

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5808825号  
(P5808825)

(45) 発行日 平成27年11月10日(2015.11.10)

(24) 登録日 平成27年9月18日(2015.9.18)

(51) Int.Cl.			F I		
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
<b>G O 1 N</b>	<b>37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	37/00	1 0 2
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/53	D
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 27 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2013-555404 (P2013-555404)	(73) 特許権者	502329223 ヒルズ・ペット・ニュートリション・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カンザス州66603, トピーカ, サウスウエスト・エイズ・アベニュー 400
(86) (22) 出願日	平成23年2月24日(2011.2.24)	(74) 代理人	110001874 特許業務法人 I P y S 特許事務所
(65) 公表番号	特表2014-507159 (P2014-507159A)	(72) 発明者	サメル・ワリード・アルームラニ アメリカ合衆国66614カンザス州トピーカ, サウスウエスト・ラギート・コート 2513番
(43) 公表日	平成26年3月27日(2014.3.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/026032		
(87) 国際公開番号	W02012/115648		
(87) 国際公開日	平成24年8月30日(2012.8.30)		
審査請求日	平成25年9月6日(2013.9.6)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネコの腎障害を診断および治療する組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ネコからの生体サンプルにおける、ルミカン(LUM)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン(DCN)；分泌型フリッツルド(frizzled)関連タンパク質2(SFRP2)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれる1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを測定することを含む、ネコにおける系球体腎炎の存在を診断する方法であって、

ここで、正常な動物からのサンプル中の発現に対するコントロール値と比べた場合の該生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現における差異は、系球体腎炎の存在を示す方法。

【請求項2】

分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)および/またはレチノール結合タンパク質5(rbp5)の発現レベルを検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ルミカン(LUM)；デコリン(DCN)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを検出することをさらに含んでよい、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

( i ) 測定される 1 つ以上のバイオマーカーに対応する mRNA または cDNA に相補的な 1 つ以上のオリゴヌクレオチドを含む DNA マイクロアレイ ; または ( i i ) 測定される 1 つ以上のバイオマーカーに対応する mRNA または cDNA 用のためのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的ポリメラーゼ鎖反応 ; のいずれかを用いて、1 つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定することによって、1 つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

1 つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定するステップが、( i ) 組織サンプルから RNA を単離すること、( i i ) RNA を逆転写して、対応する cDNA を得ること、( i i i ) このようにして得られた cDNA を単離し、フラグメント化すること、( i v ) cDNA フラグメントを、測定される 1 つ以上のバイオマーカーに対応する cDNA に相補的な 1 つ以上のオリゴヌクレオチドを含む DNA マイクロアレイと接触させること、および ( v ) DNA マイクロアレイにおける cDNA フラグメントと 1 つ以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを検出することを含む、請求項 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 6】

DNA マイクロアレイにおけるオリゴヌクレオチドが、配列番号 : 9 ~ 16 に記載の配列のいずれかを含む cDNA フラグメントの 1 つ以上にハイブリダイズすることができる 1 つ以上のプローブを含む、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

DNA マイクロアレイにおけるオリゴヌクレオチドが、1 つ以上の配列番号 : 1 ~ 8 から選ばれる配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

バイオマーカーの発現レベルが、発現されたタンパク質に対する抗体によって検出される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

バイオマーカーが、競合結合アッセイ、非競合結合アッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着法 ( E L I S A )、サンドイッチアッセイ、沈降素反応、ゲル拡散免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫測定、化学発光免疫測定、イムノ P C R イムノアッセイ、プロテイン A またはプロテイン G イムノアッセイおよび免疫電気泳動アッセイから選ばれるイムノアッセイによって検出される、請求項 8 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

バイオマーカーの発現レベルが、定量的質量分析を用いてサンプル中のタンパク質の量を測定することによって検出される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

バイオマーカーの発現レベルが、発現されたタンパク質を認識するアプタマーによって検出される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

生体サンプルが、血液または腎組織のサンプルである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項 に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

1 つ以上の、正常な、糸球体ろ過率、クレアチンクリアランス速度、尿タンパクレベル、血清クレアチニンレベル、尿クレアチニンレベル、血中尿素窒素 ( B U N ) レベル、放射性同位体代謝標識、超音波検査、磁気共鳴画像化および / またはコンピュータ断層撮影を含む軟部組織像の測定によって測定される、ネコが実質的に正常な腎機能を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

糸球体腎炎が、コントロール発現値と比較した場合の、1 つ以上の以下に挙げる発現における有意な差異によって示される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法であっ

50

て、ここで、発現の増加の場合、有意な差異は、少なくとも2倍の増加であり、発現の減少の場合、少なくとも50%の減少である：

- a . ルミカン発現の増加；
- b . コラーゲンアルファ1 ( I I I ) 鎖、変異体12の増加；
- c . デコリン発現の増加；
- d . 分泌型フリッツルド関連タンパク質2発現の増加；
- e . レチノール結合タンパク質5の減少；
- f . MMP - 2発現の増加；
- g . MMP - 7発現の増加；および/または
- h . MMP - 19発現の増加。

10

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載の方法によって糸球体腎炎の存在を診断すること、および、腎臓保護食および/または薬物療法によって障害を管理することを含む、ネコにおける糸球体腎炎を治療、改善または糸球体腎炎の進行を遅延化する方法。

【請求項16】

障害を管理するステップが、ネコに実質的に単独の食餌として腎臓保護食を提供することを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

腎臓保護食が、標準的ネコ飼料に対して、1つ以上の以下の変更を含む、請求項15または16に記載の方法：

20

- リンの減少；
- タンパク質レベルの減少；
- ナトリウムの減少；
- オメガ3脂肪酸レベルの増加；
- ビタミンB群の増加；
- 抗酸化剤の増加。

【請求項18】

腎臓保護食が、乾燥基準で、18%～40%のタンパク質、0.2%～0.85%のリンおよび0.04%～0.35%のナトリウムを含む、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項19】

ネコの生体サンプル中のルミカン；コラーゲンアルファ1 ( I I I ) 鎖、変異体12 ( C O L 3 A 1 ) ；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP - 2；MMP - 7；およびMMP - 19からなる群から選ばれる1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定する手段；および

ネコの生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現を測定するための手段を使用するため、およびネコにおける糸球体腎炎に至る過程の存在を診断するための説明書；を含む、ネコにおける糸球体腎炎の存在を診断するための請求項1～18のいずれか一項に記載の方法におけるキットの使用。

40

【請求項20】

1つ以上のバイオマーカーを測定する手段が、1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある1つ以上の核酸プローブである、請求項19に記載の使用。

【請求項21】

1つ以上の核酸プローブが、配列番号：9～16に記載の配列のいずれかを含む該バイオマーカーの1つ以上にハイブリダイズする能力がある、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

1つ以上の核酸プローブが、1つ以上の配列番号：1～8から選ばれる1つ以上の配列を含む、請求項21に記載の使用。

【請求項23】

1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある1つ以上の核酸プローブ

50

を含むDNAマイクロアレイを含む、請求項19～22のいずれか一項に記載の使用。

【請求項24】

1つ以上のバイオマーカーを測定する手段が、1つ以上のバイオマーカーを検出する能力がある1つ以上の抗体またはアプタマーである、請求項19に記載の使用。

【請求項25】

1つ以上のバイオマーカーを検出する能力がある抗体；スタンダードとして働く、バイオマーカーに対応する単離されたタンパク質；および緩衝液を含む、ELISA形式の、請求項24に記載の使用。

【請求項26】

1つ以上のバイオマーカーが、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)および/またはレチノール結合タンパク質5(rbp5)を包含する、請求項19～25のいずれか一項に記載の使用

10

【請求項27】

請求項1～18に記載の方法における、

ネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19の遺伝子に対応するか、または相補的なヌクレオチド配列、もしくは配列番号1～16に記載のヌクレオチド配列のいずれかに対応するか、または相補的なヌクレオチド配列を有するRNA、DNAもしくはポリヌクレオチド；または

20

ネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19に対する抗体；の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、選択された遺伝子の発現を測定することによって、ネコの腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする腎障害を診断する方法、該腎障害のための治療計画を考案し、モニターする方法、および該腎障害の状態をモニターする方法などのネコの腎疾患および腎障害を診断および/またはモニターするための組成物、材料および方法に関する。

30

【0002】

配列表

本願発明は、EFS-Webを介して提出された配列表を含み、その全内容は、参照することによって本願に組み込まれる。2010年3月30日に作成された該ASCIIコピーは、8888POUS.txtと呼ばれ、7,809バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

腎炎は、糸球体、尿細管または腎間質(または結合)組織を侵す限局性またはびまん性の増殖性または破壊性疾患である腎臓の炎症の総称である。腎炎は、末期腎疾患または末期腎不全に終わる多くの段階を経て進行する。腎炎の最も一般的な形は、糸球体腎炎である。

40

【0004】

糸球体腎炎(Glomerulonephritisまたはglomerular nephritis)(「GN」)は、腎臓の糸球体またはループ状毛細血管の炎症を特徴とする病気である。この病気は、急性、亜急性および慢性の形で起こり、突発性であるか、または感染症、疾患もしくは毒素への暴露に続発する。

【0005】

腎不全は、腎臓の正常な機能を維持する能力低下である。結果として、代謝老廃物および代謝産物が血液中に蓄積する。これらの老廃物および代謝産物は、大部分の身体システ

50

ムに悪い影響を及ぼしうる。体液および電解質バランスの維持における障害が、腎不全の特徴である。

【0006】

急性腎不全は、外傷、感染症、炎症または腎毒性物質への曝露によって突然に起こりうる。この病気は、脱水症、低血圧および循環虚脱をもたらす恐れがある。急性腎不全は、しばしば3つのカテゴリー：(1)腎臓血流減少を伴う前腎不全(pre-renal failure)；(2)虚血および毒素を伴う中期腎不全(intra-renal failure)；および(3)尿流閉塞から生じる後期腎不全(post-renal failure)に分けられる。

【0007】

慢性腎不全は、最終的に末期腎臓疾患または腎不全に進行しうる腎機能の進行性の喪失を引き起こす。初期には、慢性腎不全は、血液中の代謝老廃物の特筆すべき蓄積を伴わない、腎機能の減少として始まる。炎症のため、糸球体ろ過速度が遅くなるにつれて、老廃物が蓄積し始める。疾患は、腎機能低下による尿毒症に進行し、そして高レベルのタンパク質最終産物が集積し始め、そして体の機能を損なう。慢性腎不全の一般的な原因として：炎症、感染症、尿路閉塞、ならびに高カルシウム血症、エリテマトーデス、糖尿病および高血圧を含む、特定の全身性疾患および毒性が挙げられる。

【0008】

末期腎疾患は、不可逆性の慢性腎不全を特徴とする。血清クレアチニンおよび血液尿素窒素レベルが上昇し続け、そして生じる尿毒症は、体のすべてのシステムを損なう。腎臓は、正常腎機能の約10%またはそれ未満の、永続的で、そしてほぼ完全な機能喪失を被りうる。末期腎疾患の1つの原因は糸球体腎炎である。他の原因として、慢性腎不全に関して言及したものが挙げられる。

【0009】

糸球体は、腎臓の腎単位の構造成分の1つであり、しばしば毛細血管網またはクラスターと記載される微小血管で構成される。腎単位は、腎臓の基本的な構造および機能単位であり、また、マルピーギもしくはボーマン嚢として知られる構造、ならびに、細動脈および細管から構成される。ボーマン嚢は、糸球体ループおよび尿細管を包含する。糸球体は、非常に小さい毛細血管であり、これらの血管を通る血流は非常に遅く、血液中の分子がこれらの小さい毛細血管の壁に容易に蓄積することが可能である。尿細管は、基底膜および上皮層からなり、尿を分泌、収集および導く働きをする。

【0010】

糸球体は、腎単位内でフィルターとして機能する。糸球体を通る血流内の水および小分子は、糸球体およびボーマン嚢によって形成される、基底膜と呼ばれる構造を通してろ過される。水および小分子を含む液は、尿細管を通して吸収および再吸収された後、最終的に尿に変換される。腎単位の具体的な機能は、血漿から、尿酸、尿素およびクレアチニンならびにナトリウム、塩素およびカリウムイオンなどの過剰の電解質といったような特定の代謝最終産物を除去することである。水および電解質を再吸収することによって、腎単位は、身体の正常な体液平衡の維持において重要な役割を果たす。

【0011】

クレアチニンは、クレアチン代謝の結果として形成される窒素化合物である。また、クレアチンは、3つのアミノ酸、アルギニン、グリシンおよびメチオニンから体内で合成される非タンパク質性物質である。該分子は、少量で筋肉に見られ、そしてホスホクレアチンとしてホスフェートと組み合わされた際、多様な代謝プロセスで用いられる、高エネルギーホスフェートの貯蔵型として働く。クレアチニンは、血液に吸収され、そして最終的に、尿に排出される。したがって、血中のクレアチニンを測定するための単純な実験室試験を用いて、腎機能を決定することができる。該試験は、しばしば、クレアチニン・クリアランス試験と呼ばれ、所定の時間間隔で、血漿から除去されるクレアチニンの量を測定する。クレアチニンは、比較的一定の量でホスホクレアチンから形成されるため、血中のクレアチニン・レベルの上昇は、腎機能不全、すなわち腎機能の喪失の指標である。

【0012】

10

20

30

40

50

糸球体腎炎は、免疫系に対する生物学的侵襲の結果として生じうる。異物は、基底膜に接着し、そして免疫反応を引き起こして、抗体産生をもたらす。これらの抗体は、異物と組み合わせられて免疫複合体を生じ、これが小さい糸球体毛細血管の壁に沈着しはじめて、腎単位に損傷をもたらす。あるいは、ある個体では、免疫系が免疫グロブリンである自己抗体を生成して、これが腎臓細胞を攻撃し、いわゆる自己免疫反応をもたらす。体内のタンパク質が改変された場合、自己抗体は改変されたタンパク質を非自己と認識するため、自己抗体反応が生じうる。これらの自己抗体 - タンパク質複合体は、同様に、糸球体基底膜上に沈着して、腎単位機能の破壊を生じうる。

#### 【0013】

糸球体腎炎は、ネコにおけるタンパク尿の一般的な原因であり、特発型または続発型のいずれかである。後者の状況では、糸球体腎炎は、新生物、炎症性疾患、内分泌機能不全、感染症または家族性腎炎に続発しうる。ヒトにおけるように、ネコにおける糸球体腎炎は、しばしば免疫学的に仲介され、該動物体内で、免疫グロブリンおよび補体因子を伴う。傷害は、腎臓の糸球体内で生じ、糸球体に形態学的変化をもたらす。最終的に、傷害は不可逆的になり、そして腎単位の機能不全を導く。

10

#### 【0014】

糸球体腎炎は、起きている組織病理学的変化に基づいて、多くの異なる型で、科学的文献において性質決定されている。膜性糸球体腎炎は、糸球体基底膜の肥厚を伴う。増殖性またはメサングウム増殖性糸球体腎炎は、メサングウム基質における細胞の増殖を特徴とする。膜性増殖性糸球体腎炎は、前述の変化の組合せを伴う。糸球体硬化症は、マトリックス形成および瘢痕形成の増加を特徴とする。いくつかの場合、糸球体に対する最小限の変化およびメサングウム細胞増殖のわずかな増加がある。

20

#### 【0015】

差次的遺伝子発現を研究するための多くの方法、たとえば、DNAマイクロアレイ、発現配列タグ(EST)、遺伝子発現の連続分析(SAGE)、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション、mRNAに関するサブトラクティブ・クローニングおよびディファレンシャル・ディスプレイ(DD)、RNA-アービトラリリー・プライムド(arbitrarily primed)PCR(RAP-PCR)、レプレゼンテーション・ディファレンス(Representational difference)分析(RDA)、2次元ゲル電気泳動、質量分析およびタンパク質のための抗体結合に基づくタンパク質マイクロアレイが開発されてきている。

30

#### 【0016】

腎疾患に關与する生物学的経路の複雑さならびに内在する分子間相互作用および細胞間シグナル伝達過程により、起こっている相互作用を遺伝子レベルでりかいするのが非常に望ましい。ネコの腎機能喪失の早期における遺伝子の異常調節の検出は、ゲノムレベルでの根拠における腎疾患、特に糸球体腎炎の生物学を理解するのに役立つ。遺伝子の異常調節が、繰り返される虚血性傷害を起こしている動物における疾患進行の早期に検出されうるという事実は、ネコの腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を診断する方法、該腎障害のための治療計画を考案し、モニターする方法を設計するのに役立つ。

40

#### 【0017】

遺伝子発現プロファイリングを通じて關与する生物学的経路のより詳細な理解は、診断手順、診断試薬および試験キットならびに疾患経路における有益な医薬的、栄養補助的および栄養的(食事に関する)介入の発達の役に立つであろう。これらのアプローチは、特にネコにおける、潜在する腎障害、特に糸球体腎炎の早期検出および潜在的予防または治療、ならびに早期腎不全および糸球体腎炎の予後をモニターすることを可能にする。このような障害の病理学に關与する異常調節された遺伝子は、障害の診断および潜在的予防または治療のため、および適当な医薬的、栄養補助的および栄養的(食事に関する)介入の選択を最適化するための重要なバイオマーカーとして働く。

#### 【0018】

ネコにおける遺伝子発現レベルおよび/または発現された遺伝子産物の機能レベルを用

50

いて、治療または予防用途のための適当な作用剤を選択することができる。このデータは、遺伝子発現プロファイリングを通じたネコの腎疾患の予防または治療のための作用剤としての適当な薬物を選択することにおいて、当業者によって採用されうる。遺伝子発現データおよび分析を用いて、腎機能の健康な状態を示すバイオマーカーを利用することによって、腎臓の能力における有益な効果を有する栄養的組成物、食事サプリメントおよび栄養補助食品を選択することもできる。

