

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5219939号
(P5219939)

(45) 発行日 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)

(24) 登録日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)

(51) Int. Cl. F I
C O 7 K 14/585 (2006. 01) C O 7 K 14/585
C O 7 K 1/22 (2006. 01) C O 7 K 1/22

請求項の数 4 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2009-152845 (P2009-152845)	(73) 特許権者	501154389
(22) 出願日	平成21年6月26日 (2009. 6. 26)		ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ゲ
(62) 分割の表示	特願2000-576286 (P2000-576286)		ーエムペーハー
原出願日	平成11年10月13日 (1999. 10. 13)		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト
(65) 公開番号	特開2009-269920 (P2009-269920A)	(74) 代理人	100108453
(43) 公開日	平成21年11月19日 (2009. 11. 19)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成21年6月26日 (2009. 6. 26)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	198 47 690.6		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成10年10月15日 (1998. 10. 15)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症及び敗血症様全身性感染の検出のための方法及び物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

敗血症患者の血液由来の単離したプロカルシトニン 3 - 1 1 6 の調製方法であって、プロカルシトニンに特異的に結合する固定化した抗体を含むアフィニティークラムに、敗血症患者の血液由来のプロカルシトニン 3 - 1 1 6 を含むサンプルを接触させ、そして、プロカルシトニン 3 - 1 1 6 が結合している前記アフィニティークラムを洗浄する、方法。

【請求項 2】

さらなる工程において、結合したプロカルシトニン 3 - 1 1 6 ペプチドを溶離する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

さらに逆相HPLCによって精製させる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

敗血症患者の血液由来の前記サンプルが血清サンプルである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、敗血症及び敗血症様全身性感染において、プロカルシトニン又はプロカルシトニンの部分ペプチド (partial peptides) の発生に関係する、新規な、実験的に確認された発見から導かれる、新規な診断及び治療の可能性に関する。

【背景技術】

【0002】

特許DE 42 27 454及びEP 0 656 121 B1及びUS 5,639,617は、敗血症の危険を有する患者及び敗血症の典型的な症候が見られる患者の血清又は血漿中のプロホルモンのプロカルシトニン及びそこから得られる部分ペプチドの測定が、早期検出にとって、すなわち敗血症に至らしめるかもしれない感染の検出及び非感染性の病因との鑑別、重大性の検出、及び、敗血症及び敗血症様全身性感染の治療の成果の評価にとって、有益な診断手段であること開示している。前記測定は、全身性微生物感染に起因する症状を非感染性の病因の他の症状から区別するための診断に特に有益であることが証明されており、該非感染性病因の他の症状とは、敗血症を示唆するかもしれないが、実際には全身性微生物感染に起因しないものであって、それらの臨床像によるが、例えば、個々の器官の非感染性炎症から、術後の拒絶反応又はガンまでの症状である。さらに、全身性炎症は局所性炎症とは区別され得る。

10

【0003】

より最近の発見の概要としては、W. Karzaiらのin Infection, Vol 25 (1997), 6, 329-334頁及びそこに引用もしくは言及されている更なる技術文献を参照することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】DE 42 27 454

20

【特許文献2】EP 0 656 121 B1

【特許文献3】US 5,639,617

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】W. Karzaiらのin Infection, Vol 25 (1997), 6, 329-334頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

プロカルシトニンは、カルシトニンのプレホルモンとして既知となっており、その完全なアミノ酸配列は古くから知られている (FEBS 167 (1984), 93-97頁)。プロカルシトニンは、甲状腺のC細胞において、通常の状態で産生されており、それから、特異的開裂によってホルモンのカルシトニンになり、さらに、部分ペプチドのカタカルシン及び57のアミノ酸を含むN-末端残基(「アミノプロカルシトニン」)となる。

30

【0007】

敗血症の間のプロカルシトニンの生成に重要である器官もしくは細胞又は組織に関する実験資料によってサポートされているものもいくつか存在する前記技術文献中には異なる意見もあるが、敗血症のケースでは、甲状腺を完全に除去した患者からでさえも、著しく高いプロカルシトニンレベルが観察されることもあるので、敗血症患者の血中に検出可能なプロカルシトニンが、甲状腺の外で形成されると結論付けることが必要であった。

【0008】

40

敗血症において「プロカルシトニン」として測定されるペプチドの性質に関して、実際、その特定のペプチドが、甲状腺においてカルシトニン前駆体として形成される完全な長さの既知のプロカルシトニンと完全に同一である必要はないことは、上述の患者におけるアウトセットから明らかにされている。しかしながら、敗血症のケースで形成されるプロカルシトニンが甲状腺で形成されるプロカルシトニンと異なるのかどうかという疑問は、現在まで答えが得られていない。あり得る違いは、既知のプロカルシトニンの、糖化(グリコシレーション)、リン酸化あるいは一次構造の修飾等の翻訳後の修飾、さらに、変性した、短くされたあるいは長くされたアミノ酸配列であった。今日まで分析アッセイ方法は、カルシトニン前駆体として既知のプロカルシトニンと、敗血症の場合に形成されるプロカルシトニンとの間の違いを明らかにしなかったもので、敗血症のケースで形成されるプ

50

ロカルシトニン、カルシトニン前駆体と同一であり、ゆえに、既知の 116 アミノ酸のプロカルシトニン配列を有するペプチド（プロカルシトニン 1 - 116）であると暫定的、一般的に見なされていた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

しかしながら、出願人の研究室における測定によって明らかにされ、本出願の実験部分により詳細に説明されているように、敗血症のケースで形成されるプロカルシトニンは、甲状腺で形成される完全なプロカルシトニン 1 - 116 とは、わずかだが重大な違いがある。見出された違いは、それから、新規な診断及び治療方法、そこで使用可能な物質、及び、遂行され得る科学的アプローチにおいて実施可能な多数の科学的結論を導き出した。

10

【0010】

本出願において開示される発明の開始点は、敗血症及び敗血症様全身性感染のケースにおいて患者血清中に比較的高濃度で検出可能なプロカルシトニンが、116のアミノ酸を含む完全なプロカルシトニン 1 - 116 ではなく、そのアミノ末端がジペプチド分短くなっているが他は同一であり、114のアミノ酸のみのアミノ酸配列を有するプロカルシトニン（プロカルシトニン 3 - 116）であるという驚くべき発見である。

