

(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2013-532820

(P2013-532820A)

(43) 公表日 平成25年8月19日(2013.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 1
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	4 HO 4 5
GO 1 N 33/534 (2006.01)	GO 1 N 33/534	
GO 1 N 33/535 (2006.01)	GO 1 N 33/535	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-520823 (P2013-520823)	(71) 出願人	510244891 オタゴ イノベーション リミテッド ニュージーランド国 ダニーデン, セント デビッド ストリート 87
(86) (22) 出願日	平成23年7月19日 (2011.7.19)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(85) 翻訳文提出日	平成25年3月18日 (2013.3.18)	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/044586	(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(87) 国際公開番号	W02012/012469	(72) 発明者	ペンバートン, クリストファー, ジョ セフ ニュージーランド, クライストチャーチ , ステッドマン ロード 54
(87) 国際公開日	平成24年1月26日 (2012.1.26)		
(31) 優先権主張番号	61/365,677		
(32) 優先日	平成22年7月19日 (2010.7.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シグナルバイオマーカー

(57) 【要約】

C型ナトリウム利尿及びエリスロポエチンシグナルペプチド並びにフラグメントに関する診断法、並びにそのためのキット、使用及び適用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 又は 4 に対する結合剤からなる群から選択される、単離された結合剤。

【請求項 2】

配列番号 2、3、5 及び / 又は 6 に対する結合剤からなる群から選択される、単離された結合剤。

【請求項 3】

抗原性バリエーション又はその断片と結合する、請求項 1 の結合剤。

【請求項 4】

抗原性バリエーション又はその断片と結合する、請求項 3 の結合剤。

【請求項 5】

抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項又は請求項 4 に記載の結合剤。

【請求項 6】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項又は請求項 4 に記載の結合剤。

【請求項 7】

検出可能なマーカーで標識された、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項又は請求項 6 に記載の結合剤。

【請求項 8】

配列番号 2、3、5 及び / 又は 6 からなる群から選択される、単離されたペプチド。

【請求項 9】

配列番号 2、3、5 及び / 又は 6 からなる群から選択されるペプチドを含有する患者から得られた、血液試料、血漿試料又は血清試料である生物学的試料を、前記ペプチドに対する結合剤と接触させるステップを含む方法。

【請求項 10】

抗体の調製における請求項 8 のポリペプチドの使用。

【請求項 11】

対象由来の生物学的試料中の請求項 8 のポリペプチドに関するアッセイであって、前記試料を得るステップと、前記試料を結合剤と接触させるステップと、任意の既知の方法を用いて試料中の前記ペプチドのレベルを検出及び測定するステップとを含むアッセイ。

【請求項 12】

生物学的試料が循環源由来の試料である、請求項 11 のアッセイ。

【請求項 13】

前記ポリペプチドのレベルが質量分析を用いて測定される、請求項 11 又は 12 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 14】

前記ポリペプチドのレベルが、RIA、ELISA、免疫蛍光アッセイ及び免疫放射線測定アッセイから選択されるアッセイを用いて測定される、請求項 11 又は 12 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 15】

AMI 及び狭心症を含む急性冠症候群、心不全、不安定プラーク、並びにアテローム性動脈硬化を含む血管疾患からなる群から選択される心臓障害を対象において予測、診断又はモニターする方法であって、

(a) 対象由来の生物学的試料中の EPOsp 及び / 若しくは CNPsp 免疫反応性、又は EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又は EPOsp 及び / 若しくは CNPsp 断片のレベルを測定するステップと、

(b) 前記 EPOsp 及び / 若しくは CNPsp 免疫反応性、又は前記 EPOsp 及び / 若しくは前記 CNPsp ペプチド若しくは断片のレベルを、対照からのレベルと比較するステップと

10

20

30

40

50

を含み、対照レベルより高いEPOsp及び/若しくはCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はそのEPOsp断片及び/若しくはCNPs断片の測定されたレベルが、前記心臓障害を示す方法。

【請求項16】

前記方法が、対象における急性又は慢性心臓障害の治療に対する反応を評価又はモニターするのに使用され、対照レベルからの、EPOsp及び/若しくはCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片の測定レベルにおける変化が、治療に対する反応を示す、請求項15の方法。

【請求項17】

対象における急性及び/又は慢性腎臓疾患、傷害又は障害を予測、診断又はモニターする方法であって、

(a) 対象由来の生物学的試料中のEPOsp及び/若しくはCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片のレベルを測定するステップと、

(b) 前記EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片のレベルを対照からのレベルと比較するステップと

を含み、対照レベルより高い、EPOsp及び/若しくはCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片の測定されたレベルが、急性又は慢性腎臓疾患、傷害又は障害を示す方法。

【請求項18】

前記方法が、対象における急性又は慢性腎臓疾患又は障害の治療に対する反応を評価又はモニターするのに使用され、対照レベルからの、EPOsp及び/若しくはCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片の測定レベルにおける変化が、治療に対する反応を示す、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記心臓障害の発症の発症、又は臨床的提示の最初の48時間、24時間、12時間、6時間、4時間、2時間、1時間、若しくは30分以内に、対象由来の生物学的試料中のEPOsp及び/又はCNPs免疫反応性のレベル、EPOsp及び/又はCNPs断片のレベルを測定するステップを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

前記腎臓障害又は疾患の臨床的提示の最初の48時間、24時間、12時間、6時間、4時間、2時間、1時間、若しくは30分以内に、対象由来の生物学的試料中のEPOsp及び/又はCNPs免疫反応性のレベル、EPOsp及び/又はCNPs断片のレベルを測定するステップを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

範囲40~250pmol/L、65~200pmol/L、70~150、又は70~130pmol/Lにある、試料中のEPOsp及び/又はCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片のレベルがACSを示す、請求項15又は19に記載の方法。

【請求項22】

対照レベルより1.5~10、1.5~5、又は2~3倍高い、試料中のEPOsp及び/又はCNPs免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片のレベルがACSを示す、請求項15又は19に記載の方法。

【請求項23】

急性心臓障害が、提示ECG上でST上昇を有する急性心筋梗塞(AMI)、不安定狭心症、急性非ST上昇心筋梗塞、心臓虚血、急性心臓傷害、急性薬物毒性に起因する急性心臓損傷、急性心筋症である、請求項15又は19に記載の方法。

【請求項24】

生物学的試料が、血液、静脈血液、動脈血液、血漿、血清、唾液、間質液、尿又は心臓組織試料である、請求項15~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

10

20

30

40

50

前記 E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 免疫反応性、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又は E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 断片のレベルが、質量分析 (S E L D I、E S I、M A L D I 又は F T I C を含む)、R I A、E L I S A、蛍光免疫アッセイ、免疫蛍光アッセイ、及び免疫放射線測定アッセイから選択されるアッセイを用いて測定される、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 A C S の 1 つ又は複数の非 E P O s p 及び / 又は C N P s p マーカーのレベルを測定するステップと、対照からのマーカーレベルに対し前記レベルを比較するステップとをさらに含み、対照レベルからの、測定レベルにおける偏差が、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片の対照レベルより高い E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片の測定されたレベルと共に、A C S の予測若しくは診断となる、又は前記 A C S をモニターするのに使用され得る、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 27】

非 E P O s p 及び / 又は C N P s p マーカーが、トロポニン T、トロポニン I、クレアチンキナーゼ - M B、ミオグロビン、ANP、ANP - S P、BNP、NT - BNP、BNP - S P、LDH、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、H - F A B P、虚血修飾アルブミン、エンドセリン、アドレノメデュリン、レニン及びアンジオテンシン I I からなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

対象における生物学的事象又は障害を評価するためのアッセイ用キットの製造のための E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 免疫反応性、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又は E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 断片に対する結合剤の使用。

20

【請求項 29】

生物学的事象又は障害が A C S である、請求項 28 の使用。

【請求項 30】

生物学的事象又は障害が腎臓障害である、請求項 28 の使用。

【請求項 31】

生物学的事象が E P O 乱用又はドーピングに起因する、請求項 28 の使用。

【請求項 32】

急性心臓障害を予測、診断又はモニターするためのキットであって、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 又はその断片に対する結合剤を含み、A C S の発症又は臨床的提示の 6 又は 4 時間以内に得られた生物学的試料において測定された E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片のレベルから、発症又は臨床的提示の 6 又は 4 時間以内に対象における前記急性心臓障害を予測、診断又はモニターするための説明書の場合により含むキット。

30

【請求項 33】

結合剤が抗体又はその抗原結合断片である、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 34】

キットが、0 . 1 ~ 1 5 0 0 p m o l / L、0 . 1 ~ 3 5 0 p m o l / L、1 ~ 3 0 0 p m o l / L、1 0 ~ 2 5 0、又は 2 0 ~ 1 5 0 p m o l / L の範囲での、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p 免疫反応性、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片のレベルを測定するために校正される、請求項 33 に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C 型ナトリウム利尿及びエリスロポエチンシグナルペプチドに関する診断法を含む診断法及び関連技術、並びにそのためのキット、使用及び適用に関する。

【背景技術】

【0002】

50

以下は、本発明を理解するのに有用となり得る情報を含む。本明細書に提供された情報のいずれかが、現在記載されている若しくは特許請求されている発明の従来技術であること、又は現在記載されている若しくは特許請求されている発明に関連していること、或いは具体的又は黙示的に言及されているいずれかの刊行物又は文献が従来技術であることを認めるものではない。

【0003】

急性冠症候群（ACS）は、不安定狭心症から急性心筋梗塞（AMI）にわたる広範囲の心虚血事象を含む。AMIはこれらの事象の最も重篤なものとして現れ、したがって迅速及び正確な診断を必要とする。記載された特徴（虚血性胸部不快感の既往歴、連続心電図（ECG）記録の漸進的变化、並びに血漿心臓バイオマーカーの上昇及び下降）の2つ以上を呈する患者は、AMIを起こしているとして明確に同定される¹。しかし、疑わしいAMIを呈するかなりの割合の患者（40%～50%）はECGの連続変化、又は典型的な症状を有さず、故に正確な診断にはバイオマーカー分析を極めて重視する^{1, 2}。心筋梗塞の正確な早期診断は、効果的な経皮的血行再建又は血栓溶解血行再建、並びに補助的な抗凝固及び抗血小板療法を含む再灌流治療の速やかな導入を容易にする。このような治療は、診断及び管理が遅れる時間ごとに、死亡率及び罹患率を低下させる効果が徐々に低下する³⁻⁶。この臨床状況における意思決定を加速させる必要性から、急性心臓症候群（acute cardiac syndrome）及び障害、特にAMIの早期及び特異的診断を提供するバイオマーカー、特に循環バイオマーカーの同定に相当の関心が払われている¹。提案されたバイオマーカーには、クレアチンキナーゼ-MB（CK-MB）、トロポニンT（TnT）、トロポニンI（TnI）BNP、N-BNP（NP-BNPとしても知られる）、BNPシグナルペプチド（BNP-SP）及びミオグロビンが含まれる。しかし、血漿心臓バイオマーカーの検出可能な又は異常な上昇までの時間は、最大6時間（ミオグロビン、CK-MB）～12時間以上（TnT、TnI、BNP、N-BNP）であり得、ピークレベルは傷害の発症24～48時間後まで生じないことが多く、正確な診断及び治療に遅延の時間を課す³⁻⁶。さらに、ミオグロビン及びCK-MBは両方とも非特異的であり、特に外傷又は手術中に心臓外の源から分泌される可能性がある¹。特に臨床的提示の最初の数時間以内に、急性心臓傷害などの急性心臓症候群及び障害について早期及び特異的情報を提供する、1つのマーカー又は一連のマーカーに対する必要性が存在する。

10

20

30

【0004】

急性心臓事象の基質を形成する血管不安定プラークをモニターするための手段も必要である。アテローム性動脈硬化は、米国だけで500,000人の年間死亡率を有する重大な健康問題である。急性冠症候群は、最も一般的には、重症度が血管造影的に中程度であるアテローム性不安定プラークの破壊の結果であることが現在認められている。「不安定プラーク（vulnerable plaque）」は、破裂しやすく、その結果、突然の心停止を引き起こす、中程度に狭窄しているが不安定なプラークのサブグループを指すのに使用される。冠動脈造影は、冠状動脈の内腔狭窄を図解及びモニターするのに幅広く使用されるが、不安定プラークの選択的同定を提供することはできない。不安定プラークを同定する代替アプローチのほとんどは、侵襲的血管内アプローチに基づいている。したがって、不安定プラークを安定なプラークと区別できるようにする非侵襲的技法の開発は、アテローム性動脈硬化症患者の罹患率及び死亡率を低下させるために極めて重要であり、喫緊に必要とされる。内腔径狭窄の程度と無関係に不安定なアテローム性動脈硬化プラークを検出し、不安定狭心症及び/又は急性心筋梗塞、並びにこれらの結果が生じる前にプラークを治療する方法及び装置が利用可能であれば、非常に望ましいであろう。⁷

40

【0005】

国立衛生研究所（プログラムアナウンスメントPA-09-196、“Ancillary Studies of Acute Kidney Injury, Chronic Kidney Disease, and End Stage Renal Disease Accessing Information from Clinica

50

l Trials, Epidemiological Studies, and Databases”)によれば、米国における慢性腎臓疾患の公衆衛生及び経済的負担は相当なものである。糖尿病及び高血圧が慢性腎臓疾患の主な原因である。2006年における末期腎臓疾患の新規症例数は110,000人を超え、治療を受けている患者の数は500,000人を上回った。米国人口は高齢化し続けているため、末期腎臓疾患の新規症例数も増加することが予想される。米国において、約26,000,000人が慢性腎臓疾患を有すると推定されている。入院患者における急性腎不全も米国では重大な問題であり、入院患者の1~15%に及ぶ。急性腎不全の医学的管理は、伝統的に、主として支持療法と、最も重度の症例に対する腎臓代替療法から成っている。しかし、急性腎不全へのこのような介入にもかかわらず、罹患患者における死亡率は極めて高いままである(一部のシリーズでは50%超)。

【0006】

同様に、慢性腎不全(CRF)は高い死亡率及び罹患率を有し、支持療法以外に特異的療法がない⁸。組織学的に、虚血性CRFは急性尿細管壊死を特徴とするが、該疾患にアプローチする上での主な限界は、早期発見のための臨床的に実現可能な診断法がないことである。特に、進行を減速させる幾つかの有望な一次及び二次介入が利用可能であるため、慢性腎臓疾患の早期同定及び進行の適時発見は、世界の腎臓学コミュニティが直面している課題である。コストを管理するために、医師は、慢性腎臓疾患の末期腎臓疾患(ESRD)への進行速度を低下させる必要があるであろう。腎臓疾患及び腎臓疾患進行の現在のマーカーは、血清クレアチニン及び微量アルブミン尿を含む尿タンパク濃度である⁸。糸球体濾過率(GFR)の低下の傾斜は、ESRDの時期を予測することが実証されており、タンパク尿のレベルは、腎臓疾患進行速度と相関することが複数の研究で示されている。しかし、初期腎臓疾患を認識するこれらの能力は限定的である。血清クレアチニン濃度は、対象の年齢、性別、人種、筋肉量、体重、身体活動の程度、及び様々な投薬に依存し、血清クレアチニンに基づく腎機能の正しい解釈は、複雑な式を必要とする。尿タンパクは進行性腎臓疾患に感受性であるが、尿タンパクの出現は、著しい腎臓損傷が既に生じた後で起きる。有用性を最大にするために、初期及び/又は進行性腎臓損傷のバイオマーカーは、可能な限り早い時点、好ましくは腎臓損傷が生じ始めるその時点で陽性になるべきである。特に早期発見のためには、関連マーカーを発見及び検証する強い必要性が残る⁸。

