

(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2015-535936

(P2015-535936A)

(43) 公表日 平成27年12月17日(2015.12.17)

(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 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2015-534991 (P2015-534991)	(71) 出願人	514122524 シュピーニングテック ゲゼルシャフト ミ ット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ヘニッヒ スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ 1 5 アー
(86) (22) 出願日	平成25年10月1日 (2013.10.1)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月1日 (2015.6.1)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/070470	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02014/053501	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		
(31) 優先権主張番号	12187051.3		
(32) 優先日	平成24年10月2日 (2012.10.2)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	13170327.4		
(32) 優先日	平成25年6月3日 (2013.6.3)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎機能の診断若しくは監視又は腎機能障害の診断方法

(57) 【要約】

本願発明は、(a) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b) 対象において腎機能障害を診断するための、又は(c) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン(PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして(a) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能とを相関させ、又は(b) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超のレベルの上昇が、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は(c) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超のレベルの上昇が、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は(d) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である、ことを含む方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( a ) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は ( b ) 対象において腎機能障害を診断するための、又は ( c ) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は ( d ) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして

( a ) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能とを相関させ、又は

( b ) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

( c ) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

( d ) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含み、ここで前記プロ エンケファリン又はその断片が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 11 を含む群から選択される、方法。

## 【請求項 2】

前記プロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルが、プロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片に対する結合剤を使用することによって決定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記結合剤が、プロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのその断片に結合する抗体、抗体断片又は非 I g スキャフォールドを含む群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の ( a ) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は ( b ) 対象において腎機能障害を診断するための、又は ( c ) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は ( d ) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン ( P E N K ) 又はその断片のアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも 1 つの結合剤を使用することによって免疫反応性分析物のレベルを決定し；そして

( a ) 対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能とを相関させ、又は

( b ) 対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

( c ) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

( d ) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと治療又は治療介入の成

10

20

30

40

50

功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含み、ここで前記プロ エンケファリン又はその断片が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 11 を含む群から選択される、方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの結合剤が、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 を含む群から選択されるアミノ酸配列内の領域に結合し、好ましくは、エンケファリンペプチド Met エンケファリン（配列番号 3）及び Leu エンケファリン（配列番号 4）に結合せず、好ましくは、配列番号 1、2、5、6、7、8、9 及び 10 を含む群から選択される配列内の領域に結合し、好ましくは、配列番号 2、5、6 及び 10 を含む群から選択される配列を有する領域に結合し、好ましくは、配列番号 6 に結合する、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記閾値が 80 pmol / L である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記プロ エンケファリンのレベルが、イムノアッセイで測定され、そして前記結合剤が、プロエンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片に結合する抗体、又は抗体断片である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8】

使用されるアッセイが、アミノ酸 133 ~ 140（L K E L L E T G（配列番号 13））及びアミノ酸 152 ~ 159（S D N E E E V S（配列番号 14））であるプロ エンケファリンの領域内の 2 つの異なる領域に結合する 2 つの結合剤を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも 4 又は 5 つのアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

アッセイが、プロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルを決定するために使用され、そしてここで、前記アッセイのアッセイ感度が、健康な対象のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を定量することができ、そして < 15 pmol / L である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記体液が、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液（c s f）及び唾液を含む群から選択されてもよい、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

年齢、BUN、NGAL、クレアチンクリアランス、クレアチニン及び A p a c h e スコアを含む群から選択される、さらに少なくとも 1 つの臨床パラメーターが決定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記プロ エンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片の決定が、1 人の患者について、2 回以上行われる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記監視が、採用される予防及び / 又は治療手段に対する前記対象の応答を評価するために行われる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記対象をリスク群に層別化するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法

。

【請求項 15】

疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルが、死又は有害事象のリスクと相関され、ここで、閾値超の上昇したレベルが、死又は有害事象の増大したリスクについての予測であり、そしてここで、前記疾患のある対象が男性である、

50

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法を行うための臨床現場即時装置であって、ここで、前記臨床現場即時装置が、アミノ酸 133 ~ 140 (L K E L L E T G (配列番号 13)) 及びアミノ酸 152 ~ 159 (S D N E E E V S (配列番号 14)) に対する少なくとも 2 つの抗体又は抗体断片を含む、装置。

【請求項 17】

前記臨床現場即時装置が、アミノ酸 133 ~ 140 (L K E L L E T G (配列番号 13)) 又はアミノ酸 152 ~ 159 (S D N E E E V S (配列番号 14)) のいずれかに対する少なくとも 2 つの抗体又は抗体断片を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法を行うためのキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明の主題は、(a) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は (b) 対象において腎機能障害を診断するための、又は (c) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全 (k i d n e y f a i l u r e)、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は (d) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

20

前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン (P E N K) 又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして

(a) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能とを相関させ、又は

(b) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

(c) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

30

(d) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含む、方法である。

【背景技術】

【0002】

Met エンケファリンは、エンケファリン前駆体 (プレ プロ エンケファリン) 由来の 5 つのアミノ酸ペプチドであり、また「オピオイド成長因子 (O G F)」とも呼ばれ、プロ エンケファリン断片と共に放出される。成熟したペプチドは、さまざまなオピオイド受容体に結合する (K o n e r u ら、2009)。エンケファリン (O G F) が、多くの生理的機能を有することを見出した。C N S において、それは、サブスタンス P 関連疼痛シグナル伝達を下方制御し、サイトカインとしての役割を果たす (P l o t n i k o f f ら、1997)。プロ エンケファリンは、抗菌作用を示すペプチドと関連する (G o u m o n ら、1998)。プロ エンケファリン及びエンケファリンは、抗腫瘍作用を示し、そしてプロアポトーシス剤として作用する (T a v i s h ら、2007、D o n a h u e ら、2011、Z a g o n ら、2009)。エンケファリンは、腎機能障害において上昇することが報告されている (S m i t h ら、1985、Z o c c a l i ら、1987、S m i t h ら、1981)。エンケファリンは、より大きいプロ エンケファリンとして産生され、そしてタンパク質分解によって、成熟したペプチドに変換される。成熟過程の間に、多くのプロ エンケファリン断片が産生され、そしてそれは、エンケフ

40

50

ァリンと一緒に放出される (Ernstら、2006)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本願発明の主題は、健康な及び疾患のある対象における腎機能及び腎機能障害及びその臨床的有用性のためのマーカーとしてのプロ エンケファリン (PENK) 又はその断片の使用である。本願発明の主題は、対象において、腎機能を診断し又は監視するための、又は対象において、腎機能障害を診断するための、又は疾患のある対象において、死又は有害事象のリスクを予測するための方法である。

【0004】

本願発明の主題は、また、疾患のある対象における、腎機能、腎機能障害の診断及び予後値のためのPENK又はその断片の予後予測能力及び診断能力の提供である。

【0005】

驚くべきことに、PENK又はその断片は、強力なそして非常に重要な腎臓、その機能、その機能障害、死又は有害事象のリスク及び治療又は治療介入の成功を予測及び監視するためのバイオマーカーであることを示した。

【0006】

本願発明の主題は、(a) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b) 対象において腎機能障害を診断するための、又は(c) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン (PENK) 又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定し；そして

(a) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能とを相関させ、又は

(b) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

(c) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

(d) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含む、方法である。

【0007】

本願発明によれば、1つの具体的な実施態様では、前記プロ エンケファリン又はその断片は、leu エンケファリン及びmet エンケファリンではない。他の具体的な実施態様では、前記プロ エンケファリン断片は、MR プロ エンケファリン (MRPENK) 又は少なくとも5つのアミノ酸を有するその断片である。

【0008】

言い換えれば、本願発明の主題は、(a) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b) 対象において腎機能障害を診断するための、又は(c) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン (PENK) のアミノ酸配列内の

10

20

30

40

50

領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって免疫反応性分析物のレベルを決定し；そして

(a) 対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能とを相関させ、又は

(b) 対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

(c) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

(d) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含む、方法である。

【0009】

本願発明によれば、1つの具体的な実施態様では、前記免疫反応性分析物は、Leu エンケファリン及びmet エンケファリンではない。他の具体的な実施態様では、前記免疫反応性分析物は、MR プロ エンケファリン(MR PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸を有するその断片である。

【0010】

これは、体液中のプロ エンケファリン(PENK)のアミノ酸配列内の領域に結合する結合剤が本願発明の方法で使用される場合、「前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン(PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルを決定すること」は、「前記対象から取得した体液中のプロ エンケファリン(PENK)のアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって免疫反応性分析物のレベルを決定すること」に相当することを意味する。1つの具体的な実施態様では、体液中のプロ エンケファリン(PENK)のアミノ酸配列内の領域に結合する、結合剤が本願発明の方法で使用される。1つの具体的な実施態様では、本願発明の方法で使用される結合剤は、体液中のLeu エンケファリン又はmet エンケファリンのアミノ酸配列内の領域に結合しない。他の本願発明の具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、MR プロ エンケファリン(MR PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸を有するその断片に結合する。

【0011】

本願明細書中で使用される場合、用語「対象(subject)」は、生きているヒト又はヒト以外の生物を意味する。本明細書中で好ましくは、対象は、ヒト対象である。対象は、他に言及しない場合、健康又は疾患があってもよい。本願発明の1つの実施態様では、前記対象は、脳卒中に罹患していない。他の実施態様では、前記対象は、急性脳卒中患者ではない。

【0012】

用語「上昇したレベル(elevated level)」は、特定の閾値レベル超のレベルを意味する。

【0013】

治療又は治療介入の成功を予測し又は監視することは、例えば、プロ エンケファリン(PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片の測定を使用する腎代替療法の成功の予測又は監視であってもよい。

【0014】

治療又は治療介入の成功を予測し又は監視することは、例えば、プロ エンケファリン(PENK)又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片の測定を使用する腎代替療法を受けた患者におけるヒアルロン酸による治療の成功の予測又は監視であってもよい。

【0015】

治療又は治療介入の成功を予測し又は監視することは、例えば、PENK又は少なくと

10

20

30

40

50

も5つのアミノ酸のその断片の測定を使用する腎代替療法及び/又は薬剤介入の前及び後に、障害のある腎機能を有する患者における腎機能の回復の予測又は監視であってもよい。

【0016】

体液は、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液(csf)及び唾液を含む群から選択されてもよい。

【0017】

プロエンケファリン又はその断片の決定は、対象における腎機能を示す。プロエンケファリン又はその断片の増加した濃度は、低下した腎機能を示す。フォローアップ測定の間、プロエンケファリン又はその断片の相対的な変化は、対象の腎機能の改善(低減したプロエンケファリン又はその断片)及び悪化(増加したプロエンケファリン又はその断片)と関連させる。

10

【0018】

プロエンケファリン又はその断片は、腎機能障害について診断し、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である。フォローアップ測定の間、プロエンケファリン又はその断片の相対的な変化は、対象の腎機能障害の改善(低減したプロエンケファリン又はその断片)及び悪化(増加したプロエンケファリン又はその断片)と関連させる。

【0019】

プロエンケファリン又はその断片は、腎機能/機能障害診断及びフォローアップ(NGAL、血中クレアチニン、クレアチニークリアランス、システインC、尿素)のための他のマーカーと比較して優れている。優位性は、より高い特異性、より高い感受性及びより良い臨床的エンドポイントに対する関連を意味する。

20

【0020】

疾患のある対象において、前記プロエンケファリン又はその断片と死又は有害事象のリスクとを関連させ、ここで特定の閾値超の上昇したレベルは、死又は有害事象の増大したリスクについての予測である。また、この態様では、プロエンケファリン又はその断片は、上記臨床マーカーよりも優れている。

【0021】

本願発明によるリスクは、RIFLE分類(Venkataraman and Kellum, 2006)に定義されるリスクと関連する。

30

【0022】

疾患のある対象は、炎症に対する免疫応答に起因する慢性腎不全、外傷、外傷患者、手術、脳卒中、急性及び慢性腎不全(renal failure)、SIRS患者、敗血症、敗血症性ショック、急性心筋梗塞及び心筋梗塞後、急性及び慢性心不全、局所及び全身細菌及びウイルス感染、自己免疫疾患、火傷患者、癌、肝臓疾患、肺疾患、シクロスポリン、アミノグリコシドを含む抗生物質、及びシスプラチンなどの抗癌剤などの腎毒素を受けた患者に起因する極めて低い血圧を併発するかもしれない減少した血流に起因する急性心不全から選択される疾患に罹患していてもよい。

40

【0023】

腎機能を補助し又は腎機能に取って代わる治療又は治療介入は、限定されないが、血液透析、腹膜透析、血液濾過及び移植を含む腎代替療法の様々な方法を含んでもよい。

【0024】

有害事象は、腎不全を含む腎機能障害、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む群から選択されてもよい(RIFLE分類、Venkataraman and Kellum, 2006)。

【0025】

本願発明の1つの実施態様では、用語「プロエンケファリンの断片(fragment of Pro Enkephalin)」が、また、Leuエンケファリン及びMetエンケファリンを含むことを理解すべきである。

50

## 【 0 0 2 6 】

本願発明の主題は、プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片のレベルが、プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片に対する、結合剤、少なくとも1つの結合剤を使用することにより決定される、方法である。本願発明の1つの実施態様では、前記結合剤は、抗体、抗体断片、又はプロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片に結合する非 I g スキャフォールドを含む群から選択される。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。具体的な実施態様では、前記結合剤は、エンケファリンペプチドMet エンケファリン(配列番号3)及びLeu エンケファリン(配列番号4)に結合しない。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号2、5、6及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の特に具体的な実施態様では、前記結合剤は、プロ エンケファリン(119~159)、中領域プロ エンケファリン断片(MRPENK)に結合する。

10

## 【 0 0 2 7 】

プロ エンケファリンは、以下の配列を有する。

## 【 0 0 2 8 】

配列番号1(プロ エンケファリン(1~243))

20

## 【 化 1 】

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL  
RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK  
KDAEEDDSLANSDDLKELLETDGNRERSHHQDGS DNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL  
EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE  
MEKRYGGF MRF

30

## 【 0 0 2 9 】

体液中で決定されてもよいプロ エンケファリンの断片は、例えば、以下の断片の群から選択されてもよい。

## 【 0 0 3 0 】

配列番号2(シンエンケファリン(Sy nen ke ph a l i n)、プロ エンケファリン1~73)

## 【 化 2 】

40

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL  
RENSKPEESHLLA

## 【 0 0 3 1 】

配列番号3(Met エンケファリン)

【化3】

YGGFM

【0032】

配列番号4 (Leu エンケファリン)

【化4】

10

YGGFL

【0033】

配列番号5 (プロ エンケファリン90~109)

【化5】

MDELYPMEPEEEANGSEILA

20

【0034】

配列番号6 (プロ エンケファリン119~159、中領域 (Mid regional) プロ エンケファリン、MRPENK)

【化6】

DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRRERSHHQDGSNDNEEEVS

【0035】

配列番号7 (Met エンケファリン Arg Gly Leu)

【化7】

30

YGGFMRGL

【0036】

配列番号8 (プロ エンケファリン172~183)

【化8】

40

SPQLEDEAKELQ

【0037】

配列番号9 (プロ エンケファリン193~203)

【化 9】

VGRPEWWMDYQ

【0038】

配列番号10 (プロ エンケファリン 213 ~ 234)

【化10】

10

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

【0039】

配列番号11 (プロ エンケファリン 213 ~ 241)

【化11】

FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGF M

20

【0040】

配列番号12 (Met エンケファリン Arg Phe)

【化12】

YGGFMRF

30

【0041】

Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むプロ エンケファリン又はその断片のレベルを決定は、Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含む、プロエンケファリン又はその断片に向けての免疫反応性が決定されることを意味してもよい。結合の領域に依存する、Leu エンケファリン及びMet エンケファリンを含むプロ エンケファリン又はその断片の決定のために使用される結合剤は、上に示した分子の1つ以上に結合してもよい。これは、当業者に明らかである。

