

(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2016-530529

(P2016-530529A)

(43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C 0 8 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 R	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2016-539373 (P2016-539373)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月5日 (2014.9.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年4月26日 (2016.4.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2014/050841  
 (87) 国際公開番号 WO2015/031996  
 (87) 国際公開日 平成27年3月12日 (2015.3.12)  
 (31) 優先権主張番号 14/019,447  
 (32) 優先日 平成25年9月5日 (2013.9.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510156550  
 ユニヴァーシティ ヘルス ネットワーク  
 カナダ エム5ジー2シー4 オンタリオ  
 トロント エリザベス ストリート 1  
 90 アール フレイザー エリオット  
 ビルディング ルーム 1 エス-4 17  
 (74) 代理人 100086771  
 弁理士 西島 孝喜  
 (74) 代理人 100088694  
 弁理士 弟子丸 健  
 (74) 代理人 100094569  
 弁理士 田中 伸一郎  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 稲田 篤

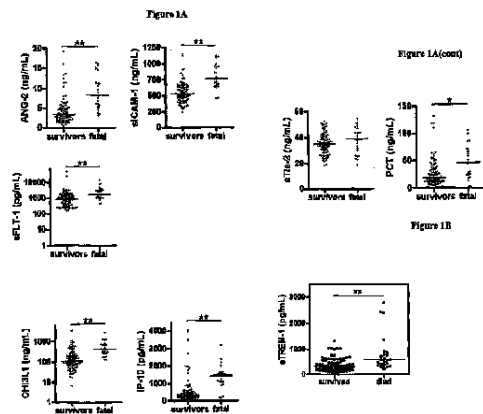
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病気に対する重篤若しくは致命的な反応及び／又は治療反応の早期決定のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、病気に対する個体の重篤及び／又は致命的な反応の早期決定並びに／或いは前記病気の予後の予測に有用性がある新規バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせの使用に関する。本発明のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせの産物の発現レベルの測定は、病気に対する個体の重篤及び／又は致命的な反応の決定を下す際に有用性がある。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは不可知論的であり、病気の原因若しくは性質の前同定及び／又は決定と無関係である。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせを利用して、重篤な病気を有する個体のための治療を選択し、及び／又は治療介入の有効性をモニターすることができる。

【選択図】 図 1 A



**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

疑われる病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を試験個体が有する可能性の決定方法であって、下記工程、

(i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記試験個体が、前記疑われる病気を有すると診断又は差別的に診断されておらず、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a (C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、

(ii) 前記タンパク質バイオマーカーの前記数量化レベルを、コントロール集団からの前記タンパク質バイオマーカーのコントロールレベルと比較する工程、

(iii) 工程(ii)の比較において、前記試験個体が重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが高いかどうかに関しての決定を下すべく各バイオマーカーについて差別的レベルを決定する工程

を含む方法。

**【請求項2】**

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記コントロール集団と比較するために使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項1の方法。

**【請求項3】**

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項2の方法。

**【請求項4】**

工程(iii)の決定が、同定された高いリスクの結果として前記個体が治療プロトコルの適用を必要とすることを示す、請求項1の方法。

**【請求項5】**

前記個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項4の方法。

**【請求項6】**

前記コントロール集団が、重篤及び/又は致命的な病気を有する個体の集団である、請求項1の方法。

**【請求項7】**

前記コントロール集団が、重篤及び/又は致命的な病気を有する個体の集団であって、前記個体が、前記病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症していない、請求項1の方法。

**【請求項8】**

前記コントロール集団が、重篤及び/又は致命的な病気を有する個体の集団であって、前記個体が、前記病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症している、請求項1の方法。

**【請求項9】**

前記コントロール集団が、正常な個体の集団である、請求項1の方法。

**【請求項10】**

前記コントロール集団が、重篤及び/又は致命的な病気を有しない個体の集団である、請求項1の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

前記コントロール集団が、該コントロール集団のメンバーは重篤及び / 又は致命的な病気を有しない個体の集団である、請求項1の方法。

## 【請求項 1 2】

前記病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項1の方法。

## 【請求項 1 3】

疑われる病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を試験個体が有する可能性の決定方法であって、下記工程、

(i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記試験個体が、前記疑われる病気を有すると診断又は差別的に診断されておらず、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a (C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、

(ii) 1つ以上のコントロール集団において前記タンパク質バイオマーカーを試験することから導かれる分類指標において前記サンプルからの前記各タンパク質バイオマーカーの数量化レベルを利用する工程、

(iii) 前記分類指標の適用の結果として、前記個体の重篤及び / 又は致命的な反応のリスクが高いかどうかに関しての決定を下す工程

を含む方法。

## 【請求項 1 4】

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記分類指標に使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項13の方法。

## 【請求項 1 5】

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項14の方法。

## 【請求項 1 6】

工程(iii)の決定が、同定された高いリスクの結果として前記個体が治療プロトコルの適用を必要とすることを示す、請求項13の方法。

## 【請求項 1 7】

前記個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項16の方法。

## 【請求項 1 8】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち前記疑われる病気を有し、かつ前記疑われる病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を有しない個体の集団並びに前記疑われる病気を有し、かつ前記疑われる病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項13の方法。

## 【請求項 1 9】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち重篤及び / 又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を有しない個体の集団並びに重篤及び / 又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤

10

20

30

40

50

及び / 又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項13の方法。

【請求項20】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち正常とみなされる個体の集団並びに重篤及び / 又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項13の方法。

【請求項21】

前記疑われる病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項13の方法。

10

【請求項22】

病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を試験個体が有する可能性の決定方法であって、下記工程、

(i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、

20

(ii) 前記タンパク質バイオマーカーの前記数量化レベルを、コントロール集団からの前記タンパク質バイオマーカーのコントロールレベルと比較する工程、

(iii) 工程(ii)の比較において、前記試験個体が前記病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を有するリスクが高いかどうかに関しての決定を下すべく各バイオマーカーについて差別的レベルを決定する工程

を含む方法。

30

【請求項23】

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記コントロール集団と比較するために使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項22の方法。

【請求項24】

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項23の方法。

【請求項25】

工程(iii)の決定が、同定された高いリスクの結果として前記個体が治療プロトコルの適用を必要とすることを示す、請求項22の方法。

40

【請求項26】

前記個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項25の方法。

【請求項27】

前記コントロール集団が、重篤及び / 又は致命的な病気を有する個体の集団である、請求項22の方法。

【請求項28】

前記コントロール集団が、重篤及び / 又は致命的な病気を有する個体の集団であって、前記個体が、前記病気に対する重篤及び / 又は致命的な反応を発症したことがない、請求項22の方法。

【請求項29】

50

前記コントロール集団が、重篤及び／又は致命的な病気を有する個体の集団であって、前記個体が、前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を発症していない、請求項22の方法。

【請求項30】

前記コントロール集団が、正常な個体の集団である、請求項22の方法。

【請求項31】

前記コントロール集団が、重篤及び／又は致命的な病気を有しない個体の集団である、請求項22の方法。

【請求項32】

前記コントロール集団が、該コントロール集団のメンバーが重篤及び／又は致命的な病気を有しない個体の集団である、請求項22の方法。

10

【請求項33】

前記疑われる病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項22の方法。

【請求項34】

病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を試験個体が有する可能性の決定方法であって、下記工程、

(i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、

20

30

(ii) 1つ以上のコントロール集団において前記タンパク質バイオマーカーを試験することから導かれる分類指標において前記サンプルからの前記各タンパク質バイオマーカーの数量化レベルを利用する工程、

(iii) 前記分類指標の適用の結果として、前記個体の重篤及び／又は致命的な反応のリスクが高いかどうかについての決定を下す工程を含む方法。

【請求項35】

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記分類指標に使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項34の方法。

40

【請求項36】

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項35の方法。

【請求項37】

工程(iii)の決定が、同定された高いリスクの結果として前記個体が治療プロトコルの適用を必要とすることを示す、請求項34の方法。

【請求項38】

前記個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項37の方法。

【請求項39】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち前記病気を有し、かつ

50

前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有しない個体の集団並びに前記病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項34の方法。

【請求項40】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち重篤及び／又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有しない個体の集団並びに重篤及び／又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項34の方法。

【請求項41】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち正常とみなされる個体の集団並びに重篤及び／又は致命的であり得る病気を有し、かつ前記病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有する個体の集団を用いて導かれる、請求項34の方法。

10

【請求項42】

前記病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項34の方法。

【請求項43】

2種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含む組成物であって、前記組成物は、病気を有すると疑われる試験個体から単離したサンプルの少なくとも2種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合可能であり、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブラン

20

30

【請求項44】

前記組成物は少なくとも3種以上の抗体のコレクションを含み、かつ下記タンパク質バイオマーカー：表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブラン

40

【請求項45】

前記サンプルが、全血サンプルである、請求項42又は43の組成物。

【請求項46】

前記サンプルが、血清サンプルである、請求項42又は43の組成物。

【請求項47】

前記サンプルが、血漿サンプルである、請求項42又は43の組成物。

50

## 【請求項48】

前記組成物が、補体断片C5a(C5a)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、C反応性タンパク質(CRP)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である少なくとも1種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができる、請求項42の組成物。

## 【請求項49】

前記サンプルが、全血サンプルである、請求項48の組成物。

## 【請求項50】

前記サンプルが、血清サンプルである、請求項48の組成物。

## 【請求項51】

前記サンプルが、血漿サンプルである、請求項48の組成物。

## 【請求項52】

前記疑われる病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項43の組成物。

## 【請求項53】

治療プロトコルの投与が、病気の1つ以上の症状を呈する試験個体に役立つ可能性があるかどうかを決定する方法であって、下記工程、

- (i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記試験個体の病気は診断又は差別的に診断されたことがなく、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、
- (ii) 前記タンパク質バイオマーカーの前記数量化レベルを、コントロール集団からの前記タンパク質バイオマーカーのコントロールレベルと比較する工程、
- (iii) 工程(ii)の比較において、前記試験個体が前記治療プロトコルから利益を得る可能性があるかどうかについての決定を下すべく各バイオマーカーについて差別的レベルを決定する工程を含む方法。

## 【請求項54】

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記コントロール集団と比較するために使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項53の方法。

## 【請求項55】

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項54の方法。

## 【請求項56】

前記試験個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項53～55のいずれか1項の方法。

## 【請求項57】

前記コントロール集団が、前記治療プロトコルから利益を得るであろう病気を有する個体の集団である、請求項53の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項58】

前記コントロール集団が、前記治療プロトコルから利益を得ないであろう病気を有する個体の集団である、請求項53の方法。

## 【請求項59】

前記疑われる病気が、肺炎、上気道感染症、下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、又はウイルス性出血熱である、請求項53の方法。

## 【請求項60】

治療プロトコルの投与が、病気の1つ以上の症状を呈したことがある試験個体に役立つ可能性があるかどうかを決定する方法であって、下記工程、

- (i) 前記試験個体からのサンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、前記試験個体の病気は診断又は差別的に診断されたことがなく、前記タンパク質バイオマーカーは、表1に示す補体断片C5a(C5a)、アンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)、10kDaのインターフェロン誘導タンパク質(IP-10)、免疫グロブリン様ループと上皮成長因子ドメイン-2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTie-2)、可溶性細胞内接着分子-1(sICAM-1)、血管内皮成長因子A(VEGF)、可溶性血管内皮成長因子受容体1(sFlt-1)、キチナーゼ3様タンパク質1(CH13L1)、骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体(sTREM-1)、C反応性タンパク質(CRP)、プロカルシトニン(PCT)、アンジオポエチン様タンパク質3(Ang様3)、補体D因子(D因子)、又はインターロイキン18結合タンパク質(IL18bpa)、エンドグリン(End)、p-セレクチン(p-SEL)、フォン上皮細胞可溶性Tie-2受容体(Tie-2)及びヴィルブランド因子(vWF)である、前記工程、
- (ii) 1つ以上のコントロール集団において前記タンパク質バイオマーカーを試験することから導かれる分類指標において前記サンプルからの前記各タンパク質バイオマーカーの数量化レベルを利用する工程、
- (iii) 前記分類指標の適用の結果として、前記試験個体が前記治療プロトコルから利益を得る可能性があるかどうかについての決定を下す工程を含む方法。

10

20

## 【請求項61】

工程(i)の前記検出及び数量化が、前記分類指標に使用できる前記2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに前記サンプルを変換するための1つ以上のデバイスを利用する、請求項60の方法。

30

## 【請求項62】

前記1つ以上のデバイスが、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである、請求項61の方法。

## 【請求項63】

前記試験個体が、前記治療プロトコルを受ける、請求項60～62のいずれか1項の方法。

## 【請求項64】

前記分類指標が、少なくとも2つのコントロール集団、すなわち前記治療プロトコルを受けることから利益を得るであろう病気を有すると診断又は差別的に診断されたことがある個体の集団並びに前記治療プロトコルを受けることから利益を得ないであろう病気を有すると診断又は差別的に診断されたことがある個体の集団から導かれる、請求項60の方法。

40

## 【請求項65】

前記治療プロトコルを受けることから利益を得るであろう病気が細菌感染症であり、前記治療プロトコルを受けることから利益を得ないであろう病気がウイルス感染症である、請求項64の方法。

## 【請求項66】

前記細菌感染症が、肺炎桿菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、シゲラ・フレックスネリ、サルモネラ菌、連鎖球菌、インフルエンザ菌、又はアシネトバクターの結果である、請求項

50

65の方法。

【請求項67】

前記治療プロトコルから利益を得るであろう病気を有する個体の集団のメンバーが、全て同一の細菌感染症を有するわけではない、請求項66の方法。

【請求項68】

前記治療プロトコルから利益を得ないであろう病気を有する個体の集団のメンバーが、全て同一のウイルス感染症を有するわけではない、請求項66の方法。

【請求項69】

前記治療プロトコルが抗体の適用である、請求項60～69のいずれか1項の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明の範囲は、病気に対する個体の重篤及び/又は致命的な反応の早期決定並びに/或いは前記病気の予後の予測に有用性がある新規バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせの使用を包含する。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは不可知論的であり、病気の原因若しくは性質の前同定及び/又は決定と無関係である。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせを利用して、病気の原因若しくは性質の前同定及び/又は決定と無関係に、重篤な病気を有する個体のための治療介入の有効性をモニターするか又は個体に有効である可能性が高い治療介入を選択することができる。

20

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

診断及び治療

医学的文脈において、診断は、患者の病歴、身体検査、症状の精査及び1つ以上の臨床試験のデータの精査を包含し得る1つ以上の因子の評価を通じて関与する状態(疾患及び/又は損傷を含めて)を同定することによる病気の性質及び/若しくは原因を同定又は決定する行為又はプロセスである。病気の正確な性質又は原因を常に同定できるわけではないが、最も可能性の高い原因を選択するために1つ以上の可能性のある原因を排除するための試みにおいて差別的診断を利用することもできる。

30

診断又は差別的診断を行なったら、治療選択肢を考慮し、治療戦略を選択する。場合によっては、診断が完了する前に治療を開始することもある(例えば、検査結果を受けるまでの治療)。他の場合には、病気の原因は分かりにくいままであるにもかかわらず、個体が呈する症状に基づいて治療を選択する。診断、差別的診断、又は症状が重篤及び/又は致命的な可能性がある状態を示すときには、管理戦略は、迅速なトリアージ、照会、入院、モニタリング強化、集中治療室への入院等を含めた最良の可能な臨床成績を確保するための追加の配慮を含み得る。

【0003】

診断及び治療への不可知論的アプローチ

40

病気の所定起源又は原因のみに基づいた治療戦略を選択する伝統的モデルは、いくつかの重大な欠点を有する。原因を同定することは治療の選択経過が疾患、損傷、又は少なくとも症状特異的であることを保証する助けとなるが、病気の経過及び重症度を定義する際にそれらの状態に対する個体独特の反応が果たす重要性を認識し損なうことが多い。原因を同定することは、適切な診断方法に伴う利用可能性及び/又は経済的負担に適合し得ない疾患又は病気の診断的前決定をも重視する。

治療に対する「不可知論的」アプローチは、病気の起源又は原因に基づいて治療戦略を選択するという伝統的規範を検証する。不可知論的アプローチは、原因又は起源は知ることができないので(宗教的状况におけるように)、或いは診断は役に立ち得ないので、必ずしも選択されるわけではないが、できる限り早く並びに/或いは個体が重篤的及び/又は

50

致命的様式で病気に対して反応するかどうかの診断の利益なしで知ることが、個体に合わせた適切な治療をトリアージ方式で決定し、選択するためのより有効かつ迅速な方法を提供することができる。

#### 【0004】

病気に対する個体の反応

全ての個体が同一様式で病気に反応するわけでないことはよく認識されている。多くは軽度及び自己限定的疾患しか発症せず、小割合が重篤及び/又は致命的な段階に進行し得る。医療的ケアに対する提示では、誰が治療介入なしで、又は最小限の治療介入のみで良くなるか及び臨床成績を改善するために誰が入院及び特殊管理を必要とするかを決定することは困難で有り得る。例えば、H1N1インフルエンザ大流行の場合には、米国内で約6100万の個体がH1N1に感染したが(2009年4月~2010年4月の期間)、当該症例の小割合だけが死に至ったと推定された。感染した6100万個体のうち、約274,000個体が入院し(0.449%)、12,470千が死亡した(0.012%)(2010年5月14日に疾患管理センター(Centre for Disease Control)から公表された新興感染症プログラム(Emerging Infection Programs)データ;死亡は十の位に四捨五入した。入院は千の位に四捨五入し、症例は百万の位に四捨五入した)。明らかに一部の個体は他の個体より強くH1N1感染と闘うことができた。

反応のこの多様性にもかかわらず、後向き分析を用いてさえ、これらの個体の差別的予後にどんな特異的因子及び特徴が寄与したかを決定するのは困難だった。例えば、2009年7月16日以前に入手可能な世界中のデータについて、その日以降に報告された684の死亡に関する後向き研究が行なわれ(Vaillant, L. et al., Eurosurveillance, Vol. 14, Issue 33, p.1-6 (2009))、国ごとに患者の年齢が精査された。当該研究では、全体的に大部分の死亡(51%)は20~49歳の年齢群で起こり、年齢の影響、及び最も影響された年齢群は国ごとに異なり、予測結論を導くことを困難にすることが分かった。

#### 【0005】

生命を脅かす可能性のある病気の別の例は敗血症である。敗血症は、推定感染に対する全身性炎症反応であり、多数の多様な疾患又は病因論から生じ得る。場合によっては、症状が臓器不全、低灌流、又は低血圧をも伴う重症敗血症が発症し得る。

病気をもつ個体の小部分のみが進行して重篤及び/又は致命的な反応を有するので、緊急トリアージ及び集中治療を必要とする当該個体をそれらを必要としない当該個体と区別する能力は著しい利点となるであろう。

病気に対する致命的な反応に最も脆弱な個体を選択的に治療するための現在の試みは、前記病気の最初の診断によって、それから既知のリスク因子(年齢、現存する併存症等)に基づいて個体を前分類すること及び/又は致命的様式で病気が進行していることを示唆する早期徴候について個体をモニターすることによって生じる。例えば、ブラジルの2つの一般病院において2段階で行なった前向きコホート研究は、敗血症に特異的な検出のための現存する測定可能な指標を用いて院内患者のモニタリングを増やし、それに応じて治療を行なうことによって患者の死亡率が61.7%から38.2%に低下することを見出した(Wesphal, G.A., et al. "重症敗血症の早期検出プロトコル実施後の死亡率低下(Reduced mortality after the implementation of a protocol for the early detection of severe sepsis)" Journal of Critical Care (2011) 26 p.76-81)。

#### 【0006】

それにもかかわらず、リスク因子への依存は、致命的な反応を有する可能性がある個体を選択する手段として非常に不十分なままであり(上記Vaillant, L.ら参照)、個体が致命的な反応を有しているという現存する測定可能な指標は、患者の広範かつ費用のかかるモニタリングを必要とすることが多く、患者を管理する際の臨床用途としては長くかかりすぎる可能性がある。さらに、モニタリング又は治療を行なう前の診断に頼ると、費用を増やし、不要な遅延を引き起こす恐れがある。これは、特に開発途上国におけるような資源が限定されている場合に問題であるが、クリティカル・ケアに伴う費用がかかる先進国にも同様に当てはまる。

例えば、H1N1治療の場合、Durbenらは、オンタリオ州の集団の治療に関する社会的観点

10

20

30

40

50

から費用をモデル化し(予防ワクチン接種なしと仮定)、総費用は\$11.0億ドルであり、約8700万ドルがホスピタルケアの種々の側面に割り当てられると決定した(Durben et al. (2011) “加国オンタリオ州のH1N1ワクチン戦略の対費用効果分析(A cost effectiveness analysis of the H1N1 vaccine strategy for Ontario, Canada)” Journal of Infectious Diseases and Immunity Vol. 3(3) p. 40-49)。感染に対する反応が不十分である可能性が高い当該個体の早期かつ正確な同定と階層化は、それらから利益を得る可能性が最も高い個体に資源を集中させ、特異的な医療介入なしでよく回復する感染個体の過半数を避けることができた。この戦略は、多分これらの将来予想される費用をかなり大きく減少させたであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、当技術に必要なものは、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応に進行するという個体の高いリスクの現在のモデルより大きい確実性を与える1種以上のバイオマーカー、並びに/或いは個体が治療介入を必要とすると同定して、前記個体に適した治療プロトコルを選択及び/又は修正することである。これらのバイオマーカーは、治療介入に最大の可能性を与えるべく、できる限り早期に高いリスクを認識するのが好ましいであろう。バイオマーカーが不可知論的であり、病気に無関係な有用性があれば特に役立ち、そうすれば最初に病気を診断する必要がなくなるであろう。また、致命的な反応の進行への治療プロトコルの影響をモニターするための1種以上のバイオマーカーを使用する能力は、必要に応じて大いに有益でもある治療プロトコルの修正を可能にするであろう。

