

(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2019-502933

(P2019-502933A)

(43) 公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/68</b> (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/49</b> (2006.01)	GO 1 N 33/49	A
<b>GO 1 N 33/84</b> (2006.01)	GO 1 N 33/84	Z
<b>GO 1 N 33/53</b> (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 55 頁)

(21) 出願番号 特願2018-552627 (P2018-552627)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月23日 (2016.12.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月16日 (2018.8.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/NZ2016/050207  
 (87) 国際公開番号 WO2017/116239  
 (87) 国際公開日 平成29年7月6日 (2017.7.6)  
 (31) 優先権主張番号 62/271, 928  
 (32) 優先日 平成27年12月28日 (2015.12.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 518229272  
 アップストリーム・メディカル・テクノ  
 ジーズ・リミテッド  
 ニュージーランド・8024・クライスト  
 チャーチ・ヘイゼルディーン・ロード・2  
 ・レヴェル・3・パワーハウス・ベンチャ  
 ーズ・リミテッド内  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦

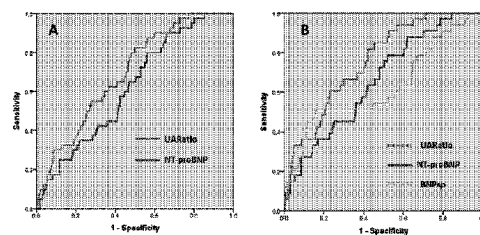
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不安定狭心症の診断

(57) 【要約】

本発明は、患者における不安定狭心症の診断に関する。更に、本発明は、不安定狭心症を発症した結果としての患者における脳卒中及び/又は心不全の合併症の予測に関する。

FIGURE 4



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断される方法。

10

**【請求項 2】**

以前に不安定狭心症と診断された患者における心不全及び/又は脳卒中の合併症を予測する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、不安定狭心症の結果として患者が心不全及び/又は脳卒中の合併症を発症することが予測される方法。

20

**【請求項 3】**

生体試料中のカリウム(K)のレベルを測定する工程を更に含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

BNPsp断片が残基17~26により定義される断片である(BNPsp(17~26))、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

BNPsp断片のレベル及び/又はNT-プロBNPのレベルがイムノアッセイ又は質量分析により決定される、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

イムノアッセイが定量的イムノアッセイである、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

イムノアッセイが、サンドイッチアッセイ、蛍光イムノアッセイ、免疫蛍光アッセイ、免疫放射線アッセイ、発光アッセイ、又は化学発光アッセイである、請求項5又は請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

イムノアッセイが、BNPsp断片結合剤及び/又はNT-プロBNP結合剤を含む、請求項5から7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

結合剤が抗体若しくはその抗原結合断片であり、又は結合剤がアプタマーである、請求項8に記載の方法。

40

**【請求項 10】**

抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、及びそれらの抗原結合断片からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

結合メンバー、抗体、又はアプタマーが固相に結合される、請求項8から10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

50

不安定狭心症の診断が、受信者動作曲線(ROC)分析を用いて特徴付けられる、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

受信者動作曲線(ROC)分析が、BNPsp断片及びNT-プロBNPのレベルを白血球数に対して正規化する工程を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

受信者動作曲線(ROC)分析により特徴付けられる不安定狭心症の診断が、(BNPsp断片+NT-プロBNP)/WCCの比を決定する工程を更に含む、請求項12又は請求項13に記載の方法。

【請求項15】

不安定狭心症の診断が、不安定狭心症を低減、消失、軽減、又は治療するために介入療法を施行する工程を更に含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項16】

生体試料が全血、血漿、又は血清からなる群から選択される、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

20

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断され、不安定狭心症の陽性診断の場合には、

(iii)患者における不安定狭心症を低減、消失、改善、又は治療するために介入療法を施行する工程とを含む方法。

【請求項18】

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのに特異的な試薬と、

30

(ii)患者における不安定狭心症の診断をどのように行うか、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/若しくは心不全の合併症をどのように予測するかに関する説明書と

を含むキット又は製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者における不安定狭心症を診断するための新規のアッセイ、方法、及びキットを提供する。更に、本発明は、不安定狭心症の結果としての患者における脳卒中及び/又は心不全の合併症を予測するための新規のアッセイ、方法、及びキットを提供する。

40

【背景技術】

【0002】

急性冠症候群(ACS)の疑いは、病院の救急科(ED)受診の中で頻度が高く、全ての来院の5~15%を含む[1]。純粋な心筋梗塞(MI)を有する者の迅速な同定は、高感度心筋トロポニンバイオマーカーアッセイの使用により強化されているが[2-5]、非梗塞性虚血(例えば不安定狭心症(UAP))を有する者のバイオマーカー支援同定は、満たされていない臨床ニーズの領域である。UAPは、その後の心血管イベントの重要な臨床的背景因子であり、UAPの明確な早期の同定は、関連する心血管罹患率及び死亡率の低下に役立つ可能性がある[6]。

【先行技術文献】

50

## 【非特許文献】

## 【0003】

【非特許文献1】Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10、227～235頁

【非特許文献2】Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版 Cold Spring Harbor Press、1987

【非特許文献3】Harlow and Lane (1988) Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York

【非特許文献4】Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY

10

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

出願人らは、ナトリウム利尿ホルモンB型ナトリウム利尿ペプチド(BNPsp)、A型ナトリウム利尿ペプチド(ANPsp)、及びC型ナトリウム利尿ペプチド(CNPsp)のシグナルペプチド(sp)領域の断片が、ヒト循環に存在するという初の報告を最近行った[7～9]。BNPsp及びANPspは両方とも、ST上昇MI中に循環における急速な上昇を示す。BNPspはまた、ドパミン負荷心エコーの状況で30分以内に急速な著しい上昇も示す[10]。故に、組織壊死に達していない心虚血を、胸痛の他の心臓以外の原因と鑑別することができるマーカーの必要性から、出願人らは、ACSが疑われる胸痛を呈する患者の前向き試験において、トロポニン、NT-プロBNP及びBNP等の他のマーカーと組み合わせて、真性心虚血の早期同定を改善するBNPspの潜在性を決定しようとした。更に、出願人らは、これらの患者においてトロポニン、NT-プロBNP及びBNPと一緒にBNPspの予後的潜在性も評価した。

20

## 【0005】

本明細書に記載及び主張される本発明は、この「発明の概要」中に明記又は記載又は言及されているものを含むが、それらに限定されない多くの属性及び実施形態を有する。全てを含むことを意図するものではなく、本明細書に記載及び主張される本発明は、例示の目的のみで含まれ、制限のためではない、この「発明の概要」中に確認される特徴若しくは実施形態に限定されず、又はこれらにより限定されない。

## 【課題を解決するための手段】

30

## 【0006】

出願人らは、残基17～26により定義されるB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド断片(BNPsp(17～26))、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NTpro-BNP)、及び白血球数(WCC)が、不安定狭心症の診断における有用なバイオマーカーパネルであることを確認した。

## 【0007】

1つの態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程とを含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断される方法を提供する。

40

## 【0008】

別の態様において、本発明は、以前に不安定狭心症と診断された患者における心不全及び/又は脳卒中の合併症を予測する方法であって、(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

50

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、不安定狭心症の結果として患者が心不全及び/又は脳卒中の合併症を発症することが予測される方法を提供する。

【0009】

更なる態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断され、不安定狭心症の陽性診断の場合には、

(iii)患者における不安定狭心症を低減、消失、改善、又は治療するために介入療法を施行する工程と

を含む方法を提供する。

【0010】

更なる別の態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断するための、又は不安定狭心症の結果としての患者における心不全及び/若しくは脳卒中の合併症を予測するための検査キットであって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのに特異的な試薬と、

(ii)患者における不安定狭心症の診断をどのように行うか、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/若しくは心不全の合併症をどのように予測するかに関する説明書と

を含む検査キットを提供する。

【0011】

出願人はまた、残基17~26により定義されるB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド断片(BNPsp(17~26))、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、及び白血球数(WCC)が、不安定狭心症の診断における有用なバイオマーカーパネルであることも確認した。

【0012】

したがって、別の態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断される方法を提供する。

【0013】

別の態様において、本発明は、以前に不安定狭心症と診断された患者における心不全及び/又は脳卒中の合併症を予測する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して

10

20

30

40

50

比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、不安定狭心症の結果として患者が心不全及び/又は脳卒中の合併症を発症することが予測される方法を提供する。

【0014】

更なる態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断され、不安定狭心症の陽性診断の場合には、

(iii)患者における不安定狭心症を低減、消失、軽減、又は治療するために介入療法を施行する工程と

を含む方法を提供する。

【0015】

更なる別の態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断するための、又は不安定狭心症の結果としての患者における心不全及び/若しくは脳卒中の合併症を予測するための検査キットであって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのに特異的な試薬と、

(ii)患者における不安定狭心症の診断をどのように行うか、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/若しくは心不全の合併症をどのように予測するかに関する説明書と

を含む検査キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】遊離シグナルペプチド、NT-プロBNP及びBNPペプチドの生成をもたらす、ヒトブレプロBNPのプロセッシングを概説する模式図である。

【図2】ブレプロBNPシグナルペプチド配列のClustal Wバージョン1.83 JALVIEWマルチプル配列アライメントを示す図である。デフォルトClustal Wパラメータは、このアライメントで次のように使用された:DNAギャップオープンペナルティ=15.0;DNAギャップ伸長ペナルティ=6.66;DNAマトリックス=同一性;タンパク質ギャップオープンペナルティ=10.0;タンパク質ギャップ伸長ペナルティ=0.2;タンパク質マトリックス=Gonnet;タンパク質/DNA ENDGAP=-1;タンパク質/DNA GAPDIST=4。アミノ酸はFastaフォーマットで提示された。

【図3】胸痛を呈する患者505名における急性心筋梗塞(MI)を診断するための、受診時TnI、hsTnT、NT-プロBNP、及びBNPspの能力に関する受信者動作特性(ROC)曲線データを示す図である。BNPspは、曲線下面積(AUC)0.69を有した( $P < 0.001$ )。これは、どちらのトロポニンよりも約0.3ポイント少なく、MIを診断するどちらの能力に対しても増えなかった。

【図4】(A)病院受診時の非MI患者390名におけるUAP( $n=40$ )を同定するための、UARatio(AUC=0.70)及びNT-プロBNP(AUC=0.62)のROC曲線を示す図である。UARatio AUCは、NT-プロBNP AUCより有意に良好であった( $p < 0.05$ )。(B)ECGに異常がない非MI患者328名におけるUAP( $n=33$ )を診断するUARatio、NT-プロBNP及びBNPspの能力のROC曲線を示す図である。UARatio(0.77)のAUCは、NT-プロBNP(0.66)及びBNPsp(0.63)の両方より有意に良好であった( $p < 0.05$ )。

【発明を実施するための形態】

【0017】

10

20

30

40

50

## 選択された定義

別段の定義がない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似又は同等の任意のアッセイ、方法、装置、及び物質が本発明の実践又は検査に使用され得るが、様々なアッセイ、方法、装置、及び物質がこれより記載される。

### 【0018】

本明細書に開示された一連の数(例えば1から10)への言及は、この範囲内の全ての関連する数(例えば、1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9及び10)、及び同様にこの範囲内の有理数の任意の範囲(例えば2から8、1.5から5.5、及び3.1から4.7)への言及も包含し、したがって、本明細書に明示的に開示された全ての範囲の全ての部分範囲が明示的に開示されることが意図される。これらは、具体的に意図されたものの例に過ぎず、列挙された最低値と最高値の間の数値の全ての可能性のある組み合わせが、本出願において同じように明示的に述べられていると見なされるべきである。

10

### 【0019】

本明細書に使用される場合、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」という語、及び類似の語は、排他的又は網羅的な意味で解釈されるべきでない。換言すれば、これらは、「含むが、限定されない(including, but not limited to)」を意味することを意図される。

### 【0020】

本明細書に使用される場合、「BNPsp」という用語は、B型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチドを意味する。BNPspの例には、残基1~27により定義される完全長BNPsp分子、及びその断片が挙げられる。特定の例において、BNPspは、残基17~26(すなわちBNPsp(17~26;配列番号1))により定義されるBNPsp断片を意味する。

20

### 【0021】

本明細書に使用される場合、「BNP」という用語は、タンパク質分解酵素により処理されると、N末端pro-BNP(NT-プロBNP)及び切断された活性型のBNPホルモンを含むB型ナトリウム利尿ペプチドを意味する。本明細書の目的のために、図1に定義されているように「BNP」はBNP(103~134)を指し、「NT-プロBNP」はNT-プロBNP(27~102)を指す。

### 【0022】

本明細書に使用される場合、頭字語「STEMI」はST上昇心筋梗塞を意味する。

30

### 【0023】

本明細書に使用される場合、頭字語「NSTEMI」は非ST上昇心筋梗塞を意味する。

### 【0024】

本明細書に使用される場合、頭字語「UAP」は不安定狭心症を意味する。

### 【0025】

本明細書に使用される場合、頭字語「ACS」は急性冠症候群を意味する。

### 【0026】

本明細書に使用される場合、頭字語「hsTnT」は高感度トロポニンTアッセイを意味する。

### 【0027】

本明細書に使用される場合、頭字語「WCC」は白血球数を意味し、試料中の白血球のレベル/数に関する。

40

### 【0028】

本明細書に使用される場合、頭字語「ROC」は受信者動作特性曲線を意味する。

### 【0029】

本明細書に使用される場合、頭字語「AF」は心房細動を意味する。

### 【0030】

本明細書に使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基が共有ペプチド結合により連結される完全長配列を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。本発明において有用なポリペプチドは、精製された天然物であってもよく、又は組換え技術若し

50

くは合成技術を用いて部分的に若しくは完全に作製されてもよい。該用語は、ポリペプチド、二量体若しくは他の多量体等のポリペプチドの凝集体、融合ポリペプチド、ポリペプチド断片、ポリペプチドバリエーション、又はそれらの誘導体を指し得る。ポリペプチドは本明細書において、完全長EPOsp及び/又はCNPspの少なくとも4個のアミノ酸、少なくとも5個のアミノ酸、又は少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、又は全23個のアミノ酸の鎖長であってもよい。本発明の他のポリペプチド又は本明細書に記載された他のポリペプチドへの言及は、同様に理解されるべきである。

10

**【0031】**

本明細書に使用される場合、ポリペプチドとの関連で「断片」という用語は、結合剤を用いて検出することができるポリペプチドの部分配列である。該用語は、ポリペプチド、二量体若しくは多量体等のポリペプチドの凝集体、融合ポリペプチド、ポリペプチド断片、ポリペプチドバリエーション、又はそれらの誘導体を指し得る。

**【0032】**

「単離された」という用語は、本明細書に開示されたポリペプチド配列に適用される場合、天然の細胞環境又は他の天然に存在する生物学的環境から取り除かれる配列を指すのに使用される。単離された分子は、任意の方法、又は生化学的技術、組換え技術、及び合成技術を含む方法の組み合わせにより得ることができる。ポリペプチド配列は、少なくとも1つの精製工程により調製され得る。

20

**【0033】**

「精製された」という用語は本明細書に使用される場合、絶対的な純度を必要としない。精製されたとは、様々な実施形態において、例えば試料中のポリペプチドの、例えば少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%、又は99%均一性を指す。該用語は、本明細書に記載された他の分子及びコンストラクトとの関連で同様に理解されるべきである。

**【0034】**

本明細書に使用される場合、「バリエーション」という用語は、1から6個又はそれ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、又は付加された、具体的に同定された配列とは異なるポリペプチド配列を指す。1、2、3、4、5又は6個のアミノ酸の置換、付加、又は欠失が企図される。バリエーションは、天然に存在するアレルバリエーション、又は天然に存在しないバリエーションであってもよい。バリエーションは、同種又は他種由来であってもよく、ホモログ、パラログ、及びオルソログを包含し得る。特定の実施形態において、本発明において有用なポリペプチドのバリエーションは、親ポリペプチドと同じ又は類似のシグナルペプチド活性又は抗原結合特性を含む生物活性を有する。ポリペプチドに関して「バリエーション」という用語は、本明細書に定義されるポリペプチドの全ての形態を包含する。

