

(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2019-528733

(P2019-528733A)

(43) 公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/6883 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/6883	Z N A Z 2 G O 4 5
<b>G O 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50	P 4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	M
<b>G O 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/543	5 O 1 A
<b>C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/6813	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-514714 (P2019-514714)	(71) 出願人	513168518
(86) (22) 出願日	平成29年9月15日 (2017.9.15)		ダイアックス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月16日 (2019.4.16)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/051772		2 4 2 1, レキシントン, 3 0 0 シャイ
(87) 国際公開番号	W02018/053260		アー ウェイ
(87) 国際公開日	平成30年3月22日 (2018.3.22)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	62/395,811		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成28年9月16日 (2016.9.16)	(74) 代理人	100121511
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝性血管性浮腫のRNAバイオマーカー

(57) 【要約】

接触活性化系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象から得られた生体サンプルを分析するための方法およびキットが本出願で提供される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

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

( i i ) 表 1 から選択される少なくとも 1 種の RNA バイオマーカを含む RNA バイオマーカのセットのレベルを測定することと、

を含む、サンプルを分析するための方法であって、前記 RNA バイオマーカのセットが 1 種の RNA バイオマーカからなる場合には前記バイオマーカは h s a - m i R - 1 6 - 5 p、h s a - m i R - 1 7 - 5 p、h s a - m i R - 1 9 a - 3 p および h s a - m i R - 2 0 a - 5 p のいずれでもない、方法。

10

## 【請求項 2】

前記バイオマーカのセットは、2 ~ 10 種の RNA バイオマーカからなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

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

## 【請求項 4】

前記接触活性化系に関連する疾患は遺伝性血管性浮腫 ( H A E ) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 H A E は I 型 H A E または I I 型 H A E である、請求項 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記 RNA バイオマーカは、ミトコンドリアにコードされたシトクロム C オキシダーゼ I I I ( M T - C O 3 ) またはミトコンドリアにコードされた N A D H : ユビキノンオキシドレダクターゼコアサブユニット 3 ( M T - N D 3 ) であるミトコンドリアタンパク質をコードするメッセンジャー RNA である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 RNA バイオマーカはマイクロ RNA である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記マイクロ RNA は、h s a - m i R - 1 6 - 5 p、h s a - m i R - 1 9 a - 3 p、h s a - m i R - 2 0 a - 5 p、h s a - m i R - 1 7 - 5 p、h s a - m i R - 2 8 - 5 p、h s a - m i R - 4 2 3 - 3 p、h s a - m i R - 2 6 a - 5 p、h s a - m i R - 1 3 0 7 - 3 p、h s a - m i R - 3 3 5 - 3 p、h s a - m i R - 1 3 9 - 5 p、h s a - m i R - 4 8 5 - 5 p、h s a - m i R - 2 6 b - 5 p、h s a - m i R - 8 8 5 - 5 p、h s a - m i R - 3 6 1 - 3 p、h s a - m i R - 7 6 9 - 5 p、h s a - m i R - 1 4 0 - 5 p、h s a - m i R - 4 8 5 - 3 p、h s a - m i R - 8 8 9 - 3 p、h s a - m i R - 9 4 1、R P L 2 3、h s a - m i R - 3 2 8 - 3 p および h s a - m i R - 4 8 4 からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

ステップ ( i i ) は、ポリメラーゼ連鎖反応または核酸ハイブリダイゼーションを伴う、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記対象はヒト患者である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記対象の前記 RNA バイオマーカのセットのレベルが、対照となる対象の同じ RNA バイオマーカのセットのレベルから逸脱する場合に、前記対象が接触系に関連する疾患を有すると特定することをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

50

前記対象が前記疾患を有すると特定された場合に、前記疾患を治療するための治療薬の有効量を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

治療薬は血漿カリクレイン ( p K a l ) 阻害剤、ブラジキニン 2 受容体 ( B 2 R ) 阻害剤および / または C 1 エステラーゼ阻害剤である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 p K a l 阻害剤は抗 p K a l 抗体または阻害性ペプチドである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記治療薬はラナデルマブ、エカランチド、イカチバントまたはヒト血漿由来 C 1 エステラーゼインヒビターである、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記対象は、前記疾患の治療を受けているヒト患者であり、前記方法は、前記 R N A バイオマーカのセットのレベルに基づいて前記治療の有効性を評価することをさらに含み、前記対象の前記 R N A バイオマーカのセットのレベルが対照となる対象のものから逸脱することが前記治療の有効性を示す、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 R N A バイオマーカのセットのレベルに基づいて前記対象に適している治療を特定することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 R N A バイオマーカのセットのレベルに基づいて前記対象を前記疾患の治療の候補として特定することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

前記ヒト患者は前記疾患の病歴を有する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記疾患は H A E である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 R N A バイオマーカのセットは、 h s a - m i R - 1 3 0 7 - 3 p、 h s a - m i R - 3 3 5 - 3 p および h s a - m i R - 4 8 5 - 5 p からなる群より選択される 1 種以上の R N A バイオマーカを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記 R N A バイオマーカのセットのレベルに基づいて前記対象における疾患の発作のリスクを評価することをさらに含み、前記対象の前記 R N A バイオマーカのセットのレベルが対照となる対象のものから逸脱することが疾患の発作のリスクを示す、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記対象が、疾患の発作のリスクがあると特定された場合に、前記対象に治療薬を投与することをさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記治療薬は、予防的治療のためのものである、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 5】

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

( i ) 表 1 から選択される第 1 の R N A バイオマーカに対して特異的な第 1 の結合物質と、

( i i ) 表 1 から選択される第 2 の R N A バイオマーカに対して特異的な第 2 の結合物質と、

を含み、前記第 1 の R N A バイオマーカと前記第 2 の R N A バイオマーカは異なる、キット。

【請求項 2 6】

50

前記第 1 の結合物質は、前記第 1 の RNA バイオマーカ―またはそのフラグメントに対して相補的なオリゴヌクレオチドである、および / または前記第 2 の結合物質は、前記第 2 の RNA バイオマーカ―またはそのフラグメントに対して相補的なオリゴヌクレオチドである、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

前記第 1 の結合物質、前記第 2 の結合物質またはその両方が標識にコンジュゲートされている、請求項 25 または 26 に記載のキット。

【請求項 28】

前記第 1 の結合物質および前記第 2 の結合物質は、支持部材上に固定化されている、請求項 25 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年9月16日に出願された米国仮出願第62/395,811号の合衆国法典第35編第119条(e)に基づく恩典を主張する。当該出願の全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

20

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

【0003】

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

30

【0004】

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

40

【発明の概要】

【0005】

本開示の概要

本開示は、接触活性化系に関連する疾患を有する対象から得られた生体サンプルでは健康な個体に比べて異なって存在する、および / または異なる病状(例えば、発作対基礎的状态)の対象から得られた生体サンプルでは異なって存在する、RNAバイオマーカ―の特定に基づく。

【0006】

従って、本開示の一態様は、(i)接触活性化系に関連する疾患を有する、有すること

50

が疑われる、またはそのリスクがある、対象（ヒト対象など）から得られた生体サンプル（例えば、血清サンプルまたは血漿サンプル）を用意することと、(ii)表1から選択される少なくとも1種のRNAバイオマーカを含むRNAバイオマーカークのセットのレベルを測定することと、を含むサンプルを分析する方法であって、バイオマーカークのセットが1種のRNAバイオマーカークからなる場合には前記RNAバイオマーカークはhsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-19a-3pおよびhsa-miR-20a-5pのいずれでもない、方法を提供する。一部の実施形態において、接触活性化系に関連する疾患は、I型HAEまたはII型HAEなどの遺伝性血管性浮腫（HAE）である。

【0007】

一部の実施形態において、バイオマーカークのセットは、表1から選択される2～10種のRNAバイオマーカークからなる。一部の実施形態において、RNAバイオマーカークは、ミトコンドリアにコードされたシトクロムCオキシダーゼIII（MT-CO3）またはミトコンドリアにコードされたオキシドレダクターゼコアサブユニット（MT-ND3）であってよいミトコンドリアタンパク質をコードするメッセンジャーRNAである。一部の実施形態において、RNAバイオマーカークは、マイクロRNA（例えば、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-1307-3p、hsa-miR-355-3p、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-335-3p、hsa-miR-485-5p）である。

10

20

【0008】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカークのセットのレベルは、ポリメラーゼ連鎖反応および/または核酸ハイブリダイゼーションを伴うプロセスによって測定されてよい。

【0009】

一部の実施形態において、方法は、対象のRNAバイオマーカークのセットのレベルが、対照となる対象の同じRNAバイオマーカークのセットのレベルから逸脱する場合に、対象が接触系に関連する疾患を有すると特定することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、対象が疾患を有すると特定された場合に、疾患を治療するための治療薬（血漿カリクレイン（pKal）阻害剤、ブラジキニン2受容体阻害剤、および/またはC1エステラーゼ阻害剤など）の有効量を対象に投与することをさらに含む。一部の実施形態において、pKal阻害剤は、抗pKal抗体（例えば、ラナデルマブ）または阻害性ペプチド（例えば、エカランチド）である。一部の例では、ブラジキニン2受容体阻害剤は、阻害性ペプチド（例えば、イカチパント）である。一部の例では、C1エステラーゼ阻害剤は、ヒト血漿由来C1エステラーゼインヒビターである。

30

【0010】

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

40

【0011】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカークのセットは、hsa-miR-1307-3p、hsa-miR-335-3pおよびhsa-miR-485-5pからなる群より選択される1種以上のRNAバイオマーカークを含む。一部の実施形態において、方法は、RNAバイオマーカークのセットのレベルに基づいて対象における疾患の発作のリスクを評価することをさらに含み、対象のRNAバイオマーカークのセットのレベルが対照と

50

なる対象のものから逸脱することは、疾患の発作のリスクを示す。

【0012】

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

【0013】

別の態様では、接触系に関連する疾患を有する、有することが疑われる、またはそのリスクがある、対象のサンプルを分析するためのキットであって、表1から選択される第1のRNAバイオマーカーに対して特異的な第1の結合物質と表1から選択される第2のRNAバイオマーカーに対して特異的な第2の結合物質とを含むキットが提供され、ここで、第1のRNAバイオマーカーと第2のRNAバイオマーカーは異なる。一部の例では、第1の結合物質は、第1のRNAバイオマーカーに対して（完全に、または部分的に）相補的なオリゴヌクレオチドである、および/または第2の結合物質は、第2のRNAバイオマーカーに対して特異的な（完全に、または部分的に）相補的なオリゴヌクレオチドである。第1の結合物質と第2の結合物質は、支持部材上に固定化されてよい。一部の例では、第1の結合物質および/または第2の結合物質は、標識（例えば、蛍光標識）にコンジュゲートされる。

