バイオマーカー候補の同定

pH4分画において4467Daペプチドを検出し、さらなる精製から、SALV（S、セリン；A、アラニン；L、ロイシン；およびV、バリン）の末端配列を与える、バリン、ロイシン、アラニンおよびセリンのモノアイソトピック質量と合致する質量差があるピークのクラスター（図2A）が明らかになったが、これはヒト α -1-抗キモトリプシン（AACT）のC末端断片に対応する。免疫沈降血漿ペプチドの高分解能MALDI分析によって、AACTとしての同一性が確認された（図2B）。

【0081】

腎臓同種移植片拒絶に関連するプロファイルをさらに発展させるために、22個の有意のタンパク質のリスト中に見出した ~ 28 kDaのピークのクラスターを分析した（表3）。ドデシル硫酸ナトリウム-PAGEによる28kDaピークの分離とそれに続くゲル中でのトリプシン消化によって、ペプチドが生成し、これをMALDI-TOF-MSによって分析し、MASCOT上で検索して、ApoA1としてタンパク質を同定した。モノクローナル抗体を用いた免疫沈降によって同一性が確認された（図2C）。ApoA1ピーク強度は、拒絶後において、拒絶および非拒絶患者と比較して有意に高く、拒絶試料（ $P = 0.001$ ）よりも拒絶後（ $P = 0.035$ ）に近かった（図2D）。ApoA1タンパク質レベルは急性拒絶の診断と有意に関連があったにもかかわらず、これらは、個々の拒絶のバンフグレードと関連がなかった。4467Daおよび28kDaピークのロジスティック回帰およびCART分析から、これらが59%の感度および100%の特異性で、拒絶を拒絶後と区別することが示された。

30

40

【0082】

ApoA1の検証

SELDIの結果を検証するために、オリジナルの拒絶／拒絶後試料（ $n = 13$ ）および非拒絶試料（ $n = 19$ ）のサブセット上で定量的ApoA1 ELISAを行った。ELISAにより測定されたApoA1レベルのパターン（図3A）は、SELDI強度ピークレベルと一致する（図2D）。これらの知見をさらに立証するために、対応する拒絶後試料がある生検により急性細胞性拒絶（ACR）が確認された患者からの27検体の血漿試料および生検により非拒絶が証明された51名の患者からなる独立コホートにおいて、ApoA1 ELISAを行った。第二コホートにおいて、ELISAによるApoA1レベルは、拒絶後（平均=0.22 $\pm$ 0.09）および非拒絶試料（平均=0.23 $\pm$

50

0.07、 $P = 4.14 \times 10^{-11}$)と比較して、拒絶中に有意に低く(平均 = 0.14 ± 0.04) (図3B)、これはオリジナルコホートと一致する知見である。

【0083】

両コホートの間で、腎臓生検前-3から0日に回収した試料を調べた。25例の拒絶および22例の非拒絶試料を比較し、生検により非拒絶が証明されている受容者と比較して、ApoA1レベルが拒絶の時点で有意に低かった(P 値 <0.0001) (図3C)。

【0084】

新しいコホートのサブセット($n = 14$)も、拒絶エピソード前の時点で回収した血漿試料が利用可能であった(中央値 = -50日、範囲 = -180から-11日)。拒絶前試料から、ApoA1レベルが拒絶後試料の平均レベルとほぼ同一であることが明らかになった(図3D)。

【0085】

患者のオリジナルおよび第二コホートの両方からの拒絶および非拒絶試料のApoA1レベルを使用して、ROC分析を行った(図3E)。結果から、 0.167 g/dL のカットポイントが、76%の感度および86%の特異性を提供し、患者の80%を正しく検出することが示される。27名の拒絶患者のうち26名のパンフ分類データは次のとおりであった：ボーダーライン変化 = 2、パンフ1A = 13、パンフ2A = 6、パンフ3血管 = 1およびパンフ抗体介在性拒絶(AMR) = 4。軽度ACR(ボーダーラインおよびパンフ1A = 15)、重度ACR(パンフ2Aおよびパンフ3血管 = 7)またはACRがないAMR($n = 4$)に基づいて、患者をカテゴリーに分けた。ApoA1中央値レベルは、全3群に対して0.14であり、このことから、拒絶の重症度がApoA1レベルによって区別されなかったことが示される。

