

(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2005-512060

(P2005-512060A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/53	F
	GO 1 N 33/53	S
	GO 1 N 33/543	5 2 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

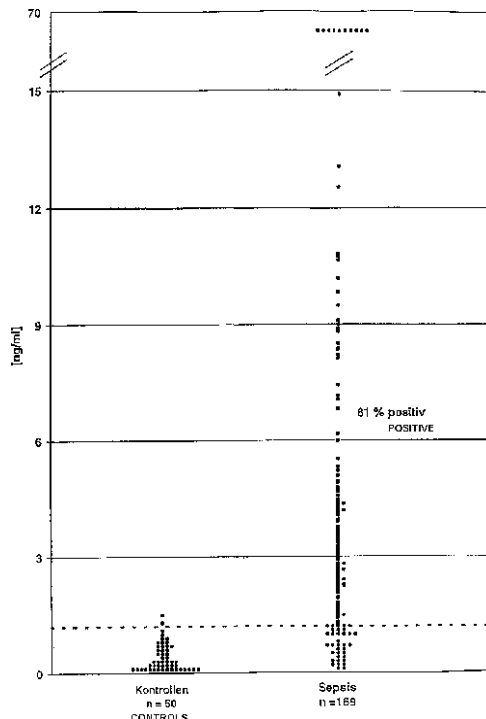
(21) 出願番号	特願2003-549926 (P2003-549926)	(71) 出願人	501154389
(86) (22) 出願日	平成14年11月29日 (2002.11.29)		ペー・エル・アー・ハー・エム・エス・アクティエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒストルフ・ノイエンドルフシュトラセ・25
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013526	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開番号	W02003/048782		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成15年6月12日 (2003.6.12)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	01128851.1		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成13年12月4日 (2001.12.4)	(74) 代理人	100101465
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 青山 正和
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP, US	(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】 可溶性サイトケラチンフラグメントの測定による敗血症の診断方法

(57) 【要約】

敗血症および敗血症様全身性感染症の早期鑑別診断および検出、予後および重篤度の評価および治療に伴う経過の評価のための方法であって、敗血症を患った、または敗血症の疑いがある患者の生物学的流体における一以上の可溶性サイトケラチンフラグメントの量を測定し、かつ、敗血症の存在、予想される経過、重篤度、および/または治療のための開始された処置の成功に関する結論を可溶性サイトケラチンフラグメントの測定量から導くことを特徴とする方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

敗血症および敗血症様全身性感染症の早期鑑別診断および検出、予後および重篤度の評価および治療に伴う経過の評価のための方法であって、敗血症を患った、または敗血症の疑いがある患者の生物学的流体における一以上の可溶性サイトケラチンフラグメントの量を測定し、かつ、敗血症の存在、予想される経過、重篤度、および/または治療のために開始された処置の成功度に関する結論を可溶性サイトケラチンフラグメントの測定量から導くことを特徴とする方法。

【請求項 2】

サイトケラチン 1、8、18 または 19 の一以上の可溶性フラグメントを測定すること 10
を特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

TPA または TPS を測定することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

CYFRA 21-1 を測定することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

患者血清中の sCY1F を測定することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

可溶性サイトケラチンフラグメントの測定が、免疫診断アッセイ法によって実施されることを特徴とする、請求項 1 ないし 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 7】

同時に少なくとも一つのさらなる敗血症パラメータが測定されるマルチパラメータ測定法で実施され、かつ、一組の少なくとも二つの測定変数の形態の測定結果が得られ、高精度の敗血症の診断のために評価されることを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

マルチパラメータ測定法において、少なくとも一つの可溶性サイトケラチンに加えて、プロカルシトニン、CA125、CA19-9、S100B、S100Aタンパク、ペプチドインフラミンおよびCHP、ペプチドプロホルモンおよびC反応タンパク(CRP) からなる群から選択される少なくとも一つのさらなるパラメータを測定することを特徴と 30
する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

マルチパラメータ測定法が、チップ技術測定装置または免疫クロマトグラフィー測定装置による同時測定として実施されることを特徴とする、請求項 7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記測定装置を用いて得られた複数の測定結果の評価がコンピュータプログラムを用いて実施されることを特徴とする、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、可溶性サイトケラチンフラグメントを測定する、敗血症の新規の診断方法に関する。 40

【0002】

本発明は、臨床的知見に基づいて細菌性敗血症と診断され、そしてそれと同時に、公知の敗血症マーカーであるプロカルシトニンの血清濃度が増大した患者の血液循環系において種々の可溶性サイトケラチンフラグメントの濃度が著しく増大することを初めて検出したことに基づいている。前記可溶性サイトケラチンフラグメントは、特に、異なる分野、特に腫瘍マーカーとして知られているパラメータCYFRA21-1およびTPS(組織ポリペプチド特異性抗原)、およびそのより非特異的な歴史的な前駆体TPA(組織ポリペプチド抗原)も含む。 50