10

【0014】

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

20

【0015】

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

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、静止状態のHAE（基礎的状态の間のHAE）および発作中のHAEの両方の間のミトコンドリアシトクロムオキシダーゼ（MT-CO3）およびミトコンドリアNADHデヒドロゲナーゼ（MT-ND3）の転写レベルの増加を示すグラフである。シーケンシングによって、およびRT-qPCRによって、測定された各転写物の倍率変化が示されている。

30

【図2】図2は、健康な個体およびHAE患者から得られた血漿サンプルにおける選択されたマイクロRNAのレベルのレベルを示すグラフを提示する。A：健康な個体（「HV」と比較した静止状態（基礎的状态にあるHAE）におけるRNA転写物の倍率変化。B：健康な個体（「HV」と比較した発作中のHAEにおけるRNA転写物の倍率変化。C：静止状態（基礎的状态にあるHAE）と比較した発作中のHAEにおけるRNA転写物の倍率変化。

【発明を実施するための形態】

【0017】

40

詳細な説明

接触活性化系は、血液凝固の内因性経路を開始させ、炎症促進性ペプチドであるブラジキニンの遊離を介して炎症を促進する。ハーゲマン因子としても知られている第XII因子（FXII）は、血液凝固の内因性経路ならびにカリクレイン-キニン系の活性化において役割を担うセリンプロテアーゼである。FXIIは、負に荷電した表面（例えば、ポリアニオン性の表面、ガラス、ポリホスフェート、エラグ酸）によって活性化されて、活性形態であるFXIIaを生じる。活性化されたFXIIaは、プレカリクレインを切断する能力を有し、活性型pKa1を生じさせる。その後、活性化されたpKa1はFXIIを切断してFXIIaにすることができ、FXIIaがさらに多くのpKa1を生じさせ、これがさらなるFXIIをさらに活性化してFXIIaにする、正のフィードバック

50

ループがもたらされる。活性化された p K a 1 はまた、高分子量キニノーゲン ( H M W K ) を切断してブラジキニンを遊離させることもできる。H A E など、接触系の活性化に関連する疾患では、ブラジキニンのレベルの増加が、浮腫性 H A E 発作をもたらす血管拡張と炎症を誘発し得る。例えば、接触活性化系によって媒介されるような疾患を特定するために、そのような疾患を有するかそのような疾患を有するリスクがある対象を特定するために、使用できる新規のバイオマーカーを特定することが望ましい。

【 0 0 1 8 】

本開示は、トランスクリプトーム解析による、接触活性化系に関連する疾患 ( 例えば、基礎的状态のものまたは発作 ) を有する対象から得られた生体サンプルでは健康な個体に比べて異なって存在する核酸 ( R N A ; 例えば、マイクロ R N A 、およびタンパク質をコードする R N A 転写物 ) の特定に少なくとも部分的に基づく。さらに、いくつかの R N A ( 例えば、マイクロ R N A バイオマーカー ) は、接触活性化系の疾患の発作中の対象から得られた生体サンプルでは静止 ( 基礎的 ) 状態の疾患を有する対象に比べて異なって存在すると特定された。

10

【 0 0 1 9 】

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

20

【 0 0 2 0 】

接触活性化系の R N A バイオマーカー

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

30

【 0 0 2 1 】

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

40

【 0 0 2 2 】

50

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

【0023】

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

10

【0024】

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

20

【0025】

【表1】

表1：接触系の活性化のバイオマーカーク

RNAの分類	RNAバイオマーカーク
ミトコンドリア機能	ミトコンドリアにコードされたシトクロムCオキシダーゼIII (MTCO3) ミトコンドリアにコードされたNADH-ユビキノロンオキシドレダクターゼコアサブユニット3 (MT-ND3)
マイクロRNA	Hsa-miR-423-3p Hsa-miR-1307-3p* Hsa-miR-485-5p Hsa-miR-16-5p Hsa-miR-19a-3p Hsa-miR-20a-5p Hsa-miR-17-5p Hsa-miR-885-5p Hsa-miR-335-3p* Hsa-miR-485-5p*

30

\*は、発作中のHAE患者からのサンプルでは静止状態の間のHAE患者に比べて異なって存在すると特定されたRNAを示す。

40

【0026】

一部の実施形態において、本明細書で説明される方法のうちいずれかで測定および分析されるバイオマーカークのセットは、表1から選択される少なくとも1種（例えば、1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、または11種以上）のRNAを含む。バイオマーカークのセットが単一のRNAバイオマーカークを含む場合、そのRNAバイオマーカークは、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-19a-3pおよびhsa-miR-20a-5pのいずれでもない可能性がある。一部の例では、本明細書で説明される方法で測定および分析されるRNAバイオマーカークのセットは、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-19a-3pおよびhsa-miR-20a-5pのうちいずれか1つ

50

の組み合わせを含まない。

【0027】

実施例1で説明されるように、似たような細胞プロセスと経路に関与するタンパク質をコードするいくつかのRNAは、HAEを有する対象からのサンプルでは健康な対象に比べて異なって存在する、ということが予想外に見出された。このデータは、表1に示されるRNAが、接触系に関連する疾患において役割を担うか当該疾患に影響される可能性がある、ということを示す。

【0028】

本明細書で説明されるRNAバイオマーカーは、特定の経路または活性に「関与する」または「関連する」と特徴付けられる可能性がある。本明細書で使用される場合、用語「～に関与する」または「～に関連する」は、経路に寄与するRNAに対して適用される。例えば、経路に関与するか関連するRNA（タンパク質をコードするRNA、またはマイクロRNAなど）は、その経路内で機能を果たす（例えば、別の核酸の発現またはタンパク質の活性を調節する）可能性があるか、その経路内または細胞プロセス内で機能を果たす分子（例えば、タンパク質）をコードする可能性がある。

10

【0029】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカーのセットは、表1に列挙されるようなミトコンドリアタンパク質をコードする1種以上のRNAを含む。

【0030】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカーのセットは、1種以上のマイクロRNA（例えば、表1から選択される1種以上のマイクロRNA）を含む。

20

【0031】

やはり実施例1で説明されるように、いくつかのRNAは、HAE発作中のHAEを有する対象からのサンプルでは、静止状態（基礎的状态）の間のHAEを有する対象に比べて異なって存在する、ということも見出された。一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、1種以上のマイクロRNA（例えば、表1から選択される1種以上のマイクロRNA）を含む。

【0032】

RNAバイオマーカーの有用性

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

30

【0033】

(i) 生体サンプルの分析

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

40

【0034】

生体サンプルは、当技術分野において公知である任意の手段を用いて対象から得ることができる。一部の実施形態において、サンプルは、サンプル（例えば、血液サンプル）を真空採取管（例えば、真空採血管）中に採取することによって対象から得られる。一部の

50

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

【0035】

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

10

【0036】

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

20

【0037】

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

30

40

【0038】

一部の実施形態において、接触活性化系に関連する疾患または状態は、遺伝性血管性浮腫（HAE）である。遺伝性血管性浮腫（HAE）は、「クインケ浮腫」、C1エステラーゼインヒビター欠損症、C1インヒビター欠損症、および遺伝性血管神経性浮腫（HANE）としても知られている。HAEは、例えば四肢、顔、生殖器、胃腸管および気道に影響を与え得る、重度の腫脹（血管性浮腫）の再発エピソードを特徴とする。HAEの症状には、例えば、腕、脚、唇、目、舌および/もしくは喉における腫脹；喉の腫脹および突然の嘔声を伴う可能性がある気道閉塞；明白な原因の無い腹部痙攣のエピソードの繰り返し；ならびに/または重篤になる可能性があり且つ腹部痙攣、嘔吐、脱水症、下痢、疼痛および/もしくはショックにつながる可能性がある腸の腫脹が包含される。HAEを有

50

する個体の約3分の1が、有縁性紅斑と呼称される、かゆみを伴わない発疹を発作中に発症する。

#### 【0039】

気道の腫脹は、生命を脅かす可能性があり、一部の患者では死をもたらす。死亡率は15～33%と推定されている。HAEは、1年あたり約15,000～30,000件の救急来院をもたらす。外傷またはストレス（例えば、歯科処置、病気（例えば、風邪およびインフルエンザなどのウイルス性疾患）、月経、および手術）は、血管性浮腫の発作を引き起こし得る。HAEの急性発作を防止するために、患者は、以前に発作を引き起こしたことがある特定の刺激を回避しようとする努力をすることができる。しかし、多くの場合、発作は、既知の誘因なしに起こる。典型的には、HAEの症状は、小児期に初めて現れ、思春期の間に悪化する。平均で、無処置の個体は1～2週間ごとに発作を起こし、大部分のエピソードは、約3～4日間続く（[ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema](http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)）。発作の頻度と期間は、遺伝性血管性浮腫を有する人々の間で（たとえ同じ家族の人々の間であっても）大きく異なる。

10

#### 【0040】

I型、II型およびIII型として知られている3つのタイプのHAEが存在する。50,000人に1人がHAEに罹患し、I型が症例の約85%を占め、II型が症例の約15%を占め、III型は非常に稀であると推定されている。III型は、最も新しく記述された形態であり、当初は女性にのみ生じると考えられていたが、男性が罹患した家族が確認されている。

20

#### 【0041】

HAEは常染色体優性パターンで遺伝し、そのため、罹患者は、1人の罹患した親からその変異を受け継ぐ可能性がある。また、遺伝子の新たな変異が生じる可能性もあり、従って、HAEは、家族にこの障害の病歴が無い人々において発生する可能性もある。症例の20～25%は新たな自然突然変異から生じると推定されている。

