

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-508211

(P2016-508211A)

(43) 公表日 平成28年3月17日(2016.3.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/68</b> (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO45
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4C084
<b>A 6 1 P 9/04</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	B
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2015-541158 (P2015-541158)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年11月8日 (2013.11.8)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月8日 (2015.6.8)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/073399		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02014/072471		T
(87) 国際公開日	平成26年5月15日 (2014.5.15)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	12191981.5		グレンツァーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成24年11月9日 (2012.11.9)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	61/724,316	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成24年11月9日 (2012.11.9)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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】 心不全におけるNTproBNPおよびcTnTをベースとする療法ガイドランス

(57) 【要約】

本発明は、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための方法に関する。本方法は、その被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定することに基づく。さらに、本発明は、本発明を実施するために適合させたキットおよびデバイスを考慮する。本発明はまた、心不全に罹患している被検体において本明細書に開示するように心不全治療をガイドするためのシステム、ならびに本明細書に開示する方法を実施する際に用いる試薬およびキットに関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

心不全治療の強化に適格な被検体の同定方法であって、下記のステップを含む方法：

a) 心不全に罹患している被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；および

b) BNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する。

## 【請求項 2】

心不全治療が、利尿薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体遮断薬、ベータ遮断薬およびアルドステロンアンタゴニストからなる群から選択される少なくとも1種類の医薬の投与を含み、特に心不全治療がベータ遮断薬とACE阻害薬の組み合わせ投与を含む、請求項1に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

被検体がヒトである、請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項 4】

試料の入手前に被検体が心不全症状の悪化を経験しておらず、特に試料の入手前3か月の期間内に被検体が心不全症状の悪化を経験していない、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 5】

試料が血液、血清または血漿の試料である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

BNPタイプのペプチドがBNPもしくはNT-proBNPであり、および/または心臓トロポニンがトロポニンTである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

心臓トロポニンがトロポニンTであれば心臓トロポニンについての基準量は約23.5 pg/mlの量であり、BNPタイプのペプチドがBNPであればBNPタイプのペプチドについての基準量は約100 pg/mlであり、および/またはBNPタイプのペプチドがNT-proBNPであればBNPタイプのペプチドについての基準量は約1000 pg/mlである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

i) 心臓トロポニンについての基準量より多い心臓トロポニンの量、および/またはBNPタイプのペプチドについての基準量より多いBNPタイプのペプチドの量は、その被検体が心不全治療の強化を必要とすることの指標であり、

ii) 心臓トロポニンについての基準量より少ない心臓トロポニンの量、およびBNPタイプのペプチドについての基準量より少ないBNPタイプのペプチドの量は、その被検体が心不全治療の強化を必要としないことの指標である、

請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 9】

心不全治療の強化が、以前に投与した医薬の投与量の増加、さらなる医薬(または医薬類)の投与、特に以前に投与した医薬と異なる作用様式を有するさらなる医薬(または医薬類)の投与、デバイス療法、ライフスタイルの変更、およびその組み合わせを含む、請求項8に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項に記載の方法であって、被検体が心不全治療の強化を必要とする被検体であり、前記方法がさらに、

c) 被検体からのさらなる試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；および

d) そのBNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、その心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する

50

ステップを含み、さらなる試料がステップ a ) の試料の 2 週 ~ 3 か月後に入手されたものである、前記方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法であって、被検体が心不全治療の強化を必要としない被検体であり、前記方法がさらに、

c ) 被検体からのさらなる試料において B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；および

d ) その B N P タイプのペプチドの量を B N P タイプのペプチドについての基準量と比較し、その心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する

10

ステップを含み、

さらなる試料がステップ a ) の試料の 3 か月 ~ 1 2 か月後に入手されたものである、前記方法。

【請求項 1 2】

G D F - 1 5 ( 増殖分化因子 1 5 ) の量の決定を包含しない、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

心不全治療の強化に適格な被検体を同定するための、心不全に罹患している被検体からの試料における、i ) B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニン、または i i ) B N P タイプの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。

20

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイス：

a ) B N P タイプの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を含む分析ユニットであって、心不全に罹患している被検体からの試料においてそれらのマーカーの量を決定するために適合させた分析ユニット；および

b ) 決定した量を基準量と比較してそれにより心不全治療をガイドするための分析ユニットであって、請求項 7 に記載の基準量を備えたデータベースおよび請求項 8 に記載の比較を実施するためのアルゴリズムを含む分析ユニット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための方法に関する。本方法は、その被検体からの試料において B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定することに基づく。さらに、本発明は、本発明を実施するために適合させたキットおよびデバイスを考慮する。本発明はまた、心不全に罹患している被検体において本明細書に開示するように心不全治療をガイドするためのシステム、ならびに本明細書に開示する方法を実施する際に用いる試薬およびキットに関する。

【背景技術】

40

【0002】

近代医療の目的は、個人化または個別化した治療計画を提供することである。それらは、患者の個々のニーズまたはリスクを考慮に入れた治療計画である。個人化または個別化した治療計画は、有望な治療計画を決定することが要求される際の措置すら考慮に入れるべきである。

【0003】

心不全 ( H F ) は主要な増大しつつある健康問題である。米国で約 5 0 0 万人の患者が H F を伴っており、米国で毎年 5 0 0 0 0 0 人を超える患者が H F を伴うと初めて診断され、毎年 2 5 0 . 0 0 0 人を超える患者が主因としての H F で死亡していると推定される。心不全 ( H F ) は先進国における罹病および死亡の主因のひとつである。集団の高

50

齢化および心血管疾患患者の長命化のため、HFの発病率および有病率は増大しつつある。

【0004】

心不全は、心室が血液を充満または排出する能力および血液/酸素の供給に対する身体の代謝要求を確保する能力を損なう何らかの構造的または機能的な心臓障害から生じる可能性のある、複雑な臨床症候群である。そのような場合、身体は要求される供給を維持するために、心筋の構造変化(たとえば肥大;最終的には線維症、アポトーシス、壊死に至る)および神経液性刺激(交感神経系およびレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化)によって供給不足を代償しようとする。HFは種々の重症度で分類される。

【0005】

ひとつの分類法は、いわゆるNYHA(New York Heart Association)分類である。心不全患者は、NYHAクラスI、II、IIIおよびIV、またはAmerican College of Cardiology and the American Heart Association(ACC/AHA)ステージA、B、CおよびDで分類される。NYHAクラスIの患者は、心血管疾患の明らかな症状をもたないが、既に機能障害の客観的証拠を備えている。NYHAクラスIIの患者は、身体活動がわずかに制限される。NYHAクラスIIIの患者は、身体活動の顕著な制限を示す。NYHAクラスIVの患者は、不快感なしにいかなる身体活動も行なうことができない。彼らは静止時に心不全の症状を示す。

【0006】

この機能分類法は、American College of Cardiology and the American Heart Association(参照:J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38:2101-2113, 2005年に更新, 参照:J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 46:e1-e82)による、より最近の分類法によって補足される。4つのステージA、B、CおよびDが規定される。心不全ステージB、CまたはDを伴う患者は、心臓に構造および機能の変化が既に生じている。患者はその健康を完全には回復することができないと予想され、療法処置の必要がある。

【0007】

WO2008/015254には、心不全療法、好ましくはスピロラク톤を含めたアルドステロンアンタゴニストのような薬物を用いる薬物ベースの療法に感受性である被検体を同定するための、GDF-15検出ベースの方法が開示されている。心臓トロポニンまたはNT-proBNPを検出してもよい。

【0008】

WO2010/0070411には、心不全に罹患している見掛け上は安定な被検体をモニターする、GDF-15、NT-proANP、NT-proBNP、および心臓トロポニンの検出をベースとする方法が開示されている。さらに、心不全に罹患しておりその生理的状态が変化しつつある見掛け上は安定な被検体に、どの療法/投薬を適用すべきかを診断および/または決断する方法が、それに関示されている。

【0009】

WO2012/025355には、スピロラク톤のようなアルドステロンアンタゴニストの投与を受けている心不全患者における療法モニタリングおよび療法適合のための、トロポニンおよびGDF-15の検出をベースとする方法が開示されている。この文献には、さらに、トロポニンT、NT-proBNPおよびGDF-15の検出により心不全患者における療法のモニタリングまたは適合が可能であることが開示されている。

【0010】

Kubo et al. 2011 (Circulation J, 75, 919-926)には、肥大性心筋症に罹患している患者の臨床衰退について、BNPおよびトロポニンをベースとする検出ベースのリスク予測が開示されている。評価された患者の多くが心不全に罹患していた。肥大性心筋症を伴う患者のモニタリングにこれら2種類のマーカーの組み合わせ測定が有用な可能性があると推測されている。

【0011】

Fonarow et al. 2008 (Am J Cardiol, 101, 231-237)には、心不全に罹患している患者

10

20

30

40

50

におけるBNPおよびトロポニンの検出をベースとする死亡リスク予測が開示されている。

【0012】

Mentz et al. 2011 (Circ J, 75(9):2031-7)には、心不全患者における療法ガイダンスおよびモニタリングのためのNT-proBNP検出ベースの方法が開示され、その際、療法は利尿薬、ACE阻害薬、ベータ遮断薬、スピロノラクトン、ナイトレートまたはジゴキシンによる治療から選択される。

【0013】

Boehm et al. 2011 (Clin Res Cardiol, 100:973-981)には、心不全患者における療法ガイダンスおよびモニタリングのためのNT-proBNP検出ベースの方法が概説されている。それには、心不全療法をガイドするためにBNPをトロポニンと組み合わせる可能性も述べられている。

10

【0014】

利用できる治療選択肢はHFを伴う患者の罹病率および死亡率を低下させることができるが、これらの治療を受けるのに適格な患者の相対数は依然として不満足なほど低い(0'Donoghue M. & Braunwald E., Nat. Rev. Cardiol. 2010; 7: 13-20)。さらに、治療に適格な患者において、治療は主に薬物の最大耐容性に対するHFの徴候および症状によりガイドおよび調整されてきた(たとえば、NYHAステージ、ACC/AHAステージ、またはうっ血スコアにより)。ナトリウム利尿ペプチドマーカー、たとえばB型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、またはそのアミノ末端フラグメントであるN末端proBNP(NT-proBNP)の測定が、HFを伴う患者の診断およびリスク層別化のための重要なツールとして浮上した。さらに、NT-proBNPは心不全における医療をガイドするのに有用であるという証拠が出現しつつある(Januzzi, Journal of Cardiac Failure, 2011; 17: 622-625);ところが、高リスクであって療法強化が有益である可能性のある患者を同定およびモニターするためには、また療法強化の効果をNT-proBNPレベルでモニターするためには、療法のガイドはNT-proBNPの連続測定を含む。

20

【0015】

しかし、NT-proBNPガイドによるHF療法は、HF代償障害および有害事象のリスクをもつすべての患者を同定するわけではない。したがって、若干の患者は、彼らのNT-proBNPレベルに関して療法に対する好ましい応答を示すにもかかわらず依然としてリスクをもつ。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】国際公開第2008/015254号

【特許文献2】国際公開第2010/007041号

【特許文献3】国際公開第2012/025355号

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】J. Am. Coll. Cardiol., 2001; 38; 2101-2113

40

【非特許文献2】J. Am. Coll. Cardiol., 2005; 46; e1-e82

【非特許文献3】Circulation J., 2011; 75; 919-926

【非特許文献4】Am. J. Cardiol., 2008; 101; 231-237

【非特許文献5】Circulation J., 2011; 75(9); 2031-2037

【非特許文献6】Clin. Res. Cardiol., 2011; 100; 973-981

【非特許文献7】Nat. Rev. Cardiol., 2010; 7; 13-20

【非特許文献8】J. Card. Fail., 2011; 17; 622-625

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

50

本発明の基礎となる技術的課題は、より大きな信頼性をもって心不全療法をガイドできる手段および方法の提供であることが分かる。

【課題を解決するための手段】

【0019】

この技術的課題は、特許請求の範囲および以下の本明細書中に述べる態様により解決される。

有利なことに、NT-proBNPと心臓トロポニンの組み合わせは、モニタリング目的で、また療法のガイドとして、現在の標準治療に加えてHF患者における療法を調整および判定するために信頼性をもって使用できることが研究により示された。具体的には、現在の標準治療と一緒にNT-proBNPまたはBNPにトロポニン測定を加えると、より強化した療法およびより緊密な観察を必要とする可能性があるHF患者のさらなるリスク層別化およびモニタリングが可能になる。

10

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1：1000 pg/mLより低いNT-proBNPレベルおよび高いレベルを伴う患者において医療を強化したTIME-CHFにおける、最初の6か月後の予後不良（心不全のため死亡、または反復もしくは長期[すなわち、>14日]入院として規定する；予後良好は、心不全による入院なしに、かつ他の原因による長期入院なしに、3年を超えて生存。元のTIME-CHF集団からのケースコントロール、n=194）；同時点で測定したhs-cTnTレベルがリスクの予測に有意にプラスとなることを示す。

20

【図2】図2：6か月後の生存；1000 pg/mLより低いNT-proBNPレベル。

【図3】図3：6か月後の生存；1000 pg/mLより高いNT-proBNPレベル。

【発明を実施するための形態】

【0021】

したがって、本発明は、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための方法であって、下記のステップを含む方法に関する：

a) 被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

30

b) BNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較し、それにより心不全治療をガイドする。

【0022】

好ましくは、心不全治療は、ステップb)で実施した比較の結果に基づいて心不全治療をガイドするさらなるステップc)を実施することによりガイドされる。

本発明はまた、心不全治療の強化に適格な被検体の同定方法であって、下記のステップを含む方法に関する：

a) 心不全に罹患している被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

40

b) BNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する；ならびに

c) 場合により、心不全治療の強化に適格な患者を同定する。

【0023】

本方法は、さらに、心不全治療の強化を推奨するステップd)を含むことができる。

前記方法のある態様において、被検体からの試料におけるBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量の決定は、下記により実施できる：a1) 試料を、i) BNPタイプのペプチドに特異的に結合する作用剤と接触させて、これによりその作用剤とBNPタイプのペプチドの間に複合体を形成させ、かつii) 心臓トロポニンに特異的に結合する