【0086】

考察

表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間質量スペクトルにより発見された22種類のペプチド/タンパク質は、急性同種移植片拒絶の診断と有意に関連があった。これらのタンパク質のうち2つ、AACTおよびApoA1の同一性を解明した。AACTのC末端断片は、拒絶後および非拒絶と比較して、拒絶中に有意に低い。AACT断片(4354Da)の様々なバリエーションは、安定な移植片があるもの(14)と比較して、急性拒絶がある患者の尿中でより高レベルで見出される。Pimentara(17)は、高速液体クロマトグラフィー単離およびMADLIを使用して、カテプシンDによってAACTの加水分解を調べ、3個のペプチド：4354Da、4468Daおよび4625Daを見出した。これらの切断生成物は、配列データに基づき、血漿中で同定された4467Daピークおよび尿中で見出された4354Daと同一であり、このことから、両方がカテプシンDにより生成され得ることが示唆される。

【0087】

O'Riordanら(14)は、免疫組織化学によって腎臓における総AACTのレベルを調べ、拒絶と対照との間で差がないことを見出し、レベルが変動したペプチドAACTの発見は、標的プロテアーゼ相互作用後の切断の結果であり、したがって、患者間のペプチドレベル変動はAACT標的プロテアーゼの活性の反映であることを示唆した。発明者らは、ペプチドレベルの変動が、総AACTが阻止されるかまたはシスタチンCまたはキニノゲンなど、カテプシンDに対する他の基質に結合される結果であり得るという仮説を立てる(18)。あるいは拒絶中、総AACTが、代わりに、同種移植片機能に関連付けられているその主要な標的、カテプシンG(19)、炎症関連好中球プロテアーゼを阻害し得る(20、21)。

【0088】

28kDaピークはApoA1として同定された。ApoA1およびApoA1活性を模倣する合成ペプチドは、強力な抗炎症および抗酸化特性を有する(22、23)。ApoA1模倣ペプチド、D-4Fは、マウスモデルにおいて慢性拒絶により引き起こされる内膜損傷を減少させる。この効果の機序は、移植片における抗酸化剤遺伝子ヘムオキシゲ

10

20

30

40

50

ナーゼー 1 の誘導および／または Tーリンパ球増殖およびエフェクターサイトカイン産生における直接的効果を含む（24）。

【0089】

オリジナルおよび独立コホートの両方において ELISA によって Ap o A 1 を検証した。両コホートにおける、拒絶、拒絶後および非拒絶試料の比較は、Ap o A 1 のレベルが低いほど拒絶と関連があることを示す SELDI の知見と一致した。独立コホートにおける拒絶前の時点は、拒絶エピソードの発症を予測し得ず、このことから、Ap o A 1 低下が拒絶の時間と密接に関連することが示唆される。さらに、全患者の Ap o A 1 ROC 分析から、Ap o A 1 が拒絶を説明するために使用される痕跡の一部となる可能性があり得ることが示唆される。Ap o A 1 はまた、肺動脈高血圧、結直腸癌および卵巣癌（25～27）において候補バイオマーカーとして同定され、より最近、シャーガス病、多嚢胞性卵巣症候群および慢性閉塞性肺疾患（28～30）とも関連付けられた。これらの全ての試験において、Ap o A 1 レベルは、非疾患と比較して、疾患状態でより低かった。

