

(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2013-534309

(P2013-534309A)

(43) 公表日 平成25年9月2日(2013.9.2)

(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 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/70</b> (2006.01)	GO 1 N 33/70	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
<b>CO 7 K 14/435</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
	CO 7 K 14/435 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁)		

(21) 出願番号 特願2013-522263 (P2013-522263)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月5日 (2011.8.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年4月3日 (2013.4.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/063519  
 (87) 国際公開番号 W02012/017071  
 (87) 国際公開日 平成24年2月9日 (2012.2.9)  
 (31) 優先権主張番号 61/371, 334  
 (32) 優先日 平成22年8月6日 (2010.8.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 10172170.2  
 (32) 優先日 平成22年8月6日 (2010.8.6)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511185564  
 プロノタ エヌ. ヴェ.  
 PRONOTA N. V.  
 ベルギー、ビー-9052 ズウェイナールデ、テフノロジーパーク 4  
 Technologiepark 4,  
 B-9052 Zwijinaarde,  
 BELGIUM  
 (74) 代理人 100065248  
 弁理士 野河 信太郎  
 (74) 代理人 100159385  
 弁理士 甲斐 伸二  
 (74) 代理人 100163407  
 弁理士 金子 裕輔

最終頁に続く

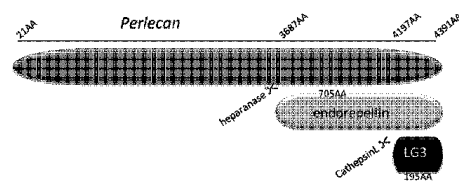
(54) 【発明の名称】 腎機能不全のバイオマーカーとしてのパールカン

(57) 【要約】

本出願は、腎機能不全についての新しいバイオマーカーとしてのパールカン、前記バイオマーカーの測定に基づいて前記機能不全を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするための方法、並びに前記バイオマーカーを測定するため及び/又は前記方法を行うためのキット及びデバイスを開示する。

【選択図】 図 7 a

Figure 7a



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象者における腎機能不全の診断、予知、予後予測及び/又はモニタリング用又は腎機能不全治療のモニタリング用血液バイオマーカーとしてのパールカン又はそのフラグメントの使用。

## 【請求項 2】

前記フラグメントがパールカンのエンドレペリンドメインである請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

前記フラグメントがパールカンのLG3ドメインである請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 4】

検査段階が対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することを含む、対象者における腎機能不全を診断、予知、予後予測及び/又はモニターする方法。

## 【請求項 5】

前記フラグメントがパールカンのエンドレペリンドメインである請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記フラグメントがパールカンのLG3ドメインである請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 7】

(i) 対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと

(ii) (i) で測定したパールカン又はそのフラグメントの量を、腎機能不全又は正常腎機能の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、パールカン又はそのフラグメントの量の参照値と比較することと、

(iii) 前記参照値からの (i) で測定したパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(iv) 逸脱又は逸脱無しの前記知見を、前記対象者における腎機能不全又は正常腎機能の具体的な診断、予知及び/又は予後に帰属させることとを含む請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

(i) 2 以上の逐次的な時点からの対象者の血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと、

(ii) (i) で測定した試料間のパールカン又はそのフラグメントの量を比較することと、

(iii) (ii) で比較した試料間のパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(iv) 逸脱又は逸脱無しの前記知見を、2 以上の逐次的な時点間の対象者における腎機能又は腎機能不全の変化に帰属させることとを含む、対象者の好ましくは医療処置経過中に腎機能不全をモニターするための請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

腎機能不全が糸球体濾過速度(GFR)又は推定糸球体濾過速度(eGFR)の低下を特徴とし、好ましくは正常GFR又はeGFRと低下したGFR又はeGFRとの間の閾値が約50~約70ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、より好ましくは60ml/分/1.73m<sup>2</sup>の値に設定され、前記閾値を超える値が正常GFR又はeGFRを示し、前記閾値未満の値が低下したGFR又はeGFRを示す請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

腎機能不全が蛋白尿を特徴とするか、慢性同種移植片腎症であるか、II型糖尿病であるか、急性腎不全(急性腎傷害)であるか、慢性腎不全(慢性腎臓疾患)であるか、又は腎線維症に関連するか若しくは腎線維症を原因とする請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

正常腎機能の予知若しくは診断を表すか又は腎機能不全についての良好な予後を表す参照

10

20

30

40

50

値と比較して上昇した対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量が、対象者が腎機能不全を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか又は対象者における腎機能不全について不良な予後を示す請求項 4 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと、パールカン又はそのフラグメントの前記測定した量を、前記対象者の糸球体濾過速度(GFR)に変換することを含む、対象者のGFRを決定する方法。

【請求項 13】

(i) 対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと

10

、  
(ii) (i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量を、腎機能不全又は正常腎機能の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、パールカン又はそのフラグメントの量の参照値と比較することと、

(iii) 前記参照値からの(i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(iv) 前記知見から、腎機能不全を処置する治療の必要性の有無を推論することとを含む、対象者が腎機能不全を処置する治療を必要としているのか又はこれから必要とするか又は必要としないのか又はこれからも必要としないのか(例えば、依然として必要としているのか又はもはや必要としないか)を決定する方法。

20

【請求項 14】

対象者が前記治療の早期の開始を必要としているのか又はこれから必要とするか又は必要としないのか又はこれからも必要としないかを決定するための請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

腎機能不全を処置する治療が、低カリウム及び/又は低リン食、リンを低下させる薬物療法、赤血球生成刺激剤、鉄サプリメント、血圧薬物療法、ビタミンサプリメント、血液透析、限外ろ過、腹膜透析及び腎臓移植から選択される請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

腎機能不全を処置する治療が、術後の及び/又は重篤な患者における血液透析、限外ろ過又は腹膜透析である請求項 14 又は 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

慢性透析患者における透析の時期又はスケジュールが、前記患者において経時的に測定されたパールカン又はそのフラグメントの量の変化によって知らされる請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

(i) 対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定するステップと、

(ii) (i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量を、死亡の既知の予知又は予後を表す、パールカンの量の参照値と比較するステップと、

40

(iii) 参照値からの(i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、

(iv) 逸脱又は逸脱無しの前記知見を、対象者における死亡の具体的な予知又は予後に帰属させるステップとを含む、腎機能不全の対象者における死亡を予知する方法。

【請求項 19】

予め決定された時間間隔内での所定の死亡の予知又は予後を表す参照値と比較して上昇した対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量が、対象者が前記時間間隔内に死亡するリスクが比較的大きいことを示す請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

50

(i)対象者からの血液試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと

(ii)(i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量を、蛋白尿の既知の予知、診断及び/又は予後を表す、パールカン又はそのフラグメントの量の参照値と比較することと、

(iii)参照値からの(i)で測定したパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(iv)逸脱又は逸脱無しの前記知見を、対象者における蛋白尿の具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させることと

を含む、対象者における蛋白尿を予知、診断、予後予測及び/又はモニターする方法。

10

【請求項 2 1】

(i) 2 以上の逐次的な時点からの対象者の試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定することと、

(ii)(i)で測定した試料間のパールカン又はそのフラグメントの量を比較することと、

(iii)(ii)で比較した試料間のパールカン又はそのフラグメントの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(iv)逸脱又は逸脱無しの前記知見を、2 以上の逐次的な時点間における対象者における蛋白尿の変化に帰属させることと

を含む、対象者の好ましくは医療処置の経過中に蛋白尿をモニターするための請求項 2 0 に記載の方法。

20

【請求項 2 2】

(i) 2 以上の逐次的な時点にて請求項 2 0 に記載の方法を対象者に適用して、対象者における蛋白尿の診断、予知及び/又は予後を前記逐次的な時点にて決定することと、

(ii)(i)で決定した前記逐次的な時点での対象者における蛋白尿の診断、予知及び/又は予後を比較することと、

(iii)(i)で決定した前記逐次的な時点での対象者における蛋白尿の診断、予知及び/又は予後の間の変化の有無を見出すことと

を含む、対象者の好ましくは医療処置の経過中に対象者における蛋白尿の診断、予知及び/又は予後の変化をモニターする方法。

30

【請求項 2 3】

蛋白尿無しの予知若しくは診断を表すか又は蛋白尿についての良好な予後を表す参照値と比較して上昇した対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量が、対象者が蛋白尿を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか又は対象者における蛋白尿についての不良な予後を示す請求項 2 0 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記フラグメントがパールカンのエンドレペリンドメインである請求項 1 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記フラグメントがパールカンのLG3ドメインである請求項 1 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

検査段階が対象者からの試料中のそれぞれの疾患又は状態の診断、予知及び/又は予後予測に有用な 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定することを更に含む請求項 4 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

(i)対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量並びに前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定することと、

(ii)(i)の測定を用いて、パールカン又はそのフラグメントの量並びに前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての対象者プロフィールを確立することと、

(iii)(ii)の前記対象者プロフィールを、パールカン又はそのフラグメントの量並びに

50

前記 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての、それぞれの疾患又は状態の既知の診断、予知及び/又は予後を表す参照プロフィールと比較することと、

(iv) 参照プロフィールからの(ii)の対象者プロフィールの逸脱又は逸脱無しを見出すことと、

(v) 逸脱又は逸脱無しの前記知見を、対象者におけるそれぞれの疾患又は状態の具体的な診断、予知及び/又は予後に帰属させることと

を含む請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記他のバイオマーカーが、クレアチニン、シスタチン C、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、ベータ-ト্রেスタンパク質、腎臓傷害分子 1 (KIM-1)、インターロイキン-18(IL-18)、B 型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド(proBNP)、アミノ末端プロ B 型ナトリウム利尿ペプチド(NTproBNP)、LTBP2及び C 反応性ペプチド並びにそれらのいずれかのフラグメント又は前駆体からなる群より選択される請求項 26 又は 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

パールカン又はそのフラグメントの量並びに/或いは 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量が、それぞれ、パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる結合物質、並びに前記 1 以上の他のバイオマーカーに特異的に結合できる結合物質を用いて測定される請求項 4 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 30】

パールカン又はそのフラグメントの量並びに/或いは 1 以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量が、イムノアッセイ技術を用いて、又は質量分析法を用いて、又はクロマトグラフィー法を用いて、又は前記方法の組み合わせを用いて、又はノザンプロットング若しくは(定量)RT-PCRのようなRNA分析ツールを用いて測定される請求項 4 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 31】

(i) 対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定する手段と、好ましくは更に(ii)腎機能不全の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、パールカン若しくはそのフラグメントの量の参照値又は前記参照値を確立する手段とを含む、請求項 4 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法を行うためのキット。

30

【請求項 32】

(i) 対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定する手段と、  
(ii) デバイス中に参照値を保存する手段と、  
(iii) 得られた量を保存された参照値と比較する手段と、  
(iv) 試料中で測定されたパールカン又はそのフラグメントの量を視覚化する手段と  
を含み、前記フラグメントが好ましくはパールカンのエンドレペリン又はLG3ドメインから選択される、対象者からの試料中のパールカン又はそのフラグメントの量を測定できる検査デバイス。

【請求項 33】

試験物質が、パールカン又はそのフラグメントのレベル及び/又は活性を調節、例えば増加又は低減、好ましくは低減できるかを決定することを含み、前記フラグメントが好ましくはパールカンのエンドレペリン又はLG3ドメインから選択される、試験物質の群から腎機能不全の処置に有用である可能性がある候補物質を選択するアッセイ。

40

【請求項 34】

前記物質が、抗体又はそのフラグメント若しくは誘導体、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣物、アプタマー、フォトアプタマー、化学物質、好ましくは有機分子、より好ましくは有機小分子である請求項 33 に記載のアッセイ。

【請求項 35】

前記物質が、パールカン又はそのフラグメントの発現を低減又は阻害するその能力について試験され、好ましくは、前記物質がアンチセンス物質、リボザイム、又はRNA干渉を引

50

き起こすことができる物質である、請求項 3 3 又は 3 4 に記載のアッセイ。

【請求項 3 6】

薬剤を用いて、必要とする対象者におけるパールカン又はそのフラグメントの活性又は発現レベルを低減することを含み、前記フラグメントが好ましくはパールカンのエンドレペリン又はLG3ドメインから選択される、腎機能不全に罹患した対象者を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、対象者における疾患及び状態、特に腎機能不全の予知、診断、予後予測及び/又はモニタリングに有用なタンパク質及び/又はペプチドに基づくバイオマーカー、並びに関連する方法、キット及びデバイスに関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多くの疾患及び状態において、予防的及び/又は治療的処置の好ましい転帰は、疾患又は状態の早期の及び/又は正確な予知、診断、予後及び/又はモニタリングと強く関連する。よって、処置の選択肢を手引きする疾患及び状態の早期で及び/又は正確な予知、診断、予後及び/又はモニタリングのための更なるそして好ましくは改善された方法が継続的に必要とされている。

20

【0003】

哺乳動物の腎臓系は、なかでも、血流からの異化廃棄生成物の除去並びに体内での体液及び電解質バランスの維持において中心的な役割を演じる。

腎機能不全は、腎臓の機能が不適切である疾患及び状態、例えば糸球体濾過速度の低下により証明されるような例えば急性又は慢性の腎臓機能の劣化を特徴とする、より具体的には急性又は慢性の腎臓排泄機能の低下を特徴とする疾患及び状態を包含する。腎機能不全は、異化廃棄生成物及びその他の有害若しくは毒性の物質の(全身での)蓄積並びに/又は体液若しくは電解質の著しい不均衡の発生が、その他の主要な臓器系の不全及び死を導くか、それに貢献するか又はそれを悪化させ得る生命を脅かす状態に発展することがある。

30

【0004】

腎機能不全の徴候及び症状は、なかでも、血中尿素レベルの増加、容量負荷及び腫脹、異常な酸レベル、カリウム、カルシウム及び/又はホスフェートの異常なレベル、排尿の変化、疲労、発疹又はそう痒、悪心、呼吸困難、腎臓サイズの減少、血尿並びに貧血を含み得る。しかし、腎機能不全は、頻繁に潜行性であり、患者が問題に気付いて医師に診てもらふことを決定する前に進行期に進むことがある。よって、腎機能不全は、一般的に診断が遅れ、患者は、根治的で些細でない処置、例えば透析又は腎臓移植を既に必要とすることがある。

【0005】

腎機能不全の診断を補助するために、いくつかの方法が以前に開発された。例えば、糸球体濾過速度(GFR)を決定する方法がある。しかし、GFRの測定は、外因性で有害な可能性がある診断物質の注射を含み、特定の期間でのそれらの排泄を測定する、侵襲的で時間がかかる高価な手順に依存する。別の方法は、血清クレアチンクリアランスを測定することである。クレアチンは、筋肉組織を起源とし、腎機能の低下とともに尿細管からの分泌が増加する。しかし、血清クレアチンレベルは、年齢、性別、食餌、筋肉量、民族背景、身体活動性、疾患、分泌の他の様式などに依存し、これらの因子は、腎機能不全の診断のためのクレアチンクリアランスの信頼性を損なうことがある。腎機能不全を診断するための更なる内因性バイオマーカーは、シスタチンCである。有利には、クレアチンと比較して、シスタチンCの発現は比較的安定である。それにもかかわらず、シスタチンCにはいくつかの制限がある。例えば、そのレベルは、免疫抑制剤の影響を受け、甲状腺

40

50

機能に依存する。シスタチンCは、GFRの急性の変化に対して十分に迅速に応答せず、よって、急性腎傷害(AKI)についての満足できるマーカーでない。別の内因性マーカーは、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)であり、これは、急性腎傷害の早期ステージを検出するとみられる。しかし、NGALの使用は、複雑な患者集団における標準以下の特異性を導くことがあるその抗炎症性の役割により混乱させられる。

#### 【0006】

更に、腎臓と関連する問題を発生しやすい術後又は重篤な患者において腎置換療法(RRT)の必要性を適時に(すなわち早期に)発見することは、死亡率を減らすための基本である。しかし、今日までに、RRTの開始の必要性についての客観的な早期の尺度はなく、早期RRTの恩恵を受ける患者を特異的に同定できるバイオマーカーが、非常に期待されている。

10

#### 【0007】

信頼できる、好ましくは早期の検出及び介入は、腎機能不全の効果的な処置にとって重要である。よって、腎機能不全の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのための更なる代替のそして好ましくは改善されたマーカー及びツールを提供することが、継続して最も重要である。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本発明は、腎機能不全並びに関連する疾患及び状態のバイオマーカーを同定し、それらの使用を提供することにより、当該技術における上記の必要性に対処する。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

網羅的な実験及び試験を行って、本発明者らは、血液試料中のタンパク質パールカン(PERLECAN)、より精密にはそのエンドレペリン(ENDOREPELLIN)部分、更により精密にはそのLG-3ドメイン(以下、包括的に「パールカン」という)のレベルが、腎臓機能の密接な指標であることを見出した。特に、299名の患者からの臨床試料において、パールカンは、腎臓機能と関連するいくつかの試験した臨床パラメータ、なかでも推定糸球体濾過速度(eGFR)、クレアチニンレベル、血中尿素窒素(BUN)レベル、腎臓不全の病歴及びシスタチンCレベルと著しい関連を示した。

30

#### 【0010】

更に、GFRが低下した対象者( $< 60\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ )を正常GFRの対象者から区別するために、AUC中央値(ROC曲線下面積;「ROC」は、受信者動作特性のことである)は、パールカン(0.91)とシスタチンC(0.92)との間で少なくとも同等である。AUC値は、感度と特異性との組み合わせた尺度であり、より高いAUC値(すなわち1に近づく)は、一般的に、試験の性能の改善を示す。

#### 【0011】

上述したように、明細書を通して、用語「パールカン」は、パールカン及びパールカンのフラグメント、例えばパールカンのエンドレペリン又はLG3ドメインを包含し得る。よって、本明細書で用いる場合、「パールカン」への言及は、「パールカン又はそのフラグメント」と読むこともできる。好ましくは、上記フラグメントは、パールカンのエンドレペリンドメインであり得る。更に好ましくは、上記フラグメントは、パールカンのLG3ドメインであり得る。

40

よって、本発明者らは、腎機能を評価するために有利な新しいバイオマーカーとしてのパールカンを実現した。

#### 【0012】

対象者からの試料中のパールカンの量を測定することを含む、対象者における腎機能を決定する方法が更に提供される。対象者からの試料中のパールカンレベルを測定することを含む、対象者における腎機能不全を予知、診断、予後予測及び/又はモニターする方法が特に提供される。本明細書を通じて用いるように、対象者からの試料中のパールカン及び/又は他のバイオマーカーのレベルを測定することは、方法の検査段階が、対象者から

50

の試料中のパールカン及び/又は他のバイオマーカーの量を測定することを含むことを特にいうことがある。疾患及び状態の予知、診断、予後及び/又はモニタリングの方法は、一般的に、対象者から及び/又は対象者に関するデータを回収する検査段階を含むことが理解される。

【0013】

ある実施形態において、腎機能不全を予知、診断及び/又は予後予測する方法は、(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定するステップと、(ii)(i)で測定したパールカンの量を、腎機能不全又は正常腎機能の既知の予知、診断及び/又は予後を表す、パールカンの量の参照値と比較するステップと、(iii)参照値からの(i)で測定したパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(iv)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者における腎機能不全又は正常腎機能の具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させるステップとを含む。

10

【0014】

腎機能不全を予知、診断及び/又は予後予測する方法、特に前の段落で述べたステップ(i)~(iv)を含む方法は、対象者について2以上の逐次的な時点で行うことができ、上記の逐次的な時点でのそれぞれの結果を比較して、それにより、上記の逐次的な時点での腎機能不全の予知、診断及び/又は予後間の変化の有無を決定できる。よって、この方法は、対象者における腎機能不全の予知、診断及び/又は予後の経時的な変化をモニターすることを可能にする。

【0015】

ある実施形態において、腎機能不全をモニターする方法は、(i)2以上の逐次的な時点からの対象者からの試料中のパールカンの量を測定するステップと、(ii)(i)で測定した試料間のパールカンの量を比較するステップと、(iii)(ii)と比較した試料間のパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(iv)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、2以上の逐次的な時点間の対象者における腎機能又は腎機能不全の変化に帰属させるステップとを含む。よって、この方法は、対象者における腎機能不全又は腎機能を経時的にモニターすることを可能にする。このモニタリングは、腎機能不全の処置の開始、タイプ及び/又は継続若しくは変更を決定するために重要であり得る。

20

【0016】

本開示を通して、本明細書で教示するいずれか1つの状態又は疾患のモニタリングに適切な方法は、なかでも、状態又は疾患の発生を予知すること、或いは状態若しくは疾患の進行、悪化、軽減若しくは再発に対する応答或いは処置又は他の外的若しくは内的因子、状況又はストレス因子などに対する応答のモニタリングを可能にする。有利には、本明細書で教示するモニタリング方法は、対象者の医療処置、好ましくはそのようにしてモニターされる状態又は疾患を軽減することを目的とする医療処置の経過において用いることができる。このようなモニタリングは、例えば、患者を退院させることができるか、患者が処置の変更を必要とするか、又は患者が更なる入院を必要とするか、又は患者が腎置換療法(RRT)の開始を必要とするかの決定に含めることができる。

30

【0017】

同様に、本開示を通して、本明細書で教示するいずれかの状態又は疾患を予後予測するために適切な方法は、なかでも、状態又は疾患の発生を予後予測すること、或いは状態若しくは疾患の進行、悪化、軽減若しくは再発に対する応答或いは処置又は他の外的若しくは内的因子、状況又はストレス因子などに対する応答を予後予測することを可能にする。

40

【0018】

実験の項に示すように、腎臓機能不全を代表する臨床パラメータ、例えばeGFRの低下及びシスタチンCレベルの上昇は、パールカンのレベルの上昇と関連する。よって、腎機能不全の予知若しくは診断又は腎機能不全の不良な予後は、特に、パールカンのレベルの上昇と関連し得る。

例えば、しかし限定されないが、それぞれ腎機能不全無し(すなわち正常腎機能)の予知若しくは診断を表す参照値又は腎機能不全についての良好な予後を表す参照値と比較して

50

上昇(すなわち逸脱)した対象者からの試料中のパールカンの量は、それぞれ、対象者が腎機能不全を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者における腎機能不全についての不良な予後(例えば、慢性腎機能不全患者が末期腎臓疾患に向かって進行するという予後)を示す。

**【 0 0 1 9 】**

腎機能不全は、GFR又はeGFRの低下を特徴とすることがある。(推定)糸球体濾過速度は、GFR又はeGFRが正常よりいくらかでも低いならば、正常と比較して低下しているということができる。例えば、しかし限定されないが、正常腎臓機能を示す正常GFR又はeGFRは、90ml/分/1.73m<sup>2</sup>より多い値のことをいうことがあり、わずかに損なわれた腎臓機能を示す中間のGFR又はeGFRは、60~90ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間の値のことをいうことがあり、重度に損なわれた腎臓機能を示す低下したGFR又はeGFRは、60ml/分/1.73m<sup>2</sup>未満の値のことをいうことがある。

10

**【 0 0 2 0 】**

例示的であるが非限定的な実験において、正常GFRと低下したGFRとの間の閾値を60ml/分/1.73m<sup>2</sup>に設定した場合に、パールカンレベルは、正常GFRと低下したGFRとの間を十分に区別した。よって、実施形態では、正常GFR又はeGFR 対 低下したGFR又はeGFRについての閾値は、約50~約70ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば約55~約65ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば55、56、57、58、59、60、61、62、63、64又は65ml/分/1.73m<sup>2</sup>、好ましくは60ml/分/1.73m<sup>2</sup>の値に設定でき、ここで、上記の閾値を超える値は正常GFR又はeGFRを反映し、上記の閾値未満の値は低下したGFR又はeGFRを表す。

20

別の実施形態では、正常GFR又はeGFR 対 低下したGFR又はeGFRについての閾値は、約80~約100ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば約85~約95ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば85、86、87、88、89、90、91、92、93、94又は95ml/分/1.73m<sup>2</sup>、好ましくは90ml/分/1.73m<sup>2</sup>の値に設定でき、ここで、上記の閾値を超える値は正常GFR又はeGFRを反映し、上記の閾値未満の値は低下したGFR又はeGFRを表す。

**【 0 0 2 1 】**

例示的であるが非限定的な実験において、正常GFRと中間のGFRとの間の閾値を90ml/分/1.73m<sup>2</sup>に設定し、中間のGFRと低下したGFRとの間の閾値を60ml/分/1.73m<sup>2</sup>に設定した場合に、パールカンレベルは、正常GFRと中間のGFRと低下したGFRとの間を十分に区別した。

よって、更に別の実施形態において、中間のGFR又はeGFR 対 低下したGFR又はeGFRについての閾値は、約50~約70ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば約55~約65ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば55、56、57、58、59、60、61、62、63、64又は65ml/分/1.73m<sup>2</sup>、好ましくは60ml/分/1.73m<sup>2</sup>の値に設定でき、ここで、上記の閾値を超える値は中間のGFR又はeGFRを反映し、上記の閾値未満の値は低下したGFR又はeGFRを表し、正常GFR又はeGFR 対 中間のGFR又はeGFRについての更なる閾値は、約80~約100ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば約85~約95ml/分/1.73m<sup>2</sup>の間、例えば85、86、87、88、89、90、91、92、93、94又は95ml/分/1.73m<sup>2</sup>、好ましくは90ml/分/1.73m<sup>2</sup>の値に設定でき、ここで、上記の閾値を超える値は正常GFR又はeGFRを反映し、上記の閾値未満の値は中間のGFR又はeGFRを表す。

30

**【 0 0 2 2 】**

本明細書で教示するように、パールカンのレベル、例えば血漿及び/又は尿中のパールカン濃度は、糸球体濾過速度(GFR)と相関する。よって、対象者において測定されるパールカンの量は、GFRの値に変換してこれを決定又は推定できる。このような目的のための適切な変換式は、更なる因子、例えば臨床パラメータ(限定されないが、身長、年齢、性別、人種、筋肉量など)及び/又は臨床変数(例えば血液測定変数、例えば、限定することなく、ヘマトクリット、アルブミン濃度、甲状腺ホルモンなど)も含んでよい。

40

よって、ある態様は、対象者からの試料中のパールカンの量を測定することと、パールカンの上記の測定した量を上記の対象者のGFRに変換することとを含む、対象者の糸球体濾過速度(GFR)を決定するための方法を提供する。

**【 0 0 2 3 】**

対象者において測定されるパールカンの量は、本明細書で開示する診断、予知、予後及

50

び/又はモニタリング方法の一部又は一ステップとしてGFRに変換できる。このようにして算出されたGFR値を、GFR及び腎臓機能低下の様々な段階を表す既知のGFRの値と比較できる。よって、パールの量は、対象者におけるGFR低下の程度を決定するために用いることができる。

よって、本明細書で開示する診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法のある実施形態において、腎機能不全は、GFR低下を包含するか、それを示すか又はそれに相当することがある。

#### 【0024】

(i)対象者からの試料中のパールの量を測定することと、(ii)(i)で測定したパールの量を、腎機能不全又は正常腎機能の既知の診断、予知及び/又は予後を表す、パールの量の参照値と比較することと、(iii)上記の参照値からの(i)で測定したパールの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、(iv)上記の知見から、腎機能不全を処置するための治療の必要性の有無を推論することを含む、対象者が腎機能不全を処置する治療を必要としているか又はこれから必要とするか又は必要としていないか又はこれからも必要としないか(例えば、依然として必要とするか又はもはや必要としない)を決定する方法も開示される。(i)~(iii)のステップが、対象者が腎機能不全を有しているか若しくは有するリスクにあるか又は腎機能不全についての予後が不良である(例えば、限定されないが、対象者からの試料中のパールの量が、腎機能不全無し(すなわち正常腎機能)の予知又は診断を表す参照値と比較して上昇している(すなわち逸脱)場合)との結論を可能にする場合に、治療を特に指示できる。限定されないが、医療センターに入院する際又は入院中に腎機能不全である患者は、本明細書で教示するようにして、上記の腎機能不全の処置の継続の必要性について試験でき、そのような処置がもはや必要でないか又は所定の限定された程度でだけ必要である場合に退院させてよい。

10

20

#### 【0025】

特に、この方法は、対象者が、上記の治療の早期の開始を必要としているか又はこれから必要とするか又は必要としていないか又はこれからも必要としないかを決定することを可能にすることがある。例えば、パールを用いるこのような決定は、現在利用可能なマーカー、例えばクレアチニン及び尿素(血中尿素窒素)と比較して、より早期に行うことができ、及び/又は治療の早期の開始を可能にすることがある。

