

(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2014-533368

(P2014-533368A)

(43) 公表日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2014-541651 (P2014-541651)	(71) 出願人	514120944 ユニベルジテートスクリニックム イェーナ ドイツ連邦共和国 07747 イェーナ エアランガー アレー 101
(86) (22) 出願日	平成24年11月14日 (2012.11.14)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月11日 (2014.7.11)	(72) 発明者	キェントプフ ミヒャエル ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ ベートーヴェンシュトラッセ 17
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/072644	(72) 発明者	シュメルラー ディアーナ ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ ノーレンドルファー シュトラッセ 2 1
(87) 国際公開番号	W02013/072381		
(87) 国際公開日	平成25年5月23日 (2013.5.23)		
(31) 優先権主張番号	11189024.0		
(32) 優先日	平成23年11月14日 (2011.11.14)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症及び全身性炎症反応症候群の診断

(57) 【要約】

本発明は、敗血症を有する対象者又は敗血症を有すると疑われる対象者の死亡率及び／又は転帰についての診断、予測、又はリスク層別化の方法に関し、以下のステップを含む：  
 ( a ) 前記対象者から採取したサンプル中のアンチトリプシン ( A T T ) 又はその断片の存在及び／又はレベルを決定するステップ並びに／あるいはトランスサイレチン ( T T R ) 又はその断片の存在及び／又はレベルを決定するステップ、 ( b ) その場合、 A T T 及び／又は T T R 又はそれらの断片の存在及び／又はレベルは、死亡リスク増大と相関しており、かつ ( c ) A T T の前記レベルがあるカットオフ値未満である場合及び／又は A T T の断片の前記レベルがあるカットオフ値を超えている場合に、死亡リスク増大及び／又は予後不良と決定するステップ、並びに／あるいは ( d ) T T R の前記レベルがあるカットオフ値未満である場合及び／又は T T R の断片の前記レベルがあるカットオフ値未満である場合に、死亡リスク増大及び／又は予後不良と決定するステップ。本発明は、一般に、敗血症診断のための A T T 及び／又は T T R 又はそれらの断片の使用に関し、 S E Q I D N O s : 2 ないし 1 4 のヌクレオチドに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

敗血症を有する対象者又は敗血症を有すると疑われる対象者の死亡率又は転帰についての診断、予測、又はリスク層別化の方法であって、下記の ( a ) ~ ( c ) のステップを含む及び / 又は下記の ( d ) ~ ( f ) のステップを含む方法：

( a ) 前記対象者から採取したサンプル中のアンチトリプシン ( A T T ) 又はその断片のレベルを決定するステップ、

( b ) 但し、A T T 又はその断片の前記レベルが、死亡リスク増大又は予後不良と相関しており、かつ

( c ) A T T の前記レベルが、あるカットオフ値未満である場合及び / 又は A T T の断片の前記レベルが、あるカットオフ値を超えている場合に、死亡リスク増大又は予後不良と決定するステップ；

( d ) 前記対象者から採取したサンプル中のトランスサイレチン ( T T R ) 又はその断片のレベルを決定するステップ、

( e ) 但し、T T R 又はその断片の前記レベルが、死亡リスク増大又は予後不良と相関しており、かつ

( f ) T T R 又はその断片の前記レベルが、あるカットオフ値未満である場合に、死亡リスク増大又は予後不良と決定するステップ。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、A T T 又はその断片の前記レベル及び / 又は T T R 又はその断片の前記レベルが、死亡又は転帰についての予測又はリスク層別化と、以下の選択肢から選択される方法によって好ましくは相関している、方法：

( a ) 所定のサンプルの集合体におけるレベルの中央値に関する相関付け、

( b ) 所定のサンプルの集合体におけるレベルの変位量に関する相関付け、及び

( c ) 例えば、C o x 回帰モデル等の数学的モデルによる相関付け。

## 【請求項 3】

請求項 1 及び 2 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

( a ) A T T の前記レベルの前記カットオフ値が約 2 g / L であって、分析対象の患者に応じて約 2 0 % だけ偏位可能であり；

( b ) T T R の前記レベルの前記カットオフ値が約 1 0 m g / d L であって、分析対象の患者に応じて約 2 0 % だけ偏位可能である、方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法であって、A T T 又はその断片の前記レベル及び / 又は T T R 又はその断片の前記レベルが、

( a ) A T T については、正常集団の中央値より低いため、

( b ) A T T の断片については、正常集団の中央値を超えているため、及び

( c ) T T R 又はその断片については、正常集団の中央値より低いために、死亡についてのリスク増大と相関している、方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、下記の ( a ) ~ ( c ) のステップを含む及び / 又は下記の ( d ) ~ ( f ) のステップを含む方法：

( a ) 対象者からサンプルを採取するステップ、

( b ) A T T 又はその断片のレベルを決定するステップ、及び

( c ) A T T 又はその断片の前記レベルと、死亡又は生存の変位量毎のリスクを相関させるステップ；

( d ) 対象者からサンプルを採取するステップ、

( e ) T T R 又はその断片のレベルを決定するステップ、及び

( f ) T T R 又はその断片の前記レベルと、死亡又は生存の変位量毎のリスクを相関させるステップ。

## 【請求項 6】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、サンプルが下記の時点で 1 回又は複数回採取される、方法：対象者が医療施設又は救急車に初めて収容される時、対象者が緊急治療室に入る時、対象者が集中治療室に入る時、治療前、治療開始後、治療開始から 2 4 時間後、治療開始から 4 8 時間後及び / 又は治療開始から 7 2 時間後。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記対象者が、敗血症様感染症の先行状態、敗血症様感染症の進行状態、重度敗血症、及び敗血症性ショックを含む群から選択される状態の下にある、方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記対象者の死亡又は転帰についての予測又はリスク層別化に加え、前記対象者から採取されたサンプル中での A T T 又はその断片の前記レベル及び / 又は T T R 又はその断片の前記レベルの決定が、前記対象者が全身性炎症 ( S I R S )、初期敗血症、重度敗血症、又は敗血症性ショックを有する可能性があるかについての鑑別診断に用いられる、方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記サンプルが、血漿サンプル、血清サンプル、全血サンプル、血液サンプル又はその画分、リンパ液サンプル、尿サンプル、並びに前記サンプルのいずれかからの抽出物を含む群から選択される、方法。

【請求項 10】

敗血症又は敗血症様疾患を有する対象者において、ある薬剤に対する反応をモニタリングすることにより、前記疾患の重症度に関する個別の患者の療法に関して、医学的決定をおこなう方法であって、下記の ( a ) ~ ( d ) のステップを含む及び / 又は下記の ( e ) ~ ( h ) のステップを含む方法：

20

( a ) 以下の群から選択される様々な時点で前記患者から少なくとも二つのサンプルを採取するステップ、

- i . 治療開始前、
- i i . 治療開始後、及び / 又は
- i i i . 一つ又は複数の他の時点、

( b ) 前記サンプル中の A T T 又はその断片のレベルを決定するステップ、

( c ) 前記サンプル中の A T T 又はその断片の前記レベルと、前記ある薬剤への陽性又は陰性反応とを関連付けるステップ、及び

30

( d ) 薬剤治療中に A T T の前記レベルが増大する場合及び / 又は薬剤治療中に A T T の断片の前記レベルが低減する場合に、陽性反応と認めるステップ；

( e ) 以下の群から選択される様々な時点で前記患者から少なくとも二つのサンプルを採取するステップ、

- i . 治療開始前、
- i i . 治療開始後、及び / 又は
- i i i . 一つ又は複数の時点、

( f ) 前記サンプル中の T T R 又はその断片のレベルを決定するステップ、

( g ) 前記サンプル中の T T R 又はその断片の前記レベルと、前記ある薬剤への陽性又は陰性反応とを関連付けるステップ、及び

40

( h ) 前記薬剤による治療中に T T R 又はその断片の前記レベルが増大する場合に、陽性反応と認めるステップ。

【請求項 11】

対象者における疾患を鑑別診断する方法であって、前記疾患が、( i ) 全身性炎症 ( S I R S )、( i i ) 初期敗血症、( i i i ) 重度敗血症、又は ( i v ) 敗血症性ショックを含む群から選択され、下記の ( a ) ~ ( d ) のステップを含む及び / 又は下記の ( d ) ~ ( f ) のステップを含む方法：

( a ) 前記対象者から採取したサンプル中の A T T 又はその断片のレベルを決定するステップ、

50

(b) A T T 又はその断片の前記レベルと、(i) 初期敗血症、(ii) 重度敗血症、又は(iii) 敗血症性ショックとを関連付けるステップ、及び

(c) 但し、A T T の前記レベルがあるカットオフ値未満である場合及び/又は A T T のタンパク質分解断片の前記レベルがあるカットオフ値を超えている場合に、A T T 又はその断片の前記レベルと、(i) 初期敗血症、(ii) 重度敗血症、又は(iii) 敗血症性ショックとの関連性を認めるステップ；

(d) 前記対象者から採取したサンプル中の T T R 又はその断片のレベルを決定するステップ、

(e) T T R 又はその断片の前記レベルと、(i) 初期敗血症、(ii) 重度敗血症、又は(iii) 敗血症性ショックとを関連付けるステップ、及び

(f) 但し、T T R 又はその断片の前記レベルがあるレベル未満である場合に、T T R 又はその断片の前記レベルと、(i) 初期敗血症、(ii) 重度敗血症、又は(iii) 敗血症性ショックとの関連性を認めるステップ。

【請求項 1 2】

敗血症患者における敗血症診断用の又はその予後予測用のキットであって、以下を含むキット：

(a) A T T 又はその断片及び/又は T T R 又はその断片に対して特異性の抗体、及び

(b) サンプルに含まれる A T T 又はその断片のレベルと予後との相関関係を示す標準データ及び/又は T T R 又はその断片のレベルと予後との相関関係を示す標準データ、及び任意選択で

(c) マニュアル。

【請求項 1 3】

S E Q I D N O : 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14の内のいずれか一つの配列を有する、ポリペプチド。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 3 に記載の及び/又は S E Q I D N O : 1 のポリペプチドの敗血症診断法における、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療分野に関し、詳細には診断に関し、より詳細には敗血症の診断及び予後診断に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、感染性合併症の診断に関する。用語の「敗血症」は、感染に伴う炎症性全身症状に関係する様々な臨床状態を指す。非感染性病因に続発する炎症反応に臨床状態が類似しているため、敗血症の同定は、特に困難な診断上の問題である。これに関して、一般的に感染性病因又は非感染性病因に対する重度の全身性反応を意味する「全身性炎症反応症候群（即ち「S I R S」）」、並びに関連する症候群である、「敗血症」、「重症敗血症」、及び「敗血症性ショック」の定義が、示されている（非特許文献 1）。S I R S は、感染、並びに、心的外傷を含む、数多くの非感染性病因の双方に、関係している可能性がある。

【0003】

抗生物質及び支持療法が適用可能ではあるが、敗血症は、著しく高い罹患率及び死亡率を示す。敗血症の診断/予後診断のための、対象者の完全な臨床検査と併用する、いくつかの実験的検査法の使用が検討されている（非特許文献 2）。

10

20

30

40

50

## 【0004】

ヒトにおける敗血症及び数種の動物における敗血症の診断、治療、及びモニターリングを容易にするいくつかの分子マーカーが検討されている。それらの内、最も幅広く用いられているのが、C反応性タンパク質（CRP）及びプロカルシトニン（PCT）である。

## 【0005】

様々なインターロイキン類も、敗血症のバイオマーカーの可能性があると検討されている。しかし、特異性に欠けるため、現状では使用が限定されている。例えば、Carriگانらは、ヒトにおけるこれらのマーカーの下記のような感度及び特異度を、報告している（非特許文献3）。

## 【表1】

10

表1. 成人及び新生児における様々なバイオマーカーによる敗血症予測のROC解析結果<sup>a</sup>

ROC解析結果					
バイオマーカー	年齢群	カットオフ値の範囲	感度 (%)	特異度 (%)	参考研究
TNF $\alpha$	成人	11.5 ng/L	55	66	(30)
	新生児	12-20 ng/L	67/79/88	43/71/86	(29, 61, 63)
IL-6	成人	50-200 ng/L	51/67/86	53/65/79	(30, 35, 36, 66)
	新生児	10-160 ng/L	71/84/100	43/71/86	(26, 29, 61, 63, 70-72)
IL-1r <sup>a</sup>	児童	NA <sup>b</sup>	33	89	(85)
	新生児	10.9 $\mu$ g/L	93	92	(70)
IL-8	成人	30-340 ng/L	57/63/66	57/76/93	(30, 35, 85)
	新生児	50 ng/L	92	70	(61)
	成人	4-150 mg/L	35/69/89	18/61/81	(30, 35, 36, 38, 46, 66, 88, 89)
CRP	新生児	1-23 mg/L	43/65/96	80/90/100	(22, 26, 63, 70, 89, 90)
	成人	0.4-81 $\mu$ g/L	65/81/97	48/73/94	(30, 35-38, 43, 46, 66, 88, 89)
PCT	新生児	1.0-61 $\mu$ g/L	77/85/99	62/83/91	(22, 72, 89, 90)

20

30

**a** この表に示す値は、健常群ではなく非感染対照群から識別した感染個体についてのものである。推定された感度及び特異度は、パーセントでの最小値、平均値（太字）、及び最大値である。

**b** 非適用

40

この概要は、欧州特許出願公開第2060920A1号明細書に記載されている。

## 【0006】

これらのデータは、現在公表されているデータの均質性はさておき、敗血症の病型が幅広く検討されてきている、ヒトにおいても、現在のマーカーの感度及び特異度が（平均値としても）それぞれ33%及び61%にまで低くなり得ることを示している。

## 【0007】

これらのデータは、改善された診断特性を有する新たな診断マーカーが明らかに必要であることを、示している。そのため、敗血症の診断、特に敗血症の早期診断が臨床医療において大いに必要とされている。敗血症を発症するリスクのある者又は敗血症の早期段階にある者を明らかにすることが、最適な診断である。特に、全身性炎症において、即ち、

50

多発性傷害患者においては、集中治療医学で通常測定される「正常な」生理学的値が他の病的過程により干渉されるため、そのような最適な診断は多くの場合非常に困難である。

【0008】

全身性炎症の患者における、例えば、多発性傷害を併発している患者における敗血症の診断は、集中治療医学において高度に必要とされる、非常に特異的な問題である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明の目的は、高感度でおよび/または高特異度で敗血症を診断する好適な方法を提供することである。

10

【0010】

定義

用語の「敗血症」又は「感染性合併症」は、本願において、同義語として使用され、全ての症状が感染を伴う炎症の全身症状に関係している、「敗血症」、「感染性合併症」、「重症敗血症」、「敗血症性ショック」、並びにそれらの早期段階を包含すると、理解される。

【0011】

本明細書において、「全身性炎症反応症候群（即ち「SIRS」）」は、下記条件の内の二つ以上を呈する、様々な重度の臨床的な病因に対する全身性炎症反応と、定義される：1) 体温 $>38$  又は $<36$  ; 2) 脈拍数 $>90$ 回/分; 3) 呼吸数 $>20$ 回/分又は $P a C O_2 < 32$  mmHg ; 及び4) 白血球数 $>12,000/mm^3$ 又は $<4,000/mm^3$ 、或いは未熟顆粒球（集団） $>10\%$ 。確認された感染過程の結果がSIRSである場合、敗血症と呼ばれる（非特許文献3）。