【0019】

ネコの疾患の診断に関連する遺伝子発現プロファイルのためのネコゲノムをスクリーニングすることにおいて、今日まで、わずかな研究しか行われていない。健康なネコの集団对本明細書に記載する腎疾患および腎機能喪失などの疾患を有するネコの集団における研究は、広範囲には行われていない。ネコゲノムの発現プロファイルに関して、特に長期間にわたるネコの腎疾患の進行に関して利用できるデータはわずかしかない。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

腎不全は、ネコの死亡する主な原因である。腎疾患を効果的に治療するために、早期に、すなわち腎臓が重篤に損傷される前にその問題に取り組むことが重要である。患者が腎不全の徴候を示す前でも、損傷は、不可逆的であるかもしれない。早期の腎疾患は、明確な症状を示さない可能性があるため、このことは、チャレンジを提供する。したがって、突発性の病気の場合に適切な食餌を与えること、および/または感染もしくは自己免疫疾患などの病気を治療することなどによって動物が適切に治療されうるように、病気の進行を逆行させるかまたは少なくとも遅延化し、阻止するために問題に寄与することができる、腎疾患の早期に動物を同定する、よりよい方法が必要である。

20

【課題を解決するための手段】

【0021】

発明の概要

本発明は、ネコの腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする腎障害を診断するため、該腎障害のための治療計画を考案し、モニターするため、および該腎障害の状態をモニターするための組成物および方法に関し、ここで、該腎障害は、ネコなどから採取された生物学的試験サンプルから単離および測定された少なくとも1つの関連するバイオマーカーを利用することによって検出可能であり、バイオマーカーの発現は、疾患と正または負に相関する。本発明の組成物および方法を実施するための関連するバイオマーカーは、ネコのそのような生物学的試験サンプルに存在するポリヌクレオチドまたはタンパク質を含む。本発明方法を実施するための生物学的試験サンプルは、たとえば、そのようなネコの腎臓の組織サンプルを含んでよい。バイオマーカーは、分泌されることに基づいても選択されたので、血清または血漿あるいは尿中に検出されうる。したがって、生物学的試験サンプルは、血液または尿などの、このようなネコから得られる体液の標本であってもよい。

30

【0022】

本発明は、ネコの特定の遺伝子発現プロファイルが、腎機能の経時低下に至る、腎臓における正常から異常への生物学的過程の変化と相関するという発見に一部基づいている。特定の遺伝子発現プロファイルと腎機能の低下の相関を、当該技術分野において承認されている腎疾患の臨床的徴候および症状に基づく従来の臨床診断を用いることなく、ネコにおける予測、検出および診断することができる。したがって、ネコにおける別の遺伝子発現プロファイルは、当該技術分野において承認されている腎機能の測定によって後の時点で診断されるような、腎機能の低下を予測する。このような当該技術分野において承認されている腎機能の測定として、代表的には、たとえば、以下の測定の1つが挙げられる：糸球体ろ過率、クレアチンクリアランス速度、尿タンパクレベル、血清クレアチンレベル、尿クレアチンレベル、血中尿素窒素(BUN)レベル、放射性同位体代謝標識、超音波検査、磁気共鳴画像化および/またはコンピュータ断層撮影を含む軟部組織像。血清ク

40

50

レアチニンおよびBUNレベルなどの非侵入型のアッセイは、典型的に、腎臓の病理組織と弱い相関しか示さず、一般的に、腎臓における今後の変化を予測しない。

【 0 0 2 3 】

本発明は、たとえば、少なくとも1つの相同ネコ遺伝子の、もしくは分泌型frizzled関連タンパク質2(SFRP2)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)；ルミカン(LUM)；デコリン(DCN)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-2、-7および-19(MMP2、MMP7およびMMP19)からなる群から選ばれるそのような遺伝子の翻訳産物の、遺伝子発現レベルまたは活性を評価することを含む、腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする腎障害の存在を測定する方法を提供する。

10

【 0 0 2 4 】

本発明は、たとえば、少なくとも1つの相同ネコ遺伝子の、もしくは分泌型frizzled関連タンパク質2(SFRP2)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)からなる群から選ばれるそのような遺伝子の翻訳産物の；および、任意に、第2群の少なくとも1つの相同ネコ遺伝子、またはルミカン(LUM)；デコリン(DCN)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-2、-7および-19(MMP2、MMP7およびMMP19)からなる群から選ばれるそのような遺伝子の翻訳産物の、遺伝子発現レベルまたは活性を評価することを含む、腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする腎障害の存在を測定する方法を提供する。

20

【 0 0 2 5 】

1つの実施態様において、本発明は、正常動物と比べて異常動物において差次的に発現される1つ以上の遺伝子または遺伝子セグメント(「遺伝子」は、本明細書中で定義するとおりである)を包含する。本発明は、正常な動物と比較して、異常な動物において差次的に発現されるポリヌクレオチドの発見に基づく。該遺伝子は、異常であると診断された動物から採取された組織サンプルにおける遺伝子発現と、正常であると診断された動物からの組織サンプルにおける遺伝子を、アフィメトリックス・ジーンチップ(登録商標)技術を用いて比較することによって同定された。

【 0 0 2 6 】

ポリヌクレオチドおよび遺伝子は、異常であると診断され、腎障害を有するネコから採取された組織サンプルからの遺伝子発現と、正常であると診断されたネコからの組織サンプルにおける遺伝子発現との差異を測定することによって同定される。遺伝子発現における変化は、当業者に知られた方法によって測定することができる。一般に、遺伝子発現における変化は、転写を測定すること(遺伝子によって産生されるmRNAの量を測定すること)または翻訳を測定すること(遺伝子によって産生されるタンパク質の量を測定すること)によって決定される。遺伝子によって産生されるRNAまたはタンパク質の量は、ポリヌクレオチドおよびタンパク質を定量するための当業者に知られた方法を用いることによって測定することができる。

30

【 0 0 2 7 】

一般に、mRNA発現は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)(逆転写-PCR(RT-PCR)および定量リアルタイムPCR(qPCR)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない)、ショートまたはロングオリゴヌクレオチドアレイ、cDNAアレイ、ESTシーケンシング、ノーザン・ブロットティング、SAGE、MPSS、MS、ビーズアレイおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて測定される。測定されたRNAは、典型的には、mRNAまたは逆転写mRNAの形態である。

40

【 0 0 2 8 】

タンパク質またはポリペプチド発現は、様々な比色分析および分光分析ならびに定量ウエスタン・プロット、ELISA、2D-ゲル、ガスまたは液体クロマトグラフィー、質量分析、ローリーッセイ、ビウレットアッセイ、蛍光アッセイ、比濁分析、ピシンコニン酸アッセイ、タンパク質チップ技術、赤外吸光度、ニンヒドリン、ブラッドフォードアッセイおよび紫外線吸光度などの方法を用いて測定される。

50

## 【 0 0 2 9 】

遺伝子チップは、生物学的過程の大規模研究およびある時点での細胞内の活性の測定を可能にする。マイクロアレイ分析は、大規模な遺伝学的根拠における表現型の差異を説明するのを可能にする。遺伝子発現産物の実際の測定は、配列決定自体よりも、より正確なインジケーターである。マイクロアレイ分析は、所定の時間での細胞における遺伝子のmRNA転写産物の濃度を定量することに基づく。DNAを培地上に固定化し、標識した標的mRNAをアレイ上で、プローブでハイブリダイズする。プローブへの標識したmRNAの結合をレーザー分析によって測定する。測定は、放出された光子のカウントである。チップ全体をスキャンし、デジタル画像化する。画像を加工して、プローブの位置決定を行い、各プローブに対して強度測定を割り当てる。この様式で、アップおよびダウンレギュレーション遺伝子を決定することができる。この分析によって、同様の発現プロファイルをもつ遺伝子のグループを当業者が見出すことができ、同様の発現プロファイルをもつ組織を決定することができるようになる。この様式で、組織サンプルにおける観察された差異を説明する遺伝子を同定することができる。

10

## 【 0 0 3 0 】

典型的に、アフィメトリックス遺伝子チップは、特定の遺伝子またはESTに対応する、25bpのプローブであり、11~20個のプローブからなるプローブセットを用いる。チップは、それぞれ25bpの完全マッチおよびミスマッチプローブを構築し、前者は、遺伝子の特定の領域と完全に相補的であり、後者は、ミスマッチを形成するように置換された第13のbpを有する。プローブセット発現値へのプローブ値の変換であるプローブ要約アルゴリズムを用いて、バックグラウンド補正、標準化およびプローブ要約を決定する。RMAは、この目的のために使用できるアルゴリズムの1つである。このアルゴリズムは、プローブレベル強度測定分析、標準化および要約の最後の二段階を行う。したがって、パーフェクトマッチ値は、バックグラウンド補正され、標準化され、発現測定値のセットに要約される。

20

## 【 0 0 3 1 】

ジーンズプリンク バージョン7.0(GS)ソフトウェア(アジレント・コーポレーション(アジレント・コーポレーション))を用いて生データを分析し、R-バイオコンダクター(RB)フリーウェアを用いて有効化する。両方のソフトウェアパッケージを用いて、アフィメトリックス・インスツルメンツによって作成されたCELファイルからプローブ強度を計算する。それぞれ、R-バイオコンダクターおよびジーンズプリンクソフトウェアを用いて、プローブ当たりの存在/不在/境界判定およびP値を計算する。

30

## 【 0 0 3 2 】

一般に、正常動物と比較しての異常動物における差次的遺伝子発現は、少なくとも1つの遺伝子の発現を測定することによって決定される。2つ以上の差次的発現遺伝子の発現を測定して、遺伝子発現パターンまたは遺伝子発現プロファイルを得るのが好ましい。複数の差次的発現遺伝子の発現を測定して、より有意な遺伝子発現パターンまたはプロファイルのためのさらなる情報を得るのがさらに好ましい。

## 【 0 0 3 3 】

本発明は、一緒に、あるいは単独で、腎疾患のマーカーであるか、または腎疾患のマーカーとして用いることができる複数のマーカーを提供する。本発明の特に有用な実施態様において、これらの複数のマーカーを選択することができ、本明細書に記載する本発明の様々な態様において用いるための発現プロファイルを提供するために、同時に、それらのmRNA発現を測定することができる。本発明方法及び組成物の好ましい実施態様において、分泌型frizzled関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9);レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10);ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはその

40

50

ネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から、少なくとも2、3、4、5、6、7または8個のマーカ―が選ばれ、本発明方法の実施に用いる遺伝子発現プロファイルを決定するのに用いることができる。各マーカ―は、腎疾患の特定の態様に、特に結合することができる。

#### 【0034】

本発明は、一緒に、あるいは単独で、腎疾患のマーカ―であるか、または腎疾患のマーカ―として用いることができる複数のマーカ―を提供する。本発明のもう1つの特に有用な実施態様において、これらの複数のマーカ―を選択することができ、本明細書に記載する本発明の様々な態様において用いるための発現プロファイルを提供するために、同時に、それらのmRNA発現を測定することができる。本発明方法及び組成物の好ましい実施態様において、分泌型frizzled関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)からなる群；および、任意に、第2群のルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドから、少なくとも2、3、4、5、6、7または8個のマーカ―が選ばれ、本発明方法の実施に用いる遺伝子発現プロファイルを決定するのに用いることができる。各マーカ―は、腎疾患の特定の態様に、特に結合することができる。

#### 【0035】

もう1つの態様において、本発明は、正常なネコと比較して、異常なネコに差次的に発現する複数の遺伝子の発現を検出するのに適したデバイスを提供する。デバイスは、既知の位置で基質に結合した本発明の複数のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブを有する基質を含む。デバイスは、本質的に、本明細書に記載するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブの固定型である。デバイスは、遺伝子およびポリヌクレオチドならびにその発現パターンおよびプロファイルを迅速かつ特異的に検出するのに有用である。典型的には、このようなプローブは、基質あるいは同様の固体支持体に結合し、1つ以上のポリヌクレオチドを含むサンプル(たとえば、遺伝子、PCR産物、リガーゼ連鎖反応(LCR)産物、増幅技術を用いて合成されたDNA配列、もしくはそれらの混合物)は、サンプルのポリヌクレオチドが、プローブにハイブリダイズするようにプローブに曝露される。プローブ、サンプルポリヌクレオチドまたはその両方は、典型的に、蛍光色素分子またはストレプトアビジンなどのその他のタグで標識され、当業者に知られている方法を用いて検出される。サンプルポリヌクレオチドが標識されるならば、ハイブリダイゼーションは、結合蛍光を検出することによって検出することができる。プローブが標識されるならば、ハイブリダイゼーションは、典型的に、標識クエンチングによって検出される。プローブおよびサンプルヌクレオチドの両方が標識されるならば、ハイブリダイゼーションは、典型的に、2つの結合した標識の近接からもたらされるカラーシフトをモニターすることによって検出される。様々な標識方策および標識が当業者に知られているが、特に蛍光標識が知られている。当業界で知られているものに匹敵するアレイ(DNAマイクロアレイ、遺伝子チップ、バイオチップ、DNAチップ、および遺伝子アレイなどのいくつかの名前で知られる)を形成するのに適した基質にプローブが固定化されるのが好ましい。

#### 【0036】

サンプル中のタンパク質の量および濃度を測定する方法は、当業者に知られている。こ

10

20

30

40

50

のような方法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析およびELISAアッセイが挙げられる。抗体を用いる方法には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が適している。このような抗体は、タンパク質、タンパク質エピトープまたはタンパク質フラグメントに対して免疫学的に特異的でありうる。

【0037】

本発明のいくつかの実施態様は、本発明の、ポリヌクレオチドの発現によって産生されたタンパク質の検出および定量的のために抗体を利用する。タンパク質は、免疫沈降、親和性分離、ウエスタン・ブロット分析、タンパク質アレイなどによって検出されうるが、抗体が固体支持体に固定化され、標的タンパク質またはペプチドが固定化された抗体に曝露されるELISA技術を利用する方法が好ましい。プローブまたは標的あるいはその両方のい

10

【0038】

さらなる態様において、本発明は、サンプルにおける、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される1つ以上の遺伝子の差次的発現を検出する方法を提供する。方法は、(a)正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される複数のポリヌクレオチドプローブの組合せを、サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせて、1つ以上のハイブリダイゼーション複合体を形成すること；(b)任意に、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される複数のプローブを、スタンダード中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせて、1つ以上のハイブリダイゼーション複合体を形成すること；(c)サンプルから、および、任意に、ステップ(b)からのスタン

20

【0039】

ステップ(b)およびステップ(c)は、任意であり、2つ以上の試験システムの相対的に同時の比較が行われるべき場合に用いられる。しかしながら、好ましい実施態様において、比較のために用いるスタンダードは、その方法を用いて先に得られたデータに基づいている。

30

【0040】

サンプルをこれらのプローブに曝露させて、検出され、スタンダードのハイブリダイゼーション複合体と比較されるハイブリダイゼーション複合体を形成する。サンプルおよびスタンダードからのハイブリダイゼーション複合体の差異は、サンプルにおける、正常な動物と比較して、異常な動物において差次的に発現される遺伝子の差次的発現を示す。好ましい実施態様において、プローブは、本発明によって同定される1つ以上の遺伝子または遺伝子フラグメントによって生成されるポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを特異的に検出するために作成される。ハイブリダイゼーション複合体を検出する方法は、当業者に知られている。

【0041】

もう1つの態様において、本発明は、サンプルにおける、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される遺伝子の差次的発現を検出する方法を提供する。方法は、(a)プローブとタンパク質の間の特異的結合が起こるようにする条件下で、複数のポリヌクレオチドプローブの組合せを、サンプル中のタンパク質と反応させること(ここで、プローブによって結合されるタンパク質は、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される)；(b)任意に、プローブとタンパク質の間の特異的結合が起こるようにする条件下で、複数のポリヌクレオチドプローブの組合せを、スタンダード中のタンパク質と反応させること(ここで、プローブによって結合されるタンパク質は、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される)；(c)サンプル中の、および任意に、ステップ(b)からのスタンダード中の、特異的結合を検出すること；および(d)サン

40

50

ル中の特異的結合とスタンダード中の特異的結合を比較すること(ここで、スタンダードとサンプルの間の特異的結合における差異は、サンプルにおける、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される遺伝子の差次的発現を示す)を含む。

【0042】

サンプルをこれらのプローブに曝露させて、検出され、スタンダードの特異的結合と比較される特異的結合を形成する。サンプルおよびスタンダードからの特異的結合間の差異は、サンプルにおける、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現されるタンパク質、したがって異常なネコにおいて差次的に発現される遺伝子、特に異常関連遺伝子の差次的発現を示す。好ましい実施態様において、プローブは、本発明によって同定される1つ以上の遺伝子または遺伝子フラグメントによって生成されるタンパク質またはそのフラグメントを特異的に検出するために作成される。

10

【0043】

1つの実施態様において、方法は、ポリヌクレオチドとタンパク質を反応させる前に、ネコまたはサンプルを被検物質に曝露させることを含む。その結果、比較は、被検物質が、サンプルにおいて、正常なネコと比較して、異常なネコにおいて差次的に発現される遺伝子、特に異常関連遺伝子の発現を変更したかどうかを示す。

【0044】

本発明方法によって、たとえば、糸球体腎炎などの腎障害を有していると診断される動物は、腎臓保護食で飼育するのが好ましい。腎臓保護食として、たとえば、上述の食餌およびWO 2006/119049 A2、WO 2006/071952(これらの内容は、参照することによって本願に組み込まれる)に記載の食餌が挙げられる。

20

【0045】

したがって、本発明は、たとえば、以下の方法などの、ネコからの生体サンプルにおける、ルミカン(LUM)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン(DCN)；分泌型フリッツルド(frizzled)関連タンパク質2(SFRP2)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれる1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを測定することを含む、ネコにおける腎障害の存在を診断する方法(方法1)(ここで、正常な動物からのサンプル中の発現に対するコントロール値と比べた場合のサンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現における差異は、腎障害の存在を示す)を提供する：

