

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-169658

(P2015-169658A)

(43) 公開日 平成27年9月28日(2015.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573	A 4 C O 8 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	B 4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	

審査請求 有 請求項の数 14 O L 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-41135 (P2015-41135)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成27年3月3日(2015.3.3)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	14157822.9		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成26年3月5日(2014.3.5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		T
	(特許庁注：以下のものは登録商標)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
	1. BLACKBERRY	(74) 代理人	100140109
			弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性呼吸困難の鑑別診断のためのセプラーゼの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において肺疾患と心疾患を鑑別するための方法を提供する。

【解決手段】 以下の段階を含む方法： a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、 b) 患者からの試料中の心臓マーカーのレベルを測定する、 c) 段階 a) で測定したレベルを基準レベルと比較する、 および d) 段階 b) で測定したレベルを基準レベルと比較する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において肺疾患と心疾患を鑑別するための方法であって、以下の段階を含む前記方法：

- a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、
- b) 患者からの試料中の心臓マーカーのレベルを測定する、
- c) 段階 a) で測定したレベルを基準レベルと比較する、および
- d) 段階 b) で測定したレベルを基準レベルと比較する。

【請求項 2】

心臓マーカーがナトリウム利尿ペプチドまたは心臓トロポニンである、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

ナトリウム利尿ペプチドが、BNP タイプのペプチド、特に NT - pro BNP または BNP である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

セプラーゼのレベルが基準レベルより低ければその患者は肺疾患に罹患しており、および/または心臓トロポニンのレベルが基準レベルより高ければその患者は心疾患に罹患している、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

患者がヒト患者である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 6】

試料が血液、血清または血漿試料である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において、(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(ii) 肺疾患を伴わない心疾患、(iii) 肺疾患を伴う心疾患、ならびに(iv) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難を鑑別するための方法であって、以下の段階を含む前記方法：

- a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、
- b) 患者からの試料中の心臓マーカー、特にナトリウム利尿ペプチドまたは心臓トロポニンのレベルを測定する、
- c) 段階 a) で測定したレベルを基準レベルと比較する、および
- d) 段階 b) で測定したレベルを基準レベルと比較する。 30

【請求項 8】

ナトリウム利尿ペプチドが、BNP タイプのペプチド、特に NT - pro BNP または BNP である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

患者がヒト患者、特に癌に罹患していないヒト患者である、請求項 7 および 8 に記載の方法。

【請求項 10】

i) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより低く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより低ければ、その患者は心疾患を伴わない肺疾患に罹患している、 40

ii) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより高く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより高ければ、その患者は肺疾患を伴わない心疾患に罹患している、

iii) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより低く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより高ければ、その患者は肺疾患を伴う心疾患に罹患している、および/または

iv) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより高く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより低ければ、その患者は心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難に罹患している、

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

【請求項 1 1】

急性息切れに罹患している対象患者の試料において、肺疾患と心疾患を鑑別するための

、
a) バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカー、および / または
b) バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤
の使用。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイス：

a . バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤を含む分析ユニットであって、急性息切れに罹患している対象からの試料においてそれらのマーカーのレベルを測定するために適合させた分析ユニット；
および

b . 測定レベルを基準レベルと比較してそれにより肺疾患と心疾患を鑑別するための分析ユニット（または評価ユニット）であって、基準レベルを備えたデータベースおよび比較を実施するためのアルゴリズムを含むユニット。

【請求項 1 3】

バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカー、特にナトリウム利尿ペプチドに特異的に結合する作用剤を含む、キット。

【請求項 1 4】

作用剤が抗体である、請求項 1 1 に記載の使用、請求項 1 2 に記載のデバイス、および請求項 1 3 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において肺疾患と心疾患を鑑別するための方法に関する。本方法は、患者からの試料中のセプラーゼおよび心臓マーカーのレベルを測定することに基づく。さらに、本発明の方法を実施するために適合させたキットおよびデバイスに関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

心疾患、特に急性心血管事象は、迅速な処置が要求される致命的な病的状態である場合が最も多い。しかし、これらの状態は必ずしも明確に診断できるわけではない。具体的には、急性心血管事象だけでなく慢性心不全などの慢性心機能障害をも含めた種々のタイプの心疾患に付随する最も一般的症状のいくつかは、他の（非心臓性）疾患にも特徴的な症状である。したがって、観察された症状が心因性のものか、他の原因によるものかを鑑別するのは困難かつ煩雑で時間がかかる場合が多い。そのような鑑別には、心臓病専門医のような専門家の助けが必要な可能性もある。

【0 0 0 3】

心疾患、特に急性心血管事象またはより重篤な慢性心不全に典型的な症状は、息切れ（呼吸困難）である。他の症状と同様に、呼吸困難は、心合併症および非心臓性肺疾患を含めた多様な原因をもつ可能性がある。その症状に心臓性原因の可能性があることからみて、その患者、たとえば救急患者においては、その原因を適正に診断することが強く望まれる。

【0 0 0 4】

呼吸困難の診断は、大部分の場合、心電図および胸部カルジオグラフを用いて実施される。いくつかの呼吸困難バイオマーカーパネルは鑑別診断の精度を改善するとは思われない。

【0 0 0 5】

NT-proBNPも他の7種類のパラメーターと一緒に、呼吸困難を呈している患者において急性心不全の指標として記載されている(Baggish 2005, American Heart Journal, 151:48-54、Januzzi JL et.al. International Collaborative of NTproBNP Study European Heart Journal 2006; 27; 330-337)。

【0006】

EP 1 845 380 A1およびWO 2009/027339には、息切れの原因を鑑別する際に界面活性タンパク質SP-BおよびSP-Dを使用することが開示されている。

最近、酵素セプラゼ(Seprase)が、結腸直腸癌の早期診断のための重要なマーカーであることが分かった。ヒトセプラゼは、ゼラチナーゼおよびジペプチジルペプチダーゼ活性をもち、2つの同一モノマー単位からなる、170kDの1回貫通型の膜結合糖タンパク質である。セプラゼは、線維芽細胞活性化タンパク質(fibroblast activation protein)(FAP-アルファ)と本質的に同一である。FAP-アルファは悪性の骨肉腫および軟組織肉腫に強く発現することが示された。1990年以来、乳癌、肺癌、皮膚癌、膵臓癌および結腸直腸癌(CRC)を含めた一般的タイプの上皮癌の大部分が多量のFAP-アルファ陽性の間質性線維芽細胞を含むことも知られている。

【0007】

WO 2009/074275には、ヒト線維芽細胞活性化タンパク質(FAP/セプラゼ)を、特に肺癌(pulmonaryまたはlung cancer)(=LC)または結腸癌のマーカーとして、また最も特別には非小細胞性肺癌(NSCLC)もしくは結腸直腸癌の評価に使用することが開示されている。さらに、それは特に、個体に由来する液体試料からその試料中のセプラゼを測定することにより癌を評価するための方法に関する。セプラゼの測定は、たとえば癌の早期検出または外科処置を受ける患者のサーベイランスに使用できる。

【0008】

WO 2010/127782には、“可溶性DPPIV/セプラゼタンパク質複合体”(=DPPIV/セプラゼ)を種々の癌タイプの万能マーカーとして使用することが開示されている。DPPIV/セプラゼの測定は、たとえば癌の早期検出もしくは診断または外科処置を受ける患者のサーベイランスに使用できる。

【0009】

WO 2012/123293には、タンパク質セプラゼを慢性閉塞性肺疾患(=COPD)の評価に際してマーカーとして使用することが記載されている。

WO 2009/074276は、たとえば無症候性個体のスクリーニングによる癌の早期検出に際して、または外科処置を受ける患者のサーベイランスに際して、セプラゼポリペプチドおよび/またはそのフラグメント、ならびに抗p53、オステオポンチン、フェリチンなどさらに他のバイオマーカーの濃度および/または活性を測定することにより、結腸直腸癌(CRC)を評価する方法に関する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】EP 1 845 380 A1

【特許文献2】WO 2009/027339

【特許文献3】WO 2009/074275

【特許文献4】WO 2010/127782

【特許文献5】WO 2012/123293

【特許文献6】WO 2009/074276

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Baggish 2005, American Heart Journal, 151:48-54

【非特許文献2】Januzzi JL et.al. International Collaborative of NTproBNP Study European Heart Journal 2006; 27; 330-337

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

対象において急性呼吸困難の原因を鑑別診断できる手段および方法を求める明らかな長年のニーズがある。その手段および方法により、信頼できる効果的な診断が可能になり、かつ従来法の欠点が避けられるであろう。

【0013】

したがって本発明の基礎となる技術的課題は、上記のニーズに応じる手段および方法を提供することであるとみるべきである。

この技術的課題は、特許請求の範囲および以下の明細書中において特徴づけられる態様により解決される。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、本発明は、急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において肺疾患と心疾患を鑑別するための方法であって、以下の段階を含む方法に関する：

- a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、
- b) 患者からの試料中の心臓マーカーのレベルを測定する、
- c) 段階a)で測定したレベルを基準レベルと比較する、および
- d) 段階b)で測定したレベルを基準レベルと比較する。

【0015】

ある態様において、段階a)およびb)は、試料をそれぞれセプラーゼに特異的に結合する作用剤（段階a)）および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤（段階b)）と接触させ、それによりそれぞれの作用剤とセプラーゼおよび心臓マーカーとの間に複合体を形成させ、作用剤とセプラーゼの間に形成された複合体の量および作用剤と心臓マーカーの間に形成された複合体の量を検出し、それによりそれぞれセプラーゼおよび心臓マーカーのレベルを測定することにより実施される。

20

【0016】

ある態様において、前記方法は、比較段階c)およびd)の結果に基づいて肺疾患と心血管を鑑別する（または鑑別を行なう）段階e)を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1：肺性 - 対 - 心臓性の呼吸困難サブグループ。種々のバイオマーカーの鑑別診断精度（セプラーゼ、NT-proBNP、SP-D、proSP-B、C末端proSP-B、CRP（C反応性タンパク質）、APEX1（DNA - （脱プリン脱ピリミジン部位 (apurinic or apyrimidinic site)）リアーゼ）、ARME1（転移型初期腫瘍内アルギニンリッチタンパク質 (arginine-rich metastasized in early tumors protein)）、CCP（環状シトルリン化ペプチド (cyclic citrullinated peptide)）、ASC（アポトーシス関連スペック様タンパク質 (apoptosis-associated speck-like protein)）、KL-6、NNMT（ニコチンアミドN - メチルトランスフェラーゼ））。この図は、それぞれ90%および95%の特異度における感度についての棒グラフを示す。他のマーカーと比較して、NT-proBNPおよびセプラーゼは適切な感度を与えた（サブグループ“心臓性”を特異度の計算について健康とみなした。NT-proBNPについてのみ、サブグループ肺性を健康とみなした）。

30

40

【図2】図2：肺性、心臓性、心臓性 - 肺性（モデル）および非心臓性 - 非肺性（モデル）の呼吸困難サブグループ；上記の4つの診断におけるセプラーゼ値およびproBNP値についての散布図（参照：前記の(i)、(ii)、(iii)および(iv)）。肺疾患は84 ng/mlのカットオフより低いセプラーゼ値により示され、心臓性呼吸困難は125 pg/mlのカットオフより高いproBNP値により示される。

【図3】図3：proBNPと組み合わせた各バイオマーカーについての肺疾患の診断に対する感度（セプラーゼ、NT-proBNP、SP-D、proSP-B、C末端proSP-B、CRP（C反応性タンパク質）、APEX1（DNA - （脱プリン脱ピリミ

50

ジン部位)リアーゼ)、A R M E T (転移型初期腫瘍内アルギニンリッチタンパク質)、C C P (環状シトルリン化ペプチド)、A S C (アポトーシス関連スベック様タンパク質)、K L - 6、N N M T (ニコチンアミド N - メチルトランスフェラーゼ)。この図は、心臓性コホートを対照と定めて、それぞれ90%および95%の特異度における各マーカーの感度についての棒グラフを示す。p r o B N Pとの組み合わせによる診断感度の改善はセプラーゼについてのみみられた(それぞれ80%および70%の感度, p r o B N P単独: 39%の感度)。

