

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5183480号
(P5183480)

(45) 発行日 平成25年4月17日(2013.4.17)

(24) 登録日 平成25年1月25日(2013.1.25)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
C 1 2 Q 1/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
C 1 2 Q 1/44	(2006.01)	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/26	(2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
C 1 2 Q 1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/28	

請求項の数 47 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-533696 (P2008-533696)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月27日(2006.9.27)
 (65) 公表番号 特表2009-510450 (P2009-510450A)
 (43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/038177
 (87) 国際公開番号 W02007/038758
 (87) 国際公開日 平成19年4月5日(2007.4.5)
 審査請求日 平成21年9月25日(2009.9.25)
 (31) 優先権主張番号 60/721,833
 (32) 優先日 平成17年9月28日(2005.9.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/762,911
 (32) 優先日 平成18年1月27日(2006.1.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性炎症状態の予後又は診断のためのリゾホスファチジルコリンの検出

(57) 【特許請求の範囲】

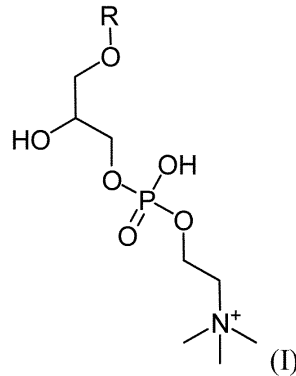
【請求項1】

SIRS陽性患者の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量を測定する工程を含む、該患者の敗血症の診断を実施するためのデータを取得する方法であって、該測定工程が、臨床的に有意な敗血症の原因となる感染症の研究室における確認より前に行われ、該方法によって得られたデータが、該感染症の研究室における確認より前に敗血症を診断するためのものである、前記方法。

【請求項2】

前記リゾホスファチジルコリンが、式(1)記載の化合物又はその塩若しくは溶媒和物である、請求項1記載の方法：

【化 1】



10

(式中、Rは、 C_{10} - C_{22} アシルである)。

【請求項 3】

Rが C_{16} - C_{18} アシルである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

ある期間にわたって、複数の総リゾホスファチジルコリン量が測定される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記リゾホスファチジルコリンが1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び1-0-ステアロイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンを含む、請求項 4 記載の方法。

20

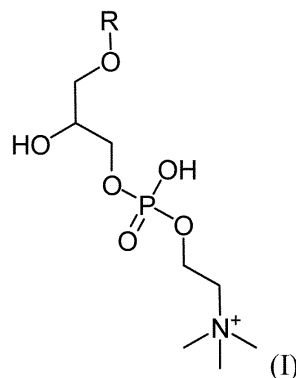
【請求項 6】

総遊離リゾホスファチジルコリン及び/又は総結合リゾホスファチジルコリンが、前記総リゾホスファチジルコリン量を示す、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

前記リゾホスファチジルコリンが、式 (I) 記載の化合物又はその塩若しくは溶媒和物である、請求項 4 記載の方法：

【化 2】



30

(式中、Rは、 C_{10} - C_{22} アシルである)。

【請求項 8】

Rが C_{16} - C_{18} アシルである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

Rが C_{16} 飽和アシル又は C_{18} 飽和アシルである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

Rがパルミトイル又はステアロイルである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

量が減少することが敗血症についてのリスクが増加していることを示す、又は、量が増加することが敗血症についてのリスクが減少することを示す、あるいは、量が減少するこ

50

とが敗血症の診断を示す、又は、量が増加することが敗血症の診断に対して示す、請求項 4 又は 7 記載の方法。

【請求項 1 2】

1 以上のバイオマーカーの測定をさらに含み、該バイオマーカーがリゾホスファチジルコリン以外である、請求項 4 又は 7 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記量が分光法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法、電気泳動法又は酵素アッセイ法によって測定される、請求項 4 又は 7 記載の方法。

【請求項 1 4】

前記体液又は組織が血液、血漿、唾液、血清、痰、尿、細胞、細胞抽出物又は組織生検である、請求項 4 又は 7 記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記体液又は組織が血液である、請求項 4 又は 7 記載の方法。

【請求項 1 6】

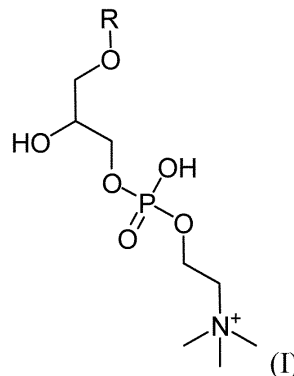
患者の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量を、敗血症を有する個体の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量を示す参照量に対して比較する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記リゾホスファチジルコリンが、式 (1) 記載の化合物又はその塩若しくは溶媒和物である、請求項 1 6 記載の方法：

20

【化 3】



30

(式中、Rは、 C_{10} - C_{22} アシルである)。

【請求項 1 8】

Rが C_{16} - C_{18} アシルである、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記量の間の相違が敗血症についてのリスクと逆相関する、請求項 1 6 又は 1 7 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記参照量がカットオフ参照量である、請求項 1 6 又は 1 7 記載の方法。

40

【請求項 2 1】

前記カットオフ参照量未満の量が、敗血症の診断を示す、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記量が敗血症の発病の12、24、36又は48時間前に測定される、請求項 1 6 又は 1 7 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記個体が敗血症陽性である、請求項 1 6 又は 1 7 記載の方法。

【請求項 2 4】

SIRS陽性患者の敗血症の診断を実施するためのデータを取得する方法であって、該患者の体液又は組織由来のサンプルを：

50

リゾホスファチジルコリンを反応させてグリセロホスファチジルコリンを形成することができる酵素又は試薬；

グリセロホスファチジルコリンを反応させてコリンを形成することができる酵素又は試薬；

コリン、水及び酸素を反応させてペルオキシドを形成することができる酵素又は試薬；及び

ペルオキシダーゼ及び該ペルオキシダーゼの蛍光発生基質；

と、蛍光産物の形成のために適切な条件下で接触させることによって該患者のリゾホスファチジルコリンを検出する工程を含み、

該蛍光産物がリゾホスファチジルコリンを示し、

該検出工程が、臨床的に有意な敗血症の原因となる感染症の研究室における確認より前に行われ、該方法によって得られたデータが、該感染症の研究室における確認より前に敗血症を診断するためのものである、前記方法。

10

【請求項 2 5】

リゾホスファチジルコリンを反応させてグリセロホスファチジルコリンを形成することができる前記酵素又は試薬がリゾホスホリパーゼである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

リゾホスファチジルコリンをグリセロホスファチジルコリンに変換することができる前記酵素又は試薬が EC 3.1.1.5 である、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

グリセロホスファチジルコリンを反応させてコリンを形成することができる前記酵素又は試薬がグリセロホスファチジルコリンジエステラーゼである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 8】

グリセロホスファチジルコリンを反応させてコリンを形成することができる前記酵素又は試薬が EC 3.1.4.2 である、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 9】

コリンを反応させてペルオキシドを形成することができる前記酵素又は試薬がコリンオキシダーゼである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 0】

コリンを反応させてペルオキシドにすることができる前記酵素又は試薬が EC 1.1.3.17 である、請求項 2 4 記載の方法。

30

【請求項 3 1】

前記ペルオキシダーゼが西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記蛍光発生基質が 10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンであり、かつ前記蛍光産物が 7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記蛍光産物が蛍光検出によって検出される、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記サンプルを、リゾホスホリパーゼ、グリセロホスファチジルコリンジエステラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び 10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンと、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンの形成のために適切な条件下で接触させ、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンがリゾホスファチジルコリンを示す、請求項 2 4 記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記サンプルを、EC 3.1.1.5、EC 3.1.4.2、EC 1.1.3.17、西洋ワサビペルオキシダーゼ及び 10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンと、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンの形成のために適切な条件下で接触させ、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンがリゾホスファチジルコリンを示す、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

50

前記蛍光産物の量が前記リゾホスファチジルコリン量を示す、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 7】

前記患者の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量が、敗血症を有する複数の個体の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量を示す参照量に対して比較される、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記患者の体液又は組織中の総リゾホスファチジルコリン量を、体液又は組織中の内部標準と比較する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 9】

1種以上の臨床測定値を使用する工程をさらに含む、請求項 1 又は 2 記載の方法。

10

【請求項 4 0】

前記臨床測定値が、呼吸数、温度、心拍数、白血球数、単球数、リンパ球数、顆粒球数、好中球数、総好中球に対する未成熟好中球の比、血小板数、血清クレアチニン濃度、尿素濃度、乳酸濃度、塩基過剰、 pO_2 及び HCO_3^- からなる群から選択される、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

前記臨床測定値が敗血症のための臨床重症度モデルに従い、前記臨床モデルが急性生理機能及び慢性健康評価、急性生理機能及び慢性健康評価II、急性生理機能及び慢性健康評価III、死亡率予測モデル、簡易急性生理機能スコア、多臓器機能障害スコア、経時的器官不全評価スコア、ロジスティック器官機能障害スコア、並びに素因、感染、反応及び器官機能障害の概念からなる群から選択される、請求項 3 9 記載の方法。

20

【請求項 4 2】

1種の臨床測定値が測定される、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 3】

呼吸数が測定される、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

温度が測定される、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 5】

複数種の臨床測定値が測定される、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 6】

呼吸数及び温度が測定される、請求項 4 5 記載の方法。

30

【請求項 4 7】

前記患者の体液又は組織中の 1 以上のバイオマーカーを測定することをさらに含み、該バイオマーカーが内毒素、細菌DNA、プロテインC、プロカルシトニン、LBP-LPS-結合タンパク質、フィブリン分解産物、抗トロンピンIII、二量体D、HLA-DR、CD-64、Eセレクトイン、コルチゾール、ACTH、CD-14、sTNF-RI、sTNF-RII、TNF、IL-6、IL-8及びIL-10、D-二量体、プロトロンピン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、プラスミノゲン活性化因子阻害剤-1、可溶性トロンボモジュリン、トロンピンで活性化可能な線維素溶解阻害剤、プロテインS、抗トロンピン、及びTNF- からなる群から選択される、請求項 3 9 記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(1. 技術分野)

本発明は、例えば対象における全身性炎症状態の診断又は予後のために有用な方法及び構成物に関する。全身性炎症状態は、例えば全身性炎症反応症候群、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害又は死亡であることができる。

【背景技術】

【0002】

(2. 発明の背景)

50

疾患状態の早期発見により、典型的には相応したより良好な臨床結果を伴ったより有効な治療的処置が可能になる。しかし、多くの場合、疾患徴候の早期発見は、疾患複雑さに起因する問題があり；それ故、疾患は、診断が可能となる前に相対的に進行するかもしれない。全身性炎症状態は、このような種類の疾患のひとつを示す。これらの状態、特に敗血症は、典型的には、しかしいつもではないが、宿主における過剰な炎症反応及び炎症反応の調節不全を引き起こす、病原微生物及び宿主の防御系との間の相互作用により生じる。全身性炎症反応の間の宿主の反応の複雑さは、疾患の病原を理解する取り組みを困難にする（Healyの論文、2002, Ann. Pharmacother. 36:648-54において概説される）。そして、疾患の病原の不完全な理解は、有用な診断のバイオマーカーを見いだすことが困難なことの要因となる。しかし、敗血症が致命的状態へ著しく急速に進行するために、早期及び信頼できる診断は、必須である。

10

【0003】

対象における敗血症の発症は、よく記述された過程に従い、すなわち、全身性炎症反応症候群（SIRS）陰性からSIRS陽性へ、次いで敗血症に進行し、それは、次いで重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害（MOD）及び最終的に死亡に進行し得る。

【0004】

臨床的に敗血症に重要な病原微生物の存在を考証することは、困難であると判明している。原因となる微生物は、典型的には、対象の血液、痰、尿、創傷分泌物、留置ラインカテーテル表面、その他を培養することによって検出される。しかし、原因となる微生物は、ある種の体内微小環境においてのみ存在し得るので、その結果、培養された特定の材料には、混入微生物が含まれていないかもしれない。検出は、感染の部位での微生物の数が少ないことによって、更に複雑になり得る。血中の病原体の数が少ないと、血液を培養することによる敗血症の診断に特定の問題がある。ある研究では、例えば、陽性の培養結果が、敗血症の臨床症状を示す対象の17%だけで得られた（Rangel-Fraustoらの論文、1995, JAMA 273:117-123）。診断は、非病原性微生物によるサンプルの混入によって、更に複雑にされ得る。例えば、検出された微生物の12.4%のみが、敗血症である707人の対象の研究において、臨床的に有意であった（Weinsteinらの論文、1997, Clinical Infectious Disease 24:584-602）。

20

【0005】

敗血症の早期診断の困難さは、疾患と関連する高い罹患率及び死亡率によって反映される。敗血症は、現在米国における第10番目の主要な死因であり、特に非冠血管集中治療室（ICU）の入院患者に流行しており、その場合、それが最も一般的な死因である。全体の死亡率は、35%程度で、1年あたり推定750,000症例が米国単独で生じる。米国単独において敗血症を治療するための年間費用は、ほぼ数億ドルである。

30

【0006】

大部分の既存の敗血症評価システム又は予測モデルでは、すでに敗血症であるとみなされ、かつ敗血症それ自体の発症を予測しない患者において、死亡を含む後期段階の合併症のリスクのみを予測する。たいてい、敗血症の診断は、APACHE IIなどの経験的スコアシステムでの臨床的疑い（Knausらの論文、1985, Crit. Care Med. 13:818-829）、続く血液培養に基づいている。任意の全身感染を確認するには、48時間以上かかり得る。それまでには、あまりに遅すぎて何人かの患者を救うことはできないことが多い。敗血症の診断又は予後を早期に行うことができる場合、治療により、重篤な敗血症又は敗血症性ショックへの敗血症の進行を妨げ、又は遅らせることができる。

40

【0007】

従って、満足のいく特異性及び感度を有し、有効な介入及び予防が可能のように十分に早い技術を使用する、敗血症を含む全身性炎症状態を診断する方法に対する需要が存在する。

【発明の開示】

【0008】

(3. 本発明の要旨)

50

一つの態様において、本発明は、部分的には、患者由来のサンプル中の総リゾホスファチジルコリン量を、対象における全身性炎症状態の迅速、高感度、かつ正確な診断又は予後のために使用することができるという発見に基づいている。本発明の態様において、患者由来のサンプルにおける総リゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態の存在又はリスクを評価するために使用される。下記の実施例に示したように、本発明の方法及び構成物は、全身性炎症状態の診断又は予後のために使用することができる。全身性炎症状態は、全身性炎症反応症候群（「SIRS」）、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害（「MOD」）及び死亡を含む当業者に公知の任意の全身性炎症状態であることができる。

【0009】

10

特定の実施態様において、対象のサンプル中の総リゾホスファチジルコリンを評価して、全身性炎症状態についての存在又はリスクを評価する。本明細書に記述したとおり、患者由来のサンプル中の総リゾホスファチジルコリン量は、全身性炎症状態の発病と関連し得ること、及びその発病に先立つ状態を示し得ることを発見した。その結果、特定の実施態様において、患者由来のサンプル中の総リゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態のための予後として使用することができる。評価は、総リゾホスファチジルコリンを評価するための当業者に公知の任意の技術に従って進めることができる。例示的技術を本明細書に記述してある。しかし、本発明は、当業者に明らかな総リゾホスファチジルコリンを評価する任意の技術に基づいた方法を提供する。

【0010】

20

別の態様において、本発明は、部分的には、対象における全身性炎症状態の迅速、高感度、かつ正確な診断又は予後に有用なリゾホスファチジルコリンバイオマーカの分類の発見に基づいている。本発明の態様において、対象における本発明のバイオマーカの評価は、全身性炎症状態の存在又はリスクを評価するために使用される。下記の実施例に示したように、本発明の方法及び構成物は、例えば8時間又は更に6時間ほどの短時間において最大80%の精度で、全身性炎症状態の診断又は予後のために使用することができる。全身性炎症状態は、全身性炎症反応症候群（「SIRS」）敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック及び多臓器機能障害（「MOD」）を含む当業者に公知の任意の全身性炎症状態であることができる。

【0011】

30

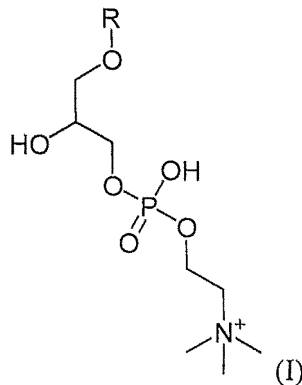
特定の実施態様において、バイオマーカは、1-O-アシル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンである。アシル基は、当業者に公知の任意のアシル基であることができる。特定の実施態様において、アシル基は、 C_{14} - C_{22} アシルである。更なる実施態様において、アシル基は、 C_{16} - C_{18} アシルである。詳細な実施態様において、アシル基は、 C_{16} アシルである。好ましい実施態様において、アシル基は、パルミトイルである。更に特定の実施態様において、アシル基は、 C_{18} アシルである。好ましい実施態様において、アシル基は、ステアロイルである。バイオマーカは、対象由来のバイオマーカの任意の形態、例えば当業者によって同定することができるバイオマーカの任意の塩又は溶媒和物であることができる。

【0012】

40

特定の実施態様において、バイオマーカは、式(1)記載の化合物又はその塩若しくは溶媒和物である。

【化1】



10

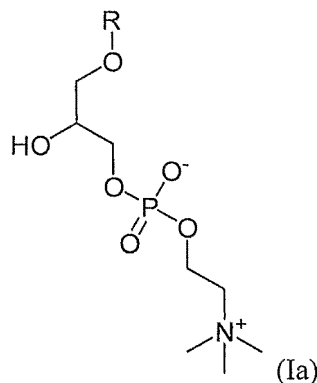
式(I)において、Rは、当業者に公知の任意のアシル基であることができる。特定の実施態様において、Rは、 C_{14} - C_{22} アシルである。更なる実施態様において、Rは、 C_{16} - C_{18} アシルである。詳細な実施態様において、Rは、 C_{16} アシルである。好ましい実施態様において、Rは、パルミトイルである。更に特定の実施態様において、Rは、 C_{18} アシルである。好ましい実施態様において、Rは、ステアロイルである。

【0013】

例示的な式(I)の塩は、式(Ia)によって提供される：

20

【化2】



30

前記塩は、当業者に公知の、任意の生理的有機若しくは無機陰イオン又は任意の生理的有機若しくは無機陽イオン又は両方と配位することができる。例示的な生理的陰イオンには、クロライド、ブロミド、ホスフェート、アセテート、カルボナート、カルボナート及びサルフェートを含む。例示的な生理的陽イオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及びアンモニウムを含む。

【0014】

特定の態様において、対象のバイオマーカーを評価して、全身性炎症状態についての存在又はリスクを評価する。評価は、当業者に公知のバイオマーカーを評価する任意の方法に従って進めることができる。特定の実施態様において、バイオマーカーの量は、対象の体液中で測定される。しかし、本発明は、当業者に明らかな本発明のバイオマーカーを評価する任意の技術に基づいた方法を提供する。

40

【0015】

以下の説明において、リゾホスファチジルコリンという用語は、特に明記しない限り、総リゾホスファチジルコリンを、又はリゾホスファチジルコリンバイオマーカーを指し得る。もちろん、本発明は、総リゾホスファチジルコリンに基づいた予後又は診断、本発明の1つ以上のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーに基づいた予後又は診断、及び本発明の1つ以上のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーと共に総リゾホスファチジル

50

コリンに基づいた予後又は診断を提供する。

【0016】

一部の実施態様において、対象における複数のリゾホスファチジルコリン測定は、ある期間にわたって行われる。時間間隔は、例えば当業者の判断に従って、3時間、4時間、6時間、12時間、24時間又はその他の間隔であることができる。これらの実施態様において、当業者により、全身性炎症状態の診断又は予後のために、リゾホスファチジルコリンの相対量が評価される。詳細な実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の減少は、全身性炎症状態についてのリスクの増大を示し、総リゾホスファチジルコリン量の増大は、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

【0017】

有利な実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後のためには、対象由来の単一サンプルで十分であり得る。リゾホスファチジルコリン量は、対象と同様の個体のサンプルにおいて相対的に一定量で維持されることが当業者に公知である、該サンプル中に存在する1つ以上のバイオマーカーと比較することができる。本発明のリゾホスファチジルコリン量は、当業者により、全身性炎症状態の診断又は予後のためのこの内部標準に対して評価することができる。詳細な実施態様において、少量のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの増大を示し、多量のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

【0018】

その他の実施態様において、評価は、リゾホスファチジルコリンの参照量に対するリゾホスファチジルコリン量の比較に基づく。参照量は、例えば定義された期間内に、公知の全身性炎症状態の1つ以上の症候が顕在化するか、又は顕在化するであろう参照個体中のリゾホスファチジルコリン量であることができる。該量は、例えば当業者によって決定される、絶対値、又は誤差範囲又は値域を含む絶対値であることができる。特定の実施態様において、参照個体は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック又はMODの症候を示すか、若しくは示すであろう、又は全身性炎症状態の症候を示さない。特定の実施態様において、少量（例えば参照量と比較して）のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの増大を示し、多量のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

【0019】

好都合なことに、参照量は、本発明の方法を実施する者によって決定される必要はない。その代わりに、リゾホスファチジルコリンの参照量は、当業者が利用できるデータを調べることによって同定することができる。このようなデータは、当業者が利用できる任意の供与源から得ることができる。特定の実施態様において、供与源は、本明細書に記述した方法に従って、当業者によって収集されるリゾホスファチジルコリンの参照量で作り出すことができる。

【0020】

特定の実施態様において、参照量は、全身性炎症状態の症候を示す参照個体由来である。参照個体は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、MOD又は死亡の症候を示すか、又は全身性炎症状態の症候を示さないことができる。特定の実施態様において、参照量は、症候の提出の前の、又は後の時点で評価することができる。例えば、有利な実施態様において、参照量は、敗血症の発病の12、24、36又は48時間前に、SIRS陽性個体において測定される量であることができる。このような参照量の測定は、当業者の技術の範囲内である。

【0021】

更なる実施態様において、参照量は、1つ以上の全身性炎症状態の症候を示す複数の個体由来である。参照量は、当業者に公知の任意の適切な統計的方法に従って算出することができる。例えば、参照量は、全身性炎症状態を示す参照個体由来の参照量の統計的平均値に基づくことができる。有利な実施態様において、比較は、リゾホスファチジルコリン量についての値又は値域で作製される。値又は値域は、本明細書に記述したとおりに得る

10

20

30

40

50

ことができ、本発明の方法の実践者が利用できる。詳細な実施態様において、少量（例えば、参照量と比較して）のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの増大を示し、多量のリゾホスファチジルコリンは、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

【0022】

比較は、当業者に公知のバイオマーカーの量を比較するための任意の技術に従うことができる。一つの実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後は、対象におけるリゾホスファチジルコリン量と参照量との間の相違に基づく。特定の実施態様において、対象におけるリゾホスファチジルコリン量と参照量との間の相違は、全身性炎症状態についてのリスクと逆相関する。さらなる実施態様において、参照量は、カットオフであり、言い換えると、対象におけるリゾホスファチジルコリン量がカットオフ参照量未満である場合に、対象は、全身性炎症状態を有するか、又は全身性炎症状態についてのリスクを有すると評価することができる。このようなカットオフ参照量は、本明細書に記述した方法に従って算出することができる。

10

【0023】

対象における総リゾホスファチジルコリン量は、限定されないが、当業者に公知の任意の技術に従って決定することができる。特定の実施態様において、当業者であれば、サンプル中の総リゾホスファチジルコリン量に相関する量を測定することができる。例えば、詳細な実施態様において、当業者であれば、サンプル中の総リゾホスファチジルコリン量を示すために、サンプル中の総遊離リゾホスファチジルコリン、総結合リゾホスファチジルコリン又は総遊離及び結合リゾホスファチジルコリンを測定することができる。言い換えると、特定の実施態様において、遊離若しくは結合又は遊離及び結合の両方のリゾホスファチジルコリンの測定は、総リゾホスファチジルコリン量に相関し得る。特定の実施態様において、総リゾホスファチジルコリンを評価するための技術は、本発明にとって重要ではなく、本明細書の方法を実践するものによって実施される必要はない。例えば、詳細な実施態様において、本発明の方法は、いずれの量が測定されるかどうかに関係なく、全身性炎症状態についてのリスクを評価もするために、参照総リゾホスファチジルコリン量に対する対象中の総リゾホスファチジルコリン量の比較の一工程を含むことができる。さらなる実施態様において、対象の総リゾホスファチジルコリンを本明細書に記述した技術によって評価し、続いて全身性炎症状態についてのリスクを評価するために、参照総リゾホスファチジルコリンに対して比較する。特定の実施態様において、総リゾホスファチジルコリンは、下記に詳細に記載したように、分光法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法、電気泳動法又は酵素アッセイ法によって評価される。

20

30

【0024】

一つの態様において、本発明は、対象のサンプルにおける総リゾホスファチジルコリンをアッセイするための蛍光法を提供する。特定の実施態様において、本方法は、対象のサンプルを、該サンプル中の総リゾホスファチジルコリンを指し示す蛍光産物を生成することができる1つ以上の試薬と接触させることを含む。本方法は、サンプル中の総リゾホスファチジルコリンの存在を検出し、若しくは総リゾホスファチジルコリン量を検出し、又は両方を検出するために使用することができる。詳細な実施態様において、サンプルを試薬の1つ以上の蛍光発生基質と接触させる。この蛍光発生基質は、総リゾホスファチジルコリンを示す蛍光産物に変換することができる。有利な実施態様において、試薬には、ペルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、グリセロホスファチジルコリンジエステラーゼ及びリゾホスホリパーゼを含む。有用な蛍光発生基質は、蛍光産物7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンに変換することができる化合物である10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンである。好都合には、このような方法は、全身性炎症状態を有するか、又はリスクのある対象における少量の総リゾホスファチジルコリンを検出するために必要な感度を提供することができる。

40

【0025】

対象におけるバイオマーカーの量は、限定されないが、当業者に公知の任意の技術に従

50

って決定することができる。特定の実施態様において、バイオマーカーを評価するための技術は、本発明にとって重要ではなく、本明細書の方法を実践するものによって実施される必要はない。例えば、詳細な実施態様において、本発明の方法は、いずれのバイオマーカーが測定されるかどうかに関係なく、全身性炎症状態についてのリスクを評価するために、参照バイオマーカーの量に対する対象中のバイオマーカーの量の比較の単一工程を含むことができる。さらなる実施態様において、対象のバイオマーカーを本明細書に記述した技術によって評価し、続いて全身性炎症状態についてのリスクを評価するために、対象中のバイオマーカーを参照バイオマーカーと比較する。特定の実施態様において、バイオマーカーは、下記に詳細に記載したように、分光法、クロマトグラフィー、免疫アッセイ法又は電気泳動法によって評価される。

10

【0026】

リゾホスファチジルコリン量は、本明細書に提供したとおり、対象の体液又は組織において測定することができる。体液又は組織を調製するための方法は、例えば本明細書に記述したリゾホスファチジルコリンを抽出するか、又は精製するための方法である。更に、リゾホスファチジルコリンを測定するための技術を本明細書に提供してある。

【0027】

別の態様において、本発明は、対象における全身性炎症状態をモニターするための方法を提供する。このような方法では、リゾホスファチジルコリンの評価が対象における全身性炎症状態をモニターするために使用される。このような方法では、リゾホスファチジルコリン量の変化が、全身性炎症状態の変化を示す。例えば、特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の増大は、全身性炎症状態についての重症度の減少又はリスクがより少ないことを示し、リゾホスファチジルコリン量の減少は、全身性炎症状態についての重症度の増大又はリスクの増大を示す。一部の実施態様において、リゾホスファチジルコリンの評価は、一つの全身性炎症状態から、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、MOD若しくは死亡などの別のもの、又は全身性炎症状態なしへの変換を示すことができる。

20

【0028】

別の態様において、本発明は、対象における全身性炎症状態の治療をモニターするための方法を提供する。このような方法では、リゾホスファチジルコリンの評価が対象における全身性炎症状態をモニターするために使用される。このような方法では、リゾホスファチジルコリン量の変化が全身性炎症状態の変化を示す。例えば、特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の増大は、全身性炎症状態についての重症度の減又はリスクがより少ないことを示し、総リゾホスファチジルコリン量の減少は、全身性炎症状態についての重症度の増大又はリスクの増大を示す。好都合には、全身性炎症状態の治療は、モニタリングに基づいて調整することができる。一部の実施態様において、リゾホスファチジルコリンの評価は、一つの全身性炎症状態から、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、MOD若しくは死亡などの別のもの、又は全身性炎症状態なしへの変換を示すことができる。好ましい実施態様において、SIRS陰性である対象を、SIRS若しくは敗血症又は別の炎症状態への変換についてモニターすることができる。更に好ましい実施態様において、SIRS陽性である対象を、敗血症又は別の全身性炎症状態への変換について、又はSIR陰性への変換についてモニターすることができる。

30

40

【0029】

別の態様において、本発明は、全身性炎症状態の診断又は予後のためのキットを提供する。一部の実施態様において、キットには、リゾホスファチジルコリンの評価のために適した構成物を含む。キットには、1つ以上の全身性炎症状態の診断又は予後のために総リゾホスファチジルコリンの評価を使用するための説明があるラベル又はラベリングを更に含むことができる。特定の実施態様において、キットには、キットの構成物と共に、全身性炎症状態の予後若しくは診断を促進するリゾホスファチジルコリンの参照量若しくはこのような参照量に対する引用があるラベル又はラベリングを含むことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 3 0 】

(5 . 発明の詳細な記載)

(5 . 1 定義)

本明細書に使用される以下の用語は、以下の意味を有するものとする。

「対象」という用語は、霊長類（例えば、ヒト）ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含むが、限定されない哺乳類などの動物をいう。好ましい実施態様において、対象は、ヒトである。「患者」という用語は、特に明記しない限り、ヒト対象と同義である。

【 0 0 3 1 】

「全身性炎症反応症候群」（又は「SIRS」）とは、24時間の期間内に以下の状態の2つ以上によって顕在化される、種々の重篤な臨床発作に対する臨床反応をいう：

38（100.4°F）を越えるか、又は36（96.8°F）未満の体温；

90拍/分を超える心拍数（HR）；

20呼吸/分を越える呼吸数（RR）又は32mmHg未満の P_{CO_2} 又は機械による人工換気が必要となること；及び、

12.0×10⁹/Lを越えるか、若しくは4.0×10⁹/L未満のいずれかの白血球数（WBC）、又は10%を超える未成熟バンド形態（immature band form）を有すること。

【 0 0 3 2 】

これらのSIRSの症候は、SIRSの共通の定義を表すが、将来修正すること、又はその他の定義に取って代わり得る。本定義は、現在の医療を明らかにするために使用され、重要な本発明の態様を表さない（例えば、米国胸部医師会/救急医学コンセンサス会議協会：敗血症及び器官不全のための定義、並びに敗血症の革新的療法の使用のための指針（American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis）、1992、Crit. Care. Med. 20、864-874を参照され、これらの全内容は、本明細書に引用により組み込まれる）。

【 0 0 3 3 】

SIRSである対象は、上で定義したとおりの、SIRSとして分類される臨床症状を有するが、臨床的には敗血症であると考えられていない。どの対象が敗血症を発症するリスクがあるかを決定するための方法は、当業者に周知である。このような対象には、例えば集中治療室（「ICU」）中のヒト、他の火傷、外科手術又はその他の発作などの生理的外傷を受けたヒトを含む。SIRSの特徴は、頻脈、頻呼吸症または過呼吸、低血圧、低灌流、乏尿、白血球増多症または白血球減少症、発熱または低体温症及び大量注入の必要性によって特徴付けることができる炎症誘発性状態を生じることである。SIRSには、特徴的に実証された感染源（例えば、菌血症）を含まない。

【 0 0 3 4 】

「敗血症」は、SIRS、更に実証された感染症（例えば、生物体について陽性培養など、その後の臨床的に有意な感染症の研究室確認）を伴う感染に対する全身性宿主反応をいう。従って、敗血症は、実証された感染症に対する全身的炎症反応をいう。（例えば、米国胸部医師会救急医学、胸部（American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine, Chest）、1997年、101：1644-1655を参照されたい。その全ての内容は、本明細書に引用により組み込まれる。）本明細書に使用される「敗血症」は、敗血症の最終段階と関連する、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック及び多臓器機能障害（「MOD」）の発病を含むが、限定されない敗血症の全ての段階を含む。

【 0 0 3 5 】

「敗血症の発病」は、例えば、従来臨床症状が敗血症の臨床的疑いを支持するのに十分な段階の前の、敗血症の早期段階をいう。本発明の方法は、従来技術を使用して敗血症が疑われるであろう時より前に敗血症を検出するために使用することができるので、特定の実施態様において、初期敗血症における対象の疾患状態は、敗血症の徴候がより臨床的に明らかである時よりも過去にさかのぼって確認される。対象が敗血症になる正確な機

