

(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2005-519267

(P2005-519267A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92	GO 1 N 33/92	Z 2GO45
A6 1 K 38/00	A6 1 P 1/18	4BO63
A6 1 P 1/18	A6 1 P 7/00	4CO84
A6 1 P 7/00	A6 1 P 7/02	
A6 1 P 7/02	A6 1 P 7/04	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-571735 (P2003-571735)	(71) 出願人	502073946
(86) (22) 出願日	平成15年2月27日 (2003. 2. 27)		バイオメリュー・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月5日 (2004. 10. 5)		bioMerieux, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005980		アメリカ合衆国27712ノースカロライ
(87) 国際公開番号	W02003/073099		ナ州ダーラム、ロドルフ・ストリート10
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003. 9. 4)		0番
(31) 優先権主張番号	60/359, 932	(74) 代理人	100083806
(32) 優先日	平成14年2月27日 (2002. 2. 27)		弁理士 三好 秀和
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100095500
(31) 優先権主張番号	60/363, 073		弁理士 伊藤 正和
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002. 3. 11)	(72) 発明者	トー、 チェン ホク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イギリス国 リバプール エル25 6イ
(31) 優先権主張番号	60/396, 392		ーキュー ビーコンスフィールド ロード
(32) 優先日	平成14年7月17日 (2002. 7. 17)		35
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 止血機能不全、重症感染及び全身性炎症反応症候群を診断し、監視するための方法

(57) 【要約】

定量的及び定性的分析を通して、リポタンパク質を異常、特にプロトンビナーゼ増強に関して検査することにより、止血機能不全、重症感染及び全身性炎症反応症候群について被験者を診断し、監視するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 患者の試料を得ること ; (b) 前記試料からのリポタンパク質分画を異常に関して測定すること ; 及び (c) 前記リポタンパク質測定を、重症感染、S I R S 又は止血機能不全を有する患者において認められる異常に相関させることを含む、感染、S I R S あるいはセプシスに対する宿主反応を診断し、監視するための方法。

【請求項 2】

前記リポタンパク質異常が、重症感染、S I R S 及び / 又はセプシスを有する患者のプロトロンビナーゼ活性を支持する高い能力である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記リポタンパク質分画が リポタンパク質を含み、前記のプロトロンビナーゼ活性を支持する高い能力が正常試料と比較してプロトロンビナーゼ活性の少なくとも 2 倍の上昇を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記段階 (b) を、トロンビン生成速度を測定することによって実施し、前記 リポタンパク質がリポタンパク質を含有するアポ B を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記測定段階を、前記 リポタンパク質と C 反応性タンパク質 (C R P) との間での複合体形成の不在下で実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 患者の試料を得ること ; (b) 前記試料からのリポタンパク質分画を P T アーゼに関して測定すること ; (c) 前記試料のプロトロンビン活性化を正常患者試料又は異常患者試料の標準品と比較すること ; 及び (d) 前記患者の死亡率を予測するために前記比較を利用することを含み、システム不全又は死亡の可能性が高い患者に関しては、P T アーゼを支持する前記リポタンパク質が正常試料と比較して P T アーゼ活性の少なくとも 2 倍の上昇を示す、患者においてシステム不全又は死亡の高い可能性を予測する方法。

【請求項 7】

(a) 患者から超低密度リポタンパク質 (V L D L) の試料を得ること ; 及び (b) プロトロンビンを活性化するための前記血漿又は血清試料中の V L D L の活性を測定することを含み、プロトロンビンを活性化するための前記 V L D L のより高い活性が前記患者における感染の高い可能性を指示する、患者において感染の高い可能性を予測するための方法。

【請求項 8】

前記患者が二相性波形を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

V L D L の活性の測定を直接又は間接的に実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

V L D L の前記活性を、トロンビン生成の速度を測定することを含む方法によって実施する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

(a) 患者の試料を得ること ; (b) 該患者試料を二相性波形スクリーニング試験に供して、正常又は二相性波形結果を得ること ; (c) 前記二相性波形結果を示す前記患者試料をリポタンパク質の P T アーゼ測定に供すること ; 及び (d) 高い P T アーゼ活性を示す患者と重症感染、S I R S 又はセプシスの診断との関係を判定することを含む、重症感染、S I R S 又はセプシスを診断するための方法。

【請求項 12】

前記感染がセプシスである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 13】

前記関係が、該患者が D I C を有することを指示する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

(a) 患者から血液試料又は血清試料を得ること ; (b) N M R を含む分析を用いて前記試料のリポタンパク質分画をリポタンパク質の定性的又は定量的特性に関して測定すること ; (c) 前記試料のリポタンパク質の前記特性を正常患者試料又は異常患者試料の標準品と比較すること ; 及び (d) 前記比較を、感染、S I R S 及びセプシスに対する宿主反応を診断する及び / 又は監視するために使用することを含む、感染、S I R S 及びセプシスに対する宿主反応を診断し、監視するための方法。

【請求項 1 5】

(a) 患者から試料を得ること ; (b) 前記試料を、異常を含むリポタンパク質を捕獲するために特異的結合剤と接触させること ; (c) 前記の捕獲した異常リポタンパク質を定量的又は定性的に分析して結果を得ること ; 及び (d) 前記結果を、重症感染、S I R S 及び止血機能不全を有する患者において認められる異常リポタンパク質と関連させることを含む、重症感染、S I R S 及びセプシスを有する患者を診断し、監視する特異的結合アッセイ。

10

【請求項 1 6】

前記特異的結合剤がアネキシン 5 (A n n e x i n 5) である、請求項 1 5 に記載のアッセイ。

【請求項 1 7】

前記特異的結合剤がアネキシン 5 に特異的な抗体である、請求項 1 6 に記載のアッセイ。

【請求項 1 8】

プロトロンビナーゼ構築を阻止するためにアネキシン 5 の有効量を投与することを含む、重症感染、S I R S 又はセプシスに関して患者を治療するため方法。

20

【請求項 1 9】

前記患者が D I C を有する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

(a) 患者からリポタンパク質の試料を得ること ; (b) 該リポタンパク質が正常患者試料からのリポタンパク質と比較して異常であるかどうかを判定すること ; 及び (c) 検出した異常リポタンパク質に基づいて該患者におけるセプシスの存在を予測することを含む、患者においてセプシスの存在を予測するための方法。

【請求項 2 1】

該異常リポタンパク質が、V L D L、I D L 及び L D L から成る群より選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

(a) 患者からリポタンパク質の試料を得ること ; (b) 該リポタンパク質が正常患者試料からのリポタンパク質と比較して異常であるかどうかを判定すること ; 及び (c) 検出した異常リポタンパク質に基づいて該患者における止血機能不全の存在を予測することを含む、患者において止血機能不全の存在を予測するための方法。

【請求項 2 3】

前記段階 (b) を、修正 A P T T アッセイにおいて凝固時間の短縮を測定すること又は希釈組織因子に基づくアッセイにおいて血栓形成の加速の速度上昇を測定することにより、二相性波形を有する患者からの V L D L の凝血促進性局面の増強を検出することによって実施する、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

(a) 患者試料を得ること ; (b) 前記試料からのリポタンパク質分画を総表面積に関して測定すること ; 及び (c) 前記リポタンパク質測定を、重症感染、S I R S 及び止血機能不全を有する患者において認められる高い表面積のリポタンパク質異常と関連させることを含む、感染、S I R S 及びセプシスに対する宿主反応を診断し、監視するための方法。

【請求項 2 5】

前記リポタンパク質表面積が、正常患者試料と比較して少なくとも約 4 5 % 高い、請求

50

項 2 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本出願は、米国特許仮出願第 S N 6 0 / 3 5 9 , 9 3 2 号 (2 0 0 2 年 2 月 2 7 日出願)、第 S N 6 0 / 3 6 3 , 0 7 3 号 (2 0 0 2 年 3 月 1 1 日出願)、第 S N 6 0 / 3 9 6 , 3 9 2 号 (2 0 0 2 年 7 月 1 7 日出願) 及び第 S N 6 0 / 4 0 4 , 6 5 2 号 (2 0 0 2 年 8 月 2 0 日出願) からの優先権を主張する。

【0002】

(発明の背景)

重症感染及びセプシスは罹病及び死亡の一般的な原因である。セプシスは、多くの形態をとる極めて広い臨床的実体である。感染に対する宿主反応の病態生理学は複雑であり、全身性炎症の徴候及び症状は、感染性又は非感染性の病因を有することがあり、特異的ではない。全身感染症を有する患者はしばしば、感染を伴わない類似した臨床徴候及び検査所見を有する患者と識別することが困難である。感染は、細菌、真菌、寄生生物及びウイルスによって引き起こされるものを含む数多くの原因を有する。

【0003】

感染の細菌学的証拠は、窮迫の臨床徴候と同時に発現しないことがある。さらに、感染性細菌の存在を確認するために血液試料からの生物の培養を増殖させるには時間がかかり、またその結果は汚染、等々のために正確ではないことがありうる。ここで使用するとき、重症感染は、セプシス、重症セプシス、敗血症及び敗血症性ショックならびに汎発性血管内凝固 (「 D I C 」) の診断を包含しうる。また、全身性炎症反応症候群「 S I R S 」も、感染性ならびに非感染性由来を有しうるが (どちらもここに包含される)、感染の定義に包含される。 S I R S は、最終的に多臓器機能不全症候群へと至る全身性炎症を示す又は全身性炎症へと進行することがある。 S I R S を有する患者は、感染、外傷、熱傷、肺炎、等々からの症候群を発現しうる。

【0004】

ここで使用するとき止血機能不全は、凝固の障害と定義しうる。 D I C 及びセプシスの両方に関して、炎症と凝固を結びつける共通且つ重複する病態生理学的経路の認識が高まりつつある。特に、失敗に終わった数え切れないほどの戦略の後に、最近、重症セプシスにおいて組換えヒト活性化プロテイン C (A P C) が治療上の成功を収めたことはこれをさらに裏付けるであろう。 A P C は、凝固補因子である第 V a 因子及び第 V I I I a 因子の不活化を通してトロンピン生成を抑制し、同時に抗炎症特性も有すると思われる。

【0005】

現在の診断方法には特異性がないため、感染、 S I R S 及び止血機能不全の早期インジケーター又はマーカーを見出すことが引き続き必要とされている。早期診断は患者の回復を大きく上昇させ、この患者群に関連する罹病率及び死亡率を低下させると考えられる。また、感染、 S I R S 及び止血機能不全に対する宿主反応の治療効果を監視する診断マーカー又は試験も求められている。

【0006】

凝固スクリーニングアッセイの時間依存的測定プロフィールは、 G i v e n s ら、国際公開公報第 W O 9 6 / 4 1 2 9 1 号及び T o h ら、国際公開公報第 W O 0 0 / 4 6 6 0 3 号に述べられているように先天性及び後天性平衡失調及び止血機能不全の予測に結び付けられてきた。かつては血栓形成前の血漿光透過率低下を有するそのようなプロフィールは、活性化部分トロンボプラスチン時間 (「 A P T T 」) アッセイのものであったが、現在は一般に二相性波形 (ここでは B P W とも称する) と称される。この B P W は、セプシスを含む多くの原発性疾患において一般的である D I C を有する危険な状態の疾病患者に結び付けられてきた。凝固機器での二相性波形は、 D I C を含む止血機能不全の早期診断のための簡単で迅速な試験を提供する。