【0090】

感染は血清脂質プロファイルの変化につながり得、Ap o A 1 の低下は、慢性炎症を伴う感染と結びつくとして仮定されている（31）。長期免疫抑制療法の使用によって、移植患者は感染しやすい状態が続く（32）。発明者らは、第二コホートからの 51 名の非拒絶患者を試験し、この試験のために使用した血漿試料が回収された時点で細菌感染のエビデンスがある 5 名の患者が見付かった。Ap o A 1 レベルは、感染がある非拒絶患者において、このごく一部の患者なしの場合と比較して有意差がなかった。これは、腎臓移植患者にとって、Ap o A 1 が低レベルであることが拒絶エピソードと関連があるという仮説に寄与するが、これを確認するためにはより多くの試験が必要である。

【0091】

5191 Da ペプチドの単離および同定は、血漿中でその存在量が低いこと、他のより多量のペプチドとの同時精製および直接それを断片化できないことのために、妨げられている。未知の理由のために、一部のペプチド断片が乏しく、得られる MS / MS スペクトルを解読することができない（33、34）。5191 および 4467 Da ピークの組み合わせは拒絶対非拒絶を確実に評価し、一方で 4467 および 28k Da ピークの組み合わせは価値があるものというほどではなく、したがって、5191 Da ピークの同定が重要である。発明者らは、現在、同定のためにこのペプチドをより良好に単離し、断片化するための代替法を探っている。

【0092】

発明者らの試験計画の制限は、所定の患者来院時に血漿を回収したことであり、これは、腎臓生検が行われた日と同日とは限らなかった。また、発明者らの試験集団の臨床パラメーターは、免疫抑制に関して均一ではなかった。さらに、AMR があったのはオリジナルコホート中の 2 名の患者のみであり、したがって AMR に対する痕跡を決定できなかった。患者の大部分は、最初の 100 日以内に拒絶があり、したがって発明者らは、早期拒絶を探索するのみに制限された。将来、遅発型腎臓同種移植片拒絶が起こっている患者においてこれらのマーカーを探索することも価値あるものとなろう。さらに、発明者らは、パンフ分類に基づく拒絶の重症度と Ap o A 1 レベルとの間の関連を見出さなかった。より大きな対象のコホートにおいて再びこの比較を試行することは興味深い。最後に、発明者らは、これらのマーカーをより良好に評価するため、臨床背景においてそれらの真の値を決定するために前向き研究が必要であることを認める。前向き研究の可能性を示すために、発明者らは、患者の両コホートを試験し、腎臓生検前 - 3 から 0 日に回収された 25 検体の拒絶および 22 検体の非拒絶試料を発見した。発明者らが、これらの群間の Ap o A 1 レベルを比較したとき、拒絶レベルは有意に低く（ $P < 0.0001$ ）、このことから、前向き研究が生検時にこれらの患者を区別したと思われることが示唆される。

【0093】

この試験から、血漿中の腎臓同種移植片拒絶の候補バイオマーカーに対する探索が有望な臨床的利点を有することが明らかになる。これらの血漿試料が回収された時点で、候補

10

20

30

40

50

バイオマーカーは、血清クレアチニンレベル変化よりも有益であった変動を示した。したがって、さらなる試験は、ApoA1を調べるだけでなく、腎臓同種移植片拒絶を正確に検出できるようにするために他のマーカーも調べるべきである。最後に、同定された2つの候補マーカーは抗炎症性タンパク質であり、それらの機能的特徴を探るべきである。

