

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5719379号

(P5719379)

(45) 発行日 平成27年5月20日 (2015. 5. 20)

(24) 登録日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006. 01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/74	(2006. 01)	GO 1 N 33/74	
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 16 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2012-543783 (P2012-543783)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成22年12月17日 (2010. 12. 17)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2013-514528 (P2013-514528A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成25年4月25日 (2013. 4. 25)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/070058		T
(87) 国際公開番号	W02011/073382		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成23年6月23日 (2011. 6. 23)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成25年3月25日 (2013. 3. 25)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	09179925.4		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成21年12月18日 (2009. 12. 18)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
		(74) 代理人	100092967
			弁理士 星野 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓手術患者における腎不全を予測するためのGDF-15

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外科的処置を受ける予定の患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための方法であって、

a) 該患者が該外科的処置を受ける前に採取された該患者の試料中のGDF-15の量を測定する工程、

b) 該測定された量を基準量と比較して、それにより、該患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程、
を含む前記方法。

【請求項 2】

ナトリウム利尿ペプチドおよび/またはトロポニンの量をさらに測定して基準量と比較する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

該ナトリウム利尿ペプチドはNT-プロBNPである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

該急性腎損傷が血液透析を必要とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

該外科的処置が心臓手術である、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

該外科的処置が冠状動脈バイパス移植である、請求項1~5のいずれか1項に記載の方

10

20

法。

【請求項 7】

患者が外科的処置を受ける前に該患者から採取された血液、血清もしくは血漿試料中のバイオマーカ G D F - 1 5 の、外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための使用。

【請求項 8】

バイオマーカトロポニン、該試料中の G D F - 1 5 に特異的に結合する抗体、および/またはトロポニンに特異的に結合する検出物質との組み合わせにおける、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

外科的処置を受ける予定の患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための装置であって、

a) 該外科的処置を受ける予定の該患者の試料中の G D F - 1 5 の量を測定するための分析部、ここで、前記試料は該患者が該外科的処置を受ける前に採取されたものであり、

b) 該測定された量を好適な基準量と比較するため、および該患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための評価部としてのコンピュータ、を含む前記装置。

【請求項 10】

トロポニンの量を測定するための分析部、

該測定された量を好適な基準量と比較するため、及び該患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための評価部、を更に含む、請求項 9 に記載の装置。

【請求項 11】

外科的処置を受ける予定の患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクを予測するためのキットであって、

a) 該患者が該外科的処置を受ける前に採取された該患者の試料中の G D F - 1 5 の量を測定するための G D F - 1 5 を特異的に認識する抗体、

b) 該測定された量を好適な基準量と比較し、該患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクをさらに予測するための評価部としてのコンピュータ、を含む前記キット。

【請求項 12】

トロポニンの量を測定するためのトロポニンを特異的に認識する抗体、

該測定された量を好適な基準量と比較し、該患者が該外科的処置の間または後に急性腎損傷に罹患するリスクをさらに予測するための評価部、を更に含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

該患者が心血管疾患および/または糖尿病に罹患している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

該患者が心血管疾患および/または糖尿病に罹患している、請求項 7 または 8 に記載の使用。

【請求項 15】

該患者が心血管疾患および/または糖尿病に罹患している、請求項 9 または 10 に記載の装置。

【請求項 16】

該患者が心血管疾患および/または糖尿病に罹患している、請求項 11 または 12 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、実験室診断法の分野に関する。具体的には、バイオマーカ G D F - 1 5 および/またはトロポニン T に基づいて、外科的処置後に患者が急性腎損傷に罹患するリスクを決定する手段および方法を開示する。

【 0 0 0 2 】

G D F - 1 5 は、T G F ファミリーのメンバーであり、4 0 k D のプロペプチドとして合成され、その N 末端部分が切断されて、ジスルフィド結合された 3 0 k D の活性な二量体タンパク質が形成され、分泌される。G D F - 1 5 は、心不全および心臓再灌流障害に関連している (Kempf T et al., 2006, Circulation Research, 98: 351-360)。G D F - 1 5 は、様々なストレスにตอบสนองして多くの組織中で誘発されることが分かっている。

【 0 0 0 3 】

トロポニン T は、心筋細胞の収縮装置の一部である。それは、心筋壊死または心筋障害の十分に確立されたバイオマーカである。これらの発見に即して、冠状動脈バイパス移植手術後から 2 4 時間以内に測定されるトロポニン T レベルが高いと、術後合併症のリスクが高まることが分かっている (Mohammed et al., 2009, Circulation, 120: 843-850)。

【 0 0 0 4 】

進行した心血管アテローム性動脈硬化症に罹患している患者は、安定な狭心症患者における経皮的冠動脈形成術 (PCI: percutaneous cardiovascular intervention) および冠動脈バイパス移植手術 (CABG: coronary artery bypass graft surgery) に伴う血行再建に関する A C C / A H A ガイドラインにまとめられているように、P C I からの利益を享受している (Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, et al. (2004)、冠動脈バイパス移植手術に関する A C C / A H A 2 0 0 4 ガイドラインの更新: 診療ガイドラインに対する米国心臓病学会 (ACC: American College of Cardiology) / 米国心臓協会 (AHA: American Heart Association) 調査特別委員会 (冠動脈バイパス移植手術に関する 1 9 9 9 年ガイドライン更新のための委員会) の報告書、Circulation 110 (14): e340-437)。

【 0 0 0 5 】

P C I は、主に大動脈の単独狭窄に罹患しているか大血管に限定数の狭窄を有する患者に有用である。C A B G は、主に複数の血管疾患および複数の狭窄に有用である。

しかし、冠動脈バイパス手術は、合併症の大きなリスクを伴う。冠動脈バイパス手術後の急性腎損傷 (AKI: acute kidney injury) の発症率は、1 0 ~ 2 0 % に及ぶ (Mehta et al., Circulation 2006, 114: 2208-2216)。これらの個体の 1 ~ 5 % は、手術後に透析を必要とする。手術後の A K I の病因は多因子性であると思われており、心臓外科手術後の罹患率の増加および長期死亡率との関連性は十分に確立されている (Brown et al., Annals of Thoracic Surgery 2008, 86: 4-11; Kourliouros et al., European journal of Cardiothoracic Surgery 2009, 近刊)。

【 0 0 0 6 】

リスク患者では、A K I を予防することができる。予防としては、手術中と術後の慎重な体液平衡、心肺バイパス (CPB: cardiopulmonary bypass) 灌流温度の低下の回避 (Kourliouros et al., loc. cit.)、手術前の腎毒性薬物の回避、および手術後のエリスロポイエチンなどの薬物の投与 (Song et al., American Journal of Nephrology 2009, 30: 253-260) が挙げられる。

【 0 0 0 7 】

従って、心臓血管外科手術前に合併症のリスクのある個体を特定して、急性腎損傷を引き起こし得る危険因子を回避することは非常に重要である。さらに、これらの個体では、手術後の腎機能の注意深い経過観察が必要である。

【 0 0 0 8 】

従って、本発明の根底にある技術的課題は、外科的処置後に腎損傷に罹患するリスクの高い個体を特定する手段および方法の提供だと分かるであろう。この課題は、特許請求の範囲および以下の明細書に記載されている本発明の態様によって解決される。

【 0 0 0 9 】

従って、本発明は、外科的処置を受ける予定のリスク患者が急性腎損傷に罹患するリス

10

20

30

40

50

クを予測する方法であって、

- a) 該患者の試料中のGDF-15および/またはトロポニンの量を測定する工程、
 - b) 該測定された量を好適な基準量と比較し、それにより、該患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程、
- を含む方法に関する。

【0010】

本発明は、外科的処置（好ましくは高度な外科的処置）を受ける予定のリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する方法であって、該患者の試料で測定されたGDF-15の量を好適な基準量と比較し、それにより、該患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程を含む方法にも関する。

10

【0011】

本発明の方法は、好ましくは生体外（in vitro）法である。さらに、本発明の方法は、上に明確に述べた工程以外の工程を含んでもよい。例えば、さらなる工程は、試料の事前処理または本方法によって得られた結果の評価に関するものであってもよい。本方法は、手動で行っても、自動化によって支援されていてもよい。好ましくは、工程（a）での測定または工程（b）でのコンピュータで実行される比較のために、工程（a）および/または（b）は、全てまたは部分的に自動化（例えば、好適なロボットおよびセンサ機器）によって支援されていてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書に使用されている「リスクを予測する」という用語は、特定の時間帯、すなわち予測時間帯内で、対象が急性腎損傷に罹患する確率を評価することを指す。本発明によれば、予測時間帯は、好ましくは、治療介入の完了から1日、2日また3日後以内である。前記時間帯内での急性腎損傷の終点は、本明細書の他の箇所に定義されているように、血清クレアチニンの増加によって明らかとなる。但し、当業者には理解されるように、そのような評価は、通常は調査対象の100%に対して正確であることを意図していない。但し、この用語は、適切かつ正確な方法で、対象中の統計的に有意な部分に対して予測を行うことが可能であることを必要とする。その部分が統計的に有意であるか否かは、周知の各種統計評価手段（例えば、信頼区間の測定、p値測定、スチューデントのt検定、マンホイットニー検定など）を用いて、当業者によって、さらなる苦勞をせずに測定することができる。詳細は、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*（研究のための統計）、John Wiley & Sons, New York 1983に記載されている。好ましい信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005または0.0001である。好ましくは、本発明によって想定される確率は、リスクが高い、標準である、あるいは低いという予測が、所与の同齡集団または一般集団の中の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%の対象に対して正確なものとなり得る。この用語は、好ましくは、前記リスクの正確な確率を提供するのではなく、対象の集団での急性腎損傷を発症する平均的なリスクと比較して、急性腎損傷のリスクが高いか否かについて予測することに関する。