10

20

30

40

50

【0007】

国際公開公報第W O 0 1 / 9 6 8 6 4号(2001年12月20日)に述べられているように、C反応性タンパク質(CRP)とリポタンパク質(特に超低密度リポタンパク質(VLDL))との間のカルシウム依存性複合体が、二相性波形の基礎となる分子機構として特定されている。この複合体は、出血又はDICを含む血栓症を導きうる他の止血機能不全を有する患者に加えて、セプシス、SIRS及び敗血症を有する患者を特定するために使用しうる。さらに、国際公開公報第W O 0 1 / 9 6 8 6 4号は、凝固アッセイ、ラテックス凝集反応又は金ゾルアッセイ、及び使用する試薬に依存して、血栓形成の前に又は血栓形成が存在しない場合に沈殿物が形成される免疫測定法によって、該複合体を検出することを述べている。

10

【0008】

二相性波形及びCRP-リポタンパク質複合体は様々な種類の重症感染及び止血機能不全(DIC及びセプシスを含む)の早期診断における進歩を提供するが、重症感染、SIRS及び止血機能不全の早期診断手段、特にマーカーをさらに特定することが引き続き求められている。

【0009】

(発明の要約)

重症感染、SIRS及び止血機能不全に対する宿主反応の診断及び監視が、正常な健常者試料において認められるリポタンパク質と比較してこの個体群のリポタンパク質との間で定性的及び定量的な相違を検出することによって実現されることが発見された。

20

【0010】

1つの好ましい実施形態では、(a)患者の試料を得ること；(b)上記試料からのリポタンパク質分画を異常に関して測定すること；及び(c)上記リポタンパク質測定を、重症感染、SIRS又は止血機能不全を有する患者において認められる異常に相関させることを含む、重症感染、SIRS及び止血機能不全を診断し、監視するための方法が見出された。さらに、上記方法は、上記患者においてシステム不全又は死亡の高い可能性を予測するために利用できる。

【0011】

本発明のもう1つの局面は、(a)患者から超大密度リポタンパク質(VLDL)の試料を得ること；及び(b)プロトロンビンを活性化するための上記試料中のVLDLの活性を測定することを含み、プロトロンビンを活性化するための上記VLDLのより高い活性が上記患者における感染の高い可能性を指示する、患者において感染(特にセプシス)の高い可能性を予測するための方法である。その測定段階は、トロンビン生成の速度を測定することなどの何らかの適切な手段によって直接又は間接的に実施しうる。

30

【0012】

本発明のさらにもう1つの局面では、重症感染、SIRS又は止血機能不全を診断するための方法は、(a)患者の試料を得ること；(b)該患者試料を二相性波形スクリーニング試験に供して、正常又は二相性波形結果を得ること；(c)上記二相性波形結果を示す上記患者試料をリポタンパク質分析に供すること；及び(d)上記リポタンパク質分析を正常試料のものと比較して、重症感染、SIRS又は止血機能不全を診断することを含む段階によって実施される。

40

【0013】

本発明のさらにもう1つの局面では、重症感染を診断するための方法は、(a)患者から試料を得ること；(b)上記試料のリポタンパク質分画をアネキシンVとの結合特異性に関して測定すること；及び(c)上記結合特異性プロトロンビン活性を、SIRS、DIC及びセプシスを含む重症感染に対する宿主反応の診断及び/又は監視と相関させることを含む段階によって実施される。さらに、上記方法は、上記患者においてシステム不全又は死亡の高い可能性を予測するために利用できる。

【0014】

(詳細な説明)

50

インビボで形成されるリポタンパク質 - 急性期タンパク質複合体 (典型的にはCRP - VLDLと称される) が感染及びセプシスを有する患者において記述されているが、該複合体基質から分離したリポタンパク質亜分画を定量的及び定性的に識別する測定は、これまで感染、SIRS、セプシス又は止血機能不全と結び付けられていなかった。重症感染、SIRS及び止血機能不全を有する患者のリポタンパク質分画は正常患者のものと識別可能であり、それ故リポタンパク質自体を、これらの疾患状態を診断し、監視するためのバイオマーカーとして使用しうるということが発見された。この患者群のリポタンパク質における相違は、単に複合体を形成するリポタンパク質だけに限定されない。これらのリポタンパク質サブクラスにおける障害は複合体形成に影響を及ぼし、同時に臨床的結果の決定因子でもありうる。

10

【0015】

患者試料からリポタンパク質を得る段階は、患者から血液試料を採集し、その後重症感染、SIRS及び止血機能不全を有する患者において認められる異常リポタンパク質を (定量的又は定性的に) 検査するための手段を用いることなどの、適切な手段によって実施しうる。

【0016】

さらに、特異的結合アッセイを使用すれば、異常リポタンパク質を分離する必要はないと考えられ、上記アッセイは競合的又は非競合的のいずれでもよい。そのようなアッセイでは、重症感染、SIRS及び止血機能不全、特にセプシス及びDICを有する患者において認められるリポタンパク質異常の一部又は全部に直接又は間接的に結合する成分を設計することができ、それ故患者試料 (試料はここでは血漿、全血試料、血清、等々を包含すると定義される) を、リポタンパク質に関連する異常に関して直接分析しうる。より好ましくは、該アッセイは、凝固アッセイ、ラテックス凝集反応又は金ゾルアッセイ、リガンドアッセイ、タンパク質結合アッセイ又は免疫測定法でありうる。より好ましくは血清又は血漿を患者試料として使用し、血漿が最も好ましい。1つの好ましいアッセイでは、異常リポタンパク質の表面変化を、直接又は間接的に、アネキシン5 (Annexin 5) (又は陰イオンリン脂質を認識する別の特異的リガンド) へのリポタンパク質結合によって測定する。好ましくは、該リポタンパク質をVLDL、IDL及びLDLに細分しうる。さらに、アネキシン5に特異的な抗体 (又はそのフラグメント) を作製し、特異的結合アッセイにおいて、異常リポタンパク質を検出し、その後重症感染、SIRS又は止血機能不全、特にDIC又はセプシスを有する患者と相関させるように使用しうる。

20

30

【0017】

特に、本発明によれば、感染、SIRS又は止血機能不全、より好ましくはセプシス及びDICに対する宿主反応についての診断方法が提供され、それによってリポタンパク質のインビボでの循環複合体が異常と特定される。好ましくは、該方法はリポタンパク質 (リポタンパク質を含有するアポB)、特に超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、及び中間密度リポタンパク質 (IDL) を含む同じ浮遊密度のものに特異的である。より好ましくは、陰イオンリン脂質を異常に関して検査し、最も好ましくはVLDLを検査する。該方法は、ひとたび治療が開始された後、患者の予後を予測し、患者を監視するために使用しうる。リポタンパク質の試験は手動又は自動のいずれでもよく、NMR分析を含みうる。特に、コレステロール及びトリグリセリド (TG) を測定するための現在の化学試験は粒子濃度には無関係である。NMRテクノロジーを使用することにより、コア脂質 (TG又はコレステロールエステル) は粒子濃度測定に影響を及ぼさない。NMRは一定の大きさの粒子の総数を与え、それ故総表面積の算定を可能にするが、現在の化学試験は、TGがVLDLサイズの粒子中のみ認められると仮定しており、またLDLサイズの粒子は主としてコレステロールエステルを含むと仮定される。リポタンパク質についての伝統的な化学試験は粒子数及び表面積に関する情報を提供しない。本発明の実施形態の1つによれば、リポタンパク質の粒子数及び表面積のこれらの差は、DIC及びセプシスを含む重症感染に関連すると考えられる。

40

【0018】

50

特に、重症感染、S I R S 及び止血機能不全に罹患している患者は、ここでは「異常」リポタンパク質と称する凝固促進性リポタンパク質を有することが発見されている。リポタンパク質の変化は、それらの代謝のゆえに異常であると考えられる。本発明によれば、リポタンパク質の変化は、物理的特性の変化ならびに凝固促進活性の上昇及び高いプロトロンビナーゼ活性を含む定性的機能変化として発現しうる。異常患者試料（重症感染、S I R S 又は止血機能不全、特にセプシス及びD I C を有する患者から）と正常患者試料の間の関係を明らかにするために測定されうるリポタンパク質変化は次のものを含む：V L D L、I D L、L D L 又は高密度リポタンパク質（H D L）のタンパク質レベルのシフト；陰イオンリン脂質（より好ましくはリン脂質ホスファチジルセリン（P S））の露出表面の上昇；V L D L サイズのシフト；V L D L 脂質（コア及び表面）のシフト；V L D L 電荷の変化；凝固促進性リポタンパク質の出現；リポタンパク質カスケード破壊の指標（すべてのリポタンパク質濃度の低下）；軽度に高い又は低いV L D L レベル；低いL D L レベル；S A A - H D L の出現；翻訳後変化；リポタンパク質構築成分の変化；リポタンパク質の運動性の変化；分泌の変化；灌流；リポタンパク質酵素の変化（C E T P、L C A T、等々）；リポタンパク質受容体の変化；リポタンパク質酸化のインジケーター、及び内毒素の取り込み。1つの好ましい実施形態では、検出される、重症感染、S I R S 及び止血機能不全、より好ましくはセプシス及びD I C に関連する異常リポタンパク質は、プロトロンビナーゼ活性を支持する高い能力を有するリポタンパク質（特にV L D L）である。さらに、1つの好ましい実施形態では、重症感染、S I R S 及び止血機能不全（より好ましくはセプシス又はD I C）を有する患者の異常リポタンパク質を、特異的アポリポタンパク質、粒子の大きさ、数又は脂質を測定することを含む様々な方法を用いることによって特定しうる。特に、正常者のと比較したリポタンパク質の総表面積を含む。

10

20

30

40

50

【0019】

インビボでのトロンビンの生成はD I Cにおける重要な過程であるとみなされ、疾患の進行中はその生成のマーカーが上昇する。プロトロンビンのトロンビンへの酵素的変換が生理的に適切な速度で起こるためには、その成分が適切な表面に局在しなければならない。インビボに関しては、これは活性化血小板、単核及び不安定内皮細胞（*p e r t u r b e d e n d o t h e l i a l c e l l s*）によって供給されると推定される。生理的レベルのV L D Lも、トロンビン生成の適切な速度を支持することができ、これは、トリグリセリドの重要な予測を心臓血管事象に結びつけると思われる。本発明によれば、C R P - V L D L は単なるD I Cのマーカー又は予測因子ではないこと、及びそれが、トロンビンの生成を増強し、維持する能力を通して可能な病原的役割を担ってインビボで存在することが発見された。

【0020】

トロンビンは、凝固カスケードの主要エフェクタープロテアーゼとして、D I Cの病因において中枢的重要性を持つ。フィブリノゲンをフィブリンに変換する上でのその凝固促進作用、及び内皮トロンボモジュリンに結合してプロテインCを活性化することによるその凝固阻止作用の促進が、D I Cでは調節不全となりうる。本発明によれば、二相性波形を有する患者からのV L D Lのこの高い凝固促進性局面が、修正A P T Tアッセイにおける凝固時間の有意の短縮を通して明らかにされることが発見されている。また、添加された正常又は患者V L D Lが、凝固反応のためのリン脂質表面を提供する唯一の識別ソースを提供することも認められている。理論に縛られるのは望むところではないが、この証明はまた、一般的な病院環境においてより短いA P T T凝固時間は好ましくない結果に結びつくという所見の1つの説明にもなりうる。