50

作用剤と接触させて、これによりその作用剤と心臓トロポニンの間に複合体を形成させる；および a 2 ) 形成された複合体の量を検出し、これによりこれらのバイオマーカーの量を決定する。

#### 【 0 0 2 4 】

前記の本発明方法は、好ましくはエキスピボまたはインビトロ方法である。さらに、本方法は前記に明記したステップに追加したステップを含むことができる。たとえば、さらなるステップは、試料の前処理または本方法により得られた結果の評価に関するものであってもよい。本方法は手動で実施でき、あるいは自動化により支援できる。好ましくは、ステップ ( a ) および / または ( b ) の全部または一部を自動化により支援できる；たとえば、ステップ ( a ) における決定に適したロボット装置およびセンサー装置、あるいはステップ ( b ) におけるコンピューター実装した比較および / またはその比較に基づく評価。

10

#### 【 0 0 2 5 】

したがって、本発明はまた、好ましくは、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための下記のものを含むシステムに関する：

a ) 被検体からの試料の一部を B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニンに対する特異的結合親和性を含むリガンドとインビトロで接触させるように構成された分析ユニット；

b ) リガンドと接触させた被検体からの試料の一部からの信号を検出するように構成された分析ユニット；

c ) プロセッサーを備え、かつ前記の分析ユニット類と作動可能な状態で連絡した、コンピューティングデバイス；および

d ) プロセッサーが実行できる複数の指令、すなわち実行した際にマーカー類の量を計算し、それらのマーカー量を基準量と比較し、これにより心不全療法をガイドする指令を含む、非一過性の ( non - transient ) 機械可読媒体。

20

#### 【 0 0 2 6 】

本明細書中で用いる “ 心不全治療をガイドする ” という句は、好ましくは、心不全に罹患している被検体の心不全治療を強化 ( かつ、好ましくはモニター ) しなければならないか否かを評価することを意味する。したがって、本発明方法を実施することにより、心不全治療の強化に適格な被検体を同定できる。こうして、心不全治療の強化を必要とする被検体または必要としない被検体を同定できる。

30

#### 【 0 0 2 7 】

したがって、本発明はまた、心不全治療の強化に適格な被検体の同定方法を考慮する。好ましくは、心不全治療の強化に適格な被検体はその強化から利益を得るであろう。特に、18 か月または3年のウィンドウ期間内にその被検体の死亡のリスクおよび / またはその被検体の入院のリスクがその強化によって低下すれば、被検体はその強化から利益を得る。療法の強化を必要としない被検体は、好ましくはその強化から利益を得ない。この場合、たとえばその強化により起きる有害な副作用が強化の有益性を上回る可能性がある。

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書中で以下にさらに詳細に記載するように、心不全治療の強化に適格な被検体は短い間隔でモニターすべきでもあり、これに対し、心不全治療の強化に適格でない被検体 ( すなわち、心不全療法の強化を必要としない被検体 ) は長い間隔でモニターされるであろう。したがって、心不全治療を強化すべきであるか否かの決断に加えて、被検体を短い間隔または長い間隔のいずれでモニターすべきであるかを評価できる。

40

#### 【 0 0 2 9 】

当業者に理解されるように、本発明の方法により行なわれる評価は、通常は診断される被検体の 1 0 0 % について正確であることを意図しない。ただし、この用語は、統計学的に有意部分の被検体 ( たとえば、コホート試験におけるコホート ) について評価が正確であることを要求する。ある部分が統計学的に有意であるかどうかは、周知の統計学的評価ツール、たとえば信頼区間の決定、p 値の決定、スチューデントの t 検定 ( Student ' s t -

50

test)、マン - ホイットニー検定(Mann-Whitney test)などを用いて、さらなる労苦なしに当業者が判定できる。詳細は、Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983にある。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。

#### 【0030】

前記方法に関して本明細書中で用いる用語“被検体(subject)”は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに関する。本発明に関して、被検体が心不全(HF)、特に慢性心不全に罹患していることを想定する。

#### 【0031】

本明細書中で用いる用語“心不全”は、心臓の収縮期および/または拡張期機能障害であって、当業者に既知の心不全の顕性徴候が付随するものに関する。好ましくは、本明細書中で心不全は慢性心不全をも表わす。本発明による心不全には、顕性および/または進行性の心不全が含まれる。顕性心不全において、被検体は当業者に既知の心不全の症状を示す。

#### 【0032】

HFは種々の重症度に分類できる。

NYHA(New York Heart Association)分類法によれば、心不全患者はNYHAクラスI、II、IIIおよびIVに属するものとして分類される。心不全を伴う患者は、既にその心臓、心筋、冠動脈循環または心臓弁に構造および機能の変化が生じている。患者はその健康を完全には回復できないと予想され、療法処置の必要がある。NYHAクラスIの患者は、心血管疾患の明らかな症状をもたないが、既に機能障害の客観的証拠を備えている。NYHAクラスIIの患者は、身体活動がわずかに制限される。NYHAクラスIIIの患者は、身体活動の顕著な制限を示す。NYHAクラスIVの患者は、不快感なしにいかなる身体活動も行うことができない。彼らは静止時に心不全の症状を示す。

#### 【0033】

この機能分類法は、American College of Cardiology and the American Heart Association(参照:J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38:2101-2113, 2005年に更新, 参照:J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 46:e1-e82)による、より最近の分類法によって補足される。4つのステージA、B、CおよびDが規定される。ステージAおよびBはHFではなく、“実際に”HFを発症する前に患者を早期同定するのに役立つと考えられる。ステージAおよびBの患者は、HFを発症するリスク因子をもつ者と定義するのが最良である。たとえば、冠動脈疾患、高血圧症または糖尿病を伴う患者であってまだ左心室(LV)機能障害、肥大、または心室の幾何学的変形を呈していない者はステージAとみなされ、一方、無症候性ではあるがLV肥大および/またはLV機能障害を呈している者はステージBと表示されるであろう。次いでステージCは根源となる構造的な心疾患に関連する現在または過去のHFの症状を伴う患者を表わし(HFを伴う患者の大部分)、ステージDは真に難治性のHFを伴う患者を示す。

#### 【0034】

本明細書中で用いる用語“心不全”は、特に、前記のACC/AHA分類のステージCおよびDを表わす。これらのステージでは、被検体は心不全の典型的な症状を示す。したがって、心不全に罹患している被検体は、ACC/AHAクラス分類のステージB、CまたはDに罹患している。同様に好ましくは、被検体をNYHAクラスII、IIIまたはIVに属すると分類することもできる。

#### 【0035】

好ましくは、心不全は収縮期機能障害によるものである。したがって、特に被検体が収縮期心不全に罹患していることを想定する。好ましくは、被検体は50%未満、より好ましくは45%未満、最も好ましくは40%未満の心室駆出分画(LVEF)をもつ。

#### 【0036】

さらに、検査される試料の入手前に被検体が心不全の徴候および/または症状の悪化を

10

20

30

40

50

経験していないことを想定する。好ましくは、被検体は試料の入手前3か月の期間内に心不全の徴候および/または症状の悪化を経験していない。好ましくは、被検体は試料の入手前6か月の期間内に心不全症状の悪化を経験していない。より好ましくは、被検体は試料の入手前3か月の期間内に心不全症状の悪化を経験していない。有利には、本発明に関して、本発明方法の実施前に(すなわち、本発明の方法に関して検査される試料の入手前に)被検体が心不全症状の悪化を経験していなければ、心臓トロポニンとBNPタイプのペプチドの組み合わせ決定は心不全療法の強化を必要とする被検体の同定を可能にすることも示された。

#### 【0037】

心不全の徴候および症状は当技術分野で周知である。好ましくは、心不全の徴候および症状は、NYHAクラスII、IIIおよびIVについて記載されたものである。好ましくは、徴候および/または症状は、息切れ(呼吸困難)、運動不耐性、疲労、浮腫、体重増加/腹水、頻脈、および咳である。

#### 【0038】

さらに、本発明に関して被検体は腎機能障害を伴わないことを想定する。好ましくは、被検体は腎不全に罹患してはならず、特に被検体は急性、慢性および/または末期の腎不全に罹患してはならない。さらに、被検体は、好ましくは腎性高血圧症に罹患してはならない。被検体が腎機能障害を示すかどうかを評価する方法は当技術分野で周知である。腎障害は、既知の適切であると思われるいずれかの手段により診断できる。特に、腎機能は糸球体濾過速度(GFR)により評価できる。たとえば、GFRはコックグロフト-ゴルト(Cockcroft-Gault)式またはMDRD式により計算できる(Levey 1999, *Annals of Internal Medicine*, 461-470)。GFRは、単位時間当たり腎糸球体毛細血管からポーマン嚢内へ濾過される体液の体積である。臨床において、これは腎機能を判定するためにしばしば用いられる。コックグロフト-ゴルト式またはMDRD式などの式から得られるすべての計算値は、イヌリンを血漿に注入することによって“真の”GFRではなく推定値を与える。イヌリンは糸球体濾過後に腎臓により再吸収されないため、その排出速度は糸球体フィルターを通る水および溶質の濾過速度に正比例する。しかし、臨床実務では、クレアチンクリアランスがGFRの測定に用いられる。クレアチンは内因性分子であり、体内で合成され、糸球体によって自由に濾過される(ただし、尿細管によってもごく少量排出される)。したがって、クレアチンクリアランス(CrCl)はGFRに近似する。GFRは一般にミリリットル/分(mL/分)で記録される。男性についてGFRの正常範囲は97~137mL/分であり、女性についてGFRの正常範囲は88~128mL/分である。したがって、特に、腎機能障害を示していない被検体のGFRはこの範囲内にあると考えられる。さらに、その被検体は、好ましくは0.9mg/dL未満、より好ましくは1.1mg/dL未満、最も好ましくは1.3mg/dL未満の血中クレアチンレベル(特に、血清クレアチンレベル)をもつ。

#### 【0039】

さらに、被検体がACS(acute coronary syndrome(急性冠動脈症候群))に罹患していないことを想定する。本明細書中で用いる用語“ACS”は、STEMI(ST-elevation myocardial infarction(ST上昇型心筋梗塞)); NSTEMI(non ST-elevation myocardial infarction(非ST上昇型心筋梗塞))および不安定狭心症を含む。さらに、検査される被検体がACSの病歴をもたないことを想定する。特に、被検体は本発明方法の実施前1か月の期間内(より厳密には、試料の入手前1か月の期間内)にACSに罹患してはならない。

#### 【0040】

心不全に罹患している被検体が心不全に対して治療されているべきであることを想定する。したがって、被検体は心不全治療を受けているべきである。

本明細書中で用いる用語“心不全治療”(本明細書中で“心不全療法”とも呼ぶ)は、好ましくは心不全を治療できるいずれかの治療を表わす。好ましくは、この用語は、心不全に罹患している被検体の治療のためのライフスタイルの変更、食事計画、身体への介入

10

20

30

40

50

、ならびに適切な医薬の投与、デバイスの使用、および/または臓器移植を包含する。

【0041】

ライフスタイルの変更には、禁煙、アルコール摂取の節制、身体活動の増大、減量、ナトリウム（食塩）制限、体重管理、および健康的な食事、魚油の常用、減塩が含まれる。適用される好ましいデバイスは、ペースメーカーおよび再同期化デバイス、除細動器、大動脈内バルーンポンプ、ならびに心室補助デバイスである。

【0042】

特に好ましい態様において、心不全治療には医薬の投与が含まれる。心不全治療に適した医薬は当技術分野で周知である；たとえば、Heart Disease, 2008, 8<sup>th</sup> Edition, Eds. Braunwald, Elsevier Saunders, chapter 24、またはthe ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (European Heart Journal (2008) 29, 2388-2442)を参照。

【0043】

好ましくは、心不全治療には、アンギオテンシン変換酵素阻害薬（ACE阻害薬）、アンギオテンシンII受容体遮断薬（しばしば、アンギオテンシンII受容体アンタゴニストとも呼ばれる）、ベータアドレナリン遮断薬（本明細書中で、ベータ遮断薬とも呼ぶ）、利尿薬、アルドステロンアンタゴニスト、アドレナリンアゴニスト、陽性変力作用薬（positive inotropic agent）、およびカルシウムアンタゴニスト、ヒドララジン、ナイトレート、アスピリンからなる群から選択される少なくとも1種類の医薬の投与が含まれる。医薬がアンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体遮断薬、ベータ遮断薬および/またはアルドステロン遮断薬であることが特に好ましい。

【0044】

好ましいACE阻害薬には、ベナゼプリル(benazepril)、カプトプリル(captopril)、シラザプリル(cilazapril)、エナラプリル(enalapril)、フォシノプリル(fosinopril)、リシノプリル(lisinopril)、モエキシプリル(moexipril)、ペリンドプリル(perindopril)、キナプリル(quinapril)、ラミプリル(ramipril)、スピラプリル(spirapril)、およびトランドラプリル(trandolapril)が含まれる。特に好ましい阻害薬はエナラプリルである。