20

【0012】

本明細書において、「 $\alpha$ -1-アンチトリプシン」は、アンチトリプシン及び「A1AT」とも呼ばれる。アルファ-1-アンチトリプシン又は $\alpha$ -1-アンチトリプシン（A1AT）は、セルピン・スーパーファミリーに属するプロテアーゼ阻害剤である。一般に、血清トリプシン阻害剤として知られている。 $\alpha$ -1-アンチトリプシンは、幅広いプロテアーゼを阻害するため、 $\alpha$ -1-プロテアーゼ阻害剤（A1PI）とも呼ばれる。 $\alpha$ -1-アンチトリプシンは、炎症性細胞の酵素、特に好中球エラスターゼから、組織を保護し、 $1.5 \sim 3.5$  g/Lの血中基準範囲を有しているが、その濃度は、急性炎症の際に何倍にも上昇し得る。 $\alpha$ -1-アンチトリプシンが存在していない場合、好中球エラスターゼがフリーとなって、肺の弾性に寄与しているエラスチンを分解し、成人における肺気腫又は慢性閉塞性肺疾患（COPD）等の呼吸器合併症、並びに成人又は児童における肝硬変を生じる。

30

【0013】

本明細書において、「トランスサイレチン」（TTR）は、甲状腺ホルモンのチロキシン（T4）及びレチノールの血清担体及び脳脊髄液担体である。チロキシン及びレチノールを輸送するため、トランスサイレチンという名前になった。TTRは、電気泳動ゲル上でアルブミンより早く走行するため、当初はプレアルブミンと呼ばれた。TTRの識別ピークは、 $13.8$  kDaにあって、特許請求される方法及びキットとの関連で請求されている。

40

【0014】

本発明の文脈において、用語の「閾」、「閾値」、「カットオフ」、及び「カットオフ値」は、同義的に用いられる。

【0015】

診断マーカー及び予後診断マーカーの使用に関連して本明細書で用いられる場合、用語の「相互関係を示すこと」は、患者におけるマーカーの存在及び量を、所定の条件にさらされていると知られている、又はさらされるリスクがあると知られている者における、あるいは所定の条件がないと知られている者における、その存在又は量と比較することを、

50

意味する。上記のように、ある患者のサンプルにおけるマーカーのレベルは、特定の診断に関連すると知られているレベルと比較可能である。サンプルのマーカーのレベルは、診断と相互関係を示すと言われており、すなわち、当業者なら、そのマーカーのレベルを用いて、患者が特定の診断を受けるか否か、したがって対応するか否かを、決定することができる。あるいは、サンプルのマーカーのレベルを、良好な転帰（例えば、疾患が存在しない等々）と関連していると知られているマーカーのレベルと比較することができる。好ましい実施形態において、マーカーレベルの分析結果は、広範な可能性又は特定の転帰と相関付けられる。

#### 【0016】

「予後診断」は、所定の経過又は転帰が生ずる可能性の指定を、意味する。予後診断は、一つ又は複数の「予後指標」の検査によって決定されることが多い。予後指標はマーカーであって、患者における（あるいはその患者から得られたサンプルにおける）その存在又は量は、所定の経過又は転帰が生ずる可能性を示す。例えば、一つ又は複数の予後指標が、患者から得られたサンプルにおいて十分高いレベルに達する場合、そのレベルは、その患者が最終的に末期腎不全（ESRD）まで進行する可能性が高いこと、すなわち、その患者が「疾患進行者」である可能性が高いことを、示すことができる。

10

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0017】

本発明の詳細な説明

本発明は、敗血症を有する又は有すると疑われる対象者の死亡率及び／又は転帰についての診断、予測、又はリスク層別化の方法に関し、以下を含む：

20

- ・前記対象者から採取したサンプル中のアンチトリプシン（ATT）又はその断片の決定並びに／あるいはトランスサイレチン（TTR）又はその断片の存在及び／又はレベルの決定、

- ・ATT及び／又はTTRあるいはそれらの断片の存在及び／又はレベルが、死亡及び／又は不良転帰の増大したリスクと相関しているとの決定；並びに

- ・ATT（成熟断片；55 kDa）の存在及び／又はレベルが特定のカットオフ値未満である及び／又はそれらの断片のレベルが特定のカットオフ値を超えている場合に、前記死亡及び／又は不良転帰の増大したリスクがもたらされるかの決定並びに／あるいは

- ・TTRの存在及び／又はレベルが特定のカットオフ値未満である及び／又はそれらの断片のレベルが特定のカットオフ値未満である場合に、前記死亡及び／又は不良転帰の増大したリスクがもたらされるかの決定。

30

#### 【0018】

前記断片は、図9に示されている断片である。

#### 【0019】

本発明は、一般に、ATT及び／又はTTRあるいはそれらの断片の敗血症診断のための使用にも関している。

#### 【0020】

多くのプロテアーゼは、-1-アンチトリプシンを活性化中心ループにおいてC-末端で消化する。-1-アンチトリプシンの断片が生成される（各図参照）。表面増強型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（SELDI-TOF-MS）は、本発明の文脈におけるこれらの断片の分析用の及び／又は存在及び／又はレベルの決定用の一つの方法として請求されている。

40

#### 【0021】

感染性敗血症又はSIRSの240名の患者を分析した。本発明により主張されるように、4789.7Daの-1-アンチトリプシンの断片が、一般にSIRSと敗血症を識別するマーカーとして、認められた。

#### 【0022】

本発明による方法は、診断される個人／患者／対象者についてのマーカーのレベルを事前に設定される値と比較することも含んでいる。この事前設定される値は、様々な形式で

50

あることができる。事前設定される値は、単にカットオフ値であることができる。事前設定される値は、例えば、対照集団の中央値又は平均値あるいは75パーセントイル、90パーセントイル、95パーセントイル、又は99パーセントイルであることができる。事前設定される値は、例えば、「最適」カットオフ値であることができる。あるマーカーについての最適カットオフ値は、このマーカーについて診断感度及び診断特異度が最高である場合の値である。診断感度は、その疾患に罹患している患者又はその疾患を発症するリスクを有する患者によって異なり（具体的なケースで答えを出すべき診断又は予後診断による）、マーカーによってその疾患があるとして精確に検知され（「真の陽性」）、また診断特異度は、その疾患に罹患している患者又はその疾患を発症するリスクを有する患者によって異なり（具体的なケースで答えを出すべき診断又は予後診断による）、マーカーによってその疾患がないとして精確に検知される（「真の陰性」）。事前設定される値は、臨床的必要性又は経済的必要性に応じて、最適化されたカットオフ値による、最大陰性予測値又は最大陽性予測値であることができる。それにより、感度及び特異度も最適化される。

10

20

30

40

50

#### 【0023】

上記のように、「偽陽性」判定の危険をおかしてもリスクのある対象者をより多く同定するのがより適切であると考えるか、あるいは中等度のリスクの対象者を見逃す危険をおかしても主に高いリスクの対象者を同定するのがより適切であると考えかによって、採用されるカットオフ値が異なる。事前設定される値は、比較される群、例えば、ある群におけるリスクが他の群の2倍である等、に応じて設定できる。比較される群に幅を持たせることができ、例えば、被試験集団を、低リスク群、中間リスク群、及び高リスク群等の群に分割する、あるいは、最低リスクの者に最低の変位量、最高リスクの者に最高の変位量を割り付けることができる。

#### 【0024】

事前設定される値は、彼らの習慣、民族性、遺伝的特徴等に基づいて選択される、特定の対照集団の間で、変わり得る。したがって、事前設定される値は、ある個人が該当するカテゴリーを考慮して選択できる。好適な幅及びカテゴリーは、通常の実験の範囲内で当業者が選定できる。

#### 【0025】

いくつかの実施形態において、あるパネル内の一つ又は複数のマーカー用の特定の閾値によらず、対象者から得られるマーカーレベルの分析結果が特定の診断/予後診断を示すか否かが決定される。むしろ、本発明は、統一された全体としてのマーカーパネル「特性」の評価を利用できる。そのようなマーカーパネルにおける特定の「明確な」変化パターンは、実際に、固有の診断指標又は予後診断指標として機能できる。上記のように、そのような変化パターンは、単一サンプルから、あるいはパネルの単一又は複数のメンバーにおける（又はパネルに対応する値における）経時的な変化から、得られる。本明細書において、パネルは、マーカーの組合せを意味する。本明細書において、既知のマーカーの内の一つをATT及び/又はTTRと組み合わせることができる。

#### 【0026】

パネルに対応する値は、様々な方法で入手可能である。その一例は、Cox比例ハザード解析法である。もう一つの例は、ROC曲線最適化法である。ROC曲線最適化は、特定のマーカーパネルの感度対そのパネルの1 - (特異度)のROC曲線を様々なカットオフ値でプロットすることで達成できる。

#### 【0027】

これらの方法において、対象者からのマーカー測定値の分析結果は、全体で、診断又は予後診断の広範囲な可能性（数値スコアとして又は危険率としてのいずれかで表される）を提供すると考えられる。そのような実施形態において、マーカーのあるサブセットにおける増大は、ある患者における特定の診断/予後診断を示すのに十分であり得て、一方、マーカーの異なるサブセットにおける増大は、別の患者における同一の又は異なる診断/予後診断を示すのに十分であり得る。重み付け係数も、パネル内の一つ又は複数のマーカー

ーに適用可能であって、例えば、あるマーカーが特定の診断/予後診断の同定に特に高い有用性を示す場合には、そのマーカーは、そのマーカーが所定のレベルにあるだけで陽性の結果を示すのに十分なほどに、重み付けられ得る。同様に、重み付け係数は、特定のマーカーが所定のレベルにないだけで陽性の結果を示すのに十分なほどに、重み付けられ得るが、他のマーカーもその分析に寄与する場合、ある結果のみを示す。

**【0028】**

いくつかの実施形態において、マーカー及び/又はマーカーパネルは、少なくとも約70%の感度、より好ましくは少なくとも約80%の感度、さらにより好ましくは少なくとも約85%の感度、その上より好ましくは少なくとも約90%の感度、最も好ましくは少なくとも約95%の感度を、少なくとも約70%の特異度、より好ましくは少なくとも約80%の特異度、さらにより好ましくは少なくとも約85%の特異度、その上より好ましくは少なくとも約90%の特異度、最も好ましくは少なくとも約95%の特異度との組合せで示すために、選択される。特に好ましい実施形態において、感度及び特異度は双方とも、少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約85%、その上より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%である。この文脈において、用語の「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。

10

**【0029】**

他の実施形態において、陽性尤度比、陰性尤度比、オッズ比、又はハザード比は、リスクを予測する又はある疾患を診断する、ある試験の能力の指標として使用される。陽性尤度比の場合、1という値は、「疾病」群及び「対照」群双方の被験者間で陽性結果が等しく生じることを示し、1を超える値は、陽性結果が疾病群においてより生じやすいことを示し、1未満の値は、陽性結果が対照群においてより生じやすいことを示す。陰性尤度比の場合、1という値は、「疾病」群及び「対照」群双方の被験者間で陰性結果が等しく生じることを示し、1を超える値は、陰性結果が疾病群においてより生じやすいことを示し、1未満の値は、陰性結果が対照群においてより生じやすいことを示す。いくつかの好ましい実施形態において、マーカー及び/又はマーカーパネルは、少なくとも約1.5以上又は約0.67以下、より好ましくは少なくとも約2以上又は約0.5以下、さらにより好ましくは少なくとも約5以上又は約0.2以下、その上より好ましくは少なくとも約10以上又は約0.1以下、最も好ましくは少なくとも約20以上又は約0.05以下の陽性尤度比又は陰性尤度比を示すように選択されることが好ましい。この文脈において、用語の「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。

20

30

**【0030】**

オッズ比の場合、1という値は、「疾病」群及び「対照」群双方の被験者間で陽性結果が等しく生じることを示し、1を超える値は、陽性結果が疾病群においてより生じやすいことを示し、1未満の値は、陽性結果が対照群においてより生じやすいことを示す。いくつかの好ましい実施形態において、マーカー及び/又はマーカーパネルは、少なくとも約2以上又は約0.5以下、より好ましくは少なくとも約3以上又は約0.33以下、さらにより好ましくは少なくとも約4以上又は約0.25下、その上より好ましくは少なくとも約5以上又は約0.2以下、最も好ましくは少なくとも約10以上又は約0.1以下のオッズ比を示すように選択されることが好ましい。この文脈において、用語の「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。

40

**【0031】**

ハザード比の場合、1という値は、「疾病」群及び「対照」群双方の被験者間である評価項目(例えば、死亡)の相対リスクが等しく生じることを示し、1を超える値は、リスクが疾病群においてより生じやすいことを示し、1未満の値は、リスクが対照群においてより生じやすいことを示す。いくつかの好ましい実施形態において、マーカー及び/又はマーカーパネルは、少なくとも約1.1以上又は約0.91以下、より好ましくは少なくとも約1.25以上又は約0.8以下、さらにより好ましくは少なくとも約1.5以上又は約0.67下、その上より好ましくは少なくとも約2以上又は約0.5以下、最も好ましくは少なくとも約2.5以上又は約0.4以下のハザード比を示すように選択されるこ

50

とが好ましい。この文脈において、用語の「約」は、所与の測定値の+/-5%を意味する。

【0032】

当業者なら、診断指標又は予後指標と、診断又は将来の臨床的転帰の予後リスクとの関連付けが統計的解析法によることを、理解するであろう。例えば、あるマーカーのレベルがXを超えることは、統計的有意性のレベルによって決定されるように、そのレベルがX以下の患者よりその患者が不良な転帰を被りやすいことを、示し得る。また、マーカー濃度のベースラインレベルからの変化は、患者の予後を反映する可能性があり、マーカーレベルの変化の程度は、有害事象の重症度に関連する可能性がある。統計的有意性は、二つ又はそれ以上の集団の比較により、並びに信頼区間及び/又はp値の決定により、決定されることが多い。例えば、非特許文献4を参照されたい。本発明の好ましい信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%、及び99.99%であり、一方、好ましいp値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、および0.0001である。

10

【0033】

さらに他の実施形態において、診断マーカー又は予後診断マーカーの多重決定をなし得て、かつマーカーにおける経時変化は、診断又は予後診断の決定に使用可能である。例えば、対象者のサンプル中のマーカー濃度は、最初に決定でき、二度目の対象者のサンプルから二度目に再度決定できる。そのような実施形態において、マーカー濃度における初回から二回目への増大は、特定の診断又は特定の予後を示す可能性がある。同様に、マーカー濃度における初回から二回目への低減は、特定の診断又は特定の予後を示す可能性がある。

20

【0034】

本明細書で使用される場合、用語の「サンプル」は、患者等の、対象者の診断、予後診断、又は評価の目的で得られる、体液のサンプルを意味する。好ましい検査サンプルには、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、痰、及び胸水が含まれる。また、当業者なら、分別操作又は精製操作、例えば、全血の血清成分又は血漿成分への分離、の後でいくつかの検査サンプルの分析がより容易になることを、理解するはずである。

【0035】

このように、本発明の方法の好ましい実施形態において、前記サンプルは、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、及び尿サンプル、又は前記サンプルのいずれかからの抽出物を含む群から選択される。

30

【0036】

本発明の好ましい実施形態において、ATT及び/又はTTR又はそれらの断片のレベルは、好ましくは、下記の選択肢の群から選択可能な方法により、死亡及び/又は転帰についての予測又はリスク層別化と関連付けられ得る：

- ・事前に決定されたサンプルの集合体におけるATT及び/又はその断片のレベルの中央値に関する関連付け、
- ・事前に決定されたサンプルの集合体におけるATT及び/又はその断片のレベルの変位値に関する関連付け、及び
- ・例えば、Cox回帰モデル等の数学的モデルによる相関付け。

