



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009137583/15, 06.03.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.03.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

12.03.2007 AT A389/2007**19.11.2007 EP 07450202.2**(43) Дата публикации заявки: **20.04.2011** Бюл. № 11(45) Опубликовано: **27.09.2012** Бюл. № 27(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 0114885 A2, 01.03.2001. RU 2003124431 A, 27.01.2005. RU 2187113 C2, 10.08.2002. RU 2005108806 A, 10.09.2006.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **12.10.2009**(86) Заявка РСТ:
AT 2008/000082 (06.03.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/109903 (18.09.2008)

Адрес для переписки:

**103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. Е.В.Воробьевой,
рег.№ 1263**

(72) Автор(ы):

**БАХРАМИ Сохейл (АТ),
ВОЛОЩУК Вольфганг (АТ),
ХАВА Герхард (АТ)**

(73) Патентообладатель(и):

**БИМЕДИКА МЕДИЦИНПРОДУКТЕ
ГМБХ УНД КО КГ (АТ)****(54) ДИАГНОСТИКА СЕПТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается способа диагностики септических осложнений у человека или других животных с множественной травмой, в котором указанные пациенты не имеют травматического повреждения головного мозга. Сущность способа заключается в том, что иммуноферментным методом определяют уровень натрий-уретического пептида С-

типа (CNP) или предшественника натрий-уретического пептида С-типа (NT-proCNP). Если уровень CNP или NT-proCNP, повышен по сравнению с нормальными уровнями у данного пациента, то делают заключение, что данный пациент имеет септические осложнения или подвержен риску развития септических осложнений. 3 н. и 7 з.п. ф-лы, 6 табл., 9 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009137583/15, 06.03.2008**

(24) Effective date for property rights:
06.03.2008

Priority:

(30) Convention priority:
12.03.2007 AT A389/2007
19.11.2007 EP 07450202.2

(43) Application published: **20.04.2011 Bull. 11**

(45) Date of publication: **27.09.2012 Bull. 27**

(85) Commencement of national phase: **12.10.2009**

(86) PCT application:
AT 2008/000082 (06.03.2008)

(87) PCT publication:
WO 2008/109903 (18.09.2008)

Mail address:

103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. E.V.Vorob'evoj,
reg.№ 1263

(72) Inventor(s):

BAKhRAMI Sokhejl (AT),
VOLOShchUK Vol'fgang (AT),
KhAVA Gerkhard (AT)

(73) Proprietor(s):

BIOMEDIKA MEDITsINPRODUKTE GMBKh
UND KO KG (AT)

(54) **DIAGNOSING OF SEPTIC COMPLICATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to diagnostic technique for septic complications in a human or other animals suffering a multiple trauma wherein said patients have no traumatic cerebral injury. Enzyme immunoassay is used to determine the level of C-type natriuretic peptide (CNP) or a C-type

natriuretic peptide precursor (NT-proCNP). If the CNP or NT-proCNP level is increased as compared with the normal levels specific for the given patient, then the given patient is stated to suffer from septic complications or being at risk of developing septic complications.

EFFECT: improved diagnostic accuracy.

6 tbl, 9 dwg, 2 ex

RU 2 462 719 C2

RU 2 462 719 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к диагностике септических осложнений.

Уровень техники

5 Термин «сепсис» применяют для описания множества клинических состояний, связанных с системными проявлениями воспаления, сопровождающегося инфекцией. Из-за клинического сходства воспалительных ответов, вторичных для неинфекционной этиологии, идентификация сепсиса является особо сложной диагностической проблемой. В данном отношении, обеспечены определения для

10 «синдрома системного воспалительного ответа» (или «SIRS»), относящиеся в целом к тяжелому системному ответу на инфекционную или неинфекционную атаку, и для связанных синдромов «сепсиса», «тяжелого сепсиса» и «септического шока» (Bone et al., Chest 101:1644-53, 1992). SIRS может быть связан как с инфекцией, так и с

15 множеством неинфекционных этиологий, включая травму.

Несмотря на доступность антибиотиков и вспомогательной терапии, сепсис является существенной причиной заболеваемости и смертности. Были разработаны некоторые лабораторные тесты, вместе с полным клиническим исследованием субъекта, для диагностики/прогнозирования сепсиса (Giamarellos-Bourboulis et al.,

20 Intensive Care Med. 28: 1351-56, 2002).

Обсуждается несколько диагностических маркеров для облегчения диагностики и мониторинга лечения сепсиса у людей и некоторых видов животных. Наиболее широко применяемыми являются CRP (С-реактивный белок) и PCT (прокальцитонин). В качестве возможных биомаркеров сепсиса также обсуждались различные

25 интерлейкины. Однако они имеют ограниченное применение в настоящее время из-за отсутствия специфичности. Например, Carrigan et al. (Clinical Chemistry 50 (8) (2004) 1301-1314) сообщают о следующей чувствительности и специфичности этих маркеров у людей:

30

Таблица 1					
Результаты анализа норм изменения для прогноза сепсиса на основе различных биомаркеров у взрослых и новорожденных ¹					
Маркер	Возрастная группа	Анализ нормы изменения			Ссылки на исследования
		Предельный диапазон	Чувствительность, %	Специфичность, %	
TNF α	Взрослые	11,5 нг/л	55	66	(30)
	Новорожденные	12-20 нг/л	67/79/88	43/71/86	(29, 61, 63)
IL-6	Взрослые	50-200 нг/л	51/67/86	53/65/79	(30, 35, 36, 66)
	Новорожденные	10-160 нг/л	71/84/100	43/71/96	(26, 29, 61, 63, 70-72)
IL-1га	Дети	NA ²	33	89	(85)
	Новорожденные	10,9 мкг/л	93	92	(70)
IL-8	Взрослые	30-340 нг/л	57/63/68	57/76/93	(30, 35, 85)
	Новорожденные	50 нг/л	92	70	(61)
CRP	Взрослые	4-150 мг/л	35/69/89	18/61/81	(30, 35, 36, 38, 46, 66, 88, 89)
	Новорожденные	1-23 мг/л	43/65/96	80/90/100	(22, 26, 63, 70, 89, 90)
PCT	Взрослые	0,4-8,1 мкг/л	65/81/97	48/73/94	(30, 35-38, 43, 46, 66, 88, 89, 122, 123)
	Новорожденные	1,0-6,1 мкг/л	77/85/99	62/83/91	(22, 72, 89, 90)

35

40

45

50

¹ Перечисленные величины предназначены скорее для дифференцировки инфицированных индивидуумов и неинфицированного контроля, чем здоровых индивидуумов. Перечисленные чувствительности и специфичности являются минимальным, средним и максимальным процентом.

² NA, нет данных.

Эти данные показывают, что даже у людей, у которых виды септического

заболевания интенсивно изучаются, чувствительность и специфичность имеющихся в настоящее время маркеров (даже в виде среднего значения) доходит лишь до 33% и 66%, соответственно, не говоря об однородности опубликованных к настоящему времени данных.

5 Эти данные показывают, что действительно имеется необходимость в новых диагностических маркерах с улучшенными клиническими характеристиками. Таким образом, в клинической медицине остается большая потребность в диагностике сепсиса, особенно в ранней диагностике сепсиса. Оптимальная диагностика сепсиса
10 должна выявлять лиц с риском развития сепсиса или лиц с ранней стадией сепсиса. Применение CNP или NT-proCNP на животных моделях сепсиса или в качестве маркеров сепсиса было предложено или раскрыто в WO 01/14885 A2, Nama et al. (BBRC 198 (3) (1994): 1177-1182, Prickett et al. (The New Zealand Medical Journal 115 (1157) (2002): p.6 или WO 2006/071583 A2.

15 Однако диагностика сепсиса оказывается различной и сложной в специфических областях, особенно в интенсивной терапии. В данных областях описанные маркеры сепсиса часто являются недостаточно надежными. В особенности у пациентов с множественной травмой такая диагностика зачастую очень затруднена по причине
20 других патологических процессов, интерферирующих с «нормальными» физиологическими значениями и параметрами, измеряемыми в стандартной интенсивной терапии.

Диагностика септических осложнений у пациентов с множественной травмой является очень специфической проблемой, в решении которой в интенсивной терапии
25 имеется настоятельная потребность.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является обеспечение подходящего способа диагностики сепсиса у пациентов, уже находящихся в отделении
интенсивной терапии, в особенности у пациентов с множественной травмой.

30 Раскрытие изобретения

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики септических осложнений у людей - пациентов с множественной травмой, в котором у
указанных пациентов нет травматического повреждения головного мозга, посредством определения уровня человеческого натрий-уретического пептида С-
35 типа (CNP) или его предшественников или их фрагментов, в особенности N-концевого фрагмента предшественника натрий-уретического пептида С-типа (NT-proCNP) у такого пациента, и диагностики пациентов, имеющих септические осложнения или подверженных риску развития септических осложнений, если уровень NT-proCNP
40 увеличен по сравнению с нормальными уровнями.