【0003】

本発明は、感染性の病因の炎症および敗血症の治療および診断のさらなる改善に関連した、出願人の研究に起因する。

【背景技術】

【0004】

炎症は、種々の外的効果、例えば傷害、やけど、アレルゲン、または微生物、真菌、ウイルスのような微生物の感染、拒絶反応を引き起こす外的組織、または自己免疫疾患や癌のような体の炎症性の内的状態に対する、生物の生理学的反応として一般的に定義されている。炎症は、身体の無害の局在化した反応として生じうるが、個々の組織、器官、器官の一部、および組織の一部の、多数の深刻で慢性的および急性の疾患の典型的な特徴でもある。

10

【0005】

敗血症または敗血症性ショックでは、炎症特異的反応カスケードが、全身にわたり無制御的に広がり、過剰な全身性免疫応答の点で生命を脅かすまでになり得る。内因性の敗血症特異的物質の各群の可能性のある役割および発生に関する現在の知識に関しては、例えば、A.Beishuizenら、“Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock”, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol.33, 1999, 55-131; およびC.Gabayら、“Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation”, *The New England Journal of Medicine*, Vol.340, No.6, 1999, 448-454を参照することができる。敗血症とそれに関連する全身的炎症性疾患の理解、およびかくして認識された定義が近年変化してきたので、

20

【0006】

少なくともヨーロッパでは、血液培養陽性によって検出可能な全身性の細菌感染が敗血症という用語を長きにわたって特徴づけていたが、敗血症は、今や、主として、感染により引き起こされる全身性の炎症であると理解されている。このような敗血症の理解の変化は、診断アプローチに変化をもたらした。かくして、細菌性病原体の直接的検出が、生理学的パラメータの複合的なモニタリングにより、そして、より最近では、特に敗血症工程

30

【0007】

または炎症工程に關与するある内因性物質、すなわち特異的「バイオマーカー」の検出により、置換または補足されている。

40

【0008】

敗血症のバイオマーカーとして特に適している公知の内因性物質はプロカルシトニンである。プロカルシトニンは、その血清濃度が感染性の病因の全身的炎症の条件下（敗血症）で非常に高い値に達するが、実際に健常者では検出不可能なプロホルモンである。高濃度のプロカルシトニンは、敗血症の比較的早期においても達成されるので、プロカルシトニンの測定は、敗血症の早期診断、および別の原因を有する深刻な炎症から感染により引き起こされた敗血症の早期診断にも適している。プロカルシトニンの測定は、さらに、敗血症の経過の治療に伴う観察に特に価値がある。敗血症マーカーとしてのプロカルシトニンの測定は、M.Assicotら、“High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection”, *The Lancet*, Vol.341, No.8844, 1993, 515-518; および特

50

許DE4227454C2およびEP0656121B1およびUS5,639,617の主題である。本明細書の記載を補うために、これらの特許および刊行物を参照としてここに含める。近年、プロカルシトニンの主題に関する刊行物の数が増えている。それゆえ、W.Karzaiら, “Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection”, *Infection*, Vol.25, 1997, 329-334; およびM.Oczenskiら, “Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the perioperative period”, *European Journal of Anaesthesiology* 1998, 15, 202-209; およびさらに、H.Redlら “Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin”, *Crit Care Med* 2000, Vol.28, No.11, 3659-3663; およびH.Redlら, “Non-Human Primate Models of Sepsis” *Sepsis* 1998; 2:243-253; およびこれらの文献に引用されているさらなる参考文献も、最近発行された論評の典型として、参照することができる。

10

【0009】

敗血症マーカーであるプロカルシトニンの利用可能性は敗血症の研究に重要な刺激を与え、本出願人により、プロカルシトニン測定を補い、かつ/または敗血症の高精度の診断または鑑別診断のための付加的情報を与えることができるさらなるバイオマーカーを見つけるための集中的な努力がなされている。かくして、生物学的流体、特に血清におけるレベルが適当に高く、その測定がプロカルシトニンの測定結果を単純に繰り返すのではなく、付加的な情報、特に敗血症の経過の段階における情報、すなわち好ましくは時間に伴う敗血症の進行に帰するような情報、および/または敗血症の進行の最初または主な器官における情報、すなわち局在的情報を与えるような、敗血症診断のさらなるバイオマーカーについての調査がなされている。この目的は、例えば、いわゆるチップ技術または免疫クロマトグラフィー法 (“ポイントオブケア” またはPOC測定法) を用いて、敗血症患者または敗血症の可能性のある患者の、血清のような生物学的流体の他、尿のような別の生物学的流体においても、同時に測定できる敗血症パラメータセットの選択、並びに、各パラメーターつだけの測定の情報価値を明らかに凌ぐ情報パターンを全体として提供することである。