1. Li Bら、N Engl J Med. 2001;344:947.
2. Clarke W. Ther Drug Monit. 2006;28:19.
3. Beckingham IJら、Br J Urol. 1994;73:13.
4. Rush DNら、Transplantation. 1994;57:208.
5. Hu Sら、Proteomics. 2006;6:6326.
6. Lescuyer Pら、J Proteome Res. 2007;6:337 10
- 1.
7. Reddy G, Dalmaso EA. J Biomed Biotechnol. 2003;2003:237.
8. Albitar Mら、Cancer, 2006;106:1587.
9. Clarke Wら、Ann Surg. 2003;237:660-4. discussion 664.
10. Schaub Sら、Kidney int. 2004;65:323.
11. O'Riordan Eら、J Am Soc Nephrol. 2004;15:3240.
12. Voshol Hら、J Proteome Res. 2005;4:1192 20
- .
13. Jahnukainen Tら、J Am Soc Nephrol. 2006;17:3248.
14. O'Riordan Eら、Am J Transplant. 2007;7:930.
15. Ling XBら、J Am Soc Nephrol. 2010;21:646.
16. Freue GVら、Mol Cell Proteomics. 2010;9:1954.
17. Pimenta DCら、J Protein Chem. 2000;19:4 30
- 11.
18. Lenarcic Bら、FEBS Lett 1991;280:211.
19. Zhang S, Janciauskiene S. J Alzheimers Dis. 2002;4:115.
20. Gibson TL, Cohen P. Growth Horm IGF Res. 1999;9:241.
21. Koo DDら、Am J Pathol. 1998;153:557.
22. Navab Mら、Circulation. 2002;105:290.
23. Navab Mら、Arterioscler Thromb Vase Biol. 2005;25:1325. 40
24. Hsieh GRら、Transplantation. 2007;84:238.
25. Yuditskaya Sら、Blood. 2008;113:1122.
26. Engwegen JYら、World J Gastroenterol. 2006;12:1536.
27. Kozak KRら、Proteomics. 2005;5:4589.
28. Ndao Mら、J Clin Microbiol. 2010;48:1139.
29. Choi DHら、J Proteome Res. 2010;9:4329.
30. Nicholas BLら、Am J Respir Crit Care M 50

ed, 2010:181:1049.

31. Burger D, Dayer JM. Autoimmun Rev. 2002;1:111.

32. Fishman JA, Rubin RH. N Engl J Med. 1998;338:1741.

33. Shevchenko Aら、Methods Mol Biol. 2000:146:1.

34. Shevchenko Aら、Rapid Commun Mass Spectrom. 1997;11:1015.

35. Racusen LCら、Am J Transplant. 2003;3:708. 10

36. Racusen LCら、Kidney Int. 1999;55:713.

37. Albrethsen J. Clin Chem. 2007;53:852.

【0094】

実施例2：急性腎臓同種移植片拒絶と関連する血漿バイオマーカーとしてのアポリポタンパク質A1 (ApoA1) の検証

Apo-A1として実施例1で同定された28kDaタンパク質は、一貫して、生検で腎臓同種移植片拒絶と証明された患者においてより低いレベルを示した。酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および生検で拒絶と証明された患者からの27検体の血漿試料の独立コホートおよび拒絶がない51名の患者を用いて、発明者らは、質量スペクトル試験を確認し、より低レベルであることが腎臓同種移植片拒絶の診断と関連することを示した。 20

【0095】

現在の試験の目的は、2010年から2013年の間にUCLAで移植を受けた73名の腎臓同種移植片受容者の独立コホートを用いて、腎臓同種移植片拒絶に対するマーカー的中率を検証することであった。71名中45名の患者で拒絶が起こり、一方で28名の患者が生検で非拒絶と証明された。

【0096】

ELISAによってApo-A1タンパク質レベルについて、73名の腎臓受容者からの血漿試料をアッセイした。45名の患者において少なくとも1回、生検で拒絶と証明されたエピソードが起こり、一方で28名の患者が生検で非拒絶と証明された。拒絶の診断前7日以内または拒絶の診断後2日以内に得られた血漿試料のApoA1レベルをELISAによって定量した。腎臓同種移植片拒絶は、バンフ基準を用いて診断した。表3および図4で示されるように、腎臓同種移植片拒絶と診断された患者のApoA1レベル (平均 0.156 ± 0.77) は、非拒絶 (平均 0.239 ± 0.16) と比較して有意に低かった ($P < 0.0024$)。0.195のカットポイントを用いて、ApoA1レベルによって、75%の感度および82%の特異性で、79%の確率で拒絶がある患者が正しく分類された (図5)。 30

【表 4】

表 3:移植あたりの最初の生検に対する T 検定

.ttest maxbl if brnk==1, by (rej)

