

(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2011-521203

(P2011-521203A)

(43) 公表日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	Z 2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2010-550748 (P2010-550748)	(71) 出願人	510244639 リニーゲン、インコーポレイテッド LINEAGEN, INC. アメリカ合衆国ユタ州、ソルト、レイク、 シティー、ワカラ、ウェイ、423、スイ ート、200
(86) (22) 出願日	平成21年2月27日 (2009.2.27)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(85) 翻訳文提出日	平成22年11月1日 (2010.11.1)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/035376	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開番号	W02009/114292	(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰
(87) 国際公開日	平成21年9月17日 (2009.9.17)		
(31) 優先権主張番号	61/068,772		
(32) 優先日	平成20年3月10日 (2008.3.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 COPDバイオマーカーシグネチャー

## (57) 【要約】

本発明は、試験試料中のCOPDであることを示す示差発現タンパク質の発現を検出する方法に関する。同定されたCOPDバイオマーカーシグネチャー内のタンパク質の循環レベルを検出することにより、COPD診断および疾患の監視、ならびに治療に対する応答の予測を助けることができる。開示されたバイオマーカーシグネチャー、またはそのバイオマーカーサブセットを評価することにより、個々のマーカーでは見出せないある程度の識別が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト対象から得られた試験試料を分類するコンピュータ実行型の方法であって、

( a ) 前記試験試料と関連するデータセットを取得する工程であって、前記取得データセットが、

( i ) アポリタンパク質 H、CD 4 0、ハプトグロビン、インターロイキン - 8 ( I L - 8 )、単球走化性タンパク質 - 1 ( M C P - 1 )、および腫瘍壊死因子受容体 I I ( T N F - R I I ) と、

( i i ) アポリタンパク質 C I I I、CD 4 0、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、ハプトグロビン、免疫グロブリン A ( I g A )、マクロファージ炎症性タンパク質 1 ( M I P - 1 )、組織因子、および腫瘍壊死因子 - ( T N F - ) と、

10

( i i i ) - 1 アンチトリプシン、C - 反応性タンパク質 ( C R P )、フィブリノゲン、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、インターロイキン - 4 ( I L - 4 )、マクロファージ由来ケモカイン ( M D C )、組織因子、腫瘍壊死因子受容体 I I ( T N F R I I )、および可溶性血管細胞接着分子 1 ( s V C A M - 1 ) と、かなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも 3 つのタンパク質マーカーについての定量的データを含む、工程と、

( b ) 1 つまたは複数の参照データセットに対して前記取得データセットを比較するコンピュータ上の分析プロセスに前記取得データセットを入力する工程と、

20

( c ) 前記分析プロセスの出力に従って前記試験試料を分類する工程であって、前記分類が慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D ) 分類および健康分類からなる群から選択される、工程と、を含む方法。

## 【請求項 2】

前記試験試料を分類した後に、( a ) 治験で薬物の効力を評価するか、前記対象における C O P D を診断するか、前記対象における C O P D の進行度を評価するか、もしくは前記対象のための C O P D 治療計画を開発するために、前記分類情報を変換する工程、または ( b ) 前記対象の C O P D を治療する工程のいずれかをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 3】

前記試験試料が、血液、血漿、および血清からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記分析プロセスが、前記 1 つまたは複数の参照データセットを含む予測モデルの使用を含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

C O P D 分類が、急速低下 C O P D 分類または緩徐低下 C O P D 分類のいずれかに相当する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の参照データセットが、健常対象、急速低下 C O P D と診断された対象、および緩徐低下 C O P D と診断された対象からなる群から選択される 1 人または複数人のヒト対象から得られた定量的データを含む、請求項 5 に記載の方法。

40

## 【請求項 7】

前記少なくとも 3 個のタンパク質マーカーが、アポリタンパク質 H、M C P - 1、および T N F - R I I を含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記取得データセットが、アポリタンパク質 H、CD 4 0、ハプトグロビン、I L - 8、M C P - 1、および T N F - R I I からの定量的データを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

50

前記少なくとも3つのタンパク質マーカーが、IgA、MIP-1、および組織因子を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項10】

前記取得データセットが、アポリタンパク質CIII、CD40、GM-CSF、ハプトグロビン、IgA、MIP-1、組織因子、およびTNF- $\alpha$ からの定量的データを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記少なくとも3つのタンパク質マーカーが、MDC、組織因子、およびsVCAM-1を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項12】

前記取得データセットが、IL-1アンチトリプシン、CRP、フィブリノゲン、GM-CSF、IL-4、MDC、組織因子、TNF-RII、およびsVCAM-1からの定量的データを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記分析プロセスが、線形判別分析(LDA)モデル、サポートベクターマシン分類アルゴリズム、再帰的特徴削除モデル、マイクロアレイの予測分析モデル、ロジスティック回帰モデル、CARTアルゴリズム、FlexTreeアルゴリズム、LARTアルゴリズム、ランダムフォレストアルゴリズム、MARTアルゴリズム、または機械学習アルゴリズムのいずれかの使用を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項14】

前記分析プロセスが、75%を超える品質メトリックを提供するように選択された項を含むLDAモデルの使用を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記品質メトリックが精度である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記LDAモデルを、少なくとも70%の感度または特異度のうちの少なくとも1つを提供するように調整する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記予測モデルが、分類のための少なくとも75%の品質メトリックを有する、請求項4に記載の方法。

【請求項18】

前記予測モデルが、分類のための少なくとも90%の品質メトリックを有する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記品質メトリックが精度である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記予測モデルの限度を、少なくとも70%の感度または特異度のうちの少なくとも1つを提供するように調整する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

ヒト対象から得られた試験試料を分類するためのキットであって、

(a) アポリタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8(IL-8)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、および腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)と、

(b) アポリタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ハプトグロビン、免疫グロブリンA(IgA)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、組織因子、および腫瘍壊死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )と、

(c) IL-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(CRP)、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-4(IL-4)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体I

10

20

30

40

50

I (TNFR I I)、および可溶性血管細胞接着分子1 (sVCAM - I)と、  
 からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マ  
 ーカーを検出するための試薬を含み、  
 前記分類が、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 分類と健康分類からなる群から選択される  
 、  
 キット。

【請求項22】

前記試薬が抗体である、請求項21に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2008年3月10日に提出された米国特許仮出願第61/068,772号の恩典を主張し、これは参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、一般に、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の迅速な検出および正確な診断のための方法に関する。より具体的には、本発明は、COPDであることを示すバイオマーカーシグネチャーと、これらのバイオマーカーシグネチャー内の1つまたは複数のタンパク質の示差発現を検出して試験試料を分類することに関する。

【背景技術】

20

【0003】

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、タバコの煙のような粒子の吸入に対する異常な炎症反応によって引き起こされる進行性の気流制限によって特徴付けられる (概説として、Fabbriら, 2006, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 173:1056-1065を参照されたい)。COPDは米国における主な死因である (Heffner, 2002, Respir. Care 47:586-607)。医師は、患者の症状を観察し、喫煙や職業などのライフスタイルの選択を評価し、健康診断を行ない、肺活量測定試験を行なって患者の気流を測定することによってCOPDを診断する。COPDの最も信頼できる診断パラメータは肺活量測定によって測定されるFEV1 (1秒間努力呼気容量) の低下である (Rennard, 1998, Chest 113:235S-241S)。健常な非喫煙者および喫煙者では、緩徐ではあるが進行性のFEV1低下が観察される (20ml/年)。喫煙者の約15%では、肺機能が正常よりも急速に低下し、加速的な身体能力制限 (低運動耐容能) と呼吸困難とをもたらす (Rennard, 1998, 前掲)。COPD患者間での低下速度は非常に大いに変動し得る。

30

【0004】

米国特許出願公開第2006/0211026号 (P. Belloniらの名で2006年9月に公開) には、生体試料中のバイオマーカーの相対的なレベルが予想されるレベルよりも高いのかまたは低いのかを決定することによって肺気腫およびCOPDを診断し、治療薬の候補の有効性を評価するための方法であって、このバイオマーカーが、特異的SpB、デスモシン、VEGF、IGFBP2、MMP12、TIMP1、MMP9、Crabp2、Rbp1、Cyp26a1、Tgm2、Timp3、Adam17、セルピナ1、Slpi、Col1a1、Eln、TGF1、TGF - RII、Sftpa1、Sftpb、Csf2、Cxc11、Cxc12、Cxc15、IL-8R、IL-8R、IL-6、TNF、EGF-R、Areg、PDGF、Hpgf、FGF7、Kdr、flt1、Angpt1、Tek、HIF1、Hyou1、PGF、およびトロポエラスチンからなる群から選択される、方法が開示されている。

40

【0005】

PCT出願公開WO2004/070058号 (Bayer Healthcare AGの名で2004年8月19日に公開) には、COPD患者における、ヒト膜貫通、4-ドメイン、サブファミリーS、メンバー8B (「MS4A8B」) の過剰発現およびC

50

OPDの診断/予後マーカーとしてのその使用が開示されている。

【0006】

PCT出願公開WO2006/118522号(Astrazeneca ABの名で2006年11月9日に公開)には、亜鉛-2-糖タンパク質、1-アンチトリプシン、コラーゲンタイプIII、プロスタグランジン-H2 Dイソメラーゼ、コラーゲンタイプI、1-ミクログロブリン、FGF、オステオポンチン、1-酸性糖タンパク質2およびフィブリノゲン-E鎖に由来するペプチドのCOPDバイオマーカーとしての同定および使用が開示されている。

【0007】

PCT出願公開WO2007/084485号(Batelle Memorial Instituteの名で2007年7月26日に公開)では、COPD関連疾患を評価するために、喫煙者で示差発現した種々の遺伝子マーカーと、該マーカーの使用とが同定されている。

10

【0008】

PCT出願公開WO2008/003066号(Respiris, Inc.の名で2008年1月3日に公開)には、情報コンテンツのリポジトリからCOPDマーカーを同定する方法と、疾患の進行を急速低下状態と緩徐低下状態の間で評価することを含むCOPDの診断に該マーカーを使用することが開示されている。

【発明の概要】

【0009】

慢性閉塞性肺疾患(COPD)の迅速な検出および/または正確な診断のための方法を提供する。本方法は、試験試料(例えば、血液または血液派生物、例えば、血漿もしくは血清)中の、開示された3つの多分析物パネルのうちの1つに含まれるタンパク質バイオマーカーの少なくともサブセットを定量化することによって実施することができる。対照対象に見出されるレベルと統計的に異なる選択されたバイオマーカーの変化レベルは、COPDの陽性診断を裏付ける。したがって、COPDと診断された患者の血漿試料中に見出される、本明細書で「バイオマーカーシグネチャー」と記載されるタンパク質バイオマーカーの多分析物パネルは、COPDの陽性診断または陰性診断の裏付け、ならびに陽性COPD診断の重症度(例えば、急速低下COPDおよび緩徐低下COPD)の分類に役立つ。特定の実施形態では、正確な診断および/または分類を行なうに当たって90%を超える精度を本開示の方法により提供する。

20

30

【0010】

COPD患者で示差発現する循環タンパク質が本明細書で同定され、記載されている。循環血漿マーカーとしては、アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8(「IL-8」)、単球走化性タンパク質-1(「MCP-1」)、腫瘍壊死因子受容体II(「TNF-RII」)、アポリポタンパク質CIII、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、免疫グロブリンA(「IgA」)、マクロファージ炎症性タンパク質1-(「MIP-1」)、組織因子、腫瘍壊死因子-(「TNF-」)、-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(「CRP」)、フィブリノゲン、インターロイキン-4(「IL-4」)、マクロファージ由来ケモカイン(「MDC」)、および可溶性血管細胞接着分子1(「sVCAM-1」)が挙げられる。上記の血漿マーカーのサブセットを含む3つのバイオマーカーシグネチャーであって、(a)急速低下COPD患者と対照(シグネチャー1)、(b)緩徐低下COPD患者と対照(シグネチャー2)、および(c)急速低下COPD患者と緩徐低下COPD患者(シグネチャー3)の区別を可能にするバイオマーカーシグネチャーを開示する。

40

【0011】

したがって、本発明は、試験試料中のCOPDであることを示す示差タンパク質発現を検出する方法を提供し、その場合、該試験試料は、血液または血液派生物(例えば、血漿)を含むが、これらに限定されない。本明細書で同定されたタンパク質の循環レベルを検出することにより、患者を「COPDを有する」と分類すること(診断)、およびCOP

50

Dと診断された患者を疾患の重症度に従って分類すること（疾患の監視）ができる。このような分類を治療に対する応答の予測で用いて、COPD治療のための奏効する治療法の開発を助け、治験での（すなわち、患者の治療計画後の）薬効の事前評価を助けることができる。例えば、ある単一の時点または時間経過において、開示されたバイオマーカーの発現測定は、患者が治療を受けた後に行なうことができ、この治療には、例えば、薬物療法、併用薬物療法、および非薬理的な介入が含まれ得る。本明細書に開示されるバイオマーカーシグネチャー、またはそのバイオマーカーサブセットを評価することにより、個々のマーカーでは見出せないある程度の識別が提供される。一実施形態では、発現プロファイルは、タンパク質の濃度または量を測定することによって決定される。

#### 【0012】

一実施形態では、本発明は、哺乳類対象から得られた試験試料を分類するコンピュータ実行型の方法であって、（a）該試験試料と関連するデータセットを取得する工程であって、該取得データセット（すなわち、試験データセット）が、（i）アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（IL-8）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、および腫瘍壊死因子受容体II（TNF-RII）と、（ii）アポリポタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、ハプトグロビン、免疫グロブリンA（IgA）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、組織因子、および腫瘍壊死因子-（TNF-）と、（iii）-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質（CRP）、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-4（IL-4）、マクロファージ由来ケモカイン（MDC）、組織因子、腫瘍壊死因子受容体II（TNFRII）、および可溶性血管細胞接着分子1（sVCAM-1）と、からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーについての定量的データを含む、工程と、（b）該取得データセットを1つまたは複数の参照データセットと比較するコンピュータ上の分析プロセスに該取得データセットを入力する工程と、（c）該分析プロセスの出力に従って該試験試料を分類する工程であって、該分類が慢性閉塞性肺疾患（COPD）分類および健康分類からなる群から選択される、工程と、を含む方法を提供する。好ましい哺乳類対象はヒト対象である。

