

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6247302号  
(P6247302)

(45) 発行日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(24) 登録日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	
A 6 1 B 5/00	(2006.01)	A 6 1 B 5/00	G

請求項の数 15 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2015-531492 (P2015-531492)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年3月28日 (2013. 3. 28)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2015-531873 (P2015-531873A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成27年11月5日 (2015. 11. 5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/056706		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02014/040759		グレンツァーヘルストラツセ124
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)	(74) 代理人	100140109
審査請求日	平成28年3月25日 (2016. 3. 25)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	12184085.4	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成24年9月12日 (2012. 9. 12)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常な短縮率 (fractional shortening) を持つ患者の同定

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

心不全を患っておらず、そして/または心不全の明らかな徴候を示さない被験体において、死亡のリスクを予測するための分析結果を提供する方法であって、

a) 前記被験体由来の試料において、IGFBP7の量を決定し、そして

b) 工程 a) において決定した量を、参照量と比較し、それによって、前記被験体における死亡のリスクを予測するための分析結果を提供する、  
工程を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

前記被験体が保持されたLVEF (左室駆出率) を有する、請求項 1 の方法。

10

## 【請求項 3】

前記方法が、FGF-23の量の決定を含み、そしてビタミンDの量の決定、FGF-23およびビタミンDの量の間の比の計算、ならびにその比の参照比との比較をさらに含む、請求項 1 または 2 の方法。

## 【請求項 4】

前記工程 a) が、被験体由来の試料における、脳ナトリウム利尿ペプチドの量、および/または心臓トロポニンの量を決定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 5】

前記被験体が心不全を患っていない、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項の方法。

20

## 【請求項 6】

前記被験体が心不全の明らかな徴候を示さない、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項の方法。

## 【請求項 7】

心不全の明らかな徴候を示さない被験体が、ACC/AHA 分類にしたがって病期 A または病期 B と分類される心不全を患うか、あるいは被験体が心疾患および障害に関しては健康である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 8】

前記試料が、血液、血清または血漿試料である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 9】

前記被験体がヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項の方法。

10

## 【請求項 10】

前記被験体が女性である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 11】

死亡のリスクを予測するための、被験体の試料における  $i \gamma$  IGFBP7、あるいは  $i \gamma$  IGFBP7 に特異的に結合する検出剤の使用。

## 【請求項 12】

死亡のリスクを予測するための組成物の製造における、 $i \gamma$  IGFBP7、ならびに / あるいは  $i \gamma$  IGFBP7 に特異的に結合する検出剤の使用。

## 【請求項 13】

前記組成物は薬学的組成物または診断的組成物である、請求項 12 の使用。

20

## 【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項の方法を実行するために適したデバイスであって、

a) IGFBP7 に特異的に結合する検出剤を含むアナライザーユニットであって、当該ユニットは被験体試料におけるマーカーの量を決定するために適応される；および

b) 決定した量と参照量を比較し、それによって、死亡のリスクを予測するためのアナライザーユニットであって、当該ユニットは参照量を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、

を含む、前記デバイス。

## 【請求項 15】

前記 a) におけるアナライザーユニットは、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および / または脳ナトリウム利尿ペプチドに特異的に結合する検出剤をさらに含む、請求項 14 のデバイス。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するための方法に関する。該方法は、被験体由来の試料における心臓トロポニンおよび / または線維芽細胞増殖因子 23 (FGF-23) の量 (単数または複数) の決定、ならびにこうして決定した量 (単数または複数) と参照量 (単数または複数) の比較に基づく。本発明はまた、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかどうかの評価を実行するためのシステム、そして本明細書に開示する方法を実行する際に用いる試薬およびキットにも関する。さらに、本発明は、死亡および / または心臓血管事象のリスクを予測するための方法に関する。保持された左室駆出を有する被験体における、初期段階のLVHを診断するための方法も含まれる。

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0002】

異常な中壁 (midwall) 短縮率 (MFS) は、左室肥大 (LVH) および心不全に進行する間の初期前臨床段階に、ならびに心筋虚血において、異常な収縮および / または拡張心室機能を示す。MFS は、標的器官損傷、収縮予備能損傷、および死亡増加の証

50

拠を有する高血圧の患者を同定する、収縮機能の測定値である。したがって、異常な短縮率を有する被験体の同定が重要である。特に、この同定によって、左室肥大またはさらに心不全の不可逆的進行が起こる前に、適切な予防治療を開始することが可能になる。

【0003】

短縮率は、画像様式を用いることによって認識可能である（例えばHonda Tら J Cardiol. 2002 Mar; 39(3): 141-50.; Palmiero Pら Echocardiography. 2008 Jan; 25(1): 20-6.; Shimizu Gら Circulation. 1985; 71: 266-272を参照されたい）。しかし、異常な中壁短縮率は、しばしば、試験されないかまたは見逃される。これは、特に高齢者に当てはまる。心エコーを用いた短縮率の評価は、高価な計測手段、特殊化された画像化技術、ならびに専門的な画像記録および解釈技能を必要とする。異常なMFSに関する心エコースクリーニングの広く行われる適用は、コスト対費用を考慮することによって限定されてきている。しかし、この不都合は、中壁短縮率に関連する血液バイオマーカーを用いて克服可能であった。

10

【0004】

さらに、バイオマーカーに基づく方法は、心エコーまたは磁気共鳴画像法などの続く画像化技術のために、患者を階層化するために有用であろう。

WO 2012/025355は、心不全を発展させるリスク因子を所持する被験体において、心臓トロポニンおよびIGFBP7の量を決定することによって、心不全に先行する心臓の機能異常および/または構造異常を診断する方法を記載する。該文献は、3.5 pg/mlに等しいかまたはそれより高いトロポニンTのレベルが、心不全に先行する心臓の機能異常および/または構造異常の指標であることを開示する。<15%の中壁短縮率(MFS)を持つ被験体は記載されない。

20

【0005】

Saytanら 2007 (Am J Kidney Dis. December; 50(6): 1009-1019)は、低い中壁短縮率が、劣った収縮機能の測定値であり、そして無症候性血液透析患者において低い中壁短縮率はlog NT-プロBNPに独立に相関する( $p < 0.01$ )ことを開示する。さらに、cTnTおよびmWFSの間には有意な相関はなかった( $p = 0.51$ )。

30

【0006】

Kitagawaら 2011 (Nephron Extra 1(1): 166-177)は、BNPならびにhsトロポニンIを用いて、非糖尿病慢性腎疾患患者における左室拡張機能不全を検出可能であることを開示する。

【0007】

線維芽細胞増殖因子-23 (FGF-23)は骨細胞から血中に分泌される32 kDa ホルモンである。その2つの機能は、尿亜リン酸排出を誘導し、そしてビタミンDの活性化を阻害することである；どちらの作用も腎近位尿細管で起こる。末期腎疾患患者において、高濃度の循環FGF-23が見出されている。該ホルモンは、カルシウム-リン酸およびビタミンD代謝の制御における重要な因子であり、そして心臓血管事象の主要な決定要因である、LV肥大の病因形成において、原因となる役割を有する。

40

【0008】

Kirkpanturら 2011 (Nephrol Dial Transplant 26: 1346-1354)は、FGF-23レベルが、透析患者における増加した左室重量指数(LVMI)および心筋性能指数と関連することを開示する(表2を参照されたい)。<15%の異常な短縮率を有する被験体は調べられなかった(表2を参照されたい；すべての被験体は、FS = ほぼ30%の短縮率を有する)。

【0009】

Mirzaaら 2009 (Mirzaa Atherosclerosis 207, 546-551)は、上昇した血清FGF-23レベル、ならびに増加した左室重量、左室肥大および左室幾何形状、および高齢被験体における左室肥大の存在に関するリスク

50

の増加の間の関連を開示し、これは腎疾患を有する患者 ( e G F R < 6 0 m L / 分 ) でより顕著である。

【 0 0 1 0 】

Faulr 2011 ( J Clin Invest 121 ( 11 ) : 4393 - 4408 ) は、動物モデルにおいて、LVHの病因形成におけるFGF - 23の原因となる役割を調べ、そして慢性的に上昇したFGF - 23レベルが、高率の左室肥大および死亡に直接寄与することを示唆する。該文献はまた、ヒトにおける上昇した血清FGF - 23レベルおよび左室肥大の有病率の間の関連もまた開示し、そして慢性腎疾患のヒトにおいて、FGF - 23レベルの増加が、左室肥大の発展に先行することも開示する。やはり記載されるのは、FGF - 23の検出に基づいて、患者が、将来、左室肥大を患うリスクを予測する方法である。

10

【 0 0 1 1 】

Gutierrez 2009 ( Circulation May 19 ; 119 ( 19 ) : 2545 - 2552 ) は、FGF - 23濃度が、LVMI増加と有意に関連することを開示する。log FGF - 23濃度の増加はまた、左室肥大の存在とも有意に関連した。

【 0 0 1 2 】

Taddei 2011 ( Heart Fail Rev 16 : 615 - 620 ) は、慢性腎疾患患者におけるLVHのリスク因子として、ビタミンD欠乏、すなわちビタミンDレベル減少を開示する。

20

【 0 0 1 3 】

Palmiero 2008 ( Echocardiography Jan ; 25 ( 1 ) : 20 - 6 ) は、中壁短縮率が、拡張機能が正常である場合であってさえ、高血圧患者における心室機能不全の重要な初期徴候であることを開示する。

【 0 0 1 4 】

Ix 2012 ( J Am College of Cardiol . ) は、FGF - 23が集団被験体における予測因子として使用可能であることを開示する。

IGFBP系は、細胞増殖および分化において、重要な役割を果たす。IGF結合タンパク質7 (= IGFBP - 7) は、内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、および上皮細胞によって分泌されることが知られる、30kDaのモジュラー糖タンパク質である ( Ono, Y. ら, Biochem Biophys Res Comm 202 ( 1994 ) 1490 - 1496 )。文献において、この分子はまた、FSTL2 ; IBP7 ; IGF結合タンパク質関連タンパク質I ; IGFBP7 ; IGFBP7v ; IGFBP rP1 ; IGFBP7 ; IGFBP RP1 ; インスリン様増殖因子結合タンパク質7 ; インスリン様増殖因子結合タンパク質7前駆体 ; MAC25 ; MAC25タンパク質 ; PGI2刺激因子 ; およびPSFまたはプロスタサイクリン刺激因子とも称されてきている。低レベルのIGFB - 7は、ランダムなヒト血清において検出されており、そして血清レベルの増加は、インスリン耐性と関連することが示されてきている ( Lopez - Bermejo, A. ら, J. Clinical Endocrinology and Metabolism 88 ( 2003 ) 3401 - 3408, Lopez - Bermejo, A. ら, Diabetes 55 ( 2006 ) 2333 - 2339 )。

30

40

【 0 0 1 5 】

US2010 / 0285491は、心不全の評価におけるIGFBP - 7の使用を開示する。該文献は、さらに、マーカー、IGFBP - 7が、HFを患う患者に対して、治療措置を選択するために使用可能であることを開示する。

【 0 0 1 6 】

Motiwalaは、IGFBP7の連続測定を、左室収縮機能不全の患者における予測因子として使用可能であることを開示する ( JACC, 2013, 61 ( 10 ), E565 )。

50

## 【0017】

ミメカン(しばしば、「オステオグリシン」とも称される)は、細胞外マトリックスの多機能構成要素である。ミメカンは、発生、組織修復、および転移において必須であるプロセス、コラーゲン原線維形成の制御に与与することが示されてきている(Tashev et al., *Mol. Vis.* 8(2002)407-415)。それは、TGF-ベータ-1またはTGF-ベータ-2との組み合わせにおいて、骨形成において役割を果たす。ラットおよびヒト心臓組織におけるトランスクリプトーム分析によって、ミメカンと左室重量、ならびに拡張性心筋疾患における細胞外リモデリングとの高い相関が明らかになった(Petretto, E. et al., *Nature Genetics* 40(2008)546-552)。

10

## 【0018】

WO2011/012268は、ミメカンを心不全評価のためのマーカーとして使用可能であることを開示する。

エンドスタチンは、元来、XVII型コラーゲンの20kDAタンパク質分解的分解断片として、ネズミ血管内皮腫から単離された(O'Reilly, M.S. et al., *Cell* 88(1997)277-285)。コラーゲンは、超分子凝集物を形成する特徴的な三重らせんコンホメーションを持つ細胞外マトリックスタンパク質ファミリーを代表し、該分子は組織構造完全性を維持する際に主要な役割を果たす。過剰なコラーゲン沈着は、周囲組織の正常機能を破壊する線維症を導く。エンドスタチンは、多様なタンパク質分解酵素の作用によって、コラーゲンXVIIのアルファ1鎖から放出される(Oregan, N. et al., *Journal of Cell Science* 115(2002)4201-4214)。エンドスタチンは、血管新生および血管成長の強力な阻害剤である。

20

## 【0019】

WO2010/124821は、エンドスタチンを心不全評価のためのマーカーとして使用可能であることを開示する。

本発明の根底にある技術的問題は、前述の必要性に応じるための手段および方法の提供として見られる。

## 【0020】

技術的問題は、請求項および以下の本明細書に特徴付けられる態様によって解決される。

30

## 【課題を解決するための手段】

## 【0021】

被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを評価するための方法

本発明は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを評価するための方法であって、

a) 被験体由来の試料において、心臓トロポニンおよび/または線維芽細胞増殖因子23(FGF-23)の量(単数または複数)を決定し、そして

b) こうして決定した量(単数または複数)を参照量(単数または複数)と比較し、それによって、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを評価する、工程を含む、前記方法に関する。

40

## 【0022】

好ましくは、工程b)において実行する比較の結果に基づいて、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを評価する、さらなる工程c)を実行することによって、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを評価する。

## 【0023】

本発明の方法は、好ましくは、ex vivoまたはin vitro法である。さらに、該方法は、上に明確に言及するものに加えて、工程を含んでもよい。例えば、さらなる工程は、試料の前処理、または方法によって得られる結果の評価に関連するものであることも可能である。方法を手動で実行してもよいし、または方法は自動化によって補助さ

50

れていてもよい。好ましくは、工程 ( a ) および / または ( b ) は、全体で、または部分的に、自動化によって、例えば工程 ( a ) における決定のための、あるいは工程 ( b ) におけるコンピュータ実装比較および / または前記比較に基づく評価のための、適切なロボットおよびセンサー装置によって、補助されていてもよい。

【 0 0 2 4 】

したがって、本発明はまた、好ましくは、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するためのシステムであって、

a ) 被験体由来の試料の一部を、 *in vitro* で、心臓トロポニンに対する特異的結合アフィニティを含むリガンドと、そして / または F G F - 2 3 に対する特異的結合アフィニティを含むリガンドと接触させるよう設定された、アナライザーユニット、

b ) リガンド ( 単数または複数 ) と接触させた被験体由来の試料の一部から、シグナルを検出するように設定された、アナライザーユニット、

c ) プロセッサを有し、そして前記アナライザー装置と操作可能な通信がある、計算デバイス、および

d ) プロセッサによって実行可能な複数の命令を含む非一過性機械読み取り可能媒体であって、該命令が実行された際、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 の量 ( 単数または複数 ) を計算し、そして参照量 ( 単数または複数 ) と該量 ( 単数または複数 ) を比較して、それによって被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価する、前記媒体

を含む、前記システムに関する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 図 1 A : ボーダーラインの L V H / 穏やかに上昇した L V 重量を持つ女性被験体における、エンドスタチンおよび N T - プロ B N P レベル。 図 1 B : ボーダーラインの L V H / 穏やかに上昇した L V 重量を持つ女性被験体における、エンドスタチンおよび c T n T レベル。

【 図 2 】 図 2 A : ボーダーラインの L V H / 穏やかに上昇した L V 重量を持つ男性被験体における、エンドスタチンおよび c T n T レベル。 図 2 B : ボーダーラインの L V H / 穏やかに上昇した L V 重量を持つ男性被験体における、エンドスタチンおよび N T - プロ B N P レベル。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

用語「評価する」は、本明細書において、本明細書に示すような被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかどうかを決定することを意味する。したがって、本発明の方法を実行することによって、本明細書に示すような被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかどうかを階層化することも可能である。本発明の方法を実行することによって、例えばこれらの診断評価に供するべきではない被験体を同定することも可能である。これらの評価は、高価な計測手段、特殊化された画像化技術、ならびに専門的な画像記録および解釈技能を必要とするため、不要な医療費を回避することも可能である。画像法に基づく評価に感受性である被験体は、好ましくは、収縮機能不全および / または拡張機能不全を患う可能性が増加している被験体である。したがって、該被験体は、画像法に基づく診断評価を必要とする。特に、画像法に基づく評価に感受性である被験体は、好ましくは、異常な中壁短縮率を患う可能性が増加している被験体である。画像法に基づく評価に感受性ではない被験体は、好ましくは、収縮機能不全および / または拡張機能不全を患う可能性が減少している被験体である。したがって、該被験体は、画像法に基づく診断評価を必要としない。特に、画像法に基づく評価に感受性ではない被験体は、好ましくは、異常な中壁短縮率を患う可能性が減少している被験体である。

【 0 0 2 7 】

当業者に理解されるであろうように、こうした評価は、通常、評価しようとする被験体の 1 0 0 % に関して正確であることは意図されない。該用語は、しかし、被験体の統計的

10

20

30

40

50

に有意な部分が正確に評価可能であることを必要とする。評価が正しいかどうかは、当該技術分野に周知の方法によって確認可能である。さらに、部分が統計的に有意であるかどうかは、多様な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデントのt検定、マン-ホイットニー検定等を用いて、当業者によって、容易に決定可能である。詳細は、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.0001である。

**【0028】**

本発明の方法にしたがって、試験しようとする被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるかを評価するものとする。好ましくは、画像法に基づく診断評価は、心臓の写真を生成することを目的とする。したがって、評価は、心臓の評価であるものとする。より好ましくは、画像法に基づく診断評価は、心エコーまたは磁気共鳴画像法(MRI)である。最も好ましい診断評価は心エコーである。

**【0029】**

上述の画像化技術は、当該技術分野に周知である。用語「心エコー」は、本明細書において、好ましくは、超音波によって生じる画像および記録を用いた心臓構造および機能の評価を指す。好ましくは、該用語には、一次元、二次元および三次元心エコーが含まれる。さらに、用語「心エコー」には、経胸壁心エコー、負荷心エコー、およびコントラスト心エコーが含まれることが想定される。特に好ましい態様において、心エコーは、Mモード心エコーである。

**【0030】**

磁気共鳴画像法は、体の内部構造を詳細に視覚化するため、放射線学で用いられる医学的画像化技術である。MRIによって、高周波電波が、強い磁場に置かれた水分子および他の組織構成要素中の水素原子を照射する際、該電波の吸収および透過を分析する。用語「磁気共鳴画像法」は、本明細書において、心臓磁気共鳴画像法(しばしば、心臓血管磁気共鳴画像法とも称される)を指す。

**【0031】**

本発明の方法の好ましい態様において、画像法に基づく診断評価を、拡張機能不全を診断するために用いる。本発明の方法のさらにより好ましい態様において、画像法に基づく診断評価を、収縮機能不全を診断するために用いる。

**【0032】**

用語「拡張機能不全」は、当業者によく理解されている。好ましくは、該用語は、心室充満障害による、心臓のポンプ機能の減少を指す。したがって、該用語は、好ましくは、拡張期中の心臓の一方または両方の心室の性能の低下を指す。用語「収縮機能不全」もまた、当該技術分野に周知である。本明細書において、該用語は、好ましくは、心室収縮の減少による、心臓のポンプ機能の減少を指す。好ましくは、収縮機能不全および/または拡張機能不全には、心不全の明らかな徴候は伴わない。やはり好ましくは、収縮機能不全および/または拡張機能不全には、左室肥大は伴わないものとする。

**【0033】**

本発明の方法の特に好ましい態様において、異常な中壁短縮率、特に異常な左室中壁短縮率を診断するため、画像法に基づく診断評価を用いる。

表現「中壁短縮率」は、当該技術分野に周知である(本明細書において、「MFS」と略される)。減少した左室(LV)MFSが、LV機能不全の初期徴候であることが当該技術分野に周知である。好ましくは、中壁短縮率は、15%より低い場合、異常と見なされる。このカットオフポイントは、HFの設定において参照値として用いられてきており、そして高血圧被験体における予後関連が立証されてきている(Murreduら, *European Journal of Heart Failure* (2012) 14, 718-729を参照されたい)。やはり好ましくは、中壁短縮率は、14%または

10

20

30

40

50

13%より低い場合、異常と見なされる。さらに、中壁短縮率は、15%より高い(またはそれに等しい)場合、正常と見なされる。やはり好ましくは、中壁短縮率は、16%または17%より高い場合、正常と見なされる。

【0034】

中壁短縮率は、周知の方法によって計算可能である。例えば、その全開示内容に関して、本明細書に援用される、Shimizuらによって記載されるような2シェル筒状モデルから計算可能である(Shimizu G, Hirota Y, Kita Y, Kawamura, K, Saito T, Gaasch WH. 全身動脈性高血圧における左室中壁力学 Circulation 1991; 83: 1676-84)。この方法は、慣用的な中壁法を洗練したものであり、そして理論的周囲中壁線維または心筋リングの短縮を反映するデータを提供する。該方法は、心周期を通じて左室重量が一定であることを仮定し、そして内壁および外壁の肥厚率が等しいという仮定を必要としない。

10

【0035】

MFSの決定はまた、Mayetらによって、またはShimizuらの先の論文においても記載され、これらはすべて本明細書に援用される(例えば、Mayetら, Hypertension. 2000; 36: 755-759; Shimizu G, Zile MR, Blaustein AS, Gaasch WH. 左室肥大を伴う患者における左室充満および中壁線維伸長: 慣用的な中壁測定による線維速度の過大評価。Circulation. 1985; 71: 266-272、またはShimizu G, Conrad CH, Gaasch WH. 左室肥大を伴う患者における左室充満および中壁線維伸長の位相面分析 Circulation. 1987; 75(suppl 1): I-34-I-39を参照されたい)。さらに、MFSの決定は、de Simoneら(JACC, 1994, Vol. 23(6): 1444-51)によって記載されてきており、これもまたその全体が本明細書に援用される。好ましくは、MFSは、本明細書において、Shimizuによって1987年および1985年に記載されるような方法にしたがって決定され、より好ましくは、MFSは、Mayetらにしたがって決定され、最も好ましくは、MFSはde Simoneにしたがって決定される。

20

【0036】

用語「被験体」は、本明細書において、動物、好ましくは哺乳動物、そしてより好ましくはヒトに関する。本発明の文脈における被験体は、男性または女性であってもよい。さらに、被験体が65歳より高齢であることが特に想定される。

30

【0037】

本発明の好ましい態様において、被験体は、左室肥大を患っていない。特に、被験体が正常な左室重量を有することが特に想定される。

用語「左室肥大」は、当該技術分野に周知である。左室肥大に関する詳細な概説は、例えば標準的な教科書に見出されうる(Swamy Curr Cardiol Rep (2010) 12: 277-282を参照されたい)。LVHは、心電図、心エコー、または心臓磁気共鳴画像法(MRI)によって検出可能である。好ましくは、LVHは、心エコーによって検出される。さらに、LVH診断のための基準が当該技術分野に周知である(Manciaら, European Heart J. 2007, 28: 1462, Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt - Wolfgang Gerok - 2007, 293ページ, Swamy Curr Cardiol Rep (2010) 12: 277-282)。

40

【0038】

LVHの評価には、好ましくは、当該技術分野に知られる公式にしたがった、左室重量の計算とともに、隔壁直径、左室後方壁厚および拡張期直径の測定が含まれる。LVHを診断するための特に好ましい基準は、例えば、ガイドラインに開示される(Mancia

50

ら, European Heart J. 2007, 28: 1462)。また、好ましくは、基準は、成人における慢性心不全の評価および管理のためのACC/AHAガイドラインから採用されてもよい。J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38; 2101-2113。

【0039】

好ましくは、Cornell電圧基準、Cornell積基準、Sokolow-Lyon電圧基準またはRomhilt-Estesポイントスコア系を用いる(Mancíaら, European Heart J. 2007, 28: 1462)。

【0040】

用語「左室肥大」(「LVH」と略される)は、本明細書において、好ましくは、心室壁の肥厚に関連する。LVHは、好ましくは、心臓に対する慢性に増加した作業負荷に対する反応である。動脈性高血圧(すなわち高い血圧)を患う患者において見出されるLVHは、治療が必要な疾患である。本発明の文脈において、心臓の機能異常および/または構造異常は、典型的には、左室肥大および/または心不全に先行する。

【0041】

全身血管耐性上昇に関連する後負荷増加に対する反応としての肥大は、特定のポイントまで必要であり、そして保護性である。そのポイントを超えると、多様な機能不全がLVHに付随し、これには、より低い冠動脈血管拡張能、抑圧された左室壁力学、および異常な左室拡張期充満パターンが含まれる。

【0042】

好ましくは、男性被験体は、左室重量指数(そしてしたがって、LVMIと略される体表面に対する左室重量の比)が、 $105 \text{ g/m}^2$ より高い、より好ましくは $110 \text{ g/m}^2$ より高い、そして最も好ましくは $115 \text{ g/m}^2$ より高い(または特に $116 \text{ g/m}^2$ より高い)場合、LVHを患う。好ましくは、女性被験体は、LVMIが、 $85 \text{ g/m}^2$ より高い、さらにより好ましくは $90 \text{ g/m}^2$ より高い、そして最も好ましくは $96 \text{ g/m}^2$ より高い場合、LVHを患う。

