

(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2015-507196
(P2015-507196A)

(43) 公表日 平成27年3月5日(2015.3.5)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2014-555211 (P2014-555211)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月31日 (2013.1.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月16日 (2014.9.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/051964
 (87) 国際公開番号 W02013/113852
 (87) 国際公開日 平成25年8月8日 (2013.8.8)
 (31) 優先権主張番号 1250917
 (32) 優先日 平成24年1月31日 (2012.1.31)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 500262120
 ユニヴェルシテ・ドゥ・ストラズブール
 UNIVERSITE DE STRASBOURG
 フランス エフ-67000 ストラズブール
 リュー ブレーズ パスカール 4
 (71) 出願人 595040744
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエル
 シュ・シャンティフィク
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

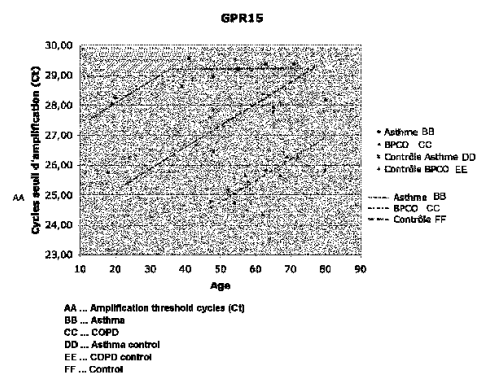
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性炎症性肺疾患のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、GPR15 Gタンパク質共役受容体遺伝子の発現のレベルを疾患のバイオマーカーとして使用した、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び/又は予後診断及び/又は評価のためのインビトロの方法に関する。

Figure 3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者が喘息に又は慢性閉塞性肺疾患（COPD）に苦しんでいるか否かを決定することを可能にする診断のインビトロの方法であって、Gタンパク質共役受容体15（GPR15）遺伝子発現レベルを、患者からの生物学的サンプル中で測定し、GPR15の過小発現が喘息を示しており、GPR15の過剰発現がCOPDを示している方法。

【請求項 2】

被験者における喘息の診断のためのインビトロの方法であって、GPR15遺伝子発現レベルを、患者からの生物学的サンプル中で測定し、GPR15の過小発現が喘息を示している方法。

10

【請求項 3】

GPR15遺伝子発現レベルを参照発現レベルと比較する、請求項1又は2記載のインビトロの方法。

【請求項 4】

参照発現レベルが患者の年齢を考慮に入れる、請求項3記載のインビトロの方法。

【請求項 5】

被験者におけるCOPDの診断のためのインビトロの方法であって、GPR15遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定し、GPR15遺伝子発現レベルを、患者の年齢を考慮に入れた参照発現レベルと比較し、GPR15の過剰発現がCOPDを示している方法。

20

【請求項 6】

GPR15遺伝子発現レベルを、GPR15タンパク質の量を測定することにより決定する、請求項1～5のいずれか一項記載のインビトロの方法。

【請求項 7】

GPR15タンパク質の量を、免疫蛍光、化学発光、免疫組織化学、免疫細胞化学、ELISA、Taqman（登録商標）タンパク質アッセイ、又はタンパク質もしくは抗体チップにより測定する、請求項6記載のインビトロの方法。

【請求項 8】

GPR15遺伝子発現レベルを、GPR15タンパク質をコードするmRNAの量を測定することにより決定する、請求項1～5のいずれか一項記載のインビトロの方法。

30

【請求項 9】

GPR15 mRNAの量は、リアルタイム定量的RT-PCR技術を用いて、マイクロ流体技術を用いて、RNAチップを用いて、又はLCR、TMA、PCE、bDNA、もしくはハイスループットシーケンシング方法を用いて測定される、請求項8記載のインビトロの方法。

【請求項 10】

生物学的サンプルが血液サンプルである、請求項1～9のいずれか一項記載のインビトロの方法。

【請求項 11】

GPR15遺伝子発現産物を白血球中で検出する、請求項10記載のインビトロの方法。

40

【請求項 12】

被験者の年齢を考慮に入れながら、被験者における喘息及びCOPDの鑑別診断のための又は被験者における喘息の診断のための、又は被験者におけるCOPDの診断のためのGPR15遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬を含むキットの使用。

【請求項 13】

被験者におけるCOPDの診断のためのキットの使用であって、キットが、GPR15遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬、及び、年齢を考慮に入れた参照GPR15発現レベルに関する情報を含む使用。

【請求項 14】

50

試薬が、GPR15に対して向けられたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、GPR15の天然又は合成リガンド、及びGPR15タンパク質をコードするmRNAのフラグメントと特異的にハイブリダイズすることが可能な核酸配列より選ばれる、請求項12又は13記載の使用。

【請求項15】

被験者の年齢を考慮に入れながら、被験者における喘息及びCOPDの鑑別診断のための、被験者における喘息の診断のための、又は被験者におけるCOPDの診断のためのGPR15遺伝子発現産物のインビトロの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、慢性炎症性肺疾患、具体的には個体における喘息及び慢性閉塞性肺疾患(COPD)を診断するための新規バイオマーカーの使用に関する。本発明に従ったバイオマーカーは、また、慢性炎症性肺疾患を発症する被験者の感受性を決定し、及び/又は、影響された被験者において慢性炎症性肺疾患の進行をモニターすることを可能にする。特に、バイオマーカーは、喘息及びCOPDを鑑別することを可能にする。

【0002】

本発明の文脈

慢性炎症性肺疾患は、変動する程度まで呼吸器系に影響し、数十年の間に、特に先進国において大きく増加している。今日では、これらの疾患に関連する世界中での死亡者数は、1年間当たり300万人を上回ると推定される。ドックにおける主な環境因子は、喫煙及び不良な空気の質である。このように、先進国において、化学汚染物質の空気中での増加は、新たな症例の出現に、及び既に列挙されている症例の悪化に寄与する。これらの間で、気道の慢性炎症性疾患は、主に喘息及び慢性閉塞性肺疾患であり、それらは、しかし、逆の炎症性プロファイルを示す。

20

【0003】

喘息は、先進国において最も広まっており、全ての年齢カテゴリーに影響を与える慢性炎症性肺疾患である。喘息は、必ずしも遺伝的起源を有さない多因子疾患である。それは、主に炎症性気管支により特徴付けられ、それらの直径における低下に寄与し、このように、喘息のある人が呼吸中に息を吐くことを困難にする。この炎症は可逆的であり、喘息のある人は、喘息発作外で、疾患の特定の症状を示さないことがありうるようになる。原因、喘息発作の数及び頻度に依存して、用語、断続的喘息、軽度の持続性喘息、中程度の持続性喘息、及び重度の持続性喘息が使用される。また、喘息、慢性、アレルギー性、運動誘発性などの性質に依存して、診断は、確立することがより困難でありうる。一般的に、反復喘息発作の発生の後だけで、患者の肺の呼吸/換気機能の徹底的な検査が行われる。関連するテスト、例えば気管支過敏テスト又は気管支拡張薬(bronchiodilatator)可逆性テストなどが、患者のために試されており、結果を、介護スタッフが、喘息の性質、疾患の状況、検査等の時での患者の身体的健康の状況に依存して、解釈することが時折困難でありうる。

30

【0004】

40

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、その一部について、呼吸器系のいくつかの慢性疾患(慢性気管支炎及び肺気腫を含む)と一緒にグループ化される。COPDは、ベータ2アドレナリン作動性アゴニストと完全には可逆的ではなく、徐々に悪化する気管支閉塞に主に起因する、呼気流量における減少により特徴付けられる。COPDは、喫煙に関連する、最も広まっている病理学的状態の1つであり、世界の成人人口の4%と10%の間に罹患し、年齢40歳を上回る成人におけるより大きな有病率を伴う。一般的に、COPDの症状は、咳、喀痰、及び運動の間での増加した息切れを含む。重症度の診断は、気管支閉塞の程度を測定する、機能呼吸テストに基づく。現在、機能検査を介したCOPDについてのスクリーニングは制限されている。なぜなら、この検査はあまり利用可能ではなく、未診断の罹患患者の割合が40%を上回ると推定されているからである。

50

【0005】

さらに、喘息及びCOPDの鑑別診断は、しばしば、かなり複雑であることが証明される。模倣体ベータ2アゴニストを用いた気管支可逆性テストの結果は、常に明かなわけではない。しかし、適切な処置の選択のために、及び、また、臨床治験に入る患者の特徴付けのために、これら2つの病理学的状態の間で明らかに区別することが重要である。

