

(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2021-524906

(P2021-524906A)

(43) 公表日 令和3年9月16日(2021.9.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 1
GO 1 N 33/493 (2006.01)	GO 1 N 33/493 A	2 G O 4 5
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 30/72 C	4 C O 8 4
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	4 C O 8 5
GO 1 N 27/62 (2021.01)	GO 1 N 27/62 V	4 C O 8 6
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-555307 (P2020-555307)
 (86) (22) 出願日 平成30年12月27日 (2018.12.27)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年8月25日 (2020.8.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/097044
 (87) 国際公開番号 W02019/129824
 (87) 国際公開日 令和1年7月4日 (2019.7.4)
 (31) 優先権主張番号 17306944.4
 (32) 優先日 平成29年12月27日 (2017.12.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 520233386
 フィート エンフェー
 ベルギー ベー2400 モル プーレタ
 ング 200
 (71) 出願人 520233397
 カトリーケ ユニフェルシテイト ルーヴ
 エン
 ベルギー ベー3000 ルーヴェン ボ
 ックス 5105 ワーイストラート 6
 カー. ユー. ルーヴェン エル・ウント
 ・デー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 同種移植片レシピエントを分類するためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、抗体関連型拒絶 (ABMR) に関連する移植片拒絶反応群に属する同種移植片レシピエントの分類またはクラス分けのためのバイオマーカーに関する。本発明はさらに、適切な治療剤の投与による、抗体関連型拒絶を患う、分類された同種移植片レシピエントの処置に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体関連型拒絶（ABMR）の有無についての同種移植片レシピエントの分類方法であって

- 同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
- 前記少なくとも2つの遺伝子についての、前記測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
- 前記測定されたタンパク質レベルと前記参照タンパク質レベルとの前記比較に基づいて、ABMRの有無について前記同種移植片レシピエントを分類する工程とを備える方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、

前記方法は、ABMRの有無について前記同種移植片レシピエントの試料を分類するためのものである、方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、

前記同種移植片レシピエントは同種腎移植片レシピエントである、方法。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法において、

前記試料は、体液試料であり、好ましくは尿試料である、方法。

20

【請求項 5】

請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法において、

TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも6つの遺伝子についてのタンパク質レベルが測定される、方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法において、

A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFからなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルが測定される、方法。

30

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法において、

A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFからなる群から選択される少なくとも6つの遺伝子についてのタンパク質レベルが測定される、方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 までのいずれか一項に記載の方法において、

前記同種移植片レシピエントまたはその試料は、ABMRを有しない同種移植片レシピエントの参照試料における前記少なくとも2つの遺伝子についての参照タンパク質レベルと比較して前記タンパク質レベルが増加したときに、ABMRを有すると分類される、方法。

40

【請求項 9】

請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の方法において、

- 前記試料におけるタンパク質をトリプシンで切断し、ペプチドの混合物を作成する工程と、
- 前記ペプチドの混合物を液体クロマトグラフィ工程に供し、ペプチドを含む溶出液を作成する工程と、
- 前記溶出液についての質量分析工程を行い、前記少なくとも2つの遺伝子についての

50

前記タンパク質レベルを表す前記少なくとも2つのペプチドについてのペプチドレベルを測定する工程とをさらに備える、方法。

【請求項10】

請求項9に記載の方法において、

前記少なくとも2つのペプチドは配列番号1 - 22から選択される、方法。

【請求項11】

請求項1から8までのいずれか一項に記載の方法において、

前記タンパク質レベルの測定は、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)により行われる、方法。

【請求項12】

同種移植片レシピエントのABMR群または非ABMR群への割り当て方法であって、

- 移植片拒絶反応を患っているか、患うリスクのある同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、

- 前記少なくとも2つの遺伝子についての、前記測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、

- 前記測定されたタンパク質レベルと前記参照タンパク質レベルとの前記比較に基づいて、前記同種移植片レシピエントを前記ABMR群または前記非ABMR群に割り当てる工程とを備える方法。

【請求項13】

尿試料における、同種腎移植片レシピエントにおけるABMRの有無についてのマーカーとしての、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、またはAPOA1の複数の遺伝子によりコードされた少なくとも2つのタンパク質、好ましくは前記少なくとも2つのタンパク質のタンパク質レベルの、使用。

【請求項14】

ABMRに関連した移植片拒絶反応を患う同種移植片レシピエントの処置に用いるための標準治療治療剤であって、

(i) 請求項1から11までのいずれか一項に記載の方法により、前記レシピエント若しくはその試料がABMRを有すると分類されるか、または、

(ii) 請求項12に記載の方法により、前記レシピエント若しくはその試料がABMR群に割り当てられる、標準治療治療剤。

【請求項15】

請求項14に記載の標準治療治療剤において、

前記治療剤は、コルチコステロイド、リツキシマブ、静脈注射用免疫グロブリン(IVIG)製品、ボルテゾミブ、エクリズマブおよびこれらの組合せからなる群から選択され、前記治療剤は治療的に有効な投薬方式により投与するためのものである、標準治療治療剤。

【請求項16】

ABMRに関連する移植片拒絶反応を患う同種移植片レシピエントの処置方法であって、

- ABMRに関連する移植片拒絶反応を患う同種移植片レシピエントに治療的に有効な量の標準治療治療剤を投与する工程を備え、

(i) 請求項1から11までのいずれか一項に記載の方法により、前記レシピエント若しくはその試料がABMRを有すると分類されるか、または、

(ii) 請求項12に記載の方法により、前記レシピエント若しくはその試料がABMR群に割り当てられる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、分子診断学の分野に関し、より具体的には、抗体関連型拒絶 (antibody-mediated rejection ; ABMR) に関連する移植片拒絶反応 (transplant rejection) を患うまたは患うリスクのある同種移植片レシピエントの同定を可能にする、移植片拒絶反応ステータスに応じた同種移植片レシピエントの分類のためのバイオマーカーの分野に関する。本発明は、治療の分野にも属し、より具体的には、ABMRに関連する移植片拒絶反応を患う同種移植片レシピエントの処置の分野であって、当該レシピエントが本明細書に記載される方法によって分類または割り当てられた場合に属する。

【背景技術】

【0002】

ドナーから宿主 (host) 患者への臓器または組織の移植は特定の医学的措置および治療プロトコルの一部である。ドナー臓器が宿主に導入される移植措置において、同種移植片拒絶反応を避けるための宿主 - ドナー組織型マッチングの取り組みにもかかわらず、宿主におけるドナー臓器の生存性を維持するため、免疫抑制療法が一般的に必要となる。このことは、同種移植片レシピエントにおいて、同種移植片拒絶反応または移植片拒絶反応は、少なくともある程度、ほとんどいつも起きる現象であることを意味している。従って、同種移植片レシピエントは、少なくともある程度、本来的に移植片拒絶反応のリスクがあると、原則的にいえるだろう。免疫抑制療法の広範な使用にも関わらず、このように、同種免疫反応による臓器移植片拒絶反応は引き起こされる。

【0003】

同種免疫駆動型の移植の拒絶は、主に、T細胞関連型拒絶 (T cell-mediated rejection ; TCMR) によって駆動される移植片拒絶反応機構、または、抗体関連型拒絶 (ABMR) によって駆動される移植片拒絶反応機構のいずれかに分けられる。

【0004】

患者の同種移植片、特に同種腎移植片をモニタリングするためのアッセイが本技術分野で知られている。腎臓の同種移植片をモニタリングするための現在の臨床的な非侵襲的方法の一つが、血清中クレアチニンレベルの測定 (Rabant M, et al, J Am Soc Nephrol, 26:2840-51 (2015))、糸球体過剰 (Wadei H.M. et al, J Am Soc Hypertens., 5(1):39-47 (2011))、およびタンパク尿 (Naesens M. et al. J Am Soc Nephrol, 27:281-92 (2016)) に基づくものである。これらのマーカーは、非特異的であり、相対的に進行した段階でようやく病理を検出するものである。また、これらは、臨床的な病気として表面化しない、または表面化していない潜在的な変化を検出することができない。従って、潜在する移植片拒絶反応機構を同定することはできない。

【0005】

同種腎移植片の拒絶反応の診断における非侵襲的なアッセイが提案されている。このようなアッセイの一つは、急性の移植片拒絶反応を示す多量の尿タンパク質の同定に関連する (Sigdel et al., Proteomics Clin Appl., 4(1):32-47 (2010))。しかし、これらのマーカーは、移植片拒絶反応の表現型を区別できず、従って、移植片拒絶反応を患うまたは患うリスクのある同種移植片レシピエントが拒絶反応表現型 / 機構により階層化される臨床の状況を可能にせず、これにより移植片拒絶反応の機構表現型 / 機構の特定の型に応じて適合した治療を可能にしない。

【0006】

これまでに、潜在する移植片拒絶反応機構に基づいて同種移植片レシピエントの分類をすることができるバイオマーカーは開発されていない。潜在する移植片拒絶反応機構によって同種移植片レシピエントを階層化し、ABMRのケースを同定できるようにすることは非常に有利である。なぜなら、このことが、ABMRに関連する移植片拒絶反応に対する治療を、同種移植片レシピエントのニーズに適合させ得る新しい臨床状況を切り開くからである。これは、潜在する拒絶反応機構の早期発見 - ときには移植片拒絶反応の兆候が表面化する前にも - およびその後の適合された治療が移植片の長期生存の重要な指標である腎臓の同種移植片の、長期生存の観点からとりわけ重要である。

10

20

30

40

50

【0007】

バイオマーカーが非侵襲的な方法によりサンプリングでき、良好な診断成績を提供する、上述した同種移植片レシピエントの分類を可能にするバイオマーカーを提供することが本発明の目的である。同様の観点から、拒絶反応機構に応じて分類された、同種移植片レシピエントにおける移植片拒絶反応の早期発見を可能にし、当該分類では、患者特異的な移植片拒絶反応機構に適合した個別化された治療の割り当てを可能にすることが本発明の目的である。ABMRを非ABMR表現型から区別することにより、さらに移植による損傷を緩和し、適切な免疫抑制の投薬を導く。

【発明の概要】

【0008】

本願発明は、抗体関連型拒絶（ABMR）の有無についての同種移植片レシピエントの分類方法であって、
- 同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料を用意する工程と、
- 当該試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1、好ましくは図1のリストに記載されたもの、からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
- 当該少なくとも2つの遺伝子についての、当該測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
- 当該測定されたタンパク質レベルと当該参照タンパク質レベルとの当該比較に基づいて、ABMRの有無について当該同種移植片レシピエントを分類する工程とを備える方法を提供することにより、これらの問題を解決する。同様に、本発明は、抗体関連型拒絶（ABMR）の有無についての同種移植片レシピエントの分類方法であって、
- 同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
- 当該少なくとも2つの遺伝子についての、当該測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
- 当該測定されたタンパク質レベルと当該参照タンパク質レベルとの当該比較に基づいて、ABMRの有無について当該同種移植片レシピエントを分類する工程とを備える方法を提供する。

【0009】

代替的に、本発明は、同種移植片レシピエントのABMR群または非ABMR群への割り当て方法であって、
- 移植片拒絶反応を患っているか、患うリスクのある同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料を用意する工程と、当該試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1、好ましくは図1のリストに記載されたもの、からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
- 当該少なくとも2つの遺伝子についての、当該測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
- 当該測定されたタンパク質レベルと当該参照タンパク質レベルとの当該比較に基づいて、当該同種移植片レシピエントを当該ABMR群または当該非ABMR群に割り当てる工程とを備える方法を提供することにより、これらの問題を解決する。同様に、本発明は、同種移植片レシピエントのABMR群または非ABMR群への割り当て方法であって、
- 移植片拒絶反応を患っているか、患うリスクのある同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
- 当該少なくとも2つの遺伝子についての、当該測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
- 当該測定されたタンパク質レベルと当該参照タンパク質レベルとの当該比較に基づいて、当該同種移植片レシピエントを当該ABMR群または当該非ABMR群に割り当てる工程とを備える方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0010】