【0043】

本明細書に上述するように、被験体は、好ましくは、正常な左室重量を有するものとする。被験体が男性である場合、以下が当てはまる: 被験体は、男性被験体の左室重量指数が、好ましくは $105 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い、あるいはより好ましくは $110 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い、あるいは最も好ましくは $115 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い(あるいは特に $116 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い)場合、正常な左室重量を有すると見なされる。被験体が女性である場合、以下が当てはまる: 被験体は、被験体の左室重量指数が、好ましくは $85 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い、あるいはより好ましくは $90 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い、あるいは最も好ましくは $96 \text{ g/m}^2$ に等しいかまたはそれより低い場合、正常な左室重量を有すると見なされる。正常な左室重量を有する被験体はLVHを患わないことが理解されるものとする。

【0044】

好ましくは、LVMIは、Langら(心室定量化に関する推奨 Eur J Echocardiogr 2006; 7: 79-108)によって開示されるように決定される。

【0045】

本発明の好ましい態様において、被験体は高血圧を患う。高血圧は、当業者に知られる、いかなる型の高血圧であってもよい。本発明の好ましい態様において、個体は、動脈性高血圧、収縮期高血圧および/または拡張期高血圧を患う。特に、被験体は、動脈性高血圧を患うものとする。好ましくは、被験体は、収縮期圧が $140 \text{ mmHg}$ を超え、そして/または拡張期圧が $90 \text{ mmHg}$ を超える場合、動脈性高血圧を患う。より好ましくは、被験体は、3ヶ月またはそれより長く、6ヶ月またはそれより長く、12ヶ月またはそれより長く、2年またはそれより長く、3年またはそれより長く、あるいは5年またはそれ

10

20

30

40

50

より長く、収縮期圧が140 mmHgを超え、そして/または拡張期圧が90 mmHgを超える場合、動脈性高血圧を患う。好ましくは、例えば運動によって一時的に上昇した血圧は、用語「動脈性高血圧」には含まれない。

【0046】

高血圧には、心不全を発展させるリスク要因が付随する可能性もある。心不全を発展させる好ましいリスク要因は、例えば心臓、脳、腎臓、血管の無症候性臓器損傷；肥満、好ましくは体格指数BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>によって定義される肥満；脂肪過多症；メタボリックシンドローム；1型または2型糖尿病、特に2型糖尿病；微量アルブミン尿を伴う1型糖尿病、喫煙；血管再建歴；心臓毒性薬剤療法歴またはアルコール濫用歴；脂質異常症；総コレステロール、総コレステロール/HDL-コレステロール比、リウマチ熱の個人歴；心筋症の家族歴である。したがって、被験体が、上述のさらなるリスク要因の1またはそれより多くが付随する高血圧を患う可能性もある。しかし、前記被験体が、高血圧のみを患うこともまた意図される。

10

【0047】

さらに、被験体が、ACS（急性冠動脈症候群）を患わないことがさらに想定される。用語「ACS」には、本明細書において、STEMI（ST上昇心筋梗塞）、NSTEMI（非ST上昇心筋梗塞）および不安定狭心症が含まれる。試験しようとする被験体は、ACS歴を持たないことがさらに想定される。特に、被験体は、本発明の方法を実行する1ヶ月以内（より正確には、試料を得る前の1ヶ月以内）に、ACSを患っていないものとする。

20

【0048】

被験体が冠動脈疾患を患っていないこともまた意図される。CADと略される用語「冠動脈疾患」は、しばしば、冠動脈心臓疾患（CHD）またはアテローム性動脈硬化性心臓疾患とも称され、当業者に知られる。好ましくは、該用語は、心臓に血液および酸素を供給する血管が狭窄している状態を指す。冠動脈疾患は、通常、アテローム性動脈硬化症と呼ばれる状態によって引き起こされ、該状態は、プラークと呼ばれる脂肪性の成分および物質が、動脈壁に蓄積した際に起こる。これによって血管が狭窄する。特に、CADは、心筋（心臓の筋肉）に供給する動脈壁内のアテローム性プラークの集積の結果である。好ましくは、CADを患う被験体は、少なくとも1つの主要冠動脈において、少なくとも50%の狭窄（そしてしたがって少なくとも50%の閉塞）を有する。したがって、CADを患っていない被験体は、好ましくは、主要冠動脈において、50%未満の狭窄を有する。冠動脈の閉塞の度合いを評価する方法は、当該技術分野に周知であり、好ましくは、度合いは、冠動脈造影によって評価される。疾患の進行した状態において、冠動脈疾患の症状および徴候が認められるが、冠動脈疾患を伴う患者の大部分は、急性事象の最初の発症、しばしば「突然の」心臓発作が最終的に起こるまで、疾患が進行するにつれて、何十年も、疾患の証拠をまったく示さない。

30

【0049】

さらに、被験体は妊娠していないものとする。また、被験体は、好ましくはアスリートではない。

被験体が、心不全を患わず、そして/または心不全の明らかな症状を示さないことがさらに想定される。

40

【0050】

用語「心不全」は、本明細書において、好ましくは、当業者に知られるような、心不全の明らかな徴候が付随する損なわれた収縮機能および/または拡張機能に関する。好ましくは、本明細書で言及する心不全はまた、慢性心不全である。本発明記載の心不全には、明らかなおよび/または進行した心不全が含まれる。明らかな心不全において、被験体は、当業者に知られるような心不全の症状を示す。用語「心不全」は、本明細書において、ACC/AHA分類の病期CおよびDを指すことが特に意図される。これらの病期において、被験体は、心不全の典型的な症状を示し、すなわち被験体は見かけ上健康ではない。心不全を有し、そして病期CまたはDと分類される被験体は、心筋に対して、永続的で、

50

不可逆的な構造および/または機能の変化を有し、そしてこれらの変化の結果、完全な健康回復は不可能である。

【0051】

A C C / A H A 分類は、米国心臓病学会および米国心臓協会によって開発された心不全の分類である ( J . A m . C o l l . C a r d i o l . 2 0 0 1 ; 3 8 ; 2 1 0 1 - 2 1 1 3 , 2 0 0 5 改訂を参照されたい。 J . A m . C o l l . C a r d i o l . 2 0 0 5 ; 4 6 ; e 1 - e 8 2 を参照されたい ) 。 4 つの病期、 A 、 B 、 C および D が定義される。病期 A および B は H F ( 心不全 ) ではないが、「真の」 H F を発展させる前の患者を早期に同定するのを補助すると見なされる。病期 A および B の患者は、 H F を発展させるリスク要因を持つ患者と定義するのが最適である。例えば、左室 ( L V ) 機能障害、肥大、または幾何学的心室変形をいまだ示さない、冠動脈疾患、高血圧、または糖尿病を有する患者は、病期 A と見なされるであろうし、一方、無症候性であるが、 L V 肥大 ( L V H 、心室壁が肥厚する現象 ) および/または L V 機能障害を示す患者は、病期 B と指定されるであろう。次いで、病期 C は、根底にある構造的な心臓疾患に関連した H F の現在のまたは過去の症状を伴う患者 ( H F 患者の大部分 ) を示し、そして病期 D は、真性の難治性 H F の患者を指定する。

10

【0052】

本発明の好ましい態様において、試験しようとする被験体は、病期 B の被験体と分類される ( 上述のような A C C / A H A 分類にしたがう ) 。したがって、被験体は、心不全の明らかな徴候を示さない。被験体が病期 B 被験体と分類される場合、被験体は、好ましくは、本明細書の別の箇所により詳細に明記するように、正常左室重量を有する。

20

【0053】

さらに、本発明の文脈において、被験体は、腎機能障害を持たないことが想定される。好ましくは、被験体は腎不全を患っていないものとし、特に被験体は、急性、慢性および/または末期腎不全を患っていないものとする。さらに、被験体は、好ましくは、腎性高血圧を患わないものとする。被験体が腎機能障害を示すかどうかを評価する方法は、当該技術分野に周知である。知られており、そして適切と見なされる任意の手段によって、腎障害を診断することも可能である。特に、糸球体濾過率 ( G F R ) によって、腎機能の評価することも可能である。例えば、 C o c k g r o f t - G a u l t または M D R D 公式によって、 G F R を計算することも可能である ( L e v e y 1 9 9 9 , A n n a l s o f I n t e r n a l M e d i c i n e , 4 6 1 - 4 7 0 ) 。 G F R は、単位時間あたりに、腎糸球体毛細管からボウマン嚢内に濾過される液体の体積である。臨床的には、これは、しばしば、腎機能を決定するために用いられる。 G F R は、元来、血漿内にインスリンを注入することによって概算された ( G F R は決定不可能であり、 C o c k g r o f t - G a u l t 公式または M D R D 公式などの公式から得られるすべての計算は、概算を述べており、そして「真の」 G F R ではない ) 。インスリンは糸球体濾過後には腎臓によって再吸収されないため、その排出速度は、糸球体フィルターの水および溶質の濾過速度に正比例する。しかし、臨床実施においては、 G F R を測定するためには、クレアチニンクリアランスが用いられる。クレアチニンは、内因性の分子であり、体において合成され、糸球体によって自由に濾過される ( しかしまた、非常に少量、腎尿細管によって分泌される ) 。クレアチニンクリアランス ( C r C l ) は、したがって、 G F R の近似値である。 G F R は、典型的には、1分あたりのミリリットルで記録される ( m L / 分 ) 。男性に関する G F R の正常範囲は、97 ~ 137 m L / 分であり、女性に関する G F R の正常範囲は、88 ~ 128 m L / 分である。したがって、腎機能障害を示さない被験体の G F R は、この範囲内であることが特に意図される。さらに、前記被験体は、好ましくは、0.9 m g / d l より低い、より好ましくは1.1 m g / d l より低い、そして最も好ましくは、1.3 m g / d l より低い血液クレアチニンレベル ( 特に、血清クレアチニンレベル ) を有する。

30

40

【0054】

本発明の方法が、 F G F - 2 3 ( およびビタミン D ) の量の決定を含む場合、被験体は

50

、好ましくは、ビタミンD欠乏を示さないものとする。

さらに、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するための方法、異常なMFSを診断するための方法、および死亡のリスクを予測するための方法の文脈において、被験体は、増加したナトリウム利尿ペプチドレベルを持たないことが好ましい。好ましくは、被験体は、増加した脳ナトリウム利尿ペプチドレベルを持たない。より好ましくは、被験体は、増加したBNP型ナトリウム利尿ペプチドレベルを持たない。最も好ましくは、被験体は、増加したNT-プロBNPレベルを持たない。好ましくは、被験体は、特に、血液、血清または血漿試料において、<75歳に関しては、125pg/ml、75歳に関しては、450pg/mlより低いNT-プロBNPレベルを有し、またはより好ましくは、<75歳に関しては、100pg/ml、75歳に関しては、300pg/mlより低いNT-プロBNPレベルを有する。

10

#### 【0055】

用語「試料」は、体液試料、分離された細胞の試料、あるいは組織または臓器由来の試料を指す。体液試料は、周知の技術によって得られることも可能であり、そしてこれには、好ましくは、血液、血漿、血清、または尿の試料、より好ましくは、血液、血漿または血清の試料が含まれる。組織または臓器試料は、例えば、生検によって任意の組織または臓器から得られうる。分離された細胞は、分離技術、例えば遠心分離または細胞ソーティングによって、体液、あるいは組織または臓器から得られうる。好ましくは、細胞、組織または臓器試料は、本明細書に言及するペプチドを発現するかまたは産生する細胞、組織または臓器から得られる。

20

#### 【0056】

用語「心臓トロポニン」は、心臓の細胞、そして好ましくは心内膜下細胞において発現されるすべてのトロポニン・アイソフォームを指す。これらのアイソフォームは、例えば、Anderson 1995, Circulation Research, vol. 76, no. 4:681-686およびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44:487-493に記載されるように、当該技術分野において、よく特徴付けられる。好ましくは、心臓トロポニンは、トロポニンTおよび/またはトロポニンIであり、そして最も好ましくは、トロポニンTである。トロポニンのアイソフォームは、本発明の方法において、一緒に、すなわち同時にまたは連続して、あるいは個々に、すなわち他のアイソフォームをまったく決定せずに、決定することも可能であることが理解されるものとする。ヒトトロポニンTおよびヒトトロポニンIのアミノ酸配列は、Anderson、同所およびFerrieres 1998, Clinical Chemistry, 44:487-493に開示される。

30

#### 【0057】

用語「心臓トロポニン」はまた、前述の特定のトロポニンの、すなわち好ましくはトロポニンIの、そしてより好ましくはトロポニンTの変異体も含む。こうした変異体は、特定の心臓トロポニンと、少なくとも同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を有する。特に、これらは、本明細書において言及するものと同じ特異的アッセイによって、例えば前記心臓トロポニンを特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイによって、検出可能である場合、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明にしたがって言及されるような変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失および/または付加のために異なるアミノ酸配列を有するものと理解され、ここで、変異体のアミノ酸配列はなお、好ましくは、特定のトロポニンのアミノ酸配列と(特に全長に渡って)、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一である。好ましくは、同一性の度合いは、比較ウィンドウに渡って2つの最適に整列された配列を比較することによって決定されるものとし、ここで、比較ウィンドウ中のアミノ酸配列の断片は、最適整列のため、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較した際、付加または欠失(例えばギャップまたはオーバーハング)を

40

50

含んでもよい。両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在する位の数を決めて、マッチした位の数を得て、比較ウィンドウ中の位の総数で、マッチした位の数割り、そして結果に100を乗じて、配列同一性パーセントを得ることによって、割合を計算する。比較のための配列の最適な整列は、SmithおよびWaterman Add. AP L. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性整列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444(1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装によって(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、BLAST、PASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group(GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、または視覚的検査によって、行うことも可能である。2つの配列が、比較のために同定されたならば、好ましくは、GAPおよびBESTFITを使用して、最適整列を決定し、そしてしたがって同一性の度合いを決定する。好ましくは、ギャップ加重の5.00、およびギャップ加重長の0.30のデフォルト値を用いる。変異体はアレル変異体または任意の他の種特異的相同体、パラログ、またはオルソログであってもよい。さらに、本明細書に言及する変異体には、断片が上述のような本質的な免疫学的および生物学的特性を有する限り、特定の心臓トロポニンまたは前述のタイプの変異体の断片が含まれる。好ましくは、心臓トロポニン変異体は、ヒトトロポニンTまたはトロポニンIのものに匹敵する免疫学的特性(すなわちエピトープ組成)を有する。したがって、変異体は、心臓トロポニンの濃度の決定に用いられる前述の手段またはリガンドによって認識可能であるはずである。こうした断片は、例えばトロポニンの分解産物であってもよい。さらに含まれるのは、リン酸化またはミリスチン化などの翻訳後修飾のために異なる変異体である。好ましくは、トロポニンIおよびその変異体の生物学的特性は、アクトミオシンATPアーゼを阻害するか、または*in vivo*および*in vitro*の血管新生を阻害する能力であり、これらは、Mosesら1999 PNAS USA 96(6):2645-2650によって記載されるアッセイに基づいて、検出可能である。好ましくは、トロポニンTおよびその変異体の生物学的特性は、トロポニンCおよびIと複合体を形成して、カルシウムイオンに結合するか、あるいは好ましくはトロポニンC、IおよびTの複合体、またはトロポニンC、トロポニンIおよびトロポニンT変異体によって形成される複合体として存在する場合、トロポニンCに結合する能力である。低濃度の循環心臓トロポニンは、多様な条件で被験体において検出可能であることが知られるが、それぞれの役割および率を理解するためには、さらなる研究が必要である(Massonら, Curr Heart Fail Rep(2010)7:15-21)。

#### 【0058】

好ましくは、心臓トロポニンはトロポニンT、特にヒトトロポニンTである。好ましくは、トロポニンTの量は、実施例、またはWO2012/025355に記載されるような高感度トロポニンアッセイを用いることによって決定される。

#### 【0059】

線維芽細胞増殖因子-23(「FGF-23」と略される)は、リン酸カルシウムおよびビタミンD代謝の制御における重要な因子であり、そして心臓血管事象の重要な決定因子であるLV肥大の病因形成において、原因となる役割を有する。線維芽細胞増殖因子-23(FGF-23)は、骨細胞から血液内に分泌される、32kDaホルモンである。その2つの機能は、尿亜リン酸排出を誘導し、そしてビタミンDの活性化を阻害することである;どちらの作用も腎近位尿細管で起こる。末期腎疾患患者において、高濃度の循環FGF-23が見出されている。好ましくは、FGF-23はヒトFGF-23である。ヒトFGF-23の配列は、当該技術分野に周知であり、例えばアミノ酸配列は、GenBank寄託番号NM\_020638.1 GI:10190673を通じてアクセス可能である。さらに、該配列はまた、Shimadara, 2001, PNAS, vo

10

20

30

40

50

1. 98(11)6500~6505ページにも開示される。用語「FGF-23」はまた、前述のFGF-23の変異体も含む。こうした変異体は、特定のFGF-23と、少なくとも同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を有する。特に、これらは、本明細書において言及するものと同じ特異的アッセイによって、例えば前記FGF-23を特異的に認識するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いたELISAアッセイによって、検出可能である場合、同じ本質的な生物学的および免疫学的特性を共有する。さらに、本発明にしたがって言及されるような変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失および/または付加のために異なるアミノ酸配列を有するものと理解されるものとし、ここで、変異体のアミノ酸配列はなお、好ましくは、FGF-23のアミノ酸配列と(特に全長に渡って)、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一である。同一性の度合いを計算する方法は、本明細書の別の箇所に開示される。好ましくは、FGF-23は、Immutopics, Inc.のヒトFGF-23(C末端)ELISAキット(例えば、カタログ番号60-6100で流通している)によって決定される。

10

**【0060】**

本明細書に言及するペプチドまたはポリペプチドの、特に心臓トロポニン、線維芽細胞増殖因子23(FGF-23)、IGFBP7(IGF結合タンパク質7)、GDF-15、エンドスタチンおよびミメカンからなる群より選択されるマーカーの量を決定する工程は、量または濃度を、好ましくは半定量的または定量的に測定する工程に関する。測定は、直接または間接的に行うことも可能である。直接測定は、ペプチドまたはポリペプチド自体から得られるシグナル、および試料中に存在するペプチドの分子数と直接関連する強度に基づいて、ペプチドまたはポリペプチドの量または濃度を測定する工程に関する。こうしたシグナルは、本明細書において時に、強度シグナルと称され、例えばペプチドまたはポリペプチドの特定の物理的または化学的特性の強度値を測定することによって得られる。間接的測定には、二次構成要素(すなわちペプチドまたはポリペプチド自体ではない構成要素)または生物学的読み取り値、例えば測定可能な細胞反応、リガンド、標識、または酵素反応産物から得られるシグナルを測定する工程が含まれる。

20

**【0061】**

本発明にしたがって、ペプチドまたはポリペプチドの量を決定する工程は、試料におけるペプチドの量を決定するためのすべての既知の手段によって達成可能である。前記手段は、イムノアッセイ、および多様なサンドイッチ、競合、または他のアッセイ形式で標識分子を利用可能な方法を含む。こうしたアッセイは、好ましくは、検出剤、例えば決定しようとするペプチドまたはポリペプチドを特異的に認識する抗体に基づく。検出剤は、直接または間接的のいずれかで、ペプチドまたはポリペプチドの存在または非存在を示すシグナルを生成することが可能であるものとする。さらに、シグナル強度は、好ましくは、試料中に存在するポリペプチドの量に、直接または間接的に(例えば反比例)関連することも可能である。さらに適切な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的な物理的または化学的特性、例えばその正確な分子量またはNMRスペクトルを測定する工程を含む。前記方法は、好ましくは、バイオセンサー、イムノアッセイにカップリングした光学デバイス、バイオチップ、分析デバイス、例えば質量分析器、NMRアナライザー、またはクロマトグラフィデバイスを含む。さらに、方法には、マイクロプレートELISAに基づく方法、完全自動化またはロボットイムノアッセイ(例えばElesysTMアナライザー装置上で利用可能)、CBA(例えば、Roche-HitachiTMアナライザー装置上で利用可能な、酵素的コバルト結合アッセイ)、およびラテックス凝集アッセイ(例えば、Roche-HitachiTMアナライザー装置上で利用可能)が含まれる。

30

40

**【0062】**

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量を決定する工程は、(a)その強度が、

50

ペプチドまたはポリペプチドの量の指標となる細胞反応を誘発可能な細胞と、前記ペプチドまたはポリペプチドを、適切な期間、接触させ、(b)該細胞反応を測定する工程を含む。細胞反応を測定するため、試料またはプロセシングされた試料を、好ましくは細胞培養に添加し、そして内部または外部細胞反応を測定する。細胞反応には、レポーター遺伝子の測定可能な発現、あるいは物質、例えばペプチド、ポリペプチド、または小分子の分泌が含まれる。発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドの量に相関する強度シグナルを生じるものとする。

#### 【0063】

やはり好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量を決定する工程は、試料におけるペプチドまたはポリペプチドから得られうる特異的強度シグナルを測定する工程を含む。上述のように、こうしたシグナルは、ペプチドまたはポリペプチドに特異的なマスペクトルまたはNMRスペクトルにおいて観察されるペプチドまたはポリペプチドに特異的な $m/z$ 変数で観察されるシグナル強度であることも可能である。

#### 【0064】

ペプチドまたはポリペプチドの量を決定する工程は、好ましくは、(a)特異的リガンドとペプチドを接触させ、(b)(場合によって)非結合リガンドを除去し、(c)結合したリガンド、すなわち工程(a)で形成されたりリガンド複合体の量を測定する工程を含むことも可能である。好ましい態様にしたがって、接触し、除去し、そして測定する前記工程は、本明細書に開示するシステムのアナライザーユニットによって実行されてもよい。いくつかの態様にしたがって、前記工程は、前記システムの単一のアナライザーユニットによって、または互いに機能可能な通信がある1より多いアナライザーユニットによって、実行可能である。例えば、特定の態様にしたがって、本明細書に開示する前記システムには、接触させ、そして除去する工程を実行するための第一のアナライザーユニット、および輸送装置(例えばロボットアーム)によって前記の第一のアナライザーユニットに機能可能であるように連結されている、測定する前記工程を実行する、第二のアナライザーユニットが含まれることも可能である。

#### 【0065】

結合したリガンド、すなわち、リガンドまたはリガンド/ペプチド複合体は、強度シグナルを生じるであろう。本発明にしたがった結合には、共有および非共有結合の両方が含まれる。本発明にしたがったリガンドは、本明細書記載のペプチドまたはポリペプチドに結合する、任意の化合物、例えばペプチド、ポリペプチド、核酸、または小分子であってもよい。好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチドまたはポリペプチド、例えば該ペプチドまたはポリペプチドに関する受容体または結合パートナー、および該ペプチドに対する結合ドメインを含むその断片、ならびにアダプター、例えば核酸またはペプチドアダプターが含まれる。こうしたリガンドを調製する方法は、当該技術分野に周知である。例えば、適切な抗体またはアダプターの同定および産生はまた、商業的供給者によっても提供される。当業者は、より高いアフィニティまたは特異性を持つリガンドの誘導体を発展させる方法をよく知っている。例えば、ランダム突然変異を、核酸、ペプチドまたはポリペプチド内に導入することも可能である。次いで、これらの誘導体を、当該技術分野に知られるスクリーニング法、例えばファージディスプレイにしたがって、結合に関して試験することも可能である。本明細書に言及するような抗体には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方、ならびに抗原またはハプテンに結合可能な、その断片、例えばFv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>断片が含まれる。本発明にはまた、一本鎖抗体およびヒト化ハイブリッド抗体も含まれ、ここで、望ましい抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列を、ヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせる。ドナー配列には、通常、少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基が含まれるが、ドナー抗体の他の構造的および/または機能的に適切なアミノ酸残基もまた含まれてもよい。こうしたハイブリッドは、当該技術分野に周知のいくつかの方法によって調製可能である。好ましくは、リガンドまたは剤は、ペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明にしたがった特異的結合は、リガンドまたは剤が、分析しようとする試料中に存在する別のペプチド、ポリペ

10

20

30

40

50

チドまたは物質に実質的に結合（これらと「交差反応」）してはならないことを意味する。好ましくは、特異的に結合するペプチドまたはポリペプチドは、いかなる他の関連するペプチドまたはポリペプチドよりも、少なくとも3倍高い、より好ましくは少なくとも10倍高い、そしてさらにより好ましくは少なくとも50倍高いアフィニティで結合しなければならない。非特異的結合は、例えばウェスタンブロット上のサイズにしたがって、または試料におけるより高い存在量によって、それがなお区別可能であり、そして明白に測定可能である場合、許容されうる。リガンドの結合は、当該技術分野に知られる任意の方法によって測定可能である。好ましくは、前記方法は、半定量的または定量的である。ポリペプチドまたはペプチドの決定のためのさらなる適切な技術を以下に記載する。