30

**【0035】**

バリエーションポリペプチド配列は、本発明の配列と少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を示す。ポリペプチドに関して、同一性は、少なくとも5から7個のアミノ酸位置の比較ウィンドウで見出される。

40

**【0036】**

ポリペプチドバリエーションは、偶然によって生じたとは合理的に考えられないものを含む、具体的に同定された配列の1つ又は複数との、それらの配列の機能等価を保っている可能性がある類似性を示すものも包含する。上記に論じられているように、EPOsp及び/又は

50

CNPspの場合、バリエーション機能は、シグナルポリペプチド若しくは抗原ポリペプチドのいずれか、又はその両方としてであってもよい。

【0037】

ポリペプチド配列同一性及び類似性は、以下の方法で決定することができる。対象ポリペプチド配列は、NCBI(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)から公的に入手可能である、bl2seqのBLASTP(プログラムのBLASTスイート、バージョン2.2.18[2008年4月]から)を用いて候補ポリペプチド配列と比較される。低複雑度領域のフィルタリングがオフにされるべきであることを除いて、bl2seqのデフォルトパラメータが利用される。

【0038】

ポリペプチド配列の類似性は、以下のUNIX(登録商標)コマンドラインパラメータ、すなわちbl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastpを用いて調べることができる。パラメータ-F Fは、低複雑度セクションのフィルタリングをオフにする。パラメータ-pは、配列対に適切なアルゴリズムを選択する。このプログラムは、配列間の類似性の領域を見出し、そのような領域ごとに「E値」を報告する。E値は、ランダム配列を含有する固定参照サイズのデータベースにおいてそのようなマッチを偶然認めることを期待できる期待回数である。1よりはるかに少ない小E値に関して、これはほぼそのようなランダムマッチの確率である。バリエーションポリペプチド配列は、具体的に同定された配列のいずれか1つと比較した場合、 $1 \times 10^{-5}$ 未満、 $1 \times 10^{-6}$ 未満、 $1 \times 10^{-9}$ 未満、 $1 \times 10^{-12}$ 未満、 $1 \times 10^{-15}$ 未満、 $1 \times 10^{-18}$ 未満、又は $1 \times 10^{-21}$ 未満のE値を一般に示す。ポリペプチド配列同一性はまた、グローバル配列アライメントプログラムを用いて、候補ポリペプチド配列と対象ポリペプチド配列の重複の全長にわたって計算することもできる。上記に論じられているようにEMBOSS-needle(<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>で入手可能)及びGAP(Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227~235頁)も、ポリペプチド配列同一性を計算するのに適切なグローバル配列アライメントプログラムである。BLASTPの使用は、本発明によるポリペプチドバリエーションの決定における使用に好ましい。

【0039】

「結合剤」という用語は本明細書に使用される場合、AMHの種、その断片又は抗原バリエーションを結合することができる任意の固体又は非固体物質を指す。1つの実施形態において該用語は、AMHの種、その断片又は抗原バリエーションに結合する任意の天然又は非天然分子を指す。結合剤の例には、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、及び小分子化合物が挙げられる。1つの選択的又は特異的結合剤は、抗体又はその抗原結合断片である。

【0040】

「抗体」という用語は、例えばBNPsp等の抗原に特異的に結合する、典型的には、例えばBNPspのC末端又はN末端領域等の、BNPspのエピトープ又は抗原決定基に結合することができる免疫グロブリン分子を指す。本明細書に使用される場合、「抗体」という用語は、完全長抗体及びその抗原結合断片又は領域を広く含む。同様に含まれるのは、モノクローナル及びポリクローナル抗体、多価及び一価抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに親和性成熟された抗体である。抗体が、非BNPsp抗原/エピトープ又は他の非標的BNPsp種と、適切な場合、例えば25%未満、又は10%未満、又は1%未満、又は0.1%未満の交差反応性を有するBNPspの領域又はドメインに優先的に結合するならば、抗体はBNPspに選択的又は特異的に結合する。通常、抗体は、約 $10^{-6}$ 、又は $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、又は $10^{-9}$ M、又は $10^{-10}$ 、又は $10^{-11}$ 、又は $10^{-12}$ Mの抗原又はエピトープに対する結合親和性(解離定数(Kd)値)を有するであろう。結合親和性は、表面プラズマ共鳴、例えば、又はスキャッチャード分析を用いて評価することができる。

【0041】

本明細書に使用される場合、「抗原結合断片」又は「抗体断片」又は「結合断片」は、抗体に関して使用される場合、インタクトな抗体の正常な結合機能のほとんど若しくは全て、又は最小限少なくとも1つを好ましくは保持する、インタクトな抗体の一部を意味す

る。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片、直鎖状抗体、ダイアボディ、一本鎖抗体(ScFV)、ドメイン抗体、及び多特異性抗体が挙げられる。

【0042】

「エピトープ」という用語は、抗体及び/又はT細胞受容体に特異的結合をすることができる任意の抗原(例えば、タンパク質)決定基を含む。これは、B及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位である。エピトープ決定基は、アミノ酸又は糖側鎖等の化学的に活性な表面分子群から通常成り、特異的三次元構造特性、及び特異的電荷特性を通常有する。エピトープは、典型的には少なくとも3、5又は8~10個のアミノ酸を含む。アミノ酸は、連続アミノ酸、又は三次折り畳みにより並置された非連続アミノ酸であってもよい。立体構造及び非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。

10

【0043】

本明細書に使用される場合、「抗原バリエーション」という用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、又は付加された、具体的に同定された配列とは異なるポリペプチド配列を指す。1、2、3、4、5、6、10、15、20個又はそれ以上のアミノ酸の置換、付加、又は欠失が具体的に企図される。バリエーションは、天然に存在するアレル抗原バリエーション、又は天然に存在しない抗原バリエーションであってもよい。バリエーションは、同種又は他種由来であってもよく、ホモログ、パラログ、及びオルソログを包含し得る。特定の例において、本発明において有用なポリペプチドの抗原バリエーションは、親ポリペプチドと同じ又は類似のホルモン機能又は抗原結合特性を含む生物活性を有する。(ポリ)ペプチドに関して「抗原バリエーション」という用語は、本明細書に定義されるポリペプチドの全ての形態を包含する。「抗原バリエーション」という用語は、天然に存在する、組換え的及び合成的に作製されたポリペプチドを包含する。例えば、ヒトBNP及びBNPspの抗原バリエーションは、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ブタ等に由来するBNP及びBNPspの配列等のBNP及びBNPspのヒト以外の配列を含んでもよい。

20

【0044】

当技術分野で周知のコンピュータ/データベース方法に加えて、ポリペプチド抗原バリエーションは、当技術分野で周知の物理的方法により、例えば、本発明のポリペプチドに対して産生された抗体を用いて発現ライブラリーをスクリーニングすること(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版 Cold Spring Harbor Press、1987)(同様にSambrookらにより記載された組換えDNA技術により)、又はそのような抗体を用いて天然の供給源由来のポリペプチドを同定することにより、同定することができる。

30

【0045】

「単離された抗体」は、その天然の環境の成分から分離若しくは回収された、又はその両方の、同定された抗体である(例えば、酵素及びホルモンを含むタンパク質から分離された)。1つの例において、抗体は、抗体の少なくとも95質量%、又は96質量%、又は97質量%、又は98質量%、又は99質量%まで精製される。純度は、例えばローリー法により決定することができる。通常、抗体は、少なくとも1つの精製工程により調製されるであろう。

【0046】

本明細書に使用される場合、「モノクローナル抗体」は、単一の抗原標的を対象にする(又は結合する)高度に特異的な抗体である抗体を意味する。モノクローナル抗体は、同種又は実質的に同種の抗体の集団から得ることができ、各モノクローナル抗体は、少量で起こり得る天然の変異を除いて同一である、及び/又は同じエピトープを結合する。モノクローナル抗体は、例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York、及びHarlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY(本明細書において合わせて及び個々にHarlow及びLaneと呼ばれる)の方法等の、当技術分野で周知の方法を用いて調製される。

40

【0047】

本明細書に使用される場合、「ポリクローナル抗体」は、複数の抗原標的を対象にし得

50

る(又は結合し得る)抗体を意味する。ポリクローナル抗体は、(例えば、Harlow及びLane(同上)の方法等の)当技術分野で周知の方法を用いて調製される。

【0048】

「ELISA」という用語は本明細書に使用される場合、試料中の分析物の量を定量化するのに使用される抗体及び検出可能な標識を含む一種の競合的結合アッセイである、酵素結合免疫吸着アッセイを意味する。

【0049】

「捕捉抗体」という用語は本明細書に使用される場合、プレート、ビーズ、又はチューブ等の固体担体に典型的には固定化され、目的とする分析物、例えば胚性幹細胞集団に関連する膜結合マーカーに結合し、これを捕捉する抗体を意味する。

10

【0050】

「検出抗体」という用語は本明細書に使用される場合、目的とする分析物に結合する検出可能な標識を含む抗体を意味する。標識は、目的とする分析物、例えば胚性幹細胞集団に関連する膜結合マーカーの定量的、半定量的、又は定性的測定のための日常的検出手段を用いて検出することができる。

【0051】

本明細書に使用される場合、「アプタマー」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質等の標的分子への高親和性結合を促進する二次構造を有する一本鎖核酸分子を指す。特定の例において、一本鎖核酸は、バイオアベイラビリティを改善するためのssDNA、RNA、又はそれらの誘導体である。標的タンパク質へのアプタマー結合親和性は、以下に更に記載される。

20

【0052】

本明細書に使用される場合、分析物の文脈における「マーカー」又は「バイオマーカー」という用語は、疾患又は障害、例えば不安定狭心症に冒された特定の組織中又は組織上で同定されることが望ましい、循環に特異的に見出される、又は特定の組織(例えば心筋)に関連する、任意の抗原、分子、又は他の化学的若しくは生物学的実体を意味する。特定の例において、マーカーは、循環ペプチド(例えば)BNPsp(17~26)又はNT-プロBNPである。他の例において、マーカーは、特定の細胞タイプにより特異的又は優先的に発現される細胞表面抗原又は核抗原である。他の例においてマーカーは、特定の細胞タイプにより特異的又は優先的に発現される細胞内抗原である。

30

【0053】

「ROC」という用語は、受信者動作特性を意味し、ROCプロットは、判定閾値の全範囲に対して感度対1-特異度をプロットすることにより2つの分布間の重複を示す。

【0054】

本明細書に使用される場合、「有効量」という用語は、疾患又は状態及び1つ若しくは複数のその症状の進行、再発、又は発症の予防をもたらして、別の療法の予防効果を増強若しくは改善し、疾患の重症度、期間を低減し、疾患若しくは状態の1つ若しくは複数の症状を改善し、疾患若しくは状態の進行を予防し、疾患若しくは状態の退縮をもたらし、及び/又は別の療法の治療効果を増強若しくは改善するのに十分な療法の量を指す。

【0055】

本明細書に使用される場合、被験体への療法の施行の文脈における「管理する(manage)」、「管理すること(managing)」、及び「管理(management)」という用語は、疾患又は状態の治癒をもたらさないものの、被験体が療法(例えば、予防剤又は治療剤)又は療法の組み合わせから得る有益な効果を指す。特定の例において、被験体は、疾患又は状態の進行又は悪化を予防するために、疾患又は状態を「管理する」1つ又は複数の療法(例えば、1つ又は複数の予防剤又は治療剤)を施行される。

40

【0056】

本明細書に使用される場合、被験体への療法の施行の文脈における「予防する(prevent)」、「予防すること(preventing)」、及び「予防(prevention)」という用語は、療法(例えば、予防剤又は治療剤)、又は療法の組み合わせ(例えば、予防剤又は治療剤の組み合わ

50

せ)の施行によって生じる、被験体における疾患若しくは状態又はその症状の再発、発症、及び/又は進行の予防又は抑制を指す。

【0057】

本明細書に使用される場合、「予防剤」という用語は、不安定狭心症を治療する目的で使用される任意の分子、化合物、及び/又は物質を指す。予防剤の例には、タンパク質、免疫グロブリン(例えば、多特異性Ig、一本鎖Ig、Ig断片、ポリクローナル抗体及びその断片、モノクローナル抗体及びその断片)、抗体コンジュゲート又は抗体断片コンジュゲート、ペプチド(例えば、ペプチド受容体、セレクチン)、結合タンパク質、増殖ベースの療法、並びに小分子薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

本明細書に使用される場合、「治療剤」という用語は、不安定狭心症等の疾患又は障害を治療及び/又は管理する目的で使用される任意の分子、化合物、及び/又は物質を指す。治療剤の例には、タンパク質、免疫グロブリン(例えば、多特異性Ig、一本鎖Ig、Ig断片、ポリクローナル抗体及びその断片、モノクローナル抗体及びその断片)、ペプチド(例えば、ペプチド受容体、セレクチン)、結合タンパク質、生物製剤(biologies)、増殖ベースの療法剤、ホルモン剤、放射免疫療法、標的剤、エピジェネティック療法、分化療法、生物剤、及び小分子薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0059】

本明細書に使用される場合、「療法(therapies)」及び「療法(therapy)」という用語は、疾患若しくは状態又は1つ若しくは複数のその症状の予防、治療及び/又は管理において使用することができる任意の方法、組成物、及び/又は薬剤を指し得る。

【0060】

本明細書に使用される場合、被験体への療法の施行の文脈における「治療する(treat)」、「治療(treatment)」、及び「治療すること(treating)」という用語は、1つ若しくは複数の療法の施行によって生じる、(例えば)不安定狭心症の進行及び/若しくは期間の低減、抑制、消失、若しくは改善、(例えば)不安定狭心症の重症度の低減、抑制、消失、若しくは改善、並びに/又は1つ若しくは複数のその症状の改善を指す。

【0061】

「試料」又は「生体試料」という用語は本明細書に使用される場合、被験体若しくは患者から採取された又は被験体若しくは患者に由来する任意の試料を意味する。本明細書において、「被験体」及び「患者」という用語は互換的に使用される。そのような試料は、被験体から得ることができ、又は被験体に提供されることが意図される生体物質から得ることができる。例えば、試料は、例えば被験体における心臓の状態を調べるために、評価されている血液又は心臓組織から得ることができる。含まれるのは、正常な健康な被験体及び/又は心臓の状態を理解することが有用となる健康な被験体等の、任意の被験体から採取された又は任意の被験体に由来する試料である。好ましい試料は、生体液試料である。「生体液試料」という用語は本明細書に使用される場合、患者等の目的とする被験体を、例えば診断、予後、分類、又は評価する目的で得られた体液の試料を指す。試料は、ペプチド抗原が検出され得る当技術分野で周知の任意の試料であってもよい。含まれるのは、例えば、全血試料、血漿、血清、卵胞液試料、精液試料、脳脊髄液、唾液、痰、尿、胸水、間質液、滑液、リンパ液、涙液等の任意の体液である。とはいえ、全血試料、血漿、及び血清が本発明における使用に特に適している。更に、当業者は、分画又は精製手順、例えば、全血から血清又は血漿成分への分離後に、特定の体液試料がより容易に分析されることに気付くであろう。

【0062】

「精製された」という用語は本明細書に使用される場合、絶対的な純度を必要としない。精製されたとは、1つの例において、試料中の(例えば)ポリペプチド又は抗体の少なくとも90%、又は95%、又は98%、又は99%均一性を指す。

【0063】

「被験体」及び「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用される。これら

10

20

30

40

50

の用語は、好ましくは哺乳動物を指し、ヒト、並びにネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、シカ、マウス、ラット、霊長類(ゴリラ、アカゲザル、及びチンパンジーを含む)、ポッサム、及び他の家畜動物又は動物園動物等のヒト以外の哺乳動物を含む。故に、本明細書に記載されたアッセイ、方法、及びキットは、特にヒト及びヒト以外の動物の両方、並びに限定されることなく、ヒト、霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、シカ、アルパカ、ラマ、バッファローを含む家畜、ネコ、イヌ、及びウマを含む愛玩動物及び/又は純血種動物に適用される。好ましい被験体は、ヒト、最も好ましくは「患者」である。患者は本明細書に使用される場合、疾患又は状態のための医療又は評価を受ける可能性がある又は受けている生きているヒトを指す。更に、被験体は好ましくは生きている生物であるが、本明細書に記載された本発明は、死後分析にも使用することができる。

