

(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2015-504519

(P2015-504519A)

(43) 公表日 平成27年2月12日(2015.2.12)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2014-543882 (P2014-543882)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成24年11月29日 (2012.11.29)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月22日 (2014.7.22)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/073897		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02013/079567		T
(87) 国際公開日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	11191579.9		グレンツアーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成23年12月1日 (2011.12.1)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳卒中診断のためのNT-proANP及びNT-proBNP

## (57) 【要約】

本発明は、一過性脳虚血発作 (TIA) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する方法に関する。この方法は、対象から採取した試料中のNT-proANP量の測定に基づく。また、本発明は、対象から採取した試料中のNT-proBNP及びNT-proANPの量の測定に基づき、対象について急性脳虚血事象を診断する方法に関する。この方法はさらに、NT-proBNP量とNT-proANP量の比を算出する工程を含み、さらに本発明の方法を実行するのに適合されたキット及び装置を企図している。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一過性脳虚血発作（T I A）の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する方法であって、対象から採取した試料中の N T - p r o A N P 量を測定することを含む方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、さらに N T - p r o A N P 測定量を基準量と比較して、該対象が一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断することを含む方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 及び 2 に記載の方法であって、T I A の発症が疑われる対象は T I A の症状を示した対象である、前記方法。

10

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法であって、一過性脳虚血発作の発症が疑われる対象は、検査用試料を採取する前の 7 2 時間以内に T I A の症状を示しており、特に該対象は検査用試料を採取する前の 2 4 時間以内に T I A の症状を示している、前記方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、検査用試料を採取する前の 7 2 時間以内に該対象が T I A を発症したか否か、特に検査用試料を採取する前の 2 4 時間以内に該対象が T I A を発症したか否かを診断する、前記方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法であって、該対象は試料を採取した時点で T I A の症状をもはや示していない、前記方法。

20

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法であって、該試料は、T I A の症状の終了後 1 時間以上後に該対象から採取されたものである、前記方法。

## 【請求項 8】

請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法であって、

a . 該基準量は、T I A を発症したとわかっている対象から採取した試料から算出され、かつ診断の対象から採取した試料中の N T - p r o A N P 量が基準量と本質的に同じ、または基準量より多ければ、該対象は一過性脳虚血発作を発症したことを示し、かつ / または

30

b . 該基準量は、T I A を発症しなかったとわかっている対象から採取した試料から採取され、かつ診断の対象から採取した試料中の N T - p r o A N P 量が基準量と本質的に同じ、または基準量より少なければ、該対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す、

前記方法。

## 【請求項 9】

請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法であって、該基準量は算出された基準量であって、診断の対象から採取した試料中の N T - p r o A N P 量が算出された基準量よりも大きければ、該対象は一過性脳虚血発作を発症したことを示し、該試料中の N T - p r o A N P 量が算出された基準量よりも少なければ、該対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す、前記方法。

40

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 に記載の方法であって、該対象は心不全及び / または冠動脈瘤を発症していない、前記方法。

## 【請求項 11】

急性脳虚血事象の発症が疑われる対象について急性脳虚血事象を診断する方法であって、該方法は、

( a ) 対象から採取した試料中の N T - p r o A N P 量を測定することと、

( b ) 対象から採取した試料中の N T - p r o B N P 量を測定することと、

50

(c) NT-proANP量及びNT-proBNP量の比を算出することと、を含む、前記方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法であって、さらに算出した比を基準比と比較して、急性脳虚血事象を診断することを含む、前記方法。

【請求項13】

請求項11及び12に記載の方法であって、該対象は心不全及び/または冠動脈瘤を発症している、前記方法。

【請求項14】

請求項11～13のいずれか一項に記載の方法であって、該急性脳虚血事象は脳卒中及び一過性脳虚血発作から選択される、前記方法。

10

【請求項15】

請求項11～14のいずれか一項に記載の方法であって、NT-proANPのNT-proBNPに対する比が算出され、

a. 該基準比は、急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANPのNT-proBNPに対する比が基準比と本質的に同じ、または基準比より多ければ、該対象は急性脳虚血事象を発症したことを示し、及び/または

b. 該基準比は、急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANPのNT-proBNPに対する比が基準比と本質的に同じ、または基準比より小さければ、該対象は急性脳虚血事象を発症しなかったことを示す、

20

前記方法。

【請求項16】

請求項11～15のいずれか一項に記載の方法であって、該急性脳虚血事象の発症が疑われる対象は、急性脳虚血事象の症状を示した対象である、前記方法。

【請求項17】

請求項11～16のいずれか一項に記載の方法であって、該急性脳虚血事象の発症が疑われる対象は、検査用試料を採取する前の24時間以内に急性脳虚血事象の症状を示した、前記方法。

30

【請求項18】

請求項11～17のいずれか一項に記載の方法であって、該急性脳虚血事象の発症が疑われる対象は、検査用試料を採取する前の24時間以内に急性脳虚血事象の症状を示した、前記方法。

【請求項19】

請求項11～17のいずれか一項に記載の方法であって、該試料は、急性脳虚血事象の症状の発症後1時間以上後に採取された、前記方法。

【請求項20】

一過性脳虚血発作(TIA)を診断するための、一過性脳虚血発作(TIA)の発症が疑われる対象から採取した試料中でのNT-proANPポリペプチド及び/またはNT-proANPポリペプチドに特異的に結合する検出試薬の使用。

40

【請求項21】

急性脳虚血事象を診断するための、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象から採取した試料中での

i) NT-proANP及びNT-proBNPポリペプチド、または

ii) NT-proANPポリペプチド

に特異的に結合する検出試薬、またはNT-proBNPポリペプチドに特異的に結合する検出試薬

の使用。

【請求項22】

50

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法または請求項 20 または 21 に記載の使用であって、該試料は血液、血清、または血漿試料である、前記方法または使用。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法または請求項 20 または 21 に記載の使用であって、該対象はヒトである、前記方法または使用。

【請求項 24】

一過性脳虚血発作を診断する装置であって、該装置は、

(a) NT - pro ANP ポリペプチドの量を測定することができる NT - pro ANP ポリペプチドの検出試薬を備える分析部と、

(b) 分析部で測定した量を、NT - pro ANP の診断を確立するためのデータベースに保存された基準量と比較するアルゴリズムを実装したデータプロセッサを備える評価部であって、該基準量は、請求項 15 で定義したように対象から採取した試料から算出され、該アルゴリズムは請求項 4 で定義したアルゴリズムである評価部と、を含む、前記装置。

10

【請求項 25】

対象について T I A を診断するキットであって、該キットは、少なくとも NT - pro ANP ポリペプチドの検出試薬と、好ましくは T I A を発症したとわかっている対象から算出した基準量及び / または T I A を発症しなかったとわかっている対象から算出した基準量を反映する規格と、

を含む、前記キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一過性脳虚血発作 ( T I A ) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象の一過性脳虚血発作を診断する方法に関する。この方法は、この対象から採取した試料中の NT - pro ANP 量を測定ことに基づいている。また本発明は、対象から採取した試料中の NT - pro BNP 及び NT - pro ANP 量を測定することに基づき、対象の急性脳虚血事象を診断する方法に関する。この方法はさらに、NT - pro BNP 量と NT - pro ANP 量の比を算出する工程を含む。本発明はまた、T I A 及び急性脳虚血事象の診断を行うシステム、本明細書で開示する方法を行うのに用いる試薬及びキットに関する。さらに本発明は、本発明の方法を実行するのに用いられるキット及び装置を想定している。

30

【背景技術】

【0002】

脳卒中は、高所得国では障害調整生存年の損失の原因として、また世界中の死亡原因として虚血性心疾患に次いで多い。初期の脳卒中の有害事象を血栓崩壊により改善することができたとしても、後で有害事象が出た場合、アスピリン及び抗凝血剤を用いた二回目に対する予防 ( 二回目の脳卒中の予防 ) が、病気の進行を回避する唯一の適切な方法と思われる ( van der Worp B and van Gijn J. NEJM 2007: 357: 572. 578 ) 。

【0003】

一過性脳虚血発作 ( T I A ) とは、ほんの短い時間継続する脳卒中症状の一連の事象であり、標準的な定義によると 24 時間以下とされるが、ほとんどの T I A は 1 時間以下である。T I A の原因は虚血性脳卒中の原因と同様であるが、T I A は脳卒中の予兆である場合があるので、個別に考慮されるべき重要な危険因子である ( W.E. Smith et al, Cerebrovascular Diseases, Chapter 364 in Harrison, Principles of Internal Medicine, 17th edition ( ハリソン内科学第 17 版、364 章脳血管疾患 ) を参照 ) 。

40

【0004】

一過性脳虚血発作 ( T I A ) の診断には困難が伴う。というのも症状が何時間も継続することがなく、治療に当たる医師が診断及び必要な処置を確定できないまま症状が消えるからである。また、症状は影響を受けた部位 ( 及びその周辺の血管 ) に依存する。中大脳

50

動脈が影響を受けることが多く、関連症状としては失語症、手脚の対側性衰弱などが挙げられる。前大脳のT I Aは、失語症、失行失認、錯乱、失読症などと関連づけられる場合がある。下部大脳の中央部分が影響を受けると、企図振戦、失調症、知覚不全などの症状となることがある。髄質の損傷は、めまい、複視、吐き気、嘔吐を伴うことがある。このように多くの症状が非特異的である場合がある。また、T I Aは一時的にのみ現れるので、立証することができない。したがって、T I Aの診断は困難であることがあり、容易に他の病気と区別することができない。

【0005】

T I Aは一時的なかん流低下及び脳の局所の虚血によって引き起こされる。局所的な浮腫が代謝性障害及びイオン性障害となって脳に可逆性の機能性異常を引き起こし、これにより機能不全が生じる。T I Aの診断は重要である。なぜなら、T I Aを発症した人は、これらT I Aの一連の事象を発症していない人に比べて脳卒中の危険性が有意に増しているからである。脳卒中の危険性はT I Aの発症から2日後に4～5%、7日後に11%である。脳卒中の危険性が最も高いのは、48時間以内にT I Aを発症して10分より長く継続し、心房細動、進行性の頸動脈狭窄が見られ、T I Aが一度以上漸次強くなるパターンで起こる患者である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

NT - proBNP及びNT - proANPはよく知られた心疾患マーカーである。NT - proBNPは、脳から放出されることが知られている脳性ナトリウム利尿ペプチドに属するが、BNPの大部分は心臓に由来する。NT - proBNP及びNT - proANPはいずれも心塞栓が原因の脳卒中と関連づけられてきた (Rodrigues-Yanez M. et al, Disease Markers 2009: 26: 189-195)。

20

【0007】

Estrada et al. 1994 (Am J Hypertens, 7: 1085-1089) には、ANPの検出に基づく患者の虚血性脳卒中を診断する方法が開示されている。Estradaによれば、健常者に比べて脳卒中患者のANPレベルは高い。

【0008】

Sato et al. 1995 (Kurume Med J, 42:71-77) には、ANP検出に基づく、危険性の高い脳卒中患者と危険性の低い脳卒中患者を見分け、また心塞栓性脳卒中とラクナ脳卒中を見分ける方法が開示している。

30

【0009】

Makikallio et al. 2005 (Stroke, 36: 1016-1020) には、NT - proANP及びNT - proBNPの血漿レベルが、(急性)脳卒中患者と急性心筋梗塞患者では等しい、または(急性)脳卒中患者の方が高かったこと、及びその血漿レベルは健康な患者に比べて脳卒中患者で高かったことが開示されている。また、脳の損傷強度はNT - proANP及びNT - proBNPの血漿レベルに対応することが考察されている。

【0010】

Shibazaki et al. 2009 (Int Med 48: 259-264) には、血漿BNPの検出に基づく、心塞栓性脳卒中の患者と他の種類の脳卒中(小血管疾患、大血管疾患を含む)の患者とを見分ける方法が開示されている。

40

【0011】

Rodrigues-Yanez et al. 2009 (Disease Markers 26: 189-195) には、血清NT - proBNPの検出に基づく、心塞栓性脳卒中の患者とアテローム血栓性脳卒中、ラクナ脳卒中、及び他の種類の脳卒中の患者とを見分ける方法が開示されている。NT - proANPを用いた対応する測定は同様の有用性を示すものであるが、データの説得力が低い。

【0012】

Naruse et al (Stroke 1991: 22: 61-65) の研究には、ラットの左中大脳動脈に閉塞が起きると脳浮腫を誘発したことが記載されている。また、ANPが注入された。ANPの

50

注入により脳浮腫が減少した。この結果は保護効果と解釈された。近年、Wiggins A.K. et al. (Neuroscience 2003: 118: 715-26) には、拡張性抑制説におけるラットの ANP 発症が報告されており、ANP を神経保護作用とみなしている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、多くの T I A 及び脳卒中患者の NT - p r o A N P 及び NT - p r o B N P の量を測定した。NT - p r o A N P は T I A マーカーとして信頼性があることがわかった。この観察は、(特に脳卒中の診断に比べて) T I A の診断が困難であるので、利点がある。また、T I A 患者の NT - p r o A N P レベルは T I A の後、相当時間の間上昇することが示された。これにより、T I A の数日後であっても T I A の診断を行うことができる。

10

【0014】

対象の一過性脳虚血発作を診断する手段及び方法が求められている。したがって、本発明の基礎となる技術的な問題を、この要求に応じるための手段及び方法の提供と考えることができる。

【0015】

この技術的な問題は、請求項及び以下の記載で特徴づけられる態様により解決される。

【発明を実施するための形態】

【0016】

一過性脳虚血発作 ( T I A ) の診断方法

20

本発明は、一過性脳虚血発作 ( T I A ) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象の一過性脳虚血発作を診断する方法に関する。この方法は、対象から採取した試料中の NT - p r o A N P 量を測定することを含む。

【0017】

好ましい態様において、上記方法はさらに、NT - p r o A N P の測定量を基準量と比較することを含む。これにより、一過性脳虚血発作を診断する。

このように、本発明は特に、一過性脳虚血発作 ( T I A ) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する方法に関し、

( a ) 対象からの試料中の NT - p r o A N P 量を測定する工程と、

( b ) NT - p r o A N P の測定量を基準量と比較して、一過性脳虚血発作を診断する工程とを含む。

30

【0018】

好ましくは、さらに工程 ( b ) で行った比較に基づいて対象が一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断する工程 ( c ) を行うことにより、対象が一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断する。