【0007】

世界ドーピング防止機構にとって継続的な問題は、アスリートによる運動能力向上剤としてのエリスロポエチン(EPO)などのペプチド/タンパク質ホルモンの乱用である。現在、血液及び尿サンプルが、禁止物質の存在について電気泳動又は免疫アッセイ法により分析されている。いずれの特有の技法的問題も別として、これらの判定は、内因性ペプチドホルモンの許容される生理学的レベル、及び該ホルモンの合成又は組換え形態の存在の判定について責任を追わなければならない。しかし、このグループの一部のホルモンに関して、該ホルモンの合成又は組換え形態のより新しい世代は、スポーツにおいて乱用される場合、検出をより難しくもしていること、並びにこの問題は、(1)合成又は組換えEPOの構築における技術開発、(2)検出を回避する時点での制御投与、(3)その結果、承認基準を超える物質レベルを確認する上で生じる困難性、(4)二次抗体の非特異的結合でのタンパク質変動(特に尿中濃縮物における)、及び等電点テストでの非特異的酵素誘導バンドシフトを反映する不確定記録により、さらに複雑化されることも認識されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の実施形態は、例えば、急性冠症候群、急性及び慢性腎臓障害及び傷害、並びに不安定プラークの評価、診断、及び予後用のほか、例えば、アスリートによるEPOドーピングの検出用を含む、診断法のための新たな初期マーカーの発見に関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書に記載及び特許請求されている本発明は、この概要に述べられ又は記載され又は言及されているものを含むがこれらに限定されない、多くの属性及び実施形態を有する。この概要は、包括的であることを意図するものではなく、及び本明細書に記載及び特許請求されている本発明は、例示のみであって制約ではない目的のために含まれているこの概要において特定された特徴若しくは実施形態に限定されず、又はこの概要において特定された特徴若しくは実施形態により限定されない。

【0010】

出願人は、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNPsp)及びエリスロポエチン(EPOsp)のシグナルペプチド断片を発見した。出願人はまた、これらのシグナルペプチド断片が、循環に放出される材料を含有する生物学的材料の試料のアッセイを含む、生物学的試料のアッセイにより検出可能であることも発見した。

10

【0011】

本発明は、C型ナトリウム利尿ペプチド及びエリスロポエチンのシグナルペプチド及びシグナルペプチド断片に関し、並びに例えば、これらの検出(EPOsp及び/又はCNPsp免疫反応性並びにEPOsp及び/又はCNPsp断片免疫反応性の検出を含む)方法、及びこのために有用な結合剤(binding agent)及びアッセイに関する。本発明はまた、試料採取され得る体液へのこれらの放出をもたらす生物学的事象又は障害又は状態の予後、診断及びモニター、並びに試料採取され得る体液へのこれらの放出をもたらす生物学的事象又は障害又は状態の予後、診断及びモニターにおけるこれらの使用にも関する。予後、診断及びモニターに関する生物学的事象、障害及び状態の例には、急性及び慢性心臓血管障害、不安定アテローム性動脈硬化プラーク、鬱血性心不全、心不整脈、急性冠症候群、慢性動脈疾患、急性及び慢性腎臓疾患障害、傷害及び状態が含まれる。

20

【0012】

EPOsp及び/若しくはCNPsp免疫反応性、EPOsp及び/若しくはCNPsp、又はEPOsp及びCNPspの断片(免疫反応性ペプチド断片を含む)の使用及び測定は、既存の標準マーカーと比べて優れた検出及び識別能力を提供する。この点について、血中でピークレベルに達するはるかにより速い時間、及び状態に対する各マーカーの特異的性質が注目されている。後者は、各シグナルペプチド断片の臓器特異的位置に起因する。故に、EPOspは腎臓から特異的に放出されるのに対し、CNPは心臓及び血管から放出される。さらに、シグナルペプチドは、既存のマーカーと比べてより短い血中半減期を有するため、より速く上昇及び下降する能力を有し、原因となっている活動性疾患を検出する。このことは、長い半減期を有し、したがって、活動性疾患に迅速に反応しない血液レベルを持つ既存のマーカーに対しては言えない。

30

【0013】

ヒトEPOspは、配列MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG(配列番号1)を有する。

ヒトEPOsp断片は、例えば、EPOsp(1~9)及びEPOsp(18~27)を含み、次のように書くことができる。

40

MGVHECPAW(配列番号2)

SLPLGLPVLG(配列番号3)

ヒトCNPspは、配列MHLSQLLACA LLLTL LSLRP SEA(配列番号4)を有する。

ヒトCNPsp断片は、例えば、CNPsp(1~13)及びCNPsp(14~23)を含み、次のように書くことができる。

MHLSQLLACALLL(配列番号5)

TLLSLRPSSEA(配列番号6)

【0014】

これらのヒト及び動物シグナルペプチド及び断片に対する結合剤を調製するのに有用な

50

これらのシグナルペプチド及び断片、並びにそのバリエーションの動物類似体は、本発明の範囲内である。

【0015】

本発明は、事象が循環へのCNPsp若しくはEPOsp又はその断片の放出と関連する、対象における生物学的事象又は障害を予測、診断又はモニターする方法、或いはEPOドーピングの評価方法を含む。1つの態様において、方法は、対象由来の生物学的試料中の1つ又は複数のこれらのシグナルペプチド又は断片のレベルを測定するステップと、シグナルペプチド断片のレベルを、1つの対照又は対照集団（歴史的対照を含む）由来の前記シグナルペプチド断片の個々のレベル又は組み合わせレベルと比較するステップとを含み、対照レベルからの、測定レベルにおける偏差は生物学的事象を示す。シグナルペプチド自体もまた測定され得る。

10

【0016】

出願人はまた、EPOsp及び/又はCNPsp断片が、急性心臓症候群の存在を評価するのに使用することができること、並びに1つ又は複数の前記EPOsp及び/又はCNPsp断片は、疑われる急性冠症候群の発症後最初の数時間で、又は疑われる急性冠症候群の臨床的提示時に典型的には最も高いことも発見した。

【0017】

さらなる態様では本発明は、対象におけるACSを予測、診断又はモニターする方法であって、対象由来の生物学的試料中のEPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルを測定するステップと、前記EPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルを、1つ又は複数の対照からの前記EPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルと比較するステップとを含み、対照レベルより高い前記EPOsp及び/又はCNPsp断片の測定レベルが、ACSを示す方法を提供する。

20

【0018】

EPOsp及び/又はCNPsp断片の上昇レベルは、典型的にはMI及び狭心症の診断となる。

【0019】

EPOsp及び/又はCNPsp断片の上昇レベルは、心不全の診断として使用することもできる。

【0020】

EPOsp及び/又はCNPsp断片の上昇レベルは、血管疾患及び/又はアテローム性動脈硬化の診断として使用することもできる。CNPspは例えば、これらの状態において正常と比べて約50%以上上昇し得る。

30

【0021】

CNPsp断片の上昇レベルは、高血圧の診断に使用することもできる。

【0022】

CNPsp断片の上昇レベルは、脳への一時的な不十分な血流に通常関連した失神、意識及び姿勢の一時的消失の診断に使用することもできる。失神は最も多くの場合、血圧が低すぎ（低血圧）、及び心臓が酸素の正常な供給量を脳に送り込まない場合に生じる。

【0023】

EPOsp及び/又はEPOsp断片の上昇レベルは、EPOドーピングの評価に使用することもできる。EPO/EPOsp免疫反応性（1つのEPOsp及び/又は1つのEPOsp断片若しくは複数の断片を示す）血漿比は、例えば特に投与の急性期の間に、最大1000:1を超えることが予期され得る。

40

【0024】

本発明はまた、対象における生物学的事象又は障害、特に急性心臓症候群の治療に対する反応をモニターする方法であって、好ましくは治療の前後に、対象由来の生物学的試料中の、本明細書に言及されている1つ又は複数のシグナルペプチド断片、例えば、EPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルを測定するステップと、前記断片のレベルを対照からの前記断片のレベルと比較するステップを含み、対照レベル由来の断片のレベル又は

50

測定レベル（例えば、歴史的対照レベル又はベースライン）における変化が、治療に対する反応を示す方法も含む。

【0025】

本発明はまた、EPOs pのレベルの測定がGFR（腎機能の指標）と陰性相関を示す、対象における急性及び慢性腎臓疾患又は腎不全若しくは腎傷害を診断又は評価する方法も含む。血漿EPOs pレベルは例えば、正常と比べて、慢性腎臓疾患を有する患者及び心不全を有する患者で上昇する。EPOs p対EPOの比は、正常な健康状態において約6であり、これは、腎臓疾患において約10に上昇し、心不全患者において約4に下がる。

【0026】

本発明はまた、対象における急性心臓症候群を予測、診断又はモニターする方法であって、ACS若しくは疑われるACSの発症又は臨床的提示の約最初の12時間以上以内、好ましくは最初の4～6時間以下以内に、対象から得られた生物学的試料中の1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNPsp断片のレベルを測定するステップと、前記1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNPsp断片の測定レベルを、対照からの1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNPsp断片のレベル（例えば、歴史的対照レベル又は既知の対照レベル）と比較するステップとを含み、対照レベルより高い1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNPsp断片の測定レベルが、ACSを示す方法も含む。

【0027】

大まかには、本発明は、1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNPsp及び/又はその断片が、細胞から、例えば、循環又は他の生体液又は組織に放出される任意の事象を予測、診断又はモニターするのに使用することができる。

【0028】

本発明の方法の1つの実施形態において、特に心臓血管障害若しくは腎臓障害、又は疑われる心臓血管障害若しくは腎臓障害に関して、1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNPsp及び/又はその断片のレベル（複数可）は、障害又は疑われる障害を有する患者の提示の約48時間、約24時間、約12時間、約10時間、約8時間、約6時間、約4時間、約2時間、若しくは約1時間以内、又は約30分以内に測定される。

【0029】

1つの実施形態において、本発明の方法はin vitro方法であり、生物学的試料は、血液、血漿、血清、尿、唾液、間質液又は心臓組織である。

【0030】

1つの実施形態において、測定ステップは、1つ又は複数の標的断片と、所望の特異性及び選択性で前記断片（複数可）と結合する結合剤との間の結合を検出するステップを含む。測定ステップは、

(a) 1つ若しくは複数の標的断片を含有する、又は1つ若しくは複数の標的断片を含有することが疑われる生物学的試料を、インキュベーションステップ有り又はなしで、結合剤又は薬剤と結び付けるステップと、

(b) 結合標的シグナルペプチド（複数可）又は断片（複数可）のレベルを測定するステップと

を含んでもよい。

【0031】

結合剤は、例えば、抗体又はその抗原結合断片を含む任意の分子であってもよい。最も一般に、抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ又はヒト化抗体であり得る。1つの実施形態において抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施形態において、結合剤は、例えば、一本鎖抗体又はscFvである。1つの実施形態において、抗断片結合剤は、例えば、生物学的試料中の又は生物学的試料から得られる断片を認識する、抗体又はその抗原結合断片である。

【0032】

別の実施形態において、1つ又は複数の標的断片のレベルは、質量分析を用いて測定さ

10

20

30

40

50

れる。

【0033】

配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片は、本発明の結合剤を用いて結合することができる。他のEPOsp及びCNPs断片もまた、本発明の範囲内である。

【0034】

結合剤又は薬剤により結合される分子は、完全長ヒトシグナルペプチド分子（配列番号1、4）又はその抗原性バリエーション若しくは断片であってもよい。1つの実施形態において、断片は、長さが少なくとも4個の隣接アミノ酸である。結合剤又は薬剤は、例えば、EPOsp及び/又はCNPsのN末端又はC末端と結合してもよい。断片は、例えば、配列番号2、3、5及び/又は6のいずれかであってもよい。

10

【0035】

配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片の結合は、例えば、抗体又は抗体断片又は固相に固定化される他の結合剤を用いて測定することができる。

【0036】

配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片のレベルは、例えば、RIA、ELISA、蛍光免疫アッセイ、免疫蛍光アッセイ、質量分析又は免疫放射線測定アッセイにより有用に測定することができる。本発明の方法は、結合剤の使用、及び対象由来の生物学的試料中の配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片に関するアッセイであって、任意の既知の方法を用いて、試料中の配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片の存在又は量を判定するステップを含むアッセイの使用を含む。

20

【0037】

本発明はまた、例えば、

(a) 試料由来の、配列番号1～6に対応する1つ又は複数の1つ又は複数のペプチド又はペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）と結合させるステップと、
(b) 配列番号1～6に対応する1つ又は複数の結合されたペプチド又はペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）のレベルを測定するステップと
を含む、配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド又はペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）若しくは他のEPOsp及び/又はCNPsの断片に関する、本明細書に記載された使用のためのアッセイを含むアッセイも提供する。

30

【0038】

本発明はまた、対象における生物学的事象又は障害の予測、診断又はモニターで使用するための、配列番号1、2、3、4、5又は6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片に関する1つ又は複数のアッセイも提供する。1つの実施形態において、アッセイはin vitroアッセイである。

40

【0039】

本発明はまた、例えば、配列番号2、3、5及び/又は6のいずれかに対応する、実質的に精製された、又は精製された、及び合成的に作製された断片も含む。

【0040】

本発明の心臓に関連した方法は、例えば、ACSの1つ又は複数の非EPOsp及び非CNPsマーカーのレベルを測定するステップと、対照からのマーカーレベルに対し該レベルを比較するステップとをさらに含んでもよく、対照レベルからの、測定レベルにおける偏差は、1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPs断片の対照レベルより高い

50

1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNPs p断片の測定レベルと共に、ACSの予測若しくは診断となる、又は前記ACSをモニターするのに使用され得る。急性冠症候群との関連で使用するためのマーカーには、例えば、トロポニンT、トロポニンI、クレアチンキナーゼMB、ミオグロビン、BNP、NT-BNP、BNP-SP、ANP、ANP-SP、LDH、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、及び心臓特異的脂肪酸結合タンパク質(H-FABP)が含まれる。

【0041】

別の態様において、本発明はまた、配列番号1~6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他の断片に対する結合剤も提供する。1つの実施形態において、本発明の結合剤は、配列番号2、3、5及び/又は6の1つと結合する。別の実施形態において、結合剤は、配列番号1~6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片のバリエーション又は断片と結合する。

10

【0042】

結合剤は、配列番号1、2、3、4、5又は6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片の放出(例えば、循環へを含む)と相関する、生物学的事象又は障害の予測、診断又はモニターにおいて有用である。このような事象又は障害には、対象における急性心臓症候群が含まれる。

【0043】

本発明はまた、抗EPOs p及び/若しくは抗CNPs p抗体又はその抗原結合断片も提供する。抗体は、例えばモノクローナル、ポリクローナル、キメラ又はヒト化抗体であり得る。本発明はまた、配列番号2、3、5及び/又は6により同定された断片を含むEPOs p及び/又はCNPs p断片に結合する、抗体及びその結合断片も含む。

20

【0044】

本発明はまた、対象における生物学的事象又は障害を評価するための、配列番号1~6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片に関するアッセイの製造における結合剤の使用、或いは対象における生物学的事象若しくは障害及び/又はこの治療を評価するための、又はEPO乱用若しくはドーピングの評価のための予後ツール、診断ツール又はモニターツールの製造における結合剤の使用にも関する。1つの実施形態において、事象又は障害は、慢性腎臓疾患若しくは傷害、心不全、高血圧、失神、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、又は心筋梗塞及び狭心症を含む急性心臓症候群、又はEPO乱用若しくはドーピングから、或いは慢性腎臓疾患若しくは傷害、心不全、高血圧、失神、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、又は心筋梗塞及び狭心症を含む急性心臓症候群、又はEPO乱用若しくはドーピング後を含む、循環への、配列番号1~6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片の放出と相関する。

30

【0045】

本発明はまた、対象における慢性腎臓疾患若しくは傷害、心不全、高血圧、失神、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、又は心筋梗塞及び狭心症を含む急性心臓症候群若しくは障害を含む、配列番号1~6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片の放出(例えば、循環へを含む)と相関する生物学的事象又は障害を評価するための予後ツール、診断ツール又はモニターツールの製造における本発明の抗体又は抗原結合断片の使用にも関する。

40

【0046】

1つの実施形態において予後ツール、診断ツール又はモニターツールは、例えば、0.1~1500 pmol/L、0.1~500 pmol/L、1~300 pmol/L、10~250又は20~150 pmol/Lの範囲での、配列番号1~6のいずれかに対応