30

【0046】

1.1.(i)測定される1つ以上のバイオマーカーに対応するmRNAまたはcDNAに相補的な1つ以上のオリゴヌクレオチドを含むDNAマイクロアレイ；または(ii)測定される1つ以上のバイオマーカーに対応するmRNAまたはcDNA用のためのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的ポリメラーゼ鎖反応；のいずれかを用いて、1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定することによって、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する方法1。たとえば、

a. ひとつ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定するステップが、(i)組織サンプルからRNAを単離すること、(ii)RNAを逆転写して、対応するcDNAを得ること、(iii)このようにして得られたcDNAを単離し、フラグメント化すること、(iv)cDNAフラグメントを、測定される1つ以上のバイオマーカーに対応するcDNAに相補的な1つ以上のオリゴヌクレオチドを含むDNAマイクロアレイと接触させること、および(v)DNAマイクロアレイにおけるcDNAフラグメントと1つ以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを検出することを含む、上述の方法。

40

b. DNAマイクロアレイにおけるオリゴヌクレオチドが、1つ以上の配列番号：9-16にハイブリダイズすることができる1つ以上のプローブを含む、上述の方法。

c. DNAマイクロアレイにおけるオリゴヌクレオチドが、1つ以上の配列番号：1-8から選ばれる配列を含む、上述の方法。

d. DNAマイクロアレイにおけるcDNAフラグメントと1つ以上のオリゴヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションが、ストリンジェント条件下である、ハイブリダイゼーション

50

を検出することを伴う上述のいずれかの方法。

【0047】

1.2. バイオマーカーの発現レベルが、発現されたタンパク質に対する抗体によって検出される、方法1。

a. バイオマーカーが、競合結合アッセイ、非競合結合アッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、サンドイッチアッセイ、沈降素反応、ゲル拡散免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫測定、化学発光免疫測定、イムノPCRイムノアッセイ、プロテインAまたはプロテインGイムノアッセイおよび免疫電気泳動アッセイから選ばれるイムノアッセイによって検出される、方法1.2。

b. 酵素結合免疫吸着法(ELISA)である、上述の方法。

c. アッセイが、側方流動免疫クロマトグラフィーアッセイである、方法1.2。

d. 生体サンプルが、血液または尿である、方法1.2。

10

【0048】

1.3. バイオマーカーの発現レベルが、たとえば、血液または尿などの生体サンプル中の発現タンパク質を測定する定量的質量分析によって検出される、方法1。

【0049】

1.4. バイオマーカーの発現レベルが、発現されたタンパク質を認識するアプタマーによって検出される、方法1。

a. アプタマーが、オリゴヌクレオチドである、方法1.4。

b. アプタマーが、ペプチドである方法1.4。

c. 生体サンプルが、血液または尿である、方法1.4。

20

【0050】

1.5. 正常なサンプルにおける発現に対するコントロール値と比較しての、生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルが、2倍以上、たとえば、5倍以上または1/2以下である、上述のいずれかの方法。

【0051】

1.6. 生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルが、正常サンプル中のバイオマーカーの平均発現よりも高いかまたは低い少なくとも1つの標準偏差である、上述のいずれかの方法。

【0052】

1.7. 生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現レベルが、比較的一定の発現を有することが知られている1つ以上の遺伝子の発現と比較して標準化される、上述のいずれかの方法。

30

【0053】

1.8. 生体サンプルが、腎組織のサンプルである、上述のいずれかの方法。

【0054】

1.9. 生体サンプルが、血液である、上述のいずれかの方法。

【0055】

1.10. 分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)および/またはレチノール結合タンパク質5(rbp5)の発現レベルを検出する、上述のいずれかの方法。

40

【0056】

1.11. 分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)および/またはレチノール結合タンパク質5(rbp5)の発現レベル、および、任意に、ルミカン(LUM); デコリン(DCN); コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)); マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2); マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7); およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを検出する、上述のいずれかの方法。

【0057】

1.12. たとえば、正常な、糸球体ろ過率、クレアチンクリアランス速度、尿タンパクレベル、血清クレアチニンレベル、尿クレアチニンレベル、血中尿素窒素(BUN)レベル、

50

放射性同位体代謝標識、超音波検査、磁気共鳴画像化および/またはコンピュータ断層撮影を含む軟部組織像のうちの1つ以上の測定によって測定される、ネコが実質的に正常な腎機能を有するなどの、腎障害が早期にある、上述のいずれかの方法。

【0058】

1.13. 腎障害が、腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする障害である、上述のいずれかの方法。

【0059】

1.14. 腎障害が、糸球体腎炎である、上述のいずれかの方法。

【0060】

1.15. 腎障害が、コントロール発現値と比較した場合の、1つ以上の以下に挙げる発現における有意な差異(たとえば、ここで、発現の増加の場合、有意な差異は、少なくとも2倍の増加であり、発現の減少の場合、少なくとも50%の減少である)によって示される、上述のいずれかの方法：

ルミカン発現の増加；

コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12の増加；

デコリン発現の増加；

分泌型フリッツルド関連タンパク質2発現の増加；

レチノール結合タンパク質5の減少；

MMP-2発現の増加；

MMP-7発現の増加；および/または

MMP-19発現の増加。

【0061】

さらなる実施態様において、本発明は、たとえば、方法1および続いて記載した方法を用いて腎障害の存在を診断すること、および、たとえば、食餌および/または薬物療法によって、病気を管理することを含む、それらを必要とするネコにおける、腎障害を治療、改善または腎障害の進行を遅延化する方法(方法2)を提供する。たとえば、本発明は、以下の方法を提供する：

【0062】

2.1. 方法1および続いて記載した方法のいずれかの方法によって診断されるか、または診断可能な腎障害を有するネコに、実質的に単独の食餌として、腎臓保護食を提供することを含む、方法2。

【0063】

2.2. ネコが、たとえば、正常糸球体ろ過率、クレアチニンクリアランス速度、尿タンパクレベル、血清クレアチニンレベル、尿クレアチニンレベル、血中尿素窒素(BUN)レベル、放射性同位体代謝標識、超音波検査、磁気共鳴画像化および/またはコンピュータ断層撮影を含む軟部組織像のうちの1つ以上の測定によって測定される、実質的に正常な腎機能を有する、方法2または2.1。

【0064】

2.3. ネコが、少なくとも5歳である、上述のいずれかの方法。

【0065】

2.4. 腎障害が、腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を特徴とする腎障害である、上述のいずれかの方法。

【0066】

2.5. 腎障害が、糸球体腎炎である、上述のいずれかの方法。

【0067】

2.6. ネコが、腎疾患であると認定されている、上述のいずれかの方法。

【0068】

2.7. ネコが、少なくとも約6ヶ月間、腎臓保護食で維持される、上述のいずれかの方法。

【0069】

10

20

30

40

50

2.8. ネコが、腎疾患の発病または初期診断後から開始し、実質的にネコの余生の間継続して、腎臓保護食で維持される、上述のいずれかの方法。

【0070】

2.9. 腎臓保護食が、標準的ネコ飼料に対して、1つ以上の以下の変更を含む、上述のいずれかの方法：

- リンの減少；
- タンパク質レベルの減少；
- ナトリウムの減少；
- オメガ3脂肪酸レベルの増加；
- ビタミンB群の増加；
- 抗酸化剤の増加。

10

【0071】

2.10. 腎臓保護食が、乾燥基準で、約18%～約40%のタンパク質、約0.2%～約0.85%のリンおよび約0.04%～約0.35%のナトリウムを含む、上述のいずれかの方法。

【0072】

2.11. 腎臓保護食が、約3.6～約7.9 g/100 kcalのMEタンパク質、約0.04～約0.17 g/100 kcalのMEリンおよび約0.008～約0.07 g/100 kcalのMEナトリウムを提供する、上述のいずれかの方法。

【0073】

2.12. 腎臓保護食が、原物で(on an 「as fed」 basis)、約5%～約40%の量のタンパク質、約0.01%～約2%の量のリンおよび約0.01%～約2%の量のナトリウムを含む乾燥食品を含む、上述のいずれかの方法。

20

【0074】

2.13. 腎臓保護食が、原物で、約4%～約12%の量のタンパク質、約0.03%～約0.2%の量のリンおよび約0.03%～約0.2%の量のナトリウムを含む水分含量の多い食物を含む、上述のいずれかの方法。

【0075】

さらなる実施態様において、本発明は、ネコにおける、ルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれる1つ以上のバイオマーカーの発現レベルの検出に有用な、任意に標識された試薬を提供する。該試薬として、たとえば、

30

a. ルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれるネコタンパク質を認識する、たとえば、モノクローナル抗体、単鎖抗体および機能的抗体フラグメントなどの抗体；

b. ルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれるネコタンパク質を認識する、たとえば、核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーなどのアプタマー；

40

c. ルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれる単離および精製または組換えネコタンパク質；

d. たとえば、1つ以上の配列番号：1-8から選ばれる、1つ以上の配列番号：9-16にハイブリダイズする能力があるルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれるネコ遺伝子にハイブリダイズする能力があるオリゴヌクレオチドプローブ；

が挙げられる。

【0076】

50

さらなる実施態様において、本発明は、

a. ネコの生体サンプル中のルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19からなる群から選ばれる1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を測定する手段；および

b. ネコの生体サンプル中の1つ以上のバイオマーカーの発現を測定するための手段を使用するため、およびネコにおける腎障害に至る過程の存在を評価するための説明書；を含む、ネコにおける腎障害の診断、予後またはモニタリング用キット(キット1)であって、たとえば、

1.1. 1つ以上のバイオマーカーを測定する手段が、1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある1つ以上の核酸プローブである、キット1；

1.2. 1つ以上の核酸プローブが、たとえば、ストリンジェント条件下などで、1つ以上の配列番号：9-16にハイブリダイズする能力がある、キット1.1；

1.3. 1つ以上の核酸プローブが、1つ以上の配列番号：1-8から選ばれる1つ以上の配列を含む、キット1.2；

1.4. 1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある1つ以上の核酸プローブを含むDNAマイクロアレイを含む、上述のいずれかのキット；

1.5. 1つ以上のバイオマーカーを測定する手段が、発現されたタンパク質を認識することによって1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある1つ以上の抗体である、キット1；

1.6. 1つ以上のバイオマーカーを検出する能力がある抗体；発現されたタンパク質に対応する単離、精製または組換えタンパク質；および緩衝液を含む、ELISA形式のキット1.5；

1.7. 1つ以上のバイオマーカーを測定する手段が、発現されたタンパク質を認識することによって1つ以上のバイオマーカーの遺伝子発現を検出する能力がある、たとえば、上述のアプタマーなどの1つ以上のアプタマーである、キット1；

1.8. 1つ以上のバイオマーカーが、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)および/またはレチノール結合タンパク質5(rbp5)を包含する、上述のいずれかのキット；

1.9. いずれかの上述の方法1および続いて記載した方法、または方法2および続いて記載した方法において用いるのに適した、上述のいずれかのキット；

【0077】

本発明はさらに、キット1および続いて記載したキットに従うキットの製造における、いずれかの上述の方法1および続いて記載した方法、または方法2および続いて記載した方法にしたがう方法における、

たとえば、配列番号：1-16のいずれかに対応するか、または相補的なヌクレオチド配列などの、ネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19の遺伝子に対応するか、または相補的なヌクレオチド配列；または

ネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19から選ばれるタンパク質に対する抗体；または

ネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19から選ばれるタンパク質に対するアプタマー；または

単離、精製または組換えネコルミカン；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン；分泌型フリッツルド関連タンパク質2；レチノール結合タンパク質5；MMP-2；MMP-7；およびMMP-19；の使用を提供する。

【0078】

本発明のさらなる適用分野は、後述する詳細な記載から明らかになる。当然のことながら、詳細な記載および特定の実施例は、本発明の好ましい実施態様を示しているとはいえ、説明の目的を意図するにすぎず、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1a】ルミカン前駆体(ケラタンスルフェートプロテオグリカンルミカン) mRNAに類似する、カニス・ファミリアリス遺伝子の発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図1b】ルミカン前駆体(ケラタンスルフェートプロテオグリカンルミカン) mRNAに類似する、カニス・ファミリアリス遺伝子の発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図2a】コラーゲンアルファ1(III) mRNAに類似するエクウス・カバックス遺伝子の発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図2b】コラーゲンアルファ1(III) mRNAに類似する、エクウス・カバックス遺伝子の発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図3a】ネコ遺伝子、カニス・ルプス・ファミリアリスデコリン mRNA, 完全ネコ(complete felines)の発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図3b】ネコ遺伝子、カニス・ルプス・ファミリアリスデコリン mRNA, 完全ネコの発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図4a】遺伝子カニス・ルプス・ファミリアリス分泌型フリッツルド関連タンパク質2 mRNAの発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図4b】遺伝子カニス・ルプス・ファミリアリス分泌型フリッツルド関連タンパク質2 mRNAの発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図5a】遺伝子カニス・ファミリアリスマトリックスメタロプロテイナーゼ2 mRNAの発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図5b】マトリックスメタロプロテイナーゼ2 mRNAに類似する、遺伝子カニス・ファミリアリスの発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図6a】遺伝子フェリス・ドメスティカスPUMP-1 mRNAの発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図6b】遺伝子フェリス・ドメスティカスPUMP-1 mRNAの発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図7a】遺伝子マカカ・ムラッタ mRNAの発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図7b】遺伝子マカカ・ムラッタ mRNAの発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図8a】カニス・ファミリアリスレチノール結合タンパク質5, 細胞性に類似する、ネコ遺伝子の発現についての、幾何学的平均倍数変化 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

【図8b】カニス・ファミリアリスレチノール結合タンパク質5, 細胞性に類似する、遺伝子の発現についての、幾何学的平均RMA強度 VS 被験ネコの糸球体腎炎の病期のプロットである。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0080】

## 発明の詳細な記載

以下の好ましい実施態様の記載は、単に、事実上の例示にすぎず、決して本発明、その適用あるいは用途を限定することを意図するものではない。

## 【0081】

## 特定の定義

本明細書および請求の範囲で用いる単数形「a」、「an」および「the」は、他に特記しない限り、複数形を包含し、たとえば、「a variant」は、「variants」を包含する。さらに、定義された用語は、適切な文法的文脈で用いられる該用語のバリエーションを包含し、たとえば、「特異的に結合する」は、「特異的結合」およびその他の形態を包含する。同様に、単語「comprise」、「comprises」および「comprising」は、排他的よりもむしろ包含的に解釈されるべきである。

## 【0082】

用語「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE抗体などの、特異的抗原に結合する任意の免疫グロブリンを意味する。該用語には、ポリクローナル、モノクローナル、一価、ヒト化、ヘテロコンジュゲート、ポリエピトープ特異性を持つ抗体組成物、キメラ、二重特異性抗体(bispecific antibodies)、二重特異性抗体(diabodies)、一本鎖抗体、ならびにFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv、または他の抗原結合性フラグメントなどの抗体フラグメントが含まれる。

## 【0083】

用語「アレイ」は、基板上的の少なくとも2つのプローブの順序づけられた配置を意味する。プローブの少なくとも1つはコントロールまたは標準であり、そしてプローブの少なくとも1つは診断プローブである。基板上的の約2~約40,000プローブの配置によって、プローブおよびサンプルポリヌクレオチドまたはポリペプチド間に形成される各標識複合体のサイズおよびシグナル強度が個々に区別可能であることが確実になる。アレイ上に沈着される分子コレクションは、合成的にまたは生合成的にのいずれかで調製することも可能である。アレイは、可溶性分子のライブラリー、樹脂ビーズ、シリカチップまたは他の固体支持体上に係留された化合物ライブラリーを含む、多様な型を取ってもよい。核酸アレイには、本質的に任意の長さ(たとえば、長さ1~約1,000ヌクレオチド)の核酸を基板上にスポットすることによって調製可能な核酸ライブラリーが含まれる。核酸プローブ・アレイが、既知の位置で基板に結合した核酸を含むのが好ましい。他の態様において、システムには、たとえば、膜、フィルター、顕微鏡スライド、マイクロウェル、サンプル試験管、ビーズ、ビーズアレイ等の固体支持体または基板が含まれてもよい。固体支持体は、紙、セルロース、ナイロン、ポリスチレン、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、セラミック、ステンレススチール等を含む、多様な材料で作製可能である。固体支持体が、剛性または半剛性表面を有するのが好ましく、そして適切なウェル、上昇領域、エッチングされた溝等を含む、球状(たとえば、ビーズ)または実質的に平面(たとえば、平らな表面)であってもよい。固体支持体にはまた、核酸を包埋可能なゲルまたはマトリックスが含まれてもよい。

## 【0084】

用語「バイオマーカー」は、遺伝子、および本明細書の遺伝子およびそのホモログ、特にそのネコホモログによってコードされる遺伝子産物を意味し、ここで、該遺伝子は、疾患、病気、障害、または物質、薬物、栄養もしくは食事成分あるいはその組合せの投与の結果として差次的に発現されると決定されており、本発明のこのような遺伝子および遺伝子産物は、配列番号：9、10、11、12、13、14、15および16またはそのホモログ遺伝子で同定されるが、ネコ遺伝子に限定されることはない。バイオマーカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、RNA転写物もしくはその翻訳生成物などのRNA、DNA、cDNA、1つ以上の上述の分子の代謝物、または上述の分子のいずれか1つの有用な変異体であってよく、その差次的発現は、糸球体腎炎(これに限定されるものではない)などの腎障