【発明を実施するための形態】

【0018】

用語“肺疾患と心血管を鑑別する”は、急性息切れに罹患している個体がその急性息切れの基礎となる原因として肺疾患および心疾患に罹患しているかどうかを評価する際に、本発明による方法が専門医、たとえば医師の補助となることを示すために用いられる。本明細書中で用いる用語“鑑別する”は、特に、肺疾患および/または心疾患(特に、急性息切れの原因としての肺疾患および/または心疾患)に罹患している患者を、その疾患に罹患している対象が本質的に同じ症状、すなわち急性息切れを呈している条件下で区別することを意味する。したがって、本方法は、急性息切れに罹患している患者における肺疾患および/または心疾患の診断に関する。本明細書中で用いるこの用語は、好ましくは肺疾患または心疾患を鑑別診断することを含む。

【0019】

本明細書中で用いる“鑑別を行なう”という句は、患者の試料中のセプラーゼおよび心臓マーカーのレベルに関して取得された情報またはデータを用いて、急性息切れに罹患している患者において肺疾患と心疾患を鑑別することを表わす。この情報またはデータは書面、口頭または電子のいずれの形態であってもよい。ある態様において、取得された情報またはデータの使用には、通信(communicating)、提示(presenting)、レポート(reporting)、記憶(storing)、送信(sending)、転送(transferring)、供給(supplying)、伝達(transmitting)、配分(dispensing)、またはその組み合わせが含まれる。ある態様において、通信、提示、レポート、記憶、送信、転送、供給、伝達、配分、またはその組み合わせは、コンピューティングデバイス、分析ユニット、またはその組み合わせにより実施される。あるさらなる態様において、通信、提示、レポート、記憶、送信、転送、供給、伝達、配分、またはその組み合わせは、実験または医療の専門家により行なわれる。ある態様において、情報またはデータには、段階a)およびb)で測定したレベルと基準レベルの比較が含まれる(段階c)およびd)で)。ある態様において、情報またはデータには、その患者が肺疾患または心疾患に罹患しているという指示が含まれる。

【0020】

“急性息切れ”または“急性呼吸困難”という表現は、呼吸数増加および/または呼吸量増加をもたらす呼吸障害を表わす。したがって、息切れは、好ましくは換気亢進をもたらす可能性がある。息切れは、通常は、正常な酸素飽和レベルの少なくとも95%より低い酸素飽和レベルで起きる。本明細書中で用いる急性呼吸困難は、非永続的に起きる息切れ、すなわち全く突然に起きる息切れ(急性発症型呼吸困難)であって特定の状態との相関性(たとえば、あるタイプのストレス下でのみ起きるなど)がないものを表わす。さらに、急性呼吸困難は、好ましくは急性発症から2週間より長くは持続せず、特に1週間より長くは持続せず、一方、慢性呼吸困難は、2週間より長い期間持続すること、または特に1か月間より長い期間持続することを特徴とする。さらに、急性呼吸困難は通常は次第に増悪する。

【0021】

用語“肺疾患”は、急性息切れを引き起こすいずれかの肺疾患を表わす。さらに、本発明に従って述べる肺疾患は、肺泡毛細血管膜閉鎖の損傷をもたらすものとする。その疾患は、好ましくは急性および慢性の呼吸不全、C O P D、喘息、気胸、肺感染症、A R D S (急性呼吸窮迫症候群)、肺傷害もしくは肺出血、肺線維症、肺胞タンパク症、肺水腫、肺炎、肺気腫、肥満症、甲状腺疾患、またはより好ましくは肺塞栓症である。特に、肺疾

10

20

30

40

50

患はCOPD、喘息、気胸、肺感染症、ARDS、肺傷害もしくは肺出血、または肺塞栓症である。

【0022】

本明細書中で用いる用語“心疾患”は、心血管系の何らかの急性または慢性障害を表わす。心血管系の急性障害には、急性心血管事象が含まれる。したがって、より好ましくは安定狭心症(SAP)または急性冠動脈症候群(ACS)が包含される。ACS患者は不安定狭心症(UAP)を示す可能性があり、あるいはこれらの個体は既に心筋梗塞(MI)に罹患している。MIは、ST上昇型MIまたは非-ST上昇型MIの可能性がある。MIの発症に続いて左心室機能障害(LVD)が起きる可能性がある。この用語には、慢性障害、および好ましくは心不全、たとえば左心室または右心室心不全も含まれる。この用語には上記の急性心血管事象に加えて心不全を引き起こす病的状態および疾患、たとえば先天性もしくは後天性の心臓弁疾患もしくは障害、心筋炎、心筋障害、アミロイドーシス、またはヘモクロマトーシスも含まれることを理解すべきである。さらに他の好ましい心疾患は、血栓症、好ましくは動脈血栓症、または血管石灰沈着を引き起こす疾患、好ましくはアテローム性硬化症、および発作である。特に、心疾患はうっ血性心不全、ACS、心筋障害、弁機能障害、不整脈、および急性非代償性心不全の可能性がある。

10

【0023】

心疾患に罹患している個体は、臨床症状(たとえば、呼吸困難、胸痛;下記のNYHA分類も参照)を示す可能性がある。詳細には、心疾患の症状はNew York Heart Association(NYHA)に従った機能分類システムに分類されている。クラスIの患者は明らかな心疾患の症状をもたない。身体活動は制限されておらず、通常身体活動が著しい疲労、動悸または呼吸困難を引き起こすことはない。クラスIIの患者は身体活動がわずかに制限されている。彼らは安静時には快感であるが、通常身体活動によって疲労、動悸または呼吸困難が生じる。クラスIIIの患者は身体活動の顕著な制限を示す。彼らは安静時には快適であるが、通常より低い身体活動が疲労、動悸または呼吸困難を引き起こす。クラスIVの患者は不快感なしにいかなる身体活動も行なうことができない。彼らは安静時に心不全の症状を示す。何らかの身体活動を行えば不快感が増す。心合併症のもうひとつの特徴は、“左心室駆出分画”(LVEF)である可能性があり、これは“駆出分画”としても知られている。健康な心臓をもつ者は通常はLVEFに損傷がなく、それは一般に50%より高いと記載されている。症候性の収縮期心疾患を伴う大部分の者は、一般に40%以下のLVEFをもつ。

20

30

【0024】

好ましくは、本発明に従った心疾患に罹患しておりかつ急性呼吸困難を呈している対象は、中間NYHAクラス、好ましくはNYHAクラスI、IIまたはIII、最も好ましくはNYHAクラスIIに割り当てることができる。

【0025】

本明細書中で述べる“対象”および“患者”は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物には家畜(たとえば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ)、霊長類(たとえば、ヒト、およびヒト以外の霊長類、たとえばサル)、ウサギ、およびげっ歯類(たとえば、マウスおよびラット)が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、患者はヒト患者である。用語“対象”と“患者”は本明細書中で互換性をもって使用できる。

40

【0026】

本発明の好ましい態様において、患者は癌に罹患していないものとする。

本明細書中で用いる用語“癌”は、好ましくは、正常な増殖制御に対する感受性を喪失した細胞の増殖により引き起こされる、またはそれを特徴とする、増殖障害性疾患を表わす。この用語は、好ましくは固形の組織または臓器に生じる固形腫瘍、および造血腫瘍を含む。この用語には、腫瘍および他のいずれかの増殖性障害が含まれる。したがって、この用語は、病期または浸潤性に関係なく、悪性細胞を伴うすべての状態を含むものとする。さらに、癌は浸潤性であり、したがってそれが由来する組織の層を越えて正常な周囲組織内へ拡散する可能性があることを特に考慮する(局所進行癌と呼ばれることも多い)

50

。浸潤癌は転移性または非転移性である可能性がある。癌がその元の位置から身体離れた位置へ拡散している場合、その癌は転移性である。特に、用語“癌”は転移性癌を表わすものとする。したがって、前記方法の概念における対象は、好ましくは転移性癌に罹患していない。

【0027】

癌は特定の組織または臓器（たとえば、胸部、前立腺または肺）に局在する可能性があり、したがって元の組織を越えて拡散していない可能性がある。

さらに、癌は下記のものからなる群から選択されることも考慮する：子宮頸癌、結腸直腸癌、胃腸癌、白血病、肺癌、中皮腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞性肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、小細胞性肺癌、脳腫瘍、子宮癌、頭頸部腫瘍、肝癌、腎癌、神経芽細胞腫、腸癌、たとえば直腸癌、家族性腺腫様ポリポーシス癌および遺伝性非ポリポーシス、食道癌、口唇癌、喉頭癌、下咽頭癌、舌癌、唾液腺癌、腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭状癌、腎癌腫、腎実質癌、卵巣癌腫、子宮頸癌腫、子宮体癌、子宮内膜癌、絨毛癌、膵臓癌腫、精巣癌、尿道癌、脳腫瘍、たとえばグリア芽細胞腫、星状細胞腫、髄膜腫、髄芽細胞腫および末梢神経管外胚葉腫瘍、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、成人T細胞白血病性リンパ腫、肝細胞癌、胆嚢癌、気管支癌、小細胞性肺癌腫、多発性骨髄腫、基礎細胞腫、奇形腫、網膜芽細胞腫、脈絡膜黒色腫、精上皮腫、横紋筋肉腫、頭蓋咽頭腫、骨肉腫、軟骨肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、ユーイング肉腫、プラズマ細胞腫、カボジ肉腫、ならびに黒色腫。

10

20

【0028】

本発明の他の好ましい態様において、患者は癌に罹患している可能性があるものとする。たとえば、対象は肺癌、膵臓癌、または結腸直腸癌に罹患している可能性がある。

用語“試料”は、体液の試料、分離した細胞の試料、または組織もしくは臓器からの試料を表わす。体液の試料は周知の手法で得ることができ、血液、血漿、血清、尿、リンパ液、喀痰、腹水、もしくは他のいずれかの身体分泌液の試料、またはその派生物を含む。組織または臓器の試料は、いずれかの組織または臓器から、たとえば生検により得ることができる。分離した細胞は、体液または組織もしくは臓器から、遠心分離または細胞選別などの分離法により得ることができる。たとえば、細胞、組織または臓器の試料は、前記のバイオマーカーを発現または産生する細胞、組織または臓器から得ることができる。試料は、凍結したもの、新鮮なもの、固定したもの（たとえば、ホルマリン固定したもの）、遠心分離したもの、および/または包埋したもの（たとえば、パラフィン包埋したもの）などであってもよい。細胞試料には、試料中のマーカーのレベルを評価する前に、もちろんだ様な周知の採集後調製法および貯蔵法（たとえば、核酸および/またはタンパク質の抽出、固定、貯蔵、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離など）を施すことができる。同様に、生検体にも採集後調製法および貯蔵法、たとえば固定を施すことができる。

30

【0029】

好ましい態様において、試料は血液、血漿、または特に血清試料である。

本明細書中で述べるマーカーのレベルを“測定する”という用語は、たとえば試料中のバイオマーカーのレベルを決定するために、本明細書のいずれかの箇所に記載する適宜な検出方法を用いてバイオマーカーを定量することを表わす。

40

【0030】

ある態様において、各マーカーに特異的に結合する検出剤と試料を接触させ、それにより検出剤とそのマーカーの間に複合体を形成させ、形成された複合体のレベルを検出し、それによりそのマーカーのレベルを測定することにより、少なくとも1種類のバイオマーカーのレベルを測定する。

【0031】

本明細書中で述べるバイオマーカーは、当技術分野で一般に知られている方法を用いて検出できる。検出法には、一般に試料中のバイオマーカーのレベルを定量する方法（定量

50

法)が包含される。バイオマーカーの定性および/または定量検出に以下の方法のうちいずれが適切であるかは、一般に当業者に知られている。たとえばタンパク質についてはウェスタン法およびイムノアッセイ、たとえば市販のELISA、RIA、蛍光ベースのイムノアッセイを用いて、試料を簡便にアッセイすることができる。バイオマーカーを検出するためのさらに他の適切な方法には、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理的または化学的特性、たとえばその厳密な分子質量またはNMRスペクトルを測定することが含まれる。それらの方法は、たとえばバイオセンサー、イムノアッセイに連結した光学デバイス、バイオチップ、分析デバイス、たとえば質量分析計、NMR分析計、またはクロマトグラフィーデバイスを含む。さらに、方法にはマイクロプレートELISAベースの方法、全自動またはロボット式イムノアッセイ(たとえば、E l e c s y s (商標)分析計で実施できる)、CBA(酵素コバルト結合アッセイ(enzymatic Cobalt Binding Assay)、たとえばR o c h e - H i t a c h i (商標)分析計で実施できる)、およびラテックス凝集アッセイ(たとえば、R o c h e - H i t a c h i (商標)分析計で実施できる)が含まれる。