#### 【0042】

SERPIN1遺伝子における変異は、I型およびII型の遺伝性血管性浮腫を引き起こす。SERPIN1遺伝子は、炎症の抑制に重要であるC1インヒビタータンパク質を産生するための指示を与える。C1インヒビターは、炎症を促進する特定のタンパク質の活性をブロックする。I型の遺伝性血管性浮腫を引き起こす変異は、血中のC1インヒビターのレベルを低下させる。対照的に、II型を引き起こす変異は、異常に機能するC1インヒビターの産生をもたらす。機能を有するC1インヒビターのレベルが適切でない場合、過剰量のブラジキニンが生成される。ブラジキニンは、血管壁を通じた体組織中への体液の漏出を増加させることによって炎症を促進する。体組織における体液の過剰な蓄積は、I型およびII型の遺伝性血管性浮腫を有する個体において見られる腫脹のエピソードを引き起こす。

30

#### 【0043】

F12遺伝子における変異は、III型の遺伝性血管性浮腫の一部の症例と関連している。F12遺伝子は、凝固第XII因子を産生するための指示を与える。血液凝固（凝血）において決定的な役割を果たすことに加えて、第XII因子はまた、炎症の重要な刺激因子でもあり、ブラジキニンの産生に関与する。F12遺伝子における特定の変異は、活性が増加した第XII因子の産生をもたらす。結果として、より多くのブラジキニンが生成され、血管壁の漏出性が増し、これが、腫脹のエピソードにつながる。III型の遺伝性血管性浮腫の他の症例の原因は不明のままである。これらの症例では、まだ同定されていない1つ以上の遺伝子における変異がこの障害の原因である可能性がある。

40

#### 【0044】

HAEは、アレルギーまたは他の医学的状態に起因する血管性浮腫の他の形態と同様に発現し得るが、HAEは、原因と治療の点で大きく異なる。HAEがアレルギーと誤診された場合、最も一般的には抗ヒスタミン薬、ステロイドおよび/またはエピネフリンで治療されるが、これらは通常、HAEには無効である（但し、エピネフリンは、生命を脅か

50

す反応に対して用いることができる)。誤診はまた、腹部の腫脹を有する患者に対する不必要な試験開腹をもたらしたこともあり、一部のHAE患者では、腹痛が、心因性のものであると誤って診断されたことがある。

【0045】

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

【0046】

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

10

【0047】

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

20

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

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

30

【0051】

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

【0052】

HAEの診断は、例えば、家族の病歴および/または血液検査に頼ることができる。I型、II型およびIII型のHAEに関連する検査所見は、例えば、Kaplan, A. P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925において説明されている。I型HAEでは、C4のレベルと同様に、C1インヒビターのレベルが低下しているが、C1qのレベルは正常である。II型HAEでは、C1インヒビターのレベルは正常であるか増加している。しかし、C1インヒビターの機能が異常である。C4のレベルは低下しており、C1qのレベルは正常である。III型では、C1インヒビター、C4およびC1qのレベルが全て正常である可能性がある。本開示は、HAE患者からのサンプルでは健康な個体に比べて異なるレベルを有するRNA(表1)の特定に少なくとも部分的に基づく。これらのRNAのバイオマーカーのセットのレベルの測定を利用して、対象が疾患(HAEなど)を有するかどうかを特定することができる。一部の実施形態において、方法は、患者がHAE発作を起こしたことが

40

50

あるかどうか、またはH A E発作を起こしているかどうか、を判定するために利用されてよい。

【0053】

H A Eの症状は、例えば、質問表（例えば、患者、臨床医または家族が回答する質問表）を利用して評価することができる。そのような質問表は、当技術分野において公知であり、例えば、視覚的アナログスケールを含む。例えば、McMillan, C. V. et al. Patient. 2012; 5(2): 113 - 26を参照のこと。

【0054】

本明細書で説明される生体サンプルは、生体サンプルにおいて本明細書で説明されるようなRNAバイオマーカのセットのレベルを測定することによる分析に供されてよい。本明細書で開示されるバイオマーカのレベル（例えば、量）またはバイオマーカのレベルの変化は、本明細書で説明されるアッセイおよび/または当技術分野で公知のアッセイを用いて評価されてよい。本明細書で説明されるバイオマーカのうちの1種以上は、従来の方法（例えば、PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたはマイクロアレイ）を用いて分析されてよい。一部の実施形態において、バイオマーカのレベルは、生体サンプル中のRNAバイオマーカを直接検出することによって評価または測定される。一部の実施形態において、RNAバイオマーカは、検出の前に、例えばPCRによって、増幅されてよい。

【0055】

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

【0056】

一部の実施形態において、バイオマーカは、例えば、サンプルを、RNAバイオマーカのうちの1種以上（例えば、表1に提示されるバイオマーカのうちのいずれか1つ）に選択的に結合する結合物質と接触させることによって、生体サンプルにおいて直接測定される。一部の実施形態において、バイオマーカ（RNA、またはRNAバイオマーカに対応するcDNA）は、ハイブリダイゼーション法（サンプルを、バイオマーカに特異的に結合する核酸プローブと接触させること、サザンブロットティング法またはノーザンブロットティング法など）を用いて検出される。

【0057】

一部の実施形態において、結合物質は、RNAバイオマーカに対して相補的なオリゴヌクレオチドである。本明細書で説明される方法における使用のためのオリゴヌクレオチドは、RNAバイオマーカ（またはRNAバイオマーカに対応するcDNA）の或る領域に対して（部分的または完全に）相補的なオリゴヌクレオチド（一本鎖のDNA分子またはRNA分子）である。

【0058】

本明細書で使用される場合、「相補的」は、当技術分野で一般的に知られている核酸塩基の相補性に対して適用される。例えば、アデニンは（DNAでは）チミン、またはRNAではウラシル、に対して相補的であり、グアニンはシトシンに対して相補的である。本明細書で使用される場合、「配列の相補性」または「核酸配列同士が互いに相補的であること」は、2つの核酸分子を互いに逆平行に整列させた場合に、各位置の、または配列中の大部分の位置の、ヌクレオチド塩基同士が相補的であるということ、および2つの核酸分子が適切な条件（例えば、ハイブリダイゼーション温度）の下でハイブリダイズして二本鎖を形成できるということを意味する。当技術分野で知られているように、2つの核酸分子がハイブリダイズして二本鎖を形成するためには、配列の相補性が100%である必要はない。オリゴヌクレオチドとRNAバイオマーカ（またはRNAバイオマーカに対応するcDNA）との間の配列の相補性は、RNAバイオマーカ中の対応する領域に

10

20

30

40

50

対して少なくとも80%相補的であってよい。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、RNAバイオマーカー（またはRNAバイオマーカーに対応するcDNA）の一部に対して少なくとも80%（例えば、85%、90%、95%、98%または100%）相補的であるフラグメントを含む。一部の例では、オリゴヌクレオチドは、RNAバイオマーカー（またはRNAバイオマーカーに対応するcDNA）の一部に対して完全に相補的（100%相補的）であるフラグメントを含む。そのようなオリゴヌクレオチドは、RNAバイオマーカーを実質的に類似する核酸（例えば、標的核酸に対して1、2または3塩基の相違を有する核酸）と区別するのに使用される可能性がある。

#### 【0059】

オリゴヌクレオチドは、100個以下のヌクレオチドを含んでよい（例えば、80nt、60nt、50ntまたは30nt以下）。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、8~50ヌクレオチド長（例えば、8~40、8~30、10~30、15~30または15~20ヌクレオチド長）であってよい。一部の例では、オリゴヌクレオチドは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長であってよい。一部の例では、オリゴヌクレオチドの分子全体が、RNAバイオマーカーの一部に対して相補的である。他の例では、オリゴヌクレオチドのフラグメントが、RNAバイオマーカーの一部に対して相補的である。例えば、オリゴヌクレオチドは、支持部材への付着のためにリンカー（例えば、ポリAリンカーまたはポリTリンカー）を含んでよい。あるいは、またはさらに、検出プローブは、標識へのコンジュゲートのために、そのようなリンカーを含んでよい。RNAバイオマーカーの一部に対して相補的であるオリゴヌクレオチドのフラグメントは、オリゴヌクレオチドの5'末端、オリゴヌクレオチドの3'末端またはオリゴヌクレオチドの中央に位置してよい。一部の実施形態において、RNAバイオマーカーに対して相補的であるオリゴヌクレオチドのフラグメントは、少なくとも10ヌクレオチド長（例えば、少なくとも12、15、18、20または25ヌクレオチド長）であってよい。

#### 【0060】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば2'-O-メトキシル基、2'-O-メトキシルエチル基および/またはホスホロチオエート基で修飾されたヌクレオチドを含む、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。一部の例では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のロックド核酸（LNA）を含む。接近しづらいRNA（inaccessible RNA）と呼称されることが多いLNAは、2'酸素と4'炭素とを連結する余分な架橋でリボース部分が修飾されている修飾RNAヌクレオチドである。この架橋は、A型二本鎖（A-form duplex）において見出されることが多い3'-endo（North）コンフォメーションでリボースを「ロック」する。DNAプローブおよびRNAプローブの両方でLNAヌクレオチドを使用できる。一部の例では、プローブ中のヌクレオチドのうちの50%以下（例えば、40%、30%、20%または10%）がLNAである。一部の例では、オリゴヌクレオチドは、10、8、6、5、4、3、2または1個のLNAを含んでよい。

#### 【0061】

オリゴヌクレオチドは、検出が望まれるRNAバイオマーカーの配列に基づいて設計されてよく、従来の方法（例えば、化学合成またはインビトロ転写）によって調製されてよい。

#### 【0062】

本明細書で説明されるようなオリゴヌクレオチドは、従来の方法によって支持部材上に固定化されてよい。本明細書で使用される場合、「固定化される」は、オリゴヌクレオチドの解離または喪失を防ぐために共有結合的または非共有結合的に付着、結合または固定されることを意味するが、オリゴヌクレオチドまたは支持部材のいずれかに関して絶対的な不動性を要求するものではない。支持部材は、ヌクレオチドプローブが支持部材に対して固定化されるように、ヌクレオチドプローブ（例えば、本開示のオリゴヌクレオチド）

を特異的に付着、結合あるいは捕捉するために使用することができる表面を有する固体または半固体の部材であってよい。

#### 【0063】

本開示の支持部材は、1種以上の好適な材料（例えば、プラスチックまたは合成ポリマー（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアミド、ポリウレタン、フェノール系ポリマー、またはニトロセルロース）、天然由来のポリマー（例えば、ラテックスゴム、多糖類、ポリペプチド）、複合材料、セラミックス、シリカまたはシリカ系材料、炭素、金属または金属化合物（例えば、金、銀、鋼、アルミニウムまたは銅を含むもの）、無機ガラス、シリカ、および様々な他の好適な材料）から作製されてよい。潜在的に好適な形状の非限定的な例としては、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）、チューブ（例えば、ナノチューブ）、プレート、ディスク、ディップスティック、チップ、マイクロチップ、カバースリップ等が挙げられる。

