

(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2017-223694

(P2017-223694A)

(43) 公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(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 D	4 B O 2 9
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	4 B O 6 4
CO 7 K 17/00 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	4 H O 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 17/00	
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 有 請求項の数 16 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-150421 (P2017-150421)  
 (22) 出願日 平成29年8月3日(2017.8.3)  
 (62) 分割の表示 特願2015-527023 (P2015-527023) の分割  
 原出願日 平成25年8月12日(2013.8.12)  
 (31) 優先権主張番号 1214440.8  
 (32) 優先日 平成24年8月13日(2012.8.13)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 512145734  
 ランドックス ラボラトリーズ リミテッド  
 イギリス BT 2 9 4 Q Y カウンティ  
 アントリム クラムリン ダイヤモンド  
 ロード 5 5 アードモア  
 (74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一  
 (74) 代理人 100131392  
 弁理士 丹羽 武司  
 (72) 発明者 マコネル, アイヴァン  
 イギリス ノーザンアイルランド アント  
 リム BT 2 9 4 Q Y カウンティ ア  
 ントリム クラムリン ダイヤモンド ロ  
 ード アードモア

最終頁に続く

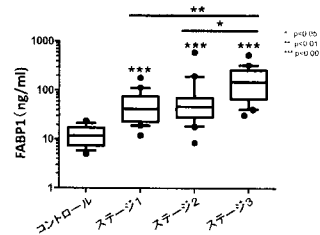
(54) 【発明の名称】 腎疾患バイオマーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】CKDに罹患している患者を、CKDのステージ1~3のうちの1つに階層化する方法を提供する。

【解決手段】患者から得られたサンプル中のFABP1のレベルをコントロール値と比較、GT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルを各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲と比較し、コントロール値と比較して増加されたFABP1のレベル、ならびに各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲内であるGT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルは、患者がステージ1CKDに罹患していることを示す工程を含む。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者から単離されたサンプル中の F A B P 1 のレベルを、前記サンプルと、活性化表面を持ち、前記活性化表面の別々の領域に F A B P 1 に対する抗体が固定化された基材を含むソリッドステートデバイスとを接触させることによって特定すること、および前記サンプル中の F A B P 1 の前記レベルを F A B P 1 のコントロール値と比較することを含み、ここで、前記コントロール値と比較した F A B P 1 の増加が、前記患者が、腎機能障害を有するか、または腎機能障害を発症するリスクを有することを示すものである、患者が、腎機能障害を有するか、または腎機能障害を発症するリスクを有するかを特定するための方法。

10

## 【請求項 2】

前記サンプルが、血清サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

約 15 ng / mL から 75 ng / mL (女性) または 21 ng / mL から 151 ng / mL (男性) の F A B P 1 レベルが、前記患者がステージ 1 またはステージ 2 C K D を有することを示し、約 75 ng / mL (女性) または 151 ng / mL (男性) を超える F A B P 1 レベルが、前記患者がステージ 3 C K D を有することを示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記腎機能障害が、慢性腎疾患 (C K D)、急性腎傷害 (A K I)、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、巣状糸球体硬化症、免疫複合体腎症、ループス腎炎、薬物誘発性腎傷害から成る群より選択される腎疾患もしくは傷害であるか、またはネフローゼ症候群もしくは腎不全として特徴付けられるか、または腎臓移植片拒絶が原因である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記患者から単離されたサンプル中のクレアチニンまたはシスタチン C のレベルを特定し、および前記サンプル中のクレアチニンまたはシスタチン C の前記レベルをコントロール範囲と比較する工程をさらに含み、ここで、前記コントロール範囲と比較した前記サンプル中のクレアチニンまたはシスタチン C の増加は、前記患者が、ステージ 2 またはそれより上の C K D を有することを示す、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記患者から単離されたサンプル中の G T または A S T のレベルを特定する工程をさらに含み、ここで、G T または A S T の前記レベルが、コントロール範囲の G T および A S T のレベル内である場合、F A B P 1 レベルの前記増加は、肝疾患に起因するものではない、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記患者が、代謝症候群を有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

活性化表面を持ち、前記活性化表面の別々の領域に F A B P 1 に対する抗体が固定化された基材を含むソリッドステートデバイス。

40

## 【請求項 9】

F A B P 1 に対する前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 8 に記載のソリッドステートデバイス。

## 【請求項 10】

前記基材が、G T または A S T に対する抗体が固定化された活性化表面を有する、請求項 8 または 9 のいずれか一項に記載のソリッドステートデバイス。

## 【請求項 11】

G T または A S T に対する前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 10 に記載のソリッドステートデバイス。

## 【請求項 12】

50

前記基材が、シスタチンCまたはクレアチニンに対する抗体が固定化された活性化表面を有する、請求項8または9のいずれか一項に記載のソリッドステートデバイス。

【請求項13】

シスタチンCまたはクレアチニンに対する前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項12に記載のソリッドステートデバイス。

【請求項14】

薬物で処理された対象から採取された、サンプル中におけるFABP1のレベルを未処理サンプルのFABP1レベルと比較して、前記薬物がFABP1レベルを下げる効果を有していたかどうかを特定することを含み、ここで、前記FABP1レベルは、活性化表面を持ち、前記活性化表面の別々の領域にFABP1に対する抗体が固定化された基材を含むソリッドステートデバイスを用いて特定されるものである、CKDまたは腎機能障害に対する薬物治療の有効性を特定するための方法。

10

【請求項15】

治療の前後に、患者から得られたサンプル中のバイオマーカー、FABP1、GT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルを特定することにより、CKDに罹患している患者をCKDのステージ1~3のうちの1つに階層化することを含み、ここで、治療後におけるCKDの前記ステージの低下、CKDのより高いステージへの進行の遅延または停止が、前記治療が成功であったことを示すものである、CKDに対する薬物治療の有効性を特定するための方法。

【請求項16】

20

薬物で処理された対象から採取された、サンプル中における、活性化表面を持ち、前記活性化表面の別々の領域にFABP1に対する抗体が固定化された基材を含むソリッドステートデバイスを用いて特定されるFABP1のレベルを、未処理サンプルのFABP1レベルと比較することによって、前記薬物がFABP1レベルを下げる効果を有していたかどうかを特定すること、および前記対象がCKDのステージ1、2、または3を有するかどうかに基づいて、薬物治療プロトコルを選択することを含む、CKDに罹患している対象のための薬物治療プロトコルを特定するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、腎疾患、およびその診断のための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

腎疾患は、腎臓が血液から老廃物をろ過し、除去することができないという病状の種類を表現する一般用語である。腎疾患には、急性腎傷害(AKI)および慢性腎疾患(CKD)という2つの形態が存在する。CKDは、その最も進行した状態以外では、通常は無症候性である。従って、診断のためには、血液および/または尿の検査が一般的には必要とされる。

【0003】

腎臓病予後改善対策(Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)(KDQI)によって策定されたCKDの定義は以下の通りであった：

40

1. 構造または機能異常として定められる腎臓の損傷が少なくとも3か月継続すること(アルブミン尿の増加、例えば、尿中アルブミン/クレアチニン比[UACR] 30mg/g、に基づく場合が最も多い)および/または

2. 少なくとも3か月継続する糸球体濾過率(GFR) < 60 mL / 分 / 1.73 m<sup>2</sup>

【0004】

このフレームワーク内で、KDQIは、次に、CKDを以下の通りの5つのステージに分類した：

ステージ1：GFR 90 mL / 分 / 1.73 m<sup>2</sup> の腎臓損傷

ステージ2：GFR 60 ~ 89 mL / 分 / 1.73 m<sup>2</sup> の腎臓損傷

50

ステージ 3 :  $GFR 30 \sim 59 \text{ mL / 分 / } 1.73 \text{ m}^2$

ステージ 4 :  $GFR 15 \sim 29 \text{ mL / 分 / } 1.73 \text{ m}^2$

ステージ 5 :  $GFR < 15 \text{ mL / 分 / } 1.73 \text{ m}^2$ 、または透析または移植によって治療された腎不全

【0005】

米国では、1999年～2006年の米国国民健康栄養調査(National Health and Nutrition Examination Survey)(NHANES)の研究からのデータに基づくと、20歳以上の成人の11.1パーセント(2240万人)が、ステージ1～3のCKDに罹患していると推定される。米国の20歳以上の成人のさらに80万人は、ステージ4CKDに罹患しており、30万人超が、ステージ5CKDに罹患し、血液透析を受けている。

10

【0006】

1988年～1994年および1999年～2004年のNHANESのデータを分析すると、CKDの罹患率は、すべてのCKDステージについて上昇しているが、CKDステージ3として分類される個人の罹患率が特に増加していることが示唆される。透析を必要とするステージ5CKDを有する患者の数も増加してきている。2015年までに、70万人以上の個人が末期腎疾患(ESRD)を有することになると推定されている。

【0007】

CKDを有する患者の大部分において、CKDは、一次腎疾患(例:糸球体疾患、尿管間質疾患、閉塞症、および多発性嚢胞腎疾患)によって引き起こされ得るが、腎臓損傷は、糖尿病および高血圧症などのその他の医学的病状を伴う。2008年には、ESRDを有する患者を除き、CKDを有するメディケアの患者の48パーセントが糖尿病を有しており、91パーセントが高血圧を有し、46パーセントがアテローム硬化性心疾患を有していた。CKDに対するその他のリスク因子としては、年齢、肥満、家族歴、および民族が挙げられる。

