

(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2015-505245

(P2015-505245A)

(43) 公表日 平成27年2月19日(2015.2.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z N A A 2 G 04 5
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z 4 B 02 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 06 3
A 61 K 31/56 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 C 08 5
A 61 K 31/616 (2006.01)	A 61 K 39/395	D 4 C 08 6
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2014-550413 (P2014-550413)	(71) 出願人 509004712
(86) (22) 出願日	平成24年12月21日 (2012.12.21)	ペイラー リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月11日 (2014.8.11)	B A Y L O R R E S E A R C H I N S
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/071360	T I T U T E
(87) 國際公開番号	W02013/101758	アメリカ国 テキサス75204 ダラス
(87) 國際公開日	平成25年7月4日 (2013.7.4)	スイート501 ライブオーツトリート3310
(31) 優先権主張番号	61/581,199	(74) 代理人 100102978
(32) 優先日	平成23年12月29日 (2011.12.29)	弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人 100102118
		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人 100160923
		弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人 100119507
		弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】川崎病のためのバイオマーカー

## (57) 【要約】

川崎病(KD)のバイオマーカーを提供する。ある局面において、上昇したPDGFC発現などの、KDバイオマーカーを検出するための方法を提供する。同様に、KDのバイオマーカーを有する対象を治療する方法を記載する。

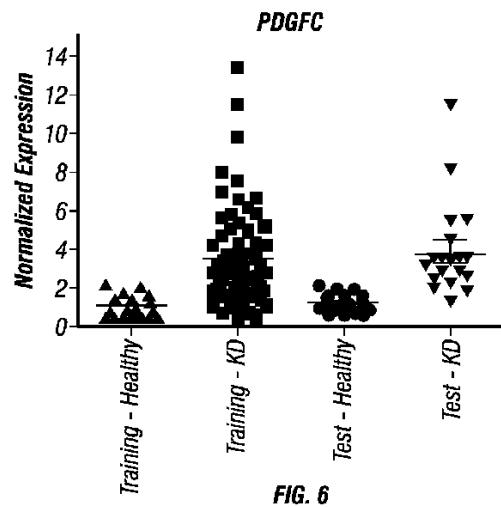
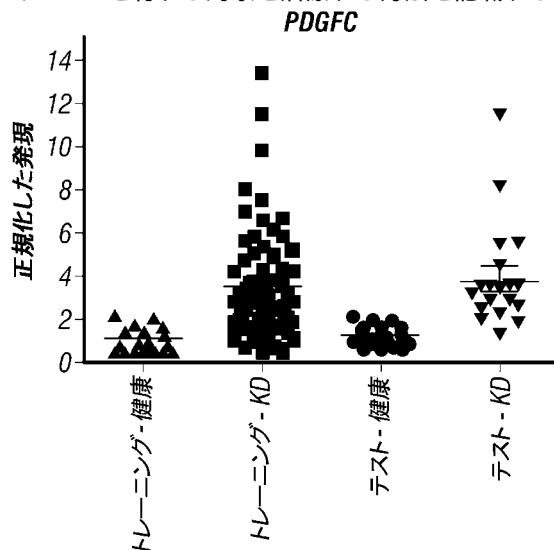


FIG. 6

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

川崎病（KD）を有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来する生物学的サンプル中の血小板由来増殖因子C（PDGFC）の発現レベルを決定する工程を含む、対象においてKDのバイオマーカーを検出するための方法であって、参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現によって、対象をKDのバイオマーカーを有すると見なす、方法。

**【請求項 2】**

生物学的サンプルが血清サンプルである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象が、以下の症状の1つまたは複数を示す、請求項1に記載の方法：口腔紅斑；発疹；腫れた唇；ひび割れた唇；手の腫れ；足の腫れ；眼の発赤；ブドウ膜炎；無菌性髄膜炎；リンパ節炎；血管炎；冠動脈瘤；発熱；関節痛；関節の腫れ；または爪床、手掌、足底、および鼠径部上の皮膚剥離。

10

**【請求項 4】**

KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象がアジア系である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

対象から生物学的サンプルを得る工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

サンプル中のPDGFC RNAの発現を決定することによってPDGFCの発現レベルを決定する、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 7】**

PDGFC RNAの発現を決定することが、活性ポリペプチドをコードするPDGFC RNAの発現を決定することを含む、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

PDGFC RNAの発現を決定することが、核酸ハイブリダイゼーションまたは核酸配列決定を含む、請求項6に記載の方法。

**【請求項 9】**

PDGFC RNAの発現を決定することがRT-PCRを含む、請求項6に記載の方法。

**【請求項 10】**

上昇したPDGFC発現が、参照レベルと比べて約3倍～約50倍大きいPDGFC RNAの発現である、請求項6に記載の方法。

30

**【請求項 11】**

参照レベルが、KDを有さない対象由来のPDGFC発現レベルを示す、請求項1に記載の方法

。

**【請求項 12】**

サンプル中の少なくとも第2の遺伝子の発現レベルを決定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

第2の遺伝子がコントロール遺伝子である、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

第2の遺伝子が、LOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、およびOLF4M4からなる群より選択される、請求項12に記載の方法。

40

**【請求項 15】**

サンプル中のPDGFC発現を報告する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

50

**【請求項 1 6】**

PDGFC発現を報告書において報告する、請求項15に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

サンプル中のPDGFC発現レベルを参照レベルと比較することによって、対象がKDのバイオマーカーを有するかどうかを判定する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

対象がKDのバイオマーカーを有するかどうかを報告する工程をさらに含む、請求項17に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

対象が上昇したPDGFC発現レベルを有さない、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 2 0】**

(a) 対象において血小板由来増殖因子C (PDGFC) の発現を評価する工程；および  
(b) 対象が参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現を示す場合、対象に抗川崎病 (KD) 治療法を施す工程

を含む、KDを有する対象を治療するための方法。

**【請求項 2 1】**

抗KD療法がIgGの投与を含む、請求項20に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

抗KD療法が、アスピリンの投与、コルチコステロイドの投与、または抗TNF 治療法の実施を含む、請求項20に記載の方法。

20

**【請求項 2 3】**

前記評価する工程の前に、対象に抗KD療法を施した、請求項20に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

対象が、以下の症状の1つまたは複数を示す、請求項20に記載の方法：口腔紅斑；発疹；腫れた唇；ひび割れた唇；手の腫れ；足の腫れ；眼の発赤；ブドウ膜炎；無菌性髄膜炎；リンパ節炎；血管炎；冠動脈瘤；発熱；関節痛；関節の腫れ；または爪床、手掌、足底、および鼠径部上の皮膚剥離。

**【請求項 2 5】**

PDGFCの発現がPDGFC RNAの発現である、請求項20に記載の方法。

30

**【請求項 2 6】**

PDGFC RNAの発現が、活性ポリペプチドをコードするPDGFC RNAの発現である、請求項25に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

PDGFCの発現を評価する工程が、PDGFCの発現を測定する工程を含む、請求項20に記載の方法。

**【請求項 2 8】**

上昇したPDGFC発現が、参照レベルと比べて約3倍～約50倍大きいPDGFC RNAの発現である、請求項25に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

参照レベルが、KDを有さない対象由来のPDGFC発現レベルを示す、請求項20に記載の方法。

40

**【請求項 3 0】**

対象において少なくとも第2の遺伝子の発現レベルを評価する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

少なくとも第2の遺伝子の発現を評価する工程が、少なくとも第2の遺伝子の発現を測定する工程を含む、請求項30に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

第2の遺伝子がコントロール遺伝子である、請求項30に記載の方法。

50

**【請求項 3 3】**

第2の遺伝子が、LOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTB3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、およびOLF4Mからなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 4】

(a) 対象に抗川崎病 (KD) 療法を施す工程；

(b) 対象において血小板由来増殖因子C (PDGFC) の発現を評価する工程；および

10

(c) 対象が参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現を示す場合、対象にさらなる抗KD療法を施す工程

を含む、KDを有する対象を治療するための方法。

【請求項 3 5】

参照レベルと比べて上昇した血小板由来増殖因子C (PDGFC) 発現を有すると判定された対象に抗川崎病 (KD) 療法を施す工程を含む、KDを治療するための方法。

【請求項 3 6】

抗KD療法がIgGの投与を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項 3 7】

抗KD療法が、アスピリンの投与、コルチコステロイドの投与、または抗TNF 療法の実施を含む、請求項35に記載の方法。

20

【請求項 3 8】

対象が、以下の症状の1つまたは複数を示す、請求項35に記載の方法：口腔紅斑；発疹；腫れた唇；ひび割れた唇；手の腫れ；足の腫れ；眼の発赤；ブドウ膜炎；無菌性髄膜炎；リンパ節炎；血管炎；冠動脈瘤；発熱；関節痛；関節の腫れ；または爪床、手掌、足底、および鼠径部上の皮膚剥離。

【請求項 3 9】

上昇したPDGFC発現レベルが、上昇したPDGFC RNAの発現レベルである、請求項35に記載の方法。

【請求項 4 0】

上昇したPDGFC RNAの発現が、活性ポリペプチドをコードするPDGFC RNAの上昇した発現である、請求項39に記載の方法。

30

【請求項 4 1】

上昇したPDGFC発現が、参照レベルと比べて約3倍～約50倍大きいPDGFC RNAの発現である、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 2】

参照レベルが、KDを有さない対象由来のPDGFC発現レベルを示す、請求項35に記載の方法。

【請求項 4 3】

対象が、参照レベルと比べて上昇したEPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、またはOLF4Mの発現を有すると判定される、請求項35に記載の方法。

40

【請求項 4 4】

対象が、参照レベルと比べて減少したLOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTB3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、またはTMCC1の発現を有すると判定される、請求項35に記載の方法。

50

**【請求項 4 5】**

コンピュータによって実行されると、

(a) KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中の血小板由来増殖因子C(PDGFC)の発現レベルに対応する情報を受け取ること；および

(b) 参照レベルと比較したPDGFCの相対的な発現レベルを決定することであって、参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現によってKDのバイオマーカーの存在が示される、PDGFCの相対的な発現レベルを決定すること

を含むオペレーションをコンピュータに行わせるコンピュータ可読コードを含む、有形のコンピュータ可読媒体。

**【請求項 4 6】**

健康な対象由来のサンプル中のPDGFCの参照発現レベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む、請求項45に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