#### 【0026】

腎機能不全についての例示的な治療は、限定することなく、低カリウム及び/又は低リン食餌、リンを低下させる薬物治療(例えば炭酸カルシウム、カルシトール、セベラマー)、赤血球生成刺激剤(例えばエリスロポエチン、ダルベポエチン)、鉄サプリメント、血圧薬物療法、ビタミンサプリメント、血液透析、限外ろ過、腹膜透析及び腎臓移植を包含する。RRT(例えば血液透析、限外ろ過又は腹膜透析)の必要性は、術後又は重篤な患者において試験することが典型的に重要である。パールは、本明細書において、RRTについての必要性の良好な早期マーカーであることが示され、よって、腎臓の流体濾過機能を適時に代償することにより、上記患者の死亡の減少を補助することができる。

30

よって、ある実施形態において、腎機能不全を処置する治療は、術後及び/又は重篤な患者における血液透析、限外ろ過又は腹膜透析であってよい。

40

#### 【0027】

ある実施形態において、慢性透析患者における透析の時期又はスケジュールが、上記の患者において経時的に測定されたパールの量の変化によって通知されてもよい。例えば、パールの量の予め決定された変化がこのような患者において経時的に検出されるならば、透析を予定してもよい。

実施形態において、腎機能不全は、本明細書で用いる場合、急性腎不全(急性腎傷害)のことをいうことがある。別の実施形態では、腎機能不全は、本明細書で用いる場合、慢性腎不全(慢性腎臓疾患)のことをいうことがある。更なる実施形態では、腎機能不全は、本明細書で用いる場合、特に(しかし限定されないが)慢性腎臓疾患患者又は心不全患者における腎臓組織の線維症(腎線維症)と関連するか又はそれを原因とすることがある。

50

特に、有利には、本明細書で意図する腎機能不全は、急性腎機能不全又はAKIを含んでよい。本発明者らにより証明されるように、パールカンは、腎機能の突然の変化を検出できる。AKIは、一般的に、GFRの突然の下落を必然的に伴うので、(このような突然のGFRの変化に対して迅速に反応するマーカーとしての)パールカンの測定は、AKIの診断、予知、予後予測及び/又はモニタリングに特に適切であり得る。

#### 【0028】

パールカンをAKIのマーカーとして用いることは、AKIを発症するリスクにあることが知られているか又は予想される患者において特に有用であり得る。限定されないが、このようなパールカン検査又はスクリーニングは、例えば手術、より具体的には心臓手術を受けた患者(急性腎傷害の発生率は、30~50%ほど高くなり得る)において、集中治療室(ICU)患者の一般集団において行ってよい(すなわち、ICUにて対象者を検査する)。これもまた限定することなく、パールカン検査又はスクリーニングは、冠動脈若しくは末梢血管の造影を受けるか又は受けた患者(造影剤誘発腎症を発生する発生率は、5~10%ほど高いことがある)において用いることができる。例えば、このような状況において、パールカンは、診断マーカー(例えばパールカンは、手順の後の所定の時間内、例えば24時間以内に測定できる)又はAKIの発症に対して感受性であるか又はAKIを発症しやすい患者を同定するための予知マーカーとして用いることができる。

#### 【0029】

実施例において証明されるように、パールカンは、(急性)呼吸困難を示す対象者集団における腎機能不全の患者を同定できる。呼吸困難(dyspnea又はdyspnoea)(又は息切れ)は、ある範囲の根本的病変、例えば肺がん、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、うっ血性又は急性心不全及び腎機能不全とつながり得る一般的で困難な症状である。呼吸困難を顕す患者を適切に処置するために、根本的問題を確立する必要がある。

よって、本明細書で教示する腎機能不全の診断、予知、予後予測及び/又はモニタリング方法において、対象者は、呼吸困難を示す(顕す)ことがある。好ましくは、呼吸困難は、急性呼吸困難であり得る。上記の方法は、特に、腎機能不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難(を有する対象者)と、他の状態(例えば、限定することなく、COPD又は肺炎)と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難(を有する対象者)とを区別することを可能にする。

#### 【0030】

実施例で述べるように、パールカンレベルとシスタチンCレベル又はeGFRとの間の相関関係は、対象者集団における急性非代償性心不全(AHF)の存在についての補正の後でさえ持続する。よって、パールカンは、心臓の急性代償不全(すなわち心拍出量の減少)による腎機能(eGFR)の突然の変化を検出できる。

よって、本明細書で教示する腎機能不全の診断、予知、予後予測及び/又はモニタリング方法において、対象者は、心不全、好ましくは急性非代償性心不全(AHF)を有していてもよいし又は有するリスクにあってもよい。このような方法は、なかでも、心拍出量の減少と関連するか若しくはそれを原因とする腎機能の急性の悪化を診断するか、又はAHFの処置の経過において腎機能をモニターすることを可能にする。

#### 【0031】

これもまた実施例に示すように、本発明者らは、急性呼吸困難を顕す対象者における入院の際のパールカンレベルが、入院後1年以内に死亡した対象者において、1年後に生存したままである対象者のものと比較して有意により高かったことを見出した。この差は、患者集団を、急性心不全(AHF)の有無に基づいて、又はGFRにより測定される腎機能(不全)に基づいて分割した場合にも観察された。よって、本発明者らは、呼吸困難、特に急性呼吸困難の患者、AHFの患者及び/又は腎機能不全、特に慢性腎機能不全の患者における死亡の予知又は予後予測に有利な新しいバイオマーカーとしてのパールカンを実現した。

よって、対象者からの試料中のパールカンの量を測定することを含む、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者における死亡を予知又は予後予測する方法も提供される。好ましくは、呼吸困難は急性呼吸困難であり得る。好ましくは、腎機能不

10

20

30

40

50

全は慢性腎機能不全、特に慢性腎臓疾患であり得る。限定することなく、呼吸困難は、AHF及び/若しくは腎機能不全と関連するか又はそれを原因とすることがあるか、或いは呼吸困難は、AHF及び腎機能不全以外の状態と関連するか又はそれを原因とすることがあるか、或いは対象者は、呼吸困難の症状なしでAHF及び/又は腎機能不全であることがある。

#### 【0032】

ある実施形態において、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者における死亡を予知又は予後予測する方法は、(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定するステップと、(ii)(i)で測定したパールカンの量を、死亡の既知の予知又は予後を表す、パールカンの量の参照値と比較するステップと、(iii)参照値からの(i)で測定したパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(iv)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者における死亡の具体的な予知又は予後に帰属させるステップとを含む。

死亡を予知又は予後予測する本発明の方法は、好ましくは、対象者が呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全を一旦表すか又はそれと診断された対象者について、より好ましくは、上記の疾患及び状態の初期(最初)の発症(presentation)又は診断の際に行うことができる。

#### 【0033】

実験の項に示すように、呼吸困難及び/又はAHF及び/又は腎不全の対象者の集団における死亡率の増加は、パールカンのレベルの上昇と関連する。よって、死亡の増加(予め決定された時間間隔内での死亡のリスク又は見込みの増加)の予知又は予後予測は、特に、パールカンのレベルの上昇と関連できる。

例えば、限定することなく、所定の死亡(すなわち、予め決定された時間間隔内での死亡の所定の(例えば通常の)リスク又は見込み)の予知予後を表す参照値と比較して上昇(すなわち逸脱)した対象者からの試料中のパールカンの量は、対象者が上記の時間間隔内で死亡するリスクが比較的大きいことを示す。

限定することなく、死亡は、ある間隔内、例えば予知又は予後予測方法を行った時点から数ヶ月又は数年の間隔内、例えば予知又は予後予測方法を行った時点から約6ヶ月若しくは約1年以内、又は約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9若しくは約10年以内に対象者が死亡する見込みとして適切に表現できる。

#### 【0034】

例示的であるが非限定的な実験において、パールカンレベルは、生存対死亡の状態に関する時間間隔を予知又は予後予測方法を行った時点から1年間に設定した場合に、呼吸困難、AHF及び腎機能不全の対象者において通常の死亡と増加した死亡との間を十分に区別した。よって、実施形態では、死亡は、予知又は予後予測方法を行ってから6ヶ月~2年の間の間隔、好ましくは1年以内に対象者が死亡する見込みとして適切に表現できる。

対象者において死亡の見込みの増加が見出されることにより、対象者の疾患又は状態を処置するための治療上の決定が手引きできることが認識される。

#### 【0035】

本発明者らは、パールカントタンパク質のレベルが、対照と比較して、胸部大動脈狭窄(TAC)動物の肥大左心室において増加することを更に見出した。よって、本発明者らは、左室肥大及び心臓線維症の評価に有利な新しいバイオマーカーとしてのパールカンを実現した。WO 2008/046509は、決定的な結果を得ることなく、左室肥大のDOCAラットモデルにおけるmRNAレベルでのパールカンの発現について研究している。

#### 【0036】

別の態様は、妊娠高血圧腎症(PE)の評価に有利な新しいバイオマーカーとしてのパールカンを提供する。更なる態様は、蛋白尿、例えば妊娠関連蛋白尿(PAP)又はメタボリックシンドローム若しくはII型糖尿病と関連する蛋白尿の評価に有利な新しいバイオマーカーとしてのパールカンを提供する。

よって、対象者からの試料中のパールカンレベルを測定することを含む、対象者における左室肥大(LVH)、心臓線維症(CF)、PE又はPAPのいずれかを予知、診断、予後予測及び/又はモニターする方法が提供される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 7 】

ある実施形態において、LVH、CF、PE又はPAPのいずれかを予知、診断及び/又は予後予測する方法は、(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定するステップと、(ii)(i)で測定したパールカンの量を、LVH、CF、PE若しくはPAPの既知の予知、診断及び/又は予後を表す、パールカンの量の参照値と比較するステップと、(iii)参照値からの(i)で測定したパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(iv)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者におけるLVH、CF、PE又はPAPの具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させるステップとを含む。

## 【 0 0 3 8 】

LVH、CF、PE又はPAPのいずれかを予知、診断及び/又は予後予測する方法、特に前の段落で述べたステップ(i)~(iv)を含む方法は、対象者について2以上の逐次的な時点で行うことができ、上記の逐次的な時点でのそれぞれの結果を比較して、それにより、上記の逐次的な時点でのLVH、CF、PE又はPAPの予知、診断及び/又は予後間の変化の有無を決定できる。この方法は、よって、対象者におけるLVH、CF、PE又はPAPのいずれかの予知、診断及び/又は予後の経時的な変化をモニターすることを可能にする。

10

## 【 0 0 3 9 】

ある実施形態において、LVH、CF、PE又はPAPのいずれかをモニターする方法は、(i)2以上の逐次的な時点からの対象者からの試料中のパールカンの量を測定するステップと、(ii)(i)で測定した試料間のパールカンの量を比較するステップと、(iii)(ii)と比較した試料間のパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(iv)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、2以上の逐次的な時点間の対象者におけるLVH、CF、PE又はPAPの変化に帰属させるステップとを含む。方法は、よって、対象者におけるLVH、CF、PE又はPAPのいずれかを経時的にモニターすることを可能にする。

20

LVH、CF、PE又はPAPのいずれかの予知又は診断或いはLVH、CF、PE又はPAPの不良な予後は、パールカンのレベルの上昇と特に関連できる。

## 【 0 0 4 0 】

例えば、限定することなく、それぞれLVH、CF、PE若しくはPAP無し(すなわち健常状態)の予知又は診断を表すか又はLVH、CF、PE若しくはPAPの良好な予後を表す参照値と比較して上昇した(すなわち逸脱)対象者からの試料中のパールカンの量は、それぞれ、対象者がLVH、CF、PE若しくはPAPを有しているか又は有するリスクにあることを示すか、或いは対象者におけるLVH、CF、PE又はPAPについての不良な予後を示す。

30

## 【 0 0 4 1 】

(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定することと、(ii)(i)で測定したパールカンの量を、LVH、CF、PE又はPAPの既知の診断、予知及び/又は予後を表す、パールカンの量の参照値と比較することと、(iii)上記の参照値からの(i)で測定したパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すことと、(iv)上記の知見から、LVH、CF、PE又はPAPを処置する治療の必要性の有無を推測することとを含む、対象者が、LVH、CF、PE若しくはPAPのいずれかを処置する治療を必要とするか又はこれから必要とするか又は必要としていないか又はこれからも必要としないのか(例えばまだ必要とするか又はもはや必要としない)を決定する方法も開示される。

40

## 【 0 0 4 2 】

(i)~(iii)のステップが、対象者がLVH、CF、PE若しくはPAPを有しているか若しくは有するリスクにあるか又はLVH、CF、PE若しくはPAPについての予後が不良であるとの結論を可能にする場合(例えば、限定することなく、対象者からの試料中のパールカンの量が、LVH、CF、PE又はPAP無し(すなわち健常状態)の予知又は診断を表す参照値と比較して上昇(すなわち逸脱)している場合)に、治療を特に指示できる。限定することなく、医療センターに入院する際又は入院中にLVH、CF、PE又はPAPを有する患者は、本明細書で教示するようにして、上記のLVH、CF、PE又はPAPの処置の継続の必要性について検査でき、そのような処置がもはや必要でないか又は所定の限定された程度でだけ必要である場合に退院させてよい。

50

## 【0043】

本明細書で教示するいずれかの予知、診断、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%又は少なくとも80%、例えば85%若しくは90%若しくは95%、例えば約80%~100%の間、若しくは約85%~95%の間の感度及び/又は特異性(好ましくは感度及び特異性)を可能にする。

## 【0044】

本明細書を通して「疾患及び/又は状態」への言及は、特に、しかし限定することなく、腎機能不全、腎不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の患者の死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE並びにPAPを含む、本明細書で開示する任意のそのような疾患及び状態を、そのような記述の文脈と矛盾しない限り包含する。

10

## 【0045】

疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターする本発明の方法は、そのようなものを有するとまだ診断されていない(例えば予防的スクリーニング)か、又はそのようなものを有すると診断されているか、又はそのようなものを有する疑いがある(例えば1以上の特徴的症状を提示する)か、又はそのようなものを発症するリスクにある(例えば遺伝的素因; 1以上の発生的、環境的又は行動的危険因子)個体において用いることができる。方法は、疾患又は状態の様々な進行段階又は重症度を検出するために用いることもできる。方法は、予防的若しくは治療的処置又はその他の介入に対する疾患又は状態の応答を検出するために用いることもできる。方法は、更に、疾患又は状態からの患者の悪化、現状維持、部分的回復若しくは完全回復を決定し、更なる処置若しくは観察又は医療センターからの患者の退院のいずれかをもたらすことについて医師を助けるために用いることができる。

20

## 【0046】

疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするための本明細書に記載するいずれの1つの方法も、集団スクリーニングのために採用できる(例えば、一般集団又は1以上の基準、例えば年齢、性別、家系、職業、AHFの危険因子の有無などに基づいて階層化された集団におけるスクリーニング)。いずれの1つの方法においても、対象者は、呼吸困難の症状を示す患者集団の一部を形成し得る。

## 【0047】

糖尿病及び高血圧症は、腎機能不全、より具体的には(慢性)腎臓不全を発生する主要な危険因子を表す。よって、本発明の診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、このような患者及び患者集団、すなわち糖尿病及び/又は高血圧症を有するか又は有するリスクにある対象者において(例えばスクリーニング設定において)好ましく採用できる。

30

## 【0048】

本発明の方法は、患者の試料中のパルカンのレベルを測定することにより、医師が疾患の進行をモニターすることを可能にする。例えば、以前の(例えばEDへの入院時の)パルカンレベルと比較してパルカンレベルが減少していることは、対象者における疾患又は状態が改善しつつあるか又は改善したことを示し、以前の(例えばEDへの入院時の)パルカンレベルと比較してパルカンレベルが増加していることは、対象者における疾患又は状態が悪化したか又は悪化しつつあることを示す。このような悪化は、疾患又は状態の再発をもたらす可能性がある。

40

## 【0049】

本開示の観点では、

- マーカー(バイオマーカー)としてのパルカンの使用;
- 本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態についてのマーカー(バイオマーカー)としてのパルカンの使用;
- 診断、予知、予後及び/又はモニタリングのためのパルカンの使用;
- 本明細書で教示するいずれか1つの疾患又は状態の診断、予知、予後及び/又はモニタ

50

リングのためのパールカンの使用；

も提供され、ここで、特に、上記の状態又は疾患は、腎機能不全、腎不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者の死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE並びにPAPから選択できる。

【0050】

本発明の予知、診断、予後及び/又はモニタリング方法において、パールカンの測定は、それぞれの疾患及び状態と関連する1以上の更なるバイオマーカー又は臨床パラメータの評価と組み合わせることもできる。

よって、検査段階が、対象者からの試料中の1以上のそのようなその他のマーカーの有無及び/又は量を測定することを更に含む方法も本明細書において開示される。この点で、任意の既知又はまだ知られていない適切なマーカーを用いることができる。

10

【0051】

本明細書を通して、「パールカン以外の」バイオマーカー又は「他のバイオマーカー」についての言及は、一般には、本明細書に開示する疾患及び状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするために有用なそのような他のバイオマーカーを包含する。例えば、限定することなく、腎機能不全の評価において有用なバイオマーカーは、クレアチニン(すなわち血清クレアチンクリアランス)、シスタチンC及び好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、ベータ-トレスタンパク質、腎臓損傷分子(kidney injury molecule 1; KIM-1)、インターロイキン-18(IL-18)及びLTBP2を含む。本開示において有用な更なるバイオマーカーは、なかでも、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、プロB型ナトリウム利尿ペプチド(proBNP)、アミノ末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド(NTproBNP)及びC反応性ペプチド並びにこれらのいずれかのフラグメント又は前駆体を含む。

20

【0052】

よって、(i)対象者からの試料中のパールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定するステップと、(ii)(i)の測定を用いて、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の対象者プロフィールを確立するステップと、(iii)(ii)の上記の対象者プロフィールを、本発明による状態、症状及び/若しくはパラメータ値の既知の予知、診断並びに/又は予後を表す、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の参照プロフィールと比較するステップと、(iv)参照プロフィールからの(ii)の対象者プロフィールの逸脱又は逸脱無しを見出すステップと、(v)逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者におけるそれぞれの疾患若しくは状態の具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させるステップとを含む、対象者における本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断及び/又は予後予測する方法が開示される。

30

【0053】

上記の方法を2以上の逐次的な時点で用いることにより、所望の疾患又は状態のモニタリングが可能になる。

【0054】

本発明の方法は、パールカンの量の参照値を用いることができ、これは、他のバイオマーカーのために以前に採用された既知の手順に従って確立できる。このような参照値は、本明細書で規定する本発明の方法内(すなわちそのステップを構成する)又は方法外(すなわちそのステップを構成しない)で確立できる。よって、本明細書で教示する任意の1つの方法は、パールカンの量の参照値を確立するステップであって、上記の参照値が、(a)本明細書で教示する疾患の非存在の予知若しくは診断又はその良好な予後、或いは(b)本明細書で教示する疾患又は状態の予知又は診断又はその不良な予後のいずれかを表すステップも含み得る。

40

【0055】

更なる態様は、パールカンの量の参照値を確立する方法であって、上記の参照値が、(a)本明細書で教示する疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断又はその良好な予後、或いは

50

(b)本明細書で教示する疾患若しくは状態の予知若しくは診断又はその不良な予後を表し、

(i)パールカンの量を、

(i a)それぞれの疾患若しくは状態を有していないか又は有するリスクにないか又はそれらについての良好な予後を有する1以上の対象者からの1以上の試料、

(i b)それぞれの疾患若しくは状態を有しているか又は有するリスクにあるか又はそれらについての不良な予後を有する1以上の対象者からの1以上の試料

において測定することと、

(ii)

(ii a)(i a)において測定されたパールカンの量を、それぞれの疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照値として、或いは

(ii b)(i b)において測定されたパールカンの量を、それぞれの疾患若しくは状態の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照値として保存することを含む方法を提供する。

【0056】

本発明の方法は、そうでなければ、パールカンの量並びに1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての参照プロフィールを用いることができ、これは、他のバイオマーカーについて以前に用いられた既知の手順に従って確立できる。このような参照プロフィールは、本発明の方法内(すなわちそのステップを構成する)又は方法外(すなわちそのステップを構成しない)で確立できる。よって、本明細書で教示する方法は、パールカンの量並びに1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての参照プロフィールを確立するステップであって、上記の参照プロフィールが、(a)本明細書で教示する疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断又はその良好な予後、或いは(b)本明細書で教示する疾患若しくは状態の予知若しくは診断又はその不良な予後のいずれかを表すステップも含み得る。

【0057】

更なる態様は、パールカンの量並びに本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするために有用な1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量についての参照プロフィールを確立する方法であって、

上記の参照プロフィールが、

(a)それぞれの疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断又はそれらについての良好な予後、或いは

(b)それぞれの疾患若しくは状態の予知若しくは診断又はそれらについての不良な予後を表し、

(i)パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を、

(i a)それぞれの疾患若しくは状態を有していないか若しくは有するリスクにないか又はそれらについての良好な予後を有する1以上の対象者からの1以上の試料、或いは

(i b)それぞれの疾患若しくは状態を有しているか又は有するリスクにあるか又はそれらについての不良な予後を有する1以上の対象者からの1以上の試料

において測定することと、

(ii)

(ii a)(i a)の測定を用いて、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量のプロフィールを創出するか、或いは

(ii b)(i b)の測定を用いて、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量のプロフィールを創出することと、

(iii)

(iii a)(ii a)のプロフィールを、それぞれの疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照プロフィールとして保存するか、或いは

10

20

30

40

50

(iii b)(ii b)のプロフィールを、それぞれの疾患若しくは状態の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照プロフィールとして保存することを含む方法を提供する。

【0058】

(i)本明細書で教示する疾患にも状態にも罹患していない対象者からの異なる時点での試料中のパールカンの量を測定することと、(ii)上記の対象者のパールカンベースライン又は参照値である対象者の範囲又は平均値を算出することを含む、対象者におけるパールカンベースライン又は参照値を確立する方法が更に提供される。

好ましくは、本発明の方法のいずれかにおいて意図する対象者は、ヒトであり得る。

【0059】

パールカンの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量は、当該技術において知られるような任意の適切な技術により測定できる。例えば、パールカンの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量は、それぞれ、パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる結合物質、並びに上記の1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合できる結合物質を用いて測定できる。例えば、結合物質は、抗体、アプタマー、フォトアプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物又は小分子であり得る。例えば、パールカンの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量は、イムノアッセイ技術若しくは質量分析法若しくはクロマトグラフィー法又は上記の方法の組み合わせを用いて測定できる。

【0060】

(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定する手段と、場合によって、好ましくは、(ii)パールカンの量の参照値又は上記の参照値を確立するための手段とを含み、上記の参照値が、それぞれの疾患又は状態の既知の予知、診断及び/又は予後を表す、対象者における本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするためのキットが更に開示される。よって、キットは、手段(i)により、対象者からの試料中のパールカンの量を測定すること、手段(i)により測定されたパールカンの量を、(ii)の参照値又は手段(ii)により確立された参照値と比較すること、(ii)の参照値からの手段(i)により測定されたパールカンの量の逸脱又は逸脱無しを見出すこと、並びにその結果、逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者におけるそれぞれの疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させることを可能にする。

【0061】

更なる実施形態は、(i)対象者からの試料中のパールカンの量を測定する手段と、(ii)対象者からの試料中の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定する手段と、場合によって、好ましくは、(iii)パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の対象者プロフィールを確立するための手段と、場合によって、好ましくは、(iv)パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の参照プロフィール、或いは上記の参照プロフィールを確立するための手段とを含み、上記の参照プロフィールが、本発明による状態、症状及び/又はパラメータ値の既知の予知、診断及び/又は予後を表す、対象者における本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするためのキットを提供する。よって、このようなキットは、それぞれ手段(i)及び(ii)により、対象者からの試料中のパールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定すること、上記の測定に基づいて、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の対象者プロフィール(例えばキットに含まれる手段を用いて又は適切な外的手段を用いて)を確立すること、対象者プロフィールを、(iv)の参照プロフィール又は手段(iv)により確立された参照プロフィールと比較すること、上記の参照プロフィールからの上記の対象者プロフィールの逸脱又は逸脱無しを見出すこと、並びにその結果、逸脱又は逸脱無しの上記の知見を、対象者におけるそれぞれの疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後に帰属させることを可能にする。

【0062】

10

20

30

40

50

本発明のキットにおけるパールカンの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定するための手段は、それぞれ、パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる1以上の結合物質、並びに上記の1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合できる1以上の結合物質を含むことができる。例えば、上記の1以上の結合物質のいずれか1つは、抗体、アプタマー、フォトアプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物又は小分子であり得る。例えば、上記の1以上の結合物質のいずれかは、有利には、固相又は支持体に固定化できる。本発明のキットにおけるパールカンの量並びに/或いは1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量を測定するための手段は、イムノアッセイ技術若しくは質量分析法若しくはクロマトグラフィー法又は上記の方法の組み合わせを用いることができる。

10

**【0063】**

よって、(a)パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる1以上の結合物質と、(b)好ましくは、既知量又は既知濃度のパールカン及び/又はそのフラグメント(例えば対照、標準物質及び/又は校正物質として用いるため)と、(c)好ましくは、パールカンの量の参照値、又は上記の参照値を確立するための手段とを含む、本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするためのキットも開示される。上記成分(a)及び/又は(c)は、本明細書の他の場所で教示するように、適切に標識できる。

**【0064】**

(a)パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる1以上の結合物質と、(b)1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合できる1以上の結合物質と、(c)好ましくは、既知量又は既知濃度のパールカン及び/又はそのフラグメント並びに既知量又は既知濃度の上記の1以上の他のバイオマーカー(例えば対照、標準物質及び/又は校正物質として用いるため)と、(d)好ましくは、パールカンの量並びに上記の1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の参照プロフィール、或いは上記の参照プロフィールを確立するための手段とを含む、本明細書で教示する疾患又は状態を予知、診断及び/又は予後予測するためのキットも開示される。上記成分(a)、(b)及び/又は(c)は、本明細書の他の場所で教示するように、適切に標識できる。

20

**【0065】**

本明細書で教示する疾患又は状態を診断、予知、予後予測及び/又はモニターするための本明細書に記載するキットの使用が更に開示される。

30

**【0066】**

パールカン及び場合によって本発明が関係する1以上の他のバイオマーカーを測定するために有用な試薬及びツールも開示される。

よって、(a)パールカン及び/又はそのフラグメント、好ましくは既知量又は既知濃度の上記のパールカン及び/又はそのフラグメントと、(b)場合によって、好ましくは、1以上の他のバイオマーカー、好ましくは既知量又は既知濃度の上記の1以上のバイオマーカーとを含むタンパク質、ポリペプチド又はペプチドアレイ又はマイクロアレイが開示される。

**【0067】**

(a)パールカン及び/又はそのフラグメントに特異的に結合できる1以上の結合物質、好ましくは既知量又は既知濃度の上記の結合物質と、(b)場合によって、好ましくは、1以上の他のバイオマーカーに特異的に結合できる1以上の結合物質、好ましくは既知量又は既知濃度の上記の結合物質とを含む結合物質アレイ又はマイクロアレイも開示される。

40

ポータブルデバイス、例えばベッドサイドデバイスとして構成された、家庭又は臨床的状况で用いるための本明細書で教示するキットも開示される。

**【0068】**

関連する態様は、よって、(i)対象者から試料を得る手段と、(ii)上記の試料中のパールカンの量を測定する手段と、(iii)試料中の測定されたパールカンの量を視覚化する手段とを含む、対象者からの試料中のパールカンの量を測定できるポータブル検査デバイス

50

を提供する。

ある実施形態において、(ii)及び(iii)の部分の手段は、同じであってよく、よって、(i)対象者から試料を得る手段と、(ii)上記の試料中のパールカンの量を測定し、試料中の測定されたパールカンの量を視覚化する手段とを含む、対象者からの試料中のパールカンの量を測定できるポータブル検査デバイスを提供する。

【0069】

ある実施形態において、上記の視覚化手段は、試料中のパールカンの量が、ある閾値レベルを超えるか若しくはそれ未満であるか、及び/又は試料中のパールカンの量が、パールカンの量の参照値から逸脱するか否か(該参照値は、本明細書で教示する疾患又は状態の既知の予知、診断及び/又は予後を表す)を示すことができる。よって、ポータブル検査デバイスは、上記の参照値又は参照値を確立するための手段も適切に含むことができる。

10

【0070】

ある実施形態において、閾値レベルは、上記の閾値レベルを超える試料中のパールカンの量が、対象者がそれぞれの疾患若しくは状態を有するか若しくは有するリスクにあることを示すか又は対象者におけるそれらについての不良な予後を示し、上記の閾値レベル未満の試料中のパールカンの量が、対象者が本明細書で教示する疾患も状態も有さないか若しくは有するリスクにないことを示すか又は対象者におけるそれらについての良好な予後を示すように選択される。