【0042】

従って、本願発明によれば、任意の上記ペプチド及びペプチド断片のアミノ酸配列（すなわち、プロ エンケファリン（PENK）及び任意の配列番号1～12による断片）内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによる免疫反応性分析物のレベルを、前記対象から取得した体液において決定し；そして、臨床的関連の具体的な実施態様と相関させる。

40

【0043】

本願発明による方法のより具体的な実施態様では、MRPENKのレベルが決定される（配列番号6：プロ エンケファリン119～159、中領域プロ エンケファリン断片、MRPENK）。より具体的な実施態様では、MR PENKに結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって、免疫反応性分析物のレベルが決定され、そして、例えば、以下：

前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能とを相関させ、又は

50

(b) 前記免疫反応性分析物のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

(c) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

(d) 疾患のある対象において、前記免疫反応性分析物のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

のように、臨床的関連の具体的な実施態様に対する本願発明による上記実施態様と相関させる。

【0044】

あるいは、任意の上の分析物のレベルが、他の分析方法、例えば、質量分析法によって、決定されてもよい。

【0045】

本願発明の主題は、(a) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b) 対象において腎機能障害を診断するための、又は(c) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全(kidney failure)、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、以下：

前記対象から取得した体液中で、配列番号1~12のペプチド及び断片を含む群から選択されるペプチドのアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって免疫反応性分析物のレベルを決定し、そして

(a) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能とを相関させ、又は

(b) 対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと腎機能障害とを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記対象における腎機能障害についての予測又は診断である、又は

(c) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと前記有害事象のリスクとを相関させ、ここで、特定の閾値超の上昇したレベルが、前記有害事象の増大したリスクについての予測である、又は

(d) 疾患のある対象において、前記プロ エンケファリン又はその断片のレベルと治療又は治療介入の成功とを相関させる、ここで、特定の閾値未満のレベルが、治療又は治療介入の成功についての予測である

ことを含む、方法である。

【0046】

具体的な実施態様では、免疫反応性分析物のレベルは、プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片を含む群から選択されるペプチドのアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって決定される。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。具体的な実施態様では、前記結合剤は、エンケファリンペプチドMet エンケファリン(配列番号3)及びLeu エンケファリン(配列番号4)に結合しない。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号2、5、6及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の特に具体的な実施態様では、前記結合剤は、プロ エンケファリン(119~159)、中領域プロ エンケファリン断片(MRPENK)に結合する。上記結合剤は、前記対象から取得した体液中で前記ペプチドに結合する。

10

20

30

40

50

## 【0047】

本願発明の1つの実施態様では、前記結合剤は、プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片に結合する抗体、抗体断片、又は非 I g スキャフォールドを含む群から選択される。

## 【0048】

より具体的な実施態様では、反応性分析物のレベルは、前記対象から取得した体液において、プロ エンケファリン(119~159)、中領域プロ エンケファリン断片(M R P E N K)(配列番号6)のアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤を使用することによって決定される。

## 【0049】

具体的な実施態様では、プロ エンケファリン又はその断片のレベルは、プロ エンケファリン又はその断片に結合する抗体又は抗体の断片を使用するイムノアッセイで測定される。プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片を決定するために有用であり得るイムノアッセイは、実施例1で概説されるステップを含んでもよい。すべての閾値及び値は、実施例1に従って使用される試験及びキャリブレーションに対する相関について理解されなければならない。当業者は、閾値の絶対値が、使用されるキャリブレーションによって影響されるかもしれないことを理解しているであろう。これは、本願明細書中で与えられたすべての値及び閾値が、本願明細書中で使用されるキャリブレーション(実施例1)の文脈において理解されるべきであることを意味する。

## 【0050】

本願発明によれば、プロ エンケファリンに対する診断結合剤は、抗体、例えば、I g G、標準的な全長免疫グロブリン、又は、少なくとも重及び/又は軽鎖のF 可変領域を有する抗体断片、例えば、化学結合した抗体(F a b)、限定されないが、F a b ミニボディを含むF a b 断片、単鎖F a b 抗体、エピトープタグを有する一価のF a b 抗体、例えば、C H 3 領域で二量体化されたF a b V 5 S x 2 ; 二価F a b (ミニ抗体) ; 二価F a b 又は多価F a b、例えば、異種ドメインを用いて多量体化を介して形成される、例えば、d H L X ドメインの二量体化を介して、例えば、F a b d H L X F S x 2 ; F ( a b ' )、s c F x 断片、多量体化多価又は/及び多重特異性s c F v 断片、二価及び/又は二重特異性ダイアボディ、B I T E (登録商標)(二重特異性T細胞誘導(b i s p e c i f i c T · c e l l e n g a g e r))、三機能性(t r i f u n c t i o n a l)抗体、多価抗体、例えば、Gとは異なるクラス由来の ; シングルドメイン抗体、例えば、ラクダ科の動物又はフィッシュ免疫グロブリン由来のナノボディからなる群から選択される。

## 【0051】

特定の実施態様では、プロ エンケファリン又はその断片のレベルは、以下で詳細に記載されるような、プロ エンケファリン又はその断片に結合する、アダプター、非 I g スキャフォールドを含む群から選択される結合剤を使用するアッセイで測定される。

## 【0052】

プロ エンケファリン又はその断片のレベルを決定するために使用され得る結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、 $10^8 M^{-1}$ のプロ エンケファリンに対する親和定数、好ましい親和定数は、 $10^9 M^{-1}$ 超、最も好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ 超を示す。当業者は、化合物のより高い用量を適用することによってより低い親和性を補うと考えられ得、そしてこの測定が、本願発明の範囲外につながることを理解する。結合親和性は、分析サービス、例えば、B i a f f i n K a s s e l G e r m a n y (<http://www.biaffin.com/de/>)として提供されるB i a c o r e法を使用して決定されてもよい。

## 【0053】

ヒトプロ エンケファリン対照サンプルは、I C I D i a g n o s t i c s , B e r l i n , G e r m a n y (<http://www.ici-diagnostics.com/>)から入手し得る。アッセイは、また、合成(本願発明者等の実験では、本願発明者

10

20

30

40

50

等は、合成MRPENK、配列番号6を使用)又は組み換えプロ エンケファリン又はその断片によってキャリアレーションしてもよい。

【0054】

抗体に加えて、他のバイオポリマースキャフォールドが、標的分子を複雑にするために当該技術分野においてよく知られており、そして非常に標的的特異的なバイオポリマーの生成のために使用される。例は、アプタマー、スピゲルマー(spiegelmer)、アンチカリン(anticalin)及びコノトキシンである。非 Ig スキャフォールドは、タンパク質スキャフォールドであってもよく、そしてそれらは、リガンド又は抗原に結合することができる抗体模倣物として使用されてもよい。非 Ig スキャフォールドは、テトラネクチンベース非 Ig スキャフォールド(例えば、米国特許出願公開第2010/0028995号に記載)、フィブロネクチンスキャフォールド(例えば、欧州特許第1266025号に記載)、リポカリンベーススキャフォールド(例えば、国際公開第2011/154420号に記載)、ユビキチンスキャフォールド(例えば、国際公開第2011/073214号に記載)、転移(transfering)スキャフォールド(例えば、米国特許出願公開第2004/0023334号に記載)、プロテインAスキャフォールド(例えば、欧州特許第2231860号に記載)、アンキリンリピートベーススキャフォールド(例えば、国際公開第2010/060748号に記載)、微小タンパク質、好ましくは微小タンパク質形成シスチンノットスキャフォールド(欧州特許第2314308号に記載)、Fyn SH3ドメインベーススキャフォールド(例えば、国際公開第2011/023685号に記載)及びクニッツ(Kunitz)ドメインベーススキャフォールド(例えば、欧州特許第1941867号に記載)を含む群から選択されてもよい。

10

20

【0055】

腎疾患/機能不全を診断するための閾値、又は死若しくは有害事象のリスクを決定するための閾値は、上限の正常範囲(99パーセントイル、80 pmol MRPENK/L、好ましくは、100 pmol/L、より好ましくは、120 pmol/L)であってもよい。閾値の範囲は、75~130 pmol MRPENK/Lの間が有用である。

【0056】

1つの実施態様では、プロ エンケファリンのレベルは、イムノアッセイで測定され、そして結合剤は、プロ エンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片に結合する抗体又は抗体断片である。

30

【0057】

1つの具体的な実施態様では、使用されるアッセイは、アミノ酸133~140(LKELLETTG(配列番号13))及びアミノ酸152~159(SDNEEVVS(配列番号14))である、プロ エンケファリンの領域内の2つの異なる領域に結合する2つの結合剤を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【0058】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記アッセイのアッセイ感度は、健康な対象のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を定量でき、そしてそれは、<15 pmol/L、好ましくは、<10 pmol/L、及びより好ましくは、<6 pmol/Lである。

40

【0059】

本願発明の主題は、(a)対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b)対象において腎機能障害を診断するための、又は(c)疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d)治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法における、前記対象から取得された体液中の配列番号1~

50

12のペプチド及び断片を含む群から選択されるペプチドのアミノ酸配列内の領域に結合する少なくとも1つの結合剤の使用である。1つの実施態様では、前記結合剤は、プロエンケファリン又は少なくとも5つのアミノ酸のその断片に結合する、抗体、抗体断片、又は非Igスカフォールドを含む群から選択される。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。具体的な実施態様では、前記結合剤は、エンケファリンペプチドMet-エンケファリン(配列番号3)及びLeu-エンケファリン(配列番号4)に結合しない。具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号1、2、5、6、7、8、9及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の具体的な実施態様では、前記少なくとも1つの結合剤は、配列番号2、5、6及び10を含む群から選択される配列を有する領域に結合する。他の特に具体的な実施態様では、前記結合剤は、プロ-エンケファリン(119~159)、中領域プロ-エンケファリン断片(MRPENK)に結合する。

10

**【0060】**

より具体的な実施態様では、少なくとも1つの結合剤は、前記対象から取得した体液において、プロ-エンケファリン119~159、中領域プロ-エンケファリン、MRPENK(配列番号6)のアミノ酸配列内の領域に、より好ましくは、アミノ酸133~140(LKELLETTG(配列番号13))及び/又はアミノ酸152~159(SDNEEVS(配列番号14))に結合し、ここで、前記領域のそれぞれは、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

20

**【0061】**

従って、本願発明では、上記結合剤の免疫反応性のレベルは、前記対象から取得した体液において決定される。免疫反応性のレベルは、そのような分析物に対する結合剤の結合反応によって、定量的、半定量的又は定性的に決定された分析物の濃度を意味し、ここで、好ましくは、結合剤は、少なくとも $10^8 M^{-1}$ の分析物に対する結合のための親和定数を有し、そして結合剤は、抗体、抗体断片又は非IgGスカフォールドであってもよく、そして結合反応は、イムノアッセイである。

**【0062】**

PENK及びその断片、特にMRPENKを使用する本願方法は、(a)対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は(b)対象において腎機能障害を診断するための、又は(c)疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は(d)治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法のための先行技術に従って使用される方法及びバイオマーカーよりも非常に優れている。まず第一に、上記使用のためのバイオマーカーとしてのPENK及びその断片は、炎症非依存性バイオマーカーである。NGAL及びKIMなどの公知の腎バイオマーカーの大部分が炎症依存性であり、対象が、例えば、敗血症などで炎症を有する場合、NGAL又はKIMの上昇が炎症又は腎機能/機能障害のいずれかに起因してもよいので、これは重要な特徴である。従って、単一のカットオフ値(1つの(1)カットオフ値を意味する)を少なくとも使用せずに、いかなる鑑別診断も行えず、そして、調査した特定の患者集団から独立している。NGAL及びKIMについて、個々の及びすべての患者は、これらの腎臓マーカーの臨床応用をいくつかの疾患で困難にし、そして他の疾患で不可能にする前記対象の炎症状態に依存する、腎機能/機能障害のための「個々の(individual)」閾値を有する。逆に、対象の炎症状態に依存しない1つの単一の閾値は、すべての対象について本願方法に従って使用されてもよい。本願発明のこのマーカーは、上記マーカーと比較して臨床ルーチンのために適している。

30

40

**【0063】**

本願発明の方法におけるバイオマーカーとしてのPENK及びその断片、特に、MRPENKは、腎障害及び炎症を反映する、NGAL及びKIMと比較して、「実際の(re

50

a 1 ) 」腎機能を反映する。

【 0 0 6 4 】

従って、本願発明の主題は、上記ステップ及び特徴を有する、( a ) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は( b ) 対象において腎機能障害を診断するための、又は( c ) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は( d ) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であって、ここで、炎症状態非依存性閾値が使用される。

【 0 0 6 5 】

上記方法及び( a ) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は( b ) 対象において腎機能障害を診断するための、又は( c ) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は( d ) 治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法におけるバイオマーカーとしての P E N K 及びその断片の使用の他の利点は、バイオマーカーとしての P E N K 及びその断片が、腎機能、腎機能障害、有害事象のリスク、治療又は治療介入の成功のための非常に早期のバイオマーカーであることである。

【 0 0 6 6 】

クレアチニンに対する P E N K の優位性の 1 つの明確な兆候は、入院の日に重病の患者において決定されたそれぞれの濃度とかれらの 7 日間の死亡率との関連性の分析に由来し：生存者の P E N K 濃度は、非生存者と著しく異なる一方で、これは、クレアチニークリアランスのケースではない。そのような患者集団の死亡率は、腎機能の喪失によって主に引き起こされる。従って、P E N K と死亡率のクレアチニークリアランスよりも顕著なそして非常に強い関連性が、腎機能障害のマーカーとして、クレアチニンに対する P E N K の優位性を裏付ける。

【 0 0 6 7 】

本願発明の主題は、また、( a ) 対象において腎機能を診断し又は監視するための、又は( b ) 対象において腎機能障害を診断するための、又は( c ) 疾患のある対象において有害事象のリスクを予測し又は監視するための、ここで、前記有害事象は、腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害の悪化、又は腎不全、腎機能の喪失及び末期腎疾患を含む腎機能障害による死を含む群から選択される、又は( d ) 限定されないが、任意の上記実施態様に従った、血液透析、腹膜透析、血液濾過及び腎移植を含む腎代替療法の様々な方法を含む腎機能を補助し又は腎機能に取って代わる治療又は治療介入の成功を予測し又は監視するための方法であり、ここで、前記対象から取得された体液中のプロエンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルは、単独で又は他の予後予測に有用である実験又は臨床パラメーターと共に使用され、以下の選択肢：

「健康な」又は「見かけ上健康な( *apparently healthy* )」対象の集団において予め決定されたサンプルのアンサンプル中の前記対象から取得した体液中のプロエンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルの中央値との比較、

「健康な」又は「見かけ上健康な」対象の集団において予め決定されたサンプルのアンサンプル中の前記対象から取得した体液中のプロエンケファリン又は少なくとも 5 つのアミノ酸のその断片のレベルの変位値との比較、

C o x 比例ハザード分析に基づく、又はリスク指標計算、例えば、N R I ( 純再分類指標( *Net Reclassification Index* ) ) 又は I D I ( 統合判別指標( *Integrated Discrimination Index* ) ) を使用することによる計算から選択されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0068】

また、前記少なくとも1つの臨床パラメーターは、年齢、NGAL、シスタチンC、クレアチンクリアランス、クレアチニン、尿素及びApacheスコアを含む群から選択され、決定されてもよい。

## 【0069】

本願発明の1つの実施態様では、前記方法は、前記対象の機能又は機能不全又はリスクを監視するために、又は腎臓及び/又は疾患の治療経過を監視するために2回以上行われる。1つの具体的な実施態様では、前記監視は、採用される予防及び/又は治療手段に対する前記対象の応答を評価するために行う。

