

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-73896
(P2020-73896A)

(43) 公開日 令和2年5月14日(2020.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 C O 8 5
A 6 1 K 31/137 (2006.01)	A 6 1 K 31/137	4 C O 8 6
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02	4 C 2 0 6

審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-234773 (P2019-234773)
 (22) 出願日 令和1年12月25日 (2019.12.25)
 (62) 分割の表示 特願2017-236881 (P2017-236881)
 の分割
 原出願日 平成26年3月19日 (2014.3.19)
 (31) 優先権主張番号 13160265.8
 (32) 優先日 平成25年3月20日 (2013.3.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN

(71) 出願人 514122524
 シュピーングテック ゲゼルシャフト ミ
 ット ベシュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国, 16761 ヘニッヒ
 スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ
 15アー
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血圧降下治療をガイドするアドレノメジュリン

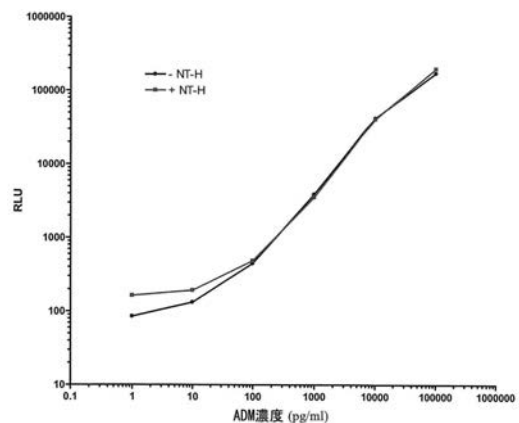
(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、輸液蘇生又は昇圧剤の投与を必要とする対象を同定するための *in vitro* 方法を提供することである。

【解決手段】当該 *in vitro* 方法は、対象の体液中のプロADM及び/又はその少なくとも6のアミノ酸を有する断片のレベルを測定し、当該レベルを、輸液蘇生又は昇圧剤の投与の患者における必要性和関連させ、ここで当該患者の体液中のプロADM及び/又はその少なくとも6アミノ酸を有する断片のレベルが閾値を超えている場合に、当該患者を、そのような必要性があると同定する、工程を含むことによる。

【選択図】 図1

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

生理的ショック状態を発達させるリスクにある対象を同定するためのインビトロ方法であって：

- ・当該対象の体液のサンプル中の、プロアドレノメデュリン proADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルを決定する工程、ここで当該サンプルは、ヒトクエン酸血漿、ヘパリン血漿、EDTA血漿、全血、血清を含む群から選択され；及び
- ・当該レベルを、当該対象が生理的ショック状態を発達させるリスクと関連させる工程であって、ここで当該対象が、当該対象の体液中における proADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルが閾値を超える場合に、そのようなリスクを有すると同定される；

を含み、ここで当該 proADM (配列番号1) 断片が、アドレノメデュリン、ADM (配列番号4) 及び/又は ADM1-52Gly (配列番号5) 及び中央領域-プロ-アドレノメデュリン、MR-proADM (配列番号3) 及びC-末端プロアドレノメデュリン CT-proADM (配列番号6) 及びプロアドレノメデュリンN-20末端ペプチド (配列番号2) を含む群から選ばれる、前記方法。

【請求項2】

ADM (配列番号4) の免疫反応性レベル及び/又は ADM1-52-Gly (配列番号5) の免疫反応性のレベル又は MR-proADM (配列番号3) の免疫反応性のレベル又は CT-proADM (配列番号6) の免疫反応性のレベルのいずれかが、決定され、そして生理的ショックを発達させるリスクと関連させ、ここで当該対象は、当該対象の体液中の ADM (配列番号4) の免疫反応性レベル及び/又は ADM1-52-Gly (配列番号5) の免疫反応性のレベル又は MR-proADM (配列番号3) の免疫反応性のレベル、又は CT-proADM (配列番号6) の免疫反応性のレベルのいずれかが、閾値を超える場合に、そのような必要性を有すると同定される、請求項1に記載のインビトロ方法。

【請求項3】

pro-ADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルが、ADM (配列番号4) 及び/又は ADM1-52-Gly (配列番号5) の配列内に構成される領域に結合するバインダー；及び ADM (配列番号4) 及び/又は成熟 ADM1-52-Gly (配列番号5) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選ばれる少なくとも1のバインダーを使用することにより決定される、請求項1又は2に記載のインビトロ方法。

【請求項4】

pro-ADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルが、MR-proADM (配列番号3) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び MR-proADM (配列番号3) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選択される少なくとも1種のバインダーを使用することにより決定される、請求項1又は2に記載のインビトロ方法。

【請求項5】

pro-ADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルが、CT-proADM (配列番号6) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び CT-proADM (配列番号6) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選択される少なくとも1種のバインダーを使用することにより決定される、請求項1又は2に記載のインビトロ方法。

【請求項6】

アッセイが、proADM (配列番号1) 及び/又はその断片のレベルを決定するために用いられ、ここで当該アッセイのアッセイ感度は、健常対象のADMを定量することができ、且つ < 70 pg/ml である、請求項1～5のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

前記バインダーが、*proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片への少なくとも $10^7 M^{-1}$ の結合親和性を示す、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 8】

前記バインダーが、*proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片に結合する、*proADM* 特異的抗体、又は *proADM* 特異的抗体フラグメント、又は *proADM* 特異的非-Ig (非イムノグロブリン) スカフォールドを含む群から選択される、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 9】

アッセイが、*proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルを決定するために用いられ、ここでそのようなアッセイが、サンドイッチアッセイ、好ましくは完全に自動化されたアッセイである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

10

【請求項 10】

前記 2 種のバインダーの少なくとも 1 種が、検出されるために標識されている、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 11】

前記 2 種のバインダーの少なくとも 1 種が、固相に結合されている、請求項 3 ~ 10 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 12】

血漿 *ADM* の閾値 90 pg/ml が適用される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

20

【請求項 13】

血漿 *MR-proADM* (配列番号 3) の閾値 0.9 nmol/L が適用される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 14】

前記対象の体液中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、閾値より大きく、かつ前記対象が 66 mmHg 超の平均動脈圧 (*MAP*) を有する場合、前記対象がそのような必要性を有すると同定される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 15】

以下の工程：
前記対象の体液中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルを測定し

30

、
前記レベルを、対象の平均動脈圧とは独立に、生理学的ショックを發達させる対象のリスクと相関させる工程であって、前記対象は、前記対象の体液中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、閾値を超える場合に、そのようなリスクを有すると同定される、
を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 16】

以下の：
前記対象の体液中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルを測定する工程、及び

40

前記レベルを、対象の平均動脈圧の介入閾値を 70 mmHg 、より好ましくは 75 mmHg 、さらにより好ましくは 80 mmHg に増加させて、輸液蘇生又は昇圧剤投与の開始する必要性と相関させる工程であって、前記対象の体液中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、閾値を超える場合に、当該対象が、そのような必要性を有すると確定する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のインビトロ方法によりショック状態を發達させるリスクにあると同定された対象においてショック状態を *in vivo* 治療又は予防するため

50

の方法において使用するための昇圧剤であって、前記対象が、前記対象の体液サンプル中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、閾値を超えているレベルを有すると同定されており、ここで前記サンプルが、ヒトクエン酸血漿、ヘパリン血漿、EDTA 血漿、全血、血清を含む群から選択され；ここで当該 *proADM* (配列番号 1) 及び / 又は断片が、アドレノメデュリン、ADM (配列番号 4) 及び / 又は ADM 1 - 52 Gly (配列番号 5) 及び中央領域 - プロ - アドレノメデュリン、MR - *proADM* (配列番号 3) 及び C - 末端プロアドレノメデュリン CT - *proADM* (配列番号 6) 及びプロアドレノメデュリン N - 20 末端ペプチド (配列番号 2) 及び *proADM* (配列番号 1) を含む群から選ばれ、そしてここで昇圧剤が、アドレナリン、カテコールアミン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、バソプレシン、レボシメンダン、バソプレッシン V 1 a 受容体アゴニスト、抗アドレノメデュリン抗体、ATP 依存性 K⁺ チャンネルの阻害剤、NOS 及び c - GMP の阻害剤を含む群 ~ 選択され、そして

ここで当該対象は、請求項 16 に記載のインビトロ方法において、前記対象の体液サンプル中の *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片の閾値を超えレベルを有すると同定され、そしてここで前記対象は、以下の：敗血症性ショック、心原性ショック及びアナフィラキシーショックを含む、生理的ショック状態；感染症、敗血症、心不全、心肺停止、心臓外科術後、右心室梗塞、徐脈性不整脈、多発性外傷、火傷、腎損傷の徴候を示すか又はこれらの状態に罹患しており、ここで血漿 ADM の 90 pg / ml 又は 70 pg / ml の閾値が適用され、そしてここで血漿 MR - *proADM* の 0.9 nmol / L 又は 0.7 nmol / L の閾値が適用され、ここで当該サンプルが、ヒトクエン酸、ヘパリン血漿、EDTA 血漿、全血、血清を含む群から選択され、そしてここで前記 *proADM* (配列番号 1) 及び / 又はその断片が、アドレノメデュリン、ADM (配列番号 4) 及び / 又は ADM 1 - 52 Gly (配列番号 5) 及び中央領域 - プロ - アドレノメデュリン、MR - *proADM* (配列番号 3) 及び C - 末端プロアドレノメデュリン CT - *proADM* (配列番号 6) 及びプロアドレノメデュリン N - 20 末端ペプチド (配列番号 2) 及び *proADM* (配列番号 1) を含む群から選ばれる、前記昇圧剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の主題は、輸液蘇生又は昇圧剤の投与を必要とする対象を確定するインビトロ方法であって：

- ・該対象の体液中の、*proADM* 及び / 又は少なくとも 6 個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルを決定する工程；
- ・該レベルを、該患者の輸液蘇生又は昇圧剤投与の必要性と相関させる工程：を含み、ここで該患者は、該対象の体液中の *proADM* 及び / 又は少なくとも 6 個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルが閾値を上回る場合に、かかる必要性を有するものとして確定される方法である。

【背景技術】

【0002】

ペプチドアドレノメジュリン (ADM) は、ヒト褐色細胞腫から単離された、52 個のアミノ酸を含む新規血圧降下ペプチドとして、最初に、Kitamura により説明された (参照 1；数値データは添付された参考文献を基にしている)。同じ年に、185 個のアミノ酸を含む前駆体ペプチドをコードしている cDNA 及びこの前駆体ペプチドの完全アミノ酸配列も、説明された。とりわけ N - 末端に 21 個のアミノ酸のシグナル配列を含む、前駆体ペプチドは、「プレプロアドレノメジュリン」 (*pre-proADM*) と称される。*Pre-proADM* は、185 個のアミノ酸を含む。成熟 ADM は、配列番号：4 に示され、ADM - Gly は配列番号：5 に示されている。

【0003】

成熟ペプチドアドレノメジュリン (ADM) は、52 個のアミノ酸を含み (配列番号：4)、且つこれは *pre-proADM* からタンパク質分解性切断により形成され、pr

e - proADMのアミノ酸95～146を含む、アミド化されたペプチドである。今日まで、pre-proADMの切断において形成されたペプチド断片の実質的にごくわずかな断片が、より正確に特徴づけられ、特に生理活性ペプチドのアドレノメジュリン(ADM)、及び、20個のアミノ酸(22-41)を含むペプチドで、これにpre-proADMにおけるシグナルペプチドの21個のアミノ酸が続く「PAMP」である。ADM及びPAMPの両方に関して、生理活性のある亜断片が、さらに発見され、より詳細に調べられている。1993年のADMの発見及び特徴決定は、活性の集中的研究及び溢れるような刊行物の引き金となり、その結果が様々な総説記事において最近まとめられ、本説明の文脈において、ADMに充てられた「ペプチド」号(Peptides 22 (2001))において認められた記事、特に(2)及び(3)が、特に参照された。更なる総説は、文献(4)である。今日までの科学研究において、とりわけ、ADMは、多機能性制御ペプチドとみなすことができることがわかった。これは、循環血中に、グリシンにより延長された不活性型で放出される(5)。また、ADMに特異的であり且つADMの作用を恐らく調節する結合タンパク質(6)も、存在する。

10

【0004】

これまでの研究で最も重要であるADMに加えPAMPのこれらの生理作用は、血圧へ影響を及ぼす作用であった。したがって、ADMは、効果的血管拡張薬であり、これは、特にADMのC-末端部分のペプチドセグメントによる血圧降下作用に関連することが可能である。

20

【0005】

さらに、pre-proADMから形成された上述の更なる生理活性ペプチドPAMPは、ADMの作用機序とは異なる作用機序を有するよう見えたとしても、PAMPは血圧降下作用を同様に示すことがわかった(上述の総説記事(3)及び(4)に加え、(7)、(8)又は(9)及び(10)参照)。

【0006】

さらに、循環血及び他の生物学的液体中で測定され得るADMの濃度は、数多くの病態において、対照健常者において認められる濃度を有意に上回っていることがわかった。したがって、うっ血性心不全、心筋梗塞、腎疾患、高血圧障害、糖尿病、ショックの急性期並びに敗血症及び敗血症性ショックの患者におけるADMレベルは、様々な程度であるが、有意に増加した。またPAMP濃度も、該病態の一部において増加したが、それらの血漿レベルは、ADMに比べ低下した((3); 1702頁)。

30

【0007】

通常ADMの高い濃度が、敗血症又は敗血症性ショックにおいて認められることが、さらに知られている((3)及び(11)、(12)、(13)、(14)及び(15)参照)。これらの知見は、敗血症及び他の重症症候群、例えばSIRSなどの患者における疾患経過の典型的現象として知られている典型的血行動態変化に関連付けられている。