20

30

40

【0013】

本出願に係る「リスク患者」は、高度な外科的処置、好ましくは、治療介入を受けた対象の集団（好ましくは、対照集団または無作為化集団）における前記急性腎損傷の発症率と比較して、統計的に有意な確率の増加を伴う高度な外科的処置の後に急性腎損傷に罹患する患者である。先に存在する基礎疾患は、外科的処置後に、患者が腎損傷に罹患するリスクを高める。好ましくは、リスク患者は、心血管疾患および/または糖尿病に罹患している患者である。より好ましくは、患者は、冠状動脈バイパス手術（CABP）による治療を必要とする心血管アテローム性動脈硬化症に罹患している。心血管アテローム性動脈硬化症に伴う疾患（好ましくは、糖尿病および心血管疾患）に罹患している患者では、患者が急性腎損傷に罹患するリスクは高まる。心血管疾患は、好ましくは、心不全または高

50

血圧症である。糖尿病は、好ましくは、1型もしくは2型糖尿病である。好ましくは、C A B Gを必要としている患者の心血管疾患の重症度は、他の種類の外科的処置を必要としている患者よりも高い。好ましくは、心血管疾患の重症度が高まるにつれて、(好ましくは高度な)外科的処置後に患者がA K Iに罹患するリスクが高まることである。上記具体的な疾患もしくは病気を除いて、リスク患者は、外見が健康であることが好ましい。

【0014】

「外科的処置」という用語は、好ましくは、全身麻酔と肺もしくは心肺補助を必要とするあらゆる外科的処置を指す。また、好ましくは、高度な外科的処置は、30分以上、好ましくは約1以上または約2時間以上の手術時間を特徴とする。より好ましくは、外科的処置は、整形外科手術、腫瘍切除、腫瘍切除(例えば憩室の除去)を伴わない消化管の手術、および心臓外科手術である。最も好ましくは、外科的処置は心臓外科手術である。心臓外科手術は、好ましくは、冠状動脈バイパス移植(C A B G)手術である。患者が、経皮的冠動脈介入(P C I)などの他の方法では治療が上手く行かない冠状動脈の狭窄に罹患している場合に、C A B Gは必要である。これは典型的に、複数の血管が影響を受けている場合または狭窄が明らかに局所的でない場合の症例である。C A B Gは、「オンポンプ(人工心肺装置を使用)」、すなわち、手術中に心臓を停止して心臓を鼓動させずに行うか、あるいは、「オフポンプ(人工心肺装置を使用しない)」、すなわち、処置の間も心臓が鼓動し続けた状態で行う。

10

【0015】

「急性腎損傷」または「A K I」という用語は、腎機能の損傷を指す。好ましくは、A K Iは、手術後72時間以内に、血清クレアチニンの少なくとも0.3mg/dlの増加または基準線から少なくとも50%の増加を特徴とする。典型的には、A K Iの全ての症例が、腎代替療法を必要とする腎臓の機能損傷に至るわけではない。急性腎損傷の深刻な症例では、患者の損なわれた腎機能を補助するための血液透析による腎代替療法が必要となる。

20

【0016】

急性腎損傷は、好ましくは、外科的処置の間または直後に生じる。好ましくは、A K Iは、外科的処置の間あるいは手術後1日、2日または3日以内に発症する。適用される診断法によっては、A K Iは、発症の数日後にようやく認識可能となる場合もある。より好ましくは、急性腎損傷は、時間的経過だけでなく、外科的処置も原因になる。すなわち、外科的処置またはその周囲環境が、当該患者が急性腎損傷に罹患する原因となる。

30

【0017】

「増殖分化因子-15(Growth-Differentiation Factor-15)」または「G D F - 15」という用語は、形質転換増殖因子(TGF:transforming growth factor) - サイトカインスーパーファミリーのメンバーであるポリペプチドに関する。ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質という用語は、本明細書全体にわたって同義で用いられている。G D F - 15は、当初はマクロファージ抑制性サイトカイン-1としてクローン化され、後に、胎盤の形質転換増殖因子-、胎盤の骨形成タンパク質、非ステロイド性抗炎症薬活性化遺伝子-1、および前立腺由来因子としても同定された(Bootcov loc cit; Hromas, 1997 Biochim Biophys Acta 1354:40-44; Lawton 1997, Gene 203:17-26; Yokoyama-Kobayashi 1997, J Biochem (Tokyo), 122:622-626; Paralkar 1998, J Biol Chem 273:13760-13767)。他のT G F - 関連サイトカインと同様に、G D F - 15は不活性前駆体タンパク質として合成され、ジスルフィド結合されたホモ二量体になる。N末端プロペプチドがタンパク質分解切断されると、G D F - 15は、約28kDaの二量体タンパク質として分泌される(Bauskin 2000, Embo J 19:2212-2220)。G D F - 15のアミノ酸配列および生物学的活性は、国際公開第99/06445号、第00/70051号、第2005/113585号、Bottner 1999, Gene 237: 105-111, Bootcov loc. cit, Tan loc. cit., Baek 2001, Mol Pharmacol 59: 901-908, Hromas loc cit, Paralkar loc cit, Morrish 1996, Placenta 17:431-441またはYokoyama-Kobayashi loc cit. に開示されている。

40

【0018】

50

「トロポニン」という用語は、心臓細胞、好ましくは心内膜下細胞内で発現される全てのトロポニンイソ型を指す。例えば、Anderson 1995, Circulation Research, vol. 76, no. 4: 681-686およびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493に記載されているように、これらのイソ型は、当該技術分野では十分に特性評価されている。好ましくは、トロポニンは、トロポニンTおよび/またはトロポニンIを指す。従って、本発明の方法では、両トロポニンを、一緒に(すなわち、同時に)、順次に、あるいは個々に(すなわち、他のイソ型を全く測定せずに)測定してもよい。ヒトのトロポニンTおよびヒトのトロポニンIのアミノ酸配列は、Anderson, loc citおよびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493に開示されている。「トロポニン」という用語は、上記特定のトロポニン変異体、すなわち、好ましくはトロポニンTまたはトロポニンIも包含する。

10

【0019】

本明細書に使用されている「GDF-15」、「ナトリウム利尿ペプチド」および「トロポニン」という用語も、上記特定のポリペプチド変異体を包含する。そのような変異体は、本発明の特定のポリペプチドとして、少なくとも同じ基本的な生物学的および免疫学的特性を有する。特に、それらは、本明細書で参照されている同じ特定のアッセイによって(例えば、前記ポリペプチドを特異的に認識するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによって)検出可能である場合、同じ基本的な生物学的および免疫学的特性を共有している。さらに、本発明によって参照されている変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失および/または付加により異なっているアミノ酸配列を有し、ここでは、変異体のアミノ酸配列は、好ましくはペプチドの長さ全体にわたって、好ましくは、本発明のポリペプチドのアミンの配列と少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約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%、少なくとも約99%の同一性をなお有するものと理解される。好ましくは、アミノ酸配列または核酸配列の配列同一性の文脈では、「少なくとも約」という用語は、示されている正確な数値以上の配列同一性を指す。2つのアミノ酸配列間の同一性の程度は、当該技術分野でよく知られているアルゴリズムによって測定することができる。好ましくは、同一性の程度は、比較ウィンドウ内に最適に整列された2つの配列を比較することによって測定することができ、ここでは、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列の断片は、最適な配列比較のための基準配列(付加または欠失を含まない)と比較して、付加または欠失(例えば、ギャップまたはオーバーハング)を含んでいてもよい。両配列中に同一のアミノ酸残基が生じている位置の数を測定し、一致した位置の数を得、一致した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を掛けて配列同一性の割合を得ることによって割合を計算する。比較のための配列の最適な整列は、Smith and Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性整列アルゴリズム、Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988)の類似性検索方法、以下のアルゴリズム: Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、BLAST、PASTAおよびTFASTAのコンピュータによる実行によって、あるいは目視検査によって行ってもよい。2つの配列が比較のために同定された場合、GAPおよびBESTFITを好ましくは用いて、それらの最適な配列、従って、同一性の程度を測定する。好ましくは、ギャップ重量(gap weight)に対して5.00、ギャップ重量長さ(gap weight length)に対して0.30のデフォルト値を使用する。上で参照した変異体は、対立遺伝子変異体あるいは、任意の他の種類の特定の相同体、パラログまたはオルソログであってもよい。さらに、本明細書で参照されている変異体としては、それらの断片が、上で参照されている基本的な免疫学的特性および/または生物学的活性を有する限り、特定のポリペプチドの断片もしくはサブユニットまたは上記種類の変異体が挙げられる。そのような断片は、例えば、本発明のポリペプチドの分解産物であってもよい。リン酸化またはミリスチル化などの翻訳後修飾により異なる変異体もさらに含まれる。