#### 【0066】

リガンドの結合を直接、例えばNMRまたは表面プラズモン共鳴によって測定することも可能である。好ましい態様にしたがって、リガンド結合の測定は、本明細書に開示するシステムのアナライザーユニットによって実行される。その後、本明細書に開示するシステムの計算デバイスによって、測定した結合の量を計算することも可能である。リガンドがまた、関心対象のペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても働く場合、酵素反応産物を測定してもよい（例えば、切断された基質の量を、例えばウェスタンブロット上で測定することによって、プロテアーゼの量を測定することも可能である）。あるいは、リガンドは、それ自体、酵素特性を示すことも可能であり、そして「リガンド/ペプチドまたはポリペプチド」複合体、あるいはペプチドまたはポリペプチドによってそれぞれ結合されるリガンドを、適切な基質と接触させて、強度シグナルの生成による検出を可能にすることも可能である。酵素反応産物の測定のため、好ましくは基質の量は飽和量である。基質はまた、反応の前に検出可能な標識で標識されてもよい。好ましくは、試料を基質と適切な期間接触させる。適切な期間は、検出可能な、好ましくは測定可能な量の産物が産生されるために必要な時間を指す。産物の量を測定する代わりに、所定の（例えば検出可能な）量の産物の出現に必要な時間を測定することも可能である。第三に、リガンドを、共有的にまたは非共有的に、リガンドの検出および測定を可能にする標識にカップリングすることも可能である。標識を、直接または間接的方法によって行ってもよい。直接標識は、標識をリガンドに直接（共有的または非共有的に）カップリングする工程を含む。間接的標識は、第一のリガンドに二次リガンドを（共有的または非共有的に）結合させる工程を含む。二次リガンドは、第一のリガンドに特異的に結合しなければならない。前記の二次リガンドを、適切な標識にカップリングさせてもよいし、そして/または前記の二次リガンドは該二次リガンドに結合する三次リガンドのターゲット（レセプター）であってもよい。二次、三次、またはさらにより高次のリガンドは、しばしば、シグナルを増加させるために用いられる。適切な二次およびより高次の他のリガンドには、抗体、二次抗体、および周知のストレプトアビジン-ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）が含まれることも可能である。リガンドまたは基質はまた、当該技術分野に知られるような1またはそれより多いタグで、「タグ付け」されていてもよい。こうしたタグは次いで、より高次のリガンドのターゲットであることも可能である。適切なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、His-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc-タグ、インフルエンザAウイルス赤血球凝集素（HA）、マルトース結合タンパク質等が含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合、タグは、好ましくはN末端および/またはC末端にある。適切な標識は、適切な検出法によって検出可能な任意の標識である。典型的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素の活性標識、放射性標識、磁気標識（例えば常磁性および超常磁性標識を含む「磁気ビーズ」）、および蛍光標識が含まれる。酵素的活性標識には、例えば西洋ワサビ（horseradish）ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびその誘導体が含まれる。検出に適した基質には、ジアミノベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（Roche Diagnostics）から既製ストック溶液として入手可能な、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリ

10

20

30

40

50

ド、および5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - ホスフェート)、CDP - Star<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences)、ECF<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences)が含まれる。適切な酵素 - 基質の組み合わせは、着色反応産物、蛍光または化学発光を生じることにも可能であり、これらは当該技術分野に知られる方法にしたがって(例えば感光フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて)測定可能である。酵素反応の測定に関しては、上述の基準が同様に適用される。典型的な蛍光標識には、蛍光タンパク質(例えばGFPおよびその誘導体)、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセイン、およびAlexa色素(例えばAlexa568)が含まれる。さらなる蛍光標識は、例えばMolecular Probes(Oregon)から入手可能である。蛍光標識としての量子ドットの使用もまた意図される。典型的な放射性標識には、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P等が含まれる。放射性標識は、既知のおよび適切な任意の方法、例えば感光フィルムまたはホスホイメジャーによって、検出可能である。本発明にしたがった適切な測定法にはまた、沈降(特に免疫沈降)、電気化学発光(電気生成化学発光)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素連結免疫吸着アッセイ)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ(ELISA)、解離増進ランタニド蛍光イムノアッセイ(DELFIA)、シンチレーション近接アッセイ(SPA)、比濁法、比濁分析、ラテックス増進比濁法または比濁分析、あるいは固相免疫試験も含まれる。当該技術分野に知られるさらなる方法(例えばゲル電気泳動、2Dゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ウェスタンブロットティング、および質量分析)を、単独で、あるいは上述の標識または他の検出法と組み合わせて、用いてもよい。

#### 【0067】

ペプチドまたはポリペプチドの量はまた、好ましくは、以下のように決定可能である：  
 (a)上に明記するようなペプチドまたはポリペプチドに対するリガンドを含む固体支持体を、ペプチドまたはポリペプチドを含む試料と接触させ、そして(b)支持体に結合しているペプチドまたはポリペプチドの量を測定する。好ましくは、リガンドは、核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体およびアプタマーからなる群より選択され、好ましくは、固定された型で、固体支持体上に存在する。固体支持体を製造するための材料は、当該技術分野に周知であり、そしてとりわけ、これには、商業的に入手可能なカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンチップおよび表面、ニトロセルロースストリップ、膜、シート、デュラサイト(duracite)、ウェルおよび反応トレイの壁、プラスチックチューブ等が含まれる。リガンドまたは剤を、多くの異なるキャリアーに結合させてもよい。周知のキャリアーの例には、ガラス、ポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが含まれる。キャリアーの性質は、本発明の目的のため、可溶性または不溶性のいずれであることも可能である。前記リガンドを固定/不動化するための適切な方法が周知であり、そしてこれには、限定されるわけではないが、イオン性、疎水性、共有相互作用等が含まれる。本発明にしたがったアレイとして、「懸濁アレイ」の使用もまた意図される(Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。こうした懸濁アレイにおいて、キャリアー、例えばマイクロビーズまたは微小球体が懸濁中に存在する。アレイは、標識されていてもよく、異なるリガンドを所持する、異なるマイクロビーズまたは微小球体からなる。例えば固相化学反応および光感受性保護基に基づいて、こうしたアレイを産生する方法が、一般的に知られる(US 5,744,305)。

#### 【0068】

好ましくは、実施例1および2に記載するアッセイを用いることによって、本明細書に言及するようなマーカの量を決定する。

用語「量」は、本明細書において、ポリペプチドまたはペプチドの絶対量、前記ポリペプチドまたはペプチドの相対量または濃度、ならびにこれらに相関するかまたはこれらか

10

20

30

40

50

ら派生しうる任意の値またはパラメータを含む。こうした値またはパラメータは、直接測定によって前記ペプチドから得られるすべての特異的物理的または化学的特性由来の強度シグナル値、例えばマススペクトルまたはNMRスペクトルの強度値を含む。さらに、本明細書の別の箇所に明記する間接的な測定によって得られるすべての値またはパラメータ、例えばペプチドに反応して生物学的読み取り系から決定される反応量、または特異的に結合したリガンドから得られる強度シグナルが含まれる。前述の量またはパラメータに相関する値はまた、すべての標準的な数学演算によっても得られうるということが理解されるものとする。

**【0069】**

用語「比較すること」は、本明細書において、本明細書に言及するようなマーカーの量、特に分析しようとする試料によって含まれるペプチドまたはポリペプチドの量を、本明細書の別の箇所に明記する適切な参照供給源の量と比較することを含む。本明細書において、比較することは、対応するパラメータまたは値の比較を指し、例えば絶対量を絶対参照量と比較する一方、濃度を参照濃度と比較するか、または試験試料から得られる強度シグナルを参照試料の同じタイプの強度シグナルと比較すると理解されるものとする。本発明の方法の工程(b)において言及される比較を、手動で、または計算デバイス(例えば本明細書に開示するシステムの)によって、実行してもよい。コンピュータ補助比較に関しては、決定される量の値を、コンピュータプログラムによってデータベース中に記憶されている適切な参照に対応する値と比較することも可能である。コンピュータプログラムは、比較の結果をさらに評価することも可能であり、すなわち適切な出力形式で所望の評価を自動的に提供する。前記結果は、好ましくは、被験体を本明細書の別の箇所に示すような画像法に基づく診断評価に供するべきであるかどうかを評価する際の補助として働くことも可能である。例えば、比較の結果を生データ(絶対量または相対量)として提供してもよいし、そしていくつかの場合、特定の診断/評価の指標となりうる単語、句、記号、または数値の形の指標として、提供してもよい。したがって、参照量は、比較される量の相違または類似性のいずれかが、本明細書に開示する評価または診断を実行することを可能にするように選択されるものとする。

**【0070】**

用語「参照量」は、本明細書において、画像法に基づく診断評価に供するべきである被験体群、または画像法に基づく診断評価に供するべきではない被験体群のいずれかに、被験体を割り当てることを可能にする量を指す。こうした参照量は、これらの群を互いに分離する閾値量であることも可能である。したがって、本明細書に言及するようなバイオマーカー、特に心臓トロポニンまたはFGF-23の参照量は、画像法に基づく診断評価に供するべきである被験体群、または画像法に基づく診断評価に供するべきではない被験体群に、被験体を割り当てることを可能にする量であるものとする。2つの群を分離する適切な閾値量は、該評価に供するべきである被験体または被験体群、あるいは該評価に供するべきではない被験体または被験体群のいずれかに由来する本明細書に言及するようなマーカーの量に基づいて、本明細書の別の箇所に言及する統計検定によって、容易に計算可能である。前述の被験体または被験体群から得られうる好ましい参照量は、本明細書の別の箇所に示される。

**【0071】**

参照量を用いて、閾値量を定義するかまたは確立することも可能である。閾値量は、好ましくは、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかどうかの包含および/または排除を可能にする。前記包含および/または排除は、参照または閾値への、計算された「量」の前記比較に基づいて、本明細書に開示するシステムの計算デバイスによって提供されうる。例えば、システムの計算デバイスは、包含または排除の指標である単語、記号、または数値の形で、指標を提供することも可能である。個々の被験体に適用可能な参照量は、多様な生理学的パラメータ、例えば年齢、性別、または亜集団、ならびに本明細書に言及するポリペプチドまたはペプチドの決定に用いる手段に応じて多様でありうる。適切な参照量を、試験試料と一緒に、すなわち同時にまたは続いて分析しようとする参

10

20

30

40

50

照試料から決定することも可能である。

【 0 0 7 2 】

好ましくは、参照量は計算された参照量である。好ましくは、計算された参照量は、画像法に基づく診断評価に供すべきである被験体、および画像法に基づく診断評価に供すべきではない被験体の間を区別することを可能にするものとする。参照量は、原則的に、標準的統計法を適用することによって、所定のバイオマーカーに関する平均値に基づいて、上に明記するような被験体のコホートに関して計算されうる。特に、試験、例えば事象かまたはそうでないかを診断する目的の方法の正確性は、受信者操作特性 ( R O C ) によって最適に記載される (特に、Zweig 1993, Clin. Chem. 39: 561 - 577を参照されたい)。ROCグラフは、観察されるデータの全範囲に渡って決定閾値を連続して変化させることから生じる感度 / 特異性対のすべてのプロットである。診断法の臨床的成績は、その正確性、すなわち特定の評価、予後または診断に被験体を正確に割り当てる能力に依存する。ROCプロットは、区別を行うために適した閾値の完全な範囲に関して、1 - 特異性に対して感度をプロットすることによる、2つの分布間の重複を示す。y軸にあるのは感度であるかまたは真の陽性分画であり、これは真の陽性の数および偽陰性試験結果の数の積に対する、真の陽性試験結果の数の比として定義される。これはまた、疾患または状態の存在における陽性とも称されてきている。これは、もっぱら、罹患した下位群から計算される。x軸にあるのは、偽陽性分画、または1 - 特異性であり、真の陰性の数および偽陽性結果の数の積に対する、偽陽性結果の数の比として定義される。これは、特異性の指標であり、そして完全に、罹患していない下位群から計算される。真の陽性および偽陽性分画は、完全に別個に計算されるため、2つの異なる下位群からの試験結果を用いることによって、ROCプロットは、コホートにおける事象の有病率からは独立である。ROCプロット上の各ポイントは、特定の決定閾値に対応する、感度 / 特異性対に相当する。完全な区別 (結果の2つの分布に重複が全くない) を伴う試験は、上部左隅を通るROCプロットを有し、ここで、真の陽性分画は、1.0、または100% (完全感度) であり、そして偽陽性分画は0 (完全特異性) である。区別なしの試験の理論的プロット (2つの群に関する結果の同一の分布) は、下部左隅から上部右隅を通る、45°の対角線である。大部分のプロットは、これらの2つの極値の間に属する。ROCプロットが45°対角線の完全に下にある場合、これは「陽性」に関する基準を「より大きい」から「未満である」に逆転させるか、またはその逆を行うことによって、容易に修正される。定性的には、プロットが上部左隅に近くなればなるほど、試験の全体の正確性が高くなる。望ましい信頼区間に応じて、閾値をROC曲線から得て、感度および特異性、それぞれの適切なバランスで、所定の事象の診断または予測を可能にすることも可能である。したがって、本発明の前述の方法に用いられるべき参照値は、好ましくは、閾値またはカットオフ量であることも可能であり、そしてこれを、好ましくは、上述のような前記コホートに関するROCを確立し、そしてそこから閾値量を得ることによって、生成することも可能である。診断法の望ましい感度および特異性に応じて、ROCプロットは、適切な閾値を得ることを可能にする。

【 0 0 7 3 】

心臓トロポニン、特にトロポニンTに関して、好ましい参照量は、5 ~ 6 pg / ml の範囲内である。特に好ましい参照量は5.9 pg / ml である。

FGF - 23に関して、好ましい参照量は、73 ~ 77 pg / ml の範囲内である。特に好ましい参照量は74 RU / ml である。好ましくは、マーカーの量は、実施例1および2に記載するアッセイを用いることによって、決定される。

【 0 0 7 4 】

好ましくは、以下が診断アルゴリズムとして適用される (特に参照が計算参照量である場合) :

好ましくは、参照量と比較した際の、被験体由来の試料におけるマーカー (そしてしたがって、心臓トロポニンおよび / または FGF - 23 ) の増加した量は、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであることを示す。やはり好ましくは、参照量と比較した

10

20

30

40

50

際の、被験体由来の試料におけるマーカー（単数または複数）の減少した量は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す。

【0075】

本明細書において、上に示すように、参照量は、画像法に基づく診断評価に感受性であることが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照量（単数または複数）と本質的に同一であるかまたはそれより高い、本発明の文脈において決定しようとするマーカー（単数または複数）の量は、試験しようとする被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを示す。好ましくは、参照量は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。好ましくは、画像法に基づく診断評価に感受性であることが知られる被験体は、異常な中壁率化（midwall fractionating）を患う被験体である（用語「異常な中壁率化」は、本明細書の別の箇所に明記される）。

10

【0076】

好ましくは、前述の参照量を適用することによって、被験体を画像法に基づく評価に供するべきであると包含することも可能である。

さらにまたはあるいは、参照量は、好ましくは、画像法に基づく診断評価に感受性ではないことが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照量（単数または複数）と本質的に同一であるかまたはそれより低い、本発明の文脈において決定しようとするマーカー（単数または複数）の量は、試験しようとする被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す。好ましくは、参照量は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。好ましくは、画像法に基づく診断評価に感受性ではないことが知られる被験体は、異常な中壁率化を患っていない被験体である（用語「異常な中壁率化」を、本明細書の別の箇所に明記する）。

20

【0077】

好ましくは、前述の参照量を適用することによって、被験体を画像法に基づく評価に供するべきではないと排除することも可能である。

さらに、参照量が、画像法に基づく診断評価に感受性でないことが知られる被験体または被験体群から、特に異常な中壁率化を患っていない被験体または被験体群から得られている場合、以下が診断アルゴリズムとして当てはまる：好ましくは、心臓トロポニン、特にトロポニンTの参照量よりも、少なくとも10%、またはより好ましくは少なくとも25%高い心臓トロポニン、特にトロポニンTの量は、画像法に基づく診断評価に供されるべきである被験体の指標である。やはり好ましくは、FGF-23の参照量よりも、少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%、またはさらにより好ましくは少なくとも25%高いFGF-23の量は、画像法に基づく診断評価に供されるべきである被験体の指標である。

30

【0078】

用語「被験体」の定義は、本明細書の別の箇所に提供される。該定義はまた、本発明の方法にしたがった参照被験体（単数または複数）（すなわち参照量を得る被験体）にも当てはまる。好ましくは、試験しようとする被験体および参照被験体（単数または複数）は、同じ年齢、性別および/または人種である。したがって、参照量は、年齢、性別および/または人種に関して調整されていることが好ましい。やはり好ましくは、試験しようとする被験体および参照被験体（単数または複数）は、高血圧、特に同じリスク要因（リスク要因に関しては、本明細書の別の箇所を参照されたい）が付随する高血圧を患うことも可能である。

40

【0079】

本明細書に言及するようなマーカーを単独で決定してもよい。しかし、これらを、一緒に決定してもよく、すなわち本発明の方法は、心臓トロポニンおよびFGF-23の決定を含むことも可能である。

【0080】

さらに、本発明の態様において、FGF-23の決定に加えて、工程a)において、ピ

50

タミンDの量をさらに決定して、FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比をさらなる工程a1)において計算して、そしてこうして計算した比を参照比と比較することが意図される。

【0081】

したがって、本発明はまた、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するための方法であって、

a)被験体由来の試料において、線維芽細胞増殖因子23(FGF-23)の量およびビタミンDの量を決定して、

a1)FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比を計算して、そして

b)こうして計算した比を参照比と比較して、それによって、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価する工程を含む、前記方法にも関する。

10

【0082】

FGF-23およびビタミンDの量を、被験体由来の異なる試料において決定してもよい。しかし、同じ試料における量を決定することもまた意図される。

好ましくは、前述の方法は、試料における心臓トロポニンの量の決定(工程a)における)、およびこうして決定した量の参照量との比較(工程b)における)をさらに含むことも可能である。

【0083】

好ましくは、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの評価は、工程b)で実行する比較(単数または複数)の結果に基づく。

20

FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比は、ビタミンDの量に対するFGF-23の量の比であってもよいし、またはFGF-23の量に対するビタミンDの量の比であってもよい。

【0084】

適切な参照比は、参照量の文脈において上に示すように、当業者によって容易に決定可能である。

好ましくは、比がビタミンDの量に対するFGF-23の量の比である場合、以下もまた診断アルゴリズムとして当てはまる：

好ましくは、(ビタミンDの量に対するFGF-23の量の)参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミンDの量に対するFGF-23の量の比の増加は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを示す。やはり好ましくは、(ビタミンDの量に対するFGF-23の量の)参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミンDの量に対するFGF-23の量の比の減少は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す。

30

【0085】

ビタミンDに対するFGF-23の参照比は、画像法に基づく診断評価に感受性であることが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照比と本質的に同一であるかまたは参照比より高い、ビタミンDに対するFGF-23の比は、被験体を前記評価に供するべきであることを示す。好ましくは、参照比は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。好ましくは、画像法に基づく診断評価に供するべきであることが知られる被験体は、異常なMFSを患う被験体である。

40

【0086】

好ましくは、前述の参照比を適用することによって、被験体を前記評価に供するべきであると包含することも可能である。

さらにまたはあるいは、ビタミンDに対するFGF-23の参照比は、好ましくは、画像法に基づく診断評価に感受性ではないことが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照比と本質的に同一であるかまたは参照比より低い、試験試料におけるビタミンDに対するFGF-23の比は、被験体を前記評価に供するべきではないことを示す。好ましくは、参照比は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料

50

から得られる。好ましくは、画像法に基づく診断評価に供すべきではないことが知られる被験体は、異常なMFSを患っていない被験体である。

【0087】

好ましくは、前述の参照比を適用することによって、被験体を前記評価に供することを排除することも可能である。

やはり好ましくは、ビタミンDに対するFGF-23の参照比が、異常な中壁率化を患っていない被験体からまたは被験体群から得られる場合、以下もまた診断アルゴリズムとして当てはまる：好ましくは、参照比より少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%高い、試験試料におけるビタミンDに対するFGF-23の比は、画像法に基づく診断評価に供されるべきである被験体の指標である。

10

【0088】

用語「ビタミンD」は、当業者によく理解される。本明細書において、該用語は、好ましくは、脂溶性プロホルモン群であって、その2つの主要な型がビタミンD2（エルゴカルシフェロールとも称される）およびビタミンD3（コレカルシフェロールとも称される）である、前記群に関する。好ましくは、該用語は、任意の型のビタミンD、特にビタミンD1、ビタミンD2、ビタミンD3またはビタミンD4を含む。さらに、該用語は、任意の前駆体も含むと想定される。ビタミンDは、典型的には、生物において、日光曝露、食品、および栄養補助剤より得られ、生物学的に不活性であり、そして2つのヒドロキシル化反応を経て、生物において活性化される。例えば、ヒトで見られるビタミンDの活性型はカルシトリオールである。

20

【0089】

当該技術分野において、ビタミンDの量を決定する最も正確な方法は、25-ヒドロキシビタミンDの決定を通じるものであることが知られる。25-ヒドロキシビタミンDは、酵素、コレカルシフェロール25-ヒドロキシラーゼによって、ビタミンD3（コレカルシフェロール）がヒドロキシル化されることによって、肝臓において産生されるプレホルモンである。したがって、用語「ビタミンD」は、特に、25-ヒドロキシビタミンDを指す。したがって、本発明の文脈において、被験体由来の試料における25-ヒドロキシビタミンDの量を決定することが特に好ましい。

【0090】

前述の方法の好ましい態様において、方法の文脈において決定しようとするマーカー（単数または複数）の参照量（比）は、工程a）に示すような試料の前に得られている、（試験）被験体由来の試料におけるマーカー（単数または複数）の量（比）である。

30

【0091】

本出願の文脈において、工程a）に示すような試料の前に得られている試料はまた、「第一の試料」と称され、工程a）に示す試験試料は、第一の試料の後で得られるはずであるため、「第二の試料」と称される。

【0092】

したがって、本発明は、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるか評価する方法であって、

a) 被験体由来の第一の試料および第二の試料において、心臓トロポニンおよび/または線維芽細胞増殖因子23（FGF-23）の量（単数または複数）を決定し、そして

40

b) こうして決定した第二の試料における量（単数または複数）を、第一の試料における量（単数または複数）と比較して、それによって、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるか評価する

工程を含む、前記方法に関する。

【0093】

上に示すように、第二の試料は、第一の試料の後で得られているはずである（言い換えると：第一の試料は第二の試料の前に得られているはずである）。第二の試料が、第一の試料を得た後、妥当な期間の後に、得られることが特に想定される。本明細書に言及するバイオマーカーの量は、瞬間的（例えば1分または1時間以内）には変化しないことが理

50

解されるものとする。したがって、この文脈における「妥当な」は、バイオマーカー（単数または複数）が調整されることを可能にする、第一および第二の試料を得る間の間隔を指す。好ましくは、第二の試料は、第一の試料の1～24ヶ月後に得られているものとする。より好ましくは、第二の試料は、第一の試料の6～18ヶ月後に得られているものとする。さらにより好ましくは、第二の試料は、第一の試料の6～12ヶ月後に得られているものとする。最も好ましくは、第二の試料は、第一の試料の9～12ヶ月後に得られているものとする。したがって、第一の試料は、好ましくは、第二の試料の1～24ヶ月前、より好ましくは6～18ヶ月前、さらにより好ましくは6～12ヶ月前、または最も好ましくは9～12ヶ月前に得られているものとする。

【0094】

本発明の方法において言及されるようなマーカー、すなわち心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の量の時間経過（または本明細書に示すような、被験体におけるFGF-23およびビタミンDの間の比の時間経過）を評価することもまた想定される。したがって、前述の方法は、前記被験体由来の少なくとも1つのさらなる試料において（したがって第三の試料において、第四の試料において、第五の試料においてなど）、心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の量（またはFGF-23およびビタミンDの間の比）を決定し、そしてこうして決定した量（比）を、前記の第一の試料および/または前記の第二の試料および/または前記の少なくとも1つのさらなる試料を得る前に得た任意の試料における、前記の心臓トロポニンおよびFGF-23の量の比（またはFGF-23およびビタミンDの間の比）と、それぞれ比較する、さらなる工程を含むことも可能である。試料を得るために好ましい時間間隔に関しては、上記を参照されたい。

【0095】

好ましくは、第一の試料と比較した際の、第二の試料における心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の量（および/またはビタミンDの量に対するFGF-23の量の比）の増加、そしてより好ましくは有意な増加、そして最も好ましくは統計的に有意な増加は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを示す。好ましくは、第一の試料と比較した際の、第二の試料における心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の量（および/またはビタミンDの量に対するFGF-23の量の比）の減少、そしてより好ましくは有意な減少、そして最も好ましくは統計的に有意な減少、あるいは心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の本質的に不変の量（または本質的に不変の比）は、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す。

【0096】

特に、有意な増加は、評価に関して有意であると見なされるサイズの増加であり、特に前記増加は統計的に有意と見なされる。

用語「有意」および「統計的に有意」は、当業者に知られる。したがって、増加または減少が有意または統計的に有意であるかどうかは、多様な周知の統計評価ツールを用いて、当業者によって、容易に決定可能である。

【0097】

本発明の経過中に、画像法に基づく診断評価に供されるべきである、またはない、被験体の指標として見出されてきている、心臓トロポニンおよび/またはFGF-23の量（またはビタミンDに対するFGF-23の比）、好ましくは血液、血清または血漿試料におけるバイオマーカー（単数または複数）の量（比）の有意な増加を、本明細書において、以下に提供する。

【0098】

マーカーが心臓トロポニンである場合、以下が当てはまる：

好ましくは、参照量（第一の試料における心臓トロポニンの量）よりも少なくとも10%、またはより好ましくは少なくとも25%高い、第二の試料における心臓トロポニン、特にトロポニンTの量は、画像法に基づく診断評価に供されるべき被験体の指標である。

【0099】

さらに、本発明にしたがって、好ましくは少なくとも0.5 pg/ml、より好ましく

10

20

30

40

50

は少なくとも1.0 pg/ml、そしてさらにより好ましくは少なくとも1.5 pg/ml、少なくとも2.0 pg/ml、または少なくとも2.5 pg/ml、少なくとも3.0 pg/ml、そして最も好ましくは少なくとも4.0 pg/mlの、第一の試料における量と比較した、第二の試料における心臓トロポニン、特にトロポニンTの量の増加は、有意であると見なされ、そしてしたがって、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであることを示す。

【0100】

マーカーがFGF-23である場合、以下が当てはまる：

好ましくは、参照量（第一の試料におけるFGF-23の量）よりも少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%高い、第二の試料におけるFGF-23の量は、  
10

