

(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2020-516301

(P2020-516301A)

(43) 公表日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	G O 1 N 33/53 D	
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556232 (P2019-556232)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月10日 (2018.4.10)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月9日 (2019.12.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/059194
 (87) 国際公開番号 WO2018/189198
 (87) 国際公開日 平成30年10月18日 (2018.10.18)
 (31) 優先権主張番号 102017107661.1
 (32) 優先日 平成29年4月10日 (2017.4.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ドイツ (DE)

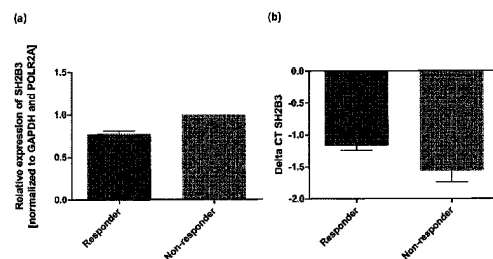
(71) 出願人 519364901
 ユニベルジテート ロストック ツェント
 ラーレ ユニベルジテーツフェアヴァルト
 ムング リフェラート 1. 1 レヒト
 ドイツ連邦共和国、18051 ロストック
 ク、ユニベルジテートシュブラッツ 1
 (74) 代理人 110001896
 特許業務法人朝日奈特許事務所
 (72) 発明者 シュタインホフ、グスタフ
 ドイツ連邦共和国、18211 レートヴ
 イッシュ、ツア ニーダーウング 3
 Fターム(参考) 2G045 AA25 DA14 DA36 FB01 FB02
 FB03
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QR08
 QR55 QR62 QS25 QX01
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨髄応答および免疫応答の予測のための SH2B アダプタータンパク質3

(57) 【要約】

本発明は、診断マーカーとしての使用のための SH2B アダプタータンパク質3 (SH2B3) に関する。さらに、本発明は、SH2B3 遺伝子発現の測定のための方法に関する。

SH2B3 gene expression analysis in peripheral blood of responder and non-responder



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

診断マーカーとしての使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2】

骨髄応答および免疫応答の予測のための診断における使用のための S H 2 B 3。

【請求項 3】

S H 2 B 3 遺伝子の発現が、RNA のレベルで、より好ましくは mRNA のレベルで測定される、請求項 1 または 2 記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 4】

骨髄性幹（前駆）細胞または非骨髄性幹（前駆）細胞および / または血液細胞および / または免疫細胞および / または血管細胞および / または組織細胞の増殖および炎症応答の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

10

【請求項 5】

インテグリンレセプターまたはエリスロポエチン（EPO）レセプターまたは幹細胞因子（CD105）または VEGF-REC（CD309）または幹細胞増殖因子（CD117）またはノッチレセプターの内皮活性化または抑制の発現の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 6】

インテグリンレセプターもしくはエリスロポエチンレセプターもしくは幹細胞因子（CD105）もしくは VEGF-REC（CD309）もしくは CXCR4（CD184）もしくは幹細胞増殖因子（CD117）もしくはノッチ受容体の骨髄性幹（前駆）細胞（MSC の CD133+）活性化または抑制の発現の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

20

【請求項 7】

EPO および VEGF の末梢血液への遊走の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 8】

末梢血液中への、炎症性サイトカインの遊走の予測、好ましくは、TNF アルファ、IP-10、インターロイキンの遊走の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

30

【請求項 9】

EPO および VEGF の末梢血液中への遊走への（幹）細胞応答の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 10】

炎症性サイトカインまたは増殖因子の末梢血液中への遊走への（幹）細胞応答の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 11】

末梢血液中における、薬剤、栄養素、（ナノ）粒子、マイクロ-RNA、タンパク質、融合溶液、および / または有毒な試薬の末梢血液レベルへの（幹）細胞応答の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

40

【請求項 12】

特に骨髄性幹細胞（CD133+）増殖および末梢の VEGF-REC へ結合する EPC（CD133+、CD117+、CD34+）の遊走による、血管新生刺激の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 13】

特に骨髄性幹細胞（CD133+）増殖および血小板の遊走による、巨核球刺激または抑制の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 14】

特に骨髄性幹細胞（CD133+）増殖ならびに赤血球、骨髄性細胞およびリンパ球の遊走による、血管新生増加刺激または抑制の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に

50

記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 1 5】

内皮または脈管前駆細胞または M S C の増殖刺激または増殖の抑制の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 1 6】

幹細胞因子またはインテグリンレセプターまたは細胞接着レセプターの内皮活性化の発現の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 1 7】

エリスロポエチンレセプターまたは V E G F - R E C の内皮活性化の発現の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

10

【請求項 1 8】

白血球またはリンパ球インテグリンレセプター発現の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 1 9】

末梢組織の修復および酸素化の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 0】

骨髄応答または骨髄不全または骨髄性幹細胞増殖応答または血液細胞の骨髄遊走の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 1】

血液細胞、免疫細胞、造血 (C D 1 3 3 +) 幹細胞、骨髄細胞または組織細胞または内皮細胞または非造血性幹細胞の炎症応答の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

20

【請求項 2 2】

骨髄性幹細胞増殖および E P C C D 1 3 3 + の遊走の予測のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 3】

末梢性虚血および炎症の処置における使用のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 4】

血管修復、心筋再生およびアテローム性動脈硬化の治療における使用のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

30

【請求項 2 5】

心筋梗塞、虚血性心筋症、および冠動脈疾患の後の心不全を患う被検体の処置のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 6】

L V E F 修復の治療のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 7】

心臓、血管、または非心血管性の組織再生、応答している患者の選択、および血管新生応答のモニタリングにおける請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

40

【請求項 2 8】

虚血性疾患、発作、末梢性虚血、(多発)外傷、蘇生、ショック、敗血性炎症反応症候群 (S I R S)、および / または敗血症を患う被検体の処置のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 2 9】

感染性疾患、ウイルス性疾患、被爆、化学療法、薬物副作用、および / またはがんを患う被検体の処置のための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用のための S H 2 B 3。

【請求項 3 0】

50

- i . 被験体からの血液サンプリング、
- ii . 好ましくは R T - P C R および / または q P C R による、 S H 2 B 3 遺伝子発現の測定、
- iii . レスポンダーまたはノンレスポンダーへの分類を含む、 S H 2 B 3 遺伝子発現を調べるための方法。

【請求項 3 1】

被検体の組織サンプリングを含む、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

骨髄性幹細胞レスポンダー対ノンレスポンダーを含む、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 3】

炎症レスポンダー対ノンレスポンダーを含む、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記被検体が、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化、セリアック病、一型糖尿病、感染性疾患、自己免疫疾患、および / または関節性リウマチを患っている、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記分類が、共分散分析 (A N C O V A) および / または 2 標本検定を介して行われる請求項 3 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、診断マーカーとしての使用のための S H 2 B アダプタータンパク質 3 (S H 2 B 3) に関する。さらに、本発明は、 S H 2 B 3 遺伝子発現の測定のための方法に関する。