10

【0032】

本明細書中で述べるバイオマーカータンパク質の検出には、そのようなアッセイ様式を用いる広範なイムノアッセイ法を利用できる;たとえば、U.S. Pat. No. 4,016,043、4,424,279、および4,018,653を参照。これらには、非競合タイプの単一部位および2部位または“サンドイッチ”アッセイ、ならびに伝統的な競合結合アッセイが共に含まれる。これらのアッセイには、ターゲットバイオマーカーへの標識抗体の直接結合も含まれる。

20

【0033】

サンドイッチアッセイは、最も有用な一般的に用いられるイムノアッセイである。電気化学的発光現象を測定するための方法は周知である。そのような方法は、特定の金属錯体が酸化により励起状態に達し、そこからそれらが基底状態にまで減衰して電気化学的発光を放出する能力を利用する。総説については、Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036を参照。

【0034】

バイオマーカーは一般的に知られている方法によっても検出でき、それには磁気共鳴分光法(NMR分光法)、ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC-MS)、液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)、超高速HPLC、逆相HPLCなどのHPLC、たとえば二重UV波長検出を備えたイオン対HPLC、レーザー誘導蛍光検出を備えたキャピラリー電気泳動、アニオン交換クロマトグラフィーおよび蛍光検出、薄層クロマトグラフィーが含まれる。

30

【0035】

好ましくは、本明細書中で述べるバイオマーカーのレベルの測定は、(a)その強度が前記のペプチドまたはポリペプチドのレベルの指標となる細胞応答を誘発できる細胞を、適切な期間、そのペプチドまたはポリペプチドと接触させ、(b)その細胞応答を測定する段階を含む。細胞応答を測定するために、試料または処理した試料を、好ましくは細胞培養物に添加し、細胞の内部応答または外部応答を測定する。細胞応答には、測定可能なレポーター遺伝子発現、またはある物質、たとえばペプチド、ポリペプチドもしくは小分子の分泌を含めることができる。この発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドのレベルと相関する強度信号を発するであろう。

40

【0036】

同様に好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドのレベルの測定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得られる特異的な強度信号を測定する段階を含む。前記に述べたように、そのような信号は、質量スペクトルにみられるペプチドもしくはポリペプチドに特異的なm/z変数で観察される信号強度、またはペプチドもしくはポリペプチドに特異的なNMRスペクトルであってもよい。

【0037】

ペプチドまたはポリペプチドのレベルの測定は、好ましくは(a)ペプチドを特異的な

50

結合剤と接触させ、(b)(所望により)結合していない結合剤を除去し、(c)結合した結合剤、すなわち段階(a)で形成された結合剤複合体のレベルを測定する段階を含むことができる。好ましい態様によれば、それらの接触、除去および測定の段階は、本明細書に開示するシステムの分析ユニットにより実施できる。ある態様によれば、それらの段階はそのシステムの単一の分析ユニットにより、または作動可能な状態で互いに連絡した1より多い分析ユニットにより実施できる。たとえば、特定の態様によれば、本明細書に開示するシステムは、接触および除去の段階を実施するための第1分析ユニット、ならびに測定段階を実施する第2分析ユニットであって作動可能な状態で輸送ユニット(たとえば、ロボットアーム)により第1分析ユニットに接続したものを含むことができる。

【0038】

結合した結合剤、すなわち結合剤または結合剤/ペプチド複合体は、強度信号を発するのであろう。本発明による結合には、共有結合および非共有結合の両方が含まれる。本発明による結合剤は、本明細書に記載するペプチドまたはポリペプチドに結合するいずれかの化合物、たとえばペプチド、ポリペプチド、核酸、または低分子であってもよい。好ましい結合剤には、抗体、核酸、ペプチドまたはポリペプチド、たとえば前記のペプチドまたはポリペプチドおよびそのフラグメントに対する受容体または結合パートナーであってそれらのペプチドに対する結合ドメインを含むもの、およびアダプター、たとえば核酸アダプターまたはペプチドアダプターが含まれる。そのような結合剤を調製するための方法は当技術分野で周知である。たとえば、適切な抗体またはアダプターの同定および製造は業者も提供している。当業者は、そのような結合剤の誘導体であってより高い親和性または特異性を備えたものを開発する方法に精通している。たとえば、ランダム変異形成を核酸、ペプチドまたはポリペプチドに導入することができる。これらの誘導体を、次いで当技術分野で既知のスクリーニング法、たとえばファージディスプレイに従って結合について試験することができる。本明細書中で述べる抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびにそのフラグメントであって抗原またはハプテンを結合できるもの、たとえばFv、FabおよびF(ab)₂フラグメントが含まれる。本発明は、一本鎖抗体、および目的とする抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせたヒト化ハイブリッド抗体をも含む。ドナー配列は、通常は少なくともドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むであろうが、ドナー抗体の他の構造および/または機能関連アミノ酸残基をも含むことができる。そのようなハイブリッドは、当技術分野で周知である幾つかの方法により調製できる。好ましくは、結合剤または作用剤はペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明による特異的結合とは、リガンドまたは作用剤が被分析試料中に存在する他のペプチド、ポリペプチドまたは物質と実質的に結合(と“交差反応”)すべきではないことを意味する。好ましくは、特異的に結合されるペプチドまたはポリペプチドは、他のいずれかの関連ペプチドまたはポリペプチドより少なくとも3倍高い、好ましくは少なくとも10倍高い、よりさらに好ましくは少なくとも50倍高い親和性で結合されるべきである。非特異的結合は、それがたとえばウェスタンブロットにおけるそのサイズによって、または試料中のその相対的に高い存在量によって、やはり明瞭に区別および測定できるならば、許容できる。結合剤の結合は、当技術分野で既知であるいずれかの方法により測定できる。好ましくは、その方法は半定量的または定量的である。ペプチドまたはポリペプチドを決定するのに適したさらに他の手法を以下に記載する。

【0039】

結合剤の結合は、直接に、たとえばNMRまたは表面プラズモン共鳴により測定できる。結合剤の結合の測定は、好ましい態様によれば、本明細書に開示するシステムの分析ユニットにより実施される。その後、測定した結合のレベルを本明細書に開示するシステムのコンピューターデバイスにより計算することができる。結合剤が目的ペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても作用するならば、酵素反応生成物を測定できる(たとえば、プロテアーゼのレベルは、開裂した基質のレベルを、たとえばウェスタンブロット法で測定することにより測定できる)。あるいは、結合剤が酵素特性そのものを示して

10

20

30

40

50

もよく、“結合剤/ペプチドまたはポリペプチド”複合体、すなわちそれぞれペプチドまたはポリペプチドが結合した結合剤を、強度信号の発生により検出できる適切な基質と接触させることができる。酵素反応生成物を測定するためには、好ましくは基質のレベルは飽和状態である。反応前に基質を検出可能な標識で標識化することもできる。好ましくは、試料を適切な期間、基質と接触させる。適切な期間とは、検出可能な、好ましくは測定可能なレベルの生成物を産生させるのに必要な時間を表わす。生成物のレベルを測定する代わりに、特定の（たとえば、検出可能な）レベルの生成物が出現するのに必要な時間を測定することができる。第3に、結合剤を検出および測定できる標識に、結合剤を共有結合または非共有結合させることができる。標識化は、直接法または間接法により行なうことができる。直接標識化は、標識を結合剤に直接に（共有結合または非共有結合により）結合させることを伴なう。間接標識化は、二次結合剤を第1結合剤に（共有結合または非共有結合により）結合させることを伴なう。二次結合剤は、第1結合剤に特異的に結合すべきである。その二次結合剤は適切な標識とカップリングすることができ、および/または二次結合剤に結合する三次結合剤のターゲット（受容体）であってもよい。信号を増強するために、二次、三次またはより高次の結合剤の使用がしばしば採用される。適切な二次およびより高次の結合剤には、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジン-ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）を含めることができる。結合剤または基質を当技術分野で既知である1種類以上のタグで“タグ付け”することもできる。その際、そのようなタグはより高次の結合剤に対するターゲットであってもよい。適切なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、His-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc-タグ、インフルエンザA型ウイルスヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは好ましくはN末端および/またはC末端にある。適切な標識は、適宜な検出法により検出できるいずれかの標識である。一般的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル(acridan ester)、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁性標識（“たとえば、磁性ビーズ”；常磁性および超常磁性の標識を含む）、および蛍光標識が含まれる。酵素活性標識には、たとえばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびその誘導体が含まれる。検出に適した基質には、ジ-アミノ-ベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリドおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート；既製原液としてRoche Diagnosticsから入手できる）、CDP-Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）が含まれる。適切な酵素-基質の組み合わせは着色反応生成物、蛍光または化学発光を生じることができ、それを当技術分野で既知の方法に従って（たとえば、感光フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて）測定できる。酵素反応の測定については、前記に挙げた基準を同様に適用する。一般的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（たとえば、GFPおよびその誘導体）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセインおよびAlexa色素（たとえば、Alexa 568）が含まれる。さらに他の蛍光標識を、たとえばMolecular Probes（オレゴン州）から入手できる。蛍光標識としての量子ドットの使用も考慮される。放射性標識は、既知の適宜ないずれかの方法、たとえば感光フィルムまたはphosphor imagerにより検出できる。

【0040】

ペプチドまたはポリペプチドのレベルは、同様に好ましくは下記に従って測定できる：
 (a) 前記に明記したペプチドまたはポリペプチドに対する結合剤を含む固体支持体を、ペプチドまたはポリペプチドを含む試料と接触させ、そして(b) 支持体に結合したペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定する。好ましくは核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体およびアプタマーからなる群から選択される結合剤は、好ましくは固体支持体上に固定化された形で存在する。固体支持体を作成するための材料は当技術分野で周知であり

10

20

30

40

50

、特に市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンのチップおよび表面、ニトロセルロースのストリップ、膜、シート、デュラサイト、反応トレーのウェルおよび壁、プラスチックチューブなどを含む。結合剤または作用剤を多種多様なキャリアーに結合させることができる。周知のキャリアーの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが含まれる。本発明の目的に対して、キャリアーの性質は可溶性または不溶性のいずれであってもよい。その結合剤を固定/固定化するのに適した方法は周知であり、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用などを含むが、これらに限定されない。“懸濁アレイ”を本発明によるアレイとして使用することも考慮される(No-lan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。そのような懸濁アレイにおいて、キャリアー、たとえばマイクロビーズまたはマイクロスフェアは、懸濁状態で存在する。アレイは種々のマイクロビーズまたはマイクロスフェアからなり、おそらくそれらは標識化され、種々の結合剤を保有する。そのようなアレイを調製する方法、たとえば固相化学および光不安定保護基に基づくものが一般に知られている(US 5,744,305)。

10

【0041】

本発明のある態様において、本明細書中で述べるバイオマーカーのレベルは、実施例のセクションに記載するアッセイを用いて測定される。

本発明方法の他の態様において、段階 a) および b) の測定は分析ユニットにより、特に本明細書のいずれかの箇所に定める分析ユニットにより実施できる。

20

【0042】

用語“結合剤”または“検出剤”は、対応する各バイオマーカーを特異的に結合する結合部分を含む分子を表わす。“結合剤”または“検出剤”の例は、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ペプチド核酸(PNA)または化合物である。

【0043】

用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合対分子が他の分子に有意には結合しない条件下で相互結合を示す結合反応を表わす。

用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合剤としてのタンパク質またはペプチドについて述べる場合、結合剤が対応するターゲット分子に少なくとも 10^{-7} M の親和性で結合する結合反応を表わす。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、好ましくはそのターゲット分子に対する少なくとも 10^{-8} M、またはよりさらに好ましくは少なくとも 10^{-9} M の親和性を表わす。用語“特異的”または“特異的に”は、試料中に存在する他の分子がターゲット分子に対して特異的な結合剤に有意には結合しないことを示すために用いられる。好ましくは、ターゲット分子以外の分子に対する結合のレベルは、ターゲット分子に対する親和性のわずか 10% 以下、より好ましくはわずか 5% 以下の結合親和性を生じるものである。