10

#### 【0064】

本開示の支持部材の表面は、核酸分子（例えば、RNAバイオマーカーに対して相補的なオリゴヌクレオチド）を特異的に付着、結合あるいは捕捉するために使用することができる、任意の分子、他の化学的実体/生物学的実体、または固体支持体上に配置された固体支持体修飾を含んでよい。核酸分子を固定化するために使用されてよい表面組成は、当技術分野において容易に見出すことができる。例えば、表面は、従来の方法によって表面に付着させることができる相補的核酸または核酸結合タンパク質を含んでよい。従って、固定化される核酸（例えば、本開示のオリゴヌクレオチド）と表面との間の連結は、1つ以上の化学的もしくは物理的な結合（例えば、ファンデルワールス力による非特異的付着、水素結合、静電相互作用、疎水性/親水性相互作用等）、および/またはそのような結合（複数可）をもたらす化学的リンカー、を含んでよい。あるいは、支持部材の表面は、固定化される核酸分子と共有結合を形成することができる反応性官能基を含んでよい。一部の実施形態において、官能基は、化学官能基である。すなわち、結合表面は、捕捉される核酸上の化学官能基と反応して付着をもたらすことができる化学官能基が結合表面に提示されるように誘導体化されてよい。有用である可能性がある付着のための官能基の例としては、アミノ基、カルボキシル基、エポキシド基、マレイミド基、オキシ基およびチオール基が挙げられるが、これらに限定されない。官能基は、直接、あるいはリンカーの使用により、付着させることができ、これらの組み合わせは、本明細書では「クロスリンカー」と呼称されることがある。核酸分子を支持部材に付着させるためのクロスリンカーは、当技術分野において公知である。例えば、ホモ二官能性クロスリンカーまたはヘテロ二官能性クロスリンカーがよく知られている（例えば、1994年のPierce Chemical Companyのカatalogueのクロスリンカーに関するテクニカルセクション（第155頁～第200頁）またはGreg T. Hermansonによる「Bioconjugate Techniques」（Academic Press, 1996）を参照のこと）。クロスリンカーの非限定的な例としては、アルキル基（置換されたアルキル基およびヘテロ原子部分を含むアルキル基を包含する）、エステル、アミド、アミン、エポキシ基およびエチレングリコールならびに誘導体が挙げられる。リンカーはまた、スルホンアミドを形成するスルホン基であってもよい。一部の実施形態において、官能基は、光で活性化される官能基である。すなわち、官能基を光で活性化して、捕捉成分（capture component）を捕捉物体表面（capture object surface）に付着させることができる。一つの例は、SurModics, Inc. (Eden Prairie, MN) から入手可能であるPhotoLink（商標）技術である。

20

30

40

#### 【0065】

支持部材および表面組成に関して本明細書で提示される例は限定的であることを意図しないということが理解されるべきである。核酸分子の固定化に適していることが当技術分野で知られている任意の支持部材が、本明細書で説明される方法とキットに従って使用されてよい。

#### 【0066】

50

一部の実施形態において、結合物質（例えば、RNAバイオマーカに対して相補的なオリゴヌクレオチド）は、標識にコンジュゲートされてよい。本明細書で使用される場合、「コンジュゲートされる」は、標識が共有結合的または非共有結合的に結合物質に付着させられることを意味する。標識物質は、好適な検出技術を用いると直接的または間接的に検出を容易にする任意の分子、粒子等であってよい。直接的な検出の場合、標識物質は、直接調査および/または検出することができるシグナルを放出することが可能な分子または部分（例えば、蛍光標識または蛍光色素）であってよい。間接的な検出の非限定的な例では、標識は、基質を、検出可能なシグナルを放出することができる生成物に変換することが可能な分子または部分（例えば、酵素）であってよい。例えば、標識は、ルシフェリンをオキシルシフェリンに変換して検出可能な光を放出させるルシフェラーゼであってよい。間接的な検出の別の非限定的な例では、標識は、基質を変換することが可能な分子または部分（例えば、酵素）に対する結合リガンドであり、ここで、変換された基質は、検出可能なシグナルを放出する。

#### 【0067】

一部の実施形態において、標識は、蛍光標識である。例としては、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド (o-phthaldehyde)、フルオレスカミンおよび蛍光金属 ( $^{152}\text{Eu}$  またはランタニド系列からの他の金属など)、CYE色素、および蛍光タンパク質 (eGFP、eYFP、eCFP、mKate2、mCherry、mPlum、mGrape2、mRaspberry、mGrape1、mStrawberry、mTangerine、mBananaおよびmHoneydewなど) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0068】

他の例示的な標識としては、ビオチン、リン光標識、化学発光標識または生物発光標識 (ルミノール (luminol)、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル (theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステルおよびジオキセタンなど)、放射性同位体 ( $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$  および  $^{75}\text{Se}$  など)、金属、金属キレートまたは金属カチオン (例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$  および  $^{68}\text{Ga}$  などの金属カチオン) が挙げられるが、これらに限定されない。他の例としては、発色団および酵素 (例えば、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-V-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-VI-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ) が挙げられる。

#### 【0069】

一部の実施形態において、バイオマーカは、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて測定される。一部の実施形態では、生体サンプルから抽出されたRNAがポリメラーゼ連鎖反応に供される。一部の実施形態では、生体サンプルのRNAに対応するcDNAがポリメラーゼ連鎖反応において使用される。核酸は、二本鎖または一本鎖であってよい。逆転写RNA、定量的PCRおよびマルチプレックスPCRを含め、ポリメラーゼ連鎖反応を用いる様々な方法が当技術分野において公知である。

#### 【0070】

一般に、ポリメラーゼ連鎖反応は、アニーリングと伸長 (extension/elongation) を含む一連のステップの繰り返しに依存する。オリゴヌクレオチド (例えば、プライマー) のペアは、所望の核酸 (例えば、バイオマーカ) に対して十分な相補性を有し、その結果、サンプル中に所望の核酸が存在すれば、適切なアニーリング条件 (例えば、アニーリング温度) の下でプライマーが所望の核酸にアニール (ハイブリダイズ) する。反応は、ポ

10

20

30

40

50

リメラーゼが核酸相補鎖を合成する伸長ステップ (extension/elongation step) に進む。二本鎖核酸生成物が変性され、別の反応サイクルが開始される。

【0071】

一部の実施形態において、ポリメラーゼ連鎖反応は、サイクルの各ステップごとに異なる温度設定を伴う。一部の実施形態において、ポリメラーゼ連鎖反応は、単一の温度で実施される (例えば、等温反応)。

【0072】

上述されるようなポリメラーゼ連鎖反応は、オリゴヌクレオチドプライマーの選択に基づいた核酸の選択的増幅を可能にする。一部の実施形態では、RNAバイオマーカのセットに対応する核酸が選択的に増幅され、その後、当技術分野において公知である任意の方法を用いて検出される。一部の実施形態において、増幅産物は、ハイブリダイゼーション法を用いて検出されてよい。あるいは、またはさらに、増幅産物は、ポリメラーゼ連鎖反応の間に導入された1つ以上の修飾によって検出されてよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応の間に色素、フルオロフォアまたは他の指示物質が核酸中にインターカレートされる。一部の実施形態では、核酸プライマーのうちの1つ以上が、検出されるタグ (例えば、核酸タグ) を含んでよい。

10

【0073】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカは、例えばRNAバイオマーカに対して (部分的または完全に) 相補的であるオリゴヌクレオチドとの、ハイブリダイゼーションを伴う方法を用いて測定される。一部の実施形態において、ハイブリダイゼーション法は、RNAバイオマーカを検出するための生体サンプルに対して、または増幅産物 (例えば、増幅されたRNAバイオマーカまたはRNAバイオマーカに対応するcDNA) を含む組成物 (例えば、PCR反応) に対して、実施される。一部の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、サンプルを、バイオマーカに特異的に結合するオリゴヌクレオチド (例えば、プローブ) と接触させることを伴う。ハイブリダイゼーション法の例としては、限定されるものではないが、サザンブロットティング法、ノーザンブロットティング法およびマイクロアレイ法が挙げられる。本明細書で説明されるように、一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、検出のための標識にコンジュゲートされてよい、および/または支持部材上に固定化されてよい。

20

【0074】

適切なバッファ、ポリメラーゼ、ハイブリダイゼーション条件の選択は当業者には明白であろうし、最適化は、通例の実験法を伴い得る。

30

【0075】

一部の実施形態において、バイオマーカは、核酸シーケンシングを用いて測定される。例えば、サンプル中の (例えばバイオマーカの) 特定の核酸配列の存在量を、別の配列中の同じ核酸配列の存在量と比較することができる (例えば、全トランスクリプトームシーケンシング、RNAseq)。そのような比較は、例えば、サンプル間で特定の配列のリード数を比較することによって実施されてよい。

【0076】

一般に、核酸シーケンシングは、当技術分野において公知である任意の方法を用いて実施されてよく、適切な方法の選択は当業者には明白であろう。例えば、核酸は、サンガーシーケンシング法またはハイスループットシーケンシング法を用いて配列決定されてよい。

40

【0077】

一部の実施形態において、生体サンプルは、 (例えば、バイオマーカを測定する前に) サンプル中に存在するRNAを単離するためにRNA抽出プロセスに供される。そのようなRNA抽出プロセスは、当技術分野において周知である。RNA抽出プロセスの例としては、市販のキットおよびフェノール-クロロホルム抽出が挙げられる。一部の実施形態において、生体サンプルから抽出されたRNAは、インビトロ翻訳に供され、それにより、存在する場合にはRNAバイオマーカによってコードされるタンパク質を含む、R

50

NAによってコードされるタンパク質が生成される。一部の実施形態において、生体サンプルまたは生体サンプルから抽出されたRNAは、逆転写に供され、それにより、存在する場合にはRNAバイオマーカを含む、RNAに対応するcDNAが生成される。