【0019】

本発明の方法は好ましくは生体外の方法である。また、この方法は、上記の工程に加えて、他の工程を含んでもよい。例えば、他の工程は試料の前処理や、この方法で得た結果の評価に関していてもよい。この方法は手動で行ってもよく、また自動化により支援されていてもよい。好ましくは、工程 ( a ) 及び / または ( b ) はその全体または一部を自動化によって支援してもよい。例えば、工程 ( a ) の決定を行う好適なロボット装置及びセンサーや、コンピュータが実行する比較及び / または工程 ( b ) の比較に基づく診断などがある。より好ましくは、この方法全体を自動で行うことである。そのような場合、工程 ( b ) で得た診断結果を好適な出力形式で生成して、例えば医師による最終的な臨床診断を行うための補助として用いることができる。

40

【0020】

したがって、本発明はまた、好ましくは一過性脳虚血発作 ( T I A ) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断するシステムに関し、このシステムは、

a ) 試験管内で対象から採取した試料の一部を、マーカー NT - p r o A N P に特異的な

50

結合親和性を有する配位子と接触させる分析装置と、

b) 配位子と接触させた、対象から採取した試料の一部からの信号を検出する分析装置と

c) プロセッサを有し、該分析装置 a) 及び b) と操作可能に接続された演算処理装置と

d) 該プロセッサで実行可能な複数の命令を含む非一時的な、機械で読取り可能な媒体と、を含み、命令が実行されると、マーカーの量を算出し、マーカーの量を基準量と比較して一過性脳虚血発作を診断する。

#### 【0021】

用語「対象」は、本明細書を通して動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを指す。本発明による対象は、一過性脳虚血発作の発症が疑われているものとする。好ましくは、該対象は、検査用試料を採取するまでの、72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に一過性脳虚血発作を発症したと疑われているものとする。したがって、検査用試料を採取する前の好ましくは72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に診断の対象がTIAを発症したか否かを本発明に従って診断する。

10

#### 【0022】

診断の対象（及び基準量が算出された対象）は腎機能が損なわれていないことが好ましい。対象が腎機能を損なっているか否かを判断する方法は当該分野で周知である。腎臓疾患は周知の適切と思われるいずれかの手段で診断することができる。特に腎機能は、糸球体濾過率（GFR）により判断することができる。例えば、GFRはコッククロフト・ゴルト式またはMDRD式により算出してもよい（Levey 1999, *Annals of Internal Medicine*, 461-470）。GFRとは、単位時間あたりに腎臓糸球体毛細血管からボーマン嚢へ濾過される流体の体積である。臨床的には、これはしばしば腎機能を決定するのに用いられる。GFRは、元来、イヌリンを血漿に注入することにより見積もられたものであった（GFRを測定することはできず、コッククロフト・ゴルト式やMDRD式から派生したすべての計算は単に見積もり値を提供するだけで、「実際の」GFRではない）。イヌリンは糸球体で濾過された後に腎臓で再吸収されないため、その排出率は、糸球体という濾過器を通る水及び溶質の濾過率に正比例する。しかしながら、臨床の診察においてはクレアチニンクリアランスを用いてGFRを測定する。クレアチニンは体内で合成される生体内分子であり、糸球で自由に濾過される（しかし、非常に少量、腎臓細管からも分泌される）。したがってクレアチニンクリアランス（CrCl）はGFRの近似値である。GFRは典型的には1分あたりのミリリットル量（mL/分）で記録される。GFRの正常範囲は男性が97~137mL/分、女性が88~128mL/分である。このように、腎機能を損なっていない対象のGFRはこの範囲にあると特に企図されている。また、好ましくは、該対象の血中クレアチニンレベル（特に血清クレアチニンレベル）は0.9mg/dl未満、より好ましくは1.1mg/dl未満、最も好ましくは1.3mg/dl未満である。

20

30

#### 【0023】

好ましくは、対象は急性脳虚血事象、特にTIAの危険因子を有している。用語「急性脳虚血事象」については、本明細書の別の箇所にて述べる。好ましい危険因子には、冠動脈瘤、心不全、特に急性心不全、収縮期及び/または拡張期心不全、弁膜性心疾患、動脈高血圧症などがある。さらに危険因子としては糖尿病及び肥満がある。したがって、診断の対象は好ましくは少なくともこれら危険因子の1つを示す。特に診断の対象（及び基準対象、すなわち基準量が算出された対象）が冠動脈瘤及び/または心不全を発症していることを想定している。

40

#### 【0024】

最も好ましくは、対象は心不全を発症している。特に本発明の方法の文脈でNT-proBNP量及びNT-proBNP量の算出する場合、これが当てはまる（本明細書の他の箇所を参照）。用語「心不全」は当該分野で周知である。本明細書を通して、この用語

50

は好ましくは、心不全のはっきりとした兆候を伴う、心臓の収縮期及び/または拡張期機能不全に関する。好ましくは、心不全は本明細書を通して慢性心不全を指す。より好ましくは、急性心不全である。用語「急性心不全」は好ましくは、最大2週間以内に、あるいは特にそれまで慢性心不全の履歴がないのに心機能が低下することを指す。

【0025】

心不全(HF)は重症度に応じて分類することができる。NYHA(New York Heart Association: ニューヨーク心臓協会)の分類によると、心不全患者はNYHAクラスI、II、III及びIVに属すると分類されている。心不全の患者は、心膜、心筋層、冠動脈の循環、または心臓弁に構造的かつ機能的に変化が起きている。患者は完全に健康を取り戻すことができないかもしれず、治療が必要である。NYHAクラスIの患者は心臓血管病の明らかな症状を示していないが、機能障害の客観的証拠がある。NYHAクラスIIの患者は、身体活動がわずかに制約されている。NYHAクラスIIIの患者は、身体活動が顕著に制約されている。NYHAクラスIVの患者は、苦痛なしに身体活動を行うことができない。NYHAクラスIVの患者は安静時にも心機能不全が見られる。

10

【0026】

この機能による分類は、米国心臓病学会及びアメリカ心臓協会による最近の分類によって補足される(J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38; 2101-2113, 2005年に改訂、J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 46; e1-e82を参照)。4段階のA、B、C、Dが記載されている。段階A及び段階BはHFではないが、患者が「実際に」HFを発症する前の初期段階にあると認定するのに役立つ。段階A及び段階Bの患者は、HFを発症する危険因子を持っていると定義しているとみなせばよい。例えば、冠動脈瘤、高血圧症、糖尿病の患者でまだ左心室(LV)機能不全、肥大、または幾何学的な心室ひずみを示していなければ段階Aとみなされる。兆候はないがLV肥大及び/またはLV機能不全が見られる患者の場合、段階Bとされる。潜在的な構造的疾患と関連づけられるHFの症状を現在または過去に示した患者(HF患者の大部分)は段階Cとされ、難治性のHFを発症している患者は段階Dとされる。

20

【0027】

本明細書を通して、用語「心不全」は好ましくは上記のACC/AHA分類の段階C及び段階Dを指す。これら段階において、対象は典型的な心不全の症状を示す。したがって、心不全を発症した対象とは、ACC/AHA分類による段階Cまたは段階Dの心不全を発症している対象である。より好ましくは、用語「心不全」は、NYHA分類によるNYHAのIIIまたはIVとして分類される。

30

【0028】

さらに、本発明の方法による診断の対象(及び基準対象)は、急性冠動脈症候群(acute coronary syndrome: 「ACS」と略す)を示していないと想定する。本明細書を通して、用語「ACS」は好ましくはSTEMI(ST-elevation myocardial infarction: ST上昇型心筋梗塞)、NSTEMI(non ST-elevation myocardial infarction: 非ST上昇型心筋梗塞)、不安定な狭心症を含む。さらに、診断の対象は好ましくは、ACSの病歴がないと想定する。好ましくは、対象は、本発明の方法を行う前の1週間以内、より好ましくは1ヶ月以内(正確には試料を採取する前の1ヶ月以内)にACSを発症していない。

40

【0029】

好ましくは、対象は(特に試料を採取したときに)心臓循環事象を発症していない。用語「心臓循環事象」は好ましくは、心機能が突然悪化することを指す。そのような悪化は、好ましくは心臓の不整脈、過渡停止、または肺動脈塞栓症によって引き起こされる。心臓の不整脈は、徐脈型不整脈及び頻拍型不整脈という2つの形態で起こりうる。徐脈型不整脈では、心拍の振動数が健康な対象に比べて異常に減少しており、好ましくは徐脈型不整脈の心拍数は、1分間に60回未満である。徐脈型不整脈の最も多い形態は、洞性徐脈、洞房ブロック、洞停止、洞不全症候群、房室ブロックである。頻拍型不整脈では、振動数が健康な対象に比べて異常に増加する。好ましくは、徐脈型不整脈では心拍数が1分間

50

に100回を超える。頻拍型不整脈の多くは、構造的な心臓血管病を伴う上室頻拍症、ウォルフ-パーキンソン-ホワイト症候群を伴う心房細動、1:1で房室伝導と心室頻拍を伴う心房粗動である。肺動脈塞栓症は、血塊(血栓塞栓症)または気泡(空気塞栓症)による肺動脈の閉塞により発症する。典型的には、血塊が骨盤静脈または下肢静脈で形成されて、肺動脈に移動し、そこで閉塞を起こす。空気塞栓症は好ましくは、潜水中の事故や静脈カテーテルの漏れにより発症する。肺動脈塞栓症の症状には、胸の痛み、呼吸困難、喀血(血液の混じった咳込み)があげられる。肺の循環にかかる圧力が上昇し、右心室不全を起こす場合がある。心臓循環事象もまた、周知の方法で判断または確認することができる。

#### 【0030】

用語「一過性脳虚血発作」(transient ischemic attack:本明細書ではTIAと略す)は、当該分野で周知のである(W.E. Smith et al, Cerebrovascular Diseases, Chapter 364 in Harrison, Principles of Internal Medicine, 17th edition(ハリソン内科学第17版、364章脳血管疾患)を参照)。本明細書を通して、この用語は好ましくは、急性梗塞及び組織の死滅を伴わない虚血によって生じる神経の機能不全の一連の事象が過度に起こることを指す。このように、脳卒中と異なり、TIAは脳細胞の死滅による不可逆性の組織損傷まで至らない。TIAは、脳血流(CBF)の阻害という、脳卒中と同じ潜在的な病因を有する。また、TIAの症状は、通常、脳卒中の症状と同じである。TIA及び脳卒中の症状は当該分野で周知である。また、当該分野で周知であるが、これらの症状は虚血(以下を参照)によって影響を受ける脳の部位に依存することがあり、その重症度は様々である。症状には、一時的な視力の損失(一過性黒内障)、発話困難(失語症)、身体の一部の衰弱(片側不全麻痺)、及び通常身体の一部に見られる無感覚や刺痛(感覚異常)などがある。さらに症状には、失語、構音障害、片側視野欠損、衰弱、失調症、及び怠慢がある。めまい、調和運動の欠如、平衡の低下もまたTIAに関連した症状である。

#### 【0031】

TIAの症状は短く、通常数秒から数分継続する。ほとんどの症状は60分以内に消える。したがって、症状は短い間だけ、好ましくは24時間未満、特に1時間未満継続する。

#### 【0032】

上記方法による診断の対象は、過去に脳卒中を発症していない、すなわち対象は脳卒中にならなかったものとする。好ましくは、対象は、検査用試料を採取する前の72時間以内、より好ましくは48時間以内、さらに好ましくは24時間以内に脳卒中を発症しなかったものとする。最も好ましくは、対象は検査用試料を採取する前の1週間または2週間以内に脳卒中を発症しなかったものとする。

#### 【0033】

用語「脳卒中」は当該分野で周知である。この用語は好ましくは虚血性脳卒中を含む。用語「虚血性脳卒中」はまた、当業者には自明である(例えばAdams et al., Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke(成人虚血性脳卒中患者の初期管理ガイドライン), A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups in Stroke. 2007; 38: 1655を参照。これらは、開示内容全体について参照により本明細書に組み込まれる)。本明細書を通して、この用語は好ましくは脳虚血性脳卒中を指す。また、この用語は好ましくは、脳やその一部への血流が低下し、脳細胞への酸素の供給が低下(供給不足)することによって起こる脳卒中を指す。本発明の方法の文脈において脳卒中は、脳細胞の死滅によって不可逆的に組織を損傷するものである。したがって、本明細書を通して、用語「脳卒中」はTIAを含まない。

#### 【0034】

脳卒中の症状は当該分野で周知である。好ましくは、その症状は、上記のT I Aについて開示されたのと同じ症状である。

虚血性脳卒中は、主要な大脳動脈のアテローム血栓症または塞栓症により、凝固不全または非アテローム性の血管病により、あるいは心臓の虚血が全体の血流を低下させることにより起こる場合がある。虚血性脳卒中は好ましくはアテローム血栓性脳卒中、心塞栓性脳卒中、及びラクナ脳卒中からなる群より選ばれる。脳卒中の型の決定は、当業者には周知であり、超音波心臓検査、心電図、超音波心臓検査など様々な画像形成技術を含む。好ましくは、虚血性脳卒中は急性虚血性脳卒中である。

【0035】

T I A及び脳卒中は、虚血の結果であり、かつ/または脳の特定部位または全体が血流低下を起こした結果である。これらの症状は、影響を受けた部位（及びそれにつながっている血管）に依存している。中大脳動脈が影響を受けることが多く、関連する症状には失語症、対側性の手脚の衰弱などがある。前大脳のT I Aは失語症、失行失認、錯乱、失読症などと関連していることがある。下部大脳の中央部が影響を受けると、企図振戦、失調症知覚不全などの症状が現れることがある。髄質の損傷はめまい、複視、吐き気、嘔吐などを含むことがある。

【0036】

用語「虚血性脳卒中」は好ましくは出血性の脳卒中を含まない。

対象が脳卒中、特に虚血性脳卒中を発症したか否かは、周知の方法で決定することができる。また、脳卒中の症状は、当該分野で周知であり、例えばAdams et al.(loc. cit.)に記載されている。例えば、脳卒中の症状は、突発性無感覚や、特に身体の片側の顔、手脚の衰弱、突発性錯乱、発話困難、理解困難、突発性の片目または両目の視覚困難、突発性歩行困難、めまい、平衡や調和運動の損失などを含む。