В особенности при интенсивной терапии пациентов - людей CNP может быть отличным диагностическим инструментом для диагностики септических осложнений у
пациентов с множественной травмой, однако данная диагностика неожиданно имеет
45 высокую надежность и отличную робастность только у пациентов, не имеющих травматического повреждения головного мозга.

В ходе создания настоящего изобретения были собраны клинические данные, которые показали, что применение человеческого CNP, его предшественников или
фрагментов этих предшественников является выгодным для идентификации пациентов
50 с сепсисом в септической группе пациентов, в особенности даже ранней стадии сепсиса или даже лиц, подверженных риску развития сепсиса. В особенности NT-proCNP, N-концевой фрагмент предшественника натрий-уретического пептида С-типа (CNP), как доказано, является подходящим диагностическим/прогностическим маркером,

связанным с сепсисом, в стратификации риска сепсиса у пациентов с множественной травмой. Эта молекула особенно пригодна благодаря своей стабильности, распространенности и простоте определения.

5 Натрий-уретические пептиды играют важную роль в регуляции натрия и контроле кровяного давления. CNP является членом семейства натрий-уретических пептидов, продуцирующихся эндотелиальными клетками сосудов и способных играть важную паракринную роль в сосудистой системе. Предсердный натрий-уретический пептид (ANP) и мозговой натрий-уретический пептид (BNP) сильно стимулируют

10 секрецию CNP. BNP оказывает гораздо больший стимулирующий эффект, чем ANP, а ANP также значительно усиливает продукцию нового CNP белка (трансляцию) и мРНК, экспрессируемой в бычьих артериальных эндотелиальных клетках.

На уровне натрий-уретического пептида в плазме оказывает влияние ряд факторов, включая возраст и пол. В здоровой популяции на уровне N-концевого ANP (NT-ANP),

15 BNP и NT-BNP в плазме в различной степени влияют клинические ковариации. В то время как уровни всех пептидов были выше у женщин, только на NT-ANP и NT-BNP влиял возраст. Уровни всех трех пептидов обратно коррелировали с частотой сердечных сокращений. В отличие от NT-ANP и NT-BNP, на уровень BNP в плазме не влиял возраст. Уровни натрий-уретических пептидов в плазме были рассмотрены для диагностики сердечной недостаточности. Отмечалось, что BNP и NT-ANP значительно

20 повышались у большинства пациентов с кардиостимуляторами. Сообщалось, что концентрации N-концевого proBNP в плазме повышались в результате нарушения систолической функции, возраста, нарушения почечной функции, сердечной ишемии и расширения, и воздействия некоторых медикаментов. Увеличение N-концевого proBNP в плазме рассматривалось как более ранний признак аномальной сердечной функции, чем отклонения, идентифицированные при эхокардиографических исследованиях. В этом отношении предполагалось, что одновременный учет и NT-ANP, и NT-BNP

25 позволяет выявить большее число пациентов с риском гибели или сердечной недостаточности, чем каждого из пептидов по отдельности (Squire I.B. et al. (din. Sci. (Lond). 2004 Sep.; 107(3): 309-16)).

Было показано, что CNP вырабатывается в сердце пациентов с хронической сердечной недостаточностью, но в гораздо меньшей степени, чем ANP или BNP. Далее,

35 он экспрессируется в больших количествах в головном мозге и эндотелии. Потенциал плазматического аминоконцевого натрий-уретического пептида C-типа (NT-CNP) в качестве маркера сердечной функции исследовали у симптоматических пациентов. Эти находки позволили сделать предположение о возможном компенсаторном ответе из периферических сосудов на сердечную недостаточность посредством находящегося в

40 эндотелии вазодилаторного пептида CNP.

В то время как CNP может применяться на широкой основе у людей и животных в качестве маркера сепсиса, нужно помнить, что всегда необходимо учитывать

45 присутствие специфических указаний, где единичный маркер необязательно является достаточным из-за специфических обстоятельств, которые могут скрывать маркерную функцию данного маркера или противодействовать ей.

Однако было неожиданным, что этот CNP, его предшественники и их фрагменты, особенно NT-proCNP, являются подходящими маркерами сепсиса у людей-пациентов с

50 множественной травмой. Замечательно, что существенность диагноза сепсиса в соответствии с настоящим изобретением у пациентов с множественной травмой значительно выражена в специфической группе пациентов: пациентов с множественной травмой (т.е. пациентов с более чем одной травмой), за исключением

пациентов с травматическим повреждением головного мозга. В исследовании, выполненном в ходе создания настоящего изобретения, оценивали долговременные профили NT-proCNP, NT-концевого фрагмента предшественника CNP, у пациентов с множественной травмой с травматическим повреждением головного мозга (TBI) или без него по отношению к септическим осложнениям и исходу (NT-proCNP был выбран потому, что он циркулирует в более высоких количествах и является более стабильным, чем активный гормон CNP, однако все предшественники CNP и их фрагменты (если они в принципе выявляются у пациента) в принципе могут применяться для оценки в соответствии с настоящим изобретением, поскольку применение стабильных и легко выявляемых форм, конечно, является предпочтительным для использования в клинической практике). Пациентов с множественной травмой (МТП) с TBI, подтвержденным компьютерной томографией, или без него, оценивали по отношению к их профилям NT-proCNP. Были неожиданно обнаружены различные профили NT-proCNP у пациентов с TBI или без него. В то время как уровни NT-proCNP были значительно выше у МТП с развитием септических осложнений без TBI, уровни NT-proCNP были ниже у МТП с TBI при развитии септических осложнений. Уровни NT-proCNP у не выживших резко повышались перед смертью. Примечательно, что профили NT-proCNP в плазме значительно различались у МТП с TBI и без него при развитии септических осложнений.

Термины «сепсис» или «септические осложнения» в настоящем изобретении применяются в качестве синонимов и понимаются как охватывающие «сепсис», «септические осложнения», «тяжелый сепсис», «септический шок», «синдром системного воспалительного ответа» (или «SIRS») и даже их более ранние стадии, все симптомы, связанные с системными проявлениями воспаления, сопровождающего инфекцию.

Разумеется, представленная диагностика применяется у пациентов с множественной травмой с подозрением на септические осложнения и/или у пациентов, подверженных риску развития септических осложнений. Диагностика в соответствии с настоящим изобретением всегда проводится с учетом септических осложнений. Это само собой разумеется, учитывая, что в истории диагностики CNP известен в качестве маркера хронической сердечной недостаточности. Также в связи с этим уровни CNP анализировали с учетом сердечной функции, чтобы установить корреляцию данного CNP маркера с другими диагностическими маркерами. Таким образом, настоящая диагностика сепсиса с применением CNP в качестве маркера не обязательно применима в качестве «абсолютного» маркера, но он пригоден для диагностики того, присутствует или ожидается сепсис у пациента, или нет. Однако этот диагностический вопрос только задается, если септические осложнения ожидаются или имеется риск сепсиса у данного пациента.

Предпочтительно уровень CNP, его предшественников или их фрагментов, в особенности NT-proCNP, у пациента определяют путем установления количества CNP, его предшественников или их фрагментов, в особенности NT-proCNP, в образцах крови, сыворотки или плазмы пациента. Хотя определение данного уровня в соответствии с настоящим изобретением также возможно в другой ткани или жидкости организма пациента (например, ликворе, лимфатической жидкости, моче и т.д.), предпочтительными являются образцы, взятые из крови пациента, поскольку такие образцы есть в любом случае, и уровни маркера в соответствии с настоящим изобретением легко выявляются. Образцы тканей обычно не практикуются, с учетом общего состояния пациента отделения интенсивной терапии.

В способе в соответствии с настоящим изобретением определяемый уровень CNP, его предшественников или их фрагментов, в особенности NT-proCNP, обычно сравнивают с «нормальными» уровнями с помощью рутинных способов (например, зная нормальный уровень или сравнивая определяемый уровень с уровнями, измеренными у пациентов без сепсиса или без риска развития сепсиса). Это сравнение может также проводиться для сопоставления предыдущих определений у одного и того же пациента, показавшего «нормальные» уровни. С другой стороны, диагностика может также быть основана на знаниях или параллельных определениях «септических» уровней CNP, его предшественников или их фрагментов, в особенности NT-proCNP (например, у пациентов с уже развитым сепсисом). Таким образом, предпочтительный способ в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что нормальным уровнем является уровень у пациента с множественной травмой без септических осложнений или без риска развития септических осложнений.

Можно сравнивать результат определения CNP с абсолютными значениями, если способ определения пригоден для обеспечения таких абсолютных значений. Кроме того, предпочтительным является определение NT-proCNP, поскольку такие абсолютные значения (или: критические значения выше тех, что указывают на вероятность сепсиса) могут легко быть обеспечены для этого фрагмента pro-CNP (предшественника CNP и NT-proCNP). Например, для евразийцев «нормальные» значения NT-proCNP находятся в пределах 2-2,5 пмоль/л. Повышенные уровни (например, предпочтительно по крайней мере на 50% выше нормального уровня, более предпочтительно по крайней мере на 70% выше нормального уровня, особенно по крайней мере на 100% выше нормального уровня (нормального уровня для определенной группы людей, обычно применяемой в медицинской диагностике (например, расы, факторов риска (особенностей питания и т.д.)) являются показательными для способа диагностики септических осложнений настоящего изобретения. Соответственно предпочтительно, чтобы пациент был признан имеющим септические осложнения или подверженным риску развития септических осложнений, если уровень NT-proCNP выше 4 пМ/л (пмоль/л).

