

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4733704号
(P4733704)

(45) 発行日 平成23年7月27日 (2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日 (2011.4.28)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1 A

GO 1 N 27/62 (2006.01)

GO 1 N 27/62 V

請求項の数 15 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2007-531401 (P2007-531401)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月9日 (2005.9.9)
 (65) 公表番号 特表2008-512685 (P2008-512685A)
 (43) 公表日 平成20年4月24日 (2008.4.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/032287
 (87) 国際公開番号 W02006/029369
 (87) 国際公開日 平成18年3月16日 (2006.3.16)
 審査請求日 平成20年1月10日 (2008.1.10)
 (31) 優先権主張番号 10/938,760
 (32) 優先日 平成16年9月9日 (2004.9.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500204577
 バイオサイト インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国92121カリフォルニア
 州サンディエゴ、サマーズ・リッジ・ロー
 ド9975番
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナトリウム利尿ペプチドを測定するための方法および組成物並びにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体から得たサンプル中の1つ以上の目的のBNP（脳性ナトリウム利尿ペプチド）関連種または1つ以上の目的のプロBNP関連種の存在または量を検出するエクスピボ方法であって、

(a) 該サンプルのアッセイを行って、該サンプル中の該目的のBNP関連種の存在または量に関連するアッセイ結果を得、ここで、該アッセイはBNPのアミノ末端の分解に感受性であり、該アッセイは、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連フラグメントとBNPとを識別するように選択された抗体を用いて、検出されるBNPのシグナルが、等モル量の、アミノ末端の1から9残基が欠失した1つ以上のBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍または少なくとも10倍低下するように構築されており；または

(b) 該サンプルのアッセイを行って、該サンプル中の該目的のプロBNP関連種の存在または量に関連するアッセイ結果を得、ここで該アッセイはプロBNPのアミノ末端の分解に感受性であり、該アッセイは、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連フラグメントとプロBNPとを識別するように選択された抗体を用いて、検出されるプロBNPのシグナルが、等モル量の、アミノ末端の1から10残基が欠失した1つ以上のプロBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍または少なくとも10倍低下するように構築されており；または

10

20

段階(a)および(b)の両方を行う
ことを含む上記方法。

【請求項 2】

該アッセイは、検出されるプロBNPのシグナルが、等モル量のBNP₃₋₁₀₈に比較して少なくとも5倍低下するように構築されたものである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

該アッセイは、検出されるBNP₅₋₁₀₈のシグナルが、等モル量のBNP₃₋₁₀₈に比較して少なくとも5倍低下するように構築されたものである、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

該アッセイは、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連種に非感受性であるが、等モル量のBNP₁₋₁₀₈からのシグナルより少なくとも5倍低いシグナルを生成するように構築されたものであるか、または、

該アッセイは、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連種に非感受性であるが、等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈からのシグナルより少なくとも5倍低いシグナルを生成するように構築されたものである、

請求項1記載の方法。

【請求項 5】

該アッセイは、プロBNPのカルボキシル末端の分解にも感受性である、請求項1-4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

被験体がヒトである、請求項1-5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

サンプルが血液、血清、および血漿から成る群から選択される、請求項1-6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

該アッセイ段階がイムノアッセイまたは質量分析を行うことを含む、請求項1-7のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

該アッセイ段階の前に、該目的のBNP関連種またはプロBNP関連種の1つ以上から1つ以上の共有結合した炭水化物残基を除去することを更に含む、請求項1-8のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

該目的のBNP関連種またはプロBNP関連種の1つ以上から1つ以上の共有結合した炭水化物残基を除去することによって、目的の該BNP関連種またはプロBNP関連種の1つ以上の質量分析による検出が増加する、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

循環器疾患に罹患した、または罹患の疑いのある患者の診断または予後診断を行うためのエクスピボ方法であって、

(a) 該患者から得たサンプルのアッセイを行って、該サンプル中の1つ以上の目的のプロBNP関連種の存在または量に関するアッセイ結果を得、ここで、該アッセイはプロBNPのアミノ末端の分解に感受性であり、該アッセイは、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連フラグメントとプロBNPとを識別するように選択された抗体を用いて、検出されるプロBNPのシグナルが、等モル量の、アミノ末端の1から10残基が欠失した1つ以上のプロBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍または少なくとも10倍低下するように構築されており；または

(b) 該患者から得たサンプルのアッセイを行って、該サンプル中の1つ以上の目的のBNP関連種の存在または量に関するアッセイ結果を得、ここで該アッセイはBNPのアミノ末

10

20

30

40

50

端の分解に感受性であり、該アッセイは、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連フラグメントとBNPとを識別するように選択された抗体を用いて、検出されるBNPのシグナルが、等モル量の、アミノ末端の1から9残基が欠失した1つ以上のBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍または少なくとも10倍低下するように構築されており；または

(c) 段階(a)および(b)の両方を行ってアッセイ結果を得る

こと含む上記方法。

【請求項12】

該患者が急性冠症候群に罹患しているか、または罹患の疑いがある、請求項11記載の方法。

10

【請求項13】

死亡、心筋梗塞、およびうっ血性心不全から成る群から選択される将来の有害事象の可能性を予測するためにアッセイ結果を得る、請求項11記載の方法。

【請求項14】

該方法が、該患者から得た同じまたは別のサンプルについてアッセイを行って、1つ以上の追加の被験体由来マーカーの存在または量に関係する1つ以上の追加のアッセイ結果を得ることを更に含む、請求項11記載の方法。

【請求項15】

該1つ以上の追加の被験体由来マーカーが、カススペース-3、血栓前駆体タンパク質、クレアチンキナーゼ-MB、遊離型および複合型心筋トロポニンI、遊離型および複合型心筋トロポニンT、遊離型心筋トロポニンI、遊離型心筋トロポニンT、複合型心筋トロポニンI、複合型心筋トロポニンT、ミオグロビン、B型ナトリウム利尿ペプチド、NT-プロBNP、C反応性タンパク質、D-ダイマー、ミエロペルオキシダーゼ、およびそれらに関連するマーカーから成る群から選択される1つ以上のマーカーを含む、請求項14記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医学的診断および治療に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の背景に関する以下の議論は単に読者の本発明に対する理解を促進するために提供するものであり、本発明に対する従来技術を記述または構成すると認めるものではない。

30

【0003】

ナトリウム利尿ペプチドは体内でレニン・アンジオテンシン系に対抗するように作用する、天然に存在する一群の物質である。主に3つのナトリウム利尿ペプチドがある：心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）（心房で合成される）；脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）（心室で合成される）；およびC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）（脳で合成される）。

【0004】

成熟ヒトB型ナトリウム利尿ペプチド（BNP）（脳性ナトリウム利尿ペプチドおよびBNP₇₉₋₁₀₈とも呼ばれる）は32アミノ酸から成る4 kDaの生物学的に活性なペプチドであり、ナトリウム利尿系に関与して血圧および体液バランスを調節する（Bonow, R.O., Circulation 93:1946-1950, 1996）。成熟BNPホルモンは108アミノ酸から成る前駆体分子（本明細書では“プロBNP”（またはBNP₁₋₁₀₈）と記載する）のタンパク分解的開裂によって生成される。開裂により76アミノ酸のN-末端ペプチド（“NTプロBNP”（またはBNP₁₋₇₆）とも呼ばれる）および32アミノ酸の成熟BNP₇₇₋₁₀₈ホルモンが生成される。これらの種（NTプロBNP、BNP-32、およびプレプロBNP）はそれぞれヒト血漿中で循環しうることが示唆されている（Tateyamaら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 185:760-7, 1992；Huntら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:1175-83, 1995）。

40

50

【0005】

BNPは心室の伸展に応答して放出され、血管緊張低下、副腎皮質におけるアルドステロン分泌の阻害、および腎臓におけるレニン分泌の阻害を引き起こす。BNPの放出によりナトリウム利尿および血管内容量の低下が起こり、効果は抗利尿ホルモン（ADH）の拮抗によって増幅される。ある種の疾病状態において血中BNPレベルが上昇することが発見されており、これはそれらの疾病（卒中、うっ血性心不全（CHF）、心虚血、全身性高血圧、および急性心筋梗塞を含む）の病態生理学においてある役割を果たしていることを示唆している。例えばWO 02/089657；WO 02/083913；およびWO 03/016910（それぞれ、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含むその全体が本発明に組み込まれる）参照。例えばBNPは心室で合成され、左心室圧、呼吸困難の量、および神経ホルモン調節の状態と相関関係

10

【0006】

循環からのナトリウム利尿ペプチドの除去は、主に循環中でのクリアランスレセプターへの結合および酵素分解によって影響を受ける。例えばChoら、Heart Dis. 1: 305-28, 1999；Smithら、J. Endocrinol. 167: 239-46, 2000参照。更に、ヒトプロBNPは血清中で加工され、そのため循環プレプロBNPは無傷の108アミノ酸型である可能性は低いことが報告されている。Huntら、Peptides 18: 1475-81, 1997。ナトリウム利尿ペプチドの分解には中性エンドペプチダーゼが介在していると信じられている。例えばNormanら（Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 175: 22-30, 1991）の報告によれば、中性エンドペプチダーゼはヒトBNPの残基2および3間、残基4および5間、そして残基17および18間を開裂する。更にKnechtら（Life Sci. 71: 2701-12, 2002）の報告によれば、腎臓中性エンドペプチダーゼは、心不全（ナトリウム利尿ペプチド濃度が上昇している症状）では亢進的に制御されている。このため、中性エンドペプチダーゼは循環器疾患の治療において阻害の標的とされてきた。例えばCortiら、Circulation 104: 1856-62, 2001参照。

20

【0007】

ナトリウム利尿ペプチドの安定性、特に血液由来サンプル（例えば血清、血漿、全血）における安定性について為されてきた報告は秩序だっていない。ANPは中性エンドペプチダーゼの基質としてBNPより優れていることが報告されている。同様にShimizuら（Clin. Chem. Acta 305: 181-6, 2001）、Gobinet-Georgesら（Clin. Chem. Lab. Med. 38: 519-23, 2000）、およびMurdochら（Heart 78: 594-7, 1997）はBNPが一定の血液由来サンプルにおいて、または血液を一定条件下で回収した場合に安定であると報告している。Shimizuらによるより最近の報告（Clin. Chem. Acta 316: 129-35, 2002）によれば、全血中のBNPの94%は2個のアミノ末端残基が除去された消化型であり；また、血漿中のBNPは多くの未同定の型に分解されていた。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本発明の一つには、サンプル中の1つ以上のナトリウム利尿ペプチドまたはそのフラグメントの存在または量を測定するために設計された組成物および方法に関する。ナトリウム利尿ペプチドの分解は進行性の過程であり、特に以下の関数であり得る：組織へのナトリウム利尿ペプチドの放出を誘発する事象の開始からサンプルを採取または分析する時点までの経過時間；タンパク分解酵素の存在量；など。この分解により循環量の1つ以上のアミノ酸を喪失したナトリウム利尿ペプチドが生成される。

【0009】

40

50

1つ以上のナトリウム利尿ペプチドについてのアッセイを設計する際、この分解を考慮しなければ、アッセイは数個の型のナトリウム利尿ペプチドを検出するものとなりうる。種々の型は被験体の生理学的状態に関連した個別の結果を生じうるため、また、罹患した被験体における亢進的に制御されたタンパク分解酵素によって、最も興味の対象である可能性の高い被験体において特に多量のフラグメントプールができるため、本明細書に記載する組成物および方法は当業者に診断および予後診断に関する優れた情報を提供しうる。

【0010】

本明細書に記載する方法および組成物は、当該分野における、以下のような種々の循環器疾患の診断および鑑別に使用される、迅速、高感度、かつ特異的な診断アッセイの必要性を満たすことができる：卒中、うっ血性心不全（CHF）、心虚血、全身性高血圧、および／または急性心筋梗塞。更に、本発明の方法および組成物を使用して患者の治療、並びに更に別の診断および／または予後診断指標および指標パネルの開発を促進することもできる。

10

【0011】

関連する目的では、本発明はサンプル中の1つ以上のナトリウム利尿ペプチドの存在または量を検出する方法に関し、方法は上述の分解に感受性であるアッセイを実施することを含む。それらのアッセイによる検出から除外される分子を“非標的”ナトリウム利尿ペプチドと呼ぶ。

【0012】

第一の目的では、本発明はサンプル中の1つ以上のナトリウム利尿ペプチド関連種（以下に定義する）の存在または量を検出する方法に関し、方法は以下に記載するように、目的の特定のポリペプチドのアミノおよび／またはカルボキシル末端での分解に“非感受性”または“感受性”であるアッセイを実施することを含む。

20

【0013】

本発明の関連する目的では、本発明は被験体の診断および／または予後診断のための方法に関し、方法は被験体から採取したサンプル中のBNP、プロBNP、および／またはそれに関連する1つ以上のフラグメントの存在または量を検出するアッセイを実施し、アッセイの結果を特定の診断および／または予後診断に関連づけることを含む。好ましい態様では、被験体は本明細書に定義する循環器症状の1つ以上を有する疑いがあるか、またはそれらの症状を有すると診断されている。好ましくは、本明細書に記載する物質および方法を使用して急性冠症候群に罹患した患者、および／または急性冠症候群に起因する1つ以上の重大な有害結果を被るリスク（例えば死亡のリスク）のある患者を同定できる。

30

【0014】

ある態様では、それらのアッセイをプロBNPのアミノおよび／またはカルボキシル末端の分解に“非感受性”であるように設計する。例えば抗体をBNP₁₋₁₀₈分子の特定の領域に結合するように選択し、それによって、BNP₁₋₁₀₈のアミノ末端から0から1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10残基が除去されて生じる標的分子および／またはBNP₁₋₁₀₈のカルボキシル末端から0から1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10残基が除去されて生じる標的分子が実質的に同等のアッセイ応答を生成するようにしてもよい。関連する態様では、それらのアッセイをBNPのアミノおよび／またはカルボキシル末端の分解に“非感受性”であるように設計する。例えば抗体をBNP₇₇₋₁₀₈分子の特定の領域に結合するように選択し、それによって、BNP₇₇₋₁₀₈のアミノ末端から0から1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9残基が除去されて生じる標的分子および／またはBNP₇₇₋₁₀₈のカルボキシル末端から0から1、2、3、4、もしくは5残基が除去されて生じる標的分子が実質的に同等のアッセイ応答を生成するようにしてもよい。

40

【0015】

等モル量の複数の標的分子に関して5倍以内、最も好ましくは2倍以内であるアッセイ応答は、それらの標的分子に関して“非感受性”であると見なされる。そのようなアッセイにおいて、等モル量の標的分子に関して5倍を超える、最も好ましくは10倍を超えるアッ

50

セイ応答を生じる分子は“非標的”ナトリウム利尿ペプチドであると見なされる。

【0016】

しかしながら、好ましくはBNPまたはプロBNPのアミノおよび／またはカルボキシル末端の分解に“感受性”であるようにアッセイを設計する。従って、無傷のBNP₁₋₁₀₈、または無傷のアミノ末端を有するプロBNPフラグメントが、アミノ末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の残基が欠失した等モル量のプロBNPに比較して少なくとも5倍、最も好ましくは10倍以上低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。あるいはまた、アミノ末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の残基が欠失したプロBNPフラグメントが等モル量の無傷のBNP₁₋₁₀₈または無傷のアミノ末端を有するプロBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍、最も好ましくは10倍以上低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。

10

【0017】

関連する態様では、無傷のBNP₇₇₋₁₀₈または無傷のアミノ末端を有するBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントが、アミノ末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の残基が欠失した等モル量の無傷のBNP₇₇₋₁₀₈またはBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントに比較して少なくとも5倍、最も好ましくは10倍以上低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。あるいはまた、アミノ末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の残基が欠失した無傷のBNP₇₇₋₁₀₈またはBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントが無傷のアミノ末端を有する等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントに比較して少なくとも5倍、最も好ましくは10倍以上低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。

20

【0018】

同様に、カルボキシル末端の分解に感受性であるようにアッセイを設定してもよい。従って、無傷のBNP₁₋₁₀₈または無傷のカルボキシル末端を有するプロBNPフラグメントが、カルボキシル末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の残基が欠失した等モル量のプロBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。あるいはまた、カルボキシル末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の残基が欠失したプロBNPフラグメントが、等モル量の無傷のBNP₁₋₁₀₈または無傷のカルボキシル末端を有するプロBNPフラグメントに比較して少なくとも5倍低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。同様に、無傷のBNP₇₇₋₁₀₈または無傷のカルボキシル末端を有するBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントが、カルボキシル末端の1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の残基が欠失した等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントに比較して少なくとも5倍低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。あるいはまた、カルボキシル末端の1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の残基が欠失したBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントが、等モル量の無傷のBNP₇₇₋₁₀₈または無傷のカルボキシル末端を有するBNP₇₇₋₁₀₈フラグメントに比較して少なくとも5倍低いシグナルで検出されるようにアッセイを設定してもよい。