【0037】

上記のように、上記の方法による診断の対象は、一過性脳虚血発作の発症が疑われるものとする。好ましくは、一過性脳虚血発作の発症が疑われる対象は、T I Aの症状を示す対象である。好ましくは、この対象は、検査用試料を採取する前の所定の空白期間以内にT I Aの症状を示している。好ましくは、この対象は、試料を採取する前の72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内にT I Aの症状を示している。しかしながら、好ましくは、検査用試料は、T I Aの症状の終了後1時間以上後、特に2時間以上後に採取されたものであるとする。さらに、検査用試料はT I Aの症状の終了後4時間以上後に採取されたものであることを想定している。また、検査用試料はT I Aの症状の終了後6時間以上後に採取されたものであることを想定している。

【0038】

また、対象は、試料が採取される12時間以内にT I Aの症状を示していたことを想定している。

上記の本発明の方法によりT I Aを診断するものとする。本明細書を通して、用語「診断する」は、本発明の方法に従って定義した対象が一過性脳虚血発作を発症したか否かを判断することを指す。特に、対象が、検査用試料を採取する前の所定の空白期間以内に一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断するものとする。好ましい態様では、対象が検査用試料を採取する前の72時間以内に一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断するものとする。さらに好ましい態様では、対象が検査用試料を採取する前の48時間以内に一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断するものとする。最も好ましい態様では、対象が検査用試料を採取する前の24時間以内に一過性脳虚血発作を発症したか否かを診断するものとする。対象は、試料を採取した時点でT I Aの症状をもはや示していないことが好ましい。

【0039】

当業者には自明であるが、本明細書で定義した対象がT I Aを発症したか否かの判断は、一般的に診断の対象100%について正しいことを意図するものではない。しかしながら、この用語は、その判断が対象の統計的に有意な部分（例えば群研究法における群）に

10

20

30

40

50

ついて正しいことを要求するものである。このように、本発明の方法は最終の臨床診断を確立するための補助を少なくとも提供する。部分が統計的に有意であるか否かは、様々な周知の統計評価ツール（例えば、信頼区間の決定、 $p$ -値の決定、スチューデントの $t$ 試験、マン・ホイットニー試験など）により当業者は苦もなく決定することができる。詳細は、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research* (研究のための統計学), John Wiley & Sons, New York 1983に記載されている。好ましい信頼区間は少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。 $p$ -値は、好ましくは0.1、0.05、0.01、0.005、または0.0001である。

#### 【0040】

用語「試料」は、体液の試料、分離された細胞の試料、または組織または器官から採取した試料を指す。体液の試料は周知の技術で採取することができる。好ましくは、血液、血漿、血清または尿の試料が好ましく、血液、血漿、尿または血清の試料がより好ましく、血液、血漿または血清の試料が最も好ましい。組織や器官の試料は任意の組織または器官（例えば生検材料）から採取してもよい。分離された細胞は、遠心分離法や細胞選別法など分離技術により体液または組織や器官から採取してもよい。細胞試料、組織試料、または器官試料は、本明細書で定義したペプチドを分泌または生成する細胞、組織、器官から採取することが好ましい。この試料は、一過性脳虚血発作の症状が発症した後の72時間以内に採取することが好ましい。前記試料は一過性脳虚血発作の症状が発症した後の、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に採取されたものである。対象は、試料を採取した時点でTIAの症状をもはや示していないことが好ましい。

#### 【0041】

マーカーNT-proANP（N-末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチドペプチド）は当該分野で周知である（例えば、Bonow, 1996, *Circulation* (循環) 93: 1946-1950を参照。参照によりその全体を本明細書に取り込む）。NT-proANPナトリウム利尿ペプチドに属する。NT-proANPは、前駆体分子、前駆プロANPペプチドからタンパク質分解的切断によって生成され、活性ホルモンANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド）及び対応するN-末端断片NT-proANPになる。ANPは心房筋細胞で合成される。放出されるときにプロホルモンは等モル量の生物学的に高活性のproANP（アミノ酸99~126）とNT-proANP（アミノ酸1~98）に分割される。活性ホルモンは体内水分、ナトリウム、カリウム及び脂肪組織の恒常的な制御に参与している。活性ホルモンは、高い血圧に応答して、心臓の心房筋肉細胞により放出される。本明細書を通して、NT-proANPは好ましくはヒトNT-proANPを指す。用語「NT-proANP」は好ましくは上記ヒトNT-proANPポリペプチドの変異体も含む。そのような変異体は、少なくとも上記NT-proANPポリペプチドと本質的に同じ生物学的及び免疫的特性を有する。特にこれら変異体が本明細書でいう同じ特定の分析（例えば、ポリクロナール抗体またはモノクローナル抗体を用いた、具体的には上記NT-proANPポリペプチドを認識するELISA分析）によって検出可能である場合、それらは本質的に同じ生物学的及び免疫的特性を共有する。NT-proANP及びNT-proBNPの特定の变異体、及びその測定方法の例は周知である（Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K. et al. (2004): 分子の不均一性はA型及びB型ナトリウム利尿ペプチドのN-末端断片の循環の測定に大きく影響を及ぼす。Clinical Chemistry, vol. 50(9), 1576-1588)。また、自明であるが、本発明に従って定義した変異体は、少なくとも1つのアミノ酸の置換、離脱及び/または付加により異なるアミノ酸配列を有し、変異体のアミノ酸配列は、好ましくはヒトNT-proANPの全長にわたって（特に全長にわたって）好ましくは特定のNT-proANPポリペプチドのアミノ配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同じであるものとする。2つのアミノ酸配列の同一性の程度は、当該分野で周知であるアルゴリズム及び本明細書の他の箇所で記載するアルゴリズムにより求めることができる。上記の変異体は、対立する変異体、任意の他の種の特定の同族体、パ

10

20

30

40

50

ラ体、またはオルト体であってもよい。また、本発明に従って定義した変異体は、上記で定義した本質的な免疫的及び生物学的特性を有する限り、特定のNT - p r o A N Pポリペプチドまたは上記型の変異体の断片または下位単位を含むものである。そのような断片は、例えばNT - p r o A N Pポリペプチドの分解したものであってもよい。さらにリン酸化反応またはミリスチル化など翻訳後の修飾によって異なる変異体も含まれる。

#### 【0042】

本明細書で定義したペプチドまたはポリペプチド量の測定は、量または濃度を好ましくは半定量的にまたは定量的に測定することに関する。測定は直接または間接的に行うことができる。直接測定は、ペプチドまたはポリペプチド自体から得られる信号及び試料中に存在するペプチド分子数と直接相関する信号の強度に基づき、ペプチドまたはポリペプチドの量または濃度を測定することに関する。本明細書では時に強度信号とも言うが、そのような信号を、例えばペプチドまたはポリペプチドの特定の物理特性または化学特性の強度値を測定することにより得てもよい。間接測定は、二次成分（すなわちペプチドまたはポリペプチド自体ではない成分）または生物学的読み出し系（例えば、測定可能な細胞応答、配位子、標識、または酵素反応生成物）から得た信号の測定を含む。

10

#### 【0043】

本発明によれば、ペプチドまたはポリペプチド量は、試料中のペプチド量を測定するすべての周知の手段により測定することができる。その手段は、免疫測定法、サンドイッチ、競合、または他の分析形式など様々な分析形式で標識化分子を利用する方法などを含む。そのような分析は好ましくは、決定するペプチドまたはポリペプチドを具体的に認識する抗体など、検出試薬に基づいている。検出試薬は、ペプチドまたはポリペプチドの有無を示す信号を直接または間接的に生成することができるものとする。また、信号強度は試料中に存在するポリペプチド量に直接または（例えば反比例）間接的に相関させることができることが好ましい。さらに、好適な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理特性または化学特性（正確な分子質量またはNMRスペクトルなど）の測定を含む。これら方法は、好ましくはバイオセンサー、免疫測定法と組み合わせた光学装置、バイオチップ、質量分析装置、NMR分析装置、クロマトグラフなどの分析装置を含む。さらに、これら方法はマイクロプレートELISA法、完全自動化またはロボット免疫測定法（例えばElecsys：エレクシス（商標）分析装置で利用可能）、CBA（enzymatic Cobalt Binding Assay：酵素コバルト結合分析、例えばロシュ・日立（商標）分析装置で利用可能）、及びラテックス凝集分析（例えばロシュ・日立（商標）分析装置で利用可能）を含む。

20

30

#### 【0044】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチド量の測定は、（a）ペプチドまたはポリペプチド量を示す強度の細胞応答を誘発することができる細胞を適切な時間の間上記ペプチドまたはポリペプチドと接触させる工程と、（b）細胞応答を測定する工程、とを含む。細胞応答の測定には、試料または処理済み試料を細胞培地に加えて、内部または外部細胞応答を測定することが好ましい。細胞応答は、レポーター遺伝子の測定可能な発現、物質（例えばペプチド、ポリペプチド、小分子など）の分泌などを含んでもよい。この発現または物質が、ペプチドまたはポリペプチド量と相関する強度信号を生成するものとする。

40

#### 【0045】

また好ましくは、ペプチドまたはポリペプチド量の測定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得ることができる特定の強度信号を測定する工程を含む。上記のように、そのような信号は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な質量スペクトルまたはNMRスペクトルで観察されるペプチドまたはポリペプチドに特定のm/z変数で観察される信号強度であってもよい。

#### 【0046】

ペプチドまたはポリペプチド量の測定は、好ましくは（a）ペプチドを特定の配位子と接触させる工程、（b）（必要に応じて）結合していない配位子を取り除く工程、（c）

50

結合配位子量を測定する工程を含んでいてもよい。

【0047】

好ましい態様によれば、これら接触、除去、及び測定工程は、本明細書で開示するシステムの分析装置により行ってもよい。いくつかの態様によれば、これら工程は、該システムの1台の分析装置または互いに操作可能に接続された2台以上の分析装置により行われてもよい。例えば、特定の態様によれば、本明細書で開示するシステムは、該接触工程及び除去工程を行う第一の分析装置と、輸送ユニット（ロボットアームなど）により該第一の分析装置に操作可能に接続されて、該測定工程を行う第二の分析装置とを備えていてもよい。

【0048】

結合配位子、特に配位子または配位子/ペプチド錯体は強度信号を生成する。本発明による結合は、共有結合、非共有結合の両方を含む。本発明による配位子は、本明細書で記載するペプチドまたはポリペプチドと結合する任意の化合物（例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸、小分子）であってもよい。好ましい配位子は核酸、レセプターなどのペプチドまたはポリペプチド、ペプチドまたはポリペプチドの結合相手、ペプチドの結合領域を含むそれらの断片、アダプター（核酸またはペプチドアダプターなど）を含む。そのような配位子を調製する方法は当該分野で周知である。例えば、好適な抗体またはアダプターの同定及び生成は、商業的な供給者により提供される。当業者には、高い親和性または特異性を有するそのような配位子の誘導体を開発する方法が知られている。例えば、ランダム変異を核酸、ペプチドまたはポリペプチドに導入することができる。これら誘導体は、当該分野で周知のスクリーニング手順（例えばファージ提示法）で結合を調べることができる。本明細書で定義した抗体は、ポリクロナール抗体及びモノクロナール抗体の両方を含む。また、抗原または付着体を結合させることができるFv、Fab及びF(ab)<sub>2</sub>断片など、それらの断片も含む。本発明はまた、単鎖抗体、及び所望の抗原特異性を示す非ヒト供与体抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と結合させたヒト化混成抗体を含む。この供与体配列は、一般的に少なくとも供与体の、抗原が結合したアミノ酸残基を含むが、他の構造的及び/または機能に適切な供与体抗体のアミノ酸残基も含んでいてもよい。このような混成抗体は、当該分野で周知のいくつかの方法で調製することができる。配位子または試薬は具体的にはペプチドまたはポリペプチドと結合していることが好ましい。本発明による特異的な結合とは、配位子または試薬が、分析用試料中に存在する他のペプチド、ポリペプチドまたは物質と実質的に結合（「クロス反応」）していないことを意味する。好ましくは、特異的に結合しているペプチドまたはポリペプチドは、他の適切ないずれのペプチドまたはポリペプチドよりも少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも10倍、最もより好ましくは少なくとも50倍親和性が高い。非特異的な結合は、例えばウェスタンブロットのサイズ、または試料中に比較的多く含まれることにより明確に区別及び測定できる場合、許容されていてもよい。配位子の結合は、当該分野で周知のいずれの方法でも測定することができる。好ましくは、この方法は半定量的または定量的なものである。さらに、ポリペプチドまたはペプチドを測定する好適な技術を以下に述べる。

【0049】

まず、配位子の結合を直接、例えばNMRまたは表面プラズモン共鳴で測定してもよい。好ましい態様による配位子の結合は、本明細書で開示するシステムの分析装置で測定される。その後、測定した結合量を本明細書で開示するシステムの演算処理装置で算出してもよい。次に、配位子が目的のペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても働く場合、酵素反応生成物を測定してもよい（例えばウェスタンブロットで切断した基質量を測定することによりプロテアーゼ量を測定することができる）。あるいは、配位子が酵素特性そのものを示していてもよく、「配位子/ペプチドまたはポリペプチド」錯体またはそのペプチドまたはポリペプチドと結合している配位子がそれぞれ、強度信号の生成により検出可能な好適な基質と接触していてもよい。酵素反応生成物の測定では、基質量が飽和していることが好ましい。基質はまた、反応の前に検出可能な標識で標識づけされて