50

する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片のレベルを測定するために校正される。さらに、エリスロポエチンシグナルペプチドは、約400～4000 pmol/L、約400～200 pmol/L、約320～520 pmol/L、又は約400～420 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも5 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。アンジオテンシンシグナルペプチドは、約10～1000 pmol/L、約5～500 pmol/L、約1～100 pmol/L、又は約0.1～10 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも0.1 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。C型ナトリウム利尿シグナルペプチドは、約50～1500 pmol/L、約25～750 pmol/L、約10～500 pmol/L、又は約5～150 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも2 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。エンドセリン-1シグナルペプチドは、約10～200 pmol/L、約5～100 pmol/L、約10～50 pmol/L、又は約1～20 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも1 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。

10

【0047】

1つの態様において、配列番号1～3を含むEPOsp及び/又はEPOsp断片の正常なレベルは、約14～約90 pmol/Lであり、本明細書に言及されている1つ又は複数の病状又は状態においては、約30～約200 pmol/Lである。このようなレベルは、例えば、血液又は血漿において測定され得る。

20

【0048】

1つの態様において、配列番号4～6を含むCNPsp及び/又はCNPsp断片の正常なレベルは、約5～約15 pmol/Lであり、本明細書に言及されている1つ又は複数の病状又は状態においては、約18～約55 pmol/Lであるこのようなレベルは、例えば、血液又は血漿において測定され得る。

【0049】

別の態様において、本発明は、対象における生物学的事象又は障害を予測、診断又はモニターするためのキットであって、配列番号1～6の1つ又は複数に対応するペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片に対する結合剤を含むキットを提供する。

30

【0050】

1つの実施形態においてキットは、上記の範囲での、配列番号1～6のいずれか1つ又は複数に対応するペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片のレベルを測定するために校正される。

【0051】

1つの実施形態においてキットはまた、結合剤を用いてアッセイを実施するための情報及び/又は説明書も含む。キットはまた、生物学的試料において測定された、配列番号1、2、3、4、5又は6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片のレベルから、及び測定レベルを対照レベルと比較しながら、対象における1つ又は複数の慢性腎臓疾患若しくは傷害、心不全、高血圧、失神、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、又は心筋梗塞及び狭心症を含む急性心臓症候群を含む生物学的事象又は障害を予測、診断又はモニターするための情報及び/又は説明書を含んでもよい。

40

【0052】

本発明はまた、抗体又はその結合断片の調製における、配列番号1～6に対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片（又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション）、又は他のシグナルペプチド断片の使用にも関する。

本発明はこれより、添付図面の図を参照して記載される。

50

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】1文字表記を用いてEPOsp及びCNPs p Pのアミノ酸配列を示す図である。

【図2】(上のパネル)CNPs p (15~23)RIAの代表的標準曲線を示す図である。(下のパネル):ヒトにおける領域血管床の試料採取は、心臓冠状静脈洞(CS)及び腎静脈(RV)のみが、循環動脈(FA1及びFA2)レベルと比べてより高いCNPs p濃度を有したことを示す図である。これは、心臓がCNPs pの機能源であること、及び動脈源の試料採取を必要とせずに所望の静脈源を試料採取できることを示す。該シグナルペプチドは、動脈試料において同定されてもよいが、静脈試料は該ペプチドの供給源を同定するのに使用することができる。

【図3】(上のパネル)血漿EPOsp(1~9)レベルがGFR(腎機能の指標)と陰性相関を示す図である。(真ん中のパネル)正常と比べて、血漿EPOspレベルが慢性腎臓疾患を有する患者で上昇し(EPOは著しく下がる一方で)、心不全を有する患者ではEPOspレベルが上昇する(EPOは著しく上昇する一方で)ことを示す図である。(下のパネル)EPOsp(pmol/L)対EPO(mU/L)の比は、正常な健康状態において約6であることを示す図である。これは、腎臓疾患において約10に上昇し、心不全患者において約4に下がる。

【図4】プレプロペプチド前駆体分子からのシグナルペプチド切断の一般化概略図を示し、並びに以前は未知及び未認識の、検出可能なシグナルペプチド断片の生成を示す図である。

【図5】上のパネル:文書に記録されたST上昇心筋梗塞(STEMI)を有する患者8人における、病院救急科での胸痛の発症時間からのCNPs p(14~23)の連続血漿濃度を示す免疫アッセイ結果を示す図である。下のパネル:上のパネルで特定された同じSTEMI患者における同時のTnI、CK-MB及びミオグロビン血漿レベルを示す免疫アッセイ結果を示す図である。

【図6】EPOsp及びCNPs p抗血清の交差反応性データの表を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0054】

定義

急性冠症候群は、提示ECG上でST上昇を有する急性心筋梗塞(AMI)、不安定狭心症、及び急性非ST上昇心筋梗塞;心臓虚血;急性心臓傷害;急性薬物毒性に起因する急性心臓損傷;並びに急性心筋症を含む、幅広いスペクトルの心臓虚血事象を包含する。これらの障害の完全な記述的定義は参考文献1に見出される。例えば、図5参照のこと。

【0055】

急性(acute(sudden))腎不全は、電解質を失うことなく、老廃物を除去し、尿を濃縮する腎臓の能力が突然失われることである。疾患及び傷害を含むこのような腎臓損傷の多くの考えられる原因がある。これらには、急性尿細管壊死;自己免疫腎臓疾患;重度の低血圧による血流の低下;腎臓の血管内に凝固を引き起こす障害;腎臓を直接に傷害する感染;妊娠合併症;及び尿路閉塞が含まれる。慢性腎臓疾患は、経時的に腎機能がゆっくりと失われることである。症状には、血便、口臭、あざがでやすい、精神状態又は気分の変化、食欲減退、特に手又は足における感覚の低下、倦怠感、側腹痛(肋骨と腰の間)、手の震え、高血圧、口内の金属味、悪心又は嘔吐(数日間続く場合がある)、鼻血、持続性吃逆、出血時間の延長、発作、ゆっくりとした緩慢な動き、全身性腫脹(体液貯留)、足首、足、及び脚の腫脹、並びに排尿変化(尿量の減少、夜間の過度の排尿、及び完全な排尿停止)が含まれる。

【0056】

慢性腎臓疾患(CKD)は、経時的にゆっくり悪化する。初期段階では、症状がない場合がある。機能の喪失は通常、生じるまでに数カ月又は数年を要する。腎機能が正常の10分の1未満になるまで症状が生じないほど緩徐な場合がある。慢性腎臓疾患の最終段階

10

20

30

40

50

は、末期腎臓疾患（ESRD）と呼ばれる。腎臓はもはや機能せず、患者は透析又は腎臓移植を必要とする。慢性腎臓疾患及びESRDは、米国では1,000人中2人を超える人に発症する。糖尿病及び高血圧は、2つの最も一般的な原因であり、ほとんどの症例の主な原因となっている。傷害はもう1つの原因である。多くの他の疾患及び状態は、腎臓に至る動脈又は腎臓の内側の動脈の問題；腎臓の先天性欠損（多発性嚢胞腎など）；一部の鎮痛剤及び他の薬剤；特定の有毒化学物質；自己免疫障害（全身性エリテマトーデス及び強皮症など）；傷害又は外傷；糸球体腎炎；腎臓結石及び感染；（尿の腎臓への逆流により腎臓が損傷される）逆流性腎症及び他の腎臓疾患を含め、腎臓を損傷し得る。症状には、全身的な病感及び倦怠感、全身性のかゆみ（掻痒）及び乾燥皮膚、頭痛、減量しようとしなない状態での体重減少、食欲不振、並びに悪心が含まれ得る。特に腎機能が悪化した場合に発症し得る他の症状には、異常な暗色又は明色皮膚、骨痛、脳及び神経系症状、眠気及び錯乱、集中又は思考の問題、手、足、又は他の領域のしびれ、筋肉の攣縮又は痙攣、口臭、あざがでやすい、出血、又は血便、過度の口渇、頻繁な吃逆、低レベルの性的関心及びインポテンス、月経期の停止（無月経）、不眠症、脚不穩症候群、及び閉塞性睡眠時無呼吸などの睡眠障害、足及び手の腫脹（浮腫）、並びに（典型的には朝の）嘔吐が含まれる。

【0057】

不安定プラークは、心臓まひ又は心臓発作などの突然の重大な問題を引き起こす傾向が特にあるアテローム性プラークである。冠状動脈血栓の最も多い原因、プラーク破裂は、連続血管造影により実証されるような冠動脈狭窄の突発的（episodic）進行に関連しており、不安定狭心症、心筋梗塞、及び突然死に多くの場合関連する。破裂しやすいアテローム性動脈硬化プラークは、脂質からなる半月状の低細胞性の塊（hypocellular mass）を覆う線維性被膜内にマクロファージ及び、（程度は少ないが）リンパ球の高密度浸潤を有する。故に、不安定プラークは、たくさんのマクロファージ、大量の脂質及びコレステロールを有し、通常、破裂する可能性のある薄い線維性被膜により覆われた、動脈壁中のアテローム性プラークとして多くの場合特徴付けられる。破裂したプラークは、脂質コア他のプラーク成分への血液の曝露をもたらし、冠状動脈血栓の大部分を引き起こすと考えられている。糜爛又は破裂する傾向があるこれらの比較的少ない狭窄プラークの特徴、並びに該プラークが不安定狭心症及び心筋梗塞に寄与するという認識は、重要な意味を有する。潜在的に不安定プラークの早期同定は、バイパス手術、血管形成、及び他の処置が検討される患者に対する適応の変化をもたらす可能性がある。“Molecular and Physical Characterization of the Vulnerable Plaque” NIHガイド、26巻、37号、1997年11月7日参照のこと。

【0058】

「抗体」という用語は、抗体を合成するのに使用される抗原を含む分子と特異的に相互作用する（結合する）、又は抗体と密接に関連した抗原と特異的に相互作用する（結合する）特異的構造を有する免疫グロブリン分子を指す。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は完全長抗体を広く含み、その抗原結合断片も含み得る。同様に含まれるのは、モノクローナル及びポリクローナル抗体、多価及び一価抗体、多特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに親和性成熟した抗体である。同様に含まれるのは、一本鎖抗体、scFv、及び抗原結合コンストラクトを含有する他の分子である。抗体が本発明のEPOsp及び/若しくはCNPsppオリゴペプチド又は断片に優先的に結合する（例えば、非EPOsp及び/若しくは非CNPsppオリゴペプチド又はオリゴペプチド断片と約25%未満、又は約10%未満、又は約1%未満、又は約0.1%未満の交差反応性を有する抗体を含む）ならば、抗体は、該標的に選択的又は特異的に結合する。抗体は、本明細書に記載及び特許請求された使用のため、抗原又はエピトープに対しいずれかの有用な結合親和性結合親和性（解離定数（Kd）値）を有するであろう。典型的な結合親和性は、例えば、 10^{-6} 、又は 10^{-7} M、及びより典型的には少なくとも約 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} 、 10^{-11} 、又は 10^{-12} Mに等しく

10

20

30

40

50

てもよい。結合親和性は、表面プラズマ共鳴、又は当技術分野で知られている他の方法を用いて評価することができる。

【0059】

本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」又は「抗体断片」は、この抗体断片の正常な機能のほとんど若しくは全て、又は最小限少なくとも1つを好ましくは保持する、インタクトな抗体の部分を意味する。抗体断片は、例えば、対応するFv領域の機能の全て若しくはほとんど又は一部を、インタクトな抗体-抗原結合領域に保持するFv領域を含んでもよい。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、直鎖抗体、ダイアボディ、一本鎖抗体(ScFv)、並びに多特異性抗体が含まれる。

【0060】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」は、単一の標的抗原に対する抗体を意味する。モノクローナル抗体は、均一な又は実質的に均一な抗体の集団から得ることができ、各モノクローナル抗体は、少量で生じる可能性がある自然突然変異を除いて、同一である及び/又は同じエピトープと結合する。

【0061】

「単離された抗体」は、抗体の自然環境の成分から分離若しくは回収された、又はその両方である(例えば、酵素及びホルモンを含む他のタンパク質から分離された)、同定された抗体である。1つの実施形態において、抗体は、抗体の少なくとも約95重量%、約96重量%約97重量%約98重量%又は約99重量%まで精製される。純度は、例えば、ローリー法により判定することができる。通常、抗体は少なくとも1つの精製ステップにより調製される。

【0062】

「結合剤」という用語は本明細書で使用される場合、EPOsp及び/若しくはCNPspポリペプチド、又はその断片若しくはバリエーションと結合することができる任意の固体又は非固体物質を指す。1つの実施形態において該用語は、EPOsp及び/若しくはCNPspポリペプチド、又はその断片若しくはバリエーションに結合する任意の天然又は非天然分子を指す。結合剤の例には、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、及び小分子化合物が含まれる。

【0063】

生物学的試料は本明細書で使用される場合、EPOsp及び/若しくはCNPspポリペプチド又はポリペプチド断片を含有する、或いはEPOsp及び/若しくはCNPspポリペプチド又はポリペプチド断片を含有することが疑われる、スクリーニングされる対象に由来する任意の試料を意味する。生物学的試料は、標的を検出することができる当技術分野で既知の任意の試料であってもよい。含まれるのは、血漿、血清、血液(動脈及び/又は静脈試料を含む)、尿、唾液、間質液、滑液、脳脊髄液、リンパ液、精液、羊水、心膜液及び腹水などの体液、並びに心臓及び腎臓組織などの組織であるが、これらに限定されない。

【0064】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリン及び/又はT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基が含まれる。エピトープは、抗体が結合する又はB細胞及び/若しくはT細胞が応答する抗原上の部位である。エピトープ決定基は、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面集団から通常成り、並びに特異的3次元構造特性、及び特異的電荷特性を通常有する。エピトープは典型的には、3個、5個、又は通常8~10個のアミノ酸を含む。アミノ酸は、隣接アミノ酸又は三次折り畳みにより並置された非隣接アミノ酸であってもよい。

【0065】

症状の発症又は臨床的提示の約2時間又は4時間~約12時間以内には、例えば、ACS、又は本明細書に記載されているような他の障害若しくは疑われる障害の発症或いは医療施設での提示から、約240分を含む1分~約240分~約720分が含まれる。測定は、発症又は提示から約10時間以内(約600分を含む1分~約600分)、約8時間

10

20

30

40

50

以内（約480分を含む1分～約480分）、約6時間以内（約360分を含む1分～約360分）、約4時間以内（約240分を含む1分～約240分）、約2時間以内（約120分を含む1分～約120分）、又は約1時間以内（約60分を含む1分～約60分）、発症又は提示の5～約45分、15～約40分、20～約35分以内、又は約25～30分以内に行われてもよい。

【0066】

対照より「高い」若しくは「低い」レベル、又は対照からの変化若しくは偏差は、1つの実施形態において、統計的に有意である。レベルが、対照レベルと比較して約5%以上、約10%以上、約20%以上、又は約50%以上対照レベルと異なるならば、対照レベル又は平均対照若しくは歴史的対照レベルからのより高いレベル、より低いレベル、偏差、又は変化が存在すると考えることができる。統計的有意は、或いは $P = 0.05$ として計算されてもよい。より高いレベル、より低いレベル、偏差、及び変化は、アッセイ基準限界値又は基準範囲を用いて判定することもできる。これらは、直観的評価又はノンパラメトリック法から計算することができる。概して、これらの方法は、 0.025 、及び 0.975 フラクタイル (fractile) を $0.025 * (n + 1)$ 及び $0.975 (n + 1)$ として計算することができる。このような方法は当技術分野でよく知られている。^{9, 10} 対照にないマーカーの存在は、より高いレベル、偏差又は変化として見ることができる。対照に存在するマーカーの欠如は、より低いレベル、偏差又は変化として見ることができる。

10

【0067】

含まれるのは、糖尿病又はACSを含む生物学的事象又は障害の病歴がない正常な健康な対象、及び急性冠症候群（提示ECG上のST上昇を有するAMI、不安定狭心症、及び急性非ST上昇MI；心臓虚血；急性心臓傷害；急性薬物毒性に起因する急性心臓損傷、及び急性心筋症）を含むがこれに限定されない様々なACSの病歴を有する対象などの任意の対象由来の試料である。