30

【0044】

用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合剤としての核酸について述べる場合、結合剤またはプローブが目的ターゲット配列に対して厳密または実質的に相補的であるハイブリダイゼーション領域を含むハイブリダイゼーション反応を表わす。十分にストリンジент(stringent)なハイブリダイゼーション条件下で結合剤またはプローブを用いて実施されるハイブリダイゼーションアッセイによって、特異的なターゲット配列の選択的検出が可能になる。ハイブリダイゼーション領域は、好ましくは約 10 から約 35 ヌクレオチドまでの長さ、より好ましくは約 15 から約 35 ヌクレオチドまでの長さである。当技術分野で周知の、ハイブリダイゼーション安定性に影響を及ぼす修飾塩基または塩基アナログの使用によって、同等の安定性を備えた、より短いまたはより長いプローブの使用が可能になる。結合剤またはプローブは、全体的にハイブリダイゼーション領域からなることができ、あるいはプローブの検出または固定化を可能にする追加の特色を含むことができるが、それらはハイブリダイゼーション領域のハイブリダイゼーション

40

50

特徴を有意には変化させない。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合剤としての核酸アプタマーについて述べる場合、核酸アプタマーが対応するターゲット分子に低い n M ないし p M の範囲の親和性で結合する結合反応を表わす。

【0045】

“結合剤”、“検出剤”または“作用剤”の例は、核酸プローブ、核酸プライマー、DNA 分子、RNA 分子、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ペプチド核酸 (PNA) または化合物である。好ましい作用剤は、測定すべきバイオマーカーに特異的に結合する抗体である。本明細書中で用語“抗体”は最も広い意味で用いられ、多様な抗体構造体を包含し、これにはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (たとえば、二重特異性抗体)、および目的とする抗原結合活性を示す限りにおいて抗体フラグメントが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体である。より好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

10

【0046】

適用できる他の結合剤は、ある観点において、試料中の少なくとも 1 種類のマーカーに特異的に結合するアプタマーであってもよい。用語“特異的結合”または“特異的に結合する”は、結合剤としての核酸アプタマーについて述べる場合、核酸アプタマーが対応するターゲット分子に低い n M ないし p M の範囲の親和性で結合する結合反応を表わす。

【0047】

さらにある観点において、結合剤と少なくとも 1 種類のマーカーの間で形成された複合体から、形成された複合体のレベルを測定する前に、試料を除去する。したがって、ある観点において、結合剤を固体支持体に固定化することができる。さらにある観点において、固体支持体上に形成された複合体から、洗浄溶液の適用により試料を除去することができる。形成された複合体は、試料中に存在する少なくとも 1 種類のマーカーのレベルに比例するであろう。適用する結合剤の特異度および/または感度が試料中に含まれる特異的に結合される少なくとも 1 種類のマーカーの比例度を決定することは理解されるであろう。決定を実施できる方法についてのさらなる詳細は、本明細書のいずれかに開示されている。形成された複合体のレベルを、試料中に実際に存在するレベルを反映する少なくとも 1 種類のマーカーのレベルに換算する。そのようなレベルは、ある観点において、本質的に試料中に存在するレベルであってもよく、あるいは他の観点において、形成された複合体と元の試料中に存在するレベルには関係があるため、その特定割合のレベルであってもよい。

20

30

【0048】

本発明によれば、2 種類のマーカー、すなわちセブラーゼおよび心臓マーカーのレベルを測定することを考慮する。

心臓マーカーは、当技術分野で周知である。好ましくは、マーカーはナトリウム利尿ペプチドまたは心臓トロポニンである。さらに、心臓マーカーはシスタチン C であってもよい。

【0049】

ナトリウム利尿ペプチドは当技術分野で周知である。用語“ナトリウム利尿ペプチド”は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) タイプおよび脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) タイプのペプチド、ならびに同じ推定力価をもつそのバリエーションを含む。本発明によるナトリウム利尿ペプチドは、ANP タイプおよび BNP タイプのペプチドならびにそのバリエーションを含む (たとえば、Bonow, R.O. (1996). New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950 を参照)。ANP タイプのペプチドは、pre-pro ANP、pro ANP、NT-pro ANP、および ANP を含む。BNP タイプのペプチドは、pre-pro BNP、pro BNP、NT-pro BNP、および BNP を含む。特に、BNP タイプのペプチドは NT-pro BNP または BNP である。

40

【0050】

pre-pro ペプチド (pre-pro BNP の場合は 134 個のアミノ酸) は短い

50

シグナルペプチドを含み、それが酵素により開裂してproペプチド(proBNPの場合は108個のアミノ酸)を放出する。このproペプチドがさらに開裂して、N末端proペプチド(NT-proペプチド; NT-proBNPの場合は76個のアミノ酸)と活性ホルモン(BNPの場合は32個のアミノ酸、ANPの場合は28個のアミノ酸)になる。本発明による好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNP、およびそのバリエーションである。ANPおよびBNPは活性ホルモンであり、それらのそれぞれの不活性対応物(counterpart)NT-proANPおよびNT-proBNPより短い半減期をもつ。BNPは血液中で代謝され、これに対しNT-proBNPは無傷分子として血液中を循環し、そのまま腎排出される。NT-proBNPのインビボ半減期は、BNPの半減期である20分より120分長い(Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. J Endocrinol. 2000; 167: 239-46)。

10

【0051】

予備分析ではNT-proBNPはより堅牢であり、試料を中央検査室へ容易に運搬できる(Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. Clin Chem Lab Med 2004; 42: 942-4)。血液試料を室温で数日間保存でき、あるいは回収損失なしに郵送または輸送できる。これと対照的に、BNPを室温または4℃で48時間保存すると、少なくとも20%の濃度損失が生じる(Mueller T, Gegenhuber A, et al., Clin Chem Lab Med 2004; 42: 942-4, 前掲; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldkamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. Clin Chem 2004; 50: 867-73)。したがって、目的とするタイムコースまたは特性に応じて、活性形または不活性形のナトリウム利尿ペプチドの測定が有利である可能性がある。

20

【0052】

本発明による最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-proBNPまたはそのバリエーションである。前記で簡単に考察したように、本発明に従って述べるヒトNT-proBNPは、好ましくはヒトproBNP分子のN末端部分に対応する長さ76個のアミノ酸を含むポリペプチドである。ヒトのBNPおよびNT-proBNPの構造は先行技術において既に詳細に記載されている; たとえば、WO 02/089657、WO 02/083913、Bonow 1996, New Insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950。好ましくは、本発明において用いるヒトNT-proBNPは、EP 0 648 228 B1に開示されるヒトNT-proBNPである。これらの先行技術文献を、それらに開示される特定のNT-proBNPおよびそのバリエーションの配列に関して本明細書に援用する。

30

【0053】

本発明によるNT-proBNPは、さらに、前記で考察したヒトNT-proBNPについての特定の配列の対立遺伝子および他のバリエーションを包含する。具体的には、アミノ酸レベルで、特に全長にわたって、ヒトNT-proBNPと少なくとも60%同一、より好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるバリエーションポリペプチドが考慮される。実質的に類似する、同様に考慮されるものは、診断手段によって、またはそれぞれの全長ペプチドを指向するリガンドによってなお認識されるタンパク質分解生成物である。同様に包含されるのは、ヒトNT-proBNPのアミノ酸配列と比較してアミノ酸の欠失、置換および/または付加をもつバリエーションポリペプチドであり、ただし、それらのポリペプチドがNT-proBNP特性をもつ限りにおいてである。本明細書中で述べるNT-proBNP特性は、免疫学的および/または生物学的特性である。好ましくは、NT-proBNPバリエーションはNT-proBNPのものに匹敵する免疫学的特

40

50

性(すなわち、エピトープ組成)をもつ。したがって、それらのバリエーションはナトリウム利尿ペプチドの量を測定するために用いる前記の手段またはリガンドによって特異的に(すなわち、交差反応なしに)認識できるであろう。生物学的および/または免疫学的NT-proBNP特性は、Karl et al. (Karl 1999. Development of a novel, N-Terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. Scand J Clin Invest 230:177-181)、Yeo et al. (Yeo 2003. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage assay. Clinica Chimica Acta 338:107-115)、および後記の実施例に記載されるアッセイにより検出できる。バリエーションには、翻訳後修飾されたナトリウム利尿ペプチド、たとえばグリコシル化ペプチドも含まれる。試料の採集後にペプチドへの標識、特に放射性標識または蛍光標識の共有結合または非共有結合により修飾されたペプチドまたはポリペプチドも、本発明によるバリエーションである。

10

【0054】

用語“心臓トロポニン”は、心臓の細胞、好ましくは心内膜下細胞に発現するすべてのトロポニンイソ形を表わす。これらのイソ形は当技術分野で十分に特性解明されており、たとえばAnderson 1995, Circulation Research, vol. 76, no. 4: 681-686、およびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493に記載されている。好ましくは、心臓トロポニンはトロポニンTおよび/またはトロポニンI、最も好ましくはトロポニンTを表わす。トロポニンのイソ形は、本発明の方法において、一緒に、すなわち同時にしくは逐次に、または個別に、すなわち他のイソ形を全く測定せずに、測定できることを理解すべきである。ヒトトロポニンTおよびヒトトロポニンIのアミノ酸配列は、Anderson, 前掲、およびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493に開示されている。

20

【0055】

用語“心臓トロポニン”は、前記の特定のトロポニン類、すなわち好ましくはトロポニンIの、最も好ましくはトロポニンTの、バリエーションをも包含する。そのようなバリエーションは、少なくともその特定の心臓トロポニンと同じ本質的な生物学的および免疫学的特性をもつ。特に、それらを本明細書中で述べるものと同じ特定のアッセイ、たとえばそれらの心臓トロポニンを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイにより検出できれば、それらは同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明に従って述べるバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加のため異なるアミノ酸配列をもち、その際、バリエーションのアミノ酸配列はなお、好ましくは、特定のトロポニンと(特に全長にわたって)、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一であることを理解すべきである。好ましくは、同一度は比較ウィンドウにわたって最適状態でアラインさせた2つの配列の比較により決定すべきであり、その際、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列のフラグメントは、最適アラインメントのために、基準配列(付加または欠失を含まないもの)と比較して付加または欠失(たとえば、ギャップまたはオーバーハング)を含むことができる。パーセントは、両方の配列に同一アミノ酸残基が現われる位置の数を決定して一致位置の数を求め、その一致位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一パーセントを求めることにより計算される。比較のための最適な配列アラインメントは、下記により実施できる: Smith and Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981)の局所相同アルゴリズム(local homology algorithm)、Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同アラインメントアルゴリズム(homology alignment algorithm)、Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988)の類似性検索法(search for similarity method)、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装(GAP、BESTFIT、BLAST、FAST、PASTA、およびTFASTA; Wisconsin Genetics Software Package中、Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、または目視検査。比較のための2つの配列が同定されると、好ましくはGAPおよびBESTFITを用いてそれらの最適アラインメ

30

40

50

ントを決定し、こうして同一度を決定する。好ましくは、ギャップ重みにつき5.00、ギャップ重み長さにつき0.30のデフォルト値を用いる。バリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ(homolog)、パラログ(paralog)もしくはオルソログ(ortholog)であってもよい。さらに、本明細書中で述べるバリエーションには、特定の心臓トロポニンまたは前記タイプのバリエーションの、フラグメントが含まれる；ただし、これらのフラグメントが前記の本質的な免疫学的および生物学的特性をもつ限りにおいてである。好ましくは、心臓トロポニンバリエーションはヒトのトロポニンTまたはトロポニンIのものに匹敵する免疫学的特性(すなわち、エピトープ組成)をもつ。したがって、バリエーションは心臓トロポニンの濃度を測定するために用いる前記の手段またはリガンドによって特異的に認識できるであろう。そのようなフラグメントは、たとえばトロポニンの分解生成物であってもよい。さらに、翻訳後修飾、たとえばリン酸化またはミリスチル化のため異なるバリエーションが含まれる。好ましくは、トロポニンIおよびそのバリエーションの生物学的特性は、アクトミオシンATPアーゼを阻害する能力、またはインビボおよびインビトロで血管形成を阻害する能力であり、それらは、たとえばMoses et al. 1999 PNAS USA 96 (6): 2645-2650により記載されたアッセイに基づいて検出できる。好ましくは、トロポニンTおよびそのバリエーションの生物学的特性は、トロポニンCおよびIと複合体を形成する能力、カルシウムイオンを結合する能力、またはトロポミオシンに結合する能力である：好ましくは、トロポニンC、IおよびTの複合体、またはトロポニンC、トロポニンIおよびトロポニンTバリエーションにより形成された複合体として存在する場合。低濃度の循環型心臓トロポニンを種々の状態の対象において検出できることが知られているが、それらのそれぞれの役割および割合を理解するためにはさらなる研究が必要である(Masson et al., Curr Heart Fail Rep (2010) 7:15-21)。