20

【0010】

しかしながら、可能性のある新規の敗血症バイオマーカーの研究は、多くの場合、炎症または敗血症の進行に関与するある内因性物質の発生についての正確な理由、または正確な機能についてほとんどあるいは全く分かっていないという事実から、困難である。

30

【0011】

敗血症においてより高濃度で存在する内因性物質は身体の複雑な反応カスケードの一部であることから、そのような物質は診断目的というばかりでなく、例えば、敗血症に観察される炎症の全身的広がりをできるだけ早く止めるために、この種の各物質の形成および/または濃度に影響を与えることにより敗血症の進行に治療的に介入する試みも相当な努力を以て現在進められている。これに関連して、敗血症の進行に関与することが示された内因性物質は、可能性のある治療ターゲットとしても考えられるべきである。

【0012】

さらなる可能性のある敗血症マーカーの測定に対する実りのある純粋に仮説的なアプローチの実験結果がDE19847690A1およびW000/22439に見られる。そこには、敗血症の場合、プロホルモンであるプロカルシトニンの濃度が顕著に増加するだけでなく、ペプチドプロホルモンに含まれる別の物質についても顕著な濃度増加が観察されることが示されている。ペプチドプロホルモンであるプロ-エンケファリン、プロ-ガストリン放出ペプチド (pro-GRP)、プロ-エンドセリン-1、プロ-脳性ナトリウム利尿ペプチド (pro-BNP)、プロ-心房性ナトリウム利尿ペプチド (pro-ANP)、プロレプチン、プロ-ニューロペプチドY、プロ-ソマトスタチン、プロ-ニューロペプチドYY、プロ-インターロイキン6、またはプロ-インターロイキン10をここで挙げるができる。記載されている現象については文書で証明されているが、敗血症におけるプロホルモンの濃度増加の原因は実質的に説明されていない。

40

50

【 0 0 1 3 】

先の未公開の特許出願DE10130985.6には、純粋に経験的なアプローチの結果がさらに記載されており、そこでは、とりわけ、治療された動物にしか検出されないペプチドが、ヒヒへの毒素注入（ネズミチフス菌のLPS）により実験的に誘導された肝臓サンプルにおいて人工的敗血症後に見出されたことが記載されている。それは可溶性サイトケラチン - 1フラグメント（以下、s C Y 1 Fと省略する）であることが示されている。この出願の実験部分に示されているように、ヒヒの肝臓抽出物中に初めて見出されたこのフラグメントs C Y 1 Fは、ヒトの敗血症患者の血清の95%の感度で見出されているが、健常者の血清中には検出されていない。

【 0 0 1 4 】

これらの実験的な知見は、敗血症患者の血清において、別の可溶性サイトケラチンフラグメント、例えば、医学的診断において既に腫瘍マーカーとしての役割を果たしている可溶性サイトケラチンフラグメントの濃度増加も測定可能であるかどうかを実験的に調べる価値があることを明らかにする。

【非特許文献1】A.Beishuizenら, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol.33, 1999, 55-131

【非特許文献2】C.Gabayら, *The New England Journal of Medicine*, Vol.340, No.6, 1999, 448-454

【非特許文献3】K.Reinhartら, *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760

【非特許文献4】M.Assicotら, *The Lancet*, Vol.341, No.8844, 1993, 515-518

【特許文献1】DE4227454C2

【特許文献2】EP0656121B1

【特許文献3】US5,639,617

【非特許文献5】W.Karzaiら, *Infection*, Vol.25, 1997, 329-334

【非特許文献6】M.Oczenskiら, *European Journal of Anaesthesiology* 1998, 15, 202-209

【非特許文献7】H.Redlら, *Crit Care Med* 2000, Vol.28, No.11, 3659-2663

【非特許文献8】H.Redlら, *Sepsis* 1998; 2:243-253

【特許文献4】DE19847690A1

【特許文献5】WO 00/22439

【特許文献6】DE10130985.6

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 5 】

驚くべきことに、敗血症において、典型的な腫瘍マーカーとして今日まで考えられてきた一部の可溶性サイトケラチンフラグメントが顕著に増大することを見出した。これは、これらのフラグメントが腫瘍特異的に形成されるのではなく、むしろこれらの腫瘍マーカーを放出する組織および器官にも影響する全身性の重要な生理学的工程を示すのに役立つ。本明細書および同時に申請した別の出願に記載されている通り、可溶性サイトケラチンフラグメントと一部の別の腫瘍マーカーの濃度は高い感度で敗血症において増加したが、この測定値と、同様に顕著に増大したプロカルシトニン濃度との定量的な相互関係は同時には存在しない。すなわち両方のパラメータは各患者で増加するが、一部の 경우에는、非常に異なる相対量であることが見出された。

【 0 0 1 6 】

本明細書では、用語「可溶性サイトケラチンフラグメント」は、先の未公開の特許出願DE10130985.6に開示されている可溶性サイトケラチン - 1フラグメントも含む包括的な意味で用いられている。先の特許出願DE10130985.6を参照としてここに含め、そのの内容は本明細書の開示の一部と解釈すべきである。