Предпочтительно NT-proCNP определяют с применением анти-NT-proCNP антител. Конечно, любой другой из CNP, его предшественников или их фрагментов также предпочтительно определяют с применением специфичных к ним антител.

Сепсис также является проблемой в ветеринарной медицине, т.е. у животных, не являющихся людьми, в качестве пациентов («животных-пациентов»). В ветеринарной медицине имеется исследование на основе таких же параметров, которые применяются в медицине у людей. Например, в работе Pusteria et al. (Am. J. Vet. Res. 67(6) (2006), 1045-1049), TNF-альфа, интерлейкин (1b)-1бета, IL-6, IL-8, IL-10, прокальцитонин (PCT) трансформирующий фактор роста (TGF)-бета исследовали ПЦР методами. Однако, хорошо разработанные методы иммуноанализа с достаточной перекрестной реактивностью или специфичные в отношении аналогичных молекул, циркулирующих у различных видов животных, все еще отсутствуют. Это отсутствие подходящих методов анализа удивительно, поскольку существует настоятельная потребность на большом рынке для таких тестов, в особенности для домашних животных, таких как собаки, кошки и лошади. Люди хотят тратить большие суммы на уход за животными из-за эмоциональной взаимосвязи с питомцами или по причине ценности животных (верховая езда, ценные племенные животные); например, в 2006 граждане США потратили 38,5 долларов США на своих домашних животных. Почти четверть этой

суммы была израсходована в ветеринарной службе. Следовательно, в ветеринарной области подходящая диагностика сепсиса также является крайне необходимой.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики септических осложнений у животных-пациентов с множественной травмой, в котором у указанных пациентов нет травматического повреждения головного мозга, посредством определения уровня натрий-уретического пептида С-типа (CNP) или его предшественников или их фрагментов, в особенности N-концевого участка натрий-уретического пептида С-типа (NT-proCNP) у такого пациента, и диагностики такого пациента как имеющего септические осложнения или подверженного риску развития септических осложнений, если уровень NT-proCNP повышен по сравнению с нормальными уровнями.

Предпочтительными животными-пациентами для диагностики в соответствии настоящим изобретением являются млекопитающие с высокой научной или индивидуальной ценностью, особенно крупный рогатый скот, олени, зоологические животные, домашние животные, лабораторные животные или рабочие животные. Разумеется, изобретение ограничивается животными, имеющими CNP, особенно с функцией, сопоставимой с человеческой. Животными-пациентами, особо предпочтительными в настоящем изобретении, являются коровы, овцы, козы, лошади, ослы, яки, свиньи, кролики, мыши, кошки, собаки, хомячки, рыбы, лягушки, рептилии, морские свинки, слоны, медведи или обезьяны. Фактически, неожиданно хорошая реактивность человеческих антител, несмотря на различия последовательности с собачьим/ кошачьим NT-proCNP или NT-proCNP других животных (и наоборот) показала, что анализ в соответствии с настоящим изобретением может работать на всех животных, у которых, как известно, присутствует CNP (даже с антителами, перекрестно реагирующими с различными видами).

В клинической практике, особенно в интенсивной терапии, NT-proCNP предпочтительно определяют с применением набора для иммуноанализа человеческого или животного NT-proCNP. Для этой цели в соответствии с настоящим изобретением может применяться иммуноанализ для человеческого или животного NT-proCNP или его антигенного фрагмента, или даже его полипептидного продолжения, лишённого CNP активности, в котором его первичный связывающий партнер является моноклональным или поликлональным антителом к этим молекулам. Способы иммуноанализа, конечно, хорошо известны в данной области техники, например, РИА, ИФА, флуоресцентный иммуноанализ (ФИА) или иммуноанализы методом «сухой химии» с помощью индикаторных полосок. В таком иммуноанализе в целом применяются моноклональные или поликлональные антитела против CNP, его предшественников или их фрагментов, особенно NT-proCNP, в способе в соответствии с настоящим изобретением, в иммобилизованной форме, например, на планшетах для микротитрования, мембранах или бусинах, для выделения, например, целевого NT-proCNP соединения. В сэндвич-анализе связанный антиген может быть помечен с применением дополнительного растворимого антитела в соответствии с изобретением, которое может быть моноклональным или поликлональным, и которое может нести метку или, более удобно, само может быть впоследствии помечено путем реакции с вторичным антителом, несущим метку.

Особо предпочтительным иммуноанализом является анализ NT-proCNP, разработанный Biomedica Group (Австрия), основанный на устройствах для микротитрования, предварительно обработанных поликлональными анти-NT-proCNP антителами.

Таким образом, если первичное антитело в соответствии с изобретением выбрано из мышинового или кроличьего, меченное вторичное антитело может быть анти-мышинным или анти-кроличьим антителом.

5 Подходящие метки включают радионуклиды, флуоресцирующие вещества, например, флюорогены на основе европия, ферменты, например такие, как применяются в ИФА-системах, использующих автоматические способы гибридизации, или красители или коллоидные частицы, такие как коллоидное золото.

10 Альтернативно, может применяться анализ конкурентного связывания, в котором известное количество, например, меченого человеческого NT-proCNP или его антигенного фрагмента, или их неактивного продолжения добавляют к раствору и приводят в контакт с ограниченным количеством иммобилизованного моноклонального или поликлонального антитела, в котором количество

15 иммобилизованного меченого антигена обратно пропорционально количеству целевого антигена, присутствующего в анализируемом образце.

Изобретение также включает применение набора для иммуноанализа человеческого или животного CNP, его предшественников или их фрагментов, в особенности NT-proCNP, для диагностического способа в соответствии с

20 изобретением, включающего:

(a) моноклональное или поликлональное антитело к CNP, его предшественникам или их фрагментам, в особенности NT-proCNP, в иммобилизованной форме, и по крайней мере один дополнительный компонент, выбранный из;

25 (b) меченого образца CNP, его предшественников или их фрагментов, особенно NT-proCNP;

(c) указанного моноклонального или поликлонального антитела в неиммобилизованной форме;

(d) меченого вторичного антитела, специфичного к указанному антителу (c).

30 Таким образом, настоящее изобретение найдет значительное применение, в особенности в отделении интенсивной терапии госпиталя, где мониторинг данного параметра является выгодным.

Как установлено выше, жидкость организма, для которой проводят иммуноанализ, может быть любой жидкостью организма, в которой есть человеческий или

35 животный NT-proCNP, но удобно является плазмой или сывороткой. В некоторых случаях может быть удобно экстрагировать пептид, или иначе обработать образец перед анализом.

CNP, его предшественники или их фрагменты, особенно NT-proCNP, и антитела к ним в наборе для диагностики животных пациентов в соответствии с настоящим изобретением должны быть обеспечены с гомологичным белком(ами) (включая предшественники или фрагменты) и антителами к нему, или с гетерологичными белками (т.е. CNP, его предшественниками или фрагментами от других видов), способными давать реакцию с перекрестно-реагирующими антителами.

45 Соответственно, набор по настоящему изобретению может, особенно для животных пациентов, содержать гомологичный CNP, его предшественники или их фрагменты, особенно NT-proCNP, и моноклональные и/или поликлональные антитела к такому гомологичному CNP, его предшественникам или их фрагментам, или содержать

50 гетерологичные CNP стандарты и перекрестно-реагирующие антитела. Было особенно неожиданно, что например, CNP белок или пептид собаки или кошки может распознаваться, например, человеческим антителом к CNP, поскольку - несмотря на относительно высокую гомологию между CNP у различных животных и человека -

например, для proANP замены 1 или 2 аминокислот, как было показано, достаточны для полного удаления иммунореактивности.

Изобретение далее описано посредством следующих примеров и чертежей, но без ограничения ими.

Перечень фигур

Фиг.1 показывает профиль CNP у МТ пациентов без ТБИ с септическими осложнениями или без них (Фиг.1А), профиль CNP у МТ пациентов с изолированным ТБИ с септическими осложнениями или без них (Фиг.1В) и профиль CNP у МТ пациентов с ТБИ с септическими осложнениями или без них (Фиг.1С);

Фиг.2 показывает профиль CNP у МТ пациентов без ТБИ (выжившие/ не выжившие; Фиг.2А), профиль CNP у пациентов с ТБИ (выжившие/ не выжившие; Фиг.2В) и профиль CNP у ТБИ плюс МТ пациентов (выжившие/ не выжившие; Фиг.2С);

Фиг.3 показывает $ISS \leq 25$ против $ISS \geq 25$ (сепсис/ не-сепсис; Фиг.3А), $ISS \leq 25$ против $ISS \geq 25$ (выжившие/ не выжившие, Фиг.3В), и связанный профиль CNP по $ISS \leq 25$ против $ISS \geq 25$ (Фиг.3С).