【0021】

さらに、本発明は、速度及び/又は加速などの波形テクノロジーのA P T Tパラメータを利用して実施しうる。また、国際公開公報第W O 0 2 / 3 4 1 1 0号が教示する包括的な凝固能力アッセイや方法も、重症感染、S I R S 及び止血機能不全を有する患者においてリポタンパク質異常を捕獲するために使用しうる。例えば、異常リポタンパク質の検出段階は、修正A P T Tアッセイにおける凝固時間の短縮を測定すること又は希釈組織因子

に基づくアッセイにおいて血栓形成の測定または血栓形成の加速の速度上昇を測定することにより、二相性波形を有する患者からのVLDLの高い抗凝固性局面を検出することによって実施しうる。

【0022】

本発明の1つの好ましい実施形態では、止血機能不全及びSIRSを有する患者及び重症感染に対する宿主反応は、トロンビン生成を有意に増強することができるVLDLを有することが発見されている。さらに、セプシス及びDICを有する患者の連続試料におけるVLDLの定量的及び定性的変化からの総トロンビン生成能力の算定は、臨床的進行と直接の正相関を示す。これは、トロンビンをセプシスの病態生理学における主要作用因子とすることの妥当性を裏付ける。その主たる役割は急性期の防護初期応答の一部であると

10

【0023】

本発明によれば、重症セプシスにおける組換えヒトAPCなどの抗凝固薬ベースの治療をよりよく標的する高いプロトロンビナーゼ潜在能のバイオマーカーが提供される。さらに、インピボで疾患状態においてトロンビン生成を増強し、異常な状態に維持することができる、微粒子及び細胞表面以外の機構についての見識が提供される。理論に縛られるのは望むところではないが、トロンビン生成の定性的上昇は、重症感染、SIRS及び止血機能不全、特にセプシス及び炎症に

20

【0024】

1つの好ましい実施形態では、VLDLのプロトロンビナーゼ活性を支持する能力を測定する。ここで使用するとき、プロトロンビナーゼ活性を支持する能力はまた、プロトロンビナーゼ活性(PTアーゼ)を指し、この語と交換可能に使用され、二相性波形を有する患者では変化していることが認められている。二相性波形は、凝固アッセイ、及び定められた正常及び異常パラメータに関するプロフィールを提供するための経時的に前凝固相(勾配-1)(slope-1)を測定する手段を用いて当業者に既知の適切な方法によって特定し、測定しうる。好ましくは、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)アッセイを、MDA 180(登録商標)(ビオメリュー社(bioMérieux))などの光透過型凝固分析器と共に使用しうる。例えば、S字状波形パターンを有する580nmでの正常波形は、図1のパネルAに示すように正しい血栓形成に先立つ初期100%光透過相を特徴とする。これに対し、二相性波形(BPW)を有する患者は、曲線の初期部分に影響を及ぼして、図1のパネルBに示すような二相性プロフィールを生じさせる、前凝固相でも起こる即時的で漸進的な光透過度の低下を有する。二相性波形を有する患者群は、それぞれ図2及び3に示すように高い死亡率とセプシスの高い発生率に結びつけられている。

30

【0025】

本発明によれば、二相性波形を有する患者は、二相性波形患者(例えば急性期宿主反応中の患者)からのリポタンパク質(特にVLDL)におけるPTアーゼ比活性が少なくとも約2倍上昇していることが認められる。重症感染、SIRS及び止血機能不全を有する患者の異常リポタンパク質(特にVLDL)のPTアーゼ比活性(トロンビン生成能力)の異常又は上昇の範囲は、正常な健常個体群からのリポタンパク質(特にVLDL)のPTアーゼ活性と比較して約2-約8倍、より好ましくは3-4倍の範囲をとりうる。総PTアーゼはAPTT波形(WF)の変化を反映することが認められている。理論に縛られるのは望むところではないが、高いPTアーゼ活性は高い陰イオンリン脂質の露出によるものと考えられる。さらに、高いPTアーゼは、血小板又は内皮微粒子によるものではないと考えられる。VLDL上のアポBの存在はPTアーゼ活性にとって重要であると考えられる。好ましくは、該PTアーゼ活性は修正されて検出され、より好ましくはAPTTなどの修正凝固アッセイ又は修正組織ベースアッセイによって検出されうる。好ましくは、リポタンパク質異常を検出するためのアッセイは、CRP-リポタンパク質複合体、よ

40

50

り好ましくはCRP-VLDL複合体を形成することなく、実施される。

【0026】

本発明のもう1つの実施形態では、重症感染、SIRS及びセプシス（最も好ましくはDIC）を有する患者は、負に荷電した（陰イオン性）リン脂質表面、特にリン脂質ホスファチジルセリン（PS）の表面積増加の特定によって診断しうることが発見されている。理論に縛られるのは望むところではないが、陰イオンリン脂質は、セプシスの患者では、証明可能な凝固促進活性を有する血小板微粒子から放出されると考えられる。同様に、陰イオンリン脂質は、膜の陰イオンリン脂質の転位又は初期内皮機能不全における流出又は多臓器不全及びDICに関連するアポトーシスから、肝臓で（hepatically）誘導されうる。さらに、VLDL粒子内でのアポリポタンパク質Eの低発現は、残存粒子組成物の取り込みに実質的に影響を及ぼし、それらのアテローム形成性及びトロンピン生成を支持する能力に関連すると考えられる。

10

【0027】

既知のように、細胞膜PSは、マクロファージの認識及び食作用を仲介するアポトーシスの初期段階の1つとして膜の外層に転位する。PSはまた、プロトロンビナーゼ構築などの凝固反応にとって非常に重要である。それ故、CRP-VLDL複合体を有する患者からのVLDL粒子の高いトロンピン生成能力は、アポトーシス細胞からVLDL表面に潜在的に吸収された、粒子表面上の露出陰イオンリン脂質（PSを含む）部位の増加、又は粒子内のコンフォメーションの変化によって引き起こされると考えられる。

【0028】

アネキシンA5（A5）は、負に荷電したリン脂質表面に高い親和性を有し、PSに対して他の陰イオンリン脂質よりも高い特異性を有する、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質である。先に述べたように、特異的結合アッセイは、重症感染、SIRS及び止血機能不全を有する患者の異常リポタンパク質が、異常リポタンパク質を直接又は間接的に検出するために標識結合タンパク質としてのA5、A5に対する抗体、等々を利用して測定できるように、この結合親和性を利用して調製しうる。

20

【0029】

本発明の別の実施形態によれば、A5結合能力は露出陰イオンリン脂質部位を特定し、陰イオンリン脂質依存性反応を阻止しうることが認められている。図8Bに示すように、A5はプロトロンビナーゼ構築を阻害する。図8Bに示すように、最初のバーはA5で処置した正常患者を示し、2番目のバーは様々な濃度のA5で処置した二相性患者を示す。好ましくは、重症感染、DIC又はセプシスを有する二相性患者の止血系を再平衡させるためにA5を有効量（好ましくは少なくとも約100ng/ml、より好ましくは100-5000ng/mlの範囲内）で投与する。A5はインビトロで明らかにしうる凝固阻止特性を有しており、それ故露出PSの周囲に抗血栓シールドを形成して、機能性凝固促進複合体の形成を予防すると思われる。抗リン脂質抗体は、推定上このシールドを破壊し、それ故これらの患者において認められるプロトロンピン傾向を説明する。本発明によれば、この治療処置が、止血系を再平衡させて、この患者群の高い死亡率に影響を及ぼしうることから、A5は、DICに関連する臨床状態を有する患者のための治療法として提供されうる。

30

40

【0030】

（実施例）

下記の非制限的实施例は本発明を例示するものである。

【0031】

（実施例1）

方法

臨床試験

24ヶ月の前向き試験において、ロイヤルリバプール大学病院（the Royal Liverpool University Hospital）のITUへの連続的な成人入院患者全員に毎日のようにAPTT波形分析を実施した。この試験は、CRP-V

50

LDL複合体形成が最大になる時から、臨床疾患に関する病態生理学的及び機械的見識を得るために実施した。興味ある関連性は、各個体の患者のエピソードについてその個々の成分(CRP又はVLDL)と比較したとき、最小TL18値、すなわち最大複合体形成を検出する上での最も異常な波形とDICの診断との関係である。DICは、国際血栓止血学会標準化小委員会(the International Society of Thrombosis and Haemostasis Standardization Sub-Committee)によれば、血小板数、プロトロンビン時間(PT)、フィブリノゲン及びD-二量体レベルの変化から導かれる累積スコアが5又はそれ以上と定義された(Taylor, F.B., Toh, C.H., Hoots, W.K., Wada, H., Levi, M. 2001。定義のための、汎発性血管内凝固症候群に関する臨床及び検査判定基準と採点システム(Towards definition, clinical and laboratory criteria and a scoring system for disseminated intravascular coagulation). Thromb. Haemost. 86:1327-1330)。PT、フィブリノゲン及びD-二量体を、シムプラスチンS(Simplastin S)、フィブリクィック(Fibriquik)及びMDA(登録商標)(米国ノースカロライナ州バイオメリュー社(bioMerieux, Inc. Durham, NC USA))D-二量体ラテックス粒子ベースの免疫測定法を用いて、それぞれ自動光学的凝固分析器、MDA 180(登録商標)で0.105Mクエン酸三ナトリウムに収集した血漿(クエン酸三ナトリウム1に対し血液9の割合)に関して測定した。Diamed AG CRP ELISA(Cressier sur Morat, Switzerland)を使用し、VLDLのマーカースとして血漿トリグリセリド(TG)を、シグマ・インフィニティー・リエージェント(Sigma Infinity Reagent)システムを用いて測定した。波形分析の結果を公開せずにDICの診断を行った。

10

20

30

40

50

【0032】

APTT波形分析

新鮮クエン酸添加血漿に関する、Platelin LS試薬を用いた580nmのMDA 180(登録商標)での波形分析は広く記述されている(例えば、Downey, C., Kazmi, R., Toh, C.H. 1997より、汎発性血管内凝固における血液凝固の光学的波形分析からの新しく診断適用可能な情報(Novel and diagnostically applicable information from optical waveform analysis of blood coagulation in disseminated intravascular coagulation.) Br. J. Haem. 98:68-73、及びDowney, C., Kazumi, R., Toh, C.H. 1998より、透過波形分析を通しての汎発性血管内凝固における早期特定と予後の意味(Early identification and prognostic implications in disseminated intravascular coagulation through transmittance waveform analysis.) Thromb. Haemostas. 80:65-69)。二相性波形異常の程度の数量化は、APTT反応への18秒目の光透過レベル(TL18)によって行い、正常波形は100%(99.43-100.69)の平均TL18及び0.15%の平均変動係数を有していた。

【0033】

材料

ヒト第X因子(FX)、第V因子(FV)及びプロトロンビン(FII)を血漿から生成し、先に述べたようにFXa及びFVaに変換した。トロンビン色素形成基質、S-2238をイタリア、ミラノのクロモジェニクス社(Chromogenix, Milan, Italy)より入手した。ヒト組換えCRPは英国ノッティンガムのカルバイオケム社(Calbiochem, Nottingham, UK)より入手し、アネキシンVはカ