## 【0070】

本願発明の1つの実施態様では、本願方法は、前記対象をリスク群に層別化するために使用される。

## 【0071】

本願発明の主題は、アミノ酸133~140(LKELLEETG(配列番号13))及びアミノ酸152~159(SDNEEVVS(配列番号14))であるプロエンケファリンの領域内の2つの異なる領域に結合する2つの結合剤を含む、サンプル中のプロエンケファリン及びプロエンケファリン断片を決定するためのさらなるアッセイであり、ここで、それぞれの前記領域は、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

## 【0072】

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記アッセイの分析感度は、健康な対象のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を定量することができ、そして、 $< 15 \text{ pmol/l}$ 、好ましくは、 $< 10 \text{ pmol/l}$ 、そして最も好ましくは、 $< 6 \text{ pmol/l}$ である。

## 【0073】

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記結合剤は、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1}$ 、好ましくは、 $10^8 \text{ M}^{-1}$ のその結合パートナーに対する結合親和性を示し、好ましい親和定数は $10^9 \text{ M}^{-1}$ 未満であり、最も好ましくは、 $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 未満である。当業者は、化合物のより高い用量を適用することによってより低い親和性を補うと考えられ得、そしてこの測定が、結合親和性が上記のように決定されてもよい、本願発明の範囲外につながらないことを理解する。

## 【0074】

本願発明の1つの実施態様では、いわゆる、POC試験(臨床現場即時(point of care)試験)であってもよく、それは、完全に自動化されたアッセイ系の必要なしで、患者の近くで、1時間未満で、試験を行うことができる試験技術である。この技術の1つの例は、イムノクロマト試験技術である。

## 【0075】

本願発明の1つの実施態様では、そのようなアッセイは、限定されないが、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光標識を含む任意の種類を検出技術を使用するサンドイッチイムノアッセイ、好ましくは、完全に自動化されたアッセイである。本願発明の1つの実施態様では、そのようなアッセイは、酵素標識サンドイッチアッセイである。自動化又は完全自動化アッセイの例は、以下の系: Roche Elecsys(登録商標)、Abbott Architect(登録商標)、Siemens Centaur(登録商標)、Brahms Kryptor(登録商標)、Biomerieux Vidas(登録商標)、Alerie Triage(登録商標)の1つに使用されてもよい系を含む。

## 【0076】

様々なイムノアッセイが知られ、そして本願発明のアッセイ及び方法のために使用されてもよく、ラジオイムノアッセイ(「RIA」)、均一酵素増幅イムノアッセイ(「EMIT」)、酵素結合免疫吸着アッセイ(「ELISA」)、アポ酵素再活性化イムノアッ

10

20

30

40

50

セイ(「ARIS」)、ディップスティックイムノアッセイ及びイムノクロマトグラフィ  
ーアッセイが挙げられる。

【0077】

本願発明の1つの実施態様では、前記2つの結合剤の少なくとも1つが、検出するた  
めに、標識される。

【0078】

好ましい検出方法は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、化学発光及び蛍光イ  
ムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ルミネックススペースブ  
レイ、タンパク質マイクロアレイアッセイ、及び例えば、イムノクロマトグラフィース  
トリップ試験などの迅速試験形式などの様々な形式のイムノアッセイを含む。

10

【0079】

好ましい実施態様では、前記標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射  
性ヨウ素標識を含む群から選択される。

【0080】

アッセイは、均一系(homogeneous)アッセイ又は不均一系(heteroge  
neous)アッセイ、競合アッセイ及び非競合アッセイであり得る。1つの実施態  
様では、アッセイは、サンドイッチアッセイ形式であり、そしてそれは、非競合ア  
ッセイであり、ここで、検出され及び/又は定量される分子は、第一抗体に結合し、  
そして第二抗体に結合する。第一抗体は、固相、例えば、ビーズ、ウェル又は他の容  
器の表面、チップ又はストリップに結合されてもよく、そして第二抗体は、例  
えば、色素、放射性同位体又は反応性若しくは触媒活性を有する部分で標識され  
た抗体である。分析物に結合された標識された抗体の量が、その後、適切な方  
法で測定される。「サンドイッチアッセイ」に関する一般的な組成物及び手順は、  
よく確立されており、そして当業者に公知である(23)。

20

【0081】

他の実施態様では、アッセイは、2つの捕捉分子、好ましくはどちらも液体反  
応混合物中に分散体として存在する抗体、を含み、ここで、分析物への両捕捉分  
子の結合に際して、サンプルを含む溶液中で形成されたサンドイッチ複合体の検  
出を可能とする測定可能なシグナルが生成されるように、第一標識構成要素が  
第一捕捉分子に結合され、ここで、前記第一標識構成要素は蛍光又は化学発光  
の消光(chemiluminescence quenching)又は増幅に基づく標識系の一部  
であり、そして、上記マーキング系の第二標識構成要素が第二捕捉分子に結合  
される。

30

【0082】

他の実施態様において、上記標識システムは、レアアースクリプテート又は  
レアアースキレート、を、蛍光色素または化学発光色素、特にシアニタイプの  
色素と共に含む。

【0083】

本願発明の文脈において、蛍光に基づくアッセイは色素の使用を含み、それは  
例えば、FAM(5 または6 カルボキシフルオレセイン)、VIC、NED、フルオレセ  
イン(Fluorescein)、フルオレセインイソチオシアネート(Fluoresce  
in isothiocyanate)(FITC)、IRD 700/800、CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、  
Cy7などのシアニン(Cyanine)色素、キサントン(Xanthene)、6 カルボキ  
シ 2', 4', 7', 4, 7 ヘキサクロフルオレセイン(HEX)、TET、6 カルボキ  
シ 4', 5' ジクロ 2', 7' ジメトジフルオレセイン(JOE)、N, N, N', N' テ  
トラメチル 6 カルボキシローダミン(TAMRA)、6 カルボキシ X ローダ  
ミン(ROX)、5 カルボキシローダミン 6G(R6G5)、6 カルボキシローダ  
ミン 6G(RG6)、ローダミン(Rhodamine)、ローダミングリーン(Rhodamine  
Green)、ローダミンレッド(Rhodamine Red)、ローダミン110(Rhodamine  
110)、BODIPY TMRなどのBODIPY色素、オレゴン・グリーン(Oregon  
Green)、Umbelliferoneなどのクマリン(Co

40

50

umarines)、Hoechst 33258などのベンズイミド(Benzimidides);テキサスレッド(Texas Red)、ヤキマイエロー(Yakima Yellow)、アレクサフルオル(Alexa Fluor)などのフェナントリジン(Phenanthridines)、PET、臭化エチジウム(Ethidium bromide)、アクリジニウム(Acridinium)色素、カルバゾール(Carbazol)色素、フェノキサジン(Phenoxadine)色素、ポルフィリン(Porphyrine)色素、ポリメチン(Polymethin)色素などを含む群から選択される。

【0084】

本願発明の文脈において、化学発光に基づくアッセイは、化学発光材料について(24)に記載された物理的原理に基づく色素の使用を含む。好ましい化学発光色素は、アクリジニウムエステルである。

10

【0085】

本願明細書中で言及されるとおり、「アッセイ(assay)」又は「診断アッセイ(diagnostic assay)」は、診断の分野において適用される任意のタイプのものであることができる。そのようなアッセイは、検出される分析物の1つ又は複数の捕捉プローブへの一定の親和性による結合に基づくことができる。捕捉分子と標的分子又は着目の分子の間の相互作用に関しては、結合定数が $10^8 M^{-1}$ 超であることが好ましい。

【0086】

本発明の文脈において、「結合剤分子(binder molecule)」は、標的分子又は着目の分子、すなわち、サンプル由来の分析物(すなわち、本発明の関係においては、PENK及びその断片)を結合するために使用されることができる分子である。従って、結合剤分子は、標的分子又は着目の分子を特異的に結合するために、空間的に並びに表面電荷、疎水性、親水性、ルイスドナー及び/又はアクセプターの存在又は不存在などの表面の特徴に関して適切に形作られなければならない。これによって、結合は、例えば、イオン性、ファンデルワールス、 $\pi-\pi$ 、シグマ $\pi$ 、疎水性又は水素結合相互作用、あるいは捕捉分子と標的分子又は着目の分子の間の上記相互作用のうち2つ以上の組合せによって仲介されることができる。本発明の関係において、結合剤分子は、例えば、核酸分子、炭化水素分子、PNA分子、タンパク質、抗体、ペプチド又は糖タンパク質を含む群から選択されることができる。好ましくは、結合剤分子は、標的又は着目の分子への十分な親和性を有するその断片を含む抗体であり、組換え抗体または組換え抗体断片、並びに少なくともその12個のアミノ酸の長さを有する、変異鎖由来の上記抗体又は断片の化学的及び/又は生化学的に修飾された誘導体を含む。

20

30

【0087】

化学発光標識は、アクリジニウムエステル標識、イソルミノール標識を含むステロイド標識などであってもよい。

【0088】

酵素標識は、ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)、クレアチンキナーゼ(CPK)、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、酸ホスファターゼ、グルコース6ホスフェートデヒドロゲナーゼなどであってもよい。

40

【0089】

本願発明の1つの実施態様において、上記2つの結合剤のうち少なくとも1つは、磁性粒子としての固相、及びポリスチレン表面に結合される。

【0090】

本願発明によるサンプル中のプロエンケファリン又はプロエンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、そのようなアッセイは、サンドイッチアッセイ、好ましくは、完全に自動化されたアッセイである。ELISAは完全に自動化又は手動であってもよい。いわゆる、POC試験(臨床現場即時(point of ca

50

re) 試験)であってもよい。自動又は完全に自動化されたアッセイの例は、以下のアッセイ: Roche Elecsys (登録商標)、Abbott Architect (登録商標)、Siemens Centaur (登録商標)、Brahms Kryptor (登録商標)、Biomerieux Vidas (登録商標)、Aleris Triage (登録商標)の1つに使用されてもよいアッセイを含む。

【0091】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記2つの結合剤の少なくとも1つが、検出されるために、標識される。標識の種類は、上で提供される。

【0092】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記2つの結合剤の少なくとも1つが、固相に結合される。固相の例は、上で提供される。

【0093】

本願発明によるサンプル中のプロ エンケファリン又はプロ エンケファリン断片を決定するためのアッセイの1つの実施態様では、前記標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨード標識を含む群から選択される。本願発明のさらなる主題は、本願発明に従ったアッセイを含むキットであり、ここで、前記キットの構成要素は、1つ以上の容器中に含まれてもよい。

【0094】

1つの実施態様では、本願発明の主題は、本願発明による方法を行うための臨床現場即時装置であり、ここで、前記臨床現場即時装置は、アミノ酸133~140 (LKEELLE T G (配列番号13))又はアミノ酸152~159 (SDNEEEVS (配列番号14))のいずれかに対する少なくとも1つの抗体又は抗体断片を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【0095】

1つの実施態様では、本願発明の主題は、本願発明による方法を行うための臨床現場即時装置であり、ここで、臨床現場即時装置は、アミノ酸133~140 (LKEELLE T G (配列番号13))及びアミノ酸152~159 (SDNEEEVS (配列番号14))に対する少なくとも2つの抗体又は抗体断片を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【0096】

1つの実施態様では、本願発明の主題は、本願発明による方法を行うためのキットであり、ここで、前記臨床現場即時装置は、アミノ酸133~140 (LKEELLE T G (配列番号13))又はアミノ酸152~159 (SDNEEEVS (配列番号14))のいずれかに対する少なくとも1つの抗体又は抗体断片を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【0097】

1つの実施態様では、本願発明の主題は、本願発明による方法を行うためのキットであり、ここで、臨床現場即時装置は、アミノ酸133~140 (LKEELLE T G (配列番号13))及びアミノ酸152~159 (SDNEEEVS (配列番号14))に対する少なくとも2つの抗体又は抗体断片を含み、ここで、前記領域のそれぞれが、少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】図1は、典型的なプロ エンケファリン用量/シグナル曲線を示す。プロ エンケファリンの標準曲線である。

【図2】図2は、健康な集団におけるプロ エンケファリンの度数分布を示す ( $n = 4211$ )。PENKの平均値は、 $44.7 \text{ pmol/L}$ であり、標準偏差 =  $1.27$ であり、99パーセンタイル (上限の正常範囲) は、 $80 \text{ pmol PENK/L}$ である。図2

10

20

30

40

50

は、PENKのLN値を示す。

【図3】図3は、健康な対象における、クレアチンクリアランス対PENKの相関を示す。Y軸はクレアチンクリアランスの四分位数であり、X軸はPENKの四分位数である。

【図4】図4は、クレアチンクリアランスと非常に相関されたPENKを示す ( $r = 0.74$ 、 $p < 0.0001$ )

【図5】図5は、増加したPENKが、腎機能障害と顕著に相関することを示す。

【図6】図6は、プロエンケファリン及びRIFLE分類(上記参照)による腎機能障害の診断の受信者操作特性曲線(ROC)を示す。曲線下面積(AUC)は、0.868であり、腎機能障害のためのプロエンケファリンの強い診断能力を示す。

【図7】図7は、増加したNGALが、腎機能障害を有する患者を顕著に増加することを示す。NGALの正常範囲( $0.037 \sim 0.106 \mu\text{g/mL}$ の範囲; [http://www.bioporto.com/products/bioporto\\_diagnostics/ngal\\_elisa\\_kits/ngal\\_rapid\\_elisa\\_kit\\_ceivd](http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/ngal_rapid_elisa_kit_ceivd))は、図中の影の部分によって示される。

【図8】図8は、NGAL及びRIFLE分類(上記参照)による腎機能障害の診断の受信者操作特性曲線(ROC)を示す。本願発明者等は、腎機能障害の参照マーカーとしてNGALを使用した。AUCは0.809であり、実質的にプロエンケファリン(AUC 0.868(図6))よりも低く、プロエンケファリンの増分値を示す。

【図9】図9は、PENKが敗血症転帰について非常に予後予測することを示す。

【図10】図10は、PENKとAPACHE2とを組み合わせた場合、重要な追加情報であることを示す。

【図11a】図11aは、初期PENKが、 $< 100 \text{ pmol/L}$ であり、入院の間、 $< 100 \text{ pmol/L}$ に維持される患者(生存者)を示す。

【図11b】図11bは、初期PENKが、 $> 100 \text{ pmol/L}$ であり、 $< 100 \text{ pmol/L}$ の値に低減しなかった患者(入院中に死亡)を示す。

【図11c】図11cは、初期PENKが、 $> 100 \text{ pmol/L}$ であり、 $< 100 \text{ pmol/L}$ の値に低減しなかった患者(入院中に死亡)を示す。

【図11d】図11dは、初期PENKが、 $> 100 \text{ pmol/L}$ であり、ICU処置の1日以内に、PENK値が、 $< 100 \text{ pmol/L}$ の値に低減した患者(生存者)を示す。

【図12】図12は、1日目(EDでの提示)において、PENKが、男性集団における院内での死の予測について、さらに強いことを示す。

【図13】図13は、AUC 0.89をもたらすPENK及びApacheの組み合わせ対Apache単独の0.837を示す。

【図14】図14は、ACU 0.91の優れた予後予測値を生じるPENK及びクレアチンクリアランスの組み合わせ対クレアチンクリアランス単独の0.721を示す。

【図15A】図15Aは、急性腎機能障害のグレードによって分類される敗血症患者における血漿PENK(A)の濃度を示す。0 = 腎機能障害なし; R = リスク(Risk); I = 損傷(Injury); F = 不全(Failure); L = 喪失(Loss)である。カテゴリーは、以下のように定義する([http://en.wikipedia.org/wiki/Acute\\_Kidney\\_injury](http://en.wikipedia.org/wiki/Acute_Kidney_injury)): リスク: GFR低下 $> 25\%$ 、血清クレアチンの1.5倍増加、又は6時間の $< 0.5 \text{ ml/kg/時間}$ の尿産生; 損傷: GFR低下 $> 50\%$ 、2倍のクレアチン、又は12時間の $< 0.5 \text{ ml/kg/時間}$ の尿産生; 不全: GFR低下 $> 75\%$ 、3倍のクレアチン又はクレアチン $> 355 \mu\text{mol/l}$ ( $> 44$ の上昇を有する)( $> 4 \text{ mg/dl}$ )、又は24時間の $0.3 \text{ ml/kg/時間}$ 未満の尿排出; 喪失: 持続性のAKI、又は4週間超の腎機能の完全な喪失。PENKの正常範囲(図2を参照)及びNGAL( $0.037 \sim 0.106 \mu\text{g/mL}$ の範囲; [http://www.bioporto.com/products/bioporto\\_diagnostics/ngal\\_elisa\\_kits/nga](http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/nga)