【 0 0 0 2】

リンパ球アダプタータンパク質 (lymphocyte adapter protein、 L N K) としても知られる S H 2 B 3 は、ヒトにおいて、 1 2 番染色体上の S H 2 B 3 遺伝子によってエンコードされているタンパク質である。これは、多くの組織およびセルタイプ中の至る所に発現している ("BioGPS - your Gene Portal System". biogps.org. 2 0 1 6 年 1 0 月 1 1 日に検索) 。 S H 2 B 3 は、造血、炎症および細胞遊走に関連するシグナル経路におけるレギュレーターとして機能する (Devalliere J, Charreau B (2 0 1 1 年、 1 1 月). Biochemical Pharmacology. 82 (10): 1391-402. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.023. PMID 21723852) 。 この結果、これは血液疾患、自己免疫不全および血管疾患に関わっている (Auburger G, Gispert S, Lahut S, Omur O, Damrath E, Heck M, Basak N (2 0 1 4 年、 6 月). World Journal of Diabetes. 5 (3): 316-27. doi:10.4239/wjd.v5.i3.316. PMC 4058736. PMID 24936253) 。 S H 2 B 3 遺伝子はまた、冠動脈疾患、一型糖尿病および関節リウマチの増大されたリスクと関連する 2 7 の一塩基多型のうちの一つを含んでいる (Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, Chasman DI, Caulfield MJ, Devlin JJ, Nordio F, Hyde CL, Cannon CP, Sacks FM, Poulter NR, Sever PS, Ridker PM, Braunwald E, Melander O, Kathiresan S, Sabatine MS (2 0 1 5 年、 6 月). Lancet. 385 (9984): 2264-71. doi:10.1016/S0140-6736(14)61730-X. PMC 4608367. PMID 25748612) 。

【 0 0 0 3】

心臓組織の修復のための幹細胞を用いた再生医療は、ここ 1 6 年における前臨床および臨床開発の最先端である。種々のアプローチのうち、心臓組織中への骨髄性幹細胞の直接的な適用が 2 0 0 1 年の初めての人への適用以来、依然として、最も熱心に行われている臨床開発的治療である (Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Lancet. 2003; 361(9351):45-46; Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Lancet 2003; 361(9351):47-9; Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 133(3):717-25) 。 しかしながら、これまでのところ、その後のいかなるプラセボ対照第 III 相試験においても効能は示され得なかった (Timothy D. Henry, Lem Moye, Jay H. Travers

10

20

30

40

50

e. Circulation Research 2016; 119:404-406; Nasser BA, Ebell W, Dandel Mら、Eur Heart J 2014; 35(19):1263-74; Bartunek J, Terzic A, Davison BAら、Eur Heart J 2016 Dec 23. pii: ehw543. doi: 10.1093/eurheartj/ehw543)。

【0004】

このことは、幹細胞適用から独立した再生メカニズムの導入およびCD34⁺EPC細胞に関連する血管内修復の潜在的な抑制因子という問題を提起した(Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. N Engl J Med. 2005; 353(10):999-1007)。最近発表された仮説に関して、CD133/CD34⁺末梢循環EPC細胞の極めて重要な役割は、心筋再生の欠如に関連付けられ得るかもしれないということが留意されるべきである(Taylor DA, Perin EC, Willerson JTら、Cell Transplant 2016; 25(9):1675-1687; Bhatnagar A, Bollen R, Johnstone BHら、Am Heart J 2016; 179:142-50; Contreras A, Orozco AF, Resende M, et al. Basic Res Cardiol 2017;112(1):3)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、心筋再生のメカニズムおよび骨髄性幹細胞調節の血管新生の役割についての疑問は依然として未解決のままである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、今回、SH2B3遺伝子の導入が、いくつかの生化学的プロセスの応答の抑制または誘導に関連付けられ得ることを見出した。

20

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、レスポンドーおよびノンレスポンドーの末梢血液中でのSH2B3遺伝子発現分析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

したがって、本発明は、診断マーカーとしての使用のためのSH2Bアダプタータンパク質3およびその遺伝子発現に関する。

【0009】

本発明によれば、種々のセルシステムおよび組織におけるSH2B3遺伝子の発現ならびにそれに関連した応答は、種々の疾患(以下に記載されている)の発症機序の同定を優位に可能にする。加えて、種々のセルシステムおよび応答メカニズムにおけるSH2B3の遺伝子発現は、診断のためおよび効果的な医療の恩恵を受けるための被験体に合った予測療法のために使用される。

30

【0010】

好ましくは、SH2B3は、in vitro/ex vivo診断のために、特に、医学的利用のために使用される。

【0011】

本発明はまた、SH2B3遺伝子発現の検査のための方法に関し、該方法は、

40

i. 被験体からの血液サンプリング

ii. SH2B3遺伝子発現の測定、好ましくはRT-PCRおよび/またはqPCRによる

iii. レスポンドーであるかまたはノンレスポンドーであるかの分類を含む。

【0012】

本発明によれば、被検体、例えば患者の応答挙動に関する予測診断、すなわち、患者がある処置に対して応答する(「レスポンドー」)か、または応答しない(「ノンレスポンドー」)か、を可能にする。有利には、ノンレスポンドーとして分類される被検体は、したがって、それから恩恵を受けることがないであろう治療を受けるようには選択されず、

50

これにより、医薬品を用いる治療によって通常受けるであろう薬物有害反応が低減される。加えて、被検体の治療は、効果的な処理に集中するように減らされ得、これによってまたコスト効率のよい治療へと減らされる。

【0013】

好ましくは、本発明の方法は、*in vitro/ex vivo*法である。さらに、上記で明確に記載された工程以外の工程を含み得る。例えば、さらなる工程は、サンプル前処置、またはさらなる評価、または該方法によって得られる結果の使用に関連し得る。該方法は、手動で行われてもよいし、または、自動化の助けを借りて行われてもよい。好ましくは、工程(i)は、自動化によって、例えば適切なロボティックおよびセンサー機器などによって、完全にまたは一部支援され得る。工程(ii)および/または(iii)は、

10

【0014】

好ましくは、SH2B3遺伝子発現の測定は、骨髄応答および免疫応答の予測のための診断において使用され、ここで、「診断(diagnosis)」との用語は、好ましくは、*in vitro/ex vivo*診断を意味している。特に、SH2B3遺伝子発現の測定は、予測治療から恩恵を受け得る疾患に罹患している被検体の予測処置のための診断において使用される。

【0015】

本明細書において使用される「被検体(subject)」との用語は、動物、好ましくはほ乳類、および、最も好ましくはヒトを意味している。本発明にしたがって、そのような被検体のサンプルは、血液、特に抹消血液、および/または血清および/または血漿サンプルおよび/または組織生検サンプルおよび/または例えば内皮前駆細胞(EPIC)などの循環(幹)細胞のサンプル由来である。

20

【0016】

本明細書中で意味されるSH2B3またはその遺伝子発現の量の測定とは、量または濃度を、好ましくは、半定量的または定量的に、測定することに関連する。測定は、直接的または間接的に行われ得る。直接的な測定は、SH2B3自体から得られるシグナルに基づいてSH2B3の量または濃度、および、サンプル中に存在するSH2B3の分子の数に直接的に相関する強度を測定することに関する。このようなシグナル-本明細書においてしばしば強度シグナルとも称される-は、例えば、SH2B3の特定の物理的または化学的特性の強度値を測定することなどによって得られ得る。間接的な測定は、二次成分(すなわち、SH2B3自体ではない成分)または生物学的な読み出しシステム、例えば、計測可能な細胞応答、リガンド、レベル、または酵素反応生成物などから得られるシグナルを測定することを含む。