【0008】

ADM及びPAMPは、これらのペプチドに相当するアミノ酸配列が等モル量の部分ペプチドとして存在するpre-proADMである同じ前駆体ペプチドから形成されると推定されるが、生物学的液体中で測定可能なADM又はPAMPの濃度は、明らかに異なる。このことは、特別なことではない。

40

【0009】

したがって、一種の及び同じ前駆体ペプチドの異なる分解産物の測定可能な濃度は異なって良く、例えばその理由は、これらは、例えば異なる病態の症例において、前駆体ペプチドの異なる断片化に繋がり、その結果異なる分解産物に繋がるような、異なる競合する分解経路の結果であるからである。前駆体ペプチドに含まれる特定の部分ペプチドは、遊離ペプチドとして形成されるか、又は形成されなくてよく、及び/又は異なるペプチドが、異なる様式で及び異なる量で形成される。前駆体ペプチドのプロセッシングのために例えただ一つの分解経路がとられ、その結果全ての分解産物が一種の及び同じ前駆体ペプチドから生じ、且つ主に等モル量でそれら自身形成されなければならないとしても、すなわ

50

ち例えば、各生物学的液体中でそれらの個々のものが異なる速度で形成され及び/又は異なる個別の安定性(寿命)を有する場合、或いはこれらが異なるクリアランス機序を基に及び/又は異なるクリアランス率で循環から除去されるならば、生物学的液体中で測定可能な異なる部分ペプチド及び断片の定常状態濃度は、非常に異なってよい。

【0010】

アドレノメジュリンは、敗血症発症時((16)、(17))、並びに多くの急性及び慢性疾患において((18)、(4))、中心的役割を果たす。

ADMのコグネート前駆体ペプチドのより安定した断片の決定により、ADMを、直接又は間接のいずれかで循環ADMレベルを測定する、いくつかの方法が説明されている。ごく最近になって、循環成熟ADMを測定するアッセイを説明する方法が公開された(Di Somma S, Magrini L, Travaglino F, Lalle I, Fiotti N, Cervellin G, Avanzi GC, Lupia E, Maisel A, Hein Fら:「救急診療部における感染症及び敗血症管理のためのバイオマーカーの革新的方法に関する見解(Opinion paper on innovative approach of biomarkers for infectious diseases and sepsis management in the emergency department)」、Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC 2013: 1-9.)。 10

【0011】

ADM前駆体由来の断片を定量する他の方法が、例えば、MR-proADMの測定(Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A.: Clin Chem. 2005年10月; 51(10): 1823-9.)、PAMPの測定(Washimine H, Kitamura K, Ichiki Y, Yamamoto Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T.: Biochem Biophys Res Commun. 1994年7月29日; 202(2):1081-7.) 20、CT-proADMの測定(EP211552)について説明されている。MR-proADM測定のための市販のアッセイが、利用可能である(BRAHMS MR-proADM KRYPTOR; BRAHMS社、ヘニッヒスドルフ、独国)(Clin Biochem. 2009年5月; 42(7-8):725-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.002. Epub 2009 Jan 23)。

【0012】

血漿中の中央領域(midregional)プロアドレノメジュリンの測定のための均一時間分解蛍光免疫測定は、完全自動化システムB.R.A.H.M.S KRYPTOR上である(Caruhel P, Mazier C, Kunde J, Morgenthaler NG, Darbouret B.)。これらのペプチドは同じ前駆体から化学量論的比で生成されるので、これらの血漿レベルは、ある程度相関している。

【0013】

わずかに数種の研究において、血漿ADMが、全身炎症、敗血症、重症敗血症又は敗血症性ショックを伴う患者において測定されており、そのレベルは、血行動態パラメータと相関している； 30

Hirataらの研究において、敗血症患者の血漿ADMは、心拍数、右動脈圧と相関するが、平均動脈圧(MAP)とは相関しないことがわかった(Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K, Marumo F:「敗血症において増加した循環アドレノメジュリン、新規血管拡張ペプチド」、The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1996, 81(4): 1449-1453)。

Nishioらは、敗血症性ショック患者において、ADMの増加した血漿濃度は、血管緊張の緩和と相関する(心係数、1回拍出量係数、心拍数、拡張期血圧の低下、体血管抵抗指数及び肺血管抵抗指数と相関)が、平均血圧との有意な相関は存在しないことを報告した [19]。 40

運動中の健常対象において、血漿ADM及びMAPの有意な負の相関が認められた [20]。

【0014】

いずれも、ショックを発症している患者における、pro-ADM若しくはそれらの断片としての循環ADM又は関連ペプチドのレベルと、輸液蘇生及び昇圧剤の必要要件の関係については、わからなかった。昇圧剤は通常、患者の状態が非常に重篤である場合に非常に遅れて投与されるので、これに関する医学的必要性は、満たされていない。患者の状態が非常に重篤になる前に輸液蘇生及び昇圧剤を必要とするそのような患者を確定する医 50

学的必要性は、満たされていない。ガイドラインが推奨する、カットオフ値 65 mmHg を適用する血圧測定によるよりも早く、輸液蘇生及び昇圧剤療法の必要性を予測する医学的必要性は、満たされていない [21]。血圧が低下したならば、これは、減少した酸素供給、臓器不全及び死亡につながる。したがって、血圧降下を発症するリスクのある患者を早くに確定する必要性は、満たされていない。そのような患者がより早く確定されたならば、他方例えば平均動脈圧についてより高いカットオフ値を、輸液蘇生及び昇圧剤療法の開始に適用することができる。より高い閾値レベルとは、 < 70 mmHg、好ましくは < 75 mmHg である。これは、65 mmHg を上回る時点で既に治療が始まることを意味する。

【発明の概要】

【0015】

本発明の主題は、輸液蘇生又は昇圧剤投与を必要とする対象を確定するインビトロ方法であって：

- ・該対象の体液中の、proADM及び/又は少なくとも6個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルを決定する工程；
- ・該レベルを、該対象又は患者の輸液蘇生又は昇圧剤投与の必要性と相関させる工程：を含み、ここで該対象又は患者は、該対象の体液中のproADM及び/又は少なくとも6個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルが閾値を上回る場合に、かかる必要性を有するものとして確定される方法である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の方法の一実施態様において、対象は、平均動脈圧 > 65 mmHg を有する。さらに、該対象は、平均動脈圧 < 75 mmHg を、別の実施態様において < 70 mmHg を有する。

【0017】

本発明の一実施態様において、該方法は、輸液蘇生又は昇圧剤投与の早期確定の方法であり、ここでより早期とは、カットオフ値 65 mmHg を適用する血圧測定によるよりもより早いこと、又は血圧の 65 mmHg への低下以前を意味する。

本発明の体液は、特定の実施態様において、血液試料である。血液試料は、全血、血清及び血漿を含む群から選択され得る。

【0018】

本発明の具体的実施態様において、該proADM及び/又は少なくとも6個のアミノ酸を有するそれらの断片は、下記を含む群から選択される：

配列番号:1 (proADM) : 164個のアミノ酸(preproADMの22-185)

ARLDVASEF RKKWKNWALS R GKRELRMSS SYPTGLADVK AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RRVY RQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYGRRR RRSLEAGPG RTLSSKPQA HGAPAPPSGS APHFL

配列番号:2(プロアドレノメジュリンN-20末端ペプチド) : ペプチド22-41

ARLDVASEF RKKWKNWALS R

配列番号:3(中央領域アドレノメジュリン、MR-proADM) : ペプチド45-92

ELRMSS SYPTGLADVK AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARIRV

配列番号:4(成熟アドレノメジュリン(成熟ADM) ; アミド化) : ペプチド95-146-CONH₂

YRQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGY-CONH₂

配列番号:5(アドレノメジュリン1-52-Gly(ADM 1-52-Gly)) : ペプチド95-147

YRQSMN NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYG

配列番号:6(C-末端プロアドレノメジュリン、CT-proADM) : ペプチド148-185

RRR RRSLEAGPG RTLSSKPQA HGAPAPPSGS APHFL

【0019】

本発明の具体的実施態様において、該proADM及び/又は少なくとも6個のアミノ酸を有するそれらの断片は、成熟ADM(配列番号:4)及び/又は成熟ADM 1-5

10

20

30

40

50

2 - G l y (配列番号 : 5) 及び M R - p r o A D M (配列番号 : 3) 及び C T - A D M (配列番号 : 6) を含む群から選択される。

【 0 0 2 0 】

本発明の具体的実施態様において、成熟 A D M (配列番号 : 4) 及び / 若しくは成熟 A D M 1 - 5 2 - G l y (配列番号 : 5) - 免疫反応性のレベル又は M R - p r o A D M (配列番号 : 3) 免疫反応性のレベル又は C T - A D M (配列番号 : 6) 免疫反応性のレベルのいずれかが、輸液蘇生又は昇圧剤投与の該患者の必要性を決定し且つこれと関連され、ここで該患者は、該対象の体液中の成熟 A D M (配列番号 : 4) 及び / 若しくは成熟 A D M 1 - 5 2 - G l y (配列番号 : 5) - 免疫反応性のレベル又は M R - p r o A D M (配列番号 : 3) 免疫反応性のレベル又は C T - A D M (配列番号 : 6) 免疫反応性のレベルが閾値を上回る場合に、かかる必要性を有するものとして確定される。

10

【 0 0 2 1 】

本発明の具体的実施態様において、p r o - A D M 及び / 又はそれらの断片のレベルは、成熟 A D M (配列番号 : 4) 及び / 又は成熟 A D M 1 - 5 2 - G l y (配列番号 : 5) の後続の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び成熟 A D M (配列番号 : 4) 及び / 又は成熟 A D M 1 - 5 2 - G l y (配列番号 : 5) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダー : の群から選択される少なくとも 1 種のバインダーを使用することにより決定される。

【 0 0 2 2 】

本発明の具体的実施態様において、p r o - A D M 及び / 又はそれらの断片のレベルは、M R - p r o A D M (配列番号 : 3) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び M R - p r o A D M (配列番号 : 3) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダー : の群から選択される少なくとも 1 種のバインダーを使用することにより決定される。

20

【 0 0 2 3 】

本発明の具体的実施態様において、p r o - A D M (配列番号 : 1) 及び / 又はそれらの断片のレベルは、C T - p r o A D M (配列番号 : 6) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び C T - p r o A D M (配列番号 : 6) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダー : の群から選択される少なくとも 1 種のバインダーを使用することにより決定される。

30

【 0 0 2 4 】

本発明の具体的実施態様において、アッセイが、p r o A D M 及び / 又は少なくとも 6 個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルを決定するために使用され、ここで該アッセイのアッセイ感度は、健常対象の A D M を定量することができ、且つ $< 70 \text{ pg/ml}$ 、好ましくは $< 40 \text{ pg/ml}$ 、及びより好ましくは $< 10 \text{ pg/ml}$ である。

【 0 0 2 5 】

本発明の具体的実施態様において、該バインダーは、p r o A D M 及び / 又はそれらの断片への結合親和性の少なくとも 10^7 M^{-1} 、好ましくは 10^8 M^{-1} を示し、好ましい親和性は、 10^9 M^{-1} より大きく、最も好ましくは 10^{10} M^{-1} よりも大きい。当業者は、化合物のより高い投与量を適用することにより、より低い親和性を補償すると考えることができ、この方策は、本発明の範囲外に繋がるものではないことを知っている。

40

【 0 0 2 6 】

アドレノメジュリンに対する抗体の親和性を決定するために、アドレノメジュリンの固定化された抗体に対する結合キネティクスを、B i a c o r e 2000 システム (GE Healthcare Europe 社、フライブルグ、独国) を使用する、非標識表面プラズモン共鳴により決定した。抗体の可逆的固定化は、製造業者の指示に従い、C M 5 センサー表面に高密度で共有結合された抗 - マウス F c 抗体を使用し実行した (マウス抗体捕獲キット ; GE Healthcare 社) (2 2) 。

【 0 0 2 7 】

本発明の具体的実施態様において、該バインダーは、p r o A D M 及び / 又はそれらの

50

断片へ結合する抗体又は抗体断片又は非-Ig スカフォールドを含む群から選択される。

本発明の具体的実施態様において、アッセイは、proADM及び/又は少なくとも6個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルを決定するために使用され、ここでかかるアッセイは、サンドイッチアッセイ、好ましくは完全に自動化されたアッセイである。

【0028】

本発明の一実施態様において、これは、完全に自動化されたアッセイシステムを必要としない、患者の傍で1時間以内に検査を行うことができる検査技術である、いわゆるPOC-検査(ポイントオブケア)であってよい。この技術の一例は、免疫クロマトグラフィ-検査技術である。

【0029】

本発明の一実施態様において、かかるアッセイは、非限定的に、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光標識を含む検出技術の任意の種類を使用するサンドイッチイムノアッセイ、好ましくは完全自動化アッセイである。本発明の一実施態様において、かかるアッセイは、酵素標識されたサンドイッチアッセイである。自動化又は完全自動化アッセイの例は、下記のシステムの一つに使用され得るアッセイを含む: Roche Elecsys (登録商標)、Abbott Architect (登録商標)、Siemens Centaur (登録商標)、Brahms Kryptor (登録商標)、Biomerieux VIDAS (登録商標)、Aleris Triage (登録商標)。

【0030】

様々な免疫測定が公知であり、且つ本発明のアッセイ及び方法のために使用することができ、これらは、放射免疫測定(RIA)、均一酵素-増幅免疫測定(EMIT)、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、アポ酵素再活性化免疫測定(ARIS)、ディップスティック免疫測定及び免疫-クロマトグラフィ-アッセイを含む。