Осуществление изобретения

Примеры

Пример 1: Клиническое исследование у пациентов с множественной травмой

Клиническое исследование проводили с применением способа в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем исследовании определяли долговременные профили NT-proCNP, N-концевого фрагмента предшественника CNP, у пациентов с множественной травмой с травматическим повреждением головного мозга (ТБИ) или без него, по отношению к септическим осложнениям и исходу (как установлено выше, NT-proCNP был выбран, поскольку он циркулирует в более высоких количествах и более стабилен, чем CNP).

Пациенты и методы

Протокол исследования соответствует стандартам Хельсинской Декларации. После утверждения Этическим Комитетом Allgemeine Unfallversicherungsanstalt это ретроспективное исследование было проведено на всех пациентах, поступивших в любой из двух участвующих травматологических центров 2 уровня с февраля 2002 по сентябрь 2003. Для включения требовались следующие критерии: изолированное ТБИ, множественная травма без ТБИ (МТ) или с ТБИ (ТБИ+МТ), поступление в травматологический центр в пределах 8 часов после травмы, отбор первого образца крови в пределах 12 часов после травмы, возраст пациента >17 лет, индекс тяжести травмы ($ISS > 16$), необходимость лечения в отделении интенсивной терапии. ТБИ определяли как травму головного мозга по сокращенной шкале травмы ($AIS \geq 3$), подтвержденную компьютерной томографией при поступлении. Сепсис определяли как комбинацию из по крайней мере 2 из 4 критериев синдрома системного воспалительного ответа в комбинации с септическим фокусом или положительной культурой крови в течение ± 3 дней. Все ретроспективные измерения NT-proCNP проводили в образцах крови для рутинного определения.

Сывороточный NT-proCNP измеряли при поступлении и ежедневно после него со следующими временными интервалами: <12 часов, 12-24 часа, и 2-16 сутки после травмы. Все измерения были основаны на действительном размере образца в каждом интервале времени, поскольку не все пациенты выжили до 16 дня после травмы. Образцы цельной крови отбирали в стерильные пробирки для анализа (Vacuette, Greiner Company, Вена, Австрия). Образцы центрифугировали при 1500g в течение 20

минут, а сыворотку хранили при -70°C . NT-proCNP измеряли с помощью NT-proCNP иммуноферментного анализа Biomedica (Австрия). Наименьший порог определения анализа составляет 0,55 пмоль/л, а нормальный диапазон составляет от 0 до 40 пмоль/л.

5 Лечение травмы проводили в соответствии с указаниями по интенсивной терапии при травме и протоколам лечения травмы. Анальгезию и седацию суфентанилом (Janssen&Cilag Pharma, Вена, Австрия) и пропофолом (AstraZeneca, Вена, Австрия) проводили во время вспомогательной искусственной вентиляции легких, и
10 все пациенты получали комбинированное парентеральное и энтеральное искусственное питание. Катетер Свана-Ганза (стреловидный катетер для термодилуции АН-0505®, Novomed Co, Вена, Австрия) вводили при необходимости, чтобы поддержать пациентов с высоко нестабильной гемодинамикой.
15 Вентрикулярные и/или паренхимальные катетеры (катетер Шпигельберга 3PS®, Schwandtner Co., Линц, Австрия) применяли для измерения внутричерепного давления у пациентов с ТБИ. Лабораторные анализы, а также неврологический контроль проводил ежедневно один и тот же невролог, и все пациенты находились под круглосуточным клиническим наблюдением лечащих анестезиологов и бригады
20 медсестер.

Статистика

Сывороточные уровни NT-proCNP сравнивали на протяжении соответствующих интервалов времени и статистически оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни относительно частоты сепсиса и не-сепсиса и смертности (не выживших и выживших) с
25 изолированным ТБИ, МТ с ТБИ или без ТБИ. Значимость корректировали для множественного применения в соответствии с Hochberg & Benjamini (Stat Med. 1990 9: (7): 811-8). Статистически значимым считали $P < 0,05$.

Уровни отсечения для сывороточного NT-proCNP для прогноза сепсиса определяли
30 отдельно для изолированного ТБИ и для ТБИ с множественной травмой на протяжении различных интервалов времени после травмы (<12 часов, 24 часа, и 2-16 сутки посредством анализа с помощью ROC-кривой (receiver operating characteristic, рабочая характеристика приемника (Metz, Sem. Nucl. Med. 1978 8(4): 283-298) максимального сывороточного уровня на протяжении этих интервалов времени после травмы. На
35 кривой ROC наносили чувствительность против 100 минус специфичность, с применением диапазона «отсекающих» значений для положительного прогноза. Площадь под кривой (AUC) является показателем точности прогноза с $\leq 0,5$ по единственному случаю и возрастанию до 1, в то время как точность возрастает
40 до 100% чувствительности и специфичности. Поскольку положительные и отрицательные прогностические значения варьируют со смертностью, чувствительность и специфичность добавляли, чтобы иметь параметр, независимый от частоты заболевания. Расчеты проводили с применением статистического программного обеспечения Medcalc (Medcalc Software, Mariak-erke, Бельгия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование было включено 53 пациента, чьи демографические данные представлены в Таблице 2.

50

Таблица 2			
Демографические данные			
	Все пациенты	Сепсис	Не-сепсис
Всего (n)	53	30	23
Мужчины (n)	47	27	20

Женщины (n)	6	3	3
Возраст (средний) (q1, q3)	36 (32, 48)	36 (33, 44)	38 (25, 58)
TBI (n)	15	5	10
MT (n)	23	16	7
TBI+MT (n)	15	9	6
Случаи смерти при TBI (n)	7	1	6
Случаи смерти при MOF (n)	5	4	1
Выжившие (n)	41	25	16
Не выжившие (n)	12	5	7
ISS≤25 (n)	21	7	14
ISS≤25 (Среднее) (q1, q3)	20 (15, 25)	25 (13, 25)	19 (15, 25)
ISS>25 (n)	32	23	9
ISS>25 (Среднее) (q1, q3)	41 (35, 47)	41 (32, 46)	50 (41, 57)
SIRS	39	30	9

Уровни Nt-proCNP были значительно выше у MT пациентов без TBI, у которых развились септические осложнения, чем у не-септических пациентов. Уровни NT-proCNP были даже ниже у MT пациентов с TBI, у которых развились септические осложнения, чем у не-септических пациентов (Фиг.1А, В). Анализ ROC кривой и подсчет AUC NT-proCNP для прогноза сепсиса у MT пациентов без TBI представлен в таблице 3. Были установлены значения AUC между 0,653 и 0,875 на вторые-восемь сутки после травмы (с максимальным достижимым значением 1).

Расчеты в соответствии с кривыми рабочей характеристики приемника (КОС)							Таблица 3
Дни после травмы	Преобладание заболевания	AUC ± станд. ош.	Доверительный интервал	Отсекающее значение (пмоль/л)	Чувствительность	Специфичность	
0	71.4	0.762	0.468-0.940	0.23	90.0	75.0	
1	72.7	0.755±0.108	0.527-0.910	0.21	93.8	66.7	
2	72.2	0.780±0.101	0.556-0.926	1.60	87.5	83.3	
3	69.6	0.857±0.079	0.649-0.965	2.24	93.8	85.7	
4	69.6	0.866±0.076	0.660-0.969	2.20	87.5	85.7	
5	69.6	0.875±0.073	0.671-0.973	2.63	93.8	85.7	
6	71.4	0.811±0.096	0.583-0.945	1.04	100	66.7	
7	71.4	0.711±0.119	0.475-0.884	1.06	93.3	66.7	
1-8	71.4	0.774±0.036	0.705-0.834	2.31	81.6	76.0	
2-8	71.2	0.797±0.036	0.725-0.858	2.31	89.0	75.0	

Уровни Nt-proCNP были выше у не выживших, чем у выживших, когда полиорганная недостаточность была причиной гибели, но не когда присутствовало TBI (Фиг.2А, В). Уровни Nt-proCNP в плазме у не выживших с TBI+MT не отличались существенно по сравнению с выжившими на протяжении всех интервалов времени после травмы (Фиг.2С).