#### 【0013】

さらなる実施形態では、本発明は、ヒト対象から得られた試験試料を分類する方法であって、（a）該試験試料と関連するデータセットを取得する工程であって、該取得データセットが、（i）アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（IL-8）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、および腫瘍壊死因子受容体II（TNF-RII）と、（ii）アポリポタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、ハプトグロビン、免疫グロブリンA（IgA）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、組織因子、および腫瘍壊死因子-（TNF-）と、（iii）-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質（CRP）、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-4（IL-4）、マクロファージ由来ケモカイン（MDC）、組織因子、腫瘍壊死因子受容体II（TNFRII）、および可溶性血管細胞接着分子1（sVCAM-1）と、からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーについての定量的データを含む、工程と、（b）該取得データセットを1つまたは複数の参照データセットと比較する分析プロセスを用いて該試験試料を分類するために該取得データセットを変換する工程と、（c）該分析プロセスの出力に従って該試験試料を分類する工程であって、該分類が慢性閉塞性肺疾患（COPD）分類および健康分類からなる群から選択される、工程と、を含む方法に関する。

#### 【0014】

本明細書に開示される分析方法は、限定するものではないが、1つまたは複数の参照データセットを利用して、予測モデルを作成する工程を含む。試料を分類するために試験試料データを予測モデルと比較するが、その場合、分類はCOPD分類および健康分類から

10

20

30

40

50

なる群から選択される。COPD分類は、急速低下COPD分類または緩徐低下COPD分類であり得る。

【0015】

本発明の予測モデルは、参照集団から得られた本明細書に記載の1つまたは複数のマーカーセットの定量的データを利用する。一実施形態では、定量的データは、開示されたバイオマーカーシグネチャー、またはそのタンパク質バイオマーカーサブセット内のタンパク質バイオマーカーの（例えば、好適な検出方法で測定される）血液または血液派生物（例えば、血漿）中のタンパク質濃度または相対量を表す。予測モデルは分類の際にある程度の精度を提供することができるが、その場合、このモデルは、所望の品質閾値を満たす。対象となる品質閾値は、所与の閾値の精度を提供することができ、本明細書で品質メトリックと呼ぶことがある。予測モデルは、例えば、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、またはそれを上回る品質メトリック、例えば、分類精度、を提供し得る。そのようなモデルにおいて、感度と選択性の所望のバランスを提供するようにパラメータを適切に選択し得る。

10

【0016】

本発明の一実施形態では、そのような予測モデルは、哺乳類対象から得られた試験試料を、健常人またはCOPDの人、特に、急速低下COPDの人に由来するものであると分類するための方法で使用することができる。該方法の第1の工程は、血液または血液派生物（例えば、血漿）試料と関連するデータセットを得ることであり、その場合、このデータセットは、アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（IL-8）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）および腫瘍壊死因子受容体II（TNF-RII）からなる群から選択される少なくとも3つ、または少なくとも4つ、または少なくとも5つ、または6つ全てのタンパク質マーカーについての定量的データを含む。次いで、試験試料データセットを、予測モデルの作成に使用される1つまたは複数の参照試料から得られる同一のタンパク質マーカー群からの定量的データを含む参照データセットと比較する。一実施形態では、試験データセットと予測モデルの作成に使用される参照データセット（単数または複数）はともに、アポリポタンパク質H、MCP-1、およびTNF-RIIという、少なくとも3つの血漿マーカーについての定量的データを含む。別の実施形態では、定量的データは、タンパク質濃度の測定値である。

20

【0017】

別の実施形態では、予測モデルは、血液または血液派生物（例えば、血漿）試料と関連するデータセットを得ることにより、哺乳類対象から得られた試験試料を分類する際に使用されるが、その場合、このデータセットは、アポリポタンパク質CIII、CD40、ハプトグロビン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、免疫グロブリンA（IgA）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、組織因子、および腫瘍壊死因子-（TNF-）からなる群から選択される少なくとも3つ、または少なくとも4つ、または少なくとも5つ、または少なくとも6つ、または少なくとも7つ、または8つ全てのタンパク質マーカーについての定量的データを含む。上記の実施形態に記載されているように、試験試料データセットを、予測モデルの作成に使用される1つまたは複数の参照試料から得られる同一のデータセット（すなわち、同一のタンパク質バイオマーカー群に由来する定量的データから構成された参照データセット）と比較する。この方法により、試料が、健常人またはCOPDの人、特に、緩徐低下COPDの人に由来するものであると分類される。さらなる実施形態では、試験データセットと予測モデルの作成に使用される参照データセット（単数または複数）はともに、IgA、MIP-1、および組織因子という、少なくとも3つの血漿マーカーについての定量的データを含む。別の実施形態では、定量的データは、タンパク質濃度の測定値である。

30

40

【0018】

さらなる実施形態では、予測モデルは、哺乳類対象から得られた試験試料を、特定の重症度のCOPD、特に、急速低下COPDまたは緩徐低下COPDの人に由来するものであると分類する際に使用される。該方法の第1の工程は、血液または血液派生物（例えば

50

、血漿) 試料と関連するデータセットを得ることであり、その場合、このデータセットは、  
 - 1 アンチトリプシン、C - 反応性タンパク質 (CRP)、フィブリノゲン、顆粒球  
 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン - 4 (IL - 4  
 )、マクロファージ由来ケモカイン (MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体 II (TNF - RII)、および可溶性血管細胞接着分子 1 (sVCAM - 1) からなる群から選  
 択される少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つ、または少なく  
 とも 6 つ、または少なくとも 7 つ、または少なくとも 8 つ、または 9 つ全てのタンパク質  
 マーカーについての定量的データを含む。試験試料データセットは、予測モデルの作成に  
 使用される 1 つまたは複数の参照試料から得られる同一のデータセット (すなわち、同一  
 のタンパク質バイオマーカー群に由来する定量的データから構成された参照データセット  
 ) と比較される。さらなる実施形態では、データセットは、MDC、組織因子、および s  
 VCAM - 1 という、少なくとも 3 つの血漿マーカーについての定量的データを含む。別  
 の実施形態では、定量的データは、タンパク質濃度の測定値である。

10

#### 【0019】

本明細書で使用するとき、急速低下 COPD の人は、肺活量測定で測定したとき、平均  
 で年間 40 ml 以上の FEV<sub>1</sub> (1 秒間努力呼気容量) を失う。緩徐低下 COPD の人は  
 、平均で年間 40 ml 未満の FEV<sub>1</sub> を失う。

#### 【0020】

「含む (comprises)」のようなオープンエンド形式 (open - ended  
 ) の用語への言及により、追加の要素または工程が認められる。追加の要素または工程の  
 可能性を強調するために、「1 つまたは複数」のような語句が、オープンエンド型の用語  
 とともにまたはオープンエンド型の用語なしで使用されることもある。

20

#### 【0021】

明示しない限り、「1 つ (a)」または「1 つ (an)」のような用語への言及は、1  
 つ (one) に限定されない。例えば、「1 つの細胞 (a cell)」は、「複数の細  
 胞 (cells)」を除外しない。複数存在する可能性を強調するために、1 つまたは複  
 数のような語句が使用されることもある。

#### 【0022】

本発明の他の特徴および利点は、様々な実施例を含む、本明細書に提供されるさらなる  
 説明から明白である。提供される実施例には、本発明を実施するのに有用な様々な要素お  
 よび方法が説明されている。本実施例は、請求された発明を限定するものではない。本開  
 示に基づいて、当業者は、本発明を実施するのに有用な他の要素および方法を同定および  
 利用することができる。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0023】

【図 1】単変量分析で測定したときに、COPD 急速低下群 (「+」) および COPD 緩  
 徐低下群 (「 」) および / または健常対象 (「 」) の間で有意に異なるレベルで存在  
 する 4 例の血漿マーカー (A) エオタキシン、(B) IL - 4、(C) MCP - 1、およ  
 び (D) sVCAM - 1 を示す。

【図 2】(A) COPD 急速低下群と健常対照、(B) COPD 緩徐低下群と健常対照、  
 および (C) COPD 急速低下群と COPD 緩徐低下群という、異なるシグネチャーを用  
 いた線形判別分析 (LDA) からのグラフ出力を示す (「 」、対照 (CTL); 「+」  
 、COPD または COPD 急速型; 「 」、COPD 緩徐型)。LDA 分析では、デー  
 タセットの各点から各群の多変量平均値までの距離を測定し、その点を最も近い群へと分類  
 する。使用した距離量は、変数間の分散と共分散を考慮に入れるマハラノビス距離である  
 。各多変量平均値は表示付きの丸である。丸の大きさは、平均値の 95% 信頼限界に相当  
 する。有意に異なる群は、交差しない丸を有する傾向にある。これらのグラフは、SAS  
 Institute (Cary, NC) の JMP ソフトウェア v 5.0.1 を用いて作  
 成された。

40

#### 【発明を実施するための形態】

50

## 【0024】

COPD患者を陽性同定するおよび/またはCOPDの結果として急速な肺の低下もしくは緩徐な肺の低下を経験する可能性のある罹患患者を区別するための分子的因子と最も信頼のおける試験の両方の開示を本明細書で提供する。COPDは、肺機能の顕著な制限が疾患の後期にしか現れない、何十年もかけてゆっくりと進行する疾患であるので、1) COPDの診断を助けること、2) 肺機能低下速度を予測すること、および3) 治療で適宜に適った形で薬効を監視することが可能なバイオマーカーを早期に検出することは非常に有用である。

## 【0025】

## I. 血漿バイオマーカー

そのレベルが健常対照と比較してCOPD患者において統計的に異なる血漿タンパク質の同定を開示する(実施例3参照)。本明細書に記載の単変量分析によって評価され、分析された89個の血漿マーカーのうち、25個がCOPD急速低下群と健常対照群の間で統計的に異なり( $p < 0.05$ ; 以下の表3参照)、4個のマーカーがCOPD緩徐低下群と健常対照群の間で統計的に異なり( $p < 0.05$ ; 以下の表4参照)、10個のマーカーがCOPD急速低下群とCOPD緩徐低下群の間で統計的に異なる( $p < 0.05$ ; 以下の表5参照)。これらの血漿マーカーはどれも、それらだけではCOPD患者と対照を明確に区別することはできないので、線形判別分析(LDA)法を用いるデータの多変量分析を行なった。この方法により、COPD急速低下群と健常対照(シグネチャー1)、COPD緩徐低下群と健常対照(シグネチャー2)、およびCOPD急速低下群とCOPD緩徐低下群(シグネチャー3)を正確に区別することができる3つの血漿バイオマーカー群が同定された。

## 【0026】

血液は、気管支肺胞洗浄液または誘発喀痰に含まれる肺分泌物よりも簡単に入手できかつ信頼できるので、血漿中で検出できるCOPDバイオマーカーが好ましい。興味深いことに、局所性炎症と全身性炎症の両方がCOPDで起こるという証拠が増えている(Wouters, 2005, Proc. Am. Thorac. Soc. 2: 26-33に概説されている)。しかしながら、COPDが、煙で刺激された肺に現れる一般的な炎症調節の欠陥に起因するのか、または肺で特異的に起こって全身に広がる制御不能の炎症プロセスが起因するのかは依然として明らかではない。いずれにせよ、末梢血は、COPDの進行に関する好都合でかつ豊富な情報源である。

## 【0027】

シグネチャー1は、以下の6つのタンパク質マーカー、すなわち、アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8(IL-8)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、および腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)から構成される多分析物パネルである。シグネチャー1は、COPD急速低下群由来の血漿試料を93%の症例(感度)で、および健常者由来の血漿試料を86%の症例(特異度)で正確に同定し、この2つの群を90%の全体精度で区別することができる(以下の実施例3の表6参照)。

## 【0028】

シグネチャー2は、以下の8つのタンパク質マーカー、すなわち、アポリポタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ハプトグロビン、免疫グロブリンA(IgA)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、組織因子、および腫瘍壊死因子-(TNF-)から構成される多分析物パネルである(以下の実施例3の表6参照)。シグネチャー2は、(健常対象ではなく)COPD緩徐低下群からの血漿試料を、感度91%、特異度96%、全体精度94%で正確に同定することができる。

## 【0029】

シグネチャー3は、以下の9つのタンパク質マーカー、すなわち、-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(CRP)、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロ

10

20

30

40

50

ニ-刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-4 (IL-4)、マクロファージ由来ケモカイン (MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体 II (TNF-RII)、および血管細胞接着分子 1 (sVCAM-1) から構成される多分析物パネルである。シグネチャー 3 は、血漿試料が COPD 急速低下群に由来するものであることを 95% の症例 (感度) で、および血漿試料が COPD 緩徐低下群に由来するものであることを 86% の症例 (特異度) で正確に同定し、この 2 つの群を 92% の全体精度で区別することができる (以下の実施例 3 の表 6 参照)。

【0030】

表 1 に、本明細書に開示されるシグネチャー 1 ~ 3 に同定されるタンパク質についてのさらなる情報を提供する。記載された受託番号は、米国国立衛生研究所によって維持されている全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) データベース内に登録されているものに対応する。