20

30

40

50

【0020】

GDF-15、ナトリウム利尿ペプチド、トロポニンまたは本明細書で参照されている任意の他のペプチドもしくはポリペプチドの量の測定は、好ましくは半定量的または定量的に量または濃度を測定することに関する。測定は、直接的または間接的に行うことができる。直接的な測定は、ペプチドまたはポリペプチド自体から得られた信号および試料中に存在するペプチドの分子数に直接関連する強度に基づいて、ペプチドまたはポリペプチドの量または濃度を測定することに関する。例えば、ペプチドまたはポリペプチドの特異的な物理的もしくは化学的特性の強度値を測定することによって、そのような信号（本明細書では強度信号と呼ぶ場合もある）を得てもよい。間接的な測定としては、二次成分（すなわち、ペプチドまたはポリペプチド自体ではない成分）から得られた信号、または、
10 生物学的読み取り系、例えば、測定可能な細胞応答、リガンド、標識または酵素反応生成物の測定が挙げられる。

【0021】

本発明によれば、ペプチドまたはポリペプチドの量の測定は、試料中のペプチドの量を測定するための全ての公知手段によって達成することができる。前記手段は、様々なサンドイッチアッセイ、競合アッセイまたは他のアッセイ形式で標識された分子を利用し得る免疫測定装置および方法を含む。前記アッセイは、ペプチドまたはポリペプチドの有無を表す信号を発生させる。さらに、信号強度は、好ましくは、直接的または間接的に、試料中に存在するポリペプチドの量と関連している（例えば、反比例している）。さらなる好適な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理的もしくは化学的特性（例えば、その正確な分子量またはNMRスペクトル）を測定することを含む。前記方法は、好ましくは、バイオセンサ、免疫測定装置に接続された光学装置、バイオチップ、質量分析計、NMR分析装置またはクロマトグラフィ装置などの分析装置を含む。さらに、当該方法は、マイクロプレートELISA系の方法、完全自動化もしくはロボット免疫測定法（例えば、E l e c s y s（商標）分析装置で利用可能）、酵素的コバルト結合アッセイ（CBA: Cobalt Binding Assay）（例えば、R o c h e - H i t a c h i（商標）分析装置で利用可能）、およびラテックス凝集反応法（例えば、R o c h e - H i t a c h i（商標）分析装置で利用可能）を含む。
20

【0022】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の測定は、（a）その強度がペプチドまたはポリペプチドの量を表す細胞応答を誘発することができる細胞を、適当な期間で前記ペプチドまたはポリペプチドに接触させる工程、（b）細胞応答を測定する工程を含む。細胞応答を測定するために、試料または処理された試料を、好ましくは、細胞培養液に添加し、内部もしくは外部の細胞応答を測定する。細胞応答としては、リポーター遺伝子の測定可能な発現、または物質（例えば、ペプチド、ポリペプチドまたは小分子）の分泌が挙げられる。発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドの量に相関する強度信号を生成するものである。
30

【0023】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の測定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得られた特異的強度信号を測定する工程も含む。上述したように、そのような信号は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な質量スペクトルまたはNMRスペクトルで観察されるペプチドまたはポリペプチドに特異的な m/z 値で観察された信号強度であつてもよい。
40

【0024】

ペプチドまたはポリペプチドの量の測定は、好ましくは、（a）ペプチドを特異的リガンドに接触させる工程、（b）（任意で）結合していないリガンドを除去する工程、（c）結合したリガンドの量を測定する工程を含む。結合したリガンドは、強度信号を生成する。本発明に係る結合としては、共有結合と非共有結合の両方が挙げられる。本発明に係るリガンドは、本明細書に記載されているペプチドまたはポリペプチドに結合する任意の化合物、例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸または小分子であつてもよい。好ましい
50

リガンドとしては、抗体、核酸、ペプチド、またはポリペプチドに対する受容体または結合パートナーなどのペプチドまたはポリペプチド、およびペプチドに対する結合ドメインを含むそれらの断片、ならびにアプタマー（例えば、核酸もしくはペプチドアプタマー）が挙げられる。そのようなリガンドの調製方法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、好適な抗体またはアプタマーの同定および産生も、商業的供給業者によって提供されている。当業者は、より高い親和性または特異性を有するそのようなリガンドの誘導体を開発する方法に精通している。例えば、ランダム突然変異を、核酸、ペプチドまたはポリペプチドに導入することができる。次いで、これらの誘導体を、当該技術分野で知られているスクリーニング法（例えば、ファージ提示法）に従って、結合について試験することができる。本明細書で参照されている抗体としては、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ならびに抗原またはハプテンに結合することができるFv、FabおよびF(ab)₂断片などのそれらの断片が挙げられる。本発明は、単鎖抗体および、所望の抗原特異性を呈しているヒト以外のドナー抗体のアミノ酸配列をヒトの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も含む。ドナー配列は、通常はドナーの少なくとも抗原結合アミノ酸残基を含むが、ドナー抗体の他の構造的および/または機能的に関連するアミノ酸残基も含んでいてもよい。そのようなハイブリッドは、当該技術分野でよく知られているいくつかの方法によって調製することができる。好ましくは、リガンドまたは作用物質は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明に係る特異的結合は、リガンドまたは作用物質が、別のペプチド、ポリペプチドまたは分析される試料中に存在する物質に実質的に結合（「交差反応する」）してはならないことを意味する。好ましくは、特異的に結合したペプチドまたはポリペプチドは、任意の他の関連するペプチドまたはポリペプチドよりも少なくとも3倍以上、より好ましくは少なくとも10倍以上、さらにより好ましくは少なくとも50倍以上の高い親和性で結合するものでなければならない。非特異的結合は、例えば、ウェスタンブロット法によるその大きさに従って、あるいは、試料中のその比較的高い存在量によって、それがなお明確に区別および測定することができる場合は許容され得る。リガンドの結合は、当該技術分野で知られている任意の方法によって測定することができる。好ましくは、前記方法は、半定量的または定量的である。好適な方法を以下に記載する。

【0025】

第1に、例えば、NMRまたは表面プラズモン共鳴によって、リガンドの結合を直接測定してもよい。

第2に、リガンドが目的のペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても用いられている場合、酵素反応産物を測定してもよい（例えば、タンパク質分解酵素の量は、例えばウェスタンブロットにより、切断された基質の量を測定することによって測定することができる）。あるいは、リガンド自体が酵素的性質を呈していてもよく、「リガンドとペプチドまたはポリペプチド」との複合体またはペプチドまたはポリペプチドによってそれぞれ結合されたりリガンドを、好適な基質に接触させ、それにより、強度信号の発生によって検出を可能にしてもよい。酵素反応産物の測定のために、基質の量が飽和されていることが好ましい。また、反応前に、基質を検出可能な標識で標識してもよい。好ましくは、適当な期間で試料を基質に接触させる。適当な期間とは、産物が検出可能（好ましくは測定可能）な量産生されるのに必要な時間を指す。産物の量を測定する代わりに、所与の（例えば検出可能な）量の産物の出現に必要な時間を測定することができる。

【0026】

第3に、リガンドを標識に共有結合または非共有結合的に結合させ、それにより、リガンドの検出および測定を可能にしてもよい。標識化は、直接的または間接的な方法で行ってもよい。直接的な標識化では、標識をリガンドに（共有結合的または非共有結合的に）直接結合させる。間接的な標識化では、二次リガンドを第1のリガンドに（共有結合的または非共有結合的に）結合させる。二次リガンドは、第1のリガンドに特異的に結合するものでなければならない。前記二次リガンドは、好適な標識に結合させてもよく、かつ/または、二次リガンドに結合している三次リガンドの標的（受容体）であってもよい。二