発明者らは、抗体関連型拒絶（ABMR）表現型を提示する同種移植片レシピエント - このような表現型は同種移植片の生検の組織学的分析により決定することができる - の生体試料において、ABMR表現型を表さない同種移植片レシピエントと比較して、タンパク質の発現が上方調節された21の遺伝子のセット（図1のリストに記載）を発見した。ABMR表現型を表さない同種移植片レシピエントは、（i）同種移植片の生検の組織学的分析により決定され得るところの、同種移植片が健常または通常であるレシピエント、および、（ii）同種移植片が、全て同種移植片の生検の組織学的分析により決定され得るところの、T細胞関連型拒絶（TCMR）、ポリオマウイルス関連腎症（PVAN）、間質性線維症および尿細管萎縮（IFTA）、糸球体腎炎（GNF）またはこれらの組合せ等の、ABMR表現型とは異なる拒絶反応表現型、を表すレシピエントを含む。当該発見されたバイオマーカーはABMRの分類に個別に用いることができる。さらに、当該セットのバイオマーカーは良好な診断成績を提供することが示され、腎臓の同種移植片を以前に受容した、腎不全を患う患者の独立したコホートにおいて成功裏に検証されている（表2 - 3および4 - 7、ならびに図2および4 - 6）。

10

【0011】

本明細書において用いられる「分類（typing）」の語は、移植片拒絶反応の（サブ）クラスによる、同種移植片レシピエントの区別または階層化を指す。この「分類」は（i）図1のリストに記載された少なくとも1つまたは少なくとも2つの遺伝子についての上記測定されたタンパク質レベルと、（ii）当該少なくとも1つまたは少なくとも2つの遺伝子について

20

【0012】

本明細書で用いられる「同種移植片」の語は、1個体または1対象者から異なる遺伝子型を有する同種の個体または対象者へ移植される、臓器または組織の移植片を指す。「同種移植片」の語は、同種異系移植片も含んで指すことができる。文脈において明確に述べられない限り、本明細書で用いられる「同種移植片」および「移植片」の語は、移植の対象物（名詞）を指す。同種移植片はドナーから提供され、生体または死体を源とすることができる。好ましくは、同種移植片は心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、腸または胸腺からなる群から選択される臓器である。代替的に、同種移植片は骨、腱（共に筋骨格系移植片と呼ばれる）角膜、皮膚、心臓弁、神経または血管等の組織とすることができる。文脈において断りが無い限り、本明細書において「同種移植片」の語と「移植片」の語は交換可能に用いられる。

30

【0013】

好ましくは、本発明の分類または割り当ての方法（本発明の方法）において、同種移植片は腎臓の同種移植片であり、本明細書において同種腎移植片とも呼ばれ得る。

【0014】

好ましくは、本発明の分類または割り当ての方法はイン・ビトロの方法である。

40

【0015】

本明細書で用いられる「同種移植片レシピエント」は、同種移植片を受容した対象者、好ましくは哺乳類、より好ましくは霊長類、最も好ましくは人間を指す。文脈から明確に異なる意味に示されていない限り、本書で用いられる「同種移植片レシピエント」の語は、移植により既に同種移植片を受容した対象者または個体を指す。同種移植片レシピエントは、臓器または組織の同種移植片の移植を必要とさせた臓器不全を患うか、または以前患っていたことが好ましい。言い換えると、同種移植片レシピエントは臓器または組織の不全を処置するための移植により、臓器または組織の移植片を受容した対象者または個体であることが好ましい。

【0016】

50

本開示の目的について、臓器不全は、臓器または組織の移植の形式における臨床的介入なしで通常ホメオスタシスの維持ができない程度の臓器の機能障害と考えられる。

【0017】

同種移植片レシピエントは、腎臓の同種移植片の移植により処置された腎不全を患うか、以前に - 移植の前に - 患っていたことが好ましい。言い換えれば、同種移植片レシピエントは、腎不全の処置のための移植により腎臓の同種移植片を受容した対象者または個体であることが好ましい。本明細書で用いられる「腎不全」の語は、末期腎臓疾患も含んで指す。

【0018】

本発明は、移植片拒絶反応の(サブ)クラスに応じて、同種移植片レシピエントを区別することを可能にする。今まで、移植された同種移植片の生検(侵襲的)の組織学的分析以外の方法で、このような「深い」移植された同種移植片の特性評価は不可能だった。これに加え、本実施例における結果により示されるように、本発明の方法を用いて、現在のところ生検の分析により同定できなかった患者集団が取り出されており、現在の治療法の改善を可能にする。

【0019】

本明細書で用いられる「移植片拒絶反応」は、移植された同種移植片に対する、レシピエントまたは宿主の免疫系によって引き起こされる病状であって、当該同種移植片を損傷または破壊し得るものを指す。従って、移植片拒絶反応の状況は、同種移植片レシピエントにより制御されることが当業者により理解される。この語は、無症状の移植片拒絶反応および臨床的移植片拒絶反応を含み、全てのステージの移植片拒絶反応を明白に含んで指す。本明細書で用いられる「潜在的な拒絶反応」または「潜在的な移植片拒絶反応」の語は、確定されたまたは直ちに観察可能な兆候を示すほど深刻ではないものの、好ましくは、しかし必ずしも必要ではないが、同種移植片の生検において拒絶反応の組織学的証拠が、任意に血清中クレアチニン濃度の上昇なしで、発見される病状を指す。潜在的な移植片拒絶反応は、長期的に移植片の損失に寄与する要素の一つとなり得る。

【0020】

本明細書で用いられる「移植片拒絶反応」の語は、急性および慢性の両方の(移植片)拒絶反応を含む。

【0021】

本明細書で用いられる「急性(移植片)拒絶反応」または「AR」は、移植された組織が免疫学的に異物であるときの、移植片レシピエントの免疫系による移植片の拒絶反応を指す。急性拒絶反応は、レシピエントの免疫細胞またはそのエフェクター細胞による、移植片の浸潤(infiltration)により特徴づけられ、移植片の損傷または破壊を起こし得る。急性拒絶反応は迅速で、人間では一般的に移植手術後数週間以内に起こる。一般的に、急性拒絶反応は、ラパマイシン、エベロリムス、シクロスポーリン、タクロリムス、ミコフェノール酸および抗CD25モノクローナル抗体等の免疫抑制剤により阻害または抑制され得る。「急性(移植片)拒絶反応」は、とりわけ、急性(活動性(active))の抗体関連型拒絶(ABMR)および急性T細胞関連型拒絶(TCMR)の両方を含んで指す。

【0022】

本明細書で用いられる「慢性(移植片)拒絶反応」は、急性(移植片)拒絶反応の免疫抑制が成功したとしても起こる、人間では一般的に移植片の生着後数か月から数年内に起こる病状を指す。線維症が、全ての型の臓器移植片における、慢性拒絶反応の共通の要素である。慢性拒絶反応は、典型的には、特定の臓器の特性である一定の範囲の具体的な障害により記述される。例えば、肺移植では、このような障害は線維増殖的な(fibroproliferative)気道の破壊(閉塞性細気管支炎)を含み、心臓移植または弁置換術等の心臓組織の移植では、このような障害は線維性のアテローム性動脈硬化を含み、腎臓の移植では、このような障害は閉塞性腎疾患、腎硬化、尿細管間質性腎症を含み、肝臓移植では、このような障害は胆管消失症候群を含む。慢性拒絶反応は、虚血性傷害、移植された組織の脱神経、脂質異常症、および免疫抑制剤に関連する高血圧により特徴付けられる。「慢性

10

20

30

40

50

移植片拒絶反応」の語は、とりわけ、慢性ABMRと慢性TCMRの両方を含む。

【0023】

好ましくは、本発明の分類、割り当てまたは測定の方法では、同種移植片レシピエントは移植片拒絶反応を患っている - 患うことには潜在的な拒絶反応も明白に含まれる - か、移植片拒絶反応を患うリスクがある。移植片が同種異系なため、原則的に、同種移植片レシピエントは定義上移植片拒絶反応を患うリスクがある。本発明の文脈上、「患う」の語は、移植片拒絶反応の兆候が同種移植片レシピエントに既に明らかであることを意味しない。このため、当該語は、潜在的な移植片拒絶反応も含んで指す。「移植片拒絶反応を患っているか、患う」の言い回しは、「移植片拒絶反応応答が起きている」とも言い換えられる。

10

【0024】

本発明の方法において、移植片拒絶反応は急性（移植片）拒絶反応が好ましく、したがって当該急性移植片拒絶反応に関連するABMRおよびTCMRは急性ABMRおよび急性TCMRであることが好ましい。

【0025】

本明細書で用いられる「ABMRに関連する移植片拒絶反応」の語句は、少なくとも一定程度、しかし好ましくは大部分は、ABMRにより引き起こされる移植片拒絶反応を指し、当該語句は簡潔に「ABMR」の語または「ABMRである移植片拒絶反応」の語句を用いても言い換えることができる。対応する言い回しは、言及される拒絶反応の表現型がTCMR等の非ABMRのときも適用される。

20

【0026】

ABMRは、しばしば深刻な型の同種移植片拒絶反応となる。ABMRの病態生理学では、抗体、B細胞および形質細胞の根本的役割が示唆されているが、他のエフェクター分子、とりわけ補体系は、ABMRの過程を修飾し得る標的候補とされている。ABMRは、腎臓移植では30-40%のケースにおいて観察されており、早期移植片喪失の主要な原因となっている。当業者は、例えば、以下に報告した2015年最新バンフ（Banff）分類区分等のバンフ分類区分を用いて組織学的分析を行うことにより、同種移植片の生検にABMRが起きているか否かを導出する方法および手段を知っている。

【0027】

同種移植片では、TCMRは、T細胞およびマクロファージによる間質の浸潤、激しいIFNおよびTGFBの効果、ならびに上皮の劣化（deterioration）により特徴づけられる。

30

【0028】

同種移植片のABMRおよびTCMRは、一般的に、2015年最新バンフ分類区分等の一般的に知られたバンフ分類区分によって同定され、急性ABMRおよび急性TCMRのセクションは、以下に再提示した。当業者は、これらのガイドラインにおいて、慢性ABMR、慢性TCMR、間質性線維症および尿細管萎縮（IFTA）の分類についての同様のガイダンスが提供されていることを知っている。当業者は、さらに、ポリオーマウィルス関連腎症（PVAN）および糸球体腎炎（GNF）が別の拒絶反応区分に分類されていることを知っており、これらは、とりわけラウピ（Loupy）らにより2017年に記述されている（Loupy et al., Am J Transplant., 17(1):28-41(2017)）ように、「急性または慢性の拒絶反応により引き起こされると考えられる他の変化」と呼ばれ得る。

40

【0029】

2015年最新バンフ分類区分

区分2：抗体関連型変化

急性/活動性ABMR：診断のために3つ全ての特徴が提示されていなければならない。組織学的特徴を示す生検および、現在/最近の血管内皮との抗体相互作用およびDSAの両方ではないが一方の証拠が、急性/活動性のABMRの疑いがあると指定され得る。病変は、臨床的に急性またはくすぶっている（smoldering）または潜在的であり得る。なお、以下の基準に基づき病変がC4d-陽性またはC4d陰性である場合は注意されたい。

50

1. 以下の1以上を含む、急性組織傷害の組織学的証拠

- 微小血管の炎症（再発性若しくは新生の糸球体腎炎が無く $g>0$ 、および/または $ptc>0$ ）
- 血管内膜または貫壁性の動脈炎（ $v>0$ ）
- 他の原因の無い急性血栓性微小血管症
- 他に明らかな原因がない場合の急性尿細管障害