10

20

30

40

50

l\_rapid\_elisa\_kit\_ce\_ivd)濃度は、図中の影の部分によって示される。図は、敗血症患者が腎機能障害を有していない場合でさえ、NGAL濃度が敗血症患者において大幅に上昇し、一方、PENKの場合はそうでないことを示す。

【図15B】図15Bは、急性腎機能障害のグレードによって分類される敗血症患者における血漿NGAL(B)の濃度を示す。0 = 腎機能障害なし; R = リスク(Risk); I = 損傷(Injury); F = 不全(Failure); L = 喪失(Loss)である。カテゴリーは、以下のように定義する([http://en.wikipedia.org/wiki/Acute\\_Kidney\\_injury](http://en.wikipedia.org/wiki/Acute_Kidney_injury)): リスク: GFR低下>25%、血清クレアチニンの1.5倍増加、又は6時間の<0.5ml/kg/時間の尿産生; 損傷: GFR低下>50%、2倍のクレアチニン、又は12時間の<0.5ml/kg/時間の尿産生; 不全: GFR低下>75%、3倍のクレアチニン又はクレアチニン>355µmol/l(>44の上昇を有する)(>4mg/dl)、又は24時間の0.3ml/kg/時間未満の尿排出; 喪失: 持続性のAKI、又は4週間超の腎機能の完全な喪失。PENKの正常範囲(図2を参照)及びNGAL(0.037~0.106µg/mLの範囲;[http://www.bioporto.com/products/bioporto\\_diagnostics/ngal\\_elisa\\_kits/ngal\\_rapid\\_elisa\\_kit\\_ce\\_ivd](http://www.bioporto.com/products/bioporto_diagnostics/ngal_elisa_kits/ngal_rapid_elisa_kit_ce_ivd))濃度は、図中の影の部分によって示される。図は、敗血症患者が腎機能障害を有していない場合でさえ、NGAL濃度が敗血症患者において大幅に上昇し、一方、PENKの場合はそうでないことを示す。

10

【図16A】図16Aは、入院当日と翌日(1日目)における重症患者の血漿PENK濃度に依存する患者の生存率を示す。図16A(左側)では、 Kaplan-Meierプロットは、それぞれ、100pmol/L超及び未満の入院当日のPENK濃度を有する患者の部分母集団を示す。図16A(右側)では、 Kaplan-Meierプロットは、それぞれ、1日目において、100pmol/L超及び未満のPENK濃度を有する患者の部分母集団を示し、そして患者は、入院当日において、100pmol/L未満のPENK濃度を有する。

20

【図16B】図16Bは、入院当日と翌日(1日目)における重症患者の血漿PENK濃度に依存する患者の生存率を示す。図16B(左側)では、 Kaplan-Meierプロットは、それぞれ、100pmol/L超及び未満の入院当日のPENK濃度を有する患者の部分母集団を示す。図16B(右側)では、 Kaplan-Meierプロットは、それぞれ、1日目において、100pmol/L超及び未満のPENK濃度を有する患者の部分母集団を示し、そして患者は、入院当日において、100pmol/L超のPENK濃度を有する。

30

【図17】図17は、PENKを予測する多変数線形回帰(multivariable linear regression)を示す。注記: BP、クレアチニン及び尿素は、MAP又はクレアチンクリアランスとの高い相関により外した。線形回帰は、以下:  $\log(PENK) = a * CreaClearance + b * Cardiovasc + c * MAP + etc.$  に挙げられた変数を使用して計算した。パーシャル(Partial)  $R^2$ は、それぞれの変数がPENKに寄与するまでの程度を与える、すなわち、CreaClearance(クレアチンクリアランス)が、最も強く、そして0.15よりも

40

【実施例】

【0099】

実施例1

抗体の開発

ペプチド

ペプチドを合成した(JPT Technologies, Berlin, Germany)。

ペプチド/免疫コンジュゲート

50

免疫のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン ( B S A ) に対するペプチドのコンジュゲートのための追加の N 末端システイン残基で合成した。ペプチドを、 S u l f o S M C C ( P e r b i o s c i e n c e , B o n n , G e r m a n y ) を使用することによって B S A と共有結合させた。共有結合の方法を、 P e r b i o の取扱説明書に従って、行った。

【 0 1 0 0 】

【表 1】

表 1 :

免疫化のためのペプチド	プロ-エンケファリン配列
(C)DAEEDD	119-125
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134
(C)LKELLETTG	133-140
(C)TGDNRERSHHQDGSNE	139-155
(C)SDNEEEVS	152-159

10

20

【 0 1 0 1 】

抗体を、以下の方法に従って作製した。

B A L B / c マウスを、0日及び14日で、100 µg ペプチド B S A コンジュゲート ( 1 0 0 µ l 完全フロイントアジュバントにおいて乳化 )、21日及び28日で、50 µg ( 1 0 0 µ l 不完全フロイントアジュバントにおいて ) で免疫した。融合実験を行った3日前に、動物は、1つは腹腔内注射及び1つは静脈内注射として与えられる、100 µ l 生理食塩水中に溶解した50 µg のコンジュゲートを受けた。

30

【 0 1 0 2 】

免疫したマウス由来の脾細胞及び骨髓腫細胞株 S P 2 / 0 の細胞を、1ml の50% ポリエチレングリコールで、37 °C で30秒間、融合した。洗浄後、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンを、H A T 培地で生育することによって選択した ( 2 0 % ウシ胎児血清及び H A T サプリメントを補充した R P M I 1 6 4 0 培地 )。2週間後、H A T 培地を、3回継代のために、H T 培地で置換し、続いて、通常の細胞培養培地に戻した。

【 0 1 0 3 】

細胞培養物上清を、融合後3週間、抗原特異的 I g G 抗体について、一次スクリーニングした。試験陽性マイクロ培養を、増殖のために、24ウェル中に移した。再試験後、選択された培養物を、限界希釈技術を使用して、クローン化しそして再クローン化し、そしてアイソタイプを決定した。

40

【 0 1 0 4 】

( L a n a , R . D . " A s h o r t d u r a t i o n p o l y e t h y l e n e g l y c o l f u s i o n t e c h n i q u e f o r i n c r e a s i n g p r o d u c t i o n o f m o n o c l o n a l a n t i b o d y s e c r e t i n g h y b r i d o m a s , " J . I m m u n o l . M e t h . 8 1 : 2 2 3 - 2 2 8 ; ( 1 9 8 5 ) , Z i e g l e r , B . 5 , " G l u t a m a t e d e c a r b o x y l a s e ( G A D ) i s n o t d e t e c t a b l e o n t h e s u r f a c e o f r a

50

t islet cells examined by cytofluorometry and complement dependent antibody mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies , " Horm. Metab. Res. 28 : 11 15 , ( 1996 ) ) .

【 0 1 0 5 】

モノクローナル抗体作製

抗体を、標準の抗体作製法 ( Marxら、Monoclonal Antibody Production ( 1997 ) , ATLA 25 , 121 ) を介して作製し、そして Protein A chromatography を介して精製した。抗体の精製率は、SDSゲル電気泳動分析に基づいて、> 95%であった。

10

【 0 1 0 6 】

抗体の標識及びコーティング

すべての抗体を、以下の方法に従って、アクリジニウムエステルで標識した。

標識化合物 ( トレーサー ) : 100  $\mu$ g ( 100  $\mu$ l ) 抗体 ( PBSにおいて、1mg/ml、pH7.4 ) を、10  $\mu$ l アクリジニウム NHS エステル ( アセトニトリルにおいて、1mg/ml、InVent GmbH、Germany ) ( 欧州特許第 0353971号 ) と混合し、そして室温で、20分間、インキュベートした。標識抗体を、Bio Sil SEC 400 5でのゲルろ過 HPLC ( Bio Rad Laboratories , Inc . , USA ) によって精製した。精製した標識抗体を、( 300mmol/lリン酸カリウム、100mmol/l NaCl、10mmol/l Na EDTA、5g/lウシ血清アルブミン、pH7.0 ) において、希釈した。最終濃度は、標識化合物 ( 約 20ng の標識抗体 ) ( 200  $\mu$ l あたり ) で、約 800.000 相対発光量 ( RLU ) であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat LB 953 ( Berthold Technologies GmbH & Co . KG ) を使用することにより、測定した。

20

【 0 1 0 7 】

固相抗体 ( コーティングされた抗体 )

固相 : ポリスチレンチューブ ( Greiner Bio One International AG , Austria ) を、抗体 ( 1.5  $\mu$ g 抗体 / 0.3ml、100mmol/l NaCl、50mmol/l Tris/HCl、pH7.8 ) で、コーティングした ( 室温で 18時間 ) 。5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブを PBS ( pH7.4 ) で洗浄し、そして真空乾燥した。

30

【 0 1 0 8 】

抗体特異性

【 表 2 】

表 2 :

免疫化のためのペプチド	プレプロエンケファリン配列	抗体名
(C)DAEEDD	119-125	NT-MRPENK
(C)EEDDSLANSDDLK	121-134	NM-MRPENK
(C)LKELLETG	133-140	MR-MRPENK
(C)TGDNRERSHHQDGSNE	139-155	MC-MRPENK
(C)SDNEEEVS	152-159	CT-MRPENK

40

【 0 1 0 9 】

50

抗体交差反応性を、以下のように決定した。

300  $\mu$ l PBS中の1  $\mu$ g ペプチド (pH 7.4) を、ポリスチレンチューブに分注し、そして室温で、1時間、インキュベートした。インキュベーション後、チューブを、PBS (pH 7.4) 中の5% BSAを使用して、5回 (それぞれ1ml) 洗浄した。標識抗体のそれぞれを添加し (PBS (pH 7.4) 中の300  $\mu$ l、800.000 RLU / 300  $\mu$ l)、室温で2時間、インキュベートした。5回洗浄した後 (それぞれ1mlの洗浄溶液 (20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X 100)、残存発光 (標識抗体) を、Auto Lumat LB 953を使用して定量した。MRPENK ペプチドを、参照物質として使用した (100%)。様々な抗体の交差反応性を表3に示す。

【0110】

【表3】

表3：

抗体	DAEE DD	EEDDSLANS DLLK	LKELLE TG	TGDNRRSHH QDGSNE	SDNEEE VS	MRPENK (配列番号6)
NT- MRPENK	121	10	<1	<1	<1	100
NM- MRPENK	<1	98	<1	<1	<1	100
MR- MRPENK	<1	<1	105	<1	<1	100
MC- MRPENK	<1	<1	<1	115	<1	100
CT- MRPENK	<1	<1	<1	<1	95	100

【0111】

すべての抗体は、免疫のために使用したペプチドに相当する、MRPENKペプチドを結合した。NT MRPENK抗体 (EEDDSLANS DLLKと10%交差反応) 以外の抗体は、個々の抗体の免疫のために使用されないMRPENKペプチドと交差反応を示さなかった。

【0112】

プロ エンケファリンイムノアッセイ

50  $\mu$ lのサンプル (又はキャリブレーター) を、コーティングされたチューブに分注し、標識抗体 (200  $\mu$ l) を添加した後、チューブを、18~25 で2時間、インキュベートした。結合しなかったトレーサーを、洗浄液 (20 mmol/l PBS、pH 7.4、0.1% Triton X 100) で、5回洗浄することによって (それぞれ1ml)、除去した。チューブ結合標識抗体を、Luminometer LB 953及び1000 pmol/l MRPENKの固定された濃度を使用して、測定した。異なる抗体の組み合わせのノイズ (MRPENKなしのRLU) 比に対するシグナル (1000 pmol MRPENK/lでのRLU) を、表4に示す。すべての抗体は、任意の他の抗体とのサンドイッチ複合体を生成することができた。驚くべきことに、ノイズ比に対す

10

20

30

40

50

る最も強いシグナル（最も良い感受性）を、MR MRPENKとCT MRPENK抗体とを組み合わせることで生成した。その後、本願発明者等は、この抗体の組み合わせを使用して、さらなる研究のためのMRPENK イムノアッセイを行った。MR MRPENK抗体を、コーティングされたチューブ抗体として使用し、そしてCT MRPENK抗体を標識抗体として使用した。

【0113】

【表4】

表4：

	固相抗体	NT-MRPENK	NM-MRPENK	MR-MRPENK	MC-MRPENK	CT-MRPENK
標識抗体						
NT-MRPENK		/	27	212	232	<1
NM-MRPENK		36	/	451	487	<1
MR-MRPENK		175	306	/	536	1050
MC-MRPENK		329	577	542	/	<1
CT-MRPENK		<1	615	1117	516	/

【0114】

キャリブレーション

アッセイを、20 mM  $K_2PO_4$ 、6 mM EDTA、0.5% BSA、50  $\mu$ M アマスタチン、100  $\mu$ M ロイペプチン、pH 8.0で希釈された、合成MRPENKの希釈液を使用して、キャリブレーションを行った。プロエンケファリン対照血漿は、ICI diagnostics, Berlin, Germanyから入手し得る。図1は、典型的なプロエンケファリン用量/シグナル曲線を示す。標準曲線プロエンケファリンである。アッセイの感受性は、0 キャリブレーター（MRPENKの添加なし）+ 2SD)の20決定、5.5 pmol/Lであった。

【0115】

クレアチンクリアランス

クレアチンクリアランスを、MDRD式(Leveyら、2009参照)を使用して決定した。

【0116】

実施例2

健康な対象中のPENK

健康な対象(n=4211、平均年齢56歳)を、MRPENKを使用して測定した。平均値は、44.7 pmol MRPENK/Lであり、最低値は、9 pmol/Lであ

10

20

30

40

50

り、そして99パーセンタイルは、80 pmol / Lであった。アッセイ感度は、5.5 pmol / Lであり、健康な対象の100%が、MRPENKアッセイ(図2参照)を使用して検出可能であった。

【0117】

プロ エンケファリンは、正常な腎機能を有する健康な対象において、クレアチニクリアランスと相関する。驚くべきことに、プロ エンケファリンは、健康な対象において、クレアチニクリアランスと負に相関した( $r = 0.33$ 、 $P < 0.0001$ ) (図3参照)。相関係数は、女性よりも男性において、わずかに強かった( $r = 0.34$ 対 $0.29$ 、それぞれ $p < 0.0001$ )。これらのデータは、PENKと腎機能との間の強い関連性を示す。

10

【0118】

図3は、健康な対象におけるクレアチニクリアランス対PENKの相関を示す。Y軸は、クレアチニクリアランスの四分位数であり、X軸は、PENKの四分位数である。

【0119】

実施例3

慢性及び急性疾患を有する対象におけるPENKと腎機能との相関

【0120】

【表5】

表5:

20

疾患	r-値	p-値
慢性心不全 N=122	-0,55	<0.0001
急性心不全 N=149	-0,68	<0.0001
急性心筋梗塞 N=78	-0,82	<0.0001
敗血症 N=101	-0,74	<0.0001
SIRS N=109	-0,79	<0.0001