【 0 0 1 7 】

10

20

30

40

50

当該先の出願の開示内容が前記用語“可溶性サイトケラチンフラグメント”および係るフラグメントの特許請求の範囲に記載の使用を予期する従来技術と考えられる限り、そのような開示は、本明細書の特許請求の範囲から放棄により除かれる。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、可溶性サイトケラチンフラグメントの顕著に増大した生理学的濃度が、敗血症患者の生物学的流体、特に血清中に見出され、このことが前記フラグメントを、特にさらなる敗血症パラメータの測定と組み合わせ、敗血症の診断に適したものとすることを最初に見出したことに基づいている。

【0019】

本発明に係る方法およびその好ましい実施態様が、請求項1から10に、より正確に定義される。

【0020】

今日まで、生物学的流体、特に血清における可溶性サイトケラチンフラグメントの濃度が敗血症において顕著に増大すること、並びに、可溶性サイトケラチンフラグメントの濃度の測定が、それゆえ敗血症診断にも重要であることは知られていなかった。これは、一部のサイトケラチンフラグメント、特にパラメータCYFRA21-1およびパラメータTPSまたはそのより特異性の低い前駆体TPAの形態のフラグメントが既に腫瘍診断において測定されており、これらのパラメータの測定に適したアッセイが商業的に入手可能であるという事実にもかかわらず正しい。

【0021】

本発明によれば、診断的敗血症検出法においても可溶性サイトケラチンフラグメントの測定を用いることが可能である。特に興味深いのは、予後マーカーおよび敗血症の経過をモニタリングするためのマーカーとしての、特に別のマーカーとの組み合わせ測定の一部としての、可溶性サイトケラチンフラグメントの適性である。高い感度および特異性により、可溶性サイトケラチンフラグメントは、個々に、または種々のタイプのもものと組み合わせ、初期の敗血症診断において測定可能なマーカーとしても適している。

【0022】

プロカルシトニン測定と組み合わせることに加えて、一以上の可溶性サイトケラチンフラグメントの測定と、今日まで典型的な腫瘍マーカーであると考えられてきた敗血症および全身性炎症のための別のマーカー、特に、炎症の制御に関連するCA19-9、CA125、S100B、またはS100Aタンパク、あるいは下記の本出願人の未公開の独国特許出願に記載の新規の敗血症マーカーであるインフラミン(DE10119804.3)およびCHP(DE10131922.3)、および/または一以上の上記のプロホルモンの測定とを組み合わせることが、特に適している。公知の炎症パラメータであるC反応タンパク(CRP)の同時測定も企図できる。本明細書およびこれと平行する出願に記載されている新しい結果に基づいて、組織または器官特異的炎症マーカーに適した公知の生体分子またはこれから見出される生体分子の測定との組み合わせも、高精度の敗血症診断のために一般的に考慮されるべきである。

【0023】

本出願人による前記先の出願の内容を、本明細書の開示の一部として考慮すべきである。

【0024】

CYFRA21-1は、サイトケラチン19の可溶性フラグメントとして定義される。サイトケラチン19は器官特異的タンパクとも腫瘍特異的タンパクとも考えられないが、CYFRA21-1の測定は、特に気管支癌の診断、治療コントロールおよびモニタリングにおける腫瘍マーカーとして、および膀胱の癌のモニタリングのための腫瘍マーカーとして重要な役割を演じる(cf. Lothar Thomas (editor): Labor und Diagnose, Section 34.10, pp.987-992, 5th Edition, 1998 TH-Books Verlagsgesellschaft)。

【0025】

10

20

30

40

50

これまでの発見に加えて、CYFRA 21-1 は一部の非悪性疾患においても高レベルで存在しうるが、 $> 10 \text{ ng/ml}$ という値は、極めて稀なケースでしか良性疾患と一致しない。良性疾患では、最も高い値は、胃腸疾患の場合に測定された。CYFRA 21-1 の測定およびその測定結果の解釈については、Thomas(上記引用文中)とそこに挙げられている文献に加えて、例えば、M.Sawarら, *Ann Nucl Med* Vol.8., No.4, 301-306, 1994; W.Ebertら, *Scand J Clin Invest* 1995;55 Suppl 221:72-80; Young-Chul Kimら, *Lung Cancer* 30 (2000)187-192を参照することができる。

【0026】

TPS (組織ポリペプチド特異性抗原) は、いわゆる40年以上も知られているいわゆるTPA (組織ポリペプチド抗原) に関連するが、より特徴決定されており、かつより特異的なサイトケラチン-18フラグメントとして定義される。これに関連して、Lars Rylanderら, *Eur. J. Biochem.* 241, 309-314(1996); およびR.Einarssonら, *Anticancer Research* 17:3121-3124(1997)を参照することができる。その測定に用いることができる抗体M3は、サイトケラチン-18のカルボキシ末端セグメントのアミノ酸322-340に結合する。肝細胞性癌、乳癌、および前立腺癌のような腫瘍の腫瘍マーカーとしてのTPSの適性および使用は、例えば、Wei-Jen Yaoら, *Oncology* 2001;61:64-70; M.Sutterlinら, *Anticancer Research* 17:2963-2966(1997); J.M.Wolffら, *Anticancer Research* 20:5003-5006(2000)に記載されている。