【0071】

ある実施形態において、ポータブル検査デバイスは、本明細書で教示する疾患若しくは状態の非存在の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての良好な予後を表す参照値を含むか、或いは上記の参照値を確立するための手段を含み、上記の参照値と比較して上昇した対象者からの試料中のパールカンの量は、対象者がそれぞれの疾患若しくは状態を有しているか又は有するリスクにあることを示すか、或いは対象者におけるそれらについての不良な予後を示す。別の実施形態において、ポータブル検査デバイスは、本明細書で教示する疾患若しくは状態の予知若しくは診断を表すか又はそれらについての不良な予後を表す参照値を含むか、或いは上記の参照値を確立するための手段を含み、上記の参照値と比較して同等の対象者からの試料中のパールカンの量は、対象者がそれぞれの疾患若しくは状態を有しているか若しくは有するリスクにあることを示すか、又は対象者におけるそれらについての不良な予後を示す。

20

30

【0072】

更なる実施形態において、ポータブル検査デバイスの測定(及び場合によって視覚化)手段は、近位及び遠位端を有する固体支持体であって、近位端の近傍の試料適用領域と、試料適用領域に対して遠位の反応領域と、反応領域に対して遠位の検出領域と、場合によって、パールカントンパク質又はペプチドフラグメントを含む対照標準とを含み、それにより、上記の支持体が、適用領域に適用された流体試料の近位端から遠位端への方向のフローを駆動するキャピラリー特性を有し、場合によって、より粘性の試料のキャピラリーフローを改善する流体源を含む固体支持体を含み得る。

【0073】

反応領域は、検出物質とコンジュゲートしたパールカン特異的結合分子の1以上のバンドを含むことができ、該パールカン特異的結合分子コンジュゲートは、それが流体のキャピラリーフローとともに移動できるように固体支持体上に配置されており、検出領域は、固体支持体上に固定化されたパールカン特異的分子の集団を含む1以上の捕捉バンドを含む。

40

反応領域は、捕捉パールカン特異的結合分子の1以上のバンドを、閾値量のパールカン特異的結合分子コンジュゲートが検出領域に移動することを妨げるのに十分な量で更を含むことができる。代わりに、上記のデバイスは、捕捉されたパールカン特異的結合分子コンジュゲートを閾値と比較するための手段を更を含む。

【0074】

その他の態様は、パールカンが、特に、しかし限定することなく、腎機能不全、腎不全

50

と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者の死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE並びにPAPを含む本明細書で教示する疾患及び状態における治療的及び/又は予防的介入のための価値のある標的であり得ることを実現することに関する。

【 0 0 7 5 】

よって、以下のいずれか 1 つ及び全ても本明細書において開示される。

(1) 医薬品として用いるため、好ましくは本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置において用いるための、パールカンのレベル及び/又は活性を調節できる物質；

(2) 本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置のための医薬品の製造のための、パールカンのレベル及び/又は活性を調節できる物質の使用、或いは本明細書で教示する  
10  
いずれかの疾患又は状態の処置のための、パールカンのレベル及び/又は活性を調節できる物質の使用；

(3) 対象者に、治療又は予防有効量のパールカンのレベル及び/又は活性を調節できる物質を投与することを含む、処置を必要とする対象者における本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態を処置するための方法；

(4) 上記の物質が、パールカンのレベル及び/又は活性を低減又は増加させることができ、好ましくはパールカンのレベル及び/又は活性を低減させることができる、上記の(1)～(3)  
のいずれか 1 つに記載の主題。

(5) 上記の物質がパールカンに特異的に結合できる、上記の(1)～(4)のいずれか 1 つに記載の主題。  
20

(6) 上記の物質が、抗体又はそのフラグメント若しくは誘導体、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣物、アプタマー、フォトアプタマー又は化学物質、好ましくは有機分子、より好ましくは有機小分子である、上記の(1)～(5)のいずれか 1 つに記載の主題。

(7) 上記の物質が、パールカンの発現を低減又は阻害でき、好ましくは、上記の物質が、アンチセンス物質、リボザイム、又はRNA干渉を引き起こすことができる物質である、上記の(1)～(4)のいずれか 1 つに記載の主題。

(8) 上記の物質が、パールカンのレベル及び/又は活性を低減又は阻害でき、好ましくは、上記の物質が、天然パールカンに対してドミナントネガティブ活性を有するパールカンポリペプチドの組換え又は単離の欠失構築物である、上記の(1)～(4)のいずれか 1 つに記載の主題。  
30

(9) 試験物質の群から、本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置に有用な可能性がある候補物質を選択するためのアッセイであって、試験物質が、パールカンのレベル及び/又は活性を調節できる、例えば増加又は低減、好ましくは低減できるかを決定することを含むアッセイ。

(10) 非ヒト動物モデル、好ましくは非ヒト哺乳動物モデルに投与して、該モデルにおける本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の予防及び/又は治療効果をモニターするための組成物を調製するために、選択された候補物質を用いることを更に含む、上記の(9)に記載のアッセイ。

(11) 上記の(10)に記載のアッセイにより単離された物質。

(12) 予防及び/又は治療有効量の上記の(1)～(8)又は(10)のいずれかに記載の 1 以上の物質、又は医薬的に許容されるその N オキシド形、付加塩、プロドラッグ若しくは溶媒和物を含み、1 以上の医薬的に許容される担体を更に含む医薬組成物又は製剤。  
40

(13) 上記の 1 以上の物質を、上記の 1 以上の医薬的に許容される担体と混和することを含む、上記の(12)に記載の医薬組成物又は製剤を製造するための方法。

【 0 0 7 6 】

上記の(1)～(13)のいずれか 1 つに記載の上記の状態又は疾患は、特に、腎機能不全、腎不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者の死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE並びにPAPから選択できる。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

50

よって、(a) 1 以上、好ましくは複数の試験パールカン結合物質を準備することと、(b) (a)の試験パールカン結合物質から、パールカンに結合するものを選択することと、(c)(b)で選択された試験パールカン結合物質から、任意の 1 以上の他の意図しない又は所望でない標的に結合するものを対抗選択する(すなわち除去する)こととを含む、パールカンに特異的に結合できる物質(例えば遺伝子又はタンパク質)を選択する方法(スクリーニングアッセイ)も企図される。

代わりに、パールカン分子又はそのフラグメントのプロセッシングを担う分子の阻害剤、例えばカテプシン L 酵素(これは、パールカンのエンドレペリンフラグメントから LG3 フラグメントを切断することが示されている)を構想できる。いくつかの CathL 阻害剤は、市販で入手可能である。非限定的な例は、ZFF-FMK (Calbiochem) 及び ZFA-FMK (MP Biomedicals) であり、これらは、不可逆的細胞透過性 CathL 阻害剤である。

10

#### 【0078】

試験パールカン結合物質とパールカンとの間の結合は、上記のパールカンと試験パールカン結合物質と、このような結合を導くに一般的な条件下で接触させる(すなわち組み合わせるか、曝露するか又はインキュベートすることにより有利に試験できる。例えば、限定することなく、試験パールカン結合物質とパールカンとの間の結合は、インビトロで適切に試験できるか、或いはパールカンを含み、試験パールカン結合物質に曝露されるか又は試験パールカン結合物質を発現するように構成された宿主細胞又は宿主生物において試験できる。

#### 【0079】

限定されないが、パールカン結合物質又はパールカン調節物質は、インビトロ、細胞、器官及び/又は生物において、パールカンに結合できるか又はパールカンの活性及び/若しくはレベルを調節できる。

20

#### 【0080】

上記の(9)及び(10)のいずれか 1 つに記載のスクリーニングアッセイにおいて、試験パールカン調節物質によるパールカンの活性及び/又はレベルの調節は、上記のパールカン(例えば遺伝子又はタンパク質)を、試験パールカン調節物質と、そのような調節を導く一般的な条件下で接触させる(すなわち組み合わせるか、曝露するか又はインキュベートすることにより有利に試験できる。例えば、限定することなく、パールカンの活性及び/又はレベルの調節が、パールカンへのパールカン調節物質の結合に起因する場合、上記の条件は、そのような結合を一般的に導き得る。例えば、限定することなく、試験パールカン調節物質によるパールカンの活性及び/又はレベルの調節は、インビトロで適切に試験できるか、或いは LPBT2 を含み、試験パールカン結合物質に曝露されるか又は試験パールカン結合物質を発現するように構成された宿主細胞又は宿主生物において試験できる。

30

#### 【0081】

以下：

- 好ましくは本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置において用いる、医薬品として用いるためのパールカン；
  - 本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置のための医薬品の製造のためのパールカンの使用；
  - 本明細書で教示するいずれかの疾患又は状態の処置のためのパールカンの使用；
  - 対象者に、治療又は予防有効量のパールカンを投与することを含む、処置を必要とする対象者における本明細書で教示するいずれか疾患又は状態を処置する方法；
- も企図され、ここで、特に、上記の状態又は疾患は、腎機能不全、腎不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者の死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE並びに PAP から選択できる。

40

#### 【0082】

これらの及び更なる態様及び好ましい実施形態は、以下の項及び添付の特許請求の範囲に記載される。

#### 【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 0 8 3 】

【図 1】全長パールカン(配列番号 1)の配列を示す。下線部はエンドレペリンドメイン(配列番号 2)を示し、太字の下線部はLG-3ドメイン(配列番号 3)を示す。MASSterclass(商標)又はMASStermind(商標)技術により検出されるペプチドには、二重下線を付す(それぞれ配列番号 4 及び 5)。

【図 2】154名全ての患者における、パールカンレベルと推定糸球体濾過速度(eGFR)及びシスタチン C レベルとの相関を示す。

【図 3】eGFRが低下した患者(ここでは  $< 60 \text{ ml/分/1.73m}^2$ )を正常eGFRの患者から区別することにおいて、パールカンがシスタチン C と同等の性能を示すことを示す。パールカン(薄い灰色)と比較したシスタチン C (濃い灰色)の受信者動作特性曲線。算出した曲線下面積(AUC)の中央値及び95%信頼区間は、シスタチン C について0.94(0.90~0.96)及びパールカンについて0.91(0.83~0.97)である。

10

【図 4】低下した( $< 60$ )及び正常( $> 90$ )及び中間( $60 \sim 90$ )のeGFRの患者におけるパールカンについての箱ひげプロットを示す。

【図 5】種々の腎不全マーカーのレベルと相関する、Basel Vコホートの1年死亡予知のグラフを示す。このグラフから、パールカンが、BNP、NT-pro-BNP及びシスタチン C マーカーと同様の様式で死亡と相関することが明確である。

【図 6】クレアチニンに基づく尺度と比較した、腎置換療法の必要性についての予知及び早期診断マーカーとしてのパールカンの性能を示す。このグラフから、パールカンが、クレアチニン及びeGfrよりも良好で早期の予知因子であることが明確である。

20

【図 7 a】MASSterclass定量に用いた、パールカン並びにそれに由来する活性ペプチド、エンドレペリン及びLG3並びに異なるペプチドの模式的概要。更に、配列番号 7 に基づくMASSterclass読出しとeGfrとの相関を示す。

【図 7 b】配列番号 4 及び 6 に基づくMASSterclass読出しとeGfrとの相関を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 8 4 】

本明細書で用いる場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明確にそうでないと示さない限り、単数形及び複数形の両方の言及を含む。

用語「含む(comprising)」、「含み(comprises)」及び「含む(comprised of)」は、本明細書で用いる場合、「含む(including)」、「含み(contains)」又は「含有する(containing)」、「含有し(contains)」と同義であり、包括的又は開放的であり、追加の言及していないメンバー、要素又は方法ステップを排除しない。

30

終点による数値範囲の言及は、それぞれの範囲内に包摂される全ての数値及び画分並びに言及される終点を含む。

## 【 0 0 8 5 】

「約」との用語は、パラメータ、量、時間的な期間などのような測定可能な値に言及する場合に本明細書で用いる場合、特定の値の及び特定の値から、特に特定の値の及び特定の値から $\pm 10\%$ 以下、好ましくは $\pm 5\%$ 以下、より好ましくは $\pm 1\%$ 以下、更により好ましくは $\pm 0.1\%$ 以下の変動(そのような変動を開示する発明において行うことが適当である限り)を包含することを意味する。修飾語「約」が言及する値は、それ自体、具体的及び好ましく開示されることが理解される。

40

## 【 0 0 8 6 】

本明細書で引用する全ての文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

そうでないと記載しない限り、技術的及び科学的用語を含む本発明を開示するために用いる全ての用語は、本発明が属する当該技術の当業者により一般的に理解される意味を有する。更なる手引きにより、本発明の教示をよりよく認識するために用語の定義を含め得る。

## 【 0 0 8 7 】

本発明者らは、パールカンが、特に腎機能(不全)、並びに呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者における死亡について、更に左室肥大、心臓線維症、妊

50

娠高血圧腎症(PE)及び妊娠関連蛋白尿(PAP)についての価値のあるバイオマーカーであることを示す。

【0088】

用語「バイオマーカー」は、当該技術において広く用いられており、対象者におけるその定性的及び/又は定量的評価が、対象者の表現型及び/又は遺伝子型の1以上の側面に関して、例えば所定の疾患又は状態についての対象者の現状に関して予知的であるか又は情報を与える(例えば予知的、診断的及び/又は予後的)生体分子及び/又はその検出可能部分のことを広く示す。

【0089】

「本明細書で教示する疾患及び/又は状態」についての本明細書における言及又は同様の言及は、そのような詳述の文脈に矛盾しない限り、特に、限定されないが、腎機能不全、腎不全と関連するか又はそれを原因とする呼吸困難、呼吸困難及び/又は急性心不全及び/又は腎機能不全の対象者における死亡の増加、左室肥大、心臓線維症、PE、蛋白尿(例えば妊娠関連蛋白尿(PAP)又はメタボリックシンドローム若しくはII型糖尿病と関連する蛋白尿)を含む本明細書で開示する任意のそのような疾患及び状態を包含する。

10

【0090】

腎若しくは腎臓不全又は不全症としても交換可能に知られる腎又は腎臓機能不全は、腎組織の機能が不適切であり、特に腎臓の排泄機能が損なわれる状態(state)、疾患及び状態(condition)を一般的に包含する。

腎機能不全の徴候及び症状は、限定することなく、血中尿素及び/若しくは窒素レベルの増加；正常より低いクレアチンクリアランス及び正常より高い血中クレアチニンレベル；正常より低い遊離水クリアランス；容量負荷及び腫脹；異常な酸レベル；血中カリウム、カルシウム及び/又はホスフェートの正常より高いレベル；排尿の変化(例えば容量、浸透圧)；ミクロアルブミン尿症又はマクロアルブミン尿症；腎臓酵素、例えばガンマグルトamilシンセターゼの活性の変化；疲労；発疹又はそう痒；悪心；呼吸困難；腎臓サイズの減少；血尿並びに貧血の任意の1以上を含み得る。

20

【0091】

従来、腎機能不全は、急性腎若しくは腎臓不全(急性腎又は腎臓疾患又は傷害、例えば急性腎傷害又は「AKI」)又は慢性腎若しくは腎臓不全(慢性腎又は腎臓疾患)として示される主要なクラスを含むと考えられている。急性腎不全における進行は典型的に早い(例えば数日から数週間)が、腎不全は、少なくとも3ヶ月間持続するならば慢性であると伝統的にみなすことができ、その進行は、複数年の範囲で起こり得る。

30

急性腎機能不全又は不全は、以下に示すような「RIFLE」(リスク、傷害、不全、喪失、末期腎疾患(Risk, Injury, Failure, Loss, end-stage renal disease)ステージ分けシステムを用いて5つの異なるステージにステージ分け(分類、階級付け)できる(Lameireら、2005, Lancet 365: 417~430に基づく)。

ステージ	GFR(血清クレアチニンに基づく)基準 GFR=糸球体濾過速度	尿量基準
「リスク」	1.5倍増加した血清クレアチニン	6時間にわたって<0.5ml/kg/h
「傷害」	2.0倍増加した血清クレアチニン	12時間にわたって<0.5ml/kg/h
「不全」	3.0倍増加した血清クレアチニン 又は>44 mM/Lの急性の上昇 があった場合にクレアチニン>355 mM/L	24時間にわたって<0.3ml/kg/h 又は12時間にわたって無尿
「喪失」	4週間を超える持続性の急性腎不全	----
「末期」	3ヶ月を超える末期腎疾患	---

40

【0092】

慢性腎機能不全又は不全は、以下に示すGFRに基づいてステージ分け(分類、階級付け)できる(Leveyら、2005, Kidney Int 67: 2089~2100に基づく)。

ステージ1 : GFR 90ml/分(正常又は上昇したGFR)

ステージ2 : GFR = 60~89ml/分(軽度のGFR低下)

50

ステージ 3 : GFR = 30 ~ 59ml / 分 (中程度のGFR低下)

ステージ 4 : GFR = 15 ~ 29ml / 分 (重度のGFR低下)

ステージ 5 : GFR < 15ml / 分 (腎不全)

【 0 0 9 3 】

腎不全の異なる段階の同様又は同等の分類をもたらす腎不全についてのその他のステージ分けの方法を本明細書において用いることができる。

【 0 0 9 4 】

本発明の診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、対象者が、急性若しくは慢性腎不全を有するか又は有するリスクにあることを決定すること、例えば特に対象者における急性又は慢性腎不全の上記の又は同等のステージのいずれか 1 つを決定することを可能にし、及び/又は対象者において上記のステージ間を区別することを可能にする。

10

【 0 0 9 5 】

急性の腎臓劣化の原因は、腎前性、腎後性及び/又は腎臓内であり得る。腎前性の原因は、腎臓への十分な血液供給の欠如(すなわち腎低灌流)(これは、次いで、なかでも出血、大量失血、うっ血性心不全、非代償性肝硬変(出血、腹水症のような合併症を伴う肝硬変)を原因とすることがある)、腎臓血管損傷、敗血症又は感染による全身炎症を含む。外科的又は手術による処置を受けた患者は、時折、急性腎傷害(AKI)に罹患し、腎臓の機能の一次的な喪失又は低下をもたらす。腎後性の原因は、蓄尿系又は腎臓外ドレナージの妨害(すなわち閉塞性尿路疾患)(これは、次いで、なかでも膀胱を空にする正常な機能を妨げる薬物療法、前立腺疾患、腎結石、腹部悪性病変(例えば卵巣がん又は結腸直腸がん)又は尿路カテーテルの閉塞を原因とすることがある)を含む。腎臓内の原因は、腎組織破壊性の状態、例えば血管炎、悪性高血圧症、急性糸球体腎炎、急性間質性腎炎及び急性尿管壊死を含む。これらは限定することなく、虚血性事象(例えばヘモグロビン尿症、ミオグロビン尿症及びミオローマ(myoloma))、又は腎毒性物質(例えば抗生物質、放射性造影剤、尿酸、オキサレート及び薬物誘発性腎毒性)を原因とすることができる。上記の状態、状態若しくは疾患を有するか又は有するリスクにある対象者は、急性腎不全を有しているか、又は発症するリスクにあることがある。よって、本発明の診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、このような患者において用いることができる。

20

【 0 0 9 6 】

慢性の腎臓劣化の原因は、なかでも血管疾患、例えば両側腎動脈狭窄、虚血性腎症、溶血性尿毒症症候群及び血管炎、更には巣状分節性腎硬化症、糸球体硬化症、糸球体腎炎、IgA腎炎、糖尿病性腎症、ループス腎炎、多発性嚢胞腎、慢性尿細管間質性腎炎(例えば薬物及び/又は毒素誘発性)、腎線維症、腎結石及び前立腺疾患を含み得る。上記の状態、状態若しくは疾患を有しているか又は有するリスクにある対象者は、慢性腎不全を有しているか又は発症するリスクにあることがある。本質的には対象者の尿中のタンパク質の異常な存在である蛋白尿は、腎機能不全の徴候であり得、多くの障害、例えばネフローゼ症候群、腎症、糸球体疾患、例えば膜性糸球体腎炎、巣状分節性糸球体腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群(リポイドネフローゼ)、子癇又は妊娠高血圧腎症(PE)及び妊娠関連蛋白尿(PAP)、II型糖尿病などで生じる。II型糖尿病は、肥満/メタボリックシンドロームの患者において発症する。これらの患者は、典型的には、糸球体傷害(炎症、高血圧症、代謝変化など)を発症して、GFRの低下及び蛋白尿になる。GFRの低下の前に、過剰濾過段階があることが、これらの患者について非常に典型的である。

30

40

【 0 0 9 7 】

術後の患者は、急性腎傷害(AKI)として最も明白な腎臓に関連する問題を発生しやすい。更に、これらの患者のかなりのパーセンテージが、手術の後日に、血液透析又は腎置換療法(RRT)を必要とし、これは、腎臓機能の回復を待つ間に溶質クリアランス及び流体バランスを達成する。RRTを適時に設定することは、このゴールを達成するための基本である。支持療法が適時に開始されない場合、腎臓は永続的な傷害に罹患し、完全に回復しないことがある。RRTについての現在の適応症は、従来処置に対して非応答性の、持続性高カリウム血症、重症アシドーシス及び循環血液量過多症を含む。早期のRRTは、臨床上

50

の指標とは関係なく、窒素含有廃棄生成物がある任意の予め定義された「臨界」血液値に到達する前に透析療法を開始することを記載するために用いられる。メタアナリシスは、RRTの早期の設定が、AKIの患者における転帰の改善(すなわち死亡の減少)と関連し得ることを示す(Seabraら, 2008; American Journal of Kidney diseases; Vol 52 (2), 272~284)。明らかに、伝統的なクレアチニン又は尿素に基づく時点の前に患者に対してRRTを行う場合、生存は改善される。クレアチニン又は尿素レベルがRRTの開始を決定するために現在用いられているが、早期のRRT介入について良好な基準は現在ない。早期のRRTの開始の必要性についての客観的で早期の尺度はなく、早期のRRTから利益を受ける患者を特異的に同定できるバイオマーカーは、是認される。

#### 【0098】

本発明は、患者がRRTを必要とするかについて早期に確立するための新しいバイオマーカー、すなわちパールカン、特にそのエンドレペリン領域、より具体的にはそのLG3領域を提供する。

よって、本発明の診断、予知、予後及び/又はモニタリング方法は、好ましくは、上に列挙する型の患者において好ましく用いることができる。

#### 【0099】

呼吸困難(呼吸困難(dyspnoea)又は息切れ)は、それ自体知られており、特に、不快で苦痛な呼吸感覚として対象者が経験する一般的で困難な症状であり、これは、より具体的には「変動する強度の、質的に独特の感覚からなる呼吸の不快感の主観的経験」と定義できる。呼吸困難は、一連の根本的病変につながることもある。

#### 【0100】

用語「心不全」、「急性心不全」及び「慢性心不全」は、本明細書で用いる場合、それらのそれぞれの当該技術において確立された意味を有する。更なる手引きのために、用語「心不全」は、本明細書で用いる場合、損なわれた拡張期又は収縮期血流量、よって心室から末梢臓器への不十分な血流を特徴とする病的状態のことを広くいう。

#### 【0101】

「急性心不全」又は「急性非代償性心不全」は、異常心機能の後の症状及び徴候の迅速な開始(緊急の治療の必要性をもたらす)として定義できる。AHFは、それ自体、新規の急性(以前に心機能不全を有することが知られていない患者における急性心不全の新しい発症)又はCHFの急性代償不全を表し得る。

心機能不全は、収縮期又は拡張期の機能不全、心臓律動の異常又は前負荷及び後負荷不整合と関連することがある。これは、頻りに致命的であり、緊急の処置を必要とする。確立された分類によると、AHFは、それを示す患者のいくつかの独特の臨床的状态を含む:(I)急性非代償性うっ血性心不全、(II)高血圧症/高血圧緊急症を伴うAHF、(III)肺浮腫を伴うAHF、(IVa)心原性ショック/低心拍出症候群、(IVb)重症心原性ショック、(V)高心拍出量性心不全及び(VI)急性右心不全。詳細な臨床的説明、AHFの分類及び診断並びにKillip分類、Forrester分類及び「臨床的重症度」分類を含む更なるAHF分類システムのまとめについて、なかでも、Niemenenら、2005(「Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology.」Eur Heart J 26: 384~416)及びその中の参考文献を参照されたい。

#### 【0102】

用語「慢性心不全」(CHF)は、一般的に、様々な補償的機構が疾患を平衡にするように働くほどゆっくりと進行する心不全の症例のことをいう。CHFの一般的な臨床症状は、なかでも、息切れ、運動能力の減衰、疲労、嗜眠及び末梢浮腫の任意の1以上を含む。他のより一般的でない症状は、動悸、記憶又は睡眠妨害及び混乱の任意の1以上を含み、通常、上記の一般的な症状の1以上と同時に生じる。

#### 【0103】

左室肥大(LVH)は、全般的に、心臓の左心室の心筋の肥厚を包含する。LVHは、後負荷を増加させる心血管疾患(例えば大動脈弁狭窄症又は大動脈弁閉鎖不全症)又は高血圧に対す

10

20

30

40

50

る病的反応を代表し得る。LVHは、原発性肥大型心筋症も表し得る。LVH診断は、なかでも、それ自体既知の基準、例えばSokolow-Lyonインデックス、Cornell電圧基準、Romhilt-Estesポイントスコアシステム又はその他の電圧に基づく基準を用いる心エコーを用いて行うことができる。

【0104】

心臓線維症は、一般的に、心臓線維芽細胞の不適切な増殖と、それに伴う基質タンパク質の過剰な生成とによる、心臓弁の異常な肥厚を包含する。

【0105】

「妊娠高血圧腎症」(PE又は子癇前症)により、蛋白尿若しくは浮腫又はその両方を伴う高血圧症、糸球体機能不全、脳浮腫、肝浮腫、或いは妊娠又は最近の妊娠の影響による凝固異常及び該障害に関連する全ての合併症を特徴とする多機能障害を意味する。子癇前症は、一般的に、妊娠20週目以降に生じる。子癇前症は、一般的に、以下の症状のある組み合わせとして定義される：

- (1) 妊娠後20週目に収縮期血圧(BP) > 140mmHg及び拡張期BP > 90mmHg(一般的に、4 ~ 168時間離れた2回の機会に測定される)、
- (2) 蛋白尿の新しい発症(検尿のディップスティックで1+、24時間蓄尿中で > 300mgのタンパク質又はタンパク質/クレアチニン比 > 0.3を有する1回の無作為の尿試料)、及び
- (3) 分娩後12週目までの高血圧症及び蛋白尿の消散。

【0106】

重症子癇前症は、一般的に、(1) 拡張期BP > 110 mmHg (一般的に、4 ~ 168時間離れた2回の機会に測定される)又は(2) 24時間蓄尿中で3.5 g以上のタンパク質の測定又はディップスティックにより少なくとも3+のタンパク質を含む2回の無作為の尿検体を特徴とする蛋白尿と定義される。子癇前症において、高血圧症及び蛋白尿は、一般的に、互いに7日以内に生じる。重症子癇前症において、重症高血圧症、重症蛋白尿及びHELLP症候群(溶血、肝臓酵素の上昇、低血小板)又は子癇は、同時又は一度に1つの症状のみが生じることがある。時折、重症子癇前症は、てんかんの発症を導くことがある。この重症形の症候群は、「子癇」とよばれる。子癇は、肝臓(例えば肝細胞損傷、門脈周囲壊死)及び中枢神経系(例えば大脳浮腫及び脳出血)のようないくつかの器官又は組織への機能不全又は損傷も含み得る。てんかんの病因は、大脳浮腫及び腎臓の小血管の巣状けいれんの発生に対して続発性であると考えられる。妊娠高血圧腎症は、胎児合併症、例えば子宮内胎児発育遅延(IUGR)及び胎内発育遅延(SGA)と関連する。「胎内発育遅延(SGA)」は、世界保健機構(WHO)により定義されるように(Zhang及びBowes 1995, Obstet Gynecol 86: 200 ~ 208)、2,500 gm未満の出生体重であるか、又は米国の、人種、出産経歴及び乳児性別による妊娠期間に関する出生体重表に従って、妊娠期間について第10百分位数未満である胎児を意味する。

【0107】

用語「予知する」又は「予知」、「診断する」又は「診断」及び「予後予測する」又は「予後」は、医療及び臨床のプラクティスにおいてありふれておりよく理解されている。所定の疾患又は状態を「予知、診断及び/又は予後予測する方法」との句は、上記の疾患若しくは状態の「予知、診断及び/又は予後の方法」又は上記の疾患若しくは状態の「予知、診断及び/又は予後を行う(又は決定する若しくは確立する)方法」などの句と交換可能に用いることもできることが理解される。