【0006】

これらの慢性炎症性肺疾患の診断の制約及び困難さに直面して、効果的で確実なバイオマーカーの開発は、これらの疾患をより簡単に診断し、それらを早期ステージでスクリーニングし、その予後診断を確立し、及び、それらに適切な処置を可能な限り早期に与えることにより、患者の処置を改善することを可能にするであろう。そのようなバイオマーカーの利益は、i) 通常の臨床診療での適切な処置の迅速な指示(社会的利点)、及びii) 新たな分子のための又は新たな治療法のための臨床治験に入る患者のより細かな特徴付け(産業的利点)でありうる。

10

【0007】

発明の概要

本発明は、特定のバイオマーカー(その発現プロファイルは、これらの疾患を代表している)の使用を提案することにより、慢性炎症性肺疾患のスクリーニング及び診断と、ならびに患者における疾患の進行のモニタリングと関連付けられる困難を克服することを目的とする。特に、本発明は、喘息及びCOPDの鑑別診断のために有用である。あるいは、本発明は、喘息の診断のために有用である。さらに、それは、また、COPDの診断のために有用である。

20

【0008】

本発明者らは、Gタンパク質共役型受容体GPR15の遺伝子の発現の分析は、予想外に、慢性炎症性肺疾患、及びかなり特に喘息及びCOPDの特徴付けのために特に適していることを実証した。GPR15遺伝子発現プロファイルの分析によって、疾患への外部の要因とは非依存的に、被験者が1つ又は別の慢性炎症性肺疾患に苦しんでいるか否かを迅速かつ確実に確立することが可能になる:本発明者らは、患者が喘息又はCOPDに苦しんでいるか否かに依存して、異なるGPR15遺伝子発現プロファイルを示すことを発見した。本発明に従ったバイオマーカーは、従って、患者が、喘息又はCOPDに苦しんでいるか否かを決定することを可能にする。本発明に従ったGPR15遺伝子発現プロファイルの使用によって、単純な生物学的サンプル、特に患者からの血液サンプルから診断を確立し、それにより、そのような診断を単純で安価にする。また、慢性炎症性肺疾患に苦しんでいる患者における本発明に従ったバイオマーカーの発現プロファイルの経時的なモニタリングによって、処置を伴い又は伴わず、疾患の進行を試験し、あるいはその進行を予測することが可能になる。特に、バイオマーカーを使用して、疾患のステージを決定することができる。最後に、本発明に従ったGPR15遺伝子発現プロファイルの使用によって、患者のための最も適した処置を選択すること、及び/又は特定の臨床的な経過観察を要求する患者を選択することが可能になる。

30

【0009】

このように、本発明の主題は、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び/又は予後診断及び/又は評価のためのインビトロ又はエクスピボの方法であって、それに従い、GPR15遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定する。

40

【0010】

本発明の1つの特定の例において、方法は、被験者における喘息の進行を診断/予測/評価するために実施し、GPR15遺伝子の過小発現は喘息を示している。

【0011】

本発明の別の特定の例において、方法は、被験者におけるCOPDの進行を診断/予測/評価するために実施し、GPR15遺伝子の過剰発現はCOPDを示している。このように、本発明は、被験者におけるCOPDの診断のためのインビトロの方法に関し、それにおいて、Gタンパク質共役受容体15(GPR15)遺伝子発現レベルを、被験者から

50

の生物学的サンプル中で測定し、GPR15 遺伝子発現レベルを、患者の年齢を考慮に入れた参照発現レベルと比較し、GPR15 の過剰発現はCOPDを示している。

【0012】

このように、本発明は、患者が、喘息に又は慢性閉塞性肺疾患(COPD)に苦しんでいるか否かを決定することを可能にする診断のインビトロの方法に関し、それにおいて、Gタンパク質共役受容体15(GPR15) 遺伝子発現レベルを、患者からの生物学的サンプル中で測定し、GPR15 の過小発現は喘息を示しており、GPR15 の過剰発現はCOPDを示している。

【0013】

診断/予後診断を提供すべき被験者からの生物学的サンプル中でのGPR15 遺伝子発現レベルを、参照発現レベルと比較する。好ましくは、参照発現レベルでは、患者の年齢を考慮に入れる。

10

【0014】

本発明は、被験者における喘息及び/又はCOPDの診断のためのインビトロの方法に関し、それにおいて、GPR15 遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定し、GPR15 遺伝子発現レベルを、患者の年齢を考慮に入れた参照発現レベルと比較し、GPR15 の過剰発現はCOPDを示しており、GPR15 の過小発現は喘息を示している。

【0015】

本発明に従い、GPR15 遺伝子発現レベルは、有利には、例えば、GPR15 発現を測定するための少なくとも1つの特定の方法を使用して、転写されたmRNAの量を測定することにより及び/又はGPR15 タンパク質の量を測定することにより、核酸及び/又はタンパク質レベルで測定される。GPR15 遺伝子の発現を核酸レベルで検出することを可能にする技術が、当業者に周知である。検出は、特に、リアルタイム定量的RT-PCR、マイクロ流体技術、DNAチップ、ハイスループットmRNAシーケンシング、又は任意の適切なmRNA定量技術、例えばRNAチップ又はLCR(「リガーゼ連鎖反応」)、TMA(「転写媒介増幅」)、PCE(「増幅酵素免疫」)、及びbDNA(「分岐DNAシグナル増幅」)方法などにより行うことができる。GPR15 遺伝子の発現をタンパク質レベルで検出することを可能にする技術が、また、当業者に周知であり、特に、フローサイトメトリー、定量的免疫細胞化学、細胞性ELISA、Taqman(登録商標)タンパク質アッセイ(Taqman(登録商標)Protein Assay, Applied Biosystems)、場合により質量分析に共役されたタンパク質又は抗体チップ、標識リガンド等の結合などを含むことができる。

20

30

【0016】

本発明の実施の1例に従い、生物学的サンプルは全血液サンプルであり、GPR15 遺伝子発現産物の検出は、好ましくは、全白血球集団で行われる。

【0017】

本発明の別の主題は、好ましくは、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び/又は予後診断及び/又は評価のための、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体又はGPR15 タンパク質と特異的に相互作用することが可能な分子もしくは巨大分子の任意の他の型、天然又は合成リガンド、あるいはGPR15 をコードするmRNAのフラグメントと特異的にハイブリダイズすることが可能な核酸配列より選ばれた、GPR15 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬を含むキットの使用に関する。慢性炎症性肺疾患は喘息又はCOPDでありうる。本発明は、被験者における喘息の診断又は喘息及びCOPDの鑑別診断のための、GPR15 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬を含むキットの使用に関する。本発明は、また、被験者におけるCOPDの診断のための、GPR15 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬、及び、年齢を考慮に入れた参照GPR15 発現レベルに関する情報を含むキットの使用に関する。

40

【0018】

50

本発明の主題は、また、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び／又は予後診断及び／又は評価のためのバイオマーカーとしてのGPR15遺伝子発現産物のインビトロ又はエキスピボでの使用である。好ましくは、慢性炎症性肺疾患は喘息又はCOPDである。また、本発明は、被験者における喘息及びCOPDの鑑別診断のためのバイオマーカーとしてのGPR15遺伝子発現産物のインビトロ又はエキスピボでの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】慢性炎症性肺疾患のためのバイオマーカーとしてのGPR15の選択をもたらした決定木の図的表現。

【図2】喘息に又はCOPDに苦しんでいる患者におけるGPR15遺伝子発現プロファイルを、これらの疾患を提示しない対照ボランティアにおける発現プロファイルと比較して示すボックスプロット。

【図3】年齢の関数としての増幅閾値サイクル(Ct)として表す、喘息に又はCOPDに苦しむ患者対これらの疾患を提示しない対照におけるGPR15遺伝子発現。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明は、Gタンパク質共役受容体15 [GPR15、GPCR15、又はBOB (Brother of Bonzo)] 遺伝子の発現プロファイルの試験に基づく。