10

【0027】

M.Sutterlinら, *Anticancer Research* 17:2963-2966(1997); B.Nismanら, *Cancer* 1998;82:1850-1859; およびV.Stearnsら, *Breast Cancer Research and Treatment* 52:239-259, 1998には、器官特異的腫瘍に対するマーカーとしてのTPSの適性が、別の腫瘍マーカー、例えばさらなるサイトケラチンフラグメントマーカーであるCYFRA 8/18、CYFRA 21-1 および別の典型的な腫瘍関連抗原およびCEAと比較されている。

20

【0028】

敗血症患者では、我々が知る限り、CYFRA 21-1 またはTPSのような可溶性サイトケラチンフラグメントの全身的測定は実施されたことがない。典型的腫瘍マーカーとして考えられているサイトケラチンフラグメントの、全身的炎症(敗血症)患者における測定値(その測定値は大多数のケースで顕著に高い)に関することは何もわかっていない。

30

【0029】

先の特許出願DE10130985.6に記載されているヒヒのモデル実験の知見に加えて、本出願人により実施された調査で初めて、大多数の敗血症患者の血清において、可溶性サイトケラチンフラグメントCYFRA 21-1 およびTPSの濃度および新規炎症マーカーsCYF1Fの濃度が実質的に高いことが見出された。これを以下の実験報告に4つの図面を参照して記載する。

【0030】

実験報告

1. CYFRA 21-1 の測定

商業的アッセイ(B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH社のKRYPTOR-CYFRA 21-1)を用いて、敗血症マーカープロカルシトニン(PCT)に高い値が見られた169人の敗血症患者の血清において、腫瘍マーカーCYFRA 21-1の血清濃度を測定した。81%の敗血症血清において、高いCYFRA 21-1濃度(1 ng/ml より高い)が観察された。コントロールとして用いた50の血清中では、CYFRA 21-1濃度は、僅かにたったの2例しか 1 ng/ml を超えなかった。

40

【0031】

この測定結果のグラフを図1に示す。

【0032】

個人の血清について測定したCYFRA 21-1値をPCTの測定値と比較した場合、最も高いCYFRA 21-1値が、高いPCT濃度が観察された血清において見出される

50

という意味での積極的な定量的相関関係は見いだせなかった。図2は、そのような比較に見られる相関関係を示す。高いCYFRA21-1値(図の上3分の1)が中間的なPCT濃度でも得られ、かつ、CYFRA21-1の中間的な値が非常に高いPCT濃度(図の右3分の1)でも得られることが明らかである。

【0033】

2. T P Sの測定

T P S測定用の商業的アッセイ(DPC-BIERMANN, Bad NauheimのT P S^{T M})を用いて、敗血症マーカープロカルシトニン(PCT)に高い値が見られた49人の敗血症患者の血清において、腫瘍マーカーT P Sの血清濃度を測定した。90%の敗血症血清において、非常に高いT P S濃度(66 U/lより高い)が観察された。一方、21人のコントロールの血清(健康な血液ドナーの血清)の全てが陰性、すなわち66 U/lの基準値未満の測定値を有していた。

10

【0034】

T P S測定の結果のグラフを図3に示す。

【0035】

3. s C Y 1 Fの測定

DE10130985.6に従って可溶性サイトケラチン-1フラグメントs C Y 1 Fの血清濃度を、敗血症マーカープロカルシトニン(PCT)に高い値が見られた20人の敗血症患者の血清において測定した。95%の敗血症血清において、非常に高いs C Y 1 F濃度(3 ng/mlより高い)が観察された。敗血症血清中のs C Y 1 Fの調査測定のために、この目的のために特別に開発した競争的蛍光免疫アッセイを用いた。このアッセイでは、サイトケラチン-1フラグメントの部分配列を含むペプチド(DE10130985.6の配列番号3のアミノ酸214から229のもの)に対するヒツジ抗体が用いられている。この抗体を得るために用いられ、かつ、競争剤として用いられた合成ペプチドは、ペプチドP L Y 1 7の商品名で商業的に入手可能である(Jerini BioTools GmbH)。これは、本明細書に添付する配列表に示される配列番号1のアミノ酸配列を有する。

