

(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2017-500547

(P2017-500547A)

(43) 公表日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 6 3
C O 7 K 7/06 (2006. 01)	C O 7 K 7/06	4 H O 4 5
G O 1 N 33/72 (2006. 01)	G O 1 N 33/72 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁)

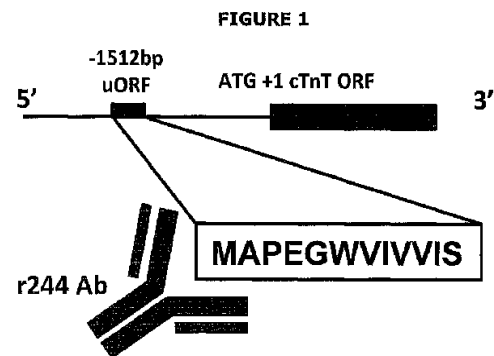
(21) 出願番号	特願2016-530994 (P2016-530994)	(71) 出願人	510244891 オタゴ イノベーション リミテッド ニュージーランド国 ダニーデン, セント デビッド ストリート 87
(86) (22) 出願日	平成26年11月14日 (2014. 11. 14)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月12日 (2016. 7. 12)	(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(86) 国際出願番号	PCT/NZ2014/000234	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(87) 国際公開番号	W02015/072865	(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(87) 国際公開日	平成27年5月21日 (2015. 5. 21)	(72) 発明者	リー, ジャクリーン アマンダ ニュージーランド, 8051 クライス トチャーチ, クロフトン ロード 94 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/904, 957		
(32) 優先日	平成25年11月15日 (2013. 11. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 心臓障害のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、一般には、心臓障害の予後予測及び／又は診断のためのアッセイ、方法及びキットに関する。本発明は、例えば、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の予測又は診断に使用するための新規クラスの循環心筋トロポニンT上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドバイオマーカーに対する結合剤も提供する。加えて、本発明の結合剤を使用して、心筋梗塞の予後予測及び診断の際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを向上させることができる。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測する方法であって、

(i) 前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 測定された前記 T n T u O R F ペプチドのレベルと、適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

前記対照集団と比較した前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になることの予測であり、さらに、前記測定するステップが、前記 T n T u O R F ペプチドと、前記 T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む、方法。

10

【請求項 2】

対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断する方法であって、

(i) 前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 測定された前記 T n T u O R F ペプチドのレベルと、適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

前記対照集団と比較した前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を示し、さらに、前記測定するステップが、前記 T n T u O R F ペプチドと、前記 T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む、方法。

20

【請求項 3】

前記対象からの第 1 の生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

前記第 1 の生体試料と同じ対象から採取されるが時間の点ではより後に採取される第 2 の生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

前記第 1 の試料中の前記 T n T u O R F ペプチドのレベルと、前記第 2 の試料中の前記 T n T u O R F ペプチドのレベルとを比較するステップと、

を含み、

前記第 1 の試料と前記第 2 の試料間での前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害になるリスク増加を示すか、又は、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害、及び / 又は心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害の持続、を示す、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

心拍数、ヘモグロビン濃度、血圧、年齢、性別、体重、身体活動レベル、並びに肥満、糖尿病及び心イベントを含むイベントの家族歴、並びにトロポニン T 及びトロポニン I の循環レベルを含む、1 つ又は複数のリスク因子の分析と併せて実行される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 5】

前記リスク因子が、心拍数及びヘモグロビン濃度を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

(i i i) 前記対象に処置レジメンを行うステップであり、前記対象が、前記対照集団における前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルと比較して、前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加を有することが判明している、ステップをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する対

50

象の反応性をモニターするための方法であって、

(i) 前記対象からの第 1 の生体試料中の T n T u O R F のレベルを測定するステップと、

(i i) 同じ対象から採取される、前記対象からの第 2 の生体試料中の T n T u O R F のレベルを測定するステップと、

(i i i) 前記第 1 の試料中の T n T u O R F の測定レベルと前記第 2 の試料中の T n T u O R F の測定レベルとを比較するステップと

を含み、

前記第 1 の試料と前記第 2 の試料間での T n T u O R F のレベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示し、前記第 1 の試料と前記第 2 の試料間での T n T u O R F のレベルの減少が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示す、方法。

【請求項 8】

前記対照集団が、前記心臓障害であることがわかっている、性別及び年齢を一致させた対象である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記基準範囲が、前記対照集団からの平均循環 T n T u O R F ペプチド濃度である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記心臓障害が、心房細動、心不全、心膜炎、神経伝導障害、血管迷走神経性失神、又はこれらのいずれかの組合せから選択される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記生体試料が、体液又は心臓組織試料である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記体液が、静脈血及び動脈血を含む血液、血漿、血清並びに間質液から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記結合剤が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体が、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ若しくはヒト化抗体又はそれらの抗原結合断片から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗体が、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記結合剤又は前記抗体が、固相に固定されている、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する対象又はそのような心臓障害になるリスクがある対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するアッセイであって、 T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、前記対象からの生体試料中の前記 T n

10

20

30

40

50

T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイ。

【請求項 19】

(i) 前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 測定された前記 T n T u O R F ペプチドのレベルと適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

前記対照集団と比較した前記 T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害になることの予測であり、又は対象を心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害と診断するのに役立ち、さらに、前記測定するステップが、前記 T n T u O R F ペプチドと、前記 T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む、請求項 18 に記載のアッセイ。

10

【請求項 20】

イムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ又は化学発光アッセイである、請求項 18 又は 19 に記載のアッセイ。

【請求項 21】

前記結合剤が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 22】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する対象又はそのような心臓障害になるリスクがある対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するためのキットであって、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、キット。

20

【請求項 23】

前記結合剤が、抗体又はその抗原結合断片である、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

前記試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルの測定方法についての取扱説明書をさらに含む、請求項 21 又は 22 に記載のキット。

【請求項 25】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクの予測に使用するための、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤。

30

【請求項 26】

対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の診断に使用するための、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤。

【請求項 27】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測するための薬剤の製造における、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤の使用。

40

【請求項 28】

対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断するための薬剤の製造における、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤の使用。

【請求項 29】

単離されたトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチド。

【請求項 30】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 又は配列番号 4 のいずれかで示されるアミノ酸配

50

列からなる、請求項 26 に記載の単離された T n T u O R F ペプチド。

【請求項 31】

対象の心筋梗塞リスクを予測する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、前記対象からの生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイ。

【請求項 32】

対象の心筋梗塞を診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、前記対象からの生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイ。

10

【請求項 33】

前記心筋トロポニンが、トロポニン T 及びトロポニン I を含む、請求項 31 又は 32 に記載のアッセイ。

【請求項 34】

前記心筋トロポニンが、高感度トロポニン T × トロポニン I によって表される、請求項 31 ~ 33 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 35】

心筋トロポニンの前記感度及び前記偽陽性パフォーマンスが、心筋トロポニンの T n T u O R F ペプチドに対する生成物比を用いることによって改善される、請求項 31 ~ 34 のいずれか一項に記載のアッセイ。

20

【請求項 36】

生成物比が、高感度トロポニン T × トロポニン I / T n T u O R F ペプチドによって表される、請求項 35 に記載のアッセイ。

【請求項 37】

心イベント後の対象における死亡率を予測するアッセイであって、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、前記対象からの生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイ。

30

【請求項 38】

心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、前記対象からの生体試料中の前記 T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイ。

【請求項 39】

対象における心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するためのキットであって、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R F との結合に基づいて定量的に測定することができる、キット。

40

【請求項 40】

心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するためのキットであって、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R F との結合に基づいて定量的に測定することができる、キット。

50

【請求項 4 1】

対象における心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤。

【請求項 4 2】

心イベント後の対象における死亡率の予測に使用するための、前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤。

【請求項 4 3】

心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、前記対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般には、心臓障害の予後予測及び / 又は診断のための方法、アッセイ及びキットに関する。

【発明の背景】

【0002】

下記は、本発明の理解に有用な可能性がある情報を含む。これは、本明細書において具体的に又は暗に言及又は参照される情報、公報又は文献のいずれかが、今般記載若しくは特許請求される発明の先行技術である、又は当該発明に不可欠であることを認めることではない。本明細書において言及されるすべての公報及び特許は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

心筋トロポニン (c T n) の検出のための高感度 (h s) アッセイの出現は、循環器におけるトロポニンについての我々の認識を有意に変え、急性心筋梗塞の診断へのそのようなトロポニンの使用の態様を変えた (M I ; T h y g e s e n ら (2012) C i r c u l a t i o n 126:2020-2035; K e l l e r ら (2009) N . E n g . J . M e d . 361:868~877; R e i c h l i n ら (2009) N . E n g . J . M e d . 361:858~867)。やがてこれらのアッセイは心筋梗塞 (M I) の診断に大きな改善をもたらしたが、この改善は、99パーセントイルガイドラインより高い上昇したトロポニンレベルを有するが実際には M I を有さない患者数の増加という犠牲の上で実現された (R e i c h l i n ら (2012) A m . J . M e d . 125:1205~1213; T h y g e s e n ら (2012) E u r . H e a r t J . 33:2252~2257; H a m m e r e r - L e r c h e r ら (2013) J . A m . H e a r t A s s o c . 2(3):e000204, doi:10.1161/JAHA.113.000204)。こうした犠牲はアッセイ特異度の有意な低下を浸透させ、結果として、バイオマーカーに基づく幾つかの戦略が h s c T n 測定に役立てるために提案された (E g g e r s ら (2008) E u r . H e a r t J . 29:2327~2335; H a a f ら (2011) A m . J . M e d . 124:731~739; M a i s e l ら (2013) J . A m . C o l l . C a r d i o l . 62:150~160; C u l l e n ら (2013) J . A m . C o l l . C a r d i o l . 62:1242~1249)。これらの制限を克服するための1つの有望な戦略は、上流オープンリーディングフレームペプチドを含む、生産される有望な全心筋トロポニンの考慮である。

【0004】

上流オープンリーディングフレーム (u O R F) は、タンパク質の主コード領域の上流 (5') の開始及び終止コドンによって定義されるアミノ酸コード配列である。ヒト及び

10

20

30

40

50

マウストランスクリプトームのおおよそ40～50%はuORFを含有し(Calvoら(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.106:7507～7512;Iaconoら(2005)Gene 349:97～105)、uORFは偶然から予測されるより低い頻度であり(Neafseyら(2007)Mol.Biol.Evol.24:1744～1751)、これは、uORFが選択圧下にあることを示唆している。しかし、uORFは、転写因子、成長因子、癌源遺伝子及びそれらの受容体を含有するタンパク質サブグループにおいて過発現される(Davuluriら(2000)Genome Res.10:1807～1816)。複雑であることに加えて、uORFは極めて多様であり、cap及び主ORF AUGに対する位置、転写物当たりの数並びに長さが様々である(Calvoら(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.106:7507～7512;Somersら(2013)Int.J.Biochem.Cell Biol.45:1690～1700)。哺乳動物細胞の場合、細胞機能に対するuORFの直接翻訳作用に関する実験的証拠は限られており、uORF由来ペプチドが循環器に存在する証拠はない。グルココルチコイド受容体転写物1A(GR-1A)がその1026bp 5'-UTRに5つのuORF開始部位を有することが記録された報告書はわずか1つである。これらのuORFの1つは93アミノ酸ペプチドをコードし、そのようなペプチドは、マウス及びヒト細胞培養物の核、サイトゾル及び細胞膜で検出され、GR-1A転写の促進に関与することが判明した(Dibaら(2001)J.Cell Biol.Biochem.81:149～161)。

10

20

【0005】

本出願人は、uORFペプチドがヒト心筋トロポニンT(TnT)遺伝子の5'-UTRに存在することをここで立証し、そして心筋TnTuORFペプチドがヒト循環器に実際に存在することと、その心筋TnTuORFペプチドのアッセイ定量には心臓障害の予後予測及び診断並びに心筋梗塞をはじめとする心臓障害の確証されたバイオマーカーの感度及び偽陽性パフォーマンス(false positive performance)の改善に有用性があることとを立証する初めての直接的証拠を驚くべきことに提供する。

【発明の概要】

【0006】

本願に記載し、本願にて請求する本発明は、当発明の概要において示す又は説明する又は言及するものを含むがそれらに限定されない、多くの属性及び実施形態を有する。当発明の概要は、すべてを含むことを意図したものではなく、本願に記載し、本願にて請求する本発明は、限定のためにではなく単に説明のために含める当発明の概要の中で確認される特徴若しくは実施形態に、又はそのような特徴若しくは実施形態によって、限定されない。

30

【0007】

本発明は、一般には、心臓障害の予後予測及び/又は診断のためのアッセイ、方法及びキットに関する。特に、本発明は、例えば心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の、予後予測及び/又は診断のためのアッセイ、方法及びキットにおける、トロポニンTの上流オープンリーディングフレームによってコードされている新規クラスの循環バイオマーカー及びこのペプチドに特異的な結合剤の使用に関する。

40

【0008】

本発明の一態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測する方法であって、

(i)対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドのレベルを測定するステップと、

(ii)測定されたTnTuORFペプチドのレベルと適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

対照集団と比較したTnTuORFペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安

50

定狭心症以外の心臓障害になることの予測であり、さらに、上記測定するステップが、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む方法を提供する。

【0009】

一実施形態において、上記方法は、(i i i) 対象に処置レジメンを行うステップであり、対象が、対照集団からの循環T n T u O R F ペプチドのレベルと比較してT n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加を有することが判明している、ステップをさらに含む。

【0010】

別の実施形態において、上記方法は、対象からの第1の生体試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、第1の生体試料と同じ対象から採取されるが時間の点ではより後に採取される第2の生体試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、第1の試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルと第2の試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを比較するステップとをさらに含み、第1の試料と第2の試料間でのT n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になるリスク増加を示す。

10

【0011】

本発明の別の態様では、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断する方法であって、

(i) 対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

20

(i i) 測定されたT n T u O R F ペプチドのレベルと適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップとを含み、

対照集団と比較したT n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を示し、さらに、上記測定するステップが、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む方法を提供する。

【0012】

一実施形態において、上記方法は、(i i i) 対象に処置レジメンを行うステップであり、対象が、対照集団からの循環T n T u O R F ペプチドのレベルと比較してT n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加を有することが判明している、ステップをさらに含む。

30

【0013】

本発明のいずれかの態様による別の実施形態において、生体試料中のT n T u O R F ペプチドの測定は、1回より多く行われることがある。例えば、1回、2回、3回、4回、5回、10回、15回などの測定が、数時間、数日、数週間、数カ月又は数年に及ぶ期間にわたって実行されることもある。

【0014】

さらなる実施形態において、上記方法は、対象からの第1の生体試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、第1の生体試料と同じ対象から採取されるが時間の点ではより後に採取される第2の生体試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、第1の試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルと第2の試料中のT n T u O R F ペプチドのレベルを比較するステップとをさらに含み、第1の試料と第2の試料間でのT n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加は、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害、及び/又は心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害の持続を示す。

40

【0015】

本発明のいずれかの態様による特定の実施形態において、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害には、例えば、心房細動、心不全、心膜炎、血管迷走神経性失神、神経伝導障害及びそれらの組合せが含まれる。

【0016】

50

本発明のさらに別の態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する対象の反応性をモニターするための方法であって、

(i) 対象からの第 1 の生体試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 同じ対象から採取される、上記対象からの第 2 の生体試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i i) 第 1 の試料中の T n T u O R F ペプチドの測定レベルと第 2 の試料中の T n T u O R F ペプチドの測定レベルを比較するステップと

を含み、

第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示し、第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベルの減少が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物又は治療法での処置に対する好反応を示すものである方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

処置すべき心臓障害によっては、第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベル増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示す可能性がある。言い換えれば、第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベル減少は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示す。

【 0 0 1 8 】

したがって、本発明のまたさらなる態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する対象の反応性をモニターするための方法であって、

(i) 対象からの第 1 の生体試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 同じ対象から採取される、上記対象からの第 2 の生体試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i i) 第 1 の試料中の T n T u O R F ペプチドの測定レベルと第 2 の試料中の T n T u O R F ペプチドの測定レベルを比較するステップと

を含み、

第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベルの減少が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示し、第 1 の試料と第 2 の試料間での T n T u O R F ペプチドのレベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示すものである方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

本明細書において開示するいずれかの方法による他の実施形態において、上記測定するステップは、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む。一実施形態において、結合剤は、抗体又はその抗原結合断片である。別の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である。他の実施形態において、T n T u O R F ペプチドとの結合は、固相に固定されている抗体を使用して測定される。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらなる態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する対象又はそのような心臓障害になるリスクがある対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するアッセイであって、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明のまたさらなる態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する対象又はそのような心臓障害になるリスクがある対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドのレベルを測定するキットであって、TnTuORFペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、TnTuORFとの結合に基づいて定量的に測定することができる、キットを提供する。