参照レベルが前記有形のコンピュータ可読媒体中に保存されている、請求項45に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

情報を受け取ることが、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中のPDGFCの発現レベルに対応する情報を有形のデータ保存デバイスから受け取ることを含む、請求項45に記載の有形のコンピュータ可読媒体。

**【請求項 4 9】**

コンピュータによって実行されると、PDGFCの相対的な発現レベルに対応する情報を有形のデータ保存デバイスへ送ることを含む1つまたは複数の追加のオペレーションをコンピュータに行わせるコンピュータ可読コードをさらに含む、請求項45に記載の有形のコンピュータ可読媒体。

**【請求項 5 0】**

情報を受け取ることが、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中のLOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、またはOLF4のうちの1つの発現レベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む、請求項45に記載の有形のコンピュータ可読媒体。

**【請求項 5 1】**

コンピュータ可読コードが、コンピュータによって実行されると、

(c) サンプルについて、該サンプルがKDを有する対象に由来する確率を示す診断スコアを算出すること

をさらに含むオペレーションをコンピュータに行わせる、請求項45に記載の有形のコンピュータ可読媒体。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、参照により本明細書に組み入れられる、2011年12月29日に出願した米国仮特許出願第61/581,199号の優先権を主張する。

**【0 0 0 2】****1. 発明の分野**

本発明は概して医学および医学的診断の分野に関する。より詳しくは、本発明は川崎病を検出および治療するための方法に関する。

**【背景技術】**

10

20

30

40

50

## 【0003】

## 2. 関連技術の説明

川崎病（KD）は年齢特異的な分布を有し、大抵の症例が6ヶ月から4歳の小児において生じる。KDは日本においておよび日系人の小児において多く見られ、年間発生率は5歳未満の小児100000人当たり約112例である。米国では、川崎病の発生率について、2000年の川崎病と関連する入院の最良推定値は4248件であり、年齢中央値は2歳である。KDは、典型的には、少なくとも5日間の高熱で始まり、他の主要な特徴および検査／臨床所見を示す。実際には冠状動脈は常に剖検例に含まれるが、川崎病は全身の血管が関与する全身性血管炎である。動脈瘤が、腹腔動脈、腸間膜動脈、大腿動脈、腸骨動脈、腎動脈、腋窩動脈、および上腕動脈などの他の実質外筋性動脈に生じる場合がある。

10

## 【0004】

川崎病の病因は依然として不明であるが、臨床的および疫学的特徴は感染性の原因を強く示唆している。好中球の流入が初期段階（発症の7～9日後）に見られ、リンパ球（主にCD8<sup>+</sup> T細胞）およびIgA形質細胞と協調して大单核細胞へ迅速に移動する。内弾性板の破壊および最終的には線維芽細胞増殖がこの段階で生じ、IL-1およびTNF- $\alpha$ の循環レベルもKD患者において上昇する。活動性炎症は数週間から数か月かけて進行性線維症に代わり、瘢痕が形成される。しかし、詳細な研究にもかかわらず、KDの診断は依然として臨床症状に基づいており、従って、治療の適用が最も有効であり得る疾患の初期段階で正確な診断をすることが多い場合できない。

20

## 【発明の概要】

## 【0005】

第1の態様において、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来する生物学的サンプルのEPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、PDGFC、またはOLFM4の発現レベルを決定する工程を含む、対象においてKDのバイオマーカーを検出するための方法であって、参照レベルと比べて上昇した発現によって、対象をKDのバイオマーカーを有すると見なす、方法を提供する。

## 【0006】

さらなる態様において、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来する生物学的サンプルのLOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、またはTMCC1の発現レベルを決定する工程を含む、対象においてKDのバイオマーカーを検出するための方法であって、参照レベルと比べて減少した発現によって、対象をKDのバイオマーカーを有すると見なす、方法を提供する。

30

## 【0007】

なおさらなる態様において、川崎病（KD）を有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来する生物学的サンプルのPDGFCの発現レベルを決定する工程を含む、対象においてKDのバイオマーカーを検出するための方法であって、参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現によって、対象をKDのバイオマーカーを有すると見なす、方法を提供する。

40

## 【0008】

なおさらなる態様において、KDを有する対象を治療するための方法であって、（a）対象においてバイオマーカーの発現を評価する工程、および（b）対象がKDバイオマーカーを含む場合、対象に抗KD療法を施す工程を含む方法を提供する。例えば、いくつかの局面において、バイオマーカーの発現を評価する工程は、対象由来のサンプル中のバイオマーカーの発現を測定する工程を含み得る。さらなる局面において、バイオマーカーの発現を評価する工程は、対象由来のサンプル中のバイオマーカーの発現レベルを提供するレポートの分析を含み得る。従って、いくつかの局面において、KDを有する対象を治療するため

50

の方法であって、(a) 対象においてPDGFCの発現を評価する工程、および(b) 対象が参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現を示す場合、対象に抗KD療法を施す工程を含む方法を提供する。

【0009】

さらなる態様において、KDを有する対象を治療するための方法であって、(a) 対象に抗KD療法を施す工程；(b) 対象においてPDGFCの発現を評価する工程；および(c) 対象が参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現を示す場合、対象にさらなる抗KD療法を施す工程を含む方法を提供する。従って、ある局面において、前記態様の方法は、抗KD療法の有効性をモニタリングするまたは決定するための方法として定義することができる。

【0010】

なおさらなる態様において、KDバイオマーカーを有すると判定された対象に抗KD療法を施す工程を含む、KDを治療する方法を提供する。例えば、ある局面において、参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現を有すると判定された対象に抗KD療法を施す工程を含む、KDを治療する方法を提供する。

【0011】

前記態様のある局面は、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に関する。例えば、対象は、以下の症状の1つまたは複数を示し得る：口腔紅斑；発疹；腫れた唇；ひび割れた唇；手の腫れ；足の腫れ；眼の発赤；ブドウ膜炎；無菌性髄膜炎；リンパ節炎；血管炎；冠動脈瘤；発熱（例えば、少なくとも2、3、4、5日間、もしくはそれ以上継続する持続性発熱）；関節痛；関節の腫れ；または爪床、手掌、足底、および鼠径部上の皮膚剥離。いくつかの局面において、対象は、小児、例えば、6ヶ月～2歳、3歳、4歳、または5歳の年齢の小児である。なおさらなる局面において、対象は、ヒト対象、例えば、アジア系（日系）の対象である。ある局面において、対象は、KDバイオマーカー（例えば、上昇したPDGFC発現レベル）を含まない対象であり得る。

【0012】

態様のある局面は、対象由来の生物学的サンプル、例えば、血液（例えば、血清）、唾液、尿、糞便、または組織サンプルに関する。ある局面において、サンプルは、対象から直接（例えば、対象から採血することによって）得ることができる。さらなる局面において、サンプルは、第三者（例えば、医師）によって得られたサンプルであり得、または組織バンクもしくは血液バンクからのものであり得る。いくつかの局面において、サンプルは、例えば、サンプルからタンパク質または核酸（例えば、RNA）を単離または濃縮することによって、処理することができる。例えば、サンプルは、タンパク質もしくは核酸を精製するもしくは部分的に精製するために、または特定のタンパク質もしくは核酸を除去するために（例えば、過剰なグロビンRNAを除去するために）、処理することができる。

【0013】

前記態様の局面は、サンプル中のKDバイオマーカーの発現を決定することに関する。例えば、発現を決定することは、バイオマーカーの発現を測定することを含み得る。バイオマーカーの発現は、例えば、RNAもしくはタンパク質の発現を検出することによって、またはRNAもしくはタンパク質の活性を検出することによって、決定することができる。従って、ある局面において、バイオマーカーの発現を決定することは、サンプル中のRNAまたはタンパク質の発現レベルを測定することを含み得る。さらなる局面において、前記態様の方法は、サンプル中のバイオマーカーの発現を（例えば、報告書または電子レポートに）報告する工程を含み得る。なおさらなる局面において、前記態様の方法は、サンプル（または対象）がKDバイオマーカーを有するかどうかを報告する工程を含み得る。

【0014】

いくつかの態様において、方法は、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルに関するデータに基づいて診断スコアを決定または算出する工程を含み、これは、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルが、そのスコアに基づいている因子の少なくとも1つであることを意味する。診断スコアは、生物学的サンプルについての情報、例えば、サンプルがKDを有する対象に由来する一般的な確率を提供する。ある態様において、確率値は

10

20

30

40

50

、対象がKDを有する可能性が0%～可能性が100%という確率を示す整数として表される。いくつかの態様において、確率値は、対象がKDを有する可能性が0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%（またはそこから導出可能な任意の範囲）という確率を示す整数として表される。

#### 【0015】

前記態様のある局面は、サンプル中のPDGFCの発現を決定することに関する。例えば、PDGFC RNAおよび／またはタンパク質の発現をサンプルにおいて決定することができる。ある局面において、発現を決定することは、活性PDGFCの発現（例えば、機能性タンパク質をコードするPDGFC RNAの発現）を決定することを含む。いくつかの局面において、PDGFCの発現を決定することは、サンプル中のRNAまたはタンパク質の発現レベルを測定することを含む。

10

#### 【0016】

バイオマーカーの発現を決定するための方法は当技術分野において周知であり、任意のそのような方法がKDバイオマーカーに関して使用され得る。例えば、タンパク質発現を検出する場合、使用することができる方法には、質量分析、アプタマー結合アッセイ、または抗バイオマーカー抗体を使用する免疫検出法（例えば、ウェスタンプロット、ELISA、もしくはIHC）が含まれるが、これらに限定されない。バイオマーカーのRNA発現を決定する場合、使用することができる方法には、核酸ハイブリダイゼーション（例えば、ノーザンプロット、もしくはアレイへのハイブリダイゼーション）、核酸配列決定、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0017】

前記態様のいくつかの局面は、KDバイオマーカーの発現がサンプル中で上昇しているかどうかを判定することを含む。例えば、KDバイオマーカー（例えば、PDGFC）の発現は、健康な対象またはKDを有さない対象に由来するサンプル中の発現レベルなどの、参照発現レベルと比較することができる。例えば、PDGFCの場合、上昇したRNA発現レベルは、参照発現レベルと比べて約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍～約20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、または50倍大きいPDGFC RNA発現の発現を含み得る。なおさらなる局面において、PDGFC発現レベルを決定する工程は、活性PDGFCポリペプチドをコードするRNA（例えば、配列番号1の配列をコードするRNA）の発現レベルを決定する工程を含み得る。従って、ある局面において、PDGFC発現を決定する工程は、活性PDGFCポリペプチドをコードするPDGFC RNAの発現を決定する工程、または活性ポリペプチドをコードしないPDGFC RNAに対する活性PDGFCポリペプチドをコードするRNAの発現比率を決定する工程を含み得る。