При сравнении пациентов с септическими осложнениями или без них, ISS не различался между группами с изолированным TBI, TBI+MT, или MT без TBI (Фиг.3А). ISS был значительно выше у не выживших по сравнению с выжившими только у MT пациентов без TBI (Фиг.3В). Уровни NT-proCNP не различались у пациентов с ISS ниже или выше 16 (Фиг.3С).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нескольких исследованиях было проведено сравнение относительной прогностической ценности различных натрий-уретических пептидов у пациентов с множественной травмой. Исследование в соответствии с настоящим изобретением относится к идентификации и применению CNP, его предшественников или их 5 фрагментов, в особенности NT-proCNP, в качестве диагностического/прогностического маркера, связанного с сепсисом, в стратификации риска сепсиса у пациентов с множественной травмой. В соответствии с настоящим изобретением исследовали CNP, его предшественники или их фрагменты, особенно NT- 10 proCNP, у пациентов с множественной травмой с травматическим повреждением головного мозга (TBI) и без него по отношению к септическим осложнениям и исходу. NT-proCNP был выбран потому, что он циркулирует в более высоких количествах и является более стабильным, чем активный гормон CNP. В настоящем исследовании было показано, что профили NT-proCNP в плазме четко отличаются у 15 MT пациентов с TBI и без него при развитии септических осложнений. Начинаясь на второй день после травмы, уровни NT-proCNP в плазме были значительно выше у пациентов с множественной травмой без TBI при развитии септических осложнений по сравнению с не-септическими пациентами. У пациентов с изолированным TBI с 20 развитием сепсиса уровни NT-proCNP в плазме были даже ниже, чем у не-септических пациентов во всех моментах времени после травмы, указывая на различные базовые регуляторные механизмы у пациентов с TBI и без него.

При сравнении N-концевых ANP, BNP и CNP прогормонов в качестве ранних индикаторов застойной сердечной недостаточности было установлено, что ProANPs 31- 25 67 является наиболее чувствительным маркером, отличающим субъектов с застойной сердечной недостаточностью от здоровых индивидуумов. Повышение CNP в плазме пациентов с застойной сердечной недостаточностью было связано с клинической и функциональной тяжестью заболевания. Было установлено, что у пациентов с 30 различными сердечно-сосудистыми заболеваниями уровень CNP в плазме значительно увеличен у лиц с септическим шоком, в то время как не отмечено изменения у пациентов с застойной сердечной недостаточностью или гипертензией, но отмечалось двукратное повышение уровня CNP в плазме у пациентов с хронической почечной 35 недостаточностью. В исследовании в соответствии с настоящим изобретением анализ ROC кривой и подсчет AUC NT-proCNP для прогноза сепсиса у MT пациентов без TBI показал, что уровни NT-proCNP в плазме являются чувствительным маркером, различающим пациентов с септическими осложнениями и без них.

В настоящем исследовании (в то же время опубликованном в Bahrami et al., *Inflamm. Res.* 56 (Suppl. 12) (2007): S104 (A81), посттравматические осложнения в каждой 40 группе (TBI, MT, TBI+MT) были не связаны с ISS. Подобным образом, уровни NT-proCNP в плазме не были ассоциированы с ISS и не различались у пациентов с ISS ниже или выше 25.

У не выживших пациентов с множественной травмой (n=2) без TBI уровни NT- 45 proCNP в плазме резко повышались перед смертью. Напротив, у пациентов с изолированным TBI уровни NT-proCNP в плазме были ниже у не выживших, чем у выживших во всех моментах времени. Однако различия не достигали значимых уровней, наиболее вероятно, по причине ограниченного числа пациентов в каждой 50 группе.

Было признано, что CNP, но не ANP или BNP, ослабляет сопротивление артерий у человека путем активации циклической ГМФ-зависимой киназы и ВКСa₂₊ каналов. В дополнение сообщалось, что CNP повышает силу сокращения миокарда с увеличением

синусовой скорости, опосредованной связанными с гуанилил-циклазой рецепторами натрий-уретического пептида, вероятно, рецепторами В типа в сердце собаки, и предполагалось, что на положительный инотропный ответ на CNP оказывает влияние циклический аденозин 3',5'-монофосфат(цАМФ)-зависимая трансдукция сигнала.

Поскольку CNP широко присутствует в эндотелии, он может играть роль в регуляции периферического сопротивления у человека при физиологических и патологических условиях. Патологическая значимость CNP в регуляции сепсиса пока не выяснена точно.

Таким образом, с настоящим исследованием можно показать, что профили NT-proCNP в плазме четко различаются у пациентов с МТ с ТБИ и без него, при развитии септических осложнений. В соответствии с анализом ROC кривой и расчетом AUC для прогноза сепсиса у пациентов с множественной травмой без ТБИ, плазматические уровни CNP, его предшественников или их фрагментов, особенно NT-proCNP, являются чувствительными маркерами при различении пациентов с септическими осложнениями и без них.

Пример 2: Диагностика сепсиса у пациентов - людей и животных.

По результатам, полученным для образцов человеческой сыворотки/плазмы, в которых была продемонстрирована маркерная функция NT-proCNP для диагностики и мониторинга лечения сепсиса (см. также: Пример 1 выше), была исследована маркерная функция CNP для сепсиса у животных.

Антитела, использованные для сбора этих данных, направлены против аминокислот 1-19 и 30-50 человеческого NT-proCNP.

В литературе доступны аминокислотные последовательности некоторых видов, по которым уже получены данные по гомологии. В следующей таблице обобщены некоторые из этих данных по эпитопам, использованных в этом исследовании:

Таблица 4: аминокислоты 1-19 (А) и 30-50 (В) NT-proCNP человека и различных видов животных.

(А)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
proCNP человека	К	Р	Г	А	Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р	Р	А	Е	Е	Л	А	Е
proCNP крысы	К	Р	Г		Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р	Р		Е	Е	Л	А	Е
proCNP быка	К	Р	Г	А	Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р			Е	Е		А	Е
proCNP овцы	К	Р	Г	А	Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р	Р		Е	Е		А	Е
proCNP мыши	К	Р	Г		Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р	Р		Е	Е	Л	А	
proCNP свиньи	К	Р	Г		Р	Р	К	В	Р	Р	Т	Р	Р		Е	Е		А	Е

(В)

	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
proCNP человека	Г	Д	К	А	Р	Г	Г	Г	Г	А	Н	Л	К	Г	Д	Р	С	Р	Л	Л	Р
proCNP крысы	Г	Д	К		Р	Г	Г	Г	Г	А	Н	Л	К	Г	Д	Р	С	Р	Л	Л	Р
proCNP быка	Г	Д	К		Р	Г	Г	Г	Г	А	Н	Л	К		Д	Р	С	Р	Л	Л	Р
proCNP овцы	Г	Д	К		Р	Г	Г	Г	Г	А	Н	Л	К		Д	Р	С	Р	Л	Л	Р
proCNP мыши	Г	Д	К		Р	Г	С	Г	Г	А	Н	Л	К	Г	Д	Р	С	Р	Л	Л	Р
proCNP свиньи	Г	Д	К		Р	Г	Г	Г	Г	А	Н	Л	К	Г	Д	Р	С	Р	Л	Л	Р

Как можно видеть, имеются некоторые отклонения (отмеченные красным) от человеческих последовательностей. Хотя даже малое число различий в аминокислотной последовательности может привести к несостоятельности анализа на основе человеческой последовательности, неожиданным оказалось, что этого не было в случае настоящего изобретения.

Например, NT-proANP антитела, направленные против АК 1-30 человеческого NT-proANP, не распознавали соответствующие последовательности собаки, хотя имелись значительные гомологии с последовательностью собаки.

Неожиданно ИФА антитела к NT-proCNP человека показали отличные эксплуатационные качества при тестировании септических образцов собачьего или кошачьего происхождения. Эксперименты и результаты описаны более подробно ниже.

Материалы и методы

В основном анализы были проведены, как установлено в упаковочном вкладыше в ИФА наборе для человеческого NT-proCNP (BI-20872) без дополнительной модификации. Вкратце метод включает следующие этапы.

1. Сбор образцов

Образцы собирали у субъектов не натощак в пробирки VACUETTE® (Greiner Bio-One) посредством венепункции. ЭДТА пробирки: 9 мл. Пробирки хранили при 4°C до отделения плазмы (параметры центрифугирования: 20 минут при 2000g, при 4°C). Все образцы немедленно помещали на -20°C после центрифугирования и анализировали вместе в одной серии анализа.

2. ИФА процедура

Добавляли 50 мкл STD/SAMPLE/CTRL (Эталон/Образец/Контроль) в двух повторностях в соответствующие ячейки, за исключением холостой пробы.

Добавляли 200 мкл конъюгата (анти-NT-proCNP-HRPO) в каждую ячейку, за исключением холостой пробы, осторожно перемешивали.

Плотно закрывали и инкубировали при комнатной температуре (18-26°) в течение 4 часов в темноте.

Отсасывали содержимое и промывали ячейки 5 раз по 300 мкл разбавленного WASHBUF (буфера для промывания); удаляли остатки буфера для промывания путем постукивания планшетом по бумажной салфетке после окончательного этапа промывания.

Добавляли 200 мкл SUB (субстрата, тетраметилбензидина) в каждую ячейку. Инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (18-26°C) в темноте. Добавляли 50 мкл STOP (останавливающего раствора, 1 н. H₂SO₄) в каждую ячейку. Немедленно измеряли поглощение при 450 нм с образцом 620 нм, при наличии.

Результаты и обсуждение

При анализе 13 нормальных и септических животных по способу, описанному выше, были получены результаты, приведенные в таблице ниже. Из опыта измерений NT-proCNP ожидалось, что собаки и кошки продемонстрируют сходную иммунореактивность. Здесь анализ не согласовался с видами.