【0101】

さらに、本発明にしたがって、好ましくは少なくとも1.0 pg/ml、より好ましくは少なくとも2.0 pg/ml、そしてさらにより好ましくは少なくとも3.0 pg/ml、少なくとも4.0 pg/ml、または少なくとも5.0 pg/ml、少なくとも6.0 pg/ml、そして最も好ましくは少なくとも7.0 pg/mlの、第一の試料における量と比較した、第二の試料におけるFGF-23の量の増加は、有意であると見なされ、そしてしたがって、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであることを示す。

【0102】

ビタミンDに対するFGF-23の比を決定する場合、以下が当てはまる。  
20

好ましくは、参照比（第一の試料における比）よりも少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%高い、第二の試料における比は、画像法に基づく診断評価に供されるべき被験体の指標である。

【0103】

前述の方法の好ましい態様において、試験しようとする被験体は、第一の試料を得た時点で、異常なMFSを患わない。さらに、被験体は、第一の試料を得た時点で、拡張機能不全および/または収縮機能不全を患っていないことが好ましい。しかし、被験体は、第一の試料を得た時点で高血圧を患っているものとする。高血圧には、本明細書の別の箇所に示すようなリスク要因が付随していてもよい。好ましくは、これは、第一の試料を得た時点で、上に言及するようなACC/AHA分類にしたがって、病期A被験体と分類される。  
30

【0104】

異常な中壁短縮率を診断するための方法

本明細書の上記に提供する定義および説明は、変更すべきところは変更して、以下に当てはまる。

【0105】

本発明はまた、被験体において、異常な中壁短縮率（MFS）を診断するための方法であって、

a) 被験体由来の試料において、心臓トロポニンおよび/または線維芽細胞増殖因子23（FGF-23）の量を決定し、そして  
40

b) こうして決定した量（単数または複数）を、参照量（単数または複数）と比較して、それによって異常な中壁短縮率を診断する

工程を含む、前記方法にも関する。

【0106】

好ましくは、c) 工程b) で実行した比較の結果に基づいて、被験体が異常なMFSを患っているかを評価する、さらなる工程を実行することによって、被験体が異常なMFSを患っているかを評価する。

【0107】

本発明の方法は、好ましくは、ex vivoまたはin vitro法である。さらに、上に明らかに言及するものに加えて、工程を含むことも可能である。例えば、さらな  
50

る工程は、試料の前処理、または方法によって得られる結果の評価に関連することも可能である。方法を手動で実行してもよいし、または自動化によって補助してもよい。好ましくは、工程(a)および/または(b)は、工程(a)における決定、あるいは工程(b)における前記比較に基づくコンピュータ実装比較および/または区別のため、全体で、または部分的に、自動化、例えば適切なロボットおよびセンサー装置によって、補助されてもよい。

【0108】

用語「診断すること」は、本明細書において、好ましくは、本明細書に言及するような被験体が、異常な中壁短縮率(MFS)を患っているかどうかを評価することを意味する。用語「異常な中壁短縮率」は、本明細書の別の箇所に定義されている。

10

【0109】

当業者に理解されるであろうように、こうした評価は、通常、診断しようとする被験体の100%に関して正しいとは意図されない。しかし、該用語は、被験体の統計的に有意な部分(例えばコホート研究におけるコホート)に関して、評価が正しいことを必要とする。部分が統計的に有意であるかどうかは、多様な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデントのt検定、マン-ホイットニー検定などを用いて、当業者によって容易に決定可能である。詳細は、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.001である。

20

【0110】

用語「参照量」は、本明細書の別の箇所に定義されている。前述の方法の文脈において、該用語は、異常なMFSを患っている被験体群、または異常なMFSを患っていない(そしてしたがって、正常MFSを有する)被験体群のいずれかに、被験体を割り当てることを可能にする量を指す。こうした参照量は、これらの群を互いに分離する閾値量であってもよい。したがって、本明細書に言及するようなバイオマーカーに関する、特に心臓トロポニンまたはFGF-23の参照量は、異常なMFSを患っている被験体群、または異常なMFSを患っていない被験体群に、被験体を割り当てることを可能にする量であるものとする。2つの群を分離する適切な閾値量は、異常なMFSを患っていることが知られる被験体または被験体群、あるいは異常なMFSを患っていないことが知られる被験体または被験体群のいずれか由来の、本明細書に言及するようなマーカーの量に基づいて、本明細書の別の箇所に言及する統計検定によって、容易に計算可能である。前述の被験体または被験体群から得られうる好ましい参照量は、本明細書の別の箇所に示される。

30

【0111】

好ましくは、以下が診断アルゴリズムとして当てはまる：

好ましくは、参照量(単数または複数)と比較した際の、被験体由来の試料におけるバイオマーカーの増加した量(単数または複数)は、被験体が異常なMFSを患うことを示し、そして参照量(単数または複数)と比較した際の、被験体由来の試料における減少した量(単数または複数)は、被験体が異常なMFSを患っていないことを示す。好ましくは、異常なMFSを患っていない被験体は、正常なMFSを有する。

40

【0112】

本明細書に上に示すように、参照量は、異常なMFSを患うことが知られる被験体または被験体群に由来することも可能である。この場合、参照量(単数または複数)と本質的に同一であるかまたはそれよりも高い、工程a)で決定されるマーカー(単数または複数)の量(単数または複数)は、試験しようとしている被験体が異常なMFSを患うことを示す。好ましくは、参照量は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。

【0113】

50

好ましくは、前述の参照量を適用することによって、異常なMFSを包含することも可能である。

さらにまたはあるいは、参照量は、好ましくは、異常なMFSを患っていないことが知られる被験体または被験体群に由来することも可能である。この場合、参照量（単数または複数）よりも低い、工程a)で決定されるマーカー（単数または複数）の量（単数または複数）は、被験体が異常なMFSを患っていないことを示す。好ましくは、参照量は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。

【0114】

好ましくは、前述の参照量を適用することによって、異常なMFSを排除することも可能である。

10

好ましくは、参照量（単数または複数）が、異常な中壁率化を患っていないことが知られる被験体または被験体群から得られる場合、以下もまた、診断アルゴリズムとして当てはまりうる：好ましくは、心臓トロポニン、特にトロポニンTの参照量よりも少なくとも10%、またはより好ましくは少なくとも25%高い、心臓トロポニン、特にトロポニンTの量は、異常なMFSを患う被験体の指標である。やはり好ましくは、FGF-23の参照量よりも少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%高い、FGF-23の量は、異常なMFSを患う被験体の指標である。

【0115】

用語「被験体」の定義は、本明細書の別の箇所に提供される。定義はまた、参照被験体（単数または複数）にも当てはまる。好ましくは、試験しようとする被験体および参照被験体（単数または複数）は、ほぼ同じ年齢（+/-歳、好ましくは同じ年齢）、同じ性別および/または人種を有する。やはり好ましくは、試験しようとする被験体および参照被験体（単数または複数）は、高血圧、特に同じリスク要因（リスク要因に関しては、本明細書の別の箇所を参照されたい）が付随する高血圧を患うことも可能である。

20

【0116】

さらに、本発明の態様において、FGF-23の決定に加えて、工程a)において、ビタミンDの量をさらに決定して、さらなる工程a1)において、FGF-23の量およびビタミンDの量の間を計算して、そしてこうして計算した比を参照比と比較することが意図される。

【0117】

したがって、本発明はまた、被験体において、異常な中壁短縮率（MFS）を診断するための方法であって、

30

a) 被験体由来の試料において、線維芽細胞増殖因子23（FGF-23）の量およびビタミンDの量を決定して、

a1) FGF-23の量およびビタミンDの量の間を計算して、そして

b) こうして計算した比を参照比と比較して、それによって、異常な中壁短縮率を診断する

工程を含む、前記方法にも関する。

【0118】

FGF-23およびビタミンDの量を、被験体由来の異なる試料において決定してもよい。しかし、同じ試料における量を決定することが特に意図される。

40

場合によって、方法は、試料における心臓トロポニンの量の決定（工程a)における）、およびこうして決定した量の参照量との比較（工程b)における）をさらに含むことも可能である。

【0119】

好ましくは、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの評価は、工程b)で実行する比較（単数または複数）の結果に基づく。

FGF-23の量およびビタミンDの量の間を計算して、そして、ビタミンDの量に対するFGF-23の量の比であってよいし、またはFGF-23の量に対するビタミンDの量の比であってよい。

50

## 【 0 1 2 0 】

適切な参照比は、参照量の文脈において上に示すように、当業者によって容易に決定可能である。

好ましくは、比がビタミンDの量に対するFGF-23の量の比である場合、以下が診断アルゴリズムとして当てはまる：

好ましくは、(ビタミンDの量に対するFGF-23の量の)参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミンDの量に対するFGF-23の量の比の増加は、被験体がMFSを患うことを示す。やはり好ましくは、(ビタミンDの量に対するFGF-23の量の)参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミンDの量に対するFGF-23の量の比の減少は、被験体が異常なMFSを患っていないことを示す。

10

## 【 0 1 2 1 】

好ましくは、ビタミンDに対するFGF-23の比を決定する場合、以下もまた当てはまる：

ビタミンDに対するFGF-23の参照比は、異常なMFSを患うことが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照比と本質的に同一であるかまたは参照比より高い、ビタミンDに対するFGF-23の比は、試験しようとする被験体が異常なMFSを患うことを示す。好ましくは、参照比は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。

## 【 0 1 2 2 】

さらにまたはあるいは、ビタミンDに対するFGF-23の参照比は、異常なMFSを患っていないことが知られる被験体または被験体群から得られてもよい。この場合、参照比と本質的に同一であるかまたは参照比より低い、試験試料におけるビタミンDに対するFGF-23の比は、被験体が異常なMFSを患っていないことを示す。好ましくは、参照量は、前記被験体の試料から、または前記被験体群の試料から得られる。

20

## 【 0 1 2 3 】

好ましくは、ビタミンDに対するFGF-23の参照比が、異常な中壁率化を患っていないことが知られる被験体からまたは被験体群から得られる場合、以下もまた診断アルゴリズムとして当てはまる：好ましくは、参照比より少なくとも5%、またはより好ましくは少なくとも10%高い、試験試料におけるビタミンDに対するFGF-23の比は、異常なMFSを患う被験体の指標である。

30

## 【 0 1 2 4 】

特に、異常な中壁率化を患っていないことが知られる被験体または被験体群から得られる好ましい参照比は、こうした被験体群における中央値比である。好ましくは、参照比は5.3である。

## 【 0 1 2 5 】

好ましい態様において、本発明の方法は、試験しようとする被験体が異常なMFSを患っている場合、および/または試験しようとする被験体が画像法に基づく診断評価に供されるべきである場合、療法を推奨する工程をさらに含む。

## 【 0 1 2 6 】

本発明の文脈において使用されるような好ましい療法は、生活様式の変更、食餌措置、体に対する介入、ならびに被験体治療のための適切な薬剤の投与を含む。

40

治療のために適切な薬剤は当該技術分野に周知であり、例えば、Heart Disease, 2008, 第8版, Braunwald監修, Elsevier Sounders, 第24章(心不全に関して)および第41章(高血圧に関して)を参照されたい。これらの治療は、本発明の一部である。

## 【 0 1 2 7 】

生活様式の変更には、禁煙、適切なアルコール消費、身体活動性の増加、体重減少、ナトリウム(塩)制限、体重管理および健康な食生活、毎日の魚油、塩制限が含まれる。

療法にはまた介入も含まれてもよい。本発明の文脈における1つの好ましい介入は、抗高血圧薬剤の投与であり、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンギオテンシ

50

ンII受容体ブロッカー（ARB）、アルドステロン・アンタゴニスト、利尿剤に対するベータブロッカー、およびカルシウム・アンタゴニストが好ましい。

【0128】

好ましくは、1またはそれより多い以下の薬剤の投与が推奨されるべきである：

ループ利尿剤のような利尿剤、チアジドおよびチアジド様利尿剤、カリウム保持性利尿剤、I型ミネラルコルチコイド受容体アンタゴニスト、抗アルドステロン、炭酸脱水素酵素阻害剤、昇圧（vasopressure）アンタゴニスト。

【0129】

プロプレノロール、メトプロロール、ピソプロロール、カルベジロール、プシンドロール、ネビボロールのようなベータブロッカー；ジヒドロピリジン、ベラパミル、ジルチアゼムのようなカルシウム・アンタゴニスト；

ドブタミン、ドーパミン、エピネフリン、イソプロテネロール、ノルエピネフリン、フェニルエフリンのようなアドレナリン作動剤；

ジゴキシン、ジギトキシンのような陽性変力剤；

エナラプリル、カプトプリル、ラミプリル、トランドラプリルのようなACE阻害剤；

ロサルタン、バルサルタン、イルベサルタン、カンデサルタン、テルミサルタン、エプロサルタンのようなアンギオテンシン受容体アンタゴニスト；

エプレロン、スピロノラクトン、カンレノン、メクスレノン、プロレノンのようなアドステロン・アンタゴニスト；スタチン、特にアトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン；

ヒダザリンおよび二硝酸イソソルビド。

【0130】

死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するための方法

本発明は、被験体において、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するための方法であって、

a) 前記被験体由来の試料において、IGFBP7の量および/またはFGF-23の量を決定し、そして

b) 工程a)で決定したような量（単数または複数）を、参照量（単数または複数）と比較して、それによって、前記被験体における死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する

工程を含む、前記方法にさらに関連する。

【0131】

前述の方法の態様において、FGF-23の決定に加えて、工程a)において、ビタミンDの量をさらに決定して、FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比を計算して、そしてこうして計算した比を参照比と比較することが意図される。

【0132】

したがって、本発明はまた、被験体において、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するための方法であって、

a) 被験体由来の試料において、線維芽細胞増殖因子23（FGF-23）の量およびビタミンDの量を決定して、

a1) FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比を計算して、そして

b) こうして計算した比を参照比と比較して、それによって、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する

工程を含む、前記方法も含む。

【0133】

もちろん、FGF-23およびビタミンDの量に加えて、IGFBP7の量もまた決定してもよい。

したがって、本発明はまた、被験体において、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するための方法であって、

a) 被験体由来の試料において、IGFBP7、線維芽細胞増殖因子23（FGF-2

10

20

30

40

50

3) およびビタミンDの量を決定して、

a 1) FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比を計算して、

b) こうして計算した比を参照比と比較して、そして

b 1) 参照比にIGFBP7の量を比較して、

それによって、前記被験体における死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する工程を含む、前記方法にも関する。

【0134】

FGF-23の量およびビタミンDの量の間の比は、ビタミンDの量に対するFGF-23の量の比であってもよいし、またはFGF-23の量に対するビタミンDの量の比であってもよい。

10

【0135】

好ましくは、c) 工程b) (または工程b) およびb 1) ) において実行する比較の結果に基づいて、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する、さらなる工程を実行することによって、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する。

【0136】

バイオマーカーの量を、被験体由来の異なる試料において決定してもよい。しかし、同じ試料における量を決定することもまた意図される。

好ましい態様において、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するための方法は、被験体由来の試料において、脳ナトリウム利尿ペプチド、特にBNPまたはNT-プロBNPの量、および/または心臓トロポニン、特にトロポニンTまたはIの量を決定する工程、ならびに前記脳ナトリウム利尿ペプチドの量および/または心臓トロポニンの量を、参照量(単数または複数)と比較する工程をさらに含む。

20

【0137】

本発明の方法は、好ましくは、ex vivoまたはin vitro法である。さらに、該方法は、上に明確に言及するものに加えて、工程を含んでもよい。例えば、さらなる工程は、試料の前処理、または方法によって得られる結果の評価に関連するものであることも可能である。本発明の方法はまた、監視、確認、および下位分類にも使用可能である。方法を手動で実行してもよいし、そして/または方法は自動化によって補助されていてもよい。好ましくは、工程(a)、(b)および/または(c)は、全体で、または部分的に、自動化によって、例えば工程(a)における決定のための、または工程(b)におけるコンピュータ実装比較のための、適切なロボットおよびセンサー装置によって、補助されていてもよい。

30

【0138】

用語「予測すること」は、本明細書において、将来の定義された時間ウィンドウ(予測ウィンドウ)内で、被験体が死ぬ(例えば心不全によって引き起こされる死亡)、および/または心臓血管事象、好ましくは急性心臓血管事象、例えば急性冠動脈症候群(ACS)を発展させる確率を評価することを指す。予測ウィンドウは、予測される確率にしたがって被験体が心臓血管事象を発展させるかまたは死亡するであろう間隔である。予測ウィンドウは、本発明の方法による分析に際して、被験体の全余命であることも可能である。しかし、好ましくは、予測ウィンドウは、本発明の方法を実施した後(より好ましくはそして正確には、本発明の方法によって分析しようとする試料を得た後)、1年、2年、3年、4年、5年、10年、15年または20年の間隔である。最も好ましくは、前記予測ウィンドウは、4年または5年の間隔である。当業者に理解されるであろうように、こうした評価は、通常、分析しようとする被験体の100%に関して正しいとは意図されない。しかし、該用語は分析しようとする被験体の統計的に有意な部分に関して、評価が有効であろうことを必要とする。部分が統計的に有意であるかは、多様な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデントのt検定、マン-ホイットニー検定などを用いて、当業者によって容易に決定可能である。詳細は、DowdyおよびWearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は

40

50

、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.0001である。好ましくは、本発明によって想定される確率は、予測が、所定の cohorts の被験体の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%に関して正しいであろうことを可能にする。

#### 【0139】

用語「死亡」は、本明細書において、好ましくは、任意の原因による死亡、そしてより好ましくは心臓血管事象による死亡に関連する。用語「心臓血管事象」は、本明細書において、心臓血管系の任意の障害を指し、これには、好ましくは任意の急性心臓血管事象が含まれる。急性心臓血管事象は、好ましくは、安定狭心症(SAP)または急性冠動脈症候群(ACS)である。ACS患者は、不安定狭心症(UAP)または心筋梗塞(MI)を示すことも可能である。MIは、ST上昇MI(STEMI)または非ST上昇MI(NSTEMI)であることも可能である。NSTE-ACSは、本明細書において、UAPおよびNSTEMIを含む。MIの発症には、左室機能不全(LVD)、心不全の発症、またはさらに死亡が続くこともありうる。さらなる好ましい心臓血管事象は、心臓徐脈性不整脈または頻脈性不整脈を含み、心突然死および脳卒中(脳血管事象またはアクシデント)を含む。また、死亡はまた、死亡率または被験体の所定の集団に対する死亡数の比を指すことも可能である。

#### 【0140】

表現「死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測すること」は、本明細書において、本発明の方法によって分析しようとする被験体を、上昇したリスクを有する集団の被験体群に、または減少したリスクを有する群のいずれかに割り当てることを意味する。本発明にしたがって称されるような、上昇したリスクは、好ましくは、あらかじめ決定した予測ウィンドウ内で、被験体集団における心臓血管事象または心臓死亡の平均リスクに関して、被験体に関する心臓血管事象を発展させるリスクまたは死亡リスクが有意に上昇している(すなわち有意に増加している)ことを意味する。本発明にしたがって言及されるような減少したリスクは、好ましくは、あらかじめ決定した予測ウィンドウ内で、被験体集団における心臓血管事象または心臓死亡の平均リスクに関して、被験体に関する心臓血管事象を発展させるリスクまたは死亡リスクが有意に減少していることを意味する。特に、リスクの有意な増加または減少は、予後に関して有意であると見なされるサイズのリスクの増加または減少であり、特に、前記増加または減少は、統計的に有意であると見なされる。用語「有意」および「統計的に有意」は、当業者に知られる。したがって、リスクの増加または減少が有意であるかまたは統計的に有意であるかは、多様な周知の統計評価ツールを用いて、当業者によって容易に決定可能である。

#### 【0141】

好ましくは、4年(または5年)の予測ウィンドウに関して、死亡(または心臓血管事象)の上昇したリスクは、8.0%~19.0%の範囲内、より好ましくは12.0%~17.0%の範囲内、最も好ましくは8.0%~16.0%の範囲内である。死亡の上昇した、そしてしたがって増加したリスクは、本明細書において、好ましくは、4年(または5年)の予測ウィンドウに関して、好ましくは、8.0%より高い、好ましくは12.0%より高い、より好ましくは17%より高い、さらにより好ましくは20%より高い、リスクに関する。本明細書において、死亡(または心臓血管事象)の減少したリスクは、好ましくは、4年の予測ウィンドウに関して、好ましくは8.0%未満、好ましくは6%未満、さらにより好ましくは4%未満、そして最も好ましくは3.0%~8.0%の範囲内である。

#### 【0142】

用語「被験体」は、上に定義される通りである。用語「被験体」の定義はまた、前述の方法にも当てはまる。したがって、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるかを評価するための方法と関連して、本明細書において、上に示すように、被験体は、例えば正常心室重量を有するものとする。

10

20

30

40

50

## 【0143】

死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測する、本発明の前述の方法の文脈において、被験体は、好ましくは、心不全を患わず、そして/または心不全の明白な症状を示さない(上記説明を参照されたい)。したがって、被験体は、ACC/AHA分類(上記参考文献を参照されたい)にしたがって、病期CまたはDと分類される心不全を患わないものとする。さらに、本明細書の以下に示すように、患者は、減少した左室駆出率を持たない。

## 【0144】

前述の方法の好ましい態様において、被験体は、好ましくは、ACC/AHA分類にしたがって、病期Aまたは病期Bと分類される心不全を患う。前述の方法の別の好ましい態様において、被験体は心臓疾患および障害に関して健康である。心臓疾患および障害に関して健康である被験体は、心臓疾患および障害を患わない被験体と見なされる。

10

## 【0145】

好ましくは、上述の方法の文脈において、被験体は、収縮不全(特に駆出率が減少した収縮不全)および/または収縮機能不全を患わない。好ましくは、被験体は、保持された左室駆出率を有するものとする。したがって、試験しようとする被験体は、好ましくは、55%より多い、より好ましくは60%より多い、そして最も好ましくは65%より多い、左室駆出率(LVEF)を有することも可能である。

## 【0146】

インスリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)系は、細胞増殖および分化において、重要な役割を果たす。該タンパク質は、2つのリガンド、IGF-IおよびIGF-II、2つの受容体1型および2型IGF受容体、そして1995年現在で、6つのIGF結合タンパク質(IGFBP)、IGFBP-1~6(Jones, J. I.ら, *Endocr. Rev.* 16(1995)3-34)を含む。近年、IGFBPファミリーは、IGFBPと有意な構造的類似性を有する、IGFBP関連タンパク質(IGFBP-rP)も含むように拡大されてきている(Hwa, V.ら, *Endocr. Rev.* 20(1999)761-787)。したがって、IGFBPスーパーファミリーには、IGFに対して高いアフィニティを有する6つの慣用的なIGFBP、ならびにIGFBPの保存されたアミノ末端ドメインを共有するだけでなく、ある程度の度合いのIGFおよびインスリンに対するアフィニティも示す、少なくとも10のIGFBP-rPが含まれる。IGFBP-rPは、多様な細胞機能、例えば細胞増殖、細胞接着および遊走、ならびに細胞外マトリックスの合成を制御する、システインリッチタンパク質群である。さらに、これらのタンパク質は、組織増殖および分化、再生、血管新生、創傷修復、炎症、線維症、および腫瘍発生のような生物学的プロセスに参与する可能性もある(Hwa, V.ら, *Endocr. Rev.* 20(1999)761-787)。

20

30

## 【0147】

IGF結合タンパク質7(=IGFBP7)は、内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、および上皮細胞によって分泌されることが知られる30kDaのモジュール糖タンパク質である(Ono, Y.ら, *Biochem Biophys Res Comm.* 202(1994)1490-1496)。文献において、この分子はまた、FSTL2; IBP7; IGF結合タンパク質関連タンパク質I; IGFBP7; IGFBP7v; IGFBP-rP1; IGFBP7; IGFBPRP1; インスリン様増殖因子結合タンパク質7; インスリン様増殖因子結合タンパク質7前駆体; MAC25; MAC25タンパク質; PGI2刺激因子; およびPSFまたはプロスタサイクリン刺激因子とも称されてきている。ノーザンブロット研究によって、心臓、脳、胎盤、肝臓、骨格筋、および膵臓を含む、ヒト組織におけるこの遺伝子の広い発現が明らかになった(Oh, Y.ら, *J. Biol. Chem.* 271(1996)30322-30325)。

40

## 【0148】

IGFBP7は、対応物腫瘍細胞と比較して、正常な軟髄膜および乳腺上皮細胞におい

50

て示差的に発現される遺伝子として最初に同定され、そして髄膜腫関連 cDNA (MAC 25) と命名された (Burger, A.M.ら, *Oncogene* 16 (1998) 2459 - 2467)。発現されるタンパク質は、腫瘍由来接着因子 (後に、アンギオモジュリンと改名された) (Sprenger, C.C.ら, *Cancer Res* 59 (1999) 2370 - 2375) として、そしてプロスタサイクリン刺激因子 (Akaogi, K.ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 8384 - 8389) として、独立に精製された。さらに、該分子は、乳癌において下方制御される遺伝子、T1 A12 としても報告されてきている (StCroix, B.ら, *Science* 289 (2000) 1197 - 1202)。

【0149】

好ましくは、用語「IGFBP7」は、ヒトIGFBP7を指す。該タンパク質の配列は、当該技術分野において周知であり、そして例えばGenBank (NP\_001240764.1) を通じてアクセス可能である。IGFBP7は、本明細書において、好ましくは、特定のIGFBP7ポリペプチドの変異体もまた含む。用語「変異体」の説明に関しては、上記を参照されたい。