30

#### 【0018】

なおさらなる態様は、サンプル中のKDバイオマーカーの発現および少なくとも第2の遺伝子の発現を決定することに関する。例えば、第2の遺伝子はコントロール遺伝子であり得る。いくつかの局面において、コントロール遺伝子の発現は、KDバイオマーカーの発現レベルを正規化するために、例えば、サンプルサイズまたはサンプル品質の差を考慮に入れるために、使用することができる。さらなる局面において、第2の遺伝子はさらなるバイオマーカーであり得る。例えば、ある局面において、前記態様の方法は、サンプル中のPDGFC発現を決定する工程、ならびにLOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHO D1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C

40

50

1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、およびOLFM4からなる群より選択される少なくとも第2の遺伝子の発現を決定する工程を含む。なおさらなる局面において、KDと関連する少なくとも第2の遺伝子からの発現をサンプルにおいて決定し、ここで、第2の遺伝子は、TNF 、IL-1、または参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20110189698号もしくは第20090304680号に記載される遺伝子のうちの1つである。従って、いくつかの局面において、方法は、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、または30個のバイオマーカーの発現を決定する工程を含み得る。

【0019】

前記態様のさらなる局面は、KDを有するかもしくはKDと診断された対象またはKDのバイオマーカーを有すると判定された対象（例えば、上昇したPDGFC発現を有すると判定された対象）の治療に関する。例えば、対象は、適切な抗KD療法で、例えば、IgGの投与、アスピリンの投与、コルチコステロイドの投与、および／または抗TNF 療法の実施によって、治療することができる。なおさらなる局面において、IgG投与を含まない抗炎症療法を施す工程を含む、KDのバイオマーカーを有さないと判定された対象を治療する方法を提供する。

10

【0020】

なおさらなる態様において、コンピュータによって実行されると、(a) KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中のKDバイオマーカーの発現レベルに対応する情報を受け取ること；および(b) 参照レベルと比較したKDバイオマーカーの相対的な発現レベルを決定することを含むオペレーションをコンピュータに行わせるコンピュータ可読コードを含む、有形のコンピュータ可読媒体を提供する。例えば、コンピュータ可読コードは、以下を含むオペレーションをコンピュータに行わせることができる：(a) KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中のPDGFCの発現レベルに対応する情報を受け取ること；および(b) 参照レベルと比較したPDGFCの相対的な発現レベルを決定することであって、ここで、参照レベルと比べて上昇したPDGFC発現によってKDのバイオマーカーの存在が示される。ある局面において、コンピュータ可読コードはさらに、健康な対象由来のサンプル中のKDバイオマーカー（例えば、PDGFC）の参照発現レベルに対応する情報をコンピュータに受け取らせる。さらなる局面において、コンピュータ可読媒体は、前記媒体中に保存された参照レベル（例えば、PDGFC参照レベル）を含む。

20

【0021】

なおさらなる局面において、コンピュータ可読媒体は、以下を含む1つまたは複数の追加のオペレーションを行うためのコードを含む：PDGFCなどの、バイオマーカー発現の相対的な発現レベルに対応する情報を有形のデータ保存デバイスへ送信すること、および／または、サンプルについて診断スコアを算出することであって、ここで、診断スコアはサンプルがKDを有する対象に由来する確率を示す。なおさらなる局面において、コンピュータ可読媒体は、KDを有する疑いがあるかまたはKDを有する危険性がある対象に由来するサンプル中のLOC641518、C21orf57、UBB、FBX07、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、またはOLFM4のうちの1つの発現レベルに対応する情報を受け取るためのコードを含む。

30

【0022】

1つまたは複数のプロセッサを、本明細書に開示される例示的な有形のコンピュータ可読媒体によって駆動されるオペレーションの実行において使用することができる。あるいは、1つまたは複数のプロセッサは、ハードウェアの制御下で、またはハードウェアおよ

40

50

びソフトウェアの制御の組み合わせの下で、それらのオペレーションを行うことができる。例えば、プロセッサは、1つまたは複数のそれらのオペレーションを行うように特別に構成されたプロセッサ、例えば、特定用途向け集積回路(ASIC)またはフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)であってもよい。1つまたは複数のプロセッサの使用は、1つもしくは複数のプロセッサの助けなしでは可能でない、または少なくとも1つもしくは複数のプロセッサで達成可能な速度では可能でない、情報(例えば、データ)の処理を可能にする。そのようなオペレーションの実行のいくつかの態様は、一定の時間内に、例えば、コンピュータシステムまたは1つもしくは複数のプロセッサを使用せずにオペレーションを行うのにかかる時間よりも短い時間内に、例えば、1時間以内、30分以内、15分以内、10分以内、1分以内、1秒以内、および1秒～1時間の秒単位の全ての時間間隔以内に、達成され得る。

10

#### 【0023】

本発明の有形のコンピュータ可読媒体のいくつかの態様は、例えば、CD-ROM、DVD-ROM、フラッシュドライブ、ハードドライブ、または任意の他の物理的記憶装置であり得る。本方法のいくつかの態様は、コンピュータによって実行されると、本発明の有形のコンピュータ可読媒体と関連するものを含む本明細書に記載のオペレーションのいずれかをコンピュータに行わせるコンピュータ可読コードを、有形のコンピュータ可読媒体に記録する工程を含んでもよい。有形のコンピュータ可読媒体に記録する工程は、CD-ROMもしくはDVD-ROM上にデータを焼き付ける工程、または別の方法で物理的記憶装置にデータを投入する工程を含んでもよい。ある局面において、有形のコンピュータ可読媒体は、前記態様のキットに含むことができる。

20

#### 【0024】

開示される組成物または開示される方法を実施するために使用される組成物を含有するキットも提供する。いくつかの態様において、キットは、1つまたは複数のバイオマーカーの発現を決定するために使用することができる。ある態様において、キットは、本明細書に開示されるRNAバイオマーカーにストリングエントな条件下で特異的にハイブリダイズし得るものを含む、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60種、もしくはそれ以上の核酸プローブ、またはそこから導出可能な任意の範囲および組み合わせの核酸プローブを含有するか、それらを少なくとも含有するか、またはそれらを多くとも含有する。さらなる態様において、キットまたは方法は、以下のうちの1つまたは複数のRNA発現を特異的に検出することができ得る核酸プローブを含み得る：LOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、PDGFC、およびOLFM4。

30

#### 【0025】

なおさらなる態様において、前記態様のキットは、本明細書に開示されるバイオマーカーに特異的に結合する、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60種、もしくはそれ以上の抗体、またはそこから導出可能な任意の範囲および組み合わせの抗体を含む。さらなる態様において、キットまたは方法は、以下のうちの1つまたは複数のタンパク質発現を特異的に検出することができ得る抗体を含み得る：LOC641518、C21orf57、UBB、FBXO7、LOC731777、BTF3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155

40

50

HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、TMCC1、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBXO30、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、PDGFC、およびOLFM4。

【0026】

なおさらなる態様において、キットは、機能性PDGFCタンパク質をコードするPDGFC RNA（例えば、配列番号1）に特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも第1の核酸プローブ、および機能性PDGFCタンパク質をコードしないPDGFC RNA（例えば、配列番号3）に特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも第2の核酸プローブを含んでもよい。例えば、前記態様のキットは、機能性PDGFCタンパク質をコードするPDGFC RNA（例えば、配列番号1）由来の配列断片を特異的に増幅することができる少なくとも第1のプライマー対、および機能性PDGFCタンパク質をコードしないPDGFC RNA（例えば、配列番号3）由来の配列断片を特異的に増幅することができる少なくとも第2のプライマー対を含み得る。

10

【0027】

本明細書において使用される場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」とは1つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲において使用される場合、「含む」なる単語と併用して使用されると、「1つの(a)」または「1つの(an)」なる単語は1つまたは複数を意味し得る。

20

【0028】

本明細書において議論されるいずれの態様も、開示される方法または組成物について実施され得ることが意図され、逆もまた同様である。特定の臓器障害について議論されたいずれの態様も、異なる臓器障害について適用または実施することができる。さらに、開示される組成物およびキットは、開示される方法を達成するために使用することができる。

【0029】

本開示は選択肢のみおよび「および/または」を指すという定義をサポートしているが、特許請求の範囲における「または」なる用語の使用は、その選択肢のみを指すように明示されているかまたはその選択肢が相互排他的である場合を除いて、「および/または」を意味するために使用される。本明細書において使用される場合、「別の」とは少なくとも第2のまたはそれ以上を意味し得る。

30

【0030】

本出願の全体にわたって、「約」なる用語は、値が、値を決定するために使用される方法、装置についての固有の誤差の変動、または研究対象において存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0031】

本発明の他の目的、特徴、および利点は以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修飾がこの詳細な説明から当業者に明らかとなるので、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示していると同時に、例としてのみ提供されていることが理解されるべきである。

40

【0032】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書に示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つまたは複数を参照することによってより十分に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】炎症と関連するシグナル伝達に関する遺伝子のネットワークの略図。KD血液中で差次的に調節されることがわかった遺伝子転写物を、シグナル伝達ネットワーク上へマッピングした。+はKDにおいて上方制御された転写物を意味する。(-)はKDにおいて下方制御された転写物を意味する。

50

【図2】結合組織発生と関連するシグナル伝達に関する遺伝子のネットワークの略図。KD血液中で差次的に調節されることがわかった遺伝子転写物を、シグナル伝達ネットワーク上へマッピングした。+はKDにおいて上方制御された転写物を意味する。(-)はKDにおいて下方制御された転写物を意味する。

【図3】PDGFC転写物はKD患者の血液中で5倍～30倍上方制御される。図は、健康な対照についての平均発現と比べたPDGFC転写物発現の倍変化(FC)を示す。PDGFC転写物の3つの領域における定量的RT-PCRによって、結果が得られた。