10

**【0064】**

本明細書に使用される場合、分析物の「存在又は量に関連する」という用語は、目的とする分析物の既知の濃度を用いて計算された標準曲線の使用により、アッセイシグナルが分析物の存在又は量に典型的には関連していることを反映する。該用語が本明細書に使用される場合、アッセイが、生理学的に適切な濃度の分析物の存在又は量を示す検出可能なシグナルを生成することができるならば、アッセイは分析物を「検出するように設定」されている。典型的には、分析物は試料において測定される。

**【0065】**

1つの実施形態において対照より「高い」若しくは「低い」レベル、又は対照(レベル)からの「変化」若しくは「偏向」は、統計的に有意である。レベルが、対照レベルと比較して約5%以上、約10%以上、約20%以上、又は約50%以上対照レベルと異なるならば、対照レベル又は平均対照若しくは歴史的対照レベルからの高いレベル、低いレベル、偏向、又は変化が存在すると見なすことができる。統計的有意は、或いは $P = 0.05$ として計算されてもよい。高いレベル、低いレベル、偏向、及び変化は、アッセイ基準限界値又は基準範囲を頼りに決定することもできる。これらは、直観的評価又はノンパラメトリック法から計算することができる。概して、これらの方法は、 $0.025$ 及び $0.975$ フラクティルを $0.025 * (n+1)$ 及び $0.975 * (n+1)$ として計算することができる。そのような方法は当技術分野で公知である。対照に欠如しているマーカーの存在は、高いレベル、偏向、又は変化として見られ得る。対照に存在するマーカーの欠如は、低いレベル、偏向、又は変化として見られ得る。

20

30

**【0066】**

詳細な説明

出願人らは、心筋梗塞(MI)及び不安定狭心症(UAP)を有する患者の同定を支援する、B型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)の能力を評価した。

**【0067】**

出願人らは、ACSが疑われる胸痛の発症の4時間以内に病院を受診した患者505名を試験した。血液試料は、受診から0、1、2及び24時間時点で採血し、BNPsp、NT-プロBNP、TnI、及び高感度TnTをアッセイした。急性心筋梗塞(MI)及び不安定狭心症(UAP)を診断し、1年以内のその後のイベントを予測するBNPsp及び他のマーカーの能力が、次いで評価された。

40

**【0068】**

出願人らは、驚くべきことに、BNPspがNT-proCNP及び白血球数と共に測定され、並びにデータが受信者動作曲線分析を用いてフィットされた場合、急性冠状動脈障害の症状により救急科を受診する患者において、不安定狭心症が診断され得ることを発見した。更に、患者におけるカリウム(K)のレベルがバイオマーカーパネルに追加された場合、診断の特異度が増強され得た。

**【0069】**

興味深いことに、心筋梗塞を鑑別するための受信者動作曲線下面積(AUC)データは、BNPspが $0.69$ 、トロポニンが $0.97$ であり、BNPspはトロポニンに対して増えなかった。しかし、重要なことには、固有のパラメータ(UARatio)にしたNT-プロBNP、白血球数、及びカリ

50

ウムの受診時値と組み合わせられた場合、非MI患者においてBNPspはUAPに対して鑑別力を有し( $p < 0.05$ )、正常なECG結果を有する患者においてUAPに関して0.76のAUCを生成した( $p < 0.001$ )。図3及び図4、並びに実施例2を参照のこと。

【0070】

したがって、1つの態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断される方法を提供する。

【0071】

診断に応じて、不安定狭心症を低減、消失、軽減、又は治療するために介入療法が患者に施行され得る。

【0072】

したがって、更なる態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断され、不安定狭心症の陽性診断の場合には、

(iii)患者における不安定狭心症を低減、消失、軽減、又は治療するために介入療法を施行する工程と

を含む方法を提供する。

【0073】

更に、非MI患者において、UARatioは1年以内のその後の脳卒中( $AUC=0.70$ 、 $p < 0.05$ )及び心不全( $AUC=0.82$ 、 $p < 0.01$ )を有意に予測した。実施例2を参照のこと。

【0074】

したがって、更なる態様において、本発明は、以前に不安定狭心症と診断された患者における心不全及び/又は脳卒中の合併症を予測する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、NT-プロBNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びNT-プロBNPのWCCに対する比から、不安定狭心症の結果として患者が心不全及び/又は脳卒中の合併症を発症することが予測される方法を提供する。

【0075】

特異度及び感度に応じて、診断は、試料中のカリウムのレベルを測定することにより増強され得る。そのため、本発明による特定の例において、方法は、患者から得られた生体試料中のカリウムのレベルを測定する工程を更に含む。

【0076】

本発明の他の例において、BNPsp断片は、完全長の/インタクトなタンパク質の残基17~

10

20

30

40

50

26により定義される断片である(示されたBNPsp(17~26))。

【0077】

他の例において、BNPsp(17~26)を含むBNPsp、及びNT-プロBNPのレベルは、イムノアッセイ又は質量分析により測定され得る。検出のための抗体ベース及びアプタマーベースのアプローチを用いたイムノアッセイによる測定に関して、更なる詳細が以下に示される。

【0078】

本発明はまた、例えば、患者から得られた生体試料中のBNPsp断片、NT-プロBNP、及び白血球のレベルの測定に特異的な市販のキット及び製品も企図する。そのため、本発明の更なる態様において、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのに特異的な試薬と、

(ii)患者における不安定狭心症の診断をどのように行うか、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/若しくは心不全の合併症をどのように予測するかに関する説明書と

を含むキット又は製品が提供される。

【0079】

出願人はまた、残基17~26により定義されるB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド断片(BNPsp(17~26))、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、及び白血球数(WCC)が、不安定狭心症の診断における有用なバイオマーカーパネルであることも確認した。

【0080】

したがって、別の態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断される方法を提供する。

【0081】

別の態様において、本発明は、以前に不安定狭心症と診断された患者における心不全及び/又は脳卒中の合併症を予測する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、不安定狭心症の結果として患者が心不全及び/又は脳卒中の合併症を発症することが予測される方法を提供する。

【0082】

更なる態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断する方法であって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定する工程と、

(ii)BNPsp断片、BNP、及びWCCのレベルを、対照被験体から得られた参照レベルに対して比較する工程と

を含み、対照被験体から得られた参照比から偏向した、BNPsp断片及びBNPのWCCに対する比から、患者が不安定狭心症を有することが診断され、不安定狭心症の陽性診断の場合に

は：

(iii)患者における不安定狭心症を低減、消失、軽減、又は治療するために介入療法を施行する工程とを含む方法を提供する。

【0083】

更なる別の態様において、本発明は、患者における不安定狭心症を診断するための、又は不安定狭心症の結果としての患者における心不全及び/若しくは脳卒中の合併症を予測するための検査キットであって、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのの特異的な試薬と、

(ii)患者における不安定狭心症の診断の行い方、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/若しくは心不全の合併症の予測のし方に関する説明書とを含む検査キットを提供する。

【0084】

抗体及び抗原結合断片

上記のように、抗体(antibody)又は抗体(antibodies)は本明細書に使用される場合、抗原又はエピトープを特異的に結合することができる免疫グロブリン遺伝子(an immunoglobulin gene)若しくは免疫グロブリン遺伝子(immunoglobulin genes)又はその断片に由来する、倣った、又は実質的にコードされたペプチド又はポリペプチドを指す[34-36]。本明細書の定義セクションに予示されているように、抗体という用語は、(i)Fab断片(VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片);(ii)F(ab')<sub>2</sub>断片(ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2つのFab断片を含む二価断片);(iii)VH及びCH1ドメインからなるFd断片;(iv)抗体の単腕のVL及びVHドメインからなるFv断片、(v)VHドメインからなるdAb断片[37];並びに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)を含む、例えば、抗原に結合する能力を保持する断片、部分配列、相補性決定領域(CDR)等の抗原結合断片を含む。一本鎖抗体も、「抗体」という用語に参照により含まれる。抗体及び断片の更なる考察は、参考文献(例えば)[38-44]に見出すことができ、それらの全てはその全体が本明細書に組み込まれる。

【0085】

同様に含まれるのは、例えば、BNPsp又はBNPsp断片等の抗原、及びその抗原バリエーションを有するマウス、ラット、又はウサギ等の動物を免疫して得られる抗血清である。要するに、ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に周知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤及び、必要に応じてアジュバントの1回又は複数回の注射により、哺乳動物において産生することができる。典型的には、免疫剤及び/又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射により哺乳動物において注射されるであろう。免疫剤は、BNPsp若しくはBNPsp断片、その抗原バリエーション、又はその融合タンパク質を含むことができる。免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に、免疫剤をコンジュゲートすることが有用となり得る。そのような免疫原性タンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシニアン、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、及び大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL TDMアジュバント(モノホスホリルリピッドA、合成トレハロースジコリノミコラート)が挙げられる。免疫プロトコルは、過度な実験なしに当業者により選択され得る。

【0086】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のハイブリドーマ法を用いて調製することができる[例えば45~47]。ハイブリドーマ細胞は、適切な培養培地で培養されてもよく、或いは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物において腹水としてインビボで増殖されてもよい。好ましい不死化細胞株は、例えば、アメリカ培養細胞系統保存機関、バージニア、USAから入手することができるマウス骨髄腫株である。イムノアッセイは、目的とする抗体を

10

20

30

40

50

分泌する不死化細胞株をスクリーニングするのに使用することができる。BNPsp若しくはBNPsp断片又はその抗原バリエーションの配列が、スクリーニングで使用され得る。

【0087】

ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を確立するための公知の手段には、免疫沈降、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、及びウエスタンブロットが挙げられる[48]。例えば、上記のように、モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スキッチャード分析により決定することができる[49]。免疫された動物由来の試料は、ポリクローナル抗体の存在について同様にスクリーニングすることができる。

【0088】

モノクローナル抗体は、組換え宿主細胞から得ることもできる。抗体をコードするDNAは、ハイブリドーマ細胞株から得ることができる。DNAは、次いで発現ベクターに入れられ、宿主細胞(例えば、COS細胞、CHO細胞、大腸菌(*E. coli*)細胞)にトランスフェクトされ、抗体が宿主細胞で産生される。抗体は、次いで標準的な手法を用いて単離及び/又は精製することができる。

【0089】

モノクローナル抗体又は断片は、組換えDNA手段により作製することもできる(例えば[50])。相同なマウス配列の代わりに、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列に置換する等のDNA修飾[50]も可能である。抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体を調製する方法は、当技術分野で公知である(例えば[51~53])。キメラ[54]、二価抗体[55]、及び多価抗体の作製も、本明細書において企図される[56]。

【0090】

ファージライブラリー由来等のモノクローナル抗体作製のための他の周知の技術手法も、使用することができる(例えば[57])。

【0091】

細胞により分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、逆相HPLC、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又は親和性クロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製手順により、培養培地又は腹水液から単離又は精製することができる[58]。

【0092】

二重特異性抗体も有用となり得る。これらの抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に結合特異性を有するモノクローナル、好ましくはヒト又はヒト化抗体である。2つを超える特異性を有する抗体、例えば三重特異性抗体も本明細書において企図される。

【0093】

本明細書に記載されたイムノアッセイにおいて使用される抗体は、BNPsp又はBNPsp断片に特異的に結合する。「特異的に結合する」という用語は、抗体が意図された標的だけに結合することを示すものではない。その理由は、上記のように、抗体は、抗体が結合するエピトープを提示するいずれのポリペプチドにも結合するためである。むしろ、適切なエピトープを提示しない非標的分子に対する抗体の親和性と比べた場合、抗体の意図された標的に対する親和性が約5倍大きければ、抗体は「特異的に結合する」。特定の例において、抗体の親和性は、非標的分子に対する親和性より、標的分子に対して少なくとも約5倍、好ましくは10倍、より好ましくは25倍、更により好ましくは50倍、最も好ましくは100倍以上大きいであろう。他の例において、抗体は、少なくとも約 $10^{-6}$ M、又は $10^{-7}$ M、又は少なくとも約 $10^{-8}$ M、又は $10^{-9}$ M、又は $10^{-10}$ 、又は $10^{-11}$ 又は $10^{-12}$ Mの親和性で結合する。

【0094】

親和性は、 $K_d = k_{off} / k_{on}$  ( $k_{off}$ は解離速度定数であり、 $k_{on}$ は結合速度定数であり、 $K_d$ は平衡定数である)として計算される。親和性は、様々な濃度( $c$ )の標識リガンドの結合の結合分画( $r$ )を測定して、平衡状態で決定することができる。データは、スキッチャード方程式: $r/c = K(n-r)$ :式中、 $r$ =平衡状態での結合リガンドのモル数/受容体のモル数; $c$ =平衡

10

20

30

40

50

状態での遊離リガンド濃度;K=平衡結合定数;及びn=受容体分子当たりのリガンド結合部位の数をを用いてグラフ化される。グラフ分析により、 $r/c$ はY軸に、対してrはX軸にプロットされ、それによりスキャッチャードプロットを作成する。スキャッチャード分析による抗体親和性測定は、当技術分野で公知である[59]。

#### 【0095】

多くの刊行物が、選択された分析物に結合するポリペプチドライブラリーを作製及びスクリーニングするためのファージディスプレイ技術の使用を論じている[60~63]。ファージディスプレイ法の基本的概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードするDNAと該ポリペプチドの間の物理的結合の確立である。この物理的結合は、ファージ粒子により提供される。ファージ粒子は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを取り囲むカプシドの一部としてポリペプチドを提示する。ポリペプチドとその遺伝子物質の間の物理的結合の確立により、異なるポリペプチドを有する非常に多くのファージの同時マスキリングが可能になる。標的に対する親和性を有するポリペプチドを提示するファージは標的に結合し、これらのファージは、標的に対する親和性スクリーニングにより濃縮される。これらのファージから提示されるポリペプチドの同一性は、ポリペプチドそれぞれのゲノムから決定することができる。これらの方法を用いて、所望の標的に結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、次いで従来手段により大量に合成することができる(例えば[64])。

#### 【0096】

これらの方法により生成される抗体は、次いで、目的とする精製ポリペプチドとの親和性及び特異性に関する第1のスクリーニング、並びに必要であれば、その結果を、結合から除外されることが望まれるポリペプチドとの抗体の親和性及び特異性と比較することにより、選択することができる。スクリーニング手順は、マイクロタイタープレートの別々のウェルへの精製ポリペプチドの固定化を含み得る。潜在的な抗体又は抗体群を含有する溶液は、次いでそれぞれのマイクロタイターウェルに入れられ、約30分から2時間インキュベートされる。マイクロタイターウェルは次いで洗浄され、標識された二次抗体(例えば、産生された抗体がマウス抗体であれば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗マウス抗体)がウェルに添加され、約30分間インキュベートされ、次いで洗浄される。基質がウェルに添加され、固定化されたポリペプチドに対する抗体が存在する場合、呈色反応が現れるであろう。

#### 【0097】

そうして同定された抗体は、次いで、選択されたアッセイデザインで親和性及び特異性について更に分析することができる。標的タンパク質のためのイムノアッセイの開発において、精製された標的タンパク質は、選択された抗体を用いてイムノアッセイの感度及び特異度を判断するための基準の役割を果たす。様々な抗体の結合親和性は異なり得、特定の抗体対(例えば、サンドイッチアッセイにおいて)は互いに立体的に干渉し得る等のため、抗体のアッセイ性能が抗体の絶対的親和性及び特異性より重要な尺度になり得る。

#### 【0098】

##### アプタマー

本発明はまた、例えば、BNP、BNPsp、及びそれらの断片を含む目的とする分析物に選択的に結合するアプタマーも企図する。

#### 【0099】

核酸アプタマーは、インビトロ選択、すなわちSELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)を複数回繰り返すことにより、小分子、タンパク質、核酸、並びに更には細胞、組織、及び生物等の様々な分子標的に結合するように操作された核酸種である。アプタマーは、抗体と同等の分子結合及び認識を提供する。その識別認識に加えて、アプタマーは、インビトロで完全に操作することができ、化学合成により容易に作製され、望ましい貯蔵特性を有し、治療的適用において免疫原性をほとんど又は全く誘発しないことから、抗体と比べて利点を提供する。