10

20

30

40

50

いてもよい。好ましくは、試料は適切な時間、基質と接触している。用語「適切な時間」とは、検出可能な、好ましくは測定可能な生成物を生成するのに必要な時間を指す。生成物を測定するのではなく、所定の（例えば、検出可能な）生成物が現れるのに必要な時間を測定してもよい。その後、配位子を、配位子の検出及び測定を可能にする標識と共有結合または非共有結合してもよい。標識化は直接または間接的な方法で行ってもよい。直接標識化は、標識を配位子と直接（共有または非共有）結合させるカップリングを含む。間接標識化は、第一の配位子と二次配位子を（共有または非共有）結合させることを含む。二次配位子は特異的に第一の配位子と結合するものとする。この二次配位子は、好適な標識と結合していてもよく、かつ/または二次配位子が結合する三次配位子の目標（レセプター）であってもよい。二次、三次またはそれ以上の配位子が、しばしば信号を増加させるために用いられる。好適な二次及びそれ以上の配位子は、抗体、第二の抗体、及び周知のストレプトアビジン - ビオチンシステム（ベクターラボラトリーズ社）を含んでもよい。配位子または基質は、当該分野で周知であるが、1つまたはそれ以上のタグで「タグ付け」されていてもよい。そのようなタグは高位配位子の目標であってもよい。適切なタグは、ビオチン、ジゴキシゲニン、His - Tag、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc - タグ、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質などを含む。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグはN - 末端及び/またはC - 末端に付けられることが好ましい。好適な標識は、適切な検出方法で検出可能ないずれの標識であってもよい。典型的な標識は、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁性標識（例えば常磁性及び超常磁性標識を含む「磁性ビーズ」）、蛍光標識などを含む。酵素活性標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、及びそれらの誘導体などを含む。検出に好適な基質は、ジアミノベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT - BCIP（塩化4 - ニトロブルーテトラゾリウム及び5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - リン酸、ロシュ・ダイアグノスティクスから既製の保存液として入手可能）、CDP - Star（商標）（アマーシャム・バイオサイエンス）、ECF（商標）（アマーシャム・バイオサイエンス）を含む。好適な酵素と基質の組み合わせは、色付きの反応生成物や、蛍光または化学発光を生じることがある。これらは当該分野で周知の方法（例えば光に高感度のフィルムまたは好適なカメラシステム）で測定することができる。酵素反応の測定は、上記基準を同様に当てはめる。典型的な蛍光標識は、蛍光タンパク質（GFP及びその誘導体など）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン、Alexa染料（例えばAlexa568）などを含む。さらに蛍光標識は、例えばモレキュラープローブ社（オレゴン）から入手できる。また蛍光標識として量子ドットを用いることも企図されている。典型的な放射性標識は、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ などを含む。放射性標識は、例えば光に高感度なフィルムまたはホスフォイメージャー（phosphorimager：蛍光画像解析装置）など、適切な周知のいずれの方法でも検出することができる。本発明による好適な測定方法はまた、沈殿（特に免疫沈殿）、電気化学発光（電気生成された化学発光）、RIA（radioimmunoassay：放射免疫測定法）、ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着測定法）、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチ免疫測定法（electrochemiluminescence sandwich immunoassay、ECLIA）、解離増感ランタノイド蛍光免疫分析（dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay、DELFI A）、シンチレーション近接分析（scintillation proximity assay、SPA）、比濁法（turbidimetry）、散乱比濁法（ネフェロ分析：nephelometry）、ラテックス増強比濁法または散乱比濁法、固相免疫試験を含む。さらに当該分野で周知の方法（ゲル電気泳動法、2Dゲル電気泳動法、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS polyacrylamid gel electrophoresis、SDS-PAGE）、ウェスタンブロットティング、質量分析など）は単独または上記の標識化または他の検出方法と組み合わせて用いてもよい。

【0050】

10

20

30

40

50

ペプチドまたはポリペプチド量はまた、好ましくは以下のように測定してもよい。(a) 上記のペプチドまたはポリペプチドに対する配位子を含む固体の支持体をペプチドまたはポリペプチドを含む試料と接触させ、(b) 支持体に結合したペプチドまたはポリペプチド量を測定する。配位子は、好ましくは核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、アダプターからなる群から選ばれ、好ましくは固定化された形態で固体の支持体に担持されている。固体の支持体を製造するための材料は当該分野で周知であり、市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラス及び/またはケイ素チップ及びこれらの表面、ニトロセルロース条片、膜、シート、デュラサイト (duracyte)、反応トレイのくぼみ及び壁、プラスチック管などが挙げられる。配位子または試薬は、様々な担体と結合していてもよい。周知の担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカルボナート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、マグネタイトなどがある。担体は、本発明の目的のため、可溶性または不溶性のいずれであってもよい。前記配位子を固定する好適な方法は周知であり、イオン性相互作用、疎水性相互作用、共有性相互作用などがあるが、これらに限定されない。また、本発明によるアレイとして「懸濁液アレイ」を用いることが企図されている (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。そのような懸濁液アレイでは、担体 (例えばマイクロビーズまたは微球体) が懸濁液中に存在している。アレイは、異なるマイクロビーズまたは微球体からなり、これらは標識化することもでき、異なる配位子を担持している。例えば固相化学及び光解離性保護基に基づいてそのようなアレイを作製する方法は、一般に周知である (米国特許第 5,744,305号)。

#### 【0051】

本明細書を通して、用語「量」は、ポリペプチドまたはペプチドの絶対量、ポリペプチドまたはペプチドの相対量または濃度、これらに相関する任意の値、またはこれらから派生させることができる任意の値を含む。このような値またはパラメータは、直接測定により該ペプチドから得た、すべての特定の物理的または化学的特性の強度信号値 (例えば、質量スペクトルまたは NMR スペクトルの強度値) などを含む。また、間接測定によって得られるすべての値またはパラメータも含む。例えば、ペプチドに応答して生物学的読み出し系から求められた応答レベルや、特異的に結合した配位子から得られた強度信号などが挙げられる。自明であるが、上記の量またはパラメータに相関する値は、すべての標準的な数学的演算によって得ることもできる。本発明の好ましい態様によれば、「量」は開示するシステムによって測定され、該システムの 1 台以上の分析装置によって行われる接触工程及び測定工程に基づき、演算処理装置が「量」を求める。

#### 【0052】

好ましくは、本明細書で定義したポリペプチド量、NT-proANP 量及び NT-proBNP 量は、実施例において記載する分析で測定される。例えば、NT-proANP 量は前駆 proANP ペプチドのアミノ酸 1~98 を検出することにより測定することができる。

#### 【0053】

本明細書を通して、用語「比較する」は、分析用試料に含まれるペプチドまたはポリペプチド量を本明細書の他の箇所に記載する好適な基準源の量と比較することを含む。自明であるが、本明細書を通して「比較する」は、対応するパラメータまたは値の比較を指す。例えば、絶対量は絶対基準量と、濃度は基準濃度と、検査用試料から得た強度信号は同じ種類の基準試料の強度信号と比較する。本発明の方法の工程 (b) で定義した比較は、手動で行われてもよく、また (例えば本明細書で開示するシステムの) 演算処理装置などコンピュータの補助によって行われてもよい。コンピュータの補助による比較の場合、測定量の値を、コンピュータプログラムでデータベースに保存した好適な基準値と比較してもよい。コンピュータプログラムはさらに、比較結果を評価する、すなわち自動的に所望の判断を好適な出力形式 (すなわち診断結果) で示してもよい。この診断結果は好ましくは、例えば医師による最終的な臨床診断の補助となるものであってもよい。

## 【 0 0 5 4 】

測定量と基準量の比較に基づき、診断の対象がT I Aを発症したか否かを判断することができるものとする。例えば、比較結果を未加工データ（絶対量または相対量）として示し、場合によって特定の診断を表しているような単語、語句、記号、または数値の形式で指標として示してもよい。したがって、比較した量が異なる、あるいは一致することで、診断の対象がT I Aを発症した、あるいは発症しなかった対象群に属することを同定することができるように基準量を選ぶ。この方法は、T I Aを発症した、あるいは発症しなかった対象を排除（除外：rule out）するまたは同定（判定：rule in）することができる。本明細書を通して、量の差、すなわち量の増減は、統計的に有意な差であることが好ましい。差が統計的に有意であるか否かは、本明細書の別の箇所に記載する統計技術により決定されることができる。同様に、量の一致は、同じ量、及び統計的に有意でない量の差、測定されたパラメータの標準偏差内の量の差を含む。

10

## 【 0 0 5 5 】

本明細書を通して、用語「基準量」は、対象を（i）T I Aを発症した対象群または（i i）T I Aを発症しなかった対象群に割り当てることを可能にする量を指す。上記の判定診断及び/または除外診断は、本明細書で開示するシステムの演算処理装置により、算出された「量」を基準値または閾値と比較することに基づいて行われてもよい。例えば、システムの演算処理装置が判定診断または除外診断のいずれかを示す単語、記号、または数値の形式で指標を示してもよい。個々の対象に適用できる基準量は、年齢、性別、部分母集団、本明細書で定義したポリペプチドまたはペプチドの測定に用いる手段など、様々な生理学的パラメータによって異なってもよい。好適な基準量は、基準となる分析用試料から、検査用試料と一緒に（すなわち同時または連続的に）求めてもよい。

20

## 【 0 0 5 6 】

原則として基準量は、標準的な統計法を適用することによりある生体指標に関する平均または平均値に基づいて、上記の対象群に対して算出することができる。特に、ある事象であるか否かの診断を目的とした方法などの試験の精度は、その受信者動作特性（receiver-operating characteristics、R O C）で最もよく記述される（特にZweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577を参照）。R O Cグラフは、観察データの全範囲について識別閾値を連続的に変化させて得た、感度/特異度のすべての対を描画（プロット）したものである。診断法の臨床性能は、その精度に依存する、すなわち対象をある予後または診断に正確に割り当てることができるかどうかに依存する。このR O Cプロットは、区別するのに好適な閾値の全範囲について感度と1 - 特異度をプロットすることにより2つの分布の重なりを示すものである。y軸に感度、すなわち真陽性分率をとる。これは、真陽性試験結果数の、真陽性試験結果数及び偽陰性試験結果数の積に対する比として定義されるものである。これはまた、疾病または条件の存在下で陽性とも言われる。感度は疾患下位群のみから算出される。x軸に偽陽性分率、すなわちまたは1 - 特異度をとる。これは、偽陽性結果数の、真陰性結果数及び偽陽性結果数の積に対する比として定義されるものである。これは、特異度の指標であり、正常下位群のみから算出される。真陽性分率及び偽陽性分率は全く別々に算出されるため、2つの異なる下位群の試験結果を用いることによりR O Cプロットは群におけるその事象の有病率から独立している。R O Cプロットのそれぞれの点は、特定の識別閾値に対応する感度/特異度の対を表している。完全に識別された（結果の2つの分布において重なりがない）試験には、左上の隅（真陽性分率が1.0または100%（完全感度）、偽陽性分率が0（完全特異度））を通るR O Cプロットがある。識別がない（2つの群の結果が同じ分布を示す）試験の論理プロットは、左下の隅から右上の隅までの45°の対角線である。ほとんどのプロットは、これら2つの極度の間になる。R O Cプロットが45°の対角線の完全に下に表れる場合、「陽性」の基準を「より大きい」から「未満」、あるいはその反対に変えることで容易に取り除かれる。その性質上、プロットが左の上隅に近づくほど試験の全体的な精度は高くなる。所望の信頼区間によって、感度と特異度の適切なバランスである事象についての診断または予測することを考慮したR O C曲線から閾値を派生させてもよい。したがって、好ましくは上記の群に対

30

40

50

するROCを作成してそのROCから閾値量を派生させることにより、上記本発明の方法に用いる基準、すなわちTIAを発症した対象とTIAを発症しなかった対象とを識別することができる閾値を生成することができる。診断法に対して望む感度及び特異度によって、ROCプロットは好適な閾値を派生させることができる。自明であるが、TIAを排除（すなわち除外）する場合は最適な感度が望ましく、TIAを発症したと判断（すなわち判定）される対象の場合には最適な特異度が想定されている。また、本発明の方法の工程（a）で測定した量を2つ以上の基準量（例えばTIAを判定する場合の基準量とTIAを排除する場合の基準量）と比較することが好ましい。

【0057】

基準量は、（特に本明細書の別の箇所で記載した空白期間以内に）TIAを発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料及び/または（特に本明細書の別の箇所で記載した空白期間以内に）TIAを発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出することが好ましい。

10

【0058】

TIAを発症しなかったとわかっている対象は、好ましくは健康な対象である。またTIAを発症しなかったとわかっている対象は、特に上記で定義した空白期間以内に脳卒中を発症しなかったことが好ましい。

【0059】

また基準対象（すなわちTIAを発症したとわかっている対象、またはTIAを発症しなかったとわかっている対象）が、急性脳虚血事象、特にTIAに対する危険因子を有していることが好ましい。好ましい急性脳虚血事象、特にTIAに対する危険因子には、冠動脈瘤、心不全、特に急性心不全、収縮期及び/または拡張期心不全、弁膜性心疾患、動脈高血圧症などがある。さらに危険因子は糖尿病及び肥満である。したがって、基準対象は好ましくは少なくともこれら危険因子の1つを示している。好ましくは、基準対象は冠動脈瘤を発症している。より好ましくは、基準対象は心不全を発症している。最も好ましくは、基準対象も診断の対象も、心不全を発症している。また、基準対象も診断の対象も急性心不全を発症していることが好ましい。これは特にNT-proANP量及びNT-proBNP量を測定し、かつ本発明の方法の文脈でNT-proANP量のNT-proBNP量に対する比を算出する場合に当てはまる（本明細書の他の箇所を参照）。

20

【0060】

NT-proANP量のみを測定する場合、基準対象も診断の対象も心不全または冠動脈瘤を発症していないことが好ましい。

30

診断アルゴリズムとして以下の方法を用いる。

【0061】

好ましくは、基準量は

- a. TIAを発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が基準量と本質的に同じ、あるいは基準量より多ければ、対象が一過性脳虚血発作を発症したことを示し、かつ/または
- b. TIAを発症しなかったとわかっている対象から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が基準量と本質的に同じ、あるいは基準量より少なければ、対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す。

40

【0062】

TIAを発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出される好ましい基準量は、約54500pg/ml～約150000pg/ml、より好ましくは約54500～約137800pg/mlである。さらに好ましくは、TIAを発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出される基準量は、約137500、約94800pg/ml、最も好ましくは約54500pg/mlである。

【0063】

TIAを発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出される好ましい基準量は、約1000pg/ml～約33600pg/ml、より好ましくは

50

約1000～約12570 pg/mlである。さらに好ましくは、TIAを発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される基準量は、約33600、約15000 pg/ml、最も好ましくは約12570 pg/mlである。基準量は約4662 pg/mlであることがさらに好ましい。

【0064】

さらに基準量は、閾値量、特に算出された基準量を定めていてもよい。これにより、それぞれの閾値よりも診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が多ければ、TIAを示すものとし、算出された基準量よりも診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が少なければ、対象はTIAを発症しなかったことを示すものとする。特に好ましい閾値量である算出された基準量は、好ましくは約54500 pg/ml、より好ましくは約45000 pg/mlである。

10

【0065】

本明細書を通して、用語「約」は、言及される特定の値+/-20%、+/-10%、+/-5%、+/-2%または+/-1%を意味する。

本発明の方法の好ましい態様では、TIAは判定されるものとする。この場合、基準量は、TIAを発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される。