20

【0068】

「心筋症」という用語は本明細書で使用される場合、心筋すなわち心臓の筋肉が弱くなった心筋の疾患を指す。これは、心臓のポンピングの低下をもたらし得る。心筋症の一般的な原因は、心臓まひ、ウイルス感染、高血圧、アルコール依存症、及び自己免疫疾患である。

30

【0069】

「生物学的事象又は障害」は本明細書で使用される場合、EPOsp及び/若しくはCNPsppオリゴペプチド又はオリゴペプチド断片が細胞から放出され、及び、例えば、対象の循環に放出される、急性及び慢性状態を含む一連の事象を指す。例示的状态には、急性並びに慢性腎臓疾患及び心臓血管疾患（急性冠症候群を含む）が含まれる。慢性状態の例は、心不全、AMI及び心臓血管疾患、並びに高血圧である。

【0070】

EPOsp及び/又はCNPsppは、ヒト配列に対する完全なシグナルペプチドを指す。同様に用語EPOsp及び/又はCNPspp内に包含されるのは、そのバリエーション及び断片である。1つの実施形態においてEPOsp及び/又はCNPsppオリゴペプチドは、シグナルオリゴペプチドとして、又は抗体が結合することができる抗原性オリゴペプチドとして機能する。EPOsp及び/又はCNPsppのバリエーション及び断片には、これらの機能のいずれか一方又は両方を保持するバリエーション及び断片が含まれる。

40

【0071】

「含む (comprising)」という用語は本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「含む (including)」を意味する。すなわち、含む (comprising) を含む、本明細書及び特許請求の範囲における記載を解釈する場合、各記載においてこの用語により前置きされた特徴は全て、存在する必要があるが、他の特徴も存在することができる。「含む (comprise)」及び「含まれる (comprised)」などの関連用語は、同じように解釈されるべきである。

50

【0072】

「ポリペプチド」という用語は本明細書で使用される場合、アミノ酸残基が共有ペプチド結合により連結されている、完全長配列を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。本発明において有用なポリペプチドは、精製された天然物であってもよく、又は組換え若しくは合成技法を用いて部分的に若しくは完全に生成されてもよい。該用語は、ポリペプチド、二量体若しくは他の多量体などのポリペプチドの集合体、融合ポリペプチド、ポリペプチド断片、ポリペプチドバリエーション、又はその誘導体を指すことができる。ポリペプチドは本明細書では、完全長E P O s p及び/又はC N P s pの少なくとも4個のアミノ酸、少なくとも5個のアミノ酸、又は少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、若しくは全23個のアミノ酸の鎖長を有してもよい。本発明の他のポリペプチド、又は本明細書に記載された他のポリペプチドへの言及は、同様に理解されるべきである。

10

【0073】

ポリペプチドの「断片」は、結合剤を用いて検出され得るポリペプチドの部分配列である。該用語は、ポリペプチド、二量体若しくは他の多量体などのポリペプチドの集合体、融合ポリペプチド、ポリペプチド断片、ポリペプチドバリエーション、又はその誘導体を指すことができる。

20

【0074】

「単離された (i s o l a t e d) 」という用語は本明細書に開示されたポリペプチド配列に適用され場合、天然の細胞環境又は他の自然発生の生物学的環境から取り除かれた配列を指すのに使用される。単離された分子は、任意の方法、又は生化学的技法、組換え技法、及び合成技法を含む方法の任意の組み合わせにより得ることができる。ポリペプチド配列は、少なくとも1つの精製ステップにより調製することができる。

【0075】

「精製された (p u r i f i e d) 」という用語は本明細書で使用される場合、絶対的な純度を必要としない。「精製された」は様々な実施形態において、例えば、試料中のポリペプチドの、例えば、少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%、又は99%均一性を指す。該用語は、本明細書に記載された他の分子及びコンストラクトに関して同様に理解されるべきである。

30

【0076】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、特異的に同定された配列と異なるポリペプチド配列を指し、1~6個以上アミノ酸残基が欠失、置換、又は付加されている。1個、2個、3個、4個、5個又は6個のアミノ酸の置換、付加又は欠失が企図される。バリエーションは、自然発生の対立遺伝子バリエーション、又は非自然発生のバリエーションであってもよい。バリエーションは、同じ種由来又は他の種由来であってもよく、ホモログ、パラログ及びオルソログを包含してもよい。特定の実施形態において、本発明において有用なポリペプチドのバリエーションは、親ポリペプチドの生物学的活性と同じである、又は類似した、シグナルペプチド活性又は抗原性結合特性を含む生物学的活性を有する。ポリペプチドに関して「バリエーション」という用語は、本明細書に定義されているようなポリペプチドの全ての形態を包含する。

40

【0077】

バリエーションポリペプチド配列は、本発明の配列に対し、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくと

50

も約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% 同一性を示す。ポリペプチドに関して、同一性は、少なくとも 5 ~ 7 個のアミノ酸位置の比較ウィンドウ上で見出される。

【0078】

ポリペプチドバリエーションはまた、1つ又は複数の特異的に同定された配列に対する類似性を示す（該配列の機能等価性を保っている可能性がある）、偶然により生じたと合理的に予想することができないものを含む、ポリペプチドバリエーションも包含する。上記に論じられているように、EPOsp 及び / 又は CNPsp バリエーションの場合、機能は、シグナルポリペプチド、若しくは抗原性ポリペプチドのいずれか一方、又は両方としてであり得る。

10

【0079】

ポリペプチド配列同一性及び類似性は、以下の方法で判定することができる。対象のポリペプチド配列は、NCBI ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/](http://ftp.ncbi.nih.gov/blast/)) から公的に入手可能である、bl2seq での BLASTP (プログラムの BLAST スイッチ、バージョン 2.2.18 [2008年4月]) から) を用いて、候補ポリペプチド配列と比較される。低複雑度領域のフィルタリングが無効にされるべきであることを除いて、bl2seq のデフォルトパラメーターが利用される。

【0080】

ポリペプチド配列の類似性は、以下の UNIX コマンドラインパラメーター、すなわち、`bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp` を用いて調べることができる。パラメーター -F F は、低複雑度セクションのフィルタリングを無効にする。パラメーター -p は、ペアの配列に対する適切なアルゴリズムを選択する。このプログラムは、配列間の類似性の領域を見出し、及びこのような領域ごとに「E 値」を報告する。E 値は、ランダム配列を含有する固定参照サイズのデータベースにおいて、偶然にそのようなマッチを認めることが予想できる期待回数である。1 よりはるかに小さい低 E 値については、これはほぼ、このようなランダムマッチの確率となる。バリエーションポリペプチド配列は、特異的に同定された配列のいずれか 1 つと比べた場合、 1×10^{-5} 未満、 1×10^{-6} 未満、 1×10^{-9} 未満、 1×10^{-12} 未満、 1×10^{-15} 未満、 1×10^{-18} 未満、又は 1×10^{-21} 未満の E 値を一般に示す。ポリペプチド配列同一性はまた、グローバル配列アライメントプログラムを用いて候補ポリペプチド配列と対象ポリペプチド配列の間の重複の全長に対して計算することもできる。上記に論じられているように EMBOS - needle (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/> で入手可能) 及び GAP (Huang, X. (1994年) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227 ~ 235 頁) もまた、ポリペプチド配列同一性を計算するための適切なグローバル配列アライメントプログラムである。BLASTP の使用は、本発明によるポリペプチドバリエーションの判定で使用するのに好ましい。

20

30

40

【0081】

1 つの実施形態においてバリエーションには、ペプチドの生物学的活性に影響しない 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ又はこれを超える保存的アミノ酸置換、欠失、付加又は挿入により、配列が本明細書のヒトシグナルペプチド及び断片と異なるペプチドが含まれる。保存的置換は典型的には、1 個のアミノ酸の、類似の特性を有するもう 1 個のアミノ酸に代わる置換、例えば、以下の群、すなわち、バリン、グリシン；グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン内での置換が含まれる。保存的置換の例はまた、ヒト配列と比較して異なる哺乳動物種における置換が示された配列表に示されているような配列において見出すこともできる。他の

50

保存的置換は当技術分野で知られている。

【0082】

非保存的置換もまた使用されてもよく、例えば、1つのアミノ酸クラス（例えば、疎水性、中性親水性、酸性、塩基性、鎖配向に影響を及ぼす残基、及び芳香族性）のメンバーを他のクラスのメンバーと交換する必要があるが得る。

【0083】

他のバリエーションには、ペプチド安定性に影響を及ぼす修飾を有するペプチドが含まれる。このような類似体は、例えば、ペプチド配列において1つ又は複数の非ペプチド結合（ペプチド結合に取って代わる）を含有してもよい。同様に含まれるのは、自然発生のL-アミノ酸以外の残基、例えばD-アミノ酸又は非自然発生の合成アミノ酸、例えばベータ若しくはガンマアミノ酸及び環状類似体を含む類似体である。

10

【0084】

「対象」は本明細書で使用される場合、好ましくは哺乳動物であり、ヒト、並びにネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、シカ、マウス、ラット、霊長類（ゴリラ、アカゲザル及びチンパンジーを含む）、及び他の家畜動物又は動物園動物などのヒト以外の哺乳動物を含む。1つの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0085】

「提示（presentation）」という用語は本明細書で使用される場合、例えば、診察所、クリニック又は病院などの医療施設での医療従事者の前を含む、対象の提示を指す。しかし、提示には、本発明を使用することになる任意の人、例えば、救急車における特別救急医療士の前での対象の提示が含まれる。

20

【0086】

「治療する（treat）」、「治療（treating）」又は「治療（treatment）」及び「予防（preventing）」という用語は、心臓血管疾患、ACS、腎臓疾患及びAMI、並びに本明細書に述べられた他の障害及び状態を含む、正常な対照レベルからの偏差を示すEPOsp及び/若しくはCNPspポリペプチド又はポリペプチド断片レベルを特徴とする生物学的事象の進行を緩和する、改善する、管理する、予防する、抑える、止める又は逆行させる治療的又は予防的手段を指す。対象は、グルコース、ラクテート、インスリン、脂肪酸、トリグリセリド、TnI、TnT、BNP、N-BNP、BNP-SP、ANP、ANP-SP、クレアチンキナーゼ-MB、ミオグロビン、LDH、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、H-FABP、エンドセリン、アドレノメデュリン、レニン、アンジオテンシンII及び他のマーカーの1つ又は複数における観察可能な又は測定可能な（統計的に有意な）減少を示し得る。

30

【0087】

「質量分析」という用語は本明細書で使用される場合、質量対電荷比に基づきイオンをフィルタリング、検出、及び測定する方法を指す。例えば米国特許第5,719,060号、米国特許第6,204,500号、米国特許第6,107,623号、米国特許第6,124,137号、米国特許第6,225,047号、米国特許第6,268,144号、米国特許第7,057,165号、及び米国特許第7,045,366号参照のこと。一般的な質量分析技法には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）及び表面増強レーザー脱離イオン化（SELDI）が含まれる。両方とも、極めて短いイオンパルスでフェムトモルレベルでの分析物の分析を可能にする飛行時間分析器（MALDI-TOF及びSELDI-TOF）と併用されてもよい。

40

【0088】

本発明において有用である、例えば米国特許第5,719,600号、米国特許第6,124,137号、及び米国特許第6,225,047号で論じられているSELDIのバージョンには、表面増強親和性捕捉（SEAC）、表面増強ニート脱離（SEND）、及び表面増強感光性付着及び放出（SEPAR）が含まれる。

【0089】

本明細書に開示された一連の数（例えば1~10）への言及は、この範囲内の全ての関

50

連する数（例えば、1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9及び10）、及び同様にこの範囲内の有理数の任意の範囲（例えば2～8、1.5～5.5及び3.1～4.7）も包含すること、したがって、本明細書に明示的に開示された全ての範囲の全ての部分範囲への言及は、明示的に開示されることが意図される。これらは、具体的に意図されたものの例にすぎず、列挙された最低値と最高値の間の数字値の全ての可能性のある組み合わせは、同じように本出願に明示的に記載されていると見なされるべきである。

[詳細な説明]

【 0090 】

EPOsp及び/又はCNPsp EPOsp及び/又はCNPspの機能的役割は、小胞体における親分子の輸送の制御に限定されると長い間考えられてきた。これがひとたび達成されると、該シグナルペプチドは、次いで、細胞から決して分泌されることなく分解されると想定されてきた。^{1 2}

10

【 0091 】

本発明者らは、EPOsp及び/又はCNPsp EPOsp及び/又はCNPsp断片が生物学的試料において入手可能であり、例えば、循環中に出現することを発見した。

【 0092 】

さらに本発明者らは、EPOsp及びCNPsp並びにその断片が、例えば、一連の生物学的事象又は障害に関する循環バイオマーカーとして有用であることを発見した。

20

【 0093 】

EPOsp及び/又はCNPspの免疫反応性シグナルペプチド断片の使用及び測定は、既存の標準マーカーと比べて優れた検出及び識別能力を提供する。この点について、血中でピークレベルに達するはるかにより速い時間、及び状態に対する各マーカーの特異的性質が注目されている。後者に関して、各シグナルペプチド断片の臓器特異的位置も注目されている。故に、EPOspは腎臓から放出されるのに対し、CNPは心臓及び血管から放出される。さらに、シグナルペプチドは、既存のマーカーと比べてより短い血中半減期を有するため、より速く上昇及び下降する能力を有し、原因となっている活動性疾患を検出する。このことは、長い半減期を有し活動性疾患に迅速に反応しない血液レベルを持つ既存のマーカーに対しては言えない。

【 0094 】

1つの態様において、本発明は、循環への1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片の放出と相関する、対象における生物学的事象を予測、診断又はモニターする方法であって、

30

(a) 対象由来の生物学的試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルを測定するステップと、

(b) 1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルを、対照からの1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルと比較するステップと

を含み、

対照レベルからの測定レベルにおける偏差が生物学的事象を示す方法を提供する。

【 0095 】

生物学的事象又は障害には、1つ又は複数の急性及び慢性腎臓疾患若しくは傷害、心不全、高血圧、失神、並びに慢性心臓血管疾患、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、不安定プラーク、又は心筋梗塞並びに狭心症（不安定）、及び安定狭心症を含む急性心臓症候群若しくは障害が含まれる。

40

【 0096 】

本出願人らはまた、急性心筋梗塞（AMI）を有する患者において、EPOsp及び/又はCNPsp断片の循環濃度が、患者の症状の発症後、最初の数時間で最高となることも驚くべきことに見出した。最初の2～6時間、又は4時間で観察されたレベルは、驚くべきことに極めて高く、正常な対照集団におけるレベルより一部は1.5～5倍、一般に2～3倍高いピークに達することが多かった。

50

【0097】

要するに、1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片は、例えば、AMI、特に非ST上昇MI、及び急性心臓虚血などの急性冠症候群(ACS)、並びに本明細書で述べられているような他の障害の明瞭な初期段階マーカーとして有用である。

【0098】

これらの驚くべき知見に基づき、本出願人は、特に、例えば、障害の発症の12、10、8、6、4、2若しくは1時間以内に、又は障害の臨床的提示時に対象から採取された生物学的試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はそのバリエーション若しくは断片をスクリーニングすることは有用となることを初めて断定した。

【0099】

本発明において有用であるのは、少なくとも4個又は5個のアミノ酸長である、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPspの抗原性断片又はバリエーションである。特に有用な断片は、本明細書のシグナルペプチドのN末端(1~9)又はC末端にある。特異的抗原性ペプチドの例は、配列番号1~6に示されている。核酸分子及びペプチドは両方とも本発明の態様を形成する。

10

【0100】

本発明の特異的ポリペプチドには、本明細書に記載されているような配列番号1~6のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。同様に企図されるのは、本明細書に定義されているようなこれらのポリペプチド、又は該ポリペプチドと少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列のバリエーション及び断片である。1つの実施形態においてバリエーション又は断片は、機能的に同等のバリエーション又は断片である。すなわち、バリエーション又は断片は、抗原又はシグナルペプチドとしての機能を維持する。配列番号1~6のペプチドはいずれも、結合剤、例えば、抗体の調製に使用することができる。