2. 以下の少なくとも1つを含む、血管内皮との現在/最近の抗体相互作用の証拠

- 尿細管周囲の毛細血管におけるリニアC4d染色（凍結切片ではIFによるC4d2若しくはC4d3、またはパラフィン切片ではIHCによるC4d >0 ）

- 少なくとも中程度の微小血管の炎症（ $[g + ptc] \geq 2$ ）、但し、急性TCMR、境界域浸潤、または感染がある場合。 $ptc \geq 2$ だけでは十分ではなく、 $g \geq 1$ でなければならない。

- 完全に検証された場合、内皮損傷を示す生検組織における遺伝子転写物の発現の増加

3. DSAの血清学的証拠（HLAまたは他の抗原）

- 基準1と2に基づいてABMRの疑いのある生検は、迅速なDSA試験が促される。

【0030】

2015年最新パンフ分類区分

区分4：急性TCMR(グレード)

IA. 重大な間質性炎症（非硬化性皮質実質の $>25\%$ 、 $i2$ または $i3$ ）および中等症尿細管炎の病巣（ $t2$ ）

IB. 重大な間質性炎症（非硬化性皮質実質の $>25\%$ 、 $i2$ または $i3$ ）および激しい尿細管炎の病巣（ $t3$ ）

IIA. 間質性炎症および尿細管炎を伴うまたは伴わない、軽度から中等度の血管内膜の動脈炎（ $v1$ ）

IIB. 間質性炎症および尿細管炎を伴うまたは伴わない、内腔面積（ $v2$ ）の $>25\%$ を含む激しい血管内膜の動脈炎（ $v2$ ）

III. 経壁性動脈炎および/または動脈フィブリノイドの変化とリンパ球性炎症を伴う内側平滑筋細胞の壊死（ $v3$ ）

【0031】

要するに、T細胞関連型拒絶（TCMR）は、間質性炎症（ i ）、尿細管炎（ t ）、および血管炎（ v ）を記録することにより診断することができ、一方、抗体関連型拒絶（ABMR）の顕著な特徴は、尿細管周囲の毛細血管における、C4dの沈着である。

【0032】

本明細書で「ABMR」の語が使用される際は、同種移植片レシピエントの同種移植片のABMRを意味する。同様に、本明細書で「非ABMR」または「TCMR」が使用される際は、同種移植片レシピエントの同種移植片の非ABMRまたはTCMRをそれぞれ意味する。

【0033】

ABMRは、パンフ分類法により分類されたABMRであることが好ましい。TCMRまたはIFTAは、パンフ分類法により分類されるTCMRまたはIFTAであることが好ましい。

【0034】

「ABMR」、「非ABMR」および「TCMR」の語は、本技術分野において「表現型」の語と関連して用いられるため、これらの語は「ABMR表現型」、「非ABMR表現型」および「TCMR表現型」としても使用される。

【0035】

本発明の方法では、ABMRは抗体関連型腎臓拒絶(antibody mediated renal rejection(ABMR))であり、および/または、TCMRはT細胞関連型腎臓拒絶(T-cell mediated renal rejection(TCMRR))であることが最も好ましい。

【0036】

本明細書で用いられる「試料」の語は、同種移植片レシピエントから得られた、タンパク質を含む試料を指す。当該試料は体液試料であることが好ましい。このような試料は、唾液または痰、血液、血清、血漿、尿、腹水および胸膜液を含むが、これらに限られない

。当該試料は尿試料であることが最も好ましい。このような試料を取得することは、十分に当業者に共通の一般的な知識の範囲内である。この語は、例えばタンパク質レベルの測定工程を行うために調製された試料等の、処理された試料も含んで指す。

【0037】

本発明の方法は、(i)ABMRの有無について上記同種移植片レシピエントの試料を分類するためのものであるか、(ii)ABMR群または非ABMR群に上記同種移植片レシピエントの試料を割り当てるためのものであることが好ましい。

【0038】

本発明の他の工程では、上記試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルであって、タンパク質発現レベルとも呼ばれるものが測定または導出される。遺伝子についてのタンパク質レベルが測定されると述べられるとき、当該遺伝子の転写および当該遺伝子転写産物の翻訳により最終的に産生されたタンパク質発現産物の測定を指すことが意図されることが、当業者には明白である。

10

【0039】

本明細書で用いられる「タンパク質」および「ペプチド」の語は、アミノ酸残基のポリマー（アミノ酸配列）を指し、特定の長さの当該分子を指すものではない。この語は、糖鎖付加、アセチル化およびリン酸化等の任意のポリペプチドの修飾（例えば翻訳後の）をも含むか、指す。例えば、対応するUniProtKBアクセッション番号により同定される、自然発生する図1中のタンパク質の変異体がこの定義に含まれる。タンパク質レベルの文脈では、タンパク質およびペプチドの語は交換可能である。

20

【0040】

好ましくは、タンパク質レベルは、図1のリストに示された遺伝子から選択される、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは少なくとも21の遺伝子について測定され、または、タンパク質レベルは、TF、SERPINA1、AZGP1、ORM1、ORM2、SERPINC1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1から選択される、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、若しくは少なくとも14の遺伝子について測定され、または、タンパク質レベルは、TF、SERPINA1、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、APOA4、AFM、A1BG、およびAPOA1から選択される、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは少なくとも10の遺伝子について測定される。好ましくは、本発明の方法において、タンパク質レベルは、TF、SERPINA1、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、APOA4、AFM、A1BG、およびAPOA1から選択される、少なくとも6の遺伝子について測定される。本発明の方法において、タンパク質レベルは少なくともTFおよびSERPINA1の遺伝子について測定されることが好ましく、少なくともTF、SERPINA1、およびAPOA4の遺伝子について測定されることがより好ましく、少なくともTF、SERPINA1、APOA4、およびAZGP1の遺伝子について測定されることがより一層好ましく、選択的にこれらの実施形態のそれぞれにおいてORM1、ORM2、C3、A1BGおよび/若しくはSERPINC1がさらに補充される。代替的に、タンパク質レベルは、図1のリストに示された遺伝子から選択される、上端（TF）から下端（CYSTM1）へ、少なくとも最初の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の遺伝子について測定される。

30

40

【0041】

代替的に、タンパク質レベルは少なくともTF、SERPINA1、AFM、A1BG、SERPINC1およびIGHA1の遺伝子について測定される。

【0042】

本明細書に記載されるように、本発明の方法において、タンパク質レベルは、A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFからなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子について測定されることが好ましい。この点について、

50

本明細書に記載される方法において、タンパク質レベルは、少なくとも、A1BGおよびAFM、A1BGおよびAPOA1、A1BGおよびAPOA4、A1BGおよびIGHA1、A1BGおよびIGHG4、A1BGおよびLRG1、A1BGおよびSERPINA1、A1BGおよびSERPINC1、A1BGおよびTF、AFMおよびAPOA1、AFMおよびAPOA4、AFMおよびIGHA1、AFMおよびIGHG4、AFMおよびLRG1、AFMおよびSERPINA1、AFMおよびSERPINC1、AFMおよびTF、APOA1およびAPOA4、APOA1およびIGHA1、APOA1およびIGHG4、APOA1およびLRG1、APOA1およびSERPINA1、APOA1およびSERPINC1、APOA1およびTF、APOA4およびIGHA1、APOA4およびIGHG4、APOA4およびLRG1、APOA4およびSERPINA1、APOA4およびSERPINC1、APOA4およびTF、IGHA1およびIGHG4、IGHA1およびLRG1、IGHA1およびSERPINA1、IGHA1およびSERPINC1、IGHA1およびTF、IGHG4およびLRG1、IGHG4およびSERPINA1、IGHG4およびSERPINC1、IGHG4およびTF、LRG1およびSERPINA1、LRG1およびSERPINC1、LRG1およびTF、SERPINA1およびSERPINC1、SERPINA1およびTF、または、SERPINC1およびTFの遺伝子について測定されることが好ましい。(i)少なくともA1BGおよびAPOA4、(ii)A1BGおよびSERPINA1、(iii)A1BGおよびTF、(iv)APOA4およびSERPINA1、(v)APOA4およびTF、または(vi)SERPINA1およびTFが非常に好ましい。

10

【 0 0 4 3 】

代替的に、タンパク質レベルは、少なくとも、AZGP1およびTF、AZGP1およびSERPINA1、AZGP1およびAPOA4、AZGP1およびAFM、AZGP1およびORM1、AZGP1およびORM2、AZGP1およびC3、AZGP1およびA1BG、AZGP1およびSERPINC1、AZGP1およびLRG1、AZGP1およびIGHA1、AZGP1およびIGHG4、AZGP1およびTFAP2C、AZGP1およびHPX、AZGP1およびA2M、AZGP1およびCARD6、AZGP1およびSERPINA7、AZGP1およびCCDC73、AZGP1およびCYSTM1、AZGP1およびAPOA1、ORM1およびTF、ORM1およびSERPINA1、ORM1およびAPOA4、ORM1およびAFM、ORM1およびORM2、ORM1およびC3、ORM1およびA1BG、ORM1およびSERPINC1、ORM1およびLRG1、ORM1およびIGHA1、ORM1およびIGHG4、ORM1およびTFAP2C、ORM1およびHPX、ORM1およびA2M、ORM1およびCARD6、ORM1およびSERPINA7、ORM1およびCCDC73、ORM1およびCYSTM1、ORM1およびAPOA1、ORM2およびTF、ORM2およびSERPINA1、ORM2およびAPOA4、ORM2およびAFM、ORM2およびC3、ORM2およびA1BG、ORM2およびSERPINC1、ORM2およびLRG1、ORM2およびIGHA1、ORM2およびIGHG4、ORM2およびTFAP2C、ORM2およびHPX、ORM2およびA2M、ORM2およびCARD6、ORM2およびSERPINA7、ORM2およびCCDC73、ORM2およびCYSTM1、ORM2およびAPOA1、C3およびTF、C3およびSERPINA1、C3およびAPOA4、C3およびAFM、C3およびA1BG、C3およびSERPINC1、C3およびLRG1、C3およびIGHA1、C3およびIGHG4、C3およびTFAP2C、C3およびHPX、C3およびA2M、C3およびCARD6、C3およびSERPINA7、C3およびCCDC73、C3およびCYSTM1、C3およびAPOA1、TFAP2CおよびTF、TFAP2CおよびSERPINA1、TFAP2CおよびAPOA4、TFAP2CおよびAFM、TFAP2CおよびA1BG、TFAP2CおよびSERPINC1、TFAP2CおよびLRG1、TFAP2CおよびIGHA1、TFAP2CおよびIGHG4、TFAP2CおよびHPX、TFAP2CおよびA2M、TFAP2CおよびCARD6、TFAP2CおよびSERPINA7、TFAP2CおよびCCDC73、TFAP2CおよびCYSTM1、TFAP2CおよびAPOA1、HPXおよびTF、HPXおよびSERPINA1、HPXおよびAPOA4、HPXおよびAFM、HPXおよびA1BG、HPXおよびSERPINC1、HPXおよびLRG1、HPXおよびIGHA1、HPXおよびIGHG4、HPXおよびA2M、HPXおよびCARD6、HPXおよびSERPINA7、HPXおよびCCDC73、HPXおよびCYSTM1、HPXおよびAPOA1、A2MおよびTF、A2MおよびSERPINA1、A2MおよびAPOA4、A2MおよびAFM、A2MおよびA1BG、A2MおよびSERPINC1、A2MおよびLRG1、A2MおよびIGHA1、A2MおよびIGHG4、A2MおよびCARD6、A2MおよびSERPINA7、A2MおよびCCDC73、A2MおよびCYSTM1、A2MおよびAPOA1、CARD6およびTF、CARD6およびSERPINA1、CARD6およびAPOA4、CARD6およびAFM、CARD6およびA1BG、CARD6およびSERPINC1、CARD6およびLRG1、CARD6およびIGHA1、CARD6およびIGHG4、CARD6およびSERPINA7、CARD6およびCCDC73、CARD6およびCYSTM1、CARD6およびAPOA1、SERPINA7およびTF、SERPINA7およびSERPINA1、SERPINA7およびAPOA4、SERPINA7およびAFM、SERPINA7およびA1BG、SERPINA7およびSERPINC1、SERPINA7およびLRG1、SERPINA7およびIGHA1、SERPINA7およびIGHG4、SERPINA7およびCCDC73、SERPINA7およびCYSTM1、SERPINA7およびAPOA1、CCDC73およびTF、CCDC73およびSERPINA1、CCDC73およびAPOA4、CCDC73およびAFM、CCDC73およびA1BG、CCDC73およびSERPINC1、CCDC73およびLRG1、CCDC73およびIGHA1、CCDC73およびIGHG4、CCDC73およびCYSTM1、CCDC73およびAPOA1、CYSTM1およびTF、CYSTM1およびSERPINA1、CYS