本発明の具体的実施態様において、該2種のバインダーの少なくとも1種は、検出されるために標識されている。

【0031】

好ましい検出方法は、例えば放射免疫測定(RIA)、化学発光-及び蛍光-免疫測定、酵素結合免疫測定(ELISA)、Luminex-ベースのビーズアレイ、タンパク質マイクロアレイアッセイなどの、様々なフォーマットの免疫測定、並びに即時免疫クロマトグラフィ-ストリップ試験などの、迅速試験フォーマットを含む。

好ましい実施態様において、該標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨウ素標識を含む群から選択される。

【0032】

これらのアッセイは、均一又は不均一アッセイ、競合及び非競合アッセイであることができる。一実施態様において、アッセイは、非競合的免疫測定である、サンドイッチアッセイの形状であり、ここで検出及び/又は定量されるべき分子は、第一の抗体及び第二の抗体へ結合される。第一の抗体は、固相、例えばビーズ、ウェル若しくは他の容器の表面、チップ又はストリップに結合され、第二の抗体は、例えば、色素、放射性同位体、又は反応性部分若しくは触媒活性部分により、標識されている抗体である。次に被検体へ結合された標識された抗体の量が、好適な方法により測定される。「サンドイッチアッセイ」

【0033】

別の実施態様において、アッセイは、2種の捕獲分子、好ましくは両方共液体反応混合物中の分散体として存在する抗体を含み、ここで第一の標識成分は、第一の捕獲分子に付着され、該第一の標識成分は、蛍光-又は化学発光-消光又は増幅を基にした標識システムの一部であり、並びに該印付けシステムの第二の標識成分は、第二の捕獲分子へ付着され、その結果両方の捕獲分子の被検体への結合時に、測定可能なシグナルが発生され、試料を含有する溶液中で形成されたサンドイッチ複合体の検出が可能になる。

【0034】

10

20

30

40

50

別の実施態様において、該標識システムは、蛍光色素又は化学発光色素、特にシアニン型の色素と組合せた、希土類クリプテート又は希土類キレートを含む。

本発明の文脈において、蛍光ベースのアッセイは、色素の使用を含み、これは例えば、FAM(5-又は6-カルボキシフルオレセイン)、VIC、NED、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、IRD-700/800、CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7などのシアニン色素、キサンテン、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、TET、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2'7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、5-カルボキシローダミン-6G(R6G5)、6-カルボキシローダミン-6G(RG6)、ローダミン、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ローダミン110、BODIPY TMRなどのBODIPY色素、オレゴングリーン、ウンベリフェロンなどのクマリン、Hoechst 33258などのベンズイミド；フェナントリジン、例えばテキサスレッド、Yakima Yellow、Alexa Fluor、PET、臭化エチジウム、アクリジニウム色素、カルバゾール色素、フェノキサジン色素、ポルフィリン色素、ポリメチン色素及び同類のものを含む群から選択され得る。

【0035】

本発明の文脈において、化学発光ベースのアッセイは、文献(24)において化学発光物質に関して説明された物理原理を基に、色素の使用を含む。好ましい化学発光色素は、アクリジニウムエステルである。

【0036】

本明細書で言及する「アッセイ」又は「診断アッセイ」は、診断分野において適用される任意の型であることができる。かかるアッセイは、検出されるべき被検体の、1又は複数の捕獲プローブへの、ある親和性での結合を基にすることができる。捕獲分子と標的分子又は関心対象の分子の間の相互作用に関して、親和定数は、 10^8M^{-1} よりも大きいことが好ましい。

【0037】

本発明の文脈において、「バインダー分子」は、試料由来の標的分子又は関心対象の分子、すなわち被検体(すなわち、本発明の文脈において、PCT及びそれらの断片)への結合に使用することができる分子である。したがってバインダー分子は、標的分子又は関心対象の分子へ特異的に結合するために、空間的に、並びに表面電荷、疎水性、親水性、ルイスドナー及び/又はアクセプターの存在若しくは非存在などの表面特徴に関しての両方で、適切に造形されなければならない。これにより、結合は、捕獲分子と標的分子又は関心対象の分子の間の、例えば、イオン結合、ファンデルワールス結合、 π -結合、 π -結合、疎水性結合又は水素結合の相互作用又は前述の相互作用の2又はそれ以上の組合せにより媒介され得る。本発明の文脈において、バインダー分子は、例えば、核酸分子、糖分子、PNA分子、タンパク質、抗体、ペプチド又は糖タンパク質を含む群から選択され得る。好ましくは、バインダー分子は、標的又は関心対象の分子に対する十分な親和性を伴うそれらの断片を含む抗体、並びに組み換え抗体又は組み換え抗体断片を含む抗体に加え、それらの長さが少なくとも12個のアミノ酸を伴う変種鎖由来の該抗体又は断片の化学的及び/又は生化学的に修飾された誘導体である。

【0038】

化学発光標識は、アクリジニウムエステル標識、イソルミノール標識に關与するステロイド標識及び同類のものであることができる。

酵素標識は、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、クレアチンキナーゼ(CPK)、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)、酸性ホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどであることができる。

【0039】

本発明の一実施態様において、該2種のバインダーの少なくとも1種は、磁気粒子として固相に、及びポリスチレン表面に結合されている。

本発明の具体的実施態様において、該2種のバインダーの少なくとも1種は、固相に結合されている。

【0040】

本発明の一実施態様において、試料中で測定されたADM又はそれらの断片の濃度は、血漿又は血液中で10～500pg/mlの範囲である。

本発明のADMレベル又はproADMレベル又はそれらの断片のレベルは各々、実施例に概略されるような、記載されたADMアッセイ(又は各々、proADMアッセイ若しくはそれらの断片アッセイ)により決定される。前述の値は、それらの校正の方式に応じて、他のADMアッセイ(又は各々、proADMアッセイ若しくはそれらの断片アッセイ)とは異なることがある。したがって前述の値は、校正における差異を考慮し、かかる異なるように校正されたADMアッセイに適用されなければならない。ADMアッセイ(又は各々、proADMアッセイ若しくはそれらの断片アッセイ)は、それらの正常範囲(健常集団)による相関及び調節により校正されることができる。或いは、市販の対照試料を、異なる校正の調節に使用することができる(ICI Diagnostics社、ベルリン、独国)。

【0041】

記載されたADMアッセイにより、正常集団の中央値は、24.7pg/mLであると決定されている。

本発明の具体的実施態様において、血漿ADMの閾値90pg/ml、好ましくは70pg/mlが適用される。

本発明の具体的実施態様において、血漿MR-proADM閾値0.9nmol/L、好ましくは0.7nmol/Lが適用される。

本発明の具体的実施態様において、血漿CT-proADM閾値1.0nmol/L、好ましくは0.8nmol/Lが適用される。

【0042】

血漿ADM又は血漿MR-proADM又は血漿CT-proADMのレベルが、該閾値を上回る場合、当該対象は、昇圧剤による治療を必要とし得る。

本発明の具体的実施態様において、該試料は、ヒトクエン酸血漿、ヘパリン血漿、EDTA血漿、全血を含む群から選択される。

【0043】

輸液蘇生又は昇圧剤による治療が必要であり得る対象は、以下を含む群から選択される状態に罹患し得る：以下により詳細に説明する、生理的ショック状態が、感染症、SIRS、敗血症、心不全、心肺停止、心臓外科術後、右心室梗塞、徐脈性不整脈、多発性外傷、火傷、腎損傷などもを発症するリスクのある患者。

【0044】

この型のショックは、以下により引き起こされ得る：

- ・重度の出血、
- ・肺塞栓(肺内の血栓)、
- ・重度の吐気及び下痢、
- ・脊髄損傷、
- ・中毒。

また、非常に特定の症状を伴う、生理的ショックの具体的型も存在する。

【0045】

心原性ショック：

心原性ショックは、心臓が重度に損傷された場合に - 例えば、重度の心発作により - 起こり、且つもはや適切に体の方々に血液を送り出すことができず、非常に低い血圧を引き起こす。これは、心発作後の約8%において発症する。これは、治療が困難であり得るが、心拍動をより強力にするために、薬物が投与される。これは、心臓がそれ自身修復する

10

20

30

40

50

まで患者に最悪の状況をやり過ごさせるのに十分であるが、心原性ショックは依然10症例中8例と多くで致命的である。「血管再建」又は心筋への血流回復への新規治療は、生存率を向上する。

【0046】

敗血症性ショック：

これは、重篤な細菌感染症が、血圧の低下を引き起こす場合に起こる。これは、50%を超える症例において致命的である。これは細菌感染症により引き起こされるが、抗生物質による敗血症性ショックの治療は簡単とは言えず、その理由は、細菌が全滅された場合に、細菌は大量の毒素を放出し、このことは最初にショックを増悪する。これは常に、正確な薬物及び補液がもたらされ得る病院において治療されなければならない。敗血症性ショックの一つの型は、毒素性ショック症候群であり - 細菌ブドウ球菌の特定株により引き起こされる稀ではあるが重度の疾患である。

10

【0047】

アナフィラキシーショック：

アナフィラキシーショックは、重度のアレルギー反応である。一般的誘発因子としては、ハチ及びジガバチの針、ナッツ、甲殻類、卵、ラテックス及びペニシリンを含む特定の医薬品が挙げられる。症状は以下である：

- ・口唇及び舌のしびれ及び腫れ、
- ・呼吸困難（喘息発作時のような）、
- ・発赤、掻痒又は水疱形成した皮膚、くしゃみ、
- ・涙目、
- ・悪心、
- ・不安症。

20

アナフィラキシーは、病院における緊急の治療を必要とする。リスクのある人は、常に、アドレナリンを含む緊急用アナフィラキシー処置キットを携帯すべきである。

【0048】

敗血症及びその進展した形（重症敗血症、敗血症性ショック）は、死亡率が30～70%であり、大きい医療上の問題であり続けている。対症療法に利点があるが、米国だけでも、毎年750,000名が敗血症を発症し、225,000名が死亡しており、敗血症の発生率は、毎年1.5%～8%の割合で上昇している[4-6]。敗血症患者の救命のためには、最初に適時、抗生物質又は他の手段により感染性刺激物と闘うことは必須であり、二番目には適時状態の悪化が認められた時点で、例えば重症敗血症が敗血症性ショックに進行した時、この理由のみでその後好適な昇圧剤療法を、早期に開始することができる。何らかの遅延は、患者を死に至らせるリスクが増大する。

30

【0049】

敗血症性ショックに進行している患者において輸液蘇生又は昇圧剤/変力作用薬療法を開始することが推奨される状況は、敗血症救命キャンペーン（SSC）ガイドラインに説明されている[3]：平均動脈圧（MAP）65mmHgを維持するために、初回輸液蘇生に反応しない低血圧症のために昇圧剤を適用することが推奨されている。このガイドラインはまた、どの時どの昇圧剤/変力作用薬が優先的に適用されるかについても語っている。現在の共通の見解は以下である：最初に選択される昇圧剤としてのノルエピネフリン。適切な血圧を維持するために追加の薬剤が必要とされる時点で、エピネフリン（ノルエピネフリンに追加及び可能性としてはこれと代替）。MAPの上昇又はノルエピネフリン（NE）用量（UG）の減少のいずれかを意図して、バゾプレシン0.03単位/分を、NEへ追加することができる。概して、臨床の実践において現在使用される昇圧剤及び変力作用薬は、以下である[7、8]：カテコールアミン（ドパミン、ドブタミン、ノルエピネフリン、エピネフリン、イソプロテレノール、フェニレフリン）、ホスホジエステラーゼIII阻害剤（ミルリノン、アムリノン）、バゾプレシン、レボシメندان。

40

【0050】

加えて、例えば選択的バゾプレシンV1受容体アゴニストである *Selepressi*

50

n [9] 及び抗 - アドレノメジュリン抗体など、他の血管作用性化合物が開発中である。

他の化合物が、研究中であるが、これらの治療について入手可能な臨床データは、わずかであり、これらのアプローチのかなり曖昧な結果が、大規模治験において得られた [1 0]。これらは、ATP - 依存性 K⁺ - チャネルの阻害剤 (グリベンクラミド [1 1、1 2]) 及び NOS 阻害剤 (N^o - モノメチル - L - アルギニン [1 3、1 4]) 及び c G M P 阻害剤 (メチレンブルー [1 5、1 6]) である。

【 0 0 5 1 】

昇圧剤及び変力作用薬は、様々な生理的ショックの型のみではなく、心臓血管疾患 (うっ血性心不全、心肺停止、心臓外科術後、右心室梗塞、徐脈性不整脈) をも、治療及び予防するために、臨床適用される [7]。

【 0 0 5 2 】

臨床の観点から、危篤状態の患者においては、血圧は常にモニタリングされるので、プレゼンテーション (presentation) 時に昇圧剤を必要とせず各閾値を上回る値の患者、例えば高 ADM ($> 70 \text{ pg/ml}$) の患者は、低血圧に関連した臓器不全及びそれに続く高死亡率から患者を保護するために、循環をより早く支援する目的で、決定した時点で MAP $< 66 \text{ mmHg}$ から例えば $< 75 \text{ mmHg}$ までに適合させることにより、昇圧剤治療されるべきである。ADM $> 70 \text{ pg/ml}$ の患者についてこの規則を用い且つ MAP $> 75 \text{ mmHg}$ で昇圧剤により治療し、患者 (第 3 群) は、標準のケア処置 (66 mmHg) の前に、平均 1.6 日間治療されるであろう。

【 0 0 5 3 】

したがって本発明の具体的実施態様において、該対象の体液中の proADM 及び / 又は少なくとも 6 個のアミノ酸を有するそれらの断片のレベルが、閾値を上回る場合、及び患者が、MAP $> 75 \text{ mmHg}$ を、しかし好ましくは MAP $> 66 \text{ mmHg}$ 、より好ましくは $> 70 \text{ mmHg}$ を有する場合に、該患者は、昇圧剤投与の必要性を有するものとして、確定される。