【0031】

【表 1】

タンパク質	別名	ヒトポリヌクレオチド受託番号 (NCBI)	ヒトタンパク質受託番号 (NCBI)
アポリポタンパク質 H	$\beta$ -2 糖タンパク質 I	NM_000042	NP_000033
CD40	CD40L 受容体	NM_001250	NP_001241
ハプトグロビン	Hp 2- $\alpha$	NM_005143	NP_005134
IL-8	インターロイキン-8	NM_000584	NP_000575
MCP-1	CCL2	NM_002982	NP_002973
TNF-RII	TNFRSF1B	NM_001066	NP_001057
アポリポタンパク質 CIII	ApoC3	NM_000040	NP_000031
GM-CSF	コロニー刺激因子 2	NM_000758	NP_000749
IgA	免疫グロブリンタイプ A	BC087841	AAH87841
MIP-1 $\alpha$	CCL3	NM_002983	NP_002974
組織因子	凝固因子 III	NM_001993	NP_001984
TNF- $\alpha$	TNFスーパーファミリーメンバー 2	NM_000594	NP_000585
$\alpha$ -1 アンチトリプシン	セルピン A1	NM_000295	NP_000286
CRP	C-反応性タンパク質	NM_000567	NP_000558
フィブリノゲン	FGA	NM_000508	NP_000499
MDC	CCL22	NM_002990	NP_002981
sVCAM-1	可溶性 VCAM-1	NM_001078	NP_001069
IL-4	インターロイキン-4	AF395008	AAK71324

【0032】

タンパク質は、複数の異なる形態で試料中に存在することが多い。これらの形態は、翻訳前修飾および翻訳後修飾のいずれかまたは両方から生じ得る。翻訳前の修飾形態としては、対立遺伝子変異体、スプライス変異体、および RNA 編集形態が挙げられる。翻訳後の修飾形態としては、タンパク質分解による切断 (例えば、親タンパク質のシグナル配列または断片の切断)、グリコシル化、リン酸化、脂質化、酸化、メチル化、システイン化、スルホン化、およびアセチル化から生じる形態が挙げられる。

【0033】

したがって、本出願において名前または受託番号によって同定される特異的なバイオマ

ーカマー配列に加えて、本発明は、表1に記載の例示されたバイオマーカー配列（ヌクレオチド配列またはタンパク質配列のいずれか）と少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも97%同一な天然に存在する変異体を試験試料中で検出することも企図する。該バイオマーカー変異体は、本発明の方法に対する有用性を有するものとし、かつ表1の列1に記載の新規バイオマーカーの検出に使用される、本明細書に開示される方法（例えば、表1に記載のタンパク質バイオマーカーに特異的な抗体との交差反応性）によって検出されるものとする。これらの変異体としては、多型、スプライス変異体、および突然変異が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0034】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列との関連で、「同一性」パーセントという用語は、配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTNもしくは当業者に利用可能な他のアルゴリズム）を用いてまたは目視検査によって測定される、最大一致を求めて比較し、整列させたときに、規定のパーセンテージの同一ヌクレオチドまたは同一アミノ酸残基を有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す。適用次第で、同一性パーセントは、比較されている配列のある領域に対して（例えば、機能ドメインに対して）存在することもあるし、あるいは、比較される2つの配列の全長にわたって存在することもある。配列比較のために、典型的には、1つの配列が参照配列の役目を果たし、試験配列がそれに対して比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と参照配列をコンピュータに入力し、必要な場合、サブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、参照配列に対する試験配列（単数または複数）の配列同一性パーセントを計算する。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、スミスとウォーターマンの局所相同性アルゴリズム（1981, Adv. Appl. Math. 2: 482）によって、ニードルマンとワンチの相同性アライメントアルゴリズム（1970, J. Mol. Biol. 48: 443）によって、ピアソンとリップマンの類似性検索の方法（1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444）によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実施（Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIの中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）によって、または目視検査によって実行することができる（一般的には、Ausubel, FMR, Current Protocols in Molecular Biology, 4, John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, N.Y., A.1E.1-A.1F.11, 1996-2004を参照されたい）。配列同一性および配列相同性のパーセントを決定するのに好適なアルゴリズムの1つの例はBLASTアルゴリズムであり、これは、Altschulら（1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410）に記載されている。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター（www.ncbi.nlm.nih.gov）から公に利用可能である。

#### 【0035】

##### II. バイオマーカー検出

タンパク質バイオマーカーは、分子量および/またはその既知のタンパク質アイデンティティにより特徴付けられる。タンパク質バイオマーカーは、種々の分画技術、例えば、質量分析を伴うクロマトグラフ分離、固定化した抗体を用いるタンパク質捕捉、および従来のイムノアッセイを用いて、試料中の他のタンパク質から分別することができる。この目的を達成するために利用し得る検出パラダイムとしては、光学的方法、電気化学的方法（ボルタメトリー技術およびアンペロメトリー技術）、原子間力顕微鏡法、および高周波法、例えば、多極共鳴分光法が挙げられる。共焦点と非共焦点の両方の顕微鏡法に加えて、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、ならびに複屈折または屈折率の検出が、光学的方法の実例となる（例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共振ミラー法、グレーティングカブラー導波管法、および干渉法）。

## 【0036】

試料（例えば、本明細書に記載の試験試料）中のタンパク質を検出または測定する場合、異なるタンパク質と同じタンパク質の異なる形態の両方を区別する能力は、タンパク質間の違いの性質と使用される検出方法によって決まる。例えば、モノクローナル抗体を用いるイムノアッセイは、エピトープを含むあらゆるタンパク質形態を検出し、それらを区別しない。しかしながら、タンパク質上の異なるエピトープに対する2つの抗体を使用するサンドイッチイムノアッセイは、両方のエピトープを含むあらゆるタンパク質形態を検出し、これらのエピトープのうちの1つしか含まない形態を検出しない。タンパク質の特定の形態（または特定の形態のサブセット）が、特定の方法によって一緒に検出される異なる形態の群よりも良好なバイオマーカーである場合、アッセイの能力が劣っていてもよい。したがって、タンパク質の形態を区別し、かつ1つまたは複数の所望のタンパク質形態を特異的に検出および測定するアッセイ法を利用することが有用であり得る。タンパク質分析物の異なる形態を区別すること、またはタンパク質分析物の特定の形態を特異的に検出することを、分析物の「分別」と言う。

10

## 【0037】

本発明の一実施形態では、血液試料、または血液由来の試料（例えば、血漿、血清）を、本明細書に記載の多分析物バイオマーカーシグネチャーのメンバーとして開示される1つまたは複数のタンパク質マーカーの存在についてアッセイする。典型的には、血液試料を採取し、血漿または血清などの派生産物を試験する。このようなタンパク質バイオマーカーは、特異的結合メンバーを使用することによって検出し得る。例えば、この目的のために抗体を使用することは、特に興味深い。以下のものを含む様々なフォーマットが、このようなアッセイに使用される：抗体アレイ；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）フォーマット；懸濁液/溶液中での標識抗体の結合ならびにフローサイトメトリーおよび質量分析を含むが、これらに限定されない方法による検出を含む。検出には、1種の抗体または抗体パネル、好ましくは、アレイフォーマットの抗体パネルを利用してもよい。

20

## 【0038】

本発明のバイオマーカーは、気相イオンを検出するために質量分析計を利用する方法である質量分析によって検出することもできる。質量分析計の例は、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型、静電場型の分析装置およびこれらのハイブリッドである。質量分析計は、レーザー脱離/イオン化（LDI）質量分析計であり得る。レーザー脱離/イオン化質量分析では、タンパク質分析物を、質量分析計のプロンプインターフェースに係合し、イオン化と質量分析計への導入のために分析物をイオン化エネルギーに提示するように構成された装置である、質量分析プローブの表面に置く。レーザー脱離質量分析計は、分析物を表面から脱離させるために、それらを揮発させてイオン化し、質量分析計のイオン光学がそれらを利用できるようにするために、通常は紫外線レーザーからのレーザーエネルギーを利用するが、赤外線レーザーからのレーザーエネルギーも利用する。LDIによるタンパク質分析は、MALDIまたはSELDIという形をとることができる（Zhangらの名で出願された米国特許公開第20070172902号参照）。

30

40

## 【0039】

質量分析は、異なる形態のタンパク質を分別するのに特に強力な方法でもあるが、それは、これらの異なる形態が、通常、この手法により分別可能な異なる質量を有するからである。したがって、タンパク質の1つの形態が、このバイオマーカーのもう1つの形態よりも、開示された方法による検出に優れたバイオマーカーであるならば、従来のイムノアッセイによって、これらの形態を区別することと有用なバイオマーカーを特異的に検出することの両方ができない場合に、質量分析によって、有用な形態を特異的に検出し、測定することができる場合がある。

## 【0040】

質量分析は、イムノアッセイと組み合わせることもできる。最初に、生体特異的捕捉試

50

薬（例えば、バイオマーカーおよびその諸形態を認識する抗体）を用いて、対象となるバイオマーカーを捕捉する。好ましくは、生体特異的捕捉試薬は、ビーズ、プレート、膜、またはアレイのような固相に結合されている。結合しなかった材料を洗い流した後、捕捉された分析物を質量分析によって検出および/または測定する。従来のMALDIまたはSELDI、およびエレクトロスプレーイオン化のような、レーザー脱離手法を含む、様々な種類の質量分析は、上記のような、タンパク質形態の検出に有用である。

#### 【0041】

試験試料は、バイオチップによって分析することもできる。バイオチップは、通常、固体基板を含み、大抵は平らな表面を有しており、そこに（吸着剤または親和性試薬とも呼ばれる）捕捉試薬が付着している。多くの場合、バイオチップの表面は複数のアドレス可能な場所を含み、各場所はそこに結合した捕獲試薬を有する。タンパク質バイオチップは、ポリペプチドを捕捉するように構成されたバイオチップである。多くのタンパク質バイオチップが当技術分野で記載されている。これらには、例えば、Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA)、Zyomyx (Hayward, CA)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、Biacore (Uppsala, Sweden)、およびProcognia (Berkshire, UK)によって製造されるタンパク質バイオチップが含まれる。このようなタンパク質バイオチップの例は、以下の特許または公開特許出願に記載されている：米国特許第6,225,047号(Hutchens & Yip)；米国特許第6,537,749号(KuimelisおよびWagner)；米国特許第6,329,209号(Wagnerら)；PCT国際公開WO00/56934号(Englertら)；PCT国際公開WO03/048768号(Boutellら)；および米国特許第5,242,828号(Bergstromら)。

10

20

#### 【0042】

##### III. 試料の分類

本発明は、対象における慢性閉塞性肺疾患(COPD)を迅速に検出および/または正確に診断し、COPDと診断された対象に由来する試料をこの疾患の重症度に従って分類および/または同定し、対象におけるCOPDの進行度を同定および評価する（疾患の監視/病期診断）ために使用される方法を開示する。試験試料を、健常対照、急速低下COPD患者、または緩徐低下COPD患者に由来するものであると分類および/または同定することを、治療計画への応答を予測および/または監視することもでき、これには、治療期間中の薬効の監視が含まれるが、これに限定されない。したがって、本発明は、治療剤および治療計画の有効性を評価する方法；疾患の病期診断および分類の方法などを含む。早期検出を用いて、発症しつつあるCOPDの存在を明らかにすることができ、それによって、適切な予防手段または防御手段による治療介入が可能になる。

30

40

50

#### 【0043】

試験試料をCOPD対象（緩徐低下COPDまたは急速低下COPDのいずれか）から得られたものであると分類および/もしくは同定するか、患者をCOPDと診断するか、または患者におけるCOPDの重症度を分類する方法では、本明細書で提供される1つまたは複数のタンパク質マーカーの、血液、血清、および血漿を含むが、これらに限定されない、試験試料中での発現パターンを入手し、対照値と比較して、診断/分類を決定する。例えば、血液由来の試料（試験試料）を、特異的結合剤（例えば、抗体）、または特異的結合剤のパネルに適用して、対象となるマーカーの存在を決定する、および/または試料中のマーカーを定量化することができる。分析は、一般に、本明細書に記載のマーカー、例えば、アポリタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（「IL-8」）、単球走化性タンパク質-1（「MCP-1」）、腫瘍壊死因子受容体I（「TNF-RII」）、アポリタンパク質CIII、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、免疫グロブリンA（「IgA」）、マクロファージ炎症性タンパク質1（「MIP-1」）、組織因子、腫瘍壊死因子-（「TNF-」）、-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質（「CRP」）、フィブリノゲ

ン、インターロイキン - 4 (「IL - 4」)、マクロファージ由来ケモカイン (「MDC」)、および可溶性血管細胞接着分子 1 (「sVCAM - 1」) のうちの少なくとも 1 つ ; 通常、これらのマーカーのうちの少なくとも 2 つ、より通常は、これらのマーカーのうちの少なくとも 3 つを検出および / または定量化する工程を含み、所望される特定の分類によっては、これらのマーカーのうちの 4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、または全てを検出および / または定量化する工程を含むこともある。

【0044】

試験試料を COPD 対象に由来するものであると分類するおよび / または対象を COPD と診断する、特に、急速低下 COPD と健常対照を分類する場合、好ましいマーカーセットは、以下の多分析物パネル、すなわち、アポリポタンパク質 H、CD 40、ハプトグロビン、IL - 8、MCP - 1、および TNF - RII のうちの少なくとも 3 つを含むが、それらのうちの 4 つ、5 つ、または 6 つ全てを含むこともある。この多分析物パネルは、本明細書に記載のシグネチャー 1 に相当する。この方法にとって好ましい定量化するための少なくとも 3 つのマーカーは、健常対象ではなく COPD 急速低下群に由来する血漿試料を約 89 % の全体精度で正確に同定する、アポリポタンパク質 H、MCP - 1、および TNF - RII である (以下の表 6 参照)。精度は、シグネチャー 1 中の記載された 6 つ全てのバイオマーカーについての定量的データを評価することによって、約 90 % まで上昇する (以下の表 6 参照)。