リフォルニア州サンディエゴのBDバイオサイエンス社 (BD Biosciences, San Diego, CA) から、またそのフルオレセイン標識形態をドイツ、ワークベンツバーグのベーリンガー・マンハイム社 (Boehringer Mannheim, Werk Penzberg, Germany) から入手した。アポリポタンパク質 (アポ) B 及び E 標準品、インフィニティーコレステロール/トリグリセリド試薬、それぞれの標準品及び乾式シリカは、ミズーリ州セントルイスのシグマ社 (Sigma, St. Louis, MO) より入手した。ヤギ抗ヒトアポ B - 100 及びヤギ抗ヒトアポ E は英国ケンブリッジのアブカム社 (Abcam, Cambridge, UK) より入手した。ウサギ抗ヒトアポ B - 100、ウサギ抗ヒトアポ E 及びモノクローナルマウス抗ヒト糖タンパク質 IB は、デンマーク、グロストラップのダコー社 (Dako, Glostrup, Denmark) より入手した。マウス抗 $v_{\beta 3}$ インテグリン複合体及びマウス抗 IgG₁ / G_{2a} はカリフォルニア州サンディエゴのBDファーマーミゲン社 (BD Pharmingen, San Diego, CA) より入手した。HRPに複合したヤギ抗ウサギ IgG は米国カリフォルニアのサンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology, California, US) より入手した。プロテインGセファロースはカリフォルニア州サンフランシスコのザイムド・ラボラトリー社 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) より入手した。リン脂質標準品はミズーリ州セントルイスのシグマ社 (Sigma, St. Louis, MO) より入手した。他のすべての試薬は分析用グレードのものであった。

10

20

【0034】

クロマトグラフィー試験

トリス緩衝食塩水 (TBS) pH 8、2.2 mM CaCl₂ で平衡させた英国アマーシャムのアマーシャム・ファーマシア社 (Amersham Pharmacia, Amersham, UK) のハイプレップ・セファクリル S - 300 (HiPrep Sephacryl S - 300) カラム (180 cm³) を用いて室温 (RT) でサイズ排除クロマトグラフィーを実施した。被験血清 5 ml をカラムに適用し、1.5 ml / 分のぜん動ポンプ速度で2分ごとに90分間にわたって分画を収集した。作動と作動の間に0.2 M 水酸化ナトリウム約500 ml でカラムを洗った。試験した種々の血清は、二相性波形を有していない正常個体2名 (それぞれ CRP = 5 及び 8 µg / ml)、二相性波形を有していないITU患者3名 (CRP = 125、150 及び 150 µg / ml) 及び二相性波形を有するITU患者4名 (CRP = 120、130、145 及び 165 µg / ml) であった。最後の群からの2名には、同じ血清を、但し全二価陽イオン依存性複合体を破壊する10 mM EDTAの存在下で、反復してクロマトグラフィーにかけた。分画を4に保持し、ELISAによってCRP、アポB及びEに関して定量した。アポB/Eの定量のために、96ウェルプレートを、各々のウェルについて、50 mM 炭酸水素ナトリウム pH 9.5 中 5 µg / ml のヤギ抗ヒトアポ B / E 100 µl により、4で一晚被覆した。2% BSA / HEPES 緩衝食塩水 (HBS) / Tween 20 で洗った後、プレートをPBS - 2% BSA によりRTで1時間遮断した。標準品 (アポBについてはA4183 及びアポEについてはA2673 - A2456) / 試料分画 100 µl を適用し、RTで2時間インキュベートした。2 µg / ml のウサギ - ヒトアポ B / E 100 µl、次いで洗浄緩衝液中 1 : 20000 のヤギ抗ウサギ HRP 複合体 100 µl で検出を行った。脱イオン水 6 ml 中 2.9% O - フェニレンジアミンジヒドロクロリド 100 µl と 30% 過酸化水素 2.5 µl (米国ミズーリ州セントルイスのシグマ・アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich Company Ltd., St. Louis, MO, US)) でシグナルを生成し、0.5 M 硫酸 50 µl で反応を停止させた。490 nm のスペクトラマックス・プラス (Spectramax Plus) (カリフォルニア州スタンフォードのモレキュラー・デバイス社 (Molecular Devices Corp., Stanford, CA)) でプレートを読み取った。

30

40

【0035】

50

VitIELloとZanetta (VitIELlo, F., Zanetta, J. P. 1978. リン脂質の薄層クロマトグラフィー (Thin-layer chromatography of phospholipids). J. Chromatogr. 166: 637-40) の方法によって二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) を実施した。簡単に述べると、TLCプレート (オレゴン州ヒルズボロのワットマンラプセル社 (Whatman Lab Sales, Hillsboro, OR)) を125で30分間活性化した。試料をプレートの縁から15mmの位置にスポットし、十分に飽和したタンクを用いて酢酸メチル:n-プロパノール:クロロホルム:メタノール:0.25%塩化カリウム (25:25:25:10:9) 中で140mm移動させた。次にプレートを窒素下で乾燥した後、同じ飽和条件を用いて、クロロホルム:メタノール:アセトン:酢酸:水 (75:15:30:15:7.5) 中で垂直方向に移動させた。その後、ニンヒドリン (メタノールと10%酢酸水溶液5ml中0.2%ニンヒドリン95ml)、次いで50%硫酸水溶液をプレートに噴霧した後、15分間120に加熱した。使用した標準品は、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、スフィンゴミエリン (SM) 及びセレブロシドであった。

10

【0036】

VLDLの単離と定量

これは、被験血漿を10で10分間、14000rpmで遠心分離してカイロミクロンを除去した後、先に述べたとおりであった(1)。VLDL分画 (密度<1.019g/mL) を4で保存し、単離から新鮮な状態で4日以内に使用した。

20

【0037】

プロトンビナーゼ支持活性

先に述べたように調製した、単離VLDL (100、300及び500µM TG) 又は50µmol/L/リン酸のPC/PS小胞 (75:25) を最初にTBS (pH7.4)、5mmol/L CaCl₂ に希釈し、15nM FVa、1µM IIと共にインキュベートした。0.1nmol/L FXaを添加して反応を開始させた。あらかじめ定められた時間間隔で、10µlアリコートをしてTBS 90µl、2mmol/L EDTA中にとった。次に10µlを96ウェルプレートに分配し、そこにS-2238 190µl (最終濃度400µmol/L) を加えた。405nmでの色素形成性遊離をスペクトラマックスプレートリーダーで測定した。既知のヒトプロトンビナーゼ標準品から作成した検量線と比較することによってプロトンビナーゼ生成の速度を確認した。プロトンビナーゼ構築へのCRPの寄与を評価する実験では、TG VLDL 500µMを100µg/mL CRPと共にRTで15分間インキュベートした後、凝固タンパク質を反応に導入した。

30

【0038】

チオバルビツール酸反応物質に基づく方法によってVLDLの酸化状態を調べた (Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H. G., Camejo, G. 1993. 単一マイクロタイタープレートにおけるリポタンパク質の酸化及びチオバルビツール酸反応物質形成の測定: 抗酸化薬の評価のためのその使用 (Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants). Anal. Biochem. 208: 10-5)。1.3%チオバルビツール酸 (0.3% NaOH中) 75µl、トリクロロ酢酸50µl、TBS緩衝液40µl及びVLDL 25µlを60で40分間インキュベートし、その後氷上で冷却した。20% SDS 10µlを加えた後、スペクトラマックスリーダーでA530-A600nmの吸光度を検査した。

40

【0039】

リン脂質表面の寄与を明らかにするため、HEPES結合緩衝液に懸濁したVLDL (

50

最終濃度 500 μ M TG)、50 mMカルシウムと共にインキュベートしたフルオレセイン標識アネキシンVにより、Cellquestソフトウェアを用いてベクトンディキンソン社(Becton Dickinson)のフローサイトメーターでFACSを実施した。プロトロンビナーゼ生成へのアネキシンVの添加の影響を、TBS/5 mM CaCl_2 中300 μ M TG VLDLと漸増濃度のアネキシンVの事前インキュベーション(0 - 100 μ g/ml、室温で15分間)によって評価した。別の実験では、TBS/5 mM CaCl_2 中500 μ mol/l TG VLDLを漸増濃度(0、10、100、1000 ng/ml)のアネキシンV又はリン脂質特異的抗体9D2(SRan、University of Texas)と共に室温で15分間プレインキュベートした後、プロトロンビナーゼ活性を比較した。

10

【0040】

単離VLDLにおける血小板又は内皮微粒子汚染の可能性を、確立された血小板及び微粒子ゲートを用いたFACSによって判定した。VLDL(最終濃度500 μ M TG)を、血小板糖タンパク質1bに特異的なフルオレセイン複合モノクローナル抗体100 μ g/ml及び内皮細胞- v_3 インテグリン複合体(10 μ l)と共にインキュベートした。それぞれのアイソタイプ対照を同時に使用した。VLDL中の結合凝固タンパク質の評価を、標準色素形成性プロトロンビナーゼアッセイのための第Va因子、第II因子又は第Xa因子を欠損する特異的反応混合物を用いて実施した。トロンビン生成が存在しないことは、評価した凝固因子の欠損を示した。

20

【0041】

免疫吸着分析

ウサギ抗ヒトアポB/E(1 mg)をプロテインGセファロースビーズ150 μ lに結合した。抗体を添加していない対照セファロースを同様に調製した。TGに対して標準化したVLDL250 μ lをエンド・オーバー・エンド回転によって混合し、4で一晚インキュベートした。採集した上清を、上述したようにプロトロンビナーゼ支持構築物及びアポB/E定量に関して、及びウエスタンブロット法によって分析した。後者は、4%濃縮用ゲル、及びアポE及びアポBに関してそれぞれ5%又は15%泳動用ゲルを用いたSDS-PAGEによって実施した。二倍力価の試料緩衝液中のVLDL25 μ lを充填し、45 mAで約1時間泳動させた。イモビロン(Immobilon)膜(マサチューセッツ州ビレリカのミリポア社(Millipore, Billerica, Massachusetts))への転移を400 mAで1時間実施し、5%乳-TBS-0.1% Tween中で一晚遮断した。最初に3%乳-TBS-0.1% Tween中1 mg/mlの抗体アポB/Eと共にRTで1時間インキュベートし、洗浄した後、次に3%乳-TBS-0.1% Tween中抗ウサギHRP(6000中1)と共にRTで40分間インキュベートした。TBS-0.1% Tween中でさらに洗浄した後、化学発光(ECL、英国、アマーシャムのアマーシャム・ファーマシア社)及びX線フィルムへの露光によって検出を行った。

30

【0042】

凝固促進性補因子凝固アッセイ

血漿媒質中のVLDLの凝固促進活性を測定するため、スペクトラマックスマイクロタイタープレートリーダーで修正APTTを実施した。一晚絶食した正常個体からの血小板欠乏血漿25 μ lをイミダゾール緩衝液中0.175%シリカ25 μ lと共に37でインキュベートした。180秒後、VLDL(等しいTGレベルの正常個体又は二相性波形異常を有する患者から)と25 mM CaCl_2 の間での50:50混合物50 μ lを加え、血栓形成までの時間を記録した。これを、半値最大吸光度変化の時点と定義した。すべてのサンプルに関して2回ずつ実施した各々の検査を、正常個体からのVLDLと同じ正常血漿に添加した二相性波形を有する患者からのVLDLと比較した。