【0011】

完全なプロカルシトニンと比べて欠落している前記ジペプチドは、Ala-Pro構造を有している。完全なプロカルシトニン配列のアミノ末端の二番目のアミノ酸としてのプロリン残基を含むジペプチドの欠落は、特定のペプチダーゼ、すなわち、いわゆるジペプチジル - （アミノ） - ペプチダーゼ IV（DP IV又はDAP IV又はCD 26）が、敗血症のケースで検出されるプロカルシトニン 3 - 116 の生成に役割を果たすかもしれないという推測を導く。

20

【0012】

全身性感染又は敗血症と関連してジペプチジル - （アミノ） - ペプチダーゼ IVの可能な役割を決定するために、発明者は実験により、前記生理的DAP IV濃度と敗血症の検出と相関関係があるのかどうかについての試験を行っている。得られた結果は相関関係を示した。

【0013】

より正確に得られた結果はさらに、敗血症及び全身性感染のケースの高濃度のプロカルシトニンの発生は孤立した現象ではなく、同様に、他のプロホルモンもまた高濃度で測定可能であり、その結果、そのようなプロホルモンの測定が、プロカルシトニン測定に代えて可能であるか又は個々のケースのプロカルシトニン測定を補足するか、もしくは、さらにそれを診断上の意義のある方法で確認するのに適している、という仮説の展開をもたらした。

30

【0014】

敗血症のケースの患者血清中に見出されるのが、完全なプロカルシトニン 1 - 116 ではなく、短くなったプロカルシトニン 3 - 116 であるとの発見も、敗血症治療にとって潜在的な興味ある問題である。Eric S. Nylenらの論文Crit Care Med 1998, Vol.26, No. 6, 1001-1006頁は、プロカルシトニンが炎症反応を維持し且つ増強するという事実に基づいて、敗血症のケースで生じているプロカルシトニンが、例えば代謝排泄物として形成される、診断上重要なマーカーであるというだけでなく、感染によって引き起こされる炎症過程におけるメディエーターとしての活性な役割を果たしているらしいことを示す、実験による発見を記載している。プロカルシトニンのこの役割は現在、論争の課題であり、その開示された試験結果は同意できる説明を与えていない。

40

【0015】

アミノ末端でアミノ酸 2 つ分短くされたプロカルシトニンが敗血症のケースで生じているという上述の発見は、敗血症及び他の炎症性全身性感染のケースで活性な役割を果たすプロカルシトニンがおそらくこの短くされたプロカルシトニン 3 - 116 であり、また、完全な長さのプロカルシトニンペプチドを用いて行われた研究が、とりわけこの理由で、

50

異なった又は矛盾した結果を与えたことを示唆している。多数の生理活性ペプチドが、開裂、例えば短いペプチド残基の最初の脱離、によってそれらの実際の活性形態に変換されることは周知である。既知の例はアンギオテンシンであり、著しく異なった生理活性を有するペプチドが、最初にテトラペプチド、次にジペプチド、そして最後に単独のアミノ酸の、連続的な脱離によって、14のアミノ酸を有する不活性なアンギオテンシノーゲンから形成される。その生理活性ペプチドのN-末端の比較的わずかな変更が、免疫学的過程で役割を果たし、対応するペプチドの活性にかなりの変化をもたらすことができるという事実は、ごく最近の数多くの出版物によって確認されているが、敗血症の病理的プロセスに対する言及はなされていない(例えば、J. Immunol 1998, Sept. 15, 161 (6): 2672-5; Biochemistry 1998, Sept. 8, 37 (36): 12672-80; FEBS Lett 1998, July 31, 432 (1-2): 73-6; L. Biol Chem 1998, March 27: 273 (13): 7222-7; J Exp Med 1997, Dec 1: 186 (11): 1865-72)。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】HPLCによる、様々な重度の敗血症患者から集められた血清をプールした血清からのプロカルシトニンの単離及び精製の結果である。

【図2】高いプロカルシトニン免疫反応性を有する、図1からのプール血清の各フラクションの質量分光分析結果である。

【図3】敗血症血清及び正常な血清中のジペプチジル - アミノペプチダーゼIVの酵素活性の測定結果である。

20

【図4】敗血症血清及び正常な血清中のプロカルシトニンの測定結果を、同じ血清中のさらなるプロホルモン、すなわちプロ - ガストリン放出ペプチド (proGRP) の測定結果と比較である。

【図5】健常者20人のグループと敗血症患者20人のグループの血清中のプロカルシトニンの測定結果である。

【図6】図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ANFの測定結果 (pg / チューブ) である。

【図7】図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ADMの測定結果 (pg / チューブ) である。

【図8】図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ENDの測定結果 (pg / チューブ) である。

30

【図9】図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-BNPの測定結果 (pg / チューブ) である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

プロカルシトニン3 - 116が実際に炎症過程と関連し、特異的分子レセプター又は類似した特異的バインダーがこの短くされたプロカルシトニンに対して存在するのであれば、プロカルシトニン3 - 116の使用、又は、プロカルシトニン3 - 116のレセプターと相互作用するアゴニスト及びアンタゴニストの使用によって、敗血症の進行に影響を与え、それがきっかけとなって起こる生理反応に、そして炎症過程にも影響を与えることができる新規な治療の可能性が開かれる。プロカルシトニン3 - 116の特異的バインダー、例えば、選択的抗体、の使用は、ここで伝えられる発見によって明らかにされる治療アプローチでもある。

40

【0018】

結局、敗血症及び全身性感染のケースでジペプチジル - アミノペプチダーゼIVがプロカルシトニン3 - 116の生成に役割を果たすかもしれないということは、更なる仮説、すなわち、例えば適当な選択的バインダー、抗体又は類似のレセプター分子によってそれをブロックすることによりジペプチジル - アミノペプチダーゼIVの活性に影響を与え、それによって、敗血症及び敗血症様炎症過程に治療上の影響を与えることも可能かもしれないという仮説を導く。

50

【 0 0 1 9 】

この特許出願の目的は、特許法下において、上述の新規な発見及びそこから導かれる結論から生じる新規な技術的教示を、現状の知識水準を考慮した上で、特許保護に到達可能な範囲まで保護することである。

【 0 0 2 0 】

特許請求の範囲は、そのような保護可能な教示を暫定的に要約している。当業者にとっては、実験セクションで述べられる実験条件と実験結果、及び、それに関連した説明を考慮した本出願の完全な本文から、さらなる保護可能な教示が生じるかもしれない。そのような教示の特許請求に関しては、補足的な請求項によって明らかに権利が保持される。