【0066】

したがって、本発明は一過性脳虚血発作（TIA）の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を判定する方法を想定しており、該方法は、

20

- a. 対象から採取した試料中のNT-proANP量を測定する工程と、
  - b. NT-proANP測定量を基準量と比較して、一過性脳虚血発作を判定する工程、
- とを含み、

該基準量はTIAを発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が基準量と本質的に同じ、あるいは基準量よりも多ければ、対象は一過性脳虚血発作を発症したことを示す。

【0067】

本発明の方法の好ましい態様において、TIAは除外されるものとする。この場合、基準量はTIAを発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される。

30

【0068】

したがって、本発明は、一過性脳虚血発作（TIA）の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作（TIA）を除外する方法を想定しており、該方法は、

- a. 対象から採取した試料中のNT-proANP量を測定する工程と、
  - b. NT-proANP測定量を基準量と比較して、一過性脳虚血発作を除外する工程、
- とを含み、

該基準量は、TIAを発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量が基準量と本質的に同じ、あるいは基準量よりも少なければ、対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す。

40

【0069】

本発明のさらに好ましい態様では、上記方法は、対象から採取した試料中のNT-proBNP量を求める工程と、NT-proANP量とNT-proBNP量の比を算出する工程とを含む。両方のマーカーを測定することは利点がある。というのも両方のマーカー量の比を用いると、特に心不全を発症している対象について信頼性の高いTIA診断が見込めるからである（実施例を参照）。

【0070】

したがって、本発明は特に一過性脳虚血発作（TIA）の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する方法であって、

50

(a) 対象から採取した試料中の NT - pro ANP 量を測定する工程と、  
 (b) 対象から採取した試料中の NT - pro BNP 量を測定する工程と、  
 (c) NT - pro ANP 量及び NT - pro BNP 量の比を算出する工程と、を含む方法に関する。

【0071】

好ましくは、(a) 及び (b) で測定した量は同じ試料で測定したものである。しかしながら、異なる試料中の量をそれぞれ測定することも想定している。

好ましい態様において、該方法はさらに、このように算出した比と基準比とを比較して該対象について TIA を診断することを含む。

【0072】

よって、本発明は、一過性脳虚血発作 (TIA) の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する方法であって、

(a) 対象から採取した試料中の NT - pro ANP 量を測定することと、  
 (b) 対象から採取した試料中の NT - pro BNP 量を測定することと、  
 (c) NT - pro ANP 量及び NT - pro BNP 量の比を算出することと、  
 (d) 算出した比と基準比とを比較して該対象について TIA を診断することと、を含む方法に関する。

【0073】

マーカー NT - pro BNP (N - 末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド) は、当該分野で周知である。NT - pro BNP は、その長さがヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide、BNP) 分子の N - 末端部位に対応する 76 個のアミノ酸を含むポリペプチドであることが好ましい。ヒト BNP 及び NT - pro BNP の構造は、関連技術においてすでに詳細に記載されている (例えば、国際公開第 02 / 089657 号、国際公開第号 02 / 083913 号、または Bonow loc. cit)。本明細書を通して、好ましくは、ヒト NT - pro BNP は欧州特許出願公開第 0648228B1 に開示されたヒト NT - pro BNP である。これら関連技術文献は、そこで開示された NT - pro BNP 及び変異体の特定の配列を参照により本明細書に組み込む。NT - pro BNP は、本発明によれば、上記ヒト NT - pro BNP の特定の配列の対立する変異体及び他の変異体をさらに含む。具体的には、好ましくはその全長にわたってアミノ酸レベルが少なくとも 60%、より好ましくは少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% または少なくとも 99% ヒト NT - pro BNP と同じである変異体ポリペプチドを想定している。原則として、2つのアミノ酸配列の同一性の度合いは、当該分野で周知のアルゴリズムにより求めることができる。好ましくは、同一性の度合いは、2つの最適な並びの配列を比較窓で比較することにより求めることができる。これらの配列では、基準配列 (付加または削除を含まない) と比較して、比較窓のアミノ酸配列の断片は、付加または削除 (例えば、間隙または突出) を含んでもよい。百分率を次のようにして算出する。両方の配列で同一のアミノ酸残基が現れる位置の数を求めて、一致する位置数を出す。一致する位置数を比較窓の合計位置数で除して、100 を掛けて配列同一性の百分率を算出する。比較する配列の最適な並びは、局所的相同性アルゴリズム (Smith 1981, *Add. APL. Math.* 2:482)、相同性配列アルゴリズム (Needleman 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443)、類似度検索法 (Pearson 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444)、これらアルゴリズムをコンピュータに実装したもの (GAP、BESTFIT、BLAST、PASTA、及び TFASTA (Wisconsin 遺伝子学ソフトウェアパッケージ (Wisconsin Genetics Software Package)、遺伝子学コンピュータグループ (Genetics Computer Group、GCG)、Wisconsin 州マジソン、サイエンスドライブ 575)、または目視により行ってもよい。2つの配列が比較から同一である場合、GAP 及び BESTFIT を用いて最適な並びとその同一性の度合いを求めるのが好ましい。好ましくは、間隙重量のデフォルト値 5.00、間隙重量長のデフォルト値 0.30 を用いる。診断手段によって、または完全な長さの各ペプチドに向けられた配位子によって認識されたタンパク質分解生成物もまた実質的に同じ、または同じと

10

20

30

40

50

想定される。また、上記ポリペプチド NT - proBNP 特性を有する限り、ヒト NT - proBNP のアミノ酸配列と比べてアミノ酸削除、置換、及び/または付加を有する変異体ポリペプチドも含まれる。本明細書で定義した NT - proBNP 特性とは、免疫的及び/または生物学的特性である。好ましくは、これら NT - proBNP 変異体は NT - proBNP と同等の免疫的特性（すなわちエピトープ組成）を有する。よって、これら変異体は、ナトリウム利尿ペプチド量の測定に用いる上記手段または配位子により認識されるものとする。生物学的及び/または免疫的 NT - proBNP 特性は、Karl et al. (Karl 1999, Scand J Clin Invest 59:177-181), Yeo et al. (Yeo 2003, Clinica Chimica Acta 338:107-115) で記載された分析により検出することができる。変異体は、グリコシル化ペプチド、ミリスチル化ペプチドなど翻訳後に修飾されたペプチドも含む。さらに、本発明による変異体は、例えばペプチドへの標識の共有結合または非共有結合により、特に放射性標識または蛍光標識により試料の採取後に修飾されたペプチドまたはポリペプチドも含む。

10

## 【0074】

本明細書を通して、用語「算出する」は、対象から採取された試料中で測定された NT - proANP 量及び NT - proBNP 量の比を計算することを指す。本発明によれば、NT - proANP 量の NT - proBNP 量に対する比、または NT - proBNP 量の NT - proANP 量に対する比を求めることができる。NT - proANP 量の NT - proBNP 量に対する比を求めることが好ましい。

## 【0075】

好ましい基準対象は、本明細書で上記のように開示されている。好ましくは、基準比は、TIA を発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料及び/または TIA を発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出されるものである（本明細書の記載も参照）。

20

## 【0076】

算出した比（及び基準比）が NT - proANP 量の NT - proBNP 量に対する比である場合、以下の診断アルゴリズムを適用する。

好ましくは、基準比は、

- a. TIA を発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料における比が、基準比と本質的に同じ、または基準比より大きい場合、対象は一過性脳虚血発作を発症したことを示し、かつ/または
- b. TIA を発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料における比が基準比と本質的に同じ、または基準比より小さい場合、対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す。

30

## 【0077】

算出した比（及び基準比）が NT - proBNP 量の NT - proANP 量に対する比である場合、以下の診断アルゴリズムを適用する。

好ましくは、基準比は、

- a. TIA を発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料における比が基準比と本質的に同じ、または基準比より小さい場合、対象は一過性脳虚血発作を発症したことを示し、かつ/または
- b. TIA を発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料における比が基準比と本質的に同じ、または基準比より大きい場合、対象は一過性脳虚血発作を発症しなかったことを示す。

40

## 【0078】

さらに、基準比は閾値比、特に算出された基準比を定義してもよく、診断の対象から採取した試料中の NT - proANP 量の NT - proBNP 量に対する比がそれぞれの閾値より大きい場合、TIA の発症を示すものとし、診断の対象から採取した試料中の NT - proANP 量の NT - proBNP 量に対する比がそれぞれの閾値より小さい場合、対象は TIA を発症しなかったことを示すものとする（NT - proANP 量の NT - p

50

roBNP量に対する比を求める場合)。

【0079】

TIAを発症しなかったとわかっている対象(対象群)から採取した試料から算出される、NT-proANP量のNT-proBNP量に対する好ましい基準比は、約10～約125、より好ましくは約20～約100、または約20～約90である。さらにより好ましくは、TIAを発症しなかったとわかっている対象(または対象群)から採取した試料から算出される基準比は、約125、最も好ましくは約80である。

【0080】

好ましくは、基準比がTIAの危険因子を有する対象(本明細書の他の箇所に記載、特に心不全を発症している対象)から算出される場合、TIAを発症しなかったとわかっている対象(対象群)から採取した試料から算出される、NT-proANP量のNT-proBNP量に対する好ましい基準比は約10～約40、より好ましくは約20～約40、または約20～約30である。さらにより好ましくは、TIAを発症しなかったとわかっている対象(または対象群)から採取した試料から算出される基準比は、約40、最も好ましくは約30である。

10

【0081】

TIAを発症したとわかっている対象(対象群)から採取した試料から算出される、NT-proANP量のNT-proBNP量に対する好ましい基準比は、約150～約300、より好ましくは約150～約250、または約200～約250である。さらにより好ましくは、TIAを発症したとわかっている対象(対象群)から採取した試料から算出される基準比は、約250、最も好ましくは約200である。

20

【0082】

本発明の好ましい態様では、該方法はさらに、TIAと診断された場合に好適な治療を推奨する工程を含む。

本明細書を通して、用語「推奨する」は対象に適用できる治療を提案することを意味する。しかしながら、自明ではあるが、なんであれ実際に治療を行うことはこの用語には含まれていない。推奨する治療は、本発明の方法によって出された診断の結果に依存する。上記の推奨工程はまた、好ましくは自動化されていてもよい。好ましくは、本発明の方法の工程(b)から得た診断または診断補助、すなわちこの方法の診断結果を用いて、個々の可能な診断結果の治療手段を推奨することを含むデータベースを検索してもよい。TIAの場合に推奨できる好適な治療は当該分野で周知であり、好ましくはさらなる脳虚血事象の危険性、特に脳卒中及び/またはTIAの危険性を低減させるための治療計画を含む。これら治療は、医薬品の投与、治療介入、生活習慣の改善などを含む。治療はTIAの原因により変化してもよい。好ましい治療計画は、抗凝血剤治療、抗血小板療法、アスピリン及び/またはヘパリンの投与、ステント植込み(Chimowitz et al. NEJM 2011: 993-1003を参照)、動脈内膜切除、特に頸動脈血管内膜切除を含む。好ましい生活習慣の改善は、喫煙及び/またはアルコールの節制、及び減量(特にカロリー摂取量の低減及び/または運動量の増加による)である。

30

【0083】

本発明のある側面では、一過性脳虚血発作(TIA)の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断する補助を行う方法が企図されている。該方法は、

40

(a)(i) マーカーと特異的に結合する検出試薬と試料を、検出試薬と試料から採取したマーカーとの錯体を形成するのに十分な時間接触させることと、(ii) 形成された錯体の量を測定すること(形成された錯体の量は試料中に含まれるマーカー量に比例する)と、(iii) 形成された錯体の量を、試料中に含まれるマーカー量を反映するマーカー量に変換することによりマーカーNT-proANPの量を測定すること、

(b) この量を基準と比較することと、

(c) 工程(b)で行った比較の結果に基づき一過性脳虚血発作(TIA)を診断するための補助を行うことと、を含む。

50

## 【0084】

本発明の他の側面では、一過性脳虚血発作（TIA）の発症が疑われるが脳卒中は発症しなかった対象について一過性脳虚血発作を診断するシステムが企図されている。該システムは、

a) マーカーNT-proANPと特異的に結合する検出試薬と試料を、検出試薬と試料から採取したマーカーとの錯体を形成するのに十分な時間接触させる分析装置と、

b) 形成された錯体の量を測定する分析装置（形成された錯体の量は試料中に含まれるマーカー量に比例する）と、

c) プロセッサを有し、該分析装置a)及びb)と操作可能に接続された演算処理装置と、

d) 該プロセッサで実行可能な複数の命令を含む非一時的な、機械で読取り可能な媒体であって、命令が実行されると、形成された錯体の量を、試料中に含まれるマーカー量を反映するマーカー量に変換し、この量を基準と比較し、基準との比較の結果に基づき一過性脳虚血発作（TIA）の診断を補助する媒体とを備える。

## 【0085】

ある側面において、好適な検出試薬は本発明の方法によって調べる対象から採取した試料中のマーカーに特異的に結合する抗体であってもよい。ある側面では、適用できる他の検出試薬は、試料中のマーカーに特異的に結合するアプタマーであってもよい。別の側面では、試料は、形成された錯体の量を測定する前に検出試薬とマーカーとで形成された錯体から取り除かれる。したがって、ある側面では、検出試薬は固体支持体で固定化されていてもよい。別の側面では、試料は、固体支持体上の形成された錯体を、洗浄液を用いて取り除いてもよい。形成された錯体は、試料中に含まれるマーカー量と比例するものとする。自明であるが、適用する検出試薬の特異度及び/または感度は、試料中の特異的に結合することができる少なくとも1つのマーカーの割合の程度を定義するものである。測定の実行については、本明細書の他の箇所により詳細に記載されている。形成された錯体の量は、試料に実際にある量を反映する少なくとも1つのマーカーの量に変換されるものとする。ある側面では、この量は、本質的に試料中に含まれる量であってもよく、他の側面では、形成された錯体と元の試料中に含まれる量の関係による量の割合であってもよい。