等分散の 2 試料 t 検定

群	Obs	平均	標準誤差	標準偏差	[95%信頼区間]	
0=非拒絶	28	.2399732	.0312028	.1651096	.1759504	.303996
1=拒絶	45	.1568389	.0114993	.0771399	.1336635	.1800143
組み合わせ	73	.188726	.0145791	.1245642	.1596631	.217789
差		.0831343	.0285355		.0262361	.1400325

diff=平均(0=非拒絶)-平均(1=拒絶)

t=2.9134

Ho:diff=0

自由度=71

Ha:diff<0

Ha:diff!=0

Ha:diff>0

Pr (T<t)=0.9976

Pr{|T|>|t|}=0.0048

Pr(T>t)=0.0024

【0097】

結論：腎臓同種移植片拒絶の診断の1週間以内で有意に低いApoA1タンパク質レベルが見出される。この試験は、腎臓同種移植片拒絶のバイオマーカーとしてのApoA1の使用をさらに裏付け、腎臓同種移植片拒絶の診断において支援となるよう使用することができるだけでなく、拒絶リスクを判定するために移植片受容者を監視するためにも使用し得る。

【0098】

実施例3：抗体に基づくELISAアッセイを用いたアルファ-2-マクログロブリンの検証

図6は、質量スペクトルを用いて明らかにされた場合と同じアルファ-2-マクログロブリンの検出パターンを示すELISAデータを与える。拒絶と診断された7名の腎臓同種移植片受容者から、一对の血漿試料を拒絶時および拒絶後に回収した。これらは、上記実施例1で使用した同じ対の血清試料である。このデータから、ELISAにより検出した場合のアルファ-2-マクログロブリンのレベルが拒絶診断時に低下することが示される。

【0099】

実施例4：質量スペクトルに同定されたバイオマーカーのアミノ酸配列

次の表に記載のように、上記実施例1で同定されたタンパク質断片のアミノ酸配列を決定した。

表4：バイオマーカーペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列

【0100】

アルファ-1-アンチトリプシンC末端断片(2505Da、A1AT397-418；配列番号11) LMIEQNTKSP LFMGKVVNP TQK

【0101】

アポリポタンパク質A1断片(4125Da、ApoA1 148-183；配列番号5)

AELQEGARQKLHE LQEKLSPLGEEMRDRARAHVDAL

【0102】

血漿プロテアーゼC1阻害剤断片(4187Da、C1 inh 445-478；配列番号13)

ARTLLVF EVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPR A(+2 Ox)

【0103】

アルファ-1-抗キモトリプシンC末端断片(4467Da、AACT385-422；配列番号8)

10

20

30

40

50

【0104】

ALVETRTIVRFNRPFLMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQ

【0105】

補体C4アナフィラトキシン(5051Da、C4アルファ698-742;配列番号3)

TAKRCCQDGVTRLPMMRSC EQRAARVQQPD CREPFLSCCQFAESL

【0106】

補体C4アナフィラトキシン(5191Da、C4アルファ702-746;配列番号2)

CCQDGVTRLPMMRSC EQRAARVQQPD CREPFLSCCQFAESLRKKS

【0107】

血清アミロイドA-4(11694Da、SAA421-122;配列番号14)

WRSFFKEALQGVGDMGRAYWDIMISNHQNSNRYLYARGNYDAAQRGPGGVWAAKLISR SRVYLQGLIDCYLFGNSSSTVLEDSKSNEKAE EWGRSGKDPDRFR

【0108】

C-反応性タンパク質(19409Da、CRP10-185;配列番号15)

VF PKESDTSYVSLKAPLTKPLKAFTVCLH FYTELSSTRGY SIFSYATKRQDNEILIFWSKD IGY SFTVGGSEILFEVPEVTVA PVHICTSWESASGIVEFWVDGKPRVRKSLKKGYTVGAEASIIILGQE QDSFGGNFEGSQSLVGDIGNVNMWDFVLS PDEINTIYLG GPFS PNVL

【0109】

アポリポタンパク質A1(28077Da、ApoA156-267;配列番号6)