10

20

30

40

50

構は、本発明の重要な態様ではない。本発明の方法は、感染過程の起源とは独立して敗血症の発病を検出することができる。

【0036】

「重篤な敗血症」は、器官機能障害、低灌流異常又は敗血症で誘導される低血圧と関連する敗血症をいう。低灌流異常は、乳酸アシドーシス、乏尿又は精神状態の急変を含むが、限定されない。

「敗血症性ショック」は、適切な静脈内補液投与にตอบสนองせず、かつ末梢低灌流の徴候を伴う、敗血症で誘導される低血圧をいう。

【0037】

「コンバーター」又は「コンバーター対象」は、対象がモニターされる期間の間に、典型的にはICU滞在の間に臨床上敗血症の疑いへと進行するSIRS陽性対象をいう。

「非コンバーター」又は非コンバーター対象」は、対象がモニターされる期間の間に、典型的にはICU滞在の間に臨床上敗血症の疑いへと進行しないSIRS陽性対象をいう。

【0038】

「バイオマーカー」は、生体サンプルに存在するか、又は生体サンプルに由来する化合物である。この状況で使用される「由来する」とは、検出されたときに、特定の分子が生体サンプルに存在することを指し示す化合物をいう。例えば、化合物の特定の断片の検出は、生体サンプルにおける化合物自体の存在を示し得る。バイオマーカーは、例えば生体サンプルから単離すること、直接生体サンプルにおいて測定すること、又は生体サンプルにあることを検出し、若しくは決定することができる。バイオマーカーは、例えば機能的で、部分的に機能的で、又は機能的でないことができる。

本明細書に使用される「従来技術」は、全身性炎症状態の診断又は予後の状況において、本発明に従ってバイオマーカーを評価することなく、表現型変化に基づいて対象を分類する技術である。

【0039】

「敗血症の発症を予測すること」とは、対象が敗血症を発病するかどうかに関して判定することである。このような予測は、この判定を行うために使用される手段の精度によって限定される。本発明は、60%以上である精度でこの判定を行うために、例えば決定規則を利用することによる方法を提供する。本明細書に使用される「敗血症の発症を予測すること」及び「敗血症を予測すること」という用語は、同義である。一部の実施態様において、作用する敗血症の発症を予測する（敗血症を予測する）行為は、敗血症の発症を指し示す決定規則を使用して対象から1つ以上のバイオマーカープロフィールを評価すること、この評価の結果として、評価対象が敗血症になるであろうことを示す決定規則による結果を受け取ることによって達成される。決定規則を使用した試験対象からの1つ以上のバイオマーカープロフィールのこのような評価では、1つ以上のバイオマーカープロフィールのいくつか又は総数を使用してこのような結果を得る。

【0040】

本明細書に使用される「特異的に」という用語及び類似の用語は、抗体の状況において、特異的に抗原若しくは抗原の分類又はその断片と結合し、かつその他の抗原又はその他の断片と特異的に結合しないペプチド、ポリペプチド及び抗体又はその断片をいう。抗原と特異的に結合するペプチド又はポリペプチドは、標準的な実験法によって、例えば当業者に周知の任意の免疫アッセイ法によって決定すると、その他のペプチド又はポリペプチドとより低い親和性で結合し得る。このような免疫アッセイ法には、放射免疫アッセイ法（RIA）及び酵素結合抗体免疫吸着アッセイ法（ELISA）を含むが、限定されない。抗原と特異的に結合する抗体又は断片は、関連した抗原と交差反応性し得る。好ましくは、抗体又はその断片は、抗原と特異的に結合するその他の抗原と交差反応しない。例えば、抗原-抗体相互作用、特異性及び交差反応性、並びに上記のもの全てを決定するための方法に関する考察について、Paul編集の論文、2003年、基礎免疫学（Fundamental Immunology）、Raven Press、New Yorkの69～105ページを参照され、これは、本明細書に引用により組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0041】

本明細書に使用される「参照集団」は、全身性炎症状態を発病するリスクがある対象のバイオマーカーの評価のための決定規則を構築するために使用することができる対象の集団である。

「参照対象」は、当業者によって認識される標準に従って、全身性炎症状態と診断されたか、又は定義された期間内に診断されるであろう対象である。参照対象は、全身性炎症状態の診断又は予後のための試験対象におけるバイオマーカーの量を評価するために使用することができるバイオマーカーの参照量を確立するために有用である。

【0042】

「バイオマーカープロフィール」には、バイオマーカー（例えば、ポリペプチド、ペプチド、脂質、核酸、代謝産物、mRNA、cDNA及び/又は炭水化物など）又はバイオマーカーの測定可能な態様（例えば、存在量、発現レベル）などの特徴をもつその指標の1つ以上のタイプの複数を含む。バイオマーカープロフィールは、少なくとも2つのこのようなバイオマーカー又は指標を含み、バイオマーカーは、例えば核酸及び炭水化物などの、同じか、又は異なる種のものであることができる。また、バイオマーカープロフィールは、少なくとも3、4、5、10、20、30以上のバイオマーカー又はその指標を含んでいてもよい。一つの実施態様において、バイオマーカープロフィールは、何百又は更に数千ものバイオマーカー又はその指標を含む。バイオマーカープロフィールは、1つ以上の対照又は内部標準を更に含むことができる。一つの実施態様において、バイオマーカープロフィールは、内部標準として役立つ少なくとも1つのバイオマーカー又はその指標を含む。別の実施態様において、バイオマーカープロフィールは、バイオマーカーの1つ以上のタイプの指標を含む。本明細書に使用される「指標」という用語は、この文脈において、バイオマーカー分子実体それ自体以外に、単にバイオマーカープロフィールがバイオマーカーのための記号、データ、略語又はその他の同様の印を含む状況をいう。

【0043】

バイオマーカープロフィールのそれぞれのバイオマーカーは、対応する「特徴」を含む。本明細書で使用される「特徴」は、バイオマーカーの測定可能な態様をいう。特徴には、例えば生体サンプルにおけるバイオマーカーの有無、サンプルにおけるバイオマーカーの存在量又は量、サンプルにおける分子の量の比などを含むことができる。また、特徴は、2つのサンプルから取得される対応するバイオマーカーの測定可能な態様間の相違でもよく、該2つのサンプルは、2つの異なる時点にて対象から収集される。当業者であれば、その他の特徴の計算方法を発明することができ、全てのこのような方法が本発明の範囲内であることを認識するであろう。例えば、特徴は、2つ以上の時点にて対象から収集した生体サンプル全体のバイオマーカーの存在量の平均を表し得る。更に、特徴は、単一の時点にて対象から得られる生体サンプル由来の2つ以上のバイオマーカーの存在量の相違又は比であり得る。また、バイオマーカープロフィールは、少なくとも3、4、5、10、20、30以上の特徴を含んでいてもよい。一つの実施態様において、バイオマーカープロフィールは、何百又は更に数千もの特徴を含む。

【0044】

「表現型の変化」は、対象の所与の状態に関連したパラメーターの検出可能な変化である。例えば、表現型の変化には、体液中のバイオマーカーの増大又は減少を含むことができ、該変化は、SIRS、敗血症、敗血症の発病、又は敗血症の進行における特定の段階と関連する。表現型の変化には、バイオマーカーの測定可能な態様の変化でない対象の所与の状態の検出可能な態様の変化を更に含むことができる。例えば、表現型の変化には、体温、呼吸数、パルス、血圧又はその他の生理的パラメーターの検出可能な変化を含むことができる。このような変化は、当業者に周知である従来技術を使用する臨床観察及び測定を介して決定することができる。

【0045】

「決定規則」は、バイオマーカープロフィールを評価するために使用される方法である。のような決定規則は、Hastieらの論文、2001年、統計学習の原理（The Elements of St

10

20

30

40

50

atistical Learning)、Springer-Verlag、New Yorkにおいて例証されるとおり、当該技術分野において公知である1つ以上の形態を採用することができ、これはその全体が引用により本明細書に組み込まれる。決定規則を特徴のデータセットに対して働くように使用して、とりわけ敗血症の発病を予測し、敗血症の進行を決定し、又は敗血症を診断してもよい。本発明の一部の実施態様において使用することができる例示的な決定規則は、下記の第5.5節に詳細に記述してある。

【0046】

「敗血症の発症を予測すること」とは、対象が敗血症を発病するかどうかに関して判定することである。このような予測は、この判定を行うために使用される手段の精度によって限定される。本発明は、60%以上である精度でこの判定を行うために、例えば決定規則を利用して対象から1つ以上のバイオマーカープロファイルを評価すること、この評価の結果として、評価対象が敗血症になるであろうことを示す決定規則による結果を受け取ることによって達成される。決定規則を使用した試験対象からの1つ以上のバイオマーカープロファイルのこのような評価では、1つ以上のバイオマーカープロファイルのいくつか又は総数の特徴を使用してこのような結果を得る。

10

【0047】

本明細書に使用される「訓練集団」は、敗血症を発病するリスクがある対象のバイオマーカープロファイルの評価のために、データ分析アルゴリズムを使用して、決定規則を構築するために使用される対象の集団由来のサンプルのセットである。好ましい実施態様において、訓練集団には、コンバーターである対象及び非コンバーターである対象由来のサンプルを含む。

20

【0048】

本明細書に使用される「データ分析アルゴリズム」は、訓練集団における対象のバイオマーカープロファイルを使用して決定規則を構築するために使用されるアルゴリズムである。代表的なデータ分析アルゴリズムを第5.5節に記述してある。「決定規則」は、データ分析アルゴリズムの最終生成物であり、1つ以上の値セットによって特徴づけられ、これらの値セットのそれぞれが、SIRSの態様、敗血症の発病、敗血症又は対象が敗血症を得るであろう予測の指標である。一つの具体例において、値セットは、対象が敗血症を発病する予測を表す。もう一つの例において、値セットは、対象が敗血症を発病しない予測を表す。

30

【0049】

本明細書に使用される「値セット」は、バイオマーカープロファイルの特徴についての値の組み合わせ又は値域である。この値セット及びその中の値の性質は、バイオマーカープロファイルに存在する特徴のタイプ及び値セットを指示する決定規則を構築するために使用されるデータ分析アルゴリズムに依存的である。例えば、訓練集団のそれぞれのメンバーのバイオマーカープロファイルを得ることができる。このようなそれぞれのバイオマーカープロファイルは、それぞれのバイオマーカーについて測定された特徴を含む。これらの特徴値をデータ分析アルゴリズムにより使用して決定規則を構築することができる。データ分析アルゴリズムは、後述する決定木であることができる。決定規則は、値セットを定義する。このような値セットは、敗血症の発病を予測する。バイオマーカー特徴値がこの値セットを満たす対象は、敗血症になる可能性が高い。例えば、値セットには、第1の値未満であるバイオマーカーAの量及び第2の値未満であるバイオマーカーBの量を含むことができる。別の値セットは、敗血症がない状態を予測する。バイオマーカー特徴値がこの値セットを満たす対象は、敗血症になる可能性が低い。これの例示的な値セットには、第1の値よりも多いバイオマーカーA及び第3の値よりも多いバイオマーカーBを含むことができる。

40

【0050】

50

データ分析アルゴリズムが、ニューラルネットワーク解析であり、かつこのニューラルネットワーク解析の最終生成物が、適切な加重ニューラルネットワークである場合、1つの値セットは、敗血症を発病する可能性が高いことを示すような加重ニューラルネットワークを生じさせるであろうバイオマーカープロファイル特徴値の範囲のものである。別の値セットは、敗血症を発病する可能性が低いことを示すような加重ニューラルネットワークを生じさせるであろうバイオマーカープロファイル特徴値の範囲である。

【0051】

「予防すること」又は「予防」は、疾患又は障害を得る（すなわち、疾患に曝露され、又は疾患に罹りやすいであろうが、いまだに疾患を経験していないか、又は疾患の症候を示さない対象において発症しないような疾患の臨床症状の少なくとも1つを生じさせる）リスクの減少をいう。好ましくは、予防は、まだ疾患若しくは障害による影響を受けないか、又はまだ疾患若しくは障害の症候を示していない対象（例えば、いまだに感染していないか、又はまだ感染の症候を示していない対象）における化合物又は組成物の使用をいう。

10

【0052】

任意の疾患又は障害を「治療すること」又は「治療」は、一つの実施態様において、対象に存在する疾患又は障害を寛解させること（すなわち、疾患若しくはその臨床症状の少なくとも1つの発症を抑えること、又は減少させること）をいう。別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、対象には識別できないであろう少なくとも1つの物理的パラメーターを寛解させることをいう。更に別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、物理的に（例えば、識別可能な症候の安定化）若しくは生理的に（例えば、物理的なパラメーターの安定化）又は両方のいずれかで、疾患又は障害を調整することをいう。更に別の実施態様において、「治療すること」又は「治療」は、疾患又は障害の発病を遅延させることをいう。

20

【0053】

「ラベル」という用語は、物品の容器に直接書かれ、印刷され、又は描かれた事項の表示、例えば医薬として活性な薬剤を含むバイアルに示される書かれた事項をいう。

「ラベリング」という用語は、全てのラベル及びその他の任意の物品、又はその容器若しくは包装紙又はこのような物品を添付するもののいずれか、例えば医薬として活性な薬剤の容器に添付する若しくは付随した、添付文書又はビデオテープ若しくはDVDなどの音声又はビデオに対して書かれ、印刷され、又は描かれた事項をいう。

30

【0054】

「アシル」は、式中Rがアルキルであるラジカル-C(O)Rをいう。

「アルキル」は、それ自体又は別の置換基の一部として、特に明記しない限り、完全に飽和していても、一価又は多価不飽和であってもよい、指定した炭素原子数を有する（すなわち、C₁-C₂₂は、1~22炭素を意味する）、直鎖又は分枝鎖炭化水素ラジカルを意味する。飽和炭化水素ラジカルの例を挙げると、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えばn-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどの同族体及び異性体などの基がある。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合又は三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例を挙げると、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2,4-ペンタジエニル、3-（1,4-ペンタジエニル）、エチニル、1-及び3-プロピニル、3-ブチニル並びにより高級の同族体及び異性体がある。

40

【0055】

「生理的に許容し得る塩」は、医薬として許容され、かつ親化合物の所望の薬理活性を有する本発明の化合物の塩をいう。このような塩は、以下を含む：（1）塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、プロピオン酸、ヘキサノ酸、シクロペンチルプロピオン酸、グリコール酸、グルタル酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、ソルビン酸、アスコルビン酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸

50

、酒石酸、クエン酸、安息香酸、3-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、ピクリン酸、ケイ皮酸、マンデル酸、フタル酸、ラウリル酸、メタン硫酸、エタン硫酸、1,2-エタン-ニスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、4-トルエンスルホン酸、ショウノウ酸、ショウノウスルホン酸、4-メチルピシクロ[2.2.2]-オクタ-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプトン酸、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、tert-ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、安息香酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸などの酸などの有機酸又は無機酸と共に形成された酸付加塩；又は(2)親化合物に存在する酸性プロトンが(a)金属イオン、例えばアルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン若しくはアルミニウムイオン又は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム及び水酸化バリウムなどの水酸化アルカリ金属若しくは水酸化アルカリ土類金属、アンモニアによって置換されているか、(b)メチルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、N-メチルグルカミンなどの脂肪族アミン、脂環式アミン又は芳香族有機アミンなどの有機塩基と配位しているかの、いずれかのときに形成される塩。

【0056】

塩には、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、テトラアルキルアンモニウムなど、化合物が塩基性官能性を含むときは、塩酸塩、臭化水素酸塩、酒石酸塩、メシル酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、シュウ酸塩などの無毒の有機酸又は無機酸の塩を更に含む。「生理的に許容し得る陽イオン」という用語は、酸性官能基の無毒の生理的に許容し得る陽イオン性対イオンをいう。このような陽イオンは、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム及びテトラアルキルアンモニウムカチオンなどによって例証される。

【0057】

「溶媒和物」は、本発明の化合物又はその塩であって、非共有結合性の分子間力によって結合した溶媒の化学量論量又は非化学量論量を更に含むものをいう。溶媒が水である場合、溶媒和物は水和物である。

同じ分子式を有するが、それらの原子の結合の性質若しくは配列が、又は空間におけるそれらの原子の配置が異なっている化合物は、「異性体」と称されることが理解されるはずである。空間におけるそれらの原子の配置が異なる異性体は、「立体異性体」と称される。

【0058】

互いの鏡像でない立体異性体は、「ジアステレオマー」と称され、互いに重ねることが出来ない鏡像であるものは「エナンチオマー」と称される。化合物が不斉中心を有するとき、例えば、それが4つの異なる基に結合するときには、エナンチオマー対が生じ得る。

エナンチオマーは、その不斉中心の絶対配置によって特徴づけることができ、Cahn及びPrelogの規則に従って(R)又は(S)と命名することができ(Cahnらの論文、1966年、Angew. Chem. 78:413-447、Angew. Chem. Internat. Ed. Eng. 5:385-414(正誤表:Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5:511); Prelog及びHelmehenの論文、1982年、94:6 14-631 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21:567-583; Mata及びLoboの論文、1993年、Tetrahedron: A

symmetry 4:657-668)又は分子が偏光面を回転する様式によって特徴づけることができ、右旋性又は左旋性と(すなわち、それぞれ(+))又は(-)異性体として)命名される。

キラル化合物は、個々のエナンチオマーとしても、又はその混合物としても、いずれで存在することもできる。同じ比率のエナンチオマーを含む混合物は、「ラセミ混合物」と言われる。

【0059】

特定の実施態様において、本発明の化合物は、1つ以上の不斉中心を有してもよく；従って、このような化合物は、個々の(R)若しくは(S)エナンチオマーとして、又はそれらの混合物として産生することができる。別に示されない限り、例えば式の任意の位置における立体化学の名称により、本明細書及び特許請求の範囲における特定の化合物の記述

10

20

30

40

50

又は命名法では、その個々のエナンチオマー及び混合物であるラセミ体又はその他の両方を含むことが意図される。立体化学の決定及び立体異性体の分離のための方法は、当該技術分野において周知である。詳細な実施態様において、本発明は、塩基での処理による本明細書に示した化合物の立体異性体を提供する。

【0060】

(5.2 本発明の実施態様)

本発明は、対象のリゾホスファチジルコリンを評価することによって、迅速かつ正確な全身性炎症状態の診断又は予後が可能である。リゾホスファチジルコリン量は、対象が全身性炎症状態を発病するリスクのある期間の間に、単一時点（「スナップショット」）又は複数のこのような時点にて、対象の1つ以上の生体サンプルから構築することができる。好都合には、全身性炎症状態は、従来の臨床症状の発病の前に診断又は予測することができ、これにより有効な治療的介入が可能になる。

10

【0061】

(5.2.1. 対象)

本発明の特定の実施態様において、対象は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくは、非ヒト霊長類である。最も好ましい実施態様において、対象は、ヒトである。

本発明の方法は、任意の対象における全身性炎症状態の診断又は予後のために使用することができるが、特に有用な対象は、全身性炎症状態に対するリスクのあるものを含む。対象は、当業者に公知の任意の基準に従った全身性炎症状態についてのリスクがあることもできる。

20

【0062】

特定の実施態様において、対象は、SIRS陰性である。本発明の状況において、SIRS陰性対象は、当業者の任意の判断に従って、敗血症の診断又は予後を必要とする健康者を含む。このような対象は、病院集中治療室におけるSIRS陰性患者及び同様の状態にある対象を含むが、限定されない。本発明の方法は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡の診断又は予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡のリスクの増大又は減少について治療又は予防をモニターするために使用することができる。詳細な実施態様において、対象は、集中治療室の患者などの全身性炎症状態のリスクがあるかもしれない患者である。

30

【0063】

さらなる実施態様において、対象は、SIRS陽性である。本発明の方法は、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡の診断又は予後のために使用することができ、又はSIRS陰性への転換の診断又は予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡のリスクの増大若しくは減少のための治療又は予防をモニターするために、又はSIRS陰性への転換の可能性をモニターするために使用することができる。

【0064】

さらなる実施態様において、対象は、敗血症を有する。本発明の方法は、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡の診断又は予後のために使用することができ、又はこれらは、SIRS陽性（及び敗血症陰性）への転換若しくはSIRS陰性への転換の診断若しくは予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡のリスクの増大若しくは減少のための治療又は予防をモニターするために、又はSIRS陽性（及び敗血症陰性）への転換又はSIRS陰性への転換の可能性についてモニターするために使用することができる。

40

【0065】

更なる実施態様において、対象は、重篤な敗血症を有する。本発明の方法は、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡の診断又は予後のために使用することができ、又はこれらは敗血症への、又はSIRS陽性（及び敗血症陰性）への、若しくはSIRS陰性への転換の診断又は予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、敗血症性シ

50

ック、多臓器機能障害若しくは死亡のリスクの増大若しくは減少のために治療又は予防をモニターするため、又は敗血症への、若しくはSIRS陽性（及び敗血症陰性）への、若しくはSIRS陰性への転換の可能性についてモニターするために使用することができる。

【0066】

更なる実施態様において、対象は、敗血症性ショックを有する。本発明の方法は、多臓器機能障害若しくは死亡の診断又は予後のために使用することができる、又はこれらは、重篤な敗血症への、敗血症への、SIRS陽性（及び敗血症陰性）への、若しくはSIRS陰性への転換の診断又は予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、多臓器機能障害若しくは死亡のリスクの増大若しくは減少のための治療又は予防をモニターするため、又は重篤な敗血症への、敗血症への、SIRS陽性（及び敗血症陰性）への、若しくはSIRS陰性への転換の可能性をモニターするために使用することができる。

10

【0067】

更なる実施態様において、対象は、多臓器機能障害を有する。本発明の方法は、死亡の診断又は予後のために使用することができる、又はこれらは、敗血症性ショック、重篤な敗血症への、敗血症への、SIRS陽性（及び敗血症陰性）への、又はSIRS陰性への診断又は予後のために使用することができる。更に、本発明の方法は、死亡のリスクの増大又は減少のための治療又は予防をモニターするため、又は敗血症性ショック、重篤な敗血症への、敗血症への、SIRS陽性（及び敗血症陰性）への、若しくはSIRS陰性への転換の可能性についてモニターするために使用することができる。

【0068】

好ましい実施態様において、対象は、SIRS陰性である（すなわち、対象は、健康であり得る）が、当業者の判断に従って、全身性炎症状態の診断又は予後を必要とする。対象は、例えば集中治療室の患者であることができるであろう。同様に、好ましい実施態様において、対象は、SIRS陰性であり、本発明の方法は、全身性炎症状態の予防をモニターするために使用される。例えば本発明の方法に従って、例えば全身性炎症状態のリスクがあると判断されるSIRS陰性対象において、介入過程を対象に施して全身性炎症状態を予防することができる。このような全身性炎症状態の予防は、本発明の方法でモニターすることができる。

20

【0069】

更に好ましい実施態様において、対象は、SIRS陽性であり、本発明の方法は、更に全身性炎症状態の診断又は予後のために使用される。同様に、好ましい実施態様において、対象は、SIRS陽性であり、本発明の方法は、SIRSの治療又は更に全身性炎症状態予防をモニターするために使用される。例えば本発明の方法に従って、例えば更に全身性炎症状態のリスクがあると判断されるSIRS陽性対象において、介入過程を対象に施して全身性炎症状態を予防することができる。このような全身性炎症状態の予防は、本発明の方法でモニターすることができる。

30

【0070】

本発明の具体的実施態様において、敗血症又はSIRSを発症するリスクのある対象は、本発明の方法を使用してスクリーニングされる。これらの実施態様に従って、本発明の方法は、例えば集中治療室に入院した対象及び/又はある種の外傷（例えば外科手術、車両事故、射創など）を経験した者をスクリーニングするために使用することができる。

40

【0071】

具体的実施態様において、対象は、本発明の方法及び構成物を使用して、全身性炎症状態の診断又は予後が必要な間にたびたび（例えば、彼らが集中治療室に滞在の間に）スクリーニングされる。好ましい実施態様において、対象は、彼らが集中治療室に到着した直後にスクリーニングされる。一部の実施態様において、対象は、彼らが集中治療室に到着した後に毎日スクリーニングされる。一部の実施態様において、対象は、彼らが集中治療室に到着した後に1～8時間、8～12時間、12～16時間又は16～24時間毎にスクリーニングされる。

【0072】

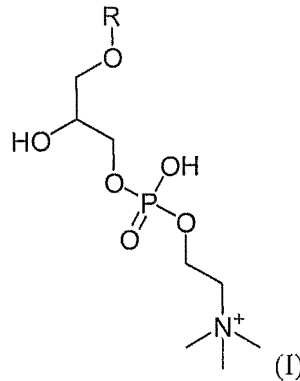
50

(5.3 総リゾホスファチジルコリン)

一つの態様において、本発明は、総リゾホスファチジルコリンに基づいた全身性炎症状態の予後又は診断を提供する。

特定の実施態様において、対象由来のサンプル中の総リゾホスファチジルコリンが、全身性炎症状態の予後又は診断のために使用される。総リゾホスファチジルコリンは、サンプル中の全てのリゾホスファチジルコリン（遊離若しくは結合又は両方）に対応する量をいう。例えば、総リゾホスファチジルコリンは、式(1)に記載されるサンプル中の分子又はその任意の塩又は溶媒和物をいう：

【化3】



式中、Rは、任意のアシル基である。アシル基は、当業者に公知の任意のアシル基であることができる。例示的なアシル基には、カプロイル、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、パルミトレイル、オレイル、アラキドニル及びリノレイルを含む。好ましくは、総リゾホスファチジルコリンは、少なくとも1-0パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン及び1-0-ステアロイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンを含む。典型的な実施態様において、総リゾホスファチジルコリンは、アシル基の同一性に関係なく測定される。有用な技術を本明細書に記述してある。

【0073】

特定の実施態様において、総リゾホスファチジルコリンは、単独で全身性炎症状態の予後又は診断のために使用される。さらなる実施態様において、1つ以上のさらなるバイオマーカーが、全身性炎症状態の予後又は診断のために使用される。さらなる実施態様において、全身性炎症状態の予後又は診断のために、1つ以上の臨床測定が加えて使用される。特定の実施態様において、全身性炎症状態の予後又は診断のために、1つ以上のさらなるバイオマーカー及び1つ以上の臨床測定が加えて使用される。

【0074】

当業者は、サンプル中の総リゾホスファチジルコリンを測定し、又は示すために、任意の技術を使用することができる。特定の実施態様において、当業者は、総リゾホスファチジルコリンに相関するサンプル由来の量又は値を測定することができる。例えば、対象由来の特定のサンプルにおいて、総リゾホスファチジルコリンの一部は、その他の分子を含まないことができるが、一方で、総リゾホスファチジルコリンさらなる部分には、その他の分子が結合することができる。例えば、総リゾホスファチジルコリンの一部には、アルブミンが結合することができる。当業者によって使用されるサンプル調製技術及び測定技術は、実際に測定されるリゾホスファチジルコリン量に影響を及ぼし得る。例えば、沈澱及び/又は精製技術により、遊離及び結合リゾホスファチジルコリンを分離することができる。検出技術は、遊離リゾホスファチジルコリンに対して、又は結合リゾホスファチジルコリンに対して、より感度が高いかもしれない。測定されるこの量は、当業者が利用できる方法に従って、サンプル中の総リゾホスファチジルコリン量に相関させることができる。特定の実施態様において、サンプル中の総リゾホスファチジルコリン量を示すために、遊離リゾホスファチジルコリンの測定が使用される。特定の実施態様において、サ

ンプル中の総リゾホスファチジルコリン量を示すために、結合リゾホスファチジルコリンの測定が使用される。特定の実施態様において、サンプル中の総リゾホスファチジルコリン量を示すために、結合及び遊離リゾホスファチジルコリンの測定が使用される。特定の実施態様において、本発明の方法における予後又は診断のために、遊離リゾホスファチジルコリンを使用することができる。特定の実施態様において、本発明の方法における予後又は診断のために、結合したリゾホスファチジルコリンを使用することができる。特定の実施態様において、本発明の方法における予後又は診断のために、遊離及び結合リゾホスファチジルコリンを使用することができる。

【0075】

それぞれのさらなるバイオマーカーは、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、リン脂質及び代謝産物（例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、ヌクレオシド、脂質又はリン脂質代謝産物）バイオマーカーを含む当業者に公知の全身性炎症状態のためのバイオマーカーの任意のタイプであることができる。全身性炎症状態の予後又は診断のための更に例示的なバイオマーカー及びそれらの評価方法は、米国特許出願公開第20030194752号、第2004096917号、第20040097460号、第20040106142号、第20040157242号、並びに2005年4月15日に出願の米国仮出願第60/671,620号、2005年4月15日に出願の第60/671,941号及び2005年4月22日に出願の第60/674,046号に記述されており、これらの全体は引用により本明細書に組み込まれる。敗血症のための更に例示的なバイオマーカーは、以下を含む：内毒素；細菌DNA；プロテインC、プロカルシトニン、LBP-LPS-結合タンパク質などの急性期タンパク質；フィブリン分解産物、抗トロンピン III、二量体Dなどの凝固因子；HLA-DR、CD-64、Eセレクトリンなどの膜細胞マーカー；コルチゾール、ACTHなどのホルモン；CD-14、sTNF RI、sTNF-RIIなどの可溶性受容体；並びにTNF、IL-6、IL-8及びIL-10などのサイトカイン；並びにD-二量体、プロトロンピン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1、可溶性トロンボモジュリン、IL-6、IL-10、IL-8、プロテインC、トロンピンで活性化可能な線維素溶解阻害剤、プロテインS、抗トロンピン、TNF-
などのその他。例えば、Kinasewitzらの論文、2004、Critical Care 8: R82-R90、Bozzaらの論文、2005、Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100 (s) 1: 217-221を参照したい。これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。好ましいバイオマーカーは、C反応性タンパク質、プロカルシトニン及びIL-6を含む。

【0076】

特定の実施態様において、本発明は、全身性炎症状態の診断又は予後について、対象由来のバイオマーカーのパネルを評価する方法を提供する。パネルには、当業者の判断に従って、全身性炎症状態の診断又は予後を行うのに十分な多くのバイオマーカーを含むことができる。パネルには、総リゾホスファチジルコリンを含むべきである。加えて、パネルには、上の段落に記述したものを含む全身性炎症状態のためのその他のバイオマーカーを含むことができる。一部の実施態様において、パネルには、全身性炎症状態のための2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20若しくは25以上のバイオマーカーを含む。それぞれのバイオマーカーは、バイオマーカーの種類に適した技術によって評価されるべきである。例示的な技術は本明細書に記述してあり、その他の技術も当業者に明らかであるはずである。便利な実施態様において、同じ種類のバイオマーカー又は同じ技術によって評価することができるバイオマーカーは、パネルにおいて共に評価することができる。例えば、詳細な実施態様において、代謝産物及び/又はタンパク質バイオマーカーは、後述するように、アレイ又はチップ形式の免疫アッセイ技術によって評価することができる。

【0077】

全身性炎症状態のための臨床測定は、当業者に公知の全身性炎症状態のための任意の臨床測定であることができる。特定の実施態様において、臨床測定は、敗血症のための臨床重症度モデルに従う。このようなモデルには、以下を含むが、限定されない：急性生理機能及び慢性健康評価スコア（Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score）（APACHE及びその改良型APACHE II及びIII）（Knausらの論文、1985、Crit Care Med 13: 818-829；Knausらの論文、1991、Chest 100: 1619-1636）、死亡率予測モデル（Mortali

10

20

30

40

50

ty Prediction Model) (MPM) (Lemeshowらの論文、1993, JAMA 270: 2957-2963)、簡易急性生理機能(Simplified Acute Physiology) (SAPS) スコア (Le Gallらの論文、1984, Crit Care Med 12: 975-977)、多臓器機能障害スコア(Multiple Organ Dysfunction Score) (MODS) (Marshallらの論文、1995, Crit Care Med 23: 1638-1652)、経時的器官不全評価(Sequential Organ Failure Assessment) (SOFA) スコア (Ferreiraらの論文、2002, JAMA 286: 1754-1758)、ロジスティック器官機能障害スコア(Logistical Organ Dysfunction Score) (Le Gallらの論文、1996, JAMA 276: 802-810)並びに素因、感染、反応及び器官機能障害(PIRO)概念(Levyらの論文、2003, Intensive Care Med 29: 530-538)(それぞれの参照の内容は、その全体が本明細書により組み込まれる)。特定の実施態様において、臨床測定は、敗血症の予後又は診断の補助のために当業者に使用される1つ以上の測定を含む。このような測定は、以下を含むが、限定されない: 温度、心拍数、白血球数、差動的白血球数(単球、リンパ球、顆粒球及び/又は好中球)、総好中球対する未成熟好中球の比、血小板数、血清クレアチニン、尿素、乳酸塩、塩基過剰、 pO_2 及び HCO_3^- である。