## 【0086】

上記方法のある側面では、工程(a)は分析装置で行ってもよく、別の側面では、本明細書の他の箇所で定義した分析装置で行ってもよい。

本発明の方法のある側面では、工程(a)で測定した量を基準と比較する。ある側面では、基準は本明細書の他の箇所で定義した基準である。他の側面では、基準は、錯体量の測定と元の試料中に含まれる量との間の比例関係を考慮したものである。よって、本発明の方法のある側面で用いる基準は、用いられた検出試薬の限定を反映するために採用した人工的な基準である。他の側面では、例えば、測定量の値と基準を実際に比較する前に測定量を正規化及び/または補正計算する工程を含むことによりこの関係を比較の実行時に考慮してもよい。測定量を正規化及び/または補正計算する工程もまた、用いられた検出試薬の限定を適切に反映するように比較工程に取り入れる。ある側面では、比較は例えばコンピュータシステムなどの支援により自動化されて行われる。

## 【0087】

TIAを診断するための補助は、本明細書の他の箇所で記述したように、対象を、TIAを発症した対象群またはTIAを発症しなかった対象群に割り当てることにより工程(b)で行う比較に基づいて行われる。すでに本明細書の他の箇所で述べたように、調べた対象の割り当ては、必ずしも調べた場合の100%正しいわけではない。また、調べた対象が割り当てられる対象群は、統計的な考察、すなわち予め選択した尤度の度合い（本発明の方法はこれに基づいて動作するものとする）に基づいて形成された人工的な群である。本発明のある側面では、TIAを診断するための補助は、例えば本明細書に記載及び開示した演算処理装置などの支援によって自動化されて行われる。

## 【0088】

10

20

30

40

50

本発明の方法のある側面では、該方法はさらに、本明細書の他の箇所で詳細に記述した工程(c)で得た結果により対象を推奨及び/または管理する工程及び/または集中的な疾病監視を適合させる工程を含む。

【0089】

該方法のある側面では、工程(b)及び/または(c)は本明細書の他の箇所で記載された1台以上の分析装置によって行われる。

本明細書の上記の記述及び定義は、以下に準用される。

【0090】

急性脳虚血事象を診断する方法

本発明者らはさらに、NT-proANP量とNT-proBNP量の比が対象について急性脳虚血事象を診断するための有益な指標であることを示した。

10

【0091】

したがって、本発明はさらに、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象について急性脳虚血事象を診断する方法に関し、該方法は

- (a) 対象から採取した試料中のNT-proANP量を測定することと、
- (b) 対象から採取した試料中のNT-proBNP量を測定することと、
- (c) NT-proANP量及びNT-proBNP量の比を算出することと、を含む。

【0092】

好ましい態様では、上記方法はさらに、このように算出した比を基準比と比較して急性脳虚血事象を診断することを含む。

20

したがって、本発明は特に、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象について急性脳虚血事象を診断する方法に関し、該方法は、

- (a) 対象から採取した試料中のNT-proANP量を測定することと、
- (b) 対象から採取した試料中のNT-proBNP量を測定することと、
- (c) NT-proANP量及びNT-proBNP量の比を算出することと、
- (d) このように算出した比を基準比と比較して急性脳虚血事象を診断することを含む。

【0093】

用語「急性脳虚血事象」は、当業者には自明である。この用語は特に、脳(または脳の一部)への血流が脳の代謝性要求に対して不十分になる急性疾病に関連する。好ましくは、急性脳虚血事象には2つの型がある。急性脳虚血事象1は、この事象に関連づけられる虚血が脳の特定の部位に限定される場合である(局所的虚血)。急性脳虚血事象2は、この事象に関連づけられる虚血が脳組織の広い面積を含む場合である(全身性虚血)。この事象は急性かつ突然現れるものとする。好ましくは、急性脳虚血事象は脳卒中及び一過性脳虚血発作から選択される。用語「脳卒中」及び「一過性脳虚血発作」は本明細書の他の箇所で定義されている。

30

【0094】

本明細書を通して、用語「対象」は本明細書の他の箇所で記述したとおりであり、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトに関する。本発明による対象は、急性脳虚血事象の発症が疑われるものとする。好ましくは、該対象は、検査用試料を採取する前の72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に急性脳虚血事象の発症が疑われるものとする。したがって、診断の対象が検査用試料を採取する前の好ましくは72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に急性脳虚血事象を発症したか否かを本発明に従って診断するものとする。

40

【0095】

好ましくは、診断の対象(及び基準対象)は急性脳虚血事象の危険因子を有する。好ましい危険因子には、冠動脈瘤、心不全、特に急性心不全、収縮期及び/または拡張期心不全、弁膜性心疾患、動脈高血圧症などがある。さらに危険因子は糖尿病及び肥満である。したがって、診断の対象は好ましくはこれら危険因子の少なくとも1つを示している。特に診断の対象(及び基準対象、すなわち基準量が算出された対象)が冠動脈瘤及び/また

50

は心不全を発症していると想定される。最も好ましくは、対象は心不全を発症している。好ましくは、同じことが基準対象にも当てはまる。

【0096】

上記のように、上記方法による診断の対象は、本明細書の他の箇所で記載した所定の空白期間以内に急性脳虚血事象を発症したと疑われ、よって急性脳虚血事象の発症が疑われるものとする。好ましくは、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象は、急性脳虚血事象の症状を示す対象である。好ましくは、該対象は、検査用試料を採取する前の所定の空白期間以内に急性脳虚血事象の症状を示した対象である。好ましくは、該対象は、検査用試料を採取する前の72時間以内、より好ましくは48時間以内、最も好ましくは24時間以内に急性脳虚血事象の症状を示した。しかしながら、好ましくは、検査用試料は、急性脳虚血事象の症状が発症した後の1時間以上後、特に2時間以上後に採取されたものとする。

10

【0097】

上記本発明の方法により急性脳虚血事象を診断するものとする。本明細書を通して、用語「診断する」は、本発明の方法に従って定義した対象が急性脳虚血事象を発症したか否かを判断することを意味する。特に、検査用試料を採取する前の所定の空白期間以内に対象が急性脳虚血事象を発症したか否かを診断するものとする。好ましい態様では、検査用試料を採取する前の72時間以内に対象が急性脳虚血事象を発症したか否かを診断するものとする。さらに好ましい態様では、検査用試料を採取する前の48時間以内に対象が急性脳虚血事象を発症したか否かを診断するものとする。さらに好ましい態様では、検査用試料を採取する前の24時間以内に対象が急性脳虚血事象を発症したか否かを診断するものとする。対象は、試料を採取した時点で急性脳虚血事象の症状をもはや示していないことが好ましい。

20

【0098】

試料は、急性脳虚血事象の症状が発症した後の72時間以内に採取されることが好ましい。試料は、急性脳虚血事象の症状が発症した後の、より好ましくは48時間以内に、最も好ましくは24時間以内に採取される。対象は、試料を採取した時点で急性脳虚血事象の症状をもはや示していないことが好ましい。

【0099】

好ましくは、基準比は、急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象（対象群）から採取した試料及び/または急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象（対象群）から採取した試料から算出される。

30

【0100】

基準対象（すなわち、急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象、または急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象）は、急性脳虚血事象の危険因子を有することが好ましい。急性脳虚血事象の好ましい危険因子は本明細書の上で開示しており、冠動脈瘤、心不全、特に急性心不全、収縮期及び/または拡張期心不全、弁膜性心疾患、動脈高血圧症などがある。さらに危険因子は糖尿病及び肥満である。したがって、基準対象は好ましくはこれら危険因子の少なくとも1つを示す。好ましくは、基準対象は冠動脈瘤を発症している。より好ましくは、基準対象は心不全を発症している。最も好ましくは、診断の対象も基準対象も、心不全を発症している。また好ましくは、診断の対象も基準対象も冠動脈瘤を発症している。

40

【0101】

算出した比（及び基準比）がNT-proANP量のNT-proBNP量に対する比である場合、以下の診断アルゴリズムを適用する。

好ましくは、基準比は、急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中のNT-proANP量のNT-proBNP量に対する比が基準比と本質的に同じ、または基準比より大きい場合、対象が急性脳虚血事象を発症したことを示し、かつ/または基準比が急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象から採取した試料から算出され、診断の対象から採取した試料中の

50

NT - proANP量のNT - proBNP量に対する比が、基準比と本質的に同じ、または基準比より小さい場合、対象が急性脳虚血事象を発症しなかったことを示す。

【0102】

急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出され、NT - proANP量のNT - proBNP量に対する好ましい基準比は、約10～約100、より好ましくは約20～約90、または約20～約80である。さらにより好ましくは、急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される基準比は、約100、最も好ましくは約80である。

【0103】

好ましくは、基準比が急性脳虚血事象の危険因子を有する対象、特に心不全または冠動脈瘤を発症している対象から算出される場合、急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出されるNT - proANP量のNT - proBNP量に対する好ましい基準比は、約10～約40、より好ましくは約20～約40、または約20～約30である。さらにより好ましくは、急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される基準比は、約40、最も好ましくは約30である。

【0104】

急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出されるNT - proANP量のNT - proBNP量に対する好ましい基準比は、約100～約250、より好ましくは、約100～約200、または約100～約150である。さらにより好ましくは、急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象（または対象群）から採取した試料から算出される基準比は、約100、最も好ましくは約150である。TIAの好ましい基準量は本明細書の他の箇所で開示されている。

【0105】

本発明のある側面では、急性脳虚血事象の発症を疑われる対象について急性脳虚血事象の診断を補助する方法が企図されており、該方法は、

(a) (i) マーカーに特異的に結合する検出試薬と試料を、検出試薬と試料から採取したマーカーとの錯体を形成するのに十分な時間接触させることと、(ii) 形成された錯体の量を測定すること（形成された錯体の量は試料中に含まれるマーカー量に比例する）と、(iii) 形成された錯体の量を、試料中に含まれるマーカーの量を反映するマーカー量に変換することによりマーカーNT - proANP及びNT - proBNPの量を測定することと、

(b) NT - proANP量及びNT - proBNP量の比を算出することと、

(c) 該比を基準比と比較することと、

(d) 工程(c)で行った比較の結果に基づき急性脳虚血事象の診断を補助することと、を含む。

【0106】

本発明の他の側面では、急性脳虚血事象の発症を疑われる対象について急性脳虚血事象を診断するシステムが企図されており、該システムは、

a) マーカーNT - proANPと特異的に結合する検出試薬と試料を、検出試薬と試料から採取したマーカーとの錯体を形成するのに十分な時間接触させる分析装置と、

b) 形成された錯体の量を測定する分析装置（形成された錯体の量は試料中に含まれるマーカー量に比例する）と、

c) プロセッサを有し、該分析装置a)及びb)と操作可能に接続された演算処理装置と、

d) 該プロセッサで実行可能な複数の命令を含む非一時的な、機械で読取り可能な媒体であって、命令が実行されると、形成された錯体の量を試料中に含まれるマーカー量を反映するマーカー量に変換し、この量を基準と比較し、該基準との比較の結果に基づき急性脳虚血事象の診断の補助する媒体とを備える。

10

20

30

40

50

## 【0107】

ある側面では、好適な検出試薬は、本明細書の他の箇所で記載した本発明の方法により調べる対象から採取した試料中のマーカ-に特異的に結合する抗体であってもよい。

上記方法のある側面では、工程(a)は、分析装置により行われてもよく、別の側面では、本明細書の他の箇所で定義した分析装置により行われてもよい。

## 【0108】

本発明の方法のある側面では、工程(b)で算出した比を基準比と比較する。ある側面では、基準比は本明細書の他の箇所で定義した基準である。このように、本発明の方法のある側面で用いた基準は、用いた検出試薬の限定を反映するために採用した人工的な基準であってもよい。別の側面では、例えば、測定量の値と基準を実際に比較する前に測定量または比を正規化及び/または補正計算する工程を含むことにより、この関係を比較の実行時に考慮してもよい。ある側面では、比較は例えばコンピュータシステムなどの支援により自動化されて行われる。

10

## 【0109】

急性脳虚血事象を診断するための補助は、本明細書の他の箇所で記述したように、対象を、急性脳虚血事象を発症している対象群または急性脳虚血事象を発症していない対象群に割り当てることにより工程(c)で行う比較に基づいて行われる。すでに本明細書の他の箇所で述べたように、調べた対象の割り当ては、必ずしも調べた場合の100%正しいわけではない。また、調べた対象が割り当てられる対象群は、統計的な考察、すなわち予め選択した尤度の度合い(本発明の方法はこれに基づいて動作するものとする)に基づいて形成された人工的な群である。本発明のある側面では、急性脳虚血事象を診断するための補助は、例えば本明細書で記載及び開示した演算処理装置などの支援によって自動化されて行われる。

20

## 【0110】

本発明の方法のある側面は、該方法はさらに、本明細書の他の箇所で詳細に記述した工程(c)で得た結果により対象を推奨及び/または管理する工程、及び/または集中的な疾病監視を適合させる工程を含む。

## 【0111】

上記方法のある側面では、工程(b)及び/または(c)は、本明細書の他の箇所で記載した1台以上の分析装置によって行われる。

30

さらに、本発明は、一過性脳虚血発作を診断するためのNT-proANPポリペプチド及び/または検出試薬の使用に関し、検出試薬は、一過性脳虚血発作(TIA)の発症が疑われる対象から採取した試料中のNT-proANPポリペプチドに特異的に結合する。

## 【0112】

さらに、本発明は、一過性脳虚血発作を診断するための、一過性脳虚血発作(TIA)の発症が疑われる対象から採取した試料中のNT-proANPポリペプチド及びNT-proBNPポリペプチドの使用に関する。

## 【0113】

また、本発明は、一過性脳虚血の診断するための検出試薬の使用に関し、該検出試薬は、一過性脳虚血発作(TIA)の発症が疑われる対象から採取した試料中のNT-proANPポリペプチドと特異的に結合する検出試薬、及び該試料中のNT-proBNPポリペプチドに特異的に結合する検出試薬である。

40

## 【0114】

また、本発明は、急性脳虚血事象を診断するための、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象から採取した試料中のNT-proANPポリペプチド及びNT-proBNPポリペプチドの使用に関する。