DEPPQSPWDR VKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQ LGPVTQE FWDNLEKETEG LRQEMSKDLEE VKAKVQPYLDDFQKKWQEEME LYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDA L RTHLAPYSDEL RQLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESF KVSFLSALLEEYTKKLNTQ

【0110】

アポリポタンパク質E(36747Da、ApoE19-317、グリコシル化;配列番号16)

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEE LLS S QVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRG EVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLA VYQAGAREGA

ERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGS LAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTTRDR LDE

VKEQVAEVR AKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQA AVGTS AAPVPSDNH

【0111】

本願を通じて、様々な刊行物を参照する。これらの刊行物のそれらの全体における開示は、本発明が属する技術分野の最先端をより詳細に記載するために、参照により本明細書によって本願に組み込まれる。

【0112】

10

20

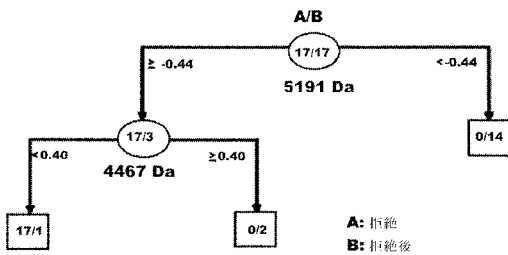
30

40

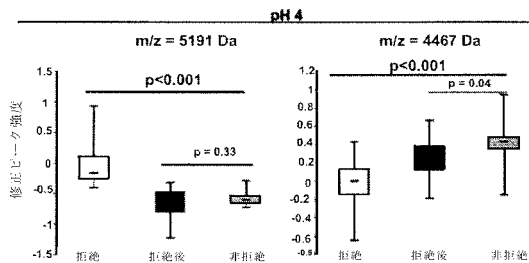
50

前述のものから、本発明の具体的な実施形態が例示目的で本明細書中に記載されるものの、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更をなし得ることが認められよう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