10

【0078】

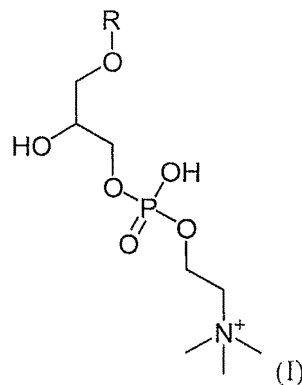
(5.4 バイオマーカー)

別の態様において、本発明は、本発明のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーによる全身性炎症状態の予後又は診断を提供する。

特定の実施態様において、バイオマーカーは、1-0-アシル-2-リゾ-snグリセロ-3ホスホコリンである。例えば、特定の実施態様において、バイオマーカーは、式(1)に記載の化合物又はその任意の塩又は溶媒和物である。

20

【化4】



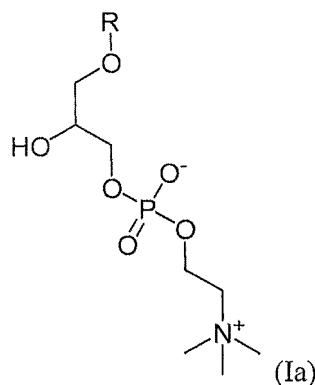
30

式中、Rは、アシル基である。

【0079】

式(1)の例示的な塩は、式(1a)によって提供される。

【化5】



40

50

式中、前記塩は、当業者に公知の任意のイオン又はイオン類と配位することができる。イオン又はイオン類は、生理的であることができるが、生理的である必要はない。例えば、イオン又はイオン類は、後述するように、対象由来のサンプルの調製の間塩との接触によって生じ得る。一部の実施態様において、塩は、陰イオン、例えば当業者に公知の生理的陰イオンと配位される。例示的な陰イオンには、クロライド、プロミド、ホスフェート、アセテート、カルボナート、バイカルボナート及びサルフェートを含む。一部の実施態様において、塩は、当業者に公知の陽イオン、例えば生理的陽イオンと配位される。例示的な陽イオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及びアンモニウムを含む。一部の実施態様において、当業者によって認識されるとおり、塩は、1つ以上の陰イオンと、及び1つ以上の陽イオンと配位される。

10

【0080】

アシル基は、当業者に公知の任意のアシル基であることができる。特定の実施態様において、アシル基は、飽和している。例示的な飽和アシル基は、カプロイル、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル及びステアロイルを含む。更なる実施態様において、アシル基は、一価不飽和である。例示的な一価不飽和のアシル基には、パルミトレイル及びオレイルを含む。更なる実施態様において、アシル基は、多価不飽和である。例示的な多価不飽和のアシル基は、アラキドニル及びリノレイルを含む。

【0081】

より系統的に、特定の実施態様において、アシル基は、 C_{10} - C_{22} アシルである。特定の実施態様において、アシル基は、 C_{14} - C_{22} アシルである。例示的なアシル基には、当業者によく知られている命名法に従って、16:0、18:0、18:1、18:2、20:4 (n-6) に及び 22:6 (n-3) を含む。このような命名法では、最初の数がアシル基の炭素原子数を示し、2番目の数が基における二重結合の数を示す。例えば、「18:1」は、18個の炭素原子及び1つの二重結合をもつアシル基を示す。括弧内の数は、もしあれば、二重結合の位置を示し、表示法「(n-x)」は、脂肪酸で最も長い鎖の末端メチルから離れてx番目の位置の二重結合を示す。Biochem. J., 1978, 171, 21-35; Chem. Phys. Lipids, 1978, 21, 159-173; Eur. J. Biochem., 1977, 79, 11-21; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1977, 358, 617-631; J. Lipid Res., 1978, 19, 114-128; Lipids, 1977, 12, 455-468; Mol. Cell. Biochem., 1977, 17, 157-171; 生化学命名法及び関連文書 (Biochemical Nomenclature and Related Documents)、第2版、Portland Press、1992、180-190ページを参照されたい。これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0082】

特定の実施態様において、アシル基は、 C_{14} - C_{22} アシルである。特定の実施態様において、アシル基は、 C_{16} - C_{20} アシルである。更なる実施態様において、アシル基は、 C_{16} - C_{18} アシルである。特定の実施態様において、アシル基は、ヘキサデカノイル又はオクタデカノイルである。詳細な実施態様において、アシル基は、 C_{16} アシルである。好ましい実施態様において、アシル基は、ヘキサデカノイルである。更に特定の実施態様において、アシル基は、 C_{18} アシルである。好ましい実施態様において、アシル基は、オクタデカノイルである。

バイオマーカーは、対象由来のバイオマーカーの任意の形態、例えば当業者によって同定することができるバイオマーカーの任意の塩又は溶媒和物であることができる。好ましい実施態様において、バイオマーカーは、ナトリウム塩の形態である。

40

【0083】

特定の実施態様において、バイオマーカーは、式(1)に記載の化合物の代謝産物である。例えば、バイオマーカーは、当業者に公知の式(1)に記載の化合物の前駆体であることができる。前駆体は、当業者に公知の生合成経路における式(1)に記載の化合物よりも、1又は2若しくは3工程前又は一部の実施態様において、それより前の工程のものであることができる。さらなる実施態様において、バイオマーカーは、当業者に公知の生合成経路における式(1)に記載の化合物の下流の代謝産物であることができる。下流の代謝産物は、当業者に公知の生合成経路における式(1)に記載の化合物よりも、1又は2又

50

は3工程後、又は一部の実施態様において、それより後の工程のものであることができる。特定の実施態様において、生合成経路は、当業者に公知の血小板活性化因子の合成のための新生経路である。さらなる実施態様において、生合成経路は、当業者に公知の血小板活性化因子の合成のための再造形経路である。

【0084】

詳細な実施態様において、代謝産物は、1-0-アシル-2-0-アシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンである。好ましい実施態様において、2-0-アシル基が上記の任意のアシル基又はアセチルである。詳細な実施態様において、代謝産物は、1-0-アシル-2-0-アルキル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンである。好ましい実施態様において、2-0-アルキル基は、グリセロ-3-ホスホコリンを修飾するための当業者に公知の任意の基、例えば任意のC₁₄-C₂₂アルキルである。

10

【0085】

特定の実施態様において、全身性炎症状態の予後又は診断のために、単一のバイオマーカーが使用される。さらなる実施態様において、全身性炎症状態の予後又は診断のために、複数のバイオマーカーが使用される。バイオマーカーは、複数で、上記のとおりの本発明によることができ、又は複数で、当業者に公知の全身性炎症状態の診断又は予後のためのさらなるバイオマーカーと共に本発明によるバイオマーカーを含むことができる。バイオマーカーは、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、リン脂質及び代謝産物（例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、ヌクレオシド、脂質又はリン脂質代謝産物）バイオマーカーを含む当業者に公知の全身性炎症状態のためのバイオマーカーの任意の型であることができる。

20

【0086】

全身性炎症状態の予後又は診断及びそれらの評価の方法のための更に例示的なバイオマーカーは、米国特許出願公開第20030194752号、第20040096917号、第20040097460号、第20040106142号、第20040157242、並びに2005年4月15日に米国仮出願第60/671,620号、2005年4月15日に出願の第60/671,941号及び2005年4月22日に米国仮出願第60/674,046号に記述されており、これらの全体が引用により本明細書に組み込まれる。敗血症のための更に例示的なバイオマーカーは、以下を含む：内毒素；細菌DNA；プロテインC、プロカルシトニン、LBP-LPS-結合タンパク質などの急性期タンパク質；フィブリン分解産物、抗トロンピンIII、二量体Dなどの凝固因子；HLA-DR、CD-64、Eセレクトリンなどの膜細胞マーカー；コルチゾール、ACTHなどのホルモン；CD-14、sTNFR1、sTNF-R1Iなどの可溶性受容体；並びにTNF、IL-6、IL-8及びIL-10などのサイトカイン；並びにD-二量体、プロトロンピン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、プラスミノゲン活性化因子阻害剤-1、可溶性トロンボモジュリン、IL-6、IL-10、IL-8、プロテインC、トロンピンで活性化可能な線維素溶解阻害剤、プロテインS、抗トロンピン、TNF- などのその他。例えば、Kinasewitzらの論文、2004、Critical Care 8: R82-R90、Bozzaらの論文、2005、Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100 (s) 1:217-221を参照されたい。これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。好ましいバイオマーカーには、C反応性タンパク質、プロカルシトニン及びIL-6を含む。

30

【0087】

特定の実施態様において、本発明は、全身性炎症状態の診断又は予後について、対象由来のバイオマーカーのパネルを評価する方法を提供する。パネルには、当業者の判断に従って、全身性炎症状態の診断又は予後を行うのに十分な多くのバイオマーカーを含むことができる。パネルは、本発明の1つ以上のバイオマーカー、例えば式I又は式Iaに記載のバイオマーカーを含むべきである。加えて、パネルには、上の段落に記述したものを含む全身性炎症状態のためのその他のバイオマーカーを含むことができる。一部の実施態様において、パネルには、全身性炎症状態のための2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20若しくは25以上のバイオマーカーを含む。それぞれのバイオマーカーは、バイオマーカーの種類に適した技術によって評価されるべきである。例示的な技術を本明細書に記述してあり、その他の技術も当業者に明らかであるはずである。便利な実施態様において、同じ種類の

40

50

バイオマーカー又は同じ技術によって評価することができるバイオマーカーは、パネルにおいて共に評価することができる。例えば、詳細な実施態様において、代謝産物及び/又はタンパク質バイオマーカーは、後述するように、アレイ又はチップ形式の免疫アッセイ技術によって評価することができる。

【0088】

(5.5 リゾホスファチジルコリンの測定)

この節及び以下の節において、特に明記しない限り、リゾホスファチジルコリンという用語は、総リゾホスファチジルコリンを、又は本発明のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーをいう。

本発明の特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリンを測定する方法は、重要ではない。従って、本発明は、全身性炎症状態の診断又は予後のための方法であって、リゾホスファチジルコリンから全身性炎症状態についてのリスクを評価する一工程を含む、方法を提供する。

10

【0089】

総リゾホスファチジルコリンは、本発明の方法を実践するものにより、全く任意の様式で測定することができる。例示的技術を本明細書に記述してある。上述のとおり、サンプル中のリゾホスファチジルコリンを示す任意の技術を本発明の方法に使用することができる。特定の実施態様において、本方法は、サンプル中の遊離リゾホスファチジルコリンに基づく。特定の実施態様において、方法は、サンプル中の結合リゾホスファチジルコリンに基づく。特定の実施態様において、方法は、サンプル中の遊離及び結合リゾホスファチ

20

【0090】

リゾホスファチジルコリンバイオマーカーの量は、本発明の方法を実践するものにより、全く任意の様式で測定することができる。例示的技術を本明細書に記述してある。

複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルを評価するときは、個々のバイオマーカーをそのバイオマーカーのために適した技術に従って評価するべきである。有利な実施態様において、同じ技術によって、又は互換性がある技術によって評価することができるバイオマーカーは、共に評価することができる。例えば、免疫アッセイ法によって評価することができるタンパク質、ペプチド、脂質、リン脂質及び代謝産物バイオマーカーは、当業者に公知の技術に従って、共に、又はグループで評価することができる。

30

【0091】

一つの実施態様において、対象から単一の時に採取した単一の生体サンプルのみを使用して、敗血症の予後又は診断を行う。別の実施態様において、対象から異なる時点に採取した複数の生体サンプルを使用して、敗血症の予後又は診断を行う。

具体的実施態様において、リゾホスファチジルコリン量は、1つの時点にて対象から収集したサンプルを使用して得られる。別の特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量は、別々の時点にて対象から得たサンプルを使用して得られる。一つの例において、これらのサンプルは、1回、又は代わりに毎日、又はより頻繁に、例えば2、3、4、6、8又は12時間毎に、対象から得られる。

【0092】

40

リゾホスファチジルコリンは、任意の生体サンプルから得ることができ、生体サンプルは、例えば、限定するものではないが、血液、血漿、血清、唾液、痰、尿、脳髄液、細胞、細胞抽出物、組織サンプル、組織生検、糞便サンプル又は当業者に周知の技術を使用して対象から得られるであろう任意のサンプルであることができる。対象から採取される正確な生体サンプルは、変更してもよいが、サンプリングは、好ましくは最小限に浸潤性であり、従来技術によって容易に行われる。

【0093】

生体サンプルは、例えばバイオマーカー及び測定技術のタイプに基づいて、当業者の判断に従って処理又は精製することができる。例えば、バイオマーカーが脂質又はリン脂質代謝産物であるときは、抽出及び/又はクロマトグラフィーによってサンプルを処理する

50

ことができる。バイオマーカーがタンパク質又はペプチドであるとき、例えばバイオマーカーのパネルを評価するときは、沈澱、遠心分離、濾過及び/又はクロマトグラフィーによってサンプルを処理することができる。バイオマーカーが核酸であるとき、例えばバイオマーカーのパネルを評価するときは、抽出、沈澱及び/又はクロマトグラフィーによってサンプルを処理して核酸を単離することができる。

【0094】

次いで、ペプチド、タンパク質、核酸、リン脂質及び代謝産物（例えば、代謝産物又はペプチド、タンパク質、リン脂質又はヌクレオシド）及び/又はサンプルのその他の分子の混合物の一部をバイオマーカープロファイルとして分離することができる。これは、バイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカーの量を測定することによって達成することができる。バイオマーカープロファイルには、バイオマーカー（例えば、リン脂質、mRNA、cDNA、タンパク質及び/又は炭水化物、その他）又はその指標の1つ以上のタイプの複数をバイオマーカーの量と共に含む。バイオマーカープロファイルには、少なくとも1つのこのようなバイオマーカー又はその指標を含むことができる。複数のバイオマーカーは、同じ種類又は例えばリン脂質とポリペプチドなどの異なる種類のものであることができる。

10

【0095】

これらの量は、任意の再現性のある測定技術又は測定技術の組み合わせを使用することによって決定することができる。このような技術には、本明細書に記述した任意の技術を含む当該技術分野において周知のものを含む。典型的には、このような技術を使用し、単一の時に対象から採取した生体サンプル又は複数時点で採取した複数のサンプルを使用して、量を測定する。好ましい実施態様において、対象から採取したサンプルからバイオマーカープロファイルを得るための例示的技術は、免疫アッセイ法である。バイオマーカープロファイルは、下記に記述したキットなどのキットを使用して作製することができる。

20

【0096】

特定の実施態様において、バイオマーカーの検出の方法は、バイオマーカー特異的抗体との相互作用を経たそれらの検出を含む。例えば、抗体は、本発明のバイオマーカーに対するものである。抗体は、当業者に周知の標準的技術を利用して産生することができる。具体的実施態様において、抗体は、ポリクローナル又はより好ましくはモノクローナルであることができる。例えば、無処置の抗体又は抗体断片（例えば、scFv、Fab、又はF(ab')₂）を使用することができる。

30

【0097】

例えば、バイオマーカーに対して特異的な抗体又は抗体の断片を使用して、定量的に、又は定性的にバイオマーカーの存在を検出することができる。これは、例えば免疫蛍光法によって達成することができる。加えて、抗体（又はその断片）は、バイオマーカーのインサイチュー検出のために、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡のように組織学的に使用することができる。インサイチュー検出は、患者から生体サンプル（例えば、生検サンプル）を取り出すこと、及びそれに対してバイオマーカーに向けられた標識抗体を適用することによって達成することができる。抗体（又は断片）は、好ましくは生体サンプルの上を抗体（又は断片）で覆うことによって適用される。このような手順を使用することにより、特定のサンプルにおけるバイオマーカーの存在だけでなく、その分布も決定することができる。多種多様な周知の組織学的方法（染色法など）を利用してこのようなインサイチュー検出を達成することができる。

40

【0098】

バイオマーカーのための免疫アッセイ法には、典型的にはバイオマーカーを同定することができる検出可能に標識された抗体の生体サンプルをインキュベートすること、及び当該技術分野において周知の多数の任意の技術によって結合した抗体を検出することを含む。更に詳細に論議したように、下記の「標識された」という用語は、例えば抗体に対して検出可能な物質を結合する（すなわち、物理的に連結する）ことを経た抗体の直接標識化をいうことができ、また直接標識されている別の試薬との反応性による抗体の間接的な標

50

識化をいうこともできる。間接的な標識化の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出を含む。

【0099】

生体サンプルは、ニトロセルロース又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性タンパク質を固定することができるその他の固体支持体などの固相支持体又は担体と接触させて、その上に固定することができる。次いで、支持体を適切な緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識されたフィンガープリント遺伝子特異的抗体で処理することができる。次いで、固相支持体を二度目に緩衝液で洗浄して、結合していない抗体を除去することができる。次いで、固体支持体に対して結合したラベルの量を従来法によって検出することができる。

【0100】

「固相支持体又は担体」とは、抗原又は抗体を結合することができる任意の支持体を意図する。周知の支持体又は担体には、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、天然及び修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、並びに磁鉄鉱を含む。担体の性質は、本発明の目的のためには、ある程度可溶性であるか、又は不溶性であることができる。支持物質は、結合された分子が抗原又は抗体に結合ができる限り、実質的に考えられるあらゆる構造配置を有することができる。従って、支持体配置は、ビーズのような球形又は試験管の内面若しくはロッドの外表面のような円筒状であることができる。或いは、表面は、シート、試験片、その他などの平面であることができる。好ましい支持体には、ポリスチレンビーズを含む。当業者であれば、結合抗体又は抗原のために多くのその他の適切な担体を知っているであろうし、又はルーチン試験を使用することによって前述のものを確認することができるであろう。

【0101】

バイオマーカーに対して特異的な抗体を検出可能に標識することができる方法の1つには、酵素に対して前述のものを連結すること、及び酵素免疫測定法(EIA)における使用による(Vollerの論文、1978、「酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)(The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA))」、Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Vollerらの論文、1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (編集), 1980、「酵素免疫アッセイ法(Enzyme Immunoassay)」、CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, Eらの文献、(編集)、1981、「酵素免疫アッセイ法(Enzyme Immunoassay)」、化学書院、東京、それぞれその全体が引用により本明細書に組み込まれる)。抗体に結合されている酵素は、例えば分光光度法により、蛍光定量的に、又は視覚的手段によって検出することができる化学物質部分を生じるような様式で適切な基質、好ましくは色素生産性基質と反応するであろう。抗体を検出可能に標識するために使用することができる酵素には、以下を含むが、限定されない：リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼ。検出は、酵素のための色素生産性基質を使用する比色法によって達成することができる。また、検出は、同じように調製された標準と比較した、基質の酵素反応の程度の視覚的比較によって達成することができる。

【0102】

また、検出は、任意の種々のその他の免疫アッセイ法を使用して達成することができる。例えば、抗体又は抗体断片を放射性標識することにより、放射免疫アッセイ法(RIA)を使用することによりバイオマーカーを検出することができる(例えば、Weintraub, Bの論文、放射免疫アッセイ法の原理、放射性リガンドアッセイ技術についての第7訓練コース(Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques)、The Endocrine Society、1986年3月を参照され、これは本明細書に引用

10

20

30

40

50

により組み込まれる)。放射性同位元素(例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 又は ^3H)は、ガンマカウンタ又はシンチレーションカウンタの使用などの手段によって、又はオートラジオグラフィによって検出することができる。

【0103】

また、蛍光性化合物で抗体を標識することもできる。蛍光標識された抗体を適当な波長の光に曝露させると、蛍光によりその存在を検出することができる。最も普通に用いられる蛍光標識化合物の中には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド及びフルオレサミンがある。

【0104】

また、抗体は、 ^{152}Eu 又はランタニド系列のその他のものなどの蛍光放射金属を使用して検出可能に標識することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミン四酢酸酸(DTPA)又はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート化基を使用して抗体に付着することができる。

【0105】

また、抗体は、これを化学発光化合物に結合することによって検出可能に標識することができる。次いで、化学発光タグを付けた抗体の存在を化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することによって決定する。特に有用な化学発光標識化合物の例には、ルミノール、イソルミノール、テロマチック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルがある。

【0106】

同様に、生物発光化合物を使用して本発明の抗体を標識することができる。生物発光は、触媒タンパク質が化学ルミネセンス反応の効率を上昇させる生物系において見いだされる一種の化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識目的に重要な生物ルミネセンス化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

【0107】

有利な実施態様において、抗体は、アレイの形態であることができる。このようなアレイにより、同時に複数のバイオマーカー若しくはバイオマーカーのパネルを測定又は検出することができる。アレイは、当業者に公知の抗体のための任意のアレイであることができる。特定の実施態様において、複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルの検出のために、複数の抗体を抗体チップの形態にすることができる。例示的な抗体アレイ及び抗体チップは、米国特許出願公報第20050048566号、第20050054015号、第20050037343号、第20050095591号、第20050100947号、第20040161748号、第20040097460号、及び第20040096917号に記述されており、これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。Whatman Schliecher & Schuell又はEurogentec、Sigma Aldrich、Novagen及びChemicon Internationalから入手可能なものを含むが、限定されない市販の抗体アレイを本発明のために使用し、又は適応することができる。抗体に対する抗原の結合は、蛍光、表面プラスモン共鳴及び質量分析を含むが、限定されない抗体アレイ又は抗体チップのために適した技術に従って進めることができる。

【0108】

別の実施態様において、アプタマーなどの抗体以外の特異的結合分子を使用してバイオマーカーに結合してもよい。更に別の実施態様において、バイオマーカープロフィールには、感染因子(例えば、リポ多糖又はウイルスタンパク質)又はその成分の測定可能な態様を含んでいてもよい。

【0109】

また、バイオマーカープロフィールにおけるバイオマーカーの量は、例えば下記に記述した以下の1つ以上の方法を使用して産生することができる。例えば、方法には、以下を含む：核磁気共鳴(NMR)分光法、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)ⁿ(nは、ゼロよりも大きい整数である)、マトリックス支援レー

10

20

30

40

50

ザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (SELDI-TOF-MS)、シリコン上での脱離/イオン化 (DIOS)、二次イオン質量分析法 (SIMS)、四極子飛行時間型 (Q-TOF)、気圧化学イオン化法 (APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS)ⁿ、気圧光イオン化質量分析法 (APPI-MS)、APPI-MS/MS及びAPPI-(MS)ⁿなどの質量分析法。その他の質量分析法には、とりわけ四極子、フーリエ変換質量分析 (FTMS) 及びイオントラップを含み得る。その他の適切な方法には、以下を含み得る：化学抽出分配する、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性 (逆相) 体液クロマトグラフィー、等電点電気泳動、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) 又は薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー若しくは体液クロマトグラフィー又は任意のこれらの組み合わせなどのその他のクロマトグラフィー。一つの実施態様において、生体サンプルは、分別法の適用の前に分画してもよい。

10

【0110】

一つの実施態様において、バイオマーカーがイオン化された分子であり、かつ投射レーザー放射によって固定支持体から蒸発される場合、バイオマーカーの量を決定するために、レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法が使用される。種々のレーザー脱離/イオン化技術が当該技術分野において公知である (例えば、Guttrnanらの論文、2001, Anal. Chem. 73:1252-62及びWeiらの論文、1999, Nature 399:243-246を参照されたい、これらは、引用により本明細書に組み込まれる)。

【0111】

20

レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法は、相対的に短時間で大量の情報を生成することができる。生物学的サンプルをサンプル中のバイオマーカーの全て、又はそのサブセットを結合する多様な支持体のいくつかに適用させる。細胞可溶化液又はサンプルを、事前の精製又は分画の有無にかかわらず、これらの表面に対して0.5 µL程度の少量で直接適用する。可溶化液又はサンプルは、支持体表面への適用前に濃縮又は希釈することができる。次いで、レーザー脱離/イオン化を使用して、わずか3時間でサンプル又はサンプル群の質量スペクトルが作製される。

【0112】

体液クロマトグラフィー-質量分析法による解析では、質量強度スペクトルを生じ、そのピークは、サンプルの種々の成分を表し、それぞれの成分が、特徴的な質量電荷比 (m/z) 及び保持時間 (r.t.) を有する。バイオマーカーのm/z及び保持時間をもつピークの存在は、マーカーが存在することを示す。マーカーを表すピークを別のスペクトル由来 (例えば、対照サンプル由来) の対応するピークと比較して相対測定を得てもよい。定量的測定が望まれるときは、当該技術分野の任意の規準化技術 (例えば、内部標準) を使用してもよい。加えて、逆重畳ソフトウェアを利用して、重なっているピークを分離することができる。保持時間は、体液クロマトグラフィー分離を行う際に使用される条件にある程度依存する。

30

【0113】

MALDI質量分析法 (MALDI-MS) では、種々の質量アナライザー、例えば単一又は3連四極子モードでの磁気セクタ/磁界偏向計測器 (MS/MS)、フーリエ変換及び直交飛行時間型 (O-TOF)、質量分析の技術分野において公知である配置を含む飛行時間型 (TOF) を使用することができる。脱離/イオン化過程のためには、多数のマトリックス/レーザーの組み合わせを使用することができる。また、イオントラップ及び反射 (reflectron) 配置を使用することもできる。

40

【0114】

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) は、概してタンパク質、核酸及び炭水化物を含む巨大分子の解析に適用できる (Fennらの論文、1989, Science 246:64-71; Crainらの論文、1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:25-34; Smithらの論文、1990, Anal Chem. 62:882-99; Han & Grossの論文、1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10635-10639)。エレクトロスプレー技術は、式I及び式Iaのもののようなバイオマーカーを分離し

50

、及び測定するために使用されている (Petkovicらの論文、2001, Anal Biochem, 289 (2) : 202-16; Pulfer & Murphyの論文、2003, Mass Spec Rev 22:332-364; Han & Gross, 1995, J. Amer. Soc. Mass Spec. 6:1202-1210を参照されたい。これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。

【0115】

以下の種類の代謝産物については、以下の供与源が、このような分子の質量分光分析についてのさらなるガイダンスを提供しており、これらの全体が引用により組み込まれる：(1) 脂質 (例えば、Fenselau, Cの論文、ACS Symp. Ser., 541:1-7 (1994)を参照されたい)；(2) 不安定な代謝産物 (例えば、Lauritsen及びLloydの論文、ACS Symp Ser. 541: 91-106 (1994)を参照されたい)；(3) 炭水化物 (例えば、Fox及びBlackの論文、ACS Symp 541: 107-131 (1994)を参照されたい)；(4) 核酸 (例えば、Edmondsらの論文、ACS Symp 541: 147-158の (1994)を参照されたい)；及び(5) タンパク質 (例えば、Vorm, O.らの論文、Anal. Chem. 66:3281-3287 (1994)；並びにVorm及びMann,の論文、J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 5:955-958 (1994)を参照されたい)。これらの刊行物の内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0116】

特定の実施態様において、生体サンプルにおける種は、上記の任意の質量分析技術と組み合わせ、液体クロマトグラフィーによって分離することができる。このような液体クロマトグラフィー/質量分析技術は、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、リン脂質及び代謝産物などのバイオマーカーの分離のために有用であることが証明されている。例えば、感度の高いリン脂質種の分離がLC/MSで達成されたので (Kimらの論文、1994, Anal. Chem. 66 (22) : 3977-82; Ma & Kim, 1995, Anal Biochem. 226 (2) : 293-301を参照されたい；これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)、このような技術は、式I又は式Iaに記載のバイオマーカーを分離し、かつ測定するために使用することができる。

【0117】

本発明の具体的実施態様において、複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルは、核酸である。このようなバイオマーカー及び対応するバイオマーカープロファイルの量は、例えば本明細書に記述された1つ以上の遺伝子の発現産物 (例えば、ポリヌクレオチド又はポリペプチド)を検出することによって作製してもよい。具体的実施態様において、バイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカー及び対応する量は、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ解析、RT-PCR、ヌクレアーゼ保護アッセイ法及びノーザンプロット解析を含むが、決して限定されない当業者に周知の任意の方法を使用して1つ以上の核酸を検出及び/又は解析することによって得られる。当業者によって認識されるであろうとおり、便利な実施態様において、生体サンプルは、核酸バイオマーカーについて評価した一部分と、タンパク質、ペプチド、脂質、リン脂質及び代謝産物などのその他のバイオマーカーについて評価した別の部分とで分けることができる。実際に、生体サンプルは、当業者に望まれるの回数で分けて、それぞれの複数のバイオマーカー若しくはバイオマーカーのパネルを評価又は測定を促進することができる。

【0118】

本発明の特定の実施態様において、本明細書に記述した遺伝子の任意の1つ以上の発現を検出することによってバイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカーの量を作製するために、核酸アレイが使用される。本発明の一つの実施態様において、バイオマーカープロファイルにおけるバイオマーカーの量を決定するために、cDNAマイクロアレイなどのマイクロアレイが使用される。cDNAアレイの診断の使用は、当該技術分野において周知である。(例えば、Zouらの論文、2002, Oncogene 21:4855-4862;並びにDraghiciの論文、2003, DNAマイクロアレイのためのデータ分析ツール (Data Analysis Tools for DNA Microarrays)、Chapman & Hall/CRCを参照されたい。それぞれ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。cDNAマイクロアレイ解析のための例示的方法は、下記に、及び下の第6節の実施例に記述してある。

【 0 1 1 9 】

特定の実施態様において、バイオマーカープロフィールにおけるバイオマーカーに関する量は、生体サンプルに存在するmRNA転写物の核酸配列を表すか、又は対応するアレイの検出可能に標識された核酸（例えば、サンプルから合成した蛍光標識されたcDNA）を1つ以上のプローブ点を含むマイクロアレイにハイブリダイズすることによって得られる。

【 0 1 2 0 】

核酸アレイ、例えばマイクロアレイは、多数の方法で作製することができ、いくつかのものを本明細書に下記に記述してある。好ましくは、アレイは、再現性があり、所与のアレイの複数のコピーを産生すること、及び前記マイクロアレイからの結果を互いに比較することができる。好ましくは、アレイは、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下で安定な材料から作製される。当業者であれば、アレイ上のプローブ点に対する試験プローブをハイブリダイズするために適した支持体、基質若しくは担体を知っているであろうし、又はルーチン試験を使用することによって前述のものを確認することができるであろう。

10

【 0 1 2 1 】

バイオマーカーを分離するために、いくつかのクロマトグラフィーの技術を使用してもよい。例えば、増幅産物を、従来法を使用してアガロース、アガロース-アクリルアミド又はポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離してもよい。Sambrookらの論文、2001を参照されたい。また、電気泳動法を伴わずにバイオマーカーを定量的に検出するためのいくつかの技術を、本発明に従って使用してもよい（例えば、PCRプロトコル、方法及び適用のためのガイド（PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications）、Innisらの文献、1990、Academic Press社 N.Y.を参照されたい。これは、引用により本明細書に組み込まれる）。例えば、クロマトグラフィーの技術を使用して分離を行ってもよい。本発明に使用してもよい多くの種類のクロマトグラフィー：吸着、分割、イオン交換及びモレキュラーシーブ、HPLC、並びにカラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを含む多くの特殊化された技術がある（Freifelderの文献、生化学及び分子生物学に対する物理生化学適用、第2版、W m.Freeman and Co.、ニューヨーク、N.Y.、1982、これは、引用により本明細書に組み込まれる）。

20

【 0 1 2 2 】

特定の実施態様において、1つ以上のバイオマーカーは、タンパク質である。具体的実施態様において、バイオマーカープロフィールは、タンパク質マイクロアレイ解析、免疫組織化学及び質量分析法を含むが限定されないタンパク質を検出するための任意の周知の方法を使用して、1つ以上のタンパク質を検出し、及び/若しくは解析し、並びに/又はその断片を識別することによって作製される。

30

【 0 1 2 3 】

サンプルに存在する関心対象のタンパク質又はタンパク質群の量を決定するために、標準的な技術を利用してもよい。例えば、標準的な技術を使用して、例えば免疫アッセイ法、例えばウェスタンブロット及び免疫沈降に続く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）、免疫細胞化学などを使用して、サンプルに存在する関心対象のタンパク質又はタンパク質群の量を決定することができる。関心対象のタンパク質を検出するための1つの例示的薬剤は、関心対象のタンパク質に対して特異的に結合することができる抗体、好ましくは直接又は間接的に検出可能に標識された抗体である。

40

【 0 1 2 4 】

このような検出方法については、必要に応じて、解析するサンプル由来のタンパク質を、当業者に周知の技術を使用して容易に単離することができる。タンパク質単離法は、例えば、Harlow及びLaneの文献、1988、抗体：実験室マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual.）Cold Spring Harbor Laboratory Press（Cold Spring Harbor, New York）に記述されたものなどであることができ、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