40

【0043】

統計

臨床試験において、3パラメータロジスティックモデルによる非線形回帰分析を、最も

50

異常な波形結果、それぞれ対応するCRP及びTGレベルと、DICの診断との間の関係のデータに適合させた(Toh, C.H., Ticknor, L.O., Downey, C., Giles, A.R., Paton, R., Wenstone, R. 2003. 簡単に迅速な凝固-波形分析を通してのセプシス及び死亡危険度の早期特定(Early identification of sepsis and mortality risks through simple, rapid clot-waveform analysis). Intensive Care Med. 29: 55-61及びRatkowsky, D.A. 1983. 非線形回帰モデリング(Nonlinear Regression Modeling)。(ニューヨーク州、マーセルデッカー社(Marcel Dekker Inc., New York))。これらの算定はすべて
10
S-PLUS 2000(ワシントン州シアトルのマスソフト社(MathSoft, Seattle, WA))を用いて実施した。実験作業からの結果は平均+/-SEMとして算定した。その平均を、一変量ANOVA(プロトンピナーゼ)又はスチューデントt検定による分散分析のいずれかを用いて比較した。データの分布について仮定を含まないようにt検定を補足するためノンパラメトリック検定も使用した。統計的有意性を定義するために $p < 0.05$ の値を使用した。

【0044】

結果

DICとの相関の程度

24ヶ月の試験期間にわたってITUに連続的に入院した合計1187名の患者のうち
20
、758名(64%)が二相性波形を有していた;すなわち集中治療室で治療を受けた期間中にいずれかの時点で $TL18 < 99\%$ であった。図4Aに示すデータは、CRP-VLDL形成の程度を反映する波形異常の度合とDICの診断との高い結びつきを明らかにしている。正常波形を有する患者では、10-15%がDICについての判定基準を満たし、 $TL18$ が20%低下したときにはこの可能性が60%に上昇した。60%又はそれ以下の $TL18$ 値を有する患者では、DICと事実上100%の結びつきでプラトーに達した。比較すると、二相性波形の基礎となる複合体の個々の成分は、それぞれ図4B及びCに示すようにDICとの結びつきがより弱かった。VLDLのマーカースとして、CRP及びトリグリセリドの最高レベルは、それぞれ症例の約60%及び70%においてDICと結びついていた。大部分の数値と比較して、ロジスティック曲線への適合において高い
30
影響を及ぼす、いくつかの比較的大きなトリグリセリド読取り値が存在したが、それらは、これらの大きな数値でDICの上昇傾向を反映するために示されている。これらの結果は、確実に、高いレベルのCRP-VLDL複合体形成を臨床的DICの存在に結びつけており、またこれが複合体及び/又はその個々の成分の各々の関数であることを示している。

【0045】

インピボでのLC-CRPのクロマトグラフィーによる証拠

図5Aは、大部分のクラスのリポタンパク質中に存在することの結果として、初期分画全体に広く溶出するアポBに関する、正常絶食個体の血清からのクロマトグラフィープロファイルを示す。より低密度のリポタンパク質のマーカースであるアポEは、個体間での変動はあるが、一般にそれより後で検出される。一貫する所見は、しかしながら、集中治療患者における急性期反応の一部として、大きく増幅された溶出プロファイルの中央付近での単一ピークとしてのCRPの出現であろう。二相性波形を持たない患者では(図5B)、これは単一ピークのままであるが、二相性波形を有する患者では、アポB及びEと同時溶出する、第二のより小さく、より早期のCRPピークも検出される(図5C)。空隙容量内の「重い」形態のこの早期CRPピークはまた、アポBのピーク濃度も含む。そのプロファイルはカルシウム依存性であり、EDTAの存在下では単一CRPピークの容量内に消失する。

【0046】

二相性波形を有する患者における定性的及び定量的VLDL変化はプロトンピナーゼ活
50

性を増強する

トロンビン生成へのVLDLの速度論的寄与をPCPS小胞と比較した。図6Aは、PCPS小胞による即時反応を明らかにしており、30秒以内に半値最大反応を示す。比較すると、二相性VLDLについての半値最大反応は、正常VLDLについての8分と25分である。トロンビン生成を支持する能力のこの変動の証拠を、同じく種々の患者群においてVLDLの差を検討した大きな標本セットにおいてさらに評価した。トロンビン生成の速度を、正常VLDL (n = 24)、及び二相性波形を有する (n = 25) 及び二相性波形を有していない (n = 22) ICU患者からのVLDLの数多くの濃度で測定した。図6Bに示す関係の勾配は、二相性波形患者は正常VLDL及び波形異常のないITU患者からのVLDLよりも2.5倍強力であることを示している (p < 0.0001)。正常者からのVLDLと二相性波形を有していない患者からのVLDLの間でトロンビン生成の速度には差がなかった (p = 0.23)。漸増濃度のCRPの含有は、試験した種々のVLDL群からのトロンビン生成の速度を有意に変化させなかった。

10

【0047】

同じ標本において、VLDLの分離の前に総トリグリセリド含量を定量した。図7Aは、二相性波形を有する患者においてのみしばしば総トリグリセリドレベルが高く、波形異常の上昇と正の相関傾向が存在することを示している。VLDLの定性的及び定量的変化の両方がトロンビン生成の潜在能に関連するので、総血漿トリグリセリドとプロトロンビナーゼ比活性 [I I a (s e c - 1) / m M T G] の積を調べた。この関係は、図7B及びCにおいて数日間にわたる標本からの個々の患者のシリーズで明らかにされており、それぞれ治療して消散した例と最終的に死亡に至った重症セプシスの例を示している。

20

【0048】

二相性波形を有する患者におけるトロンビン生成のVLDL表面増強

リン脂質表面は凝固反応にとって欠くことのできない部分であるので、VLDL表面上の高まる効用が高いプロトロンビナーゼ活性を説明しうるかどうかを評価した。凝固剤活性リン脂質に特異的なカルシウム依存性結合タンパク質である蛍光標識アネキシンV (Me e r s , P . , M e a l y , T . 1 9 9 3 . リン脂質へのカルシウム依存性アネキシンVの結合: 化学量論、特異性、及び負電荷の役割 (C a l c i u m - d e p e n d e n t a n n e x i n V b i n d i n g t o p h o s p h o l i p i d s : s t o i c h i o m e t r y , s p e c i f i c i t y , a n d t h e r o l e o f n e g a t i v e c h a r g e) 。 B i o c h e m i s t r y . 3 2 : 1 1 7 1 1 - 2 1 及び T a i t , J . F . , G i b s o n , D . 1 9 9 2 . アネキシンVのリン脂質結合: カルシウム及び膜ホスファチジルセリン含量の作用 (P h o s p h o l i p i d b i n d i n g o f a n n e x i n V : e f f e c t s o f c a l c i u m a n d m e m b r a n e p h o s p h a t i d y l s e r i n e c o n t e n t) 。 A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 9 8 : 1 8 7 - 9 1) を使用して、二相性波形を有する16名の患者からのVLDLを正常個体からの対応する数と、FACSによって比較した。二相性患者から単離したVLDLからのより強いシグナル (幾何平均蛍光58.02対19.25) は、凝固剤活性脂質の高い露出を示唆する。図8Aは典型的な実験所見を示す。これはCRPとのインキュベーションによって影響されなかった (データは示していない)。プロトロンビナーゼ活性を阻害するアネキシンVの能力は、正常者4名と二相性波形を有する患者4名からのVLDLのデータを示す図8Bにおいて明らかにされている。100ng/mlのアネキシンVで二相性VLDLに関してトロンビン生成の有意の阻害が存在した (p = 0.003)。正常者と比較したときCRP-VLDL複合体を有する患者からのVLDLに関してはプロトロンビナーゼ活性の阻害の程度がはるかに大きく、高いトロンビン生成が二相性波形患者からのVLDLにおける凝固剤活性リン脂質の高い露出によるものであることを示唆した。

30

40

【0049】

この高い凝固促進潜在能は、インビボ及び/又はエクスピボでの血小板又は内皮微粒子による汚染によって説明されうる。これは、内皮細胞及び血小板に特異的な分画を特定す

50

ることができなかつたりポタンパク質微粒子のフローサイトメトリーによって排除された。さらに、収集したVLDLへの結合プロトンビナーゼタンパク質の寄与の可能性も検討した。プロトンビナーゼアッセイを用いて、精製第Va因子、第II因子又は第Xa因子の不在下では有意のトロンピンが生成されず、VLDLと関連凝固タンパク質の結びつきが存在しないことを示唆した。

【0050】

この高い凝固活性が二相性波形を有する患者からのVLDLにおける高いPS露出によるものであるかどうかを評価するため、3つの別々の実験において9D2モノクローナル抗体(Dr Ran, Univ. of Texas)を使用した。これは、PS、ホスファチジン酸、カルジオリピン、ホスファチジルイノシトール及びホスファチジルグリセロールに対して十分に特性付けられた特異性を有し、PC、PE及びSMには反応性がない(Ran, S., Downes, A., Thorpe, P. E. 2002. 腫瘍血管の表面での陰イオンリン脂質の高い露出(Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels). Cancer Res. 62: 6132-6140)。図8Bは、これがプロトンビナーゼ活性を支持するVLDLの表面能力に有意の阻害作用を及ぼさないことを示している。これは、PSの変化がプロトンビナーゼ増強の原因ではないことを示唆する。

10

【0051】

二相性波形患者からのVLDLはPEを欠くが、PC、SM及びセレプロシドを含有する。上記の所見を確認し、関与するリン脂質部分をさらに検討するため、TLCを実施した。アミノ含有リン脂質0.25µgの検出限界まで感受性であるこの方法は、正常個体(n=5)及び患者(n=10)からの両方のVLDLにおいてPSの欠如を確認した。PC、SM及びセレプロシドはすべてのVLDL中に存在し、それ故9D2抗体によるトロンピン生成の排除が相対的に欠如していることを説明する(図9A)。組成上の唯一の相違は二相性波形患者だけにおけるPEの欠如であった(図9B)。波形異常を有していないICU患者は正常者と同様のTLC所見を有していたので、これは二相性波形を有する患者に特異的な再現可能所見であった。

20

【0052】

VLDLからのアポリポタンパク質Bの免疫吸着は粒子構造及びトロンピン生成を支持する能力を破壊する

30

VLDLタンパク質の寄与を定義するために、アポB-100又はアポEに対する固定化抗体を、プロトンビナーゼ活性を吸着する能力に関して試験した。抗アポB IgGは、対照セファロースビーズと比較してプロトンビナーゼ活性の80%を吸着した。SDS-PAGE及びデンシトメトリー分析に基づき、固定化抗アポB抗体は標的抗原を吸着した；すなわち、吸着上清中の染色アポBタンパク質バンドは、対照セファロースビーズからのものの5%であった。吸着工程自体はプロトンビナーゼ潜在能の喪失を導くが、特異的アポB除去は、3つの異なる出発VLDLにおいて活性の有意の喪失(p=0.0002)を導く(図10)。アポB免疫吸着後のVLDLの構造完全性を評価するためのさらなるフローサイトメトリー分析は特定しうる粒子を示さなかつた。これは、アポBが、プロトンビナーゼ構築を高めるために必要な脂質のコンフォメーションを構造的に支持することによって、二相性波形患者からのVLDLの高いトロンピン生成に寄与することを示唆する。

40

【0053】

これに対し、対照吸着と比較して5%未満という低いレベルのアポEの免疫吸着は、FACにより、プロトンビナーゼ活性(図10)あるいはその構造完全性を低下させなかつた。アポEは、それ故、トロンピン増強を最適化する表面立体配置において必須ではない。