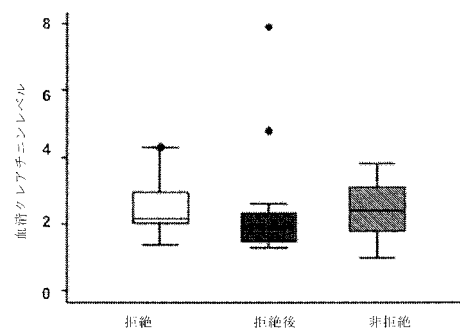
【図 1 A】



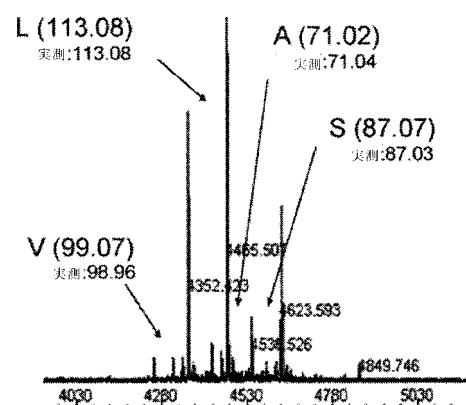
【図 1 B】



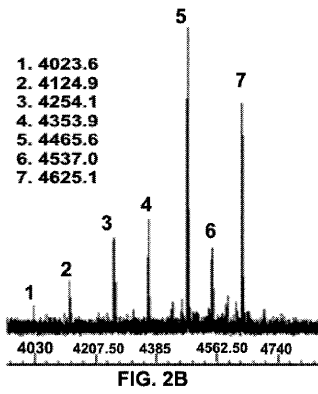
【図 1 C】



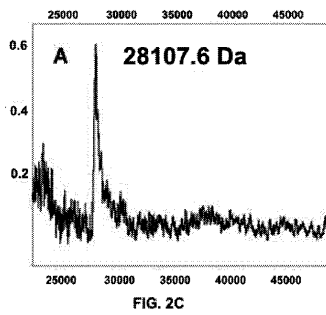
【図 2 A】



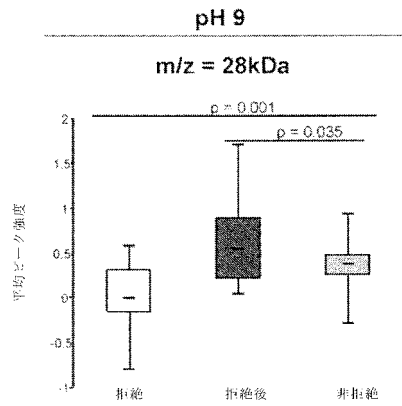
【図 2 B】



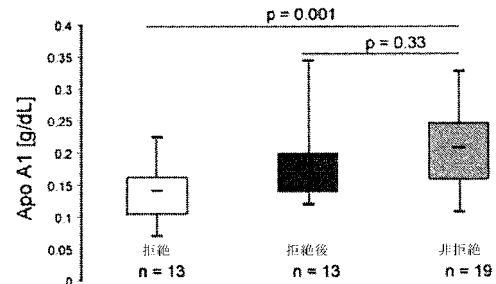
【図 2 C】



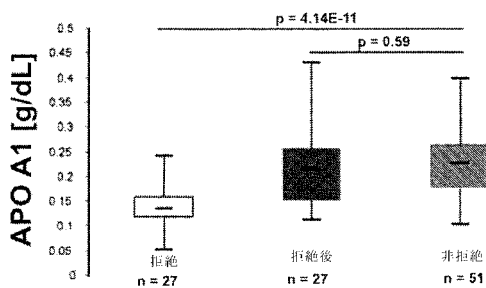
【図 2 D】



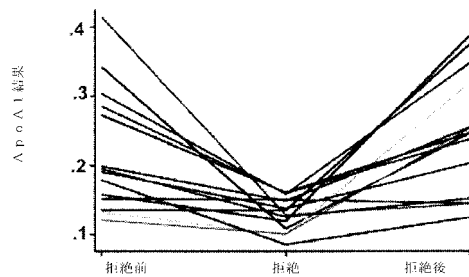
【図 3 A】



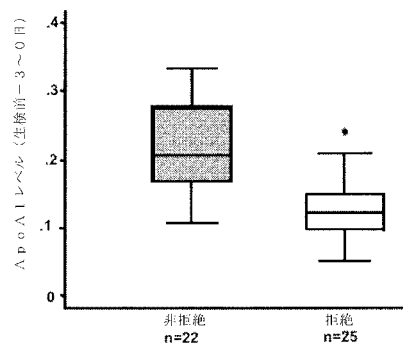
【図 3 B】



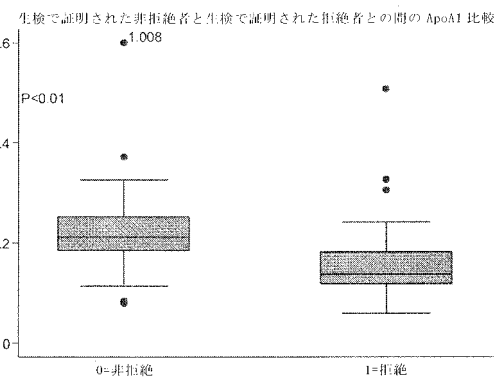
【図 3 D】



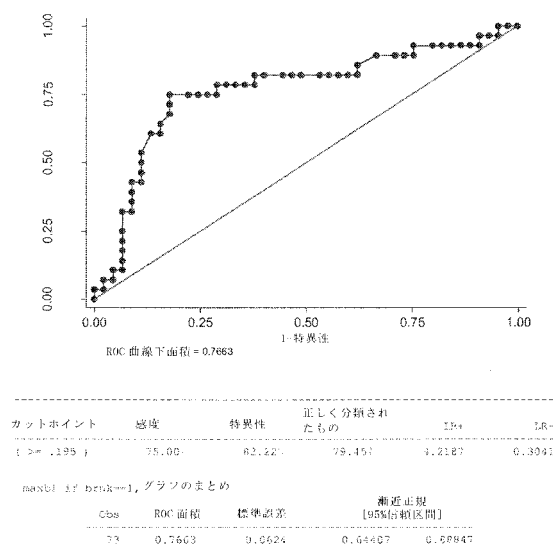
【図 3 C】



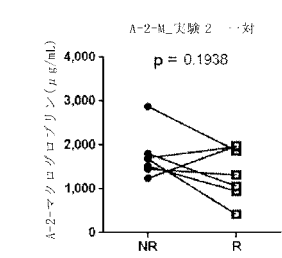
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/025164
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/53(2006.01)i, G01N 30/72(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C07K 14/47(2006.01)i		
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) G01N 33/53; G01N 33/49; A61P 37/06; C12Q 1/68; G01N 30/72; C07K 14/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: transplantation, solid organ, graft rejection, complement C4 anaphylatoxin (C4A), fragment, Apolipoprotein A1 (Apo A1), α-1 anti-chymotrypsin C terminal fragment (AACT), C1 protease inhibitor, Serum Amyloid A, C-reactive Protein, Apolipoprotein E, alpha-1-antitrypsin (A1AT), Post-translational modified ApoA1, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, Alpha-2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8003333 B2 (CHARLTON, MICHAEL R.) 23 August 2011 See abstract; claim 1; columns 1-8, 14-15; and tables 1-2.	1-3, 5-6, 10-14
Y		4, 15-21
A		7-9
Y	ZIEGLER, MARY E. et al., 'Apolipoprotein A1 and C-terminal fragment of α-1 antichymotrypsin are candidate plasma biomarkers associated with acute renal allograft rejection', Transplantation, Author manuscript (NIH Public Access version), 2011, Vol. 92, Issue 4 (internal pp. 1-15) See abstract; pages 1-4, 6-8; figures 1-3; and table 1.	4, 15-21
A	US 2009-0053195 A1 (RAULF, FRIEDRICH et al.) 26 February 2009 See abstract; claim 1; and tables 1-2.	1-21