【0056】

好ましくは、心臓トロポニンはトロポニンT、特にヒトトロポニンTである。好ましくは、トロポニンTの量は実施例またはWO 2012/025355に記載される高感度トロポニンアッセイを用いて測定される。

【0057】

マーカーであるセプラーゼは当技術分野で周知であり、たとえばPineiro-Sanchez, M.L. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7595-7601、またはPark, J.E. et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 36505-36512により記載されている；これらをそれらの開示内容全体に関して本明細書に援用する。セプラーゼは、本発明の意味において線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(=FAP)または膜統合型セリンプロテアーゼとしても知られ、好ましくはゼラチナーゼおよびジペプチジルペプチダーゼ活性をもつ170kDaの糖タンパク質である(EC 3.4.21.-)。マーカーであるセプラーゼに関する包括的総説は、Swissprot Accession Number Q12884, Version 142(2014年2月19日に最終改訂)により評価できる；その開示内容全体を本明細書に援用する。好ましくは、セプラーゼは2つの同一のモノマー状セプラーゼ単位を含む(参照：Pineiro-Sanchez et al. and Park et al.)。ヒトの膜結合セプラーゼタンパク質のモノマーは760個のアミノ酸を含み、UniProtKB/Swiss-Prot寄託番号Q12884に、またはWO 2012/123293のSEQ ID NO: 6に示される；その開示内容全体を本明細書に援用する。ヒトセプラーゼは、その最初の4個のN末端残基を線維芽細胞の細胞質内にもち、続いて21残基の膜貫通ドメイン、次いで734残基の細胞外C末端触媒ドメインをもつと推定される(Goldstein, L.A. et al., Biochim Biophys Acta. 1361 (1997) 11-19; Scanlan, M.J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 5657-5661)。より短い形のヒトセプラーゼタンパク質が、可溶性セプラーゼまたは循環型アンチプラスミン開裂酵素(antiplasmin-cleaving enzyme)(=APCE)として当業者に知られている(Lee, K.N. et al., Blood 103 (2004) 3783-3788; Lee, K.N. et al., Blood 107 (2006) 1397-1404)。好ましくは、可溶性セプラーゼは、Swissprotデータベース寄託番号Q12884からのイソ形1(特に、イソ形1, 最終改変2010年3月23日, バージョン5, Checksum: 7FF817B5A4F75142を参照)の、またはWO 2012/123293のS

10

20

30

40

50

EQ ID NO : 6 に示されるポリペプチドの、アミノ酸位置 26 - 760 を含む。Human Protein Atlas は、セブラーゼについて 6 つのイソ形の存在を記録し、これには推定シグナルペプチドを備えた 2 つが含まれる。UniProt はオルタナティブスプライシングにより産生された 2 つのイソ形を記載している : 760 アミノ酸のカノニカルイソ形、およびアミノ酸 1 - 521 を喪失したトランケート S イソ形。可溶性セブラーゼの二量体は、2 つの同一のモノマー状可溶性セブラーゼタンパク質単位からなる 160 kDa の糖タンパク質である。Pineiro-Sanchez et al. (前掲) は、セブラーゼの発現増大がヒト黒色腫および癌細胞の浸潤性表現型と関連することを見出した。Henry, L.R. et al., Clin. Cancer Res. 13 (2007) 1736-1741 には、高レベルの間質性セブラーゼをもつヒト結腸腫瘍患者は攻撃的な疾患進行および潜在的な転移発症または再発を伴う可能性がより高いと記載されている。

10

【0058】

本発明のある態様において、用語“セブラーゼ”は、可溶性セブラーゼ(前記を参照)を表わす。したがって、本明細書に明記する試料中の可溶性セブラーゼのレベル、特に可溶性セブラーゼの二量体のレベルを測定することを考慮する。

【0059】

本明細書中で用いる用語“レベル”は、本明細書中で述べるバイオマーカーの絶対量、そのバイオマーカーの相対量または濃度、およびそれと関連するかまたはそれから誘導できるいずれかの数値またはパラメーターを包含する。そのような数値またはパラメーターは、それらのペプチドから直接測定により得られるすべての特異的な物理的または化学的特性からの強度信号値、たとえば質量スペクトルまたは NMR スペクトルにおける強度値を含む。さらに、本明細書のいずれかの箇所に明記した間接測定により得られるすべての数値またはパラメーター、たとえば生物学的読出し系から前記ペプチドに応答して測定された応答レベル、または特異的に結合したりガンドから得られた強度信号が包含される。前記のレベルまたはパラメーターと関連する数値はあらゆる標準的数学操作によっても得られることを理解すべきである。

20

【0060】

本明細書中で用いる用語“比較する”は、個体または患者からの試料中のバイオマーカーのレベルを、本明細書のいずれかの箇所に明記するそのバイオマーカーの基準レベルと比較することを表わす。本明細書中で用いる比較は通常は対応するパラメーターまたは数値の比較を表わすことを理解すべきである ; たとえば、絶対量を絶対基準量と比較し、一方、濃度を基準濃度と比較し、あるいは試料中のバイオマーカーから得られる強度信号を基準試料から得られる同じタイプの強度信号と比較する。この比較は、手動で、またはコンピューター支援により実施できる。したがって、比較はコンピューティングデバイス(たとえば、本明細書に開示するシステムの)により実施できる。個体または患者からの試料中のバイオマーカーの測定レベルまたは検出レベルの値を、たとえば互いに比較することができ、その比較は比較のためのアルゴリズムを実行するコンピュータープログラムにより自動的に実施できる。その評価を実施するコンピュータープログラムは、目的とする評価を適切な出力フォーマットで提供するであろう。コンピューター支援による比較のために、測定量の値を、データベースに記憶されている適切な基準に対応する値とコンピュータープログラムにより比較することができる。コンピュータープログラムはさらに比較の結果を評価することができる ; すなわち、目的とする評価を適切な出力フォーマットで自動的に提供する。

30

40

【0061】

本発明の方法に従って、心臓マーカーのレベルおよびバイオマーカーであるセブラーゼのレベルを、適切な基準レベルと比較する ; すなわち、心臓マーカーのレベルをその心臓マーカーの基準レベルと比較し、バイオマーカーであるセブラーゼのレベルをそのバイオマーカーの基準レベルと比較する。好ましくは、心臓マーカーおよびバイオマーカーであるセブラーゼの基準レベルは、本明細書中で述べる鑑別を可能にするものである。当業者に認識されるように、心臓マーカーおよびバイオマーカーであるセブラーゼの基準レベル

50

は予め測定され、たとえば特異度および/または感度に関するルーティンな要求を満たすように設定される。これらの要求は、たとえば規制当局毎に異なる可能性がある。それは、たとえばアッセイの感度または特異度をそれぞれ特定の限界、たとえばそれぞれ80%、90%、95%または98%に設定すべきであるというものである。これらの要求は、プラスまたはマイナスの推定値により規定される可能性もある。それにもかかわらず、本発明に示す教示に基づいて、当業者は常にこれらの要求を満たす基準レベルに到達することができるであろう。1態様において、基準レベルは健康な個体からの基準試料において測定される。1態様において、基準レベルは患者が属する疾病(disease entity)からの基準試料、したがって急性息切れに罹患している患者からの試料において、前決定されている。好ましくは、バイオマーカーであるセプラーゼの基準レベル、すなわち本発明方法の段階c)で適用すべき基準レベルは、急性息切れに罹患している患者の試料から、特に肺疾患を伴う急性息切れに罹患している患者の試料から、または肺疾患を伴わない急性息切れに罹患している患者の試料から、得ることができる。同様に好ましくは、心臓マーカーの基準レベル、すなわち本発明方法の段階d)で適用すべき基準レベルは、急性息切れに罹患している患者の試料から、特に心疾患を伴う急性息切れに罹患している患者の試料から、または心疾患を伴わない急性息切れに罹患している患者の試料から、得ることができる。

10

【0062】

特定の態様において、基準レベルは、調べる疾病(disease entity)における数値の全分布の25%~75%のいずれかのパーセントに設定できる。他の態様において、基準レベルは、調べる疾病(disease entity)からの基準試料における数値の全分布から測定した中央値、三分位置(tertile)または四分位置(quartile)に設定できる。1態様において、基準レベルは、調べる疾病(disease entity)からの基準試料における数値の全分布から決定した中央値に設定される。基準レベルは、種々の生理的パラメーター、たとえば年齢、性別または下位集団、および本明細書中で述べるバイオマーカーの決定に用いる手段に応じて、変動する可能性がある。1態様において、基準試料は本質的に、本発明の方法を施す個体または患者からの試料と同じタイプの細胞、組織、臓器または体液源からのものである;たとえば、本発明に従って個体のバイオマーカーのレベルを測定するための試料として血液を用いる場合、基準レベルも血液またはその一部において測定される。

20

【0063】

本明細書中で述べるように、基準レベルは前決定したレベルであってもよい。好ましくは、段階c)およびd)で適用すべき基準レベルは、急性息切れを伴う患者を肺疾患に罹患している患者グループおよび/または心疾患に罹患している患者グループに配属できるレベルである。

30

【0064】

下記を診断アルゴリズムとして適用する:

セプラーゼのレベルが基準レベルより低ければその患者は肺疾患に罹患しており、および/または心臓トロポニンのレベルが基準レベルより高ければその患者は心疾患に罹患している。

【0065】

特に、下記を適用する:

- ・基準レベルより低いレベルのセプラーゼは、肺疾患に罹患している患者の指標となる
- ・基準レベルより高いレベルのセプラーゼは、肺疾患に罹患していない患者の指標となる
- ・基準レベルより高いレベルの心臓マーカーは、心疾患に罹患している患者の指標となる、および/または
- ・基準レベルより低いレベルの心臓マーカーは、心疾患に罹患していない患者の指標となる。

40

【0066】

本発明に従って適用するために好ましい基準レベルは、バイオマーカーであるセプラー

50

ぜについては約 39 ng/ml ~ 約 159 ng/ml、特に約 47 ng/ml ~ 約 144 ng/ml の範囲内である。好ましい態様において、このマーカーの基準レベルは、約 67 ng/ml ~ 約 78 ng/ml の範囲内である。同様に好ましくは、この基準レベルは約 78 ng/ml であってもよい。さらに好ましくは、この基準レベルは約 84 ng/ml であってもよい。

【0067】

本発明に従って適用するために好ましいマーカー NT-proBNP (または BNP) の基準レベルは、NT-proBNP については約 100 ~ 約 500 pg/ml (BNP については約 80 ~ 約 130 pg/ml)、特に NT-proBNP については約 250 ~ 約 450 pg/ml (BNP については約 90 ~ 約 110 pg/ml) の範囲内である。好ましい態様において、この NT-proBNP についての基準レベルは約 400 pg/ml であり、BNP については基準レベルは約 100 pg/ml である。さらに、NT-proBNP については基準レベルは約 125 pg/ml であるものとする。

10

【0068】

特定の態様において、用語“基準レベルより高い”は、個体または患者からの試料において、基準レベルより高いバイオマーカーのレベル、または本明細書に記載する方法により測定して基準レベルと比較して全体的に 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100% またはそれ以上の増加を表わす。特定の態様において、増加という用語は、個体または患者からの試料におけるバイオマーカーのレベルの上昇を表わし、その際、上昇は、たとえば基準試料から前決定した基準レベルと比較して少なくとも約 1.5 -、1.75 -、2 -、3 -、4 -、5 -、6 -、7 -、8 -、9 -、10 -、15 -、20 -、25 -、30 -、40 -、50 -、60 -、70 -、75 -、80 -、90 -、または 100 - 倍高い。