【図4】機能性PDGFCタンパク質をコードするPDGFC転写物がKD患者において上方制御されている。グラフは、機能PDGFC ORFを含まない転写物に対する機能性タンパク質をコードするPDGFC転写物の比率を表す。KDはKD患者由来のサンプルを示す。Hは健康な対象由来のサンプルを示す。

10

【図5】KDおよび他の熱疾患由来の全血中のPDGFC転写物レベルを定量的RT-PCRで評価した。

【図6】マイクロアレイ分析は、PDGFC転写がKD患者において上方制御されることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0034】

例示的な態様の説明

I. 本発明

川崎病は小児における後天性心疾患の主な原因であり、KD症例の80%超が6ヶ月から4歳の年齢において見られる。KDの原因は不明であり、感染性因子が疑われているが、遺伝および環境も疾患において役割を果たすようである。現在、KDの診断は臨床的特徴の組み合わせによってのみ達成することができ、従って、迅速な診断が可能でない。残念ながら、診断の遅延(および適切な治療の適用の遅延が生じること)は、深刻な合併症の確率を上げる。実際に、冠動脈瘤が20%もの未治療患者において発症する一方で、治療患者では5%のみがそのような動脈瘤を発症する。従って、KDの迅速な診断方法が非常に必要である。

20

【0035】

本明細書において詳述する研究では、他のIL-1関連疾患である、新生児期発症多臓器性炎症性疾患(NOMID)および全身型若年性特発性関節炎(sJIA)と比較したKD患者の遺伝子発現レベルを調べた。全体的に、これら3つの疾患における遺伝子発現パターンは非常に類似していることがわかった。しかし、KDの場合のみで特異的に上方制御または下方制御された多数の遺伝子を同定した。特に、血小板由来増殖因子C(PDGFC)が、川崎病患者において特異的に上方制御されるが、NOMIDおよびsJIAにおいては上方制御されないことがわかった。同様に、血小板由来増殖因子C(PDGFC)が、川崎病患者において特異的に上方制御されるが、若年性皮膚筋炎(JDM)、全身性エリテマトーデス(SLE)、ライノウイルス(Rhinovirus)感染症、大腸菌(Escherichia coli)感染症、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA))感染症、または黄色ブドウ球菌(Staph)感染症においては上方制御されないことがわかった。さらに、KD患者は、機能性PDGFCタンパク質をコードする増加したレベルのPDGFC転写物を優先的に発現することがわかった。

30

【0036】

従って、本明細書において詳述する研究は、増加したPDGFC発現がKDを診断するためのバイオマーカーとして使用できることを実証する。例えば、KDを有する疑いがある患者に由来する血清サンプルを分析し、PDGFC発現を決定することができる。従って、上昇したPDGFC発現レベルまたは活性PDGFC RNAアイソフォームの上昇した発現を使用し、対象がKDを有するかどうかを判定することができる。そのような迅速な診断は、同様に、早期の治療的介入を可能にし、これは、疾患の重症度を著しく低下させ、冠動脈瘤などの合併症を発症する可能性を下げることができる。

40

【0037】

II. PDGFC

50

PDGFCは組織の増殖および機能において重要であり、薬剤耐性腫瘍と関連する線維芽細胞の動員において役割を果たす。この遺伝子は、PDGF/VEGF遺伝子ファミリーの他のメンバーとのその類似性によって最初に同定された(Reigstad et al., 2005)。2つの異なるmRNA転写物が同定された。2つのPDGFCコーディングRNAのうちの短い方は、PDGFCタンパク質についての機能性オープンリーディングフレーム(ORF)をコードする(NM\_016205.2、参照により本明細書に組み入れられる；配列番号1)。長い方の転写物は、PDGFCコーディング領域をフレームから排除する選択的スプライシング事象を含み、従って、機能性PDGFCタンパク質をコードしない(NR\_036641.1、参照により本明細書に組み入れられる；配列番号3)。

【0038】

10

前記態様のある局面は、サンプル中のPDGFCの発現を決定することに関する。いくつかの局面において、PDGFCの発現を決定することは、機能性PDGFCタンパク質をコードするRNAおよび機能性タンパク質をコードしないRNAの発現を決定することを含む。しかし、ある局面において、PDGFCの発現を決定することは、機能性PDGFCタンパク質をコードするRNAの発現を決定すること、または機能タンパク質をコードしないRNAに対する機能性PDGFCタンパク質をコードするRNAの発現比率を決定することを含む。例えば、機能性PDGFCタンパク質をコードするRNAの上昇した発現を有するか、または機能タンパク質をコードしないRNAに対する機能性PDGFCタンパク質をコードするRNAの増加した発現比率を有する対象は、KDのバイオマーカーを有すると判定することができる。

【0039】

20

当業者は、様々な方法がPDGFC RNAの発現を決定するために使用され得、機能性タンパク質をコードするRNA(例えば、配列番号1)の発現と機能タンパク質をコードしないRNA(例えば、配列番号3)の発現とを識別することができることを認識するであろう。例えば、一方のRNAまたは他方に特有である配列の領域にのみハイブリダイズするハイブリダイゼーションプローブを使用することができる。同様に、一方のRNAもしくは他方に由来する配列を単に増幅することができるプライマー、または異なるPDGFC RNAの場合に異なる長さのアンプリコンを生成するプライマーを、RT-PCRについて使用することができる。非機能性RNAに対して機能性RNAを定量化することができる一つの検出方法を本明細書において例示する。

【0040】

30

### III . KDバイオマーカーの検出

ある態様は、インビオまたはサンプル中のいずれかで、KDバイオマーカーの発現を検出することに関する。例えば、いくつかの態様において、PDGFCなどのKDバイオマーカーの発現は、タンパク質の発現または活性を測定することによって検出することができる。さらなる局面において、KDバイオマーカーの発現は、バイオマーカーをコードするRNAの発現を測定することによって検出することができる。

【0041】

#### A . 核酸検出

いくつかの態様において、PDGFCなどのKDバイオマーカーの発現を評価することは、mRNA発現を定量化することを含み得る。ノーザンプロッティング技術は当業者に周知である。ノーザンプロッティングは標的としてのRNAの使用を含む。簡単に説明すると、適切なマトリックス、多くの場合ニトロセルロースのフィルター上に固定化されているRNA種を標的とするために、プローブを使用する。分析を容易にするために、異なる種は空間的に分離されるべきである。これは、多くの場合、核酸種のゲル電気泳動、続くフィルター上への「プロッティング」によって行われる。続いて、プロットされた標的を、変性および再ハイブリダイゼーションを促進する条件下でプローブ(例えば、標識プローブ)と共にインキュベートする。プローブは標的と塩基対を形成するように設計されているので、プローブは、復元条件下で標的配列の一部に結合する。次いで、未結合プローブを除去し、検出を行う。

【0042】

40

50

いくつかの態様において、ゲルによる分離、および臭化エチジウムでの染色、およびUV光の下での可視化に続いて、核酸を定量化する。いくつかの態様において、核酸が、放射標識されたまたは蛍光測定的に標識された一体型のヌクレオチドを使用する合成または増幅により生成される場合、産物を、分離に続いて、X線フィルムへ感光するか、または適切な刺激スペクトル下で可視化することができる。

#### 【0043】

いくつかの態様において、可視化は間接的に達成される。核酸の分離に続いて、標識された核酸を標的配列と接触させる。プローブは発色団または放射標識にコンジュゲートしている。別の態様において、プローブは結合パートナー、例えば、抗体またはビオチンにコンジュゲートし、結合対の他方の要素が検出可能な部分を保有する。前述のものの一例は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,279,721号に記載されており、これは、核酸の自動電気泳動および転写のための装置および方法を開示している。前記装置は、ゲルの外部操作なしに電気泳動およびプロッティングを可能にし、本態様に従う方法の実施に理想的に適している。

10

#### 【0044】

いくつかの態様において、RNAのcDNAへの逆転写（RT）、続く相対的定量的PCR（商標）（RT-PCR（商標））は、特定のmRNA（例えば、PDGFCコーディングRNA）またはさらには対象から単離した特定のmRNA種（例えば、活性PDGFCをコードするmRNA）の相対的濃度を決定するために使用することができる。特定のmRNAまたはmRNA種の濃度が変動することを決定することによって、特定のmRNA種をコードする遺伝子が差次的に発現されることが示される。ある局面において、mRNA発現は、コントロールmRNAの発現、例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ1（PGK1；NCBIアクセッション番号NM\_000291.3、参照により本明細書に組み入れられる）またはTATAボックス結合タンパク質（TBP；NCBIアクセッション番号NM\_003194.4、参照により本明細書に組み入れられる）の発現に対して相対的に定量化され得る。

20

#### 【0045】

いくつかの態様において、上記の増幅産物は、標準的な配列分析技術を使用して、特定の種類の変動を同定するために配列分析に供してもよい。ある方法において、遺伝子の網羅的分析が、最適な配列決定のために設計されたプライマーセットを使用して、配列分析によって行われる。本態様は、これらのタイプの分析のいずれかまたは全てが使用され得る方法を提供する。本明細書に開示される配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、KDバイオマーカー遺伝子の全体にわたる配列（またはタンパク質コーディング配列）の増幅を可能してもよく、次いでこれを直接的な配列決定によって分析してもよい。同様に、DNA配列決定を使用して、KDバイオマーカー遺伝子の発現を検出および/または定量化してもよい。そのような配列についての方法には、リバーシブルターミネーター法（例えば、Illumina（登録商標）およびHelicos（登録商標）BioSciencesによって使用される）、パイルシーケンシング（例えば、Roche製の454シーケンシング）、およびライゲーションによる配列決定（例えば、Life Technologies（商標）SOLID（商標）シーケンシング）が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0046】

PCR（商標）において、増幅される標的DNAの分子の数は、一部の試薬が律速になるまで、反応の各サイクルで2に近い倍率で増加する。その後、増幅速度は、増幅される標的の増加がサイクル間でなくなるまで、次第に減少する。サイクル数をX軸にし、増幅された標的DNAの濃度の対数をY軸にするグラフをプロットすると、特徴的な形状の曲線が、プロットされた点をつなぐことによって形成される。第1サイクルから始まり、線の勾配はプラスでありかつ一定である。これは、曲線の線形部分であると言われる。試薬が律速になつた後、線の勾配は減少し始め、最終的には0になる。この時点で、増幅された標的DNAの濃度は、ある一定の値に漸近する。これは、曲線のプラトー部分であると言われる。