【0054】

二相性波形患者からのVLDLは正常血漿の凝固アッセイにおいて凝固促進活性を示す

50

上記のプロトロンビナーゼ所見に続いて、我々は修正APTT凝固アッセイを用いて血漿媒質中でのVLDLの凝固促進性補因子活性を検討した。図10に示すように、二相性波形患者からの単離VLDLの正常血漿への添加は、同じ血漿への正常個体からの等容量VLDLの添加と比較して、凝固時間の有意の短縮を示した ($p = 0.000$)。平均凝固時間は、7名の正常な無関係のドナーからのVLDLについては203秒 (SEM 0.95) であり、二相性波形 (TL18 77 - 85) を有する7名の患者からのVLDLについてはこれが178秒 (SEM 3.02) に低下した。図10のボックスプロットは、正常又は二相性VLDL添加についての25 - 75百分位の四分位区間及びそれぞれ205秒と179秒の凝固時間中央値を示す。この明らかな差は、正常者 (0.4 - 1.5 mMの範囲) と二相性波形患者 (0.5 - 1.8 mMの範囲) の間でかなり重複する総TG含量の差によっては説明できなかった。それ故、二相性波形を示す患者からのVLDLは有意の凝固促進性補因子活性を示す。

10

【0055】

この試験において、我々は二相性波形からのVLDLが正常VLDLの少なくとも2倍のトロンビン生成能力を有すること及びこれは脂質酸化あるいは微粒子汚染によるものではないことを明らかにすることができた。これまでの試験は、正常VLDLが、ドナーによるかなりの変動性を伴うけれども、生理的レベルのトロンビンを生成しうることを確立した (Moyer, M. P., Tracy, R. P., Tracy, P. B., van't Veer, C., Sparks, C. E., Mann, K. G. 1998. 血漿リポタンパク質はプロトロンビナーゼ及び他の凝固促進性酵素複合体を支持する (Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 458 - 465 及び Rota, S., McWilliam, N. A., Baglin, T. P., Byrne, C. D. 1998. アテローム形成性リポタンパク質はプロトロンビナーゼ複合体の構築及びトロンビン生成を支持する: 酸化及びビタミンEによる調節 (Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E). *Blood.* 91: 508 - 15)、この識別的な上昇は、検討した大きな標本セット内の二相性波形を有する患者において一貫しており、インビボでトロンビン生成を支持する重要な役割を果たしたと考えられる。

20

30

【0056】

我々は最初に、二相性波形を有する患者からのVLDLにおける高いトロンビン生成能力は高い陰イオンリン脂質の効用によるものであるという仮説を立てたが、これが高いホスファチジルセリンによるものであることを示すことはできなかった。これは2つの別々の系統の証拠に基づいていた。第一に、PSに関して十分に特性付けられた特異性を有する9D2阻止抗体からのデータはプロトロンビナーゼ活性の阻害を示さなかった。第二に、0.25 μ gのPSを検出する感受性があるTLC試験は、二相性波形患者からのVLDLにおいても高いプロトロンビナーゼ支持活性の証拠を示さなかった。Deguchiらは、正常VLDLにおいて少量のPS (0.4%) を見出しており (Deguchi, H., Fernandez, J. A., Hackeng, T. M., Banka, C. L., Griffin, J. H. 2000. カルジオリピンはヒト血漿リポタンパク質の正常成分である (Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 1743 - 1748)、極微量がプロトロンビナーゼ活性を支持することができたとも考えられる (Moyer, M. P., Tracy, R. P., Tracy, P. B., van't Veer, C., Sparks, C. E., Mann, K. G. 1998. 血漿リポタンパク質はプロトロンビナーゼ及び他の凝固促進性酵素複合体を支持する (Plasma lipoproteins support

40

50

t prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:458-465)。しかし、特にインビボでプロトロンビン複合体を活性化するためのリン脂質の最も適切な組成物がまだ論議の対象であるので、これに代る説明もありえよう。PSの重要性は、3:1というPC:PS組成比が活性化血小板の凝固促進作用に最も類似すると思われる静的条件下でのインビトロ試験から導かれる (Deguchi, H., Fernandez, J. A., Hackeng, T. M., Banka, C. L., Griffin, J. H. 2000. カルジオリピンはヒト血漿リポタンパク質の正常成分である (Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1743-1748)。これに対し、PCだけを含む小胞は、フィブリン沈着によって測定するとき、凝固促進活性の最大上昇を引き起こしうる (Higgins, D. L., Callahan, P. J., Prendergast, F. G., Nesheim, M. E., Mann, K. G. 1985. プロトロンビナーゼ複合体の構築及び活性の発現における脂質運動性 (Lipid mobility in the assembly and expression of the activity of the prothrombinase complex). *J. Biol. Chem.* 260:3604-3612)。PCは我々の所見を解釈する上で特に適切であると考えられ、Roslingらも、正に荷電した膜がプロトロンビンの活性化を増強する能力を示している (Galan, A. M., Hernandez, M. R., Bozzo, J., Reverter, J. C., Estelrich, J., Roy, T., Mazzara, R., Ordinas, A., Escollar, G. 1998. 合成リン脂質の製剤は損傷した血管の凝固促進活性を促進する: 流動条件下での試験 (Preparations of synthetic phospholipids promote procoagulant activity on damaged vessels: studies under flow conditions). *Transfusion.* 38:1004-1010)。PEが特に二相性波形を有する患者のVLDLには存在しないという所見はまた、特に血漿凝固時間を短縮する作用においても重要であると考えられる。PEは主として凝固阻止経路を増強するとみなされ、抗リン脂質抗体によるその遮断はトロンビンの凝固促進活性を促進する (Rosling, J., Speijer, H., Zwaal, R. F. 1988. 正の静電ポテンシャルを有するリン脂質膜上でのプロトロンビン活性化 (Prothrombin activation on phospholipid membranes with positive electrostatic potential). *Biochemistry.* 27:8-11)。しかし、組成物の相違に加えて、凝固反応にとって適切な表面形状のコンフォメーションも考慮する必要がある。リポタンパク質の完全性を破壊する上でのアポB免疫吸着を通してのプロトロンビナーゼ活性の喪失は、この特定局面を強調する。

【0057】

上記に示すように、二相性波形を示す患者からのVLDLはトロンビン生成を有意に増強することができる。さらに、セプシス及びDICを有する患者の連続的試料におけるVLDLの定量的及び定性的変化からの総トロンビン生成能力の算定は、臨床上的進行と直接の正相関を示す。これは、セプシスの病態生理学における主要因子としてのトロンビンの関連性を裏付ける。その主たる役割は急性期防護初期反応の一部であると考えられるが、VLDLの凝固促進表面によって提供される持続的な又は増強された反応は有害な結果を導きうる。

【0058】

(実施例2)

CRP及びVLDLの測定

二相性波形を示す15名の患者の血漿において、ベックマン (Beckman) TL -

100卓上超遠心機を用いてポリカーボネート遠心分離管中(11×34mm、カリフォルニア州パロ・アルトのベックマン・インストルメンツ社(Beckman Instruments, Palo Alto, CA)10で2時間、356,000×gで初期遠心分離してVLDL測定を得た。上部VLDL分画を収集し、その容量を記録した。Gabel, B. R.ら、Biochemistry, 1998、37:7892-7898及びWang, Xら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000、20:1301-1308が述べたように単離したLDLを、アポB-100 ELISAのための標準品として使用した。コレステロール・インフィニティー試薬(Cholesterol Infinity Reagent)及びコレステロール検量器(Cholesterol Calibrator)を用いて二相性患者及び正常血漿試料からの単離VLDL分画において500nmでの比色定量によってコレステロール濃度を測定した。回収したVLDL分画中の総タンパク質濃度を、BSAを標準品として用いてブラッドフォード(Bradford)アッセイによって測定した。CRPレベルは、捕獲のためにウサギ抗ヒトCRP IgGを使用し、Tijssenら、Analytical Biochemistry, 1984、136:451-457が述べた方法でHRPに複合した同じ抗体によって検出するELISAによって測定した。CRPはまた、1187名の臨床試験患者においても測定し、レベルをユーロジェネティクス(Eurogenetics)キットを使用して照合した。VLDLレベルのマーカーとして、同じコホートにおいてトリグリセリド濃度も測定した。

10

20

30

40

【0059】

患者血清からの単離VLDL分画におけるCRPの検出

様々な度合のBPWを有する4名の患者からの血清を得た。これらの各々を0.9mlずつの3つのアリコートに分けた。最初のアリコートは収集したときの状態のままに残した。0.1M EDTA 0.1mlを第二のアリコートに加えて、キレートを形成し、存在する可能性のある複合体を破壊した。0.25M CaCl₂ 0.1mlを第三のアリコートに加え、複合体形成を最適化した。次にすべての試料を、VLDLの単離について上述したように遠心分離した。単離した分画をCRP及びトリグリセリド(シグマ・ダイアゴノスティックス・インフィニティー・リエージェント)に関して測定し、値を測定されたVLDLトリグリセリドmM当りのCRPとして表わした。

【0060】

単離VLDLのプロトンビナーゼ支持活性

BPWを有する3名の患者の単離VLDLを、20名の健常志願者のプールから単離した試料と共に、プロトンピン活性化においてリン脂質成分に取って代わる能力に関して分析した。VLDL濃度を100、200及び300µM(コレステロール)に調整し、プロトンピン形成の初期速度を、一般的にNesheim, M. E.ら、J. Biol. Chem. 1979, 254:10952-10956により説明される手順に従って蛍光マイクロタイタープレートリーダーでの蛍光によって測定した。

【0061】

二相性波形を有する患者の血清におけるCRP/VLDL複合体の存在の証拠

血漿Ca²⁺の存在によりCRP/VLDL複合体が循環中に存在するという推論を引き出すことができたが、その複合体が、カルシウム再添加の前に血漿試料を調製するために使用した抗凝血薬への初期暴露によって形成した可能性を検討した。抗凝固薬に暴露されていない血液の血清において複合体を特定することを目指して実験を実施した。下記の表Iに示すように、BPWを有する患者の未処理血清から単離したVLDLにおいてELISAによってCRPを検出した。

【表 1】

表 I

明確な二相性波形を有する患者からの血清の未処理試料、EDTA
及びカルシウム処理試料からのVLDL分画中のCRP

患者 番号	血清 CRP ($\mu\text{g/ml}$)	VLDL分画		VLDL分画 プラスEDTA		VLDL分画 プラスCa ²⁺	
		総CRP	CRP mM	Total	CRP mM	総CRP	CRP mM
			Trig	CRP	Trig		Trig
1	323	14.3	1.29	1.3	0.08	160	21.92
2	281	18.6	4.04	1.1	0.15	172	40.95
3	264	4.2	1.17	0.9	0.12	157	50.70
4	218	21.5	9.77	2.2	0.85	157	112.14

10

【0062】

CRPとVLDLの間の相互作用はCa²⁺依存性であるので、試料の事前のキレート
化は、検査したすべての患者において検出可能なCRPの喪失を導いた。同様に、CRP
とVLDLの間の複合体形成を促進する付加的なCa²⁺との事前のインキュベーション
は、VLDL分画内のCRPの高い検出を導いた。正常患者からのVLDLは検出可能な
CRPを有しておらず、BPWのない、高いCRPを有する患者は回収可能なVLDLを
有していなかった。これらの観察から、該複合体は、その血漿がBPWを示す患者の血液
中に測定可能な割合で存在すると結論された。