30

【0017】

本発明にしたがって、SH2B3の量を測定することは、サンプル中の、ペプチド、タンパク質、低分子、例えばDNAもしくはRNAなどの核酸、または細胞もしくはその亜集団の量を測定するための全ての公知の方法によって達成され得る。該方法は、免疫測定法および様々なサンドイッチアッセイ、競争的アッセイ、また他のアッセイのフォーマット中のラベルされた分子を利用し得る方法を含む。このようなアッセイは、好ましくは、測定されるSH2B3またはその遺伝子発現を特異的に認識する例えば抗体などの検出試薬に基づいている。検出試薬は、SH2B3の存在または非存在を示すシグナルを直接的または間接的のどちらかで生成することができるであろう。さらに、シグナル強度は、好ましくは、サンプル中に存在するSH2B3の量に直接的または間接的に(例えば反比例的に)相関し得る。さらなる適切な方法は、例えばその正確な分子量またはNMRスペクトルなどのSH2B3に特異的な物理的または化学的特性を測定することを含んでいる。これらの方法は、好ましくは、バイオセンサー、免疫測定法、FACS分析、バイオチップに連結された光学装置、例えば質量分析器、NMR分析器またはクロマトグラフィー装置などの分析装置を含む。さらに、該方法は、マイクロプレートELISAベースの方法

40

50

、完全に自動化されたまたはロボティックな免疫測定法、酵素コバルト結合分析、およびラテックス凝集分析を含む。

【0018】

好ましくは、SH2B3またはその遺伝子発現の量をそれぞれ測定することは、(a)細胞応答を引き出すことのでき、その強度が適切な時間のあいだSH2B3の量を示すことができる例えば血液細胞などの細胞を接触させる工程、(b)細胞応答を測定する工程を含む。細胞応答を測定するために、サンプルまたは処理されたサンプルが、好ましくは、細胞培養液へと添加され、そして、細胞内応答または細胞外応答が測定される。細胞応答としては、測定可能なレポーター遺伝子の発現、または、例えばペプチド、ポリペプチドまたは低分子などの物質の分泌が挙げられる。発現または物質は、SH2B3の量と相関する強度シグナルを作製するであろう。

10

【0019】

また好ましくは、SH2B3の量を測定することは、サンプル中のSH2B3から得られ得る特異的なシグナルの強度を測定する工程を含む。上述されるように、このようなシグナルは、マスペクトルにおいて観察されるSH2B3に特異的な m/z 変数で観察される、またはSH2B3に特異的なNMRスペクトルで観察されるシグナル強度であり得る。

【0020】

本明細書において使用される「量 (amount)」との用語は、SH2B3の絶対量、SH2B3の相対量または濃度、および、それに相関するまたはそれから導かれ得る任意の値またはパラメータを包含する。このような値またはパラメータは、例えば、マスペクトルまたはNMRスペクトルにおける強度値などの、直接的な測定によって該ペプチドから得られる、全ての特異的な物理的または化学的特性由来のシグナル強度値を含む。さらに、本明細書中で特定される、間接的な測定によって得られる全ての値またはパラメータ、例えば、ペプチドに反応して生物学的読み出しシステムから決定される反応レベル、または、特異的に結合したリガンドから得られるシグナル強度などが含まれる。上述の量またはパラメータに相関している値はまた、全ての標準的な数学的操作によって得られ得ること、および、次数なしに、例えば本明細書中で記載される評価システムなどにおいて、使用され得ることが理解されるであろう。

20

【0021】

本発明の方法において意味される分類は、手動でまたはコンピューターに支援されて実行され得る。コンピューター支援の分類のために、測定された量の値は、コンピュータープログラムによってデータベース内に保管されている適切な参照に対応する値と比較され得る。コンピュータープログラムは、さらに、比較の結果を評価し得る、すなわち、適切な出力フォーマットで所望の評価を自動的に提供し得る。好ましくは、このような評価は、機械学習 (ML) によって行われる。測定値と参照値との比較に基づいて、例えば、心臓幹細胞治療後の心臓の機能改善などの反応を予測することが可能である。特に、高い確からしさ (すなわち被検体がレスポnderであろうこと) または低い確からしさ (すなわち、被検体がノンレスポnderであろうこと) があるのか、または被検体が両価性であるのかを分類しおよび予測することが可能であろう。したがって、参照値は、比較される量のあいだの相違または類似性のどちらかがこれらの試験の被検体を同定することを可能とするように選択される。

30

40

【0022】

本明細書中で使用される用語「参照 (reference)」とは、被験体を、治療から恩恵を受けることが期待され得る被検体の群または恩恵のある治療が期待できない被検体の群のどちらかの群または両価性である被検体へと振り分けることを可能にするSH2B3の量に基づいた値、閾値または差を意味する。

【0023】

用語「サンプル (sample)」とは、体液のサンプル、および、好ましくは、血液 (全血)、血漿または血清のサンプルを意味する、しかしながら、該用語はまた、上述の全血、

50

血漿、または血清から、例えば部分精製などによって得られる例えば血液、血漿または血清の画分などの例えば前処置工程などによって得られる全てのサンプルを包含する。

【0024】

本発明のさらに好ましい態様は、以下の記載とともに従属クレームから導かれ、ここで、ある種のカテゴリの特許クレームは異なるカテゴリの従属クレームによって形成され得、および、種々の実施例の特徴は、新しい実施例へと組み合わせられ得る。上記および下記でなされた用語の定義および説明は、本明細書および添付のクレーム中で記載される全ての実施例に適切に適用されることが理解されるべきである。以下において、本発明の方法の具体的な実施形態がさらに特定される。

【0025】

好ましい実施形態において、SH2B3は、骨髄応答および免疫応答の予測のための診断において使用される。用語「診断 (diagnosis)」は好ましくは、*in vitro* / *ex vivo* 診断を意味している。

【0026】

本明細書において使用される用語「予測すること (predicting)」は、確からしさであって、それに基づいて試験体が、例えば骨髄応答および/または免疫応答などから恩恵を受けるであろうという確からしさを評価することを意味する。本発明にしたがって行われる予測は、確からしさが高く、および、したがって、例えば被検体の例えば心臓システムなどの機能的改善が起こることが期待されているかどうか、または、確からしさが治療の成功が両価的であるくらいであるか、または、確からしさが低く、および、したがって、被検体での機能的改善が起こらないであろうことが期待されるのかどうか、を評価することを可能にする。

【0027】

当該技術分野における当業者によって理解されるであろうように、このような評価は、通常、診断される被検体の100%について正確であることは意図されない。しかしながら、用語は、統計的に有意な割合の被検体に対して正確であることを要件としている(例えばコホート研究におけるコホート)。割合が統計的に有意であるかどうかは、当該技術分野における当業者によって困難なしに、例えば信頼区間の決定、p値の決定、Studentのt検定、Mann-Whitney検定などの様々な公知の統計評価ツールを用いて決定され得る。詳細は、例えば、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983などで見ることができる。優位には、本発明の方法は、共分散分析 (ANCOVA) および/または2標本検定を介して行われ得る分類を含み得る。