Результаты испытаний на животных									
	Виды	NT-proCNP пмоль/л	Возраст	Пол		Виды	NT-proCNP пмоль/л	Возраст	Пол
Нор 01	собака	0,0	1,0	м	Сепс01	собака	1,1	12	м
Нор 02	собака	0,0	12,0	ж	Сепс02	собака	6,4	14	м
Нор 03	собака	0,2	4,0	м	Сепс03	собака	1,1	7	ж
Нор 04	собака	0,0	4,0	ж	Сепс04	собака	5,0	11	ж
Нор 05	собака	0,0	6,0	ж	Сепс05	собака	0,3	1	м

5	Нор 06	собака	0,0	15,0	м	Сепс06	собака	16,8	10	м
	Нор 07	собака	0,0	1,0	ж	Сепс07	собака	0,0	1	ж
	Нор 08	собака	0,0	7,0	ж	Сепс08	собака	0,0	6	ж
	Нор 09	собака	0,0	4,0	ж	Сепс09	собака	5,2	11	м
	Нор 10	собака	0,0	5,0	м	Сепс10	собака	26,5	8	ж
10	Нор 11	собака	4,0	0,6	ж	Сепс11	собака	22,6	0,18	ж
	Нор 12	собака	0,0	2,0	ж	Сепс12	собака	9,9	11	ж
	Нор 13	собака	0,9	0,5	м	Сепс13	кошка	8,6	12	ж

15

Таблица 6			
Итог и анализ результатов на животных			
	Результаты анализа (пмоль)		
	<0,2	>0,3	
20	Клинический диагноз	N	S
	N	11	2
	S	0	11
	Чувствительность	82%	
	Специфичность	100%	
25	Сокращения: N - нормальный, S - септический, Норхх - нормальный образец, Сепсхх - септический образец.		

Как можно видеть из вышеприведенных данных, ИФА способен выявить сепсис у этих животных с отличной специфичностью и чувствительностью.

30 Два нормальных образца, показавших уровни выше предела отсечения (0,2 пмоль/л) могут быть результатом малого возраста животных (0,5 и 0,6 лет), что было продемонстрировано для NT-proCNP также в человеческой системе.

Из данных экспериментов очевидно, что CNP является отличным маркером для сепсиса и что измерения CNP, особенно NT-proCNP, являются ценным новым инструментом для выявления сепсиса и контроля лечения у людей и животных.

35

Формула изобретения

1. Способ диагностики септических осложнений у пациентов - людей и животных с множественной травмой, причем у указанных пациентов отсутствует травматическое повреждение головного мозга, путем определения уровня натрий-уретического пептида С-типа (CNP) или предшественника натрий-уретического пептида С-типа (NT-proCNP) у данного пациента и диагностики пациента как имеющего септические осложнения или подверженного риску развития септических осложнений, если уровень CNP или NT-proCNP повышен по сравнению с нормальными уровнями, где за 40 нормальный уровень принимается:

уровень CNP измеренный ранее у данного пациента; или

уровень CNP у пациентов с множественными травмами без сепсиса или без риска развития сепсиса; или

50 средний уровень CNP у группы людей, обычно применяемой в медицинской диагностике.

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что пациент - человек или животное, является человеком, крупным рогатым скотом, оленем, животным зоопарка,

домашним животным, лабораторным животным или рабочим животным, предпочтительно человеком, быком, овцой, козой, лошастью, ослом, яком, свиньей, крысой, мышью, кошкой, собакой, хомячком, рыбой, лягушкой, морской свинкой, слоном, медведем или обезьяной, особенно пациентом - человеком.

5 3. Способ диагностики септических осложнений у пациентов - людей с множественной травмой, причем у указанных пациентов отсутствует травматическое повреждение мозга, путем определения уровня натрий-уретического пептида С-типа (CNP) или предшественника натрий-уретического пептида С-типа (NT-proCNP), у
10 данного пациента и диагностики пациента как имеющего септические осложнения или подверженного риску развития септических осложнений, если уровень CNP или NT-proCNP повышен по сравнению с нормальными уровнями, где за нормальный уровень принимается:

15 уровень CNP измеренный ранее у данного пациента; или
уровень CNP у пациентов с множественными травмами без сепсиса или без риска развития сепсиса; или
средний уровень CNP у группы людей, обычно применяемой в медицинской диагностике.

20 4. Способ по любому из пп.1-3, характеризующийся тем, что уровень CNP или NT-proCNP у данного пациента определяют путем определения количества CNP или NT-proCNP в образце крови, сыворотки или плазмы пациента.

25 5. Способ по любому из пп.1 и 3, характеризующийся тем, что нормальным уровнем является уровень у пациента, не имеющего септических осложнений или не подверженного риску развития септических осложнений.

6. Способ по любому из пп.1 и 3, характеризующийся тем, что пациент диагностируется как имеющий септические осложнения или подверженный риску развития септических осложнений, если уровень NT-proCNP выше 4 пМ (пикомоль/л).

30 7. Способ по любому из пп.1 и 3, характеризующийся тем, что CNP определяют с применением анти-NT-proCNP антител.

8. Способ по любому из пп.1 и 3, характеризующийся тем, что CNP определяют посредством применения набора для иммуноанализа человеческого или животного NT-proCNP.

35 9. Применение CNP или NT-proCNP в качестве маркеров для диагностики септических осложнений у пациентов - людей с множественной травмой, не имеющих травматического повреждения головного мозга.

40 10. Применение по п.9, характеризующееся тем, что анализ является иммуноанализом NT-proCNP.

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG
 <120> Diagnosis of septic complications
 <130> R 51449
 <140> PCT/AT2008/000082
 <141> 2008-03-06
 <150> AT A 389/2007
 <151> 2007-03-12
 <150> EP 07450202.2
 <151> 2007-11-19
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of human proCNP
 <400> 1
 Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu
 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of rat proCNP
 <400> 2
 Lys Pro Gly Thr Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Gly Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu
 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of bovine proCNP
 <400> 3
 Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Ser Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Val Ala Glu

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of sheep proCNP

<400> 4

Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Val Ala Glu

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of mouse proCNP

<400> 5

Lys Pro Gly Thr Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Asp

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptide consisting of amino acids 1-19 of pig proCNP

<400> 6

Lys Pro Gly Thr Pro Pro Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Val Ala Glu

<210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptide consisting of amino acids 30-50 of human proCNP

<400> 7

Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg

Gly Asp Lys Thr Pro Gly Ser Gly Gly Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg
 1 5 10 15

Ser Arg Leu Leu Arg
 20

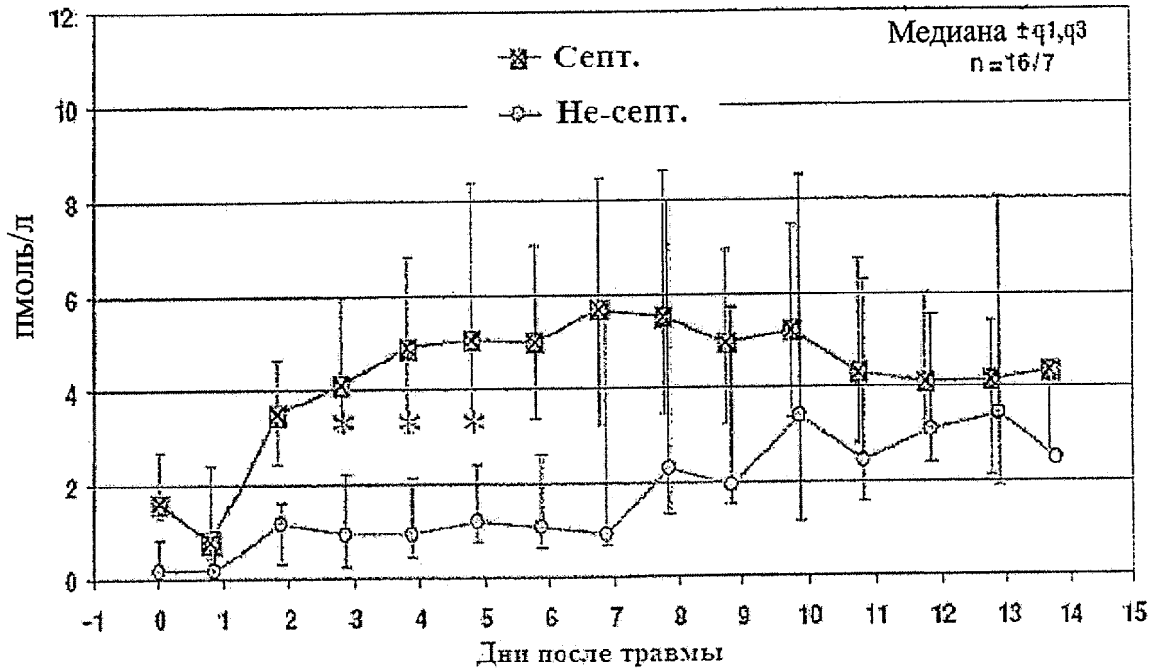
<210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> peptide consisting of amino acids 30-50 of pig procNP