50

【 0 1 2 5 】

特定の実施態様において、関心対象のタンパク質又はタンパク質群の検出の方法は、タンパク質特異的抗体との相互作用を経たそれらの検出を含む。例えば、抗体は、関心対象のタンパク質に対するものである。抗体は、当業者に周知の標準的技術を利用して産生することができる。具体的実施態様において、抗体は、ポリクローナル又はより好ましくはモノクローナルであることができる。例えば、無処置の抗体又は抗体断片（例えば、scFv、Fab、又はF(ab')₂）を使用することができる。例示的免疫アッセイ法を上記してある。

【 0 1 2 6 】

一部の実施態様において、タンパク質チップアッセイ法（例えば、Zhu & Snyder, 2003, Curr. Opin. Chem. Biol. 7:55-63; Mitchell, 2002, Nature Biotechnology 20:225-229を参照されたい）を使用して、バイオマーカープロフィールにおけるバイオマーカーについての量を測定する。また、例えば、Linの論文、2004, Modern Pathology, 1-9; Liの論文、2004, Journal of Urology 171, 1782-1787; Wadsworthの論文、2004, Clinical Cancer Research, 10, 1625-1632; Prietoの論文、2003, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 26, 2315-2328; Coombesの論文、2003, Clinical Chemistry 49, 1615-1623; Mianの論文、2003, Proteomics 3, 1725-1737; Lehreらの論文、2003, BJU International 92, 223-225; 及びDiamondの論文、2003, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 14, 760-765を参照されたい。これらは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。MALDI又はSELDIによる検出を促進する抗体チップは、本発明の特定の実施態様に特に有用である（例えば、Wangらの論文、2001, Int'l. J. of Cancer 92:871-876; Figeysの論文、2002, Proteomics 2:373-382; Sonksenらの論文、1998, Anal. Chem. 70:2731-6; Glokler, & Angenendtの論文、2003, J. Chromatography B, 797:229-240を参照されたい；これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）。

【 0 1 2 7 】

(5.5.1. 本発明のバイオマーカーに対する選択的抗体)

本発明のバイオマーカーに対する抗体は、当業者に明らかな任意の技術に従って産生すること、又は得ることができる。例えば、本発明のリン脂質及び代謝産物に対する抗体は、Mourdjevaらの論文、2005 Apoptosis 10(1):209-17, von Landenbergらの論文、1999, J Autoimmun, 13:215-23又はMenonらの論文、J Autoimmun. 10:43-57に記述された技術に従って調製すること、又は単離することができ、これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。ポリペプチド又はその代謝産物に対する抗体は、標準的な技術に従って調製することができる。

【 0 1 2 8 】

本発明の単離されたリン脂質又はその代謝産物若しくは断片は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製のために標準的技術を使用して抗体を発生するための免疫原として使用することができる。免疫原は、典型的には適切な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス又はその他の哺乳類）を免疫することによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原調製物には、例えば組換えで発現されたか、又は化学的に合成されたポリペプチドを含むことができる。該調製物には、フロイント完全又は不完全アジュバントなどのアジュバント又は同様の免疫賦活薬を更に含むことができる。特定の実施態様において、抗体産生を促進するために、本発明のリン脂質又はその代謝産物若しくは断片を担体、例えばスカシガイ（keyhole limpet）ヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、チログロブリン及び卵白アルブミンなどのタンパク質に結合することができる。

【 0 1 2 9 】

ポリクローナル抗体は、適切な対象を、免疫原として本発明のリン脂質又は本発明の、その代謝産物若しくは断片で免疫することによって調製することができる。免疫された対象の抗体価は、標準的技術により、固定されたポリペプチドを使用する酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などで、ある期間にわたってモニターすることができる。所望の場合、

抗体分子は、対象から（例えば、血液から）単離して、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィーなどの周知の技術によって更に精製することができる。或いは、本発明のリン脂質又は本発明のその代謝産物若しくは断片に対して特異的な抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィによって選択すること、（例えば、部分的に精製すること）又は精製することができる。例えば、本発明の組換えで発現されたタンパク質及び精製した（又は部分的に精製した）タンパク質を本明細書に記述したとおりに産生して、例えばクロマトグラフィーカラムなどの固体支持体に共有結合で、又は非共有結合で結合させる。次いで、カラムを使用して、多数の異なるエピトープに対して向けられた抗体を含むサンプルから本発明のタンパク質に対して特異的な抗体をアフィニティー精製し、これにより実質的に精製された抗体組成物、すなわち混入する抗体を実質的に含まないものを産生することができる。実質的に精製した抗体組成物とは、この文脈において、本発明の所望のタンパク質又はポリペプチドに対するもの以外のエピトープに対して向けられた混入抗体を多くても30%（乾燥重量によって）を含み、好ましくはサンプルの多くても20%、より好ましくは多くても10%、及び最も好ましくは多くても5%（乾燥重量によって）が混入抗体である抗体サンプルを意味する。精製された抗体組成物は、組成物における抗体の少なくとも99%が本発明の所望のタンパク質又はポリペプチドに向けられ低ることを意味する。

10

【0130】

免疫化後の適当な時期、例えば特異的な抗体価が最高のときに、抗体産生細胞を対象から得て、最初にKohler及びMilstein（1975, *Nature* 256:495-497）によって記述されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborらの論文、1983, *Immunol Today* 4:72）、EBV-ハイブリドーマ技術（Coleらの論文、1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss社, pp. 77-96）又はトリオーマ技術などの標準的技術によってモノクローナル抗体を調製するために使用することができる。ハイブリドーマを産生するための技術は周知である（例えば、*Current Protocols in Immunology*, Coliganらの文献（版）John Wiley & Sons社, New York, N.Y.（1994）を参照されたい）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマ培養液上清を、例えば標準的なELISAアッセイ法を使用して、関心対象のポリペプチドに結合する抗体についてスクリーニングすることによって検出される。

20

【0131】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、本発明のポリペプチドに向けられたモノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）を関心対象のポリペプチドでスクリーニングすることによって同定すること、及び単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製し、かつスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、Pharmacia組換え位相抗体系、カタログ番号27-9400-01；及びStratagene SurfZAPファージディスプレイキット、カタログ番号240612）。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作製し、かつスクリーニングする際に使用するために特に適用できる方法及び試薬の例は、例えば以下において見いだすことができる：米国特許第5,223,409号；PCT公報WO92/18619；PCT公報WO91/17271；PCT公報WO92/20791；PCT公報WO92/15679；PCT公報WO93/01288；PCT公報WO92/01047；PCT公報WO92/09690；PCT公報WO90/02809；Fuchsらの論文、1991, *BioTechnology* 9:1370-1372；Hayらの論文、1992, *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85；Huseらの論文、1989, *Science* 246:1275-1281；Griffithsらの論文、1993, *EMBO J.* 12:725-74。

30

40

【0132】

加えて、標準的な組換えDNA技術を使用して作製することができる、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体などの、ヒト及び非ヒト部分の両方を含む組換え抗体も本発明の範囲内である。キメラ抗体は、マウスmAbに由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有するものなどの、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である（例えば、Cabillyらの特許、米国特許第4,816,567及びBossらの特許、米国特許第4,816,397号を参照さ

50

りたい。これらは、それらの全体が引用により本明細書に組み込まれる)。ヒト化抗体は、1つ以上の相補性決定領域(CDR)とヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する非ヒト種由来の抗体分子である(例えば、Queen、米国特許第5,585,089号を参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。このようなキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野において公知の組換えDNA技術によって、例えば以下に記述された方法を使用して産生することができる：PCT公報WO87/02671；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494；PCT公報WO86/01533；米国特許第4,816,567号；欧州特許出願第125,023号；Betterらの論文、1988、Science 240：1041-1043；Liuらの論文、1987、Proc Natl Acad Sci. 84：3439-3443；Liuらの論文、1987、J. Immunol. 139：3521-3526；Sunらの論文、1987、Proc Natl Acad Sci. 84：214-218；Nishimuraらの論文、1987、Cancer Res. 47：999-1005；Woodらの論文、1985、Nature 314：446-449；及びShawらの論文、1988、J. Natl. Cancer Inst. 80：1553-1559；Morrisonの論文、1985、Science 229：1202-1207の；Oiraらの論文、1986、BioTechniques 4：214)；米国特許代5,225,539号；Jonesらの論文、1986、Nature 321：552-525；Verhoeyanらの論文、1988、Science 239:1534；及びBeidlerらの論文、1988、J. Immunol. 141：4053-4060。

【0133】

完全ヒト抗体は、例えば内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することができる。トランスジェニックマウスには、選択した抗原、例えば本発明のポリペプチドの全部又は一部を通常の様式で免疫する。抗原に向けられたモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスに收容されているヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッチ及び体細胞突然変異を受ける。従って、このような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA及びIgEの抗体を産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、Lonberg及びHuszar(1995、Int. Rev. Immunol. 13：65-93)を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術、並びにこのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；及び米国特許第5,545,806号を参照されたい。加えて、Abgenix社(Fremont、Calif.)などの会社は、上に記述したものと同様の技術を使用して選択した抗原に向けられたヒト抗体の提供を請け合うことができる。

【0134】

選択したエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる技術を使用して産生することができる。このアプローチでは、選択した非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して前述のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導する。(Jespersらの論文、1994、BioTechnology 12：899-903)。

【0135】

(5.5.2. 本発明のバイオマーカーのための酵素アッセイ法)

有利な実施態様において、総リゾホスファチジルコリンは、1つ以上の酵素アッセイ法によって検出し、測定し、又はモニターすることができる。酵素アッセイ法は、本発明のバイオマーカーの1つ以上を検出し、測定し、又はモニターするために有用な当業者に公知の任意の酵素アッセイ法であることができる。

【0136】

特定の実施態様において、酵素アッセイ法は、出願公開JP 2002-17938(Kishimotoらの文献、2002、リン脂質を測定する方法)に従うこと、又はKishimotoらの論文、2002、Clinical Biochem. 35:411-416に従うことができ、これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0137】

特定の実施態様において、総リゾホスファチジルコリンは、本発明のサンプルを、リゾ

10

20

30

40

50

ホスファチジルコリンを加水分解してグリセロホスホリルコリンを得ることができる酵素と接触させることによって測定することができる。該酵素は、当業者に公知の任意のこのような酵素であることができる。例示的酵素には、EC 3.1.1.5（例えば、Asahi Chemical社から市販）などのリゾホスホリパーゼを含む。特定の実施態様において、リゾホスホリパーゼは、その他のリン脂質と比べて、リゾリン脂質を優先して加水分解する。特定の実施態様において、リゾホスホリパーゼは、バシラス属（*Bacillus*）由来ある。特定の実施態様において、リゾホスホリパーゼは、JP 2002-17938に記載されている。

【0138】

生じるグリセロホスホリルコリンは、当業者に明らかな任意の技術に従って検出し、測定し、又はモニターすることができる。例えば、特定の実施態様において、グリセロホスホリルコリンを、コリンを得るために適した条件下で当業者に公知のグリセロホスホリルコリンジエステラーゼ（例えば、BC 3.1.4.2）と接触させることができる。生じるコリンを、ペルオキシドを得るために適した条件下で当業者に公知のコリンオキシダーゼ（例えば、EC 1.1.3.17）と接触させることができる。コリンオキシダーゼの使用により、セリン又はエタノールアミンを含むリゾリン脂質などのその他のリゾリン脂質に優先してリゾホスファチジルコリンを検出するための方法が可能になる。生じるペルオキシドは、例えば比色分析技術を含む当業者に明らかな任意の技術によって検出することができる。

10

【0139】

過酸化水素の検出は、当業者に明らかな任意の技術によって達成することができる。例示的技術には、以下を含む：化学発光（Kibaraの論文、2003、*Analytical Science* 19（6）：823-827）、蛍光（Zhangらの論文、199、*Talanta* 48（5）：1031-1038；Chenらの論文、2001、*Analytica Chimica* 434（1）：51-58）及び分光光度法（Pappasらの論文、2002、*Analytica Chimica* 455（2）：305-313）。その他の例示的技術には、金属錯体（Paleologosの論文、2002、*Analytical Chemistry* 74（1）：100-106）並びにレドックスを媒介した電気化学的検出（例えば、市販のグルコースメーター）を含む。

20

【0140】

有利な実施態様において、ペルオキシダーゼ活性は、蛍光発生基質で検出することができる。このような実施態様は、サンプルにおける総リゾホスファチジルコリンの検出のための迅速かつ感度の高い技術を提供する。従って、これらの技術は、本明細書に記述したような全身性炎症状態の診断又は予後のための迅速かつ高感度のアッセイ法を提供する。蛍光発生基質は、適切な条件下で、例えば水及び酸素と共にペルオキシドの存在下においてペルオキシダーゼによって蛍光産物に変換することができる当業者に公知の任意の蛍光発生基質であることができる。詳細な実施態様において、蛍光発生基質は、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンである。この基質は、市販の供給元（例えば、Amplex Red、Invitrogen）から得ることができる。当業者であれば、この蛍光発生基質を当業者に明らかな技術によって検出可能な蛍光産物7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン（レゾルフィン）に変換させることができることを認識するであろう。有用な検出技術には、もちろん蛍光検出を含む。好ましくは、検出方法は、産物が形成されて、検出することができる条件下で実施される。有用な条件及び結果は、作業実施例に記述してある。

30

【0141】

特定の実施態様において、グリセロホスホリルコリンを適切な条件下で当業者に公知のグリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼと接触させてグリセロール-3-リン酸を得ることができる。生じるグリセロール-3-リン酸を適切な条件下で当業者に公知のグリセロール-3-リン酸オキシダーゼと接触させてペルオキシドを得ることができる。有用なグリセロール-3-リン酸オキシダーゼは、連鎖球菌属（*Streptococcus*）、アエロコッカス属（*Aerococcus*）及びペジオコッカス属（*Pediococcus*）に由来するもの、並びにJP 2002-17938に記述されているものを含む。生じるペルオキシドは、例えば比色技術を含む当業者に明らかな任意の技術によって検出することができる。

40

【0142】

特定の実施態様において、ホスファチジルコリンを適切な条件下で当業者に公知のホス

50

ファチジルコリンホスホジエステラーゼと接触させてグリセロール-3-リン酸を得ることができる。生じるグリセロール-3-リン酸を適切な条件下で当業者に公知のグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼと接触させて、検出可能な産物を得ることができる。例えば、接触をNAD⁺の存在下で行い、検出可能なNADHを得ることができる。また、接触をNADP⁺の存在下で行い、検出可能なNADPHを得ることができる。

【0143】

ペルオキシド、NADH及びNADPHなどの検出可能な産物を検出し、測定し、又はモニターするための技術は、当業者に周知である。有用な技術は、JP 2002-1793 8、Misakiの論文、1999、Modern Medical Laboratory 27(8):973-980、(1999)、日本特許第1594750号、特開05-229993及びAoyamaの論文、1997、Journal of Medical Technology 14:1014-1019に記述されており、これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

10

【0144】

(5.6 全身性炎症状態の診断又は予後)

本発明の特定の方法において、全身性炎症状態の診断又は予後のために、対象の総リゾホスファチジルコリンが使用される。上述のとおり、総リゾホスファチジルコリンは、直接測定することができ、又は測定は総リゾホスファチジルコリン量に相関して行うことができる。特定の実施態様において、遊離リゾホスファチジルコリンが測定される。特定の実施態様において、結合リゾホスファチジルコリンが測定される。特定の実施態様において、遊離リゾホスファチジルコリン及び結合リゾホスファチジルコリンが測定される。

【0145】

本発明の特定の方法において、全身性炎症状態の診断又は予後のために、対象における1つ以上のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーの量が使用される。

20

本発明の特定の方法において、全身性炎症状態の診断又は予後のために、対象における総リゾホスファチジルコリン及び1つ以上のリゾホスファチジルコリンバイオマーカーの量が使用される。

【0146】

一部の実施態様において、対象由来の単一サンプルでも、全身性炎症状態の診断又は予後のために十分である。このような実施態様において、リゾホスファチジルコリン量は、対象と同様の個体における相対的に一定量で存在する生体サンプルの内部基準と比較することができる。内部基準は、当業者に適切であると判断される任意の基準であることができ、好ましくはバイオマーカーに、又は全身性炎症状態に関連がない。特定の実施態様において、内部基準は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン又はホスファチジルセリンである。

30

【0147】

一部の実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後のために、対象由来の複数の生体サンプルが評価される。このような実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の変化は、全身性炎症状態についてのリスクを示す。

【0148】

特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の増大は、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。例えば、特定の実施態様において、以前の量の少なくとも10%、125%、150%、175%、200%、300%、400%又は500%である第2の量は、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

40

【0149】

特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量の減少は、全身性炎症状態についてのリスクの増大を示す。例えば、特定の実施態様において、以前の量の95%未満、90%、80%、75%、50%、33%、25%、20%又は10%である第2の量は、全身性炎症状態についてのリスクの減少を示す。

【0150】

特定の実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後は、リゾホスファチジルコリンの参照量に対する対象のサンプルにおけるリゾホスファチジルコリン量の比較に基づく

50

ことができる。参照量は、下記の節に記述してある。有意に、参照量は、本発明の方法の当業者によって得られ、又は測定される必要はない。その代わりに、参照量は、当業者が利用できる参照集団における参照量を参照することによって同定することができる。このような量は、例えば電子データベース上の科学文献にて公表され得る。

【0151】

好ましい実施態様において、参照量は、サンプルにおける量を測定するために使用されるのと同じ技術又は相当する技術によって測定される。例えば、好ましくは、サンプル中の遊離リゾホスファチジルコリンが測定される場合、参照量は、参照対象又は参照集団中の遊離リゾホスファチジルコリンに基づくことができる。例えば、好ましくは、サンプルにおいて結合リゾホスファチジルコリンが測定される場合、参照量は、結合リゾホスファチジルコリンに基づくことができる。もちろん、総リゾホスファチジルコリン及び参照量が異なる技術によって測定される場合、2つの量の相関は、当業者の能力の範囲内であるはずである。

10

【0152】

リゾホスファチジルコリンバイオマーカーがサンプルにおいて測定される場合、参照量は、参照対象又は参照集団におけるリゾホスファチジルコリンバイオマーカーに基づくことができる。もちろん、リゾホスファチジルコリンバイオマーカー及び参照量が異なる技術によって測定される場合、2つの量の相関は、当業者の能力の範囲内であるはずである。

【0153】

参照量が使用されるときは、当業者が参照量と試験対象における量との間の相違を使用して、全身性炎症状態の診断又は予後がなされる。特定の実施態様において、試験対象における量が、参照量の10～190%、20～180%、30～170%、40～160%、50～150%、75～125%、80～120%、90～110%又は95～105%の間にある場合、全身性炎症状態の診断又は予後が示される。

20

【0154】

カットオフ参照量が使用される場合、当業者がカットオフと試験対象の量との間の相違を使用して、全身性炎症状態の診断又は予後がなされる。特定の実施態様において、試験対象における量が、カットオフ参照量を下回るか、又は実質的に下回る場合、全身性炎症状態の診断又は予後が示され、試験対象における量がカットオフ参照量を上回るか、又は実質的に上回る場合は、全身性炎症状態の診断又は予後が示されないであろう。

30

特定の実施態様において、試験対象におけるリゾホスファチジルコリン量と参照量との間の相違は、全身性炎症状態についてのリスクと逆相関する。このような相関は、当業者によって決定することができる。

【0155】

複数の参照対象からの参照量が使用されるときは、評価は、当業者に公知の任意の統計的技術に基づくことができる。同様に、複数のバイオマーカーが使用されるときは、診断又は予後は、米国特許出願公開第20030194752号、第20040096917号、第20040097460号、第20040106142号、第20040157242号、並びに2005年4月15日に出願の米国仮出願第60/671,620号、2005年4月15日に出願の第60/671,941号及び2005年4月22日に出願の第60/674,046号に記述されたもの（これらの内容は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）などの当業者に公知の技術に従って複数の量に基づくことができる。

40

【0156】

(5.7 参照バイオマーカー)

本発明の特定の方法において、対象の総リゾホスファチジルコリンを総リゾホスファチジルコリンの対応する参照量と比較する。参照量は、典型的には、定義された期間内に公知の全身性炎症状態を有するか、又は有するであろう参照対象（本方法の対象ではない）における総リゾホスファチジルコリン量である。任意の特定の方法論によって拘束されることは意図しないが、本発明は、部分的には、対象における総リゾホスファチジルコリンと全身性炎症状態との間の相関の発見に基づいている。従って、本発明の方法を実践す

50

るものは、全身性炎症状態の予後又は診断を行うために、対象における総リゾホスファチジルコリン量を総リゾホスファチジルコリンの参照量と比較することができる。

【0157】

本発明の特定の方法において、対象のリゾホスファチジルコリンバイオマーカの量をバイオマーカの対応する参照量と比較する。典型的には、定義された期間内に公知の全身性炎症状態を有するか、又は有するであろう参照対象（本方法の対象ではない）における同じバイオマーカ又はその誘導体の量である。任意の特定の作動理論によって拘束されることを意図しないが、本発明は、部分的には、対象における本発明のリゾホスファチジルコリンバイオマーカと全身性炎症状態との間の相関の発見に基づいている。従って、本発明の方法を実践するものは、全身性炎症状態の予後又は診断を行うために、対象に

10

【0158】

好都合には、本発明の方法を実践するためには、参照集団におけるリゾホスファチジルコリンの参照量を集める必要はない。このような参照量は、公的又は私的データベースなどの当業者に利用可能な供与源で、又は本明細書に提供したデータを参照することにより、同定することができる。従って、リゾホスファチジルコリンの参照量を使用する方法において、本方法に記述した比較を行う必要があるだけである。

参照量は、本明細書に記述したものを含む当業者に公知の技術に従って測定することができる。好都合には、特定の実施態様において、参照対象におけるリゾホスファチジルコリン量と試験対象におけるリゾホスファチジルコリン量は、同じ技術によって得られる。

20

【0159】

参照対象は、当業者に従って、定義された期間内に全身性炎症状態の症候を示すか、又は示すであろう任意の対象であることができる。特定の実施態様において、参照量は、参照対象が症候を示すときに得られる。特定の実施態様において、参照量は、参照対象が全身性炎症状態の症候を示すか、又は全身性炎症状態と診断される前の時点又は後の時点で得ることができる。例えば、特定の実施態様において、参照量は、敗血症の発病の48、36、24又は12時間前に参照対象から得られる。当業者であれば、このような量を敗血症についてのリスクがある参照集団の量を測定すること、続いてある期間にわたって参照対象を診断することによって得ることができることを認識するであろう。

30

【0160】

参照対象は、任意の全身性炎症状態を有することができ、又は全身性炎症状態がないこともできる。特定の実施態様において、参照対象は、SIRS陰性であるか、又はSIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡の症候を示し得る。このような参照量は、状態の診断又は予後のために使用することができる。

全身性炎症状態の診断のための方法は、当業者の知識に従って実施される。このような方法は、ルーチンであり、本明細書に記述していない。

【0161】

特定の実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後は、カットオフ参照量に基づく。カットオフ参照量は、全身性炎症状態についてのリスクを示す量についての絶対値である。例えば、本発明のバイオマーカについての100のカットオフ参照量は、試験対象が100未満の（又は代わりの実施態様において100を越える）バイオマーカの量を有するときに、全身性炎症状態についてのリスクを示し得る。カットオフ参照量は、参照対象から得られる参照量に基づいて、当業者に公知の統計的技術を使用して決定することができる。例えば、特定の全身性炎症状態についてのカットオフは、新たな参照対象が当業者に適した信頼区間内で、例えば60%、70%、80%、85%、90%、95%又は99%の信頼度で診断又は予後を有することができるように決定することができる。

40

【0162】

（5.8 全身性炎症状態の治療又は予防をモニターする方法）

特定の態様において、本発明は、全身性炎症状態又は全身性炎症状態についてのリスク

50

を、その必要のある対象においてモニターする方法を提供する。特定の実施態様において、リゾホスファチジルコリン量を対象から得て、状態又は状態についてのリスクを評価するために使用する。

【0163】

詳細な実施態様において、本発明は、全身性炎症状態の治療をモニターする方法を提供する。本発明の方法は、治療の有効性を評価し、該方法の結果に応じて治療を変更するために使用することができる。このような方法は、一般に全身性炎症状態の治療又は予防が施されたか、又は施されるであろう対象における全身性炎症状態についてのリスクを評価するためにリゾホスファチジルコリン量を測定する工程を含む。

【0164】

特定の実施態様において、本発明は、SIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害若しくは死亡(mortality)の治療又は予防をモニターする方法を提供する。治療又は予防は、当業者に公知のSIRS、敗血症、重篤な敗血症、敗血症性ショック、多臓器機能障害又は死亡の任意の治療又は予防であることができる。

【0165】

特定の実施態様において、治療又は予防は、当業者に公知の技術に従った抗生物質の投与を含む。抗生物質は、当業者に公知の全身性炎症状態の治療又は予防のために適した任意の抗生物質であることができる。一部の実施態様において、抗生物質は、ゲンタマイシン、セフトリアキソン、トブラマイシン又はセフトジジン(ceftazidine)など、グラム陽性菌に対して有効であり得る。一部の実施態様において、抗生物質は、バンコマイシンなど、グラム陰性菌に対して有効であり得る。一部の実施態様において、抗生物質は、メトリオニダゾール(metronidazole)など、嫌気性菌に対して有効でありえる。

【0166】

さらなる実施態様において、治療又は予防は、当業者に公知の技術に従ったステロイドの投与を含む。ステロイドは、当業者に公知の全身性炎症状態の治療又は予防のために適した任意のステロイドであることができる。特定の実施態様において、ステロイドは、ヒドロコルチゾン又はデキサメサゾンである。

【0167】

さらなる実施態様において、治療又は予防は、当業者に公知の技術に従った昇圧又は変力療法の投与を含む。昇圧又は変力療法は、当業者に公知の全身性炎症状態の治療又は予防のために適した任意の昇圧又は変力療法であることができる。特定の実施態様において、昇圧又は変力療法は、ノルエピネフリン、ドーパミン又はドブタミンである。

【0168】

さらなる実施態様において、治療又は予防は、XIGRIS(登録商標)(ドロトレコギン(活性型)Eli Lilly and Company)の投与を含む。XIGRIS(登録商標)は、重篤な敗血症である成人患者における死亡の減少のために米国食品医薬品局によって承認されたヒト活性型プロテインCの組換え形態である。

【0169】

詳細な実施態様において、本発明は、全身性炎症状態を治療し、又は防止する方法を提供する。本方法は、全身性炎症状態の治療又は予防を管理する工程及び本発明の方法に従って全身性炎症状態のリスク又は重症度をモニターする工程を含む。全身性炎症状態のリスク又は重症度は、本明細書に記述される方法に従って評価することができる。特定の実施態様において、治療又は予防の投与は、当業者の判断に従って、モニタリングの結果に基づいて更に調整することができる。

【0170】

ある実施態様において、本発明は、その必要のある対象における全身性炎症状態を治療し、又は予防する方法であって、対象に対してXIGRIS(登録商標)の有効量を投与する工程及び本発明の方法に従って全身性炎症状態をモニターする工程を含む方法を提供する。特定の実施態様において、全身性炎症状態は、敗血症又は重篤な敗血症である。

【0171】

一部の実施態様において、複数のリゾホスファチジルコリン量のある期間にわたって得て、全身性炎症状態をモニターする。特定の実施態様において、量の増大は、全身性炎症状態のリスクの減少又は状態の重症度の減少を示す。例えば、特定の実施態様において、以前の量の少なくとも110%、125%、150%、175%、200%、300%、400%又は500%である第2の量は、全身性炎症状態についてのリスクの減少又は状態の重症度の減少を示す。さらなる実施態様において、量の減少は、全身性炎症状態のリスクの増大又は状態の重症度の増大を示す。例えば、特定の実施態様において、以前の量の95%、90%、80%、75%、50%、33%、25%、20%又は10%未満である第2の量は、全身性炎症状態についてのリスクの増大又は状態の重症度の増大を示す。

【0172】

一部の実施態様において、1つ以上の量のある期間にわたって得る。このような実施態様において、全身性炎症状態の診断又は予後のために、リゾホスファチジルコリン量と全身性炎症状態についての総リゾホスファチジルコリンの参照量との間の相違が使用される。参照量に対する比較は、上記のとおりを実施することができる。

【0173】

(5.9 全身性炎症状態の、診断若しくは予後又はモニタリングのためのキット)

また、本発明は、対象における全身性炎症状態を診断若しくは予後又はモニタリングのために有用であるキットを提供する。一部の実施態様において、本発明のキットは、総リゾホスファチジルコリンに特異的に結合する試薬を含む。試薬は、アレイの一部であってもよく、又は試薬は、別々に及び/又は個々に包装されていてもよい。また、キットには、総リゾホスファチジルコリンを評価するために使用される少なくとも1つの内部標準を含んでいてもよい。詳細な実施態様において、キットには、本発明の複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルの1つ以上のバイオマーカーに対して特異的な抗体のアレイ又は抗体のチップを含む。

【0174】

本発明のキットは、バイオマーカープロファイルを作製する生体サンプルに含まれるバイオマーカーを検出するために使用することができる試薬を含んでいてもよい。具体的実施態様において、本発明は、総リゾホスファチジルコリンに特異的に結合する抗体を含む、試験対象における敗血症の発症を予測するためのキットを提供する。この実施態様によれば、キットには、総リゾホスファチジルコリンに優先して結合する抗体又はその機能的断片若しくは誘導体(例えば(Fab)、F(ab')₂、Fv、又はscFv断片)を含んでいてもよい。特定の実施態様において、抗体は、検出可能に標識されていてもよい。

【0175】

特定の実施態様において、キットには、サンプル中の総リゾホスファチジルコリンの検出のために有用な試薬を含む。特定の実施態様において、試薬には、リゾホスファチジルコリンの検出のために有用な1つ以上の酵素及び1つ以上の基質を含む。詳細な実施態様において、キットには、総リゾホスファチジルコリンの検出のために有用な蛍光発生基質を含むことができる。特定のキットには、適切な条件下でリゾホスファチジルコリンを反応させてグリセロホスファチジルコリンを形成することができる酵素又は試薬、適切な条件下でグリセロホスファチジルコリンを反応させてコリンを形成することができる酵素又は試薬、適切な条件下でコリンを反応させてペルオキシドを形成することができる酵素又は試薬、ペルオキシダーゼ、及び前記ペルオキシダーゼの蛍光発生基質を含む。特定のキットには、リゾホスホリパーゼ、グリセロホスファチジルコリンジエステラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンを含む。特定のキットには、EC 3.1.1.5、EC 3.1.4.2、EC 1.1.3.17、西洋ワサビペルオキシダーゼ及び10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンを含む。キットには、本発明の方法に従って総リゾホスファチジルコリンを評価するための1つ以上の標準品を更に含むことができる。

【0176】

また、本発明は、対象における全身性炎症状態の診断若しくは予後又はモニタリングの

10

20

30

40

50

ために有用であるキットを提供する。一部の実施態様において、本発明のキットには、本発明のバイオマーカーに特異的に結合する試薬を含む。試薬は、アレイの一部であってよく、又は試薬は、別々に及び/又は個々に包装されていてもよい。また、キットには、本発明のバイオマーカーを評価するために使用される少なくとも1つの内部標準を含んでいてもよい。詳細な実施態様において、キットには、本発明の複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルの1つ以上のバイオマーカーに対して特異的な抗体のアレイ又は抗体のチップを含む。

【0177】

本発明のキットは、バイオマーカープロフィールが作製される生体サンプルに含まれるバイオマーカーを検出するために使用することができる試薬を含んでいてもよい。具体的実施態様において、本発明は、本発明のバイオマーカーに特異的に結合する抗体を含む、試験対象における敗血症の発症を予測するためのキットを提供する。この実施態様によれば、キットには、本発明の1以上のバイオマーカーに特異的に結合する抗体又はその機能的断片若しくは誘導体（例えば（Fab）、F(ab')₂、Fv、又はscFv断片）を含んでいてもよい。特定の実施態様において、抗体は、検出可能に標識されていてもよい。

10

【0178】

その他の実施態様において、本発明のキットは、アプタマーなどのバイオマーカーに特異的に結合する試薬を含んでいてもよい。バイオマーカーが核酸を含む場合、キットでは、バイオマーカーと、又はバイオマーカーの相補鎖と二重鎖を形成することができるオリゴヌクレオチドプローブを提供してもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、検出可能に標識されていてもよい。

20

【0179】

また、本発明のキットは、緩衝液などの試薬又はバイオマーカーの量を得るのに使用することができるその他の試薬を含んでいてもよい。微生物作用の予防は、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含む種々の抗菌薬及び抗真菌薬の包含によって保証することができる。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張薬を含むことも望ましいであろう。