【0150】

上に示すように、前述の方法は、被験体由来の試料における脳ナトリウム利尿ペプチドの量および/または心臓トロポニンの量の決定をさらに含むことも可能である。用語「心臓トロポニン」は、本明細書において別の箇所に記載されてきている。本明細書において、用語「脳ナトリウム利尿ペプチド」は、好ましくは脳ナトリウム利尿 (Brain Natriuretic Peptide) (BNP) 型ペプチドおよび同じ予測能を有するその変異体を指す。BNP型ペプチドは、プレプロBNP、プロBNP、NT-プロBNP、およびBNPを含む。プレプロペプチド (プレプロBNPの場合は134アミノ酸) は、短いシグナルペプチドを含み、該シグナルペプチドは、酵素的に切断されて、プロペプチドを放出する (プロBNPの場合は108アミノ酸)。プロペプチドは、さらに切断されてN末端プロペプチド (NT-プロペプチド、NT-プロBNPの場合は76アミノ酸) となり、そして活性ホルモン (BNPの場合は32アミノ酸) となる。好ましくは、本発明にしたがった脳ナトリウム利尿ペプチドは、NT-プロBNP、BNP、およびその変異体である。BNPは活性ホルモンであり、そしてそれぞれの不活性対応物NT-プロBNPよりも短い半減期を有する。BNPは血液中で代謝され、一方、NT-プロBNPは、インタクトな分子として血液中を循環し、そしてこうしたものとして、腎臓で排出される。NT-プロBNPのin vivo半減期は、20分であるBNPの半減期より120分長い (Smith 2000, *J Endocrinol*, 167:239 - 46.)。前解析は、NT-プロBNPでよりロバストであり、中央実験室に試料を容易に輸送することが可能である (Mueller 2004, *Clin Chem Lab Med* 42:942 - 4.)。血液試料は、数日間、室温で保存してもよく、あるいは回収損失を伴わずに郵送または搬送することも可能である。対照的に、室温または4℃でBNPを48時間保存すると、少なくとも20%の濃度損失につながる (Mueller、同所; Wu 2004, *Clin Chem* 50:867 - 73.)。したがって、時間経過または関心対象の特性に応じて、ナトリウム利尿ペプチドの活性型または不活性型のいずれかの測定が好適でありうる。本発明にしたがって最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-プロBNPまたはその変異体である。上に簡潔に論じるように、ヒトNT-プロBNPは、本発明にしたがって称される際、好ましくは、ヒトNT-プロBNP分子のN末端部分に対応する長さ76アミノ酸を含むポリペプチドである。ヒトBNPおよびNT-プロBNPの構造は、先行技術、例えばWO 02/089657、WO 02/083913またはBonow、同所にすでに詳細に記載されてきている。好ましくは、ヒトNT-プロBNPは、本明細書において、EP 0648228 B1に開示されるような、ヒトNT-プロBNPである。これらの先行技術文献は、文献中に開示されるNT-プロBNPおよびその変異体の特定の配列に関して、本明細書に援用される。本発明にしたがって言及されるNT-プロBNPは、上に論じるヒトN

10

20

30

40

50

T - プロBNPの前記の特定の配列のアレル変異体および他の変異体をさらに含む。具体的には、アミノ酸レベルで、ヒトNT - プロBNPに、好ましくはヒトNT - プロBNPの全長に渡って、好ましくは少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一である変異体ポリペプチドが想定される。2つのアミノ酸配列間の同一性の度合いは、当該技術分野に周知のアルゴリズムによって決定可能である。好ましくは、同一性の度合いは、2つの最適に整列される配列を、比較ウィンドウに渡って、比較することによって決定可能であり、ここで、比較ウィンドウ中のアミノ酸配列の断片は、最適整列のため、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較した際、付加または欠失（例えばギャップまたはオーバーハング）を含んでもよい。両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在する位の数を決して、マッチした位の数を得て、比較ウィンドウ中の位の総数で、マッチした位の数割り、そして結果に100を乗じて、配列同一性パーセントを得ることによって、割合を計算する。比較のための配列の最適な整列は、SmithおよびWaterman Add. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性整列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444(1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装によって(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、BLAST、PASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group(GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、または視覚的検査によって、行うことも可能である。2つの配列が、比較のために同定されたならば、好ましくは、GAPおよびBESTFITを使用して、最適整列を決定し、そしてしたがって同一性の度合いを決定する。好ましくは、ギャップ加重の5.00、およびギャップ加重長の0.30のデフォルト値を用いる。上に言及する変異体はアレル変異体または任意の他の種特異的相同体、パラログ、またはオルソログであってもよい。診断手段によって、またはそれぞれの全長ペプチドに対して向けられるリガンドによって、なお認識されるタンパク質分解性分解産物は、実質的に類似であり、そしてやはり想定される。ポリペプチドがNT - プロBNP特性を有する限り、ヒトNT - プロBNPのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸欠失、置換、および/または付加を有する変異体ポリペ

ポリペプチドもまた含まれる。本明細書に言及するようなNT - プロBNP特性は、免疫学的および/または生物学的特性である。好ましくは、NT - プロBNP変異体は、ヒトNT - プロBNPのものに匹敵する免疫学的特性（すなわちエピトープ組成）を有する。したがって、変異体は、ナトリウム利尿ペプチドの量の決定のために用いられる前述の手段またはリガンドによって認識可能であるものとする。生物学的および/または免疫学的NT - プロBNP特性は、Karlら(Karl 1999, Scand J Clin Lab Invest 230:177-181)、Yeoら(Yeo 2003, Clinica Chimica Acta 338:107-115)に記載されるアッセイによって検出可能である。変異体にはまた、グリコシル化ペプチドなどの翻訳後修飾ペプチドも含まれる。さらに、本発明にしたがった変異体はまた、試料収集後に、例えばペプチドへの標識、特に放射性または蛍光標識の共有または非共有付着によって修飾されているペプチドまたはポリペプチドである。

#### 【0151】

用語「参照量」は、上に定義される通りである。前述の方法の文脈において、本明細書に言及するようなバイオマーカーに関する、特にFGF - 23、IGFBP7、心臓トロポニン、または脳ナトリウム利尿ペプチドの参照量は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇した被験体群に、あるいは死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少した被験体群に、被験体を割り当てることを可能にする量であるものとする。2つの群を分離する、適切な閾値量は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇していることが知られる被験体または被験体群、あるいは死亡および/または心臓血管事象のリス

10

20

30

40

50

クが減少していることが知られる被験体または被験体群のいずれかから、本明細書に言及するようなマーカーの量に基づいて、本明細書の別の箇所に言及する統計検定によって、容易に計算可能である。前述の被験体または被験体群から得られうる好ましい参照量は、本明細書の別の箇所に示される。

【0152】

好ましくは、以下が診断アルゴリズムとして当てはまる：

好ましくは、参照量は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇していることが知られる被験体または被験体群から得られる。この場合、参照量（単数または複数）と本質的に同一であるかまたはこれより多い、マーカー FGF - 23 の量および/または IGF BP7 の量は、試験しようとする被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇していることを示す。本発明の文脈において、さらに決定されてもよいマーカー、すなわち心臓トロポニンおよび脳ナトリウム利尿ペプチドにも同じことが当てはまる。

10

【0153】

さらにまたはあるいは、参照量は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少していることが知られる被験体または被験体群から得られうる。この場合、参照量（単数または複数）と本質的に同一であるかまたはこれより低い、マーカー FGF - 23 の量および/または IGF BP7 の量は、試験しようとする被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少していることを示す。本発明の文脈において、さらに決定されてもよいマーカー、すなわち心臓トロポニンおよび脳ナトリウム利尿ペプチドにも同じことが当てはまる。

20

【0154】

さらに、参照量が計算された参照量であることが想定される。好ましくは、計算された参照量は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇している被験体、および死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少している被験体の間を区別することを可能にするものとする。好ましくは、マーカー（単数または複数）の増加した量（単数または複数）は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇している被験体の指標であり、一方、マーカー（単数または複数）の減少した量（単数または複数）は、死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少している被験体の指標である。

【0155】

上に示すように、前述の方法は、FGF - 23 およびビタミン D の組み合わせた決定、ならびに参照比の計算を含んでもよい。適切な参照比は、参照量の文脈において、上に示すように、当業者によって容易に決定可能である。

30

【0156】

ビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の比に関する好ましい参照比は、4 ~ 8.5 の範囲内、特に、6.5 ~ 8.5 の範囲内である。ビタミン D の量に対する FGF - 23 の量のさらなる参照比は、好ましくは、6.5、より好ましくは 7.5、または最も好ましくは 8.5 である。

【0157】

好ましい参照量は、IGFBP7 に関して 100 ~ 115 ng/ml の範囲内である。特に好ましい参照量は 115 ng/ml である。

40

好ましくは、比が、ビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の比である場合、以下もまた、診断アルゴリズムとして当てはまる：

好ましくは、（ビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の）参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の比の増加は、被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇していることを示す。やはり好ましくは、（ビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の）参照比と比較した際の、被験体由来の試料におけるビタミン D の量に対する FGF - 23 の量の比の減少は、被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少していることを示す。

【0158】

やはり好ましくは、ビタミン D に対する FGF - 23 の参照比は、死亡および/または

50

心臓血管事象のリスクが上昇していることが知られる被験体または被験体群に由来することも可能である。この場合、参照比と本質的に同一であるか、またはこれより大きい、ビタミンDに対するFGF-23の比は、被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが上昇していることを示す。

【0159】

さらにまたはあるいは、ビタミンDに対するFGF-23の参照比は、好ましくは、死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少していることが知られる被験体または被験体群に由来することも可能である。この場合、参照比と本質的に同一であるか、またはこれより低い、試験試料におけるビタミンDに対するFGF-23の比は、被験体の死亡および/または心臓血管事象のリスクが減少していることを示す。

10

【0160】

#### 初期段階の左室肥大(LVH)を診断するための方法

本発明の根底にある研究において、エンドスタチンおよびBNP型ペプチド(例えばNT-プロBNPおよび/またはBNP)の組み合わせた決定、またはエンドスタチンおよび心臓トロポニンの組み合わせた決定によって、初期段階の左室肥大である被験体の信頼可能な同定が可能になることが示されてきている。これらのマーカーの組み合わせた決定は、一方でエンドスタチン、そしてもう一方でBNP型ペプチドまたは心臓トロポニンの決定が、初期段階のLVHである被験体の異なる下位群の同定を可能にするため、改善された診断を生じる。マーカーの1つの増加した量、または2つのマーカーの増加した量は、初期段階のLVHの指標である。1つのマーカーの量のみを決定する場合、初期段階のLVHである患者のあるものは、見逃されるであろう。

20

【0161】

マーカーの組み合わせた決定は、特に、LVHがより顕著になる前に、高血圧から収縮または拡張機能不全へと進行中の、中間表現型を可能にするため、保持された左室駆出率を有する被験体において好適である。

【0162】

したがって、本発明は、保持された左室駆出率を有する被験体において、初期段階の左室肥大を診断するための方法であって、

a) 被験体由来の試料において、エンドスタチンの量を決定し、そして

b) 被験体由来の試料において、BNP型ペプチドおよび/または心臓トロポニンの量を決定し、そして

30

c) 工程a)およびb)で決定したような量を、参照量と比較して、これによって、初期段階の左室肥大を診断する

工程を含む、前記方法に関する。

【0163】

好ましくは、初期段階の左室肥大は、d)工程c)で実行する比較の結果に基づいて、被験体が初期段階の左室肥大であるかどうかを診断する、さらなる工程を実行することによって、診断される。

【0164】

工程a)およびb)におけるマーカーの量は、被験体由来の同じ試料において決定されてもよいし、または被験体由来の異なる試料において決定されてもよい。

40

用語「診断すること」は、本明細書において、好ましくは、前述の方法の文脈において本明細書に言及するような被験体が、初期段階のLVHを患っているかどうか評価することを意味する。当業者に理解されるであろうように、こうした評価は通常、診断しようとする被験体の100%に関して正しいとは意図されない。しかし、該用語は、被験体の統計的に有意な部分(例えばコホート研究におけるコホート)に関して、評価が正しいことを必要とする。部分が統計的に有意であるかどうかは、多様な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデントのt検定、マン-ホイットニー検定などを用いて、当業者によって容易に決定可能である。詳細は、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley

50

& Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.0001である。

【0165】

本発明の方法の文脈において、方法は、被験体が、初期段階の左室肥大(LVH)であるかどうかを診断するものとする。本明細書において、用語「初期段階の左室肥大」は、好ましくは、高血圧から心不全に進行する際に起こる、心筋のかすかな構造的変化に関する。したがって、前述の方法の工程を実行することによって、高血圧から心不全に進行する際の間接表現型を診断することが可能である。したがって、用語「初期段階の左室肥大」は、好ましくは、左室重量がわずかに増加するLVHの病期を含む。好ましくは、被験体が以下に示すようなLVMIを有する場合、左室重量はわずかに増加する。

10

【0166】

好ましくは、被験体が男性の場合、用語「初期段階のLVH」は、左室重量指数(そしてしたがって、体表面に対する左室重量の比、LVMIと略される)が $116 \text{ g/m}^2 \sim 149 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、より好ましくは $116 \text{ g/m}^2 \sim 135 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、さらにより好ましくは $116 \text{ g/m}^2 \sim 130 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、そして最も好ましくは $116 \text{ g/m}^2 \sim 125 \text{ g/m}^2$ の間の範囲であるLVHの病期を含む。

【0167】

好ましくは、被験体が女性の場合、用語「初期段階のLVH」は、左室重量指数(そしてしたがって、体表面に対する左室重量の比、LVMIと略される)が $96 \text{ g/m}^2 \sim 125 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、より好ましくは $96 \text{ g/m}^2 \sim 120 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、または $96 \text{ g/m}^2 \sim 115 \text{ g/m}^2$ の間の範囲、そして最も好ましくは $96 \text{ g/m}^2 \sim 108 \text{ g/m}^2$ の間の範囲であるLVHの病期を含む。

20

【0168】

したがって、本発明の方法を実施することによって、試験しようとする被験体が、上述のような左室重量指数を有するかどうかを診断することも可能である。

好ましくは、本明細書に提供するLVMI値は、Langら(Recommendations for chamber quantification. Eur J Echocardiogr 2006; 7: 79-108)によって開示されるようなLVHを評価するための方法に基づく。

30

【0169】

上記にしたがうと、試験しようとする被験体は、顕著な型のLVHを患わないものとする。好ましくは、被験体が男性である場合、LVMIは、 $149 \text{ g/m}^2$ より低い、 $135 \text{ g/m}^2$ より低い、 $130 \text{ g/m}^2$ より低い、または $125 \text{ g/m}^2$ より低い(そしてしたがってこれらより高くない)。好ましくは、被験体が女性である場合、LVMIは、 $125 \text{ g/m}^2$ より低い、 $120 \text{ g/m}^2$ より低い、 $115 \text{ g/m}^2$ より低い、または $108 \text{ g/m}^2$ より低い(そしてしたがってこれらより高くない)。

【0170】

用語「被験体」は、前述の方法に関連して、動物、好ましくは哺乳動物、そしてより好ましくはヒトである。好ましい態様において、被験体は男性である。別の好ましい態様において、被験体は女性である。さらに、被験体は65歳より高齢であることも可能である。

40

【0171】

被験体は、本発明の前述の方法の文脈において、好ましくは心不全を患わず、そして/または心不全の明らかな症状を示さない(上記説明を参照されたい)。したがって、被験体は、ACC/AHA分類にしたがって、病期CまたはDと分類される心不全を患わないものとする。

【0172】

上に示すように、心不全の明らかな症状を示さない被験体は、上に言及するACC/A

50

H A分類にしたがって、病期 A または B の心不全を患うことも可能である。本発明の前述の方法と関連して、被験体は、したがって、好ましくは、A C C / A H A 分類にしたがって、病期 A と分類される心不全、またはより好ましくは病期 B の心不全を患う ( J . A m . C o l l . C a r d i o l . 2 0 0 1 ; 3 8 ; 2 1 0 1 - 2 1 1 3 , 2 0 0 5 年改訂、J . A m . C o l l . C a r d i o l . 2 0 0 5 ; 4 6 ; e 1 - e 8 2 を参照されたい)。

【 0 1 7 3 】

前述の方法の別の好ましい態様において、被験体は、心臓疾患および障害に関して健康である。心臓疾患および障害に関して健康である被験体は、心臓疾患および障害を患っていない被験体と見なされる。

10

【 0 1 7 4 】

前述の方法の文脈において、被験体は、保持された左室駆出率 ( L V E F ) を有するものとする。したがって、被験体は、好ましくは 5 5 % より多い、より好ましくは 6 0 % より多い、そして最も好ましくは 6 5 % より多い左室駆出率 ( L V E F ) を有するものとする。したがって、被験体は、好ましくは、収縮心不全または収縮機能不全を患っていない。用語「収縮心不全」の定義は、上に提供されている。

【 0 1 7 5 】

本発明は、特に、高血圧を患う被験体において好適であり、これは、マーカー、エンドスタチンおよび/または心臓トロポニンの組み合わせた決定が、高血圧から心不全に進行する際に生じる、心筋のわずかな構造変化の診断を可能にするためである。したがって、被験体は、好ましくは、高血圧、特に動脈性高血圧 ( この用語の説明に関しては、本明細書の別の箇所を参照されたい ) を患う。

20

【 0 1 7 6 】

さらに、被験体が A C S および/または冠動脈疾患を患わないことが想定される。さらに、被験体の腎機能は損なわれていないものとする ( これらの用語の定義に関しては、上記を参照されたい ) 。さらに、被験体は妊娠していないものとする。やはり好ましくは被験体はアスリートではない。

【 0 1 7 7 】

用語「試料」、「決定すること」、「量」、「比較すること」および「参照量」は、上に定義される。定義はまた、前述の方法に関しても当てはまる。

30

また、本発明の方法の文脈において決定される用語「心臓トロポニン」および「BNP 型ペプチド」の定義もまた、上記に見出されうる。好ましい心臓トロポニンは、トロポニン T およびトロポニン I である。好ましい BNP 型ペプチドは NT - プロBNP および BNP である。

【 0 1 7 8 】

マーカー、エンドスタチンは当該技術分野に周知である。エンドスタチンは、元来、X V I I I 型コラーゲンの 2 0 k D a タンパク質分解断片として、ネズミ血管内皮腫から単離された ( O ' R e i l l y , M . S . ら , C e l l 8 8 ( 1 9 9 7 ) 2 7 7 - 2 8 5 ) 。コラーゲンは、超分子凝集体を形成する、特徴的な三重らせんコンホメーションを持つ、細胞外マトリックスタンパク質のファミリーに相当し、組織構造完全性を維持する際に、主要な役割を果たす。過剰なコラーゲン沈着は線維症を導き、周囲組織の正常な機能を破壊する。コラーゲン X V I I I は、主に基底膜における、中央三重らせんドメインに多数の中断を持ち、そして C 末端にユニークな非三重らせんドメインを持つ、コラーゲンのマルチプレキシン・ファミリーのメンバーである。コラーゲン X V I I I のヒト型アルファ 1 鎖の短いアイソフォームの配列 ( S w i s s P r o t : P 3 9 0 6 0 ) は、例えば W 0 2 0 1 0 / 1 2 4 8 2 1 に開示され、該文献は、その全開示内容に関して本明細書に援用される。

40

【 0 1 7 9 】

エンドスタチンは、多様なタンパク質分解酵素の作用によって、コラーゲン X V I I I のアルファ 1 鎖から放出される ( 詳細に関しては、O r t e g a , N . および W e r b

50

, Z., Journal of Cell Science 115 (2002) 4201-4214を参照されたい - 本論文の全開示は、本明細書に援用される)。エンドスタチンは、本明細書において、WO2010/124821に開示されるように、コラーゲンXVIIの amino acid 1337位から amino acid 1519位に渡るコラーゲンXVII断片によって抑制される。コラーゲンXVIIのアルファ鎖のC末端のヒンジ領域は、いくつかのプロテアーゼ感受性部位を含有し、そして好中球エラスターゼ、カテプシンおよびマトリックス・メタロプロテイナーゼを含む多くの酵素が、この領域でコラーゲン鎖を切断することによって、エンドスタチンを生成することが知られる。これらのプロテアーゼは、もっぱらエンドスタチンを放出するのではなく、エンドスタチン配列を含有する他のより大きい断片もまた放出する可能性もある。当業者には明らかであろうように、こうしたより大きい断片もまた、エンドスタチンに関するイムノアッセイによって測定されるであろう。

10

**【0180】**

用語「参照量」は、本明細書の別の箇所に定義されている。上に示すように、参照量は、計算された参照量であることも可能である。好ましくは、計算された参照量は、初期段階のLVHである被験体、および初期段階のLVHではない被験体の間を区別することを可能にするものとする。

**【0181】**

原則として、以下が診断アルゴリズムとして当てはまる可能性がある：好ましくは、試験被験体は、(i) 決定したマーカーの1つ(例えばエンドスタチンまたは脳ナトリウム利尿ペプチド、あるいはエンドスタチンまたは心臓トロポニン)の量が、参照量より高い場合、または(ii) 両方のマーカーの量が参照量より高い場合、初期段階のLVHにある。好ましくは、試験被験体は、両方のマーカーの量が参照量より低い場合、初期段階のLVHにはない。

20

**【0182】**

被験体が初期段階のLVHにあるかどうかを診断することを可能にする、適切な参照量は、当業者によって決定可能である。前述の方法に関連して、本明細書で言及するようなバイオマーカーに関する参照量は、初期段階の左室肥大にある被験体群、および/または初期段階のLVHにない被験体群に、被験体を割り当てることを可能にする量であるものとする。2つの群を分離する適切な閾値量は、初期段階のLVHにあることが知られる被験体または被験体群、あるいは初期段階のLVHにないことが知られる被験体または被験体群のいずれかに由来する、本明細書に言及するようなマーカーの量に基づいて、本明細書の別の箇所に言及する統計検定によって、容易に計算可能である。

30

**【0183】**

本明細書において上に示すように、バイオマーカーの参照量を、初期段階のLVHにあることが知られる被験体または被験体群から得ることも可能である。この場合、参照量と本質的に同一であるかまたは参照量よりも多い、決定したマーカーの少なくとも1つの量は、被験体が初期段階のLVHにあることを示す。したがって、1つのマーカーの量が参照量と本質的に同一であるかまたは参照量よりも大きい場合、初期段階のLVHが診断可能である。

40

**【0184】**

さらにまたはあるいは、バイオマーカーの参照量は、初期段階のLVHにはないことが知られる被験体または被験体群に由来することも可能である。この場合、参照量と本質的に同一であり、そして/または参照量よりも低い、すべてのマーカーの量(すなわち2つのマーカーを決定する場合、両方のマーカーの量)は、被験体が初期段階のLVHにはないことを示す。したがって、両方のマーカーの量が参照量に本質的に同一であり、そして/または参照量よりも大きい場合、被験体は初期段階のLVHにはない。

**【0185】**

好ましい参照量は、エンドスタチンに関して、180~200 ng/mlの範囲内である。特に好ましい参照量は190 ng/mlである。

50

NT - プロBNPの好ましい参照量は、180 ~ 250 pg/mlの範囲内である。特に好ましい参照量は約200 pg/mlである。

【0186】

トロポニンTに関する好ましい参照量は、5 ~ 10 pg/mlの範囲内である。好ましくは、参照量は8 pg/mlである。

本発明の態様において、方法は、被験体が初期段階のLVHにあると試験された場合、療法を推奨する工程をさらに含む。好ましい療法は、異常なMFSを診断するための方法の文脈において開示される。

【0187】

本発明の好ましい態様において、方法は、被験体由来の試料において、ミメカン、増殖分化因子15 (GDF-15)、FGF-23、およびビタミンDからなる群より選択される、少なくとも1つのさらなるマーカーの量を決定し、そしてこうして決定した前記の少なくとも1つのさらなるマーカーに関する量(単数または複数)を、前記の少なくとも1つのさらなるマーカーに関する参照量(単数または複数)と比較する工程をさらに含む。FGF-23および/またはビタミンDの量を決定する場合、ビタミンDに対するFGF-23の比(またはその逆)を計算し、そして参照比と比較してもよい。好ましい組み合わせは、心臓トロポニン、エンドスタチンおよびFGF-23:ビタミンDである。

【0188】

ミメカンは、ロイシンリッチリピートを含む小分子プロテオグリカンであり、そして前駆体は298アミノ酸を含む。ミメカンの他の名称は、OGN、オステオグリシン、OGIF、SLRR3Aである。

【0189】

ミメカンは、構造的に関連したコアタンパク質を含む、分泌小分子ロイシンリッチ・プロテオグリカン(SLRP)ファミリーのメンバーである。すべてのSLRPに共有される共通の特徴は、コアタンパク質のC末端半分にあるタンデムなロイシンリッチ・リピート(LRP)単位である。しかし、N末端領域においては、各クラスのSLRPは、LRRN-ドメインと称される、保存されたスペーシングを伴う、システインクラスターを含有するユニークなドメインを有する。クラスIII SLRPは、6つのカルボキシルLRPを含有し、そしてミメカン、エピフィカンおよびオプティシンを含む。

【0190】

クラスIおよびIIメンバー、例えばデコリン、ピグリカン、ルメカン、およびフィブロモジュリンのマウスノックアウトによる機能研究によって、異常なコラーゲン原線維形成に寄与しうる、広い範囲の欠陥が示され、これらのSLRPがコラーゲンマトリックスを確立し、そして維持する際に重要な役割を果たすことが示唆されている(Ameye, L.およびYoung, M.F., Glycobiology 12(2002)107R-116R)。クラスIIIミメカンの不全もまた、コラーゲン原線維異常を引き起こした(Tasheva, E.S.ら, Mol. Vis. 8(2002)407-415)。

【0191】

ミメカンは、細胞外マトリックスの多機能構成要素である。ミメカンは多様な他のタンパク質(IGF2、IKBK G、IFNB1、INSR、CHUK、IKBKB、NFKBIA、IL15、Cd3、レチノイン酸、APP、TNF、リポ多糖、c-abl癌遺伝子1、受容体チロシンキナーゼ、v-src肉腫ウイルス癌遺伝子)に結合する。これらの多様な結合活性は、多くの組織において、ミメカンが多様な機能を発揮する能力の主な原因となりうる。