40

【0037】

好ましくは、ATTのカットオフ値は、約2g/Lであって、分析対象の患者に応じて約5%、10%だけ、あるいは20%も偏位可能である。

【0038】

好ましくは、ATTの断片のカットオフ値は、例えば、断片4789.7(表3のSEQ ID NO: 10、PMSIPPEVKFNKPFVLMIEQNTKSP LFMGKVVNP TQK)については20ng/μLに相当する、約4.18pmol/μLであり、かつ断片50kD(4.18pmol/μL)は、分析対象の患者に応じて約5%、10%だけ、あるいは20%偏位可能である。

50

## 【0039】

T T Rのカットオフ値は、約10mg/dL(表4参照)であって、分析対象の患者に応じて約5%、10%だけ、あるいは20%も偏位可能である。

## 【0040】

本発明によれば、死亡の増大したリスクと関連している、A T T又はその断片並びに/あるいはT T R又はその断片のレベルは、下記のいずれかである：

- ・ A T Tについて、正常集団の中央値より低い、及び/又は
- ・ A T Tの断片について、正常集団の中央値より高い、及び/又は
- ・ T T Rについて、正常集団の中央値より低い。

## 【0041】

請求される方法は、下記のステップをさらに含むことができる：

- ・ 対象者からサンプルを採取するステップ、及び/又は
- ・ A T T又はその断片のレベルを決定するステップ、及び/又は
- ・ T T R又はその断片のレベルを決定するステップ、及び/又は
- ・ A T T又はその断片並びに/あるいはT T R又はその断片のレベルと、死亡のリスク又は生存の変位値とを関連付けるステップ。

10

## 【0042】

本発明は、下記の時点の内の一つ又は複数においてサンプルが採取される、方法に関する：対象者が医療施設又は救急車に初めて収容される時、対象者が緊急治療室に入る時、対象者が集中治療室に入る時、治療前、治療開始前、治療開始から24時間後、治療開始から48時間後、及び/又は治療開始から72時間後、並びに/あるいはそれらから10日後、14日後等、さらには20日後。

20

## 【0043】

前記対象者は、抗菌療法を必要とする感染症；敗血症、重症敗血症、及び敗血症性ショック等の感染症の進行した状態を含む群から選択される状態にある。

## 【0044】

前記対象者の死亡及び/又は転帰についての予測又はリスク層別化に加えて、対象者から採取されたサンプル中のA T T又はその断片並びに/あるいはT T R又はその断片のレベルの決定は、本発明において、対象者が全身性炎症(S I R S)、初期敗血症、重度敗血症、又は敗血症性ショックを有する可能性があるかについての鑑別診断に用いられる。

30

## 【0045】

前記サンプルは、好ましくは、血漿サンプル、血清サンプル、全血サンプル、血液サンプル又はその画分、リンパ液サンプル、尿サンプル、並びに前記サンプルのいずれかからの抽出物を含む群から選択される。

## 【0046】

A T T又はその断片並びに/あるいはT T R又はその断片のレベルは、好ましくは、E L I S A又は質量分析法又は表面増強型レーザー脱離イオン化・飛行時間型・質量分析法(S E L D I - T O F - M S)またはL C - M S / M S等の診断検査により決定される。

## 【0047】

本発明は、以下のステップを含む、敗血症を有する対象者又は敗血症様疾患を有する対象者において、ある薬剤に対する反応をモニターリングすることにより、前記疾患の重症度に関する個別の患者の療法に関して、医学的決定をおこなう方法に関する：

40

・ 以下の群から選択される様々な時点で前記患者から少なくとも二つのサンプルを採取するステップ、

- i . 治療開始前、及び/又は
- i i . 治療開始後、及び/又は
- i i i . 一つ又は複数の他の時点、

・ 前記対象者から採取された前記サンプル中のA T T又はその断片並びに/あるいはT T R又はその断片のレベルを決定するステップ、

- ・ 前記対象者から採取された前記サンプル中のA T T又はその断片並びに/あるいは

50

は T T R 又はその断片のレベルと、前記ある薬剤に対する陽性又は陰性反応とを関連付けるステップ。

【0048】

前記陽性反応は、前記薬剤による治療中に A T T のレベルが増大する場合及び / 又は前記薬剤による治療中に A T T の断片のレベルが低減する場合、並びに / あるいは前記薬剤による治療中に、T T R 又はその断片のレベルが低減する場合に、認められる。

【0049】

本発明は、好ましくは、以下のステップを含む、ある対象者における疾患の重症度に関する個別の患者の療法についての医学的決定をおこなう方法に関する：

・以下の群から選択される様々な可能な時点で前記患者から少なくとも一つのサンプルを採取するステップ、

- i . 治療開始前、及び / 又は
- i i . 治療開始後、及び / 又は
- i i i . 一つ又は複数の他の時点、

・前記対象者から採取された前記サンプル中の A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片のレベルを決定するステップ、

・前記対象者から採取された前記サンプル中の A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片のレベルと、ある治療の必要性とを関連付けるステップ。

【0050】

A T T 又はその断片のレベルと、( i ) 初期敗血症、( i i ) 重度敗血症、又は ( i i i ) 敗血症性ショックとの関連性は、A T T のレベルがあるカットオフ値より低い場合及び / 又は A T T のタンパク質分解断片のレベルがあるカットオフ値より高い場合に認められ、並びに / あるいは、T T R 又はその断片のレベルと、( i ) 初期敗血症、( i i ) 重度敗血症、又は ( i i i ) 敗血症性ショックとの関連性は、T T R 又はその断片のレベルがあるカットオフ値より低い場合に認められる。

【0051】

本発明は、好ましくは、対象者におけるある疾患を鑑別診断する方法であって、前記疾患が、( i ) 全身性炎症 ( S I R S )、( i i ) 初期敗血症、( i i i ) 重度敗血症、又は ( i v ) 敗血症性ショックを含む群から選択され、以下のステップを含む方法に関する：

( 1 ) 前記対象者から採取されたサンプル中の A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片のレベルを決定するステップ、及び

( 2 ) A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片の存在及び / 又は前記レベルと、( i ) 初期敗血症、( i i ) 重度敗血症、又は ( i i i ) 敗血症性ショックとを関連付けるステップ、

( 3 ) 但し、前記 A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片の存在及び / 又はレベルと、( i ) 初期敗血症、( i i ) 重度敗血症、又は ( i i i ) 敗血症性ショックとの関連性は、A T T の前記レベルがあるカットオフ値より低い場合及び / 又は A T T のタンパク質分解断片の前記レベルがあるカットオフ値より高い場合に認められ、並びに / あるいは

( 4 ) 前記 A T T 及び / 又は T T R あるいはそれらの断片の存在及び / 又はレベルと、( i ) 初期敗血症、( i i ) 重度敗血症、又は ( i i i ) 敗血症性ショックとの関連性は、T T R の前記レベルがあるカットオフ値より低い場合に認められる。

【0052】

また、本発明は、敗血症患者における敗血症診断用及び / 又はその予後予測用のキットであって、A T T 又はその断片並びに / あるいは T T R 又はその断片に対して特異的である抗体、アダプター、又は他の標的特異的分子；サンプルに含まれる A T T 又はその断片の量と、予後との相関関係を示す標準データ、並びにマニュアルを含むキットに関する。

【0053】

また、本発明は、敗血症患者における敗血症診断用及び / 又はその予後予測用の L C -

10

20

30

40

50

MS / MSキットであって、ATT、TTR、又はそれらの断片が、LC - MS / MSによって再保証されるキットに関する。これらは、標準データセットと比較される。

【0054】

好ましくは、SEQ ID NO : 1のタンパク質が検知される。上記及び下記の概略のように、敗血症において、完全長タンパク質のその断片に対する比は、下記の変化を示した。

【0055】

【表2】

表2.  $\alpha$ -1-アンチトリプシン

10

完全アミノ酸配列 (N-末端からC-末端まで; SEQ ID NO : 1)

```

      10      20      30      40      50      60
MPSSVSWGIL LLAGLCCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEF AFS
      70      80      90     100     110     120
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF
      130     140     150     160     170     180
QELLRTL NQP DSQLQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAF TVN FGDTEEAKKQ
      190     200     210     220     230     240
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTV FALVN YIFFK GKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV
      250     260     270     280     290     300
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL
      310     320     330     340     350     360
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA
      370     380     390     400     410
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

```

20

30

SEQ ID NO : 14は、リーダーを欠く上記のタンパク質であって、下記の配列を有する：

```

EDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEF AFS LYRQLAHQSN
STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF
QELLRTL NQP DSQLQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAF TVN
FGDTEEAKKQ INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTV FALVN YIFFK GKWER
PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG
NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL ENEDRRSASL HLPKLSITGT
YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA VLTIDEKGTE
AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

```

40

【0056】

【表 3】

表 3. 好ましい断片

SEQ ID NO.	等級	サイズ [ダルトン]	切断部位	配列
2	6	2503.9	F <sub>398</sub> -L <sub>397</sub>	LMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
3	4	4047.8	S <sub>383</sub> -I <sub>384</sub>	IPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
4	2	4134.9	M <sub>382</sub> -S <sub>383</sub>	SIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
5	3	4266.1	P <sub>381</sub> -M <sub>382</sub>	MSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
6	5	4363.2	I <sub>380</sub> -P <sub>381</sub>	PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
7	3	4476.4	A <sub>379</sub> -I <sub>380</sub>	I PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
8	4	4547.5	E <sub>378</sub> -A <sub>379</sub>	AI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
9	5	4676.6	L <sub>377</sub> -E <sub>378</sub>	EAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
10	1	4789.7	F <sub>376</sub> -L <sub>377</sub>	LEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
11	6	4936.9	M <sub>375</sub> -F <sub>376</sub>	FLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
12	5	5068.1	A <sub>374</sub> -M <sub>375</sub>	MFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
13	6	5139.2	G <sub>373</sub> -A <sub>374</sub>	AMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

10

20

表 3 は、完全長タンパク質の断片を示す。この表においては、前記断片が、敗血症の診断 / 予後診断においてのおおよその好ましさに別に分類されている（等級 1 は、非常に好ましく、等級 6 は、好ましい）。

30

SEQ ID NO : 10 は、上記の方法用に最も好ましく使用される。

SEQ ID NO : 4 は、非常に好ましく使用可能である。

SEQ ID NO : 5 及び / 又は 7 は、好ましく使用可能である。

SEQ ID NO : 3 及び / 又は 8 は、使用可能である。

SEQ ID NOs : 1、2、6、9、11、12、及び 13 も、使用可能である。

## 【0057】

上記の方法において、一つ又は複数の前記断片が検知され得る。上記の断片のいずれの組合せも本明細書に開示されており、当業者なら可能なように全てを書き留めることなく、請求されている。

40

## 【0058】

本発明は、SEQ ID NO : 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は 14 の内のいずれか一つを有するポリペプチドにも関する。

## 【0059】

さらに、SEQ ID NO : 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は 14 で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも包含される。

## 【0060】

本発明が、列挙された前記バイオマーカーの断片の決定を含む方法に関するため、本発明は、これらの断片を特異的に検知し、それらの決定を可能とする、物質にも関する。好ましい実施形態において、前記物質は、抗体である。したがって、本発明は、SEQ I

50

D NO : 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14のいずれかの配列を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体にも関する。

【0061】

さらに、本発明は、敗血症を診断する方法における、好ましくは上記の方法における、SEQ ID NO : 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、及び/又は14で示されるポリペプチドの使用にも関する。

【0062】

本発明は、さらに、切断に好適な条件下でMMP-7と共にAATをインキュベートするステップを含む方法により産生されたAATの断片用の参照基準に関する。この種の参照基準の人工的に合成された参照基準をしのぐ利点は、*in vivo*で発生するAATの断片により類似していることである。前記参照基準は、同定される*in vivo*分子の分子量の決定、その濃度決定等に、他の参照基準と同様に、使用可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1A】SIRS患者及び敗血症患者の分類 二つの決定木アルゴリズムによる、非感染病原性のSIRS (SIRS - PCT+)患者及び敗血症(重症敗血症及び敗血症性ショック)患者の分類並びにアプロチニンとしてのマーカーCM\_6.15の同定及びそのトラジロール療法との関連性。A及びB、分類木(最上部); CM = CM10アレイから得られたクラスター; C1 = Q10アレイから得られたクラスター。受信者動作特性曲線分析(中段)及びピーククラスターを用いるクラス有意化結果(下段)及び患者群(敗血症; SIRS - PCT+)識別用の決定木アルゴリズム; 青色 = 訓練サンプル、緑色 = 盲検化試験サンプル、橙色 = 5か月後に再分析された盲検化試験サンプル、赤色 = 決定木検証用に前向きに収集されている19のICU試験サンプル。

20

【図1B】SIRS患者及び敗血症患者の分類 二つの決定木アルゴリズムによる、非感染病原性のSIRS (SIRS - PCT+)患者及び敗血症(重症敗血症及び敗血症性ショック)患者の分類並びにアプロチニンとしてのマーカーCM\_6.15の同定及びそのトラジロール療法との関連性。A及びB、分類木(最上部); CM = CM10アレイから得られたクラスター; C1 = Q10アレイから得られたクラスター。受信者動作特性曲線分析(中段)及びピーククラスターを用いるクラス有意化結果(下段)及び患者群(敗血症; SIRS - PCT+)識別用の決定木アルゴリズム; 青色 = 訓練サンプル、緑色 = 盲検化試験サンプル、橙色 = 5か月後に再分析された盲検化試験サンプル、赤色 = 決定木検証用に前向きに収集されている19のICU試験サンプル。

30

【図1C】SIRS患者及び敗血症患者の分類 二つの決定木アルゴリズムによる、非感染病原性のSIRS (SIRS - PCT+)患者及び敗血症(重症敗血症及び敗血症性ショック)患者の分類並びにアプロチニンとしてのマーカーCM\_6.15の同定及びそのトラジロール療法との関連性。CM10チップ上での、トラジロールのマーカー6.51に近いm/z領域の代表的な分析結果(最上部)、非感染病原性SIRS (SIRS - PCT+)患者個人からの代表的な分析結果(中段)、及び敗血症患者個人からの代表的な分析結果(下段)。内部校正に用いた内部標準のピークには、矢印を付けた。

【図2】決定木アルゴリズムにより検討された、非感染性病原性のSIRS (SIRS - PCT+)患者及び感染性病原性のSIRS (sSEPSIS)(重度敗血症/敗血症性ショック)患者の分類用の、CM\_6.15を考慮しない二つ目の代替の決定木 分類木; QC及びC1 = Q10アレイから得られたクラスター(上段パネル); 患者群(SIRS - PCT+; sSEPSIS)識別用のピーククラスター及び決定木アルゴリズムを用いる、ROC曲線分析(下段右側のパネル)及び分類結果(下段左側のパネル)。青色 = 訓練サンプル、緑色 = 盲検化試験サンプル、橙色 = 5か月後に再分析された盲検化試験サンプル、赤色 = 決定木検証用に前向きに収集されている19のICU試験サンプル。

40

【図3】SIRS - PCT+のサンプル及びsSEPSISのサンプルの正規化ProteinChipアレイ分析結果の代表例 SIRS - PCT+のサンプル及びsSEPSISのサンプルの正規化ProteinChipアレイ分析結果の代表例。ゲル一覧に示