20

【0008】

CKDは、数多くの健康有害事象と関連付けられてきた。多くの研究から、 $30 \sim 59 \text{ mL / 分 / } 1.73 \text{ m}^2$ のGFRは、死亡、心血管疾患、骨折、骨量減少、感染、認知障害、および虚弱のリスクの上昇を伴うと報告されている。同様に、タンパク尿またはアルブミン尿の重篤度と、死亡、ESRD、および心血管疾患を含む健康有害事象との間にも、段階的な関連性が存在すると思われる。さらに、GFRの減少およびアルブミン尿(またはタンパク尿)の増加によって付与される有害事象のリスクは、独立しており、乗法的であると思われる。

30

【0009】

初期ステージCKDのスクリーニングを考える理論的根拠としては、高く上昇しつつあるCKDの罹患率、その既知のリスク因子、その数多くの健康有害事象、その長い無症候期、CKDのための考え得るスクリーニング試験の利用可能性、および初期ステージCKDの経過を改変して、初期ステージCKDの合併症またはその付随する健康状態を軽減し得る治療の利用可能性が挙げられる。

【0010】

選択された集団におけるCKDのスクリーニングを既に推奨している組織もある。国際腎臓病予後改善委員会(KDIGO)は、高血圧症、糖尿病、または心血管疾患を有するすべての患者のスクリーニングを推奨している。米国糖尿病学会は、「専門家のコンセンサスまたは臨床上の経験」に基づいて、糖尿病を有するすべての成人の年1回のスクリーニングを推奨している。高血圧の予防、発見、診断および治療に関する米国合同委員会(JNC7)は、高血圧症および糖尿病を合わせて有するすべての患者の年1回のスクリーニングを推奨している。また、選択的スクリーニングを支援するものとして、全米腎臓基金が、高血圧症、糖尿病を有する、または腎疾患、高血圧症、もしくは糖尿病の病歴を持つ主要血縁者を有するすべての成人に対する無料のCKDスクリーニングを主催している。

40

【0011】

50

CKDステージ1～3を有するほとんどの患者において、GFRはゆっくり低下する。しかし、低下の速度は個人によって様々であり、多くの因子が進行に影響を与えるものと考えられる。CKDステージ1～3は、通常、無症候で進行することから、初期ステージCKDの検出には、実験室での試験が必要である。

#### 【0012】

CKDを有する患者における腎機能または損傷の変化のモニタリングを推奨する組織もある。例えば、腎臓病予後改善対策(KDOQI)は、ESRDの発症を予測し、CKD治療の効果を評価する目的で、CKDを有する成人において、少なくとも年1回の推算GFR測定を推奨している。JNC7は、「腎疾患」を有するすべての患者におけるアルブミン尿の年1回の定量的測定を推奨している。KDOQIはまた、腎機能が悪化しつつあるCKD患者のより頻繁なモニタリングも推奨している。

10

#### 【0013】

組織傷害後に放出される細胞タンパク質の血液中での出現が、急性虚血再灌流、神経障害、癌、臓器移植拒絶、または外傷に起因する組織傷害を有する患者の管理において重要であるとして、ますます関心を集めつつある。脂肪酸結合タンパク質(FABP)は、そのような組織傷害バイオマーカーの1つである。これは、比較的小さい細胞質タンパク質(15kDa)であり、心臓および肝臓を例とする脂肪酸代謝が活性である組織中にて豊富に発現される。FABPの9つの異なる型が現在識別されており、各型は、独特の組織内分布パターンを示す。それらは、最初に発見された組織に応じて名付けられており、肝臓型(L FABP/FABP1)、腸型(I FABP/FABP2)、筋肉および心臓型(H FABP/FABP3)、脂肪細胞型(A FABP/FABP4)、上皮型(E FABP/FABP5)、回腸型(I FABP/FABP6)、脳型(B FABP/FABP7)、ミエリン型(M FABP/FABP8)、および精巢型(T FABP/FABP9)が挙げられる。

20

#### 【0014】

FABPは、長鎖脂肪酸(FA)と高い親和性で結合する。それらの三次構造は、ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフと連結された僅かに楕円形のバレル構造を含んでおり、FAの接触および放出のための入り口(portal)として作用すると考えられている。それらの主たる機能は、細胞内長鎖脂肪酸輸送の促進であり、一方その他の機能としては、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)への脂肪酸シグナル転位を媒介することによる遺伝子発現の制御が挙げられる。

30

#### 【0015】

FABP1は、腎臓の近位尿細管、肝臓、腸、膵臓、肺、および胃で発現される。これは、腸細胞による脂質吸収、ならびに肝細胞の脂質輸送およびリポタンパク質代謝に関与しているとする仮説が立てられてきた。その独特の結合および表面の特徴が、その特異的な機能特性に寄与している可能性が高い。その他のFABPによる長鎖FAの化学量論的結合とは対照的に、各FABP1分子は、2つのFA分子と結合する。これは、リゾリン脂質、ヘム、およびビタミンKなどの様々なその他の小疎水性リガンドとも結合する。

#### 【0016】

米国特許第7,592,148 B1号には、ヒトにおける腎疾患の診断または予後のための方法が開示されており、それは、腎臓組織または尿中のFABP1の検出を含む。Kamijo et al. (Diabetes Care 2011;34:691-6)は、CMIC ELISAを用いて、FABP1の尿中排泄は、腎機能の低下と共に増加するが、血清中FABP1は大きく影響を受けることはないことを示した。これらの方法は、サンプルマトリックスとしての尿中のFABP1の特定を教示するものである。CMIC ELISAは、FABP1の尿分析のためのものが市販されている。米国特許第7,592,148 B1号には、CKDを有する患者から回収した34の尿検体の分析が報告されている。加えて、尿検体中のNAG(Nアセチル D グルコサミニダーゼ)の量も特定されている。NAGは、腎臓組織細胞中に存在するマーカー酵素であり、尿中のNAGレベルは、一般的に、腎臓組織傷害の指標と見なされている。NAGのレベルとFABP1のレベルとは、標準的な

40

50

ケースにおいて、互いに正の相関を示すことが確認された。しかし、15%のケースでは、NAGのレベルは高いが、FABP1のレベルは低かった。このグループでは、腎臓組織中のFABP1のレベルが低いことが示唆された。しかし、これらのサンプルにおいてFABP1のレベルが低いことは、これらの特定の患者における疾患の性質に起因する可能性があり、その結果として、尿中に漏れ出すFABP1の量が減少するものであると仮定することも可能である。

【0017】

Kamijo et alによる刊行物の発見が、他のグループによって行われた研究と合致していないことを示唆する科学文献が存在する。Kim SS et al. (Diab Res Clin Pract, 2012) は、微量アルブミン尿を有する患者の尿中では、FABP1が大きく上昇はしないことを見出した。さらに、彼らは、尿サンプルの多くが、この研究で用いられたCMIC ELISAの検出可能カットオフ範囲以下であることも見出した。Kamijo et al (2006) は、FABP1の発生源が肝臓組織損傷に起因する場合もあることから、血清中FABP1の使用は、腎疾患の有効なバイオマーカーではないことを示している。このことは、腎疾患の診断を補助するためにFABP1の血清中レベルを測定することの有用性が他者によって無視されることに自然と繋がってしまう。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

血清または尿中のCKDに関する臨床的パラメーターを測定することの重要性にも関わらず、この疾患の進行を予測、およびモニタリングするための診断試験はほとんど存在しない。GFRの測定は、腎疾患の初期の検出において十分な感度を持たず、一方、尿タンパク質の測定は、腎疾患に特異的ではなく、この疾患の進行のモニタリングに適してもいない。従って、初期CKDの診断および腎疾患のステージ分類のための特異的で高感度の臨床マーカーが求められている。

20

【0019】

本発明は、腎機能障害の診断のための方法を提供する。より詳細には、本発明は、FABP1に対して高い感度および特異性を有し、CKDの初期診断およびステージ分類のための手段を提供する簡便な血液試験を提供する。

【課題を解決するための手段】

30

【0020】

本発明は、コントロール個人からの血清と比較して、ステージ1、2、および3CKDを有する患者からの血清中では、FABP1の進行的な上方制御が見られるという発明者らによる驚くべき発見に基づいている。

【0021】

第一の態様では、CKDに罹患している患者をCKDのステージ1~3に階層化する方法は、患者から得られたサンプル中のバイオマーカー、FABP1、GT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルを特定すること、ならびにサンプル中のFABP1のレベルをコントロール値と比較し、サンプル中のGT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルを各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲と比較することを含み、ここで、コントロール値と比較して増加されたFABP1のレベル、ならびに各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲内であるGT、AST、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルは、患者がステージ1CKDに罹患していることを示し、またはここで、コントロール値と比較して増加されたFABP1のレベル、各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲内であるGTおよびAST、ならびにクレアチニンおよびシスタチンCの、これらのバイオマーカーに対するコントロール範囲の上限値と比較して増加されたレベルは、患者が、ステージ2またはステージ3CKDに罹患していることを示す。

40

【0022】

第二の態様では、本発明は、患者が、腎機能障害を有するか、または腎機能障害を発症

50

するリスクを有するかを特定するための方法を提供し、その方法は、患者から単離されたサンプル中のF A B P 1のレベルを、そのサンプルと、活性化表面を持ち、その活性化表面の別々の領域にF A B P 1に対する抗体が適用される基材を含むソリッドステートデバイスとを接触させることによって特定すること、およびサンプル中のF A B P 1のレベルをF A B P 1のコントロール値と比較することを含み、ここで、コントロール値と比較したF A B P 1の増加は、その患者が、腎機能障害を有するか、または腎機能障害を発症するリスクを有することを示す。

