

(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2012-513591

(P2012-513591A)

(43) 公表日 平成24年6月14日(2012.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 2	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2011-542564 (P2011-542564)  
 (86) (22) 出願日 平成21年12月22日 (2009.12.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月28日 (2011.7.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/069156  
 (87) 国際公開番号 W02010/075360  
 (87) 国際公開日 平成22年7月1日 (2010.7.1)  
 (31) 優先権主張番号 61/139,936  
 (32) 優先日 平成20年12月22日 (2008.12.22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511136061  
 ザ チルドレンズ リサーチ インスティ  
 テュート  
 アメリカ合衆国 ディストリクト オブ  
 コロンビア ワシントン州 20010  
 エヌダブリュー ミシガン アヴェニュー  
 111  
 (74) 代理人 100096699  
 弁理士 鹿嶋 英貴  
 (72) 発明者 フレイシュタット ロバート ジェフリー  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208  
 54 ポトマック ピッツフィールド コ  
 ート 8408

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症の検出のための方法

(57) 【要約】

本発明は、敗血症及びこの重症度の診断、検出、又は、予後のための方法に関する。より具体的には、この方法は、敗血症のためのマーカーとして、敗血症を有している、あるいは、有している疑いのある個体の血小板中のグランザイムBの存在、又は、量を用いる。(バックグラウンドレベルを超えた) グランザイムBの存在は、敗血症の存在を示し、また、グランザイムBの量は、この病気の重症度と直接的に相関する(濃度がより高いほど、この病気がより重篤である)。

【選択図】 図2

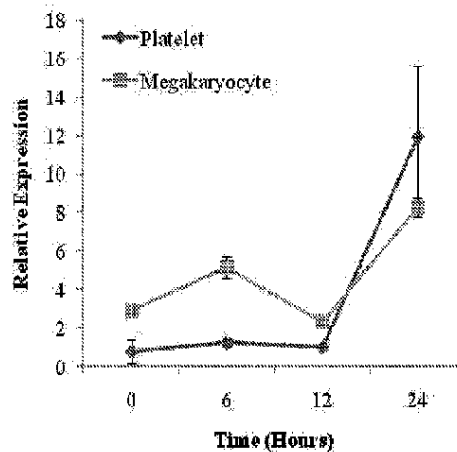


FIGURE 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体における敗血症の進行を検出、診断、又は、モニターする方法であって、該個体の血小板中のグランザイム B の存在を決定するステップを備えることを特徴とする敗血症の進行を検出、分析、又は、モニターする方法。

## 【請求項 2】

該決定するステップは、免疫測定法によって達成されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

該免疫測定法は、E L I S Aであることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

該免疫測定法は、免疫プロット法であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

該決定するステップは、核酸レベルの測定により達成されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

該核酸は、m R N Aであることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 7】

該 m R N A は、グランザイム B をコード化することを特徴とする請求項 6 に記載の方法

20

## 【請求項 8】

該核酸レベルは、ノーザンプロット法によって測定されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 9】

該核酸レベルは、マイクロアレイ分析によって測定されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 10】

該決定するステップは、

グランザイム B と特異的に結合する分子と、該個体からの試料を接触させるステップと

30

、  
該グランザイム B 及び該分子の間の結合の存在を検出するステップと、  
を備えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

該分子は、抗体であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

該抗体は、モノクローナル抗体、及び、ポリクローナル抗体よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

該分子は、標識化されていることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

該標識は、ビオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光、及び、酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

40

## 【請求項 15】

該決定するステップは、

該個体の血小板から m R N A を分離するステップと、

該グランザイム B の m R N A と特異的にハイブリダイズするプローブと、該分離された m R N A を接触させるステップと、

該プローブ、及び、該 m R N A の間の結合の存在を検出するステップと、  
を備えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

50

該プローブは、核酸プローブであることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

該プローブは、オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

該プローブは、標識化されていることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

該標識は、ビオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光、及び、酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

該プローブは、固体の基質に付着していることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 21】

該プローブは、マイクロアレイ上にあることを特徴とする請求項 15 の方法。

【請求項 22】

敗血症の個体の治療をモニターする方法であって、  
敗血症を治療するための組成物を該個体に投与するステップと、  
該個体の血小板中のグランザイム B の存在を決定するステップと、  
を備えることを特徴とする敗血症の個体の治療をモニターする方法。

【請求項 23】

該決定するステップは、免疫測定法によって達成されることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

該免疫測定法は、ELISAであることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

該免疫測定法は、免疫プロット法であることを特徴とする請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

該決定するステップは、核酸レベルの測定により達成されることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

該核酸は、mRNAであることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

該 mRNA は、グランザイム B をコード化することを特徴とする請求項 27 の方法。

30

【請求項 29】

該核酸レベルは、ノーザンプロット法によって測定されることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

該核酸レベルは、マイクロアレイ分析によって測定されることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 31】

該決定するステップは、  
特異的にグランザイム B を結合する分子と、個体の血清を接触させるステップと、  
該グランザイム B 及び該分子の間の結合の存在を検出するステップと、  
を備えることを特徴とする請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 32】

該分子は、抗体であることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

該抗体は、モノクローナル抗体、及び、ポリクローナル抗体よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

該分子は、標識化されていることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

50

該標識は、ビオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光、及び、酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

該決定するステップは、  
該血小板から mRNA を分離するステップと、  
該グランザイム B の mRNA と特異的にハイブリダイズするプローブと、該分離された mRNA を接触させるステップと、  
該プローブ、及び、該 mRNA の間の結合の存在を検出するステップと、  
を備えることを特徴とする請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

該プローブは、核酸プローブであることを特徴とする請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

該プローブは、オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

該プローブは、標識化されていることを特徴とする請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

該標識は、ビオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光、及び、酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

該プローブは、固体の基質に付着していることを特徴とする請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

該プローブは、マイクロアレイ上にあることを特徴とする請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 3】

該敗血症の進行に対する該組成物への効果を決定するために該個体のグランザイム B の存在を経時的に比較するステップをさらに備えることを特徴とする請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年12月22日出願の米国仮特許出願第61/139,936号に対する優先権を主張するものであり、これは、参照により本明細書に盛り込まれる。

【0002】

本発明は、敗血症及びこの重症度の診断、検出、又は、予後のための方法に関する。より具体的には、本発明は、敗血症のためのマーカーとして、血小板中のグランザイム B の存在、及び、量を用いる。

【背景技術】

【0003】

抗生物質、救命医療、及び、器官サポートモダリティにおける、数十年間の価値ある進歩にもかかわらず（ホッチキスら（Hotchkiss et al.）, N Engl J Med, 348:138-150, 2003、及び、ラッセル（Russell）, N Engl J Med 355:1699-1713, 2006）、敗血症による死亡率は、約40%と概ね変わらなかった（アンガスら（Angus et al.）, Crit Care Med 29:1303-1310, 2001）。事実、敗血症は、米国において毎年215,000人の死亡原因である。これは、急性心筋梗塞による死亡率と類似しており（アンガスら（Angus et al.）, 2001）、これを10番目の主要な死亡原因にしている（コチャネックら（Kochanek et al.）, Natl Vital Stat Rep 52:1-47, 2004）。最近のパラダイムシフトは、敗血症関連の死亡が、深刻なリンパ球アポトーシスに付随して起こる免疫不全に一部起因することを示す（ホッチキスら（Hotchkiss et al.）, Nat Rev Immunol 6:813-822, 2006）。実際、このアポ

10

20

30

40

50

トーシスは、進行性の敗血症、及び、多臓器機能不全の診断上の特徴と考えられる。しかしながら、アポトーシスの病因は不明である。

【0004】

敗血症は、感染症によって引き起こされた全身の炎症性の状態によって特徴づけられる。全身性の炎症では、敗血症の場合で見られるように、炎症特異反応カスケードが、無制御な方法で全身に広がり、過度の免疫反応を背景に生死にかかわるようになる。敗血症のための最新の定義は、レヴィーら (Levy et al.) (Critical Care Medicine 31(4):1250-1256, 2003) が発表した。

【0005】

炎症過程は、多くの物質（これらは、主にタンパク質性、あるいは、ペプチド性である）によって制御される、もしくは、一定の生体分子の発生を伴う。炎症反応に關与する内因性の物質は、特に、サイトカイン、メディエータ、血管刺激物質、急性期タンパク質、及び/又は、ホルモン調整物質を含む。炎症反応は、炎症過程を活性化する内因性の物質（例えば、TNF- $\alpha$ ）、及び、非活性化する物質（例えば、インターロイキン10）の両方を含む複雑な生理的反應である。内因性の炎症特異的物質の個々のグループの発生、及び、可能性のある役割についての現在の知識は、例えば、ベイスハイゼンら (Beishuizen et al.) (Advances in Clinical Chemistry 33:55-131, 1999)、及び、ギャベイら (Gabay et al.) (The New England Journal of Medicine 340(6):448-454, 1999, 448-454) 中に開示される。最近の文献は、敗血症関連の免疫不全が、深刻なリンパ球アポトーシスの原因であることを示す (ホッチキスら (Hotchkiss et al.) 2003、ラッセル (Russell) 2006、ホッチキスら (Hotchkiss et al.), Scand J Infect Dis. 35(9):585-592, 2003、グローズドンクら (Groesdonk et al.), J Immunol. 179(12):8083-8089, 2007、ホッチキスら (Hotchkiss et al.), J Immunol. 174(8):5110-5118, 2005、及び、ウェッシュラ (Wesche et al.), J Leukoc Biol. 78(2):325-37, 2005)。また、脾臓、肺、及び、腸のような他の末端器官において、アポトーシスがよく見られる (クラウサーら (Crouser et al.), Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161(5):1705-1712, 2000)。実際、このアポトーシスは、進行性の敗血症の診断上の特徴と考えられる。

