

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532415

(P2004-532415A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/68

GO 1 N 33/53

F I

GO 1 N 33/68

GO 1 N 33/53

テーマコード (参考)

2GO45

D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2002-589804 (P2002-589804)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月15日 (2002.5.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月17日 (2003.11.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/005350
 (87) 国際公開番号 W02002/093175
 (87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002.11.21)
 (31) 優先権主張番号 60/290,973
 (32) 優先日 平成13年5月16日 (2001.5.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501084307
 フォルスヴィル, グザヴィエ
 フランス国 77860 サン ジェルマ
 ン シュル モラン リュ ドゥ シャン
 パーニュ 12
 (74) 代理人 100092277
 弁理士 越場 隆
 (72) 発明者 フォルスヴィル, グザヴィエ
 フランス国 77860 サン ジェルマ
 ン シュル モラン リュ ドゥ ラ シ
 ャンパーニュ 12
 Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 DA77 FB03

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症反応を含む疾患をインビトロ診断またはモニターするための方法およびキット

(57) 【要約】

【課題】患者の炎症反応を伴う疾患をインビトロ診断またはモニターする方法。

【解決手段】下記の段階(a)~(c)からなる:

- (a) 患者からの生体試料を用意し、
 (b) この生体試料中に含まれるセレノ蛋白質Pの量を測定し、
 (c) 段階(b)で測定されたセレノ蛋白質Pの量を下記の(i)または(ii)と比較する:
 (i) 非罹患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質Pの量、
 (ii) 同一患者からの過去の生体試料中に含まれていたセレノ蛋白質Pの量。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記の段階 (a) ~ (c) からなることを特徴とする、患者の炎症反応を伴う疾患をインビトロ診断またはモニターする方法：

(a) 患者からの生体試料を用意し、

(b) この生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の量を測定し、

(c) 段階 (b) で測定されたセレノ蛋白質 P の量を下記の (i) または (ii) と比較する：

(i) 非罹患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の量、

(ii) 同一患者からの過去の生体試料中に含まれていたセレノ蛋白質 P の量。

10

【請求項 2】

生体試料が血液試料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

生体試料が血漿試料である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

炎症反応を伴う疾患が全身性炎症反応症候群 (SIRS) である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

炎症反応を伴う疾患が敗血症性ショックである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

炎症反応を伴う疾患が慢性炎症疾患である請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

慢性炎症疾患が結節性多発動脈炎のような全身性疾患群の中から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

炎症反応を伴う疾患が細菌、真菌、ウイルス性感染に関連する慢性炎症疾患である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

測定したセレノ蛋白質 P 量を、被験者と出身地が同じ非罹患者群で予想されるセレノ蛋白質 P 量と比較する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量より低いときに疾患の発生であると診断する追加の段階 (d) をさらに有する請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量より低いか、同じ患者の前回の試験での測定量より低いか高くない (すなわち等しい) ときに疾患が持続していると診断する追加の段階 (d) をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常な量と少なくとも同じか、同じ患者の前回の試験での測定量より高いときに疾患から回復したと診断する追加の段階 (d) をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量より高いか、同じ患者の前回の試験での測定量より高いときに疾患から回復したと診断する追加の段階 (d) をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

段階 (c) における非罹患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P 量が少なくとも 40nmol/L である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

患者の生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P 量が 30nmol/L 以下のときに敗血症性ショックであると診断する請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 16】

処置期間中に所定時間毎に採取した生体試料中のセレノ蛋白質 P の測定量が常に 20nmol/L 以下、好ましくは 10 nmol/L 以下のときに死亡とみなす請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

段階 (b) がセレノ蛋白質 P に対する抗体を用いた免疫アッセイから成る請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

患者の炎症反応を伴う疾患をインビトロ診断またはモニターするためのキットにおいて、生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P 量を検定する手段 (i) を含むことを特徴とするキット。

10

【請求項 19】

標準対照として用いるセレノ蛋白質 P を所定量含んだ一つまたは複数の試料 (ii) をさらに含む請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の量を検定する手段がセレノ蛋白質 P に対する抗体からなる請求項 18 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、炎症反応を含むいくつかの疾患、特にヒトおよび動物の血管内皮の損傷に関連した疾患を診断およびモニターする方法に関するものである。

20

【背景技術】**【0002】**

多臓器不全を引き起こす重症の敗血症、さらに進んだ敗血症性ショックは危篤患者における医学上の主要な問題であり、集中治療室 (ICU) で最も多い死因である (Definition and epidemiologypp This LG, Dhainaut JF, in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Parked, Sunders 2000)。

【0003】

敗血症性ショックはその頻度 (米国では新たな症例が年に 500,000 ~ 700,000 件) とその死亡率 (約 45%) の高さによって公衆健康上大きな問題である。敗血症性ショックの全身への駆散は免疫炎症反応が抑制されずに全身に広がった結果と考えられる。敗血症性ショックの場合、この免疫炎症反応は侵入性感染に対する宿主の全身反応によって生じることは下記文献に記載されている。

30

【非特許文献 1】

ケルススからガレンそしてポーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC, Aarts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【0004】

この免疫炎症反応は臓器障害、さらには、臓器不全を引き起こす。生理病理学的には敗血症性ショックをフリーラジカルの過剰生産の結果とみなすこともできる (下記文献参照)

40

【非特許文献 2】

Novelli, G.P.、敗血症性ショックにおけるフリーラジカルの役目、J Physiol Pharmacol、1997年、48(4)、517 ~ 527頁

【非特許文献 3】

Zimmerman, J.J.、敗血症の病原におけるオキシラジカルの役目の定義、Critical Care Medicine、1995年、23、(4) : 616 ~ 617頁

【0005】

この考えは、敗血症性ショックに関する通常のダイアグラムとも一致し、フリーラジカルが細胞損傷の直接の原因であると指摘されている。このフリーラジカルの有害な過剰生産の主たる起源は静脈の後毛細管部分に付着する活性化した多核性好中球であると考えられ

50

る（下記文献参照）。

【非特許文献4】

Bast, A., Haenen, G.R. Doelman, C.J. 酸化剤および酸化防止剤、state of the art, Am J Med, 1991年、91、(3C)、2S-13S

【0006】

敗血症性ショックでは酸化窒素が大きな役目をしているということは知られている。酸化窒素は敗血症性ショックの初期に見られる。生体に対するこの酸化窒素の有害作用は、内皮細胞でのNOと多形核細胞等の食細胞でのスーパーオキシドアニオンとの同時合成時に生じるペルオキシニトレート(ONOO-)に主として起因するようみえる。さらに、内皮はペルオキシニトレートの特異的標的であるので、セレンは敗血症性ショックの有効な治療となり、特にセレノ蛋白質P濃度を上げる点で有用である（下記文献参照）。 10

【非特許文献5】

セレンおよび「自由」電子、敗血症または炎症ICU患者を対象としたセレンの追跡、フォルスヴィル(Forceville) X、集中治療薬, 2001、27: 16~18

【0007】

敗血症性ショックの初期における診断および治療は救急状態で行われなければならない。ヒトの場合、現在のところ敗血症性ショックの炎症反応の第三期治療試験が陽性の場合のみ24時間以内に敗血症性ショックの治療を開始しなければならない（下記文献参照）。

【非特許文献6】

重症敗血症のための組換えヒト活性蛋白質Cの有効性および安全性、Bernard G.R., Vincent JL, Laterre PF, New England Journal of Medicine, 2001) 20

【0008】

実際に、敗血症性ショック時には微小循環内皮が急速に損傷される。敗血症性ショックの結果において内皮の大きな変化が主要な生理病理学的役目をして臓器不全を引き起こす（下記文献参照）。

【非特許文献7】

敗血症/敗血症性ショック：微小循環の関与、略記概観、Hinshaw LB 救急治療薬、1996年、24(6)、1072~1078

【0009】

従って、反復可能な疫学的データを得るためと、敗血症試験で必要な適切な患者数を定めるためと、治療効果が期待される患者数を確認するためと、治療後に敗血症性ショックの変化をモニターするために、敗血症性ショック患者を正確に同定、識別するための単純で反復可能な生物学的マーカーが求められている。 30

さらに、理想的には、このマーカーは敗血症性ショックの発現に關与する生物学的プロセスをターゲットにしたものでなければならない。下記文献では「このようなマーカーの追求は進行中の研究にとって重要な優先課題である」と述べられている。

【非特許文献8】

ケルススからガレンそしてボーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC, Arts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【0010】

しかし、敗血症および敗血症性ショックの診断は現在でも複雑であり、臨床上の発現をベースにした定義に依存している（下記文献参照）。 40

【非特許文献9】

Groneveld, This, Dhainaut 2000、355頁)

【0011】

この定義では患者のサブグループを全身性炎症反応症候群で特徴付けているが、感染症だけではなく膵臓炎、広範囲の火傷、多くの外傷等の疾患に起因するものも含んでいる。これ以上の説明が必要な場合には下記文献を参照されたい。

【非特許文献10】

胸部医師米国大学 および 救急治療薬学会、全体一致協議会、Chicago 1991(The ACCP-S 50

CCM 敗血症および臓器不全に関する全体一致協議会、Chest 1992、101：1644～55)

【非特許文献 1 1】

MarchallおよびAartsの論文(ケルススからガレンそしてボーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC、Aarts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12)

【0 0 1 2】

敗血症、重症敗血症さらに敗血症性ショックは細菌に起因する検出された菌血症による場合またはよらない場合の他に、真菌またはウイルスにも関連すると考えられる。

【0 0 1 3】

敗血症性ショックとは、適正な流体蘇生術をしても敗血症に起因す血流量が低下(最大血圧<90mmHgまたはベースラインよりも40mmHg低下)し、乳酸性アシドーシス、乏尿症または精神状態の急変(これらに限定されるものではない)等の灌流異常を伴う疾患と定義されている。変力剤または昇圧剤を投与された患者は灌流異常が測定されたときに低血圧にはならない(下記文献参照)。

10

【非特許文献 1 2】

Bone,1992,ref.2925(Definition and epidemiology This LG, Dhainaut JF in Septic Shock Dhainaut JF, This LG,G Park ed.:Sunders 2000)

【0 0 1 4】

下記文献に示すように、1991年8月、シカゴでの敗血症および臓器不全に関するACCP-SCCMコンセンサス協議会で定められた臨床定義が唯一有効な定義である

20

【非特許文献 1 3】

敗血症および臓器不全に関するACCP-SCCMコンセンサス協議会、Chest1992,101：1644-55

【0 0 1 5】

敗血症性ショック、特にその初期の発現のマーカーは種々提案されているが、これらは非特異的で、しかも感度が悪い(下記文献参照)。

【非特許文献 1 4】

Diagnosis:from clinical signs to haemodynamic evaluation, Groeneveld AB J, This GT; in Septic Shock, Dhainaut JF,This LG,G Park ed.:Sunders 2000

【0 0 1 6】

サイトカイン網を含む炎症経路の活性化は敗血症性ショックの病原において大きな役目をすると考えられるので、サイトカインは敗血症性ショックの可能性のあるマーカーとして広範囲に研究されている(下記文献参照)。

30

【非特許文献 1 5】

Cytokines and Anticytokines in the pathogenesis of sepsis, van der Poll T, van D eventer S JH, Infectious disease Clinics of North America;13(2)1999,413-426)

【0 0 1 7】

IL-6(混合されたプロおよび抗炎症サイトカイン)は他のサイトカインと比べて敗血症患者の循環において絶えず報告されている。しかし、IL-6レベルはかなりばらつきがあり、敗血症性ショックの患者を確認するための臨界値を定義することができない(下記文献参照)。

40

【非特許文献 1 6】

Cytokines and Anticytokines in the pathogenesis of sepsis, van der Poll T, van D eventer S JH, Infectious disease Clinics of North America;13(2)1999,413-426)

【0 0 1 8】

敗血症性ショックの患者を確認するためにプロカルシトニン(PCIT)、C-反応性蛋白質(CRP)、白血球増加、乳酸濃度、凝血パラメータおよび他のパラメータが提案されている(下記文献参照)。