40

#### 【0047】

PCR（商標）増幅の線形部分における標的DNAの濃度は、反応が始まる前の標的の出発濃

50

度に正比例する。同数のサイクルを完了しあつその線形範囲内にあるPCR(商標)反応物中の標的DNAの増幅産物の濃度を決定することによって、元のDNA混合物中の特定の標的配列の相対的濃度を決定することが可能である。DNA混合物が異なる組織または細胞から単離されたRNAから合成されたcDNAである場合、標的配列の由来である特定のmRNAの相対的存在量を、それぞれの組織または細胞について決定することができる。PCR(商標)産物の濃度とmRNAの相対的存在量との間のこの正比例関係は、PCR(商標)反応の線形範囲においてのみ当てはまる。

## 【0048】

曲線のプラトー部分における標的DNAの最終濃度は、反応混合物中の試薬の利用可能性によって決定され、標的DNAの元の濃度と無関係である。従って、mRNA種の相対的存在量をRNA集団の集合体についてRT-PCR(商標)によって決定し得る前に満たされなければならない第1条件は、増幅されたPCR(商標)産物の濃度を、PCR(商標)反応がその曲線の線形部分にあるときにサンプリングしなければならないということである。

## 【0049】

特定のmRNA種の相対的存在量を決定するのに成功するためにRT-PCR(商標)実験について満たされなければならない第2条件は、増幅可能なcDNAの相対的濃度をある独立した標準に対して正規化しなければならないということである。RT-PCR(商標)実験の目的は、サンプル中の全てのmRNA種の平均存在量に対する特定のmRNA種の存在量を決定することである。

## 【0050】

競合的PCR(商標)のほとんどのプロトコルでは、標的とほぼ同じくらい豊富に存在するPCR(商標)内部標準物質を利用する。これらの戦略は、PCR(商標)増幅産物がその線形相の間にサンプリングされる場合に有効である。反応がプラトー相に接近している場合に産物がサンプリングされると、それほど豊富でない産物が相対的に過大に示されることになる。多くの異なるRNAサンプルに対してなされる相対存在量の比較は、差次的発現についてRNAサンプルを調べる場合と同様に、RNAの相対存在量の差を、実際に存在するよりも少なく見せるように歪められる。内部標準物質が標的よりもはるかに豊富であるならば、これは重大な問題ではない。内部標準物質が標的よりも豊富であるならば、直接的な線形比較をRNAサンプル間で行うことができる。

## 【0051】

## B. タンパク質バイオマーカーの検出

いくつかの局面において、前記態様の方法は、PDGFCなどのタンパク質バイオマーカーの発現または活性の検出に関する。例えば、PDGFCなどのタンパク質成分を結合する、精製する、取り出す、定量化する、および/または別の方法で一般に検出するための免疫検出法を使用することができる。本態様に従って作製される抗体を、KDバイオマーカーの発現および/またはKDバイオマーカーの活性化を検出するために用いてもよい。いくつかの免疫検出法には、数例を記載すると、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、免疫放射定量測定法、蛍光免疫測定法、化学発光法、生物発光法、およびウェスタンプロットが含まれる。様々な有用な免疫検出法の手段が科学文献、例えば、Dolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B and Galand P, 1993; De Jager R et al., 1993; およびNakamura et al., 1987に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0052】

一般に、免疫結合法は、KDバイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチド(例えば、PDGFC)を含有する疑いがあるサンプルを得る工程、ならびに免疫複合体の形成を可能にするために有効な条件下で、サンプルを本態様に従う第一の抗バイオマーカー抗体と接触させる工程を含む。

## 【0053】

これらの方法は、患者のサンプルから野生型および/もしくは変異バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および/もしくはペプチドを精製する場合に使用され得るような

10

20

30

40

50

、野生型および／もしくは変異バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／もしくはペプチドを精製するための方法、ならびに／または組換え発現させた野生型もしくは変異タンパク質、ポリペプチド、および／もしくはペプチドを精製するための方法を含む。これらの場合において、抗体は、サンプルから抗原性バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチド成分を取り出す。抗体は、好ましくは、カラムマトリックスの形態などの固体支持体へ連結され、バイオマーカータンパク質抗原性成分を含有する疑いがあるサンプルが、固定化された抗体へ適用される。望ましくない成分は、カラムから洗浄され、固定化された抗体と免疫複合体化した抗原が残り、次いで、バイオマーカータンパク質抗原が、カラムからタンパク質および／またはペプチドを取り出すことによって回収される。

10

## 【0054】

免疫結合法は、サンプル中のKDバイオマーカーまたは活性化KDバイオマーカーの量を検出および定量化するための方法も含む。ここでは、バイオマーカーを含有する疑いがあるサンプルを得て、サンプルを抗体と接触させ、次いで、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出および定量化する。

## 【0055】

抗原検出に関して、分析される生物学的サンプルは、KDバイオマーカーを発現する細胞を含有する疑いがある任意のサンプル、例えば、血清もしくは全血サンプル、組織抽出物、または別の生体液であり得る。

20

## 【0056】

選ばれた生物学的サンプルを、免疫複合体（一次免疫複合体）を形成させるために有効な条件下で十分な期間、抗体に接触させることは、一般的に、抗体組成物をサンプルに単に添加し、抗体が、存在する任意のKDバイオマーカータンパク質抗原と免疫複合体を形成する、即ち、結合するのに十分な長い期間、混合物をインキュベートするという事である。この後、一般的に、組織切片、ELISAプレート、ドットプロット、またはウェスタンプロットなどのサンプル-抗体組成物を洗浄して、任意の非特異的に結合した抗体種を除去し、一次免疫複合体内の特異的に結合した抗体のみを検出する。

## 【0057】

一般的に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数のアプローチの応用を通して達成されてもよい。これらの方法は一般的に、任意の放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグ、および酵素タグなどの、標識またはマーカーの検出に基づく。そのような標識の使用に関する米国特許には、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号が含まれる。当然、当技術分野において公知であるように、二次抗体、および／またはビオチン／アビジンリガンド結合機構などの二次結合リガンドを用いることによるさらなる利点が見出される可能性がある。

30

## 【0058】

いくつかの態様において、検出に使用されるKDバイオマーカー抗体（例えば、抗PDGFC抗体）はそれ自体を、検出可能な標識に連結してもよく、次にこの標識を単純に検出して、それによって組成物における一次免疫複合体の量を決定することができる。いくつかの態様において、一次免疫複合体内の結合する第一抗体は、その抗体に対して結合親和性を有する第二の結合リガンドによって検出されてもよい。ある態様において、第二の結合リガンドを、検出可能な標識に連結してもよい。第二の結合リガンドはそれ自体が、多くの場合抗体であり、これは従って「二次」抗体と呼ばれることがある。一次免疫複合体を標識された二次結合リガンドまたは抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で十分な期間、接触させる。次いで、一般的に、二次免疫複合体を洗浄して、任意の非特異的に結合した標識二次抗体またはリガンドを除去して、次いで、二次免疫複合体において残っている標識を検出する。

40

## 【0059】

さらなる方法には、二段階アプローチによる一次免疫複合体の検出が含まれる。抗体に

50

対して結合親和性を有する抗体などの、第二の結合リガンドを用いて、先に記述したように二次免疫複合体を形成する。洗浄後、二次免疫複合体を、第二抗体に対して結合親和性を有する第三の結合リガンドまたは抗体と、再び免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下で十分な期間、接触させる。第三のリガンドまたは抗体を検出可能な標識に連結して、このように形成された三次免疫複合体を検出する。このシステムは、これが望ましい場合は、シグナル増幅を提供する可能性がある。

#### 【0060】

一つの免疫検出法は、異なる二つの抗体を用いる。第一段階のビオチン化したモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて標的抗原を検出し、次に第二段階の抗体を用いて、複合体化したビオチンに結合したビオチンを検出する。その方法において、試験されるサンプルを、最初に第一段階の抗体を含有する溶液中でインキュベートする。標的抗原が存在する場合、一部の抗体は、抗原に結合してビオチン化抗体／抗原複合体を形成する。次に、抗体／抗原複合体を、ストレプトアビジン（もしくはアビジン）、ビオチン化DNA、および／または相補的なビオチン化DNAの一連の溶液におけるインキュベーションによって増幅して、各段階で抗体／抗原複合体にさらなるビオチン部位を付加する。適した増幅レベルが達成されるまで増幅段階を繰り返し、この時点でサンプルを、ビオチンに対する第二段階の抗体を含有する溶液中でインキュベートする。この第二段階の抗体を、例えば色素原基質を用いる組織酵素学によって抗体／抗原複合体の存在を検出するために用いることができる酵素によって標識する。適した増幅によって、肉眼で見ることができるコンジュゲートを生成することができる。

10

20

30

40

#### 【0061】

別の公知の免疫検出法は、免疫-PCR方法論を利用する。PCR（商標）法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と同様であるが、複数ラウンドのストレプトアビジンおよびビオチン化DNAによるインキュベーションを用いる代わりに、DNA／ビオチン／ストレプトアビジン／抗体複合体を、抗体を遊離させる低pHまたは高塩緩衝液によって洗浄する。次に、得られた洗浄液を用いて、適切な対照と共に適したプライマーによるPCR（商標）反応を行う。少なくとも理論的に、PCR（商標）の非常に大きな増幅能および特異性を利用して一つの抗原分子を検出することができる。

#### 【0062】

本態様の免疫検出法は、例えばKDなどの様々な形態の炎症性疾患の状態の診断および予後予測において明らかな有用性を有する。ここで、KDバイオマーカータンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および／または変異体を含有することが疑われる生物学的および／または臨床サンプルを用いる。しかし、これらの態様は、抗原または抗体試料の力価測定などにおける、例えば炎症の細胞媒介物質の同定における、非臨床試料に対する応用も有する。