【0023】

第三の態様では、本発明は、活性化表面を持ち、その活性化表面の別々の領域にF A B P 1に対する抗体が適用される基材を含むソリッドステートデバイスである。

10

【0024】

第四の態様では、本発明は、C K Dのための治療の有効性を特定する方法であり、その方法は、治療の前後に、本発明の第一の態様の方法に従って、C K Dに罹患している患者をC K Dのステージ1～3のうちの1つに階層化することを含み、ここで、治療後のC K Dのステージ数の減少は、その治療が成功したことを示す。

【0025】

第五の態様では、本発明は、適切な治療を特定するために、C K Dに罹患している患者をC K Dのステージ1～3のうちの1つに階層化する方法であり、その方法は、本発明の第一の態様の方法を実施すること、およびその患者が分類されるC K Dのステージに基づいて最適な治療を特定することを含む。

20

【0026】

本発明を、以下の表および図を参照して記述する。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、F A B P 1アッセイの直線性を示す。

【図2】図2は、腎疾患を有する患者からの血清中のF A B P 1レベルを示す。

【図3】図3は、腎疾患を有する患者からの血清中のシスタチンCのレベルを示す。

【図4】図4は、腎疾患を有する患者からの血清中のクレアチニンのレベルを示す。

【図5】図5は、腎疾患を有する患者からの血清中のA S Tのレベルを示す。

【図6】図6は、腎疾患を有する患者からの血清中のG Tのレベルを示す。

30

【図7】図7は、コントロールと比較した、代謝患者から採取された血清中のF A B P 1のレベルを示す。

【図8】図8は、コントロールと比較した、代謝症候群患者から採取された血清中のシスタチンCのレベルを示す。

【図9】図9は、コントロールと比較した、代謝症候群患者から採取された血清中のクレアチニンのレベルを示す。

【図10】図10は、代謝症候群を有する患者およびコントロールからの血清サンプル中のA S Tのレベルを示す。

【図11】図11は、代謝症候群を有する患者およびコントロールからの血清サンプル中のG Tのレベルを示す。

40

【図12】図12は、コントロールグループとすべてのC K D患者とを区別する本発明の特異性および感度を特定するための受信者動作特性曲線(receiver-operator curve)(R O C)分析を示す。

【図13】図13は、ステージ1 C K D患者と、コントロールグループ、ならびにステージ2およびステージ3 C K D患者を含むそれ以外のすべての患者とを区別する本発明の特異性および感度を特定するための受信者動作特性曲線(R O C)分析を示す。

【図14】図14は、ステージ2 C K D患者と、コントロールグループ、ならびにステージ1およびステージ3 C K D患者を含むそれ以外のすべての患者とを区別する本発明の特異性および感度を特定するための受信者動作特性曲線(R O C)分析を示す。

【図15】図15は、ステージ3 C K D患者と、コントロールグループ、ならびにステー

50

ジ1およびステージ2 CKD患者を含むそれ以外のすべての患者とを区別する本発明の特異性および感度を特定するための受信者動作特性曲線（ROC）分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、患者から得られたサンプル中のFABP1のレベルを特定し、そのFABP1のレベルをコントロールと比較することにより、腎機能障害を検出するための方法を提供する。コントロールと比較して増加されたサンプル中のFABP1のレベルは、患者が、腎機能障害を有するか、または腎機能障害を発症するリスクを有することを示す。

【0029】

本発明の文脈における「腎機能障害」の用語は、健康な患者と比較した腎機能の低下を特徴とする病状または疾患を意味するものと理解される。腎疾患としては、慢性腎疾患（CKD）、急性腎傷害（AKI）、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、巣状糸球体硬化症、免疫複合体腎症（immune complex nephropathy）、またはループス腎炎が挙げられ得る。腎機能障害は、薬物誘発性腎傷害または腎臓移植片拒絶によって引き起こされ得る。腎機能障害は、ネフローゼ症候群または腎不全として特徴付けられ得る。

10

【0030】

本発明の文脈において、「コントロール値」とは、健康な個人で通常見出される、FABP1、GT、AST、クレアチニン、またはシスタチンCなどの特定のバイオマーカーのレベルであると理解される。バイオマーカーのコントロールレベルは、健康な個人から単離されたサンプルの分析によって特定されてよく、または当業者によって健康な個人に典型的であると理解されるバイオマーカーのレベルであってもよい。「コントロール」は、当業者によって健康な個人におけるバイオマーカーの正常レベルであると見なされる値の範囲であってもよい。当業者であれば、バイオマーカーのコントロール値が、健康な個人からのサンプル中のバイオマーカーのレベルを分析するユーザーによって、またはサンプル中のバイオマーカーのレベルの特定に用いられるアッセイの製造元が提供する典型値を参照することによって算出され得ることは理解されるであろう。

20

【0031】

好ましくは、患者から単離されるサンプルは、血清サンプルであるが、血漿であってもよい。FABP1のレベルの特定は、患者からの1つ以上のサンプルに対して行われてよい。サンプルは、本技術分野にて日常的に用いられる方法によって患者から得られてよい。

30

【0032】

本発明者らは、CKDに罹患している患者から得られたサンプル中において、この疾患の進行ステージと相関してFABP1が段階的に増加していることを見出した、従って、本発明は、初期CKDの診断に用いることができる。本発明の文脈において、「初期ステージ」とは、KDOQI分類によって定義されるCKDの第一から第三ステージのいずれかを意味するものと理解される。

【0033】

さらなる態様において、本発明は、サンプル中のFABP1のレベルに従い、そのレベルを、上限値レベルおよび下限値レベルを有する値のコントロール範囲のFABP1のレベルと比較することで、CKDの種々のステージに患者を分類する方法を提供する。FABP1の値のコントロール範囲は、集団の個体群統計学（demographic of population）および試験されるサンプルに応じて変動し得る。例えば、健康な個人からの値のコントロール範囲は、尿サンプルと比較して血液サンプルでは異なり得る。任意のサンプルおよび患者の個体群統計学に対する上限値および下限値は、患者コホートからのサンプルを分析して平均値を見出すことにより、当業者によって特定され得る。そのような方法の例は、実施例7に記載される。血清サンプルの場合、好ましくは、女性におけるおよそ15 ng/mLから76 ng/mLの、および男性におけるおよそ21 ng/mLから151 ng/mLの血清中FABP1レベルが、ステージ1またはステージ2 CKDを示す。女性におけるおよそ75 ng/mLより高い、または男性におけるおよそ152 ng/mLより

40

50

高いF A B P 1の濃度は、ステージ3またはそれより上のC K Dを示す。血清中F A B P 1レベルの段階的な増加は、患者における腎疾患の進行速度を評価することが可能であることを意味している。

【0034】

C K Dのステージのうちの一つとして患者を階層化することは、別のタイプと比較して一つのタイプの治療が患者にとって有益であるかどうかを評価すること、また治療が成功であるかどうかをモニタリングすることにも有用である。患者の階層化はまた、患者の予後の特定の補助にもなり、それによって、今後のケアの必要事項の実施が可能となる。

【0035】

推算G F Rは、クレアチニンおよび/またはシスタチンCレベルと逆相関の関係にある。F A B P 1レベルの増加を示す患者において、コントロール値と比較してクレアチニンまたはシスタチンCレベルが増加していれば、患者をステージ1またはステージ2 C K Dとして階層化することができる。従って、本発明の方法は、さらに、サンプル中のクレアチニンおよび/またはシスタチンCレベルの特定、ならびにそのレベルと正常範囲との比較を含んでよい(表14)。コントロール値と比較して増加したF A B P 1のレベルを持つが(実施例7で実証されるように)、クレアチニンおよびシスタチンCのレベルはこれらのバイオマーカーのコントロール範囲内である患者は、ステージ1 C K Dとして分類され得る。コントロール値と比較して増加したF A B P 1のレベル、ならびに各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲と比較して増加したクレアチニンおよび/またはシスタチンCのレベルを持つ患者は、ステージ2 C K Dとして分類され得る。コントロール範囲を超える増加したF A B P 1のレベル、ならびに各バイオマーカーに対するコントロール値の範囲と比較して増加したクレアチニンおよび/またはシスタチンCのレベルは、その患者がステージ3またはそれより上のC K Dに罹患していることを示す。G T、A S T、クレアチニン、およびシスタチンCのレベルは、本技術分野にて公知の日常的に用いられる定量法によって特定することができる。従って、本発明の方法により、腎機能障害を有する患者を、非C K D患者、またはC K Dのステージ1から3のうちの一つである患者として階層化することができる。好ましくは、患者の階層化は、次の基準に従ってよい：

【0036】

「非C K D」 - 健康な個人の cohorts から当業者によって算出された下限値未満のF A B P 1。好ましくは、この下限値は、15 ng / mL (女性)および21 ng / mL (男性)である。

【0037】

「ステージ1」 - 上記で定める下限値超のF A B P 1、ならびにこれらのバイオマーカーに対するコントロール範囲内であるクレアチニンおよびシスタチンCのレベル、ならびにこれらのバイオマーカーに対するコントロール範囲内であるA S TまたはG T。

【0038】

「ステージ2」 - 上記で定める下限値超のF A B P 1、ならびにこれらのバイオマーカーに対するコントロール範囲を超えるクレアチニンおよび/またはシスタチンCのレベル。

【0039】

「ステージ3」 - 上限値超のF A B P 1、ならびにこれらのバイオマーカーに対するコントロール範囲よりも高いクレアチニンおよび/またはシスタチンC。好ましくは、F A B P 1レベルに対する上限値は、> 75 ng / mL (女性)および151 ng / mL (男性)である。