【課題を解決するための手段】

【0008】

### 3. 概要

一態様では、開示するものは、病気に対する個体の反応、当該反応の重症度、並びに個体が病気の重篤及び/又は致命的な形態を既に有するか、又は該形態に進行しているかどうかの指標を与えるバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせである。別の態様では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは、病気の原因又は起源の最初の決定によって予測されない病気に対する個人の反応の重症度の早期指標を与えることができる。さらに別の態様では、開示するものは、診断若しくは差別的診断の前、又はその代わりに、適切な治療プロトコルを選択するために使用できるバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせである。さらに別の態様では、開示するものは、個体の致命的な反応のリスク又は進行への治療プロトコルの影響の早期指標を与えるバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせである。

【0009】

別の態様は、2種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含む組成物であり、この組成物は、試験個体から単離したサンプルの少なくとも2種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは表1中のものである。別の態様では、組成物は3種以上の抗体を含む組成物であり、この組成物は、試験個体から単離したサンプルの少なくとも3種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは表1中のものである。別の態様では、組成物は2種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含み、この組成物は、試験個体から単離したサンプルの少なくとも2種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは、C5a、VEGF、sFlt-1、CHI3L1、CRP、Ang様3、D因子、又はIL18bpaである。別の態様では、組成物は3種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含み、この組成物は、試験個体から単離したサンプルの少なくとも3種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは、C5a、VEGF、sFlt-1、CHI3L1、CRP、Ang様3、D因子、又はIL18bpaである。さらに別の態様では、サンプルは全血サンプル、血清サンプル又は血漿サンプルである。別の態様では、組成物は2種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含み、この組成物は、試験個体から単

10

20

30

40

50

離したサンプルの少なくとも2種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは、CRP、PCT、CHI3L1、P-セレクチン、vWF、Ang3L1、Tie-2、エンドグリン、及びIL18bpaである。別の態様では、組成物は3種以上の抗体のコレクション及び適切な緩衝液を含み、この組成物は、試験個体から単離したサンプルの少なくとも3種のタンパク質バイオマーカーに選択的に結合することができ、タンパク質バイオマーカーは、CRP、PCT、CHI3L1、P-セレクチン、vWF、Ang3L1、Tie-2、エンドグリン、及びIL18bpaである。さらに別の態様では、サンプルは全血サンプル、血清サンプル又は血漿サンプルである。

#### 【0010】

一部の実施形態では、組成物を用いて、(i)サンプル中の2種以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化し、(ii)この数量化レベルをコントロール集団のタンパク質バイオマーカーのコントロールレベルと比較し、(iii)コントロール集団と比べて個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが有意に高いという決定を下すべく2種以上のバイオマーカーについて差別的レベルの存在を決定する。一部の実施形態では、検出及び数量化は1つ以上のデバイスを利用して、サンプルを2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに変換する。一部の実施形態では、デバイスはサンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである。一部の実施形態では、試験個体は工程(iii)の決定に基づいた治療プロトコルを受ける。

一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有する個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有し、かつ該病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症していない個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は正常な個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、該コントロール集団のメンバーの過半数が試験個体と同じ病気を有していない個体の集団である。一部の実施形態では、上記集団は不偏集団である。

#### 【0011】

一部の実施形態では、試験個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するか又は発症する可能性の決定方法であり、この方法は、(i)サンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、タンパク質バイオマーカーは表1中のものである工程、(ii)前記タンパク質バイオマーカーの数量化レベルを、コントロール集団からのタンパク質バイオマーカーのコントロールレベルと比較する工程、(iii)コントロール集団と比べて個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが高いという決定を下すべく工程(ii)の比較に基づいて2種以上のバイオマーカーについて差別的レベルの存在を決定する工程を含む。

一部の実施形態では、個体のリスクが有意に高いという決定が下される。一部の実施形態では、工程(i)の検出及び数量化は1つ以上のデバイスを利用して、サンプルを2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに変換する。一部の実施形態では、1つ以上のデバイスは酵素結合免疫アッセイである。一部の実施形態では、個体は、下された決定に基づいた治療プロトコルを受ける。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有する個体の不偏集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有し、かつ該病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症していない個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は正常な個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、該コントロール集団のメンバーの過半数が試験個体と同じ病気を有していない個体の集団である。

#### 【0012】

一部の実施形態では、試験個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症する可能性の決定方法であり、この方法は、(i)サンプル中の2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化する工程であって、タンパク質バイオマーカーは表1中のものである工程、(ii)病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症した第1集団と、第2コントロール集団との2つの集団を用いて生成された分類指標において、サンプルの各タンパク質バイオマーカーの数量化レベルを使用する工程、(iii)個体が病気に対する

重篤及び/又は致命的な反応を発症するリスクが高いかどうかを決定すべく、数量化レベルが第1集団又は第2コントロール集団により似ている個体を示すかどうかに関しての決定を下す工程を含む。

一部の実施形態では、個体のリスクが有意に高いという決定が下される。一部の実施形態では、工程(i)の検出及び数量化は、1つ以上のデバイスを利用してサンプルを2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに変換する。一部の実施形態では、1つ以上のデバイスは酵素結合免疫アッセイである。一部の実施形態では、個体は、下された決定に基づいた治療プロトコルを受ける。一部の実施形態では、第2コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有する個体の不偏集団である。一部の実施形態では、第2コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有し、かつ該病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症していない個体の集団である。一部の実施形態では、第2コントロール集団は正常な個体の集団である。一部の実施形態では、第2コントロール集団は、該コントロール集団のメンバーの過半数が試験個体と同じ病気を有していない個体の集団である。

一部の実施形態では、試験個体は、開示通りに組成物又は方法を使用する前に重篤及び/又は致命的になる可能性を有する病気と診断又は差別的に診断されたことがない。

#### 【0013】

一部の実施形態では、組成物を用いて、(i)サンプル中の2種以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化し、(ii)この数量化レベルをコントロール集団中のタンパク質バイオマーカーのレベルと比較し、(iii)治療プロトコルを個体に投与すべきであるという決定を下すべく2種以上のバイオマーカーについて差別的レベルの存在を決定する。一部の実施形態では、検出及び数量化は1つ以上のデバイスを利用して、サンプルを2種以上の各タンパク質バイオマーカーのレベルを示すデータに変換する。一部の実施形態では、デバイスは、サンプルをデータに変換するために利用される酵素結合免疫アッセイである。

一部の実施形態では、コントロール集団は、治療プロトコルを投与するのが適切である病気を有する個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、治療プロトコルの投与が不要である個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、該コントロール集団のメンバーの過半数が、治療プロトコルを投与するのが適切なメンバーである個体の集団である。一部の実施形態では、上記集団は不偏集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、抗生物質で治療できる細菌感染症を有する個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、抗生物質が有効でないウイルス感染症を有する個体の集団である。

#### 【0014】

#### 4. 図面の簡単な説明

以下の詳細な説明及び図面を参照して本発明の目的及び特徴をより良く理解することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1A】一実施形態において、マラリアを有すると診断された小児(脳性マラリア(CM)又は重症マラリア貧血(SMA)のどちらかを有すると下位分類できる個体を含めて)及びマラリアを乗り越った小児の血漿から単離したタンパク質バイオマーカーレベルを比較し、マラリアで死亡した小児の血漿から単離したタンパク質バイオマーカーレベルと比べて、2つの表現型群間での統計的有意差を実証する。図1Aは、バイオマーカーAng-2、sICAM-1、sFlt-1、CHI3L1、IP-10、sTie-2、及びPCTの結果を示す。

【図1B】バイオマーカーsTREM-1の結果を示す。<sup>\*</sup>は<0.05のp値でのタンパク質レベルの統計的差異を示す。<sup>\*\*</sup>は<0.01のp値を示す。

【図2A】一実施形態において、致死性マラリアと非致死性マラリアとを区別するために選択したバイオマーカーsICAM-1、sFlt-1、Ang-2、PCT、IP-10、sTREM-1、及びCHI3L19を用いて生成した受信者動作特性(receiver operating characteristic)(ROC)曲線を示す。参照破線は、識別能力のない試験の(ROC)曲線を表す。各グラフにおいて下括弧内に示す9

10

20

30

40

50

5%信頼区間でROC曲線下面積を記している。p値は、\*が $p < 0.05$ 、\*\*が $p < 0.01$ を示している。

【図2 B】一実施形態において、寄生虫血症(parasetimia)診断のみに対する受信者動作特性(ROC)を示す。参照破線は、識別能力のない試験のROC曲線を表す。各グラフにおいて下括弧内に示す95%信頼区間でROC曲線下面積を記している。p値は、\*が $p < 0.05$ を示している。

【図3】一実施形態において、重症マラリア感染症の予後を宿主バイオマーカーで予測するために用いた分類ツリー解析を示し、この解析では、6種のバイオマーカーをCRTに入力し、IP-10、Ang-2、及びsICAM-1を用いた結果として生じるCRTが、決められた通りにカットオフポイントで示されるように帰着した。生存及び死亡の事前確率を特定した(それぞれ94.3%及び5.7%)。解析によって選択されたカットポイントを親ノードと子ノードとの間に示してある。各終端ノード(すなわち、さらに分岐しない)下には、当該ノードにおける全ての患者の予測カテゴリー化を示している。このモデルは死亡率を予測するために100%の感度及び92.5%の特異度をもたらす(標準誤差4.9%で交差検証した誤分類率15.4%)。

【図4 A】一実施形態において、STSSを有するか又は有しない患者の急性及び回復期血漿中のアンジオポエチン-1(Ang-1)及びアンジオポエチン-2(Ang-2)の絶対濃度及びメジアン濃度、並びに両者間の比(常用対数として表したAng-2 : Ang-1)を示す。\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ 。

【図4 B】一実施形態において、病気の急性期におけるSTSSを有する患者を病気の急性期におけるSTSSを有しない患者と比較する、Ang-1、Ang-2及び両者間の比のそれぞれに対する受信者動作特性を示す。

【図5】一実施形態において、侵襲性A群連鎖球菌感染症及びSTSSを有する患者のマッチした急性及び回復期血漿サンプル中のアンジオポエチン-1及びアンジオポエチン-2(Ang-1及びANG-2)濃度、並びに両者間の比(Ang-2 : Ang-1)を示す。

【図6】図6 Aは、一実施形態において、死亡率(%)と入院時に測定したANG-1レベルとの間の関連性を示す棒グラフである。図6 Bは、一実施形態において、血漿Ang-1レベル、MODスコア又は年齢をこれら3つの変数の組み合わせと比較して、28日死亡率を予測する際に付加された感度及び特異度を図解する受信者動作特性(ROC)曲線を示す。

【図7 A】一実施形態において、重症敗血症を有する患者のAng-2レベルと、死亡率の予測因子としてのMODスコアとの比較を示す。

【図7 B】一実施形態において、重症敗血症を有する患者のMODスコアを評価する1日前に行なったAng-2レベルの比較を示す。

【図8 A】一実施形態において、無併発性大腸菌O157:H7感染症を有する小児(感染)、HUSの診断前の小児(pre-HUS)、及び診断時にHUSを示している小児(HUS)におけるアンジオポエチン-1(Ang-1)、アンジオポエチン-2(Ang-2)のレベル及びAng-2 : Ang-1比を示す。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。白丸は外れ値( $1.5 \times$ 四分位範囲[IQR])を表し、黒丸は極端な外れ値( $3 \times$  IQR)を表す。

【図8 B】一実施形態において、無併発性感染症を有する小児及び病気のpre-HUS期を有する小児を比較して、Ang-1、Ang-2及びAng-2 : Ang-1比について受信者動作特性(ROC)を示し、帰無仮説は、Ang-1では曲線下面積が0.5  $p=0.01$ である。

【図9】一実施形態において、バイオマーカーCRP、エンドグリン及びp-セレクチンが、肺炎(胸部x線で確認)を有する小児と、WHOスタンダードに準じた「臨床的」肺炎を有するが、胸部x線基準によれば肺炎を有しないと特徴づけられる小児とを区別する能力を示す表10から、実施例15のモデル1のCRT解析を、以前のバイオマーカーの決定ツリー上に層化するときの各バイオマーカーの増加性利益と同様に示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

5. 詳細な説明

5.1 定義

下記説明で使用する具体的用語について以下に定義を与える。

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「ポリペプチドのアミノ末端領域」は、タンパク質バイオマーカーのポリペプチド配列を指す。本明細書で使用する場合、「アミノ末端領域」は、ポリペプチドのアミノ末端近傍に位置し、長さが3アミノ酸以上かつ長さが350アミノ酸以下であるアミノ酸の連続的、又はほとんど連続的な区間を指す。ポリペプチドの「アミノ末端」領域の他の可能な長さとしては、限定するものではないが、5、10、20、25、50、100及び200アミノ酸が挙げられる。

用語「抗体」は、モノクロナール及びポリクロナール抗体を包含し、抗体の抗原結合断片をも包含する。抗体の用語「抗原結合断片」(又は単に「抗体部分」、又は「抗体断片」)は、本明細書で使用する場合、本発明のバイオマーカーの遺伝子の1つによってコードされたポリペプチドに特異的に結合する能力を保持する全長抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の用語「抗原結合断片」内に包含される結合断片の例としては、(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価断片であるFab断片；(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片；(iii)VH及びCH1ドメインから成るFd断片；(iv)抗体の単一アームのVL及びVHドメインから成るFv断片；(v)VHドメインから成るdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；及び(vi)単離した相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは別々の遺伝子によってコードされるが、組換え法を用いて、VL及びVH領域が対になって一価分子を形成する単一タンパク質鎖(単鎖Fv(scFv)として知られる)と成れるようにする合成リンカーによってそれらのドメインを連結可能である(例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426；及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883参照)。該単鎖抗体は、抗体の用語「抗原結合部位」内に包含されるようにも意図されている。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来技術を用いて得られ、インタクト抗体と同様に有用性についてスクリーニングされる。抗体は単一特異性、例えば、モノクロナール抗体、又はその抗原結合断片であってよい。用語「単一特異的抗体」は、特定標的、例えば、エピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す抗体を指す。この用語は、「モノクロナール抗体」又は本明細書では単一分子組成物の抗体若しくはその断片の製剤を意味する「モノクロナール抗体組成物」を包含する。

#### 【0017】

本明細書で使用する場合、「アレイ」は、担体に固定された一連のタンパク質バイオマーカー、若しくはタンパク質バイオマーカーに相補的な抗体、又はその組み合わせを指す。アレイは、担体に固定されたタンパク質バイオマーカーの断片又は抗体の断片を含むこともでき、この断片は、タンパク質又は抗体断片の、その相補的結合相手への選択的結合をまだ可能にする。

本明細書で使用する場合、「ポリペプチドのカルボキシ末端領域」は、タンパク質バイオマーカーのポリペプチド配列を指す。本明細書で使用する場合、「カルボキシ末端領域」は、ポリペプチドのカルボキシ末端近傍に位置し、長さが3アミノ酸以上かつ長さが350アミノ酸以下であるアミノ酸の連続的、又はほとんど連続的な区間を指す。ポリペプチドの「アミノ末端」領域の他の可能な長さとしては、限定するものではないが、5、10、20、25、50、100及び200アミノ酸が挙げられる。ポリA尾部がタンパク質バイオマーカーに存在する場合、「カルボキシ末端」領域は一般的にポリA尾部を含まない。

#### 【0018】

本明細書で使用する場合、用語「分類指標」は、病気に対する個体の反応に関して少なくとも2つの異なる形質を区別するその能力に基づいて生成された数学モデルを含む。分類指標は、ロジスティック回帰、分類及び/又は回帰ツリー解析、又は他の既知の数学モデルを含むことができ、集団の表現型が分かっている少なくとも2つの集団を用いて生成される。一部の実施形態では、第1集団は病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を示すと確認されたことがあり、第2集団は本明細書の定義どおりのコントロール集団である。そのように生成された分類指標を試験個体のデータと共に使用して、個体に病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症するリスクがあるか、(或いは個体が既に病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症しているか)、否かを示す数値出力を生成するこ

とができる。

本明細書で使用する場合、用語「相補的結合相手」には、タンパク質バイオマーカーに選択的に結合する化合物が含まれ、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー、ペプチ体(peptibody)、ミメティック、インヒビター、並びにin vivoでタンパク質バイオマーカーに結合する任意の化合物、モノクロナール抗体及び/又はポリクロナール抗体を含めた抗体がある。

#### 【0019】

本明細書で使用する場合、用語「コントロール集団」は、試験個体のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせのレベルをコントロール集団のレベルと比較して、試験個体が重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性を決定し、及び/又は反応の予後を予測しなければならないので、試験個体に関連して考慮される。コントロール集団は、陰性コントロール集団又は陽性コントロール集団のどちらでもあり得る。一部の実施形態では、コントロール集団は陰性コントロール集団であり、試験集団は病気と診断されたことがあり、コントロール集団は、試験個体の病気にかかったことがあり、かつ重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがない個体の集団である。一部の実施形態では、試験個体は病気と診断されたことがあり、コントロール集団は正常な個体の集団である。一部の実施形態では、試験個体は病気と診断されたことがあり、コントロール集団は前記病気を有する個体の不偏集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は陽性コントロール集団であり、試験個体は病気と診断されたことがあり、コントロール集団は、該病気にかかったことがあり、かつ重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがある個体の集団である。上記実施形態のいずれにおいても、コントロール集団は不偏集団であってよい。

10

20

#### 【0020】

一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせの有用性は、試験個体の病気の原因又は起源と無関係である。にもかかわらずコントロール集団は陰性コントロール集団又は陽性コントロール集団のどちらでもあり得る。一部の実施形態では、試験個体は、バイオマーカー及び/又はバイオマーカー組み合わせを試験する前に病気と診断及び/又は差別的に診断されたことがない。一部の実施形態では、個体は、試験前に、重篤及び/又は致命的であり得る病気と診断及び/又は差別的に診断されたことがない。一部の実施形態では、コントロール集団は、病気にかかったことがあり、かつ重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがない個体の陰性コントロール集団である。これらの実施形態では、病気は試験個体の病気と同一である必要はない(病気が診断及び/又は差別的に診断されたことがある場合)。一部の実施形態では、コントロール集団のメンバーの誰も試験個体と同じ病気にかかったことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団のメンバーの過半数が試験個体と同じ病気にかかったことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団の20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が試験個体と同じ病気を有しない。さらに他の実施形態では、コントロール集団の20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が試験個体と同じ病気を有する。一部の実施形態では、試験個体は、バイオマーカー及び/又はバイオマーカー組み合わせを試験する前に病気と診断されたことがなく、コントロール集団は、正常な個体の集団である。一部の実施形態では、試験個体は試験前に病気と診断されたことがなく、コントロール集団は、病気にかかったことがあり、かつ前記病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがある個体の陽性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団のメンバーの誰も試験個体と同じ病気にかかったことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団のメンバーの過半数が試験個体と同じ病気にかかったことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団の20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が試験個体と同じ病気を有しない。さらに他の実施形態では、コントロール集団の20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が試験個体と同じ病気を有する。さらに他の実施形態では、コントロール集団のメンバーの誰も、重篤及び/又は致命的な病気と診断及び/又は差別的に診断されたことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団のメンバーの過半数が、重篤及び/又は致命的な病気と診断及び/又は差別的に診断されたことがない。さ

30

40

50

らに他の実施形態では、コントロール集団の20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が、重篤及び／又は致命的な病気と診断及び／又は差別的に診断されたことがない。さらに他の実施形態では、コントロール集団は、重篤及び／又は致命的であり得る病気と診断及び／又は差別的に診断されたことがない個体の集団である。さらに他の実施形態では、コントロール集団は、重篤及び／又は致命的である可能性があるいずれの病気とも診断及び／又は差別的に診断されたことがない個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、被験者と同等である地域又は地理的領域から選択され、重篤及び／又は致命的な病気に関するコントロール集団の状態は、当該地域又は地理的領域に元々ある病気に基づいて決定される。上記実施形態のいずれでも、コントロール集団は不偏集団であってよい。

10

**【0021】**

本明細書で使用する場合、「診断」は、患者病歴、身体検査、症状の精査及び1つ以上の臨床検査データの精査を含み得る1つ以上の因子の評価を通じて関与する状態(疾患及び／又は損傷を含めて)を同定することによって病気の性質及び／又は原因を同定又は決定する行動又はプロセスを指す。