【0006】

診断目的のためには、炎症過程に關連する内因性の物質の複雑なカスケードにおいて、この役割を知る必要がない、各バイオマーカーと疾患との信頼できる相関関係が、最重要である。ボユオン (Bohuan) の米国特許第5,639,617号は、敗血症のマーカーとして、ペプチドであるプロカルシトニンを開示する。ベルクマンら (Bergmann et al.) の米国特許第6,756,483号は、炎症過程そして敗血症に積極的に關与する形態として、完全プロカルシトニンペプチドのアミノ酸3-116を含む、短くされたプロカルシトニンを開示する。

【0007】

敗血症のための他のマーカーは、カルバモイルリン酸シンターゼ1 (CPS1) 又はそのN末端フラグメント (米国特許第7,413,850号) と、CD25、CD11c、CD33、及び、CD66bの白血球 (米国特許第5,830,679号) と、3-クロロチロシン又は3-プロモチロシン (米国特許第6,939,716号) と、そして、C5aR (米国特許第7,455,837号) とを含む。

【0008】

敗血症、あるいは、敗血症疑いのある多くの患者が、24~48時間の期間にわたる急速な衰えを示す。従って、診断、及び、治療送達の迅速な方法が、効果的な患者のケアに

10

20

30

40

50

として不可欠である。敗血症と診断し、かつ、治療することができる薬剤の必要性が依然としてあることは疑いもない。

【発明の概要】

【0009】

敗血症の研究は、脾臓、及び、他の末端器官における血小板の蓄積を実証している（シバザキら（Shibazaki et al.）, *Infect Immun* 64:5290-5294, 1996、及び、ドレークら（Drake et al.）, *Am J Pathol* 142:1458-1470, 1993）。さらに、活性化された血小板に由来する微粒子には、血管内皮（アゼヴェードら（Azevedo et al.）, *Endocr Metab Immune Disord Drug Target* 6:159-164, 2006、ガンピンら（Gambim et al.）, *Crit Care* 11:R107, 2007、及び、ヤニシェフスキーら（Janiszewski et al.）, *Crit Care Med* 32:818-825, 2004）、及び、平滑筋（ヤニシェフスキーら（Janiszewski et al.）, 2004）への細胞傷害活性を有する。しかしながら、血小板は無核で、骨髄に存在する巨核球によって与えられた細胞質成分のみを有し、デノボ遺伝子転写をする能力がない。従って、これらの従来の研究は、血小板機能の変化が転写後のレベルであると仮定した。血小板は、確かにmRNAの蓄積を含む。また、多くの研究は、mRNAプロファイリングを用いて、ヒト血小板のトランスクリプトームを報告している（ラグハバチャリら（Raghavachari et al.）, *Circulation* 115:1551-1562, 2007、ディットリッヒら（Dittrich et al.）, *Thromb Haemost* 95:643-651, 2006、ヒルマンら（Hilman et al.）, *J Thromb Haemost* 4:349-356, 2006、及び、アウエハントら（Ouwehand et al.）, *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:188-195, 2007）。また、血小板が、外部刺激に応じて、これらのトランスクリプトームの翻訳を調節することも確立されている（ウェイリッチら（Weyrich et al.）, *Blood* 109:1975-1983, 2007、ウェイリッチら（Weyrich et al.）, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:5556-5561, 1998、及び、ジーママンら（Zimmerman et al.）, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:s17-24, 2008）。しかしながら、実験的敗血症、又は、臨床的敗血症のような、全身性の刺激の機能に応じて、血小板のmRNAプールで急激な変化を示す研究はない。

【0010】

ゲノム規模でのmRNA分析を通じて、本発明者は、グランザイムBが敗血症を有する対象の血小板において上方制御され、また、血小板中のグランザイムBの量が、直接敗血症の重症度に対応することを発見した。従って、本出願は、敗血症の診断、検出、又は、予後のための方法に関する。これは、先行技術の試験より高感度で、かつ、より信頼性がある。

【0011】

本発明は、敗血症の進行を検出、診断、又は、モニターする方法を提供する。この方法は、敗血症を有している、あるいは、有している疑いのある個体の血小板中のグランザイムBの存在、又は、量を決定することを含む。（バックグラウンドレベルを超えた）グランザイムBの存在は、敗血症の存在を示し、また、グランザイムBの量は、この病気の重症度と直接的に相関する（濃度がより高いほど、この病気がより重篤である）。

【0012】

本発明は、敗血症を有している個体の治療をモニターする方法をさらに提供する。この方法は、敗血症で苦しむ個体に薬剤組成物を投与すること、及び、この個体の血小板中のグランザイムBの存在、又は、量を決定することを含む。グランザイムBの量が治療に渡

って減少する場合、この治療は、良好であると考えられる。しかしながら、治療は、グランザイム B の量がバックグラウンドレベルまで減少する、又は、不検出になるまで、継続するべきである。

【0013】

本発明は、敗血症の発症又は進行を調整することができる薬剤のためのスクリーニング方法をさらに提供する。この方法は、敗血症で苦しむ個体をこの薬剤に曝露すること、及び、この個体の血小板中のグランザイム B の存在、又は、量を決定することを含む。この薬剤は、薬剤の投与の際、グランザイム B の量が治療に渡って減少する、もしくは、バックグラウンドレベルにまで低下すれば、敗血症の発症又は進行を調整する能力があると考えられる。

10

【0014】

本発明の実施形態において、グランザイム B の量は、免疫測定法、核酸分析（好ましくは mRNA）、又は、基質分解を用いて、血小板中のグランザイム B 遺伝子産物を検出することによって決定される。本明細書で列挙されるような遺伝子産物は、核酸（DNA 又は RNA）、及び/もしくは、タンパク質であり得る。DNA 及び RNA の場合には、例えば、オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを通じて、検出できる。タンパク質の場合には、例えば、特異的結合反応（例えば、免疫測定法）、及び、基質分解のような様々なタンパク質相互作用を通じて、検出できる。

【0015】

グランザイム B の決定用の試料は、個体から血液を採取することにより得ることができる。一実施形態において、血液試料中の血小板を溶解し、血小板から放出されたグランザイム B を分析することができる。あるいは、例えば、グランザイム B を標的とする免疫染色を用いて血小板を染色し、例えば、この技術分野において公知である血球計算法技術を用いて、染色した細胞を観察することができる。別の実施形態において、グランザイム B は、試料から直接検出することができる。

20

【0016】

本発明の血清試験は、単独で、もしくは、本発明の背景技術において先に開示されたマーカーのような、この技術分野において公知の他の診断法と連動して用いることができる。

【図面の簡単な説明】

30

【0017】

【図1】図1は、包括的な臨床的データ及び検査データの監視なしクラスタ化を介した敗血症重症度の分類を示す。我々の三次治療の小児 ICU に入院した、敗血症と推定診断された小児及び青年（ $n = 17$ ）から、72 時間にわたって集められたデータを、Hierarchical Clustering Explorer（HCE）に入力した。変数入力は、0、24、48、及び、72 時間において、以下を含んだ。温度、心拍数、呼吸数、収縮期動脈血圧、拡張期動脈血圧、及び、平均動脈血圧；グラスゴー昏睡スコア；血液 pH、 $pCO_2$ 、 $O_2$ 、及び、塩基過剰；白血球数；絶対的好中球数、絶対的リンパ球数、及び、絶対的単球数；血液ヘモグロビン、及び、血小板数；プロトロンビン、及び、活性化部分トロンボプラスチン時間；血清ナトリウム、カリウム、塩化物、グルコース、クレアチニン；並びに、血液尿素窒素。これらの表現型間の類似は、クラスタ（これは、より多くの類似を表す、より短い棒で示される）に反映されている。これらの結果は、囲われた枠によって示されたように、敗血症の参加者を重度（ $n = 6$ ）、及び、中程度（ $n = 7$ ）に分類するために用いられた。

40

【0018】

【図2】図2は、血小板グランザイム B の mRNA 発現が、敗血症のマウスにおける巨核球発現を反映することを示す。血小板は転写の機構を有していない。従って、敗血症のマウス（ $n = 12$ ）における血小板グランザイム B の mRNA 発現の変化は、自己由来の巨核球において同時に測定した。この qRT-PCR 分析の結果は、増加する巨核球、及び、血小板グランザイム B の mRNA 発現の間で経時的に良好な相関を示す。

50

## 【 0 0 1 9 】

【図 3】図 3 は、敗血症の小児、及び、健康な小児からの血小板中の細胞内のグランザイム B の発現のフローサイトメトリーによる測定を示す。クエン酸全血は CD 6 1 + 血小板でゲート制御された。健康な小児 ( n = 1 0 )、並びに、入院の後 1 日及び 3 日において、我々が重篤 ( n = 1 )、及び、中程度 ( n = 3 ) と分類した敗血症の小児において、細胞内のグランザイム B を測定した。示されるのは、重篤な疾患を有する小児からの結果であり、アイソタイプコントロールと比較して、1 日目 ( 4 9 . 7 % )、及び、3 日目 ( 4 4 . 3 % ) の両方で、血小板グランザイム B の発現を示す。中程度の敗血症の対象のうちの 1 つだけがいくらかのグランザイム B を発現し、なおかつ、3 日目 ( 2 4 . 0 % ) のみであった。対照小児からの血小板中には、測定可能な細胞内のグランザイム B はなかった。