#### 【0063】

KDを有する患者の臨床診断および／またはモニタリングにおいて、正常な対象由来の対応する生物学的サンプル中のレベル（即ち、参照レベル）と比較した、PDGFCの増加した発現または活性化などのバイオマーカーの検出により、KDを有する患者が示される。しかし、当業者に公知であるように、そのような臨床診断は、必ずしもこの方法単独に基づいて行われるものではない。当業者は、陽性の同定を示す、バイオマーカーのタイプおよび／もしくは量の有意な差異、ならびに／または、バイオマーカーの低レベル変化および／もしくはバックグラウンド変化を区別することに非常に精通している。実際に、バックグラウンドの発現レベルは、「カットオフ」を作成するためにしばしば使用され、「カットオフ」を超える検出の増加が有意および／または陽性と評価される。同様に、診断は、2個、3個、もしくはそれ以上のバイオマーカーの存在に基づいて、および／またはKDを示す1つもしくは複数の臨床症状を併用したバイオマーカーの存在に基づいて行うことができる。

#### 【0064】

1. ELISA

50

上記に詳述したように、免疫測定法は、その最も単純および／または直接的な意味で、結合アッセイである。ある好ましい免疫測定法は、当技術分野において公知の、様々なタイプの酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）および／または放射性免疫測定法（RIA）である。組織切片を用いる免疫組織化学検出も同様に特に有用である。

#### 【0065】

いくつかの態様において、前記態様の抗バイオマーカー抗体は、ポリスチレンマイクロタイタープレートにおけるウェルなどの、タンパク質親和性を示す選択された表面上に固定される。次に、臨床試料などの、バイオマーカータンパク質抗原を含有することが疑われる試験組成物をウェルに添加する。結合および／または洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合したバイオマーカータンパク質抗原を検出してもよい。検出は一般的に、検出可能な標識へ連結されている別の抗バイオマーカー抗体を添加することによって達成される。このタイプのELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第二の抗バイオマーカー抗体を添加した後に、第二抗体に対して結合親和性を有しあつ検出可能な標識に連結されている第三抗体を添加することによって達成されてもよい。

10

#### 【0066】

いくつかの態様において、バイオマーカータンパク質抗原を含有する疑いがあるサンプルを、ウェル表面上に固定して、および／または次いで前記態様の抗バイオマーカー抗体と接触させる。結合および／または洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した抗バイオマーカー抗体を検出する。最初の抗バイオマーカー抗体が、検出可能な標識に連結している場合、免疫複合体を直接検出してもよい。この場合も、免疫複合体を、第一の抗バイオマーカー抗体に対して結合親和性を有しあつ検出可能な標識に連結されている第二抗体を用いて検出してもよい。

20

#### 【0067】

いくつかの態様において、バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドを固定する。いくつかの態様において、ELISAは、検出において抗体の競合を用いることを含む。このELISAにおいて、KDバイオマーカータンパク質に対する標識抗体をウェルに添加して、結合させ、および／またはその標識によって検出する。次に、未知サンプル中の野生型または変異型バイオマーカータンパク質抗原の量は、コーティングしたウェルとのインキュベーションの前および／または間に、バイオマーカーに対する標識抗体とサンプルとを混合することによって決定する。サンプル中のバイオマーカータンパク質の存在は、ウェルへの結合に利用できる野生型または変異型タンパク質に対する抗体の量を低減するように作用して、従って最終的なシグナルを低減させる。これは、未知サンプル中のバイオマーカータンパク質に対する抗体を検出するのにも適切であり、この場合、非標識抗体は、抗原がコーティングされたウェルに結合し、同様に標識抗体への結合に利用できる抗原の量を低減させる。

30

#### 【0068】

使用される構成によらず、ELISAはコーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的に結合した種を除去するための洗浄、ならびに結合した免疫複合体の検出などの、一般的な特定の特徴を有する。これらを以下に記述する。

40

#### 【0069】

抗原または抗体のいずれかをプレートにコーティングする場合、一般的にプレートのウェルを抗原または抗体の溶液と共に、一晩または指定された時間、インキュベートする。次にプレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を除去する。次に、ウェルの残っている利用可能な任意の表面を、試験抗血清に関しては抗原的に中性である非特異的タンパク質によって「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、または粉乳溶液が含まれる。コーティングによって、固定表面上の非特異的吸着部位をブロッキングすることができ、従って、表面上への抗血清の非特異的結合によって引き起こされるバックグラウンドを低減させる。

#### 【0070】

50

いくつかの態様において、直接的手順ではなく二次または三次検出手段を使用する。そのようないくつかの態様において、タンパク質または抗体をウェルに結合させて、バックグラウンドを低減するために非反応性材料によってコーティングし、洗浄して未結合材料を除去した後、固定表面を、免疫複合体（抗原／抗体）の形成を可能にするのに有効な条件下で、試験される生物学的サンプルと接触させる。次に、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第三の結合リガンドを併用した二次結合リガンドまたは抗体を必要とする。

## 【0071】

「免疫複合体（抗原／抗体）の形成を可能にするのに有効な条件下」とは、条件に、好ましくはBSA、ウシ グロブリン（BGG）、またはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）/Tweenなどの溶液によって抗原および／または抗体を希釈することが含まれることを意味する。これらの添加される物質は、非特異的バックグラウンドの低減を補助する傾向もある。

10

## 【0072】

「適した」条件とは同様に、インキュベーションが、有効な結合を可能にするのに十分な温度または期間で行われることを意味する。インキュベーション段階は典型的に、約1～2時間から4時間等で、温度は好ましくは25～27のオーダーであるか、または約4で一晩等であってもよい。

## 【0073】

ELISAにおけるインキュベーション段階の後、複合体化していない材料を除去するために接触した表面を洗浄する。好ましい洗浄手順には、PBS/Tweenまたはホウ酸緩衝液などの溶液による洗浄が含まれる。試験サンプルと最初に結合した材料との間の特異的な免疫複合体の形成、およびその後の洗浄の後、微量の免疫複合体の存在でさえも決定され得る。

20

## 【0074】

検出手段を提供するために、第二または第三抗体は、検出を可能にするために結合された標識を有してもよい。いくつかの態様において、これは適切な色素原基質と共にインキュベートした場合に発色する酵素である。従って、例えば、第一および第二の免疫複合体を、さらなる免疫複合体形成の発生に好都合な期間および条件（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中で室温で2時間のインキュベーション）で、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、または水素ペルオキシダーゼがコンジュゲートされた抗体と接触させるか、またはそれらと共にインキュベートすることが望まれる。標識抗体とのインキュベーションの後、洗浄して未結合材料を除去した後で、標識の量を、例えば尿素、もしくはプロモクレゾールパープル、もしくは2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）などの色素形成基質、または酵素標識がペルオキシダーゼの場合にはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と共にインキュベートすることによって定量化する。次に定量化は、例えば可視スペクトルの分光光度計を用いて、生じた色の度合いを測定することによって達成される。

30

## 【0075】

## 2. 免疫組織化学

本態様の抗KDバイオマーカー抗体は、免疫組織化学（IHC）による試験のために調製された、新鮮凍結および／またはホルマリン固定された両者のパラフィン包埋組織ブロックと共に用いてもよい。これらの粒状の標本から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子に関するこれまでのIHC試験において用いられて成功しており、および／または当業者に周知である（Brown et al., 1990 ; Abbondanzo et al., 1990 ; Allred et al., 1990）。

40

## 【0076】

簡単に説明すると、凍結した「粉碎された」組織50 ngを、小さいプラスチック製のカプセルにおいて室温でリン酸緩衝生理食塩液（PBS）中で再水和させる段階；前記粒子を遠心分離によってペレット化する段階；粘性の包埋剤（OCT）にそれらを再懸濁する段階；カプセルを上下にして、および／もしくは遠心分離によって再度ペレット化する段階；

50

70 のイソペンタンにおいて瞬間凍結させる段階；プラスチックカプセルを切断して、および／もしくは凍結した柱状の組織を取り出す段階；柱状の組織を低温槽ミクロトームチャックに固定する段階；ならびに／または25～50枚の連続切片を切削する段階によって、凍結切片（例えば、血管組織切片）を調製してもよい。

【0077】

プラスチック製のマイクロチューブにおいて試料50 mgを再水和させる段階；ペレット化する段階；4時間固定するために10%ホルマリンに再懸濁する段階；洗浄／ペレット化する段階；温かい2.5%寒天に再懸濁する段階；ペレット化する段階；氷水中で冷却して寒天を硬化させる段階；組織／寒天ブロックをチューブから取り出す段階；ブロックをパラフィンの中に浸潤および／もしくは包埋する段階；ならびに／または最大50枚の連続永久切片を切削する段階を含む、類似の方法によって、永久的な切片を調製してもよい。

10

【0078】

### 3. 免疫電子顕微鏡

本態様の抗体は、細胞内組織成分を同定するために電子顕微鏡と共に用いてもよい。簡単に説明すると、電子密度の高い標識を抗バイオマーカー抗体に直接または間接的にコンジュゲートさせる。前記態様に従う電子密度の高い標識の例は、フェリチンおよび金である。電子密度の高い標識は電子を吸収して、電子顕微鏡によって可視化することができる。

【0079】

### 4. 免疫検出キット

いくつかの局面において、本態様は、先に記述した免疫検出法と共に使用するための免疫検出キットに関する。抗KDバイオマーカー抗体は一般的に、そのようなバイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドを検出するために用いられるところから、該抗体は好ましくはキットに含まれる。しかし、そのような成分の両方ともが含まれるキットを提供してもよい。従って、免疫検出キットは、適切な容器手段内に、バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／もしくはペプチドに結合する一次抗体（例えば、抗PDGFC抗体）、ならびに／または任意で免疫検出試薬、ならびに／またはさらに任意で、精製されたもしくは組換えのバイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／もしくはペプチドを含む。

20

【0080】

いくつかの態様において、モノクローナル抗体を用いる。ある態様において、バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドに結合する第一抗体を、カラムマトリクスおよび／またはマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体に予め結合させてもよい。

30

【0081】

キットの免疫検出試薬は、所定の抗体に会合させるおよび／または連結される検出可能な標識を含む、多様な形態のうちの任意の一つを呈してもよい。二次結合リガンドに会合および／または結合する検出可能な標識も企図される。例示的な二次リガンドは第一抗体に対して結合親和性を有する二次抗体である。

40

【0082】

さらに、本発明のキットにおいて用いるための適した免疫検出試薬には、第一抗体に対して結合親和性を有する二次抗体を、第二抗体に対して結合親和性を有しあつ検出可能な標識に連結されている第三抗体と共に含む、二成分試薬が含まれる。先に述べたように、多数の例示的な標識が当技術分野において公知であり、および／またはそのような全ての標識を本態様に関して使用してもよい。