20

【0069】

特定の態様において、本明細書中の用語“減少”または“より低い”は、個体または患者からの試料において、基準レベルより低いバイオマーカーのレベル、または本明細書に記載する方法により測定して基準レベルと比較して全体的に 5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上の減少を表わす。特定の態様において、減少という用語は、個体または患者からの試料におけるバイオマーカーのレベルの低下を表わし、その際、レベルの低下は、たとえば基準試料から前決定した基準レベルの最大で約 0.9 -、0.8 -、0.7 -、0.6 -、0.5 -、0.4 -、0.3 -、0.2 -、0.1 -、0.05 - もしくは 0.01 - 倍またはそれ以下である。

30

【0070】

好ましくは、本明細書中で用いる用語“約”は、その明記した量と対比して ± 20% の範囲、より好ましくは ± 10% の範囲、よりさらに好ましくは ± 5% の範囲、最も好ましくは ± 2% の範囲を包含する；たとえば、“約 100”のレベルという指示は、8 から 120 までの範囲のレベルを包含する。用語“約”は、その厳密なレベルをも表わす。好ましくは、レベルは実施例の記載に従って測定される。

【0071】

本明細書中で前記に挙げた定義および説明は、必要な訂正を加えて、以下の本発明の態様に適用される。

40

本発明はさらに、急性息切れ（急性呼吸困難）に罹患している患者において、(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(ii) 肺疾患を伴わない心疾患、(iii) 肺疾患を伴う心疾患、ならびに (iv) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難を鑑別するための方法であって、以下の段階を含む前記方法に関する：

- a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、
- b) 患者からの試料中の心臓マーカー、特にナトリウム利尿ペプチドまたは心臓トロポニンのレベルを測定する、
- c) 段階 a) で測定したレベルを基準レベルと比較する、および

50

d) 段階 b) で測定したレベルを基準レベルと比較する。

【0072】

ある態様において、前記方法は、比較段階 c) および d) の結果に基づいて (i)、(ii)、(iii) および (iv) を鑑別する (または鑑別を行なう) 段階 e) を含むことができる。

【0073】

用語“鑑別”は、本明細書中で前記に定義されている。前記方法に従って、用語“鑑別”は特に (i) 肺疾患、(ii) 心疾患、(iii) 肺疾患を伴なう心疾患、または (iv) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難 (すなわち、心臓性または肺性の原因を伴わない条件下の急性呼吸困難) に罹患している対象を区別することを意味する。前記方法に従ったこの用語は、好ましくは肺疾患、心疾患、肺疾患を伴なう心疾患、または心臓性または肺性の原因を伴わない急性呼吸困難 (すなわち、心疾患および肺疾患を伴わない急性息切れ) を鑑別診断することを含む。

10

【0074】

用語“心疾患”および“肺疾患”は、前記に定義されている。

“肺疾患を伴なう心疾患”とは、対象が心疾患および肺疾患に罹患していることを意味する。これら2つの疾患または障害は、独立して、すなわち一方が他方の原因となることなく、出現する可能性があることを理解すべきである。しかし、本明細書中で述べる原発性心疾患が続発性肺疾患の原因である症例、およびその逆も、好ましくは上記の表現に含まれる。したがって、心疾患がその肺疾患により引き起こされる可能性およびその逆の可能性もある。

20

【0075】

さらに、急性呼吸困難は、いずれにしろ、心疾患にも肺疾患にも罹患していない患者にみられる可能性がある。そのような症例は、本発明の目的に関して“心疾患または肺疾患を伴わない急性呼吸困難”に含まれるであろう。非心臓性および非肺性の急性息切れの好ましい原因は、好ましくは肥満症、高体重、対象の鍛練されていないかまたは鍛練の乏しい身体状態、精神状態、たとえば不安状態である。したがって、“心疾患または肺疾患を伴わない急性呼吸困難”という表現は、急性息切れに罹患している患者が非心臓性および非肺性の疾患に罹患していることを意味する。

【0076】

用語“基準レベル”は、前記に定義されている。その定義を適宜適用する。好ましくは、段階 c) および d) で適用すべき基準レベルは、急性息切れを伴なう患者を下記に罹患している患者グループに割り当てることができるレベルである：(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(ii) 肺疾患を伴わない心疾患、(iii) 肺疾患を伴なう心疾患、ならびに (iv) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難。

30

【0077】

下記を好ましくは診断アルゴリズムとして適用する：

i) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより低く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより低ければ、その患者は心疾患を伴わない肺疾患に罹患している、

ii) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより高く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより高ければ、その患者は肺疾患を伴わない心疾患に罹患している、

iii) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより低く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより高ければ、その患者は肺疾患を伴なう心疾患に罹患している、および/または

iv) セプラーゼの測定レベルが基準レベルより高く、かつ心臓マーカーの測定レベルが基準レベルより低ければ、その患者は心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難に罹患している。

40

【0078】

本発明方法の好ましい態様において、その方法はさらに、その対象が心疾患および/または肺疾患に罹患しているかどうかに応じて適切な療法を選択、推奨および/または開始

50

する段階を含む。

【0079】

本明細書中で用いる句“療法を推奨する”は、患者の試料中の本発明に従って述べるバイオマーカーのレベルに関して取得された情報またはデータを、適切な療法の推奨のために使用することを表わす。患者が肺疾患に罹患していると同定されれば、適切な療法は好ましくはその肺疾患の治療を意図する療法である。そのような療法は当技術分野で周知であり、基礎となる肺疾患のタイプに依存するであろう。たとえば、療法は少なくとも1種類の抗コリン作動薬、少なくとも1種類のベータ2-アドレナリン作動性アゴニスト、および/または少なくとも1種類のステロイドの投与、あるいは肺疾患がCOPDまたは喘息であれば酸素療法、あるいは肺疾患が肺炎であれば少なくとも1種類の抗生物質の投与、あるいは肺疾患が肺線維症であれば免疫抑制療法であってもよい。

10

【0080】

患者が心疾患に罹患していると同定されれば、適切な療法は好ましくはその心疾患の治療を意図する療法である。そのような療法は当技術分野で周知であり、基礎となる心疾患のタイプに依存するであろう。たとえば、療法はアスピリン、クロピドグレル(clopidogrel)、チカグレロル(ticagrelor)および/またはニトログリセリンの投与、あるいは急性冠動脈症候群(ACS)に対しては血管形成術、あるいは肺高血圧症に対しては少なくとも1種類のプロスタサイクリンアナログ、少なくとも1種類のエンドセリン受容体アンタゴニストおよび/または少なくとも1種類のホスホジエステラーゼ-5阻害薬の投与、あるいは右室心不全に対しては少なくとも1種類の利尿薬および/または少なくとも1種類の抗凝固薬の投与であってもよい。使用または取得された情報またはデータは、書面、口頭または電子など、いかなる形態であってもよい。ある態様において、取得された情報またはデータの使用は、通信、提示、レポート、記憶、送信、転送、供給、伝達、配分、またはその組み合わせが含まれる。ある態様において、通信、提示、レポート、記憶、送信、転送、供給、伝達、配分、またはその組み合わせは、コンピューティングデバイス、分析ユニット、またはその組み合わせにより実施される。あるさらなる態様において、通信、提示、レポート、記憶、送信、転送、供給、伝達、配分、またはその組み合わせは、実験または医療の専門家により行なわれる。ある態様において、情報またはデータには、本発明の方法に従って述べるバイオマーカーのレベルを基準レベルと比較することが含まれる。

20

【0081】

したがって、本発明は、急性息切れに罹患している対象を処置するための方法であって、以下の段階を含む前記方法に関する：

30

- a) 患者からの試料中のセプラーゼのレベルを測定する、
- b) 患者からの試料中の心臓マーカー、特にナトリウム利尿ペプチドまたは心臓トロポニンのレベルを測定する、
- c) 段階a)で測定したレベルを基準レベルと比較する、
- d) 段階b)で測定したレベルを基準レベルと比較する、
- e) 対象を、特に比較段階c)およびd)の結果に基づいて、肺疾患の処置を意図する療法および/または心疾患の処置を意図する療法に適すると同定する、および
- f) 肺疾患の処置を意図する療法および/または心疾患の処置を意図する療法を選択、開始、推奨および/または継続する。

40

【0082】

さらに、本発明は、急性息切れ(急性呼吸困難)に罹患している患者からの試料において、肺疾患と心疾患を鑑別するための、

- a) バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカー、および/または
 - b) バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤
- の使用に関する。

【0083】

さらにまた、本発明は、急性息切れ(急性呼吸困難)に罹患している患者からの試料に

50

において、(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(i i) 肺疾患を伴わない心疾患、(i i i) 肺疾患を伴う心疾患、ならびに(i v) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難を鑑別するための、

a) バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカー、ならびに / あるいは

b) バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤

の使用に関する。

【 0 0 8 4 】

また、本発明は、急性息切れに罹患している患者において、肺疾患と心疾患を鑑別する診断薬を製造するための、

a) バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカー、ならびに / あるいは

b) バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤

の使用に関する。

【 0 0 8 5 】

さらに、本発明は、急性息切れに罹患している患者において、(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(i i) 肺疾患を伴わない心疾患、(i i i) 肺疾患を伴う心疾患、ならびに(i v) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難を鑑別する診断薬を製造するための、

a) バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカー、ならびに / あるいは

b) バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤

の使用に関する。

【 0 0 8 6 】

本発明によれば、バイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカーのそれぞれに特異的に結合する作用剤は、好ましくはバイオマーカーであるセプラーゼおよび心臓マーカーのそれぞれに特異的に結合する検出剤である。用語“作用剤”および“検出剤”は、前記に明記されている。好ましくは、作用剤はそのマーカーを特異的に結合する抗体である。より好ましくは、抗体はポリクローナル抗体である。最も好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。しかし、他の検出剤も適用できる。

【 0 0 8 7 】

本発明の好ましい態様によれば、本発明の方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイスが提供される：

a . バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤を含む分析ユニットであって、急性息切れに罹患している対象からの試料においてそれらのマーカーのレベルを測定するために適合させた分析ユニット；および

b . 測定レベルを基準レベルと比較してそれにより肺疾患と心疾患を鑑別するための分析ユニット（または評価ユニット）であって、基準レベルを備えたデータベースおよび比較を実施するためのアルゴリズムを含むユニット。

【 0 0 8 8 】

本発明の好ましい態様によれば、本発明の方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイスが提供される：

a . バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤および心臓マーカーに特異的に結合する作用剤を含む分析ユニットであって、急性息切れに罹患している対象からの試料においてそれらのマーカーのレベルを測定するために適合させた分析ユニット；および

b . 測定レベルを基準レベルと比較してそれにより(i) 心疾患を伴わない肺疾患、(i i) 肺疾患を伴わない心疾患、(i i i) 肺疾患を伴う心疾患、ならびに(i v) 心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難を鑑別するための分析ユニット（または

10

20

30

40

50

評価ユニット)であって、基準レベルを備えたデータベースおよび比較を実施するためのアルゴリズムを含むユニット。

【0089】

好ましくは、アルゴリズムはコンピューター実装アルゴリズムである。好ましくは、アルゴリズムは本明細書のいずれかの箇所に述べた診断アルゴリズムである。好ましい基準レベルは本明細書のいずれかの箇所に開示されている。

【0090】

本明細書に開示する好ましい態様は、急性息切れに罹患している患者において、心疾患と肺疾患(または(i)心疾患を伴わない肺疾患、(ii)肺疾患を伴わない心疾患、(iii)肺疾患を伴う心疾患、ならびに(iv)心疾患および肺疾患を伴わない急性呼吸困難)を鑑別するためのシステムを含む。システムの例には、化学反応もしくは生物反応の結果を検出するために、または化学反応もしくは生物反応の進行をモニターするために用いられる、臨床化学分析計、凝固化学分析計、免疫化学分析計、尿分析計、核酸分析計が含まれる。より具体的には、本明細書に開示する代表的システムには、RocheのElec Sys(商標)システムおよびCobas(登録商標)eイムノアッセイ分析計、AbbottのArchitect(商標)およびAxSYM(商標)分析計、SiemensのCentaur(商標)およびImmulite(商標)分析計、ならびにBeckman CoulterのUniCell(商標)およびAccess(商標)分析計などを含めることができる。