本明細書で使用する場合、「病気と診断された」とは、前記個体が示した症状の1つ以上に関与する薬剤、疾患、又は損傷を同定することによって病気の性質及び／又は原因を確認したこと、並びに／或いは典型的な北米の病院に存在する条件で定義されるように、最適条件下で利用可能な前記病気を診断するために適用すべき最も適切な試験とみなされ、かつ該病気を決定する際に該病院のための「ゴールドスタンダード」試験として採用されている診断試験及び／又はベンチマークを利用したことを意味する。

20

本明細書で使用する場合、「差別的に病気と診断された」とは、病気の性質及び／又は原因が確実に分かっていたら患者が受けたであろう同一の治療を患者が受けることを保証するのに十分に病気の性質及び／又は原因を絞り込んだこと、或いは典型的な北米の病院に存在する条件で定義されるように、最適条件下で利用可能な前記病気を診断するために適用すべき最も適切な試験とみなされ、かつ該病気を決定する際に該病院のための「ゴールドスタンダード」試験として採用されている診断試験及び／又はベンチマークを利用して診断されたことを意味する。

**【0022】**

本明細書で使用する場合、「病気」は、1つの可能な予後として、死亡を含めた重篤及び／又は致命的な予後を有する状態を指す。一部の実施形態では、病気は、内皮細胞機能の障害を包含する。一部の実施形態では、病気は、寄生虫感染症、ウイルス感染症、細菌感染症等の感染症に起因し、及び／又は微生物毒素を含めた生理活性分子に起因するものである。一部の実施形態では、病気は、状態の原因の1つが著しい熱傷又は身体的外傷である状態を含む。他の実施形態では、病気は、炭疽菌等の生物学的脅威作用物質への曝露を包含する。他の実施形態では、病気は、急性肺損傷を引き起こし得る作用物質、例えば煙への曝露を包含する。他の実施形態では、病気は兵器化微生物及び／又は生物学的脅威作用物質に起因する疾患を含むことがあり、一部の実施形態では、伝統的診断手法を用いて診断することができない。例えば、微生物及び／又は生物学的脅威作用物質の病原性因子又は毒素が修飾されて、無害の担体細菌、ウイルス又は他の担体作用物質に挿入されたことがある(トロイの木馬効果(Trojan horse effect))。病気の例としては、限定するものではないが、肺炎及び下気道感染症、インフルエンザ、大腸菌感染症及びその合併症、例えば溶血性尿毒症症候群、菌血症、リケッチア感染症、サルモネラ症、連鎖球菌感染症、ブドウ球菌感染症、マラリア、敗血症、デング熱、ウエストナイルウイルス、毒素性ショック症候群、レプトスピラ症、ウイルス性出血熱を引き起こす作用物質(例えばエボラ、マールブルグ)、及び微生物又は生物学的脅威作用物質、例えば伝統的診断を不明瞭にするように変化したものが挙げられる。

30

40

**【0023】**

「差別的レベル」は、コントロール集団のタンパク質バイオマーカーのレベルと比較するとレベルの統計的有意差を示すタンパク質バイオマーカーレベルを指し、その差が少な

50

くとも10%以上、例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上であるか、或いはタンパク質レベルがコントロール集団のレベルに対して1.5倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍以上である。

「差別的に増加したレベル」は、コントロール集団のタンパク質バイオマーカーのレベルと比較すると統計的に有意なレベル増加を示すタンパク質バイオマーカーレベルを指し、そのレベルの増加が少なくとも10%以上、例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上であるか、或いはコントロール集団のレベルに対して1.5倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍以上のタンパク質レベルの増加である。

「差別的に減少したレベル」は、コントロール集団のタンパク質バイオマーカーのレベルと比較すると統計的に有意なレベル減少を示すタンパク質バイオマーカーレベルを指し、そのレベルの減少が少なくとも10%以上、例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上であるか、或いはコントロール集団のレベルに対して1.5倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍以上のタンパク質レベルの減少である。

10

#### 【0024】

本明細書で使用する場合、「病気に対する個体の反応」は、病気を制御し、及び/又は病気と闘うための資源を獲得する能力を意味し、個体内における病気の過程を決定する。病気に対する個体の反応は、彼らの自然免疫反応及び獲得免疫反応、遺伝的背景、病歴、健康状態、年齢、性別、並びに既存若しくは共存病気及び/又は治療によって影響される。さらに、病気の過程は、病気自体に適用される治療プロトコルによっても影響を受ける。病気に対する個体の反応に影響する特定因子とは無関係に、該反応は当該個体の病気の過程に影響を及ぼす。

20

本明細書で使用する場合、「病気に対する重篤及び/又は致命的な反応」は、該病気を患う個体の不偏集団の死亡リスクと比較して個体の死亡リスクが高いような、病気に対する個体の反応を示す。一部の実施形態では、高い死亡リスクは「有意に高いリスク」であり、病気を有する個体の不偏集団に比べてリスク上昇が50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%以上であることを意味する。

#### 【0025】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチドの内部領域」はタンパク質バイオマーカーのポリペプチド配列を指す。本明細書で使用する場合、「内部領域」は、ポリペプチドの内部領域内に位置するアミノ酸の連続的、又はほとんど連続的な区間を指し、長さが3アミノ酸以上、かつ長さが350アミノ酸以下である。ポリペプチドの「内部」領域の他の可能な長さとしては、限定するものではないが、5、10、20、25、50、100及び200アミノ酸が挙げられる。

30

本明細書で使用する場合、「正常」は、本明細書の定義どおりの病気のいずれの症状をも示したことがない及び/又は病気を有しない個体、個体群、又は個体集団を指す。

本明細書で使用する場合、「患者」又は「個体」はヒトを意味する。

本明細書で使用する場合、「タンパク質バイオマーカー」は、発現され、加工される可能性があり、かつ該タンパク質に選択的に結合する化合物を用いてヒトにおいて測定できるように十分な量で十分な時間存在する、断片を含めたタンパク質の形態を指す。バイオマーカーは、個々に使用可能であり、或いは他のバイオマーカーと併用して、病気に対する個体の反応に関する情報を追加的又は相乗的に提供することができる。本明細書で使用する場合、「タンパク質バイオマーカー断片」は、「ポリペプチドのアミノ末端領域」、「ポリペプチドのカルボキシ末端領域」又は「ポリペプチドの内部ポリペプチド領域」を包含し得る。

40

#### 【0026】

本明細書で使用する場合、タンパク質バイオマーカー及び/又は相補的結合相手(例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体)の文脈における用語「精製された」は、細胞又は組織源に由来する化合物であって、該細胞又は組織源からの細胞物質が実質的になく、一部の実施形態では、該細胞又は組織源からの異種作用物質(すなわち、混入タンパク質)が実質的にないか、或いは化合物が化学的に合成されたときは、化学的前駆

50

物質又は他の化学物質が実質的にない化合物を指す。「実質的に細胞物質がない」という表現は、細胞から単離又は組換え生成されたタンパク質が該細胞の細胞成分から分離されている、タンパク質の製剤を含める。従って、実質的に細胞物質がない化合物は、約30%、20%、10%、又は5%未満(乾燥質量で)の異種タンパク質(例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、又は抗体；「混入タンパク質」とも呼ばれる)を有する化合物の製剤を含める。化合物が組換え生成されるとき、該化合物は好ましくは培地も実質的にない。すなわち、培地はタンパク質製剤の体積の約20%、10%、又は5%未満を占める。化合物が化学合成によって生成されるとき、化合物は化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないのが好ましい。すなわち、化合物は、化合物の合成に關与する化学的前駆体又は他の化学物質から分離されている。従って、化合物の該製剤は、約30%、20%、10%、5%未満(乾燥質量で)の化学前駆体又は興味ある化合物以外の化学物を有する。 10

#### 【0027】

本明細書で使用する場合、用語「選択的に結合する」とは、タンパク質バイオマーカーと、特異的様式で、かつ他のタンパク質に対して優先的にタンパク質バイオマーカーと相互作用できる相補的結合相手との間の特異的相互作用を指す。タンパク質バイオマーカーと相補的結合相手の選択的結合には、抗体とタンパク質バイオマーカーの特異的相互作用、例えば非特異的結合に比べて優先的なモノクロナール抗体及び/又はポリクロナール抗体のタンパク質バイオマーカーへの結合が含まれる。選択的結合は、タンパク質バイオマーカーと核酸又はペプチドアプタマー、ペプチド体等との結合をも包含し得る。例えば、第1タンパク質分子の領域、部分又は構造が、第2タンパク質分子の領域、部分又は構造を、非特異的タンパク質の結合に優先して認識してそれに結合する。「選択的結合」は、本明細書で使用する場合、分子が非特異的分子と結合するより少なくとも2倍、好ましくは少なくとも10倍、20倍、50倍、100倍以上高い親和性でその特異的結合相手と結合することを意味する。 20

本明細書で使用する場合、用語「疑われる病気」は、診断及び/又は差別的に診断されたことがない病気を意味する。

#### 【0028】

本明細書で使用する場合、用語「療法プロトコル」又は「治療プロトコル」は、伝統的診断、差別的診断、症状の同定の結果として及び/又は本発明のタンパク質バイオマーカーの使用の結果として個体が受ける、また受け得る治療及び/又はモニタリング戦略を指し、1以上の薬物療法又は戦略、医療モニタリング(看護増加、病院若しくはクリニックへの入院、集中治療室への入院、及び/又はその組み合わせを含み得る)の適用を包含し得る。 30

本明細書で使用する場合、「不偏集団」とは、特定病気を有するが、該特定病気に対する反応の1つ以上の既知リスク因子(例えば、年齢、性別、存在する併存症等)に基づいて前選択されたことがない個体の集団を意味する。

本明細書で使用する場合、「複数の」又は「一連の」は、例えば、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上等を意味する。

本明細書で使用する場合、用語「治療する」、「治療」及び「治療すること」は、病気のエピソード及び/又は症状の進行、重症度及び/又は持続期間の低減又は改善を意味する。 40

#### 【0029】

### 5.2 詳細な要約

我々は、それぞれ明確に異なる病因論にもかかわらず、共通して重篤及び/又は致命的な段階に進行する可能性がある種々の病気を精査した。これらの病気間の別の共有性は、適正に診断されているにもかかわらず、全ての個体が病気の重篤及び/又は致命的な形態に進行するとは限らないという事実である。病気に対する個体の反応は疾患進行に重要な役割を果たすことは知られているが、一度病気が診断されたことがあるにしても、個体が重篤及び/又は致命的な反応を示すと正確に予測することは困難だった。我々は、驚くべきことに、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を示さないであろう個体でバイオマ 50

ーカーが見られるのとは異なるレベルで病気の重篤及び/又は致命的な段階に進行する個体の血液中で循環していることが見られる特定のタンパク質バイオマーカーの多くが上皮細胞活性化及び/又は炎症に關与することを同定した。これらのバイオマーカーは多くの場合、病気の非常に早期段階でさえ、多くの場合疾患の重症度の他の既知指標を測定できる前に異なるレベルで見られる。さらに驚くべきことに、我々は、これらのバイオマーカーが多様な群の病気にわたって有用性を有することを見出し、これらのバイオマーカーは、個体がまだ特定病気と診断又は差別的に診断されていない場合でさえ有用性があり、これらのバイオマーカーの適用を特に下記：診断が不可能あるか(例えば同定を妨げると指摘されている兵器化微生物又は生物学的脅威作用物質の場合)、診断に費用がかかり過ぎる可能性があるか(例えば、発展途上世界において)、診断が適切な治療を遅らせる恐れがあるか、又は診断が治療の過多をもたらす状況で有益なものにすることを示唆している。そのようなものとして、我々は、個体が有効に病気に反応できないという指標及び病気の重篤及び/又は致命的な段階に進行するという指標を早期に呈するタンパク質を同定した。これらのタンパク質は、該多様な疾患にわたって差別的に見られるので、それらを利用しない場合よりタイムリーかつ費用効率の良い治療介入を可能にする診断を先験的に使用できる能力を有する。

10

本発明の実施は、当技術のスキルの範囲内であるタンパク質化学及び分子生物学の従来技術を部分的に利用する。該技術は文献に完全に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Harnes & S.J. Higgins, eds., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, 1984); and a series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Short Protocols In Molecular Biology*, (Ausubel et al., ed., 1995を参照されたい。上記及び下記の本明細書で言及する全ての特許、特許出願、及び出版物は、参照することによりそれらの全体がここに組み込まれる。

20

【0030】

### 5.3 コントロール及び試験サンプル

一部の実施形態において、必要なのは一滴の血液だけである。この一滴の血液は、例えば、単に針で刺すことから得ることができる。一部の実施形態では、表1中の遺伝子の1、2、3、4、5、6、7種以上の発現を検出するのに十分な任意量の血液を採取する。一部の実施形態では、採取する血液の量は1ul以下、0.5ul以下、0.1ul以下、又は0.01ul以下である。一部の実施形態では、より多くの血液が利用可能であり、一部の実施形態では、より多くの血液を用いて本発明の方法を達成することができる。そのようなものとして、種々の具体的実施形態では、0.001ml、0.005ml、0.01ml、0.05ml、0.1ml、0.15ml、0.2ml、0.25ml、0.5ml、0.75ml、1ml、1.5ml、2ml、3ml、4ml、5ml、10ml、15ml以上の血液を対象から採取する。別の実施形態では、0.001ml~15ml、0.01ml~10ml、0.1ml~10ml、0.1ml~5ml、1~5mlの血液を対象から採取する。

30

一部の実施形態では、全血を利用する。本発明の一部の実施形態では、対象から採取した全血を分画(すなわち、成分に分離)し、特定画分のみを利用する。一部の実施形態では、血清のみを使用する。血清は、凝固させた血液の液体画分を単離することによって残留血液サンプルから分離される。一部の実施形態では、血漿サンプルを使用する。この場合、血液をEDTA、クエン酸ナトリウム(緩衝化又は非緩衝化を含めて)、ヘパリン等の抗凝固剤で前処理し、収集した上清を利用する。一部の実施形態では、血液をフィコール・ハイパック(Pharmacia)勾配遠心分離に供し、末梢血単核細胞(PBMC)を用いる。技術上周知の他の画分及び/又は分画法を使用してもよく、例えば、蛍光活性化セルソーター(FACS)(例えばKamarch, 1987, *Methods Enzymol* 151:150-165)を用いて血液細胞を選別することができる。

40

【0031】

### 5.4 バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

表1は、個々に又は組み合わせでバイオマーカーとして有用なタンパク質のリストを提

50

供する。

バイオマーカーを用いて、病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を発症することに関する個体の状態を決定することができる。場合によってはバイオマーカーは、個体が病気に対する重篤及び／又は致命的な反応を有する可能性の評価を助ける際に個々に役立つ。場合によってはバイオマーカーは、個体の重篤及び／又は致命的な反応のリスクが有意に高いかどうかの評価を助ける際に役立つ。さらに他の場合には、バイオマーカーは、個体の重篤及び／又は致命的な反応のリスクが有意に高くないかどうかの評価を助ける際に役立つ。さらに他の場合には、バイオマーカーは、適切な治療プロトコルを決定する際に役立つ。さらに他の場合には、バイオマーカーは、重篤及び／又は致命的な反応の有意に高いリスクを有する個体への治療プロトコルの影響を評価する際に役立つ。場合によっては、バイオマーカーは、個体が重篤及び／又は致命的な反応の改善を示す可能性を決定する際に役立つ。バイオマーカーの多くは、上皮細胞活性化及び血管漏出、血管新生、血栓症、及び炎症で役割を果たすので、重篤及び／又は致命的な病気の早期指標として役立つと考えられる。

【 0 0 3 2 】

表1

タンパク質名	記号/代替記号	
補体断片 C5a	C5a	
アンジオポエチン-1	Ang-1	
アンジオポエチン-2	Ang-2	
10kDのインターフェロン $\gamma$ 誘導タンパク質	IP-10	10
可溶性細胞内接着剤分子-1	sICAM-1	
血管内皮成長因子A	VEGF	
可溶性Fms様チロシンキナーゼ受容体-1(可溶性VEGFR1-血管内皮成長因子受容体1としても知られる)	sFlt-1	20
キチナーゼ3様タンパク質1	CHI3L1	
骨髄系細胞-1に発現する可溶性誘発性受容体	sTREM-1	
C反応性タンパク質	CRP	
プロカルシトニン	PCT	
アンジオポエチン様タンパク3	Ang様3; Ang-3様1; Ang3L1	30
補体D因子	D因子	
インターロイキン18結合タンパク質	IL18bp; IL18bpa	
エンドグリン	End; エンドグリン	
p-セレクチン	P-sel; Pセレクチン;	40
上皮細胞可溶性Tie-2受容体	sTie 2;	
フォンビルブランド因子	vWF	

## 【 0 0 3 3 】

本発明のバイオマーカーの組み合わせには、表1に列挙した使用可能なバイオマーカーの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、又は全てのいずれの組み合わせも含まれる。例えば、上表1中のn個のタンパク質の部分集合mの可能な組み合わせの数は、下記一般式：

$m!/(n)!(m-n)!$

を用いてFeller, Intro to Probability Theory, Third Edition, volume 1, 1968, ed. J. Wileyに記載されている。

$n$ が2であり、 $m$ が14である、本発明の一実施形態では、表1から選択されるタンパク質の組み合わせの数は以下のとおりである：

$$\frac{14!}{2!(14-2)!} = \frac{14 \times 13 \times 12 \times 11 \times 10 \times 9 \times 8 \times 7 \times 6 \times 5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1}{(2 \times 1)(12 \times 11 \times 10 \times 9 \times 8 \times 7 \times 6 \times 5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1)}$$

$$= 91$$

ユニークな二遺伝子組み合わせ。

【0034】

$n$ が2であり、 $m$ が18である、本発明の別の実施形態では、表1から選択されるタンパク質の組み合わせの数は以下のとおりである：

$$\frac{18!}{2!(18-2)!} = \frac{18 \times 17 \times 16 \times 15 \times 14 \times 13 \times 12 \times 11 \times 10 \times 9 \times 8 \times 7 \times 6 \times 5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1}{(2 \times 1)(16 \times 15 \times 14 \times 13 \times 12 \times 11 \times 10 \times 9 \times 8 \times 7 \times 6 \times 5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1)}$$

$$= 153$$

相加様式で、これらの各二遺伝子組み合わせの遺伝子発現の測定を本明細書に述べるように使用することができる。別の実施形態では、 $14!/3!(14-3)!$ 、すなわち364のユニークな三遺伝子組み合わせがあり、相加様式で、これらの各三遺伝子組み合わせの測定を本明細書に述べるように使用することができる。

【0035】

## 5.5 バイオマーカー数量化

多くの場合、最初に、当業者に周知の技術を用いて、数量化すべきタンパク質バイオマーカーをサンプルから単離する。タンパク質単離方法は、例えば、Harlow and Lane (Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988))に記載されている方法であってよい。

サンプル中のバイオマーカーの量又はレベルの検出は、前記サンプル中で直接、或いは例えば密度勾配遠心分離、超遠心分離、濃縮、透析、クロマトグラフィー、沈降、電気泳動、流れ調製(flow preparation)電気泳動、選択的分染法等の当分野で既知の1つ以上の技術を用いて抽出タンパク質をさらに単離又は精製すると起こり得る。血液を含め、サンプルからタンパク質を精製するための市販製品も技術上周知であり、例えばQiagen(登録商標)のAllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit、及びMolecular Research Centre's (MRC(登録商標)) Tri-Reagent(登録商標) BD-RNA/DNA Protein Isolation Blood Derivativeが挙げられる。

【0036】

ウエスタンブロット法と併用する可能性があるドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)等の該標準的技術を用いた精製又は部分精製によってサンプルのタンパク質バイオマーカーを区別することもできる。タンパク質バイオマーカーの量は、当分野で既知の技術を用いて決定可能である。該レベルの決定に有用な方法としては、限定するものではないが、ウエスタンブロット、タンパク質マイクロアレイ、及び酵素結合免疫吸着アッセイ(「ELISA」)等が挙げられる。タンパク質バイオマーカーの存在を測定するいくつかの異なるタイプの他の有用なアッセイは技術上周知である。免疫アッセイは均一であってよく、すなわち単相で行なわれ、或いは不均一であってよく、この場合は抗原又は抗体を不溶性固形担体上に結合させてアッセイが行なわれる。サンドイッチ又は競合アッセイを行なってよい。同時又は逐次的に反応工程を行なってよい。許容限界アッセイを行なうことができ、この場合はアッセイを行なう前に捕獲試薬を用いてサンプルから所定量の分析物を除去し、特定濃度より高い分析物レベルのみを検出する。アッセイ形式としては、限定するものではないが、例えば、試験管、ウェル内又は免疫クロマトグラフィー試験片、及び尿試験紙(dipstick)上で行なうアッセイ、側方流動又は移動形式免疫アッセイが挙げられる。該例は、サンプル中のタンパク質バイオマーカーのレベルを

10

20

30

40

50

決定する可能性のある手段を限定する意図ではない。

【0037】

タンパク質バイオマーカーを検出するための作用物質は、興味あるタンパク質に結合できる相補的結合相手を利用し得る。適切な相補的結合相手としては、*in vivo*若しくは*in vitro*でタンパク質バイオマーカーと特異的相互作用を有することが分かっている核酸アプタマー、ペプチドアプタマー、ペプチ体、ミメティック、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体又は他の任意のタンパク質若しくは核酸、又はその断片が挙げられる。