10

【0045】

試験試料を、COPD 対象に由来するものであると分類するおよび / または対象を COPD と診断する、特に、緩徐低下 COPD と健常対照を分類する場合、好ましいマーカーセットは、以下の多分析物パネル、すなわち、アポリポタンパク質 CIII、CD 40、ハプトグロビン、GM - CSF、IgA、MIP - 1、組織因子、および TNF - のうちの少なくとも 3 つを含むが、それらのうちの 4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、または 8 つ全てを含むこともある。この多分析物パネルは、本明細書に記載のシグネチャー 2 に相当する。この方法にとって好ましい定量化するための少なくとも 3 つのマーカーは、健常対象ではなく COPD 緩徐低下群に由来する血漿試料を約 76 % の全体精度で正確に同定する、IgA、MIP - 1、および組織因子である (以下の表 6 参照)。精度は、GM - CSF (合計 4 つのバイオマーカー) をさらに定量化することによって約 78 % まで上昇し、GM - CSF とアポリポタンパク質 CIII (合計 5 つのバイオマーカー) をさらに定

20

30

【0046】

試験試料を、COPD 対象に由来するものであると分類するおよび / または対象を COPD と診断する、特に、急速低下 COPD と緩徐低下 COPD を分類する場合、好ましいマーカーセットは、以下の多分析物パネル、すなわち、IL - 1 アンチトリプシン、CRP、フィブリノゲン、GM - CSF、IL - 4、MDC、組織因子、TNF - RII、および sVCAM - 1 のうちの少なくとも 3 つを含むが、それらのうちの 4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、または 9 つ全てを含むこともある。この多分析物パネルは、本明細書に記載のシグネチャー 3 に相当する。この方法にとって好ましい定量化するための少なくとも 3 つのマーカーは、COPD 緩徐低下群に由来する血漿試料ではなく COPD 急速低下群に由来する血漿試料を約 80 % の全体精度で正確に同定する、MDC、組織因子、および sVCAM - 1 である (以下の表 6 参照)。精度は、IL - 4 (合計 4 つのバイオマーカー) をさらに定量化することによって約 85 % まで上昇し、また、精度は、記載された 9 つ全てのバイオマーカーについての定量化データを評価することによって約 92 % まで上昇する。COPD (すなわち、急速低下群と緩徐低下群) の重症度の段階を決める場合、個々の試験データセットを、既知の病期の疾患試料から得られた 1 つまたは複数の参照データセットと比較し、病期を予測するモデルを構築し、そのモデルにデータセットを入力して、予測された病期診断を得る。

40

50

## 【0047】

したがって、本明細書に開示される情報を用いて、本発明は、哺乳類対象から得られた試験試料を分類するコンピュータ実行型の方法であって、(a)該試料と関連するデータセットを取得する工程であって、該取得データセット(すなわち、試験データセット)が、(i)アポリタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8(IL-8)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、および腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)と、(ii)アポリタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-4(IL-4)、ハプトグロビン、免疫グロブリンA(IgA)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、組織因子、および腫瘍壊死因子-(TNF-)と、(iii)-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(CRP)、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)、および可溶性血管細胞接着分子1(sVCAM-1)と、からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーについての定量的データを含む、工程と、(b)該取得データセットを1つまたは複数の参照データセットと比較するコンピュータ上の分析プロセスに、該取得データセットを入力する工程と、(c)該分析プロセスの出力に従って該試料を分類する工程であって、該分類がCOPD分類および健康分類からなる群から選択される、工程と、を含む方法を提供する。さらなる実施形態では、COPD分類は、急速低下COPD分類および/または緩徐低下COPD分類のいずれかに相当する。

10

20

## 【0048】

本発明はさらに、ヒト対象から得られた試験試料を分類するための方法であって、(a)該試験試料と関連するデータセットを取得する工程であって、該取得データセットが、(i)アポリタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8(IL-8)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、および腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)と、(ii)アポリタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ハプトグロビン、免疫グロブリンA(IgA)、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、組織因子、および腫瘍壊死因子-(TNF-)と、(iii)-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(CRP)、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-4(IL-4)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体II(TNF-RII)、および可溶性血管細胞接着分子1(sVCAM-1)からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーについての定量的データを含む、工程と、(b)該取得データセットを1つまたは複数の参照データセットと比較する分析プロセスを用いて該試験試料を分類するために該取得データセットを変換する工程と、(c)該分析プロセスの出力に従って該試料を分類する工程であって、該分類が慢性閉塞性肺疾患(COPD)分類および健康分類からなる群から選択される、工程とを含む方法を提供する。

30

## 【0049】

対象(例えば、ヒト患者)に最も適した治療方針を正確に開発するために、本明細書に記載の分類方法を用いて、診断または疾患の病期診断の目的でこのような対象を同定することができる。これらの分類方法を用いて、治療期間中にCOPD治療薬の有効性を計算および評価するのを助けることもできる。したがって、ひとたび対象が分類されれば、この情報を変換して、例えば、該対象においてCOPDがさらに進行するのを制限するより効果的な治療計画を作成する、またはCOPD治療で使用される薬剤候補の有効性を決定することができる。

40

## 【0050】

本明細書に開示される方法は、本明細書に記載の3つのバイオマーカーシグネチャーの少なくともサブセットの、試験血漿試料中濃度の決定とともに実施することができる。特定の実施形態では、開示される方法は、正確な診断をするに当たって90%を超える精度

50

を提供する。

【0051】

本明細書に記載の方法は、これらの方法を実施することができる任意の装置を用いて実施し得る。使用し得る装置の例としては、あらゆる種類のコンピュータを含む、電子計算装置が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法がコンピュータ上で実施される場合、コンピュータがこれらの方法の工程を実行するように設定するために使用し得るコンピュータプログラムは、コンピュータプログラムを含むことができる任意のコンピュータ可読媒体に含まれ得る。使用し得るコンピュータ可読媒体の例としては、ディスク、CD-ROM、DVD、ROM、RAM、ならびに他のメモリおよびコンピュータ記憶装置が挙げられるが、これらに限定されない。コンピュータがこれらの方法の工程を実行するように設定するために使用し得るコンピュータプログラムは、電子ネットワーク上で、例えば、インターネット、ワールドワイドウェブ、イントラネット、または他のネットワーク上でも提供し得る。

10

【0052】

本明細書に記載の方法は、プロセッサとコンピュータ可読媒体とを含むシステムであって、このシステムにこれらの方法の工程を実行させるためのプログラムコード手段を含むシステムの中で実施し得る。プロセッサは、これらの方法の実施に必要とされる作業を実行できる任意のプロセッサであり得る。プログラムコード手段は、システムの中で実施されたときに、このシステムに本明細書に記載の方法の工程を実行させることができる任意のコードであり得る。プログラムコード手段の例としては、C++、Java、もしくはFortranのような、高レベルのコンピュータ言語で書かれた、本出願に記載の方法を実行するための命令；アセンブリ言語のような低レベルのコンピュータ言語で書かれた、本出願に記載の方法を実行するための命令；またはコンパイルされ、連結されたマシン言語のような、コンピュータで実行可能な形式の、本明細書に記載の方法を実行するための命令が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0053】

IV. データ分析

試料（例えば、試験試料または参照試料）中のマーカーの定量は、上記の、当技術分野で公知の方法によって測定される。試験試料から得られた定量的データ（本明細書で互換的に使用される、「取得データセット」または「試験データセット」）は、取得データセットを1つまたは複数の参照データセットと比較する分析的な分類プロセスを受ける。一実施形態では、試験されるバイオマーカーのタンパク質濃度データを含むが、これに限定されない、生データを定量化し、試験試料から得られるのと同じ定量的データを用いて1つまたは複数の参照集団を評価することによって作成される予測モデルと比較する。予測モデルは、参照集団からの学習データセットを用いて作成されるが、その場合、この学習データセットと試験（または取得）データセットはともに、同じ定量的情報から構成される。例えば、本発明の一実施形態では、試験試料を分類する方法または対象を急速低下COPD患者と診断する方法を実施する場合に、アポリタンパク質H、MCP-1、およびTNF-R1Iの循環血漿濃度データからなる試験試料と関連するデータセットを、健康人（参照試料1）と急速低下COPDの人（参照試料2）の両方から得られる同じ濃度データセット（すなわち、アポリタンパク質H、MCP-1、およびTNF-R1Iの循環血漿濃度）を用いて作成された予測モデルと比較する。

30

40

【0054】

したがって、好ましい実施形態では、本発明の方法は、COPDを診断または分類するための分類子を使用する。分類子は、多分析物プロファイルを含む入力を受け取って、試験試料がどの群に属するかを示すデータを含む出力を提供する、任意の適当なパターン認識方法に基づくことができる。分類子は、対象の1つまたは複数の参照集団（参照データセット）からの学習データを用いて学習させることができる。通常、学習データは、学習集団中の各々の対象について、患者から採取した好適な試料中のバイオマーカータンパク質の定量的測定結果を含む多分析物プロファイルを含む。

50

## 【0055】

分析的な分類プロセスは、定量的データを操作して試験試料を分類するために、種々の統計的分析方法のいずれか1つを使用し得る。有用な方法の例としては、線形判別分析(LDA)、再帰的特徴削除、マイクロアレイの予測分析、ロジスティック回帰、CARTアルゴリズム、FlexTreeアルゴリズム、LARTアルゴリズム、ランダムフォレストアルゴリズム、MARTアルゴリズム、および機械学習アルゴリズムが挙げられる。好ましい分析方法は、LDAである。これらの方法のいずれか1つを使用しつつ、1つまたは複数の参照データセットを用いて予測モデルを作成する。このようなモデルの作成では、対照試料および/または罹患試料を含むデータセットを学習セットとして使用する。学習セットは、試験試料で定量されるのと同じマーカー群についてのデータを含むことになる。急速低下COPD患者と健常対象、緩徐低下COPD患者と健常対象、および急速低下COPD患者と緩徐低下COPD患者を区別するために使用される予測モデルの例を本明細書で提供する。例えば、実施例3を参照されたい。

10

## 【0056】

本明細書に示される予測モデルは、本明細書に記載のシグネチャー1、2、もしくは3に含まれるバイオマーカー、または該シグネチャー内のバイオマーカーサブセットの、複数回のタンパク質レベル測定の結果を利用し、そして、所望の精度で、ある人が特定の状態(ここで、状態は、急速低下COPD、緩徐低下COPD、または健康(疾患状態なし)であり得る)に属すると分類する方法を提供する。したがって、対象となる分類には、試験試料を以下の状態、すなわち、i) COPD状態(急速低下COPD状態または緩徐低下COPD状態を含む)とii)健康状態(疾患状態なし)のうちの1つまたは複数に割り当てることが含まれるが、これに限定されるものではない。

20

## 【0057】

取得データセットと参照データセットを比較することで統計的に有意な差が得られるかどうかを決定することによって分類することもできる。統計的に有意な差が得られる場合は、データセットが得られた試料を参照データセット群に属しないと分類する。逆に、このような比較が参照データセットと比べて統計的に有意でない場合は、データセットが得られた試料を参照データセット群に属すると分類する。

## 【0058】

試料が所与の群に属する確率を決定するための閾値を設定する予測モデル化方法によって分類することができる。本発明の方法の確率は、少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%またはそれを上回るものである。モデルの予測能力は、特定の値または値の範囲の品質メトリック、例えば、精度、を提供するその能力によって評価し得る。一実施形態では、望ましい品質閾値は、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%もしくはそれを上回る精度で、試験試料を分類する能力を有する。「精度」という用語は、疾患状態(例えば、COPD)と対照状態(例えば、健康)とを正確に識別する個々のマーカーまたはマーカー組合せのコンピュータ演算能力を指す。当技術分野で知られているように、予測モデルの相対的な感度と特異度は、選択性メトリックまたは感度メトリックのどちらかに有利になるように合わせることができるが、この場合、2つのメトリックは反対の関係にある。「感度」という用語が、疾患状態を正確に同定する個々のマーカーまたはマーカー組合せの能力を指すのに対し、「特異度」という用語は、正常な(例えば、罹患していない)状態を正確に同定するこの(これらの)マーカーの能力を指す。上記のモデルの限度を調整して、実施される試験の特定の要件に応じた、選択された感度レベルまたは特異度レベルを提供することができる。感度と特異度の一方または両方は、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%もしくはそれを上回るものであり得る。

30

40

## 【0059】

各マーカーの値(例えば、濃度)を、通常3つ1組でまたは3つ1組で複数回、測定す

50

ることによって、生データを初めに分析することができる。データは操作することができる。例えば、標準曲線を用いて生データを変換することができ、3つ1組の測定結果の平均値を用いて各患者の平均値および標準偏差を算出することができる。モデルで使用する前に、これらの値を変換する、例えば、対数変換、ボックス・コックス変換（BoxおよびCox（1964） J. Royal Stat. Soc, Series B, 26: 211-246参照）することができる。次に、データを予測モデルに入力すると、この予測モデルが、試料を状態によって分類する。得られた情報は、患者、医療従事者、または臨床研究の分析者に提供することができる。

#### 【0060】

COPD状態についての予測モデルを作成するために、既知の対照試料および/または対象となる分類に対応する試料を含む、頑健なデータセットを学習セット（「参照データセット」）で使用する。試料サイズは、一般に認められている基準を用いて選択する。上で論じられているように、異なる統計的方法を用いて、精度の高い予測モデルを得ることができる。線形判別分析（LDA）を用いたそのような分析の一例を実施例3に示す。

#### 【0061】

線形判別分析（LDA）は、試験試料または試験対象を、特定の対象物特性に基づいて、2つのカテゴリーのうちの1つに分類しようとする。換言すれば、LDAは、実験で測定された対象物属性によって対象物のカテゴリー化が予測されるかどうかを検証する。LDAは、通常、連続独立変数と二値カテゴリー独立変数を必要とする。本発明において、学習集団サブセットの全てにわたる本明細書に開示の選択されたバイオマーカーセットの定量値（例えば、タンパク質濃度データ）は、必須の連続独立変数の役割を果たす。学習集団の各メンバーの臨床群分類は、二値カテゴリー独立変数の役割を果たす。