【0180】

リゾホスファチジルコリンに加えて核酸バイオマーカーなどのバイオマーカーを使用する実施態様において、キットには、都合よくはマイクロアレイを含めることができる。一つの実施態様において、このマイクロアレイには、キットで評価されるバイオマーカーのための複数のプローブスポットを含む。一部の実施態様において、マイクロアレイは、基板上に約3～約100個の間のプローブスポットを有する。一部の実施態様において、マイクロアレイは、基板上に約3～約100個の間のプローブスポットを有する。この状況に使用される、「約」という用語は、明示された値の5パーセントの範囲内、明示された値の10パーセントの範囲内又は明示された値の25パーセントの範囲内を意味する。

30

【0181】

特定の実施態様において、キットには、本発明の方法を実施するための説明を伴うラベル又はラベリングを更に含む。例えば、ラベル又はラベリングは、1つ以上の全身性炎症状態に対応するリゾホスファチジルコリンの参照量又は参照量群を提供することができる。ラベル又はラベリングは、1つ以上の全身性炎症状態に対応するリゾホスファチジルコリンの1つ以上のカットオフ参照量を提供することができる。更に、ラベル又はラベリングでは、このような参照量の供与源に対する引用又はリンクを提供することができる。

40

【0182】

本発明のいくつかのキットには、コンピュータシステムと組み合わせて使用するためのコンピュータプログラム製品を更に含んでいてもよく、コンピュータプログラム製品は、コンピュータ読み取り可能な記憶媒体及びその中に埋め込まれたコンピュータプログラム機構を含む。このようなキットにおいて、コンピュータプログラム機構は、全身性炎症状態を発病するリスクがある試験対象のリゾホスファチジルコリンの1つ以上の量が第1の値セットを満足させるかどうかを評価するための説明書を含む。第1の値セットを満たすこ

50

とは、試験対象が全身性炎症状態を発病する可能性が高いことを予測する。いくつかのキットにおいて、コンピュータプログラム製品は、試験対象のリゾホスファチジルコリン量が第2の値セットを満たすかどうかを評価するための説明書を更に含む。第2の値セットを満たすことは、試験対象が全身性炎症状態を発病する可能性が高くないことを予測する。

【0183】

(5.10 全身性炎症状態の診断若しくは予後又はモニタリングのためのアルゴリズム)

本発明は、全身性炎症状態の診断、予後及びモニタリングのために有用な総リゾホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルコリンバイオマーカーを提供する。上述のとおり、リゾホスファチジルコリンは、単独又は複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルの一部として使用することができる。複数のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルには、本発明のリゾホスファチジルコリン、有用なことが当業者に公知のバイオマーカー又は両方を含むことができる。有利な実施態様において、これらのバイオマーカーは、コンバーター及び非コンバーターを区別することができる。

10

【0184】

これらのバイオマーカー及びそれらの対応する特徴（例えば、量又は発現値）の同一性を、決定規則又は複数の決定規則（コンバーター及び非コンバーターを区別する）を開発するために使用することができる。データ分析アルゴリズムは、多数のこのような決定規則を構築するために使用することができる。データ分析アルゴリズムは、コンバーター及び非コンバーターを含む訓練集団全体の発明のバイオマーカーのサブセットの特徴（例えば、量又は発現値）を使用する。典型的には、SIRS対象は、対象が定義された時間（例えば、観察期間）に敗血症を発病しないときに、非コンバーターとみなされる。この定義された時間は、例えば12時間、24時間、48時間、1日、1週、1月又はそれより長期であることができる。定義された期間に敗血症を発病する対象と敗血症を発病しない対象との間を区別する決定規則又は複数の決定規則を構築するための具体的データ分析アルゴリズムは、下記のサブセクションに後述する。これらの例示的データ分析アルゴリズム又は当該技術分野において公知のその他の技術を使用して一旦決定規則が構築されると、決定規則を使用して、試験対象を2つ以上の表現型の分類（例えば、コンバーター又は非コンバーター）のものに分類することができる。これは、決定規則を試験対象から得られるバイオマーカープロファイルに適用することによって達成される。従って、このような決定規則は、診断の指標としての価値を有する。

20

30

【0185】

本発明は、一つの態様において、訓練集団から得られるバイオマーカープロファイルに対する試験対象由来のバイオマーカープロファイルの評価を提供する。一部の実施態様において、訓練集団の対象、並びに試験対象から得られたそれぞれのバイオマーカープロファイルは、複数の異なるバイオマーカーのそれぞれについての特徴を含む。一部の実施態様において、この比較は、(i) 訓練集団由来のバイオマーカープロファイルを使用して決定規則を開発すること、及び(ii) 試験対象由来のバイオマーカープロファイルに対して決定規則を適用することによって達成される。従って、本発明の一部の実施態様において適用される決定規則は、SIRSを有する試験対象が敗血症を得る可能性が高いであろうか、又は高くないであろうかどうかを決定するために使用することができる。

40

【0186】

本発明の一部の実施態様において、対象が敗血症を得る可能性が高いであろうことを決定規則の適用の結果が示すとき、対象は、「敗血症」対象と診断される。対象が敗血症を得ないことを決定規則の適用の結果が示す場合、対象は、「SIRS」対象と診断される。従って、一部の実施態様において、上記の2値の決定状況の結果は、4つの可能性の結果を有する：

- ・対象が敗血症を得るであろうし、かつ対象が定義された期間の間に、実際に敗血症を得ることを決定規則が示す（真の陽性、TP）、真の敗血症；
- ・(ii) 対象が敗血症を得るであろうし、かつ対象が定義された期間の間に、実際に敗血症を得ないことを決定規則が示す（偽陽性、FP）、偽敗血症；

50

・ (iii) 対象が敗血症を得ないであろうし、かつ対象が定義された期間の間に、実際に敗血症を得ないことを決定規則が示す (真の陰性、TN)、真のSIRS；又は

・ (iv) 対象が敗血症を得ないであろうし、かつ対象が定義された期間の間に、実際に敗血症を得ることを決定規則が示す (偽陰性、FN)、偽SIRS。

【0187】

TP、FP、TN、FNについて、その他の定義を行うこともできることが認識されるであろう。例えば、TPは、決定規則により対象が敗血症を得ないであろうし、かつ対象が定義され期間の間に、実際に敗血症を得ないことを示す例として定義してしまってもできるであろう。全てのこのような代わりの定義が本発明の範囲内であるが、本発明の理解の容易のために、特に明記しない限り、上の定義 (i) ~ (iv) によって与えられるTP、FP、TN及びFNについての定義が本明細書において使用される。

10

【0188】

当業者には理解されるであろうとおり、多数の定量的基準を使用して、試験バイオマーカープロファイルと参照バイオマーカープロファイルとの間で行った比較の性能を伝えることができる (例えば、試験対象からのバイオマーカープロファイルに対する決定規則の適用)。これらには、陽性予測値 (PPV)、陰性予測値 (NPV)、特異性、感度、精度及び確実性を含む。加えて、その他の構築物のこのようなレシーバオペレータ曲線 (ROC) を使用して決定規則性能を評価することができる。本明細書に使用されるとおり：

- ・ $PPV = TP / (TP + FP)$
- ・ $NPV = TN / (TN + FN)$
- ・ 特異性 = $TN / (TN + FP)$
- ・ 感度 $TP / (TP + FN)$
- ・ 精度 = 確実性 = $(TN + TP) / N$

20

ここで、Nは、比較したサンプルの数 (例えば、敗血症又はSIRSの決定を調べた試験サンプルの数) である。例えば、SIRS / 敗血症分類を調べた10人の対象がある場合を考える。バイオマーカープロファイルを10人の試験対象のそれぞれについて構築する。次いで、それぞれのバイオマーカープロファイルを、訓練集団から得られるバイオマーカープロファイルに基づいて開発した決定規則を適用することによって評価する。この例では、上記の方程式からのNは、10に等しい。典型的には、Nは、多数のサンプルであり、それぞれのサンプルは、異なる集団のメンバーから収集した。この集団は、実際に2つの異なるタイプのものであることができる。一方のタイプでは、サンプル及び表現型データ (例えば、バイオマーカーの特徴値及び対象が敗血症を得たか否かの指標) を使用して決定規則を構築した、又は洗練した対象を集団に含む。このような集団は、本明細書において訓練集団と称する。他方のタイプでは、決定規則を構築するために使用されなかった対象を集団に含む。このような集団は、本明細書においてバリデーション集団と称する。特に明記しない限り、Nによって表される集団は、2つの集団タイプの混合とは対照的に、訓練集団のみ又はバリデーション集団のみである。精度などのスコアは、それらが、バリデーション集団とは対照的に訓練集団に基づくときにより高い (単一により近い) ことが認識されるであろう。それにもかかわらず、他に本明細書において明確に明示されていなければ、確実性 (精度) を含む決定規則 (又は試験対象由来のバイオマーカープロファイルの評価のその他の形態) の性能を評価するために使用される全ての基準は、基準に対応する決定規則を訓練集団又はバリデーション集団に対して適用することによって測定された基準をいう。そのうえ、上で定義したPPV、NPV、特異性、感度及び精度についての定義は、また、Draghiciの文献、DNA微量分析のためのデータ分析ツール (Data Analysis Tools for DNA Microanalysis)、2003、CRC Press LLC、Boca Raton、Florida、pp. 342-343において見いだすことができ、これは、引用により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0189】

一部の実施態様において、訓練集団には、非コンバーター及びコンバーターを含む。一部の実施態様において、バイオマーカープロファイルは、集団のコンバーターによる敗血症の発病の数時間前に訓練集団から収集した生体サンプルを使用して、この集団から構築

50

される。従って、訓練集団のコンバーターについては、生体サンプルは、コンバーターが敗血症になる2週間前に、1週間前に、4日前に、3日前に、1日前に、又は他の任意の時間前に収集することができる。実際には、このようなコレクションは、SIRS診断であると病院に入院後に、規則的な時間間隔にて生体サンプルを収集することによって得られる。例えば、一つのアプローチにおいて、病院においてSIRSと診断された対象が訓練集団として使用される。一旦SIRSで病院に入院すると、生体サンプルは、選択時間（例えば、1時間毎、8時間毎、12時間毎、毎日など）に対象から収集される。一部の対象は、敗血症を得て、一部の対象は、敗血症を得ない。敗血症を得る対象については、敗血症の発病の直前に対象から採取した生体サンプルを $T_{.12}$ 生体サンプルと称する。対象からのその他の全ての生体サンプルは、これらの生体サンプルに相対的にさかのぼってインデックスを付ける。例えば、生体サンプルを対象から毎日採取したときは、 $T_{.12}$ サンプルの前日に採取した生体サンプルを $T_{.36}$ 生体サンプルとよぶ。訓練集団における非コンバーターについての生体サンプルのための時点は、非コンバーター対象をコンバーター対象と「時間を一致させること」によって同定される。例証のために、訓練集団の対象が彼の登録の6日目に敗血症であると臨床的に定義された場合を考える。例証のために、この対象について、 $T_{.36}$ は、研究の4日目であり、 $T_{.36}$ 生体サンプルは、研究の4日目に得た生体サンプルである。同様に、一致させた非コンバーター対象についての $T_{.36}$ は、この対にした非コンバーター対象での研究の4日目であると考えられる。

10

【0190】

一部の実施態様において、Nは、1を超え、5を超え、10を超え、20を超え、10~100の間、100を超え、又は1000未満の対象である。決定規則（又は比較のその他の形態）は、一部の実施態様において、訓練集団又はバリデーション集団に対して少なくとも約99%又は更により多くの確実性を有することができる。その他の実施態様において、確実性は、訓練集団又はバリデーション集団に対して少なくとも約97%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%又は少なくとも約70%である。有用な確実性は、本発明の特定の方法に応じて変更してもよい。本明細書に使用される「確実性」は、「精度」を意味する。一つの実施態様において、感度及び/又は特異性は、訓練集団又はバリデーション集団に対して少なくとも約97%、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%又は少なくとも約70%である。適切な確実性で試験対象を分類するために決定規則により使用してもよい特徴の数は、典型的には約4つである。しかし、求められる確実性に応じて、決定規則に使用される特徴の数は、より少なくてもよいが、全ての場合で少なくとも2つである。一つの実施態様において、試験対象を分類するために決定規則により使用してもよい特徴の数は、高い確実性で個体を分類することを可能にするように最適化されている。

20

30

【0191】

下記の実施例では、代謝産物存在量データをそれぞれの対象における複数のバイオマーカーについて収集した。すなわち、バイオマーカープロファイルにおけるそれぞれのバイオマーカーについて、バイオマーカーのための特徴、代謝産物存在量データを測定した。決定規則は、観察される遺伝子発現パターンに基づいてサンプル表現型を予測するために、データ分析アルゴリズムを使用して、訓練集団由来のこのようなバイオマーカープロファイルから開発する。新たな分類ツールが常に開発されているが、既存のパターン認識及び予測アルゴリズムの本体が、決定規則を構築するために有効なデータ分析アルゴリズムを提供する。例えば、国立研究査問協議会；判別分析分類及び分類タリング、判別分析及び分類タリングについてのパネル（National Research Council; Panel on Discriminant Analysis Classification and Clustering, Discriminant Analysis and Clustering）Washington, D.C. : National Academy Pressを参照されたい。これは、引用により本明細書に組み込まれる。更に、Dudoitらの論文、2002、「遺伝子発現データを使用する腫瘍の分類のための識別方法の比較（Comparison of discrimination methods for the classification of tumors using gene expression data.）」JASA 97;、77-87（その全体が引用により本明細書に組み込まれる）に記述された本技術を使用して、このような決定規則

40

50

を開発することができる。

【0192】

決定規則を開発するための関連したデータ分析アルゴリズムには、以下を含むが、限定されない：線形、ロジスティック及びより柔軟な識別技術を含む判別分析（例えば、Gnanadesikanの文献、1977、「多変量観察結果の統計的データ分析法（Methods for Statistical Data Analysis of Multivariate Observations）」、New York: Wiley 1977を参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）；分類木及び回帰木（CART）及び変異型などの樹に基づいたアルゴリズム（例えば、Breimanの文献、1984、「分類木及び回帰木（Classification and Regression Trees）」、Belmont, California: Wadsworth International Group（これはその全体が引用により本明細書に組み込まれる）並びに以下の第5.1.3節を参照されたい）；全般的付加モデル（例えば、Tibshiraniの文献、1990、「全般的付加モデル（Generalized Additive Models）」、London: Chapman and Hallを参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）；及びニューラルネットワーク（例えば、Nealの文献、1996、「ニューラルネットワークのためのベイジアン学習（Bayesian Learning for Neural Networks）」、New York: Springer-Verlag;及びInsuaの文献、1998、ノンパラメトリック回帰のためのフィードフォワードニューラルネットワーク：Practical Nonparametric and Semiparametric Bayesian Statistics, pp. 181-194, New York: Springer（これらは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる））、並びに以下の第1.6節を参照されたい。

【0193】

一つの実施態様において、試験対象のバイオマーカープロファイルの、訓練集団から得たバイオマーカープロファイルに対する比較が行われ、決定規則を適用することを含む。決定規則は、コンピュータパターン認識アルゴリズムなどのデータ分析アルゴリズムを使用して構築される。決定規則を構築するためのその他の適切なデータ分析アルゴリズムには、ロジスティック回帰（下記の、第1.10節を参照されたい）又は特徴値の分布の相違を検出するノンパラメトリックなアルゴリズム（例えば、ウィルコクソン符号付き順位試験（Wilcoxon Signed Rank Test）（非調整済及び調整済み）を含むが、限定されない。決定規則は、1、2、3、4、5、10、20以上のバイオマーカーから測定される観察可能なものに対応する2、3、4、5、10、20以上の特徴に基づくことができる。一つの実施態様において、決定規則は、何百もの特徴又はそれ以上に基づく。また、決定規則は、分類木アルゴリズムを使用して構築してもよい。例えば、訓練集団由来のそれぞれのバイオマーカープロファイルには、少なくとも3つの特徴を含むことができ、該特徴は、分類木アルゴリズムの予測子である（下記の第1.1節を参照されたい）。決定規則は、少なくとも約70%の、少なくとも約75%の、少なくとも約80%の、少なくとも約85%の、少なくとも約90%の、少なくとも約95%の、少なくとも約97%の、少なくとも約99%の、少なくとも約98%の、又は約100%の精度で集団（又は分類）内のメンバシップを予測する。

【0194】

適切なデータ分析アルゴリズムは、当該技術分野において公知であり、その幾つかは、Hastieらの論文、上記において概説されている。具体的実施態様において、本発明のデータ分析アルゴリズムには、分類木及び回帰木（CART；下記の第1.1節）、多重相加回帰木（MART；下記の第1.4節）、マイクロアレイのための予測解析（PAM；下記の第1.2節）又はランダムフォレスト解析（下記の第1.1節）を含む。このようなアルゴリズムは、血液サンプルなどの生物材料由来の複雑なスペクトルを分類して、対象を正常なものと、又は特定の疾病状態に特徴的なバイオマーカー発現レベルを有するものと区別する。その他の実施態様において、本発明のデータ分析アルゴリズムには、ANOVA及びノンパラメトリックな同等物、線形判別分析（下記の第1.10節）、ロジスティック回帰分析（下記の第1.10節）最近隣分類子解析（下記の第1.9節）、ニューラルネットワーク（下記の第1.6節）主成分分析法（下記の第1.8節）、二次判別分析（下記の第1.11節）、回帰分類子（下記の第1.5節）及びサポートベクトルマシン（下記の第1.12節）を含む。このようなアルゴリズムを使用して決定規則を構築し、及び/又は決定規則の適用の速度及び効率を上昇させ

、並びに研究者バイアスを回避してもよいが、当業者であれば、本発明の方法を実施するためにコンピュータに基づいたアルゴリズムが必要とされないことを認識するであろう。

【0195】

バイオマーカープロファイルを作製するために使用された方法に係わらず、決定規則を使用してバイオマーカープロファイルを評価することができる。例えば、バイオマーカープロファイルを評価するために使用することができる適切な決定規則は、Harperの論文、「重合体解析における熱分解及びGC (Pyrolysis and GC in Polymer Analysis)」Dekker、New York (1985) に論議されたように、ガスクロマトグラフィーを使用して作製された。更に、Wagnerらの論文、2002、Chem. 74:1824-1835は、静電的飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) によって得られるスペクトルに基づいて対象を分類する能力を改善する決定規則を開示する。加えて、Brightらの論文、2002、J. Microbiol. Methods 48:127-38 (その全体が引用により本明細書に組み込まれる) は、MALDI-TOF-MSスペクトルの解析により高い確実性 (79~89%の正確な分類率) で菌株間を区別する方法を開示する。Dalugeの論文、2000、Fresenius J Anal. Chem. 366:701-711 (その全体が引用により本明細書に組み込まれる) は、複雑な生体サンプルにおけるバイオマーカープロファイルを分類するためのMALDI-TOF-MS及び液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC/ESI-MS) の使用を論議している。

10

【0196】

(5.10.1決定木)

本発明において同定されたバイオマーカーの特徴値を使用して構築することができる決定規則の1つのタイプは、決定木である。本明細書において、「データ分析アルゴリズム」は、決定木を造ることができる任意の技術であるが、最終的な「決定木」は、決定規則である。決定木は、訓練集団及び特異的データ分析アルゴリズムを使用して構築される。決定木は、Dudaの文献、2001、「パターン分類 (Pattern Classification)」、John Wiley & Sons社、New York、pp. 395-396によって一般に記述されており、これは引用により本明細書に組み込まれる。系統樹に基づいた方法は、長方形のセット内に特徴空間を分配し、次いでそれぞれにモデルをフィットさせる (一定と同様)。

20

【0197】

訓練集団データは、訓練セット集団全体の発明のバイオマーカーのために、特徴 (例えば、発現値又はいくつかのその他の観察可能なもの) を含む。決定木を構築するために使用することができる1つの具体的アルゴリズムは、分類木及び回帰木 (CART) である。その他の具体的決定木アルゴリズムには、ID3、C4.5、MART及びランダムフォレストを含むが、限定されない。CART、ID3及びC4.5は、Dudaの文献、2001、「パターン分類 (Pattern Classification)」、John Wiley & Sons社、New York、pp. 396-408及びpp. 411-412に記述されており、これらは、引用により本明細書に組み込まれる。CART、MART及びC4.5は、Hastieらの文献、2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer-Verlag、New York、9章に記述されており、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。ランダムフォレストは、Breimanの文献、1999、「ランダムフォレスト-ランダムな特徴 (Random Forests-Random Features)」、Technical Report 567、Statistics Department、U.C.Berkeley、1999年9月に記述されており、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0198】

本発明の一部の実施態様において、本発明のバイオマーカーの組み合わせについての特徴を使用して対象を分類するために、決定木が使用される。決定木アルゴリズムは、教師あり学習アルゴリズムの分類に属する。決定木の目的は、現実の実施例データから分類子 (系統樹) を誘導することである。この系統樹を使用して、決定木を引き出すために使用されなかった未知の実施例を分類することができる。従って、決定木は、訓練データに由来する。例示的な訓練データには、複数の対象 (訓練集団) についてのデータを含む。各それぞれの対象について、それぞれの対象の分類 (例えば、敗血症/SIRS) である複数の特徴がある。本発明の一つの実施態様において、訓練データは、訓練集団全体のバイオマ

50

ーカーの組み合わせについての発現データである。

【0199】

以下のアルゴリズムにより、例示的な決定木導出を記述する：

ルートノード作成

全ての例が同じクラス値を有する場合、該ルートにこのラベルと与える

他には、特徴が空のラベルである場合、該ルートは最も共通の値に従う

他には、以下を始める

各特徴について情報ゲインを計算する

最も高い情報ゲインを有する特徴Aを選択し、該ルート特徴を作成する

この特徴のそれぞれの可能な値vについて

A = vに相当する該ルート下に新しい枝分かれを加える

例(v)をA = vを有するこれらの例とする

例(v)が空の場合、新しい枝分かれに、例の間で最も共通の値を有するリーフノードを作成する

他には、新しい枝分かれを下記により作成された木とする

木(例(v), クラス, 特徴 - {A})

終了

【0200】

情報ゲインの算出のより詳細な説明を以下において示してある。例のうちの可能な分類 v_i が確率 $P(v_i)$ を有する場合、実際の答えの情報内容Iは、以下によって与えられる：

【数1】

$$I(P(v_1), \dots, P(v_n)) = \sum_{i=1}^n -P(v_i) \log_2 P(v_i)$$

I-値は、使用した特異的データセットについての分類結果を記述することができるために、本発明者らがどれくらいの情報を必要とするかを示す。データセットがpポジティブ（例えば、敗血症を発病するであろう）及びnネガティブ（例えば、敗血症を発病しないであろう）例（例えば、対象）を含むと仮定すると、正解に含まれる情報は、以下のとおりである：

【数2】

$$I\left(\frac{p}{p+n}, \frac{n}{p+n}\right) = -\frac{p}{p+n} \log_2 \frac{p}{p+n} - \frac{n}{p+n} \log_2 \frac{n}{p+n}$$

式中、 \log_2 は、底2を使用する対数である。単一の特徴を試験することにより、正確な分類を作製するために必要な情報の量を減少させることができる。特定の特徴A（例えば、特異的なバイオマーカーを表す）についての剰余は、必要とされる情報をいかに減少させることができるかを示す。

【数3】

$$\text{Remainder}(A) = \sum_{i=1}^v \frac{p_i + n_i}{p+n} I\left(\frac{p_i}{p_i + n_i}, \frac{n_i}{p_i - n_i}\right)$$

「v」は、特定のデータセットにおける特徴Aについての独特の性状値の数であり、「i」は、特定の性状値であり、「 p_i 」は、分類がポジティブ（例えば、血症を発病するであろう）である特徴Aについての例の数であり、「 n_i 」は、分類がネガティブ（例えば、血

10

20

30

40

50

症を発病しないであろう)である特徴Aについての例の数である。特定の特徴Aの情報ゲインは、分類についての情報内容と特徴Aの剰余との間の相違として算出される：

【数4】

$$Gain(A) = I\left(\frac{p}{p+n}, \frac{n}{p-n}\right) - Remainder(A)$$

【0201】

情報ゲインは、異なる特徴が分類にとってどれほど重要か(これらが、例をどれほど十分に分割するか)及び最も高い情報をもつ特徴を評価するために使用される。

10

一般に、多数の異なる決定木アルゴリズムがあり、これらの多くが、Dudaの論文、Pattern Classification, 第2版, 2001, John Wiley & Sons社に記述されている。決定木アルゴリズムには、特徴プロセッシング、不純物測定、枝切りの基準及び剪定が必要であることが多い。特定の決定木アルゴリズムには、切断は分類木及び回帰木(CART)、多変量の決定木ID3及びC4.5を含むが、限定されない。

【0202】

一つのアプローチにおいて、決定木が使用されるときに、訓練集団全体の発明に記述した遺伝子の組み合わせを選択するための遺伝子発現データは、平均値0及び単位分散を有するように標準化される。訓練集団のメンバーは、訓練セット及び試験セットにランダムに分けられる。例えば、一つの実施態様において、訓練集団のメンバーの2/3は、訓練セットに配置され、訓練集団のメンバーの1/3は、試験セットに配置される。決定木を構築するために、本発明において記述したバイオマーカーの選択した組み合わせについての発現値を使用する。次いで、決定木が試験セットにおけるメンバーを正しく分類する能力を決定する。一部の実施態様において、この計算は、バイオマーカーの所与の組み合わせに対して数回行われる。計算のそれぞれの繰り返しの際に、訓練集団のメンバーを訓練セット及び試験セットに無作為割付けする。次いでバイオマーカーの組み合わせの品質が、それぞれのこのような決定木計算の繰り返しの平均として得られる。

20

【0203】

それぞれの分割が本発明のバイオマーカーのセットの中の、対応するバイオマーカーについての特徴値又は2つのこのようなバイオマーカーの相対的特徴値に基づく一変量決定木に加えて、多変量決定木を決定規則として実行することができる。このような多変量決定木において、決定のいくらか又は全ては、実際に本発明の複数のバイオマーカーについての特徴値の一次結合を含む。このような一次結合は、分類上でグラジエントデセント (gradient descent) などの公知の技術を使用して、又は和-平方-エラー基準 (sum-square d-error criterion) を使用して訓練することができる。このような決定木を例証するために、方程式：

30

$$0.04 x_1 + 0.16 x_2 < 500,$$

を考える。ここで、 x_1 及び x_2 は、本発明のバイオマーカーの中から2つの異なるバイオマーカーについての2つの異なる特徴をいう。決定規則を得るためには、特徴 x_1 及び x_2 の値を分類されていない対象から得られる測定値から得る。次いで、これらの値を方程式に挿入する。500未満の値が計算される場合、決定木の第1の枝分れが採用される。さもなければ、決定木の第2の枝分れが採用される。多変量決定木は、Dudaの文献、2001年、「パターン分類 (Pattern Classification)」、John Wiley & Sons社、New York, pp. 408-409に記述されており、これは引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0204】

本発明に使用することができる別のアプローチは、多変量適応回帰スプライン (MARS) である。MARSは、回帰のための適応手順であり、本発明によって対処される高次元問題のために非常に適している。MARSは、段階的直線回帰の一般化又は回帰設定におけるCARTの性能を改善するためのCART法の改変として見ることができる。MARSは、Hastieらの文献、

50

2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer-Verlag, New York, pp. 283-295に記述されており、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0205】

(5.10.2. マイクロアレイの予測的解析 (PAM))

本発明のバイオマーカーの特徴値を使用する決定規則を開発するための1つのアプローチは、最近隣重心分類子である。このような技術では、それぞれの分類 (敗血症及びSIRS) について、分類におけるバイオマーカーの平均特徴レベルによって与えられる重心を計算し、次いで新たなサンプルを重心が最も近い分類に割り当てる。このアプローチは、クラスターが公知の分類によって置換されること以外、k平均クラスタリングと同様である。このアルゴリズムは、多数のバイオマーカーが使用されるときに、ノイズに感受性であり得る。本技術に対する1つの強化では、収縮を使用する：それぞれのバイオマーカーについて、それらが偶然による可能性があるときみなされる場合、分類重心間の相違をゼロに設定する。このアプローチは、マイクロアレイの予測解析又はPAMで実行される。例えば、Tibshiraniらの論文、2002、Proceedings of the National Academy of Science USA 99; 6567-6572を参照され、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。収縮は、相違がノイズであるとみなされた閾値以下によって制御される。ノイズレベルを上回る相違を示さないバイオマーカーは、除かれる。閾値は、クロスバリデーションによって選択することができる。閾値が減少するにつれて、より多くのバイオマーカーが含まれ、見積もられる分類エラーは、それらが底に到達してノイズバイオマーカーの結果として再び登り始める - 過剰フィッティングとして公知である現象まで減少する。

【0206】

(5.10.3. バギング法、ブースティング法及びランダム部分空間法)

バギング法、ブースティング法、ランダム部分空間法及び相加的系統樹 (additive tree) は、弱い決定規則を改善するために使用することができる技術の組み合わせとして知られるデータ分析アルゴリズムである。これらの技術は、上の第1.1節に記述した決定木などの、決定木のためにデザインされ、また通常適用される。加えて、このような技術は、線形識別分析などのデータ分析アルゴリズムのその他のタイプを使用して開発された決定規則にも有用であり得る。

【0207】

バギング法では、訓練セットを標本抽出し、ランダムな独立したブートストラップ複製を生成して、これらのそれぞれに対して決定規則を構築して、最終決定規則において単純多数投票によってこれらを統合する。例えば、Breimanの論文、1996、Machine Learning 24, 123-140; 及びEfron & Tibshiraniの論文、An Introduction to Bootstrap, Chapman & Hall, New York, 1993を参照されたい。これらは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0208】

ブースティング法では、決定規則を、以前の分類結果に依存的な訓練セットの加重バージョンに対して構築する。最初に、考慮中の全ての特徴が同じ加重を有し、第1の決定規則が、このデータセットに対して構築される。次いで、決定規則の性能に従って、加重を変更する。誤って分類された特徴は、より大きな加重を得て、次の決定規則は、再度加重された訓練セットにブーストされる。このようにして、訓練セット及び決定規則の列を得て、次いでこれを最終決定規則において単純多数投票によって、又は加重多数投票によって組み合わせる。例えば、Freund & Schapireの論文、「新規ブースティングアルゴリズムでの実験」 ("Experiments with a new boosting algorithm,")」 Proceedings 13th International Conference on Machine Learning, 1996, 148-156を参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0209】

ブースティング法を例証するために、研究中の集団によって示される2つの表現型群の表現型1 (例えば、定義された期間の間に敗血症を得る) 及び表現型2 (例えば、定義され

た期間内に敗血症を得ることを意味するSIRSのみ)がある場合を考える。訓練セットデータからの予測子バイオマーカーのベクトル(このようなバイオマーカーを示す特徴のベクトル)を想定すると、決定規則 $G(x)$ は、2つの値セット: {表現型1、表現型2}の一方のタイプの値をとる予測を生じる。訓練サンプルでのエラー率は、
【数5】

$$\overline{\text{err}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(y_i \neq G(x_i))$$

10

であり、式中 N は、訓練セットにおける対象の数(表現型1又は表現型2を有する対象の総計)である。例えば、敗血症を得る49の生物体及びSIRS状態のままである72の生物体がある場合、 N は、121である。弱い決定規則は、そのエラー率がランダム推測よりもわずかにだけ優れているものである。ブースティングアルゴリズムにおいて、弱い決定規則は、データの修正バージョンに繰り返し適用されることにより、弱い決定規則 $G_m(x)$ 、 $m=1, 2, \dots, M$ の列を生じる。次いで、この列の決定規則の全てからの予測を、加重多数投票によって組み合わせて、最終的予測を生成する:
【数6】

$$G(x) = \text{sign} \left(\sum_{m=1}^M \alpha_m G_m(x) \right)$$

20

ここで、 $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_M$ は、ブースティングアルゴリズムによって計算され、これらの目的は、それぞれの決定規則 $G_m(x)$ のそれぞれの貢献を加重することである。これらの効果は、列においてより正確な決定規則に対してより多大な影響を与えることである。

【0210】

それぞれのブースティング工程でのデータ修飾は、加重 w_1, w_2, \dots, w_n を訓練観察(x_i, y_i)、 $i=1, 2, \dots, N$ のそれぞれに対して適用することからなる。最初に、全ての加重を $w_i=1/N$ にセットし、その結果、第1の工程では、単に通常の様式でデータに対して決定規則を訓練するだけである。それぞれの連続した繰り返し $m=2, 3, \dots, M$ について、観察加重を個々に修正して、決定規則を加重観察に対して再度適用する。工程 m では、以前の工程にて誘導された決定規則 $G_{m-1}(x)$ によって誤分類されたこれらの観察は、これらの加重が増大されるが、正しく分類されていたものについては、加重が減少される。従って、繰り返しが進むにつれて、正しく分類するのが困難な観察ほど、絶えず増大の影響を受ける。これにより、それぞれの連続した決定規則が、列における以前のものによって誤ってしまったこれらの訓練観察へと集中させられる。