30

【0019】

種々の好ましい態様では、サンプル中のBNP₁₋₁₀₈、またはBNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連フラグメントの存在または量を非感受性の様式で検出するように本発明のアッセイを設定する。しかしながら、他の好ましい態様では、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連フラグメントに非感受性であるが、等モル量のBNP₁₋₁₀₈に比較して少なくとも5倍低下したシグナルが得られる、より好ましくは10倍低下したシグナルが得られる、最も好ましくはシグナルの検出が認められないように本発明のアッセイを設定する。更に別の好ましい態様では、BNP₁₋₁₀₈からのシグナルを提供するが、等モル量のBNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₃₋₇₆、BNP₅₋₇₆、BNP₇₋₇₆、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のプロBNP関連フラグメントから少なくとも5倍低下したシグナルが得られる、より好ましくは検出が認められないように、本発明のアッセイを設定する。

40

50

【0020】

種々の他の好ましい態様では、サンプル中のBNP₇₇₋₁₀₈、およびBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連フラグメントの存在または量を非感受性の様式で検出するように本発明のアッセイを設定する。しかしながら他の好ましい態様では、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連フラグメントに対して非感受性であるが、等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈に比較して少なくとも5倍低下したシグナルが得られる、より好ましくは10倍低下したシグナルが得られる、そして最も好ましくは検出が認められないように、本発明のアッセイを設定する。更に別の好ましい態様では、BNP₇₇₋₁₀₈からのシグナルを提供するが、等モル量のBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される1つ以上のBNP関連フラグメントに比較して少なくとも5倍低下したシグナルが得られる、好ましくは検出が認められないように、本発明のアッセイを設定する。

10

【0021】

あるアッセイ条件下で、第1群のポリペプチドの結合に関連するシグナルは得られるが等モル量の第2群のポリペプチドからはバックグラウンドを超えるシグナルが得られない場合、そのアッセイでは第2群のポリペプチドの“検出が認められない”。

【0022】

以下に記載するように、それらのアッセイは当業者に周知の種々の方法で設計することができる。好ましいアッセイはイムノアッセイであるが、他の方法も当業者に周知である（例えば一体化した分析物レセプターおよび変換器を含むバイオセンサーの使用、または当業界で周知のナトリウム利尿ペプチドに対する天然のレセプターの使用）。任意の好適なイムノアッセイを利用してもよく、それらは例えば分析物の結合を（例えば偏光解析法によって）直接検出するアッセイ、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、競合結合アッセイ、サンドイッチイムノアッセイなどである。1つ以上のナトリウム利尿ペプチドフラグメントへの抗体またはレセプターの特異的免疫学的結合は直接または間接的に検出できる。直接標識には蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種などを抗体に結合させるものがある。間接標識には当業界で周知の種々の酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどがある。第2の分子（例えば検出可能な標識）に結合した抗体を、本明細書では“抗体コンジュゲート”と記載する。当業者に理解されるように、ナトリウム利尿ペプチドの天然のレセプターが存在し、それらのレセプターを抗体と同様に利用して結合アッセイを提供してもよい。

20

30

【0023】

標的ナトリウム利尿ペプチドと比較してナトリウム利尿ペプチドの非標的フラグメントが部分的に、または完全に存在しないエピトープに結合するように選択した1つ以上の抗体を用いてイムノアッセイを構築してもよい。例えばサンドイッチアッセイにおいて、固相に結合した抗体が分子のN末端部分に選択的に結合するように選択され、標識された抗体が分子のC末端部分に結合するように選択される場合、分子のNおよびC末端部分の両方を含む分子だけがアッセイで検出される。あるいはまた、固相および標識された抗体の両方を分子のN末端部分に結合するように選択してもよい。

40

【0024】

当業者に理解されるように、ナトリウム利尿ペプチドの開裂により、1つの抗体が結合するエピトープ（例えば抗体は天然型N末端領域に結合する）の全てが除去され、新たなエピトープが暴露されてもよい（例えば1つ以上の天然型N末端残基の喪失の際に、新たなN末端領域に抗体が結合する）。あるいはまた、分子の直鎖配列においては連続していないが溶液中での3次元空間において関係のあるナトリウム利尿ペプチドの部分からエピトープが形成され、そのためエピトープは記載したアミノ酸残基以外のものも含むが、記載したアミノ酸残基の領域の除去によって抗体の結合が低減し、アッセイのシグナルが低下する。

50

【0025】

好ましくは種々のナトリウム利尿ペプチドを識別するように本発明のイムノアッセイを設計する。最大のシグナルを得るのに必要な第1のポリペプチド群の量の2倍を超えない量でアッセイを実施する場合、イムノアッセイによって第1ポリペプチド群の結合に関係するシグナルが得られ、そのシグナルが同じアッセイ条件下で同数の第2ポリペプチド群の分子から得られるシグナルより少なくとも5倍高ければ、そのイムノアッセイは第1ポリペプチド群および第2ポリペプチド群を“識別する”と見なされる。更に好ましくは、シグナルはそれらのアッセイ条件下で少なくとも10倍高く、より好ましくは少なくとも20倍高く、そして最も好ましくは少なくとも50倍高いか、少なくとも100倍またはそれ以上高い。

10

【0026】

別の目的では、本発明はBNP₇₇₋₁₀₈またはBNP₁₋₁₀₈のアミノおよび／またはカルボキシル末端での分解状態に“非感受性”または“感受性”のいずれかである抗体に関する。抗体が2つの標的ポリペプチドに対して実質的に同じ結合を示す場合、抗体は第1の標的ポリペプチドおよび第2の標的ポリペプチドに関して“非感受性”であると見なされる。2つのポリペプチドに関して“非感受性”でない抗体は、それらのポリペプチドに関して“感受性”であると見なされる。

【0027】

“実質的に同じ結合”という用語は、アッセイに使用する際、等モル量の2つの標的ポリペプチドに関して5倍以内、最も好ましくは2倍以内のシグナルを提供する抗体をいう。1倍はシグナルが等しいことを示す；シグナルが2倍以内であるということは、一方のシグナルが他方のシグナルx2と等しいかそれ未満であることを示す。好ましくは、実質的に同じ結合を示す抗体は、約1.75倍以内、より好ましくは約1.5倍以内、更に好ましくは約1.25倍以内、そして最も好ましくは約1.1倍から1倍以内のシグナルを提供する。

20

【0028】

それらの抗体は第1の標的ポリペプチドおよび第2の標的ポリペプチドに関して“実質的に同じ親和性”を有してもよく、これは2つの標的ポリペプチドに関して5倍以内、そして最も好ましくは2倍以内である親和性を意味する。1倍は親和性が等しいことを示す；親和性が2倍以内であるということは、一方の親和性が他方のシグナルx2と等しいかそれ未満であることを示す。好ましくは実質的に同じ結合を示す抗体は約1.75倍以内、より好ましくは約1.5倍以内、更に好ましくは約1.25倍以内、そして最も好ましくは約1.1倍から1倍以内の親和性を提供する。

30

【0029】

本発明のある好ましい抗体は、BNP₁₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチドに関して非感受性である。本発明の特に好ましい抗体はBNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメント（例えばBNP₃₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₆など）に関して非感受性であり、そのため抗体はBNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメントに実質的に同じ結合を示す。

【0030】

しかしながら、他の好ましい抗体はBNP₇₇₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチド；またはBNP₁₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチドに関して感受性である。本発明の特に好ましい抗体はBNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメント（例えばBNP₃₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₆など）に関して感受性である。それらの感受性抗体は、例えばBNP₁₋₁₀₈に結合してもよいが、等モル量のBNP₃₋₁₀₈より低いアッセイシグナルを示す。あるいはまた、それらの感受性抗体は、例えばBNP₃₋₁₀₈に結合するが、等モル量のBNP₁₋₁₀₈より低いアッセイシグナルを示す。本発明の他の特に好ましい抗体はBNP₇₇₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したBNPフラグメント（

40

50

例えばBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆など) に関して感受性である。それらの感受性抗体は、例えばBNP₇₇₋₁₀₈に結合してもよいが、等モル量のBNP₇₉₋₁₀₈より低いアッセイシグナルを示す。あるいはまた、それらの感受性抗体は、例えばBNP₇₉₋₁₀₈に結合してもよいが、等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈より低いアッセイシグナルを示す。

【0031】

抗体がシグナルの生成に必要な複合体の形成に関与する場合、イムノアッセイからのシグナルは“抗体の結合に依存する”と見なされる。例えば、固相抗体および第2抗体コンジュゲートを用いて調製されるサンドイッチイムノアッセイでは、それぞれが分析物と結合してサンドイッチを形成し、固相抗体および第2抗体のそれぞれがシグナルの生成に必要な複合体の形成に関与しなければならない。単一の抗体を使用し、分析物が結合をめぐって分析物コンジュゲートと競合する競合イムノアッセイでは、単一の抗体がシグナル生成に必要な複合体の形成に関与する。当業者に理解されるように、多くの更に別のイムノアッセイが構築されうる。

【0032】

当業者に明白なように、本明細書に記載する感受性および／または非感受性抗体およびアッセイを種々に組合せたものを、診断および／または予後診断法における様々なアッセイフォーマットで使用してもよい。例えば、第1の組のポリペプチドに結合する抗体を用いてアッセイを構築し、第2の組のポリペプチドに結合する抗体を用いて第2のアッセイを構築し、2つの群のポリペプチドの比率を求めてもよい。同様に、第1の組のポリペプチドに結合する抗体を用いてそれらのアッセイを構築し、第2の組のポリペプチドに結合する抗体を用いて第2のアッセイを構築し、結果を合計して2つの群のポリペプチドの総量を得てもよい。以下に記載するように、同じサンプルについて複数のアッセイを実施するような装置を提供してもよい。

【0033】

診断および／または予後診断法に使用する場合、本明細書に記載する種々のナトリウム利尿ペプチド関連種に感受性および／または非感受性であるアッセイおよび抗体を使用して複数のマーカー(2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくはそれ以上のマーカー、または個別のマーカーを含む)を提供してもよく、それらのマーカーをマーカーパネルに集結させてもよい。本明細書に記載するアッセイと組み合わせ使用するのに好適なマーカーには“血圧調節関連マーカー”、“血液凝固および止血関連マーカー”、“炎症関連マーカー”、“血管組織関連マーカー”、および“アポトーシス関連マーカー”があり、それらはPCT/US03/41453(2003年12月23日出願)に記載されている(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。特に好ましいマーカーにはカスベース-3、血栓前駆体タンパク質、クレアチンキナーゼ-MB、遊離型および複合型心筋トロポニンI、遊離型および複合型心筋トロポニンT、遊離型心筋トロポニンI、遊離型心筋トロポニンT、複合型心筋トロポニンI、複合型心筋トロポニンT、ミオグロビン、B型ナトリウム利尿ペプチド、NT-プロBNP、C反応性タンパク質、D-ダイマー、ミエロペルオキシダーゼ、およびそれらの関連マーカーがある。

【0034】

更に別の態様では、本明細書に記載するアッセイを用いて複数回の測定を行うことができ、マーカーの経時変化を用いて診断および／または予後診断を行うことができる。例えば1つ以上のポリペプチドを開始時および第2の時点で測定し、その時間にわたるポリペプチドレベルの変化(または変化がないこと)を測定してもよい。それらの態様において、開始時から第2の時点までのポリペプチドの増加によって、1つ以上の症状に潜在する特定の疾患、特定の予後などが診断されうる。同様に、開始時から第2の時点までの減少によって、1つ以上の症状に潜在する特定の疾患、特定の予後などが診断されうる。1つ以上のマーカーの経時変化を、1つの時点でのマーカーレベルと共に用いて、マーカーパネルの識別力を高めてもよい。

【0035】

従って別の目的では、本発明は本明細書に記載するアッセイを実施するために構築およ

10

20

30

40

50

び調整したアッセイ装置に関する。本明細書に記載するアッセイを実施するための装置は好ましくは複数の分離した、独立してアドレスすることができる位置または“診断区画（diagnostic zones）”を含み、そのそれぞれは目的とする特定の分析物または分析物群に関係し、その1つ以上はナトリウム利尿ペプチドである。例えば複数の分離した区画のそれぞれは異なる分析物への結合のためのレセプター（例えば抗体）を含んでもよい。サンプルと装置との反応に次いで診断区画からシグナルが生成され、これを目的のペプチドの存在または量に相関させてもよい。

【0036】

更に別の目的では、本発明は1つ以上の感受性および／または非感受性抗体を選択する方法に関する。これらの方法は、当業界で周知の方法を用いて抗体標品を感受性（またはその欠如）についてスクリーニングすることを含む。代表的なスクリーニング法を以下に記載する。選択が終われば、それらの抗体を本明細書に記載する方法に用いてナトリウム利尿ペプチドの測定を行うことができる。

10

【0037】

特定の好ましい選択法では、BNP₇₇₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチド；またはBNP₁₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチドに関して非感受性である1つ以上の抗体を同定する。

【0038】

20

特に好ましい選択法は、BNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメント（例えばBNP₃₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₆など）に関して非感受性である1つ以上の抗体を同定し、そのため抗体はBNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメントに対して実質的に同じ結合を示す。他の特に好ましい選択法は、BNP₇₇₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したBNPフラグメント（例えばBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆など）に関して非感受性である1つ以上の抗体を同定し、そのため抗体はBNP₇₉₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したBNPフラグメントに対して実質的に同じ結合を示す。

【0039】

特定の他の好ましい選択法は、BNP₇₇₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₇₋₁₀₆、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆から成る群から選択される少なくとも2つのポリペプチド；またはBNP₁₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、およびBNP₇₋₁₀₆から選択される少なくとも2つのポリペプチドに関して感受性である1つ以上の抗体を同定する。特に好ましい選択法は、BNP₁₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したプロBNPフラグメント（例えばBNP₃₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₆など）に関して感受性である1つ以上の抗体を同定する。それらの感受性抗体は、例えばBNP₁₋₁₀₈に結合するが等モル量のBNP₃₋₁₀₈に比較して低いアッセイシグナルを示してもよい。あるいはまた、それらの感受性抗体は、例えばBNP₃₋₁₀₈に結合するが等モル量のBNP₁₋₁₀₈に比較して低いアッセイシグナルを示してもよい。他の特に好ましい選択法は、BNP₇₇₋₁₀₈および2個のアミノ末端残基が欠失したBNPフラグメント（例えばBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆など）に関して感受性である1つ以上の抗体を同定する。それらの感受性抗体は、例えばBNP₇₇₋₁₀₈に結合するが等モル量のBNP₇₉₋₁₀₈に比較して低いアッセイシグナルを示してもよい。あるいはまた、それらの感受性抗体は例えばBNP₇₉₋₁₀₈に結合するが、等モル量のBNP₇₇₋₁₀₈に比較して低いアッセイシグナルを示してもよい。

30

40

【0040】

別の目的では、本発明の1つ以上の抗体および／または抗体コンジュゲートを、ナトリウム利尿ペプチドの存在または量を測定するためのキットとして提供してもよい。これらのキットは、好ましくは本明細書に記載するアッセイの少なくとも1つを試験サンプルに対して実施するための装置および試薬を含む。好ましくはそれらのキットは、それらの測定の1つ以上を実施するために十分な試薬、および／または食品医薬品局（FDA）認可の表示を含む。

50

【0041】

更に別の目的では、本発明は患者に使用する治療計画を決定するための方法に関する。方法は、好ましくは本明細書に記載する方法によって1つ以上のナトリウム利尿ペプチドの存在または量を測定し、この存在または量を疾病または予後の状態と関連づけることを含む。本明細書に記載するように、種々の心血管および脳血管疾患（卒中、うっ血性心不全（CHF）、心虚血、全身性高血圧、急性冠症候群、および／または急性心筋梗塞を含む）の診断および鑑別を、プロBNPおよびそのフラグメントのレベルに関連づけてもよい。診断または予後診断がなされれば、その診断に合わせて治療計画を選択する。

【0042】

上記の本発明の概要は非制限的なものであり、他の本発明の特徴および利点は以下の発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明白になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

発明の詳細な説明

本発明は一部分においては、特定のプロBNP中の種々の型のナトリウム利尿ペプチドを識別する方法に関する。本明細書に記載するように、プロBNPおよび／またはその分解産物を選択的に認識する抗体を生成し、アッセイに使用してもよい。臨床設定において、それらのアッセイから重要な診断および予後診断の情報が得られる。

【0044】

本明細書で使用する“ナトリウム利尿ペプチド”という用語は、体内でレニン・アンギオテンシン系の活性に反して作用する、一群の天然に存在するポリペプチドホルモンのメンバー、並びにその生合成前駆体および生物学的に活性なフラグメントをいう。3つの主たるヒトナトリウム利尿ペプチドがある：心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）（心房で合成される）；脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）（心室で合成される）；およびC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）（脳で合成される）。