【 0 0 5 4 】

本発明の具体的実施態様において、血漿 ADM の閾値 90 pg/ml 、好ましくは 70 pg/ml が適用され、及び / 又は患者は、MAP $> 75 \text{ mmHg}$ 、しかし好ましくは MAP $> 66 \text{ mmHg}$ 、より好ましくは $> 70 \text{ mmHg}$ を有する。

本発明の具体的実施態様において、血漿 MR - proADM の閾値 0.9 nmol/L 、好ましくは 0.7 nmol/L が適用され、及び / 又は患者は、MAP $> 75 \text{ mmHg}$ 、しかし好ましくは MAP $> 66 \text{ mmHg}$ 、より好ましくは $> 70 \text{ mmHg}$ を有する。

【 0 0 5 5 】

本発明の具体的実施態様において、血漿 CT proADM の閾値 1.0 nmol/L 、好ましくは 0.8 nmol/L が適用され、及び / 又は患者は、MAP $> 75 \text{ mmHg}$ 、しかし好ましくは MAP $> 66 \text{ mmHg}$ 、より好ましくは $> 70 \text{ mmHg}$ を有する。

血漿 ADM 又は血漿 MR - proADM 又は血漿 CT proADM のレベルが、該閾値を上回る場合、及び / 又は患者が、MAP $> 75 \text{ mmHg}$ 、しかし好ましくは MAP $> 66 \text{ mmHg}$ 、より好ましくは $> 70 \text{ mmHg}$ を有する場合、該患者は、昇圧剤による治療が必要である。

【 0 0 5 6 】

補液又は輸液蘇生は、発汗、出血、体液移動、又は、前述のような他の病理学的プロセスにより失われた体液を補充する医療行為である。液体は、経口投与 (飲料)、静脈内投与、経直腸的に、又は皮下注入、皮下組織への液体の直接注射により置き換えることができる。経口及び皮下経路により投与される液体は、静脈内に投与される液体よりも、より緩徐に吸収される。経口補液療法 (ORT) は、コレラ又はロタウイルスにより引き起こされたものなど、下痢、特に胃腸炎 / 胃腸障害を伴う脱水のための簡単な処置である。ORT は、経口摂取される塩及び糖質の溶液からなる。

【 0 0 5 7 】

重度の脱水において、静脈内補液が好ましく、且つ救命し得る。これは、細胞内腔及び

10

20

30

40

50

血管腔の両方の内部の体液が枯渇した場合に、特に有用である。

補液はまた、前述の状態のいずれかによる、体液枯渇においても適応される。

【0058】

本発明の抗体は、抗原へ特異的に結合する免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされた1又は複数のポリペプチドを含むタンパク質である。認識された免疫グロブリン遺伝子は、 γ 、 δ 、 ϵ (I g A)、 α 、 β (I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄)、 μ (I g D)、 ν (I g E) 及び λ (I g M) 定常領域遺伝子に加え、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。完全長免疫グロブリン軽鎖は一般に、約25 K d又は長さ214アミノ酸である。完全長免疫グロブリン重鎖は一般に、約50 K d又は長さ446アミノ酸である。軽鎖は、NH₂-末端で可変領域遺伝子(長さ約110アミノ酸)により、及びC
OOH-末端で κ 又は λ 定常領域遺伝子によりコードされている。重鎖は同様に、可変領域遺伝子(長さ約116アミノ酸)及び他の定常領域遺伝子の一つによりコードされている。

10

【0059】

抗体の基本的構造単位は一般に、免疫グロブリン鎖の2つの同一対からなる四量体であり、各対は、1本の軽鎖及び1本の重鎖を有する。各対において、軽鎖及び重鎖可変領域は、抗原へ結合し、且つ定常領域はエフェクター機能を媒介する。免疫グロブリンはまた、例えば、Fv、Fab、及び(Fab')₂、さらには二機能性ハイブリッド抗体及び単鎖抗体を含む、様々な他の形でも存在する(例えば、Lanzavecchiaら、Eur. J. Immunol. 17:105, 1987; Hustonら: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883, 1988; Bird
ら: Science 242:423-426, 1988; Hoodら: Immunology, Benjamin, N.Y., 第2版, 1984; Hunkapiller及びHood: Nature 323:15-16, 1986参照)。免疫グロブリン軽鎖又は重鎖可変領域は、相補性決定領域(CDR)とも称される、3つの超可変領域により中断されたフレームワーク領域を含む(「免疫学的関心のあるタンパク質配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, E. Kabatら, U.S. Department of Health and Human Services, 1983参照)。前述のように、CDRは主に、抗原のエピトープへの結合に寄与する。免疫複合体は、抗原に特異的に結合された、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体若しくはヒト抗体、又は機能性抗体断片などの、抗体である。

20

【0060】

キメラ抗体は、その軽鎖及び重鎖遺伝子が、通常異なる種に属する免疫グロブリン可変領域遺伝子及び定常領域遺伝子から、遺伝子操作により構築される抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変セグメントが、 γ 、 δ 、 ϵ 、 α 、 β 、 μ 、 ν 及び λ 1又は3などの、ヒト定常セグメントへ連結され得る。したがって一例において、治療用キメラ抗体は、マウス抗体由来の可変又は抗原-結合ドメイン及びヒト抗体由来の定常又はエフェクタードメインで構成されたハイブリッドタンパク質であるが、他の哺乳動物種も使用することができ、あるいは可変領域は、分子技術により作製することができる。キメラ抗体の作製方法は、当該技術分野において周知であり、例えば米国特許第5,807,715号を参照されたい。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域及び非-ヒト(マウス、ラット又は合成など)免疫グロブリン由来の1又は複数のCDRを含む免疫グロブリンである。CDRを提供する非-ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と称され、フレーム
ワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と称される。一実施態様において、全てのCDRは、ヒト化免疫グロブリン中のドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合、これらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85~90%、例えば約95%以上など同一でなければならない。したがって、可能性のあるCDRを除き、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化された軽鎖及びヒト化された重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリン又は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから採用されたアミノ酸による限定数の置換を有することができる。ヒト化又は他のモノクローナル抗体は、

30

40

50

抗原結合又は他の免疫グロブリン機能に対し実質的に作用しない追加の保存的アミノ酸置換を有することができる。保存的置換の例は、gly、ala；val、ile、leu；asp、glu；asn、gln；ser、thr；lys、arg；及び、phe、tyrなどの置換である。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作により構築することができる（例えば、米国特許第5,585,089号参照）。ヒト抗体は、軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子が、ヒト起源である抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において公知の方法を用いて、産生することができる。ヒト抗体は、関心対象の抗体を分泌するヒトB細胞の不死化により産生することができる。不死化は、例えば、EBV感染によるか、又はトリオーマ細胞を作製するためのヒトB細胞の骨髓腫若しくはハイブリドーマ細胞との融合により、達成することができる。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイ法（例えば、Dowerら、PCT公開W091/17271；McCaffertyら、PCT公開W092/001047；及び、Winter、PCT公開W092/20791参照）により産生されるか、又はヒトコンビナトリアルモノクローナル抗体ライブラリーから選択されることができる（Morphosysウェブサイト参照）。ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニック動物を用いて、調製することができる（例えば、Lonbergら、PCT公開W093/12227；及び、Kucherlapati、PCT公開W091/10741参照）。

10

【0061】

したがって、本抗体は、当該技術分野において公知のフォーマットを有することができる。例としては、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR-グラフト化抗体がある。好ましい実施態様において、本発明の抗体は、例えばIgG、典型的完全長免疫グロブリン、又は重鎖及び/又は軽鎖の少なくともF-可変ドメインを含む抗体断片のように、組み換えにより作製された抗体、例えば化学的に結合された抗体（断片抗原結合）であり、Fabミニボディ、一本鎖Fab抗体、エピトープタグを伴う一価Fab抗体、例えばFab-V5Sx2を含むFab-断片；CH3ドメインを伴う二量体化された二価Fab（ミニ-抗体）；例えば異種ドメインに支援された多量体化により形成された、例えばdHLXドメインの二量体化により形成された、二価Fab又は多価Fab、例えばFab-dHLX-FSx2；F(ab')₂-断片、scFv-断片、多量体化された多価及び/又は多重特異性scFv-断片、二価及び/又は二重特異性ディアボディ、BITE（登録商標）（二重特異性T細胞誘導抗体）、三機能性抗体、例えばG以外の様々なクラス由来の多価抗体；単-ドメイン抗体、例えばラクダ科動物又は魚類免疫グロブリン由来のナノボディ、並びに多くの他のものを含むが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0062】

抗体に加え、標的分子と複合し且つ高度に標的特異性のバイオポリマーを作製するために使用される他のバイオポリマースカフォールドは、当該技術分野において周知である。例としては、アプタマー、スピーゲルマー、アンチカリン及びコノトキシンがある。

【0063】

好ましい実施態様において、抗体フォーマットは、Fv断片、scFv断片、Fab断片、scFab断片、(Fab)₂断片及びscFv-Fc融合タンパク質を含む群から選択される。別の好ましい実施態様において、抗体フォーマットは、scFab断片、Fab断片、scFv断片、及びPEG化された断片など、それらの生物学的利用能が最適化された複合体を含む群から選択される。最も好ましいフォーマットの一つは、scFabフォーマットである。

40

【0064】

非-Igスカフォールドは、タンパク質スカフォールドであってよく、且つこれらはリガンド又は抗原に結合することが可能であるので、抗体模倣体として使用されてよい。非-Igスカフォールドは、テトラネクチン-ベースの非-Igスカフォールド（例えば、US 2010/0028995に開示）、フィブロネクチンスカフォールド（例えば、EP 1266 025に開示）；リポカリン-ベースのスカフォールド（例えば、WO 2011/154420に開示）；ユビキチンスカフォールド（例えば、WO 2011/073214に開示）、トランスフェリンスカフォール

50

ド（例えば、US 2004/0023334に開示）、プロテイン A スカフォールド（例えば、EP 2231 860に開示）、アンキリン反復配列ベースのスカフォールド（例えば、WO 2010/060748に開示）、マイクロタンパク質（好ましくは形成するシスチンノットを形成するマイクロタンパク質）スカフォールド（例えば、EP 2314308に開示）、F y n S H 3ドメインベースのスカフォールド（例えば、WO 2011/023685に開示）、E G F R - A - ドメインベースのスカフォールド（例えば、WO 2005/040229に開示）、及びK u n i t zドメインベースのスカフォールド（例えば、EP 1941867に開示）を含む群から選択されてよい。

【0065】

本発明の一実施態様において、本発明の抗体は、下記のように作製され得る：

B a l b / cマウスを、0及び14日目に、A D M - 1 0 0 μ g ペプチド - B S A - 複合体（完全フロイントアジュバント100 μ l中に乳化された）、並びに21及び28日目に50 μ g（不完全フロイントアジュバント100 μ l中）により免疫化した。動物は、融合実験の3日前に、1回腹腔注射及び1回静脈内注射として投与される、食塩水100 μ l中に溶解した該複合体50 μ gを、受け取った。

【0066】

免疫化されたマウス由来の脾細胞及び骨髓腫細胞株S P 2 / 0の細胞を、50%ポリエチレングリコール1 mlにより、30秒間、37 で融合した。洗浄後、細胞を、96 - ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンを、H A T培地 [20%ウシ胎仔血清及びH A T - 補充物を補充したR P M I 1 6 4 0培養培地] において成長させることにより選択した。2週間後、H A T培地を、3継代のためにH T培地と交換し、引き続き通常の細胞培養培地に戻した。

【0067】

この細胞培養物上清を、融合後3週間、抗原特異性I g G抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験した微量培養物を、増殖のために、24 - ウェルプレートへ移した。再試験後、選択された培養物を、限定 - 希釈技術を用い、クローニング及び再クローニングし、且つアイソタイプを決定した(同じく、Lane, R.D. (1985)、*「モノクローナル抗体-分泌性ハイブリドーマの生産増大のための短期ポリエチレングリコール融合技術(A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas)*」、*J. Immunol. Meth.* 81 : 223-228 ; Ziegler, B.ら(1996)、*「サイトフロメトリー及びモノクローナルGAD抗体の補体依存性抗体媒介性細胞傷害により試験したラット島細胞表面上で検出不可能なグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD) (Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies)*」、*Horm. Metab. Res.* 28: 11-15参照)。

【0068】

抗体は、下記の手順に従うファージディスプレイにより作製することができる：

ヒトナープ抗体遺伝子ライブラリーH A L 7 / 8を、アドレノメジュリンペプチドに対する組み換え一本鎖F - 可変ドメイン (s c F v) の単離のために、使用した。この抗体遺伝子ライブラリーを、アドレノメジュリンペプチド配列へ2種の異なるスパーサーにより連結されたビオチンタグを含むペプチドの使用を含む、パニング戦略によりスクリーニングした。非特異的に結合された抗原及びストレプトアビジン結合された抗原を使用するパニングラウンド混合物を使用し、非特異的バインダーのバックグラウンドを最小化した。パニングの第3ラウンドから溶離されたファージを使用し、モノクローナルs c F v 発現している大腸菌株を作製した。これらのクローン性株の培養物からの上清を、抗原E L I S A 試験に直接使用した(Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Riilker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schutte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Diibel, S. : 2011 *「プロテオソーム研究のためのヒトscFv抗体作製パイプライン(A human scFv antibody generation pipeline for proteome research)*」、*Journal of Biotechnology* 152, 159- 170 ; Schutte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rose

10

20

30

40

50

nstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Diibel, S.: 2009 「アスペルギルス属の特異的検出のための推定Cr f スプライシング変種の同定及び組み換え抗体の作製(Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of Aspergillus fumigatus)」, PLoS One 4, e6625参照)。