【0040】

バイオマーカーシスタチンC、クレアチニン、A S T、およびG Tに対するコントロール範囲および上限値レベルを、それぞれ、表5~7に示す。

【0041】

10

20

30

40

50

本発明の方法は、F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンのレベルを特定するための本技術分野にて公知の方法を用いてよく、酵素および/もしくは化学タンパク質特定、または免疫学的アッセイに基づく方法などである。F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンのレベルを特定するための免疫学的アッセイは、様々なアッセイフォーマットで実施されてよく、例えば、サンドイッチアッセイ (E L I S A)、競合アッセイ (競合 R I A)、ブリッジ免疫アッセイ (bridge immunoassays)、免疫組織化学的検査 (I H C)、および免疫細胞化学的検査 (I C C) が挙げられる。F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンのレベルを特定するための方法は、F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンと結合する抗体と患者サンプルを接触させること、ならびに結合を検出することを含む。F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンに対する特異性を有する抗体は、従来の方法を用いて支持物質上に固定化されていてよい。支持体上の抗体とのF A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンの結合は、F A B P 1、G T、A S T、シスタチンC、およびクレアチニンに対する特異性を有するさらなる抗体を用いて、または表面プラズモン共鳴法 (ピアコア I n t (B i a c o r e I n t), スウェーデン) などの物理的方法を用いて検出されてよい。

#### 【0042】

好ましくは、患者から単離されたサンプル中のF A B P 1のレベルの特定に、ソリッドステートデバイスが用いられてよい。ソリッドステートデバイスは、活性化表面の別々の領域へF A B P 1に対する抗体が適用される活性化表面を持つ基材を含む。好ましくは、ソリッドステートデバイスは、患者から単離されたサンプル中のF A B P 1のレベルが、サンプル中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (A S T)、およびガンマグルトミルトランスペプチダーゼ (G T)、シスタチンC、およびクレアチニンと同時に特定できるように、多検体アッセイを行ってよい。この実施形態では、ソリッドステートデバイスは、各々が基材に共有結合した所望される抗体を持つ複数の別個の反応部位を有し、ここで、反応部位の間の基材表面は、標的バイオマーカーに対して不活性である。本発明で用いられるソリッドステート多検体デバイスは、従って、非特異的結合をほとんど、またはまったく示さないであろう。

#### 【0043】

本発明で用いられてよいデバイスは、適切な基材の表面を活性化すること、およびその表面上の別々の部位へ抗体のアレイを適用することによって作製されてよい。所望される場合、そのほかの活性領域がブロックされてよい。リガンドは、リンカーを介して基材と結合されてよい。特に、活性化表面は、順次に、オルガノシラン、二官能性リンカー、および抗体と反応されることが好ましい。本発明の方法で用いられるソリッドステートデバイスは、例えば、その全内容が本明細書に援用されるG B A 2 3 2 4 8 6 6に開示される方法に従って製造されてよい。好ましくは、本発明の方法で用いられるソリッドステートデバイスは、バイオチップアレイテクノロジーシステム (B A T) (ランドックスラボラトリーズリミティッド (Randox Laboratories Limited) から入手可能) である。

#### 【0044】

本発明の方法で用いられるソリッドステートデバイスは、F A B P 1に対する抗体を含む。好ましくは、この抗体は、F A B P 1に対して特異的であり、その他のF A B P サブタイプおよびミオグロビンとの交差反応性は、0.5%未満、好ましくは0.1%未満である。好ましくは、F A B P 1抗体は、モノクローナル抗体である。

#### 【0045】

血清中F A B P 1の増加は、肝疾患によって引き起こされることも示されている。腎疾患および肝疾患によって引き起こされるF A B P 1レベルの増加を区別するために、本発明は、肝疾患の1つ以上のバイオマーカーの特定、およびこれらのバイオマーカーのレベルのコントロールとの比較をさらに含んでよい。肝疾患のバイオマーカーとしては、A S TおよびG Tが挙げられ得る。従って、サンプル中で観察されるF A B P 1のレベルの増加は、A S TまたはG Tなどの他の肝臓損傷マーカーが正常範囲内であり、試験の

精度が確保されていることを確認することによって、患者が腎疾患を有するとして認められ得る。従って、肝疾患または腎疾患によって引き起こされるF A B P 1レベルの増加を区別し、患者をステージ1 C K Dおよびステージ2 C K Dに階層化する場合、本発明の方法で用いられるソリッドステートデバイスは、A S T、G T、シスタチンC、およびクレアチニンに特異的な抗体をさらに含んでよい。

【0046】

本発明の方法を用いて、術後の患者をモニタリングし、患者が腎臓合併症を発症するリスクを評価することができる。具体的には、術後の任意の間隔で患者からサンプルが採取され、サンプル中のF A B P 1のレベルが特定されてよい。特定の時間枠にわたるF A B P 1レベルの評価により、患者が初期ステージのC K Dに罹患しているかどうかを臨床医に示され、それに応じて、医学的介入を実施することができる。

10

【0047】

代謝症候群を有する患者では、C K Dを発症するリスクが高められていることは受け入れられている。従って、これらの患者を識別し、C K Dの種々のステージに階層化することができるアッセイは、その患者に対する任意の治療が成功する可能性の評価において、または今後の治療プロトコルのための予後の手引きの提供において、臨床的に非常に有益なものとなる。国際糖尿病連合による代謝症候群の診断のための基準は、以下の通りである：

【0048】

【表1】

20

表1

中心性肥満（ウエスト周囲長*として、民族に特異的値と共に定義）プラス、以下の4因子のうちいずれか2つ：	
トリグリセリドの上昇	$\geq 150 \text{ mg/dL}$ ( $1.7 \text{ mmol/L}$ ) またはこの脂質異常に対する特定の治療中
HDLコレステロールの低下	男性 $< 40 \text{ mg/dL}$ ( $1.03 \text{ mmol/L}$ ) 女性 $< 50 \text{ mg/dL}$ ( $1.29 \text{ mmol/L}$ ) またはこの脂質異常に対する特定の治療中
血圧の上昇	収縮期血圧 $\geq 130$ もしくは拡張期血圧 $\geq 85 \text{ mmHg}$ またはこれまでに診断された高血圧の治療中
空腹時血漿中グルコースの上昇	(FPG) $\geq 100 \text{ mg/dL}$ ( $5.6 \text{ mmol/L}$ ) またはこれまでに2型糖尿病と診断 $5.6 \text{ mmol/L}$ もしくは $100 \text{ mg/dL}$ を超える場合、OGTTが強く推奨されるが、症候群の存在を必ずしも定めるものではない。

30

\*BMIが  $> 30 \text{ kg/m}^2$  である場合、中心性肥満であると仮定してよく、ウエスト周囲長を測定する必要はない。

40

【0049】

本発明者らは、代謝症候群患者の血清中F A B P 1の分析から、健康ドナーサンプルと比較して、F A B P 1の濃度の統計的に有意な増加が見出された。本発明の方法は、従って、代謝症候群を示す患者にとって、これらの患者を種々のステージのC K Dに階層化する手段として、特に適している。より好ましくは、代謝症候群に罹患している患者を、C K Dの初期ステージの間に（ステージ1または2を含む）、本発明の方法によって診断し、腎疾患発症のリスクを低下させるために、臨床的に管理し、モニタリングすることができる。同様に、G F R不全を有する代謝症候群患者を、本発明の方法を用い

50

てさらに階層化し、腎疾患のリスクがより高い患者を識別することもできる。

【0050】

代謝症候群に罹患している患者は、基礎肝疾患に起因するFABP1レベルの増加を有する場合がある。従って、患者が代謝症候群に罹患している場合、本発明の方法は、さらに、患者から得られたサンプル中のASTまたはGTなどの肝疾患に対するバイオマーカーのレベルを特定する工程、およびこれらのマーカーのレベルをコントロールと比較して、FABP1の増加が腎疾患に起因するものであることを確認する工程を含んでよい。

【0051】

本発明を、以下の限定されない実施例を参照してさらに記載する。

10

【実施例】

【0052】

実施例1：組換えヒトFABP1の発現

大腸菌(BL21)細胞中におけるヒトFABP1 1抗原の発現

T7プロモーターの支配下のFABP1発現コンストラクトを、大腸菌K12株BL21細胞中へ形質転換した。形質転換した細胞を、100µg/mLのアンピシリンを含有するLBカンテンプレート上で一晚増殖させた。一晚の培養物は、新たに画線引きしたプレートから増殖させ、LBプロス100mLの接種に用いた。この培養物を、細胞密度が0.4~0.8AUのOD<sub>600</sub>に達するまで、37°Cでインキュベートした。1mMのIPTGを添加することで、T7RNAポリメラーゼによる発現を誘発し、この細胞を、振とうしながら、37°Cで2時間インキュベートした。

20

【0053】

ヒトFABP1抗原の精製

細胞を遠心分離(15分間; 5000rpm; 4°C)で回収し、ペレットを、1×PBS pH7.2で洗浄した。次に、ペレットを液体窒素中で瞬間冷凍した。この細胞ペレットを、2mM PMSF(シグマ)および10µg/mLデオキシリボヌクレアーゼI(シグマ)を含有するCellLytic B(シグマ)中、撹拌しながら4°Cにて1時間溶解した。次に、遠心分離によって上澄を透明化した(15分間; 5000rpm; 4°C)。目盛り付きコバルトセファロースカラム(容量10mg HISタグタンパク質/mL樹脂)を調製し、20mM Tris HCl pH8.0(5CV)で洗浄した。HISタグタンパク質を、PD10カラム上、重力流で精製し、次に1×PBS pH7.2中へ脱塩した。タンパク質の濃度を、A<sub>280</sub>で特定した。純度を、SDS PAGE-銀染色およびQuantiscan(著作権)により特定した。