【0045】

本明細書でヒトプロBNPに関して使用する“無傷のプロBNP”という用語は、SEQ ID NO: 1に示す完全長の108アミノ酸分子をいう：

HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSL LQVEQTSLEP LQESPRPTGV 50 WKSREVATEG IRGHRKMLVLY
TLRAPRSPKM VQSGGCFGRK MDRISSSSGL 100 GCKVLRRH 108 (SEQ ID NO: 1)

【0046】

成熟ヒトBNP、“BNPナトリウム利尿ペプチド”、または“BNP-32”（上記下線部分）はこの前駆体のアミノ酸77-108を表す32アミノ酸分子であり、BNP₇₇₋₁₀₈とも呼ばれる。残りの残基1-76は以下、NT-プロBNPまたはBNP₁₋₇₆と記載する。

【0047】

種々の他の種（ブタ（*Sus scrofa*）、ウシ（*Bos Taurus*）、イヌ（*Canis familiaris*）、ネコ（*Felis catus*）、ヒツジ（*Ovis aries*）、マウス（*Mus musculus*）、ラット（*Rattus norvegicus*）など）由来のプロBNPの配列が当業界で知られている。例えばLiuら, *Gene* 292: 183-190, 2002参照。

【0048】

本明細書で使用する“フラグメント”という用語は、フラグメントが由来するポリペプチドの少なくとも6個の連続するアミノ酸を含むが、完全長の親ペプチドよりは短いポリペプチドをいう。従って、プロBNP（BNP₁₋₁₀₈）のフラグメントとはBNP₁₋₁₀₈の少なくとも6個の連続するアミノ酸を含むポリペプチドをいう。好ましい態様では、フラグメントとは以下を含むポリペプチドをいう：フラグメントが由来するポリペプチドの少なくとも10個の連続するアミノ酸；フラグメントが由来するポリペプチドの少なくとも15個の連続するアミノ酸；またはフラグメントが由来するポリペプチドの少なくとも20個の連続するアミノ酸。プロBNPの最も好ましいフラグメントはBNP₁₋₇₆の少なくとも6個の連続するアミノ酸およびBNP₇₇₋₁₀₈の少なくとも6個の連続するアミノ酸を含む。従って、最も好ましいフラグメントはNT-プロBNP／成熟BNP開裂部位を架橋する。

10

20

30

40

50

【0049】

本明細書に記載する“関連するフラグメント”という用語は特定のポリペプチドまたはその生合成親化合物の1つ以上のフラグメントをいい、ポリペプチドそのものの代用として、または独立したマーカーとして検出してもよい。BNP₇₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、BNP₇₋₁₀₆、およびBNP₁₋₇₆は“BNP関連フラグメント”の例である。

【0050】

便宜上、特定のナトリウム利尿ペプチド（または生合成前駆体）およびその分子に由来するフラグメントを、本明細書では集合的に“関連種”と記載する。従ってプロBNP（生合成前駆体）並びにBNP₃₋₁₀₈、BNP₅₋₁₀₈、BNP₇₋₁₀₈、BNP₁₋₁₀₆、BNP₃₋₁₀₆、BNP₅₋₁₀₆、BNP₇₋₁₀₆、BNP₁₋₇₆、およびBNP₇₇₋₁₀₈は“プロBNP関連種”である。同様に、BNP₇₇₋₁₀₈（成熟ナトリウム利尿ホルモンBNP）並びにBNP₇₉₋₁₀₈、BNP₈₁₋₁₀₈、BNP₈₃₋₁₀₈、BNP₇₉₋₁₀₆、BNP₈₁₋₁₀₆、およびBNP₈₃₋₁₀₆は“BNP関連種”である。

【0051】

ナトリウム利尿ペプチドフラグメントに関連して本明細書で使用する“アミノ末端分解物（degradation）”という用語は、無傷ペプチドのアミノ末端から1つ以上のアミノ酸を除去して生成されたナトリウム利尿ペプチドのフラグメントをいう。BNP₃₋₁₀₈は2個のアミノ末端残基の除去によるプロBNPのアミノ末端分解物の一例である。同様に、BNP₇₉₋₁₀₈は2個のアミノ末端残基の除去によるBNPのアミノ末端分解物の一例である。好ましい態様では、それらのフラグメントは無傷ペプチドのアミノ末端から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはそれ以上のアミノ酸を除去して生成される；しかしながら、ナトリウム利尿ペプチドはアミノ末端およびカルボキシル末端分解の両方を含んでもよい。BNP₃₋₁₀₆はそれらのプロBNP分解物の一例である。

【0052】

本明細書でナトリウム利尿ペプチドフラグメントに関連して使用する“カルボキシル末端分解物”という用語は、無傷のペプチドのカルボキシル末端から1つ以上のアミノ酸が除去されて生成するナトリウム利尿ペプチドフラグメントをいう。好ましい態様では、それらのフラグメントは無傷ペプチドのアミノ末端から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはそれ以上のアミノ酸が除去されて生成する。BNP₁₋₁₀₆はプロBNPのカルボキシル末端分解物の一例である。

【0053】

本明細書でポリペプチドに関連して使用する“グリコシル化”という用語は、（多くの場合グリカン鎖の形態で）共有結合した糖単位を含有するポリペプチドをいう。個々の糖単位を本明細書では“共有結合した炭水化物残基”と記載する。真核生物におけるポリペプチドのグリコシル化は主にアスパラギン側鎖へのグリコシド結合によって生じるか（“N-結合型”）；セリンもしくはスレオニン側鎖へのグリコシド結合によって生じるか（“O-結合型”）；またはポリペプチドは炭水化物架橋を介してホスファチジルイノシトール脂質アンカーに結合してもよい（“GPI-結合型”）。

【0054】

本明細書で使用する“脱グリコシル”という用語はポリペプチドから1つ以上の共有結合した炭水化物残基を除去する方法をいう。全ての共有結合した炭水化物残基が除去されるのが好ましいが、共有結合した炭水化物残基のいずれかが除去されれば、ポリペプチドは脱グリコシルされたものとみなす。酵素処理、非酵素処理、またはその2つを組み合わせる共有結合した炭水化物残基をポリペプチドから除去してもよい。好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、更に好ましくは少なくとも約80%、そして最も好ましくは少なくとも約90%から約100%の炭水化物残基がポリペプチドから除去される。

【0055】

ポリペプチドに関連して本明細書で使用する“精製された”という用語は、完全に純粋であることを必要としない。むしろ、目的のポリペプチドが分離された環境にあって、他

10

20

30

40

50

のタンパク質と比較した（質量ベースでの）存在量が生体サンプル中の存在量より高いことを意味する。“分離された環境”とは、単一の媒質、例えば単一の溶液、単一のゲル、単一の沈殿などを意味する。精製されたポリペプチドは、例えば実験室での合成、クロマトグラフィー、分離用電気泳動、遠心分離、沈殿、アフィニティー精製など、多くの方法で得てもよい。好ましくは、1つ以上の“精製された”目的のポリペプチドは分離された環境のタンパク質含有量の少なくとも10%である。1つ以上の“実質的に精製された”ポリペプチドは分離された環境のタンパク質含有量の少なくとも50%、より好ましくは分離された環境のタンパク質含有量の少なくとも75%、そして最も好ましくは分離された環境のタンパク質含有量の少なくとも約95%である。タンパク質含有量の測定はHartree (Anal Biochem 48: 422-427 (1972)) が報告するLowryら, J. Biol. Chem. 193: 265, 1951、の方法を変更し、タンパク標準物質としてウシ血清アルブミンを使用して行う。

10

【0056】

本明細書で使用する“抗体”という用語は、抗原もしくはエピトープに特異的に結合する能力のあるイムノグロブリン遺伝子（単数または複数）またはそのフラグメントに由来する、それぞれをモデルとした、または実質的にそれにコードされるペプチドまたはポリペプチドをいう。例えばFundamental Immunology, 第3版, W.E. Paul編, Raven Press, N. Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97参照。抗体という用語は抗原に結合する能力を有する抗原結合部分、すなわち“抗原結合部位”（例えばフラグメント、サブシーケンス、相補性決定領域（CDR））を含み、それらには例えば以下がある：(i) Fabフラグメント（VL、VH、CL、およびCH1ドメインから成る1価フラグメント）；(ii) F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFabフラグメントを含む2価フラグメント）；(iii) VHおよびCH1ドメインから成るFdフラグメント；(iv) 抗体の1つのアームのVLおよびVHドメインから成るFvフラグメント；(v) VHドメインから成るdAbフラグメント（Wardら, (1989) Nature 341:544-546）；(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）。1本鎖抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および分子生物学的方法（例えばファージディスプレイ法）によって得た抗体も参照により“抗体”という用語に含まれる。好ましい抗体は“オムニクローナル（Omniconal）”抗体である。これはファージディスプレイライブラリーから選択される種々の抗体分子の混合物であり、各抗体は 10^9 M^{-1} から 10^{10} M^{-1} の最低限の親和性で標的抗原に特異的に結合する。

20

30

【0057】

“特異的に結合する”という用語は、抗原が全く目的の標的だけに結合することを示すものではない。むしろ、その目的の標的への親和性が非標的分子に対する親和性に比較して約5倍高ければ、抗体は“特異的に結合する”。好ましくは抗体の標的分子に対する親和性は、非標的分子に対する親和性に比較して少なくとも約5倍、好ましくは10倍、より好ましくは25倍、更に好ましくは50倍、そして最も好ましくは100倍以上高い。好ましい態様では、抗体または他の結合物質と抗原間の特異的結合とは、少なくとも 10^6 M^{-1} の結合親和性を意味する。好ましい抗体は少なくとも約 10^7 M^{-1} 、好ましくは約 10^8 M^{-1} から約 10^9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} から約 10^{10} M^{-1} 、または約 10^{10} M^{-1} から約 10^{11} M^{-1} の親和性で結合する。

40

【0058】

親和性は $K_d = k_{off} / k_{on}$ として算出される（ k_{off} は解離速度定数、 k_{on} は会合速度定数、そして K_d は平衡定数である）。親和性の測定は平衡状態で、種々の濃度（ c ）での標識されたりガンドの画分結合（fraction bound）（ r ）を測定することによって行うことができる。データはスキャッチャード式を用いてグラフにする： $r / c = K (n - r)$ ：

式中、

r = 平衡状態における結合したりガンドのモル数／受容体のモル数；

c = 平衡状態における遊離のりガンドの濃度；

K = 平衡会合定数；および

n = 受容体分子当たりのりガンド結合部位数

50

図解法により、 r/c をY軸、 r をX軸にプロットし、スキッチャードプロットを得る。親和性は負の傾きの直線である。 k_{off} の測定は、未標識の過剰なリガンドと結合した標識されたリガンドを競合させることによって得られる（例えば米国特許第6,316,409号参照）。ターゲティング物質の標的分子への親和性は好ましくは少なくとも約 1×10^{-6} 分子/リットル、好ましくは少なくとも約 1×10^{-7} 分子/リットル、より好ましくは少なくとも約 1×10^{-8} 分子/リットル、更に好ましくは少なくとも約 1×10^{-9} 分子/リットル、そして最も好ましくは少なくとも約 1×10^{-10} 分子/リットルである。スキッチャード分析による抗体親和性の測定は当該分野で周知である。例えばvan Erpら, J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; NelsonおよびGriswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988参照。

10

【0059】

本明細書で使用する“分離された”という用語は非連続である表面の領域をいう。すなわち、2つの領域のいずれの部分でもない境界部がそのそれぞれを包囲していれば、2つの領域は互いに分離している。本明細書で使用する“独立してアドレスすることができる”という用語は、特異的シグナルが得られうる表面の分離された領域をいう。当業者に認識されるように、抗体区画も互いに独立であってもよいが、表面上で互いに接触していてもよい。

【0060】

本明細書で使用する“試験サンプル”という用語は、1つ以上の目的的分析物の存在または量が未知であり、アッセイ、好ましくはイムノアッセイで測定されるべきであるサンプルをいう。好ましくは、試験サンプルは被験体（例えば患者）の診断、予後診断、または評価の目的で得た体液である。ある態様では、それらのサンプルは進行中の症状の転帰または症状に対する治療計画の効果を測定する目的で得てもよい。好ましい試験サンプルには血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、および唾液がある。更に当業者に認識されるように、ある種の試験サンプルは分画または精製操作（例えば全血の血清または血漿成分への分離）後に、より簡便に分析される。好ましいサンプルは細菌、ウィルス、および動物（例えばイヌおよびネコ）から得てもよい。特に好ましいサンプルはヒトから得る。比較のために、“標準サンプル”とは、1つ以上の分析物のアッセイ以前に1つ以上の目的的分析物の存在または量が既知であるサンプルをいう。

20

【0061】

本明細書で使用する“疾病サンプル”という用語は、所定の疾病に罹患していることが確認されている被験体から得た組織サンプルをいう。臨床的診断法は当業者に周知である。例えば以下を参照されたい：Kelley's Textbook of Internal Medicine, 第4版, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第17版, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N.J., 1999。

30

【0062】

本明細書で使用する“被験体由来マーカー”という用語は、被験体の1つ以上の細胞で発現または生成されるタンパク質、ポリペプチド、リン脂質、核酸、プリオン、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質、脂質、リポタンパク質、炭水化物、または小分子マーカーをいう。1つ以上のマーカーの存在、非存在、または量変化は特定の疾病の存在を示すか、または特定の疾病の非存在を示しうる。

40

【0063】

本明細書で使用する“約”という用語は、所定の数の $\pm 10\%$ をいう。

【0064】

ナトリウム利尿ペプチドフラグメントの予後診断および診断マーカーとしての使用

上記のように、ナトリウム利尿ペプチドの血中レベルの上昇がある種の疾病状態で観察されており、それらの疾病（例えば卒中、うっ血性心不全（CHF）、心虚血、全身性高血圧、および急性心筋梗塞）の病態生理学における役割を示唆している。例えば以下を参照されたい：WO 02/089657; WO 02/083913; WO 03/016910; Huntら, Biochem. Biophys. Re

50

s. Comm. 214: 1175-83 (1995); Venugopal, J. Clin. Pharm. Ther. 26: 15-31, 2001; およびKalraら, Circulation 107: 571-3, 2003 (それぞれ、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ナトリウム利尿ペプチドは単独で、集合的に、および／または更に別のタンパク質と共に、種々の循環器症状における疾病マーカーおよび予後診断の指標としての役割も果たす。

【0065】

PCT/US04/26984 (2004年4月15日出願) に記載されるように、プロBNPおよび成熟BNPの両者のアミノ末端領域はプロリル特異的ジペプチジルペプチダーゼの標的であり、これらのペプチドのアミノ末端残基は分解に対して感受性であることが証明されている。同様に、プロBNPおよび成熟BNPの両者のカルボキシル末端領域も分解を受ける。1つ以上のナトリウム利尿ペプチドの測定の際に臨床サンプル中に存在する種々のナトリウム利尿ペプチドフラグメントを考慮しなければ、診断または予後診断法の正確さに関して重大な結果を招くことになりうる。例えば単純な症例で、プロBNPに関するサンドイッチイムノアッセイを行い、存在していたプロBNPの有意な量 (例えば50%) が分解し、アミノおよび／またはカルボキシル末端から残基が喪失した場合を検討されたい。プロBNPフラグメントに残存する領域に結合する抗体で構成されたイムノアッセイによってサンプル中に存在する完全長のプロBNPの量が過剰評価され、目的が完全長のプロBNPのみの場合はアッセイにおいて“偽陽性”結果を生じる可能性がある。

【0066】

サンプルのナトリウム利尿ペプチド濃度の過剰評価は患者の管理に重大な結果をもたらす。例えば、プロBNP濃度を用いて (例えば治療に際して上昇したレベルが正常に戻るかどうかを知るためにプロBNPをモニタリングすることによって) うっ血性心不全の療法が有効であるかどうかを判断してもよい。上記と同じプロBNPの“偽陽性”結果によって、医師は現行の治療が有効でないという誤った印象のために治療を継続、増加、または変更する (例えば利尿剤、ACE阻害剤、ジゴキシン、 β -阻害剤、カルシウムチャンネル阻害剤、および／もしくは血管拡張剤投与量を増加する、または外科的処置を考慮する場合さえありうる)。

【0067】

更に、臨床サンプル中に存在する種々のナトリウム利尿ペプチドフラグメントを考慮しなければ、心不全におけるいわゆる“内分泌パラドックス”を明らかにすることになりうる。Goetze (Clin. Chem. 50: 1503-1510, 2004) に記載されるように、心不全患者はBNPの血漿濃度が著しく上昇する。しかしながら驚くべきことにそれらの患者はナトリウム利尿の上昇を示さない。実際、事実は逆で、心不全患者はうっ血、ナトリウム貯留、および浮腫に苦しむ。更に驚くべきことは、これらの同じ患者が外来BNPの投与にตอบสนองして、予期されるナトリウム利尿の上昇を起こすことである。内分泌パラドックスに関して特定の解釈にとらわれることは意図しないが、それらの患者で観察されるBNPの血漿濃度の上昇は、少なくとも一部には、種々のBNPアッセイが無傷のアミノおよび／またはカルボキシル末端を有するBNPとBNPフラグメントを識別できないことに起因すると考えられる。