【 0 0 2 1 】

その新規な発見を支持するか又はそこから導かれる仮定の正しさを証明する、選択された実験材料は、いくつかの図を参照して以下に示される。

【 0 0 2 2 】

図 1 は、HPLCによる、様々な重度の敗血症患者から集められた血清をプールした血清からのプロカルシトニンの単離及び精製の結果を示す。

図 2 は、高いプロカルシトニン免疫反応性を有する、図 1 からのプール血清の各フラクションの質量分光分析結果を示す。

図 3 は、敗血症血清及び正常な血清中のジベプチジル - アミノペプチダーゼ IV の酵素活性の測定結果を示す。

図 4 は、敗血症血清及び正常な血清中のプロカルシトニンの測定結果を、同じ血清中のさらなるプロホルモン、すなわちプロ - ガストリン放出ペプチド (proGRP) の測定結果と比較して示す。

図 5 は、健常者 20 人のグループと敗血症患者 20 人のグループの血清中のプロカルシトニンの測定結果を示す。

図 6 は、図 5 と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ANF の測定結果 (pg / チューブ) を示す。

図 7 は、図 5 と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ADM の測定結果 (pg / チューブ) を示す。

図 8 は、図 5 と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-END の測定結果 (pg / チューブ) を示す。

図 9 は、図 5 と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-BNP の測定結果 (pg / チューブ) を示す。

【 実施例 】

【 0 0 2 3 】

実験セクション

A. 敗血症患者の血清からの内因性プロカルシトニンペプチドの単離と確認

重度の敗血症に苦しむ複数の患者からの血清サンプルを混合することによって、総容量 68 ml の混合血清が調製された。得られたプール血清中のプロカルシトニン濃度は、市販のプロカルシトニンアッセイ (LUMitest PCT, B.R.A.H.M.S. Diagnostica) を用いて測定したところ、280 ng/ml (総量 19 µg) であった。前記プール血清は、同量のバッファー (68 ml ; 10 mM EDTA、1 mg/ml マウス - IgG、2 mg/ml ヒツジ - IgG、2 mg/ml ウシ - IgG、0.1 mmol/l ロイペプチン、PBS 中 50 µM アマスタチン) と混合し、そのサンプル中に含まれるプロカルシトニンを、アフィニティークロマトグラフィーによって単離及び精製した。

【 0 0 2 4 】

このために、全てのプールサンプルを、0.5 ml/min の流速で 4 回、連続して、アフィニティークラム (0.5 × 1 cm、抗カルシトニン抗体、Pierce からの Carbolink に結合、プロカルシトニン結合容量約 20 µg) に送った。それからそのカラムを 30 ml の PBS で洗浄し、結合したペプチドを、50 mM 酢酸 (pH 約 2.0) を用いて溶離させた。カラム流出物を 280 nm での吸収を用いて持続的にモニターし、酢酸によって溶離したタンパク質フ

10

20

30

40

50

ラクションを集めた（最終容量 2 . 0 ml）。

【 0 0 2 5 】

この方法で集められた物質は、rpC₁₈ カラム μ Bondapak 0 . 4 $\times$ 3 0 mm（Watersより）での逆相HPLCによって精製した。その流速は 1 ml/minであり、移動相及び溶離条件は以下の表 1 に示す。

【 0 0 2 6 】

【表 1】

表 1：プロカルシトニンの r p - H P L C のための溶離条件

移動相 A： 5 % アセトニトリル			
2 0 mM 酢酸アンモニウム			
移動相 B： 9 0 % アセトニトリル			
2 0 mM 酢酸アンモニウム			
勾配 (Gradient)：	0 . 0 分	1 0 0 % A	0 % B
	2 . 5 分	1 0 0 % A	0 % B
	5 . 0 分	8 9 % A	1 1 % B
	5 5 . 0 分	5 6 % A	4 4 % B
	6 0 . 0 分	0 % A	1 0 0 % B

【 0 0 2 7 】

そのカラム流出物は、2 1 4 nmでの吸収によって持続的に測定され、0 . 2 5 mlのフラクションが集められた。市販のプロカルシトニンアッセイ（LUMitest PCT, B.R.A.H.M.S. Diagnostica）を用いて、PCT免疫反応性を検出できたフラクションを決定した。主要な免疫反応性を有する部分が、シャープなバンドとして5 1 番目のフラクションに溶離したことが見出された。加えて、不均一な組成及び低い P C T 免疫反応性を有するタンパク質フラクションが、3 9 から 4 9 のフラクションにて得られた。

【 0 0 2 8 】

図 1 は、前記 r p HPLC の、集められた各フラクションについて決定され、溶離したフラクションの吸光度（OD）を示す曲線に重ね合わせた PCT 免疫反応性（ng PCT/ml で表される）を示す。

【 0 0 2 9 】

ポジティブなプロカルシトニン免疫反応性を有する全てのフラクションを、窒素ガス処理によって乾燥させた。その後、それらのサンプルをマスマスペクトロメトリーで分析し、N - 末端塩基配列決定を行った。

【 0 0 3 0 】

前記マスマスペクトロメトリー分析（MSLDI-TOF法）では、図 2 に示されるプロファイルが、フラクション 5 0 - 5 2 に対して得られ、そのプロファイルから、 12640 ± 15 のモル質量という結果となった。マスマスペクトロメトリーで調べられた他のフラクション（3 6 - 4 9、5 3 - 5 9）はすべて、 12640 未満のモル質量で不均一な質量分布を示した。それらの個々の質量は、フラクション 5 0 - 5 2 の質量の強度と比べて 2 % 未満の強度を与えた。このように、敗血症患者血清中のプロカルシトニン免疫反応性が、 12640 ± 15 の質量と関連があることが示された。

【 0 0 3 1 】

フラクション 36 - 59 中に含まれるペプチドのN - 末端塩基配列決定を行った。ここでも、フラクション 36 - 49 及び 53 - 59 の内容が不均一であると証明された。すなわち、N - 末端の多様性が測定された。

【 0 0 3 2 】

その優勢なプロカルシトニン免疫反応性がわかったフラクション 50 - 52 では、そこに含まれるペプチドが明らかに以下のN - 末端 (15 のアミノ酸) : Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leuを有することが明らかになった。

【 0 0 3 3 】

それから、フラクション 50 - 52 からのペプチドは、プロテアーゼGlu-C又はトリプシンを用いて消化され、得られたフラグメントは、SMART-HPLCによってそれ自身は既知である方法で元に戻され、それから、マスペクトロメトリーと配列分析によって調べられた。

【 0 0 3 4 】

既知のプロカルシトニン 1 - 116 のアミノ酸 3 - 116 の配列と完全に対応した配列が得られた。その配列の理論上の質量は 12627 であったが、これはマスペクトロメトリーにより測定された 12640 ± 15 の質量と一致する。