#### 【0100】

10

20

30

40

50

本発明の例によれば、アプタマーは単量体(1単位)である。本発明の別の例によれば、アプタマーは多量体アプタマーである。多量体アプタマーは、複数のアプタマー単位(mer s)を含み得る。アプタマーの複数の単位はそれぞれ同一であってもよい。そのような場合、多量体アプタマーは、単一の特異性を有するがアビディティが増強されたホモ多量体(多価アプタマー)である。

【0101】

或いは、多量体アプタマーは、少なくとも2merの多量体アプタマーが構造、核酸配列、又はその両方において非同一である、2つ以上のアプタマー単量体を含んでもよい。そのような多量体アプタマーは、本明細書においてヘテロ多量体と呼ばれる。ヘテロ多量体は、(立体障害を避けるために)単一の結合部位を対象にしてもよく、すなわち単一特異性であつてもよい。ヘテロ多量体は、複数の結合部位を対象にしてもよく、すなわち多特異性であつてもよい。ヘテロ多量体は、例えばBNP、BNPsp、及びそれらの断片を含む、異なる分析物の複数の結合部位を対象にしてもよい。多量体アプタマーの更なる説明は以下に提供される。

【0102】

複数の多量体アプタマーはコンジュゲートされて、多量体アプタマーのコンジュゲートを形成することができる。多量体アプタマーは、2(二量体)、3(三量体)、4(四量体)、5(五量体)、6(六量体)、及び更に多くの単位を含んでもよい。

【0103】

本発明のアプタマーは、当技術分野における任意の適切な方法により合成及びスクリーニングすることができる。

【0104】

例えば、アプタマーは、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)によりランダムアプタマーライブラリーからスクリーニング及び同定することができる。目的とする抗原に結合するアプタマーは、本明細書において細胞(cell)SELEX又は細胞(cellular)SELEXと呼ばれる改変された選択方法により適切にスクリーニング及び選択することができる[30~32]。他の例において、細胞表面標的分子(例えば、BNP又はBNPsp)に結合するアプタマーは、キャピラリー電気泳動によりスクリーニングことができ、アプタマー-標的分子複合体は非結合アプタマーと比較して、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動速度の遅延を示したという観察に基づきSELEXにより濃縮することができる。

【0105】

単量体、二量体、三量体、四量体、又は他のより高次の多量体アプタマーを含有するランダムアプタマーライブラリーが作成され得る。ランダムアプタマーライブラリー(ssDNA又はRNAのいずれか)は、個々のアプタマー単量体を連結して多量体アプタマー融合分子を形成するためのオリゴヌクレオチドリンカーを含むことにより改変されてもよい。他の例において、ランダムオリゴヌクレオチドライブラリーは、選択されたアプタマーの増幅に使用される、ランダム配列の上流及び下流(すなわち、5'腕及び3'腕として知られる)の両方の定義された20nt配列に両側が隣接されたランダム化45nt配列を用いて合成される。連結オリゴヌクレオチド(すなわち、リンカー)は、ランダムアプタマーの5'腕及び3'腕領域の両方に相補的な配列を含有して、二量体アプタマーを形成するように設計される。三量体又は四量体アプタマーには、小さい三量体又は四量体(すなわち、ホリデイジャンクシオン様)DNAナノ構造がランダムアプタマーの3'腕領域に相補的な配列を含むように操作され、したがってハイブリダイゼーションにより多量体アプタマー融合をもたらす。更に、3~5又は5~10dTリッチヌクレオチドが、アプタマー-結合モチーフ間の一本鎖領域としてリンカーポリヌクレオチドの中に操作されてもよい。該一本鎖領域は、細胞リガンド又は受容体との多価相互作用を調整し、シナジーを与えるための複数のアプタマーの柔軟性及び自由を提供する。或いは、多量体アプタマーは、するビオチン化アプタマーをストレプトアビジンと混合して形成することもできる。

【0106】

改変された細胞SELEX手順が、標的結合アプタマーを選択するために使用されてもよい。多量体アプタマーは、多価であるが単一結合特異性であってもよい(すなわち、ホモ多量体アプタマー)。或いは、多量体アプタマーは、多価及び多特異性であってもよい(すなわち、ヘテロ多量体アプタマー)。

【0107】

故に、ホモ多量体アプタマーの各単量体は、標的タンパク質(例えば、BNP、BNPsp、又はそれらの断片)を同一の様式で結合する。故に、本発明の例によれば、ホモ多量体アプタマーの全ての単量体成分は同一である。

【0108】

反対に、ヘテロ多量体アプタマーは、単量体アプタマーの少なくとも2つが単一の標的タンパク質の異なる部位を結合する、又は少なくとも2つの異なる標的タンパク質を結合する、複数の単量体アプタマーを含む。

【0109】

RNAアプタマーの選択は、科学文献(例えば[33])に記載されたプロトコルを用いて十分に確立されている。

【0110】

特定の例において、アプタマーの適切なヌクレオチド長は、約15から約100ヌクレオチド(nt)にわたり、様々な他の例において、12~30、14~30、15~30nt、30~100nt、30~60nt、25~70nt、25~60nt、40~60nt、又は40~70nt長にわたる。

【0111】

他の例において、アプタマーは10~100nMの範囲の親和性を有する。これは、腫瘍細胞表面分子へのアプタマーの結合後、標的分子(例えば、BNP又はBNPsp)からのアプタマーの解離を可能にし、他の腫瘍細胞を標的にするアプタマー核酸ナノ構造の放出及び再利用をもたらす。個々のアプタマーの親和性は、共有結合又は非共有結合により共に連結された多量体アプタマーを構築することにより、4~50倍増加され得る。アプタマーを多量体化する方法は、以下に更に記載される。

【0112】

故に、特定の例において、目的とする分析物(例えばBNP又はBNPsp)に対するアプタマーの望ましい親和性は、単量体アプタマーの多重度を調整して微調整することができる。

【0113】

多量体化は、次のようにライブラリーレベルで行うことができる。

【0114】

特定の例において、リンカーポリヌクレオチドは、約5ヌクレオチド(nt)から約100ntの間の長さ、すなわち、様々な例において、10~30nt、20~30nt、25~35nt、30~50nt、40~50nt、50~60nt、55~65nt、50~80nt、又は80~100ntを有する。リンカーポリヌクレオチドの長さを調整して多量体構造における各単量体アプタマーを適応させることは、当業者の能力の範囲内である。

【0115】

特定の例において、多量体アプタマーは、本明細書に記載されたランダム多量体アプタマーライブラリーから同定及びスクリーニングすることができる。他の例において、単量体アプタマーは、1つ又は複数のリンカーポリヌクレオチドにより互いに連結されて多量体アプタマーを形成する。単量体アプタマーは、任意の適切な手段により、及び任意の立体配置で多量体アプタマーを形成するように連結することができる。

【0116】

本発明の単量体構造は、SELEX後手順により更に多量体化され得ることが理解されるであろう。

【0117】

多量体は、スペーサーなしで又は核酸スペーサーを用いてDNAの連続的直鎖状合成により、直鎖状に連結することができる。アプタマー合成は、通常、標準的な固相ホスホロアミダイト化学に依存する。

10

20

30

40

50

## 【0118】

故に、二量体、三量体、及び四量体、又はより高次のオリゴマー構造(例えば、五量体、六量体、七量体、八量体等)は、ポリマースペーサーにより連結することができる。そのようなポリマー構造を生成する方法は、(例えば)[65]に提供されている。

## 【0119】

特定の例において、アプタマーは、ヌクレアーゼ及び他の酵素活性からアプタマーを保護するために更に改変される。アプタマー配列は、当技術分野で周知の任意の適切な方法により改変することができる。例えば、DNAアプタマーに関して、ホスホロチオエートが骨格に組み込まれてもよく、5'改変ピリミジンがssDNAの5'末端に含まれてもよい。RNAアプタマーには、リボース骨格の2'-OH基の、例えば、2'-デオキシ-NTP又は2'-フルオロ-NTPとの置換等の改変ヌクレオチドが、T7 RNAポリメラーゼ変異体を用いてRNA分子に組み込まれてもよい。ヌクレアーゼに対するこれらの改変アプタマーの耐性は、精製ヌクレアーゼ又はマウス血清由来のヌクレアーゼのいずれかと該アプタマーをインキュベートして検査することができ、アプタマーの完全性はゲル電気泳動により分析することができる。

10

## 【0120】

本発明の単量体又は多量体アプタマーは、検出可能な部分又は治療的部分(すなわち、薬剤部分)に更に付加又はコンジュゲートすることができる。

## 【0121】

故に、上記のように、診断的又は治療的部分は、本明細書に具現化されたアプタマーに付加されて、状態又は疾患を診断、予防、又は治療するため等の追加の生物活性を提供することができる。1つの例において検出可能な部分、例えば、標識(例えば、Hisタグ、フラッグタグ)、蛍光、放射性、ビオチン/アビジン等の診断的部分がアプタマーに結合されてもよく、撮像、免疫組織化学、又は他の侵襲的若しくは非侵襲的方法が、体内の位置へのコンジュゲートの結合位置及び程度を同定するのに使用されてもよい。治療的使用のために、化学療法剤等の細胞毒性剤、放射性部分、毒素、抗体、核酸サイレンシング剤、例えば、低分子干渉RNA(siRNA)、又はアプタマーが標的にする分子を発現する細胞に送達されるときに治療的活性を有する他の分子が、アプタマーの治療的活性を増強する、又はアプタマーが標的活性を提供している生物活性を提供するのに使用されてもよい。更に、スクフォールド、糖、タンパク質、抗体、ポリマー、及びナノ粒子等の(ただしこれらに限定されない)、本明細書に記載されたアプタマーとの他のコンジュゲートが企図される。これらの各々は、当技術分野で認識された治療的又は診断的有用性を有し、本明細書に具現化されたアプタマーを用いて、インビボで特定の部位を標的にすることができる。

20

30

## 【0122】

## 結合剤の検出

本開示は、BNP、BNPsp、及びそれらの断片を含むがこれらに限定されない、目的とする分析物の結合剤への結合、並びに次いで結合剤の量の検出を含む検出系の使用を含む。類似の解法は、試料中の非結合結合剤の量を検出して、目的とする非結合又は結合ペプチド又はタンパク質の指標を得ることである。そのような代替方法は、結合された結合剤の量を直接検出することの機能的代替物として本開示の範囲内にあることが意図される。当業者は、試料中のBNP、BNPsp、及びそれらの断片の濃度は、試料容量が既知である場合、試料中のBNP、BNPsp、及びそれらの断片の量から容易に計算できることを理解するであろう。

40

## 【0123】

本開示による抗体は、試料中のBNP、BNPsp、及びそれらの断片の存在及び/又は量を決定するためのイムノアッセイにおいて特に有用である。種々の抗体の可変的な結合親和性のために、試料中のタンパク質の量と対比した測定値の標準結合曲線は、試料中のタンパク質の量の決定を可能にする特定の抗体について確立されるべきであることを当業者は理解するであろう。そのような曲線は、次いで試料中のタンパク質の真の量を決定するのに使用される。換言すれば、基準範囲は、抗体を含む使用される結合剤ごとに決定される必要がある。

50

## 【0124】

試料物質には生体液が挙げられるが、これに限定されない。本開示に関して、生体液は典型的には血液である。1つの例において、試料はインビトロで検査される。

## 【0125】

BNP、BNPsp、及びそれらの断片に特異的なイムノアッセイは、BNP、BNPsp、及びそれらの断片に特異的に結合する抗体の作製を必要とする。抗体は、以下の競合的結合アッセイにおけるように広範な特異度を有するイムノアッセイを構築するのに使用されてもよく、又は目的とする3種類のペプチドのそれぞれ、若しくは他のペプチドに特異的なアッセイを作製するのにサンドイッチ型アッセイにおいて、以下に記載される他の抗体と共に使用されてもよい。当業者は、非競合的アッセイもまた可能であることを理解するであろう。以下を参照のこと。

10

## 【0126】

本開示の方法は、本明細書に提供されたキットを用いて行うことができる。生体試料中のBNP、BNPsp、及びそれらの断片のレベルを測定するキットが提供される。キットは、BNP、BNPsp、及びそれらの断片に選択的に結合し、BNP、BNPsp、及びそれらの断片に結合すると定量的に測定することができる結合剤を含む。結合剤は、上記に記載された通りである。

## 【0127】

別の例において、指示薬も使用され得る。指示薬は、ELISA及びRIA法で使用され得る。

## 【0128】

ポリクローナル及びモノクローナル抗体は、競合的結合又はサンドイッチ又はディップスティック型アッセイで使用することができる。この方法の1つの例において、液体試料が抗体と接触され、標識BNP、BNPsp、及び断片、又は抗体に認識されるエピトープを含有する改変ペプチドと同時に又は連続的に接触される。

20

## 【0129】

標識は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 等の放射性成分、又は時間分解蛍光、蛍光、蛍光偏光、発光、化学発光、若しくは比色法により測定され得る非放射性成分であってもよい。これらの化合物には、放射能計数、発光又は蛍光の光出力、光吸収等の測定により直接測定することができる、ユーロピウム若しくは他のアクチニド元素、アクリジニウムエステル、フルオレセイン、又は上記のもの等の放射性物質が挙げられる。標識はまた、ビオチン、ジゴキシン、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素等の、間接的に測定され得る任意の成分であってもよい。これらの標識は、数多くの方法で間接的に測定することができる。西洋ワサビペルオキシダーゼは例えば、吸収が測定され得る着色産物を生成するo-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)及び過酸化物等の基質、又はルミノメーターで測定することができる化学発光光をもたらすルミノール及び過酸化物とインキュベートされてもよい。ビオチン又はジゴキシンは、これらに強く結合する結合剤と反応することができる。例えばアビジンは、ビオチンに強く結合するであろう。これらの結合剤が今度は、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の測定可能な標識、又は上記のような他の直接若しくは間接的に測定される標識に共有結合又は連結され得る。これらの標識及び上記のものは、合成中、標識との直接反応により、又はMCS及びカルボジイミド等の一般に

30

40

## 【0130】

抗体との接触後(通常は4で18~25時間、又は30で1~240分)、結合剤(例えば、抗体)に結合された標識ペプチドが、非結合標識ペプチドから分離される。溶液相アッセイにおいて、分離は、セルロース又は磁性物質等の固相粒子に結合された抗ガンマグロブリン抗体(二次抗体)の添加により達成され得る。二次抗体は、一次抗体に使用されるものと異なる種において産生され、一次抗体を結合する。全ての一次抗体は、したがって二次抗体を介して固相に結合される。この複合体は、遠心分離又は磁力により溶液から除去され、結合標識ペプチドがこれに結合した標識を用いて測定される。遊離標識から結合し

50

たものを分離するための他の選択肢には、溶液から沈殿する免疫複合体の形成、ポリエチレングルコールによる抗体の沈殿、又は遊離標識ペプチドの炭への結合及び濾過の遠心分離による溶液からの除去が挙げられる。分離された結合相又は遊離相中の標識は、上記に示されたもの等の適切な方法により測定される。

#### 【0131】

行うのがより容易であり、したがって上記のものより好ましい固相アッセイとして、競合的結合アッセイも設定され得る。このタイプのアッセイは、ウェルを有するプレート(一般にELISAプレート又はイムノアッセイプレートとして知られる)、固体ビーズ、又はチューブの表面を使用する。一次抗体は、プレート、ビーズ、又はチューブの表面に吸着若しくは共有結合される、又はプレートに吸着若しくは共有結合された二次抗ガンマグロブリン若しくは抗Fc領域抗体を通じて間接的に結合されるかのいずれかである。試料及び標識ペプチド(上記のような)は、一緒に又は連続的にプレートに添加され、試料中のBNP、BNPsp、及びそれらの断片と標識ペプチドの間の結合抗体をめぐる競合を可能にする条件下でインキュベートされる。非結合標識ペプチドはその後吸引され得、プレートは、抗体結合標識ペプチドがプレートに付着した状態のまますがれ得る。標識ペプチドは、次いで上記に記載された手法を用いて測定され得る。