【非特許文献 1 7】

Diagnosis of sepsis: Novel and Conventional Parameters, Rheinhardt K, Meisner M and Hartog C, Advances in sepsis,2001;42-51)

50

【 0 0 1 9 】

これらのパラメータは敗血症性ショックの診断およびモニター法を改良するのに有用にみえるが、特異性が無いために敗血症性ショック患者を明確に確認することができず、敗血症性ショックの診断は依然として臨床パラメータに基づいている（下記文献参照）。

【 非特許文献 1 8 】

ケルススからガレンそして骨へ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC、Aarts M A、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【 0 0 2 0 】

現在、研究室での異常状態は敗血症の診断に有効であるだけで、敗血症性ショックの存在を証明することはできない。血液学的パラメータと分析学的パラメータとの異常を一緒にすることによって敗血症性ショックの指標にすることだけはできる（下記文献参照）。

10

【 非特許文献 1 9 】

Diagnosis: from clinical signs to haemodynamic evaluation, Groeneveld AB J, This GT; in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Park ed.: Sunders 2000

【 0 0 2 1 】

しかし、上記パラメータは単独では意味がない（下記文献参照）。

【 非特許文献 2 0 】

Defining a clinical Syndrome of Systemic inflammation, Vincent JL, Byl B, Sepsis ;200;4:15-19

【 0 0 2 2 】

また、敗血症性ショック患者を定義するための特異的および信頼できるパラメータの発見も急を要する。敗血症性ショック患者の正確な定義が見つければ、敗血症性ショックの初期診断および経過観察が可能になる。このパラメータは敗血症性ショックの生理病理学的プロセスに密接に関連しているのが理想的である（下記文献参照）。

20

【 非特許文献 2 1 】

ケルススからガレンそしてボーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC、Aarts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 3 】

本発明は、ヒトおよび動物の両方で、敗血症性ショックの生化学的マーカーとして、特に全身性炎症反応症候群（SIRS）の重症度を知るための生化学的マーカーとして、セレノ蛋白質Pを用いることができるという知見に基づいている。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 4 】

本発明の第1の対象は、下記の段階（a）～（c）からなることを特徴とする患者の炎症反応を伴う疾患（disease involving an inflammatory reaction）をインビトロ診断またはモニターする方法にある：

（a）患者からの生体試料を用意し、

（b）この生体試料中に含まれるセレノ蛋白質（selenoprotein）Pの量を測定し、

40

（c）段階（b）で測定されたセレノ蛋白質Pの量を下記の（i）または（ii）と比較する：

（i）非罹患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質Pの量、

（ii）同一患者からの過去の生体試料中に含まれていたセレノ蛋白質Pの量。

【 0 0 2 5 】

「炎症反応を伴う疾患」とは、本明細書では炎症反応が末梢血食細胞（phagocytic cells）すなわち単核細胞／大食細胞、特に多形核細胞、特に好中球の活性化に関連する疾患を意味する。この定義の「炎症反応を伴う疾患」は血管内皮細胞（vascular endothelial cells）の損傷と関連しているのがさらに望ましい。

【 0 0 2 6 】

50

セレノ蛋白質 P の「量」とは、本明細書では試料中のセレノ蛋白質 P の定量化を可能にする任意パラメータまたは測定単位を意味する。セレノ蛋白質 P の量は試料中の絶対量（例えば、セレノ蛋白質 P のモル数）または濃度（例えば試料中のセレノ蛋白質 P の濃度 nmol/L）で示すことができる。

上記の血管内皮細胞の損傷は上記疾患の開始時に現れるか、上記疾患の開始を原因として表れ、血管内皮細胞の二次損傷となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明の好ましい第1実施例では、上記疾患が全身性炎症反応症候群（systemic inflammation response syndrome、SIRS）、一般には敗血症性ショック（septic shock）である。 10

本発明の好ましい第2実施例では、上記疾患が慢性炎症疾患である。この慢性炎症疾患は結節性多発動脈炎（polyarteritis nodosa）のような全身性疾患群の中から選択できる。慢性炎症疾患は細菌、真菌、ウイルス性感染に関連する疾患または子癇症（eclampsia）でもよい。従って、妊娠の経過観察中に妊娠中のセレノ蛋白質 P を経過観察することができる。

【0028】

本発明のさらに好ましい実施例では、追加の段階（d）で上記疾患の発生または悪化を診断することができる。すなわち、測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量より低い、同じ患者で行った前回の試験の試料で測定された量より低いときに上記疾患の発生または悪化と診断することができる。 20

【0029】

本発明のさらに別の好ましい実施例では、追加の段階（d）で、測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量より低い、同じ患者で行った前回の試験の試料で測定された量より低い、もしくは高くない（すなわち等しい）ときに上記疾患の持続と診断される。

【0030】

本発明方法のさらに別の好ましい実施例では、追加の段階（d）で、測定された生体試料中のセレノ蛋白質 P 量が非罹患者の正常量と少なくとも同じか、同じ患者で行った前回の試験の試料で測定された量より高いときに上記疾患から回復したと診断される。 30

【0031】

本発明方法のさらに別の実施例では、治療期間中に経時的に採取した生体試料中で測定されるセレノ蛋白質 P 量が常に 20 nmol/L 以下、より厳密には 10 nmol/L 以下になったときに死亡とみなされる。

【0032】

本発明はさらに、患者の炎症反応を伴う疾患をインビトロ診断またはモニターするためのキットに関するものである。本発明のキットは生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P 量を検定する手段（i）を含む。

本発明キットの好ましい第1実施例では、本発明キットが、標準対照として用いるためのセレノ蛋白質 P の所定量を含む一つまたは複数の試料（ii）をさらに含む。 40

本発明キットの好ましい第2実施例では、生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P 量を検定する手段（i）がセレノ蛋白質 P に対する抗体からなる。

【0033】

本発明者は、炎症反応を伴う疾患の患者では、セレノ蛋白質 P の血中濃度の測定値が大幅に低下するという見出しをした。

本発明者は、セレノ蛋白質 P の血中濃度のこの大幅な低下は、重症の敗血症患者、特に全身性炎症反応症候群（SIRS）患者で起こり、敗血症性ショックの患者で測定された血中セレノ蛋白質 P レベルではより大きく低下するという見出しをした。

【0034】

セレノ蛋白質 P は1971年から公知である。これは1本のポリペプチド鎖当たり一つ以上の 50

セレン原子を含む唯一のセレノ蛋白質(selenoprotein)で、ポリペプチド1つ当たり10個のセレノシステイン残基を有する形をしている(下記文献参照)。

【非特許文献22】

Orphan selenoproteins Burk RF, Hill KE BioEssays 21(3):231-237,1999

【非特許文献23】

Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation Mostert V, Archives of Biochemistry and Biophysics, 376(2):433-438, 2000

【0035】

このセレノ蛋白質はセレノシステインを含む蛋白と定義される。セレノシステインはシステイン中の硫黄がセレンに置換された21番目のアミノ酸として知られている。各種の種からのセレノ蛋白質Pのアミノ酸配列の比較から、これらのアミノ酸を一緒に見た場合、システイン基およびセレノシステイン基はほぼ完全に保存されることがわかる。セレノ蛋白質Pは主として肝臓で合成される。ヒトの血漿中には少なくとも2種の異なるイソ型のセレノ蛋白質Pが存在する(下記文献参照)。

10

【非特許文献24】

A Novel Method for the Purification of Selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J, Archives of Biochemistry and Biophysics; 357(2):326-330, 1998

【0036】

セレノ蛋白質Pは内皮細胞の表面に多量に存在する。セレノ蛋白質Pはヘパリンと結合する特性を持ちながら炎症を起こした内皮とも結合できる(下記文献参照)。

20

【非特許文献25】

Burk, R.F.; Hill, K.E.; Boeglin, M.E.; Ebner, F.F.; Chittum, H.S., Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues, Histochem Cell Biol; 1997, 108(1), 11-15

【0037】

健康な人および炎症反応のない種々の疾患を有する患者ではセレノ蛋白質Pの血漿濃度の安定性が高いので、セレノ蛋白質Pは炎症性疾患の診断と、炎症性疾患からの回復モニターの両方で信頼性の高いマーカーになり、例えば治療期間全体で利用でき、さらには治療後にも患者を完全に回復させるために利用できる。

30

【0038】

食欲不振、栄養不良、中国のある地域のセレン欠乏、重症アルコール疾患すなわち硬変症、透析または語頭音消失患者および炎症性腸疾患患者ではセレノ蛋白質Pの血漿濃度が低くなると予測できる。これはこれらの患者のセレンステータスの低さで現れ、炎症性疾患の場合は合成の低下となって現れ、慢性衰弱および/または重症肝臓疾患すなわち硬変症になる。

【0039】

従って、本発明の第1の対象は、下記の段階(a)~(c)を含む、患者の炎症反応を伴う疾患をインビトロ診断またはモニターする方法にある:

(a) 患者からの生体試料を用意し、

40

(b) この生体試料中に含まれるセレノ蛋白質(selenoprotein)Pの量を測定し、

(c) 段階(b)で測定されたセレノ蛋白質Pの量を下記の(i)または(ii)と比較する:

(i) 非罹患患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質Pの量、

(ii) 同一患者からの過去の生体試料中に含まれていたセレノ蛋白質Pの量。

【0040】

「生体試料」とは、本明細書では血液試料、例えば全血試料を意味する。生体試料は血漿試料からなるのが最も好ましい。

本発明方法の第1の観点では、炎症反応を伴う疾患が全身性炎症反応症候群(SIRS)からなる。

50

本発明方法の第2の観点では、炎症反応を伴う疾患が敗血症性ショックからなる。

【0041】

本発明方法の第3の観点では、血管内皮の損傷に関連する炎症反応を伴う疾患が慢性炎症疾患からなる。

本発明方法の第4の観点では、慢性炎症疾患が炎症性腸疾患または結節性多発動脈炎等の全身性疾患群の中から選択される。

本発明方法の第5の観点では、炎症反応を伴う疾患が細菌、真菌、ウイルス性感染に関連した慢性炎症疾患からなる。

HIV感染で生じる炎症反応の変化を診断またはモニターすることが本発明の診断方法で一つの使用例である。

10

【0042】

本発明方法の最も有用な用途は、ノルエピネフリンおよびエピネフリン等の高濃度のカテコールアミンをベースにした治療を必要とする敗血症性ショックの疾患の診断およびモニターである。

【0043】

本発明方法の有用な用途は炎症反応を伴う下記のような疾患・病状の診断、モニターまたは予後観察である：

(a) 主要標的疾患（診断用、重症度評価用、予後用）

多臓器不全に関連または関連しない菌血症、真菌血症、寄生虫血症、ウイルス血症に関連または関連しない敗血症性ショック

20

(b) 関連標的疾患（予後および重症度用、診断用） - S I R S

(1) 敗血症性ショックを伴わない感染症、すなわち重症敗血症（腹膜炎、肺炎、髄膜炎、カテーテル関連感染症、尿管、胆管感染症、マラリア発作、特に大脳マラリア）、感染以外の起源：膵臓炎、広範囲の火傷、脂肪塞栓症に関連または関連しない多数の外傷、大量輸血、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）または同種疾患、特に炎症性疾患に関連する新生児腎不全（ARF）、外科大手術、

(2) 任意起源のショック、特に多臓器不全および重症灌流低下すなわち出血性、心臓性、アナフィラキシーショック

(3) 虚血-再灌流

(4) 圧挫症候群、大動脈交差クランプ、再灌流を伴う虚血（腸間膜の、下肢虚血）

30

(5) 長期癲癇重積状態、急性横紋筋融解症（労作性横紋筋融解症）悪性過温症

(6) 子癇

(7) 重症ぜん息発作重積状態

(8) 腫瘍融解症候群、全身性疾患の悪化、（急性）溶血性症候群

(9) 金属中毒（鉄Fe、銅Cu）：血管酸化応力を含む全ての中毒または被毒（パラコート、ダイオット）、移植（特に移植反応、二次凝結、移植片対宿主反応に関連する場合）