30

【0211】

例示的なブースティングアルゴリズムは、以下のとおりに要約される:

1. 観察加重 $w_i=1/N$ 、 $i=1, 2, \dots, N$ を初期化する
2. $m=1 \sim M$ について:
 - (a) 分類子 $G_m(x)$ を加重 w_i を用いて訓練セットにフィットさせる
 - (b) 下記を計算する

40

【数7】

$$\text{err}_m = \frac{\sum_{i=1}^N w_i I(y_i \neq G_m(x_i))}{\sum_{i=1}^N w_i}$$

50

(c) $w_m = \log((1 - \text{err}_m) / \text{err}_m)$ を計算する

(d)

【数 8】

$$\text{Set } w_i \leftarrow w_i \cdot \exp[\alpha_m \cdot I(y_i \neq G_m(x_i))], i = 1, 2, \dots, N.$$

3. 出力

【数 9】

$$G(x) = \text{sign} \left[\sum_{m=1}^M \alpha_m G_m(x) \right]$$

10

【0 2 1 2】

このアルゴリズムに従った一つの実施態様において、それぞれの目的は、実際に因子である。更に、本アルゴリズムにおいて、現在の決定規則 $G_m(x)$ は、第2a行にて加重観察に対して誘導される。生じる加重エラー率は、第2b行にて計算される。第2c行では、最終決定規則 $G(x)$ を生成する際に $G_m(x)$ に与えられる加重 w_m を算出する（第3行）。各々の観察の個々の加重を、第2d行にて次の繰り返しのために更新する。 $G_m(x)$ によって誤分類された観察は、因子 $\exp(w_m)$ によってそれらの加重を定めて、列における次の決定規則 $G_{m+1}(x)$ を誘導するためのこれらの相対的影響を増大させる。一部の実施態様において、Freund及びSchapireの論文、1997, Journal of Computer and System Sciences 55, pp. 119-139の修飾、ブースティング法が使用される。例えば、Hastieらの文献、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer, New York, Chapter 10を参照され、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。例えば、一部の実施態様において、特徴予選択は、Parkらの論文、2002, Pac. Symp. Biocomput. 6, 52-63（これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）のノンパラメトリックな評価法などの技術を使用して行われる。特徴予選択は、分類間を最も識別する遺伝子を決定規則に使用するために選択する際の次元減少の形態である。次いで、Freund及びSchapireのブースティング法以外に、Friedmanらの論文、2000, Ann Stat 28, 337-407によって導入されたLogitBoost法を使用する。一部の実施態様において、Ben-Dorらの論文、2000, Journal of Computational Biology 7, 559-583（これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）のブースティング法及びその他の分類法が本発明に使用される。一部の実施態様において、Freund及びSchapireの論文、1997, Journal of Computer and System Science 55, 119-139（これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる）のブースティング法及びその他の分類法が本発明に使用される。

20

30

【0 2 1 3】

ランダム部分空間法では、決定規則は、データ特徴空間のランダムな部分空間に構築される。これらの決定規則は、通常最終決定規則において絶対多数投票によって組み合わせられる。例えば、Hoの論文、「決定フォレストを構築するためのランダム部分空間法 (The Random subspace method for constructing decision forests)」、IEEE Trans Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1998; 20(8): 832-844を参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0 2 1 4】

(5.10.4. 多重相加回帰木)

多重相加回帰木 (MART) は、本発明に使用することができる決定規則を構築する別の方法を表す。MARTのための一般的アルゴリズムは、以下のとおりである：

1. 初期化する

【数10】

$$f_0(x) = \arg \min_{\gamma} \sum_{i=1}^N L(y_i, \gamma).$$

2. 1~Mについて:

(a) $l = 1, 2, \dots, M$ について下記を計算する

【数11】

$$r_{lm} = - \left[\frac{\partial L(y_i, f_{l-1}(x_i))}{\partial f_{l-1}(x_i)} \right]_{f=f_{l-1}} \quad 10$$

(b) 回帰木を標的 r_{lm} にフィットさせ、最終領域 R_{jm} , $j = 1, 2, \dots, J_m$ を与える(c) $j=1, 2, \dots, J_m$ について下記を計算する

【数12】

$$\gamma_{jm} = \arg \min_{\gamma} \sum_{x_i \in R_{jm}} L(y_i, f_{m-1}(x_i) + \gamma). \quad 20$$

(d) 書き換える

【数13】

$$f_m(x) = f_{m-1}(x) + \sum_{j=1}^{J_m} \gamma_{jm} I(x \in R_{jm})$$

3. 出力

【数14】

$$\hat{f}(x) = f_M(x). \quad 30$$

【0215】

具体的アルゴリズムは、異なる喪失基準 $L(y, f(x))$ を挿入することによって得られる。アルゴリズムの最初の行は、ちょうど単一末端ノードの系統樹である最適な特定のモデルに初期化する。第2行(a)において、計算される負の勾配成分は、全般的な仮性残余 r と呼ばれる。一般に使用される喪失機能のための勾配は、Hastieらの文献、2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer-Verlag, New York, 321ページの表10.2に要してあり、これは、引用により本明細書に組み込まれる。分類のためのアルゴリズムは、同様であり、Hastieらの文献、10章に記述されており、これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。MART手順と関連する調整パラメータは、反復の数 M 及び構成系統樹 J_m , $m = 1, 2, \dots, M$ のそれぞれのサイズである。

【0216】

(5.10.5. 回帰により誘導した決定規則)

一部の実施態様において、対象を分類するために使用される決定規則は、回帰を使用して構築される。このような実施態様では、決定規則は、回帰分類子 (regression classifier)、好ましくはロジスティック回帰分類子として特徴づけることができる。このような回帰分類子には、分類子を構築するために使用した各々のバイオマーカーに対する係数 (例えば、このようなそれぞれのバイオマーカーのための特徴) を含む。このような実施態様において、回帰分類子のための係数は、例えば最大尤推定アプローチを使用して計算さ

50

れる。このような計算には、バイオマーカーのための特徴（例えば、RT-PCR、マイクロアレイデータ）が使用される。詳細な実施態様において、2つの形質サブグループのみからの分子マーカーデータが使用され（例えば、形質サブグループa：定義された時間に敗血症を得るであろう、及び形質サブグループb：定義された時間に敗血症を得ないであろう）、従属変数は、バイオマーカーデータが利用できる対象における特定の形質の非存在又は存在である。

【0217】

別の特定の実施態様において、訓練集団には、複数の形質サブグループ（例えば、3つ以上の形質サブグループ、4つ以上の特異的形質サブグループなど）を含む。これらの複数の形質サブグループは、訓練集団における健康からSIRSへの、敗血症への、敗血症のより進行した段階への表現型の進行における別々の段階に対応し得る。この特定の実施態様において、多カテゴリー反応を扱うロジスティック回帰モデルの一般化を使用して、訓練集団において見いだされる種々の形質サブグループを区別する決定を開発することができる。例えば、訓練集団において表される任意の複数の形質サブグループの間を識別することができる決定規則を開発するために、選択された分子マーカーについて測定されたデータを、Agrestiの文献、「分類上のデータ分析への導入（An Introduction to Categorical Data Analysis）」、1996、John Wiley & Sons社、New York、8章（本明細書により、その全体が引用により組み込まれる）に記述された任意の多カテゴリーロジットモデル適用することができる。

【0218】

（5.10.6. ニューラルネットワーク）

一部の実施態様において、本発明の選択されたバイオマーカーのために測定される特徴データ（例えば、RT-PCRデータ、質量分析データ、マイクロアレイデータ）は、ニューラルネットワークを訓練するために使用することができる。ニューラルネットワークは、二段階回帰又は分類決定規則である。ニューラルネットワークは、出力ユニットの層に対して加重の層によって接続された入力ユニット（及びバイアス）の層を含む階層構造を有する。回帰のためには、出力ユニットの層は、典型的には出力ユニットを一つだけ含む。しかし、ニューラルネットワークは、継ぎ目のない様式で複数の定量的反応を扱うことができる。

【0219】

多層ニューラルネットワークには、入力ユニット（入力層）、隠れユニット（隠れ層）及び出力ユニット（出力層）がある。更に、単一バイアスユニットがあり、これは、入力ユニット以外のそれぞれのユニットに接続されている。ニューラルネットワークは、Dudaらの論文、2001、「パターン分類（Pattern Classification）」、第2版、John Wiley & Sons社、New York；及びHastieらの文献、2001、「統計学習の原理（The Elements of Statistical Learning）」、Springer-Verlag、New Yorkに記述されており、そのそれぞれは、引用により本明細書に組み込まれる。また、ニューラルネットワークは、Draghiciの文献、2003、「DNAマイクロアレイのためのデータ分析ツール（Data Analysis Tools for DNA Microarrays）」、Chapman & Hall/CRC；及びMountの論文、2001、「バイオインフォマティクス：配列及びゲノム解析（Bioinformatics: sequence and genome analysis）」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New Yorkにも記述されており、そのそれぞれは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。下記に開示したものは、ニューラルネットワークのいくつかの例示的形態である。

【0220】

ニューラルネットワークの使用の基本的アプローチは、未訓練ネットワーク（untrained network）で開始し、該ネットワークを通して入力層及びパッセージに訓練パターンを提供し、かつ出力層で出力を決定することである。次に、これらの出力を標的値と比較する；幾らかの差は誤差に相当する。この誤差又は基準関数は、加重の幾つかのスカラ関数であり、かつネットワーク出力が所望の出力と一致する場合、最小化される。従って、加重は、この誤差の尺度を減少するように調整される。回帰にとって、この誤差は、二

10

20

30

40

50

乗和誤差であり得る。分類にとって、この誤差は、二乗誤差、又はクロスエントロピー(偏差)のいずれかであり得る。例えば、Hastieらの文献、2001、「統計学習の原理(The Elements of Statistical Learning)」, Springer-Verlag, New Yorkを参照されたい。これは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0221】

3つの一般に使用される訓練プロトコルは、確率的、バッチ及びオンラインである。確率的訓練では、パターンをランダムに訓練セットから選択し、それぞれのパターン提示のためにネットワーク加重を更新する。確率的逆伝播などの勾配下降法によって訓練された多層非線形ネットワークは、ネットワーク形態によって定義されるモデルにおける加重値の最尤推定を行う。バッチ訓練では、学習が行われる前に、全てのパターンをネットワークに提示する。典型的には、バッチ訓練では、いくつかのパスを、訓練データを介して作製する。オンライン訓練では、それぞれのパターンを一回及び一度だけネットに提示する。

10

【0222】

一部の実施態様において、加重のための出発値についての考慮がなされる。加重がゼロに近い場合、ニューラルネットワークの隠れ層に一般に使用されるS字形の有効部分(例えば、Hastieらの文献、2001、「統計学習の原理(The Elements of Statistical Learning)」, Springer-Verlag, New York)を参照されたい。これは、引用により本明細書に組み込まれる)は、おおまかに線形であり、それ故、ニューラルネットワークは、ほぼ線形の分類子にすぎされる。一部の実施態様において、加重のための出発値は、ゼロの近くのランダムな値であるように選ばれる。それ故、本分類子は、ほとんど線形のものから始まり、加重が増大するにつれて非線形になる。必要な場合、個々のユニットに方向を配置して、非線形性を導入する。正確なゼロ加重の使用により、ゼロ導関数及び完全対称性を導き、アルゴリズムは決して移動しない。或いは、大きな加重で始めると、解が不十分となることが多い。

20

【0223】

入力のスケールリングにより、最下層の加重の有効なスケールリングを決定するので、これは、最終解の品質に対して多大な影響を有し得る。したがって、一部の実施態様において、初めに、全ての発現値は、平均ゼロ及び標準偏差1を有するように標準化される。これにより、全ての入力が正規化過程において同程度に確実に処理されて、ランダムに開始する加重にとって意味がある範囲を選択することができる。標準化入力では、範囲[-0.7, +0.7]にわたってランダムな一様な加重をすることが典型的である。

30

【0224】

3層ネットワークの使用における回帰問題は、ネットワークに使用する隠れユニットの最適な数である。ネットワークの入力及び出力の数は、解決される問題によって決定される。本発明において、所与のニューラルネットワークのための入力数は、訓練集団から選択されたバイオマーカーの数と同じであろう。ニューラルネットワークのための出力数は、典型的には、たったの1つであろう。しかし、一部の実施態様において、2つ以上の状態をネットワークによって定義することができるように複数の出力が使用される。例えば、多重出力ニューラルネットワークを使用して健康な表現型、SIRSの種々の段階及び/または敗血症の種々の段階の間を識別することができる。あまりに多くの隠れユニットがニューラルネットワークに使用される場合、ネットワークは、また、自由度が大きすぎ、訓練が長くなりすぎるであろうし、ネットワークが、データに過剰に適合するおそれがある。あまりに少ない隠れユニットである場合、訓練セットは、学習することができない。しかし、一般的に言って、少なすぎるよりも、多すぎる隠れユニットを有する方が優れている。あまり少ない隠れユニットでは、分類子は、データの非線形性を獲得するほど十分な柔軟性を有しないかもしれないし;多すぎる隠れユニットでは、後述するように、適切な正規化又は枝刈りが使用される場合に、余分の加重がゼロの方へ縮小し得る。典型的な実施態様において、隠れユニットの数は、5~100の範囲でどれかであり、数は、入力数及び訓練事例の数とともに増大する。

40

50

【 0 2 2 5 】

使用する隠れユニットの数を決定するための一般的アプローチは、正則化アプローチを適用することである。正則化アプローチでは、新たな基準関数が、古典的訓練エラーだけでなく、分類子の複雑さにも依存して構築される。具体的には、新たな基準関数には、きわめて複雑なモデルを適用し；この基準における最小を検索するには、訓練セットに対するエラーを、訓練セットにプラスして解の制約又は望ましい特性を表す正則化期間に対するエラーと釣り合わせる： $J = J_{pat} + J_{reg}$ 。パラメータ λ は、いくらか強めに正則化を課すように調整される。言い換えると、 λ がより大きな値だと、ゼロの方へ加重を縮小する傾向があり；典型的には、 λ を見積もるためにバリデーションセットによるクロスバリデーションを使用した。このバリデーションセットは、訓練集団のランダムなサブセットを蓄積することによって得ることができる。また、その他の形態のペナルティー、例えば加重除去ペナルティーが提供されている（例えば、Hastieらの文献、2001、「統計学習の原理（The Elements of Statistical Learning）」、Springer-Verlag, New York）を参照されたい。これは、引用により本明細書に組み込まれる）。

10

【 0 2 2 6 】

使用する隠れユニットの数を決定するための別のアプローチは、最小限必要な除去-枝切り-加重をすることである。あるアプローチにおいて、最も小量での加重が除去される（ゼロにセット）。このような量に基づいた枝切りは、機能することができるものの、最適ではなく；時には、小量での加重も、学習及び訓練データにとって重要である。一部の実施態様において、量に基づいた枝切りアプローチを使用する以外に、Wald統計量が計算される。Wald統計量の基本的なアイデアは、分類子における隠れユニット（加重）の重要性を見積もるためにこれらを使用することができることである。次いで、重要性が最少である隠れユニットを（これらの入出力加重をゼロにセットすることにより）除去する。これに関連した2つのアルゴリズムは、訓練エラーがどれほど加重に依存するかについて予測するために二次近似値を使用し、及び訓練エラーの増大を最も小さくさせる加重を除去するOptimal Brain Damage (OBD) 及びOptimal Brain Surgeon (OBS) アルゴリズムである。

20

【 0 2 2 7 】

Optimal Brain Damage及びOptimal Brain Surgeonは、加重wにて極小エラーに対してネットワークを訓練し、次いで訓練エラーの増大が最も小さくなる加重を枝切りするという同じ基本的アプローチを共有する。完全加重ベクトル w の変化についての予測される関数のエラーの増大は、以下のとおりである：

30

【 数 1 5 】

$$\Delta \mathcal{E} = \left(\frac{\partial J}{\partial w_i} \right)^T \cdot \delta w_i + \frac{1}{2} \delta w_i^T \cdot \frac{\partial^2 J}{\partial w_i^2} \cdot \delta w_i + O(\|\delta w_i\|^3)$$

式中、

【 数 1 6 】

40

$$\frac{\partial^2 J}{\partial w_i^2}$$

は、ヘッセ行列である。本発明者らは、エラーの局所極小にあるので、第1項を消去する；第3項及びより高次の項は、無視してある。1つの加重を除去する制約を与えたこの関数を最小化するための一般解は、以下のとおりである：

【数 17】

$$\Delta w = - \frac{w_q}{\left[\mathbf{H}^{-1} \right]_{qq}} \mathbf{H}^{-1} \cdot w_q \quad \text{及び} \quad L_q = \frac{1}{2} - \frac{w_q^2}{\left[\mathbf{H}^{-1} \right]_{qq}}$$

ここで、 w_q は、加重空間において q 番目の方向に沿った単位ベクトルであり、 L_q は、加重 q （-加重 q が枝切りされ、その他の加重が w を更新する場合の訓練エラーの増大）の顕著度(saliency)に対する近似である。これらの方程式は、 H の逆数を必要とする。この逆行列を算出するための1つの方法は、小さな値である

10

【数 18】

$$H_0^{-1} = \alpha^{-1} \mathbf{I},$$

で開始することであり、式中、 α は、小さなパラメーター、効率的には加重定数である。次に、行列を、

【数 19】

$$H_{m+1}^{-1} = H_m^{-1} - \frac{H_m^{-1} X_{m+1} X_{m+1}^T H_m^{-1}}{\frac{1}{\alpha_{m+1}} + X_{m+1}^T H_m^{-1} X_{m+1}} \quad \text{式 1}$$

20

に従ってそれぞれのパターンで更新し、式中、添字は、提示されるパターンに対応し、 m は m と共に減少する。完全な訓練セットが提示された後、ヘッセ行列の逆行列が $H^{-1} = H_n^{-1}$ によって与えられる。アルゴリズムの形態では、Optimal Brain Surgeon法は、以下のとおりである：

$n_H, w,$ を初期化する

合理的に大きいネットワークを誤差が最小になるように訓練する

式1により H_{m+1}^{-1} を $J(w) >$ になるまで計算する

30

【数 20】

$$q^* \leftarrow \arg \min_q w_q^2 / (2 \left[H^{-1} \right]_{qq}) \quad (\text{顕著度 } L_q)$$

$$w \leftarrow w - \frac{w_{q^*}}{\left[H^{-1} \right]_{q^* q^*}} H^{-1} e_{q^*}, \quad (\text{顕著度 } L_q)$$

40

w を返す

終了

第3行目のヘッセ行列の逆行列の算出は、特に対角行列にとって単純であるので、Optimal Brain Damage法は、計算的により単純である。上記のアルゴリズムは、エラーが ϵ であるように初期化された基準よりも大きい時は、終了する。別のアプローチは、加重の除去のために $J(w)$ の変化がいくつかの基準値よりも大きいときに、第6行目を終了するように変更される。逆伝播ニューラルネットワーク（例えば、Abdiの論文、1994、「ニューラルネットワークプライマー(A neural network primer)」, J. Biol System. 2, 247-283を参照されたい。その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

50

【 0 2 2 8 】

(5.10.7. クラスタリング)

一部の実施態様において、本発明のバイオマーカーを選択するための特徴は、訓練セットをクラスタリングするために使用される。例えば、本発明に記述した10個の特徴（10個のバイオマーカーに相当する）が使用される場合を考える。訓練集団のそれぞれのメンバー m は、10個のバイオマーカー各々についての特徴値（例えば、発現値）を有するであろう。訓練集団のメンバー m からのこのような値がベクトルを定義し：

【 数 2 1 】

$$X_{1m} X_{2m} X_{3m} X_{4m} X_{5m} X_{6m} X_{7m} X_{8m} X_{9m} X_{10m}$$

式中、 X_{im} は、生物体 m における i 番目のバイオマーカーの発現レベルである。訓練セットにおける m 個の生物体がある場合、 i 個のバイオマーカーの選択が、 m ベクトルを定義するであろう。本発明の方法は、全ての単一ベクトル m において表されるベクトルに使用される全ての単一バイオマーカーのそれぞれの発現値が必要ではないことに留意されたい。言い換えると、 i 番目のバイオマーカーの1つが見いだされない対象からのデータは、なおもクラスタリングのために使用することができる。このような場合には、失われた発現値には、「ゼロ」又はいくつかのその他の規準化された値が割り当てられる。一部の実施態様において、クラスタリングの前に、特徴値がゼロ及び単位エラーの平均値を有するように規準化される。訓練群全体で同様の発現パターンを示すこれらの訓練集団のメンバーは、共にクラスタリングする傾向がある。本発明の遺伝子の特定の組み合わせは、ベクトルが訓練集団で見いだされる形質群にクラスタリングされるときに、本発明の本態様の優れた分類子であるとみなされる。例えば、訓練集団がクラス a ：敗血症を発病しない対象及びクラス b ：敗血症を発病する対象を含む場合、理想的なクラスタリング分類子は、集団を2群にクラスタリングし、一方のクラスター群は、クラス a を一義的に表し、他方のクラスター群は、クラス b を一義的に表すであろう。

【 0 2 2 9 】

クラスタリングは、Duda及びHartの論文、「パターン分類及び場面解析 (Pattern Classification and Scene Analysis)」、第2版、2001、John Wiley & Sons社、New Yorkのページ211-256（その全体が引用により本明細書に組み込まれる）（以下に「Duda, 1973」）で記述されている。Duda, 1973の第6.7節に記載されているように、クラスタリング問題は、データセットにおいて自然なグループ化の知見の1つとして記述される。自然なグループ化を同定するためには、2つの問題に対処する。第1に、2つのサンプル間の類似性（又は相違点）を測定するための方法が決定される。この測定規準（類似性の程度）は、一方のクラスターのサンプルが、これらがその他のクラスターのサンプルに対するよりも互いに類似することを確認するために使用される。第2に、類似性の程度を使用してデータをクラスターに分配するための機構が決定される。

【 0 2 3 0 】

類似性計測は、Duda, 1973の第6.7節において論議されており、そこには、クラスタリング研究を開始するための1つの方法は、距離関数を定義し、データセットにおけるサンプルの全ての対の間の距離の行列を計算することであると述べられている。距離が優れた類似性の測定値である場合、同じクラスターのサンプル間の距離は、異なるクラスターのサンプル間の距離よりも著しく少なくなる。しかし、Duda, 1973の215ページに述べられているように、クラスタリングには、距離の計量を使用する必要はない。例えば、2つのベクトル x 及び x' を比較するために、非計測類似関数 (nonmetric similarity function) $s(x, x')$ を使用することができる。従来法では、 $s(x, x')$ は対称式であり、 x 及び x' が何とか「類似する」ときに、その値が大きい。非計測類似関数 $s(x, x')$ の例は、Duda, 1973の216ページに提供されている。

【 0 2 3 1 】

一旦データセットの位置間の「類似性」又は「相違点」を測定するための方法が選択されると、クラスタリングには、データの任意の分割のクラスタリング品質を測定する基準関数が必要である。データをクラスタリングするために、基準関数を極値(extremize)にするデータセットの分割を使用する。Duda,1973の217ページを参照されたい。基準関数は、Duda,1973の第6.8節において論議されている。

【0232】

より最近では、Dudaらの論文、「パターン分類 (Pattern Classification)」、第2版、John Wiley & Sons社、New Yorkが発行されている。537~563ページには、クラスタリングが詳細に記述されている。クラスタリング技術についての詳細な情報は、Kaufman及びRousseeuwの論文、1990年、「データのグループの発見：クラスター解析への導入 (Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis)」、Wiley, New York, NY; Everittの論文、1993年、「クラスター解析 (Cluster analysis)」（第3版）、Wiley, New York, NY; 及びBackerの論文、1995年、「クラスター解析のコンピューター支援推論 (Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis)」、Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jerseyに見いだすことができる。本発明に使用することができる特定の例示的クラスタリング技術としては、階層的クラスタリング (最近隣アルゴリズムを使用する集塊性クラスタリング、最遠隣アルゴリズム、平均連結アルゴリズム、重心アルゴリズム又は2乗和アルゴリズム)、k平均クラスタリング、ファジーk平均クラスタリングアルゴリズム及びJarvis-Patrickクラスタリングを含むが、限定されるわけではない。

【0233】

(5.10.8. 主成分分析法)

主成分分析法 (PCA) は、遺伝子発現データを分析するために提唱された。より一般的には、PCAを使用して、コンバーターと非コンバーターを識別する決定規則を構築するために、本発明のバイオマーカーの特徴値データを分析することができる。主成分分析法は、データをデータの特色を要約する新たな変数 (主成分) のセットに変換することによって、データセットの次元を減少させる古典的技術である。例えば、Jolliffeの論文、1986年、「主成分分析 (Principal Component Analysis)」、Springer, New Yorkを参照されたい。これは、引用により本明細書に組み込まれる。また、主成分分析法は、Draghiciの論文、2003、「DNAマイクロアレイのためのデータ分析ツール (Data Analysis Tools for DNA Microarrays)」、Chapman & Hall/CRCに記述されており、これは引用により本明細書に組み込まれる。以下のことは、主成分分析の非限定的な例である。

【0234】

主成分 (PC) は、相関がなく、k番目のPCが、PCの中でk番目に大きな分散を有するように順序づけられる。k番目のPCは、それが最初のk-1番目のPCに直交するように、データポイントの射影の分散を最大にする方向として解釈することができる。最初のいくつかのPCは、データセットの大部分の分散を捕獲する。対照的に、最後のいくつかのPCは、たいていデータに残留する「ノイズ」のみを捕獲すると想定されることが多い。

【0235】

また、PCAは、本発明の決定規則を作製するために使用することもできる。このようなアプローチにおいて、本発明の選択バイオマーカーについてのベクトルは、上記のクラスタリングのために記述したのと同様に構築することができる。実際に、ベクトルのセットは、それぞれのベクトルが訓練集団の特定のメンバーからの選択遺伝子についての特徴値 (例えば、存在量の値) を表す場合に、行列とみなすことができる。一部の実施態様において、この行列は、単量体の定性的な二進法記述のFree-Wilson法で表され (Kubinyi, 1990, ドラッグデザイン法及び応用 (drug design theory methods and applications) 3D QSAR, Pergamon Press, Oxford, pp 589-638)、PCAを使用して最大圧縮空間に分散させ、その結果第1の主成分 (PC) が、可能性がある分散情報の最大量を収集し、第2の主成分 (PC) が、全ての分散情報の2番目に大きな量を収集し、行列の全ての分散情報を占めてしまうまで収集する。

【0236】

次いで、各々のベクトル（それぞれのベクトルが、訓練集団のメンバーを表す場合）をプロットする。多くの異なるプロットのタイプが可能である。一部の実施態様において、一次元プロットが作製される。この一次元プロットにおいて、訓練集団の各のメンバーのそれぞれからの第1の主成分についての値をプロットする。このプロットの形態では、期待値は、第1のサブグループのメンバー（例えば、定義された期間に敗血症を発病しない対象）が、第1の主成分値の1つの範囲にクラスタリングするであろうし、第2のサブグループのメンバー（例えば、定義された期間に敗血症を発病する対象）が、第1の主成分値の範囲の第2の範囲にクラスタリングする。

【0237】

一つの理想的な例において、訓練集団は、2つのサブグループ：「敗血症」及び「SIRS」を含む。第1の主成分は、全訓練集団データセット全体の本発明の選択バイオマーカーについての分子マーカー発現値を使用して計算される。次いで、訓練セットのそれぞれのメンバーは、第1の主成分のために値の関数としてプロットする。この理想的な例において、第1の主成分が陽性である訓練集団のメンバーは、「応答者」であり、第1の主成分が陰性である訓練集団のメンバーは、「敗血症である対象」である。

10

【0238】

一部の実施態様において、訓練集団のメンバーは、複数の主成分に対してプロットされる。例えば、一部の実施態様において、訓練集団のメンバーは、第一次元が第1の主成分であり、第二次元が第2の主成分である二次元プロットでプロットされる。このような二次元プロットでは、訓練集団に示されたそれぞれのサブグループのメンバーが別のグループにクラスタリングするであろうことが予想される。たとえば、二次元プロットの第一のクラスターのメンバーは、所与の期間において敗血症を発病する対象を表すであろうし、二次元プロットの第二のクラスターのメンバーは、所与の期間において敗血症を発病しない対象を表すであろう。

20

【0239】

(5.10.9. 最近傍分析 (Nearest neighbor analysis))

最近傍分析は、メモリに基づいており、フィットさせる分類子を必要としない。問い合わせ位置 x_0 を想定すると、 x_0 での距離が最も近い k 訓練位置 $x(r), r, \dots, k$ を同定し、次いで位置 x_0 を、 k 最近傍法を使用して分類する。結合は、ランダムに破壊することができる。一部の実施態様において、特徴空間におけるユークリッド距離を使用して、

30

【数22】

$$d_{(i)} = \|x_{(i)} - x_0\|.$$

として距離を決定する。

【0240】

典型的には、最近傍アルゴリズムを使用するときに、発現データを計算するために使用した線形識別式を平均ゼロ及び分散1を有するように標準化する。本発明において、訓練集団のメンバーは、訓練セットと試験セットとにランダムに分けられる。例えば、一つの実施態様において、訓練集団のメンバーの2/3は、訓練セットに配置され、訓練集団のメンバーの1/3は、試験セットに配置される。本発明のバイオマーカーの選択組み合わせは、試験セットのメンバーがプロットされている特徴空間を表す。次に、試験セットが試験セットのメンバーを正しく特徴づける能力を計算する。一部の実施態様において、最近傍計算は、本発明のバイオマーカーの所与の組み合わせに対して数回行われる。計算のそれぞれの繰り返しにおいて、訓練集団のメンバーを訓練セット及び試験セットに無作為割付けする。次いで、バイオマーカーの組み合わせの品質を、それぞれのこのような最近傍計算の繰り返しの平均として得る。

40

【0241】

50

最近傍規則は、等しくない事前分類 (unequal class priors)、差動的誤分類コスト及び特徴選択の問題を扱うように洗練させることができる。これらの洗練の多くは、いくつかの形態の近隣に対する加重投票を含む。最近傍分析の詳細については、Dudaの文献、2001年、「パターン分類 (Pattern Classification)」、第2版、John Wiley & Sons社；及びHastieの文献、2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer, New Yorkに記述されており、そのそれぞれは、引用により本明細書に組み込まれる。

【0242】

(5.10.10. 線形判別分析)

線形識別分析 (LDA) では、特定の目的特性に基づいて対象を2つのカテゴリ1つに分類することを試みる。言い換えると、LDAでは、実験で測定された目的性状が、目的の分類を予測するかどうかを検査する。LDAでは、典型的には連続独立変数及び二分カテゴリの従属変数を必要とする。本発明において、訓練集団のサブセット全体にわたる本発明のバイオマーカーの選択組み合わせについての特徴値は、必要な連続独立変数として役立つ。訓練集団のメンバーのそれぞれの形質サブグループ分類は、二分カテゴリの従属変数として役立つ。

10

【0243】

LDAでは、グループ化情報を使用することにより、群間分散及び群内分散の比を最大にする変数の一次結合を求める。暗に、LDAにより用いられる線形加重は、訓練セット全体の分子マーカーの発現が、どの程度2群 (例えば、定義された期間の間に敗血症を発病するグループaと定義された期間の間に敗血症を発病しないグループb) に分離けられか、及びこのような特徴値が、どの程度その他のバイオマーカーの特徴値と相関するかに依存する。一部の実施態様において、LDAは、本発明に記述したバイオマーカーの組み合わせにおけるKバイオマーカーによる訓練サンプルにおけるNメンバーのデータ行列に適用される。次いで、訓練集団のそれぞれのメンバーの線形識別式をプロットする。理想的には、第1のサブグループを表す訓練集団のメンバー (例えば、定義された期間に敗血症を発病する対象) は、線形識別値の範囲 (例えば、負) の1つにクラスタリングし、第2のサブグループを表す訓練集団のメンバー (例えば、定義された期間に敗血症を発病しないであろう対象) は、線形識別値の第2の範囲 (例えば、正) の1つにクラスタリングする。識別値のクラスター間の分離がより大きなときに、LDAは、より良好であるとみなされる。線形識別分析のより詳細については、Dudaの文献、2001年、「パターン分類 (Pattern Classification)」、第2版、John Wiley & Sons社；及びHastieの文献、2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer, New York；及びVenables & Ripleyの文献、1997年、「現代応用統計学s-plus (Modern Applied Statistics with s-plus)」、Springer, New Yorkに記述されており、そのそれぞれは、引用により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0244】

(5.10.11. 二次判別分析)