抗体を含め、相補的結合相手は、磁性化合物、常磁性化合物、他のタンパク質、例えばアビジン及び/又はビオチン、核酸、抗体断片、又はその組み合わせ等の非限定物質に結合させ、並びに/或いは例えばガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース、変性セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩、及びマグネタイトNPV膜、プラスチック、例えば尿試験紙として使用することを意図した支持体又はマイクロアレイに有用な支持体等を含めた検出を可能にするのに適した表面の上に配置させることができる。

タンパク質バイオマーカーの数量化に用いる1種以上の相補的結合相手は、検出可能標識に動作可能に連結する(共有結合又は非共有結合のどちらかによって結合させる)ことができる。前記検出可能標識を相補的結合相手に連結するための方法は技術上周知である(例えば、Wong, S. S., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press 1991; Burkhardt et al., *The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts*, John Wiley & Sons Inc., New York City, N.Y., 1999参照)。

【0038】

有用な標識としては、限定するものではないが、フルオロフォア(例えば、フルオレセイン(FITC)、フィコエリトリン、ローダミン)、化学色素、蛍光色素又は放射性、化学発光性、磁性、常磁性、プロマグネティック(promagnetic)である化合物、或いは着色性、化学発光性、又は磁性であってよい産物を生じさせる酵素が挙げられる。シグナルは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的手段を含めたいずれの適切な手段によっても検出可能である。ある場合には、シグナルは2つ以上の手段によって検出可能である。

全てのタンパク質バイオマーカーは血液から容易に精製され、直ちにこれを用いて技術上周知の抗体産生の伝統的技術によりモノクロナール抗体及び/又はポリクロナール抗体を作り出すことができる。モノクロナール抗体は、例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)に記載されている方法のようなハイブリドーマ法を用いて調製可能であり、或いは組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製可能である。また、Goding, *Monoclonal Antibodies Principles and Practise*, (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63をも参照されたい。

タンパク質バイオマーカーを検出するために役立つ可能性のある相補的結合相手として使用されているか又は利用可能なことが分かっているモノクロナール及び/又はポリクロナール抗体を下表2に開示する。

【0039】

決定する可能性のある手段を限定する意図ではない。

表2

タンパク質名	タンパク質 記号	市販抗体 リファレンス
補体断片 C5a	C5a	Abcam(登録商標) ab11878
アンジオポエチン-1	Ang-1	Abcam(登録商標) ab8451
アンジオポエチン-2	Ang-2	Abcam(登録商標) ab8452
10 kDaインターフェロン $\gamma$ 誘導タンパク質	IP-10	Abcam(登録商標) ab8098
可溶性細胞内接着剤分子-1	sICAM-1	R&D Systems(登録商標) Mab720
血管内皮成長 因子 A	VEGF	Abcam(登録商標) Ab46154
可溶性血管内皮 成長因子受容体1	sFlt-1	R&D Systems(登録商標) Mab321
キチナーゼ3様 タンパク質1	CHI3L1	Abcam(登録商標) Ab93034
骨髄系細胞-1に発現する可 溶性 誘発性受容体	sTREM-1	Abcam(登録商標) Ab93717
C反応性 タンパク質	CRP	Abcam(登録商標) Ab76434
プロカルシトニン	PCT	Abcam(登録商標) Ab53897
アンジオポエチン様タンパ ク質3	Ang様3	R&D Systems(登録商標) MAb38291
補体D因子	D因子	R&D Systems(登録商標) Mab1824

10

20

30

40

インターロイキン18結合タンパク質	IL18bpa	Abcam(登録商標) Ab52914
エンドグリン	END	R&D Systems(登録商標) Mab13201
P-セレクチン	Psel	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-8419
上皮細胞可溶性Tie-2受容体	sTie 2	Abcam(登録商標) Ab10349
フォンビルブランド因子	vWF	Santa Cruz Biotechnology In. sc-365712

10

## 【 0 0 4 0 】

## 5.6 バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせの使用

ここに開示するように、1種以上のバイオマーカー又はバイオマーカー組み合わせを用いて、試験個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するか又は有しない可能性を決定することができる。一態様では、試験個体は、バイオマーカー又はバイオマーカー組み合わせの使用前に診断又は差別的に診断されたことがある。別の態様では、試験個体は、バイオマーカー又はバイオマーカー組み合わせの使用前に診断又は差別的に診断されたことがない。他の態様では、試験個体は、病気を有することを示す1つ以上の症状で診断されたことがあるが、病気の起源若しくは原因、及び/又は適切な治療はバイオマーカー又はバイオマーカー組み合わせの使用前に未知のままである。

20

一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは、試験個体の重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが高いことを決定する。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは、試験個体の重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが低いことを決定する。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは、試験個体の重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが有意に高いことを決定する。一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせは、試験個体の重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが有意に低いことを決定する。高いリスク又は低いリスクはコントロール集団と比較する。一部の実施形態では、コントロール集団は、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応の高いリスクを有しない個体の陰性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応の高いリスクを有する個体の陽性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体の病気にかかったことがあり、かつ重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがない個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は正常な個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有する個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、病気にかかったことがあり、かつ重篤及び/又は致命的な反応を発症したことがある個体の集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、重篤及び/又は致命的であり得るいずれの病気をも有すると診断又は差別的に診断されたことがない個体の集団である。一部の実施形態では、集団は、上記いずれに関しても不偏である。

30

40

## 【 0 0 4 1 】

一部の実施形態では、バイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせを用いて、試験個体が特定治療プロトコルから利益を得るであろうと決定することができる。一部の実施形態では、試験個体は、治療プロトコルが保証されている病気を有すると診断又は差別的に

50

診断されないが、それにもかかわらずバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせを用いて試験個体が該治療プロトコルの適用から利益を得るであろうという高い可能性がある」と決定することができる。一部の実施形態では、試験個体は、治療プロトコルが保証されている病気を有すると診断又は差別的に診断されないが、それにもかかわらずバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせを用いて試験個体が該治療プロトコルの適用から利益を得ないであろうという高い可能性がある」と決定することができる。一部の実施形態では、コントロール集団は、該治療プロトコルから利益を得ないであろう病気を有する個体の陰性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、該治療プロトコルから利益を得るであろう病気を有する個体の陽性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と同じ病気を有する個体の陽性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、試験個体と異なる病気を有するが、それにもかかわらず該治療プロトコルから利益を得るであろう病気を有する個体の陽性コントロール集団である。一部の実施形態では、コントロール集団は、該治療プロトコルから利益を得ないであろう病気を有する個体の陰性コントロール集団である。

10

20

30

40

50

**【 0 0 4 2 】**

個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性を決定するために、サンプル中の表1の1種以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化し、コントロール集団の前記1種以上のタンパク質バイオマーカーの数量化コントロールレベルと比較する。重篤及び/又は致命的な病気に有効な治療プロトコルの適用から個体が利益を得る可能性を決定するために、サンプル中の表1の1種以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを検出及び数量化し、コントロール集団の前記1種以上のタンパク質バイオマーカーの数量化コントロールレベルと比較する。

**【 0 0 4 3 】**

試験個体のタンパク質バイオマーカーのレベルがコントロール集団のタンパク質バイオマーカーのレベルと有意に異なる(有意に異なるとは、統計的有意差を意味する)場合のそれぞれ個々のタンパク質バイオマーカーは、試験個体が、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応にコントロール集団とは異なる反応を有する可能性があるという決定に役立つ。一部の実施形態では、単一バイオマーカーによる結果が、試験個体の病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが高いか又は低いと決定するのに十分であり得る。単一バイオマーカーが、試験個体の病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するリスクが高いか又は低いと決定するのに十分であるかどうかは、試験結果の望ましい感度及び/又は特異度によって決まる。一部の実施形態では、感度が51%より高く、かつ特異度が51%より高いと十分であろう。他の実施形態では、試験結果の感度が55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高くなければならず、或いは100%でなければならない。一部の実施形態では、試験結果の特異度が55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%より高くなければならず、或いは100%でなければならない。

**【 0 0 4 4 】**

一部の実施形態では、試験結果の望ましい感度及び/又は特異度を達成するために、2種以上のバイオマーカー、3種以上のバイオマーカー、4種以上のバイオマーカー、5種以上のバイオマーカー、6種以上のバイオマーカー、7種以上のバイオマーカー、8種以上のバイオマーカー、9種以上のバイオマーカー、10種以上のバイオマーカー、11種以上のバイオマーカー、12種以上のバイオマーカー、13種以上のバイオマーカー、14種以上のバイオマーカー、15種以上のバイオマーカー、16種以上のバイオマーカー、17種以上のバイオマーカー、又は全てのバイオマーカーを組み合わせ使用しなければならない。

一部の実施形態では、前記2種以上のバイオマーカー、3種以上のバイオマーカー、4種以上のバイオマーカー、5種以上のバイオマーカー、6種以上のバイオマーカー、7種以上のバイオマーカー、8種以上のバイオマーカー、9種以上のバイオマーカー、10種以上のバイオマーカー、11種以上のバイオマーカー、12種以上のバイオマーカー、13種以上のバイオマーカー、14種以上のバイオマーカー、15種以上のバイオマーカー、16種以上のバイオ

マーカー、17種以上のバイオマーカー、又は全てのバイオマーカーのそれぞれに等しく加重値を与えて、試験個体の状態に関する決定を下す。

一部の実施形態では、望ましい感度及び/又は特異度を達成するために、組み合わせた前記バイオマーカーのそれぞれに少なくとも2つの集団を用いて分類指標により決定されるように差別的に加重値を与えてよく、この場合、少なくとも1つの集団は病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有すると予め決定されており、かつ少なくとも1つの集団は病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有しないと予め決定されている。

一部の実施形態では、数理モデルとしてロジスティック回帰分析を用いて分類指標を構築する。他の実施形態では、分類及び/又は回帰ツリー解析を使用する。

【0045】

## 5.7 キット

本発明は、本発明のタンパク質バイオマーカーの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、又は任意若しくは全ての組み合わせのレベルを測定するためのキットを提供する。該キットは、該タンパク質バイオマーカーのレベルの測定に必要な物質及び試薬を含む。そのようなものとして、キットは、前記組み合わせの前記バイオマーカーのレベルを測定するための1種以上の相補的結合タンパク質を提供する。

一部の実施形態では、相補的結合タンパク質はモノクロナール抗体であり、キットは、測定すべき各バイオマーカーに特異的に結合する抗体を含む。キットは、さらに種々の方法で利用される1種以上の追加試薬、例えば(1)前記キットの相補的結合タンパク質と結合できる1種以上の標識抗体又は非標識抗体(例えば抗マウス抗体(1)標識試薬);(2)1種以上の緩衝媒体、例えば、ハイブリダイゼーション及び洗浄緩衝液;(3)タンパク質精製試薬;(4)シグナル生成及び検出試薬、例えばストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ複合体、化学蛍光又は化学発光基質等を含んでよい。特定の実施形態では、キットは、コントロールとして使用するための前標識品質管理タンパク質を含む。

一部の実施形態では、抗体に基づくキットは、例えば下記:(1)(支持体に付着し、又は付着していなくてよい)特異的タンパク質バイオマーカーに結合する少なくとも1種の一次抗体;(2)タンパク質バイオマーカー、又は一次抗体のどちらかに結合する異なる抗体であって、検出可能標識(例えば、蛍光標識、放射性同位元素又は酵素)に結合している二次抗体を含むことができる。抗体に基づくキットは、免疫沈降を行なうためのビーズを含んでもよい。抗体に基づくキットの各成分は一般的にそれ自体に適した容器の中にある。従って、これらのキットは一般的に各抗体に適した別個の容器を含む。さらに、抗体に基づくキットは、アッセイを実施するため並びにアッセイの実施の結果生じるデータを解釈及び分析する方法のための説明書を含んでよい。特定の実施形態では、キットは、個体の病気に対する重篤及び/又は致命的な反応のリスクが高い可能性を決定するための説明書を含む。

【実施例】

【0046】

## 5.8 実施例

実施例1 前診断されたマラリアの予後を予測する個々のバイオマーカー

病気としてマラリアを患う小児を研究しているカンパラのMulago病院で後向きケース・コントロール研究を行なった。顕微鏡分析により熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)感染の存在を検出することによって診断を確認したマラリアの臨床徴候及び症状を呈する6カ月~12歳の年齢の小児を登録して利用した。鎌状赤血球形質/疾患、HIV同時感染又は重症の栄養障害等の併存症を患う小児は除外した。保存血漿サンプルを用いて、診断は脳性マラリア(CM)又は重症マラリア貧血(SMA)(両方とも致命的疾患に進行する恐れがある病気)と確認された約100名のウガンダの小児からの血漿中の種々のタンパク質バイオマーカーを単離及び測定した。保存血漿サンプルにおける特異的タンパク質バイオマーカーの各選択品のレベルを測定し、死亡した小児のこれらのタンパク質バイオマーカーのレベルと比

10

20

30

40

50

べてマラリアを乗り切ったことが分かった小児との間で比較した。

【0047】

クエン酸ナトリウム抗凝固剤で処理した後の全血から血漿サンプルを単離し、試験前は-20 で貯蔵した。ELISAを用いて前記サンプル中の可能性のある種々のタンパク質バイオマーカー、例えばAng-2、CRP、sTREM-1、IP-10、sFlt-1、sICAM-1、及びPCT等のレベルを数量化した。製造業者の説明書に従い、以下の変更を加えてELISAを行なった：50 µl/ウェルの体積でアッセイを行ない；血漿サンプルを4 で一晩インキュベートし；及びExtra avidin(登録商標)-アルカリ性ホスファターゼ(Sigma、1:1000希釈、45分のインキュベーション)を用いて次にp-ニトロフェニルリン酸基質(Sigma)を添加してELISAを展開し、405nmで光学密度を解読した。テトラメチルベンジリデンでアッセイを展開し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、450nmで解読した。検出限界未満の濃度を有するサンプルは背景レベルの2倍と指定した。各プレートに含まれるブランクウェル(サンプルの代わりにアッセイ緩衝液を添加した)から背景シグナルを決定し、分析前の全てのサンプル及び標準物質から背景光学密度を減算した。最低検出可能標準物質未満の光学密度を有するサンプルには当該標準物質の値を割り当てた。

10

解析のためにはGraphPad Prism v4、SPSS v18、及びMedCalcソフトウェアを用いた。臨床及び人口統計変数については、群間の差をカイ二乗検定(カテゴリー変数)又はクラスカル・ワリス検定とダネット多重比較事後検定(連続変数)を用いて評価した。マン・ホイットニーのU検定を用いて群間のバイオマーカーレベルを比較し、多重比較についてはホルム補正を用いてp値を補正した。

20

【0048】

マラリアが原因で死亡した小児と比べてマラリアを乗り切った小児との間でタンパク質バイオマーカーのレベルを比較し、図1Aに示すメジアンを用いてドットプロットとして表す。図1Bは、バイオマーカーsTREM-1について同集団に関する結果を示し、ドットプロットは、生き延びたか又は死亡した個体を分類する。2つの集団間のレベルの差の統計的有意性を決定するための各比較ではマン・ホイットニーのU検定を行ない、図1A、1Bに2つの集団間の統計的有意差を示す当該バイオマーカーを\* (p<0.05)又は\*\* (p<0.01)で示してある。この小さいサンプルサイズ内では、sTie-2は統計的有意性に到達しなかった。それにもかかわらず、sTie-2間の密接な相互作用(Ang-2に対する受容体として)、Ang-2が統計的に有意な反応を示したという事実、及びsTie-2について見られる差別的傾向を考えると(統計的有意性に到達しないにもかかわらず)、我々は、このバイオマーカーは、もっと多くの数のサンプル集団で試験したときには有用性を示すであろうと合理的に予測する。

30

【0049】

DeLongら(DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL (1988) 2つ以上の補正受信者動作特性曲線下面積の比較：ノンパラメトリック手法(Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach.) Biometrics 44:837-845)の方法を用いて受信者動作特性曲線を生成した。図2Aに、バイオマーカーsICAM-1、sFlt-1、Ang-2、PCT、IP-10、及びsTREM-1についてデータを示す。当然のことながら、ROC曲線下面積は、各バイオマーカーが個体の死亡する可能性と死亡しない可能性とを区別する能力を示す。識別能力を持たない試験のROC曲線を参照破線で示してある。ROC曲線下面積が記述され、\*p<0.05又は\*\*p<0.01のどちらかとして統計的有意性を示してある。括弧内は曲線下面積の95%信頼区間である。図2Bは、現在マラリアに対する個体の反応を評価するために頼っている寄生虫血症のROC曲線を示す。寄生虫血症は、血中の寄生虫の定量的含量を予測し、生物内の寄生虫負荷の測定値として、また活発な寄生虫感染の度合の指標として用いられる。明らかのように、記述した各バイオマーカーは、現在利用されている寄生虫血症指標よりも死を予測するのに優れている。

40

バイオマーカーをさらに評価するために、ヨーデン指数を用いて各バイオマーカーについてカットポイント、及びこれらの二分バイオマーカーについて評価した臨床性能尺度を得た(表3)。表3に提示した全てのパラメーターは、括弧内に示す95%信頼区間を与えられている。ヨーデン指数を用いて全てのカットポイントを決定した(J-max[感度+特異度-1

50

)]。各バイオマーカーについて陽性尤度比PLR、陰性尤度比NLR、陽性予測値PPV、及び陰性予測値NPVを示す。PPV及びNPVは、Mulago病院で5.7%のCM及びSMA診断患者がマラリア感染症で死亡したという推定に基づいた。sTREM-1は最高の感度(95.7%)を達成したが、低い特異度(43.8%)を有した。一方でIP-10は最高の全体的精度(82.6%の感度、85%の特異度)で死亡を予測した。

【 0 0 5 0 】

表3 重症マラリアを有する小児間で死亡率を予測するためのバイオマーカーの臨床性能

	カット ポイント	感度 (%)	特異度 (%)	PLR	NLR	PPV (%)	NPV (%)
Ang-2	>5.6ng/ml	78.3 (56.3-92.5)	78.8 (68.2-87.1)	3.7 (2.9-4.7)	0.3 (0.1-0.7)	18.2 (5.8-38.7)	98.4 (92.4-99.9)
sICAM	>645.3ng/ ml	87.0 (66.4-97.2)	75.0 (64.1-84.0)	3.5 (2.8-4.3)	0.2 (0.06-0.5)	17.4 (5.9-35.9)	99.0 (93.2-100)
sFlt-1	>1066.3pg/ /ml	82.6 (61.2-95.0)	57.5 (45.9-68.5)	1.9 (1.5-2.5)	0.3 (0.1-0.8)	10.5 (3.4-23.1)	98.2 (90.4-100)
PCT	>43.1ng/ ml	56.5 (34.5-76.8)	82.5 (72.4-90.1)	3.2 (2.2-4.7)	0.5 (0.3-1.0)	16.3 (3.8-39.5)	96.9 (90.5-99.5)
IP-10	>831.2pg/ ml	82.6 (61.2-95.0)	85.0 (75.3-92.0)	5.5 (4.5-6.8)	0.2 (0.07-0.6)	25 (8.3-49.8)	98.8 (93.4-100)
sTREM-1	>289.9pg/ ml	95.7 (78.1-99.9)	43.8 (32.7-55.3)	1.7 (1.3-2.2)	0.1 (0.01-0.7)	9.3 (3.3-19.6)	99.4 (90.5-100)

【 0 0 5 1 】

実施例2 前診断マラリアにおける死亡率を予測するバイオマーカー組み合わせ

実施例1で述べたようにデータを得た。バイオマーカー組み合わせの使用は、マラリアにおける個体の致命的な反応の可能性を予測する能力を改善した。この実施例では、多変量ロジスティック回帰分析を用いて2~3より多くの独立変量で分類指標を生成して、研究における中程度の数の死亡を防止した(Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB (1996) 多変量ロジスティックモデル：モデル開発、仮説及び妥当性の評価、並びに測定及び誤差低減における問題(Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors.) Stat Med 15: 361-387)。従って、他の条件で行なったように(Morrow DA, Braunwald E (2003) 急性冠症候群におけるバイオマーカーの将来：マルチマーカー戦略への移行(Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy.) Circulation 108:250-252; Vinueza CA, Chauhan SP, Barker L, Hendrix NW, Scardo JA (2000) 単純スコアリングシステムを用いた労働トライアル成功の予測(Predicting the success of a trial of labor with a simple scoring system.) J Reprod Med 45:332-336)、6種

のバイオマーカーを組み合わせで(Ang-2、sICAM-1、sFlt-1、PCT、IP-10及びTREM-1)、単一スコアにした。各マーカーについて、測定値が対応カットポイントより大きければワンポイントを割り当て、それが低くければゼロポイントを割り当てた。各患者について6種全てのマーカーのポイントを合計することによって、累積「バイオマーカースコア」を計算した。2種の二分バイオマーカーは高度に相関しなかった(スピアマンの $\rho < 0.6$ ; データ示さず)。相関しないバイオマーカーは、単一バイオマーカーのみと比べてバイオマーカーがそれぞれ新しい情報を加えることを示すので、各バイオマーカーはスコアに一意的な情報を与えるであろうことを示唆している。