## 【0115】

さらに、本発明は、急性脳虚血事象を診断するための検出試薬の使用に関し、該検出試薬は、急性脳虚血事象の発症が疑われる対象から採取した試料中のNT-proANPポ

50

リペプチドに特異的に結合する検出試薬、及び該試料中のNT-proBNPポリペプチドに特異的に結合する検出試薬である。

【0116】

本明細書を通して、用語「検出試薬」は、試料に含まれる場合、本明細書で定義した生体指標（NT-proANPまたはNT-proBNP）を特異的に認識し、この生体指標に結合することができる試薬を指す。また、試薬は、試薬と生体指標とで形成された錯体を直接または間接的に検出することができるものとする。直接検出は、試薬に検出可能な標識を含有させることで達成することができる。間接標識化は、生体指標と検出試薬と含む錯体に特異的に結合する別の試薬によって達成されてもよく、この別の試薬は検出可能な信号を生成することができる。検出試薬として用いることができる好適な化合物は当該分野で周知である。好ましくは、検出試薬は生体指標と特異的に結合する抗体またはアプタマーである。本明細書で定義した抗体は、ポリクロナール抗体及びモノクローナル抗体の両方を含む。また、抗原または付着体を結合させることができるFv、Fab及びF(ab)<sub>2</sub>断片など、それらの断片も含む。また、単鎖抗体、及び所望の抗原特異性を示す非ヒト供与体抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と結合させたヒト化混成抗体も想定されている。

10

【0117】

本発明はさらに、一過性脳虚血発作を診断する装置に関し、該装置は、  
(a) NT-proANPポリペプチドの量を測定することができるNT-proANPポリペプチドの検出試薬を備える分析部と、  
(b) 分析部で測定した量を、NT-proANPの診断を確立するためのデータベースに保存された基準量と比較するアルゴリズムを実装したデータプロセッサを備える評価部であって、該基準量は、TIAを診断する方法の文脈において本明細書の他の箇所で記載した対象から採取した試料から算出され、該アルゴリズムは該方法の文脈に記載したアルゴリズムである評価部と、を備える。

20

【0118】

本発明の別の側面によれば、本発明の方法を実行するための装置が提供され、該装置は、  
(a) NT-proANPポリペプチドの量を測定することができるNT-proANPポリペプチドの検出試薬を備える分析部と、  
(b) 測定量を基準量と比較して、対象がTIAを発症したか否かを診断する分析部であって、基準量値のデータベースと、該比較を実行するコンピュータに実装されたアルゴリズムとを備える分析部と、を備える。

30

【0119】

本発明はさらに、一過性脳虚血発作を診断する装置であって、該装置は、  
(a) NT-proANPポリペプチドの量を測定することができるNT-proANPポリペプチドの検出試薬と、NT-proBNPポリペプチドの量を測定することができるNT-proBNPポリペプチドの検出試薬とを備える分析部と、  
(b) 該分析部によって測定したNT-proANP量及びNT-proBNP量の比を算出するデータプロセッサを備える評価部であって、該データプロセッサには算出した比を、TIAの診断を確立するためのデータベースに保存された基準比と比較するアルゴリズムが実装されており、該基準比はTIAを診断する方法の文脈において本明細書の他の箇所で記載した対象から採取した試料から算出され、該アルゴリズムは該方法の文脈に記載したアルゴリズムである評価部と、を備える。

40

【0120】

本発明はさらに、急性脳虚血事象を診断する装置に関し、該装置は、  
(a) NT-proANPポリペプチドの量を測定することができるNT-proANPポリペプチドの検出試薬と、NT-proBNPポリペプチドの量を測定することができるNT-proBNPポリペプチドの検出試薬とを備える分析部と、  
(b) 分析部で測定したNT-proANP量及びNT-proBNP量の比を算出する

50

データプロセッサを備える評価部であって、該データプロセッサには算出した比を、T I Aの診断を確立するためのデータベースに保存された基準比と比較するアルゴリズムが実装されており、該基準比は、急性脳虚血事象を診断する方法の文脈において本明細書の他の箇所で記載した対象から採取した試料から算出され、該アルゴリズムは該方法の文脈で記載したアルゴリズムである評価部と、を備える。

#### 【0121】

また、急性脳虚血事象を診断する装置が企図されており、該装置は、

(a) NT - pro ANPポリペプチドの量を測定することができるNT - pro ANPポリペプチドの検出試薬と、NT - pro BNPポリペプチドの量を測定することができるNT - pro BNPポリペプチドの検出試薬とを含む分析部と、

(b) NT - pro ANP量及びNT - pro BNP量の比を算出するデータプロセッサを備える分析部であって、該データプロセッサは、該算出した比を、急性脳虚血事象の診断を確立するためのデータベースに保存された基準比と比較するアルゴリズムが実装されており、該基準比は急性脳虚血事象を診断する方法の文脈において本明細書の他の箇所で記載した対象から採取した試料から算出され、該アルゴリズムは該方法の文脈で記載したアルゴリズムである分析部と、を備える。

#### 【0122】

本明細書を通して、用語「装置」は、本発明の方法によって診断できるように互いに操作可能に接続された上記の各部を備えるシステムを指す。この分析部に用いることができる好ましい検出試薬は、本明細書の他の箇所で開示されている。分析部は好ましくは、固体支持体上に固定化された形態の検出試薬を備え、検出試薬を、生体指標を含む試料と接触させて、生体指標の量を測定する。また、分析部は、生体指標に特異的に結合する検出試薬の量を測定する検出器を備えていてもよい。測定量を評価部に送信することができる。評価部は、測定量と好適な基準とを比較するアルゴリズムが実装された、コンピュータなどのデータ処理構成要素を備える。好適な基準は、本明細書の他の箇所ですでに記載した基準量の生成に用いる、対象から採取した試料から算出されていてもよい。診断結果は、診断用の未加工データのパラメータとして出力されてもよく、好ましくは絶対量または相対量として出力されてもよい。自明であるが、これらデータは臨床医の解釈を必要とするものであってもよい。しかしながら、その出力の解釈に専門臨床医を必要としない処理済みの診断用未加工データを含む専門システム装置を想定している。好ましくは、本発明の装置は、上記本発明の方法を自動化して実行するのに用いることができる。

#### 【0123】

本開示の好ましい態様は、他の箇所で開示したT I Aまたは急性脳虚血事象を診断するシステムを含む。このシステムは、化学的または生物学的反応の結果を検出、または化学的または生物学的反応の進行を監視するのに用いる装置、例えば臨床化学分析装置、凝固化学分析装置、免疫化学分析装置、尿分析装置、核酸分析装置などを含む。より具体的には、本開示のシステムは、例えばロシュエレクシス (Roche Elecsys (商標)) システム及びコバス (Cobas (登録商標)) e免疫分析装置、アボットアーキテクト (Abbott Architect (商標)) 及びアキシム (AxSYM (商標)) 分析装置、シーメンスケンタウルス (Siemens Centaur (商標)) 及びイムライト (Immulite (商標)) 分析装置、ベックマンコールターユニセル (Beckman Coulter UniCel (商標)) 及びAccess (商標) 分析装置などを含んでいてもよい。

#### 【0124】

このシステムの態様は、本開示を実施するために用いられる1台以上の分析装置を備えていてもよい。本明細書で開示するシステムの分析装置は、周知の有線接続、ブルートゥース (Bluetooth)、LAN (Local Area Network: ローカル・エリア・ネットワーク)、または無線信号のいずれかを介して本明細書で開示された演算処理装置に操作可能に接続されている。また、本開示によれば、分析装置は独立型装置、または大きな装置中のモジュールを備えていてもよく、診断のために例えば試料の質的評価及び/または量的評価のいずれか、または両方の検出を行う。例えば、分析装置は、試料及び/または試薬ピペ

ット操作、投入、混合を行う、あるいは支援してもよい。分析装置は、試薬を保持して分析を行う試薬保持部を備えていてもよい。試薬は、例えば個々の試薬または試薬群を入れる容器またはカセットの形態で配置されていてもよい。容器またはカセットは、貯蔵室またはコンベヤ内の適切な貯蔵部または位置に置かれている。検出試薬は、固体支持体上に固定化された形態であってもよく、試料と接触させる。さらに、分析装置は、特定の分析に最適化することができるプロセス及び/または検出要素を含んでいてもよい。

#### 【0125】

いくつかの態様によると、分析装置は、マーカなどの検体を試料で光学的に検出するように構成されていてもよい。光学的に検出を行うように構成された分析装置は、例えば、単一の光学検出器と、複素子またはアレイ光学検出器の両方を備える、電磁気エネルギーを電気信号に変換する装置などを含む。本開示によれば、光学検出器は、光学電磁気信号を監視して、光学路に置かれた試料中の検体の存在及び/または濃度を示す基線信号に対する電気出力信号または応答信号を出力することができる。そのような装置はまた、フォトダイオード（アバランシェフォトダイオードを含む）、フォトトランジスタ、光導電性検出器、リニアアレイセンサ、CCD検出器、CMOS検出器（CMOSアレイ検出器、光電子増倍管、光電子増倍管アレイを含む）などを含んでいてもよい。ある態様によれば、フォトダイオードまたは光電子増倍管などの光学検出器は、さらに信号調節電子機器または処理電子機器を含んでいてもよい。例えば、光学検出器は、少なくとも1つの前置増幅器、電子フィルタ、または集積回路を備えていてもよい。好適な前置増幅器には、例えば積分前置増幅器、トランスインピーダンス前置増幅器、電流利得（電流ミラー）前置増幅器などがある。

10

20

#### 【0126】

また、本開示による1台以上の分析装置は、発光する光源を含んでいてもよい。例えば、分析装置の光源は、検査する試料を用いて検体の濃度を測定する、またはエネルギー移動（例えば、蛍光共鳴エネルギー移動により、または酵素で触媒するなど）ができる少なくとも1つの発光素子（発光ダイオード、白熱灯などの電気放射源、エレクトロルミネセント灯、ガス放電灯、高輝度放電ランプ、レーザーなど）であってもよい。

#### 【0127】

さらに、システムの分析装置は、1つまたはそれ以上の培養部（例えば、試料または試薬を所定の温度または温度範囲に維持する）を備えていてもよい。いくつかの態様では、分析装置は、熱サイクラーを含んでいてもよい。熱サイクラーは、試料を繰り返し温度サイクルにさらして、試料の増幅産物量の変化を監視するリアルタイム熱サイクラーを含む。

30

#### 【0128】

また、本明細書で開示するシステムの分析装置は、反応槽またはキュベット供給部を備えていてもよく、あるいは反応槽またはキュベット供給部と操作可能に接続されていてもよい。供給部は、例えばピペット操作部などの液体処理部を含み、試料及び/または試薬を反応槽に供給する。ピペット操作部は、鋼針などの洗浄できる再利用可能な針や、使い捨てのピペット先端部を備えていてもよい。分析装置はさらに、1つまたはそれ以上の混合部、例えば、液体を含むキュベットを振とうする震盪器や、キュベットまたは試薬容器中の液体を混合する混合パドルなどを備えていてもよい。

40

#### 【0129】

以上のことから、本開示のいくつかの態様によれば、本明細書で開示及び記載した方法のいくつかの工程である部分は演算処理装置によって行われてもよい。演算処理装置は、例えば汎用コンピュータまたはポータブル演算処理装置などであってもよい。また自明であるが、ネットワークまたは他のデータ転送方法により複数の演算処理装置を用いて本明細書で開示する方法の1つまたはそれ以上の工程を行ってもよい。演算処理装置は、例えば、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、ブラックベリー（BLACKBERRY）端末などのパーソナルデータアシスタント（personal data assistant、PDA）、携帯端末装置、タブレットコンピュータ、サーバなどがある。一般に、演算処理装置は（ソフ

50

トウェアのプログラムなど)複数の命令を実行することができるプロセッサを備える。

【0130】

演算処理装置は好ましくはメモリにアクセスする。メモリは、コンピュータで読取り可能な媒体であり、1つまたは複数の記憶装置を備えていてもよい。この(これらの)記憶装置は、演算処理装置に配置されていてもよく、あるいはネットワークなどを介して演算処理装置とアクセス可能に配置されていてもよい。コンピュータで読取り可能な媒体は、演算処理装置がアクセスできる任意の利用可能な媒体であってよく、揮発性媒体及び不揮発性媒体の両方を含む。さらに、コンピュータで読取り可能な媒体は、取外し可能な媒体及び取り外し不可能な媒体のいずれか、または両方であってもよい。コンピュータで読取り可能な媒体は例えば、コンピュータ記憶媒体を含んでいてもよいが、これらに限定されない。コンピュータ記憶媒体は、例えばRAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリまたは任意の他のメモリ技術、CD-ROM、デジタル多用途ディスク(Digital Versatile Disk、DVD)または他の光学ディスク記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶媒体または他の磁気記憶装置、または演算処理装置によってアクセスすることができ、かつ演算処理装置のプロセッサによって実行することができる複数の命令を記憶するのに用いることができる任意の他の媒体などがあるが、これらに限定されない。

10

【0131】

本開示の態様によれば、ソフトウェアは命令を含んでいてもよく、命令が演算処理装置のプロセッサによって実行されると、本明細書で開示する方法の1つまたはそれ以上の工程を実行してもよい。いくつかの命令は、他の機器を制御する信号を生成するように適合させてもよく、よってこれら制御信号を用いて操作して、コンピュータ自体から離れたところにある材料を変化させてもよい。これらの記述及び表現は、例えば他の当業者に動作の内容を最も有効に伝達するために、データ処理の当業者によって用いられる意味である。

20

【0132】

複数の命令はまた、一般に自己矛盾のない一連の工程であって所望の結果が得られると考えられるアルゴリズムを含んでいてもよい。これらの工程は、物理量を物理的に操作することが求められる。必ずしも必要ではないが、通常これら物理量は、記憶、転送、変換、結合、比較、及び他の操作をすることができる電気または磁気パルスまたは信号の形態を取る。主に一般的な用法であるという理由から、このような信号を具体化するあるいは表現する物理的なものや表示について述べる際に、これら信号を値、文字、表示データ、数などと言うのは、時として便利であることがわかる。しかしながら、これらすべての用語及び類似の用語は、適切な物理量と関連づけられるべきものであり、本明細書ではこれら物理量に付ける便利な標識としてのみ用いることに留意すべきである。本開示のいくつかの態様によれば、本明細書で開示した1つまたはそれ以上のマーカの測定量と好適な基準とを比較するアルゴリズムは、命令を実行することにより具体化及び実行される。その結果は、診断用未加工データのパラメータ、あるいは絶対量または相対量として出力されてもよい。本明細書で開示するシステムの様々な態様によれば、算出した「量」と基準または閾値との比較に基づき、本明細書で開示するシステムの演算処理装置によって「診断」を行ってもよい。例えば、システムの演算処理装置は、特定の診断を示す単語、記号、または数値の形で指標を示してもよい。