50

すように、異なる研究群の患者からの代表的なMALDI-TOF-MSタンパク質パターン。左側：チップタイプQ10；低分子量領域、4.4 kDaないし5 kDaのチップタイプQ10；ピーククラスターC1\_\_4.7。中間：チップタイプQ10；中間分子量領域、12.5 kDaないし15 kDa；ピーククラスターC1\_\_13.8。右側：チップタイプQ10；高分子量領域、30 kDaないし60 kDa；ピーククラスターQC\_\_55.7。SIRS-PCT+患者及び敗血症患者を識別するピーククラスターは、矢印およびボックスで強調されている。

【図4】トランスサイレチン(TTR)として識別発現されたピークC1\_\_13.8の同定及び検証 (A) TTRのウェスタンブロット分析；sSIRS=SIRS-PCT+患者からのサンプル；sSEPSIS=sSEPSIS患者からのサンプル；+=TTR陽性の対照；-=TTR陰性の対照。(B) 69名のsSEPSIS患者からのサンプル及び59名のSIRS-PCT+患者からのサンプルの $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのTTR濃度の箱ひげ図。(C) 特異的に発現されるマーカーC1\_\_13.8によるTTR増大確認のための、TTR特異性抗体(下側のパネル)又は対照抗体のいずれかをを用いた免疫喪失後のサンプルの代表的な正規化ProteinChipアレイ分析結果。

【図5】QC\_\_55.7及びC1\_\_4.7の精製及び同定 (A) ゲル内消化並びにMS分析及びMALDI-TOF/TOF分析によって、-1-アンチトリプシン(ATT)及び線維素原(FBG)として同定されている、三つのスポットを示す、SIRS-PCT+患者及びsSEPSIS患者からのサンプルの10% Maxi-PAGE (B) ATTが、狭いバンドを有する二つのアイソフォームで主にsSEPSISサンプル中に存在していることを示す、抗ATTウェスタンブロット (C) SIRS-PCT+患者からのサンプルに比べ、sSEPSIS患者からのサンプルにおける増大したATT断片を示すための等電点電気泳動法 (D) sSEPSIS患者におけるATTの切断によって4.79 kDaのピークが生成されることを実証するため、我々が、sSEPSIS患者からの少量の血漿と共にATTをインキュベートし、sSEPSIS血漿の存在下でATTが切断され、4.78 kDaの断片が生じた (E) 還元剤の存在下で、汚染している血清タンパク質を沈殿させた後の代表的なProteinChipアレイの分析結果。ほとんど存在していないアルブミンのピークに比べ、55.7 kDaのATTのピーク及び28 kDaの領域における二重に標識されたピーク(55982.11+2H)のピーク強度の増大により、ATTの増強が示されている。

【図6】アミノ酸配列 アンチトリプシンの活性中心のアミノ酸配列。

【図7】敗血症患者 アンチトリプシンの断片を含む、敗血症患者からのSELDIスペクトル。

【図8】敗血症患者 四つの患者集団内でのLC-MSによる4.8 kDaのアンチトリプシン断片の定量化。そのレベルは、非感染性の多傷害患者及びSIRS患者と比べる場合、感染病原性の患者集団において著しく高い。媒体の高い濃度が、好中球減少症患者及び軽度感染症患者において測定可能である。

【図9】 -1-アンチトリプシンの完全アミノ酸配列(N-末端からC-末端まで)及びその断片

【図10】バイオマーカーレベルは、重度敗血症患者においてのみ増大する 重度敗血症患者又は重度SIRS患者から採取したサンプルにおけるバイオマーカーレベルの、乳癌(Mamma-Ca)患者から採取したサンプルにおけるバイオマーカーレベルとの比較。

【実施例】

【0064】

表1：患者の臨床特性

データは、平均値 $\pm$ SD(数値は、小数第1に四捨五入した)及びパーセントで示す。SIRS-PCT-は、 $<0.3 \text{ ng}/\text{mL}$ の血清PCTレベルを表わし、SIRS-PCT+は、 $>0.3 \text{ ng}/\text{mL}$ の血清PCTレベルを表わす。\*APACHE-IIは、急性生理学及び慢性健康評価IIスコアである。この尺度のスコアは、0から71までであり

10

20

30

40

50

、スコアが高いほど疾患の重症度が高いことを示す。\* \* S O F A は、逐次臓器不全評価スコアである。S O F A の小計スコアは、6 の臓器系のそれぞれについて0 から4 までであり、総計スコアは0 から2 4 までであって、スコアが高いほど臓器不全の重症度が高いことを示す。

#### 【0065】

##### 材料及び方法

2002年9月から2003年9月まで及び2006年1月から2006年3月まで麻酔科及び集中治療科の集中治療室（ICU）に収容された患者の内、ACCP / SCCM 合意会議の敗血症基準又は急性臓器不全を伴い非感染性病原のSIRSの基準を満たす患者それぞれを本研究に組み入れた（ICD - 10 - GMコード）。

10

#### 【0066】

非感染病原性SIRS患者において、ICU収容後に血液サンプルを採取し、内67名（83%）ではICU収容後24時間以内に、7名（8.6%）では48時間以内に、残りの患者では48時間より後に採取した。重症敗血症患者又は敗血症性ショック患者においては、最初の敗血症誘発性臓器不全発症後24時間以内に採取した。18歳未満、妊婦、又はインフォームドコンセントを得られなかった患者は、除外した。非感染病原性SIRS患者については、組み入れ日の血清プロカルシトニン（PCT）濃度によりさらに層別化した。<0.3 ng / mLの血清PCTレベルはPCT陰性SIRS（SIRS - PCT - ）に、上昇した血清PCTレベルはPCT陽性SIRS（SIRS - PCT + ）に分類した。倫理委員会は、本研究を承認した。

20

#### 【0067】

標準化プロトコルに従い、動脈血10 mLをEDTAチューブ（Sarstedt株式会社、Neumbrecht市、ドイツ）内に吸入し、直後にプロテアーゼ阻害剤カクテル（商品名、Complete Mini ; Roche Diagnostics社、Mannheim市、ドイツ）800 µLを加えた。チューブの内容物をおだやかに混合し、3750 rpm（チューブの中央で2516 g）にて4 で10分間遠心分離し、血漿アリコートに-80 で直ちに冷凍した。159名の患者から合計して166個のサンプルを採取し、SIRSからsSEPSISへと分類が変更された7名の患者においては、ICU滞在中の異なる時点で二つずつサンプルを採取し、それぞれのサンプル群に割り付けた。

30

#### 【0068】

SELDI - TOF - MSは、Series 4000 ProteinChip SELDIリーダー（Bio - Rad社、Hercules市、カリフォルニア州）で実施し、Biomek 2000液体操作ステーションをProteinChipで処理するためのサンプル希釈用に用いた。サンプルは、4 で1晩解凍し、2回分析した。アリコートは、1回又は2回それぞれ3度目及び4度目の測定のために解凍した。2度目の測定において、既にU9緩衝液で変性され-80 で分析までに保管されていた、1度目の測定で残ったアリコートを用いた。タンパク質チップ分析のため、サンプル40 µLを変性緩衝液（9 M尿素、1%Chaps）60 µLで変性し、30分間インキュベートした。変性したサンプルの内20 µLは、0.1 mol / LのトリスHCl、pH9.0（Q10）、又は0.05 mol / LのHEPES、pH7.3（CM10）で5倍に希釈し、好適なチップの準備及び洗浄の後に、それぞれQ10 ProteinChip アレイ（強陰イオン交換アレイ ; Ciphergen Biosystems社、Fremont市、カリフォルニア州）上及びCM10 ProteinChip アレイ（弱陽イオン交換アレイ ; Ciphergen Biosystems社、Fremont市、カリフォルニア州）上に載せた。DPC MicroMix 5 シェーカー（Promega社、Madison市、ウィスコンシン州）上で室温で30分間インキュベートした後、各チップを好適な緩衝液で3回洗い、水で2回リンスした。残った液体を除去するため、ProteinChipチップを2950 rpmで10秒間遠心分離し、5分間風乾した。各チップを分析する前に、エネルギー吸収分子（EAM）の飽和溶液（アセトニトリ

40

50

ル75  $\mu$ L及び1%トリフルオロ酢酸75  $\mu$ Lの中にシナピン酸5mgが溶解している) 1  $\mu$ Lをスポット表面に塗布した。質量分析は、350レーザーショットを含む自動化データ収集プロトコルを用いて、ProteinChipリーダー(PCS 4000、Ciphergen Biosystems社、Fremont市、カリフォルニア州)で実施した。二つのスペクトル部: 1~30kDa及び30~200kDa:に分けられた、1~200kDaの質量範囲を用いた。レーザーエネルギーは、1~30kDa及び30~200kDaの測定に対して、CM10チップ用に3000nj及び4900nj(予熱ショットは3700nj及び5500nj)、Q10チップ用に3250nj及び5200nj(予熱ショットは3750nj及び5900nj)にそれぞれ設定した。各ポイントについて、データを平均化して、スペクトルとした。質量精度は、既知のタンパク質基準を用いて内部的に、かつ一体型ペプチド/タンパク質分子量基準を用いて外部的に、補正した。

10

#### 【0069】

スペクトルは、全イオン電流(TIC)によって正規化した。ほとんどの場合、最初の決定木用に、二つの異なる領域(1.5~200kDa及び5.5~200kDa)で行い、正規化因子が平均正規化因子の2.55倍を超えるスペクトル及び0.42倍を下回るスペクトルを本分析から除外した。異なる測定間でのピーク強度の比較可能性を確保するため、最初の測定の正規化の後で得られた、外部正規化係数を用いた。ピークは、チップタイプ毎に、3つの異なる領域(即ち、 $m/z$ : 1500~10000、10000~30000及び30000~200000)でCiphergen Express ソフトウェア(バージョン3.0; Ciphergen Biosystems社、Fremont市、カリフォルニア州)を用いて検知された。ピークのクラスターは、ベースライン減算後に下記の条件で検知された: ファーストパスについて、最小ピーク閾値が5%で $S/N$ 比>5並びにセカンドパスにおいてクラスター完了のため、分析対象のクラスター領域に応じてクラスターマスインドウが0.1%~0.3%で $S/N$ 比>2。次いで、各ピークについての強度値が、分析対象の二つのサンプルペアのそれぞれについて平均化された。3つの異なる $m/z$ 領域についてのピークデータは、CSVファイルとしてMicrosoft Excel(Microsoft社、Redmond市、ワシントン州)中にエクスポートされた。CART分析は、全質量範囲(1.5~200kDa)のピーク強度を含む一つのファイルを得るために統合された、二つのチップタイプからの三つの異なる質量領域のピークデータを含むCiphergen バイオマーカーパターンソフトウェア(BPS)バージョン5.0 CSVファイルを用いて実施された。トレーニングセットからのデータは、BPS内にインポートされ、上記のように、分類木が樹立された。

20

30

#### 【0070】

統計的解析は、SPSS 18を用いて実施された。平均ピーク強度の算出並びに第二の決定木(図S2 A~C)の個別マーカーのボックスプロット及びROC曲線作成のために、三つのマーカーの全てについて完全なデータセットを有するサンプルのみを含ませた。

#### 【0071】

タンパク質は、陰イオン交換クロマトグラフィー及び/又は一次元SDS-PAGEにより精製された。対応するサイズを有するスポットは、摘出され、ゲル内トリプシン消化され、MS分析を受けた。詳細については、本論文のオンラインバージョンに添付される補足データ中の補足文を参照されたい。

40

#### 【0072】

- 1 - アンチトリプシン(ATT)は、Glaserら(15)の修正法に従って濃縮された。トランスサイレチン(TTR)は、比濁法によりIMMAGE(登録商標)免疫化学システム上で製造業者(Beckman Coulter社、Brea市、カリフォルニア州)に指示に従って測定された。

#### 【0073】

50

## 結果

非感染性病原SIRS患者とsSEPSIS患者とを識別するSELDI-TOF-MSの能力を試験するため、血漿タンパク質プロファイルを、臨床ACCP/SCCM合意基準に従って分類された患者からのサンプルにおいて分析した。患者159名からの166のサンプル、重度敗血症又は敗血症性ショック(sSEPSIS)の患者からの81のサンプル、非感染性病原SIRS患者からの85のサンプルが組み込まれた。例えば、SIRSからsSEPSISへと分類が変更された7名の患者においては、二つずつサンプルを採取し、それぞれのサンプル群に割り付けた。非感染病原性SIRS患者は、組み入れ日の血清PCT濃度により、PCT陰性(PCT<0.3ng/mL)SIRS患者(SIRS-PCT-)及びPCT陽性(PCT>0.3ng/mL)SIRS患者(SIRS-PCT+)にさらに分類された。診断質量パターン同定のプロトコルには、以下のステップが含まれていた：(1)決定木を得るための、既知の診断を有するサンプルを含む訓練セットの分析；(2)同一コホートの追加の患者からの試験セットにおいての、所定の決定木の識別能の検証；(3)5か月後に同一の試験セットの分析を繰り返すことによる、この識別能の再現性の試験；及び(4)独立した盲検化試験セットにおけるこの分析の繰り返し。訓練群、試験群、及び予後試験群に割り付けられた、SIRS-PCT-患者、SIRS-PCT+患者、及びsSEPSIS患者の臨床特性を表1に示す。

10

## 【0074】

精緻化されたアルゴリズムは、SIRS-PCT陽性患者とsSEPSIS患者とを識別するが、トラジロール療法に関係するアプロチニンに依存するPCTは、SIRS患者とsSEPSIS患者とを識別できない

20

我々は、最初に、我々の研究コホートにおける感染病原性SIRS患者と非感染病原性SIRS患者とを識別するためのPCTの診断値を評価した。SIRSサンプルについてのPCTの中央値(n=75; PCT=6.79[中央値]; 3.38~11.50[25~75パーセントイル])並びにsSEPSISサンプルについての中央値(n=72; PCT=4.02[中央値]; 1.84~12.46[25~75パーセントイル])の間で有意な違いは認められなかった(Mann-Whitney U検定によるp=0.62)。ROC曲線による解析は、PCTがSIRS患者からのサンプルとsSEPSIS患者からのサンプルとを識別するには不十分であることを、明らかにした(AUC=0.525; 95%CI=0.428~0.621; オンライン補足データの図S1A)。訓練群、試験群、及び予後試験群において、SIRS-PCT+サンプルとsSEPSISサンプルとを識別するPCTの識別能に注目する場合にも、同じである(AUC=0.411~0.69; オンライン補足データの図S1B~D)。

30

## 【0075】

あるアルゴリズムは、SIRS-PCT+患者とsSEPSIS患者とを識別し、盲検化試験セットにおいて検証されている

次に、我々は、質量分析結果がSIRS-PCT+患者とsSEPSIS患者とをさらに識別できるか試みてみた。この目的のために、54名の患者(sSEPSIS患者、n=31、PCT=25.84±75.4; SIRS-PCT+患者、n=23、PCT=20.01±34.3; 表1)からのスペクトルによるCART解析を実施した。得られた分類アルゴリズムは、sSEPSIS患者とSIRS-PCT+患者との識別に重要なのが6.5kDaのピークであることを、明らかにした。図1に示す、二つのアルゴリズムの例は、それぞれ96%及び100%のSEPSIS患者及びSIRS-PCT+患者の正確な同定を可能とした。これらの結果の検証には、同様な構成の別の患者77名(表1: SIRS-PCT+患者、n=36、PCT=16.98±26.1; sSEPSIS患者、n=41、PCT=15.82±33.1)を含む盲検化試験セットを用いた。図1A/Bに示すこれらの分類アルゴリズムは、再度、患者37名中36名のsSEPSIS及び患者25名中24名のSIRS-PCT+をそれぞれ正確に予測した(感度=90.2%/87.8%、特異度=66.6%/69.4%; 試験セットの予測AUC、sSEPSISについて0.756/0.753)。