【0045】

好ましいベータ遮断薬には、セプトロール(cebutolol)、アルプレノロール(alprenolol)、アテノロール(atenolol)、ベタキソロール(betaxolol)、ピソプロロール(bisoprolol)、ブプラノロール(bupranolol)、カラゾロール(carazolol)、カルテオロール(carteolol)、カルベジロール(carvedilol)、セリプロロール(ceiprolol)、メチプラノロール(metipranolol)、メトプロロール(metoprolol)、ナドロール(nadolol)、ネビボロール(nebivolol)、オキシプレノロール(oxprenolol)、ペンブトロール(penbutolol)、ピンドロール(pindolol)、プロパノロール(propranolol)、ソタロール(sotalol)、タニロロール(tanidolol)、およびチモロール(timolol)が含まれる。特に好ましいベータ遮断薬は、アテノロール、ピソプロロール、カルベジロールまたはメトプロロールである。

【0046】

好ましいアンギオテンシンII受容体アンタゴニストは、ロサルタン(Losartan)、バルサルタン(Valsartan)、イルベサルタン(Irbesartan)、カンデサルタン(Candesartan)、テルミサルタン(Telmisartan)、およびエプロサルタン(Eprosartan)である。特に好ましいアンタゴニストは、ロサルタンまたはバルサルタンである。

【0047】

好ましい利尿薬は、ループ利尿薬、チアジド(thiazide)およびチアジド様利尿薬、K保持性利尿薬(K-sparing diuretic)、ミネラルコルチコイド受容体アンタゴニスト、およびバソプレシンアンタゴニストである。

【0048】

好ましいアルドステロンアンタゴニストは、エプレロン(Eplerone)、スピロノラクトン(Spironolactone)、カンレノン(Canrenone)、メキシレノン(Mexrenone)、プロレノン(Prorenone)；ならびにスタチン類、特にアトルバスタチン(Atorvastatin)、フルバスタチン(

Fluvastatin)、ロバスタチン(Lovastatin)、プラバスタチン(Pravastatin)、ロスバスタチン(Rosuvastatin)、およびシンバスタチン(Simvastatin)である。特に好ましいアンタゴニストはスピロラクトンである。

【0049】

好ましい陽性変力作用薬は、ジゴキシンおよびジギトキシンである。

好ましいカルシウムアンタゴニストは、ジヒドロピリジン類、ベラパミル(verapamil)およびジルチアゼム(diltiazem)である。

【0050】

好ましいアドレナリンアゴニストは、ドブタミン(dobutamine)、ドパミン(dopamine)、エピネフリン(epinephrine)、イソプロテレノール(isoprotenerol)、ノルエピネフリン(norepinephrine)、およびフェニレフリン(phenylephrine)である。

10

【0051】

ガイドされる心不全治療は、本明細書中で前記に述べたいかなる治療であってもよい。しかし、好ましい態様において、ガイドされる心不全治療には前記に述べた少なくとも1種類の医薬の投与が含まれる。よりさらに好ましい態様において、心不全治療は、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体遮断薬、およびベータ遮断薬からなる群から選択される少なくとも1種類の医薬の投与を含む。最も好ましくは、ガイドされる心不全治療はベータ遮断薬とACE阻害薬の組み合わせ投与を含む。

【0052】

本発明の方法によれば、検査される被検体の心不全治療を強化すべきであるか否かを評価すべきである。好ましくは、心不全治療の強化は下記のうち少なくとも1つを含む：

20

- ・以前に投与した医薬または以前に投与した医薬類の投与量の増加、
- ・さらなる医薬(または医薬類)の投与、特に以前に投与した医薬と異なる作用様式を有するさらなる医薬(または医薬類)の投与、
- ・デバイス療法、特にペースメーカーデバイス、心臓再同期化療法(cardiac resynchronization therapy)(CRT)、植え込み型除細動器(implantable defibrillator device)(ICD)、または左心室補助デバイス(left ventricular assist device)(LVAD)、ライフスタイルの変更、および
- ・その組み合わせ。

【0053】

30

好ましくは、強化は、以前に投与した医薬または以前に投与した医薬類の投与量の増加、特に利尿薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体遮断薬、アルドステロンアンタゴニスト、およびベータ遮断薬からなる群から選択される医薬の投与量の増加を含む。投与量を増加させる方法は当技術分野で周知であり、たとえばガイドラインから入手できる。好ましくは、これらの医薬の投与量を、最大推奨療法用量まで、または最大耐量まで(いずれにしろ最初に到達するもの)増加させることができる。

【0054】

同様に好ましくは、強化は、さらなる医薬(または医薬類)の投与、特に以前に投与した医薬と異なる作用様式を有するさらなる医薬(または医薬類)の投与、またはさらなるデバイスの適用(すなわち、本発明の方法を実施する前に投与/使用していない医薬/デバイス)を含む。好ましいさらなる医薬には、ヒドララジン、ナイトレート、変力作用薬、アドレナリン作用薬が含まれる。好ましいデバイスには、ペースメーカーデバイス、心臓再同期化療法(CRT)、および植え込み型除細動器(ICD)が含まれる。

40

【0055】

同様に、心不全治療の強化はさらに、被検体を短い間隔でモニターすることを包含できる。したがって、本発明方法の実施によって、特に心不全治療に関して、より緊密なモニタリング(したがって、より緊密な観察)を必要とする被検体を同定できる。“より緊密なモニタリング”について、それは、好ましくは本明細書中で述べるバイオマーカー、すなわち心臓トロポニンおよびBNPタイプのペプチドを、本発明方法のステップa)に述べた試料の後の短い間隔後に得られた少なくとも1つのさらなる試料において測定するこ

50

とを意味する。好ましい短い間隔については本明細書中で後記に述べる。

【0056】

心不全治療の強化を必要としない被検体は、好ましくは治療計画を変更せずにその心不全治療を継続できる。したがって、医薬（または医薬類）の投与量の適合および/または医薬類の変更は必要ない。

【0057】

用語“試料”は、体液の試料、分離した細胞の試料、または組織もしくは臓器からの試料を表わす。体液の試料は周知の方法により得ることができ、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を含む。組織または臓器の試料は、組織または臓器から、たとえば生検により得ることができる。分離した細胞は、体液または組織もしくは臓器から、遠心分離またはセルソーティングなどの分離法により得ることができる。好ましくは、細胞、組織または臓器の試料は、本明細書中で述べるペプチドを発現または産生する細胞、組織または臓器から得られる。

【0058】

用語“心臓トロポニン”は、心臓の細胞、好ましくは心内膜下細胞に発現するすべてのトロポニンイソ型を表わす。これらのイソ型は当技術分野で十分に特性解明されており、たとえばAnderson 1995, *Circulation Research*, vol. 76, no. 4: 681-686、およびFerrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493に記載されている。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、最も好ましくはトロポニンTを表わす。トロポニンのイソ型は、本発明の方法において、一緒に、すなわち同時もしくは逐次に、または個別に、すなわち他のイソ型を全く測定せずに、測定できることを理解すべきである。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, 前掲、およびFerrieres 1998, *Clinical Chemistry*, 44: 487-493に示されている。

【0059】

用語“心臓トロポニン”は、前記の特定のトロポニン類、すなわち好ましくはトロポニンIの、より好ましくはトロポニンTの、バリエーションをも包含する。そのようなバリエーションは、少なくともそれらの特定の心臓トロポニンと同じ本質的な生物学的および免疫学的特性をもつ。特に、それらを本明細書中で述べるものと同じ特異的アッセイ、たとえばそれらの心臓トロポニンを特異的に認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイにより検出できれば、それらは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、本発明に従って述べるバリエーションは少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失および/または付加のため異なるアミノ酸配列をもつはずであり、その際、バリエーション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（特に全長にわたって）、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%、同一であることを理解すべきである。好ましくは、同一度は比較ウィンドウにわたって最適状態でアラインさせた2つの配列の比較により決定すべきであり、その際、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列フラグメントは、最適アラインメントのために、基準配列（付加または欠失を含まないもの）と比較して付加または欠失（たとえば、ギャップまたはオーバーハング）を含むことができる。そのパーセントは、両方の配列に同一アミノ酸残基が現われる位置の数を決定して一致位置の数を求め、その一致位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一パーセントを求めることにより計算される。比較のための最適な配列アラインメントは、下記により実施できる：Smith and Waterman *Add. APL. Math.* 2:482 (1981)の局所相同アルゴリズム(local homology algorithm)、Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)の相同アラインメントアルゴリズム(homology alignment algorithm)、Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444 (1988)の類似性検索法(search for similarity method)、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装(GAP、BESTFIT、BLAST、PASTA、およびTFASTA; Wisconsin Genetics Software Package中, Gen

10

20

30

40

50

etics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)、または目視検査。比較のための2つの配列が同定されていれば、好ましくはGAPおよびBESTFITを用いてそれらの最適アラインメントを決定し、こうして同一度を決定する。好ましくは、ギャップ重みにつき5.00、ギャップ重み長さにつき0.30のデフォルト値を用いる。バリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ(homolog)、パラログ(paralog)もしくはオルソログ(ortholog)であってもよい。さらに、本明細書中で述べるバリエーションには、特定の心臓トロポニンまたは前記タイプのバリエーションの、フラグメントが含まれる；ただし、これらのフラグメントが前記の本質的な免疫学的および生物学的特性をもつ限りにおいてである。好ましくは、心臓トロポニンバリエーションはヒトのトロポニン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)をもつ。したがって、バリエーションは心臓トロポニンの濃度を測定するために用いる前記の手段またはリガンドによって特異的に認識できるであろう。したがって、バリエーションは心臓トロポニンの濃度を測定するために用いる前記の手段またはリガンドによって特異的に認識できるであろう。そのようなフラグメントは、たとえばトロポニンの分解生成物であってもよい。さらに、翻訳後修飾、たとえばリン酸化またはミリスチル化のため異なるバリエーションが含まれる。好ましくは、トロポニンIおよびそのバリエーションの生物学的特性は、インビボおよびインビトロでアクチンATPアーゼを阻害する能力または血管形成を阻害する能力であり、それらは、たとえばMoses et al. 1999 PNAS USA 96 (6): 2645-2650により記載されたアッセイに基づいて検出できる。好ましくは、トロポニンTおよびそのバリエーションの生物学的特性は、トロポニンCおよびIと複合体を形成する能力、カルシウムイオンを結合する能力、またはトロポニンCに結合する能力である：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バリエーションにより形成された複合体として存在する場合。低濃度の循環型心臓トロポニンを種々の状態の被検体において検出できることが知られているが、それらのそれぞれの役割および割合を理解するためにはさらなる研究が必要である(Masson et al., Curr Heart Fail Rep (2010) 7:15-21)。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

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WO 2012/025355に記載される高感度トロポニンアッセイを用いて決定される。

#### 【0061】

本明細書中で用いる用語“BNPタイプのペプチド”は、pre-proBNP、proBNP、NT-proBNP、およびBNPを含む。pre-proペプチド(pre-proBNPの場合は134個のアミノ酸)は短いシグナルペプチドを含み、それが酵素により開裂除去されてproペプチド(proBNPの場合は108個のアミノ酸)を放出する。このproペプチドがさらに開裂して、N末端proペプチド(NT-proペプチド；NT-proBNPの場合は76個のアミノ酸)と活性ホルモン(BNPの場合は32個のアミノ酸)になる。好ましくは、本発明によるBNPタイプのペプチドは、NT-proBNP、BNP、およびそのバリエーションである。BNPは活性ホルモンであり、それぞれの不活性カウンターパートNT-proBNPより短い半減期をもつ。BNPは血中で代謝され、これに対しNT-proBNPは無傷分子として血中を循環し、そのまま腎排出される。NT-proBNPのインビボ半減期は、BNPの半減期である20分より120分長い(Smith 2000, J Endocrinol. 167: 239-46.)。予備分析ではNT-proBNPはより堅牢であり、試料を中央検査室へ容易に運搬できる(Mueller 2004, Clin Chem Lab Med 42: 942-4.)。血液試料を室温で数日間保存でき、あるいは回収損失なしに郵送または輸送できる。これと対照的に、BNPを室温または4℃で48時間保存すると、少なくとも20%の濃度損失が生じる(Mueller 前掲；Wu 2004, Clin Chem 50: 867-73.)。したがって、目的とするタイムコースまたは特性に応じて、活性形または不活性形のナトリウム利尿ペプチドのいずれかの測定が有利である可能性がある。本発明による最も好ましいナトリウム利尿ペプチドは、NT-proBNPまたはそのバリエーションであ