20

30

40

50

TM1およびAPOA4、CYSTM1およびAFM、CYSTM1およびA1BG、CYSTM1およびSERPINC1、CYSTM1およびLRG1、CYSTM1およびIGHA1、CYSTM1およびIGHG4、CYSTM1およびAPOA1の遺伝子について測定される。

【0044】

図1のリストに示される遺伝子からの、少なくとも2つの遺伝子のタンパク質レベルだけでも、ABMRの分類が可能になることが示される(図6)。

【0045】

より好ましくは、A1BG、APOA4、SERPINA1およびTFからなる群から選択される少なくとも1または少なくとも2の遺伝子について、タンパク質レベルが測定される。さらに好ましくは、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも6の遺伝子について、タンパク質レベルが測定される。より一層好ましくは、上記少なくとも6の遺伝子は、A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFからなる群から選択され、(i)少なくともA1BG、APOA1、APOA4、IGHA1、SERPINA1およびTF、(ii)少なくともA1BG、APOA4、IGHA1、LRG1、SERPINA1およびTF、または(iii)少なくともA1BG、APOA1、APOA4、LRG1、SERPINA1およびTF等である。

10

【0046】

本発明の方法において、好ましくは少なくともTFおよびSERPINA1の遺伝子について、より好ましくは少なくともTF、SERPINA1およびAPOA4の遺伝子について、より一層好ましくは少なくともTF、SERPINA1、APOA4およびA1BGの遺伝子について、タンパク質レベルが測定され、選択的にこれらの実施形態のそれぞれにおいてAFM、APOA1、IGHA1、IGHG4、LRG1および/またはSERPINC1が追加される。

20

【0047】

本発明がさらに提供する、抗体関連型拒絶(ABMR)の有無についての同種移植片レシピエントの分類方法は、
 - 同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
 - 前記少なくとも1つの遺伝子についての、前記測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
 - 前記測定されたタンパク質レベルと前記参照タンパク質レベルとの前記比較に基づいて、ABMRの有無について前記同種移植片レシピエントを分類する工程とを含む。図1は、全ての個々の遺伝子のタンパク質レベルがABMRと関連することを示している。本発明がさらに提供する、同種移植片レシピエントのABMR群または非ABMR群への割り当て方法は、
 - 移植片拒絶反応を患っているか、患うリスクのある同種移植片レシピエントからのタンパク質を含む試料における、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1、およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程と、
 - 前記少なくとも1つの遺伝子についての、前記測定されたタンパク質レベルと参照タンパク質レベルとの比較を行う工程と、
 - 前記測定されたタンパク質レベルと前記参照タンパク質レベルとの前記比較に基づいて、前記同種移植片レシピエントを前記ABMR群または前記非ABMR群に割り当てる工程とを備える。本明細書に記載されている、少なくとも2つの遺伝子に基づいて分類または割り当てを行う方法に関する実施態様も、少なくとも1つの遺伝子を採用するそのような方法に適宜同様に適用される。

30

40

【0048】

本発明は、尿試料における、同種腎移植片レシピエントにおけるABMRの有無の(バイオ)マーカーとしての、少なくとも2つの(異なる)タンパク質、好ましくは当該少なくとも2つのタンパク質のタンパク質レベルの使用も提供し、当該少なくとも2つのタンパク質は、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGH

50

A1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1またはAPOA1の遺伝子によりコードされる。この使用は、A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFの遺伝子によりコードされる、少なくとも2つのタンパク質、好ましくは当該少なくとも2つのタンパク質のタンパク質レベルの使用であることが好ましく、この使用は、A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTFの遺伝子によりコードされる、少なくとも6つのタンパク質、好ましくは当該少なくとも6つのタンパク質のタンパク質レベルの使用であることがより好ましい。本明細書に記載されている方法に関する実施態様は、例えばタンパク質/遺伝子の組合せに関して、本明細書に記載されている使用にも適宜適用される。

【0049】

10

当業者は、タンパク質若しくはペプチドの相対若しくは絶対濃度の測定、および/または長期的な(longitudinal)(同一の患者の経時的な複数のサンプリング)若しくは横断的な(cross-sectional)(患者当たり、ある一時点での測定)測定を含む、試料における遺伝子についてのタンパク質またはペプチドのレベルを測定するために適宜用いることができる、豊富な周知の方法および手段を有する。

【0050】

タンパク質またはペプチド分析の方法の、明示的に非制限的な例としては、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)や、質量分析(MS)、好ましくは特にMS/MSモードで設定されるものや、LC-MSに基づくペプチドプロファイリング、好ましくはHPLC-MS、好ましくは後者においてMS/MSモードで設定されるもの(ショットガンモード/データ依存取得(data dependent acquisition(DDA))、データ独立取得(data independent acquisition(DIA))、標的模式(選択反応モニタリング(SRM)、並列反応モニタリング(parallel reaction monitoring(PRM))、多重反応モニタリング(MRM))や、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)や、タンパク質マイクロアレイや、タンパク質QPCR等が含まれる。広い意味では、タンパク質発現評価は質的でも量的でもよい。本願発明の方法では、タンパク質またはペプチドが分析される試料に存在するかの量的な検出、すなわち、分析される試料におけるタンパク質またはペプチドの実際の量または相対量の評価または判断が提供される。このような実施形態では、量的な検出は絶対的なものかもしれないし、あるいは、もし当該方法が試料における2以上の異なるタンパク質またはペプチドを検出するものであれば、相対的なものかもしれない。そのため、「レベル」または「定量する」の語は、試料におけるタンパク質またはペプチドの定量またはそのタンパク質レベルの測定の文脈において用いられる場合には、絶対的なまたは相対的な定量を指し得る。絶対的な定量は、既知の濃度の1以上のコントロール検体を含ませ、標的のタンパク質またはペプチドの検出レベルを、当該既知コントロール検体を参照する(例えば、検量線の生成により)ことにより達成することができる。代替的に、相対的な定量は、2以上の異なるタンパク質またはペプチドのそれぞれの相対的な定量(例えば、互いに相対的)を提供するために、2以上の異なる標的タンパク質またはペプチドの間での検出レベルまたは量の比較を行うことにより達成することができる。これに加えて、相対的な定量は、1以上のコントロール試料からのコントロール値または参照値(またはプロファイル)を用いて確かめることができる。「タンパク質レベル」の語は、ペプチドレベル、とりわけこのようなペプチドレベルがタンパク質レベルの測定として実際に用いられる場合を含む。同様に、タンパク質の語は、タンパク質の部分をも含む。

20

30

40

【0051】

本発明の方法では、用意された試料における、図1のリストに記載された少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質の発現レベルが測定され、当該試料についてタンパク質またはペプチドの痕跡(signature)またはプロファイルを生成すれば、都合のよいいずれのタンパク質またはペプチドの定量プロトコルを採用してもよい。このような方法としては、抗体またはアプタマーに基づくタンパク質定量測定法(例えば、マルチプレックスELISA測定法等のELISA測定法、ウェスタンブロットおよびFACSに基づくタンパク質分析等)を含む標準的な免疫測定法、マルチプレックスタンパク質活性測定法を含むタンパク質

50

活性測定法、タンパク質QPCR、タンパク質発現アレイ等が含まれる。

【0052】

本発明の方法は、 - 前記試料におけるタンパク質をトリプシン（または任意の代替的なプロテアーゼ若しくはこれらの組合せ）で切断し、ペプチドの混合物を作成する工程と、 - 前記ペプチドの混合物を液体クロマトグラフィ工程（またはキャピラリー電気泳動のような類似の分離技術）に供し、ペプチドを含む溶出液を作成する工程と、 - 前記溶出液についての質量分析工程を行い、前記少なくとも2つの遺伝子についての前記タンパク質レベルを表す前記少なくとも2つのペプチドについてのペプチドレベルを測定する工程とをさらに備えてもよい。

【0053】

本発明の方法において参照されるように、前記少なくとも2つの遺伝子についてのペプチドレベルは、前記少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルの尺度であることが当業者に理解される。加えて、上述における質量分析工程の実行は、より具体的に述べると、ペプチドプロファイル/痕跡を測定若しくは提供し、そして少なくとも2つのペプチドについてのペプチドレベルを測定若しくは導出することとでき、当該少なくとも2つのペプチドについてのペプチドレベルは、前記少なくとも2つの遺伝子についてタンパク質レベルを表すか、尺度となっている。この言い回しにより、当該少なくとも2つのペプチドは、前記少なくとも2つの遺伝子のうちのそれぞれ異なる遺伝子によりコードされたタンパク質の一部を元々形成していたことが、当業者に明らかである。さらなるペプチドについてのペプチドレベルを測定または導出してもよく、このようなペプチドは、当該最初の2つのペプチドの1つと同じタンパク質を表してもよいし、あるいは代わりに図1のリストに記載されたさらなるタンパク質についての鑑別子であってもよいことが、当業者に理解される。

【0054】

同様の文脈から、本発明者は、図1のリストに記載された6つのタンパク質（緑/灰色でマークされたタンパク質）についての特異的な鑑別子である12のユニークなペプチドのセット（表1、配列番号1-12）を同定した。同様に、さらなる10ペプチド（配列番号13-22）が同定された（表4）。タンパク質またはペプチドの測定ツールとしてMSが採用される場合、これらのペプチド配列は、これらのペプチドに対応する、生成されたMSプロファイルにおけるピークが容易に同定でき、本明細書に記載されるタンパク質バイオマーカーに起因するものと容易に判断できるという利点がある。このようなペプチドのMSピークは、そのペプチドレベルの尺度となるが、これらのペプチドが図1のリストに記載された1つのタンパク質にユニークである事実から、これらはタンパク質レベルの尺度にもなる。なお、タンパク質発現レベルは、数多くの他の方法により測定することも可能であることが理解される。

【0055】

従って、本発明の方法において、少なくとも2つのペプチドは、配列番号1-12および/または13-22の配列を有するペプチドから選択される少なくとも2つのペプチドであることが好ましい。本発明の方法において、表1のリストに記載された少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のペプチドのペプチドレベルが測定されるか若しくは導出され、または、表4のリストに記載された少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20のペプチドのペプチドレベルが測定されるか若しくは導出されることがより好ましい。(i)配列番号3または4、(ii)配列番号7または8、および(iii)配列番号11または12から選択される少なくとも2つのペプチドについて、ペプチドレベルが導出されることがより一層好ましい。

【0056】

代替的に、本発明の方法において、タンパク質レベルの測定は、酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）により行われる。

【0057】

10

20

30

40

50

本発明の分類方法または割り当て方法は、測定されたまたは導出されたタンパク質レベルを参照タンパク質レベルと比較することをさらに備える。

【0058】

標的タンパク質のタンパク質レベルを測定および導出し、例えばこのようなタンパク質レベルデータをプロファイルまたは痕跡の形式で提供した後、タンパク質レベルが分析または評価され、同種移植片レシピエントがABMRまたは非ABMR反応を患っているかまたは経験しているかが導出される。このような分析では、遺伝子の組についての測定されたまたは導出されたタンパク質レベルと、同じ遺伝子の組についての参照タンパク質レベルとの比較が行われる。