【0044】

(c) 酸化血管損傷を伴う全ての疾患（経過観察、特にセレン化合物を含むまたは含まない治療が悪化し、モニターする場合）

(1) 慢性感染症：HIV、心内膜炎（感染による動脈炎すなわち梅毒）

40

(2) 全身性疾患：（特にANCAの上昇に関連するもの）

(3) 壊死性脈管炎、ヴェグナー症候群、結節性多発性動脈炎、アレルギー性肉芽腫症、巨細胞性動脈炎、腎血管硬化症、高安病、バーガー病

(4) 自己免疫疾患：リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス（LES）、急性リウマチ熱、皮膚筋炎、全身性強皮症、血小板減少性血栓性紫斑病

(5) サイトカイン（TNF- α ）の上昇または腫瘍融解または内皮攻撃に関連する血液学および癌腫学的疾患

(6) カーラー病、リンパ腫特にTリンパ種

(7) 自然発生的または血液または腫瘍疾患の抗発癌治療で誘発された腫瘍融解症候群（急性白血病、充実性腫瘍であって特にサイトカインの上昇によるもの）

50

(8)免疫複合体病（バーガー病）

(9)アテローム性動脈硬化症（特にセレンを含むまたは含まない治療妨害または急性悪化の経過観察およびモニター）

(10)血管形成術後の術後血管再狭窄

(11)糖尿病（糖尿病性血管炎）

(12)妊娠経過観察、治療のモニター（特に子癇前症の初期検出）

(13)重症肝臓疾患、炎症性腸疾患

【0045】

一般的には、本発明方法を用いることによって、当業者はACCD-ISCMコンセンサス協議会で定義された炎症性疾患群の中から選択される炎症性疾患の患者の診断およびモニターを
10

【非特許文献26】

ケルススからガレンそしてポーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC、Aarts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【0046】

セレンの栄養学的状態による影響はいくらかあるが、母集団全体ではセレノ蛋白質Pの血漿濃度は安定している。種々の欧州国出身の414人を調査したところ、セレノ蛋白質Pの濃度はスペインの100%からギリシャの76%まで相違している（下記文献参照）。

【非特許文献27】

欧州地域の血清中のセレノ蛋白質P濃度の違い（Marchaluk E、Persson-Moschos M、Thorning EB、Akesson B、Eur J Clin Nutr、1995;49(1);42-48）
20

【0047】

セレノ蛋白質Pはセレン栄養学的状態の指標（特にセレンの栄養学的ステータスが低い場合の）指標になるように思われる。事実、フィンランドの研究では、セレンを経口で200 μg/日摂取した場合、セレノ蛋白質Pが増加するため約100 μg/日のベースラインセレン投与量を廃止した。観察されたセレン投与量は約40 μg/日のベースラインである（下記文献参照）。

【非特許文献28】

各種セレンを経口投与した後の各セレンステータスでの健康男性の血漿セレノ蛋白質Pレベル（Persson-Moschos M、Alftan G、Akesson B、Eur J Clin Nutr、1998;52(5);363-367）
30

【0048】

米国のセレン栄養学的ステータスは欧州よりも高いことは知られている（下記文献参照）。

【非特許文献29】

Rayman、M.Pの「人の健康におけるセレンの重要性」（Lancet;2000、356:233-41）

【0049】

グルタチオンペルオキシダーゼ等の他のセレノ蛋白質に比べて、セレノ蛋白質Pはセレン摂取量が低下したときに良く維持される（下記文献参照）。

【非特許文献30】

Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status、Persson-Moschos M、Huang W、Srikumar TS、Akesson B、Lindeberg S、Analyst 1995;120(3);833-836）
40

【0050】

既に述べたように、セレノ蛋白質Pの血漿濃度は極めて安定はしているが、正常なセレノ蛋白質Pの血漿濃度は出身地によっていくらか異なることが確認されている（下記文献参照）。

【非特許文献31】

Marchaluk et al.,1995、Persson-Moschos et al., 1998; Rayman et al., 2000; OP.Cit .

【0051】

異なる出身国の人々の間で認められるセレノ蛋白質 P 濃度の不一致は、統計的に有意なセレノ蛋白質 P の著しい低下に影響を及ぼすことはほとんどないので、セレン摂取量が極めて低い国、例えば中国、フィンランド（サプリメントをとらない場合）、ニュージーランドを除いては、被検者の出身国または地域に応じて本発明方法を合せる必要はない。

【0052】

しかし、本発明方法の最も好ましい実施例では、段階（b）で測定したセレノ蛋白質 P の量を、段階（c）で被検者と同じ出身地の非罹患者群中のセレノ蛋白質 P の予想値と比較する。

従って、患者が欧州、米国、オーストラリアまたはアジアの出身である場合は、段階（b）で測定したセレノ蛋白質 P の量を本発明方法の段階（c）でそれぞれ欧州、米国、オーストラリアまたはアジアの出身の非罹患者群の類似生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の平均量と比較するのが好ましい。

10

【0053】

本発明方法のさらに好ましい実施例では、出身国（例えばフランス、スペインまたはギリシャ等）を考慮に入れることができる。

本発明の一つの実施例では、本発明方法によって被検者の生体試料中の測定されたセレノ蛋白質 P の量が非罹患者の正常量より統計学的に低いときに、追加の段階（d）で上記疾患が発生したと診断できる。

【0054】

本発明の別の好ましい実施例では、本発明方法によって、被検者の生体試料中の測定されたセレノ蛋白質 P の量が非罹患者の正常量より低いか、同じ患者が前回の試験で測定した量よりも低いか、ほとんど変わらないときに、追加の段階（d）で上記疾患が持続していると診断できる。

20

【0055】

本発明のさらに別の好ましい実施例では、本発明方法によって、被検者の生体試料中で測定されたセレノ蛋白質 P の量が非罹患者の正常量と少なくとも同じか、同じ患者が前回の試験で測定した量よりも高いときに、追加の段階（d）で上記疾患から回復したと診断できる。

「少なくとも同じ」とは、本明細書では、比較される生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の平均量から少なくとも統計学的に異なる値のセレノ蛋白質 P の量を意味する。

30

【0056】

特定の理論に縛られるものではないが、本発明者は血管内皮細胞の損傷に関連する炎症反応を伴う疾患の患者、特に SIRS または敗血症性ショックの患者の治療では、非罹患者で測定されるセレノ蛋白質 P の血漿濃度の値より高い値が必要であると考えます。この状況はセレンの投与を主にした治療に基づく結果である。セレノ蛋白質 P の血漿濃度が正常値を超えるということは、急性または慢性の内皮酸化攻撃から内皮が守られているという患者のステータスを示しているといえる。

すなわち、本発明の別の実施例では、被検者の生体試料中で測定されたセレノ蛋白質 P の量が非罹患者の正常量より高いときに、追加の段階（d）で上記疾患から回復したと診断される。

40

【0057】

血管内皮細胞の損傷に関連する炎症反応を伴う疾患に罹っていない非罹患者からの生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の標準レベルの血漿濃度は少なくとも 50nmol/L であるのが好ましい（本発明方法の段階（c）で用いられる）。このセレノ蛋白質 P の血漿濃度値は 40~80nmol/L、好ましくは 40~70nmol/L、さらに好ましくは 40~60nmol/L であるのがより好ましい。

被検者の生体試料中で測定されるセレノ蛋白質 P の量が 30nmol/L 以下であるときに、そのセレノ蛋白質 P 血漿濃度が血管内皮細胞の損傷に関連する炎症反応を伴う疾患を示すのが好ましい。

【0058】

50

本発明の一つの実施例では、セレノ蛋白質 P の血漿濃度が 20nmol/L 以下のときにノルエピネフリンおよびエピネフリン等の高濃度のカテコールアミンを必要とする敗血症性ショックの患者であると診断される。

本発明の別の実施例では、セレノ蛋白質 P の血漿濃度が 15nmol/L 以下、特に 10 nmol/L 以下のときに死亡と診断され、特に、患者にセレン治療を行っている間にセレノ蛋白質 P の量が低い値を持続した場合に死亡と診断される。

一方、患者が疾患から回復する段階ではセレノ蛋白質 P の血漿濃度が正常値を越えることを本発明者は確認した。すなわち、敗血症性ショックから回復した患者のセレノ蛋白質 P の血漿濃度は超正常値の 106 nmol/L に達する。S I R S でない患者の超正常値は 181 nmol/L までである。

10

【0059】

本発明のさらに別の実施例では、治療期間中に経時的に採取した生体試料中の測定されたセレノ蛋白質 P の量が 20nmol/L 以下、厳密には 10nmol/L 以下を維持した場合、死亡と診断することができる。

特定の理論に縛られるものではないが、本発明者はセレノ蛋白質 P の増加が攻撃状態にある内皮で重要な防御メカニズムとなると考えている。このことが、セレンをベースにした治療またはサプリメント投与を行う（または行わない）急逝または二次的な内皮酸化損傷に関連する全ての全身性血液炎症の場合に、セレノ蛋白質 P の血漿濃度をモニターすることの重要性を裏付けている。

【0060】

20

本発明方法の一つの実施例では、比較段階 (c) で予め分かっている被検者の慢性的セレノ蛋白質 P 欠乏症を考慮に入れて、セレノ蛋白質 P の標準濃度に対するセレノ蛋白質 P の血漿濃度のわずかな低下を炎症性疾患を示すものと解釈しないようにする。

既に述べたように、本発明方法を用いてヒトおよび動物の敗血症性ショックの診断および敗血症性ショックの重症度を診断するための新規な生化学的マーカーすなわちセレノ蛋白質 P の血漿濃度のマーカーを作ることができる。

【0061】

さらに、患者のセレノ蛋白質 P の血漿濃度を経過観察することによって敗血症性ショック等の疾患の変化をモニターすることができる。セレノ蛋白質 P の血漿濃度が 20nmol/L または 30 nmol/L 以下の低レベルで持続する場合、特に治療中に多量のセレンを投与した場合

30

、本発明方法によって全身性炎症が持続していると診断できる。本発明方法はセレノ蛋白質 P の血漿濃度を経過観察することによってセレンをベースにした治療をしている患者のベネフィットをモニターするのに極めて有用である。

【0062】

さらに、敗血症性ショック患者においてセレノ蛋白質 P が低レベルを持続することは疾患が重篤であることを意味し、死亡のマーカーになる。

本発明の最も好ましい実施例では、被検者の生体試料中に含まれるセレノ蛋白質 P の量を測定する本明細書の段階 (b) の操作はセレノ蛋白質 P に対する抗体を用いた免疫学的検定 (アッセイ) で行う。この免疫学的検定法の実施方法に関しては下記文献を参照されたい。

40

【非特許文献 32】

Mostert 達の論文 (1998, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 357(2):326-330)

【0063】

モニター目的で本発明方法を実施する場合には、患者が病院の集中治療室に入ってから少なくとも毎日モニターする。救急治療期間後は、患者の疾患からの回復をモニターするために治療期間中に本発明方法を隔日に行うことができる。

急性疾患場合特に、例えばセレノ蛋白質 P をベースにしたセレンをベースにした治療の場合には、セレノ蛋白質 P を毎日投与して、疾患およびその重症度に応じたセレノ蛋白質 P の血漿濃度を得るのが好ましい。その後は隔日投与にし、回復期には週 1 回の投与にする

50

のが好ましい。

【0064】

急性障害のない慢性疾患または妊娠の場合には、ルーチンの生物学的検査の一部としてセレノ蛋白質Pの投与を行うことができる。

セレンをベースにした治療のモニターでは、セレノ蛋白質Pの血漿濃度をモニターして、疾患の重症度および血液成分の酸化ストレス度に応じてセレノ蛋白質Pの最適濃度が得られるようにすることができる。血液成分の酸化ストレス度が高い敗血症性ショックの場合には、セレノ蛋白質Pのレベルを基準値より高くし、極めて高いレベルに維持するのが正しい。

【0065】

本発明の他の対象は、患者の炎症反応を伴う疾患をインピトロ診断またはモニターするためのキットにおいて、生体試料中に含まれるセレノ蛋白質Pの量を検定する手段(i)を含むキットにある。