10

20

30

40

50

害に伴い、コントロール動物から採取されるサンプルに対する、試験動物から採取されるサンプルにおけるこのような差次的発現の相関関係を、それを必要とする動物における、病気、疾患または障害の診断、予後、モニタリングまたは治療に用いることができる。さらに、バイオマーカーは、一般的に、たとえば、本発明のアッセイまたは他の方法における、全長遺伝子またはタンパク質を同定可能であるかまたはこれらと相関する遺伝子またはタンパク質の任意の部分もしくはセグメントを意味するように使用することができる。バイオマーカー発現はまた、バイオマーカー翻訳の検出(すなわちサンプル中のバイオマーカータンパク質の検出)によっても同定可能である。バイオマーカータンパク質の検出に適した方法には、細胞または細胞抽出物からタンパク質を検出し、そして/または測定するのに適した任意の方法が含まれる。こうした方法には、限定されるものではないが、10 イムノプロット(たとえば、ウエスタン・プロット)、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫沈降、免疫組織化学および免疫蛍光が含まれる。タンパク質を検出するために特に好ましい方法として、免疫組織化学および免疫蛍光アッセイを含む、任意の単細胞アッセイが挙げられる。こうした方法は当業界で周知である。さらに、本明細書記載の特定のバイオマーカーに対する抗体が当業界に知られ、そして公開された文献に記載され、そしてその調製手順は当業者に周知である。

【0085】

コントロールサンプルに対する試験サンプルの発現を比較するために用いる用語「同等に」は、形質および量などの特徴を意味し、限定されるものではないが、比較が行われる平均値の周囲の1つの標準偏差内の値および試験サンプルとコントロールサンプルとの間の差次的発現を包含している値を包含する。20

【0086】

交換可能で用いられる、用語「差次的発現遺伝子」、「差次的遺伝子発現」、「差次的発現」または「差次的に発現される」およびそれらの類義語は、正常またはコントロール被験者における発現と比較して、疾患、病気または障害を患っている被験者か、あるいは物質、薬物、栄養または食事成分もしくはその組合せを投与された結果としての被験者において、その発現が、より高いか、あるいはより低いレベルに活性化される遺伝子を意味する。この用語は、同じ疾患の異なる病期において、その発現が、より高いか、あるいはより低いレベルに活性化される遺伝子も包含する。差次的発現遺伝子が、核酸レベルまたはタンパク質レベルにおいて活性化または阻害される可能性があるか、あるいは異なるポリペプチド生成物をもたらす選択的スプライシングに付される可能性があることも理解される。このような差異は、例えば、mRNAレベル、ポリペプチドの表面発現、分泌、またはポリペプチドのその他の分配における変化によって証明されうる。差次的遺伝子発現として、2つ以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物間での発現の比較、または2つ以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物間での発現の比率の比較、または、同じ遺伝子の異なってプロセシングされた2つの産物の比較(この比較は、正常な被験者と疾患、病気または障害を患っている被験者か、あるいは物質、薬物、栄養または食事成分もしくはその組合せを投与された結果としての被験者との間、もしくは同じ疾患、病気または障害の種々の病期の間で、あるいは物質、薬物、栄養または食事成分もしくはその組合せの異なる量を投与された結果として異なる)さえもが挙げられ得る。差次的な発現として、たとえば、40 、正常な細胞と罹患した細胞との間で、あるいは、異なる疾患イベントもしくは疾患病期を経験した細胞間での、遺伝子またはその発現産物における時間パターンまたは細胞発現パターンにおける定量的な差異および定性的な差異の両方が挙げられる。本発明の目的のために、「差次的遺伝子発現」は、サンプル中の転写されたポリヌクレオチドまたは翻訳されたタンパク質の量において、少なくとも約2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1もしくは1.0倍、好ましくは少なくとも約2倍以上、より好ましくは少なくとも約2.5、3または4倍以上の変化が存在する場合に、存在すると考えられる。

【0087】

用語「倍」は、差次的遺伝子発現の測定値として用いる場合、たとえば、腎機能の異常喪失、腎不全、糸球体ろ過率の低下または糸球体腎炎を示していない動物と比較した場合50

の、このような病気を有するネコなどの比較ネコにおける遺伝子発現量と比較した、遺伝子発現の倍数または分数である、ネコにおける遺伝子発現量を意味する。たとえば、比較動物と比較して、動物において2倍発現される遺伝子は、2倍の差次的遺伝子発現を有し、そして比較動物と比較して、動物において1/2発現される遺伝子もまた、2倍の差次的遺伝子発現を有する。

【0088】

用語「フラグメント」は、(1)完全配列の一部であり、そして完全ポリヌクレオチド配列と、特定の使用に関して同じまたは類似の活性を有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列、あるいは(2)完全配列の一部であり、そして完全ポリペプチド配列と、特定の使用に関して同じまたは類似の活性を有するペプチドまたはポリペプチド配列を意味する。こうしたフラグメントは、特定の使用に適していると見られる、任意の数のヌクレオチドまたはアミノ酸を含むことができる。一般的に、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドフラグメントは、完全配列由来の少なくとも約10、50、100または1000ヌクレオチドを含有し、そしてポリペプチドフラグメントは、少なくとも約4、10、20または50の連続アミノ酸を含有する。該用語は、フラグメントのポリヌクレオチドおよびポリペプチド変異体を含む。たとえば、ポリヌクレオチドは、複数のセグメントに破壊されるかまたはフラグメント化されることも可能である。

【0089】

核酸をフラグメント化する多様な方法が当該技術分野に周知である。これらの方法は、例えば性質として化学的または物理的のいずれであってもよい。化学的フラグメント化には、DNアーゼでの部分的分解；酸での部分的脱プリン；制限酵素の使用；イントロンにコードされるエンドヌクレアーゼ；核酸分子中の特定の部位に、切断剤を局在化させる、核酸セグメントの特異的ハイブリダイゼーションに頼るDNAに基づく切断法、たとえば、三重鎖およびハイブリッド形成法；あるいは既知のまたは未知の位置のDNAを切断する他の酵素または化合物が含まれる。物理的フラグメント化法は、DNAを高い切断速度に供することを伴う。高い切断速度は、たとえば、ピットまたはスパイクを持つチャンバーまたはチャンネルを通じてDNAを移動させるか、あるいは制限されたサイズの流路、たとえば、ミクロンまたはミクロン未満のスケールの断面寸法を有する開口部を通じて、DNAサンプルを押し出すことによって、産生可能である。他の物理的方法には、超音波処理および噴霧が含まれる。物理的および化学的フラグメント化法の組み合わせが同様に使用可能であり、たとえば、熱およびイオン仲介加水分解によるフラグメント化がある。たとえば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)（「Sambrookら」）を参照されたい；これは、参照することによって本願に組み込まれる。これらの方法を最適化して、核酸を、選択したサイズ範囲のフラグメントに消化することも可能である。有用なサイズ範囲は、100、200、400、700または1000~500、800、1500、2000、4000または10,000塩基対でありうる。しかし、より大きいサイズ範囲、たとえば、4000、10,000または20,000~10,000、20,000または500,000塩基対もまた有用でありうる。

【0090】

用語「(単数または複数の)遺伝子」は、ポリペプチド産生に関与し、コード領域に先行する領域および続く領域(リーダーおよびトレーラー)、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)を含む、DNAの完全(complete)または部分的(partial)セグメントを意味する。該用語は、遺伝子コード配列の相補体にハイブリダイズする、任意のDNA配列を含む。

【0091】

用語「ホモログ」は、(1)ポリヌクレオチドに対して30%、50%、70%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%より高い配列類似性を有する、同じまたは異なる動物種由来のポリヌクレオチドを含み、そして完全ポリヌクレオチドと同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行するか、あるいはストリンジェント条件下で、ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする能力を有する、

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド、あるいは(2)ポリヌクレオチドの発現によって同定されるポリペプチドに対して30%、50%、70%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%より高い配列類似性を有する、同じまたは異なる動物種由来のポリペプチドを含み、そして完全ポリペプチドと同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行するか、あるいはポリヌクレオチドの発現によって同定されるポリペプチドに特異的に結合する能力を有する、ポリペプチドを意味する。2つのポリペプチド配列または2つのポリヌクレオチド配列の配列類似性は、当業者に知られる方法、例えばKarlinおよびAltschulのアルゴリズム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268(1990))を用いて決定される。こうしたアルゴリズムは、Altschulら(J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))のNBLASTおよびXBLASTプログラムに取り込まれている。比較目的のためにギャップ化調整列を得るため、Altschulら(Nucl. Acids Res. 25:3389-3402(1997))に記載されるようなギャップ化Blastを利用してよい。BLASTおよびギャップ化BLASTプログラムを利用する際、それぞれのプログラム(たとえば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを用いる。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。

#### 【0092】

用語「ハイブリダイゼーション」は、2つの一本鎖ポリヌクレオチドが非共有結合的に結合して、安定な二本鎖ポリヌクレオチドを形成するプロセスを指す。用語「ハイブリダイゼーション」はまた、三本鎖ハイブリダイゼーションを意味することも可能である。得られる(一般的には)二本鎖ポリヌクレオチドは「ハイブリッド」である。安定なハイブリッドを形成するポリヌクレオチド集団の比率は、本明細書において、「ハイブリダイゼーションの程度」と称される。

#### 【0093】

絶対または示差ハイブリダイゼーション形式で、ハイブリダイゼーション反応を行ってもよい。絶対ハイブリダイゼーション形式では、1つのサンプル由来のポリヌクレオチドを、核酸アレイ中のプローブにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション複合体形成後に検出されるシグナルは、サンプル中のポリヌクレオチドレベルに相関する。示差ハイブリダイゼーション形式では、2つのサンプルから得られるポリヌクレオチドは、異なる標識部分で標識されている。これらの示差標識ポリヌクレオチドの混合物を核酸アレイに添加する。次いで、2つの異なる標識からの発光が個々に検出可能である条件下で、核酸アレイを調べる。1つの態様において、フルオロフォアCy3およびCy5(Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を示差ハイブリダイゼーション形式の標識部分として用いる。

#### 【0094】

アフィメトリックス(Affymetrix)またはアジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies)によって提供されるものなどの商業的に入手可能なソフトウェアを用いて、核酸アレイから集めたシグナルを分析してもよい。好ましくは、ハイブリダイゼーション実験に、たとえば、スキャン感度、プローブ標識およびcDNAまたはcRNA定量化のためのコントロールを含める。さらなる分析に供する前に、ハイブリダイゼーションシグナルをスケールリングするかまたは標準化してもよい。たとえば、各個々のプローブに関するハイブリダイゼーションシグナルを標準化して、類似の試験条件下で、1より多いアレイを用いた際のハイブリダイゼーション強度における変動を考慮することも可能である。また、各アレイ上に含有される内部標準対照から得られる強度を用いて、ハイブリダイゼーションシグナルを標準化してもよい。さらに、サンプルに渡って比較的一定の発現レベルを持つ遺伝子を用いて、他の遺伝子の発現レベルを標準化してもよい。1つの態様において、特定の維持遺伝子に関するプローブを本発明の核酸アレイ中に含める。これらの遺伝子は、多様な組織セットに渡って安定な発現レベルを示すので、選択される。これらの維持遺伝子の発現レベルに基づいて、ハイブリダイゼーションシグナルを標準化し、そして/またはスケールリングしてもよい。

#### 【0095】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、一方のポリヌクレオチドのプリンが、相補

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドのピリミジンと水素結合した際にサンプルポリヌクレオチド間で形成される複合体を意味し、例えば5'-A-G-T-C-3'は、3'-T-C-A-G-5'と塩基対形成する。相補性の程度およびヌクレオチド類似体の使用は、ハイブリダイゼーション反応の効率およびストリンジент度に影響を及ぼす。

【0096】

用語「ハイブリダイゼーションプローブ」には、核酸の相補鎖に、塩基特異的方式で結合可能な核酸(たとえば、オリゴヌクレオチド)が含まれる。このようなプローブとして、Nielsenら、Science 254:1497-1500(1991)、Nielsen Curr. Opin. Biotechnol., 10:71-75(1999)に記載されているようなペプチド核酸、ならびに他の核酸類縁体および核酸模倣体が挙げられる。1996年4月3日出願の米国特許第6,156,501号を参照されたい。

10

【0097】

用語「腎疾患」または「腎障害」あるいは類似の「腎臓疾患」または「腎臓障害」は、腎不全、糸球体ろ過率の低下および糸球体腎炎などの急性または慢性の腎機能の異常な喪失を含むことが意図される。糸球体腎炎は、糸球体基底膜肥厚を伴う膜性糸球体腎炎の形を取りうる。あるいは、糸球体腎炎は、増殖性またはメサンギウム増殖性糸球体腎炎の形を取ることも可能であり、これは、メサンギウム基質における細胞の増殖によって特徴付けられる。さらに、糸球体腎炎は、膜増殖性糸球体腎炎の形を取ることも可能であり、これは、前述の変化の組み合わせを伴う。糸球体硬化症は、糸球体腎炎の重症型である。腎疾患または腎障害にはまた、すべて当業者である獣医によって示差的に診断されるような、腎炎、腎症、過剰ろ過、軽度微量アルブミン尿、臨床的アルブミン尿、進行性臨床的腎症、慢性腎機能不全、腎乳頭に対する傷害、尿細管壊死および糖尿病性腎症も含まれる。該用語は、遺伝子起源の多発性嚢胞腎疾患を含むことは意図されない。

20

【0098】

正常な腎機能をもつネコは、腎障害について無症状であり、腎障害の臨床徴候または症状を示さないか、または腎機能の臨床検査測定値に変化を示さないネコである。正常な腎機能は、これらに限定されるものではないが、糸球体ろ過率、尿タンパクレベル、血清クレアチニンレベル、尿クレアチニンレベル、クレアチニンクリアランスおよび血中尿素窒素などの1つ以上の測定によって測定される。

【0099】

「核酸配列」は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよびそのフラグメントまたは部分を意味し、ならびに、一本鎖または二本鎖であってよく、センスもしくはアンチセンス鎖を表してよいゲノム起源もしくは合成起源のDNAもしくはRNAを意味する。

30

【0100】

用語「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーを意味する。該用語は、直鎖または環状型いずれかの、一本鎖または二本鎖いずれかの、そして一本鎖の場合、その相補配列の、DNAおよびRNA(cDNAおよびmRNAを含む)分子を含む。該用語はまた、元来の配列と同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行する配列に関して適切であるような、フラグメント、変異体、ホモログおよびアレルも含む。配列は、整列させた際に完全に相補的(ミスマッチなし)であってもよいし、または約30%までの配列ミスマッチを有してもよい。好ましくは、ポリヌクレオチドに関しては、鎖は、約20~10,000ヌクレオチド、より好ましくは約150~3,500ヌクレオチドを含有する。好ましくは、オリゴヌクレオチドに関しては、鎖は、約2~100ヌクレオチド、より好ましくは約6~30ヌクレオチドを含有する。ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの正確なサイズは、多様な因子に、そしてポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの特定の適用および使用に応じて変化する。該用語には、合成されたヌクレオチドポリマー、および天然供給源から単離されそして精製されたものが含まれる。用語「ポリヌクレオチド」は「オリゴヌクレオチド」を包括する。

40

【0101】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」または「タンパク質」は、アミノ酸のポリマーを

50

意味する。該用語は、天然および非天然(合成)ポリマー、ならびに人工的な化学的模倣体が1つまたはそれより多いアミノ酸を置換しているポリマーを含む。該用語はまた、元来の配列と同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行する、フラグメント、変異体およびホモログも含む。該用語は、任意の長さのポリマー、好ましくは約2~1000アミノ酸、より好ましくは約5~500アミノ酸を含有するポリマーを含む。該用語には、合成されたアミノ酸ポリマー、および天然供給源から単離されそして精製されたものが含まれる。

#### 【0102】

用語「プローブ」は、(1)プローブに相補的な配列を持つポリヌクレオチドとアニーリングするかまたは該ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることが可能な、精製された制限酵素消化物におけるように天然に存在するかまたは合成的に産生された、RNAまたはDNAいずれかの、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、あるいは(2)他のタンパク質またはタンパク質フラグメントを実質的に排除するほど、特定のタンパク質またはタンパク質フラグメントに特異的に結合可能なペプチドまたはポリペプチドを意味する。オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブは、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。プローブの正確な長さは、温度、供給源および使用などの多くの因子に応じて変化するであろう。たとえば、診断適用のため、ターゲット配列の複雑性に応じて、オリゴヌクレオチドプローブは、典型的には、約10~100、15~50または15~25ヌクレオチドを含有する。特定の診断適用において、ポリヌクレオチドプローブは、約100~1000、300~600ヌクレオチド、好ましくは300ヌクレオチドを含有する。本明細書のプローブは、特定のターゲット配列の異なる鎖に「実質的に」相補的であるように選択される。これは、プローブが、一組のあらかじめ決定された条件下で、それぞれのターゲット配列と特異的にハイブリダイズするかまたはアニーリングするために十分に相補的でなければならないことを意味する。したがって、プローブ配列は、ターゲットの正確な相補配列を反映する必要はない。たとえば、非相補的ヌクレオチド断片をプローブの5'または3'端に付着させ、残りのプローブ配列がターゲット配列に相補的であってもよい。あるいは、プローブ配列が、ターゲットポリヌクレオチドの配列と十分な相補性を有し、ターゲットポリヌクレオチドに特異的にアニーリングするという条件で、非相補的塩基またはより長い配列をプローブ内に散在させてもよい。ペプチドまたはポリペプチドプローブは、DNA(DNA結合タンパク質に関する)、抗体、細胞膜受容体、ペプチド、補因子、レクチン、糖、多糖、細胞、細胞膜、細胞内小器官および細胞内小器官膜を含めて、タンパク質またはペプチドが特異的に結合する任意の分子であってもよい。

#### 【0103】

用語「サンプル」および「標本」は、細胞、ならびにDNAおよびRNAを含有する他の組織を含む、ポリヌクレオチドを含有する任意の動物組織または体液を意味する。例として、次のものが挙げられる：血液、腎臓、結合、上皮、リンパ、筋肉、神経、痰等が含まれる。サンプルは、固体または液体であってもよく、そしてDNA、RNA、cDNA、血液または尿などの体液、細胞、細胞調製物あるいはその可溶性分画または媒体アリコート、染色体、細胞内小器官等であってもよい。