【0028】

好ましくは、SH2B3遺伝子の発現は、RNAレベルで、より好ましくはmRNAレベルで定量的に検出され、これにより、SH2B3遺伝子発現の迅速かつ正確な測定が可能である。診断マーカーとしての使用のためのSH2B3遺伝子発現は、ヒトまたは非ヒトSH2B3全配列の天然のバリエーションを包含するだけでなく、例えばwww.uniprot.org/uniprot/Q9UQQ2もしくは009039またはwww.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SH2B3に示されているようなその配列の一部およびそれらの修飾物をも包含する。特に、例えば全血、CD14単球、CD33骨髄細胞、BDCA4樹状細胞、CD56NK細胞、CD4T細胞、CD8T細胞などである、体液および/または組織および/または細胞中のSH2B3bの遺伝子発現パターンもまた決定され得る。しかしながら、SH2B3遺伝子の発現または遺伝子パターンは、代わりにまたは追加で、タンパク質レベルにおける間接的な方法によって、例えば、SH2B3へと結合する抗体を介した検出などによって、決定されてもよい。

【0029】

好ましい実施形態において、本発明は、骨髄性幹(前駆)細胞または非骨髄性幹(前駆)細胞および/または血液細胞および/または免疫細胞および/または血管細胞および/または組織細胞の増殖および炎症応答の予測のための診断におけるSH2B3に関連する

10

20

30

40

50

。

【0030】

さらに好ましい実施形態は、インテグリンレセプターまたはエリスロポエチン（EPO）レセプターまたは幹細胞因子（CD105）またはVEGF-REC（CD309）または幹細胞増殖因子（CD117）またはノッチレセプターの内皮活性化または抑制の発現の予測のための診断マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【0031】

本明細書において使用される用語「インテグリンレセプター（Integrin Receptor）」は、細胞-細胞外マトリックス（ECM）接着を可能にする膜貫通レセプターを意味する。リガンドの結合の際、インテグリンは、例えば細胞サイクルの調節、細胞内の細胞骨格の組織化、および細胞膜への新規レセプターの移動などの細胞シグナルを媒介するシグナル伝達経路を活性化する。

10

【0032】

本明細書において使用される用語「エリスロポエチン（Erythropoietin、EPO）」は、サイトカインである溶解性のポリペプチドを意味する。これは、典型的には低酸素条件下で腎臓細胞によって産生される。

【0033】

好ましくは、EPOは、例えばYanagawa 1984, J. Biol. Chem. 259(5): 2707-2710などに記載されているように、ヒトIL-6を意味する。より好ましくは、ヒトIL-6は、Genbankの登録番号p01588.1, GI: 119526で示されるようなアミノ酸配列を有する。該用語はまた、上記のヒトEPOポリペプチドのバリエーションも包含する。このようなバリエーションは、上記のEPOポリペプチドと少なくとも同一の必須の生物学的および免疫学的特性を有する。具体的には、それらは、本明細書において言及される同一の特異的なアッセイによって、例えば該EPOポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイなどによってそれらが検出可能である場合、同一の必須の生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明にしたがって言及されるバリエーションは、少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加に起因して異なるアミノ酸配列を有し得、ここで、バリエーションのアミノ酸配列は依然として、好ましくは、特異的なIL-6アミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一である。バリエーションは、アレル多型、スプライシングバリエーション、または任意の他の種に特異的なホモログ、パラログ、またはオルソログであり得る。さらに、本明細書において言及されるバリエーションは、特異的なEPOまたは上述の種類のバリエーションのフラグメントを、これらのフラグメントが上記に記載されるような必須の免疫学的および生物学的特性を有している限り、包含する。このようなフラグメントは、例えば、EPOの分解生成物などであり得る。バリエーションは、それらが本明細書で言及された同一の特異的なアッセイによって、例えばEPOポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイなどによって検出可能である場合に同一の必須の生物学的および免疫学的特性を有しているとみなされる。好ましいアッセイは、以下の実施例に記載されている。例えばリン酸化またはミリスチル化などの翻訳語修飾に起因して異なるバリエーションもさらに含まれる。

20

30

40

【0034】

用語「VEGF-REC（CD309）」は、キナーゼ挿入ドメインレセプター（KDR、タイプIII受容体型チロシンキナーゼ）を意味し、これは、血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR-2）とも知られている。KDRは、それをエンコードしているヒト遺伝子である。KDRは、CD309（分化抗原群（cluster of differentiation）309）とも称されている。KDRはまた、Flk1（Fetal Liver Kinase 1）とも知られている。

【0035】

本明細書において使用される用語「幹細胞（stem cell）」とは、他のタイプの幹細胞

50

へと分化することのできる生物学的細胞を意味し、同じタイプの幹細胞をさらに産生するために分裂し得る。これらは、多細胞生物においてみられる。幹細胞因子 (CD105) はまた、エンドグリン (endoglin) としても知られており、幹細胞において発現している主な細胞膜糖タンパク質である。

【0036】

用語「幹細胞因子レセプター (stem cell factor receptor) (SCFR)」はまた、がん原遺伝子 *c-Kit* またはチロシンプロテインキナーゼ *Kit* または CD117 としても知られており、ヒトにおいては KIT 遺伝子によってエンコードされている受容体型チロシンキナーゼタンパク質である。種々のアイソフォームをエンコードする複数の転写物バリエーションがこの遺伝子に関して発見されている。

10

【0037】

用語「ノッチ受容体 (Notch receptor)」とは、ノッチタンパク質、例えば NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3 および NOTCH4 を意味している。ノッチ受容体は、一回膜貫通タンパク質である。短い細胞外領域を含むより小さなノッチタンパク質とのカルシウム依存性の非共有的な相互作用に関連する大きな細胞外部分、単一の膜貫通部分、および小さな細胞内領域を含むヘテロオリゴマーである。

【0038】

次の好適な実施形態は、インテグリンレセプターもしくはエリスロポエチンレセプターもしくは幹細胞因子 (CD105) もしくは VEGF-REC (CD309) もしくは CXCR4 (CD184) もしくは幹細胞増殖因子 (CD117) もしくはノッチ受容体の骨髓性幹 (前駆) 細胞 (MSC の CD133+) 活性化または抑制の発現の予測のための診断マーカーとしての使用のための SH2B3 に関する。

20

【0039】

用語「骨髓性幹細胞活性の発現 (expression of bone marrow stem cell activation)」とは、骨髓の間葉系幹細胞 (MSC) 上での CD133 の発現 (= CD133+) を意味する。「CD133」は、抗原であり、ヒトにおいては PROM1 遺伝子によってエンコードされている Prominin-1 としても知られている。これは、ペンタスパン膜貫通糖タンパク質 (5-transmembrane、5-TM) のうちの一つであり、細胞突起に特異的に局在している。

【0040】

用語「CXCR-4」は、CXCKeモカインレセプター4型を意味し、融合体または CD184 (分化抗原群 184) としても知られており、ヒトにおいては CXCR4 遺伝子によってエンコードされているタンパク質である。