二次識別分析 (QDA) では、同じ入力パラメータを採用し、LDAと同じ結果が戻る。QDAは、結果を生成するために、一次方程式ではなく二次方程式を使用する。LDA及びQDAは、交換可能であり、いずれを使用するかは、分析をサポートするソフトウェアの好み及び/又は入手の問題である。ロジスティック回帰では、同じ入力パラメータを採用し、LDA及びQDAと同じ結果が戻る。

40

【0245】

(5.10.12. サポートベクトルマシン)

本発明の一部の実施態様において、本発明に記述した遺伝子の特徴値を使用して対象を分類するために、サポートベクトルマシン (SVM) が使用される。SVMは、学習アルゴリズムの比較的新しいタイプである。例えば、SVMの一般的な記述は、Cristianini及びShawe-Taylorの文献、2000年、「サポートベクトルマシンについての紹介 (An Introduction to Support Vector Machines)」、Cambridge University Press, Cambridge；Boserらの

50

文献、1992年、「最適マージン分類のための訓練アルゴリズム (A training algorithm for optimal margin classifiers)」、「第5回計算機学習理論についての年間ACMワークショップ(Proceedings of the 5th Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory)」、ACM Press, Pittsburgh, PA pp. 142-152; Vapnikの文献、1998年、「統計学学習理論 (Statistical Learning Theory)」、Wiley, New York; Dudaの文献、「パターン分類 (Pattern Classification, Second Edition)」、第2版、John Wiley & Sons社; Hastieの文献、2001年、「統計学習の原理 (The Elements of Statistical Learning)」、Springer, New York; 及びFureyらの論文、2000年、Bioinformatics 16, 906-914に見出すことができる。各々はその全体において本明細書に組み込まれる。分類のために使用されるときに、SVMは、二成分標識されたデータ訓練データの所与のセットを、最大にそれらから離れた超平面で分離する。線形分離が可能ではない場合については、SVMを「カーネル」と組み合わせて作用することができ、これにより、特徴空間に対する非線形マッピングが自動的に現実する。特徴空間においてSVMによって見いだされる超平面は、入力空間における非線形決定境界に対応する。

10

【0246】

一つのアプローチにおいて、SVMが使用されるときに、特徴データは、平均値0を有するように標準化され、単位分散及び訓練集団のメンバーをランダムに訓練セットと試験セットとに分ける。例えば、一つの実施態様において、訓練集団のメンバーの2/3は、訓練セットに配置され、訓練集団のメンバーの1/3は、試験セットに配置される。本発明で記述された遺伝子の組み合わせについての発現値を、SVMを訓練するために使用する。次いで、訓練したSVMが試験セットのメンバーを正しく分類する能力を決定する。一部の実施態様において、この計算は、分子マーカーの所与の組み合わせに対して数回行われる。計算のそれぞれの繰り返しの際に、訓練集団のメンバーを訓練セット及び試験セットに無作為割付けする。次いで、バイオマーカーの組み合わせの品質を、それぞれのこのようなSVM計算の繰り返しの平均として得る。

20

【0247】

(5.10.13. 進化的方法)

生物進化過程による影響を受けて、決定規則設計の進化的方法では、決定規則に対して確率論的検索を使用する。おおざっぱな概要において、このような方法では、本発明に記述したバイオマーカーの組み合わせから、いくつかの決定規則-集団-を作製する。それぞれの決定規則は、その他のものからいくぶん変化している。次に、決定規則を訓練集団全体の特徴データに記録する。生物進化との類似性に合わせて、生じる(スカラー)スコアは、時に適応度と呼ばれる。決定規則をこれらのスコア順に並べて、最高の決定規則を保持する(総決定規則集団の一部分)。また、生物学的用語法に合わせて、これは、適者生存とも呼ばれる。決定規則は、次世代の子供又は子孫において確率的に変化する。いくつかの子孫決定規則は、以前の世代のそれらの親よりも高いスコアを有するであろうし、いくつかは、より低いスコアを有するであろう。次いで、全体の過程をその後の世代に対して繰り返して：決定規則を記録し、最高のものを保持してランダムに変化させ、更にもう一世代などを得る。部分的には、ランキングのため、それぞれの世代は、平均して以前のものよりわずかに高いスコアを有する。世代における単一の最高の決定規則が、所望の基準値を上回るスコアを有するときは、本過程を停止する。進化的方法についての詳細な情報は、例えばDudaの論文、「パターン分類 (Pattern Classification, Second Edition)」、第2版、John Wiley & Sons社に見いだされる。

30

40

【0248】

(5.10.14. その他のデータ分析アルゴリズム)

上記のデータ分析アルゴリズムは、コンバーターを非コンバーターから識別するための決定規則を構築するために使用することができる方法のタイプの単なる例である。更に、上記の技術の組み合わせを使用することができる。決定木とブースティング法との組み合わせの使用などのいくつかの組み合わせを記述した。しかし、多くのその他の組み合わせも可能である。加えて、投射追跡 (Projection Pursuit) 及び加重投票 (Weighted Voting)

50

g) などの当該技術分野のその他の技術において、決定規則を構築に使用することができる。

【0249】

(5.11 全身性炎症状態の診断若しくは予後又はモニタリングのための装置)

また、本発明は、全身性炎症状態の診断、予後又はモニタリングのために有用な装置を提供する。本発明のいくつかの装置は、中央処理装置を有するコンピュータ及び中央処理装置に結合されたメモリを含む。メモリは、全身性炎症状態を発病するリスクがある試験対象の1つ以上のバイオマーカーの1つ以上の量が第1の設定値を満たすかどうかを評価することのための命令を貯蔵する。第1の設定値を満たすと、試験対象が全身性炎症状態を発病する可能性が高いと予測する。

図1は、上述した機能を支援する例示的なシステムを詳述する。本システムは、好ましくは以下を有するコンピュータシステム10である：

- ・中央処理装置22；
- ・ソフトウェア及びデータを記憶するための、メイン非揮発性記憶装置ユニット14、例えばハードディスク装置、記憶装置14はメモリコントローラ12によって制御される；
- ・非揮発性記憶装置ユニット14からロードしたプログラム及びデータを含む記憶システム制御プログラム、データ及びアプリケーションプログラムのためのシステムメモリ36、好ましくは高速ランダムアクセス・メモリ（RAM）；また、システムメモリ36は、読出し専用メモリ（ROM）を含んでいてもよい；
- ・1つ以上の入力装置（例えば、キーボード28）及びディスプレイ26又は出力装置を含むユーザインタフェース32；
- ・任意の有線又は無線通信ネットワーク34（例えば、インターネットなどの広域ネットワーク）に接続するためのネットワークインターフェイスカード20；
- ・上述したシステムのエレメントに相互接続するための内部バス30；及び
- ・上述したエレメントに電力を供給する電源24。

【0250】

コンピュータ10の操作は、主にオペレーティング・システム40によって制御され、これは中央処理装置22によって実行される。オペレーティング・システム40は、システムメモリ36に記憶させることができる。オペレーティング・システム40に加えて、典型的な実施システムメモリ36には、以下を含む：

- ・本発明によって使用される種々のファイル及びデータ構造へのアクセスを制御するためのファイルシステム42；
- 本発明に従った1つ以上の決定規則の構築に使用するための訓練データセット44；
- ・トレーニングデータを処理し、及び決定規則を構築するためのデータ分析アルゴリズムモジュール54；
- ・1つ以上の決定規則56；
- ・試験対象のバイオマーカープロフィールにおける複数の量が、第1の値セットを満たすかどうかを決定するためのバイオマーカープロフィール評価モジュール60；
- ・バイオマーカー64及びこのようなそれぞれのバイオマーカーについて、量66を含む試験対象バイオマーカープロフィール62；及び
- ・本発明の選択バイオマーカーのデータベース68。

【0251】

図1に図示したように、コンピュータ10は、ソフトウェアプログラムモジュール及びデータ構造を含む。コンピュータ10に記憶されたデータ構造には、訓練データセット44、決定規則56、試験対象バイオマーカープロフィール62及び/又はバイオマーカーデータベース68を含み得る。これらのデータ構造のそれぞれは、フラットASCII若しくはバイナリファイル、Excelスプレッドシート、リレーショナルデータベース（SQL）又はオンライン解析プロセッシング（OLAP）データベース（MDX及び/又はその変形型）を含むが、限定されないデータメモリシステムの任意の形態を含むことができる。いくつかの具体的実施態様において、このようなデータ構造は、それぞれ、階層構造を含む1つ以上のデータベース

10

20

30

40

50

の形態である（例えば、スタースキーマ）。一部の実施態様において、このようなデータ構造は、それぞれ、明確な階層を有さないデータベースの形態である（例えば、階層的に配置されていない次元表）。

【0252】

一部の実施態様において、記憶されたデータ構造又は単一のデータ構造のそれぞれがシステムにアクセス可能である。その他の実施態様において、このようなデータ構造は、同じコンピュータ10が全てのホストをつとめても、又はつとめなくてもよい複数のデータ構造（例えば、データベース、ファイル、アーカイブ）を実際に含む。例えば、一部の実施態様において、訓練データセット44は、コンピュータ10に、及び/又は広域ネットワーク34を渡ってコンピュータ10によってアドレス指定可能であるコンピュータ貯蔵されているに複数のExcelスプレッドシートを含む。別の例において、訓練データセット44は、コンピュータ10に記憶されているか、又は広域ネットワーク34を渡ってコンピュータ10によってアドレス指定可能である1つ以上のコンピュータを渡って分配されるデータベースを含む。

10

【0253】

図1に図示したモジュール及びデータ構造の多くが1つ以上のリモートコンピュータ上に位置することができることが認識されるであろう。例えば、本出願の一部の実施態様は、ウェブサービス型実施態様である。このような実施態様では、バイオマーカープロフィール評価モジュール60及び/又はその他のモジュールは、ネットワーク34を介してコンピュータ10と通信するクライアントコンピュータ上に存在することができる。一部の実施態様において、例えば、バイオマーカープロフィール評価モジュール60は、対話式ウェブページであることができる。

20

【0254】

一部の実施態様において、図1に図示した訓練データセット44、決定規則56及び/又はバイオマーカーデータベース68は、単一のコンピュータ（コンピュータ10）上にあり、1つ以上のその他の実施態様において、このようなデータ構造及びモジュールは、1つ以上のリモートコンピュータがホストをつとめる（図示せず）。1つ以上のコンピュータ上のデータ構造及びソフトウェアモジュールの任意の配置は、これらのデータ構造及びソフトウェアモジュールがネットワークを渡って、又はその他の電子手段によって互いにアドレス指定可能な限り、本発明の範囲内である。従って、本発明は、コンピュータシステムの広域アレイを完全に包含する。

30

【実施例】

【0255】

（6. 実施例）

（6.1 実施例1：敗血症及びSIRS患者の血清代謝産物の分析）

実施例1及び2は、敗血症及びSIRSの診断、並びに予後のための、本発明のバイオマーカーの有用性を証明する。参照バイオマーカープロフィールを患者ボランティアの2つの集団について確立した。

【0256】

（患者集団）

患者は、2つの集団に分けた。第1の集団（SIRS群）は、SIRSを発病し、かつ「1日目」に現在の研究に参加したが、その病院滞在の間に敗血症に進行しなかった患者を表す。第2の集団（敗血症群）は、同様にSIRSを発病し、かつ1日目にて現在の研究に参加したが、典型的には研究に参加した少なくとも数日後に敗血症に進行した患者を表す。

40

【0257】

（サンプル収集）

血液サンプルを、それぞれの研究群から約24時間毎に採集した。敗血症群における敗血症の臨床的疑いは、「時間0」にて生じた。サンプルを、敗血症群における敗血症の発病の臨床的疑いの日の前に「時間-12時間」「時間-36時間」及び「時間-60時間」に採集した。すなわち、敗血症群からのサンプルには、研究に参加した日（1日目）、敗血症の臨

50

床的疑いの60時間前（時間-60時間）、敗血症の臨床的疑いの36時間前（時間-36時間）及び敗血症の発病の臨床的疑いの日（時間-12時間）に採集されたものを含んだ。

【0258】

（サンプル調製）

20 μ Lのヒト血漿を200 μ Lの氷冷メタノール（-20 $^{\circ}$ Cにて貯蔵）に添加した。次いで、混合物を60秒間ボルテックスし、その後、血漿タンパクの沈澱を補助するために20分間4 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。次いで、混合物を4 $^{\circ}$ Cにて10分間、13,000 rpmにて遠心分離してタンパク質をペレットにした。次いで、代謝産物を含む上清（100 μ L）をエッペンドルフチューブへ移して、Speed-Vacによって乾燥するために水分を取り除いた。質量分析（MS）による解析については、代謝産物を内部標準として200 nMレセルピンを有する50%メタノール及び0.5%ギ酸の脱イオン水溶液に、元の血漿に関して1:50の最終希釈で調製した。

10

【0259】

（代謝産物の質量分析）

血清代謝産物抽出物のMS分析を、Qstar XL MS/MSシステム（Applied Biosystems）で行った。サンプルをNanomate（Advion Bioscience）、自動化ナノエレクトロスプレーシステムによってMSに注入した。エレクトロスプレーは、1.5 kVのスプレー電圧及び0.15 psiの噴霧圧にて行った。MSスペクトルは、100~1200ダルトンの範囲の質量電荷比（M/Z）で3分間蓄積した。

【0260】

（6.2 実施例2：本発明のバイオマーカー496.3又はバイオマーカー518.3による敗血症及びSIRSの診断、並びに予後）

20

本実施例は、バイオマーカー496.3及び518.3の時間経過研究を提供し、敗血症及びSIRSの診断、予後、並びにモニタリングのためのこれらの有用性を証明する。バイオマーカー496.3は、1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンであり、バイオマーカー518.3は、1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンのナトリウム塩である。

【0261】

血液は、実施例1に記載したように、ICUに入った日から13日まで、本研究に登録された患者から毎日抜いた。実施例1にも記載されているように、開示した代謝産物バイオマーカーの相対濃度を冷却メタノール抽出の後にESI-MSで測定した。

30

図2及び3は、敗血症患者M113及びSIRS患者M245についての13日の期間にわたるバイオマーカー496.3及び518.3の相対濃度変化を提供する。

【0262】

図2で分かるように、SIRS患者のM245からのバイオマーカー496.3の濃度は、1日目から3日目まで次第に増加し、最初のショック外傷からのSIRS患者の段階的な回復を示している。

一方では、敗血症患者からの同じバイオマーカーの濃度は、12日目の敗血症の臨床診断の2日後まで次第に減少する。また、図2に示したように、敗血症患者M113について5日目~7日目の間にバイオマーカー518.3の突然の濃度低下があり、全身感染の開始又は悪化を示している。

40

【0263】

図3で分かるように、SIRS患者M245からのバイオマーカー518.3の濃度は、1日目から13日目まで次第に増加し、最初のショック外傷からSIRS患者の段階的な回復を示している。

一方では、敗血症患者からの同じバイオマーカーの濃度は、12日目の敗血症の臨床診断の2日後まで次第に減少する。また、図3に示したように、敗血症患者M113について6日目~7日目の間にバイオマーカー518.3の突然の濃度低下があり、全身感染の開始又は悪化を示している。

【0264】

従って、臨床症状が生じた約4日前である6日目~7日目の間に、M113患者のために敗血症の発病を診断することができる。敗血症患者M113は、バイオマーカー496.3及び518.3の

50

回復によって示されるように（図2及び3を参照されたい）、13日目の最終的な回復の12日前目に敗血症性ショックに罹患した。

初期の治療的又は予防的介入を伴う6日目～7日目の間の敗血症の早期診断により、敗血症性ショックの治療と関連する全ての費用と共に、患者を敗血症性ショックから救うことができた。

【0265】

上記で証明されるように、バイオマーカー496.3及び518.3の量は、患者M245（1～13日を参照されたい）及びM113（1～6日を参照されたい）においてSIRSの診断及びモニタリングに対して有用であった。更に、バイオマーカー496.3及び518.3は、また、患者M113における敗血症及び敗血症性ショックへの変換の診断又は予後（1～6日を参照されたい）及び同じ状況からの回復のモニタリング（12～13日を参照されたい）に対して有用であった。

10

【0266】

（6.3 実施例3：MS/MSによるバイオマーカーの同定）

バイオマーカーは、一般的に、血漿サンプルからMSピークのシグナルについてタンデムMSを行うことによって同定した。次いで、MS/MSピークのシグナルを想定されたバイオマーカー由来の対応する断片に割り当てた。最終的に、バイオマーカーは、商業的に購入した化合物のMS/MSスペクトルによって確認した。

【表1】

表1. 496.3 (1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) のMS/MS

20

イオンピーク (ダルトン)	割り当てられた断片
496.34	親分子イオン (MH ⁺)
478.33	MH ⁺ - H ₂ O
313.27	MH ⁺ -ホスホリルコリン
184.07	ホスホリルコリン
104.11	コリン

30

【表2】

表2. 524.3 (1-O-ステアロイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) のMS/MS

イオンピーク (ダルトン)	割り当てられた断片
524.37	親分子イオン (MH ⁺)
506.35	MH ⁺ - H ₂ O
341.02	MH ⁺ -ホスホリルコリン
184.07	ホスホリルコリン
104.11	コリン

40

【0267】

（6.4実施例4：最小2乗法解析を使用する敗血症の診断としての1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンの最小2乗法性能）

本実施例では、マーカーである1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンに基づいたアッセイ法が、敗血症の診断のためにいかに十分に行われるかを証明する。これらの例示的アッセイ法では、最小二乗法の曲線フィットを使用してデータをモデル化し

50

、敗血症の切迫性を診断する。モデルの性能は、対象における全身性炎症状態の診断、予後及びモニタリングのための本発明の方法の有用性を証明する。

【0268】

本アッセイ法は、対象における2つの特徴、496.3の見かけの分子量を有する1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び518.3の見かけの分子量を有する対応するナトリウム塩を評価した。

55人の総患者がいて、そのうちの23人がSIRS患者であり、32人が敗血症患者であった。以下の表4-1及び4-2は、人種、性別、年齢及びこれらのサンプルの敗血症の状態の分布を提供する。

【表4-1】

10

表4-1

状態	性別	アフリカ系 アメリカ人	コーカサス人	その他
SIRS	女性	0	5	0
	男性	6	10	2
敗血症	女性	0	11	0
	男性	5	16	0

20

【表4-2】

表4-2

群	最小	平均	中央値	標準偏差	最大
SIRS	18	52.5	57	19.4	84
敗血症	19	40.7	40	18.4	79

30

【0269】

患者は、敗血症の切迫性に基づいた時間点にてスコアした。SIRS患者を0とスコアした。参加日での敗血症患者を1とスコアした。敗血症の発病2日前の患者を2とスコアした。敗血症の発病1日前の患者を3とスコアした。敗血症の発病直前の患者を4とスコアした。

【0270】

「遅延」特徴は、それぞれの患者についての彼らの時間経過にわたった特徴から構築した。所与の時間における所与の患者についての遅延0データは、その時だけのその患者からのデータである。その時のその患者についての遅延1データは、遅延0データ、並びにその患者についての以前の時点からのデータである。同様に、その時のその患者についての遅延2データは、その時、並びに2つの以前の時点でのその患者から利用可能なデータである。

40

【0271】

0よりも高い遅延を構築する一つの結果は、遅延データが利用できないので、初期の時点での患者のためのデータが不完全であるということである。これらの場合は、解析から外される。遅延0データは、完全であり、遅延1データは、第1の利用できる時点からの場合を有さず、遅延2データは、第1又は第2の利用できる時点からの場合を有さない。より

50

高い遅延では、所与の時間にて患者あたりにより多くの情報をもたらすが、より少ない場合を訓練する。もちろん、遅延がより高いほど、予測がなされる前の時間は長くすることができるが、その予測は、最終的により正確なものになるであろう。

【0272】

SPSA（同時の混乱確率論的な近似値）最適化ルーチンを使用して、含まれる特徴、並びにモデル-複雑さのパラメーターを変化させて、多くの多重線形回帰モデルをフィットさせた。多重回帰モデルについて、複雑さのパラメーターは、利用できない。モデルは、平均二乗誤差損失を最適化するように選択した。

【0273】

予想損失が小さなモデルリング法は、一般的に、予想損失が高いモデルリング法よりも優れた患者の結果（より正確な呼び出し、より早い呼び出し、その他）を与える。しかし、損失自体は、どの患者が呼ばれるか、又はいつかを我々に教えてくれない。これを評価するために、クロスバリデーションを同定されたモデルリング法で実施する。患者は、それぞれ同様なサイズで同じような数のSIRS及び敗血症の患者を有するK群（典型的には10）に分配する（所与の患者からの全てのデータは、同じ群に割り当てられる。）。モデルを該モデルリング法に従ってフィットして、次にそれぞれの群を除外する。次いで、フィットしたモデルは、それぞれの時点にて除外された患者データに適用し、予測されるSI値を算出する。次に、一連の閾値をそれぞれの予測されたSI値に適用する。次いで、それぞれの閾値について、我々は、患者の予測されたSI値がこれまでに閾値を上回ったかどうか、及びその場合はそれがいつかを決定することができる。次いで、全ての患者からの予測された結果を集めて、全ての閾値について集計された感度及び特異性評価を形成する。

10

20

【0274】

（6.4.1. 遅延0の結果）

見積もられた最高のモデルによって選択された特徴には、見かけの分子量496.3及び518.3を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカである1-O-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び対応するナトリウム塩に相当する。

【0275】

反復1000は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.4482をもたらすと見積もられる。このモデルリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図4-1は、これらの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるであろう感度及び特異性を図示する。表4-3は、選択された点からのデータ提示す。表4-4は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について選択した閾値について、切迫性敗血症の最初の呼び出しの時間の見積もられた速度を要約する。

30

【0276】

表4-3は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表4-3】

40

表4-3

閾値	感度	特異性
1.329	96.88	13.04
1.7107	75	52.17
2.1145	6.25	91.3

50

【 0 2 7 7 】

表4-4は、それぞれ高感度、高一致及び高特異性を与える選択された閾値について、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「I」は、研究の過程において、敗血症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表 4 - 4】

表4-4

研究の日数:		1	2	3	4	I
感度	敗血症	28	2	0	1	1
	SIRS	19	1	0	0	3
一致	敗血症	10	4	5	5	8
	SIRS	7	1	0	3	12
特異性	敗血症	0	0	0	2	30
	SIRS	0	0	1	1	21

10

20

図4-2は、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、本過程は、ランダムであり、最高の反復が見積もられ；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

【 0 2 7 8 】

(6.4.2. 遅延1の結果)

見積もられた最高のモデルによって選択される特徴は、496.3及び518.3の見かけの分子量を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカーである1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び対応するナトリウム塩に相当する。

【 0 2 7 9 】

反復1000は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.4638をもたらすと見積もられる。このモデリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図4-3は、これらの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるであろう感度及び特異性を図示する。表4-5は、選択された点からのデータを示す。表4-6は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について選択した閾値について、切迫性敗血症の最初の呼び出しの時間の見積もられた速度を要約する。

【 0 2 8 0 】

表4-5は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表 4 - 5】

表4-5

閾値	感度	特異性
1.7107	90.62	30.43
2.1145	75	65.22
2.2587	62.5	91.3

30

40

50

【 0 2 8 1 】

表4-6は、それぞれ高感度、高一一致及び高特異性を与える選択された閾値について、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「I」は、研究の過程において、敗血症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表 4 - 6】

表4-6

研究の日数:		1	2	3	4	I
感度	敗血症	0	21	4	4	3
	SIRS	0	5	3	8	7
一致	敗血症	0	8	10	6	8
	SIRS	0	1	0	7	15
特異性	敗血症	0	5	8	7	12
	SIRS	0	0	0	2	21

10

図4-4及び4-5は、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、その過程は、ランダムであり、こうして我々は、最高の反復を見積もり；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

20

【 0 2 8 2 】

(6.4.3. 遅延2の結果)

見積もられた最高のモデルによって選択される特徴は、496.3及び518.3の見かけの分子量を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカーである1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び対応するナトリウム塩に相当する。

【 0 2 8 3 】

反復1000は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.6208をもたらすと見積もられる。このモデリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図4-6は、これらの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるだろう感度及び特異性を図示する。表4-7は、選択された点からのデータを示す。表4-8は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について選択した閾値について、切迫性敗血症の最初の呼び出しの時間の見積もられた速度を要約する。

30

【 0 2 8 4 】

表4-7は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表 4 - 7】

表4-7

閾値	感度	特異性
1.7107	90.62	26.09
2.3465	68.75	69.57
2.5329	59.38	91.3

40

50

【 0 2 8 5 】

表4-8は、それぞれ高感度、高一致及び高特異性を与える選択された閾値について、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「I」は、研究の過程において敗血症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表 4 - 8】

表4-8

研究の日数:		1	2	3	4	I
感度	敗血症	0	0	24	5	3
	SIRS	0	0	8	9	6
一致	敗血症	0	0	19	3	10
	SIRS	0	0	0	7	16
特異性	敗血症	0	0	11	8	13
	SIRS	0	0	0	2	21

10

【 0 2 8 6 】

図4-7及び4-9は、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、その過程は、ランダムであり、こうして我々は、最高の反復を見積もる；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

20

【 0 2 8 7 】

(6.5 実施例5：ニューラルネットワーク解析を使用した、敗血症のための診断としての1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンの性能)

本実施例では、マーカーである1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンに基づいたアッセイ法が、敗血症の診断のためにいかに十分に行われるかを証明する。これらの例示的アッセイ法において、ニューラルネットワークの曲線フィットを使用してデータをモデル化し、敗血症の切迫性を診断する。モデルの性能は、対象における全身性炎症状態の診断、予後及びモニタリングのための本発明の方法の有用性を証明する。

30

本アッセイ法は、対象における2つの特徴、496.3の見かけの分子量を有する1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び518.3の見かけの分子量を有する対応するナトリウム塩を評価した。

【 0 2 8 8 】

55人の総患者がいて、そのうちの23人がSIRS患者であり、32人が敗血症患者であった。以下の表5-1及び5-2は、人種、性別、年齢及びこれらのサンプルの敗血症の状態の分布を提供する。

【表5 - 1】

表5-1

状態	性別	アフリカ系 アメリカ人	コーカサス人	その他
SIRS	女性	0	5	0
	男性	6	10	2
敗血症	女性	0	11	0
	男性	5	16	0

10

【表5 - 2】

表5-2

群	最小	平均	中央値	標準偏差	最大
SIRS	18	52.5	57	19.4	84
敗血症	19	40.7	40	18.4	79

20

【0289】

患者は、敗血症の切迫性（「SI」）に基づいた時間点にてスコアした。SIRS患者を0とスコアした。参加日での敗血症患者を1とスコアした。敗血症の発病2日前の患者を2とスコアした。敗血症の発病1日前の患者を3とスコアした。敗血症の発病直前の患者を4とスコアした。

30

【0290】

「遅延」特徴は、それぞれの患者についての彼らの時間経過にわたった特徴から構築した。所与の時間における所与の患者についての遅延0データは、その時だけのその患者からのデータである。その時のその患者についての遅延1データは、遅延0データ、並びにその患者についての以前の時点からのデータである。同様に、その時のその患者についての遅延2データは、その時、並びに2つの以前の時点でその患者から利用可能なデータである。

【0291】

0よりも高い遅延を構築する一つの結果は、遅延データが利用できないので、初期の時点での患者のためのデータが不完全であるということである。これらの場合は、解析から外される。従って、遅延0データは、完全であり、遅延1データは、第1の利用できる時点からの場合を有さず、遅延2データは、第1又は第2の利用できる時点からの場合を有さない。より高い遅延では、所与の時間にて患者あたりにより多くの情報をもたらすが、より少ない場合を訓練する。もちろん、遅延がより高いほど、予測がなされる前の時間は長くすることができるが、その予測は、最終的により正確なものになるであろう。

40

【0292】

SPSA（同時の混乱確率論的な近似値）最適化ルーチンを使用して、含まれる特徴、並びにモデル-複雑さのパラメーターを変化させて、多くのニューラルネットワークモデルをフィットさせた。ニューラルネットワークモデルについて、複雑さは、隠れたノード及び

50

加重減衰によって支配される。モデルは、平均二乗誤差損失を最適化するように選択した。

【0293】

予想損失が小さなモデルリング法は、一般的に、予想損が失高いモデルリング法よりも優れた患者の結果（より正確な呼び出し、より早い呼び出し、その他）を与える。しかし、損失自体は、どの患者が呼ばれるか、又はそれがいつかを我々に教えてくれない。これを評価するために、クロスバリデーションを同定されたモデルリング法で実施する。患者は、それぞれ同様なサイズで同じような数のSIRS及び敗血症の患者を有するK群（典型的には10）に分配する（所与の患者からの全てのデータは、同じ群に割り当てられる。）。モデルを該モデリング法に従ってフィットして、次にそれぞれの群を除外する。次いで、

10

【0294】

（6.5.1. 遅延0の結果）

見積もられた最高のモデルによって選択された特徴は、見かけの分子量496.3及び518.3を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカーである1

20

【0295】

反復1000は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.3537をもたらすことが見積もられる。このモデルリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図5-1は、これらの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるであろう感度及び特異性を図示する。表5-3は、選択された点からのデータを示す。表5-4は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について

30

【0296】

表5-3は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表5-3】

表5-3

閾値	感度	特異性
1.1336	96.88	4.35
2.0036	68.75	69.57
2.5551	37.5	91.3

40

【0297】

表5-4は、それぞれ高感度、高一一致及び高特異性を与えている選択された閾値について、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「1」は、研究の過程において、敗血

50

症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表5 - 4】

表5-4

		研究の日数:				
		1	2	3	4	I
感度	敗血症	21	6	3	1	1
	SIRS	17	2	0	3	1
一致	敗血症	5	2	9	6	10
	SIRS	3	1	0	3	16
特異性	敗血症	1	0	4	7	20
	SIRS	0	1	0	1	21

10

図5-2は、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、その過程は、ランダムであり、最高の反復が見積もられる；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

【0298】

20

(6.5.2. 遅延1の結果)

見積もられた最高のモデルによって選択される特徴は、496.3及び518.3の見かけの分子量を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカーである1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び対応するナトリウム塩に相当する。同定されたモデルの複雑さのパラメーターは、4つの隠れたノード及び1.0563の加重減衰である。

【0299】

反復847は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.3603をもたらすと見積もられる。このモデリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図5-3は、彼らの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるであろう感度及び特異性を図示する。表5-5は、選択された点からのデータを示す。表5-6は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について選択した閾値について、切迫性敗血症の最初の呼び出しの時間の見積もられた速度を要約する。

30

【0300】

表5-5は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表5 - 5】

表5-5

閾値	感度	特異性
1.3215	90.62	26.09
2.1481	68.75	69.57
2.5311	59.38	91.3

40

【0301】

表5-6は、それぞれ高感度、高一一致及び高特異性を与えている選択された閾値について

50

、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「I」は、研究の過程において、敗血症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表5 - 6】

表5-6

研究の日数:		1	2	3	4	I
感度	敗血症	0	21	3	5	3
	SIRS	0	6	2	9	6
一致	敗血症	0	10	9	3	10
	SIRS	0	1	0	6	16
特異性	敗血症	0	7	5	7	13
	SIRS	0	0	0	2	21

10

図5-4~5-5は、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、その過程は、ランダムであり、こうして我々は、最高の反復を見積もる；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

20

【0302】

(6.5.3. 遅延2の結果)

見積もられた最高のモデルによって選択される特徴は、496.3及び518.3の見かけの分子量を有する特徴を含む。上記の実施例3に示したように、これらの特徴は、マーカーである1-0-パルミトイル-2-リゾ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン及び対応するナトリウム塩に相当する。同定されたモデルの複雑さのパラメーターは、3つの隠れたノード及び1.6457の加重減衰である。

【0303】

反復1000は、最高の性能を有することが見積もられる。この反復にて選択された特徴及びモデルの複雑さは、損失1.5287をもたらすと見積もられる。このモデリング法を10回のクロスバリデーションで評価した。図5-6は、これらの全ての時間経過にわたって患者に関して達成されるであろう感度及び特異性を図示する。表5-7は、選択された点からのデータを示す。表5-8は、それぞれ高感度、高い全体の一致及び高い特異性について選択した閾値について、切迫性敗血症の最初の呼び出しの時間の見積もられた速度を要約する。

30

【0304】

表5-7は、高感度（最低の閾値）、高特異性（最高の閾値）及び高い全体の一致について選択した閾値について、見積もられた感度及び特異性を提供する。

【表5 - 7】

40

表5-7

閾値	感度	特異性
1.0748	90.62	13.04
2.1886	68.75	65.22
2.6667	62.5	91.3

50

【 0 3 0 5 】

表5-8は、それぞれ高感度、高一致及び高特異性を与えている選択された閾値について、最初の敗血症の危急の呼び出し時間の見積もられた分布を提供する。1日目は、参加の日であり、2日目は、試験したその翌日などである。「I」は、研究の過程において、敗血症の危急の呼び出しがないことを示している。