#### 【0062】

LDAは、グループ分け情報を用いて群間分散と群内分散の比を最大化する変数の線形結合を求める。暗黙のうちに、LDAによって使用される線形重みは、学習セット全体のバイオマーカーの定量値（例えば、タンパク質濃度）がどのように2つの群（例えば、COPD対照群と健常対照群）に分かれるかによって決まる。いくつかの実施形態では、LDAを、学習試料中のメンバーN個×本明細書に記載のバイオマーカーと組み合わせたバイオマーカーK個のデータ行列に適用する。次に、学習集団の各メンバーの線形判別式をプロットする。第1の対照亜群（例えば、健常群）に相当する学習集団のメンバーがクラスターを形成して1つの範囲の線形判別値（例えば、負）をとり、第2の対照亜群（例えば、COPD対象）に相当する学習集団のメンバーがクラスターを形成して第2の範囲の線形判別値（例えば、正）をとることが理想的である。判別値のクラスター間の分離がより大きい場合に、LDAはより成功していると考えられる。線形判別分析についてのさらなる情報については、Duda, Pattern Classification, 第2版, 2001, John Wiley & Sons, Inc; および Hastie, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer, New York; Venables & Ripley, 1997, Modern Applied Statistics with s-plus, Springer, New Yorkを参照されたい。

#### 【0063】

二次判別分析（QDA）は、LDAと同じ入力パラメータを受け取り、LDAと同じ結果を返す。QDAは、線形方程式ではなく、二次方程式を用いて、結果を出す。LDAとQDAは互換的であり、どちらを用いるかは好みの問題および/または分析を支援するソフトウェアの可用性の問題である。ロジスティック回帰は、LDAおよびQDAと同じ入力パラメータを受け取り、LDAおよびQDAと同じ結果を返す。

#### 【0064】

一実施形態では、予測モデルの導出において階層的クラスタリングを行ない、その場合、ピアソン相関をクラスタリングメトリックとして利用する。1つの手法は、COPDデータセットを「教師あり学習」問題の「学習試料」とみなすことである。CARTは、医

10

20

30

40

50

学への適用において標準となっているが (Singer (1999) Recursive Partitioning in the Health Sciences, Springer)、これは、任意の質的特徴を量的特徴に変換し、それらをホテリングの  $T^2$  統計量のための標本再利用法で評価される達成有意性水準によって分類し、lasso法を好適に適用することによって改変し得る。予測の問題は、回帰の質を評価する際の種類にジニ基準を実際に好適に利用することにより、予測を見失わない回帰の問題へと変わる。

【0065】

この手法は、FlexTree (Huangら, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10529-10534) と呼ばれるものにつながっている。FlexTreeは、シミュレーションにおいて、また、SNPおよび他の種類のデータに適用したときに、非常によく機能する。ソフトウェア自動化FlexTreeが開発されている。近年の努力により、LARTreeまたはsimply LART (Turnbull (2005) Classification Trees with Subset Analysis Selection by the Lasso, Stanford University) と呼ばれる手法が開発されている。この名前は、CARTおよびFlexTreeに見られるような二分木；上で言及したlasso法；およびEfronら (2004) Annals of Statistics 32:407-451によってLARSと呼ばれているものによるlasso法の実施を反映している。Huangら, 2004 (前掲) も参照されたい。

【0066】

使用し得る他の分析方法には、ロジスティック回帰が含まれる (例えば、Ruczinskiら, 2003, J. Comput. Graph. Stat. 12:475-512 参照)。ロジスティック回帰は、その分類子を二分木として示すことができるという点でCARTに似ている。ロジスティック回帰は、各ノードが、CARTによって生成される単純な「and」文よりも一般的な特徴についてのブーリアン文を有するという点で異なる。

【0067】

別の手法は、最短収縮重心 (nearest shrunken centroid) の手法である (Tibshiraniら, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6567-72)。この技法はk-means法に似ているが、クラスター中心を収縮することにより、情報を提供する少数の特徴に焦点を絞るように (lasso法に見られるような) 特徴を自動的に選択するという利点を有する。この手法は、PAMソフトウェアとして利用可能であり、広く使用されている。さらに2組のアルゴリズムは、ランダムフォレスト (Breimanら, 2001, Mach. Learn. 45:5-32) とMART (Hastieら, 2001, The Elements of Statistical Learning, Springer) である。これら2つの方法は、既に「コミッティー法 (committee method)」である。したがって、これらは、結果を「採決する」予測子を含む。

【0068】

有意性を順序付けるために、偽発見率 (FDR) を決定することができる。まず、1組の非類似値の帰無分布を作成する。一実施形態では、観測されたプロファイル値を並べ変えて、偶然に得られる一連の相関係数の分布を創出し、それによって、適当な組の相関係数の帰無分布を創出する (参照により本明細書に組み入れられる、Tusherら, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 5116-21を参照されたい)。帰無分布の組は、全ての利用可能なプロファイルについての各プロファイルの値を並べ変え、全てのプロファイルの対相関係数を計算し、この順列の相関係数の確率密度関数を計算し、この手順をN回 (ここで、Nは大数、通常約300である) 繰り返すことによって得られる。N個の分布を用いて、所与の有意水準の実験的に観測された類似値の分布から得られる (類似) 値を超える相関係数値のカウントの適当な尺度 (平均値、中

10

20

30

40

50

中央値など)を計算する。

【0069】

FDRとは、実験データにおけるこの選択されたピアソン相関よりも大きい相関(有意な相関)の数に対する(ランダム化されたデータの組におけるこの選択されたピアソン相関よりも大きい相関から推定される)期待される偽有意な相関(falsely significant correlation)の数の比率のことである。このカットオフ相関値を、実験プロファイル間の相関に適用することができる。

【0070】

上述の分布を用いて、有意性についての信頼度を選択する。これを用いて、偶然に得られたと考えられる結果を超える相関係数の最小値を決定する。この方法を用いて、正の相関、負の相関、または両方の閾値を得る。この閾値(単数または複数)を用いて、ユーザーは、対相関係数の観測値をフィルタリングし、閾値(単数または複数)を超えないものを削除することができる。さらに、所与の閾値について、偽陽性率の推定値を得ることができる。各々の個々の「ランダム相関」分布については、観測結果がいくつ閾値範囲から外れるかを見出すことができる。この手順によってカウントの数列が得られる。この数列の平均と標準偏差から、潜在的な偽陽性の平均数とその標準偏差が得られる。

10

【0071】

代替の分析手法では、横断面分析で選択される変数を予測子として個別に利用する。具体的なCOPD転帰と、各々の患者が観察されるランダムな時間長と、プロテオームの特徴および他の特徴の選択とが与えられれば、生存分析のためのパラメトリック手法が、広く適用されているセミパラメトリックなコックスモデルよりも優れている場合がある。ワイブルの生存に関するパラメトリックフィットは、ハザード率が単調増加するか、単調減少するか、または一定となること許すものであるが、これはまた、(コックスモデルが表示する)比例ハザードを表示し、加速故障時間も表示する。回帰係数の近似最尤度推定量とその関数を得るときに利用可能な標準的手段は全て、このモデルで利用可能である。

20

【0072】

さらに、特に共変量の数を、lassoを用いて扱いやすい大きさに減らすことによって、分析が大幅に単純化されることになり、生存に対する完全にノンパラメトリックな手法の可能性が認められるので、コックスモデルを使用することができる。これらの統計手法は、ありとあらゆるプロテオームデータに適用可能である。容易に測定可能であって、かつ臨床的意義のあるCOPDを有する人の検出に関して極めて情報量の多い、1組のバイオマーカーを提供する。

30

【0073】

予測モデルの開発においては、1サブセットのマーカー、すなわち、少なくとも3組、少なくとも4組、少なくとも5組、少なくとも6組、または完全な組のマーカーを選択することが望ましい場合がある。通常、精度の高い予測モデルを維持しながら、定量的試料分析に必要なもの(例えば、試薬の可用性、定量の利便性など)を提供する1サブセットのマーカーを選択する。分類モデルを構築するためのいくつかの情報提供マーカーの選択は、性能メトリックに基づいた有用な予測能力を有するモデルを生成するために、性能メトリックの定義とユーザー定義の閾値とを必要とする。例えば、性能メトリックは、予測の感度および/または特異度、ならびに予測モデルの全体精度であってもよい。実施例3に記載されるように、COPDおよびこの疾患の特定の病期に関連するバイオマーカーを同定するために、LDAが学習モデルで使用された。1サブセットのマーカーの選択を、マーカーサブセットの前進選択または後退選択に使用してもよい。マーカー全てを用いることなくモデルの性能を最適化するいくつかのマーカーを選択してもよい(下記の実施例3の表6参照)。最適な項数を定義するための1つの方法は、所望の予測能力(例えば、80%を超える精度、または同等量の感度/特異度)を有するモデルを生成する項数であって、所与の分析プロセスに使用される任意の項の組合せと項数とを用いてこのメトリックについて得られる最大値からわずかに1標準誤差である項数を選択することである。

40

【0074】

50

## V. 試薬およびキット

1つまたは複数の上記方法を実施するための試薬およびそのキットも提供する。本試薬およびそのキットは、非常に様々なものであってもよい。対象となる試薬には、COPDと関連する循環タンパク質マーカーの上記発現プロファイルの作成で使用されるように特別に設計された試薬が含まれる。

### 【0075】

したがって、本発明は、1つまたは複数の上記方法を実施するためのキットであって、本明細書に記載のCOPDバイオマーカーに特異的な少なくとも1つの試薬を含み、このCOPDバイオマーカーが、アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（「IL-8」）、単球走化性タンパク質-1（「MCP-1」）、腫瘍壊死因子受容体II（「TNF-RII」）、アポリポタンパク質CIII、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、免疫グロブリンA（「IgA」）、マクロファージ炎症性タンパク質1（「MIP-1」）、組織因子、および腫瘍壊死因子-（「TNF-」）、-1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質（「CRP」）、フィブリノゲン、インターロイキン-4（「IL-4」）、マクロファージ由来ケモカイン（「MDC」）、および可溶性血管細胞接着分子1（「sVCAM-1」）からなる群から選択される、キットを提供する。1つまたは複数のバイオマーカーの発現は、1つまたは複数のバイオマーカーを検出する該試薬を用いて測定することができる。このキットを用いて、COPD群または健常群のヒト対象から得られる試験試料を分類する。

10

20

### 【0076】

一実施形態では、該キットは、本明細書に記載の1つまたは複数のバイオマーカーシグネチャーから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーを検出するための試薬を含む。したがって、該キットは、

(a) アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（IL-8）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、および腫瘍壊死因子受容体II（TNF-RII）と、

(b) アポリポタンパク質CIII、CD40、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、ハプトグロビン、免疫グロブリンA（IgA）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、組織因子、および腫瘍壊死因子-（TNF-）と、

30

(c) -1アンチトリプシン、C-反応性タンパク質（CRP）、フィブリノゲン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-4（IL-4）、マクロファージ由来ケモカイン（MDC）、組織因子、腫瘍壊死因子受容体II（TNFRII）、および可溶性血管細胞接着分子1（sVCAM-1）と、

からなる群から選択される多分析物パネルから選択される少なくとも3つのタンパク質マーカーを検出するための試薬を含み得る。

### 【0077】

本発明のキットは、生体試料中の本明細書に開示されるCOPDバイオマーカーに対応するポリペプチドまたは本明細書に開示されるCOPDバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードするmRNAを検出するのに有用な標識化合物または標識薬剤である試薬と、試料中のポリペプチドまたはmRNAの量を測定するための手段（例えば、ポリペプチドに結合する抗体またはポリペプチドをコードするDNAもしくはmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）とを含み得る。COPDバイオマーカーに対応するポリペプチドとの結合に好適なこのような試薬の1つの種類は、対象となるマーカーに結合する抗体またはその断片（抗体誘導体を含む）である。さらに、核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNA、スプライスされたmRNA、cDNA）との結合に好適な試薬には、相補的核酸が含まれる。プローブ構造、基質組成、および結合技術が多種多様に異なっている、種々様々なアレイフォーマットが当技術分野で知られている。さらなる実施形態では、試薬は、検出可能な物質で直接的または間接的に標識されている。

40

50

## 【0078】

特定の実施形態では、1つまたは複数のバイオマーカーの発現は、(a) 1つまたは複数のバイオマーカーによって調節されるポリペプチドの発現を検出すること、(b) バイオマーカーを調節するポリペプチドの発現を検出すること、または(c) バイオマーカーの代謝物の発現を検出することによって検出される。

## 【0079】

抗体ベースのキットについて、キットは、例えば(1) 本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドに結合する(例えば、固体支持体に結合した)第1の抗体と、任意で(2) 当該ポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかに結合し、かつ検出可能な標識にコンジュゲートされている第2の異なる抗体とを含むことができる。

10

## 【0080】

オリゴヌクレオチドベースのキットについて、キットは、例えば(1) 本発明のバイオマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または(2) 本発明のバイオマーカーに対応する核酸分子を増幅するのに有用な1対のプライマーを含むことができる。

## 【0081】

キットは、緩衝剤、防腐剤、タンパク質安定化剤、および/または検出可能な標識の検出に必要な構成要素などの、他の構成要素を含むこともできる。キットは、様々な方法で利用される試薬、例えば、血液試料を採取および処理するための装置、2次抗体、E L I S A 試薬; チューブ、スピンカラムなどを含み得る。キットの各構成要素を個々の容器に封入することができ、また、これらの様々な容器を全て、単一のパッケージに納めることができる。