30

【0041】

さらにまた好適な実施例は、EPO および VEGF の末梢血液への遊走の予測のための診断マーカーとしての使用のための SH2B3 を包含する。

【0042】

本明細書において使用される用語「血管内皮増殖因子 (VEGF)」とは、血管新生、脈管形成、および血管透過性を刺激する溶解性ポリペプチド増殖因子を意味する。これは様々なセルタイプで産生される。これらは、5つの異なる VEGF ポリペプチド、VEGF-A、プラセンタ増殖因子 (PGF)、VEGF-B、VEGF-C、および VEGF-D である。本明細書において使用される場合、好ましくは、VEGF-A が意図される。VEGF-A に関して公知の択一的なスプライシングの結果得られる様々なアイソフォームが存在する。最も知られているものは、VEGF₁₂₁、VEGF_{121b}、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF_{165b}、VEGF₁₈₉、および VEGF₂₀₆ である。

40

【0043】

好ましくは、VEGF は、Tischer 1991, J. Biol. Chem. 266 (18): 11947-11954 に記載されているヒト VEGF-A (VEGF-A の最も長いアイソフォームとして開示されている) を意味する。アミノ酸配列に関しては、例えば、Genbank 受理番号 NP_001020537.2, GI: 76781480 も参照のこと (Genbank は、www.ncbi.nlm.nih.gov/entre

50

zで、NCBI（アメリカ合衆国）からアクセス可能である）。用語はまた、上記のヒト VEGFポリペプチドのバリエーションを包含する。このようなバリエーションは、上記の VEGFポリペプチドと同一の必須の生物学的および免疫学的特性を少なくとも有する。具体的には、それらは、本明細書において言及される同一の特異的アッセイによって、例えば該 VEGFポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた ELISAアッセイなどによってそれらが検出可能である場合、同一の必須の生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明にしたがって言及されるバリエーションは、少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加に起因して異なるアミノ酸配列を有し得、ここで、バリエーションのアミノ酸配列は依然として、好ましくは、特異的な VEGFポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または 99% 同一である。2つのアミノ酸配列のあいだの同一性の程度は当該技術分野において公知であるアルゴリズムによって決定され得る。好ましくは、同一性の程度は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインされた2つの配列を比較することによって決定されるものであり、ここで、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列のフラグメントは、最適なアラインメントのための参照配列（すなわち付加または欠失を含んでいない）と比較して、付加または欠失（例えばギャップまたはオーバーハングなど）を含んでいてもよい。パーセンテージは、一致した位置の数を得るために両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在している位置の数を決定すること、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算すること、および配列相同性のパーセンテージを得るために結果に 100 を乗じることによって算出される。比較のために最適な配列のアラインメントは、Smith 1981, *Add. APL. Math.* 2:482に開示されている局地的相同性アルゴリズムによって、Needleman 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson 1988, *Proc Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444の類似性サーチの方法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター処理された実行（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison WIの G A P、B E S T F I T、B L A S T、F A S T、P A D T A、および T F A S T A）によって、または目視での検査によって行われ得る。2つの配列が比較のために同定された場合、G A Pおよび B E S T F I Tが好ましくは、それらの最適なアラインメントおよびしたがって同一性の程度を決定するために用いられる。好ましくは、ギャップ重みとして 5 . 0 0 のデフォルト値およびギャップ重み長さとして 0 . 3 0 のデフォルト値が使用される。上記で言及されたバリエーションは、アレル多型、または任意の他の種に特異的なホモログ、パラログ、またはオルソログであり得る。さらに、本明細書において言及されるバリエーションは、特定の VEGFポリペプチドまたは上述のタイプのバリエーションのフラグメントまたはサブユニットを、これらのフラグメントが上記に記載されるような必須の免疫学的および生物学的特性を有している限り、包含する。このようなフラグメントは、例えば VEGFポリペプチドの分解生成物などであってもよい。バリエーションは、それらが本明細書で言及された同一の特異的アッセイによって、例えば該 VEGFポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた ELISAアッセイなどによって検出可能である場合に同一の必須の生物学的および免疫学的特性を有しているとみなされる。

10

20

30

40

【0044】

別の好ましい実施形態にしたがい、SH2B3は、炎症性サイトカイン（例えば、TNFアルファ、IP-10、インターロイキンなど）の末梢血液中への遊走の予測のための診断用マーカーとして使用される。

【0045】

別の好ましい実施形態は、EPOおよびVEGFの末梢血液中への遊走に対する（幹）細胞応答の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【0046】

次の実施形態は、炎症性サイトカインまたは増殖因子の末梢血液中への遊走に対する（幹）細胞応答の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

50

【 0 0 4 7 】

さらなる実施形態は、末梢血液中における、薬剤、栄養素、（ナノ）粒子、マイクロ-RNA、タンパク質、融合溶液、および/または有毒な試薬の末梢血液レベルへの（幹）細胞応答の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【 0 0 4 8 】

次の実施形態によれば、SH2B3は、特に、骨髄性幹細胞（CD133+）増殖および末梢のVEGF-RECへ結合するEPC（CD133+、CD117+、CD34+）の遊走による、血管新生刺激の予測のための診断用マーカーとして使用される。

【 0 0 4 9 】

さらに別の好ましい実施形態は、特に、骨髄性幹細胞（CD133+）増殖および血小板の遊走による、巨核球刺激または抑制の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

10

【 0 0 5 0 】

次の実施形態によれば、SH2B3は、特に、骨髄性幹細胞（CD133+）増殖および赤血球、骨髄性細胞およびリンパ球の遊走による、血管新生増加刺激または抑制の予測のための診断用マーカーとして使用される。

【 0 0 5 1 】

さらなる実施形態は、内皮または脈管前駆細胞またはMSCの増殖刺激または増殖の抑制の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【 0 0 5 2 】

次の実施形態は、幹細胞因子（SCF）またはインテグリンレセプターまたは細胞接着レセプターの内皮活性化の発現の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3を扱う。

20

【 0 0 5 3 】

別の実施形態は、エリスロポエチンレセプターまたはVEGF-RECの内皮活性化の発現の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3を扱う。

【 0 0 5 4 】

さらなる別の実施形態は、白血球またはリンパ球インテグリンレセプター発現の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【 0 0 5 5 】

さらなる実施形態は、末梢組織の修復および酸素化の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

30

【 0 0 5 6 】

別の実施形態は、骨髄応答または骨髄不全または骨髄性幹細胞増殖応答または血液細胞の骨髄遊走の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3を包含する。

【 0 0 5 7 】

さらなる実施形態は、血液細胞、免疫細胞、造血（CD133+）幹細胞、骨髄細胞または組織細胞または内皮細胞または非造血性幹細胞の炎症応答の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3を包含する。

【 0 0 5 8 】

用語「造血幹細胞（hematopoietic stem cell）、HSC」は、他の血液細胞を増加させる幹細胞を意味する。このプロセスは造血と称される。このプロセスは、赤色骨髄中、大部分の骨の中心部で起こる。

40

【 0 0 5 9 】

別の実施形態は、骨髄性幹細胞増殖およびEPC CD133+の遊走の予測のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【 0 0 6 0 】

さらなる他の実施形態は、末梢性虚血および炎症の処置における使用のための、診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【 0 0 6 1 】