20

【0036】

以下の工程を、s C Y 1 Fの測定を行うために用いた。

【0037】

ポリスチレンチューブ(Greiner社)を300 μlのP B S中の100 ngのペプチド(P L Y 1 7; 配列番号1)で被覆した。室温で20時間インキュベーションした後、1%のB S Aを含む2 x 4 mlのP B Sで洗浄した。このペプチド被覆チューブを、次の測定を実施するための固相として用いた。ここで、固定されたペプチドとサンプル中のサイトケラチン-1フラグメントとが、上記部分ペプチド配列に対するヒツジ抗体について競争する。この抗体は、抗血清の形態で加えられた。

30

【0038】

測定には以下のスキームを用いた。

1. 上記チューブに100 μgのサンプル(敗血症血清、コントロール血清、または検量溶液)をピペットで移す;
2. 200 μlの抗血清(P B Sで1:5000に希釈)をピペットで移す;
3. 揺すりながら室温で2時間インキュベートする;
4. チューブから未結合の抗体を洗い流す(1 mlのP B Sを満たしデカンテーションする: 4回);
5. 固相に結合した抗体をマーキングするために、300 mlのP B S、1% B S A中のアクリジニウムエステルでマーキングしたロバの抗ヒツジ抗体(B.R.A.H.M.S Diagnostic a)を添加する;
6. 室温で2時間インキュベーションした後、未結合のマーキング抗体を4と同様に洗浄して取り除く;
7. ルミノメーター(Berthold社)により公知の方法で固相に結合したアクリジニウムエステルを測定する。

40

50

【 0 0 3 9 】

検量線を調製するために、公知の量の合成ペプチド（配列番号 1）を含む溶液を用いた。敗血症血清について測定した値と検量線とを対比することにより、サイトケラチン - 1 フラグメントの濃度を決定した。

【 0 0 4 0 】

測定結果のグラフは図 4 に示されている。敗血症におけるサイトケラチン - 1 フラグメント測定の非常に良好な感度が、上記の暫定的で非常に単純で敏感でない競争的測定法を用いて明らかにされた。

【 0 0 4 1 】

可溶性サイトケラチンフラグメントの測定の定量的な結果が実質的に P C T 測定結果から独立であるという事実は、敗血症で両方のパラメータが増加するにもかかわらず、明らかに異なる効果が測定されることを示しており、これは、両方のパラメータを測定することが、唯一のパラメータを測定するよりも多くの情報を提供することを意味する。

10

【 0 0 4 2 】

可溶性サイトケラチンフラグメントの測定と、一以上の別の敗血症マーカーの測定とを組み合わせることは、それゆえ、敗血症の高精度の診断を改善すること、および疾患の経過の予後を改善すること、および敗血症患者の経過の治療に伴うモニタリングに適しており、できるだけ完全に記録した個々のケースの正確な評価に基づく上記組み合わせ測定の結果の理解が（例えば、感染のタイプについての情報、敗血症の理由および経過、患者の年齢および性別の特徴的データ）、評価されたケースの数に伴って着実に改善されるであ

20

【 0 0 4 3 】

可溶性サイトケラチンフラグメントの測定は、適切な選択的抗体を用いた免疫診断方法により患者の体液、特に血清または例えば尿で測定することが、実際的な観点から、最も有利であるように思われるが、所望の適切な検出方法により実施できる。一部の可溶性サイトケラチンフラグメントの測定に関する商業的アッセイが既に入手可能であり、本発明においても用いることができる。必要であれば、敗血症診断に関連する測定範囲における測定の良好な精度が保証されなければならない。

【 0 0 4 4 】

かくして、可溶性サイトケラチンフラグメントの測定は、上記方法により患者の生物学的流体のサンプルにおける可溶性サイトケラチンフラグメントの濃度を測定すること、可溶性サイトケラチンフラグメントの検出された存在および/または量から敗血症の存在に関する結果を導くこと、および得られた結果を重篤度、敗血症の進行、および/または敗血症により最も影響を受けた組織または器官と相関させ、かつ、可能な治療を適切に選択することおよび/または治療の展望を評価することにより、敗血症の診断、特に敗血症の早期の鑑別診断、および検出および予後の準備、重篤度の評価、および経過の治療に伴う評価のために実施することができる。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 5 】

【 図 1 】 50 人のコントロール（血液ドナー）群と比較した、169 人の敗血症患者の血清におけるパラメータ C Y F R A 2 1 - 1（可溶性サイトケラチン - 19 フラグメント）の測定結果を示す。

40

【 図 2 】 図 1 記載の 169 人の敗血症患者の C Y F R A 2 1 - 1 の測定結果と、同一の血清中のプロカルシトニンの測定結果との定量的相関関係を示す。

【 図 3 】 21 人のコントロール（血液ドナー）群と比較した、49 人の敗血症患者の血清におけるパラメータ T P S（組織ポリペプチド特異性抗原；可溶性サイトケラチン - 18 フラグメント）の測定結果を示す。

【 図 4 】 16 人のコントロール（血液ドナー）群と比較した、20 人の敗血症患者の血清中の s C Y 1 F（DE10130985.6 記載；可溶性サイトケラチン - 1 フラグメント）の測定結果を示す。