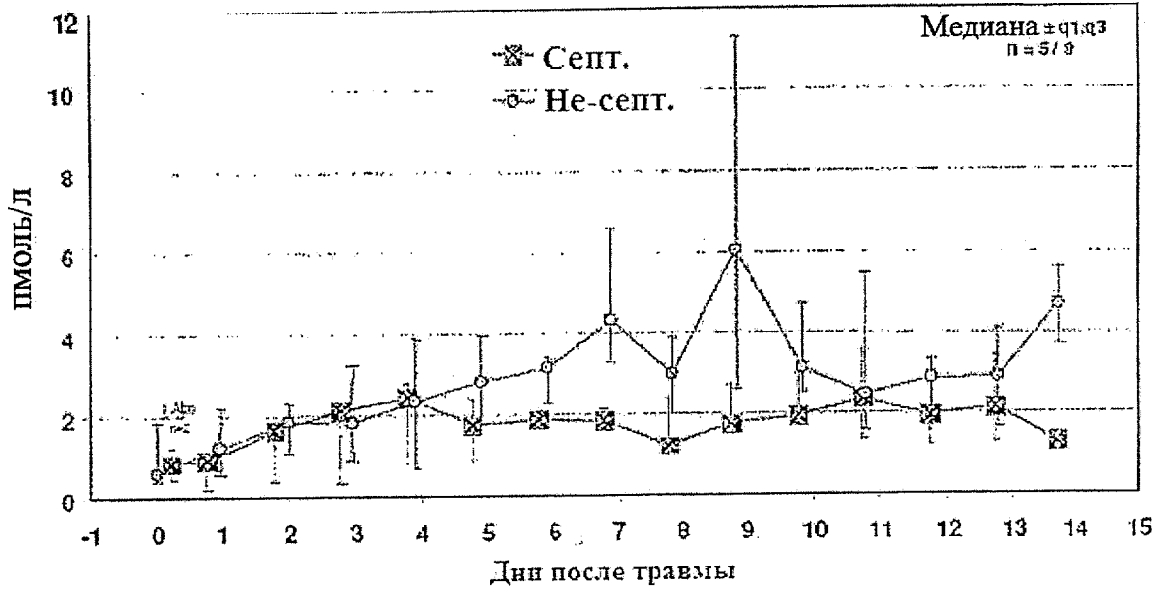
<400> 12

Gly Asp Lys Thr Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg
 1 5 10 15

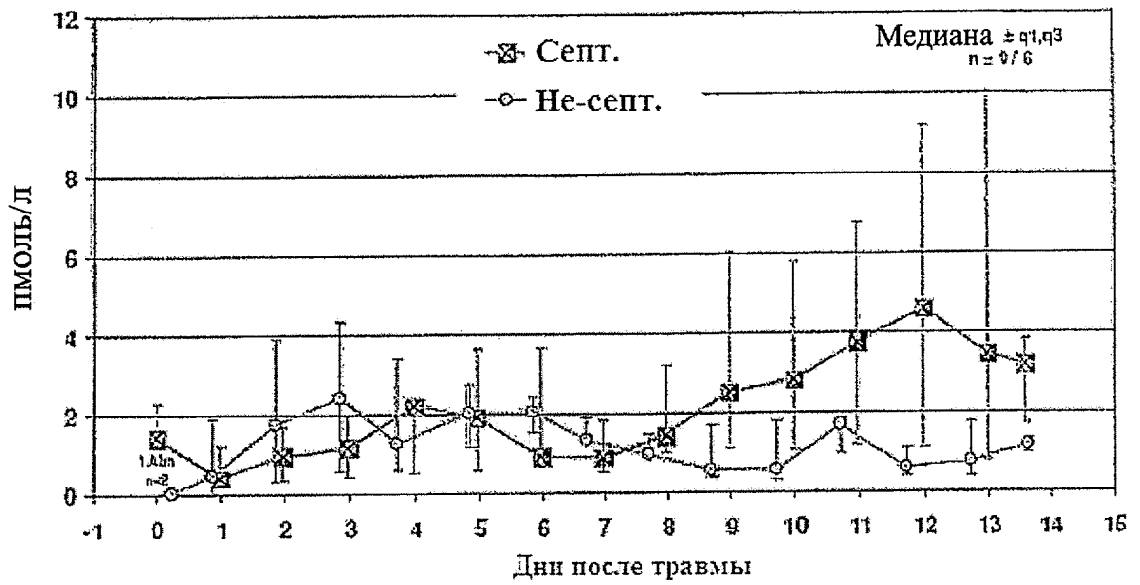
Ser Arg Leu Leu Arg
 20



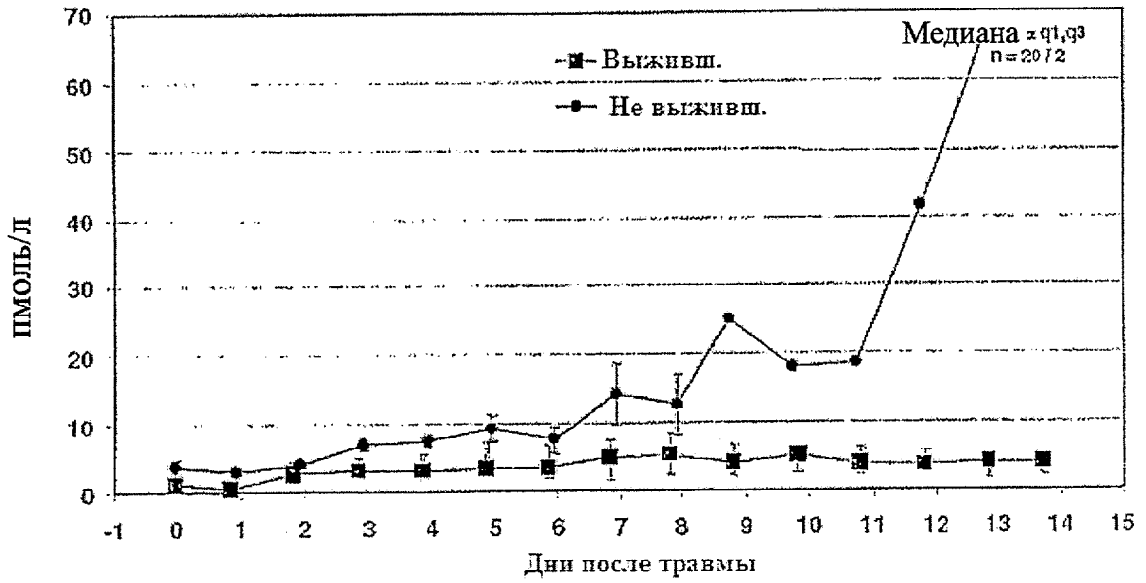
Фиг. 1А



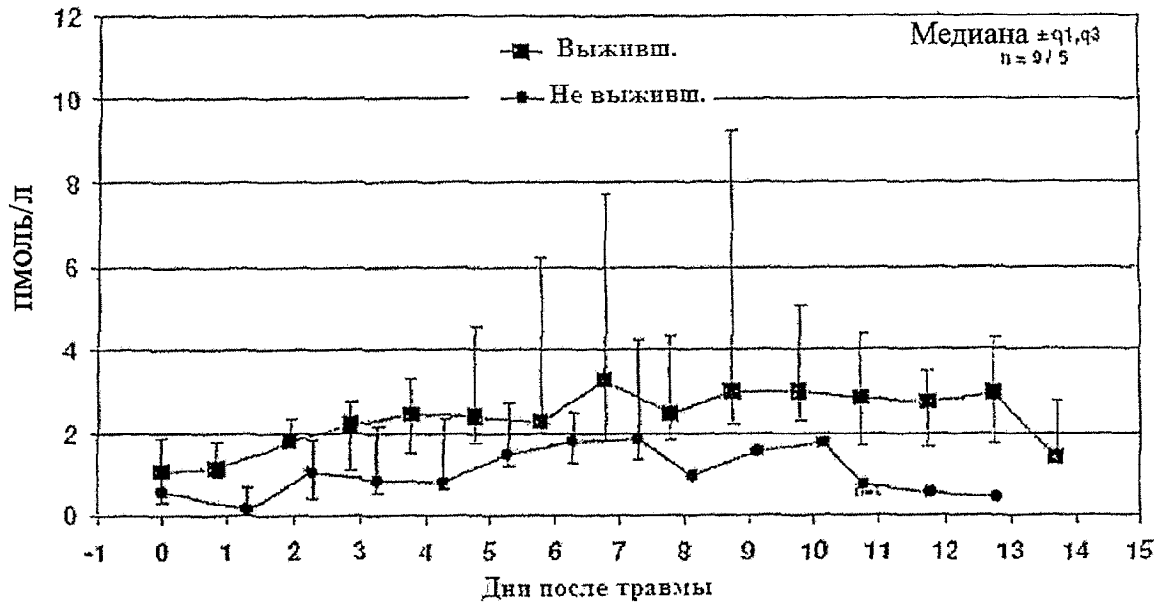