る。前記で簡単に考察したように、本発明に従って述べるヒトNT-proBNPは、好ましくはヒトNT-proBNP分子のN末端部分に対応する長さ76個のアミノ酸を含むポリペプチドである。ヒトのBNPおよびNT-proBNPの構造は先行技術において既に詳細に記載されている；たとえば、WO 02/089657、WO 02/083913、またはBonow 前掲。好ましくは、本発明に用いるヒトNT-proBNPは、EP 0 648 228 B1に開示されるヒトNT-proBNPである。これらの先行技術文献を、それらに開示される特定のNT-proBNPおよびそのバリエーションの配列に関して本明細書に援用する。本発明に従って述べるNT-proBNPは、さらに、前記で考察したヒトNT-proBNPについての特定の配列の対立遺伝子および他のバリエーションを包含する。具体的には、アミノ酸レベルで、ヒトNT-proBNPと、好ましくはヒトNT-proBNPの全長にわたって、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%同一であるバリエーションポリペプチドが考慮される。2つのアミノ酸配列間の同一度は、当技術分野で周知のアルゴリズムにより決定できる。好ましくは、同一度は比較ウィンドウにわたって最適状態でアラインさせた2つの配列の比較により決定すべきであり、その際、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列フラグメントは、最適アラインメントのために、基準配列（付加または欠失を含まないもの）と比較して付加または欠失（たとえば、ギャップまたはオーバーハング）を含むことができる。そのパーセントは、両方の配列に同一アミノ酸残基が現われる位置の数を決定して一致位置の数を求め、その一致位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一パーセントを求めることにより計算される。比較のための最適な配列アラインメントは、下記により実施できる：Smith and Waterman *Add. APL. Math.* 2:482 (1981)の局所相同アルゴリズム、Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)の相同アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装（GAP、BESTFIT、BLAST、PASTA、およびTFASTA；Wisconsin Genetics Software Package中、Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI）、または目視検査。比較のための2つの配列が同定されていれば、好ましくはGAPおよびBESTFITを用いてそれらの最適アラインメントを決定し、こうして同一度を決定する。好ましくは、ギャップ重みにつき5.00、ギャップ重み長さにつき0.30のデフォルト値を用いる。前記のバリエーションは、対立遺伝子バリエーション、または他のいずれかの種特異的なホモログ、パラログもしくはオルソログであってもよい。実質的に類似し、かつ同様に考慮されるのは、タンパク質分解生成物であって、診断手段により、またはそれぞれの全長ペプチドを指向するリガンドにより、なお認識されるものである。同様に包含されるのは、ヒトNT-proBNPのアミノ酸配列と比較してアミノ酸の欠失、置換および/または付加をもつバリエーションポリペプチドであり、ただし、それらのポリペプチドがNT-proBNP特性をもつ限りにおいてである。本明細書中で述べるNT-proBNP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-proBNPバリエーションはヒトNT-proBNP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）をもつ。したがって、それらのバリエーションは、ナトリウム利尿ペプチドの量を測定するために用いる前記の手段またはリガンドによって特異的に（すなわち、交差反応なしに）認識されるはずである。生物学的および/または免疫学的NT-proBNP特性は、Karl et al. (Karl 1999, *Scand J Clin Lab Invest* 230:177-181)、Yeo et al. (Yeo 2003, *Clinica Chimica Acta* 338:107-115)に記載されるアッセイにより検出できる。バリエーションには、翻訳後修飾されたペプチド、たとえばグリコシル化ペプチドも含まれる。さらに、試料の採集後に、たとえばペプチドへの標識、特に放射性標識または蛍光標識の共有結合または非共有結合により修飾されたペプチドまたはポリペプチドも、本発明によるバリエーションである。

#### 【0062】

本明細書中で述べるペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、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ことに関する。測定は直接または間接的に行なう

10

20

30

40

50

ことができる。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信号であってその強度が試料中に存在するペプチドの分子数と直接相関する信号に基づいて、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ことに関する。そのような信号 - 本明細書中で時には強度信号と呼ぶ - は、たとえばペプチドまたはポリペプチドの特異的な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ることができる。間接測定には、二次成分（すなわち、そのペプチドまたはポリペプチド自体ではない成分）または生物学的読出し系、たとえば測定可能な細胞応答、リガンド、標識、または酵素反応生成物から得られる信号を測定することが含まれる。

#### 【0063】

本発明によれば、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、試料中のペプチドの量を決定するためのあらゆる既知手段により達成できる。それらの手段には、イムノアッセイ、および標識分子を多様なサンドイッチ、競合その他のアッセイ様式で利用できる方法が含まれる。そのようなアッセイ法は、好ましくは、決定すべきペプチドまたはポリペプチドを特異的に認識する検出剤、たとえば抗体に基づく。検出剤は、ペプチドまたはポリペプチドの存在または非存在の指標となる信号を直接的または間接的に発することができるべきである。さらに、信号強度を、好ましくは試料中に存在するポリペプチドの量に直接的または間接的（たとえば、反比例）に相関させることができる。さらに他の適切な方法は、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、たとえばその厳密な分子質量またはNMRスペクトルを測定することを含む。それらの方法は、好ましくはバイオセンサー、イムノアッセイに連携した光学機器、バイオチップ、分析機器、たとえば質量分析計、NMR分析器、またはクロマトグラフィー機器を含む。さらに、方法にはマイクロプレートELISAベースの方法、全自動またはロボット式イムノアッセイ（たとえば、E l e c s y s（商標）分析器で得られる）、CBA（酵素によるコバルト結合アッセイ(Cobalt Binding Assay)、たとえばR o c h e - H i t a c h i（商標）分析器で得られる）、およびラテックス凝集アッセイ（たとえば、R o c h e - H i t a c h i（商標）分析器で得られる）が含まれる。

10

20

#### 【0064】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、下記のステップを含む：（a）ペプチドまたはポリペプチドの量の指標となる強度の細胞応答を誘発できる細胞を、適切な期間、そのペプチドまたはポリペプチドと接触させ、（b）細胞応答を測定する。細胞応答を測定するために、試料または処理済み試料を、好ましくは細胞培養物に添加し、細胞内または細胞外応答を測定する。細胞応答には、測定可能なレポーター遺伝子発現、または物質、たとえばペプチド、ポリペプチドもしくは小分子の分泌を含めることができる。この発現または物質は、ペプチドまたはポリペプチドの量に相関する強度信号を発すべきである。

30

#### 【0065】

同様に好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、試料中のペプチドまたはポリペプチドから得られる特異的な強度信号を測定するステップを含む。前記のように、そのような信号は、質量スペクトルにみられるペプチドもしくはポリペプチドに特異的な $m/z$ 変数で観察される信号強度、またはペプチドもしくはポリペプチドに特異的なNMRスペクトルであってもよい。

40

#### 【0066】

ペプチドまたはポリペプチドの量の決定は、好ましくは下記のステップを含むことができる：（a）ペプチドを特異的なリガンドと接触させ、（b）（場合により）結合していないリガンドを分離し、（c）結合したリガンドの量を測定する。

#### 【0067】

好ましい態様によれば、これらの接触、分離および測定のステップは、本明細書に開示するシステムの分析ユニットにより実施できる。ある態様によれば、それらのステップは前記システムの単一の分析ユニットにより、または互いに作動可能な状態で連絡する2以上の分析ユニットにより実施できる。たとえば、特定の態様によれば、本明細書に開示す

50

るシステムは、接触および分離のステップを実施するための第1分析ユニット、ならびに第1分析ユニットに輸送ユニット（たとえば、ロボットアーム）によって作動可能な状態で接続して測定ステップを実施する第2分析ユニットを含むことができる。

#### 【0068】

結合したリガンド、特にリガンドまたはリガンド/ペプチド複合体は、強度信号を発するであろう。本発明による結合には、共有結合および非共有結合の両方が含まれる。本発明によるリガンドは、本明細書に記載するペプチドまたはポリペプチドに結合するいずれかの化合物、たとえばペプチド、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、たとえば前記のペプチドまたはポリペプチドに対する受容体または結合パートナー、およびそのフラグメント（前記ペプチドに対する結合ドメインを含むもの）、ならびにアダプター、たとえば核酸アダプターまたはペプチドアダプターが含まれる。そのようなリガンドを作成する方法は当技術分野で周知である。たとえば、適切な抗体またはアダプターの同定または作成は供給業者によっても提供される。当業者は、より高い親和性または特異性を備えたそのようなリガンドの誘導体を開発する方法に精通している。たとえば、核酸、ペプチドまたはポリペプチドにランダム変異を導入することができる。これらの誘導体を、次いで当技術分野で既知のスクリーニング法、たとえばファージディスプレイ法に従って、結合について試験することができる。本明細書中で述べる抗体には、ポリクローナル抗体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を結合できるそのフラグメント、たとえばFv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントが含まれる。本発明には、一本鎖抗体、および目的とする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たヒト化ハイブリッド抗体も含まれる。ドナー配列は通常は少なくともドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むであろうが、ドナー抗体の他の構造関連および/または機能関連アミノ酸残基も含むことができる。そのようなハイブリッドは、当技術分野で周知である幾つかの方法で作成できる。好ましくは、リガンドまたは作用剤は前記のペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合する。本発明による特異的結合は、リガンドまたは作用剤が、分析すべき試料中に存在する他のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質的に結合（それらと“交差反応”）すべきではないことを意味する。好ましくは、特異的に結合されるペプチドまたはポリペプチドは、他のいずれかの関連ペプチドまたはポリペプチドより少なくとも3倍高い、より好ましくは少なくとも10倍高い、よりさらに好ましくは少なくとも50倍高い親和性で結合されるべきである。非特異的結合は、たとえばウェスタンブロット上でのそのサイズに従って、または試料中での相対的に高いその存在量によって、それをなお明白に識別および測定できるならば許容できる。リガンドの結合は、当技術分野で周知であるいずれかの方法により測定できる。好ましくは、その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に適したさらに他の手法を以下に記載する。

#### 【0069】

第1に、リガンドの結合は、直接的に、たとえばNMRまたは表面プラズモン共鳴により測定できる。リガンド結合の測定は、好ましい態様によれば、本明細書に開示するシステムの分析ユニットにより実施される。その後、測定した結合の量を、本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより計算することができる。第2に、リガンドが、目的とする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作用するならば、その酵素反応生成物を測定してもよい（たとえば、プロテアーゼの量は開裂した基質の量をたとえばウェスタンブロットで測定することにより測定できる）。あるいは、リガンドが酵素特性そのものを示す場合があり、その“リガンド/ペプチドまたはポリペプチド”複合体、すなわちそれぞれペプチドまたはポリペプチドが結合したリガンドを、強度信号の発生により検出できる適切な基質と接触させることができる。酵素反応生成物の測定のためには、好ましくは基質の量は飽和状態である。反応前に基質を検出可能な標識で標識化することもできる。好ましくは、適切な期間、試料を基質と接触させる。適切な期間は、検出可能な、好ましくは測定可能な量の生成物が生成するのに必要な時間を表わす。

生成物の量を測定する代わりに、特定の（たとえば、検出可能な）量の生成物が出現するのに必要な時間を測定することができる。第3に、リガンドを検出および測定できる標識にリガンドを共有結合または非共有結合させてもよい。標識化は、直接法または間接法により実施できる。直接標識化は、標識をリガンドに直接（共有または非共有）結合させることを伴う。間接標識化は、二次リガンドを一次リガンドに（共有または非共有）結合させることを伴う。二次リガンドは一次リガンドに特異的に結合すべきである。この二次リガンドは適切な標識とカップリングさせることができ、および/または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、三次またはよりさらに高次のリガンドの使用は、信号を増強するためにしばしば採用される。適切な二次およびより高次のリガンドには、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.）を含めることができる。リガンドまたは基質に、当技術分野で既知である1以上のタグを“タグ付け”することもできる。その際、そのようなタグはより高次のリガンドにとってのターゲットであってもよい。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-ヘマグルチニン（HA）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。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、適切な検出法により検出できるいずれかの標識である。代表的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダン(acridan)エステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁性標識（たとえば、“磁性ビーズ”；常磁性および超常磁性標識を含む）、および蛍光標識が含まれる。酵素活性標識には、たとえば西洋わさびペルオキシダーゼ、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（4-ニトロブルー-トラゾリウムクロリドおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート；既製原液としてRoche Diagnosticsから入手できる）、CDP-Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）が含まれる。適切な酵素-基質の組み合わせは、有色反応生成物、蛍光または化学発光を生じることができ、それらを当技術分野で既知の方法に従って測定できる（たとえば、感光性フィルムまたは適切なカメラシステムを用いて）。酵素反応の測定については、前記に挙げた基準を同様に適用する。代表的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（たとえば、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（たとえば、Alexa 568）が含まれる。さらに他の蛍光標識を、たとえばMolecular Probes（オレゴン州）から入手できる。蛍光標識としての量子ドットの使用も考慮される。代表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などが含まれる。放射性標識は、いずれか既知の適切な方法、たとえば感光性フィルムまたはホスフォイメージャー(phosphor imager)により検出できる。本発明による適切な測定法には、下記のものも含まれる：沈降法（特に免疫沈降法）、電気化学発光（電氣的に発生する化学発光）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、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(electrochemiluminescence sandwich immunoassay)（ECLIA）、解離増強型ランタニド蛍光イムノアッセイ(dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay)（DELFA）、シンチレーション近接アッセイ（SPA）、タービディメトリー（濁度測定）、ネフェロメトリー（比濁分析）、ラテックス増強型タービディメトリーもしくはネフェロメトリー、または固相免疫試験。当技術分野で周知であるさらに他の方法（たとえば、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法、および質量分析）を、単独で、または前記の標識法もしくは他の検出法と組み合わせで使用できる。

【0070】

10

20

30

40

50

ペプチドまたはポリペプチドの量は、同様に好ましくは下記により決定できる：(a) 前記に明記した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、その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から選択されるリガンドは、好ましくは固体支持体に固定化された形態で存在する。固体支持体を作成するための材料は当技術分野で周知であり、特に市販のカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンのチップおよび表面、ニトロセルロースのストリップ、膜、シート、デュラサイト(duracyte)、反応トレーのウェルおよび壁、プラスチックチューブなどを含む。リガンドまたは作用剤を多種多様なキャリアーに結合させることができる。周知のキャリアーの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、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、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱が含まれる。本発明の目的に関して、キャリアーの性質は可溶性または不溶性のいずれであってもよい。それらのリガンドを固定/固定化するのに適した方法は周知であり、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用などが含まれるが、これらに限定されない。本発明に従ってアレイとして“懸濁アレイ”を用いることも考慮される(Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1): 9-12)。そのような懸濁アレイには、キャリアー、たとえばマクイロビーズまたはマイクロスフェアが懸濁状態で存在する。アレイは、種々のリガンドを保有する、おそらく標識された種々のマクイロビーズまたはマイクロスフェアからなる。そのようなアレイを調製する方法、たとえば固相化学および光不安定保護基に基づくものが一般に知られている(US 5,744,305)。