30

40

【0133】

演算処理装置はまた、出力装置にアクセスしてもよい。出力装置は例えば、ファックス、ディスプレイ、プリンター、ファイルなどがある。本開示のいくつかの態様によれば、演算処理装置は、本明細書で開示した方法の1つまたはそれ以上の工程を行ってもよく、その後、結果に関して、該方法による標識、比または他の係数を、出力装置を介して出力してもよい。

【0134】

本発明はまた、対象についてTIAを診断するキットを含み、該キットは、少なくともNT-proANPポリペプチドの検出試薬を備え、好ましくはTIAを発症したとわか

50

っている対象及び/またはT I Aを発症しなかったとわかっている対象から算出される基準量を反映する規格を備える。

【0135】

本発明はまた、対象についてT I Aを診断するキットを含み、該キットは、少なくともNT - proANPポリペプチドの検出試薬と、NT - proBNPポリペプチドの検出試薬とを備え、好ましくはT I Aを発症したとわかっている対象及び/またはT I Aを発症しなかったとわかっている対象から算出される基準比を反映する規格を備える。

【0136】

本発明はまた、対象について急性脳虚血事象を診断するキットを含み、該キットは少なくともNT - proANPポリペプチドの検出試薬と、NT - proBNPポリペプチドの検出試薬とを備え、好ましくは急性脳虚血事象を発症したとわかっている対象または急性脳虚血事象を発症しなかったとわかっている対象から算出される基準比を反映する規格を備える。

10

【0137】

本明細書を通して、用語「キット」は、上記構成要素の集合を指し、好ましくはこれら構成要素は別々に、または1つの容器で提供される。この容器は、本発明の方法を実行するための取扱説明書を含む。これら取扱説明書は、マニュアルの形式であってもよく、または本発明の方法で定義した比較を実行することができるコンピュータプログラムコードによって提供されて、コンピュータまたはデータ処理装置で実行されると診断を確立してもよい。コンピュータプログラムコードは、光学記憶媒体（例えば、コンパクトディスク）などのデータ記憶媒体または装置で、または直接コンピュータまたはデータ処理装置で提供されてもよい。また、このキットは、好ましくは上記の基準量及び本明細書の他の箇所で詳細に述べた基準量を反映する規格を含んでいてもよい。検出試薬は好ましくは担体上で固定化されており、好ましくは試験条片である。

20

【0138】

本明細書で引用したすべての基準は、その全体の開示内容及び具体的に本明細書で述べた開示内容を参照により本明細書に組み込む。

【実施例】

【0139】

以下の実施例は本発明を単に例示したものであるとする。これら実施例はなんであれ、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

30

実施例1：NT - proBNP及びNT - proANPの測定

ロシュの電気化学発光サンドイッチ免疫測定法（electrochemiluminescence sandwich immunoassay、ECLIA）Elecsys proBNP II STAT（Short Turn Around Time）分析を用いてNT - proBNPを求めた。この試験は、proBNP（1 - 108）のN - 末端部分（1 - 76）に位置するエピトープを認識する2つのモノクローナル抗体を用いている。

【0140】

Biomedica Medizinprodukte GmbH（オーストリア国ウィーン）のNT - proANP分析を用いてNT - proANP（前駆proANPペプチドのアミノ酸1～98）を測定した。カタログ番号BI - 20892。測定限界は、0.05nmol/lである。分析はポリクローナルヒツジ抗proANP抗体を利用するものである。

40

【0141】

以下の対象群について血清試料中の生体指標のレベルを調べた。

健常な対象（n = 149）

安定した冠動脈瘤（coronary artery disease、CAD）の患者（すなわち、脳卒中が発達していることが多い患者、n = 235）

心不全患者（n = 64）

T I A患者（n = 79）

軽度及び重度脳卒中の患者（それぞれn = 61及び108）

CAD患者：合計235人の慢性動脈瘤患者（平均年齢64歳、男性141人、女性9

50

4人)を調べた。すべての患者について、血管造影法で冠動脈瘤を確認した。血管の直径が50%減少しているかどうかを基準に血管疾病1、2または3に分類した。心臓の機能を、超音波心臓検査法及びNT-proBNPの測定により判断した。

【0142】

心不全：64人の患者(女性24人、男性40人、平均年齢69歳)が非代償性心不全であった。この群の患者は、過去2週間以内に息切れが増加したという特徴が見られ、すべての患者をNYHA分類のIIIまたはIVに分類することができた。

【0143】

健常な対照：149人の臨床的に健常なヒト対象(男性52人、女性97人、19歳から56歳までの平均年齢41歳)を対照として調べた。これらの対象は、病歴及び心電図から判断して心臓疾患が見られず、また糖尿病及びこれら疾患の危険因子も見られなかった。さらに、これらの対象は、正常なクレアチニン値によって腎臓機能は正常であると判断された。また、悪性疾患もなかった。

10

【0144】

脳卒中/TIA患者：合計255人のTIAまたは虚血性脳卒中患者(平均年齢70歳)を調べた。23人の患者が一過性脳虚血発作、61人の患者が軽度脳卒中、108人の患者が重度脳卒中であった。また、上述したように、頸動脈経頭蓋超音波検査、経頭蓋超音波検査、電気及び超音波心臓検査を行って、患者をTOAST(The trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment)基準に従って分類した。脳卒中患者及びTIA患者について、発症時に採取した試料、及び発症から6時間後及び24時間後に採取した試料を用いて生体指標NT-proANP及びNT-proBNPを測定した。症状の発症と認定との中央区間は、4.2時間であった(第一四分位数：2.5時間、第三四分位数：8時間)。

20

【0145】

実施例2：結果

次のような結果が得られた(中央レベル、第一四分位数及び第三四分位数として示す)

。

【0146】

	NT-proBNP pg/ml	NT-proANP pg/ml
健常な対象	37	882
n=149	18-68	635-1280
安定したCAD患者	266	2710
n=236	95-928	1880-4662
心不全患者	4477	33600
n=64	1971-7131	12570-57800
TIA	331	106000
n=27	165-473	79000-149000
軽度脳卒中	238	81000
n=60	79-547	43400-125000
重度脳卒中	412	107151
n=108	127-1053	70600-240000

30

驚くべきことに、脳卒中のNT-proANPレベルがTIA患者及び脳卒中患者で有意に増加していた。特にこれら患者のNT-proANPレベルは、明らかな心不全患者よりも高かった。このように、NT-proANPによって、心臓疾患患者と脳卒中患者とを区別した。NT-proBNPの測定は追加情報を提供する。

40

【0147】

また、NT-proANPのNT-proBNPに対する比を測定した。

比は以下のとおりであった(中央レベル、第一四分位数/第三四分位数)。

健常な対象 74(14/125)

50

CAD	10(4/25)
非代償性心不全	10(4/18)
重度脳卒中	249(128/603)
軽度脳卒中	321(149/670)
TIA	524(204/905)

表から分かるように、比を求めることは利点がある。というのも、i) 脳卒中 / T I A の危険因子を有する患者、すなわち NT - p r o A N P 及び NT - p r o B N P が高レベルの冠動脈瘤 ( C A D ) 患者及び心不全 ( H F ) 患者と i i ) 脳卒中または T I A を発症した患者とを区別することができるからである。

#### 【 0 1 4 8 】

脳卒中の経過中に NT - p r o A N P 値を追跡したところ、以下の値を得た。

	NT-proANP
	pg/ml
発症時	106000
	79000-149000
6 時間後	95500
	54000-139000
2 4 時間後	82000
	48000-139000

この追跡により、 NT - p r o A N P の効力が継続すること、また過去の事象も認識できることがわかった。

#### 【 産業上の利用可能性 】

#### 【 0 1 4 9 】

結論：

T I A は、しばしば重症の脳卒中の前に発症する場合があるため、その認識は重要である。T I A はわずかに数分継続するのみであることが多く、ほとんどの T I A は、脳に永久的な損傷を起こすことなく 1 時間以内に消散する。T I A の診断は次のことから困難を伴う。i ) T I A はその発症部位により他の様々な障害と似ている、i i ) 患者が症状の判断のために診察を受けても、もはや症状が示されておらず、これが最終診断を困難にしている。T I A は、全身性高血圧症、冠動脈瘤、発端が異なる心不全など心疾患の既往歴を有する患者で発達することが多い。本研究によれば、驚くべきことに、心不全において放出されると知られている NT - p r o A N P が、脳卒中において非常に上昇すること、また T I A 患者の NT - p r o A N P レベルが、進行性心不全患者及び非代償性心不全患者よりも高くなることがわかった。NT - p r o A N P / NT - p r o B N P 比はまた、この目的のために、特に心不全患者に安全に用いることができる。

#### 【 0 1 5 0 】

潜在的な原因 ( 例えば心塞栓 ) 、適切な介入 ( 例えば頸動脈狭窄症での血管形成術、心房細動での抗凝血剤 ) 、さらには脳卒中、具体的には重度脳卒中の予防において、T I A の疑いを確定することは臨床的に重要である。

#### 【 0 1 5 1 】

また、NT - p r o A N P / NT - p r o B N P 比を求めることにより、心不全を発症した患者について信頼性の高い脳卒中及び T I A の診断を行うことができることがわかった。

10

20

30

40

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/073897
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 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 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, WPI Data, CHEM ABS 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	US 2005/181386 A1 (DIAMOND CORNELIUS [US] ET AL) 18 August 2005 (2005-08-18) paragraph [0349]; claims 86,87,104,108,109,116,117 -----	1-10,20, 22-25
X	A.M. MAKIKALLIO ET AL: "Natriuretic Peptides and Mortality After Stroke", STROKE, vol. 36, no. 5, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1016-1020, XP055025278, ISSN: 0039-2499, DOI: 10.1161/01.STR.0000162751.54349.ae cited in the application	24,25
Y	* abstract; table 1; page 1017, left-hand column, last paragraph * ----- -/--	1-10,20, 22,23
<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		Date of mailing of the international search report
31 January 2013		02/07/2013
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  Fausti, Simone

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/073897
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARCIA-BERROCOSO T ET AL: "Blood biomarkers in cardioembolic stroke", CURRENT CARDIOLOGY REVIEWS, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NETHERLANDS, vol. 6, no. 3, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 194-201, XP009158782, ISSN: 1573-403X, DOI: 10.2174/157340310791658767 *abstract; table 1; page 195, right-hand column, fourth full paragraph * -----	1-10,20, 22,23
X	J. MAGGA ET AL: "Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction", JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY, vol. 96, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 1306-1311, XP055012580, ISSN: 8750-7587, DOI: 10.1152/japplphysiol.00557.2003 * abstract; page 1306, left-hand column, first paragraph; page 1307, left-hand column, lines 18-20 * -----	24,25
Y	GIUFFRIDA ET AL: "Immunohistochemical modifications of vasoactive neuropeptides and excitatory amino acids in the nervous tissue of the Mongolian gerbil after transient cerebral ischemia.", INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE, vol. 17, no. 2, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 99-107, XP055025300, ISSN: 0736-5748 abstract -----	1-10,20, 22,23
A	ESTRADA V ET AL: "HIGH PLASMA LEVELS OF ENDOTHELIN-1 AND ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE IN PATIENTS WITH ACUTE ISCHEMIC STROKE", AMERICAN JOURNAL OF HYPERTENSION, NEW YORK, NY, US, vol. 7, no. 12, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 1085-1089, XP008032880, cited in the application abstract -----	4-7
X	WO 2004/059293 A2 (BIOSITE INC [US]; BUECHLER KENNETH F [US]; MAISEL ALAN [US]; ANDERBERG) 15 July 2004 (2004-07-15) paragraphs [0112], [0122]; claims 78,79,89,125 ----- -/--	1-10,20, 22-25

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2012/073897

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 731 910 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]) 13 December 2006 (2006-12-13) claims 1,12,15; table 8 -----	24,25

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2012/073897**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-10, 20, 24, 25 (completely); 22, 23 (partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 073897

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10, 20, 24, 25(completely); 22, 23(partially)

Diagnosis of TIA by means of the NP-proANP marker, kits and devices therefor.

---

2. claims: 11-19, 21(completely); 22, 23(partially)

Diagnosis of an acute cerebral ischemic event by means of the combination of the NT-proANP and NT-proBNP markers, kits therefor.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/073897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005181386 A1	18-08-2005	NONE	
-----			
WO 2004059293 A2	15-07-2004	AU 2003302340 A1	22-07-2004
		CA 2511501 A1	15-07-2004
		EP 1587955 A2	26-10-2005
		JP 2006526140 A	16-11-2006
		WO 2004059293 A2	15-07-2004
-----			
EP 1731910 A1	13-12-2006	AT 469353 T	15-06-2010
		CA 2607264 A1	14-12-2006
		CN 101194167 A	04-06-2008
		EP 1731910 A1	13-12-2006
		EP 1889073 A1	20-02-2008
		JP 4828600 B2	30-11-2011
		JP 2008542778 A	27-11-2008
		US 2009042228 A1	12-02-2009
		WO 2006131529 A1	14-12-2006
-----			

---

 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B L U E T O O T H
2. B L A C K B E R R Y

(72)発明者 ヘス, ゲオルク

ドイツ国 5 5 1 3 0 マインツ, オッペンハイマー・シュトラッセ 8 2

(72)発明者 ホルシュ, アンドレア

スイス国 6 0 0 6 ルツェルン, ハルデンシュトラッセ 4

(72)発明者 ズドゥネック, ディートマー

ドイツ国 8 2 3 2 7 トウツィング, エリー - ナイ - シュトラッセ 3

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 DA54 FB03 FB13

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015504519A5</a>	公开(公告)日	2016-10-20
申请号	JP2014543882	申请日	2012-11-29
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ヘスゲオルク ホルシュアンドレア ズドウネックディートマー		
发明人	ヘス,ゲオルク ホルシュ,アンドレア ズドウネック,ディートマー		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2333/58 G01N2800/2871 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB03 2G045/FB13		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	2011191579 2011-12-01 EP		
其他公开文献	JP6059735B2 JP2015504519A		

#### 摘要(译)

本发明涉及在怀疑患有短暂性脑缺血发作 ( TIA ) 但没有中风的受试者中诊断短暂性脑缺血发作的方法。 该方法基于测量从受试者获得的样品中 NT-proANP 的量。 本发明还涉及基于测量从受试者收集的样品中的 NT-proBNP 和 NT-proANP 的量来诊断受试者中的急性脑缺血事件的方法。 该方法进一步包括计算 NT-proBNP 的量与 NT-proANP 的量之比的步骤 , 并且进一步考虑适于实施本发明方法的试剂盒和装置。 [选择图]无