【0069】

マウス抗体のヒト化は、下記の手順に従い実行することができる：

マウス起源の抗体のヒト化のために、この抗体配列を、相補性決定領域(CDR)を伴うフレームワーク領域(FR)と抗原の構造的相互作用について分析した。構造モデリングを基に、ヒト起源の好適なFRを選択し、且つマウスCDR配列を、ヒトFRに移植した。CDR又はFRのアミノ酸配列に変動を導入し、FR配列に関する種スイッチにより無効とされた構造相互作用を取り戻すことができる。この構造相互作用の回復は、ファージディスプレイライブラリーを使用するランダムアプローチによるか、又は分子モデリングによりガイドされる方向づけられたアプローチを介して、達成され得る(Almagro JC, Fransson J.: 2008 「抗体のヒト化(Humanization of antibodies)」, Front Biosci. 2008 Jan 1; 13:1619-33参照)。

【0070】

本発明の別の主題は、輸液蘇生又は昇圧剤投与の必要性のある対象の治療において使用する昇圧剤であり、ここで該対象は、前述のインビトロ方法の全ての実施態様を含む該インビトロ方法のいずれかに従い確定される。

【図面の簡単な説明】

【0071】

図の説明

【図1】図1は、典型的ADM投与量/シグナル曲線、及び100 µg/mL抗体NT-Hの存在下でのADM投与量/シグナル曲線を示す。

【図2】図2は、ロジスティック回帰分析の結果の、推定院内死亡率である。

【図3】図3は、推定院内死亡率 - ADMは、APACHEから独立し、且つ追加の予後情報を提供する。

【図4】図4は、血漿ADMレベルによって決まる平均動脈圧である。散布図及び相関係数を、入院時の患者から得た値について示している。統計的有意性は、 $p < 0.0001$ であった。

【図5】図5は、入院時の昇圧剤療法を必要とする患者、対、昇圧剤療法を必要としない患者におけるアドレノメジュリン濃度である。これら2群間の差異は、統計学的に有意であった($p < 0.0001$)。

【図6】図6は、入院時に昇圧剤により治療を受けた患者(「ADMなし(no ADM)」)、入院後最初の4日間以内昇圧剤療法を必要としなかった患者(「処置なし(never)」)、及び入院後最初の4日以内に昇圧剤療法を必要としたが入院日は必要としなかった患者(「遅れて処置(later)」)の、入院時のADM濃度である。グラフにおいて、ADM濃度の正常範囲が示されている。

【図7】図7は、昇圧剤療法を必要とする(感度)及び必要としない(特異度)、急性心不全患者のADM濃度の受診者動作特性(ROC)曲線である。曲線下面積は、0.75であった($p < 0.0001$)。

【実施例】

【0072】

実施例1

抗体の作製及びそれらの親和定数の決定

本発明者らは、ADMのN-末端、中央領域及びC-末端部分に結合するマウスモノクローナル抗体を開発し、且つそれらの親和定数を決定した(表1)。

【0073】

免疫化のためのペプチド

10

20

30

40

50

ペプチドは、JPT Peptide Technologies社(ベルリン、独国)により供給された。ペプチドは、スルホ-S M C C架橋法を用い、B S Aに結合させた。この架橋手順は、製造業者(Thermo Fisher/ Pierce社)の指示に従い行った。マウス抗体を、下記の方法に従い作製した：

B a l b / cマウスを、0及び14日目に、100 μ g ペプチド - B S A - 複合体(完全フロイントアジュバント100 μ l中に乳化された)、並びに21及び28日目に50 μ g(不完全フロイントアジュバント100 μ l中)により免疫化した。動物は、融合実験の3日前に、1回腹腔注射及び1回静脈内注射として投与される、食塩水100 μ l中に溶解した複合体50 μ gを受け取った。

【0074】

免疫化されたマウス由来の脾細胞及び骨髓腫細胞株S P 2 / 0の細胞を、50%ポリエチレングリコール1mlにより、30秒間、37 で融合した。洗浄後、細胞を、96-ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンを、H A T培地[20%ウシ胎仔血清及びH A T - 補充物を補充したR P M I 1 6 4 0培養培地]において成長させることにより選択した。2週間後、H A T培地を、3継代のためにH T培地と交換し、引き続き通常の細胞培養培地に戻した。

【0075】

この細胞培養物上清を、融合後3週間、抗原特異性I g G抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験した微量培養物を、増殖のために、24-ウェルプレートへ移した。再試験後、選択された培養物を、限定-希釈技術を用い、クローニング及び再クローニングし、且つアイソタイプを決定した(Lane, R.D. (1985)、「モノクローナル抗体-分泌性ハイブリドーマの生産増大のための短期間ポリエチレングリコール融合技術」、J. Immunol. Meth. 81 : 223-228 ; Ziegler, B.ら(1996)、「サイトフロメトリー及びモノクローナルGAD抗体の補体依存性抗体媒介性細胞傷害により試験したラット島細胞表面上で検出不可能なグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)」、Horm. Metab. Res. 28: 11-15参照)。

【0076】

【表1】

表1：

抗原/免疫原	ADMの領域	命名	親和定数Kd(M-1)
YRQSMNFFQGLRSFGC	1-16	NT-ADM	1,6 x 10 ⁹
CTVQKLAHQIQ	21-32	MR-ADM	2 x 10 ⁹
CAPRSKISPQGY-NH2	C-42-52	CT-ADM	1.1 x 10 ⁹

【0077】

モノクローナル抗体産生

抗体は、標準抗体産生法(Marxら、「モノクローナル抗体産生(Monoclonal Antibody Production)」、ATLA 25, 121, 1997)により作製し、及びプロテインAにより精製した。抗体の純度は、S D Sゲル電気泳動分析を基に、> 95%であった。

【0078】

親和定数

抗体のアドレノメジュリンに対する親和性を決定するために、固定化された抗体に対するアドレノメジュリンの結合キネティクスを、B i a c o r e 2 0 0 0システム(GE Healthcare Europe社、フライブルグ、独国)を使用する、無標識表面プラズモン共鳴により決定した。抗体の可逆性固定化は、製造業者の指示に従い、C M 5センサー表面へ、高密度で共有結合された抗-マウスFc抗体を用いて行った(マウス抗体捕獲キット ; GE Healt

10

20

30

40

50

hcare社)。

【0079】

標識手順(トレーサー)：抗体(PBS中1mg/ml、pH7.4)100ug(100ul)を、アクリジニウムNHS-エステル(アセトニトリル中1mg/ml、InvVent社、独国)10ulと混合し(57)、且つ室温で20分間インキュベーションした。標識したCT-Hを、Bio-Sil(登録商標)SEC 400-5(Bio-Rad Laboratories社、米国)上のゲル-濾過HPLCにより精製した。精製された標識された抗体を、溶液(リン酸カリウム300mmol/L、NaCl 100mmol/L、Na-EDTA 10mmol/L、ウシ血清アルブミン5g/L、pH7.0)中に希釈した。最終濃度は、200μLにつき標識された化合物およそ800.000相対発光量(RLU)(およそ20ng標識抗体)であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat LB 953(Berthold Technologies社、KG)を用いて測定した。

10

【0080】

固相：ポリスチレンチューブ(Greiner Bio-One International社、オーストリア)を、抗体(抗体1.5μg/0.3mL、NaCl 100mmol/L、トリス/HCl 50mmol/L、pH7.8)によりコーティングした(室温、18時間)。5%ウシ血清アルブミンでブロックした後、チューブをPBS(pH7.4)で洗浄し、真空乾燥した。

【0081】

キャリアプレート：合成ヒトADM(Bachem社、スイス)を、50mMトリス/HCl、250mM NaCl、0.2% Triton X-100、0.5% BSA、20錠/Lプロテアーゼコンプリートプロテアーゼ阻害カクテル錠(Roche社)；pH7.8を用い、線形希釈した。キャリアプレートは、使用まで-20で貯蔵した。

20

【0082】

実施例2

高シグナル/ノイズ比を生じる抗体組合せの決定

ADM免疫測定：

試料(又はキャリアプレート)50ulを、標識された二次抗体(200ul)の添加後、コーティングされたチューブにピペットで入れ、これらのチューブを、室温で2時間インキュベーションした。未結合のトレーサーを、洗浄液(20mM PBS、pH7.4、0.1% Triton X-100)により、5回洗浄(各1ml)することにより除去した。

30

チューブに結合した化学発光を、LB 953を用いて測定した。

【0083】

全ての抗体を、コーティングされたチューブ及び標識抗体として、サンドイッチイムノアッセイにおいて使用し、下記の変数と組み合わせた(表2)：

インキュベーションは、hADM-免疫測定で説明したように行った。結果は、特異的シグナル(10ng/ml ADM)/バックグラウンド(ADMを含まない試料)シグナルの比で示した。

40

【0084】

【表2】

表2：

シグナル/ノイズ比	NT-ADMトレーサー	MR-ADMトレーサー	CT-ADMトレーサー
NT-ADM	/	195	241
MR-ADM	204	/	904
CT-ADM	260	871	/

50

【 0 0 8 5 】

驚くべきことに、本発明者らは、最高シグナル/ノイズ比の組合せとしてMR - ADMとCT - ADMの組合せを認めた。

引き続き、本発明者らは、この抗体 - 組合せを更なる研究に使用した。本発明者らは、固相抗体としてMR - ADMを、及び標識抗体としてCT - ADMを使用した。典型的投与量/シグナル曲線を、図1に示している。本アッセイの分析感度(10回試行の平均、ADM - 非含有試料 + 2SD)は、2 pg ADM/mlであった。

【 0 0 8 6 】

実施例 3

ヒトアドレノメジュリンの安定性：

ヒトADMを、ヒトクエン酸血漿中に希釈し(n = 5、最終濃度10 ng ADM/ml)、24でインキュベーションした。選択された時点で、アリコートをし、-20で凍結した。これらの試料を解凍した直後に、前述のhADM免疫測定を使用し、hADMを定量した。

【 0 0 8 7 】

【表 3】

表3は、ヒト血漿中、24°CでのhADMの安定性を示す。

時間(時)	平均ADM回収(N=5)	免疫反応性の相対喪失	免疫反応性の喪失(%/時)
0	100	/	/
2	99.2	0.8	0.4
4	96.4	3.6	0.8
8	88.2	11.8	1.5
			平均:0.9%/時

【 0 0 8 8 】

驚くべきことに、サンドイッチイムノアッセイにおいてMR - ADM及びCT - ADMの抗体 - 組合せを使用すると、この被検体の分析前安定性は、高かった(わずかに0.9%/時の免疫反応性の平均喪失)。対照的に、別のアッセイ法を使用すると、わずか22分間の血漿半減期が報告された(Hinson 2000)。病院の日常業務における試料の採取から分析までの時間は2時間未満であるので、使用されたADM検出法は、日常的診断に適している。許容し得るADM - 免疫反応性の安定性に達するには、試料への一般的でない添加物(アプロチニンなど(20))は不要であることは、驚きに値する。

【 0 0 8 9 】

実施例 4

キャリブレーター - 調製の再現性

本発明者らは、ADMアッセイのためのキャリブレーターの調製において、結果の高い変動性を認めた(平均CV 8.5%、表4参照)。これは、プラスチック及びガラスの表面へのhADMの高い吸着のためであるかもしれない(同じく(58)参照)。この作用は、界面活性剤(最大1% Triton X 100又は1% Tween 20)、タンパク質(最大5% BSA)及び高イオン強度物質(最大1M NaCl)又はそれらの組合せの添加により、わずかだけ低下した。驚くべきことに、余分の抗ADM抗体(10 ug/ml)を、キャリブレーター希釈緩衝液に添加した場合、ADMアッセイキャリブレーター - 調製物の回収及び再現性は、調製間(inter preparation) CV < 1%まで実質的に改善された(表4)。

幸いなことに、N - 末端抗体の存在は、MR - 及びC - 末端抗体の組合せにより発生したADM - シグナルに影響を及ぼさなかった(図1)。

【 0 0 9 0 】

【 表 4 】

表 4

	NT-ADM抗体の 存在下 (10ug/ml)	調製物間CV(%)	抗体なし	調製物間CV(%)
キャリブレーター				
100ng/ml	3453 s/n-r	0.9	2842 s/n-r	2.8
10ng/ml	1946 s/n-r	0.8	1050 s/n-r	7.9
1ng/ml	179 s/n-r	1.1	77 s/n-r	14.8
		平均:0.93		平均:8.5

10

【 0 0 9 1 】

キャリブレーターの調製物間変動

ADMアッセイキャリブレーターを、NT-ADM-抗体10ug/mlを伴う又は伴わずに、上述のように調製した。変動係数(CV)は、5つの独立した調製試行から得た。キャリブレーターは、上述のADMアッセイを用いて測定した。シグナル対ノイズ比 = s/n-r。

20

全ての下記の試験について、本発明者らは、トレーサー緩衝液中の補充物としてNT-ADM抗体10ug/ml及びNT-ADM抗体10ug/mlの存在下で調製したキャリブレーターを基にした、ADMアッセイを使用した。

【 0 0 9 2 】

実施例 5感度

アッセイ感度の目的は、健常対象のADM濃度を完全に対象とすることである。

【 0 0 9 3 】

健常対象におけるADM濃度：

健常対象(n=100、平均年齢56歳)を、ADMアッセイを用いて測定した。中央値は24.7pg/mlであり、最低値は11pg/mlであり、99パーセンタイル値は43pg/mlであった。アッセイ感度は2pg/mlであったので、全健常対象の100%が、記載のADMアッセイを用い、検出可能であった。