#### 【0104】

用語「特異的に結合する」は、その構造、特にその分子側鎖基に依存する、2つの分子間の特別でそして正確な相互作用を意味する。たとえば、DNA分子の主溝内への調節タンパク質のインターカレーション、2つの一本鎖核酸間の主鎖に沿った水素結合、あるいはタンパク質のエピトープ、およびアゴニスト、アンタゴニスト、または抗体間の結合がある。

#### 【0105】

用語「特異的にハイブリダイズする」は、当業界において一般的に用いられる、あらかじめ決定された条件下での、こうしたハイブリダイゼーションを可能にするのに十分に相補的な(ときに、「実質的に相補的な」と称される)配列の2つの一本鎖ポリヌクレオチド間の会合を意味する。たとえば、該用語は、非相補配列の一本鎖ポリヌクレオチドとポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションを実質的に排除するほどの、本発明の一態様にしたかった一本鎖DNAまたはRNA分子内に含有される実質的に相補的な配列と、ポリヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションを指してもよい。

【0106】

用語「ストリンジェント条件」は、(1)750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウムとともに、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%Ficoll、0.1%ポリビニルピロリドン、50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5を含む、50%(体積/体積)ホルムアミド中の42 でのハイブリダイゼーション、(2)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸中の42 のハイブリダイゼーションであって；0.2xSSCおよび0.1%SDS中、42 での洗浄、または0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム、0.1%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で50 での洗浄を伴うもの、あるいは類似の低イオン強度および高温洗浄剤および類似の変性剤を使用する類似の方法を意味する。

10

【0107】

用語「有用な変動」は、(1)ポリヌクレオチドに関して、該ポリヌクレオチドの相補体；該ポリヌクレオチドのホモログおよびその相補体；該ポリヌクレオチドの変異体、その相補体、およびそのホモログ；ならびに該ポリヌクレオチドのフラグメント、その相補体、そのホモログ、およびその変異体、ならびに(2)ポリペプチドに関して、該ポリペプチドのホモログ；該ポリペプチドの変異体およびそのホモログ；ならびに該ポリヌクレオチドのフラグメント、その相補体、そのホモログ、およびその変異体を意味する。

20

【0108】

用語「変異体」は、(1)ポリヌクレオチド配列からまたはポリヌクレオチド配列への1つまたはそれより多いヌクレオチドの任意の置換、変異、修飾、交換、欠失、または付加を含有し、そして元来の配列と同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行する、ポリヌクレオチド配列、ならびに(2)ポリペプチド配列からまたはポリペプチド配列への1つまたはそれより多いアミノ酸の任意の置換、変異、修飾、交換、欠失、または付加を含有し、そして元来の配列と同じかまたは実質的に同じ特性を有し、そして同じかまたは実質的に同じ機能を実行する、ポリペプチド配列を意味する。該用語には、したがって、一塩基変異多型(SNP)およびアレル変異体が含まれ、そしてポリペプチドにおける保存的および非保存的アミノ酸置換が含まれる。該用語はまた、適切なように、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの化学的誘導体化、および天然には存在しないヌクレオチドまたはアミノ酸でのヌクレオチドまたはアミノ酸によるヌクレオチドまたはアミノ酸の置換も含む。

30

【0109】

他に定義しない限り、本明細書に使用するすべての技術的および科学的用語、ならびに頭字語はいずれも、本発明の分野において、当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0110】

プローブ

本発明の実施に有用であり、ネコサンプル中のネコバイオマーカーの同定で利用されるプローブは、配列番号：1~8を含む。本願明細書においてさらに詳述するように、プローブ配列は、アフィメトリックス・ネコ・ジーンチップ(GeneChip)(登録商標)として同定される、アフィメトリックスによって製造される登録されたネコ遺伝子チップに用いられる以下のプローブ同定番号に対応する。

40

【0111】

HP04719\_atは、配列番号：1に対応し、推定分泌型フリッツルド関連タンパク質2(sfrp2 遺伝子)のためのイヌ遺伝子カニス・ルプス・ファミリアリス mRNAのmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。配列番号：1がハイブリダイズするネコホモログの配列は、配列番号：9である。プローブ同定番号は、アフィメトリックス・ネコ・ジーンチップ(登録商標)で用いられる同定番号に対応する。対応するイヌmRNA配列は、Ge

50

neID : 475471における受託番号NM\_001002987.1によって同定される。

【 0 1 1 2 】

HP12767\_atは、配列番号：2に対応し、レチノール結合タンパク質5；細胞性；転写変異体2に類似する、カニス・ファミリアリスのmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。配列番号：2がハイブリダイズするネコホモログの配列は、配列番号：10である。プローブ同定番号は、アフィメトリックス・ネコ・ジーンチップ(登録商標)で用いられる同定番号に対応する。対応するイヌmRNA配列は、LOC477706およびNCBI参照配列：XM\_848184.1によって同定される。

【 0 1 1 3 】

HP04078\_atは、配列番号：3に対応し、ルミカン前駆体(ケラタンスルフェートプロテオグリカンルミカン)(KSPGルミカン)に類似する、遺伝子カニス・ファミリアリスのmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。対応するイヌmRNA配列は、LOC 482599によって同定される。対応するイヌmRNA配列は、GeneID : 482599におけるNCBI参照配列：XM\_539716.2によって同定される。

10

【 0 1 1 4 】

HP04079\_atは、配列番号：4に対応し、カニス・ルプス・ファミリアリスデコリン(DCN)のmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。対応するイヌmRNA配列は、GeneID : 403904におけるNCBI参照配列：NM\_001003228.1として同定される。

【 0 1 1 5 】

HP06873\_atは、配列番号：5に対応し、コラーゲン；タイプIII；アルファ1(エーラス・ダンロス症候群タイプIV；常染色体優性)に類似する、エクウス・カバツルスのmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。対応するウマmRNA配列は、Gene ID 100034123におけるNCBI参照配列：XM\_001917620によって同定される。

20

【 0 1 1 6 】

HP00944\_atは、配列番号：6に対応し、カニス・ファミリアリスマトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP-2)のmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。対応するイヌmRNA配列は、GeneID : 403733におけるNCBI参照配列：XM\_535300.2によって同定される。

【 0 1 1 7 】

HP09664\_atは、配列番号：7に対応し、合成構築物であるフェリス・ドメスティカスPUM P-1 mRNAのネコmRNA配列にハイブリダイズするのに有用である。ネコPUMP-1は、受託番号U04444.1として同定される。

30

【 0 1 1 8 】

HP00012\_atは、配列番号：8に対応し、予測(Predicted)：マカカ・ムラッタマトリックスメタロプロテイナーゼ 19；転写変異体1(MMP19)のmRNA配列のネコホモログにハイブリダイズするのに有用である。NCBI参照配列番号は、GeneID 7100111におけるXM\_001111542である。

【 0 1 1 9 】

バイオマーカー

本発明の実施に有用なバイオマーカーは：分泌型フリッツルド関連タンパク質2(sFRP2)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)；ルミカン(LUM)；デコリン(DCN)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-2、-7および-19(MMP2、MMP7およびMMP19)であり、以下および本明細書に添付する配列表においてさらに詳述する。

40

【 0 1 2 0 】

配列番号：9は、カニス・ルプス・ファミリアリス分泌型フリッツルド関連タンパク質2 mRNAに相同なネコ核酸配列に対応する。イヌ配列は、NCBI参照配列：NM\_001002987.1およびGeneID : 475471によって同定される。全長イヌヌクレオチド配列は、1760 bpである。対応するイヌポリヌクレオチドは、NCBI参照配列NP\_001002987.1を有する。イヌ分泌型フリッツルド関連タンパク質2(sFRP2)は、294アミノ酸である。「フリッツルド」(FZ)膜

50

貫通タンパク質ファミリーのメンバーは、Wntファミリーメンバーの受容体であり、細胞極性および悪性転換のコントロールなどの様々な細胞プロセスに関するシステインリッチグリコシル化リガンドである。分泌型フリッツルド関連タンパク質(sFRP)は、分泌されたWntリガンドの結合に対して膜結合フリッツルド受容体と競合することによるWntシグナル伝達の可溶性モジュレーターとして動作するように見える。

【 0 1 2 1 】

配列番号：10は、レチノール結合タンパク質5、細胞性、転写変異体2(LOC477706) mRNAに類似する、カニス・ファミリアリスに相同なネコ核酸配列に対応する。イヌ配列は、NCBI参照配列XM\_848184.1によって同定される。全長イヌヌクレオチド配列は、511 bpである。対応するイヌポリペプチドは、NCBI参照配列XP\_853277.1を有する。イヌrbp5は、135

10

【 0 1 2 2 】

配列番号：11は、ルミカン前駆体(ケラタンスルフェートプロテオグリカンルミカン)(LOC 482599) mRNAに類似する、予測(Predicted)：カニス・ファミリアリスに相同なネコ核酸配列に対応する。イヌ配列は、NCBI参照配列XM\_539716.2によって同定される。全長イヌヌクレオチド配列は、2028 bpである。対応するイヌポリペプチドは、NCBI参照配列XP\_539716.1を有する。イヌルミカン前駆体(ケラタンスルフェートプロテオグリカンルミカン)は、338アミノ酸のタンパク質である。ルミカン(LUM)は、コラーゲンタイプIおよびタイプVIなどのマトリックスアセンブリに関するタンパク質と相互作用する細胞外マトリ

20

【 0 1 2 3 】

配列番号：12は、カニス・ルプス・ファミリアリスデコリン前駆体、mRNAに相同なネコ核酸配列に対応する。配列は、GeneID 403904におけるNCBI参照配列NM\_001003228.1によって同定される。全長イヌヌクレオチド配列は、1470 bpである。対応するイヌポリペプチド配列は、NCBI参照配列：NM\_001003228.1を有する。対応するイヌポリペプチドイヌデコリン前駆体は、NCBI参照配列NP\_001003228.1を有する。イヌデコリン前駆体は、360アミノ酸のタンパク質である。該タンパク質は、ビグリカンへの構造に密接に関連する小細胞マトリックスまたは細胞周囲マトリックスプロテオグリカンであり、結合組織の構成要素である。デコリンは、タイプIコラーゲンに結合し、マトリックスアセンブリにおいて役割を演じる。それは、1つの結合したグリコサミノグリカン鎖を含む。このタンパク質は、さまざまな腫瘍細胞株の増殖を抑制する能力があると考えられている。多くの別にスプライスされた転写変異体が、この遺伝子に関する科学文献において同定されている。

30

【 0 1 2 4 】

配列番号：13は、エクウス・カバックスコラーゲン、タイプIII、アルファ1(エーラス・ダンロス症候群タイプIV；常染色体優性)(COL3A1) mRNAに相同なネコ核酸配列に対応する。配列は、GeneID 100034123におけるNCBI参照配列XM\_001917620.1によって同定される。全長ウマヌクレオチド配列は、5492 bpである。対応するウマポリペプチド配列は、NCBI参照配列：XP\_001917655を有する。ウマコラーゲン、タイプIII、アルファ1(エーラス・ダンロス症候群タイプIV；常染色体優性)(COL3A1)は、1466アミノ酸のタンパク質である。ヒトのタイプIIIコラーゲンは、3つのアルファ-1(III)鎖を含む繊維形成コラーゲンであり、早期胚で、および胚形成を通して発現される。成人において、タイプIIIコラーゲンは、さまざまな臓器および皮膚における細胞外マトリックスの主要成分である。タイプIIIプロコラーゲンをコードするCOL3A1遺伝子の突然変異は、成人期早期に大動脈破裂をもたらす疾患であるタイプIVエーラス・ダンロス症候群を引き起こす。

40

【 0 1 2 5 】

配列番号：14は、カニス・ファミリアリスマトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP-2) mRNAに相同なネコ核酸配列に対応する。配列は、GeneID 4037333におけるNCBI参照配

50

列XM\_535300.2によって同定される。全長イヌヌクレオチド配列は、2618 bpである。対応するウマポリペプチド配列は、NCBI参照配列：XP\_535300.2を有する。イヌMMP-2は、612アミノ酸のタンパク質である。このタイプIVコラゲナーゼは、哺乳類において細胞外マトリックスのコラゲナーゼを分解する亜鉛メタロプロテイナーゼのグループのメンバーである。MMP2は、触媒ドメインに挿入されたフィブロネクチンタイプIIドメインの3つの反復を有する；Nagaseら、J. Biol. Chem.、1999、Vol. 274(31)：21491-21494によって提供されたマトリックスメタロプロテイナーゼに関するミニレビューを参照。

【0126】

配列番号：15は、フェリス・ドメスティカスPUMP-1 mRNA、部分cdsのネコ核酸配列に対応する。配列は、GeneBank：U04444.1におけるNCBI参照配列FDU04444として同定される。全長ネコPUMP-1ヌクレオチド配列は、1001 bpである。全長PUMP-1ポリペプチド配列は、GeneBank配列：AAA18222.1として同定される。ネコPUMP-1は、262アミノ酸のタンパク質である。

10

【0127】

配列番号：16は、予測：マカカ・ムラッタマトリックスメタロプロテイナーゼ 19、転写変異体1(MMP-19) mRNAに相同なネコ核酸配列に対応する。該アカゲザル(rhesus monkey)配列は、NCBI参照配列：XM\_001111542.1として同定される。全長アカゲザルヌクレオチド配列は、2182 bpである。全長ポリペプチド配列は、XP\_001111542.1として同定される。アカゲザルMMP-19は、485アミノ酸のタンパク質である。

【0128】

20

本発明の実施態様の議論に関して、本発明は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)；ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる遺伝子およびその発現産物を含むバイオマーカーの組合せをさらに企図すると理解すべきである。本発明の実施態様は、遺伝子およびその発現産物からなる2つのグループの様々な組合せからバイオマーカーのパネルを構築することを企図する。

30

【0129】

本発明の特定の実施態様において、ネコは、糸球体ろ過率、クレアチニンクリアランス、尿タンパクレベル、血中クレアチニンレベル、尿クレアチニンレベルおよび/または血中尿素窒素レベルなどの当該技術分野において承認されている臨床的測定によって定義される正常な腎機能を有し、本発明方法を用いて、そのようなネコにおける、腎機能低下、腎不全、糸球体ろ過率低下および糸球体腎炎を特徴とする腎障害をもたらす正常状態から異常状態への変化を予測、検出および診断することができる。

40

【0130】

もう1つの実施態様において、本発明方法は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)；ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ

50

-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる1つ以上の遺伝子またはそれらの発現産物の遺伝子発現変化、レベルもしくは活性を検出するアレイを用いることによって実施することができる。1つの方法において、このようなアレイは、DNAマイクロアレイである。1つ以上の遺伝子の活性または発現のレベルは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはタンパク質である、このような遺伝子の発現産物を測定することによって決定することができる。

#### 【0131】

もう1つの好ましい実施態様において、本発明方法は、あるいは分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)からなる群から選ばれる1つ以上の遺伝子または遺伝子産物；および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群；の遺伝子発現変化、レベルもしくは活性を検出するアレイを用いることによって実施することができる。1つの方法において、このようなアレイは、DNAマイクロアレイである。1つ以上の遺伝子の活性または発現のレベルは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはタンパク質である、このような遺伝子の発現産物を測定することによって決定することができる。

#### 【0132】

本発明の1つの態様は、組織サンプルまたは体液標本を、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)；ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる1つ以上の遺伝子またはそのような1つ以上の遺伝子の発現産物をネコにおいて検出する作用剤と接触させることを包含する。該作用剤は、固相上の固定化、マイクロタイターウエル、チューブ、1.計深棒またはその他の従来手段などの従来のアッセイ手段と併用して用いる抗体または核酸プローブでありうる。

#### 【0133】

本発明のもう1つの態様は、組織サンプルまたは体液標本を、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)からなる群から選ばれる1つ以上の遺伝子またはそのような1つ以上の遺伝子の発現産物；および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグ

10

20

30

40

50

メント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群;をネコにおいて検出する作用剤と接触させることを包含する。該作用剤は、固相上の固定化、マイクロタイターウエル、チューブ、1.計深棒またはその他の従来手段などの従来のアッセイ手段と併用して用いる抗体または核酸プローブでありうる。

【0134】

本発明方法のもう1つの実施態様は、単独もしくはポリペプチドオリゴヌクレオチドポリヌクレオチドを用いる遺伝子発現アレイディスプレイと併用する、ネコにおける遺伝子発現を測定するための従来のアッセイ手段の使用を包含し、このような従来のアッセイ手段は、ELISA、RIA、免疫プロット、インシトゥ・ハイブリダイゼーション、ノーザン・ブロット分析、ウエスタン・ブロット分析およびルミネックス(Luminex)X-Map(登録商標)分析の1つ以上を含む。

10

【0135】

本発明のさらなる態様は、ネコの腎障害の新規なバイオマーカーの同定、ならびにインビボでのこのようなバイオマーカーの遺伝子発現の特徴的パターンに基づく、そのようなネコにおける腎障害の検出方法に関するものである。さらに詳しくは、本発明方法は、身体サンプル、好ましくは血液サンプル中の、コントロール発現レベルと比較した場合の少なくとも1つのバイオマーカーの差次的発現を検出することを含み、特に、このようなバイオマーカーの差次的発現は、糸球体腎炎を有するネコを同定する。したがって、このような方法は、正常またはコントロール動物からの細胞と比較して、腎障害を有するネコにおいて差次的に発現される少なくとも1つのバイオマーカーの検出に依存している。本発明のバイオマーカーは、異常な腎障害、特に腎障害を有するか、または発症する可能性があるネコにおいて差次的に発現される、タンパク質および/または核酸である。1つの実施態様において、遺伝子発現パターンは、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9);レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10);ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログ

20

30

【0136】

もしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子またはそのような遺伝子の翻訳産物のグループから選ばれる、少なくとも1つのRNA転写産物またはその翻訳産物を含む。好ましい実施態様において、差は、平均の周囲の少なくとも約1標準偏差である。より好ましい実施態様において、差は、少なくとも約2倍差である。