30

40

【0121】

PENKは、急性疾患において、常に顕著にクレアチニクリアランスと相関し、その相関は、慢性疾患又は健康な対象における相関よりもより強かった。

【0122】

実施例4

急性臨床現場において、腎不全の診断のためのPENKの診断性能を調査するために、本願発明者等は、以下の臨床試験を行った。

50

## 【 0 1 2 3 】

## 臨床試験

敗血症の定義 (Crit Care Med. 2008 Jan; 36 (1) : 296 327) を満たす 101 人の ED 患者を、続いて入院させ (平均 5 日間の入院)、そして標準治療を受けた。EDTA 血漿を、1 日目 (ED プレゼンテーション) から作製し、そして入院の間、毎日 1 つのサンプルを作製した。後の分析物測定のための凍結サンプルの時間は、4 時間未満であった。患者の特性を、以下の表 6 に要約する。

## 【 0 1 2 4 】

## 【 表 6 】

表 6 :

変数	全体 (n=101)	院内死亡 (n=27)	退院 (n=74)	p-値
<b>個体群統計</b>				
性別 - 男性	60 (60)	13 (48)	47 (64)	0,163
年齢 - 中央値 [IQR]	78 [72-72]	77 [71.25-83]	80 [75-84.5]	0,142
<b>試験変数</b>				
BP 収縮期 (mmHg) - 中央値 [IQR]	115 [100-100]	120 [106.25-138.75]	105 [80-120]	0,001
BP 拡張期 (mmHg) - 中央値 [IQR]	65 [60-60]	65 [60-85]	60 [50-70]	0,002
HR - 中央値 [IQR]	100 [94-94]	100 [94-114.75]	100 [93.5-107.5]	0,407
RR - 中央値 [IQR]	24 [22-22]	24 [22-28]	26 [24-28]	0,069
MAP (mmHg) - 中央値 [IQR]	83.3 [74-74]	83.3 [77.62-100.75]	81.6 [63.5-89]	0,026
<b>合併症</b>				
心血管 - yes	26 (25.7)	9 (33.3)	17 (23)	0,311
高血圧 - yes	47 (46.5)	13 (48.1)	34 (45.9)	1,000
糖尿病 - yes	35 (34.7)	9 (33.3)	26 (35.1)	1,000
癌 - yes	13 (12.9)	3 (11.1)	10 (13.5)	1,000
<b>ルーチン臨床検査変数</b>				
血液培養 - yes	31 (31)	5 (19)	26 (35)	0,246
陰性	15 (16.3)	2 (8)	13 (19.4)	
陽性	16 (17.4)	3 (12)	13 (19.4)	
クレアチニン クリアランス (ml/分) - 中央値 [IQR]	48 [23.25-23.25]	56 [29.25-80]	31.5 [14.75-66]	0,043
クレアチニン - 中央値 [IQR]	1.3 [0.9-0.9]	1.25 [0.9-2.08]	1.8 [1-3.15]	0,080
UREA - 中央値 [IQR]	36 [21-21]	31.5 [20-53.25]	51 [42-87]	0,004
GCS - 中央値 [IQR]	15 [10-10]	15 [12.5-15]	8 [8-11]	<0.001
Pcr - 中央値 [IQR]	16 [6.6-6.6]	14.5 [6.7-23.7]	17.35 [6.6-28.05]	0,846
Gluko - 中央値 [IQR]	113.5 [94.5-94.5]	110 [95.5-144]	128 [94-160.5]	0,400

## 【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

【表 7】

biliru - 中央値 [IQR]	0.9 [0.71-0.71]	0.9 [0.7-1.03]	0.91 [0.77-1.18]	0,534
GR - 中央値 [IQR]	3.8 [3.3-3.3]	3.8 [3.2-4.3]	3.7 [3.4-4.2]	0,684
GB - 中央値 [IQR]	12700 [6774-6774]	13100 [8115-17565]	11920 [25.55-18790]	0,343
PLT - 中央値 [IQR]	213 [150-150]	217 [154.75-301]	185 [130-236.5]	0,113
HCT - 中央値 [IQR]	32 [28-28]	31.5 [28-37]	34 [31.25-39.5]	0,149
Leuco/Neutr (%) - 中央値 [IQR]	87 [80-80]	86 [78.25-89.95]	91 [87-93.05]	0,001
HB - 中央値 [IQR]	10.4 [9.47-9.47]	10.15 [9.3-12.4]	10.85 [9.9-12.67]	0,220
Na - 中央値 [IQR]	137 [134-134]	137 [133-141]	139 [134-144.5]	0,204
K - 中央値 [IQR]	3.9 [3.5-3.5]	3.9 [3.6-4.3]	3.9 [3.3-5.1]	0,982
INR - 中央値 [IQR]	1.19 [1.1-1.1]	1.19 [1.1-1.4]	1.18 [1.04-1.36]	0,731
TC - 中央値 [IQR]	38.4 [36-36]	38.5 [38.12-38.7]	36 [35.55-38.5]	<0.001
SAO2 - 中央値 [IQR]	94 [90-90]	95 [90.25-97]	93 [88.5-95.5]	0,119
pH - 中央値 [IQR]	7.45 [7.38-7.38]	7.46 [7.4-7.5]	7.4 [7.24-7.4]	<0.001
PO2 - 中央値 [IQR]	67 [56-56]	66.5 [56-78]	67 [56.5-79.5]	0,806
PCO2 - 中央値 [IQR]	36 [32-32]	37.5 [33-43.75]	34 [30-41]	0,245
Lact - 中央値 [IQR]	1.5 [1-1]	1.3 [0.83-1.9]	2.5 [1.4-4.15]	<0.001
Bic - 中央値 [IQR]	23.5 [21-21]	24.25 [21.43-28]	21 [17.35-23.25]	0,001
FiO2 (%) - 中央値 [IQR]	21 [21-21]	21 [21-23.25]	24 [21-45]	<0.001
他				
急性臓器障害 - yes	39 (43.3)	16 (64)	23 (35.4)	0,021
Apacheスコア (%) - 中央値 [IQR]	19 [12.5-12.5]	14.65 [12.12-20.38]	32 [20-39]	<0.001
入院日数 - 中央値 [IQR]	5 [2-2]	6 [4-7]	2 [1-6]	0,003
ベースラインでの処置				
多尿 (cc) - 中央値 [IQR]	900 [600-600]	1000 [700-1200]	450 [200-1025]	<0.001
ステロイド - yes	16 (15.8)	4 (14.8)	12 (16.2)	1,000
昇圧剤 - yes	18 (17.8)	13 (48.1)	5 (6.8)	<0.001
抗生物質 - yes	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000
輸液療法 - yes	101 (100)	27 (100)	74 (100)	1,000

10

20

30

入院期間中にすべての患者の 26.7% が死亡し、そして処置非応答者としてカウントし、すべての患者の 73.3% が敗血症から生き延び、そして処置応答者としてカウントした。

## 【0126】

敗血症を呈するすべての患者の 53% が、非正規 P EN K 値 > 80 pmol / L (99 パーセントイル) を有し、P EN K が感染のマーカーでないことを示した。

## 【0127】

臨床試験の結果

P EN K は、クレアチニクリアランスと非常に相関した ( $r = 0.74$ 、 $p < 0.0001$ 、図 4)。

40

## 【0128】

P EN K による腎機能障害の診断

腎機能障害を、RIFLE 分類 (Venkatamaran and Kellum, 2007) に基づいて定義した。患者を、なんらかの RIFLE 分類因子を充足した場合、腎機能障害としてカウントした。試験コホート内で、本願発明者等は、1日目 (ED プレゼンテーション) で、90 人の患者内で RIFLE を決定し、39 人の患者が RIFLE 分類を充足し (腎疾患のリスク、腎損傷、腎不全、腎機能の喪失又は末期腎疾患を有する)、そして 51 人の患者が、腎機能障害を有さなかった。増加した P EN K は、有意に ( $p < 0.0001$ ) 腎機能障害と相関した (AUC: 0.868) (図 5 及び 6)。

50

## 【0129】

腎機能障害のための診断値を比較するために、本願発明者等は、NGALを参照マーカーとして使用した(Sonira, 2010)。NGALを、ELISA(NGAL ELISA kit, Bioporto, Gentofte, Denmark)を使用して測定した。

## 【0130】

NGALは、PENKのように、腎機能障害を有する患者で有意に増加し( $p < 0.001$ )、腎機能障害の診断のためのAUCは、0.809であった(図7及び8)。

## 【0131】

PENK及びNGALの比較は、腎機能障害の診断のためのPENK対NGALの強い優位性を示した。PENKのChi2値は、45.32であるのに対して、NGALは、32.21であり、PENKによって、診断品質(特異性及び感度)の40%の改善を示した(表7)。

10

## 【0132】

【表8】

表7:

モデル	N	事象	モデル Chi2	d.f.	LR p-値	C 指標 [95-CI]
PCT	76	34	13.02	1	0.00031	0.721 [0.602,0.839]
Apache	90	39	28.58	1	<0.00001	0.778 [0.681,0.874]
NGal	90	39	32.21	1	<0.00001	0.809 [0.723,0.896]
PENK	90	39	45.32	1	<0.00001	0.868 [0.796,0.94]

20

30

## 【0133】

初期PENKの高い予後予測

本願発明者等は、初期PENK値と院内死亡率とを相関させ、そしてPENKとAPACHE 2敗血症スコア(Knausら, 1985, 2001)及びクレアチンクリアランスとを比較した。PENKは、敗血症転帰について非常に予後予測し(図9参照)、そしてAPACHE 2スコアに匹敵する(AUC/C指標 0.744 (PENK)及び0.783 (Apache))。PENK及びAPACHE 2を組み合わせた場合、有意な追加情報である(組み合わせAUC: 0.794 図10)。PENKは、予後予測において、クレアチンクリアランス(AUC 0.638)よりも実質的に強力である。驚くべきことに、PENKの予後予測値は、ICU処置の初日後、より強力である(AUC 0.79)。

40

## 【0134】

ICU処置1日目後のベースライン及び1サンプルを使用する院内死予後予測のためのカットオフ分析

PENKの予後予測能力が、UCU処置開始後1日目にさらに改善したので、本願発明者等は、ICU処置前日及びICU処置開始後1日目の連続測定で、PENKを分析した。臨床性能を示すために、本願発明者等は、100 pmol/Lのカットオフ値で、単一カットオフ分析を使用した。

## 【0135】

50

患者が、病院でのプレゼンテーションにおいて、カットオフ未満であり、そしてICU処置開始後、カットオフ未満を維持する場合、死亡率は11%であった（入院前及び中に十分処置された）。PENKが、両時点において、カットオフ超であった場合、死亡率は、約5倍高く（52.5%）（処置に応答していない）、そして患者が、100 pmol/l超のPENK値を示し、そしてICU処置中に、100 pmol/l未満にPENKレベルが低下した場合、死亡率は0であった（処置応答者）。これらのデータは、PENKと処置の成功との強い関連性を示し、治療フォローアップのためのその使用を支持する。

【0136】

【表9】

10

表8：

	死亡率	N (死亡患者対全体)
PENK > 100 pmol/l (プレゼンテーション及びICU処置後初日)	52,5%	21/40
PENK > 100 pmol/l (プレゼンテーション)及び< 100 pmol/l (ICU処置後初日)	0%	0/7
PENK < 100 pmol/l (プレゼンテーション及びICU処置初日)	11%	6/54

20

【0137】

30

図11a~d：患者のフォローアップ測定の例

- a) 初期PENK < 100 pmol/lを有し、そして入院中に、< 100 pmol/lを維持した患者（生存者）
- b) 初期PENK > 100 pmol/lを有し、そして< 100 pmol/lの値に低下しなかった患者（入院中に死亡）
- c) 初期PENK > 100 pmol/lを有し、そして< 100 pmol/lの値に低下しなかった患者（入院中に死亡）
- d) 初期PENK > 100 pmol/lを有し、PENK値が、ICU処置の1日目以内に< 100 pmol/lの値に低下した患者（生存者）

【0138】

40

実施例5

PENKの連続測定の使用

実施例4に記載の患者集団において（敗血症、重度の敗血症又は敗血性ショック）、入院日及び翌日（1日目）に測定した。正常範囲の99パーセントイル近くである、100 pmol/lのサンプルカットオフ値を使用して、集団を2つの群に分け（100 pmol/l超及び未満）、そして対応する7日目生存率をカプランマイヤープロットで示した（図16a及びb）。入院日に100 pmol/l未満のPENK濃度を有する患者で、PENK濃度が1日目に100 pmol/l未満を維持した患者は、87%の高い生存率を有したが、一方で、一日目に、患者のPENK濃度が100 pmol/l超に増加した場合、生存率は67%に低下した。対照的に、入院日に100 pmol/l超のPENK

50

濃度を有する患者で、1日目に、PENK濃度が100 pmol/L超を維持した患者は、たった50%の低い生存率を有したが、一方で、1日目に、患者のPENK濃度が100 pmol/L未満に低下した場合、生存率は100%であった。

【0139】

#### 実施例6

入院日に、実施例4に記載の患者集団（敗血症、重度の敗血症又は敗血性ショック）において決定した血漿PENK濃度を使用して、多変数線形回帰分析によって分析し、そしてPENK濃度の程度のためにパラメーター/変数を決定する。図17において、パーシャルR<sup>2</sup>を示す。分析は、腎機能の測定（クレアチニンクリアランスを示す場合）が、これまでで、PENK濃度についての最も強い決定因子であることを示す。

【0140】

【表10】

10

表9：

変数-中央値 (IQR)	全体	死亡 (deaths within)	7日間生存	p-値
	(n=101)	7日(n=28)	(n=73)	5
PENK (pmol/L)	87 [50-205]	209 [77-499]	75 [47-124]	<0.001
クレアチニンクリアランス (ng/mL)	48 [23-77]	33 [15-69]	56 [29-81]	0.071
Apacheスコア(ポイント)	16 [13-21]	23 [18-27]	14 [12-18]	<0.001

20

10

30

表9：実施例4で記載したような、入院日において患者集団で決定された変数と7日目の死との関連性

【0141】

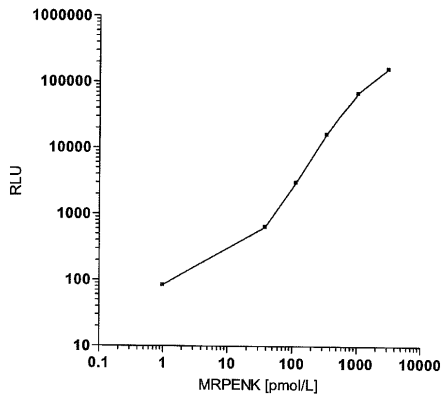
#### 男性におけるPENK

予後予測マーカーとしてPENKを使用したところ、初日（EDでのプレゼンテーション）でのPENKは、男性集団における院内死の予後予測において、さらに強力であり（AUC 0.849、図12）、Apache単独ではAUC 0.837であったのに対して、PENK及びApacheの組み合わせは、AUC 0.89をもたらした（図13）。PENK及びクレアチニンクリアランスの組み合わせは、クレアチニンクリアランス単独ではAUC 0.721であったのに対して、AUC 0.91の優れた予後予測値を生じた（図14）。全患者集団については、PENKの予後予測値は、ICU処置の初日後、より強力であった（2日目、AUC 0.872）。

40

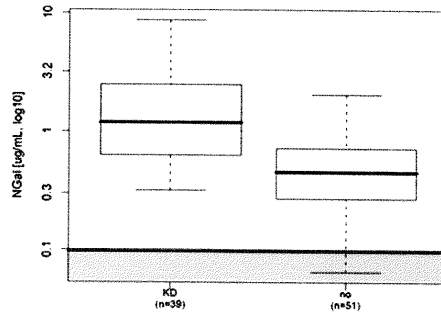
【 図 1 】

Fig. 1:



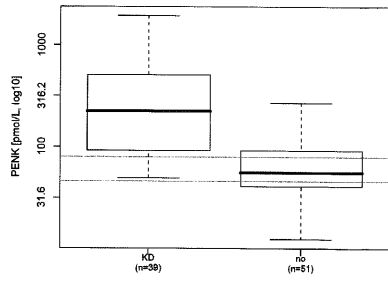
【 図 7 】

Fig. 7:



【 図 5 】

Fig. 5:



【 図 1 1 a 】

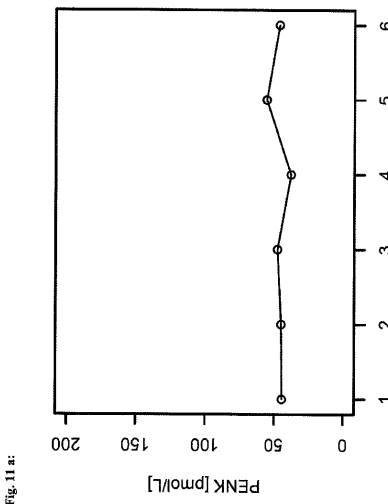


Fig. 11 a:

【 図 1 1 b 】

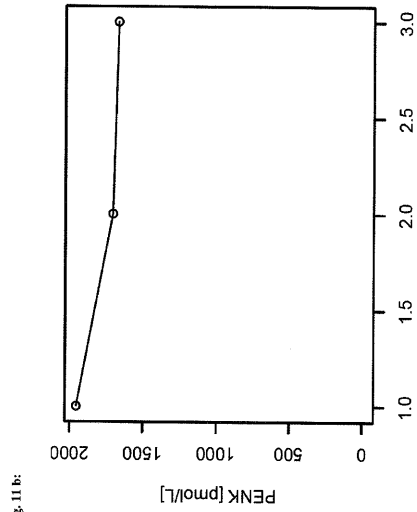


Fig. 11 b:

【 1 1 c 】

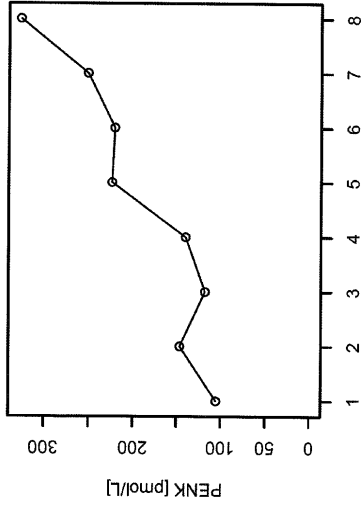


Fig. 11 c

【 1 1 d 】

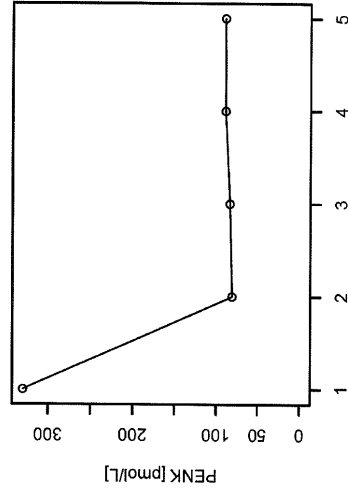
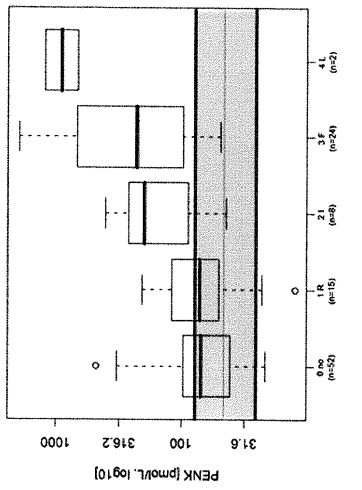


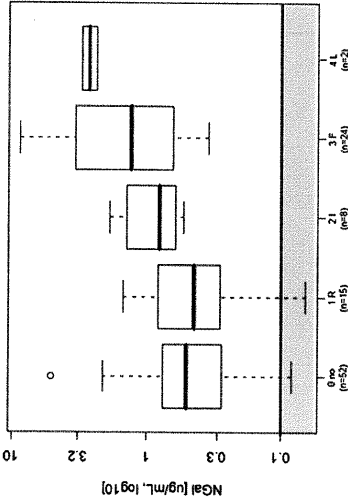
Fig. 11 d

【 1 5 A ) 】



A)

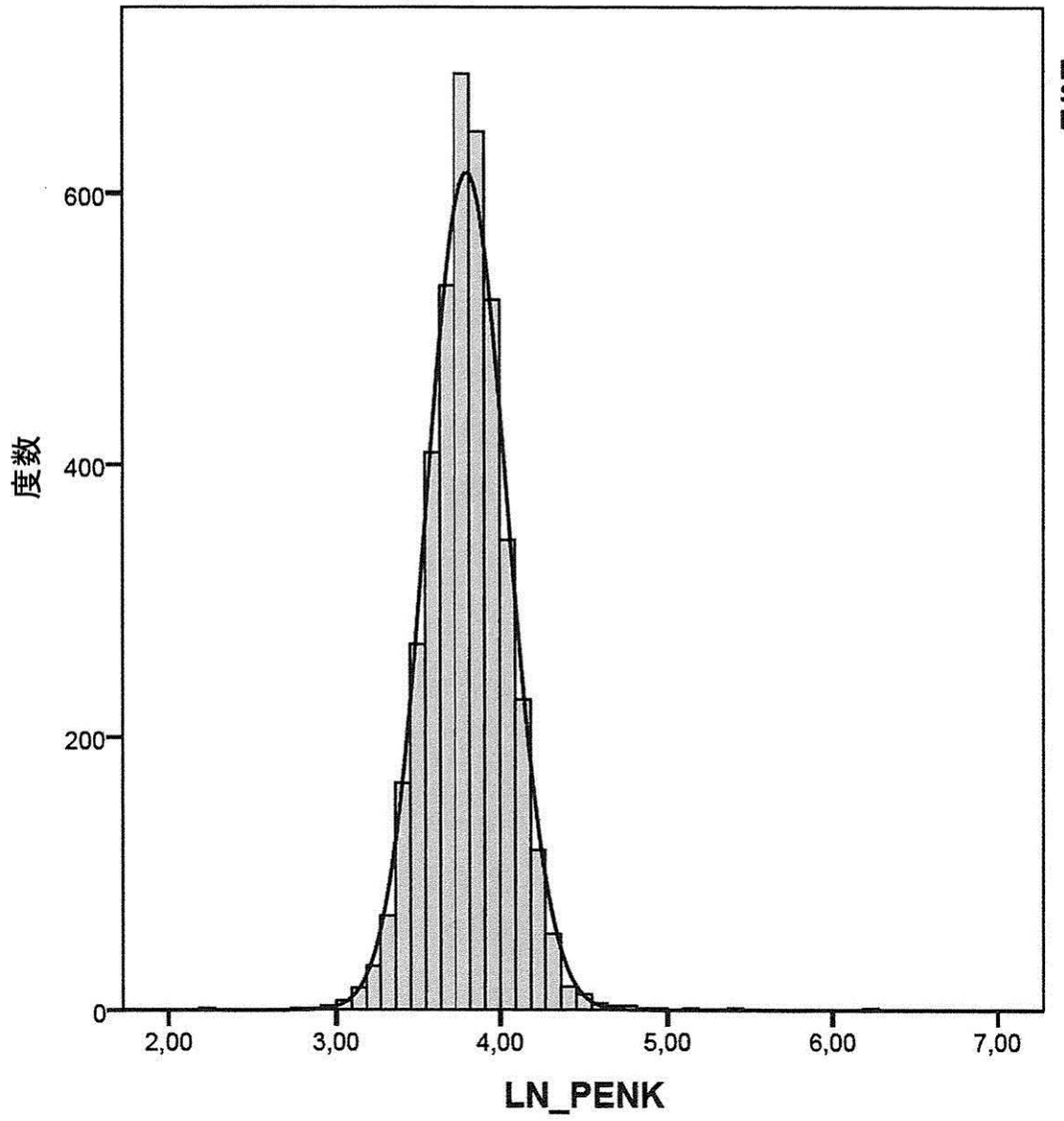
【 1 5 B ) 】



B)

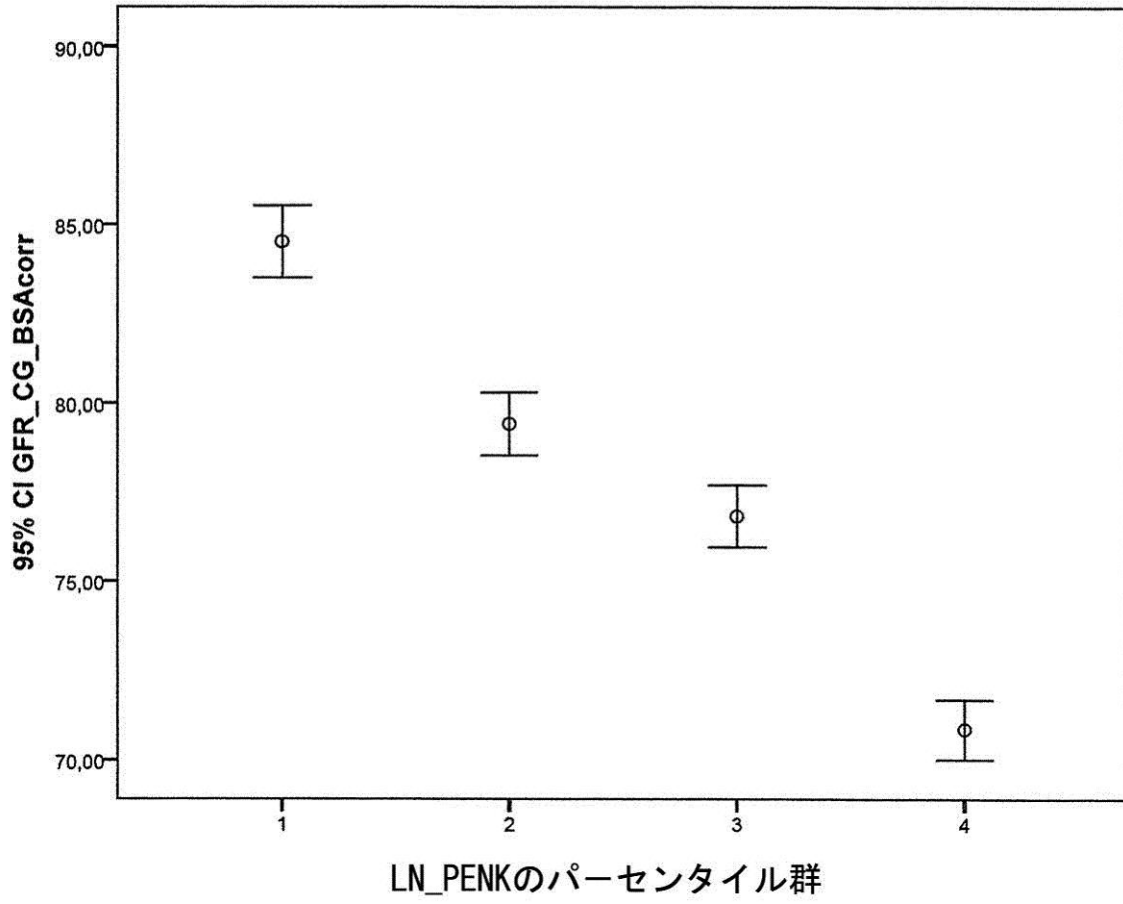
【 図 2 】

Fig. 2:



【 図 3 】

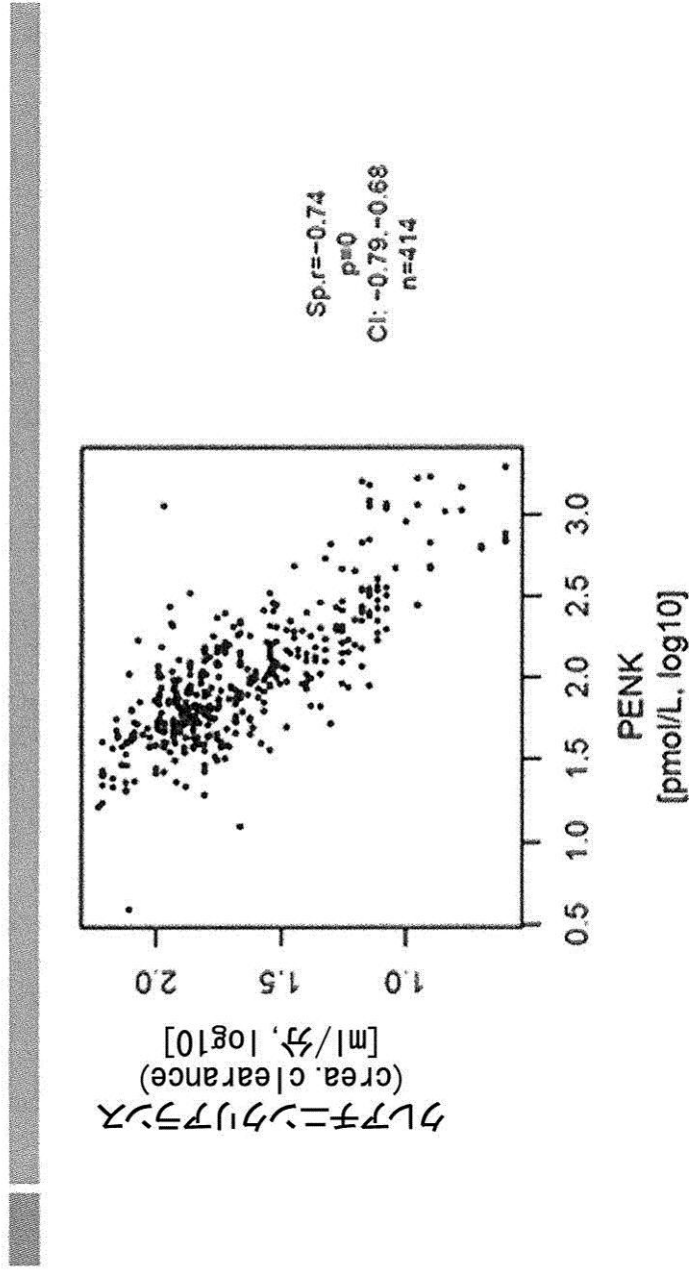
Fig. 3:



【 図 4 】

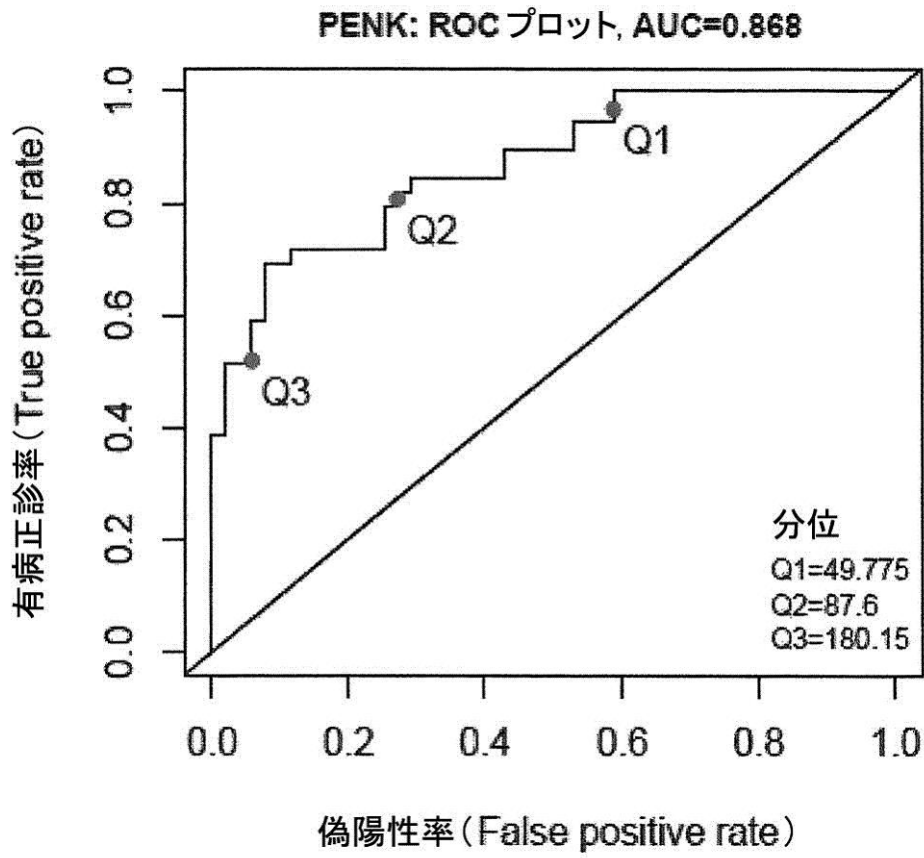
Fig. 4:

相関: PENK対クレアチニンクリアランス(Creatinin. Clearance)



【 図 6 】

Fig. 6:



【 図 8 】

Fig. 8:

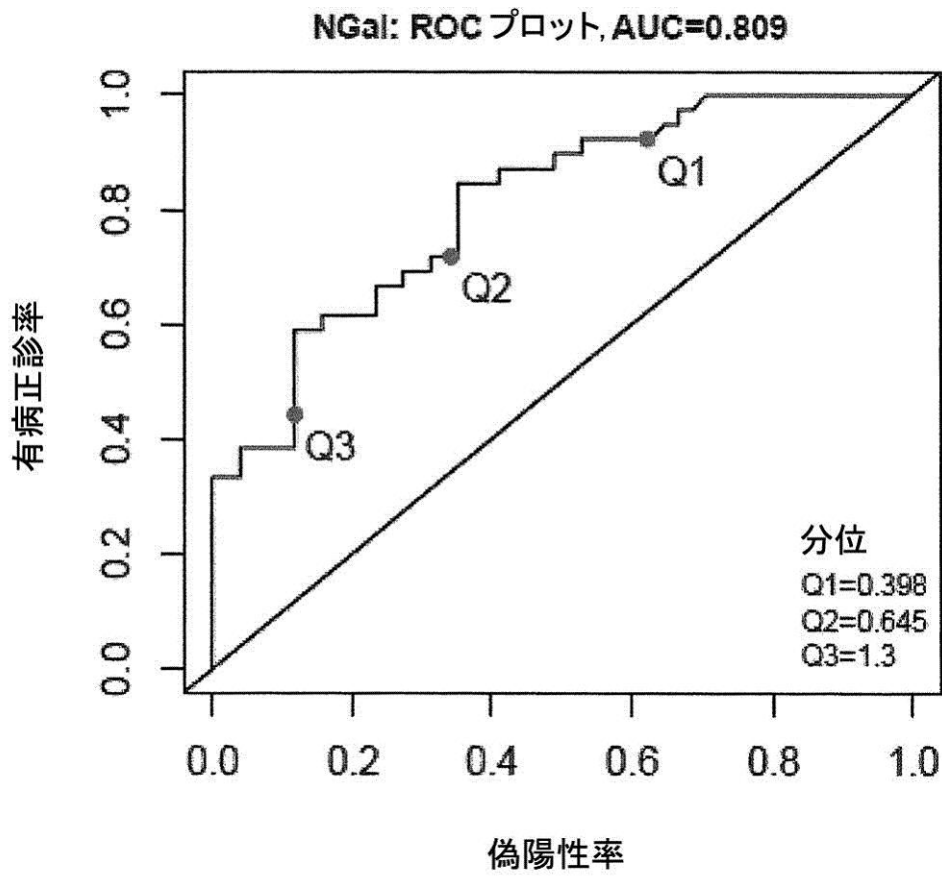


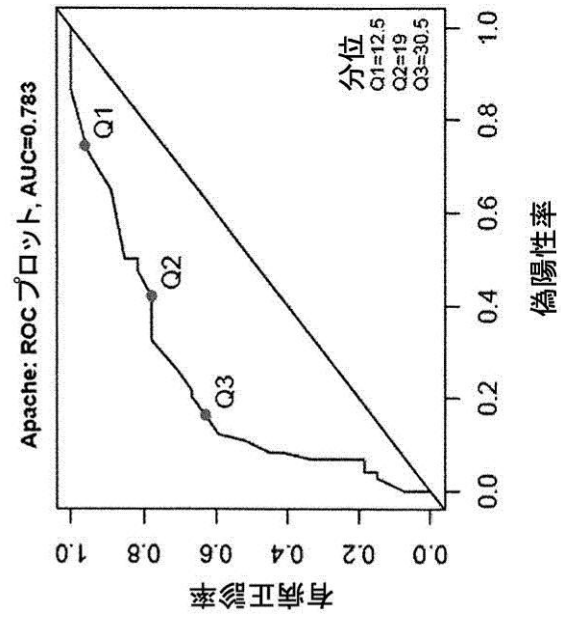
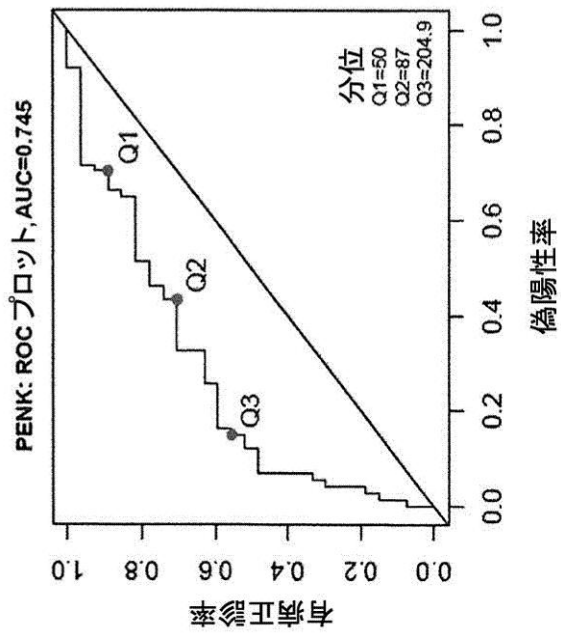
Fig. 9:

【 図 9 】

# 院内死亡率予測

## ロジスティック回帰分析の結果：

モデル	N	事象	モデル	Chi2	d.f.	LR p-値	C指標 [95-CI]
crea.clearance	98	24	4.02		1	0.04485	0.638 [0.503,0.772]
PENK	101	27	17.53		1	0.00003	0.744 [0.631,0.858]
APACHE	101	27	19.98		1	0.00001	0.783 [0.681,0.886]



【図 10】

Fig. 10:

## 院内死亡率予測

- PENKはApacheから独立し、そして追加の  
予後予測情報を提供する:

	LR $\chi^2$	d.f.	p値
APACHE (Apache) にPENKを追加	7.07	1	0.0078
PENK (PENK) にAPACHEを追加	4.62	1	0.0316

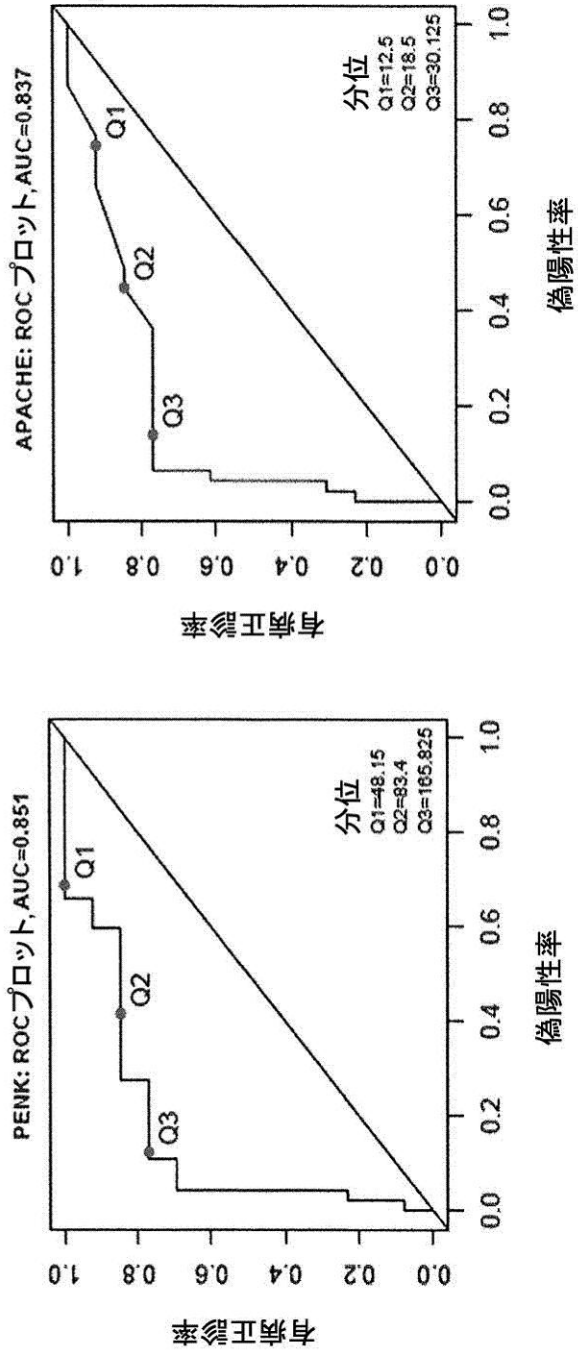
- AUC (PENK + APACHE) :  
0.794 (対0.783  
(APACHE単独))
- $\text{Chi}^2$ : 26.4 (対20.0  
(APACHE))

Fig. 12:

# 院内死亡率予測

## ロジスティック回帰分析の結果：

モデル	N	事象	モデル	Chi2	d.f.	LR p-値	C指標 [95-CI]
crea.clearance	58	11	5.26		1	0.02188	0.721 [0.528,0.913]
PENK	60	13	18.9		1	0.00001	0.849 [0.724,0.979]
APACHE	60	13	20.19		1	0.00001	0.837 [0.693,0.981]



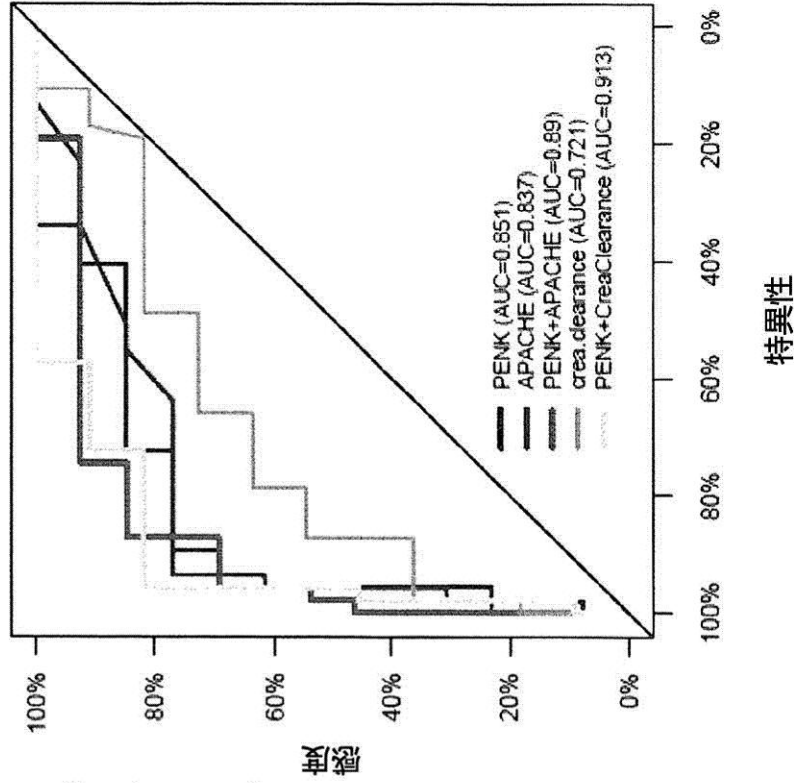
【 図 1 3 】

# 院内死亡率予測

- PENKはApacheから独立し、そして追加の予後予測情報を提供する:

	LR	$\chi^2$	d.f.	p値
APACHE (Apache) にPENKを追加	7.69	1	0.0056	
PENK (PENK) にAPACHEを追加	6.4	1	0.0114	

- AUC (PENK + APACHE) : 0.890 (対0.837 (APACHE単独))
- $Chi^2$  : 26.6 (対20.2 (APACHE))



【 図 1 4 】

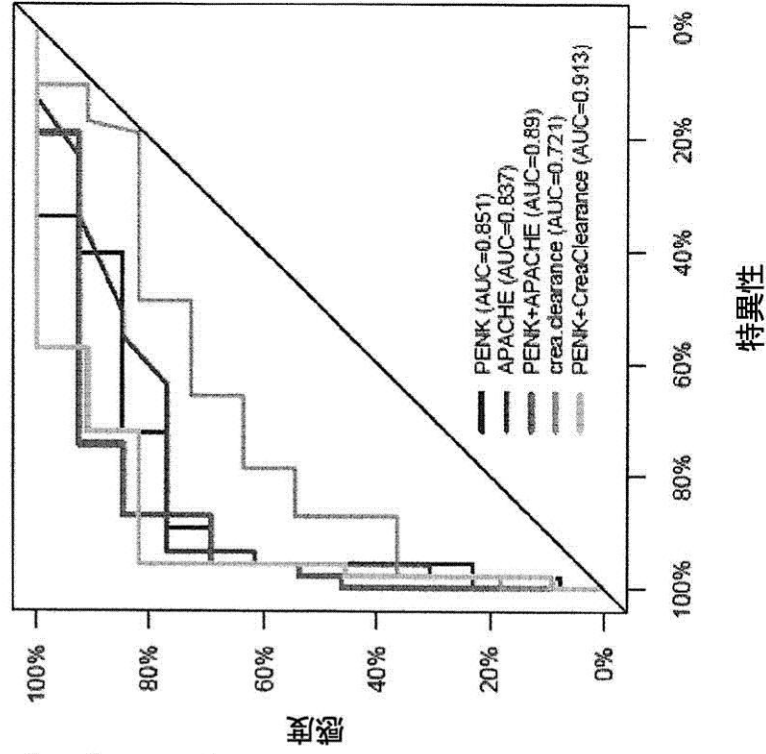
Fig. 14:

# 院内死亡率予測

- PENKはクレアチニンクリアランスから独立し、そして優位な予後予測情報を提供する:

	LR	$\chi^2$	d.f.	p値
crea.clearance(crea.clearance)にPENKを追加	3.31	1	0.069	
PENK(PENK)にcrea.clearanceを追加	18.23	1	<0.00001	