【0022】

本発明の別の態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクの予測に使用するための、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤を提供する。

10

【0023】

本発明のまたさらなる態様では、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の診断に使用するための、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤を提供する。

【0024】

本発明の別の態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測するための薬剤の製造における、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤の使用を提供する。

【0025】

本発明のさらに別の態様では、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断するための薬剤の製造における、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤の使用を提供する。

20

【0026】

本発明のさらなる態様では、単離されたトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドを提供する。

【0027】

一実施形態では、TnTuORFペプチドは、配列番号1、2、3又は4のいずれか1つで示されるペプチドの群から選択される。

30

【0028】

本発明の別の態様では、対象の心筋梗塞リスクを予測する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0029】

本発明のまたさらなる態様では、対象における心筋梗塞を診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

40

【0030】

いずれかの態様による一実施形態において、心筋トロポニンは、トロポニンT及びトロポニンIを含む。別の態様において、上記アッセイは、心筋トロポニンとTnTuORFペプチド間の生成物比を算出することを含む。

【0031】

本発明のまたさらなる態様では、心イベント後の対象における死亡率を予測するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTu

50

ORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0032】

本発明のまた別の態様では、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際のN末端脳ナトリウム利尿ペプチド（NT-プロBNP）の感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0033】

本発明のさらなる態様では、対象における心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドのレベルを測定するキットであって、TnTuORFペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、TnTuORFとの結合に基づいて定量的に測定することができる、キットを提供する。

【0034】

本発明のさらなる態様では、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際のN末端脳ナトリウム利尿ペプチド（NT-プロBNP）の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドのレベルを測定するキットであって、TnTuORFペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、TnTuORFとの結合に基づいて定量的に測定することができる、キットを提供する。

【0035】

本発明のまたさらなる態様では、対象における心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤を提供する。

【0036】

本発明のまたさらなる態様では、心イベント後の対象における死亡率の予測に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤を提供する。

【0037】

本発明のまたさらなる態様では、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際のN末端脳ナトリウム利尿ペプチド（NT-プロBNP）の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】TnTuORF及びr244抗血清の遺伝子位置及びエピトープ設計を示す図である。ヒト心筋トロポニンのTをコードする主オープンリーディングフレーム（ORF）（NCBIアクセッションNG_007556）が（ATG+1 cTnT ORF）によって示されている。cTnT ORFから5'上流の-1512塩基対（bp）に、配列MAPEGWVIVVISを有する推定12アミノ酸ペプチド（TnTuORF）をコードするuORFがある。本出願人は、イムノアッセイで使用するためのTnTuORFのアミノ末端に対するポリクローナル抗血清（r244）をウサギにおいて産生させた。

【図2】合成TnTuORFペプチド標準曲線（黒丸）と比較してヒト静脈血漿の並行希釈（白丸；示されている希釈度）を示す代表的TnTuORFイムノアッセイ曲線を示す図である。

10

20

30

40

50

【図3】クレアチニンとの統計的に有意な（スピアマンの順位相関分析により、 $r = 0.201$ 、 $p < 0.05$ ）負の相関によって立証されるような、109の正常な健常ボランティア血漿試料中の免疫反応性（IR）TnTuORFの濃度を示す図である。

【図4】臨床的に必要と判断された心臓カテーテル留置を受けた患者16名におけるIR TnTuORF（上方パネル）及び免疫反応性hsTnT（下方パネル）の局所動脈-静脈濃度を示す図である。静脈濃度は灰色バーであり、これに対して黒いバーは、器官の循環レベルへの可能性のある寄与を比較するための、時間を一致させた動脈試料である。FV = 大腿静脈、RV = 腎静脈、HV = 肝静脈、IVC = 下大静脈、JUG = 頸静脈、CS = 心冠静脈洞、PA = 肺動脈。バーは、平均 $\pm$ SDであり、対応t検定により、 $* = < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 。

【図5】ヒト循環器における免疫反応性TnTuORFの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を示す図である。（A）ヒト血漿からの免疫親和性精製TnTuORFが逆相HPLCで2つのピーク（I及びII）として溶出した。ピークIIは、示されているように合成TnTuORFペプチドと一致して溶出した。灰色の線は、アセトニトリルの濃度を示す。（B）パネルAからの免疫反応性ピークI及びIIのサイズ排除HPLCは、ピークIIがTnTuORFの理論重量（予測Mr 1.3k）と一致する、約1.5キログルトン（k）の見かけのMrを有することを明示した。ピークIは、カルボキシ末端短縮形と一致する、約1kの見掛けのMrを有した。矢印は、校正ペプチドの分子量値を示す。Vt = カラムの総容積。

【図6】病院での症状提示（hospital presentation）から症状提示72時間後までのST上昇MI患者4名の静脈血中のTnTuORF（パネルA）及びhsTnT（パネルB）の同時免疫反応性（concomitant immunoreactive）（IR）濃度を示す図である。データは平均 $\pm$ SDである。

【図7】他の心臓の状態（ $n = 26$ ）を診断するためのNTプロBNP、TnTuORF及びTnTuORF + Hb + 心拍数（HR）変数のパフォーマンスについての受信者操作曲線（receiver operator curve）（ROC）分析グラフを示す図である。

【図8】急性NSTEMI（ $n = 96$ ）を診断するためのhsTnT及びトロポニンプラス（Troponin PLUS）のパフォーマンスについての受信者操作曲線（ROC）分析グラフを示す図である。

【図9】指標となる入院1年以内の急性非代償性心不全での再入院（ $n = 10$ ）を予測するための24時間NTプロBNP及びNTプロBNP $\times$ TnTuORFの予後予測能力を示す受信者操作曲線（ROC）分析グラフを示す図である。

【定義】

【0039】

通則

特に別段の定義がない限り、本明細書で用いるすべての専門及び科学用語は、本発明が属する技術分野の（例えば、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学及び生化学の）当業者によって一般に理解されている意味と同じ意味を有すると解釈されるものとする。

【0040】

別段の指示がない限り、本発明で用いる組換えタンパク質及び免疫学的技術は、当業者に周知の標準的手順である。そのような技術は、J. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley and Sons（1984）、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）、T. A. Brown（編者）、Essential Molecular Biology: A Practical Approach、第1及び2巻、IRL Press（1991）、D. M. Glover及びB. D. Hames（編者）、DNA Cloning: A Practical Approach、第1～4巻、IRL Press（1995及び1996）

10

20

30

40

50

、並びに F. M. Ausubel ら、(編者)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までのすべての改訂版を含む)、Ed Harlow 及び David Lane (編者) Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、(1988)、並びに J. E. Coligan ら、(編者) Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons (現在までのすべての改訂版を含む) などの出所の文献全体にわたって記載され、説明されている。

【 0041 】

10

用語「及び／又は」、例えば「X 及び／又は Y」は、「X 及び Y」又は「X 又は Y」のいずれかを意味すると解されるものとし、両方の意味又はいずれかの意味の明確な支持を提供すると解釈されるものとする。

【 0042 】

本明細書全体を通して、特に別段の記述がない限り、又は文脈が別様に要求していない限り、単一のステップ、組成物、ステップ群又は組成物群への言及は、それらのステップ、組成物、ステップ群又は組成物群の 1 つ及び複数 (すなわち 1 つ又は複数) を包含すると解釈されるものとする。

【 0043 】

本明細書において開示する数の範囲 (例えば 1 ~ 10) がその範囲内のすべての関連数 (例えば 1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9 及び 10) 及びまたその範囲内の有理数の任意の範囲 (例えば 2 ~ 8、1.5 ~ 5.5 及び 3.1 ~ 4.7) への言及も包含すること、したがって、本明細書において明確に開示するすべての範囲のすべての部分範囲が明確に開示されていることを意図している。これらは具体的に意図しているものの単なる例に過ぎず、列挙されている最低値と最高値の間の数値のすべての可能な組合せは、同様に、本願において明確に述べられていると考えるものとする。

20

【 0044 】

本明細書全体を通して、語「含む (comprise)」、又は語尾変化形、例えば「含む (comprises)」若しくは「含む (comprising)」は、述べられている要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群の包含を含意するが、他の任意の要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群の除外を含意しないと解されることになる。

30

【 0045 】

本明細書に記載する本発明が、具体的に記載するもの以外の変形形態及び修飾形態を受け入れる余地があることは、当業者には理解されるであろう。本発明はすべてのそのような変形形態及び修飾形態を含むと解するべきである。本発明は、本明細書において個々に又は集合的に言及する又は示すステップ、特徴、組成物及び化合物のすべて、並びに前述のステップ又は特徴のすべての組合せ又はいずれか 2 つ以上も含む。

【 0046 】

本発明は、単に例示を目的とする意図をもつ、本明細書に記載の特定の実施形態によって、範囲が限定されないものとする。機能的に等価の生成物、組成物及び方法は明らかに、本明細書に記載の本発明の範囲内にある。

40

【 0047 】

本明細書におけるいずれの実施形態も、特に別段の記述がない限り、他のいずれかの実施形態に準用されると解釈されるものとする。

【 0048 】

精選定義集

本明細書全体を通して、用語「TnTuORF」は、トロボニン T 上流オープンリーディングフレームを意味する。本明細書において、用語「TnTuORF」及び「TnTuORF ペプチド」は同義で用いており、別個の化学エンティティー (chemical

50

entity)として循環器に存在し、トロポニンT遺伝子の上流オープンリーディングフレームによってコードされている、任意のペプチドを意味することを意図したものである。

【0049】

本発明による用語「急性心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害」は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の任意の心臓障害を含み、例えば、心房細動、心不全、心膜炎、神経伝導障害及びそれらの組合せを含む。

【0050】

本明細書で用いる場合の用語「生体試料」は、静脈血及び動脈血を含む血液、血漿、血清、間質液、又は他の任意の体液から選択される生体液を含む。用語「生体試料」は、心臓組織試料も含む。本明細書で用いる場合の用語「生体試料」及び「体液試料」は、例えば、患者などの興味のある対象の診断、予後予測、分類又は評価を目的として得られる、生体試料又は体液の試料を指す。特定の実施形態において、そのような試料は、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害を診断するために得られることもあり、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害のリスク層別化を実行するために得られることもあり、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害を有する患者の疾患経過の予後予測を行うために得られることもあり、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害のリスクが上昇した患者を特定するために得られることもあり、又はそれらの組合せであることもある。加えて、当業者は、特定の体液試料が分画又は精製手順後、例えば、全血の血清又は血漿成分への分離後に、より容易に分析されることを実感していることだろう。

10

20

【0051】

本明細書で用いる場合の用語「レベル」は、TnTuORFの重量当たりの量又は重量当たりの重量を指すことを意図したものである。この用語は、体積当たりの量又は体積当たりの重量として表現される「濃度」を包含することも意図したものである。用語「循環レベル」は、循環体液中に存在するTnTuORFペプチドの重量当たりの量又は重量当たりの重量又は濃度を指すことを意図したものである。

【0052】

対照と比較してTnTuORFペプチド（若しくはその物質のための他の任意のバイオマーカー）の循環レベルの「増加」若しくは「減少」、又は一実施形態では対照（レベル）からの「変化」若しくは「偏差」は、統計的に有意である。対照レベル又は平均若しくは履歴対照レベルからのレベル増加、レベル減少、偏差又は変化は、上記レベルが上記対照レベルと比較して約5%以上、約10%以上、約20%以上、又は約50%以上異なる場合、存在すると考えることができる。或いは、統計的に有意なものは、 $P < 0.05$ と算出することができる。レベル増加、レベル減少、偏差及び変化を、アッセイ基準限界又は基準範囲によって判定することもできる。これらは、直観的評価又はノンパラメトリック法から算出することができる。概して、これらの方法は、 0.025 及び 0.975 フラクタイルを $0.025 * (n + 1)$ 及び $0.975 * (n + 1)$ として計算することができる。このような方法は、当技術分野において周知である。対照中に不在のマーカの存在を、より高いレベル、偏差又は変化として見ることもある。対照中に存在するマーカの不在を、より低いレベル、偏差又は変化と見ることもある。

30

40

【0053】

具体的には、本明細書で用いる場合の用語「基準範囲」は、代表的濃度の統計バンド内の数値、又は代替的には上側濃度若しくは下側濃度に関する数値を指すことを意図したものである。基準範囲は、循環TnTuORFのレベルを人工的に上昇させることがあろう既存の状態を一切有さない対象から通常は得られるであろう。これらの状態については本明細書の他の箇所論じる。

【0054】

本明細書で用いる場合の用語「デルタ%」は、所与の変数（すなわち、TnTuORFペプチドのレベル又は濃度）の変化率を指すと解される。デルタ%は、生体試料中のTnTuORFペプチドの最終濃度を得、TnTuORFペプチドの初期濃度を引き、それを

50

T n T u O R F ペプチドの初期濃度で割ることによって決定され、結果は百分率として提示される。したがって、非限定的な例として、800 pmol / mL の初期濃度からの300 pmol / mL の増加は、37.5 % の変化を表す。

【0055】

分かりやすくするために、31 ~ 39 デルタ % の増加は、例えば、31、32、33、34、35、36、37、38 又は 39 % のデルタ % 増加、並びにこれらの値間の分数を含む。

【0056】

本明細書で用いる場合の用語「対象」は、ヒト又は非ヒト霊長類を指すことを意図したものである。一実施形態において、対象はヒトである。

10

【0057】

本発明による用語「適切な対照集団」は、心臓障害情報がわかっている、性別及び年齢を一致させた対象からの平均循環 T n T u O R F ペプチドのレベルを指す。上記対照集団を用いて、測定される T n T u O R F ペプチドのレベルを比較する適切な基準範囲を得る。

【0058】

本明細書で用いる場合の用語「結合剤」は、T n T u O R F ペプチドに結合する任意の分子を指すことを意図したものであり、小分子、ポリクローマルであるかモノクローマルであるかにかかわらず任意の種からの抗体、抗原結合断片（例えば F a b 及び F a b₂）、ヒト化抗体、キメラ抗体、或いは、アミノ酸の置換及び / 又は他のペプチド若しくはタンパク質（例えば P E G）との融合を含む他の方法で修飾された抗体を含む。この用語は、任意の種からの受容体若しくは結合タンパク質又はそれらの修飾形態も含む。一例では、結合剤は、T n T u O R F と特異的に結合する。

20

【0059】

本明細書で用いる場合の用語「特異的に結合する」は、結合剤が、特定の物質と、別の物質と反応又は会合するより、高い頻度で、迅速に、長い間継続して、及び / 又は大きい親和性で反応又は会合することを意味すると解釈するものとする。例えば、T n T u O R F と特異的に結合する結合剤は、そのタンパク質又はそのエピトープ若しくは免疫原性断片に、無関係のタンパク質及び / 又はそのエピトープ若しくは免疫原性断片と結合するより、大きい親和性、結合活性で、容易に、及び / 又は長い間継続して結合する。例えば、第1の標的（例えば T n T u O R F）と特異的に結合する結合剤が第2の標的と特異的に結合することもあり、又はしないこともあることは、この定義を読むことによって理解される。したがって、「特異的結合」は、別の分子の排他的結合又は検出不能な結合を必ずしも必要としない。必然的にはではないが、一般には、結合への言及は特異的結合を意味する。

30

【0060】

用語「抗体」は、少なくとも1つの可変領域内に含有されている抗原結合部位によって T n T u O R F 等の標的と特異的に結合することができる免疫グロブリン分子を指す。この用語は、4本鎖抗体（例えば、2本の軽鎖及び2本の重鎖）、組換え又は修飾抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体、ハーフ抗体、二重特異性抗体）並びにシングルドメイン抗体、例えばドメイン抗体及び重鎖のみ抗体（例えば、ラクダ化抗体又は軟骨魚類免疫グロブリン新規抗原受容体（I g N A R））を含む。抗体は、定常領域又は定常断片又は結晶性断片（F c）に配列されることがある、定常ドメインを一般に含む。抗体の好ましい形態は、4本鎖構造を基本単位として含む。完全長抗体は、共有結合している2本の重鎖（約50 ~ 70 k D a）と、2本の軽鎖（各々約23 k D a）とを含む。軽鎖は、可変領域及び定常ドメインを一般に含み、哺乳動物ではκ軽鎖又はλ軽鎖のいずれかである。重鎖は、可変領域と、ヒンジ領域によってさらなる定常ドメイン（複数可）と結合している1つ又は2つの定常ドメイン（複数可）とを一般に含む。哺乳動物の重鎖は、次のタイプのうちの1つのものである：α、δ、ε、γ又はμ。各軽鎖も重鎖の1本と共有結合している。例えば、2本の重鎖、及び重鎖と軽鎖とは、鎖間ジ