40

50

ら選ばれる少なくとも1つの遺伝子またはそのような遺伝子の翻訳産物からなる第1グループ；および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群；から選ばれる少なくとも1つのRNA転写産物またはその翻訳産物を含む。好ましい実施態様において、差は、平均の周囲の少なくとも約1標準偏差である。より好ましい実施態様において、差は、少なくとも約2倍差である。

#### 【0137】

本発明のさらなる態様は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)；ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのRNA転写産物またはその翻訳産物を含む、ネコの糸球体腎炎のバイオマーカーに関する。もう1つの実施態様において、バイオマーカー(1つまたはそれ以上)は、糸球体腎炎を検出するのに用いられる。好ましい実施態様において、バイオマーカー(1つまたはそれ以上)は、ネコの糸球体腎炎の病期を区別するのに用いられる。

#### 【0138】

本発明のさらなる態様は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)からなる群；および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：14)；マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：15)；およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群；から選ばれる少なくとも1つの遺伝子またはそのような遺伝子の翻訳産物を含む、ネコの糸球体腎炎のバイオマーカーに関する。もう1つの実施態様において、バイオマーカー(1つまたはそれ以上)は、糸球体腎炎を検出するのに用いられる。好ましい実施態様において、バイオマーカー(1つまたはそれ以上)は、ネコの糸球体腎炎の病期を区別するのに用いられる。

#### 【0139】

さらなる態様において、本発明は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：9)；レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：10)；ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：11)；デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：12)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号：13)；マトリックスメ

10

20

30

40

50

タロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる本発明のバイオマーカーをコードする核酸またはそのフラグメントに特異的にハイブリダイズする1つ以上の核酸プローブを含む組成物に関する。

【0140】

さらなる態様において、本発明は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10)からなる群;および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群;から選ばれる本発明のバイオマーカーをコードする核酸またはそのフラグメントに特異的にハイブリダイズする1つ以上の核酸プローブを含む組成物に関する。

【0141】

さらなる態様において、本発明は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9);レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10);ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる本発明のバイオマーカーを発現する遺伝子によってコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む組成物に関する。

【0142】

さらなる態様において、本発明は、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9)およびレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10)からなる群;および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群;から選ばれる本発明のバイオマーカーを発現する遺伝子によってコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体を含む組成物に関する。

【0143】

本明細書において、本発明方法は、腎障害の物理的および形態学的特徴を検出することができる従来の診断技術と組み合わせて用いることをさらに企図される。したがって、た

10

20

30

40

50

例えば、糸球体腎炎などのネコの腎障害の診断を裏付けるために、ネコの組織サンプルまたは体液標本から得られる細胞中の腎臓に関する遺伝子の差次的発現の特性評価を、従来の診断(放射線などの)技術と組み合わせることができる。

【0144】

本発明のさらなる態様は、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；動物から得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法である。

【0145】

本発明のさらにもう1つの実施態様は、ネコの腎障害の診断および/または予後用キット、さらに詳しくは、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；動物から得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法を行うためのキットであり、キットは、任意に、該バイオマーカーに結合した検出可能な作用剤をさらに含む。

【0146】

本発明のさらなる実施態様は、試薬ネコの腎障害の診断および/または予後用試薬、さらに詳しくは、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；ネコから得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法を行うための試薬であり、試薬は、任意に、該バイオマーカーに結合した検出可能な作用剤をさらに含む。

【0147】

本発明のさらなる概要は、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；動物から得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表および第4表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法である。

【0148】

本発明のさらにもう1つの実施態様は、ネコの腎障害の診断および/または予後用キット、さらに詳しくは、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；動物から得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表および第4表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法を行うためのキットであり、キットは、任意に、該バイオマーカーに結合した検出可能な作用剤をさらに含む。

【0149】

本発明のさらなる実施態様は、試薬ネコの腎障害の診断および/または予後用試薬、さらに詳しくは、動物から少なくとも1つの組織サンプルまたは体液標本を得ること；ネコから得られた少なくとも1つのサンプルまたは標本中の、第3表および第4表から選ばれるポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物である1つ以上のバイオマーカーの量を測定すること；からなるステップを含む、ネコの腎障害の診断および/または予後方法を行うための試薬であり、試薬は、任意に、該バイオマーカーに結合した検出可能な作用剤をさらに含む。

【0150】

本発明のもう1つの実施態様は、糸球体腎炎の診断および/または予後用バイオマーカー、特にネコの糸球体腎炎の診断または予後用キットを形成するためのバイオマーカーと

10

20

30

40

50

しての、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9);レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10);ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる1つ以上のポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物の使用である。

10

## 【0151】

本発明のもう1つの実施態様は、糸球体腎炎の診断および/または予後用バイオマーカー、特にネコの糸球体腎炎の診断または予後用キットを形成するためのバイオマーカーとしての、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9)andレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10)からなる群;および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群;から選ばれる1つ以上のポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物の使用である。

20

## 【0152】

本発明のもう1つの実施態様は、腎障害の診断および/または予後用バイオマーカー、特にネコの腎障害の診断または予後用キットを形成するためのバイオマーカーとしての、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9);レチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10);ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる1つ以上のポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物の使用である。

30

40

## 【0153】

本発明のもう1つの実施態様は、腎障害の診断および/または予後用バイオマーカー、特にネコの腎障害の診断または予後用キットを形成するためのバイオマーカーとしての、分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:9)andレチノール結合タンパク質5(rbp5)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:10)からなる群;および、任意に、ルミカン(LUM)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:11);デコリン(DCN)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:12);コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:13);マトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:14);マ

50

トリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP7、PUMP-1)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:15);およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-19(MMP19)またはそのネコホモログもしくはフラグメント(配列番号:16)からなる群から選ばれる少なくとも1つのポリヌクレオチドからなる第2群;から選ばれる1つ以上のポリペプチド、タンパク質、RNA、DNA、ポリヌクレオチドまたはその代謝産物の使用である。

【0154】

さらなる別の実施態様は、試薬および備品が、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ、c-DNAマイクロアレイ、および特定化された(focused)遺伝子チップもしくはその組合せを包含するDNAマイクロアレイ分析材料を含むキットである。

【0155】

本発明のその他のさらなる目的、特徴および利点は、当業者には容易に明らかとなるであろう。

【0156】

本明細書の開示を通して、本発明のさまざまな態様が、さまざまな形式で提供されうる。さまざまな形式での記載は、単に利便性と簡便さを目的とするのであり、柔軟性のない限定と解釈されるべきではないことを理解すべきである。したがって、範囲の記載は、特に開示されたすべての可能な部分範囲ならびにその範囲内の個々の数値を含むとみなされるべきである。たとえば、1~5などの範囲の記載は、1~3、1~4、2~4、2~5、3~5などの特に開示された部分範囲ならびに1、2、3、4および5などのその範囲内の個々の数値を含むとみなされるべきである。このことは、範囲の幅にかかわらず適用される。

【0157】

本発明の実施は、他に特記しない限り、当業者の知識の範囲内である、従来技術および有機化学、高分子技術、分子生物学(組換え技術を含む)、細胞生物学、生化学および免疫学の記載を用いることができる。このような従来技術として、ポリマーアレイ合成、ハイブリダイゼーション、ライゲーションおよび標識を用いるハイブリダイゼーションの検出が挙げられる。適当な技術の特定の説明は、後記実施例を参照することにより、得ることができる。しかしながら、もちろん、他の等価な従来の手順も用いることができる。このような従来技術および記載は、Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV); Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cells: A Laboratory Manual; PCR Primer: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) Freeman, New York; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984、IRL Press, London, Nelson and Cox(2000); Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.; および Bergら, (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.などの標準的実習マニュアルに見出すことができる。これらのすべては全内容として、すべての目的のために、参照することによって本願に組み込まれる。

【0158】

本発明において有用な核酸アレイは、アフィメトリックス(サンタ・クララ、カリフォルニア)から商標名ジーンチップ(登録商標)で市販されているアレイを包含する。例示のアレイは、ウェブサイト [affymetrix.com](http://affymetrix.com)に載せられている。

【0159】

本発明は、固体基質に結合されたポリマーのための多くの用途も企図する。これらの用途として、遺伝子発現モニタリング、プロファイリング、ライブラリ・スクリーニング、遺伝子型決定および診断法が挙げられる。遺伝子発現モニタリングおよびプロファイリング法は、米国特許番号5,800,992、6,013,449、6,020,135、6,033,860、6,040,138、6,177,248、6,309,822および6,344,316に記載されている。したがって、遺伝子型決定およびその用途は、米国特許出願番号60/319,253、10/013,598および米国特許番号5,856,092、6,300,063、5,858,659、6,284,460、6,361,947、6,368,799および6,333,179に記載されている。その他の用途は、米国特許番号5,871,928、5,902,723、6,045,996、5,541,061および

10

20

30

40

50

6,197,506に記載されている。

【0160】

当業者は、本発明において具体化された生成物および方法は、当業界で知られているさまざまな方法を用いるさまざまな材料で構成された、核酸プローブアレイ、膜プロット、マイクロウエル、ビーズおよびサンプル管といったような市販の遺伝子発現モニタリングシステムなどのさまざまなシステムに適用することができるということを認識するであろう。したがって、本発明は、いずれかの特定の状況に限定されるものではなく、本発明の特定の実施態様に関する以下の記載は、説明を目的とするのみである。

【0161】

好ましい実施態様において、遺伝子発現モニタリングシステムは、核酸プローブアレイ (オリゴヌクレオチドアレイ、cDNAアレイ、スポットアレイなど)、膜プロット(ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析などで用いられる)、あるいはマイクロウエル、サンプル管、ビーズまたは繊維(もしくは結合した拡散を含むいずれかの固体支持体)を含む。米国特許番号5,770,722、5,744,305、5,677,195、5,445,934および6,040,193を参照(これらは、参照することによって本願に組み込まれる)。遺伝子発現モニタリングシステムは、溶液中に核酸プローブを含んでもよい。

10

【0162】

本発明は、増幅を含むサンプル調製も企図する。ゲノムサンプルは、さまざまなメカニズムによって増幅され、そのうちのいくつかは、PCRを用いる。たとえば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Eds. Innisら、Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattilaら、Nucleic Acids Res. 19, 4967(1991); Eckertら、PCR Methods and Applications 1, 17(1991); PCR (Eds. McPhersonら、IRL Press, Oxford); および米国特許番号4,683,202、4,683,195、4,800,159、4,965,188、and 5,333,675などを参照(これらは、参照することによって本願に組み込まれる)。サンプルは、アレイ上で増幅される。たとえば、米国特許番号6,300,070および米国特許出願番号09/513,300を参照(これらは、参照することによって本願に組み込まれる)。

20

【0163】

ほかの適当な増幅方法として、リガーゼ連鎖反応(LCR)(たとえば、WuおよびWallace、Genomics 4, 560 (1989)、Landegrenら、Science 241, 1077 (1988)およびBarringerら、Gene 89: 117(1990))、転写増幅(Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)およびW088/10315)、自己持続配列複製(Guatelliら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874(1990)and W090/06995)、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅(米国特許番号6,410,276)、コンセンサス配列プライムドポリメラーゼ連鎖反応(CP-PCR)(米国特許番号4,437,975)、任意プライムドポリメラーゼ連鎖反応(AP-PCR)(米国特許番号5,413,909、5,861,245)、および核酸に基づく配列増幅(NABSA)などが挙げられる。(米国特許番号5,409,818、5,554,517および6,063,603を参照;それぞれは、参照することによって本願に組み込まれる)。用いることができる他の増幅方法は、米国特許番号5,242,794、5,494,810、4,988,617、6,344,316および米国特許出願番号09/854,317に記載されており、それぞれは、参照することによって本願に組み込まれる。

30

40

【0164】

その他のサンプル調製方法および技術は、Dongら、Genome Research 11, 1418(2001)、米国特許番号6,361,947、6,391,592ならびに米国特許出願番号09/916,135、09/920,491、09/910,292および10/013,598に記載されている。

【0165】

本発明の遺伝子発現モニタリングシステムを用いて、異なる細胞または組織、同じ細胞または組織の異なる亜集団、同じ細胞または組織の異なる生理学的状態、あるいは同じ組織の異なる細胞集団における発現の比較分析を促進することができる。好ましい実施態様において、本発明の比例増幅法は、試験サンプルにおける定量的ならびに定性的差異の測

50

定を促進するのに十分な再現性のある結果(すなわち、統計学的に有意な誤差限界または信頼度内にある結果)を提供することができる。

【0166】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイは、当業界で公知である。ハイブリダイゼーションアッセイ手順および条件は、適用に応じて異なり、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger and Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); YoungおよびDavis, P.N.A.S., 80: 1194 (1983)に言及されているものなどの既知の一般的結合方法にしたがって選ばれる。反復および制御ハイブリダイゼーション反応を行うための方法および装置は、米国特許番号5,871,928、5,874,219、6,045,996、6,386,749および6,391,623(これらは、参照することによって本願に組み込まれる)に記載されている。リガンド間のハイブリダイゼーションのシグナル検出は、特定の好ましい実施態様である：米国特許番号5,143,854、5,578,832、5,631,734、5,834,758、5,936,324、5,981,956、6,025,601、6,141,096、6,185,030、6,201,639、6,218,803および6,225,625、米国特許出願番号60/364,731およびPCT出願番号：PCT/US99/06097(WO99/47964として公開)を参照(これらのそれぞれもまた、全内容は、参照することによって本願に組み込まれる)。シグナル検出および強度データの処理のための方法および装置は、たとえば、米国特許番号5,143,854、5,547,839、5,578,832、5,631,734、5,800,992、5,834,758; 5,856,092、5,902,723、5,936,324、5,981,956、6,025,601、6,090,555、6,141,096、6,185,030、6,201,639; 6,218,803および6,225,625、米国特許出願番号60/364,731およびPCT出願番号：PCT/US99/06097(WO99/47964として公開)に開示されている(これらのそれぞれもまた、全内容は、参照することによって本願に組み込まれる)。

10

20

【0167】

本明細書に記載された特定の метод論、プロトコルおよび試薬は異なりうるものであり、本発明はそれらに限定されるものではない。さらに、本明細書で用いた専門用語は、特定の実施態様を説明するという目的のみのために用いたものであり、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0168】

本明細書に引用もしくは言及されたすべての特許、特許出願、刊行物およびその他の文献は、法律が許す範囲で、参照することによって本願に組み込まれる。それらの文献に関する議論は、それらにおいてなされた主張を要約することのみを意図している。こうした特許、特許出願、刊行物または参考文献のいずれも、あるいはその部分のいずれも、本発明に関連する先行技術であるという承認はなされず、そしてこうした特許、特許出願、刊行物およびその他の参考文献の正確さおよび適切性に異議を申し立てる権利は特に留保される。

30

【0169】

本明細書を通して、範囲は、その範囲内のそれぞれおよびすべての値を記載するための略記として用いられる。その範囲内のいずれの値も、その範囲の末端の値として選ぶことができる。さらに、本明細書に引用されたすべての文献は、参照することによって本願に組み込まれる。本明細書の開示および引用文献の開示中の定義において不一致がある場合、本明細書の開示が制御する。

40

実施例

【実施例1】

【0170】

国際獣医腎臓病研究グループ(International Renal Interest Society)のガイドラインにしたがった慢性腎疾患を持つネコの分類

以下の実施例において、慢性腎疾患の徴候または症状を示さない動物に対して、慢性腎疾患の臨床的徴候を示すネコを試験した。以下の第1表および第2表に示す基準に基づいて、そして国際獣医腎臓病研究グループ(IRIS)のガイドラインにしたがって、慢性腎疾

50

患の病理学的診断を行った。

【0171】

被検動物の適切な治療および監視を促進するため、慢性腎疾患(CKD)の診断後に、CKDの病期決定を行う。病期決定は、まず、安定な動物において、少なくとも2回の機会に評価した、絶食時血漿クレアチニンに基づく。正常腎機能を示し、そしてCKDの臨床的徴候または症状を示さないネコを非疾患ネコとしてグループ化した。ネコにおける病期1は、高窒素血症が検出されないが、糸球体ろ過率(GFR)が減少している可能性もあり、そして腎臓濃縮能が劣っている可能性もある、CKDから腎機能不全に向かう生化学的証拠がまったくない、以前の初期腎臓疾患の分類に対応する。病期2は、以前の初期腎不全の分類に対応する。病期2では、軽度の高窒素血症が認められる。病期3は、中程度の高窒素血症が検出される、以前の尿毒症腎不全の分類に対応する。尿毒症腎不全の全身徴候は、骨疼痛、尿毒症胃炎、貧血および代謝性アシドーシスなどとして存在しうる。病期4は、重度高窒素血症および尿毒症発作の全身臨床徴候の増加によって性質決定される、末期腎不全に対応する。

10

【0172】

第1表は、それぞれ、研究したネコの5つのカテゴリーを同定する。CKDを持たないと診断されたネコ総数42匹を研究した。総数14匹の病期1のネコは、最小限の糸球体腎炎(GN)を示した。CKDの進行した病期を示す、研究したネコの数：病期2、軽度GN=24匹；病期3、中程度GN=8匹、および病期4、顕著なGN=13匹であった。ネコ群各々に関する血漿クレアチニンレベルを、ネコの各群に関する血漿クレアチニンレベルの平均および中央値として、第2表に示す。

20

【0173】

第1表：ネコの病期決定

IRIS CKD 病期決定	血漿クレアチニ範囲 mg/dl
疾患なし	<1.6 疾患の確かな証拠なし
病期1	<1.6(<140 $\mu\text{mol/l}$ ) 疾患の証拠あり  非高窒素血症性。いくつかの他の腎異常が存在する(たとえば、同定可能な腎外性の原因を伴わない不適切な濃縮能；異常な腎触診および/または腎画像所見；腎起源のタンパク尿；異常な腎生検
病期2	1.6~2.8(140-249 $\mu\text{mol/l}$ ) 軽度の腎性高窒素血症。臨床徴候は、通常軽度または存在せず。
病期3	2.9~5.0(250-439 $\mu\text{mol/l}$ ) 中程度の腎性高窒素血症。多くの臨床徴候が存在する可能性あり。
病期4	>5.0(>440 $\mu\text{mol/l}$ ) 重度腎性高窒素血症S。多くの臨床徴候が存在する