20

【0101】

バリエーションポリペプチド及び断片を含むポリペプチドは、固相合成又は自動合成を用いる直接ペプチド合成などの当技術分野でよく知られているペプチド合成方法を用いて調製することができる。ポリペプチドの変異型も、アミノ酸配列をコードするDNAの部位特異的変異誘発などの合成方法を用いて作製することができる。

30

【0102】

ポリペプチド並びにそのバリエーションポリペプチド及び断片は、1つの実施形態において単離される。これらは、当技術分野でよく知られている様々な技法を用いて、天然源から、又は合成後に単離又は精製されてもよい。技術には、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、及び免疫クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されない。

【0103】

別の態様において、本発明は、対象における急性心臓症候群を予測、診断又はモニターする方法であって、対象由来の生物学的試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片のレベルを測定するステップと、前記EPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片のレベルを対照からのレベルと比較するステップとを含み、測定レベルが対照レベルより高く、及びACSを示す方法を提供する。

40

【0104】

別の態様において本発明は、対象におけるACS又は慢性腎臓疾患の治療に対する反応をモニターする方法であって、対象由来の生物学的試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片のレベルを測定するステップと、前記1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片を対照からのレベルと比較するステップとを含み、対照レベルからの、測定レベルにおける変化が治療に対する反応を示す方法を提供する。

【0105】

熟練した読者は、評価目的のため、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片レベルが、基準値又は対照値と有用に比較され得又は関連付けられ得ることを

50

理解するであろう。

【0106】

本明細書で使用される場合、対照は、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片の試料が採取され、並びに平均レベルが判定される個体又は群であってもよい。通常、個体又は群は、正常な健康な個体、又はモニターされる生物学的事象を患っていることが知られていない個体の群を含むであろう。正常な個体におけるEPOsp断片のレベルは、約14~90pmol/Lの間の範囲である(平均は約50pmol/Lである)。正常な個体におけるCNPsp断片のレベルは、約8~50pmol/Lの間の範囲であり、平均対照レベルは約21pmol/Lである。或いは、対照レベルは、以前にテストされた個体又は群からの複数の測定値に基づき評価されてもよい。

10

【0107】

試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片のレベルを測定するステップは、単一試料についての単一測定であってもよく、又は試験されている生物学的事象に応じて幾つかの試料についての反復測定であってもよいことが理解されるであろう。ACSの場合、測定は、種々の時間に採取された試料中の、例えば、EPOsp及び/若しくはCNPsp又は断片の1~20回以上の測定、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片の1~10回、1~5回、1~3回、又は2回若しくは3回測定を含んでもよい。1つの実施形態において測定は、障害又は疑われる障害の発症又は臨床的提示の最初の12、10、8、6、5、4、2時間以内、又は1時間以下以内に採取された試料についてである。上記の採取期間(sample period)外の単一又は反復測定もまた、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片のレベルが、正常な対照レベル、又は、例えば、心臓組織対照レベルまで下がるかどうかを立証するために行われてもよい。

20

【0108】

1つの実施形態において、方法は、発症又は提示の最初の1時間以内に採取された1つ又は2つの試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片のレベルを測定するステップと、これに続く発症又は提示の2~4時間以内、又は2~3時間以内に採取された1つ又は2つの試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片のレベルを測定するステップ、或いは1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp又はその断片のレベルの最初の測定を含む。

30

【0109】

上述されているように、例えば、ACS、心不全、又は腎不全の発症又は提示の最初の1~12、10、8、6、4時間以内又は2時間以下以内に測定された1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPsp断片のレベルは、正常な対照において測定されたレベルより1.5~10倍、1.5~5倍高く、通常は2~3倍高い。

【0110】

1つの実施形態において予後ツール、診断ツール又はモニターツールは、例えば、0.1~1500pmol/L、0.1~500pmol/L、1~300pmol/L、10~250又は20~150pmol/Lの範囲での、配列番号1、2、3、4、5又は6のいずれかに対応する1つ又は複数のペプチド若しくはペプチド断片(又はその非ヒト類似体若しくはバリエーション)、又は他のシグナルペプチド断片のレベルを測定するために校正される。さらに、エリスロポエチンシグナルペプチドは、約400~4000pmol/L、約400~200pmol/L、約320~520pmol/L、又は約400~420pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも5pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。アンジオテンシンシグナルペプチドは、約10~1000pmol/L、約5~500pmol/L、約1~100pmol/L、又は約0.1~10pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも0.1pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。C型ナトリウム利尿シグナルペプチドは、約50~1500pmol/L、約25~750pmol/L、約10~500pmol/L、

40

50

又は約5～150 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも2 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。エンドセリン-1シグナルペプチドは、約10～200 pmol/L、約5～100 pmol/L、約10～50 pmol/L、又は約1～20 pmol/L以下の範囲のレベルで、血漿試料を含む生物学的試料において見出すことができる。少なくとも1 pmol/Lまで低いレベルが検出可能である。

【0111】

別の実施形態において、約40～約250 pmol/L、約65～250 pmol/L、約65～200 pmol/L、約70～150、又は約70～130 pmol/Lの範囲での、試料中の1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNP s p又はその断片のレベルは、ACSを示している。

10

【0112】

上記のような生物学的試料は、1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNP s p又はその断片があり得る又は分泌され得る任意の生物学的材料であってもよい。1つの実施形態において生物学的試料は、循環生物学的試料、例えば血液、血清又は血漿である。1つの実施形態において、生物学的試料は心臓組織である。

核酸アッセイ

【0113】

1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNP s p EPOs p及び/又はCNP s p、又はその断片の存在、及び試料中の発現のレベルは、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、FISH若しくはmRNAの転写を定量するための定量的PCR、¹/²ドットブロッティング、(DNA分析)又は本明細書に提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用いたin situハイブリダイゼーションなどの当技術分野で既知の方法により判定することができる。1つの実施形態においてハイブリダイゼーションプローブは、標識されたプローブである。標識の例には、蛍光標識、化学発光標識、放射性酵素標識、及びビオチン-アビジン標識が含まれる。標識されたプローブの標識及び可視化は、上記のものなどの既知の技術方法により実施される。便宜上核酸プローブは、樹脂(ポリアクリルアミドなど)、炭水化物(セファロースなど)、プラスチック(ポリカーボネートなど)、及びラテックスビーズを含む固体担体上に固定化されてもよい。

20

【0114】

核酸発現レベルは、RT-PCR技法及びSDS-PAGEを含む電気泳動技法などの既知の技術を用いて判定することができる。これらの技術を用いて、対象試料中の本発明の核酸分子のDNA配列又はcDNA配列は増幅され、DNA又はcDNA又はRNAのレベルが測定される。代替方法においてDNA、cDNA又はRNAレベルは、増幅なしに試料中で直接測定することができる。1つの実施形態において方法は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション分析である。

30

【0115】

或いは、発現レベルは、核酸配列に特異的なプライマーを用いた逆転写ベースのPCR(RT-PCR)アッセイを用いて測定されてもよい。所望であれば、試料中の1つ又は複数のEPOs p及び/又はCNP s pポリヌクレオチドのレベルの比較は、測定されているパラメーター又は条件から発現が独立している対照核酸分子を参照して行うことができる。対照核酸分子は、レベルが障害又は移植拒絶状態と健康な状態との間で異なる分子を指す。対照分子のレベルは、比較される集団におけるレベルを正規化するのに使用されてもよい。このような対照分子の例は、GAP-DHである。本発明のEPOs p及び/又はCNP s pポリペプチド並びに断片は、生物学的事象又は障害によりレベルを変化させるであろう。

40

ペプチドアッセイ

【0116】

1つの実施形態において測定ステップは、1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNP s p、又はその断片と、1つ又は複数のEPOs p及び/若しくはCNP s p又はそ

50

の断片若しくはバリエントに結合する、例えば、選択的又は特異的に結合する結合剤の間の結合を検出するステップを含む。

【0117】

したがって、1つの実施形態において本発明は、生物学的試料中の1つ又は複数のEPOsp及び/又はCNPs p又はその断片若しくはバリエントに関するアッセイであって、任意の既知の方法を用いて試料中のこのレベルを検出及び測定するステップを含むアッセイを提供する。1つの実施形態において、生物学的試料は、ACS又は生物学的試料中の前記断片(複数可)の濃度又は量に関連する他の障害の発症から約12、10、8、6時間以内若しくは4時間以下以内、又は例えばACSの臨床的提示の約12、10、8、6時間以内若しくは4時間以下以内に対象から得られ、EPOsp及び/若しくはCNPs p又はその断片が測定される。

10

【0118】

1つの実施形態において、本発明は、
 (a) 生物学的試料由来の1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPs p EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片と結合させるステップと、
 (b) 結合されたEPOsp及び/若しくはCNPs p EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片、ペプチド若しくは断片のレベルを測定するステップと
 を含む、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPs p EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片に関するアッセイを提供する。

20

【0119】

1つの実施形態において、標的分子は、1つ又は複数の配列番号1~6又はそのバリエント若しくは断片である。

【0120】

1つの実施形態において、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片は、結合剤を用いて結合される。結合剤は、選択的(特異的)結合剤であり得る。すなわち、結合剤は、生物学的事象の他のマーカー、及びより詳細にはグレリンとの低い交差反応性を有する。結合剤は1つの実施形態において、抗体又は抗体の抗原結合断片を含む分子である。抗体がアッセイで使用される場合、抗体が生物学的試料、好ましくは断片の存在が細胞からの排出を示す試料において見出される断片と結合する限り、抗体は、N末端又はC末端内を含む、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片のいずれの抗原性部分に対して産生されてもよい。1つの実施形態において抗体は、任意の1つ又は複数の配列番号1~6又はそのバリエント若しくは断片によるペプチドに対して産生される。

30

【0121】

本発明はまた、例えば、抗体及び抗体の抗原結合断片を含む結合剤、並びに結合剤の使用にも関する。アッセイに若しくはアッセイの製造に含まれる、又は予後ツール、診断ツール又はモニターツールとしての使用が、使用のための説明書を含む関連するキットと同様に、本明細書に記載されているように提供される。

【0122】

結合剤、例えば、抗体は、単離又は精製された形態にあってもよい。1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片若しくはバリエントに結合する抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びキメラ抗体の全てのクラス、並びに他の抗原結合コンストラクトを含む任意の形態にあってもよい。同様に含まれるのは、マウス、ラット又はウサギなどの動物を免疫化して得られる抗血清である。抗体は、断片の一群における共通の配列、又は特異的なEPOsp及び/若しくはCNPs p断片、又はさらに断片のセットに結合することができる。

40

【0123】

抗体の断片又は修飾抗体は、これが、所望のシグナルペプチド又はその断片若しくはバリエントと結合する限り、使用されてもよい。抗原結合断片は、例えば、Fab、F(ab'), Fv断片又はH鎖及びL鎖からのFv断片が適切なリンカーによ

50

リライゲートされる一本鎖 F v (s c F v) であってもよい。 ^{1 3}

【 0 1 2 4 】

抗体を調製し、並びに抗体を検出、修飾及び単離する方法は、当技術分野でよく知られている。 ^{1 4} , ^{1 5} , ^{1 6} 1つの実施形態において、使用される抗体は、適切な宿主哺乳動物を免疫して作製される。1つ又は複数の E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片を含む融合タンパク質も、免疫原として使用することができる。

【 0 1 2 5 】

抗体又は抗原結合部位を含む他の分子などの結合剤は、本明細書に論じられているようなポリエチレングリコール (P E G)、ビオチン、ストレプトアビジン、及び化学発光、蛍光、熱量測定標識、及び放射性免疫測定標識などの様々な分子とのコンジュゲーションにより修飾されてもよい。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾して得ることができる。これらの修飾方法は、当分野で従来のものである。

【 0 1 2 6 】

手短には、ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に知られている。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤及び所望であればアジュバントの1回又は複数回の注射により哺乳動物において産生することができる。典型的には、免疫剤及び / 又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射により哺乳動物に注射されるであろう。免疫剤は、1つ又は複数の E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片若しくはバリエーション、又はその融合タンパク質を含むことができる。免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫剤をコンジュゲートすることは、有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例には、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、ウシチログロブリン、及び大豆トリプシンインヒビターが含まれるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及び M P L T D M アジュバント (モノホスホリル脂質 A、合成トレハロースジコリノミコラート) が含まれる。免疫プロトコルは、過度の実験なしに当業者により選択され得る。

【 0 1 2 7 】

モノクローナル抗体は、当技術分野でよく知られているハイブリドーマ方法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ細胞は、適切な培地において培養されてもよく、或いは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物において腹水として *i n v i v o* で増殖されてもよい。好ましい不死化細胞株は、例えば、アメリカ培養細胞系統保存機関 (バージニア、U S A) から得ることができるマウス骨髄腫系である。免疫アッセイは、目的とする抗体を分泌する不死化細胞株をスクリーニングするのに使用することができる。1つ又は複数の E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片若しくはバリエーションは、スクリーニングで使用され得る。

【 0 1 2 8 】

したがって、同様に本明細書で企図されるのは、E P O s p 及び / 又は C N P s p 断片特異的モノクローナル抗体を分泌することができる不死化細胞株であるハイブリドーマである。

【 0 1 2 9 】

ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を確立するためのよく知られている手段には、免疫沈降、ラジオリンクド免疫アッセイ (*r a d i o l i n k e d i m m u n o a s s a y*) (R I A)、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 及びウェスタンブロットが含まれる。例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スキャッチャード分析により判定することができる。 ^{1 4} 免疫された動物由来の試料は、ポリクローナル抗体の存在について同様にスクリーニングすることができる。

【 0 1 3 0 】

モノクローナル抗体及び他の抗原結合コンストラクトはまた、組換え宿主細胞から得ることもできる。抗体又は抗原結合コンストラクトをコードする D N A は、ハイブリドーマ細胞株から得ることができる。D N A は、次いで、発現ベクターに入れられ、宿主細胞 (

10

20

30

40

50

例えば、COS細胞、CHO細胞、大腸菌(E. coli)細胞)にトランスフェクトされ、抗体又は抗原結合コンストラクトが宿主細胞で産生される。抗体は、次いで、標準的技法を用いて単離及び/又は精製することができる。

【0131】

検出を容易にするため、本明細書での抗体及び断片は、例えば、蛍光化合物、生物発光化合物、及び化学発光化合物、並びに放射性同位体、磁気ビーズ、及び親和性標識(例えば、ビオチン及びアビジン)などの検出可能なマーカーで標識されてもよい。結合の間接的な測定を可能にする標識の例には、基質が着色蛍光生成物を提供できる酵素が含まれ、適切な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が含まれる。蛍光色素(例えば、テキサスレッド、フルオレスセイン、フィコビリタンパク質、及びフィコエリスリン)は、蛍光活性化細胞選別装置と共に使用することができる。標識技法は、当技術分野でよく知られている。

10

【0132】

例えば、細胞により分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、逆相HPLC、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又は親和性クロマトグラフィーなどの従来免疫グロブリン精製手順により、培地又は腹水から単離又は精製することができる。

【0133】

1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp、又はその断片の結合は、特異的(抗体ベースの)及び非特異的(HPLC固相などの)手段を含む、当技術分野で既知の任意の手段により検出することができる。最も一般に、抗体は、上述されているようなELISA又はRIAなどのアッセイを用いて検出される。単独の又はクロマトグラフィーフォーマットなどの非特異的結合剤との併用で、競合的結合アッセイ、サンドイッチアッセイ、非競合的アッセイ、蛍光免疫アッセイ、免疫蛍光アッセイ、若しくは免疫放射線測定アッセイ、発光アッセイ、化学発光アッセイ、及び表面増強レーザー脱離及びイオン化(SELDI)、エレクトロスプレーイオン化(ESI)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(FTICR)などの質量分光分析も実現可能である。