【0108】

更なる説明によりそして限定することなく、「予知する」又は「予知」は、一般的に、疾患又は状態を(まだ)有していない対象者における該疾患又は状態の事前の宣言、表示又は予告のことをいう。例えば、対象者における疾患又は状態の予知は、例えばある期間以内又はある年齢までに上記の疾患又は状態を対象者が発生する可能性、見込み又はリスクを示し得る。上記の可能性、見込み又はリスクは、なかでも、絶対値、範囲若しくは統計値として示すことができるか、又は適切な対照対象者又は対象者集団に対して(例えば一般、正常又は健常対象者又は対象者集団に対して)示すことができる。よって、対象者が

10

20

30

40

50

疾患又は状態を発生する可能性、見込み又はリスクは、適切な対照対象者又は対象者集団に対する増加若しくは減少又は倍数増加若しくは倍数減少として有利に示すことができる。本明細書で用いる場合、対象者における本明細書で教示する状態又は疾患の「予知」との用語は、対象者がそのようなものの「陽性」の予知を有する、すなわち対象者がそのようなものを有するリスクにある(例えばリスクが対照対象者又は対象者集団に対して著しく増加している)ことも特に意味し得る。対象者における本明細書で記載する本明細書で教示する疾患又は状態が「ないことの予知」との用語は、対象者がそのようなものの「陰性」の予知を有する、すなわちそのようなものを有する対象者のリスクが、対照対象者又は対象者集団に対して著しく増加していないことを特に意味し得る。

【0109】

用語「診断する」又は「診断」は、一般的に、症状及び徴候並びに/又は様々な診断手順の結果に基づいて(例えば診断される疾患又は状態に特徴的な1以上のバイオマーカーの有無及び/又は量を知ることから)対象者における疾患又は状態について認識、決定又は結論付けるプロセス又は動作のことをいう。本明細書で用いる場合、対象者における本明細書で教示する疾患又は状態の「診断」は、対象者がそのようなものを有していること、すなわち対象者がそのようなものを有していると診断することを特に意味し得る。対象者における本明細書で教示する疾患又は状態が「ないことの診断」は、対象者がそのようなものを有していないこと、すなわち対象者がそのようなものを有していないと診断することを特に意味し得る。対象者は、そのようなものを連想させる1以上の通常症状又は徴候を示すにもかかわらず、そのようなものを有していないと診断されることがある。

【0110】

用語「予後予測する」又は「予後」は、一般的に、疾患又は状態の進行及び回復の見通し(例えば可能性、持続期間及び/又は程度)についての予想のことをいう。

本明細書で教示する疾患又は状態の良好な予後は、一般的に、好ましくは許容可能な期間内での疾患又は状態からの満足のいく部分的又は完全な回復の予想を包含し得る。そのようなものの良好な予後は、より一般的には、好ましくは所定の期間内でのそのようなものの更なる悪化(worsening)又は悪化(aggravating)がないとの予想を包含し得る。

本明細書で教示する疾患又は状態の不良な予後は、一般的に、標準以下の回復及び/又は満足でない遅い回復或いは実質的に回復がないこと又はそのようなものが更に悪化することの予想を包含し得る。

【0111】

本明細書で用いる場合、用語「対象者」又は「患者」は、典型的にヒトのことをいうが、非ヒト動物、好ましくは温血動物、より好ましくは哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどについての言及も包含し得る。

【0112】

用語「試料」又は「生体試料」は、本明細書で用いる場合、対象者から得られた任意の生物学的検体を含む。試料は、限定することなく、全血、血漿、血清、赤血球、白血球(例えば末梢血単核球)、唾液、尿、便(すなわち糞便)、涙、汗、皮脂、乳頭吸引液、管洗浄液、腫瘍浸出液、滑液、脳脊髄液、リンパ、穿刺吸引液、羊水、任意のその他の体液、細胞可溶化物、細胞分泌生成物、炎症液、精液及び腔分泌液を含み得る。好ましい試料は、パールカンタンパク質を検出可能な量で含むものを含み得る。好ましい実施形態において、試料は、全血若しくはその分画成分、例えば血漿、血清又は細胞ペレットであってよい。好ましくは、試料は、対象者から上記の試料を回収又は単離することを可能にする最小限に侵襲性の方法により容易に得ることができる。試料は、組織試料及び生検、組織ホモジネートなども含み得る。好ましくは、パールカンレベルを検出するために用いる試料は、血漿である。これもまた好ましくは、パールカンレベルを検出するために用いる試料は、尿である。用語「血漿」は、細胞を含有しないが、血液細胞(赤血球、白血球、血小板など)が懸濁されており、栄養分、糖類、タンパク質、ミネラル、酵素などを含有する血液の無色の水のような流体を定義する。

【0113】

10

20

30

40

50

分子又は分析物、例えばタンパク質、ポリペプチド又はペプチド、或いは2以上の分子又は分析物、例えば2以上のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドは、上記の分子若しくは分析物又は分子若しくは分析物の上記の群の有無及び/又は量が試料中で、好ましくはその他の分子及び分析物を実質的に排除して検出又は決定される場合に、試料中で「測定」される。

#### 【0114】

用語「量(quantity)」、「量(amount)」及び「レベル」は同義であり、一般的に当該技術においてよく理解されている。これらの用語は、本明細書で用いる場合、特に、試料中の分子若しくは分析物の絶対量又は試料中の分子若しくは分析物の相対量、すなわち別の値に対する量、例えば本明細書で教示する参照値若しくはバイオマーカーのベースライン発現を示す値の範囲に対する量のことをいうことがある。これらの値又は範囲は、単一の患者又は患者の群から得ることができる。

試料中の分子又は分析物の絶対量は、有利には、重量若しくはモル量、又はより一般的には濃度、例えば容量あたりの重量若しくは容量あたりのモルで表すことができる。

試料中の分子又は分析物の相対量は、有利には、上記の別の値に対する、例えば本明細書で教示する参照値に対する増加若しくは減少又は倍数増加若しくは倍数減少として表すことができる。第1パラメータと第2パラメータ(例えば第1の量と第2の量)との間の相対比較を行うことは、まず、上記の第1及び第2パラメータの絶対値を決定することを必要とすることがあるが、必ずしも必要でない。例えば、測定方法は、上記の第1及び第2パラメータについての定量可能な読み出し(例えばシグナル強度)を生成でき、上記の読み出しは、上記のパラメータの値の関数であり、上記の読み出しは、該読み出しを各パラメータの絶対値にまず変換することを実際に必要とせずに、第1パラメータ対第2パラメータについての相対的な値を生成するように直接比較できる。

#### 【0115】

本明細書で用いる場合、用語「パールカン」は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン2(HSP G2)としても知られ、時折SJA、SJS、SJS1又はPRCANと省略されるパールカン(PLC)として一般的に知られるタンパク質、すなわち当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるタンパク質及びポリペプチドに相当する。この用語は、見出される場合に任意の生物、特に動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくはヒト及び非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物、更により好ましくはヒトのこのようなタンパク質及びポリペプチドを包含する。この用語は、天然の配列を有するこのようなタンパク質及びポリペプチド、すなわち1次配列が天然で見出されるか又は天然に由来するパールカンのものと同じであるものを特に包含する。当業者は、パールカンの天然配列が、種間の遺伝子分岐により異なる種同士で異なることがあることを理解している。更に、パールカンの天然配列は、所定の種内での通常の遺伝子多様性(変異)により同じ種の異なる個体間又は個体内で異なることがある。また、パールカンの天然配列は、転写後又は翻訳後修飾により、同じ種の異なる個体間又は個体内でさえ異なることがある。よって、天然で見出されるか又は天然に由来する全てのパールカン配列は、「天然」であるとみなされる。この用語は、生存生物、器官、組織若しくは細胞の一部分を形成する場合、生体試料の一部分を形成する場合、及びそのような供給源から少なくとも部分的に単離されている場合のパールカンタンパク質及びポリペプチドを包含する。この用語は、組換え又は合成の手段により生成される場合のタンパク質及びポリペプチドも包含する。

#### 【0116】

例示的なパールカンは、限定されないが、図1に転載するように4391アミノ酸を含む、NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)アクセッション番号NP\_005520(配列バージョン4)の下でアノテートされる1次アミノ酸配列を有するヒトパールカンを含む(配列番号1)。当業者は、上記の配列がパールカンの前駆体のものであり、成熟パールカンからプロセッシングされて除かれる部分を含み得ることも認識できる。例えば、図1において、C末端エンドレペリン(配列番号2)及びLG3(配列番号3)ドメインも示す。用語「パールカン」は、本明細書で用いる場合、全長パールカン及びそのフラグメントを包含する。

そのようなフラグメントの好ましい例は、エンドレペリン及び/又はLG3である。

【0117】

ある実施形態において、細胞結合型又は細胞限定型パールカンタンパク質に対向して、循環パールカン、例えば血漿中を循環する分泌形を検出してよい。

よって、パールカンへの本明細書における言及は、パールカンのフラグメントも包含できる。よって、パールカン測定すること又はパールカンの量を測定することへの本明細書における言及は、パールカンタンパク質又はポリペプチドを測定すること、例えばパールカンの成熟及び/若しくはプロセシングされた可溶/分泌形(例えば血漿循環形)を測定すること、並びに/又はその1以上のフラグメント、例えばエンドレペリン及び/若しくはLG3を測定することを包含し得る。例えば、パールカン及び/又はその1以上のフラグメントは、例えばパールカンのC末端の端に結合する結合分子を用いることにより、集散的に測定でき、測定された量は、集散的に測定された種の全量に相当する。別の例では、パールカン及び/又はその1以上のフラグメント、例えばエンドレペリン及び/又はLG3は、それぞれ個別に測定できる。好ましくは、パールカンの上記のフラグメントは、パールカンの血漿循環形である。「パールカンの血漿循環形」又は短縮して「循環形」との表現は、血漿中を循環する全てのパールカンタンパク質又はそのフラグメントを包含し、すなわち、細胞又は膜結合型でない。いずれの理論に結び付けられることも望まないが、このような循環形は、天然プロセシングにより全長パールカンタンパク質から導くことができるか、又は上記の試料中で生じる既知の分解プロセスに起因できる。あるいくつかの状況では、循環形は、全長パールカンタンパク質であり得、これは、血漿に循環しているのが見出される。よって、上記の「循環形」は、試料中で循環している、すなわち上記の試料の細胞又は膜画分に結合していない任意のパールカンタンパク質若しくはパールカンの任意のプロセシングされた可溶形又はそれらのいずれか一方のフラグメントであり得る。例示的なフラグメントは、プロセシングされたエンドレペリン又はLG-3ペプチドであり得る。例えば、LG3ドメインがエンドレペリンドメインからカテプシンLにより、内皮細胞のアポトーシスプロセス中に切断されることが報告されている(Cailhierら, 2008, JBC Vol.283(40):27220~27229)。

10

20

【0118】

エンドレペリン及び特にそのLG3ペプチドは、血管新生阻害剤として知られている(Mongiatら, 2003, JBC Vol.278(6):4238~4249)。パールカンは、例えば、例えばヒトの胎盤及び脱落膜の基底膜に存在することが示されており、ここでこれは、血管の維持及び絨毛の完全性又はそのモデリングにおいて重要であるとみられる(Chenら, 2008, Placenta 29:309~316)。

30

しかし、文献において、ヒト対象者の血液中のパールカンレベルは、腎機能不全の診断的価値のために用いられておらず、そのことについて示唆されてもいなかった。末期腎患者(Odaら, Clinica Chimica Acta 255(1996):119~132)又は腎臓移植片の急性拒絶を原因とする慢性同種移植片腎症(O'Riordanら, 2008 Proteomics Clin. Appl. 2:1025~1035)の尿中のパールカンフラグメントを検出した2つの出版物があるが、血液試料中のパールカンレベルが腎不全を示すことは予想できない。この出版物は、実際には、末期腎疾患の患者の尿からの低分子量タンパク質の新しい精製方法について報告している。上記のペプチドが診断マーカーであり得ることは示されていない。

40

【0119】

本発明の方法及び使用に従って対象者の試料中で検出されるペプチドは、パールカンのC末端部分、より精密にはエンドレペリンドメイン、更により精密にはLG-3ドメイン中にある(図1を参照)。いずれの理論に結び付けられることも望まないが、試料中で測定されるパールカンレベルの上昇は、よって、全般的なパールカンタンパク質発現の増加及び/又はパールカンタンパク質(これは、通常、細胞外基質中にあり、切断形(例えばエンドレペリン及び/又はLG-3)は全長分子から放出される)のタンパク質分解若しくはプロセシングの増加につながることを示唆している。

【0120】

50

本明細書で用いる場合、用語「プロB型ナトリウム利尿ペプチド」(「proBNP」と省略することもある)及び「アミノ末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド」(「NTproBNP」と省略することもある)及び「B型ナトリウム利尿ペプチド」(「BNP」と省略することもある)は、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られているペプチドのことをいう。更なる説明として、限定することなく、インビボproBNP、NTproBNP及びBNPは、ナトリウム利尿ペプチド前駆体Bプレプロタンパク質(preproBNP)に由来する。特に、proBNPペプチドは、preproBNPからN末端分泌シグナル(リーダー)配列を除去した後のpreproBNPの部分に相当する。NTproBNPは、N末端部分に相当し、BNPは、proBNPのアミノ酸76のC末端側での切断後のproBNPペプチドのC末端部分に相当する。

【0121】

用語「シスタチンC」(ARMD11;MGC117328、シスタチン-3(CST3)としても知られる)は、Genbankアクセッション番号NP\_000090(配列バージョン1)の下で例示的にアノテートされるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0122】

本明細書で用いる場合、「好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン」又は「NGAL」(発癌性リポカリン24P3、ユテロカリン又はリポカリン2(LCN2)としても知られる)は、Genbankアクセッション番号NP\_005555(配列バージョン2)の下で例示的にアノテートされるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0123】

用語「C反応性タンパク質」(CRP又はPTX1としても知られる)は、Genbankアクセッション番号NP\_000558(配列バージョン2)の下で例示的にアノテートされるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0124】

用語「ベータ-ト্রেスタンパク質」(なかでもプロスタグランジン-H2 D-イソメラーゼ、プロスタグランジン-D2シンターゼ、セレブリン-28及びPTGDSとしても知られる)は、Genbankアクセッション番号NP\_000945(配列バージョン3)の下で例示的にアノテートされるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0125】

用語「腎臓傷害分子1」又はKIM-1は、Ichimuraら、2004(Am J Physiol Renal Physiol 286(3): F552~63)及びIchimuraら、1998(J Biol Chem 273: 4135~4142)に例示的に開示されるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0126】

用語「インターロイキン-18」は、Genbankアクセッション番号NP\_001553(配列バージョン1)の下で例示的にアノテートされるような、当該技術においてこれらの表示の下で一般的に知られるペプチドのことをいう。

【0127】

文脈からそうでないことが明らかでない限り、任意のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドへの本明細書における言及は、見出される場合に任意の生物から、特に好ましくは動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくはヒト及び非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物、更により好ましくはヒトからのそのようなものを包含する。

更に、文脈からそうでないことが明らかでない限り、全般的に、任意のタンパク質、ポリペプチド又はペプチド及びそれらのフラグメントへの本明細書における言及は、例えばリン酸化、グリコシル化、脂質化、メチル化、システイン化、スルホン化、グルタチオン化、アセチル化、メチオニンスルホキシド又はメチオニンスルホンへのメチオニンの酸化などを含む発現後修飾を有するような上記のタンパク質、ポリペプチド又はペプチド及びフラグメントの改変形も包含し得る。

【0128】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、パールカン及びそのフラグメント又は本明細書で用いる他のバイオマーカー及びそのフラグメントは、ヒトであり得、すなわち、それらの1次配列が、天然に生じるヒトペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の対応する1次配列又は天然に生じるヒトペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質に存在する対応する1次配列と同じであり得る。よって、この関係における「ヒト」との修飾語は、それらの起源又は供給源よりもむしろ、各タンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はフラグメントの1次配列に関する。例えば、このようなタンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はフラグメントは、ヒト対象者の試料に存在するか若しくはそこから単離されてよいか、又はその他の手段により得ることができる(例えば組換え発現、無細胞翻訳又は非生物学的ペプチド合成により)。

10

## 【0129】

タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの「フラグメント」との用語は、一般的に、上記のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのN末端及び/又はC末端欠失又は短縮形のことをいう。この用語は、任意の機構、例えば、限定することなく、上記のタンパク質又はポリペプチドの選択的翻訳、エキソ及び/又はエンドタンパク質分解並びに/或いは分解、例えばインビボ又はインビトロでの、例えば物理的、化学的及び/又は酵素的タンパク質分解により生じるフラグメントを包含する。限定することなく、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのフラグメントは、該タンパク質、ポリペプチド又はペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5%又は少なくとも約10%、例えば20%、30%若しくは40%、例えば50%、例えば60%、70%若しくは80%、又は90%若しくは95%さえ

20

表し得る。例えば、フラグメントは、対応する全長タンパク質の5連続アミノ酸の配列、又は10連続アミノ酸、又は20連続アミノ酸、又は30連続アミノ酸、例えば40連続アミノ酸、例えば50連続アミノ酸、例えば60、70、80、90、100、200、300、400、500若しくは600連続アミノ酸を含み得る。

## 【0130】

ある実施形態において、フラグメントは、対応する成熟全長タンパク質又はその可溶性若しくは血漿循環形と比較して、1~約20の間のアミノ酸、例えば1~約15の間のアミノ酸、又は1~約10の間のアミノ酸、又は1~約5の間のアミノ酸がN末端及び/又はC末端で短縮され得る。例えば、バイオマーカーとして有用なproBNP、NTproBNP及びBNPフラグメントは、WO2004/094460に開示される。

30

## 【0131】

ある実施形態において、所定のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのフラグメントは、上記のタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのインビトロタンパク質分解により達成して、有利に検出可能なペプチドを試料から得ることができる。例えば、このようなタンパク質分解は、適切な物理的、化学的及び/又は酵素的な物質、例えばプロテイナーゼ、好ましくはエンドプロテイナーゼ、すなわちタンパク質、ポリペプチド又はペプチド鎖の内部を切断するプロテアーゼにより行うことができる。適切なエンドプロテイナーゼの非限定的なリストは、セリンプロテイナーゼ(EC 3.4.21)、トレオニンプロテイナーゼ(EC 3.4.25)、システインプロテイナーゼ(EC 3.4.22)、アスパラギン酸プロテイナーゼ(EC 3.4.23)、メタロプロテイナーゼ(EC 3.4.24)及びグルタミン酸プロテイナーゼを含む。例示的な非限定的なエンドプロテイナーゼは、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、リソバクター・エンザイモゲネス(*Lysobacter enzymogenes*)エンドプロテイナーゼLys-C、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)エンドプロテイナーゼGlu-C(エンドペプチダーゼV8)又はクロストリジウム・ヒストリティカム(*Clostridium histolyticum*)エンドプロテイナーゼArg-C(クロストリパイン)を含む。更なる既知の又はまだ同定されていない酵素を用いることができる。当業者は、それらの切断特異性及び頻度に基づいて適切なプロテアーゼを選択して、所望のペプチド形を達成できる。好ましくは、タンパク質分解は、トリプシン型のエンドペプチダーゼ(EC 3.4.21.4)、好ましくはトリプシン、例えば、限定されないが、ウシ膵臓、ヒト膵臓、ブタ膵臓からのトリプシン、組

40

50

換えトリプシン、Lys-アセチル化トリプシン、可溶化トリプシン、固体支持体に固定化されたトリプシンなどのトリプシンの調製物により行うことができる。トリプシンは、なかでも、高い特異性及び切断の効率から特に有用である。本発明は、任意のトリプシン様プロテアーゼ、すなわちトリプシンのものと同様の特異性を有するプロテアーゼの使用も包含する。そうでなければ、化学試薬をタンパク質分解のために用いることができる。例えば、CNBrはMetにて切断でき、BNPS-スカトールはTrpにて切断できる。処理についての条件、例えばタンパク質濃度、酵素又は化学試薬の濃度、pH、バッファー、温度、時間は、用いる酵素又は化学試薬に依存して当業者が決定できる。

#### 【0132】

よって、上記で定義されるようなパールカンの単離フラグメントも開示される。このようなフラグメントは、生体試料中のパールカンの存在及び量に関する有用な情報を提供し、そのことにより、上記のフラグメントの検出を興味深いものにすることができる。よって、本明細書で開示するパールカンのフラグメントは、有用なバイオマーカーである。好ましいパールカンフラグメントは、配列番号2に示す配列を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる。

#### 【0133】

特定の成分(例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はそれらのフラグメント)に関する「単離」との用語は、一般的に、そのような成分がその天然の環境の1以上のその他の成分から分離されて存在する(例えばそれらから分離された又は分離されて調製された)ことをいう。例えば、単離ヒト又は動物タンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はフラグメントは、それが天然に生じるヒト又は動物の体から分離されて存在する。

用語「単離」は、本明細書で用いる場合、好ましくは、修飾語「精製」も包含できる。本明細書で用いる場合、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はそのフラグメントに関する「精製」との用語は、絶対的な純粋性を必要としない。代わりに、これは、そのようなタンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はフラグメントが、その他のタンパク質に対するそれらの豊富さ(簡便には、質量若しくは重量又は濃度の点で表される)が生体試料中よりも大きい孤立環境にあることをいう。孤立環境とは、単一媒体、例えば単一溶液、ゲル、沈殿物、凍結乾燥物などのことをいう。精製ペプチド、ポリペプチド又はフラグメントは、例えば実験室又は組換え合成、クロマトグラフィー、調製電気泳動、遠心分離、沈殿、親和性精製などを含む既知の方法により得ることができる。

#### 【0134】

精製タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はフラグメントは、好ましくは、重量で、孤立環境のタンパク質含量の10%、より好ましくは50%、例えば60%、更により好ましくは70%、例えば80%、更により好ましくは90%、例えば95%、96%、97%、98%、99%又は100%さえを構成できる。タンパク質含量は、例えばLowry法(Lowryら1951. J Biol Chem 193: 265)、場合によってHartree 1972 (Anal Biochem 48: 422~427)により記載されるようにして決定できる。また、ペプチド又はポリペプチドの純度は、クーマシーブルー若しくは好ましくは銀染色を用いる還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEにより決定できる。

#### 【0135】

検出可能な標識を含む本明細書で教示する単離パールカン又はそのフラグメントが更に開示される。このことにより、そのようなフラグメントの素早い検出が容易になる。用語「標識」は、本明細書を通して用いる場合、検出可能で好ましくは定量可能な読み出し又は特性を提供するために用いることができ、興味対象の実体に結合できるか又はその一部分を形成できる任意の原子、分子、部分又は生体分子、例えばペプチド若しくはポリペプチド又は特異的結合物質のことをいう。標識は、質量分析、分光光学、光学、比色、磁気、光化学、生化学、免疫化学又は化学的手段により適切に検出可能であり得る。標識は、限定されないが、色素;放射性標識、例えば $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ;高電子密度試薬;酵素(例えばイムノアッセイにおいて通常用いられるようなセイヨウワサビホスファターゼ(phosphatase)又はアルカリホスファターゼ(phosphatase));結合部分、例えばピ

10

20

30

40

50

オチン-ストレプトアビジン；ハプテン、例えばジゴキシゲニン；発光性、リン光性若しくは発蛍光性部分；マスタグ；及び単独又は蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)により発光スペクトルを抑制若しくはシフトできる部分と組み合わせた蛍光色素を含む。

【0136】

例えば、標識は、質量変更標識(mass-altering label)であり得る。好ましくは、質量変更標識は、対応する非標識ペプチドに対して、ペプチドの1以上のアミノ酸における別個の安定同位体の存在を含み得る。質量標識ペプチドは、質量分析の用途において陽性対照、標準物質及び校正物質として特に有用である。特に、1以上の別個の同位体を含むペプチドは、化学的に同様であり、クロマトグラフィー及び電気泳動により同じ方法で分離され、同じ方法でイオン化及びフラグメント化される。しかし、適切な質量分析計において、このようなペプチド及び場合によってその選択フラグメンテーションイオンは、区別可能なm/z比を示し、よって、識別できる。区別可能な安定同位体の対の例は、HとD、<sup>12</sup>Cと<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>Nと<sup>15</sup>N又は<sup>16</sup>Oと<sup>18</sup>Oを含む。通常、本発明において分析する生体試料のペプチド及びタンパク質は、天然において高く普及している一般的な同位体、例えばH、<sup>12</sup>C、<sup>14</sup>N及び<sup>16</sup>Oだけを実質的に含有し得る。そのような場合、質量標識ペプチドを、天然において普及が低い1以上の一般的でない同位体、例えばD、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N及び/又は<sup>18</sup>Oで標識できる。生体試料のペプチド又はタンパク質が1以上の一般的でない同位体を含む場合に、質量標識ペプチドが、それぞれの一般的な同位体を含み得ることも考えられる。

10

【0137】

同位体標識合成ペプチドは、なかでも、1以上の同位体標識アミノ酸基質を用いてそのようなペプチドを合成若しくは組換え生成することにより、又は未標識のペプチドを化学的若しくは酵素的に改変することにより1以上の別個の同位体を導入して得ることができる。例えば、そして限定することなく、D標識ペプチドは、市販で入手可能な重水素化L-メチオニンCH<sub>3</sub>-S-CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH又は重水素化アルギニンH<sub>2</sub>NC(=NH)-NH-(CD<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CD(NH<sub>2</sub>)-COOHの存在下で合成又は組換え生成できる。その重水素化又は<sup>15</sup>N-若しくは<sup>13</sup>C-含有形が存在する任意のアミノ酸を、標識ペプチドの合成又は組換え生成のために考慮できることが認識される。別の非限定的な例において、ペプチドを、H<sub>2</sub><sup>16</sup>O又はH<sub>2</sub><sup>18</sup>O中でトリプシンで処理して、該ペプチドのCOOH末端に2つの酸素(それぞれ<sup>16</sup>O又は<sup>18</sup>O)の組み込みを導くことができる(例えばUS 2006/105415)。

20

【0138】

よって、場合によって検出可能な標識を含む本明細書で教示するパールカン及びその単離フラグメントの、パールカンの定性的又は定量的検出アッセイ(測定方法)における、特に対象者における本明細書で教示する疾患若しくは状態を予知、診断、予後予測及び/又はモニターするためのそのような方法における(陽性)対照、標準物質又は校正物質としての使用も意図する。タンパク質、ポリペプチド又はペプチドは、任意の形、なかでも沈殿物、真空乾燥物、凍結乾燥物、液体若しくは凍結した溶液、或いは固相、例えば固体クロマトグラフィーマトリクス若しくはガラス若しくはプラスチック若しくはその他の適切な表面(例えばペプチドアレイ及びマイクロアレイの一部として)に共有的又は非共有的に固定化されて供給できる。ペプチドは、容易に調製でき、例えば天然供給源から単離できるか又は組換え若しくは合成により調製できる。

30

40

【0139】

本明細書で教示するパールカンの任意の1以上の単離フラグメントに特異的に結合できる結合物質も開示される。本明細書で教示するパールカンの単離フラグメントの1つだけに特異的に結合できる結合物質も開示される。本明細書を通して意図する結合物質は、なかでも、抗体、アダプター、フォトアダプター、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物又は小分子を含み得る。

結合物質は、パールカンの血漿循環形及び細胞結合又は保持形の両方に結合できる。好ましくは、結合物質は、パールカンの血漿循環形に特異的に結合できるか又はそれを特異的に検出できる。

【0140】

50

用語「特異的に結合する」は、本明細書を通して用いる場合、物質(本明細書において「特異的結合物質」ともいう)が、1以上の所望の分子又は分析物、例えば1以上の興味対象のタンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド又はそのフラグメントに、無作為又は無関係のその他の分子を実質的に排除して、かつ場合によって構造的に関連するその他の分子を実質的に排除して結合することを意味する。用語「特異的に結合する」は、物質がその意図する標的のみに結合することを必ずしも要求しない。例えば、物質は、結合の条件下での意図する標的についてのその親和性が、非標的分子についてのその親和性よりも少なくとも約2倍大きい、好ましくは少なくとも約5倍大きい、より好ましくは少なくとも約10倍大きい、更により好ましくは少なくとも約25倍大きい、更により好ましくは少なくとも約50倍大きい、更により好ましくは少なくとも約100倍以上大きいならば、興味対象のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び/又はそのフラグメントに特異的に結合することができる。

10

## 【0141】

好ましくは、物質は、その意図する標的に、 $K_A = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、より好ましくは $K_A = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、更により好ましくは $K_A = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、更により好ましくは $K_A = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、更により好ましくは $K_A = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 又は $K_A = 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  (ここで、 $K_A = [\text{SBA}_T]/[\text{SBA}][\text{T}]$ であり、SBAは、特異的結合物質を示し、Tは、意図する標的を示す)のそのような結合の親和性定数( $K_A$ )で結合できる。 $K_A$ の決定は、当該技術において知られる方法、例えば平衡透析及びScatchardプロット解析を用いて行うことができる。