10

20

30

40

50

次、三次またはさらにより高次のリガンドは、信号を増加させるために使用されることが多い。好適な二次以上のリガンドとしては、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社) が挙げられる。また、リガンドまたは基質を、当該技術分野で知られている1つまたは複数のタグで「タグ付け」してもよい。その場合、そのようなタグは、より高次のリガンドの標的であってもよい。好適なタグとしては、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ウイルスヘマグルチニン (HA) およびマルトース結合タンパク質などが挙げられる。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。好適な標識は、適当な検出法によって検出可能な任意の標識である。典型的な標識としては、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射標識、磁気標識 (常磁性および超常磁性標識などの「例えば磁気ビーズ」) および蛍光標識が挙げられる。酵素活性標識としては、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、
 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびそれらの誘導体が挙げられる。検出に適した基質としては、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 - リン酸、Roche Diagnostics社から既製の原液として入手可能)、CDP - Star (商標) (Amersham Biosciences社)、ECF (商標) (Amersham Biosciences社) が挙げられる。好適な酵素と基質の組み合わせによって、有色の反応生成物、蛍光または化学発光を生じさせ、それらを当該技術分野で知られている方法によって測定することができる (例えば、感光性フィルムまたは好適なカメラシステムを用いる)。酵素反応の測定については、上に示した判定基準を同様に適用する。典型的な蛍光標識としては、蛍光性タンパク質 (例えば、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 (例えば、Alexa568) が挙げられる。さらなる蛍光標識は、例えば、Molecular Probes社 (オレゴン州) から入手可能である。蛍光標識としての量子ドットの使用も想定される。典型的な放射標識としては、³⁵S、¹²⁵I、³²Pおよび³³Pなどが挙げられる。放射標識は、公知かつ適当な任意の方法 (例えば、感光性フィルムまたはホスフォイメージャ) によって検出することができる。本発明に係る好適な測定方法としては、沈降 (特に免疫沈降)、電気化学ルミネセンス (電気化学発光)、放射免疫測定法 (RIA: radioimmunoassay)、酵素結合免疫測定法 (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)、サンドイッチ酵素免疫測定法、サンドイッチ法による電気化学発光免疫測定法 (ECLIA: electrochemiluminescence sandwich immunoassays)、解離促進ランタニド免疫測定法 (DELFI: dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay)、シンチレーション近接アッセイ (SPA: scintillation proximity assay)、濁度測定、比濁分析、ラテックス凝集 (latex-enhanced) 濁度測定もしくは比濁分析または固相免疫測定法が挙げられる。当該技術分野で知られているさらなる方法 (例えば、ゲル電気泳動、2Dゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE)、ウェスタンブロット法および質量分析) を、単独で、あるいは上記標識化または他の検出法と併用して使用することができる。

【0027】

また、ペプチドまたはポリペプチドの量を、好ましくは、以下のように測定してもよい：
 (a) 上に指定されているペプチドまたはポリペプチドに対するリガンド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に接触させ、そして (b) 支持体に結合されたペプチドまたはポリペプチドの量を測定する。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たリガンドを、固定化形態で固体支持体上に存在させることが好ましい。固体支持体を製造するための材料は、当該技術分野でよく知られており、とりわけ、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、磁気ビーズ、コロイド状金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンチップおよび表面、ニトロセルロース試験片、膜、シート、デュラサイト (duracyte)、ウェル、ならびに反応トレイの壁、プラスチック管などが挙げられる。リガンドまたは作用

10

20

30

40

50

物質を、多くの異なる担体に結合させてもよい。周知の担体の例としては、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、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、本発明の目的では、可溶性または不溶性のどちらであってもよい。前記リガンドの固定/固定化に適した方法は周知であり、イオン相互作用、疎水的相互作用および共有結合的相互作用などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明に係るアレイとして「懸濁液アレイ」を使用することも想定される (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。そのような懸濁液アレイでは、担体 (例えば、マイクロビーズまたは微小球体) は、懸濁液中に存在する。当該アレイは、異なるリガンドを担持する (場合により標識された) 異なるマイクロビーズまたは微小球体からなる。例えば、固相化学および感光性保護基に基づく、そのようなアレイの製造方法は、一般に知られている (米国特許第 5,744,305 号)。

【0028】

「試料」という用語は、体液の試料、分離された細胞の試料、または組織もしくは臓器からの試料を指す。体液の試料は、周知の技術によって得ることができ、好ましくは、血液、血漿、血清または尿の試料、より好ましくは、血液、血漿または血清の試料が挙げられる。組織または臓器の試料は、例えば生検によって、任意の組織または臓器から得てもよい。分離された細胞は、遠心分離または細胞選別などの分離技術によって、体液または組織あるいは臓器から得てもよい。好ましくは、細胞、組織または臓器の試料は、本明細書で参照されているペプチドを発現または産生するそれらの細胞、組織または臓器から得られる。好ましくは、試料は、患者が外科的処置を受ける前に採取されたものである。より好ましくは、試料は、外科的処置が行われる 1 日前 ~ 6 週間前の時間帯で採取されたものである。試料は、好ましくは、外科的処置の 1 日または 2 日前に採取される。また、安定な患者、すなわち健康状態が変化しない患者では、外科的処置前の 1 週間または 2 週間以内に試料を採取することが好ましい。不安定な患者では、試料は、好ましくは、外科的処置前の 6 時間、12 時間または 24 時間以内に採取される。

【0029】

本明細書に使用されている「比較する」という用語は、分析される試料に含まれているペプチドまたはポリペプチドの量を本説明の他の箇所に指定されている好適な基準供給源の量と比較することを包含する。本明細書に使用されている「比較する」とは、対応するパラメータまたは値の比較を指し、例えば、絶対量は絶対基準量と比較するが、濃度は基準濃度と比較すること、あるいは、試験試料から得られた強度信号は、基準試料の同じ種類の強度信号と比較することであることを理解されたい。本発明の方法の工程 (c) で述べた比較は、手動で行っても、コンピュータを利用するものであってもよい。コンピュータを利用した比較では、コンピュータプログラムによって、測定された量の値をデータベースに格納された好適な基準に対応する値と比較してもよい。コンピュータプログラムは比較の結果をさらに評価してもよく、すなわち、好適な出力形式で所望の評価を自動的に提供する。工程 a) で測定された量と本発明の方法の基準量との比較に基づいて、対象が本明細書で参照されている 1 つまたは複数の合併症に罹患するリスクを予測することができる。従って、比較した量の違いまたは類似性のいずれか一方によって外科的処置後に急性腎損傷に罹患するリスクのある患者を同定することができるように、基準量を選択しなければならない。

【0030】

従って、本明細書に使用されている「基準量」という用語は、患者が外科的処置後に急性腎損傷に罹患するリスクが高いか否かを予測することができる量を指す。従って、この基準は、(i) 後に AKI に罹患したことが分かる患者の手術を受ける前に採取された試料、または (ii) 手術後に AKI に罹患しなかったことが分かる患者の手術を受ける前に採取された試料のいずれか一方から得られたものであればよい。好ましくは、上記 (i) または (ii) のいずれか一方の基準を満たす患者群から得られた量の平均中央値に基づいて基準量を測定する。さらに、基準量は、閾値よりも大きな量が AKI のリスクが高

10

20

30

40

50

い対象を表す閾値量を定義していてもよい。個々の対象に適用可能な基準量は、年齢、性別または亜集団などの様々な生理学的パラメータならびに本明細書で参照されているポリペプチドまたはペプチドの測定に使用される手段によって異なってもよい。好適な基準量は、一緒に（すなわち、試験試料と同時に）あるいはその後に、分析される基準試料から本発明の方法によって測定してもよい。閾値として用いられている好ましい基準量は、正常上限(ULN:upper limit of normal)、すなわち、上に定義されている合併症に罹患したことがないか現在罹患していない対象、即ち手術後にA K Iに罹患していない対象、の集団からの手術を受ける前の試料中に存在した生理学的な量の上限から導き出してもよい。対象の所与の集団のULNは、様々な周知の技術によって測定することができる。好適な技術は、本発明の方法で測定されるペプチドまたはポリペプチドの量に対する集団の中央値または平均値を測定するためのものであってもよい。

10

【0031】

診断マーカー（すなわち、GDF-15、ナトリウム利尿ペプチドまたはトロポニン）の基準量を確立することができ、患者試料中のマーカーレベルを、基準量と単純に比較することができる。診断および/または予後の試験の感度および特異性は、試験の分析「品質」のみだけでなくそれ以上のものに依存している。すなわち、それらは、異常な結果を構成するものの定義にも依存している。好ましくは、外科的処置後に急性腎損傷に罹患した患者の集団における本発明のマーカーの測定量の分布を、前記合併症のない患者における前記マーカー量の分布と比較する。好ましくは、前記分布は、手術前に採取された試料で測定する。当業者によく知られている統計学的方法を使用して、前記合併症に罹患するリスクのある患者とリスクのない患者を分けるために使用することができる閾値量を定義することができる。本目的では、受信者動作特性曲線すなわち「ROC」曲線の計算が特に好ましい。ROC曲線は典型的に、「正常」および「疾患」集団での変数の値対その相対度数をプロットすることによって計算される。任意の特定のマーカーでは、疾患に罹患している対象と疾患に罹患していない対象のマーカーレベルの分布は重複する可能性がある。このような条件下では、試験によって、完全に100%の精度で正常対象と疾患対象が区別されることはなく、重複部分の面積は、試験によって正常対象と疾患対象を区別することができない箇所を示す。それ以上である（あるいは、マーカーが疾患によって変化する仕方によっては、それ以下である）と試験が異常であるとみなされ、それ以下であると試験は正常であるとみなされる閾値を選択してもよい。ロック曲線下面積は、認められた測定値によって病気の正しい同定が可能となる確率の尺度である。試験結果が必ずしも正確な数を提供しない場合であっても、ROC曲線を使用することができる。結果を分類することができる限り、ROC曲線を作成することができる。例えば、「疾患」試料の試験の結果を、程度（例えば、1 = 低い、2 = 正常、3 = 高い）に応じて分類することができる。この分類を、「正常」集団の結果に相関させ、ROC曲線を作成することができる。これらの方法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、Hanley et al, Radiology 143: 29-36 (1982)を参照されたい。