本発明の好ましくは実施例では、このキットは標準対照として用いるセレノ蛋白質Pを所定量含んだ一つまたは複数の試料(ii)をさらに含む。このキットは所定濃度のセレノ蛋白質Pを含んだ1つの標準試料を含むのが好ましい。この濃度は50~80nmol/L、好ましくは約50nmol/Lのセレノ蛋白質Pであるのがより好ましい。

【0066】

セレノ蛋白質Pの複数の標準試料を含むキットの実施例では、セレノ蛋白質Pの濃度を200、100、50、30、20および10 nmol/Lにし、これらの濃度を用いて検量線を作り、被検者の生体試料中のセレノ蛋白質Pの血漿濃度を正確に求めることができるようにするのが好ましい。

本発明の最も好ましい実施例での標準試料は液体中にセレノ蛋白質Pを含む。すなわち、所定濃度のセレノ蛋白質Pを含む生理食塩水緩衝液(例えば最小必須培地、MEM)または血漿試料のいずれかの液体中にセレノ蛋白質Pを含む。

【0067】

セレノ蛋白質Pの標準試料は凍結乾燥の形でバイアル中に包装でき、キット使用時に適切な緩衝液の必要量を添加して使用する。

本発明キットの一つの実施例では、生体試料中に含まれたセレノ蛋白質Pの量を検定する手段がセレノ蛋白質Pに対する抗体からなる。この抗体はMOSTERT達(1998)(非特許文献32)に開示の抗体にするのがさらに好ましい。

従って、本発明キットはセレノ蛋白質Pに対する抗体を適切な緩衝液中に懸濁状態または凍結乾燥状態で含むバイアルを含むことができる。

【0068】

セレノ蛋白質Pの血漿濃度は精製したセレノ蛋白質Pを標準として用いる免疫学的検定法によって求めることができる(下記文献参照)。

【非特許文献33】

A Novel Method for the Purification of Selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J, Archives of Biochemistry and Biophysics; 357(2):326-330, 1998

【0069】

母集団全体のセレノ蛋白質Pの基準レベルは約50 nmol/Lで、40 nmol/L以上である。30 nmol/L以下ではセレノ蛋白質Pの血漿濃度が低いとみなすことができ、10 nmol/L以下では極めて低いとみなされる。

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明が下記実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0070】

実施例1

21人のICU患者と7人の健康なボランティアに対する予備試験で、精製したセレノ蛋白質Pを標準として用いた免疫学的検定法によってセレノ蛋白質Pの血漿濃度を測定した(

10

20

30

40

50

下記文献参照)。

【非特許文献34】

A Novel Method for the Purification of Selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J, Archives of Biochemistry and Biophysics; 357(2):326-330, 1998

【0071】

この試験では、21人のICU患者の中の7人が敗血症性ショック患者であった。投与はICU入室時と、その後はICU入室期間中と、週1回の間隔で行った。敗血症性ショックのICU患者では入室時に全身性炎症のないICU患者に比べてセレノ蛋白質P血漿濃度が極めて低いことが認められた([表1] 参照)。入室期間中に検出できないほどの極度に低いセレノ蛋白質P血漿濃度が認められたのは敗血症性ショック患者にのみである。セレノ蛋白質Pの減少は重症感染症または急性呼吸困難症候群のような重症の炎症有害事象と関連していた。死亡した3人の敗血症性ショック患者の死亡前の最後の測定値は重症SIRSでないと言われた死亡した3人の患者の値に比べて極めて低かった。これらのセレノ蛋白質P値は死亡した炎症性でない群の3患者でみられた値よりも有意に低かった($p < 0.05$; マンホイットニー検定法)。この差は患者数が少ないにもかかわらず有意であることは明らかである。

10

【0072】

入室時のセレノ蛋白質Pのレベルは、簡易急性生理学評点II (Simplified Acute Physiology Score II) (SAPS II) に従って測定される重症度との相関性が乏しかった(r 約0.3)

20

【非特許文献35】

欧州/北米多施設治験に基づくA new simplified acute physiology Score (SAPA II)、Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F, JAMA 1993; 270: 2957-2963

【0073】

このことから、セレノ蛋白質Pは患者の全体的重症度を検定(アッセイ)するのではなく敗血症性ショック(およびSIRS)の重症度を測定するものであるということがわかる。

【0074】

【表1】

30

敗血症性ショックICU患者の入室時のセレノ蛋白質Pの血漿濃度

	敗血症性ショック患者 (全員挿管有り)	SOFA評点の心血管機能 スケール4の敗血症性 ショック患者を含む
患者数	(7患者) (6患者のみ入室時に測定)	(4患者) (3患者のみ入室時に測定)
セレノ 蛋白質P	15 ± 11 nmol/L (1 - 28)	16 ± 9 nmol/L (7 - 28)
死亡率	(3患者)	(3患者)

40

【0075】

S O F A 評点 [S O F A (敗血症に関連した器官不全評価)] とは、器官機能障害/不全を意味する(下記文献参照)。

50

【非特許文献36】

J.L.VINCENT、Moreno R、Takala J 達の集中治療医療、1996；22：707-710）。

【0076】

結果は平均値±標準偏差で示し、（ ）内は最大値および最小値である。

【0077】

実施例2

健康なボランティアおよび他のICU患者と比較した敗血症性ショック患者のセレノ蛋白質Pの測定

入室時のセレノ蛋白質Pの血漿濃度は重症SIRSでない（定義については下記および[表2]を参照）患者群（p=0.0015；マンホイットニー検定法）および健康なボランティア（p=0.003）と比べて敗血症性ショック患者群で有意に低かった。この差は患者数が少なさにもかかわらず有意であり、この2つの群の明らかな差を裏付けるものであることは明らかである。

10

同様に、入室時のセレノ蛋白質Pの血漿濃度は重症SIRSでない患者群（p<0.05）および健康なボランティア（p<0.01）と比べて重症SIRS患者群で有意に低かった（表2参照）。

重症SIRSでない患者は重症感染症または敗血症性ショック、重症急性膵炎、広範囲の火傷が判明していないか、疑わしくない患者、SAPS IIが30以上の術後事象がみられない患者および大動脈交差クランプ、下肢虚血-再灌流、腸間膜血管虚血等の大再灌流-灌流処置をしていない患者と定義される。

20

SAPS IIによって定義される重症度評点の平均値はSIRSでない患者群の方が重症SIRS患者群よりも低く、SAPS II 36±11に対してSAPS II 47±14であった。しかし、SIRSでない患者群の中にもSAPS IIの値が極めて高い患者がいた（SAPS II値が35以上の患者が6人）。

【0078】

【表2】

ICU患者の入室時セレノ蛋白質P血漿濃度

群	敗血症性ショック または 重症SIRS患者	重症SIRSでない患者	健康なボランティア
患者数	(9患者) (8患者のみ 入室時に測定)	(12患者)	(7人)
セレノ 蛋白質P	17±12 nmol/L (1-38)	55±45 nmol/L (20-181)	49±8 nmol/L (39-65)

30

(p<0.01 対 健康なボランティア)

(p<0.05 対 重症SIRSでない患者)

SIRS：全身性炎症反応症候群

40

【0079】

敗血症性ショックで入院した7患者の初期投与量は全て30nmol/Lにした。この群では4患者が0.1µg/kg×分以上の投与量でエピネフリンまたはノルエピネフリンを必要とし、これはSOFA評点4の心血管のスケール値に対応し、最大心血管障害である。これらの4人のうち3人の初期測定におけるセレノ蛋白質P値は15nmol/L以下であった。これらの4人のうち3人が敗血症性ショックで死亡した。死亡した3患者の全員が初期（すなわち入室時の

50

) セレノ蛋白質 P の血漿濃度が 15nmol/L 以下であった。

さらに、上記患者のセレノ蛋白質 P の血漿濃度は入室時から最初の週一回の測定までの間にさらに低下していた。上記患者の値は敗血症性ショック患者 7 人中 3 人の 10nmol/L より低く、敗血症性ショック患者 7 人中 6 人の 16nmol/L より低かった。最初の週一回の測定でセレノ蛋白質 P の血漿濃度が 28nmol/L を持続していた敗血症性ショック患者だけが生存した。

【0080】

実施例 3

他の S I R S 患者

重症 S I R S 患者群の 1 人の女性患者には入院時に重症喘息に関連する重症敗血症（遡及的に百日咳菌と診断された）があった。この患者の入室時のセレノ蛋白質 P の血漿濃度は重症 S I R S 群の中で最高の 38nmol/L であったが、セレノ蛋白質 P の血漿濃度は 7.5 nmol/L まで急低下し、同時に患者は極めて重症な成人呼吸窮迫症候群（ARDS）を発症し、100% FiO₂ での人工呼吸、高レベルの陽性呼気終圧、一酸化窒素および腹臥位 - 背臥位を必要とした。

10

重症 S I R S 患者群の別の患者には多数の重症の外傷があった。この 34 歳の男性には緊急外科手術を必要とする重症な胸部および腹部の外傷があり、さらに、両方の大腿骨が折れ、片方の上腕骨も折れていた。この患者は初期にショック死状態で、多量の輸血を必要とした。重症の横紋筋融解症を発症し、さらに重症脂肪塞栓症の極めて確証的な臨床的および生物学的像を示し、その後、感染症が疑われた。この患者のセレノ蛋白質 P の血漿濃度は入室時に低く（セレノ蛋白質 P : 10nmol/L）、ICU 入室期間中も低いままであった。

20

患者は 3 週間弱で ICU から整形外科病棟に移った。セレノ蛋白質 P が母集団全体で安定しており、また、多数の外傷を負った若い患者は事故前には健康であったので、この患者が上記のような低いセレノ蛋白質 P の血漿濃度を示したことは、重症 S I R S 群でみられたセレノ蛋白質 P の著しい低下は重症 S I R S の症例で急速に現れるということを示している。

【0081】

実施例 4

重症 S I R S でない患者

重症 S I R S でない患者では 12 人中 4 人の初期測定でのセレノ蛋白質 P の血漿濃度が 20 ~ 30nmol/L であった。その中の 1 人はセレン欠乏群（長期透析）であり、2 人は虚血 - 再灌流外傷に誤分類されていた（一人は一過性乳酸性アシドーシスとして知られるてんかん重積であり、一人は下肢血管交差クランプの後の出血および心筋梗塞であった）。

30

反対に、重症 S I R S でない ICU 患者では高レベルのセレノ蛋白質 P が認められた。この群では 6 人が 60 nmol/L 以上のセレノ蛋白質 P の血漿濃度を示し、SAPA II 値が高い ICU 患者でもそうであった。

実際に、全患者において SAPS II 重症度評点とセレノ蛋白質 P の血漿濃度との相関性はほとんどない ($r = 0.33$)。また、重症 S I R S 患者群においても SAPS II 重症度評点とセレノ蛋白質 P 血漿濃度との相関性はほとんどない ($r = 0.25$)。SAPS II 重症度評点は ICU 患者の死亡確率を示すものであり、S I R S または敗血症の特異的重症度を示すものではないことは明らかである（下記文献参照）。

40

【非特許文献 37】

ケルススからガレンそしてボーンへ：急性炎症の疾病、症候群、疾患、Marshall JC、Aarts MA、集中治療および救急薬の年鑑、Vincent JL ed、Springer Verlag、2001、3-12

【0082】

平均 SAPS II 重症度評点は重症 S I R S でない患者の方が重症 S I R S 患者よりも低く、 47 ± 14 対 36 ± 11 ($p = 0.055$) であった。しかし、両群の死亡率は近く、重症 S I R S 患者群（全員敗血症性ショック患者）では 9 人中 3 人が死亡し、重症 S I R S でない患者群では 12 人中 3 人が死亡した。

【0083】

実施例 5

50

重症度、経過観察

死亡した敗血症性ショック患者3人の死亡前に認められた最後のセレノ蛋白質P血漿濃度は死亡した重症SIRSでない患者3人の値と比べて有意に低かったことは明らかである(表3参照)。

さらに、ICU退室前の最後の投与でLセレノ蛋白質P血漿濃度が3nmol/Lと極めて低かった生存患者は摂食障害患者であり、従って、初期にセレン欠乏症を有し、ICU入室期間中に数回の院内感染(初期腹膜炎に続いて2回の院内腹膜炎など)を有していた。この患者は退室時に持続性腸管瘻を有していた。