本明細書を通して用いる特異的結合物質は、なかでも、抗体、アプタマー、フォトアプタマー、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物又は小分子を含み得る。

20

## 【0142】

本明細書で用いる場合、用語「抗体」は、その最も広い意味で用い、一般的に、任意の免疫学的結合物質のことをいう。この用語は、具体的に、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価(例えば2、3又はそれより多い価数)及び/又は少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体(例えば2重又はそれより多い特異性の抗体)、並びに所望の生物活性(特に、興味対象の抗原に特異的に結合する能力)を示す限り抗体フラグメント、並びにそのようなフラグメントの多価及び/又は多重特異性複合体を包含する。用語「抗体」は、免疫化を含む方法により作製される抗体だけでなく、興味対象の抗原上のエピトープに特異的に結合できる少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を包含するように作製された任意のポリペプチド、例えば組換え発現ポリペプチドも含む。よって、この用語は、それらがインビトロ又はインビボで生成されたかにかかわらず、そのような分子に対して用いられる。

30

## 【0143】

抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMクラスのいずれであってもよく、好ましくはIgGクラス抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体、例えば抗血清又はそれから精製される(例えば親和性精製)免疫グロブリンであってよい。抗体は、モノクローナル抗体又はモノクローナル抗体の混合物であってよい。モノクローナル抗体は、特定の抗原又は抗原内の特定のエピトープを、より大きい選択性及び再現性で標的にできる。例えば、そして限定することなく、モノクローナル抗体は、Kohlerら1975 (Nature 256: 495)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製できるか、又は組換えDNA法(例えば米国特許第4,816,567号におけるような)により作製できる。モノクローナル抗体は、例えばClacksonら1991 (Nature 352: 624~628)及びMarksら1991 (J Mol Biol 222: 581~597)により記載される技術を用いるファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

40

## 【0144】

抗体結合物質は、抗体フラグメントであってよい。「抗体フラグメント」は、その抗原結合領域又は可変領域を含むインタクトな抗体の一部を含む。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、 $F(\text{ab}')_2$ 、Fv及びscFvフラグメント；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；並びに抗体フラグメントから形成される多価及び/又は多重特異性抗体、例えばダイボディ、トリボディ及びマルチボディを含む。上記の記載Fab、Fab'、 $F(\text{ab}')_2$ 、Fv、sc

50

Fvなどは、当該技術において確立されたそれらの意味を有することを意図する。

【0145】

抗体との用語は、任意の動物の種、例えば鳥類及び哺乳動物を含む好ましくは脊椎動物の種に由来する1以上の部分を起源とするか又は含む抗体を含む。限定することなく、抗体は、ニワトリ、シチメンチョウ、ガチョウ、アヒル、ホロホロチョウ、ウズラ又はキジであり得る。これもまた限定することなく、抗体は、ヒト、ネズミ科(例えばマウス、ラットなど)、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ(例えばカメルス・バクトリアヌス(Camelus bactrianus)及びカメルス・ドロマデリウス(Camelus dromaderius))、ラマ(例えばラマ・パッコス(Lama paccos)、ラマ・グラマ(Lama glama)又はラマ・ビクナ(Lama vicugna))又はウマであり得る。

10

【0146】

当業者は、抗体が、1以上のアミノ酸の欠失、付加及び/又は置換(例えば保存置換)を、そのような変更が各抗原へのその結合を保存する限り含むことができることを理解している。抗体は、その構成アミノ酸残基の1以上の天然又は人工的な改変(例えばグリコシル化など)も含み得る。

【0147】

ポリクローナル及びモノクローナル抗体並びにそのフラグメントを生成する方法は、組換え抗体又はそのフラグメントを生成する方法のように当該技術において公知である(例えばHarlow及びLane, 「Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow及びLane, 「Using Antibodies: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; 「Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques」, Zola編, CRC Press 1987, ISBN 0849364760; 「Monoclonal Antibodies: A Practical Approach」, Dean及びShepherd編, Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: 「Antibody Engineering: Methods and Protocols」, Lo編, Humana Press 2004, ISBN 1588290921を参照)。

20

【0148】

用語「アプタマー」は、ペプチドのような標的分子に特異的に結合できる1本鎖又は2本鎖のオリゴDNA、オリゴRNA又はオリゴDNA/RNA或いはその任意の類似体のことをいう。有利には、アプタマーは、それらの標的に対して相当に高い特異性及び親和性を示すことができる(例えば $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 程度の $K_A$ )。アプタマー生成は、なかでも米国特許第5,270,163号; Ellington及びSzostak 1990 (Nature 346: 818~822); Tuerk及びGold 1990 (Science 249: 505~510); 又は「The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications」, Klussmann編, Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592(本明細書に参照により組み込まれる)に記載される。用語「フォトアプタマー」は、標的分子と共有結合又は架橋できる1以上の光反応性官能基を含有するアプタマーのことをいう。用語「ペプチド模倣物」は、対応するペプチドの位相幾何学的類似体である非ペプチド物質のことをいう。ペプチドのペプチド模倣物を合理的に設計する方法は、当該技術において既知である。例えば、硫酸化8マーペプチドCCK26-33に基づく3つのペプチド模倣物及び11マーペプチド、サブスタンスPに基づく2つのペプチド模倣物の合理的設計、並びに関連するペプチド模倣物設計原理が、Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132~134)に記載されている。

30

40

【0149】

用語「小分子」は、製薬分野において通常用いられる有機分子のサイズと同等のサイズを有する化合物、好ましくは有機化合物のことをいう。この用語は、生物学的巨大分子(例えばタンパク質、核酸など)を除外する。好ましい有機小分子のサイズは、約5000 Daまで、例えば約4000まで、好ましくは3000 Daまで、より好ましくは2000 Daまで、更により好ましくは約1000 Daまで、例えば約900、800、700、600まで又は約500 Daまでの範囲である。

【0150】

50

よって、場合によって提示担体に結合した、本明細書で教示するパールカンのフラグメントを用いて(すなわち免疫化抗原として用いて)、動物、例えば非ヒト動物、例えば実験動物又は家畜を免疫化するための方法も開示される。免疫化及び免疫血清からの抗体試剤の調製は、それ自体公知であり、本明細書の他の場所で言及する文献に記載されている。免疫化される動物は、任意の動物の種、好ましくは温血種、より好ましくは例えば鳥類及び哺乳動物を含む脊椎動物種を含み得る。限定することなく、抗体は、ニワトリ、シチメンチョウ、ガチョウ、アヒル、ホロホロチョウ、ウズラ又はキジであり得る。これもまた限定することなく、抗体は、ヒト、ネズミ科(例えばマウス、ラットなど)、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ、ラマ又はウマであり得る。用語「提示担体」又は「担体」は、一般的に、第2分子に結合している場合に、該第2分子に対する免疫応答を、通常、更なるT細胞エピトープを提供することにより増強する免疫原性分子のことをいう。提示担体は、(ポリ)ペプチド構造又は非ペプチド構造、例えばなかでもグリカン、ポリエチレングリコール、ペプチド模倣物、合成ポリマーなどであり得る。非限定的な担体の例は、ヒトB型肝炎ウイルスコアタンパク質、多重C3dドメイン、破傷風毒素フラグメントC又は酵母Ty粒子を含む。

10

本明細書で教示する免疫化により得られる又は得ることができる免疫血清は、本明細書で開示するパールカンのフラグメントの1以上に特異的に結合する抗体試剤を作製するために特に有用であり得る。

#### 【0151】

(a)本明細書で教示するパールカンフラグメントの1以上、実質的に(b)パールカン及び/又はその他のフラグメントを除外したものに結合する特異的結合物質を選択するための方法が更に開示される。簡便には、このような方法は、(b)の下での所望でないパールカン分子に交差反応又は交差結合する結合物質を差し引くか又は除去することに基づくことができる。このような差し引きは、様々な親和性分離方法、例えば親和性クロマトグラフィー、親和性固相抽出、親和性磁性抽出などにより当該技術において知られるようにして容易に行うことができる。

20

#### 【0152】

試料中のパールカン及び/又はそのフラグメント並びに場合によって1以上の他のバイオマーカー又はそのフラグメントの有無(例えば存在する読出し 対 存在しない読出し；又は検出可能な量 対 検出不可能な量)及び/又は量(例えば絶対的又は相対的な量である読出し、例えば絶対的又は相対的な濃度)を測定するために、任意の現存する、利用可能な又は従来からの分離、検出及び定量方法を本明細書において用いることができる(パールカン及びそのフラグメントを含む試料中のそのようにして測定される興味対象の任意の分子又は分析物は、以下、集合的にバイオマーカーということがある)。

30

例えば、そのような方法は、イムノアッセイ法、質量分析法若しくはクロマトグラフィー法又はそれらの組み合わせを含み得る。

#### 【0153】

用語「イムノアッセイ」は、一般的に、試料中の興味対象の1以上の分子又は分析物を検出するためのそれ自体で既知の方法のことをいい、ここで、興味対象の分子又は分析物についてのイムノアッセイの特異性は、特異的結合物質、一般的には抗体と、興味対象の分子又は分析物との間の特異的結合による。イムノアッセイ技術は、限定することなく、直接ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、間接ELISA、サンドイッチELISA、競合ELISA、多重ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ELISPOT技術及び当該技術において既知のその他の同様の技術を含む。これらのイムノアッセイ法の原理は、当該技術、例えばJohn R. Crowther, 「The ELISA Guidebook」, 第1版, Humana Press 2000, ISBN 0896037282において既知である。

40

#### 【0154】

更なる説明のため、そして限定することなく、直接ELISAは、固体支持体、例えばマイクロウェルプレートに固定化された、試料中の標的抗原に結合し、それによりそれを定量する標識1次抗体を用いる。間接ELISAは、標的抗原に結合する非標識1次抗体と、抗原

50

に結合した1次抗体を認識しそれを定量することを可能にする2次標識抗体とを用いる。サンドイッチELISAでは、標的抗原は、抗原内の1つの抗原部位に結合する固定化「捕捉」抗体を用いて試料から捕捉され、非結合分析物の除去の後に、そのようにして捕捉された抗原を、該抗原内の別の抗原部位に結合する「検出」抗体(検出抗体は、直接標識されるか、又は上記のように間接的に検出できる)を用いて検出する。競合ELISAは、1次抗体又は標的抗原のいずれかであり得る標識「競合物質」を用いる。例えば、非標識固定化1次抗体を試料とインキュベートし、この反応を平衡に到達させ、次いで、標識標的抗原を加える。標識標的抗原は、1次抗体に、その結合部位が試料からの非標識標的抗原により占められていない場合に結合する。よって、結合した標識抗原の検出された量は、試料中の非標識抗原の量に逆比例する。多重ELISAは、2以上の分析物の同時の検出を、単一区画(例えばマイクロプレートウェル)内で、通常、複数のアレイアドレスにて可能にする(例えばNielsen及びGeierstanger 2004. *J Immunol Methods* 290: 107~20並びにLingら2007. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 87~98を更なる手引きのために参照されたい)。認識されるように、ELISA技術における標識は、通常、酵素(例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ)コンジュゲーションにより、終点は、典型的に、比色、化学発光若しくは蛍光、磁気、圧電、焦電などである。

#### 【0155】

ラジオイムノアッセイ(RIA)は、競合に基づく技術であり、既知の量の放射活性標識(例えば $^{125}\text{I}$ 又は $^{131}\text{I}$ 標識)標的抗原を、該抗原に対する抗体と混合し、次いで、試料からの非標識又は「非放射性」抗原を加え、置き換えられた標識抗原の量を測定することを含む(例えば「An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques」, Chard T編, Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198を更なる手引きのために参照されたい)。

#### 【0156】

一般的に、ペプチドの質量、好ましくは更にフラグメンテーション及び/又は選択されたペプチドの(部分的)アミノ酸配列についての正確な情報を得ることができる任意の質量分析(MS)技術も(例えばタンデム質量分析、MS/MS;又はポストソース分解で、TOF MS)本明細書において有用である。適切なペプチドMS及びMS/MS技術及びシステムは、それ自体公知であり(例えばMethods in Molecular Biology, vol. 146: 「Mass Spectrometry of Proteins and Peptides」, Chapman編, Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. *Methods Enzymol* 193: 455~79;又はMethods in Enzymology, vol. 402: 「Biological Mass Spectrometry」, Burlingame編, Academic Press 2005, ISBN 9780121828073を参照)、本明細書で用いることができる。バイオマーカーペプチド分析に適切なMSの構成、装置及びシステムは、限定することなく、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化時間飛行型(MALDI-TOF) MS; MALDI-TOFポストソース分解(PSD); MALDI-TOF/TOF; 表面増強レーザー脱離/イオン化時間飛行型質量分析(SELDI-TOF) MS; エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)<sup>n</sup> (nは、ゼロより大きい整数である); ESI 3D又は線形(2D)イオンラップMS; ESI三連四重極MS; ESI四重極直交型TOF (Q-TOF); ESIフーリエ変換MSシステム; シリコン上での脱離/イオン化(DIOS); 2次イオン質量分析(SIMS); 大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS)<sup>n</sup>; 大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS); APPI-MS/MS; 及びAPPI-(MS)<sup>n</sup>を含み得る。タンデムMS (MS/MS)の構成におけるペプチドイオンフラグメンテーションは、当該技術において確立された方法、例えば衝突誘起解離(CID)を用いて達成できる。質量分析によるバイオマーカーの検出及び定量は、例えばなかでもKuhnら2004 (*Proteomics* 4: 1175~86)により記載される多重反応モニタリング(MRM)を含み得る。MSペプチド分析法は、有利には、上流のペプチド若しくはタンパク質分離又は分画法、例えば本明細書の以下に記載するクロマトグラフィー及びその他の方法と組み合わせることができる。

#### 【0157】

クロマトグラフィーも、バイオマーカーを測定するために用いることができる。本明細書で用いる場合、用語「クロマトグラフィー」は、それ自体のことをいい、当該技術において広大に利用可能な化学物質を分離するための方法を包含する。好ましいアプローチに

10

20

30

40

50

において、クロマトグラフィーは、液体又は気体の移動流(「移動相」)により運ばれる化学物質の混合物(分析物)が、それらが定常の液体又は固体相(「固定相」)の周囲又は上を上記の移動相と固定相との間で流れながら、分析物の異なる分布の結果として成分に分離されるプロセスのことをいう。固定相は、通常、微細に分けられた固体、フィルタ材料のシート、又は固体の表面上の液体の薄層などであり得る。クロマトグラフィーは、生体起源の化学的化合物、例えばアミノ酸、タンパク質、タンパク質若しくはペプチドのフラグメントなどの分離のためにも広く用いることができる。

#### 【0158】

本明細書で用いる場合、クロマトグラフィーは、好ましくはカラムクロマトグラフィー(すなわち固定相がカラム内に堆積又は充填されている)、好ましくは液体クロマトグラフィー、更により好ましくはHPLCであり得る。クロマトグラフィーの詳細は当該技術において公知であるが、更なる手引きのために、例えばMeyer M., 1998, ISBN: 047198373X及び「Practical HPLC Methodology and Applications」, Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993を参照されたい。クロマトグラフィーの型の例は、限定することなく、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、順相HPLC(NP-HPLC)、逆相HPLC(RP-HPLC)、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)、例えばカチオン又はアニオン交換クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、ゲルろ過クロマトグラフィー又はゲル透過クロマトグラフィーを含むサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、クロマトフォーカシング、親和性クロマトグラフィー、例えば免疫親和性、固定化金属親和性クロマトグラフィーなどを含む。

10

20

#### 【0159】

1次元、2次元又は多次元クロマトグラフィーを含むクロマトグラフィーを、更なるペプチド分析法、例えば本明細書の他の場所で記載する下流の質量分析と組み合わせてペプチド分画法として用いることができる。

#### 【0160】

更なるペプチド又はポリペプチドの分離、同定又は定量法は、場合によって上記の分析法のいずれかと組み合わせて、本開示におけるバイオマーカーを測定するために用いることができる。このような方法は、限定することなく、化学抽出分画、キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)、キャピラリー等速電気泳動(CITP)、キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)などを含む等電点電気泳動(IEF)、1次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-PAGE)、キャピラリーゲル電気泳動(CGЕ)、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)、ミセル導電クロマトグラフィー(MEKC)、フリーフロー電気泳動(FFE)などを含む。

30

#### 【0161】

本明細書で教示する様々な態様及び実施形態は、本明細書で定義するように試料中で測定されるパールカンの量を、パールカンの量の参照値と比較することに更に依拠し、ここで、上記の参照値は、本明細書で教示する疾患又は状態の既知の予知、診断及び/又は予後を表す。

例えば、独特の参照値は、本明細書で教示する所定の疾患又は状態を有するリスク(例えば異常に上昇したリスク)の予知 対 上記の疾患又は状態を有さない又は通常のリスクの予知を表し得る。別の例では、独特の参照値は、このような疾患又は状態を有するリスクの程度が異なる予知を表し得る。

40

#### 【0162】

更なる例において、独特の参照値は、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の診断 対 そのような疾患又は状態がないことの診断(例えば健常、又は上記の疾患若しくは状態からの回復などの診断)を表し得る。別の例では、独特の参照値は、様々な重度のそのような疾患又は状態の診断を表し得る。

更に別の例では、独特の参照値は、本明細書で教示する所定の疾患又は状態についての良好な予後 対 上記の疾患又は状態の不良な予後を表し得る。更なる例において、独特の参照値は、そのような疾患又は状態についての様々に好ましい又は好ましくない予後を表

50

し得る。

【0163】

このような比較は、一般的に、少なくとも1つの差の有無、及び場合によってそのような差のサイズを、比較される値又はプロフィールの間で決定するための任意の手段を含み得る。比較は、測定の日視検査、算術的又は統計学的比較を含み得る。このような統計学的比較は、それらに限定されないが、法則を当てはめることを含む。値又はバイオマーカーのプロフィールが少なくとも1つの標準物質を含むならば、該値又はバイオマーカーのプロフィールにおける差を決定するための比較は、これらの標準物質の測定も含むことができ、これにより、バイオマーカーの測定は、内部標準物質の測定と相関する。

パールカンの量についての参照値は、他のバイオマーカーについて以前に用いられた既知の手順に従って確立できる。

例えば、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後のためのパールカンの量の参照値は、上記の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後の特徴とする個体又は個体の集団からの試料中のパールカンの量を決定することにより確立できる(すなわち、腎機能不全の上記の予知、診断及び/又は予後が真である者について)。このような集団は、限定することなく、2、10、100又は数百以上の個体さえ含み得る。

【0164】

よって、例示的な例により、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の診断 対 そのような疾患又は状態がないことの診断のためのパールカンの量の参照値は、それぞれ疾患又は状態を有するか又は有しないと診断される1の個体又は個体集団(例えばその他の適切に決定的な手段、例えば臨床徴候及び症状、イメージング、ECGなどに基づく)からの試料中のパールカンの量を決定することにより確立できる。

【0165】

ある実施形態において、本明細書で意図する参照値は、パールカンの絶対量を伝え得る。別の実施形態では、試験される対象者からの試料中のパールカンの量は、参照値に対して直接的に決定できる(例えば増加若しくは減少又は倍数増加若しくは倍数減少の点で)。有利には、このことにより、対象者からの試料中のパールカンの量を、パールカンのそれぞれの絶対量をまず決定する必要なく、参照値と比較する(言いかえると、参照値に対する対象者からの試料中のパールカンの相対量を測定する)ことができる。

【0166】

患者の試料中のバイオマーカーの発現レベル又は存在は、時折変動し、すなわち症状が変化する(症状の見かけ、悪化又は改善)ことなく著しく増加又は減少し得る。このような場合には、マーカーの変化が症状の変化に先行し、症状の変化よりも感度が高い尺度になる。治療的介入は、より早期に開始でき、悪化させる症状を待つよりも効果的であり得る。より良性の状況での早期の介入は、家庭で安全に行うことができ、これは、重度に悪化した患者を緊急室で処置することからの主要な改善である。

【0167】

よって、同じ患者のパールカンレベルを異なる時点で測定することは、そのような場合に、患者の状況の継続的なモニタリングを可能にし、本明細書で教示する所定の疾患又は状態に関する患者の状態の悪化又は改善の予知を導くことができる。本明細書で示す家庭又は臨床的な試験キット又はデバイスは、この継続的モニタリングのために用いることができる。そのような試験についてのある疾患状態(例えば腎機能不全又は腎機能不全がないこと)に関連するパールカンレベルの1以上の参照値又は範囲は、例えば、予め、又は該対象者におけるある期間にわたるモニタリングプロセス中に決定できる。代わりに、これらの参照値又は範囲は、非常に類似する疾患表現型を有するいくつかの患者のデータセットにより、例えば健常対象者又は興味対象の疾患若しくは状態を有さない対象者から確立できる。上記の参照値又は範囲からのパールカンレベルの突然の逸脱により、実際に(しばしば重度の)症状を感じるか又は症状が観察できる前に患者の状態の悪化を(例えば家庭で又は医療機関で)予知できる。

10

20

30

40

50

## 【0168】

よって、臨床状況の変化(悪化又は改善)を示す、ある患者におけるパールカンマーカのレベルの著しい変化を決定するための方法又はアルゴリズムも開示される。更に、本発明は、対象者が、本明細書で教示する所定の疾患若しくは状態から回復しているか又は回復したとの診断を確立することを可能にする。

## 【0169】

ある実施形態において、本方法は、そのような参照値を確立するステップを含み得る。ある実施形態において、本キット及びデバイスは、本明細書で教示する所定の疾患若しくは状態の具体的な予知、診断及び/又は予後のための、パールカンの量の参照値を確立するための手段を含み得る。このような手段は、例えば、上記の疾患又は状態の上記の具体的な予知、診断及び/又は予後を特徴とする1以上の個体からの1以上の試料(例えば別々又はプールされた試料)を含み得る。

10

## 【0170】

本明細書で教示する様々な態様及び実施形態は、対象者からの試料中で測定したパールカンの量と、所定の参照値との間の逸脱又は逸脱無しを見出すことを必然的に更に伴うことがある。

第2の値からの第1の値の「逸脱」は、一般的に任意の方向(例えば増加：第1の値 > 第2の値；又は減少：第1の値 < 第2の値)及び任意の程度の変化を包含し得る。

例えば、逸脱は、限定することなく、比較を行う第2の値に対して、少なくとも約10% (約0.9倍以下)又は少なくとも約20% (約0.8倍以下)又は少なくとも約30% (約0.7倍以下)又は少なくとも約40% (約0.6倍以下)又は少なくとも約50% (約0.5倍以下)又は少なくとも約60% (約0.4倍以下)又は少なくとも約70% (約0.3倍以下)又は少なくとも約80% (約0.2倍以下)又は少なくとも約90% (約0.1倍以下)第1の値が減少することを包含し得る。

20

## 【0171】

例えば、逸脱は、限定することなく、比較を行う第2の値に対して、少なくとも約10% (約1.1倍以上)又は少なくとも約20% (約1.2倍以上)又は少なくとも約30% (約1.3倍以上)又は少なくとも約40% (約1.4倍以上)又は少なくとも約50% (約1.5倍以上)又は少なくとも約60% (約1.6倍以上)又は少なくとも約70% (約1.7倍以上)又は少なくとも約80% (約1.8倍以上)又は少なくとも約90% (約1.9倍以上)又は少なくとも約100% (約2倍以上)又は少なくとも約150% (約2.5倍以上)又は少なくとも約200% (約3倍以上)又は少なくとも約500% (約6倍以上)又は少なくとも約700% (約8倍以上)第1の値が増加することを包含し得る。

30

好ましくは、逸脱は、統計学的に有意な観察される変化のことをいうことがある。例えば、逸脱は、所定の集団における参照値の誤差範囲の外側(例えば標準偏差若しくは標準誤差で表されるか又は予め決定されたその倍数、例えば $\pm 1 \times SD$ 若しくは $\pm 2 \times SD$ 又は $\pm 1 \times SE$ 若しくは $\pm 2 \times SE$ )の観察される変更のことをいうことがある。逸脱は、所定の集団における値により定義される参照範囲の外側(例えば該集団における値の40%、50%、60%、70%、75%若しくは80%若しくは85%若しくは90%若しくは95%又は100%さえを含む範囲の外側)の値のことをいうこともある。

40

## 【0172】

更なる実施形態において、観察される変化が所定の閾値又はカットオフを超えるならば、逸脱を結論付けることができる。このような閾値又はカットオフは、当該技術において一般的に知られるようにして選択して、予知、診断及び/又は予後方法の選択された感度及び/又は特異性、例えば少なくとも50%又は少なくとも60%又は少なくとも70%又は少なくとも80%又は少なくとも85%又は少なくとも90%又は少なくとも95%の感度及び/又は特異性を提供できる。

例えば、ある実施形態において、本明細書で教示する所定の疾患若しくは状態がないとの予知又は診断を表すか或いは上記の疾患又は状態についての良好な予後を表す参照値と比較して上昇した(好ましくは少なくとも約1.1倍上昇若しくは少なくとも約1.2倍上昇、

50

より好ましくは少なくとも約1.3倍上昇、更により好ましくは少なくとも約1.4倍上昇、更により好ましくは少なくとも約1.5倍上昇、例えば約1.1倍～3倍の間上昇若しくは約1.5倍～2倍の間上昇した)対象者からの試料中のパールカンの量は、対象者が、上記の疾患又は状態を有するか又は有するリスクにあることを示すか、或いは対象者における疾患又は状態についての不良な予後を示す。

#### 【0173】

対象者からの試料中のパールカンの量と、本明細書で教示する所定の疾患又は状態のある予知、診断及び/又は予後を表す参照値との間に逸脱が見出される場合、該逸脱は、該対象者における上記の疾患又は状態の予知、診断及び/又は予後が、参照値により表されるものとは異なるとの結論を示すか又はそのような結論に帰することができる。

10

対象者からの試料中のパールカンの量と、本明細書で教示する所定の疾患又は状態のある予知、診断及び/又は予後を表す参照値との間に逸脱が見出されない場合、そのような逸脱無しは、該対象者における上記の疾患又は状態の予知、診断及び/又は予後が、参照値により表されるものと実質的に同じであるとの結論を示すか又はそのような結論に帰することができる。

上記の考察は、バイオマーカープロファイルについても同様に当てはめられる。

#### 【0174】

2以上の異なるバイオマーカーを対象者において決定する場合、それらのそれぞれの有無及び/又は量は、バイオマーカープロファイル、すなわち該プロファイルの一部分を構成する各測定されたバイオマーカーについての値として一緒に表し得る。本明細書で用いる場合、用語「プロファイル」は、興味対象の状態、例えば本明細書で教示する所定の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後に関連する独特の特性又は特徴を表す任意のデータセットを含む。この用語は、一般的に、なかでも核酸プロファイル、例えば遺伝子型プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上の遺伝子の遺伝子型を表す遺伝子型データセット)、遺伝子コピー数プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上の遺伝子の増幅又は欠失を表す遺伝子コピー数のデータセット)、遺伝子発現プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上の遺伝子のmRNAレベルを表す遺伝子発現データセット)、DNAメチル化プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上の遺伝子のDNAメチル化レベルを表すメチル化データセット)、並びにタンパク質、ポリペプチド又はペプチドプロファイル、例えばタンパク質発現プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上のタンパク質のレベルを表すタンパク質発現データセット)、タンパク質活性化プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上のタンパク質の活性化又は不活性化を表すデータセット)、タンパク質改変プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上のタンパク質の改変を表すデータセット)、タンパク質切断プロファイル(興味対象の状態に関連する1以上のタンパク質のタンパク質分解切断を表すデータセット)並びにそれらの任意の組み合わせを包含する。

20

30

#### 【0175】

バイオマーカープロファイルは、いくつかの方法で創出でき、比率のような方法又はその他のより複雑な連係法若しくはアルゴリズム(例えば法則に基づく方法)を用いて測定可能なバイオマーカー又はバイオマーカーの態様の組み合わせであり得る。バイオマーカープロファイルは、少なくとも2の測定を含み、該測定は、同じ又は異なるバイオマーカーに対応できる。バイオマーカープロファイルは、少なくとも3、4、5、10、20、30以上の測定を含むこともできる。一実施形態において、バイオマーカープロファイルは、数百又は数千の測定さえ含む。

40

#### 【0176】

よって、例えば、独特の参照プロファイルは、所定の疾患又は状態を有するリスクの予知(例えば異常に上昇したリスク)対該疾患又は状態がないか又はそれを有する通常のリスクの予知を表し得る。別の例では、独特の参照プロファイルは、上記の疾患又は状態を有するリスクの異なる程度の予知を表し得る。