【0021】

Gタンパク質共役受容体ファミリーは、多くの膜受容体(GPR15を含む)と一緒にグループ化する。GPR15をコードする遺伝子は、ヒトにおける染色体3q11.2-q13.1上に位置付けられる(Heiber et al, Genomics 32, 462-465, 1995)。今日まで、GPR15とヒト免疫不全ウイルス(HIV)による感染の間での関連が実証されている(Blaak et al, Journal of virology, 79: 1686-1700, 2005, - Okamoto & Shikano, Journal of Biological Chemistry 286, 7171-7181, 2001)。GPR15は、循環リンパ球中へのHIV侵入のための共受容体であると考えられる。

【0022】

本文書において使用する通り、用語「GPR15」は、Gタンパク質共役受容体15を指す。それは、以下の参考文献下の遺伝子データベース中に記載されている: HGNC: 4469; GeneID: 2838; RefSeq Protein: NP_005281.1; RefSeq ARN: NM_005290.1。もちろん、GPR15はヒトのものに関する。

【0023】

驚くべきことに、本発明者らは、GPR15発現と慢性炎症性肺疾患の間での相関を実証している。特に、本発明者らは、GPR15遺伝子発現プロファイルの分析によって、被験者が慢性炎症性肺疾患に苦しんでいるか否かを確実に決定すること、及び、有利には、喘息に苦しんでいる被験者を、COPDに苦しんでいる被験者から鑑別することを可能にすることを発見した。

【0024】

このように、本発明は、また、特に、慢性炎症性肺疾患を診断するための、しかし、また、慢性炎症性肺疾患の進行の予後診断及びモニタリングのためのバイオマーカーとしてGPR15遺伝子発現産物を使用することを提案する。好ましくは、慢性炎症性肺疾患は喘息又はCOPDである。特に、それは、喘息及びCOPDの鑑別診断のための、即ち、喘息に苦しんでいる被験者から、COPDに苦しんでいる被験者を鑑別するためのバイオマーカーとしてGPR15遺伝子発現産物を使用することを提案する。

【0025】

特に、本発明は、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び／又は予後診断及び／又は評価のためのインビトロ又はエキスピボの方法を提案し、それに従い、Gタンパク質共役受容体15(GPR15)遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定する。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明の文脈において、「被験者」又は「患者」は、任意の哺乳動物被験者又は患者、好ましくはヒト被験者又は患者（特に小児及び成人を含む）を含む。

【0027】

用語「慢性炎症性肺疾患」は、気道の慢性炎症性疾患、及び、より具体的には、喘息及び慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎及び肺気腫を含む）を意味することを意図する。

【0028】

本発明の文脈において、「診断」の目的は、被験者において、慢性炎症性肺疾患を、そのステージを問わず、検出及び／又は同定することである。特に、診断は、被験者が、喘息に又はCOPDに苦しんでいるか否かを決定することを可能にする。

10

【0029】

「予後診断」は、疾患を発生する感受性に関する、及び／又はより進行性のステージ／程度に向かう進行の感受性に関する、及び／又は合併症の及び憎悪のリスクに関する、及び／又はその転帰などに関する疾患の評価であると理解される。

【0030】

「疾患の進行の評価」は、以前に診断された、又は予後診断が以前に提供された、疾患の進行の経時的な分析に対応する。経時的なそのようなモニタリングは、処置を選択、検証、及び／又は適応することを可能にする。それによって、また、患者について要求される臨床的な経過観察の強度を決定することが可能になる。この経過観察によって、処置が必要であるか否かをいつでも決定することが可能になる。

20

【0031】

本発明は、また、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行を診断及び／又は予測及び／又は評価するために有用でありうる情報を提供するための方法を提案し、それに従い、GPR15遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定する。好ましくは、慢性炎症性肺疾患は喘息又はCOPDである。特に、本発明は、患者において喘息又はCOPDを鑑別診断するために、即ち、喘息に苦しんでいる被験者を、COPDに苦しんでいる被験者から鑑別するために有用でありうる情報を提供するための方法を提案する。本発明に従い、GPR15は、慢性炎症性肺疾患、より具体的には、COPD及び喘息の予後診断及び／又は診断のための、ならびに、また、喘息及びCOPDの鑑別診断のためのバイオマーカーとして使用することができる。

30

【0032】

同様に、GPR15は、慢性炎症性肺疾患を有するとして診断された、ならびに／あるいは、そのような疾患を発生しやすい及び／又はより進行性／重度のステージを伴うそのような疾患を発生しやすい及び／又は合併症及び／又は憎悪を発生しやすいとして予測された被験者をモニターするためのバイオマーカーとして使用することができる。好ましくは、慢性炎症性肺疾患は喘息である。あるいは、慢性炎症性肺疾患はCOPDである。

【0033】

そのようなバイオマーカーは、また、特定の処置から利益を得ることが可能な慢性炎症性肺疾患に苦しんでいる被験者の選択のために及び／又は処置の間に慢性炎症性肺疾患に苦しんでいる被験者において疾患の進行を評価するために使用することができる。GPR15は、このように、慢性炎症性肺疾患に苦しんでいる被験者の処置の選択、評価、及び適応のためのバイオマーカーとして役立つ。本発明は、患者が、喘息に又はCOPDに苦しんでいるか否かに従って、適切な処置を選ぶために、かなり特に有用である。

40

【0034】

本発明に従い、GPR15は、慢性炎症性肺疾患、より具体的には喘息及びCOPDのためのバイオマーカーとして使用する。

【0035】

GPR15遺伝子発現プロファイルを、種々の方法において、特に、被験者からの生物学的サンプルからのこの遺伝子の発現産物の量を測定することにより、決定することにより、又はアッセイすることにより、産生することができる。サンプルは、好ましくは、被

50

験者からの生物学的体液（例えば血液など）に由来する細胞サンプルである。1つの好ましい実施態様において、被験者からのサンプルは、白血球を含むサンプルである。本発明に従った方法は、サンプリング工程及び/又はサンプルを調製/精製する工程を含みうる。

【0036】

GPR15 遺伝子発現産物は、この遺伝子の転写又は翻訳産物、例えばその mRNA 又は G タンパク質共役受容体 GPR15 自体などに対応する。

【0037】

GPR15 タンパク質の量は、当業者に公知の任意の方法により決定することができる。従来は、これらの方法は、サンプルを、GPR15 タンパク質の選択的リガンド、例えば GPR15 特異的エピトープに対して向けられた抗体、又はこの抗体のフラグメントもしくは誘導体、又は強い親和性を用いて受容体に結合する内在性リガンドもしくは小分子などと接触させる工程を含む。

10

【0038】

一般的に、本発明において使用される抗 GPR15 抗体は、抗体又はマイクロモル以下の親和性を用いて GPR15 に特異的に結合する任意のタンパク質分子などである。それらは、例えば、モノクローナル抗体又は単一特異性ポリクローナル抗体、即ち、1つのエピトープだけを特異的に認識する抗体である。好ましくは、抗体は、受容体の細胞外部分について特異的でありうる。

20

【0039】

これらの抗体は、特に、産生の任意の従来の方法により得ることができる。特に、抗 GPR15 抗体は、GPR15 を用いた又はその抗原性配列を用いた非ヒト動物（ウサギ、マウスなど）の免疫化、得られた抗血清のサンプリング及び次に枯渴（例えば GPR15 を含む免疫吸着剤上）により、当業者に公知の方法に従って、得ることができる。

【0040】

GPR15 タンパク質の量は、フローサイトメトリー技術、免疫学的アッセイ（ELISA、EIA、RIA など）、放射性免疫、化学発光又は蛍光アッセイ、免疫電気泳動法、免疫沈降法、質量分析の使用などを使用して測定することができる。この方法は、最も一般には、標識、例えば蛍光性、放射性、又は酵素的標識などを明らかにする、あるいは、着色分子、又は、より一般的には、抗原/抗体複合体の形成を実証することを可能にする任意の標識又は GPR15 とタンパク質分子もしくは合成分子（アプタマー、リガンドなど）のいずれかの間での相互作用を実証することを可能にする任意の生物物理学的方法を使用する工程を含む。