退室前に認められた平均セレノ蛋白質P血漿濃度は、死亡した重症SIRS患者が10nmol/Lであるのに対して、生存している重症SIRS患者は23nmol/Lであった。しかし、セレンは指示量である1日当たり40μgしか補充しなかったことに注目すべきである。このような炎症性患者ではこのような補充量では極めて不十分であると思われる(下記文献参照)。

【非特許文献38】

セレンおよび「自由」電子、敗血症または炎症ICU患者を対象としたセレンの追跡、フォルスヴィル(Forceville) X、集中治療薬,2001、27:16~18

【0084】

事実、全てのセレノ蛋白質においてセレノ蛋白質Pの合成には所定量のセレンが必要である。

セレノ蛋白質Pはセレン補充の経過観察または炎症性ICU患者の治療の良い指標である。

【0085】

【表3】

ICU退室前最後のセレノ蛋白質Pの血漿濃度

群	敗血症性ショックまたは重症SIRS患者	重症SIRSでない患者	
死亡患者	(3人) (敗血症性ショック患者全員)	(3人) (SIRS死亡患者なし)	
セレノ蛋白質P	10 nmol/L (0-24)	49 (27-84)	P<0.05
ICU生存患者	(6人)	(9人)	
セレノ蛋白質P	23 nmol/L (3-60)	41 (20-77)	

【0086】

上記の結果は平均値±標準偏差であり、()内は最大値および最小値である。SIRSは全身性炎症反応症候群を表す。

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/093175 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
 (21) International Application Number: PCT/JP02/05350
 (22) International Filing Date: 15 May 2002 (15.05.2002)
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data: 50/290,973 16 May 2001 (16.05.2001) US
- (71) Applicant and
 (72) Inventor: FORCEVILLE, Xavier [FR/FR]; 12 rue de la Champagne, F-77860 Saint Germain sur Morin (FR).
- (74) Agents: CATHERINE, Alain et al.; Cabinet Harle et Philip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
 — of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only
- Published:
 — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/093175 A1

(54) Title: METHODS AND KITS FOR THE IN VITRO DIAGNOSTIC OR FOR THE MONITORING OF A DISEASE INVOLVING AN INFLAMMATORY REACTION

(57) Abstract: The invention relates to a method for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said method comprises the steps of: a) providing a biological sample from said patient; b) measuring the amount of selenoprotein P which is contained in said biological sample; c) comparing the amount of selenoprotein P measured at step b) i) with the amount of selenoprotein P which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease; or ii) with the amount of selenoprotein P which was contained in a biological sample from the same patient.

WO 02/093175

PCT/EP02/05350

Methods and kits for the *in vitro* diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to the field of the diagnostic and of the monitoring of several diseases involving an inflammatory reaction, especially those which are associated with damages to the vascular endothelium in human and animals.

10 **Background of the invention**

Severe sepsis and more particularly at a further stage, septic shock, leading to multiple organ failure are major medical problems in critically ill patients and are the most common cause of death in medical and surgical intensive care unit (ICU) (Definition and epidemiology This LG, Dhainaut JF ; in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Parked. ; Sunders 2000). Septic shock is a public health problem because of its frequency (500 000 to 700 000 new cases per year in the United States), and of its mortality rate (around 45%). The systemic repercussion of septic shock is considered as the result of an uncontrolled and generalized immuno-inflammatory reaction. In the case of septic shock, that reaction results from a systemic host response to invasive infection. (From Celsus to Galen to Bone: The illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12). This reaction leads to organ dysfunction and, at a further stage, organ failure.

The physiopathology of septic shock could be considered as a consequence of an overproduction of free radicals (Novelli, G. P., Role of free radicals in septic shock, J Physiol Pharmacol; 1997,48 (4): 517-527) (Zimmerman, J. J., Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis, Critical Care Medicine; 1995, 23, (4): 616-617) This does not contradict the usual diagrams concerning septic shock but points to free radicals as being directly responsible for cellular damages. The main origin of this deleterious overproduction of free radicals would be the activated polynuclear neutrophils adhering to the venous postcapillary segment (Bast, A.; Haenen, G. R.; Doelman, C. J., Oxidants and antioxidants: state of the art, Am J Med; 1991,

CONFIRMATION COPY

91, (3C): 2S-13S). In septic shock, nitric oxide is known to have a marked role. It appears early in septic shock. Its deleterious effects on the organism seems to be essentially mediated by peroxynitrite (ONOO-), formed during the simultaneous synthesis of NO by endothelium cells and superoxide anion by phagocytic cells, such as polymorphonuclears. Moreover, the endothelium is a particular target for peroxynitrite, Selenium may be an efficient treatment of septic shock in particular for increasing selenoprotein P concentration (Selenium and the "free" electron" -Selenium a trace to be followed in septic or inflammatory ICU patients, Forceville X, Intensive Care Medicine; 2001, 27: 16-18).

The early diagnosis and treatment of septic shock have to be conducted in a state of emergency. In man, at the present time, in the only phase III positive therapeutical trial in the treatment of the inflammatory reaction of septic shock, patients had to begin treatment within the first 24 hours of septic shock (Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis, Bernard G.R. , Vincent JL, Laterre PF, New England Journal of Medicine; 2001). In fact, microcirculation endothelium is rapidly damaged during septic shock. The massive alterations of endothelium have a major physiopathological role in the consequences of septic shock and lead to organ failure (Sepsis/septic shock: Participation of the microcirculation: An abbreviated review, Hinshaw LB Critical Care Medicine 1996, 24 (6), 1072-1078).

There is a need in the art to have a relatively simple and reproducible biological marker to precisely identify septic shock patients in order to have reproducible epidemiological data, to define appropriate populations of patients to be included in sepsis trials, to identify populations of patients who might benefit from those therapies, and to monitor the evolution of septic shock under those therapies. Moreover that marker should ideally target the, or a, biological process responsible for the manifestation of septic shock. "The search for such (a) marker(s) is an important priority for ongoing investigations" (From Celsus to Galen to Bone: The Illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12).

However, the diagnostic of sepsis and septic shock remains presently complex and depends on definitions that are based on clinical manifestations (Groeneveld, This, in Dhainaut 2000, Pg. 355). They characterize a subgroup of

patients with systemic inflammatory response syndrome not only due to infection but also to diseases such as pancreatitis, extended burns, and polytrauma. For further details, see the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine, conference consensus, Chicago 5 1991 (The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure, Chest 1992; 101:1644-55), and the article by Marshall and Aarts (From Celsus to Galen to Bone: The Illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12). Sepsis, 10 severe sepsis and at a further stage septic shock may be due to infection associated or not with detected bacteremia due to bacteria, but also fungi or virus.

Septic shock is defined as a sepsis-induced hypoperfusion (i.e. systolic blood pressure < 90 mmHg or a reduction of ≥ 40 mmHg from baseline) despite 15 adequate fluid resuscitation along with the presence of perfusion abnormality that may include -but are not limited to- lactic acidosis, oliguria or an acute alteration in mental state. Patients who are receiving inotropic or vasopressor agents may not be hypotensive at the time that perfusion abnormalities are measured (Bone, 1992, ref. 2925) (Definition and epidemiology This LG, 20 Dhainaut JF ; in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Park ed. ; Sunders 2000). This clinical definition established in the ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure, Chicago, August 1991 remains the only valid one (The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure, Chest 1992; 101:1644-55).

25 Different markers of septic shock, and especially of its initial manifestation, have been proposed, but are non-specific and insensitive (Diagnosis : from clinical signs to haemodynamic evaluation, Groeneveld AB J, This GT ; in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Park ed. ; Sunders 2000). 30 As activation of inflammatory pathways, including the cytokine network, is considered to play a major role in the pathogenesis of septic shock, cytokines have been extensively studied as a potential marker of septic shock (Cytokines and Anticytokines in the Pathogenesis of sepsis, van der Poll T, van Deventer S JH, Infectious disease Clinics of North America; 13 (2) 1999; 413-426). In 35 comparison with other cytokines, IL-6 (a mixed pro- and anti-inflammatory cytokine) has been reported most consistently in the circulation of septic patients. However, IL-6 level shows considerable variation, and it is not

WO 02/093175

PCT/EP02/05350

4

possible to define a cut-off value to identify septic shock patients (Cytokines and Anticytokines in the Pathogenesis of sepsis, van der Poll T, van Deventer S JH, Infectious disease Clinics of North America; 13 (2) 1999; 413-426) Procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), leukocytosis, lactate concentration, coagulation parameters, and other parameters have also been proposed to identify septic shock patients (Diagnosis of sepsis: Novel and Conventional Parameters, Rheinart K, Meisner M and Hartog C, Advances in sepsis, 2001; 42-51). However, though they seem to be useful parameters to improve the diagnosis and monitoring of septic shock, they cannot clearly identify septic shock patients due to their lack of specificity and the diagnosis of septic shock remains based on clinical parameters. (From Celsus to Galen to Bone: The Illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12). Presently, laboratory abnormalities can only be supportive for the diagnosis of sepsis and cannot prove the presence of septic shock. Taken together, abnormalities in hematological and chemical laboratory parameters may only constitute indicators of septic shock (Diagnosis : from clinical signs to haemodynamic evaluation, Groeneveld AB J, This GT ; in Septic Shock, Dhainaut JF, This LG, G Park ed. ; Sanders 2000). Each alone of this parameters carries little meaning. (Defining a Clinical Syndrome of Systemic inflammation, Vincent JL, Byl B, Sepsis; 200; 4:15-19).

There is also an urgent need in the art to find a specific and reliable parameter to define septic shock patients. A precise definition of septic shock patients could allow an early diagnosis and a follow-up of septic shock. This parameter should ideally be closely related to the physiopathological process of septic shock (From Celsus to Galen to Bone: The Illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based on the observation that selenoprotein P can be used as a biochemical marker of septic shock, both in man and in animals, and more generally as a biochemical marker of the severity of the systemic inflammation response syndrome (SIRS).

Thus, a first object of the present invention consists of a method for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said method comprises the steps of :

- a) providing a biological sample from said patient;
- b) measuring the amount of selenoprotein P which is contained in said biological sample;
- c) comparing the amount of selenoprotein P measured at step b)
 - i) with the amount of selenoprotein P which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease; or
 - ii) with the amount of selenoprotein P which was contained in a biological sample from the same patient.

By « a disease involving an inflammatory reaction », it is intended herein a disease wherein the inflammatory reaction is associated with an activation of the peripheral blood phagocytic cells, namely monocytes/macrophages and most importantly polymorphonuclear cells and more specifically neutrophils. Most preferably, a « disease involving an inflammatory reaction » as defined above is also associated with a damage to the vascular endothelial cells.

By « amount » of selenoprotein P, it is intended herein any parameter or unit of measure which allows the quantification of selenoprotein P in a sample. An amount of selenoprotein P may be expressed as an absolute quantity in a sample (e.g. number of moles of selenoprotein P) or as a concentration (e.g. nmol/L of selenoprotein P in the sample).

The damage to the vascular endothelial cells may be present at the onset of the disease or alternatively is a consequence of the onset of the disease and thus consists of a secondary damage to the vascular endothelial cells.

In a first preferred embodiment, the disease consists of a systemic inflammation response syndrome (SIRS), and most preferably of a septic shock.

In a second preferred embodiment, the disease consists of a chronic inflammatory disease. Said chronic inflammatory disease may be selected from the group consisting of a systemic disease such as polyarteritis nodosa. The chronic inflammatory disease may also be a disease related to a bacterial, a fungal or a viral infection or may be an eclampsia, therefore the follow up of selenoprotein P during pregnancy may be done during routine pregnancy follow up.

In a further preferred embodiment, the occurrence or the aggravation of the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of Selenoprotein P measured in the biological sample is lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals or when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is lower than that measured in a sample from the same patient in a former test.

In another preferred embodiment, the persistence of the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of Selenoprotein P measured in the biological sample is lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals or when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is lower than or not higher than, or equal to, the amount measured in a sample from the same patient in a former test.

In a still further preferred embodiment of the method disclosed above, the recovering from the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is at least equal to the normal amount which is contained within non-affected individuals or when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is higher to that measured in a sample from the same patient in a former test.