50

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft
 <120> Verfahren zur Diagnose von Sepsis unter Bestimmung löslicher Cytokeratinfragmente
 <130> 3636 PCT AS
 <140>
 <141>
 <150> EP 01128851.1
 <151> 2001-12-04
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Contains a partial (AA 14 to 29) sequence of cytokeratin 1
 <400> 1
 Cys Leu Gln Gln Val Asp Thr Ser Thr Arg Thr His Asn Leu Glu Pro
 1 5 10 15
 Tyr

10

20

【図 1】

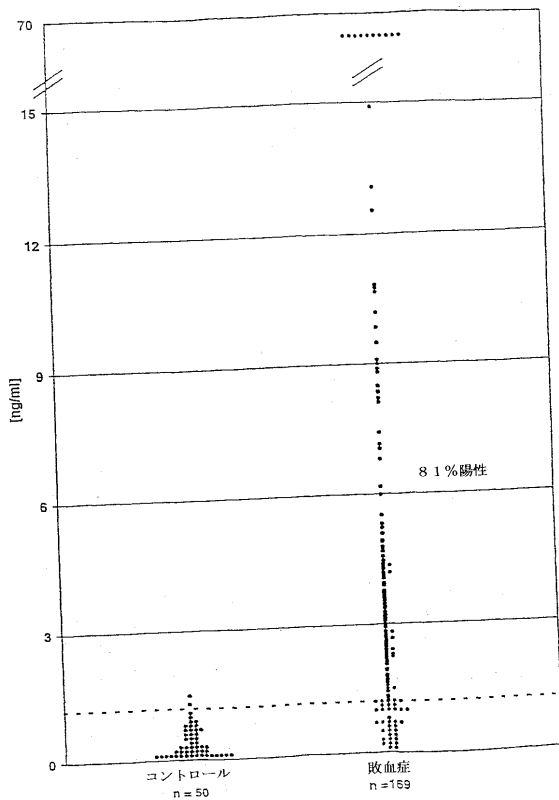


FIGURE 1

【図 2】

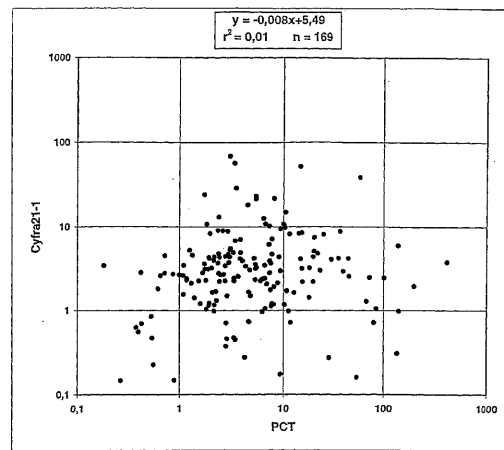


FIGURE 2

【 図 3 】

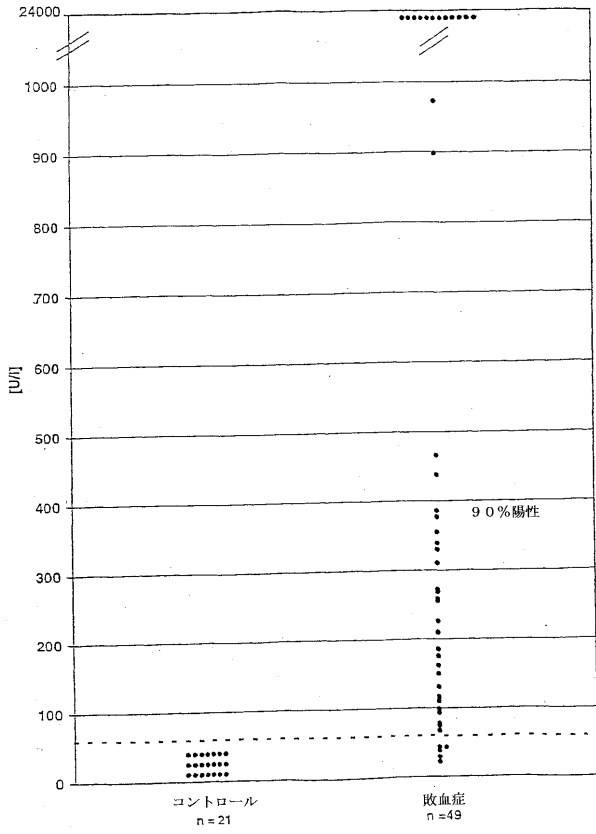


FIGURE 3

【 図 4 】

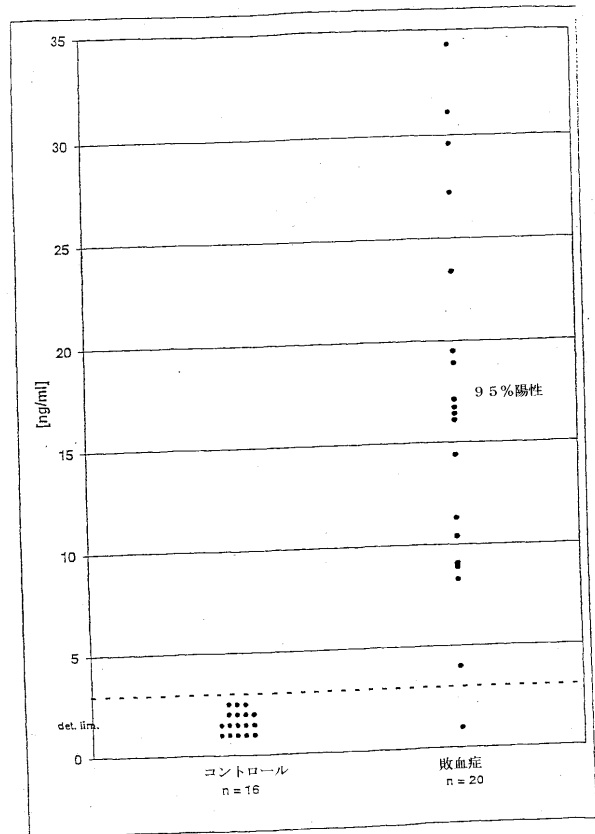


FIGURE 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/569		
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) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STREICHER JOHANNES ET AL: "Anticytokeratins are a potential source of false-positive indirect immunofluorescence assays for C-ANCA." JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 12, no. 1, 1998, pages 54-59, XP008003116 ISSN: 0887-8013 abstract page 55, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1 page 56, right-hand column, paragraph 2 -page 57, left-hand column, paragraph 1 page 57, right-hand column, paragraph 1 --- -/--	1,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 29 April 2003		Date of mailing of the International search report 12/05/2003
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
PCT/EP 02/13526

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TREVISANI LUCIO ET AL: "Cytokeratin tumor marker levels in bronchial washing in the diagnosis of lung cancer." CHEST, vol. 109, no. 1, 1996, pages 104-108, XP008003364 ISSN: 0012-3692 abstract table 1	1,6
A	REINHART, K ET AL: "Intensivmedizin: Sepsis und septischer Schock (Seiten 756-760)" 2001, THIEME VERLAG, XP008003130 cited in the application page 756, right-hand column, paragraph 3	1-6
A	BEISHUIZEN A ET AL: "Endogenous mediators in sepsis and septic shock" ADVANCES IN CLINICAL CHEMISTRY, vol. 33, 1999, pages 55-131, XP008008256 cited in the application page 57, paragraph 2 table 1	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13526