30

【0041】

本発明に従い、GPR15 遺伝子の mRNA を、当業者に公知の任意の方法により検出することができる。一般的に、これらの方法は、当業者に周知の技術を用いて、例えば、溶解酵素、適切な化学溶液、又は特定の抽出樹脂を使用して、生物学的サンプル中に含まれる核酸を抽出する最初の工程を要求する。前記 mRNA は、次に、前記 mRNA とのハイブリダイゼーション、それに続く、得られた、有利に標識されたハイブリッド形態のアッセイを許す条件下で、GPR15 mRNA について特異的な、有利に標識された核酸プローブと接触させる。抽出した mRNA は、また、（例えば、RT-PCR 技術を使用して）プレ増幅することができる。RT-PCR（「逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」）技術、及び特にリアルタイム定量的 RT-PCR が、特に好ましい。あるいは、核酸を検出するための他の方法を使用することができる：例えば LCR（「リガーゼ連鎖反応」）、TMA（「転写媒介増幅」）、PCE（「酵素増幅免疫測定法」）、bDNA 法（「分岐 DNA シグナル増幅」）、及びハイスループットシーケンシング方法など。典型的には、GPR15 遺伝子の RNA の検出は、以下により行われる：

40

- 生物学的サンプル（例えば全血液サンプルなど）からの全又はメッセンジャー RNA の取得、

- 逆転写による cDNA 合成、

50

- G P R 1 5 遺伝子について特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの存在における c D N A の P C R 増幅、

- 特に、ハイブリダイゼーション、それに続く、得られた、有利に標識されたハイブリッド形態のアッセイを許す条件下で、G P R 1 5 m R N A について特異的な、有利に標識された核酸プローブと接触させることによる（間接的検出）、P C R 産物の定量化。

【 0 0 4 2 】

本発明の1つの特定の実施態様に従い、患者からの生物学的サンプル中でのG P R 1 5 遺伝子産物の発現プロファイル、G P R 1 5 遺伝子産物の参照発現プロファイルと比較する。この参照発現プロファイルは、対照生物学的サンプルから得られたものでありうる。もちろん、対照発現プロファイルは、対照生物学的サンプルのパネルについて得られた発現プロファイルの平均値又は中央値に対応しうる。分析すべき被験者からのサンプル中で及び対照サンプル中で得られた発現レベルは、有利には、慢性炎症性肺疾患を伴う被験者における及び健康被験者における安定した発現レベルを有することが公知であるタンパク質、例えばヒト白血球m R N A についてのH P R T 1（ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1）、T B P（T A T A 結合タンパク質）、又はT F R C（トランスフェリン受容体タンパク質1）、及び、例えばタンパク質サンプルについてのアクチン又はG A P D H（グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ）などの発現レベルを使用して標準化する。

10

【 0 0 4 3 】

優先的に、生物学的サンプル中での患者の発現プロファイルを産生するために及び対照発現プロファイルを産生するために分析されたG P R 1 5 遺伝子産物は、同一であり、使用されたサンプルの性質と同様である。それらは、しかし、シーケンシングにより実証されうる可能な変異を含みうる。

20

【 0 0 4 4 】

実施の一例において、参照発現プロファイルは、慢性炎症性肺疾患を有しやしくない被験者からの生物学的サンプルから産生される。そのような参照発現プロファイルによって、特に、疾患の非常に早期のステージで慢性炎症性肺疾患を診断することが可能になる。

【 0 0 4 5 】

実施の別の例において、参照発現プロファイルは、診断された慢性炎症性肺疾患を有する被験者からの生物学的サンプルから産生され、そのステージ/程度が有利に公知である。疾患のステージの各々について、慢性炎症性肺疾患を有するとして診断された被験者の生物学的サンプルから参照発現プロファイルを産生することは特に有利でありうる。そのようなプロファイルは、特に、合併症及び/又は増悪のリスクを評価するために、ならびに/あるいは処置を選択、適応、改変、開始、又は停止するために、被験者における疾患の進行をモニターするために特に有用でありうる。

30

【 0 0 4 6 】

例えば、喘息の場合において、G I N A（“global initiative for asthma”）分類（2006、2011）に従って、あるいは重症度のステージ：断続的又は軽度、中等度、もしくは重度、持続性（2002 G I N A）に従って、「制御」又は「非制御」として記載される、喘息を有するとして診断された被験者から参照発現プロファイルを産生することが可能である。喘息は、また、促進因子（例えばアレルギーなど）に従って記載してもよく、用語「アレルギー性喘息」又は「非アレルギー性喘息」を次に使用する。

40

【 0 0 4 7 】

同様に、C O P D の場合において、慢性気管支炎を有するとして診断された被験者から、肺気腫を有するとして診断された被験者から、ならびに慢性気管支炎及び肺気腫を有するとして診断された被験者から参照発現プロファイルを産生することが可能である。気管支閉塞の程度を考慮に入れることも可能である（ティフノー指数：F E V 1 / F V C < 70%）。例えば、軽度（F E V 1 80%）、中等度（50% F E V 1 80%）、重度（30% F E V 1 50%）、及び非常に重度（F E V 1 < 30%）の慢性気管支炎を有する被験者から参照発現プロファイルを産生することが可能である。

50

【0048】

驚くべきことに、本発明者らは、GPR15発現レベルと被験者の年齢の間での相関を実証している。この観察は、喘息に苦しんでいる全ての患者、COPDに苦しんでいる者、及び全ての対照被験者について拡大されている。特に、図3に示す通り、喘息に苦しんでいる患者は、年齢に従って一定である低いGPR15発現レベル（特に、検出するために、高い数の増幅サイクルが要求される）を示す。逆に、対照（健常）被験者及びCOPD被験者は、年齢に従って減少するGPR15発現レベルを示すことが観察されている。COPDについて、本発明者らは、年齢パラメータを絶対的に考慮に入れなければならないことを実証している。このように、優先的に、参照発現レベルでは、患者の年齢を考慮に入れる。しかし、また、COPDと喘息を鑑別するために、2群が十分に互いに別個であるため、被験者の年齢パラメータが、場合により、無視することができることが注意されうる。参照発現プロファイルは、従って、対照被験者の年齢の関数として産生することができる。患者についてのGPR15発現レベルは、次に、有利に、同じ年齢カテゴリー（患者の年齢 \pm 2.5歳）の対照の参照レベルと比較する。

10

【0049】

疾患の症状は、COPDに苦しんでいる患者（>40歳）について遅く、喘息患者についてより早期に現れるため、対照集団の年齢は、優先的に、18~85歳までの層において上昇する。

【0050】

年齢カテゴリーに従ったそのような分類は、特定の年齢で現れることが公知である慢性肺疾患の診断又は予後診断のために特に有利でありうる。この分類は、また、疾患の、特にCOPDについての進行を評価するために有用であることが証明されうるが、患者の年齢に従ったその進行は、迅速及び/又は決定的でありうる。

20

【0051】

対照発現プロファイルを産生するための上を示す種々の基準は、互いに関して排他的ではない。例えば、疾患のステージ及び被験者の年齢に従って参照発現プロファイルを産生することが、特に有利でありうる。

【0052】

本発明者らは、喘息に苦しんでいる患者が、COPDに苦しんでいる患者の発現プロファイルとは逆のGPR15遺伝子発現プロファイルを示すことを発見した。このように、GPR15バイオマーカーの使用は、被験者がこれら2つの慢性肺疾患の1つ又はもう1つに苦しんでいるか否かを確実に決定することについて特に関連することが証明される。

30

【0053】

より具体的には、喘息に苦しんでいる被験者は、この疾患に苦しんでいない対照被験者におけるGPR15遺伝子産物発現と比較して、GPR15遺伝子産物発現における減少を示す。逆に、COPDに苦しんでいる被験者は、この疾患に苦しんでいない対照被験者におけるGPR15遺伝子産物の発現と比較して、GPR15遺伝子産物の過剰発現を示す。

【0054】

本発明の実施の一例において、方法は、被験者におけるGPR15遺伝子産物発現レベルが、参照発現レベルと比較して高い又は低いかを決定するための工程を含む。

40

【0055】

実施の一例において、参照発現レベルが、GPR15遺伝子産物の正常な発現レベル、即ち、任意の慢性炎症性肺疾患外のレベルに対応すると考えられる。被験者における発現レベルは、前記レベルが、例えば、標準化後の参照発現レベルよりも少なくとも20%、30%、40%、又は50%高く、優先的には、少なくとも100%、150%、又は200%高い場合、高いと考えられ、従って、過剰発現を示す。逆に、被験者における発現レベルは、前記レベルが、例えば、標準化後の参照発現レベルよりも少なくとも20%、30%、40%、又は50%低く、好ましくは、少なくとも100%、150%、又は200%低い場合、低いと考えられ、従って、過小発現を示す。所与の時間tでの患者自身のGPR15