【0192】

ミメカンは、角膜、骨、皮膚、およびさらなる組織に見出されうる。その発現パターンは、異なる病理学的状態において改変される。ミメカンの生物学的役割に関するデータ量が増加しているにもかかわらず、その機能はなお明らかではない。ミメカンは、発生、組織修復、および転移において必須のプロセスである、コラーゲン原線維形成を制御する際

10

20

30

40

50

に關与することが示されてきている ( T a s h e v a ら , M o l . V i s . 8 ( 2 0 0 2 ) 4 0 7 - 4 1 5 ) 。 ミメカンは、 T G F - ベータ - 1 または T G F - ベータ - 2 とともに、骨形成に役割を果たす。

【 0 1 9 3 】

本発明の側面において、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するため、または被験体が異常な M F S を患っているかを評価するための補助を確立するための方法であって：

a ) ( i ) 試料を、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤と、前記検出剤および前記心臓トロポニンの複合体の形成を可能にするのに十分な時間、接触させ、そして / または試料を、 F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤と、前記検出剤および F G F - 2 3 の複合体の形成を可能にするのに十分な時間、接触させ、 ( i i ) 形成された複合体 ( 単数または複数 ) の量 ( 単数または複数 ) を測定し、ここで形成された複合体 ( 単数または複数 ) の前記量 ( 単数または複数 ) は、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 の量 ( 単数または複数 ) に比例し、そして ( i i i ) 形成された複合体 ( 単数または複数 ) の量 ( 単数または複数 ) を、試料中に存在する心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 の量 ( 単数または複数 ) を反映する、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 の量 ( 単数または複数 ) に変換することによって、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 、ビタミン D からなる群より選択される少なくとも 1 つのマーカの量を決定し；

b ) 前記量 ( 単数または複数 ) を参照 ( 単数または複数 ) と比較し；そして

c ) 工程 b ) で行った比較の結果に基づいて、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するため、または異常な M F S を診断するための補助を確立する工程を含む、前記方法が意図される。

【 0 1 9 4 】

本発明の別の側面において、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するため、または異常な M F S を診断するための補助を確立するためのシステムであって：

a ) 試料を、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤と、前記検出剤および試料由来の心臓トロポニンの複合体の形成を可能にするのに十分な時間、接触させ、そして / または試料を、 F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤と、前記検出剤および試料由来の F G F - 2 3 の複合体の形成を可能にするのに十分な時間、接触させる ( そして場合によって、 F G F - 2 3 を決定する場合、ビタミン D に特異的に結合する検出剤と、前記検出剤および試料由来のビタミン D の複合体の形成を可能にするのに十分な時間、接触させる ) ように設定された、アナライザーユニット、

b ) 形成された複合体 ( 単数または複数 ) の量 ( 単数または複数 ) を測定するよう設定された、アナライザーユニット、ここで形成された複合体 ( 単数または複数 ) の前記量 ( 単数または複数 ) は、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D ) の量 ( 単数または複数 ) に比例する、

c ) プロセッサを有し、そして前記アナライザーユニットと機能可能な通信がある、計算デバイス、および

d ) プロセッサによって実行可能な複数の命令を含む非一過性機械読み取り可能媒体であって、命令が実行された際、心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D ) の量 ( 単数または複数 ) を、試料における心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D ) の量 ( 単数または複数 ) を反映する心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D ) の量 ( 単数または複数 ) に変換し、前記量 ( 単数または複数 ) を参照量 ( 単数または複数 ) と比較して、そして前記参照 ( 単数または複数 ) への前記比較の結果に基づいて、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきかを評価するための、または異常な M F S を診断するための補助を確立する、前記媒体を含む、前記システムが意図される。

【 0 1 9 5 】

10

20

30

40

50

適切な検出剤は、1つの側面において、本発明の方法によって調べようとする被験体の試料において、マーカーに特異的に結合する抗体、すなわち心臓トロポニンに特異的に結合する抗体またはFGF-23に特異的に結合する抗体であることも可能である。適用可能な別の検出剤は、1つの側面において、心臓トロポニンまたはFGF-23に特異的に結合するアプタマーであることも可能である。さらに別の側面において、検出剤の間で形成された複合体から、そして少なくとも形成された複合体の量を測定する前に、試料を取り除く。したがって、1つの側面において、検出剤を固体支持体上に固定してもよい。さらなる側面において、洗浄溶液を適用することによって、固体支持体上の形成された複合体から試料を除去することも可能である。形成された複合体は、試料中に存在するマーカーの量に比例するはずである。適用しようとする検出剤の特異性および/または感度は、特異的に結合可能な試料に含まれるマーカーの割合の度合いを定義することが理解されるであろう。決定を実行可能である方法のさらなる詳細もまた、本明細書の別の箇所に見出される。形成された複合体の量を、試料中に実際に存在する量を反映する少なくとも1つのマーカーの量に変換するものとする。こうした量は、1つの側面において、本質的に、試料中に存在する量であることも可能であるし、または別の側面において、形成される複合体および元来の試料中に存在する量の間の関連により、その特定の比率である量であることも可能である。

**【0196】**

前述の方法のさらなる側面において、アナライザーユニット、1つの側面において、本明細書の別の箇所に定義するような、アナライザーユニットによって、工程a)を実行してもよい。

**【0197】**

本発明の方法の側面において、工程a)において決定される量(単数または複数)は、参照と比較される。1つの側面において、参照は、本明細書の別の箇所に定義するような参照である。さらに別の側面において、参照は、測定した複合体の量および元来の試料中に存在する量の間の比例関係を考慮する。したがって、本発明の方法の側面において適用される参照は、用いられている検出剤の限界を反映するよう採用された人工的参照である。別の側面において、前記関係はまた、比較を実施する際、例えば決定した量に関して、決定した量および参照の値を実際に比較する前に、規準化および/または修正計算工程を含めることによって、考慮されてもよい。再び、決定した量に関する規準化および/または修正計算工程は、用いてきた検出剤の限界が適切に反映されるように、比較工程を採用する。1つの側面において、比較を自動的に、例えばコンピュータシステム等によって補助して行う。

**【0198】**

被験体を画像法に基づく評価に供するべきであるか評価するための補助は、工程b)において、前記評価に供するべき被験体群、または前記評価に供するべきではない被験体群に、被験体を割り当てることによって、行われる比較に基づいて確立される。異常なMFSを診断するための補助は、工程b)において、異常なMFSを患う被験体群、または異常なMFSを患っていない被験体群に、被験体を割り当てることによって、行われる比較に基づいて確立される。本明細書の別の箇所にすでに論じているように、調べた被験体の割り当ては、調べた例の100%において正しい必要はない。さらに、調べた被験体を割り当てる被験体群は、統計的考慮、すなわち本発明の方法が作動するであろうものに基づく可能性の特定のあらかじめ選択された度合いに基づいて確立される人工的な群である。本発明の側面において、補助は、自動的に確立され、例えば本明細書に記載し、そして開示するような、計算デバイス等によって補助される。

**【0199】**

本発明の方法の側面において、前記方法は、工程c)で確立される結果にしたがって、被験体を推奨しそして/または管理する工程をさらに含む。

前述の方法の側面において、工程b)および/またはc)は、本明細書の別の箇所に示すような、1またはそれより多いアナライザーユニットによって行われる。

10

20

30

40

50

## 【0200】

本発明はまた、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるか評価するための、被験体の試料における i ) 心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3、あるいは i i ) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および / または F G F - 2 3 に特異的に検出する検出剤の使用にも関する。

## 【0201】

F G F - 2 3 を用いる場合、使用は、ビタミン D の使用をさらに含んでもよい。検出剤が、F G F - 2 3 に特異的に結合する場合、使用は、ビタミン D に特異的に結合する検出剤の使用をさらに含んでもよい。さらに、F G F - 2 3 およびビタミン D の間の比を計算してもよい。

10

## 【0202】

本発明はまた、被験体を画像法に基づく診断評価に供すべきであるかを評価するための薬学的または診断的組成物を製造するための、i ) 心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D )、あるいは i i ) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および / または F G F - 2 3 に特異的に検出する検出剤 ( および場合によってビタミン D に特異的に結合する検出剤 ) の使用にも関する。

## 【0203】

本発明はまた、異常な M F S を診断するための、被験体の試料における i ) 心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3、あるいは i i ) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および / または F G F - 2 3 に特異的に検出する検出剤の使用にも関する。

20

## 【0204】

本発明はまた、被験体が異常な M F S を患っているかどうか診断するための薬学的または診断的組成物を製造するための、i ) 心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 ( および場合によってビタミン D )、あるいは i i ) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および / または F G F - 2 3 に特異的に検出する検出剤 ( および場合によってビタミン D に特異的に結合する検出剤 ) の使用にも関する。好ましい検出剤は、測定しようとするマーカーに特異的に結合する抗体である。

## 【0205】

F G F - 2 3 を用いる場合、使用は、ビタミン D の使用をさらに含んでもよい。F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤を用いる場合、使用は、ビタミン D に特異的に結合する検出剤の使用をさらに含んでもよい。さらに、F G F - 2 3 およびビタミン D の間の比を計算してもよい。

30

## 【0206】

本発明はまた、死亡および / または心臓血管事象のリスクを予測するための、被験体の試料における i ) F G F - 2 3 および / または I G F B P 7 ( および場合によって心臓トロポニンおよび / または脳ナトリウム利尿ペプチド )、あるいは i i ) F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤、および / または I G F B P 7 に特異的に検出する検出剤 ( および場合によって、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および脳ナトリウム利尿ペプチドに特異的に検出する検出剤 ) の使用にも関する。

## 【0207】

本発明はまた、死亡および / または心臓血管事象のリスクを予測するための薬学的または診断的組成物の製造のための、i ) F G F - 2 3 および / または I G F B P 7 ( および場合によって心臓トロポニンおよび / または脳ナトリウム利尿ペプチド )、あるいは i i ) F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤、および / または I G F B P 7 に特異的に検出する検出剤 ( および場合によって、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および脳ナトリウム利尿ペプチドに特異的に検出する検出剤 ) の使用にも関する。

40

## 【0208】

F G F - 2 3 を用いる場合、使用は、ビタミン D の使用をさらに含んでもよい。F G F - 2 3 に特異的に結合する検出剤を用いる場合、使用は、ビタミン D に特異的に結合する検出剤の使用をさらに含んでもよい。さらに、F G F - 2 3 およびビタミン D の間の比を

50

計算してもよい。

【0209】

本発明はまた、初期段階のLVHを診断するための、保持された左室駆出率を有する被験体の試料におけるi)エンドスタチンおよびBNP型ペプチド、またはii)エンドスタチンに特異的に結合する検出剤および/またはBNP型ペプチドに特異的に結合する検出剤の使用にも関する。

【0210】

本発明はまた、初期段階のLVHを診断するため、被験体が保持された左室駆出率を有するか診断するための薬学的または診断的組成物の製造のための、i)エンドスタチンおよびBNP型ペプチド、ii)エンドスタチンに特異的に結合する検出剤および/またはBNP型ペプチドに特異的に結合する検出剤の使用にも関する。好ましい検出剤は、測定しようとするマーカーに特異的に結合する抗体である。

10

【0211】

本発明はまた、初期段階のLVHを診断するための、保持された左室駆出率を有する被験体の試料におけるi)エンドスタチンおよび心臓トロポニン、またはii)エンドスタチンに特異的に結合する検出剤および心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤の使用にも関する。

【0212】

本発明はまた、保持された左室駆出率を有する被験体において、初期段階のLVHを診断するための薬学的または診断的組成物の製造のための、i)エンドスタチンおよび心臓トロポニン、またはii)エンドスタチンに特異的に結合する検出剤および心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤の使用にも関する。好ましい検出剤は、測定しようとするマーカーに特異的に結合する抗体である。

20

【0213】

本発明はまた、初期段階のLVHを診断するための、保持された左室駆出率を有する被験体の試料におけるi)エンドスタチン、脳ナトリウム利尿ペプチドおよび心臓トロポニン、またはii)エンドスタチンに特異的に結合する検出剤、BNP型ペプチドに特異的に結合する検出剤、および心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤の使用にも関する。

【0214】

用語「検出剤」は、本明細書において、試料中に存在するバイオマーカー・ポリペプチド(単数または複数)を特異的に認識し、そしてこれに結合することが可能な剤を指す。該用語は、本明細書において、用語「リガンド」と交換可能に用いられる。さらに、前記剤は、前記剤およびバイオマーカーによって形成される複合体の直接または間接的な検出を可能にするものとする。直接検出は、剤の中に検出可能標識を含めることによって達成可能である。間接的標識は、バイオマーカーおよび検出剤を含む複合体に特異的に結合するさらなる剤によって達成可能であり、前記のさらなる剤は、次いで、検出可能なシグナルを生成することが可能である。検出剤として使用可能な適切な化合物が当該技術分野に周知である。好ましくは、検出剤は、本明細書に言及するようなバイオマーカーに特異的に結合する抗体、特にモノクローナル抗体、またはアプタマーである。用語「抗体」は、本明細書の別の箇所に定義されている。

30

40

【0215】

本発明の好ましい態様にしたがって、本発明の方法を実行するために適応したデバイスであって

a) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および/またはFGF-23に特異的に結合する検出剤(ならびに場合によって、FGF-23を決定する場合、ビタミンDに特異的に結合する検出剤)を含むアナライザーユニットであって、被験体試料におけるマーカー(単数または複数)の量(単数または複数)を決定するために適応した、前記ユニット;および

b) 決定した量(単数または複数)と参照量(単数または複数)を比較し、それによって、被験体を画像法に基づく評価に供するべきか評価するためのアナライザーユニットで

50

あって、参照量（単数または複数）を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、前記ユニットを含む、前記デバイスを提供する。

【0216】

好ましい参照量およびアルゴリズムは、本明細書の別の箇所に開示される。

本発明の好ましい態様にしたがって、本発明の方法を実行するために適応したデバイスであって

a) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および/またはFGF-23に特異的に結合する検出剤（ならびに場合によって、FGF-23を決定する場合、ビタミンDに特異的に結合する検出剤）を含むアナライザーユニットであって、被験体試料におけるマーカー（単数または複数）の量（単数または複数）を決定するために適応した、前記ユニット；および

b) 決定した量（単数または複数）と参照量（単数または複数）を比較し、それによって、被験体が異常なMFSを患うかを評価するためのアナライザーユニットであって、参照量（単数または複数）を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、前記ユニットを含む、前記デバイスを提供する。

【0217】

本発明の別の好ましい態様にしたがって、本発明の方法を実行するために適応したデバイスであって

a) IGFBP7に特異的に結合する検出剤、および/またはFGF-23に特異的に結合する検出剤（ならびに場合によって、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および/または脳ナトリウム利尿ペプチドに特異的に結合する検出剤）を含むアナライザーユニットであって、被験体試料におけるマーカー（単数または複数）の量（単数または複数）を決定するために適応した、前記ユニット；および

b) 決定した量（単数または複数）と参照量（単数または複数）を比較し、それによって、死亡および/または心臓血管事象のリスクを予測するためのアナライザーユニットであって、参照量（単数または複数）を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、前記ユニットを含む、前記デバイスを提供する。

【0218】

本発明の別の好ましい態様にしたがって、本発明の方法を実行するために適応したデバイスであって

a) i) エンドスタチンに特異的に結合する検出剤、ならびにii) BNP型ペプチドに特異的に結合する検出剤、および/または心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤を含むアナライザーユニットであって、保持されたLVEFを有する被験体由来の試料におけるi) エンドスタチン、ならびにii) BNP型ペプチドおよび/または心臓トロポニンの量を決定するために適応した、前記ユニット；および

b) 決定した量（単数または複数）と参照量を比較し、それによって、初期左室肥大を診断するためのアナライザーユニットであって、マーカーに関する参照量を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、前記ユニットを含む、前記デバイスを提供する。

【0219】

好ましい参照量およびアルゴリズムは、本明細書の別の箇所に開示される。

FGF-23およびビタミンDを決定する場合、比は本明細書の別の箇所に示すように計算されるものとし、そして参照比と比較されるものとする。この場合、前述のデバイスの文脈において示すようなアナライザーユニットは、（やはり）FGF-23およびビタミンDの間の比を計算することを可能にするものとする。さらに、データベースは参照比の値を含むものとする。

【0220】

10

20

30

40

50

本開示の好ましい態様には、本明細書の別の箇所に示すように、被験体を画像法に基づく評価に供するべきかを評価するため、または異常なMFSを診断するためのシステムが含まれる。システムの例には、化学的または生物学的反応の結果を検出するか、あるいは化学的または生物学的反応の進行を監視するために用いられる、臨床的化学アナライザー、凝固化学アナライザー、免疫化学アナライザー、尿アナライザー、核酸アナライザーが含まれる。より具体的には、本開示の例示的なシステムには、Roche Elecsys<sup>TM</sup>システムおよびCobas（登録商標）eイムノアッセイアナライザー、Abbott Architect<sup>TM</sup>およびAxSYM<sup>TM</sup>アナライザー、Siemens Centaur<sup>TM</sup>およびImmulite<sup>TM</sup>アナライザー、ならびにBeckman Coulter UniCel<sup>TM</sup>およびAccess<sup>TM</sup>アナライザー等が含まれることも可能である。

10

#### 【0221】

システムの態様には、本開示を実施するために利用される1またはそれより多いアナライザーが含まれてもよい。本明細書開示のシステムのアナライザーユニットは、知られるように、任意の有線通信、Bluetooth（登録商標）、LANS、または無線シグナルを通じて、本明細書に開示する計算デバイスと機能可能な通信がある。さらに、本開示にしたがって、アナライザーユニットは、1つまたは両方の検出、例えば診断目的のための試料の定性的および/または定量的評価を実行する、独立型装置、またはより大きい機器内のモジュールを含むことも可能である。例えば、アナライザーユニットは、試料および/または試薬のピペティング、投薬、混合を実行するかまたはこれらを補助することも可能である。アナライザーユニットは、試薬を保持してアッセイを実行するための試薬保持装置を含むことも可能である。試薬を、例えば、貯蔵区画またはコンベヤー内の適切な貯蔵所または位置に配置された、個々の試薬または試薬群を含有する容器またはカセットの形で配置してもよい。検出試薬はまた、固体支持体上に固定された型であってもよく、ここに試料を接触させる。さらに、アナライザーユニットには、特定の分析のために最適化可能なプロセスおよび/または検出構成要素が含まれてもよい。

20

#### 【0222】

いくつかの態様にしたがって、アナライザーユニットは、試料での分析物、例えばマーカーの光学的検出のために設定されることも可能である。光学検出のために設定された例示的なアナライザーユニットは、電磁エネルギーを電気シグナルに変換するために設定されたデバイスを含み、該デバイスは、単一および多要素またはアレイ光学検出装置の両方を含む。本開示にしたがって、光学検出装置は、光学的電磁シグナルを監視し、そして光学経路中に位置する試料における分析物の存在および/または濃度の指標となる、ベースラインシグナルに比較した、電気出口シグナルまたは反応シグナルを提供することが可能である。こうしたデバイスにはまた、例えば、アバランシェフォトダイオードを含む、フォトダイオード、光トランジスタ、光伝導性検出装置、リニアセンサーアレイ、CCD検出装置、CMOSアレイ検出装置を含むCMOS検出装置、光電子増倍管、および光電子増倍管アレイもまた含まれてもよい。特定の態様にしたがって、光検出装置、例えばフォトダイオードまたは光電子増倍管は、さらなるシグナル調整またはプロセッシング電子機器を含有してもよい。例えば、光学検出装置には、少なくとも1つのプリアンプ、電子フィルター、または集積回路が含まれてもよい。適切なプリアンプには、例えば、集積、トランスインピーダンス、および電流増幅（電流ミラー）プリアンプが含まれる。

30

40

#### 【0223】

さらに、本開示にしたがった1またはそれより多いアナライザーユニットは、光放出のための光源を含んでもよい。例えば、アナライザーユニットの光源は、試験しようとする試料で、分析物濃度を測定するための、またはエネルギー移動（例えば蛍光共鳴エネルギー移動または酵素触媒を通じて）を可能にするための、少なくとも1つの光放出要素（例えば光放出ダイオード、電力放射源、例えば白熱灯、エレクトロルミネセントランプ、ガス放電ランプ、高輝度放電ランプ、レーザー）からなることも可能である。

#### 【0224】

50

さらに、システムのアナライザーユニットには、1またはそれより多いインキュベーション装置（例えば、特定の温度または温度範囲で、試料または試薬を維持するため）が含まれてもよい。いくつかの態様において、アナライザーユニットには、試料を反復温度周期に供し、そして試料での増幅産物の量の変化を監視するため、サーモサイクラーが含まれてもよく、リアルタイム・サーモサイクラーが含まれてもよい。

【0225】

さらに、本明細書に開示するシステムのアナライザーユニットは、反応容器またはキュベット供給ユニットを含んでもよいし、またはこれらに機能可能であるように連結されてもよい。例示的な供給ユニットには、試料および/または試薬を反応容器に送達する、液体プロセッシングユニット、例えばピペッティングユニットが含まれる。ピペッティングユニットは、再使用可能な洗浄可能な針、例えばスチール針、または使い捨てピペットチップを含んでもよい。アナライザーユニットは、1またはそれより多い混合ユニット、例えば液体を含むキュベットを振盪する振盪ユニット、またはキュベット中の液体を混合する混合パドル、または試薬容器をさらに含んでもよい。

10

【0226】

上記から、本開示のいくつかの態様にしたがって、本明細書に開示し、そして記載する方法のいくつかの工程の部分を、計算デバイスによって行うことも可能である。計算デバイスは、例えば、汎用コンピュータまたはポータブル計算デバイスであることも可能である。本明細書開示の方法の1またはそれより多い工程を実行するため、ネットワークを通じてまたはデータをトランスファーする他の方法を通じて、多数の計算デバイスを一緒に用いてもよいこともまた理解されるべきである。例示的な計算デバイスには、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、パーソナルデータアシスタント（「PDA」）、例えばBLACKBERRYブランドデバイス、セルラーデバイス、タブレットコンピュータ、サーバー等が含まれる。一般的に、計算デバイスは、複数の命令（例えばソフトウェアのプログラム）を実行可能なプロセッサを含む。

20

【0227】

計算デバイスは、メモリへのアクセスを有する。メモリは、コンピュータ読み取り可能媒体であり、そして例えば計算デバイスとともにローカルに位置するか、またはネットワークを通じて計算デバイスにアクセス可能である、単一の記憶デバイスまたは多数の記憶デバイスを含むことも可能である。コンピュータ読み取り可能媒体は、計算デバイスによってアクセス可能な任意の利用可能な媒体であることも可能であり、そしてこれには、取り外し可能な媒体および取り外し不能な媒体の両方が含まれる。さらに、コンピュータ読み取り可能媒体は、取り外し可能な媒体および取り外し不能な媒体の一方または両方であることも可能である。例えば、そして限定なしに、コンピュータ読み取り可能媒体は、コンピュータ記憶媒体を含むことも可能である。例示的なコンピュータ記憶媒体には、限定されるわけではないが、計算デバイスによってアクセス可能な、そして計算デバイスのプロセッサによって実行可能な複数の命令を保存するために使用可能な、RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリまたは任意の他のメモリ技術、CD-ROM、デジタル多用途ディスク（DVD）または他の光学ディスク記憶、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶または他の磁気記憶デバイス、あるいは任意の他の媒体が含まれる。

30

40

【0228】

本開示の態様にしたがって、ソフトウェアには、計算デバイスのプロセッサによって実行された際、本明細書に開示する方法の1またはそれより多い工程を実行可能な命令が含まれてもよい。命令のいくつかは、他の機械の操作を制御するシグナルを生じるように適応していてもよく、そしてしたがって、これらの制御シグナルを通じて作動して、コンピュータ自体から遠く離れて素材を変換することも可能である。これらの説明および表現は、データプロセッシングの当業者によって用いられる手段であり、例えばその研究の内容を他の当業者に最も有効に伝達する。

【0229】

複数の命令はまた、一般的には所望の結果を導く工程の首尾一貫した順序であると想定

50

されるアルゴリズムもまた含んでもよい。これらの工程は、物理量の物理的処理を必要とするものである。必ずしもではないが、通常、これらの量は、記憶し、トランスファーし、変換し、組み合わせ、比較し、そして別の方式で処理することが可能な、電氣的または磁氣的パルスまたはシグナルの形を取る。時に、原理的には一般の使用のため、これらのシグナルを、こうしたシグナルが具体化されるかまたは発現される物理的項目または明示に関連して、値、文字、ディスプレイデータ、数字等で称することが好適であることがわかる。しかし、これらおよび類似の用語はすべて、適切な物理量と関連付けられるものとし、そして本明細書において、単にこれらの量に適用される好適な標識として用いられることを心に留めるべきである。本開示のいくつかの態様にしたがって、本明細書に開示する1またはそれより多いマーカーの決定した量、および適切な参照の間の比較を実行するためのアルゴリズムは、命令を遂行することによって具体化され、そして実行される。結果は、パラメトリック診断生データの出力として、あるいは絶対量または相対量として提供されてもよい。本明細書に開示するシステムの多様な態様にしたがって、「診断」は、参照または閾値に対する、計算された「量」の前記比較に基づいて、本明細書に開示するシステムの計算デバイスによって提供可能である。例えば、システムの計算デバイスは、特定の診断の指標である単語、記号、または数値の形で、指標を提供することも可能である。