10

## 【 0 0 2 0 】

【図 4】図 4 は、敗血症のマウスから採取された血小板は、グランザイム B の欠如を除き、対照となる CD 4 + 脾細胞におけるアポトーシスを誘導することを示す。パーセントアポトーシスは、健康かつ野生型のマウス、及び、血小板のない脾細胞からの血小板よりも、敗血症かつ野生型の ( すなわち、C 5 7 B L 6 ) マウスから採取された血小板で共培養された脾細胞において大幅により高かった。敗血症のグランザイム B ヌル ( - / - ) マウス ( すなわち、B 6 . 1 2 9 S 2 - G z m b <sup>t m 1</sup> L e y ) からの血小板を用いた反復実験は、誘導された脾細胞アポトーシスの完全な欠如を示した。これらのいかなる状態下で、組み換え TNF を用いてさらに血小板を活性化しても、リンパ球毒性の能力は変わらなかった。

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 2 1 】

多くの生物学的機能が、転写制御を通じて ( 例えば、開始の制御、RNA 前駆体の提供、RNA プロセシング等を通じて )、及び / 又は、翻訳制御を通じて、様々な遺伝子の発現を改変することにより達成される。例えば、細胞周期、細胞分化、及び、細胞死のような基本的な生物学的プロセスは、多くの場合、個々の遺伝子の発現レベル、又は、一群の遺伝子の発現レベルの変動が特徴である。

## 【 0 0 2 2 】

遺伝子発現における変化は、病因にも関連付けられる。例えば、機能性腫瘍抑圧遺伝子の十分な発現の欠如、及び / 又は、癌遺伝子 / 癌原遺伝子の過発現は、細胞の腫瘍化、又は、過形成の増殖に導くことができた ( マーシャル ( M a r s h a l l ) ( 1 9 9 1 ) C e l l 6 4 : 3 1 3 - 3 2 6、ヴァイルベルク ( W e i r l b e r g ) ( 1 9 9 1 ) , S c i e n c e 2 5 4 : 1 1 3 8 - 1 1 4 6 )。従って、個別の遺伝子、又は、グループの遺伝子 ( 例えば、癌遺伝子、又は、腫瘍抑制因子 ) の発現レベルの変化は、さまざまな疾患の存在及び進行のための指標として役立つ。

30

## 【 0 0 2 3 】

また、遺伝子発現の変化をモニタリングすることで、薬物スクリーニングの開発中に一定の利点を提供し得る。多くの場合、薬物は、これらの薬物が細胞に対して有するに他の効果に関係なく、主要な標的と相互作用する能力に対してスクリーニング、もしくは、プレスクリーニングされる。多くの場合、このような他の効果は、全身動物中の毒性を引き起こし、これが、可能性のある薬物の開発及び使用を妨げる。

40

## 【 0 0 2 4 】

本発明者は、敗血症に関連付けられるマーカーとして、血小板中のグランザイム B を同定している。また、血小板中のグランザイム B の変化は、疾患状態、疾患進行、薬物毒性、薬物効果、及び、薬物代謝をモニターするために用いることができるマーカーと同様に、診断上の使用のための有用なマーカーを提供することができる。具体的には、本発明者は、血小板中のグランザイム B の上方制御、及び、敗血症の存在の間の直接の相関を発見した。存在するグランザイム B の量は、敗血症の重症度と直接相関する。

## 【 0 0 2 5 】

50

#### 診断法としての血小板中のグランザイム B の使用

本明細書で記述されるように、血小板中のグランザイム B は、敗血症の検出、診断、又は、予後のための診断上のマーカーとして用いることができる。例えば、患者からの試料は、本明細書に記載された方法のうち任意の方法によって、又は、当業者に知られる他の方法によって、分析されてもよい。また、血小板中のグランザイム B の発現レベルは、正常な血小板（敗血症を有しない個体の血小板）において発見された発現レベルと、もしくは、グランザイム B のバックグラウンドレベルと、比較されてもよい。正常な個体、又は、病気の個体の血清からの発現レベルに実質上似ている血小板中のグランザイム B の発現レベルは、例えば、疾患診断、及び/又は、予後を助けるために用いられてもよい。血小板中のグランザイム B のレベルの比較は、研究者又は診断医によって行われてもよく、また、コンピュータ及びデータベースを活用して行われてもよい。

10

#### 【0026】

一般的に、血小板中のグランザイム B のバックグラウンド量は検出できない。それ故、好ましくは、少しでもグランザイム B レベルが検出できれば常に、敗血症の存在が指摘される。しかしながら、用いられるアッセイに応じて、診断を適切に行なうために、バックグラウンドのグランザイム B レベルを決定することは重要である。一般的に、血小板の約 40% 以上がグランザイム B を発現する場合に、重症の敗血症が指摘される。血小板の約 20~40% がグランザイム B を発現する場合に、中程度の敗血症が存在する。

#### 【0027】

#### 薬物スクリーニングのための血小板中のグランザイム B の使用

本発明によれば、敗血性の患者の治療に対する候補薬物又は候補薬剤の効果を評価するために、血小板中のグランザイム B のレベルをマーカーとして用いることができる。

20

#### 【0028】

薬物候補を用いて敗血症で苦しむ患者を治療し、この疾患の進行を経時的にモニターする。この方法は、患者を薬剤で治療すること、この患者からの試料周期的に得ること、これらの試料から血小板中のグランザイム B のレベル、又は、量を決定すること、経時的にグランザイム B のレベルを比較して、敗血症の進行に対するこの薬剤の効果を決定することを含む。

#### 【0029】

本発明の候補薬物又は候補薬剤は、炭水化物だけでなく、ペプチド、小分子、ビタミン誘導体であり得るが、これらに限定されない。陰性の主要タンパク質、これらのタンパク質をコード化する DNA、これらのタンパク質の抗体、これらのタンパク質のペプチドフラグメント、又は、これらのタンパク質の模倣体を、機能に影響を与えるために患者へ導入してもよい。本明細書で用いられるような「模倣体」は、化学的に親ペプチドと異なるが、組織分布的に、及び、機能的に親ペプチドと類似する構造を提供するための、ペプチド分子の 1 つの領域、又は、いくつかの領域の変更を表す（グラント（Grant）（1995）, in *Molecular Biology and Biotechnology*, マイヤーズ編（Meyers (editor) VCH Publishers を参照）。当業者は、本発明の候補薬物又は候補薬剤の構造的な性質に関して、限定がないことを容易に認識することができる。

30

40

#### 【0030】

#### 疾患進行をモニターするための血小板中のグランザイム B の使用

また、上述のように、疾患進行（例えば、敗血症の発生）のモニタリングのために、血小板中のグランザイム B の発現をマーカーとして用いることができる。例えば、患者からの試料は、本明細書で記述された任意の方法で分析してもよく、また、血小板中のグランザイム B の発現レベルを、感染していない個体で発見された発現レベルと比較してもよい。この疾患の進行を追跡するため、血小板中のグランザイム B のレベルを経時的にモニターすることができる。本方法は、疾患進行をモニターするのに特に有用である。なぜなら、血小板中のグランザイム B の発現が、この疾患の重症度に比例するためである。グランザイム B の発現レベルの比較は、研究者又は診断医によって行われてもよく、また、コン

50

コンピュータ及びデータベースを活用して行われてもよい。

【0031】

アッセイフォーマット

血小板中のグランザイムBの上方制御は、メッセンジャーリボ核酸(mRNA、メッセンジャーRNA)及びタンパク質の両レベルにおいて一目瞭然である。血小板中のグランザイムBは、mRNAレベルによって、もしくは、タンパク質レベルの生化学的測定値によってのいずれかで決定されるが、これは、敗血症に関連付けられることが分かっている。

【0032】

本発明の一実施形態において、グランザイムBのレベルは、免疫測定法によって検出される。一般的に、免疫測定法は、グランザイムB、及び、anti-グランザイムB抗体の結合を伴う。結合の存在、及び、量は、試料中に存在するグランザイムBの存在、及び、量を示す。免疫測定法の例は、ELISA、放射免疫検定、免疫プロット法、及び、免疫染色(これらは、この技術分野において周知である)を含むが、これらに制限されない。この抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。また、好ましくは、容易な検出のために標識化される。この標識は、ビオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光、及び、酵素であり得るが、これらに制限されない。

【0033】

一実施形態において、ELISAは、固定されたモノクローナルanti-グランザイムB抗体によりグランザイムBを捕捉し、その後、ビオチン化されたポリクローナルanti-グランザイムB抗体を用いて検出することに基づくが、これは、血清グランザイムBを検出するために用いられる。このシステムでは、マルチウェルプレートのウェルを、モノクローナル抗体でコーティングし、例えば、ミルク又はアルブミンでブロックする。その後、試料をウェルに加え、モノクローナル抗体によりグランザイムBを捕捉するために培養する。その後、プレートはポリクローナル抗体、及び、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの共役体を用いて検出されてもよい。