30

【0054】

実施例2：FABP1特異的モノクローナル抗体の開発

組換えヒトFABP1の水溶液を、フロイント完全アジュバント(FCA)と配合して、50%(体積/体積)FCA中の0.1mg/mLの免疫原から成るエマルジョンを形成した。3匹のヒツジに対して、各動物の側腹部の4つの部位の各々に0.25mLのこのエマルジョンを筋肉内注射することで免疫化を行った。続いての追加免疫(ブースト)は、50%(体積/体積)フロイント不完全アジュバント(FIA)中に乳化された0.05mg/mLの免疫原から構成し、これらを、ポリクローナル応答が確認されるまで、月1回、同じ方法で投与した。次に、各動物の腋窩および前肩甲部(prescapular region s)へのさらに2回のブーストによる皮下免疫の後、リンパ節を採取した。

40

【0055】

採取したリンパ節を、媒体で灌流し、ハサミおよび鉗子を用いて解体して、リンパ球を単離した。単離されたリンパ球とヘテロミエロマ(heteromyeloma)細胞株との融合を、およそ2:1の比率にて、ポリエチレングリコール1500(PEG)を添加することで行った。得られた融合物を、7×96ウェルプレートへ、×1ヒポキサンチンアミノプテリンチミジン(HAT)を含有する20%DMEM P/S中に移した。第7日に、各融合物プレートへ、×1HAT含有の20%DMEM P/Sを補充し、第

50

14日に、180μL/ウェルの上澄を取り出し、ELISAによるハイブリドーマ培養物上澄のスクリーニングに用いた。FABP1に対する特異性を示すハイブリドーマを選別した。

【0056】

陽性のハイブリドーマを、37、5% CO2で1% メチルセルロースを用いることによってクローン化し、安定なモノクローナルハイブリドーマを作製した。2つの細胞株、P2386およびP2388を、仕様を満たすものとして識別し、3つの反復サンプルとしてクローン化し、その後、限界希釈法によってクローン化した。

【0057】

実施例3：FABP1モノクローナル抗体の特性決定

次に、ハイブリドーマP2386およびP2388（上記参照）からの精製したモノクローナル抗体の評価を、1μg/mLのモノクローナル、およびFABPの各変異体の滴定を用い、これらのFABPファミリー組換えタンパク質との直接結合アッセイにより、特異性を確認する目的で行った。結果を以下の表2に示す。

【0058】

さらなる分析評価により、これらのモノクローナル抗体が、FABP1に対して特異的であり、FABP2、FABP3、FABP4、FABP5、FABP6、FABP7、FABP8、FABP9、およびミオグロビンに対する合わせた交差反応性は<0.1%であることが示された。これらの結果を、以下の表3に示す。

【0059】

【表2】

表2

供給業者	カタログ番号	P2386@1μg/mL MAP-DAS-094@1:5K	ng/mL										
			1582.28	500.72	158.46	50.14	15.87	5.02	1.59	0.5	0.16	0.05	0
BioVendor	RD172-240100	FABP-肝臓型	2.498	2.283	1.77	1.17	0.65	0.325	0.204	0.198	0.13	0.089	0.065
R&D systems	2594-CL/CF	FABP-組換え型	0.062	0.063	0.054	0.07	0.059	0.051	0.061	0.064	0.056	0.067	0.061
Capricorn	FAB-053	FABP-心臓型	0.088	0.068	0.056	0.069	0.078	0.047	0.057	0.054	0.066	0.063	0.062
BioVendor	RD172-036100	FABP-脂肪型	0.059	0.059	0.055	0.07	0.058	0.057	0.062	0.053	0.063	0.067	0.058
BioVendor	RD172-050100	FABP-上皮型	0.065	0.062	0.059	0.071	0.061	0.056	0.065	0.071	0.068	0.054	0.057
Randox	PAS10094	FABP-回腸型	0.064	0.063	0.056	0.068	0.057	0.057	0.064	0.062	0.06	0.065	0.058
Abnova	H0000-2173-P01	FABP-脳型	0.076	0.064	0.054	0.068	0.062	0.048	0.067	0.062	0.066	0.062	0.059
Randox	PAS10092	FABP-ミエリソ型	0.092	0.062	0.059	0.079	0.068	0.054	0.048	0.067	0.061	0.071	0.053
供給業者	カタログ番号	P2388@1μg/mL MAP-DAS-094@1:5K	ng/mL										
			1582.28	500.72	158.46	50.14	15.87	5.02	1.59	0.5	0.16	0.05	0
BioVendor	RD172-240100	FABP-肝臓型	2.639	2.406	1.976	1.357	0.738	0.334	0.188	0.148	0.115	0.106	0.055
R&D systems	2594-CL/CF	FABP-組換え型	0.067	0.061	0.062	0.06	0.055	0.067	0.047	0.049	0.056	0.056	0.054
Capricorn	FAB-053	FABP-心臓型	0.062	0.055	0.063	0.057	0.053	0.077	0.049	0.046	0.052	0.056	0.05
BioVendor	RD172-036100	FABP-脂肪型	0.064	0.058	0.058	0.061	0.054	0.055	0.059	0.049	0.055	0.053	0.048
BioVendor	RD172-050100	FABP-上皮型	0.066	0.053	0.057	0.066	0.055	0.056	0.059	0.055	0.065	0.057	0.049
Randox	PAS10094	FABP-回腸型	0.066	0.054	0.056	0.056	0.059	0.054	0.049	0.054	0.057	0.052	0.049
Abnova	H0000-2173-P01	FABP-脳型	0.061	0.052	0.052	0.057	0.06	0.052	0.06	0.055	0.064	0.061	0.055
Randox	PAS10092	FABP-ミエリソ型	0.079	0.075	0.064	0.075	0.061	0.058	0.066	0.069	0.062	0.069	0.059

【0060】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3

交差反応体	濃度 (ng/mL)	交差反応性%
FABP 2	4000	0.03
FABP 3	4000	0.07
FABP 4	4000	0.02
FABP 5	4000	0.03
FABP 6	4000	0.06
FABP 7	4000	0.03
FABP 8	4000	0.05
FABP 9	4000	0.07
ミオグロビン	800	0.02

10

## 【0061】

## 実施例 4：FABP 1 アッセイの最適化および確認

特性決定された FABP 1 モノクローナル抗体を用いて、バイオチップサンドイッチイムノアッセイを開発した。このアッセイは、ELISA イムノアッセイの原理に基づき、バイオチップアレイテクノロジーを用いる Evidence Investigator analyser (ランドックスラボラトリーズ (Randox Laboratories) 製) に適用した。

20

## 【0062】

捕捉および検出/トレーサー抗体のエピトープマッピングを、FABP 1 から誘導されたオーバーラップペプチドを用いて完了し、捕捉および検出/トレーサー抗体が、それぞれ、FABP 1 の N および C 末端領域に結合することが確認された。バイオチップに基づくイムノアッセイを用いて、この抗体ペアの分析性能を評価し、アッセイを、Evidence Investigator analyser に適用した。この FABP 1 アッセイから、アッセイ範囲 0 ~ 400 ng/mL と共に、感度値 0.66 ng/mL が示された。

30

## 【0063】

スポッティングの前に、バイオチップ表面を、Fitzgerald S.P. et al, Clin. Chem. 51(7):1165-1176;2005 に記載のようにして活性化した。10 nL の捕捉抗体を、炭酸バッファー、pH 9.6 中の 0.32 mg/mL でスポッティングした。スポッティングしたバイオチップを、炭酸バッファー中の 2% カゼインにより、室温で 1 時間ブロッキングし、次に PBS で洗浄した。次に、これらを安定化し、37 °C で乾燥し、別々に切り離し、キャリア中に集め、その後、真空シールして 2 ~ 4 °C で保存した。

40

## 【0064】

FABP 1 用のアッセイは、FABP 1 に特異的であるように設計した。このアッセイの特異性を、FABP タンパク質および関連する分析体のパネルに対する交差反応性を調べることで評価した (表 3)。パネル分析体の各々について、4000 ng/mL の分析体を校正血清 (calibration serum) に添加した。これは、FABP 1 の定量上限値レベルの 10 倍に相当する。関連する分析体であるが FABP ではないミオグロビンを、800 ng/mL の濃度で導入した。交差反応体のいずれとも、有意な交差反応性は見られなかった。これらのデータから、このアッセイが、FABP 1 に対して特異的であることが確認される。FABP 1 アッセイの特異性を、非標的アッセイ成分との接合体の非特異的結合についての試験によって評価した。FABP 1 接合体を、その他のパネル成分、H FABP 3、B FABP 7、および M FABP 8 に対して試験した。L FABP 1

50

接合体を、その他のパネル成分抗原および捕捉抗体の各々に対して試験した。

【0065】

実施例5：腎疾患を有する患者からの血清中におけるFABP1の発現

血清サンプルを、上記で詳述した分類方法を用いてステージ1、ステージ2、またはステージ3として分類された患者から得た。具体的には、調べたCKDサンプルコホートは、55歳以上の男性および女性患者からの血清サンプルから構成され、臨床ガイドラインによって定められるステージ1、2、および3CKDサンプルを含んでいた。

【0066】

推算糸球体濾過量(EGFR)を、Levey et al (Ann Intern Med 1999;130(6):461-70)に記載の以下の式に従って特定した。

$$EGFR = 186 \times (\text{クレアチニン} / 88.4) - 1.154 \times (\text{年齢}) - 0.203 \times [(\text{女性の場合} 0.742) \times (\text{黒人の場合} 1.210)]$$
; 式中、クレアチニンはマイクロモル/リットル単位で測定される。