更なる例において、独特の参照プロファイルは、本明細書で教示する所定の疾患又は状

50

態の診断 対 そのような疾患又は状態がないことの診断(例えば健常の、又は該疾患若しくは状態からの回復などの診断)を表すことができる。別の例では、独特の参照プロフィールは、様々な重度の上記の疾患又は状態の診断を表し得る。

更に別の例では、独特の参照プロフィールは、本明細書で教示する疾患又は状態の良好な予後 対 該疾患又は状態の不良な予後を表し得る。更なる例では、独特の参照プロフィールは、そのような疾患又は状態についての様々に好ましい又は好ましくない予後を表し得る。

【0177】

本明細書で用いる参照プロフィールは、他のバイオマーカーについて以前に用いた既知の手順に従って確立できる。

例えば、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後についてのパールカンの量並びに1以上の他のバイオマーカーの有無及び/又は量の参照プロフィールは、上記の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後を特徴とする(すなわち、該疾患又は状態の予知、診断及び/又は予後が真である)1の個体又は個体の集団からの試料中のプロフィールを決定することにより確立できる。このような集団は、限定することなく、2、10、100又は数百以上の個体さえ含み得る。

【0178】

よって、例示的な例により、本明細書で教示する所定の疾患又は状態 対 そのような疾患又は状態がないことの診断についての参照プロフィールは、それぞれ該疾患又は状態を有するか又は有しないと診断された1の個体又は個体の集団からの試料におけるバイオマーカープロフィールを決定することにより確立できる。

【0179】

ある実施形態において、本方法は、このような参照プロフィールを確立するステップを含み得る。ある実施形態において、本キット及びデバイスは、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後についての参照プロフィールを確立するための手段を含み得る。このような手段は、例えば、上記の疾患又は状態の具体的な予知、診断及び/又は予後を特徴とする1以上の個体からの1以上の試料(例えば別々又はプールされた試料)を含み得る。

更に、当該技術において既知の多重パラメータ分析を、必要な変更を加えて用いて、値及びそれから得られるプロフィールの群の間(例えば試料プロフィールと参照バイオマーカープロフィールとの間)の逸脱を決定できる。

【0180】

試料プロフィールと本明細書で教示する所定の疾患又は状態のある予知、診断及び/又は予後を表す参照プロフィールとの間に逸脱が見出された場合、該逸脱は、該対象者における上記の疾患又は状態の予知、診断及び/又は予後が、参照プロフィールにより表されるものとは異なるとの結論を示すか又はそのような結論に帰することができる。

試料プロフィールと本明細書で教示する所定の疾患又は状態のある予知、診断及び/又は予後を表す参照プロフィールとの間に逸脱が見出されない場合、そのような逸脱無しは、該対象者における上記の疾患又は状態の予知、診断及び/又は予後が、参照プロフィールにより表されるものと実質的に同じであるとの結論を示すか又はそのような結論に帰することができる。

【0181】

本発明は、患者の試料中の任意の1以上のバイオマーカーのレベルを検出するための手段を含む、本明細書で教示する任意の1の疾患又は状態の診断、予知、予後及び/又はモニタリングのためのキット又はデバイスを更に提供する。より好ましい実施形態において、本発明のこのようなキットは、臨床的背景又は家庭で用いることができる。本発明によるキットは、該疾患若しくは状態を診断するため、該疾患若しくは状態に罹患している対象者を薬剤で処置する有効性をモニターするため、又は該対象者における該疾患若しくは状態の出現について対象者を防止的にスクリーニングするために用いることができる。

【0182】

10

20

30

40

50

臨床的背景において、キット又はデバイスは、ベッドサイドデバイスの形、又は緊急チームの背景において、例えば救急車若しくは他の移動式緊急車両の備品の一部又はチーム備品又は応急手当キットの一部であり得る。診断キット又はデバイスは、医師、応急手当ヘルパー又は看護師が、観察下にある患者が本明細書で教示する疾患又は状態を発生しているかを決定することを支援でき、その後、適当な行動又は処置を行うことができる。

家庭での検査キットは、患者に読出しを提供し、患者は、これを医師、応急手当ヘルパー又は病院の救急部門に伝えることができ、その後、適当な行動をとることができる。このような家庭での検査キットは、本明細書で教示するいずれか1つの疾患又は状態の病歴を有するか又はそれに罹患するリスクにある人々にとって特に興味がある。

#### 【0183】

本発明による典型的なキット又はデバイスは、以下の要素を含む：

- a) 対象者から試料を得る手段
- b) 上記の試料中の本明細書で教示する任意の1以上のマーカの量を測定し、該試料中の1以上のマーカの量が、ある閾値レベル若しくは値未満又はそれを超えるかを視覚化し、対象者が本明細書で教示する所定の疾患又は状態に罹患しているか否かを示すための手段又はデバイス。

本発明のいずれの実施形態においても、キット又はデバイスは、c) 医師、病院の救急部門又は応急手当ポストと直接交流して、ある人が上記の疾患又は状態に罹患しているか否かを示すための手段を更に含むことができる。

#### 【0184】

用語「閾値レベル又は値」又は「参照値」は、同義語として交換可能に用いられ、本明細書で定義されるとおりである。これは、妊娠のほぼ同時期に採取された、個別の患者又は非常によく似た疾患状態を有する患者の群において決定されたベースライン(例えば「乾燥重量」)の値の範囲でもあり得る。

#### 【0185】

いずれの理論とも結び付けられることを望まないが、本発明者らは、腎機能不全の症例において、パールカンレベルがタンパク質及びmRNAの両方のレベルで増加することを観察した。検査したPE患者において、パールカンレベルは、健常対象者のものより高い。

よって、本発明において示す閾値の値は、妊娠のほぼ同じ段階で採取された参照、すなわち非PE妊娠対象者における値であるとよりみなされ、PE対象者の妊娠前又は後の値であるとはあまり見られない。

#### 【0186】

本明細書で定義するキットはいずれも、対象者自身又は臨床従事者が用いるためのベッドサイドデバイスとして用いることができる。

非限定的な例は、固相に結合した上記の1以上のマーカについての特異的結合分子を含むシステム、例えば当該技術において公知のラテラルフローストリップ又はディップスティックデバイスなどである。生化学的アッセイを行うためのある非限定的な例は、メンブレンの洗浄を必要としない組み合わせであるテストストリップと標識抗体とを用いることである。テストストリップは、例えば抗hCG抗体が支持体上に存在し、hCGと複合して、尿のフローにより、視覚化を許容する固定化2次抗体へと運ばれる妊娠検査キットの分野において周知である。このような家庭での検査デバイス、システム又はキットのその他の非限定的な例は、例えば以下において見出すことができる；米国特許第6,107,045、6,974,706、5,108,889、6,027,944、6,482,156、6,511,814、5,824,268、5,726,010、6,001,658号又は米国特許出願第2008/0090305若しくは2003/0109067号。好ましい実施形態では、本発明は、ラテラルフローデバイス又はディップスティックを提供する。このようなディップスティックは、試料が適用されるストリップの一端から試料中の分析物の存在が測定されるそのようなストリップの他端へのキャピラリーフローによる試料の移動を可能にするテストストリップを含む。別の実施形態では、本発明は、試剤ストリップを含むデバイスを提供する。このような試剤ストリップは、1以上の試験パッドを含み、これは、試料で湿らせた場合に、分析物の存在下で色の変化を示し、及び/又は試料中のタンパク質

10

20

30

40

50

の濃度を示す。

【0187】

試料中の任意の1以上のマーカーのレベルがある予め決定された閾値レベル又は値より一旦高くなった場合にだけシグナルが形成される半定量的テストストリップを得るために、予め決定された量のパールカンの固定捕捉抗体が、テストストリップ上に存在できる。このことにより、予め決定された閾値レベル又は値に対応する試料中に存在するある量のパールカンの捕捉が可能になる。例えばコンジュゲートされたか又は標識された結合分子が結合する残りの量のパールカン(もしあれば)は、次いで、検出ゾーンに移動することができ、これは、その後、試料中の該1以上のバイオマーカーのレベルが予め決定された閾値レベル又は値よりも高い場合にのみ、実質的にシグナルを生成する。

10

【0188】

試料中の任意の1以上のマーカーの量がある閾値レベル又は値未満又はそれを越えるかを決定する別の可能性は、試料中に存在する全ての上記の1以上のマーカーを捕捉する1次捕捉抗体を、固相に結合した場合にあるシグナル又は色を発生する標識2次抗体と組み合わせることである。色又はシグナルの強度を、次いで、シグナルの強度がある閾値シグナルを越える場合に、試験が陽性であることを示す参照の色又はシグナルチャートと比較できる。代わりに、色又はシグナルの量又は強度を、例えば光吸収センサ又は光放射計を含み、形成されるシグナル強度又は色吸収の数値をもたらす電子デバイスを用いて測定でき、これは、次いで、該数値が閾値の値未満であるならば陰性の結果又は数値が閾値の値を超えるならば陽性の結果の形で対象者に示すことができる。この実施形態は、患者における1以上のマーカーのレベルを経時的にモニターする場合に特に適切である。

20

【0189】

参照値又は範囲は、例えば、対象者が所定の疾患又は状態を有さない期間に家庭でのデバイスを用いて決定でき、患者に、任意の1以上のマーカーの患者のベースラインレベルを示すことができる。家庭での検査デバイスを定期的に用いることにより、よって、ベースラインレベルと比較した1以上のマーカーのレベルの突然の変化を対象者に知らせることができ、このことは、対象者が医師に接触することを可能にする。

代わりに、参照値は、本明細書で教示する所定の疾患又は状態に罹患している対象者において決定して、これは、次いで、任意の1以上のマーカーの対象者個人の「リスクレベル」、すなわち対象者が上記の疾患又は状態にあるか又はそれにすぐに曝露されることを示す上記の1以上のマーカーのレベルを示すことができる。このリスクレベルは、疾患の進行をモニターするため又は処置の効果を評価するために興味深い。

30

【0190】

更に、参照値又はレベルは、非常によく似た疾患状態又は表現型を有する対象者(例えば全員が本明細書で教示する疾患又は状態を有さない又は該疾患若しくは状態を有する)における測定結果の組み合わせにより確立できる。

【0191】

その原理を本発明による家庭での検査デバイスに用いることができる当該技術において既知の半定量的試験の非限定的な例は、Sanitoetsにより販売されるHIV/AIDS検査又は前立腺がん検査である。家庭での前立腺検査は、全血中での4 ng/mlより高いPSA血液レベルを検出するための最初の半定量的検査を意図する迅速試験である。典型的な家庭での自己検査キットは、以下の成分を含む：血液試料を適用し、タンパク質レベルがある閾値レベルを超える場合にシグナルをもたらす検査デバイス、例えば滴下ピペット中のある量の希釈剤(分析物(すなわち興味対象のタンパク質)が試料適用ゾーンからシグナル検出ゾーンに移動することを助けるため)、場合によって血液検体回収のための空のピペット、指ブリックデバイス、場合によって滅菌スワブ(ブリックした領域を清浄するため)及びキットの使用説明書。

40

【0192】

類似の検査は、例えば乳がん検出及び心臓リスクの家庭での検査の観点でのCRP-タンパク質レベル検出についても知られている。後者の検査は、検査結果を検査機関に送ること

50

を包含し、ここで、結果が技術又は医療専門家により解釈される。このような患者の状態の電話又はインターネットに基づく診断は、もちろん、ほとんどのキットにおいて可能であり、推奨される。なぜなら、検査結果の解釈は、検査を行うことよりも頻繁により重要であるからである。試料中に存在するタンパク質のレベルの数値を与える上記の電子デバイスを用いる場合、この値は、もちろん、電話、携帯電話、衛星電話、電子メール、インターネット又はその他の通信手段により容易に伝えることができ、ある人が、本明細書で教示する疾患又は状態に罹患しているか又は罹患するリスクにあることを病院、医師又は応急手当チームに警告できる。このようなシステムの非限定的な例は、米国特許第6,482,156号に開示されている。

#### 【0193】

試料中のパールカンの存在及び/又は濃度は、固定化されたパールカン結合分子を有するチップを用いる表面プラズモン共鳴(SPR)、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)、蛍光消光、蛍光分極測定又は当該技術において既知のその他の手段により測定できる。本明細書に記載する結合アッセイのいずれも、試料中のパールカンの存在及び/又は濃度を決定するために用いることができる。そのようにするために、パールカン結合分子を試料と反応させ、パールカンの濃度を、用いる結合アッセイについて適切なようにして測定する。アッセイを検証及び校正するために、異なる濃度の標準パールカン及び/又はパールカン結合分子を用いる対照反応を行うことができる。固相アッセイを用いる場合、インキュベーションの後に、洗浄ステップを行って未結合のパールカン除去する。結合したパールカン、所定の標識について適当なようにして測定する(例えばシンチレーションカウント、蛍光、抗体-色素など)。定性的結果が所望される場合、対照及び異なる濃度は必要でないことがある。もちろん、パールカン及びパールカン結合分子の役割は、交換できる。当業者は、パールカン結合分子が、様々な濃度の試料にて試料に提供されるように方法を適合させることができる。

#### 【0194】

本発明によるパールカン結合分子は、パールカンに特異的に結合する任意の物質である。本発明により有用なパールカン結合分子の例は、それらに限定されないが、抗体、ポリペプチド、ペプチド、脂質、炭水化物、核酸、ペプチド-核酸、小分子、有機小分子、又はその他の薬物候補を含む。パールカン結合分子は、例えば合成小分子、動物、植物、細菌又は真菌細胞の抽出物に含まれる化合物、及びそのような細胞からの馴化培地を含む天然又は合成の化合物であり得る。代わりに、パールカン結合分子は、パールカンについての結合部位を有する工学的なタンパク質であり得る。本発明の態様によると、パールカン結合分子は、パールカンに、 $10^{-6}$  Mよりよい親和性で特異的に結合する。適切なパールカン結合分子は、パールカンの標準試料とのその結合から決定できる。パールカン結合分子とパールカンの間の結合を決定する方法は、当該技術において既知である。本明細書で用いる場合、抗体との用語は、それらに限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化又はキメラ抗体、工学的な抗体及びタンパク質との抗体フラグメントの結合にとって十分な生物学的に機能的な抗体フラグメント(例えばscFv、ナノボディ、Fvなど)を含む。このような抗体は、パールカンに対する市販で入手可能な抗体、例えばマウス、ラット、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体であり得る。

#### 【0195】

好ましい実施形態において、結合分子又は結合物質は、成熟膜結合又は細胞結合パールカントタンパク質又はフラグメントの両方に結合できる。より好ましい実施形態において、結合物質又は結合分子は、本明細書で定義するパールカンの可溶性、好ましくは血漿循環形に特異的に結合するか又はそれを特異的に検出する。

#### 【0196】

本発明のある態様によると、パールカン結合分子は、別の物質(例えばプローブ結合パートナー)を用いる検出を可能にするタグで標識される。このようなタグは、例えば、ビオチン、ストレプトアビジン、hisタグ、mycタグ、マルトース、マルトース結合タンパク質又は結合パートナーを有する当該技術において既知の任意のその他の種類のタグであり

10

20

30

40

50

得る。プローブ：結合パートナーの構成において利用できる相互作用の例はいずれでもよく、例えば、ピオチン：ストレプトアビジン、hisタグ：金属イオン(例えばNi<sup>2+</sup>)、マルトース：マルトース結合タンパク質を含む。

【0197】

本キットにおける特異的結合物質、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、バイオマーカーなどは、例えば凍結乾燥された、溶液中に遊離又は固相に固定化された様々な形であり得る。これらは、例えば、マルチウェルプレートで、又はアレイ若しくはマイクロアレイとして提供できるか、或いはこれらは別々及び/又は個別に包装され得る。これらは、本明細書で教示するようにして適切に標識され得る。上記のキットは、本発明のアッセイ法、例えばイムノアッセイ、ELISAアッセイ、質量分析アッセイなどを行うために特に適切であり得る。

10

【0198】

用語「調節する」は、一般的に、調節されるものの増加(例えば活性化)又は減少(例えば阻害)の両方を具体的に包含する定性的又は定量的な変更、変化又は変動のことをいう。この用語は、任意の程度のそのような調節を包含する。

例えば、調節が決定可能又は測定可能な変数に影響する場合、調節は、該調節がない参照状況と比較して、該変量の値の少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、例えば少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約50%、例えば少なくとも約75%、更により好ましくは少なくとも約100%、例えば少なくとも約150%、200%、250%、300%、400%又は少なくとも約500%の増加を包含し得るか、或いは調節は、該調節がない参照状況と比較して、該変量の値の少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、少なくとも約30%、例えば少なくとも約40%、少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%、例えば少なくとも約96%、97%、98%、99%又は100%さへの減少又は低下を包含し得る。

20

【0199】

好ましくは、意図する標的(例えばパールカン遺伝子又はタンパク質)の活性及び/又はレベルの調節は、特異的又は選択的であり得、すなわち意図する標的の活性及び/又はレベルは、無作為で無関係(意図しない、所望しない)標的の活性及び/又はレベルを実質的に変更することなく調節できる。

30

標的、例えばパールカントタンパク質の「活性」への言及は、一般的に、標的の生物活性の任意の1以上の態様、例えば、限定することなく、例えば細胞、組織、器官又は生物内でのその生化学的活性、酵素活性、シグナル伝達活性及び/又は構造活性の任意の1以上の態様を包含し得る。

【0200】

標的の治療的又は予防的ターゲティングの文脈において、標的、例えばパールカン遺伝子又はタンパク質の「レベル」への言及は、好ましくは、例えば細胞、組織、器官又は生物内での標的の量及び/又は利用可能性(例えばその生物活性を行うための利用可能性)を包含し得る。

例えば、標的のレベルは、標的の発現を調節し、及び/又は発現される標的を調節することにより調節できる。標的の発現の調節は、例えば、標的をコードするヘテロ核RNA(hnRNA)、前駆mRNA(プレmRNA)、mRNA又はcDNAのレベルにて達成又は観察できる。例えば、そして限定することなく、標的の発現の減少は、当該技術において既知の方法、例えば細胞、組織、器官又は生物に、アンチセンス物質、例えばアンチセンスDNA若しくはRNAオリゴヌクレオチド、アンチセンス物質をコードする構築物又はRNA干渉物質、例えばsiRNA若しくはshRNA、又はリボザイム又はそのようなものをコードするベクターなどを、(例えばエレクトロポレーション、リポフェクションなどにより)トランスフェクト又は(例えばウイルスベクターを用いて)形質移入することにより達成できる。例えば、そして限定することなく、標的の発現の増加は、当該技術において既知の方法、例えば細胞、組織、器官又は生物に上記の標的をコードする組換え核酸を、該細胞、組織、器官又は生物における

40

50

適切な発現レベルをもたらす調節配列の制御下で(例えばエレクトロポレーション、リポフェクションなどにより)トランスフェクト又は(例えばウイルスベクターを用いて)形質移入することにより達成できる。例えば、そして限定することなく、標的のレベルは、標的の形成の変化(例えばフォールディング又は複合体の形成を導く相互作用)及び/又は安定性(例えば複合体に会合するか又は複合体から解離する複合体構成要素の傾向)、標的の分解又は細胞局在などにより調節できる。

#### 【0201】

好ましい実施形態において、上記の調節は、タンパク質レベルでその機能を不活性化若しくは遮断するか又はパルカンのコード配列がそのタンパク質に転写及び翻訳されることを、すなわちmRNA又は遺伝子レベルにて妨げることにより、パルカン活性の減少を導く。パルカンレベルが、本明細書で定義するように腎機能不全に罹患した対象者において増加していることが明らかであるので、パルカンの活性を減少させることは、対象者の状態を正常化及び/又は改善することを意図する。

10

#### 【0202】

用語「アンチセンス」は、一般的に、遺伝子発現に干渉するように設計され、意図する標的核酸配列に特異的に結合できる分子のことをいう。アンチセンス物質は、典型的に、標的配列に特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体を包含し、典型的に、標的核酸に対応するゲノムDNA、hnRNA、mRNA又はcDNA、好ましくはmRNA又はcDNA内の配列に相補的又は実質的に相補的である核酸配列を含むか、本質的にそれからなるか又はそれからなることができる。本明細書において適切なアンチセンス物質は、典型的に、高ストリンジェントな条件にてそれらの各標的にハイブリダイズでき、生理的条件下で標的に特異的にハイブリダイズできる。

20

#### 【0203】

用語「リボザイム」は、ポリヌクレオチドを触媒作用により切断できる核酸分子、好ましくはオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体のことをいう。好ましくは、「リボザイム」は、所定の標的タンパク質のmRNAを切断し、それによりその翻訳を低減できる。本明細書で構想する例示的なりボザイムは、限定することなく、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピン型リボザイム、デルタ型リボザイムなどを含む。リボザイム及びその設計についての教示について、例えば米国特許第5,354,855号、米国特許第5,591,610号、Pierceら、1998 (Nucleic Acids Res 26: 5093~5101)、Lieberら、1995 (Mol Cell Biol 15: 540~551)及びBenselerら、1993 (J Am Chem Soc 115: 8483~8484)を参照されたい。

30

#### 【0204】

「RNA干渉」又は「RNAi」技術は、当該技術において慣例であり、本明細書で意図する適切なRNAi物質は、なかでも、当該技術において知られるように小型干渉核酸(siNA)、小型干渉RNA (siRNA)、2本鎖RNA (dsRNA)、マイクロRNA (miRNA)及び小型ヘアピンRNA (shRNA)分子を含み得る。RNAi分子及びその設計についての教示について、なかでもElbashirら、2001 (Nature 411: 494~501)、Reynoldsら、2004 (Nat Biotechnol 22: 326~30)、<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>、Wang及びMu 2004 (Bioinformatics 20: 1818~20)、Yuanら、2004 (Nucleic Acids Res 32(ウェブサーバー版): W130~4)、M Sohail 2004 (「Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application」, 第1版, CRC, ISBN 0849321417)、U Schepers 2005 (「RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C. elegans, Drosophila, and Mammals」, 第1版, Wiley-VCH, ISBN 3527310207)並びにDR Engelke及びJJ Rossi 2005 (「Methods in Enzymology, Volume 392: RNA Interference」, 第1版, Academic Press, ISBN 0121827976)を参照されたい。

40

#### 【0205】

用語「医薬的に許容される」は、本明細書で用いる場合、当該技術に矛盾せず、医薬組成物のその他の成分と相溶性であり、その受容者にとって有害でないことを意味する。

本明細書で用いる場合、「担体」又は「賦形剤」は、任意の及び全ての溶剤、希釈剤、

50

バッファー(例えば中性緩衝食塩水又はリン酸緩衝食塩水)、可溶化剤、コロイド、分散媒、ビヒクル、充填剤、キレート化剤(例えばEDTA又はグルタチオン)、アミノ酸(例えばグリシン)、タンパク質、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色料、香料、芳香付加剤(aromatisers)、増粘剤、デポー効果を達成するための物質、コーティング、抗真菌剤、防腐剤、抗酸化剤、等張性調節物質、吸収遅延剤などを含む。医薬的活性物質にこのような媒体及び物質を用いることは、当該技術において周知である。任意の従来の媒体又は物質が活性物質と相溶性でない場合を除いて、治療用組成物におけるそれらの使用が企図できる。

#### 【0206】

本活性物質(作用剤)は、単独で、又は本明細書で教示する疾患及び状態について当該技術において既知の任意の療法と組み合わせて(「併用療法」)用いることができる。本明細書で企図する併用療法は、本発明の少なくとも1つの活性物質と、少なくとも1つのその他の医薬的又は生物学的活性成分との投与を含み得る。上記の本活性物質及び医薬的又は生物学的活性成分は、同じ又は異なる医薬製剤中で、同時又は任意の順序で逐次的に投与できる。

10

#### 【0207】

場合によって投与される1以上のその他の活性化合物と組み合わせて用いられる本活性物質(作用剤)の投与量又は量は、個別の事例に依存し、慣例と同様に、最適な効果を達成するための個別の状況に適合される。つまり、これは、処置される障害の性質及び重症度、並びに性別、年齢、体重、全身の健康、食餌、投与の形態及び時間、処置されるヒト若しくは動物の個別の応答性、投与経路、用いる化合物の効力、代謝安定性及び作用持続期間、療法が急性若しくは慢性であるか又は予防的であるか、或いはその他の活性化合物が本発明の作用剤に加えて投与されるかにも依存する。

20

#### 【0208】

限定することなく、疾患の型及び重症度に依存して、典型的な1日投与量は、上記の因子に依存して約1 µg/kg~100 mg/kg体重以上の範囲であり得る。数日間以上にわたる反復投与について、状態に依存して、処置は、疾患症状の所望の抑制が出現するまで持続される。本発明の活性物質の好ましい投与量は、約0.05 mg/kg~約10 mg/kg体重の範囲であり得る。つまり、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg又は10 mg/kg(又は任意のそれらの組み合わせ)の1以上の用量を、患者に投与できる。このような用量は、間欠的、例えば毎週、2週間又は3週間ごとに投与できる。

30

#### 【0209】

本明細書で用いる場合、「処置を必要とする対象者」のような句は、本明細書で教示する所定の疾患又は状態の処置から利益を受け得る対象者を含む。このような対象者は、限定することなく、上記の状態を有すると診断された対象者、上記の状態にかかるか若しくは発生しやすい対象者及び/又は上記の状態を防止しようとする対象者を含み得る。

#### 【0210】

用語「処置する」又は「処置」は、既に発症した疾患又は状態の治療的処置及び予防的又は防止措置の両方を包含し、その狙いは、望ましくない病気の発症の見込みを妨げるか又は少なくし、例えば本明細書で教示する疾患又は状態にかかること及びその進行の見込みを妨げることである。利益のある又は所望の臨床結果は、限定することなく、1以上の症状若しくは1以上の生物学的マーカーの軽減、疾患の程度の減少、疾患の安定した(すなわち悪化しない)状態、疾患進行の遅延又は減速、疾患状態の軽減若しくは寛解などを含み得る。「処置」は、処置を受けない場合に予期される生存と比較した生存の延長を意味することもできる。

40

#### 【0211】

用語「予防有効量」は、研究者、獣医学者、医者又はその他の臨床者が求める障害の開始を対象者において阻害又は遅延する活性化合物又は医薬剤の量のことをいう。用語「治療有効量」は、本明細書で用いる場合、研究者、獣医学者、医者又はその他の臨床者が求める生物学的又は医学的応答を対象者において誘発する活性化合物又は医薬剤の量のこと

50

をいい、これは、なかでも処置される疾患又は状態の症状の軽減を含み得る。本化合物についての治療及び予防有効量を決定するための方法は、当該技術において既知である。

【0212】

上記の態様及び実施形態は、以下の非限定的な実施例により更に支持される。

【実施例】

【0213】

実施例1：発見に由来する候補マーカーの早期の確認のためのMASSterclass標的タンパク質定量

MASSTERCLASS実験構成

MASSterclassアッセイは、最終段階ペプチド定量システムとして安定同位体希釈法を用いる標的タンデム質量分析を用いる(多重反応モニタリング(MRM)及び単一反応モニタリング(SRM)ともよばれる)。標的ペプチドは、興味対象の特定タンパク質について特異的(すなわちプロテオタイプの)であり、すなわち測定されるペプチドの量が、元の試料中のタンパク質の量に正比例する。複合試料中のバイオマーカー定量に必要な特異性及び感度に達するために、ペプチド分画を、最終段階定量ステップの前に行う。

【0214】

適切なMASSterclassアッセイは、以下のステップを含み得る：

- 血漿/血清試料
- ProteoPrepスピンカラム(Sigma Aldrich)を用い、抗アルブミン及び抗IgG抗体を用いる親和性捕捉を用いるヒトアルブミン及びIgGの枯渇(タンパク質レベルでの複雑さの低減)
- 既知量の同位体標識ペプチドの添加。このペプチドは、質量の差を生じるために組み込まれた1つの同位体標識アミノ酸を典型的に有する興味対象のプロテオタイプペプチドと同じアミノ酸配列を有する。プロセス全体の中に、標識ペプチドは、分子質量に基づく最終段階定量ステップ中以外は、内因性ペプチドと同一の化学的及びクロマトグラフィーにおける挙動を有する。
- トリプシン消化。枯渇血清/血漿試料中のタンパク質を、トリプシンを用いてペプチドに消化する。この酵素は、リシン又はアルギニンのC末端にプロリンが存在する場合を除いて、タンパク質をリシン及びアルギニンのC末端で切断する。消化の前に、タンパク質を煮沸により変性させ、これによりタンパク質分子は37℃にて16時間のインキュベーションの間にトリプシン活性がより近づきやすくなる。