【0034】

別の実施形態において、グランザイムBのレベルは、血清中の核酸レベル、好ましくは、グランザイムBのmRNAを測定することにより検出することができる。これは、グランザイムBのmRNAに対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを有する試料中において、好ましくは厳しい条件で、核酸をハイブリダイズすることにより達成される。本発明の方法、及び、アッセイにおいて用いられる核酸試料は、任意の利用可能な方法又はプロセスによって用意されていてもよい。また、全RNAを分離する方法は、この技術分野における知識を有する者に周知である。例えば、核酸の分離方法、及び、精製方法は、以下の第3章に詳細に記載されている。Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I - Theory and Nucleic Acid Preparation, ティッセン(Tijssen), (1993) 編者(editor) Elsevier Press。このような試料は、RNA試料を含むだけでなく、興味のある細胞又は組織から分離されたmRNA試料から合成されたcDNA(相補的DNA)を含む。また、このような試料は、cDNAから増幅されたDNA、及び、増幅されたDNAから転写されたRNAを含む。この技術分野における知識を有する者であれば、ホモジネートを用い得る前に、ホモジネート中に存在するRNase(リボヌクレアーゼ)を阻害、又は、破壊することが望ましいことを認識するだろう。

【0035】

核酸ハイブリダイゼーションは、プローブ及び標的の核酸と接触することを単純に伴う。この状態の下で、このプローブ、及び、この相補の標的は、相補的塩基対を通じて安定したハイブリッド二本鎖を形成することができる(ロックハートら(Lockhart et al.)の米国特許第6,333,155号、これは参照により本明細書に盛り込

10

20

30

40

50

まれる)。核酸ハイブリダイゼーションの方法は、この技術分野において周知である。好ましい実施形態において、このプローブは、ビーズ、マイクロアレイ、又は、遺伝子チップのような固体担体上に固定される。

#### 【0036】

このハイブリダイズされた核酸は、試料である核酸、又は、プローブに付着した1又は複数の標識の検出することにより通常は検出する。この標識は、この技術分野における知識を有する者に周知の多くの任意の方法によって組込まれでもよい(ロックハートら(Lockhart et al.)の米国特許第6,333,155号、これは参照により本明細書に盛り込まれる)。一般的に使用される標識は、ピオチン、蛍光性の分子、放射性の分子、色素形成基質、化学発光の標識、酵素、及び、同種のものを含むが、これらに制限されない。核酸をピオチン化する方法は、蛍光性の分子及び放射性の分子をオリゴヌクレオチド及びヌクレオチドへ導入する方法と同様にこの技術分野において周知である。

10

#### 【0037】

抗体プローブ及び核酸プローブは、具体的には本明細書で開示されるが、グランザイムBのタンパク質、又は、mRNAを特異的に結合する任意の分子は、抗体プローブ又は核酸プローブのものと同様の方法でグランザイムB上方制御を検出するために用いることができる。特異的結合反応は、例えば、WO 第2008/021055号、米国特許第7,321,829号、米国特許第7,267,992号、米国特許第7,214,346号、米国特許第7,138,232号、米国特許第7,153,681号、米国特許第7,026,002号、米国特許第6,891,057号、米国特許第6,589,798号、米国特許第5,939,021号、米国特許第5,723,345号、及び、米国特許第5,710,006号に教示され、これらは、参照により本明細書に盛り込まれる。

20

#### 【0038】

特異的結合反応のための検出方法、特に免疫測定法及び核酸アッセイのための検出方法は、蛍光性の標識、放射性の標識、化学発光の標識、色原体の標識、その他、一般的に用いられる標識と同様に周知である。簡潔に言えば、蛍光性の標識は、これらの吸収波長、及び、蛍光放出波長、並びに、強度によって、最も直接的に同定、かつ、定量することができる。適切な波長の光源を用いる顕微鏡/カメラの設定は、蛍光性の標識を検出するための便利な方法である。放射性の標識は、標準的なオートラジオグラフィ、リン光体画像解析、又は、CCD検出器によって、視覚化されてもよい。他の検出システムが利用可能で、かつ、この技術分野において公知である。

30

#### 【0039】

別の実施形態において、グランザイムBは酵素であるため、この検出は、基質分解を通じて達成できる。この実施形態において、試料は、グランザイムBの基質に接触するようにする。基質の分解を測定して、グランザイムBのレベルを間接的に得る。この場合、分解速度が高ければ高いほど、存在するグランザイムBのレベルも高い。グランザイムBのための基質は、例えば、OncoImmulin, Inc. (ゲーサズバーグ、メリーランド州)、CalBiochem (サンディエゴ、カリフォルニア州)、及び、A.G. Scientific, Inc. (サンディエゴ、カリフォルニア州)を通じて、市販で入手可能である。グランザイムBのための基質、及び、これらの方法は、例えば、以下で開示される。ケップリンガーら(Koepfingler, et al.), Protein Exp. Purif. 18:378, 2000、カラハシら(Karahashi et al.), Biol. Pharm. Bull. 23:140, 2000、ハリスら(Harris, et al.), J. Biol. Chem. 273:27364, 1998、ソーンベリーら(Thornberry et al.), J. Biol. Chem. 272:17907, 1997、ハリスら(Harris et al.), J. Biol. Chem. 273:27364, 1998、及び、ソーンベリーら(Thornberry et al.), J. Biol. Chem. 272:17907, 1997。これらは参照により本明細書に盛り込まれる。これらの基質、又は、その酵素の産物は、蛍光分析で、又は、比色分析で検出するこ

40

50

とができる。

【0040】

さらなる記述がなくとも、この技術分野における通常の知識を有する者であれば、先の記述、及び、以下に説明する実施例を用いることで、本発明の化合物を製造及び利用し、また、クレームされた方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は本発明を説明するために挙げられる。本発明がこの実施例に記載された具体的な条件、又は、詳細に制限されるものではないことが理解されるべきである。

【実施例】

【0041】

方法

動物

マウスは、Jackson Laboratories (バーハーバー, メイン州, USA) から購入し、通常の動物施設において飼育、繁殖させた。すべての実験は、我々の動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。以前に述べられたように (ウィチターマンら (Wichterman et al.), J Surg Res 29:189-201, 1980)、盲腸の結紮及び穿刺は、8~12週の老年雄マウスにおいて、時間=0時間で行なわれた。簡潔に言えば、自然換気でのイソフルラン麻酔の下で、長さ1cmの中線腹部切開を通じて盲腸を摘出して、4-0の絹糸 (Ethicon, コーネーリア, ジョージア州, USA) で緩く結紮し、18のゲージ針で近接して2度穿刺した。腹

10

20

【0042】

血小板分離

心内血液は、クエン酸ナトリウム (Becton-Dickinson, フランクリンレイクス, ニュージャージー州, USA) 中へ直接引き込み、直ちに、25、770rpmで10分間、遠心分離機にかけた。血小板は、Ficoll-Plus (商標) (GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, ピスカタウェイ, ニュージャージー州, USA) を通じて、単一の高速遠心分離によって、多血小板血漿から分離した。血小板分離物の塗抹標本の顕微鏡検査は、>90%の血小板純度を示した。mRNA研究を意図した血小板は、Trizol (登録商標) (Invitrogen, カールスバード, カリフォルニア州, USA) 中に直ちに播種した。機能的な研究を意図した血小板は、フォルマルら (Vollmar et al.) (Microcirculation 10:143-152, 2003) が記載したように、無関係のタンパク質を除去するために、10mLのセファロース2Bゲルカラムを通してろ過した。血小板濃度は、手動の血球計を用いて測定した。また、PBSで希釈することにより試料間の濃度を均等にした。

30

【0043】

巨核球分離

マウス巨核球は、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) で洗い流すことにより、マウスの脛骨及び大腿骨から分離した。結果として生じる骨髄の懸濁液を処理し、メーカーのプロトコルに従い、正の選択のためにビオチンで標識化したanti-CD42d抗体を用いて、StemSep (登録商標) 磁性重力カラム (StemCell Technologies, バンクーバー, ブリティッシュコロンビア州, カナダ) に通した。純度は、Wright's stain (Sigma-Aldrich, セントルイス, ミズーリ州, USA) を用いて顕微鏡検査で確認した。血小板の際に記述したように、mRNAを分離した。

40

【0044】

脾臓摘出

50

健康な対照の脾臓を除去して、40  $\mu$ mのメッシュの細胞ストレーナを通して、直ちにすりつぶした。脾細胞は遠心分離機にかけ、洗浄して、Ficoll-Plus (商標) Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) を通して相にした。CD4<sup>+</sup>細胞は、メーカーのプロトコルに従って、StemSep (登録商標) の磁性重力カラム (StemCell) を用いて分離した。

#### 【0045】

##### 発現プロファイリング

発現量は、dChip 差分モデル・プローブセット・アルゴリズム (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>)、及び、Probe Logarithmic Intensity Error Estimation (PLIER) (Affymetrix, サンタクララ, カリフォルニア州) アルゴリズムを用いて計算した。dChip 及び PLIER の信号は、Hierarchical Clustering Explorer (HCE) (ソラ (Seo et al.), Bioinformatics 20:2534-2544, 2004) へ取り込んだ。また、プロファイルの適切なグループ化のため、結果として生じる監視なしクラスターを視覚的に検討した。最も適切なプロファイルのグループ化を有するアルゴリズムからの信号を、各種 (すなわち、マウス = dChip、ヒト = PLIER) の範囲内で、その後の分析のために用いて、GeneSpring GX (Agilent Technologies, サンタクララ, カリフォルニア州, USA) へ取り込んだ。マウスのデータセット (NCBI GEO Record #GSE10343)、及び、ヒトのデータセット (NCBI GEO Record #GSE10361) を、各チップ内で50パーセンタイルに標準化し、また、チップを制御するために1遺伝子ごとに標準化した。one-way ANOVA (一元配置分散分析) ( $p < 0.001$ ) は、multiple testing corrections ではなく、cross-gene error model を用いて、特異的に発現したプローブセットのリストを経時的に生成した。