Фиг. 1В



Фиг. 1С

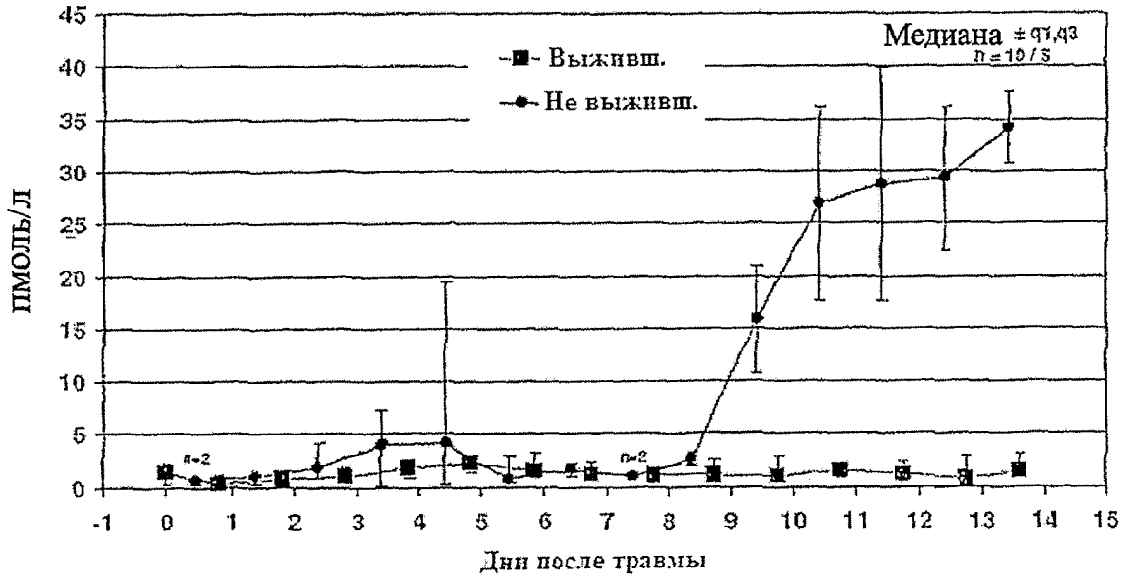


Фиг. 2А
СНР ТВІ

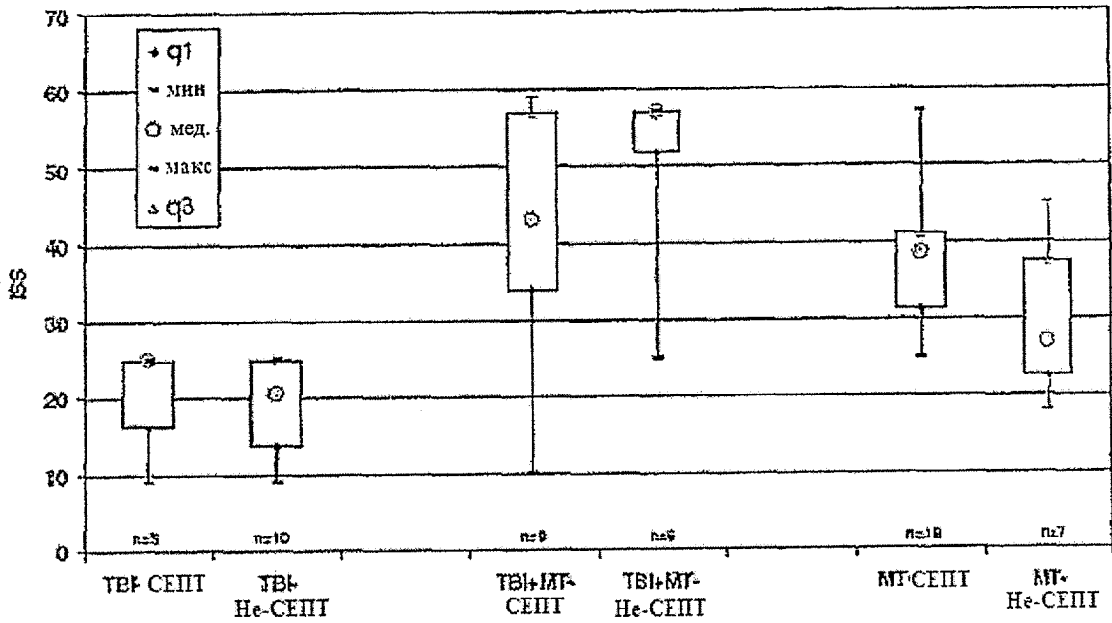


Фиг. 2В

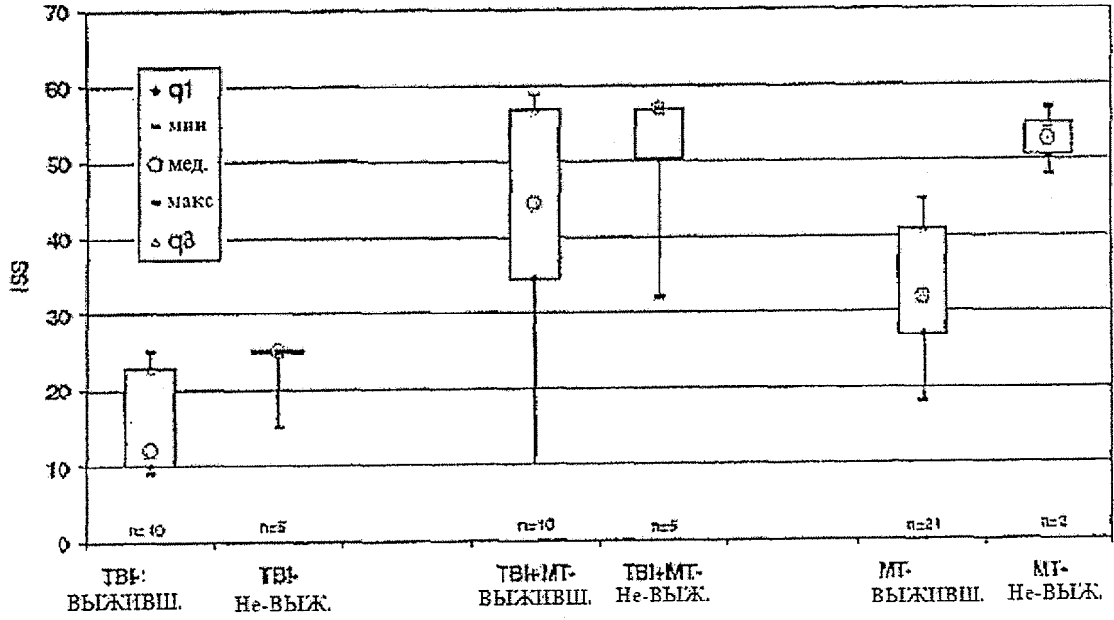
CNP TBI + MT



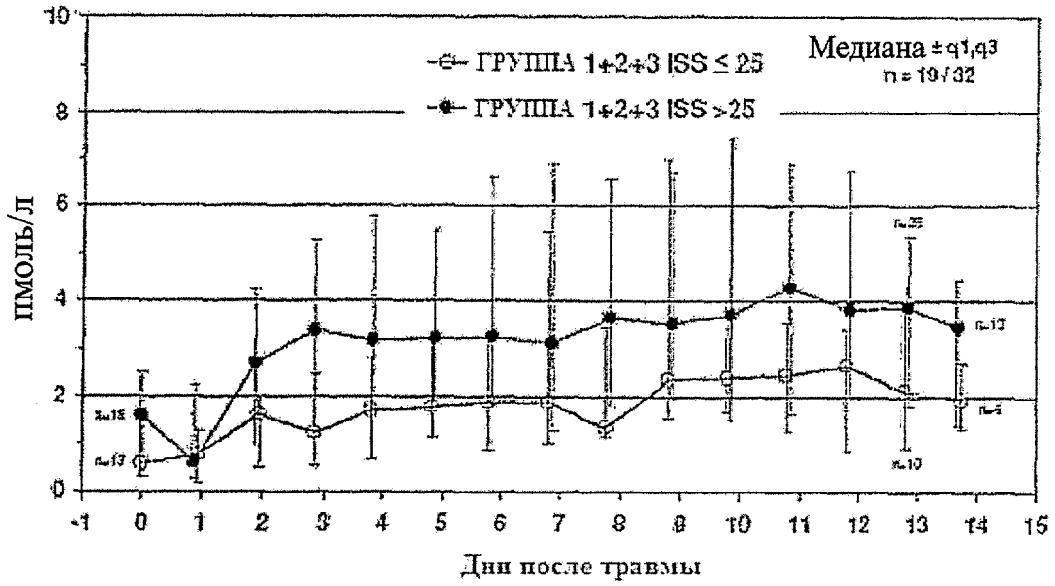
Фиг. 2С



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С