【0059】

「参照タンパク質レベル」の語は、同種移植片レシピエントの試料において測定された若しくは導出されたタンパク質レベルを解釈するために用いることができる標準化されたタンパク質レベル（または標準化されたタンパク質レベルのプロファイル若しくは痕跡、または規格化された全タンパク質レベル）を指す。

【0060】

本願発明の分類または割り当て目的に適切な参照タンパク質レベルは、当業者により多数の代替的な手段により設定されることができ、このような参照タンパク質レベルの設定は当業者の一般的な技術常識に属する。

【0061】

例えば、本発明の方法において、参照タンパク質レベルは、参照試料における前記少なくとも2つの遺伝子の参照タンパク質レベルとすることができ、参照試料に基づいて取得されたことが好ましい。参照試料は、健康または病気の個体等、いずれの個体からの試料でもよいが、同種移植片レシピエントからの試料が好ましい。同種移植片レシピエントからの参照試料は、移植片拒絶反応のいずれの兆候も示していない健康な同種移植片レシピエントからの試料でもよいし、ABMRまたはTCMRのような移植片拒絶（反応）を患っているか経験している同種移植片レシピエントからの参照試料でもよい。参照試料は、ABMRでなく、代わりにTCMRのような非ABMRの移植片拒絶（反応）を患っているか経験している同種移植片レシピエントからのものでもよい。本発明の方法では、ABMRを有しない同種移植片レシピエントからの参照試料における前記少なくとも2つの遺伝子について比較が行われたとき、分類が行われるまたは群への割り当てが行われる同種移植片レシピエントは、もしタンパク質レベルが当該参照タンパク質レベルと比較して増加していた場合は、それぞれ、ABMRを有する若しくはABMR反応を経験しているものと分類されるか、または、ABMR群に割り当てられる。図1における発見されたバイオマーカーは、ABMRが存在するときに、存在しないときと比較してタンパク質レベルが上方調節されることが確立されている。タンパク質発現の方向性を知ることで、当業者は、ABMRの表現型に対する類似または非類似のいずれかを示す適切な参照タンパク質レベルを規定通りに適用し、本明細書に記載される分類または割り当て方法を行うことができる。本明細書に記載されるいずれの方法においても、レシピエントがABMRを有すると分類される場合は、前記少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質発現レベルが、ABMRを有しない同種移植片レシピエントの当該タンパク質発現レベルと比較して増加または上方調節されていることが好ましい。

【0062】

ABMRを有する1以上の同種移植片レシピエントからの試料、および、ABMRを有しないが、同じかまたは異なる非ABMRの1以上の同種移植片レシピエントからの試料等の、多数の参照試料を、適切な参照値を設定するために用いることができることが当業者に理解される。

【0063】

参照試料は多数の個体、好ましくはABMR（反応）を有しないまたは経験しない同種移植片レシピエント等の、上述の同種移植片レシピエントからのプールされたタンパク質試料でもよい。当該試料は、10を超える個体、20を超える個体、30を超える個体、40を超える個体または50を超える個体からプールされたものとする事ができる。

10

20

30

40

50

【0064】

非常に有益な参照タンパク質レベルは、非ABMRとABMRとを区別するための絶対的なタンパク質レベルである。このような絶対的な閾値のタンパク質レベルを設定することは当業者の技術常識の範囲内である。

【0065】

同種移植片レシピエントの分類、または同種移植片レシピエントの拒絶反応表現型への割り当ては様々な手段により行うことができる。一つの方法は、特定の細胞の種類、組織、病状、または任意の他の生物学的に若しくは臨床的に興味のある試料群に特異的な、予め確立された - 図1のリストに記載の遺伝子についての - 参照タンパク質レベルを用いて、標的試料におけるタンパク質レベルの類似または非類似の尺度となる係数が導出される。このような参照タンパク質発現レベルは、プロファイルテンプレート (profile template) と呼ぶことができる。試料の分類または割り当ては、試料が単一のプロファイルテンプレートと (非) 類似かに基づくことができ、多数のプロファイルテンプレートに基づくことが好ましい。プロファイルテンプレートとの相関を導出することにより、遺伝子の組についての全体的な類似スコアを設定することができる。類似スコアは、同種移植片レシピエントからの試料における遺伝子の組のタンパク質レベルとプロファイルテンプレートとの平均的な相関の尺度である。この類似スコアは、当該同種移植片レシピエントの試料における遺伝子の組のタンパク質レベルとプロファイルテンプレートとの高い相関を示す + 1 と、逆の相関を示す - 1 との間の数値とすることができるが、必ずしもそうしなくともよい。そして、拒絶反応の表現型に基づいて試料を区別するために閾値を設定することができる。この閾値は、ABMRの同種移植片レシピエントの試料と、ABMRでない同種移植片レシピエントの試料とを区別することが可能なように任意に設定する値である。類似についての閾値が採用される場合、許容可能な数のABMRである同種移植片レシピエントが偽陰性のスコアとなり、許容可能な数のABMRでない同種移植片レシピエントが偽陽性となるように値が設定されることが好ましい。類似スコアは、ユーザーインターフェース装置、コンピュータ読取り可能記憶媒体、またはローカル若しくはリモートのコンピュータシステムに表示または出力されることが好ましい。

10

20

【0066】

異なる予測因子があるときの類似スコアの古典的な算出方法は線形ロジスティック回帰であるが、類似スコアを算出するために用いることができる、統計学のおよびデータマイニングによるさらなる分類方法が当業者に利用可能である。例えば、分類モデルを構築するための統計学的学習方法であるサポートベクターマシンが一つの非制限的な例である (クリスティアニーニ (Cristianini) ら、「サポートベクターマシンとその他のカーネルに基づく学習方法 (An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-based Learning Methods)」、2000年、ケンブリッジ大学出版。バプニク (Vapnik) 「統計学的学習方法の本質 (Nature of Statistical Learning Theory)」、1995年、ニューヨークスプリングー社。チャン (Zhang) ら、BMC バイオインフォマティクス、7、197 (2006年))。

30

【0067】

本発明の方法において、参照タンパク質レベルは、酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) タンパク質測定法等の、抗体またはアプタマーに基づくタンパク質量測定法のために設定された、標準化された絶対的なタンパク質レベル値であることがより好ましい。このようなタンパク質レベル値は、ABMRを有するか、患っているか、経験している同種移植片レシピエントの試料におけるタンパク質レベルと、ABMRを有しないか、患っていないか、経験していない (非ABMR) が、代わりに例えばTCMRを有するか、患っているか、経験している同種移植片レシピエントの試料におけるタンパク質レベルとの区別を可能にする閾値として機能する。

40

【0068】

本発明の分類方法において、同種移植片レシピエントがABMRを有しないか、経験していないと分類される場合、当該レシピエントは、健康若しくは正常な同種移植片、またはTC

50

MRの移植片拒絶反応表現型に関連した同種移植片を有すると分類することが好ましい。

【0069】

本明細書で用いられる「非ABMR」は、(i)健康または正常であって、そのため拒絶反応の兆候を示さない同種移植片、および(ii)ABMRでなく、代わりに、TCMR、ポリオーマウィルス関連腎症(PVAN)、間質性線維症および尿細管萎縮(IFTA)、糸球体腎炎(GNF)またはこれらの組合せ等の移植片拒絶反応表現型に関連する同種移植片を含んで指す。

【0070】

さらに、本発明の方法は、同種移植片レシピエントに治療法を割り当てる工程を備え、当該レシピエントがABMRを有するか、患っているか、または経験していると分類される場合、下記のABMRに対する標準治療治療剤が治療法として割り当てられる。本発明による割り当て方法に関しても、対応する工程を行うことができる。代替的に、当該レシピエントがABMRを有しないか、患っていないか、経験していない場合、潜在する非ABMR表現型を同定するためのさらなる分類またはクラス分けを行うことができる。本発明による割り当て方法に関しても、対応する工程を行うことができる。

10

【0071】

加えて、本発明の方法は、 - 同種移植片レシピエントの血清試料における血清クレアチニンレベルを測定する工程、 - 好ましくは静脈注射により(i)イヌリン、(ii)シニストリン等のイヌリンアナログ、または(iii)51Cr-EDTA若しくは99mTc-DTPA等の糸球体ろ過率の導出に用いられる放射性物質を、同種移植片レシピエントの血流に注入しその除去を測定することにより、糸球体ろ過率を導出する工程、および/または、尿試験紙検査を行うか、ヒト血清アルブミン(HSA)レベルを液晶を用いて導出し、このようなHSAレベルを参照値と比較することにより、同種移植レシピエントの尿試料のタンパク尿を検査する工程をさらに備えることができる。

20

【0072】

代替的に、本発明がさらに提供する、ヒト被検者の試料におけるタンパク質レベルの測定方法は、

- ヒト被検者からのタンパク質を含む試料、好ましくはヒト同種移植レシピエントからの試料を用意する工程と、
- 前記試料における、好ましくは図1のリストに記載された、TF、SERPINA1、APOA4、AFM、AZGP1、ORM1、ORM2、C3、A1BG、SERPINC1、LRG1、IGHA1、IGHG4、TFAP2C、HPX、A2M、CARD6、SERPINA7、CCDC73、CYSTM1およびAPOA1からなる群から選択される少なくとも1つまたは少なくとも2つの遺伝子、特に少なくとも2つの遺伝子についてのタンパク質レベルを測定する工程とを含む。

30

【0073】

本文書において試料を用意する工程およびタンパク質レベルを測定する工程に関連して記載された実施態様は、本明細書に記載される試料におけるタンパク質レベルの測定方法における実施態様でもある。

【0074】

加えて、本発明のタンパク質レベルの測定方法は、 - 同種移植片レシピエントの血清試料における血清クレアチニンレベルを測定する工程、 - 好ましくは静脈注射により(i)イヌリン、(ii)シニストリン等のイヌリンアナログ、または(iii)51Cr-EDTA若しくは99mTc-DTPA等の糸球体ろ過率の導出に用いられる放射性物質を、同種移植片レシピエントの血流に注入しその除去を測定することにより、糸球体ろ過率を導出する工程、ならびに/または、尿試験紙検査を行うか、および/またはヒト血清アルブミン(HSA)レベルを液晶を用いて導出し、このようなHSAレベルを参照値と比較することにより、同種移植レシピエントの尿試料のタンパク尿を検査する工程をさらに備えることができる。

40

【0075】

本発明はさらに、本発明の方法により分類または割り当てされた同種移植片レシピエントへの治療法を提供する。移植片拒絶反応表現型に応じて同種移植片レシピエントを階層化することが可能なため、患者のニーズに合わせた治療を行うことができる。さらに、本

50

願実施例は、古典的な組織学的分析である同種移植片生検によりこれまで同定できなかった新しい患者の群が同定され、個別化治療に供することができることを示している。

【0076】

その点において、本発明は、ABMRに関連した移植片拒絶反応を患うまたは経験している同種移植片レシピエントの処置に用いるための標準治療治療剤を提供し、(i)前記レシピエント若しくはその試料が、本発明の分類方法によりABMRを有するまたは経ていると分類されるか、または、前記レシピエント若しくはその試料が、本発明による割り当て方法によりABMR群に割り当てられている。

【0077】

本明細書で用いられる「標準治療治療剤」の語は、医師により、特定の種類の患者、病
10
気、または移植片拒絶反応等の臨床的な状況において、適切で、受け入れられ、および/
または広範囲に使用されるものとして考えられている治療用化合物またはこのような化合
物の組合せを指す。移植片拒絶反応を弱める標準治療法が本件技術分野において利用可能
である。ABMRに関連した移植片拒絶反応を患うまたは経験している同種移植片レシピエ
ントの処置に用いるための具体的な標準治療治療剤は、コルチコステロイド、リツキシマブ
、静脈注射用免疫グロブリン(IVIG)製品、ボルテゾミブ、エクリズマブまたはこれらの
組合せを含む。より一般的には、移植片拒絶反応の処置における標準治療治療剤は、シク
ロスポーリン、タクロリムス、ミコフェノール酸、シロリムス、エベロリムス、ベラタセ
プト(belatacept)、パシリキシマブおよび抗胸腺細胞グロブリンを含む。

