

(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2006-523302

(P2006-523302A)

(43) 公表日 平成18年10月12日(2006. 10. 12)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	Z N A D	2 G O 5 4
GO 1 N 33/577	(2006. 01)	GO 1 N 33/577	B	4 H O 4 5
GO 1 N 21/78	(2006. 01)	GO 1 N 21/78	C	
CO 7 K 14/47	(2006. 01)	CO 7 K 14/47		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

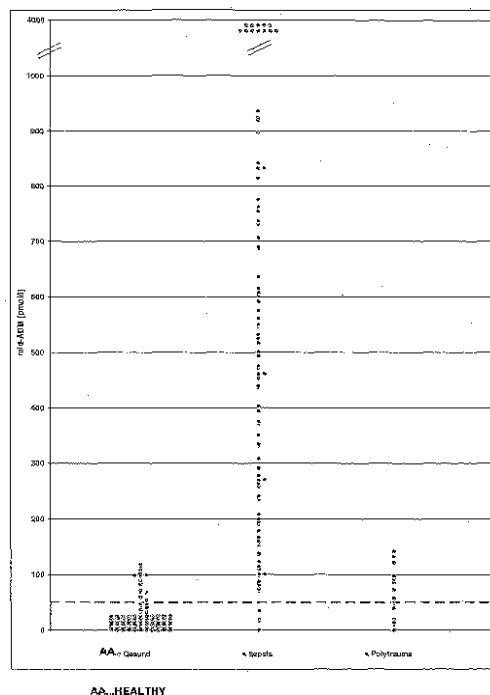
(21) 出願番号	特願2006-504400 (P2006-504400)	(71) 出願人	501154389
(86) (22) 出願日	平成16年1月29日 (2004. 1. 29)		ペー・エル・アー・ハー・エム・エス・ア
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月7日 (2005. 10. 7)		クティエンゲゼルシャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/000806		ドイツ・D-1 6 7 6 1・ヘーニッヒスト
(87) 国際公開番号	W02004/090546		ルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・2 5
(87) 国際公開日	平成16年10月21日 (2004. 10. 21)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	10316583.5		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成15年4月10日 (2003. 4. 10)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		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】 診断目的のための生物学的液体における中間領域プロアドレノメデュリン部分領域の測定およびこのような測定を行うためのイムノアッセイ

(57) 【要約】

診断目的で、特に敗血症、心臓病および癌の診断目的で、生物学的液体中のアドレノメデュリンの免疫活性の測定のための方法であって、本方法においては、完全なプレプロアドレノメデュリン(pre-proAM; 配列番号: 1) のアミノ酸(45-92)を含むプロアドレノメデュリンの中間領域部分ペプチド(mid-proAM; 配列番号: 3)を、特に、mid-proAMの配列を特異的に認識する少なくとも1つの標識した抗体を用いて行うイムノアッセイ手法によって測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

完全なプレプロアドレノメデュリン（pre-proAM；配列番号：1）のアミノ酸（45－92）を含むプロアドレノメデュリンの中間領域部分ペプチド（mid-proAM；配列番号3）を測定することを特徴とする、診断目的のための生物学的液体におけるアドレノメデュリンの免疫活性の測定方法。

【請求項 2】

生物学的液体のmid-proAMを、mid-proAMの配列を特異的に認識する少なくとも1つの標識抗体を用いて行うイムノアッセイによって測定することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

イムノアッセイが、分析物のための固相に結合した競合物および標識抗体を用いたアッセイ（SPALTアッセイ）、または、mid-proAM（配列番号：3）の異なる部分配列に特異的に結合する少なくとも2つの抗体を用いたサンドイッチアッセイ（2サイドイムノアッセイ）であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

循環mid-proAM（配列番号：3）を測定し、生物学的液体が血漿であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

両方の抗体が、pre-proAMのアミノ酸60からアミノ酸94へと広がるmid-proAMの領域に結合することを特徴とする、請求項3に記載の方法。

20

【請求項 6】

抗体/複数の抗体が、モノクローナルおよび/またはポリクローナルであることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

両方の抗体が、アフィニティ精製したポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

一方の抗体が、pre-proAMのアミノ酸69－86（配列番号：4）を含む合成ペプチド配列を含む抗原で動物を免疫することによって得られ、他方の抗体が、pre-proAMのアミノ酸83－94（配列番号：5）を含む合成ペプチド配列を含む抗原で免疫することによって得られることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

一方の抗体を標識し、他方の抗体を固相に結合させるか、または、固相に選択的に結合させることができることを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第一抗体および第二抗体の両方が液体反応混合液中に分散して存在していること、検出すべきmid-preAMへの両方の抗体の結合後に、測定溶液中に生じたサンドイッチ複合体の検出を可能とする測定可能なシグナルが発生するように、蛍光または化学発光消光または増幅に基づく標識システムの部分である第一の標識構成要素が第一抗体に結合していること、およびこの標識システムの第二の標識構成要素が第二抗体に結合していることを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

標識システムが、蛍光または化学発光色素、特にシアニンタイプの色素と組み合わせた希土類クリプテートまたはキレートを含むことを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

診断のため、重篤度の測定および予後診断のため、ならびに敗血症の進行に付随する治療コントロールのために使用することを特徴とする、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

50

敗血症の診断と関連する少なくとも1つの更なるパラメーターを同時に測定する複合パラメーター測定の一部として実施することを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

敗血症の診断と関連する更なるパラメーターまたは複数のパラメーターが、抗-ガングリオシド抗体、タンパク質プロカルシトニン、CA125、CA19-9、S100B、S100Aタンパク質、LASP-1、可溶性サイトケラチンフラグメント、特にCYFRA21、TPSおよび/または可溶性サイトケラチン-1フラグメント(sCY1F)、ペプチドインフラミンおよびCHP、他のペプチドプロホルモン、グリシン-N-アシルトランスフェラーゼ(GNAT)、カルバモイルホスフェートシンターゼ1(CPS1)およびC-反応性タンパク質(CRP)またはこれらのフラグメントからなる群から選択されることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

10

【請求項15】

心臓病の診断領域で使用されることを特徴とする、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

心臓病の診断と関連する更なるパラメーターを同時に測定する複合パラメーター測定の過程において実施することを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

癌の診断領域で使用されることを特徴とする、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

癌の診断と関連する更なるパラメーターを同時に測定する複合パラメーター測定の過程において実施することを特徴とする、請求項17に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学的診断目的で、特に敗血症の診断（それだけでなく、例えば、癌の診断および心臓病の診断）で、または一般的にペプチドアドレノメデュリン(AM)の測定が診断に関連した結果をもたらす病気の状態の診断における、生物学的液体中のプロアドレノメデュリンの中間領域部分ペプチド(mid-proAM)の測定、特にproAM(45-92)部分ペプチドを測定する方法に関する。本発明の測定は、特に、標識した抗体を使用するタイプのイムノアッセイ手法(サンドイッチアッセイ; SPALTまたはSPARTの原則に従った競合アッセイ)によって実施される。

30

【0002】

本明細書においては、単語「診断」は、基本的に、予後/早期診断および治療に付随するモニタリングも含むことを意図する簡素で一般的な単語として使用される。

【背景技術】

【0003】

ペプチドアドレノメデュリン(AM)は、ヒトのフェノクロモサイトーム(phenochromocytome)から単離された52アミノ酸を含む新規の低血圧効果ペプチドとして、Kitamura et al.(f. 18; 数値は、添付した引用のリストに基づく)によって1993年に最初に発表された。同じ年に、185アミノ酸を含む前駆体ペプチドをコードするcDNAおよびこの前駆体ペプチドの完全なアミノ酸配列をコードするcDNAも発表された(19; 配列番号: 1)。この前駆体ペプチド、とりわけ、N末端に21アミノ酸のシグナル配列を含む前駆体ペプチドは、「プレプロアドレノメデュリン」(pre-proAM)と呼ばれている。本明細書においては、特定された全てのアミノ酸部位は、何か異なることが本文中の特定の文脈から明らかでない限り、通常、185アミノ酸を含む、配列番号: 1の配列を有するpre-proAMに関する。

40

【0004】

ペプチドアドレノメデュリン(AM)は、52アミノ酸を含むペプチド(配列番号: 2)であって、タンパク質分解切断によって形成される、pre-proAMのアミノ酸95から146を含むペプチドである。現在、実質的に、pre-proAMの切断によって形成される数個のペプチド

50

フラグメント断片のみが、特に、生理的に活性なペプチドアドレノメデュリン (AM) および「PAMP」、pre-proAMの21アミノ酸シグナルペプチドの後に続く20アミノ酸 (22-41) を含むペプチドが、より正確に特徴付けられている。AMおよびPAMPの両方について、生理的に活性なサブフラグメントが更に発見され、より詳細に研究されている。

【0005】

1993年におけるAMの発見と特徴づけにより、集中的な研究活動と盛んな論文発表がもたらされ、それらの結果が、最近、様々なレビューにおいて要約されている。本明細書の文脈においては、特に、AMについて扱っている出版物「Peptides」(Peptides 22 (2001)) (特に、(12)および(2)) の論文を参照する。更なるレビューは(3)である。現在までの科学的研究において、とりわけ、AMを多機能性の調整ペプチドとしてみなすことができること 10
が見出された。AMは、グリシンによって伸張した不活性な形態で、血液へと放出される(5)。AMに特異的であって、恐らくAMの効果を調整する結合タンパク質も存在する(11)。

【0006】

現在までの研究において第一に重要である、AMだけでなくPAMPの生理的效果は、血圧に影響を与える効果であった。それゆえ、AMは効果的な血管拡張剤であって、その低血圧効果は、特にAMのC末端部位のペプチドセグメントと関連付けることができる。一方、AMのN末端のペプチド配列は、高血圧効果を示す (cf. 例えば(6)) 。

【0007】

pre-proAMから形成される、前記の更なる生理的に活性なペプチドPAMPは、AMの活性機構と異なる活性機構を有していると考えられていても、同様に、低血圧効果を示すことが 20
更に見出された (cf. 前記した論文(2)および(3)に加えて、(8)、(9)または(14)およびEP 0622458A2) 。

【0008】

血液および他の生物学的液体中の測定することができるAMの濃度は、多くの病気の状態において、健康な対照となるヒトに見られる濃度を顕著に超えていることが更に見出された。それゆえ、鬱血性心不全、心筋梗塞、腎臓病、高血圧病、糖尿病、急性ショック症状、敗血症、および敗血症ショックの患者におけるAMレベルは、程度は異なるが、顕著に増加する (cf. 例えば(2), Section 7., およびこの文脈中で引用されている論文)。PAMP濃度は、また、前記病気の状態の幾つかにおいて増加するが、その血漿レベルは、AMに比べて減少する ((2); page 1702) 。

【0009】

AMの異常な高濃度が敗血症または敗血症ショックにおいて観察されることが更に知られている (cf. (2)および(4)、(1)、(13)、(15)および(16))。この知見は、敗血症および他の重症の疾患 (例えばSIRSのような) の患者における病状の経過の一般的な現象として知られている典型的な血行動態の変化に関連している。

【0010】

AMおよびPAMPは同じ前駆体ペプチドpre-proAM (配列番号: 1) (AMおよびPAMPに対応するアミノ酸配列は等モルで部分ペプチドとして存在している) から形成され则认为られているにもかかわらず、生物学的液体中の測定可能なAMまたはPAMPの濃度は、明らかに異なる。これは、おかしいことではない。1つの同じ前駆体ペプチドに由来する異なった 40
分解産物の測定濃度が異なるのは、(例えば、病気の状態が異なる場合) 前駆体ペプチドの異なる断片化によって異なる分解産物が生じるような、異なった競合的な分解経路に由来してそれらが生じるからである。前駆体ペプチドに含まれる特定の部分ペプチドが、遊離ペプチドとして形成されるまたは形成されない、および/または、異なるペプチドが異なる方法で異なる量で形成されるのであろう。たとえ、前駆体ペプチドをプロセッシングするために、1つの分解経路のみが行われ、全ての分解産物が1つの同じ前駆体ペプチドに由来し、それら自身は最初に等モルで形成されているにしても、例えば、それら各自が、異なる速度で形成されるか、および/または各生物学的液体において個々の安定性 (寿命) を有しているか、あるいは、異なるクリアランス機構に基づいて、および/または、異なるクリアランス速度で血液から取り除かれるならば、生物学的液体中の測定可能な異なる 50

部分ペプチドおよびフラグメントの定常状態の濃度は非常に異なっている。

【0011】

それゆえ、AMの形成に関連して、AMおよびPAMP以外に、他のペプチドフラグメントもpre-proAMのタンパク質分解プロセッシングにおいて形成されているはずであろうことが想像されることは事実である。しかしながら、たとえ、このようなpre-proAMペプチドフラグメントに相当するペプチド、および、これを測定するためのラジオイムノアッセイ（RIA）が研究目的で市販（例えば、Phoenix Pharmaceuticals, Incから）されていても、科学論文においては、現在までのところ、そのような可能性のある更なるフラグメントの発生および安定性については記載されていない。

【0012】

敗血症におけるプロホルモンプロカルシトニンの存在とともに得られた基本的な知識（cf. 例えばEP0656121B1）に基づき、そして、通常観察されない他のプロホルモンが敗血症の場合は敗血症の患者の血液において検出できるかもしれないという仮説から開始して、出願人は、pre-proAMのアミノ酸45-92に結合するが成熟AMの配列には結合しない抗体を用いた市販のRIAを使用して、敗血症の患者の血清において、プロアドレノメデュリンを検出するための調査実験を行った。その結果（WO 00/22439に記載されている）により、プロアドレノメデュリンと仮称した分析物が、健康なコントロールのヒトと比較して増加することを見出した。しかしながら、測定した増加は、通常の値の約2倍の大きさでしかなく、すなわち、相対的に小さかった。敗血症の場合には通常の値の12倍の大きさに増加したAM値が報告されている論文を考慮すれば、使用したアッセイで測定したproAMの免疫反応性として、通常の値の約2倍の増加では、敗血症の診断において、AMに代わって、この「proAM免疫反応性」を測定することはそれほど魅力があるものではないように思われる。プロアドレノメデュリン（22-185または22-146）を実際に記載の実験で測定するか、あるいは、記載の方法で測定したプロアドレノメデュリンの免疫反応性が患者に生じている1つの敗血症または多くの異なる敗血症に由来するのかは、測定した知見に基づいては求めることができなかった。

【0013】

敗血症診断のための臨床的に使用できるバイオマーカーのための総括的な研究および開発活動の過程で、特に複合パラメーター測定方法（複数のバイオマーカーの同時測定）によって、良好な敗血症診断を改良することができるという目的を考慮し、出願人は、敗血症で増加するAMの測定または付加的な測定を検討した。しかしながら、観察されたように、それぞれ独立した研究活動の制限を越えて測定結果の単純な比較を可能とする結果の取得によるAMの信頼できる測定は、直接には不可能であった。大部分の研究活動のデータは、抗体の共通のAM結合部位のための標識したマーカーペプチドとAMとの競合に基づくRIAを用いて得られた。それぞれのRIAは、しばしば別個に開発され、様々な抗体およびペプチドが使用され、測定結果の定量的な分析法間の比較は更に困難となった（cf. 例えば10）。更にその上、最近の研究結果によれば、様々な形態のAMが存在し（C末端グリシン残基が存在するまたは存在しない）、これらは異なる活性を有していることが（cf. (2)および、例えば(5)）示された。AM結合タンパク質の発見（cf. 11）により、更に複雑な状況が引き起こされた—グリシン残基が存在するかまたは存在しないかによって、あるいは、AMと結合タンパク質との複合体が存在するかまたは存在しないかによって、予測不可能な方法でそれぞれのアッセイに応じてAMの測定に影響を与えかねない。これらの状況は、通常の研究に適したAMのための有効なイムノアッセイに関して、多大な必要条件が求められる：このようなアッセイのためには、結合タンパク質によってふさがれていない、これらのAM領域に結合する適切な抗体が、もしこのような領域が存在するならば見つけ出すことが必要である。もう1つの方法として、AMから結合タンパク質を遊離させて分離するための先に行う工程を（このような工程の、AMの安定性および/または得られた測定値に対する影響は見積もるのが難しいが）、実施する必要がある。完全なAMに加えて、異なるAM部分ペプチドが生理的に見出され、全体的な生理的工工程において重要な役割を果たしていると考えられるという事実により、有効なイムノアッセイの付与および文献で見られる測

10

20

30

40

50

定値の比較が更に困難になっている。

【特許文献 1】 EP 0622458A2

【特許文献 2】 EP 0656121B1

【特許文献 3】 WO 00/22439

【特許文献 4】 US-A-4822733

【特許文献 5】 EP-B1-180492

【特許文献 6】 EP-B1-539477

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

10

それゆえ、一般的な手法に適しており、AMの直接的な測定の前記妨害要因に実質的に影響を受けず、様々な病気の状態（特に、敗血症、または、増加したAM値が観察される他の病気の状態）においてAMおよび/またはその前駆体の生理的産生のための信頼性ある値を求めることができる有効な方法を供給することが、出願人の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明にしたがって、AMまたは現在までに研究されている他のpre-proAM部分ペプチドの代わりに、pre-proAMのアミノ酸42-95を含む中間部分ペプチド（配列番号：3）を、診断目的のために測定するならば、この目的は達成される。この測定は、特に好ましくは、標識した抗体を用いたイムノアッセイを使用して行われる。

20

【0016】

請求項1は、本発明の主要部を表す。

【0017】

本発明の有用で、現在のところ好ましい実施態様は、下位請求項に記載する。

【0018】

様々な病気の状態（特に、敗血症だけでなく、例えば、心臓病、高血圧病または癌、あるいは、増加したAMレベルが観察される他の病気）における、AMの形成またはその前駆体産生物または副産物を確実に測定するアッセイ方法を供給する目的を達成するために、一方で、敗血症の間に増した「プロアドレノメデュリンの免疫反応性」の結果（WO 00/22439に記載されている）を、あまり期待できる結果でないにもかかわらず、基礎として用いた。一方、様々な新規のアッセイを使用して、敗血症、癌および心臓病の患者の血清の測定を用いた追加の包括的な臨床研究を行ったところ、驚くべきことに、実質的に改良された有効性を有する測定値が得られた。

30

【0019】

行った実験およびこれらの実験の最も重要な結果は、図面を参照にしながら、より詳細に以下に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明に導かれる発明に関連して、様々な病気で測定されるスピーシーズの特性に関する問題点、または、AM/proAM測定に特に適したスピーシーズの選択に関する問題点は、主要な重要事項である。RIAは、基本的に、この問題点に関する価値ある知識をもたらすのにあまり適しておらず、その上、様々な理由で、RIAは一般的な測定に適したアッセイを供給する開発目的にはあまり有望でないと思われるので、最初に新規のアッセイ（標識抗体を使用することができるタイプのイムノアッセイ）を開発する必要がある。

40

【0021】

敗血症においてプロアドレノメデュリンの免疫活性の値の増大（WO 00/22439による測定）が、実際に、試験サンプルのプロアドレノメデュリン濃度の増大に反映しているかどうかに関する疑問を調べるにおいて、サンドイッチアッセイを最初に開発した。このサンドイッチアッセイは、前記アッセイデザインに基づいて、AMを認識することができずAMを含まないpre-proAM部分ペプチドも認識することができない点で、実質的にプロアドレノ

50

メデュリン（22-146または22-185）に特異的である。

【0022】

このサンドイッチアッセイでは、ペプチド（69-86：ペプチドレンジSPCD19；配列番号：4）のアミノ酸配列、または、ペプチド（129-147：C末端AMペプチド）を特異的に認識する2つの異なる抗体を用いた。使用した標準物質は、市販の競合AMアッセイでキャリブレーションした完全なリコンビナントプロアドレノメデュリン（22-185）であった。

【0023】

敗血症の患者の血清および健康な通常のヒトの血清の測定においては、このサンドイッチアッセイを用いても、約40pg/mlの検出限界よりも高い測定値は得られなかった（結果は示さない）。これらの知見から、敗血症の場合に見られる増加したproAM免疫活性の増大は、サンプル中のプロアドレノメデュリンペプチドの存在が原因でないという結論に達する必要がある。

10

【0024】

より早期の測定における比較的になぜかに増加した（約2倍）「proAM免疫活性測定値」が正しかったかどうか、または、用いた市販のRIAが原因の人為的産物がこれらの測定において何らかの役割を果たしているかどうかに関する疑問を更に調べるために、いわゆるSPALTの原則に基づいた更なるアッセイを開発した。このようなアッセイにおいては、分析物（「抗原(antigen)」=A）のための固相に結合した（固相(solid phase)=SP）競合物と分析物との間の競合（反応液に存在する標識抗体が認識する共通の結合部位における競合）を利用する。このような場合、抗体は、発光トレーサー（luminescence tracer (L T)、cf.実験セクション）で標識した。分析物の存在すなわち、サンプル中の競合する結合パートナーによる抗体の結合部位の占有は、固相への標識抗体の結合の減少として明らかである。

20

【0025】

本明細書で記載のSPALTアッセイにおいて使用する固相に結合した競合物は、固相結合ペプチド（69-86：ペプチドレンジSPCD19；配列番号：4）であり、使用した抗体は、前記ペプチドに対して調製され、前記ペプチドを認識する標識抗-SPCD19-ヒッジ抗体（アフィニティ精製；cf.実験セクション）であった。用いた標準は、通常のウマ血清のペプチドSPCD19の希釈液を含む。検出限界は、約50pmol/lであった。この測定において、それぞれの場合、100μlのサンプル（標準）および100μlのトレーサーを、SPCD19ペプチドでコートしたPolysorbチューブ内で4℃で、一晩インキュベートし、その後、出願人のLUMItest（登録商標）の標準洗浄溶液1mlで四回洗浄し、ルミノメーターで測定した。

30

【0026】

このSPALTアッセイによる敗血症の測定により、敗血症患者と健康な通常のヒトとの間の劇的な違いが見られた。約1ng/mlの検出限界において、敗血症の患者の血清では、平均で約19000pg/mlの値を示した。市販のRIA（W0 00/22439）を用いた予備実験ではわずかな増加であったことから、敗血症の患者の血清と健康なヒトの血清との間の実質的な違いは、大変驚くべきことであった。

【0027】

前記SPALTアッセイを用いることによって、臨床用の測定にも拡張できた。この拡張した研究の結果を、図1にグラフとして要約する。図1の説明を参照せよ。

40

【0028】

SPALTアッセイを用いた前記の肯定的な結果により、

(i)敗血症の血清で求めた「proAM免疫活性」は、実際のプロアドレノメデュリンの存在が原因ではない、しかし、

(ii)pre-proAMの中間断片に由来するアミノ酸配列（より正確には配列番号：3で示されるmid-proAM）を有する分析物の対応する測定が、敗血症患者と通常のヒトを区別するのに明確に適している、

ことが示された。

【0029】

50

これらの結果に基づき、この研究を、以下の2つの方向へと拡張した。

1. 血液中に実際に生じるpre-proAMの種類を同定し、場合によっては、一般的な方法のためのバイオマーカーとしての適用性に関して研究する。
2. 同時に、これらの物質の測定が、診断的に有用な測定結果をもたらす程度を更に研究する。

【0030】

その結果を、実験セクションを参考に、以下により詳細に記載する。それらは、以下のようによ約することができる。

1. pre-proAMのアミノ酸45-92（配列番号：3）を含むペプチド、またはこのアミノ酸からなるペプチド（この出願人によってmid-proAMと命名されたペプチド）は、血液（血清、血漿）において有意に増加した濃度で存在し、それは良好な再現性を有していた。
2. このmid-proAMを特異的に測定するアッセイを用いて患者の血清を測定することにより、敗血症の患者と通常のヒトとの間を明瞭に区別できるだけでなく、一臨床的な知見と組み合わせてAMの増加と関連する他の病気（特に心臓病および癌）も検出できる測定結果が得られる。

【0031】

それゆえ、この方法は、特に、患者の血液中の（特に血漿サンプルを用いた）mid-proAMの測定に関する。

【0032】

本発明の好ましい実施態様のある一般的な側面も以下により詳細に説明する。そして、更に選択した実験結果をより詳細に説明する。

【0033】

本発明の実際の実施のためには、標識抗体を使用するアッセイフォーマットが好ましい。例えば、前記した競合的なSPALTの原則に従って行うアッセイ（しかしながら、他の標識、例えばSPARTアッセイの形態における放射性標識も使用することができる）である。

【0034】

しかしながら、非競合のサンドイッチアッセイ、例えば、更により広範囲な研究のために使用される、以下により詳細に記載するタイプのアッセイが、特に好ましい。

【0035】

競合イムノアッセイと比較して、非競合サンドイッチアッセイ（2サイドイムノアッセイ）は、固相アッセイ（ヘテロジニアス・アッセイ）よりも良好にデザインすることができ、ハンドリングの点でより丈夫にすることができ、より高感度の測定結果を得ることができ、オートマチック化および連続測定により適しているという事項を含む多くの利点を有する。更にその上、非競合サンドイッチアッセイは、1つのタイプの抗体しか用いない競合イムノアッセイと比較して、更なる情報も得ることができる。それは、サンドイッチイムノアッセイが認識するのは、サンドイッチ形成のために用いた複数の抗体の結合部位が、同じ分子上に存在する分子またはペプチドだけであるからである。

【0036】

抗体は、基本的に、任意の適したモノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体とすることができるが、今のところ、アフィニティ精製したポリクローナル抗体が好ましい。特に好ましくは、一方の抗体が、pre-proAMのアミノ酸69-86およびN末端に付加的なシステイン残基を有する合成ペプチド配列（配列番号：4）を含む抗原で、動物（特にヒツジ）を免疫することによって得られる。従って、他方の抗体は、例えば、N末端に付加的なシステイン残基を有するpre-proAMのアミノ酸83-94（ペプチドレンジPSR13；配列番号：5）を有する合成ペプチド配列を含む抗原を用いて得ることができる。proAM配列の中間領域の連続断片をカバーしている前記合成ペプチドを用いて得られた抗体は、前記mid-proAM（アミノ酸45-92）の領域中の結合部位しか、より正確には、pre-proAMのアミノ酸60-92の領域中の結合部位しか認識しない。

【0037】

好ましい実施態様においては、この方法は、一方の抗体が、任意の望む固相上、例えば

10

20

30

40

50

コートしたテストチューブ（例えばポリスチレンのチューブ；「Coated Tubes；CT」）またはマイクロタイタープレート（例えばポリスチレンのプレート）の壁、もしくは粒子上（例えばマグネティック粒子）に固定され、対して、他方の抗体が、直接検出可能な標識を有する残基、または、選択的に標識に結合して形成されたサンドイッチ構造を検出することができる残基を有するような、ヘテロジニアス・サンドイッチイムノアッセイとして実施される。適した固相を用いた、遅れてその後に行う固定化も可能である。

【0038】

基本的に、記載したタイプのアッセイにおいて使用される全ての標識手法を使用することができる。この手法は、放射性同位体、酵素、蛍光、化学発光または生物発光標識、および、いわゆるポイント・オブ・ケア（POC）またはクイックテストのために用いられる、直接的に任意に検出可能な色素標識（例えば金原子および色素粒子）を含む。ヘテロジニアス・サンドイッチイムノアッセイの場合、2つの抗体は、ホモジニアス・アッセイに関する以下に記載のタイプの検出システムのパーツを有することができる。

10

【0039】

それゆえ、本発明は、また、本発明による方法のクイックテストとしての企図に関する。

【0040】

本発明の方法は、更にその上、2つの抗体および検出されるべきmid-proAMから形成されるサンドイッチ複合体が、液相に存在し続けるようなホモジニアスな方法としてデザインされることができる。この場合、両方の抗体が1つのサンドイッチとして一体化した場合に、シグナル産生またはシグナル誘導を導くことができる検出システムのパーツで、両方の抗体を標識することが好ましい。このような方法は、特に、蛍光増幅または蛍光消光検出方法としてデザインすることができる。このタイプの特に好ましい方法は、例えば、US-A-4822733、EP-B1-180492またはEP-B1-539477およびこれらに引用されている周知技術に記載されているような、ペアを組んで使用される検出試薬の使用に関する。これらの試薬によって、1つの免疫複合体中に両方の標識された構成要素を含んでいる反応産生物のみを、反応混合液中から直接、選択的に検出する測定を行うことができる。例えば、前記出願の方法を使用しているTRACE（登録商標）（Time Resolved Amplified Cryptate emission）およびKRYPTOR（登録商標）によって提供される方法を参照せよ。

20

【0041】

驚くべきことに、本発明によって、mid-proAM（配列番号：3）の検出によって、非常に有意な測定結果が得られることを見出した。以下に示すように、この言質は、敗血症の診断だけでなく、心臓病の診断および癌診断にも適用される。

30

【0042】

本発明による測定方法は、特に、いわゆる複合パラメーター診断の過程での、特に心臓病診断の領域および癌診断の領域における実施にも有用であることができると想定される。さらに、測定されるパラメーターは、例えば、心臓病のパラメーターANP、BNP、proANPまたはproBNP、もしくは例えば抗ガングリオシド抗体、タンパク質プロカルシトニン、CA125、CA19-9、S100B、S100Aタンパク質、LASP-1、可溶性サイトケラチンフラグメント、特にCYFRA21、TPSおよび/または可溶性サイトケラチン-1フラグメント(sCY1F)、ペプチドインフラミンおよびCHP、他のペプチドプロホルモン、グリシン-N-アシルトランスフェラーゼ（GNAT）、カルバモイルホスフェートシンターゼ1（CPS1）およびC-反応性タンパク質（CRP）またはこれらのフラグメントからなる群から選択される敗血症のパラメーターである。前記複合パラメーターの場合、複数のパラメーターの測定結果を同時にまたは並行して測定し、例えば、臨床的に有意なパラメーターの相関関係を利用するコンピュータープログラムを用いて、それらを評価することが企図される。

40

【0043】

好ましいアッセイの構成要素の調製、サンドイッチタイプのアッセイの好ましい実施態様の方法、ならびに、このようなアッセイを用いて得られるコントロールのヒトおよび敗血症の患者、心臓病の患者および癌患者のEDTA血漿中のmid-proAMの測定結果を記載する

50

ことによって、本発明を以下により詳細に説明する。

【0044】

更にその上、実際に測定した血液中に存在するproAM部分ペプチドの同定を記載する。

【実施例】

【0045】

(実験セクション)

(対象と方法)

<1. ペプチド合成>

既知のヒトのプレプロアドレノメデュリン(配列番号: 1)のアミノ酸配列から、第一の範囲(Pos. 69-86: ペプチドレンジSPCD19; 配列番号: 4)および第二の範囲(Pos. 83-94: ペプチドレンジPSR13; 配列番号: 5)を選択した。それぞれの場合においてN-末端にシステイン残基を付け足して、両方の範囲を可溶性ペプチドとして標準的な方法によって化学的に合成し、精製し、質量分析および逆相HPLCを用いて品質管理を行って、一定分量で凍結乾燥した(JERINI AG, Berlin, Germany)。ペプチドのアミノ酸配列は: ペプチドSPCD19: CRPQDMKGASRSPEDSSPD(配列番号: 4) ペプチドPSR13: CSSPDAARI RVKR(配列番号: 5) である。

【0046】

加えて、完全なmid-proAM(Pos. 45-92; 配列番号: 3)を、標準として合成した: ELRMSSSYPTGLADVKAGPAQTLIRPQDMKGASRSPEDSSPDAARIRV(配列番号: 3)。

【0047】

<2. コンジュゲートの調製および免疫>

前記ペプチドSPCD19およびPSR13を、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、キャリアタンパク質KLH(スカシ貝ヘモシアニン; keyhole limpet hemocyanin)に結合させた(cf. PIERCE, Rockford, IL, USAの取扱説明書「N IH ester maleimide crosslinkers」を使用)。これらのコンジュゲートを用いて、ヒツジを以下のスキームに従って免疫した: それぞれのヒツジに、最初に100μgのコンジュゲート(コンジュゲートのペプチド画分に基づく質量データ)を与え、その後、4週間間隔で、それぞれ50μgのコンジュゲート(コンジュゲートのペプチド画分に基づく質量データ)を与えた。免疫を開始してから4ヶ月から、700mlの血液を、4週間間隔でヒツジから取り出し、遠心することにより血液から抗血清を得た。コンジュゲートの調製、免疫及び抗血清の取得は、Micropharm, Carmarthenshire, UKによって行われた。

【0048】

<3. 抗体の精製>

1つの工程の方法において、免疫後4ヶ月して得られた抗血清から、ペプチド特異的抗体を調製した。

【0049】

この目的のため、最初に、前記のペプチドSPCD19およびPSR13を、SulfoLink Gelに結合させた(cf. 製品の取扱説明書PIERCE, Rockford, IL, USAの「SulfoLink Kit」)。それぞれの場合において、結合のために、ゲル5ml当たり5mgのペプチドを用いた。

【0050】

両方のペプチドに対するヒツジの特異的な抗体のアフィニティ精製は、以下の方法で行った。

【0051】

ペプチドカラムを、最初に、交互に3回、10mlの溶出バッファー(50mMクエン酸、pH2.2)および結合バッファー(100mMリン酸ナトリウム、0.1% Tween、pH6.8)を用いて洗浄した。100mlのヒツジ抗血清を、0.2μmフィルターに通し、カラム物質と混合した。この目的のため、ゲルは、10mlの結合バッファーを用いて定量的にリンスしておいた。インキュベーションは、一晚室温で攪拌しながら行った。その後、そのバッチを、定量的に空のカラム(NAP 25, Pharmacia, emptied)へと移した。流れ出した物質は捨てた。その後、タンパ

ク質を含まない250mlの結合バッファーを用いて洗浄した（洗浄の際の溶出液のタンパク質含量は、0.02より小さい280nmの吸光度を示した）。溶出バッファーを洗浄したカラムに加えて、1mlフラクションを集めた。各フラクションのタンパク質含量は、BCA方法によって求めた（cf. PIERCE, Rockford, IL, USAの取扱説明書）。タンパク質の濃度が0.8mg/mlより多いフラクションをプールした。BCA方法を用いてプールしたタンパク質を求めたところ、抗-SPCD19抗体（アフィニティ精製；ポリクローナル）としては49mgの収率および抗-SPR13抗体（アフィニティ精製；ポリクローナル）としては60mgの収率で得られた。

【0052】

<4. 標識>

取扱説明書に従って、500 μ lの精製した抗-SPCD19抗体（前記を参照）を、1mlの100mMリン酸カリウムバッファー（pH8.0）中で再緩衝化した。抗体溶液のタンパク質濃度を求めたところ、1.5mg/mlの値であった。

【0053】

化学発光マーカを結合させた抗体を供給するために、10 μ lのMA70アクリジニウムNHSエステル（1mg/ml;HOECHST Behring）を67 μ lの抗体溶液に加えて、15分間室温でインキュベートした。その後、423 μ lの1Mグリシンを加えて、更に10分間インキュベートした。更にその後、取扱説明書に従って、標識反応を行ったバッチを、移動相A（50mMリン酸カリウム、100mM NaCl、pH7.4）を用いて、NAP-5ゲルろ過カラム（Pharmacia）に供し、低分子量成分を除いた。抗体に結合しなかった標識成分の最終的な成分を取り除くために、ゲルろ過HPLCを行った（カラム：Waters Protein Pak SW300）。サンプルをアプライし、移動相Aを用いて、流速1ml/minでクロマトグラフィーを行った。フローフォトメーターを用いて、連続的に、280nm及び368nmの波長を測定した。抗体の標識された程度としての368nm/280nmの吸光度比は、ピークで0.10であった。抗体を含むモノマーフラクション（リテンションタイム：8-10分）を集め、3mlの100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%アザイド、pH7.4中に加えた。

【0054】

標識した抗体を、以下により詳細に示すように、サンドイッチイムノアッセイの一方に使用し、もう一方を既に記載したSPALTアッセイに使用した。

【0055】

<5. カップリング>

本発明によるサンドイッチイムノアッセイの固相の調製のために、照射殺菌5mlポリスチレンチューブ（Greiner）を、以下のように、精製した抗-PSR13抗体でコートした：抗体を、50mM Tris、100mM NaCl、pH7.8で希釈し、濃度を6.6 μ g/mlとした。300 μ lのこの溶液を、それぞれのチューブにピペッティングした。その後、チューブを20時間、22°Cでインキュベートした。溶液を吸引して除去した。その後、それぞれのチューブを4.2mlの10mMリン酸ナトリウム、2% Karion FP、0.3%ウシ血清アルブミン、pH6.5で満たした。20時間後、溶液を吸引して除去した。最後に、チューブを、真空乾燥機内で乾燥させた。

【0056】

記載した標識および固定化方法は、また、他の抗体でも実質的に同じように行い、「インバース」サンドイッチアッセイを得た。このような「インバース」標識/固定イムノアッセイを用いて以下のように同じように行った測定では、実質的に同一の結果が得られ、それゆえ、更に記載しない。

【0057】

<6. サンドイッチイムノアッセイの実施およびその評価>

以下の組成を有するアッセイバッファーを測定に用いた：

100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、5%ウシ血清アルブミン、0.1%非特異的ヒツジIgG、0.1%アジ化ナトリウム、pH7.4。

【0058】

用いた標準物質は、化学的に合成したmid-proAM（配列番号：3）であった。このペプチドを連続して標準ウマ血清（SIGMA）を用いて希釈した。このように調製した標準をペ

10

20

30

40

50

プチドのサンプル重量の濃度とした。

【0059】

明らかに健康なヒトのEDTA血漿、敗血症の患者のEDTA血漿および心臓病の患者のEDTA血漿および癌患者のEDTA血漿を、サンプルとして測定した。

【0060】

10 μ lの標準またはサンプルおよび200 μ lのアッセイバッファー（1ミリオンRPU（relative light units：相対発光量）のMA70標識抗-SPCD19抗体を含む）を、テストチューブへとピペティングした。2時間22°Cで攪拌しながらインキュベートした。その後、チューブ当たり1mlの洗浄溶液（0.1% Tween20）で4回洗浄し、洗浄液を除去し、チューブに結合した化学発光をルミノメーター（BERTHOLD, LB952T; base reagents from BRAHMS AG）で測定した。

10

【0061】

MultiCalc(spline fit)ソフトウェアを用いて、サンプルの中間領域プロアドレノメデュリン濃度を、標準曲線から求めた。結果を図2にグラフで要約する。

【0062】

<7. SPALTイムノアッセイの実施およびその評価>

SPALTで使用する固相に結合した競合物は、固相に結合したペプチドSPCD19（ペプチドレンジ69-86；配列番号：4）であった。このペプチドはPolysorbチューブの壁に結合している。用いた抗体は、前記1.から4.の記載で得られた標識抗-SPCD19ヒツジ抗体（アフィニティ精製）であった。標準ウマ血清中でのペプチドSPCD19の希釈液を標準として用いた。

20

【0063】

測定においては、それぞれの場合において、100 μ lのサンプル（または標準）および100 μ lのトレーサーを、一晚4°Cで、SPCD19ペプチドでコートしたPolysorbチューブ中でインキュベートし、その後、出願人のLUMitest（登録商標）の標準洗浄溶液1mlで4回洗浄した。その後、ルミノメーターで測定した。

【0064】

このアッセイを用いて得られた測定結果を図1に示す。

【0065】

<8. 前記したアッセイで測定した分析物の同定>

30

前記したアッセイで使用した抗体によって認識される分析物のために、3つの個々の敗血症の血漿を、C18逆相HPLCを用いてアセトニトリルのリニアなグラジエントによって溶出させることによって、分析的に直接フラクションに分けた。1mlのフラクションを集めて、乾燥させた。フラクションをアッセイバッファー中に加え、それぞれのフラクションのSPCD19免疫活性を求めた。この目的のために、抗-SPCD19抗体（cf. 3.）をPolysorbチューブの壁上に固定し、サンプル（フラクション）および発光標識SPCD19の抗体に対する競合を求めた。

【0066】

このような分析により、全ての敗血症のサンプルにおいて、最も大きな免疫活性は同じフラクション（フラクション22）に見られることが見出された。

40

【0067】

測定した分析物の更なる同定のために、7つの敗血症血清を約3mlずつプールした（最終的な容量：22ml）。抗-SPCD19抗体を結合させたCarbolinkカラムを用いて、プールした血清をアフィニティ精製に供し、酸溶出液を、前記のように、C18逆相HPLCを用いてフラクションに分けた。フラクション22を乾燥させて、質量分析によって調べた。

【0068】

直接質量分析によって、約5146ダルトンの値が、単離した分析物の分子量として求めた。この値は、アミノ酸部位45-92に対応するproAMフラグメント、すなわちmid-proAMの分子量に対応する（理論値は5146.72ダルトンであり、存在する2つのメチオニン残基が酸化されていると考えられる）。

50

【0069】

単離したフラクション22のトリプシン分解物のMALDI-TOF分析によって、とりわけ、pre-proAMのアミノ酸部位79-89、75-89、61-74および61-78に対応するペプチドフラグメントが、モノアイソトピック質量 ($M+H^+$) として同定された。分子量データおよびトリプシン分解物の質量分析によって、単離したフラクション中に存在するペプチドがmid-proAM(45-92)として示されるペプチド（配列番号：3）であることが証明された。この形成は、シグナルペプチダーゼ、プロホルモン転換酵素（塩基性アミノ酸の間を切断）ならびにアミノ-およびカルボキシ-ペプチダーゼ（塩基性アミノ酸の切除）による、元のpre-proAM翻訳産物のタンパク質プロセッシングによって説明することができる（cf. (20)のプロカルシトニン分解の類似のスキーム）。

10

【0070】

<9. 安定性の研究>

サンプルまたは測定溶液中のmid-proAMの不十分な安定性のために、mid-proAMの測定において問題が生じるという疑問を説明するために、20の敗血症の血清を、それぞれ、調製直後の状態で、および、室温で3日間保存後に測定した。結果を以下の表に要約する。この結果により、免疫活性が、3日間の保存後で変化しないことが示された。このことから、mid-proAMの安定性が、診断を行うという側面において、大きな利点を有していることが証明された。

【0071】

【表 1】
表 1

患者 #	mid-proAM [nmol/l] 日数=0	mid-proAM [nmol/l] 日数=3	変化	
1	6.2	6.1	98.8%	
2	3.3	3.2	98.1%	10
3	2.2	2.1	97.0%	
4	1.6	1.5	95.4%	
5	1.1	1.0	92.7%	
6	1.3	1.2	95.7%	
7	1.9	2.1	109.6%	
8	2.6	2.7	102.8%	
9	2.8	2.7	96.4%	
10	3.1	3.1	99.9%	20
11	4.6	4.9	106.3%	
12	5.8	5.9	102.1%	
13	3.6	3.4	95.2%	
14	4.2	4.6	110.7%	
15	3.0	2.4	80.0%	
16	1.2	1.3	105.5%	
17	1.5	1.5	102.2%	
18	1.7	1.8	103.4%	30
19	2.0	1.8	89.5%	
20	2.1	2.0	94.1%	
平均値=98.8%				

【 0 0 7 2 】

まとめると、例えばSPCD19抗体を用いた、mid-proAMの測定は、例えばAMの測定において多くの利点を有する：

mid-proAMの測定は、結合タンパク質の存在、断片化の存在、および弱い濃度動態の存在という任意の既知の制限を受けることはない。

【 0 0 7 3 】

更にその上、分析物mid-proAMは、良好な安定性を有している、すなわち、室温での保存の間にほとんど免疫活性を失わない。これは、診断の一般的測定における大きな実際的な利点である。

【 0 0 7 4 】

極めて有利な動態が観察され、このことは敗血症に特異的である想定されるわけではない。

【 0 0 7 5 】

それゆえ、mid-proAMの測定が、一般的に、AM濃度の増加を表す全ての臨床診断に有用性を有していると考えられる。現在、敗血症、心臓病および癌の診断における測定が、特に有用であることが明らかである

10

20

30

40

50

[参考文献]

1. K. Ehlenz et al.: "High levels of circulating adreno-medullin in severe illness: Correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin", *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (1997) 105, 156-162
2. Tanenao Eto: "A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides", *Peptides* (2001) 22, 1693-1711 10
3. Joy Patricia Hinson et al.: "Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide", *Endocr. Rev.* (2000) 21(2), 138-167
4. Yukio Hirata et al.: "Increased circulating adreno-medullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1996) Vol. 81, Nr. 4, 1449-1453 20
5. K. Kitamura et al.: "The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 244(2), 551-555 30
6. Kazuo Kitamura et al.: "Adrenomedullin (11-26): a novel endogenous hypertensive peptide isolated from bovine adrenal medulla", *Peptides* (2001) 22, 1713-1718
7. M. Kohno et al.: "Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension", *Hypertension* (1996) 27(1), 102-107 40

8. K. Kuwasako et al.: "Purification and characterization of PAMP-12 (PAMP-20) in porcine adrenal medulla as a major endogenous biologically active peptide", FEBS Lett (1997) 414(1), 105-110
9. K. Kuwasako et al.: "Increased plasma proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in patients with essential hypertension", Ann. Clin. Biochem. (1999) 36 (Pt 5), 622-628 10
10. Lynley K. Lewis et al.: "Adrenomedullin(1-52) measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage", Clin. Chem. (1998) 44:3, 571-577
11. Rubén Pío et al.: "Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners", J. Biol. Chem. (2001) Vol. 276, Nr. 15, 12292-12300 20
12. Kazuhiro Takahashi: "Adrenomedullin: from a pheochromocytoma to the eyes", Peptides (2001) 22, 1691
13. Yoshio Tomoda et al.: "Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells", Peptides (2001) 22, 1783-1794 30
14. T. Tsuruda et al.: "Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells", Life Sci. (2001) 69(2), 239-245
15. Shiro Ueda et al.: "Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome", Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1999) Vol. 160, 132-136 40
16. Ping Wang: "Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis", Peptides (2001) 22, 1835-1840

17. H. Washimine et al.: "Plasma concentration of human adrenomedullin in patients on hemodialysis", Clin. Nephrol. (1995) 44(6), 389-393
18. K. Kitamura et al.: "Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated From Human Pheochromocytoma"; Biochem.Biophys.Res.Comm. 192:553-560 (1993)
19. K. Kitamura et al.: "Cloning And Characterization of cDNA Encoding a Precursor for Human Adrenomedullin"; Biochem.Biophys.Res.Comm. 194:720-725 (1993)
20. Meisner M., (2000) "Procalcitonin", Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-105473-5, S.22

10

【図面の簡単な説明】

【0076】

20

【図1】図1は、敗血症の患者の110の血清の測定結果、および、多発外傷の患者の20の血清と比較した、109人の健康な通常のヒトの血清中のmid-proAMの測定結果を示す。全ての測定は、より詳細に実施例で記載するように、SPALTアッセイ方法によって行った。プロカルシトニンおよび他の炎症性マーカーと対照的に、敗血症の患者の値だけが増加し（健康なヒトの値33 pmol/lと比較して、約550 pmol/lおよび550 fmo/lという高い濃度）、多発性外傷の患者の値は増加しないことは注目に値する。

【図2】図2は、より詳細に実施例で記載するサンドイッチアッセイを使用した、274人の健康な通常のヒト、267人の敗血症の患者、20人の心臓病の患者および49人の癌患者の血清中のmid-proAMの測定結果を示す。

【図 1】

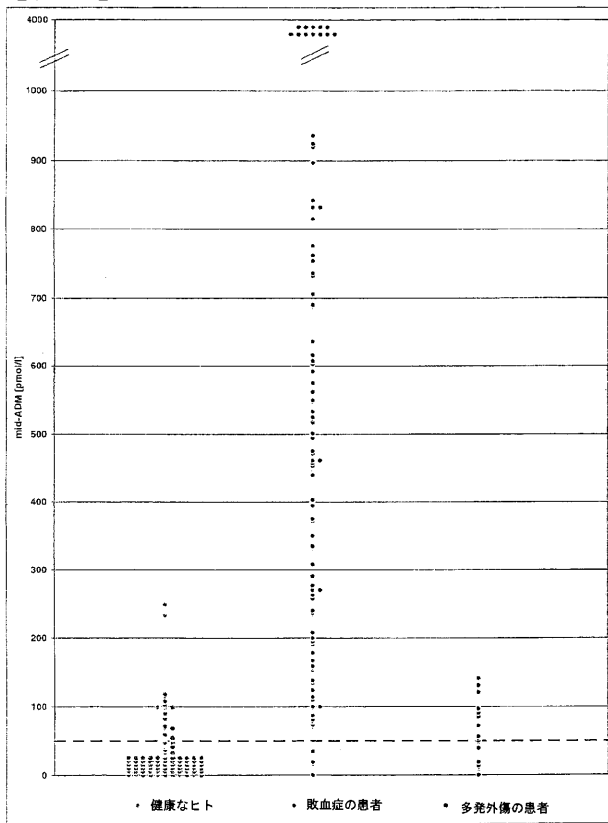


Figure 1

【図 2】

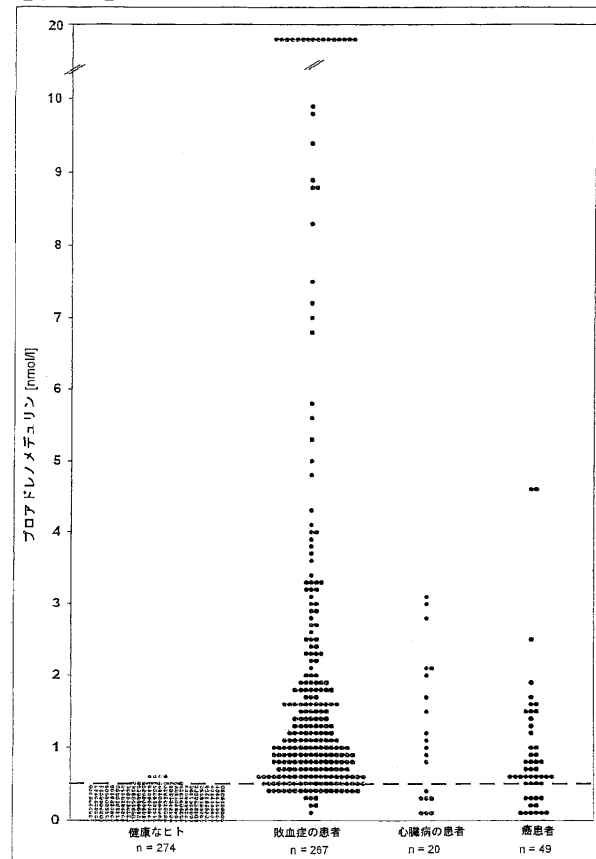


Figure 2

【配列表】

2006523302000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/000806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 G01N33/74 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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, WPI Data, PAJ, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ; WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM (DE) 20 April 2000 (2000-04-20) cited in the application claims 1,2	1-18
A	WO 00/69900 A (CONJUCHEM INC ; HOLMES DARREN L (CA); BRIDON DOMINIQUE P (CA); THIBAUD) 23 November 2000 (2000-11-23) SEQ ID NO: 939	1-18
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 May 2004		07 07 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:

Although claims 1 to 18 include diagnostic methods practised on the human or animal body, the search was carried out and was based on the parts of the claims that relate to *in vitro* methods.
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/000806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0022439 A	20-04-2000	DE 19847690 A1	20-04-2000
		WO 0022439 A2	20-04-2000
		EP 1408334 A1	14-04-2004
		EP 1121600 A2	08-08-2001
		JP 2002527753 T	27-08-2002
WO 0069900 A	23-11-2000	AT 252601 T	15-11-2003
		AT 226593 T	15-11-2002
		AU 764103 B2	07-08-2003
		AU 4774800 A	05-12-2000
		AU 754770 B2	21-11-2002
		AU 4855500 A	05-12-2000
		AU 761591 B2	05-06-2003
		AU 5027100 A	05-12-2000
		AU 765753 B2	25-09-2003
		AU 5139300 A	05-12-2000
		BR 0010750 A	26-02-2002
		BR 0010757 A	19-02-2002
		CA 2363712 A1	23-11-2000
		CA 2372338 A1	23-11-2000
		CA 2373252 A1	23-11-2000
		CA 2373680 A1	23-11-2000
		CN 1350548 T	22-05-2002
		CN 1351611 T	29-05-2002
		DE 60000665 D1	28-11-2002
		DE 60000665 T2	26-06-2003
		DE 60006100 D1	27-11-2003
		DE 60006100 T2	01-07-2004
		DK 1180121 T3	01-03-2004
		EA 3922 B1	30-10-2003
		EP 1171582 A2	16-01-2002
		EP 1180121 A1	20-02-2002
		EP 1179012 A1	13-02-2002
		EP 1105409 A2	13-06-2001
		EP 1264840 A1	11-12-2002
		ES 2185595 T3	01-05-2003
		WO 0070665 A2	23-11-2000
		JP 2003508350 T	04-03-2003
		JP 2002544287 T	24-12-2002
		JP 2003527312 T	16-09-2003
		JP 2003500341 T	07-01-2003
		NO 20015584 A	03-01-2002
		PT 1180121 T	31-03-2004
		SI 1180121 T1	30-04-2004
		WO 0069911 A1	23-11-2000
		WO 0069900 A2	23-11-2000
		WO 0069902 A1	23-11-2000
		US 6329336 B1	11-12-2001
		US 2002049153 A1	25-04-2002
		ZA 200106676 A	19-07-2002
		ZA 200109110 A	13-06-2002
		US 2003108567 A1	12-06-2003
		US 2003108568 A1	12-06-2003
		US 6514500 B1	04-02-2003

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/000806

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/574 G01N33/74 G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPQ-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00/22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ; WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM (DE) 20. April 2000 (2000-04-20) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,2	1-18
A	WO 00/69900 A (CONJUCHEM INC ; HOLMES DARREN L (CA); BRIDON DOMINIQUE P (CA); THIBAUD) 23. November 2000 (2000-11-23) SEQ ID NO: 939	1-18
☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. Mai 2004		07. 07. 2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/000806

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-18 Diagnostizierverfahren, die am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen werden, mit einschliessen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die Teile der Ansprüche, die sich auf die Verfahren in vitro beziehen.
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/000806

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0022439 A	20-04-2000	DE 19847690 A1	20-04-2000
		WO 0022439 A2	20-04-2000
		EP 1408334 A1	14-04-2004
		EP 1121600 A2	08-08-2001
		JP 2002527753 T	27-08-2002
WO 0069900 A	23-11-2000	AT 252601 T	15-11-2003
		AT 226593 T	15-11-2002
		AU 764103 B2	07-08-2003
		AU 4774800 A	05-12-2000
		AU 754770 B2	21-11-2002
		AU 4855500 A	05-12-2000
		AU 761591 B2	05-06-2003
		AU 5027100 A	05-12-2000
		AU 765753 B2	25-09-2003
		AU 5139300 A	05-12-2000
		BR 0010750 A	26-02-2002
		BR 0010757 A	19-02-2002
		CA 2363712 A1	23-11-2000
		CA 2372338 A1	23-11-2000
		CA 2373252 A1	23-11-2000
		CA 2373680 A1	23-11-2000
		CN 1350548 T	22-05-2002
		CN 1351611 T	29-05-2002
		DE 60000665 D1	28-11-2002
		DE 60000665 T2	26-06-2003
		DE 60006100 D1	27-11-2003
		DE 60006100 T2	01-07-2004
		DK 1180121 T3	01-03-2004
		EA 3922 B1	30-10-2003
		EP 1171582 A2	16-01-2002
		EP 1180121 A1	20-02-2002
		EP 1179012 A1	13-02-2002
		EP 1105409 A2	13-06-2001
		EP 1264840 A1	11-12-2002
		ES 2185595 T3	01-05-2003
		WO 0070665 A2	23-11-2000
		JP 2003508350 T	04-03-2003
		JP 2002544287 T	24-12-2002
		JP 2003527312 T	16-09-2003
		JP 2003500341 T	07-01-2003
		NO 20015584 A	03-01-2002
		PT 1180121 T	31-03-2004
		SI 1180121 T1	30-04-2004
		WO 0069911 A1	23-11-2000
		WO 0069900 A2	23-11-2000
		WO 0069902 A1	23-11-2000
		US 6329336 B1	11-12-2001
		US 2002049153 A1	25-04-2002
		ZA 200106676 A	19-07-2002
		ZA 200109110 A	13-06-2002
		US 2003108567 A1	12-06-2003
		US 2003108568 A1	12-06-2003
		US 6514500 B1	04-02-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/000806

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:
- a. Art des Materials
- ☒ Sequenzprotokoll
- ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
- b. Form des Materials
- ☒ in schriftlicher Form
- ☒ in computerlesbarer Form
- c. Zeitpunkt der Einreichung
- ☒ in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht
- ☐ bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht
2. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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・ベルクマン

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 ヨアキム・ストルック

ドイツ・1 2 1 6 1・ベルリン・ホルスタイニッシェ・シュトラッセ・2 8

Fターム(参考) 2G054 AA06 GB02

4H045 BA10 CA40 EA50

专利名称(译)	用于诊断目的的生物流体中的中间区肾上腺髓质素原部分区域的测量和用于进行这种测量的免疫测定		
公开(公告)号	JP2006523302A	公开(公告)日	2006-10-12
申请号	JP2006504400	申请日	2004-01-29
[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	アンドレアスベルクマン ヨアキムストルック		
发明人	アンドレアス・ベルクマン ヨアキム・ストルック		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N21/78 C07K14/47 G01N33/574 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/574 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/577.B G01N21/78.C C07K14/47		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/GB02 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	10316583 2003-04-10 DE		
其他公开文献	JP4602321B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测定生物体液中肾上腺髓质素免疫反应性的方法，用于诊断目的，特别是用于诊断败血症，心脏病和癌症，其中完整的前肾上腺髓质素原（pre-proAM; 包含氨基酸（45-92）的原肾上腺髓质素（mid-proAM; SEQ ID NO：1）的中间区域部分肽，SEQ ID NO：3），特别是通过用至少一种特异性识别中间proAM序列的标记抗体进行的免疫测定方法。