In a further preferred embodiment of the method above, mortality is predicted when the amount of selenoprotein P which is measured within a serial of biological samples collected during the time period of the therapeutical treatment is always lower than 20nmol/L, preferably lower than 10 nmol/L.

The invention also relates to a kit for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction associated with a damage of the vascular endothelial cells within a patient, wherein said kit comprises (i) means for assaying the amount of Selenoprotein P contained in a biological sample.

WO 02/093175

PCT/EP02/05350

7

In a first preferred embodiment, the kit of the invention further comprises (ii) a sample or a plurality of samples containing each respectively a predetermined amount of Selenoprotein P to be used as a standard reference.

In a second preferred embodiment of the kit according to the invention, the means for assaying the amount of Selenoprotein P contained in the biological sample consist of antibodies directed against Selenoprotein P.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 It has now been found according to the invention that a marked decrease in the blood concentration of selenoprotein P is measured in patients suffering from diseases that involve an inflammatory reaction.

The inventor has now shown that a marked decrease in the blood concentration of selenoprotein P occur in patients affected with severe sepsis, particularly in patients which are affected with a systemic inflammation response syndrome (SIRS) and that a more further decrease in the blood selenoprotein P level is measured in patients which are undergoing a septic shock.

20 Selenoprotein P has been known since 1971. It is the only selenoprotein to contain more than one selenium atom per polypeptide chain in the form of 10 selenocysteine residues per polypeptide (Orphan selenoproteins Burk RF, Hill KE BioEssays 21 (3): 231-237, 1999) (Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation Mostert V, Archives of Biochemistry and Biophysics; 376 (2): 433-438, 2000). Selenoproteins are defined as proteins containing selenocysteine. Selenocysteine is known to be the 21st amino acid by the replacement of sulfur to selenium in the cysteine. The comparison of deduced amino acid sequences of selenoprotein P from different species indicates almost complete conservation of cysteine and selenocysteine residues when these amino acids are considered together. Selenoprotein P is mainly synthesized in the liver. There are at least two distinct isoforms of selenoprotein P in human plasma (A Novel Method for the Purification of Selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J, Archives of Biochemistry and Biophysics; 357 (2): 326-330, 1998).

35 Selenoprotein P is present in a large amounts of the surface of the endothelial cells. Through its heparin-binding properties it could bind to the inflamed endothelium (Burk, R. F.; Hill, K. E.; Boeglin, M. E.; Ebner, F. F.;

Chittum, H. S., Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues, *Histochem Cell Biol*; 1997, 108 (1), 11-15).

Because of the high stability of the selenoprotein P plasma concentration in healthy individuals as well as in individuals affected with diverse pathologies which are not involving an inflammatory reaction, selenoprotein P consists of a highly reliable marker both for diagnosing inflammatory diseases and for monitoring the recovering of patients from these inflammatory diseases, for example during the whole time period of treatment and even after the end of the treatment in order to ensure the total recovery of the patient from the disease.

In anorexic, malnutrition, selenium deficiency, in particular in some countries of China, severe alcoholic disease i.e. cirrhosis, dialyzed or apheresis patients as in inflammatory bowel diseases patients, seleno protein P plasma concentration may be expected to be low, reflecting the low selenium status of these patients and perhaps in case of inflammatory diseases the chronic consumption and/or reduced synthesis for severe liver diseases i.e. cirrhosis.

Thus, the present invention firstly relates to a method for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said method comprises the steps of :

- a) providing a biological sample from said patient;
- b) measuring the amount of selenoprotein P which is contained in said biological sample;
- c) comparing the amount of selenoprotein P measured at step b)
 - i) with the amount of selenoprotein P which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease; or
 - ii) with the amount of selenoprotein P which was contained in a biological sample from the same patient.

By a « biological sample », it is herein intended a blood sample, such as a whole blood sample. Most preferably, the biological sample consists of a blood plasma sample.

According to a first aspect of the method, the disease involving an inflammatory reaction involving an inflammatory reaction consists of a Systemic Inflammation Response Syndrome (SIRS).

According to a second aspect, the disease involving an inflammatory reaction consists of a septic shock.

According to a third aspect, the disease involving an inflammatory reaction associated with a damage of the vascular endothelial cells consists of a chronic inflammatory disease.

5 According to a fourth aspect, the chronic inflammatory disease is selected from the group consisting of the inflammatory bowel disease or a systemic disease such as polyarteritis nodosa.

In a fifth aspect, the disease involving an inflammatory reaction consists of a chronic inflammatory disease related to a bacterial, a fungal or a viral infection. The diagnostic or the monitoring of the evolution of the inflammatory reactions occurring during a HIV infections is an illustrative example of the use of the diagnostic method disclosed herein.

10 Most preferably, the method according to the invention is highly useful for diagnosing as well as monitoring septic shock disorders which require a treatment based on a high level of catecholamines such as norepinephrine and epinephrine.

15 More preferably, the method according to the invention is performed for the diagnosis, the monitoring or for pronostic purposes for the following pathologies involving inflammatory reactions :

20 a/ Main target diseases (for diagnostic, severity, pronostic)
⇒ Septic shock associated or not with bacteremia, funguemia, parasitemia, viremia, associated or not with multiple organ failure,

25 b/ Associated target diseases (for pronostic and severity, also for diagnostic)- SIRS :

• infections without septic shock ie. with severe sepsis, (ie. peritonitis, pneumonia, meningitidis, catheter related infection, urinay, biliary tract infection, atack of malaria, especially cerebral malaria)
30 non infectious origin : pancreatitis, burns, polytrauma associated of not with fat embolism, massive transfusion, adult respiratory distress syndrom (ARDS), or similar diseases especially in newborn acute renal failure (ARF) related to inflammatory disease, major surgery.

35 • shock whatever the origin especially with multiple organ dysfunction and severe hypoperfusion : i.e. hemorrhagic, cardiogenic, anaphylactic.

- ischemia-reperfusion :
 - crush syndrom, aortic cross clamping, ischemia with reperfusion (ie. mesenteric, lower limb ischemia).
 - prolonged status epilepticus, acute rhabdomyolysis (ie. exertionnal rhabdomyolysis) malignant hyperthermia.
 - eclampsia
 - severe status asthmaticus
 - tumoral lysis syndrom , exacerbation of systemic diseases. (Acute) hemolytic syndrom
 - Metals intoxication i.e. iron (Fe), copper (Cu) ; all intoxication or poisoning involving vascular oxidative stress (i.e. paraquat, diquat) transplantation (especially if associated with graft reaction, second set, graft versus host reaction).
- 15 c/ All diseases involving oxidative vascular damages, for the follow-up especially in cases of exacerbation and the monitoring of treatment involving or not selenium compound.
- ⇒ Chronic infection :
- i.e. HIV, endocarditis, (infection related arteritis i.e. syphilis)
- 20 ⇒ Systemic diseases : (especially those associated with elevated ANCA) :
- ⇒ i.e. necrotizing angeitis, Wegner's syndrome, polyarteritis nodosa, allergic granulomatosis, temporal arteritis, nephroangiosclerosis, Takayasu's disease, Buerger's disease
- Autoimmune diseases : i.e. rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (LES), acute rheumatic fever, dermatomyositis, systemic scleroderma thrombotic thrombocytopenic purpura
- 30 ⇒ hematologic and cancerologic diseases -associated with elevated cytokines (i.e. TNF- α) or tumoral lysis, or endothelium aggression
- Kahler's disease, Lymphoma especially T cell Lymphoma,
 - tumoral lysis syndrom either spontaneous or induced by anti carcinologic treatment in hematologic or tumoral diseases (i.e. acute leukemia, solid tumor especially with elevated cytokines) .
- 35 • Immun complex diseases (i.e. Berger's disease)

- ⇒ Atherosclerosis (especially for follow-up and the monitoring of treatment prevention or for acute exacerbation, including or not selenium)
- 5 Post-operative vascular restenosis following vascular angioplasty
Diabetes (diabetic angitis)
- ⇒ Pregnancy follow-up, monitoring of treatment (especially for the early detection of preeclampsia).
- 10 ⇒ Severe liver diseases, inflammatory bowel disease.

In general, the method of the invention enables the one skilled in the art to diagnostic and monitor patients with the inflammatory diseases selected from the group of inflammatory diseases which are defined in the ACCD-ISCM Conference consensus (from Celsus to Galen to Bone: The illnesses syndromes and diseases of acute inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12).

20 In the general population, selenoprotein P plasma concentration is stable, though it could be somewhat affected by the selenium nutritional status of the population. In a survey of 414 people from various European countries, selenoprotein P level varies from 100% for Spain, to 76 % for Greece (Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions, Marchaluk E, Persson-Moschos M, Thorling EB, Akesson B, Eur J Clin Nutr, 1995; 49 (1): 42-48). Selenoprotein P appears to be an index of selenium nutritional status especially in the case of low selenium nutritional status. Indeed, in the Finland studies, a baseline selenium intake of about 100 µg/day abolishes the increase of selenoprotein P under oral supplements of 200 µg/day selenium, contrary to what was observed in the case of a baseline selenium intake of about 40 µg/day (Plasma selenoprotein P levels of healthy males in different selenium status after oral supplementation with different form of selenium, Persson-Moschos M, Aftan G, Akesson B, Eur J Clin Nutr; 1998, 52 (5): 363-367). Also, in the United States selenium nutritional status is known to be higher than in Europe (Rayman, M. P., The importance of selenium to human health, Lancet; 2000, 356: 233-41). Compared to other selenoprotein,

such as glutathione peroxidase, selenoprotein P concentration is better preserved during the decrease of selenium intake (Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status, Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Akesson B, Lindeberg S, *Analyst*, 1995,; 120 (3): 833-836).

5 As it is detailed hereabove, although the selenoprotein P plasma concentration is highly stable, some differences in the normal selenoprotein P plasma concentration were observed when individuals from various geographical origins were compared (see Marchaluk et al., 1995, Persson-Moschos et al., 1998; Rayman et al., 2000; *OP. Cit.*).

10 The discrepancies in selenoprotein P concentration which are observed in individuals belonging to distinct countries of origin do not require an adaptation of the method described above depending of the country of birth or of the genealogy of the patient tested, since these discrepancies do not significantly affect the statistical significance of the marked decrease in the selenoprotein P concentration, except in countries with very low selenium intake i.e. part of China, Finland without supplementation, New Zeland.

15 Nevertheless, in a most preferred embodiment of the method described herein, the amount of selenoprotein P which is measured at step b) is compared, at step c), with the amount of selenoprotein P which would be expected within a group of non-affected individuals from the same geographical origin than that of patient tested.

20 Consequently, when the patient originates from Europe, United States of America, Australia, or an asian country, the amount of selenoprotein P which is measured at step b) will be preferably compared, at step c) of the method, with the mean amount of selenoprotein P which is contained in the same biological sample of a group of non-infected individuals originating respectively from Europe, United States of America, Australia or an asian country.

25 In a further most preferred embodiment of the method, the country of origin may be taken into account, such as France, Spain or Greece, for example.

30 In a specific embodiment of the invention, the method described above allows the diagnosis of the occurrence of the disease in a further step d), when the amount of selenoprotein P which is measured in the biological sample of the patient tested is statistically lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals.

35

In a further particular embodiment of the invention, the method described above allows to diagnose the persistence of the disease in a further step d), when the amount of selenoprotein P which is measured in the biological sample of the patient tested is lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals, or alternatively when the amount of selenoprotein P is lower or not significantly higher than the amount found for the same patient in a former test.

In still a further embodiment of the invention, the method allows the diagnosis of the recovering of the patient from the disease in a further step d), when the amount of selenoprotein P which is measured in the biological sample of the patient tested is at least equal to the normal amount which is contained within the non-affected individuals, or alternatively when the amount of selenoprotein P is higher than the amount found for the same patient in a former test.

By « at least identical » as used herein, is intended an amount of selenoprotein P which is of a value which is at least not statistically distinct from the mean amount of selenoprotein P which is contained in the biological sample which is compared.