10

20

30

40

50

#### 【0071】

本明細書中で用いる用語“量”は、ポリペプチドまたはペプチドの絶対量、そのポリペプチドまたはペプチドの相対量または濃度、およびそれらに相関するかまたはそれらから誘導できるいずれかの数値またはパラメーターを包含する。そのような数値またはパラメーターは、それらのペプチドから直接測定により得られるあらゆる特異的な物理的または化学的特性からの強度信号値、たとえば質量スペクトルまたはNMRスペクトルにおける強度値を含む。さらに、本明細書の他の箇所に明記する間接測定により得られるすべての数値またはパラメーター、たとえばペプチドに応答した生物学的読出し系から決定される応答レベル、または特異的に結合したリガンドから得られる強度信号が包含される。前記の量またはパラメーターに相関する数値はあらゆる標準的数学操作によっても得られることを理解すべきである。本発明の好ましい態様によれば、“量”の決定は開示するシステムにより行なわれ、それによればそのシステムの1以上の分析ユニットにより実施される接触および測定のスレッドに基づいてコンピューティングデバイスが“量”を決定する。

#### 【0072】

本明細書中で用いる用語“比較する”は、分析すべき試料が含むペプチドまたはポリペプチドの量を、本明細書の他の箇所に明記する適切な基準源と比較することを包含する。本明細書中で用いる比較するとは、対応するパラメーターまたは数値の比較を表わすことを理解すべきである；たとえば、絶対量を絶対基準量と比較し、一方で濃度を基準濃度と比較し、あるいは検査試料から得られる強度信号を標準試料の同じタイプの強度信号と比較する。本発明方法のステップ(b)に述べる比較は、手動で、またはコンピューター支援により実施できる。したがって、本発明方法のステップ(b)に述べる比較は、(たとえば、本明細書に開示するシステムの)コンピューティングデバイスにより実施できる。たとえば量の数値と基準を互いに比較し、その比較は、比較のためのアルゴリズムを実行するコンピュータープログラムによって自動的に実施できる。その評価を行なうコンピュータープログラムは、目的とする評価を適切な出力フォーマットで提供するであろう。コンピューター支援による比較のために、決定した量の数値を、データベースに記憶された適切な基準に対応する数値とコンピュータープログラムにより比較することができる。コンピュータープログラムはさらに比較の結果を評価することができ、すなわち目的とする

評価を適切な出力フォーマットで自動的に提供する。コンピューター支援による比較のために、決定した量の数値を、データベースに記憶された適切な基準に対応する数値とコンピュータープログラムにより比較することができる。コンピュータープログラムはさらに比較の結果を評価することができ、すなわち目的とする評価を適切な出力フォーマットで自動的に提供する。その結果は、好ましくは、被検体における心不全治療をガイドするための補助として採用できる。

**【 0 0 7 3 】**

ステップ a) で決定した量と基準量の比較に基づいて、被検体が心不全治療を継続できるかどうか、あるいは心不全治療を強化すべきかどうかを評価できるであろう。たとえば、比較の結果を生データ（絶対量または相対量）として、またある場合には特定の評価を指示できる言語、字句、記号または数値の形の指標として得ることができる。したがって、比較した量の差または同一性により、心不全治療を継続できる被検体グループに属する被検体または心不全治療を強化すべき被検体を同定できるように、基準量を選定すべきである。この評価は、本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより、計算“量”と基準量または閾値との比較に基づいて得ることができる。たとえば、システムのコンピューティングデバイスは、評価を指示する言語、記号または数値の形の指標を提供できる。本明細書中で用いる量の差、すなわち増加または減少は、好ましくは統計学的に有意の差である。差が統計学的に有意であるかどうかは、本明細書の他の箇所に述べる統計学的手法により決定できる。同様に、量の同一性は、同一の量、および統計学的に有意ではなく測定したパラメーターについての標準偏差内にある量の差を包含する。

10

20

**【 0 0 7 4 】**

本明細書中で用いる用語“基準量”は、被検体を ( i ) 心不全治療を継続できる被検体のグループまたは ( i i ) 心不全治療を強化すべき被検体のグループのいずれかに配属できる量を表わす。個々の被検体に適用できる基準量は、種々の生理学的パラメーター、たとえば年齢、性別または亜集団に応じて、および本明細書中で述べ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、異なる可能性がある。適切な基準量は、検査試料と一緒に、すなわち同時または逐次に分析される標準試料から決定できる。

**【 0 0 7 5 】**

好ましくは、1つのバイオマーカー、すなわち心臓トロポニンまたは B N P タイプのペプチドを決定する場合、下記の診断アルゴリズムを適用する：

30

原則として、被検体からの試料において基準量と比較して増加したバイオマーカー量は心不全治療を強化すべきであることの指標であり、その際、被検体からの試料において基準量と比較して減少したバイオマーカー量は心不全治療を強化すべきではないことの指標である。

**【 0 0 7 6 】**

好ましくは、2つのバイオマーカー、すなわち心臓トロポニンおよび B N P タイプのペプチドを決定する場合、下記の診断アルゴリズムを適用する：

好ましくは

- ・被検体からの試料において基準量（それぞれ、B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニンについて）と比較して両方とも増加した B N P タイプのペプチドの量および心臓トロポニンの量は、心不全治療を強化すべきであることの指標である；

40

- ・被検体からの試料において B N P タイプのペプチドについての基準量と比較して増加した B N P タイプのペプチドの量、または心臓トロポニンのペプチドについての基準量と比較して増加した心臓トロポニンの量は、心不全治療を強化すべきであることの指標である；

- ・被検体からの試料において基準量（それぞれ、B N P タイプのペプチドおよび心臓トロポニンについて）と比較して両方とも減少した B N P タイプのペプチドの量および心臓トロポニンの量は、心不全治療を強化すべきではないことの指標である。

**【 0 0 7 7 】**

好ましい基準量を本明細書中で後記に示す。

50

基準量は、原則として、前記に明記した被検体のコホートについて、特定のバイオマーカーについての平均値または中央値に基づいて、統計学の標準法を適用することにより計算できる。さらに、基準量（単数または複数）は、（i）心不全治療の強化を必要とすることが分かっている被検体もしくは被検体グループ、および/または（ii）心不全治療の強化を必要としないことが分かっている被検体もしくは被検体グループからのものであることを想定する。

【0078】

好ましくは、下記を診断アルゴリズムとして適用する：

好ましくは、本明細書中で述べるバイオマーカーについての、すなわち心臓トロポニンおよび/またはBNPタイプのペプチドについての基準量は、心不全療法の強化を必要とする

10

、  
・検査試料において両マーカーについての基準量と比較して増加した両マーカー量、および/または検査試料において両マーカーについての基準量と比較して本質的に同一である両マーカー量、あるいは

・検査試料において基準量と比較して増加した、または本質的に同一である、心臓トロポニンの量またはBNPタイプのペプチドの量は、心不全療法の強化を必要とする被検体の指標である。

【0079】

さらに、または代わりに、本明細書中で述べるバイオマーカーについての、すなわち心臓トロポニンおよび/またはBNPタイプのペプチドについての基準量は、心不全治療の強化を必要としないことが分かっている被検体もしくは被検体グループから、したがって治療計画を変更せずに心不全治療を継続できる被検体もしくは被検体グループから得られ、その際、検査試料において基準量と比較して減少した両マーカー量、および/または検査試料において両マーカーについての基準量と比較して本質的に同一である両マーカー量は、心不全療法の強化を必要としない、したがって心不全治療を継続できる（特に、治療計画を変更せずに）被検体の指標である。

20

【0080】

本発明方法の好ましい態様において、本方法はGDF-15（増殖分化因子15）の量の決定を包含しない。本発明に関して、GDF-15を決定しなくても、心臓トロポニンおよびBNPタイプのペプチドの決定に基づいて信頼性をもって心不全治療をガイドできることが示された。

30

【0081】

本発明の方法に関して適用される好ましい基準量は、実施例に記載するものである。好ましい基準量は、BNPについて約100pg/ml、NT-proBNPについて約1000pg/ml、トロポニンTについて約23.5pg/ml、トロポニンIについて約50pg/mlである。

【0082】

好ましくは、本明細書中で用いる用語“約”は、特定の量に対比して±20%の範囲、より好ましくは±10%の範囲、よりさらに好ましくは±5%の範囲、最も好ましくは±2%の範囲を包含する；たとえば、“約100”の量という表記は、80から120までの範囲の量を包含するものとする。用語“約”はその厳密な量をも表わす。

40

【0083】

本発明方法の結果に応じて、すなわちその被検体が心不全療法の強化を必要とするか否かに応じて、さらなるステップを実施できる。前記に既に述べたように、被検体のさらなるモニタリングに関して決定を行なうことができる。好ましくは、心不全治療の強化を必要とする被検体は短い間隔でのモニタリングをも必要とし、これに対し、心不全治療の強化を必要としない被検体は短い間隔でのモニタリングも必要としない（したがって、長い間隔でモニターすればよい）。

【0084】

50

好ましくは、被検体、すなわち被検体の心不全治療は、その被検体からの少なくとも1つのさらなる試料において、本明細書中で述べるバイオマーカーの量を決定することによりモニターされる。本発明方法（すなわち、ステップ a）および b））の結果に応じて、さらなる試料を、好ましくはステップ a）に述べた試料の後に短い間隔後または長い間隔後に入手する。

【0085】

したがって、本発明の方法は、下記のさらなるステップを含む：

c) 被検体からのさらなる試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

d) そのさらなる試料におけるBNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、そのさらなる試料における心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する。

【0086】

ステップ c) に述べたさらなる試料は、ステップ a) に述べた試料の後に得られたものでなければならない。

ステップ d) に関する基準量および診断アルゴリズムは、好ましくはステップ b) についてのもと同じである。

【0087】

ステップ c) および d) を実施することにより、心不全に罹患している被検体が心不全治療の強化/さらなる強化を必要とするかどうかの評価される。

好ましくは、被検体が心不全療法の強化を必要とする（本発明方法のステップ a）および b）による）場合、ステップ c) および d) を実施する。この場合、さらなるステップ c) および d) により、その被検体が心不全治療のさらなる強化を必要とするかどうかを評価することが可能になる。

【0088】

しかし、被検体が心不全療法の強化を必要としない（本発明方法のステップ a）および b）による）場合にも、ステップ c) および d) を実施してもよい。この場合、さらなるステップ c) および d) により、その被検体が心不全治療の強化を必要とするかどうかを評価することが可能になる。

【0089】

被検体が - 本発明方法のステップ a) および b) に従って - 心不全療法の強化を必要とする場合、好ましくは下記を適用する：好ましくは、上記に述べたさらなる試料はステップ a) に述べた試料の2週～4か月後に入手されたものである。より好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の4週～3か月後に入手されたものである。よりさらに好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の2週～2か月後に入手されたものである。最も好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の約6週後に入手されたものである。上記の期間/間隔を短い間隔とみなす。

【0090】

好ましくは、心臓トロポニンおよびBNPタイプのペプチドの量が基準量より低くなるまで、上記の間隔でステップ c) および d) を反復する。これは、被検体が心不全の強化を必要としない、すなわち心不全のさらなる強化を必要としないことの指標となる。この場合、次の節に述べる間隔でステップ c) および d) を反復する。

【0091】

被検体が - 本発明方法のステップ a) および b) に従って - 心不全療法の強化を必要としない場合、好ましくは下記を適用する：好ましくは、上記に述べたさらなる試料はステップ a) に述べた試料の3か月～12か月後に入手されたものである。より好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の4か月～10か月後に入手されたものである。よりさらに好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の5か月～9か月後に入手されたものである。最も好ましくは、さらなる試料はステップ a) に述べた試料の6～8か月後に入手されたものである。上記の期間/間隔を長い間隔とみなす。

10

20

30

40

50

## 【0092】

本発明のある観点においては、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための方法が考慮され、この方法は下記を含む：

a) 被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を下記により決定する：i) 試料と、BNPタイプの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とを、その検出剤と試料からのマーカ-との複合体を形成させるのに十分な期間接触させ、ii) 形成された複合体の量を測定し、その際、形成された複合体の量は試料中に存在するマーカ-の量に比例する、ならびにiii) 形成された複合体の量を、試料中に存在するマーカ-の量を反映するマーカ-量に換算する；

b) それらの量を基準量と比較する；ならびに

c) ステップb)で行なった比較の結果に基づいて、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための補助を確立する。

## 【0093】

本発明の他の観点においては、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための補助を確立する、下記を含むシステムが考慮される：

a) 試料と、BNPタイプの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とを、その検出剤と試料からのマーカ-との複合体を形成させるのに十分な期間接触させよう構成された分析ユニット；

b) 形成された複合体の量を測定するために適合させた分析ユニット；その際、形成された複合体の量は試料中に存在するマーカ-の量に比例する；

c) プロセッサを備え、かつ前記の分析ユニット類と作動可能な状態で連絡した、コンピューティングデバイス；および

d) プロセッサが実行できる複数の指令、すなわち実行した際に、形成された複合体の量を試料中のマーカ-の量を反映するマーカ-量に換算し、それらの量を基準量と比較し、その基準量との比較の結果に基づいて心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための補助を確立する指令を含む、非一過性の機械可読媒体。

## 【0094】

適切な検出剤、すなわち本発明の方法により検査すべき被検体からの試料中のBNPタイプのペプチドに結合する検出剤または心臓トロポニンに結合する検出剤は、ある観点において、少なくとも1種類のマーカ-に特異的に結合する抗体であってもよい。適用できる他の検出剤は、ある観点において、マーカ-に特異的に結合するアプタマーであってもよい。さらなる観点において、検出剤とマーカ-の間に形成された複合体から、形成された複合体の測定前に試料を分離する。したがって、ある観点において、検出剤を固体支持体に固定化することができる。さらなる観点において、洗浄溶液の適用により、固体支持体上に形成された複合体から試料を分離することができる。形成された複合体は試料中に存在する少なくとも1種類のマーカ-の量に比例すべきである。適用する検出剤の特異度および/または感度が試料に含まれる特異的に結合できる少なくとも1種類のマーカ-の比例度を規定することは理解されるであろう。決定を実施できる方法についてのさらなる詳細も本明細書の他の箇所にある。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種類のマーカ-の量に換算すべきである。そのような量は、ある観点において、本質的に試料中に存在する量であってもよく、あるいは他の観点において、形成された複合体と元の試料中に存在する量の間に関係があるためその一定割合の量であってもよい。