【0068】

本発明は“急性冠症候群”に分類される1つ以上の症状の診断および予後診断における特定のフラグメント (例えばBNP₇₇₋₁₀₈、BNP₃₋₁₀₈など) に関するアッセイの使用について詳述するが、この代表的な態様は限定的なものではない。プロBNPおよびそのフラグメントの測定を一般的に循環器疾患の診断および／または予後診断に適用してもよい。“循環器疾患”という用語は多様な一連の心臓および血管系障害をいい、それらには以下がある: アテローム性動脈硬化症、虚血性卒中、脳内出血、くも膜下出血、一過性脳虚血発作、収縮不全、拡張機能障害、動脈瘤、大動脈解離、心筋虚血、狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、拡張型うっ血性心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、肺性心、不整脈、心臓弁膜症、心内膜炎、肺塞栓症、静脈血栓症、末梢血管疾患、および急性冠症候群。

【0069】

“急性冠症候群” (“ACS”) という用語は心臓の虚血性発作に起因する一群の冠動脈

10

20

30

40

50

疾患に適用されてきた。ACS患者は異なる病態生理学、臨床所見、および有害事象のリスクを有する異種群をなす。それらの患者は安定狭心症、不安定狭心症、非ST上昇-非Q波心筋梗塞（“NST”-“MI”）、ST上昇-非Q波MI、および貫壁性（Q波）MIを含む連続的な範囲にわたる症状で医師を訪れる。ACSは、主として1つ以上の冠動脈内で血栓が沈着および増大することによって動脈の部分的または完全な閉塞が起こり、多くの場合プラークの破裂を伴って虚血性傷害が起きることによって発症すると信じられる。ACSは冠攣縮性狭心症または心筋需要の上昇によっても発症しうる。総説は、例えばDavies, Clin. Cardiol. 20 (Suppl. I): I2-I7 (1997)を参照されたい。

【0070】

ACSは、アテローム性動脈硬化症または高血圧に一般的に続発する心筋傷害または心筋損傷ともいわれる心臓の血管傷害の症状であり、米国における主要死亡原因である。ACSは一般に冠動脈疾患（動脈硬化プラークの発生および更なる閉塞または亀裂への進行によって起こる）に伴う閉塞によって発症する。ACSは安定狭心症、不安定狭心症、または心筋梗塞の症状を呈しうる。

【0071】

ACSの重症度には虚血発作後の罹患率および死亡率が潜在する。例えば労働者に関する推測によれば、ACS所見の4から6週間以内の死亡または続発する心筋梗塞（MI）のリスクは8-14%であり、死亡、MI、または難治性虚血の割合は15-25%である（TherouxおよびFuster, Circulation 97: 1195-1206, 1998）。米国における急性MIによる死亡総数が約600,000人とすれば、当該分野におけるACSの診断、予後診断、および管理に関する情報の探求が多大なものであったことは当然である。ある種の患者集団においてそれらの情報を提供しうるいくつかの可能性のあるマーカーが同定されており、例えば以下がある：循環心筋トロポニンレベル（例えばAntmanら, N. Eng. J. Med. 335: 1342-9, 1996；米国特許第6,147,688号、第6,156,521号、5,947,124号、および5,795,725号（それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）参照）、ST部分下降（例えばSavonittoら, JAMA 281: 707-13, 1999参照）、循環クレアチンキナーゼレベル（例えばAlexanderら, Circulation (Suppl.) 1629, 1998参照）、および循環C反応性タンパク質レベル（例えばMorrowら, J. Am. Coll. Cardiol. 31: 1460-5, 1998参照）。

【0072】

安定狭心症は労作またはストレス時に起こる収縮性の胸痛を特徴とし、安静またはニトログリセリン舌下剤で緩和される。不安定狭心症は安静時の収縮性胸痛を特徴とし、ニトログリセリン舌下剤で緩和される。狭心痛は通常、ニトログリセリン舌下剤で緩和され、痛みは一般に30分以内に鎮静される。心筋梗塞は30分間以上にわたって継続する収縮性の胸痛を特徴とし、診断用心電図（ECG）でQ波が見られる。不安定狭心症は安定狭心症と心筋梗塞の間の臨床状態であると考えられ、一般に動脈硬化プラークの破裂および血栓の形成を伴う。この点に関して、動脈硬化プラークの破裂は心筋梗塞の最も一般的な要因である。

【0073】

炎症は安定狭心症の間に起こり、プラーク破裂、血小板活性化、および初期の血栓のマーカーを使用して進行中の不安定狭心症の重症度を同定およびモニタリングすることができる。定義によれば、狭心症発作の際に起こる心筋の損傷は可逆的であり、心筋梗塞の際に起こる損傷は不可逆である。このモデルによれば、心筋損傷の特異的マーカーを使用して心筋梗塞を同定することができる。軽度の不安定狭心症から重度の不安定狭心症および心筋梗塞への冠動脈疾患の進行はプラークの不安定性および動脈閉塞の程度に関係する。この進行は、安定なプラークが増大して閉塞が進むことによって緩慢に起こるか、または不安定なプラークの破裂によって血小板の活性化および閉塞性血栓の形成が起こるために急速に起こる。心筋梗塞は最も高い頻度で不安定狭心症と病態生理学を同じにするので、これら2つの事象を識別できるのは心筋損傷の可逆性のみでありうる。しかしながら、重度の不安定狭心症と軽度の心筋梗塞との唯一の識別は臨床的な判断に基づくため、心筋損傷のマーカーは不安定狭心症に罹患すると診断された患者の末梢循環においても見られう

る。

【0074】

現在のACSの診断法には、一般に臨床症状、心電図（ECG）、および末梢循環における心臓マーカーの測定がある。通常不安定狭心症および急性心筋梗塞（AMI）に伴う重度の胸痛の症例においては、血管造影法も使用される。ACS患者は多くの場合、頸部、顎、肩、または左もしくは両腕の内側に放散する収縮性の胸痛を有し、呼吸困難、発汗、動機、意識朦朧、および悪心の随伴症状を有しうる。心筋虚血によってECG診断において変化（Q波およびST部分の変化を含む）が生じうる。心酵素の血漿濃度の上昇は重度の不安定狭心症および心筋梗塞に伴う心組織壊死の程度を反映しうる。

【0075】

循環からのナトリウム利尿ペプチドの除去は分解経路を伴うことが報告されている。事実、一定の環境下でナトリウム利尿ペプチドを開裂する中性エンドペプチダーゼの阻害剤は、ある種の循環器疾患の治療に有望であることが示唆されている。例えばTrindadeおよびRouleau, Heart Fail. Monit. 2: 2-7, 2001参照。ナトリウム利尿ペプチド中のメチオニン残基の酸化によって、生体活性が還元型に比較して低下することも報告されている（Koyamaら, Eur. J. Biochem. 203: 425-32）。本明細書に記載する目的では、メチオニン酸化型は分解産物であると見なしてもよい。

【0076】

本明細書で使用する“診断”という用語は、当業者が患者が所定の疾病または症状に罹患しているかどうかを推定（および決定さえ）できる方法をいう。当業者は多くの場合、1つ以上の診断指標、すなわちマーカーに基づいて診断を行い、その存在、非存在、または量は症状の存在、重症度、または非存在の指標となる。

【0077】

同様に、予後診断は多くの場合、1つ以上の“予後指標”の分析によって行われる。それらはマーカーであり、その患者（または患者から採取したサンプル）におけるその存在または量は所定の経過または結果を起こす確率を表す。例えばそれらの患者から採取したサンプル中で1つ以上の予後指標が十分高レベルに達していれば、そのレベルは、患者がより低いマーカーレベルを示す同様の患者に比較して未来事象を経験する確率が高いことを示しうる。罹患率または死亡率の上昇に関係する予後指標のレベルまたはレベル変化は、患者において“有害事象の素因の増加に関係する”と見なされる。好ましい予後マーカーは患者における遅発性の有害事象の発現または将来のACSの可能性を予測できる。

【0078】

本明細書で診断および予後指標の使用に関して用いられる“相関させる”という用語は、患者における指標の存在または量を、所定の症状に罹患している、もしくはそのリスクがあることが知られている患者；または所定の症状に罹患していないことが知られている個人（すなわち健常者）における存在または量と比較することをいう。例えば、患者サンプル中のマーカーレベルを、特定の型のACSに関係することが知られているレベルと比較することができる。サンプルのマーカーレベルは診断と相関があると見なされる；すなわち当業者はマーカーレベルを用いて患者が特定の型のACSに罹患しているかどうかを確認し、それに従って対応することができる。あるいはまた、サンプルのマーカーレベルを、好ましい転帰（例えばACSの非存在）に関係することが知られているマーカーレベル、例えば健常者集団で観察される平均レベルと比較することができる。

【0079】

Fischerら, Intensive Care Med. 29: 1043-51, 2003の記載から試験の精度の基準を得、それを使用して所定のマーカーまたはマーカーパネルの有効性を測定してもよい。これらの基準には感度および特異度、適中率、尤度比、診断オッズ、およびROC曲線面積がある。好適な試験はこれらの種々の基準に関して以下の結果の1つ以上を示しうる：少なくとも75%の感度かつ少なくとも75%の特異度；少なくとも0.7、より好ましくは少なくとも0.8、更に好ましくは少なくとも0.9、そして最も好ましくは少なくとも0.95のROC曲線面積；および／または少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、そして最も好ましくは少

10

20

30

40

50

なくとも20の陽性尤度比（感度／（1-特異度）で算出）かつ0.3以下、より好ましくは0.2以下、そして最も好ましくは0.1以下の陰性尤度比（（1-感度）／特異度で算出）。

【0080】

ナトリウム利尿ペプチドのグリコシル化

グリコシル化されたポリペプチドは、一般に以下を含有する：1つ以上のアスパラギン残基のアミノ基に結合したN-結合型糖；1つ以上のセリンおよび／もしくはスレオニン残基のヒドロキシル基に結合したO-結合型糖；またはN-およびO-結合型糖を組み合わせたもの。プロBNPを含むナトリウム利尿ペプチドはグリコシル化される可能性があり、そのグリコシル化はサンプル中のある種のナトリウム利尿ペプチド検出法の能力に有意に影響を与えうる。

10

【0081】

グリコシル化によって検出スキームに与えられる可能性のある困難を回避するために、いくつかの方法が用いられる。第1に、グリコシル化の存在が正確な検出の妨げになっている場合、薬剤または酵素処理によってポリペプチドから炭水化物残基を除去することによって、1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドを“検出可能な”状態に変化させてもよい。第2に、目的のナトリウム利尿ペプチド中のグリコシル化の影響を受けないような1つ以上の領域に結合する抗体を慎重に選択し、特定のグリコシル化状態に“非感受性”である抗体を得てもよい。第3に、目的のナトリウム利尿ペプチド中のグリコシル化された1つ以上の領域に結合するが脱グリコシル状態では結合の低下を示す抗体を慎重に選択し、特定のグリコシル化状態に“感受性”である抗体を得てもよい。第4に、目的のナトリウム利尿ペプチドのグリコシル化された1つ以上の領域に結合するが、脱グリコシル状態では結合の増加を示す抗体を慎重に選択し、特定のグリコシル化状態に“感受性”である抗体を得てもよい。必要または要望により、これらの方法を組み合わせてもよい。

20

【0082】

N-およびO-結合型炭水化物残基を除去するための効果的な酵素法は当該分野で周知であり、以下のような酵素を用いる：N-グリカナーゼ（別名：N-グリコシダーゼ）、エンドグリコシダーゼH、エンドグリコシダーゼA、O-グリカナーゼ（別名：エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ）、 α 2-（3,6,8,9）-neuraminidase、 β （1,4）-ガラクトシダーゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンドグリコシダーゼF₁、エンドグリコシダーゼF₂、および／またはエンドグリコシダーゼF₃。このリストは非制限的なものである。ペプチドから糖を除去するためのそれらの酵素法を天然型（非変性）ペプチドに使用してもよい。しかしながらそれらの酵素法においてグリコペプチドの変性を使用してもよく、多くの場合、それによって脱グリコシルの割合が高くなる。一般的な変性条件は約0.01%から約1%のドデシル硫酸ナトリウム（“SDS”）、および必要により約5mMから約500mMの β -メルカプトエタノールをおよそ中性のpH（すなわち約pH6.5から約pH8）でバッファー溶液に混合したものを添加することを含む。それらの方法は約0.2%から約2%のNP-40（一部の脱グリコシル酵素を安定化する役割を果たす）を更に含んでもよい。それらの変性条件と共に高温（例えば約37℃で約0.5時間から約48時間）を使用してもよい。

30

【0083】

共有結合した炭水化物残基をペプチドから除去するための非酵素的薬剤処理の場合、ヒドラジン加水分解が非還元型O-およびN-結合型オリゴ糖の遊離に有効であることが発見されている。オリゴ糖を選択的かつ逐次的に遊離させるには、まず約60℃でO-結合型オリゴ糖を穏やかにヒドラジン分解し、続いて約95℃でN-結合型オリゴ糖をヒドラジン分解する。例えばPatelおよびRarekh, Meth. Enzymol. 230, 58-66, 1994参照。しかしながら、それらの処理によってポリペプチドの分解が起こりうる。マイルドな塩基環境においてアルカリ性水素化ホウ素ナトリウムを利用するO-結合型オリゴ糖のアルカリ- β -脱離は好ましい。例えばGlycobiology: A Practical Approach, Fukuda, M.およびKobata, A. 編, pp. 291-328, IRL/Oxford Univ. Press, Oxford, 1993参照。更に、トリフルオロメタンスルホン酸加水分解を使用してもよい。この方法では一般に無傷のポリペプチドが残されるがグリカンの分解が起こる。これは糖間のグリコシル結合はトリフルオロメタンスルホン酸

40

50

による開裂に感受性であるがペプチド結合は、更に長時間の処理でも安定であるためである。例えばEdge, Biochem. J. 376: 339-50, 2003参照。

【0084】

重要なことに、それらの酵素またはトリフルオロメタンスルホン酸処理後にペプチド内に多く観察される変化は糖残基の除去に起因させることができ、これはグリコシル化以外の翻訳後修飾がそれらの処理に対して安定であると信じられるためである。これによって、目的のポリペプチド上の抗原性エピトープに対する炭水化物およびグリコシル化部位の相対的寄与をよりよく理解することができる。また、脱グリコシルによってポリペプチド集団（例えばサンプル中に存在する目的のナトリウム利尿ペプチドまたはフラグメントの集団で、当業者に周知の方法で配列と関係づけることができるもの）における相違をより理解することができ、これは糖残基の除去によって、観察される集団における相違がアミノ酸含量ではなく糖含量の相違によるものでありうるかどうかの疑念が取り除かれるためである。

【0085】

ペプチドから糖を除去する上記の方法を天然型（非変性）ポリペプチドおよび／または以下のポリペプチドの変性物（denaturation）に用いてもよい。共有結合した炭水化物残基をナトリウム利尿ペプチドから除去するために酵素処理、非酵素処理、または両方の処理のいずれを用いる場合でも、好ましくはこの処理によって少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、更に好ましくは少なくとも約70%、更により好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%から約100%の炭水化物残基が、グリコシル化された目的のナトリウム利尿ペプチドの1つ以上、好ましくは全てから除去される。ポリペプチドのグリコシル化の程度はポリペプチドの見かけの質量をポリペプチドを構成するアミノ酸の質量と比較し、見かけの質量の差し引き分がグリコシル化によるものであると仮定することによって測定できる。他の修飾（例えば酸化、ニトロ化、リン酸化）が起こっていたことが知られている事象において、これらの他の修飾が寄与する質量を見かけの質量から控除してもよい。その後、脱グリコシル処理後のポリペプチドの見かけの質量を測定することによって炭水化物残基除去の程度をモニタリングすることができる。ポリペプチドの見かけの質量の測定法（例えばSDSゲル電気泳動、分析用遠心分離、ゲル浸透クロマトグラフィー、質量分析など）は当業者に周知である。

【0086】

それらのグリコシル化されたナトリウム利尿ペプチドを含有するサンプルが本明細書に定義する試験サンプルであってもよい。それらのサンプル中に存在するグリコシル化されたナトリウム利尿ペプチドは天然に（例えば患者由来のサンプル中に）存在するものであるか、または標準サンプルであってもよい。それらの標準物質の調製に使用されるナトリウム利尿ペプチドは多くの場合、活性なグリコシル化機能を有する哺乳動物組織培養系で組換えによって発現させる。