#### 【0046】

##### qRT-PCR

cDNA は、メーカーのプロトコルによって SuperScript (商標) II First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて合成した。DNA プライマー (Invitrogen) は、既知の遺伝子配列に従って以下のように設計した。グランザイム A (順方向) 5' - GAA CCA C TG CTA CTC GGC ATC TGG [FAM] TC - 3'、グランザイム A (逆方向) 5' - CAG AAA TGT GGC TAT CCT TCA CC - 3'、グランザイム B (順方向) 5' - GAC GAT CCT GCT CTG AT T ACC CAT CG [FAM] C - 3'、グランザイム B (逆方向) 5' - TCA GAT CCT GCC ACC TGT CCT A - 3'。GAPDH を含有したウェルは、陽性対照として役立ち、また、ポリメラーゼなしのウェルは、陰性対照として役立った。反応は、ABI PRISM (登録商標) 7900HT PCR 装置 (Applied Biosystems, フォスターシティ, カリフォルニア州, USA) を用いて行った。また、Sequence Detection System 2.2 Software (Applied Biosystems) を用いて計算した。発現量は、試料の GAPDH の mRNA 発現に対して標準化された。

#### 【0047】

##### アポトーシスの検出

健康な対照マウスからの CD4<sup>+</sup> 脾細胞は、10 ng/mL の組み換えの TNF (Sigma-Aldrich) で90分間前処理した血小板を用いて、もしくは、用いずに、37 及び5%のCO<sub>2</sub>で、対照又は敗血性のマウスから分離した血小板と90分間共培養した。脾細胞アポトーシスは、DNA切断の原位置での検出のための定量的な比色測定法である、TiterTACS (商標) (Trevigen, ゲーサーズバーグ, メ

10

20

30

40

50

リーランド州，USA)により評価した。全試料は、メーカーのプロトコルに従い、陰性対照、及び、ヌクレアーゼに誘導された陽性対照で標準化したデータを用いて3回繰り返して行われた。

#### 【0048】

##### 統計的分析

データは、Microsoft Excel 2007 (レドモンド，ワシントン州，USA)で管理した。統計的有意性は、対応のある、もしくは、対応のないT検定を用いて、SPSS 15 (SPSS，シカゴ，イリノイ州，USA)で試験した。結果は、別段の定めがない限り、平均±標準誤差 (SEM)として報告する。

#### 【0049】

##### 結果

敗血症は血小板細胞死遺伝子発現を誘導する。

盲腸結紮穿孔 (CLP)を受けたすべてのマウスでは、犠死時において、毛づくろいの減少、嗜眠、及び、肉眼的・病理学的な腹膜炎を含む、腹膜の敗血症と一致する徴候及び症状が進行した。これらのマウスでは、48時間にわたって重篤な体重減少が進行した (平均±SEM<sub>0h対48h</sub>: -14.8±1.6%， $p < 0.0001$ )。研究された96匹のマウスのうちの14匹のマウス (14.6%)は、CLPの後状態で6~48時間の間で死亡したため、最終分析には含まれなかった。

#### 【0050】

各時点 (CLP後状態で0 (未治療)、24、及び、48時間)において、5匹のマウスからプールした血小板mRNAの発現プロファイル [Mouse 430 plus 2.0 GeneChips (登録商標) (Affymetrix，サンタクララ，カリフォルニア州，USA)]は、59のプローブセットを示し、56の固有の遺伝子を表した (表1に示す)。これは、研究された時間間隔にわたって別個に調節された。これらの遺伝子は、主として敗血症への対応で従来よく記載されていた、遺伝子オントロジーの生物学的プロセスのグループ (細胞粘着、細胞増殖調節、走化性、炎症性及び免疫反応、タンパク質分解、並びに、情報伝達)に関する。これらのうち、6つのプローブセットは、細胞死用遺伝子オントロジーの分子機能グループ (GO: 0008219)に属した。特に、0~48時間の間では、グランザイムA及びグランザイムB (強力な細胞傷害性セリンプロテアーゼ)は、>100倍に上方制御された (倍率変化 = 549.6、及び、141.3 (各々))。

#### 【0051】

10

20

30

【表1】

CLP後状態で0時間の対照、並びに、CLP後状態で24時間及び48時間の敗血症のマウスの間の特異的に調節されたプローブセット(n=59)

Affymetrix プローブセットID	24時間 倍率 変化	48時間 倍率 変化	Genbank ID	遺伝子記号	遺伝子名
1427747_a_at	1593	540.1	X14607	Lcn2	リボカリン2
1440865_at	276.4	202.3	BB193024	Ifitm6	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質6
1419764_at	189.6	181.6	NM_009892	Chi3l3	キチナーゼ3様3
1442339_at	185.7	606.5	BB667930	MGI:3524944	ステフィンA2様1
1417898_a_at	156.7	549.6	NM_010370	Gzma	グランザイムA
1418809_at	153	530.7	NM_011087	Pira1	ベア型Ig様受容体A1
1449984_at	137.5	206.3	NM_009140	Cxcl2	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド2
1451563_at	128.4	1831	AF396935	Emr4	EGF様モジュール含有, ムチン様, ホルモン受容体様配列4
1456250_x_at	126.3	324.6	BB533460	Tgfb1	トランスフォーミング増殖因子, ベータ誘導
1422013_at	120.3	759.8	NM_011999	Clec4a2	C型レクチンドメインファミリー4, メンバーa2
1436530_at	109.6	287	AA666504		CDNAクローン MGC:107680 IMAGE:6766535
1450826_a_at	104.9	524	NM_011315	Saa3	血清アミロイドA 3
1419394_s_at	104.6	48.6	NM_013650	S100a8	S100カルシウム結合タンパク質A8(カルグラニューリンA)
1424254_at	98.9	86.1	BC027285	Ifitm1	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質1
1442798_x_at	93.7	104.1	BB324660	Hk3	ヘキソキナーゼ3
1456223_at	93.2	246.8	BF322016		転座
1416635_at	83	683.2	NM_020561	Smpd3a	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ, 酸性様3A
1437478_s_at	81.2	200.3	AA409309	Ehfd2	EFハンドドメイン含有2
1422953_at	77.8	62	NM_008039	Fpr-rs2	ホルミルペプチド受容体, 関連配列2
1436202_at	76.1	160.7	AI853644	Malat1	肺腺癌転写産物1関連転移(非コード化RNA)
1419709_at	71.8	314.9	NM_025288	Stfa3	ステフィンA3
1450808_at	68.2	125.5	NM_013521	Fpr1	ホルミルペプチド受容体1
1430700_a_at	67.7	309.5	AK005158	Pla2g7	ホスホリラーゼA2, グループVII(血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ, 血漿)
1448756_at	67.5	23.5	NM_009114	S100a9	S100カルシウム結合タンパク質A9(カルグラニューリンB)
1420331_at	65.8	251.8	NM_019948	Clec4e	C型レクチンドメインファミリー4, メンバーe
1420330_at	64.9	220.2	NM_019948	Clec4e	C型レクチンドメインファミリー4, メンバーe
1423346_at	63.2	272.6	AV286991	Degsl	変性精母細胞ホモログ1(ショウジョウバエ)
1418722_at	62.4	28.6	NM_008694	Ngp	好中球の顆粒タンパク質
1429900_at	62	286.4	BM241296	5330406M23Rik	理研(RIKEN)のcDNA 5330406M23遺伝子
1434773_a_at	57.7	137.9	BM207588	Slc2a1	溶質輸送体ファミリー2(促進グルコース輸送体), メンバー1
1420671_x_at	57	413.4	NM_029499	Ms4a4c	膜貫通4ドメイン, サブファミリーA, メンバー4C
1419598_at	55.4	276.6	NM_026835	Ms4a6d	膜貫通4ドメイン, サブファミリーA, メンバー6D
1421392_a_at	53.8	140.5	NM_007464	Birc3	バクテリオウイルスIAPリピート含有3
1418189_s_at	53.2	197.8	AF146523	Malat1	肺腺癌転写産物1関連転移(非コード化RNA)
1435761_at	51.2	322.8	AW146083	Stfa3	ステフィンA3
1419599_s_at	49.6	362.9	NM_026835	Ms4a11	膜貫通4ドメイン, サブファミリーA, メンバー11
1421408_at	49.3	246.7	NM_030691	Igsf6	免疫グロブリンスーパーファミリー, メンバー6
1418204_s_at	46.1	282.2	NM_019467	Aif1	アログラフト炎症因子1
1420394_s_at	40.3	89	U05264	Gp49a ; Liltrb4	糖タンパク質49 A; 白血球免疫グロブリン様受容体, サブファミリーB, メンバー4
1416530_a_at	39	168.2	BC003788	Pnp	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ
1437584_at	38.8	158.8	BE685667		転座
1419647_a_at	38.6	109.6	NM_133662	Ier3	即時初期応答3
1419060_at	35.2	141.3	NM_013542	Gzmb	グランザイムB
1448123_s_at	33.9	129.3	NM_009369	Tgfb1	トランスフォーミング増殖因子, ベータ誘導
1429954_at	28.7	245.8	AK014135	Clec4a3	C型レクチンドメインファミリー4, メンバーa3
1448061_at	27.9	204	AA183642	Msr1	マクロファージスカベンジャー受容体1
1438943_x_at	27.7	136.2	AV308148	Rpn1	リポフォリン1
1439057_x_at	23.3	292.2	BB143557	Zdhhc6	ジンクフィンガー, DHHCDメイン含有6
1448620_at	22.2	77.9	NM_010188	Fcgr3	Fc受容体, IgG, 低親和性III
1455899_x_at	21.4	88.3	BB241535	Socs3	サイトカインシグナル抑制因子3
1447277_s_at	20.9	630.1	BB785407	Pcyox1	プレニルシステインオキシダーゼ1
1419209_at	20.5	407.7	NM_008176	Cxcl1	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド1
1433699_at	17.7	58.8	BM241351	Tnfaip3	腫瘍壊死因子, アルファ誘導タンパク質3
1455908_a_at	16.3	212.3	AV102733	Scepl	セリンカルボキシペプチダーゼ1
1457666_s_at	14.8	67.8	AV229143	Ifi202b	インターフェロン活性化遺伝子202B
1427076_at	12.9	91.1	L20315	Mpeg1	マクロファージ発現遺伝子1
1420249_s_at	8.8	94.7	AV084904	Ccl6	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド6
1416382_at	6.1	101	NM_009982	Ctsc	カテプシンC
1449193_at	2.5	66.9	NM_009690	Cd5l	CD5抗原様