20

30

【0032】

特定の態様では、少なくとも約70%の特異性、より好ましくは少なくとも約80%の特異性、さらにより好ましくは少なくとも約85%の特異性、さらにより好ましくは少なくとも約90%の特異性、最も好ましくは少なくとも約95%の特異性と組み合わせて、少なくとも約70%の感度、より好ましくは少なくとも約80%の感度、さらにより好ましくは少なくとも約85%の感度、さらにより好ましくは少なくとも約90%の感度、最も好ましくは少なくとも約95%の感度を呈するように、マーカー（すなわち、GDF-15、ナトリウム利尿ペプチドまたはトロポニン）を選択する。特に好ましい態様では、感度および特異性は、少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%である。

40

【0033】

手術前にGDF-15量が約1078 pg/ml未満の場合、好ましくは、手術後のA

50

KIのリスクから除外される。GDF-15量が約1717 pg/ml超の場合、好ましくは、手術後にAKIのリスクが高まることを示している。GDF-15量が約2573 pg/ml超の場合、好ましくは、血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まることを示している。以下の表1aに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0034】

手術前にトロポニン量が約7.7 pg/mlまたは約13.3 pg/ml未満の場合に手術後のAKIのリスクから除外されるのが好ましい。トロポニン量が約25.5 pg/mlまたは約33.1 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まることを示すのが好ましい。トロポニン量が約60.9 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まることを示すのが好ましい。以下の表1bに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

10

【0035】

手術前にNT-プロBNP量が約160.3 pg/mlまたは約488.2 pg/ml未満の場合に手術後のAKIのリスクから除外されるのが好ましい。NT-プロBNP量が約1118.7 pg/mlまたは約1385.5 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まることを示すのが好ましい。NT-プロBNP量が約2227.1 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まることを示すのが好ましい。以下の表1cに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

20

【0036】

「約」という用語は、指示量の+/-30%、好ましくは指示量の+/-20%、好ましくは指示量の+/-10%、より好ましくは指示量の+/-5%を示すものとする。

上述したように、基準量は、後にAKIに罹患したことが分かる患者の手術を受ける前に採取された試料から得られたものであってもよい。バイオマーカGDF-15および/またはトロポニンの前記基準量と本質的に同じかそれより多い量の場合に手術後にAKIのリスクが高まることを示すのが好ましい。また、上述したように、基準量は、後にAKIに罹患し血液透析が必要であることが分かる患者の手術を受ける前に採取された試料から得られたものであってもよい。バイオマーカGDF-15および/またはトロポニンの前記基準量と本質的に同じか多い量の場合に手術後に血液透析を必要とするAKIのリスクが高まることを示すのが好ましい。

30

【0037】

さらに、基準量は、手術後にAKIに罹患しなかったことが分かる患者の手術を受ける前に採取された試料から得られたものであってもよい。バイオマーカGDF-15および/またはトロポニンの前記基準量と本質的に同じか少ない量の場合に手術後にAKIのリスクから除外される(従って、リスクが低いことを示す)のが好ましい。

【0038】

有利なことに、本発明の方法によって、外科的処置の前にAKIのリスクが高まる患者を特定することができる。これは、患者において外科的処置前に測定された本発明のマーカ量によって、外科的処置後に患者がAKIに罹患するリスクを予測するという驚くべき発見に基づく。患者のAKIリスクが高まるという決定から、実用的な結果をすぐに引き出すことができる。よって、外科的処置後にAKIに罹患するリスクが高い患者では、AKIを引き起こす公知の危険因子を制御しなければならない。これらの危険因子の制御としては、手術中と術後の慎重な体液平衡が挙げられる。手術中に心肺バイパスを使用する場合は、灌流温度の低下を回避しなければならない(Kourliouros, loc. cit.)。腎毒性薬物(例えば、非ステロイド性抗炎症薬およびスルホンアミド)も回避しなければならない。さらに、エリスロポイエチンの投与が必要となる場合もある(Song et al., 2009, American Journal of Nephrology, 253-260)。前記治療介入前に外科的処置後の患者の急性腎損傷リスクを予測するという可能性は、明らかに、当該患者がこの外科的処置に適して

40

50

いるか否かを決定するという重要性を有する。

【 0 0 3 9 】

本発明の方法の別の側面では、前記方法は、外科的処置を受ける予定のリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する方法であって、患者の試料中の G D F - 1 5 および / またはトロポニンの量を、本明細書の他の箇所に記載されているような好適な基準量と比較して、患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程を含む方法であることが理解されるであろう。

【 0 0 4 0 】

本発明の好ましい態様では、G D F - 1 5 および / またはトロポニンの量に加えて、ナトリウム利尿ペプチドの量も測定する。

「ナトリウム利尿ペプチド」という用語は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP: Atrial Natriuretic Peptide) 型および脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP: Brain Natriuretic Peptide) 型ペプチドおよび同じ予測可能性を有するそれらの変異体を含む。本発明に係るナトリウム利尿ペプチドは、ANP 型およびBNP 型ペプチドおよびそれらの変異体を含む (例えば、Bonow, R.O. (1996). *New insights into the cardiac natriuretic peptides* (心臓ナトリウム利尿ペプチドへの新しい洞察). *Circulation* 93: 1946-1950を参照)。ANP 型ペプチドは、プレプロANP、プロANP、NT - プロANP およびANP を含む。BNP 型ペプチドは、プレプロBNP、プロBNP、NT - プロBNP およびBNP を含む。プレプロペプチド (プレプロBNP の場合は134個のアミノ酸) は、短いシグナルペプチドを含み、それは、酵素によって切断されて、プロペプチド (プロBNP の場合は108個のアミノ酸) を放出する。プロペプチドは、N末端プロペプチド (NT - プロペプチド、NT - プロBNP の場合は76個のアミノ酸) と活性なホルモン (BNP の場合は32個のアミノ酸、ANP の場合は28個のアミノ酸) にさらに切断される。本発明に係る好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT - プロANP、ANP、NT - プロBNP、BNP およびそれらの変異体である。ANP およびBNP は活性なホルモンであり、それらの各不活性相対物であるNT - プロANP およびNT - プロBNP よりも短い半減期を有する。BNP は、血液中で代謝されるが、NT - プロBNP は、そのままの分子として血液中を循環しているため、腎臓によって排出される。NT - プロBNP の生体内 (in vivo) での半減期はBNP の半減期 (20分) よりも長い120分である (Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. *Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase* (ヒトの脳ナトリウム利尿ペプチドの遅い代謝は、中性エンドペプチダーゼに対する抵抗を反映している). *J Endocrinol.* 2000; 167: 239-46.)。事前分析法 (Preanalytical) ではNT - プロBNP はより堅牢であり中央検査室に試料を容易に運ぶことができる (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* (冷凍した血漿試料中の内因性B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) およびアミノ末端プロBNP (NT - プロBNP) の長期的な安定性). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4.)。血液試料は、室温で数日間貯蔵したり、回収損失なく郵送または輸送したりすることができる。対照的に、BNP を室温または摂氏4で48時間貯蔵すると、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, supra; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp 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* (心不全患者におけるBayer ADVIA Centaur自動化B型ナトリウム利尿ペプチドアッセイの分析および臨床的評価: 多部位調査). *Clin Chem* 2004; 50: 867-73)。従って、時間経過または関連の特性に応じて、ナトリウム利尿ペプチドの活性または不活性形態のいずれか一方を測定するのが有利かも知れない。本発明に係る最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT - プロBNP またはその

10

20

30

40

50

変異体である。上に簡単に述べたように、本発明に従って参照されているヒトのNT-プロBNPは、好ましくは、ヒトのNT-プロBNP分子のN末端部分に対応する76個のアミノ酸長を含むポリペプチドである。ヒトのBNPおよびNT-プロBNPの構造は、既に先行技術（例えば、国際公開第02/089657号、第02/083913号、Bonow 1996, New Insights into the cardiac natriuretic peptides (心臓ナトリウム利尿ペプチドへの新しい洞察). Circulation 93: 1946-1950) に詳細に記載されている。好ましくは、本明細書に使用されているヒトのNT-プロBNPは、欧州特許第0648228B1号に開示されているようなヒトのNT-プロBNPである。これらの先行技術文書は、そこに開示されているNT-プロBNPおよびその変異体の特定の配列に関する参照によって、本明細書に組み込まれる。

10

【0041】

さらに、本発明によれば、外科的処置後のGDF-15の量が、急性腎損傷に罹患するリスクが高まったか否かの指標となることも分かった。

従って、本発明は、外科的処置を受けたリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する方法も想定しており、本方法は、

- a) 患者の試料中のGDF-15の量を測定する工程、
 - b) 測定された量を基準量と比較して、それにより、患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程、
- を含む。