【 0 0 3 5 】

したがって、114 のアミノ酸を含み且つプロカルシトニン 3 - 116 としてデザインされたプロカルシトニンペプチドが敗血症患者の血液中を循環することが示された。そのペプチドは、リン酸化又はグリコシル化等の翻訳後の修飾によって変化しない。

【 0 0 3 6 】

前記プロカルシトニン 3 - 116 は、可能性のある内因性プロカルシトニン部分ペプチドとしては、現在に至るまで科学論文で論じられておらず、それゆえに、当業者にとって、今日までに、具体的に、このペプチドを調製し、その性質についてそれを調べる理由もない。しかしながら、上記発見は、今や、遺伝子工学技術によって前記プロカルシトニン 3 - 116 の具体的な調製の理由をもたらししている。その調製は以下に記載される。

【 0 0 3 7 】

B . 組み換えプロカルシトニン 3 - 116 のクローニング、発現及び精製

1 . クローニング

プロカルシトニン 3 - 116 (以下、PCT 114と略す) をコードするDNAフラグメントを、適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅によって、ヒト甲状腺cDNAプールから単離した。望ましいフラグメントが通常の手法 (Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA及びStruhl K (1991), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) によってクローニングされ、その正確なヌクレオチド配列がDNA塩基配列決定と、プロカルシトニンをコードする既知のDNA配列との比較とによって確かめられた。

【 0 0 3 8 】

PCT 114をコードするcDNAの発現にはベクターが用いられた。これは、T7プロモーターと、いわゆるpeIBタンパク質のシグナルペプチドをコードする領域を含んでいる。このpeIBシグナルペプチドは、クローニング及び発現後に形成される融合タンパク質が、発現に用いられた宿主細胞の細胞質を通してそのペリプラズム部分に輸送されることを保証する。この輸送過程では、そのN - 末端シグナルペプチドが、膜上に位置するシグナルペプチダーゼによって、同時に分離される (Stader JA及びSilhavy TJ (1990), Engineering Escherichia coli to secrete heterologous gene products, Methods Enzymol. 185, 166-187) 。この手順は、見出された発現生成物が正確に望ましい配列を有することを保証する。この手順では、他の発現方法では必要とされるN - 末端メチオニンが存在しない。

【 0 0 3 9 】

前記タイプのベクターへのPCT 114用のcDNAのクローニング、及びこのベクターによるE . coliの形質転換の後、プロカルシトニン 3 - 116 が発現した。発現したプロカルシトニン 3 - 116 を有するペリプラズムフラクションが、それ自身は既知の方法で単離した

(Neu HC及びHeppel LA (1965), The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroblasts, J. Biol. Chem. 240, 3685-3692)。遠心(100,000g、30分、4℃)及び、その上澄み液(0.2µm)のろ過の後、得られたる液をアニオン交換クロマトグラフィーによって分離した。プロカルシトニン免疫反応性を有するフラクションは、敗血症血清からのPCT 3-116の単離に関して記載されたように、合わされて、逆相HPLCによって精製された。

【0040】

プロカルシトニン免疫反応性を有するすべてのフラクションは、合わされて、凍結乾燥された。SDS-PAGEを用いてその物質をチェックすることによって示されるように、つまり、得られる物質は少なくとも純度95%である。

10

【0041】

プロカルシトニン 3-116として発現し、精製されたペプチドの同一性は、マスペクトロメトリーと配列分析によって確認された。

【0042】

得られた組み換えプロカルシトニン 3-116は、新規な組み換えペプチドであり、この形態で、免疫試薬の調製に用いられることができ、また、治療上の適性、あるいは、上述の出版物(Eric S Nylen, Loc. cit.)との関係で、予防上及び治療上の活性を有するその能力について調べられることができる。

【0043】

PCTアッセイ用の標準物質の調製のために、上述した、遺伝子工学によるプロカルシトニン 3-116の調製方法が、また、完全なプロカルシトニン 1-116及びプロカルシトニン 2-116の調製にも本質的に同一の形態で用いられた。

20

【0044】

C. 通常のヒト血清及び重度の敗血症患者からの血清中におけるジペプチジル-アミノペプチダーゼIV(DAP IV)活性の測定

健常者から、及び、敗血症患者からの、それぞれ20の血清サンプルを、それらのジペプチジル-アミノペプチダーゼIV特異的酵素活性について調べた。このDAP IV酵素活性は、Lys-Pro-4-メトキシ-ベータ-ナフチルアミドを用いるそれ自身は既知の方法で、フルオロメトリーによって測定した。このために、各ケース、2µlの血清が3mlの基質(50µg/ml Lys-Pro-4-メトキシ-ベータ-ナフチルアミド、50mM Tris/HCl、pH 7.5)を用いてテストされ、340nmの波長を有する光による励起で生じた蛍光は、410nmの放射波長で持続的に測定された。その蛍光シグナルは、4-メトキシナフチルアミン溶液を用いて校正された。この方法で決定された酵素活性は、nmol/minで記載される。

30

【0045】

得られた結果を図3に示す。

【0046】

敗血症血清中のDAP IV酵素活性が実質的に、健常者血清(血液提供者の血清)中の活性よりも低いことは明確である。つまり、血漿又は血清中のDAP IV酵素活性の決定は、患者血清中の敗血症を検出するために用いることもできる。

40

【0047】

敗血症のケースでの、実質的に減少したDAP IVの血漿濃度は、一方では、該DAP IVが敗血症のプロセスに関与している証拠として考えることができる。他方では、それらの結果は、プロカルシトニン 3-116の形成に責任があるのが血漿中のDAP IV濃度ではないことを示している。どちらかといえば、得られた結果は、プロカルシトニン 3-116が、おそらく細胞内で、組織又は細胞結合DAP IVによって形成され、プロカルシトニン生成細胞又はプロカルシトニン貯蔵細胞から遊離されるという結論を示唆している。

【0048】

DAP IVが活性化T細胞から発現するという効果についての文献(cf. Hegen及びOravec, Protein Reviews on the WEB; Fleischer, loc. cit.)に含まれる情報は、DAP IVの発

50

現と免疫系の活性状態との間の密接な関係を示しており、これは、敗血症全身性感染のケースでは過剰なストレス下にあり、それゆえに、とりわけプロカルシトニン 3 - 1 1 6 の形成が非常に増加するという、それら自身を表す典型的な反応を示す。