10

【0091】

システムの態様には、本明細書の開示内容を実施するために用いる1以上の分析ユニットを含めることができる。本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、既知のように有線接続、Bluetooth(登録商標)、LANS、または無線信号のいずれかにより、本明細書に開示するコンピューティングデバイスと作動可能な状態で連絡している。さらに、本明細書の開示によれば、分析ユニットは、診断の目的で試料の検出、たとえば定性および/または定量評価の一方または両方を実施する独立型装置またはより大型機器内のモジュールを含むことができる。たとえば、分析ユニットは試料および/または試薬のピペティング、投入、混合を実施または支援することができる。分析ユニットは、アッセイを行なう試薬を保持するための試薬保持ユニットを含むことができる。試薬は、たとえば個々の試薬または一群の試薬を収容した容器またはカセットの形態で、貯蔵コンパートメントまたはコンベヤー内の適宜な受器または位置に置いた状態で配置することができる。検出試薬は、試料と接触させる固体支持体に固定化された形態であってもよい。さらに、分析ユニットは処理および/または検出の構成要素を含むことができ、それは個々の分析に最適化できる。

20

30

【0092】

ある態様によれば、分析ユニットは、試料について被検体、たとえばマーカを光学検出するために構成できる。光学検出のために構成された代表的な分析ユニットは、電磁エネルギーを電気信号に変換するように構成されたデバイスを含み、それには単一素子および多重素子またはアレイ状の光学検出器が共に含まれる。本明細書の開示によれば、光学検出器は、光路に配置された試料中の被検体の存在および/または濃度の指標となる光電磁信号をモニターし、そして電氣的な出力信号または応答信号をベースライン信号に対比して提供することができる。そのようなデバイスには、たとえば下記のものも含めることができる：アバランシェフォトダイオード(avalanche photodiode)を含むフォトダイオード、フォトトランジスター、光伝導検出器、リニアセンサーアレイ、CCD検出器、CMOSアレイ検出器を含むCMOS検出器、光電子増倍管、および光電子増倍管アレイ。特定の態様によれば、光学検出器、たとえばフォトダイオードまたは光電子増倍管は、信号の調整または処理用の追加エレクトロニクスを含むことができる。たとえば、光学検出器は少なくとも1つの前置増幅器、フィルター回路、または集積回路を含むことができる。適切な前置増幅器には、たとえば積分型、トランスインピーダンス型、および電流利得型(current gain)(カレントミラー(current mirror))の前置増幅器が含まれる。

40

50

【 0 0 9 3 】

さらに、本明細書の開示による 1 以上の分析ユニットは、光を発するための光源を含むことができる。たとえば、分析ユニットの光源は、被検試料について被検体濃度を測定するための、またはエネルギー移動（たとえば、蛍光共鳴エネルギー移動による、または酵素の触媒作用による）を可能にするための、少なくとも 1 つの発光素子（たとえば、発光ダイオード、電源付き輻射線源、たとえば白熱電球、エレクトロルミネセントランプ、気体放電ランプ、高輝度放電ランプ、レーザー）からなることができる。

【 0 0 9 4 】

さらに、このシステムの分析ユニットは、1 以上の保温ユニット（たとえば、試料または試薬を、特定した温度または温度範囲に保持するためのもの）を含むことができる。ある態様において、分析ユニットは、試料に反復温度サイクルを施してその試料について増幅生成物の量の変化をモニターするためのサーモサイクラー（リアルタイムサーモサイクラーを含む）を含むことができる。

10

【 0 0 9 5 】

さらに、本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、反応器またはキュベットへの供給ユニットを含むことができ、あるいはそれに操作可能な状態で接続していてもよい。代表的な供給ユニットには、試料および/または試薬を反応器へ送達するための液体操作ユニット、たとえばピペティングユニットが含まれる。ピペティングユニットは、再利用可能な可洗ニードル、たとえばスチールニードル、または使い捨てピペットチップを含むことができる。分析ユニットは、さらに 1 以上の混合ユニット、たとえば液体を入れたキュベットを振とうするためのシェーカー、またはキュベットもしくは試薬容器内の液体を混合するための混合パドルを含むことができる。

20

【 0 0 9 6 】

以上から、この開示内容のある態様によれば、本明細書に開示および記載した方法の幾つかの段階の一部をコンピューティングデバイスにより実施できることが分かる。コンピューティングデバイスは、たとえば汎用コンピューターまたはポータブルコンピューティングデバイスであってもよい。本明細書に開示する方法の 1 以上の段階を実施するために、多数のコンピューティングデバイスを、たとえばネットワークまたは他のデータ移送方法を介して一緒に使用することも理解すべきである。代表的なコンピューティングデバイスには、デスクトップコンピューター、ラップトップコンピューター、パーソナルデータアシスタント(personal data assistant) (“ P D A ”)、たとえば B L A C K B E R R Y 銘柄のデバイス、セル方式デバイス、タブレットコンピューター、サーバーなどが含まれる。一般に、コンピューティングデバイスは複数の指示（たとえば、ソフトウェアのプログラム）を実行できるプロセッサを含む。

30

【 0 0 9 7 】

コンピューティングデバイスはメモリーにアクセスできる。メモリーはコンピューター可読媒体であり、単一記憶デバイスまたは多重記憶デバイスを含むことができ、それらはコンピューティングデバイスと共に局所に配置され、あるいはたとえばネットワークを介してコンピューティングデバイスにアクセス可能であってもよい。コンピューター可読媒体はコンピューティングデバイスがアクセスできる入手可能ないかなる媒体であってもよく、これには持久性(volatile)および非持久性(non-volatile)の両方の媒体が含まれる。さらに、コンピューター可読媒体はリムーバブル媒体および非リムーバブル媒体のうち的一方または両方であってもよい。たとえば、限定ではなく、コンピューター可読媒体はコンピューター記憶媒体を含むことができる。代表的なコンピューター記憶媒体には下記のものが含まれるが、それらに限定されない：R A M、R O M、E E P R O M、フラッシュメモリーまたは他のいずれかの記憶テクノロジー、C D - R O M、デジタル多目的ディスク(Digital Versatile Disk) (D V D) もしくは他の光ディスク記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶デバイスもしくは他の磁気記憶デバイス、またはコンピューティングデバイスによりアクセスしてコンピューティングデバイスのプロセッサにより実行できる複数の指示を記憶させるために使用できる他のいずれかの媒体。

40

50

【0098】

本明細書に開示する態様によれば、ソフトウェアは、コンピューティングデバイスのプロセッサにより実行された際に本明細書に開示する方法の1以上の段階を実施できる指示を含むことができる。ある指示は、他の機械の操作を制御する信号を発するように適合させることができ、こうしてそれらの制御信号によりコンピューター自体から遠く離れた資料を変換する操作を行なうことができる。これらの記述および表現は、データ処理技術分野の専門家が、たとえば彼らの作業の内容を最も効率的に他の当業者へ伝達するために用いる手段である。

【0099】

複数の指示は、目的とする結果を導く自己矛盾しない一連のステップであると一般に考えられるアルゴリズムをも含むことができる。これらのステップは、理学的量の理学的操作を必要とするものである。通常は（必ずしもそうではないが）これらの量は、記憶、転送、変換、結合、比較その他の形で操作できる電気的もしくは磁気的なパルスまたは信号の形をとる。それは時には、主に、これらの信号をそのような信号が具体化または表現される理学的事項または発現に対する基準としての数値、文字、ディスプレイデータ、番号などとして表わすための共用化という理由で、好都合になる。ただし、これらおよび類似の用語はすべて適宜な理学的量と関連づけるべきものであり、ここではこれらの量に適用される好都合なラベルとして用いられるにすぎないことを留意すべきである。本明細書に開示するある態様によれば、本明細書に開示する1種類以上のマーカの測定量と適切な基準との比較を実施するためのアルゴリズムは、指示を実行することによって具体化および実施される。その結果を、パラメトリック診断生データの出力として、または絶対量もしくは相対量として得ることができる。本明細書に開示するシステムの多様な態様によれば、“診断”は本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより、計算“量”と基準または閾値との比較に基づいて提供できる。たとえば、あるシステムのコンピューティングデバイスは、特定の診断の指標となる言語、記号または数値の形の指標を提供できる。

【0100】

コンピューティングデバイスは、出力デバイスにもアクセスできる。代表的な出力デバイスには、たとえばファックス機、ディスプレイ、プリンター、およびファイルが含まれる。本明細書に開示するある態様によれば、コンピューティングデバイスは本明細書に開示する方法の1以上の段階を実施し、その後、本方法の結果、指示、比または他のファクターに関する出力を出力デバイスにより提供することができる。

【0101】

最後に、本発明は、好ましくは本発明の方法を実施するために適合させたキットであって、バイオマーカーであるセプラーゼに特異的に結合する作用剤、および心臓マーカー、特にナトリウム利尿ペプチドに特異的に結合する作用剤を含む、キットに関する。好ましくは、キットはさらに、バイオマーカーであるセプラーゼおよび/または心臓マーカーに対する標準品、ならびにその方法を実施するための指示を含む。

【0102】

本明細書中で用いる用語“キット”は、前記構成要素の集合体であって、好ましくは個別に、または単一容器内で提供されるものを表わす。容器は本発明の方法を実施するための指示も含む。これらの指示は、マニュアルの形であってもよく、あるいはコンピューターまたはデータ処理デバイスに実装した際に本発明の方法において述べた比較を実施してそれに従って診断を確立することができるコンピュータープログラムコードにより提供されてもよい。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体またはデバイス、たとえば光学記憶媒体（たとえば、コンパクトディスク）上に、または直接にコンピューターまたはデータ処理デバイス上に提供されてもよい。さらにキットは、本明細書中で前記に定めた基準としての少なくとも1つの標準品、すなわち本明細書のいずれかの箇所に述べる基準レベル（単数または複数）である前決定したレベル（単数または複数）の心臓マーカーおよび/またはバイオマーカーであるセプラーゼを含む溶液を含む。

【0103】

ある態様において、本明細書に開示するキットは、開示された方法を実施するための少なくとも1つの構成要素、またはパッケージされた組合わせの構成要素類を含む。“パッケージされた組合わせ”とは、それらのキットが本明細書に開示する1以上の構成要素、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）、指示などの組合わせを収容した単一のパッケージを備えていることを意味する。単一の容器を収容したキットも“パッケージされた組合わせ”の定義に含まれる。ある態様において、キットは少なくとも1種類のプローブ、たとえば抗体（本明細書に開示するバイオマーカーのエピトープに対して特異的な親和性をもつもの）を含む。たとえば、キットは、蛍光体で標識した抗体、または融合タンパク質のメンバーである抗体を含むことができる。キットにおいて、プローブは固定化されていてもよく、特定のコンホメーションで固定化されていてもよい。たとえば、固定化されたプローブは、ターゲットタンパク質を特異的に結合するために、試料中のターゲットタンパク質を検出するために、および/またはターゲットタンパク質を試料から分離するために、キットに備えることができる。

10

【0104】

ある態様によれば、キットは、固定化されていてもよい少なくとも1種類のプローブを少なくとも1つの容器内に含む。キットは、固定化されていてもよい複数のプローブを1以上の容器内に含むこともできる。たとえば、複数のプローブは、たとえば単一の容器内または別個の容器内（その際、各容器は単一のプローブを収容している）に存在することができる。

20

【0105】

ある態様において、キットは1種類以上の固定化されていないプローブおよび1以上の固体支持体（固定化されたプローブを含むもの、または含まないもの）を含むことができる。そのようなある態様は、1種類以上のプローブを固体支持体に固定化するのに必要な試薬および補充用品の一部または全部、あるいは固定化されたプローブを試料中の特定のタンパク質に結合させるのに必要な試薬および補充用品の一部または全部を含むことができる。