【0067】

CKDサンプルコホートは、以下から構成されていた：

- ・合計69の血清サンプル(男性33、女性36)
- 20のCKDステージ1患者(平均年齢63歳)
- 20のCKDステージ2患者(平均年齢66歳)
- 20のCKDステージ3患者(平均年齢72歳)
- 9のドナーコントロール(平均年齢59歳)

【0068】

サンプルはすべて、FABP1、シスタチンC、クレアチニン、AST、およびGTについて分析した。

【0069】

これらのサンプルを、健康なドナーからの血清と共に、血液系マトリックス中のFABP1濃度を特定するための記載した発明を用いて分析した。このアッセイによって測定された腎疾患患者サンプル中のFABP1のレベルを、健康なドナーから採取したサンプル中のFABP1のレベルと比較した。結果の有意性は、クラスカル・ワリス検定(J American Stat Assoc 1952; 47:583-621)を、続いてマン・ホイットニーの事後比較(Ann Math Stats 1947;18:50-60)(ボンフェローニ法(Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 1936; 8:3-62)を用いて補正)を用いて判定した。結果から、記載した発明により、疾患のすべてのステージにおいて、腎疾患患者を識別することができることが実証された。FABP1のレベルは、コントロールグループ(n=9)と比較して、ステージ1(p<0.001、n=20)、ステージ2(p<0.001、n=20)、およびステージ3(p<0.001、n=20)の患者で有意に増加していた。さらに、ステージ3腎疾患患者からの血清には、ステージ1(p<0.01、n=20)およびステージ2(p<0.05、n=20)腎疾患患者よりも高いレベルのFABP1が含まれており、ステージ1およびステージ2患者の間には、有意差は観察されなかった。これらの結果を、以下の表4および図2に示す。

【0070】

【表 4】

表 4

FABP1 (ng/mL)				
	コントロール	ステージ1	ステージ2	ステージ3
メジアン	10	41.45	46	147.2
最小	3.6	11.9	8.4	31
最大	19.6	178.3	586.9	522.5
範囲	3.6~19.6	11.9~178.3	8.4~586.9	31~522.5
n数	9	20	20	20
p値 (補正後)		<0.001	<0.001	<0.001

10

## 【0071】

このアッセイはまた、腎臓損傷に対する他のマーカーと比較して、初期ステージでの腎疾患の診断に対する感度が高いことも実証した。このことは、ステージ1、ステージ2、およびステージ3腎疾患患者からの血清サンプル、ならびに健康なドナーから採取したサンプルを、RX Daytona analyser (ランドックス, 英国) を用い、クレアチニンおよびシスタチンCについて分析することによって実証された。これらのマーカーのレベルを特定し、コントロールレベルと比較した。ステージ1またはステージ2腎疾患では、コントロールグループと比較して、シスタチンCまたはクレアチニンのいずれにおいても、有意な変化は見られなかった。しかし、ステージ3腎疾患グループでは、コントロールと比較して、シスタチンCおよびクレアチニンの両方のレベルが有意に上昇した。これらのデータを、以下の表5および6、ならびに図3および4に示す。これらの比較は、分析体のレベルに基づいたものであり、製造元によって提供される使用説明で提案される正常範囲よりも上か下かというものではない。疾患およびコントロールグループの間の比較を用いて、患者を分類するのではなく、疾患の特定のステージにおいて対象であり得るマーカーを単に識別した。これらのデータから、記載の発明は、腎疾患診断における初期指標として作用し、腎機能障害の診断における本技術分野にて公知の現行技術よりも優れた性能を持つことが示唆される。

20

30

## 【0072】

【表 5】

表 5

シスタチンC (mg/L)				
	コントロール	ステージ1	ステージ2	ステージ3
メジアン	0.74	0.74	0.82	1.21
最小	0.54	0.4	0.58	0.75
最大	0.84	0.99	1.04	2.38
範囲	0.54~0.84	0.4~0.99	0.58~1.04	0.75~2.38
n数	9	19	20	20
p値 (補正後)		0.99	0.123	<0.001

40

50

【 0 0 7 3 】

【 表 6 】

表 6

クレアチニン (umol/L)				
	コントロール	ステージ1	ステージ2	ステージ3
メジアン	84.55	82.94	97.1	137.2
最小	59.55	67.72	69.23	85.26
最大	93.42	107.5	124.4	257.2
範囲	59.55～ 93.42	67.72～ 107.5	69.23～ 124.4	85.26～ 257.2
n数	9	20	20	20
p値 (補正後)		0.96	0.078	<0.001

10

【 0 0 7 4 】

20

F A B P 1 の血清中レベルは、F A B P 1 が肝疾患にも応答して産生させることから、腎疾患の診断において限定的な有用性しか持たないとする主張がこれまでに成されてきた。この潜在的な問題点を克服するために、腎疾患およびコントロールのグループからの血清サンプルを、肝臓損傷の既知の指標である A S T および G T のレベルについて、R X X I m o l a a n a l y s e r ( ランドックス, 英国 ) を用いて分析した。A S T および G T はいずれも、腎疾患およびコントロールのグループにおいて、F A B P 1 との有意な相関を示さなかった。さらに、コントロールと比較して、ステージ 1、ステージ 2、またはステージ 3 C K D のいずれかを診断された患者における A S T または G T のいずれのレベルにも、有意な変化は見られなかった。これらのデータを、以下の表 7 および 8、ならびに図 5 および 6 に示す。これらのデータは、腎疾患の診断のための血清中 F A B P 1 の有用性をさらに強調するものである。

30

【 0 0 7 5 】

【 表 7 】

表 7

A S T (U/L)				
	コントロール	ステージ1	ステージ2	ステージ3
メジアン	17	17	16	14
最小	13	7	11	9
最大	22	32	53	72
範囲	13～22	7～32	11～53	9～72
n数	9	20	20	20
p値 (補正後)		1	1	0.8

40

【 0 0 7 6 】

【表 8】

表 8

ガンマ - GT (U/L)				
	コントロール	ステージ 1	ステージ 2	ステージ 3
メジアン	24	36	26.5	37.5
最小	10	9	11	10
最大	109	136	216	422
範囲	10~109	9~136	11~216	10~422
n 数	9	20	20	20
p 値 (補正後)		1	1	0.93

10

## 【0077】

実施例 6 : 代謝症候群を有する患者からの血清中における FABP1 の発現

上記で詳述した分類の方法を用いて代謝症候群に罹患しているとして分類された患者から、血清サンプルを得た。これらのサンプルを、健康なドナーからの血清と共に、血液系マトリックス中の FABP1 濃度を特定するための記載した発明を用いて分析した。このアッセイによって測定された代謝症候群患者サンプル中の FABP1 のレベルを、健康なドナーから採取したサンプル中の FABP1 のレベルと比較した。結果の有意性は、マン・ホイットニー検定を用いて判定した。結果から、記載した発明により、コントロールグループと比較して、代謝症候群を有する患者を識別することができることが実証された。代謝患者から採取した血清には、健康コントロール (n = 40 ; 表 9) で見られるよりも有意に高いレベルの FABP1 (p < 0.001、n = 90) が含まれていた。

20

## 【0078】

代謝症候群患者および健康提供者からのサンプルを、腎機能障害のマーカーの濃度についても測定した。代謝症候群グループにおけるシスタチン C の血清中濃度は、健康提供者のそれと比較して有意に増加していた (p < 0.001、n = 90、表 10)。

30

## 【0079】

## 【表 9】

表 9

FABP1 (ng/mL)		
	コントロール	代謝症候群
メジアン	10.53	77.19
最小	4.97	5.48
最大	49.78	603.1
範囲	4.97~49.78	5.48~603.1
n 数	40	90
p 値		<0.001

40

## 【0080】

## 【表 10】

表 10

シスタチンC (mg/L)		
	コントロール	代謝症候群
メジアン	0.775	0.885
最小	0.6	0.54
最大	0.96	1.65
範囲	0.6~0.96	0.54~1.65
n数	40	90
p値		<0.0001

10

## 【0081】

興味深いことに、クレアチニンのレベルは、コントロールグループと比較して、有意に減少した ( $p < 0.001$ 、 $n = 90$ 、表 11)。クレアチニンレベルの減少は、損傷による肝機能の低下を示すものであり得、従って、このことにより、付随する病態として肝疾患の可能性を除外する/含めるために、他の因子も考慮する必要があることが強調される。

20

## 【0082】

## 【表 11】

表 11

クレアチニン (umol/L)		
	コントロール	代謝症候群
メジアン	83	71
最小	51	39
最大	106	131
範囲	51~106	39~131
n数	40	90
p値		<0.0001

30

## 【0083】

以下の表 12 および 13 に示されるように、代謝および健康ドナーの血清サンプル中において、FABP1 レベルは、AST および ALT などの肝疾患のマーカーと有意な相関を示さなかった。このことに加えて、代謝およびコントロール患者の間で、血清中の AST レベルに有意な増加は見られなかった。しかし、代謝患者からの血清中の ALT 濃度については、コントロールグループと比較して有意な増加が見られた ( $p = 0.0056$ 、 $n = 90$ )。このことは、代謝症候群患者の場合、FABP1 の増加が、基礎肝疾患、腎機能障害、または合併症としてその両方に起因し得るものであるかどうかを確かめるために、FABP1 の増加の特定は、クレアチニン、シスタチンC、ALT、および AST の特定によって確認されるべきであることを示唆している。