【 0 0 4 9 】

上述の発見から生じる可能性とは別に、敗血症診断の過程でのDAP IVの測定にとって、上述の結果はまた、敗血症においてカスケード様の様式で生じるプロセスがDAP IVインヒビターによって治療上の影響を受け、その結果、敗血症下でのプロカルシトニン 3 - 1 1 6 及び他のホルモンあるいは変換されたプロホルモンの遊離を予防又は減少させることが可能であろうということを示し、このプレホルモンの遊離に対して、減少又は予防されるべきという病理学的結論を可能にしているのかもしれない。

10

【 0 0 5 0 】

D. 敗血症のケースにおけるプロカルシトニン以外のプロホルモン濃度の測定

敗血症のケースで放出されるのが完全なプロホルモンのプロカルシトニンではなく、Xa a-Proジペプチドの分短くなった変性プロホルモンであるという事実は、敗血症のケースで放出されるのはプロカルシトニン 3 - 1 1 6 だけではなく、プロカルシトニン 3 - 1 1 6 は単に、例えば、免疫調節能を有するものであり、敗血症のケースではおそらく変換形態で高度に遊離されるプロホルモン又は同様のペプチド全体の中の代表的な 1 つにすぎないという仮説を導く。

【 0 0 5 1 】

既知のプロホルモン及びこれらのプロホルモンに関する文献に述べられるアミノ酸配列のチェックによって、事実上最も良く知られたプロホルモンが、そのアミノ末端に、Xaa-Proと定義されることができ且つそれゆえにプロカルシトニンの場合に見られたのと同様に除去され得るジペプチドを有することが示された。特に、前記タイプのジペプチドは数多くのプロホルモン又は免疫調節体 (immunomodulators) のアミノ末端に存在する。下記の、表の形態の文献データのリストは、いくつかの選択されたプロホルモン又は免疫調節体、それらのアミノ末端に見出されるジペプチド、及び、それらのアミノ酸総数の概要を示す。

20

【 0 0 5 2 】

表 2 に示されるプロホルモンは、敗血症のケースで濃度が上昇するかもしれないプロホルモンの例であるが、そのリストは網羅的なものとみなされるべきではない。免疫調節体の場合、ジペプチドの脱離はその活性に影響するであろう。

30

【 0 0 5 3 】

【表 2】

プロホルモン/ 免疫調節体	N-末端のジペプチド	全アミノ酸の総数	
プロ-エンドセリン-1 (pro-END)	Ala Pro	195	
プロ-脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-BNP)	His Pro	108	
プロ-心房性ナトリウム排泄増加性 ペプチド (pro-ANP; 又はプロ-心房 性ナトリウム排泄増加性因子 pro-ANF)	Asn Pro	128	10
プロ-レプチン	Val Pro	146	
プロ-ニューロペプチドY	Tyr Pro	69	
プロ-ソマトスタチン	Ala Pro	92	
プロ-ニューロペプチドYY	Thr Pro	69	20
インターロイキン6	Val Pro	183	
インターロイキン10	Ser Pro	160	
プロ-ガストリン放出ペプチド (pro-GRP)	Val Pro	115	
プロ-オピオメラノコルチン	Trp Cys	241	
プロ-アドレノメデュリン (pro-ADM)	Ala Arg	164	30
プロカルシトニン (PCT)	Ala Pro	116	

【0054】

今日までの実験による発見は、敗血症等の全身性感染のケースでは、一般的に、インターロイキン等のプロホルモン及びペプチド免疫調節体が、おそらく、アミノ末端でのジペプチドの脱離による変性を伴って遊離されること、並びに、これらがおそらく、関連する特定のレセプター又はその他のバインダーとの相互作用によって、免疫応答のカスケード内の更に次のステップを開始させること示す。

【0055】

通常の血清と敗血症患者からの血清におけるプロカルシトニン決定と平行して、他のプロホルモンの決定も行った。これらは公平に、ランダムに選択された。これらは、(i) プロ-ガストリン放出ペプチド (proGRP)、(ii) プロ-心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-ANP又はpro-ANF)、(iii) プロ-アドレノメデュリン (pro-adrenomedullin, pro-ADM)、(iv) プロ-エンドセリン (pro-END) 及び(v) プロ-脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-BNP) であった。

【0056】

D.1. 敗血症患者からの血清及び健常者からの血清中のproGRPの決定

アッセイは、proGRP決定用のものが市販されている。近年の出版物に、proGRPが気管支

10

20

30

40

50

の小細胞癌の腫瘍マーカーとして記載されている (Petra Stieber et al., J Lab Med 1997, 21 (6): 336-344)。proGRPの決定用アッセイは、トーネンコーポレーションのProGRP ELISA KITTMの名称のものが市販されている。

【 0 0 5 7 】

このキットを用い、この市販のキットの使用のための情報にて指定された手順に従って、図 4 に示す測定結果が得られた。

【 0 0 5 8 】

プロカルシトニン及びproGRPについて得られた値の比較は、正常な血清と敗血症の血清との間の差違が、プロカルシトニンの場合よりも明確であること、しかし該proGRP濃度がプロカルシトニンの濃度と同様に上昇することを示している。

10

【 0 0 5 9 】

D.2. 敗血症患者からの血清及び健常者からの血清中のpro-ANF、pro-ADM、pro-END及びpro-BNPの決定

プレホルモンであるpro-ANF、pro-ADM、pro-END及びpro-BNPの決定については、アッセイは、DRG (DRG Instruments GmbH, D-35018 Marburg, ドイツ) からキットの形態で市販されており、製造者の指示に従って次の測定に用いられた。

【 0 0 6 0 】

特に、以下のものが用いられた。

【 0 0 6 1 】

pro-ANFの決定には、Prepro-ANF 26-55 (ヒト) RIAキット ; pro-ADMの決定には、Pro-Adrenomedullin 45-92 (ヒト) RIAキット ; pro-ENDの決定には、Prepro-Endothelin 18-50 (ヒト) RIAキット ; 及び、pro-BNPの決定には、Prepro-BNP 22-46 (ヒト) RIAキットであり、これらは上述のDRG社のものである。

20

【 0 0 6 2 】

20人の正常者A-Tの群の血清及び敗血症患者20人の血清において、上述のプロホルモンと、それらと同時に、プロカルシトニンとを決定した。その結果は以下の表3に要約されている。表3のデータは、図5から9にグラフでも示している。

【 0 0 6 3 】

示された結果は、正常者に比べると、敗血症患者のケースでは、測定されたプロホルモン全ての値でおおよそ明確な増加を示すが、正常者と敗血症患者の間の差違はプロカルシトニンの決定において最も際立っている。