【0083】

本態様に従うキットはさらに、検出アッセイのための標準曲線を作成するために用いられる可能性があることから、標識および／または非標識であるかに関わらず、バイオマーカータンパク質、ポリペプチド、および／またはポリペプチドの適切にアリコートにした組成物を含んでもよい。提供するキットは、完全にコンジュゲートさせた形態で、中間体

50

の形態で、および／またはキットのユーザーによってコンジュゲートされる別個の部分としてのいずれかで、抗体標識コンジュゲートを含有してもよい。キットの成分は、水性媒体中および／または凍結乾燥型のいずれかで梱包され得る。

#### 【0084】

キットの容器手段には、その中へ抗体を入れ得る、および／または好ましくは適切にアリコートにし得る、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、および／または他の容器手段が一般的に含まれる。本態様のキットには、典型的に、抗体、抗原、および／または販売用に密封された他の任意の試薬容器を含有するための手段も含まれる。そのような容器には、所望のバイアルが保持される射出成形および／またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれてもよい。

10

#### 【実施例】

#### 【0085】

#### IV. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術は、本発明の実施において十分に機能すると本発明者によって見出された技術を表し、従って、その実施のための好ましい態様を構成すると見なすことができると、当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示される特定の態様に多くの変更を施すことができ、それでもなお同様または類似の結果を得ることができると認識すべきである。

#### 【0086】

20

#### 実施例1 - KDバイオマーカーの同定

#### サンプル採取および処理

研究はBaylor Research Instituteの治験審査委員会によって承認された。インフォームドコンセントを全ての患者および健康なドナーから得た。血液を患者および健康な対照からTempus (商標) チューブ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) またはPaxGeneチューブ (Qiagen, Valencia, CA) 中に採取し、Baylor Institute for Immunology Researchへ送り、-20°で保存した。KD血液サンプルのために使用した患者の概要を表1として提供する。

#### 【0087】

30

#### (表1) KD患者サンプル

川崎病	人数
全患者	98
IVIGの前および24時間後の患者	47
前および2週間または4週間後の患者	13
前および1年後の患者	1
前のみの患者	15
24時間後の患者 (前なし)	13
5週間後の患者 (前なし)	2
状態の不明な患者	7

40

#### 【0088】

全RNAを、MagMax (商標) 全RNA抽出キット (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を使用して全血溶解物から単離し、グロビンmRNAをGLOBINclear (商標) Whole Blood Globin Reduction Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) で除去した。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) を使用し、RNA完全性の数値 (RNA integrity number (RIN)) を測定した。RIN > 6のグロビン低減処理したRNAをさらに増幅し、Illumina (登録商標) TotalPrep (商標) RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)

50

で標識した。cRNAをHuman HT12 BeadChipアレイ ( Illumina ( 登録商標 ) , San Diego, CA ) にハイブリダイズし、 Illumina ( 登録商標 ) BeadStation 500でスキャンした。蛍光のハイブリダイゼーションシグナルをGenomeStudio ( 登録商標 ) ソフトウェア ( Illumina ( 登録商標 ) , San Diego, CA ) で評価した。

【 0 0 8 9 】

マイクロアレイ分析

バックグラウンドサブトラクションおよび平均値正規化の後、GeneSpring ( 登録商標 ) 11.5ソフトウェア ( Agilent, Santa Clara, CA ) を使用してマイクロアレイデータを分析した。分析前に、いずれのサンプルにおいても発現しなかったプローブを除外した。統計分析 ( ベンジャミン・ホッホバーグ ( Benjamini-Hochberg ) 多重検定補正を伴うマン・ホイットニーのU検定 ) および倍変化分析を、疾患群とその対応する健康な対照群との間で行つた。各データセットの健康な対照と比較して、川崎病においては有意であるが ( P < 0.05 、ベンジャミン・ホッホバーグ多重検定補正を伴うマン・ホイットニーのU検定、倍変化 > 1.5 ) 、NOMIDおよびSOJIA群においては有意でない ( P > 0.5 ) プローブを得ることによって、有意性の分析を行つた。IPAソフトウェア ( Ingenuity System Redwood City, CA ) を使用し、経路分析を行つた。モジュール分析のために、260個の転写モジュールのセットを分析のための既存のフレームワークとして使用した。そのようなフレームワークの構築のために使用したアプローチは以前に報告された ( Chaussabel et al., 2008 ) 。簡単に説明すると、9つの全血疾患データセット内でまたは該データセット間で協調的に発現する遺伝子を、複数ラウンドのクリーク ( clique ) およびパラクリーク ( paraclique ) クラスタリングにおいて選択して、260個の転写モジュールのフレームワークを形成し、各モジュール内で、有意なプローブのパーセンテージをT検定によって評価した。KDにおいて差次的に調節される遺伝子を有するシグナル伝達経路の例を、図1～2に示す。

【 0 0 9 0 】

RT-PCR

High Capacity Reverse Transcriptionキット ( Applied Biosystems, Carlsbad, CA ) を使用して、全mRNAからcDNAを作製した。10 μlの反応体積でLightCycler ( 登録商標 ) 480 ( Roche Applied Science, Indianapolis, IN ) においてTaqMan ( 登録商標 ) 遺伝子発現アッセイを使用して、定量的リアルタイムPCRを行つた。ヒトPDGFC遺伝子についてのTaqman ( 登録商標 ) アッセイIDは、Hs00211916\_m1、Hs01053574\_m1、およびHs01044216\_m1である ( 下記表2を参照のこと ) 。PDGFC遺伝子についての閾値サイクル ( CT ) 値を、内在性コントロール遺伝子である、ホスホグリセリン酸キナーゼ1 ( PGK1 ; NCBI アクセション番号NM\_000291.3 ) およびTATAボックス結合タンパク質 ( TBP ; NCBI アクセション番号NM\_003194.4 ) の平均値に対して正規化した。

【 0 0 9 1 】

( 表 2 ) 分析したPDGFC領域

Taqman® アッセイID	アンプリコン長	検出されるmRNA	コードされるPDGFC
Hs00211916_m1	90 ヌクレオチド	NR_036641.1; NM_016205.2	機能性PDGFC ORFおよび ナンセンス転写物
Hs01053574_m1	94 ヌクレオチド	NR_036641.1	ナンセンス転写物
Hs01044216_m1	98 ヌクレオチド	NM_016205.2	機能性PDGFC ORF

【 0 0 9 2 】

結果

1700個を超える転写物が、対応する健康な対照と比較してKD患者由来のエクスピボ血液サンプル中で差次的に発現することがわかつた。KD患者はまた、全身性エリテマトーデス

10

20

30

40

50

(SLE) 患者と比べて、適応免疫と関連する転写物の下方制御および炎症と関連する転写物の大きな上方制御を示した。KD特異的な転写プロフィールは、有意性分析戦略を使用してKDと類似した他の状態を有する患者における転写物発現と比較した場合、特に顕著であった。従って、炎症および系統組織損傷を示すIL-1介在性疾患である、新生児期発症多臓器性炎症性疾患 (NOMID) および全身型若年性特発性関節炎 (SoJIA) の両方が、この分析方法 (参照により本明細書に組み入れられる、Allantaz et al., 2007に記載される) を使用して差次的な転写物発現によってKDと区別することができる。

【0093】

KD患者由来の血液サンプルは、LOC641518、C21orf57、UBB、FBX07、LOC731777、BTB3、C13orf15、SFRS2B、HEMGN、HPS1、IFT52、FAM10A7、IFT52、LOC441714、IMMP2L、TMEM57、IFRD2、LOC646784、PYROXD1、MIR155HG、ZNF138、TCC39B、OR7E156P、FANCD2、XPOT、AZIN1、BLOC152、CDK2、MYL5、HRASLS2、およびTMCC1遺伝子からの転写物の減少した発現を示した。一方で、KD血液サンプルは、EPSTI1、OASL、CEBPA、C9orf167、FHOD1、ALDH3B1、LRSAM1、SIGLEC7、SLC24A4、GAA、RRBP1、DAB2、HIST2H3C、LGALS9、GPR177、CMTM4、FBX030、WSB2、PAPSS1、SERPINB2、ACTA2、LOC729417、ABCD1、GNB4、MITF、C1QC、CCDC24、PGM5、LOC729816、OLF4M4、およびPDGFC遺伝子からの転写物の増加した発現を有することがわかった。特に、マイクロアレイおよびRT-PCRは両方とも、PDGFC mRNAレベルが、健康な小児および他の炎症性疾患を患っている小児と比較してKD患者において有意に上昇することを実証した。次いで、KD特異的な転写物を、炎症 (図1) および結合組織発生 (図2) に関するシグナル伝達経路におけるそれらの役割について分析し、どのマーカーが該疾患において主要な役割を有し得るかを決定した。

【0094】

これらの分析から同様に、PDGFCはKDにおける主要な役者と示され、従ってさらなる研究に供した。定量的RT-PCRによって、PDGFC転写物はKD患者において5倍～30倍上方制御されることが実証された (図3)。この発現の上昇は、PDGFC転写物の3つの異なる領域を増幅するプライマー対を使用して明らかであった。重要なことには、発現の上昇は、機能性PDGFCタンパク質をコードする転写物を増殖するプライマー対において最も明らかであった。機能性PDGFCタンパク質をコードするPDGFC転写物の発現と非機能性PDGFCタンパク質をコードするPDGFC転写物の発現とのさらなる比較によって、KD患者は機能性PDGFC転写物を優先的に発現することが示された (図4)。

【0095】

KDおよび他の熱疾患由来の全血中のPDGFC転写物レベルを定量的RT-PCR (TaqmanアッセイHs00211916\_m1) で評価した (図5)。PDGFCの発現値は、若年性皮膚筋炎 (JDM)、全身性エリテマトーデス (SLE)、ライノウイルス、大腸菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、黄色ブドウ球菌 (Staph)、および新生児期発症多臓器性炎症性疾患 (NOMID) を有する患者においては有意には変化しなかった (図5)。PDGFCの発現の上昇がKD患者において見られ、5倍～30倍増加した (図5)。

【0096】

マイクロアレイ分析によって、PDGFC転写は、KDサンプルの2つの独立したコホート (n=66およびn=19) でKD患者において上方制御されることが示唆された (図6)。

【0097】

本明細書において開示および特許請求される方法は全て、本開示を考慮して過度の実験をすることなく実行および実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様について説明したが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される方法および方法の工程または工程の順序に対して変更が適用され得ることが当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連するある薬剤が、同一または類似の結果を達成しながら、本明細書に記載される薬剤の代わりに使用され得ることが明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の置換および改変は全て、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲、および概念内にあると見なされる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 8 】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する程度に、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

U.S. Patent 3,817,837

U.S. Patent 3,850,752

U.S. Patent 3,939,350

U.S. Patent 3,996,345

U.S. Patent 4,275,149

U.S. Patent 4,277,437

U.S. Patent 4,366,241

U.S. Patent 5,279,721

U.S. Patent Publn. 20090304680

U.S. Patent Publn. 20110189698

10

20

30

Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.