20

## 【0082】

対象となる代表的なアレイ組成物またはキット組成物は、アポリポタンパク質H、CD 40、ハプトグロビン、IL - 8、MCP - 1 およびTNF - RII からなる群から選択される少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、もしくは6つ全てのマーカーを定量するための試薬を含むか、またはこれらの試薬からなる。このキットを用いて、試験試料を、健常患者ではなく、急速低下COPDと分類する、および/または対象を、健常患者ではなく、急速低下COPDと診断することができる。キットに含まれる試薬を用いて定量するのに好ましい少なくとも3つのマーカーは、アポリポタンパク質H、MCP - 1、およびTNF - RII を含み得る、またはこれらからなり得る。

30

## 【0083】

別の一実施形態では、代表的なアレイまたはキットは、アポリポタンパク質CIII、CD 40、ハプトグロビン、GM - CSF、IgA、MIP - 1、組織因子、およびTNF - からなる群から選択される少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、もしくは8つ全てのマーカーを定量するための試薬を含むか、またはこれらの試薬からなる。このキットを用いて、試験試料を、健常患者ではなく、緩徐低下COPDと分類する、および/または対象を、健常患者ではなく、緩徐低下COPDと診断することができる。キットに含まれる試薬を用いて定量するのに好ましい少なくとも3つのマーカーは、IgA、MIP - 1、および組織因子を含み得る、またはこれらからなり得る。

40

## 【0084】

またさらなる実施形態では、代表的なアレイまたはキットは、IL - 1 アンチトリプシン、CRP、フィブリノゲン、GM - CSF、IL - 4、MDC、組織因子、TNF - RII、およびsVCAM - 1 からなる群から選択される少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、もしくは9つ全てのマーカーを定量するための試薬を含むか、またはこれらの試薬からなる。このキットを用いて、試験試料を、緩徐低下COPDではなく、急速低下COPDと分類する、および/または対象を、緩徐低下COPDではなく、急速低下COPDと診断することができる。

50

。キットに含まれる試薬を用いて定量するのに好ましい少なくとも3つのマーカーは、MDC、組織因子、およびsVCAM-1を含み得る、またはこれらからなり得る。

【0085】

キットは、1つまたは複数の表現型を統計分析するためのソフトウェアパッケージをさらに含み得、予測モデル内での分類の確率を計算するための参照データベース（単数または複数）を含み得る。

【0086】

上記の構成要素に加えて、本キットは、本方法を実施するための、および本キットを用いて実施されたアッセイの結果を解釈するための指示をさらに含み得る。これらの指示は、種々の形態で本キットに存在し得、1つまたは複数のこれらの形態が、本キットに存在し得る。これらの指示が存在し得る1つの形態は、好適な媒体または基板（例えば、情報が印刷された1枚または複数枚の紙）の上、キットの包装中、添付文書中などに印刷された情報としてのものである。さらに別の手段は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、ディスク、CDなどである。存在し得るさらに別の手段は、遠隔部位の情報にアクセスするためにインターネット経由で使用し得るウェブサイトアドレスである。任意の好都合な手段がキットに存在し得る。

10

【0087】

本発明の様々な特徴をさらに説明する実施例を以下でさらに示す。これらの実施例は、本発明を実施するための有用な方法も説明する。これらの実施例は、請求された発明を限定するものではない。

20

【実施例】

【0088】

実施例1

研究対象の採取

15年間の縦断的肺機能研究の最後に、40人のCOPD患者と20人の健常対照からクエン酸緩衝液中に血液を採取した。COPD患者と健常対照は、現喫煙者または元喫煙者のいずれかであった。COPD患者は、当初、NIHが資金援助した全米肺健康研究（National Lung Health Study）という、肺機能に関する5年間の縦断的研究の一環として1987～88年に募集された（Owens, 1991, Am. J. Med. 91:375-405）。募集された患者は、FEV1が50%～90%の範囲で、FEV1/努力肺活量（FVC）が0.7未満で、かつCOPDの特徴的な呼吸器症状を示す、35歳～59歳の現喫煙者であった。肺活量測定は、肺健康研究の期間中、毎年行なわれた。この研究で評価されたCOPD患者については、ユタ大学で次の10年間、様々な間隔でさらなる肺活量測定が行なわれた。15年間の肺機能に関する縦断的情報に基づいて、COPD患者は2つのはっきりと区別できる群に分類された。26人の急速低下群のCOPDサブグループは、過去15年間で年間平均40ml以上のFEV1を失った人によって定義される。これは、健康な喫煙者と非喫煙者について報告されている20mlのFEV1という正常な低下の2倍以上である（Rennard, 1998, 前掲）。14人の緩徐低下群のCOPDサブグループは、年間平均40ml未満のFEV1を失った人によって定義される。血液採取の時点で、急速低下群は、それまでの15年間で平均20.2%のFEV1を失っているので、全体で、予想される正常FEV1の64%を有していた。緩徐低下群は、それまでの15年間で平均2.4%のFEV1しか失っていないので、全体で、予想される正常FEV1の72%を有していた。COPD患者は全員、他の主な病気にはかかっておらず、研究期間中はコルチコステロイドを使用しておらず、よく似た年齢および性別分布であった。健康な喫煙者/元喫煙者の対照は、研究期間中ずっと募集され、性別、年齢、および民族性によってマッチングされた。研究におけるCOPD患者と対照の臨床的特徴を表2に報告する。

30

40

【表 2】

群	性別	平均年齢	現在のFEV1 %	過去15年間における	
				FEV1損失 %	1年間に失われたFEV1 ml
対照喫煙者 (n=20)	男11;女9	56	99.4	na	na
COPD 緩徐低下群 (n=14)	男9;女5	61	72.3	<12% (平均:2.4)	<40ml (平均:24.0)
COPD 急速低下群 (n=26)	男13;女13	62	64.0	≥12% (平均:20.2)	≥40ml (平均:62.3)

na = 不適用

## 【0089】

## 実施例 2

## 血漿マーカーの分析

Rules - Based Medicine社 (Austin, TX) 独自のヒト抗原MAPプラットフォームでマーカーを分析するために、この会社に凍結血漿試料を送付した。凍結血漿試料を室温で解凍し、ボルテックスし、清澄化するために13,000 x gで5分間回転させ、マーカー分析用に40 uLを取って、マスターマイクロタイタープレートに入れた。自動ピペティングを用いて、各試料のアリコートをし、ヒト抗原MAPの捕捉マイクロスフェアマルチプレックスの1つに導入した。これらの試料と捕捉マイクロスフェアの混合物を完全に混合し、室温で1時間インキュベートした。次に、各マルチプレックスに対するビオチン化レポーター抗体のマルチプレックス化カクテルをロボット制御によって添加し、完全に混合した後、室温でさらに1時間インキュベートした。各マルチプレックス中に完全に混合し、室温で1時間インキュベートした過剰なストレプトアビジン-フィコエリスリン溶液を用いて、これらのマルチプレックスを発色させた。各マルチプレックス化反応液の容量を真空濾過で減少させ、分析用のマトリックス緩衝液中に希釈することによって容量を増大させた。Luminex 100装置で分析を行ない、得られたデータ流を、Rules - Based Medicineで開発された独自のデータ分析ソフトウェアを用いて解釈した。各マルチプレックスについて、各マイクロタイタープレート上に校正物質と対照を含めた。各プレートの最初と最後の列に8点の校正物質を入れ、3つのレベルの対照を2つ1組で含めた。適切なアッセイ性能を保証するために、各マルチプレックスの高レベルと中レベルと低レベルの対照について、まず検査結果を明らかにした。データ分析パッケージに含まれる4および5パラメータの、加重および非加重曲線当てはめアルゴリズムを用いて、特定のマルチプレックス中にある各々の分析物についての未知値を測定した。

## 【0090】

## 実施例 3

## データ分析

個々のマーカーの単変量分析。ウィルコクソン順位和検定を用いて、COPD急速低下群と健常対照、COPD緩徐低下群と健常対照、およびCOPD急速低下群とCOPD緩徐低下群の間の各マーカーの有意性を評価した。正確なp-値は、シフトアルゴリズム (StreitbergおよびRohmel (1986) Exact Distribution for Permutations and Rank Test: An Introduction to Some Recently Published Algorithms. Statistical Software Newslette

10

20

30

40

50

r . 1 2 : 1 0 - 1 7 ) を用いて決定した。加えて、より厳密な偽発見率を用いて、各マーカーの有意性の強さをさらに評価した。p - 値で評価される偽陽性率 ( F P R ) は、実際に変化しなかった全マーカーの中での偽陽性の比率のことである。q - 値で評価される偽発見率 ( F D R ) は、偽陽性である有意変化の比率である。各マーカーの q - 値は、Benjamini & Hockberg ( Benjamini および Hockberg , 2000 , J . Behav . Educ . Statist . 25 : 60 - 83 ) によって提唱された方法を用いて導き出された。分析は全て、R、バージョン 2 . 4 ( R Development Core Team ( 2006 ) . R : A language and environment for statistical computing . R Foundation for Statistical Computing , Vienna , Austria . ISBN 3 - 900051 - 07 - 0 , URL http : / / www . R - project . org . ) を用いて実施された。

10

#### 【 0 0 9 1 】

本発明者らは、まず、試験した 89 個の血漿マーカーの 1 つ 1 つについて、COPD 急速低下群と対照の間の平均値 ( 中央値 ) を比較した。多くの小さいけれども有意な (  $p < 0 . 05$  ) 差がこれら 2 つの群の間に認められた ( 表 3 ) 。 p - 値で評価される偽陽性率 ( F P R ) は、実際に変化しなかった全マーカーの中での偽陽性の比率のことである。q - 値で評価される偽発見率 ( F D R ) は、偽陽性である有意変化の比率である。正の変化倍数値は、健常対照に対する増加を表し、負の値は減少を表す。激しい変化倍数という点で、最も大きな差は、インターロイキン - 4 ( I L - 4 ; 急速低下群において 4 . 2 倍の増加 ) 、エオタキシン ( 2 . 6 倍の増加 ) 、インターロイキン - 7 ( I L - 7 ; 2 . 2 倍の増加 ) 、およびハプトグロビン ( 2 . 0 倍の増加 ) の場合に見られた。統計的に最も有意な差は、I L - 4、単球走化性タンパク質 ( M C P - 1 ) 、可溶性血管細胞接着分子 - 1 ( s V C A M - 1 ) 、およびエオタキシンについて認められ、p 値 ( 偽陽性率 ) は 0 . 1 % 未満、q 値 ( 偽発見率 ) は 1 % 未満であった ( 図 1 ) 。対照的に、緩徐 COPD 低下群と対照との単変量比較からは、より少なくかつより小さい有意差が明らかとなった ( 表 4 ) 。 4 つのマーカーのみが 0 . 05 未満の p 値を有し、かつ 4 例全てにおいて、偽発見率が非常に高かった (  $> 50\%$  ) 。最後に、緩徐 COPD 低下群と急速 COPD 低下群を比較したときに、いくつかの興味深い差が見られた ( 表 5 ) 。インターロイキン - 4 ( I L - 4 ) 、インターロイキン - 5 ( I L - 5 ) 、単球走化性タンパク質 - 1 ( M C P - 1 ) 、マクロファージ由来ケモカイン ( M D C ) 、および組織因子は、緩徐低下群と比較して急速低下群において有意により高いレベルで存在した (  $p < 0 . 05$  ) 。癌抗原 19 . 9、免疫グロブリン A 型 ( I g A ) 、インスリン、マクロファージ炎症性タンパク質 1 ( M I P - 1 ) 、および可溶性血管細胞接着分子 1 ( s V C A M - 1 ) は、緩徐低下群と比較して急速低下群において有意により低いレベルで存在した。

20

30

【表 3】

単変量分析で決定されたCOPD急速低下群と健常対照の間の血漿マーカーの差

マーカー	変化倍数	p 値 (FPR)	q 値 (FDR)
$\alpha$ -1-アンチトリプシン	1. 11	0. 0238	0. 062
$\alpha$ フェトタンパク質	1. 38	0. 0498	0. 094
アポリポタンパク質A1	1. 38	0. 0020	0. 017
アポリポタンパク質H	1. 15	0. 0029	0. 019
癌胎児性抗原	1. 75	0. 0022	0. 017
エオタキシン	2. 64	0. 0007	0. 008
第V I I 因子	1. 16	0. 0448	0. 091
フィブリノゲン	1. 18	0. 0231	0. 062
GM-CSF	1. 51	0. 0061	0. 026
ハプトグロビン	2. 02	0. 0115	0. 034
IL-10	1. 54	0. 0116	0. 034
IL-13	1. 69	0. 0086	0. 031
IL-1 $\alpha$	1. 16	0. 0336	0. 079
IL-3	1. 46	0. 0496	0. 094
IL-4	4. 21	<0. 0001	0. 000
IL-5	1. 59	0. 0041	0. 023
IL-7	2. 16	0. 0044	0. 023
IL-8	1. 20	0. 0398	0. 088
MCP-1	1. 51	<0. 0001	0. 001
血清アミロイドP	1. 28	0. 0049	0. 023
組織因子	1. 19	0. 0410	0. 088
TNF-R I I	-1. 19	0. 0071	0. 028
トロンボポエチン	7. 55	0. 0117	0. 034
sVCAM-1	-1. 20	0. 0002	0. 003
VEGF	1. 18	0. 0301	0. 075

10

20

30

【表 4】

単変量分析で決定されたCOPD緩徐低下群と健常対照の間の血漿マーカーの差

マーカー	変化倍数	p 値 (FPR)	q 値 (FDR)
アポリポタンパク質H	1. 16	0. 0230	0. 696
癌抗原19. 9	2. 29	0. 0078	0. 563
エオタキシン	1. 68	0. 0358	0. 696
VEGF	1. 11	0. 0545	0. 696

40

【表5】

単変量分析で決定されたCOPD急速低下群と緩徐低下群の間の血漿マーカーの差

マーカー	変化倍数	p値 (FPR)	q値 (FDR)
癌抗原19.9	-1.43	0.0355	0.300
IgA	-1.57	0.0120	0.157
IL-4	1.27	0.0008	0.054
IL-5	1.48	0.0139	0.157
インスリン	-5.86	0.0165	0.160
MCP-1	1.44	0.0026	0.089
MDC	1.28	0.0422	0.300
MIP-1 $\alpha$	-1.26	0.0468	0.300
組織因子	1.32	0.0125	0.157
sVCAM-1	-1.31	0.0043	0.098