30

【 0 0 9 4 】

市販のアッセイを使用し、MR-proADM(BRAHMS MR-proADM KRYPTOR)(BRAHMS社、ヘニツヒストルフ、独国)を測定した(ClinBiochem. 2009 May; 42(7-8):725-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.002. 電子版2009年1月23日)。

血漿中の中央領域プロアドレノメジュリンの測定に関する均一時間分解蛍光免疫測定は、完全に自動化されたシステムB.R.A.H.M.S KRYPTORである(Caruhel P, Mazier C, Kunde J, Morgenthaler NG, Darbouret B.)。

40

【 0 0 9 5 】

実施例 6臨床試験

敗血症の定義を満たす救急診療部(ED)患者101名(Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale Rら:「敗血症救命キャンペーン: 重度敗血症及び敗血症性ショックの管理に関する国際指針(Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock)」、2008 Critical care medicine 2008, 36(1):296-327)は、引き続き入院し(平均5日間の入院)、標準ケア処置を受け取った。EDTA-血漿

50

を、1日目に作製し（ED提示）、入院中は毎日1試料を作製した。後のADM-測定のために試料を凍結する時間は、4時間未満であった。

患者の特徴は、表5にまとめている。

【0096】

【表5】

表5：

変数	全員 (n=101)	院内死亡例 (n=27)	退院 (n=74)	p値
患者背景				
性別-男性	60 (60)	13 (48)	47 (64)	0,163
年齢-中央値[IQR]	78 [72-72]	77 [71.25-83]	80 [75-84.5]	0,142
試験変数				
収縮期血圧(mmHg)-中央値[IQR]	115 [100-100]	120 [106.25-138.75]	105 [80-120]	0,001
拡張期血圧(mmHg)-中央値[IQR]	65 [60-60]	65 [60-85]	60 [50-70]	0,002
心拍数-中央値[IQR]	100 [94-94]	100 [94-114.75]	100 [93.5-107.5]	0,407
呼吸数-中央値[IQR]	24 [22-22]	24 [22-28]	26 [24-28]	0,069
平均動脈圧(mmHg)-中央値[IQR]	83.3 [74-74]	83.3 [77.62-100.75]	81.6 [63.5-89]	0,026
併発疾患				
心臓血管系-あり	26 (25.7)	9 (33.3)	17 (23)	0,311
高血圧-あり	47 (46.5)	13 (48.1)	34 (45.9)	1,000
糖尿病-あり	35 (34.7)	9 (33.3)	26 (35.1)	1,000
癌-あり	13 (12.9)	3 (11.1)	10 (13.5)	1,000
慣習的臨床検査変数				
血液培養-あり	31 (31)	5 (19)	26 (35)	0,246
	陰性	15 (16.3)	2 (8)	13 (19.4)
	陽性	16 (17.4)	3 (12)	13 (19.4)
クレアチンクリアランス(ml/分)-中央値[IQR]	48 [23.25-23.25]	56 [29.25-80]	31.5 [14.75-66]	0,043
クレアチニン-中央値[IQR]	1.3 [0.9-0.9]	1.25 [0.9-2.08]	1.8 [1-3.15]	0,080
尿素-中央値[IQR]	36 [21-21]	31.5 [20-53.25]	51 [42-87]	0,004
GCS-中央値[IQR]	15 [10-10]	15 [12.5-15]	8 [8-11]	<0.001
Per-中央値[IQR]	16 [6.6-6.6]	14.5 [6.7-23.7]	17.35 [6.6-28.05]	0,846
グルコース-中央値[IQR]	113.5 [94.5-94.5]	110 [95.5-144]	128 [94-160.5]	0,400
ビリルビン-中央値[IQR]	0.9 [0.71-0.71]	0.9 [0.7-1.03]	0.91 [0.77-1.18]	0,534
GR-中央値[IQR]	3.8 [3.3-3.3]	3.8 [3.2-4.3]	3.7 [3.4-4.2]	0,684
GB-中央値[IQR]	12700 [6774-6774]	13100 [8115-17565]	11920 [25.55-18790]	0,343
PLT-中央値[IQR]	213 [150-150]	217 [154.75-301]	185 [130-236.5]	0,113
HCT-中央値[IQR]	32 [28-28]	31.5 [28-37]	34 [31.25-39.5]	0,149
白血球/好中球(%) -中央値[IQR]	87 [80-80]	86 [78.25-89.95]	91 [87-93.05]	0,001
HB-中央値[IQR]	10.4 [9.47-9.47]	10.15 [9.3-12.4]	10.85 [9.9-12.67]	0,220
Na-中央値[IQR]	137 [134-134]	137 [133-141]	139 [134-144.5]	0,204
K-中央値[IQR]	3.9 [3.5-3.5]	3.9 [3.6-4.3]	3.9 [3.3-5.1]	0,982
INR-中央値[IQR]	1.19 [1.1-1.1]	1.19 [1.1-1.4]	1.18 [1.04-1.36]	0,731
TC-中央値[IQR]	38.4 [36-36]	38.5 [38.12-38.7]	36 [35.55-38.5]	<0.001
SAO2-中央値[IQR]	94 [90-90]	95 [90.25-97]	93 [88.5-95.5]	0,119
pH-中央値[IQR]	7.45 [7.38-7.38]	7.46 [7.4-7.5]	7.4 [7.24-7.4]	<0.001
PO2-中央値[IQR]	67 [56-56]	66.5 [56-78]	67 [56.5-79.5]	0,806
PCO2-中央値[IQR]	36 [32-32]	37.5 [33-43.75]	34 [30-41]	0,245

10

20

30

40

【表 6】

乳糖-中央値[IQR]	1.5 [1-1]	1.3 [0.83-1.9]	2.5 [1.4-4.15]	<0.001
Bic-中央値[IQR]	23.5 [21-21]	24.25 [21.43-28]	21 [17.35-23.25]	0,001
FiO2(%)-中央値[IQR]	21 [21-21]	21 [21-23.25]	24 [21-45]	<0.001
その他				
急性臓器不全-あり	39 (43.3)	16 (64)	23 (35.4)	0,021
APACHEスコア(%)-中央値[IQR]	19 [12.5-12.5]	14.65 [12.12-20.38]	32 [20-39]	<0.001
入院日数-中央値[IQR]	5 [2-2]	6 [4-7]	2 [1-6]	0,003
ベースライン治療				
利尿剤(cc)-中央値[IQR]	900 [600-600]	1000 [700-1200]	450 [200-1025]	<0.001
ステロイド剤-あり	16 (15.8)	4 (14.8)	12 (16.2)	1,000
血管拡張薬-あり	18 (17.8)	13 (48.1)	5 (6.8)	<0.001
抗生物質-あり	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000
補液療法-あり	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000
新規バイオマーカー				
ADM(pg/mL) -中央値[IQR]	53.8 [37.4-94.0]	93.9 [48.7-241]	50.1 [32.2-77.8]	<0.001
MR-proADM(nmol/L)	0.54 [0.32-0.86]	0.98 [0.42-18.4]	0.46 [0.28-0.82]	<0.001

10

20

【0097】

全患者の26.7%は、入院期間中に死亡し、治療非反応者としてカウントし、且つ全患者の73.3%は、敗血症を生存し、治療反応者としてカウントした。

敗血症を示す全患者の66%は、非正常ADM値 $> 43 \text{ pg/ml}$ (99パーセントイル値)を有し、このことは、ADMはこの感染症のマーカーではないことを示している。

【0098】

臨床試験の結果

初期ADMは、高度に予後診断的である。

本発明者らは、初期ADM値を、院内死亡率と関連させ、且つADMを、APACHE 2スコアと比較した。ADMは、敗血症の転帰について高度に予後診断的であり(図2参照)、且つAPACHE 2スコアと同等である。ADMとAPACHE 2が組合せられた場合、有意な追加情報が存在する(図3)。

30

【0099】

治療モニタリングにおけるADM

患者は、標準ケア処置を基に治療した(表5)。平均入院期間は、5日間であった。ADMは、入院中毎日測定し(1日目=入院日)、院内死亡率と関連させた(表6)。入院期間中に変化したADM及び変化した期間は、予後診断値を最初のカイ二乗19.2から5日目の29.2まで、52%改善した。

【0100】

ADMの 70 pg/ml での単純なカットオフモデルを使用し、これは、ADM濃度 $> 70 \text{ pg/ml}$ で始まる患者について68%の死亡リスクを、並びに $> 70 \text{ pg/ml}$ (治療非反応者)は全て入院し続けることを示した。常にADM値 $< 70 \text{ pg/ml}$ を有する患者又は $> 70 \text{ pg/ml}$ から $< 70 \text{ pg/ml}$ へと進展する患者は、わずかに11%の死亡率を有し(良好に治療された/治療反応者)、並びにADM値 $> 70 \text{ pg/ml}$ を示す患者及び入院治療時にそれらのADM濃度が値 $< 70 \text{ pg/ml}$ まで低下する患者は、死亡率0%であった。入院治療時に $< 70 \text{ pg/ml}$ から $> 70 \text{ pg/ml}$ まで進展する患者はいなかった。全ての患者について反応者/非反応者の情報を得るのに必要な平均時間は、約1日であった。 $> 70 \text{ pg/ml}$ の入院期間中に治療に反応する患者は、ADMによる治療の成功を示すのに、約2日間必要であった。

40

【0101】

50

【表 7】

表 6

	全日 >70pg/ml の患者	全日 <70pg/ml の患者	>70pg/ml から <70pg/ml まで変化した患者
N	28/101 (27.7%)	73/101 (72.3%)	15/73 (20.5%)
死亡率	68%	11%	0%
入院後 ADM >70pg/ml から ADM <70pg/ml まで変化したか又は変化しなかった平均日数	1日	1.2日	2.2日

10

【0102】

血漿 ADM の平均動脈圧 (MAP) 及び昇圧剤療法の必要性との関係

本発明者らは、ADM 濃度の平均動脈圧との (図 4)、及びショックを治療 / 予防するための昇圧剤療法の必要性との (図 5) 有意な相関関係を認めた。

20

本発明者らはまた、ADM 濃度と昇圧剤療法の必要性の時間的關係も調べ (図 6) : ここで、患者 101 名を調べ、既に 18 名は、入院時に昇圧剤療法を必要とし ; これらの患者の入院時の ADM 濃度中央値は、129 pg/mL であった。入院後最初の 4 日以内の病院滞在時に昇圧剤療法の必要性を示さなかった患者 (n = 79) は、ADM 濃度中央値 48.5 pg/mL を有した。重要なことに、入院時よりも病院滞在時に昇圧剤療法を必要とした患者は、既に入院時に上昇した ADM レベル (中央値 87.2 pg/mL) を有し、例えば、血漿 ADM 濃度の上昇が、昇圧剤療法に先行していた。

【0103】

血漿試料中に、ADM 前駆体分子の安定した断片である MR - proADM も測定した。MR - proADM は、成熟 ADM 放出の代理マーカーとして提唱されている (Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A : 「敗血症患者の血漿中のアドレノメジュリン前駆体断片の同定 (Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients)」 Peptides 2004, 25(8) : 1369-1372 ; Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A) : 「免疫発光測定による血漿中の中央領域プロアドレノメジュリンの測定 : (Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay)」 Clinical chemistry 2005, 51(10) : 1823-1829)。市販の MR - proADM アッセイ (BRAHMS MR-proADM KRYPTOR) を、製造業者 (BRAHMS 社、ヘニッヒスドルフ、独国) の指示に従い使用した。入院時の日の中央値レベルは、昇圧剤療法を必要としない患者について 0.63 nmol/L であり、並びに昇圧剤療法を必要とする患者について 1.57 nmol/L であった。MR - proADM の濃度は、ADM 濃度と有意に相関していた (r = 0.79)。

30

40

【0104】

実施例 7

昇圧剤必要性の診断及び予測のためのカットオフ分析

患者データは、実施例 6 参照。この分析は、敗血症患者の救急センターでのプレゼンテーション時の初回採血を基に行った。

【0105】

カットオフ値 70 pg/mL を選択し、<70 pg/mL は、昇圧剤の必要性の低いリスクを示し、並びに >70 pg/mL は、昇圧剤の必要性の高いリスクを示した。第 1 群は、昇圧剤の必要性がなく (MAP 66 mmHg)、4 日間の経過観察期間中のプレゼ

50

ンテーション時に昇圧剤を受け取らなかった患者である。第2群は、昇圧剤の必要性があるか(MAP 66 mmHg)、又はプレゼンテーション時に昇圧剤を受け取った患者である。第3群は、昇圧剤の必要性がなく、プレゼンテーション時に昇圧剤を受け取らなかったが、4日間の経過観察期間中に昇圧剤の必要性を顕在化した患者である。昇圧剤治療に関する情報が失われた患者(n=2)は、除外した。

【0106】

【表8】

表7

	<70pg/ml ADM	>70pg/ml ADM	
第1群	56	15	特異度79%
第2群	3	18	感受性89.5%
第3群	2	5	正確な分類71%

10

【0107】

ADMの70 pg/mlでの単純なカットオフ分析を使用し、EDプレゼンテーション時に昇圧剤を必要とする全患者の89.5%を、ADMにより確定した(第2群)。20名の患者は、>70 pg/mlで、プレゼンテーション時に昇圧剤の必要性がなく(第1/3群)、15名(75%)は、4日間の経過観察期間中に昇圧剤の必要性を顕在化せず、並びに患者5名(25%)は、4日間の経過観察期間中に昇圧剤の必要性を顕在化した。対照的に、ADMが<70 pg/mlである場合、患者はプレゼンテーション時に昇圧剤の必要性がなく(第1/3群)、56名(96.5%)は、4日間の経過観察期間中に昇圧剤の必要性を顕在化せず、並びにわずかに2名(3.5%)が、昇圧剤の必要性を顕在化した。ADM値が70 pg/mlを上回る患者の次の4日間に昇圧剤の必要性を顕在化するリスクは、ADMレベルが70 pg/mlを下回る患者よりも、7.1倍高かった(25%、対、3.5%)。