## 【0095】

前記方法のさらなる観点において、ステップa)は分析ユニットにより、ある観点において本明細書の他の箇所定める分析ユニットにより実施できる。

本発明方法のある観点において、ステップa)で決定した量を基準量と比較する。ある観点において、基準量は本明細書の他の箇所定める基準量である。さらに他の観点において、基準は、複合体の測定量と元の試料中に存在する量との比例関係を考慮に入れる。

10

20

30

40

50

したがって、本発明方法のある観点において適用する基準は、用いた検出剤の限界を反映するように採用された人為的基準である。他の観点において、比較を実施する際に、決定量の数値と基準を実際に比較する前に決定量についての正規化および/または補正計算のステップを含めることにより、その関係を考慮に入れることもできる。この場合も、決定量についての正規化および/または補正計算のステップは、用いた検出剤の限界が適正に反映されるように比較ステップを採用する。ある観点において、比較は自動的に、たとえばコンピューターシステムなどにより支援して実施される。

【0096】

心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための補助は、本明細書の他の箇所に述べるように、ステップb)で実施した比較に基づいて、療法強化を必要とする被検体グループまたは必要としない被検体グループのいずれかに被検体を配属することにより確立される。既に本明細書の他の箇所で考察したように、検査した被検体の配属は検査した症例の100%において正確でなければならないわけではない。さらに、検査した被検体が配属される被検体グループは、それらが統計学的考慮、すなわち本発明の方法をそれに基づいて操作すべき一定の前選択した尤度(degree of likelihood)に基づいて確立されるという点で、人為的グループである。本発明のある観点において、本明細書に記載および開示するように、リスク評価を最適化するための補助は自動的に、たとえばコンピューティングデバイスなどにより支援して確立される。

10

【0097】

本発明方法のある観点において、本方法はさらに、本明細書の他の箇所に詳細に述べるようにステップc)で確立された結果に従って被検体を推奨および/または管理し、ならびに/あるいは疾患モニタリングの強さを適合させるステップを含む。

20

【0098】

前記方法のある観点において、ステップb)および/またはc)は、本明細書の他の箇所に述べる1以上の分析ユニットにより実施される。

本発明には、心不全治療を受けている患者において心不全治療を強化する方法も含まれる：

a) 被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

b) BNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する；

30

c) 被検体を心不全治療の強化が必要であると同定する；ならびに

d) その被検体において心不全治療を強化する。

【0099】

心不全治療の強化を必要とする被検体の同定は、前記方法のステップb)で実施した比較の結果に基づく。心不全治療の強化を必要とする被検体を同定する方法は、本明細書の他の箇所に記載されている。ある態様において、心臓トロポニンについての基準量より多い心臓トロポニンの量、および/またはBNPタイプのペプチドについての基準量より多いBNPタイプのペプチドの量は、その被検体が心不全治療の強化を必要とすることの指標である。

40

【0100】

本発明は、心不全治療をガイドするための、心不全に罹患している被検体からの試料における、i) BNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの使用、あるいはii) BNPタイプの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の使用に関する。

【0101】

本明細書中で用いる用語“検出剤”は、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)を特異的に認識してそれに結合することができる作用剤を表わす。さらに、検出剤は、その検出剤とバイオマーカーにより形成された複合体の直接検出または間接検出を可能にするものでなければならない。直接検出は、その検出剤に検出可能な標

50

識を含有させることにより達成できる。間接標識化は、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作用剤により達成でき、その際、このさらなる作用剤は検出可能な信号を発することができるものである。検出剤として使用できる適切な化合物は当技術分野で周知である。好ましくは、検出剤はバイオマーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーである。用語“抗体”は本明細書の他の箇所に記載されている。

#### 【0102】

本発明の好ましい態様によれば、本発明の方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイスが提供される：

a) BNPタイプの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を含む分析ユニットであって、心不全に罹患している被検体からの試料においてそれらのマーカーの量を決定するために適合させた分析ユニット；ならびに

b) 決定した量を基準量と比較してそれにより心不全治療をガイドするための分析ユニットであって、基準量を備えたデータベースおよび比較を実施するためのアルゴリズムを含む分析ユニット。

#### 【0103】

好ましくは、アルゴリズムはコンピューター実装されている。

好ましい基準量およびアルゴリズムは本明細書の他の箇所に開示されている。

本発明の好ましい態様は、心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするためのシステムを含む。システムの例には、化学反応もしくは生物反応の結果を検出するために、または化学反応もしくは生物反応の進行をモニターするために用いられる、臨床化学分析計、凝固化学分析計、免疫化学分析計、尿分析計、核酸分析計が含まれる。より具体的には、本発明の代表的システムには、RocheのEleclys(商標)システムおよびCobas(登録商標)eイムノアッセイ分析計、AbbottのArchitect(商標)およびAxSYM(商標)分析計、SiemensのCentaur(商標)およびImmulite(商標)分析計、ならびにBeckman CoulterのUniCell(商標)およびAccess(商標)分析計などを含めることができる。

#### 【0104】

システムの態様には、本明細書の開示内容を実施するために用いる1以上の分析ユニットを含めることができる。本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、既知のように有線接続、Bluetooth(登録商標)、LANs、または無線信号のいずれかにより、本明細書に開示するコンピューティングデバイスと作動可能な状態で連絡している。さらに、本明細書の開示によれば、分析ユニットは、診断の目的で試料の検出、たとえば定性および/または定量評価の一方または両方を実施する独立型装置またはより大型機器内のモジュールを含むことができる。たとえば、分析ユニットは試料および/または試薬のピペティング、投入、混合を実施または支援することができる。分析ユニットは、アッセイを行なう試薬を保持するための試薬保持ユニットを含むことができる。試薬は、たとえば個々の試薬または一群の試薬を収容した容器またはカセットの形態で、貯蔵コンパートメントまたはコンベヤー内の適宜な受器または位置に置いた状態で配置することができる。検出試薬は、試料と接触させる固体支持体に固定化された形態であってもよい。さらに、分析ユニットは処理および/または検出の構成要素を含むことができ、それを個々の分析に最適化できる。

#### 【0105】

ある態様によれば、分析ユニットは、試料について分析物、たとえばマーカーを光学検出するために構成できる。光学検出のために構成された代表的な分析ユニットは、電磁エネルギーを電気信号に変換するために構成されたデバイスを含み、それには単一素子および多重素子の両方またはアレイ状の光学検出器が含まれる。本明細書の開示によれば、光学検出器は光電磁信号をモニターし、そして光路に配置された試料中の分析物の存在および/または濃度の指標となる電氣的な出力信号または応答信号をベースライン信号に対比して提供することができる。そのようなデバイスには、たとえば下記のものも含めることができる：アバランシェフォトダイオード(avalanche photodiode)を含むフォトダイオー

10

20

30

40

50

ド、フォトトランジスター、光伝導検出器、リニアセンサーアレイ、CCD検出器、CMOSアレイ検出器を含むCMOS検出器、光電子増倍管、および光電子増倍管アレイ。特定の態様によれば、光学検出器、たとえばフォトダイオードまたは光電子増倍管は、信号の調整または処理用の追加エレクトロニクスを含むことができる。たとえば、光学検出器は少なくとも1つの前置増幅器、フィルター回路、または集積回路を含むことができる。適切な前置増幅器には、たとえば積分型、トランスインピーダンス型、および電流利得型(current gain)(カレントミラー(current mirror))の前置増幅器が含まれる。

【0106】

さらに、本明細書の開示による1以上の分析ユニットは、光を発するための光源を含むことができる。たとえば、分析ユニットの光源は、検査試料について分析物濃度を測定するための、またはエネルギー移動(たとえば、蛍光共鳴エネルギー移動による、または酵素の触媒作用による)を可能にするための、少なくとも1つの発光素子(たとえば、発光ダイオード、電源付き輻射線源、たとえば白熱電球、エレクトロルミネセントランプ、気体放電ランプ、高輝度放電ランプ、レーザー)からなることができる。

10

【0107】

さらに、このシステムの分析ユニットは、1以上の保温ユニット(たとえば、試料または試薬を、特定した温度または温度範囲に保持するためのもの)を含むことができる。ある態様において、分析ユニットは、試料に反復温度サイクルを施してその試料について増幅生成物の量の変化をモニターするためのサーモサイクラー(リアルタイムサーモサイクラーを含む)を含むことができる。

20

【0108】

さらに、本明細書に開示するシステムの分析ユニットは、反応器またはキュベットへの供給ユニットを含むことができ、あるいはそれに作動可能な状態で接続していてもよい。代表的な供給ユニットには、試料および/または試薬を反応器へ送達するための液体操作ユニット、たとえばピペティングユニットが含まれる。ピペティングユニットは、再利用可能な可洗ニードル、たとえばスチールニードル、または使い捨てピペットチップを含むことができる。分析ユニットは、さらに1以上の混合ユニット、たとえば液体を入れたキュベットを振とうするためのシェーカー、またはキュベットもしくは試薬容器内の液体を混合するための混合パドルを含むことができる。

30

【0109】

以上から、本明細書の開示内容のある態様によれば、本明細書に開示および記載した方法の幾つかのステップの一部をコンピューティングデバイスにより実施できることが分かる。コンピューティングデバイスは、たとえば汎用コンピューターまたはポータブルコンピューティングデバイスであってもよい。本明細書に開示する方法の1以上のステップを実施するために、多数のコンピューティングデバイスを、たとえばネットワークまたは他のデータ移送方法を介して一緒に使用することも理解すべきである。代表的なコンピューティングデバイスには、デスクトップコンピューター、ラップトップコンピューター、パーソナルデータアシスタント(personal data assistant) (“PDA”)、たとえばBLACKBERRY銘柄のデバイス、セル方式デバイス、タブレットコンピューター、サーバーなどが含まれる。一般に、コンピューティングデバイスは複数の指令(たとえば、ソフトウェアのプログラム)を実行できるプロセッサを含む。

40

【0110】

コンピューティングデバイスはメモリーにアクセスできる。メモリーはコンピューター可読媒体であり、単一記憶デバイスまたは多重記憶デバイスを含むことができ、それらはコンピューティングデバイスと共に局所に配置され、あるいはたとえばネットワークを介してコンピューティングデバイスにアクセス可能であってもよい。コンピューター可読媒体はコンピューティングデバイスがアクセスできる入手可能ないかなる媒体であってもよく、これには持久性(volatile)および非持久性(non-volatile)の両方の媒体が含まれる。さらに、コンピューター可読媒体はリムーバブル媒体および非リムーバブル媒体のうち的一方または両方であってもよい。たとえば、限定ではなく、コンピューター可読媒体はコ

50

ンピューター記憶媒体を含むことができる。代表的なコンピューター記憶媒体には下記のものが含まれるが、それらに限定されない：RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリまたは他のいずれかの記憶テクノロジー、CD-ROM、デジタル多目的ディスク(Digital Versatile Disk)(DVD)もしくは他の光ディスク記憶媒体、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶デバイスもしくは他の磁気記憶デバイス、またはコンピューティングデバイスによりアクセスしてコンピューティングデバイスのプロセッサにより実行できる複数の指令を記憶させるために使用できる他のいずれかの媒体。

#### 【0111】

本明細書の開示内容の態様によれば、ソフトウェアは、コンピューティングデバイスのプロセッサにより実行された際に本明細書に開示する方法の1以上のステップを実施できる指令を含むことができる。ある指令は、他の機械の操作を制御する信号を発するように適合させることができ、こうしてそれらの制御信号によりコンピューター自体から遠く離れた資料を変換する操作を行なうことができる。これらの記述および表現は、データ処理技術分野の専門家が、たとえば彼らの作業の内容を最も効率的に他の当業者へ伝達するために用いる手段である。

10

#### 【0112】

複数の指令は、目的とする結果を導く自己矛盾しない一連のステップであると一般に考えられるアルゴリズムをも含むことができる。これらのステップは、理学的量の理学的操作を必要とするものである。通常は(必ずしもそうではないが)これらの量は、記憶、転送、変換、結合、比較その他の形で操作できる電氣的または磁氣的なパルスまたは信号の形をとる。それは時には、主に、これらの信号をそのような信号が出現または発生する理学的な事項または発現に対する基準としての数値、文字、ディスプレイデータ、番号などとして表わすための共用化という理由で、好都合になる。ただし、これらおよび類似の用語はすべて適宜な理学的量と関連づけるべきものであり、ここではこれらの量に適用される好都合なラベルとして用いられるにすぎないことを留意すべきである。本明細書の開示内容のある態様によれば、本明細書に開示する1種類以上のマーカの決定量と適切な基準との比較を実施するためのアルゴリズムは、指令を実行することによって具体化および実施される。それらの結果を、パラメトリック診断生データの出力として、または絶対量もしくは相対量として得ることができる。本明細書に開示するシステムの多様な態様によれば、“診断”は本明細書に開示するシステムのコンピューティングデバイスにより、計算“量”と基準または閾値との比較に基づいて提供できる。たとえば、あるシステムのコンピューティングデバイスは、特定の診断を指示する言語、記号または数値の形の指標を提供できる。