10

## 【0092】

シグネチャーを同定するための多変量分析。線形判別分析 (Venables, W. N. & Ripley, B. D., (2002). *Modern Applied Statistics*, 第4版. Springer) による前進選択法を用いて、COPD急速低下群と健常対照、COPD緩徐低下群と健常対照、およびCOPD急速低下群とCOPD緩徐低下群を最適に類別する多分析物パネル(シグネチャー)を決定した。この分析では、データセットの各点から各群の多変量平均(セントロイドと呼ぶ)までの距離を測定し、その点を最も近い群へと分類した。使用した距離量は、変数間の分散と共分散を考慮に入れるマハラノビス距離であった。代表的な多分析物パネル(シグネチャー)を、その予測性能とともに表6に示す。これらのマーカーが提供データセットについてCOPDと対照を類別する予測性能を、50回繰り返しの5倍クロス確認を用いて調べた。これによって、データがランダムに5つの亜群に分けられ、各グループが1回に1つ除外され、残りの4つの亜群に対するモデルが構築され、このフィッティングしたモデルを用いて第5の亜群における疾患分類が予測され、これが5つの群全てに対して繰り返された後、結果が平均化される。この分析を50回繰り返して、全体精度の信頼できる推定値を、バイオマーカーシグネチャーの感度と特異度とともに生成する。これらの分析は、20人の対照と14人または26人のCOPD対象に基づいており、R、バージョン2.4 (R Development Core Team (2006). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.) を用いて行なわれた。

20

30

【表 6】

多変量分析で同定された代表的な多分析物パネル（シグネチャー）と、  
その予測性能のまとめ

比較したグループ	精度	シグネチャー要素
急速低下群（n = 26） 対 健常喫煙者（n = 20） （1年）	90%	アポリポタンパク質H CD40 ハプトグロビン IL-8 MCP-1 TNF-R1I
急速低下群（n = 9） 対 健常喫煙者（n = 5） （2年）	93%	
緩徐低下群（n = 14） 対 健常喫煙者（n = 20）	94%	アポリポタンパク質C111 CD40 GM-CSF ハプトグロビン IgA MIP1- $\alpha$ 組織因子 TNF- $\alpha$
急速低下群（n = 26） 対 緩徐低下群（n = 14）	92%	$\alpha$ -1アンチトリプシン CRP フィブリノゲン GM-CSF IL-4 MDC 組織因子 TNF-R1I VCAM-1

10

20

30

## 【0093】

どの血漿マーカーもそれらだけではCOPD患者と対照を明確に区別することができなかつたので、本発明者らは、線形判別分析法（LDA）を用いるデータの多変量分析を行った。この方法によって、COPD急速低下群と対照（健常喫煙者）を正確に区別することができる血漿マーカー群（シグネチャー1）が同定された（図2A）。図2Aは、COPD急速低下群と健常対照を類別する6マーカーシグネチャーの主成分を用いた二次元表示の線形判別分析（LDA）からの出力である。使用した距離量は、変数間の分散と共分散を考慮に入れるマハラノビス距離である。各多変量平均は、表示付きの丸である。丸の大きさは、平均の95%信頼限界に相当する。有意に異なる群は、交差しない丸を有する傾向にある。シグネチャー1は、以下の6個のマーカーから構成されている：アポリポタンパク質H、CD40、ハプトグロビン、インターロイキン-8（IL-8）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）、および腫瘍壊死因子受容体1I（TNF-R1I）。これらのマーカーの単変量分析により、CD40（1.15倍、 $p < 0.5$ ）を除いて、有意差が示された（ $p < 0.05$ ；表3）。シグネチャー1は、血漿試料がCOPD急速低下群に由来するものであることを93%の症例（感度）で、血漿試料が健常対象に由来するものであることを86%の症例（特異度）で正確に同定することができ、2つのグループを約90%の全体精度で区別することが50回繰り返しの5倍クロス確認によって示された。

40

## 【0094】

50

次に、本発明者らは、シグネチャー 1 の縦断的安定性を検証することを望んだ。最初の試料を用いてシグネチャー 1 を同定してから約 1 年後に、26 人中 9 人の COPD 急速低下群と 20 人中 5 人の健常対照から血液試料を採取した。このシグネチャーは、9 人全ての COPD 急速低下群と 5 人中 4 人の健常対照を正確に同定し、約 93% の全体精度を示した (表 6)。

#### 【0095】

LDA 法を用いて、本発明者らは、COPD 緩徐低下群と健常対照を正確に区別することができる 2 つ目の血漿マーカー群 (シグネチャー 2) も同定した (図 2)。図 2 は、COPD 緩徐低下群と健常対照を類別する 8 マーカーシグネチャーの主成分を用いた二次元表示の線形判別分析 (LDA) からの出力である。シグネチャー 2 は、以下の 8 個のマーカーから構成されている：アポリポタンパク質 C I I I、CD 40、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、ハプトグロビン、免疫グロブリン A (IgA)、マクロファージ炎症性タンパク質 1 (MIP - 1)、組織因子、および腫瘍壊死因子 - (TNF - )。シグネチャー 2 は、91% の感度と 96% の特異度を有し、緩徐低下群と対照を約 94% の全体精度で区別することが 50 回繰り返しの 5 倍クロス確認によって示された (表 6)。

10

#### 【0096】

最後に、本発明者らは、COPD 急速低下群と緩徐低下群を正確に区別することができる 3 つ目の血漿マーカー群 (シグネチャー 3) を同定した (図 2C)。図 2C は、COPD 緩徐低下群と急速低下群を類別する 9 マーカーシグネチャーの主成分を用いた二次元表示の線形判別分析 (LDA) からの出力である。シグネチャー 3 は、以下の 9 個のマーカーから構成されている：1 - アンチトリプシン、C - 反応性タンパク質 (CRP)、フィブリノゲン、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、インターロイキン - 4 (IL - 4)、マクロファージ由来ケモカイン (MDC)、組織因子、腫瘍壊死因子受容体 II (TNF - RII)、および可溶性血管細胞接着分子 - 1 (sVCAM - 1)。シグネチャー 3 は、血漿試料が COPD 急速低下群に由来するものであることを 95% の症例で、血漿試料が COPD 緩徐低下群に由来するものであることを 86% の症例で正確に同定することができ、2 つのグループを約 92% の全体精度で区別することが 50 回繰り返しの 5 倍クロス確認によって示された (表 6)。

20

#### 【0097】

表 7 に、LDA 分析から得られた、優れた感度と特異度を与える代表的なバイオマーカー組合せを記載する。R (Venables, W. N. & Ripley, B. D., (2002). Modern Applied Statistics, 第 4 版. Springer, New York) 中のコントリビュトライブラリー (contributed library) を用いて、様々なマーカー組合せの性能を評価するための LDA を行なった。R 中のコントリビュトライブラリーを用いて、バイオマーカー組合せの性能メトリックの信頼できる推定値を得るための 5 倍クロス確認を行なった (Andrea Peters および Torsten Hothorn, 2004, Improved Predictors, R パッケージ バージョン 0.8 ~ 3)。

30

【表 7】

線形判別分析 (LDA) (「最適なLDA」) で決定された、本明細書に開示の3つのバイオマーカーシグネチャーそれぞれの、ならびにバイオマーカーの中で最良のものを3つ、4つ、および/または5つ含むこれらの最適シグネチャーのサブセットの精度 (「Acc」) パーセント、感度 (「Sen」) パーセント、および特異度 (「Spe」) パーセントのまとめ。

		Acc%	Sen%	Spe%
	シグネチャー1			
対照対COPD-急速型				
最適なLDA (6個のマーカー)	アポリポタンパク質H、 CD40、ハプトグロビン、 IL-8、MCP-1、 TNF-R11	90.1	93.1	86.2
上記のうち最良のもの3個	アポリポタンパク質H、 MCP-1、TNF-R11	89	90.6	87
上記のうち最良のもの4個	アポリポタンパク質H、 CD40、MCP-1、 TNF-R11	88.2	91.4	84.1
	シグネチャー2			
対照対COPD-緩徐型				
最適なLDA (8個のマーカー)	アポリポタンパク質C11 I、CD40、GM-CSF、 ハプトグロビン、IgA、 MIP-1 $\alpha$ 、組織因子、 TNF- $\alpha$	94.1	90.7	96.4
上記のうち最良のもの3個	IgA、MIP-1 $\alpha$ 、 組織因子	76.1	62	86
上記のうち最良のもの4個	GM-CSF、IgA、 MIP-1 $\alpha$ 、組織因子	78.3	63.3	88.9
上記のうち最良のもの5個	アポリポタンパク質C11 I、GM-CSF、IgA、 MIP-1 $\alpha$ 、組織因子	83.3	68.4	93.8
	シグネチャー3			
COPD-急速型対 COPD-緩徐型				
最適なLDA (9個のマーカー)	$\alpha$ 1-アンチトリプシン、 CRP、フィブリノゲン、 GM-CSF、IL-4、 MDC、組織因子、sVCAM M-1、TNF-R11	91.8	94.9	86.1
上記のうち最良のもの3個	MDC、組織因子、 sVCAM-1	80.3	89.4	63.4
上記のうち最良のもの4個	IL-4、MDC、組織因子、 sVCAM-1	85.4	92.9	71.3
上記のうち最良のもの5個	GM-CSF、IL-4、 MDC、組織因子、 sVCAM-1	85.9	92.9	73

考察。本研究において、本発明者らは、そのレベルが健常対照と比較してCOPD患者で統計的に異なる血漿タンパク質を同定した。評価した89個の血漿マーカーのうち、25個が急速低下群と対照の間で統計的に異なっていた( $p < 0.05$ )のに対し、4個のマーカーしか、緩徐低下群と対照の間で統計的に異なっていなかった( $p < 0.05$ )。これらの単変量分析から、緩徐低下群と対照の間に存在する(わずか4個のマーカー、 $p < 0.05$ )統計的有意差よりも大きい統計的有意差が急速低下群と緩徐低下群の間に実際に存在する(10個のマーカー、 $p < 0.05$ )ことが示された。本発明者らの知る限り、これは、この疾患の緩徐発現と急速発現をこのように大規模に血清学的に区別した最初の研究である。

#### 【0099】

1 - アンチトリプシン (Aldonyteら, 2004, COPD 1: 155 - 164)、エオタキシン (Aldonyteら, 2004, 前掲; Janhaz - Rozykら, 2000, Pol. Merkur. Lekarski. 9: 649 - 652)、フィブリノゲン (Ganら, 2004, Thorax 59: 574 - 580)、IL - 4 (Zhangら, 1999, J. Tongji Med. Univ. 19: 15 - 19)、IL - 8、MCP - 1、およびVEGF (Pinto - Plataら, 2007, Thorax 62: 595 - 601)などの、急速低下群と対照の間で差を示すマーカーのうちのいくつかは、増悪していないCOPD患者の血液中で調節されることが過去に報告されている。対照と比較して急速低下群で顕著に調節される25個のマーカーのうち、可溶性のTNF - 受容体II (sTNFRII)と可溶性の血管細胞接着分子 - 1 (sVCAM - 1)の2個しか急速低下群で減少しない。興味深いことに、これらは両方とも、炎症性タンパク質である。sTNFRIIが炎症促進性タンパク質TNF - (Carpentierら, 2004, Curr. Med. Chem, 11: 2205 - 2212)を捕捉するのに対し、sVCAM - 1は、VCAM - 1を担持する白血球がVCAM - 1リガンドである41インテグリンを発現する内皮細胞に接着するのを妨害する (Foster, 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: S270 - S277)。

#### 【0100】

興味深いことに、対照よりも急速低下群で顕著に増大するマーカーのパネルの中には、好中球とマクロファージという、COPDに關与する2つの細胞型の活性を調節することが知られている、GM - CSF、IL - 8、およびMCP - 1などの走化性因子が存在している (Barnes, 2004, Pharmacol Rev. 56: 515 - 548)。より一層興味深いことに、そのリストの中には、Th2/Tc2表現型と関連する、IL - 4、IL - 5、IL - 10、IL - 13、およびエオタキシンなどのいくつかのメディエーターが存在している。このことは、COPD患者の肺に存在するTリンパ球が、健常喫煙者由来のTリンパ球よりも顕著に多いIL - 4、IL - 10、およびIL - 13を産生するという最近の研究報告と一致する (Barceloら, 2006, Clin. Exp. Immunol. 145: 474 - 479)。この観察は、より重篤な種類の疾患において喘息とCOPDの間に重複があることを示唆する仮説を支持する (Jeffery, Peter K. "Lymphocytes, Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Pathogenesis to Treatment: Novartis Foundation Symposium, 第234巻. Derek Chadwick & Jamie A. Goode編. Chichester: Wiley, 2001. 149 - 168)。

#### 【0101】

COPDは、多くの他の慢性疾患と同様に、表現型の発現が遺伝的要因と環境要因によって影響される不均一性の高い疾患であると考えられている。このため、単変量分析を行ったときに、各血漿マーカーについて群内変動性が観測されることが予想される。CO