バイオマーカースコアは、死亡のリスクと高度に正に相関した(データ示さず: スピアマンの $\rho = 0.96$ ,  $p = 0.0031$ )。スコアは生存者に比べて死亡者間で上昇した(メジアン(四分位範囲)): それぞれ、5(4 - 6)及び1(0 - 2.5)、データ示さず。

単変量ロジスティック回帰モデルでは、バイオマーカースコアは、7.9のオッズ比で死亡の有意な予測因子であった(95%CI 4.6 - 4.4)(表4、モデル1)。予測因子としてマラリア死亡率と関連していた寄生虫血症及び年齢を排除するための調整後には、スコアは7.8の調整オッズ比で有意なままだった(4.7 - 134)(表4、モデル2)。

#### 【 0 0 5 2 】

上記のように種々のバイオマーカー組み合わせについてROC曲線分析及びカットポイント決定を行なって、病気の予後の予測指標としてのそれらの有用性を決定した。表5は、試験したいくつかのバイオマーカー組み合わせ結果のデータを示す。全ての組み合わせは、病気の予後の予測指標としていくらかの有用性を実証した。さらなる組み合わせを表6、表6A及び6Bに示す。表中の全てのパラメーターには括弧内に95%CIを提示してある。ヨードン指数を用いてカットポイントを決定した( $J = \max[\text{感度} + \text{特異度} - 1]$ )。PLRは陽性尤度比を表し; NLRは陰性尤度比を表し; PPVは陽性予測値を表し; NPVは陰性予測値を表す。

#### 【 0 0 5 3 】

Ang-2、sICAM-1、sFlt-1、PCT、IP-10及びTREM-1の6バイオマーカー組み合わせに関してロジスティック回帰分析を用いると、AUCは0.96(0.90 - 0.99)であり(データ示さず)、試験したサンプルで死亡を予測するためにスコア 4は95.7%の感度及び88.8%の特異度を有することが分かった(表5、列1)。ロジスティック回帰分析のために、Box-Tidwell変換をモデルに含めてこの項が有意であることを確認することによって独立変数と従属変数の対数オッズとの直線性を評価した。ブートストラップ法(1000サンプル抽出)を用いてカットポイントの分散推定値を生成した。モデル適合度をホスマー・レメショウ検定(Hosmer-Lemeshow test)及び較正勾配分析で評価した(Steyerberg EW, Eijkemans MJ, Harrell FE, Jr., Habbema JD (2001) 小データセットで妥当な戦略の検索においてロジスティック回帰分析を用いた予後モデル化(Prognostic modeling with logistic regression analysis: in search of a sensible strategy in small data sets.) Med Decis Making 21:45-56)。顕微鏡確認したCM及びSMA症例について5.7%の報告症例死亡率を用いて陽性及び陰性予測値を計算した。(Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2000)。PPV及びNPVは、サンプルを得たMulgo病院でCM及びSMA患者の5.7%がマラリア感染で死亡したという推定に基づいていた。5.7%の死亡率を考えると、6バイオマーカー組み合わせの陽性予測値は低かった(33.9%)が、陰性予測値(NPV)は99.7であった。これはスコア 3を有する小児は標準的治療プロトコルによく反応する可能性があることを示唆している。

#### 【 0 0 5 4 】

表4

表 4. 重症マラリアを有する小児間のバイオマーカースコアと予後の関係：ロジスティック回帰分析<sup>a</sup>

変量	b (95% CI)	SE	Wald	df	p 値	OR (95% CI)	ホスマー・レメシヨウ検定	
							カイ二乗	df p 値
モデル 1 <sup>b</sup> バイオマーカー スコア	2.1 (1.5-4.0)	2.3	18.6	1	0.001	7.9 (4.6-54.4)	3.3	5 0.66
モデル 2 <sup>c</sup> バイオマーカー スコア <sup>d</sup>	2.1 (1.6-4.9)	21.5	18.2	1	0.001	7.8 (4.7-134)	1.1	8 1.0
対数寄生虫血症 <sup>e</sup>	0.050 ((-1.1)-1.3)	2.8	0.010	1	0.91	1.1 (0.35-3.6)		
年齢	0.053 ((-0.61)- 1.2)	8.5	0.052	1	0.89	1.1 (0.55-3.3)		

<sup>a</sup>参照カテゴリーは“生存”だった。<sup>b</sup>擬似-R<sup>2</sup> (Cox & Snell) 0.473 及び校正勾配 0.98。  
<sup>c</sup>擬似-R<sup>2</sup> (Cox & Snell) 0.474 及び校正勾配 1.0。<sup>d</sup>バイオマーカースコアと対数寄生虫血症は、有意であるが低い相関性を有した (スピアマンの rho 0.292, p<0.01)。<sup>e</sup>寄生虫血症は、従属変数の対数オッズとの直線性を得るために対数変換した。  
SE、標準誤差；OR、オッズ比。

表 5. 重症マリアアを有する小児間で死亡率を予測するためのバイオマーカー組み合わせの臨床性能\*

バイオマーカー組み合わせ	データ生成に利用した個体数 (n)	閾値 (ROC 曲線に基づいて正数)	感度 (%)	特異度 (%)	PPV	NPV
IP-10, sICAM1	104	2/2	77.3	96.6	85	94.4
IP-10, sICAM1	98 (非 CM/SMA 致死除外)	2/2	93.8	96.3	83.3	98.8
ANG-2, IP10, sICAM1	104	2/3	86.4	87.5	63.3	96.3
ANG-2, IP10, sICAM1	98 (非 CM/SMA 致死除外)	2/3	93.8	86.6	57.7	98.6
ANG-2, IP10, CHI3L1	77	2/3	93.8	82.0	57.7	98.0
ANG-2, IP10, sTREM1	77	2/3	93.8	85.2	62.5	98.1
ANG-2, sICAM1, CHI3L1	77	2/3	93.8	93.4	78.9	98.3
ANG-2, sICAM1, sTREM1	77	2/3	93.8	88.5	68.2	98.2
ANG-2, CHI3L1, sTREM1	77	2/3	81.3	85.2	59.1	94.5
IP10, sICAM1, CHI3L1	77	2/3	93.8	88.5	68.2	98.2
IP10, sICAM1, sTREM1	77	2/3	93.8	86.9	65.2	98.1
sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	2/3	93.8	86.9	65.2	98.1
ANG-2, IP10, sICAM1, CHI3L1	77	2/4	100.0	80.3	57.1	100.0

ANG-2, IP10, sICAM1, sTREM1	77	2/4	100.0	78.7	55.2	100.0
ANG-2, sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	2/4	100.0	82.0	59.3	100.0
IP10, sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	2/4	100.0	77.0	53.3	100.0
ANG-2, IP10, CHI3L1, sTREM1	77	2/4	100.0	73.8	50.0	100.0
ANG-2, IP10, sICAM1, CHI3L1	77	3/4	87.5	93.4	77.8	96.6
ANG-2, IP10, sICAM1, sTREM1	77	3/4	87.5	95.1	82.4	96.7
ANG-2, sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	3/4	81.3	93.4	76.5	95.0
IP10, sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	3/4	87.5	95.1	82.4	96.7
ANG-2, IP10, CHI3L1, sTREM1	77	3/4	81.3	93.4	76.5	95.0
ANG-2, IP10, sICAM1, CHI3L1, sTREM1	77	3/5	100	91.8	76.2	100

10

20

30

40

【 0 0 5 6 】  
表6

表 6. 重症マラリアを有する小児間で死亡率を予測するための選択バイオマーカーの臨床性能<sup>a</sup>

組み合わせ	カットポイント <sup>b</sup>	感度 (%)	特異度 (%)	PLR <sup>c</sup>	NLR	PPV (%) <sup>d</sup>	NPV (%)
(Ang-2, sICAM-1, sFlt-1, PCT, IP-10)	≥4	95.7 (78.1-99.9)	88.8 (79.7-94.7)	8.5 (7.6-9.6)	0.05 (0.007-0.4)	33.9 (12.8-61.3)	99.7 (95.2-100)
Ang-2, PCT, sICAM-1	≥2	91.3 (72.0-98.9)	88.8 (79.7-94.7)	8.1 (7.0-9.4)	0.1 (0.02-0.4)	32.9 (12.1-60.3)	99.4 (94.7-100)
Ang-2, IP-10, PCT	≥2	91.3 (72.0-98.9)	86.3 (76.7-92.9)	6.6 (5.7-7.7)	0.1 (0.02-0.4)	28.6 (10.2-54.4)	99.4 (94.6-100)
PCT, IP-10, sTREM-1	≥2	91.3 (72.0-98.9)	81.3 (71.0-89.1)	4.9 (4.1-5.7)	0.1 (0.03-0.4)	22.7 (8.1-44.8)	99.4 (94.2-100)

10

20

30

40

50

表 6A

バイオマーカー 組み合わせ	カット ポイント	Sens	Spec	PLR	NLR	PPV	NPV
バイオマーカー スコア (全6マーカー)	≥4	95.7 (78.1 - 99.9)	88.8 (79.7 - 94.7)	8.5 (7.6 - 9.6)	0.049 (0.007 - 0.4)	21.9 (4.9 - 51.3)	99.8 (95.6 - 100.0)
ANG-2, IP-10, CHI3L1	≥2	100 (85.2 - 100)	81.2 (71.0 - 89.1)	5.3 (4.8 - 5.9)	0	15.0 (3.4 - 37.2)	100 (95.5 - 100)
ANG-2, sICAM-1, CHI3L1	≥2	95.7 (78.1 - 99.9)	81.3 (71.0 - 89.1)	5.1 (4.4 - 5.8)	0.054 (0.007 - 0.4)	14.4 (3.1 - 36.5)	99.8 (95.2 - 100)
ANG-2, sICAM-1, PCT	≥2	91.3 (72.0 - 98.9)	88.8 (79.7 - 94.7)	8.1 (7.0 - 9.4)	0.098 (0.02 - 0.4)	21.2 (4.5 - 50.5)	99.7 (95.3 - 100)
ANG-2, IP-10, PCT	≥2	91.3 (72.0 - 98.9)	86.3 (76.7 - 92.9)	6.6 (5.7 - 7.7)	0.10 (0.02 - 0.4)	18.0 (3.7 - 44.8)	99.7 (95.2 - 100)
sICAM-1, IP-10, CHI3L1	≥2	91.3 (72.0 - 98.9)	83.8 (73.8 - 91.1)	5.6 (4.8 - 6.6)	0.10 (0.03 - 0.4)	15.7 (3.3 - 39.4)	99.7 (95.0 - 100)
sICAM-1, PCT, CHI3L1	≥2	91.3 (72.0 - 98.9)	80.0 (69.6 - 88.1)	4.6 (3.9 - 5.4)	0.11 (0.03 - 0.4)	13.1 (2.7 - 34.3)	99.6 (94.8 - 100)
sICAM-1, CHI3L1 (オルタナティブ 二分化)	2	91.3 (72.0 - 98.9)	85.0 (75.3 - 92.0)	6.1 (5.2 - 7.1)	0.09 (0.02 - 0.4)	16.8 (3.4 - 42.4)	99.7 (95.1 - 100)

10

20

30

40

表 6B

バイオマーカー	# +ve BMs	Sen (%)	Spec (%)	NPV
sICAM-1, IP-10	2/2	93.8	95.8	94
CHI3L1, sTREM-1, sICAM-1	2/3	93.8	84.8	98
ANG-2, CHI3L1, sTREM-1, sICAM-1	2/4	100	82.5	100
CHI3L1, sTREM-1, ANG-2, IP-10, sICAM-1	3/5	100	87.9	100
CHI3L1, sTREM-1, ANG-2, IP-10, sICAM-1, sFLT-1	4/6	100	90.9	100

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 9 】

実施例3 - 前診断マラリアにおける死亡率を予測する代替分類指標としての分類ツリー解析の使用

各バイオマーカーの重み付けが変動し得る他の相乗的組み合わせ戦略を探索するため、独立変数を選択して、従属尺度を最適に予測する決定ツリーに体系化する分類ツリー解析を用いた。最初に、死亡率を予測するために43.5%の感度と100%の特異度でIP-10及びTREM-1に基づくモデルを作製した(図3)。高い感度が特に重要である場合もあるので、死亡を生存と誤分類するコストを割り当てる分析を、生存を死亡と誤分類するコストより10倍高いと重み付けした。予後を予測するために100%の感度と92.5%の特異度でIP-10、Ang-2、及びsICAM-1に基づくモデルを作製した(交差検証誤分類率15.4%、標準誤差4.9%)。要約すると、スコアリングシステム又は分類ツリーを用いて二分バイオマーカーを組み合わせる

と、我々の患者集団における重症マラリア死亡率を高精度で予測した。

【0060】

実施例4 侵襲性化膿性連鎖球菌(*S. pyogenes*)感染症患者において毒素性ショック症候群を発症する患者を予測する個々のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

加国オンタリオ州で通常は無菌の場所からの化膿性連鎖球菌単離菌の研究所報告義務を経て侵襲性A群連鎖球菌感染症の前向き集団ベースサーベイランスが行なわれ、この研究には1999~2009年に登録された37名の患者が含まれた。インフォームドコンセントを得て、細菌単離菌及び血漿サンプル、並びに主治医によるインタビュー及び患者カルテの精査から詳細な臨床データが収集された。凝固障害、急性腎不全、血清アミノトランスフェラーゼ上昇、急性呼吸促進症候群(ARDS)、発疹、又は壊死性筋膜炎の少なくとも2つと組み合わせられた低血圧症を含め、指標となる症状の現在のコンセンサスを満たした場合、患者は連鎖球菌毒素性ショック症候群(STSS)(化膿性連鎖球菌感染症の重篤及び/又は致命的な形態)をもたらす化膿性連鎖球菌感染症を有するとみなされた。37名の患者のうち、16名は侵襲性連鎖球菌感染症と毒素性ショック(STSS)を有するとみなされたが、21名は侵襲性連鎖球菌感染症のみ(非STSS)を有すると決定された。感染症の根底にある起源は2群間で同様であり、両群の患者の過半数は皮膚及び軟組織の感染症を有した(7名の患者(44%)はSTSSを有し、12名の患者(57%)は侵襲性連鎖球菌感染症のみを有した)。残りの患者における提示A群連鎖球菌感染症は、呼吸器感染症、起源が明らかでない菌血症、産後感染症、及び腹膜炎を含み、群間に有意な差はなかった。これらの2群は、STSSの対症診断基準のみが有意に異なり；低血圧症は、STSSを有する患者の100%、STSSを有しない患者の33%に存在した( $p < 0.0001$ )。侵襲性感染症のみを有する1名の患者に比べて、侵襲性感染症とSTSSを有する5名の患者は死亡した(31%対5%、 $P = 0.06$ )。

10

20

【0061】

研究登録時に急性期血漿サンプルを収集し、使用するまでマイナス70℃で貯蔵した。アンジオポエチン-1及びアンジオポエチン-2の血漿濃度はELISA(R&D Systems, Minneapolis MN)で製造業者の使用説明書に従って測定した。アッセイの検出上限及び下限はそれぞれ、Ang-1では10,000pg/mL及び9.77pg/mLであり、Ang-2では2520pg/mL及び2.46pg/mLであった。検量線の範囲に入るようにサンプルをアッセイ希釈剤で希釈した(Ang-1では1:20、Ang-2では1:4)。

アンジオポエチン調節不全(Ang-1レベルの相関減少及びAng-2レベルの増加)は、個体がSTSSなしで侵襲性A群連鎖球菌感染症を有する可能性に比べて個体がSTSSのある侵襲性A群連鎖球菌感染症を有する可能性が高いことと関係があった(図4A及び図4B)。Ang-1のメジアン血漿濃度は、侵襲性感染症及びSTSSと前診断された患者では、侵襲性連鎖球菌感染症のみと前診断された患者におけるより急性期中に低く(13,915pg/mL対29,084pg/mL)、Ang-2のメジアン血漿濃度は高かった(5752pg/mL対1337pg/mL)。結果として、通常は低いAng-2:Ang-1比が、侵襲性感染症とSTSSを有する患者では、侵襲性連鎖球菌感染症のみを有する患者に比べて有意に高かった(0.437対0.048、 $p < 0.05$ )。

30

【0062】

Ang-1、Ang-2、及びAng-2:Ang-1比について受信者動作特性(ROC)曲線が生成された。ROC曲線下面積は、Ang-1/2調節不全の規模の程度がSTSSを有する患者をSTSSを有しない患者と正確に区別することを示した(図4B)。血漿Ang-1濃度のROC曲線は確率と有意に異ならなかったが(AUC:0.833、 $P = 0.07$ )、血漿Ang-2のROC曲線(AUC:0.759、 $P = 0.009$ )及びAng-2:Ang-1比のROC曲線(AUC:0.791、 $P = 0.003$ )は、両方ともSTSSを有する患者と侵襲性連鎖球菌感染症のみを有する患者(非STSS)を識別することを明らかにした。血漿Ang-1濃度のROC曲線は、統計的有意差に到達しないにもかかわらず傾向を示したので(AUC:0.683、 $P = 0.07$ )、サンプルサイズを大きくすれば血漿Ang-1のROC曲線も差別的であると見込まれる。

40

【0063】

実施例5 A群連鎖球菌感染症を有する患者の反応を予測する個々のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

50

実施例4で概要を述べたサンプル及び方法を用いて、我々はさらに、患者が快方に向かうときのバイオマーカーAng-1、Ang-2及びAng-1/Ang-2の比を測定して、バイオマーカーが治療に対する反応の指標として機能する可能性を実証した。Ang-1/2調節不全は、両患者群において回復と一致して解決することが分かった(図4A)。STSSを有する患者のコホートでは、Ang-1のメジアン血漿濃度は13,519pg/mLから21,115pg/mLに上昇し、Ang-2のメジアン血漿濃度は5752pg/mLから378pg/mLに低下し( $P < 0.01$ )、メジアンAng-2 : Ang-1比は0.437から0.019に減少した( $P < 0.05$ )。

さらに、STSSを有する個々の患者では、対応した急性及び回復期血漿Ang-2濃度及びAng-2 : Ang-1比も有意に異なった(図5)。STSSなしで侵襲性連鎖球菌感染症を有する患者のコホートで同パターンが観察されたが、Ang-1/2濃度変化はより控えめだった。この群のAng-1のメジアン血漿濃度は29,084pg/mLから31,743pg/mLに上昇し、Ang-2濃度は1337pg/mLから535pg/mLに低減し、Ang-2 : Ang-1比は0.048から0.027に低減した。

#### 【0064】

実施例6 前診断された敗血症の予後を予測する個々のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

先を見越して収集した生物学的データ及び臨床データについて、重症敗血症で死亡する患者の高い可能性を実証する分子マーカーを同定すべく多中心後向き分析を行なった。加国ハミルトン州のハミルトン総合病院と関連する3つの三次病院の集中治療室(ICU)からサンプルを収集した。

ICUに入院して24時間以内に重症敗血症を有する重症患者を登録し、日28まで退院又は死亡を追跡調査した。臨床データ及び血漿サンプルは全ての患者について入院時及び1週間毎日、その後は70名の患者の43名について毎週入手可能だった。

患者が、当分野で知られている敗血症のための改訂米国胸部専門医学会 / 米国集中治療医学会基準(modified American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine criteria)を満たしたら、患者は重症敗血症を有すると診断した(Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, et al. 重症敗血症のための組換えヒト活性化タンパク質Cの効力と安全性(Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.) N Engl J Med 2001;344(10):699-709; Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. 敗血症及び臓器不全に関するACCP-SCCMコンセンサス会議(The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.) Chest 1992;101(6):1481-1483)。患者が感染のみならず4つの改訂SIRS基準のうちの少なくとも3つ及び臓器不全の5つの基準のうちの少なくとも1つを知っていたか又は疑っていた場合に患者を含めた。

#### 【0065】

留置カテーテルから採取した静脈血(4.5ml)を、0.5mlの0.105M緩衝クエン酸三ナトリウム(pH 5.4)及び100  $\mu$ lの1MベンズアミジンHClを含有する15mlのプロピレン管に移して1,500gで10分間(20 )遠心分離した。分析用に血漿を一定分量ずつ-80 で貯蔵する。商業的酵素結合免疫アッセイ(ELISA)を用いてバイオマーカーのレベルを測定した。日1~7、14、28に入手可能なサンプルについてAng-1及びAng-2(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を測定した。ESEL(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、sICAM-1(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)及びvWF(抗体 : Dako, Carpinteria, CA, USA ; 標準物質 : American Diagnostica, Stamford, CT, USA)のレベルを日1及び3に測定した。全ての標準物質、コントロール及び試験サンプルは二通りアッセイし、解釈前に平均した。組換えヒトタンパク質の検量線を用いて生成された4パラメーターロジスティック適合曲線から濃度を内挿した。

入院時に低いAng-1血漿レベル(  $< 5.5$ ng/mL)を有する患者は、高いAng-1レベルを有する患者より生き延びる可能性が低いことが分かった(  $< 5.6$ ng/ml ; 相対リスク0.49[95%CI : 0.25 - 0.98]、 $p = 0.046$ (図6A))。

Ang-1レベル  $< 5.5$ ng/mLも、高死亡リスクの既知臨床指標を用いる多変量ロジスティック回帰モデル(調整オッズ比0.282[95%信頼区間(CI) : 0.086 - 0.93]、 $p = 0.037$ )で28日に有意な死亡指標のままだった。年齢は、敗血症での死亡の高い可能性につながる既知のリス