20

【0063】

(実施例3)

高いレベルのIL-6、CRP、フィブリノゲン及び/又はSAAによって証明される
急性期反応を経験した患者からの20の試料を検査した。20名の患者全員がある程度の
凝固活性化を示し、リポタンパク質プロファイルの著明な破壊を明らかにすると共に、
すべての患者が低コレステロール、しばしば低トリグリセリドレベルの形態の低脂血症を経
験した。20名の患者のうち16名は、ICU入院中又は入院の前に感染があったと判定
された。リポタンパク質プロファイル及びVLDL特性を下記に述べるように検討した。

30

【0064】

リポタンパク質プロファイル

現在臨床検査室で一般的に使用されている古典的脂質化学では見出されない付加的な情
報を得るために、各々の血漿の一部を、NMR分析によってリポタンパク質プロファイル
を測定するべく送付した。NMR分析は、粒子の脂質化学に関わりなく、所与の大きさの
リポタンパク質粒子の数の定量的分析を提供した。この分析から、2つの観察がすべての
被験者について共通していた。HDLサイズの粒子は、量的に正常粒子濃度から50%以
上低下していた。VLDLサイズの粒子も、プロトコルの血液検査中すべての被験者に
おいて低下した。VLDL量の低下は血液検査の日に依存して変化した。

40

【0065】

LDLサイズの粒子の量は血液検査の日に依存して多少の変動を示したが、VLDL及
びHDLサイズの粒子で見られたよりも変動は小さかった。4つの試料が、ICU試験期
間中に非常に低いLDLレベルを示した。

【0066】

すべてのリポタンパク質クラスにおける全体的変化についての概念を得るために、すべ
てのリポタンパク質クラスから総表面積を求める算定を行った。この算定を実施するこ
とは、リポタンパク質が潜在的に担いする総コア脂質の量の間接的インジケータとなる。

50

20名の被験者のうち6名は67%以上のリポタンパク質レベルの総低下(表面積による)を示し、20名のうち13名は50%以上の低下を示した。これを下記の表IIに要約する。

【表2】

表II リポタンパク質表面積	
患者番号	正常値からの総リポタンパク質表面積の%低下
1	58
2	44
3	60
4	68
5	53
6	76
7	53
8	38
9	68
10	55
11	41
12	53
13	38
14	50
15	49
16	79
17	70
18	44
19	37
20	74
	平均ナノモル正常プール面積 9.13 x 10 ⁶ nm ² /L
	表面積を算定するために: VLDLの平均直径=NMRによって算定(33-140nmの範囲) LDLの平均直径=NMRによって算定(19-22nmの範囲) HDLの平均直径=NMRによって算定(8-11nmの範囲) すべてのリポタンパク質濃度をNMRによってnmolで示す。 そこで、式は4*3.1416*(平均直径/2) ² *(nmolでのリポタンパク質濃度)となる。

10

20

30

40

【0067】

VLDL特性

20名の患者試料のVLDLを、1.006g/ccの密度(未調整密度)の超遠心分離によって各々の標本から単離した。次にこの浮遊密度サブクラスを、初期血漿と平行してアガロース電気泳動によって分析した。正常血清から単離した、この浮遊密度からのリポタンパク質(VLDLと称される)は通常、非変性アガロースゲルでの電気泳動でブレ移動パターンを示した。典型的なパターンは単離と分画時に出現し、すべての患者がブレ移動からある程度の移動への電気泳動シフトを経験した。しばしば、ICU血液検査の少なくとも1日又はほぼまる1週間にわたる移動への完全なシフトのVLDLにおける証拠が認められた。

【0068】

50

アガロースゲルでの全血漿の泳動から、HDL移動パターンの変化も認められた。正常ドナーでは、HDLは領域で移動する。すべてのICU患者(20名)について、HDLの移動は、血清アミロイドA(SAA)の取り込みの指標であるポスト/プレへと変化した。

【0069】

単離VLDLの一部を還元SDSポリアクリルアミドゲル上で泳動させた。VLDLは通常5以上のタンパク質を含むリポタンパク質である：アポB、アポE、アポCI、アポCII、アポCIIIは正常VLDLにおいて最も一般的に認められるタンパク質である。SDS-PAGE分析により、患者のICU入院中に分析したときタンパク質に変化があったと思われる。アポBは常に存在した。アポCはそのサイズが小さいため分析が困難であったが、患者のICU入院中に多少の変化が起こったと思われる。アポEの変化は最も一般的であり、20名のICU患者で明らかな変化が見られた。患者のICU滞在中に、時々アポEバンドが消失した。図12Aは、患者20として特定した患者からの連続的な試料の二相性勾配-1のデータを示す。図12Bは、患者図12AについてのVLDLの移動性のシフトを例示する、対応するアガロースゲルを示す。リポタンパク質のシフトは異常波形パターンの出現と一致した。

10

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1は、580nmでの正常波形(パネルA)、及び二相性波形プロフィールを生じる、正しい血栓形成前の光透過率低下(パネルB)を示しており、点線は、定量的指数として18秒目の透過レベル(TL18)を表わし、AではTL18=100及びBではTL18=63である。

20

【図2】図2は、死亡率が、正常波形を有する患者での0.26から、TL18値が25-35%低下すると0.61まで上昇することを示す、TL18データのロジスティック回帰評価を表わしており、白丸=観察された割合；点線=95%信頼限界である。

【図3】図3は、同じコホートの患者におけるセプシスとの結びつきについてのTL18データのロジスティック回帰評価を示しており、白丸=観察された割合；点線=95%信頼限界である。

【図4】図4A-Cは、(A)APTT-TL18値、(B)CRP及び(C)トリグリセリド測定からのDIC予測についてのロジスティックモデルを例示する。白丸は観察された割合であり、点線は95%信頼限界を表わす。

30

【図5】図5A-Cは、(A)正常個体、(B)二相性波形を有していない集中治療患者、及び(C)二相性波形を有する集中治療患者からの血清のサイズ排除クロマトグラフィーを例示する。分画は、CRP(太線)、アポB(細線)及びアポE(点線)に関して測定した。

【図6】図6A-Bは、プロトンビナーゼ支持活性を例示する。(A)は、PCPS()、正常個体からのVLDL()及び二相性波形を有する患者からのVLDL()によって生じる比較活性を示す。(B)は、正常VLDL()、二相性波形を有する()及び二相性波形を有していない()集中治療患者からの81試料における差を示す。

40

【図7】図7A-Cは総トリグリセリドレベルを例示しており、(A)は正常個体(x)、正常波形を有する患者(+)及び種々のAPTT-TL18値で二相性波形を有する患者()の間での血漿トリグリセリド濃度の差を示す。(B)及び(C)は、それぞれセプシスから回復した患者と死亡した患者の合計2名からの、血漿トリグリセリドとプロトンビナーゼ比活性/mMトリグリセリドの積によって算定した総プロトンビナーゼ活性()、及びAPTT-TL18値()についての時間経過を示す。

【図8】図8A-CはアネキシンV試験を例示する。(A)は、蛍光複合アネキシンVの添加後の正常及び二相性波形を有する患者(矢印)からのVLDLを比較したFACSプロットを示す。(B)は、漸増濃度のアネキシンVを正常個体(白いバー)及び二相性波形を有する患者(影付きバー)からのVLDLと共にインキュベートすることによる、プ

50

ロトロンビナーゼ活性への作用を例示している。データは平均 ± S E M であり、各々の群で $n = 4$ である (* $p < 0.01$ 、** $p < 0.002$)。(C)は、正常()対二相性波形を有する患者()からのVLDLにおけるプロトロンビナーゼ活性への、漸増アネキシンV(実線)又は9D2抗体(点線)の比較作用を示している。

【図9】図9A - Bは、ホスファチジルコリンを表わすPC；ホスファチジルエタノールアミンを表わすPE；スフィンゴミエリンを表わすSM；セレプロシドを表わすCerに関しての(A)正常患者と(B)二相性波形患者のVLDLの二次元薄層クロマトグラフィー比較を示す。

【図10】図10は、平均 ± S E M (* $p < 0.01$ 、** $p < 0.002$)として表わした、対照、アポB及びアポEの免疫吸着の前及び後の二相性波形患者($n = 3$)からのVLDLのプロトロンビナーゼ活性を示す。

【図11】図11は、修正APTT凝固アッセイにおける7名の正常患者対7名の二相性波形を有する患者からのVLDLの比較凝固促進性補因子活性を示す。箱のプロットは、生じた凝固時間(秒)の25 - 75百分位の四分位区間を表わす。太線は中央値を表わし、上端及び下端データ点は四分位区間の外側に示されている。