40

50

スルフィド結合によって及び非共有結合性相互作用によって互いに保持されている。鎖間ジスルフィド結合の数は、抗体のタイプによって変わることがある。各鎖は、N末端可変領域（各々、長さが約110アミノ酸である、 V_H 又は V_L ）、及びC末端に1又は複数の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン（長さが約110アミノ酸である C_L ）は、重鎖の第1の定常ドメイン（長さが約330～440アミノ酸である C_H ）と整列しており、ジスルフィド結合している。軽鎖可変領域は、重鎖の可変領域と整列している。抗体重鎖は、2つ以上のさらなる C_H ドメイン（例えば C_{H2} 、 C_{H3} など）を含むことができ、 C_{H1} 定常ドメインと C_m 定常ドメイン間に同定することができるヒンジ領域を含むことができる。抗体は、いずれのタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）又はクラス（例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂）又はサブクラスのものであってもよい。一例では、抗体は、ネズミ（マウス若しくはラット）抗体又は霊長類（好ましくはヒト）抗体である。用語「抗体」は、インタクトポリクローナル又はモノクローナル抗体のみならず、変異体、抗原結合部位を有する抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体又はベニヤード抗体（veneered antibody）も含む。

【0061】

用語「抗原結合断片」は、TnTuORFと結合する能力を保持する抗体、好ましくはTnTuORFと特異的に結合する抗体、の任意の断片を意味すると解釈するものとする。この用語は、数ある中でも、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、1本鎖抗体（SCA又はSCAB）を含む。「Fab断片」は、抗体分子の一価抗原結合断片からなり、酵素パプインで全抗体分子を消化して、インタクト軽鎖と重鎖の一部分とからなる断片を生じさせることによって生産することができる。抗体分子の「Fab'断片」は、全抗体分子をペプシンで処理し、その後、還元して、インタクト軽鎖と重鎖の一部分とからなる分子を生じさせることによって得ることができる。この要領で処理して抗体1分子につき2つのFab'断片が得られる。抗体の「F(ab')₂断片」は、2つのジスルフィド結合によって互いに保持されている2つのFab'断片の二量体からなり、全抗体分子を酵素ペプシンで処理することにより、その後の還元なしで得られる。「Fv断片」は、2本の鎖として発現される軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含有する、遺伝子改変断片である。「1本鎖抗体」（SCA）は、適切な、可動性ポリペプチドリンカーによって連結されている軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含有する、遺伝子改変1本鎖分子である。

【0062】

用語「キメラ抗体」は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が、特定の種（例えば、マウスなどのネズミ）に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖（複数可）の残部が、別の種（例えば、ヒトなどの霊長類）に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である抗体はもちろん、所望の生物活性を示すのであればそのような抗体の断片も指す（米国特許第4,816,567号；及びMorrissonら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851～6855）。

【0063】

用語「ヒト化抗体」は、組換え技術を用いて一般に調製されるキメラ分子であって、非ヒト種からの免疫グロブリンに由来するエピトープ結合部位と、ヒト免疫グロブリンの構造及び／又は配列に基づく残りの免疫グロブリン分子構造とを有するキメラ分子を指すと解するものとする。抗原結合部位は、ヒト抗体の可変ドメイン内の適切なフレームワーク領域にグラフトされた非ヒト抗体からの相補性決定領域（CDR）と、ヒト抗体からの残りの領域とを好ましくは含む。エピトープ結合部位は、野生型であることもあり、又は1若しくは複数のアミノ酸置換によって修飾されていることもある。重鎖と軽鎖の両方の可変領域が、問題のエピトープに応じて様々であり結合能力を決める3つの相補性決定領域（CDR）を含有し、これらに隣接して、所与の種において比較的保存されており、上記CDRに足場を提供すると推定される4つのフレームワーク領域（FR）があることは公

10

20

30

40

50

知である。特定のエピトープに対する非ヒト抗体を調製する場合、修飾すべきヒト抗体中に存在するFR上に非ヒト抗体に由来するCDRをグラフトすることによって可変領域を「作り直す」又は「ヒト化する」ことができる。

【0064】

用語「エピトープ」は、抗体及び/又はT細胞受容体と特異的に結合することができる任意の抗原（例えばタンパク質）決定基を含む。すなわち、B及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位。エピトープ決定基は、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面上の基から通常はなり、特異的三次元構造特性はもちろん、特異的電荷特性も通常は有する。エピトープは、例えば少なくとも3、5又は8～10個のアミノ酸を概して含む。上記アミノ酸は、連続したアミノ酸であることもあり、又は三次フォールディングによって並置されている連続していないアミノ酸であることもある。高次構造エピトープと非高次構造エピトープは、高次構造エピトープとの結合が変性溶媒の存在下で失われるが、非高次構造エピトープとの結合は失われないことで区別される。

10

【0065】

本明細書で用いる場合、用語「抗原変異体」は、1つ若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されている、特異的に同定された配列とは異なるペプチド配列を指す。

1、2、3又は4個のアミノ酸の置換、付加又は欠失が具体的には考えられる。変異体は、天然に存在する対立遺伝子抗原変異体であることもあり、又は天然に存在しない抗原変異体であることもある。変異体は、同じ種からのものであることもあり、又は他の種からのものであることもあり、ホモログ、パラログ及びオルソログを包含することができる。特定の実施形態において、本発明に有用なポリペプチドの抗原変異体は、親ポリペプチドと同じ又は同様である、ホルモン機能又は抗原結合特性をはじめとする生物活性を有する。（ポリ）ペプチドに関して用語「抗原変異体」は、本明細書にて定義のポリペプチドのすべての形態を包含する。用語「抗原変異体」は、天然に存在するポリペプチド、組換え生産されたポリペプチド及び合成生産されたポリペプチドを包含する。

20

【0066】

当技術分野において公知のコンピュータ/データベース法に加えて、ポリペプチド抗原変異体は、当技術分野において公知の物理的方法によって、例えば、本発明のポリペプチドに対して産生された抗原を使用する発現ライブラリーのスクリーニング（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Press、1987）によって、同じくSambrookらによって記載されている組換えDNA法によって、又はそのような抗体を活用する天然源からのポリペプチドの同定によって、同定することができる。

30

【詳細な説明】

【0067】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の予後予測又は診断のためのアッセイ、方法及びキットにおける、本明細書に記載するトロポニンT上流オープンリーディングフレーム（TnTuORF）ペプチド及び結合剤の使用は、例えば心房細動、心不全、心膜炎、神経伝導障害、血管迷走神経性失神及びこれらの組合せ（Thygesenら（2012）Circulation 126:2020～2035；2024頁の表Iにおいて定義されている）の早期発症の検出に明らかな臨床的意義がある。本明細書に記載する本発明は、心臓障害リスク又は既存の心臓障害が悪化するリスクが潜在的にある可能性がある対象を層別化する能力を臨床医に与える。加えて、本開示の方法、アッセイ及びキットは、既存の治療に対する対象の反応性をモニターする手段を臨床医に与える。例えば、対象におけるTnTuORFのレベルを経時的に測定することによって、臨床医は、治療又は処置に対する対象の反応をモニターすることができる。

40

【0068】

さらに、心筋梗塞の予測又は診断の際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するための、心イベント後に急性非代償性心不全で再入院する対象のリスクを予

50

測する際の又は心イベント後の対象における死亡率を予測する際のNT-プロBNPの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するための、TnTuORFペプチドに特異的な結合剤を含むアッセイ、方法及びキットが、本発明から得られる。

【0069】

本明細書に記載する本発明は、以下の詳細な説明を考慮することにより明らかになるであろう。

【0070】

TnTuORFペプチドはヒト循環器に存在する

本出願人は、心筋トロポニンの上流オープンリーディングフレームによってコードされたペプチドが、循環器に及び特にヒト血漿中にはっきりと区別できる別個のバイオマーカーとして存在するという本発明者らの仮説を先ず確認することを試みた。

【0071】

心筋トロポニン遺伝子の詳細なバイオインフォマティック分析に従って、本出願人は、心筋トロポニンTの主開始コドンの-1512bp(すなわち上流)に位置するオープンリーディングフレーム(ORF)を同定した(図1)。+2のコザックスコア及び翻訳される高い尤度から、本出願人は、この上流オープンリーディングフレーム(uORF)が推定12アミノ酸ペプチドをコードするはずであると予測し、免疫組織化学検査を用いてそのようなペプチドの存在を確認することを試みた。

【0072】

本出願人は、MAPEGWVIVVIS(配列番号1)の予測配列を有する推定12アミノ酸ペプチドのアミノ末端に対するポリクローナル抗体を先ずは産生させた。この抗体(r244)は、他の公知の確証されている循環ペプチド及び/又は薬物、重要なことには、例えば心筋トロポニンT及び心筋トロポニンI、N末端脳ナトリウム利尿ペプチド(NT-プロBNP)、並びに脳ナトリウム利尿ペプチドの成熟形態を含む、そのような循環ペプチド及び/又は薬物との交差反応性を殆ど又は全く示さなかった(BNP、実施例2の表III)。

【0073】

次いで、r244ポリクローナル抗体を使用して、高感度で特異的なラジオイムノアッセイを開発した。図2は、合成TnTuORFペプチド標準曲線と比較してヒト静脈血漿(健康成人対象の末梢血から得た)の並行希釈(parallel dilution)を示す代表的TnTuORFイムノアッセイ曲線を示す。これらのデータは、循環器にはっきりと区別できる化学エンティティーとして存在する、上流オープンリーディングフレームコード配列、この場合はトロポニンTのuORF、によってコードされたペプチドの存在を立証する初めての直接的証拠を提供する。

【0074】

さらに、及び重要なこととして、TnTuORFには高感度トロポニンT(hsTnT)レベル、年齢、血圧及びボディーマスインデックスとの有意な関連性がなかった。

【0075】

次に、本出願人は、イムノアッセイと結合された逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)及びサイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)によるイムノアッセイによって検出されるTnTuORF種を同定することを試みた(図5)。これらの分析の結果によって、免疫反応性TnTuORFはヒト血漿中に(i)インタクト12アミノ酸ペプチド(すなわち、MAPEGWVIVVIS;配列番号1)及び(ii)MAPEGWVIVVI(配列番号2)、MAPEGWVIVV(配列番号3)及びMAPEGWVIV(配列番号4)をはじめとするカルボキシ末端短縮形として存在することが確認されたが、これらに限定されない。

【0076】

心臓障害のバイオマーカーとしてのTnTuORF

免疫反応性TnTuORFが実際にヒト循環器に存在することが確証されたので、本出願人は、急性冠症候群をはじめとする心臓障害におけるそのような免疫反応性TnTuO

10

20

30

40

50

R F の潜在的臨床的有用性を判定することを試みた。まず、4つの独立したコホートからの患者、すなわち、(i) 心血管、内分泌又は神経疾患の証拠も病歴もない健常ボランティア (n = 109)、(i i) 臨床的に必要と判断された心臓カテーテル留置を受けた患者 (n = 16)、(i i i) 記録された S T 上昇心筋梗塞がある患者 (n = 4) 及び急性冠症候群コホート (n = 502) をリクルートした。これらの種々の患者コホートからの血液サンプリング範囲の詳細は、実施例 1 の方法セクションに記載する。

【0077】

最初の測定セットは、心筋梗塞をもたらす急性心虚血 (すなわち患者コホート (i i i)) の診断バイオマーカーとしての循環 T n T u O R F ペプチドの潜在的臨床的有用性の調査を含んでいた。図 5 の A は、静脈 T n T u O R F ペプチド濃度は症状発症後最初の 4 ~ 5 時間に減少する傾向があり、一般的な増加は約 24 時間で安定水準に戻ったが、T n T u O R F のレベルは実際には正常対照で観察されたものの半分未満であったこと (実施例 5) を示す。h s T n T マーカー濃度が虚血イベント後の急性期に S T E M I 患者の血漿において急上昇する h s T n T (図 5 の B) と比較して、これらのデータは、心筋梗塞をもたらす急性心虚血の診断における T n T u O R F ペプチドの臨床的有用性の裏付けにならない。

10

【0078】

急性冠症候群 (T h y g e s s e n ら (2012) C i r c u l a t i o n 126 : 2020 ~ 2035) をはじめとする他の心臓障害の予測又は診断における T n T u O R F ペプチドの潜在的有用性を評価するために、本出願人は、心臓に起因することが疑われる胸痛の主訴を救急診療部 (E D) に提示した患者 502 名の予期的観察研究に着手した。患者人口統計学的及び分析物データを表 I I (実施例 1) に提示する。様々な分析の結果により、E D に提示した患者の T n T u O R F ペプチド血漿濃度は心筋梗塞 (M I) 及び安定狭心症 (U A) 以外の心臓障害の診断に有用性があることが確認された (図 7)。

20

【0079】

したがって、本出願人は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する患者において T n T u O R F ペプチドの循環濃度が患者の症状発症後最初の 12 時間で最も高いという驚くべき知見を得た。障害時間に関して臨床症状提示 (c l i n i c a l p r e s e n t a t i o n) 開始後最初の 12、10、8、6、4、2 若しくは 1 時間に又は臨床症状提示時に観察されるレベルは、驚くほど高く、多くの場合、正常対照集団におけるレベルより最大 2 倍、3 倍、4 倍及び 5 倍高い、一般には 1.5 倍高いレベルに達した。

30

【0080】

つまり、1つ又は複数の T n T u O R F ペプチドは、例えば、心房細動、心不全、心膜炎、神経伝導障害及びこれらの組合せ並びに本明細書において述べるような他の障害をはじめとする、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の、明確な早期マーカーとして有用である。

【0081】

これらの驚くべき知見に基づいて、本出願人は、対象から、特に、例えば障害の臨床症状提示開始後 12、10、8、6、4、2 若しくは 1 時間以内に又は臨床症状提示時に、採取した生体試料において 1つ若しくは複数の T n T u O R F ペプチド又はその断片についてスクリーニングすることが有用になると初めて断定した。

40

【0082】

したがって、本発明の一態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測する方法であって、

(i) 対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 測定された T n T u O R F ペプチドのレベルと適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

対照集団と比較した T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安

50

定狭心症以外の心臓障害になることの予測であり、さらに、上記測定するステップが、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む方法を提供する。

【0083】

本発明の別の態様では、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断する方法であって、

(i) 対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するステップと、

(i i) 測定された T n T u O R F ペプチドのレベルと適切な対照集団からの基準範囲とを比較するステップと

を含み、

対照集団と比較した T n T u O R F ペプチドの循環レベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になることを示し、さらに、上記測定するステップが、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することを含む方法を提供する。

【0084】

評価のために、T n T u O R F ペプチドのレベルが基準値又は対照値と有用に比較される又は相関付けられることがあることは、当業者には理解されるであろう。一実施形態において、対照集団は、心臓障害であることがわかっている、性別及び年齢を一致させた対象である。

【0085】

本明細書で用いる場合、対照集団は、T n T u O R F ペプチドの試料が採取され、平均レベルが決定される、個体又は群であることができる。通常、上記個体又は群は、心臓障害に罹患していることがわかっていない正常な健常個体又は個体の群を含むことになる。一実施形態において、基準範囲は、対照集団からの平均循環 T n T u O R F ペプチド濃度である。対照集団における T n T u O R F ペプチドのレベルは、約 4 3 0 ~ 1 1 3 0 p g / m L の範囲であり、平均は約 7 7 8 p g / m L (P < 0 . 0 0 1) である。或いは、対照集団は、事前に検査を受けた個体又は群からの複数の読取値に基づいて評価することができる。平均が約 1 1 5 9 p g / m L である、ほぼ 7 3 0 ~ 1 5 9 0 p g / m L 程度のレベルは、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を典型的に示す。

【0086】

試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定するステップが、研究される生体イベントに依存して、単一試料での単回測定であることもあり、多数の試料での反復測定であることもあることは理解されるであろう。心臓障害の場合、測定は、例えば、T n T u O R F ペプチドの 1 ~ 2 0 回以上の測定、様々な時点で採取された試料中の T n T u O R F ペプチドの 1 ~ 1 0 回、1 ~ 5 回、1 ~ 3 回、又は 2 回、又は 3 回の測定を含むことがある。一実施形態において、測定は、障害又は疑われる障害の臨床症状提示開始又は臨床症状提示後最初の 1 2、1 0、8、6、5、4、2 時間以内、又は 1 時間以下以内に採取された試料でのものである。上記サンプル期間外の単回又は反復測定を用いて、T n T u O R F ペプチドのレベルが正常対照レベルに入るのか、又は例えば心組織対照レベルに入るのかを確認することもできる。

【0087】

本発明のアッセイ、方法及びキットは、発症又は症状提示の最初の 1 時間以内に採取された 1 つ又は 2 つの試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定すること、その後、発症若しくは症状提示後 2 ~ 4 時間若しくは 2 ~ 3 時間以内に採取された 1 つ又は 2 つの試料中の T n T u O R F ペプチドのレベルを測定すること、つまり T n T u O R F ペプチドのレベルの初期測定を含む。