ク因子である。同様に多臓器機能不全(MOD)スコアは、臓器機能不全を測定及び数量化する現在の方法として、死亡のリスク因子として、病気の重症度の尺度として、又は経時的病的状態の高リスクの尺度として存在する。多変量ロジスティック回帰モデルは、年齢( $p = 0.008$ )及びMODスコア( $p = 0.014$ )を追加の臨床バイオマーカーとして使用し、Ang-1は、年齢及びMODスコアのみに加えて独立予後情報を提供することを示唆している。

この知見は、血漿Ang-1レベルと比較して28日死亡率を予測する際に明らかに追加された感度及び特異度を示す受信者動作特性(ROC)曲線分析(図6B)によって支持される(ROC曲線下面積(AUROC) : 0.62[95%CI : 0.50 - 0.76])、MODスコア(AUROC : 0.64[95%CI : 0.51 - 0.77])又は年齢(AUROC : 0.68[95%CI : 0.55 - 0.80])3つの変数の組み合わせ(AUROC : 0.79[95%CI : 0.67 - 0.90])。 10

#### 【 0 0 6 6 】

実施例7 敗血症を有する患者の死亡リスクの早期予測因子としての個々のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

述べたように、敗血症で死亡する可能性が高い個体を決定するための現在の基準は多臓器機能不全(MOD)スコアである。実施例6で述べたようにサンプル及び方法を用いて、試験した個体の集団全体についてAng-2のレベルを測定し、MODスコアと関連づけた。図7Aに示すように、死亡率の予測因子としてMODスコア(x軸に示すように)と比較して関連づけられたAng-2のレベル(y軸にng/mlで示すように)が、単一のバイオマーカーとして用いて試験した場合に $p < 0.0001$ の統計的有意性で実証された。MODスコアで決定したのと同様に、患者の評価一日前に患者から取ったAng-2のレベル(ng/ml)を比較することによって、Ang-2レベルが死亡率の早期予測因子として働く能力を分析した。図7Bで分かるように、日xに測定したAng-2レベルは、次の在院日(すなわち日x+1)の臨床状態を予測した。日xに機能したAng-2レベル間には次の在院日(日x+1)のMODスコアに比べて強い統計的相関性( $P < 0.001$ )があった。これは、Ang-2が、MODスコアという現在の基準より疾患の進行及び死亡リスクの早期指標であることを示唆している。 20

#### 【 0 0 6 7 】

実施例8 大腸菌感染の結果として溶血性尿毒症症候群(HUS)を有する患者を予測する個々のバイオマーカー及びバイオマーカー組み合わせ

陽性便培養の研究所報告義務を通じてワシントン、オレゴン、アイダホ、及びワイオミング州で10歳未満の小児の大腸菌O157:H7感染症について集団ベースサーベイランス研究を行なった。この分析には病気の最初の7日以内に陽性便培養を得た1998~2005年に登録された78名の小児を含めた。登録時に、臨床的には以下に示すように静脈切開術を行なった。HUSは溶血性貧血(ヘマトクリット $< 30\%$ 、末梢血薄膜の分裂赤血球の証拠)、血小板減少症(血小板数 $< 150000/\text{mm}^3$ )、及び腎不全(正常の年齢調整上限より高い血清クレアチニン値)と診断され；病気の日14までにこれらの基準を満たさなかった参加者は無併発性感染症を有したとみなされた。 30

84の血清サンプル、すなわち、HUSと診断された日の患者からの26サンプル、引き続きHUSと診断されるであろうが、まだ診断基準を満たしたことがない患者(pre-HUS)からの8サンプル、及び無併発性感染症を有する患者からの5サンプルを試験した。6名の患者からはHUS診断前(pre-HUS)とHUS診断日の両方でサンプルを取った。 40

血清サンプルは、使用するまで一定分量ずつ-80 で貯蔵した。細胞培養上清中のアンジオポエチンレベルを測定するために、6ウェルプレートの完全培地内でHMVECを成長させてコンフルエンスにした。毒素処理の日に完全培地を血清と成長因子を欠く基本培地と交換した。4時間後に志賀毒素又はビヒクルを添加し、毒素添加24時間後に培地の一定分量を取り、遠心分離して死細胞を除去し、使用するまで同様に-80 で貯蔵した。

Ang-1とAng-2の血清及び上清濃度をELISA(R&D(登録商標) Systems, Minneapolis MN)で製造業者の使用説明書通りに測定した。検出の技術的上限は、Ang-1では10,000pg/mL、Ang-2では2520pg/mLであり、該アッセイで利用した希釈度に対してそれぞれ、200,000pg/mL及び10,080pg/mLの検出有効上限をもたらした。アッセイの検出下限は、Ang-1では9.77pg/mL、Ang-2では2.46pg/mLであった。 50

## 【0068】

アンジオポエチン調節不全(Ang-1減少及びAng-2増加)は病気の重症度と関係があることが分かった。無併発性感染症患者のメジアン血清Ang-1濃度は、HUS患者の当該濃度より有意に高かった(77,357pg/mL[四分位範囲(IQR):53,437-114,889pg/mL]対10,622pg/mL[IQR:3464-43,523pg/mL])、 $P < 0.001$ (図8A)。反対に、メジアン血清Ang-2濃度は、無併発性感染症患者においてHUS患者より有意に低かった(1140pg/mL[IQR:845-1492pg/mL]対1959pg/mL[IQR:1057-2855pg/mL])、 $P < 0.05$ 。最後に、Ang-2:Ang-1比は、無併発性感染症患者では0.014(IQR:0.011-0.023)であり、0.18(IQR)で、10倍を超えて高かった。

さらに、病院への提出時の血清Ang-1濃度は、臨床的に識別不能な小児の2つの集団を効果的に区別した:1)無併発性出血性大腸炎を有する小児及び2)最終的にHUSを発症するであろう出血性大腸炎を有する小児(受信者動作特性(ROC)曲線下面積[AUC]:0.785、95%信頼区間(CI):0.641-0.923; $P = 0.01$ )(図8B)。

無併発性感染症を有する小児についてここに報告する血清Ang-1及びAng-2濃度は、健康な小児及び成人の血清に見られる当該濃度に匹敵し、これらの患者には上皮活性化がほとんど存在しないという臨床観察と一致している。対照的に、HUSを有する小児に見られる相対的なAng-1不足とAng-2過剰は、これらの患者には顕著な上皮細胞活性化があると見込まれることと一致している。

## 【0069】

実施例9 前診断マラリアの予後の個々のバイオマーカー及び予後の他の臨床指標との併用

マラウイ国のブランタイヤのクイーンエリザベスセンター病院に発熱を提示する小児について後向きケースコントロール研究を行なった。小児は6カ月~14歳であり、1997~2009年にリクルートした。インフォームドコンセントを得た後にEDTA血漿サンプルを得た。脳性マラリア(CM)に関する小児の状態に基づいて、また出血、網膜白化(retinal whitening)、又は血管異常等の網膜指標に基づいて小児を特徴づけした。血漿サンプルから単離したEDTAタンパク質をELISAに供して、例えばAng-2、Ang-1、及びsTie-2等の可能性のある種々のバイオマーカーのレベルを数量化した。

マン・ホイットニーのU検定及びスピアマンの順位相関係数を用いて連続変数の比較を行なった。ピアソンのカイ二乗検定(Person chi-square test)、線形・線形連関検定、又はフィッシャー直接検定を用いて比率の比較を行なった。ピアソンのカイ二乗又はロジスティック回帰モデルを用いてオッズ比(ORs)を計算して共変数について調整した。ボンフェローニ調整を用いて複数の比較を説明した。

ロジスティック回帰及びCRT分析を用いて、タンパク質バイオマーカーと組み合わせてルーチンの臨床パラメーターを使用する予後モデルを作製した。容易に入手可能な臨床パラメーター(年齢、BCS、呼吸促進、重症貧血)を単に使用することによって、死亡率の臨床的に予測可能なモデルを作製し、この臨床モデルからの確率を用いて0.73(95%信頼区間[CI]、0.65-0.79)というc-指数(受信者動作特性曲線下面積に等価)を生成した(データ示さず)。

これらの臨床モデルを基盤として用いて、個々に又は組み合わせてバイオマーカー試験を加えて、バイオマーカーが臨床パラメーターモデルのみの予測精度を有意に改善するかどうかを決定した。臨床モデルを3種全てのバイオマーカーAng-1、Ang-2及びsTie-2と併用するとき、結果として生じるモデルは0.79(95%信頼区間[CI]、0.72-0.84)というc-指数を有し、臨床モデルのみより有意に良かった( $p = 0.03$ )(データ示さず)。

## 【0070】

実施例10 重篤及び/又は致命的な反応を予測するバイオマーカー組み合わせを用いる試験個体の診断

正常な個体のコントロール集団におけるタンパク質バイオマーカーAng-2、IP10及びCHI3L1の検出レベルと比較して、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を示す個体の集団におけるタンパク質バイオマーカーAng-1、Ang-2、IP10及びCHI3L1の検出レベルを用いて本発明の分類指標を生成する。ロジスティック回帰分析を適用して2つの集団を区別し

10

20

30

40

50

、90%の感度及び95%の特異度を有する方程式を生成する。

大腸菌感染にさらされた可能性があるが、まだ大腸菌感染症と診断されたことがない試験個体からの血清サンプルに関する標準的ELISA試験を用いて、タンパク質バイオマーカー-Ang-2、IP10及びCHI3L1のレベルを決定する。上記分類指標から生成されたロジスティック回帰方程式に従って、病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有するか又は有しないかのどちらかとして試験個体を分類する。

【0071】

実施例11 試験個体が診断又は差別的に診断されていないにもかかわらず、重篤及び/又は致命的な反応を予測するバイオマーカー組み合わせを用いる、試験個体が病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性の決定。

マラリア、毒素性ショック症候群、A群連鎖球菌感染症、敗血症、及び大腸菌感染症のリストから選択される重篤な病気を有するが、該重篤な病気に対する重篤及び/又は致命的な反応を発症していない個体の集団からの全血サンプルにおいて、表1に示すバイオマーカーのタンパク質レベルを検出する。また、マラリア、毒素性ショック症候群、A群連鎖球菌感染症、及び大腸菌感染症のリストから選択される病気に対する重篤な反応を発症している個体の第2集団からの全血サンプルにおいても表1に示すバイオマーカーのタンパク質レベルを検出する。2つの集団から生成されたデータを用いて分類指標を生成し、特に表2に示す抗体を用いて各集団の各個体の全血サンプルについてELISA試験を行ない、ロジスティック回帰分析を適用して2つの集団を区別する。曲線下面積が90%より高い感度及び90%より高い特異度を示す各生成方程式に対しては、分類指標を利用して、マラリアを有すると疑われる試験個体が重篤又は致命的な反応を起こしやすく、あたかも該個体が重症マラリアを有するかのように治療すべきである可能性を決定する。当該同定個体は、北米病院が指示するように重症マラリアに対するゴールドスタンダードの治療に従って薬物及び流体で静脈内治療される。

【0072】

実施例12 マラリアを有すると疑われる試験個体を予測するバイオマーカー組み合わせを用いる、試験個体が疾患に対する重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性の決定

マラリアにさらされたことがあると疑われ、インフルエンザ様症状を示す試験個体から血清サンプルを採取する。表2に示す各抗体を用いて該血清サンプルについてELISA試験を行なう。ELISA試験の結果を表5及び表6に示すバイオマーカー組み合わせと併用し、各バイオマーカー組み合わせについて、実施例2で行なったように、バイオマーカー組み合わせの各バイオマーカーにワンポイントを用いてバイオマーカースコアを決定した。このとき、測定値が実施例2で決定した対応カットポイントより大きい場合にポイントを割り当てた。各バイオマーカー組み合わせの結果は、試験個体が重症マラリアを有する高い可能性を有し、それに応じて治療すべきであるかどうかを(さまざまな感度及び特異度で)示す。

【0073】

実施例13 肺炎を有すると疑われる試験個体を用いる、試験個体が疾患に対する重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性の決定

肺炎を有すると疑われる試験個体から血清サンプルを採取した。表2に示す各抗体を用いて該血清サンプルについてELISA試験を行ない、血清サンプル中の抗体に選択的にハイブリダイズするタンパク質のレベルを決定する。結果として生じるデータを実施例4で述べたバイオマーカー組み合わせと併用し、試験サンプル中のタンパク質レベルを、肺炎を有し、かつ致命的な反応を発症したことがないと決定された個体の集団、及び肺炎を有し、かつ致命的な反応を発症したことがあると決定された個体の集団におけるバイオマーカー組み合わせの各バイオマーカーのタンパク質レベルと比較する。前記試験個体のバイオマーカーレベルを、組み合わせの各バイオマーカーについての2つのコントロール集団における前記バイオマーカーレベルと比較し、組み合わせの結果を分析して、肺炎を有し、かつ致命的な反応を発症していないコントロール集団及び肺炎を有し、かつ致命的な反応を発症しているコントロール集団により類似するかどうかを決定する。ここで、肺炎を有

10

20

30

40

50

し、かつ致命的な反応を発症しているコントロール集団により類似するという結果は、試験個体が肺炎を有するか又は肺炎に対する致命的な反応を発症する高い可能性を有することを示す。

【0074】

実施例14 大腸菌感染症を有すると疑われる試験個体を用いる、試験個体が疾患に対する重篤及び/又は致命的な反応を有する可能性の決定

汚染水供給に対する曝露の結果として大腸菌感染症を有すると疑われる試験個体から全血サンプルを採取する。不十分な試験施設の結果として、試験個体は溶血性尿毒症症候群について診断されず、大腸菌感染症を確認するために試験されない。表2に示す抗体を用いて血清サンプルについてELISA試験を行ない、サンプル中の、表1に示すバイオマーカーに対応する各タンパク質のレベルを決定する。表1に示すバイオマーカーのタンパク質レベルを、2つの別々の集団、すなわち、大腸菌感染症を有するが、溶血性尿毒症症候群を発症していない個体の集団、及び大腸菌感染症を有し、かつ溶血性尿毒症症候群を有する個体の集団から決定した前記バイオマーカーのレベルを比較することから生成される分類指標と共に利用する。90%より高い感度と90%より高い特異度を有する分類指標を選択する。分類指標の結果が、溶血性尿毒症症候群を発症している個体の集団にサンプルが十分に類似することを示す場合は、引き続き溶血性尿毒症症候群に対して試験個体を治療する。

10

【0075】

実施例15 WHO基準を用いて臨床的肺炎を有する小児と比較して、肺炎を有し、咳と発熱を呈する小児を区別する能力によって示されるように、不可知論的バイオマーカーを個々に、及び組み合わせて使用する、試験個体が肺炎を有する可能性の決定

20

アフリカの地域医療施設に発熱及び上気道症状で来院した小児を用いて前向き研究を行った。表1から選択した9種のバイオマーカー：CRP、PCT、sTie-2、エンドグリン、P-セレクチン、vWF、CHI3L1、IL18bpa、及びアンジオポエチン様タンパク質3の下記パネルに対する抗体を用いてこれらの小児から得た血清サンプルについてELISA試験を行った。9種のバイオマーカーを個々に、及び組み合わせて、胸部x線の北米のゴールドスタンダードを用いて後で肺炎を有すると診断された小児(CXR+肺炎)(n=30)又は臨床的肺炎のWHO基準を適用することによって肺炎を有すると後で診断されたが、胸部x線では肺炎を示さなかった小児(CXR-肺炎)(n=90)を区別するそれらの能力について試験した。肺炎を判定するためのWHO基準は、以下のように小児の年齢を考慮して呼吸数を測定することによって判定される頻呼吸の決定に頼る：呼吸数は<月齢2カ月の小児では>60呼吸/分、月齢2~12カ月の小児では>50呼吸/分、及び1歳の小児では>40呼吸/分。CXR+肺炎でもなく、CXR-肺炎でもない小児は肺炎でない上気道感染症(URTI)を有すると分類した(n=90)。

30

発熱及び上気道症状で来院した全ての小児の個体群統計学及び臨床的特徴づけを表7に示す。

【0076】

表7

## CXR+肺炎、CXR-肺炎の個体群統計学／臨床的特徴

	CXR+肺炎 n = 30	臨床的肺炎(CXR-) n = 90
年齢(月)	19.4 (3.6, 100.0)	14.6 (2.3, 112.8)
性別(%男性)	36.7%	61.1%
研究場所(%ダルエスサラーム)	46.7%	36.7%
温度(°C)	38.7 (38.0, 40.5)	38.4 (38.0, 40.4)
来院前の発熱日数	2.5 (1-5)	3 (1-6)
呼吸数(/分)	53 (32-90)	50 (40-70)
心拍数(/分)	129.5 (84-169)	124 (91-180)
重症度(%) <sup>+</sup>	30.0%	23.3%
ヘモグロビン(g/dL)	9.4 (5.5, 17.9)	9.7 (3.8, 13.6)
白血球数( $\times 10^9$ /mL)	23.6 (7.4, 38.7)	11.7 (3.5, 49.9) <sup>***</sup>
好中球数(ユニット)	63.4 (35.0, 87.9)	49.8 (8.7, 83.2) <sup>**</sup>

連続変数はメジアン(範囲)として表す

+はWHO小児疾病の総合管理(IMCI)基準に従って「重症」とみなされる症状を表す。

10

20

30

## 【 0 0 7 7 】

各バイオマーカーを、CXR + 肺炎(胸部x線で確認された肺炎)とCXR - 臨床的肺炎(WHO基準によれば肺炎と分類されるが、胸部x線により判定される肺炎に対しては陰性)とを識別するその能力について個々に試験した。二変量解析の結果を表8に示す。

## 【 0 0 7 8 】

表8

CXR+ 対 臨床的肺炎			
バイオマーカー <sup>&amp;</sup>	n	オッズ比 (CI)	p値 *
Ang-L-3 (ng/mL, log)	120	1.01 (0.39, 2.60)	0.984
CHI3L1 (ng/mL, log)	120	3.30 (1.87, 5.83)	<0.001*
CRP (μg/mL, log)	120	3.20 (2.01, 5.11)	<0.001*
sエンドグリン (ng/mL)	120	0.91 (0.79, 1.05)	0.186
IL-18 BP (ng/mL, log)	120	1.23 (0.62, 2.44)	0.546
PCT (ng/mL, log)	120	1.80 (1.27, 2.55)	0.001*
pセレクトイン (ng/mL, log)	120	1.39 (0.94, 2.04)	0.006
sTie-2 (ng/mL)	120	0.87 (0.32, 2.35)	0.784
vWF (ug/mL)	120	1.38 (0.82, 2.32)	0.231
年齢 (対数月)	120	1.86 (1.06, 3.24)	0.038
温度	120	1.05 (0.99, 1.12)	0.125
心拍数	120	1.00 (0.99, 1.02)	0.602
呼吸数	120	1.01 (0.96, 1.06)	0.742
場所 (ダルエスサラーム対イファカラ)	120	1.33 (0.65, 3.48)	0.333
WBC	119	7.35 (2.74, 19.73)	<0.001*
男性	120	0.37 (0.16, 0.87)	0.022*

<sup>&</sup> 連続変量として処理し、ロジスティック回帰分析を用いて試験した。  
sエンドグリン以外の全てのバイオマーカーでは、対数変換変数を使用した。

<sup>\*</sup> 太字のP値は、統計的に有意なマーカーを表す(p<0.05)。  
仮定したバイオマーカーの複数比較の説明後に、p値≤0.0056(0.05/9)に\*印を付けた。

<sup>#</sup> 年齢、温度、発熱持続期間、心拍数、呼吸数、ヘモグロビン、WBC、ALT、性別、場所、痙攣、脱水症、黄疸、手掌蒼白、胸部引き込み(chest indrawing)、鼻フラッピング(nose flapping)、呻吟、胸部聴診、喘鳴、日付、HIV状態を分析した。

#### 【 0 0 7 9 】

個々に、バイオマーカーCRP、PCT、CHI3L1及びP-セレクトインは、単変量解析によっても、マン・ホイットニーのU検定によっても(図示せず)2つの小児群を区別することが分かった。表9は、受信者動作特性曲線(ROC曲線)によって決定されたCRP、PCT、CHI3L1及びP-セレクトインのそれぞれの診断カットオフポイント、及び個々のバイオマーカーの感度と特異度を示す。組み合わせの感度(Sens)と特異度(Spec)を陽性尤度比(PLR)、陰性尤度比(NLR)、陽性予測値(PPV)及び陰性予測値(NPV)と共に示す。

#### 【 0 0 8 0 】

表9

10

20

30

40

	<b>AUC*</b>	<b>カットポイント**</b>	<b>Sens</b>	<b>Spec</b>	<b>PLR</b>	<b>NLR</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>CHI3L1</b>	0.80	> 57.0 ng/mL	93.3	64.4	2.6	0.10	39.6	97.5
<b>CRP</b>	0.86	> 45.9 ug/mL	80.0	81.1	4.2	0.25	51.4	94.2
<b>PCT</b>	0.71	> 0.51 ng/mL	70.0	70.0	2.3	0.43	36.8	90.3
<b>Pセレクチン</b>	0.62	> 59.0 ng/mL	70.0	62.2	1.9	0.48	31.7	89.2