【0078】

一部の実施形態において、バイオマーカは、イムノアッセイを用いて測定される。一部の実施形態において、生体サンプルは、RNAバイオマーカに結合する結合物質（核酸結合タンパク質など）と接触させられる。次いで、サンプル中のバイオマーカの量の間接的な尺度として結合物質を検出するためにイムノアッセイが実施されてよい。イムノアッセイの例としては、限定されるものではないが、イムノプロットイングアッセイ（ウェスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）（例えば、サンドイッチELISA）、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光を利用した検出アッセイ、磁気イムノアッセイ、ラテラルフローアッセイおよび関連技術が挙げられる。例えばバイオマーカに結合する結合物質を検出することによって、本明細書で提示されるバイオマーカを検出するための、さらなる好適なイムノアッセイは、当業者には明らかであろう。しかし、本開示はイムノアッセイに限定されないということ、および発色基質に依存する検出アッセイもまた、本明細書で提示されるような接触系のバイオマーカの検出および/または定量化に有用である可能性があるということが当業者には明らかであろう。

10

【0079】

ELISAは、当技術分野において公知であり（例えば、Crowther, John R (2009)、「The ELISA Guidebook」、第2編、Human PressおよびLequin R (2005)、「Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)」、Clin. Chem. 51(12):2415-8を参照のこと）、例示的なELISAが本明細書で説明されている。ELISAを実施するためのキットも当技術分野において公知であり、市販されている（例えば、Life TechnologiesおよびBD BiosciencesのELISAキットを参照のこと）。

20

【0080】

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

30

【0081】

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

40

50

## 【 0 0 8 2 】

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

## 【 0 0 8 3 】

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

10

## 【 0 0 8 4 】

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

## 【 0 0 8 5 】

アッセイ（例えば、サザンブロットアッセイまたはノーザンブロットアッセイ）は、市販されている定量的イメージングシステム（例えば、L I C O R イメージング技術）の使用をさらに伴ってよい（例えば、L I - C O R B i o s c i e n c e s の O d y s s e y（登録商標） C L x 赤外線イメージングシステムを参照のこと）。一部の実施形態では、電気化学発光検出アッセイ、または電気化学発光とパターン化アレイ技術の組み合わせに依存するアッセイ、が使用される（例えば、M e s o S c a l e D i s c o v e r y（M S D）の E C L または M U L T I - A R R A Y 技術アッセイ（ECL or MULTI-ARRAY technology assay））。

20

## 【 0 0 8 6 】

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

30

## 【 0 0 8 7 】

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

## 【 0 0 8 8 】

（ i i ） 診断および/または予後診断の用途

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

40

## 【 0 0 8 9 】

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

50

## 【 0 0 9 0 】

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

10

## 【 0 0 9 1 】

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

20

## 【 0 0 9 2 】

一部の実施形態において、バイオマーカーのセットは、疾患を有するか疾患を有するリスクがある対象では健康な対象に比べて異なって存在する（上昇および/または低下している）2種以上のRNAバイオマーカーを含む。一部の例では、バイオマーカーのセットは、疾患を有するか疾患を有するリスクがある対象ではレベルが上昇している少なくとも1種のRNAバイオマーカーと、疾患を有するか疾患のリスクがある対象ではレベルが低下している少なくとも1種のRNAバイオマーカーと、を含む。「上昇している」および「低下している」RNAバイオマーカーの例は、表1に列挙されている。一部の実施形態では、バイオマーカーのセットは、2種以上のRNAを含み、その各々について、上昇したレベルは、対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示す。一部の実施形態では、バイオマーカーのセットは、2種以上のRNAを含み、その各々について、低下したレベルは、対象が疾患を有するか疾患を有するリスクがあることを示す。

30

## 【 0 0 9 3 】

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

## 【 0 0 9 4 】

本明細書で使用される場合、対照となる対象は、RNA（複数可）のレベルが測定される時点において標的疾患（例えば、接触系に関連する疾患）を有さないことが明らかである健康な対象もしくは健康な個体またはその疾患の病歴を有さない健康な対象もしくは健康な個体であってよい。「対照となる対象」なる用語は、個々の対象、または類似する特徴を有する対象の群（例えば、候補対象のものとは一致する特定の特徴（例えば、年齢、性別、民族等）を有する健康な対象の群）、を包含する。一部の実施形態において、対照となる対象におけるバイオマーカーのレベルは、候補対象または試験対象におけるバイオマーカーのレベルと比較されてよい基準値（例えば、対象の群を包含する対照となる対象におけるバイオマーカーの平均レベル）を確立するために使用される。

40

## 【 0 0 9 5 】

対照レベルは、対照となる対象における本明細書で説明されるようなRNAバイオマーカーのセットのレベルを指す。対照レベルは、所定のレベルまたは閾値であってよい。そ

50

のような所定のレベルは、標的疾患を有さないかそのリスクがない対象の集団におけるそのRNAのレベル（例えば、健康な対象の集団における平均レベル）を表してよい。それはまた、標的疾患を有する対象の集団におけるそのRNAのレベルを表してもよい。

【0096】

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

10

【0097】

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

【0098】

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

20

【0099】

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

30

40

【0100】

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

50

3倍、1.4倍、15倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍または10000倍以上、低い。

#### 【0101】

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

10

#### 【0102】

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

#### 【0103】

バイオマーカーのレベルとそのような疾患との間の相関関係を考えれば、本明細書で説明されるアッセイ法とキットはまた、接触系に関連する疾患（本明細書で説明されるものなど）に対する治療の有効性の評価に適用することもできる。例えば、複数の生体サンプル（例えば、血液サンプルまたは血漿サンプル）が、治療の前後に、あるいは治療過程の間に、治療が実施される対象から採取されてよい。バイオマーカーのレベルは、本明細書で説明されるようなアッセイ法のうちのいずれかによって測定されてよく、それに応じてバイオマーカーの値（例えば、量）が決定されてよい。例えば、バイオマーカーの上昇したレベルが、対象が標的疾患を有することを示し、且つ治療後に、または治療の経過と共に、バイオマーカーのレベルが低下するのであれば（先に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルと比較した、後に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベル）、それは、その治療が有効であることを示す。別の例として、バイオマーカーの低下したレベルが、対象が標的疾患を有することを示し、且つ治療後に、または治療の経過と共に、バイオマーカーのレベルが上昇するのであれば（先に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルと比較した、後に採取されたサンプルにおけるバイオマーカーのレベル）、それは、その治療が有効であることを示す。一部の例では、治療は、有効量の治療薬（血漿カリクレイン阻害剤、ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、またはC1エステラーゼインヒビター（C1-INH）など）を伴う。治療薬の例としては、ラナデルマブ、エカランチド、イカチバントおよびヒト血漿由来C1-INHが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0104】

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

40

#### 【0105】

他の実施形態では、バイオマーカーまたはバイオマーカーのセットの値はまた、障害が接触系に関連していることを、またはその障害は、例えばpKa1阻害剤によって、治療できる可能性があることを、特定するために利用することもできる。この方法を実施するために、標的疾患を有する対象から採取されたサンプル（例えば、血液サンプルまたは血漿サンプル）におけるバイオマーカーのレベルが、好適な方法（例えば、質量分析、クロマトグラフィー、イムノアッセイなどの本明細書で説明されるもの）によって測定されて

50

よい。バイオマーカーのレベルが基準値から逸脱する（例えば、上昇または低下している）のであれば、それは、その疾患を治療するのに p K a 1 阻害剤が有効である可能性があることを示す。疾患が p K a 1 阻害剤に感受性である（p K a 1 阻害剤によって治療できる）と特定された場合には、方法は、その疾患を有する対象に有効量の p K a 1 阻害剤（抗 p K a 1 抗体または阻害性ペプチド（例えば、ラナデルマブ、エカランチド等）など）、ブラジキニン 2 受容体阻害剤（例えば、イカチバント）および / または C 1 - I N H（例えば、ヒト血漿由来 C 1 - I N H）を投与することをさらに含んでよい。

【 0 1 0 6 】

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

10

【 0 1 0 7 】

本開示の他の態様は、疾患の発作（例えば、H A E 発作）のリスクを評価するための方法を提供する。本明細書で説明されるように、H A E 発作は、典型的には、その間に対象が症状（疼痛および腫脹など）を経験する可能性がある再発エピソードである。一部の実施形態において、1 種以上のバイオマーカーのレベルは、対象が H A E 発作を起こすリスクがあるかどうかを示す。一部の実施形態において、方法は、H A E を有する対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルを、同じ対象から得られたサンプル（例えば、基礎的状态にある同じ対象から得られたサンプルまたは H A E 発作中の同じ対象から得られたサンプル）におけるそのバイオマーカーのレベルと比較することを伴う。例えば、対象からの別のサンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、対象が、H A E 発作を起こすリスクがある場合と比較すると H A E 発作に関連するバイオマーカーのレベルの上昇（または低下）を有するというを示す可能性がある。

20

30

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態において、方法は、H A E を有する対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルを、対照サンプルまたは参照用サンプルにおけるバイオマーカーのレベルと比較することを伴う。一部の実施形態において、対照サンプルまたは参照用サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、H A E の発作状態を示すバイオマーカーのレベルを表す。例えば、H A E の発作状態を表す参照用におけるバイオマーカーのレベルと類似する H A E を有する対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、対象が H A E 発作を起こすリスクがあることを示す可能性がある。一部の実施形態において、対照サンプルまたは参照用サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、基礎的状态にある H A E を示すバイオマーカーのレベルを表す。例えば、基礎的状态にある H A E を表す参照用におけるバイオマーカーのレベルに対して逸脱する（上昇または低下している）H A E を有する対象から得られたサンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、対象が H A E 発作を起こすリスクがあることを示す可能性がある。

40

【 0 1 0 9 】

( i i i ) 非臨床用途

さらに、本明細書で説明されるバイオマーカーのセットのうちのいずれかのレベルは、研究目的で使用されてよい。接触活性化系に関連する疾患が多数特定されているが、他の疾患が、類似するメカニズムによって媒介される、または類似するコンポーネントを伴う、という可能性がある。一部の実施形態において、本明細書で説明される方法は、疾患を

50

接触活性化系または接触活性化系のコンポーネントに関連すると特定するために使用されてよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される方法は、疾患のメカニズム（例えば、疾患の発症に關与する新規の生物学的経路またはプロセスの発見）または進行を研究するために使用されてよい。