10

#### 【0132】

サンドイッチ型アッセイは、特異度、スピード、及びより大きな測定範囲の理由でより好ましい。このタイプのアッセイにおいてBNP、BNPsp、及びそれらの断片に対する過剰な一次抗体は、固相競合結合アッセイについて上記に記載されているように、吸着、共有結合、又は抗Fc若しくはガンマグロブリン抗体を介してELISAプレートのウェル、ビーズ、又はチューブに付着される。試料流体又は抽出物は、固相に付着された抗体と接触される。抗体は過剰であるため、この結合反応は通常、急速である。BNP、BNPsp、及びそれらの断片に対する二次抗体も、一次抗体と共に同時に又は連続的に試料とインキュベートされる。この二次抗体は、一次抗体の結合部位とは異なるBNP、BNPsp、及びそれらの断片上の部位に結合するように選択される。これらの2種類の抗体反応は、2種類の抗体の間に挟まれた試料由来のBNP、BNPsp、及びそれらの断片のサンドイッチをもたらす。二次抗体は通常、競合的結合アッセイに関して上記に詳述されている容易に測定可能な化合物で標識される。或いは、二次抗体に特異的に結合する標識された三次抗体が試料と接触されてもよい。非結合物質の洗浄後、結合標識抗体は、競合的結合アッセイに関して概説された方法により測定することができる。非結合標識抗体を洗い流した後、結合標識は、競合的結合アッセイに関して概説されているように定量することができる。

20

30

#### 【0133】

##### イムノアッセイ

一般に、イムノアッセイは、目的とするペプチドバイオマーカ含有する又は含有することが疑われる試料を、バイオマーカに特異的に結合する少なくとも1つの抗体と接触させる工程を含む。試料中のペプチドの抗体への結合により形成された複合体の存在又は量を示すシグナルが、次いで生成される。シグナルは、次いで試料中のペプチドバイオマーカの存在又は量と関連付けられる(定量的、半定量的、又は定性的に)。ペプチドバイオマーカを検出及び分析するための多くの方法及び装置が、当業者に公知である(例えば[66-79])。

40

#### 【0134】

本発明によるアッセイ装置及び方法は、様々なサンドイッチ、競合的又は非競合的アッセイフォーマットにおいて標識分子を利用して、例えば、試料中のBNP又はBNPsp、又はそれらの断片の存在又は量に関連するシグナルを生成することができる。本発明に使用される適切なアッセイフォーマットには、特に、酵素結合免疫アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、競合的結合アッセイ等が挙げられる。同様に企図されるのは、クロマトグラフィー法、質量分析法、及びタンパク質「プロットイング」法である。更に、バイオセンサー及び光学イムノアッセイ等の特定の方法及び装置が、標識分子の必要なく分析物の存在又は量を決定するのに使用され得る[80、81]。当業者はまた、本発明の一例として、

50

Beckman ACCESS(登録商標)(商標)、Abbott AXSYM(登録商標)(商標)、Roche ELECSYS(登録商標)(商標)、Dade Behring STRATUS(登録商標)(商標)システムを含むがこれらに限定されないロボット計測が、本明細書に記載されたイムノアッセイを行うことができるイムノアッセイ分析器の1つであることも認識する。

【0135】

抗体又は他のポリペプチドは、本発明のアッセイ及び方法において使用するために様々な固体担体に固定化することができる。特異的な結合剤を固定化するのに使用され得る固体担体又は固相には、固相結合アッセイにおける固相として開発及び/又は使用されるものが挙げられる。適切な固相の例には、メンブランフィルター、セルロースベースの紙、ビーズ(ポリマー粒子、ラテックス粒子、及び常磁性粒子を含む)、ガラス、シリコンウエハー、微粒子、ナノ粒子、TentaGel、AgroGel、PEGAゲル、SPOCCゲル、及びマルチプルウェルプレートが挙げられる。アッセイストリップは、抗体又は複数の抗体を固体担体に一列にコーティングして調製され得る。このストリップは、次いで検査試料に浸漬され得、次いで着色スポット等の測定可能なシグナルを生成するために洗浄及び検出工程を通じて素早く処理され得る。抗体又は他のポリペプチドは、例えばアッセイ装置表面への直接コンジュゲート、又は間接的結合のいずれかにより、アッセイ装置の特定のゾーンに結合されてもよい。後者の場合の例において、抗体又は他のポリペプチドは、粒子又は他の固体担体に固定化され、この固体担体が装置表面に固定化されてもよい。

10

【0136】

生物学的アッセイは検出のための方法を必要とし、結果を定量化する最も一般的な方法の1つは、生物系又は試験されている試料中の成分の1つに親和性を有するタンパク質に、検出可能な標識をコンジュゲートすることである。本発明のアッセイ及び方法において、検出可能な標識は、抗体等の結合剤に典型的にはコンジュゲートされる。複合体を形成するBNPsp又はその断片の抗体への結合は、直接又は間接的に検出することができる。検出可能な標識には、それ自体検出可能な分子(例えば、蛍光部分、電気化学標識、金属キレート等)、及び検出可能な反応産物(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素)の産生により、又はそれ自体検出可能な特異的結合分子(例えば、ピオチン、ジゴキシゲニン、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジニトロベンゼン、フェニルアルセネート、ssDNA、dsDNA等)により、間接的に検出され得る分子が挙げられ得る。

20

30

【0137】

例証として、西洋ワサビペルオキシダーゼは例えば、吸収が測定され得る着色産物を生成するo-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD)及び過酸化物等の基質、又は当技術分野で周知のように、ルミノメーターで測定することができる化学発光光をもたらずルミノール及び過酸化物とインキュベートされてもよい。ピオチン又はジゴキシゲンは、これらに強く結合する結合剤と反応することができる。例えば、タンパク質アビジン及びストレプトアビジンは、ピオチンに強く結合するであろう。更なる測定可能な標識が、次いで、該タンパク質との直接反応、又はカルボジイミド等の一般に入手可能な架橋剤の使用、若しくはキレート剤の添加のいずれかにより、該タンパク質に共有結合又は連結される。

【0138】

特に、例えばBNP、BNPsp、及びそれらの断片を同時測定するための本発明による二重アッセイフォーマットにおいて、検出には、蛍光標識間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)も挙げられる。

40

【0139】

そのため、本発明はまた、当業者に周知となるように(例えば[82])、多部位アッセイフォーマットを用いる例えばBNPsp(17~26)の検出及び測定等の、BNP及びBNPspの異なる種の分析も企図する。

【0140】

標識からのシグナルの生成は、当技術分野で公知の様々な光学的、音響的、及び電気化学的方法を用いて行うことができる。本明細書に記載される場合、検出モードの例には、

50

蛍光、放射化学検出、反射率、吸光度、電流測定、コンダクタンス、インピーダンス、インターフェロメトリー、偏光解析等が挙げられる。このリストは、限定を意味するものではない。任意選択で標識分子の必要性をなくす抗体ベースのバイオセンサーも、分析物の存在又は量を決定するのに使用することができる。

【0141】

イムノアッセイ分析器も周知であり、該分析器には、とりわけ十分に記載されているBeckman Access、Abbott AxSym、Roche ElecSys、及びDade Behring Statusシステムが挙げられる。

【0142】

固相及び検出可能な標識コンジュゲートの調製は、化学的架橋剤の使用をしばしば含む。架橋試薬は少なくとも2つの反応基を含有し、(同一反応基を含有する)ホモ官能性架橋剤及び(非同一反応基を含有する)ヘテロ官能性架橋剤に一般的に分けられる。アミン、スルフィドリルを通じて結合し、又は非特異的に反応するホモ二官能性架橋剤は、多くの商業的供給源から入手可能である。マレイミド、ハロゲン化アルキル及びアリアル、アルファ-ハロアシル、並びにピリジルジスルフィドは、チオール反応基である。マレイミド、ハロゲン化アルキル及びアリアル、並びにアルファ-ハロアシルは、スルフィドリルと反応してチオールエーテル結合を形成するが、ピリジルジスルフィドは、スルフィドリルと反応して混合ジスルフィドを産生する。ピリジルジスルフィド産物は切断可能である。イミドエステルも、タンパク質-タンパク質架橋に非常に有用である。コンジュゲーションの成功のために、それぞれ異なる属性を組み合わせる様々なヘテロ二官能性架橋剤が市販されている。

【0143】

サンドイッチ型アッセイ(競合的結合アッセイのタイプ)は、より優れた特異度、スピード、及びより大きな測定範囲を有する。このタイプのアッセイにおいてBNP、BNPsp、及びそれらの断片に対する過剰な一次抗体は、固相競合結合アッセイについて上記に記載されているように、吸着、共有結合、又は二次抗体を介してELISA プレートのウェル、ビーズ、又はチューブに付着される。試料流体又は抽出物は、固相に付着された抗体と接触される。抗体は過剰であるため、この結合反応は通常、急速である。BNP又はBNPspに対する検出抗体も、一次抗体と共に同時に又は連続的に試料とインキュベートされる。検出抗体は、一次抗体の結合部位とは異なるBNP又はBNPsp上の部位に結合するように選択される。これらの2種類の抗体反応は、2種類の抗体の間に挟まれた試料由来のBNP又はBNPsp又は断片のサンドイッチをもたらす。検出抗体は通常、上記に詳述されている容易に測定可能な化合物で標識される。或いは、検出抗体に特異的に結合する標識された三次抗体が試料と接触されてもよい。非結合物質を洗い流した後、結合標識抗体は、競合的結合アッセイに関して概説された方法により測定及び定量することができる。

【0144】

本発明の特定の例において、競合型のイムノアッセイを含み得る様々なタイプのイムノアッセイが使用される。競合的イムノアッセイの例には、酵素イムノアッセイ若しくは酵素結合免疫吸着アッセイ(EIA又はELISA)、蛍光イムノアッセイ、放射測定若しくは放射免疫アッセイ(RIA)、磁気分離アッセイ(MSA)、側方流動アッセイ、拡散イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、固体担体に結合された分析物を用いる免疫吸着若しくは「抗原ダウン」アッセイ、又は凝集アッセイが挙げられる。1つのそのようなアッセイにおいて、試料は未知の量の測定される分析物を含有し、分析物はBNPsp又はBNPsp断片等のタンパク質であってもよい。分析物は抗原とも呼ばれ得る。試料は、既知量又は固定量の標識分析物でスパイクすることができる。スパイクされた試料は、次いで、試料中の分析物及び試料に添加された標識分析物が利用可能な抗体結合部位への結合をめぐって競合するように、BNP又はBNPsp又はそれらの断片等の分析物に結合する抗体とインキュベートされる。多かれ少なかれ標識分析物は、試料中に存在する非標識分析物の相対濃度に応じて抗体結合部位に結合することができるであろう。したがって、抗体に結合された標識分析物の量が測定される場合、これは試料中の非標識分析物の量に反比例する。原試料中の分析物の量は、

次いで、当技術分野で周知の標準的な手法を用いて、測定された標識分析物の量に基づき計算することができる。

【0145】

別のタイプの競合的イムノアッセイにおいて、BNP又はBNPsp又はそれらの断片等の分析物に結合する抗体は、リガンドと結合又はコンジュゲートされてもよく、リガンドは試料に添加された追加の抗体に結合する。そのようなリガンドの1つの例には、フルオレセインが挙げられる。追加の抗体は、固体担体に結合されてもよい。追加の抗体は、抗体と結合されたリガンドに結合し、リガンドが、今度は分析物又は或いは標識分析物に結合し、標識分析物と結合された標識により生成されるシグナルの単離及び測定を可能にする大量の複合体を形成する。

10

【0146】

別のタイプの競合的イムノアッセイにおいて、測定される分析物は固体担体に結合され、分析物に結合する抗体及び測定される分析物を含む試料の両方とインキュベートされてもよい。抗体は、試料中の分析物の濃度に応じた相対的比率で、固体担体に結合された分析物、又は試料中の分析物のいずれかに結合する。固体担体に結合された分析物に結合する抗体は、次いで、標識と結合された抗マウスIgG等の別の抗体に結合される。標識から生成されるシグナルの量が、次いで、固体担体に結合された分析物に結合された抗体の量を測定するために検出される。そのような測定値は、試料中に存在する分析物の量に反比例するであろう。そのようなアッセイは、マイクロタイタープレートフォーマットにおいて使用することができる。

20

【0147】

本明細書に開示された本発明の例は、免疫測定「2部位」又は「サンドイッチ」イムノアッセイと呼ばれるイムノアッセイを行うのに使用することができる。分析物は、BNP又はBNPsp又はそれらの断片等の分析物上の異なるエピトープに結合する2つの抗体に結合されてもよく、又は2つの抗体の間に挟まれてもよい。そのようなイムノアッセイの代表的な例には、酵素イムノアッセイ又は酵素結合免疫吸着アッセイ(EIA又はELISA)、免疫放射線アッセイ(IRMA)、蛍光イムノアッセイ、側方流動アッセイ、拡散イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、及び磁気分離アッセイ(MSA)が挙げられる。1つのそのようなアッセイにおいて、「捕捉」抗体として記載され得る一次抗体は、例が上記に列挙されている固体担体に結合され得る。捕捉抗体は、当技術分野で周知の手順を用いて固体担体に結合又はコーティングすることができる。或いは、捕捉抗体は、固体担体に結合又はコーティングされた追加の抗体に認識されるリガンドと結合することができる。リガンドを介した追加の抗体への捕捉抗体の結合は、次いで捕捉抗体を固体担体に間接的に固定化する。そのようなリガンドの例はフルオレセインである。「検出」抗体として記載され得る二次抗体は、化学発光剤、熱量測定剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤、又は放射性同位体を含み得る標識と結合され得る。検出抗体は、当技術分野で周知の手順を用いて標識と結合又はコンジュゲートすることができる。標識は、二次抗体と結合されたビオチン等の第1のタンパク、及び酵素に結合されたストレプトアビジン等の第2のタンパク質を含んでもよい。第2のタンパク質は、第1のタンパク質に結合する。酵素は、基質が提供される場合、測定されたシグナルの量が分析物に結合された二次抗体の量に対応するように、検出可能なシグナルを生成する。西洋ワサビペルオキシダーゼは、そのような酵素の例であり、可能性のある基質には、TMB(3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、OPD(o-フェニレンジアミン)、及びABTS(2,2'-アジノ-bis(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)が挙げられる。

30

40

【0148】

サンドイッチイムノアッセイ又はサンドイッチELISAは、本発明における使用に特に適している。

【0149】

ディップスティック型アッセイもまた使用することができる。これらのアッセイは、当技術分野で公知である。これらは、例えば、特異的抗体を付着された金又は着色ラテックス粒子等の小粒子を使用してもよい。測定される液体試料は、粒子をプレロードされた膜

50

又は紙ストリップの一端に添加し、ストリップに沿って移動させることができる。粒子への試料中の抗原(BNP、BNPsp、又はそれらの断片等の)の結合は、更にストリップに沿って、抗原又は抗体等の粒子に対する結合剤を含有する捕捉部位に結合する粒子の能力を改変する。これらの部位における着色粒子の蓄積は、試料中の競合抗原の濃度に依存する発色現象をもたらす。他のディップスティック法は、紙又は膜ストリップに共有結合された抗体を使用して試料中の抗原を捕捉することができる。西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素に結合された二次抗体を使用するその後の反応、及び色、蛍光又は化学発光光出力をもたらす基質とのインキュベーションは、試料中の抗原の定量化を可能にするであろう。

#### 【0150】

放射免疫アッセイ(RIA)もまた使用することができる。1つのRIAにおいて放射標識抗原及び非標識抗原は、抗体との競合的結合において使用される。一般的な放射標識には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、及び $^{14}\text{C}$ が挙げられる。特異的抗体及び放射標識抗体結合タンパク質によるBNP、BNPsp、又はそれらの断片の沈殿を伴う放射免疫アッセイは、試料中のBNP又はBNPspの量に比例した沈殿物中の標識抗体の量を測定することができる。或いは、標識BNP、BNPsp、又はそれらの断片が作製され、非標識抗体結合タンパク質が使用される。試験される生体試料が次いで添加される。標識BNP、BNPsp、又はそれらの断片からの数の減少は、試料中のBNP、BNPsp、又はそれらの断片の量に比例する。