【0087】

脱グリコシルに次いで、当業者は当該分野で周知の任意のアッセイ法を用いてもよい。それらのアッセイ法でアフィニティー分離、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、液体クロマトグラフィー、および／またはHPLCのような分離法を用いて、検出のために目的の分析物を分離してもよい。好ましい態様では、イムノアッセイ装置および方法を種々のサンドイッチ、競合、または非競合アッセイフォーマットで使用し、目的の1つ以上のナトリウム利尿ペプチドの存在または量に関係するシグナルを発生させる。

【0088】

更に、質量分析法をアッセイ法の一部として便宜に使用してもよい。“質量分析”または“MS”という用語はその質量対電荷比（または“ m/z ”）に基づいてイオンをフィルタリング、検出、および測定する方法をいう。一般に、1つ以上の目的の分子をイオン化し、次いでイオンを質量分析装置内へ導入し、磁場と電場の組合せによってイオンは質量（“ m ”）および電荷（“ z ”）に基づいた空間中の経路をたどる。例えば以下参照：米国特許第6,204,500号（“Mass Spectrometry From Surfaces”）；米国特許第6,107,623号（“M

10

20

30

40

50

ethods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry") ; 米国特許第6,268,144号 ("DN A Diagnostics Based On Mass Spectrometry") ; 米国特許第6,124,137号、 ("Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes") ; Wrightら, "Proteinchip surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures," Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2: 264-76 (1999) ; および、MerchantおよびWeinberger, "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry," Electrophoresis 21: 1164-67 (2000)参照（それぞれ、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。試験サンプル中の分子（例えばペプチド）は当業者に周知の任意の方法でイオン化できる。これらの方法には、限定されるわけではないが電子イオン化法、化学イオン化法、高速原子衝撃イオン化法、電解脱離法、およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（“MALDI”）、表面増強レーザー脱離イオン化法（“SELDI”）、光子イオン化法、エレクトロスプレー法、および誘導結合プラズマ法がある。

10

【0089】

ある種の態様では、上記のMS法をアフィニティー精製段階（例えば1つ以上の目的のポリペプチドに特異的に結合する抗体への結合）と併用する。例えばNelsonら, Anal. Chem., 67: 1153, 1995 ; Tubbsら, Anal. Biochem. 289: 26, 2001 ; Niederkoflerら, Anal. Chem. 73: 3294, 2001参照。

20

【0090】

糖タンパク質の1つの特徴は典型的なグリカンの不均一性である。所定の糖タンパク質の個々の分子がポリペプチド鎖の同じ結合位置に異なる炭水化物を保持していることは非常によく起こることである。炭水化物残基における構造変化によって、糖型と呼ばれる別個の分子サブセットが形成される。種々の分離法では、それらの不均一性により、多様な目的のポリペプチドの電荷および質量の相違、並びに／または多様な目的のポリペプチドの結合マトリクス（例えば抗体）への結合の相違のために分析は実質的に複雑になる。更に炭水化物は、容易にプロトン化されるタンパク質のような化合物ほど効率的にイオン化されず、また気相への移行も効率的でないと考えられる。

【0091】

30

従って好ましい態様では、本明細書に記載する方法によって、1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドから1つ以上の共有結合した炭水化物残基を除去することなく同じアッセイ段階を行った場合に比較して、より高度な目的のナトリウム利尿ペプチドの検出を行うことができる。本明細書で使用する“高度な検出”という用語は、特定の目的のナトリウム利尿ペプチドの1つ以上に関してアッセイ法から得られるシグナルが高いことをいう。それらの高シグナルは、全ての目的のナトリウム利尿ペプチドを検出する能力が高いことを表しうる。例えば、1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドのある種のグリコシル化型には結合しない抗体によって、それらのナトリウム利尿ペプチドの濃度が過小評価されうる；または1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドのある種のグリコシル化型のイオン化効率が低いことによって、MSのアッセイシグナルでそれらのナトリウム利尿ペプチドの濃度が過小評価されうる。脱グリコシルによってアッセイシグナルは高くなりうる。そのようにシグナルが高くなることは、1つ以上の特定の型の目的のナトリウム利尿ペプチドを検出する能力が高いことを表しうる。例えばグリカンの不均一性によって、ある分離法（例えば質量および／または電荷に基づくもの）において1つのポリペプチドが複数の異なる画分に分離されうる。脱グリコシルによってそれらの異なる画分が1つの画分に合一され、それによってその画分はより良好なアッセイシグナルを発生しうる。

40

【0092】

種々の態様で、1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドの検出が1つ以上の目的のナトリウム利尿ペプチドから1つ以上の共有結合した炭水化物残基を除去せずに行った同じアッセイ段階に比較して高いことは、アッセイシグナルが少なくとも約5%、より好ましく

50

は少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約50%、更に好ましくは少なくとも約100%、そして最も好ましくは少なくとも約200%以上上昇することによって評価される。

【0093】

本明細書における“1つ以上の共有結合した炭水化物残基の除去”という用語は、必ずしも存在する炭水化物残基をポリペプチドから除去するために酵素処理または非酵素薬剤処理を使用することを意味しない。むしろ1つ以上の共有結合した炭水化物残基が欠失したポリペプチドを生成させるためのいずれの方法も含むことを意味する。例えば固相合成法を用いて、それらの抗体スクリーニング法で使用するための炭水化物残基を全く含まないポリペプチドを生成してもよい。少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、更に好ましくは少なくとも約80%、そして最も好ましくは少なくとも約90%から約100%の炭水化物残基を目的のグリコシル化されたナトリウム利尿ペプチドの1つ以上、好ましくは全てから除去し、本明細書に記載するスクリーニング法に使用する。

【0094】

抗体の選択

プロBNPおよび成熟BNPの分解状態に感受性または非感受性である抗体の生成および選択を行うにはいくつかの方法がある。例えば1つの方法は目的のフラグメントを精製するか、または（例えば当該分野で周知の固相ペプチド合成法を使用して）目的のフラグメントを合成する。例えばGuide to Protein Purification, Murray P. Deutcher編, Meth. Enzymol. Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields編, Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kisoら, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafaviら, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwaraら, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996参照。次いで、選択したポリペプチドを（例えばマウスまたはウサギに）注射し、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を産生させる。当業者に認識されるように、抗体産生のための多くの方法がある（例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.）。当業者に認識されるように、抗体を模倣する結合フラグメントまたはFabフラグメントは種々の方法によって遺伝情報から調製することもできる（Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C.編), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)）。

【0095】

更に、多くの文献がファージディスプレイ法の使用による選択した標的への結合のためのポリペプチドの生成およびライブラリースクリーニングについて報告している。例えばGwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlinら, Science 249, 404-6, 1990, ScottおよびSmith, Science 249, 386-88, 1990; およびLadnerら, 米国特許第5,571,698号参照。ファージディスプレイ法の基本コンセプトはスクリーニングすべきポリペプチドをコードするDNAとポリペプチド間の物理的結合の構築である。この物理的結合は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを封入するキャプシドの一部としてポリペプチドを表示するファージ粒子によって提供する。ポリペプチドとその遺伝物質間の物理的結合の構築によって、異なるポリペプチドを保有する非常に多くのファージの同時マスキングが可能となる。標的に親和性のあるポリペプチドを提示するファージは標的と結合し、それらのファージは標的に対するアフィニティースクリーニングによって濃縮される。それらのファージから提示されるポリペプチドの同定はその各々のゲノムから行うことができる。次いでこれらの方法を用いて、目的の標的に対して結合親和性を有することが同定されたポリペプチドを慣例的な方法で大量合成できる。例えば米国特許第6,057,098号（全ての表、図面、および特許請求の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照。

【0096】

その後これらの方法で生成された抗体を、精製された目的のナトリウム利尿ペプチド（

10

20

30

40

50

例えばプロBNPまたはそのフラグメントの1つ)との親和性および特異性に関する第1のスクリーニングによって選択し、必要によりその結果を、結合から除去することが所望されるナトリウム利尿ペプチドと抗体との親和性および特異性と比較してもよい。スクリーニング法はマイクロタイタープレートの分離されたウェルに精製されたナトリウム利尿フラグメントを固定化することを含んでもよい。次いで、可能性のある抗体または抗体群を含む溶液をそれぞれのマイクロタイターウェルに注入し、約30分から2時間インキュベートする。その後マイクロタイターウェルを洗浄し、標識された2次抗体(例えば産生させた抗体がマウス抗体である場合、アルカリホスファターゼにコンジュゲートさせた抗マウス抗体)をウェルに添加し、約30分間インキュベートした後洗浄する。基質をウェルに添加し、色素反応によって固定化されたナトリウム利尿ペプチドおよびフラグメントに対する抗体がどこに存在するかを明らかにする。同様の方法を使用してグリコシル化非感受性抗体をスクリーニングしてもよい。この場合、スクリーニングは1つ以上の炭水化物残基を含有する、および欠失する、精製されたナトリウム利尿フラグメントを用いて行ってもよい。

10

【0097】

その後、選択したアッセイで、そのようにして同定された抗体を目的のナトリウム利尿ペプチドに対する親和性および特異性に関して更に分析してもよい。標的タンパク質のイムノアッセイの開発において、精製された標的タンパク質は標準物質として作用し、これによって選択された抗体を用いるイムノアッセイの感度および特異度を判定する。種々の抗体の結合親和性は多様であり、ある種の抗体対は(例えばサンドイッチアッセイで)互いに立体的あるいはその他の様式で干渉する場合があるため、抗体のアッセイ挙動は抗体の絶対的な親和性および特異性より重要な基準でありうる。

20

【0098】

当業者に認識されるように、抗体または結合フラグメントの生成、並びに種々のナトリウム利尿ペプチドの親和性および特異性のスクリーニングおよび選択のために多くの方法がとられるが、これらの方法は本発明の意図を変更するものではない。

【0099】

マーカーパネルにおけるナトリウム利尿ペプチドの利用

疾病の診断、特に鑑別診断のための1つ以上のマーカーを同定する方法および系がこれまでに報告されてきた。疾病状態の診断に有用なマーカーを同定するための好適な方法は米国特許出願第10/331,127号(“METHOD AND SYSTEM FOR DISEASE DETECTION USING MARKER COMBINATIONS”(代理人整理番号071949-6802、2002年12月27日出願)(全ての表、図面、および特許出願の範囲を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に詳述されている。当業者に認識されるように、マーカーの単変量解析を行い、複数のマーカーの単変量解析から得たデータを合わせて、種々の疾病状態を鑑別するためのマーカーパネルを生成することができる。

30

【0100】

診断に有用なマーカーパネルの開発において、一定のマーカーの存在またはレベルに関する試験によって、可能性のある多くのマーカーに関するデータを被験体群から得てもよい。被験体群を2群に分け、好ましくは第1群および第2群はそれぞれ約同数の被験体を有する。第1群は、疾病を有する、またはより一般的には症状の第1段階にあることが確認されている被験体を含む。例えばこの第1群の患者は最近発症した患者であるか、または特定の型の疾病を有する患者であってもよい。症状の確認は、より厳密および/または高価な試験(例えばMRIまたはCT)によって行ってもよい。以下、この第1群の被験体を“疾病を有する”と記載する。

40

【0101】

第2群の被験体は単に第1群に分類されない被験体である。この第2群の被験体は“非疾病”、すなわち健常者であってもよい。あるいは、この第2群の被験体は“疾病を有する”被験体が呈する症状に類似した症状または一連の症状を示すように選択してもよい。更に別の選択肢としてこの第2群は、発症から種々の時点にあるものであってもよい。

50

【0102】

それらの群の被験体から得られるデータには複数のマーカーのレベルがあり、本発明の目的では、個別に、または群として測定されるナトリウム利尿ペプチドの1つ以上のフラグメントがある。好ましくは同じ群のマーカーに関するデータが各患者から得られる。このマーカー群には、特定の疾病または症状の検出に関係があると考えられうる全ての候補となるマーカーが含まれる。実際に関連性が既知である必要はない。本明細書に記載する方法および系の態様を使用して、候補マーカーのいずれが疾病または症状の診断に最も関連性が高いかを確認してもよい。2群の被験体におけるそれぞれのマーカーのレベルは、例えばガウス分布のように、広範にわたって分布しうる。しかしながら、分布に適合する必要はない。

10

【0103】

多くの場合、マーカーによって疾病または非疾病患者を断定的に同定することはできない。例えばある患者のマーカーレベルがオーバーラップした領域に含まれると測定された場合、試験結果は患者の診断に有効ではない。人為的なカットオフを用いて陽性試験結果と陰性試験結果を区別し、疾病または症状の検出を行ってもよい。カットオフをどこに選択するかにかかわらず、診断ツールとしての1つのマーカーの有効性は影響を受けない。カットオフ値の変更は単に、1つのマーカーの使用に起因する偽陽性数と偽陰性数間のトレードオフである。そのようなオーバーラップを有する試験の有効性は、多くの場合ROC (Receiver Operating Characteristic; 受信者動作) 曲線を用いて表される。ROC曲線は当業者に周知である。

20

【0104】

ROC曲線の横軸は(1-特異度)を表し、これは偽陽性の割合に伴って増加する。曲線の縦軸は感度を表し、これは真陽性の割合に伴って増加する。従って選択した特定のカットオフに関して、(1-特異度)の値を測定し、相当する感度を得てもよい。ROC曲線下面積は、測定したマーカーレベルによって正確な疾病または症状の同定が行える可能性の度合いである。従ってROC曲線下面積を用いて試験の有効性を判定できる。

【0105】

上述のように、1つのマーカーレベルの測定ではその有用性が限定されうる。更に別のマーカーの測定によって追加の情報が得られるが、2つの関連していない可能性のある測定値のレベルを好適に組み合わせるのには困難が伴う。本発明の態様にかかる方法および系では、疾病患者群および非疾病群に関する種々のマーカーのレベルに関連するデータを用いて、有効なパネル応答が得られるようなマーカーパネルを開発してもよい。データはMicrosoft Access、Oracleのようなデータベース、他のSQLデータベース、または単なるデータファイルとして得てもよい。データベースまたはデータファイルは、例えば患者の識別子(例えば名前または番号)、存在する種々のマーカーのレベル、および患者が疾病を有するか否かを含んでもよい。

30

【0106】

次に、各マーカーについて、最初に人為的なカットオフ領域を選択してもよい。カットオフ領域の位置はいずれの時点で選択してもよいが、その選択は以下に記載する最適化過程に影響を与えうる。この点に関して、最適な位置と考えられる付近を選択することによって、最適化の実施者はより迅速に収束を行うことができる。好ましい方法では、初めにカットオフ領域を2群の患者のオーバーラップ領域の中央付近に集中させる。ある態様では、カットオフ領域は単にカットオフ点であってもよい。他の態様では、カットオフ領域はゼロを超える長さを有してもよい。この点に関して、カットオフ領域は中央値および長さで定義してもよい。実践では、最初のカットオフ領域の限界の選択はあらかじめ選択した各被験体群の百分率に従って決定してもよい。例えば、あらかじめ選択した疾病患者の百分率の測定値より高い点を、カットオフ領域の右(上)限として使用してもよい。

40

【0107】

次いで各患者の各マーカー値を指標に対してマッピングする。指標の一方はカットオフ領域より低い値、他方はカットオフ領域より高い値とする。例えば、マーカー値が一般的

50

に非疾病者で低く、疾病患者で高い場合、ゼロ指標を特定のマーカーの低値とし、これは陽性診断の可能性が潜在的に低いことを示している。他の態様では、指標は多項式に基づいて算出してもよい。多項式の係数は疾病患者および非疾病者間のマーカー値の分布に基づいて算出してもよい。

【0108】

種々のマーカーの相対的重要度は重み係数で示してもよい。まず重み係数を各マーカーの係数としてもよい。カットオフ領域の場合と同じように、重み係数の最初の選択はいずれの許容しうる値で選択してもよいが、その選択は最適化過程に影響を与えうる。この点に関しては、最適な位置であると考えられる付近を選択することによって、最適化の実施者はより迅速に収束を行うことができる。好ましい方法では、許容される重み係数を0から1の間とし、各マーカーの重み係数の初期値を0.5としてもよい。好ましい態様では、各マーカーの重み係数の初期値はそのマーカーそのものの有効性と関係してもよい。例えば1つのマーカーに関してROC曲線を作成し、ROC曲線下面積をそのマーカーの重み係数の初期値として用いてもよい。

10

【0109】

次に、2つの群のそれぞれにおいて、各被験者についてパネル応答を算出してもよい。パネル応答は、各マーカーレベルをマッピングする指標と、各マーカーの重み係数との関数である。好ましい態様では、各被験者（ j ）に関するパネル応答（ R ）は以下のように表される：

$$R_j = \sum w_i I_{i,j},$$

20

式中、 i はマーカーインデックスであり、 j は被験者インデックスであり、 w_i はマーカー i の重み係数であり、 I は被験者 j についてのマーカー i のマーカーレベルをマッピングする指標値であり、そして Σ は全ての候補マーカー i の合計である。