太字で記載したものは、細胞死(GO:0008219)遺伝子(n=6)である。

## 【0052】

我々は、治験審査委員会(Institutional Review Board)が承認した、1歳から18歳の間(8.8±1.3)の敗血症の小児(n=17)に関する

10

20

30

40

50

る研究において、ヒト敗血症におけるこれらの細胞死遺伝子の発現を調査した。9名の参加者(53%)が男性だった。敗血症の診断は、敗血症のためのコンセンサス定義から小児科学に適した基準を用いてなされた(ボーンら(Bone et al.), Chest 101:1481-1483, 1992、ブルーら(Proulx et al.), Chest 109:1033-1037, 1996、及び、ブルーら(Proulx et al.), Crit Care Med 22:1025-1031, 1994)。我々は、臨床データ及び検査データ(すなわち、前の24時間で最多の極値)を72時間にわたって集めた。相対的な臨床重症度は、Hierarchical Clustering Explorer(HCE)(<http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/>)における、すべての生の臨床データ及び検査データの監視なしクラスタ化により決定した(図1)。臨床的な変数及び検査の変数によって、参加者らを2つのグループに明確にクラスタ化した。グループ1(n=6)は、「重篤」と指定された。なぜなら、これが、他と比べて著しく高い重症度の疾病スコア[すなわち、平均のPediatric Risk of Mortality(PRISM)III(ポラックら(Pollack et al.), Crit Care Med 24:743-752, 1996)スコア(17.0±2.7対4.5±1.1, p<0.001)]、及び、より長期の入院期間(45.5±10.6日、対、13.7±2.8日, p=0.029)を有するためである。グループ2(n=11)は、「中程度」と指定された。また、死亡率、及び、ショックの存在を含む、他の分析された結果変数に関して、重篤なグループと著しく異なっていなかった。

10

20

#### 【0053】

マウスデータの予備検証として、Human U133A GeneChip(登録商標)(Affymetrix)を用いて、1名の例示された重篤な敗血症のヒト対象、及び、1名の例示された中程度の敗血症のヒト対象からの血小板mRNAをプロファイリングし、3名の健康な若年成人層の対照における血小板遺伝子発現と比較した。この小グループの試料に対して、統計的に強健なゲノム規模での事前評価を行なう意図はなく、むしろ、我々は、マウス研究で同定された6つの細胞死遺伝子のための異種間のスクリーニングに対して注目した。これらのうち、グランザイムBのみが、重篤な対象において、72時間(倍率増加=2.9)にわたって特異的に調節された。いずれのグループにおいても、研究された他の細胞死遺伝子は、差別的発現を示さなかった。

30

#### 【0054】

巨核球血小板の転写軸における敗血症に誘導された変化の検証

定量的な逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)は、マイクロアレイによって検出されたマウス血小板のグランザイムA及びグランザイムBの上方制御を検証するために用いられた。我々は、敗血症の誘導後、最初の24時間のみを調査した。なぜなら、グランザイムの大部分の上方制御は、この期間中に起こるマイクロアレイによって見られるからである。敗血症のマウス(n=12(1時点当たり3匹のマウス、プールせず))の独立したコホートにおいて、グランザイムBのmRNA発現が、0~24時間の間に著しく増加した(mean±SE<sub>0h</sub>対<sub>24h</sub>:0.77±0.61対11.94±3.65, p=0.04)(図2)。グランザイムAのmRNAの発現は、これと同じ時間にわたって著しくは増加しなかった(mean±SE<sub>0h</sub>対<sub>24h</sub>:1.57±2.73対2.61±4.53, p=0.11)。

40

#### 【0055】

血小板は、無核で、かつ、転写の機構を欠くため、我々は、自己由来の巨核球の同時測定によって、敗血症における増加した血小板グランザイムBのmRNA発現をさらに検証できると仮定した。qRT-PCRを用いて、我々は、血小板qRT-PCR検証ステップにおいて用いた同じマウスから同時に得た骨髓巨核球における血小板グランザイムBのmRNA発現を測定した。巨核球グランザイムBのmRNAの相対的な発現は、24時間で、著しく増加した(mean±SE<sub>0h</sub>対<sub>24h</sub>:2.88±0.27対8.25±0.52, p=0.05)。血小板グランザイムBのmRNA発現は、巨核球のそれのすぐ

50

後に経時的に続いた(図2)。巨核球グランザイムAのmRNA発現は変化しなかった( $mean \pm SEM_{0h}$ 対 $24h$ :  $3.18 \pm 0.54$ 対 $2.99 \pm 0.12$ ,  $p = 0.42$ )。

#### 【0056】

敗血症は血小板グランザイムBのタンパク質発現を誘導する。

グランザイムBのmRNAの上方制御が、グランザイムBのタンパク質発現の増加を説明するかどうかを決定するため、敗血性のマウス、及び、対照のマウスからクエン酸全血をさらに採集した。これを1%のパラホルムアルデヒドで固定し、透過処理して、適切なアイソタイプ対照、及び、陰性の(未標識の)対照を用いて、anti-グランザイムB(clone 16G6 (eBioscience, サンディエゴ, カリフォルニア州, USA))で細胞内染色した。フローサイトメトリーのデータは、FACSCalibur(商標)System(BD Biosciences, サンホセ, カリフォルニア州, USA)で生成して、CD61<sup>+</sup>(clone 2C9.G2 (BD))の血小板でゲーティングし、FlowJo 7.2(Tree Star, Inc., アシランド, オレゴン州, USA)を用いて分析した。敗血性のマウス( $n = 9$ )からの血小板は、24時間の後に、細胞内のグランザイムBのタンパク質発現における増加を示した( $mean \pm SEM_{0h}$ 対 $24h$ :  $4.4 \pm 1.3$ 対 $19.6 \pm 6.3\%$ ,  $p = 0.039$ )。腫瘍壊死因子(TNF)で血小板をさらに活性化しても、細胞内のグランザイムBは変化しなかった(データ示さず)。

#### 【0057】

異種間の検証ステップにおいて、敗血性の小児、及び、健康な小児からのクエン酸全血を同様の方法で調査した。この場合、フローサイトメトリーのデータは、細胞内のグランザイムB(クローンGB11 (BD))用に染色されたCD61<sup>+</sup>(クローンVI-PL2 (BD))血小板で生成した。「重篤」な1名の敗血症の対象、及び、「中程度」の3名の敗血症の対象に対して、入院の1日後、及び、3日後にグランザイムBを測定し、定期検査用に血液を採取した、同様の年齢の健康な対照小児( $n = 10$ )と比較した。重篤な対象からの血小板は、1日目(49.7%)及び3日目(44.3%)の両方において、細胞内のグランザイムBを発現した(図3)。中程度の敗血性の対象のうち1名のみが、グランザイムBをいくらか発現した。また、3日目(24.0%)にのみであった。対照小児からの血小板中には、測定可能な細胞内のグランザイムBはなかった。さらに、血小板活性化状態(すなわち、CD62P<sup>+</sup>)は、グランザイムBの発現に作用しなかった。さらに、敗血性の小児からの血小板において、我々は、タンパク質[すなわち、Fasリガンド(FasL)、インターロイキン(IL)1、TNF、及び、TNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)]を誘導する他のアポトーシスの表面発現を検出しなかった。