#### 【0151】

RIAにおいて結合BNP、BNPsp、又はそれらの断片を、遊離BNP、BNPsp、又はそれらの断片から分離することも実行可能である。これは、二次抗体とのBNP/抗体又はBNPsp/抗体複合体を沈殿させる工程を伴い得る。例えば、BNP/抗体又はBNPsp/抗体複合体がウサギ抗体を含有するならば、次いでロバ抗ウサギ抗体が使用されて複合体を沈殿させ、標識の量がカウントされ得る。例えばLKB社、Gammamasterカウンターにおいて[83]。

#### 【0152】

受信者動作特性(ROC)分析

臨床検査の臨床性能は、診断精度、又は臨床的に関連のあるサブグループに被験体を正しく分類する能力に依存する。診断精度は、調べられる被験体の2つの異なる状態を正しく区別する検査の能力を測定する。そのような状態は、例えば、健康及び疾患、又は良性対悪性疾患である。

#### 【0153】

いずれの場合にも、受信者動作特性(ROC)プロットは、判定閾値の全範囲に対して感度対1-特異度をプロットすることにより2つの分布間の重複を表す。y軸上は感度、すなわち、真の陽性画分[(真の陽性検査結果の数)/(真の陽性検査結果の数+偽陰性検査結果の数)]として定義]である。これは、疾患又は状態の存在下の陽性とも呼ばれている。これは、罹患サブグループからのみ計算される。x軸上は偽陽性画分、すなわち、1-特異度[(偽陽性結果の数)/(真の陰性結果の数+偽陽性結果の数)]として定義]である。これは、特異度の指標であり、もっぱら非罹患サブグループから計算される。真の陽性及び偽陽性画分は、2つの異なるサブグループからの検査結果を用いて、もっぱら別々に計算されるため、ROCプロットは標本における疾患の有病率から独立している。ROCプロット上の各点は、特定の判定閾値に対応する感度/-特異度の対を表す。完全に鑑別される(結果の2つの分布に重複がない)検査は、左上隅を通過するROCプロットを有する。左上隅において、真の陽性画分は1.0、又は100%であり(完全感度)、偽陽性画分は0である(完全特異度)。鑑別されない(2つの群の結果の同一の分布)検査に対する理論的プロットは、左下隅から右上隅への45°の対角線である。ほとんどのプロットは、これらの2つの曲の間にある。ROCプロットが45°の対角線を完全に下回る場合、これは「陽性」の基準を「を超える」から「に満たない」へ逆転させて(又はその逆)容易に修正される。定性的には、プロットが左上隅に近いほど、検査の全体の精度は高くなる。

#### 【0154】

臨床検査の診断精度を数量化する好都合な目的は、単一の数によりその性能を表すことである。最も一般的な包括的尺度は、ROCプロット下面積である。慣例により、この面積

は常に 0.5である(そうでないならば、そうなるように判定規則を逆転することができる)。値は、1.0(2つの群の検査値の完全解離)から0.5(検査値の2群間に明白な分布の差がない)の間にわたる。面積は、対角線に最も近い点又は90%特異度での感度等の、プロットの特定の部分にのみ依存するわけではなく、プロット全体に依存する。これは、ROCプロットが完全なもの(面積=1.0)にどれほど近いかの定量的な記述表現である。

【0155】

キット及び製品

本発明はまた、本明細書に記載されたアッセイ及び方法を行うための装置及びキットにも関する。適切なキットは、記載された閾値比較を行うための説明書と一緒に、記載されたBNP又はBNPsp種の少なくとも1つに関するアッセイを行うのに十分な試薬を含む。例えば、キットは、当技術分野で周知のアッセイ、特にELISAアッセイ用にフォーマットされるであろう。

10

【0156】

本発明の1つの態様において、

(i)患者から得られた生体試料中のB型ナトリウム利尿ペプチドシグナルペプチド(BNPsp)断片のレベル、N末端B型ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)のレベル、及び白血球数(WCC)を測定するのに特異的な試薬と、

(ii)患者における不安定狭心症の診断をどのように行うか、又は患者における不安定狭心症を発症した結果としての脳卒中及び/又は心不全の合併症をどのように予測するかに関する説明書と

20

を含むキット又は製品がある。

【0157】

特定の例において、そのようなアッセイを行うための試薬はアッセイ装置において提供され、そのようなアッセイ装置はそのようなキットに含まれてもよい。例えば、好ましい試薬は、1つ又は複数の固相抗体であって、固体担体に結合されたBNP又はBNPsp種を検出する抗体を含む固相抗体を含み得る。

【0158】

したがって、本発明の特定の例において、第1の結合剤は固体担体に固定化される。

【0159】

サンドイッチイムノアッセイの場合、そのような試薬は、1つ又は複数の検出可能に標識された抗体であって、検出可能な標識に結合された意図されたBNP又はBNPsp種を検出する抗体を含む検出可能に標識された抗体も含むことができる。アッセイ装置の一部として提供され得る追加の任意選択の要素は、以下に記載される。検出可能な標識には、それ自体検出可能な分子(例えば、蛍光部分、電気化学標識、電気化学発光(ecl)標識、金属キレート、コロイド金属粒子等)、及び検出可能な反応産物(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素)の産生により、又はそれ自体検出可能であってよい特異的結合分子(例えば、二次抗体に結合する標識抗体、ビオチン、ジゴキシゲニン、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジニトロベンゼン、フェニルアルセネート、ssDNA、dsDNA等)の使用により、間接的に検出され得る分子が挙げられ得る。

30

【0160】

そのため、本発明の他の例において、第2の結合剤は検出可能な標識を含む。

40

【0161】

本明細書に記載される場合、本発明のキット内に含まれる結合剤には、抗体又はその抗原結合断片、例えば、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が挙げられ得る。抗体及びその抗原結合断片を含む結合メンバーに関する詳細な説明は、本明細書の他の部分に記載されている。

【0162】

特定の態様において、キットは、少なくとも1つの検査試料を分析するための試薬を含む。キットは、本明細書に記載された1つ又は複数の診断的及び/又は予後的相関を行うための装置及び説明書も含むことができる。好ましいキットは、BNP又はBNPsp等の分析物に

50

ついて、サンドイッチアッセイを行うための抗体対、又は競合的アッセイを行うための標識種を含むであろう。好ましくは、抗体対は、固相にコンジュゲートされた一次抗体、及び検出可能な標識にコンジュゲートされた二次抗体を含み、一次及び二次抗体のそれぞれは、異なる形態のBNP又はBNPspを結合するであろう。典型的には、及び特異性のために、本発明のキットにおいて使用される各抗体はモノクローナル抗体を含む。キットを使用し、相関を行うための説明書は、ラベルの形態であってもよい。ラベルは、キットの製造、輸送、販売、又は使用中いつでもキットに貼付される、又はさもなければキットに添付する任意の書面又は記録資料を指す。例えば、ラベルという用語は、広告チラシ及びパンフレット、包装材、説明書、オーディオカセット又はビデオカセット、コンピュータディスク、並びにキットに直接プリントされた文書を包含する。

10

#### 【0163】

本発明の範囲内に更に包含されるのは、BNP及びBNPspを含む異なる種のBNPを検出及び測定するための、二重目的又は多部位アッセイを含むキットである。すなわち、本発明は、被験体から得られた生体試料中の異なる種のBNP及びBNPspの存在及び量を同時に決定することができるアッセイ及びキットを提供する。特定の例において、本発明は、BNP及びBNPsp、並びにそれらの断片を同時測定するための二重目的アッセイ及び二重目的アッセイを含むキットを提供する。アッセイは、本明細書に記載されたアッセイの任意の組み合わせを含む。

#### 【0164】

本明細書における先行技術文献へのいかなる言及も、そのような先行技術が当分野で広く知られている、又は共通する一般知識の一部を形成することを認めるものであると見なされるべきではない。

20

#### 【0165】

本発明は、以下の例を参照して更に記載される。特許請求された本発明は、これらの例に決して限定されるものではないことが理解されるであろう。

#### 【実施例】

#### 【0166】

(実施例1)

材料及び方法

試験集団及びデザイン

30

急性冠症候群(ACS)が疑われる胸痛を有する患者を、Signal Peptides in Acute Coronary Events(SPACe、<http://www.anzctr.org.au>、ACTRN12609000057280)として知られる我々の進行中の観察試験に前向きに登録した。全ての患者を、ニュージーランド保健省保健及び障害倫理委員会(Health and Disabilities Ethics Committee of the Ministry of Health, New Zealand)によって承認されたプロトコルに従って登録した。全ての参加者が募集前にインフォームドコンセントに同意し、全ての調査は、ヘルシンキ宣言の原則に従った。2009年3月から2013年9月の間に、ACSが臨床的に疑われる急性胸痛を主な愁訴とし、発症から4時間の18歳以上の適格患者505名を募集した。より全般的/非定型症状(疲労、悪心、吐き気、発汗、及び失神型めまい等)は、組み入れ基準として使用しなかった。透析を受けている末期腎臓疾患患者は除外した。

40

#### 【0167】

確定診断

急性MIの確定診断は、全ての臨床データにアクセスできるが、BNPsp又はhsTnT結果にはアクセスできない2名の独立した心臓専門医により、公表されているガイドライン[1]に従って行った。不一致の場合には、独立した第3の心臓専門医が確定してこれを解決した。MIの診断の生化学的要素は、受診の12時間以内の1の値 99 URL(99パーセントイル=0.03 µg/L)とする同時TnIアッセイ(高感度でない)に基づいた。救急科受診中の心房細動(AF)はECGから決定したのに対し、UAPの診断は、確認的誘発調査(運動負荷試験(ETT)、又はドブタミン負荷心エコー検査(DSE))、又は血管造影用カテーテル検査所見に基づき行った。

#### 【0168】

50

追跡調査及び予後評価項目

退院後365日以内に、患者を電話により又は文書で追跡調査した。報告された臨床イベントを患者自身(又はそのかかりつけ医)から特定し、治療施設の記録、又は死亡率及びイベントに関するニュージーランド保健省集中データベースレジストリ入力により裏付けた。検討した退院後評価項目は、死亡、MI、急性非代償性心不全、及び脳卒中であった。イベントを、3群、すなわち、全患者(n=505)、MI患者(n=115)、及び非MI患者(n=390)についてROC分析により分析した。

【0169】

臨床評価及び試料採集

全患者について、初期評価は、病歴、理学的検査、ECG記録、標準的血液検査、パルスオキシメトリ、及び胸部X線を含んだ。患者管理は担当医の判断に委ねられた。標準的臨床コア検査TnI(Abbott Architect、試験開始時に利用可能な非高感度指標検査)、及び他の標準的血液検査結果のみが、治療スタッフに入手可能であった。同意が得られた後、BNPsp、NT-プロBNP、及びhsTnT(EDTAチューブ)、並びにTnI及び脂質(ヘパリンチューブ)を測定するための一連の血液試料を、受診後0、1、2及び12~24時間で採取した。血液試料(10ml)を氷冷したEDTAチューブに吸引し、2500gで10分間遠心分離し、血漿をアッセイ前に-80℃で凍結した。ヘパリン試料を5mlチューブに採取し、cTnI及び脂質の測定のため直ちに病院の生化学コアユニットへ送った。

10

【0170】

BNPspアッセイ

BNPspは、我々の以前に報告したアッセイ[7-10]を用いて測定した。簡単には、アッセイは試料検出限界 $5.0 \pm 0.6 \text{ pmol/L}$ 、 $ED_{50}$   $161 \pm 8 \text{ pmol/L}$ 、及びアッセイ内CVが<10%である試料測定範囲4~112pmol/Lを有した。アッセイ間CVは、それぞれ130pmol/Lで約14%、44pmol/Lで約13%であった。BNPspに関して、正常範囲の99パーセンタイル上限は25pmol/Lであり、アッセイ内CVは6.2%である。交差反応性評価は、他の関連するペプチド又は心血管障害で一般に使用される薬物による検出可能な干渉を示さなかった。

20

【0171】

心臓及び他のマーカーアッセイ

NT-プロBNP及びhsTnTは、Cobas e411分析器(Roche Diagnostics社)で決定した。NT-プロBNPアッセイの検出限界(LOD)は5ng/Lであり、44ng/Lで不確かさの変動係数(CV)4.6%を有した。hsTnTアッセイのLODは5ng/Lであり、不確かさのCVは13ng/Lで<10%であった。この試験の目的のために、hsTnT値14ng/Lを正常なカットオフの上限及びMIの診断の臨床閾値として使用した[11]。全てのhsTnT結果をRoche社によるhsTnTの世界的再評価中に提出し、3結果のみが調整を必要とし、それらの全てが14ng/Lより下であった。TnIは、30ng/L(0.03ug/L)の99パーセンタイルカットオフによる同時アッセイ(Abbott Architect)により決定した。コレステロール、HDL、LDL、及び中性脂肪は、クライストチャーチ病院コアラボ(Canterbury Health Laboratories)によりAbbott Series C分析器で決定した。

30

【0172】

統計分析

連続変数は中央値(四分位範囲、(IQR))として示し、カテゴリー変数は数及びパーセンテージとして示す。患者転帰と連続変数の間の二変量の関性連はノンパラメトリックマン-ホイットニー-U検定を、カテゴリー変数はピアソンの<sup>2</sup>検定を用いて分析した。血漿分析物結果の分析は、スピアマンの順位相関検定及び受信者動作特性曲線(ROC)分析を使用し、診断性能(感度、特異度、陽性予測値(PPV)及び陰性予測値(NPV))はSPSS v22(IBM社)を用いて実施した。ROC曲線生成及びバイオマーカーパネル比較のために、バイオマーカーデータを標準化変数(zスコア)として分析した。全ての場合において、標準化変数はt=0、1及び2時間試料から得られた最大バイオマーカー値から算出した。

40

【0173】

個々のバイオマーカー(BNPsp、NT-プロBNP、TnI、及びhsTnT)を、指標となるMI及びUAPを予測するためにROC分析により評価した。指数となるUAPを検出するための標準化バイオ

50

マーカーの組み合わせ評価(故に本明細書で「UARatio」と呼ばれる比を生成する)は、ROC分析がより低値又はより高値を示すかどうかに従って分析物を用いて行った。故に、UARatioは、中間パーフォーマー(約0.5)と比較してより高いROC値からの乖離が増大したより低いROC値を利用して、指数となるUAPを予測する。より高いROC分析物は分子の役目を果たすのに対し、より低いROC値は分母の役目を果たす。反復解析は最良標準化マーカーの最小コアセットを同定した。該セットの相加的性質は異常の除去及び付加により確認し、一方、一致は3つの無作為に選択した試験集団の半分において評価した。

#### 【0174】

ROC曲線比較は、Hanley及びMcNeill[12]のアプローチを用いて行った。全ての分析において、 $p$ 値 $<0.05$ を有意と見なした。

#### 【0175】

(実施例2)

結果

患者特性

募集した患者505名のベースライン特性を表1に示す。115名(23%)がMIの確定診断を受け、40名(8%)がUAPを有し、324名(64%)が未鑑別又は心臓以外の胸痛を有し、26名(5%)が心房細動(AF)、心不全、又は大動脈弁狭窄等の非ACS心臓障害を有した。これらの別の心臓障害のうち、19名(4%)は救急科受診中にAFになった。

#### 【0176】

バイオマーカーレベル

受診時BNPspレベルは最高( $r=-0.13$ ,  $p=0.006$ )と逆相関し、WCC( $r=0.17$ ,  $P<0.001$ )、HDL( $r=0.10$ ,  $p=0.035$ )、NT-プロBNP( $r=0.10$ ,  $p=0.043$ )、TnI( $r=0.11$ ,  $p=0.01$ )、及びhsTnT( $r=0.10$ ,  $p=0.029$ )と正の関連を示した。血漿BNPspは、他の診断群と比べてMI及び他の心臓障害群で有意に高かった(Table 1(表1))。MI症例を除去すると、BNPspレベルは他の診断群と比べてUAP患者で有意に高かった(Table 1(表1))。興味深いことに、BNPspの受診時レベルは、AFなしの患者(22.2(18.3-25.9pmol/L)、 $n=486$ )に対してAF患者(25.9(19.8-36.0pmol/L)、 $n=19$ )で有意に高かった( $p=0.018$ )。hsTnT及びTnIは両方ともMIで有意に高く(予想通り)、hsTnTは他の心臓障害でも有意に高かった(Table 1(表1))。NT-プロBNPレベルは、心臓以外の症例又は未鑑別胸痛を有する者と比べて全ての心臓障害群で高かった。