【0110】

マーカー値ではなく指標値を使用する利点の一つは、マーカーレベルが極度に高い、または低いことによって、その特定のマーカーに関する疾病または非疾病の診断の可能性が変化することがないことである。一般に、あるレベル以上のマーカー値はある種の疾病状態を示す。そのレベル以上のマーカー値は同じ確実性を示す。従って、極度に高いマーカー値がその疾病状態の可能性が極度に高いことを示さない場合もありうる。カットオフ領域の片側で一定である指標を用いることによって、この問題が回避される。

30

【0111】

パネル応答もまた、マーカーレベルおよび他の因子（例えば患者の人種および性別）を含むいくつかのパラメーターの一般関数でありうる。パネル応答に関与する他の因子には一定時間にわたる特定のマーカー値の傾きがありうる。例えば、患者が最初に病院に到着した時点で特定のマーカーを測定する。1時間後に同じマーカーを再び測定し、レベル変化をパネル応答に反映させる。更に、更に別のマーカーが他のマーカーから誘導されてもよく、パネル応答の値に寄与してもよい。例えば2つのマーカー値の割合がパネル応答の算出における係数であってもよい。

【0112】

各被験者群の各被験者についてのパネル応答が得られたら、各群のパネル応答の分布を分析してもよい。目的関数を定義して、有効なパネルの選択を容易にしてもよい。目的関数は、一般にパネルの有効性を示すものであるべきであり、例えば疾病群患者のパネル応答と非疾病群のパネル応答のオーバーラップによって表してもよい。このように、例えばオーバーラップを最小化することによって、パネルの有効性が最大となるように目的関数を最適化してもよい。

40

【0113】

好ましい態様では、2群の被験者のパネル応答を表すROC曲線を用いて目的関数を定義してもよい。例えば、目的関数はROC曲線下面積を反映してもよい。曲線下面積を最大にすることによって、マーカーパネルの有効性を最大にすることができる。別の態様では、ROC曲線の他の特徴を用いて目的関数を定義してもよい。例えば、ROC曲線の傾きが1に等

50

しくなる点は有用な特徴でありうる。他の態様では、感度および特異度の積が最大となる点（ニー（knee）と呼ばれることもある）を用いてもよい。ある態様では、ニーでの感度が最大でありうる。更に別の態様では、既定の特異度レベルでの感度を用いて目的関数を定義してもよい。他の態様では既定の感度レベルでの特異度を用いてもよい。更に別の態様では、これらのROC曲線の特徴の2つ以上を併用してもよい。

【0114】

パネル中のマーカーの一つが、診断されるべき疾病または症状に特異的であってもよい。それらのマーカーが一定の閾値より高い、または低い場合、“陽性”の試験結果が得られるようにパネル応答を設定してもよい。しかしながら、閾値が満足なものではない場合であっても、マーカーのレベルを目的関数の可能な寄与因子として用いることができる。

10

【0115】

最適化アルゴリズムを用いて目的関数を最大化または最小化してもよい。最適化アルゴリズムは当業者に周知であり、それらにはいくつかの一般に利用できる最小化または最大化関数、例えばシプレックス法および他の制約付き最適化法がある。当業者に理解されるように、ある最小化関数は局所的な最小点ではなく大域的な最小点の探索において他のものより優れている。最適化の過程では、各マーカーのカットオフ領域の位置およびサイズを変化させることによって、マーカー当たり少なくとも2自由度を与えてもよい。本明細書ではそれらの可変パラメーターを独立変数と記載する。好ましい態様では、各マーカーの重み係数を最適化アルゴリズムの反復にわたって変化させてもよい。種々の態様において、これらのパラメーターの順列を独立変数として用いてもよい。

20

【0116】

上記のパラメーターに加え、各マーカーのセンス（sense）も独立変数として用いてもよい。例えば多くの場合、ある種のマーカーのレベルが高いことが一般に疾病状態を示しているのか非疾病状態を示しているのか、未知であり得る。それらの場合、最適化過程で両側についての検討を行うのが有用であり得る。実際には、これはいくつかの方法で実施される。例えばある態様では、センスは全く分離した独立変数であって、最適化過程で正と負を逆にしてもよい。あるいはまた、センスは重み係数を負にして行ってもよい。

【0117】

同様に、最適化アルゴリズムはある種の制約を伴って与えられてもよい。例えば得られるROC曲線が特定の値より高い曲線下面積となるように制約を与えてもよい。曲線下面積が0.5であるROC曲線は完全に区別不能であり、曲線下面積が1.0であれば2つの群は完全に分離していることを示している。従って、特に目的関数に曲線下面積が組み込まれない場合、許容される最小値（例えば0.75）を制約として用いてもよい。他の制約には、特定のマーカーの重み係数に対する制限がある。更なる制約により、全ての重み係数の和を特定の値（例えば1.0）に制限してもよい。

30

【0118】

最適化アルゴリズムの反復は一般に、制約を満たしつつ目的関数を最小化または最大化するように独立パラメーターを変化させる。最適化過程で反復数を制限してもよい。更に、目的関数における2つの連続する反復間の差異が既定の閾値未満となり、それによって最適化アルゴリズムが局所的な最小または最大領域に達したことが示された時点で最適化過程を終了してもよい。

40

【0119】

従って、最適化過程は指標に対してマーカー値をマッピングするための、各マーカーの重み係数およびカットオフ領域を含むマーカーパネルを提供してもよい。測定が必要とされるマーカーレベルがより少ない低コストのパネルを開発するために、一定のマーカーをパネルから除去してもよい。この点において、パネル中の各マーカーの効果的寄与を確認し、マーカーの相対的重要度を同定してもよい。ある態様では、最適化過程から得られた重み係数を用いて各マーカーの相対的重要度を求めてもよい。最も係数の低いマーカーを除いてもよい。

【0120】

50

ある場合には、重み係数の低さが重要度の低さを示していないこともある。同様に、重み係数の高さが重要度の高さを示していないこともある。例えば関連するマーカーが診断に無関係である場合、最適化過程によって高い係数が得られうる。この場合、係数を無理に低くする利点はない。この係数の変化は目的関数の値に影響を与えないかもしれない。

【0121】

治療計画の作成のためのナトリウム利尿ペプチドの使用

本明細書に記載する種々のナトリウム利尿ペプチドのような有用な診断または予後指標は、医師が治療計画の選択肢から選択を行う助けとなる。例えば急性冠症候群後にトロポニンTまたはIが上昇した患者は、有効な抗血小板療法および抗血栓療法、並びに血管再建術を含む早期の積極的戦略によって特定の利益が得られると考えられる。Hammら, N. Engl. J. Med. 340: 1623-9 (1999); Morrowら, J. Am. Coll. Cardiol. 36: 1812-7 (2000); Cannonら, Am. J. Cardiol. 82: 731-6 (1998)。更に、心筋梗塞後にC反応性タンパク質が上昇した患者は、HMG-CoA還元酵素阻害剤療法で特定の利益が得られると考えられる。Ridkerら, Circulation 98: 839-44 (1998)。うっ血性心不全患者において、ACE阻害剤はBNPレベルを用量依存的に低下させることが予備的研究で示唆されている。Van Velthuisenら, J. Am. Coll. Cardiol. 32: 1811-8 (1998)。

【0122】

同様に、1つ以上のナトリウム利尿ペプチドのレベルに基づく“患者に合わせた (tailoring)”利尿および血管拡張療法によって予後が改善されうる。例えばTroughtonら, Lancet 355: 1126-30 (2000)参照。最後に、16患者についての1回の予備的研究で明らかになったところによれば、Q波MI後のプラセボではなくACE阻害剤に対するランダム化はそれに続く6ヶ月間にわたるBNPレベルの低下と関係があった。Motwaniら, Lancet 341: 1109-13 (1993)。BNPは有用な心臓および腎臓効果を有する拮抗 (counter-regulatory) ホルモンであるため、BNP濃度の変化は心室機能の向上および心室壁張力の低下を反映すると考えられる。近年の論文はNTプロBNPおよびBNPアッセイの相関を明らかにしている (Fischerら, Clin. Chem. 47: 591-594 (2001))。ナトリウム利尿ペプチド (個別の場合も、またはマーカー群としてみなす場合も) の濃度を指針として利尿および血管拡張療法を行い、患者の予後を改善できる。更に、患者の予後指標として使用するためのナトリウム利尿ペプチド (個別の場合も、またはマーカー群としてみなす場合も) の測定は本発明の範囲内に含まれる。

【0123】

うっ血性心不全で入院した患者に関する最近の研究で、BNPの連続測定によって、1回の測定に比較して多くの予後情報が得られうることが示唆されている。すなわち、治療後にBNPが低下すれば、上昇したままの場合に比較して良好な予後であることが、アッセイによって明らかになる。Chengら, J. Am. Coll. Cardiol. 37: 386-91 (2001)。従って、本発明にかかるナトリウム利尿ペプチドの連続測定によって、患者におけるマーカーの予後診断および／または診断価値が上昇し、従ってこれは本発明の範囲に含まれる。

【0124】

アッセイ測定法

試験サンプル中のポリペプチドまたはタンパク質の検出および分析のための多くの方法および装置が当業者に知られている。好ましい態様では、多くの場合、イムノアッセイ装置および方法を使用する。例えば米国特許第6,143,576号、第6,113,855号、第6,019,944号、第5,985,579号、第5,947,124号、第5,939,272号、第5,922,615号、第5,885,527号、第5,851,776号、第5,824,799号、第5,679,526号、第5,525,524号、および第5,480,792号参照 (それぞれ、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。これらの装置および方法では、種々のサンドイッチ、競合、または非競合アッセイフォーマットで、標識された分子を用いて目的の分析物の存在または量に関するシグナルを生じさせてもよい。更に、ある種の方法および装置 (例えばバイオセンサーおよび光学イムノアッセイ) を用いて、標識された分子を必要とせずに分析物の存在または量を測定してもよい。例えば米国特許第5,631,171号および第5,955,377号

参照（それぞれ、全ての表、図面、および特許請求の範囲を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。当業者に認識されるように、ロボット装置（それに限定されるわけではないがBeckman Access、Abbott AxSym、Roche ElecSys、Dade Behring Stratusシステムがある）は本明細書に記載するイムノアッセイを行う能力のあるイムノアッセイ分析装置に含まれる。マーカーへの抗体の特異的免疫学的結合は直接または間接的に検出できる。直接標識には抗体に結合した蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種などがある。間接標識には当該分野で周知の種々の酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどがある。

【0125】

1つ以上のポリペプチドに特異的な固定化された抗体の使用も本発明で企図される。抗体は種々の固相担体、例えば磁気またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイ個所の表面（例えばマイクロタイタープレートのウェル）、固体基質物質または膜の薄片（例えばプラスチック、ナイロン、紙）などに固定化してもよい。抗体または配列させた複数の抗体を固相担体上にコーティングしてアッセイストリップを調製してもよい。次いでこのストリップを試験サンプルに浸漬した後、素早く洗浄および検出段階を行い、測定可能なシグナル（例えば有色点）を生成させる。

【0126】

複数のポリペプチドの分析を個別に、または1つの試験サンプルで同時に行ってもよい。個別または逐次アッセイに好適な器具には臨床検査分析器、例えばElecSys (Roche)、AxSym (Abbott)、Access (Beckman)、ADVIA（登録商標）CENTAUR（登録商標）(Bayer)イムノアッセイシステム、NICHOLS ADVANTAGE（登録商標）(Nichols Institute)イムノアッセイシステムなどがある。好ましい器具またはタンパク質チップは1つの表面上で複数のポリペプチドの同時アッセイを行うものである。特に有用な物理的フォーマットには、複数の異なる分析物を検出するための複数の分離した、アドレス可能な位置を有する表面が含まれる。それらのフォーマットにはタンパク質マイクロアレイ、または“タンパク質チップ”（例えばNgおよびIlag, J. Cell Mol. Med. 6: 329-340 (2002)参照）、およびある種のキャピラリー装置（例えば米国特許第6,019,944号参照）がある。これらの態様では、それぞれの分離した表面位置は1つ以上の分析物（例えば1つ以上の本発明のポリペプチド）を固定化するための抗体を含み、それぞれの位置で検出が行われてもよい。あるいはまた、表面は、表面の分離した位置に固定化された1つ以上の分離した粒子（例えばマイクロ粒子またはナノ粒子）を含み、マイクロ粒子は検出のために分析物（例えば1つ以上の本発明のポリペプチド）を固定化する抗体を含んでもよい。

【0127】

更に、当業者に認識されるように、同じ個体由来の（例えば連続的時点での）複数のサンプルを試験することは価値がある。それらの連続的サンプルの試験によって、一定時間にわたるポリペプチドレベルの変化を同定できる。ポリペプチドレベルの増加または低下、並びにそれらのレベルが変化しないことによって、疾病状態に関する有用な情報が得られるが、それらには、限定されるわけではないが以下がある：事象の発生からのおおよその時間の同定、救済可能な組織の存在および量、薬剤治療の妥当性、再灌流または症状の回復によって示される種々の療法の有効性、同様の症状を有する種々の型の疾病の識別、事象の深刻度の同定、疾病の重症度の同定、および未来事象のリスクを含む患者の転帰の同定。

【0128】

上記のポリペプチドからなり、必要により疾病の診断、予後診断、または鑑別に有用な他のタンパク質マーカーを含むパネルを構築して、鑑別診断に関係する関連情報を得てもよい。それらのパネルを構築して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、もしくはそれ以上、または個別的分析物（1つ以上の本発明のポリペプチドを含む）を検出してもよい。当業者は1つの分析物または分析物のサブセットの分析を実施し、種々の臨床設定において臨床感度または特異度を最適化することができる。これらには、限定されるわけではないが通院（ambulatory）、救急（urgent care）、救命救急、集中治療、モニタリン

10

20

30

40

50

グユニット、入院患者、外来患者、診察室 (physician office)、診療所、および健康診断設定がある。更に、当業者は上記の設定のそれぞれにおいて、1つの分析物または分析物のサブセットを診断閾値の調整と合わせて用いることによって臨床感度および特異度を最適化することができる。アッセイの臨床感度をアッセイが正確に予測する疾病を有する者のパーセントで定義し、アッセイの特異度をアッセイが正確に予測する疾病を有さない者のパーセントと定義する (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 第2版, Carl Burtis および Edward Ashwood 編, W.B. Saunders and Company, p. 496)。

【0129】

分析物の分析は同様に種々の物理的フォーマットで実施できる。例えばマイクロタイタープレートまたは自動化の使用により、大量の試験サンプルの処理を容易にできる。あるいはまた、1つのサンプルフォーマットを開発して、例えば救急輸送または緊急治療室の設定で直ちに緊急治療および診断を行うことができる。

10

【0130】

ある態様では、アッセイから得られるシグナルは1つ以上のナトリウム利尿ペプチドの存在または量に関係している必要はない；むしろ、疾病の存在もしくは非存在、または疾病に関係する将来的な有害事象の可能性に直接関係していてもよい。例えば、シグナルのレベル x はサンプル中に y pg/mLのナトリウム利尿ペプチドが存在していることを示しているかもしれない。その場合、表はそのナトリウム利尿ペプチド y pg/mLがうっ血性心不全を示していることを示唆しうる。どれだけの量のナトリウム利尿ペプチドが存在するかを測定せずに、単にシグナルレベル x をうっ血性心不全に直接関係づけることも同様に有効であり得る。それらのシグナルは好ましくはイムノアッセイから本発明の抗体を用いて得るが、他の方法も当業者に周知である。

20

【0131】

上記のように、サンプルは、採取した瞬間からナトリウム利尿ペプチドまたはそのフラグメントを分解し続けうる。従って1つ以上のプロテアーゼ阻害剤をアッセイ前にサンプルに添加するのが便宜であり得る。多くのプロテアーゼ阻害剤が当業者に知られており、代表的な阻害剤は例えばThe Complete Guide for Protease Inhibition, Roche Molecular Biochemicals (1999.6.3改訂)、http://www.roche-applied-science.com/fst/products.htm?/prod__inf/manuals/protease/prot__toc.htm、およびヨーロッパ特許出願第03013792.1号 (EP 1 378 242 A1として出願) に掲載されている (それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。種々の金属プロテアーゼおよびカルシウム依存性プロテアーゼが血液由来のサンプル中に存在することが知られているため、EGTAおよび/またはEDTAのようなキレート剤はプロテアーゼ阻害剤としても作用する。更に、またはその代替として、中性エンドペプチダーゼおよび/またはジペプチジルペプチダーゼの阻害剤を使用してもよい。

30

【実施例】

【0132】

以下の実施例は本発明を例証するためのものである。これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【0133】