【0088】

したがって、特定実施形態において、心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測する方法、又は対象における心筋梗塞若しくは不安定狭心症以外

10

20

30

40

50

の心臓障害を診断する方法は、対象からの第1の生体試料中のTnTuORFペプチドのレベルを測定するステップと、第1の生体試料と同じ対象から採取されるが時間の点ではより後に採取される第2の生体試料中のTnTuORFペプチドのレベルを測定するステップと、第1の試料中のTnTuORFペプチドのレベルと第2の試料中のTnTuORFペプチドのレベルを比較するステップとをさらに含み、第1の試料と第2の試料間でのTnTuORFペプチドの循環レベルの増加は、心臓障害になるリスク増加を示す。

【0089】

上で述べたように、TnTuORFペプチドのレベルは、心臓障害の発症又は症状提示の最初の1～12、10、8、6、4又は2時間以下以内に測定されることがあり、例えば、正常対照において測定されるレベルより1.5～5倍高い。

10

【0090】

上で定義したような生体試料は、TnTuORFペプチドが存在できる、又はTnTuORFペプチドを分泌することができる、いずれの生体物質であってもよい。一実施形態において、生体試料は、循環器系生体試料、例えば、静脈血及び動脈血、血漿、血清又は間質液である。別の実施形態において、生体試料は、心組織又は心臓組織試料である。

【0091】

生体試料中の「TnTuORFペプチドのレベルを測定すること」という用語は、当業者には公知と予想されるような、例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫蛍光アッセイ及び免疫放射定量測定法をはじめとする、イムノアッセイなどの、試料中のTnTuORFペプチドのレベル又は濃度の決定を可能にする方法論を指す。一例では、TnTuORFペプチドのレベルは、pg/mLとして表される。用語TnTuORFペプチドのレベル及びTnTuORFペプチド濃度は、同義で用いることができる。

20

【0092】

本発明によるアッセイ、方法及びキットにおいて、測定ステップは、TnTuORFペプチドに選択的に又は特異的に結合する結合剤であって、生体イベントの他のマーカーとの低い交差反応性を有する結合剤とTnTuORFペプチドとの結合を検出することを含む。特定の実施形態において、結合剤は、抗体又はその抗原結合断片である。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であってもよいし、又はそれらの抗原結合断片であってもよい。他の実施形態において、結合剤又は抗体は、固相に固定されていることもある。抗体及び抗原結合断片をはじめとする結合剤のより詳細な説明は、本明細書の他の箇所にて概説する。

30

【0093】

心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を予測又は診断する際のTnTuORFペプチドの特異度及び感度は、TnTuORFの濃度を心拍数値及びヘモグロビン濃度に加えたとき、さらに改善された。実例として、及び図7を参照して、TnTuORFを心拍数及びHb濃度に加えたとき、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の診断は、AUC = 0.79 ($P < 0.001$) から AUC = 0.83 ($P < 0.001$) へと好転した。したがって、本発明の特定の実施形態では、本発明の心臓障害を予測又は診断するためのアッセイ、方法及びキットを、例えば、心拍数、ヘモグロビン濃度、血圧、年齢、性別、体重、身体活動レベル、並びに肥満、糖尿病及び心イベントを含むイベントの家族歴、並びに、トロポニンT及びトロポニンIの循環レベルなどの、1つ又は複数のリスク因子の分析と併せて実行することもできる。

40

【0094】

上で言及した「AUC」値に関して、並びにTnTuORFペプチド、及び対象を心臓障害であると予測又は診断するTnTuORFペプチドの能力に関して後続の実施例に記載するように、集団研究を用いて決定閾値を選択することもできる。受信者操作特性(「ROC」)は、レーダー画像の分析のために第二次世界大戦中に開発された信号検出理論から生まれたものであり、ROC分析は、多くの場合、「罹病」亜集団を「非罹病」亜集団と最もよく区別することができる閾値を選択するために用いられる。この場合の偽陽性

50

は、人物が陽性反応を示すが実際には疾患を有さないときに起こる。その一方で、偽陰性は、人物が実際には疾患を有しながら健常であることを示唆する陰性反応を示すときに起こる。ROC 曲線を描くために、決定閾値を継続的に変化させながら真陽性率 (TPR) 及び偽陽性率 (FPR) を決定する。TPR は感度と等価であり、FPR は、 $1 - \text{特異度}$ に等しいので、ROC グラフは、感度対 ($1 - \text{特異度}$) プロットと呼ばれることもある。完全検定は、 1.0 の (ROC) 曲線下面積 (すなわち AUC) を有することとなり、無作為検定は、 0.5 の面積を有することになる。閾値は、許容可能な特異度及び感度レベルをもたらすように選択される。

【0095】

上で説明したように、本開示の方法、アッセイ及びキットは、既存の治療に対する対象の反応性をモニターする手段を臨床医に与える。

10

【0096】

したがって、本発明の別の実施形態において、対象を心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害であると予測又は診断するための方法は、対象が、対照集団における TnTuORF ペプチドの循環レベルと比較して TnTuORF ペプチドの循環レベルの増加を有すると判明した場合、対象に処置レジメンを行うことをさらに含む。

【0097】

さらに、本発明のまた別の態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する対象の反応性をモニターするための方法であって、

20

(i) 対象からの第 1 の生体試料中の TnTuORF のレベルを測定するステップと、
(ii) 同じ対象から採取される、上記対象からの第 2 の生体試料中の TnTuORF のレベルを測定するステップと、

(iii) 第 1 の試料中の TnTuORF の測定レベルと第 2 の試料中の TnTuORF の測定レベルを比較するステップと

を含み、

第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF のレベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示し、第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF のレベルの減少が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示すものである方法を提供する。

30

【0098】

処置すべき心臓障害によっては、第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF ペプチドのレベルの増加が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示す可能性がある。言い換えれば、第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF ペプチドのレベルの減少は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示す。

【0099】

したがって、本発明のまたさらなる態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する対象の反応性をモニターするための方法であって、

40

(i) 対象からの第 1 の生体試料中の TnTuORF ペプチドのレベルを測定するステップと、

(ii) 同じ対象から採取される、上記対象からの第 2 の生体試料中の TnTuORF ペプチドのレベルを測定するステップと、

(iii) 第 1 の試料中の TnTuORF ペプチドの測定レベルと第 2 の試料中の TnTuORF ペプチドの測定レベルを比較するステップと

を含み、

第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF ペプチドのレベルの減少が、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する反応不良を示し、第 1 の試料と第 2 の試料間での TnTuORF ペプチドのレベルの増加が、心筋梗塞又

50

は不安定狭心症以外の心臓障害のための薬物での処置、又は治療に対する好反応を示すものである方法を提供する。

【0100】

対象をモニターすべき場合、多数の生体試料を継続的に採取することもある。逐次サンプリングによって、マーカーレベルの変化を継続的に測定することが可能になる。サンプリングは、イベントのおおよその開始時間、イベントの重症度に関する情報をもたらすことができ、どの治療レジメンが適切である可能性があるのかを示し、用いられる治療レジメンに対する応答を示し、又は長期予後予測を示すことができる。救急車内、診療所内、臨床症状提示時、入院中、外来の際、又は定期的人間ドック中などのようなケアの時点で分析を行うことができる。

10

【0101】

さらに、上記方法を、例えば、心拍数、ヘモグロビン濃度、血圧、年齢、性別、体重、身体活動レベル、並びに、肥満、糖尿病及び心イベントをはじめとするイベントの家族歴、並びに、トロポニンT及びトロポニンIの循環レベルなどの、1つ又は複数の心臓障害リスク因子の分析と併せて実行することもできる。

【0102】

最後に、本発明が、特異的TnTuORFペプチド結合メンバー、並びに対象を心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害がある、又はそのような心臓障害を発症するリスクがあると予測又は診断するための薬剤の製造における上記特異的TnTuORFペプチド結合メンバーの使用にも関することは、当業者には理解されるであろう。

20

【0103】

したがって、本発明は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクの予測に使用するための、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤も提供する。

【0104】

本発明は、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害の診断に使用するための、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤をさらに提供する。

【0105】

本発明は、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害になる対象のリスクを予測するための薬剤の製造における、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤の使用も提供する。

30

【0106】

本発明は、対象における心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を診断するための薬剤の製造における、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤の使用をさらに提供する。

【0107】

心筋梗塞のバイオマーカーとしてのTnTuORF

心筋梗塞をもたらす急性心虚血を直接予測又は診断することができる点でのTnTuORFペプチドの有用性欠如にもかかわらず、驚くべきことに、本出願人は、TnTuORFペプチドが、心筋梗塞を予測及び/又は診断する際の既存心筋トロポニンバイオマーカーの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善することを立証する。絶対的には、トロポニンI×hsトロポニンT/TnTuORF(本明細書ではトロポニンプラス(商標)と呼ぶ)の生成物比が、2時間以内に検出された心筋梗塞患者数を4%増加させ(すなわち、94/96 NSTEMI患者又は98%; 90/96 NSTEMI患者又は90%を検出したhsTNT及び88/96 NSTEMI患者又は92%を検出したTnIと比較)、偽陽性診断率を7%低下させた(実施例6; 図8)。

40

【0108】

したがって、本発明のさらなる態様では、対象における心筋梗塞リスクを予測する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニ

50

ンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0109】

本発明は、対象における心筋梗塞リスクを診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイをさらに提供する。

【0110】

いずれかの態様による一実施形態において、心筋トロポニンは、トロポニンT及びトロポニンIを含む。一例では、心筋トロポニンを高感度トロポニンT(hsTnT)×トロポニンIによって表すことができる。別の実施形態では、心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスは、心筋トロポニンのTnTuORFペプチドに対する生成物比を用いることによって改善される。一例では、上記生成物比は、 $hsTnT \times TnI / TnTuORF$ によって表される。上で説明したように、この生成物比は、心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスを増す。

【0111】

本発明は、対象における心筋梗塞を予測又は診断する際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドのレベルを測定するキットであって、TnTuORFペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、TnTuORFとの結合に基づいて定量的に測定することができる、キットも提供する。

【0112】

一実施形態において、キットは、TnTuORFペプチドのレベルの測定方法についての取扱説明書をさらに含む。

【0113】

本発明は、対象における心筋梗塞を予後予測又は診断の際の心筋トロポニンの感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合するTnTuORFペプチド結合剤をさらに提供する。

【0114】

さらに、予後予測に関しては、トロポニンプラス(商標)(すなわち $hsTnT \times TnI / TnTuORF$)は、1年での死亡率をhsTnT及びTnI単独(それぞれAUC = 0.72及び0.71)より正確に予測した(AUC = 0.74、 $P < 0.001$)が、トロポニンT又はトロポニンのIいずれかでは1年以内の心筋梗塞又は慢性心不全による再入院の予測を改善しなかった。

【0115】

したがって、本発明のまたさらなる態様では、心イベント後の対象における死亡率を予測するアッセイであって、トロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中のTnTuORFペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0116】

一実施形態では、上記アッセイを用いて、心イベント後9カ月、10カ月、11カ月、12カ月、13カ月、14カ月及び15カ月まで、より一般的には心イベント後12カ月までの対象における死亡率を予測することができる。

【0117】

本発明は、心イベント後の対象における死亡率の予測に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(TnTuORF)ペプチド

10

20

30

40

50

に選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤をさらに提供する。

【 0 1 1 8 】

一致させた N T プロ B N P への単一入院患者 2 4 時間 T n T u O R F 濃度の追加は、約 1 年の急性非代償性心不全 (A D H F) での再入院を予測するための 2 4 時間 N T プロ B N P のみの R O C 曲線を改善した (A U C = 0 . 9 3 対 0 . 9 1 ; 図 9) 。

【 0 1 1 9 】

したがって、本発明のさらなる態様では、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスを改善するアッセイであって、トロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、上記対象からの生体試料中の T n T u O R F ペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

10

【 0 1 2 0 】

一実施形態では、上記アッセイを用いて、心イベント後 9 カ月、1 0 カ月、1 1 カ月、1 2 カ月、1 3 カ月、1 4 カ月及び 1 5 カ月まで、より一般的には心イベント後 1 2 カ月までに急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測することができる。

【 0 1 2 1 】

本発明は、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドのレベルを測定するキットであって、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R F との結合に基づいて定量的に測定することができる、キットをさらに提供する。

20

【 0 1 2 2 】

最後に、本発明は、心イベント後に急性非代償性心不全になる対象のリスクを予測する際の N 末端脳ナトリウム利尿ペプチド (N T - プロ B N P) の感度及び偽陽性パフォーマンスの改善に使用するための、対象からの生体試料中のトロポニン T 上流オープンリーディングフレーム (T n T u O R F) ペプチドに選択的に結合する T n T u O R F ペプチド結合剤も提供する。

【 0 1 2 3 】

30

T n T u O R F に対する結合剤

T n T u O R F ペプチドは、体液試料において、T n T u O R F ペプチドと、T n T u O R F ペプチドに選択的に結合する結合剤との間の結合を検出することによって測定される。本開示の方法で使用するための結合剤は、例えば A N P 及び B N P との、低い交差反応性を好ましくは有する。結合剤としては、抗原 T n T u O R F ペプチド又はその断片を免疫抗原として使用して調製される、抗体又は抗原結合断片、例えば F a b 及び F (a b)₂ を挙げることができる。ポリペプチド又は断片を記載の担体に結合させてもよい。一例では、結合剤は、抗体である。抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、又はポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体並びにそれらの断片の生産方法は、当技術分野において周知である (例えば、H a r l o w 及び L a n e、Antibodies : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、New York 1988 を参照されたい) が、本出願人も社内でも開発した (例えば、Siriwardena ら (2010) Circulation 122 : 255 ~ 264) 。特異性のため、モノクローナル抗体が好ましい。ヒト化抗体がインビトロアッセイに必要とされないことは、当業者には理解されるであろう。

40

【 0 1 2 4 】

一例では、抗体は、抗原 T n T u O R F ペプチドに対して産生される。一例では、抗原 T n T u O R F ペプチドは、M A P E G W V I V V I S (配列番号 1)、M A P E G W V I V V I (配列番号 2)、M A P E G W V I V V (配列番号 3) 又は M A P E G W V I V

50

(配列番号4)を含む。この抗原 T n T u O R F ペプチドは、特異的アミノ酸検出に十分なエピトープを一般に提供する。

【0125】

モノクローナル抗体は、公知技術の方法によって生産することができる。これらの方法としては、K o h l l e r ら (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 (5 5 1 7) : 4 9 5 ~ 7 によって記載された免疫学的方法、及び H u s e ら (1 9 8 9) 2 4 6 (4 9 3 5) : 1 2 7 5 ~ 8 1 によって記載された組換えDNA法が挙げられる。1本鎖可変抗体断片を生産するための組換えファージ抗体系、及びNT-CNPペプチドに対する抗体を生産するためのその後の突然変異(例えば部位特異的突然変異誘発)又は鎖交換の使用も考えられる。

10

【0126】

ポリクローナル抗体を生成するための従来の手順は、H a r l o w 及び L a n e (上掲) において詳述されている。簡単に言うと、プロトコルは、選択された動物宿主、例えばウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラット又はマウス(通常はウサギ)に対する単離されたNT-CNPペプチドでの間隔をあけた何回もの免疫処置とともに、瀉血及び採血前の1回又は複数回の検査を必要とする。血清を遠心分離によって血餅から分離してもよい。E L I S A 又はラジオイムノアッセイ競合アッセイ又は技術等価の方法を用いて血清をポリクローナル抗体の存在について検査してもよい。

【0127】

T n T u O R F に特異的な抗体は、これらの又は類似のペプチドを、先ず、大きいタンパク質、例えばリンペットヘモシアニン(K L H)、ウシ血清アルブミン(B S A) 又はウシサイログロブリンと複合体化して、そのようなペプチドを免疫原性にした後、産生させることができる。結合は、例えば一般的な薬剤グルタルアルデヒド、カルボジイミド又はN-(e-マレイミド-カプロイルオキシ)スクシンイミドエステル(M C S) をはじめとする任意のタンパク質架橋剤の使用によって果たすことができるが、但し、システイン残基をカップリング前にペプチド配列に付加させることを条件とする。これらの複合体のウサギ、ヒツジ、マウス又は他の種への1カ月間隔での注射、続いて2週間後の血液試料の採集によって、マウスの脾臓からポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を生産することが可能になる。

20

【0128】

例えば、上に記載したマウス宿主を屠殺し、マウスの脾臓を除去してもよい。次いでメッセンジャーRNA(mRNA)を単離し、抗体の可変領域の重鎖及び軽鎖に特異的なプライマーとポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅とを用いてmRNAからcDNAを作製する。重鎖及び軽鎖のDNA配列をリンカー配列で連結させて、正しいリーディングフレームを確保する。次いで、宿主への形質転換のために、DNA構造をベクター、例えばプラスミド若しくはバクテリオファージ、又はウイルスに挿入する。一例では、ベクターはバクテリオファージである。