20

【0108】

臨床の観点から、血圧は常にモニタリングされるので、プレゼンテーション時に昇圧剤の必要性のない高ADM(>70 pg/ml)を有する患者は、低血圧に関連した臓器不全及びそれに続く高い死亡率から患者を保護するために循環をより早期に支援する目的で、MAP<66 mmHgから、例えば<75 mmHgまでの決定時点を採用することにより、昇圧剤治療されなければならない。ADM>70 pg/mlの患者についてこのルールを使用し、且つMAP 75 mmHgで昇圧剤により治療し、患者(第3群)は、標準ケア処置(66 mmHg)前に、平均1.6日間治療されるであろう。

30

【0109】

ADMの代わりに分析において、MR-proADMのカットオフ値0.78 noml/Lを使用した場合、同様の結果が得られた。

【0110】

40

【表 9】

表 8

	< 0.78 noml/L MR-proADM	> 0.78 noml/L MR-proADM	
第1群	54	17	特異度76.1%
第2群	4	17	感受性81%
第3群	2	5	正確な分類71%

10

【0111】

実施例 8

臨床試験 / 急性心不全

登録された患者は、急性心不全により救急診療部へ入院した患者であった。患者の特徴：年齢平均±SD 74.3±12.2歳；n=1022（男性643名、63%）；既往歴、虚血性心疾患31%、高血圧58%、糖尿病33%、心不全35%。患者は、2年間経過観察した。ADM及び他の被検体の測定のための血漿試料は、入院日に入手した。

【0112】

コックス解析は、ADMは、急性非代償性心不全による、1年後死亡（表9）及び1年後死亡/入院（表10）の独立した予測因子であることを明らかにした。ロジスティック回帰分析は、ADMは、院内死亡の独立した予測因子であることを明らかにした（表11）。

20

【0113】

昇圧剤療法（変力作用薬）を必要とした患者は、全ての他の患者のADM濃度よりも有意に高い濃度を有した（曲線下面積=0.75；p<0.001；図7）。

【0114】

【表10】

30

表 9

	ハザード比(P値)単変量	ハザード比(P値)多変量
年齢	1.04(<0.0005)	1.04(<0.0005)
心不全の既往	1.48(<0.001)	N.S
腎不全の既往	1.79(<0.0005)	N.S
心拍数	0.99(<0.003)	N.S
収縮期血圧	0.98(<0.0005)	0.98(<0.0005)
呼吸数	1.02(<0.0005)	1.02(<0.001)
NYHA	1.61(<0.0005)	N.S
尿素	1.03(<0.0005)	1.05(<0.0005)
クレアチニン	1.003(<0.0005)	N.S
Na	0.96(<0.0005)	0.95(<0.0005)
NTproBNP	2.73(<0.0005)	N.S
ADM	3.92(<0.0005)	2.35(<0.0005)

40

【0115】

【表 1 1】

表 1 0

	ハザード比(P値)単変量	ハザード比(P値)多変量
年齢	1.02 (<0.0005)	1.02 (<0.001)
心不全の既往	1.72 (<0.001)	1.33 (<0.023)
腎不全の既往	1.75 (<0.0005)	N.S
心拍数	0.99 (<0.002)	N.S
収縮期血圧	0.99 (<0.0005)	0.99 (<0.012)
呼吸数	1.01 (<0.008)	1.02 (<0.0005)
NYHA	1.53 (<0.0005)	1.29 (<0.018)
尿素	1.03 (<0.0005)	1.05 (<0.0005)
クレアチニン	1.002 (<0.0005)	N.S
Na	0.98 (<0.012)	0.98 (<0.03)
NTproBNP	1.82 (<0.0005)	N.S
ADM	2.75 (<0.0005)	1.67 (<0.01)

10

【0 1 1 6】

【表 1 2】

20

表 1 1

	オッズ比(P値)単変量	オッズ比(P値)多変量
年齢	1.04 (<0.001)	1.04 (<0.039)
心不全の既往	1.98 (<0.007)	1.33 (<0.023)
腎不全の既往	2.71 (<0.0005)	N.S
心拍数	0.99 (<0.074)	N.S
収縮期血圧	0.99 (<0.071)	N.S
呼吸数		N.S
NYHA	1.67 (<0.023)	N.S
尿素	1.078 (<0.0005)	1.069 (<0.015)
クレアチニン	1.008 (<0.0005)	N.S
Na	0.929 (<0.0005)	0.916 (<0.0005)
トロポニンI	N.S	N.S
NTproBNP	3.22 (<0.001)	N.S
ADM	10.75 (<0.0005)	5.182 (<0.001)

30

40

【0 1 1 7】

参考文献

【表 1 3】

- (1) Kitamura, K., *et al.*, "Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated From Human Pheochromocytoma", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 192 (2), pp. 553-560 (1993).
- (2) Editorial, Takahashi, K., "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", *Peptides*, Vol. 22, p. 1691 (2001). 10
- (3) Eto, T., "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides*, Vol. 22, pp. 1693-1711 (2001).
- (4) Hinson, *et al.*, "Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide", *Endocrine Reviews*, Vol. 21(2), pp. 138-167 (2000). 20
- (5) Kitamura, K., *et al.*, "The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 244(2), pp. 551-555 (1998). Abstract Only.
- (6) Pio, R., *et al.*, "Complement Factor H is a Serum-binding Protein for Adrenomedullin, and the Resulting Complex Modulates the Bioactivities of Both Partners", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276(15), pp. 12292-12300 (2001). 30
- (7) Kuwasako, K., *et al.*, "Purification and characterization of PAMP-12 (PAMP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", *FEBS Lett*, Vol. 414(1), pp. 105-110 (1997). Abstract Only.
- (8) Kuwasaki, K., *et al.*, "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", *Ann. Clin. Biochem.*, Vol. 36 (Pt. 5), pp. 622-628 (1999). Abstract Only. 40

【 0 1 1 8 】

【表 1 4】

- (9) Tsuruda, T., *et al.*, "Secretion of proadrenomedullin N-terminal20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", *Life Sci.*, Vol. 69(2), pp. 239-245 (2001). Abstract Only.
- (10) EP 0 622 458 A2, Shionogi & Co. Ltd.; Kangawa, Kenji 10
- (11) Hirata, *et al.*, "Increased Circulating Adrenomedullin, a Novel Vasodilatory Peptide, in Sepsis", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 81(4), pp. 1449-1453 (1996).
- (12) Ehlenz, K., *et al.*, "High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: Correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin", *ExpClinEndocrinol Diabetes*, Vol. 105, pp. 156-162 (1997). 20
- (13) Tomoda, Y., *et al.*, "Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", *Peptides*, Vol. 22, pp. 1783-1794 (2001).
- (14) Ueda, S., *et al.*, "Increased Plasma Levels of Adrenomedullin in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 160, pp. 132-136 (1999). 30
- (15) Wang, P., "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", *Peptides*, Vol. 22, pp. 1835-1840 (2001).
- (16) Wang P: Adrenomedullin in sepsis and septic shock. *Shock* 1998, 10(5):383-384.
- (17) Wang P, Ba ZF, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: The pivotal role of adrenomedullin in producing hyperdynamic circulation during the early stage of sepsis. *Archives of surgery* 1998, 133(12):1298-1304. 40
- (18) Parlapiano, C., *et al.*; "Adrenomedulin assay and its clinical significance", *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 1999; 3:53-61

【 0 1 1 9 】

【表 1 5】

- (19) Nishio K, Akai Y, Murao Y, Doi N, Ueda S, Tabuse H, Miyamoto S, Dohi K, Minamino N, Shoji H *et al*: **Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 1997, **25**(6):953-957.
- (20) Krzeminski K, Mikulski T, Kruk B, Nazar K: **Plasma adrenomedullin response to maximal exercise in healthy subjects.** *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 2003, **54**(2):225-232. 10
- (21) Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R *et al*: **Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012.** *Critical care medicine* 2013, **41**(2):580-637. 20
- (22) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** *Critical care medicine* 2001, **29**(7):1303-1310.
- (23) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(16):1546-1554. 30
- (24) Melamed A, Sorvillo FJ: **The burden of sepsis-associated mortality in the United States from 1999 to 2005: an analysis of multiple-cause-of-death data.** *Critical care* 2009, **13**(1):R28.
- (25) Overgaard CB, Dzavik V: **Inotropes and vasopressors: review of physiology and clinical use in cardiovascular disease.** *Circulation* 2008, **118**(10):1047-1056. 40
- (26) Bangash MN, Kong ML, Pearse RM: **Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients.** *British journal of pharmacology* 2012, **165**(7):2015-2033.

【表 1 6】

- (27) Boucheix OB, Milano SP, Henriksson M, Reinheimer TM: **Selepressin, a New V1A Receptor Agonist: Hemodynamic Comparison to Vasopressin in Dogs.** *Shock* 2013.
- (28) Bracht H, Calzia E, Georgieff M, Singer J, Radermacher P, Russell JA: **Inotropes and vasopressors: more than haemodynamics!***British journal of pharmacology* 2012, 165(7):2009-2011. 10
- (29) Singer M, Coluzzi F, O'Brien A, Clapp LH: **Reversal of life-threatening, drug-related potassium-channel syndrome by glibenclamide.** *Lancet* 2005, 365(9474):1873-1875.
- (30) Warrillow S, Egi M, Bellomo R: **Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 2006, 34(4):980-985. 20
- (31) Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J *et al*: **Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002).** *Critical care medicine* 2004, 32(1):1-12. 30
- (32) Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D *et al*: **Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 2004, 32(1):21-30. 40
- (33) Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, Egorina EM, Sovershaev MA, Sveinbjornsson B, Nedashkovsky EV, Bjertnaes LJ: **Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study.** *Critical care medicine* 2001, 29(10):1860-1867.

【 0 1 2 1】

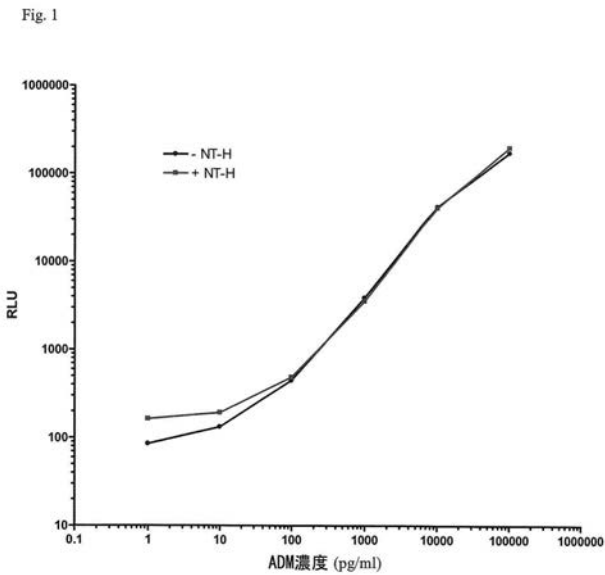
【表 1 7】

- (34) Juffermans NP, Vervloet MG, Daemen-Gubbels CR, Binnekade JM, de Jong M, Groeneveld AB: **A dose-finding study of methylene blue to inhibit nitric oxide actions in the hemodynamics of human septic shock.** *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2010, **22**(4):275-280.
- (35) Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A: **Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay.** *Clinical chemistry* 2005, **51**(10):1823-1829.
- (36) Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A: **Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients.** *Peptides* 2004, **25**(8):1369-1372.