30

40

【0174】

第2表：血漿クレアチニンレベル

病理学的診断	平均血漿クレアチニン mg/dl	中央値血漿クレアチニン mg/dl
疾患なし(n = 15)	1.3	1.0
最小限GN(n = 4)	1.4	1.5
軽度GN(n = 10)	2.4	1.8
中程度GN(n = 20)	3.8	2.6
顕著なGN(n = 13)	7.1	7.1

## 【実施例2】

10

## 【0175】

## 候補選択基準

遺伝子発現データがDNAマイクロアレイ解析によって得られたネコにおける報告を行う実施例において、選択基準は、慢性腎疾患およびそれに対応する糸球体腎炎の適当な生物学的マーカーとして特定の遺伝子および発現されたタンパク質を同定するために設立された。生物学的に意味のあるCKDのマーカーとして同定されるために、遺伝子発現プロファイルは、(1)遺伝子が分泌タンパク質であること；(2)少なくとも2倍(アップまたはダウンレギュレーション)のCKDの、糸球体腎炎の臨床的徴候または症状がないことを実証する正常な動物と、最小限、軽度、中程度または顕著(それぞれ病期1~4)の徴候を実証する動物との間の差次的発現レベルが存在しなければならないこと；(3)遺伝子発現レベルが最小限から軽度、中程度または顕著(病期1~4)への疾患の進行と関連しなければならないこと；および(4)非疾患動物と中程度動物の間に、平均の周囲の少なくとも1標準偏差の差があること；が必要であると判断された。後者の選択基準は、マイクロアレイ遺伝子チップが、半定量的デバイスであり、データの標準化のために対数スケールロバストマルチアレイ解析(RMA)が用いられるという観察に基づく。

20

## 【0176】

当業者は、遺伝子チップデータを解析するための多くのアルゴリズムの中から選択することができる。これらは、MASS統計的アルゴリズム、プローブ対数強度誤差推定およびロバストマルチチップ解析(RMA)を包含する。アルゴリズムの処理は、以下の文献に詳細に議論されている：Li, C. Mo, 2001, Model-based analysis of oligonucleotide arrays : expression index computation and outlier detection, Proc. Acad. Sci., Vol. 98 : 31-36 ; Irizarry R.A.ら、Exploration, normalization and summaries of high density oligonucleotide array probe level data, Biostatistics, 2003, Vol. 4 : 249-264 ; Irizarryら、Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data, Nucleic Acid Res., 2003, Vol. 31(4) : e15 ; および Fan, W., Aら、A class of models for analyzing GeneChip gene expression analysis array data, BMC Genomics, 2005, Vol. 16 : 6-16 ; Zhou, Lら、An expression index for Affymetrix GeneChips based on the generalized logarithm, Bioinformatics, 2005, Vol. 21(21) : 3983-3989 and Hein A.K.ら、BGX : a fully Bayesian integrated approach to the analysis of Affymetrix GeneChip data, Biostatistics, 2005, Vol. 6 : 349-373。

30

40

## 【0177】

以下の実施例において、ジーンスプリング(GeneSpring)バージョン7.0(GS)ソフトウェア(アジレント・コーポレーション)を用いて生データを分析し、そしてR-バイオコンダクター(RB)フリーウェアを用いて検証した。両方のソフトウェア・パッケージを用いて、アフィメトリックス装置(Affymetrix Instrument)によって生成されるCELファイルからプローブ強度を計算する。R-バイオコンダクターおよびジーンスプリング・ソフトウェアを別個に用いて、プローブあたりの存在/不在/境界コール(Marginal call)およびP値を計算する。

## 【0178】

いかなる所定の分析に関しても、遺伝子発現データは、「上方」または「下方」制御の

50

いずれかを受けると決定される。遺伝子が「上昇する」かまたは「下降する」かの決定は、倍変化に基づき、これは各個々のプローブに関して、治療強度/コントロール強度として計算される。値が $<1/2$ である場合、倍変化は下方制御されると見なされ、そして $>2.0$ の場合、上方制御されると見なされる。また、プローブは、比較されている(治療またはコントロール)状態の一方のみに存在するとコールされるならば、そして他方には「存在しない」かまたは「境界」であり、そして用いたソフトウェアによれば倍変化が有意である場合、さらなる精査のために有意であると見なされる。

【実施例3】

【0179】

RNA単離法

材料および方法。以下の一般法を用いて、本明細書の実施例にさらに記載するように、遺伝子チップを利用した遺伝子発現プロファイリングのため、ネコの組織サンプルからRNAを単離してもよい。一般の当業者には、これらの方法または当業界内で認められるようなその変法を適用して、一般の当業者に利用可能な多様な分析法、特にマイクロアレイ技術を用いて、さらなる遺伝子発現分析のため、組織または体液サンプルからRNAを単離してもよいことが明らかであろう。

【0180】

]組織からのリボ核酸(RNA)の単離。組織サンプルを収集し、液体窒素中で凍結し、融解し、次いで、乳鉢および乳棒で粉碎し、ホモジナイズし、そして50mlコニカルフラスコに移した。次いで、製造者の指示(インビトロジェン)にしたがって、TRIzol(登録商標)RNA抽出法を用いて、ホモジナイズした組織サンプルを加工して、優れた品質のRNAを産出し、これを次いで、さらなるゲノム分析に付す。

【0181】

材料：氷、液体窒素、凍結ネコ組織、TRIzol(登録商標)溶解試薬、クロロホルム最低限99%、イソプロピルアルコール、70%エタノール(無水エタノールおよび脱イオンRNアーゼを含まない水で調製)、RNアーゼ Zap(登録商標)、脱イオン水、AmbionのRNA保存溶液(登録商標)。

【0182】

装置：Ultra-Turrax T25強力ホモジナイザー、ベックマン・コールター・アレグラ 25R遠心分離装置、エップンドルフ遠心分離装置、ピンセット、外科用メス、堅いカッティング表面、すなわちカッティングボード、1.5mL DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌微量遠心管、50mL DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌使い捨てポリプロピレン試験管、P1000、P200、P20、P10およびP2 レイニン・ピペットマン・ピペット、P1000、P200、P20、P10およびP2ピペット用のフィルターピペットチップ、DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌および糸くず不含ワイプ。

【0183】

準備：4mL TRIzol(登録商標)を含む50mLポリプロピレン試験管を準備する(RNA単離用に選択した各組織に対して1つの試験管)。

【0184】

組織ホモジナイズ：液体窒素を保持可能な容器を、3~4杯の液体窒素で満たす。前述の容器内に凍結組織片を直ちに入れ(組織はおよそエンドウ豆サイズでなければならない)、組織を、適切にラベル付けした50mLポリプロピレン試験管(すでに4mL TRIzol(登録商標)が入っているもの)内に入れる。Ultra-Turrax T25強力ホモジナイザーを用いて、直ちにホモジナイズを開始する。最高設定(6)で10~15秒間ホモジナイズする。サンプルを氷上でさらに10~15秒間冷却し、次いで、反復する。組織が完全にホモジナイズされるまで続ける、溶液は濁った状態である。完全にホモジナイズされたら、50mL試験管に蓋をし、そして氷に戻す。ホモジナイズした組織を室温で5分間インキュベーションした後、単離手順を進める。

【実施例4】

【0185】

## RNA調製手順

RNA単離：一般的に、TRIzol(登録商標)試薬とともに提供されるインビトロジェン使用説明書に示される方法に従う。ホモジナイズしたサンプルを、4つの1.5mL微量遠心管中、4つの1mLアリコートに分ける。各1mLのアリコートに200 $\mu$ Lのクロロホルムを添加する。試験管に蓋をし、15秒間ボルテックスし、次いで、上下に振盪する。結果はピンクの乳濁した液体となる。試験管を室温で2~3分間インキュベーションする。試験管を14,000rpmおよび4 で15分間遠心分離する。水性層(最上層)を無菌1.5mL微量遠心管に移す。新規試験管に移す水性層の典型的な体積は約500 $\mu$ Lである。中間相または下相のいずれも移さないように注意する。水性層を含有する各微量遠心管に500 $\mu$ Lのイソプロピルアルコールを添加することによって、溶液からRNAを沈殿させる。少なくとも20秒間、試験管を上下に振盪する。サンプルを室温で10分間インキュベーションする。サンプルを14,000rpm、4 で10分間遠心分離する。ペレットをなくさないようにしながら、液体を吸引することによって、上清を注意深く取り除く。1mLの70%エタノールを添加してペレットを洗浄する。試験管を軽く叩く(または試験管をベンチトップに軽く当てる)ことによってペレットを取り外し、そして振盪して混合する。8,200rpm、4 で5分間遠心分離する。ペレットをなくさないようにしながら、液体を吸引することによって、上清を注意深く取り除く。糸くず不含ワイプを用いて、過剰なエタノールを注意深く吸い取り、ペレットが乾燥していることを確実にする。各ペレットを30 $\mu$ LのRNA保存溶液に再懸濁する。RNAが溶液に戻るまで、ピペティングによって穏やかに混合し、そして次いで、-80 で保存する。RNAの再懸濁を容易にするため、低速で数秒間、サンプルをボルテックスすることが必要な場合もある。これが必要である場合には、凍結前に、微量遠心分離装置を用いてサンプルを沈降させる。

## 【0186】

RNAクリーニング：RNeasy(登録商標)ミニ・ハンドブックに提供される方法に従う。

## 【0187】

RNeasyミニキットを用いる、オプティセル・チャンパー中で培養した細胞からのRNA単離。哺乳動物細胞株から培養した細胞を用いて、優れた品質のRNAを単離し、次いで、さらなる下流ゲノム分析に用いる。細胞の培養に関連するすべての実験は、厳密な無菌条件下で行うものとする。

## 【0188】

試薬：10xPBS、脱イオンH<sub>2</sub>O、無水エタノール、RNA保存溶液、 $\beta$ -メルカプトエタノール、RNアーゼ Zap(登録商標)、緩衝液RLT、ならびに緩衝液RW1および緩衝液RPE(RNeasyミニキットにて提供される)。

## 【0189】

装置/材料：RNeasyミニキット、QIAシュレッダー・スピンカラムオプティセル・ナイフ、20mL無菌シリンジ、オプティセル・チップ、細胞スクレーパー、P1000 ピペットマン・ピペット、レイニン、P200 ピペットマン・ピペット、レイニン、100~100 $\mu$ Lフィルター処理ピペットチップ、1~200 $\mu$ Lフィルター処理ピペットチップ、無菌トランスファーピペット、55mL無菌溶液ボウル、1.5ml無菌微量遠心管およびエッペンドルフ微量遠心装置。

## 【0190】

溶液：緩衝液RLT(RNeasyミニキットにて提供されるストック)；プロトコルを開始する前に、緩衝液RLT 10mL当たり100 $\mu$ Lの $\beta$ -メルカプトエタノールを添加する。70%エタノール：35mL無水エタノールを15mLの脱イオンRNアーゼを含まない水に添加することによって、50mLの70%エタノールを作る。1xPBS：RNアーゼを含まない水。0.22 $\mu$ mフィルターを用いて、溶液をろ過する。

## 【0191】

手順：オプティセル・チャンパーから細胞を取り除く(一回に1つのオプティセルで進める)。RNAを単離する前に細胞が活着していることを確実にするために、顕微鏡下で細胞をチェックする。細胞培養培地を取り除き、捨てる。オプティセル・ナイフを用いて、上

10

20

30

40

50

の膜を切り取り、下部の膜上の細胞を曝露する。細胞が付着している膜を1xPBSで3回洗浄する。600  $\mu$ Lの緩衝液RLT溶液( -メルカプトエタノールを含有する)を、細胞が付着している膜中央にピペティングする。細胞スクレーパーを用いて、緩衝液RLTを膜の表面全体に優しく広げ、次いで、液体を1つの角に集める。緩衝液RLTの全体積をピペティングで取り去って、QIAシュレッター・スピнкаラム内に入れる。

【0192】

RNA単離：QIAシュレッター・スピнкаラムを14,000rpmで2分間遠心分離する。スピнкаラムを廃棄するが、コレクションチューブおよびその内容物は保持する。600  $\mu$ Lの70%エタノールをコレクションチューブに添加し、ピペティングによってよく混合する(総体積はここで1.2mL)。600  $\mu$ Lの細胞溶解物をRNeasyミニカラムに移し、そして14,000rpmで15秒間遠心分離する。フロースルーを捨てるが、コレクションチューブおよびスピнкаラムは保持する。細胞溶解物の残りの体積(~600  $\mu$ L)をスピнкаラムに移し、遠心分離を繰り返す。フロースルーを捨てるが、コレクションチューブおよびスピнкаラムは保持する。700  $\mu$ Lの緩衝液RW1をスピнкаラムに添加する。14,000rpmで15秒間遠心分離して、カラムを洗浄する。フロースルーおよびコレクションチューブを捨てる。スピнкаラムを新規2mLコレクションチューブに移し、そして500  $\mu$ Lの緩衝液RPEをカラムに添加する。14,000rpmで15秒間遠心分離する。フロースルーを捨て、コレクションチューブ/カラムを保持する。別の500  $\mu$ L緩衝液RPEをカラムに添加する。14,000rpmで2分間遠心分離する。スピнкаラムを1.5mLのコレクションチューブに移す。30  $\mu$ LのRNA保存溶液をシリカゲル膜に直接添加し、14,000rpmで1分間遠心分離してRNAを溶出する。最終RNAを -70 で保存する。

【0193】

RNA 6000ナノアッセイ：アジレント2100バイオアナライザーおよびRNA 6000ナノアッセイを用いて、培養哺乳動物細胞、リンパ球または組織から単離したRNAを、品質に関して分析する。

【0194】

試薬：RNA 6000ナノゲルマトリックス、RNA 6000ナノ色素濃縮物、RNA 6000ナノマーカ(上記試薬はすべて、RNA 6000ナノアッセイキット、アジレントに含まれる)、RNA 6000ラダー、アンピオン(Ambion)のRNアーゼ ZapおよびRNアーゼを含まない水。

【0195】

装置/他の材料：アジレント・チップ・プライミング・ステーション、アジレント、RNA 6000チップ、アジレント、電極クリーナー、P2、P10、P200およびP1000 レイニン・ピペットマン・ピペット、無菌DNアーゼ/RNアーゼ不含る過ピペットチップ、1.5mL微量遠心管、無菌、ボルテックス、IKAボルテックス混合装置、微量遠心分離装置および加熱ブロック。

【0196】

手順：手順は、アジレント・テクノロジーズによる、2003年11月版の試薬キットガイド、RNA 6000ナノアッセイにおいて提供される。以下の変更を伴って、ガイドに提供される手順を行う：ゲルの調製(17ページ) - ろ過したゲルを各65  $\mu$ Lずつアリコートに分けるのではなく、ストックのろ過したゲルを元来の微量遠心管に保持し、必要に応じて65  $\mu$ Lずつ取る。RNA 6000ナノマーカの装填(22ページ) - 各サンプルウェルに、(RNA 6000ナノマーカの代わりに)サンプルを含有しないであろう1  $\mu$ LのRNアーゼを含まない水を添加する。これは用いるマーカの量を節約するだけでなく、RNアーゼを含まない水を含めて、試薬がいずれも汚染されていないことを見る陰性コントロールとしても働く。ラダーおよびサンプルの装填(23ページ) - サンプルおよびRNA 6000ラダーをさらに30秒間(全部で2.5分間)71 で熱変性させる。チップ・ランの開始(26ページ) - アッセイメニューから「真核生物総RNAナノ」オプションを選択する。

【実施例5】

【0197】

アフィメトリックス・ジーンチップ発現分析

アフィメトリックス・ネコ・ジーンチップ(登録商標)を用いて、遺伝子発現を分析する。総RNAをcDNAに逆転写する。cDNAを用いて、cRNAを生成し、これをフラグメント化して、そしてジーンチップハイブリダイゼーションのプロープとして用いる。遺伝子チップを洗浄し、そしてアフィメトリックス・レーザースキャナでハイブリダイゼーション・シグナルを測定する。次いで、ハイブリダイゼーション・データを検証し、説明書の指示にしたがって、さらなる分析のため標準化する。

【0198】

装置：エッペンドルフ微量遠心装置、1.5 mL DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌微量遠心管、50mL DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌使い捨てポリプロピレン試験管、P1000、P200、P20、P10およびP2 レイニン・ピペットマン・ピペット、P1000、P200、P20、P10およびP2ピペット用のフィルターピペットチップ、DNアーゼおよびRNアーゼ不含/無菌およびペルチェ・サーマルサイクラーPTC-200。

10

【0199】

手順：ジーンチップ発現分析技術マニュアル(アフィメトリックス、著作権1999~2003)に記載のすべての手順に正確に従う。第一鎖cDNA合成には、5マイクログラムの総RNAを用いる。反応およびプロープ変性における温度調節には、ペルチェ・サーマルサイクラーPTC-200または熱ブロックを用いる。バイオアナライザー2100とともにRNAナノドロップチップを用いて、品質管理を行う。ネコ遺伝子チップには100形式(ミディアレイ)を用いる。