40

50

## 【0076】

繰返しにより、診断タンパク質パターン分析の長時間後での再現性が示され、独立した試験セットにおいて臨床的検証が可能である

盲検化試験セットは、訓練セットと同一の条件を用いて5か月後に再分析された。同一の決定木を用いて、我々は、sSEPSIS患者(78%; 29/37; AUC = 0.841)及びSIRS-PCT+患者(92.8%; 26/28; AUC = 0.872)の正確な同定についての同様な結果を得た(図1)。更なる検証のため、この分析を、サンプリング時にPCT陽性であって、後に従来からの臨床基準に従ってsSEPSIS群(n = 9)又はSIRS-PCT+群(n = 10)のいずれかに後向きに割り付けられた、19名のICU患者の独立した盲検化試験セットにおいて繰り返した。図1に示すように、サンプルは、それぞれsSEPSIS患者及びSIRS-PCT+患者の77%/66%及び100%/100%において正確に同定された。

10

## 【0077】

CM\_6.15は、トラジロール療法に関係するアプロチニンとして同定される

次に、我々は、最初に特異的に発現されるマーカーCM\_6.15の同定を試みた。この研究用にサンプルが収集された2002年及び2003年において、冠動脈バイパス移植手術(CABG)を受ける患者は、術中失血及び輸血の必要性を低減させるために一般にアプロチニン(商品名、トラジロール(登録商標))を投与されたが、我々のSIRS-PCT+患者にほとんど心臓手術を受けた(表1)。心臓手術患者98名中70名でアプロチニン用量の後向き評価のための記録が利用可能であって、そのほとんど(94.29%)は、5億単位から最高80億単位までの総用量を投与された。アプロチニンは、6.512kDaの分子量を有する、天然のタンパク質分解酵素阻害剤である。CM\_6.15がアプロチニンであるエビデンスは、CM10チップ上に(登録商標)を塗布した後のSELDI-TOFスペクトルと、トラジロール(登録商標)を投与されたSIRS-PCT+患者からのスペクトルとの比較によってもたらされた(図1)。6512.74DaのマーカーCM\_6.15は、6512.78Daのアプロチニンのピークに対応し、さらに、CM\_6.15は、SIRS-PCT+患者(患者番号162;トラジロール(登録商標)50億単位を投与)に存在するが、トラジロール(登録商標)を投与されていないsSEPSIS患者(患者番号140)においてはほぼ存在していない。CM\_6.15のピーク強度は、トラジロール(登録商標)15億単位以上を投与されたSIRS患者に適用されたトラジロール(登録商標)の総用量と相関している(Pearsonの相関係数 = 0.848; p < 0.001)。したがって、CM\_6.15は、心肺バイパス法を受けるそれらの患者における予防的なトラジロール(登録商標)投与を反映するため、異なる患者群を真に識別するが、CM\_6.15は、感染性のSIRS(重症敗血症/敗血症性ショック)/重度臓器不全を有する非感染性SIRSの過程における病態生理学的マーカーではない。

20

30

## 【0078】

代替の識別決定木は、CM\_6.15とは無関係である

代替の識別決定木作成のため、我々は、異なる分析設定、例えば、上記のマーカーCM\_6.15の除外を評価した。図2には、練習セットにおいてsSEPSIS患者とSIRS-PCT+患者とを識別する(感度、93%; 特異度、95%)、二つ目の決定木が示されている。興味深いことに、この決定木は、最初の決定木において重要な予測因子であることが既に示されている、二つのクラスター(4.7kDa、13.8kDa)を含んでいた。追加される主な識別要素は、Q10表面上で検知され、約55.7kDaの分子量を有していた。得られた正規化ProteinChipアレイ分析結果の代表的な例を図3に示す。この決定木の試験セットにおける最初の検証で、85.3%の感度、86.1%の特異度が得られた(図2)。この検証は、5か月後に、86.4%の感度、92.8%の特異度として再現された(図2)。独立した盲検化繰返し試験セットにおいてこの決定木を用いると、sSEPSIS患者で88.8%、SIRS-PCT+患者で90%の正確な同定が再度もたらされた(全分類アルゴリズムのROC曲線下面積(ROC積分値))

40

50

、即ち、 $AUC = 0.911$ 、図2)。SIRS - PCT+及びsSEPSISの予測についての最初の試験サンプル及び独立した盲検化試験サンプルにおける三つの関連するマーカーのROC面積は、それぞれ $0.895 \sim 0.933$  (QC\_\_55.7)、 $0.656 \sim 0.910$  (C1\_\_13.8)、及び $0.712 \sim 0.922$  (C1\_\_4.7)の範囲であった(オンライン補足データの図S2A~C)。

#### 【0079】

特異的に発現するタンパク質の同定は、従来からの免疫分析法及びSELDI - TOF - MSによる免疫捕捉の検証を可能にする

特異的に発現するタンパク質の同定のため、対象のタンパク質ピークが多量に存在するサンプルを使用した。同定のため、サンプルp218のアリコートの分別後に陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた、 $13.8$  kDaのタンパク質フラクション4は、 $12\%$  Mini - PAGEによって精製された。 $m/z 55.7$  kDaのピークは、 $10\%$  Maxi - PAGE上で精製され、対応するサイズのスポットは、抽出され、ゲル内でトリプシン消化された。得られた断片のSELDI - TOF / TOF分析及びそれに続くMASCOTサーチは、トランスサイレチン(TTR)としてマーカーC1\_\_13.8の同定を可能にした。TTRの特異的に発現した $13.8$  kDaのタンパク質への割合は、TTRが主にSIRS - PCT+患者において発現される一方、sSEPSIS患者においては検知されないことを示す、ウェスタンブロット分析(図4A)によって最初に確認された。次に、TTRは、69名のsSEPSIS患者及び59名のSIRS - PCT+患者のサンプルで測定され、平均濃度は、それぞれ $7.15$  mg / dL ( $95\%CI = 6.35 \sim 7.95$ )及び $10.7$  mg / dL ( $95\%CI = 10.0 \sim 11.5$ )であって(図4B)、C1\_\_13.8のピーク強度が従来からのTTRの免疫分析結果(図S2B)と相関していることを示している。最後に、TTR特異的抗体を用いる免疫喪失は、対照抗体を用いた後に認められるピーク強度に比べ、 $13.8$  kDaのピーク強度の大幅な低下をもたらした(図4C)。

#### 【0080】

$m/z 55.7$  kDaのピークの同定のための、 $10\%$  Maxi - PAGE上での精製後に得られた三つのスポットの分析(図5A)は、 $\alpha$  - 1 - アンチトリプシン(ATT)及び線維素原(FBG)の同定をもたらした。SIRS - PCT+患者及びsSEPSIS患者におけるウェスタンブロット分析は、FBGの発現に差がないことを示した(データは示さず)。一方、ATTは、狭いバンドを有する二つのアイソフォームで主にsSEPSISサンプル中に存在している(図5B)。このため、ATTがsSEPSIS患者内で分解されると仮定した。この仮定を確認するため、我々は、ATTのアイソフォームを等電点電気泳動法で分析した。図5Cに示すように、SIRS - PCT+患者からのサンプルに比べ、より明白なATTの断片化をsSEPSIS患者からのサンプルに認めた。この結果は、炎症部位で好中球から放出されるメタロプロテイナーゼによってATTが切断されることを示した、Vissersらの結果(16)と整合している。予想された断片は $4790$  Daであり、 $4.79$  kDaでQ10チップ上でsSEPSIS患者からのサンプルに認められる3番目に重要な識別ピークのサイズそのものである。このピークが、sSEPSIS患者におけるATTの切断から生じることを確認するため、我々は、図5Dに示すように、sSEPSIS患者からの少量の血清と共に、ATT(商品名、Prolastin(登録商標); Bayer Vital社、Leverkusen市、ドイツ)をインキュベートした。ATTは、sSEPSIS患者からの血清の存在下で切断され、対照サンプル中には存在しない $4.78$  kDaの断片が生じた。この結果は、sSEPSIS患者からのサンプルで認められた $55.7$  kDaのピーク発現の低減(オンライン補足データの図S2C)が、 $50$  kDa領域におけるピーク強度増大(データは示さず)に伴われるとの知見に適合する。最後に、 $55.7$  kDaのピークがATTに対応することをさらに確認するため、我々が、まず、ATTを免疫捕捉した。 $55.7$  kDa及び二重に標識化された $28$  kDaのピークについてのピーク強度低減が小さかったため(データは示さず)、次に、我々は、汚染している血漿タンパク質を還元剤の存在下

10

20

30

40

50

で沈殿させる、G l a s e rらの修正法(15)に基づき、A T Tを強化した。図5 Eに示すように、A T Tの強化は、他のタンパク質、例えば、アルブミンのピーク強度に比べ、55.7 k D aのピーク及び28 k D aの領域で二重に標識化されたピークのピーク強度の大幅な増大を生じ、55.7 k D aのピークが実際にA T Tであることをさらに裏付けた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0081】

【非特許文献1】Bone et al., Chest 101:1644-53, 1992

【非特許文献2】Giamarellos-Bourboulis et al., Intensive Care Med. 28: 1351-56, 2002

【非特許文献3】Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. 敗血症及び器官損傷の定義並びに敗血症における革新的治療の利用指針(Definition s for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapie s in sepsis.) The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun.;101(6):1644-1655

【非特許文献4】Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983

図1:

A

Node = 節

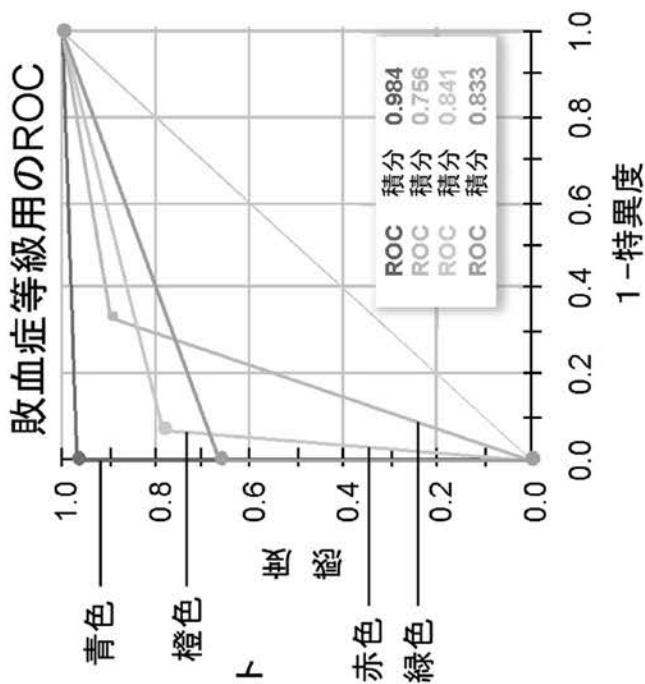
Class = 等級

Cases% = 症例%

Actual Class = 実際の等級

Total Class = 総症例

Percent Correct = 正確なパーセント



Node 1	
Class = SEPSIS	
CM6520_7 <= 3.585	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	23 42.6
sSEPSIS	31 57.4
W = 54.000	
N = 54	

Terminal Node 1	
Class = SEPSIS	
C14798_1 <= 7.383	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	0 0.0
SEPSIS	27 100.0
W = 27.000	
N = 27	

Node 2	
Class = SIRS-PCT+	
C14798_1 <= 7.383	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	23 85.2
SEPSIS	4 14.8
W = 27.000	
N = 27	

Node 3	
Class = SIRS-PCT+	
C113841_ <= 5.918	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	23 92.0
SEPSIS	2 8.0
W = 25.000	
N = 25	

Terminal Node 4	
Class = SEPSIS	
C14798_1 > 7.383	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	0 0.0
SEPSIS	2 100.0
W = 2.000	
N = 2	

Terminal Node 2	
Class = SEPSIS	
C113841_ <= 5.918	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	0 0.0
SEPSIS	1 100.0
W = 1.000	
N = 1	

Terminal Node 3	
Class = SIRS-PCT+	
C113841_ > 5.918	
Class	Cases %
SIRS-PCT+	23 95.8
SEPSIS	1 4.2
W = 24.000	
N = 24	

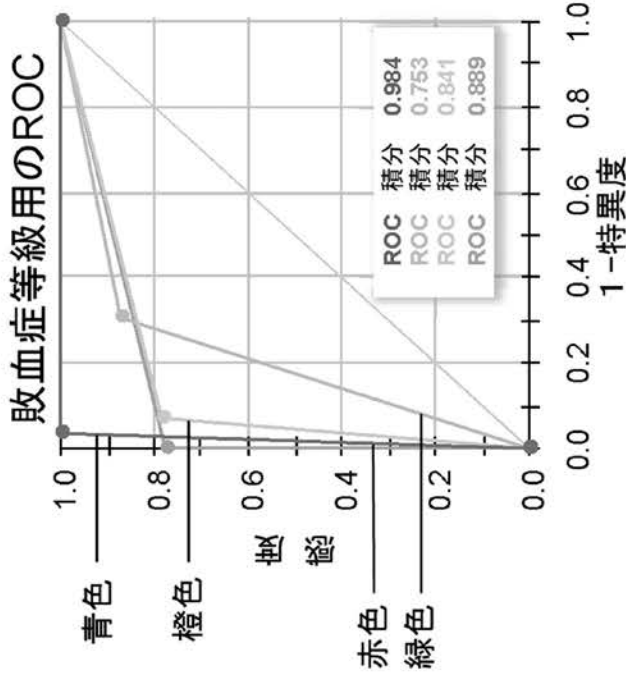
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=30	SIRS-PCT+ N=24
SEPSIS	31	96.774	30	1
SIRS-PCT+	23	100.00	0	23
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=49	SIRS-PCT+ N=28
SEPSIS	41	90.244	37	4
SIRS-PCT+	36	66.667	12	24
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=31	SIRS-PCT+ N=34
SEPSIS	37	78.378	29	8
SIRS-PCT+	28	92.857	2	26
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=6	SIRS-PCT+ N=13
SEPSIS	9	66.667	6	3
SIRS-PCT+	10	100.00	0	10