20

【0134】

好都合には、抗体は、ポリペプチド/抗体複合体の洗浄及び単離を容易にするために固体基質に固定することができる。固体担体への抗体の結合は、既知の技術技法を用いて達成することができる。抗体に有用な固体基質には、ガラス、ナイロン、紙、及びプラスチックが含まれる。同様に、1つ又は複数のEPOsp及び/若しくはCNPsp、又はその断片は、イオン交換、逆相(例えばC18コーティング)又は他の材料で場合により被覆された又は誘導体化された吸着シリカ、又は樹脂粒子、又はシリコンチップなどの固体基質上に吸着することができる。基質は、ビーズ、プレート、チューブ、スティック又はバイオチップの形態にあってもよい。バイオチップの例には、Ciphergen, Proteinチップアレイ(Ciphergen Biosystems(CA, USA))、及びPerkin Elmer、USAから入手可能なPackardBioチップが含まれる。バイオチップには、クロマトグラフィー表面が含まれてもよい。アドレス指定可能な位置を有するバイオチップ又はプレート、及びディスクリート(discreet)なマイクロタイプレートは特に有用である。同様に使用に好ましいのは、複数の分析物に対する抗体を含有するビーズが単一試料中の分析物のレベルを測定するのに使用される多重システムである。測定される分析物は、他のマーカー、例えば、心臓マーカー、並びにEPOsp及び/若しくはCNPsp、又はそのバリエーション若しくは断片を含んでもよい。本明細書での使用に適切な多重ビーズシステムの一例は、Luminex Fluorokine Multianalyte Profilingシステムである。

30

40

【0135】

抗体アッセイ方法は、当技術分野でよく知られている(例えば米国特許第5,221,685号、米国特許第5,310,687号、米国特許第5,480,792号、米国特

50

許第5, 525, 524号、米国特許第5, 679, 526号、米国特許第5, 824, 799号、米国特許第5, 851, 776号、米国特許第5, 885, 527号、米国特許第5, 922, 615号、米国特許第5, 939, 272号、米国特許第5, 647, 124号、米国特許第5, 985, 579号、米国特許第6, 019, 944号、米国特許第6, 113, 855号、米国特許第6, 143, 576号、並びに非標識アッセイに関しては米国特許第5, 955, 377号及び米国特許第5, 631, 171号を参照のこと)。本明細書に引用された文献の全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0136】

免疫アッセイ分析器もまた、よく知られており、及び十分に記載されている中でも Beckman Access、Abbott AxSym、Roche Elecsys / Cobas and Dade Behring Status システムが含まれる。

10

【0137】

1つ又は複数の EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又はその断片、並びに複合体を形成する抗体の結合は、直接的又は間接的に検出することができる。直接的検出は、蛍光、発光、放射性核種、金属、色素等などの標識を用いて実施される。間接的検出は、ジゴキシンなどの検出可能な標識、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどの酵素と結合して標識抗体を形成するステップと、これに続く、検出試薬の添加により標識を検出するステップを含む。

【0138】

例えば西洋ワサビペルオキシダーゼは、吸光度が測定され得る着色生成物を生成するための o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド (Phenylenediamine Dihydrochloride) (OPD) 及び過酸化物などの基質と共に、又は当技術分野で知られているようにルミノメーターで測定することができる化学発光を得るためのルミノール及び過酸化物と共にインキュベートすることができる。ピオチン又はジゴキシンは、これらに強く結合する結合剤と反応することができる。例えば、タンパク質アビジン及びストレプトアビジンは、ピオチンに強く結合するであろう。さらなる測定可能な標識は、次いで、タンパク質との直接反応により、又は MCS 及びカルボジイミドなどの一般に入手可能な架橋剤の使用を通じて、若しくはキレート剤の添加により、タンパク質に共有結合され又は連結される。

20

30

【0139】

一般に、複合体は、例えば遠心分離により、複合体を形成していない試薬から分離される。抗体が標識されていれば、複合体の量は、検出された標識の量により反映されるであろう。或いは、1つ又は複数の EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又はその断片は、抗体への結合により標識されてもよく、及び抗体標識ポリペプチドが、標識されていない1つ又は複数の EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又はその断片を含有する生物学的試料と共にインキュベートされる場合、結合された標識ポリペプチドの減少を測定して、競合的アッセイにおいて検出されてもよい。他の免疫アッセイ、例えば、サンドイッチアッセイが使用されてもよい。

【0140】

1つの実施形態において、通常 4 で一晩 18 ~ 25 時間、又は 25 ~ 40 で 1 ~ 2 ~ 4 時間、抗体と接触した後、結合剤 (抗体) に結合された標識 EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又はその断片は、結合されていない標識 EPOsp 及び / 若しくは CNPsp、又はその断片から分離される。液相アッセイにおいて、分離は、セルロース又は磁性材料などの固相粒子に結合された抗ガンマグロブリン抗体 (二次抗体) の添加により達成することができる。二次抗体は、一次抗体に使用されるのと異なる種において産生され、及び一次抗体と結合する。したがって、全ての一次抗体は、二次抗体を介して固相に結合される。この複合体は、遠心分離又は磁力により溶液から取り除かれ、結合された標識ペプチドが、これに結合された標識を用いて測定される。遊離標識から結合された (bound) を分離する他の選択肢は、溶液から沈降する免疫複合体の形成、ポリエチレン

40

50

グリコールによる抗体の沈降又は木炭への遊離標識ペプチドの結合、及び濾過 (f i l t r a t i o n) の遠心分離による溶液からの除去を含む。分離された結合相又は遊離相中の標識は、上記に示されたものなどの適切な方法により測定される。

【 0 1 4 1 】

競合的結合アッセイは、行うのがより容易な、したがって上記のものに好ましい固相アッセイとしても構成され得る。この型のアッセイは、ウェルを有するプレート (一般に E L I S A 又は免疫アッセイプレートとして知られる)、固体ビーズ又はチューブの表面を使用する。一次抗体は、プレートの表面、ビーズの表面若しくはチューブの表面に吸着され又は共有結合される、又はプレートに吸着され若しくは共有結合された二次抗ガンマグロブリン抗体若しくは抗 F c 領域抗体を通じて間接的に結合されるかのいずれかである。試料及び標識ペプチド (上記のような) は、一緒に又は連続してプレートに添加され、試料中の E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片と標識ペプチドとの間の抗体結合をめぐる競合を可能にする条件下でインキュベートされる。結合されていない標識ペプチドは、この後吸引除去することができ、プレートは、抗体結合標識ペプチドをプレートに付着させたまますぐことができる。標識ペプチドは、次いで上記の技法を用いて測定することができる。

10

【 0 1 4 2 】

サンドイッチ型アッセイは、より大きな特異性、スピード及びより大きな測定範囲を有する。この型のアッセイにおいて E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片に対する過剰な一次抗体は、固相競合結合アッセイに関して上記に記載のように吸着、共有結合、又は抗 F c 抗体若しくは抗ガンマグロブリン抗体を介して、E L I S A プレート、ビーズ又はチューブのウェルに付着される。試料液体又は抽出物は、固相に付着された抗体と接触される。抗体が過剰であるため、この結合反応は通常、迅速である。E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片に対する二次抗体も、一次抗体と同時に又は連続して試料と共にインキュベートされる。この二次抗体は、一次抗体の結合部位と異なる、E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片上の部位に結合するように選択される。これらの2つの抗体反応は、2つの抗体の間に挟まれた試料由来の E P O s p 及び / 若しくは C N P s p、又はその断片のサンドイッチをもたらす。二次抗体は、競合的結合アッセイに関して上記に詳述されているように、容易に測定可能な化合物で通常標識される。或いは、二次抗体に特異的に結合する標識三次抗体が、試料と接触されてもよい。結合されていない材料を洗い流した後、結合標識抗体は、競合的結合アッセイに関して概説された方法により測定及び定量化することができる。

20

30

【 0 1 4 3 】

ディップスティック型アッセイもまた使用されてもよい。これらのアッセイは、当技術分野でよく知られている。該アッセイは、例えば、特異的抗体が付着した金粒子又は着色ラテックス粒子などの小さい粒子を使用し得る。測定される液体試料は、粒子を予め添加された膜ストリップ又は紙ストリップの一端に添加され得、ストリップに沿って移動するままにされ得る。粒子への試料中の抗原の結合は、ストリップにさらに沿って、抗原又は抗体などの、粒子に対する結合剤を含有する捕捉部位に結合する粒子の能力を改変する。これらの部位での着色粒子の蓄積は、色の発生をもたらす、これは、試料中の競合抗原の濃度に依存する。他のディップスティック方法は、試料中の抗原を捕捉するために紙ストリップ又は膜ストリップに共有結合された抗体を使用してもよい。西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素に結合された二次抗体、及び色、蛍光又は化学発光の光出力を生じさせるための基質とのインキュベーションを使用するこの後の反応は、試料中の抗原の定量を可能にするであろう。

40

【 0 1 4 4 】

以下の例で論じられているように、1つの実施形態において放射免疫アッセイ (R I A) は、使用される実験室技法である。ある R I A において、放射性標識抗原及び非標識抗原が、抗体との競合的結合で使用される。一般的な放射性標識には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 及び ^{14}C が含まれる。

50

【0145】

特異的抗体及び放射性標識抗体結合タンパク質による、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片の沈降を伴う放射免疫アッセイは、試料中のEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片の量に比例する沈降物中の標識抗体の量を測定することができる。或いは、標識EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片が作製され、及び非標識抗体結合タンパク質が使用される。テストされる生物学的試料が、次いで添加される。標識EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片からのカウントの減少は、試料中のEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片の量に比例する。

【0146】

RIAにおいて、遊離EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片から結合EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片を分離することも実現可能である。これは、二次抗体でペプチド/抗体複合体を沈降させることを伴い得る。例えば、ペプチド/抗体複合体がウサギ抗体を含有する場合、次いでロバ抗ウサギ抗体が複合体を沈降させるのに使用され得、及び標識の量がカウントされ得る。例えばLKB、Gamma master counterにおいて。⁹

10

【0147】

本発明の方法は、腎臓疾患、心臓血管疾患等の1つ又は複数の他のマーカーのレベルを測定するステップをさらに含む。他のマーカー(複数可)のレベルは、対照集団からの平均対照レベルと比較することができる。平均対照レベルからの、測定レベルにおける偏差は、急性若しくは慢性腎臓疾患、急性若しくは慢性心臓血管疾患等の予測若しくは診断となり、又は急性若しくは慢性腎臓疾患、急性若しくは慢性心臓血管疾患等に対する素因である。

20

【0148】

本発明の方法は、急性冠症候群(例えば、AMI及び狭心症)、心不全、アテローム性動脈硬化を含む血管疾患、及び慢性腎臓疾患を示す、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片のより高いレベル、或いはEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片のレベルの上昇に関して記載されている。対照レベルを上回る又は下回る偏差を測定することも企図される。

【0149】

他のマーカーには、トロポニンT、トロポニンI、クレアチンキナーゼ-MB、ミオグロビン、BNP、NT-BNP、BNP-SP、ANP、ANP-SP、LDH、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、H-FABP、エンドセリン、アドレノメデュリン、レニン及びアンジオテンシンIIが含まれる。これらのマーカーは全て、心臓機能障害又は心臓疾患に関連している。このようなアッセイを行うためのキット及び試薬は、幾つかの供給者から市販されている。他のマーカーとのEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片のレベルの関連づけは、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片の予測値、診断値又はモニター値を増大させることができる。ACSの場合、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又は断片マーカーレベルを既知の心臓マーカーと組み合わせることは、患者転帰の予測値又は診断値を増大させることができる。

30

【0150】

幾つかのペプチドマーカーの分析は、単一のテスト試料を用いて同時に又は個別に実施することができる。同時の2部位又は複数部位フォーマットアッセイが好ましい。多重ビーズ、マイクロアッセイ又はバイオチップシステムは、特に有用である。ビーズ、アッセイ又はチップは、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片を含む1つ又は複数のマーカーに対する抗体を含む、幾つかのディスクリートの、多くの場合アドレス指定可能な位置を有し得る。1つ又は複数のマーカーには、1つを超えるEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片マーカーが含まれる。例えば、N末端及びC末端に関してEPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片をアッセイし、アッセイ結果を組み合わせることは有用であり得る。多くの他のこのようなマーカーの組み合わせが実現可能である。米国特許出願公開第2005/0064511号及び米国特許第6,019,

40

50

944号は、本発明において有用なマイクロアレイ、チップ、キャピラリー装置、及び技法の記載を提供している。Lumindexは、本発明において有用な多重ビーズシステムを提供する。個別アッセイ又は連続アッセイと使用するのに適切な実験室分析器には、AxSym (Abbott, USA)、ElecSys (Roche)、Access (Beckman)、ADVIA CENTAUR (登録商標) (Bayer) 及びNichols Advantage (登録商標) (Nichols Institute) 免疫アッセイシステムが含まれる。

【0151】

1つの実施形態において、複数のポリペプチドの同時アッセイは、チップ又はアレイなどの単一表面で行われる。

【0152】

別の実施形態において、1つ又は複数の非EPOsp及び/若しくはCNPsp、又は断片マーカの個別アッセイが行われ、結果がEPOsp及び/若しくはCNPsp、又は断片マーカ結果と照合され又は組み合わせられる。

【0153】

対象がモニターされる場合、幾つかの生物学的試料は経時的に採取されてもよい。逐次試料採取は、マーカレベルの変化を経時的に測定できるようにする。試料採取は、事象のおよその発症時間、事象の重症度に関する情報を提供することができ、どの治療レジームが適切であり得るか、使用される治療レジームに対する反応、又は長期予後を示すことができる。分析は、救急車、診察所、臨床的提示時、入院中、外来、又は日常的な集団検診の間等などでのケアの時点で実施されてもよい。

【0154】

本発明の方法は、1つ又は複数のリスク因子(年齢、体重、身体活動性のレベル、性別、並びに肥満、糖尿病及び心臓事象などの事象の家族歴などであるが、これらに限定されない)の分析と併せて行うこともできる。テスト結果はまた、本発明の方法と併せて使用することもできる。例えば、グルコース負荷試験、ECG結果及び臨床検査。EPOsp及び/若しくはCNPsp、又はその断片の循環レベルの統計的に有意な変化は、1つ又は複数の追加のリスク因子又はテスト結果と共に、対象の状態をより正確に診断、予測又はモニターするのに使用されてもよい。

【0155】

急性心臓症候群

本出願人らは、様々なシグナルペプチド断片の濃度が、急性心臓障害と相関していることを示した(図6)。さらに、EPOsp及び/若しくはCNPsp、又はその断片(複数可)のレベルは、疑われる急性心筋梗塞(AMI)又は心臓まひを示す患者の場合、臨床的提示時に最も高い。急性心臓症候群又は障害、及び特に(心臓の筋肉すなわち心筋に瘢痕を残す心臓まひ)により引き起こされる急性心臓虚血冠状動脈疾患を示す患者は、この後の心筋梗塞(MI)を経験する又は経験しない可能性がある。MIを経験しない群は、現在の臨床技法及びマーカを用いて容易に診断することができない。本出願人らは、例えばMIに関連する心筋損傷の有用な早期及び特異的マーカを提供した。これは、有害事象による心筋損傷の早期診断を可能にし、医師が、狭心症を含む他の急性冠症候群、及び胸痛の他の原因(例えば、胃腸疾患、肺/胸膜障害等)とこのような症例を区別するのを可能にするであろう。これは、ミオグロビン、CK-MB、TnT及びTnIなどの現在の心臓バイオマーカのレベルの上昇を待ちながら現在経験されるウィンドウを大幅に短縮する。より正確な診断及び治療も、より早期に達成することができ、罹患率及び死亡率を低下させ、より良好な予後転帰をもたらすことができる。

【0156】

別の実施形態において、本発明は、心臓患者において再灌流治療をモニターする上での適用を有する。再灌流治療は一般に、経皮的冠状動脈インターベンション(例えば血管形成)及び/又は薬理的治療を含む。血行再建のための血栓溶解薬は、薬理的治療で一般に使用される。補助療法は、抗凝固及び抗血小板療法を含む。再灌流治療は、診断後で