Without wishing to be bound by any particular theory, the inventor believes that the treatment of patients affected with a disease involving an inflammatory reaction associated with a damage to the vascular endothelial cells, particularly patients affected from SIRS or a septic shock, may need to obtain selenoprotein P plasma concentration values which are higher than those found in non-affected individuals. This situation may be the consequence of the therapeutical treatment based mainly on the administration of selenium. A supra-normal value of selenoprotein P plasma concentration may indicate a patient status wherein the endothelium is protected against endothelium oxydative aggression, whether it be acute or chronic.

Thus, in another particular embodiment of the invention, the method disclosed herein allows to diagnose the recovering from the disease in a further d), when the amount of selenoprotein P which is measured in the biological sample of the patient tested is higher than the normal amount which is contained within the non-affected individuals.

Preferably, the standard level of selenoprotein P plasma concentration which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease involving an inflammatory reaction associated with a

damage to the vascular endothelial cells, at step c) of the method, is of at least 50 nmol/L. Most preferably, this selenoprotein P plasma concentration value is comprised between 40 and 80 nmol/L, advantageously between 40 and 70 nmol/L and most preferably between 40 and 60 nmol/L.

5 Most preferably, the selenoprotein P plasma concentration is indicative of a disease involving an inflammatory reaction associated with a damage to the vascular endothelial cells when the amount of selenoprotein P which is measured within the biological sample of the patient tested is lower than 30 nmol/L.

10 In a particular embodiment, the diagnostic of a selenoprotein P plasma concentration of less than 20 nmol/L is indicative of patients with septic shock requiring high level of catecholamines such as norepinephrine and epinephrine.

In a further embodiment, the diagnostic of a selenoprotein P plasma concentration of less than 15 nmol/L and most preferably of less than 10 nmol/L is predictive of mortality, especially when there is a persistence of a weak selenoprotein P amount during a selenium-based treatment of the patient.

15 However, at the stage of patients recovering from the disease, the inventor has observed supranormal values of selenoprotein P plasma concentration up to 106 nmol/L in recovering septic shock patients who survived, and supra normal values up to 181 nmol/L in non SIRS aggrressed patients.

20 In a still further embodiment, the methods of the invention allows to predict mortality when the amount of selenoprotein P which is measured within a serial of biological samples collected during the time period of the therapeutic treatment is always lower than 20nmol/L, preferably lower than 10 nmol/L.

25 Without wishing to be bound by any particular theory, the inventor believes that the increase of selenoprotein P may be an interesting defense mechanism of the endothelium in situation of aggression. This reinforces the interest of the monitoring of selenoprotein P plasma concentration in all situations of generalized blood inflammation associated with immediate or secondary endothelium oxydative damages, whether or not it is associated with a selenium-based treatment or supplementation.

30 According to a specific embodiment of the method disclosed herein, the comparison step c) might take into account previously known chronic deficiencies in selenoprotein P of the tested patient, in order to avoid

interpreting a weak decrease of selenoprotein P plasma concentration as regards the selenoprotein P standard concentration as indicative of an inflammatory disease.

5 As it is disclosed herein, the method of the invention allows the use of a novel biochemical marker, namely plasma concentration of selenoprotein P, in order to diagnose septic shock, and even the severity of the septic shock in man and in animal.

Moreover, the follow up of the selenoprotein P plasma concentration in a patient permits the monitoring of the evolution of the disease, for example septic shock. A persistent low level of selenoprotein P plasma concentration less than 20 nmol/L or 30 nmol/L, especially if abundant selenium administration is provided during the therapeutical treatment, will correspond to the persistence of the systemic inflammation which was diagnosed according to the method of the invention.

15 Indeed, the method of the invention, by following up the plasma concentration of selenoprotein P, is very useful to monitor the benefit to the patient of a selenium-based treatment.

Further, the persistence of a low level of selenoprotein P consists of a marker of the gravity and the mortality of the disease in a septic shock patients.

20 In a most preferred embodiment, the measure of the amount of selenoprotein P which is contained in the biological sample of the patient tested, in step b) of the disclosed method, consists of an immuno assay wherein antibodies directed against selenoprotein P are used.

For performing such an immunoassay, the one skilled in the art will advantageously refer to the article of Mostert et al. (1998, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 357 (2): 326-330).

When performing the method of the invention for monitoring purposes, said method will be performed at least daily during the period of time starting from the admission of the patients in an emergency care unit of an hospital. 30 After this critical period, the method of the invention may be performed every two-days time period during the therapeutical treatment in order to monitor the recovering of the patients from the disease .

A daily dosage of selenoprotein P is preferred for acute diseases, especially if selenium-based treatment - e.g. by selenoprotein P - in order to 35 achieve the optimal selenoprotein P plasma concentration adapted to the disease and its severity. Then, a dosage every two days periods or a weekly

dosage is advantageous during the recovering period and then monthly after recovering of the normal selenoprotein P plasma concentration.

For chronic diseases in the absence of an acute disorder, or in cases of pregnancy, selenoprotein P dosages may be part of the routine biological examination.

Monitoring of selenium-based treatment can be achieved with selenoprotein P plasma concentration monitoring in order to obtain optimal selenoprotein P concentration according to the gravity of the disease and the importance of oxidative stress in the blood compartment.

In cases of septic shock with high level of oxidative stress in the blood compartment, it could be appropriate to obtain and maintain very high level of selenoprotein P much higher than the reference values.

Another object of the present invention consists of a kit for the *in vitro* diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said kit comprises (i) means for assaying the amount of selenoprotein P contained in a biological sample.

In a preferred embodiment, said kit further comprises (ii) a sample or a plurality of samples containing each respectively a predetermined amount of selenoprotein P to be used as a standard reference.

Most preferably, said kit comprises one standard sample containing selenoprotein P at a determined concentration, said concentration being comprised between 50 and 80 nmol/L, and most preferably about 50 nmol/L selenoprotein P.

In the embodiment wherein said kit comprises a plurality of standard samples containing selenoprotein P, the respective concentration are preferably 200, 100, 50, 30, 20 and 10 nmol/L selenoprotein P which are used to generate a standard curve allowing a precised determination of the selenoprotein P plasma concentration within the biological sample of the patient tested.

In a most preferred embodiment, the standard samples contain a selenoprotein P in a liquid solution, either a physiological saline buffer (e.g. minimum essential medium - MEM) or a plasma sample containing a predetermined concentration of selenoprotein P.

Standard samples of selenoprotein P may be contained in lyophilized form in a vial that will be added with the required volume of a suitable buffer at the time of use of the kit.

In a specific embodiment of the kit above, the means for assaying the amount of selenoprotein P contained in the biological sample consist of antibodies directed against selenoprotein P. Most preferably, said antibodies are those disclosed by MOSTERT et al. (1998).

5 Thus, the kit of the invention may also contain a vial containing the antibodies directed against selenoprotein P, either in suspension in a suitable buffer or alternatively under a lyophilized form.

By the determination of selenoprotein P plasma concentration by immunoblot analysis using purified selenoprotein P as a standard (A Novel
10 Method for the Purification of selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J, Archives of Biochemistry and Biophysics; 357 (2): 326-330, 1998), the reference level of selenoprotein P in the general population is about 50 nmol/L and more than 40 nmol/L. Selenoprotein P plasma concentration could be considered as low when it is less than 30 nmol/L and very low when it
15 is less than 10 nmol/L.

The present invention will be further disclosed by, without in any case being limited to, the following examples.

EXAMPLES

20 In a preliminary study on 21 ICU patient and 7 healthy volunteers, selenoprotein P plasma concentration has been measured by immunoblot analysis using purified selenoprotein P as a standard (A Novel Method for the Purification of selenoprotein P from Human Plasma, Mostert V, Lombeck I, Abel J,
25 Archives of Biochemistry and Biophysics; 357 (2): 326-330, 1998). In this study, 7 septic shock patients were included among the 21 ICU patients. Dosages have been realized at admission in ICU and later on at weekly intervals during their ICU length of stay. At admission, a very low selenoprotein P plasma concentration was observed in septic shock ICU patients (see Table 1 below) compared to non
30 systemic inflammatory ICU patients. Extremely low level of selenoprotein P plasma concentration, even undetectable, was observed only in septic shock patients during their length of stay. Decrease of selenoprotein P was associated with severe inflammatory adverse events such as severe infections or acute respiratory distress syndrome. Last measurement before death was very low in
35 the 3 septic shock patients who died compared to the value of the 3 defined as non severe SIRS patients who died. These selenoprotein P value was significantly

lower than the one observed in the 3 patients who died in the non inflammatory group ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). It is to underline that this difference is significative despite the small number of patients involved .

The level of selenoprotein P at admission was poorly correlated (r about 0.3) with gravity index as measured to the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) (A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on European/North American multicenter study, Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F, JAMA 1993; 270: 2957-2963).

This indicates that selenoprotein P doesn't assess the global gravity of the patients, but rather measures septic shock's (and SIRS's) gravity.

Table 1
Selenoprotein P plasma concentration at admission
in septic shock ICU patients

	septic shock patients (all intubated)	Including septic shock patients with grade 4 in the cardiovascular function scale of the SOFA score
number of patients	(7 patients) (measurement at admission on only 6 patients)	(4 patients) (measurement at admission on only 3 patients)
Selenoprotein P	15 ± 11 nmol/L (1 - 28)	16 ± 9 nmol/L (7 - 28)
Mortality	(3 patients)	(3 patients)

SOFA (The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure, Vincent JL, Moreno R, Takala J and al, Intensive Care Medicine 1996, 22:707-710).

Results are given in mean \pm standard deviation; followed by minima and maxima in brackets .

EXAMPLE 2:**Selenoprotein P measurement in septic shock patients and comparison with healthy- volunteers and with other ICU patients.**

5 The selenoprotein P plasma concentration at admission was significantly lower in the septic shock patient group compared to the non severe SIRS (see below for definition, and Table 2) patient group ($p = 0,0015$; Mann-Whitney test), and healthy volunteers ($p = 0.003$). It is to underline that this difference is
10 significant despite the small number of patients involved, supporting the marked difference between the two groups.

 As well, The selenoprotein P plasma concentration at admission was significantly lower in the severe SIRS patient group compared to the non severe SIRS ($p < 0.05$) and to the healthy volunteer group ($p < 0.01$) (see below Table 2
15).

 Non severe SIRS patients were defined as patients without suspected or proven severe infection or septic shock, severe acute pancreatitis, extended burns; without post operative event with a SAPS II of more than 30; and without
20 exposition to major ischemia-reperfusion process such as aortic cross clamping, inferior leg ischemia-reperfusion, mesenteric vascular ischemia.

 Mean gravity index score, as defined by the SAPS II value, was lower in the non SIRS patient group than in the severe SIRS patient group : SAPS II 36 ± 11 vs. SAPS II 47 ± 14 . But there were also patients in the non SIRS group with very high values of SAPS II (6 patients with SAPS II values superior to 35).

Table 2
Selenoprotein P plasma concentration at admission in ICU patients

Groups	Septic shock or severe SIRS patients	Non severe SIRS patients	Healthy volunteers
number of patients	(9 patients) (measurement at admission on only 8 patients)	(12 patients)	(7 volunteers)
Selenoprotein P	17 ± 12 nmol/L (1 - 38)	55 ± 45 nmol/L (20 - 181)	49 ± 8 nmol/L (39 - 65)

5 (p < 0.01 vs. healthy volunteers)
 (p < 0.05 vs. non severe SIRS patients)

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

10 Initial dosages of the 7 patients admitted for septic shock were all inferior to 30 nmol/L. In this group, 4 patients required epinephrine or norepinephrine at doses superior to 0.1 µg/kg.min, corresponding to a cardiovascular scale value in the SOFA score of 4, which is the maximum cardiovascular dysfunction. In these 4 patients, 3 had a selenoprotein P value less than 15 nmol/L at their
 15 initial measurement. Three of these 4 patients died as a consequence of their septic shock. All of these three patients had had initially, at admission, a plasma selenoprotein P concentrations inferior to 15 nmol/L.