30

【0129】

適切な宿主は、原核細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞から選択することができる。一例では、原核細胞宿主、好ましくはエシェリキア・コリ(E s c h e r i c h i a c o l i) を使用する。バクテリオファージがウイルスコートを生産し、上記コート上で抗体断片、ファージディスプレイライブラリー、が発現される。ファージディスプレイライブラリーを、特異的抗原に対して適切な親和性を有する抗体断片についてスクリーニングすることができる。ライブラリーを何回もスクリーニングすることができ、タンパク質工学技術、例えば、部位特異的突然変異誘発及び鎖シャフリングによって抗体構築物を修飾することができ、上記技術はすべて当業者の能力の範囲内である。

40

【0130】

ペプチド結合アッセイを含む結合剤の検出

本発明は、T n T u O R F ペプチドを結合剤と結合させることと、その後、結合されたペプチドの量を検出することを含む、検出システムの使用を含む。類似の解決策は、試

50

料中の未結合の結合剤の量を検出して、未結合の又は結合したT n T u O R Fの指標を得ることである。そのような代替法は、結合した結合剤の量を直接検出するための機能的代替手段として本発明の範囲内に入ると解釈される。試料体積がわかっている場合、試料中のT n T u O R Fの量から試料中のT n T u O R Fの濃度を容易に算出することができることは、当業者には理解されるであろう。

【0131】

本発明によるアッセイ、方法及びキットにおいて、測定ステップは、T n T u O R Fペプチドに選択的に又は特異的に結合し、生体イベントの他のマーカーとの低い交差反応性を有する結合剤とT n T u O R Fペプチドとの結合を検出することを含む。

【0132】

したがって、本発明のまた別の態様では、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する対象又はそのような心臓障害になるリスクがある対象からの生体試料中のトロポニンT上流オープンリーディングフレーム(T n T u O R F)ペプチドのレベルを測定するアッセイであって、T n T u O R Fペプチドに選択的に結合する結合剤を含み、該結合剤は、T n T u O R Fペプチドとの結合に基づいて定量的に測定することができる、アッセイを提供する。

【0133】

特定の実施形態において、結合剤は、抗体又はその抗原結合断片である。抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であってもよいし、又はそれらの抗原結合断片であってもよい。それ故、一実施形態において、本発明のアッセイは、イムノアッセイである。

【0134】

本発明の抗体は、試料中のT n T u O R Fの存在及び/又は量を決定するためのイムノアッセイに特に有用である。異なる抗体の可変的結合親和性のため、試料中のT n T u O R Fの量に対する測定値の標準結合曲線を特定の抗体について確立して、試料中のT n T u O R Fの量を決定できるようにするべきであることは、当業者には理解されるであろう。そのような曲線を使用して、試料中のT n T u O R Fの真の量を決定する。

【0135】

試料材料は、生体液を含むが、それらに限定されない。本開示に関して、通常、生体液は全血、血漿又は血清から選択される。

【0136】

T n T u O R Fペプチドに特異的なイムノアッセイは、T n T u O R Fペプチドと特異的に結合する抗体の生産を通常は必要とすることになる。一例では、抗体は、M A P E G W V I V V I S (配列番号1)、M A P E G W V I V V I (配列番号2)、M A P E G W V I V V (配列番号3)又はM A P E G W V I V (配列番号4)によって定義されるT n T u O R Fペプチドを認識する。抗体を使用して、下記競合結合アッセイにおけるような広範な特異度を有するイムノアッセイを構築することができ、又はサンドイッチ型アッセイで下記の他の抗体と併用して、T n T u O R Fペプチドに特異的なアッセイを生成することができる。非競合アッセイも可能であることは、当業者には理解されるであろう。サンドイッチイムノアッセイのための後者の抗体は、M A P E G W V I V V I S (配列番号1)を含むアミノ酸配列に特異的なものはもちろん、それらのカルボキシ短縮形態(すなわち配列番号2~4)も含む。

【0137】

別の例では、指示薬も使用することがある。指示薬は、E L I S A及びR I Aアッセイ形式で利用されることがある。

【0138】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を競合結合アッセイ又はサンドイッチ型アッセイで使用することができる。この方法の一例では、液体試料を抗体と接触させ、抗体によって認識されるエピトープを含有する標識T n T u O R Fペプチド又は修飾ペプチドと同時に又は逐次的に接触させる。

10

20

30

40

50

【0139】

標識は、放射活性成分、例えば ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C であってもよく、又は時間分解蛍光、蛍光、蛍光分極、発光、化学発光若しくは比色法によって測定することができる非放射活性成分であってもよい。これらの化合物には、放射活性計数法、発光又は蛍光光出力の測定、吸光度などによって直接測定することができる、ユーロピウム若しくは他のアクチニド元素、アクリジニウムエステル、フルオレセイン、又は放射活性物質、例えば上記のものが含まれる。標識は、間接的に測定することができる任意の成分、例えば、ピオチン、ジゴキシン、又は酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼであってもよい。これらの標識を多数の方法で間接的に測定することができる。例えばホースラディッシュペルオキシダーゼを、 o -フェニレンジアミン二塩酸塩（OPD）及び過酸化物質などの基質と共にインキュベートして、吸光度を測定することができる着色生成物を生じさせることができ、又はルミノール及び過酸化物質と共にインキュベートして、ルミノメータで測定することができる化学発光を得ることができる。ピオチン又はジゴキシンを、それらと強力に結合する結合剤と反応させることができる；例えば、アビジンはピオチンと強力に結合するであろう。そしてまた、これらの結合剤を、測定可能な標識、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、又は上記の他の直接若しくは間接的に測定される標識と、共有結合又は連結させることができる。これらの標識及び上記のものを、ペプチド又はタンパク質に、合成中に、標識との直接反応によって、又はMCS及びカルボジイミドなどの一般に利用可能な架橋剤の使用によって、又はキレート剤の添加によって結合させることができる。

10

20

【0140】

抗体との、通常は18～25時間、4 での、又は1～240分間、30 ～40 での接触後、結合剤（抗体）と結合した標識ペプチドを未結合標識ペプチドから分離する。溶液相アッセイでは、上記分離を、固相粒子、例えばセルロース、又は磁性材料に結合された抗ガンマグロブリン抗体（二次抗体）の添加によって果たすことができる。二次抗体は、一次抗体に使用されるものとは異なる種で産生され、一次抗体に結合する。したがって、すべての一次抗体は、二次抗体によって固相と結合される。この複合体を遠心分離又は磁気引力によって溶液から除去し、結合標識ペプチドを、そのペプチドに結合している標識を使用して測定する。遊離標識から結合したものを分離するための他の選択肢としては、溶液から沈殿する免疫複合体の形成、ポリエチレングリコールによる抗体の沈殿、又は遊離標識ペプチドを木炭と結合させて遠心分離又は濾過により溶液から除去することが挙げられる。分離された結合又は遊離相中の標識を、上に提示したものなどの適切な方法によって測定する。

30

【0141】

競合結合アッセイを固相アッセイとして構成することもでき、固相アッセイは、より容易に行われ、したがって上記のものより好ましい。このタイプのアッセイは、ウェルを有するプレート（ELISAプレート若しくはイムノアッセイプレートとして一般に知られている）、固体ビーズ、又はチューブの表面を使用する。一次抗体を、プレート、ビーズ若しくはチューブの表面に吸着若しくは共有結合させるか、又はプレートに吸着若しくは共有結合している二次抗ガンマグロブリン若しくは抗Fc領域抗体によって間接的に結合させる。試料及び標識ペプチド（上記の通り）と一緒に又は逐次的にプレートに加え、試料中のTnTuORFと標識ペプチド間での抗体結合についての競合を可能にする条件下でインキュベートする。その後、未結合標識ペプチドを吸引除去し、プレートをすすいで、プレートに付着している抗体結合標識ペプチドを遊離させる。次いで、上で説明した技術を用いて標識ペプチドを測定することができる。

40

【0142】

サンドイッチ型アッセイは、特異度、速度及びより大きい測定範囲という理由で、より好ましい。このタイプのアッセイでは、NT-CNPに対して過剰な一次抗体を、固相競合結合アッセイについて上で説明したように、吸着、共有結合、又は抗体Fc若しくはガンマグロブリン抗体によってELISAプレートのウェル、ビーズ又はチューブに付着さ

50

せる。試料流体又は抽出物を固相に付着している抗体と接触させる。抗体が過剰に存在するため、この結合反応は通常は迅速である。T n T u O R F ペプチドに対する二次抗体も、一次抗体と同時に又は逐次的に、試料と共にインキュベートする。この二次抗体は、一次抗体の結合部位とは異なる N T - C N P 上の部位と結合するように選択される。これら 2 種の抗体の反応は、2 種の抗体間にサンドイッチされた試料からの N T - C N P を伴うサンドイッチをもたらす。二次抗体は、通常は、競合結合アッセイについて上で詳述したような容易に測定可能な化合物で標識される。或いは、二次抗体と特異的に結合する標識三次抗体を試料と接触させてもよい。未結合材料の洗浄後、競合結合アッセイについて概説した方法によって結合標識抗体を測定することができる。未結合標識抗体を洗浄除去した後、競合結合アッセイについて概説したように結合標識を定量することができる。

10

【0143】

ディップスティック型アッセイを用いてもよい。これらのアッセイは、当技術分野において周知である。それらのアッセイは、例えば、特異的抗体が付着している金又は着色ラテックス粒子などの小粒子を用いることがある。測定すべき液体試料を、粒子が前もって負荷された膜又は紙ストリップの一端に加え、ストリップに沿って泳動させてもよい。試料中の抗原の粒子との結合は、抗原又は抗体などの粒子用の結合剤をさらにストリップに沿って含有する捕捉部位と結合する粒子の能力を修飾する。これらの部位での着色粒子の蓄積は、試料中の競合抗原の濃度に応じて発色をもたらす。他のディップスティック法は、紙又は膜ストリップと共有結合している抗体を用いて試料中の抗原を捕捉することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素に結合された二次抗原を用いるその後の反応、及び色、蛍光又は化学発光光出力を生成するための基質とのインキュベーションによって、試料中の抗原の定量が可能になる。

20

【0144】

キット

典型的に、キットは、当技術分野において公知のアッセイ用に、及び特定の実施形態では当技術分野において公知であるような R I A 又は E L I S A アッセイ用に構成されることになる。

【0145】

キットは、本明細書において述べる障害のための 1 つ又は複数のさらなるマーカーも含むことがある。心臓障害の場合、例えば、さらなるマーカーは、トロポニン T、トロポニン I、クレアチンキナーゼ M B、ミオグロビン、A N P、B N P、B N P - S P、A N P、A N P - S P、N T - B N P、L D H、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、H - F A B P、エンドセリン、アドレノメデュリン、レニン及びアンジオテンシン I I のうちの 1 つ又は複数を含むことがある。

30

【0146】

キットは、1 つ又は複数の容器で構成されていることがあり、採集用具、例えばボトル、バッグ（例えば静脈内輸液バッグ）、バイアル、注射器及び試験管も含むことがある。少なくとも 1 つの容器が含まれることになり、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害などの生体イベントの予測、診断又はモニタリングに有効である生成物を保持することになる。生成物は、通常、ポリペプチド及び/若しくは結合剤、特に本発明の抗体若しくは抗原結合断片、又はこれらのいずれかを含む組成物である。一実施形態において、容器上の又は容器に付随する取扱説明書又はラベルは、組成物が心臓障害の予測、診断又はモニタリングに使用されることを指示する。他の構成要素としては、針、希釈液及び緩衝液を挙げることができる。キットは、医薬的に許容される緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水、リンガー溶液又はデキストロース溶液を備えている少なくとも 1 つの容器を含むことができることが有用である。

40

【0147】

T n T u O R F ペプチド又はその断片（複数可）に選択的に結合する結合剤が、望ましくはキットに含められる。一実施形態において、結合剤は、本発明の抗体又は抗原結合断片である。アッセイ及びキットにおいて使用される抗体は、例えば、モノクローナルであ

50

ってもよいし、又はポリクローナルであってもよく、上記のいずれかの哺乳動物において調製されることがあり、例えば、天然及び融合ペプチドを使用して調製された抗原結合断片及び抗体を含む。

【0148】

1つのキット実施形態では、TnTuORFペプチド結合剤を固体マトリックス、例えば、多孔性ストリップ又はチップに固定して、TnTuORFペプチド又はその断片（複数可）のための少なくとも1つの検出部位を形成する。多孔性ストリップの測定又は検出領域は、複数の検出部位を含むこともあり、そのような検出部位が検出試薬を含有する。上記部位は、棒、十字形若しくはドット又は他の配列で配列されていることもある。試験ストリップ又はチップは、陰性及び／又は陽性対照のための部位を含有することがある。或いは、対照部位が異なるストリップ又はチップ上にあることもある。異なる検出部位が、固定された核酸又は抗体の異なる量、例えば、第1の検出部位にはより多い量、及び後続の部位にはより少ない量を含有することもある。検査生体試料の添加時に検出可能シグナルを提示する部位の数は、試料中に存在するTnTuORFペプチド又はその断片（複数可）の量の定量的指標となる。

10

【0149】

試料検査を行うための適切な成分（マーカー、抗体及び試薬）を有する使い捨て試験用カートリッジを含む試料分析用デバイスをキットに含めてもよい。上記デバイスは、検査ゾーン及び検査結果ウィンドウを適宜含むことになる。免疫クロマトグラフィーカートリッジは、そのようなデバイスの例である。例えば、米国特許第6,399,398号、米国特許第6,235,241号及び米国特許第5,504,013号を参照されたい。

20

【0150】

或いは、上記デバイスは、対照レベル及び他のマーカーレベルに対する測定マーカーのレベルの入力、記憶及び評価を可能にする電子デバイスであってもよい。米国特許出願公開第2006/0234315号には、そのようなデバイスの例が提供されている。Ciphergenのプロテインチップ（Protein Chip）（登録商標）ソフトウェアパッケージを使用してSELDI結果を処理するために使用することができるCiphergenのプロテインチップ（登録商標）も本発明において有用である。

【0151】

TnTuORFペプチドの臨床的有用性

30

急性冠症候群（ACS）をはじめとする心臓障害の臨床診断は、トロポニンT及びトロポニンIをはじめとする心筋トロポニンなどの循環診断バイオマーカーに依存するところが多い。しかし、高感度（hs）アッセイを用いたときでさえ、循環トロポニンの検出可能な変化が遅れることは、疑われる心臓障害を提示する有意な数の患者において臨床的不確実性につながる。したがって、心臓障害の早期情報を提供することができる新規バイオマーカーの同定が主として重要である。本出願人は、上流オープンリーディングフレーム（uORF）ペプチドがヒト循環器にはっきりと区別できる化学的エンティティーとして存在することの初めての証拠をここに提供する。このuORFは、心筋トロポニンTに由来し（TnTuORF）、正常な健常個体に存在する。TnTuORFの最高血漿レベルは、例えば心房細動、心不全、心膜炎及び神経伝導障害を含むがこれらに限定されない、心筋梗塞又は不安定狭心症以外の心臓障害を有する患者において観察され、したがって、TnTuORFの最高血漿レベルを本発明のアッセイ、方法及びキットにおいて用いて、対象における心臓障害を予測又は診断することができる。

40

【0152】

次に、以下の非限定的実施例に関して本発明を例証することにする。

【実施例】

【0153】

実施例1：方法及び材料

化学物質

合成ヒトTnTuORF、TnTuORF（Tyr）、TnTuORF（Cys）、及

50

び小胞内在性膜タンパク質36のシグナルペプチドのアミノ酸1~7(VIP36sp(1~7))を、質量分析及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって95%より高い純度でミモトープ(Melbourne, Australia)によって合成した。他のすべての合成又は精製タンパク質は、Hytest(Turku, FI)、株式会社ペプチド研究所(大阪府、日本)又はSigma-Aldrich(St Louis, USA)から購入した。

【0154】

ヒトTnTuORFアッセイ開発

ヒト心筋トロポニンTの主オープンリーディングフレームの上流5'領域(NCBIアクセッションNG_007556)の評価により、+2のコザックスコアを有し、効率的に翻訳される尤度が高い、主オープンリーディングフレーム(ORF)開始部位の上流1512bpをコードする推定12アミノ酸ペプチド(全アミノ酸配列MAPEGWVIVVIS; 配列番号1)を同定した(図1)。この配列は、速筋型(NCBIアクセッションNG_013085)又は遅筋型(NCBIアクセッションNG_011829)ヒト骨格筋トロポニンTには見られなかった。しかし、NCBI BLAST検索エンジンでの調査により、相同性を示すような1つの部分配列、小胞内在性膜タンパク質36のシグナルペプチドの最初の7アミノ酸(配列MAAEGWI)、が明らかになった(Fielerら(1994)EMBO J. 13:1729~1740)。本出願人は、シグナルペプチドがヒト循環器に存在することを以前に証明した(Siriwardenaら(2010)Circulation 122:255~264; Pembertonら(2012)Clin. Chem. 58:757~767)ので、検出抗体をTnTuORFのアミノ末端に対して作り、VIP36sp(1~7)ペプチドを潜在的干渉について評価した。TnTuORFのアミノ末端に特異的な抗体を本出願人の以前のプロトコル(Siriwardenaら(2010)Circulation 122:255~264; Pembertonら(2012)Clin. Chem. 58(757~767)に従って発生させた。簡単に言うと、全身性TnTuORF(Cys)をキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合させ、4匹のニュージーランド白ウサギの5~6部位に皮内注射した。注射11~13日後にウサギから採血し、妥当な抗血清(r244)力価が得られるまで4~6週間ごとに上記手順を繰り返した。