Allantaz *et al.*, *J. Exp. Med.*, 204(9):2131-2144, 2007.

Allred *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(149), 1990.

Brown *et al.* *Immunol. Ser.*, 53:69-82, 1990.

Chaussabel *et al.*, *Immunity*, 29(1):150-164, 2008.

De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.

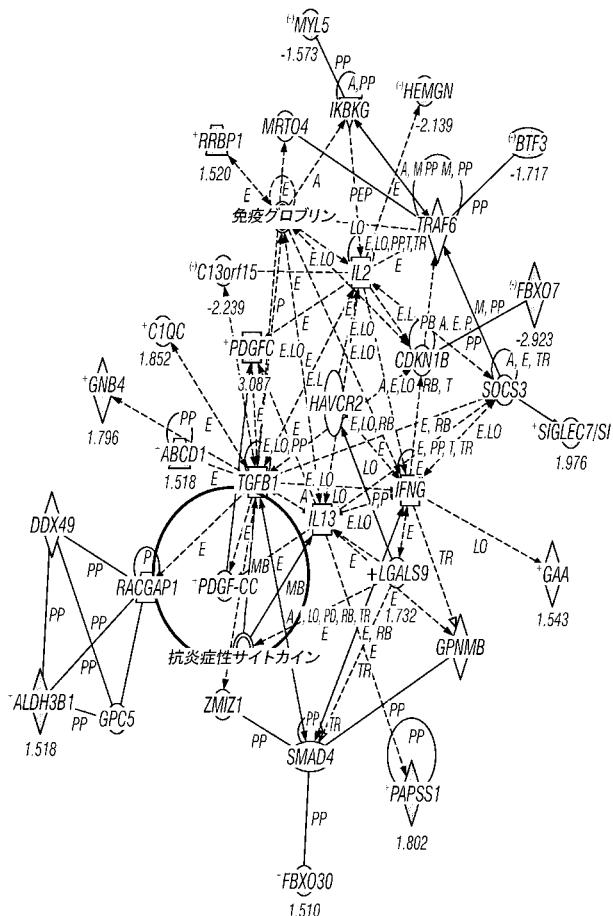
Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12):1271-1285, 1993.

Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*,

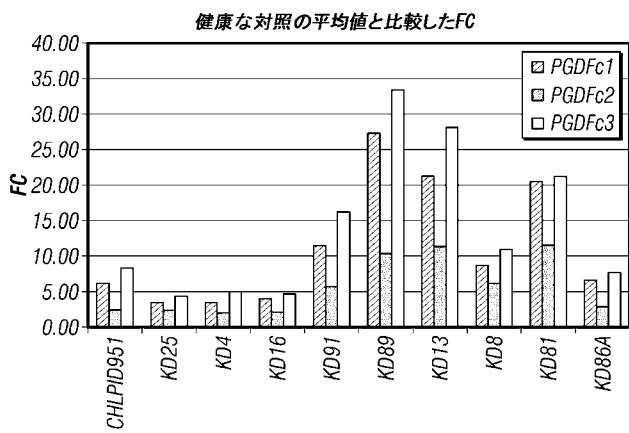
Chapter 27, 1987.

Reigstad *et al.*, *FEBS J.*, 272:5723-5741, 2005.

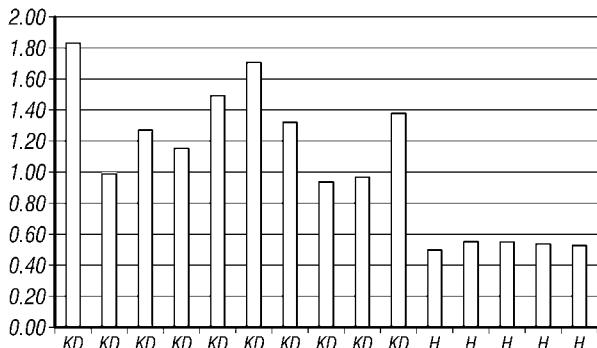
【 図 1 】



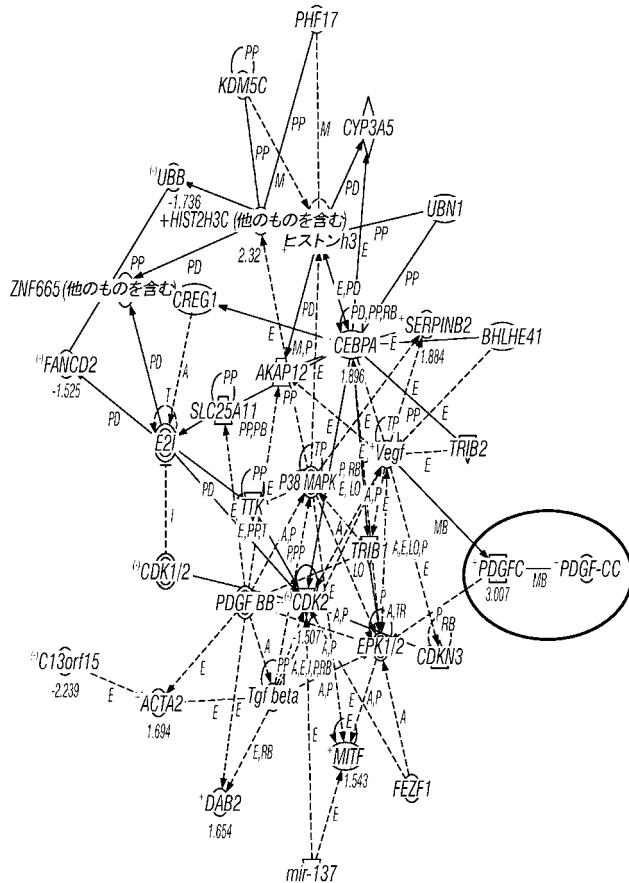
【 図 3 】



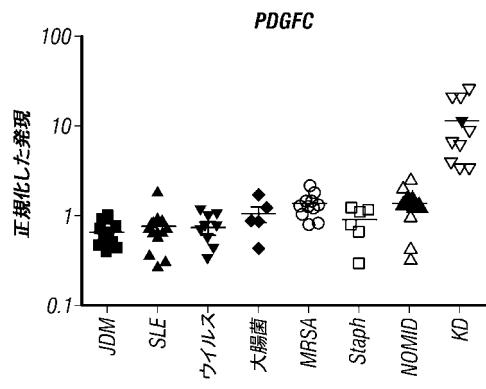
【 図 4 】



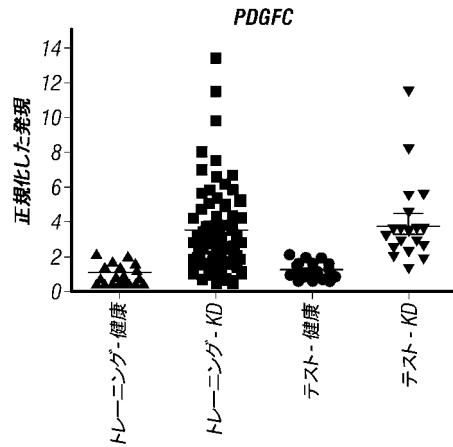
【 図 2 】



【 5 】



〔 四 6 〕



【配列表】

2015505245000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/071360
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/564 ADD.
---

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) C12Q G01N
--

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS
--------------------------------

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANTONELLA FIORAVANTI ET AL: "Circulating levels of the adipocytokines vaspin and omentin in patients with Kawasaki disease", RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL, vol. 32, no. 5, 26 March 2011 (2011-03-26), pages 1481-1482, XP055055688, ISSN: 0172-8172, DOI: 10.1007/s00296-011-1873-3 the whole document ----- US 5 286 623 A (LEUNG DONALD Y M [US] ET AL) 15 February 1994 (1994-02-15) claims 1-7 ----- -/-	1-51
A		1-51 -/-

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" type="checkbox"/> 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
---

Date of mailing of the international search report
--

7 March 2013
--------------

15/03/2013
------------

Name and mailing address of the ISA/
--------------------------------------

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer
--------------------

Eveleigh, Anna
----------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/071360

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHIEA CHUEN KHOW ET AL: "Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease", NATURE GENETICS, vol. 43, no. 12, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1241-1246, XP055055700, ISSN: 1061-4036, DOI: 10.1038/ng.981 the whole document</p> <p>-----</p> <p>XURI LI ET AL: "VEGF-independent angiogenic pathways induced by PDGF-C", ONCOTARGET, vol. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 309-314, XP055054682, the whole document</p> <p>-----</p>	1-51
A		1-51

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2012/071360

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5286623	A 15-02-1994	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/56	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/616	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/48	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100142929	弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699	弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048	弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506	弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100130845	弁理士 渡邊 伸一
(74) 代理人 100114340	弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889	弁理士 五十嵐 義弘
(74) 代理人 100121072	弁理士 川本 和弥
(72) 発明者 パスクアル バージニア エム.	アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ライブ オーク ストリート 3434 スイート 12 5 ベイラー リサーチ インスティテュート内
(72) 発明者 スー チャオホイ	アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ライブ オーク ストリート 3434 スイート 12 5 ベイラー リサーチ インスティテュート内
(72) 発明者 ラミー・オクタビオ	アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ライブ オーク ストリート 3434 スイート 12 5 ベイラー リサーチ インスティテュート内
(72) 発明者 チマズ ローランド	イタリア共和国 ミラノ ヴィーア チマブーエ 6
F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA14 FB02 JA01	4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 HA12
	4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ53 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25
	QS34 QX02
	4C085 AA13 AA14 BB36

4C086 AA01 AA02 DA08 DA17 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZB11 ZC54