#### 【0058】

血小板は、グランザイムBを介する敗血症におけるリンパ球毒性のあるエフェクターである。

敗血性のマウス、及び、敗血性のヒトからの血小板中のグランザイムBの我々の発見の結果、血小板がこのシナリオではリンパ球毒性があり得ると我々は仮定した。この問題を調査するために、CLPの後状態で18時間のマウスからの血小板を健康な対照マウスから分離されたCD4<sup>+</sup>脾細胞と共培養した。敗血性かつ野生型の(すなわち、C57BL/6)マウスからの血小板は、疑似野生型マウスからの血小板と比較して、際立った脾細胞アポトーシスを誘導した(アポトーシス速度 =  $26.0 \pm 3.4$ 対 $3.9 \pm 3.4\%$ ,  $p = 0.007$ ) (図4)。この共培養実験を、敗血性のグランザイムBヌル(-/-)マウス(すなわち、B6.129S2-Gzmb<sup>tm1Lev</sup>)からの血小板で繰り返した。この場合、敗血性の血小板による誘導された脾細胞アポトーシスの完全な欠如があった。注目すべきことに、活性化されていない対照の血小板が、リンパ球毒性を有しなかったのと同様に、TNFによりさらに活性化された野生型の血小板も、リンパ球毒性を有しなかった( $4.5 \pm 1.3\%$ ,  $p = 0.88$ ) (図4)。

## 【 0 0 5 9 】

考察

敗血症関連の死亡率は、深刻なリンパ球アポトーシスに付随して起こる免疫不全に一部起因する（ホッチキスら（Hotchkiss et al.）2003、ラッセル（Russell）2006、ホッチキスら（Hotchkiss et al.）, Scand J Infect Dis 35:585-592, 2003、グロズドンクら（Groesdonk et al.）, J Immunol 179:8083-8089, 2007、ホッチキスら（Hotchkiss et al.）, J Immunol 174:5110-5118, 2005、及び、ウェッシュュら（Wesche et al.）, J Leukoc Biol 78:325-337, 2005）。この広範囲なリンパ球細胞死亡に關与する生物学的機構は分からないが、この機構は、Toll様受容体、及び、MyD88（ペック-パーマーら（Peck-Palmer et al.） J Leukoc Biol 2008: jlb.0807528, 2008）を通じた直接の病原体シグナル伝達に一部寄与している。しかしながら、これらの研究において、我々は、敗血症のマウス実験モデルでの時系列研究を行なうことにより、このプロセスにおいて血小板が直接の役割を果たす可能性を探った。敗血症における全身性の攪乱に対する血小板の反応が、細胞死に關連する遺伝子のmRNA発現の変化の原因となり得ると仮定するため、第1のスクリーニングツールとしてマイクロアレイを用いた。その後、一連のマウス及びヒトの研究を通じて、このモデルを試験した。我々の実験により、我々は、巨核球-血小板の転写軸における敗血症に誘導された変化を特徴づけ、結果として生じる血小板に強いリンパ球毒性があるという斬新な発見を提示するに至った。第2に、敗血症に誘導されたマウスモデルからの血小板を用いて、我々は、セリンプロテアーゼである、グランザイムBが、このリンパ球毒性の原因であると同定した。グランザイムは、ナチュラルキラー（NK）リンパ球、及び、細胞傷害性Tリンパ球が、細胞傷害性果粒内で最も一般的に分泌する細胞傷害性セリンプロテアーゼのグループの1つである（マソンら（Masson et al.）, Cell 49:679-685, 1987）。グランザイムBは、これらのプロテアーゼ（他のヒトグランザイムは、グランザイムA、グランザイムH、グランザイムK、及び、グランザイムMを含む）の中で最もよく特徴づけられ、また、複数の既知のカスパーゼ標的、及び、カスパーゼ非依存性基質の増え続けるリストを有している。これらは、ポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）（フローリッチら（Froelich et al.）, Biochem Biophys Res Commun 227:658-665, 1996）、及び、繊維芽細胞増殖因子受容体-1（FGFR1）（ローブラ（Loeb et al.）, J Biol Chem 281:28326-28335, 2006）を含む。グランザイムBは、通常は、共放出されたパーフォリンのチャンネルを通じて標的細胞に入るだけでなく（トラパニら（Trapani et al.）, J Biol Chem 273:27934-27938, 1998）、独立して入ることができる（チョイら（Choy et al.）, Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:2245-2250, 2004、フロリアンら（Florian et al.）, FEBS letters 562:87-92, 2004、及び、ゴンドェックら（Gondek et al.）, J Immunol 174:1783-1786, 2005）。いったん、標的細胞に入ると、細胞質のグランザイムBは、いくつかの細胞内のアポトーシス促進性システインプロテアーゼ（最も著名で、かつ、最も研究されたものは、カスパーゼ3である）を開裂する（トラパニら（Trapani et al.） 1998）。あるいは、グランザイムBは、Bidに誘導されたミトコンドリアの損傷を介してアポトーシスを誘導することが示されている（ウォーターハウスら（Waterhouse et al.）, J Biol Chem 280:4476-4482, 2005、ウォーターハウスら（Waterhouse et al.）, Cell Death Differ 13:607-618, 2006、及び、ウォーターハウスら（Waterhouse et al.）, Immunol Cell Biol 84:72-78,

2006)。グランザイムBがカスパーゼ媒介性の機序、及び、カスパーゼ非媒介性の機序によって同時に細胞死を誘導することが示されていることに注目することは重要である(ローブラ(Loeb et al.) 2006、及び、ブレードマイヤーら(Bredemeyer et al.), *J Biol Chem* 281:37130-37141, 2006)。さらに、ウォンら(Wong et al.)は、グランザイムBが、小児の敗血症性ショック非生存者からの全血において、生存者と比較して上方制御された転写物の一つあることを示した(ウォンら(Wong et al.), *Physiol Genomics* 30:146-155, 2007)。

#### 【0060】

我々の実験は、血小板が、敗血症におけるグランザイムBが原因で、実際に強いリンパ球毒性があることを示した。我々の結果は、様々な炎症性疾患状態、特に適応免疫に関するものにおける血小板及びリンパ球の間の相互調節性の重要な相互作用を実証する従来の研究に基礎として確立している。例えば、血小板CD40は、Tリンパ球CD40リガンドに結合し、CCL5(これは、さらにTリンパ球を活性化して、それ故、免疫反応を増幅する)の血小板放出を誘導することが示されている(ダネーゼら(Danese et al.), *J Immunol* 172:2011-2015, 2004)。特に敗血症において、血小板に由来する微粒子は、血管内皮(アゼヴェードら(Azevedo et al.) 2006、ガンピンら(Gambim et al.) 2007、及び、ヤニシェフスキーら(Janiszewski et al.) 2004、並びに、平滑筋(ヤニシェフスキーら(Janiszewski et al.) 2004)に対して細胞傷害性があることが示されている。しかしながら、我々の知っている限りでは、我々のものは、疾患損傷に応じて血小板トランスクリプトームの急激な変化を検討する最初の研究である。我々は、骨髄における巨核球が全身性の敗血症に応答し、グランザイムBを含めるために血小板のトランスクリプトームを変化させることを発見した。

#### 【0061】

敗血症における血小板中のグランザイムBの存在は、血小板活性化が、この発現に影響を与えるようには見えないという事実を特に踏まえると、興味深い問題を提起する、つまり、転写後調節がないことを示唆する。まず、グランザイムBが、巨核球カスパーゼ活性化(これは、正常な血小板形成には必須である)の役割を果たし得る(クラークら(Clark et al.), *J Cell Biol* 160:577-587, 2003)。そうならば、敗血症での血小板の過剰新生において、その巨核球がグランザイムBのmRNAを上方制御することで、結果として、血小板中にこの転写物を含ませ得る。もう一つとしては、血小板グランザイムBが、ある点において、進化の利点を表わしたということである。多種多様の機序を通じてアポトーシスを誘導するグランザイムBの能力により、細胞内の病原体での免疫回避戦略の迂回が有望な機序となる。実際、細胞傷害性T細胞からのグランザイムBが、トキソプラズマ種及びマラリア原虫種に対する防御の役割を果たす可能性があるという証拠がある(ハードら(Hurd et al.), *Int J Parasitol* 2004; 34:1459-1472, 2004、及び、ギャブリレッシュら(Gavrilescu et al.), *Infect Immun* 71:6109-6115, 2003)。

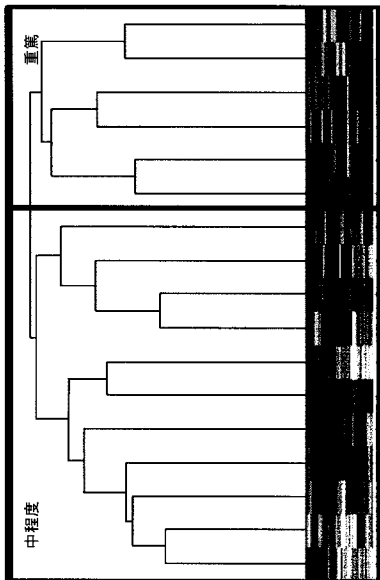
#### 【0062】

まとめると、我々は、血小板が、マウス敗血症、及び、ヒト敗血症におけるグランザイムBを上方制御すると結論付ける。我々は、敗血症のマウスからの血小板が、グランザイムBの作用を介して、生体外において、健康な脾細胞で際立ったアポトーシスを誘導することをさらに示した。我々の発見は、敗血症における概念的な進歩を確立する：敗血症の巨核球は、急性的に変化したmRNAプロファイルを用いて血小板を産生し、これらの血小板は、グランザイムBを介してリンパ球毒性を媒介する。リンパ球アポトーシスが敗血症関連の死亡率に寄与すると仮定すると、血小板グランザイムBの調節が、検討及び治療の重要な新しい目標になる。