40

## 【0084】

【表 1 2】

表 1 2

AST (U/L)		
	コントロール	代謝症候群
メジアン	19.5	17
最小	0	5
最大	70	91
範囲	0~70	5~91
n数	40	90
p値		0.22

10

【0085】

【表 1 3】

表 1 3

ガンマ-GT (U/L)		
	コントロール	代謝症候群
メジアン	28	42
最小	10	11
最大	187	339
範囲	10~187	11~339
n数	40	89
p値		0.0056

20

30

【0086】

実施例 7 : F A B P 1 閾値の特定および C K D ステージの分類

受信者動作特性曲線 (ROC) 分析を用いて、第一には、コントロールグループとすべての CKD 患者とを区別するための (図 1 2)、第二には、ステージ 1 (図 1 3)、ステージ 2 (図 1 4)、およびステージ 3 CKD (図 1 5) を区別するための、提案される発明の特異性および感度を特定した。コントロールグループと腎疾患患者とを区別するために用いられた F A B P 1 に対する ROC の曲線下面積 (AUC) は、女性の場合は 0.983 (カットオフ > 15.65 ng/mL、感度 = 0.967、特異性 = 1.00)、男性の場合は 0.98 (カットオフ > 21.6 ng/mL、感度 = 0.933、特異性 = 1.00) であった。F A B P 1 は、ステージ 2 およびステージ 3 CKD の間の区別において、女性および男性の場合の AUC としてそれぞれ、0.83 (カットオフ > 75.8 ng/mL、感度 = 0.7、特異性 = 0.9) および 0.76 (カットオフ > 151.9、感度 = 0.5、特異性 = 0.9) を示した。これらのレベルは、別個の集団から集めたサンプルのコホートを用いて特定したものであり、従って、正常範囲は、最終ユーザーによって算出されるべきである。

40

【0087】

F A B P 1 の定量測定を、シスタチン C およびクレアチニンなどの CKD のその他の潜在的マーカーと合わせて用いることにより、ステージ 1 およびステージ 2 の患者間の区別が可能となる。ステージ 1 とステージ 2 との間の主たる臨床的相違は、GFR 状態である

50

。推算 GFR は、シスタチン C またはクレアチニンのいずれかの血清中レベルに基づいており、血清中濃度は、GFR と逆相関の関係にある。従って、製造元によって提供される使用説明に提案されるレベルと比較して、シスタチン C および / またはクレアチニンの上昇と合わせて F A B P 1 レベルが上昇（カットオフ下限値よりは上であるが、カットオフ上限値よりは下）している場合、患者はステージ 2 CKD として分類されることになり、一方 F A B P 1 レベルは上昇するが（カットオフ下限値よりは上であるが、カットオフ上限値よりは下）、シスタチン C およびクレアチニン濃度は正常範囲内である場合、ステージ 1 CKD として分類されることになる。ステージ 3 患者は、カットオフ上限値よりも高い F A B P 1 濃度、ならびにアッセイの使用説明に提案される正常範囲よりも高いクレアチニンおよび / またはシスタチン C 濃度を有することに基いて分類される。

10

#### 【0088】

実施例 8：F A B P 1 およびその他の分析体の血清中レベルを用いて CKD 疾患重篤度を予測するアルゴリズム

いくつかの方法を用いて、CKD と健康なコントロールとを正確に区別する複数のバイオマーカーの最適なパネルを識別し、CKD 疾患ステージを階層化した。第一に、クラスカル・ワリスおよびマン・ホイットニー解析などの標準的な単変量統計解析を通して、有意な予測値を持つとして個別に識別されるマーカーを識別した。これにより、F A B P 1 を、健康な提供者からの血清中と比較して、すべての CKD ステージ（1、2、および 3）において血清中の発現が有意に増加されたものとして識別した。さらに、ステージ 1 およびステージ 2 CKD と比較して、ステージ 3 CKD 患者からの血清中では、F A B P 1 レベルが有意に増加している。血清中クレアチニンおよびシスタチン C の両レベルは、健康な提供者と比較して、ステージ 3 CKD で有意に増加したが、一方 A S T および G T はいずれも、コントロールと比較して、すべての疾患ステージにおいて変化を示さなかった（そうであっても、肝疾患を除外するために、このことを考慮に入れることは重要である）。F A B P 1 に対するカットオフ値を特定し（実施例 7 に記載のように）、一方クレアチニン、シスタチン C、A S T、および G T に対するカットオフ値は、製造元（ランドックス、英国）による対応するアッセイの使用説明によって定め、これらの閾値に基づく分類アルゴリズムを用いることで、これらの 5 種類のマーカーに基づいて疾患状態を予測した。この結果、71.5% の確率で疾患の重篤度を正しく予測するアルゴリズムを得た。

20

30

#### 【0089】

これに続いて、多項ロジスティック回帰分析を用いて、各マーカーの重要性を識別するための高度なアルゴリズムの開発が可能かどうかを調べた。各疾患状態およびコントロールのグループに対して、F A B P 1、クレアチニン、シスタチン C、A S T、および G T の濃度を用いる完全実施要因モデル（full-factorial model）を開発し、これらのマーカーの多くが、性別による影響を受けることから、それを、分析における因子として用いた。この分析により、すべての共変量および因子（シスタチン C を除く）が、モデルに対して有意な影響を持つことが示された。このことから、F A B P 1 およびクレアチニンが、疾患状態の最も強力な予測因子として識別された。推定回帰係数（b）を用いて、推定確率比を、各カテゴリー（非 CKD [コントロール]、ステージ 1、ステージ 2、およびステージ 3）に対して算出することができた。次に、これらの比を用い、F A B P 1、クレアチニン、シスタチン C、A S T、および G T の濃度に基づいて、患者が指定され得る最も可能性の高いカテゴリーを予測するための推定確率を算出することができた。このモデルを用いることで、疾患状態の予測を、86.2% のレベルで行うことができた。

40

#### 【0090】

最後に、誤差逆伝播学習を用いて、人工ニューラルネットワークを開発した。より小さいランダムに割り当てられた一式のデータを用いて多層パーセプトロンをトレーニングし、次に、これをデータの検証サンプル（hold-out sample）に対して確認した。ここでも、F A B P 1 およびクレアチニンの濃度が、疾患状態の特定における最も重要な因子とし

50

て識別された。5種類すべてのマーカーの濃度の組み合わせを用い、性別も考慮に入れることにより、このモデルは、84%の精度で疾患状態を予測することができた。中には他と比べてそれほど重要ではないマーカーもあるが、これらを除外しても精度が高められないことが見出された。

【0091】

これらの実施例で提供される結果から、本発明の方法は、先行技術の方法と比べて、CKDの初期ステージとコントロールとの間のより改善された区別を行うことが示され、このことは、本発明を用いることで、CKDの初期診断を補助し、それによって臨床診断に進展をもたらすことができることを示唆している。本発明の方法は、合併症としてCKDを発症するリスクがより高いグループに患者を階層化することにも用いることができ、な

10

【0092】

本発明の方法の利点は、先行技術の尿中バイオマーカーの場合のような希釈に対する補正が、血清中FABP1では必要ないということである。クレアチンを例とする希釈補正の使用は、その補正マーカーが腎機能によって直接影響を受ける場合、基本的に欠陥を有する。従って、血清中FABP1は、この制限を取り除くものである。腎疾患を有する患者からの60の血清サンプルを分析したところ、そのような影響は見られなかった。このことは、腎疾患の診断およびステージ分類において、血清は、尿よりも適切なマトリックスであることを示唆している。実際、実施例で提示される結果から、疾患の進行に伴っ

20

【0093】

【表14】

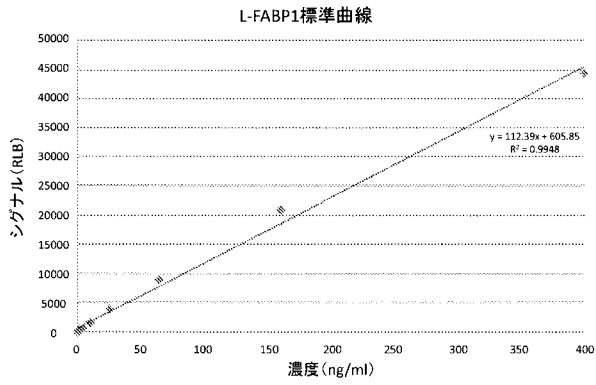
表14

バイオマーカー	男性	女性	単位	分析器
シスタチンC	0.57~1.05	0.57~1.05	mg/L	RX Daytona, ランドックス
クレアチニン	53~97	44~80	umol/L	RX Daytona, ランドックス
AST	<37	<31	U/L	RX Imola, ランドックス
γ-GT	11.0~50	7.0~32	U/L	RX Imola, ランドックス