\*AUC=ROC曲線下面積

\*\*ヨードン指数に基づくカットポイント:  $J = \max\{\text{sens} + \text{spec} - 1\}$

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

さらに分類及び回帰ツリー (CRT) 解析を行なって、試験した9種のバイオマーカーのバイオマーカー組み合わせの有用性を実証した。多数の組み合わせ及びバリエーションが有用

50

性を有することが見込まれるが、最適の組み合わせを選択するためのバイオマーカーの数、任意のバイオマーカーに特異的なカットオフポイントを選択する(例えば二分する)か又はツリー毎の連続範囲、ノードの最小数及び最大レベルが過剰適合を回避できるようにすること、並びに優先的なバイオマーカー組み合わせを選択すべく、例えば偽を優先的に回避するための誤分類コストを設定する能力を含めた種々の基準を設定した。表10及び表11は、多様な入力に基づいて選ばれた組み合わせモデルの種々の例を示し、該組み合わせの感度(Sens)と特異度(Spec)を、陽性尤度比(PLR)、陰性尤度比(NLR)、陽性予測値(PPV)及び陰性予測値(NPV)と共に示す。同様に、図9は、表10中のモデル1の組み合わせのCRT解析をツリー形式で実証し、2つの集団(臨床的肺炎(又はCXR - 肺炎)と比べてCXR + 肺炎)を区別する際に各バイオマーカーによって加えられた組み合わせ力を示している。

10

【 0 0 8 2 】

表10

	入力したバイオマーカー	他	マーカー	性能指標					
				Sens	Spec	PLR	NLR	PPV	NPV
1	全9、 連続変量	ノード: 10親, 5子 3x 誤分類コスト**	CRP, エンドグ リン, Pセレクチ ン	93.3	76.7	4.0	0.1	50.0	97.9
2	全9 連続変量	ノード: 10親, 5子 3x 誤分類コスト 2レベルに限定さ れたツリー***	CRP, エンドグ リン	86.7	81.1	4.6	0.2	53.4	96.1
3	全9, 連続変量	ノード: 10親, 5子 5x 誤分類コスト 剪定ツリー	CHI3L1, C RP	93.3	74.4	3.6	0.1	47.7	97.8
4	全9, 二分CRP, PCT を除き連続*	ノード: 10親, 5子 2x 誤分類コスト 2レベルに限定さ れたツリー	CRP, CHI3 L1, エン ドグリン	90.0	81.1	4.8	0.1	54.3	97.0
5	全9; 二分CRP, PCT を除き連続*	ノード: 10親, 5子 2x 誤分類コスト 剪定ツリー	CRP, CHI3 L1	80.0	85.6	5.6	0.2	58.1	94.5

20

30

\* これらのカットオフにPOC検査が既に存在するのでCRP(40ug/mL)及びPCT(0.5ng/mL)を二分した

40

\*\* 誤分類コストは常にCXR + 肺炎の高感度に有利である

\*\*\* 2分割後の切断(truncated)モデル1

【 0 0 8 3 】

表11

モデル	入力したバイオマーカー	モデルパラメーター	選択マーカー	Sens	Spec	PPV	NPV
1	Chi3L1, CRP	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト <sup>1</sup>	Chi3L1, CRP	70.1	91.1	72.4	90.1
2	Chi3L1, PCT	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1, PCT	53.3	93.3	72.7	85.7
3	Chi3L1, Tie-2	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1, Tie-2	40.0	97.8	85.7	83.0
4	Chi3L1, vWF	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1, vWF	73.3	84.4	61.1	90.5
5-7	a. Chi3L1, Pセレクトイン b. Chi3L1, エンドグリン c. Chi3L1, IL18bpa	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1 <sup>2</sup>	53.3	98.9	87.5	79.5
8	Chi3L1, CRP, PCT	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	CRP	70.0	91.1	72.4	90.1
9	Chi3L1, CRP, Pセレクトイン	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1, CRP	56.7	96.7	85.0	87.0
10	Chi3L1, PCT, Pセレクトイン, エンドグリン	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト	Chi3L1, PCT	53.3	93.3	72.7	85.7
11	全マーカー <sup>3</sup>	ノード:10親, 5子 1x 誤分類コスト 剪定ツリー	CRP, Tie2, Ang3L1	70.0	91.1	72.4	90.1
12	全マーカー <sup>3</sup>	ノード:10親, 5子 3x 誤分類コスト	CRP, エンドグリ ン, Pセレクトイン	93.3	76.7	50.0	97.9
13	全マーカー <sup>3</sup>	ノード:10親, 5子 3x 誤分類コスト 2レベルに限定されたツ リー <sup>4</sup>	CRP, エンドグリ ン	86.7	81.1	53.4	96.1
14	全マーカー <sup>3</sup>	ノード:10親, 5子 3x 誤分類コスト 剪定ツリー	CHI3L1, CRP	93.3	74.4	47.7	97.8
15	全9, 二分CRP, PCT を 除き連続 <sup>5</sup>	ノード:10親, 5子 2x 誤分類コスト 2レベルに限定されたツ リー	CRP, CHI3L1, エ ンドグリン	90.0	81.1	54.3	97.0
16	全9; 二分CRP, PCT を 除き連続 <sup>5</sup>	ノード:10親, 5子 2x 誤分類コスト 剪定ツリー	CRP, CHI3L1	80.0	85.6	58.1	94.5

1 誤分類コストは常にCXR + 肺炎の高感度に有利である

2 モデルに他のバイオマーカーを選択しなかった。

3 全マーカー: Chi3L1、CRP、PCT、エンドグリン、P-セレクトイン、vWF、Ang3L1、Tie-2、IL18bpa

4 2分割後の切断モデル1

10

20

30

40

50

5 これらのカットオフにPOC検査が既に存在するのでCRP(40ug/mL)及びPCT(0.5ng/mL)を二分した

【0084】

実施例16 咳及び発熱を呈する肺炎(CXR+)を有する小児を他の上気道感染症(URI)を有する小児と比較して区別する能力によって示されるように、不可知論的バイオマーカーを個々に、及び組み合わせて用いる、試験個体が肺炎を有する可能性の決定

実施例15で述べたように、アフリカの地域医療施設に発熱及び上気道症状で来院した小児を用いて前向き研究を行なった。表1から選択した9種のバイオマーカー：CRP、PCT、sTie-2、エンドグリン、P-セレクチン、vWF、CHI3L1、IL18bpa、及びAng3L1の下記パネルに対する抗体を用いてこれらの小児から得た血清サンプルについてELISA試験を行なった。9種のバイオマーカーを個々に、及び組み合わせて、胸部x線の北米のゴールドスタンダードを用いて肺炎を有すると後で診断された小児(CXR+肺炎)(n=30)又は肺炎と確認されない上気道感染症を有する年齢、性別、臨床場所及び日付が一致した小児(n=90)を区別するそれらの能力について試験した。単一パラメーターバイオマーカーを評価し、(a)CXR+肺炎対CXR-臨床的肺炎及び(b)CXR+肺炎対細気管支炎(ARI)を除く他の上気道感染症(URTI)を区別する能力について比較した。結果を表12に示す。

【0085】

表12

バイオマーカー <sup>&amp;</sup>	CXR+対臨床的肺炎			CXR+対他のARIs <sup>§</sup>		
	n	オッズ比 (CI)	p値*	n	オッズ比 (CI)	p値*
Ang様-3 (ng/mL)	120	1.01 (0.39, 2.60)	0.984	120	1.27 (0.48, 3.4)	0.63
CHI3L1 (ng/mL)	120	3.30 (1.87, 5.83)	<0.001*	120	4.39 (2.10, 9.18)	<0.001*
GRP (μg/mL)	120	3.20 (2.01, 5.11)	<0.001*	120	3.36 (1.88, 6.00)	<0.001*
sエンドグリン (ng/mL)	120	0.91 (0.79, 1.05)	0.186	120	0.99 (0.89, 1.10)	0.803
IL-18 bp (ng/mL)	120	1.23 (0.62, 2.44)	0.546	120	1.54 (0.77, 3.05)	0.221
PCT (ng/mL)	120	1.80 (1.27, 2.55)	0.001*	120	1.93 (1.28, 2.91)	0.002*
p-セレクチン (ng/mL)	120	1.39 (0.94, 2.04)	0.006	120	1.51 (0.97, 2.35)	0.067
sTie-2 (ng/mL)	120	0.87 (0.32, 2.35)	0.784	120	3.01 (1.00, 9.01)	0.049
vWF (ug/mL)	120	1.38 (0.82, 2.32)	0.231	120	1.43 (0.83, 2.45)	0.196
年齢_対数 <sup>#</sup>	120	1.86 (1.06, 3.24)	0.030	120	1.54 (0.52, 4.52) (変量のマッチング)	0.436
温度	120	1.05 (0.99, 1.12)	0.125	120	該当なし	
心拍数	120	1.00 (0.99, 1.02)	0.602	120	1.35 (1.16, 1.57)	<0.001*
呼吸数	120	1.01 (0.96, 1.06)	0.742	120	1.05 (1.03, 1.08)	<0.001*
WBC	119	7.35 (2.74, 19.73)	<0.001*	119	8.45 (2.91, 24.55)	<0.001*
男性	120	0.37 (0.16, 0.87)	0.022*	120	該当なし(性別が一致)	

& 連続として処理した。sエンドグリンを除く全てのマーカーについて、対数変換変数を用いた。

CXR + 対CXR - の患者分析は一致せず、ロジスティック回帰分析を用いた。

CXR + 対URTI分析では、年齢、性別、場所及び日付について患者が一致したので、条件付きロジスティック回帰分析を用いた。

§ 細気管支炎を除く

% 太字のP値は統計的に有意なマーカーを表す(p < 0.05)。複数比較の説明後に、p値 0.0056(0.05/9)に\*印を付けた。

# 年齢、温度、発熱持続期間、心拍数、呼吸数、ヘモグロビン、WBC、ALT、性別、場所、痙攣、脱水症、黄疸、手掌蒼白、胸部引き込み、鼻フラッピングを分析した

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

同様に、バイオマーカーCRP、PCT、及びCHI3L1を含め、個々のバイオマーカーは、他の上気道感染症と比較してCXR + 肺炎を区別することができた。P-セレクトインも、マン・ホイットニー検定で分析したときには統計的に有意な個々のバイオマーカーと同定されたが ( $p = 0.044$ ) (データ示さず)、クラスカル・ウォリス (Kruskal Wallis) 解析を利用してDunnの事後検定で分析したときには同定されなかった (データ示さず)。全ての場合に、URTI及びCXR - 臨床的肺炎は個々のバイオマーカーで識別不能だった (データ示さず)。表13は、受信者動作特性曲線 (ROC曲線) で決定した場合のCRP、PCT、CHI3L1及びP-セレクトインのそれぞれの診断カットオフポイント、及びCXR + 肺炎対URTIと比較したときの個々のバイオマーカーの感度と特異度を示す。組み合わせの感度 (Sens) と特異度 (Spec) を陽性尤度比 (PLR)、陰性尤度比 (NLR)、陽性予測値 (PPV) 及び陰性予測値 (NPV) と共に示す。

10

【 0 0 8 7 】

表13

	AUC*	カットポイント**	Sens	Spec	PLR	NLR	PPV	NPV
CHI3L1	0.80	> 57.0 ng/mL	93.3	66.1	2.8	0.1	15.2	99.3
CRP	0.87	> 31.4 ug/mL	86.7	73.9	3.3	0.2	17.7	98.8
PCT	0.70	> 0.51 ng/mL	70.0	65.6	2.0	0.5	11.7	97.1
Pセレクトイン	0.62	> 59.2 ng/mL	70.0	61.7	1.8	0.5	10.6	96.9

20

【 0 0 8 8 】

実施例15に示すように、さらに分類及び回帰ツリー解析 (CRT) を行なって、試験した9種のバイオマーカーのバイオマーカー組み合わせの選択を実証した。表14は、多様な入力に基づいて選ばれた選択組み合わせモデルを示し、該組み合わせの感度 (Sens) と特異度 (Spec) を陽性尤度比 (PLR)、陰性尤度比 (NLR)、陽性予測値 (PPV) 及び陰性予測値 (NPV) と共に示す。

30

【 0 0 8 9 】

表14

モデル	入力した バイオマーカー	他	マーカー	Sens	Spec	PLR	NLR	PPV	NPV
1	全9, 連続変量	・ノード: 20 親, 10子 ・5x誤分類 コスト	CRP, CHI3L1	86.7	86.1	6.2	0.2	28.8	99.0
2	全9, 二分CRP, PCTを除き 連続*	・ノード: 20 親, 10子 ・5x誤分類 コスト	CRP, CHI3L1	80.0	88.3	6.8	0.2	30.8	98.5
3	全9, 二分CRP, PCTを除き 連続*	・ノード: 20 親, 10子 ・10x誤分類 コスト	CRP, CHI3L1	93.3	81.1	4.9	0.1	24.3	99.5
4	全9, 二分CRP, PCTを除き 連続*	ノード: 10 親, 5子 ・5x誤分類 コスト	CRP, CHI3L1, IL18bpa	80.0	91.1	9.0	0.2	36.9	98.6

\*これらのカットオフにPOC検査が既に存在するのでCRP(40ug/mL)及びPCT(0.5ng/mL)を二分した

\*\*誤分類コストは常にCXR+肺炎の高感度に有利である

10

20

30

40

50

【0090】

実施例17 不可知論的バイオマーカーが個々に、及び組み合わせ、抗体で治療可能な細菌感染症を有する個体と、抗体が有効でなさそうであるウイルス感染症を有する個体とを

### 区別できるかどうかの決定

アフリカの地域医療施設に発熱及び上気道症状で来院した小児群(n=15)を用いて前向き研究を行なった。表1から選択した9種のバイオマーカー：CRP、PCT、sTie-2、エンドグリン、P-セレクチン、vWF、CHI3L1、IL18bpa、及びAng3L1の下記パネルに対する抗体を用いてこれらの小児から得た血清サンプルについてELISA試験を行なった。小児は後で(i)大腸菌、黄色ブドウ球菌、シゲラ・フレックスネリ(*S. flexneri*)、サルモネラ菌、連鎖球菌、インフルエンザ菌、又はアシネトバクター菌の1種由来の菌血症を有するか(n=16)又は(ii)エプスタイン・バーウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV6)、パルボウイルス又はムンプスウイルスの1種由来のウイルス感染症を有すると同定された(データ示さず)。細菌感染症に肺炎桿菌を含めたときに同様の結果が見られた。

抗体で治療可能な細菌感染症を有する小児と、抗体に反応しないであろうウイルス感染症を有する小児とを識別する能力について各バイオマーカーを個々に試験した。二変量分析の結果を表15に示す。

【0091】

表15

バイオマーカー	カットポイント (ヨーデン)	感度(%)	特異度(%)	PPV (%)	NPV (%)
エンドグリン	<12.5 ng/mL	73.3	75	65	81.6
CHI3L1	>29.8 ng/mL	80	62.5	57.5	83.1
CRP	>8.6 ug/mL	93.3	68.7	65.4	99.4
TREM1	>71.1 pg/mL	93.3	43.7	51.3	91.2
PCT	>0.4 ng/mL	60	100	100	79.8
P-セレクチン	>48.4 ng/mL	86.7	75	68.7	89.9
ANGL3	>294.6 ng/mL	80	75	67	86
IP10	<477.8 ng/mL	66.7	81.2	69.3	79.4
IL18bpa	<25.5 ng/mL	93.3	62.5	61.2	93.7

【0092】

分類及び回帰ツリー解析(CRT)を適用することによって、細菌感染症(抗体で治療可能)を有する小児と、ウイルス感染症(抗体から利益を得ない)を有する小児とを区別する能力について9種のバイオマーカーの組み合わせを試験した。各バイオマーカーについて、バイオマーカーの値が設定カットポイント(ヨーデン指数を用いて決定した)より高い場合にポイントを割り当てた。全てのポイントの合計を計算して「バイオマーカースコア」を決定した。表16は、最適のスコアカットポイントに基づいて選ばれた選択組み合わせモデルを示す。組み合わせの感度(Sens)と特異度(Spec)を陽性予測値(PPV)及び陰性予測値(NPV)と共に示す。

【0093】

表16

10

20

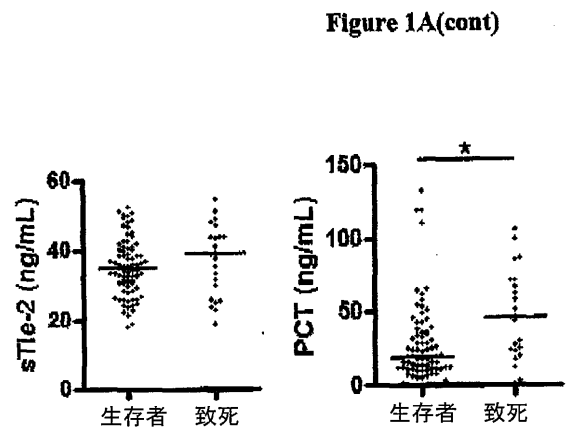
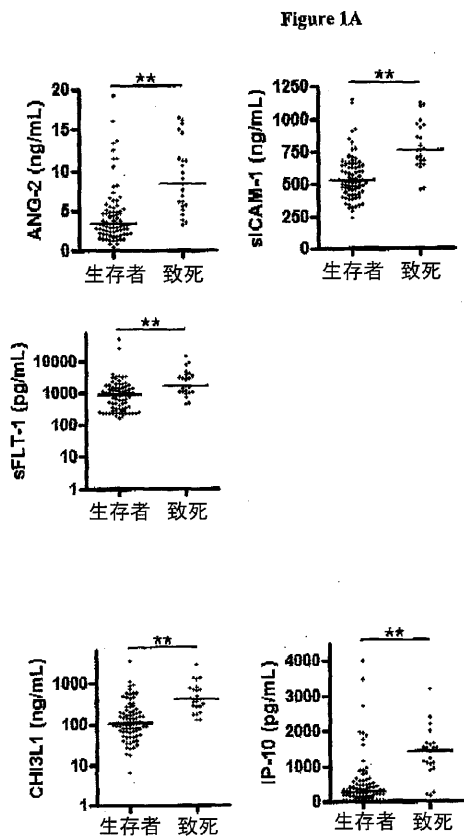
30

40

組み合わせ	カットポイント (ヨーデン)	感度(%)	特異度(%)	PPV (%)	NPV (%)
TREMI + IL18bpa	スコア 2	86.7	87.5	81.5	91.2
PCT + END (又はPCT + Pse1)	スコア $\geq 1$	93.3	75	70.3	94.7
PCT + ANGL3	スコア $\geq 1$	100	75	71.7	100
PCT + IP10	スコア $\geq 1$	100	81.2	77.2	100
End + PCT + IL18bpa	スコア $\geq 2$	93.3	93.7	90.4	95.7
PCT + ANGL3 + IL18bpa	スコア $\geq 2$	100	87.5	83.5	100
PCT + ANGL3 + IP10	スコア $\geq 2$	93.3	100	100	95.9