20

30

#### 【0113】

コンピューティングデバイスは、出力デバイスにもアクセスできる。代表的な出力デバイスには、たとえばファックス機、ディスプレイ、プリンター、およびファイルが含まれる。本明細書の開示内容のある態様によれば、コンピューティングデバイスは本明細書に開示する方法の1以上のステップを実施し、その後、本方法の結果、指示、比または他のファクターに関係する出力を出力デバイスにより提供することができる。

#### 【0114】

最後に、本発明は、好ましくは本発明の方法を実施するために適合させたキットであって、心臓トロポニンに特異的に結合する検出剤およびBNPタイプのペプチドに特異的に結合する検出剤、標準品、ならびにその方法を実施するための指示を含む、キットに関する。

40

#### 【0115】

本明細書中で用いる用語“キット”は、前記構成要素の集合体であって、好ましくは個別に、または単一容器内で提供されるものを表わす。容器は本発明の方法を実施するための指示をも含む。これらの指示は、マニュアルの形であってもよく、あるいはコンピューターまたはデータ処理デバイスに実装した際に本発明の方法において述べた比較を実施してそれに従って診断を確立することができるコンピュータープログラムコードにより提供

50

されてもよい。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体もしくはデバイス、たとえば光学記憶媒体（たとえば、コンパクトディスク）上に、または直接にコンピューターもしくはデータ処理デバイス上に提供されてもよい。さらにキットは、本明細書中で前記に定めた基準のための少なくとも1つの標準品、すなわち基準量となる前決定量のSP-Bペプチドポリペプチドを含む溶液を含むであろう。そのような標準品は、たとえば急性心血管事象の症状を示し、かつ肺合併症に罹患している被検体もしくは被検体グループ、または急性心血管事象の症状を示し、肺合併症に罹患していない被検体もしくは被検体グループ、または臨床的に明らかに健康な被検体もしくはそのグループからのSP-Bペプチドの量を表わすことができる。

【0116】

ある態様において、本明細書に開示するキットは、開示された方法を実施するための少なくとも1つの構成要素、またはパッケージされた組み合わせの構成要素類を含む。“パッケージされた組み合わせ”とは、それらのキットが本明細書に開示する1以上の構成要素、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）、指示などの組み合わせを収容した単一のパッケージを備えていることを意味する。単一の容器を収容したキットも“パッケージされた組み合わせ”の定義に含まれる。ある態様において、キットは少なくとも1種類のプローブ、たとえば抗体（本明細書に開示するバイオマーカーのエピトープに対して特異的な親和性をもつもの）を含む。たとえば、キットは、蛍光体で標識した抗体、または融合タンパク質のメンバーである抗体を含むことができる。キットにおいて、プローブは固定化されていてもよく、特定のコンホメーションで固定化されていてもよい。たとえば、固定化されたプローブは、ターゲットタンパク質を特異的に結合するために、試料中のターゲットタンパク質を検出するために、および/またはターゲットタンパク質を試料から分離するために、キットに備えることができる。

【0117】

ある態様によれば、キットは少なくとも1つの容器内に少なくとも1種類のプローブを含み、それは固定化されていてもよい。キットは1以上の容器内に複数のプローブを含むこともでき、それらは固定化されていてもよい。たとえば、複数のプローブが、たとえば単一の容器内または別個の容器内（その際、各容器は単一のプローブを収容している）に存在することができる。

【0118】

ある態様において、キットは1種類以上の固定化されていないプローブおよび1以上の固体支持体（固定化されたプローブを含むもの、または含まないもの）を含むことができる。そのようなある態様は、1種類以上のプローブを固体支持体に固定化するのに必要な試薬および補充用品の一部または全部、あるいは固定化されたプローブを試料中の特定のタンパク質に結合させるのに必要な試薬および補充用品の一部または全部を含むことができる。

【0119】

特定の態様において、単一プローブ（同一プローブの複数コピーを含む）を単一の固体支持体に固定化し、単一容器に入れて提供することができる。他の態様において、それぞれ異なるターゲットタンパク質または異なる形態の単一のターゲットタンパク質（たとえば、特異的エピトープ）に対して特異的な2種類以上のプローブを、単一容器に入れて提供する。そのようなある態様において、固定化されたあるプローブを複数の異なる容器に入れて提供することができる（たとえば、1回用形態）、あるいは複数種類の固定化されたプローブを複数の異なる容器に入れて提供することができる。さらなる態様において、プローブ類を複数の異なるタイプの固体支持体に固定化することができる。固定化されたプローブ（単数または複数）と容器（単数または複数）のいかなる組み合わせも本明細書に開示するキットについて考慮され、その組み合わせはいずれも目的用途に適したキットを達成するように選択できる。

【0120】

キットの容器は、たとえばプローブ（たとえば、抗体）、対照、緩衝液、および試薬（たとえば、コンジュゲートおよび/または基質）を含めた本明細書に開示する1以上の構成要素をパッケージおよび/または収容するのに適したいかなる容器であってもよい。適切な材料にはガラス、プラスチック、厚紙その他の紙製品、木材、金属、およびそのいずれかのアロイが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、容器は固定化されたプローブ（単数または複数）を完全に包み込んでもよく、あるいは粉塵、油などによる汚染、および露光を最小限に抑えるために、プローブを覆うだけでもよい。あるさらなる態様において、キットは単一の容器または複数の容器を含むことができ、複数の容器が存在する場合、各容器は他のすべての容器と同一であってもよく、他の容器と異なってもよく、あるいは他のすべての容器ではなく一部の容器と異なってもよい。

10

## 【0121】

本発明の態様

以下に本発明の態様を開示する。前記の定義および説明を、必要な変更を加えて適用する。

## 【0122】

1. 心不全に罹患している被検体において心不全治療をガイドするための、特に心不全治療の強化に適格な被検体を同定するための方法であって、下記のステップを含む方法：

a) 被検体からの試料においてBNPタイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

b) BNPタイプのペプチドの量をBNPタイプのペプチドについての基準量と比較し、心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較し、それにより心不全治療をガイドし、特にそれにより心不全治療の強化を必要とする被検体を同定する。

20

## 【0123】

2. 心不全治療が、利尿薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体遮断薬、ベータ遮断薬およびアルドステロンアンタゴニストからなる群から選択される少なくとも1種類の医薬の投与を含み、特に心不全治療がベータ遮断薬とACE阻害薬の組み合わせ投与を含む、態様1の方法。

## 【0124】

3. 被検体がヒトである、態様1または2の方法。

4. 試料の入手前に被検体が心不全症状の悪化を経験しておらず、特に試料の入手前3か月の期間内に被検体が心不全症状の悪化を経験していない、態様1～3のいずれか1つの方法。

30

## 【0125】

5. 試料が血液、血清または血漿の試料である、態様1～4のいずれか1つの方法。

6. BNPタイプのペプチドがBNPもしくはNT-proBNPであり、および/または心臓トロポニンがトロポニンTである、態様1～5のいずれか1つの方法。

## 【0126】

7. 心臓トロポニンがトロポニンTであれば心臓トロポニンについての基準量は約23.5 pg/mlの量であり、BNPタイプのペプチドがBNPであればBNPタイプのペプチドについての基準量は約100 pg/mlであり、および/またはBNPタイプのペプチドがNT-proBNPであればBNPタイプのペプチドについての基準量は約1000 pg/mlである、態様1～6のいずれか1つの方法。

40

## 【0127】

8. i) 心臓トロポニンについての基準量より多い心臓トロポニンの量、および/またはBNPタイプのペプチドについての基準量より多いBNPタイプのペプチドの量は、その被検体が心不全治療の強化を必要とすることの指標であり、ならびに/あるいは

ii) 心臓トロポニンについての基準量より少ない心臓トロポニンの量、およびBNPタイプのペプチドについての基準量より少ないBNPタイプのペプチドの量は、その被検体が心不全治療の強化を必要としないことの指標である、態様1～7のいずれか1つの方法。

50

## 【 0 1 2 8 】

9. 心不全治療の強化が、以前に投与した医薬の投与量の増加、さらなる医薬（または医薬類）の投与、特に以前に投与した医薬と異なる作用様式を有するさらなる医薬（または医薬類）の投与、デバイス療法、ライフスタイルの変更、およびその組合わせを含む、態様 8 の方法。

## 【 0 1 2 9 】

10. 態様 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法であって、被検体が心不全治療の強化を必要とする被検体であり、前記方法がさらに、

c) 被検体からのさらなる試料において BNP タイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

d) その BNP タイプのペプチドの量を BNP タイプのペプチドについての基準量と比較し、その心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する

ステップを含み、

さらなる試料がステップ a) の試料の 2 週 ~ 3 か月後に入手されたものである、前記方法。

10

## 【 0 1 3 0 】

11. 態様 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法であって、被検体が心不全治療の強化を必要としない被検体であり、前記方法がさらに、

c) 被検体からのさらなる試料において BNP タイプのペプチドおよび心臓トロポニンの量を決定する；ならびに

d) その BNP タイプのペプチドの量を BNP タイプのペプチドについての基準量と比較し、その心臓トロポニンの量を心臓トロポニンについての基準量と比較する

ステップを含み、

さらなる試料がステップ a) の試料の 3 か月 ~ 12 か月後に入手されたものである、前記方法。

20

## 【 0 1 3 1 】

12. GDF - 15 (増殖分化因子 15) の量の決定を包含しない、態様 1 ~ 11 のいずれか 1 つの方法。

13. 心不全治療をガイドするための、心不全に罹患している被検体からの試料における、i) BNP タイプのペプチドおよび心臓トロポニン、または ii) BNP タイプの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。

30

## 【 0 1 3 2 】

14. 態様 1 ~ 12 のいずれか 1 つの方法を実施するために適合させた、下記のものを含むデバイス：

a) BNP タイプの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を含む分析ユニットであって、心不全に罹患している被検体からの試料においてそれらのマーカーの量を決定するために適合させた分析ユニット；ならびに

b) 決定した量を基準量と比較してそれにより心不全治療をガイドするための分析ユニットであって、態様 7 に述べる基準量を備えたデータベースおよび態様 8 に述べる比較を実施するためのアルゴリズムを含む分析ユニット。

40

## 【 0 1 3 3 】

前記に引用するすべての参考文献を、それらの開示内容全体および前記で明白に言及した具体的な開示内容に関して本明細書に援用する。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 3 4 】

本発明を次いで以下の実施例により説明する；それらは本発明の範囲を制限または限定するためのものではない。

実施例 1：アッセイ法

トロポニン T は、血漿試料において Roche の電気化学発光 E L I S A サンドイッチ

50

試験 Elecsys トロポニン T hs (high sensitive (高感度)) STAT (Short Turn Around Time (短いターンアラウンド時間)) アッセイを用いて決定された。この試験は、ヒト心臓トロポニン T を特異的に指向する 2 種類のモノクローナル抗体を用いる。これらの抗体は、288 個の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ある 2 つのエピトープ (アミノ酸位置 125 - 131 および 136 - 147) を認識する。この hs - TnT アッセイは、3 ~ 10000 pg / mL の範囲のトロポニン T レベルの測定が可能である。

【0135】

NT - proBNP は、血漿試料において Roche の電気化学発光 ELISA サンドイッチ試験 Elecsys proBNP I STAT (短いターンアラウンド時間) アッセイを用いて測定された。この試験は、proBNP (1 - 108) の N 末端部分 (1 - 76) にあるエピトープ類を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を用いる。

【0136】

実施例 2 : 患者コホート / 結果

この試験に含まれる患者を、NT - proBNP ガイドによる心不全療法または症状ガイドによる心不全療法のいずれかにランダムに配属した。増量ベースの試験介入を 6 か月以内に行ない、患者をさらに 12 か月間、経過観察した。死亡率および入院についての長期結果も得られる。

【0137】

NT - proBNP 目標値より低い患者または高い患者において予後不良に差があるかどうかを調べた。NT - proBNP レベルが目標値より低く予後不良である患者において、cTnT - hs がリスク患者を同定して心不全療法をガイドするための追加マーカーとして有用となりうるかどうかを調べた。

【0138】

HF (NYHA クラス II - IV 収縮期 HF (LVEF 45%) に罹患している 499 人の患者を、NT - proBNP ターゲットまたは通常のケア (Pfisterer M. et al. JAMA. 2009; 301:383-92) に従ってガイドした。全体として、NT - proBNP レベル < 1000 pg / mL (予後良好について予め同定したカットオフ値) の患者は、NT - proBNP レベルをこれらのレベルまで低減できなかった患者より有意に良好な予後を示した。しかし、< 1000 pg / mL の低い NT - proBNP レベルをもつ若干の患者が、依然としてリスクを伴っていた。このリスクは、たとえば 6 か月の療法後にさらに cTnT レベルを測定することによって良好な精度で同定できた。さらに、cTnT - hs は、より高いリスクをもつグループ (すなわち、6 か月後の NT - proBNP レベルが > 1000 pg / mL) において有望な療法ガイダンスのための重要な追加情報も提供した。したがって、このグループにおいて迅速な行動が必要な極度のリスクをもつ患者を同定できた ; これに対し、NT - proBNP が > 1000 pg / mL であるけれども低い cTnT - hs を伴うグループでは、NT - proBNP が < 1000 pg / mL であるけれども > 23.5 pg / mL の高い cTnT - hs を伴うグループより、リスクがいっそう小さかった。

【0139】

実施例 3 : 症例研究

クラス C 心不全を伴う 78 歳の男性患者が、標準推奨量のフロセミド (furosemide)、エナラプリル (enalapril) およびメトプロロール (metoprolol) を投与されている。この患者は規則的な来院時に HF 悪化の徴候または症状を示していない。患者から得た血漿試料において NT - ProBNP およびトロポニン T を決定する。NT - proBNP 値は 1000 pg / mL 未満であり、トロポニン T 値は 23.5 pg / mL 未満である。その療法を維持し、患者は試験終了時まで予後良好で安定な状態を維持する (死亡または入院がない)。