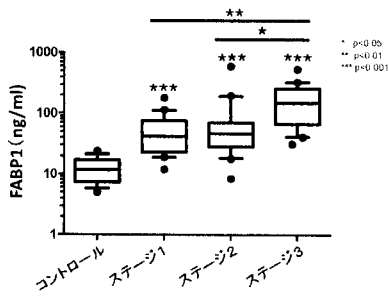
30

40

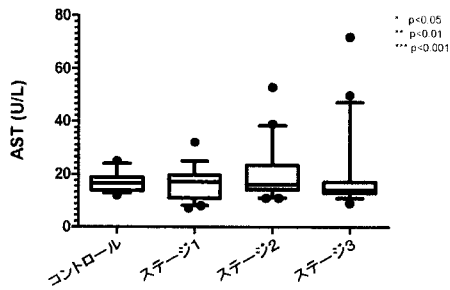
【 図 1 】



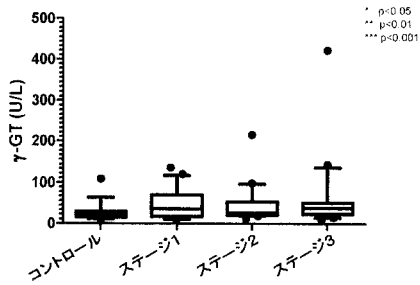
【 図 2 】



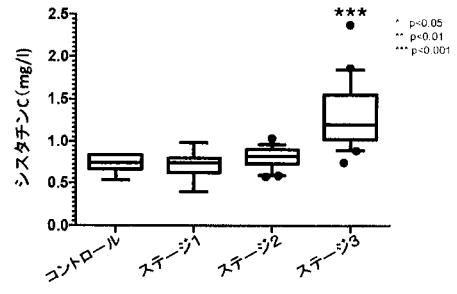
【 図 5 】



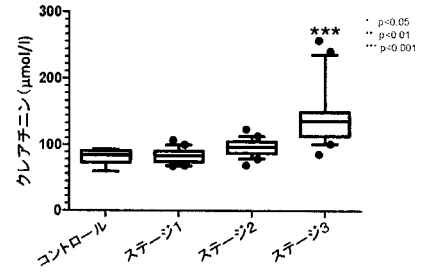
【 図 6 】



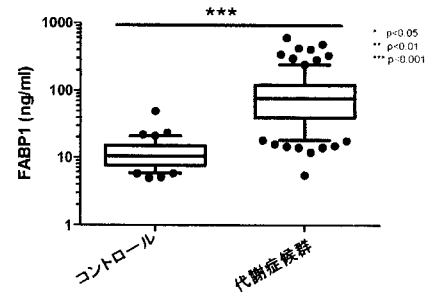
【 図 3 】



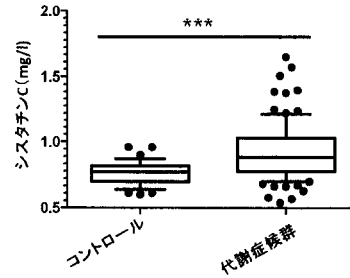
【 図 4 】



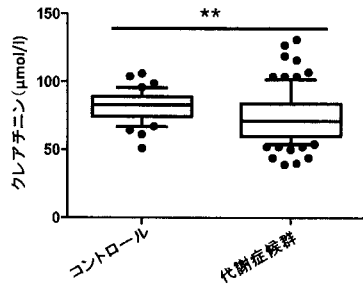
【 図 7 】



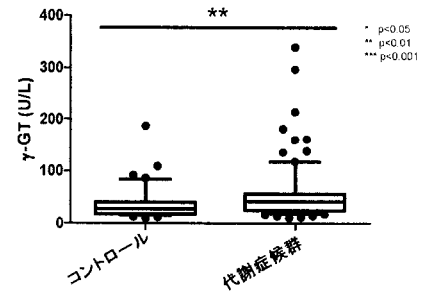
【 図 8 】



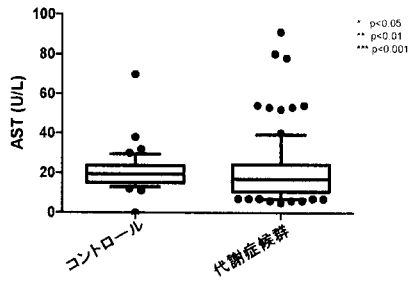
【 図 9 】



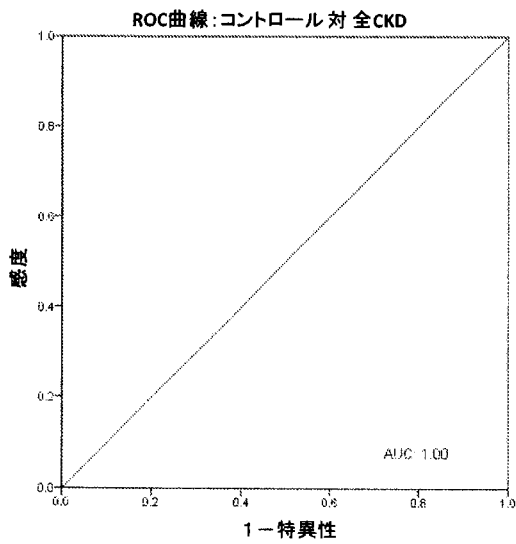
【 図 1 1 】



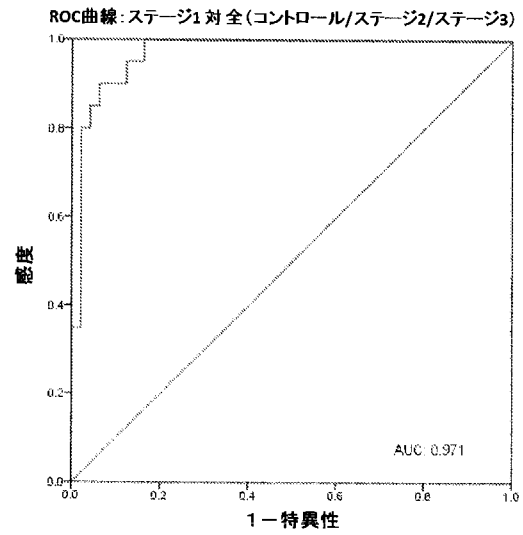
【 図 1 0 】



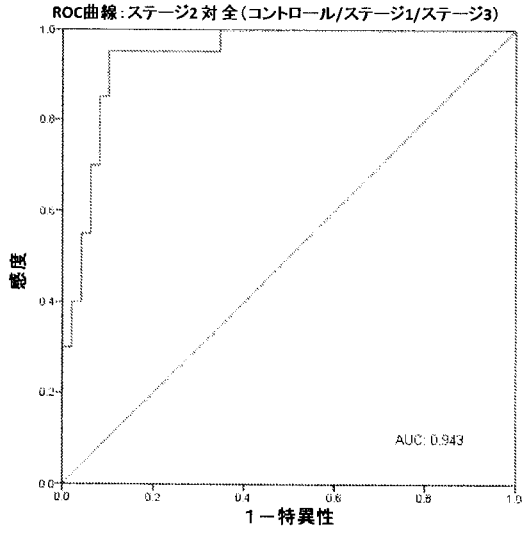
【 図 1 2 】



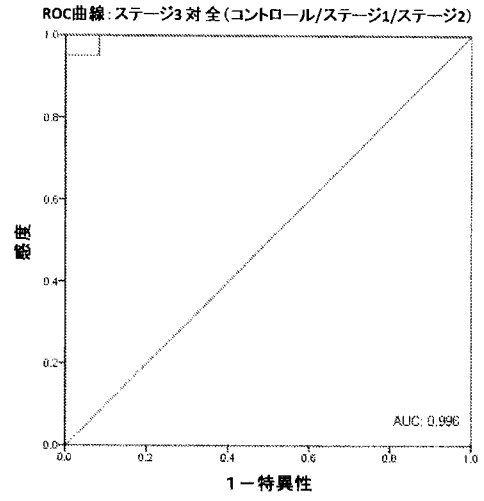
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード(参考)		
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	16/40		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C	
			C 1 2 P	21/08		

(72)発明者 フィッツジェラルド, ステファン, ピーター  
 イギリス ノーザンアイルランド アントリム B T 2 9 4 Q Y カウンティ アントリム ク  
 ラムリン ダイヤモンド ロード アードモア

(72)発明者 ラumont, ジョン  
 イギリス ノーザンアイルランド アントリム B T 2 9 4 Q Y カウンティ アントリム ク  
 ラムリン ダイヤモンド ロード アードモア

(72)発明者 リチャードソン, キアラン  
 イギリス ノーザンアイルランド アントリム B T 2 9 4 Q Y カウンティ アントリム ク  
 ラムリン ダイヤモンド ロード アードモア

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA21 BB17 CC03 FA12  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC15 CC24 DA13  
 4H045 AA11 BA60 DA76 EA50 FA74 FA81

专利名称(译)	肾脏疾病生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017223694A</a>	公开(公告)日	2017-12-21
申请号	JP2017150421	申请日	2017-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
申请(专利权)人(译)	兰花码头实验室有限公司		
[标]发明人	マコネルアイヴァン フィッツジェラルドステファンピーター ラモントジョン リチャードソンキアラン		
发明人	マコネル, アイヴァン フィッツジェラルド, ステファン, ピーター ラモント, ジョン リチャードソン, キアラン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 C07K17/00 C07K16/18 C07K16/40 C12M1/34 C12N15/02 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/475 C07K14/8139 C12N9/104 G01N33/70 G01N33/92 G01N33/573 G01N33/6845 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2333/8139 G01N2333/9108 G01N2333/91188 G01N2800/347 G01N2800/50 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.S G01N33/577.B C07K17/00 C07K16/18 C07K16/40 C12M1/34.F C12N15/00.C C12P21/08 C12N15/00		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/BA60 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/FA81		
优先权	2012014440 2012-08-13 GB		
其他公开文献	JP6608407B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种将患有CKD的患者分级为CKD的第1至第3阶段之一的方法。与从患者获得的样品中的控制值水平FABP1的比较，比较的γ-GT，AST，肌酐和半胱氨酸蛋白酶抑制剂C在控制值的每种生物标志物的范围内的水平时，控制值这是在比较增加FABP的水平，并且所述生物标志物在该组的对照值内的γ-GT，AST，肌酐和半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的水平包括指示该患者患有1期CKD。