【図 1 A】

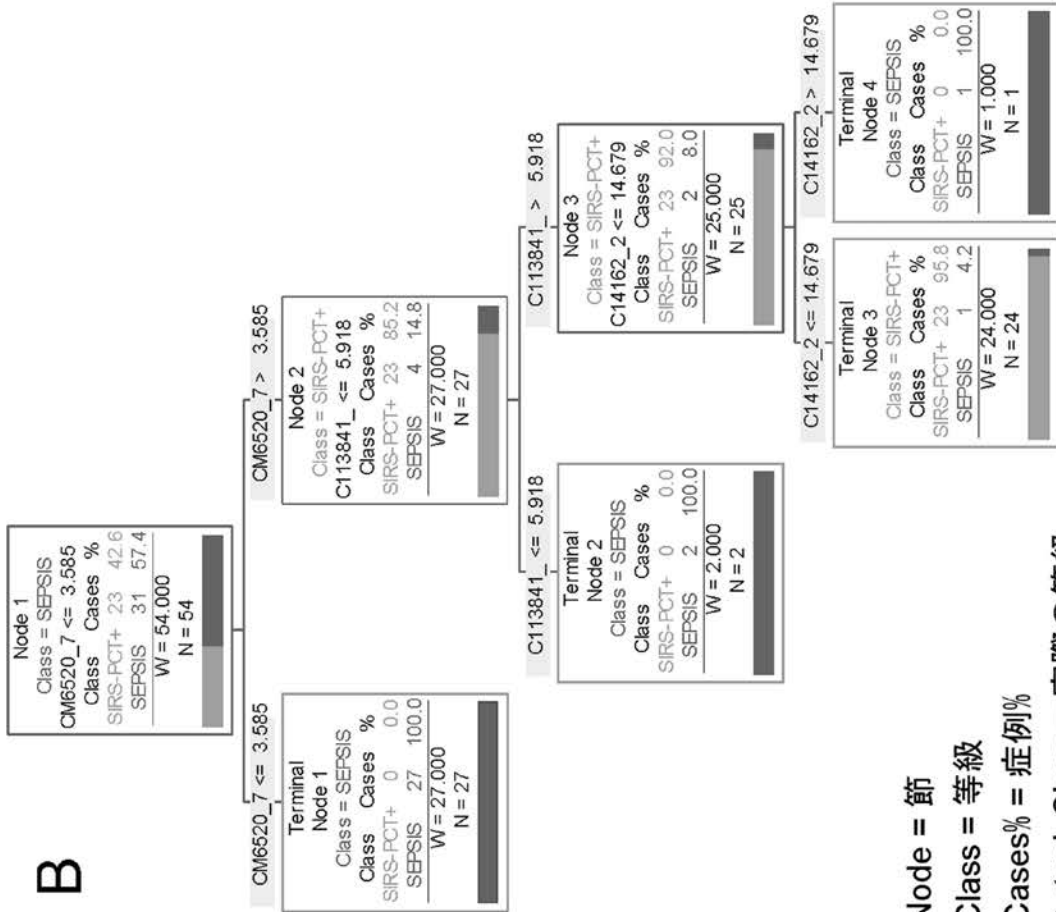
【図 1 B】

図 1:

B



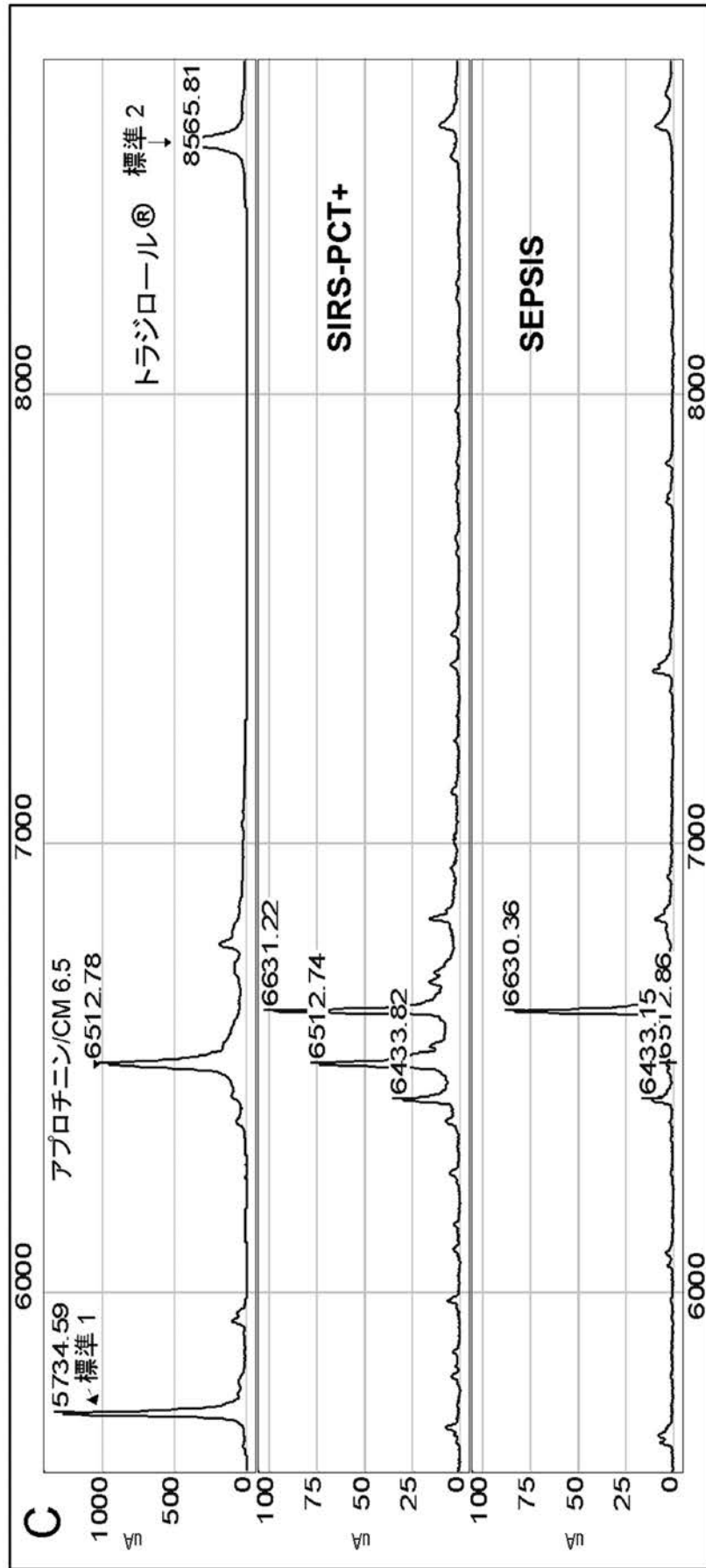
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=30	SIRS-PCT+ N=24
SEPSIS	31	96.774	30	1
SIRS-PCT+	23	100.00	0	23
<b>Actual Class</b>	<b>Total Cases</b>	<b>Percent Correct</b>	<b>SEPSIS N=47</b>	<b>SIRS-PCT+ N=30</b>
SEPSIS	41	87.805	36	5
SIRS-PCT+	36	69.444	11	25
<b>Actual Class</b>	<b>Total Cases</b>	<b>Percent Correct</b>	<b>SEPSIS N=31</b>	<b>SIRS-PCT+ N=34</b>
SEPSIS	37	78.378	29	8
SIRS-PCT+	28	92.857	2	26
<b>Actual Class</b>	<b>Total Cases</b>	<b>Percent Correct</b>	<b>SEPSIS N=7</b>	<b>SIRS-PCT+ N=12</b>
SEPSIS	9	77.778	7	2
SIRS-PCT+	10	100.00	0	10



Node = 節  
 Class = 等級  
 Cases% = 症例%  
 Actual Class = 実際の等級  
 Total Class = 総症例  
 Percent Correct = 正確なパーセント

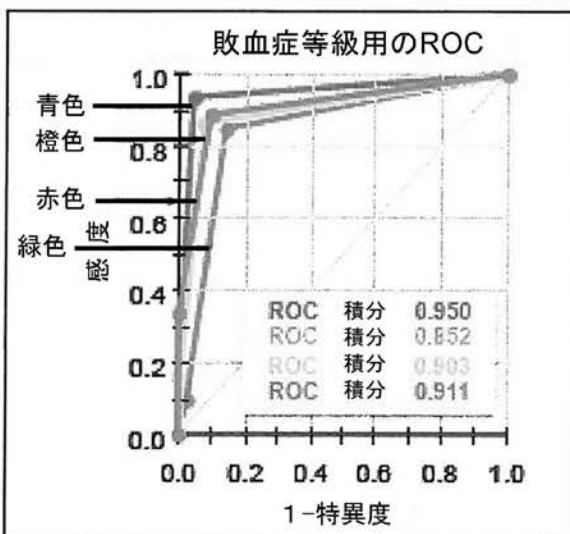
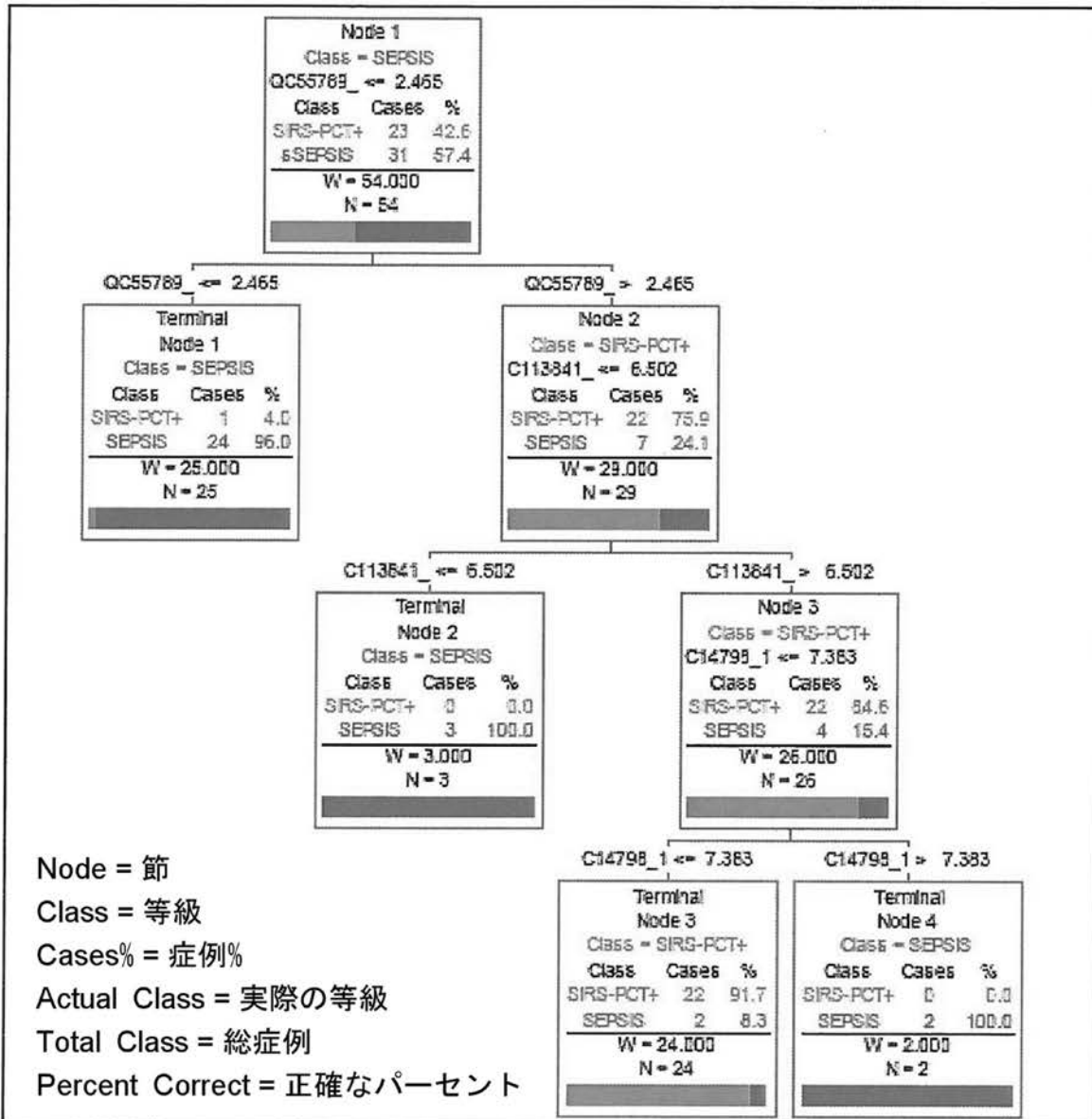
【 図 1 C 】

図1:



【 図 2 】

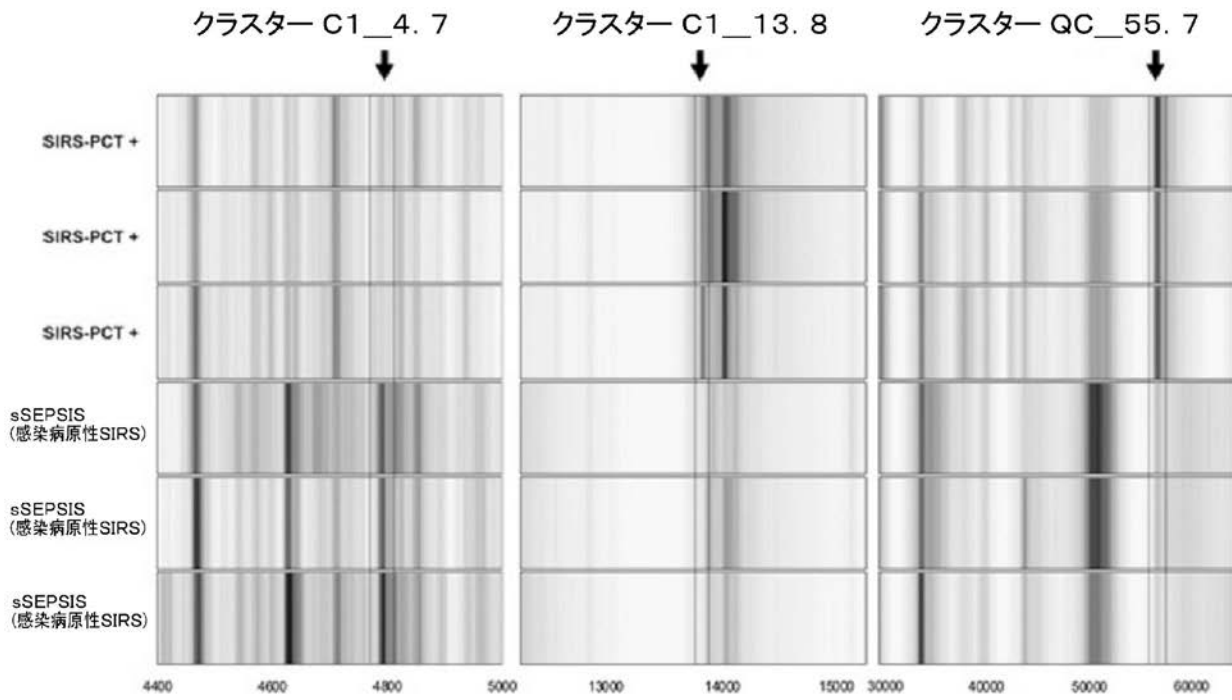
図2:



Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=30	SSIRS-PCT+ N=24
SEPSIS	31	93.548	29	2
SIRS-PCT+	23	95.652	1	22
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=40	SSIRS-PCT+ N=37
SEPSIS	41	85.366	35	6
SIRS-PCT+	36	86.111	5	31
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=34	SSIRS-PCT+ N=31
SEPSIS	37	86.466	32	5
SIRS-PCT+	28	92.857	2	26
Actual Class	Total Cases	Percent Correct	SEPSIS N=10	SSIRS-PCT+ N=9
SEPSIS	9	88.889	8	1
SIRS-PCT+	10	90.000	1	9