【0155】

¹²⁵I-放射性標識ヒトTnTuORF(Tyr)の調製

5µLの0.5Mリン酸緩衝液(pH7.3)中の5µgクロラミンTの存在下、0.5mCi Na-¹²⁵Iを使用して、15~20秒間、ヒトTnTuORF(Tyr)(2.5µg)をヨウ素化した。さらなる5µLのリン酸緩衝液中の50µgのシステインHClの添加によって反応を停止させた。得られたヨージネートを10cm RP300 Brownlee HPLCカラム(Applied Biosystems, San Jose, CA)に負荷し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中0%~60%アセトニトリルの勾配で15分にわたって1mL/分の流速で純粋なTnTuORF(¹²⁵I-Tyr)を溶出させた。

【0156】

TnTuORF及び心臓マーカーアッセイ

TnTuORFアッセイには、抗血清r244を1:15,000の最終希釈度で使用した。すべての放射活性トレース及び抗血清をイムノアッセイ用緩衝液(Siriwardenaら(2010)Circulation 122:255~264)で希釈した。血漿試料及び標準物質をアッセイ用緩衝液で1:3希釈した。アッセイインキュベートは、混合し、22時間、4℃で放置してインキュベートした、希釈度1:5000の50µLの抗体と混合した50µLの試料又は標準物質(0~13,000pg/mL TnTuORFペプチド)から成った。次いで、50µLのヨウ素化TnTuORF(Tyr)トレーサー(約3000cpm)を添加し、チューブを混合し、さらに22時間、4℃で放置してインキュベートした。次いで、遊離及び結合TnTuORFを、固相二次抗体

法（ロバ抗ウサギ SacCell、Immunodiagnostic Systems、Bolderon、UK）によって分離した。2%ポリエチレングリコール/リン酸緩衝液中の Sac-Cell（500 uL）（最終 Sac-Cell 濃度 5%）を各チューブに添加し、室温で 30 分間放置してインキュベートした。次いで、チューブを $2800 \times g$ で 15 分間、遠心分離し、上清をデカントし、ペレットをガンママスター（Gammamaster）カウンター（LKB、Uppsala、Sweden）でカウントした。溶血の評価により、TnTuORF が、最大 1.5 g/L のヘモグロビン濃度まで又は最大 2.0 g/L の血漿脂質含有量によって改変されなかったと判定した。NT-プロBNP は、社内イムノアッセイ（Richards ら（2006）J. Am. Coll. Cardiol. 47: 52~60; Wright ら（2003）J. Am. Coll. Cardiol. 42: 1793~1800）によって判定した。高感度 TnT は、 14 pg/mL の 99 パーセンタイルカットオフを用いてエレクシス（ElecSys）2010 アナライザー（Roche Diagnostics）で判定した。すべての hsTnT 結果を Roche による hsTnT の世界的再評価（worldwide reassessment）（Apple ら（2012）Clin. Chem. 58: 1599~1600）中に Penzberg に提出し、3 つだけは修正を要すると報告された。TnI は、 0.03 ug/L の 99 パーセンタイルカットオフを用いてレイトジェネレーションアッセイ（Abbott Architect）によって判定した。

【0157】

ヒト血漿試料採集

ヒト血漿試料は、4 つの研究群（人口統計学的データを表 I 及び II に示す）から、ニュージーランド保健省の Health and Disabilities Ethics Committee によって承認された倫理プロトコルに従って得た。すべての参加者は、リクルートメント前にインフォームドコンセントを与えた。すべての調査は、ヘルシンキ宣言の指針を順守する。血漿試料を、(i) 心血管、内分泌又は神経疾患の証拠又は病歴のない健常ボランティア（ $n = 109$ ）、(ii) 臨床的に必要と判断された心臓カテーテル留置を受けた患者（ $n = 16$ ）、(iii) 記録された ST 上昇心筋梗塞がある患者（ $n = 4$ ）及び (iv) ACS コホート（ $n = 502$ ）から採取した。この研究のために、胸痛持続時間 < 4 時間の主訴を Christchurch Hospital に提示した患者に、急性冠動脈イベントにおけるシグナルペプチド（SPACE、<http://www.anzctr.org.au>、ACTRN12609000057280）として公知の本発明者らの予期的観察研究へのリクルートメントを申し出た。ACS が疑われ、明らかな心臓以外の原因のない、20 分以上続く急性胸、上腹部、頸部、顎又は腕痛の主訴を有する患者を、ガイドライン定義（Leupker ら（2003）Circulation 108: 2543~2549）に従って登録した。より一般的な / 非定型な症状（例えば、疲労、悪心、嘔吐、発汗及び失神型めまい）は、組み入れ基準として用いなかった。急性 MI の宣告診断（adjudicated diagnosis）は、2 名の独立した心臓専門医が 2007 ESC / ACCF / AHA / WHF タスクフォースガイドライン（Thygesen ら（2007）Circulation 352: 98~100）に従って、TnTuORF ではなくすべての臨床データにわたって診断した。診断の生化学成分は、入院 24 時間以内の血漿 cTnI の上昇 0.03 ug/L を用いた。すべての関連臨床、人口統計学的及び診断パラメータを、指標となる入院時に採集し、45 及び 365 日に追跡調査した。

【0158】

【表 1】

表I:患者群(i)～(iii)の人口統計学的データ(平均±SD)

	正常対照(n=109)	カテーテル留置(n=16)	STEMI(n=4)
年齢(歳)	43.9±15.2	65.6±10.6	61.3±2.9
男性	40(37%)	12(75%)	3(75%)
BMI(kg.m ²)	26.2±4.3	29.4±6.4	26.5±6.6
高血圧	27(21.6%)	10(63%)	2(50%)
糖尿病	6(5.5%)	4(25%)	0(0%)
高脂血症	18(17%)	-	0(0%)
GFR(mL/分/1.73m ²)	83.0±13.5	61.9±24.7	-

10

【0159】

1.8 mg/mL Na³-EDTA (Becton-Dickinson)が入っている冷却したバキュテナーチューブにすべての患者から採血した。試料を採血から2時間以内に遠心分離し、血漿を-80℃で保存した。(i)群については、単一試料を(一晚絶食後)前腕静脈から採取し、直ちに遠心分離して血漿を調製し、-80℃で保管した。(ii)群の患者には左大腿動脈経路でカテーテル留置し、局所血管部位(大腿静脈、腎静脈、肝静脈、下大静脈、頸静脈、心冠静脈洞及び肺動脈)から採血した。入口及び出口大腿動脈試料を比較のために採取した。(iii)群のSTEMI患者は、病院での症状提示時、症状提示後次の時間に採取した前腕静脈試料を有した: 0、0.5時間、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間及び72時間。(iv)群の患者は、病院での症状提示時、並びに症状提示1、2及び24時間後に採取した血液試料を有した。

20

【0160】

【表 2】

表II:患者群(iv)の人口統計学的データ(平均±SD)

	心筋梗塞 (MI)	不安定 狭心症(UA)	他の心臓 障害	非心臓性 胸痛	全患者	P値
患者数(%)	114(23)	40(8)	26(5)	322(64)	502(100)	
性別 数(%)						
男性	77(15)	26(5)	16(3)	182(37)	302(60)	
女性	37(7)	14(3)	10(2)	139(28)	200(40)	
年齢、歳						
男性	66.0±13.1	64.0±8.3	65.0±14.1	59.0±13.7	62.2±13.4	
女性	78.0±12.7	66.0±7.6	72.5±6.7	68.0±13.5	68.3±12.9	<0.001
分析物						
24時間Tnl (ug/L)						
男性	7.8±15.6	0.02±0.03	0.3±1.2	0.01±0.02	2.1±8.6	<0.001
女性	6.1±11.9	0.01±0.01	0.2±0.6	0.01±0.01	1.2±5.6	<0.001
Chol (mg.dL ⁻¹) ψ	181.1±60.3	175.2±45.2	173.7±31.3	186.8±59.3	183.5±57.4	
HDL (mg.dL ⁻¹) ψ	39.5±12.5	38.6±10.7	40.3±13.8	39.6±12.3	39.5±12.3	
LDL (mg.dL ⁻¹) ψ	116.3±38.8	106.7±37.7	100.7±25.6	115.5±36.9	114.2±37.1	
Trig (mg.dL ⁻¹) δ	159.1±83.0	149.1±90.7	141.6±57.9	166.1±182.9	161.3±148.3	
リスク因子 (%)						
高血圧	78(16)	33(7)	20(4)	192(38)	323(65)	
糖尿病	19(4)	9(2)	4(1)	43(8)	75(15)	
BMI(kg.m ²)	28.4±5.2	27.6±4.3	28.4±5.5	28.5±6.1	28.4±5.7	
現在喫煙者	16(3.5)	2(0.5)	0(0)	44(9)	62(13)	
かつて 喫煙者	56(11)	21(4)	19(4)	157(31)	253(50)	
病歴(%)						
CVD	78(15)	36(7)	13(3)	199(40)	326(65)	
MI	36(7)	20(4)	10(2)	99(20)	165(33)	
CABG	9(1.5)	6(1)	3(0.5)	35(7)	53(10)	
高脂血症	62(12)	34(7)	14(3)	193(38)	303(60)	
狭心症	48(10)	30(6)	17(3)	158(31)	253(50)	
心不全	10(2)	4(1)	2(0.5)	33(6.5)	49(10)	
ECG所見						
LBBB	3(1)	1(0)	1(0)	7(2)	12(4)	
ST上昇	23(6)	0(0)	2(1)	0(0)	25(7)	
ST下降	10(3)	1(0)	3(0.5)	2(0.5)	16(4)	
T波逆転	20(4)	5(1)	6(1)	30(7)	61(13)	
変化なし	58(9)	33(6)	14(3)	283(54)	388(72)	

ψ=mg・dL⁻¹ コレステロールをmmol/Lに変換するには0.0259を掛けるδ=mg・dL⁻¹ トリグリセリドをmmol/Lに変換するには0.0113を掛ける

【 0 1 6 1 】

ヒト血漿からのTnTuORFペプチドの精製

ヒト血漿において検出された免疫反応性TnTuORFを生成するために、r244からの抗TnTuORF IgGを、TnTuORF(Cys)と結合されたスルホリンク(SulfoLink)(商標)カラム(Pierce Biotechnology、IL)での抗原親和性クロマトグラフィーによって精製した。2mLのr244無希釈抗血清をPBS(pH7.2)で1:1v/v希釈し、スルホリンク(商標)カラムに通した。結合した抗体を0.1Mグリシン(pH2.5)で溶出させ、0.1Mリン酸緩衝液

での3回の洗浄によって0.1Mリン酸緩衝液に透析した。次いで、精製されたr244抗TnTuORF IgGを、製造業者の取扱説明書に従って調製したプロテインAアガロースゲル(Pierce Biotechnology、IL)に結合させた。純粋なTnTuORFを得るために、100mLのST上昇MI患者血漿をPBS(pH7.2)で1:1v/v希釈し、プロテインA/r244-IgGカラムに重力下、室温で2時間にわたって通した。次いで、カラムを0.1M PBS/0.5M NaCl(pH7.2)で洗浄し、0.1Mグリシン(pH2.5)で溶出させた。1mL画分を回収し、アリコート用イムノアッセイ用緩衝液で1:10v/v希釈し、特異的イムノアッセイに付して、精製されたTnTuORFの量を決定した。グリシン溶出生画分を直ちに-80で、HPLCによる分析まで保存した。

10

【0162】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

0.1Mグリシン中の免疫親和性精製TnTuORFペプチドを40の逆相(RP)HPLCカラム(Phenomenex、Torrance、CA)に直接負荷し、10~40%アセトニトリル/0.1%TFAの勾配で30分にわたって1mL/分の流速で溶出させた。画分を1分間隔で回収し、アリコートをTnTuORFイムノアッセイに付した。免疫反応性画分を空気下で乾燥させ、次いで、G2000シリカカラム(東ソー株式会社、日本)を用いる60%アセトニトリル/0.1%TFAの定組成勾配で0.25mL/分の流速でのサイズ排除(SE)HPLCに付した。画分を1分間隔で回収し、RP-HPLCの場合と同様にイムノアッセイによって調べて、適切な分子サイズを決定した。免疫精製されたTnTuORFの溶出後、RP-HPLCを合成TnTuORFペプチドで校正した。SE-HPLC実行は、シトクロムC(Mr12,000)、アプロチニン(MR6,500)、CNP22(Mr2,200)及びアンジオテンシンII(Mr1,045)ペプチドで校正した。

20

【0163】

統計

結果を平均±SDとして提示する。対応両側スチューデントt検定を用いて平均の比較を適宜行った。スピアマンの順位相関検定及び受信者操作曲線(receiver operated curve)(ROC)分析を用いる血漿分析物濃度の関係分析を、SPSS v17を使用して行った。ROC曲線生成及びバイオマーカーパネル比較のために、バイオマーカーデータを標準化変数(zスコア)として分析した。すべての場合、標準化変数は、t=0、1及び2時間試料から得た最大バイオマーカー値、すなわち3つの値の最大値から導出した。すべての分析において、P値<0.05を有意と考えた。

30

【0164】

実施例2：ヒト血漿中の内因性TnTuORFの同定

TnTuORFのアミノ末端に対するポリクローナル抗体r244により、 $31 \pm 3\%$ の平均ゼロ結合、 $26 \pm 6 \text{ pg/mL}$ の試料検出限界、 $458 \pm 105 \text{ pg/mL}$ のED₅₀及び $130 \sim 3900 \text{ pg/mL}$ の動作範囲を有する、高感度、特異的ラジオイムノアッセイ(図2)を得、アッセイ内変動係数(CV)は、25アッセイにわたって<10%であった。アッセイ間CVは、 1300 pg/mL で14%、 747 pg/mL で15%であった。抗血清244と関連内因性ペプチド、特に心筋トロポニンT、トロポニンI及びVIP36sp(1~7)、並びに周知薬剤との交差反応性は無視できた(表III)。初期評価により、TnTuORF免疫反応性がNa³-EDTAに採集した末梢血からのヒト血漿中に存在すること、及びそのTnTuORF免疫反応性が合成標準曲線と並行して弱まることを確認した(図2)。正常ヒト静脈血漿中の免疫反応性TnTuORFのレベル(平均±SD)は、 $725 \pm 340 \text{ pg/mL}$ (範囲273~2260 pg/mL、正常範囲の上限の99パーセントイル=1885 pg/mL)であり、免疫反応性がすべての試料において検出された。TnTuORF濃度は、男性のほうが有意に高く($825 \pm 403 \text{ pg/mL}$ 対 $666 \pm 285 \text{ pg/mL}$ 、 $p = 0.018$)、血漿クレアチニンとのみ有意な生化学的相関を有した($r = 0.201$ 、 $p = 0.036$ 、図3)。付

40

50

随する h s T n T レベル、年齢、血圧及び B M I には T n T u O R F との有意な関連性はなかった。対応する h s T n T レベルは、 $6.0 \pm 2.4 \text{ pg/mL}$ (範囲 $3.0 \sim 14.9 \text{ pg/mL}$) であり、免疫反応性が試料の 49% (53名/109名) に存在した。h s T n T レベルは、男性のほうが高い傾向があり ($6.6 \pm 2.4 \text{ pg/mL}$ 対 $5.5 \pm 2.3 \text{ pg/mL}$)、年齢と有意に相関した ($r = 0.328$ 、 $P = 0.017$)。

【0165】

【表3】

表III:r244ウサギ抗ヒトTnTuORF抗血清の交差反応性データ

ペプチド/薬物	TnTuORF抗血清との交差反応性(%)
TnTuORF	100
VIP36sp(1-7)	<0.3
心筋トロポニンT	<0.01
心筋トロポニンI	<0.01
hFABP	<0.01
CK-MB	<0.01
プロBNP(1-13)	<0.001
プロBNP(1-76)	<0.001
プロANP(1-30)	<0.003
ANP	<0.002
BNP	<0.003
エンドセリン1	<0.003
アンジオテンシンII	<0.003
アンジオテンシン(1-7)	<0.01
ウロテンシンII	<0.003
CNP22	<0.004
クロピドグレル (Clopidigrel)	0
モルフィン	0
アスピリン	0

すべてのペプチドはヒト型である。

【0166】

実施例3：循環器への免疫反応性TnTuORF放出

M I の診断に使用される T n T の形態は、心臓特異的であると考えられる (T h y g e s s e n ら (2012) C i r c u l a t i o n 126:2020~2035)。これを踏まえて、本出願人は、T n T u O R F のレベルが心臓に供給する血液 (すなわち動脈試料) 中より心臓から流出する血液中 (すなわち、心冠静脈洞試料中) のほうが高くなると予想した。冠静脈洞血漿は、同時に採取した動脈血漿試料と比較して、より高い濃度の免疫反応性 T n T u O R F を含有する傾向があった ($978.2 \pm 118.1 \text{ pg/mL}$ 対 $908.7 \pm 88.9 \text{ pg/mL}$ 、平均 $\pm$ S D、 $P = 0.472$ 、図4)。しかし、T n T u O R F の静脈レベル上昇も肝静脈全域にわたって観察されたが、大腿静脈全域にわたって T n T u O R F のレベルが低減される傾向があった。比較すると、h s T n T のレベルは、心冠静脈洞試料において有意に上昇された ($13.1 \pm 2.7 \text{ pg/mL}$ 対 $10.1 \pm 1.8 \text{ pg/mL}$ 、 $P = 0.019$)。h s T n T の腎静脈レベルは、動脈レベルと比較して有意に低かった ($8.6 \pm 1.5 \text{ pg/mL}$ 対 $10.1 \pm 1.7 \text{ pg/mL}$ 、 $P = 0.002$ 、図4)。このように、T n T u O R F 及び c T n T の局所血漿プロファイルは、純生産量及びクリアランスの勾配に関して、器官によって異なった。

【0167】

実施例4：R I A によって検出された免疫反応性種の分析

精製 T n T u O R F を 100 mL の血漿から免疫親和性精製によって調製し、次いで、イムノアッセイと結合された R P - H P L C 及び S E - H P L C によるさらなる精製に付した。主 R P - H P L C によって2つの大きい免疫反応性ピークを同定し、2番目に溶出したものが合成 T n T u O R F ペプチドと一致した (ピーク I I、図5のA)。S E - H P L C では、R P - H P L C で得られたピーク I I がおよそ 1.5 K 分子量で溶出した

一方で、ピーク I は、およそ 1 K 分子量で溶出した (図 5 の B)。考え合わせると、これらの結果は、免疫反応性 T n T u O R F がヒト血漿中に (i) 1 2 アミノ酸インタクト形態、及び (i i) M A P E G W V I V V I (配列番号 2)、M A P E G W V I V V (配列番号 3) 又は M A P E G W V I V (配列番号 4) を含む、カルボキシル末端短縮形体として存在することを示唆している。

【 0 1 6 8 】

本出願人は、タンデム M s / M S を使用して循環 T n T u O R F ペプチドのさらなる特性評価を行って、このペプチドの配列及び分解を確認することにする。

【 0 1 6 9 】

実施例 5 : S T E M I 患者における T n T u O R F ペプチド

10

免疫反応性 T n T u O R F がヒト循環器に存在することを確認したので、本出願人は、心筋梗塞をもたらす急性心虚血の診断バイオマーカーとしての循環 T n T u O R F の臨床的有用性を判定することを試みた。症状発症が症状提示前 4 時間未満であった、記録された S T 上昇心筋梗塞 (S T E M I) がある患者 4 名において、静脈 T n T u O R F 濃度は、症状発症 4 ~ 5 時間後には減少する傾向があり、そして 2 4 時間までに増加して安定水準に戻った (図 6 の A)。症状発症後 5 時間までの平均濃度は、正常対照に見られるもののほぼ半分であり、7 2 時間までにその対照で見られる範囲に完全には戻らなかった。このプロファイルは、S T E M I の血漿において急上昇する h s T n T のプロファイルとは異なる (図 6 の B)。

【 0 1 7 0 】

20

実施例 6 : 胸痛を提示する患者の予期的観察研究における T n T u O R F ペプチド

T n T u O R F 測定が A C S の診断に役立つ可能性を評価するために、本出願人は、心臓に起因することが疑われる胸痛の主訴を継続的に提示する患者 5 0 2 名の予期的観察研究に着手した。患者人口統計学的及び分析物データを表 I I に示す。患者のおおよそ 2 3 % は、心筋梗塞 (M I) の最終宣告診断を有した。提示 T n T u O R F 濃度は、急性 M I (R O C A U C = 0 . 4 6 、 P = N S) の診断にも不安定狭心症 (U A 、 R O C A U C = 0 . 4 7 、 P = N S) の診断にも一切有用性も有さなかったが、A C S 以外の心臓障害を有する患者の良好な診断能力を有し (A U C = 0 . 7 9 、 P < 0 . 0 0 1 、図 7)、N T プロ B N P より正確であった (A U C = 0 . 7 2 、 P < 0 . 0 0 1)。したがって、症状提示 2 時間以内の T n T u O R F の最大濃度は、非 M I、非 U A 心臓障害を有する患者では、他のすべての患者群と比較して有意に高かった (1 1 5 9 ± 4 2 9 p g / m L 対 7 7 8 ± 3 5 3 p g / m L 、 P < 0 . 0 0 1)。さらに、T n T u O R F を心拍数及びヘモグロビン (H B) 濃度に加えたとき、代替心臓障害の診断のための A U C は 0 . 8 3 に好転した (P < 0 . 0 0 1 、図 7)。h s T n T 及び T n I 両方は、それぞれ 0 . 9 5 及び 0 . 9 7 の R O C 曲線 (N S T E M I n = 9 6 、両方とも P < 0 . 0 0 1) で、非 S T 上昇 M I (N S T E M I) を診断する優れた診断能力を有した。比較すると、T n I × h s T n T / T n T u O R F (ここでは「トロポニンプラス (商標)」と呼ぶ) の生成物比は、0 . 9 7 の A U C をもたらした (P < 0 . 0 0 1 、図 8)。絶対的には、症状提示 2 時間以内に、h s T n T は N S T E M I 患者の 9 4 % (9 0 名 / 9 6 名) を検出した一方で、T n I は、9 2 % (8 8 名 / 9 6 名) を検出したが、h s T n T によって示されたこの改善された感度は、偽陽性増加という犠牲を払って実現された (h s T n T 陽性非 M I 患者 = 6 8 名対 T n I 陽性非 M I 患者 = 3 2 名)。比較すると、トロポニンプラスは、2 時間以内に N S T E M I 患者の 9 8 % (9 4 名 / 9 6 名) を検出し、6 3 の非 M I 陽性結果を生じさせた。このように、h s T n T 単独と比較して、トロポニンプラス比は、2 時間以内に検出される M I 患者数を 4 % 増加させ、偽陽性率を 7 % 低下させた。

30

40

【 0 1 7 1 】

予後予測に関しては、トロポニンプラスは、1 年での死亡率を h s T n T 及び T n I 単独 (それぞれ、A U C 0 . 7 2 及び 0 . 7 1) よりわずかに良好に予測した (A U C = 0 . 7 4 、 P < 0 . 0 0 1) が、トロポニン T 又はトロポニン I のいずれかでは 1 年以内の M I 又は C H F による再入院の予測を改善しなかった。一致させた N T プロ B N P への

50

単一入院患者 24 時間 T n T u O R F 濃度の追加は、1 年以内に急性非代償性心不全 (A D H F) による再入院を予測するための 24 時間 N T プロ B N P のみの R O C 曲線を改善した (0 . 9 3 対 0 . 9 1 、図 9) 。

【 0 1 7 2 】

考察 / 要約

本出願人の結果は、循環器内のはっきりと区別できる別々のエンティティーとしての u O R F ペプチドの初めての証明である。G R - 1 A 受容体からの u O R F ペプチドが分離細胞サイトゾル抽出物中に存在すること (D i b a ら (2 0 0 1) J . C e l l . B i o c h e m . 8 1 : 1 4 9 ~ 1 6 1) は以前に報告されており、著者は、上記 u O R F ペプチドが彼らの実験で使用した培地中に存在することを報告しなかった。本出願人は、イム
10
ノアッセイでも H P L C でもヒト血漿中の T n T u O R F が h s T n T と関連しているという証拠を見いださず、実際、T n T u O R F の血漿レベルは h s T n T 及び T n I と負の相関をもつ傾向があった。しかし、本出願人は、T n T と T n I の両方について報告されている (E r i k s s o n ら (2 0 0 5) N . E n g l . J . M e d . 3 5 2 : 9 8 ~ 1 0 0 ; S a v u k o s k i ら (2 0 1 2) C l i n . C h e m . 5 8 : 1 0 4 0 ~ 1 0 4 8) ような、T n T u O R F が他の血漿エンティティー、例えば自己抗体又は他の結合タンパク質と関連又は結合する可能性を排除することができない。

【 0 1 7 3 】

調べた S T E M I 患者コホート (実施例 1 、表 I) において、局所血漿濃度分析は、最高量の h s T n T を含有する心冠静脈洞を明示した。この観察は、h s T n T の心血管診断の有用性と完全に一致する。しかし、特筆すべきは、4 / 1 6 個体が上昇した肝動脈 - 静脈 h s T n T 勾配を有し、6 / 1 6 が上昇した顎動脈 - 静脈勾配を有し、1 1 / 1 6 が
20
上昇した大腿動脈 - 静脈勾配を有したことである。これがアッセイの問題に係る可能性は低く、それは、差異が常にアッセイ C V よりはるかに大きかったからである。これらの観察の関連性は不明確であるが、h s T n T アッセイで観察された診断特異度の減少は、特に、偽陽性トロポニン T の可能性のある原因と述べられていること (J a f f e ら (2 0 1 1) J . A m . C o l l . C a r d i o l . 5 8 : 1 8 1 9 ~ 1 8 2 4) に照らして、一因となる可能性がある。腎静脈 h s T n T 濃度の有意な減少は、腎臓が h s T n T の主クリアランス機構である可能性が高いことを示す。T n T u O R F に関しては、本
30
出願人は、心冠静脈洞全域にわたって動脈 - 静脈勾配上昇を観察したが、この観察は、統計的に有意でなかった。

【 0 1 7 4 】

インタクト形態及びカルボキシ末端分解形態と一致する、免疫精製 T n T u O R F が、R P - 及び S E - H P L C システムで溶出した。したがって、T n T u O R F は、分解に関して c T n T 及び c T n I と同等であるが、同様の酵素又はプロセスがこのことを説明するかどうかは不明である。重要なこととして、イムノアッセイ検証に関して、c T n T 及び c T n I は、T n T u O R F 抗体と交差反応もせず、R P - 及び S E - H P L C プロ
40
ファイルに現れもしなかった。さらに、B L A S T 配列アラインメントツールを使用して、最も近いペプチド同一性が V I P 3 6 s p (1 ~ 7) であることが判明した。このペプチドは、T n T u O R F の最初の 7 アミノ酸とアミノ酸 2 個だけ異なるが、T n T u O R F ペプチド抗体との交差反応性 < 0 . 3 % を有し、そのため本発明のアッセイに干渉する可能性が極小であることを示した。これらのデータは、T n T u O R F 内の 3 位のプロリンが、本発明者らの抗体認識に主に関与し、アッセイ特異度の維持に役立つことを示唆しており、このペプチドの配列及び分解を確認するためにタンデム M S / M S による循環 t n T u O R F の完全特性評価が必要になる。

【 0 1 7 5 】

最新の証拠は、u O R F がタンパク質生産と負の相関関係をもつことを示唆している (C a l v o ら (2 0 0 9) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 1 0 6 : 7 5 0 7 ~ 7 5 1 2 ; V o g e l ら (2 0 1 0) M o l . S y s . B i o l . 6 : 4 0 0 ~ 4 0 8 ; M a t s u i ら (2 0 0 7) F E B S L e t t e r s . 5 8 1 : 4 1 8 4 ~ 4 1 8 8) が、
50

uORFの実際の機能活性は、ほんの少数のケースでしか実証されていない。例えば、uORFによるシス作用性ペプチドの生産は、uORFの末端でリボソームを停止させることによって下流主ORFの翻訳開始を低減させることができる（Oyamaら（2004）Genome Res. 14:2048~2052）。この証拠は、静脈TnTuORF濃度が、記録されたSTEMIを有する患者において最初は減少するという本出願人の観察と相まって、本出願人に、急性心筋梗塞の疑いのある胸痛を提示する患者においてTnTuORFとhsTnT及び/又はTnIとの間に潜在的に有用な相互関係が存在するかどうかを調査することを促した。予想通り、症状提示2時間以内のhsTnT及びTnIの平均最大濃度は、心筋梗塞患者では他の患者群と比較して有意に高かった。対照的に、TnTuORFの最大濃度は、心筋梗塞患者でのほうが低い傾向があり、他の心臓障害を有する患者と比較して有意に低かった。心筋トロポニンT及びトロポニンI（トロポニンプラス（商標））との比の分母としてのTnTuORFの利用は、hsTnT測定のみと比較してNSTEMIの診断及び1年死亡率の予後予測を改善した。心拍数及びHb変数を加えることによって改善することができた、心筋梗塞以外の心臓障害を提示する胸痛患者を特定する際のTnTuORFの診断性能も、興味を引いた。

10

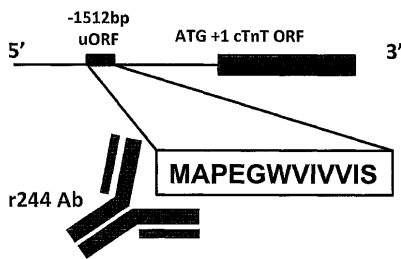
20

【0176】

本発明を実施例によって説明したが、特許請求の範囲において定義する本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更及び修飾を加えることができることは理解されるはずである。さらに、公知の均等物が特異的特徴に対して存在する場合、そのような均等物は、本明細書中で具体的に言及されているかのごとく組み入れられている。