【 図 1 A - 1 】

【 図 1 A - 2 】



【 図 1 B 】

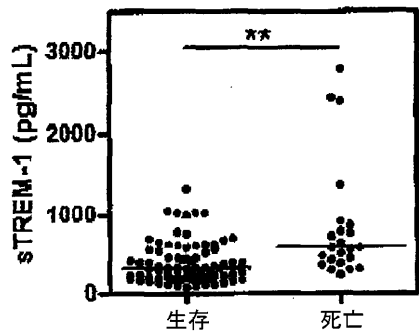


Figure 1B

【 図 2 A 】

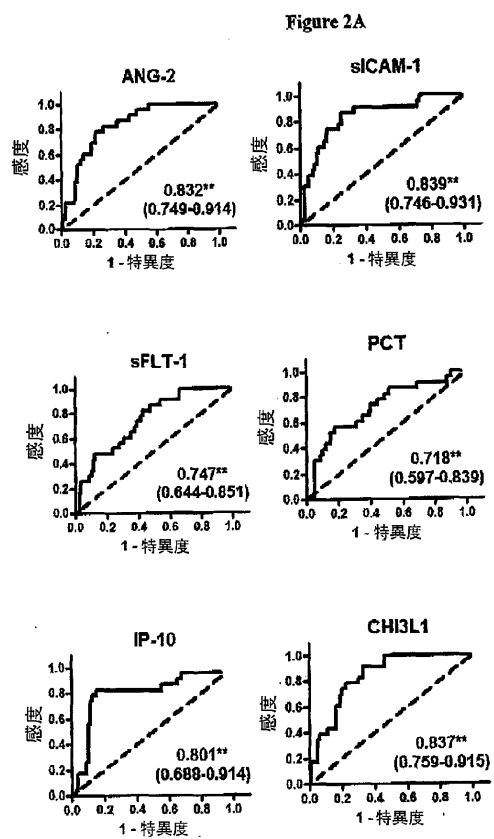


Figure 2A

【 図 2 B 】

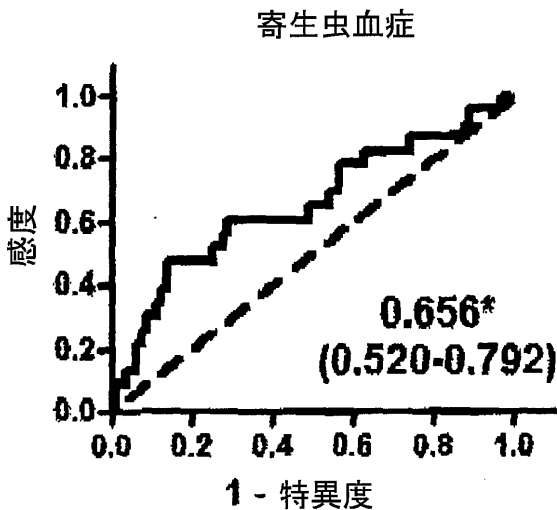


Figure 2B

【 図 3 】

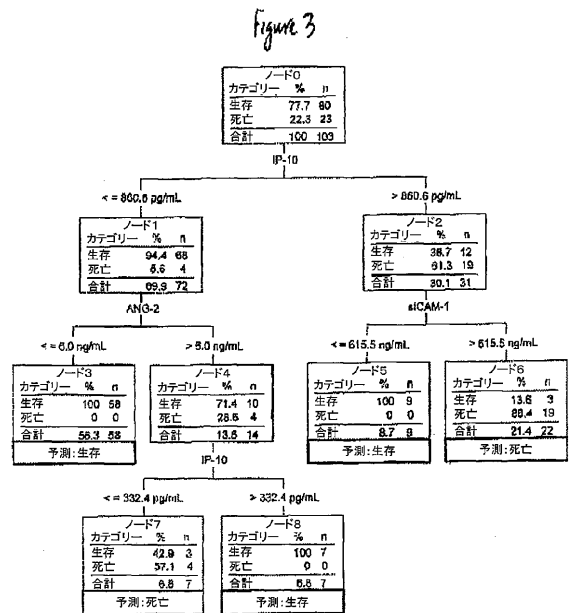


Figure 3

【 図 4 A 】

BIOMARKERS FOR EARLY DETERMINATION OF A CRITICAL OR LIFE THREATENING RESPONSE TO ILLNESS AND/OR TREATMENT RESPONSE  
Kain, K., et al.  
Sheet 6/14

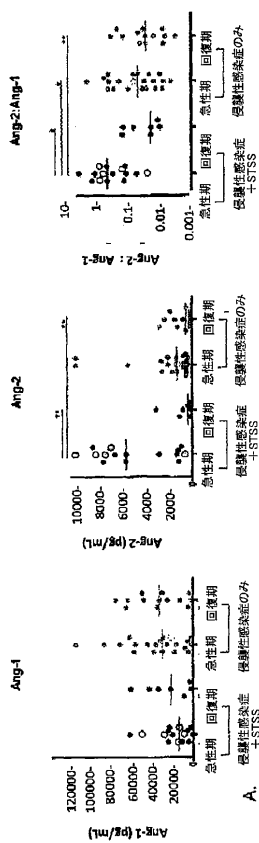


Figure 4A

【 図 4 B 】

BIOMARKERS FOR EARLY DETERMINATION OF A CRITICAL OR LIFE THREATENING RESPONSE TO ILLNESS AND/OR TREATMENT RESPONSE  
Kain, K., et al.  
Sheet 7/14

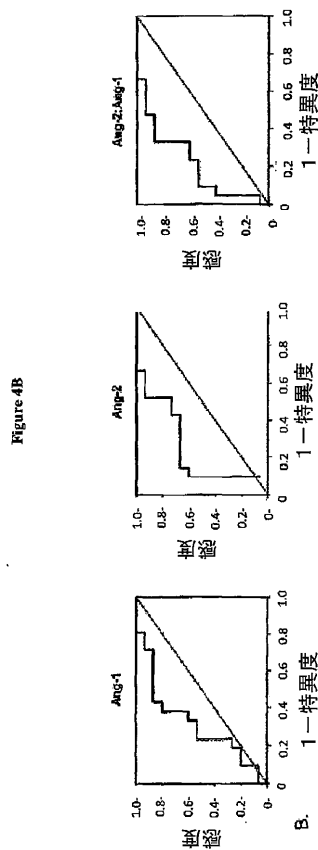


Figure 4B

【 図 5 】

BIOMARKERS FOR EARLY DETERMINATION OF A CRITICAL OR LIFE THREATENING RESPONSE TO ILLNESS AND/OR TREATMENT RESPONSE  
Kain, K., et al.  
Sheet 8/14

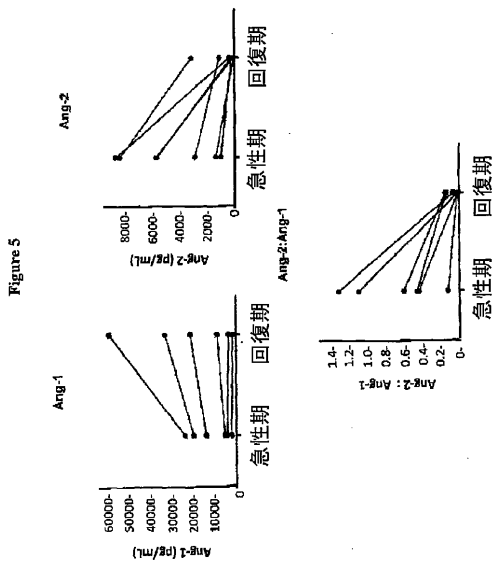
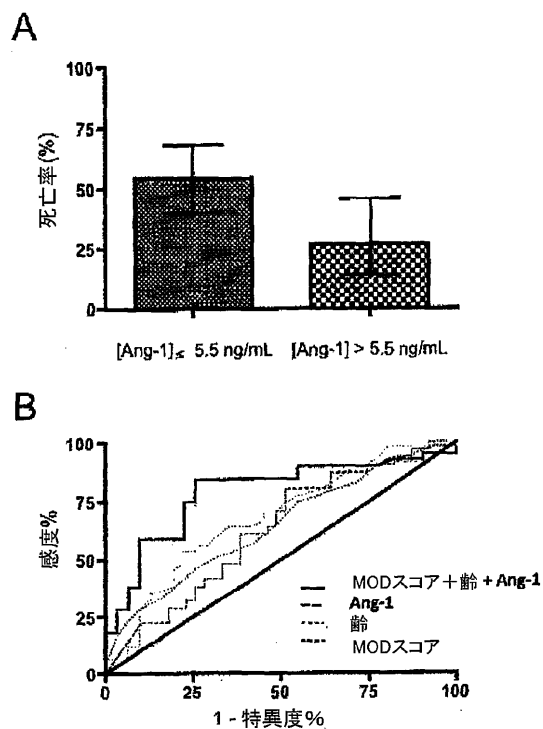


Figure 5

【 図 6 】

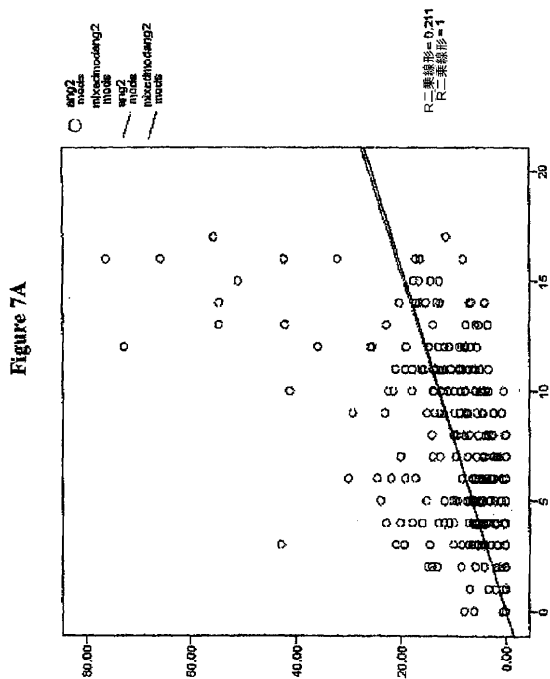
Figure 6



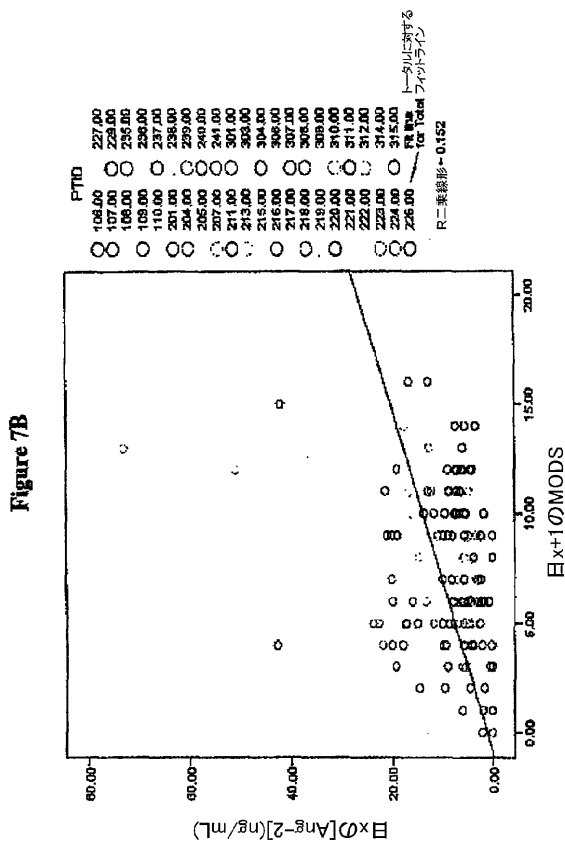
A

B

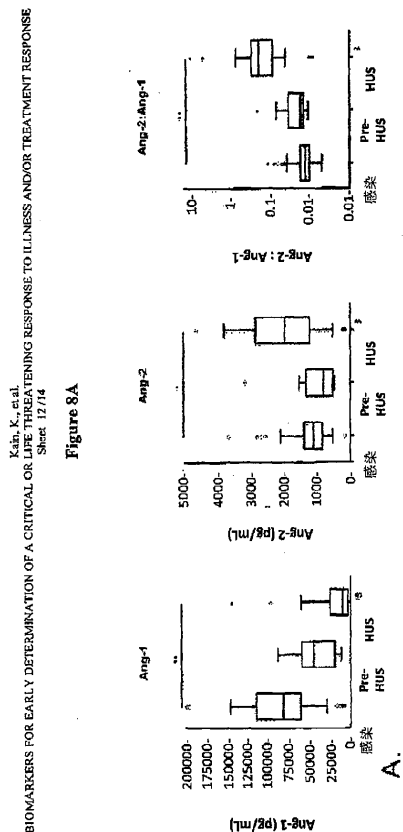
【 7 A 】



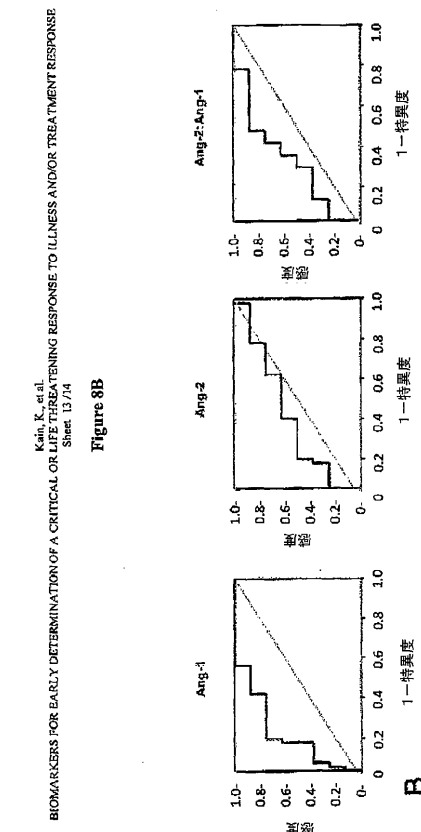
【 7 B 】



【 8 A 】



【 8 B 】



【 図 9 】

Kahn, K., et al.  
BIOMARKERS FOR EARLY DETERMINATION OF A CRITICAL OR LIFE-THREATENING RESPONSE TO ILLNESS AND/OR TREATMENT RESPONSE  
Sheet 14/14

MODスコア+年齢+Ang-1  
Ang-1  
年齢  
MODスコア

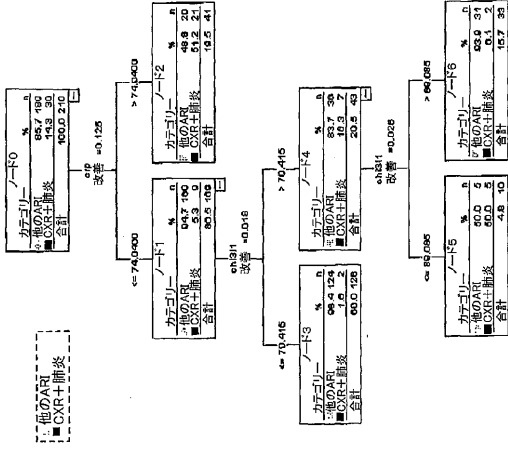


Figure 9

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CA2014/050841</b>									
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER            IPC: <i>G01N 33/543</i> (2006.01), <i>C40B 30/04</i> (2006.01), <i>C40B 40/10</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)            IPC: <i>G01N 33/543</i> (2006.01), <i>C40B 30/04</i> (2006.01), <i>C40B 40/10</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)            Questel Orbit, Canadian Patent Database, Google Scholar</p> <p>Keywords: Angiopoeitein-1, complement fragment C5a</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>CA 2769433 KAIN et al 27 August 2013 (27-08-2014) *see the whole document, in particular the claims*</td> <td style="text-align: center;">1-59</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>CONROY et al. Performance Characteristics of Combinations of Host Biomarkers to Identify Women with Occult Placental Malaria: A Case-Control Study from Malawi. PLoS One, December 2011, volume 6, issue 12, pages 1-7 *see abstract, page 2 section titled "Biomarker ELISAs" and Table 2*</td> <td style="text-align: center;">1-59</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CA 2769433 KAIN et al 27 August 2013 (27-08-2014) *see the whole document, in particular the claims*	1-59	X	CONROY et al. Performance Characteristics of Combinations of Host Biomarkers to Identify Women with Occult Placental Malaria: A Case-Control Study from Malawi. PLoS One, December 2011, volume 6, issue 12, pages 1-7 *see abstract, page 2 section titled "Biomarker ELISAs" and Table 2*	1-59
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	CA 2769433 KAIN et al 27 August 2013 (27-08-2014) *see the whole document, in particular the claims*	1-59									
X	CONROY et al. Performance Characteristics of Combinations of Host Biomarkers to Identify Women with Occult Placental Malaria: A Case-Control Study from Malawi. PLoS One, December 2011, volume 6, issue 12, pages 1-7 *see abstract, page 2 section titled "Biomarker ELISAs" and Table 2*	1-59									
<input 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:	"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									
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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									
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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									
"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)	"&" document member of the same patent family									
"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										
Date of the actual completion of the international search 04 November 2004 (04-11-2014)		Date of mailing of the international search report 24 November 2014 (24-11-2014)									
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer  Cecilia Alperin (819) 994-3009									

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CA2014/050841****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

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

1.  Claim Nos.: 63  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 63 is directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, which the International Searching Authority is not required to search under Rule 39.1(iv) of the PCT. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effect or purpose/use of the treatment protocol defined in claim 63.
2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:  
1-69 as they relate to C5a and Ang-1.

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CA2014/050841**

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
CA2769433A1	27 August 2013 (27-08-2013)	None	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2014/050841

The claims are directed to a method of determining the likelihood of a test individual having a critical and/or life threatening response to a suspected illness, the method comprising detecting and quantifying a level of each of two or more protein biomarkers in a sample and comparing said quantified levels of proteins biomarkers to control levels so as to make a determination as to whether the individual is at an increased risk of having the critical and/or life threatening response.

It should be noted that the independent claims recite a list of biomarkers. However, there appears to be some typographical errors leading to a lack of clarity. For example, lines 7-9 of claim 1 recite "soluble tyrosine kinase with immunoglobulin-like loop and epidermal growth factor domain-2 (sTie-2)". Lines 14-15 of claim 1 recite "von Endothelial soluble Tie-2 Receptor (Tie-2) and Wilibrand factor (vWF)". Claim 1 also recites the list of markers "as set out in Table 1". The same applies to the remaining independent claims. Table 1 does not recite "soluble tyrosine kinase with immunoglobulin-like loop and epidermal growth factor domain-2 (sTie-2)" or "von Endothelial soluble Tie-2 receptor (Tie-2)". As Table 1 is clear and concise, the list of protein biomarkers will be derived from this table as opposed to independent claims 1, 13, 22, 34, 43, 44, 53, and 60.

The claims are directed to a plurality of inventions as follows:

The claims recite two or more biomarkers selected from a group of eighteen (18). As such there exists 243,357 possible marker combinations. Each combination of markers is considered to be a separate inventive concept.

Group A1: Claims 1-69 (in part) are directed to methods of determining the likelihood of a test individual having a critical and/or life threatening illness the method comprising detecting and quantifying the level of each of two or more protein biomarkers in a sample and comparing said quantified levels of said protein biomarkers to control levels from a control population, determining the differential levels for each biomarker so as to make a determination as to whether said test individual is at an increased risk of having the critical and/or life threatening response, methods wherein the quantified levels are utilized in a classifier and determining the increased risk as a result of the application of said classifier, along with compositions comprising a collection of two or more antibodies binding to at least two protein biomarkers wherein the biomarkers are complete fragment C5a (C5a) and angiotensin-1 (Ang-1);

Group A2: Claims 1-69 (in part) are directed to methods of determining the likelihood of a test individual having a critical and/or life threatening illness the method comprising detecting and quantifying the level of each of two or more protein biomarkers in a sample and comparing said quantified levels of said protein biomarkers to control levels from a control population, determining the differential levels for each biomarker so as to make a determination as to whether said test individual is at an increased risk of having the critical and/or life threatening response, methods wherein the quantified levels are utilized in a classifier and determining the increased risk as a result of the application of said classifier, along with compositions comprising a collection of two or more antibodies binding to at least two protein biomarkers wherein the biomarkers are complete fragment C5a (C5a) and angiotensin-2 (Ang-2);

.....

Group A243,357: Claims 1-69 (in part) are directed to methods of determining the likelihood of a test individual having a critical and/or life threatening illness the method comprising detecting and quantifying the level of each of two or more protein biomarkers in a sample and comparing said quantified levels of said protein biomarkers to control levels from a control population, determining the differential levels for each biomarker so as to make a determination as to whether said test individual is at an increased risk of having the critical and/or life threatening response, methods wherein the quantified levels are utilized in a classifier and determining the increased risk as a result of the application of said classifier, along with compositions comprising a collection of two or more antibodies binding to at least two protein biomarkers wherein the biomarkers are all the markers listed in Table 1.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in Rule 13 of the PCT.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100093300  
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき

(72)発明者 カイン ケヴィン  
カナダ エム5ジー 1エル7 オンタリオ トロント カレッジ ストリート 101 ティー  
エムディーティー 10-360エイ トロント メディカル ディスカヴァリー タワー マ  
ーズ センター

(72)発明者 ライルズ ダブリュー コンラッド  
アメリカ合衆国 ワシントン州 98122 シアトル グランド アヴェニュー 1412

(72)発明者 アードマン ローラ  
カナダ エム5ジー 1エル7 オンタリオ トロント カレッジ ストリート 101 ティー  
エムディーティー 100-360エイ トロント メディカル ディスカヴァリー タワー マ  
ーズ センター

(72)発明者 コンロイ アンドレア  
カナダ エム5ジー 1エル7 オンタリオ トロント カレッジ ストリート 101 ティー  
エムディーティー 100-360エイ トロント メディカル ディスカヴァリー タワー マ  
ーズ センター

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 CC23 EE01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016530529A5</a>	公开(公告)日	2017-10-19
申请号	JP2016539373	申请日	2014-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	盐湖城健康网		
申请(专利权)人(译)	盐湖城健康网		
[标]发明人	カインケヴィン ライルズダブリューコンラッド アードマンローラ コンロイアンドレア		
发明人	カイン ケヴィン ライルズ ダブリュー コンラッド アードマン ローラ コンロイ アンドレア		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K39/395 A61P31/04		
CPC分类号	G01N33/6842 G01N2800/50 G01N2800/52 Y02A50/53 Y02A50/56 Y02A50/58		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A A61K39/395.R A61P31/04		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01		
代理人(译)	西岛隆义 田中真一郎 山崎 一夫		
优先权	14/019447 2013-09-05 US		
其他公开文献	JP2016530529A		

摘要(译)

本发明涉及新型生物标志物和生物标志物组合的用途，其可用于早期确定个体对疾病的严重和/或致命反应和/或预测所述疾病的预后。测量本发明的生物标志物和生物标志物组合的产物的表达水平可用于确定个体对疾病的严重和/或致命反应。在一些实施方案中，生物标志物和生物标志物组合是不可知的，并且与疾病的原因或性质的预先鉴定和/或确定无关。在一些实施方案中，生物标志物和生物标志物组合可以用于为患有严重疾病的个体选择治疗和/或监测治疗干预的有效性。[选型图]图1A