【0110】

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

10

【0111】

RNAバイオマーカのセットを測定するためのキットおよび検出装置

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

20

【0112】

一部の実施形態において、結合物質は、RNAバイオマーカに対して相補的である、本明細書で説明されるようなオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、結合物質は、それぞれがRNAバイオマーカ中の特定のヌクレオチド配列に結合（ハイブリダイズ）するオリゴヌクレオチドのペア（例えば、プライマーのペア）を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドのペアは、ポリメラーゼ連鎖反応などの方法に供された際に、RNAバイオマーカにハイブリダイズしてRNAバイオマーカの増幅を可能にする。一部の実施形態において、増幅産物は、例えばポリメラーゼ連鎖反応の間に核酸中にインターカレートされる色素、フルオロフォアまたは他の指示物質を検出することによって、直接検出されてよい。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、検出できる標識にコンジュゲートされる。

30

【0113】

一部の実施形態において、RNAバイオマーカは、核酸ハイブリダイゼーション法を用いて測定される。一部の実施形態において、結合物質は、RNAバイオマーカに対して相補的であるオリゴヌクレオチドであってサンプル（例えば、生体サンプルまたはポリメラーゼ連鎖反応からのサンプル）中にそのRNAバイオマーカが存在する場合にはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、検出できる標識（本明細書で説明される標識のうちのいずれかなど）にコンジュゲートされる。本明細書で説明されるようなハイブリダイゼーション法の非限定的な例としては、ノーザンブロットティング、サザンブロットティングおよびマイクロアレイが挙げられる。

40

【0114】

一部の実施形態において、結合物質のうちの1つ以上は、バイオマーカのセットのRNAに特異的に結合する核酸結合タンパク質である。一部の実施形態において、結合物質は、直接検出されるか、または直接もしくは間接的に識別できるタグにコンジュゲートされてよい。

【0115】

一部の実施形態において、キットまたは装置は、本明細書で説明されるような支持部材をさらに含む。キットまたは検出装置において、結合物質のうちの1つ以上が、支持部材

50

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

【0116】

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

【0117】

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

10

【0118】

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

20

【0119】

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

【0120】

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

30

【0121】

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

40

【0122】

接触活性化系に関連する疾患の治療

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

【0123】

一部の実施形態において、本明細書で説明される方法は、対象を防止的(予防的)治療の候補として特定する方法を提供する。本明細書で使用される場合、「防止的」治療には、疾患の発生(例えば、HAE発作)を防止または低減することを目的とする任意の療法

50

または治療レジメンが包含される。一部の実施形態において、方法は、対象に防止的治療を施すことをさらに含む。本明細書で説明される治療薬のうちのいずれか（例えば、ラナデルマブなどの p K a 1 阻害剤）。一部の実施形態において、対象から得られたサンプルにおける R N A バイオマーカのセットのレベルは、（例えば、R N A バイオマーカのレベルを参照用サンプルまたは対照サンプルにおけるレベルと比較することによって）患者が H A E を有するか H A E を有するリスクがあることを示す。H A E を有するか H A E を有するリスクがある対象はいずれも、予防的治療を施されてよい。防止的治療のための適切な治療薬と投与レジメンの選択は、当業者には明白であろう。

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態において、方法は、アッセイ（例えば、バイオマーカの検出）のアウトプットに基づいた対象への投与のための治療薬（例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体阻害剤および / または C 1 エステラーゼ阻害剤）の選択または投与のうち的一方または両方を含む。

10

【 0 1 2 5 】

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

【 0 1 2 6 】

治療薬（例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体阻害剤および / または C 1 - I N H ）は、接触活性化系と関わる疾患または状態の治療のための併用療法の一部として別の療法と一緒に与えられてよい。併用療法（例えばカリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストまたは C 1 - I N H 補充薬（replacement agent））のうちの一つ以上との併用療法、例えばカリクレイン阻害剤、ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストまたは C 1 - I N H 補充薬のうちの一つ以上および別の療法との併用療法）は、複数の異なる構成で提供されてよい。第 1 の薬は、他の療法の実施の前または後に投与されてよい。いくつかの状況では、第 1 の薬と別の療法（例えば、治療薬）は同時に、または時間的に近接して（例えば、同じ治療セッション中など、短時間の注射間隔で）、与えられる。第 1 の薬と他の療法はまた、より長い時間間隔で与えられてもよい。

20

30

【 0 1 2 7 】

治療薬

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

【 0 1 2 8 】

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

40

50

する場合には、それらは、それらのシステインの対応するサブセット間で形成され得る。それぞれのシステイン間の間隔は、以下に提示されるBPTI配列の番号付けに従った以下の5~55、14~38および30~51に対応する位置間の間隔の7、5、4、3、2、1または0アミノ酸以内である可能性がある。BPTI配列は、任意の一般的なクニツドメインにおける特定の位置を指すための基準として使用できる。関心のあるクニツドメインとBPTIとの比較は、合致するシステインの数が最大になる最も良好に一致したアライメントを特定することによって実施できる。

【0129】

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

10

20

30

【0130】

【表2】

表2: 例示的な天然のクニツドメイン

LACI (配列 番号 1)	<pre> 1  MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNads eedehtiit dtelpplkIM 51  HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101  KKMCTRDnan riiktntlqge <u>kpdfCfleed pgiCrgyitr</u> <u>yfyngqtkqC</u> 151  <u>erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvndnygtq</u> lnavnsltp 201  qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251  ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301  vknm  シグナル配列(1-28)は大文字であり、且つ下線を引かれている LACI-K1 (50-107)は大文字である LACI-K2 (121-178)は下線を引かれている LACI-K3 (211-270)は太字である </pre>
BPTI (配列 番号 2)	<pre> 1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTC<del>CGGA</del> </pre>

40

50

## 【 0 1 3 1 】

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

## 【 0 1 3 2 】

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

## 【 化 1 】

A4\_HUMAN (P05067), A4\_MACFA (P53601), A4\_MACMU (P29216),  
 A4\_MOUSE (P12023), A4\_RAT (P08592), A4\_SAISS (Q95241),  
 AMBP\_PLEPL (P36992), APP2\_HUMAN (Q06481), APP2\_RAT (P15943),  
 AXP1\_ANTAF (P81547), AXP2\_ANTAF (P81548), BPT1\_BOVIN (P00974),  
 BPT2\_BOVIN (P04815), CA17\_HUMAN (Q02388), CA36\_CHICK (P15989),  
 CA36\_HUMAN (P12111), CRPT\_BOOMI (P81162), ELAC\_MACEU (O62845),  
 ELAC\_TRIVU (Q29143), EPPI\_HUMAN (O95925), EPPI\_MOUSE (Q9DA01),  
 HTIB\_MANSE (P26227), IBP\_CARCR (P00993), IBPC\_BOVIN (P00976),  
 IBPI\_TACTR (P16044), IBPS\_BOVIN (P00975), ICS3\_BOMMO (P07481),  
 IMAP\_DROFU (P11424), IP52\_ANESU (P10280), ISC1\_BOMMO (P10831),

ISC2\_BOMMO (P10832), ISH1\_STOHE (P31713), ISH2\_STOHE (P81129),  
 ISIK\_HELPO (P00994), ISP2\_GALME (P81906), IVB1\_BUNFA (P25660),  
 IVB1\_BUNMU (P00987), IVB1\_VIPAA (P00991), IVB2\_BUNMU (P00989),  
 IVB2\_DABRU (P00990), IVB2\_HEMHA (P00985), IVB2\_NAJNI (P00986),  
 IVB3\_VIPAA (P00992), IVBB\_DENPO (P00983), IVBC\_NAJNA (P19859),  
 IVBC\_OPHHA (P82966), IVBE\_DENPO (P00984), IVBI\_DENAN (P00980),  
 IVBI\_DENPO (P00979), IVBK\_DENAN (P00982), IVBK\_DENPO (P00981),  
 IVBT\_ERIMA (P24541), IVBT\_NAJNA (P20229), MCP1\_MELCP (P82968),  
 SBPI\_SARBU (P26228), SPT3\_HUMAN (P49223), TKD1\_BOVIN (Q28201),  
 TKD1\_SHEEP (Q29428), TXCA\_DENAN (P81658), UPT1\_PIG (Q29100),  
 AMBP\_BOVIN (P00978), AMBP\_HUMAN (P02760), AMBP\_MERUN (Q62577),  
 AMBP\_MESAU (Q60559), AMBP\_MOUSE (Q07456), AMBP\_PIG (P04366),  
 AMBP\_RAT (Q64240), IATR\_HORSE (P04365), IATR\_SHEEP (P13371),  
 SPT1\_HUMAN (O43278), SPT1\_MOUSE (Q9R097), SPT2\_HUMAN (O43291),  
 SPT2\_MOUSE (Q9WU03), TFP2\_HUMAN (P48307), TFP2\_MOUSE (O35536),  
 TFPI\_HUMAN (P10646), TFPI\_MACMU (Q28864), TFPI\_MOUSE (O54819),  
 TFPI\_RABIT (P19761), TFPI\_RAT (Q02445), YN81\_CAEEL (Q03610)

## 【 0 1 3 3 】

様々な方法を用いて配列データベースからクニツドメインを特定できる。例えば、クニツドメインの公知のアミノ酸配列、コンセンサス配列、またはモチーフ ( 例えば、P r o S i t e M o t i f ) を、例えば H M M ( 隠れマルコフモデル ) の P f a m データベースに対して B L A S T を用いて ( 例えば、P f a m 検索のためにデフォルトのパラメータを用いて ; S M A R T データベースに対して ; または P r o D o m データベースに対して )、G e n B a n k 配列データベース ( N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a M D ) に対して検索することができる。例えば、P f a m R e l e a s e 9 の P f a m アクセション番号 P F 0 0 0 1 4 は、数多くのクニツドメイン、およびクニツドメインを特定するための H M M、を提供する。P f a m データベースの説明は、S o n h a m m e r e t a l . P r o t e i n s ( 1 9 9 7 ) 2 8 ( 3 ) : 4 0 5 - 4 2 0 に見出すことができ、H M