#### 【0177】

MIの診断

指標となるTnIアッセイはMIの診断に関して0.97のROC AUCを有したのに対し、調査hsTnT測定値は0.96のAUCを生成した(Table II(表2)、図3)。両方のアッセイは、高感度、特異度、PPV、及びNPVデータを生成した。対照的に、BNPspはAUC=0.69及びNT-プロBNP=0.64を生成した。BNPspをTnI、hsTnT、又はNT-プロBNPに追加することは、それぞれのAUCの感度又は特異度を改善しなかった。

#### 【0178】

心虚血及び他の診断の同定

試験群全体で、UAPの検出に関する非鑑別ラインを超えるマーカーAUCはなく、最も近いものはNT-プロBNPでAUC 0.58(95%CI、0.50-0.67、 $p=0.079$ )であった。MI患者( $n=115$ )を除去すると、分析に適格な患者は390名となった。この群におけるROC分析は、プロBNP、BNPsp、カリウム、及び白血球数(WCC)のみが、確定UAP患者の同定に関して有意なAUCを生成したことを明らかにした(Table II(表3))。UARatioは、UAP患者の同定に関してAUC 0.70を生成し(Table II(表3))、最も良い個別マーカー、NT-プロBNPより有意に良好であった( $p<0.05$ 、図4A)。したがって、UARatioの中央標準化値は、全ての他の診断群と比べて確定UAP患者で有意に高かった(1.19(0.49-2.92) vs. 0.43(0.24-1.29)、 $p=0.002$ )。ECG異常の証拠がない非MI患者( $n=328$ )に注目した更なる分析は、UARatioがUAPの同定に関して、それぞれ90%、50%、18%、及び98%の感度、特異度、PPV、及びNPVでAUC 0.76を有することを明らかにした( $n=33$ 、95% CI、0.68-0.83、 $p<0.001$ 、図4B)。このAUCは、NT-プロBNP(AUC=0.66、95%CI 0.57-0.75)及びBNPsp(AUC=0.63、95%CI、0.52-0.74、図4B)の比較AUCより有

10

20

30

40

50

意に良好であった ( $p < 0.05$ )。UARatioからの個々の変数の連続異常除去、及び試験集団の3つの無作為に選択された半分におけるその性能の反復評価は、該比の一貫した検査性能を裏付けた。

【 0 1 7 9 】

【表 1 A】

Table 1:患者ベースライン特性(中央値、IQR、パーセント)

	心筋梗塞(MI)	不安定狭心症 (UAP)	他の心臓障害	未鑑別/心臓以外の胸痛	全患者	p 値
患者、数(%)	115 (23)	40 (8)	26 (5)	324 (64)	505 (100)	
性別、数(%)						
男性	78 (68)	26 (65)	16 (62)	185 (57)	305 (60)	<0.001
女性	37 (32)	14 (35)	10 (38)	139 (43)	200 (40)	<0.001
年齢、歳						
男性	66 (56-76)	64 (58-70)	65 (52-77)	59 (48-70)	62 (51-70)	<0.001
女性	78 (68-86)	66 (59-73)	73(65-80)	68 (58-80)	68 (59-80)	<0.001
分析物						
コレステロール(mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>ψ</sup>	181 (154-216)	175 (141-213)	174 (149-202)	187 (153-214)	184 (154-216)	
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> ) <sup>ψ</sup>	40 (34-50)	39 (35-42)	40 (30-58)	40 (37-53)	40 (36-51)	

【表 1 B】

LDL (mg.dL <sup>-1</sup> ) $\psi$	116 (93-143)	107 (77-139)	101 (85-125)	116 (89-135)	114 (89-135)	
中性脂肪(mg.dL <sup>-1</sup> ) $\S$	159 (97-195)	149 (95-177)	142 (88-181)	166 (126-186)	161 (107-206)	
リスク因子(%)						
高血圧	79 (69)	33 (83)	20 (77)	195 (60)	327 (65)	<0.01
糖尿病	19 (4)	9 (23)	4 (15)	43 (13)	75 (15)	<0.01
現在の喫煙者	16 (3.5)	2 (5)	0 (0)	47 (15)	65 (13)	<0.01
元喫煙者	57 (11)	21 (53)	19 (73)	157 (48)	254 (50)	<0.01
BMI (kg.m <sup>2</sup> )	27.7 (24.7-31.3)	27.2 (25.1-30.3)	27.7 (24.6-31.8)	27.7 (24.9-31.3)	27.7 (24.7-31.1)	
既往歴(%)						
CVD	78 (68)	36 (90)	13 (50)	199 (61)	326 (65)	<0.01
MI	36 (31)	20 (50)	10 (38)	99 (31)	165 (33)	<0.01
CABG	9 (8)	6 (15)	3 (12)	35 (11)	53 (10)	<0.01
高脂血症	62 (54)	34 (85)	14 (54)	193 (60)	303 (60)	<0.01

10

20

30

40

【表 1 C】

アンギナ	48 (42)	30 (75)	17 (65)	158 (49)	253 (50)	<0.01
心不全	10 (9)	4 (10)	2 (8)	33 (10)	49 (10)	<0.01
<b>ECG 結果(%)</b>						
LBBB	3 (3)	1 (3)	1 (4)	9 (3)	14 (4)	
ST 上昇	23 (20)	0 (0)	2 (8)	0 (0)	25 (7)	<0.01
ST 下降	10 (9)	1 (3)	3 (12)	2 (1)	16 (4)	<0.01
T 波逆転	20 (17)	5 (13)	6 (23)	30 (9)	61 (13)	<0.01
変化なし	59 (51)	33 (83)	14 (54)	283 (9)	389 (72)	<0.01
マーカーレベル						
hsTnT(ng/L)	79* (37-219)	6 (3-10)	22* (8-36)	5 (3-12)	8 (3-27)	*<0.01
TnI (ug/L)	0.25* (0.07-1.30)	0.01 (0.01-0.01)	0.02 (0.01-0.04)	0.01 (0.01-0.01)	0.01 (0.01-0.03)	*<0.01
BNPsp (pmol/L)	26.1* (20.5-36.9)	23.1† (18.1-28.2)	25.0* (19.6-34.0)	21.3 (17.7-24.2)	22.3 (18.4-26.2)	*<0.01 †<0.05

10

20

30

40

【表 1 D】

プロ BNP(ng/L)	758* (279-1447)	436* (288-1445)	1159* (445-2013)	340 (157-767)	392 (183-1063)	*<0.01
UARatio	0.44* (-0.81-1.96)	0.23* (-0.50-1.94)	0.01 (-0.51-1.40)	-0.76 (-1.37-0.16)	-0.35 (-1.09-0.76)	*<0.01

10

20

30

40

【表 2】

Table II:MI 及び確定的不安定狭心症(UAP)の診断に関する ROC 曲線パラメータ

MI (n=115/505)の診断

マーカー	AUC	95% CI	感度%	特異度%	PPV %	NPV %	p 値
TnI	0.97	0.96-0.99	85	95	83	96	<0.001
hsTnT	0.96	0.94-0.98	94	83	62	98	<0.001
NT-プロ BNP	0.64	0.58-0.69	56	73	38	85	<0.001
BNPsp	0.69	0.63-0.75	55	84	50	86	<0.001
UARatio	0.64	0.58-0.70	60	68	36	85	<0.001

10

20

30

40

【表 3】

UAP (n=40/390)の診断

マーカー	AUC	95% CI	感度%	特異度%	PPV %	NPV %	p 値
TnI	0.54	0.44-0.64	5	85	4	89	0.419
hsTnT	0.51	0.42-0.59	10	80	5	89	0.910
NT-プロ BNP	0.62	0.54-0.70	83	37	13	95	0.012
カリウム	0.61	0.53-0.70	5	97	16	90	0.019
WCC <sup>1</sup>	0.60	0.52-0.69	5	93	8	90	0.032
BNPsp	0.59	0.49-0.70	83	45	15	96	0.048
UARatio <sup>2</sup>	0.70*	0.62-0.77	83	51	16	97	<0.001

【表 4 A】

Table III: 1年以内の転帰を同定する受診時マーカーレベルのROC性能。† =  $p < 0.05$ , \* =  $p < 0.01$ , nd=未検

試験群全体(n=505)

マーカー	死亡率 (n=21)	MI (n=29)	脳卒中 (n=10)	心不全 (n=10)
TnI	0.70* (0.59-0.80)	0.64* (0.54-0.74)	0.51 (0.34-0.68)	0.72† (0.58-0.86)
hsTnT	0.70* (0.60-0.80)	0.68* (0.59-0.77)	0.68 (0.55-0.80)	0.82* (0.73-0.90)
NT-プロBNP	0.73* (0.63-0.74)	0.70* (0.60-0.79)	0.77* (0.64-0.90)	0.92* (0.84-1.00)

10

20

30

40

【 0 1 8 6 】

【表 4 B】

BNPsp	0.59 (0.49-0.69)	0.44 (0.33-0.55)	0.48 (0.31-0.64)	0.51 (0.34-0.69)
UARatio	0.61 (0.48-0.75)	0.62† (0.52-0.72)	0.63 (0.49-0.77)	0.81* (0.70-0.92)

10

20

30

40

【表 5】

MI 患者(n=115)		死亡率 (n=7)	MI (n=13)		
マーカー					
NT-プロ BNP	0.71 (0.48-0.94)	0.63 (0.47-0.78)	nd	nd	
BNPsp	0.54 (0.49-0.69)	0.71 <sup>†</sup> (0.57-0.85)	nd	nd	
NT-プロ BNP + BNPsp	0.67 (0.40-0.93)	0.70 <sup>†</sup> (0.56-0.84)	nd	nd	

10

20

30

40

【表6】

非MI患者(n=390)		死亡率 (n=14)	MI (n=16)	脳卒中 (n=9)	心不全 (n=7)
マーカー					
UARatio	0.62 (0.48-0.77)	0.61 (0.48-0.74)	0.70 <sup>+</sup> (0.55-0.85)	0.82* (0.67-0.96)	
BNPsp	0.59 (0.48-0.70)	0.47 (0.33-0.62)	0.50 (0.31-0.65)	0.61 (0.37-0.85)	

10

20

30

40

50

【0189】

BNPsp及びUARatioの予測能力

指標となる入院から1年に対するBNPspの予測性能に関する試験群全体(n=505)の評価は、受診時のBNPspが死亡率、心筋梗塞、脳卒中、又は心不全を予測しないことを明らかにした。更に、BNPspは、それらの転帰に関するhsTnT、TnI、又はNT-proBNの予測能力より増すことはなかった(Table III(表4))。対照的に、変数UARatioは、1年以内のMI(n=29、p=0.029)及び心不全(n=10、p=0.001)を予測した(Table III(表4))。

#### 【0190】

MI患者単独(n=115)に注目すると、BNPsp濃度はAUC 0.71(p=0.014)を生成し、BNPsp<26p mol/Lは1年以内の新規MI(n=13)と有意に関連することが明らかになった。BNPspの追加は、1年以内の新規MIの予測に関するNT-プロBNPのAUCを、0.63(p=0.136)から0.70(p=0.021、Table III(表5))に改善した。UARatioはMI患者におけるいずれの転帰も予測しなかった。MIに罹患していない患者(n=390)の分析は、UARatioが1年以内の脳卒中(n=9、P=0.038)及び心不全(n=7、p=0.004)を予測できることを明らかにしたTable III(表6))。BNPspは非MI患者におけるいずれのイベントも予測しなかった。

#### 【0191】

(実施例3)

考察

急性MI[7]、及び誘発心臓検査[10]の両方において急速に上昇するプロフィールを有する循環実体としてのBNPspを同定する上での出願人らの以前の研究は、本明細書に示された試験の論理的根拠を提供した。この研究の主な知見は、i)BNPspが、胸痛を有するED患者におけるコペプチン(約0.7)と類似した急性MIのROC診断力を有したことである[13]。しかし、コペプチンとは異なり、BNPspはトロポニンより診断力が増すことはなく;ii)BNPspレベルはAFを呈する患者で有意に高く、iii)BNPspはNT-プロBNPと併せて、非MI患者においてUAPに対していくらかの鑑別力を有し、WCC及びK+と組み合わせたこれら2つの相加値は、特にECGに変化がない患者におけるUAPに診断的潜在性を有し得る固有の比を生み出し、iv)BNPspは、急性MI罹患患者におけるNT-プロBNPからの予測情報を増やし得た。

#### 【0192】

受診の2時間以内のBNPspレベルが急性MIで高かったという知見は、STEMI患者における我々の以前の知見[7]と一致する。更に、この試験における上昇が心虚血の発症及び消失時に急速であったという点で、この試験は、心虚血におけるBNPsp上昇の極めて動的な性質も裏付けた。BNPsp放出のこのパターンは、反復虚血エピソードの検出に関して有用となり得るが、上昇の検出をより難しくし、反復試料採取を必要とする。循環からの急速な半減期及びクリアランスは、BNPspがMIの診断に関してhsTnT測定より増すものがなかった1つの理由となる可能性がある。

#### 【0193】

AF患者におけるBNPspの上昇は、新規の知見である。発症機序は不明であるが、心房筋細胞及び/又は頻脈誘発性虚血の様々な集団における急速に変化する局所機械的ストレスを反映している可能性がある。トロポニンの場合と同様に[17,18]、BNP/NT-プロBNPとAF発生及びリスク予測との関係はよく知られており[14-16]、より大規模な適切にデザインされた試験サンプルにおいて、BNPspが類似の能力を有するかどうかを決定することは、興味深いであろう。

#### 【0194】

梗塞がない心虚血を検出するBNP潜在的能力は、実証研究[19]、臨床研究[20]、及びメタ解析研究[21]からの証拠的裏付けがある。これらの全ては、BNP測定が誘発検査体制中の心筋虚血の検出を改善できることを示唆している。BNPspが、NT-プロBNPほど強力ではないが、非MI患者におけるUAPをある程度鑑別したという我々のデータは陽性所見であり、負荷心エコー検査を受けているCAD患者における我々の以前の報告[10]と一致するが、検査刺激又は誘発を全く受けなかった患者から生成された。NT-プロBNPにBNPspを追加することは、UAP患者において有意なROC反応を示す他の変数も含める「UARatio」という概念に更に発展した。UARatioの論理的根拠は、目的とする症候群に特異的に応答する複数の潜在的に有用なバイオマーカー値を含めるという試みである。本明細書に同定された4

つの変数のうち、BNPsp及びNT-プロBNPは直感的に適切であり、他の2つはそれほどではない。分母にWCCを使用することは、この試験では、WCCレベルが、全ての他の診断群と比べてUAPで有意に低かった( $P=0.01$ )という事実を反映している。対照的に、WCC値は、急性MI患者で有意に高かった( $P<0.01$ )。UAP患者におけるWCCレベルに関する文献にはばらつきがあり、WCCレベルは高い[22]、変わらない[23]、及び減少する[24]と報告されている。このばらつきは、試験群のサンプリングのタイミング、以前の薬歴、及び喫煙状況を反映している可能性がある。対照的に、我々は、弱い有意なROC AUCを生成する、UAP患者におけるカリウムレベルの上昇(非有意)を見出した。UAPの検出において、カリウムをNT-プロBNP及びBNPspのそれぞれと、並びにNT-プロBNP及びBNPspの組み合わせと積極的に組み合わせることは注目に値する。

10

**【0195】**

本明細書に示唆れたUARatioに関して、特にはっきりしないECG群のUAP患者において生成されたPPV及びNPV値は、組み合わせられた運動試験及び心エコー検査について報告されている範囲内である[25]。更に、UARatioは、1年以内のその後のMI、脳卒中、及び心不全エピソードの予測能力を有した。今後の研究は、1)本明細書に記載された該比が、現在の誘発心臓検査体制からの低い診断的及び治療的利益を改善することができるか[26]、並びに2)該比とmicroRNAs等のUAPの他の新規の潜在的マーカーとの組み合わせがあるか[27]どうかを扱う可能性がある。

**【0196】**

本発明は例として記載されたが、変形及び変更が、特許請求の範囲に定義された本発明の範囲を逸脱することなく行われ得ることが理解されるべきである。更に、特定の特徴の既知の同等物が存在する場合、そのような同等物は、本明細書に具体的に言及されているかのように援用される。

20

(参考文献)

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2012;126:2020-35.
2. Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009;361:868-77.
3. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009;361:858-67. 10
4. Reichlin T, Twerenbold R, Reiter M, Steuer S, Bassetti S, Balmelli C, et al. Introduction of high sensitivity troponin assays: impact on myocardial infarction incidence and prognosis. *Am J Med* 2012;125:1205-13.
5. Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, Mueller C, Lindahl B, Blankenberg S, et al. Study Group on Biomarkers in Cardiology of ESC Working Group on Acute Cardiac Care. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012;33:2252-57.
6. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;32:2999-3054. 20
7. Siriwardena M, Kleffmann T, Ruygrok P, Cameron VA, Yandle TG, Nicholls MG, et al. BNP signal peptide circulates in human blood: evaluation as a potential biomarker of cardiac ischemia. *Circulation* 2010;122:255-64.
8. Pemberton CJ, Siriwardena M, Kleffmann T, Ruygrok P, Palmer SC, Yandle TG, et al. First identification of circulating preproANP signal peptide fragments in man: initial assessment as cardiovascular biomarkers. *Clin Chem* 2012;58:757-77. 30
9. Pemberton CJ, Siriwardena M, Kleffmann T, Richards AM. CNP signal peptide fragments are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;449:301-306.
10. Siriwardena M, Campbell V, Richards AM, Pemberton CJ. Cardiac biomarker responses to dobutamine stress echocardiography in healthy volunteers and patients with coronary artery disease. *Clin Chem* 2012;58:1492-94. 40
11. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010;56:254-61.
12. Hanley JA, McNeill BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;148:839-43.