【0215】

- 第1のペプチドに基づく分画：フリーフロー電気泳動(FFE ; BD Diagnostic)は、ゲルフリーの流体分離技術であり、連続層流で移動する荷電分子が流れに対して垂直の電場により分離される。電場により、荷電分子はその等電点(pI)に従ってpH勾配中で分離される。モニターするペプチドを含有する画分だけを、更なる分画及びLC-MS/MS分析のために選択する。興味対象の各ペプチドをFFEチャンバから特定の画分番号(これは、合成ペプチドホモログを用いるタンパク質アッセイ開発中に決定する)にて溶出する。特定の画分又は画分プール(多重化(multiplexing))は、次のレベルの分画に進んだ。
- 第2のペプチドに基づく分画：フェニルHPLC (XBridge Phenyl ; Waters)は、ペプチドを、ペプチド配列中に存在するアミノ酸の疎水性及び芳香族の性質に従って分離する。バックエンドC18分離を用いる直交性は、増加したpH値(pH 10)でカラムを操作することにより達成する。Gilarら2005, J Sep Sci 28(14): 1694 ~ 1703により証明されるように、pHは、RP-HPLCにおけるペプチド選択性を変更するための各段に最も劇的なパラメータである。興味対象の各ペプチドは、フェニルカラムから特定の保持時間にて溶出され、これは、合成ペプチドホモログを用いるタンパク質アッセイ開発中に決定される。9つの標準ペプチドの混合物を試料分離のバッチの前に分離する外的対照システムを用いることにより、保持時間シフトを修正するために画分回収を調整することが可能になる。分画の程度は、試料中のタンパク質の濃度及び試料の複雑さに依存する。
- 逆相(C18)ナノLC (PepMap C18 ; Dionex)及びMS/MS : MRM (4000 QTRAP ; ABI)/SRM (Vantage TSQ ; Thermo Scientific)モードを用いるタンデム質量分析での更なる分離を含むLC-

10

20

30

40

50

MS/MSに基づく定量。LCカラムは、質量分析計のソースヘッドに連結されたエレクトロスプレーの針に連結する。物質がカラムから溶出されるにつれ、分子はイオン化され、気相の質量分析計に入る。モニタリングされるペプチドは、第1四重極(Q1)を通過するように、その質量電荷比(m/z)に基づいて特異的に選択される。選択されたペプチドは、次いで、衝突セルとして用いられる第2四重極(Q2)においてフラグメンテーションされる。得られたフラグメントは、次いで、第3四重極(Q3)に入る。装置の設定により(アッセイ開発段階中に決定される)、1又は複数の特異的ペプチドフラグメント(又はいわゆるトランジション)のみが検出のために選択される。

- モニターするペプチドのm/zとこのペプチドのモニターするフラグメントのm/zとの組み合わせは、トランジションとよばれる。このプロセスは、1つの実験中の複数のトランジションについて行うことができる。内因性ペプチド(分析物)及びその対応する同位体標識合成ペプチド(内部標準物質)はともに、同じ保持時間にて溶出され、同じLC-MS/MS実験において測定される。

- MASSterclassの読出しは、分析物に特異的なピーク下面積と、合成同位体標識類似体(内部標準物質)に特異的なピーク下面積との比により定義される。MASSterclass読出しは、試料中のタンパク質の元の濃度に正比例する。MASSterclass読出しは、よって、異なる試料及び試料の群の間で比較できる。

#### 【0216】

本研究において従った典型的なMASSTERCLASSプロトコルを以下に示す：

- 25 µLの血漿を、20mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を結合/平衡化バッファーとして用いた以外は、製造業者のプロトコルに従って(ProteoPrepスピンカラム；Sigma Aldrich)、ヒトアルブミン及びIgGの枯濁に供する。

- 濁濁試料(225 µL)を、95 にて15分間変性させ、直ちに氷上で冷却する。

- 500 fmolの同位体標識ペプチド(カスタム調製「Heavy AQUA」ペプチド；Thermo Scientific)を試料に添加する。

- 20 µgのトリプシンを試料に加え、37 にて16時間消化を行う。

- 消化した試料を、まず、溶剤A(0.1%ギ酸)中で1/8、次いで250 amol/µLの全て同位体標識した興味対象ペプチド(カスタム調製「Heavy AQUA」ペプチド；Thermo Scientific)を含有する同じ溶剤中で1/20に希釈した。

- 20 µLの最終希釈物を、オンラインMS/MSを有する逆相NanoLCをMRM/SRMモードで用いて分離した：

- カラム：PepMap C18、75 µm I.D. × 25cm L、100 孔径、5 µm粒子サイズ

- 溶剤A：0.1%ギ酸

- 溶剤B：80%アセトニトリル、0.1%ギ酸

- 勾配：30分；2%～55% 溶剤B

- MRMモードでのMS/MS：方法は、分析物及び合成標識ペプチドについてのトランジションを含む。

- 用いたトランジションは、タンパク質アッセイ開発中に実験的に決定して選択した。

- 興味対象のトランジションのそれぞれは、興味対象のペプチドの決定された保持時間の3分前に開始して3分後に終了する期間にわたって測定して、各ピークが少なくとも15のデータ点を有することを確実にした。

- 未処理データを、LCQuanソフトウェア(Thermo Scientific)を用いて分析して定量した：同じC18保持時間での分析物(=パールカンペプチド)ピーク下面積及び内部標準物質(標識合成パールカンペプチド)ピーク下面積を、自動ピーク検出により決定した。これらは、手動で確認した。

- MASSterclass読出しは、分析物ピーク面積と内部標準物質ピーク面積の比により定義した。

#### 【0217】

MASSTERCLASS読出し

測定した比は、ペプチドの示差的な量である。言い換えると、比は、ペプチドの正規化

した濃度である。ペプチドの濃度は、質量分析計において測定した比に比例する。

【0218】

実施例2：急性呼吸困難試料のパールカンについてのスクリーニング

本実施例では、呼吸困難患者の評価のためのパールカン測定の臨床的有用性を評価した。

本研究で用いた299の臨床試料は、最も優勢な症状として呼吸困難を有してBASEL大学病院のEDで診察を受けた治療継続患者についての前向き研究であるBASEL Vコホートの一部である(このコホートの一部は、Potockiら, *Journal of Internal Medicine* 2010 Jan;267(1):119~29に記載される)。急性心不全の診断についての最も基準となるものは、90日フォローアップデータ及びBNPレベルを含む患者に関する全ての医療記録についての2人の別々の心臓病専門医の解釈に基づいた。これに基づいて、患者の56% (n=168)は、急性心不全イベントを有すると判定され、その他のものは非心不全呼吸困難と分類された。患者の人口統計、医療病歴、慢性の薬物療法、腎機能パラメータ、エコーパラメータ、確立された心臓及び炎症マーカーレベルを含む広範囲の臨床的及びマーカー変量を収集した(まとめについて表1を参照)。糸球体濾過速度は、腎疾患における食餌の改変(Modification of Diet in Renal Disease; MDRD)式を用いて算出した(Stevensら, *New England Journal of Medicine* 2006; 354:2473~83)。患者は、入院後少なくとも1年間フォローアップし、全ての原因の死亡を記録した。

10

【0219】

パールカン及びシスタチンCレベルを、MASSterclass(登録商標)アッセイを用いて実施例1に記載するようにして測定した。BNP、NT-proBNP及びCRPレベルを、Potockiら(2010)に記載される市販で入手可能なイムノアッセイを用いて測定した。

20

特定のタンパク質の診断における正確性を、受信者動作特性(ROC)曲線下面積(AUC)を、Sullivan Pepe M (*The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*. 1993 Oxford University Press New York)におけるようにして測定することにより決定した。AUCについての推定及び信頼区間も、ノンパラメトリックアプローチ、すなわちブートストラッピングを用いて計算した(Efron B, Tibshirani RJ. *Nonparametric confidence intervals. An introduction to the bootstrap*. Monographs on statistics and applied probability. 1993; 57:75~90 Chapman & Hall New York)。

30

【0220】

全ての入手可能な臨床パラメータとのパールカン、シスタチンC、BNP、NT-proBNP及びCRPレベルの関連を、一変量統計法を用いて計算した。Spearmanの順位検定を用いて相関係数を計算し、Wilcoxon順位和検定を用いて、観察している2つの独立した試料が同じ集団を起源とするかを評価した。

【0221】

【表 1】

表1: 研究に含まれる患者の特徴のまとめ。

特徴	全ての患者 (n=299)
年齢 (歳)	77
性別 (%男性)	52
<b>BMI</b>	26
<b>履歴 (%)</b>	
高血圧症	68
心不全	24
CAD	28
糖尿病	18
COPD	34
慢性腎臓疾患	28
<b>身体的/ECG</b>	
心拍数	93 ± 23
収縮期bp	138 ± 26
拡張期bp	83 ± 16
LVEF	24 (20-28)
<b>lab s</b>	
クレアチニン (umol/L)	85 (66-120)
eGFR (mL/分 /1.73m <sup>2</sup> )	67 (44-89)
BNP (pg/mL)	350 (90-1120)
Nt-proBNP (pg/mL)	1656 (314-6105)
<b>診断(%)</b>	
ADHF	56%
肺炎	10%
肺塞栓症	3%
COPD/喘息	16%
過換気症	3%
その他	12%
<b>転帰</b>	
1年目での生存	73%

10

20

30

## 【 0 2 2 2 】

実施例 3 : パールカンは腎臓機能パラメータと関連する

急性呼吸困難患者(実施例 2)をパールカンレベルについてスクリーニングすることにより、推定糸球体濾過速度(eGfr)、クレアチニンレベル及び血中尿素窒素(BUN)レベルでの Spearman 順位相関についての低い p 値並びに腎臓不全の病歴の有無についての Wilcoxon の低い p 値により示されるように(表 2 にまとめる)、パールカンレベルが腎臓機能に関連する全ての入手可能な臨床パラメータと関連することが明確に示された。図 2 は、パールカンと eGfr との相関を示し、これは、パールカンが糸球体濾過の良好な指標であることを示す。パールカンと濾過との相関は、Gfr についての既知の良好なマーカーであるシスタチン C との相関により更に支持される。シスタチン C は、これらの試料中で MASSterclass 技術を用いても測定した。パールカンとシスタチン C 及び eGfr との相関は、急性非代償性心不全の存在について補正した後に妥当なままである(表 2)。

40

50

【 0 2 2 3 】

【表 2 - 1】

表2: シスタチンCおよびパールカンについての一変量関連についての統計のまとめ。  
Spearman順位検定について言及する値は、2の連続変数間の相関係数である。Wilcoxon検定は、連続マーカーレベルおよび2の離散集団の間の関連の有意性を示すp値を生じる。

コホート	集団1	集団2	パールカン
BASEL	AHF (n=85)	非AHF呼吸困難(n=69)	0.76 (0.68-0.83)
BASEL	腎臓不全 (n=40)	腎臓不全なし (n=115)	0.91 (0.83-0.97)

10

【 0 2 2 4 】

【表 2 - 2】

	集団	パールカン
<i>history_kidney.failure</i>	AHF	1.16E-07
<i>history_kidney.failure</i>	非AHF呼吸困難	0.004415
<i>lab_creatinine</i>	AHF	4.78E-12
<i>lab_creatinine</i>	非AHF呼吸困難	3.94E-08
<i>lab_creatinine.bin.150</i>	AHF	3.77E-08
<i>lab_creatinine.bin.150</i>	非AHF呼吸困難	0.005128
<i>lab_creatinine.bin.250</i>	AHF	
<i>lab_creatinine.bin.250</i>	非AHF呼吸困難	
<i>lab_gfr</i>	AHF	1.34E-11
<i>lab_gfr</i>	非AHF呼吸困難	3.70E-08
<i>lab_urea.bin.7.5</i>	AHF	2.16E-08
<i>lab_urea.bin.7.5</i>	非AHF呼吸困難	0.000257
<i>Cystatin C_MC089_B</i>	AHF	0
<i>Cystatin C_MC089_B</i>	非AHF呼吸困難	1.27E-08
<i>medication.on.admission_diuretic</i>	AHF	5.04E-06
<i>medication.on.admission_diuretic</i>	非AHF呼吸困難	

## 【0225】

## 実施例 4：腎機能不全のマーカとしてのパールカン

推定糸球体濾過速度は、腎臓がどれだけ良好に機能しているかについての良好な指標である。最短で3ヶ月間60未満のeGfrである患者を、慢性腎臓疾患(CKD)とみなした。研究下の急性呼吸困難母集団は、107名の低下したeGfrを有する患者 対 192名のより正常な糸球体濾過速度を有する患者を有する。

## 【0226】

受信者動作特性(ROC)分析は、0.85~0.93の95% CIでの0.9の全体的なAUC中央値により示されるように(図3)、この呼吸困難患者の集団において、パールカンが、腎臓機能不全を診断するために高感度で特異性が高いことを証明した。この診断性能は、慢性腎臓疾患についての最良の利用可能なバイオマーカーであるシスタチンCと同等である。

図4は、低下した(<60)、中間の(60~90)及び正常(>90)推定糸球体濾過速度を有する患者においてMASSterclassにより測定されるパールカンの相対レベルを示す。低下したeGfrを有する患者を有する患者のうちのパールカンレベル中央値は、正常eGfr(>90)を有する患者より4.7倍高かった。パールカンレベルは、わずかに低下した腎臓機能を有する

患者 (eGfr が 60 ~ 90 の間) においても上昇する。

【 0 2 2 7 】

実施例 5 : 腎機能の急性変化についてのマーカーとしてのパルカン

パルカンとシスタチン C 及び eGfr との相関は、急性非代償性心不全の存在について補正した後に妥当なままである。AHF 患者における相関は、パルカンが、心臓の急性代償不全 (すなわち心拍出量の低下) による eGfr の急性変化を検出できることを暗示する。

治療的介入により心拍出量及び腎機能を回復した後に、パルカンレベルもベースラインレベルに戻る。

【 0 2 2 8 】

実施例 6 : 死亡についての予知マーカーとしてのパルカン

研究下の急性呼吸困難患者のコホートにおいて、患者を、入院後少なくとも 1 年間フォローアップした。入院後 1 年にて、82/299 の対象者 (27%) が死亡した (全ての原因の死亡)。パルカン並びにその他の臨床的及びマーカー変量と死亡との関係を、異なる方法を用いて研究した。1 年目での死亡を参照基準として用いる受信者動作特性分析を行い、曲線下面積の中央値を算出した。「生存」及び「死亡」患者におけるマーカーレベルの分布を、Wilcoxon 順位和検定を用いて比較した。Kaplan Meier 曲線は、パルカンレベルの関数として分割した群における、発症の後のフォローアップ期間全体にわたる死亡を比較した。

10

【 0 2 2 9 】

急性呼吸困難の患者における発症時のパルカン濃度は、1 年までに死亡した患者のうちで (n=82 ; 27%)、生存していた患者と比較して有意により高かった ( $p=2e^{-11}$ )。死亡者におけるパルカン濃度がより高いこのパターンは、対象者を、急性心不全の存在 ( $p=3.5e^{-08}$ ) 又は非存在 ( $p=0.01$ ) の関数として考慮した場合、及び集団を腎機能について分割した場合 (eGfr < 60 ;  $p=8.8e^{-05}$  対 eGfr > 60 ;  $p=0.0003$ ) に、そのままであった。このことは、パルカンが、呼吸困難の一般集団並びに急性心不全集団及び慢性腎臓疾患集団における不良な転帰を予知する可能性を有することを示す。

20

【 0 2 3 0 】

更に、1 年目での死亡率の関数として調べたパルカン濃度のデシル分析は、マーカーの濃度の上昇とともに死亡の段階的な増加があったことを明らかにした。全ての急性呼吸困難患者において 1 年目の死亡を予知するために行った ROC 分析は、パルカンについて 0.74 の AUC を示し (95% CI : 0.64 ~ 0.83)、これは、NT-proBNP と同様であったが (AUC=0.77)、BNP、シスタチン C 及び CRP タンパク質マーカーより高かった (図 5)。

30

【 0 2 3 1 】

実施例 7 : パルカンは、術後患者における腎置換療法の必要性を予知する

パルカンレベルを、心臓手術患者のコホート (n=100) において、手術前及び術後 24 時間の両方で更に研究した。患者は、50 名の対照とマッチさせた、フォローアップ中に AKI を発症した 50 名の患者を含むように選択した。100 名の患者のうち、12% がフォローアップ中に腎置換療法 (RRT) を必要とした。表 3 は、本研究に含めた患者の特徴をまとめる。検出されたペプチドは、配列番号 4 及び 6 で表される。

【 0 2 3 2 】

40

【表 3】

表3: 心臓手術を受けた患者の特徴の概要

変数	RRTなし (n=88)	RRT (n=12)	P値
年齢(歳)	69.5	73.5	p=0.04
年齢 > 70歳	53% (n=47)	69% (n=8)	p=0.22
性別(%男性)	76% (n=67)	69% (n=8)	p=0.72
手術の型			
CABG	55% (n=48)	33% (n=4)	p=0.2
弁修復 / 置換	72% (n=63)	67% (n=8)	p=0.7
付随	30% (n=26)	25% (n=3)	p=1
手術前腎臓機能			
eGfr	63.8 (54-77)	47.5 (41-67)	p=0.07
血清クレアチニン	88.4	122.4	p=0.06
血清クレアチニン > 120umol/L		50% (n=6)	
医療履歴			
NYHA IIIまたはIV	26% (n=23)	0	p=1
LVEF	52.5 (39.25-60)	50 (45-60)	p=0.97
COPD	17% (n=15)	33% (n=4)	P=0.25
IDDM	6% (n=5)	0	P=0.61
転帰			
AKI	44%	91% (n=10)	0.004

10

20

## 【 0 2 3 3 】

パールカン、シスタチンC、ラクテート、NGAL (血漿及び尿)及び血清クレアチニンレベルを、手術前(選定時(at induction))及び術後24時間にて測定した。パールカン及びシスタチンCはMASSterclassを用いて測定し、尿NGALはABBOTT Architect (ABBOTT diagnostics, Germany)で測定し、血漿NGALはBioporto NGALアッセイ(Bioporto diagnostics, Denmark)を用いて測定した。RRTの必要性を予知する異なるマーカーの性能を算出し、表4にまとめる。図6は、手術の前及び後の異なる時点でクレアチニンに基づく予知と比較したパールカンの性能を示す。術後24時間で測定したパールカンは、RRTの必要性の良好な予知因子であり、この時点にて、クレアチニンに基づく予知よりも3~4日早くそのようにする。24時間の時点にて、パールカンは、クレアチニン又はeGfrよりも有意により良い性能を有する。既に手術前においても、パールカンは、RRTの必要性を予知するより良い性能を示す。

30

## 【 0 2 3 4 】

【表 4】

表4:手術前および術後24時間の両方にてRRT必要性を予測する異なるマーカーの性能

時点	タンパク質/マーカー	AUC (95% CI)
手術前	Ngal (血漿)	0.69 (0.50-0.84)
手術前	Ngal (尿)	0.52 (0.30-0.74)
手術前	ラクテート	0.58 (0.43-0.72)
手術前	シスタチンC	0.76 (0.61-0.88)
手術前	パールカン	0.77 (0.62-0.88)
術後24時間	Ngal (血漿)	0.73 (0.55-0.88)
術後24時間	Ngal (尿)	0.58 (0.38-0.78)
術後24時間	ラクテート	0.68 (0.48-0.85)
術後24時間	クレアチニン	0.75 (0.59-0.88)
術後24時間	シスタチンC	0.87 (0.78-0.94)
術後24時間	パールカン	0.89 (0.81-0.95)

10

## 【0235】

実施例 8 : 異なるパールカンペプチドは、腎臓濾過機能との異なる関係を示すことがある。パールカン分子の異なるドメイン/鎖を定量する異なるMASSterclassアッセイを構築した(表 5 及び図 7 を参照)。配列番号 7 に基づくアッセイは大きいパールカン分子に特異的である一方、配列番号 4 及び 6 に基づくアッセイは、パールカンの報告されている生物活性フラグメントであるLG3ペプチドを標的にする。LG3ペプチドを標的にするアッセイは、しかし、このペプチドに特異的でなく、エンドレペリン及びパールカン分子全体も定量する。

20

## 【0236】

異なるアッセイを用いて、I型糖尿病患者のコホートにおける腎臓濾過機能を測定した。これらの患者は、正常からeGfrが40ml/分/1.72m<sup>2</sup>未満の重度に損なわれた腎臓機能までの範囲で、eGfrの良好な広がりを持つ。LG3アッセイを用いて測定されるレベルは、ここでもまたeGfrとうまく相関し(図7を参照)、このことは、両方のLG3アッセイについても真である。この特定の実験において、パールカン特異的アッセイは、eGfr及びその他の濾過機能関連マーカー、例えばシスタチンC及びベータ-トレースと比較的より乏しい相関を示す。よって、観察される濾過機能は、おそらく、LG3ペプチド(及び/又はエンドレペリン分子)に由来し、パールカン分子全体に由来しない。

30

## 【0237】

【表 5】

配列	位置	鎖	配列番号
GSIQVDGEELVSGR	4305-4318	LG3ドメイン	4
SLPEVPETIELEVR	4222-4235	LG3ドメイン	6
LEGDTLIIPR	3258-3267	パールカンドメイン	7

40

## 【0238】

結果を、図 7 及び以下の表 6 に示す。

## 【0239】

【表 6】

相関係数	$r^2$	パールカンアッセイ	LG3/エンドレペリン アッセイ
シスタチンC		0.216	0.923
LG3/エンドレペリン		0.214	0.937
ペーダトレース		0.162	0.897

## 【 図 1 - 1 】

## 配列番号1

1 mgwraagall lalllhgrll avthglrayd glslpediet vtasqmrwth sylsddedml  
61 adsisgddlg sgdlgsgdfq mvyfralvnf trsieyspql edagsrefre vseavvdtle  
121 seylkipgdq vsvvfikel dgwvfveldv gsegnadgaq iqemllrvis sgsvasyvts  
181 pqgfqfrrlg tvpqfpract eaefachsyn ecvaleyrce rrpdcrdmsd elnceepvlg  
241 isptfslive ttslpprpet timrqppvth apqllpgsv rplpcgpqea acrnghcipr  
301 dylcdgqedc edgsdelcgc ppppcepnef pcgnghcalk lwrcdgdgfdc edrtdeancp  
361 tkrpeevcgp tqfrcvstnm cipasfhcde esdcpdrsde fgcmppqvvt ppresiqasr  
421 gqvtvftcva igvptpiinw rlnwghipsh prvtvtsegg rgtliirdvk esdqgaytce  
481 amnargmvfg ipdgvlelvp qrgpcpdghf ylehsaacpl cfcfgitsvc qstrrfrdqi  
541 rlrfdqpddf kgvntmpaq pgtplsstq lqidpslhev qlvdlrrfl vhdswalpe  
601 qflgnkvdsy ggslrynvry elargmlepvr qrpdvvlvga gyrlsrght ptqpgalnqr  
661 qvqfseehwv hesgrpvqra ellqvlqsle avliqtvynt kmasvgltdi amdtvtthat  
721 shgrahsvee crcpigysgl scescdahft rvpggpylgt csgcncngha sscdpvyghc  
781 lncqhntegp qcnkckagff gdamkatats crpcpcpyid asrrfsdtcf ltddgqatcd  
841 acapgytgrr cescapgyeg npiqpggkcr pvnqeivrce ergsmgtsge acrcknnvvg  
901 rlcnecadgs fhlsrnpdg clkcfcmgvs rhctssswsr aqlhgaseep ghfsltnaas  
961 thttnegifs ptpgelgfss fhrlsgpyf wslpsrflgd kvtsyggelr ftvtqrsqpg  
1021 stplhgqplv vlqgnniile hvvaqepspg qpstfivpfr eqawqrpdgq patrehllma  
1081 lagidtlir asyaqppaes rvsgismdva vpeetgqdpv leveqcscpp gyrgpscqdc  
1141 dtgytrtpsg lylgtcercs chghseacep etgacqgcqh htegrprceqc qpgyygdaqr  
1201 gtpqdcqlcp cygdpaagqa ahtcfltdg hptcdacspg hsgrhcerca pgyygnpsqg  
1261 qpcqrdsqvp gpigcncdpq gsvssqdaa gqcqckaave gltshcrph hfhlsasnpd  
1321 gclpcfcmgi tqqcassayt rhlisthfap gdfqgfalvn pqrnsrltge ftvepvpega  
1381 qlsfgnfaql ghesfywqlp etyqgdkvaa yggklrytls ytagpqqspl sdpdvqitgn  
1441 nimlvasqpa lqgperrsyse imfreefwrr pdgqpatreh llmaladlde lliratfssv

## 【 図 1 - 2 】

1501 plaasisavs levaqppsn rpraleveec rcpogyigls cqdcapgytr tgsglylghc  
 1561 elcecnghsd lchpetgacs qcqhnaagef celcapgyyg datagtpedc qpcacpltnp  
 1621 enmfsrtces lgaggyrcta cepgytgqyc eqcgpgyvgn psvqggqclp etnqaplvve  
 1681 vhparsivpq ggshslrcqv sgspphyfyw sredgrpvps gtqqrhggse lhfpsvqpsd  
 1741 agvyictcrn lqsnstsrar llvteapskp itvtveeqrs qsvrpgadvf fictaksksp  
 1801 aytlvwtrlh ngklptramd fngiltirnv qlsdagtyvc tgsnmfamdq gtatlhvqas  
 1861 gtlsapvvsj hppqltvqpg qlaefrcsat gsptptlewt gpgggqlpak aqihggilrl  
 1921 paveptdqaq ylcrahsag qqvaravlvh hggggprvqv spertqvahg rtrvlycraa  
 1981 gvpsatitwr keggslppqa rsertdiatl lipaittada gfyldvatsp agtaqariqv  
 2041 vvlsasdaspp pvkiesssp svteggqtdl ncvvagsaha qvtwyrnggs lphtqvghs  
 2101 rrlrpqvspa dsgeyvcrve ngsgpkeasi tvsvlhgths gpsytpvpgs trpirieps  
 2161 shvaegqtdl lncvvpqah aqvtwhkrhg slparhqthg slrlrhqvtp adsgyvchv  
 2221 vgtsgpleas vlvteasvi pggippvrie sssstvaeqg tdlscvrag qahaqvwyk  
 2281 rggslparhq vrgsrlyifq aspadagqyv crasngmeas itvtvtgtqg anlaypagst  
 2341 qpiriepsss qvaegqtdl ncvvpgqsha qvtwhkrngs lpvrhqthgs llrlyqaspa  
 2401 dsgeyvcrvl gssvpleasv lvtiepagsv palgvtptvr iessssqvae gqtdlncvl  
 2461 agqahaqvtw hkrngslpar hqvghsrllrl lqvtpadsge yvcrvngssg tqeasvlvti  
 2521 qqrlsgshsq gvaypvries ssaslanght ldlncvasq aphtitwykr ggslpsrhqi  
 2581 vgsrlripqv tpadsgeyvc hvsngagsre tslivtiqgs gshvpsvsp piriesspt  
 2641 vvegqtdln cvvarqpai itwykrngsl psrhqthgsh lrlhqmsvad sgeyvcrann  
 2701 nidaleasiv isvpsagsp sapgssmpir iesssshvae getldlncv ppqahaqvtw  
 2761 hkrngslpsh hqtrgsrlrl hhvspadsge yvcrvmgssg pleasvlvti easgssavhv  
 2821 papggappir iepsssrvaeg qqtdlkcvc ppqahaqvtw hkrngnlpar hqvghprrl  
 2881 nqvspadsge yscqvngssg tleasvlvti epssppipa pglapqiyie assshvtegg  
 2941 tdlncvvpq qahaqvwyk rggslparhq thgsqrlrhl vspadsgeyv craasgpgpe  
 3001 qeasftvtp psegssyrlr spvisidpps stvqqqdas fkclihdga pislewktrn  
 3061 qelednvhis pngsiitivg trpsnhgtyr cvasnaygva qsvvnlsvhg pptvsvlpeg  
 3121 pvwkvvgkav tlecvsagep rrsarwtris stpakleqrt yglmdshavl qissakpsda  
 3181 gtyvclaqa lgtaqkqvev ivdtgamapq apqvqaeae ltveaghtat lrscatgspa