【0106】

特定の態様において、単一プローブ（同一プローブの複数コピーを含む）を単一の固体支持体に固定化し、単一容器に入れて提供することができる。他の態様において、2種類以上のプローブであって、それぞれが異なるターゲットタンパク質または異なる形態の単一のターゲットタンパク質（たとえば、特異的エピトープ）に対して特異的なプローブを、単一容器に入れて提供する。そのようなある態様において、固定化されたあるプローブを複数の異なる容器内に入れて提供することができ（たとえば、1回用形態）、あるいは複数種類の固定化されたプローブを複数の異なる容器に入れて提供することができる。さらなる態様において、プローブ類を複数の異なるタイプの固体支持体に固定化することができる。固定化されたプローブ（単数または複数）と容器（単数または複数）のいかなる組合わせも本明細書に開示するキットについて考慮され、その組合わせはいずれも目的とする用途に適したキットを達成するように選択できる。

30

40

【0107】

キットの容器は、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）を含めた本明細書に開示する1以上の構成要素をパッケージおよび/または収容するのに適したいかなる容器であってもよい。適切な材料にはガラス、プラスチック、厚紙その他の紙製品、木材、金属、およびそのいずれかのアロイが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、容器は固定化されたプローブ（単数または複数）を完全に包み込んでもよく、あるいは粉塵、油などによる汚染、および露光を最小限に抑えるために、プローブを覆うだけでもよい。あるさらなる態様において、キットは単一の容器または複数の容器を含むことができ、複数の容器が存在する場合、各容器は他のすべての容器と同一であってもよく、他の容器と異なってもよく、

50

あるいは他のすべての容器ではなく一部の容器と異なってもよい。

【0108】

前記に引用するすべての参考文献を、それらの開示内容全体および前記で明白に言及した具体的な開示内容に関して本明細書に援用する。

【実施例】

【0109】

本発明を次いで以下の実施例により説明する；それらは本発明の範囲を制限または限定するためのものではない。

実施例1：アッセイ法

シスタチンCは、ヒトの血清および血漿中におけるシスタチンCの定量インビトロ決定のためのイムノタービディメトリーアッセイを用いてRoche自動臨床化学分析計(Assay:Tina-quant Cystatin C, Roche Diagnostics GmbH, ドイツ、マンハイム)で測定された。このアッセイでは、ヒトシスタチンCが抗シスタチンC抗体でコートされたラテックス粒子と共に凝集する。この凝集体を546nmでタービディメトリーにより測定する。

10

【0110】

NT-proBNPは、Rocheの電気化学発光ELISAサンドイッチ試験Elysya proBNP IISTAT(Short Turn Around Time(短いターンアラウンド時間))アッセイを用いて測定された。この試験は、proBNP(1-108)のN末端部分(1-76)にあるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いる。

20

【0111】

セブラーゼは、血清試料において、マウスで産生されたモノクローナル抗セブラーゼ抗体を用いて測定された。モノクローナル抗体の産生のために、8週齢の雌Balb/cマウスを、HEK293組換えセブラーゼ発現系において発現した組換え細胞外(アミノ酸26-760)セブラーゼフラグメント30μgで腹腔内免疫化した。初回免疫化に続いてさらに3回の不完全フロイントアジュバント(Incomplete Freund's adjuvant:iFA)による免疫化を6週間後に1か月間隔で行なった。脾臓摘出の3日前に、5μgの上記抗原でマウスを静脈内追加免疫した。脾臓細胞およびP3X63Ag8.653骨髄腫細胞をPEGと融合させ、HAz選択培地で培養した。摘出後に、脾臓の単一細胞標本を作成し、脾臓細胞を骨髄腫細胞に融合させた；たとえば、Koehler and Milstein(1975)の記載に従った。得られたハイブリドーマをELISAでビオチニル化抗原に対する反応性についてスクリーニングした。抗原に対する高い親和性をもつハイブリドーマを、FACS Aria IIIを用いる単一細胞沈着によりクローニングした。得られたモノクローナルサブクローンを、再びELISAMonoclonal IgGにより試験し、次いでビオチニル化およびジゴキシゲニル化した；特許出願WO 2012/123293の記載に従った。

30

【0112】

実施例2：患者コホート/結果

急性呼吸困難を伴う患者からの血清試料を検査して、n=28は心臓性原因、n=20は肺性原因をもっていた。

40

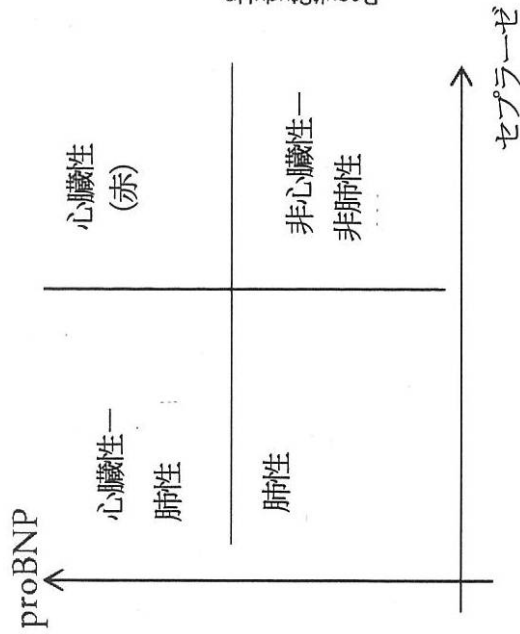
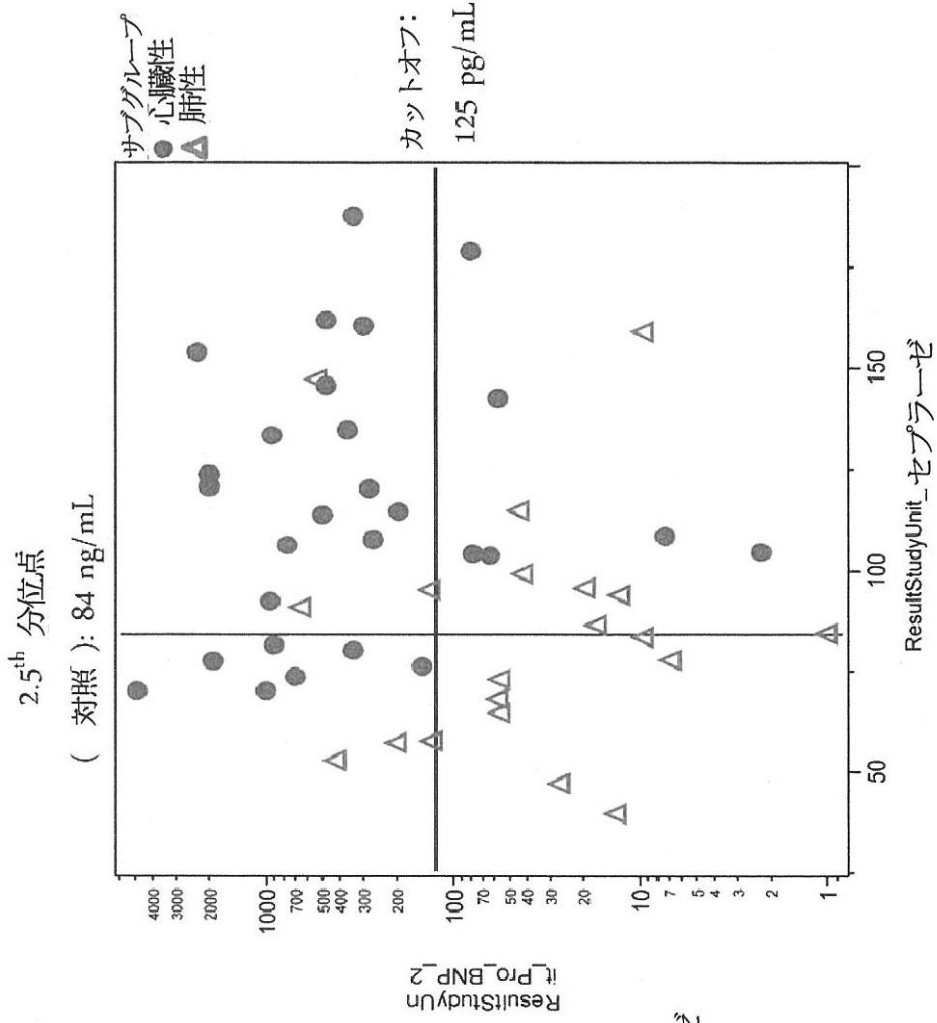
【0113】

呼吸困難コホートにおいて、臨床感度をそれぞれ90%および95%の特異度で計算し、サブグループ心臓性(n=28)を特異度の計算について“健康”と定めた。セブラーゼアッセイの評価は、それぞれ90%および95%の特異度で40%および35%の感度を示した。これに対して、NT-proBNP試験(肺性サブグループn=20を“健康”とみなした)の診断精度は、90%および95%の両方の特異度について39.3%の感度であった(図1)。NT-proBNPについて高い数値は呼吸困難の心臓性原因の指標であり、これに対しセブラーゼについて低い数値は肺性原因の指標であると考えられるので、心臓性原因のみの呼吸困難と臨床診断された患者は両方のアッセイについてより高い数値をもち、これに対し肺性原因のみと臨床診断された患者はより低い数値をもち

50

【 図 2 】

- セプララーゼについて、低い値は疾患を指示する
- モックアップ



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
	A 6 1 K	39/395		P
(72)発明者 ヴォルフガング・ロリンガー				
	ドイツ国	8 6 9 3 5	ロット, ミュールヴェーク	1 2
(72)発明者 ヨハン・カール				
	ドイツ国	8 2 3 8 0	パイセンベルク, ベルト - シュラッツルセアー - シュトラレーセ	7
(72)発明者 ラルフ・レーディガー				
	ドイツ国	6 9 5 1 7	ゴルクスハイマータール, ジードルングスシュトラレーセ	5 7
(72)発明者 マグダレナ・スウィアテク - デ・ランゲ				
	ドイツ国	8 2 3 7 7	ペンツベルク, アホルンシュトラレーセ	5 2
(72)発明者 エーレット・クリストフ				
	ドイツ国	8 1 4 7 7	ミュンヘン, ペーターセンシュトラレーセ	3 アー
F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA20 DA36 DA54				
		4C084 AA17 NA14	ZA592 ZA602 ZC202	
		4C085 AA13 AA14	AA19 BB22 CC23 EE01 GG01	

【外国語明細書】

2015169658000001.pdf

专利名称(译)	seprase用于急性呼吸困难的鉴别诊断		
公开(公告)号	JP2015169658A	公开(公告)日	2015-09-28
申请号	JP2015041135	申请日	2015-03-03
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ヴォルフガングロリンガー ヨハンカール ラルフレーディガー マグダレナスウィアテクデランゲ エーレットクリストフ		
发明人	ヴォルフガング・ロリンガー ヨハン・カール ラルフ・レーディガー マグダレナ・スウィアテク・デ・ランゲ エーレット・クリストフ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/53 A61K45/00 A61P11/00 A61P43/00 A61K39/395		
CPC分类号	A61B5/0205 A61P11/00 A61P43/00 G01N33/6893 G01N2333/96411 G01N2333/96433 G01N2800/12 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/573.A G01N33/53.B A61K45/00 A61P11/00 A61P43/00.111 A61K39/395.D A61K39/395.P		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA54 4C084/AA17 4C084 /NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA602 4C084/ZC202 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085 /BB22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	2014157822 2014-03-05 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(21) 出願番号 特願2015-41135 (P2015-41135) (22) 出願日 平成27年3月3日 (2015.3.3) (31) 優先権主張番号 14157822.9 (32) 優先日 平成26年3月5日 (2014.3.5) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (特許庁注：以下のものは登録商標) 1. BLACKBERRY	(71) 出願人 591003013 エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツァーヘルストラッセ124 (74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎 (74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰 (74) 代理人 100101373 弁理士 竹内 茂雄 (74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修
要解决的问题：为患有急性呼吸急促（急性呼吸困难）的患者提供区分肺病和心脏病的方法。该方法包括以下步骤：a）测量来自患者的样品中seprase的水平，b）测量来自患者的样品中的心脏标志物的水平，c）测量步骤中心脏标志物的水平将水平与参考水平进行比较，以及d）将步骤b）中测量的水平与参考水平进行比较。【选择图】无		