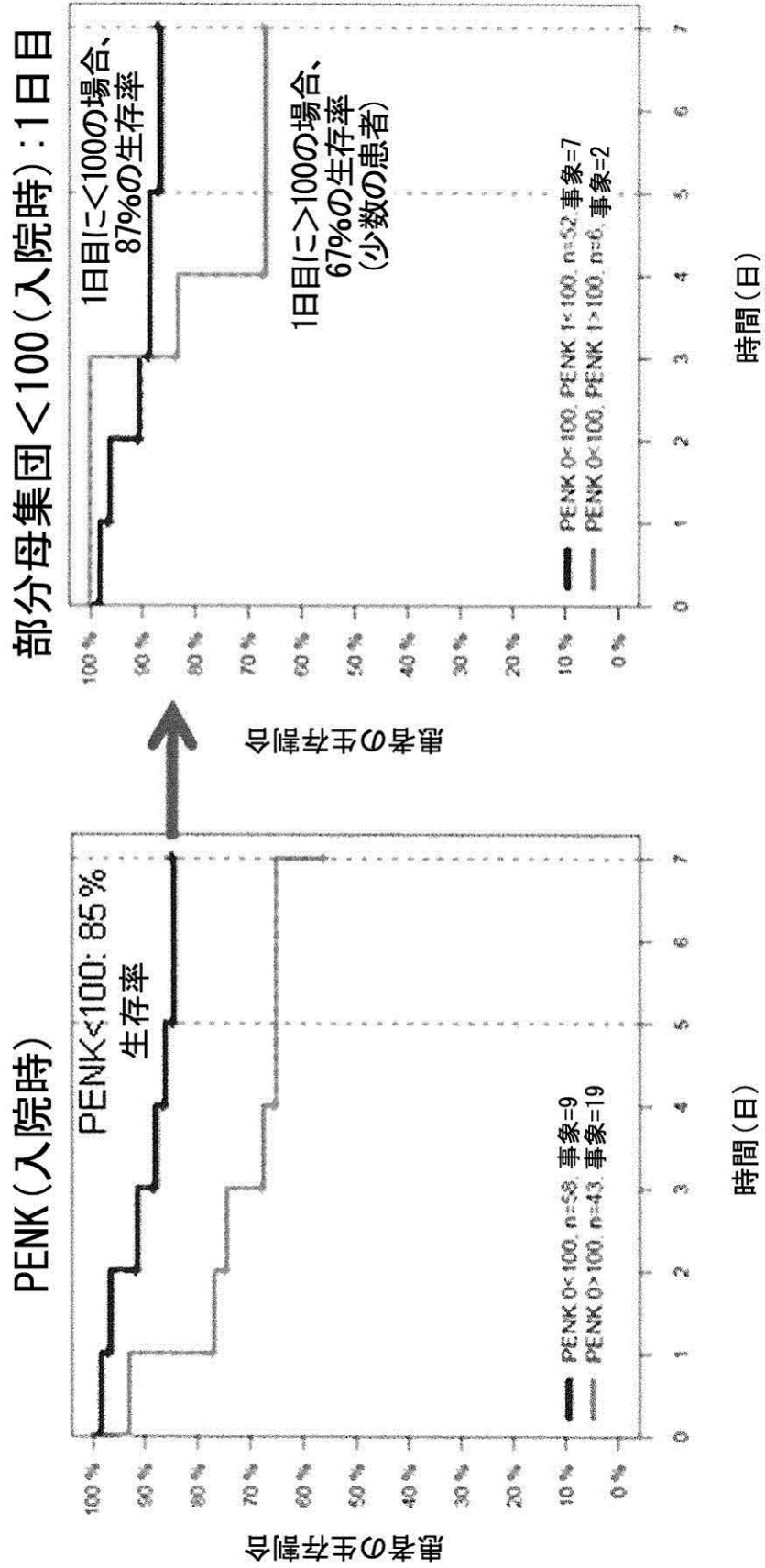
- AUC (PENK + Crea CI) : 0.913  
(対0.851 (PENK単独))



【 図 1 6 A 】

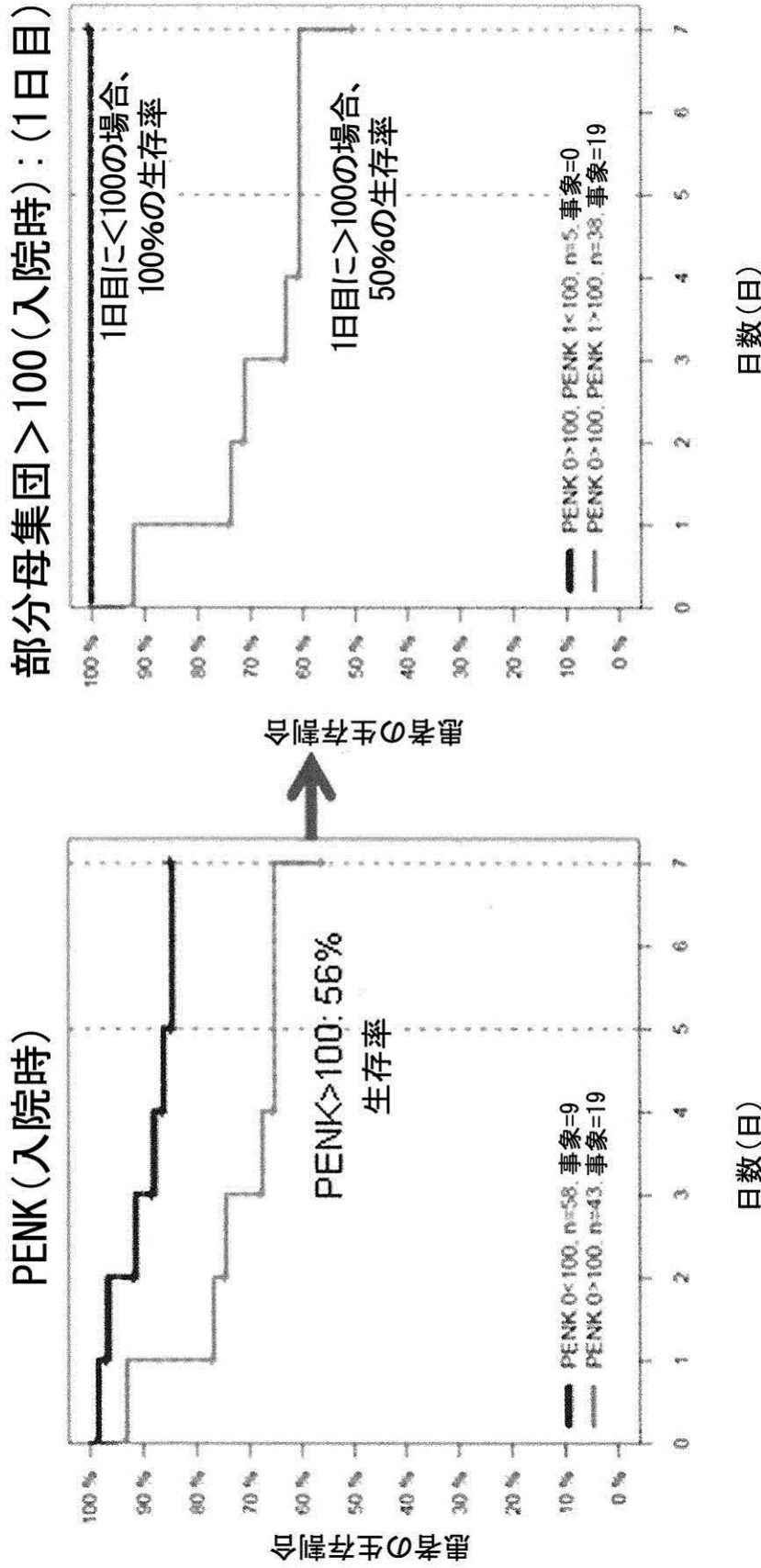
Fig. 16

A)



【図16B】

B)

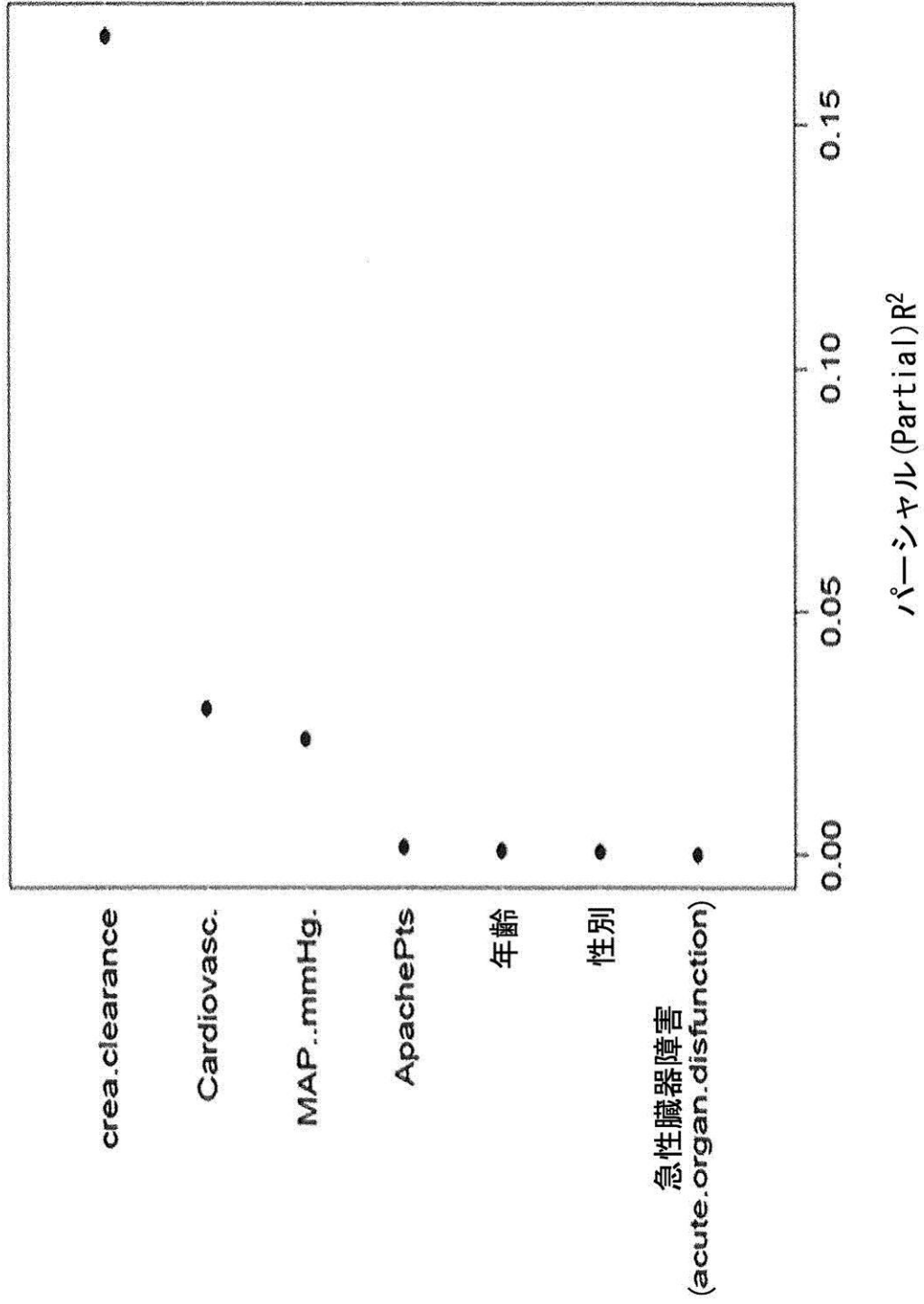


全母集団の生存率

全母集団の生存率

【 図 17 】

Fig. 17:



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/070470
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 293 079 A2 (BRAHMS GMBH [DE]) 9 March 2011 (2011-03-09) claim 10 figures 1,5,6 example 5	16-19
Y	----- WO 2012/017071 A1 (PRONOTA N V [BE]; KAS KOEN [BE]; VANPOUCKE GRIET [BE]; MOERMAN PIET [B]) 9 February 2012 (2012-02-09) page 2, line 28 - page 4, line 36 page 17, line 21 - line 31 claims 4,7,11 page 39, line 15 - line 22 claims 4,7,11,18,30 examples 4-7 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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		Date of mailing of the international search report
20 November 2013		04/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Adida, Anne

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/070470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZOCCALI C ET AL: "Plasma met-enkephalin and leu-enkephalin in chronic renal failure.", NEPHROLOGY, DIALYSIS, TRANSPLANTATION : OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN DIALYSIS AND TRANSPLANT ASSOCIATION - EUROPEAN RENAL ASSOCIATION 1987, vol. 1, no. 4, 1987, pages 219-222, XP008160110, ISSN: 0931-0509 cited in the application abstract -----	1-15
Y	SMITH R ET AL: "STUDIES ON CIRCULATING MET-ENKEPHALIN AND BETA-ENDORPHIN: NORMAL SUBJECTS AND PATIENTS WITH RENAL AND ADRENAL DISEASE", CLINICAL ENDOCRINOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 15, no. 3, 1 January 1981 (1981-01-01), pages 291-300, XP008035979, ISSN: 0300-0664 cited in the application abstract -----	1-15
Y	SMITH R ET AL: "Effect of liver and renal dysfunction on circulating methionine-enkephalin immunoreactivity", NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 60, no. 3, 10 October 1985 (1985-10-10), pages 301-305, XP024374763, ISSN: 0304-3940, DOI: 10.1016/0304-3940(85)90594-4 [retrieved on 1985-10-10] cited in the application abstract -----	1-15
A	WOLFRAM DOEHNER ET AL: "Elevated Plasma Levels of Neuropeptide Proenkephalin A Predict Mortality and Functional Outcome in Ischemic Stroke", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 60, no. 4, 16 April 2012 (2012-04-16) , pages 346-354, XP028427535, ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/J.JACC.2012.04.024 [retrieved on 2012-06-02] the whole document -----	1-19

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/070470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2293079	A2	09-03-2011	AT 502305 T 15-04-2011
			EP 1745297 A1 24-01-2007
			EP 2293079 A2 09-03-2011
			ES 2363156 T3 22-07-2011
			ES 2431288 T3 25-11-2013
			JP 4976282 B2 18-07-2012
			JP 2007537430 A 20-12-2007
			US 2008261232 A1 23-10-2008
			WO 2005114222 A1 01-12-2005
-----			
WO 2012017071	A1	09-02-2012	AU 2011287538 A1 10-01-2013
			CA 2802273 A1 09-02-2012
			EP 2601532 A1 12-06-2013
			JP 2013534309 A 02-09-2013
			US 2012034240 A1 09-02-2012
			US 2013129750 A1 23-05-2013
			WO 2012017071 A1 09-02-2012
-----			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2013/070470

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100179039

弁理士 伊藤 洋介

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 5 ベルリン, アム ローゼンアンガー 7 8

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 DA36 DA42

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ94 QR66 QR82 QS03 QS33 QS35 QX01

4H045 AA11 AA30 BA70 DA76 EA50 FA71 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015535936A5</a>	公开(公告)日	2016-05-19
申请号	JP2015534991	申请日	2013-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン		
发明人	アンドレアスベルクマン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/02 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/6893 G01N2333/70 G01N2800/347 G01N2800/52 G01N33/563 G01N33/68 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/68 C12Q1/02 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/DA42 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ94 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QS35 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 伊藤洋介		
优先权	2012187051 2012-10-02 EP 2013170327 2013-06-03 EP		
其他公开文献	JP6307509B2 JP2015535936A		

#### 摘要(译)

一种用于 (a) 诊断或监测受试者的肾功能或 (b) 诊断受试者的肾功能不全或 (c) 预测或监测患病受试者中不良事件风险的方法，其中所述不良事件选自包括以下的组：包括肾衰竭，肾功能丧失和终末期肾病在内的肾功能不全恶化，或由于包括肾衰竭，肾功能丧失和终末期肾病在内的肾功能不全而导致的死亡或 (d) 预测或监测治疗的成功 或包括确定从所述受试者获得的体液中至少5个氨基酸的前脑啡肽 (PENK) 或其片段的水平的干预；或 (a) 使所述脑啡肽原或其片段的所述水平与受试者的肾功能相关；或 (b) 使所述脑啡肽原或其片段的所述水平与肾功能障碍的相关，其中高于某个阈值的升高水平可预测或诊断 所述受试者中的肾功能不全或 (c) 使所述脑啡肽原或其片段的水平与所述患病受试者中不良事件的所述风险相关，其中高于某个阈值的升高水平可预示所述不良事件或 (d) 在患病受试者中治疗或干预成功的前脑啡肽或其片段的所述水平，其中低于某个阈值的水平可预测治疗或干预的成功。