10

20

30

40

50

Mの詳細な説明は、例えば、Gribskov et al. Meth. Enzymol. (1990) 183:146-159; Gribskov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:4355-4358; Krogh et al. J. Mol. Biol. (1994) 235:1501-1531; および Stultz et al. Protein Sci. (1993) 2:305-314に見出すことができる。HMMのSMARTデータベース(Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE)は、Schultz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:5857およびSchultz et al. Nucl. Acids Res (2000) 28:231で説明されている通りである。SMARTデータベースは、HMMer2検索プログラムの隠れマルコフモデルによるプロファイリングによって特定されたドメインを含む(R. Durbin et al. (1998) 「Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids」 Cambridge University Press)。このデータベースはまた、注釈付きであり、モニタリングされている。ProDomタンパク質ドメインデータベースは、相同ドメインの自動編集からなる(Corpet et al. Nucl. Acids Res. (1999) 27:263-267)。ProDomの現在のバージョンは、SWISS-PROT 38およびTREMBLタンパク質データベースの再帰的PSI-BLAST検索(Altschul et al. Nucleic Acids Res. (1997) 25:3389-3402; Gouzy et al. Computers and Chemistry (1999) 23:333-340)を使用して構築されている。このデータベースは、各ドメインのコンセンサス配列を自動的に生成する。Prositeは、クニツドメインをモチーフとして収載しており、クニツドメインを含むタンパク質を特定する。例えば、Falquet et al. Nucleic Acids Res. (2002) 30:235-238を参照のこと。

#### 【0134】

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

#### 【0135】

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

#### 【0136】

一実施形態において、これらのクニツドメインは、ヒトリポタンパク質関連凝固インヒビター(lipoprotein-associated coagulation inhibitor)(LACI)のクニツドメイン1を含むループ構造のパリエント型である。LACIは、パラダイムクニツドメインである明確に定義された内部のペプチドループ構造を3つ含む(Girard, T.

10

20

30

40

50

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

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

例示的な血漿カリクレイン結合タンパク質は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20120201756号に開示されている。一部の実施形態において、カリクレイン結合タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01（DX-2922とも呼称される）、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03

10

20

30

40

50

、X 6 7 - G 0 4、X 1 1 5 - B 0 7、X 1 1 5 - D 0 5、X 1 1 5 - E 0 9、X 1 1 5 - H 0 6、X 1 1 5 - A 0 3、X 1 1 5 - D 0 1、X 1 1 5 - F 0 2、X 1 2 4 - G 0 1 (本明細書ではDX - 2 9 3 0またはラナデルマブとも呼称される)、X 1 1 5 - G 0 4、M 2 9 - D 0 9、M 1 4 5 - D 1 1、M 0 6 - D 0 9およびM 3 5 - G 0 4からなる群より選択される抗体の軽鎖および/または重鎖を有する抗体(例えば、ヒト抗体)である。一部の実施形態において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、M 1 6 2 - A 0 4、M 1 6 0 - G 1 2、M 1 4 2 - H 0 8、X 6 3 - G 0 6、X 1 0 1 - A 0 1(本明細書ではDX - 2 9 2 2とも呼称される)、X 8 1 - B 0 1、X 6 7 - D 0 3、X 6 7 - G 0 4、X 8 1 - B 0 1、X 6 7 - D 0 3、X 6 7 - G 0 4、X 1 1 5 - B 0 7、X 1 1 5 - D 0 5、X 1 1 5 - E 0 9、X 1 1 5 - H 0 6、X 1 1 5 - A 0 3、X 1 1 5 - D 0 1、X 1 1 5 - F 0 2、X 1 2 4 - G 0 1、X 1 1 5 - G 0 4、M 2 9 - D 0 9、M 1 4 5 - D 1 1、M 0 6 - D 0 9およびM 3 5 - G 0 4と競合するか、またはこれらと同じエピトープに結合する。一部の実施形態において、血漿カリクレイン結合タンパク質は、ラナデルマブである。参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2 0 1 1 0 2 0 0 6 1号および米国特許出願公開第2 0 1 2 0 2 0 1 7 5 6号を参照のこと。

10

【0 1 4 1】

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

20

【0 1 4 2】

ラナデルマブの重鎖可変領域の配列(配列番号4)

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYIMMWV  
 RQA PGKGLEWVSG IYSSGGITVY ADSVKGRFTI SRD  
 NSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAYRR IGVPRRDEFD  
 IWGQGTMTV SS

【0 1 4 3】

ラナデルマブの軽鎖可変領域の配列(配列番号5)

DIQMTQSPS TLASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQ  
 QK PGKAPKLLIY KASTLES GVPSRFSGSGSGT EFTL  
 TISSLQ PDDFATYYCQ QYNTY WTFGQ GTKVEI

30

【0 1 4 4】

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

40

【0 1 4 5】

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

【0 1 4 6】

ブラジキニンB2受容体阻害剤

50

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

【0147】

C1 - INH 補充薬

一部の実施形態では、C1 - INH 補充薬などの C1 エステラーゼインヒビター（C1 - INH）が対象に投与される。例示的な C1 - INH 補充薬は公的に利用可能であり、これらには、例えば、ヒト血漿由来 C1 - INH（例えば、ペリナート（登録商標）およびシンライズ（登録商標））が包含される。

10

【0148】

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

【実施例】

【0149】

実施例

実施例 1: H A E 患者からのサンプルでは健康な個体に比べて異なって存在する R N A 分子の特定

20

遺伝性血管性浮腫の新規の R N A バイオマーカーを調査するために、H A E を有する患者から得られた血漿サンプル中に存在する循環低分子 R N A (circulating small RNA) を健康な個体から得られたサンプルと比較して分析を実施した。健康な個体 (n = 3) ならびに疾患の静止状態の間の H A E を有する患者（「基礎的状态」；N = 19）および浮腫性発作中の H A E を有する患者（「発作」；N = 20）から循環クエン酸血漿を採取した。血漿サンプルから R N A を抽出した。HiSeq 2500 シーケンシングシステム (Illumina) を用いて 128 ~ 158 ヌクレオチドのライブラリーフラグメントを配列決定した。リードを逆多重化し、アダプター配列を除去し、リード数が 5 を超えるユニーク配列を作成した。配列アラインメントツールである Bowtie2 (bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml) を用いて、互いに重複しない配列 (non-redundant sequences) を参照用ゲノム (hg19) と配列比較し、完全に一致するアラインメントおよび 1 ヌクレオチドのミスマッチのアラインメントを伴う配列を、さらに cDNA、ノンコーディング R N A、miRNA および piRNA のデータベースで配列比較した。RNASeq のデータにより、1,811 の検出可能なヒト R N A 転写物および 457 のヒトマイクロ R N A が特定された (サンプルの 25% 以上において 10 リード以上)。検出された R N A のそれぞれの存在量を、健康な個体からのサンプルと H A E を有する患者からのサンプルとの間で比較した。特定のミトコンドリアタンパク質をコードする R N A 転写物は、H A E 患者からのサンプルでは健康な個体からのサンプルに比べて著しく上昇していることが見出された (図 1) 。さらに、RNASeq 分析により、H A E 患者からのサンプルでは健康な個体からのサンプルに比べて異なって発現している 24 のマイクロ R N A が特定された。特定された R N A 転写物とマイクロ R N A を、健康な個体 (N = 20)、疾患の静止状態の間の H A E を有する患者 (N = 34) および浮腫性発作中の H A E を有する患者 (N = 18) から得られた別個のサンプルに対する RT - qPCR を用いて検証した。

30

40

【0150】

図 1 に示されるように、最初の RNASeq において、ならびに RT - qPCR 分析でも、ミトコンドリアにコードされた NADH : ユビキノンオキシドレダクターゼコアサブユニット 3 (MT - ND3) とミトコンドリアにコードされたシトクロム C オキシダーゼ I I I のミトコンドリアにコードされた転写物の R N A 転写物は、(発作中の、または静

50

止状態の間の) H A Eを有する患者からのサンプルでは、健康な個体からのサンプルに比べて、より高かった。これらの結果により、これらのRNAは、H A Eを有する患者からのサンプルと健康な個体からのサンプルとを区別するためのバイオマーカーとして使用できると示された。

【0151】

図2のパネルAとパネルBに示されるように、いくつかのマイクロRNAは、H A E患者および健康な個体から得られたサンプルにおいて異なって存在することが見出された。例えば、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-1307-3p、hsa-miR-355-3pおよびhsa-miR-485-5pは、H A E患者からのサンプルでは上昇していた。また、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-17-5pおよびhsa-miR-885-5pを含め、いくつかのマイクロRNAは、H A E患者からのサンプルでは低下したレベルにあることも見出された。最後に、この分析はまた、発作中のH A E患者からのサンプルでは基礎的状态にあるH A E患者に比べて低下しているいくつかのマイクロRNA(例えば、hsa-miR-1307-3p、hsa-miR-335-3pおよびhsa-miR-485-5p)も特定した(図2のパネルC)。

10

【0152】

本明細書で特定されたRNA(例えば、H A E患者と健康な個体との間で著しい倍率変化を有するRNA)のいずれも、例えば、接触活性化系に関連する疾患(例えば、H A E)のリスクがある患者を特定するための、治療の候補を選択するための、疾患の進行もしくは病状をモニタリングするための、疾患に対する治療の有効性を評価するための、治療の過程を決定するための、疾患もしくは障害が接触活性化系に関連しているかどうかを特定するための、および/または研究目的(例えば、新しい治療法の開発のために利用される可能性がある疾患のメカニズムの研究を含む)の、方法において、接触活性化系に関連する疾患のバイオマーカーとして(個別に、または組み合わせて(バイオマーカーのセットで))使用されてよい。

20

【0153】

他の実施形態

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

30

【0154】

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

【0155】

均等物および範囲

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

40

【0156】

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

50

とみなされる。本開示は、群のまさに1つのメンバーが所与の産物またはプロセスに存在するか、所与の産物またはプロセスにおいて使用されるか、あるいは所与の産物またはプロセスに関連する、実施形態を包含する。本開示は、群のメンバーの2つ以上または全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、所与の産物またはプロセスにおいて使用されるか、あるいは所与の産物またはプロセスに関連する、実施形態を包含する。