【表5 - 8】

表5-8

研究の日数:		1	2	3	4	I
感度	敗血症	0	0	27	2	3
	SIRS	0	0	11	9	3
一致	敗血症	0	0	19	3	10
	SIRS	0	0	2	6	15
特異性	敗血症	0	0	13	7	12
	SIRS	0	0	0	2	21

10

【 0 3 0 6 】

図5-7より5-9までは、最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。最後の反復が典型的には最高であるが、その過程は、ランダムであり、こうして我々は、最高の反復を見積もる；この場合、反復1000は、最高であると見積もられる。

20

【 0 3 0 7 】

(6.6 実施例6：総リゾホスファチジルコリン量の決定のための比色酵素アッセイ法)
(患者集団)

患者は、2つの集団に分けた。第1の集団（SIRS群）は、SIRSを発病し、かつ「1日目」に現在の研究に参加したが、その病院滞在の間に敗血症に進行しなかった患者を表す。第2の集団（敗血症群）は、同様にSIRSを発病し、かつ1日目にて現在の研究に参加したが、典型的には研究に参加した少なくとも数日後に敗血症に進行した患者を表す。

30

【 0 3 0 8 】

(サンプル収集)

血液サンプルを、それぞれの研究群から約24時間毎に採集した。敗血症群における敗血症の臨床的疑いは、「時間0」にて生じた。サンプルを、敗血症群における敗血症の発病の臨床的疑いの日の前に「時間-12時間」「時間-36時間」及び「時間-60時間」に採集した。すなわち、敗血症群からのサンプルには、研究に参加した日（1日目）、敗血症の臨床的疑いの60時間前（時間-60時間）、敗血症の臨床的疑いの36時間前（時間-36時間）及び敗血症の発病の臨床的疑いの日（時間-12時間）に採集されたものを含んだ。

【 0 3 0 9 】

(試薬の供与源)

リゾホスホリパーゼ（EC 3.1.1.5）は、Asachi Chemical Co. (Tokyo, Japan) から得た。グリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ（GPCP; EC 3.1.4.2）、コリンオキシダーゼ（COD; BC 1.1.3.17）、ペルオキシダーゼ（EC 1.11.1.7）、ナトリウムN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン無水物（TOOS）及び4-アミノアンチピリンは、Aldrich (Milwaukee, WI) から購入した。1-パルミトイル-2-ヒドロキシホスファチジルコリンは、Avanti Polar Lipids社 (Alabaster, AL) から得た。10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンは、Invitrogen (Carlsbad, CA) から得た。

40

【 0 3 1 0 】

(メカニズム)

スキーム1（図6）に示したアッセイ法のメカニズムでは、1つのリゾホスファチジルコ

50

リン (LPC) 分子は、一連の酵素反応を行って、2つの過酸化水素分子を生じることができる。生じる過酸化水素は、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン無水ナトリウム塩 (TOOS) の存在下において4-アミノアンチピリンを酸化して、キノネイミン色素を生じることができる。キノネイミンの吸光強度は、590 nmの波長にて測定することができる。

【0311】

(試薬)

試薬Aは、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.01% Triton X-100、1 mM 塩化カルシウム、3 mM TOOS (N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン、ナトリウム塩、二水和物)、10 K 単位/L ペルオキシダーゼ、0.1 K単位/L GPCP (グリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ) 及び10 K単位/L COD (コリンオキシダーゼ) を含む。試薬Bは、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.01% Triton X-100、5 mM 4-アミノアンチピリン及び30 K 単位/Lリゾホスホリパーゼを含む。

10

【0312】

(LPCの比色酵素アッセイ法)

8 µlの血漿サンプルを240 µlの試薬Aと共に37 °Cで5分間プレインキュベートし、570 nm (一次波長) ~ 700 nm (二次波長) の間の吸光度をプレートリーダー (Perkin-Elmer Victor3) にて測定した。反応は、80 µlの試薬Bの添加によって開始した。5分後に、570 nm ~ 700 nmの間の吸光度を測定した。総LPC濃度は、500 µmol/Lの1-バルミトイル-2-ヒドロキシ-ホスファチジルコリンの段階的希釈から検量線の補助を用いて決定した。

20

【0313】

(結果)

【表6】

試料	Rep1 (吸光度)	Rep2 (吸光度)	平均 (吸光度)
STD1: 600 µM	0.449	0.445	0.447
STD2: 400 µM	0.336	0.334	0.335
STD3: 200 µM	0.169	0.233	0.201
STD6: 0 µM	0.071	0.116	0.094
健常対象	0.231	0.223	0.228
患者113D10 (敗血症)	0.081	0.078	0.080
患者237D09 (SIRS)	0.165	0.193	0.179

30

上記の表に示したように、敗血症患者及びSIRS患者は、正常な健康者と比較してより低いLPC濃度を有する。敗血症患者におけるLPC濃度は、SIRS患者と比較して更に減少する。両方の相違は、より大きなサンプルセットにおいて見られた。

40

【0314】

(6.7 実施例7: 総LPC量の決定のための蛍光酵素アッセイ法)

(患者集団)

患者は、2つの集団に分けた。第1の集団 (SIRS群) は、SIRSを発病し、かつ「1日目」に現在の研究に参加したが、その病院滞在の間に敗血症に進行しなかった患者を表す。第2の集団 (敗血症群) は、同様にSIRSを発病し、かつ1日目にて現在の研究に参加したが、典型的には研究に参加した少なくとも数日後に敗血症に進行した患者を表す。

50

【 0 3 1 5 】

(サンプル収集)

血液サンプルを、それぞれの研究群から約24時間毎に採集した。敗血症群における敗血症の臨床的疑いは、時間0にて生じた。サンプルを、敗血症群における敗血症の発病の臨床的疑いの日の前に「時間-12時間」、「時間-36時間」及び「時間-60時間」に採集した。すなわち、敗血症群からのサンプルには、研究に参加した日(1日目)、敗血症の臨床的疑いの60時間前(時間-60時間)、敗血症の臨床的疑いの36時間前(時間-36時間)及び敗血症の発病の臨床的疑いの日(時間-12時間)に採集されたものを含んだ。

【 0 3 1 6 】

(試薬の供与源)

10

【 0 3 1 7 】

リゾホスホリパーゼ(EC 3.1.1.5)は、Asachi Chemical Co. (Tokyo, Japan) から得た。グリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ(GPCP; EC 3.1.4.2)、コリンオキシダーゼ(COD; BC 1.1.3.17)、ペルオキシダーゼ(EC 1.11.1.7)、ナトリウムN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン無水物(TOOS)及び4-アミノアンチピリンは、Aldrich (Milwaukee, WI) から購入した。1-パルミトイル-2-ヒドロキシ-ホスファチジルコリンは、Avanti Polar Lipids社(Alabaster, AL) から得た。10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンは、Invitrogen (Carlsbad, CA) から得た。

【 0 3 1 8 】

(メカニズム)

20

比色酵素アッセイ法と同様に、1つのLPC分子は、一連の酵素反応を通じて、2つの過酸化水素分子を生じることができる(スキーム1; 図6を参照されたい)。次いで、生じる過酸化水素は、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンを蛍光産物の7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンに酸化することができる。7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オンの蛍光強度は、530 nm周辺の励起波長で590 nmにて測定することができる。

【 0 3 1 9 】

(試薬)

試薬Aは、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.01% Triton X-100、10 mM 塩化マグネシウム、0.1 K単位/L GPCP (グリセロホスホリルコリンホスホジエステラーゼ)、10 K単位/L ペルオキシダーゼ、10 K単位/L COD (コリンオキシダーゼ) 及び20 mM 10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンを含む。試薬Bは、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.01% Triton X-100及び30 K Units/Lリゾホスホリパーゼを含む。

30

【 0 3 2 0 】

240 µlの試薬Aを、蛍光用の黒色96マイクロプレートのそれぞれのウェルに添加する。8 µlのそれぞれのサンプル及び又は標準物質を、試薬Aを含むそれぞれのウェルに添加する。

80 µlの試薬Bをそれぞれのウェルに添加する。生じる混合物を37 °Cにて少なくとも60分間遮光してインキュベートする。蛍光は、Perkin Elmer Victor 3プレートリーダーで、530 nmの励起波長、590 nmの蛍光波長、「10000」のランプエネルギー及び「小」の発光開口部で読んだ。総LPC量を100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.01% Triton X-100及び10 mM塩化マグネシウムを含む緩衝液において段階希釈した500 µmol/Lの1-パルミトイル-2-ヒドロキシ-ホスファチジルコリンからの検量線の補助を用いて決定する。

40

【 0 3 2 1 】

(結果)

参加日、T-60、T-36及びT-12(敗血症の発病の臨床的疑いの日)間隔における、29人の敗血症及び22人のSIRS対象についての総LPC濃度を図7に示してある。図7から分かるように、大部分のSIRS患者についての総LPC濃度は、参加の日から次第に増加し、最初のショック外傷からそれぞれのSIRS患者の段階的な回復を示している。一方で、大部分の敗血症患者についての総LPC濃度は、下がり、又は敗血症の発病の臨床的疑いの日の2日前(T-12)のレベルになる。

50

【0322】

このデータセットにおいて、敗血症の臨床予後は、以下の基準を使用して、90%の特異性及び60%の感度で敗血症の発病の1~2日前に、本発明の方法に従って行うことができる：

LPC 濃度 (D_n) < 呼び出しの日 (n 日) に $60 \mu\text{M}$; 及び

$D_n - D_{n-1} < 0 \mu\text{M}$ (LPC濃度は、下がるか、又は横ばいになった)

初期の治療的又は予防的介入を伴う敗血症の早期診断により、敗血症性ショックの治療と関連する全ての費用に加えて、患者を敗血症性ショックから救うことができた。

【0323】

本明細書において引用される全ての刊行物及び特許出願は、あたかもそれぞれの個々の刊行物又は特許出願が引用として組み込まれたことが具体的かつ個々に示されたかのように、引用として本明細書に組み込まれる。前述の発明は、理解の明快さを目的として例証及び実施例によっていくらか詳細に記述してあるが、本発明の教示を考慮して、添付の請求の範囲の精神又は範囲から逸脱することなく、それに対して特定の変更及び修正を行ってもよいことは当業者に直ちに明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0324】

【図1】本発明の例示的な系を提供する。

【図2】バイオマーカー496.3の時間経過解析を提供する。

【図3】バイオマーカー518.3の時間経過解析を提供する。

【図4 - 1】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図4 - 2】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図4 - 3】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図4 - 4】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図4 - 5】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図4 - 6】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図4 - 7 - 4 - 9】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図5 - 1】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図5 - 2】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図5 - 3】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図5 - 4】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図5 - 5】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図5 - 6】本発明に従った実行モデルにおける感度及び特異性対閾値を図示する。

【図5 - 7 - 5 - 9】本発明の方法の最適化の間の特徴包含パラメーターの進化を図示する。

【図6】本発明の実施態様に従ったリゾホスファチジルコリンの検出のためのスキームを提供する。

【図7】SIRS又は敗血症の症候を示した患者由来のサンプルにおいて蛍光で検出されたりゾホスファチジルコリンを提供する。

10

20

30

40

【 図 1 】

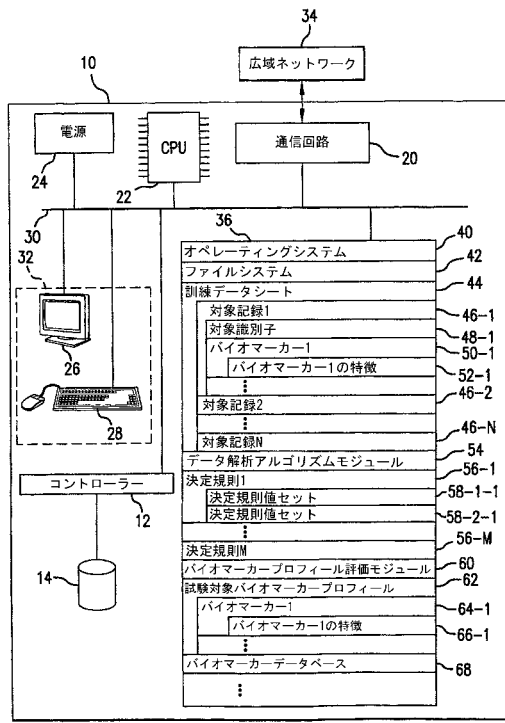


図1

【 図 2 】

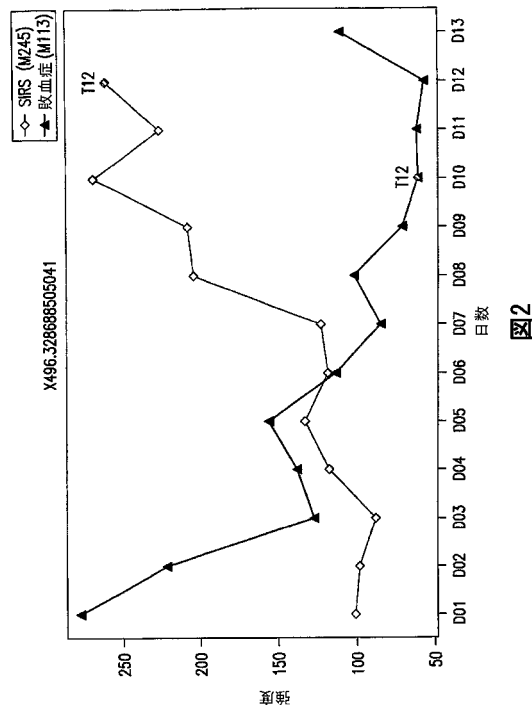


図2

【 図 3 】

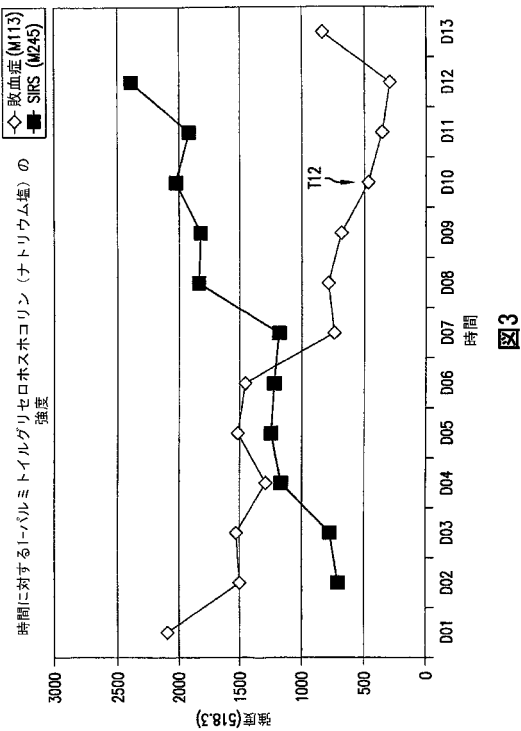


図3

【 図 4 - 1 】

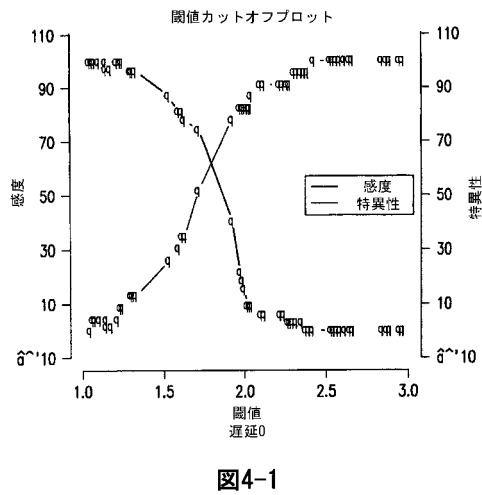


図4-1

【 図 4 - 2 】

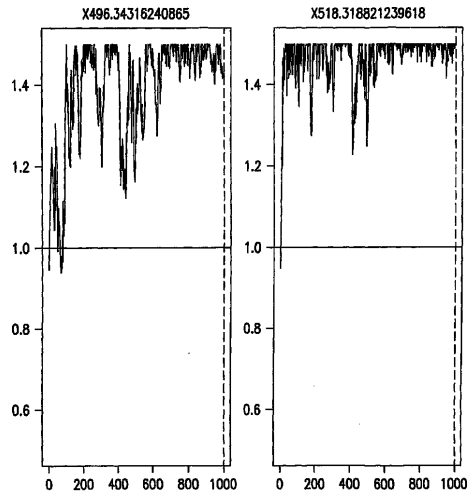


FIG.4-2

【 図 4 - 3 】

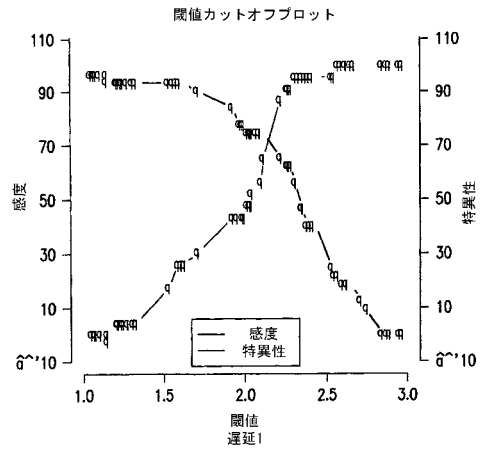


図4-3

【 図 4 - 4 】

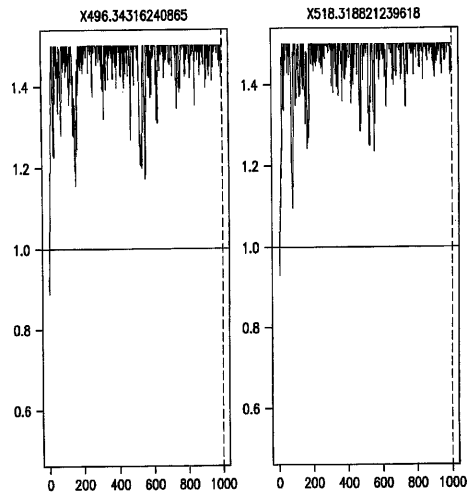


FIG.4-4

【 図 4 - 5 】

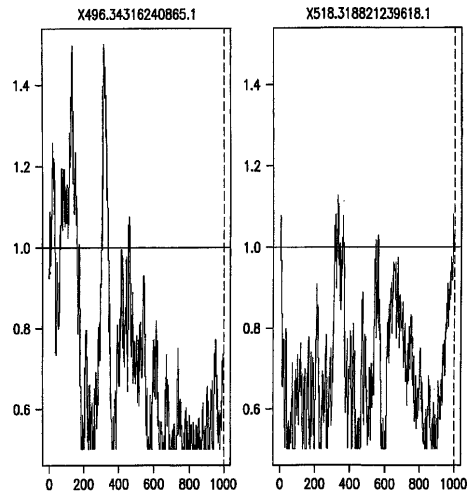


FIG.4-5

【 図 4 - 6 】

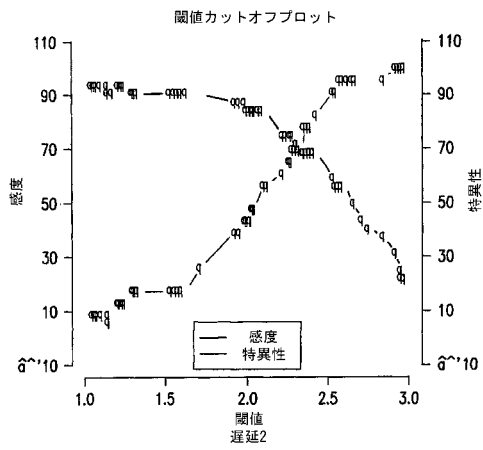


図4-6

【 図 4 - 7 】

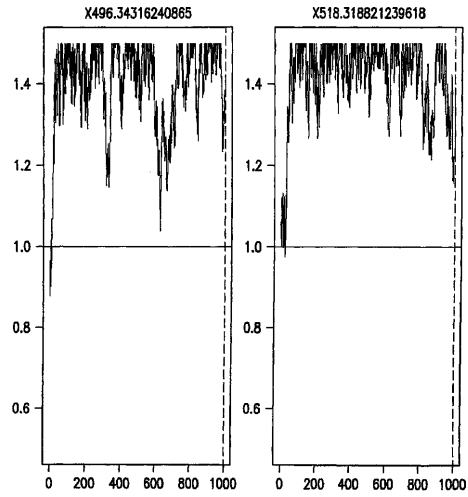


FIG.4-7

【 図 4 - 8 】

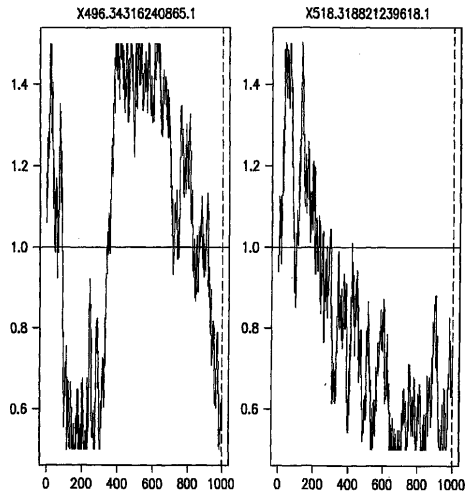


FIG.4-8

【 図 4 - 9 】

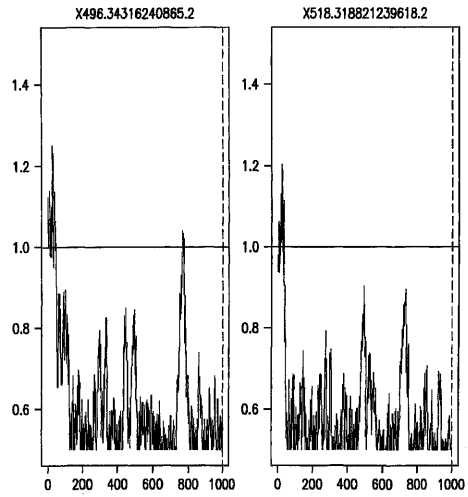


FIG.4-9

【 図 5 - 1 】

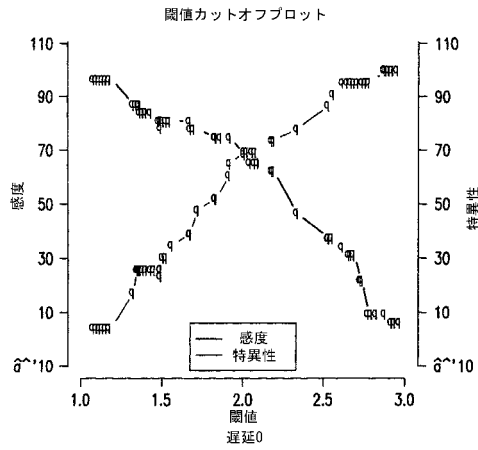


図5-1

【 図 5 - 2 】

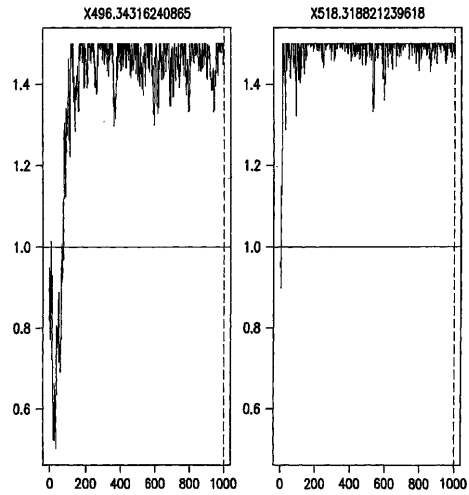


FIG.5-2

【 図 5 - 3 】

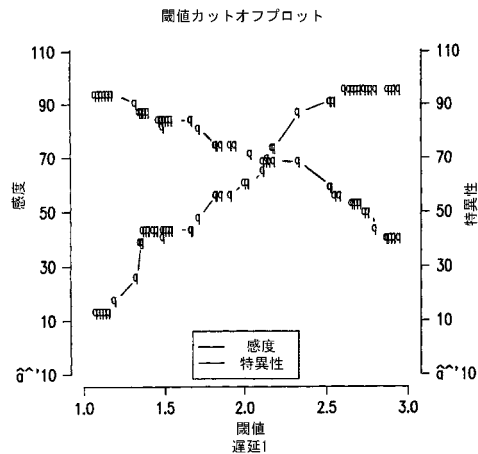


図5-3

【 図 5 - 4 】

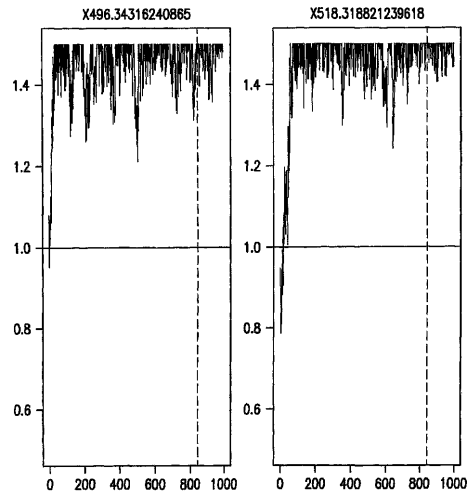


FIG.5-4

【 図 5 - 5 】

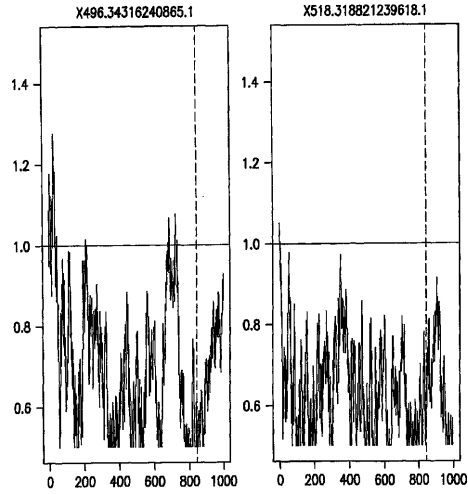


FIG.5-5

【 図 5 - 6 】

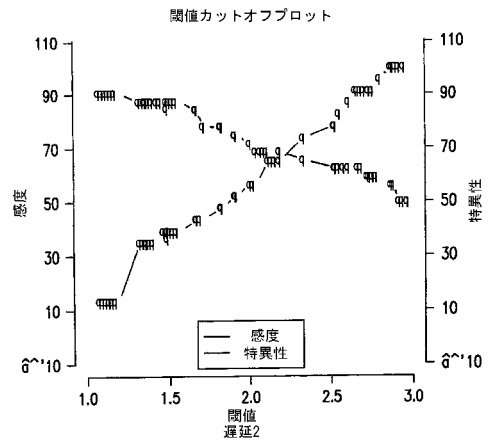


図5-6

【 図 5 - 7 】

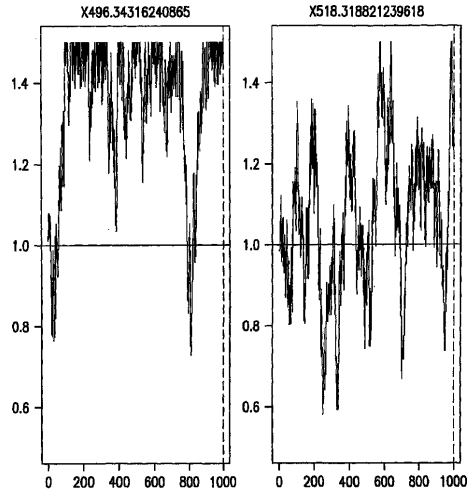


FIG.5-7

【 図 5 - 8 】

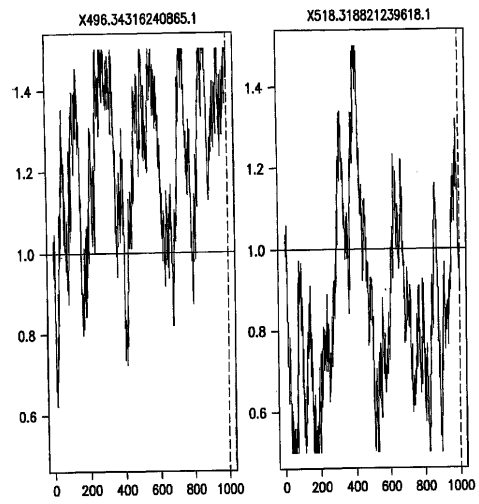


FIG.5-8

【 図 5 - 9 】

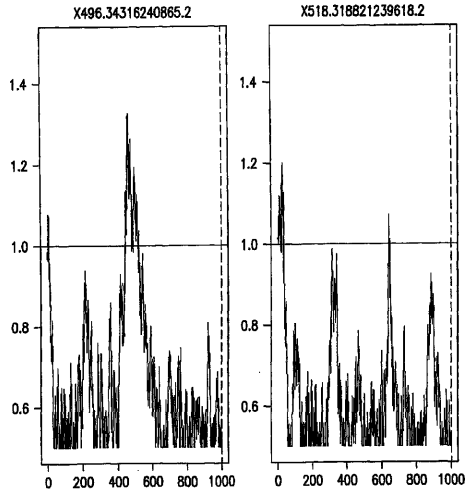


FIG.5-9

【 図 6 】

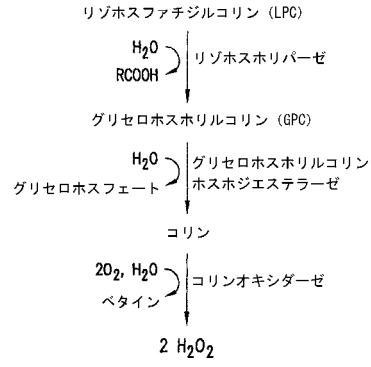


図6

【 図 7 】

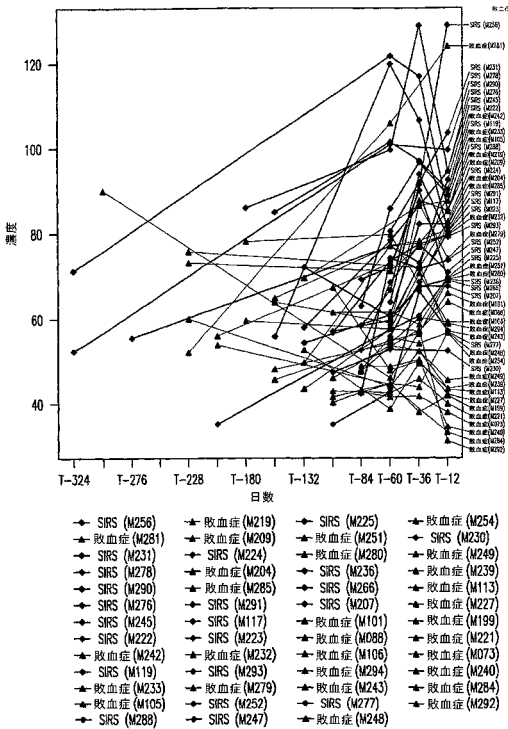


図7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	E
G 0 1 N 33/92	(2006.01)	G 0 1 N 33/92	Z

(31)優先権主張番号 60/841,407
 (32)優先日 平成18年8月30日(2006.8.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ソング スヒ
 アメリカ合衆国 2 1 1 3 6 メリーランド州 レイステルストウン ビルルイ バルチン シル
 クレ 1 9 1 6

(72)発明者 トホマス ゲントレ
 アメリカ合衆国 5 5 3 7 6 ミネソタ州 サイント ミチャエル ネ クアレ アベニュー 5
 6 4 3

(72)発明者 リチャルド モオレ
 アメリカ合衆国 1 7 3 2 9 ペンシルバニア州 グレンビルレ ウオオル ミルル ロード 5
 5 3 7

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 国際公開第2004/044554(WO, A1)
 特表2003-524762(JP, A)
 Drobnik W et al., Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with
 mortality in sepsis patients., J Lipid Res., 2003年 4月, 44(4), 754-761

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 33/50-33/92

专利名称(译)	检测溶血磷脂酰胆碱用于预后或诊断全身炎症状况		
公开(公告)号	JP5183480B2	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	JP2008533696	申请日	2006-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
当前申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	ソングスヒ トホマスゲントレ リチャルドモオレ		
发明人	ソング スヒ トホマス ゲントレ リチャルド モオレ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/06 C12Q1/44 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/68 C12M1/34 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/92 C12Q1/26 C12Q1/44 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.S C12Q1/06 C12Q1/44 C12Q1/26 C12Q1/28 C12Q1/68.Z C12M1/34.E G01N33/92.Z		
代理人(译)	石川彻		
优先权	60/721833 2005-09-28 US 60/762911 2006-01-27 US 60/841407 2006-08-30 US		
其他公开文献	JP2009510450A JP2009510450A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于诊断或预测全身性炎症病症如败血症的方法和组合物。