50

別の実施形態によれば、SH2B3は、血管修復、心筋再生およびアテローム性動脈硬化の治療における診断用マーカーとして使用される。

【0062】

さらに別の実施形態は、心筋梗塞、虚血性心筋症、および冠動脈疾患の後の心不全を患う被検体の処置における使用のためのSH2B3に関する。

【0063】

本明細書中において使用される用語「心不全 (heart failure)」は、左心不全、右心不全、または両室不全を含む心臓の任意の機能障害を意味する。典型的には、本明細書中で言及される用語心不全は、減少された駆出分画、例えば顕著に減少されたLVEF (左室駆出率) を結果としてもたらす左心不全である。心不全のさらなる徴候は、臨床医にとっては広く公知である。本明細書において言及される心不全は、急性型および慢性型の、ならびに、全てのステージの重症度の心不全、例えば、New York Heart Association (NYHA) の分類システム、NYHA I ~ IVにしたがった全てのステージ左心不全など、を包含する。

10

【0064】

次の実施形態は、LVEF修復の治療のための診断用マーカーとして使用のためのSH2B3に関する。

【0065】

本明細書中において使用される用語「回復 (recovery)」とは、該LVEFを試験体の処置の前および後で比較した際に観察される心臓のLVEFの増加を意味する。好ましくは、顕著な増加とは、処置後に観察される5%以上のLVEFの増加である。機能向上を見出すために追加で考慮され得るさらなるパラメータは、10%より大きい全灌流欠損サイズの減少、MIBI SPECTで定量された左室収縮終期容積の10%より大きい減少、および経胸壁エコー法によって測定される収縮期最高流速の10%より大きい増加である。

20

【0066】

さらなる次の実施形態は、心臓、血管、または非心血管性の組織再生、応答している患者の選択、および血管新生応答のモニタリングにおける診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3を包含する。

【0067】

本明細書中において使用される用語「心臓、血管、または心血管性の組織再生 (cardiac, vascular or cardiovascular tissue regeneration)」とは、心臓、血管、または心血管性システムに関連する再生および/または疾患の処置および/または改善を含む。

30

【0068】

さらなる好ましい実施形態は、虚血性疾患、発作、末梢性虚血、(多発)外傷、蘇生、ショック、敗血性炎症反応症候群 (SIRS)、および/または敗血症のための診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3に関する。

【0069】

優位な、診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3は、感染性疾患、ウイルス性疾患、被爆、化学療法、薬物副作用、および/またはがんを患う被検体の処置のために使用される。

40

【0070】

本発明による診断用マーカーとしての使用のためのSH2B3は、ヒト被検体における使用に非常に優位であるが、ヒトに限定されるわけではなく、非ヒトである対象に対しても用いられ得る。

【0071】

好ましい方法は、被検体がレスポンドであるかまたはノンレスポンドであるかを予測することに関連し、および、以下の工程：

(i) 被験体からの血液サンプリング、

(ii) 好ましくはRT-PCRおよび/またはqPCRによる、SH2B3遺伝子発現の

50

測定、

(iii) 測定された量をベースライン値および/または参照値と比較すること、
(iv) レスポンダーまたはノンレスポンダーへの分類を含む。

【0072】

好ましい方法は、優位には、*in vitro*/*ex vivo* 診断に使用され、および、医学的使用のために使用される。

【0073】

好ましい方法は、被検体の組織サンプリングを含む。組織サンプリングは、あるいは、血液サンプリングのために行われてもよい。

10

【0074】

好ましい方法にしたがって、血液および/または組織サンプルは、前処理工程によって得られ、具体的には、例えば部分的精製などによって血液、血漿または血清が得られる。

【0075】

別の好ましい方法は、骨髄性幹細胞レスポンダー対ノンレスポンダーの分類を包含する。

【0076】

さらなる好ましい方法は、炎症レスポンダー対ノンレスポンダーの分類を包含する。

【0077】

次の好ましい実施形態によれば、好ましい方法は、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化、セリアック病、一型糖尿病、感染性疾患、自己免疫疾患、および/または関節性リウマチを患っている被検体を扱う。

20

【0078】

好ましい実施形態によれば、方法は、骨髄性幹(前駆)細胞または非骨髄性幹(前駆)細胞および/または血液細胞および/または免疫細胞および/または血管細胞および/または組織細胞の増殖および炎症反応の予測のための診断において使用される。

【0079】

さらなる好ましい方法は、インテグリンレセプターもしくはエリスロポエチン(EPO)レセプターもしくは幹細胞因子(CD105)もしくはVEGF-REC(CD309)もしくは幹細胞増殖因子(CD117)もしくはノッチ受容体の内皮活性化または抑制の発現の予測のために使用される。

30

【0080】

次の好ましい方法は、インテグリンレセプターもしくはエリスロポエチンレセプターもしくは幹細胞因子(CD105)もしくはVEGF-REC(CD309)もしくはCXCR4(CD184)もしくは幹細胞増殖因子(CD117)もしくはノッチ受容体の骨髄性幹(前駆)細胞(MSCのCD133+)活性化または抑制の発現の予測のために使用される。

【0081】

さらにより好ましい方法は、末梢血液へのEPOおよびVEGFの遊走の予測のために使用される。

40

【0082】

別の好ましい方法によれば、炎症性サイトカイン(例えばTNF-アルファ、IP-10、インターロイキンなど)の末梢血液への遊走の予測のために使用される。

【0083】

別の好ましい方法は、EPOおよびVEGFの末梢血液への遊走に対する(幹)細胞応答の予測のために使用される。

【0084】

次の方法は、炎症性サイトカインまたは成長因子の末梢血液への遊走に対する(幹)細胞応答の予測のために使用される。

【0085】

50

さらなる方法は、末梢血液中の薬剤、栄養素、(ナノ)粒子、マイクロ-RNA、タンパク質、融合溶液、および/または有毒な試薬の末梢血液レベルに対する(幹)細胞応答の予測のために使用される。

【0086】

次の好ましい実施形態によれば、方法は、特に、骨髄性幹細胞(CD133+)増殖および末梢のVEGF-RECへ結合するEPC(CD133+、CD117+、CD34+)の遊走による、血管新生刺激の予測のために使用される。

【0087】

さらに別の好ましい方法は、特に、骨髄性幹細胞(CD133+)増殖および血小板の遊走による、巨核球刺激または抑制の予測のために使用される。

10

【0088】

次の実施形態によれば、方法は、特に、骨髄性幹細胞(CD133+)増殖および赤血球、骨髄性細胞およびリンパ球の遊走による、造血増大刺激または増大の抑制の予測のために使用される。