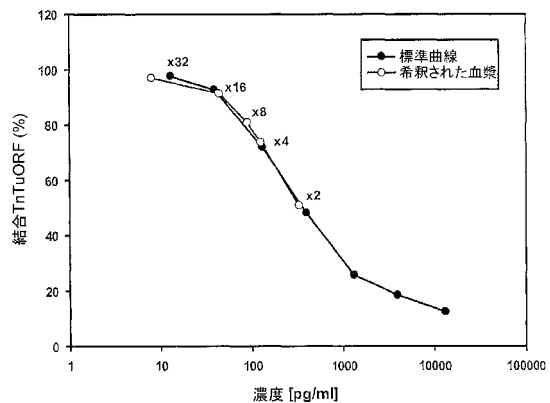
【図1】

FIGURE 1



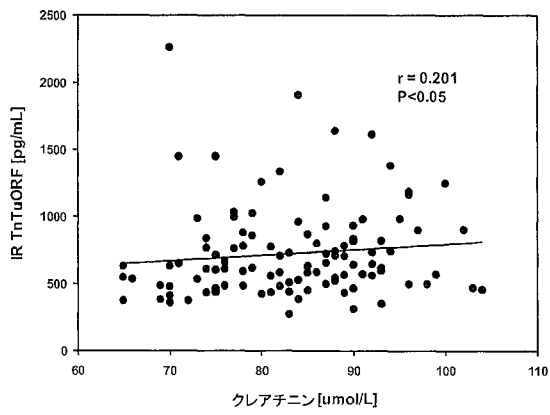
【図2】

FIGURE 2



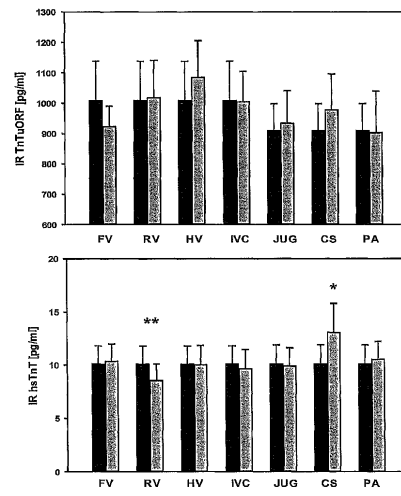
【 図 3 】

FIGURE 3



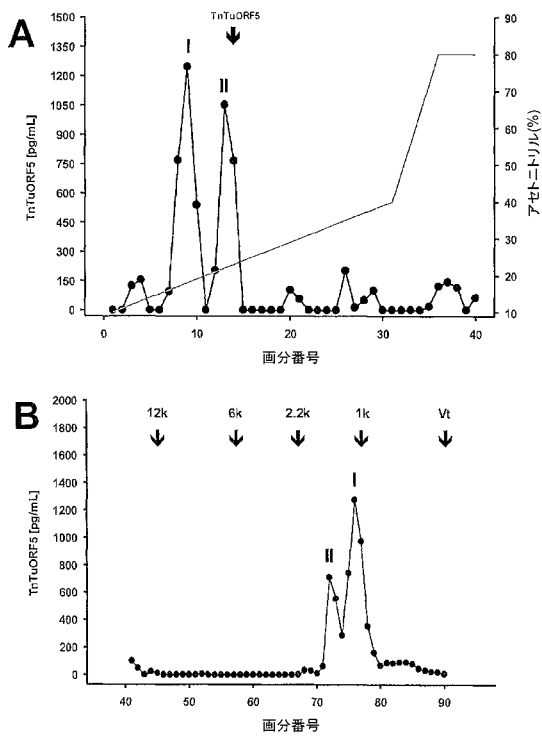
【 図 4 】

FIGURE 4



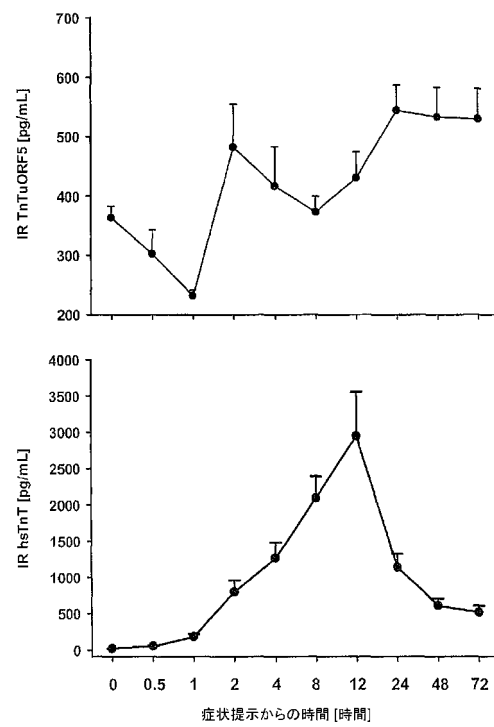
【 図 5 】

FIGURE 5



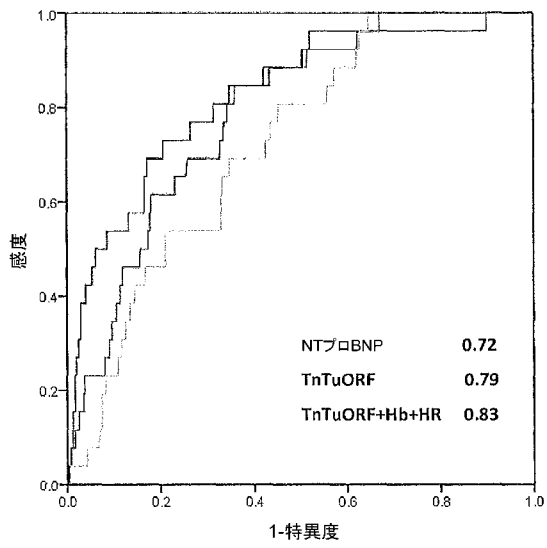
【 図 6 】

FIGURE 6



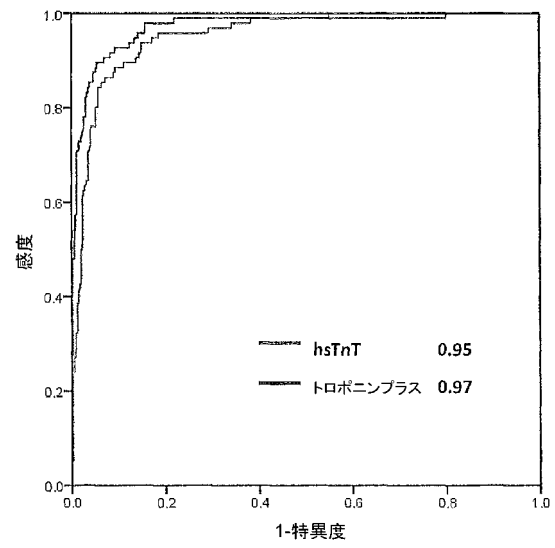
【 図 7 】

FIGURE 7



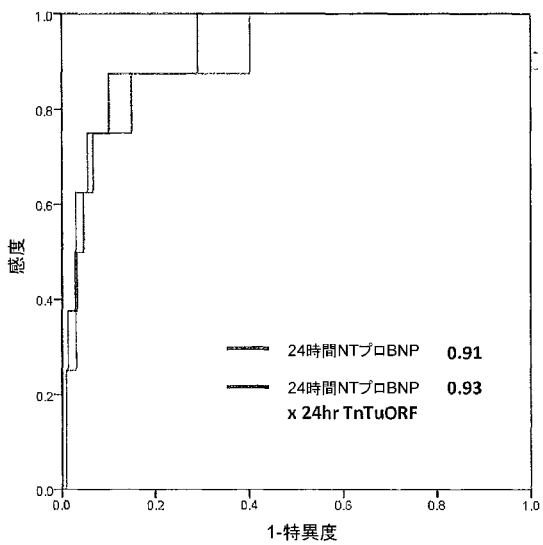
【 図 8 】

FIGURE 8



【 図 9 】

FIGURE 9



【配列表】

2017500547000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ2014/000234
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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) EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, EMBASE: troponin, cTnT, UORF, upstream open reading frame, TnTuORF, UTR, peptide and like terms GenomeQuest: SEQ ID NOs: 1-4 Espacenet: inventor/applicant search, troponin, myocardial, cardiomyopathy, fibrillation, pericarditis, vasovagal, cardiac, heart Google Scholar: inventor search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 January 2015		Date of mailing of the international search report 23 January 2015
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Jonathan Konrad AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2601

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/NZ2014/000234
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Aldous, S. et al., 'High-sensitivity troponin T for early rule-out of myocardial infarction in recent onset chest pain', Emergency Medicine Journal, 2012, Vol. 29, pages 805-810 See the whole document, particularly the title and abstract	
A	US 6,376,206 B1 (Katus et al.) 23 April 2002 See the whole document, particularly Example 8 and the title, abstract and claims	
A	EP 2261669 A1 (Alere San Diego, Inc.) 15 December 2010 See the whole document, particularly the abstract and claims	
A	US 2012/0129198 A1 (Buechler et al.) 24 May 2012 See the whole document, particularly [0008]-[0012], [0034], [0048]-[0049], [0064] and the examples	
A	WO 2008/030122 A1 (UNIVERSITY OF OTAGO) 13 March 2008 See the whole document, particularly page 6 second paragraph and page 44 last paragraph	
A	WO 2013/017690 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.) 07 February 2013 See the whole document, particularly page 3 and the abstract and claims	
P,X	Pemberton, C. J. et al., 'A novel human cardiac troponin T upstream open reading frame peptide assists in the diagnosis and prognosis of NSTEMI patients', Circulation, 26 November 2013, Vol. 138, No. 22, Supplement, Abstract 9552 See whole document	1-43
P,X	Pemberton, C. J. et al., 'A novel troponin T peptide in acute breathless patients presenting to ED', European Heart Journal, published online 2 September 2014, Vol. 35, Supplement 1, page 1180 See whole document	1-43
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NZ2014/000234

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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- 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 purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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:
- SEQ ID NOs: 1-4 in the description were used for searching purposes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 6,376,206 B1	23 April 2002	DE 3922873 A1	31 Oct 1990
		EP 0394819 A2	31 Oct 1990
		EP 0394819 B1	18 Jan 1995
		HK 1002814 A1	18 Sep 1998
		JP H037597 A	14 Jan 1991
		JP 2564686 B2	18 Dec 1996
		JP H07198718 A	01 Aug 1995
		JP 2818116 B2	30 Oct 1998
		US 6333397 B1	25 Dec 2001
EP 2261669 A1	15 December 2010	AU 2002252636 B2	08 Mar 2007
		AU 2002305394 A1	18 Nov 2002
		AU 2003300407 A1	22 Jul 2004
		AU 2003302340 A1	22 Jul 2004
		AU 2003302340 B2	21 Aug 2008
		AU 2004232990 A1	04 Nov 2004
		AU 2007201180 A1	19 Apr 2007
		AU 2007201180 B2	25 Nov 2010
		CA 2412648 A1	24 Oct 2002
		CA 2414073 A1	14 Nov 2002
		CA 2457775 A1	27 Feb 2003
		CA 2511482 A1	15 Jul 2004
		CA 2511501 A1	15 Jul 2004
		CA 2522670 A1	04 Nov 2004
		CA 2522709 A1	04 Nov 2004
		CA 2535971 A1	03 Mar 2005
		CA 2579802 A1	16 Mar 2006
		CA 2692217 A1	15 Jul 2004
		CN 1751128 A	22 Mar 2006
		EP 1311701 A1	21 May 2003
		EP 1311701 B1	23 Jul 2008
		EP 1322957 A2	02 Jul 2003
		EP 1322957 B1	12 Aug 2009
		EP 1419388 A1	19 May 2004
		EP 1419388 B1	07 Oct 2009

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		EP 1587955 A2	26 Oct 2005
		EP 1588159 A2	26 Oct 2005
		EP 1616181 A2	18 Jan 2006
		EP 1616181 B1	12 Aug 2009
		EP 1620726 A2	01 Feb 2006
		EP 1656555 A1	17 May 2006
		EP 1656555 B1	21 Mar 2012
		EP 1666881 A2	07 Jun 2006
		EP 1666881 B1	17 Feb 2010
		EP 1786931 A2	23 May 2007
		EP 1786931 B1	27 Jan 2010
		EP 1867734 A1	19 Dec 2007
		EP 1983058 A1	22 Oct 2008
		EP 1983058 B1	18 Dec 2013
		JP 2004519688 A	02 Jul 2004
		JP 3749225 B2	22 Feb 2006
		JP 2004520598 A	08 Jul 2004
		JP 3806694 B2	09 Aug 2006
		JP 2005049351 A	24 Feb 2005
		JP 4119408 B2	16 Jul 2008
		JP 2006234823 A	07 Sep 2006
		JP 4235652 B2	11 Mar 2009
		JP 2008512685 A	24 Apr 2008
		JP 4733704 B2	27 Jul 2011
		JP 2011257407 A	22 Dec 2011
		JP 5460649 B2	02 Apr 2014
		JP 2005121664 A	12 May 2005
		JP 2005522669 A	28 Jul 2005
		JP 2006523849 A	19 Oct 2006
		JP 2006526140 A	16 Nov 2006
		JP 2006527190 A	30 Nov 2006
		JP 2007502991 A	15 Feb 2007
		JP 2009103721 A	14 May 2009
		NZ 523210 A	27 Apr 2007
		NZ 532625 A	30 May 2008
		US 2005064511 A1	24 Mar 2005
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 7341838 B2	11 Mar 2008
		US 2006063204 A1	23 Mar 2006
		US 7358055 B2	15 Apr 2008
		US 2003109420 A1	12 Jun 2003
		US 7361473 B2	22 Apr 2008
		US 2003119064 A1	26 Jun 2003
		US 7427490 B2	23 Sep 2008
		US 2005148024 A1	07 Jul 2005
		US 7524635 B2	28 Apr 2009
		US 2005255484 A1	17 Nov 2005
		US 7608406 B2	27 Oct 2009
		US 2003022235 A1	30 Jan 2003
		US 7632647 B2	15 Dec 2009
		US 2004121343 A1	24 Jun 2004
		US 7713705 B2	11 May 2010
		US 2003199000 A1	23 Oct 2003
		US 2003219734 A1	27 Nov 2003
		US 2004121350 A1	24 Jun 2004
		US 2004126767 A1	01 Jul 2004
		US 2004171064 A1	02 Sep 2004
		US 2004176914 A1	09 Sep 2004
		US 2004203083 A1	14 Oct 2004
		US 2004209307 A1	21 Oct 2004
		US 2004219509 A1	04 Nov 2004
		US 2004253637 A1	16 Dec 2004
		US 2006177870 A1	10 Aug 2006
		US 2008008696 A1	10 Jan 2008
		US 2008045444 A1	21 Feb 2008
		US 2008160540 A1	03 Jul 2008
		US 2009275512 A1	05 Nov 2009
		US 2011065210 A1	17 Mar 2011
		WO 02083913 A1	24 Oct 2002
		WO 02089657 A2	14 Nov 2002
		WO 03016910 A1	27 Feb 2003
		WO 2004058055 A2	15 Jul 2004
		WO 2004059293 A2	15 Jul 2004
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2004094459 A2	04 Nov 2004
		WO 2004094460 A2	04 Nov 2004
		WO 2004097368 A2	11 Nov 2004
		WO 2005019819 A1	03 Mar 2005
		WO 2005071421 A1	04 Aug 2005
		WO 2006029369 A2	16 Mar 2006
<u>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.</u> Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2012/0129198 A1	24 May 2012	AU 1929199 A	12 Jul 1999
		AU 5665696 A	07 Nov 1996
		AU 5799898 A	15 Jul 1998
		CA 2218491 A1	24 Oct 1996
		CA 2275294 A1	25 Jun 1998
		CA 2315186 A1	01 Jul 1999
		EP 0821794 A1	04 Feb 1998
		EP 0821794 B1	03 Nov 2004
		EP 0821794 B2	11 Aug 2010
		EP 0935140 A2	11 Aug 1999
		EP 0935140 B1	02 Oct 2013
		EP 0946879 A1	06 Oct 1999
		EP 0946879 B1	08 Jun 2005
		EP 1042675 A1	11 Oct 2000
		EP 1042675 B1	31 Jan 2007
		EP 1591789 A2	02 Nov 2005
		EP 1591789 B1	03 Mar 2010
		EP 2172776 A1	07 Apr 2010
		JP H11505605 A	21 May 1999
		JP 3065667 B2	17 Jul 2000
		US 5795725 A	18 Aug 1998
		US 6156521 A	05 Dec 2000
		US 6174686 B1	16 Jan 2001
		US 6579687 B1	17 Jun 2003
		US 6627404 B1	30 Sep 2003
		US 6939678 B1	06 Sep 2005
		US 6991907 B1	31 Jan 2006
		US 2005164317 A1	28 Jul 2005
		US 7604946 B2	20 Oct 2009
		US 2007196880 A1	23 Aug 2007
		US 7723059 B2	25 May 2010
		US 2011014629 A1	20 Jan 2011
		US 8084224 B2	27 Dec 2011
US 2011143455 A1	16 Jun 2011		
US 8114612 B2	14 Feb 2012		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/NZ2014/000234	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2008/030122 A1	13 March 2008	US 2003211544 A1	13 Nov 2003
		US 2010167307 A1	01 Jul 2010
		WO 9633415 A1	24 Oct 1996
		WO 9827435 A1	25 Jun 1998
		WO 9932888 A1	01 Jul 1999
		AU 2007293777 A1	13 Mar 2008
		AU 2007293777 B2	20 Mar 2014
		CA 2662629 A1	13 Mar 2008
		CN 101611318 A	23 Dec 2009
		EP 2089722 A1	19 Aug 2009
		JP 2010506145 A	25 Feb 2010
		NZ 576061 A	22 Feb 2013
		US 2009239246 A1	24 Sep 2009
		US 8298772 B2	30 Oct 2012
WO 2013/017690 A2	07 February 2013	US 2013183683 A1	18 Jul 2013
		US 2013316378 A1	28 Nov 2013
		EP 2554995 A1	06 Feb 2013
		US 2013035603 A1	07 Feb 2013
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

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, ST, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(72)発明者 ペンバートン, クリストファー ジョゼフ
ニュージーランド, 8042 クライストチャーチ, ブルームフィールド, ステッドマン
ロード 54

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB01 DA36 DA51 FB03
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QS33 QX01
4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 CA42 DA86 EA50 FA10

专利名称(译)	心脏疾病的生物标志物		
公开(公告)号	JP2017500547A	公开(公告)日	2017-01-05
申请号	JP2016530994	申请日	2014-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	奥塔哥创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥塔哥创业有限公司		
[标]发明人	リージャクリーンアマンダ ペンバートンクリストファージョゼフ		
发明人	リー, ジャクリーン アマンダ ペンバートン, クリストファアー ジョゼフ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C07K7/06 G01N33/72		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/4716 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N2333/4712 G01N2800/32 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/02.ZNA C07K7/06 G01N33/72.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA51 2G045/FB03 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA42 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	61/904957 2013-11-15 US		
其他公开文献	JP2017500547A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及用于心脏病的预后和/或诊断的测定，方法和试剂盒。本发明还提供了一种新型循环心肌肌钙蛋白T上游开放阅读框（TnTu ORF）肽生物标记物的结合剂，用于例如预测或诊断除心肌梗塞或不稳定性心绞痛之外的心脏疾病。。此外，本发明的结合剂可用于改善心肌肌钙蛋白在心肌梗塞的预后和诊断中的敏感性和假阳性。 [选图]图1