10

20

30

40

50

PDと対照から得られた血清中マーカーを単変量分析した後の類似の変動性が別のグループによって最近記載された(Pinto-Plataら, 2007, 前掲)。このような状況において、各々の個々の血漿マーカーは、健常人由来の試料と緩徐型または急速型のいずれかのCOPD患者を正確に区別する限られた能力しか持たない。多変量分析における複数のマーカーの組合せは、こうした群内不均一性を考慮に入れる。多変量分析により、急速低下群と健常対照を約90%の精度で区別することができる6マーカーシグネチャーが同定された。重要なことは、約1年後に同じコホートから得られた試料を分析したとき、これらの同じ6個のマーカーを用いて類似の結果が得られたということであり、これによって、このシグネチャーが縦断的に安定であり、したがって、臨床的に有用である可能性があることが示唆される。このシグネチャーは、COPDの特徴となる炎症において役割を果たすことが推定される、IL-8やMCP-1などの、好中球と単球に対する走化性因子(Barnes, 2004, 前掲); 慢性腎不全(Schwabeら, 1999, Clin. Exp. Immunol. 117: 153-158)、慢性肝疾患(Schmilovitz-Weissら, 2004, Apoptosis 9: 205-210)、アルツハイマー病(Mocaliら, 2004, Exp. Gerontol. 39: 1555-1561)、および全身性硬化症(Komuraら, 2007, J. Rheumatol. 34: 353-358)の患者で上昇することが過去に報告されているCD40と命名された表面糖タンパク質の血中可溶性形態; 抗酸化特性と抗炎症特性を有する急性期タンパク質であるハプトグロビン(ZviおよびLevy, 2006, Clin. Lab. 52: 29-35); 抗炎症性sTNFRII; ならびに血液凝固、止血、および抗リン脂質抗体の産生を含む、種々の生理的経路に關与する血漿糖タンパク質であるアポリポタンパク質H(McNeilら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4120-4124)から構成される。

10

20

30

40

50

#### 【0102】

sCD40とハプトグロビンは、緩徐低下群と対照を約94%の精度で区別することができる8個の血漿マーカーからなる群の一部でもある。このシグネチャーには、3つの他のサイトカイン/ケモカイン、すなわち、安定なCOPD患者と増悪したCOPD患者から得られる気管支肺胞洗浄液中に高いレベルで見られる、好中球の生存と活性の調節因子であるGM-CSF(Balbiら, 1997, Eur. Respir. J. 10: 846-850); 好中球と単球に対する走化性因子であるMIP1-(Barnes, 2004, 前掲)、およびCOPDに關与し(Barnes, 2004, 前掲)、安定なCOPD患者の血中により高いレベルで見られる(Ganら, 2994, 前掲)サイトカインである、TNF- $\alpha$ も含まれる。COPD緩徐低下群のシグネチャーは、リポタンパク質代謝の調節因子であるアポリポタンパク質CIII(Shachter, 2001, Curr. Opin. Lipidol. 12: 297-304); 過去に抗リン脂質抗体と關連付けられている血中免疫グロブリンのサブタイプであるIgA(Staubら, 2006, Autoimmun. Rev. 6: 104-106); および抗リン脂質抗体の存在と血栓閉塞性合併症を特徴とする抗リン脂質症候群の患者で上昇することが分かっている凝固因子である可溶性組織因子(sTF)によって完成となる。

#### 【0103】

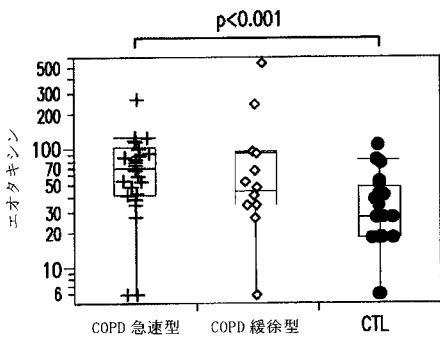
急速COPD低下群対緩徐COPD低下群のシグネチャーは、9個の血漿マーカーから構成される。これらのマーカーのうち3つ、1-アンチトリプシン、C-反応性タンパク質(CRP)、およびフィブリノゲンは、COPD患者において調節されることが広く報告されている(Ganら, 2004, 前掲; RanesおよびStoller, 2005, Semin. Respir. Crit. Care Med. 26: 154-166)。3つの他のマーカーは、GM-CSF、IL-4、およびマクロファージ由来ケモカイン(MDC)という、サイトカイン/ケモカインである。GM-CSFは、緩徐低下群のシグネチャーにも含まれており、上で考察されている。IL-4は、単変量分析において緩徐低下群や対照と比較して急速低下群で最も顕著に増大したマーカーである。MDC(CCL22)は、IL-4によって上方調節されることが示されており、Th2細胞の

炎症部位への動員に重要な役割を果たしている (Ganら, 2004, 前掲; YamashitaおよびKuroda, 2002, Crit. Rev. Immunol. 22: 105-114)。このシグネチャーは、上記のsTF、sTNFR II、およびsVCAM-1をもって完成となる。

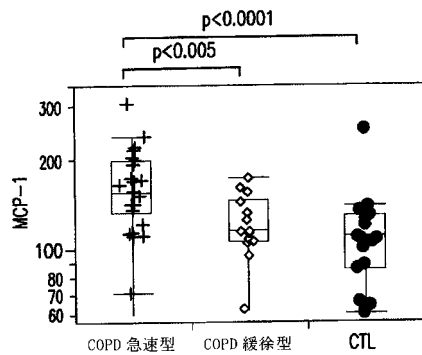
【0104】

対照と緩徐COPD低下群と急速COPD低下群を区別する単一のシグネチャーを同定するという試みからは、82%を超える精度が得られなかった。急速COPD低下群または緩徐COPD低下群と対照を正確に区別する明確なシグネチャーの必要性と、急速COPD低下群と緩徐COPD低下群を正確に区別するシグネチャーを発見することができるという事実とによって、COPDにおける肺機能低下速度と関連がある基本的な生化学的違いが存在することが示唆される。本発明者らの知る限り、本研究は、緩徐低下型のCOPDと急速低下型のCOPDを区別する血漿マーカーを記載した最初の研究である。

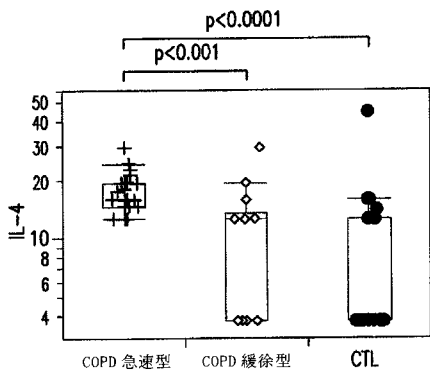
【図1A】



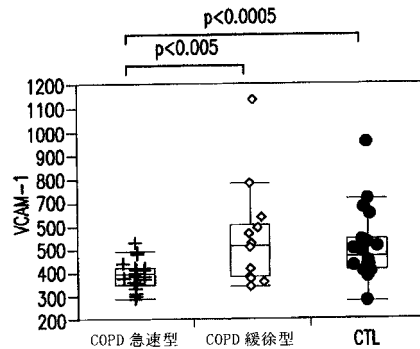
【図1C】



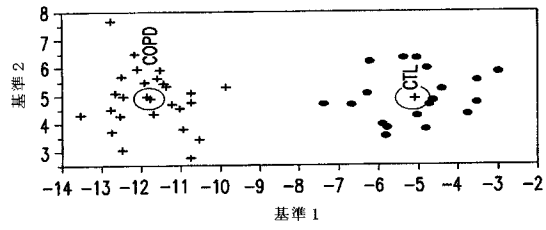
【図1B】



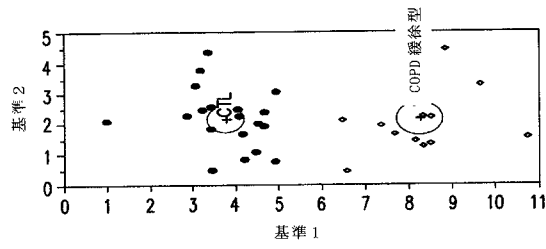
【図1D】



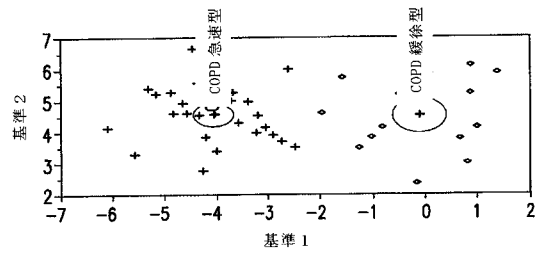
【 図 2 】



A



B



C

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/35376
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/48; C40B 30/02 (2009.01) USPC - 702/19, 506/8 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) USPC: 702/19, 506/8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 702/19, 1, 506/8, 7 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: (USPT, PGPB, EPAB, JPAB); Google Scholar Search Terms: COPD, biomarker, gen expression array, molecular signature, prognosis, rapid decliner, slow decliner, predictive model, computer algorithm, linear discrimination analysis (LDA)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	WO 2007/084485 A2 (RENNE et al.) 26 July 2007 (26.07.2007). Especially pg 5 para [00023], pg 9 para [00042], pg 27 para [000145], pg 30 para [000159], pg 47 para [000277], pg 70 para [000412].	1-4,21,22 ----- 5-20
Y	WO 2008/003066 A2 (HOIDAL et al.) 3 January 2008 (03.01.2008). Especially pg 7 para [0033], pg 20 para [0067], pg 21 table 2.	5-12
Y	US 2007/0269804 A1 (LIEW et al.) 22 November 2007 (22.11.2007). Especially para [0287], [0288], [0521-0522]	13-20
Y	PILETTE et al. Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A? IN: Proc Am Thorac Soc April 2004 Vol 1 No 2 Pages 125-135. Abstract only.	9,10
Y	REYNOLDS et al. Cigarette Smoke-Induced Egr-1 Upregulates Proinflammatory Cytokines in Pulmonary Epithelial Cells. IN: Amer Jour Resp Cell Mol Biol September 2006 (Epub 6 April 2006) Vol 35 No 3 Pages 314-319. Especially pg 318 right col para 1.	9-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 15 July 2009 (15.07.2009)		Date of mailing of the international search report <b>29 JUL 2009</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSF: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/35376

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THERIEN et al. Adenovirus IL-13-induced airway disease in mice: a corticosteroid-resistant model of severe asthma. IN: Am Jour RespCell Mol Bio. 7 February 2008 Vol 39 No 1 Pages 26-35.	7,8
Y	DE BOER et al. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. IN: Jour Pathol April 2000 Vol190 No 5 Pages 619-626. Abstract only.	7,8
Y	VERNOOY et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. IN: Am J Respir Crit Care Med 1 November 2002. Vol166 No 9 Pages 1218-1224. Abstract only.	7,8,12
Y	PONS et al. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. IN: Eur Respir Jour April 2005 Vol 25 No 4 Pages 647-652. Abstract only.	8,10
Y	D'AMBROSIO et al. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. IN: Am Jour Respir Crit Care Med 2001 Vol 164 No 7 Pages 1266-1275.	11,12
Y	KOIZUMI et al. Elevation of serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) levels in bronchial asthma. IN: Clin Exp Immunol September 1995 Vol 101 No 3 Pages 468-473. Abstract only.	11,12
Y	US 2007/0178504 A1 (COLPITTS et al.) 2 August 2007 (02.08.2007). Especially para [0035].	10
Y	DAHL et al. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. IN: Am Jour Resp Crit Care Med 15 September 2001 Vol 164 No 6 Pages 1008-1111. Abstract only.	12
Y	TORRES et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. IN: Eur Resp Jour. May 2006 Vol 27 No 5 Pages 902-907. Abstract only.	12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2007)

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . J A V A

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 フランソワ、ジェルベ

カナダ国ケベック州、カークランド、トランス カナダ、ハイウェイ、16711

(72)発明者 ビスワナス、デバナラヤン

アメリカ合衆国ニュージャージー州、ラーウェイ、イースト、リンカーン、アベニュー、126

Fターム(参考) 2G045 DA36 FB03 JA01

4B063 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX01

特許名称(译)	COPD生物标志物签名		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011521203A</a>	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2010550748	申请日	2009-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	莱恩进公司		
申请(专利权)人(译)	Rinigen公司		
[标]发明人	フランソワジェルベ ビスワナスデバナラヤン		
发明人	フランソワ、ジェルベ ビスワナス、デバナラヤン		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/04		
CPC分类号	G16B40/00 G01N2800/122		
FI分类号	G01N33/48.Z G01N33/53.D C12Q1/04		
F-TERM分类号	2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/JA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	中村KoTakashi 反町隆史博		
優先権	61/068772 2008-03-10 US		
其他公开文献	JP5574990B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及检测表达测试样品中COPD的差异表达蛋白质表达的方法。检测鉴定的COPD生物标志物特征内的蛋白质的循环水平可以帮助COPD诊断和疾病监测以及对治疗反应的预测。评估所公开的生物标志物特征或其生物标记物子集提供了对个体标记物不能发现的一些区分。

タンパク質	別名	ヒトポリヌクレオチド受託番号 (NCBI)	ヒトタンパク質受託番号 (NCBI)
アポリポタンパク質H	β-2糖タンパク質I	NM_000042	NP_000033
CD40	CD40L受容体	NM_001250	NP_001241
ハプトグロビン	Hp2-α	NM_005143	NP_005134
IL-8	インターロイキン-8	NM_000584	NP_000575
MCP-1	CCL2	NM_002982	NP_002973
TNF-RII	TNFRSF1B	NM_001066	NP_001057
アポリポタンパク質CIII	ApoC3	NM_000040	NP_000031
GM-CSF	コロニー刺激因子2	NM_000758	NP_000749
IgA	免疫グロブリンタイプA	BC087841	AAH87841
MIP-1α	CCL3	NM_002983	NP_002974
組織因子	凝固因子III	NM_001993	NP_001984
TNF-α	TNFスーパーファミリーメンバー2	NM_000594	NP_000585
α-1アンチトリプシン	セルピンA1	NM_000295	NP_000286
CRP	C-反応性タンパク質	NM_000567	NP_000558
フィブリノゲン	FGA	NM_000508	NP_000499
MDC	CCL22	NM_002990	NP_002981
sVCAM-1	可溶性VCAM-1	NM_001078	NP_001069
IL-4	インターロイキン-4	AF395008	AAK71324