【0042】

20

上になされている用語の説明および定義を準用する。本方法では、外科的処置が完了した後に、好ましくは、手術後1日、2日または3日以内の時間帯の範囲内で試料を採取したことが理解されるであろう。治療介入の完了後すぐに、あるいは1日以内に試料を採取することがより好ましい。手術直後に試料を採取することが最も好ましい。「手術直後」という用語は、好ましくは、手術後約0.5時間以内、約1時間以内、約2時間以内、約3時間以内または約6時間以内、最も好ましくは手術後0.5時間以内に試料を採取することを指す。本発明の方法を手術後に実施して、外科的処置を受けた患者が急性腎損傷に罹患するリスクが高まったか否かをできる限り早く診断することができる。このリスクに効果的に対処するために、できる限り早く治療手段を施す必要がある。

【0043】

30

手術直後に採取された試料では、GDF-15量が約1807 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。GDF-15量が約3389 pg/ml超の場合に手術後のAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。GDF-15量が約6393 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。

【0044】

手術から1日後に採取された試料では、GDF-15量が約6375 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。GDF-15量が約11988 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。GDF-15量が約14507 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2aに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

40

【0045】

手術から2日後に採取された試料では、GDF-15量が約2352 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。GDF-15量が約8034 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。GDF-15量が約8929 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2aに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用するこ

50

とができる。

【0046】

手術から3日後に採取された試料では、GDF-15量が約1903 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。GDF-15量が約4675 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。GDF-15量が約5938 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2aに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0047】

手術直後に採取された試料では、トロポニン量が約176.6 pg/mlまたは約312.4未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。トロポニン量が約503.6 pg/mlまたは約593.1 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。トロポニン量が約640.3 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2bに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0048】

手術から1日後に採取された試料では、トロポニン量が約364.5 pg/mlまたは約863.9 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。トロポニン量が約1108.1 pg/mlまたは約1217.3 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。トロポニン量が約1280.9 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2bに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0049】

手術から2日後に採取された試料では、トロポニン量が約279.5 pg/mlまたは約537.6 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。トロポニン量が約739.1 pg/mlまたは約856.0 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。トロポニン量が約981.3 pg/mlまたは約2006.1 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2bに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0050】

手術から3日後に採取された試料では、トロポニン量が約182.7 pg/mlまたは約370.9 pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。トロポニン量が約492.6 pg/mlまたは約812.5 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。トロポニン量が約575.0 pg/mlまたは約1424.2 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2bに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0051】

手術直後に採取された試料では、NT-プロBNP量が約139.2 pg/mlまたは約368.6未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。NT-プロBNP量が約924.6 pg/mlまたは約940.3 pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。NT-プロBNP量が約1933.3 pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2cに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分

10

20

30

40

50

位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0052】

手術から1日後に採取された試料では、NT-プロBNP量が約914.1pg/mlまたは約1560.7pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。NT-プロBNP量が約1972.2pg/mlまたは約2565.1pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。NT-プロBNP量が約3296.2pg/mlまたは約4876.7pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2cに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

10

【0053】

手術から2日後に採取された試料では、NT-プロBNP量が約1667.0pg/mlまたは約2717.2pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。NT-プロBNP量が約4618.5pg/mlまたは約4953.2pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。NT-プロBNP量が約6597.7pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2cに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

20

【0054】

手術から3日後に採取された試料では、NT-プロBNP量が約1812.3pg/mlまたは約2825.0pg/ml未満の場合にAKIのリスクから除外されるのが好ましい。NT-プロBNP量が約4983.7pg/mlまたは約5393.4pg/ml超の場合に手術後にAKIのリスクが高まったことを示すのが好ましい。NT-プロBNP量が約5291.9pg/ml超の場合に血液透析を必要とする急性腎損傷のリスクが高まったことを示すのが好ましい。以下の表2cに記載されている75百分位に基づいて疾患を確定するか25百分位に基づいて疾患を除外するために、前記閾値をさらに採用することができる。

【0055】

上記を鑑みると、対象が血液透析などの腎代替療法を必要としているか否かを予測するため、あるいは死亡リスク、好ましくは死亡リスクの増加を予測するために、本発明の方法を適用することもできる。

30

【0056】

本発明の方法の別の側面では、前記方法は、外科的処置を受けたリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する方法であって、患者の試料で測定されたGDF-15量を、本明細書の他の箇所に記載されているような好適な基準量と比較して、患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測する工程を含む方法であることが理解されるであろう。

【0057】

本発明の好ましい態様では、GDF-15の量に加えて、ナトリウム利尿ペプチドおよび/またはトロポニンの量を測定する。

40

さらに、本発明は、リスク患者が外科的処置に適しているか否かを決定するための方法に関し、本方法は、

- a) 患者の試料中のGDF-15および/またはトロポニンの量を測定する工程、
 - b) 測定された量を好適な基準量と比較して、それにより、患者が外科的処置に適しているか否かを決定する工程、
- を含む。

【0058】

個々の患者のそれぞれに対して、外科的処置の潜在的な利点と、その潜在的な副作用とのバランスを考慮しなければならない。これらの潜在的な副作用の1つは、急性腎損傷である。本発明の本方法によって個々の基準でリスクを予測することができるため、外科的

50

処置に関する決定は、患者の特定の必要性およびリスクに基づいて行うことができる。従って、「リスク患者が外科的処置に適しているか否かを決定する」とは、治療介入の前記リスクと利点とのバランスを考慮し、かつ治療介入を行うことを勧めるか否かのために、上述したようなリスクの層別化を行うことを意味する。

【0059】

本発明の好ましい態様では、外科的処置は、冠状動脈バイパス移植手術である。C A B Gによって患者の生活の質は向上するが、長期間の生存には至らない(Eagle et al, 1999, J. Am Coll Cardiol 34: 1262)。従って、計画的なC A B Gの場合、A K Iの致死的となり得る結果と、C A B G後に向上し得る生活の質とのバランスを考慮しなければならない。

10

【0060】

好ましくは、本明細書の他の箇所に記載されているように、後にA K Iに罹患するリスクのある患者は、外科的処置に適していない。リスク患者に外科的処置を行うか否かに関する決定は、本出願で先に提供されているG D F - 15および/またはトロポニンの基準量に基づくことが好ましい。

【0061】

本発明の方法の別の側面では、前記方法は、リスク患者が外科的処置に適しているか否かを決定するための方法であって、患者の試料で測定されたG D F - 15および/またはトロポニンの量を、本明細書の他の箇所に記載されている好適な基準量と比較して、患者が外科的処置に適している否かを決定する工程を含む方法であることが理解されるであろう。

20

【0062】

本発明の好ましい態様では、G D F - 15および/またはトロポニンの量に加えて、ナトリウム利尿ペプチドの量を測定する。

さらに、本発明は、急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための、外科的処置を受ける予定の患者の試料中のバイオマーカG D F - 15および/またはトロポニンの使用に関する。

【0063】

さらに、本発明は、急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための、外科的処置を受ける予定の患者の試料中のG D F - 15に特異的に結合する検出物質および/またはトロポニンに特異的に結合する検出物質の使用に関する。

30

【0064】

また、本発明は、リスク患者が外科的処置に適しているか否かを決定するための、前記リスク患者の試料中のバイオマーカG D F - 15および/またはトロポニンの使用に関する。

【0065】

さらに、本発明は、リスク患者が外科的処置に適しているか否かを決定するための、前記患者の試料中のG D F - 15に特異的に結合する検出物質および/またはトロポニンに特異的に結合する検出物質の使用に関する。

【0066】

本発明は、外科的処置を受けたリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための、前記患者の試料中のバイオマーカG D F - 15の使用にも関する。

40

さらに、本発明は、外科的処置を受けたリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための、前記患者の試料中のG D F - 15に特異的に結合する検出物質の使用に関する。

【0067】

本明細書に使用されている「検出物質」という用語は、好ましくは、試料中に存在する場合に、上で参照されているバイオマーカのうちの1つを特異的に認識して結合することができる物質を指す。さらに、前記物質は、前記物質とバイオマーカによって形成された複合体の直接的または間接的な検出を可能にするものでなければならない。直接的な検出

50

は、物質の中に検出可能な標識を含めることによって達成することができる。間接的な標識化は、バイオマーカを含む複合体に特異的に結合するさらなる物質と、前記さらなる物質が検出可能な信号を生成することができる検出物質によって達成してもよい。検出物質として使用することができる好適な化合物は、当該技術分野でよく知られている。好ましくは、検出物質は、抗体（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体）あるいはバイオマーカに特異的に結合するアプタマーである。

【0068】

さらに、本発明は、外科的処置を受ける予定のリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための装置に関し、本装置は、

a) 患者の試料中のGDF-15および/またはトロポニンの量を測定するための分析部

10

、
b) 測定された量を好適な基準量と比較するため、および患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測するための評価部、
を含む。