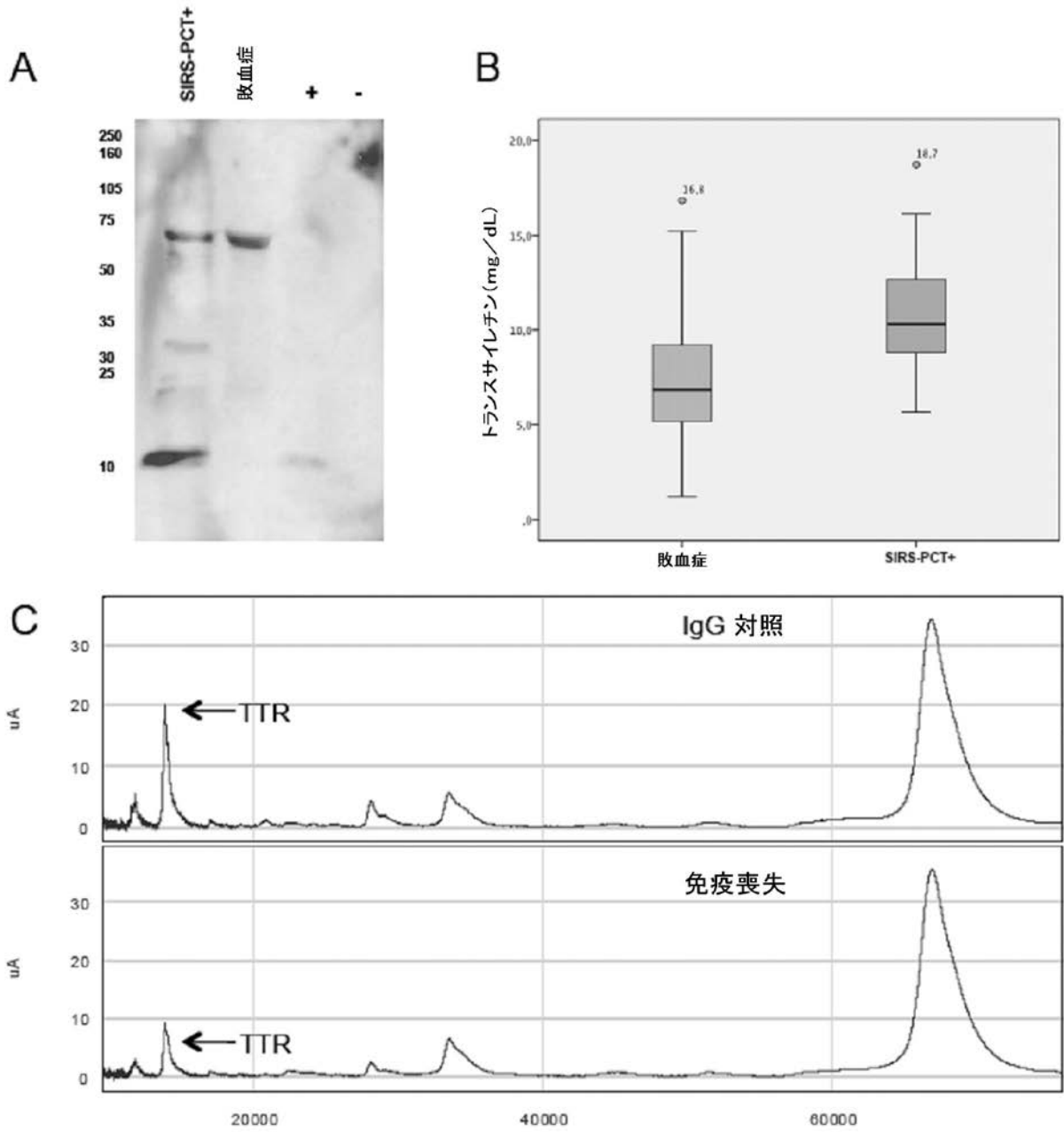
【 図 3 】

図3:



【 図 4 】

図4:



【 図 5 】

図5:

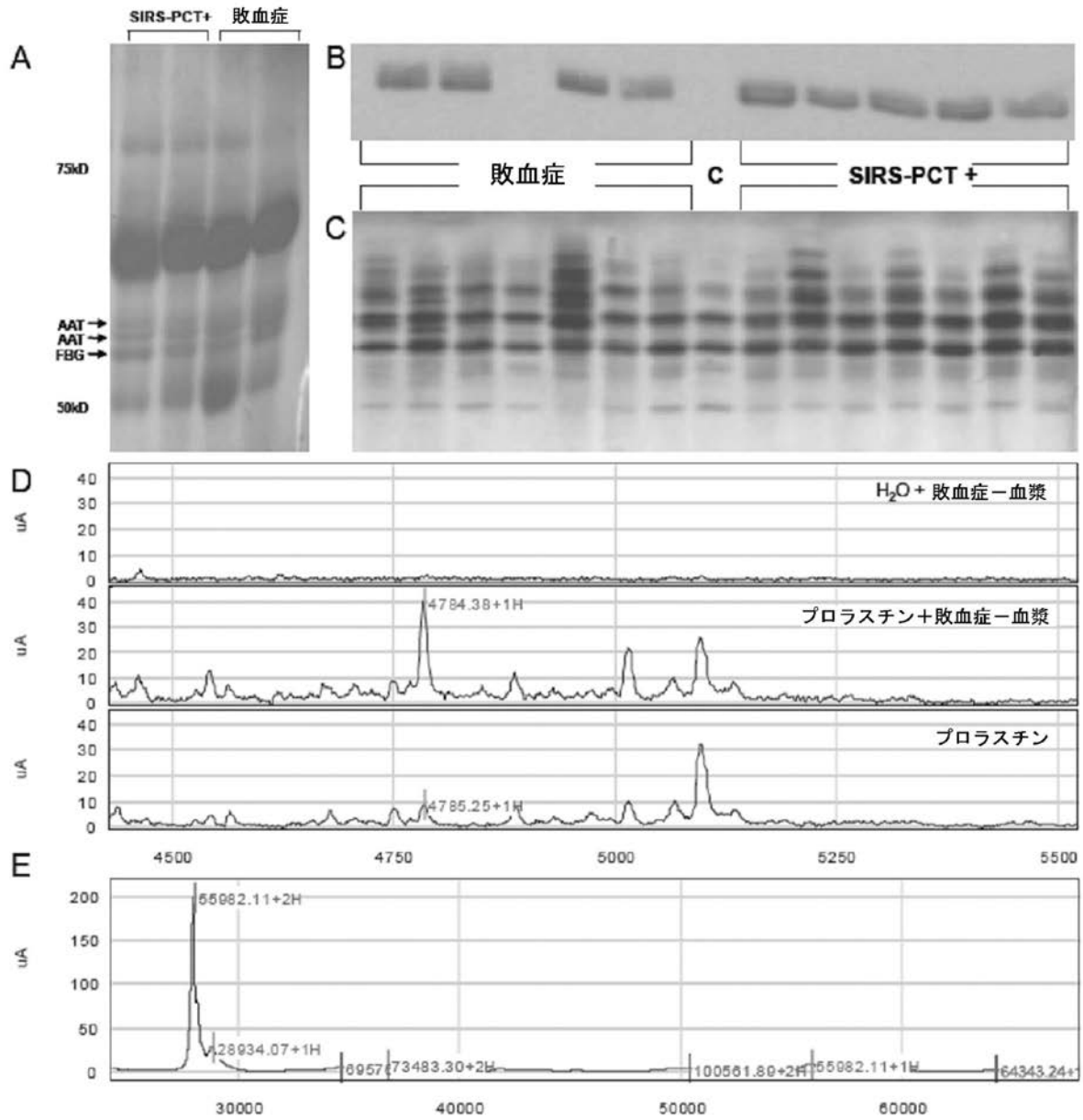
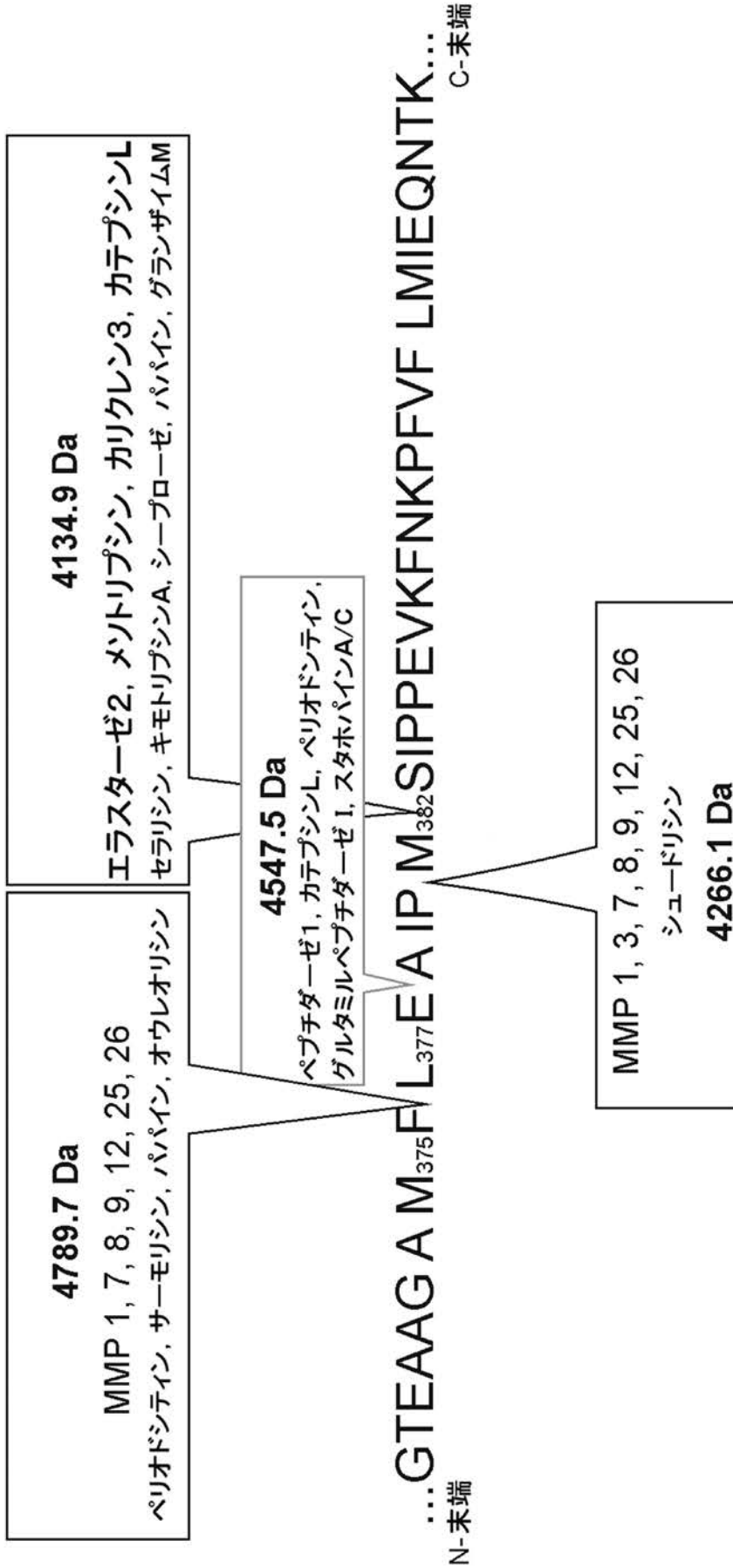


図6:



【 図 7 】

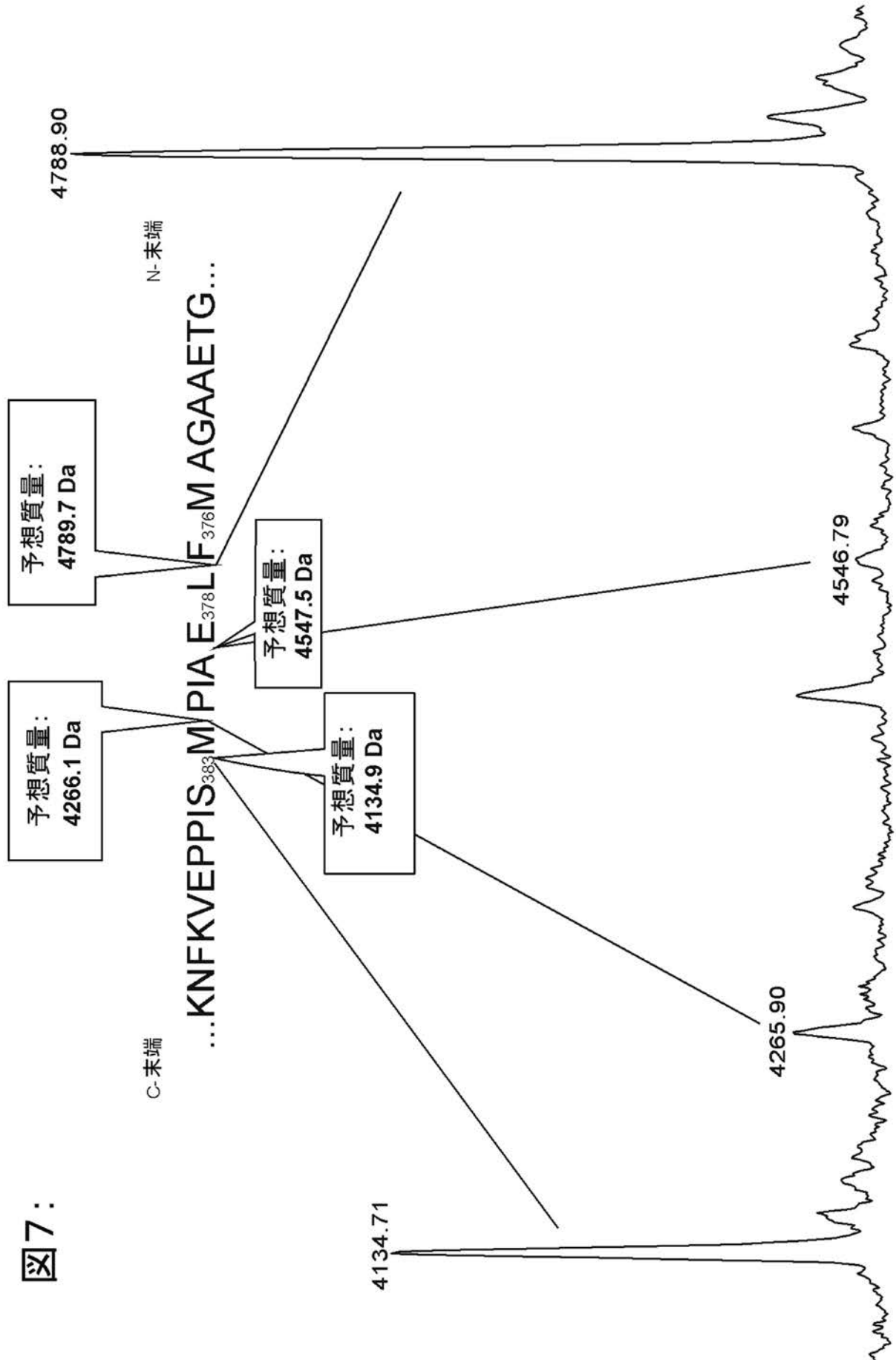
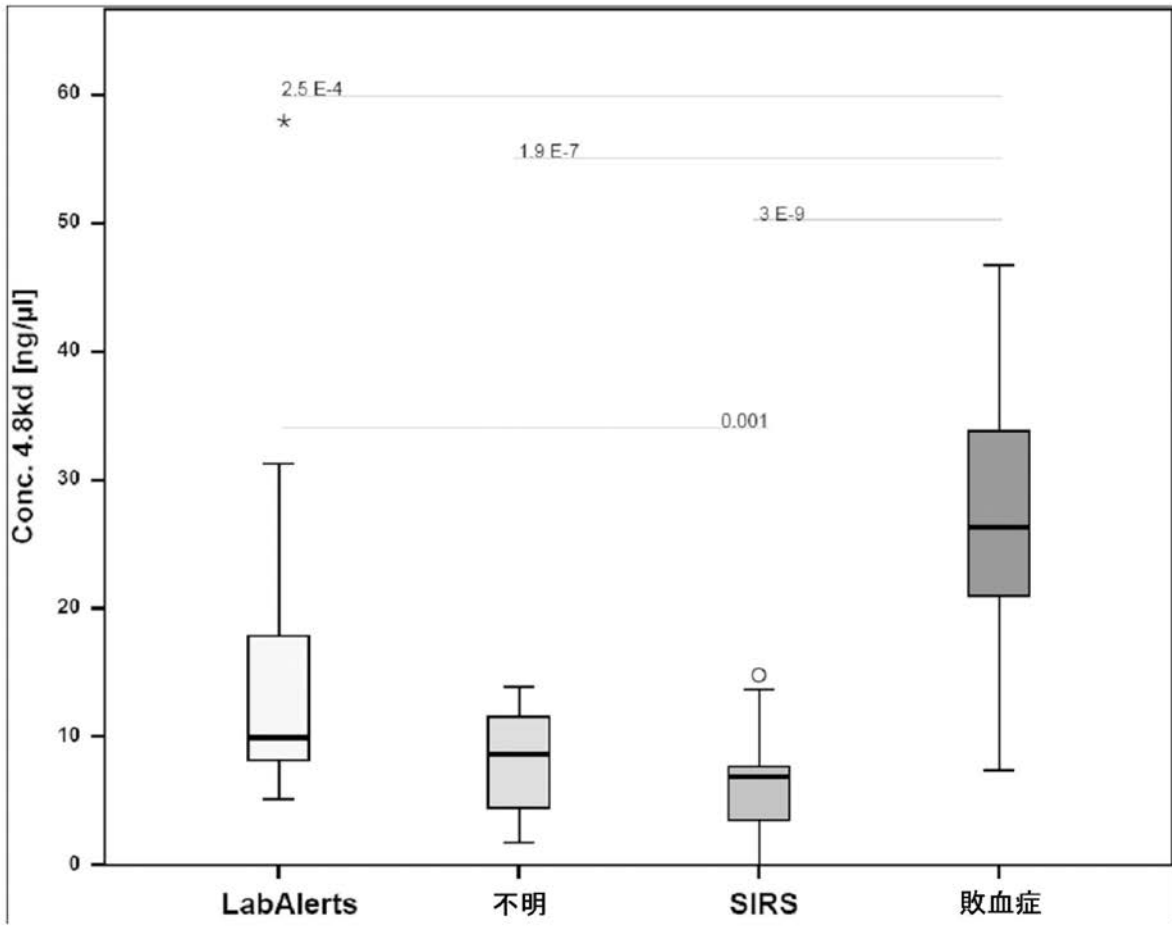