40

実施例1：血液サンプリング

血液は好ましくは20ゲージ針 (multi-sample needle) および真空管を用い、静脈穿刺によって回収するが、少量の場合は指先穿刺、足底面穿刺、耳たぶ穿刺などでも十分である。全血採取では、訓練を受けた研究者がEDTAを含有する血液採取管に血液標本を採取する。血清回収では、訓練を受けた研究者がトロンビン含有する血液回収管に血液標本を採取する。血液を5-10分間凝固させ、遠心分離で血清を不溶性物質から分離する。血漿回収では、訓練を受けた研究者がクエン酸塩を含有する血液採取管に血液標本を採取し、12分間以上遠心分離する。サンプルは使用まで4℃で保存するか、より長期の保存には-20℃以下で凍結してもよい。全血は好ましくは凍結しない。

【0134】

50

実施例 2 : BNP₃₋₁₀₈の発現

ヒトBNP₃₋₁₀₈の5'末端の配列およびヒトプロBNPの3'末端のコード配列に相当するようにPCRプライマーを構築した (Genbank 受託番号M31776)。5' PCRプライマーは、翻訳開始部位に加え、マウスカッパ鎖シグナル配列のコドンヒトプロBNPの第3のアミノ酸のすぐ上流に、インフレームで導入する。アウター5'プライマーはその5'末端にEcoRI部位およびすぐ上流の配列に相当する21塩基対のベクター配列を含有した。3'プライマーは、組換えタンパク質の精製を容易にするためのタグのコドンコード配列の末端および停止コドンの間に導入し、それらはFLAGペプチドタグおよび金属キレートアフィニティークロマトグラフィーに好適な第2のタグであった。アウター3'プライマーはその5'末端に、6塩基のNotI部位およびすぐ下流の配列を含む約20ヌクレオチドのベクター配列を含有した。構築したこれらのプライマーの5'末端のベクター配列は、T4 DNAポリメラーゼ処理の際に1本鎖のオーバーハングとなり、これはベクター上のものに特異的かつ相補的である。

【0135】

BNP₃₋₁₀₈遺伝子挿入断片の第一次PCR増殖を、以下を含有する50 μl反応液中で行った：50pmolの5'プライマー、50pmolの3'プライマー、1.25ユニットのExpandポリメラーゼ (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)、5 μlの2mM dNTP、5 μlのExpand反応バッファー、1 μlのClontech Quick-clone ヒト脾臓cDNA (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) (テンプレートとして) に水を加えて50 μlとする。米国特許第6,057,098号の実施例18に記載されるようにPerkin-Elmerのサーマルサイクラーで反応を行った。得られたPCR産物を第2のPCR増幅のテンプレートとして使用し、クローニングのための隣接するベクター配列を添加した。以下の反応混液でPCR増幅を実施した (x 2) : それぞれ100pmolの5'プライマー、100pmolの3'プライマー、2.5ユニットのExpandポリメラーゼ、10 μlの2mM dNTP、10 μlの10x Expand反応バッファー、1 μlのプライマリーPCR反応液 (テンプレートとして) を含有し、水で100 μlとした。米国特許第6,057,098号の実施例17に記載されるようにPCR産物を沈殿させ、アガロースゲル電気泳動で分画し、完全長の産物をゲルから切り出し、精製し、水に再懸濁した。

【0136】

NotIおよびEcoRIでの消化によって挿入断片を得られるようにクローニングベクターを構築した。挿入断片およびEcoRI/NotI消化したベクター (1.0 μgのDNA) を1 μl (1U/μl) のT4 DNAポリメラーゼで30℃、4分間消化した。70℃で10分間インキュベートし、T4 DNAポリメラーゼを熱不活性化した。サンプルを冷却し、軽く遠心分離し、45ngの消化した挿入断片を新たなマイクロチューブ内で100ngの消化したベクターに添加した。1.0 μlの10xアニーリングバッファーを添加した後、水で容量を10 μlとした。混合液を70℃で2分間加熱し、20分間にわたって室温まで冷却し、挿入断片とベクターをアニールさせた。アニールしたDNAを蒸留水で1対4に希釈し、米国特許第6,057,098号の実施例8に記載されるように30 μlのエレクトロコンピテントE. coli株、DH10B (Invitrogen, Carlsbad, CA) にエレクトロポレーションした。

【0137】

形質転換した細胞を2xYT培養液で1.0mlに希釈し、10 μl、100 μl、300 μlをアンピシリン (75 μg/ml) を補足したLB寒天培地に播種し、37℃で一晩増殖させた。コロニーを採取し、2x YT (75 μg/mlアンピシリン) 中、37℃で一晩増殖させた。翌日、グリセロールストック液を-80℃で長期保存するために調製した。シーケンシングを行ってBNP₃₋₁₀₈クローンの配列を確認した。ヒトBNP₃₋₁₀₈のトランスフェクション並びにその後の発現および精製に好適なプラスミドを、EndoFree Plasmid Mega Kitを用い、製造者の推奨に従って調製した (Qiagen, Valencia, CA) (クローン proBNP4.2)。

【0138】

細胞をproBNP4.2プラスミドで形質転換し、いくつかの形質転換からの細胞培養液をブールし、EDTA未含有プロテイナーゼ阻害剤混合液を添加し (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)、3500rpmで20分間遠心分離し、上清をBNP₃₋₁₀₈の精製のために確保した

。上清 (1.6L) を調整して15mMイミダゾールとし、 NiCl_2 を負荷させたChelating Fast Flow樹脂6ml (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を添加し、2.5時間インキュベートした。上清をカラムに通して樹脂を捕捉および充填 (pack) した。カラムをBBS (20mM ホウ酸塩、150mM NaCl、0.01% NaN_3) (10mMイミダゾール) で洗浄し、BBS (200mMイミダゾール) で溶出した。溶出物をBBSで25mlとし、5mlの抗FLAGイムノアフィニティー樹脂 (Sigma, St. Louis, MO) を充填してBBSで平衡化しておいたカラムに負荷した。カラムをBBSで洗浄し、4mlの0.1Mグリシンバッファー (pH3.0) でBNP₃₋₁₀₈を溶出した。溶出物にNaClを添加して150mMとし、2M TRISを用いてpHを8.0とし、サンプルをBBS (pH8.0) に対して透析した。精製したタンパク質は約0.2mg/mlであり、アリコートで-80℃で保存した。米国特許第6,057,098号の実施例9に記載されるようにBNP₃₋₁₀₈をビオチニル化した。

10

【0139】

実施例3：組換え抗体の調製

抗原でのマウスの免疫化およびマウス脾臓からのRNAの精製

2種のマウスを用いて免疫化した：Balb/c (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.) およびA/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.)。10検体のマウスそれぞれについて、0日目、14日目、および28日目にアジュバント (例えばフロイント完全アジュバントまたはQuil A) 中のタンパク質50 µgを用いて抗原の腹腔内接種を行った。マウスの血液を後眼窩洞 (retro-orbital sinus) への穿刺で採取した。42および43日目に50 µgのタンパク質で追加免疫した。

20

【0140】

45日目に脾臓を回収し、浸軟させ、粘稠性の全ての細胞が溶解されるまで18ゲージの針を通して脾臓懸濁液を吸引した後、遠心チューブに移した。サンプルを2つの遠心チューブに等量ずつ分け、以下を順に添加した (各添加後は反転させて混合した)：100 µlの2M酢酸ナトリウム (pH4.0)、1.0mlの水飽和フェノール (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)、200 µlのクロロホルム/イソアミルアルコール (49:1) (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)。溶液をボルテックスで10秒間攪拌し、氷上に15分間放置した。2-8℃で14,000rpm、20分間遠心分離した後、水相を新たなチューブに移した。等量の水飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (50:49:1) を添加し、チューブを10秒間ボルテックスにかけた。氷上に15分間放置した後、サンプルを2-8℃で20分間遠心分離し、水相を新たなチューブに移し、等量のイソプロパノールを用いて-20℃で最低30分間沈殿させた。4℃で14,000rpm、20分間遠心分離した後、上清を吸引除去し、チューブを軽く遠心し、全ての液体痕を除去した。

30

【0141】

得られたRNAペレットをそれぞれ300 µlの溶液Dに溶解し、合一し、等量のイソプロパノールを用いて-20℃で最低30分間沈殿させた。サンプルを4℃で14,000rpm、20分間遠心分離し、前のように上清を吸引除去し、サンプルを100 µlの氷冷70%エタノールで洗浄した。サンプルを再び遠心分離し (14,000rpm、20分間、4℃)、70%エタノール溶液を吸引除去し、RNAペレットを真空乾燥した。ペレットを100 µlの滅菌蒸留水に再懸濁し、RNAを-80℃で保存した。

40

【0142】

相補DNA (cDNA) の調製

上記のように精製した総RNAをcDNA調製のためのテンプレートとして直接使用した。RNA (50 µg) を無菌水で希釈して100 µLとし、10 µLの130ng/mLオリゴdT₁₂を添加した。サンプルを70℃で10分間加熱した後、氷上で冷却した。40 µLの5xファーストストランドバッファー (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)、20 µLの0.1Mジチオトレイトール (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)、10 µLの20mMデオキシスクレオシド 3 リン酸 (dNTP', Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) および10 µLの水を方丈で氷上で添加した。その後、37℃で2分間インキュベートした。10 µLの逆転写酵素 (Superscript II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) を添加し、37℃で1時間、インキュベーションを継続した。cDNA産物

50

をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に直接用いた。

【0143】

PCRによるcDNAの増幅

PCRを用いて実質的に全てのHおよびL鎖遺伝子を増幅するために、実質的に全ての報告されている配列に対応するようにプライマーを選択した。実質的にU.S.2003104477に記載されるようにして、33オリゴヌクレオチドを合成してH鎖の5'プライマーとし、29オリゴヌクレオチドを合成してカッパL鎖の5'プライマーとした。PCRでの増幅は、それぞれの5'および3'プライマー対について個別に行った。50pmolの5'プライマー、50pmolの3'プライマー、0.25μLのTaq DNAポリメラーゼ (5ユニット/μL、Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)、3μLのcDNA (実施例2に記載)、5μLの2mM dNTP、5μLの10x Taq DNAポリメラーゼバッファー (MgCl₂含有) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)、およびH₂O (50μLとする)を用い、各プライマー対について50μLで反応を行った。次いで、3'プライマーのみを用いてPCR過程のdsDNA産物で非対称PCRを行い、実質的に標的遺伝子のアンチセンス鎖のみを生成させた。

【0144】

ssDNAの高速液体クロマトグラフィー精製およびssDNAのキナーゼ処理 (kinasing)

H鎖ss-PCR産物およびL鎖ss-PCR産物に2.5容量のエタノールおよび0.2容量の7.5M酢酸アンモニウムを添加し、-20℃で最低30分間インキュベートしてエタノール沈殿を行った。エッペンドルフ遠心機を用いて2-8℃で14,000rpm、10分間遠心分離を行い、DNAのペレットを得た。上清を注意深く吸引し、チューブを再度、軽く遠心した。ピペットで上清を完全に除去した。DNAを中温で10分間真空乾燥した。H鎖およびL鎖産物を210μLの水中で別々にプールした。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でssDNAを精製し、HPLCから溶出したssDNAを0.5分の画分に回収した。ssDNAを含有する画分について、上記のようにエタノール沈殿を行い、ペレットを得、乾燥した。乾燥したDNAペレットを200μLの無菌水中にプールした。

【0145】

突然変異誘発のための調製で、必要により、ssDNAの5'末端をキナーゼ処理した。24μLの10xキナーゼバッファー (United States Biochemical, Cleveland, Ohio)、10.4μLの10mMアデノシン-5'-3リン酸 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)、および2μLのポリヌクレオチドキナーゼ (30ユニット/μL、United States Biochemical, Cleveland, Ohio)、を各サンプルに添加し、チューブを37℃で1時間インキュベートした。チューブを70℃で10分間インキュベートして反応を停止させた。平衡化したフェノール (pH>8.0、United States Biochemical, Cleveland, Ohio) -クロロホルム-イソアミルアルコール (50:49:1) で1回、クロロホルム:イソアミルアルコール (49:1) で1回抽出してDNAを精製した。抽出後、上記のようにDNAのエタノール沈殿を行い、ペレットを得た。

【0146】

抗体ファージディスプレイベクター

抗体ファージディスプレイベクターには、実質的にHuse (WO 92/06024) に記載されるように、ベクターに挿入したマウスモノクローナルFabフラグメントの重鎖および軽鎖をコードするDNA配列を含有させた。第1の誘導クローニングベクターを生成するために、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によってH鎖およびL鎖の可変領域を欠失させた (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985); Kunkelら, Methods. Enzymol. 154:367 (1987))。これらの変異によって各鎖のCDR1の5'末端からCDR3の3'末端までの領域が欠失し、DNA配列が添加されてここでタンパク質の翻訳が停止する。得られるクローニングベクターをBS11と記載する。

【0147】

BS11を変化させて本発明のスクリーニング法で使用するクローニングベクターを生成した。重鎖および偽遺伝子VIII配列間のアンバー終止コドンを除き、全ての重鎖が遺伝子VIIIタンパク質を有する融合タンパク質として発現されるようにした。L鎖の3'末端およびアルカリホスファターゼシグナル配列の5'末端間の配列中にあるHindIII制限酵素部位

を欠失させた。LおよびH鎖のカルボキシル末端の鎖間システイン残基をセリン残基に変化させた。lacプロモーターの5'側および偽陽性遺伝子VIII配列の3'側にある本質的でないDNA配列を欠失させた。転写停止DNA配列をL鎖クローニング部位でベクターに添加した。最後にタンパク質タグのDNA配列を種々のベクターに添加し、多価ファージの濃縮を金属キレートクロマトグラフィーによって、またはデカペプチドタブおよびデカペプチドタグに結合する固定化された抗体を有する磁性ラテックスを用いたアフィニティー精製によって行った。

【0148】

エレクトロポレーションによるE. coliの形質転換

エレクトロコンピテントE. coli細胞を氷上で解凍した。DNAを20-40 μ Lのエレクトロコンピテント細胞と混合するために、ピペットで気泡が入らないように注意しながら細胞を2-3回、穏やかに出し入れした。ここでも気泡が入らないように注意しながら、細胞を氷上に放置しておいたGene Pulserキューベット (0.2 cmギャップ, BioRAD, Hercules, Calif.) に移した。キューベットをE. coli Pulser (BioRAD, Hercules, Calif.) に配し、製造者の推奨に従い、電圧を1.88kVに設定してエレクトロポレーションを行った。形質転換したサンプルを直ちに2x YT培養液で1mlに希釈した。

10

【0149】

実施例4：ビオチニル化抗原および抗体の調製

タンパク質抗原または抗体を、最低100容量の20mMホウ酸塩、150mM NaCl、pH8 (BBS) に対して、2-8°Cで少なくとも4時間透析した。バッファーを少なくとも1回交換した後、ビオチニル化した。タンパク質抗原または抗体とビオチン-XX-NHSエステル (Molecular Probes, Eugene, OR、40mM/ジメチルホルムアミドのストック溶液) (最終濃度1mM) を室温で1時間反応させた。1時間後、タンパク質抗原または抗体をBBSに対して大規模に (extensively) 透析し、未反応の小分子を除去した。

20

【0150】

実施例5：アルカリホスファターゼ-抗原コンジュゲートの調製

アルカリホスファターゼ (AP, Calzyme Laboratories, San Luis Obispo, Calif.) を、最低100容量のカラムバッファー (50mMリン酸カリウム、10mMホウ酸塩、150mM NaCl、1mM MgSO_4 (pH7.0)) に対して2-8°Cで少なくとも4時間透析した。APを使用する前にバッファーを少なくとも2回交換した。APをカラムバッファーで5mg/mLに希釈した。20:1のSMCC:AP比を用いてAPとスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) を反応させた。SMCCをアセトニトリルに溶解して20mg/mLとし、ボルテックスにかけるか迅速に攪拌しながらAPに添加する際に84倍に希釈した。溶液を室温に90分間放置した後、ゲル濾過クロマトグラフィー (G50 Fine, Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) を用い、カラムバッファーで平衡化したカラムで未反応のSMCCおよび低分子量の反応産物をAPから分離した。

30

【0151】

タンパク質抗原を最低100容量の20mMリン酸カリウム、4mMホウ酸塩、150mM NaCl、pH7.0に対して、2-8°Cで少なくとも4時間透析した。抗原を使用する前にバッファーを少なくとも2回交換した。20:1モル比のSPDP:抗原を用いて抗原とN-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (SPDP, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) を反応させた。SPDPをジメチルホルムアミドに溶解して40mMとし、ボルテックスをかけながら抗原に希釈した。溶液を室温で90分間放置し、タウリン (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) を最終濃度20mMまで添加して5分間反応をクエンチングした。ジチオトレイトール (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) を最終濃度1mMで30分間タンパク質に添加した。ゲル濾過クロマトグラフィーを用い、50mMリン酸カリウム、10mMホウ酸塩、150mM NaCl、0.1mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) pH7.0で平衡化したカラムで低分子量の反応産物を抗原から分離した。