【0069】

本明細書に使用されている「装置」という用語は、本発明の方法を実施するために動作可能に互いに接続された上記手段を少なくとも含む手段からなるシステムに関する。本発明のマーカの量を測定するための好ましい手段と比較を行うための手段は、本発明の方法に関連させて上に開示されている。これらの手段を動作可能に接続させる方法は、装置内に含まれる手段の種類によって決まる。例えば、本発明の遺伝子産物の量を自動的に測定するための分析部が適用される場合、前記自動的に動作している分析部によって得られたデータは、例えば、所望の結果を得るための評価部としてのコンピュータによって処理することができる。好ましくは、上記手段は、そのような場合には単一の装置に含まれている。

20

【0070】

好ましい好適な基準量は、本明細書の他の箇所に記載されている。

前記装置は、好ましくは、適用される試料中のGDF-15および/またはトロポニンの量の測定のための分析部、結果データを処理するための評価部を含む。好ましくは、評価部は、格納された基準量を有するデータベースと、コンピュータに明らかに組み込まれている場合に、測定された量とデータベース内に格納されている基準量との比較を行うコンピュータプログラムコードとを含む。より好ましくは、評価部は、比較の結果をリスク予測に対して割り当てるさらなるコンピュータプログラムコードを含む。このような場合、好ましくは、評価部は、基準量がリスクに対して割り当てられているさらなるデータベースを含むことも想定される。

30

【0071】

あるいは、GDF-15および/またはトロポニンの量を測定するために試験片などの手段が使用される場合、評価部は、対照試験片と、測定された量を基準量に対して割り当てる表を含んでいてもよい。試験片は、好ましくは、GDF-15および/またはトロポニンに特異的に結合するリガンドに結合されている。試験片または装置は、好ましくは、前記GDF-15および/またはトロポニンの前記リガンドへの結合を検出するための手段を含む。検出のための好ましい手段は、上記本発明の方法に関する態様に関連させて開示されている。この場合、本システムの利用者は、マニュアルに提供されている説明および解説により、量の測定結果とそれらの診断もしくは予後の値を統合するために、分析部と評価部は動作可能に接続されている。分析部および評価部は、そのような態様では、別個の装置として存在していてもよく、キットとして一緒に包装されていることが好ましい。当業者であれば、さらなる苦勞をせずに本手段を接続させる方法を分かっているであろう。好ましい装置は、専門の臨床医の特定の知識がなくとも適用することができる装置（例えば、単に試料の充填のみを必要とする試験片または電子素子）である。結果は、臨床医による解釈を必要とする生データの出力として提供されてもよい。但し、装置の出力は、臨床医の解釈を必要としない処理された（すなわち、評価された）生データであること

40

50

が好ましい。さらなる好ましい装置は、分析部/装置（例えば、バイオセンサ、アレイ、遺伝子産物を特異的に認識するリガンドに結合された固体支持体、プラズモン表面共鳴装置、NMR分光計、質量分析計など）あるいは本発明の方法に従って上で参照されている評価部/装置を含む。

【0072】

さらに、本発明は、外科的処置を受ける予定のリスク患者が急性腎損傷に罹患するリスクを予測するためのキットに関し、本キットは、

- a) 患者の試料中のGDF-15および/またはトロポニンの量を測定するための分析物質、
 - b) 分析物質で測定された量を好適な基準量と比較し、患者が急性腎損傷に罹患するリスクをさらに予測することができる評価部、
- を含む。

10

【0073】

本明細書に使用されている「キット」という用語は、一緒に包装されていても一緒に包装されていなくてもよい上記構成要素の集合体を指す。キットの構成要素は、別個の瓶に（すなわち、別個の部品のキットとして）含まれていてもよく、あるいは、単一の瓶で提供されていてもよい。さらに、本発明のキットは、本明細書において上で参照されている方法を実施するために使用することができることを理解されたい。好ましくは、全ての構成要素が上で参照されている方法を実施するためにすぐに使用可能な方法で提供されていることが想定される。さらに、本キットは、好ましくは、前記方法を実施するための説明書を含む。説明書は、紙または電子式でユーザーズマニュアルによって提供することができる。例えば、マニュアルは、本発明のキットを用いて上記方法を実施する場合に得られる結果を解釈するための説明書を含んでいてもよい。本キットは、分析物質を含むものである。本物質は、対象の試料中のGDF-15および/またはトロポニンを特異的に認識することができる。さらに、1種以上の前記物質は、GDF-15および/またはトロポニンに結合するとすぐに、好ましくは、検出可能な信号、すなわち試料中に存在するGDF-15および/またはトロポニンの量に相関する強度を生成することができる。生成される信号の種類に応じて、当該技術分野でよく知られている信号の検出方法を適用することができる。本発明のキットに好ましくは使用される分析物質としては、抗体またはアプタマーが挙げられる。分析物質は、本明細書の他の箇所に記載されている試験片上に存在していてもよい。従って、このように検出されたGDF-15および/またはトロポニンの量は、評価部でさらに評価することができる。本発明のキットに使用される好ましい評価部としては、本明細書の他の箇所で参照されている評価部が挙げられる。

20

30

【0074】

異なる側面では、本発明は、患者（好ましくはリスク患者）の心筋梗塞（MI）を診断するための方法にも関し、本方法は、

- a) 患者の試料中のトロポニンTの量を測定する工程、
 - b) 測定されたトロポニンTの量を好適な基準量と比較する工程、
 - c) 工程b)の結果に基づいて前記患者がMIに罹患している否かを診断する工程、
- を含む。

40

【0075】

さらに、本発明のさらに別の側面では、本方法は、GDF-15の代わりにTGF- β を測定することによって実施される。

本明細書に引用されている全ての参考文献は、それらの開示内容全体および本明細書で具体的に述べられている開示内容に関して、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0076】

以下の実施例は、単に本発明を例示するものである。それらは、決して本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

50

患者、材料および方法

冠状動脈バイパス移植（C A B G）手術を受ける予定の全部で126人の継続患者が調査に参加した。68人の男性と58人の女性（年齢の中央値：68歳（52～81歳））がいた。血清クレアチニンレベルは、全ての患者で正常であった。全ての患者は、内腔の50%を超える少なくとも1つの狭窄によって示されている2つ以上の血管疾患に罹患していた。急性腎損傷の死亡率および発症に関して患者を30日間追跡調査した。調査の終点は以下のとおりであった：急性腎損傷（AKI、手術後3日以内の少なくとも0.3 mg / dlのクレアチニンの増加）、血液透析の新しい必要性または死亡（手術後30日以内）。手術前および手術直後ならびに手術から1日、2日および3日後に血液を採取した。試料を30分間遠心分離し、分析まで摂氏 - 20 で保存した。

10

【0077】

R o c h e社 / 日立社製のC O B A S分析装置を用いてサンドイッチ免疫測定法によって、G D F - 1 5、トロポニンTおよびNT - プロBNPを測定した。この測定法は、各ポリペプチドに特異的な2種類のモノクローナル抗体を含む。これらのうち、一方はビオチン化され、他方はトリス（2, 2' - ビピリジル）ルテニウム（II）錯体で標識されている。第1のインキュベーション工程では、両方の抗体を試料と共にインキュベートする。測定されるペプチドおよび2種類の異なる抗体を含むサンドイッチ複合体が形成される。次のインキュベーション工程では、ストレプトアビジンでコーティングしたビーズをこの複合体に添加する。このビーズは、サンドイッチ複合体に結合する。次いで、反応混合物を測定用セルに吸引し、そこで、電極の表面にビーズを磁氣的に捕捉する。次いで、電圧を印加して、ルテニウム錯体からの化学発光を引き起こし、それを、光電子増倍管で測定する。光の発光量は、電極上のサンドイッチ複合体の量に依存している。トロポニンTアッセイの測定範囲は、3 pg / ml ~ 10000 pg / mlであり、G D F - 1 5では、300 pg / ml ~ 20000 pg / mlであった。5 pg / ml ~ 35000 pg / mlのNT - プロBNP量を測定することができた。

20

【0078】

クレアチニンを、J a f f e法を一部修正したものを用いて測定した(Foster-Swanson A et al., 1994, Clinical Chemistry, Abstract #361; Seelig HP and Wust H, 1969, Arztliches Labor, 15: 34-39; Bartels H et al., 1972, Clinical Chimica Acta, 37: 193-197)。簡潔に言うと、ピクリン酸をクレアチニンのアルカリ溶液と反応させて、黄橙色の複合体を形成した。前記複合体を、R o c h e社 / 日立製の分析装置で測光的に検出した。

30

【0079】

【表1】

表1 a : 手術前のG D F - 1 5 レベル

結果	AKIではない	AKI	透析	死亡
数	89	37	12	9
G D F - 1 5 の中央値 [pg / ml]	1078	1717	2573	2442
25百分位 [pg / ml]	781	1101	1250	1626
75百分位 [pg / ml]	1401	2448	4508	3273

40

50

【0080】

【表2】

表1b：手術前のトロポニンTレベル

結果	AKIではない	AKI	透析
数	89	37	12
TnTの中央値 [pg/ml]	13.34	25.52	60.89
25百分位 [pg/ml]	7.67	16.54	23.20
75百分位 [pg/ml]	33.11	62.01	495.97