図7:

【 図 8 】

図8:



【 図 9 】

## 図 9 :

 $\alpha$ 1-アンチトリプシン

完全アミノ酸配列 (N-末端から C-末端まで):

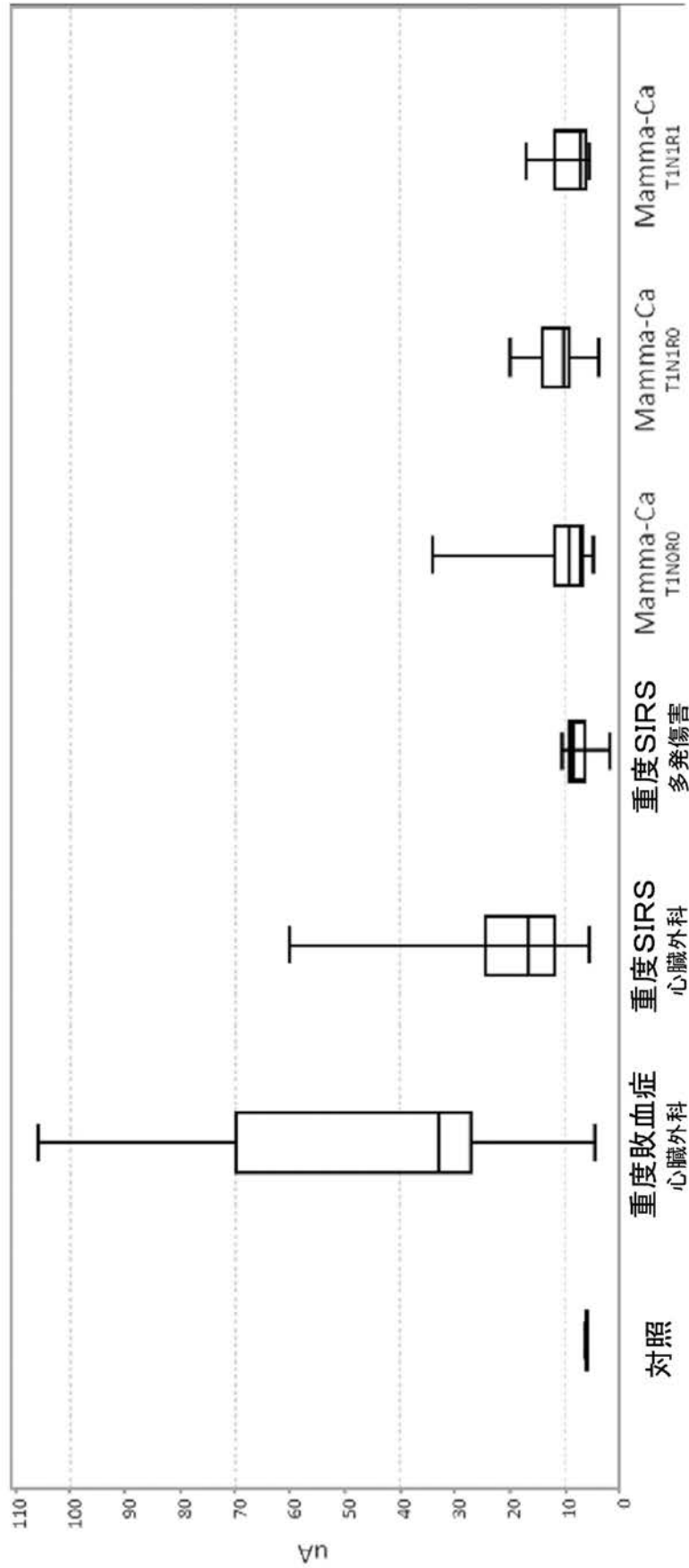
10 20 30 40 50 60  
 MPSSVSWGIL LLAGLCLLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTSHH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF  
 70 80 90 100 110 120  
 LYRQLAHQSN STNIFPSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF  
 130 140 150 160 170 180  
 QELLRTLNOF DSQQLTGTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEBAKKQ  
 190 200 210 220 230 240  
 INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV  
 250 260 270 280 290 300  
 KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL  
 310 320 330 340 350 360  
 ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFNSGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA  
 370 380 390 400 410  
 VLTIDEKGTQ AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

断片:

等級	サイズ [ダルトン]	切断部位	配列
6	2503.9	F <sub>396</sub> -L <sub>397</sub>	LMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
4	4047.8	S <sub>383</sub> -I <sub>384</sub>	IPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
2	4134.9	M <sub>382</sub> -S <sub>383</sub>	SIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
3	4266.1	P <sub>381</sub> -M <sub>382</sub>	MSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
5	4363.2	I <sub>380</sub> -P <sub>381</sub>	PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
3	4476.4	A <sub>379</sub> -I <sub>380</sub>	I PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
4	4547.5	E <sub>378</sub> -A <sub>379</sub>	AI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
5	4676.6	L <sub>377</sub> -E <sub>378</sub>	EAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
1	4789.7	F <sub>376</sub> -L <sub>377</sub>	LEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
6	4936.9	M <sub>375</sub> -F <sub>376</sub>	FLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
5	5068.1	A <sub>374</sub> - M <sub>375</sub>	MFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
6	5139.2	G <sub>373</sub> -A <sub>374</sub>	AMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
1	ca. 50000 (N-末端)	F <sub>376</sub> -L <sub>377</sub>	MPSSVSWGIL LLAGLCLLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTSHH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF LYRQLAHQSN STNIFPSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF QELLRTLNOF DSQQLTGTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEBAKKQ INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFNSGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA VLTIDEKGTQ AAGAMF

【 図 10 】

図10:



【 配列表 】

2014533368000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/072644

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. G01N33/68 C07K14/81 C07K16/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 10 2005 056839 A1 (SIRS LAB GMBH [DE]) 14 June 2007 (2007-06-14) the whole document	1-12
X	----- SOARES, A. J. C., SANTOS, M. F., CHUNG, J., DAVID, C. M. N., DOMONT, G. B.: "Proteômica e Sepse. Novas Perspectivas para o Diagnóstico", REVISTA BRASILEIRA DE TERAPIA INTENSIVA, vol. 19, no. 1, 2007, pages 14-22, XP002671348, the whole document ----- -/--	1-9,11, 13,14,16
<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  13 February 2013		Date of mailing of the international search report  06/03/2013
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  R. von Eggelkraut-G.

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/072644
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REN YAN ET AL: "The alterations of mouse plasma proteins during septic development", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 6, no. 7, 2007, pages 2812-2821, XP002671349, ISSN: 1535-3893 abstract tables 1,2 pp. 2813-2814, "Materials and Methods"	1-9,11,13,14,16
X	US 2009/104605 A1 (SIUZDAK GARY [US] ET AL) 23 April 2009 (2009-04-23) pp. 8-9, paragraph [0070], pp. 12-15, paragraphs [0113]-[0127], pp. 23-24, paragraphs [0195]-[0209], pp. 34-61, paragraphs [0309]-[0498], Table 1	1-9,11,13,14,16
X	REN YI ET AL: "The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome", PROTEOMICS, vol. 4, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 3477-3484, XP002671350, ISSN: 1615-9853 the whole document	12-15
X	WO 2008/031190 A1 (OSTA BIOTECHNOLOGIES INC [CA]; SCHIPPER HYMAN [CA]; GUPTA AJAY [CA]) 20 March 2008 (2008-03-20) p. 10, line 6 - p. 12, line 3, p. 14, line 15 - p. 20, line 6	12-15
X	WO 2007/022248 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; TEMPST PAUL [US]; VILLANUEVA JOSEP [US]) 22 February 2007 (2007-02-22) Ex. 8, Fig. 33 (No. 8)	13,14
X	WO 2010/054195 A2 (CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC [US]; CALDERON CESAR [US]; GETSY JOHN [US]) 14 May 2010 (2010-05-14) pp. 44-45, Table 7, Fragment 80, pp. 65-68, SEQ ID NO: 1, cl. 1	12-15
X	WO 99/45940 A1 (UNIV VIRGINIA COMMONWEALTH [US]) 16 September 1999 (1999-09-16) p. 4, line 26 - p. 9, line 1, SEQ ID NO: 1	13,14
X	WO 2007/100183 A1 (BIOINFRA INC [KR]; KIM CHUL WOO [KR]; OHN SYNG-YUP [KR]; HAN MI YOUNG) 7 September 2007 (2007-09-07) SEQ ID NO: 3, p. 29, line 8 - p. 39, line 1	12-15
	----- -/--	

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2012/072644

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	KIEHNTOPF M ET AL: "Mass spectrometry-based protein patterns in the diagnosis of sepsis/systemic inflammatory response syndrome", SHOCK (PHILADELPHIA): INJURY, INFLAMMATION, AND SEPSIS: LABORATORY AND CLINICAL APPROACHES, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 36, no. 6, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 560-569, XP009157248, ISSN: 1073-2322, DOI: 10.1097/SHK.0B013E318237EA7C the whole document -----	1-16

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/072644

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102005056839 A1	14-06-2007	NONE	
-----			
US 2009104605 A1	23-04-2009	NONE	
-----			
WO 2008031190 A1	20-03-2008	NONE	
-----			
WO 2007022248 A2	22-02-2007	US 2009208921 A1 US 2011312522 A1 WO 2007022248 A2	20-08-2009 22-12-2011 22-02-2007
-----			
WO 2010054195 A2	14-05-2010	EP 2352998 A2 US 2012052066 A1 WO 2010054195 A2	10-08-2011 01-03-2012 14-05-2010
-----			
WO 9945940 A1	16-09-1999	AU 3074099 A CA 2323077 A1 EP 1069905 A1 JP 2002506040 A US 6150332 A WO 9945940 A1	27-09-1999 16-09-1999 24-01-2001 26-02-2002 21-11-2000 16-09-1999
-----			
WO 2007100183 A1	07-09-2007	EP 1989552 A1 US 2009018026 A1 WO 2007100183 A1	12-11-2008 15-01-2009 07-09-2007
-----			

## 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

(72)発明者 ドイフェル トーマス

ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ マルクト 23

(72)発明者 ブルンクホルシュト フランク

ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ クリッツェグラーベン 6

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 CB08 DA36 FA03

专利名称(译)	诊断为败血症和全身炎症反应综合征		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014533368A</a>	公开(公告)日	2014-12-11
申请号	JP2014541651	申请日	2012-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	耶拿大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	海胆Beruji泰特订阅NIK-时间耶拿		
[标]发明人	キーントプフミヒャエル シュメルラーディアーナ ドイフェルトーマス ブルンクホルシュトフランク		
发明人	キーントプフ ミヒャエル シュメルラー ディアーナ ドイフェルトーマス ブルンクホルシュト フランク		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/8125 G01N33/6848 G01N2333/8125 G01N2570/00 G01N2800/26 G06F19/00 G16H50/30 C07K16/38 C07K2317/34 G01N33/5308 G01N33/6893 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/DA36 2G045/FA03		
优先权	2011189024 2011-11-14 EP		
其他公开文献	JP6308946B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及一种对患有败血症或怀疑患有败血症的受试者的死亡率和/或结果进行诊断，预测或风险分层的方法，该方法包括以下步骤：(a) 确定从受试者获取的样品中抗胰蛋白酶(ATT)或其片段的在存在和/或水平，和/或确定运甲状腺素蛋白(TTR)或其片段的在存在和/或水平，(b) 在这种情况下，ATT和/或TTR或其片段的在存在和/或水平与死亡风险增加相关，并且(c) ATT的水平低于某个临界值和/或 或者，如果所述ATT片段的水平超过某个临界值，和/或(d) 所述TTR水平的某个临界值，则确定死亡风险增加和/或预后不良。如果它小于所述截止值是片段的水平的情况下和/或TTR是充分，确定死亡风险增加和/或预后差。本发明总体上涉及ATT和/或TTR或其片段在脓毒症诊断中的用途，并且涉及SEQ ID NO: 2-14的核苷酸。

SEQ ID NO.	等級	サイズ [ダルトン]	切断部位	配列
2	6	2503.9	F <sub>286</sub> -L <sub>287</sub>	LMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
3	4	4047.8	S <sub>283</sub> -I <sub>284</sub>	IPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
4	2	4134.9	M <sub>282</sub> -S <sub>283</sub>	SIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
5	3	4266.1	P <sub>281</sub> -M <sub>282</sub>	MSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
6	5	4363.2	I <sub>280</sub> -P <sub>281</sub>	PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
7	3	4476.4	A <sub>278</sub> -I <sub>280</sub>	I PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
8	4	4547.5	E <sub>278</sub> -A <sub>279</sub>	AI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
9	5	4676.6	L <sub>277</sub> -E <sub>278</sub>	EAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
10	1	4789.7	F <sub>276</sub> -L <sub>277</sub>	LEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
11	6	4936.9	M <sub>275</sub> -F <sub>276</sub>	FLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
12	5	5068.1	A <sub>274</sub> -M <sub>275</sub>	MFLAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK
13	6	5139.2	G <sub>273</sub> -A <sub>274</sub>	AMFLAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK