

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-227095

(P2011-227095A)

(43) 公開日 平成23年11月10日(2011.11.10)

(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 B	4 H O 4 5
CO 7 K 7/16 (2006.01)	CO 7 K 7/16 Z N A	

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2011-168242 (P2011-168242)	(71) 出願人	501154389
(22) 出願日	平成23年8月1日 (2011.8.1)		ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ゲ
(62) 分割の表示	特願2007-526400 (P2007-526400)		ーエムペーハー
原出願日	平成17年8月19日 (2005.8.19)		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスド
(31) 優先権主張番号	04019732.9	(74) 代理人	100108453
(32) 優先日	平成16年8月19日 (2004.8.19)		弁理士 村山 靖彦
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(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	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コペプチンを使用する疾患の診断方法

(57) 【要約】

【課題】 バソプレッシンの低いin vivoの安定性、及び血小板への結合及び血小板からの放出に由来して変化する結果のために、バイオマーカーとしての使用は、急速に生じる分解の影響で、最適化されたサンプルの実施条件であっても極端に制限される。

【解決手段】 特に循環器疾患、腎臓疾患、及び肺疾患、並びに敗血症ショックを含むショック、敗血症、及び中枢神経系の疾患/病気、及び神経変性疾患の検出及び早期の検出、診断及び経過のモニタリングのために、特に神経下垂体からのバソプレッシンの放出の非生理学的な変化に相関する疾患と関連してバソプレッシンの放出を定量するための診断マーカーとしてのコペプチンの使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の身体の流動体サンプル中のコペプチン、またはコペプチン免疫反応性を示すコペプチンの生理学的に生じるスプライスパリアント、フラグメント、若しくは翻訳後修飾された形態の量の測定、並びにコペプチンの測定された量またはコペプチン免疫反応性と、疾患の存在及び/または経過及び/または重度及び/または予後との関連付けによる、神経下垂体からのバソプレッシンの放出の非生理学的な変化に関連する、または誘導される疾患の診断及びモニタリングのための *in vitro* 診断方法。

【請求項 2】

前記神経下垂体からのバソプレッシン放出の非生理学的変化に関連する、または誘導される疾患が、循環器疾患、特に慢性若しくはうっ血性心不全、心停止、心臓性ショック、心筋梗塞、急性心筋梗塞、高血圧症、心臓手術；肝硬変；肺疾患、腎多嚢胞病のような腎臓(腎)疾患；尿崩症；低ナトリウム症の形態、不適合抗利尿ホルモン分泌症候群の形態；出血、浮腫形成疾患、炎症性疾患、外傷、火傷、それらの感染性合併症及び敗血症、重度な敗血症、及び敗血症ショック；並びに中枢神経系(CNS)の疾患/病気からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記コペプチン免疫反応性が、配列番号1に存在するアミノ酸配列を認識する第1の特異的な結合物、並びに配列番号2に存在するアミノ酸配列を認識する第2の特異的な結合物を使用するサンドイッチ免疫アッセイを使用して測定することが可能である免疫反応性である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記特異的な結合物がポリクローナル及び/またはモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫アッセイが第1の固定化された特異的な結合物、及び検出可能なラベルを有する、または標識されたマーカー分子との反応によって選択的に標識されることが可能である、第2の可溶化された特異的な結合物を使用するヘテロジニアス免疫アッセイである、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫アッセイがホモジニアス免疫アッセイである、請求項 3 または 4 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記生物学的な流動体が血清、血漿、血液、または脳脊髄液(cerebrospinal fluid ; (CSF))より選択される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記疾患が敗血症、心筋梗塞、慢性心不全、及び動脈の血圧の増大より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

- 配列番号 1 または配列番号 2 に存在する第1のアミノ酸配列を認識する、少なくとも1つの第1の抗体；及び
- 配列番号 1 または配列番号 2 に存在する他の第2のアミノ酸配列を認識する、少なくとも1つの第2の抗体、
- 前記第1または第2の抗体の少なくとも1つは検出可能なラベルを有する、
を含む、免疫アッセイのための試薬を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

40

【請求項 10】

前記第1または第2の抗体の1つが表面上に固定化される、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

標準物質として使用され、且つ検定目的のためのペプチドを更に含む、請求項 9 または

50

10に記載のキット。

【請求項12】

前記ペプチドが配列番号3に係るアミノ酸配列を有する、請求項11に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、心臓疾患、腎臓疾患、炎症性疾患、及び敗血症、並びに中枢神経系の病気/疾患及び神経変性疾患、並びに他の下記 of 疾患に存在するような、神経下垂体からのバソプレッシンの放出の非生理学的な変化に関連する若しくは誘導される疾患のための、コペプチン、及び/またはその前駆体若しくはフラグメント、及び/またはそのスプライズバリエーション、コペプチンを含むフラグメント、及び/または組み合わせ、及び/またはそれらの誘導体の液性のバイオマーカーとしての医学的な診断における使用に関する。

10

【0002】

本願の以下の記述において、コペプチン免疫反応性を示すという共通の特徴を有する、いかなる生体分子、並びに上述のフラグメント、誘導体、及びそれらの組み合わせは、「コペプチン」を意味する。そのため、用語「コペプチン」は、とりわけ、その様なサンプルに存在する場合は、例えばVP-プロホルモンを含む。

【0003】

本発明に係るコペプチンは、バイオマーカー、特に液性のバイオマーカーとして使用され、慢性的若しくはうっ血性心不全、心停止、心臓性ショック、心筋梗塞、急性心筋梗塞、高血圧症、心臓手術、肝硬変、肺疾患、腎多嚢胞病のような腎臓(腎)疾患、尿崩症、低ナトリウム症の形態、不適合抗利尿ホルモン分泌症候群の形態、出血、浮腫形成疾患、炎症性疾患、外傷、火傷、それらの感染性合併症、及び敗血症、重度な敗血症、及び敗血症ショック、並びに中枢神経系(CNS)の疾患/病気及び神経変性疾患に存在するような、神経下垂体からのバソプレッシンの放出の非生理学的な変化、特に増大に関連するまたは誘導される疾患の診断に使用されて良い。

20

【0004】

本願において、バイオマーカーの使用が述べられる場合は、血液、血清若しくは血漿、及び脳脊髄液(cerebrospinal fluid (CSF))のような生物学的な流動体のin vitroのサンプル(すなわち、ex vivo)における前記バイオマーカーの定量を意味する。当業者にとって、これは、サンプルに事実上存在し得る生理学的に生じる「コペプチン」分子のみを定量すべきであることを明示する。例えば、糖鎖付加及び/若しくはリン酸化のような翻訳後修飾の長さ、及び/または存在によって、及び/またはタイプ、及びまたは程度が異なる、本質的に同一の免疫反応性である身体の流動体の幾つかの異なる種のサンプルに存在してよい。任意に与えられるアッセイが1種より多い分子を認識する可能性があるという固有の可能性に鑑みて、好ましい実施態様によるコペプチンの定量はコペプチン免疫反応性の定量、特に好ましくは以下に記載されるようなアッセイを使用して測定されるような免疫反応性として理解されるべきである。

30

【0005】

バイオマーカーとしての、または製薬品の活性成分としてのコペプチンの定量に関連して有用なアッセイ成分及び試薬の調製にも本願発明の使用が拡張する限りでは、例えば天然のコペプチンとの相同性が減少した、または安定性が修飾された融合生成物及び修飾物を含む、任意のコペプチンペプチドまたは誘導体が、天然のコペプチド生成物にいかなる制限もされずに使用されて良い。

40

【0006】

したがって、本発明のコペプチンという用語は、コペプチンに対して、例えば75%のみの相同性、好ましくは少なくとも80%の相同性、より好ましくは少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列も含む。

【0007】

用語「診断」または「診断上」は、本明細書において、他に規定されない限り、特定の

50

疾患の同定という意味での診断だけでなく、特定の疾患のリスクにおけるまたは特定の疾患を有することが推定される、無症候または高リスク集団のスクリーニング、特に早期の検出、未治療または治療された患者のモニタリング、並びに治療の過程及び予後/早期の予後及び生存予後のモニタリングも含むことを意図する一般的な用語として使用される。

【0008】

本発明はさらに、特に上述の方法、並びにその様な成分を含むキット及びアッセイにおける使用のための、コペプチンに対するまたはコペプチンの部分的なペプチドに対する抗体に関する。

【背景技術】

【0009】

ショックの血管拡張状態は生命を脅かす状態である。末梢の血圧が急激に減少し、通常はカテコールアミンの投与後に正常に戻らない。最も頻度の高いショックの形態は敗血症の最も重度な形態でもある敗血症ショックである。さらに、激しい心臓の手術、出血性及び心臓性のショックの後、または医薬品または毒物によって毒に犯された後に血管拡張性のショックが現れうる [1、2]。

【0010】

オートクリン/パラクリン経路を介して主に効果的な一連のペプチドは血圧の調節に関与する。以下の分子は血管拡張性の作用を有することが既知である：例えば、アドレノモジュリン、カルシトニン、遺伝子関連ペプチド(CGRP)、及び心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)。血管収縮性の効果は例えば以下の分子を示す：エンドセリン、アンジオテンシンII、及びバソプレッシン(アルギニン-バソプレッシン、抗利尿ホルモン(ADH)としても既知である)。

【0011】

バソプレッシンは、視床下部のニューロンにおいて主に形成される、より大きな前駆体分子の切断生成物である(「VPプロホルモン」；ポリペプチド配列を図3に示す；配列番号4)[20]。合成後に、VPプロホルモンはゴルジ体で糖鎖付加され、分泌小胞に封じられ、プロホルモンコンバーターゼSP3によってバソプレッシン、ニューロフィジン、及びコペプチンの3つのペプチドに分割される。下垂体の神経末端への軸索の移動後に、前記ペプチドは特定の刺激(例えば、高浸透圧、血液量の減少、または他のホルモン)に対して小胞より分泌される。

【0012】

バソプレッシンの最も主要な生理学的な作用は身体の水分の維持である(抗利尿)。生理学的に増加した血圧に対するバソプレッシンの作用は、健康な個体では敗血症ショックの個体より顕著ではない。さらなるバソプレッシンの生理学的な作用は、下垂体副腎軸(ACTH、コルチゾール)の調節、胃腸管の活性の刺激、及び血小板の凝集である。[1、この番号は参考文献の番号を意味する]。

【0013】

ショックの病因において、バソプレッシンは中心的な役割を担う：実験的なショックのモデルでは、バソプレッシンの血漿濃度が刺激後15分以内に正常な濃度よりも3桁増大することが示された[4]。下垂体に蓄えられているバソプレッシンの急速な放出後に、敗血症ショックの患者で観察されたようにショック症候群のさらなる過程の間にバソプレッシン濃度が急激に減少する[5-7]。この観察は、成功裏に試験された敗血症ショックの治療のためのバソプレッシン補充療法の概念の基であった[8-10]。これらの結果は、生体内のバソプレッシンの減少が敗血症ショックの状態に寄与することを示す[5]。

【0014】

バソプレッシンは、心停止を有する患者の生存の可能性の診断マーカーとしても議論されており [11]、続いて、そのような患者の治療に使用された[12]。

【0015】

バソプレッシンまたはVPプロホルモンの病態生理学的な過剰発現は、前立腺、精巣ガン、卵巣、及び膵臓ガン、下垂体腺腫、及び神経節腫、嗅神経芽腫、乳ガン、及び結腸ガン

10

20

30

40

50

、鼻咽頭ガン、頭及び首のガン、褐色細胞腫、及び胃腸起源のガン、扁平上皮ガン、腺ガン、及び大細胞ガンのような幾つかのタイプのガンで示されている[13、24、25、26]。ガンにおいて生産または放出されるバソプレッシンは、病態生理学的に形成されたもの、すなわち正常な生理学的なバソプレッシン生産と異なる異常な生理学的経路(変化した病態組織)によって形成されたものとして解されるべきである。

上述の疾患において、バソプレッシンは正常な起源である器官(神経下垂体)より放出されるが、非生理学的なレベルである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

10

【非特許文献1】Singh Ranger G: The physiology and emerging roles of antidiuretic hormone. Int. J. Clin. Pract. 56: 777-782, 2002

【非特許文献2】Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of vasodilatory shock. N. Engl. J. Med. 345: 588-595

【非特許文献3】Coates LC, Birch NP: Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. J. Neurochem. 70: 1670-1678, 1998

【非特許文献4】Wilson MF, Brackett DJ, Tompkins P, Benjamin B, Archer LT, Hinshaw LB: Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and E.coli shock. Adv. Shock. Res. 6: 15-26, 1981

【非特許文献5】Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA: Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. Crit. Care Med. 30: 497-500

20

【非特許文献6】Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. Crit Care Med 30: 497-500, 2002

【非特許文献7】Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Circulating vasopressin levels in septic shock. Crit Care Med 31: 1752-1758, 2003

【非特許文献8】Forrest P: Vasopressin and shock. Anaesth Intensive Care 29: 463-472, 2001

30

【非特許文献9】Vincent JL: Endocrine support in the critically ill. Crit Care Med 30: 702-703, 2002

【非特許文献10】Holmes CL, Landry DW, Granton JT: Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2- clinical physiology. Crit Care 8: 15-23, 2004

【非特許文献11】Lindner KH, Strohmenger HU, Ensinger H, Hetzel WD, Ahnefeld FW, Georgieff M: Stress hormone response during and after cardiopulmonary resuscitation. Anaesthesiology 77: 662-668, 1992

【非特許文献12】Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH: A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. N Engl J Med 350: 105-113, 2004

40

【非特許文献13】North WG: Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. Exp Physiol 85 Spec No: 27 S-40 S, 2000

【非特許文献14】Baumann G, Dingmann JF: Distribution, blood transport and degradation of antidiuretic hormone in man. J Clin Invest 57: 1109-1116, 1976

【非特許文献15】Smyth DG, Massey DE: A new glycopeptide in pig, ox and sheep pituitary. Biochem Biophys Res Commun 87: 1006-1010, 1979

【非特許文献16】de Bree FM, Burbach JP: Structure-function relationships of the vasopressin prohormone domains. Cell Mol Neurobiol 18: 173-191, 1998

【非特許文献17】Holwerda DA: A glycopeptide from the posterior lobe of pituitary

50

ries. I. Isolation and characterization. Eur J Biochem 28: 334-339, 1972

【非特許文献 1 8】Nagy G, Mulchahey JJ, Smyth DG, Neill JD: The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophysial prolactin releasing factor. Biochem Biophys Res Commun 151: 524-529, 1988

【非特許文献 1 9】Hyde JF, North WG, Ben-Jonathan N: The vasopressin-associated glycopeptide is not a prolactin-releasing factor: studies with lactating Brattleboro rats. Endocrinology 124: 35-40, 1989

【非特許文献 2 0】North, W. G. "Biosynthesis of vasopressin and neurophysins" in : D. Gash and G. Boer (eds.), Vasopressin: Principles and Properties, pp. 175-209. New York: Plenum Press, 1987)

【非特許文献 2 1】Chesney et al., J. Lab. Clin. Med. 1985, S. 106, abrufbar unter www.ncbi.nlm.nih.gov

【非特許文献 2 2】Kluge et al., Clinical Chemistry 1999, S. 98-100

【非特許文献 2 3】Robertson et al., Journal of Clinical Investigation, Vol. 52, 1973, S. 2340-2352

【非特許文献 2 4】North, W. G. et al, "Immunohistochemical Evaluation of Vasopressin Expression in Breast Fibrocystic Disease and Ductal Carcinoma In Situ (DCT S)", Endocrine Pathology, 2003, Vol. 14, No.3, 2003, pages 257-262

【非特許文献 2 5】North W. G. et al. , "Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, Vol. 34, 1995, pages 229-235

【非特許文献 2 6】North W.G. : "Neuropeptide Production by Small Cell Carcinoma: Vasopressin and Oxytocin as Plasma Markers of Disease", J Clin Endocrinol Metab, Vol. 73, 1991, No. 6, pages 1316-1320

【非特許文献 2 7】Thibonnier M., Vasopressin receptor antagonists in heart failure, Current Opinion in Pharmacology 2003, 3:683-687

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

コペプチン(C末端糖タンパク質としても既知である)は39アミノ酸、その糖鎖部分を含み、約2000Daの分子量を有する[15-17]。糖鎖付加は前駆体VP-プロホルモンの131位である(配列番号4参照)。コペプチンの生物学的な機能は不明確なままである。

【0018】

例えば血清または血漿のような身体の流動体における液性の診断マーカーとしてバソプレッシンを直接定量することは、ルーチンの診断にとって適切でない。90%より多くのバソプレッシンは血小板に結合することから、測定のために利用できない[21]。かくして、血漿で認められるフリーなバソプレッシンは血流に放出されたバソプレッシンの真の量を反映しない。血小板に対するバソプレッシンの結合は、血漿を得るために使用される遠心分離に依存して変化する測定に含まれる血小板の量に依存して異なる結果を導く[22]。さらなる妨害は、血液サンプルを遠心分離前に室温の状態にすると、より多量のバソプレッシンが認められるという事実である。これらの効果及びin vivoにおけるバソプレッシンの短い半減期(24分、[14])、及び-20℃で保存した際でもex vivoの血漿サンプルにおける短い半減期は、ルーチンの診断におけるバソプレッシンの使用を妨害している。その短い半減期のため、ルーチンの診断において、バソプレッシンが検出限界に達する前にサンプルの入手、血漿の取得、サンプルの実験室への輸送、及び必要とされる試験を含む実験室における診断の実施をすることが不可能であった。

【0019】

さらに、バソプレッシンの低いin vivoの安定性、及び血小板への結合及び血小板からの放出に由来して変化する結果のために、バイオマーカーとしての使用は、急速に生じる分解の影響で、最適化されたサンプルの実施条件であっても極端に制限される。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明の主題は、バソプレッシンの不利な半減期の効果、及び測定において変化する結果を克服すること、並びに循環器疾患及び敗血症の診断のための、バソプレッシンの放出に関連する分子、より具体的にはコペプチンの検出及び定量的ための方法、使用、及びキットを開発することである。

【0021】

本発明の主題は、VPプロホルモン(バソプレッシンの前駆体)の特定のフラグメント、特にコペプチンを、循環器疾患及び敗血症の診断及びモニタリングにおいて、特に身体の流動体におけるバソプレッシンの生理学的な放出の定量的ためのツールとして使用できるという驚くべき発見に基づいて達成されるであろう。

10

【0022】

前記フラグメント、特にコペプチンの産生は、同一の前駆体に由来するために、バソプレッシンの放出と関連する。

【0023】

ex vivoにおける前記前駆体タンパク質、フラグメント、及び/またはその組み合わせの安定性は驚くほど高く、前記フラグメント、特にコペプチンをルーチンの目的に完全に適したものとするのが認められた。

【0024】

コペプチンのようなフラグメントと前記前駆体ペプチドの他のフラグメントとの間の結合は、バソプレッシンが関与する全ての疾患のための診断のツールとしてそれらを適切なものとする。そのため、特にコペプチンは、各種の疾患、特に循環器疾患及び全身の炎症、特に敗血症の診断及びモニタリングのための医学的な診断方法において使用されて良い。

20

【0025】

さらに、1つの実施態様において本発明は、バソプレッシンが関与する上述の疾患ための疾患の診断、経過の調節、及び予後のためのコペプチンの使用に関する。

【0026】

臨床的なデータが、前記疾患の診断を支持するために更に考慮に入れられても良い。

【0027】

本発明に係るコペプチンと少なくとも75%の相同性、好ましくは80%の相同性、より好ましくは少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を使用することが可能である。

30

【0028】

本発明の好ましい実施態様において、以下の実施例よれば、ヒトバソプレッシン-ニューロフィジン2-コペプチン前駆体のアミノ酸配列の2つの領域(PATV17; PLAY17)が特定の抗体によって認識される免疫学的な結合部位として選択された：

132-147位：CATQLDGPAGALLRLV (PATV17 - 配列番号 1)

149-164位：CLAGAPEPFEPAPDAY (PLAY17 - 配列番号 2)。

【0029】

検定のため、及び標準溶液の調製のために、上述の結合部位の双方を含むペプチドを使用した(PAY33)：

40

132-164位：ATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY (PAY33 - 配列番号 3)。

【0030】

特定の抗体に認識される免疫学的な結合部位PATV17及びPLAY17は、131位のコペプチンの推定の糖鎖付加部位を含まないように選択された。そのため、定量されたコペプチンの翻訳後修飾(糖鎖付加)の存在または不在は、その様な抗体を使用するアッセイにおけるコペプチンの認識に対していかなる有意な影響も有するはずがない。そのため、用語「コペプチン」は「裸の」コペプチンペプチドと同様に、前記ペプチドの翻訳後修飾形態を含む。

【0031】

50

上述の各ペプチドが以下の記載のように合成される際に、アミノ末端にシステイン残基を各コペプチンアミノ酸配列に付加し、前記ペプチドを当業者に既知の方法によって可溶性タンパク質として化学的に合成した。それらを精製し、質量分析器及び逆相HPLCによって品質を調整し、分取して凍結乾燥した(Jerini AG, Berlin, Germany)。

【0032】

本発明に係る合成ペプチドを抗原の生産に使用して、動物に注射し、本発明に係るコペプチンに対する抗体を産生した。当業者に既知の、この主題を達成するための他の方法が使用されて良い。

【発明を実施するための形態】

【0033】

好ましい実施態様では、Pierce, Rockford, IL, USAの方法に従って、前記ペプチドPATV17及びPLAY17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)を介して担体タンパク質であるスカシ貝ヘモシアニン(KLH)に接合した。ヒツジで上述のペプチドに対する抗体を生産した。本発明の好ましい実施態様では、上述のペプチドに対するポリクローナル抗体を産生させた。既知の方法に従って抗体を精製した。本発明の好ましい実施態様では、これは、Pierce(Boston, USA)の方法に従って、PierceのSulfoLink-Gelのアミノ末端のシステイン残基を介するペプチドのカップリングによるリガンド特異的なアフィニティークロマトグラフィーによって好適に達成された。好ましい実施態様では、検出可能なマーカーを使用して前記抗体を標識した。使用されるマーカーは好ましくは蛍光マーカーであり、より好ましい実施態様では、前記抗体を化学発光マーカーで標識し、更に好ましい実施態様では、PATV17(0413-pAK)及びPLAY17(0417-pAK)に対する抗体を化学発光マーカーで標識した。

10

20

【0034】

さらなる好ましい実施態様では、本発明は、身体の流動体のサンプル中の本発明に係るコペプチンの検出のために産生された抗体の使用、並びに特定量のそのような抗体または本発明に係る分子の検出に特異的な多量の抗体を含むキットに関する。各種の標識を使用する手動の、自動の、若しくは治療の時点の様式の競争的またはサンドイッチ免疫アッセイを含む、当業者に既知のもののような、異なるアッセイが前記分子の検出に使用されて良い。

【0035】

個々の分子に対する抗体の結合の検出方法も当業者に既知である。そのような既知のアッセイのいかなる様式がコペプチンの定量との関連で使用されても良い。例えば、いわゆるPOC(治療の時点の)試験として免疫クロマトグラフィータイプのような即時試験の装置を用いてコペプチンを定量することは本発明の範囲の内である。コペプチンの定量は、いわゆるTRACE(登録商標)技術を使用する、いわゆるKRYPTOR(登録商標)タイプのホモジニアスアッセイで実施されても良い。

30

【0036】

本発明の好ましい実施態様は、特にサンドイッチタイプの2つの部位の免疫アッセイのための、上述のペプチド0413-pAK及び0417-pAKに対して産生された抗体の使用を開示する。本発明の他の好ましい実施態様は、各種の身体の流動体及び他の生体物質中の本発明の分子、特にコペプチンの濃度の検出及び定量のためのこれらの抗体の使用を開示する。好ましい実施態様では、コペプチンは身体の流動体で50pg/mlを超える濃度で検出されて良い(図1)。

40

【0037】

1つの好ましい実施態様では、本発明は、血清及び血漿におけるex vivoのコペプチンの長期の安定性の発見に基づき、それを使用する(表2)。血漿及び血清におけるコペプチンのレベルは、驚くべきことに、室温で2日間貯蔵した後でさえ安定であった。かくして、コペプチンは、パソプレッシンよりもはるかに診断の目的に適する。

【0038】

本発明の好ましい実施態様は、健康な個体、敗血症患者、心筋梗塞患者、及び動脈の血

50

圧の増大した患者におけるコペプチンの検出のための、並びに慢性またはうっ血性心不全 (CHF) の重度の決定のためのPLAY17及びPATV17に対して産生された抗体の使用を開示する (図 4)。

【 0 0 3 9 】

本発明は、身体の流動体中の本発明の分子、特にコペプチンの存在及び安定性の決定、並びに健康な対照と上述の各種の患者を含む各種の疾患の患者とのペプチド濃度の差の測定を可能にする (図 2 ; 図 4)。健康な対照個体の中央値は約13pg/mlである。

【 0 0 4 0 】

本発明は、更に、上述のものを含む疾患の状態における、身体の流動体中の液性のバイオマーカーであるコペプチンの濃度の優位な変化を開示する。

10

【 0 0 4 1 】

本発明の好ましい実施態様は非常に有意な変化、すなわち敗血症患者 (中央値150.5pg/ml) 及び心筋梗塞の患者 (中央値129.5pg/ml) におけるコペプチンの濃度の約10倍の増大、並びに動脈の血圧が増大した患者 (中央値459.5pg/ml) における約35倍の増大という驚くべき発見に基づく。

【 0 0 4 2 】

CHF患者では、コペプチンの測定レベルは、New York Heart Association (NYHA) 機能分類システムを使用して一般的に評価される病気の重度と良く相関する。NYHAクラスIからIVは以下の典型的な機能と一致する：NYHAクラスI - 無症候；NYHAクラスII - 中程度の運動に伴う症状；NYHAクラスIII - 最小限の運動に伴う症状；NYHAクラスIV - 休息時の症状 (呼吸困難)。全部で348のCHF患者 (25のNYHAクラスI；124のNYHAクラスII；127のNYHAクラスIII；72のNYHAクラスIV；表 1 参照) の血漿サンプル中のコペプチンレベルを定量した試験において、異なるクラスの中央値は明らかに傾向を示した (以下の表 1 参照)。

20

本発明は、特にコペプチンの1つ以上の抗体を使用する、上述の疾患のための診断方法、キット、及びアッセイも提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【 図 1 】 標準物質としてペプチドPAY33を使用してコペプチンの免疫反応性のサンドイッチ免疫アッセイのための標準曲線を示す。

【 図 2 】 健康な個体と異なる群の患者 (敗血症、心筋梗塞、及び動脈の血圧の増大) のサンプルにおけるコペプチン免疫反応性の濃度を示す。

30

【 図 3 】 バソプレッシンプロホルモンアミノ酸配列 (1文字表記；配列番号 4 参照) を示す。

【 図 4 】 NYHA分類システムに従って分類されたCHF (慢性心不全) 患者のサンプルにおけるコペプチン免疫反応性の濃度を示す。

【 実施例 】

【 0 0 4 4 】

物質、方法、及び測定

(実施例 1)

ペプチド合成

40

当業者に既知の標準的な方法に従って、ペプチドを合成し、それらの品質を質量分析器及び逆相HPLCによって調整して、分取して凍結乾燥した (Jerini AG, Berlin, Germany)。前記ペプチドのアミノ酸配列を以下に示す (番号はヒトバソプレッシン-ニューロフィジン2-コペプチン-前駆体 (132-147位及び149-164位) に相当する位置を意味する)：

PATV 17 (132-147 + N末端システイン残基)：

CATQLDGPAGALLRLV [配列番号 1]，

PLAY 17 (149-164 + N末端システイン残基)：

CLAGAPEPFEPAPDAY [配列番号 2]，

標準ペプチド PAY 33 (132-164)

ATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY [配列番号 3]。

50

【 0 0 4 5 】

(実施例 2)

接合及び免疫

PIERCE, Rockford, IL, USAによる「NHS-エステルマレイミド架橋剤」のプロトコルに従って、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)によって、配列番号1から2のペプチドを担体タンパク質KLH(スカシ貝ヘモシアニン)に接合した。100 µgの接合体(接合体のペプチド量に係るµg)を受けさせ、続いて4週間ごとに50 µgの接合体(接合体のペプチド量に関する量)を受けさせてヒツジを免疫した。4週間毎の免疫後4ヶ月から、700mlの血液を全ての羊より回収し、遠心分離によって抗血清を得た。接合、免疫、及び抗血清の生産はMicroPharm, Carmerthenshire, UKによって実施された。

10

【 0 0 4 6 】

(抗体の精製)

ヒツジ由来のポリクローナル抗体をリガンド特異的なアフィニティー精製を使用して精製した。この工程のために、ペプチドPATV17及びPLAY17をPierce社(Boston, USA)製のSulfoLink-Gelに結合させた。Pierce社のプロトコルに従って前記結合を生じさせた。5mgのペプチドを5mlのゲルに添加した。

【 0 0 4 7 】

まとめると、カラムを10mlの溶出バッファー(50mM クエン酸、pH2.2)及び結合バッファー(100mM リン酸ナトリウム、0.1% Tween、pH6.8)を使用して3回洗浄した。100mlのヒツジ抗血清を0.2 µmのフィルターを使用して濾過し、カラムから10mlの結合バッファーの入ったビーカーに移されたカラム物質に添加した。前記物質を穏やかに回転させて室温で一晩インキュベートした。前記物質を空のカラム(NAAP25, Pharmacia, emptied)に移した。溶出液を廃棄した。続いて、前記カラムを250mlのタンパク質を含まない結合バッファー(洗浄溶出液のタンパク質量<0.02A 280nm)で洗浄した。洗浄したカラムに溶出バッファーを添加して、1mlのフラクションを回収した。各フラクションのタンパク質量をBCA法によって測定した(PIERCE, Rockford, IL, USAのプロトコルに従って)。タンパク質量が0.8mg/mlより大きいフラクションを溜めた。タンパク質量の測定後、39mgの抗PATV17抗体0413-pAk及び103mgの抗PLAY17抗体0417-pAkを得た。

20

【 0 0 4 8 】

(実施例 4)

標識

以下の様に、抗PLAY17抗体0417-pAkを処理した：Pharmacia社のプロトコルに従い、NAP-5ゲル濾過カラム(Pharmacia)を介して、500 µlのアフィニティー精製した産生された抗体を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は1.5mg/mlであった。

30

【 0 0 4 9 】

化学発光マーカーを使用する標識のために、10 µlのMA70-Akridinium-NHS-エステル(1mg/ml; Hoechst Behring)を67 µlの抗体溶液に添加して、室温で15分間インキュベートした。次いで、423 µlの1Mグリシンを添加して、10分間インキュベートした。Pharmacia社のプロトコルに従い、NAP-5ゲル濾過カラムを使用して、前記溶液を1mlの溶媒A(50mMリン酸カリウム、100mM NaCl、pH7.4)中で再緩衝化した。未結合のラベルの最終的な除外のために、ゲル濾過HPLCを実施した(カラム：Waters Protein Pak SW300)。前記サンプルを添加して、溶媒A、1ml/分の流速でクロマトグラフィーを実施した。クロマトグラフィーの流れを、標識の程度を測定するために280nm及び368nmの波長でUVメーターにおいて連続的にモニターした。標識化抗体の吸収比368/280nmは0.1であった。モノマー状の抗体を含有するフラクションを回収し(保持時間8から10分)、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%アジ化ナトリウム、pH7.4)で処理した。

40

【 0 0 5 0 】

(実施例 5)

カップリング

50

抗PATV17抗体0413-pAkを放射された5mlのポリスチロール管(Greiner, Germany)に固定化した。その方法のために、前記抗体溶液を、50mM Tris、100mM NaCl、pH7.8で6.6 μ g/mlのタンパク質濃度に希釈した。管毎に300 μ lの希釈タンパク質溶液をピペットで移した。これらを22℃で20時間インキュベートして、溶液を除去した。次いで、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の溶液を各管に添加した。20時間後に前記溶液を除去して、前記管を真空乾燥器で乾燥させた。

【0051】

(実施例6)

免疫アッセイ

以下のアッセイバッファーを使用した：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。

10

【0052】

健康な個体と各種の疾患/上述の疾患の患者、特に心臓疾患及び循環の疾患のEDTA-血漿のコペプチン濃度を定量した。

【0053】

標準的な物質として、バソプレッシン-ニューロフィジン2-コペプチン前駆体の132-164位に相当する、化学的に合成されたペプチド(ペプチドPAY33)を使用した。前記標準物質を正常なウマの血清に希釈した(Sigma)。

【0054】

試験管中に、100 μ lの標準物質またはサンプル、並びに100 μ lのアッセイバッファーをピペットで移した。前記管を穏やかに回転させて、22℃で2時間インキュベートした。1mlの洗浄バッファー(0.1% Tween20)を使用して4回洗浄した後に、上清を廃棄した。次いで、100万RLU(相対光単位)のMA70で標識された抗体を含有する200 μ lのアッセイバッファーを添加して、22℃で穏やかに回転させて更に2時間インキュベートした。1mlの洗浄バッファー(0.1% Tween20)を使用して4回洗浄した後に、管に結合した化学発光物質をルミノメーターで定量した(Berthold, LB952T, basic reagents Brahms AG)。ソフトウェアMultiCalc(Spline Fit)を使用して、サンプルの濃度を測定した。

20

【0055】

(実施例7)

コペプチン濃度の測定

30

コペプチン免疫反応性という用語は、開発されたサンドイッチ免疫アッセイによって検出される基質の量を意味する。前記サンドイッチ免疫アッセイは、基質の検出のために、バソプレッシン-ニューロフィジン2-コペプチン-前駆体の132-147位及び149-164位に対して産生された抗体を使用する。開発されたアッセイの典型的な標準曲線を図1に記載する。前記アッセイを使用して、50pg/mlを超える血漿または血清中のコペプチンの免疫反応性が定量的に測定されて良い。

【0056】

(実施例8)

健康な個体及び疾患状態のコペプチン免疫反応性の濃度

40

健康な個体の血清及び血漿、並びに敗血症、心筋梗塞、及び動脈の血圧の増大を含む各種の疾患に罹っている患者の血清及び血漿を分析した(図2)。コペプチン免疫反応性を測定した。健康な個体と比較すると、コペプチン免疫反応性は疾患状態で驚くほど増大した。健康な個体は約13pg/mlの中央値を示し、敗血症患者は約150pg/mlの中央値、心筋梗塞の患者では約129pg/mlの中央値、動脈の血圧の増大の患者では459pg/mlの中央値であった。

【0057】

(実施例9)

NYHAクラスIからIVの慢性的心不全(CHF)患者におけるコペプチン免疫反応性の濃度

全部で348のCHF患者(NYHAクラスIに25；NYHAクラスIIに124；NYHAクラスIIIに348；NYHAクラスIVに72；表1参照)の血清及び血漿サンプルにおいて、上述のアッセイを使用して

50

コペプチンレベルを測定した。結果を図4に図示する。認められ得るように、異なるクラスのpg/mlにおけるコペプチン濃度の中央値は明らかな増大の傾向を示した。NYHAクラスIの患者の中央値は20.30pg/ml、クラスIIは33.25pg/ml、クラスIIIは49.60pg/ml、及びクラスIVは85.80pg/mlであると認められた(以下の表1の統計データ参照)。

【0058】

【表1】

表1

	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV
数	25	124	127	72
中央値	20.30	33.25	49.60	85.80
平均値	27.00	45.32	63.91	184.7
95%未満のCI の平均値	17.45	38.79	55.29	118.9
95%より大きいCI の平均値	36.56	51.86	72.54	250.5

10

CI = 信頼区間

20

【0059】

血漿中のコペプチンレベルとCHFの重度との密接な相関関係が存在するという発見は、コペプチンを、CHFの診断(ポジティブなまたはネガティブな診断)、CHFの経過及び進展のモニタリング、並びにCHF治療のモニタリング及び調節における使用のためのバイオマーカーの候補にする。更に、心不全の治療においてバソプレッシンレセプターアンタゴニストの有用性を評価する現在の試みに鑑みて[27]、心不全の患者の血清または血漿サンプル中のコペプチンの定量は、とりわけバソプレッシンレセプターアンタゴニストを使用する治療が有用であり得る患者を同定することが可能である。

【0060】

30

(実施例10)

コペプチン免疫反応性の安定性

コペプチン免疫反応性は血漿及び血清中において驚くほど安定であることを発見した(表2)。表2は、敗血症患者の血清及び血漿中の外来性の免疫反応性コペプチンのex vivoにおける安定性を示す。

【0061】

【表 2】

表2

サンプル	貯蔵 (日数/温度)	回収 (%)
血清 (n = 3)	1d / 4°C	98,0 %
	2d / 4°C	99,2 %
	1d / RT	94,1 %
	2d / RT	103,7 %
血漿 (n = 5)	1d / 4°C	103,4 %
	2d / 4°C	101,6 %
	1d / RT	99,9 %
	2d / RT	104,9 %

10

【 0 0 6 2 】

室温 (RT) で2日間の貯蔵でさえ、免疫反応性における減少は検出されないであろう。

【 0 0 6 3 】

かくして、コペプチン免疫反応性の *ex vivo* における安定性はバソプレッシンと比較して驚くほど顕著に増大した。

20

【 0 0 6 4 】

1. Singh Ranger G: The physiology and emerging roles of antidiuretic hormone. In t. J. Clin. Pract. 56: 777-782, 2002;
2. Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of vasodilatory shock. N. Engl. J. Med . 345: 588-595;
3. Coates LC, Birch NP: Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. J. Neurochem. 70: 1670-1678, 1998;
4. Wilson MF, Brackett DJ, Tompkins P, Benjamin B, Archer LT, Hinshaw LB: Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and E.coli shock. Adv. Shock. Res. 6: 15-26, 1981;
5. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, Oz M C, Oliver JA: Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. Crit. Care Med. 30: 497-500;
6. Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. Crit Care Med 30: 497-500, 2002;
7. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Circulating vasopressin levels in septic shock. Crit Care Med 31: 1752-1758, 2003;
8. Forrest P: Vasopressin and shock. Anaesth Intensive Care 29: 463-472, 2001;
9. Vincent JL: Endocrine support in the critically ill. Crit Care Med 30: 702-703, 2002;
10. Holmes CL, Landry DW, Granton JT: Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2- clinical physiology. Crit Care 8: 15-23, 2004;
11. Lindner KH, Strohmenger HU, Ensinger H, Hetzel WD, Ahnefeld FW, Georgieff M: Stress hormone response during and after cardiopulmonary resuscitation. Anaesthesiology 77: 662-668, 1992;
12. Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH: A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. N Engl J Med 350: 105-113, 2004;

30

40

50

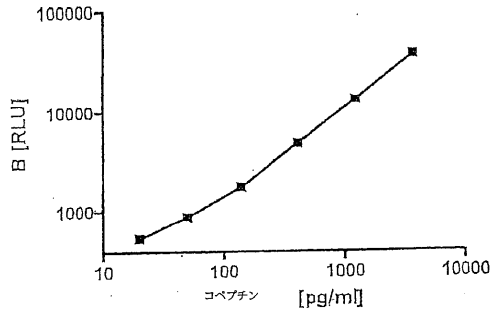
13. North WG: Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer . Exp Physiol 85 Spec No: 27 S-40 S, 2000;
14. Baumann G, Dingmann JF: Distribution, blood transport and degradation of antidiuretic hormone in man. J Clin Invest 57: 1109-1116, 1976;
15. Smyth DG, Massey DE: A new glycopeptide in pig, ox and sheep pituitary. Biochem Biophys Res Commun 87: 1006-1010, 1979;
16. de Bree FM, Burbach JP: Structure-function relationships of the vasopressin prohormone domains. Cell Mol Neurobiol 18: 173-191, 1998;
17. Holwerda DA: A glycopeptide from the posterior lobe of pituitaries. I. Isolation and characterization. Eur J Biochem 28: 334-339, 1972;
18. Nagy G, Mulchahey JJ, Smyth DG, Neill JD: The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophysial prolactin releasing factor. Biochem Biophys Res Commun 151: 524-529, 1988;
19. Hyde JF, North WG, Ben-Jonathan N: The vasopressin-associated glycopeptide is not a prolactin-releasing factor: studies with lactating Brattleboro rats. Endocrinology 124: 35-40, 1989;
20. North, W. G. "Biosynthesis of vasopressin and neurophysins" in: D. Gash and G. Boer (eds.), Vasopressin: Principles and Properties, pp. 175-209. New York: Plenum Press, 1987);
21. Chesney et al., J. Lab. Clin. Med. 1985, S. 106, abrufbar unter www.ncbi.nlm.nih.gov;
22. Kluge et al., Clinical Chemistry 1999, S. 98-100
23. Robertson et al., Journal of Clinical Investigation, Vol. 52, 1973, S. 2340-2352;
24. North, W. G. et al, "Immunohistochemical Evaluation of Vasopressin Expression in Breast Fibrocystic Disease and Ductal Carcinoma In Situ (DCTS)", Endocrine Pathology, 2003, Vol. 14, No.3, 2003, pages 257-262;
25. North W. G. et al . , "Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, Vol. 34, 1995, pages 229-235;
26. North W.G. : "Neuropeptide Production by Small Cell Carcinoma: Vasopressin and Oxytocin as Plasma Markers of Disease", J Clin Endocrinol Metab, Vol. 73, 1991, No. 6, pages 1316-1320;
27. Thibonnier M., Vasopressin receptor antagonists in heart failure, Current Opinion in Pharmacology 2003, 3:683-687.

10

20

30

【図 1】

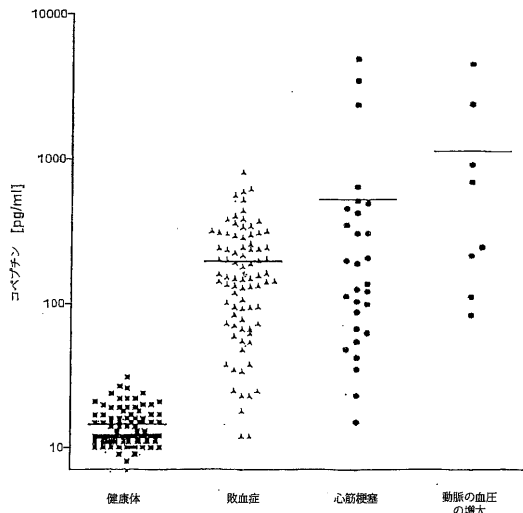


【図 3】

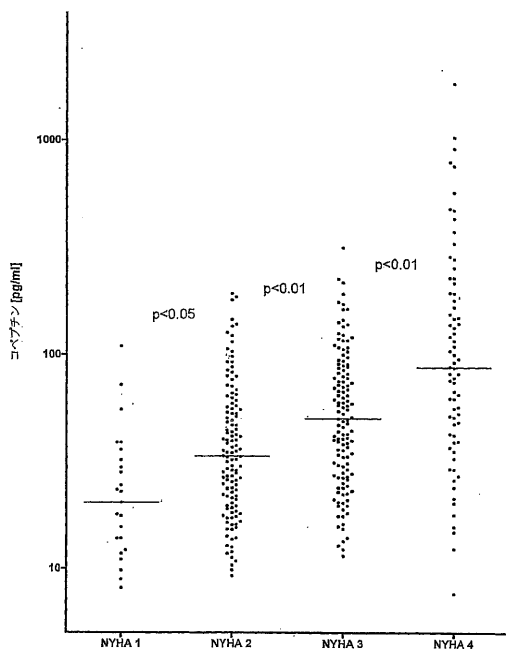
10	20	30	40	50	60
MPDTMLPACF	LGLLAFSSAC	YFQNCPRGGK	RAMSDLELRQ	CLPCGPGGKG	RCFGPSICCA
70	80	90	100	110	120
DELGCFFVGT	EALRCQBBNY	LPSPCQSGQK	ACGSGGRCAR	FGVCCNDASC	VTEPSCREGF
130	140	150	160		
HRRARASDRS	NATQLDGPAG	ALLRLRVQLA	GAPEPFFFAQ	PDAY	

1-19 シグナル配列
20-28 ARG-バソプレッシン
32-124 ニューロフィジン2
126-164 コペプチン

【図 2】



【図 4】



【配列表】

2011227095000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 アンドレアス・ベルグマン

ドイツ・１２３５１・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・４７

(72)発明者 ヨアヒム・シュトルック

ドイツ・１３４６５・ベルリン・ツェルンドルファー・ヴェーク・５２Ａ

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA17 BA18 CA42 DA30 EA50 FA20

【外国語明細書】

DIAGNOSTIC METHOD FOR DISORDERS USING COCEPTIN

The present invention relates to the use of copeptin and/or its precursors or fragments and/or its splice variants, fragments comprising copeptin and/or combinations and/or derivatives thereof in medical diagnosis as humoral biomarker for disorders associated with or caused by non-physiological alterations of vasopressin release from the neurohypophysis, as there are, for example, cardiac diseases, renal diseases, inflammatory diseases and sepsis and diseases/disorders of the central nervous system and neurodegenerative diseases and others as mentioned below.

In the following text all biomolecules and fragments, variants and combinations thereof as mentioned above, which share the common feature that they display copeptin immunoreactivity, are referred to as "copeptin" in the present application. The term "copeptin", therefore, inter alia also comprises for example VP-prohormone, if present in a sample as such.

Copeptin according to the present invention is used as biomarker, especially humoral biomarker, which can be used to diagnose disorders associated with or caused by non-physio-

logical alterations, especially increases, of vasopressin release from the neurohypophysis as there are cardiovascular diseases like chronic or congestive heart failure, cardiac arrest, cardiac shock, cardiac infarction, acute myocardial infarction, arterial hypertension, cardiac surgery, cirrhosis, pulmonary disorders, kidney (renal) diseases as polycystic kidney disease, Diabetes insipidus, forms of hyponatremia, forms of syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion, hemorrhage, edema-forming states, inflammatory diseases, trauma, burns, infectious complications thereof and sepsis, severe sepsis and septic shock, as well as diseases/disorders of the central nervous system (CNS) and neurodegenerative diseases.

If, in the present application, a use as biomarker is mentioned, this means the determination of said biomarker in *in vitro* samples of biological fluids (i.e. *ex vivo*) as blood, serum or plasma and liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid; CSF). For any skilled person this clearly implies that only such physiologically occurring "copeptin" molecules are to be determined which in fact can be present in such samples. There may be present in a sample of a body fluid several distinct species of essentially identical immunoreactivity, which differ e.g. in length and/or by the presence and/or type and/or degree of their posttranslational modification, e.g. glycosylation and/or phosphorylation. In view of the inherent possibility that any given assay may recognize more than just one sort of molecule, according to a preferred embodiment the determination of copeptin is to be understood as determination of copeptin immunoreactivity, especially preferred as immunoreactivity as measured with an assay as described below.

As far as the use of the present invention also extends to the preparation of assay components and reagents useful in connection with the determination of copeptin as biomarker, or as active ingredient in pharmaceuticals, any suitable

blood pressure. The following molecules are known to have vasodilatory function: e.g. adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and atrial natriuretic peptide (ANP). Vasoconstrictive effects show for example the following molecules: endothelin, angiotensin II and vasopressin (also known as arginine-vasopressin, antidiuretic hormone (ADH)).

Vasopressin is a cleavage product of a larger precursor molecule ("VP pro-hormone"; its polypeptide sequence is shown in Fig. 3; or as SEQ ID NO:4) that is mainly formed in the neurons of the hypothalamus [20]. After synthesis the VP pro-hormone is glycosylated in the Golgi apparatus, packed into secretory vesicles and split by pro-hormone convertase SP3 into the three peptides vasopressin, neurophysin and copeptin. After axonal migration to the nerve endings of the hypophysis the peptides are secreted from the vesicles upon certain stimuli (e.g. high osmolarity, decrease of blood volume or different hormones).

The most prominent physiological effect of vasopressin is the retention of body water (antidiuresis). The effect of vasopressin to physiologically increase blood pressure is in healthy individuals less prominent than in septic shock. Further physiological functions of vasopressin are the regulation of the pituitary adrenal axis (ACTH, Cortisol), stimulation of the activity of the gastro-intestinal tract and the aggregation of blood platelets [1; numbers in brackets refer to the attached list of literature references].

In the pathogenesis of shock vasopressin plays a central role: in experimental shock-models it was shown that plasma concentrations of vasopressin are increased by three orders of magnitude above the normal concentration within 15 minutes after stimulation [4]. After rapid release of vasopressin stored in the hypophysis the vasopressin concentrations are decreasing drastically during further course of shock

syndrome as was observed in patients with septic shock [5-7]. This observation was the base for the concept of a vasopressin substitution therapy for the treatment of septic shock that was successfully tested [8-10]. These results indicate that an endogenous decrease of vasopressin is contributing to the state of septic shock [5].

Vasopressin has also been discussed as a marker for the prognosis of probability of survival of patients with cardiac arrest [11] and consequently it was used for the treatment of such patients [12].

A pathophysiological overexpression of vasopressin or VP pro-hormone has been shown for several types of cancer like prostate, testicular cancer, ovarian and pancreatic cancer, pituitary adenomas and gangliomas, olfactory neuroblastomas, breast and colon tumours, nasopharyngeal carcinoma, head and neck cancer, phaeochromocytoma and tumours of gastrointestinal origin, squamous-cell carcinomas, adenocarcinomas and large cell carcinomas [13, 24, 25, 26]. Vasopressin produced or released in cancers is to be considered as pathophysiologically formed, i.e. formed by unnormal physiological routes (altered pathological tissues) which are distinct from the normal physiological vasopressin production.

In diseases as mentioned above vasopressin is released from an organ (neurohypophysis) which is its normal origin, although in non-physiological levels.

Copeptin - also known as C-terminal glycoprotein - comprises 39 amino acids, its sugar moiety and has a molecular weight of about 2000 Da [15-17]. The glycosylation is at position 131 of the precursor VP-prohormone (cf. SEQ ID NO:4). The biological function of copeptin remains unclear.

The direct determination of vasopressin as humoral diagnostic marker in body fluids as e.g. serum or plasma itself is

copeptin peptides or derivatives, including fusion products and modifications having e.g. a reduced homology with the naturally occurring copeptin, or having a modified stability, can be used, without any restriction to naturally occurring copeptin products.

The term copeptin of the present invention consequently comprises also amino acid sequences showing e.g. only 75 % homology, preferred at least 80 % homology, more preferred at least 90 % homology to copeptin.

Terms as "diagnosis" or "diagnostic" are used in this specification as general terms, which, if not defined otherwise, are intended to comprise not only diagnosis in the sense of identifying a specific disease, but also screening of asymptomatic or high risk populations at risk of certain diseases or suspected to have certain diseases, especially for early detection, monitoring of untreated or treated patients and monitoring the course of a therapy and for prognosis/-early prognosis and survival prognosis.

The invention further relates to antibodies raised against copeptin or against partial peptides of copeptin, especially for use in a method as mentioned above, as well as kits and assays involving such components.

Vasodilatory states of shock are life threatening situations. The peripheral blood pressure decreases drastically and often does not normalise after administration of catecholamines. The most frequent form of shock is septic shock, which is also the most severe form of sepsis. Furthermore vasodilatory shock can manifest itself after severe heart surgery, hemorrhagic and cardiac shock or after poisoning by medicaments or toxins [1, 2].

A series of peptides being predominantly effective via the autocrine/paracrine route are involved in the regulation of

not suitable for routine diagnostics. More than 90 % of vasopressin are bound to blood platelets and are thus not available for the measurements [21]. Thus free vasopressin found in the plasma does not reflect the true amount of vasopressin released into the blood stream. The binding of vasopressin to the blood platelets leads to different results, depending on the amount of platelets included in the measurement, which is variable depending on the centrifugation used to obtain the plasma [22]. A further hindrance is the fact that a higher amount of vasopressin is observed, if the blood sample is left at room temperature before centrifugation. These effects and the short half-life of vasopressin *in vivo* (24 minutes, [14]) and in plasma samples *ex vivo* even when stored at -20 [23] so far has hindered the use of vasopressin in routine diagnostics. Due to the short half-life, it is not possible in routine diagnostics to take samples, obtain the plasma, transport the sample into the laboratory and do the diagnostics in the laboratory including the required tests before vasopressin reaches a critical level of detection.

Furthermore due to the low *in vivo* stability of vasopressin and the variable results due to the binding to and release from blood platelets, the use as a biomarker is extremely limited even under optimized samples logistics, as the influence of the degradation occurs rapidly.

The object of the invention was to overcome the effects of the disadvantageous half-life of vasopressin and the variable results in measurements and to develop a method, use and a kit for the detection and determination of the molecules associated with the release of vasopressin, more specially copeptin, for the diagnosis of cardiovascular diseases and sepsis.

This object could be achieved on the basis of the surprising finding that certain fragments of VP prohormone - the pre-

cursor of vasopressin - copeptin in particular, can be used as a tool for the determination of the physiological release of vasopressin, in particular in body fluids, in the diagnosis and monitoring of cardiovascular diseases and sepsis.

This generation of the fragments, copeptin in particular, correlates with the release of vasopressin, since all are derived from the same precursor.

Furthermore the stability of the precursor proteins, fragments and/or combinations thereof *ex vivo* were found to be surprisingly high and render the fragments, copeptin in particular, fully suitable for routine purposes.

This linkage between the fragments like copeptin and other fragments of the precursor peptides made them suitable as diagnostic tools for all diseases, where vasopressin plays a role. Copeptin in particular can therefore be used in medical diagnostics for diagnosing and monitoring a variety of diseases, especially cardiovascular diseases and systemic inflammations, especially sepsis.

Furthermore the present invention in one embodiment relates to the use of copeptin for diagnosis of the diseases, course control and prognosis for the above mentioned diseases where vasopressin plays a role.

Clinical data may additionally be taken into consideration to support the determination of the disease.

It is possible to use amino acid sequences showing at least 75 % homology, preferred 80 % homology more preferred at least 90 % homology to copeptin according to the present invention.

In a preferred embodiment of the present invention according to the following examples two regions (PATV17; PLAY17) of

the human vasopressin-neurophysin 2-copeptin-precursor amino acid sequence were chosen as immunological binding sites to be recognized by specific antibodies:

positions 132-147: CATQLDGPAGALLRLV (PATV17 - SEQ ID NO:1)
positions 149-164: CLAGAPEPFEPAPDAY (PLAY17 - SEQ ID NO:2),

For calibration purposes and for the preparation of standard solutions, a peptid comprising both binding sites mentioned above was used (PAY33):

positions 132-164: ATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY
(PAY33 - SEQ ID NO:3).

The immunological binding sites PATV17 and PLAY17 to be recognized by specific antibodies were selected such that they do not include the putative glycosylation site of copeptin at position 131. Therefore, the presence or absence of a posttranslational modification (glycosylation) of the determined copeptin should not have any significant impact on the recognition of copeptin in an assay using such antibodies. The term "copeptin", therefore, includes the "naked" copeptin peptide as well as posttranslationally modified forms of said peptide.

When each of the peptides mentioned above were synthesized as described below, an amino terminal cystein residue was added to each copeptin amino acid sequence, and the peptides were chemically synthesized as soluble proteins according to methods known by the person skilled in the art. They were purified and quality controlled by mass spectroscopy and reversed phase HPLC and lyophilised into aliquots (Jerini AG, Berlin, Germany).

The synthesized peptides according to the present invention were used to produce antigens and injected into animals to raise antibodies against copeptin according to the present

invention. Different methods can be used to achieve this object known by the person skilled in the art.

In a preferred embodiment the peptides PATV17 and PLAY17 were conjugated to a carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) via MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) according to the methods of Pierce, Rockford, IL, USA. Antibodies were produced to the above mentioned peptides in sheep. In a preferred embodiment of the present invention, polyclonal antibodies were raised against the above mentioned peptides. Antibodies were purified according to known methods. In a preferred embodiment of the invention, this was achieved preferably by ligand specific affinity chromatography by coupling the peptides via the amino terminal cystein residue to SulfoLink-Gel of Pierce (Boston, USA) according to the methods of Pierce. In a preferred embodiment the antibodies were tagged with a marker to enable detection. The marker used is preferably a luminescent marker and in a yet more preferred embodiment, the antibody was tagged with a chemiluminescent marker and in a yet further preferred embodiment the antibodies against PATV17 (0413-pAK) and PLAY17 (0417-pAK) were tagged with a chemiluminescent marker.

The invention in a further preferred embodiment involves the use of the generated antibodies for detection of coceptin in accordance with the present invention in samples of body fluids, as well as a kit comprising a certain quantity of such an antibody or more antibodies specific to detect molecules in accordance with the present invention. Different assays can be used to detect the molecules as are known to the person skilled in the art comprising competitive or sandwich immunoassays in manual, automated or point of care test formats employing various kinds of labels.

Methods for the detection of binding of the antibody to the respective molecule are also known by the person skilled in

the art. All such known assay formats can be used in the context of the determination of copeptin. It is, for example, within the scope of the present invention to determine copeptin with the aid of a rapid test device, e.g. of the immunochromatographic type, as so-called POC (Point of Care) test. The determination of copeptin can also be conducted with a homogeneous assay of the so-called KRYPTOR® type, using the so-called TRACE® technology.

A preferred embodiment of the present invention discloses the use of antibodies generated against the above mentioned peptides, 0413-pAK and 0417-pAK, in particular for a two-site immunoassay of the sandwich type. Another preferred embodiment of the invention discloses the use of these antibodies for the detection and the determination of the concentration of the molecules of the present invention, copeptin in particular in various body fluids and other biomaterials. In a preferred embodiment copeptin can be detected at concentrations above 50 pg/ml of body fluid (Figure 1).

In one embodiment the invention is based on and uses the discovered long term stability of copeptin *ex vivo* in plasma and serum (Table 2). In plasma and serum copeptin levels were surprisingly stable even after two days storage at room temperature. Thus copeptin is by far more suitable for diagnostic purposes than vasopressin.

A preferred embodiment of the invention discloses the use of antibodies generated against PLAY17 and PATV17 for the detection of copeptin in healthy individuals, in patients with sepsis, cardiac infarction and increased arterial blood pressure (Figure 2), and for determining the severity of chronic or congestive heart failure (CHF) (Figure 4).

The invention further permits the determination of the presence and stability of the molecules of the present

invention, copeptin in particular in body fluids, and the determination of the difference in peptide concentration in healthy controls and patients of various diseases comprising those mentioned above (Fig. 2; Fig. 4). The median of healthy control individuals is at about 13 pg/ml.

The invention further discloses a significant change of the concentration of the humoral biomarker copeptin in body fluids in state of disease comprising those mentioned above.

A preferred embodiment of the invention is based on the surprising finding of a highly significant change i.e. an about 10 fold increase in copeptin concentration in plasma of sepsis patients (median 150,5 pg/ml) and in cardiac infarction (median 129,5 pg/ml) and an about 35 fold increase in patients with increased arterial blood pressure (median 459,5 pg/ml).

In patients with CHF the measured levels of copeptin correlates well with the severity of the illness which is generally evaluated using the New York Heart Association (NYHA) functional classification system, wherein NYHA classes I to IV correspond to the following typical functional capacities: NYHA class I - asymptomatic; NYHA class II - symptoms with moderate exertion; NYHA class III - symptoms with minimal exertion; NYHA class IV - symptoms (dyspnea) at rest. In a study in which copeptin levels in plasma samples of a total of 348 CHF patients (25 in NYHA class I; 124 in NYHA class II; 127 in NYHA class III; 72 in NYHA class IV; see Table 1) were determined, the medians for the different classes showed a clear tendency (see Table 1 below).

The invention also provides a diagnostic method, kit and assay for the above mentioned diseases, using one or more antibodies of copeptin in particular.

Description of the Figures

- Fig. 1 shows the standard curve for the sandwich-immunoassay for copeptin immunoreactivity using the peptide PAY33 as a standard material.
- Fig. 2 shows the concentration of copeptin immunoreactivity in samples of healthy individuals and different groups of patients (sepsis, cardiac infarction and increased arterial blood pressure).
- Fig. 3 shows the vasopressin prohormone amino acid sequence (one-letter code; cf. also SEQ ID NO:4).
- Fig. 4 shows the concentrations of copeptin immunoreactivity in samples of patients with CHF (chronic heart failure) classified according to the NYHA classification system.

Materials, methods and measurements

Example 1

Peptide Synthesis

Peptides were synthesized and their quality was controlled by mass spectrometry and reversed phase HPLC and lyophilized in aliquots (Jerini AG, Berlin, Germany) according to standard procedures known to the person skilled in the art. The amino acid sequences of the peptides are the following (numbers refer to corresponding positions in the human pro-vasopressin-neurophysin 2-copeptin-precursors (positions 132-147 and 149-164):

PATV 17 (132-147 + N-terminal cystein residue):
CATQLDGPAGALLRLV [Sequence ID 1],

PLAY 17 (149-164 + N-terminal cystein residue):
CLAGAPEPFEPAPDAY [Sequence ID 2],

Standard peptide PAY 33 (132-164)
ATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY [Sequence ID 3].

Example 2

Conjugation and Immunization

Peptides of Sequence IDs 1-2 were conjugated to the carrier protein KLH (keyhole limpet hemocyanin) by MBS (-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid ester) according to the protocols for "NHS-esters-maleimide crosslinkers" by PIERCE, Rockford, IL, USA. Sheep were immunized receiving 100 μ g of conjugate (μ g according to the peptide content of the conjugate) and subsequently 50 μ g of conjugate every four weeks (quantity related to the peptide content of the conjugate). Starting at month 4 after immunization every four weeks 700 ml of blood were withdrawn from every sheep and antiserum was gained by centrifugation. Conjugation, immunizations and production of antisera were done by MicroPharm, Carmarthenshire, UK.

Example 3

Purification of Antibodies

The polyclonal antibodies from sheep were purified using ligand specific affinity purification. For that step the peptides PATV 17 and PLAY 17 were linked to SulfoLink-Gel supplied by Pierce (Boston, USA). The binding occurred according to the protocol of Pierce. 5 mg of peptide were added per 5 ml of gel.

In summary, columns were washed three times with 10 ml elution buffer (50 mM citric acid, pH 2.2) and binding

buffer (100 mM sodium phosphate, 0.1% Tween, pH 6.8). 100 ml of sheep antiserum were filtered using a filter diameter of 0.2 μ m and added to the column material, which had been transferred from the column to a beaker with 10 ml binding buffer. The material was incubated over night at room temperature by gentle rotation. The material was transferred to empty columns (NAP 25, Pharmacia, emptied). The eluates were discarded. Subsequently the columns were washed with 250 ml protein-free binding buffer (protein content of washed eluate < 0.02 A 280 nm). Elution buffer was added to the washed columns and fractions of 1 ml were collected. The protein content of each fraction was determined by the BCA-method (according to the protocol of PIERCE, Rockford, IL, USA). Fractions of a protein content > 0.8 mg/ml were pooled. After determination of protein content 39 mg of anti-PATV 17 antibody 0413-pAk and 103 mg of anti-PLAY 17 antibody 0417-pAk were gained.

Example 4

Tagging

The anti-PLAY 17 antibody 0417-pAk was treated as follows: 500 μ l of affinity purified antibodies generated were rebuffered in 1 ml 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) via a NAP-5 gel filtration column (Pharmacia) according to the protocol of Pharmacia. The protein concentration of antibody solution was 1,5 mg/ml.

For the tagging with a chemiluminescent marker 10 μ l of MA70-Akridinium-NHS-ester (1mg/ml; Hoechst Behring) were added to 67 μ l of antibody solution and incubated for 15 minutes at room temperature. Then 423 μ l of 1 M glycine was added and incubated for 10 minutes. The solution was rebuffered in 1 ml solvent A (50 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4) using a NAP-5 gel filtration column according to the protocols of Pharmacia. For final elimination of

unbound label a gel filtration HPLC was done (Column: Waters Protein Pak SW300). The sample was added and chromatographed at a flow rate of 1ml/minute in solvent A. The flow was continuously monitored in a UV-meter at wave length of 280 and 368 nm to determine the degree of tagging. The absorption ratio 368/280 nm of labelled antibody was 0,1. The fractions containing monomeric antibodies were collected (retention time 8-10 minutes) and taken up in 3 ml 100mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5% bovine serum albumin, 0,1 % sodium azide, pH 7.4)

Example 5

Coupling

The anti-PATV 17 antibody 0413-pAk was immobilized on irradiated 5 ml polystyrol tubes (Greiner, Germany). For that procedure the antibody solution was diluted to a protein concentration of 6.6 µg/ml with 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.8. 300 µl of diluted protein solution per tube were pipetted. These were incubated for 20 hours at 22°C, the solution was removed. Then 4.2 ml of a 10 mM sodium phosphate, 2 % Karion FP, 0.3 % bovine serum albumin, pH 6.5 solution were added to each tube. After 20 hours the solution was removed and the tubes were dried in a vacuum drier.

Example 6

Immunoassay

The following assay buffer was used: 100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5 % bovine serum albumin, 0.1 % unspecified sheep IgG, 0.1 % sodium azide, pH 7.4.

The copeptin concentration of EDTA-plasma of healthy individuals and patients of various diseases/diseases mentioned above was determined, heart diseases and diseases of the

circulation in particular.

As a standard material chemically synthesized peptide (peptide PAY 33) was used which corresponds to positions 132-164 of vasopressin-neurophysin 2-copeptin precursor. The standard was diluted in normal horse serum (Sigma).

In the test tubes 100 μ l of standards or sample as well as 100 μ l of assay buffer was pipetted. The tubes were incubated for two hours at 22°C using gentle rotation. After washing 4 times with 1 ml of washing buffer (0.1 % Tween 20), the supernatant was discarded. Then 200 μ l of assay buffer, containing 1 million RLU (relative light units) of MA70-tagged antibody was added and incubated for a further two hours under gentle rotation at 22°C. After washing 4 times with 1 ml of washing buffer (0.1 % Tween 20), the chemiluminescence bound to the tube was determined in a luminometer (Berthold, LB952T, basic reagents Brahms AG). Using the software MultiCalc (Spline Fit) the concentrations of the samples were determined.

Example 7

Determination of copeptin concentration

The term copeptin immunoreactivity describes the amount of substrate detected by the developed sandwich immunoassay. The sandwich immunoassay uses antibodies raised against positions 132-147 and 149-164 of the vasopressin-neurophysin 2-copeptin-precursor for detection of the substrate. A typical standard curve for the developed assay is described in Fig. 1. Using the assay concentrations above 50 pg/ml copeptin immunoreactivity in plasma or serum can be determined quantitatively.

Example 8Concentration of copeptin immunoreactivity in healthy individuals and state of disease

Serum and plasma of healthy individuals and patients suffering from various diseases comprising sepsis, cardiac infarction and increased arterial blood pressure were analysed (Fig. 2): The copeptin immunoreactivity was determined. Compared to healthy individuals copeptin immunoreactivity was surprisingly increased in state of disease. Healthy individuals showed a median of about 13 pg/ml, sepsis patients a median of about 150 pg/ml, in cardiac infarction the median was about 129 pg/ml and in increased arterial blood pressure the median was about 459 pg/ml.

Example 9Concentration of copeptin immunoreactivity in patients with chronic heart failure (CHF) of NYHA classes I to IV

In serum and plasma samples of a total of 348 CHF patients (25 in NYHA class I; 124 in NYHA class II; 127 in NYHA class III; 72 in NYHA class IV; see Table 1) copeptin levels were determined using the assay described above. The results are shown in diagrammatic form in Figure 4. As can be seen, the medians of the copeptin concentration in pg/ml for the different classes showed a clear tendency to increase in that the median for patients of NYHA class I was found to be 20.30 pg/ml, class II 33.25 pg/ml, class III 49,60 pg/ml, and class IV 85.80 pg/ml (see the statistical data in Table 1 below).

Table 1

	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV
Number of values	25	124	127	72
Median	20.30	33.25	49.60	85.80
Mean	27.00	45.32	63.91	184.7
Lower 95% CI of mean	17.45	38.79	55.29	118.9
Upper 95% CI of mean	36.56	51.86	72.54	250.5

CI = confidence interval

The finding that there is a close correlation of the severity of CHF with the copeptin levels in plasma makes copeptin a biomarker candidate for use in the diagnosis (positive or negative diagnosis) of CHF, the monitoring of the course and evolution of CHF and the monitoring and control of a CHF therapy. Further, in view of current attempts to evaluate the usefulness of vasopressin receptor antagonists in the therapy of heart failure [27], the determination of copeptin in serum or plasma samples of heart failure patients can allow the identification of such patients who would benefit more than others from a treatment with vasopressin receptor antagonists.

Example 10

Stability of copeptin immunoreactivity

Copeptin immunoreactivity was found to be surprisingly stable in plasma and serum (Table 2). Table 2 shows the *ex vivo* stability of endogenous immunoreactive copeptin in serum and plasma of sepsis patients.

TABLE 2

Sample	Storage (days/temperature)	Recovery (%)
Serum (n = 3)	1d / 4°C	98,0 %
	2d / 4°C	99,2 %
	1d / RT	94,1 %
	2d / RT	103,7 %
Plasma (n = 5)	1d / 4°C	103,4 %
	2d / 4°C	101,6 %
	1d / RT	99,9 %
	2d / RT	104,9 %

Even after two days storage at room temperature (RT) no decrease in immunoreactivity could be detected.

Thus the *ex vivo* stability of copeptin immunoreactivity is surprisingly remarkably increased as compared to vasopressin.

Literature:

1. Singh Ranger G: The physiology and emerging roles of antidiuretic hormone. *Int. J. Clin. Pract.* 56: 777-782, 2002;
2. Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 345: 588-595;
3. Coates LC, Birch NP: Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. *J. Neurochem.* 70: 1670-1678, 1998;
4. Wilson MF, Brackett DJ, Tompkins P, Benjamin B, Archer LT, Hinshaw LB: Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and *E.coli* shock. *Adv. Shock. Res.* 6: 15-26, 1981;
5. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA: Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Crit. Care Med.* 30: 497-500;
6. Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* 30: 497-500, 2002;
7. Sharshar T, Blanchard A, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: Circulating vasopressin levels in septic shock. *Crit Care Med* 31: 1752-1758, 2003;
8. Forrest P: Vasopressin and shock. *Anaesth Intensive Care* 29: 463-472, 2001;
9. Vincent JL: Endocrine support in the critically ill. *Crit Care Med* 30: 702-703, 2002;
10. Holmes CL, Landry DW, Granton JT: Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2- clinical physiology. *Crit Care* 8: 15-23, 2004;
11. Lindner KH, Strohmer HU, Ensinger H, Hetzel WD, Ahnefeld FW, Georgieff M: Stress hormone response during and after cardiopulmonary resuscitation. *Anaesthesiology* 77: 662-668, 1992;

12. Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH: A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med* 350: 105-113, 2004;
13. North WG: Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp Physiol* 85 Spec No: 27 S-40 S, 2000;
14. Baumann G, Dingmann JF: Distribution, blood transport and degradation of antidiuretic hormone in man. *J Clin Invest* 57: 1109-1116, 1976;
15. Smyth DG, Massey DE: A new glycopeptide in pig, ox and sheep pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 1006-1010, 1979;
16. de Bree FM, Burbach JP: Structure-function relationships of the vasopressin prohormone domains. *Cell Mol Neurobiol* 18: 173-191, 1998;
17. Holwerda DA: A glycopeptide from the posterior lobe of pituitaries. I. Isolation and characterization. *Eur J Biochem* 28: 334-339, 1972;
18. Nagy G, Mulchahey JJ, Smyth DG, Neill JD: The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophysial prolactin releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 524-529, 1988;
19. Hyde JF, North WG, Ben-Jonathan N: The vasopressin-associated glycopeptide is not a prolactin-releasing factor: studies with lactating Brattleboro rats. *Endocrinology* 124: 35-40, 1989;
20. North, W. G. "Biosynthesis of vasopressin and neurophysins" in: D. Gash and G. Boer (eds.), *Vasopressin: Principles and Properties*, pp. 175-209. New York: Plenum Press, 1987);
21. Chesney et al., *J. Lab. Clin. Med.* 1985, S. 106, abrufbar unter www.ncbi.nih.gov;
22. Kluge et al., *Clinical Chemistry* 1999, S. 98-100
23. Robertson et al., *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 52, 1973, S. 2340-2352;
24. North, W. G. et al, "Immunohistochemical Evaluation of

- Vasopressin Expression in Breast Fibrocystic Disease and Ductal Carcinoma *In Situ* (DCIS)", *Endocrine Pathology*, 2003, Vol. 14, No.3, 2003, pages 257-262;
25. North W. G. et al., "Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer". *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 34, 1995, pages 229-235;
 26. North W.G.: "Neuropeptide Production by Small Cell Carcinoma: Vasopressin and Oxytocin as Plasma Markers of Disease", *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 73, 1991, No. 6, pages 1316-1320;
 27. Thibonnier M., Vasopressin receptor antagonists in heart failure, *Current Opinion in Pharmacology* 2003, 3:683-687.

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Diagnostic method for disorders associated with non-physiological alterations of vasopressin release from the neurohypophysis, using copeptin as humoral biomarker

<130> 4470 PCT

<150> EP 04019732.9

<151> 2004-08-19

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 1

Cys Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu Arg Leu
1 5 10 15

Val

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 2

Cys Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln Pro Asp Ala
1 5 10 15

Tyr

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 3

Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu Arg Leu Val
1 5 10 15

Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln Pro Asp Ala
20 25 30

Tyr

<210> 4
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Asp Thr Met Leu Pro Ala Cys Phe Leu Gly Leu Leu Ala Phe
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Cys Tyr Phe Gln Asn Cys Pro Arg Gly Gly Lys Arg Ala
 20 25 30

Met Ser Asp Leu Glu Leu Arg Gln Cys Leu Pro Cys Gly Pro Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Arg Cys Phe Gly Pro Ser Ile Cys Cys Ala Asp Glu Leu Gly
 50 55 60

Cys Phe Val Gly Thr Ala Glu Ala Leu Arg Cys Gln Glu Glu Asn Tyr
 65 70 75 80

Leu Pro Ser Pro Cys Gln Ser Gly Gln Lys Ala Cys Gly Ser Gly Gly
 85 90 95

Arg Cys Ala Ala Phe Gly Val Cys Cys Asn Asp Glu Ser Cys Val Thr
 100 105 110

Glu Pro Glu Cys Arg Glu Gly Phe His Arg Arg Ala Arg Ala Ser Asp
 115 120 125

Arg Ser Asn Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu
 130 135 140

Arg Leu Val Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln
 145 150 155 160

Pro Asp Ala Tyr

1. Diagnostic in vitro method for the diagnosis and monitoring of disorders associated with or caused by non-physiological alterations of vasopressin release from the neurohypophysis by determining in a sample of a body fluid of the patient the amount of copeptin or a pathophysiologically occurring splice variant, fragment or posttranslationally modified form of copeptin displaying copeptin immunoreactivity, and associating the determined amount of copeptin or copeptin immunoreactivity with the presence and/or course and/or severity and/or prognosis of such disorder.

2. Method according to claim 1, wherein said disorder associated with or caused by non-physiological alterations of vasopressin release from the neurohypophysis is selected from the group consisting of cardiovascular diseases, especially chronic or congestive heart failure, cardiac arrest, cardiac shock, cardiac infarction, acute myocardial infarction, arterial hypertension, cardiac surgery; cirrhosis; pulmonary disorders; kidney (renal) diseases as polycystic kidney disease; Diabetes insipidus; forms of hyponatremia, forms of syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion; hemorrhage, edema-forming states, inflammatory diseases, trauma, burns, infectious complications thereof and sepsis, severe sepsis and septic shock; and diseases/disorders of the central nervous system (CNS).

3. Method according to claim 1 or 2, wherein the copeptin immunoreactivity is an immunoreactivity which can be determined by using a sandwich immunoassay using a first specific binder recognizing an amino acid sequence present in SEQ ID NO:1, and a second specific binder recognizing an amino acid sequence present in SEQ IN NO:2.

4. Method according to claim 3, wherein said specific

binders are polyclonal and/or monoclonal antibodies.

5. Method according to claim 3 or 4, wherein said immunoassay is a heterogenous immunoassay using a first immobilized specific binder and a second solubilized specific binder which carries a detectable label or which can be selectively labeled by reaction with a labeled marker molecule.

6. Method according to claim 3 or 4, wherein said immunoassay is a homogeneous immunoassay.

7. Method according to any of claims 1 to 6, wherein the biological fluid is selected from serum, plasma, blood or liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid; CSF).

8. Method according to claim 2, wherein said disease is selected from sepsis, cardiac infarction, chronic heart failure and increased arterial blood pressure.

9. Kit for conducting a method in accordance with any of claims 1 to 8, comprising reagents for an immunoassay comprising

- at least one first antibody recognizing a first amino acid sequence present in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, and
- at least one second antibody recognizing another, second amino acid sequence present in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2,
- wherein at least one of said first or second antibodies carries a detectable label.

10. Kit according to claim 9, wherein one of said first or second antibodies is immobilized onto a surface.

11. Kit according to claim 9 or 10, further comprising a peptide to be used as standard and for calibration purposes.

12. Kit according to claim 11, wherein said peptide has the amino acid sequence according to SEQ ID NO:3.

1 Abstract

The use of copeptin as diagnostic marker for the determination of the release of vasopressin, especially in connection with disorders associated with non-physiological alterations of vasopressin release from the neurohypophysis, especially for detection and early detection, diagnosing and monitoring of the course of cardiovascular diseases, renal and pulmonary diseases as well as shock, including septic shock, sepsis and diseases/disorders of the central nervous system and neurodegenerative diseases.

2 Representative Drawing

None

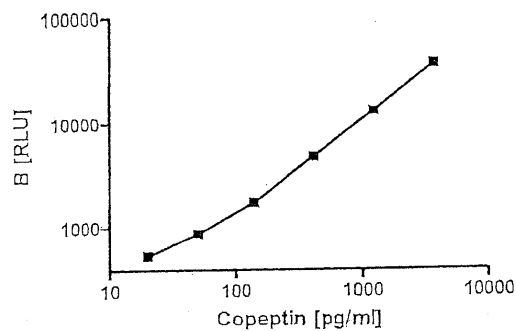


FIGURE 1

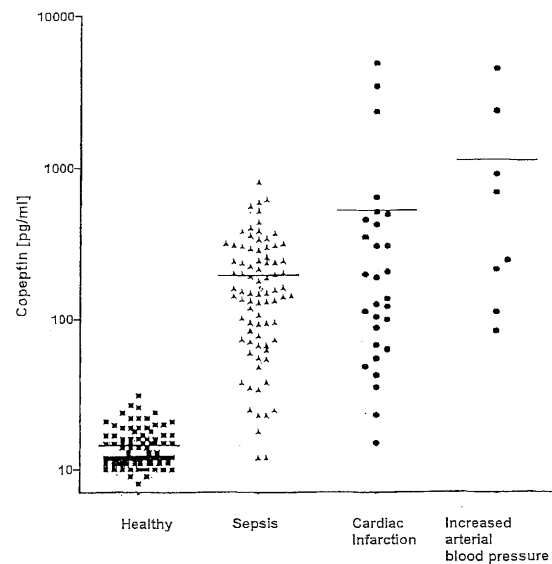


FIGURE 2

10	20	30	40	50	60
MPDTMLPACF	LGLLAFSSAC	YFQNCPRGGK	RAMSDLELRQ	CLPCGPGGKG	RCFGPSICCA
70	80	90	100	110	120
DELGCFVGTG	EALRCQENY	LESPOQSGQK	ACGSGGRCAA	EGVCCNDESC	VTEPECREGF
130	140	150	160		
HRRRASDRS	NATQLDGPAG	ALLLRLLVQLA	GAPEPFEPAQ	PDAY	

1-19 Signal Sequenz
20-28 ARG-VASOPRESSIN.
32-124 NEUROPHYSIN 2.
126-164 COPEPTIN.

FIGURE 3

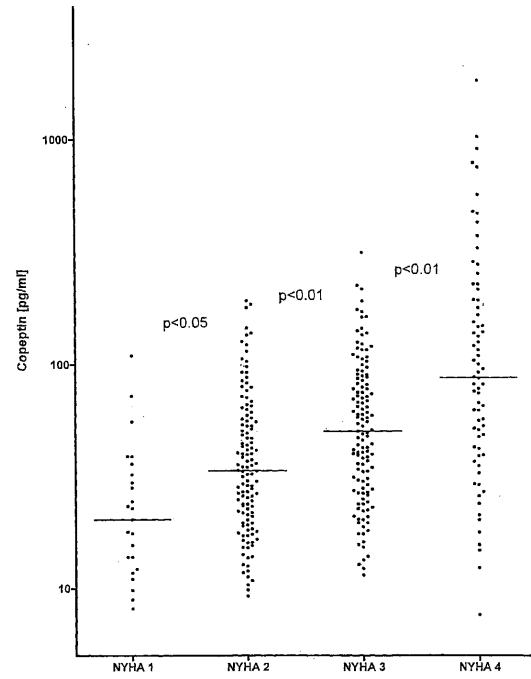


FIGURE 4

专利名称(译)	使用和肽素诊断疾病的方法		
公开(公告)号	JP2011227095A	公开(公告)日	2011-11-10
申请号	JP2011168242	申请日	2011-08-01
[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有限公司		
[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		
发明人	アンドレアス・ベルグマン ヨアヒム・シュトルック		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/16 A61K38/095 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/575 G01N2333/5757 Y10S930/15		
FI分类号	G01N33/53.B C07K7/16.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA42 4H045/DA30 4H045/EA50 4H045/FA20		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2004019732 2004-08-19 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：即使在优化的样品物流下，也极大地抑制了作为生物标志物的用途，因为降解的影响迅速发生，由于血管抑制的体内稳定性低以及血液结合和释放导致的可变结果血小板。 ZSOLUTION：使用和肽素作为诊断标记物来测定血管加压素的释放，尤其是与神经垂体释放加压素的非生理性变化有关的疾病，特别是用于检测和早期发现，诊断和监测心血管病程疾病，肾脏和肺部疾病以及休克，包括脓毒性休克，败血症和中枢神经系统疾病/紊乱和神经退行性疾病。 Z

	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV
数	25	124	127	72
中央値	20.30	33.25	49.60	85.80
平均値	27.00	45.32	63.91	184.7
95%未満のCI の平均値	17.45	38.79	55.29	118.9
95%より大きいCI の平均値	36.56	51.86	72.54	250.5