## 【 ㊦ 1 - 3 】

3241 ptihwsklrs plpwqhrleg dtliiprvaq qdsgqyicna tspaghaeat iilhvesppy  
 3301 attvpehasv qagetvqlqc lahgtpplft qwsrvgsslp gratarnell hferaapeds  
 3361 gryrcrvtnk vgsaeafaql lvqgppgslp atsipagstp tvqvtpqlet ksigasvefh  
 3421 cavpsdrqtq lrwfkeggql ppghsvqdgvl lriqnlldqsc qgtyicqahg pwgkaqasaq  
 3481 lviqalpsvl inirtsvqtv vvghavefec lalgdpkpqv twskvgghlr pgivqsggvv  
 3541 riahvelada gqyrctatna agttqshvll lvqalpqism pquevrpags aavfpciasg  
 3601 yptpdiswsk ldgslppdsr lennmlmlps vrpqdagtyv ctatnrqgkv kafahlqvpe  
 3661 rvvpyftqtp ysflplptik dayrkfeiki tfrpdsadgm llyngqkrvp gsptnlanrq  
3721 pdfisfglvq grpefrfdag sgmahirhpt plalghfhtv tllrsltqgs livgdlapvn  
3781 gtsqgkfqgl dlneelylgg ypdyaipka glssgfigcv relriggeei vfhdlnltah  
3841 gishcptcrd rpcqngggch dsesssyvcv cpagftgsrc ehsqalhchp eacgpdatcv  
 3901 nrpdgrgytc rchlgrsgrl ceegvtvttp slsgagsyla lpaltnthhe lrlldvefkpl  
3961 apdgvllfsg gksqpvedfv slamvgghle fryelgsgla vlrsaaplal grwhrvsaer  
 4021 lnkdgslrvn ggrpvlrssp gksqglnlht llylggveps vplspatnms ahfrgcvgev  
 4081 svngkrlldt ysflgsggig qcydsspcer qpcqhgatcm pageyefqcl crdgfkqdlc  
4141 eheenpcqlr epclhggtcq gtrclclpgf sgprcqqgsg hgiaesdwhl egsggndapq  
4201 qygayfhddg flafpghvfs rslpevpeti elevrtstas glllwqgvev geagqgkdfi  
4261 slglqdghlv fryqlgsgea rlvsedpind gewhrvtalr egrrGSIQVD GEELVSGRsp  
4321 gpnvavnakg svyiggapdv atltggrfss gitgcvknlv lhsarPGAPP PQPLDLQHRa  
4381 qagantrpcp s

## 【 図 1 - 4 】

## 配列番号2:

1 eikitfrpds adgmlllyngq krvpgsptnl anrqpdfisf glvggrpefr fdagsgmati  
 61 rhptplalgh fhtvtllrsl tqgslivgdl apvngtsqgk fqgldlneel ylggyppyga  
 121 ipkaglssgf igcvrelriq geeivfhdl nltahgishcp tcrdrpcqng gqchdsesss  
 181 yvcvcpagft gsrcehsqal hchpeacgpd atcvnrpdgr gytrchhlgr sglrceegvt  
 241 vtttpslsgag sylalpaltn thhelrldve fkplapdgvl lfsaggksgpv edfvslamvg  
 301 ghlefryelg sglavlrsae plalgrwhrv saerlnkdgs lrvnggrpvl rsspqksqgl  
 361 nlhtllylgg vepsvplspa tnmsahfrgc vgevsvngkr ldltysflgs qgigqcydss  
 421 pcerqpcqhg atcmpageye fqclcrdgfk gdlceheenp cqlrepclhg gtcqgtrclc  
 481 lpgfsgprcq qgsgghgiaes dwhlegsggn dapgqygayf hddgflafpg hvfsrslpev  
 541 petielevrt stasglllwq gvevgeaggg kdfislglqd ghlfvryqlg sgearlvsed  
 601 pindgewhrv talregrrgs iqvdgeelvs grspgpnvav nakgsvyigg apdvatltgg  
 661 rfssgitgcv knlvlhsarp gappqppldl qhraqagant rpcps

## 配列番号3:

1 dapgqygayf hddgflafpg hvfsrslpev petielevrt stasglllwq gvevgeaggg  
 61 kdfislglqd ghlfvryqlg sgearlvsed pindgewhrv talregrrgs iqvdgeelvs  
 121 grspgpnvav nakgsvyigg apdvatltgg rfssgitgcv knlvlhsarp gappqppldl  
 181 qhraqagant rpcps

配列番号4: GSIQVDGEELVSGR

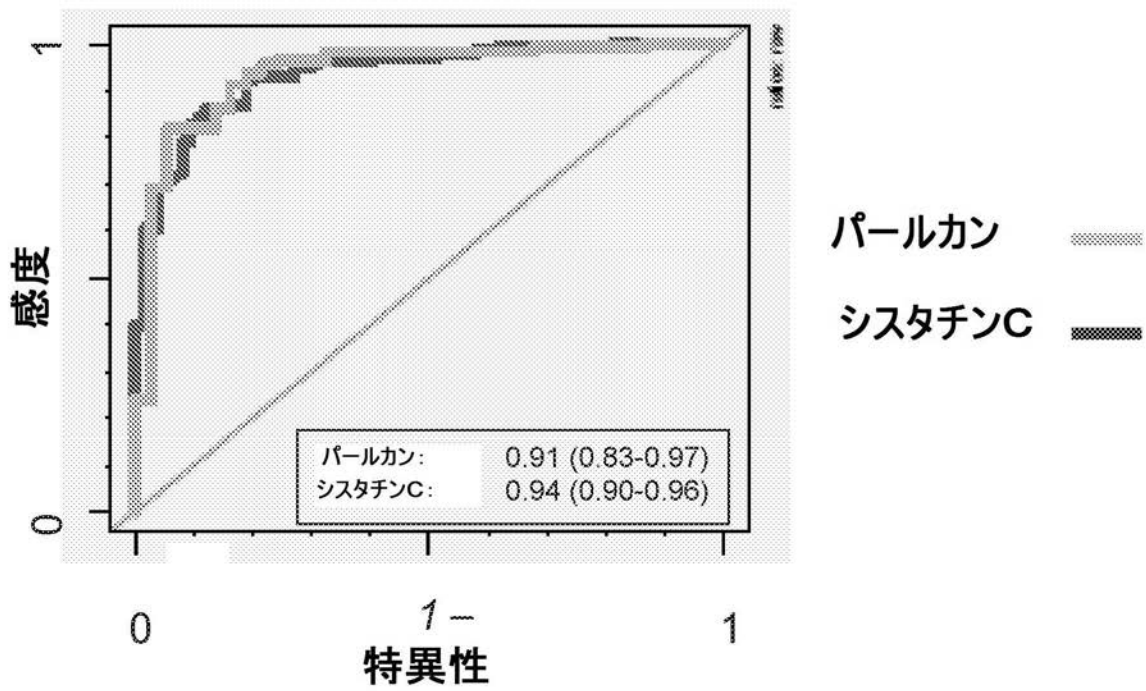
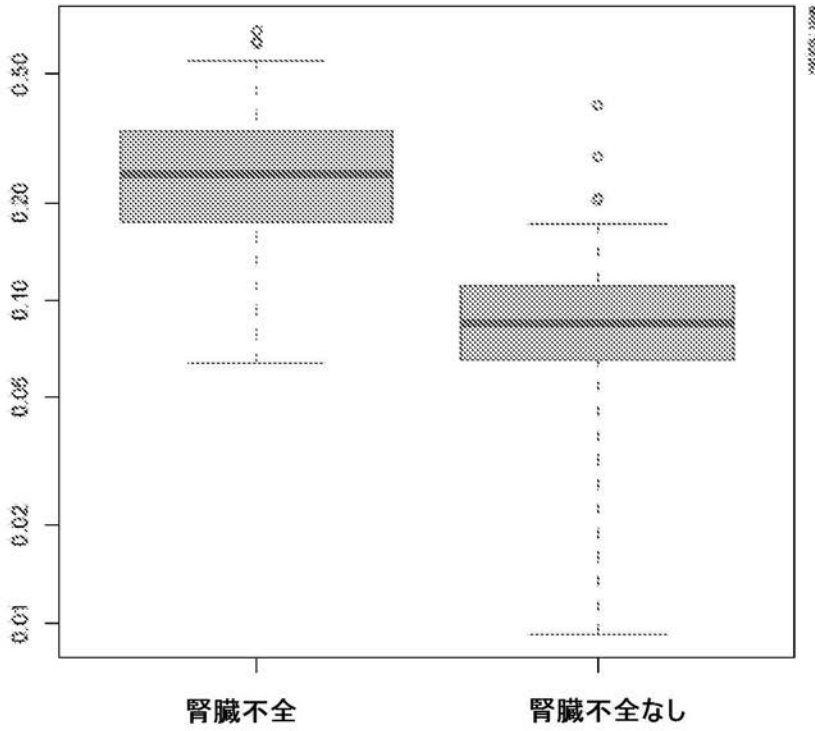
配列番号5: PGAPPPQPLDLQHR

配列番号6: SLPEVPETIELEVR

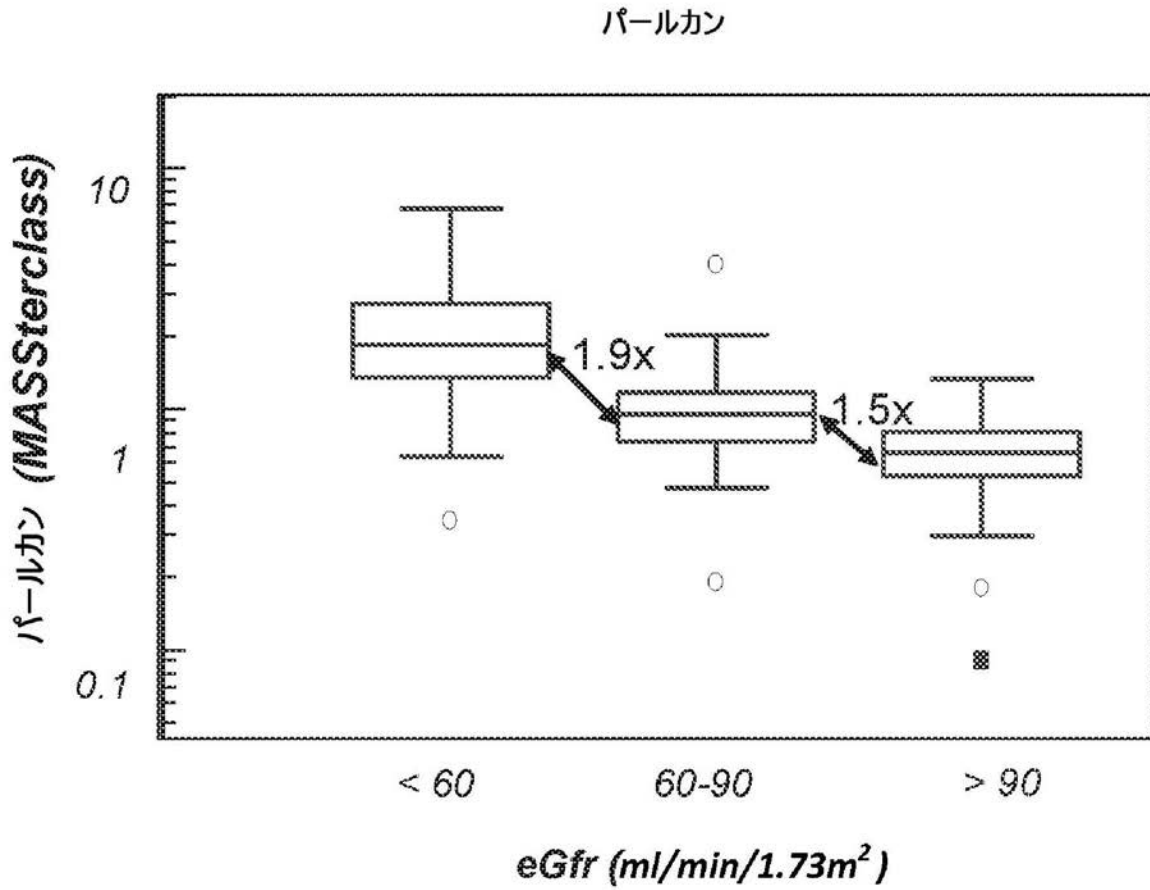
配列番号7: LEGDTLIIPR



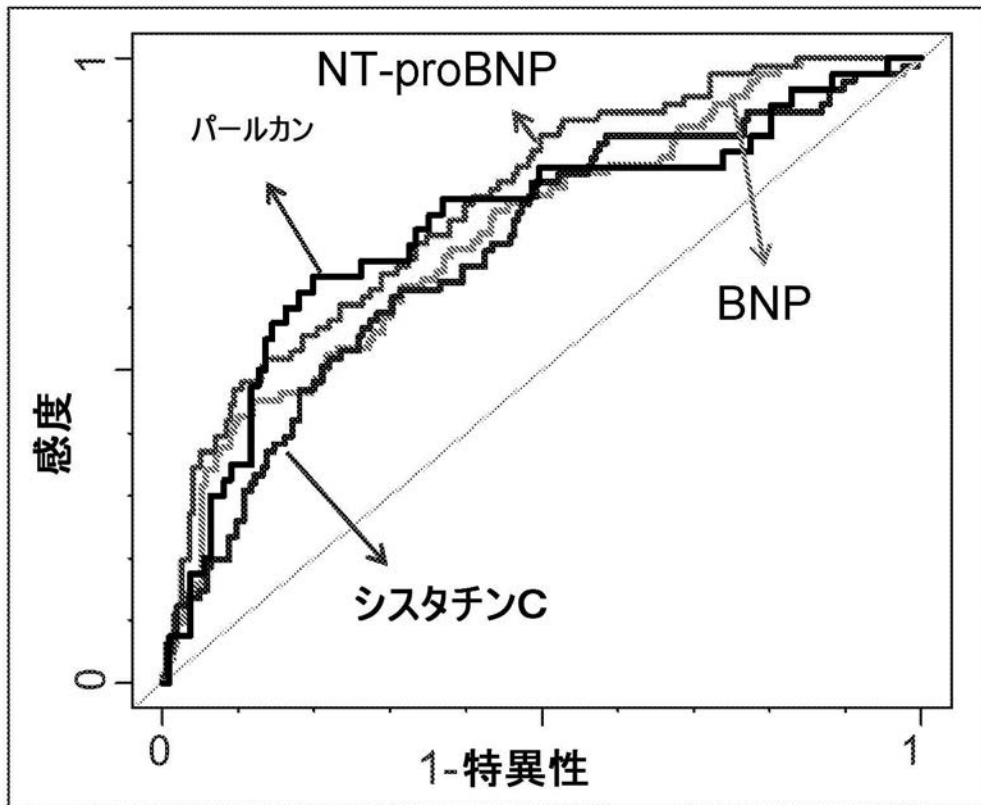
【 図 3 】



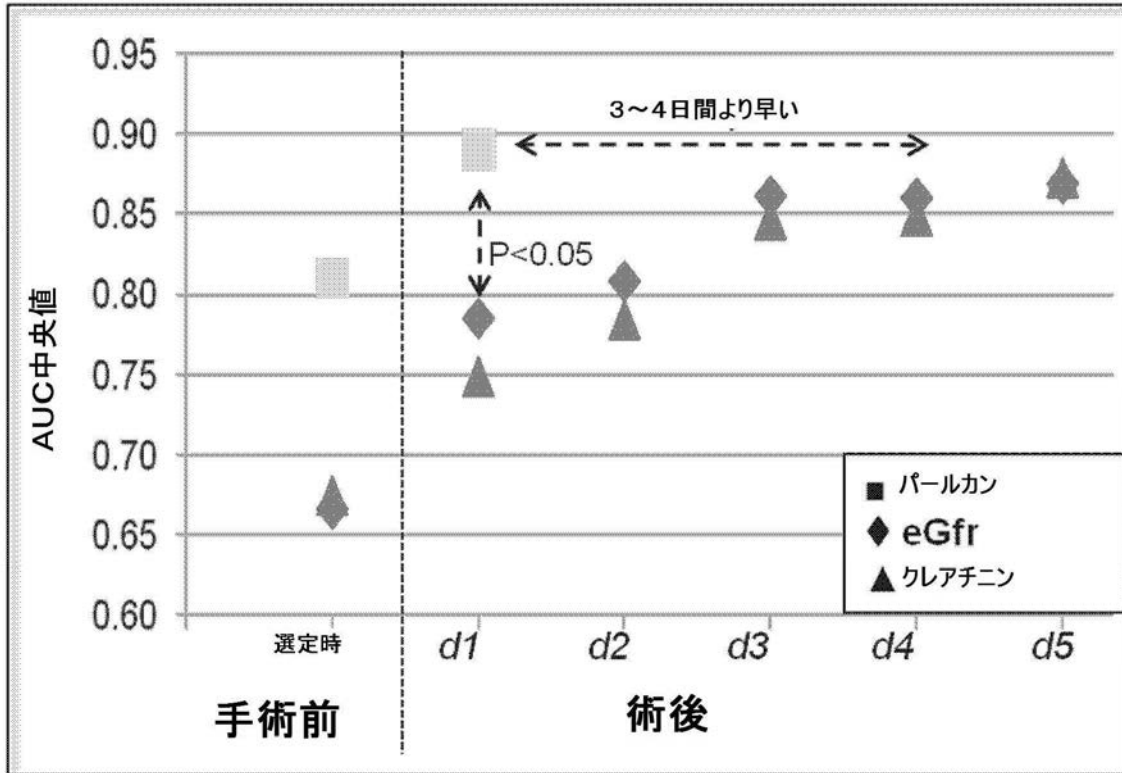
【 図 4 】



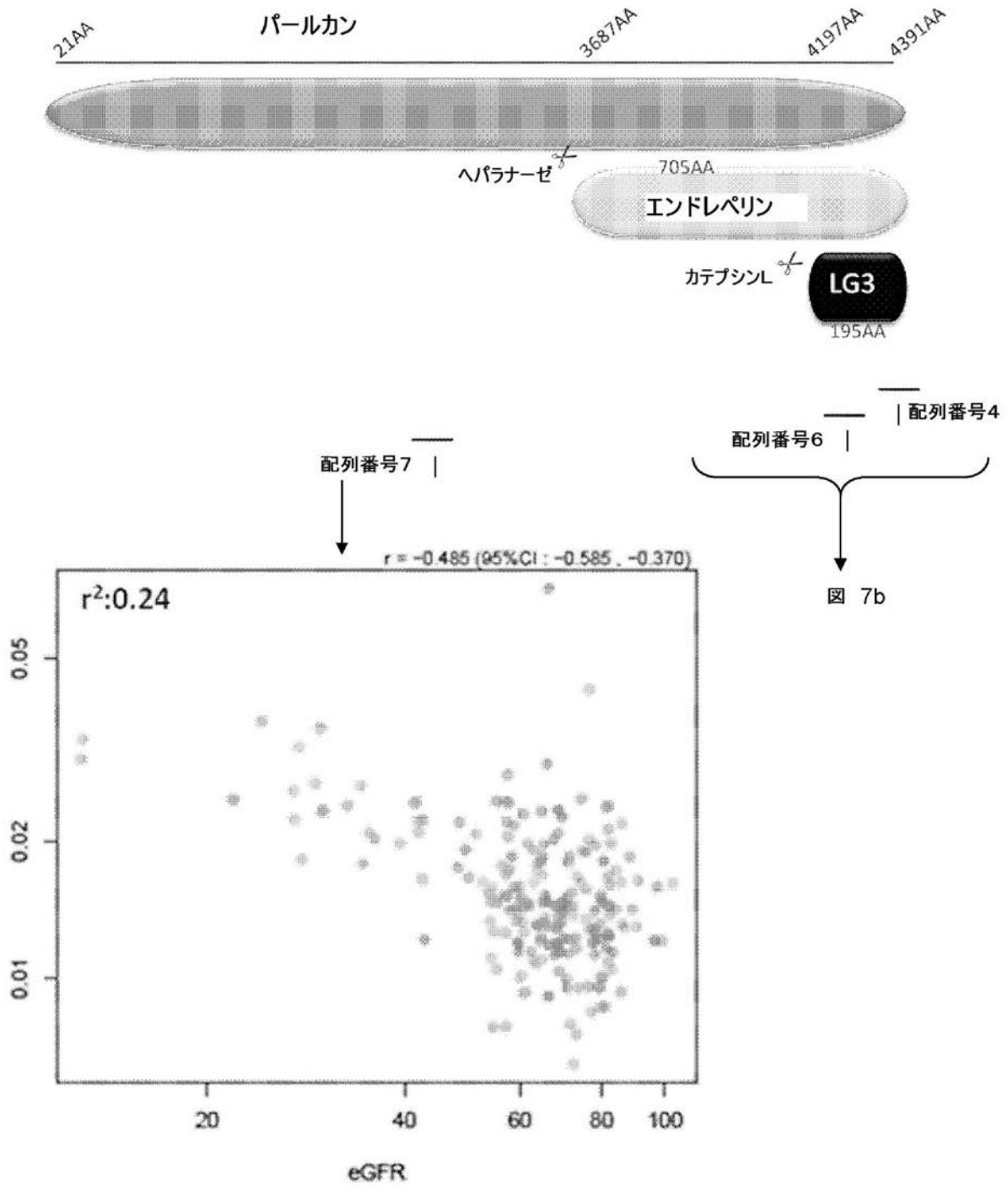
【 図 5 】



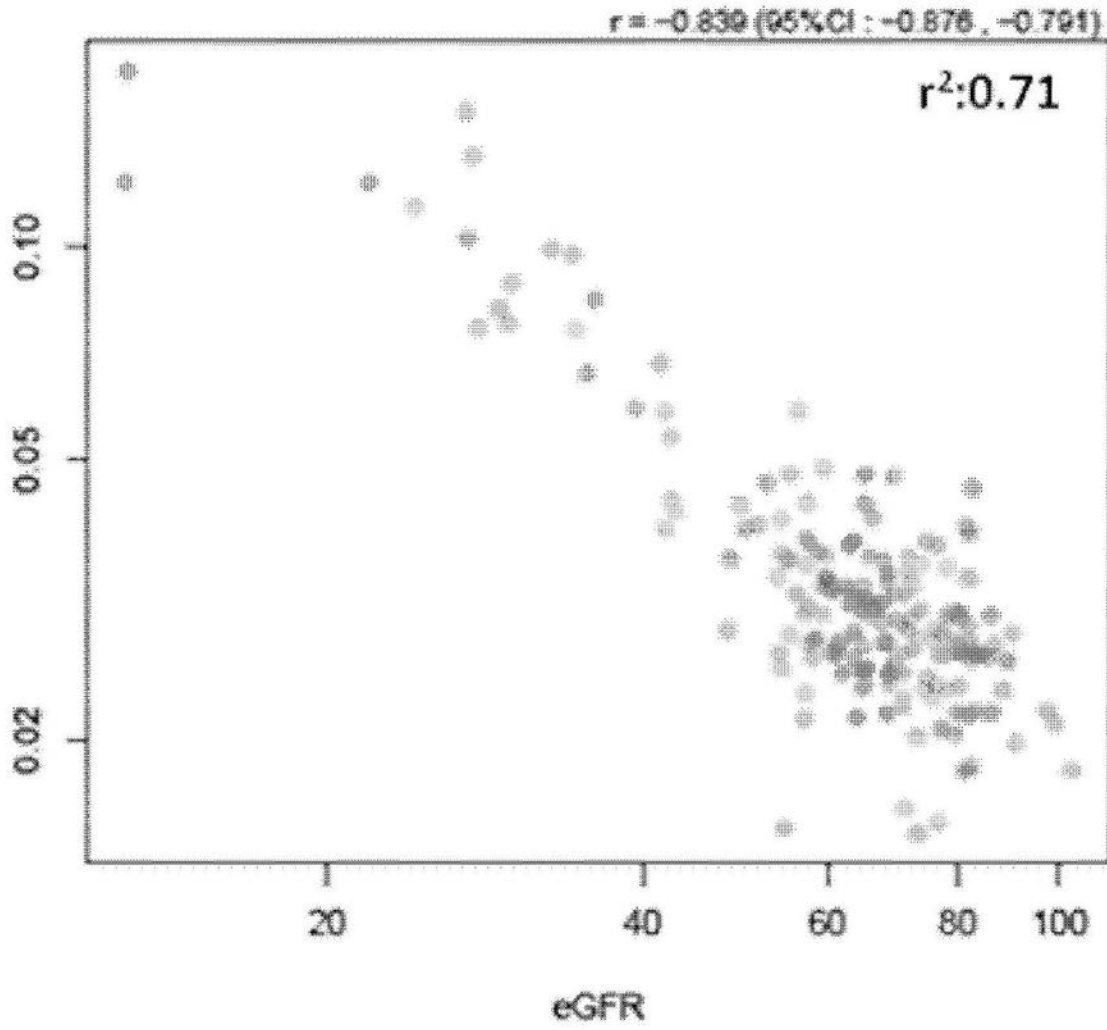
【 図 6 】



【図7a】



【 図 7 b 】



【 配列表 】

[2013534309000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/063519
---

<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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ODA OSAMU ET AL: "Purification and characterization of perlecan fragment in urine of end-stage renal failure patients", CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 255, no. 2, 1996, pages 119-132, XP008144567, ISSN: 0009-8981 cited in the application	31-34
Y	the whole document	1-30
X	US 2003/104999 A1 (IOZZO RENATO V [US]) 5 June 2003 (2003-06-05)	31-36
Y	paragraphs [0057] - [0060]	1-30
	-/--	
<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 document 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  26 October 2011		Date of mailing of the international search report  04/11/2011
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  Gundlach, Björn

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEN GUANGPING ET AL: "A protective role for kidney apolipoprotein E. Regulation of mesangial cell proliferation and matrix expansion",            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US,            vol. 276, no. 52,            28 December 2001 (2001-12-28), pages 49142-49147, XP008144569,            ISSN: 0021-9258, DOI:            10.1074/JBC.M104879200            [retrieved on 2001-09-28]            abstract</p>	1-36
X	<p>WO 88/06620 A1 (UNIV ROCKEFELLER [US])            7 September 1988 (1988-09-07)</p>	31,32
Y	<p>page 1, line 6 - line 8            claims 1,4,6            page 16, paragraph 1            page 13, paragraph 3</p>	1-30
X	<p>EDMOND O'RIORDAN ET AL: "Urinary proteomic analysis of chronic allograft nephropathy",            PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS,            vol. 2, no. 7-8, 1 July 2008 (2008-07-01),            pages 1025-1035, XP55010421,            ISSN: 1862-8346, DOI:            10.1002/prca.200780137            abstract</p>	31,32
A	<p>MINER JEFFREY H ET AL: "Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha-3(IV): Implications for Alport syndrome",            THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US            ,            vol. 135, no. 5            1 January 1996 (1996-01-01), pages 1403-1413, XP008143721,            ISSN: 0021-9525            Retrieved from the Internet:            URL:http://www.jcb.org/            [retrieved on 2011-10-03]            the whole document</p>	1-36

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/063519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RAO JIA ET AL: "Expression of Angiopoietin-Like 3 Associated with Puromycin-Induced Podocyte Damage", NEPHRON EXPERIMENTAL NEPHROLOGY, S. KARGER AG, SWITZERLAND, vol. 115, no. 3, 1 July 2010 (2010-07-01), pages E38-E45, XP008144571, ISSN: 0028-2766, DOI: 10.1159/000313829 [retrieved on 2010-04-24] the whole document</p> <p>-----</p>	1-36

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/063519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003104999 A1	05-06-2003	AU 2002346651 A1 WO 03048333 A2	17-06-2003 12-06-2003
WO 8806620 A1	07-09-1988	AU 1625888 A EP 0304481 A1 JP H01500798 A	26-09-1988 01-03-1989 23-03-1989

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 カス, クーネン

ベルギー、ビー - 2 9 7 0 スヒルデ、ブラボラーン 1 1

(72)発明者 ヴァンプーケ, グリット

ベルギー、8 5 7 0 インホーイヘム、クレイトラート 1 4

(72)発明者 モーマン, ピエト

ベルギー、ビー - 9 8 3 1 ドゥール、ポントストラート 8 7

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 DA36 FA36 FB01 FB02 FB03

4H045 AA30 CA42 EA50

专利名称(译)	Perlecan作为肾功能障碍的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013534309A</a>	公开(公告)日	2013-09-02
申请号	JP2013522263	申请日	2011-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	Puronotaenuve 普罗诺塔股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Puronota NV.Ve的.		
[标]发明人	カスクーネン ヴァンプーケグリット モーマンピエト		
发明人	カス,クーネン ヴァンプーケ,グリット モーマン,ピエト		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/70 G01N33/53 C07K14/435		
CPC分类号	A61P13/12 G01N33/6893 G01N2800/347 Y10T436/24 C12Q1/44 G01N2333/705 G01N2800/325		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/70 G01N33/53.D G01N33/53.M C07K14/435.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/EA50		
代理人(译)	清稻本潤一 富田雅美		
优先权	61/371334 2010-08-06 US 2010172170 2010-08-06 EP		
其他公开文献	JP5899213B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

该申请公开了PERLECAN作为肾功能障碍的新生物标志物;基于测量所述生物标志物预测, 诊断, 预测和/或监测所述功能障碍的方法;用于测量所述生物标志物和/或执行所述方法的试剂盒和装置。

Figure 7a