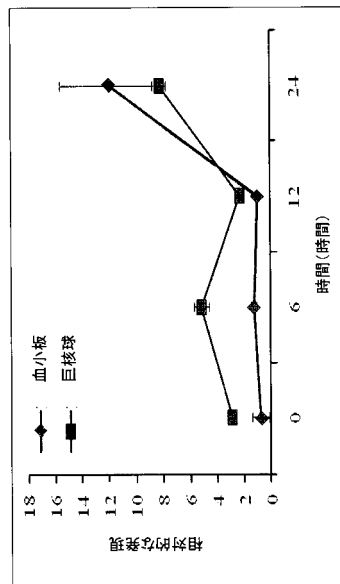
#### 【0063】

本発明の一定の現在好ましい実施形態が本明細書で具体的に記述されているが、本明細書で示され記述された様々な実施形態の変形及び修正が、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく、行なわれてもよいことは、この分野における知識を有する者にとって明らかだろう。従って、添付されたクレーム、及び、適用可能な法規によって必要とされる程度にのみ本発明が制限されるべきことが意図される。

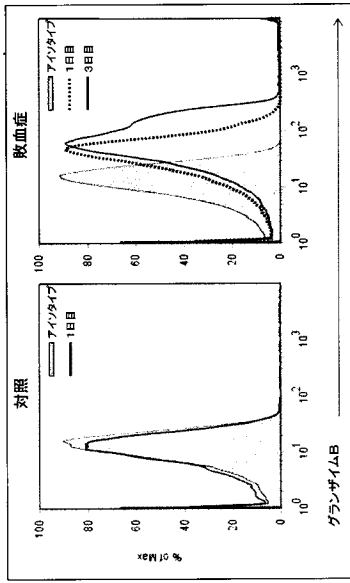
【 図 1 】



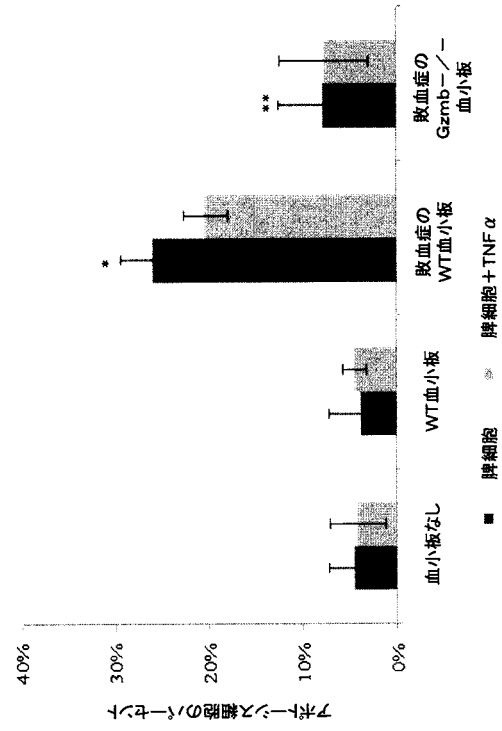
【 図 2 】





【 図 3 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2009/069156</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/573(2006.01)i, G01N 33/532(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/573; A01N 1/02; C12Q 1/00; A61K 49/00; C07D 487/04; A61K 31/55; A61M 1/36; G01N 33/53; A61K 38/17; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal), NCBI database, google, google scholar & Keywords: granzyme B, sepsis , platelet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FREISHTAT, R. et al, The FASEB Journal, 2007, Vol. 21: 864.1. See abstract.	22-43
PX	FREISHTAT, R. et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, epub 08 January 2009, Vol. 179, pages 467-473. See the whole document.	22-43
A	WO 2004-002518 A1 (NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST- NATUURWETENSCHAPP ELIJK ONDERZOEK TNO et al.) 08 January 2004 See abstract and claims 1,10,11.	22-43
A	US 6303321 B1 (TRACEY; KEVIN J. et al.) 16 October 2001 See abstract.	22-43
A	US 2005-0064409 A1 (ANDREAS BERGMANN et al.) 24 March 2005 See abstract and claims 1,2.	22-43
A	WO 2006-122237 A3 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. et al.) 1 6 November 2006 See abstract.	22-43
<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 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 15 SEPTEMBER 2010 (15.09.2010)		Date of mailing of the international search report <b>15 SEPTEMBER 2010 (15.09.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo- gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Sohn, Younghee Telephone No. 82-42-481-5975 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/US2009/069156**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006-0019945 A1 (KEVIN CHAPMAN et al.) 26 January 2006 See abstract and claims 19,22.	22-43

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/069156

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1-21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1-21 pertain to methods for diagnosis or treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/069156**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004-002518 A1	08.01.2004	AT 396737 T	15.06.2008
		AU 2003-280523 A1	19.01.2004
		DE 60321341 D1	10.07.2008
		EP 1517696 A1	30.03.2005
		EP 1517696 B1	28.05.2008
		JP 2005-537243 A	08.12.2005
		JP 2005-537243 T	08.12.2005
		NL 1020962C2	30.12.2003
		US 2006-0111283 A1	25.05.2006
		US 6303321 B1	16.10.2001
AU 2000-36983 A1	29.08.2000		
AU 2000-36983 B2	15.09.2005		
CA 2359926-A1	17.08.2000		
DE 60028358 D1	06.07.2006		
DE 60028358 T2	29.03.2007		
DK1165110T3	25.09.2006		
EP 1165110 A2	02.01.2002		
EP 1165110 A4	07.08.2002		
EP 1165110 B1	31.05.2006		
EP 1707214 A1	04.10.2006		
EP 1757937 A2	28.02.2007		
EP 1757937 A3	11.04.2007		
ES 2269118 T3	01.04.2007		
JP 2003-520763 A	08.07.2003		
JP 2003-520763 T	08.07.2003		
PT1165110E	31.10.2006		
PT1165110T	31.10.2006		
US 2002-0102609 A1	01.08.2002		
US 2003-0017155 A1	23.01.2003		
US 2003-0113323 A1	19.06.2003		
US 2003-0143194 A1	31.07.2003		
US 2004-0120953 A1	24.06.2004		
US 2006-0210565 A1	21.09.2006		
US 2006-0240019 A1	26.10.2006		
US 6268639 B1	31.07.2001		
US 6448223 B1	10.09.2002		
US 6468533 B1	22.10.2002		
US 6645802 B1	11.11.2003		
US 7060504 B2	13.06.2006		
US 7097838 B2	29.08.2006		
US 7151082 B2	19.12.2006		
US 7192917 B2	20.03.2007		
US 7537908 B2	26.05.2009		
US 7572446 B2	11.08.2009		
WO 00-47104 A2	17.08.2000		
WO 00-47104 A3	17.08.2000		
WO 00-47104A3	25.10.2001		
WO 00-47104A9	29.11.2001		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/069156**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0064409 A1	24.03.2005	AT 313801 T	15.01.2006
		DE 10131922 A1	30.01.2003
		EP 1402267 A1	31.03.2004
		EP 1402267 B1	21.12.2005
		JP 04-307250 B2	15.05.2009
		JP 2005-500044 A	06.01.2005
		JP 2005-500044 T	06.01.2005
		JP 4307250 B2	05.08.2009
		US 7235368 B2	26.06.2007
		WO 03-005035 A1	16.01.2003
WO 2006-122237 A3	16.11.2006	WO 2006-122237 A2	16.11.2006
US 2006-0019945 A1	26.01.2006	AU 2003-210770 A1	02.09.2003
		CA 2474917-A1	14.08.2003
		EP 1474093 A2	10.11.2004
		EP 1474093 A4	16.02.2005
		JP 2005-522430 A	28.07.2005
		US 2006-019945 A1	26.01.2006
		WO 03-065987 A2	14.08.2003
		WO 03-065987 A3	14.08.2003

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR55 QR72  
QR77 QS33 QS34 QX01

专利名称(译)	检测败血症的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012513591A</a>	公开(公告)日	2012-06-14
申请号	JP2011542564	申请日	2009-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	儿童研究所		
申请(专利权)人(译)	儿童研究所		
[标]发明人	フレイシュタットロバートジェフリー		
发明人	フレイシュタット ロバート ジェフリー		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/68 C12Q1/04		
CPC分类号	C12Q1/37 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/142 C12Q2600/158 G01N2333/96436 G01N2800/26 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/573.A G01N33/53.U G01N37/00.102 C12Q1/68.A C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
优先权	61/139936 2008-12-22 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及败血症及其严重程度的诊断，检测或预后的方法。更具体地说，该方法利用患有或怀疑患有败血症的个体的血小板中颗粒酶B的存在或量作为败血症的标志。颗粒酶B的存在（高于背景水平）表明存在败血症，颗粒酶B的量与疾病的严重程度直接相关（浓度越高，疾病越严重。这是严重的）。[选择图]图2

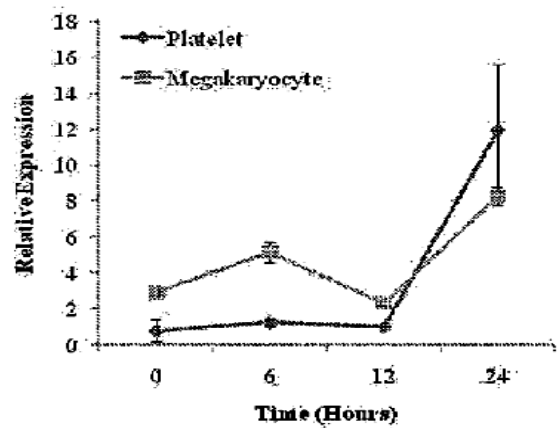


FIGURE 2