30

【 0 0 6 4 】

補足的な文献検索によって、さらに、敗血症性ショックにおけるプロ - オピオメラノコルチン (POMC) 関連ペプチドの確認に関する出版物J. Endocr. (1988) 119, 159-165頁が明らかになった。該出版物は、敗血症性ショックにおける内因性オピオイド活性の増加に関する疑問、及び、ステロイドの投与による選択性の影響を検討している。感染プロセスの直接の影響又は抗生物質による測定値の影響は論じられていない。前記出版物における問題に基づいては、他のプロホルモンペプチドを含む報告結果の一般化された議論について、論理的な実現可能性はない。ここに開示される本発明の教示に照らすと、前記出版物は、敗血症のケースにおける一般的なプロホルモンの増加をさらに示したものとして回顧的に解釈することができる。

40

【 0 0 6 5 】

さらなるプロホルモンをテストすることは、ここに開示された結果を見ると決まり切った測定であると見なされるべきであり、もしそのようなテストがポジティブな結果を導き、それによってさらなるプロホルモン決定が敗血症の診断に用いられるのであれば、本出願の教示の使用によるものであるであろう。

【 0 0 6 6 】

【表 3】

	PCT [ng/ml]	Pro-ANF [pg/ tube]	Pro-ADM [pg/ tube]	Pro-END [pg/ tube]	Pro-BNP [pg/ tube]
<u>正常</u> <u>患者:</u>					
A	0.07	69.4	64	29.3	31.1
B	0.26	26.6	50.2	15.4	30.1
C	0.10	14.7	1.0	1.0	24.7
D	0.06	53.2	77.8	19.3	27.4
E	0.06	51.1	66.5	20.6	25.4
F	0.04	95.5	53.5	28.2	28.9
G	0.07	117	83.5	18.3	17.3
H	0.10	88.1	52.3	25.1	28.1
I	0.10	69.4	107	23.2	25
J	0.07	38.3	91.1	26.1	25.7
K	0.06	111	64.9	22.8	29.6
L	0.09	73.8	66.3	32.4	21.6
M	0.07	42	58.9	27.1	23.7
N	0.09	107	114	27.3	31.2
O	0.10	56.7	62.5	20.3	26.2
P	0.10	47.2	51.7	24.5	33.3
Q	0.12	155	72.5	34.6	36.7
R	0.13	92.1	64.7	29.6	35.2
S	0.12	153	100	34.7	36
T	0.11	78	69.6	27.1	37.7
<u>敗血症</u> <u>患者:</u>					
13a	1.1	333	195	70	34.9
10a	11.9	62.5	154	30.5	30.4
18b	6.4	323	209	75.4	46.4
19b	21.2	346	180	71.6	50.7
8a	1.8	303	203	70.3	48.8
9a	24.7	271	205	78.4	33.6
9b	29.0	305	210	62.5	40.3
12b	5.8	324	204	67.4	36.1
10b	1.9	127	128	30.5	33.9
16a	86.7	347	198	83.3	39
8b	1.1	138	153	29.6	33.7
20a	1.4	167	176	41.3	30.9
20b	1.1	170	178	39	34.9
13b	0.8	295	186	45.3	36.9
19a	17.6	354	201	58.6	54.5
7b	2.5	356	199	78.6	
7a	2.9	345	197	148	
16b	40.0	343	197	88.1	43.9
12a	5.2	327	216	76.1	34.3
15b	1.9	420	215	82.5	52