【0078】

同様に、本発明がさらに提供する、ABMRに関連する移植片拒絶反応を患う同種移植片レ
20
シピエントの処置方法は、- ABMRに関連する移植片拒絶反応を患うかまたは経験してい
る同種移植片レシピエントに治療的に有効な量の標準治療治療剤を投与する工程を含み、
(i)前記レシピエント若しくはその試料がABMRを有する若しくは経ていると、本発明の
分類方法により分類されているか、または、(ii)前記レシピエント若しくはその試料
が、本発明の割り当て方法によりABMR群に割り当てられている。

【0079】

「治療的に有効な量」の語は、特定の薬剤により処置される対象者において所望の効果が
30
得られるのに十分な当該薬剤の量を指す。理想的には、薬剤の治療的に有効な量は、対
象者において実質的に細胞毒性を起こさずに、病気または病状を抑制または治療するの
に十分な量である。薬剤の治療的に有効な量は、処置される対象者、苦痛の深刻さ、および
治療剤の投与方法に依存し得る。治療的に有効な投与方式を決定することは、技能を持つ
実践者の知識および能力の範囲内である。

【0080】

本明細書で用いられる「投与する」の語は、本件技術分野において当業者に知られてい
40
る様々な方法およびデリバリーシステムのうち任意のものを用いて、薬剤または治療用化
合物を同種移植片レシピエント患者に物理的に導入することを指す。当業者は、適切な投
与の方法と投与形式を分かっている。小分子の投与は経口および経腸投与等の、非経口で
ない投与により一般的に行われ得る。抗体等のタンパク質に基づく薬剤の好ましい投与の
ルートは、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄、または他のとりわけ溶液の形式での注
射若しくは注入による非経口投与を含む非経口投与による。投与は、例えば、1回、複数
回、および/または1度若しくは長期間にわたって行うことができる。

【0081】

同様に、本発明がさらに提供する、ABMRに関連する移植片拒絶反応を患う同種移植片レ
50
シピエントの処置のため薬剤の製造における標準治療治療剤の使用では、(i)前記レシ
ピエント若しくはその試料がABMRを有する若しくは経ていると、本発明の分類方法により
分類されているか、または、(ii)前記レシピエント若しくはその試料が、本発明の割
り当て方法によりABMR群に割り当てられている。

【0082】

ABMRに関連する移植片拒絶反応を処置するための医学的方法では、標準治療治療剤は、

10

20

30

40

50

コルチコステロイド、リツキシマブ、静脈注射用免疫グロブリン（IVIG）製品、ボルテゾミブ、エクリズマブおよびこれらの組合せからなる群から選択され、前記治療剤は治療的に有効な投薬方式により投与するためのものであることが好ましい。前記標準治療治療剤はボルテゾミブ、エクリズマブまたはリツキシマブであることがより好ましい。

【0083】

明確で簡潔な説明のために、各特徴は、本明細書において同一または分離された態様およびその好適な実施形態の一部として説明されるが、本発明の範囲は説明された各特徴の全てまたはいくつかの組合せを有する実施態様を含み得ることが理解される。

【0084】

本明細書で参照される文書の内容は、参照として組み込まれる。

10

【0085】

本発明は、以下の図の説明文と実施例により説明され、これらは説明により提供されるものであって制限的なものではなく、また記載された方法および示された量についての多くの変形は、本発明の趣旨および添付される特許請求の範囲から逸脱することなく行われることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】同種腎移植片レシピエントにおいてABMRと非ABMRと分離するためのバイオマーカーのリストである。ケースコントロール設定において工程1および2（トレーニング群（training cohort））におけるABMRと非ABMRとを分離する上位21の選択された上方調節タンパク質である。緑色（灰色）で選択された6つのタンパク質は、2つのユニークなペプチド（表1参照）が使用されて統計学的SVMモデルをトレーニングおよび検証したタンパク質である（実施例1）。AMBRケースでは、全ての21のタンパク質は上方調節される（log2で示される最小の増加率（fold change）は、工程1または2において0.8である）。

20

【図2】検証データセットのROCカーブである。腎臓の同種移植片を受容した患者を含む検証群（validation cohort）（N=240）において、バイオマーカーとして、図1のリストに記載の12ペプチドの形式で検出された6つのタンパク質を採用して得られた受信者動作特性（ROC）カーブである。

【図3】研究の概略であり、トレーニング群（工程1および2）および検証群を示す。

【図4】トレーニングデータセットのROCカーブである。トレーニングセット（実施例2）におけるタンパク質バイオマーカーの診断の正確性である。トレーニングセット（N=249、図4）について10タンパク質（表4）の完全モデル（full model）の受信者動作特性（ROC）カーブが示されている。トレーニングデータセットにおいて、10タンパク質の完全モデルは98%のAUCを有した。

30

【図5】検証データセットのROCカーブである。検証セット（実施例2）におけるタンパク質バイオマーカーの診断の正確性である。検証セット（N=391、図5）について10タンパク質（表4）の完全モデルの受信者動作特性（ROC）カーブが示されている。検証データセットにおいて、10タンパク質の完全モデルは88%のAUCを有した。

【図6】表5の2つのランダムなタンパク質のクラス分けである。ABMRクラス分けを行うのに必要な表5のランダムなタンパク質の数である。

40

【発明を実施するための形態】

【0087】

実施例

【実施例1】

【0088】

抗体関連型腎臓同種移植片拒絶と、他の腎臓の同種移植片拒絶反応表現型とを分離するバイオマーカーのトレーニングと検証

【0089】

器具・材料および方法（Materials and Methods）

調査対象母集団

50

我々は、他施設共同の後ろ向き調査を行った。4つの欧州臨床センター（ルーヴェン大学病院、パリのネッカー、CHUリモージュおよびハノーファーメディカルスクール）において、文書にてインフォームドコンセントを行った、腎臓の同種移植片を受容した患者が含まれた。プロトコル生検（protocol biopsy）または適応生検（indication biopsy）が行われ、尿試料が収集された。このプロテオミクス研究において、尿試料のみが分析に用いられた。生検は現地または中央の病理医が読み取り、全ての試料を、正常（NL）、抗体関連型拒絶（ABMR）、T細胞関連型拒絶（TCMR）および間質性線維症および尿細管萎縮（IFTA）の4つの異なる表現型にクラス分けした。これらの表現型の組合せも可能とした。

【0090】

研究計画の概要

本研究は概略的に3つの工程に分けることができる。工程1では、130人の腎臓の同種移植片レシピエントの尿試料が分析され、工程2では、133人の腎臓の同種移植片レシピエントの尿試料が分析された。工程1および2は、診断に用いるABMRバイオマーカーとしての使用のための異なって発現されるタンパク質の同定、およびトレーニング、に関連する。工程3は複数のバイオマーカーの独立した検証に関連し、当該工程では、腎臓の同種移植片レシピエントの240の試料について、バイオマーカーの診断能力が試験された。

【0091】

尿の収集

尿試料は、上記4つの異なる臨床センターで収集された。排尿後すぐの尿試料、特に2回目の排尿を、朝、生検を採取する前に収集した。尿クレアチニン、ヘモグロビン、白血球、グルコースおよびタンパク質含有量を、現地で尿試験紙検査を用いて測定した。収集から2時間以内に、尿試料は2000g、4℃で20分間遠心分離され、細胞残屑および細胞円柱を除去した。上清は分析センターへと発送されるまで-20℃で保管された。到着後、試料は-80℃で保管された。工程を通じて、試料は24試料のバッチに無作為化され、全てのバッチに各臨床センターからの全ての異なる表現型の試料が含まれるように考慮された。

【0092】

試料の調製

Pierce（商標）BCAプロテインアッセイキット（サーモサイエンティフィック）を用いた最初の濃度決定の後、10kDa分子量カットオフ膜（メルクミリポア）を用い、アミコン（Amicon）ウルトラ-0.5遠心分離フィルタユニット上で2mgのタンパク質を処理した。濃縮された試料のタンパク質濃度は再度同様のBCAプロテインアッセイを用いて決定された。その後、Pierce（商標）脱アルブミンキット（サーモサイエンティフィック）のスピンカラム上に100μgのタンパク質を投入し、試料からヒトアルブミンを除去した。脱アルブミン化の後、タンパク質濃度が最後に決定された。20μgのタンパク質が0.1%ラビジェスト（RapiGest（商標）SF、ウォーターズ（Waters））中で変性された。変性後、200mM TCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン、サーモサイエンティフィック）2μlを加え、試料を55℃で1時間インキュベーションすることによりタンパク質の還元を行った。その後、375mM IAA（ヨードアセトアミド、サーモサイエンティフィック）2μlを加え、暗中室温で30分間、試料のアルキル化を行った。タンパク質を沈殿させるため、予め冷却したアセトン1mlを加え、-20℃、オーバーナイトでインキュベーションした。遠心分離工程（10000g、15分、4℃）の後、タンパク質の沈殿物を200mM TEAB（重炭酸トリエチルアンモニウム、シグマアルドリッチ）20μlに再懸濁させた。トリプシン（トリプシンゴールド、質量分析グレード、プロメガ）1μgを加え、37℃でオーバーナイトでインキュベーションしてタンパク質を消化した。HClを最終濃度が200mMになるように加え（30分、室温）、消化を停止させてラビジェストを加水分解した。遠心分離工程（10000g、15分、4℃）の後、沈殿物が除去され、試料は、2%アセトニトリル、0.1%ギ酸により、最終濃度が0.2μg/μlとなるように希釈した。全ての試料に4fmol/μl GFP（[Glu1]-フィブリノペプチドB、ヒト、シグマアルドリッチ）を添加した。

【0093】

ナノ逆相液体クロマトグラフィおよび質量分析

LCカラムに、20 fmolのGFPが添加された、総量で1 μ gのペプチド混合物を投入した。トリプシンの消化で生じたペプチド混合物を、ACQUITY UPLC ペプチドBEH C18ナノACQUITYカラム(100 μ m x 100 mm、ウォーターズ)と連結したナノACQUITY UPLCシンメトリーC18トラップカラム(180 μ m x 20 mm、ウォーターズ)を用いたナノアクイティウルトラパフォーマンスLCシステム(ウォーターズ)で分析した。68分かけて移動相B(98% アセトニトリル、0.1% ギ酸、pH=2)を線形のグラジエントで5%から45%とし、その後、移動相Bを3分間で90%まで急増させた。流速は400 nl/minに設定した。ナノLCは、ナノスプレーイオン源(サーモサイエンティフィック)を介してLTQ ベロス(Velos)オービトラップ質量分析計(サーモサイエンティフィック)とオンラインで連結させた。

【0094】

10

LTQベロスオービトラップは、MS/MSショットガンモードに設定し、フルMS1プレカーサーキャン(300-2000 m/z、解像度60000)の後、最大10個の最も強度の高いプレカーサーのピークについての、衝突誘起解離(CID)による10のMS2スペクトルを得た。CIDスペクトルは質量分析計のリニアイオントラップにおいて取得した。CIDで用いた、規格化された衝突エネルギーは35%に設定した。データ依存取得では30秒のダイナミックエクスクルージョン(dynamic exclusion)を適用した。

【0095】

品質管理分析

MS/MSの結果(生データ)と、プロテオームディスカバラー(Proteome Discoverer)の結果を品質管理(QC)分析で検査した。QC分析は、各試料について各時点での試料とMS機器の品質を保証するものであるため、系統的に行った。何らかの理由で試料が要求されるQCパラメータを満たさない場合、これらの試料はさらなるデータ分析工程から除いた。

20

【0096】

データ改良過程

各試料について全てのペプチドの量的データを得るため、生MS1データからピーク強度を調べるための組織内ソフトウェアを開発した。すなわち、このソフトウェアツールは、10分の保持時間ウィンドウにおいて、デルタppmが5として生MS1データにおけるm/z値を調べる。このようにして、ほぼ全ての同定されたペプチドからの量的情報を含むデータ行列が取得される。このアルゴリズムはおとり調査(decoy search)を用いることで結果として得られたデータを整頓するとともに、ピーク形状もチェックした。