【0089】

さらなる方法は、内皮または脈管前駆細胞またはMSCの増殖刺激または増殖の抑制の予測のために使用される。

【0090】

次の好ましい方法は、幹細胞因子(SCF)またはインテグリンレセプターまたは細胞接着レセプターの内皮活性化の発現の予測のために使用される。

20

【0091】

別の方法は、エリスロポエチンレセプターまたはVEGF-RECの内皮活性化の発現の予測のために使用される。

【0092】

さらなる次の方法は、白血球またはリンパ球インテグリンレセプター発現の予測のために使用される。

【0093】

さらなる方法は、末梢組織の修復および酸素化の予測のために使用される。

【0094】

別の方法は、骨髄応答または骨髄不全または骨髄性幹細胞増殖応答または血液細胞の骨髄遊走の予測のために使用される。

30

【0095】

さらなる方法は、血液細胞、免疫細胞、造血(CD133+)幹細胞、骨髄細胞または組織細胞または内皮細胞または非造血性幹細胞の炎症応答の予測のために使用される。

【0096】

さらに別の方法は、骨髄性幹細胞増殖およびEPC CD133+の遊走の予測のために使用される。

【0097】

さらなる方法は、末梢性虚血および炎症を処置するために使用される。

【0098】

別の実施形態によれば、方法は、血管修復、心筋再生およびアテローム性動脈硬化の治療において使用される。

40

【0099】

さらなる別の方法は、心筋梗塞、虚血性心筋症、および冠動脈疾患の後の心不全を患う被検体の処置のために使用される。

【0100】

次の方法は、LVEF修復の治療のために使用される。

【0101】

さらに次の方法は、心臓、血管、または非心血管性の組織再生、応答している患者の選択、および血管新生応答のモニタリングにおいて使用される。

50

【0102】

さらなる好ましい方法は、虚血性疾患、発作、末梢性虚血、（多発）外傷、蘇生、ショック、敗血性炎症反応症候群（SIRS）、および/または敗血症を患う被検体の処置のために使用される。

【0103】

さらなる別の方法は、感染性疾患、ウイルス性疾患、被爆、化学療法、薬物副作用、および/またはがんを患う被検体の処置のために使用される。

【0104】

優位には、本発明の方法は、共分散分析（ANCOVA）および/または2標本検定を介して行われ得る分類を含み得る。

10

【0105】

本発明のさらなる特徴は、クレームおよび図面と組み合わせられて実施例から導き出される。単一の特徴は、具体的な実施例において、他の特徴と組み合わせられて実行されてもよく、本発明が主張する範囲を限定するものではない。本発明による以下の実施例の記載は、以下の図面に関連する。

【0106】

ここで、図1は、レスポナーおよびノンレスポナーの末梢血液中でのSH2B3遺伝子発現分析を示している。

【実施例】

【0107】

実施例1

心筋内CD133⁺精製自己骨髄性幹細胞（BMSC）移植が、急性PCIおよび二次的な冠動脈バイパス術による冠動脈血行再建で順に処置された、ST上昇型心筋梗塞（STEMI）および冠動脈3枝病変疾患の後の、左室駆出率（LVEF）の低下を伴う左室心機能の回復のための冠動脈バイパスグラフト（CABG）血管再生への補助的方法として調べられた。安全性および有効性に関する先のトライアル（フェーズI、IIa、IIb）は、向上された左室駆出率（LVEF）、および、補助的なCD133⁺ BMSC処置の冠動脈血管再建術への臨床的安全性を示した。無作為化二重盲検プラセボ対照臨床試験が、臨床的安定性、有効性、および、インターベンションCD133⁺ BMSC移植による心臓の修復機序と関連するCD133⁺骨髄性幹細胞を同定するためのバイオマーカーを評価するためにデザインされた。

20

30

【0108】

無作為化二重盲検プラセボ対照第III層臨床試験が、心筋再生の誘導のための冠動脈バイパス術（CABG）と組み合わせられた心筋内CD133⁺骨髄性幹細胞処置の臨床的安定性および有効性を評価するために行われた。

【0109】

デザイン：GCP-ICHにしたがった多施設二重盲検無作為化プラセボ対照臨床試験。

【0110】

参加者：資格のある患者は、慢性虚血、冠動脈狭窄、および低下したLVEF（25～50%）をもつ梗塞後患者であった。

40

【0111】

介入：82人の患者が、CABG血管再生と組み合わせ、5mLのプラセボまたは0.5～5×10⁶の精製自己CD133⁺骨髄性幹細胞の懸濁液の心筋内適用を受ける2つの群に無作為に選ばれた。

【0112】

結果：主要エンドポイントは、MRIで測定された6m/0後のデルタ（ ）LVEFであった。

【0113】

発見：事前に定められた解析：全体での有効群（n=58）はベースラインLVEF 3

50

3.5 ± 6.3% から 9.6 ± 11.6% (p = 0.001)。プラセボ (n = 30) は 8.2 ± 2.1 (-11.2 ~ -4.5)、p < 0.001。CD133⁺群 (n = 28) は 1.1 ± 13.7 SD、CI -16.7 ~ -6.1、p < 0.001。プラセボ / CD133⁺は、LVEFにおいて差異がなかった (p = 0.355)。CD133⁺はプラセボと比較して、梗塞サイズの減少 (p = 0.022) および生育不能組織の減少 (p = 0.022) で異なっていた。

事後解析：主要エンドポイントレスポナー (R：LVEFが5%以上) 群は、LVEFにおいて大きな増加を示した (17.6% 6か月 / 0、プラセボ対CD133⁺：+13.9対+19.1%、p = 0.066)。ノンレスポナー (NR) (LVEF < 5% 6か月 / 0) (CD133⁺で36%およびプラセボで43.5%) は、末梢血液において、増加されたSH2B3 mRNA発現 (p = 0.032片側p値 / p = 0.073両側p値、NR対R)、増加したEPO (p = 0.02、NR対R) の存在下の減少した血小板 (p = 0.004、NR対R) およびEPC (NR対R、CD133⁺117+、p = 0.027) によって術前に特徴づけられた。長期生存は、NRにおいて低下した (カプランマイヤー法、R対NR、HR 0.3、p = 0.067)。機械学習を用いて、レスポナーまたはノンレスポナーの患者の区別を可能にする10個の術前パラメータが同定された。

10

【0114】

SH2B3発現が、レスポナーおよびノンレスポナーの末梢血液中中で分析された。全血サンプルが、冠動脈バイパスグラフト (CABG) 血管再生の前に21人の患者から採取された。SH2B3の相対的な発現 (a) および対応するCT値 (b) が2-CT法を用いて算出された。全ての値は、平均の ± SEMとしてならびにGAPDHおよびPOLR2Aに対して正規化されて表された。n = 13 (レスポナー)、n = 8 (ノンレスポナー)。CT値：p = 0.033 (両側t検定)。得られたデータは、図1に示されている。結果は、SH2B3発現がレスポナーに対してノンレスポナーにおいて顕著に高かったことを示している。

20

【0115】

上記の臨床試験は末梢血液EPC、血小板およびSH2B3レベルと関連した心筋再生の重要な調節の証拠を示している。これは、高い応答性の患者の診断選択を可能とし、患者にとってテイラーメイドの再生医療へのアクセスを与える。

30

【0116】

実施例2

SH2B3遺伝子発現の測定が全血のサンプリング、その後のRT-PCRによって行われた。

【0117】

【表1】

表1:RT-PCRの適用によるSH2B3遺伝子発現の測定

標的: SH2B3	全血 (EDTA)の サンプリング	方法: RT-PCR	Agilent 2100 バイオアナライザを用いたRNA Integrity Number(RIN)の測定。RINが7以上であるサンプルが以降の実験に用いられた。 RNA濃度および純度のNanoDrop(登録商標) 1000を用いた測定。 2つの内因性正規化コントロール POLR2A TaqMan(登録商標) Gene Expression Assay(Hs00172187_m1、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)およびGAPDH(4326317E、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)が、ΔΔCT方法のために使用された。
--------------	-------------------------	---------------	--

40

【0118】

実施例3

50

末梢血液（EDTA血液）の未変性のサンプルが、LightCycler（登録商標）480 システムII（Roche Deutschland Holding GmbH）を用いた定量リアルタイムPCRに用いられた。