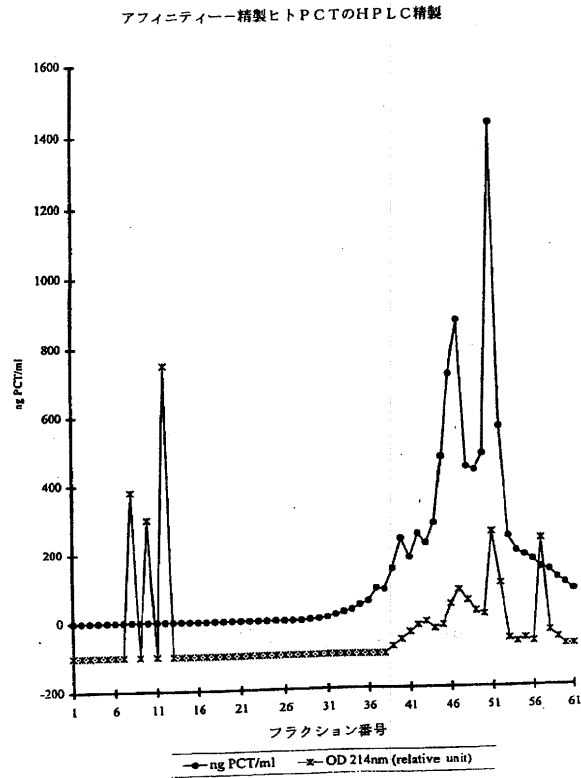
10

20

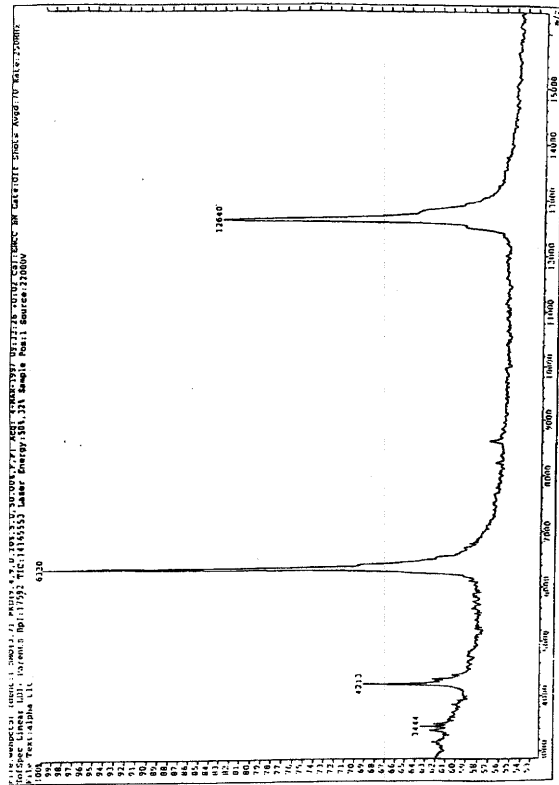
30

40

【図 1】

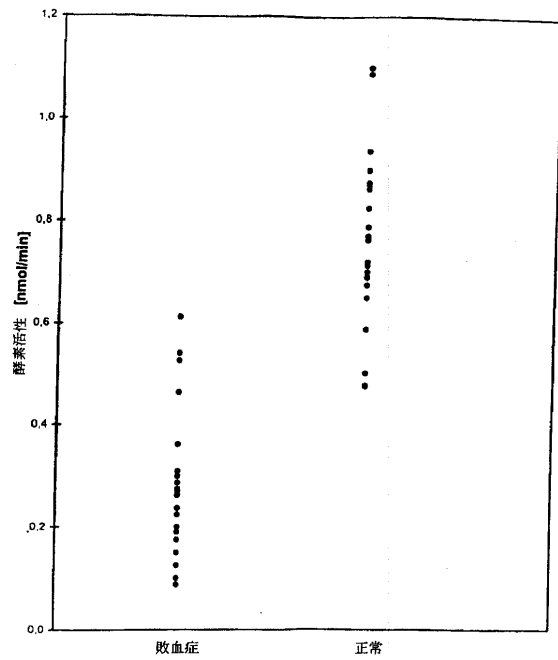


【図 2】

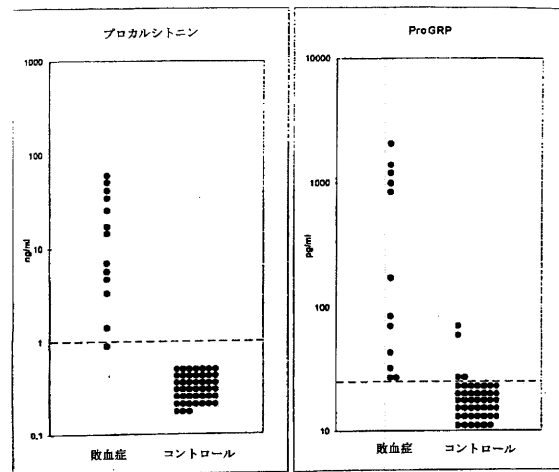


【図 3】

敗血症血清 対 血液提供者血清のDAP IVの酵素活性

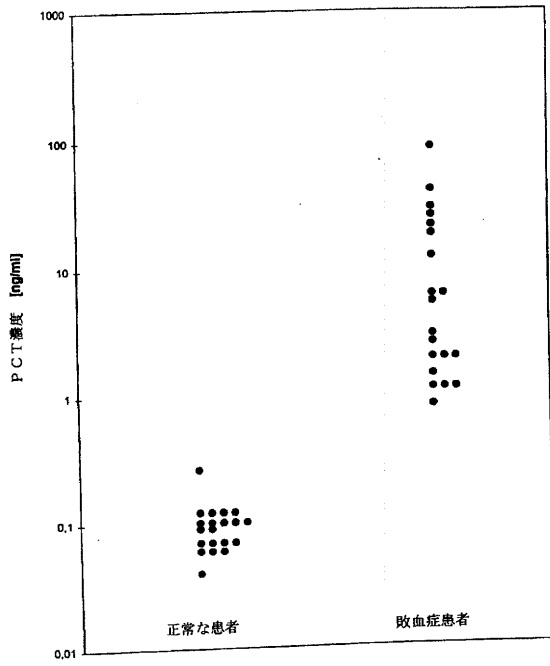


【図 4】



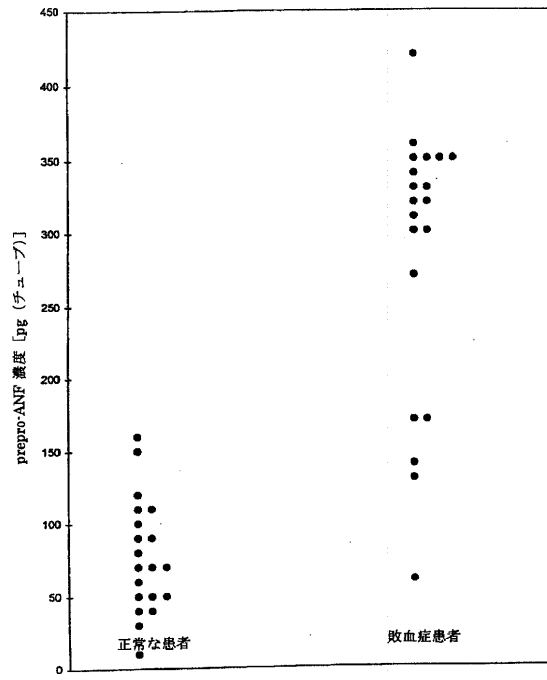
【図 5】

正常な患者対敗血症患者のプロカルシトニン濃度の比較



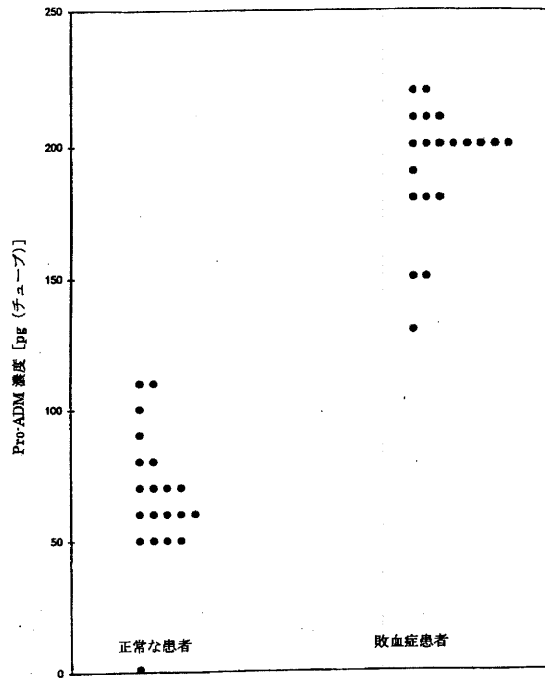
【図 6】

正常な患者対敗血症患者の prepro-ANF (26-55)濃度の比較



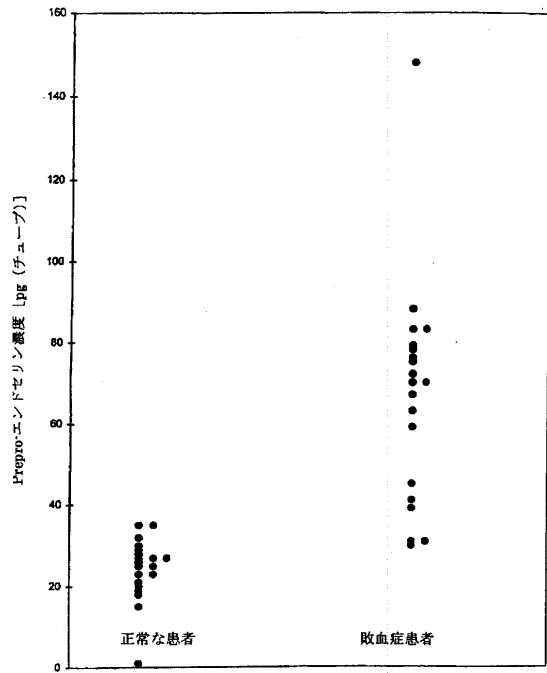
【図 7】

正常な患者対敗血症患者のプロアドレノメデュリン(45-92)濃度の比較



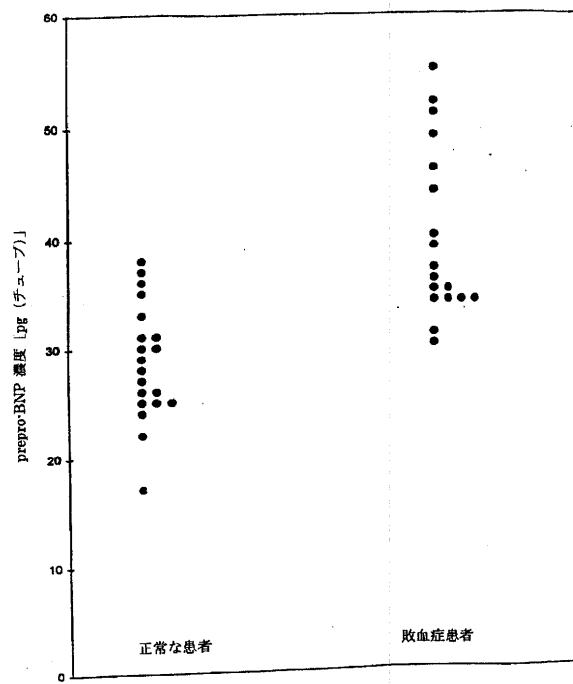
【図 8】

正常な患者対敗血症患者の prepro-エンドセリン(18-50)濃度の比較



【図 9】

正常な患者対敗血症患者の prepro-BNP (22-46) 濃度の比較



フロントページの続き

- (72)発明者 アンドレアス・ベルグマン
ドイツ・D - 1 2 3 5 1・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7
- (72)発明者 ヨアヒム・シュトルック
ドイツ・D - 1 2 1 6 1・ベルリン・ホルシュタイニッシェ・シュトラッセ・2 8
- (72)発明者 ヴォルフガング・ヴェクレナー
ドイツ・D - 1 2 0 9 9・ベルリン・ローレンツヴェーク・2

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特表平08 - 501151 (JP, A)
国際公開第98 / 033524 (WO, A1)
特表2002 - 527753 (JP, A)
J.Clin.Endocrinol.Metab., Vol.79, No.6(1994)p.1605-1608
J. Invest. Med., Vol.45, No.9(1997)p.552-560
FEBS Lett., Vol.198, No.1(1986)p.71-79
Biochem.Biophys.Res.Comm., Vol.226, No.2(1996)p.420-425
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.86, No.23(1989)p.9519-9523

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
CA / BIOSIS / WPIDS (STN)
PubMed
UniProt / GeneSeq

专利名称(译)	用于检测败血症和败血症样全身性感染的方法和物质		
公开(公告)号	JP5219939B2	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	JP2009152845	申请日	2009-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルグマン ヨアヒムシュトルック ヴォルフガングヴェクレナー		
发明人	アンドレアス・ベルグマン ヨアヒム・シュトルック ヴォルフガング・ヴェクレナー		
IPC分类号	C07K14/585 C07K1/22 G01N33/53 A61P29/00 C12N15/09 C12N15/16 C12P21/02 C12Q1/37 C12R1/19 G01N33/74		