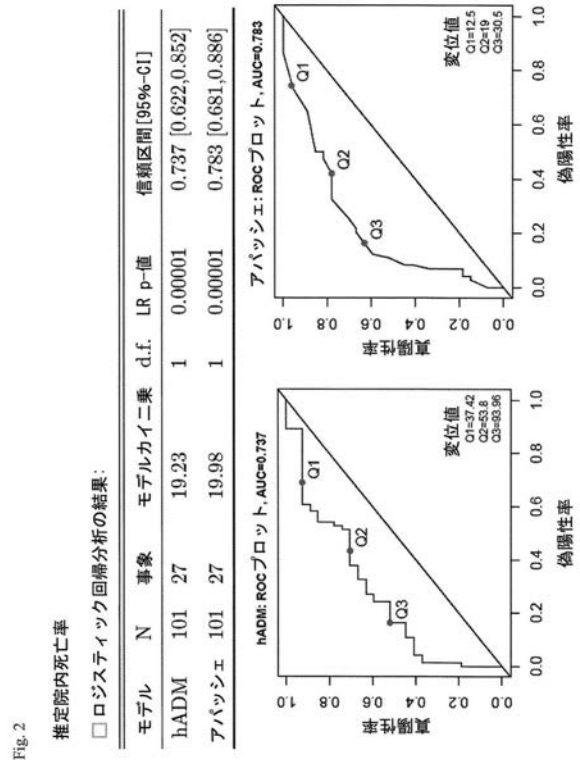
10

20

【 図 1 】

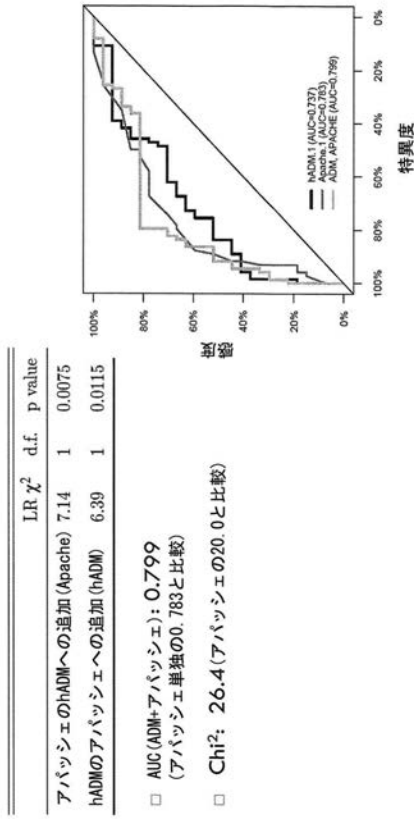


【 図 2 】



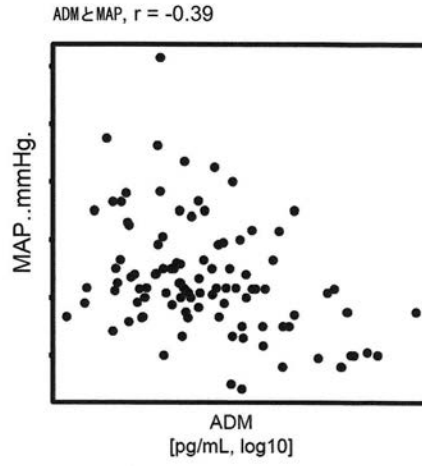
【 図 3 】

Fig. 3
推定院内死亡率
ADMはアパシエから独立し、且つ追加の予後情報を提供する：



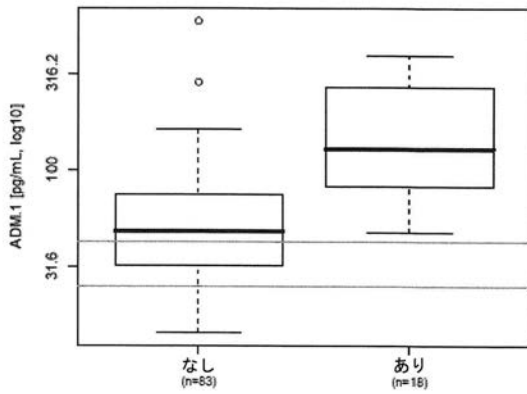
【 図 4 】

Fig. 4



【 図 5 】

Fig. 5



【 図 6 】

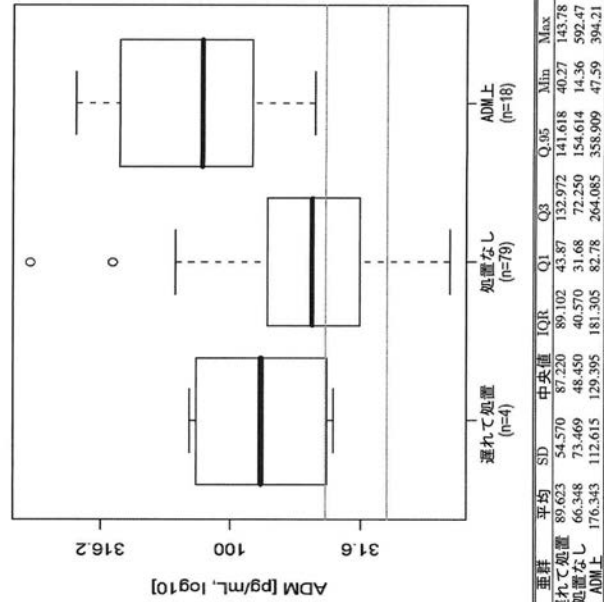
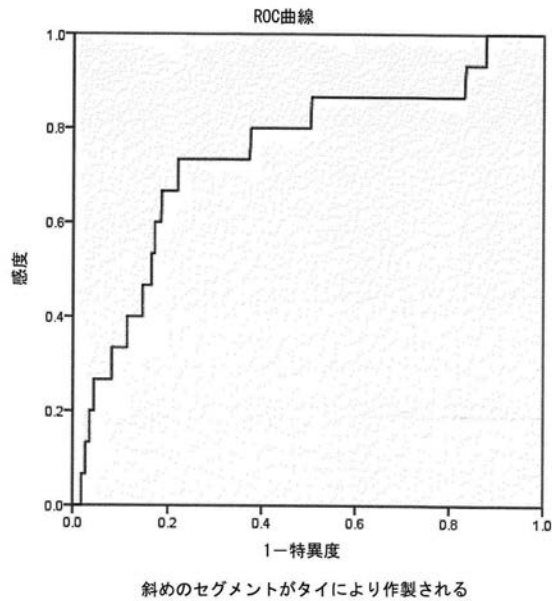


Fig. 6

【 図 7 】

Fig. 7



【 配列表 】

2020073896000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和2年1月22日 (2020.1.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

生理的ショック状態を発達させるリスクにある対象を同定するためのインビトロ方法であって：

- ・当該対象の体液のサンプル中の、プロアドレノメデュリン proADM (配列番号 1) 及び/又はその断片のレベルを決定する工程、ここで当該サンプルは、ヒトクエン酸血漿、ヘパリン血漿、EDTA血漿、全血、血清を含む群から選択され；及び
- ・当該レベルを、当該対象が生理的ショック状態を発達させるリスクと関連させる工程であって、ここで当該対象が、当該対象の体液中における proADM (配列番号 1) 及び/又はその断片のレベルが閾値を超える場合に、そのようなリスクを有すると同定される；

を含み、ここで当該 proADM (配列番号 1) 断片が、アドレノメデュリン、ADM (配列番号 4) 及び/又は ADM1-52Gly (配列番号 5) 及び中央領域 - プロ - アドレノメデュリン、MR-proADM (配列番号 3) 及び C - 末端プロアドレノメデュリン CT-proADM (配列番号 6) 及びプロアドレノメデュリン N - 20 末端ペプチド (配列番号 2) を含む群から選ばれる、前記方法。

【請求項 2】

A D M (配列番号 4) の免疫反応性レベル及び / 又は A D M 1 - 5 2 - G 1 y (配列番号 5) の免疫反応性のレベル又は M R - p r o A D M (配列番号 3) の免疫反応性のレベル又は C T - p r o A D M (配列番号 6) の免疫反応性のレベルのいずれかが、決定され、そして生理的ショックを発達させるリスクと関連させ、ここで当該対象は、当該対象の体液中の A D M (配列番号 4) の免疫反応性レベル及び / 又は A D M 1 - 5 2 - G 1 y (配列番号 5) の免疫反応性のレベル又は M R - p r o A D M (配列番号 3) の免疫反応性のレベル、又は C T - p r o A D M (配列番号 6) の免疫反応性のレベルのいずれかが、閾値を超える場合に、そのようなリスクを有すると同定される、請求項 1 に記載のインビトロ方法。

【請求項 3】

p r o - A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、A D M (配列番号 4) 及び / 又は A D M 1 - 5 2 - G 1 y (配列番号 5) の配列内に構成される領域に結合するバインダー; 及び A D M (配列番号 4) 及び / 又は成熟 A D M 1 - 5 2 - G 1 y (配列番号 5) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選ばれる少なくとも 1 のバインダーを使用することにより決定される、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロ方法。

【請求項 4】

p r o - A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、M R - p r o A D M (配列番号 3) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び M R - p r o A D M (配列番号 3) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選択される少なくとも 1 種のバインダーを使用することにより決定される、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロ方法。

【請求項 5】

p r o - A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルが、C T - p r o A D M (配列番号 6) の配列内に構成される領域に結合するバインダー、及び C T - p r o A D M (配列番号 6) の配列内に構成される領域に結合する第二のバインダーの群から選択される少なくとも 1 種のバインダーを使用することにより決定される、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロ方法。

【請求項 6】

アッセイが、p r o A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルを決定するために用いられ、ここで当該アッセイのアッセイ感度は、健常対象の A D M を定量することができ、且つ $< 70 \text{ pg/ml}$ である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 7】

前記バインダーが、p r o A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片への少なくとも 10^7 M^{-1} の結合親和性を示す、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 8】

前記バインダーが、p r o A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片に結合する、p r o A D M 特異的抗体、又は p r o A D M 特異的抗体フラグメント、又は p r o A D M 特異的非 - I g (非イムノグロブリン) スカフォールドを含む群から選択される、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 9】

アッセイが、p r o A D M (配列番号 1) 及び / 又はその断片のレベルを決定するために用いられ、ここでそのようなアッセイが、サンドイッチアッセイ、好ましくは完全に自動化されたアッセイである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 10】

前記 2 種のバインダーの少なくとも 1 種が、検出されるために標識されている、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 11】

前記2種のバインダーの少なくとも1種が、固相に結合されている、請求項3～10のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項12】

血漿ADMの閾値90pg/mlが適用される、請求項1～11のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項13】

血漿MR-proADM(配列番号3)の閾値0.9nmol/Lが適用される、請求項1～12のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項14】

前記対象の体液中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルが、閾値より大きく、かつ前記対象が66mmHg超の平均動脈圧(MAP)を有する場合、前記対象がそのような必要性を有すると同定される、請求項1～13のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項15】

以下の工程：

前記対象の体液中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルを測定し

、前記レベルを、対象の平均動脈圧とは独立に、生理学的ショックを発達させる対象のリスクと関連させる工程であって、前記対象は、前記対象の体液中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルが、閾値を超える場合に、そのようなリスクを有すると同定される、

を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項16】

以下の：

前記対象の体液中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルを測定する工程、及び

前記レベルを、対象の平均動脈圧の介入閾値を70mmHg、より好ましくは75mmHg、さらにより好ましくは80mmHgに増加させて、輸液蘇生又は昇圧剤投与の開始する必要性と関連させる工程であって、前記対象の体液中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルが、閾値を超える場合に、当該対象が、そのような必要性を有すると確定する、請求項1～10のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項17】

請求項1～16のいずれか一項に記載のインビトロ方法によりショック状態を発達させるリスクにあると同定された対象においてショック状態をin vivo治療又は予防するための方法において使用するための昇圧剤であって、前記対象が、前記対象の体液サンプル中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片のレベルが、閾値を超えているレベルを有すると同定されており、ここで前記サンプルが、ヒトクエン酸血漿、ヘパリン血漿、EDTA血漿、全血、血清を含む群から選択され；ここで当該proADM(配列番号1)及び/又は断片が、アドレノメデュリン、ADM(配列番号4)及び/又はADM1-52Gly(配列番号5)及び中央領域-プロ-アドレノメデュリン、MR-proADM(配列番号3)及びC-末端プロアドレノメデュリンCT-proADM(配列番号6)及びプロアドレノメデュリンN-20末端ペプチド(配列番号2)及びproADM(配列番号1)を含む群から選ばれ、そしてここで昇圧剤が、アドレナリン、カテコールアミン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、バソプレシン、レボシメンダン、バソプレッシンV1a受容体アゴニスト、抗アドレノメデュリン抗体、ATP依存性K⁺チャンネルの阻害剤、NOS及びc-GMPの阻害剤を含む群～選択され、そして

ここで当該対象は、請求項16に記載のインビトロ方法において、前記対象の体液サンプル中のproADM(配列番号1)及び/又はその断片の閾値を超えレベルを有すると同定され、そしてここで前記対象は、以下の：敗血症性ショック、心原性ショック及びアナフィラキシーショックを含む、生理的ショック状態；感染症、敗血症、心不全、心肺停

止、心臓外科術後、右心室梗塞、徐脈性不整脈、多発性外傷、火傷、腎損傷の徴候を示すか又はこれらの状態に罹患しており、ここで血漿ADMの90 pg/ml又は70 pg/mlの閾値が適用され、そしてここで血漿MR-proADMの0.9 nmol/L又は0.7 nmol/Lの閾値が適用され、ここで当該サンプルが、ヒトクエン酸、ヘパリン血漿、EDTA血漿、全血、血清を含む群から選択され、そしてここで前記proADM（配列番号1）及び/又はその断片が、アドレノメデュリン、ADM（配列番号4）及び/又はADM1-52 Gly（配列番号5）及び中央領域-プロ-アドレノメデュリン、MR-proADM（配列番号3）及びC-末端プロアドレノメデュリンCT-proADM（配列番号6）及びプロアドレノメデュリンN-20末端ペプチド（配列番号2）及びproADM（配列番号1）を含む群から選ばれる、前記昇圧剤。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/12 (2006.01)	A 6 1 K	38/12	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/50 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 K	31/50	

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン

ドイツ連邦共和国, 1 3 6 4 5 ベルリン, アム ローゼンアンガー 7 8

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

4C084 AA17 BA44 DB01 NA05 ZA431 ZA432 ZC202 ZC412

4C085 AA13 AA14 EE01

4C086 AA01 AA02 BC31 MA01 MA04 NA05 ZA43

4C206 AA01 AA02 FA14 MA01 MA04 NA05 ZA43

专利名称(译)	肾上腺髓质素指导降血压治疗		
公开(公告)号	JP2020073896A	公开(公告)日	2020-05-14
申请号	JP2019234773	申请日	2019-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン		
发明人	アンドレアス ベルクマン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543 A61K31/137 A61P9/02 A61K45/00 A61K38/12 A61K39/395 A61K31/50		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/74 A61P7/00 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P13/12 A61P17/02 A61P31/00 G01N33/68 C07K16/26 G01N2333/575 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N33/543.501.A A61K31/137 A61P9/02 A61K45/00 A61K38/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/50		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DB01 4C084/NA05 4C084/ZA431 4C084/ZA432 4C084/ZC202 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC31 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA43 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/FA14 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZA43		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	2013160265 2013-03-20 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的主题是用于鉴定需要进行液体复苏或升压药的对象体外方法，其包括以下步骤：•确定身体中具有至少6个氨基酸的proADM和/或其片段的水平 所述受试者的体液•使所述水平与所述患者对液体复苏或血管加压药的需要相关，其中如果所述proADM和/或其片段的水平在所述患者体内具有至少6个氨基酸，则所述患者被鉴定为具有这种需要。所述受试者的体液高于阈值。

Fig. 1