Moreover, selenoprotein P plasma concentration decreased further between admission and the first weekly measurement. Their values were
 20 inferior to 10 nmol/L in 3 out of the 7 patients in septic shock, and inferior to 16 nmol/L for 6 out of the 7 septic shock patients. The only septic shock patient who had a persistent selenoprotein P plasma concentration at 28 nmol/L at the first weekly measurement survived.

EXAMPLE 3:
Other SIRS patients

5 In the severe SIRS group, one patient had at admission only a severe sepsis, retrospectively diagnosed as *Bordetella pertussis*, associated with severe asthma. Her selenoprotein P plasma concentration at admission was the highest observed in the severe SIRS group : 38 nmol/L. A rapid decrease of the selenoprotein P plasma concentration to a concentration of 7.5 nmol/L was
10 observed, simultaneously as she developed a very severe Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS), requiring 100 % FiO₂ ventilation, with high level of positive end expiratory pressure, nitric oxide and prone-supine positions.

In the severe SIRS group, another patient was a severe polytrauma patient. This 34 year old man had severe thoracic and abdominal injuries requiring emergency surgery. In addition, his both femurs were broken and he
15 had also a broken left humerus. He was initially in shock, and required abundant transfusion. He developed a severe rhabdomyolysis, and a very convincing clinical and biological picture of severe fat embolism, and later, infection was suspected. In this patient, the selenoprotein P plasma
20 concentration was low at admission (selenoprotein P : 10 nmol/L) and remained low during his ICU length of stay. He was discharged from ICU to the orthopedic ward in less than three weeks.

As selenoprotein P is stable in the general population and as this young polytrauma patient was healthy before his accident, such a low initial plasma
25 selenoprotein P concentration indicates that the marked decrease of selenoprotein P observed in the severe SIRS group rapidly appears in the case of a severe SIRS.

EXAMPLE 4:
30 **Non severe SIRS patients**

In the non severe SIRS group, four patients out of 12 had a selenoprotein P plasma concentration between 20 and 30 nmol/L at their initial
35 measurement. One of them belongs to a selenium deficient group (chronic dialysis); and two were misclassified as they had ischemia-reperfusion injuries (one with a status epilepticus well known to have transient lactate acidosis, and

the other an inferior leg vascular cross clamping followed by hemorrhage and myocardial infarcts).

On the opposite, high level of selenoprotein P was observed in the non severe ICU SIRS patients; in this group, 6 patients had a selenoprotein P
5 plasma concentration superior to 60 nmol/L, even in ICU patients with high SAPS II value.

Indeed, there is little correlation between SAPS II gravity index score, and the selenoprotein P plasma concentration for the all patients ($r=0.33$).
10 There was also little correlation between SAPS II gravity index score, and the selenoprotein P plasma concentration in the severe SIRS patient group ($r = 0,25$). One should underlined that fact, as SAPS II gravity index score reflects the probability of death of ICU patients, but not the specific gravity of the SIRS
15 or septic shock (From Celsus to Galen to Bone: The Illnesses, Syndromes, and Diseases of Acute Inflammation, Marshall JC, Aarts MA, in Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, Vincent JL ed.; Springer Verlag, 2001; 3-12). Mean SAPS II gravity index score was lower in the non severe SIRS patients, 47 ± 14 vs. 36 ± 11 ($p =0.055$) than in the severe SIRS patients. However, the mortality rate of the two group was close with 3 deceased
20 patients out of 9 in the severe SIRS patient group (all of them septic shock patients) and 3 deceased patients out of 12 in the non severe SIRS patient group.

EXAMPLE 5:

25

Gravity index, Follow-up

One should underlined that the last selenoprotein P plasma concentration observed before death were significantly lower ($p < 0.05$) in the 3
30 deceased septic shock patients, compared to the 3 deceased patients of the non SIRS group (see Table 3 below).

Moreover, the surviving patient with a very low selenoprotein P plasma concentration of 3 nmol/L at his last dosage before discharge from ICU was an anorexic patient, with therefore an initial selenium deficiency, which had made
35 during his ICU length of stay several severe nosocomial infections, including 2

nosocomial peritonitis, following the initial peritonitis. This patient had at his discharge a persistent abundant enteric fistula.

The mean selenoprotein P plasma concentration of the surviving severe SIRS patients observed before discharge was 23 nmol/L compared to 10 nmol/L for the deceased severe SIRS patients. However, it is to be noticed that selenium supplementation was only 40 µg per day, according to the daily recommended intake. This supplementation is probably very insufficient, in such inflammatory patients. (Selenium and the "free" electron" -Selenium a trace to be followed in septic or inflammatory ICU patients, Forceville X, Intensive Care Medicine; 2001, 27: 16-18). Indeed, as for all selenoprotein, the syntheses of selenoprotein P requires available selenium.

Selenoprotein P is a good marker for the follow-up of selenium supplementation or treatment in inflammatory ICU patients.

Table 3

**Selenoprotein P plasma concentration
at the latest value before ICU discharge**

Groups	Septic shock or severe SIRS patients	Non severe SIRS patients	
deceased patients	(3 patients) (all septic shock patients)	(3 patients) (non SIRS diseased patients)	
Selenoprotein P	10 nmol/L (0-24)	49 (27-84)	P<0.05
ICU surviving patients	(6 patients)	(9 patients)	
Selenoprotein P	23 nmol/L (3-60)	41 (20-77)	

Results are given in mean ± standard deviation; followed by minima and maxima in brackets

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome.

WO 02/093175

PCT/EP02/05350

24

What is claimed is :

1. A method for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said method comprises the steps of :
 - a) providing a biological sample from said patient;
 - b) measuring the amount of selenoprotein P which is contained in said biological sample;
 - c) comparing the amount of selenoprotein P measured at step b)
 - i) with the amount of selenoprotein P which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease; or
 - ii) with the amount of selenoprotein P which was contained in a biological sample from the same patient.
2. The method of claim 1, wherein the biological sample consists of a blood sample.
3. The method of claim 1, wherein the biological sample consists of a blood plasma sample.
4. The method of claim 1, wherein said disease involving an inflammatory reaction consists of a Systemic Inflammation Response Syndrome (SIRS).
5. The method of claim 1, wherein said disease involving an inflammatory reaction consists of a septic shock.
6. The method of claim 1, wherein said disease involving an inflammatory reaction consists of a chronic inflammatory disease
7. The method of claim 6, wherein said chronic inflammatory disease is selected from the group consisting of a systemic disease such as polyarteritis nodosa.
8. The method of claim 6, wherein said disease involving an inflammatory reaction consists of a chronic inflammatory disease related to a bacterial, a fungal or a viral infection.
9. The method of claim 1, wherein at step c), the amount of selenoprotein P which is measured is compared with the amount of selenoprotein P which would be expected within a group of non affected individuals from the same geographical origin than that of the patient tested.
10. The method of claim 1, wherein the occurrence of the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of selenoprotein P measured in

the biological sample is lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals.

11. The method of claim 1, wherein the persistence of the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is lower than the normal amount which is contained within non-affected individuals or when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is lower or not higher than, or equal to, the amount measured in a sample from the same patient in a former test.

12. The method of claim 1, wherein the recovering from the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is at least equal to the normal amount which is contained within non-affected individuals or the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is higher than the amount measured in a sample from the same patient in a former test.

13. The method of claim 1, wherein the recovering from the disease is diagnosed in a further step d) when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is higher than the normal amount which is contained within non-affected individuals or when the amount of selenoprotein P measured in the biological sample is higher than the amount measured in a sample from the same patient in a former test.

14. The method of claim 1, wherein the amount which is contained in a biological sample from an individual which is not affected with the disease at step c) is of at least 40 nmol/L.

15. The method of claim 1, wherein a septic shock is diagnosed when the amount of selenoprotein P which is measured within the biological sample is lower than 30 nmol/L.

16. The method of claim 1, wherein mortality is predicted when the amount of selenoprotein P which is measured within a serial of biological samples collected during the time period of the therapeutical treatment is always lower than 20nmol/L, preferably lower than 10 nmol/L.

17. The method of claim 1, wherein step b) consists of an immunoassay wherein antibodies directed against selenoprotein P are used.

18. A Kit for the in vitro diagnostic or for the monitoring of a disease involving an inflammatory reaction within a patient, wherein said kit comprises (i) means for assaying the amount of selenoprotein P contained in a biological sample.

WO 02/093175

PCT/EP02/05350

26

19. The kit of claim 18, which further comprises (ii) a sample or a plurality of samples containing each respectively a predetermined amount of selenoprotein P to be used as a standard reference.

20. The kit of claim 18, wherein the means for assaying the amount of selenoprotein P contained in the biological sample consist of antibodies directed against selenoprotein P.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/05350
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N 07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERSSON-MOSCHOS M ET AL: "SELENOPROTEIN P IN SERUM AS A BIOCHEMICAL MARKER OF SELENIUM STATUS" ANALYST, LONDON, GB, vol. 120, no. 3, March 1995 (1995-03), pages 833-836, XP002924559 *page 833, "Radioimmunoassay of Selenoprotein P" --- -/--	18,20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document collating the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 July 2002		Date of mailing of the international search report 20/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Thiele, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/05350

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NICHOL COLIN ET AL: "Changes in the concentrations of plasma selenium and selenoproteins after minor elective surgery: Further evidence for a negative acute phase response?" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 44, no. 8 PART 1, August 1998 (1998-08), pages 1764-1766, XP001084140 ISSN: 0009-9147 *page 1764, right-hand column, lines 17 - line 26; page 1765, left-hand column, line 17 - line 20* table 1</p>	20
A	<p>P. GALLOWAY ET AL.: "Effect of the inflammatory response of trace element and vitamin status" ANN. CLIN. BIOCHEM., 'Online! 2000, pages 289-297, XP002206057 Retrieved from the Internet: <URL:www.leeds.ac.uk/acb/annals/annals_pdf /May00/ACB289.PDF> 'retrieved on 2002-07-04! page 291, right-hand column, paragraph 2</p>	
A	<p>GÄRTNER R ET AL: "Significance of selenium in intensive care medicine. Clinical studies of patients with SIRS/sepsis syndrome!" MEDIZINISCHE KLINIK (MUNICH, GERMANY: 1983) GERMANY 15 OCT 1999, vol. 94 Suppl 3, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 54-57, XP001088107 ISSN: 0723-5003 abstract</p>	
A	<p>FORCEVILLE X ET AL: "Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients." CRITICAL CARE MEDICINE. UNITED STATES SEP 1998, vol. 26, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 1536-1544, XP001088109 ISSN: 0090-3493 page 1538, left-hand column page 1538, right-hand column</p>	

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

专利名称(译)	用于体外诊断或监测包括炎症反应在内的疾病的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2004532415A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002589804	申请日	2002-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	假威乐泽维尔		
申请(专利权)人(译)	假威乐, 泽维尔		
[标]发明人	フォルスヴィルグザヴィエ		
发明人	フォルスヴィル,グザヴィエ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/47 Y10S436/801 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03		
优先权	60/290973 2001-05-16 US		
其他公开文献	JP4196265B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于体外诊断或监测患者炎症反应相关疾病的方法。解决方案：步骤 (a) 至 (c) 如下：(a) 从病人制备生物样本，(b) 测量该生物样品中所含硒蛋白P的量，(c) 将步骤 (b) 中测得的硒蛋白P与以下 (i) 或 (ii) 进行比较：(i) 来自未患病者的生物样品中所含硒蛋白P的量，(ii) 同一患者过去的生物学样本中所含硒蛋白P的量。

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/68	G01N 33/68	2G045
G01N 33/53	G01N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2002-589804 (P2002-589804)	(71) 出願人	501084307 フォルスヴィル, グザヴィエ
(22) 出願日	平成14年5月15日 (2002.5.15)		
(23) 優先権主張番号	60/290,973	(72) 発明者	フォルスヴィル, グザヴィエ フランス国 77860 サン ジェル ン シュル モラン リュ ドゥ シャ ンパーニュ 12
(24) 発明の名称	用于体外诊断或监测包括炎症反应在内的疾病的方法和试剂盒		
(31) 優先権主張番号	60/290,973		
(32) 優先日	平成13年5月16日 (2001.5.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(74) 代理人	100082277 弁理士 越場 隆		
			Fターム (参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 DA77 FB03