CPC分类号	A61P29/00 C07K14/585 G01N33/74 G01N2333/585		
FI分类号	C07K14/585 C07K1/22 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA01 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/GA11 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA25 4H045/GA26		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	19847690 1998-10-15 DE		
其他公开文献	JP2009269920A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了解决这样一个问题，因为直到今天的分析测定方法并没有明确已知的降钙素作为降钙素前体和和在败血症情况下形成的降钙素原之间的差异，在败血症的情况下形成了降钙素原与降钙素前体相同，因此暂时且通常认为是具有已知116氨基酸的降钙素原序列的肽（降钙素原1-116）。ŽSOLUTION：重组降钙素原3-116可用于诊断和治疗败血症，测定除降钙素原以外的激素原和二肽基肽酶IV，以及作为诊断败血症的生物标志物。Ž

	PCT (ng/ml)	Pro-ANF (pg/ tube)	Pro-ADM (pg/ tube)	Pro-END (pg/ tube)	Pro-BNP (pg/ tube)
正常					
A	0.07	69.4	64	29.3	31.1
B	0.26	26.6	50.2	15.4	30.1
C	0.10	14.7	1.0	1.0	24.7
D	0.06	53.2	77.8	19.3	27.4
E	0.06	51.1	66.5	20.6	25.4
F	0.04	95.5	83.5	28.2	28.9
G	0.07	11.7	83.5	18.3	17.3
H	0.10	88.3	52.3	25.1	28.1
I	0.10	69.4	107	23.2	25
J	0.07	38.3	91.1	26.1	25.7
K	0.09	11.1	64.9	22.8	29.6
L	0.09	73.8	66.3	32.4	23.6
M	0.07	42	58.9	27.1	23.7
N	0.09	107	114	27.3	31.2
O	0.10	56.7	62.5	20.3	26.2
P	0.10	47.2	51.7	24.5	33.3
Q	0.12	195	72.5	34.6	36.7
R	0.12	92.1	64.7	29.6	35.2
S	0.12	153	100	34.7	36
T	0.11	78	69.6	27.1	37.7
败血症					
13a	1.1	333	195	70	34.9
13b	11.9	62.5	154	30.5	30.4
15a	6.4	323	209	75.4	46.4
15b	21.2	346	180	71.6	50.7
9a	1.9	303	203	70.3	48.0
9b	24.7	271	205	78.4	33.6
12b	29.0	305	210	62.5	40.3
10b	5.8	324	204	67.4	36.1
16a	1.9	127	128	30.5	33.9
8b	86.7	347	196	83.3	39
11.1	1.1	138	153	29.6	33.7
20a	1.4	157	176	41.3	30.9
13b	1.1	170	178	39	34.9
0.0	0.0	295	186	45.3	36.9
19a	17.6	354	201	58.6	54.5
2.5	2.5	356	199	78.6	
7a	2.9	345	197	148	
16b	40.0	343	197	89.1	43.9
12a	5.2	327	216	76.1	34.3
15b	1.9	420	215	82.5	52