【0119】

1 mLの全血アリコット（-80にて保存）からのRNAの単離が、GeneJET（登録商標）Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて行われた。逆転写反応が、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて行われた。RT-PCRが、StepOnePlus（登録商標）リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems（登録商標））を用いて行われた。cDNA（それぞれの反応について30 ng）、TaqMan（登録商標）Universal PCR Master Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）、およびSH2B3 TaqMan（登録商標）Gene Expression Assay（Hs01081959_g1、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）が用いられた。3回のテクニカルリプリケートが行われた。SH2B3の相対的発現比率を算出するために、CT方法が適用された。

10

【0120】

実施例4

未変性のヒト組織サンプルが、全血サンプルの代わりに用いられた。SH2B3の測定が、実施例2または3で記載されているようにRT-PCRによって行われた。

【0121】

20

実施例5

培養されたヒトまたは非ヒト細胞および組織が、全血サンプルの代わりに用いられた。SH2B3の測定が、実施例2または3で記載されているようにRT-PCRによって行われた。

【0122】

実施例6

遺伝子組み換えのヒトまたは非ヒト細胞、組織および器官が、全血サンプルの代わりに用いられた。SH2B3の測定が、実施例2または3で記載されているようにRT-PCRによって行われた。

【0123】

30

略語

CD = 分化抗原群

CABG = 冠動脈バイパスグラフト

BM = 骨髄

QC = BMから単離されたCD133⁺内で行われる品質維持

LVEF = 左室駆出率

MNC = 単核細胞

PB = 末梢血液

IHG = ISHAGEガイドラインに従って行われる分析

EPC = 内皮前駆細胞、EPCパネル、PB中で測定されるCD

40

CEC = 循環内皮細胞、CECパネル、PB中で測定されるCD

SCF = 幹細胞因子

VEGF = 血管内皮増殖因子

VEGFR2/KDR/VEGF-REC = 血管内皮増殖因子レセプター2/キナーゼ挿入ドメインレセプター

【0124】

実施例7

末梢血液中の誘導されたSH2B3発現の組織再生に対する影響が以下の表2に示されている。

【0125】

50

【表 2】

表2:

	SH2B3 通常	増加されている	
末梢性虚血および炎症(HIF、TNF)	↑	↑	
内皮活性化VEGF Rec発現	↑	↑	
EPO、VEGF遊走の抹消血液	↑	↑	
骨髄性幹細胞増殖/EPC CD133 ⁺ の遊走	↑	↓	
EPCの末梢VEGF-RECへの結合による血管新生刺激	↑	↓	10
末梢組織修復および十分な酸素供給	↑	↓	

【0126】

ベースラインでのノンレスポonder対レスポonderにおける低下された骨髄刺激および血管新生応答の主要な特徴が以下の表3に示されている。

【0127】

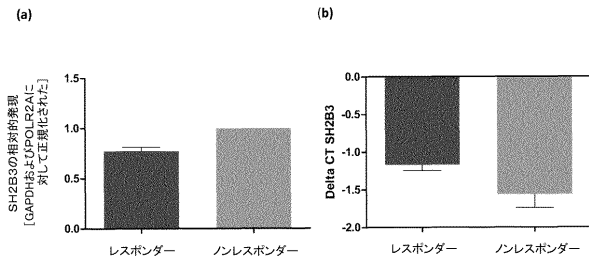
【表 3】

表3:

SH2B3	↑		20
血小板	↓		
CD133 ⁺ EPC	↓		
CEC	↑		
VEGF	↑		
EPO	↑		
Hill-CFU	↓		

【 図 1 】

レスポンドーおよびノンレスポンドーの末梢血液におけるSH2B3遺伝子発現解析



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/059194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6813 C12Q1/6883 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JULIE DEVALIRE ET AL: "The adaptor Lnk (SH2B3): An emerging regulator in vascular cells and a link between immune and inflammatory signaling", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, ELSEVIER, US, vol. 82, no. 10, 16 June 2011 (2011-06-16), pages 1391-1402, XP028319046, ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/J.BCP.2011.06.023 [retrieved on 2011-06-24]	1-29
Y	the whole document ----- -/--	30-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 May 2018		Date of mailing of the international search report 29/05/2018
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 Costa Roldán, Nuria

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/059194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DALE BETHANY L ET AL: "Linking inflammation and hypertension via LNK/SH2B3", CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY & HYPERTENSION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, LTD, GB, vol. 25, no. 2, 29 February 2016 (2016-02-29), pages 87-93, XP009505337, ISSN: 1062-4821, DOI: 10.1097/MNH.0000000000000196	1-29
Y	abstract	30-35
X	GE ZHENG ET AL: "Co-existence of IL7R high and SH2B3 low expression distinguishes a novel high-risk acute lymphoblastic leukemia with Ikaros dysfunction", ONCOTARGET, vol. 7, no. 29, 19 July 2016 (2016-07-19), pages 46014-46027, XP002781036,	1-29
Y	abstract	30-35
X	DING L-W ET AL: "LNK (SH2B3): paradoxical effects in ovarian cancer", ONCOGENE, vol. 34, no. 11, March 2015 (2015-03), pages 1463-1474, XP055475179,	1-29
Y	abstract	30-35
A	STAMM ET AL: "Intramyocardial delivery of CD133 ⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies", JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURG, MOSBY-YEAR BOOK, INC., ST. LOUIS, MO, US, vol. 133, no. 3, 21 February 2007 (2007-02-21), pages 717-725.e5, XP005913832, ISSN: 0022-5223, DOI: 10.1016/J.JTCVS.2006.08.077 the whole document	1-35
T	STEINHOFF GUSTAV ET AL: "Stem cells and heart disease - Brake or accelerator?", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 120, 18 October 2017 (2017-10-18), pages 2-24, XP085288663, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2017.10.007 the whole document	1-35
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/059194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	STEINHÖFF GUSTAV ET AL: "Cardiac Function Improvement and Bone Marrow Response - : Outcome Analysis of the Randomized PERFECT Phase III Clinical Trial of Intramyocardial CD133<+>Application After Myocardial Infarction.", EBIOMEDICINE AUG 2017, vol. 22, August 2017 (2017-08), pages 208-224, XP002781037, ISSN: 2352-3964 the whole document -----	1-35

1

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 K 14/47

(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

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA50

专利名称(译)	Sh2b衔接蛋白3可预测骨髓和免疫反应		
公开(公告)号	JP2020516301A	公开(公告)日	2020-06-11
申请号	JP2019556232	申请日	2018-04-10
[标]发明人	シュタインホフグスタフ		
发明人	シュタインホフ、グスタフ		
IPC分类号	C12N15/12 G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/686 C07K14/47		
CPC分类号	C12Q1/6813 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 C12Q1/6851 C12Q1/686 G06F17/18		
FI分类号	C12N15/12 G01N33/68 G01N33/53.M G01N33/53.D C12Q1/686.Z C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
优先权	102017107661 2017-04-10 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用作诊断标记的SH2B衔接子蛋白3 (SH2B3)。此外，本发明涉及用于测量SH2B3基因表达的方法。

SH2B3 gene expression analysis in peripheral blood of responder and non-responder