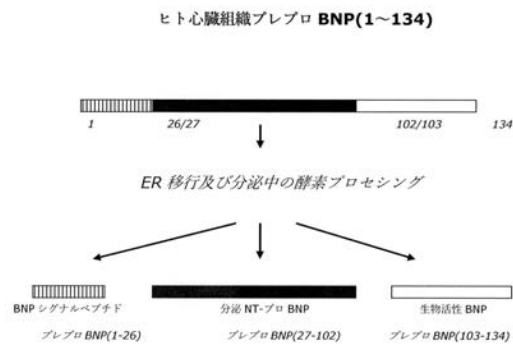
13. Raskovalova T, Twerenbold R, Collinson PO, Keller T, Bouvaist H, Folli C, et al. Diagnostic accuracy of combined cardiac troponin and copeptin assessment for early rule-out of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2014;3:18-27.
14. Patton KK, Ellinor PT, Heckbert S, Christenson RH, DeFilippi C, Gottdiener JS, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is a major predictor of the development of atrial fibrillation: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2009;120:1768-74.
15. Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, Sullivan LM, Pencina MJ, Meigs JB, et al. Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community. *Circulation* 2010;121:200-207. 10
16. Sinner MF, Stepas KA, Moser CB, Krijthe BP, Aspelund T, Sotoodehnia N, et al. B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in the prediction of atrial fibrillation risk: the CHARGE-AF consortium of community based cohort studies. *Europace* 2014;16:1426-33.
17. Hussein AA, Bartz TM, Gottdiener JS, Sotoodehnia N, Heckbert SR, Lloyd-Jones D, et al. Serial measures of cardiac troponin T levels by a highly sensitive assay and incident atrial fibrillation in a prospective cohort of older ambulatory adults. *Heart Rhythm* 2015: <http://dx.doi.org/10.1016.j.hrthm.2015.01.020> 20
18. Filion KB, Agarwal SK, Ballantyne CM, Eberg M, Hoogeveen RC, Huxley RR, et al. High sensitivity cardiac troponin T and the risk of incident atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J* 2015;169:31-8.
19. Mollmann H, Nef HM, Kostin S, Dragu A, Maack C, Weber M, et al. Ischemia triggers BNP expression in the human myocardium independent from mechanical stress. *Int J Cardiol* 2010;141:265-71.
20. Staub D, Jonas N, Zellweger MJ, Nusbaumer C, Wild D, Pfisterer ME, et al. Use of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to detect myocardial ischemia. *Am J Med* 2005;118:1287. 30
21. Nadir MA, Witham MD, Szwejkowski BR, Struthers AD. Meta-analysis of B-type natriuretic peptide's ability to identify stress induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2011;107:662-67.
22. Yip HK, Wu CJ, Hang CL, Chang HW, Yang CH, Hsieh YK, et al. Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. *Int Heart J* 2005;46:571-81.
23. Avramakis G, Papadimitraki E, Papakonstandinou D, Liakou K, Zidianakis M, Dermizakis A, et al. Platelets and white blood cell subpopulations among patients with myocardial infarction and unstable angina. *Platelets* 2007;18:16-23. 40
24. Yang N, Feng JP, Chen G, Kou L, Li Y, Ren P, et al. Variability in lipid profile among patients presented with acute myocardial infarction, unstable angina and stable angina pectoris. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18:3761-66.

25. Cheitlin MD, Alpert JS, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, et al. ACC/AHA Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Clinical Application of Echocardiography). Developed in collaboration with the American Society of Echocardiography. *Circulation* 1997;95:1686-1744.
26. Hermann LK, Newman DH, Pleasant A, Rojanasartikul D, Lakoff D, Goldberg SA, et al. Yield of routine provocative cardiac testing among patients in an emergency department based-chest pain unit. *JAMA Intern Med* 2013;173:1128-33. 10
27. Zeller T, Keller T, Ojeda F, Reichlin T, Twerenbold R, Tzikas S, et al. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *Eur Heart J* 2014;35:2106-14.
28. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000;36:355-59.
29. Zimmermann R, Baki S, Dengler TJ, Ring GH, Remppis A, Lange R, et al. Troponin T release after heart transplantation. *Br Heart J* 1993;69:395-98.
30. Dastjerdi et al. 2011 *Biotechnology and Applied Biochemistry* 58(4):226-230 20
31. Phillips et al., 2008, *Anal Chim Acta* 621: 101-108
32. Shamah et al., 2008, *Acc Chem Res* 41: 130-138
33. Ohuchi et al., 2006. *Biochimie* 88:897-904
34. *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)
35. Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273
36. Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97
37. Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546
38. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)
39. *Protein Eng* 8(10) 1057-1062 (1995) 30
40. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Springer-verlag 1994, Rosenberg and Moore Eds
41. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444-6448 (1993)
42. *Nature* 321: 522-525 (1986)
43. *Nature* 332: 323-329 (1988)
44. WO 2005/003154
45. Kohler and Milstein (1975) *Nature* (5517) 256, 495-497
46. United States Patent No. 4,196,265 40
47. United States Patent No. 4,816,567
48. Lutz et al. (1988) *Exp. Cell. Res.* 175:109-124
49. Munson et al. (1980) *Anal Biochem* 107: 220
50. United States Patent No. 4,816,567
51. United States Patent No. 5,334,708

52. United States Patent No. 5,821,047
53. United States Patent No. 7,476,724
54. United States Patent No. 4,816,567
55. United States Patent No. 5,843,708
56. United States Patent No. 6,020,153
57. Nature 352: 624-628 (1991)
58. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982).
59. van Erp *et al.* (1991) *J. Immunoassay* 12: 425-43; Nelson and Griswold (1988) *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8 10
60. Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82
61. Devlin *et al.* (1990) *Science* 249, 404-6
62. Scott and Smith (1990) *Science* 249, 386-88
63. United States Patent No. 5,571,698
64. United States Patent No. US 6,057,098
65. United States Patent Application No. 20120225088
66. United States Patent No. 6,143,576 20
67. United States Patent No. 6,113,855
68. United States Patent No. 6,019,944
69. United States Patent No. 5,985,579
70. United States Patent No. 5,947,124
71. United States Patent No. 5,939,272
72. United States Patent No. 5,922,615
73. United States Patent No. 5,885,527
74. United States Patent No. 5,851,776
75. United States Patent No. 5,824,799 30
76. United States Patent No. 5,679,526
77. United States Patent No. 5,525,524
78. United States Patent No. 5,480,792
79. The Immunoassay Handbook, David Wild, ed. Stockton Press, New York, 1994
80. United States Patent No. 5,631,171
81. United States Patent No. 5,955,377
82. United States Patent No. 7,541,160
83. Hunt *et al.* *Clin. Endocrinol.* 1997 47:287-296 40

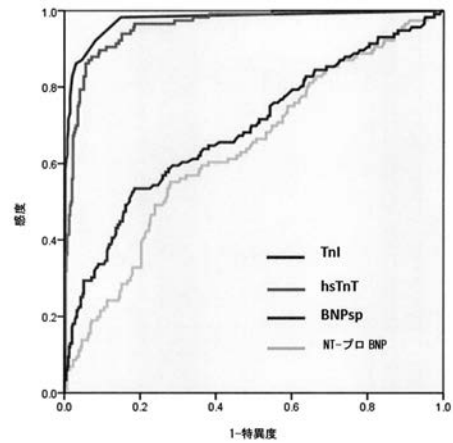
【 図 1 】

FIGURE 1



【 図 3 】

FIGURE 3



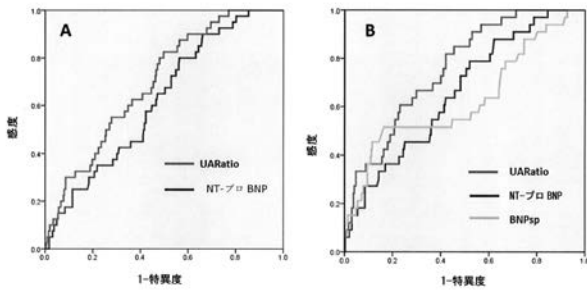
【 図 2 】

FIGURE 2

ヒト/1-26	MIPQTAPSRALLLLFLHLAFLGGRS
ネコ/1-26	MIPK TALLRALLLLFLHLSPLGGRS
ヒツジ/1-26	MIPQKALSR TLLLLFLHLSLLGGRS
ブタ/1-25	MGFRMALPR-VLLLLFLHLLLGCRS
イヌ/1-26	MIPCAALPRALLLLFLHLSPLGGRS
ラット/1-26	MILQKVLPMILLLFLHLSPLGGHS
マウス/1-26	MILLKVLQMI LLLFLHLSPLGGHS

【 図 4 】

FIGURE 4



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/NZ2016/050207</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)</b>		
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)		
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)		
EPODOC, WPIAP, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, PUBMED & Keywords: G01N 33/6848, G01N 2800/50, G01N 2800/324, G01N 33/53, G01N 33/68, unstable angina, heart, cardio, stroke, BNP, BNPsp, NT-proBNP, white blood cell, potassium, and like terms, as well Applicant and Inventor names;		
GenomeQuest & publicly available BNPsp, NT-proBNP sequences (see Search Information Statement for sequence details);		
INTESS & Keywords: Applicant and Inventor names, angina, heart, stroke; AUSPAT, PAMS & Keywords: Applicant and Inventor names.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<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 14 March 2017		Date of mailing of the international search report 14 March 2017
<b>Name and mailing address of the ISA/AU</b>  AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au		<b>Authorised officer</b>  Alexander Theodossis AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 62832438

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/NZ2016/050207
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PEMBERTON, C.J. et al., 'BNP signal peptide circulates in human blood and is a novel biomarker of ACS', European Heart Journal, 2010, Vol. 31, No. Suppl. 1, page 773, Abstract P4544  & EMBASE Document ID 70282478 whole document	18
Y	TALWAR, S. et al., 'Plasma N terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiotrophin 1 are raised in unstable angina', Heart, 2000, Vol. 84, pages 421-424 Abstract; Figure 1A	18
A	KIKUTA, K. et al., 'Increased plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina', American Heart Journal, 1996, Vol. 132, pages 101-107 Abstract; Figure 1	
Y	WO 2005/052593 A1 (THE UNIVERSITY OF LEICESTER) 09 June 2005 para.5 on p.12; Figure 1	18
Y	AU 2007293777 B2 (OTAGO INNOVATION LIMITED) 20 March 2014 Claims 8, 17	18
Y	YIP, H.K. et al., 'Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris', International Heart Journal, 2005, Vol. 46, pages 571-581 para.3 on p.572; para.1 on p.579	18
Y	YANG, N. et al., 'Variability in lipid profile among patients presented with acute myocardial infarction, unstable angina and stable angina pectoris', European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2014, Vol. 18, pages 3761-3766 Abstract; Table III	18
A	AVRAMAKIS, G. et al., 'Platelets and white blood cell subpopulations among patients with myocardial infarction and unstable angina', Platelets, 2007, Vol. 18, pages 16-23 Table I	
A	AHMED, W. et al., 'Plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina pectoris or acute myocardial infarction: prognostic significance and therapeutic implications', Angiology, 2007, Vol. 58, pages 269-274 Abstract	
A	WEST, M.J. et al., 'The value of N-terminal fragment of brain natriuretic peptide and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels as predictors of cardiovascular outcome in the LIPID study', European Heart Journal, 2008, Vol. 29, pages 923-931 Abstract; Table I; para. bridging col.1-2 on p.924	
P,X	PEMBERTON, C.J. et al., 'B-type natriuretic peptide signal peptide (BNPsp) in patients presenting with chest pain', Clinical Biochemistry, March 2016, Vol. 49, pages 645-650 Whole Document	1-18
L	SIRIWARDENA, M. et al., 'B-type natriuretic peptide signal peptide circulates in human blood', Circulation, 2010, Vol. 122, pages 255-264 Support	
	AKHTAR, N. et al., 'The role of leukocyte counts in patients with unstable angina pectoris or myocardial infarction; prognostic significance and correlation with plasma brain natriuretic peptide (BNP) levels', The Journal of the Pakistan Medical Association, 2011, Vol. 61, pages 51-54	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<b>PCT/NZ2016/050207</b>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	whole document	
A	VAN GILST, W.H. et al., 'Serum potassium values in relation to the use of diuretics in patients with unstable angina pectoris', European Heart Journal, 1988, Vol. 9, pages 795-799 whole document	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.	
Information on patent family members		<b>PCT/NZ2016/050207</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
WO 2005/052593 A1	09 June 2005	WO 2005052593 A1	09 Jun 2005
		US 2005244904 A1	03 Nov 2005
AU 2007293777 B2	20 March 2014	AU 2007293777 A1	13 Mar 2008
		AU 2007293777 B2	20 Mar 2014
		CA 2662629 A1	13 Mar 2008
		CN 101611318 A	23 Dec 2009
		CN 101611318 B	04 Mar 2015
		EP 2089722 A1	19 Aug 2009
		JP 2010506145 A	25 Feb 2010
		JP 5994121 B2	21 Sep 2016
		NZ 576061 A	22 Feb 2013
		US 2009239246 A1	24 Sep 2009
		US 8298772 B2	30 Oct 2012
		US 2013316378 A1	28 Nov 2013
		US 9255930 B2	09 Feb 2016
		US 2013183683 A1	18 Jul 2013
		US 2016258967 A1	08 Sep 2016
		WO 2008030122 A1	13 Mar 2008

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.  
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/NZ2016/050207</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## 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, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 クリストファー・ジョゼフ・ペンバートン  
ニュージーランド・8042・クライストチャーチ・ブルームフィールド・ステッドマン・ロード  
・54

(72)発明者 アーサー・マーク・リチャーズ  
ニュージーランド・8011・クライストチャーチ・リッカートン・モナ・ベール・アベニュー・  
8エー

Fターム(参考) 2G045 AA04 AA25 CA25 CA26 DA36 DB10 FA36 FB03

专利名称(译)	不稳定型心绞痛的诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019502933A</a>	公开(公告)日	2019-01-31
申请号	JP2018552627	申请日	2016-12-23
[标]发明人	クリストファー・ジョゼフ・ベンバートン アーサー・マークリチャーズ		
发明人	クリストファー・ジョゼフ・ベンバートン アーサー・マークリチャーズ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/49 G01N33/84 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/58 G01N2800/325 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N33/84 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/49.A G01N33/84.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA04 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DB10 2G045/FA36 2G045/ /FB03		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	62/271928 2015-12-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及患者中不稳定型心绞痛的诊断。此外，本发明涉及预测由于发展为不稳定型心绞痛的患者中风和/或心力衰竭的并发症。

FIGURE 4