【0157】

さらに、本開示は、列挙される請求項のうちの1つ以上からの1つ以上の限定、要素、条項および説明用語が別の請求項に導入された、全ての変形、組み合わせおよび置換を包含する。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項が、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項に見出される1つ以上の限定を含むように改変されてよい。要素がリストとして（例えば、マーカッシュグループ形式で）提示されている場合、要素の各サブグループも開示されており、任意の要素（複数可）が、そのグループから削除されてよい。一般に、本開示または本開示の態様が特定の要素および/または特徴を含むと言及される場合、本開示または本開示の態様の特定の実施形態は、そのような要素および/または特徴からなるか、本質的にそれらからなる、ということが理解されるべきである。簡潔にするために、それらの実施形態は、本明細書では、それらの言葉によって具体的には記載されていない。用語「含む（comprising）」および「含む（containing）」は、開放的であることを意図され、追加の要素またはステップを含めることを許容する、ということも留意されるべきである。範囲が与えられている場合、端点が含まれる。さらに、別段の指示がない限り、あるいは文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、本開示の種々の実施形態において、記載された範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈が明らかにそうではないことを示さない限り、範囲の下限の10分の1の単位まで、想定し得る。

10

20

【0158】

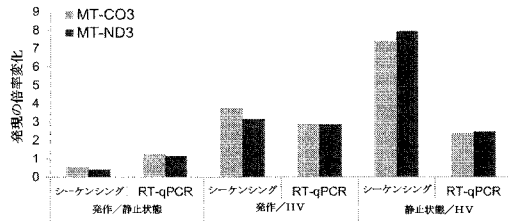
本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、学術論文および他の刊行物に言及するが、これらは全て、参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれた参考文献のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合、本明細書が優先されるものとする。さらに、先行技術に含まれる本開示の特定の実施形態はいずれも、請求項のうちの1つ以上から明示的に除外され得る。そのような実施形態は、当業者に公知であると見なされるため、その除外が本明細書に明示的に記載されていない場合でも、それらは除外され得る。本開示の特定の実施形態はいずれも、先行技術の存在に関連するか否かにかかわらず、任意の理由で、任意の請求項から除外され得る。

30

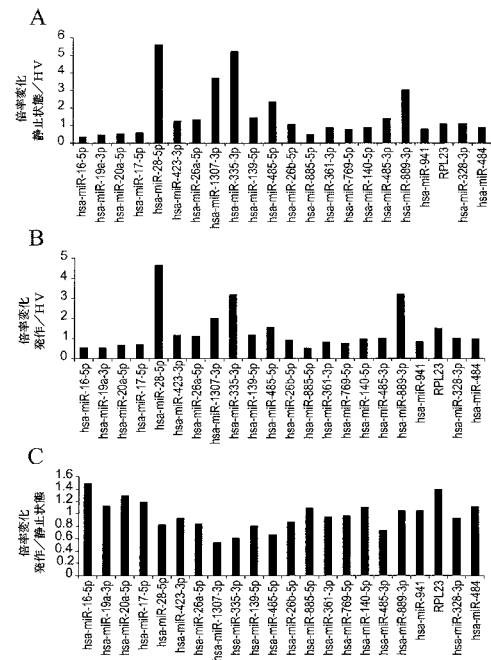
【0159】

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

【 図 1 】



【 図 2 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 令和1年5月16日 (2019.5.16)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2019528733000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/051772

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. G01N33/50 C12Q1/68 ADD.		
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 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALBERTO LÓPEZ-LERA ET AL: "Disease-modifying factors in hereditary angioedema: an RNA expression-based screening", ORPHANET JOURNAL OF RARE DISEASES, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 8, no. 1, 20 May 2013 (2013-05-20), page 77, XP021152609, ISSN: 1750-1172, DOI: 10.1186/1750-1172-8-77 abstract, pg 2, right col; pg 4, left col, third par and pg 4, right col, last par-pg 8; table 2.  ----- -/--	1-7, 9-20, 22-24
<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		*Z* 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	
23 November 2017	05/02/2018	
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  Motrescu-Hateley, E	

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/051772

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Peisong Gao, et al: "Circulating Extracellular Micrnas in Hereditary Angioedema", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1 February 2014 (2014-02-01), page AB32, XP055427084, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.140 Retrieved from the Internet: URL:http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(13)02045-9/pdf abstract 117.	1-7, 9-20, 22-28
X	----- WO 2014/036429 A1 (APTAMIR THERAPEUTICS INC [US]) 6 March 2014 (2014-03-06) par 0018-0019, 0055, 0061, 00110-00111. -----	25-28
A	WO 2016/109774 A1 (DYAX CORP [US]) 7 July 2016 (2016-07-07)  the whole document	1-7, 9-20, 22-28
A	----- WO 2015/031679 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 5 March 2015 (2015-03-05)  the whole document -----	1-7, 9-20, 22-28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2017/051772**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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
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:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
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.:

1-7, 9-20, 22-28(all partially)

**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 Application No. PCT/US2017/051772

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 9-20, 22-28(all partially)

A method for analyzing a sample, comprising: (i) providing a biological sample obtained from a subject having, suspected of having, or being at risk for a disease associated with the contact activation system; and (ii) measuring the level of a RNA biomarker set, which comprises at least one RNA biomarker selected from Table 1, wherein if the RNA biomarker set consists of one RNA biomarker, said biomarker is not hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, or hsa-miR-20a-5p. The at least one RNA biomarker is: MT-C03. A corresponding kit.

---

2. claims: 1-7, 9-20, 22-28(all partially)

A method for analyzing a sample, comprising: (i) providing a biological sample obtained from a subject having, suspected of having, or being at risk for a disease associated with the contact activation system; and (ii) measuring the level of a RNA biomarker set, which comprises at least one RNA biomarker selected from Table 1, wherein if the RNA biomarker set consists of one RNA biomarker, said biomarker is not hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, or hsa-miR-20a-5p. The at least one RNA biomarker is: MT-ND3. A corresponding kit.

---

3-5. claims: 21(completely); 1-5, 8-20, 22-28(partially)

A method for analyzing a sample, comprising: (i) providing a biological sample obtained from a subject having, suspected of having, or being at risk for a disease associated with the contact activation system; and (ii) measuring the level of a RNA biomarker set, which comprises at least one RNA biomarker selected from Table 1, wherein if the RNA biomarker set consists of one RNA biomarker, said biomarker is not hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, or hsa-miR-20a-5p. The at least one RNA biomarker is one of the following: hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-485-5p. A corresponding kit.

---

6. claims: 1-5, 8-20, 22-28(all partially)

A method for analyzing a sample, comprising: (i) providing a biological sample obtained from a subject having, suspected of having, or being at risk for a disease associated with the contact activation system; and (ii) measuring the level of a RNA biomarker set, which comprises at least one RNA biomarker selected from Table 1, wherein if the RNA biomarker set consists of one RNA biomarker, said biomarker

International Application No. PCT/US2017/051772

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

is not hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, or  
hsa-miR-20a-5p. The at least one RNA biomarker is one of the  
biomarkers as disclosed in claim 8. A corresponding kit

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/051772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014036429 A1	06-03-2014	CA 2882966 A1	06-03-2014
		EP 2890789 A1	08-07-2015
		HK 1212381 A1	10-06-2016
		US 2015232837 A1	20-08-2015
		WO 2014036429 A1	06-03-2014
WO 2016109774 A1	07-07-2016	AU 2015373910 A1	27-07-2017
		CA 2972800 A1	07-07-2016
		CN 107405399 A	28-11-2017
		EA 201791527 A1	29-12-2017
		EP 3240570 A1	08-11-2017
		KR 20170118058 A	24-10-2017
		WO 2016109774 A1	07-07-2016
WO 2015031679 A2	05-03-2015	AU 2014312196 A1	03-03-2016
		CA 2921839 A1	05-03-2015
		CN 105517556 A	20-04-2016
		EP 3038627 A2	06-07-2016
		JP 2016533751 A	04-11-2016
		KR 20160048119 A	03-05-2016
		US 2017002359 A1	05-01-2017
		US 2017314026 A1	02-11-2017
		WO 2015031679 A2	05-03-2015

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 Q 1/686 (2018.01)</b>	C 1 2 Q	1/686	Z	
<b>C 1 2 N 15/11 (2006.01)</b>	C 1 2 N	15/11	Z	

(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

(72) 発明者 セクストン, ダニエル, ジェー .

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

(72) 発明者 ヴィスワナサン, マリーニ

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

(72) 発明者 フォーセット, ライアン

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

(72) 発明者 ガウル, トゥリプティ

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

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA14 FB02

4B063 QA19 QQ52 QQ53 QR08 QR62 QS25 QS36

专利名称(译)	遗传性血管性水肿のRNA生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019528733A</a>	公开(公告)日	2019-10-17
申请号	JP2019514714	申请日	2017-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
[标]发明人	セクストンダニエルジェー フォーセットライアン		
发明人	セクストン,ダニエル,ジェー. ヴィスワナサン,マリーニ フォーセット,ライアン ガウル,トゥリプティ		
IPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/6813 C12Q1/686 C12N15/11		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/178 C12Q1/6876 G01N33/502 G01N2800/224 C12Q1/6813 C12Q1/6851 C12Q1/686 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/6883.ZNA.Z G01N33/50.P G01N33/53.M G01N33/543.501.A C12Q1/6813.Z C12Q1/686.Z C12N15/11.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA14 2G045/FB02 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063 /QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36		
代理人(译)	Iwahori明代		
優先権	62/395811 2016-09-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)  
 本文提供的方法和试剂盒用于分析从患有，怀疑患有接触危险性系统或患有与该疾病相关的疾病的受试者的生物样品。 [选择图]无

(1) 日本国特許庁 (JP)	(2) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2019-528733 (P2019-528733A)
	(43) 公表日	令和1年10月17日 (2019. 10. 17)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/6883 (2018.01)</b>	C12Q 1/6883	ZNAZ
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/50	P
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53	M
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543	501A
<b>C12Q 1/6813 (2018.01)</b>	C12Q 1/6813	Z
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2019-514714 (P2019-514714)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成29年9月15日 (2017. 9. 15)	513168518
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月16日 (2019. 4. 16)	ダイアックス コーポレーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/051772	アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02018/053260	2421, レキシントン, 300 シャイ
(87) 国際公開日	平成30年3月22日 (2018. 3. 22)	アー ウェイ
(31) 優先権主張番号	62/395, 811	(74) 代理人
(32) 優先日	平成28年9月16日 (2016. 9. 16)	100114775
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	弁理士 高岡 亮一
		100121511
		弁理士 小田 直
		100202751
		弁理士 岩堀 明代
		100191086
		弁理士 高橋 香元
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	遺伝性血管性浮腫のRNAバイオマーカー	