【0140】

・クラス D 心不全を伴う 83 歳の男性患者が、最大推奨量のフロセミド、ペリンドブ

10

20

30

40

50

リル(perindopril)、ジゴキシン(digoxin)およびアテノロール(atenolol)を静脈内投与されている。この患者は植込み型除細動器(ICD)も装着している。この患者は過去に代償不全のエピソードおよび入院を伴ったが、この3カ月間は安定であった。患者から得た血漿試料においてNT-ProBNPおよびトロポニンTを決定する。NT-proBNP値は1000pg/mLより高く、トロポニンT値は23.5pg/mLより高い。治療を強化する；すなわち、推奨開始量のスピロノラクトン(spironolactone)を追加する。2週間後、NT-proBNPおよびcTnT-hsの両方が減少しているが、目標レベル未満ではない。スピロノラクトンの用量を増加し、NT-proBNP値が1000pg/mL未満に低下しかつトロポニンT値が23.5pg/mL未満に低下するまで、組み合わせ除細動器/心臓再同期化刺激装置を12週間にわたって植え込む。その後、患者は試験終了時まで比較的良好な予後で安定な状態を維持する(死亡なし、呼吸困難のため1回の短期入院、同日に退院)。

10

#### 【0141】

・クラスC心不全を伴う68歳の女性患者が、標準療法量のカプトプリル(captopril)を投与されている。この患者は急性心不全のため以前に入院した後、9か月間は安定であった。計画前来院時に患者から得た血漿試料においてNT-ProBNPおよびトロポニンTを決定する。NT-proBNP値は1000pg/mL未満であり、トロポニンT値は23.5pg/mLより高い。その療法を維持し、患者は自宅へ戻る。3週間後、患者は、心房細動を伴う急性呼吸困難、肺うっ血、および心機能の漸次悪化のためその後14日間にわたって入院し、心臓ケアユニットへ移される結果となり、そこで患者は心力不全のため5日後に死亡する。この患者は心不全代償障害のリスクが増大しており、それは臨床所見およびNT-proBNP値だけに基づいて明らかにすることはできなかった。しかし、cTnT-hsは高いリスクを指示しており、計画前来院時に療法を強化すべきであった。メトプロロールなどのベータ遮断薬およびスピロノラクトンなどのアルドステロンアンタゴニストの追加が有益な投薬であり、予後不良を阻止できたであろう。

20

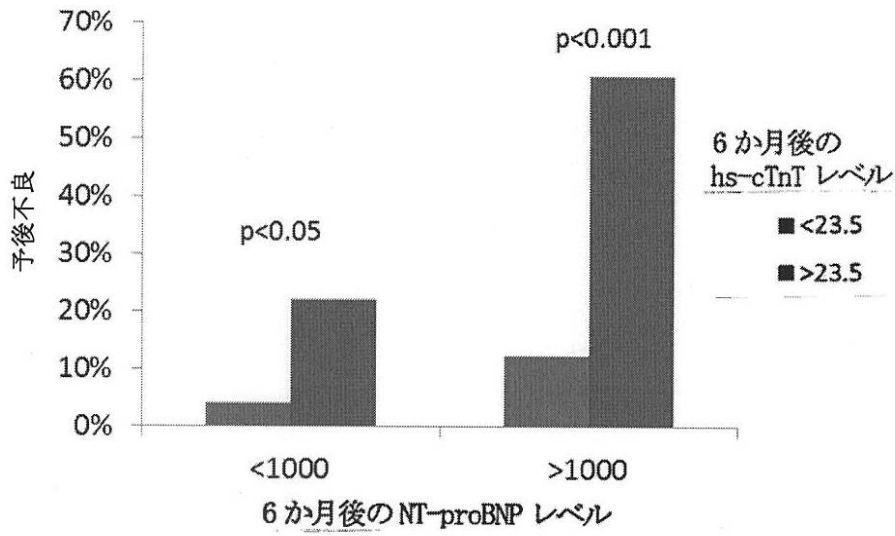
#### 【0142】

##### 結論

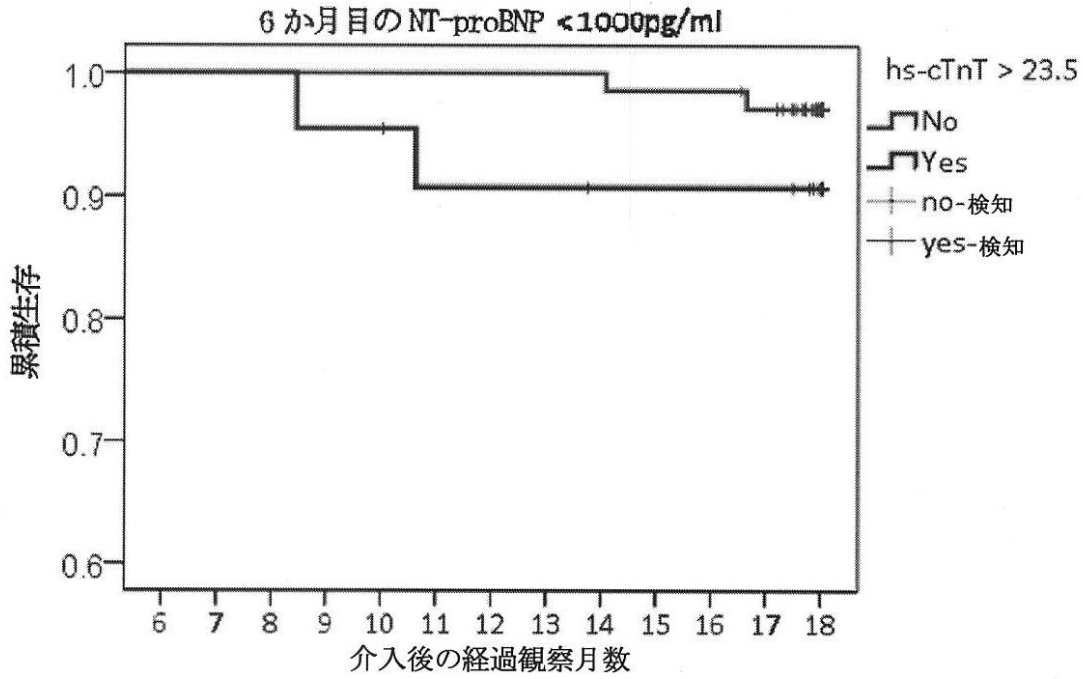
本発明は、心不全患者の療法をモニタリングおよびガイドするために、BNPタイプのペプチドと心臓トロポニンを組み合わせる方法を提供する。先行技術および従来バイオマーカーガイドによる心不全対策と比較して、本発明はcTnTとNT-proBNPの両方の目標レベルを提供する。本発明は、BNPタイプのペプチドのみで行なわれるガイドされた心不全療法が役に立たない有害事象のリスクを伴う患者の同定を改善する。したがって、本発明は、心不全患者における死亡率および罹患率を低下させることを目的とする。

30

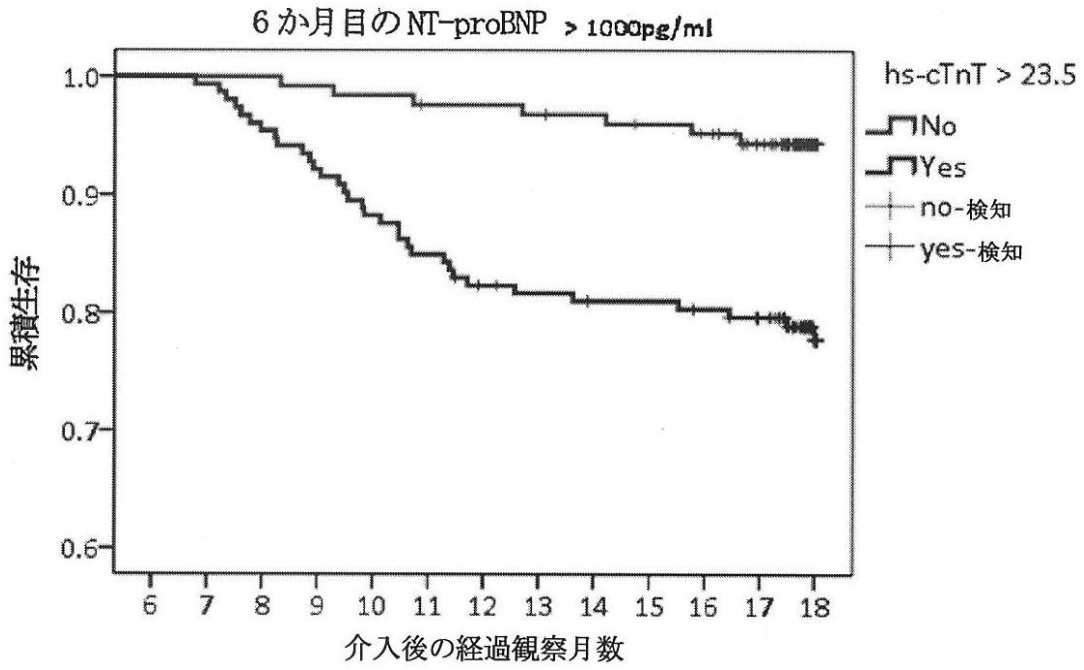
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/073399
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/007041 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HESS GEORG [DE];) 21 January 2010 (2010-01-21) cited in the application page 26, line 15 - page 27, line 4; claims; table 1	1-14
X	WO 2008/061978 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HESS GEORG [DE];) 29 May 2008 (2008-05-29) page 20, line 22 - line 29; claims 5-8, 13-19, 23	1-14
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 200px;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</span>		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 November 2013		03/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Luis Alves, Dulce

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/073399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MARTA DE ANTONIO ET AL: "Combined use of high-sensitivity cardiac troponin T and N-terminal pro-B type natriuretic peptide improves measurements of performance over established mortality risk factors in chronic heart failure",            AMERICAN HEART JOURNAL,            vol. 163, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01),            pages 821-828, XP055048490,            ISSN: 0002-8703, DOI:            10.1016/j.ahj.2012.03.004            abstract; figures 3, 4            -----</p>	1,7,13
X	<p>M. VAVURANAKIS: "Biomarkers as a Guide of Medical Treatment in Cardiovascular Diseases",            CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY,            vol. 19, no. 16,            1 January 2012 (2012-01-01), XP055048491,            ISSN: 0929-8673, DOI:            10.2174/092986712800492977            page 2490, left-hand column, last            paragraph - page 2493, left-hand column,            paragraph 1            -----</p>	1-6,13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/073399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010007041 A1	21-01-2010	EP 2318844 A1	11-05-2011
		JP 2011528115 A	10-11-2011
		US 2011107821 A1	12-05-2011
		WO 2010007041 A1	21-01-2010
-----			
WO 2008061978 A2	29-05-2008	EP 2089719 A2	19-08-2009
		JP 5306218 B2	02-10-2013
		JP 2010510481 A	02-04-2010
		WO 2008061978 A2	29-05-2008
-----			

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ブロック, ディルク

ドイツ国 8 3 6 7 3 ビヒル, クロイトヴェーク 1 0

(72) 発明者 ブラズ, ジュリアン

アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 1 4 3, グリーンウッド, オールド・イーグル・ウェイ 1 1  
3 9

(72) 発明者 ブルンナー, ハンス - ペーター

スイス国 4 1 4 2 ミュンヘンシュタイン, イム・カスパー 2 2

(72) 発明者 クリーデン, ジェームズ

スイス国 4 0 5 1 バーゼル, アルノルト・ベックリンシュトラッセ 1 5

(72) 発明者 ロイダ, ハンス - ユルゲン

アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 0 3 3, カーメル, ケリア・コート 4 8 0 3

(72) 発明者 ヴィーンヒューズ - テレン, ウルスラ - ヘンリケ

ドイツ国 8 2 1 5 2 クライリング, ガルテンシュトラッセ 1 0

(72) 発明者 ツァウグ, クリステリアン

スイス国 4 3 1 0 ラインフェルデン, フランケヴェーク 6

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36

4C084 AA17 NA05 ZA362 ZA372

专利名称(译)	基于NTproBNP和cTnT的心力衰竭治疗指导		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016508211A</a>	公开(公告)日	2016-03-17
申请号	JP2015541158	申请日	2013-11-08
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 ブラズジュリアン ブルナーハンスペーター クリーデンジェームズ ロイダハンスユルゲン 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		
发明人	ブロック,ディルク ブラズ,ジュリアン ブルナー,ハンス-ペーター クリーデン,ジェームズ ロイダ,ハンス-ユルゲン 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		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 A61P9/04 A61K45/00		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2333/58 G01N2800/325 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.B A61P9/04 A61K45/00		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZA362 4C084/ZA372		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	2012191981 2012-11-09 EP 61/724316 2012-11-09 US		
其他公开文献	JP6313319B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种在患有心力衰竭的受试者中引导心力衰竭治疗的方法。该方法基于确定来自受试者的样品中BNP型肽和心肌肌钙蛋白的量。此外，本发明考虑了适用于实施本发明的试剂盒和装置。本发明还涉及用于在患有心力衰竭的受试者中引导如本文所公开的心力衰竭治疗的系统以及用于实施本文公开的方法的试剂和试剂盒。

(21) 出願番号	特願2015-541158 (P2015-541158)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年11月8日 (2013.11.8)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月8日 (2015.6.8)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/073399		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	WO2014/072471		T
(87) 国際公開日	平成26年5月15日 (2014.5.15)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	12191981.5		グレンツァーヘルストラッセ124
(32) 優先日	平成24年11月9日 (2012.11.9)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	61/724,316	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成24年11月9日 (2012.11.9)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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