10

20

30

40

50

きるだけすぐに使用される場合、最も有効である。診断を加速するための、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片(複数可)の分析の使用は、再灌流治療の迅速な導入を可能にする。治療の有効性も、反復試験によりモニターすることができ、治療は必要に応じて調整され得る。再灌流治療の包括的な議論については、本明細書におけるBraunwaldらを参照のこと。³

【0157】

心臓疾患

本発明の方法はまた、特に循環から採取された生物学的試料(又はこのような試料に由来する生物学的試料)において、EPOsp及び/若しくはCNPs p、又はその断片(複数可)の分析により対象における心臓疾患を診断又は予測することにも有用であり得る。

10

【0158】

血液ドーピング

アスリートが成績を違法に高めるために選択できる薬剤のスペクトルに適用される時、タンパク質及びペプチドは魅力的な選択肢を提供する。1つの態様において、本発明はこの問題に対する解決法を提供する。合成又は組換え技術により作製される場合、EPOなどのタンパク質は、循環又は組織に存在する内因性の対応物をできるだけ厳密に模倣するように作製される。これは、容易に検出されやすい分子を提供する成分の、事前又は事後どちらかの除去を必要とする。1つのこのような成分は、シグナルペプチドとして知られる分子の領域である。タンパク質の内因性産生に由来するシグナルペプチド配列は、細胞内破壊を受け、したがって循環から欠如すると考えられた。しかし、本発明者らは、新規の免疫アッセイ技術を開発して、EPOのシグナルペプチド配列はヒトの循環中に存在するだけでなく、尿(又は他の体液、組織試料等)においても測定できることを実証した。EPOシグナルペプチド配列は、完全長天然又は組換えEPOと比較して極めて短く、グリコシル化がない単純な一次及び三次構造を有し、既存のアッセイフォーマットによる測定をはるかに容易にする。ヒトEPOのシグナルペプチドに対する免疫アッセイは、本明細書に記載されており、該アッセイは、免疫反応性ヒトEPOシグナルペプチド(EPOsp)に感受性であり、20fmol/ml未満(640pg/ml未満)までの循環レベルを検出することができる。このアッセイを利用して、本発明者らは、正常なヒト血漿ではEPOsp:EPOの比を約6:1と判定した。しかし、慢性腎不全を有する患者では、この比が約10:1に上昇するのに対し、心不全を有する患者では、比は約3:1である。故に、異なる疾患状態を有する患者では、EPOsp:EPO比の反応差がある。このパラダイムを、組換えEPOの乱用による又は別の方法によるアスリートドーピングに適用すると、血漿EPOsp:EPO比は、例えば投与の急性期の間に、1:10、1:100、1:1000以下を含む1:1未満になることが予期され得る。EPOの反復投与後、EPOspの循環レベルは、内因性分泌及び排出の変化により、正常な、薬物のないレベルよりはるかに低くなるであろう。さらに、EPOspはEPO自体よりはるかに小さい分子であることから、EPOspの腎クリアランス及びこの後の尿中存在は、血漿EPOspと比較した場合、比の顕著な振幅を伴う著しい変動を示すであろう。

20

30

【0159】

キット

最も通常には、キットは、当技術分野で既知のアッセイ用に、及び特定の実施形態において、当技術分野で知られているようなRIA又はELISAアッセイ用にフォーマットされるであろう。

40

【0160】

キットはまた、本明細書に述べられた障害に対する1つ又は複数の追加のマーカーを含むこともできる。例えば、ACSの場合、追加のマーカーには、トロポニンT、トロポニンI、クレアチンキナーゼMB、ミオグロビン、ANP、BNP、BNP-SP、ANP-SP、NT-BNP、LDH、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、H-FABP、エンドセリン、アドレノメデュリン、レニン及びアンジオテンシンIIの1

50

つ又は複数が含まれ得る。1つの実施形態において、サブセットのマーカの全てがキットに含まれる。

【0161】

キットは、1つ又は複数の容器から成ってもよく、収集装置、例えば、ボトル、バッグ（静脈内輸液バッグなどの）、バイアル、シリンジ、及び試験管を含むこともできる。少なくとも1つの容器が含まれ、及び急性又は慢性腎臓疾患、急性又は慢性心臓血管疾患、ACS等などの生物学的事象の予測、診断、又はモニターに有効である生成物を有するであろう。生成物は、通常、ポリペプチド及び/若しくは結合剤、特に本発明の抗体若しくは抗原結合断片、又はこれらのいずれかを含む組成物である。好ましい実施形態において、容器上の又は容器に関連する説明書又はラベルは、組成物が生物学的事象の予測、診断、又はモニターに使用されることを示す。他の構成要素は、針、希釈剤及び緩衝液を含んでもよい。有用には、キットは、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液又はデキストロス溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む少なくとも1つの容器を含んでもよい。

10

【0162】

EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片（複数可）を選択的に結合する結合剤は、望ましくはキットに含まれる。1つの実施形態において、結合剤は、抗体、好ましくは本発明の抗体又は抗原結合断片である。アッセイ及びキットにおいて使用される抗体は、例えば、モノクローナル又はポリクローナルであってもよく、上記に論じられているように任意の哺乳動物において調製されてもよく、例えば、天然及び融合ペプチドを用いて調製された抗体断片及び抗体を含む。

20

【0163】

1つのキット実施形態において標的ペプチド検出試薬は、固体マトリックス、例えば、多孔性のストリップ又はチップ上に固定化されて、EPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片（複数可）に対する少なくとも1つの検出部位を形成する。多孔性ストリップの測定又は検出領域は、複数の検出部位を含むことができ、このような検出部位は検出試薬を含有することができる。部位は、バー、クロス若しくはドット又は他の配列で配置されてもよい。テストストリップ又はチップはまた、陰性及び/又は陽性対照のための部位も含有することができる。対照部位は、或いは、異なるストリップ又はチップ上であってもよい。異なる検出部位は、固定化核酸又は抗体の異なる量、例えば、最初の検出部位ではより高量、及び後続の部位ではより低量を含有してもよい。テスト生物学的試料を添加すると、検出可能なシグナルを示している部位の数は、試料中に存在するEPOsp及び/若しくはCNPs、又はその断片（複数可）の量の定量的指標を提供する。

30

【0164】

同様にキットに含まれるのは、試料試験を実施するための適切な構成要素（マーカー、抗体及び試薬）を有する使い捨て試験カートリッジを含む、試料分析のための装置であってもよい。装置は、好都合には試験ゾーン及びテスト結果ウィンドウを含むであろう。免疫クロマトグラフィーカートリッジは、このような装置の例である。例えば米国特許第6,399,398号、米国特許第6,235,241号及び米国特許第5,504,013号を参照のこと。

【0165】

或いは、装置は、対照レベル及び他のマーカーレベルに対する測定されたマーカーのレベルの入力、保存及び評価を可能にする電子装置であってもよい。米国特許出願公開第2006/0234315号は、このような装置の例を提供している。同様に本発明において有用であるのは、CIPHERGENのタンパク質チップ（登録商標）ソフトウェアパッケージを用いてSELDI結果を処理するのに使用することができるCIPHERGENのタンパク質チップ（登録商標）である。

40

【0166】

特許明細書、他の外部文献、又は他の情報源に対して言及が行われている本明細書において、これは一般に、本発明の特徴を論じるための背景を提供するためである。他に具体的に記載のない限り、このような外部文献への言及は、任意の管轄において、このような

50

文献、又はこのような情報源が従来技術であること、又は当技術分野における共通の一般的知識の部分を形成することを認めるものとして解釈されるべきではない。

【0167】

本発明はこれより、以下の例を参照して非限定的に例示される。

【0168】

実施例 1

方法

全てのヒトプロトコルは、Upper South Regional Ethics Committee of the Ministry of Health、ニュージーランドにより承認され、及びヘルシンキ宣言に従って行われた。

10

化学物質

【0169】

EPOsp及びCNPspに対応する合成ヒトシグナルペプチド断片は、穏やかなFmoc固相合成法を用いて合成した。^{4, 9} 全ての緩衝液試薬は、BDH(登録商標)(UK)及び/又はSigma(Mo, USA)から購入した。EPOsp(1~9)及びCNPsp(14~23)は、方向性担体結合(directional carrier coupling)のために伸展システイン(C末端又はN末端)で全て合成した。EPOsp(1~9)及びCNPsp(14~23)、チロシル含有ペプチドも、トレーサー調製のために合成した。

20

【0170】

ヒト試験

非空腹時血液試料は、Christchurch Hospital、ニュージーランドで受診した患者の以下の群から回収した。

1) 正常な健康なボランティア55人。試料をEDTA血液チューブに回収し、遠心分離し、血漿を分析まで-80で貯蔵した。

2) 急性非代償性心不全(CHF)を有する患者10人。試料を受診時、入院24~48時間後、及び退院時に採取した。

3) ST上昇心筋梗塞(STEMI)患者23人。試料を冠疾患集中治療室(0時間)への入院時に採取し、以後、入院患者として0.5、1、2、4、8、12、24及び72時間に採取し、試料を氷上でチューブに取り、+4、2700gで5分間遠心分離し、血漿を分析まで-80で貯蔵した。

30

4) 末期腎臓疾患を有する患者75人。試料を外来通院時にEDTA回収チューブに採取し、遠心分離して血漿を調製し、-80で貯蔵した。

【0171】

血漿抽出

全ての血漿試料は、以前に記載されているようにSepPakカートリッジ(Waters, USA)で抽出し、⁹乾燥させ、RIA及びHPLCの前に-20で貯蔵した。

【0172】

ホルモン濃度分析

血漿試料を、標準的な製造者プロトコルに従いルテニウム標識ビオチン化抗体を用いて、Elexsys 2010(Roche, USA)で異種免疫アッセイを用いてTn1、CK-MB、ミオグロビン及びインスリンについてアッセイした。

40

EPOsp及びCNPsp断片は、次のように特異的RIAにより測定した。

EPOsp(1~9)及びCNPsp(14~23)RIA

【0173】

循環ヒトEPOsp(1~9)及びCNPsp(14~23)ペプチドの測定のため、本発明者らは新規の及び特異的な免疫アッセイを生み出した。

【0174】

抗体生成

N末端又はC末端連結システインのどちらかを含有する各抗原性残基配列を、室温で穏

50

やかな混合によりPBS (pH 7.0) 中でマレミド (maleimide) 処理 N - e - マレイミドカプロイルオキシスクシンイミドエステル (EMCS) 誘導体化BSAに結合させた。結合ペプチドをフロイドの (2 ml) アジュバントで乳化し、1ヵ月間隔で4~5部位に2匹のヒツジに皮下注射した (合計 2 ml)。ヒツジを注射12日後に放血して、十分なレベルが得られるまで抗体価を評価した。免疫アッセイについては、EPOsp及びCNPsp免疫反応性を、1:6,000~1:45,000の最終希釈範囲内で抗血清を用いて判定した。各抗血清は、ヒトproBNP (1~13)、proBNP (1~76)、proANP (1~30)、インスリン、アンジオテンシンII、アンジオテンシン (1~7)、ウロテンシンII、CNP、グレリン、Cグレリン (52~117)、proCNP (1~15)、アドレノメデュリン (adrenomedullin)、ウロコルチンI、ウロコルチンII、BNP-SPn (1~10)、ANP-SPc (16~25)、ANP-SP (1~10)、INS-SPn (1~9)を含む、図6に示されたペプチド及び薬物との検出可能な交差反応性を有さなかった。交差反応性は、当技術分野でよく知られた標準化プロトコルに従って評価した。¹⁰

10

【0175】

ヨウ素化及びアッセイ方法

N末端又はC末端チロシン残基のどちらかを含有する各抗原性残基を、クロラミンT法を介してヨウ素化し、逆相HPLC (RP-HPLC) で精製した。この調製物からRP-HPLC後のヨウ素化トレーサー形態をテストした。全ての試料、標準物、放射性トレーサー及び抗血清溶液を、カリウムベースのアッセイ緩衝液に希釈した。^{4,9} 各アッセイインキュベートは、100µL試料又は標準物 (適切な合成抗原性ペプチド配列) 及び100µL特異的抗原抗血清から成り、該インキュベートをボルテックスし、4で24時間インキュベートした。100µLのトレーサー (4000~5000cpm) を次いで添加し、4で24時間さらにインキュベートした。遊離及び結合免疫反応性は、固相二次抗体法 (ロバ抗ヒツジSac-Cel (登録商標)、IDS Ltd、英国) により最終的に分離し、Gammamasterカウンター (LKB、ウプサラ、スウェーデン) でカウントした。

20

【0176】

統計分析

全ての結果は、平均±SEMとして示す。経時的データを、反復測定と、これに続く最小有意差事後試験のため二元ANOVAを用いて分析した。血漿ホルモン濃度の相関分析は、一般線形回帰モデルを用いて実施した。全ての分析において、P値<0.05は有意と見なした。

30

【0177】

結果

健康なヒトにおけるEPOsp及びCNPsp断片について測定したそれぞれの静脈血漿濃度 (pmol/L) は、以下である。

EPOsp断片 49.9±3.7

CNPsp断片 20.7±3.1

【0178】

健康なヒトにおいて、血中EPOsp及びCNPspの濃度は、BMIとの有意な相関を示さない。EPOsp及びCNPsp断片がヒト血漿中に存在することを立証したことから、本発明者らは次いで、文書に記録されたAMIを有する患者における免疫反応性EPOsp及びCNPspの連続濃度を測定した。免疫反応性EPOsp及びCNPspの最高濃度は、入院数時間後に観察され、約8時間かけて安定なレベルにゆっくり下がった。重要には、平均ピークEPOsp及びCNPsp断片レベルは、正常な健康なボランティアにおけるレベルより2~3倍高かった (範囲2~5倍高い)。ミオグロビンのピーク濃度は入院1~2時間後に生じたのに対し、ピークTnI及びCK-MBレベルは入院8~12時間後まで達しなかった。

40

【0179】

50

実施例 2

臨床的に安定な疑われるACSを有する患者8人にカテーテルを挿入し、血液試料を複数の臓器部位から採取した。これらは、大腿動脈FA(1)及びFA(2)大腿静脈(FV)、腎静脈(RV)、肝静脈(HV)、下大静脈(IVC)、頸静脈(JUG)、心臓冠状静脈洞静脈(CS)及び肺動脈(PA)であった。血液は、冷却したEDTAチューブに回収し、遠心分離により血漿から調製し、血漿を免疫反応性EPOsp及びCNPspRIAに提出した。図2は、免疫反応性CNPsp濃度の最も高い部位が、心臓、特に心室を流れる静脈、CSであることを明白に示している。これは、心臓が免疫反応性CNPsp(例えば、CNPsp断片)を分泌し得るという証拠である。特にEPOsp断片の形態での免疫反応性EPOspもまた分泌され得る。

10

【0180】

実施例 3

急性非代償性心不全を有する患者10人、及び慢性腎不全を有する患者75人からの血漿抽出物を、特異的EPOsp及びEPO免疫アッセイに供した。上段パネル：慢性腎不全を有する患者10人における推定糸球体濾過率(eGFR)。eGFRと血漿EPOspとの間に統計的に有意な陰性関係がある。中段パネル：正常な健康な個体、慢性腎不全を有する患者、及び非代償性急性心不全を有する患者における血漿EPOsp濃度。EPOspの血漿濃度は、慢性腎不全及び心不全を有する患者で有意に上昇する。下段パネル：正常な健康状態、慢性腎不全及び急性心不全におけるEPOsp/EPOの比。正常な健康状態における比が約6:1であるのに対し、慢性腎不全において比は、約10:1に有意に増加する(正常と比較して)。対照的に、急性心不全において、EPOsp対EPOの比は、約3:1に有意に減少する(正常と比較して)。

20

【0181】

結論

臨床的に安定な患者における循環EPOsp及びCNPsp濃度は、心臓源に由来する可能性がある。著しい心臓分泌は、心臓ホルモンであるEPOsp及びCNPspと一致している。

【0182】

考察

この証拠は、ACSを呈する患者の2時間以内、又はACSの発症の2時間以内に循環中及び細胞外空間に存在するとしてEPOsp及びCNPsp断片を文書に記録する最初のものである。本発明者らは、最初の例において、血中の免疫反応性EPOsp及びCNPspの測定が、急性心臓虚血及び/又はこの後の傷害の迅速なバイオマーカーとしての可能性を有すること、並びに第2の例において、事象後の免疫反応性EPOsp及びCNPspの測定が、長期の予後及び転帰のマーカーとして潜在的メリットを有することを示す。

30

【0183】

本発明者らはまた、免疫反応性EPOsp及びCNPspの測定が、急性又は慢性腎臓疾患での潜在的な使用を有し、及び急性又は慢性腎機能/機能障害のバイオマーカーとして作用する可能性を有することも示す。

40

【0184】

当業者は、上記の記載は例証として提供されること、本発明はこれらに限定されないことを当然理解するであろう。

【0185】

引用された文献

1. Universal definition of myocardial infarction. Consensus statement from the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Taskforce for the redefinition of myocardial infarction. *Circulation* 2007 116:2634-2653.
2. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for standardisation of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: analytic

50

- al issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007 115:e352-e355.
3. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Acute myocardial infarction Chp. 35 *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, 6th ed. 2001. pgs. 1114-1231.
 4. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998 97:1921-1929.
 5. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J. Am. Coll. Cardiology* 2002 40:437-445. 10
 6. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002 106:2913-2918.
 7. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekheter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II *Circulation* 2003 108: 1772-1778. 20
 8. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008 52:1527-1539.
 9. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin. Endocrinol.* 1997 47:287-296. 30
 10. *The Immunoassay Handbook*. 3rd edition, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.
 11. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998 391:795-799.
 12. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980 77:5201-5205.
 13. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai J, Novotny J, Margolies R, Ridge R, Bruccoleri E, Haber R, Crea. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988 85:5879-5883. 40
 14. Harbour E, Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988 Cold Spring Harbour Press New York.
 15. Kohler G, Milstein C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 1975 256: 495-497.
 16. Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: grafting an antibody activity. *Science* 1988 239: 1534-1536.