【図12A】図12Aは、代表的患者についての勾配 - 1値の連続的試料プロフィールを提供する。

【図12B】図12Bは、患者の血漿と単離VLDLの対応するアガロースゲル電気泳動を提供する。

【図1】

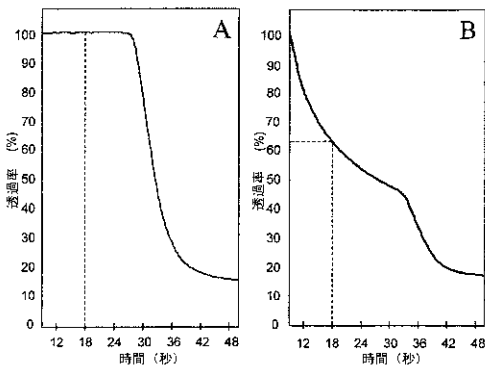


Fig. 1

【図2】

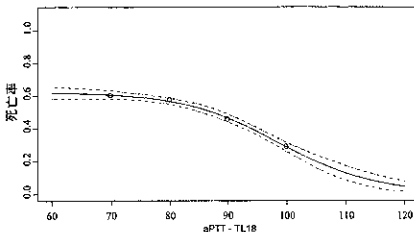


FIG. 2

【図3】

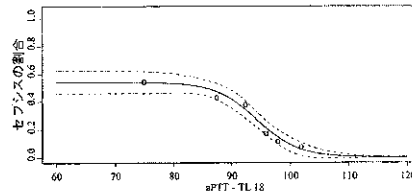


FIG. 3

【 図 4 】

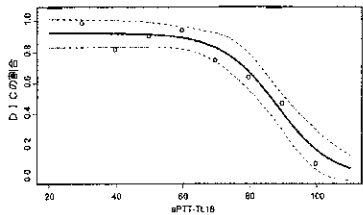


Fig. 4A

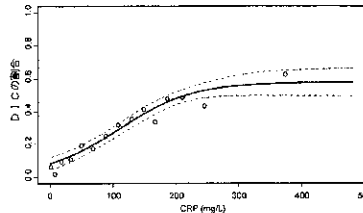


Fig. 4B

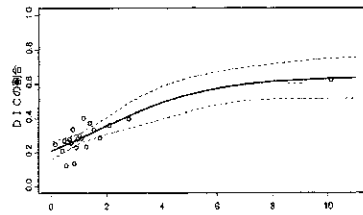


Fig. 4C

【 図 6 】

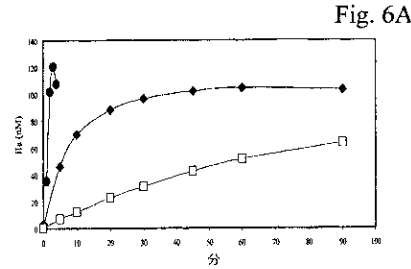


Fig. 6A

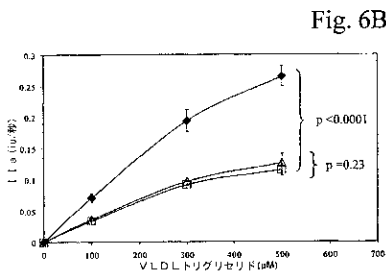


Fig. 6B

【 図 5 】

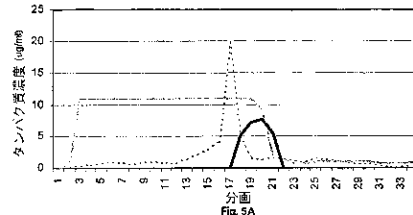


Fig. 5A

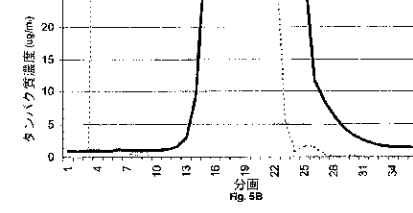


Fig. 5B

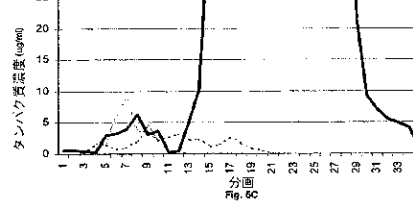


Fig. 5C

【 図 7 】

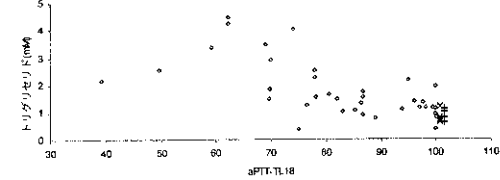
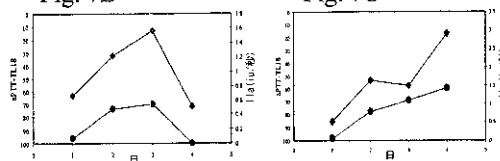


Fig. 7B

Fig. 7C



【 図 8 】

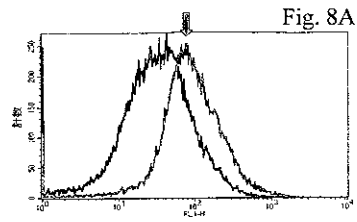


Fig. 8A

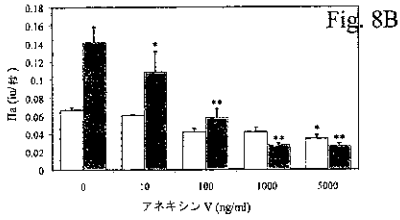


Fig. 8B

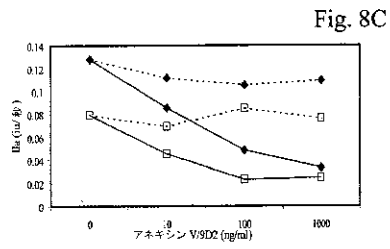
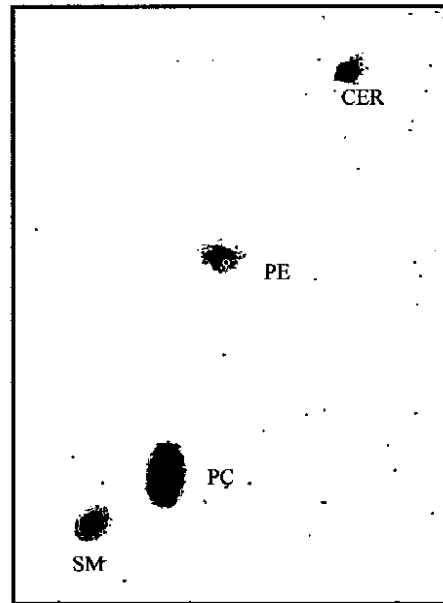


Fig. 8C

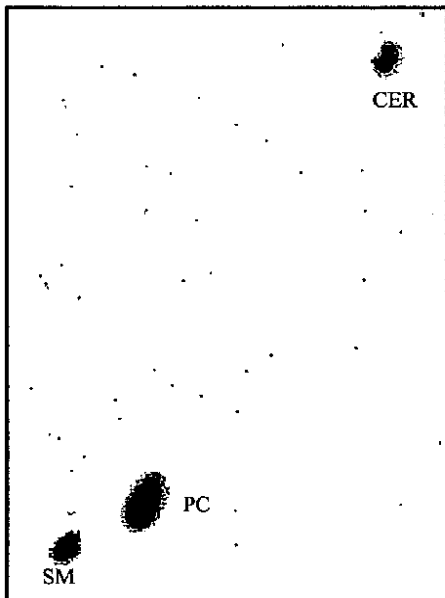
【 図 9 A 】

Fig. 9A



【 図 9 B 】

Fig. 9B



【 図 1 0 】

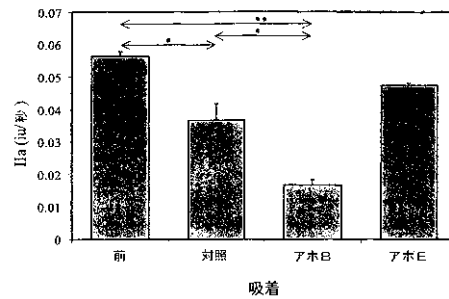
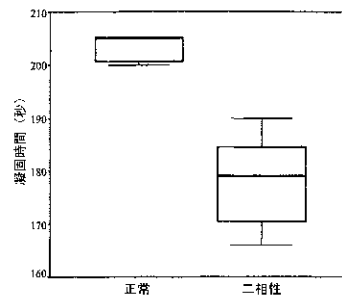


Fig. 10

【 図 1 1 】

Fig. 11



【 図 1 2 A 】

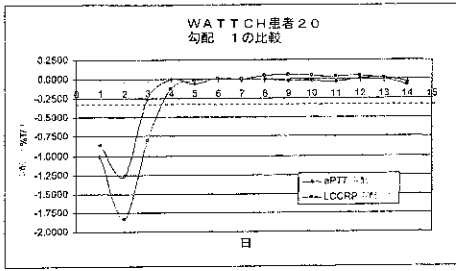


Fig. 12A

【 図 1 2 B 】

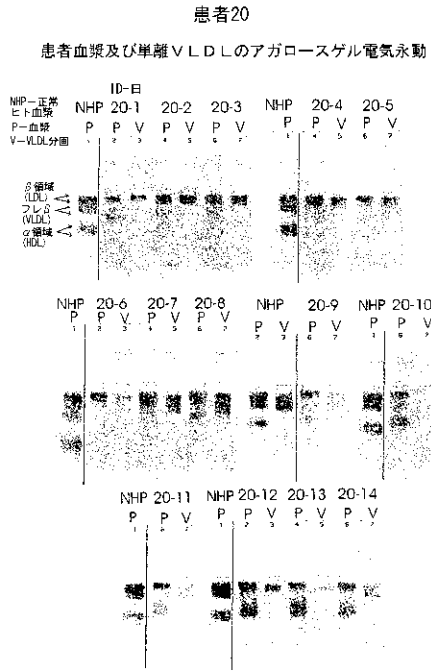


Fig. 12B

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成16年12月27日 (2004.12.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

患者試料からのリポタンパク質分画を、プロトンビナーゼ活性を支持する高い能力を含む異常に関して測定すること、及び上記測定を、重症感染、SIRS又は止血機能不全を有する患者の既知のリポタンパク質測定に相関させることを含む、上記患者試料の感染、SIRS及びセプシスに対する宿主反応を診断し、監視するための方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/05980		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1 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) U.S. : 435/7.1 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 practicable, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A.P	US 2002/0150534 A1 (YU et al.) 17 October 2002 (17.10.02), see the entire document.	1-25		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 23 May 2003 (23.05.2003)		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris</i> Raymond J. Henley III Telephone No. 703-308-1235		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 43/00	1 0 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/56	C 1 2 Q 1/56	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	W
G 0 1 N 33/86	G 0 1 N 33/86	
G 0 1 R 33/465	G 0 1 N 24/08	5 1 0 Q
	A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 60/404,652

(32)優先日 平成14年8月20日(2002.8.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,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,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 テジドー、 リリアナ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27615 ラレイ レスリー ドライブ 10440

(72)発明者 ネイシェイム、 マイク

カナダ国 オンタリオ州 ケイ7ケイ - 6エス4 キングストン プレイス ディアームス 70
- 1

(72)発明者 ジョーンズ、 グレゴリー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27278 ヒルズボロウ コマンチェ トレイル 25
25

Fターム(参考) 2G045 CA26 DA62 FA40 FB01 FB03 FB06 JA01

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ36 QQ79 QR41 QR69 QS12 QS24 QS36
QX01 QX02

4C084 AA02 AA03 BA44 CA62 MA65 NA14 ZA312 ZA532 ZA542 ZA892
ZB052 ZB112 ZB332 ZB352 ZB382 ZC202

专利名称(译)	用于诊断和监测止血功能障碍，严重感染和全身炎症反应综合征的方法		
公开(公告)号	JP2005519267A	公开(公告)日	2005-06-30
申请号	JP2003571735	申请日	2003-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	主要生物有限公司刘 生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物主刘，公司		
[标]发明人	トーチェンホク テジドーリリアナ ネイシエイムマイク ジョーンズグレゴリー		
发明人	トー、チェン ホク テジドー、リリアナ ネイシエイム、マイク ジョーンズ、グレゴリー		
IPC分类号	G01R33/465 A61K38/00 A61P1/18 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P17/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P43/00 C12Q1/37 C12Q1/56 G01N33/53 G01N33/86 G01N33 /92		
CPC分类号	A61P1/18 A61P17/02 A61P29/00 G01N33/92		
FI分类号	G01N33/92.Z A61P1/18 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P17/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P43/00.101 A61P43/00.111 C12Q1/37 C12Q1/56 G01N33/53.W G01N33 /86 G01N24/08.510.Q A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/DA62 2G045/FA40 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/JA01 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QR41 4B063/QR69 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA44 4C084 /CA62 4C084/MA65 4C084/NA14 4C084/ZA312 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA892 4C084 /ZB052 4C084/ZB112 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZC202		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一		
优先权	60/359932 2002-02-27 US 60/363073 2002-03-11 US 60/396392 2002-07-17 US 60/404652 2002-08-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于诊断和监测受试者的止血功能障碍，严重感染和系统性炎症反应综合征的方法，其中通过定量和定性分析检查脂蛋白的异常，特别是凝血酶原的增强。

表 II リポタンパク質表面積	
患者番号	正常値からの総リポタンパク質表面積の%低下
1	58
2	44
3	60
4	68
5	53
6	76
7	53
8	38
9	68
10	55
11	41
12	53
13	38
14	50
15	49
16	79
17	70
18	44
19	37
20	74
	平均ナノモル正常ブール面積 $9.13 \times 10^{-6} \text{ nm}^2/\text{L}$ 表面積を算定するために： VLDLの平均直径=NMRによって算定（33-140nmの範囲） LDLの平均直径=NMRによって算定（19-22nmの範囲） HDLの平均直径=NMRによって算定（8-11nmの範囲） すべてのリポタンパク質濃度をNMRによってnmolで示す。 そこで、式は $4 \times 3.1416 \times (\text{平均直径}/2)^2 \times (\text{nmolでのリポタンパク質濃度})$ となる。