50

遺伝子産物発現レベルは、時刻 $t + 1$ での前記患者の疾患の進行をモニターするための参照発現レベルとして役立つ。時間 t での患者の G P R 1 5 遺伝子産物発現レベルと比較した、 $t + 1$ での患者の G P R 1 5 遺伝子産物の過剰発現又は過小発現が、観察された疾患に従った、前記患者の健康の状況の改善又は劣化を示しうる。

【 0 0 5 6 】

実施の別の例において、参照発現レベルは、喘息に（喘息の診断のために）又は C O P D に（その診断のために）苦しんでいる患者の集団についての G P R 1 5 遺伝子産物発現レベルに対応すると考えられる。このように、参照曲線又はクラウドは、喘息及び / 又は C O P D について、年齢の関数として定義されうる。一度、診断すべき被験者について G P R 1 5 遺伝子産物の発現が決定されると、前記発現を、患者の年齢を考慮に入れながら、これらの参照曲線又はクラウドと比較し、被験者が C O P D に又は喘息に苦しんでいるか否かが決定されうる。

10

【 0 0 5 7 】

さらに、G P R 1 5 遺伝子発現プロファイルを使用して、慢性肺疾患、特に C O P D のステージを決定することが提案される。このように、G P R 1 5 遺伝子発現の参照は、C O P D の各々のステージについて決定されるであろう。好ましくは、これらの G P R 1 5 遺伝子発現の参照では、C O P D のステージ及び患者の年齢を考慮に入れる。このように、本発明は、被験者の C O P D のステージを決定するためのインビトロの方法に関し、それにおいて、G P R 1 5 遺伝子発現レベルを、被験者からの生物学的サンプル中で測定し、G P R 1 5 遺伝子発現レベルを、C O P D のステージ及び好ましくは被験者の年齢を考慮に入れた参照発現レベルと比較し、この比較に基づき、被験者における C O P D のステージが決定される。患者の情報は、参照データのセットの文脈中に置かれ、このように、考慮下の患者の病理学的状態の状況を決定することを可能にする。上に記載する特定の実施態様は、この方法において適用可能である。

20

【 0 0 5 8 】

本発明の別の主題は、被験者における慢性炎症性肺疾患の進行の診断及び / 又は予後診断及び / 又は評価のための、マイクロモル以下の親和性を伴い G P R 1 5 に特異的に結合する G P R 1 5 又は任意のタンパク質分子などに対して向けられたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、G P R 1 5 をコードする m R N A の又は c D N A のフラグメントと特異的にハイブリダイズすることが可能なプローブ、及び G P R 1 5 をコードする m R N A について又は c D N A について特異的な核酸プライマーの少なくとも1つの対より選ばれた、G P R 1 5 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬を含むキットの使用である。好ましくは、慢性炎症性肺疾患は喘息又は C O P D である。また、本発明は、被験者における喘息及び C O P D の鑑別診断のための、G P R 1 5 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬を含むキットの使用に関する。

30

【 0 0 5 9 】

1つの特定の実施態様において、本発明は、C O P D の診断のための、G P R 1 5 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬及び年齢を考慮に入れた参照 G P R 1 5 発現レベルに関する情報を含むキットの使用に関する。特に、情報は、年齢の関数としての、対照個体における G P R 1 5 発現の参照曲線 / クラウド、及び / 又は年齢の関数としての、喘息被験者における G P R 1 5 発現の参照曲線 / クラウド、及び / 又は年齢の関数としての、C O P D に苦しんでいる被験者における G P R 1 5 発現の参照曲線 / クラウドでありうる。

40

【 0 0 6 0 】

1つの追加の実施態様において、本発明は、G P R 1 5 遺伝子発現産物について特異的な少なくとも1つの試薬ならびに C O P D のステージ及び、場合により、年齢を考慮に入れた参照 G P R 1 5 発現レベルに関する情報を含む、C O P D のステージを決定するためのキットの使用に関する。特に、情報が、疾患のステージ及び、場合により、年齢の関数として、C O P D に苦しんでいる個体における G P R 1 5 発現の参照曲線 / クラウドでありうる。患者の情報は、参照データのセットの文脈中に置かれ、このように、考慮下の患

50

者の病理学的状態の状況を決定することを可能にする。

【0061】

本発明の実施の1つの特定の例において、キットは、GPR15タンパク質とリガンドの間に形成された複合体を検出するための手段、ならびに/あるいはGPR15をコードするmRNA又はcDNAのフラグメントへの少なくとも1つの特異的プローブのハイブリダイゼーションを検出するための手段、ならびに/あるいは前記mRNA又はcDNAを増幅及び/又は検出するための手段を含みうる。

【0062】

本発明の他の局面及び利点は、以下の実験セクションにおいて明らかになり、それは、例示として見なすべきであり、それは、任意の方法において、求められる保護の範囲を限定しない。

10

【0063】

実験法

材料及び方法

患者の特徴

喘息患者及びそれらの遺伝的に対である対照（祖先、子孫、兄弟）を、Nantes病院（A. Magnan教授）及びMarseilles病院（P. Chanez教授）の呼吸器学部門において募集する。これらのボランティアの特徴を、下の表1に記載する。

【0064】

【表 1】

表 1: 喘息患者及びそれらの関連する対照の特徴

被験者 No.	性別	年齢	喫煙者 (パケット-年)	時間の長さ (年数)	重症度のステージ	基礎 FEV1 %	PD20 (µg MCh)	最後の増悪	Phadiatop
A101	F	65	NS	20	重度	75	ND	20/04/08	陰性
A102	F	48	EX 1	20	重度	45	ND	1/05/08	陰性
A1002	F	71	NS	51	重度	53	ND	多数	陰性
A1003	M	19	NS	18	重度	65	ND	前年の間 5	陽性 (der.p)
A1004	F	41	NS	23	重度	55	ND	前年の間 6	陽性
A1005	M	20	NS	19	重度	100	陽性	なし	陽性
A1006	F	54	S	19	重度	72	ND	前年の間 10	陰性
A3006	F	63	NS	63	重度	67	ND	20/06/10	陰性
A3007	F	55	NS	33	重度	79	ND	30/03/09	陽性 (Cat IgE)
C101	M	39	NS			100	ND		陰性
C102	F	48	EX 20			100	> 500		陰性
C1001	M	52	NS			103	> 3100		陰性
C1003	M	47	EX			97	> 3100		陰性
C1004	F	18	?			114	> 3100		陰性
C1005	F	52	EX 20			100	陰性		陰性
C1006	F	24	S 10			102	> 500		陰性
C3004	F	42	NS			90	> 1600		陰性
C3005	M	43	S 10			104	> 1600		陰性
C3006	M	65	NS			76	> 1600		陰性

10

20

30

40

F = 女性 ; M = 男性 ; S = 喫煙者 ; NS = 非喫煙者 ; EX = 元喫煙者 ; ND = 未決定
 FEV1 = 1 秒間での強制呼気容積。

50

P D 2 0 = F E V 1 における 2 0 % 降下を誘発するメタコリンの用量。

最後の増悪：疾患の症状の増幅に関連する呼吸器感染症に起因する最後の入院

P h a d i a t o p : アレルギー評価テスト

【 0 0 6 5 】

慢性閉塞性肺疾患又はC O P D に苦しんでいる患者及びそれらの対である環境対照（配偶者、隣人）を、Strasbourgの大学病院（R. Kessler教授）の呼吸器学部門において募集する。これらのボランティアの特徴を、下の表 2 に記載する。