10

#### 【0230】

計算デバイスはまた、出力デバイスにアクセスを有することも可能である。例示的な出力デバイスには、例えば、ファックス装置、ディスプレイ、プリンタ、およびファイルが含まれる。本開示のいくつかの態様にしたがって、計算デバイスは、本明細書に開示する方法の1またはそれより多い工程を実行することも可能であり、そしてその後、出力デバイスを通じて、方法の結果、徴候、比、または他の要因に関連する出力を提供することも可能である。

20

#### 【0231】

最後に、本発明は、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および/またはFGF-23に特異的に結合する検出剤、参照標準、ならびに前記方法を実行するための使用説明書を含む、本発明の方法を実行するために適応したキットに関する。

#### 【0232】

好ましい態様において、キットは、ビタミンDに特異的に結合する検出剤をさらに含んでもよい。

30

用語「キット」は、本明細書において、好ましくは別個にまたは単一の容器内に提供されている、前述の構成要素のコレクションである。容器はまた、本発明の方法を実行するための使用説明書も含む。これらの使用説明書はマニュアルの形であってもよく、または本発明の方法において言及するような比較を実行することが可能であり、そしてコンピュータまたはデータプロセッシングデバイス上で実装された際、適宜、診断を確立することが可能な、コンピュータプログラムコードによって提供されてもよい。コンピュータプログラムコードは、データ記憶媒体またはデバイス、例えば光学記憶媒体（例えばコンパクトディスク）上に、あるいはコンピュータまたはデータプロセッシングデバイス上に直接、提供されてもよい。さらに、キットは、上に定義するような、参照に関する少なくとも1つの標準を含むものとする。

40

#### 【0233】

いくつかの態様において、本明細書開示のキットには、開示する方法を実施するための、少なくとも1つの構成要素または構成要素のパッケージングされた組み合わせが含まれる。「パッケージングされた組み合わせ」によって、キットが、1またはそれより多い構成要素、例えば本明細書に開示するような、プローブ（例えば抗体）、対照、緩衝剤、試薬（例えばコンジュゲートおよび/または基質）、使用説明書等を含む単一のパッケージを提供することを意味する。単一容器を含むキットもまた、「パッケージングされた組み合わせ」の定義内に含まれる。いくつかの態様において、キットには、少なくとも1つのプローブ、例えば抗体（本明細書に開示するようなバイオマーカーのエピトープ

50

に対する特異的アフィニティを有する)が含まれる。例えば、キットには、フルオロフォアで標識された抗体、または融合タンパク質のメンバーである抗体が含まれてもよい。キットにおいて、プローブは固定されていてもよく、そして特定のコンホメーションで固定されていてもよい。例えば、固定されたプローブは、キット中に提供されて、ターゲットタンパク質に特異的に結合し、試料におけるターゲットタンパク質を検出し、そして/または試料からターゲットタンパク質を除去することも可能である。

#### 【0234】

いくつかの態様にしたがって、キットには、少なくとも1つの容器中の、固定されていてもよい少なくとも1つのプローブが含まれる。キットにはまた、1またはそれより多い容器中の、場合によって固定されている多数のプローブも含まれてもよい。例えば、多数のプローブが、単一の容器中に、または別個の容器中に存在してもよく、例えば、各容器が単一のプローブを含有してもよい。

10

#### 【0235】

いくつかの態様において、キットには1またはそれより多い固定されないプローブ、および固定されたプローブを含むまたは含まない1またはそれより多い固体支持体が含まれてもよい。いくつかのこうした態様は、1またはそれより多いプローブを固体支持体に固定するために必要な試薬およびサプライのいくつかまたはすべて、あるいは試料内の特定のタンパク質に、固定されたプローブを結合させるために必要な試薬およびサプライのいくつかまたはすべてを含んでもよい。

#### 【0236】

特定の態様において、単一のプローブ(同じプローブの多数のコピーを含む)を、単一の固体支持体上に固定し、そして単一の容器中に提供してもよい。他の態様において、各々、異なるターゲットタンパク質または単一のターゲットタンパク質の異なる型(例えば特定のエピトープ)に特異的な、2またはそれより多いプローブを、単一の容器中に提供してもよい。いくつかのこうした態様において、固定されたプローブを、多数の異なる容器中に(例えば単回使用型で)提供してもよいし、または多数の固定されたプローブを、多数の異なる容器中に提供してもよい。さらなる態様において、プローブを多数の異なる型の固体支持体上に固定してもよい。固定されたプローブ(単数または複数)および容器(単数または複数)の任意の組み合わせが、本明細書に開示するキットに意図され、そしてその任意の組み合わせを選択して、望ましい使用に適したキットを達成することも可能である。

20

#### 【0237】

キットの容器は、例えばプローブ(例えば抗体)、対照、緩衝剤、および試薬(例えばコンジュゲートおよび/または基質)を含む、本明細書に開示する1またはそれより多い構成要素をパッケージングおよび/または含有するのに適した任意の容器であってもよい。適切な材料には、限定されるわけではないが、ガラス、プラスチック、ボール紙または他の紙製品、木材、金属、およびその任意の合金が含まれる。いくつかの態様において、容器は、固定されたプローブ(単数または複数)を完全に包み込んでもよいし、あるいは埃、油等による混入、および光への曝露を最小限にするためにプローブを単に覆ってもよい。いくつかのさらなる態様において、キットは単一の容器または多数の容器を含んでもよく、そして多数の容器が存在する場合、各容器は、すべての他の容器と同じであってもよく、他のものと異なってもよく、またはいくつかとは異なるがすべての他の容器とは異ならなくてもよい。

30

40

#### 【0238】

以下に、本発明の好ましい態様を列挙する。本明細書の上記に、そして請求項に提供される定義および説明は、変更すべきところは変更して適用される。

1. 被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するための方法であって

a) 被験体由来の試料において、心臓トロポニンおよび/または線維芽細胞増殖因子23(FGF-23)の量(単数または複数)を決定し、そして

50

b) こうして決定した量 ( a ) を参照量 ( 単数または複数 ) と比較し、それによって、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価する工程を含む、前記方法。

【 0 2 3 9 】

2 . 被験体が高血圧を患う、態様 1 の方法。

3 . 被験体が左室肥大を患わず、特に、被験体が正常左室重量を有する、態様 1 および 2 の方法。

【 0 2 4 0 】

4 . 画像法に基づく診断評価が心エコーまたは磁気共鳴画像法である、態様 1 ~ 3 のいずれか一項の方法。

5 . 画像法に基づく診断評価が、拡張機能不全および / または収縮機能不全を診断するためであり、特に、異常な中壁短縮率を診断するためである、態様 1 および 4 のいずれか一項の方法。

【 0 2 4 1 】

6 . 参照量と比較した際の被験体由来の試料における量の増加が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを示す、態様 1 ~ 5 のいずれか一項の方法。

7 . 参照量と比較した際の被験体由来の試料における量の減少が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す、態様 1 ~ 6 のいずれか一項の方法。

【 0 2 4 2 】

8 . 参照量が計算された参照量である、態様 1 ~ 7 のいずれか一項の方法。

9 . 参照量が、態様 1 の工程 a ) に示すような試料 ( 「 第二の試料 」 ) の前に、被験体から得られていた第一の試料における心臓トロポニンおよび / または F G F - 2 3 の量である、態様 1 ~ 7 のいずれか一項の方法。

【 0 2 4 3 】

1 0 . 第一の試料が、第二の試料の 6 ~ 1 8 ヶ月前に得られている、態様 9 の方法。

1 1 . 第一の試料における量より少なくとも 1 0 %、または特に少なくとも 2 5 % 多い、第二の試料における心臓トロポニン、特にトロポニン T の量、および / または、第一の試料における量より少なくとも 5 %、または特に少なくとも 1 0 % 多い、第二の試料における F G F - 2 3 の量が、画像法に基づく診断評価に供するべき被験体の指標である、態様 9 または 1 0 の方法。

【 0 2 4 4 】

1 2 . 被験体が、第一の試料が得られた時点では異常な M F S を患っていなかった、態様 9 ~ 1 1 のいずれか一項の方法。

1 3 . 被験体が、第一の試料を得た時点で高血圧を患っていた、態様 9 ~ 1 2 のいずれか一項の方法。

【 0 2 4 5 】

1 4 . 被験体において、異常な中壁短縮率 ( M F S ) を診断するための方法であって

a ) 被験体由来の試料において、心臓トロポニンおよび / または線維芽細胞増殖因子 2 3 ( F G F - 2 3 ) の量を決定し、そして

b ) こうして決定した量を参照量と比較し、それによって、異常な中壁短縮率を診断する工程を含む、前記方法。

【 0 2 4 6 】

1 5 . 被験体が左室肥大を患わず、特に、被験体が正常左室重量を有する、態様 1 4 の方法。

1 6 . 参照量と比較した際の被験体由来の試料における量の増加が、被験体が異常な M F S を患うことを示し、そして、参照量と比較した際の被験体由来の試料における量の減少が、被験体が異常な M F S を患っていないことを示す、態様 1 4 および 1 5 の方法。

【 0 2 4 7 】

1 7 . 試料が、血液、血清または血漿試料である、態様 1 ~ 1 6 のいずれか一項の方法

10

20

30

40

50

。 18. 心臓トロポニンおよび FGF-23 の両方の量を決定する、態様 1 ~ 17 のいずれかの方法。

【0248】

19. FGF-23 の量を決定する際、方法が、工程 a) において、FGF-23 の決定に加えて、ビタミン D の量の決定、さらなる工程 a1) において、ビタミン D の量に対する FGF-23 の量の比の計算、およびこうして計算した比の参照比との比較を含む、態様 1 ~ 18 のいずれか一項の方法。

【0249】

20. 被験体が腎機能障害を患っていない、態様 1 ~ 19 のいずれか一項の方法。 10

21. 被験体が、特に血液、血清または血漿試料において、増加した NT-プロBNP レベルを持たない、態様 1 ~ 20 のいずれか一項の方法。

【0250】

22. 被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかを評価するための、被験体試料における i) 心臓トロポニンおよび / または FGF-23 の、あるいは ii) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤および / または FGF-23 に特異的に結合する検出剤の使用。

【0251】

23. 態様 1 ~ 13 の方法を実行するために適応したデバイスであって

a) 心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤、および / または FGF-23 に特異的に結合する検出剤 (ならびに場合によって、FGF-23 を決定しようとする場合、ビタミン D に特異的に結合する検出剤) を含むアナライザーユニットであって、被験体試料におけるマーカー (単数または複数) の量 (単数または複数) を決定するために適応した、前記ユニット; および 20

b) 決定した量 (単数または複数) と参照量 (単数または複数) を比較し、それによって、被験体を画像法に基づく評価に供するべきか評価するためのアナライザーユニットであって、参照量 (単数または複数) を含むデータベース、および比較を実行するためのコンピュータ実装アルゴリズムを含む、前記ユニットを含む、前記デバイス。 30

【0252】

本明細書に引用するすべての参考文献は、その全開示内容および本明細書に特異的に言及する開示内容が本明細書に援用される。

【実施例】

【0253】

以下の実施例は、本発明を単に例示するものとする。これらは、どんなものであっても、本発明の範囲を限定するとは見なされないものとする。

実施例 1: 患者コホート

FGF-23 (ELISA、Immutopics)、総 25-ヒドロキシビタミン D (ECLIA、Roche Diagnostics)、IFG BP7、エンドスタチン、ミメカンおよび 2 つの心臓マーカー (hs-cTnT および NT-プロBNP、Roche Elecsys アッセイ) の血漿レベル、ならびに上昇した LV 重量 / BSA (女性に関しては、 $> 95 \text{ g/m}^2$ 、男性に関しては、 $> 115$ )、正常以下の中壁短縮率 (MFS  $< 15\%$ ) および死亡の間の関係を、中央イタリアに住む、2001 人の高齢者 (平均年齢  $73 \pm 5$  歳、48% 女性) で調べた (PREDICTOR 研究)。LV 重量指数および MF の正常値にしたがって、被験体を 4 つのカテゴリーに分けた。血漿試料におけるマーカーを決定した。すべての死因の死亡に関するデータは、47 ヶ月の追跡中央値後、1200 人の被験体の下位群に関して入手可能であった (86 の死亡)。

【0254】

3 つのマーカー (エンドスタチン、IGFBP7 ミメカン / オステオグリシン) を、疫学的研究 PREDICTOR の 65 ~ 84 歳の 2001 人の被験体から選択した、55 50

0 人の高齢被験体で調べた。このサブコホートは、50 人の正常被験体、150 人の A H A / A C C 病期 A の被験体、300 人の病期 B の被験体を含む。追跡中央値は、47 ヶ月であった(21 の死亡)。

【0255】

被験体を、LV 重量指数および M F S の正常値にしたがって 4 つのカテゴリーに分けた。

a) 正常 LV 重量指数(女性に関しては、LV 重量 / B S A  $95 \text{ g / m}^2$ 、そして男性に関しては  $115 \text{ g / m}^2$ ) および正常 M F S ( 15 %) を有する被験体

b) 正常 LV 重量指数(女性に関しては、LV 重量 / B S A  $95 \text{ g / m}^2$ 、そして男性に関しては  $115 \text{ g / m}^2$ ) および異常 M F S ( $< 15 \%$ ) を有する被験体

c) 上昇した LV 重量指数(女性に関しては、LV 重量 / B S A  $> 95 \text{ g / m}^2$ 、そして男性に関しては  $> 115 \text{ g / m}^2$ ) および正常 M F S ( 15 %) を有する被験体

d) 上昇した LV 重量指数(女性に関しては、LV 重量 / B S A  $> 95 \text{ g / m}^2$ 、そして男性に関しては  $> 115 \text{ g / m}^2$ ) および異常 M F S ( $< 15 \%$ ) を有する被験体

実施例 2 : アッセイ

R o c h e の電気化学発光 E L I S A サンドイッチ試験 E l e c s y s トロポニン T h s (高感度) S T A T (短いターンアラウンド時間) アッセイを用いて、トロポニン T を決定した。該試験は、ヒト心臓トロポニン T に対して特異的に向けられる 2 つのモノクローナル抗体を使用する。抗体は、288 アミノ酸からなる心臓トロポニン T タンパク質の中央部分に位置する 2 つのエピトープ(アミノ酸 125 ~ 131 位および 136 ~ 147 位)を認識する。h s - T n T アッセイは、3 ~ 10000 p g / m L の範囲のトロポニン T レベルの測定を可能にする。

【0256】

R o c h e の電気化学発光 E L I S A サンドイッチ試験 E l e c s y s プロBNP I I S T A T (短いターンアラウンド時間) アッセイを用いて、NT - プロBNP を決定した。該試験は、プロBNP (1 ~ 108) の N 末端部分(1 ~ 76)に位置するエピトープを認識する、2 つのモノクローナル抗体を使用する。

【0257】

I m m u n o t o p i c s I n c . 、カタログ番号 60 - 6100、血漿または細胞培地中のヒト線維芽細胞増殖因子 23 レベルを決定するための第二世代酵素連結免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) の ( C 末端 ) E L I S A キットを用いることによって、ヒト F G F - 23 を決定した。この第二世代ヒト F G F - 23 ( C 末端 ) E L I S A キットは、血漿または細胞培地中の F G F - 23 の測定のための、2 部位酵素連結免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) である。F G F - 23 のカルボキシル末端 ( C 末端 ) 部分内のエピトープを検出するため、2 つのアフィニティ精製ヤギポリクローナル抗体を選択している。一方の抗体は、捕捉のため、ビオチン化されており、そして他方の抗体は、検出のため、酵素、西洋ワサビ ( h o r s e r a d i s h ) ・ペルオキシダーゼ ( H R P ) でコンジュゲート化されている。これらの抗体は、ヒト F G F - 23 のインタクトな分子および大きなカルボキシル末端断片の両方に結合する。ヒト F G F - 23 を含有する試料を、ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイターウェル中で、ビオチン化捕捉抗体および H R P コンジュゲート化抗体と同時にインキュベーションする。試料中に含有される F G F - 23 は、捕捉抗体および検出抗体によって免疫学的に結合されて、「サンドイッチ」複合体を形成する。インキュベーション期間の終了時、ウェルを洗浄して、いかなる未結合抗体および他の構成要素も除去する。ウェルに結合した酵素を、時限反応において、基質溶液とインキュベーションし、そして次いで分光光度マイクロタイタープレート読み取り装置中で測定する。ウェルに結合した抗体複合体の酵素活性は、試料における F G F - 23 の量に正比例する。線形または対数スケールで、各標準に関して、それぞれの F G F - 23 濃度に対して吸光度をプロットすることによって、標準曲線を生成する。試料におけるヒト F G F - 23 の濃度を、この曲線から直接決定する。

【0258】

10

20

30

40

50

ヒト血清または血漿中のミメカンの検出のため、サンドイッチELISAを用いた。抗原の捕捉および検出のため、R & D Systems (カタログ番号: AF2660)の抗ミメカン・ポリクローナル抗体のアリコットを、それぞれ、ビオチンおよびジゴキシゲニンとコンジュゲート化する。ストレプトアビジンでコーティングした96ウェルマイクロタイタープレートを、100 $\mu$ lビオチン化抗ミメカン・ポリクローナル抗体と、1xPBS溶液中、0.2 $\mu$ g/mlで60分間インキュベーションする。インキュベーション後、プレートを1xPBS+0.02%Tween-20で3回洗浄し、PBS+2%BSA(ウシ血清アルブミン)で45分間ブロッキングし、そして次いで、再び1xPBS+0.02%Tween-20で3回洗浄した。次いで、ウェルを100 $\mu$ lの標準抗原としての組換えミメカンの連続希釈と、あるいはそれぞれ、患者または対照個体由来の希釈した血清または血漿試料(1xPBS+1%BSA中、1:5)のいずれかとインキュベーションする。ミメカンの結合後、プレートを1xPBS+0.02%Tween-20で3回洗浄する。結合したミメカンの特異的検出のため、ウェルを100 $\mu$ lのジゴキシゲニン化抗ミメカンポリクローナル抗体と、1xPBS+1%BSA中、0.2 $\mu$ g/mlで45分間インキュベーションする。その後、プレートを3回洗浄して、未結合抗体を除去する。次の工程で、ウェルを100 $\mu$ lの75mU/mlの抗ジゴキシゲニン-PODコンジュゲート(Roche Diagnostics GmbH、ドイツ・マンハイム、カタログ番号1633716)と、1xPBS+1%BSA中、30分間インキュベーションする。プレートを続いて、上記と同じ洗浄緩衝液で6回洗浄する。抗原-抗体複合体の検出のため、ウェルを100 $\mu$ lのABTS溶液(Roche Diagnostics GmbH、ドイツ・マンハイム、カタログ番号11685767)とインキュベーションし、そして光学密度(OD)を、15分後、405および492nmで、ELISA読み取り装置を用いて測定する。

10

## 【0259】

ヒト血清または血漿中のエンドスタチンの測定のため、商業的に入手可能なサンドイッチELISA(Quantikineヒトエンドスタチン・イムノアッセイ、カタログ番号DNSTO、R & D Systems)を用いた。製造者に提供される使用説明書にしたがって、測定を実行する。

20

## 【0260】

ヒト血清または血漿中のIGFBP7の検出のため、サンドイッチELISAを用いた。抗原の捕捉および検出のため、R & D Systemsの抗IGFBP7ポリクローナル抗体(カタログ番号: AF1334)のアリコットを、それぞれ、ビオチンおよびジゴキシゲニンとコンジュゲート化した。

30

## 【0261】

## 実施例3: 結果

LV形状のわずかな改変 - 中壁短縮率

結果を表1に示す。hs-cTnT、NT-プロBNP、FGF-23およびビタミンDの濃度中央値は平均して低かった。hs-cTnT、NT-プロBNPおよびFGF-23/ビタミンDの濃度中央値は、上昇したLV重量および/または正常以下のMFS(どちらに関しても、性別および年齢に関して調整する)を有する被験体においてより高かった。FGF-23およびビタミンDは、hs-cTnTとは独立に、LV重量に有意に関連した。

40

## 【0262】

表1: LV重量指数/MFSのカテゴリ

## 【0263】

【表 1 - 1】

	LV重量指数/MFSのカテゴリ						P*
	正常な LVMI	正常な LVMI		上昇した LVMI	上昇した LVMI		
		正常な MFS	異常な MFS		正常な MFS	異常な MFS	
N	918 (57,8)	275 (17,3)	189 (11,9)	206 (13)			
年齢 (歳)	72,1 (4,8)	73,3 (5,2)	72,9 (4,9)	74,3 (5,1)			<0,0001
女性	444 (48,4)	108 (39,3)	130 (68,8)	120 (58,3)			0,0525
LV重量/BSA (g/m <sup>2</sup> )	81,1 (14,1)	88,0 (13,8)	116,0 (18,0)	125,7 (22,8)			<0,0001
MFS (%)	17,4 (1,6)	13,5 (1,2)	16,5 (1,3)	12,8 (2,0)			P
マーカ							
NT-プロBNP	78	80	124	182			<0,0001

【表 1 - 2】

Hs-cTnT	4,3	5,9	5,48	8,5	<0,0001
ビタミン D [ng/ml]	13,53	13,71	9,88	10,64	0,0021
FGF-23 [相対単位 /ml]	69,1	74,0	76,2	84,1	<0,0001
FGF-23/ ビタミンD <sup>†</sup>	5,3	5,9	6,8	8,3	<0,0001

\* P 性別および年齢に関して調整された。# FGF-23およびビタミンDの循環レベルの間の比（各被験体に関して個々に計算される）

NT-プロBNP濃度中央値は、正常LV重量および正常MFSを有する高齢被験体に対して、正常LV重量指数および正常以下のMFSを有する高齢被験体において増加しなかった。

【0266】

対照的に、hs-cTnTの濃度中央値、およびFGF-23/ビタミンDの濃度中央値比は、正常LV重量および正常MFSを有する高齢被験体に対して、正常LV重量指数および正常以下のMFSを有する高齢被験体において、37%および11%、有意に増加した。

10

【0267】

心臓トロポニンおよびFGF-23レベルは、高齢被験体において上昇しており、LV形状および機能にわずかな改変を伴う（LV形状における検出可能な改変の前であっても）。したがって、これらのマーカーの決定は、（エコー、MRI、ECGによって）LVHが明らかになる前に、高血圧から収縮機能不全または拡張機能不全に進行する際の間表現型の同定を補助するであろう。FGF-23/ビタミンDの比をさらに決定してもよい。それぞれの参照レベルと比較した、心臓トロポニン、FGF-23（好ましくはFGF-23/ビタミンDの比）より選択したマーカーのレベル増加は、該患者がMFSを患うことを示す。

【0268】

20

死亡/心臓血管事象

NT-プロBNP、hs-cTnT、ビタミンDおよびFGF-23を、1202人の被験体において決定し、データはすべての死因を含んだ。追跡中央値は47ヶ月であった[Q1-Q3 39-55]。結果を以下の表に示す。循環バイオマーカーを除き、平均±SDとして連続データを示す（中央値[Q1-Q3]）。カテゴリーデータをn（%）とする。

【0269】

生存状態にしたがったマーカー（死亡対生存）

【0270】

【表2-1】

30

	すべての被験体 (死亡に関する データが利用可 能である)	死亡者(すべ ての死因)	生存者	P
数	1202	86	1116	
バイオマーカー (中央値 [Q1-				
hs-cTnT (ng/L)	5.4 [3.0-9.7]	10.0 [5.2-18.6]	5.2 [3.0-9.2]	<0.001
Hs-cTnT > 3ng/L (n,%)	820 (68.6)	70 (81.4)	750 (67.6)	0.008
NTIプロBNP (ng/L)	90 [44-186]	192 [108-441]	85 [42-174]	<0.001
ビタミン D (ng/mL)	12.8 [7.2-20.5]	8.8 [4.5-17.5]	13.1 [7.4-	<0.001

40

【0271】

【表 2 - 2】

FGF-23 (RU/mL)	74.9 [58.5 - 100.1]	90.2 [66.4- 137.0]	74.3 [58- 97.3]	<0.001
----------------	---------------------	--------------------	-----------------	--------

【0272】

以下のデータは、より包括的な概観を提供する（そして例えば臨床特性を含む）。

【0273】

【表 3】

	すべての被験体 (死亡に関するデータ が利用可能である)	死亡者 (すべ ての死因)	生存者	P
数 (%)	1202	86	1116	
年齢 (歳、平均 ± SD)	73 (5.0)	75.1 (5.2)	72.8 (5.0)	<0.0001
女性 (n,%)	580 (48.3)	36 (41.9)	544 (48.7)	0.218
正常	134 (11.1)	5 (5.8)	129 (11.6)	<0.0001
A	249 (20.7)	16 (18.6)	233 (20.9)	
B	737 (61.3)	50 (58.1)	687 (61.6)	
C	82 (6.8)	15 (17.4)	67 (6.0)	
ECGでのLV肥大 (n,%)	76 (6.8)	7 (9.9)	69 (6.6)	0.508
MFS (%)	13.7 (6.1)	12.2 (6.4)	13.8 (6.1)	0.018
減少 MFS* (n,%)	296 (29.6)	32 (47.8)	264 (28.3)	0.001
LVEF (n,%)	66.3 (7.4)	63.4 (8.1)	66.5 (7.3)	<0.0001
HF有病率 (n,%)	82 (7.1)	15 (19.0)	67 (6.2)	<0.0001
拡張性機能不全の有病率 (n,%)	553 (49.1)	44 (57.9)	509 (48.5)	0.113
hs-cTnT (ng/L)	5.4 [3.0-9.7]	10.0 [5.2-18.6]	5.2 [3.0-9.2]	<0.001
NT-プロBNP (ng/L)	90 [44-186]	192 [108 - 441]	85 [42 - 174]	<0.001
ビタミン D (ng/mL)	12.8 [7.2-20.5]	8.8 [4.5 - 17.5]	13.1 [7.4 - 20.7]	<0.001
FGF-23 (RU/mL)	74.9 [58.5 - 100.1]	90.2 [66.4- 137.0]	74.3 [58- 97.3]	<0.001