40

【0152】

APおよび抗原を等モル比で混合した。室温で2時間反応させた。コンジュゲートを、1%

50

ウシ血清アルブミン (30% BSAから。Bayer, Kankakee, Ill.)、10mM トリス、150mM NaCl、1mM $MgCl_2$ 、0.1mM $ZnCl_2$ 、0.1%ポリビニルアルコール (80%加水分解。Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) pH8.0を含有するブロック溶液で0.1mg/mLまで希釈した。

【0153】

実施例6：キーホールリンペットヘモシアニンおよびウシ血清アルブミンとのペプチドコンジュゲートの調製

キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) コンジュゲートの調製は本質的に米国特許第6,057,098号の実施例21の記載に従い、以下の変更を加えて行った：KLH-SMCCを2倍過剰のペプチドチオール (特定のシステイン含有ペプチド90%、およびペプチドのN末端およびペプチドのC末端にシステインを有するPADREペプチド各5%から成る) (Alexanderら, *Immunity* 1: 751-761, 1994からのペプチド1024.03) と反応させた。

【0154】

ペプチドとウシ血清アルブミン (BSA) とのコンジュゲートは本質的に米国特許第6,057,098号の実施例21の記載に従って調製した。BSAビオチンペプチドコンジュゲートの調製は、まずBSAをビオチニル化し (米国特許第6,057,098号の実施例9)、次いでペプチドとコンジュゲートさせて行った。

【0155】

実施例7：アビジン磁性ラテックスの調製

磁性ラテックス (Estapor, 10% solids, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.) を完全に懸濁させ、15mlのコニカルチューブに2mlアリコート注入了。磁性ラテックスを12mlの蒸留水に懸濁し、磁石を用いて10分間、溶液から分離した。磁石中に静置しつつ、10mL無菌ピペットを用いて液体を注意深く除去した。この洗浄過程を3回繰り返した。最終洗浄後、ラテックスを2mlの蒸留水に懸濁した。別の50mlコニカルチューブで、10mgのアビジン-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, Ill.) を18mlの40mM トリス、0.15M塩化ナトリウム、pH7.5 (TBS) に溶解した。ボルテックスにかけながら2mlの洗浄した磁性ラテックスを希釈したアビジン-HSに添加し、混合液を更に30秒間ボルテックスで攪拌した。この混合液を45°Cで2時間、30分毎に攪拌しながらインキュベートした。上記のように磁石を用いてアビジン磁性ラテックスを溶液から分離し、20ml BBSで3回洗浄した。最終洗浄後、10mlのBBSにラテックスを再懸濁し、4°Cで保存した。

【0156】

使用の直前にアビジン磁性ラテックスをパニングバッファー (40mM トリス、150mM NaCl、20mg/mL BSA、0.1% Tween20 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)、pH7.5) で平衡化した。パニング実験に必要とされるアビジン磁性ラテックス (200 μ l/サンプル) を無菌の15ml遠心チューブに添加し、パニングバッファーで10mlとする。チューブを10分間磁石上に配し、ラテックスを分離した。上記のように10mL無菌ピペットを用いて溶液を注意深く除去した。磁性ラテックスを10mLのパニングバッファーに再懸濁し、2回目の洗浄を開始した。磁性ラテックスをパニングバッファーで合計3回洗浄した。最終洗浄後、ラテックスをパニングバッファーに再懸濁し、最初のアリコート容量とした。

【0157】

実施例8：ポリクローマルファージの濃縮

以下のペプチドを、コンジュゲートに使用するためにカルボキシル末端システインを含有させてチオールを提供するように合成した：BNP₁₋₈ (HPLGSPGSC)；BNP₁₋₁₂ (HPLGSPGSA SDLC)；BNP₃₋₁₀ (lgspgsasc)；およびBNP₃₋₁₄ (lgspgsasdletc)。

【0158】

BNP₃₋₁₀₈に特異的なポリクローマルファージの濃縮

第1ラウンドの抗体ファージは、概ね米国特許第6,057,098号の実施例7に記載されるように、KLHおよびPADRE (pan-DR T-ヘルパーエпитープ) にコンジュゲートさせたBNP₃₋₁₀で免疫化したマウスから単離したRNAから調製した。概ね米国特許第6,057,098号の実施例16に記載されるように、抗体ファージサンプルをアビジン磁性ラテックスでパニングした。SMCCリンカーを介してBSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₃₋₁₄ (BSAの最終濃度

5X10⁻⁹ M) を用いて第1ラウンドの抗体ファージサンプル(5個の異なる脾臓からの10検体)を選択し、SMCCアームに特異的な抗体を除去するために10⁻⁶ M BSA-SMCCを添加した。溶出したファージを7F11磁性ラテックスで濃縮した後、BSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₃₋₁₄(BSAの最終濃度5X10⁻⁹ M) および10⁻⁶ M BSA-SMCCで2回目のパニングを行った。第2ラウンドのパニングから溶出したファージをプールし、第3ラウンドのパニングをBSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₃₋₁₄(BSAの最終濃度1X10⁻⁹ M) を用いて行い、BSAにコンジュゲートさせた未標識のBNP₁₋₁₂(2X10⁻⁷ M BSA) を添加して3-10ペプチドのN末端に特異的でない抗体を除去した。第4および最終ラウンドの選択を、BNP₃₋₁₀₈ ビオチン(最終濃度1X10⁻⁸ M)で行った。概ね米国特許第6,057,098号の実施例18に記載されるように、選択したファージをプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。

10

【0159】

BNP₁₋₁₀₈に特異的なポリクローナルファージの濃縮

第1ラウンドの抗体ファージは、概ね米国特許第6,057,098号の実施例7に記載されるように、KLHおよびPADREにコンジュゲートさせたBNP₁₋₁₂で免疫化したマウスから単離したRNAから調製した。概ね米国特許第6,057,098号の実施例16に記載されるように、抗体ファージサンプルをアビジン磁性ラテックスでパニングした。BSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₁₋₈(BSAの最終濃度5X10⁻⁹ M) を用いて第1ラウンドの抗体ファージサンプル(5個の異なる脾臓からの10検体)を選択し、SMCCアームに特異的な抗体を除去するために最終濃度10⁻⁶ M BSA-SMCCを添加した。溶出したファージを7F11磁性ラテックスで濃縮した後、BSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₁₋₈(BSAの最終濃度5X10⁻⁹ M) に最終濃度10⁻⁶ MのBSA-SMCCを添加して2回目のパニングを行った。第2ラウンドのパニングから溶出したファージサンプルをプールし、第3ラウンドのパニングをプールしたファージを用いて上記のように行った。第4ラウンドの選択を、BSA-ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₁₋₈(BSAの最終濃度1X10⁻⁹ M) を用い、BSAにコンジュゲートさせた未標識のBNP₃₋₁₄(BSAの最終濃度2X10⁻⁷ M) の存在下で行い、N末端の1-12ペプチドに特異的でない抗体を除去した。第5ラウンドの選択は、ビオチンにコンジュゲートさせたBNP₁₋₁₀₈(最終濃度1x10⁻⁸ M) を用いて行った。第6および最終ラウンドの選択はビオチンにコンジュゲートさせたBNP₁₋₁₀₈(最終濃度1X10⁻⁹ M) および未標識のBNP₃₋₁₀₈(最終濃度5X10⁻⁷ M) を用いて行った。概ね米国特許第6,057,098号の実施例18に記載されるように、選択されたファージサンプルをプラスミド発現ベクターにサブクローニングした。

20

30

【0160】

実施例9：生化学アッセイ

目的のBNP種を標準的なイムノアッセイ法によって測定する。これらの方法はタンパク質標的に特異的に結合する抗体の使用を含む。1つ以上の型のBNPに対する抗体(例えばBNP₁₋₁₀₈-特異的またはBNP₃₋₁₀₈-特異的抗体)を、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン(NHS-ビオチン)を抗体当たり約5 NHS-ビオチン部分の割合で用いてビオチニル化する。次いでビオチニル化した抗体を標準アビジン384ウェルマイクロタイタープレートに添加し、プレートに結合しないビオチニル化抗体を除去する。これによってマイクロタイタープレートに抗BNP固相が形成される。別の抗BNP抗体(例えばBNP₇₇₋₁₀₈の一部に対する)を標準的な方法で、SMCCおよびSPDP(Pierce, Rockford, IL)を用いてアルカリホスファターゼにコンジュゲートさせる。TECAN Genesis RSP 200/8 Workstationでイムノアッセイを行う。試験サンプル(10 μL)をマイクロタイタープレートのウェルにピペッティングし、60分間インキュベートする。次いでサンプルを除去し、ウェルを洗浄バッファー(150mM NaCl、0.1%アジ化ナトリウム、および0.02% Tween-20を含有する20mMホウ酸塩(pH 7.42)から成る)で洗浄する。その後、アルカリホスファターゼ-抗体コンジュゲートをウェルに添加し、更に60分間インキュベートし、その後抗体コンジュゲートを除去し、ウェルを洗浄バッファーで洗浄する。基質(AttoPhos(登録商標), Promega, Madison, WI)をウェルに添加し、蛍光産物の生成速度を試験サンプル中のBNP濃度と関係づける。

40

【0161】

BNP₇₇₋₁₀₈に結合する抗体と対にしたBNP₃₋₁₀₈特異的抗体を用いて、最初の2つの残基

50

が欠失したプロBNPフラグメント（“BNP_{3-xx}フラグメント”と記載する）に特異的になるようにサンドイッチイムノアッセイを構築した。BNP₃₋₁₀₈を標準として用い、検出可能な最小レベル（“mdl”）は150pg/mLと算出された。うっ血性心不全患者および健常者から採取したサンプルで測定されたプロBNPフラグメントレベルは以下の通りであった。

【0162】

【表1】

CHF患者1D フラグメント濃度 (pg/mL)	BNP _{3-xx}	健常者1D 濃度	BNP _{3-xx} フラグメント (pg/mL)	
1	10998			
2	15018	1	<150	
3	2008	2	≤mdl	10
4	1928	3	≤mdl	
5	264	4	≤mdl	
6	2201	5	≤mdl	
7	2382	6	≤mdl	
8	6953	7	≤mdl	
9	8630	8	≤mdl	
		9	≤mdl	
		10	191	
		11	252	
		12	≤mdl	
		13	≤mdl	
		14	276	
		15	≤mdl	20
		16	≤mdl	
		17	≤mdl	
		18	≤mdl	
		19	≤mdl	
		20	≤mdl	

【0163】

実施例10：質量分析法によるナトリウム利尿ペプチドの分析

抗体捕捉表面の調製

3 μLの抗体溶液（0.25mg/mLの抗BNPモノクローナル抗体／ホウ酸バッファーpH8.0（“BBS”））をPS10 ProteinChipアレイ（CIPHERGENカタログ番号C553-0044）の好適なスポットに適用し、チップを恒湿器内に入れ、20℃で3時間穏やかに攪拌する。抗体溶液を除去し、アレイスポットを3 μLの1.5mg/mL BSA／0.1% Triton X-100／0.5M Tris-HCl pH8.0で2回洗浄する。2回目の洗浄の際、チップを攪拌せずに20℃で3時間、恒湿器に入れた。この洗浄後、アレイを5mM HEPES pH7.5に浸漬し、過剰のバッファーを除去する。

【0164】

BNPの捕捉

BIOMEC自動ピペッティングステーション（Beckman Instruments）を用いてアレイを以下で洗浄した：150 μLの1% Triton X-100／BBS（10分間）；150 μLの10% PEG300／0.1% Triton X-100／BBS（10分間）；そして150 μLの0.2% Triton X-100／BBS（5分間）を3回。40 μLの0.2% Triton X-100／BBSおよび40 μLの脱グリコシルサンプル（またはコントロールサンプル）を適用し、穏やかに攪拌しながら4℃で一晩インキュベートする。

【0165】

エネルギー吸収マトリクスおよびMS分析の適用

このインキュベーション後、以下のようにアレイを洗浄する：150 μLの1M尿素／0.1% CHAPS／0.3M KCl／50mM Tris-HCl pH7.5（1分間）を3回；および300 μLの5mM HEPES pH7.5（3秒間）を3回。過剰のバッファーを除去し、光沢が見えなくなるまでアレイを風乾する。低分子量の分析（M/Z≤6000）では、0.5%トリフルオロ酢酸（Pierceカタログ番号28904）／50%アセトニトリル（Pierceカタログ番号20062）に混合した20%α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（CHCA, CIPHERGENカタログ番号28904）1 μLをエネルギー吸収マトリクス（“EAM”）として好適なスポットに適用する。高分子量の分析（M/Z>6000）では、1 μLの5

0%シナピン酸（SPA、Ciphergenカタログ番号C300-0002）（0.5%トリフルオロ酢酸／50%アセトニトリルに混合）をEAMとして好適なスポットに適用する。スポットを風乾し、再び好適なEAMの1 μ L滴を適用する。

【0166】

MSスペクトルにはCiphergen ProteinChip測定器モデルPBS IICが必要である。低分子量分析では以下の装置パラメーターを使用する：高質量は70kDaに設定し、2kDaから15kDaまで最適化する；初期レーザー強度は165に設定する；初期検出感度は9に設定する；質量デフレクターを1kDaに設定する；捕捉方法はSELDI定量法とする；"SELDI acquisition parameters"=26、"delta"=10、"transients per"=18、"ending position"=76；および"warming positions with 5 shots at intensity"=175。高分子量分析では以下の装置パラメーターを使用する：高質量は70kDaに設定し、3kDaから30kDaまで最適化する；初期レーザー強度は200に設定する；初期検出感度は9に設定する；質量デフレクターを2kDaに設定する；捕捉方法はSELDI定量法とする；"SELDI acquisition parameters"=24、"delta"=10、"transients per"=13、"ending position"=74；および"warming positions with 3 shots at intensity"=210。

10

【0167】

本発明について、当業者がこれを生成および使用するために十分詳細に記述および例証したが、種々の変更、修飾、および改良は本発明の意図および範囲を逸脱することなく明白である。

【0168】

20

当業者に認識されるように、本発明は目的を実施し、記載した結果および利点、並びにそれに内在するものを得るのに十分適合される。本明細書に提供する実施例は好ましい態様の典型であり、例であって、本発明の範囲を制限することを意図しない。当業者はその修飾および他の使用を着想しうる。それらの修飾は本発明の意図に含まれ、特許請求の範囲で定義される。

【0169】

当業者に容易に認識されるように、本発明の範囲および意図から逸脱することなく種々の置換および修飾を本明細書に開示する発明に施してもよい。

【0170】

本明細書に記載した全ての特許および文献は本発明が属する分野の通常の技術者のレベルを示している。全ての特許および文献は、個々の文献が参照により具体的かつ個別に組み込まれるのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0171】

本発明について本明細書に適切に例証として記載したが、これは任意の要素、制限が欠如した形で実施してもよいが、それらについては本明細書に特記しない。従って例えば本明細書中のそれぞれの事例において、“を含む”、“本質的から成る”、および“から成る”という用語は、互いに他の2つの用語のいずれかで置き換えてもよい。使用した用語および表現は、制限のためではなく記述のための用語として使用したものであり、それらの用語および表現の使用にあたっては表示および記載する特長の同等物またはその一部のいずれを除外することも意図せず、認識されるように請求する本発明の範囲内で種々の修飾が可能である。従って、好ましい態様および他の特長を用いて本発明について具体的に記載したが、当業者は本明細書に記載するコンセプトの修飾および変更を行ってもよく、それらの修飾および変更は添付する特許請求の範囲で定義される本発明の範囲内に含まれると見なされることは理解されるべきである。

40

【0172】

他の態様を別記の特許請求の範囲に記載する。

フロントページの続き

(72)発明者 ビュークラー, ケネス, エフ.
アメリカ合衆国 92067 カリフォルニア州 ランチョ サンタ フェ, ピーオー ボックス
77

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 国際公開第03/087819 (WO, A1)
特開2004-518118 (JP, A)
特開2004-037455 (JP, A)
国際公開第99/013331 (WO, A1)
国際公開第04/046727 (WO, A1)
特表2006-506623 (JP, A)
特表2005-522697 (JP, A)
特表2006-514609 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - G01N 33/98
G01N 27/62

专利名称(译)	用于测量利尿钠肽的方法和组合物及其用途		
公开(公告)号	JP4733704B2	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	JP2007531401	申请日	2005-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
当前申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
[标]发明人	ビュークラーケネスエフ		
发明人	ビュークラー,ケネス,エフ.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N27/62 A61K39/395 C07K16/40		
CPC分类号	G01N33/5306 A61K38/05 A61K38/06 A61K38/2242 A61K45/06 C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/6827 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2400/02 G01N2440/38 A61K2300/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N27/62.V		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	10/938760 2004-09-09 US		
其他公开文献	JP2008512685A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明描述了使用二肽基肽酶抑制剂治疗心血管疾病和心肌梗塞的组合物和方法。还提供了通过施用一种或多种B型利尿钠肽类似物来增加利尿钠肽功能的方法，所述类似物在脯氨酰特异性二肽基肽的存在下提供增加的稳定性。