A	LIN, DAVID CHIA-HSIANG, 'Biomarkers of acute and chronic human heart allograft rejection', Doctoral Dissertation, The University of British Columbia, Pathology and Laboratory Medicine, 2012 (Epub. 2013) See abstract and pages 70-82.	1-21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 2015 (29.06.2015)		Date of mailing of the international search report 29 June 2015 (29.06.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/025164

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAO, YANG et al., 'Proteomic profiling of heterotopic heart-transplanted rats using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Potential biomarkers and drug targets', Journal of International Medical Research, 2013, Vol. 41, No. 3, pp. 628-635 See the whole document.	1-21
A	ROEDDER, SILKE et al., 'Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine', Genome Medicine, 2011, Vol. 3, Issue 6, Article No. 37 (internal pp. 1-12) See abstract; pages 1-9; figures 1-2; and tables 1-2.	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2015/025164

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/025164

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 8003333 B2	23/08/2011	US 2009-0088409 A1	02/04/2009
US 2009-0053195 A1	26/02/2009	EP 1791974 A2	06/06/2007
		JP 2008-512646 A	24/04/2008
		WO 2006-027192 A2	16/03/2006
		WO 2006-027192 A3	27/04/2006

フロントページの続き

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

(72)発明者 リード, エレイン エフ.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90095-1652, ロサンゼルス, 1000 ヴェテラン アベニュー, 15-20 レハブ, ユーシーエルエー パス アンド ラブ メドローイミュノジェネティクス シーエヌティーアール ボックス 951652

(72)発明者 グリッチ, ハンス アルビン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90095-7309, ロサンゼルス, 3361 ピープイユービー, ボックス 957309, ユーシーエルエー ユロロジー ディージェーエスオーエム

(72)発明者 ヴィール, ジェフリー ローン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90095-7309, ロサンゼルス, 3361 ピープイユービー, ボックス 957309, ユーシーエルエー ユロロジー ディージェーエスオーエム

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QR72 QR82 QS33