【実施例6】

【0200】

慢性腎疾患を持つネコにおける遺伝子発現

慢性腎疾患の多様な病期を有するネコを用いて、先の実施例1~5にしたがって、実験を行い、正常腎機能を有するネコ、ならびに第1表に提示するような病期1~4に対応する最小限の、軽度の、中程度の、そして顕著な糸球体腎炎を有するネコの間、基礎的な遺伝子発現の差異を決定した。本明細書の実施例に記載するような手順を用いて、第2表に提示される血漿クレアチニンレベルによって、そして臨床観察によって決定されるような、正常な腎臓機能を有する15匹のネコ、最小限の糸球体腎炎を有する4匹のネコ、軽度の糸球体腎炎を有する10匹のネコ、中程度の糸球体腎炎を有する20匹のネコ、および顕著な糸球体腎炎を有する13匹のネコから、組織および体液サンプルを調製した。

20

【0201】

先の実施例に定義するように、糸球体腎炎を有するネコに対して、正常な腎機能を有するネコと比較した遺伝子発現データに基づいて、第3表に列挙する4つの遺伝子が、ネコにおける慢性腎障害の潜在的なバイオマーカーとして、実施例2の選択基準を満たすものとして同定された。遺伝子には、ルミカン(LUM)；コラーゲンアルファ1(III)鎖、変異体12(COL3A1)；デコリン(DCN)；および分泌型フリッツルド関連タンパク質2(SFRP2)が含まれる。類似のヒト同義語ならびにmRNAおよびタンパク質寄託番号を、各遺伝子について第3表に列挙する。各タンパク質は分泌タンパク質である。4つの各遺伝子について、幾何学的倍数変化データ VS 糸球体腎炎の病期をプロットして、図1~4にそれぞれ示す。

30

【0202】

図1 aは、ルミカン遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、10であることを実証する。1 bは、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

40

【0203】

図2 aは、COL3A1遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、10であることを実証する。2 bは、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

【0204】

図3 aは、デコリン遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を

50

有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、4.3であることを実証する。3 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

【0205】

図4 a は、SFRP2遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、3.8であることを実証する。4 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

【0206】

図5 a は、トリックスメタロプロテイナーゼ-2遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、10.3であることを実証する。5 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

10

【0207】

図6 a は、マトリックスメタロプロテイナーゼ-7遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、23であることを実証する。6 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

【0208】

図7 a は、マトリックスメタロプロテイナーゼ-19遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、6.9であることを実証する。7 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

20

【0209】

図8 a は、レチノール結合タンパク質5遺伝子発現産物について、正常ネコに対して、顕著な糸球体腎炎を有するネコにおける幾何学的平均倍数変化が、3.9であることを実証する。8 b は、被検動物のそれぞれについて、糸球体腎炎の病期に対してプロットした幾何学的平均RMA強度を示す。

【0210】

本明細書に記載したものに類似あるは等価ないずれの組成物、方法、製品またはその他の手段もしくは材料も、本発明の実施において用いることができ、好ましい組成物、方法、製品またはその他の手段もしくは材料は、本明細書に記載される。

30

【0211】

第3表：バイオマーカーのリスト

遺伝子	ネコにおける記号	ヒト同義語	ホモログ同義語	遺伝子記述	mRNA	タンパク質
ルミカン	LUM	LDC ; SLR R2D	イヌ LUM	ルミカン前 駆体に類似	XM_539716.2 遺伝子 ID : 48259 9	XP_539716.1
コラーゲン Ⅲ 鎖 、 変異体 1 2	COL3A1	EDS4A ; FL J34534	ウマ COL3A1	コラーゲン 、 タイプⅢ 、 アルファ 1(エーラス ・ ダンロス 症候群Ⅳ 、 常染色体 優性)	XM_001917620.1 遺伝子 ID : 10003 4123	XP_001917655
デコリン	DCN	CSCD ; DS PG2 ; PG40 ; PGII ; PG S2 ; SLRR1 B	イヌ DCN	デコリン	NM_001003228.1 遺伝子 ID : 40390 4	NP_001003228.1
SFRP2	SFRP2	FRP-2 ; SA RP1 ; SDF-2 5	イヌ Sfrp	分泌型フリ ッツルド関 連タンパク 質2	NM_001002987.1 遺伝子 ID : 47547 1	NP_001002987.1

10

20

## 【 0 2 1 2 】

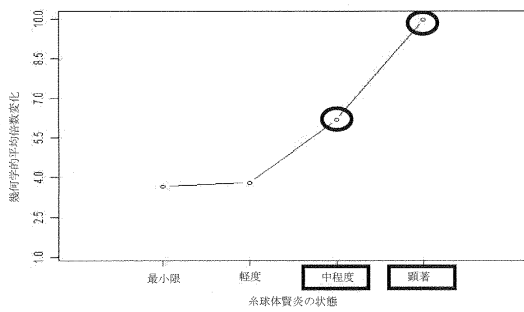
第 4 表 : バイオマーカーのリスト

遺伝子	ネコにおける記号	ヒト同義語	ホモログ同義語	遺伝子記述	mRNA	タンパク質
レチノール結合タンパク質5	Rbp5	Rbp-5	イヌ Rbp5	レチノール結合タンパク質5、細胞性	XM_848184.1 LOC477706	XP_853277.1
MMP-2	MMP2	MMP2	イヌ	マトリックスメタロプロテイナーゼ 2(ゼラチナーゼA、72kDa ゼラチナーゼ、92kDa タイプIV コラゲナーゼ)	XM_535300.2 遺伝子 ID : 4037333	XP_535300.2
MMP-7	MMP7	MMP7 PUMP-1	ネコ PUMP-1	マトリックスメタロプロテイナーゼ 7	FDU04444 遺伝子Bank U04444.1	AAA18222.1
MMP-19	MMP19	MMP19	マカカ ムラッタ MMP19	マトリックスメタロプロテイナーゼ 19	XM_001111542.1	XP_001111542.1

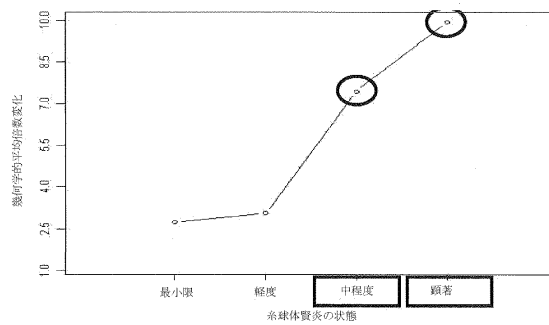
10

20

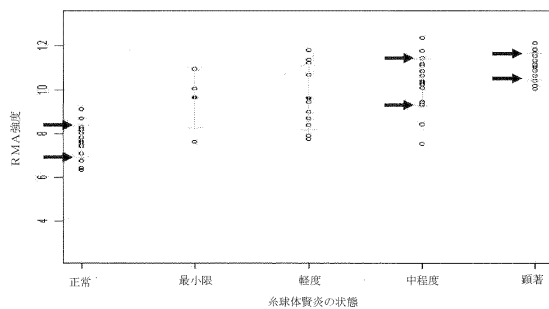
【図 1 a】



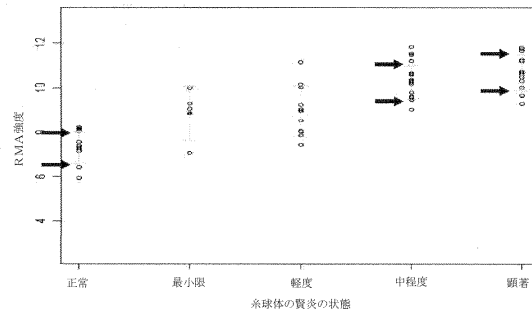
【図 2 a】



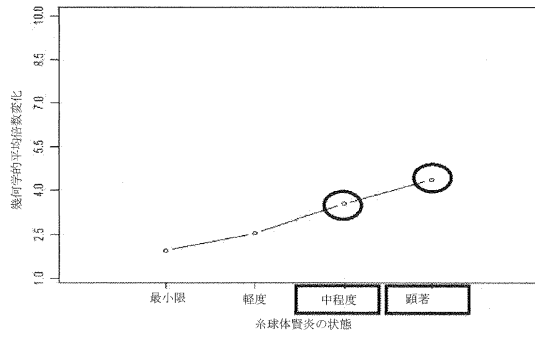
【図 1 b】



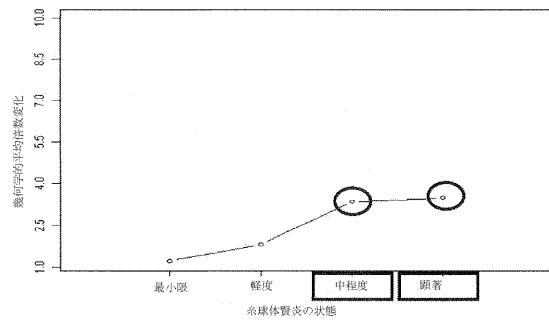
【図 2 b】



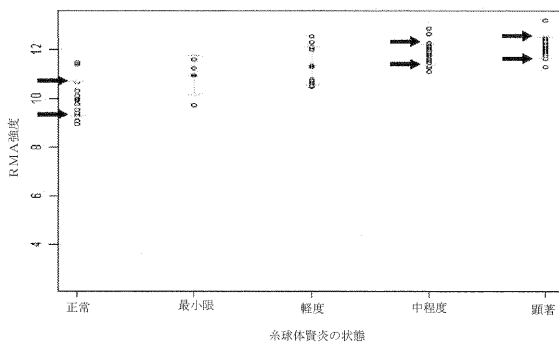
【図3 a】



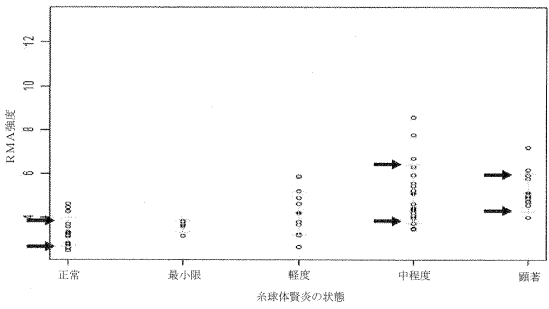
【図4 a】



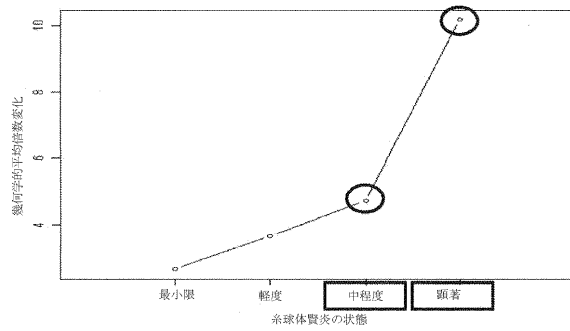
【図3 b】



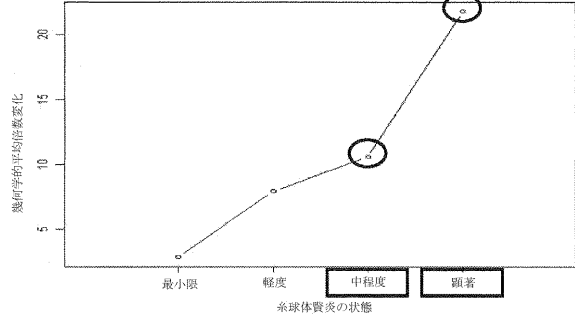
【図4 b】



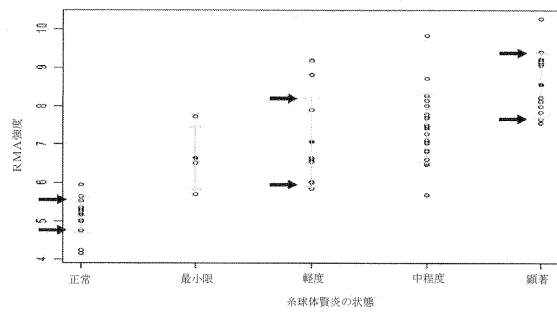
【図5 a】



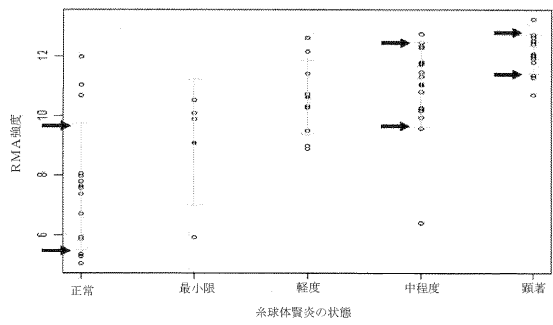
【図6 a】



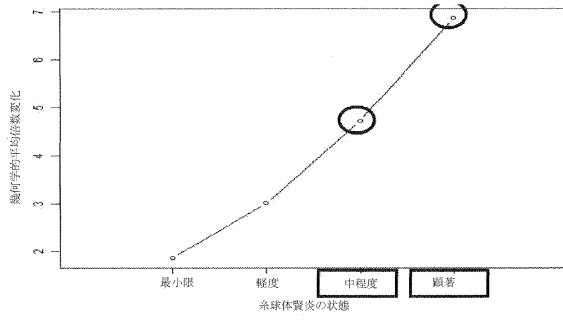
【図5 b】



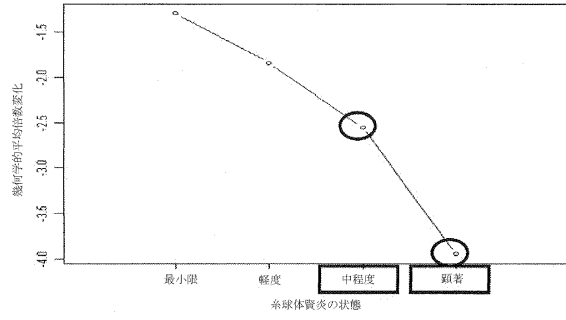
【図6 b】



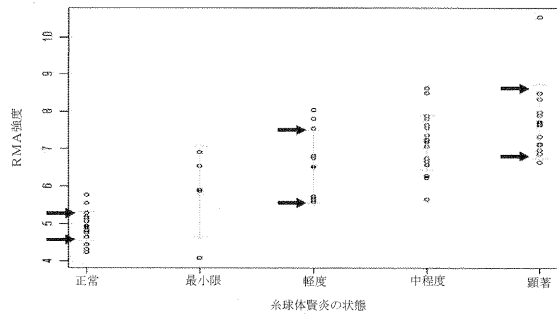
【図7 a】



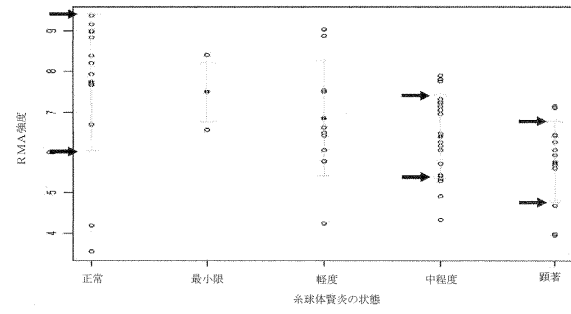
【図8 a】



【図7 b】



【図8 b】



【配列表】

0005808825000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 シャンミン・ガオ  
アメリカ合衆国 6 6 6 1 5 カンザス州トピーカ、サウスウエスト・レッド・オークス・コート 1 0  
3 2 番
- (72)発明者 スカスワミ・マラディ  
アメリカ合衆国 6 6 0 4 9 カンザス州ローレンス、コロニアル・サークル 1 0 0 5 番

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 0 7 9 2 8 0 ( W O , A 1 )  
Journal of Immunological Methods, 2 0 0 8 年, Vol.329, p.208-213  
日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2 0 0 1 年, Vol.132, p.139  
獣医畜産新報, 2 0 0 4 年, Vol.57, No.1, p.46-51  
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2 0 0 5 年, Vol.46, No.2, p.479-486  
Journal of Feline Medicine and Surgery, 2 0 0 0 年, Vol.2, p.75-82  
Molecular Cancer Therapeutics, 2 0 1 0 年, Vol.9, No.6, p.1680-1687

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 0

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	用于诊断和治疗猫肾病的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5808825B2</a>	公开(公告)日	2015-11-10
申请号	JP2013555404	申请日	2011-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	希尔氏宠物营养品公司		
申请(专利权)人(译)	希尔斯宠物玉女山公司		
当前申请(专利权)人(译)	希尔斯宠物玉女山公司		
[标]发明人	サメルワリードアルムラニ シャンミンガオ スカスワミマラディ		
发明人	サメル・ワリード・アルムラニ シャンミン・ガオ スカスワミ・マラディ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N37/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A23K50/40 C12Q2600/112 G01N33/6893 G01N2800/347 C12Q1/6883		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N37/00.102 G01N33/53.D C12N15/00.A		
其他公开文献	JP2014507159A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译) 本发明涉及从猫科动物中筛选生物样品的方法，包括培养lumican，胶原α1(III)链，突变体12;核心蛋白聚糖;分泌的卷曲蛋白相关蛋白2;视黄醇结合蛋白5; MMP-一种诊断猫肾病的存在的方法，包括测量选自MMP-7和MMP-19的一种或多种生物标志物的表达水平，其中所述对照在来自正常动物的样品中表达与该值相比，样品中一种或多种生物标志物的表达差异表明存在肾病;治疗如此诊断的猫的方法;和如所定义的方法为...提供套件。	(21) 出願番号	特願2013-555404 (P2013-555404)	(73) 特許権者	502328223 ヒルズ・ペット・ニュートリション・イン コーポレーテッド アメリカ合衆国カンザス州66603, ト ビーカ, サウスウエスト・エイズ・アベニ ュー 400
	(86) (22) 出願日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)	(74) 代理人	110001874 特許業務法人IPYS特許事務所
(65) 公表番号	特表2014-507159 (P2014-507159A)	(72) 発明者	サメル・ワリード・アルムラニ アメリカ合衆国66614カンザス州トビ ーカ、サウスウエスト・ラギート・コート 2513番	
(43) 公表日	平成26年3月27日 (2014. 3. 27)			
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/026032			
(87) 国際公開番号	WO2012/115648			
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012. 8. 30)			
審査請求日	平成25年9月6日 (2013. 9. 6)			