10

【0081】

【表3】

表1c：手術前のNT-プロBNPレベル

結果	AKIではない	AKI	透析
数	89	37	12
NT-プロBNPの中央値 [pg/ml]	488.18	1385.49	2227.06
25百分位 [pg/ml]	160.26	481.45	794.08
75百分位 [pg/ml]	1118.66	2485.66	3358.61

20

30

【0082】

表1a～表1cは、CABP後に急性腎損傷に罹患している患者群のGDF-15、トロポニンTおよびGDF-15の中央値が高いことを示している。さらに、手術前の上記バイオマーカの中央値は、手術後にAKIの深刻な症例（血液透析を必要とする）を患っている患者群では、より高かった。従って、バイオマーカによる予測によって、異なる重症度のAKIに区別される。

40

【0083】

【表4】

表2a：手術後の異なる時点のGDF-15レベル [pg/ml]

	AKIではない*	AKI*	透析*	死亡*
手術直後	1807 1337-3467	3389 2036-6584	6393 3571-7653	5256 3401-8099
手術から1日後	6375 4177-8603	11988 8393-20600	14507 9525-22230	9786 8605-14260
手術から2日後	2352 1619-3201	8034 3985-11748	8929 5233-13038	8930 5087-13774
手術から3日後	1903 1487-3033	4675 3397-7731	5938 4366-11022	5652 4150-8408

*中央値、25百分位および75百分位

【0084】

【表5】

表2b：手術後の異なる時点のトロポニンTレベル [pg/ml]

	AKIではない*	AKI*	透析*
手術直後	312.39 176.63-503.56	593.14 139.87-1908.04	640.34 549.87-1421.68
手術から1日後	863.85 364.48-1217.33	1108.10 448.83-3612.46	1280.91 500.98-5439.78
手術から2日後	537.61 279.53-855.98	739.07 387.11-2074.96	981.30 357.56-2006.06
手術から3日後	370.92 182.70-812.45	492.60 310.91-1424.18	574.96 315.58-1724.62

*中央値、25百分位および75百分位

【0085】

10

20

30

40

【表6】

表2c：手術後の異なる時点のNT-プロBNPレベル [pg/ml]

	AKIではない*	AKI*	透析*
手術直後	368.58 139.15-940.25	924.62 381.57-2124.55	1933.30 914.53-5824.65
手術から1日後	1560.68 914.09-2565.12	1972.22 1086.06-4686.00	4876.65 3296.20-6485.33
手術から2日後	2717.21 1667.04-4618.54	4953.24 2344.10-10839.93	6597.74 2978.74-13846.26
手術から3日後	2825.03 1812.31-5393.36	4983.66 2661.26-9243.66	5291.93 4092.11-12000.25

*中央値、25百分位および75百分位

【0086】

表2a～表2cから分かるように、合併症を経験する可能性のある患者を心臓血管外科手術後にも特定することができる。マーカーにより、AKIの発症だけでなく、重症度も予測される。血液透析を必要とするAKIの深刻な症例の患者のGDF-15、トロポニンTおよびNT-プロBNPレベルは一般に、血液透析を必要としないAKIに罹患した患者よりも高い。

実施例2

個々の患者症例

症例1：

複数の狭窄を有する三枝病変に罹患している62歳の男性にCABGを行った。この患者は、長期の動脈性高血圧症に罹患しており、真正糖尿病または喫煙履歴はなかった。この患者の脂質は正常範囲内であった。但し、この患者には肥満症の病歴があった。手術の前後に、以下の結果が得られた：

【0087】

【表7】

	手術前	手術後	手術から 1日後	手術から 2日後	手術から 3日後
クレアチニン [mg/dl]	0.80	0.72	0.90	0.81	0.84
GDF-15 [pg/ml]	1700	1800	5600	2900	1900
TnT [pg/ml]	12.9	316.0	582.0	416.0	352.0
NT-プロBNP [pg/ml]	380	410	1420	1530	1380

【0088】

この患者は、さらなる合併症を発症せずにCABGから回復した。AKIは発症しなかった。

手術前のGDF-15およびNT-プロBNP量は、手術後にAKIのリスクが高まることを示す基準量には満たなかった(それぞれ1717 pg/mlおよび1119 pg/ml)。このトロポニンT量は、AKIのリスクの増加から除外され得ることをさらに示していた(13.3 pg/ml未満のTnT)。

症例2:

複数の狭窄を有する二枝病変に罹患している58歳の男性にCABGを行った。この患者は、過去に喫煙者であり、動脈性高血圧症に罹患していたが、真正糖尿病には罹患していなかった。この患者の脂質は正常範囲内であった。手術の前後に、以下の結果が得られた:

【0089】

10

【表8】

	手術前	手術後	手術から 1日後	手術から 2日後	手術から 3日後
クレアチニン [mg/dl]	1.15	1.08	1.40	2.1	1.6
GDF-15 [pg/ml]	3200	3300	10000	13000	4100
TnT [pg/ml]	23.9	621.0	490.0	380.0	210.0
NT-プロBNP [pg/ml]	1480	2010	3860	3540	3790

20

【0090】

この患者は、急性腎損傷に罹患したが、急性透析を必要とすることなく自然に回復した。

手術前に測定したGDF-15量は、腎代替療法を必要とするAKIのリスクが高いことを示していた。トロポニンT量は、AKIのリスクが高いことを示す閾値(25.5 pg/ml)を僅かに下回っていた。NT-プロBNP量は、AKIのリスクが高いことを示していた。総合すると、3つのマーカーのうち2つは、AKIのリスクが高いことを示していた。1つのマーカーによって血液透析の必要性も予測されていた。従って、AKIの発症は予想に合致している。

30

症例3:

広範囲にわたる三枝病変に罹患している62歳の男性にCABGを行った。この患者は、手術前に呼吸困難に陥り、また、過去に症候性心不全を発症し、それをACE阻害薬、遮断薬および利尿薬で治療したことが報告されていた。この患者の腎機能は限界であり、ループ利尿薬を用いて改善した。この患者のリスク因子には、喫煙、動脈性高血圧症および肥満症が含まれていたが、最近になって減量した。手術の前後に、以下の値が得られた:

【0091】

【表 9】

	手術前	手術後	手術から 1 日後	手術から 2 日後	手術から 3 日後
クレアチニン [mg/dl]	1.2	1.3	1.6	3.2	4.5
GDF-15 [pg/ml]	2416	5820	9210	8760	5820
TnT [pg/ml]	62.3	657.0	1380.0	975.0	612.0
NT-プロBNP [pg/ml]	2480	1980	4920	6370	5910

10

【0092】

この患者は手術後にAKIに罹患し、血液透析を必要とした。

トロポニンTおよびNT-プロBNPは、血液透析を必要とするAKIのリスクが高いことを示していた。手術前のGDF-15量は、血液透析を必要とするAKIのリスク(2573pg/ml)を示す基準値を僅かに下回っていた。従って、3つのマーカー全てが、AKIの発症を正確に予測し、2つのマーカーは、血液透析を必要とするAKIの深刻な症例も予測していた。

フロントページの続き

- (74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
- (74)代理人 100157923
弁理士 鶴喰 寿孝
- (72)発明者 ホルシュ, アンドレア
ドイツ国 6 8 2 5 9 マンハイム, クリスティアン - モルゲンシュテルン - シュトラーセ 1 1
- (72)発明者 ズドゥネック, ディートマー
ドイツ国 8 2 3 2 7 トゥッツィング, エリー - ナイ - シュトラーセ 3
- (72)発明者 ヘス, ゲオルク
ドイツ国 5 5 1 3 0 マインツ, オッペンハイマー・シュトラーセ 8 2

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第2009/141357(WO, A1)
国際公開第2009/047283(WO, A1)
国際公開第2008/015254(WO, A1)
国際公開第2009/107384(WO, A1)
国際公開第2008/125681(WO, A1)
HAASE MICHAEL et al., "Novel biomarkers early predict the severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults, THE ANNALS OF THORACIC SURGERY, 2009年 7月, Vol.88, No.1, P.124-130

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	GDF-15用于预测心脏手术患者的肾功能衰竭		
公开(公告)号	JP5719379B2	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	JP2012543783	申请日	2010-12-17
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ホルシュアンドレア ズドウネックディートマー ヘスゲオルク		
发明人	ホルシュ,アンドレア ズドウネック,ディートマー ヘス,ゲオルク		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/74 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4716 G01N33/6863 G01N33/74 G01N2333/52 G01N2800/347 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2333/495		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/74 G01N33/53.D		
代理人(译)	小林 泰 星野 修 山本修 鹤喰 寿孝		
优先权	2009179925 2009-12-18 EP		
其他公开文献	JP2013514528A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及实验室诊断领域。具体地，公开了用于确定患者在外科手术
后患有急性肾损伤的风险的手段和方法，其基于GDF-15，肌钙蛋白T和/
或利尿钠肽的检测。

結果	AKIではない	AKI	透析	死亡
数	89	37	12	9
GDF-15の中央値 [pg/ml]	1078	1717	2573	2442
2.5百分位 [pg/ml]	781	1101	1250	1626
7.5百分位 [pg/ml]	1401	2448	4508	3273