30

【0097】

モデル構築

工程1と工程2のデータがトレーニングデータとして使用される。工程1データは顕著に異なって発現されたタンパク質を選択するために使用した。工程2データは最初の検証データセットとして使用された。テストされた仮説はABMR対ABMR無し(no ABMR)である。ABMRケースにおいて、有意に上方調節または下方調節されたタンパク質を選択するためにANOVAを用いた。ANOVAは、工程1と工程2の試料の各タンパク質について生成されたデータに独立して適用した。最後に、ABMR0と比較してABMR1において(すなわち、ABMR対ABMR無し)、2つの工程のうち1つの工程で少なくとも0.8(log2倍の変化(fold change))(タンパク質レベルについて)上方調節された上位21タンパク質を選択した(図1)。

40

【0098】

タンパク質が選択されたら、タンパク質ごとに2つのユニークなペプチドを選択した(切断ミス(miscleavage)の無い)(図1)。この選択は、ピークのスコア付けの結果とその標的分析への適応性に基づいて行った。もし最終リストにおけるタンパク質がこれらの基準を満たす2つのペプチドを有しないのであれば、当該タンパク質はモデルから除去された。このようにして、標的プロテオミクスを用い、この研究に続く他の検証工程においてモデルが検証され得る。ユニークなペプチドのみをこのANOVA分析に使用した。工程1および工程2の分析の結果は、以下の表1においてlog2倍の変化およびp値によりリストに示された。

【0099】

50

モデル検証

最後に、独立した検証データセットとなる、工程3の試料から得られた規格化された、改良されたデータに、モデルされたサポートベクターマシン(SVM)が適用される。ROCカーブが生成され、結果が検査されて個々の患者ごとにプロットされた。

【0100】

結果

ペプチド同定

全てのデータは、プロテオームディスクカバーソフトウェア(バージョン2.1、サーモサイエンティフィック)を用いて、ヒトUniprotデータベースに対して検索を行った。MascotとSequestの両検索エンジンを用いた。以下の検索パラメータを用いた。プレカ-サーマストレランス 10ppm、フラグメントマストレランス 0.5Da。切断酵素としてトリプシンを選び、2つの切断のミスまで許容した。カルバミドメチル化(carbamidomethylation)を、システインの固定された修飾として設定し、メチオニンの酸化、ならびに、セリン、チロシンおよびスレオニンのリン酸化を可変の修飾として設定した。結果として得たペプチド同定結果は以下の設定を用いてフィルターした。標的-おとりアプローチに基づく誤発見率(False Discovery Rate)(FDR)<5%の高信頼性のもの、および第一にランクされた(first ranked)ペプチドのみを含ませ、図1に示されたタンパク質を得た。

10

【0101】

代替的な実験設定では、図1のリストに記載された遺伝子の発現産物は、当該発現産物がmRNA(データは示さず)のときは、ABMRと非ABMR表現型の区別を提供しないことが確認された。

20

【0102】

統計学的分析 - モデル構築

工程1および工程2で得られたデータに、ANOVAを適用し、結果をp値によりリストにした。上位21の選択されたタンパク質を図1に示す。標的分析においても利用できるタンパク質あたりの高信頼性同定を用いて、2つのユニークなペプチドを選択した。このようなユニークなペプチドがリスト上のタンパク質について利用可能でない場合、当該タンパク質はモデルにおいて使用しなかった。このようにして、我々の最終モデルは、6つのタンパク質からの12のペプチドを含んだ。選択されたペプチドは以下の表1に示す。生検の結果は、我々の分析において「結果変数(outcome variable)」として考慮した。12の選

30

【0103】

【表 1】

遺伝子ID	タンパク質 アクセシビリティ 番号	置列	工程 1 増加率 (foldchange)	工程 2 増加率 (foldchange)	工程 1 p値	工程 2 p値	置列番号 (SEQ ID)
SERPINC1	P01008	EQLQDMGLVDLFSPEK	1.23	1.58	0.00257	0.00007	1
SERPINC1	P01008	VAEGTQVLELPFK	1.40	1.64	0.17546	0.00013	2
SERPINA1	P01009	LSITGTYDLK	1.30	1.63	0.00027	0.00039	3
SERPINA1	P01009	SVLGQLGITK	1.26	1.36	0.00017	0.00012	4
IGHA1	P01876	DASGVFTWTPSSGK	1.14	1.71	0.00081	0.00006	5
IGHA1	P01876	TFTcTAAYPEsk	0.86	2.01	0.00145	0.00002	6
TF	P02787	cSTSSLLLEAcTFR	1.94	3.00	0.00001	0.00000	7
TF	P02787	DSGFQMNQLR	1.54	2.11	0.00018	0.00002	8
A1BG	P04217	ATWSGAVLAGR	1.97	1.30	0.00002	0.02962	9
A1BG	P04217	cEGPIPVDVTFELLR	1.91	1.96	0.00003	0.01734	10
AFM	P43652	AESPEVcFNEESPK	1.54	1.66	0.00153	0.00001	11
AFM	P43652	FTDSENvcqER	1.34	1.71	0.00076	0.00001	12

表 1 SVMモデルのトレーニングに用いた、選択されたタンパク質ペプチドのリスト

10

20

30

40

【表 2】

		生検診断		
		ABMR無し	ABMR	
モデル 分類	ABMR 無し	160	13	173
	ABMR	29	47	76
		189	60	249

10

感度= 84.7 %

特異度= 78.3 %

表2 トレーニングデータセットの分割表

【0105】

表2に、生検での結果と比較した、モデルを用いた試料のクラス分けの概要を示す。生検の結果でABMRの診断となったケースのうち、おおよそ30%においてモデルは異なる診断をしており、一方、ABMR0（すなわちABMR無し）に関し、モデルはABMR0のケースの15%しか異なる診断をしていないため、ABMRの診断について、モデルは病理医の決定よりも控えめに行っていると考えられる。しかし、この15%は、組織学において拒絶反応の何らかの兆候が示される前に、ABMRの兆候をピックアップできた可能性があるから、重要なケースである。ABMRを診断する場合には、当該モデルは、病理医がより正確な診断を行うための助けとなると考えられる。

20

【0106】

統計学的分析 - モデルの検証

工程1および2のデータをトレーニングデータセットとして用い、SVMモデルを不変とした。こうして工程3の試料を完全に独立した検証データセットとして用いた。検証は、以前に腎臓の同種移植片を受容した独立した患者の大規模コホート（240）について行った。

30

【0107】

試料の77%は正しくクラス分けされた。カットオフ点を固定したあと、感度79.1%、特異度70.3%が取得された（表3参照）。

【0108】

【表 3】

検証データ

		カットオフ=0.75		
		生検診断		
		ABMR	無し	
モデル分類	ABMR			
	無し	117	11	128
	ABMR	31	26	57
		148	37	185

10

感度= 79.1 %

特異度= 70.3 %

20

表3 検証データセットの分割表

【実施例 2】

【0109】

本実施例は、実施例 1 を土台としている。

【0110】

追加の同種腎移植片レシピエントが本研究に含められた。試料の調製とタンパク質発現レベル測定は、実施例 1 に示したものと同様である。

【0111】

トレーニングデータセットは、249人の腎臓の同種移植片レシピエントについて表しており、検証データセットは391人の腎臓の同種移植片レシピエントについて表している。本研究に含まれる全ての生検は、元々のセンターから独立した中央の病理医が、ブラインドで検査および等級分けを行った。研究の概要は、図 3 に提供される。

30

【0112】

結果

トレーニングセットにおいて、60/249ケースはABMR(24.1%)を示し、検証セットにおいて、43/391(11.0%)がABMRを示した。

【0113】

実施例 1 の結果は、患者集団を広げた場合も達成された。

【0114】

その後、実施例 1 と同様に、10のタンパク質 (A1BG、AFM、APOA1、APOA4、IGHA1、IGHG4、LRG1、SERPINA1、SERPINC1およびTF) に基づき、1タンパク質当たり2つのユニークなペプチドを選択することにより診断モデルを構築した。この20ペプチドの組は、以下の表 4 に示される。

40

【0115】

【表 4】

遺伝子ID	ペプチド	配列番号 (SEQ ID)
A1BG	ATWSGAVLAGR	9
A1BG	cEGPIPDVTFELLR	10
AFM	AESPEVcFNEESPK	11
AFM	FTDSENVcQER	12
APOA1	DLATVYVDVLK	13
APOA1	DYVSQFEGSALGK	14
APOA4	ISASAEELR	15
APOA4	SLAELGGHLDQQVEEFR	16
IGHA1	DASGVTFTWTPSSGK	5
IGHA1	TFTcTAAYPESK	6
IGHG4	TTPPVLDSDGSFFLYSR	17
IGHG4	YGPPcPScPAPEFLGGPSVFLFPPKPK	18
LRG1	ALGHLDLsgNR	19
LRG1	DLLLQPDLR	20
SERPINA1	LSITGTYDLK	3
SERPINA1	SVLGQLGITK	4
SERPINC1	ADGEScSASMMYQEGK	21
SERPINC1	IEDGFSLK	22
TF	cSTSSLLEAcTFR	7
TF	DSGFQMNQLR	8

表 4: トレーニングセットにおいてSVMモデルをトレーニングするため使用された、
選択されたペプチドのリスト

【 0 1 1 6 】

上記10の遺伝子のそれぞれの診断能力を表 5 に示す。

【 0 1 1 7 】

【表 5】

遺伝子ID	ユニプロット(Uniprot) タンパク質アクセッション	同定されたペプチドの総数	同定されたユニークな ペプチドの総数	トレーニングデータセットの log2増加率(log2 fold change)の中央値	トレーニングデータセットにおける FDRにより修正されたp値	PSMにマッチする、 ペプチドスペースの最大数	最大配列カバレッジ(coverage)
A1BG	P04217	12	4	1.13	0.01093	227	54.14
AFM	P43652	14	14	1.00	0.00005	55	37.06
APOA1	P02647	16	3	0.61	0.04509	54	60.30
APOA4	P06727	21	21	0.60	0.00005	148	70.20
IGHA1	P01876	12	4	0.87	0.00030	79	68.84
IGHG4	P01861	2	2	0.78	0.00757	50	39.45
LRG1	P02750	9	9	0.68	0.00000	86	44.96
SERPINA1	P01009	24	18	1.29	0.00000	1057	71.29
SERPINC1	P01008	9	7	0.86	0.00022	35	44.61
TF	P02787	53	31	1.37	0.00000	1420	82.38

表5 トレーニングデータセットにおいてABMRと非ABMRとを区別する10タンパク質のリスト

【0118】

各タンパク質が2つのペプチドで示される、この10のタンパク質の組は、図1から選択される10のランダムなタンパク質の良い代表と考えられる。当該10タンパク質モデルのROCカーブを、図4(トレーニングデータセット)および図5(検証データセット)に示す。カットオフ点を0.3に固定した後、このモデルは感度95%、特異度96%に達した。さらに、10タンパク質モデルの診断能力を、上記10タンパク質の組の6のランダムなタンパク質についてのものと共に取得して示した(表6および7)。

【0119】

10

20

30

【表 6】

モデル名	モデルの説明	モデルに含まれるタンパク質										
		AIBG	AFM	APOA1	APOA4	IGHA1	IGHG4	LRG1	SERPINA1	SERPINC1	TF	
モデル 10	全10タンパク質	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
モデル 6A	6タンパク質の第1の組	X		X	X	X				X		X
モデル 6B	6タンパク質の第2の組	X			X	X		X	X			X
モデル 6C	6タンパク質の第3の組	X		X	X			X	X			X