【0274】

表から理解可能であるように、86人の被験体（7.1%）が約4年間の追跡調査中に死亡した。hs-cTnT、NT-プロBNPおよびFGF-23の血漿濃度は、死亡者より高く、一方、ビタミンDはより低かった。

【0275】

以下の表は、バイオマーカー濃度およびすべての死因の間の関連に関する一変数Cox分析（HR：ハザード比）を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 6 】

【 表 4 】

	HR	p
NT-プロBNP	1.971	<0.0001
hs-cTnT	2.650	<0.0001
ビタミン D	0.585	<0.0001
FGF-23	2.081	<0.0001

10

【 0 2 7 7 】

表からわかるように、NT-プロBNP、hs-cTnT、ビタミンDおよびFGF-23は、一変数分析で、すべての死因と有意に関連する。

以下の表は、バイオマーカー濃度およびすべての死因の間の調整後の関連に関する、多変数Cox分析を提供する。

【 0 2 7 8 】

【 表 5 】

	HR	p
NTプロBNP	1.707	<0.0001
hs-cTnT	2.102	<0.0001
ビタミン D	0.684	0.016
FGF-23	1.884	<0.0001

20

30

【 0 2 7 9 】

したがって、FGF-23のより高い循環レベル(HR 1.88 [1.40 - 2.54]、 $p < 0.0001$ )およびビタミンDのより低い濃度(HR 0.68 [0.50 - 0.93]、 $p = 0.02$ )は、人口統計学的変数および臨床変数に関して、そして基準心臓バイオマーカー(NT-プロBNPまたはhs-cTnT)に関して調整した後、すべての死因と関連する(86の死亡、7.2%)。

【 0 2 8 0 】

さらに、マーカーIGFBP7、ミメカンおよびエンドスタチンを、Predictor研究から選択した550人の高齢被験体由来の試料においてアッセイした。結果を以下の表に示す。循環バイオマーカーを除いて、連続データを平均 $\pm$ SDとして示す(中央値[Q1 - Q3])。カテゴリーデータをn(%)とする。

40

【 0 2 8 1 】

生存状態にしたがったマーカー(死亡者対生存者)

【 0 2 8 2 】

【表 6】

	すべての被験体 (死亡に関するデータが利用可能である)	死亡者 (すべての死因)	生存者	P (死亡者対生存者)
数	511	21	490	
バイオマーカー (中央値 [Q1-Q3])				
hs-cTnT (ng/L)	5.8 [3 - 9.5]	14.9 [9.1 - 17.6]	5.5 [3 - 8.9]	<0.001
NTプロBNP (ng/L)	95 [47 - 210]	304 [170 - 959]	90 [46 - 198]	<0.001
IGFBP7 (ng/mL)	99 [85 - 113]	124 [106 - 143]	98 [85 - 112]	<0.001
ミメカン (ng/mL)	72 [55 - 98]	68 [61 - 92]	72 [55 - 98]	0.650
エンドスタチン (ng/mL)	164 [138 - 201]	158 [150 - 200]	164 [138 - 201]	0.979

10

【 0 2 8 3 】

以下の表は、より包括的な概観を提供する (そして例えば臨床特性を含む) :

20

【 0 2 8 4 】

【表 7 - 1】

	すべての被験体 (死亡に関するデータが利用可能である)	死亡者 (すべての死因)	生存者	P (死亡者対生存者)
数 (%)	511	21	490	
年齢 (歳、平均±SD)	72.8 (5.1)	76.0 (4.7)	72.7 (5.1)	0.004
女性 (n,%)	248 (48.5)	4 (19.0)	244 (49.8)	0.005
ACC/AHA 病期 (%)				
正常	44 (8.6)	0	44 (9.0)	0.060
A	138 (27.0)	9 (42.9)	129 (26.3)	
B	282 (55.2)	8 (38.1)	274 (55.9)	
C	47 (9.2)	4 (19.0)	43 (8.8)	
心エコー/ECG知見				
ECGでのLV肥大 <sup>i</sup> (n,%)	50 (10.7)	2 (11.1)	48 (10.7)	0.844
MFS (%)	14.0 (5.7)	11.8 (6.8)	14.1 (5.6)	0.082
LVEF (n,%)	65.9 (7.9)	60.9 (10.3)	66.1 (7.8)	0.007

30

40

【 0 2 8 5 】

50

【表 7 - 2】

HF有病率 (n,%)	47 (9.6)	4 (22.2)	43 (9.1)	0.084
拡張機能不全有病率 (n,%)	196 (43.3)	9 (56.3)	187 (42.8)	0.036
IGFBP7 R&D (ng/mL)	99 [85 - 113]	124 [106 - 143]	98 [85 - 112]	<0.001
ミメカン (ng/mL)	72 [55 - 98]	68 [61 - 92]	72 [55 - 98]	0.650
エンドスタチン (ng/mL)	164 [138 - 201]	158 [150 - 200]	164 [138 - 201]	0.979

10

## 【 0 2 8 6 】

コメント：表からわかるように、LVEFの中央値は、65%より大きかった。試験した被験体は、したがって、収縮型心不全を患っていなかった。21人の被験体(4.1%)は、約4年の追跡中に死亡した。死亡者のLVEF中央値は>60%であった。すべてのバイオマーカーIGFBP7の血漿濃度は、死亡者において有意に高かったが、ミメカンおよびエンドスタチンはそうではなかった。

## 【 0 2 8 7 】

以下の表は、バイオマーカー濃度およびすべての死因の間の関連に関する一変数Cox分析を提供する(HR：ハザード比)

20

## 【 0 2 8 8 】

【表 8】

	HR	p
NT-プロBNP	2.271	<0.0001
hs-cTnT	4.180	<0.0001
IGFBP7	12.081	<0.0001
ミメカン	0.941	0.882
エンドスタチン	1.161	0.839

30

## 【 0 2 8 9 】

NT-プロBNP、hs-cTnTおよびIGFBP7は、一変数分析で、すべての死因と有意に関連するが、ミメカンおよびエンドスタチンはそうではない。興味深いことに、最大ハザード比は、IGFBP7で観察される。したがって、IGFBP7は、トロポニンTまたはNT-プロBNPよりも死亡のリスクのより優れた予測因子である。

40

## 【 0 2 9 0 】

以下の表は、調整後のバイオマーカー濃度およびすべての死因の間の関連に関する多変数Cox分析を提供する。

## 【 0 2 9 1 】

【表 9 - 1】

	HR	p
NT-プロBNP	2.122	0.001

【 0 2 9 2 】

【表 9 - 2】

hs-cTnT	3.040	0.004
IGFBP7	10.312	0.015
ミメカン	0.829	0.614
エンドスタチン	0.389	0.261

10

【 0 2 9 3 】

調整後、NT-プロBNP、hs-cTnTおよびIGFBP7は、すべての死因と有意に関連する。最大ハザード比は、IGFBP7に関して観察される。

#### わずかな心臓変化の検出

7つのマーカー（NT-プロBNP、hsTnT、エンドスタチン、IGFBP7、ミメカン/オステオグリシン、FGF-23、ビタミンD）を、PREDICTOR研究から選択した550人の高齢被験体において調べた。このサブコホートの臨床特性を上に記載する。わずかな心筋変化、LVHおよび/または減少したMFSを持ち、そして保持された駆出率を持つ（LVEF > 55%）被験体において、心臓トロポニン、FGF-23、IGFBP7、エンドスタチンおよびミメカンレベルは上昇し、一方、ビタミンDレベルは減少する。したがって、これらのマーカーの決定は、高血圧から心不全に進行する際の中央値表現型の同定を補助するであろう。FGF-23/ビタミンDの比をさらに決定することも可能である。それぞれの参照レベルと比較した、NT-プロBNP、エンドスタチン、心臓トロポニンから、またはFGF-23（好ましくはFGF-23/ビタミンDの比）およびミメカンより選択したマーカーの増加したレベルは、患者がわずかな心臓変化、MFSおよび/またはLVHを患うことを示す。

20

30

【 0 2 9 4 】

以下の表は、Predictor研究の550人の患者サブコホートにおける初期HF段階（n = 352）の試料の検出における、NT-プロBNPまたは心臓トロポニンTおよびエンドスタチンの組み合わせの80%特異性の感度を提供する。ボーダーラインLVHまたは穏やかに上昇したLV重量（96 ~ 121 g / m<sup>2</sup>のLV重量の女性；116 ~ 148 g / m<sup>2</sup>のLV重量の男性）あるいは異常MFSまたは病期Cの患者に由来する試料。対照群は、HF病期0またはAの患者の試料で構成された（n = 211）。

40

【 0 2 9 5 】

【表 10 - 1】

	特異性	感度
NTプロBNP	80%	113 (32%)

【0296】

【表 10 - 2】

cTnT hs	80%	141 (40%)
エンドスタチン	80%	141 (40%)
NT-ProBNP + エンドスタチン	80%	149 (43%)
cTnT hs + エンドスタチン	80%	166 (47%)

10

20

【0297】

表から得られうるように、両方のマーカー単独に対して、NT-プロBNPまたはcTnT hsとエンドスタチンの組み合わせは、わずかな心臓変化、LVH、異常なMFS、初期心不全病期Bおよび病期Cを伴う患者のより高い率を検出する。表から得られうるように、ボーダーラインの穏やかから中程度の異常なLV重量（女性の場合、 $95 \sim 132 \text{ g/m}^2$ 、そして男性の場合、 $116 \sim 148 \text{ g/m}^2$ ）の数人の患者は、NT-プロBNP（239/352）またはcTnT（211/352）またはエンドスタチン（211/352）のいずれか単独では、対照群（わずかな心筋変化を伴わない、病期0またはAの211の試料）において80%特異性で検出されない。

30

【0298】

2つのマーカーの組み合わせは、80%特異性で、両方のマーカー単独の32%（NT-プロBNP）および40%（エンドスタチン）に対して、43%（エンドスタチンおよびNT-プロBNP）のわずかに改善された感度を生じた。2つのマーカーの組み合わせは、80%特異性で、両方のマーカー単独の40%（cTnT hs）および40%（エンドスタチン）に対して、47%（エンドスタチンおよびcTnT hs）の、さらにより改善された感度を生じた。cTnTおよびエンドスタチンの組み合わせは、穏やかに上昇したLV重量または異常なMFSの初期HF段階の検出のために特に好ましい。

40

【0299】

初期HF病期の患者試料における、わずかな心筋変化、異常なMFSまたは穏やかに上昇したLV重量またはボーダーラインLVHに関するさらに好ましいマーカーの組み合わせは、高感度心臓トロポニン、エンドスタチン、およびビタミンDに対するFGF-23の比を含む。

【0300】

ボーダーラインまたは穏やかに上昇したLV重量を伴う女性または男性における、エンドスタチン、NT-プロBNPおよびcTnTのマーカーレベルを図1および2に示す。

図から得られうるように、わずかな心筋変化を伴う被験体のいくつかの試料を低いマ-

50

カーレベルと関連させる（ラインによって示される中央値未満）。中央値は、対照群におけるマーカーレベルに関する（わずかな心筋変化を伴わない病期 0 または A）。グラフからさらに得られうるように、異なる試料サブセットが、異なるマーカーによって検出される。特に、女性被験体において、エンドスタチンおよび NT - プロ BNP または エンドスタチンおよび c T n T のマーカーの組み合わせは、感度を改善するために好ましい。

#### 【 0 3 0 1 】

##### 症例研究

クラス A 心不全の 75 歳の女性患者は、 $30 \text{ kg} / \text{m}^2$  未満の BMI および高血圧を有する。（上記キットを用いて）患者から得た血清試料においてトロポニン T および FGF - 23 を決定する。トロポニン T 値は、 $7.1 \text{ pg} / \text{ml}$  であり、FGF - 23 値は  $93 \text{ RU} / \text{ml}$ （相対単位 / ml、Immunotopics）であり、これは画像法に基づく診断評価を行うべきであることを示す。バイオマーカーに基づく評価を確認するため、LV 充満圧増加の間接的な概算値として、左室流入血流および肺静脈流のドップラー由来指数、ならびに側方僧帽弁輪の組織ドップラー画像（E/e'）を含む、ドップラー由来マルチパラメトリックアルゴリズムを用いて、拡張機能不全の画像法に基づく診断試験を行う。患者は、拡張機能不全を有すると診断される。これによって、トロポニン T および FGF - 23 の検出が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの信頼可能な評価を可能にすることが確認される。

10

#### 【 0 3 0 2 】

クラス A 心不全を有する 71 歳の男性患者は、 $30 \text{ kg} / \text{m}^2$  未満の BMI および高血圧を有する。患者から得た血清試料においてトロポニン T および FGF - 23 を決定する。トロポニン T 値は  $3.0 \text{ pg} / \text{ml}$  未満であり、FGF - 23 値は  $59 \text{ RU} / \text{ml}$  であり、これは画像法に基づく診断評価が必要でないことを示す。バイオマーカーに基づく評価を確認するため、LV 充満圧増加の間接的な概算値として、左室流入血流および肺静脈流のドップラー由来指数、ならびに側方僧帽弁輪の組織ドップラー画像（E/e'）を含む、ドップラー由来マルチパラメトリックアルゴリズムを用いて、拡張機能不全の画像法に基づく診断試験を行う。患者は、拡張機能不全を持たないと診断され、したがって、トロポニン T の検出が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの信頼可能な評価を可能にすることが確認される。

20

#### 【 0 3 0 3 】

クラス A 心不全の 69 歳の女性患者は、 $30 \text{ kg} / \text{m}^2$  未満の BMI および高血圧を有する。患者から得た血清試料においてトロポニン T および FGF - 23 を決定する。トロポニン T 値は  $6.5 \text{ pg} / \text{ml}$  であり、FGF - 23 値は  $99 \text{ RU} / \text{ml}$  であり、これは画像法に基づく診断評価が必要であることの指標となる。したがって、バイオマーカーに基づく評価を確認するため、収縮機能に関して画像法に基づく評価を行う。修飾楕円形モデルを用いて、中壁レベル（中壁短縮率、MFS）で LV 収縮機能を計算する。さらに、米国心エコー図学会および欧州心エコー協会（EAE）の推奨にしたがって、LV 重量を計算する。患者は、正常以下の MFS および正常 LV 重量を有すると診断され、したがって、トロポニン T の検出が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの信頼可能な評価を可能にすることが確認される。

30

40

#### 【 0 3 0 4 】

クラス A 心不全の 76 歳の男性患者は、 $30 \text{ kg} / \text{m}^2$  未満の BMI および高血圧を有する。患者から得た血清試料においてトロポニン T を決定する。トロポニン T 値は  $3 \text{ pg} / \text{ml}$  未満であり、FGF - 23 値は  $64 \text{ RU} / \text{ml}$  であり、これは画像法に基づく診断評価が必要ではないことを示す。バイオマーカーに基づく評価を確認するため、収縮機能の診断を行う。修飾楕円形モデルを用いて、中壁レベル（中壁短縮率、MFS）で LV 収縮機能を計算する。さらに、米国心エコー図学会および欧州心エコー協会（EAE）の推奨にしたがって、LV 重量を計算する。患者は、正常な MFS および正常 LV 重量を有すると診断され、これは、トロポニン T の検出が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの信頼可能な評価を可能にすることを確認する。

50

## 【 0 3 0 5 】

クラス A 心不全の 66 歳の女性患者は、 $40 \text{ kg} / \text{m}^2$  の BMI および高血圧および糖尿病を有する。患者から得た血清試料においてトロポニン T を決定する。トロポニン T 値は  $3.0 \text{ pg} / \text{ml}$  未満であり、これは画像法に基づく診断評価が必要ではないことを示す。患者は、12 ヶ月後、または症状が悪化した場合、追跡受診に戻ってくるように告げられている。12 ヶ月後、患者は追跡受診にやってくる。患者から得た血清試料においてトロポニン T を決定する。トロポニン T 値は  $3.5 \text{ pg} / \text{ml}$  であり、これは画像法に基づく診断評価が必要であることを示す。したがって、トロポニンに基づく評価を確認するため、収縮機能の画像法に基づく診断試験を行う。修飾楕円形モデルを用いて、中壁レベル（中壁短縮率、MFS）で LV 収縮機能を計算する。さらに、米国心エコー図学会および欧州心エコー協会（EAE）の推奨にしたがって、LV 重量を計算する。患者は、正常以下の MFS および正常 LV 重量を有すると診断され、トロポニン T の検出が、被験体を画像法に基づく診断評価に供するべきであるかの信頼可能な評価を可能にすることが確認される。

10

## 【 0 3 0 6 】

結論

結論：hs-cTnT および FGF-23 レベルは、LV 形状および機能にわずかな変化を伴う高齢被験体において上昇しており、そしてこうしたレベルは、心不全の進行における初期中間表現型を同定するのを補助しうる。特に、hs-cTnT レベルおよび FGF-23 レベル / ビタミン D レベルの比は、正常 LV 重量指数および異常な MFS を有する高齢被験体において上昇している。

20

## 【 0 3 0 7 】

収縮 / 拡張機能不全に関する心エコースクリーニングの広く行われる適用は、コスト対利益を考慮することによって限定されてきている。しかし、この不都合は、本発明の方法を適用することによって克服可能であった。心臓トロポニンおよび / または FGF-23 の量を決定することによって、心臓機能の画像法に基づく評価が必要であるかどうかを評価することが可能である。したがって、本発明の方法を実行することによって、不要な医療費を回避することも可能である。

## 【 0 3 0 8 】

わずかな初期心筋変化および / または初期 LVH の検出は、NT-プロBNP、トロポニン T およびエンドスタチンより選択されるバイオマーカーの組み合わせによって改善可能である。さらに、わずかな初期心筋変化を検出するため、マーカー、ミメカン、FGF-23 / ビタミンおよび GDF-15 を決定することも可能である。

30

## 【 0 3 0 9 】

本明細書に言及するマーカーの検出によって、正常左室重量を有し、そして左室肥大を患っていない、高血圧患者を、拡張機能不全または収縮機能不全を診断するための画像法に基づく診断評価（好ましくは心エコー）に供するべきであるか、階層化することを可能にし、ここで、それぞれの参照レベルに対するマーカー（単数または複数）の増加したレベルは、患者を画像法に基づく診断評価に供するべきであることを示し、そして任意の他のレベルのマーカー（単数または複数）は、患者を画像法に基づく診断評価に供するべきではないことを示す。

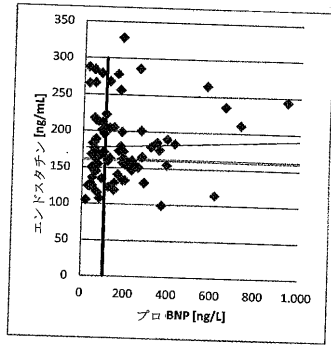
40

## 【 0 3 1 0 】

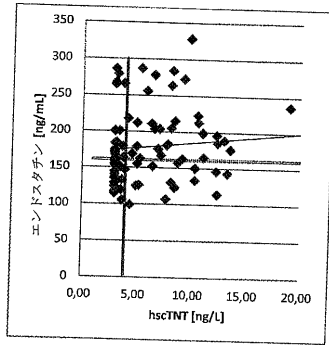
低リスクの高齢者の現在の集団において、上昇したレベルの FGF-23 および低レベルのビタミン D は、わずかな構造変化を持つ個体を同定し、そしてすべての死因を予測する。

【 図 1 】

A

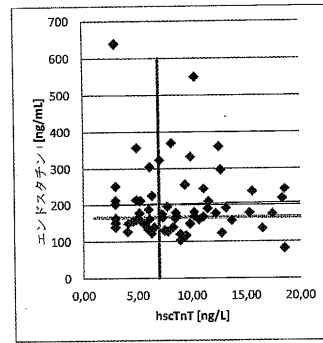


B

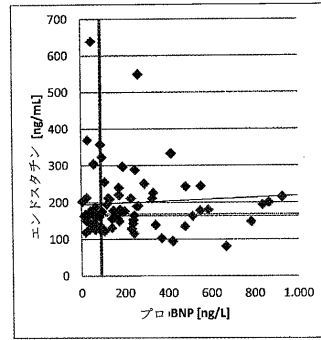


【 図 2 】

A



B



## フロントページの続き

- (74)代理人 100157923  
弁理士 鶴喰 寿孝
- (72)発明者 ブロック, デイルク  
ドイツ国 83673 ビヒル, クロイトヴェーク 10
- (72)発明者 マッソン, セルジェ  
イタリア国 20900 モンツァ, ヴィア・エルネスト・アンブロシーニ 3
- (72)発明者 ヴィーンヒューズ-テレン, ウルストラ-ヘンリケ  
ドイツ国 82152 クライリング, ガルテンシュトラッセ 10
- (72)発明者 ツァウグ, クリステリアン  
スイス国 4310 ラインフェルデン, フランケヴェーク 6
- (72)発明者 ラティーニ, ロベルト  
イタリア国 20129 ミラノ, ヴィア・エレ・パンカルド 1

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 国際公開第2012/025355 (WO, A1)  
特表2010-517023 (JP, A)  
国際公開第2009/091556 (WO, A2)  
特表2012-524282 (JP, A)  
国際公開第2012/029837 (WO, A1)  
特表2013-515243 (JP, A)  
NEGISHI Kazuaki, Association Between Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Maintenance Hemodialysis Patients - Comparison With B-Type Natriuretic Peptide and Cardiac Troponin T -, Circ J, 2010年11月 1日, Vol.74 No.12, Page.2734-2740  
Mirza Majd A I, Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population, ATHEROSCLEROSIS, 2009年12月 1日, Vol. 207, No. 2, pp. 546-551, Electronic Publication Date: 21 May 2009  
Gutierrez Orlando M, Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease, CIRCULATION, 2009年 5月 4日, Vol. 119, No. 19, pp. 2545-2552, Electronic Publication Date: 4 May 2009  
猪俣善隆, 保存期の血清FGF23値と, 透析導入および透析導入前後でのCVDイベントとの関連, 日本透析医学会雑誌, 2012年 5月28日, Vol.45 No.Supplement 1, Page.350 SY-5-1  
駒場大峰, 慢性腎臓病におけるリン管理 II. 慢性腎臓病におけるリン代謝とバランス異常, Clinical Calcium, 2009年 1月28日, Vol.19 No.2, Page.166-172  
中井健太郎, リンコントロール-基礎と実践 4 高リン血症の病態1-生命予後とリン, 季刊腎と骨代謝, 2009年10月 1日, Vol.22 No.4, Page.309-316  
鈴木正司, Q&A 透析医療の現場から 1 FGF23はどのようなことに関係するのか, 透析フロンティア, 2010年 9月10日, Vol.20 No.3, Page.25-26  
YEAP Bu B, Associations of IGF1 and IGF1BP3 with all-cause and cardiovascular mortality in older men: the Health In Men Study, Eur J Endocrinol, 2011年 5月, Vol.164 No.5, Page.715-723  
CHRISTIAN FAUL, FGF23 induces left ventricular hypertrophy, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 2011年11月 1日, V121 N11, P4393-4408  
福本誠二, 心血管疾患とミネラル代謝異常 FGF23 Klotho系と心血管疾患, 循環器内科, 2012年 3月28日, Vol.71 No.3, Page.223-227  
濱野高行, 心血管疾患とミネラル代謝異常 ミネラル代謝と心血管, 生命予後, 循環器内科, 2012年 3月28日, Vol.71 No.3, Page.217-222

加藤秀樹, 慢性腎臓病とリン代謝, FGF23, Annual Review 腎臓, 2012年 1月25日, Vol. 2012, Page.171-177

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/68

A61B 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	识别异常分数的患者		
公开(公告)号	<a href="#">JP6247302B2</a>	公开(公告)日	2017-12-13
申请号	JP2015531492	申请日	2013-03-28
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ブロックディルク マッソンセルジェ ヴィーンヒューズテレンウルスラヘンリケ ツァウグクリスティアン ラティーニロベルト		
发明人	ブロック,ディルク マッソン,セルジェ ヴィーンヒューズ-テレン,ウルスラ-ヘンリケ ツァウグ,クリスティアン ラティーニ,ロベルト		
IPC分类号	G01N33/68 A61B5/00		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/82 G01N2333/4712 G01N2333/50 G01N2800/32 G01N2800/50 A61B5/055 A61B8/0883 G01N2333/4703 G01N2333/4706 G01N2333/78 G01N2800/329		
FI分类号	G01N33/68 A61B5/00.G		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 鹤喰 寿孝		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2012184085 2012-09-12 EP		
其他公开文献	JP2015531873A JP2015531873A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种用于评估受试者是否应进行基于成像的诊断评估的方法。该方法基于确定来自受试者的样品中心脏肌钙蛋白和/或成纤维细胞生长因子23 ( FGF-23 ) 的量, 并且基于因此确定的量的比较。参考金额 ( 参考金额 )。本发明还涉及用于进行评估受试者是否应进行基于成像的诊断评估以及用于实施本文公开的方法的试剂和试剂盒的系统。此外, 本发明涉及一种用于预测死亡和/或心血管事件风险的方法。还包括用于诊断具有保留的左心室射血的受试者的LVH早期阶段的方法。

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/68 (2006.01)  
A 6 1 B 5/00 (2006.01)

GO 1 N 33/68  
A 6 1 B 5/00

G

請求項の数 15 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2015-531492 (P2015-531492)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年3月28日 (2013. 3. 28)		エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2015-531873 (P2015-531873A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成27年11月5日 (2015. 11. 5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/056706		T
(87) 国際公開番号	W02014/040759		スイス・シーエイチー・4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成28年3月25日 (2016. 3. 25)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	12184085.4		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成24年9月12日 (2012. 9. 12)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常な短縮率 (fractional shortening) を持つ患者の同定