【 0 0 6 6 】

【表 2】

表 2: COPD 患者の特徴及びそれらの対になった環境制御

被験者 No.	性別	年齢	喫煙者 (パケット・年)	時間の長さ (年数)	FEV1 (%)	FEV1/FVC (%)	重症度のステージ	PD20 (µg MCh)	最後の増悪	Phadia-top
B2003	M	67	S 40	9	65	46	中等度		Sep-08	ND
B2004	M	69	EX 80	1	61	38	中等度		June-08	陰性
B2005	M	80	Ex 10	7	42	52	重度		2007	陰性
B2006	F	57	S 40	2	89	62	中等度		Nov-09	陽性
B2007	F	47	EX 30	3	66	51	中等度		July-09	陰性
B2009	F	80	S 90	ND	59	62	中等度		Oct-09	陰性
B2010	M	72	EX 50	1	51	41	中等度		feb-2010	陽性
B2014	F	58	S 30	4	70	61	中等度		2009	陰性
B2015	M	62	S 40	2	57	41	中等度		ND	陰性
B2016	F	63	EX 80	3	75	54	中等度		6/07/07	陰性
C2001	F	75	受動		141	84		> 1500		ND
C2002	F	37	S 20		121	87		> 3100		ND
C2003	F	67	受動		99	82		> 2080		ND
C2004	F	62	受動		115	83		> 3100		陰性
C2006	F	51	EX 30		99	86		> 3100		陰性
C2007	F	48	NS		105	88		> 3100		陰性
C2008	F	62	NS		121	87		> 3100		陰性
C2010	F	68	S 30		129	78		> 1500		陰性
C2014	M	37	S 15		96	77		> 3100		陰性
C2016	F	74	NS		115	74		> 3100		陰性

10

20

30

40

50

F = 女性 ; M = 男性 ; S = 喫煙者 ; NS = 非喫煙者 ; Ex = 元喫煙者 ; Passive = 受動喫煙

FEV1 = 1 秒間での強制呼気容積。

ティフノー指数 : パーセンテージとして FEV1 / FVC (強制肺活量) 比率。閉塞性患者において : FEV1 / FVC < 70 %

PD20 = FEV1 における 20 % 降下を起こすメタコリンの用量。

重症度のステージ = 中等度ステージ : FEV1 の理論値の 80 ~ 50 % ; 重度ステージ : FEV1 の理論値の 50 ~ 30 %。

最後の増悪 : 疾患の症状の増幅に関連する呼吸器感染症に起因する最後の入院

Phadiatop : 共通のニューモアレゲンへの感作を評価するためのテスト

【 0067 】

本試験は、2005年6月14日付けのFrench Biomedical Research Ethic Committee (CCPPRB) Alsace No. 1への提出後、公衆衛生コードの1988年12月20日の修正されたHuriet法第88~1138号に従って行われ、Haute Autorite de Sante [French National Health Authority] に宣言された。プロトコル (プロモーション、追加の研究者) への修正は、倫理委員会 (CPP Est No.IV) に言及された。

【 0068 】

白血球を得ること

全白血球を、EDTAで取られた全血液 (20ml) から得る。6mlの血液を、白血球を保持するLeukoLOCK (商標) 微孔質フィルター (Fractionation & Stabilization Kit, Life Technologies (商標)) を通じて注射する。フィルターを、PBS、次に、RNAの保存用のRNAlater (登録商標) を用いてリンスし、RNA抽出まで - 80 で保存する。

【 0069 】

RNA抽出及び精製

解凍後、RNAlater (登録商標) 溶液を、シリンジを使用してフィルター中に空気を注射することにより排除する。細胞の溶解用のLysing/Binding溶液濃縮物 (全RNA単離キット、LeukoLOCK (商標)) をフィルターに加える。ライセートを、15mlのFalconチューブ中に回収し、キットからのプロテイナーゼKを用いて処理する。RNAを、RNA Binding Beadsを加えることによりビーズに付着させ、遠心する。上清を除去し、ビーズを、イソプロパノールを含む溶液を用いて3回、次にエタノールを用いて洗浄する。RNAを、次に、-80 で保存することができるエッペンドルフチューブ (50 µL ; 溶出溶液、LeukoLOCK (商標)) 中に溶出する。

【 0070 】

全RNAを、RNAについて高い親和性を有するシリカゲル (RNeasy (登録商標) ミニキット、Qiagen) 上での遠心により精製し、DEPC水 (50 µL) を用いて溶出し、-80 で保存されているエッペンドルフチューブ中に回収する。

【 0071 】

RNAの定量化及び質

全RNAを、2つの異なる技術を使用して定量化する : 1) 230 ~ 350 nmの吸収スペクトルをもたらす、微量 (1 µL) の分析を可能にする高度に正確なNanoDrop (登録商標) 分光光度法 (Thermo Scientific) ; 良質のRNAを、2に近いA₂₆₀ / A₂₈₀ 比率及び1.8と2.2の間のA₂₃₀ / A₂₆₀ 比率により定義する ; 2) Quant-it (商標) RNAアッセイキット蛍光インターカレート薬剤 (Qiagen) を用いた蛍光測定 (Quibit (商標) 蛍光光度計、Qiagen) 。結果は、放出された蛍光に比例したRNA濃度として表す。この濃度を、NanoDrop (登録商標) で得られたものと比較する。比率が0.9と1.1の間である場合、RNAは、残りの分析のために受け入れられる。これがその場合ではない場合、RNAは排除される (図1) 。

【 0072 】

RNA完全性

RNAの完全性は、「RNA 6000 Nano LabChips」(Agilent Technologies) を使用した

10

20

30

40

50

自動化キャピラリー電気泳動 (Bioanalyzer 2100、Agilent Technologies) により測定する。RNA 結合蛍光薬剤を加える；RNA を電界に供して、放出された蛍光を測定する。RNA の質は、28S リボソーム RNA / 18S rRNA の比率を用いて、及び、小さな分解 RNA を含む完全な電気泳動図の分析を用いて評価し、RIN (RNA 完全性ナンバー) 値がもたらされる。RNA の完全性は、28S / 18S 比率 > 1.8 及び RIN > 7 により検証する (図 1)。

【0073】

ゲノム DNA による混入

GPCR の定量的 PCR 分析は、干渉しうる残留ゲノム DNA の非存在の立証を要求する。この検証は、単一エクソン上で設計されたプライマーの対を使用した RNA サンプルでの高度に発現された遺伝子の増幅により行う (TaqMan (登録商標) 遺伝子発現アッセイ)。PCR の時に増幅がなければ、サンプル中にゲノム DNA がないことを検証する。この工程において満足な結果を与えない RNA は排除される (図 1)。

【0074】

逆転写

逆転写時に、RNA サンプル中の PCR 阻害剤の非存在を検証するための実験が設定される。それは、サンプル中に任意の相同な真核生物 RNA 配列 (Alien (登録商標)、Stratagene) を含まない外来 RNA の導入を含む。Alien (登録商標) RNA (2 µL、10⁶ コピー) を、スキーム 1 に表した Go-NoGo スクリーンを通した全 RNA (1 µg) に加え、後者は、37 で 2 時間にわたり、ウイルス起源の逆転写酵素、マウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MuLV、Life Technologies (商標)) の存在において、逆転写に供する。反応混合物 (Life Technologies (商標) により販売) は、MuLV、デオキシヌクレオチド三リン酸、縮重プライマー、及び RNase 阻害剤を、キットの RT 緩衝液中に、最終容積 100 µL 中に含む。

【0075】

PCR 阻害剤の非存在の検証

リアルタイム PCR 増幅を、96 ウェルプレート中で、ABI Prism (登録商標) 7000 機 (Life Technologies) 上で行う。目的の cDNA の存在における Alien (登録商標) cDNA を、Alien (登録商標) プライマー (Stratagene) を使用して増幅する。Alien (登録商標) 増幅閾値サイクル (Ct) 値を、種々の希釈での cDNA サンプルの存在及び非存在において比較する。未改変 Alien (登録商標) cDNA の増幅を許す希釈は、目的の cDNA のサンプルの 1 / 3 までの希釈に対応する。この希釈は、PCR 阻害剤として作用するサンプル処理残渣 (フェノール、エタノール、グアニジン、EDTA) の十分な希釈に対応する。

【0076】

GPCR 遺伝子発現の定量化

リアルタイム定量的 PCR による GPCR 遺伝子発現の定量化は、ABI Prism (登録商標) 7900 機 (Life Technologies (商標)) において、「TaqMan (登録商標) Low Density Array」(TLDA, Life Technologies (商標)) 384 ウェルマイクロ流体カード中で行われる。TLDA カードの各々のウェルには、凍結乾燥 TaqMan (登録商標) プローブ及び特異的プライマーの対が含まれる。プライマーの 384 対の内、360 は GPCR 遺伝子について特異的であり、20 はハウスキッピング遺伝子について特異的であり、4 は対照遺伝子 18S について特異的である。増幅は、2 時間にわたり、最終反応容積 2 µl 中で行う。実証されたバイオマーカー遺伝子の発現の結果は、ABI Prism (登録商標) 7000 機上の 96 ウェルプレート中で、定量的 PCR により確認される。