表6 モデルに含まれるタンパク質の異なる組

【 0 1 2 0 】

【表 7】

モデル名	TP	TN	FP	FN	感度	特異度	PPV	NPV
トレーニングセット								
モデル 10	57	182	7	3	0.95	0.96	0.89	0.98
モデル 6A	57	179	10	3	0.95	0.95	0.85	0.98
モデル 6B	57	178	11	3	0.95	0.94	0.84	0.98
モデル 6C	57	178	11	3	0.95	0.94	0.84	0.98
検証セット								
モデル 10	41	263	85	2	0.95	0.76	0.33	0.99
モデル 6A	36	243	105	7	0.84	0.70	0.26	0.97
モデル 6B	36	241	107	7	0.84	0.69	0.25	0.97
モデル 6C	40	243	105	3	0.93	0.70	0.28	0.99

表7 トレーニングデータセットと検証データセットに対してフィッティングした、4つのモデル全ての結果 TP: 真陽性、TN: 真陰性、FP: 偽陽性、FN: 偽陰性、PPV: 陽性的中率、NPV: 陰性的中率

【 0 1 2 1 】

最後に、上記10タンパク質の組の少なくとも2つのランダムなタンパク質の診断能力を

10

20

30

40

50

図 6 に示す。予測しなかったことに、上記10の組の少なくとも2つのランダムなタンパク質でも、すでにABMRとの相関が87%を超えていたことが示された。6タンパク質の場合ですでに、診断能力のプラトーに達していたことが示されている。

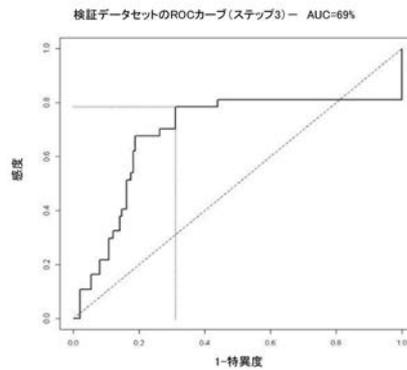
【 図 1 】

タンパク質 アラセプション	遺伝子 ID	工程 1 ΔF値の値数	中央値 増大率 (fold change)	工程 1 P 値	工程 1 FDR 修正 P 値	工程 2 ΔF値の値数	中央値 増大率 (fold change)	工程 2 P 値	工程 2 FDR 修正 P 値	LDCP 出力値	ANOVA	工程 2 P 値
P02787	IT	85	1.30	0.00000	0.00000	100	1.30	0.00000	0.00000	10.00000	10.0	1.0
P02806	SERPINA1	44	1.11	0.00000	0.00000	54	1.24	0.00000	0.00000	10.00000	20.0	2.0
P06727	AFM44	43	0.92	0.00000	0.00001	52	1.49	0.00001	0.00000	4.0	4.0	0.0
P43642	AFM	25	1.14	0.00000	0.00079	31	1.17	0.00000	0.00000	8.0	8.0	0.0
P25111	AZGP1	17	0.82	0.00000	0.00112	20	1.01	0.00000	0.00001	9.0	9.0	0.0
P02763	ORM1	18	0.66	0.00000	0.00178	25	0.94	0.00000	0.00000	9.0	9.0	0.0
P19632	ORM2	22	0.82	0.00000	0.00000	27	1.00	0.00000	0.00014	9.8	9.8	0.0
P02024	CI	42	0.27	0.00001	0.00136	42	0.85	0.00000	0.00000	12.5	12.5	0.0
P04217	IGFBP	9	1.48	0.00000	0.00000	18	1.33	0.00000	0.00000	18.0	18.0	0.0
P02088	SERPINC1	17	0.80	0.00004	0.00114	12	1.61	0.00000	0.00000	18.0	18.0	0.0
P02750	IRG1	16	0.69	0.00001	0.00121	21	0.89	0.00002	0.00142	20.8	20.8	0.0
P02876	SERP1	10	0.81	0.00000	0.00119	14	1.08	0.00000	0.00129	20.0	20.0	0.0
P02861	IGHG4	5	1.36	0.00002	0.00067	8	1.39	0.00000	0.00210	41.5	41.5	0.0
P02754	TFAP2C	1	1.48	0.00046	0.01110	1	1.75	0.00000	0.00140	48.0	48.0	0.0
P02790	MPX	14	0.22	0.00160	0.03770	21	0.84	0.00000	0.00000	50.0	50.0	0.0
P02013	ARM	30	0.17	0.00001	0.01118	24	0.88	0.00000	0.00407	54.5	54.5	0.0
P08869	CARD6	1	1.27	0.00001	0.00109	1	1.63	0.00000	0.04471	64.3	64.3	0.0
P02543	SERPINA7	6	0.67	0.00108	0.02731	9	1.38	0.00000	0.01195	77.5	77.5	0.0
P02866	CCDC13	1	0.73	0.00175	0.06023	1	2.08	0.00000	0.00044	83.3	83.3	0.0
P08157	CYS1MS	1	1.77	0.00000	0.09300	1	1.43	0.00000	0.00773	103.8	103.8	0.0
P02647	AFM41	6	0.37	0.02630	0.22641	8	1.85	0.00000	0.10515	221.5	221.5	0.0

【 図 2 】

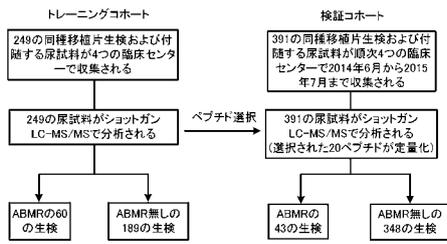
【図2】

【図1】



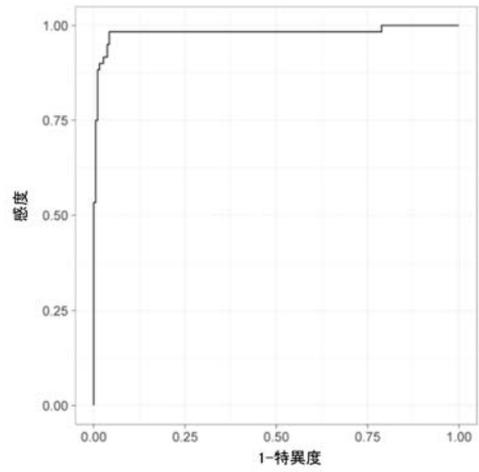
【 図 3 】

【 図3】



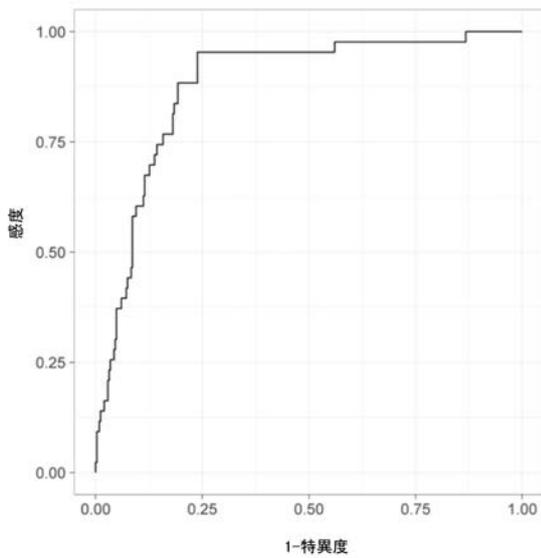
【 図 4 】

【 図4】



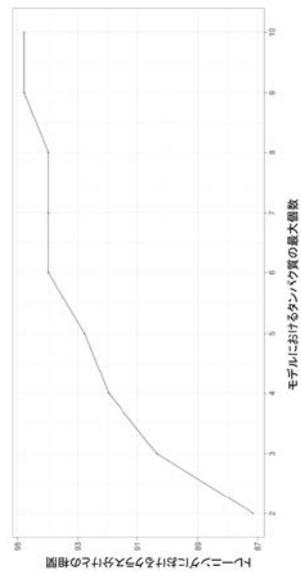
【 図 5 】

【 図5】



【 図 6 】

【 図6】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/097044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 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) 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, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XU-DUBOIS Y.-C. ET AL.: "Markers of endothelial-to-mesenchymal transition: Evidence for antibody-endothelium interaction during antibody-mediated rejection in kidney recipients", J. AM. SOC. NEPHROL., vol. 27, no. 1, 20 May 2015 (2015-05-20), pages 324-332, XP055455475, the whole document	1-16
X	----- WO 2015/157546 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US]) 15 October 2015 (2015-10-15) abstract	1-4,6, 8-16
A	paragraphs [0012], [0035], [0040], [0053] example 1 claim 15 ----- -/--	5,7
<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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 March 2019	02/04/2019	
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 Giry, Murielle	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/097044

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>WO 2009/143624 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA [CA]) 3 December 2009 (2009-12-03) the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>HALLORAN P.F. ET AL.: "Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: An international prospective study (INTERCOM) : Molecular diagnosis of ABMR", AM. J. TRANSPLANT., vol. 13, no. 11, 3 October 2013 (2013-10-03), pages 2865-2874, XP055457647, the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/097044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015157546 A1	15-10-2015	AU 2015243424 A1	27-10-2016
		CA 2944990 A1	15-10-2015
		EP 3129781 A1	15-02-2017
		JP 2017513009 A	25-05-2017
		KR 20160142390 A	12-12-2016
		US 2017030928 A1	02-02-2017
		WO 2015157546 A1	15-10-2015

WO 2009143624 A1	03-12-2009	AU 2009253696 A1	03-12-2009
		CA 2725599 A1	03-12-2009
		CN 102119224 A	06-07-2011
		EP 2297335 A1	23-03-2011
		JP 2011521630 A	28-07-2011
		KR 20110020853 A	03-03-2011
		US 2011189680 A1	04-08-2011
		WO 2009143624 A1	03-12-2009

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 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	X
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 31/69 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
	A 6 1 K 31/69	
	C 1 2 N 15/12	

(81) 指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(71) 出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1

(71) 出願人 520233401
 アペアシュペ - アシスタンス パブリク - オピタル パリ
 フランス 7 5 0 0 4 パリ 3 アヴェニュー ヴィクトリア フィヤード

(71) 出願人 520233412
 ユニヴェルシティ ホスピタル セントル オブ リモージュ
 フランス 8 7 0 4 2 リモージュ 2 アヴェニュー マルタン ルター キング

(71) 出願人 520233423
 メディツィニシェ ホウーシュル ハノーファー
 ドイツ 3 0 6 2 5 ハノーファー カール - ノイベルグ ストラーセ 1

(74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

(74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

(74) 代理人 100084412
 弁理士 永井 冬紀

(74) 代理人 100169018
 弁理士 網屋 美湖

(72) 発明者 メルテンス, インゲ
 ベルギー ベー 2 4 0 0 モル セーオー ブーレタング 2 0 0

(72) 発明者 ウィレムス, ハニー
 ベルギー ベー 2 4 0 0 モル セーオー ブーレタング 2 0 0

(72) 発明者 ネッセン, マーテン
 ベルギー 3 0 0 0 ルーヴェン セーオー アウデ マークト 1 3 - ブス 5 5 0 0

(72) 発明者 マルクエ, ピエール
 フランス 7 5 0 1 3 パリ セーオー 1 0 1, ルー ドゥ トルビアック

(72)発明者 アンゲリチャウ, ダニー

フランス 7 5 0 0 4 パリ 3 アヴェニュー ヴィクトリアセーオー フィヤード

(72)発明者 エシフ, マリー

フランス 8 7 0 4 2 リモージュ セーオー 2 アヴェニュー マルタン ルター キング

(72)発明者 グィンネル, ヴィルフリード

ドイツ 3 0 6 2 5 ハノーファー セーオー カール-ノイベルグ ストラベ 1

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 FA12 GA09 HA01 JA02 LA08

2G045 AA25 CB03

4C084 AA17 MA66 NA14 ZB08

4C085 AA14 AA33 BB11 EE01 GG02

4C086 AA01 AA10 DA10 DA43 MA01 MA04 MA66 NA14 ZB08