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 G01N33/569		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes 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) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STREICHER JOHANNES ET AL: "Anticytokeratins are a potential source of false-positive indirect immunofluorescence assays for C-ANCA." JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, Bd. 12, Nr. 1, 1998, Seiten 54-59, XP008003116 ISSN: 0887-8013 Zusammenfassung Seite 55, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1 Seite 56, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 57, linke Spalte, Absatz 1 Seite 57, rechte Spalte, Absatz 1 --- -/--	1,6
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
29. April 2003		12/05/2003
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/EP 02/13526

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TREVISANI LUCIO ET AL: "Cytokeratin tumor marker levels in bronchial washing in the diagnosis of lung cancer." CHEST, Bd. 109, Nr. 1, 1996, Seiten 104-108, XP008003364 ISSN: 0012-3692 Zusammenfassung Tabelle 1	1,6
A	REINHART, K ET AL: "Intensivmedizin: Sepsis und septischer Schock (Seiten 756-760)" 2001, THIEME VERLAG, XP008003130 in der Anmeldung erwähnt Seite 756, rechte Spalte, Absatz 3	1-6
A	BEISHUIZEN A ET AL: "Endogenous mediators in sepsis and septic shock" ADVANCES IN CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 33, 1999, Seiten 55-131, XP008008256 in der Anmeldung erwähnt Seite 57, Absatz 2 Tabelle 1	1-6

フロントページの続き

(72)発明者 アンドレアス・ベルクマン

ドイツ・12351・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・47

专利名称(译)	通过测量可溶性细胞角蛋白片段诊断败血症的方法		
公开(公告)号	JP2005512060A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003549926	申请日	2002-11-29
[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		
发明人	アンドレアス・ベルクマン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2800/26 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.F G01N33/53.S G01N33/543.521		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2001128851 2001-12-04 EP		
其他公开文献	JP4291153B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过确定生物流体样品中的一个或多个可溶性细胞角蛋白片段 (I)，对败血症或类似的全身感染进行鉴别诊断 (早期) 检测，从中 (I) 的存在和/或数量得出以下结论： (a) 败血症的存在； (b) 可能的进展； (c) 其严重性； 和/或 (d) 治疗结果是新的。