【0077】

統計分析及び結果の表現

増幅の結果を、ABI Prism (登録商標) 7900 機に統合された RQ Study ソフトウェアによる増幅閾値サイクル (Ct) 値として各々の遺伝子のために提供する。

【0078】

10

20

30

40

50

統計分析を、Excelスプレッドシート及びRソフトウェアを用いて行う。

【0079】

結果及び分析

喘息対照及びCOPD対照におけるGPR15発現の値は、有意に異なる($p = 0.20728197$) ; 2つの対照セットを、従って、組み合わせ、「対照」セットを形成し、このように、分析出力を増加させた。

【0080】

GPR15発現の結果を図表で表す: i) Box plotとして(図2)、ii) 患者の年齢の関数としてのCtのポイントごとの分散及び各々の群についての年齢の関数としての変動を要約する直線として(図3)。

10

【0081】

COPD患者及び対照群についてのGPR15発現値は、有意に異なる($p = 0.00164019$) (図2)。

【0082】

喘息患者及び対照群についてのGPR15発現値は、また、有意に異なる($p = 0.02535037$) (図2)。

【0083】

対照群におけるGPR15発現の分析は、発現と患者の年齢の間での相関を示し($r^2 = 0.32$)、COPD群においてと同様である($r^2 = 0.51$)。

【0084】

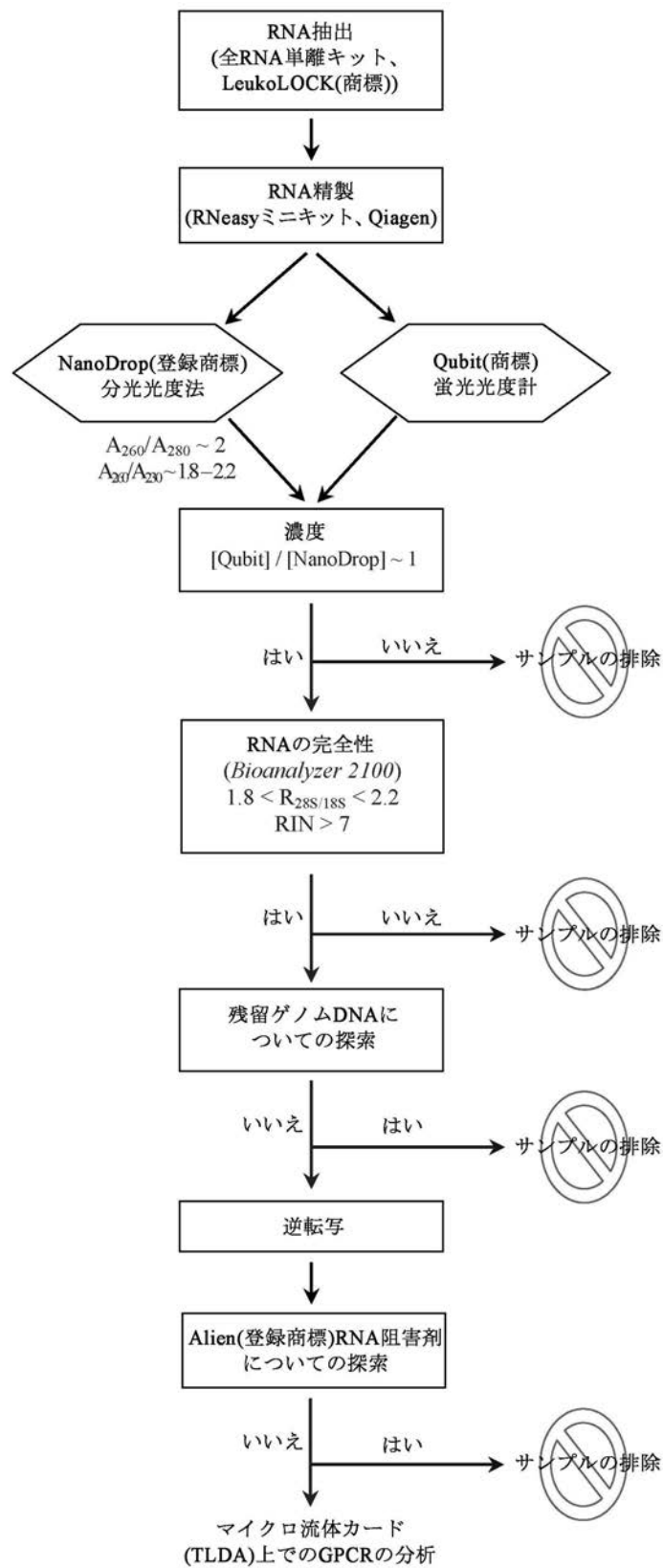
図3は、年齢変動を伴う患者の種々の群におけるGPR15発現値のこの依存性を例示する。

20

【0085】

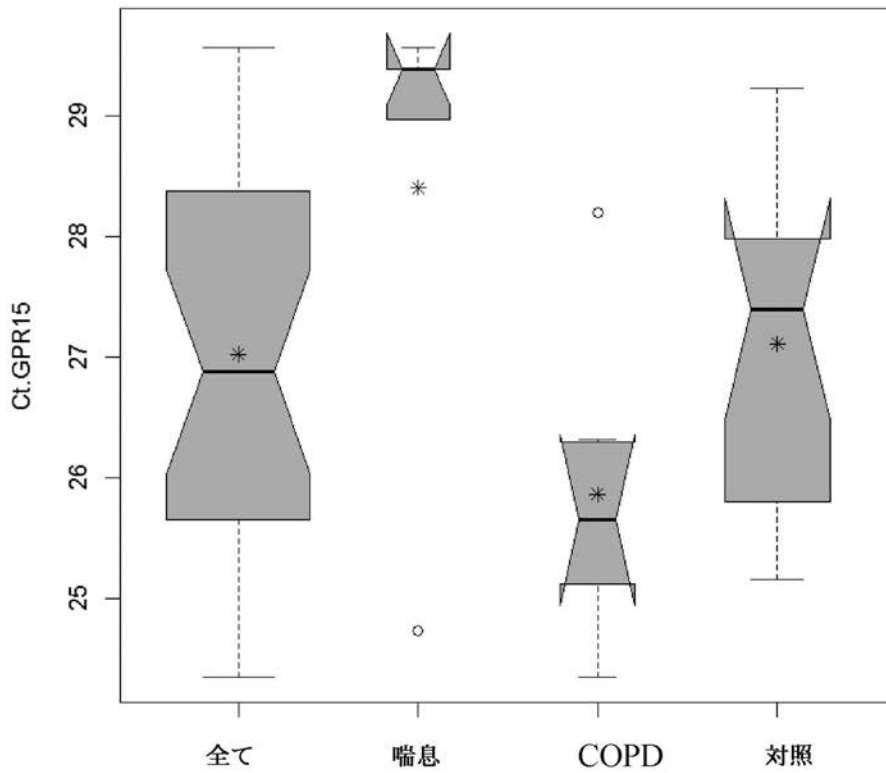
3つの非定型の値がCOPD群において観察される: それらは、喘息の喫煙者(A1006)であり、診断を確認すべきである; 喫煙者(C2010、30パケット/年)である対照被験者; 及び、78のティフノー指数(FEV1/FVC%)を伴う非喫煙者であり、再診する必要のある対照被験者を含む。