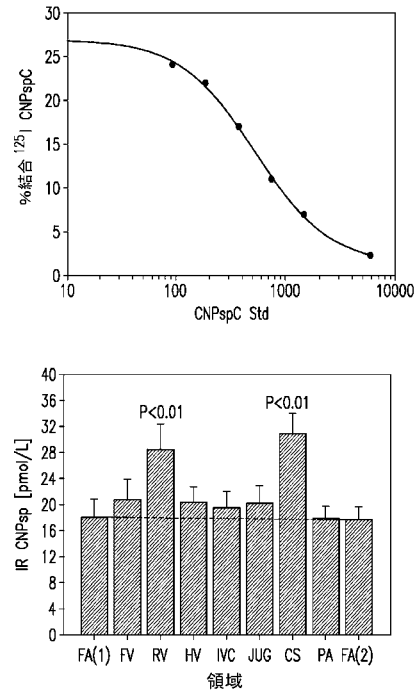
このリスト、及び特許明細書を含む本明細書全体にわたる全ての引用された文献は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【 図 1 】

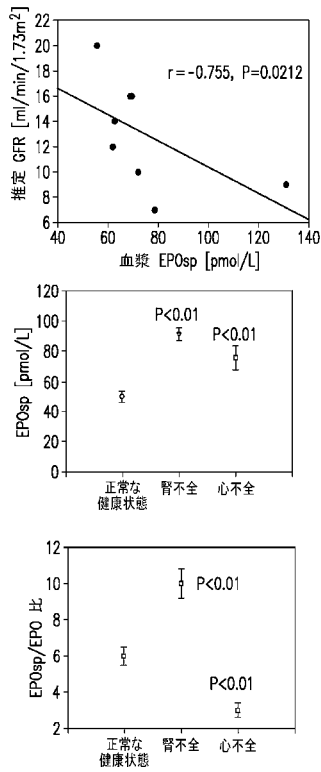
EPO及びCNPシグナルペプチドの配列
(1文字アミノ酸表記)

EPO MGVHECPAHLWLLLSLLSLPLGLPLVLG
CNP MHLSQLLACALLLTLLSLRPSEA

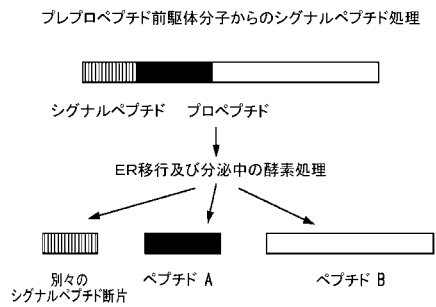
【 図 2 】



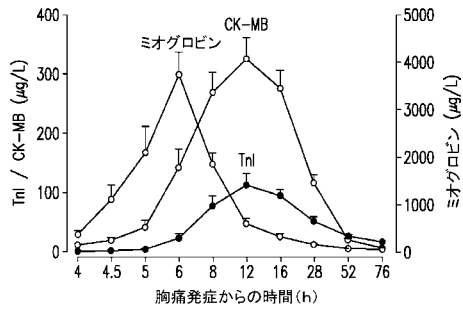
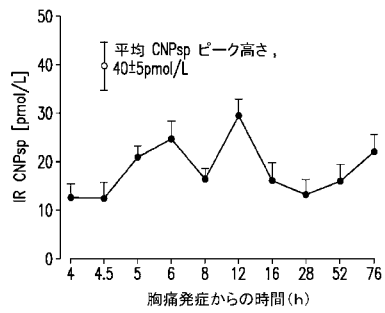
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

EPOsp 及び CNPsp 抗血清に関するペプチド交差反応性データ (%)

proBNP(1-13)	<0.003
proBNP(1-76)	<0.01
proANP(1-30)	<0.009
インスリン	<0.003
IGF-I	<0.002
IGF-II	<0.006
ANP	<0.008
BNP	<0.009
エンドセリン 1	<0.006
アンジオテンシン II	<0.003
アンジオテンシン(1-7)	<0.01
ウロテンシン II	<0.003
CNP	<0.006
グレリン	<0.007
C-グレリン	<0.01
proCNP(1-15)	<0.008
アドレノメデュリン	<0.01
ウロコルチン I	<0.01
ウロコルチン II	<0.01
BNP-SPn(1-10)	<0.001
ANP-SPc(16-25)	<0.001
ANP-SPn(1-10)	<0.001
INS-SPn(1-9)	<0.001
グレリン-SP(1-9)	<0.002
クロピジグレル (Clopidigrel)	0
モルヒネ	0
アスピリン	0

【 配 列 表 】

2013532820000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/44586
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/00; C12P 21/08 (2012.01) USPC - 530/387.1 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) IPC(8): C07K 14/00; C12P 21/08 (2012.01) USPC: 530/387.1 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) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google Scholar; esp@cenet; GenCore 6.3: erythropoietin, EPO, biomarker, monoclonal, chimeric, polyclonal, humanized, antibody, variant, fragment, Otago, Pemberton, biomarker, SEQ ID NO: 1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/0244904 A1 (NG) 3 November 2005 (03.11.2005), para [0002], [0006], [0035], [0046], [0054], [0058], [0059].	1, 3-6
Y	US 2004/0157293 A1 (EVANS et al.) 12 August 2004 (12.08.2004), abstract; para [0063], [0089], [0137], SEQ ID NO: 226	1, 3-6
Y	US 20080312179 A1 (PECKER) 18 December 2008 (18.12.2008) abstract; para [0099]	1, 3-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "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 15 March 2012 (15.03.2012)		Date of mailing of the international search report 27 MAR 2012
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/44586

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 7
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1-6, directed to an isolated binding agent selected from the group consisting of binding agents to SEQ ID NOs: 1-6; wherein the first invention is limited to an agent that binds SEQ ID NO: 1 (applicants may opt for the additional sequences to be searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each elected sequence). (Therefore the first invention is limited to claims 1 and 3-6).

Groups II+: claims 8-14, directed to an isolated peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3, 5 and 6; wherein the first invention is limited to SEQ ID NO: 2 (applicants may opt for the additional sequences to be searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each elected sequence).

- Please see extra sheet for continuation -

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 and 3-6: limited to SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 11/44586

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Groups III+: claims 15, 16, 19 and 21-27, directed to a method for predicting, diagnosing or monitoring a cardiac disorder in a subject, selected from the group consisting of acute coronary syndromes including AMI and angina, heart failure, vulnerable plaque and vascular disease including atherosclerosis, the method comprising: a) measuring the level of EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity or an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp, or an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp fragment in a biological sample from a subject; and b) comparing the level of said EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity or said EPO.sub.sp or CNP.sub.sp peptide or fragment with the level from a control, wherein an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp level or immunoreactivity that is higher than the control level is indicative of a cardiac disorder; wherein the first invention is limited to an EPO.sub.sp immunoreactivity or level. (applicants may opt for CNP.sub.sp immunoreactivity to be searched by specifying said search, and paying an additional invention search fee).

Groups IV+: claims 17, 18 and 20-27, directed to a method for predicting, diagnosing or monitoring an acute or chronic renal disease, injury or disorder in a subject, the method comprising: a) measuring the level of EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity or an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp, or an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp fragment in a biological sample from a subject; and b) comparing the level of said EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity or said EPO.sub.sp or CNP.sub.sp peptide or fragment with the level from a control, wherein an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp level or immunoreactivity that is higher than the control level is indicative of an acute or chronic renal disease, injury or disorder; wherein the first invention is limited to an EPO.sub.sp immunoreactivity or level. (applicants may opt for CNP.sub.sp immunoreactivity to be searched by specifying said search, and paying an additional invention search fee).

Groups V+: claims 28-34, directed to the use of a binding agent for EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity, or EPO.sub.sp or CNP.sub.sp or a fragment thereof for the manufacture of a kit for an assay for assessing a biological event or disorder in a subject; wherein the first invention is limited to EPO.sub.sp immunoreactivity or EPO.sub.sp or a fragment thereof. (applicants may elect for CNP.sub.sp immunoreactivity, or CNP.sub.sp or a fragment thereof to be searched by specifying said search and paying an additional invention search fee for said search).

The inventions listed as Groups I+ - V+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups I+ is an isolated binding agent selected from the group consisting of binding agents to SEQ ID NOs: 1-8, wherein each subgroup is directed to an isolated binding agent that binds a different specific peptide - not required by the claims of any other Group. The special technical feature of the claims of Groups II+ is an isolated peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3, 5 and 6; wherein each subgroup is directed to a different isolated peptide - not required by the claims of any other Group. The special technical feature of the claims of Groups III+ is a method for predicting, diagnosing or monitoring a cardiac disorder in a subject, comprising measuring the level of an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp directly or by immunoreactivity, and comparing the level to a control; wherein each subgroup is directed to measuring a different signal peptide. The special technical feature of the Group IV+ claims is a method for predicting, diagnosing or monitoring a kidney disorder in a subject, comprising measuring the level of an EPO.sub.sp or CNP.sub.sp directly or by immunoreactivity, and comparing the level to a control; wherein each subgroup is directed to measuring a different signal peptide. The special technical feature of the Group V+ claims is the use of a binding agent for EPO.sub.sp or CNP.sub.sp immunoreactivity, or EPO.sub.sp or CNP.sub.sp or a fragment thereof for the manufacture of a kit for an assay for assessing a biological event or disorder in a subject; wherein each subgroup is directed to the use of a binding agent directed to a different signal peptide.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to signal peptides which are processed from a precursor. Groups III+ and V+ are further related to the assessment of the levels of said signal peptides or immunoreactivity thereto in relation to a cardiac condition. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2005/0244804 A1 to Ng, which specifically discloses measurement of a signal peptide sequence in bodily fluids (para [0007]), including CNP (para [0014], using antibodies specific to the signal peptides (para [0067]), and a kit therefor (abstract); wherein increased levels of CNP.sub.sp relative to controls is indicative of heart disease (para [0047], [0048]). The claims of Groups IV+ and V+ are further related to the assessment of the levels of said signal peptides or immunoreactivity thereto in relation to a kidney condition. This common technical element does not improve upon the prior art of US 2003/0083251 A1 to Westenfelder, which discloses wherein ischemic acute renal failure causes reduced expression of EPO (para [0020]). It would have been obvious to a person skilled in the art to assess the levels or immunoreactivity of at least a portion of the EPO polypeptide, including the signal peptide, as a means of assessing the levels of EPO associated with ARF to assess the occurrence or severity thereof, based on the teaching of Westenfelder. The claims of Groups I+ and II+ are related to signal peptide fragments and antibodies to said signal peptides, wherein the signal peptide may be an EPO signal peptide comprising SEQ ID NOs: 1, 2 or 3 (which does not improve upon the prior art of US 2003/0054494 A1 to DeSavauge et al., which discloses (SEQ ID NO: 2) an erythropoietin polypeptide comprising the same N-terminal sequence as applicants' SEQ ID NO: 1, as well as "An isolated CHEPO polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from 1 or about 28 to about 193 of FIG. 2 (SEQ ID NO:2), or a fragment thereof sufficient to provide a binding site for an anti-CHEPO antibody" (claim 19); wherein, based on the fact that residues from about 1 to about 28 are specifically included as a potential binding site for said antibody, it would have been obvious to a person skilled in the art to produce an antibody binding specifically to this region based on combining the teaching of Ng with that of DeSavauge. A person skilled in the art would have desired to assess the fate and potential functionality of the leader peptide of EPO, post-cleavage (see the abstract of the article entitled "Intracellular peptides as Biochemical Regulators" by Seital et al., which suggests wherein the erythropoietin leader peptide functions as a transcription factor. It should be further noted that, although SEQ ID NO: 1 includes SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3, the parent sequence includes amino acids in addition to both smaller peptides, and therefore an antibody that binds to SEQ ID NO: 1 may not bind to either SEQ ID NO: 2 or 3.) or a CNP peptide comprising SEQ ID NOs: 4, 5, or 6 (which does not improve upon the prior art of SEQ ID NO: 5 of Ng; wherein, similar to the discussion of the EPO signal peptide, above, the parent peptide includes residues beyond those in the claimed smaller peptides; therefore, an antibody which binds to the parent sequence, SEQ ID NO: 4, may not bind to either of SEQ ID NOs: 5, or 6).

Therefore, the inventions of Groups I+ to V+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

** Note: Claim 2 is withdrawn for being drawn to non-elected subject matter.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08		
C 0 7 K	14/505	(2006.01)	C 0 7 K	14/505		
C 0 7 K	14/58	(2006.01)	C 0 7 K	14/58		

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

(72)発明者 リチャーズ, アーサー, マーク
 ニュージーランド, クライストチャーチ, リッカートン, モナ ヴェール アヴェニュー
 8エー

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 DA04 DA05 FA12 LA08
 4H045 AA10 BA10 BA15 BA16 CA40 DA13 DA31 DA32 EA50

专利名称(译)	信号生物标志物		
公开(公告)号	JP2013532820A	公开(公告)日	2013-08-19
申请号	JP2013520823	申请日	2011-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	奥塔哥创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥塔哥创业有限公司		
[标]发明人	ペンバートン、クリストファー、ジョセフ リチャーズ、アーサー、マーク		
发明人	ペンバートン、クリストファー、ジョセフ リチャーズ、アーサー、マーク		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N27/62 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/505 C07K14/58		
CPC分类号	C07K16/18 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/22 C07K16/26 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/76 G01N33/74 G01N33/746 G01N2333/505 G01N2333/58 G01N2800/324 G01N2800/325 G01N2800/347 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N27/62.V C07K7/06.ZNA C07K7/08 C07K14/505 C07K14/58		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/FA12 2G041/LA08 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA13 4H045/DA31 4H045/DA32 4H045/EA50		
代理人(译)	池田 成人 山口和弘		
优先权	61/365677 2010-07-19 US		
其他公开文献	JP6087816B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

涉及C型利尿钠和促红细胞生成素信号肽和片段的诊断，以及试剂盒，用途和应用。

