

(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2009-517670

(P2009-517670A)

(43) 公表日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b> (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 38/22</b> (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 31/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 9/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-542609 (P2008-542609)  
 (86) (22) 出願日 平成17年12月1日 (2005. 12. 1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月24日 (2008. 7. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/012844  
 (87) 国際公開番号 W02007/062676  
 (87) 国際公開日 平成19年6月7日 (2007. 6. 7)

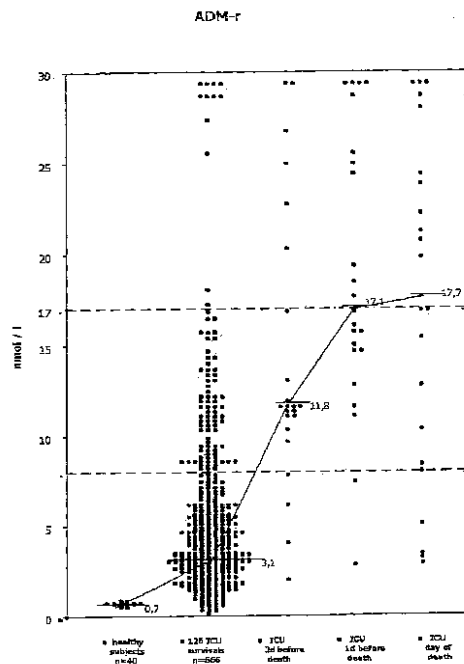
(71) 出願人 501154389  
 ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ア  
 クティエンゲゼルシャフト  
 ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト  
 ルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドセリン、エンドセリンアゴニスト及びアドレノメジュリンアンタゴニストによる危篤患者の診断及び治療のための方法

(57) 【要約】

重篤な致死性の疾患の死亡危険性の評価を含む、診断、経過管理及び予後に関して、危篤患者の体液中のプロアドレノメジュリン(プロ-ADM)/プロエンドセリン(プロ-END)免疫反応性の濃度比率が用いられる。さらに、血管収縮性エンドセリンまたはその前駆体及び/またはエンドセリンアゴニストまたはアドレノメジュリンアンタゴニストを含む医薬による、高レベルのプロ-ADMであるが、不十分なレベルのプロ-END免疫反応性を有する危篤患者の治療が提供される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

危篤患者において致死的なエンドセリン欠乏（「低エンドセリン症候群」または「LES」）の発現可能性または存在を診断するためのインビトロ方法であって、

- 患者の体液のサンプルにおいてプロアドレノメジュリン（プロADM）分子及び/または生理的に生じた1種または複数のその断片の濃度をインビトロで判定する工程と、
- 患者の体液のサンプルにおいてプロエンドセリン（プロEND）分子及び/または生理的に生じた1種または複数のその断片の濃度をインビトロで判定する工程と、
- 前記測定された濃度を使用してプロADM/プロENDの比率を算出する工程と、
- 前記算出された比率を、プロADM単独の測定濃度と場合によって組み合わせを使用して、LESの発現または存在、並びに前記疾患の重症度及び/またはそれぞれの疾患の経過及び/または経過の予後を評価する工程と

を含む方法。

10

**【請求項 2】**

前記比率が死亡危険性の評価の過程で使用される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記体液が血漿、血清、血液、羊水または尿である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記患者が、敗血症、SIRS、敗血症ショック、多臓器不全、全身または局所感染症、細菌感染症、心疾患、腹膜炎、膵炎、局所及び/または全身炎症、髄膜炎、外傷、大動脈瘤破裂、中毒、内毒血症、無尿症、腎不全、動脈性高血圧、肺高血圧、アテローム性動脈硬化症、癌、うっ血性心不全、循環器疾患、冠動脈疾患、虚血、抗不整脈作用、結腸直腸癌を含む癌、腎不全及び/または心不全、臓器損傷のうちの1つまたは複数の診断で集中治療室（ICU）に入ることが認められたICU患者である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記プロADM分子及び/またはプロEND分子が、血管作用性の成熟ADM及びENDをそれぞれ含まない生理的に生じた断片を認識する選択的免疫診断アッセイを使用して判定される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

プロADM及びプロENDを判定するアッセイにおいて、選択的抗体の組み合わせが用いられ、生理的に生じる断片に特異的に結合する抗体の少なくとも1種が固相に固定化され、同一断片の他の部分に特異的に結合する少なくとも1種の第2の抗体が、前記固相に付着した前記断片の検出に用いられる、請求項 6 に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

検出に用いられる前記第2の抗体に発光性マーカーがタグ付けされている、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 8】**

判定された前記プロADM断片が、配列番号 2 または 3 によるアミノ酸配列を有するペプチドであり、判定された前記プロEND断片が、配列番号 6 または 7 によるアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

**【請求項 9】**

前記プロアドレノメジュリンまたは生理的に生じるその断片の判定が、免疫クロマトグラフィー-POC測定装置を使用した半定量的判定として行われる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記比率の算出、診断及び予後を目的とした前記比率の使用、並びにスコア群への患者の分類のために、アルゴリズム及び好適なコンピュータプログラムがそれぞれ使用される、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

50

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法の結果を処理するためのコンピュータ装置であって、

- 請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法からの情報を受け取るための入力と、
  - 受け取った情報を解析するための手段と、
  - 疾患の重症度に関して、及び/または治療的助言として、得られた結果を表現するための手段と
- を含むコンピュータ装置。

【請求項 1 2】

低エンドセリン症候群を発現している危篤患者の治療のための医薬の調製のための、活性成分としての血管作用性エンドセリン及び/またはエンドセリンアゴニスト及び/またはアドレノメジュリンアンタゴニストまたはアドレノメジュリン中和結合剤の使用。

10

【請求項 1 3】

前記医薬が注入または注射による静脈内投与用の液体医薬である、請求項 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 4】

前記危篤患者が、敗血症、SIRS、敗血症ショック、多臓器不全、全身または局所感染症、細菌感染症、心疾患、腹膜炎、膵炎、局所及び/または全身炎症、髄膜炎、外傷、大動脈瘤破裂、中毒、内毒血症、無尿症、腎不全、動脈性高血圧、肺高血圧、アテローム性動脈硬化症、癌、うっ血性心不全、循環器疾患、冠動脈疾患、虚血、抗不整脈作用、結腸直腸癌を含む癌、腎不全及び/または心不全、臓器損傷のうちの1つまたは複数の診断で集中治療室（ICU）に入ること認められた患者である、請求項 1 2 または 1 3 に記載の使用。

20

【請求項 1 5】

前記血管作用性エンドセリンが、エンドセリン1、大型エンドセリン、エンドセリン2、エンドセリン3、及びそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記調合物が、前記患者への静脈内投与に好適な、製薬的に許容できる液体担体、並びに、安定化剤、栄養物質、電解質、溶解塩、等張性条件を提供するための浸透圧剤、緩衝剤及び/または溶媒、並びにその他のアジュバント及び賦形剤のうちの1つまたは複数を含む、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか一項に記載の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、重篤な致死性疾患の診断及び治療に有用な新規な診断、及び誘導治療法に関する。本発明はまた、集中治療医療の分野に関すると思なされてもよい。

【背景技術】

【0002】

より具体的には、本発明は、2つの異なる血管作用性タイプのペプチド、すなわち、併用が考慮された場合、例えば、敗血症及び他の重篤な病態などの致死性可能性のある病態の間に上昇が見られる可能性があることがすでに報告されている、アドレノメジュリンファミリー及びエンドセリンファミリーのペプチドの生理的放出は、危篤患者の実際の状態及び予後についての新規の関連性の高い情報を提供するという驚くべき発見に基づいている。患者の循環中の一定の危険な閾値濃度レベル以上の、体液中の前記ペプチドの実際のレベルではなく、該ペプチドの放出についての情報を提供する好適な方法によって少なくとも判定される場合、前記ファミリーのペプチドの不均衡の検出によって、そうでない場合は死に至ると考えられる急性発症から患者が回復する機会を得るように、医師が介入し、前記均衡を回復させることを可能にする。

40

【0003】

本発明が高い診断的及び治療的価値を有すると考えられる疾患は、敗血症、SIRS、敗血

50

症ショック、MOF（多臓器不全）、重症の全身または局所感染症、特に細菌感染症、腹膜炎、膵炎、局所及び/または全身炎症、髄膜炎、外傷、大動脈瘤破裂、中毒、内毒血症、無尿症、腎不全、動脈性高血圧、肺高血圧、アテローム性動脈硬化症、いくつかのタイプの癌、例えば、大腸癌、うっ血性心不全、循環器疾患、冠動脈疾患、虚血、抗不整脈作用、腎不全及び/または心不全、臓器損傷、及び発育関連疾患、並びに他の疾患を含む。

#### 【0004】

本発明は、高濃度のアドレノメジュリンを有する危篤患者におけるエンドセリン-1としての強力な血管収縮物質の高い生理的放出を示すペプチドの測定によって判定できるエンドセリンファミリーの高濃度の血管作用性ペプチドが、有益な生命救助の可能性のある作用を行使し得るという驚くべき発見に基づいている。アドレノメジュリン及びエンドセリンペプチドのアンタゴニスト的挙動についての推測を時折見ることのできる科学文献の中で、血管収縮物質のエンドセリンファミリーの高濃度は、常に危険であり、望ましくないと考えられている。逆に、アドレノメジュリンの高濃度は肯定的に考えられている。このような推測の一例は、Takayuki Shindoら、Circulation、2000年、101：2309～2316頁中、Hypotension and Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Shock in Transgenic Mice Overexpressing Adrenomedullin in Their Vasculatureの刊行物に見られる。

10

#### 【0005】

前記出願者は、循環中の「成熟」ペプチドの実際の濃度ではなく、両タイプのペプチドの生理的放出についての情報を提供するプロホルモン（プロペプチド）免疫反応性を測定する新規のアッセイを用いて、危篤患者におけるアドレノメジュリンファミリー及びエンドセリンファミリーペプチドの形成または放出を判定し、危篤患者の血清の測定結果に関連した実施例において下記により詳細に説明される一定の状況下で、測定可能なエンドセリン形成の劇的な減少、同時に、放出アドレノメジュリンの濃度の危険な高さが、このような患者の死に先行することを見出している。

20

#### 【0006】

前記所見に基づいて、前記出願者は、アドレノメジュリン（より具体的には、「アドレノメジュリン-r」または下記に定義されるとおり、「ADM-r」）の放出に関連して、エンドセリン（より具体的には、「エンドセリン-r」または下記に定義されるとおり、「END-r」）の放出段階での致死的变化を特徴とする「低エンドセリン症候群」（これ以降、簡単にLES）または「エンドセリン欠乏症候群」と称される病態を定義している。前記症候群は、血管拡張物質アドレノメジュリンの高い全身濃度または高い放出率、かつ同時に、血管収縮物質エンドセリン（END-r）の不十分な放出率を特徴とする。このような不均衡の結果、制御不能な血管拡張、及び1つ以上の臓器への血液供給不足、すなわち、1つまたは複数の臓器不全となる。

30

#### 【0007】

本出願において、用語、END-rまたはADM-rに用いられる接尾辞「r」は、「放出された」を意味する。これは、問題のパラメーターが、問題の生物活性生体分子（成熟ペプチド）の実際の、多少とも瞬間的な、または一過性の測定可能な血清濃度または血漿濃度ではなく、より長時間にわたるその累積的放出を反映することを意味する。これは、例えば、活性生体分子の断片が、該活性生体分子よりも、循環内でかなり長い半減期（かなり緩徐な分解速度またはクリアランス速度）を有する活性生体分子の形成と同時に、生理学的前駆体ペプチド（プレプロもしくはプロペプチドまたはプレプロもしくはプロホルモン）から形成されたペプチド断片を測定することにより直接測定され得る。ADM-r測定用のアッセイは、欧州特許第1,488,209B1号、「Bestimmung eines midregionalen Proadrenomedullin-Teilpeptids in biologischen Flüssigkeiten zu diagnostischen Zwecken, sowie Immunoassays für die Durchführung einer solchen Bestimmung」に記載されている。END-r測定用のアッセイは、出願人の欧州特許第1,564,558B1号、「Verfahren zur Bestimmung der Bildung von Endothelinen zu Zwecken der medizinischen Diagnostik, sowie Antikörper und Kits für die Durchführung eines solchen Verfahrens」に記載されている。両特許の内容は、参照として本出願の本明細書に特に含まれている。本出願の実施

40

50

例 1 ~ 6 は、本出願に使用可能な開示を提供するための両特許からの引用として考えることができる。

【特許文献 1】欧州特許第1,488,209B1号、「Bestimmung eines midregionalen Proadrenome-dullin-Teilpeptids in biologischen Flüssigkeiten zu diagnostischen Zwecken, sowie Immunoassays für die Durchführung einer solchen Bestimmung」

【特許文献 2】欧州特許第1,564,558B1号、「Verfahren zur Bestimmung der Bildung von Endothelinen zu Zwecken der medizinischen Diagnostik, sowie Antikörper und Kits für die Durchführung eines solchen Verfahrens」

【非特許文献 1】Takayuki Shindoら、Circulation、2000年、101 : 2309 ~ 2316頁中、Hypotension and Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Shock in Transgenic Mice Overexpressing Adrenomedullin in Their Vasculature

【非特許文献 2】www.talessin.de/scripte/medizin/sepsis1.html

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

測定可能なアドレノメジュリン及びエンドセリンの形成及び放出の両方（ADM-r及びEND-r）は、本発明による関連する組み合わせ測定の一部である。関連パラメーターとして、両方の「比率」を規定できる。これは、下記により詳細に説明されている。

【0009】

本発明の一態様によれば、本発明は、前記に挙げた疾患/病態の1つに罹患している危篤患者における低エンドセリン症候群（LES）の診断のための、ADM-r/END-rの「比率」、特にプロアドレノメジュリン（プロ-ADM）/プロエンドセリン（プロ-END）の比率またはその断片または組み合わせの比率の使用に関する。より具体的には、本発明は、死亡危険性単独の評価及び/またはそれぞれのコンピュータプログラムと組み合わせた評価を目的とした、そのような疾患の経過管理及び予後のための前記比率の測定に関する。

【0010】

本発明の好ましい一実施形態において、本発明は、そのような危険性の評価のための臨床的及び/または他の情報をさらに含むことに関する。

【0011】

LESは、前記に挙げた疾患などの疾患の関連を含み得るが、それらに限定されない。

【0012】

ADM-r及びEND-rは、通常、好適な体液、特に循環（血清、血漿、全血）中のADM-r及びEND-rの生理学的前駆体ペプチド（プレプロもしくはプロペプチドまたはプレプロもしくはプロホルモン）の比較的持続的な断片を判定することにより測定される。従って、測定されるものは、プロペプチドの免疫反応性（プロホルモンの免疫反応性）と考えることもできる。用語のプロADM及びプロENDは、このような測定可能な免疫反応性に関連し、プロADMまたはプロEND、それらの断片または前駆体に対して、少なくとも75%の同一性、好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性を示すアミノ酸配列も含む。

【0013】

診断という用語は、予後、早期予後及び経過管理もまた含む。

【0014】

本発明はさらに、LES及び/または前記に挙げた疾患を含む疾患の治療を目的とした医薬調製のための、より具体的にはEND-1及び/または大型ENDの血管収縮活性を有するエンドセリン形態、並びに場合によってはENDアゴニスト（END受容体に結合し、そこで、血管作用性エンドセリンと同一または同様な作用を行使する分子）及び/またはADMアンタゴニスト（ADM受容体に結合し、そこで、血管作用性アドレノメジュリンの作用をブロックする分子）の使用に関する。LESは、一定の強力なエフェクター分子の不均衡を含む急性代謝性障害として考えることができる。糖尿病患者に対するインスリンの投与と同様に、必要な均衡を再確立するために活性生理学的分子を患者に適用することによって、前記活性生

10

20

30

40

50

理学的分子の欠乏の有害作用がより優勢になり得る。LESに關与する分子は、アドレノメジュリン（ADM）及びエンドセリン（END）である。敗血症の患者では、エンドセリン及びアドレノメジュリンの濃度は、疾患の重症度に依存して正常以上に増加する（図1及び2）。死に先行する敗血症のきわめて重篤な状態において、本発明によれば、驚くべきことに、エンドセリンの濃度が劇的に減少することが判明した（図3及び4）。これにより、ADMの高濃度が持続していることから考えて、結果として血圧の劇的低下に至る。エンドセリン欠乏に起因したこの劇的な血圧低下（LES）は、本発明に開示されているように患者の死に至ることが多い。

#### 【0015】

アドレノメジュリン及びエンドセリンについての公開された情報に関しては、前記の2つの先行出願について引用されている。また、とりわけ国際公開第00/22439号に公開された、敗血症におけるプロADM及びプロENDの判定に關連した出願者の最も早い特許出願について引用されている。以下で最も重要な事実を概説する。

10

#### 【0016】

アドレノメジュリン（ADM）は、褐色細胞腫から単離された52個のアミノ酸を含有する新規の降圧性ペプチドとして、1993年に初めて記載されている。同年、185個のアミノ酸を含有する前駆体タンパク質のプレプロアドレノメジュリン（プレプロADM）が記載されている。該前駆体タンパク質は、そのN末端に21個のアミノ酸のシグナル配列を含有する。ADMは、プレプロADMアミノ酸配列の95位～146位を含み、そのスプライス産物である。他のスプライス産物は、シグナルペプチドの21個のアミノ酸に続く22位～41位からスプライスされた20個のアミノ酸ペプチドであるPAMPである。本発明に用いられる用語のADMまたはプロADMは、ADM、その前駆体及びそれらの断片を含む。

20

#### 【0017】

現在まで、ADM及びPAMPは、血圧に影響を及ぼすことが知られている。ADMは、強力な血管拡張物質であり、その降圧作用はADMのC末端部分にあると推定されている。逆に、N末端のペプチド配列は昇圧作用を示す。PAMPもまた、降圧作用を有することが示されているが、その作用機序は異なっているようである。

#### 【0018】

本出願の治療的態様の考察に關連して、用語「エンドセリン」（END）は、血管収縮作用を有するエンドセリン形態、特に、エンドセリン1（END-1）及びその前駆体である大型エンドセリンを一般に含むが、例えば、エンドセリン2（END-2）またはエンドセリン3（END-3）並びにそれらの前駆体などの關連分子も含み得る。

30

#### 【0019】

分析判定に關連して、「エンドセリン」は、前記で定義したEND-rを一般に意味する。しかし、エンドセリン、すなわち、特にEND-1または大型エンドセリンの活性体を判定またはモニターすることは本発明の範囲内にある。それらの減少及び最終的には循環からの消失もまた重大な致死的発作の発症を直接指示するものだからである。測定可能な濃度、及び測定可能な濃度の比率に關する絶対値は、勿論、例えば実際に測定される分子種、測定値を表現する単位、及び用いられるアッセイの検量によって影響される。本出願に報告された絶対数値は、本明細書に記載されたアッセイ設計のみに關連したものである。例えば、別の検体が測定される場合、またはその判定事項が変わる場合、それらを適合させる必要があり得るため、本発明の結果を絶対数値で表すことは実用的ではない。しかし、測定結果の記載されたスコアリングなど、本出願の以下の教示に従うことにより、当業者は任意の改変された判定法に關連した数値及び比率を容易に判定することができる。

40

#### 【0020】

エンドセリン1は、21個のアミノ酸を含み、知られている最も強力な血管収縮物質である。ENDの3つのイソ型：エンドセリン1（END-1）、エンドセリン2（END-2）及びエンドセリン3（END-3）が存在し、END-1は最も高濃度で存在し、最も強力である。エンドセリン1は、肺、心臓、腎臓及び脳における内皮細胞内で合成される。ヒトエンドセリン1遺伝子の主要な翻訳産物は、212個のアミノ酸を含むプレプロエンドセリン1である。分泌経路に

50

において、該シグナルペプチダーゼは17個のアミノ酸を含む短いN末端シグナル配列を除去する。得られたプロエンドセリンは、循環中に見ることができるプロテアーゼのフリン (furin) により、38個のアミノ酸を含む、生物学的にはまだ不活性の大型エンドセリンへと引き続き処理される。成熟した生物学的に活性なエンドセリン1は、エンドセリン変換酵素により、大型エンドセリンから形成される。エンドセリンは筋細胞、ミオサイト及び線維芽細胞に局在している特定の受容体に結合することによってその生物学的作用を行使する。この結合により、カルシウムの流出、ホスホリパーゼCの活性化及びNa/K ATPアーゼの抑制が生じる。血管収縮作用以外に、エンドセリンは成長の調節も行う。

【0021】

血液循環中のADM及び他の生物体液の濃度は、うっ血性心不全、心筋梗塞、腎臓疾患、高血圧、真性糖尿病、ショック急性期、敗血症、敗血性ショック、多臓器不全などの種々の疾患において、著しく増加する。PAMP濃度もまた、前記疾患/障害のいくつかにおいて増加するが、血漿中濃度はADMに比較して減少する。敗血症及び敗血性ショックにおいて、ADMの異常に高い濃度が見られることが知られている。この所見は、敗血症及びSIRSなどの他の重篤な疾患に罹っている患者の疾患の経過に典型的な血液動態変化に関連している。

10

【0022】

エンドセリン1及び大型エンドセリンの血漿中濃度の増加は、肺性高血圧、アテローム性動脈硬化症、うっ血性心不全、心筋梗塞、敗血症、敗血性ショック及び癌を含む循環器疾患を含むいくつかの疾患で示されている。

20

【0023】

敗血症による主な死因は、血圧低下及び単一の臓器及び組織の優先供給の損失などの全身的な血管拡張に起因する、いわゆる多臓器不全である。エンドセリンは敗血症の重症度にある役割を果たし、敗血症の死亡率に役割を果たしていると考えられる。

【0024】

本発明の分析的/診断的態様

本発明の一態様において、本発明は、LES及び/または前記の疾患を含む関連疾患の診断に関する。本発明はさらに、END-r及びADM-rの濃度、より具体的には、プロEND及びプロADM及び/またはそれらの断片の濃度の同時判定に関する。この組み合わせ測定によって、診断、予測、重症度の経過の予後、及びLES及び/または前記の疾患の死亡危険性に関する比率及び/またはアルゴリズムの算出並びにそのような誘導された比率及び/またはアルゴリズムの使用が可能になる(図1及び2)。

30

【0025】

本発明は、プロADMとプロEND両方の値が、疾患の経過中、患者において増加し、プロADMの値は、プロENDの値より増加し、死亡1日前まで、プロADM/プロENDの総比率の増加に至るという驚くべき発見に基づいている。

【0026】

しかし、より顕著なことに、死亡日のエンドセリンの濃度が劇的に減少する。その結果、プロADM/プロENDの比率及び/またはアルゴリズムは劇的に増加する(図3及び4)。

【0027】

従って、ADM、より具体的には、ADM-r、並びにEND、より具体的には、END-rの判定によって、危篤患者の健康状態、特に介入を要する致死的発作に関する情報が提供される。これは、以下の分析所見並びに表1(実施例8を参照)及び図に示された結果を参照してより完全に説明される。

40

【0028】

集中治療室(ICU)に入院し、ICUに滞在中に敗血症が発症した149人の患者を試験に含めた。

【0029】

患者がICUに滞在(3~29日)中、毎日、患者のEDTA-血漿を採取した。該血漿はさらに使用するまで-20で保存した。

50

## 【 0 0 3 0 】

プロADM及びプロENDの値は、すでに前記した出願者の先の欧州特許に記載されたコーティング管アッセイを用いて判定した。該アッセイには、抗原を作製するために合成ペプチドを用い、動物に注入して先述した種々のペプチドに対する抗体を生じさせた。好ましい実施形態において、MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を用いて、該ペプチドを担体タンパク質キーホールリンペットヘモシアニンに結合させ、ヒツジの免疫化に用いた。

## 【 0 0 3 1 】

より具体的には、プレプロADM 1~185 [ 配列番号 1 ] の部分的ペプチド83~94 [ SSPDAA RIRVKR=配列番号 2 ] 及び69~86 [ RPQDMKGASRSPEDSSPD=配列番号 3 ]、並びにプレプロEND 1~212 [ 配列番号 5 ] の部分的ペプチド168~181 [ RSSEEHLRQTRSET=配列番号 6 ] 及び200~212 [ SRERYVTHNRAHW=配列番号 7 ] のアミノ酸配列を合成した。これらの配列は、プレプロADM 1~185及びプレプロEND 1~212の中に含まれた。アミノ末端のシステイン残基を各ペプチドに加えた。該ペプチドをヘモシアニンに結合させ、先述のとおり、ヒツジにおいて前記ペプチドに対する抗体を産生させた。前記ペプチドに対して、ポリクローナル抗体を生じさせた。抗体を精製した。好ましい実施形態において、これは、Pierce (ボストン、米国)のSulfoLink-Gelに、Pierceの方法に従って、アミノ末端システイン残基を介しペプチドを結合させることにより、リガンド特異的アフィニティークロマトグラフィーによって達成された。該抗体はさらに、マーカーがタグ付けされて、検出を可能にした。用いられるマーカーは、発光マーカーであることが好ましく、先述の化学発光マーカーであることがより好ましい。

## 【 0 0 3 2 】

それぞれの分子に対する該抗体の結合を検出する方法は、当業者に知られており、サンドイッチ免疫アッセイ、放射免疫アッセイ、ELISAまたは監査試験のポイントを含む。本発明により、標的に対する該抗体の結合は、化学発光によって検出されることが好ましい。

## 【 0 0 3 3 】

プロADM及びプロENDの濃度の検出及び判定は、種々の体液、組織及び他の生体材料において実施され得るが、血清または血漿中で実施されることが好ましい。それは、LES、敗血症、敗血性ショック、SIRS及び関連した重篤な病態に至り得る前記で例示したあらゆる種類の疾患の種々の段階で行うことができる。

## 【 0 0 3 4 】

特に、体液、組織または他の生体材料、血液、血漿及び羊水 (liquor) 中で、疾患/障害の状態におけるADM-r及びEND-r、好ましくは、プロADM及びプロEND免疫反応性を有する前駆体タンパク質の関連性、または実行可能な場合は、END及びADMのような成熟タンパク質の関連性を用いることは本発明の一部である。

## 【 0 0 3 5 】

本発明はさらに、疾患または障害における、特に、急性合併症としてLESを伴う疾患の重篤な状態における、体液、組織または他の生体材料中の前駆体タンパク質濃度の有意な変化を用いる。

## 【 0 0 3 6 】

本明細書に記載されたとおりに測定されると、ADM-rは、健康な個体の血漿中に $<1\text{nmol/l}$  (中央値: 0.7) の濃度で存在する。敗血症を生き延びた重篤患者は、有意に増加したADM-r濃度 (中央値: 3.1) を示す。瀕死患者の中央値は、生存患者群に比較して有意に増加する (死亡2日前/死亡1日前/死亡日でそれぞれ、中央値11.8/17.1/17.7、図1)。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書に記載されるとおりに測定されると、ADMの推定上のアンタゴニストとしてのEND-rの濃度は、生存患者において、中央値が $0.035\text{nmol/l}$ 血漿から $0.054\text{nmol/l}$ 血漿へと増加する。瀕死患者の濃度は死亡2日前と死亡1日前で、それぞれ、 $0.096\text{nmol/l}$ と $0.133\text{nmol/l}$ にさらに増加する。しかし、驚くべきことに、END-rの濃度は死亡日に劇的に減少する

10

20

30

40

50

(中央値が0.064nmol/l、図2)。

【0038】

これらの所見は、ADM-r、END-r及びそれらの組み合わせの濃度を判定し、追加パラメータとして、前記タンパク質の比率及び/またはそのアルゴリズムを形成することにより、LESまたは前記疾患を含む他の疾患の重篤な状態における生存の予後に関連づけることができる。

【0039】

まず、ADM-r単独の濃度が、生存の予後の判定に用いられた(表1及び図1)。コラム2(特異性)は、17nmol/l血清/血漿未満の濃度のADM-rを有する生存患者の数を示す。すなわち、126人中117人の患者が17nmol/l未満の濃度を有し、102人の患者が8nmol/l未満の濃度を有する。このように、ADM-rは、17nmol/lでは生存に対して切捨てで93%の特異性、8nmol/lでは切捨てで81%の特異性を示す。

10

【0040】

死亡率の感度は、以下の方法で判定される。23人の患者がICUでの滞在中に死亡した。17nmol/lのADM-r切捨て値で、6人の患者(26%=死亡率感度)は死亡2日前に、12人の患者(52%)は死亡1日前に、13人の患者(57%)は死亡日に、17nmol/l以上の濃度を示した。8nmol/lの切捨て値で、23人の患者のうち19人(83%)が死亡2日前に、21人の患者(91%)が死亡1日前に、19人の患者(83%)が死亡日に、8nmol/l以上の濃度のADM-rを示した(表1、実施例8を参照)。

【0041】

このように、8nmol/lのADM-r切捨て値(すなわち、8nmol/l以下の濃度のADM-rを有する患者を除外する)は、ICUに滞在中に死亡した患者の大部分を含む。

20

【0042】

さらに、本発明者によって見出されたように、本発明によるADM-r/END-rの比率は、ICUにおける敗血症患者の予後と関連する高い有効性の追加パラメータを形成する。

【0043】

驚くべきことに、前記比率は、疾患の経過中に増加し、さらに驚くべきことに、その比率は死亡日に劇的に増加する。前記結果により、LES及び前記疾患を含む他の種々の疾患の生存率及び死亡率それぞれの特異性及び感度が、疾患の重症度の予後及び死亡危険性と同様に開示される。

30

【0044】

ADM-r/END-rの測定比を、表1及び図3に示す。健常者個々のADM-r/END-r比は、約50の最高値(中央値20)を有する。ICUにおける生存患者の中央値は、56に増加する。さらに有意な増加を死亡2日前(中央値135)、及び死亡1日前(中央値129)に、また、中央値336の驚くべき劇的な増加を、死亡日に見ることができる。76%の特異性における予後(表1、すなわち、43nmol/l未満のADM-r濃度を有する患者を含む)は、死亡2日前で91%、死亡1日前で96%、死亡日で87%である(表1及び図3)。より高い93%の特異性(すなわち、18nmol/l未満のADM-r濃度を有する患者を含む)では、予後は、61%の感度を有する死亡日のみ可能である(表1)。

【0045】

驚くべきことに、前記結果から、血管拡張の高い可能性に達することが必要な、LESにおける命への脅威は、高いADM濃度においてのみ存在するということが推論できる。高濃度のADMは、それぞれのEND濃度がより優勢になる場合にのみ許容される。

40

【0046】

前記結果のさらなる解析のために、該患者をさらに以下のように選択した：

1. ADM-r濃度(>8nmol/l)に従う
2. ADM-r/END-rの比率に従う(図4)。

【0047】

ICU滞在の1日目に>8nmol/lのADM-r濃度を有する生存患者の高い割合のN=24が、90未満(N=15)の比率を有し、従って、その生存が保証されることを示した。しかし、その仮定

50

に従うと、瀕死の患者もまた、死亡2日前に高い確率で含まれることになる（感度が死亡2日前で87%/死亡1日前で91%/死亡日で78%）。該試験に含まれる患者の合計（126人の生存患者）を考慮すると、特異性は驚くべきことに93%もの高さである。

【0048】

等しく高い特異性（93%）におけるADM-r、END-r及びADM-r/END-rの比率及び/またはアルゴリズムの連続的解析により、驚くべきことに、ADM-r単独（26%/52%/57%）または比率単独（0/0/61）（値はそれぞれ、死亡2日前/死亡1日前/死亡日）の解析よりも、予後に関するより高い感度が示される。

【0049】

その結果、本発明は、前記比率または決められたアルゴリズムを用いた、前記疾患/障害の検出、早期検出、重症度の判定、経過管理及び予後にも関する。

10

【0050】

この文脈において、本発明は、LES及び/または前記疾患の検出、早期検出、重症度の判定、経過管理及び予後に関して該比率から得られたデータを使用するためのコンピュータプログラムの使用を考慮している。

【0051】

前記で考察された測定を実施するために、前記の出願者の欧州特許に記載されたとおりのADM-r及びEND-rに関するアッセイ、並びに対応するキットを有利に使用することができる。

【0052】

本発明の治療的態様

当該技術分野の現状とは対照的に、本発明は、エンドセリン（特に、END-rとして判定される場合）の濃度上昇は、例えば、敗血症及び前記の関連疾患のような重篤な病態における患者に典型的に見られるようなADM-rの高い濃度上昇を有する患者にとって有益であるという驚くべき発見を開示している。言い換えると、高濃度のEND-rは、敗血症のような病態に典型的であるが、別な場合には致命的な高濃度のADM-rを患者が許容することを可能にし、その結果、死を防ぐことができる。すなわち、十分に高い生理的END濃度は、高濃度のADMより明らかに優勢となり得る。

20

【0053】

このような危篤患者におけるEND-r、または血清中ENDの測定可能な減少は、高濃度のADM-rを有する患者の死の危険性が高いことを示す明白な臨床的徴候を構成する。測定可能なEND-r及びENDそれぞれの観察された急激な減少は、敗血症のような病態の生理学的ストレス下で、END前駆体の細胞リザーバが消耗された徴候、または並行して継続されるADMの産生に追いつき、及び/または高ADM濃度の継続的血管拡張作用より優勢となるように、END及びその前駆体を産生する生理学的分子機序が不能であることの徴候として解釈できる。

30

【0054】

第1の治療的態様により、本発明は、高濃度のADM-rが測定された危篤患者に、このような患者における活性ENDを外部から補充するために、血管収縮性のエンドセリン形態、特に、END-1及び/または大型ENDの投与を考慮している。「血管収縮性エンドセリン形態」は、END-1のような直接作用するエンドセリン形態、並びに、それ自体は不活性であるが、ヒト患者の循環内に導入されると活性形態に容易に変換される大型ENDのような前駆体を含むことが意図されている。

40

【0055】

例えば、ICU（集中治療室）におけるような臨床設定におけるエンドセリンの投与前に、ADM-r、END-rの実際の濃度の分析及び前記で考察した「比率」の判定を先行させることができる。しかし、このような先行する測定及び分析は、本発明によるエンドセリン投与にとって不可欠の必要条件であると見なされるべきではない。

【0056】

例えば、ICUにおけるような健康管理設定において、治療的介入に関する決定をなし得

50

る前に、例えば、ADM-r及びEND-rのような生体分子の測定結果を待つ十分な時間がない場合があり得る。従って、基礎をなす低エンドセリン症候群（LES）を示す他の生理学的パラメーターの特徴的な変化に応じて、重篤患者に活性エンドセリンを投与することは、本発明の範囲内にある。このようなパラメーターは、敗血症患者の状態をモニターするために使用されるような、血圧、体温、パルス周波数及び類似パラメーターなどの生理学的変数の測定値であり得る。エンドセリン投与の有益な作用を知ること、このような投与を、純粋に経験的な臨床データに基づいて実施できる。

【0057】

しかし、ADM-r単独の定量的または半定量的測定に応じて、すなわち、ADM濃度が危険な高さになった場合にエンドセリンを投与することもまた本発明の範囲内にある。速やかな決定を行う必要性を考慮して、POC（管理ポイント）測定装置、例えば、免疫クロマトグラフィータイプの装置または対象となっている濃度の読取りを迅速に示す電気化学的プローブを有する装置によってICUにおけるADM-rの判定を行い、患者における実際のADM-r濃度の評価を可能にする少なくとも半定量的読取りを得て、エンドセリンの静脈内投与に関する決定を行うことが好ましい。好適なPOC測定装置は当業者に周知である。好適な設計に関する一例は、例えば、病院設定において、プロカルシトニン（PCT）の迅速なPOC判定のための、B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaftから入手可能な迅速試験装置PCT-Q（登録商標）である。

10

【0058】

さらに、関連した生体分子、または他の関連した臨床パラメーターの1つ以上の濃度に関して連続的にモニターされる患者にエンドセリンを投与することが本発明の範囲内にある。

20

【0059】

先に述べたとおり、治療的文脈において、「エンドセリン」は、血管収縮活性を有するエンドセリン形態、特にエンドセリン1（END-1）及びその前駆体である大型エンドセリンを意味するが、この用語は、例えば、エンドセリン2（END-2）またはエンドセリン3（END-3）並びにそれらの前駆体などの同様な活性を有する関連分子に拡張できる。

【0060】

現在、最も活性で直接的に作用するEND-1の投与が臨床管理状況において好ましいと考えられる。このような投与は、好適な濃度のEND-1を製薬的に許容できる担体などと共に含有する液体製剤（溶液または分散）を用いて、注入または注射による静脈内投与であることが好ましい。このような液体製剤（医薬）は、全て製薬的に許容できて有用な賦形剤、安定化剤、及びこのようなタイプの投与に好適な、また注入時に投与された製剤内での安定状態の維持に好適な他の成分を含有することができる。

30

【0061】

さらに、エンドセリンの緩徐作用形態、例えば、迅速作用形態と緩徐作用形態の混合物を投与、または同時投与することが、本発明の範囲内にある。緩徐作用形態、例えば、大型ENDの形態は、エンドセリンのより均一な薬物動態プロファイル及びより長時間続く作用を提供できる。このような形態は、注射により好適であると考えられ、一方、直接的に作用する形態は、注入による投与に好ましい。

40

【0062】

さらに、特定の作用、例えば、有益な薬物動態プロファイルを達成するために、または最も危険な急性期を切り抜けた状況にある患者を補助するために、血管収縮性エンドセリンの代わりに、またはそれと共に、エンドセリンのアゴニストを投与することが本発明の範囲内にある。

【0063】

さらに、患者に対する致死的影響は、エンドセリン自体の欠乏ではなく、高濃度ADM（ADM-r）の血管拡張作用であるため、エンドセリン及び/またはエンドセリンアゴニストの代わりに、またはそれと組み合わせて、アドレノメジュリンアンタゴニスト、すなわち、アドレノメジュリンの血管拡張作用を、例えば、その関連受容体をブロックすることによ

50

り阻止するか、もしくは減弱させる分子、またはアドレノメジュリンのその受容体に対する結合を阻止する物質（例えば、アドレノメジュリンに結合しその受容体結合部位をブロックする抗体などの特定の結合物質：「免疫学的中和」）を使用することも本発明の範囲にある。引き続きの、または先行する別個の使用を含むこのような使用、または併用は、例えば、治療の成功を改善するため、または非所望の生理学的ストレスもしくは副作用を回避するために、一定の場合に望ましい場合がある。

【0064】

さらに、本発明は、LES及び前記のものを含む他の病態及び疾患の治療用医薬の調製のために、血管収縮活性を有するエンドセリン形態、より具体的には、END-1及び/または大型END、並びにENDアゴニストの使用を開示する。特に危篤患者に投与する医薬を調製するために、エンドセリン1、大型エンドセリン及び/または任意のエンドセリン1受容体アゴニストが、活性成分として用いられる。該医薬は、注入、例えばカテーテルを介する注入による、または注射による静脈内投与用の液体製剤であることが好ましい。

10

【0065】

入手可能な科学的文献中に、医療目的で血管収縮性エンドセリンを使用する提案は存在しないようである。従って、当該の請求される使用は、明らかに最初の医療的使用と考えることができる。

【0066】

前記で考察された医薬中に、好適な濃度の、例えば、患者における投与に好適である、適切な担体、安定化剤、栄養物質、電解質、溶解塩、等張条件を提供するための浸透圧剤、緩衝剤及び/または溶媒、並びに他のアジュバント及び賦形剤を含有する液体製剤中の前述の活性ENDを、当該技術分野の慣例通りに使用できる。

20

【実施例】

【0067】

<実施例1：ペプチド合成>

ヒトプロADM及びプロENDの合成ペプチドに、N末端システイン残基を付加した。質量分析を用いてそれらを精製し、逆相HPLCを用いて品質管理し、当業者に知られた標準的操作に従い、アリコートで凍結乾燥した（Jerini AG、ベルリン、ドイツ国）。

【0068】

<実施例2：結合及び免疫化>

30

PIERCE、ロックフォード、イリノイ州、米国による「NHS-エステル-マレイミド架橋剤」に関するプロトコルに従い、MBS（マレイミド-ベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）により、配列番号1～4のペプチドを、担体タンパク質KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）に結合させた。100 µgの結合体（該結合体のペプチド含量によるµg）を投与してヒツジを免疫化した。免疫化から4ヵ月後に開始して、4週ごとに各ヒツジから700mlの血液を採取し、遠心分離により抗血清を獲得した。結合、免疫化及び抗血清の作製は、Micropharm、カーマーセンシャー、英国により行った。

【0069】

<実施例3：抗体の精製>

40

リガンド特異的アフィニティー精製を用いて、ヒツジからのポリクローナル抗体を精製した。このステップのために、Cys(0)-ペプチドを、Pierce（ボストン、米国）から供給されたSulfoLink-Gelに結合させた。Pierceのプロトコルに従って結合が生じた。5mlのゲル当たり、5mgのペプチドを加えた。

【0070】

要約すると、10mlの溶出緩衝液（50mMのクエン酸、pH2.2）及び結合緩衝液（100mMのリン酸ナトリウム、0.1%Tween、pH6.8）により、カラムを3回洗浄した。0.2 µm径のフィルターを用いて、100mlのヒツジ抗血清をろ過し、カラム材料に加えた。10mlの結合緩衝液により、該ゲルから定量的に溶出させた。該材料を静かに攪拌しながら、室温で一晩インキュベートした。該材料を空のカラム（NAP 25、Pharmacia、空の状態）に移した。溶出物を廃棄した。引き続き、250mlの無タンパク質結合緩衝液によりカラムを洗浄した（洗

50

浄溶出物のタンパク質含量 $<0.02$  A280nm)。洗浄したカラムに溶出緩衝液を加え、1mlの画分を採取した。各画分のタンパク質含量を、BCA法によって判定した(PIERCE、ロックフォード、イリノイ州、米国のプロトコルに従って)。タンパク質含量 $>0.8\text{mg/ml}$ の画分をプールした。

【0071】

<実施例4：タグ付け>

配列番号1～4のペプチドに対して作製したアフィニティー精製抗体の500 $\mu\text{l}$ を、100mMのリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)1ml中に再緩衝化し、NAP-5ゲルろ過カラム(Pharmacia)により、Pharmaciaのプロトコルに従って再緩衝化した。

【0072】

化学発光マーカーによるタグ付けのために、10 $\mu\text{l}$ のMA70-アクリジニウム-NHS-エステル(1mg/ml; Hoechst Behring)を、67 $\mu\text{l}$ の抗体溶液中に加え、室温で15分間インキュベートした。該溶液を、NAP-5ゲルろ過カラムにおいて、Pharmaciaのプロトコルに従い、1mlの溶媒A(50mMのリン酸カリウム、100mMのNaCl、pH7.4)中に再緩衝化し、低分子量の粒子を溶出した。非結合標識の溶出のため、ゲルろ過HPLCを行った(カラム: Waters Protein Pak SW300)。サンプルを加え、溶媒A中、1ml/分の流速でクロマトグラフィーを行った。該サンプルを、280nmと368nmの波長で測定し、タグ付けの程度を判定した。吸収比368nm/280nmは、1.0のピークを有した。モノマー抗体を含有する画分を回収し(保持時間は8～10分)、100mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl、5%のウシ血清アルブミン、0.1%のアジ化ナトリウム、pH7.4の3ml中に吸収させた。

【0073】

タグ付抗体を、サンドイッチアッセイ、並びにSPALTアッセイなどの種々のアッセイに使用した。

【0074】

<実施例5：結合>

サンドイッチアッセイのために、配列番号1～4のペプチドに対する精製抗体を、照射済みポリスチロール管(Greiner、ドイツ国)上に固定化した。その操作のために、抗体溶液を、50mMのTris、100mMのNaCl、pH7.8によって、6.7 $\mu\text{g/ml}$ のタンパク質濃度に希釈した。1つの管当たり、300 $\mu\text{l}$ の希釈タンパク質溶液をピペットで移した。これらを室温で20時間インキュベートし、該溶液を取り出した。次いで、10mMのリン酸ナトリウム、2%のKarion FP、0.3%のウシ血清アルブミン、pH6.5の溶液4.2mlを、各管に加えた。20時間後、該溶液を取り出し、該管を真空乾燥器内で乾燥させた。該操作は、当業者に既知の操作に従い、逆サンドイッチアッセイとして行うこともできる。

【0075】

<実施例6：サンドイッチ免疫アッセイ>

以下のアッセイ緩衝液を用いた：100mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl、5%のウシ血清アルブミン、0.1%の非特異的ヒツジIgG、0.1%のアジ化ナトリウム、pH7.4。

【0076】

健康な個体及び種々の疾患/前記疾患の患者のEDTA-血漿のタンパク質含量を判定した。

【0077】

固定化抗体を含有する管に、患者のEDTA-血漿をピペットで入れた(10 $\mu\text{l}$ のADM及び50 $\mu\text{l}$ のEND-r)。200 $\mu\text{l}$ のPBS(リン酸緩衝生理食塩水)、0.1%のウシ血清アルブミンを、各管に加え、室温で2時間インキュベートした。4mlのPBSで3回洗浄後、200 $\mu\text{l}$ のアクリジニウムエステルでタグ付けしたポリクローナルヒツジ抗体(アフィニティー精製)を、プレプロADM 1～185のペプチド83～94(配列番号2)及び69～86(配列番号3)、並びにプレプロEND 1～212の部分的ペプチド168～181[RSSEEHLRQTRSET=配列番号6]及び200～212[SRERYVTHNRAHW=配列番号7]のPBS、0.1%ウシ血清アルブミン中、各20ngそれぞれに対して生じさせた。さらに2時間室温でインキュベーション後、非結合のタグ付抗体を各2mlのPBSで5回洗浄することにより除去する。ルミノメータ(Berthold LB 952T/16)においてルミネセンスを測定することにより、該管に結合したタグ付抗体を定量化した。

10

20

30

40

50

## 【0078】

基準溶液として、合成プレプロADM 45～92及びプレプロEND 169～212の規定希釈を用いて確立された通常の検量線によって、測定した個々の値を定量化した。

## 【0079】

<実施例7：測定>

健康な個体及び疾患状態の個体におけるADM-r及びEND-rの濃度

種々の理由で集中治療室に滞在し、集中治療室に滞在中に敗血症を発症した149人の患者を該試験に含めた（基準：[www.talessin.de/scripte/medizin/sepsis1.html](http://www.talessin.de/scripte/medizin/sepsis1.html)）。集中治療室に滞在中（3～29日）、毎日、患者のEDTA-血漿を採集し、さらなる使用まで、-20で保存した。

10

## 【0080】

ADM-rは、個々の健常者の血漿中に、 $<1\text{nmol/l}$ （中央値： $0.7$ ）の濃度で存在する。敗血症を生き延びた危篤患者は、有意に増加したADM-r濃度（中央値 $3.1$ ）を示す。瀕死患者の中央値は、生存患者群に比較して、有意に増加している（中央値： $11.8/17.1/17.7$ ；それぞれ、死亡2日前/死亡1日前/死亡日、図1）。

## 【0081】

ADMの推定上のアンタゴニストとしてのEND-r（プロEND）の濃度は、生存患者において、 $0.035\text{nmol/l}$ 血漿の中央値から $0.054\text{nmol/l}$ に増加する。この濃度は、死亡2日前と死亡1日前に、それぞれ、 $0.096\text{nmol/l}$ と $0.133\text{nmol/l}$ へとさらに増加する。驚くべきことに、END-rの濃度は、死亡日に劇的に減少する（中央値 $0.064\text{nmol/l}$ 、図2）。

20

## 【0082】

<実施例8：評価>

疾患/障害の重症度に関するADM-r及び予後

ADM-rの濃度を用いて、生存の予後を判定した（表1及び図1）。表1の欄2（特異性）に、 $17\text{nmol/l}$ 血漿未満の濃度のADM-rを有する生存患者数を示す。すなわち、126人中117人の患者は $17\text{nmol/l}$ 未満の濃度を有し、102人の患者は $8\text{nmol/l}$ 未満の濃度を有した。従って、ADM-rは、生存に関して、 $17\text{nmol/l}$ では切捨てで93%の特異性、 $8\text{nmol/l}$ では切捨てで81%の特異性を示す。死亡率の感度は、以下の方法で判定した：23人の患者がICU滞在中に死亡した。 $17\text{nmol/l}$ のADM-r切捨て値で、6人の患者（26%=死亡率の感度）が死亡2日前に、12人の患者（52%）が死亡1日前に、13人の患者（57%）が死亡日に、 $17\text{nmol/l}$ 以上の濃度を示した。 $8\text{nmol/l}$ の切捨て値で、23人の患者のうち19人（83%）が死亡2日前に、21人の患者（91%）が死亡1日前に、19人の患者（83%）が死亡日に、 $8\text{nmol/l}$ 以上のADM-r濃度を示した（表1）。

30

## 【0083】

従って、 $8\text{nmol/l}$ のADM-r切捨て値、すなわち、 $8\text{nmol/l}$ 以下のADM-r濃度を有する患者を除いて、ICUに滞在中に死亡した大多数の患者を含む。

## 【0084】

【表 1】

表 1

	特異性 生存 n=126	死亡2日前 n=23	感度 死亡1日前 n=23	死亡日 n=23	
<b>ADM-r</b>					
切捨て 17 nmol/l	117	6	12	13	10
切捨て 8 nmol/l	102	19	21	19	
<b>比率 ADM-r/END-r</b>					
切捨て 215	117	0	0	14	
切捨て 90	96	21	22	20	
<b>比率 ADM-r/END-r</b>					
ADM-r >8 nmol/l 切捨て 90	117	20	21	18	20
<b>ADM-r</b>					
切捨て 17 nmol/l	93 %	26 %	52 %	57 %	30
切捨て 8 nmol/l	81 %	83 %	91 %	83 %	
<b>比率 ADM-r/END-r</b>					
切捨て 215	93 %	0 %	0 %	61 %	
切捨て 90	76 %	91 %	96 %	87 %	
<b>比率 ADM-r/END-r</b>					
ADM-r >8 nmol/l 切捨て 90	93 %	87 %	91 %	78 %	40

【 0 0 8 5 】

&lt; 実施例 9 : 比率 &gt;

ADM-r/END-rの比率

ADM-r/END-rの比率を、表 1 及び図 3 に示す。個々の健常者におけるADM-r/END-rの比率は、約50（中央値20）の最高値を有する。ICUにおける生存患者の中央値は、56に増加する。さらに有意な増加が、死亡2日前（中央値135）、死亡1日前（中央値129）に、驚くべ

き劇的な増加が中央値336で死亡日に見ることができる。76%の特異性における予後（表1、すなわち、含まれる患者で、43nmol/l未満のADM-r濃度を有する者は、死亡2日前に91%、死亡1日前に96%、死亡日に87%である（表1及び図3）。93%のより高い特異性、すなわち、含まれる患者で、18nmol/l未満のADM-r濃度を有する者は、61%の感度を有する死亡日にのみ予後が可能である（表1）。

【0086】

<実施例10>

8nmol/l以上のADM-r濃度を有する患者を含むADM-r/END-rの比率

従って、患者を、ADM濃度(>8nmol/l)により、また、ADM-r/END-rの比率により、さらに選択した（図4）。

【0087】

ICU滞在1日目にADM濃度>8nmol/lを有する生存患者、N=24の高い割合（N=15）が90未満の比率を有し、従って、その生存が保証されることを示した。しかし、その仮定によると、瀕死患者も死亡2日前に、高い確率で含まれることになる（感度は、死亡2日前87%/死亡1日前91%/死亡日78%）。該試験に含まれた患者の合計（126人の生存患者）を考慮すると、特異性は驚くべきことに、93%の高さになる。

【0088】

従って、等しく高い特異性（93%）で、ADM-r、END-r、並びにその比率及び/またはADM-r/END-rのアルゴリズムの連続的な分析により、それら自体、ADM（26%/52%/57%）または比率（0/0/61）の分析（それぞれ、死亡2日前/死亡1日前/死亡日の値）として、予後（87%/91%/78%）に対してより高い感度が示される。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】40人の健常対照者、ICUにおける126人の生存患者、並びに死亡2日前、1日前及び死亡日の23人の患者の血漿中ADM-r濃度を示す図である。

【図2】40人の健常対照者、ICUにおける126人の生存患者、並びに死亡2日前、1日前及び死亡日の23人の患者の血漿中END-r濃度を示す図である。

【図3】40人の健常対照者、ICUにおける126人の生存患者、並びに死亡2日前、1日前及び死亡日の23人の患者の血漿中ADM-r/END-rの比率を示す図である。

【図4】血漿中ADM-r濃度>8nmol/lを有する患者のみ；ICUにおける24人の生存患者、並びに死亡2日前、1日前及び死亡日の20人の患者を含むADM-r/END-rの比率を示す図である。

10

20

30

【 図 1 】

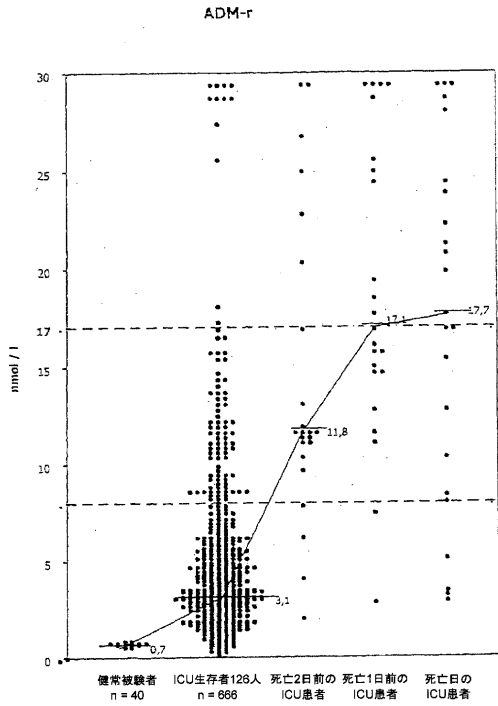


FIGURE 1

【 図 2 】

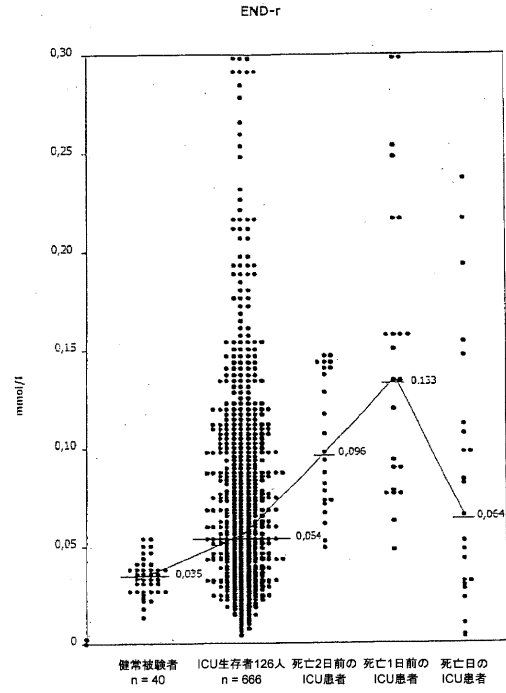


FIGURE 2

【 図 3 】

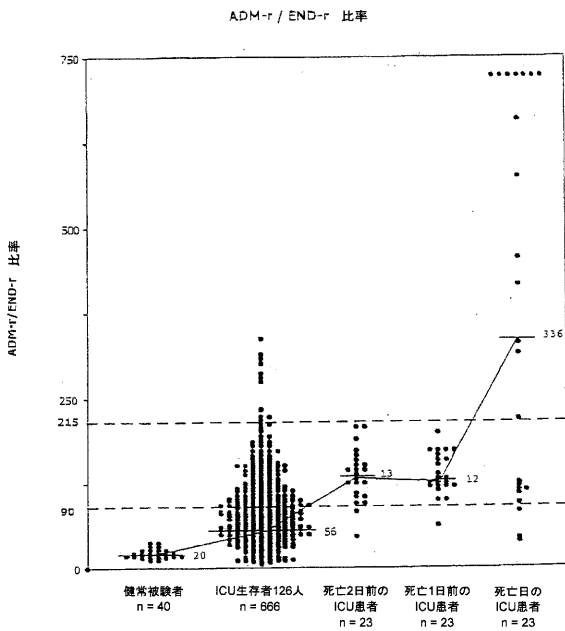


FIGURE 3

【 図 4 】

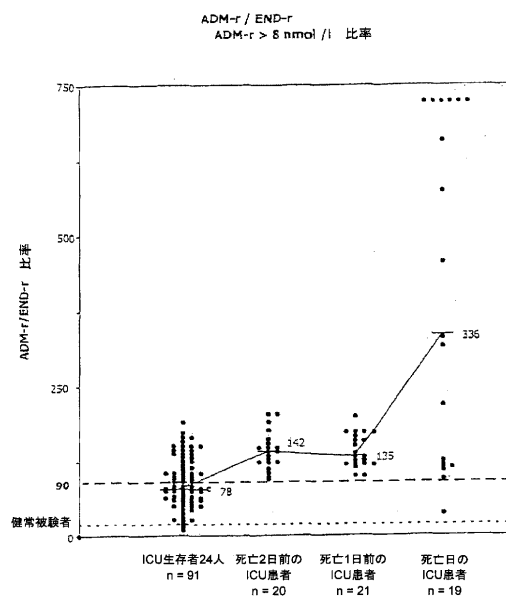


FIGURE 4

【配列表】

2009517670000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2005/012844
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/74 A61K38/22 A61P9/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; October 2001 (2001-10), ZHENG H ET AL: "[The change in the plasma contents of adrenomedullin and endothelin in burn patients during early postburn stage]" XP002352776 Database accession no. NLM11774814 abstract & ZHONGHUA SHAO SHANG ZA ZHI = ZHONGHUA SHAOSHANG ZAZHI = CHINESE JOURNAL OF BURNS, OCT 2001, vol. 17, no. 5, October 2001 (2001-10), pages 279-281, ISSN: 1009-2587	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 May 2006		17. 10. 2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 940-3016		Authorized officer
		Gundlach, Björn

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2005/012844

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEI YU-XING ET AL: "Relationship of proadrenomedullin N terminal 20 peptide and the other vasoconstrictive substance in patients with chronic heart failure." ZHONGHUA XINXUEGUANBING ZAZHI, vol. 31, no. 8, August 2003 (2003-08), pages 600-602, XPO08053669 ISSN: 0253-3758 abstract	1-10
A	WO 00/22439 A (B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH; BERGMANN, ANDREAS; STRUCK, JOACHIM; WEGL) 20 April 2000 (2000-04-20) cited in the application the whole document	1-10
A	US 2002/095041 A1 (CHAN MING FAI ET AL) 18 July 2002 (2002-07-18) the whole document	
A	EP 1 564 558 A (B.R.A.H.M.S AKTIENGESELLSCHAFT) 17 August 2005 (2005-08-17) sequences 4,5	1-10
A	WO 2004/090546 A (B.R.A.H.M.S AKTIENGESELLSCHAFT; BERGMANN, ANDREAS; STRUCK, JOACHIM) 21 October 2004 (2004-10-21) sequence 4	1-10
E	EP 1 619 505 A (BRAHMS AKTIENGESELLSCHAFT) 25 January 2006 (2006-01-25) the whole document	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2005/012844**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2005/ 012844

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: Claims 1-10

Method for diagnosing critically ill patients  
---

## 2. claim: 11

Computer device  
---

## 3. claims: 12-16

Use of endothelin, its agonists or adrenomedullin  
antagonists for the manufacture of medicaments.  
---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/012844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0022439	A	20-04-2000	AT 320607 T 15-04-2006
			DE 19847690 A1 20-04-2000
			EP 1121600 A2 08-08-2001
			JP 2002527753 T 27-08-2002
			US 6756483 B1 29-06-2004
-----			
US 2002095041	A1	18-07-2002	NONE
-----			
EP 1564558	A	17-08-2005	AT 312351 T 15-12-2005
			WO 2005078456 A1 25-08-2005
			ES 2255003 T3 16-06-2006
-----			
WO 2004090546	A	21-10-2004	AT 312342 T 15-12-2005
			CN 1759319 A 12-04-2006
			DE 10316583 A1 28-10-2004
			EP 1488209 A1 22-12-2004
			ES 2250959 T3 16-04-2006
			MX PA05010827 A 09-03-2006
-----			
EP 1619505	A	25-01-2006	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00

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

(72) 発明者 アンドレアス・ベルグマン

ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7

(72) 発明者 ヨアヒム・シュトルック

ドイツ・1 3 4 6 5・ベルリン・ツェルンドルファー・ヴェーク・5 2 A

(72) 発明者 ニルス・ゲー・モーゲンターラー

ドイツ・1 3 5 0 3・ベルリン・ハイリゲンゼーシュトラッセ・1 2 1 F

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA17 BA44 DB01 ZA361 ZA421 ZA451 ZA661 ZA811 ZB111  
ZB261 ZB321 ZB351

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009517670A5</a>	公开(公告)日	2011-10-06
申请号	JP2008542609	申请日	2005-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルグマン ヨアヒムシュトルック ニルスゲーモーゲンターラー		
发明人	アンドレアス・ベルグマン ヨアヒム・シュトルック ニルス・ゲー・モーゲンターラー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/22 A61K45/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P9/12 A61P9/10 A61P35/00 A61P1/18 A61P29/00		
CPC分类号	A61P1/18 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 G01N33/74 A61K39/3955 C07K16/26		
FI分类号	G01N33/53.D A61K37/24 A61K45/00 A61P31/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P9/12 A61P9/10 A61P35 /00 A61P1/18 A61P29/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DB01 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA451 4C084 /ZA661 4C084/ZA811 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB321 4C084/ZB351		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
其他公开文献	JP4976412B2 JP2009517670A		

#### 摘要(译)

重症患者体液中肾上腺髓质素原 ( pro-ADM ) /内皮素原 ( pro-END ) 免疫反应性的浓度比值用于诊断，病程控制和预后，包括评估死亡风险，严重威胁生命的疾病。此外，提供了用包含血管收缩性内皮素或其前体和/或内皮素激动剂或肾上腺髓质素拮抗剂的药物治疗具有高水平的ADM前体但缺乏足够的pro-END免疫反应性的重症患者。