【 図 1 】



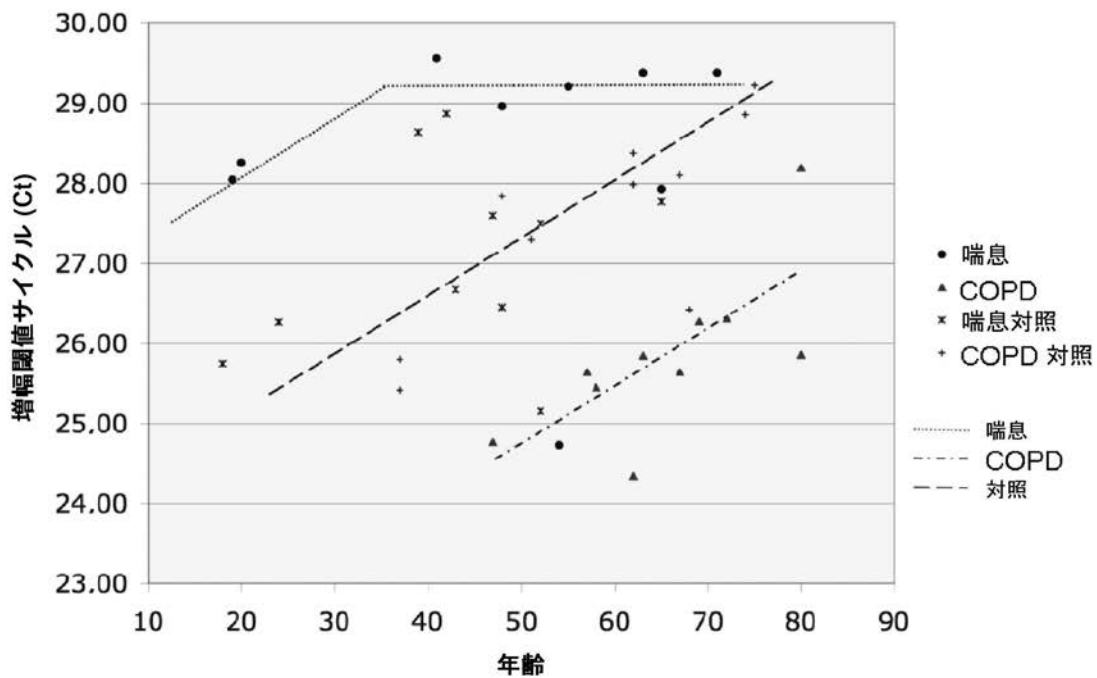
【 図 2 】

標的別のCt GPR15 (サンプル) の分布



【 図 3 】

GPR15



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/051964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/040823 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 6 May 2005 (2005-05-06) page 48, line 3 - page 49, line 17 -----	1-15
A	WO 2009/097262 A2 (MEDIMMUNE LLC [US]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]; ASSIST PUBL HOPITAUX) 6 August 2009 (2009-08-06) paragraphs [0001], [0006] - [0010], [0023], [0414], [0420], [0427] claim 1 -----	1-15
A	US 2007/148676 A1 (KACHALSKY SYLVIA G [IL] ET AL) 28 June 2007 (2007-06-28) paragraphs [0098] - [0129] ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 22 March 2013		Date of mailing of the international search report 05/04/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ripaud, Leslie

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/051964

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2006/105252 A2 (UNIV COLORADO [US]; GERACI MARK W [US]; COLDREN CHRISTOPHER D [US]; GR) 5 October 2006 (2006-10-05) page 5, line 5 - page 6, line 5</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>DESHPANDE D A ET AL: "Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma", CELLULAR SIGNALLING, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 18, no. 12, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 2105-2120, XP024910637, ISSN: 0898-6568, DOI: 10.1016/J.CELLSIG.2006.04.008 [retrieved on 2006-12-01] the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>SARAH A MAHER ET AL: "G-protein coupled receptors regulating cough", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 11, no. 3, 2 July 2011 (2011-07-02), pages 248-253, XP028099991, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2011.06.005 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>S. MARWITZ ET AL: "HOPE-BAL: Improved Molecular Diagnostics by Application of a Novel Technique for Fixation and Paraffin Embedding", JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, vol. 59, no. 6, 23 March 2011 (2011-03-23), pages 601-614, XP055044923, ISSN: 0022-1554, DOI: 10.1369/0022155411404417 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/051964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005040823 A1	06-05-2005	NONE	

WO 2009097262 A2	06-08-2009	NONE	

US 2007148676 A1	28-06-2007	EP 1758792 A2	07-03-2007
		US 2007148676 A1	28-06-2007
		WO 2005118403 A2	15-12-2005

WO 2006105252 A2	05-10-2006	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2013/051964

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/68 G01N33/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2005/040823 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 6 mai 2005 (2005-05-06) page 48, ligne 3 - page 49, ligne 17 -----	1-15
A	WO 2009/097262 A2 (MEDIMMUNE LLC [US]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]; ASSIST PUBL HOPITAUX) 6 août 2009 (2009-08-06) alinéas [0001], [0006] - [0010], [0023], [0414], [0420], [0427] revendication 1 -----	1-15
A	US 2007/148676 A1 (KACHALSKY SYLVIA G [IL] ET AL) 28 juin 2007 (2007-06-28) alinéas [0098] - [0129] ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
22 mars 2013	05/04/2013	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Ripaud, Leslie	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2013/051964

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 2006/105252 A2 (UNIV COLORADO [US]; GERACI MARK W [US]; COLDREN CHRISTOPHER D [US]; GR) 5 octobre 2006 (2006-10-05) page 5, ligne 5 - page 6, ligne 5</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>DESHPANDE D A ET AL: "Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma", CELLULAR SIGNALLING, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 18, no. 12, 1 décembre 2006 (2006-12-01), pages 2105-2120, XP024910637, ISSN: 0898-6568, DOI: 10.1016/J.CELLSIG.2006.04.008 [extrait le 2006-12-01] le document en entier</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>SARAH A MAHER ET AL: "G-protein coupled receptors regulating cough", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 11, no. 3, 2 juillet 2011 (2011-07-02), pages 248-253, XP028099991, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2011.06.005 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>S. MARWITZ ET AL: "HOPE-BAL: Improved Molecular Diagnostics by Application of a Novel Technique for Fixation and Paraffin Embedding", JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, vol. 59, no. 6, 23 mars 2011 (2011-03-23), pages 601-614, XP055044923, ISSN: 0022-1554, DOI: 10.1369/0022155411404417 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2013/051964

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005040823	A1	06-05-2005	AUCUN

WO 2009097262	A2	06-08-2009	AUCUN

US 2007148676	A1	28-06-2007	EP 1758792 A2 07-03-2007
			US 2007148676 A1 28-06-2007
			WO 2005118403 A2 15-12-2005

WO 2006105252	A2	05-10-2006	AUCUN

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 110001508

特許業務法人 津国

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74) 代理人 100119079

弁理士 伊藤 佐保子

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100146422

弁理士 田中 聖

(72) 発明者 フロッサール, ネリー

フランス国、エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール、リュ・デュ・ジュ・ド・ポーム 4 べ

(72) 発明者 エーシュ, ジャック

フランス国、エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール、リュ・デュ・ドーム 2

(72) 発明者 ルアル, クリスティーヌ

フランス国、エフ - 6 7 4 0 0 イルキルシュ、リュ・デュ・ミリュール 1 0

(72) 発明者 ケスラー, ロマン

フランス国、エフ - 6 7 2 0 5 オーバーハウスベルゲン、リュ・マルロー 9

(72) 発明者 マニャン, アントワーヌ

フランス国、エフ - 4 4 0 0 0 ナント、リュ・シミリアン 3

(72) 発明者 シャネス, パスカル

フランス国、エフ - 1 3 0 0 7 マルセイユ、リュ・スキュデリー 7

(72) 発明者 ガルジ, ジャン - リュク

フランス国、エフ - 6 7 5 0 0 ワイツブリュック、リュ・デ・メシュール 3 8

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR35 QR36 QR42

QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36

QS39 QX02

专利名称(译)	生物标志物用于慢性炎症性肺病		
公开(公告)号	JP2015507196A	公开(公告)日	2015-03-05
申请号	JP2014555211	申请日	2013-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	单威赛引用和斯特拉斯堡 斯特拉斯堡大学 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Üniversite电斯特拉斯堡 中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	フロッサールネリー エーシュジャック ルアルクリスティーヌ ケスラーロマン マニャンアントワーヌ シャネスパスカル ガルジジャンリュク		
发明人	フロッサール,ネリー エーシュ,ジャック ルアル,クリスティーヌ ケスラー,ロマン マニャン,アントワーヌ シャネス,パスカル ガルジ,ジャン-リュク		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/6884 G01N2333/7158 G01N2333/726 G01N2800/122		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	津国 肇 三宅 俊男 阿基奥·希巴达 田中洋子 田中 圣		
优先权	2012050917 2012-01-31 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明使用体外方法来诊断和/或预后和/或评估受试者中慢性炎性肺疾病的进展，使用GPR15 G蛋白偶联受体基因的表达水平作为疾病的生物标志物。关于

Figure 3

