

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6661216号  
(P6661216)

(45) 発行日 令和2年3月11日 (2020.3.11)

(24) 登録日 令和2年2月14日 (2020.2.14)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47 Z N A

請求項の数 13 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2017-511945 (P2017-511945)	(73) 特許権者	517063798
(86) (22) 出願日	平成27年8月14日 (2015.8.14)		フンダシオ インスティトゥト ディンベ
(65) 公表番号	特表2017-526924 (P2017-526924A)		スティガシオ エン シエンシエス デ
(43) 公表日	平成29年9月14日 (2017.9.14)		ラ サルト ヘルマンズ トリアス イ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/068729		ブホル
(87) 国際公開番号	W02016/030209		スペイン国 バダローナ イー-0891
(87) 国際公開日	平成28年3月3日 (2016.3.3)		6, カレテラ デ カン ルティ, カミ
審査請求日	平成30年8月8日 (2018.8.8)		デ レス エスコレス シン ヌメロ
(31) 優先権主張番号	14182846.7	(74) 代理人	110000659
(32) 優先日	平成26年8月29日 (2014.8.29)		特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ベイエス ゲニス, アントニ
			スペイン国 バルセロナ イー-0801
			0, カレル デ ジロナ, 10, プラル.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心不全予後マーカーとしてのネブリライシン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビトロにおける心不全疾患 (HF) に罹患している患者の予後を判定するための方法であって、前記患者の検査試料中の可溶性ネブリライシン (NEP) レベルを測定するステップを含む、インビトロでの方法。

【請求項 2】

前記可溶性 NEP レベルが基準値より高い場合、予後不良を示す、請求項 1 に記載のインビトロでの方法。

【請求項 3】

前記可溶性 NEP レベルが、イムノアッセイ技術によって測定される、請求項 1 に記載のインビトロでの方法。

【請求項 4】

前記イムノアッセイ技術が、サンドイッチアッセイである、請求項 3 に記載のインビトロでの方法。

【請求項 5】

前記サンドイッチアッセイが、ELISAである、請求項 4 に記載のインビトロでの方法。

【請求項 6】

前記検査試料が、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、および細胞上清液からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のインビトロでの方法。

10

20

**【請求項 7】**

前記検査試料が、血清または血漿である、請求項 6 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 8】**

前記予後不良が、心不全の増悪または代償不全および死亡からなる群から選択される心血管事象のリスクである、請求項 1 または 2 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 9】**

前記心血管事象のリスクが、可溶性 N E P レベルとともに比例的に増加する、請求項 8 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 10】**

前記患者が慢性 H F に罹患している、請求項 1 に記載のインビトロでの方法。

10

**【請求項 11】**

可溶性 N E P の存在の検出は、前記試料を、可溶性 N E P と特異的に結合する抗体またはその断片と接触させることにより行われる、請求項 1 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 12】**

前記抗体またはその断片が、キットの一部を構成する、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

対象者において N E P 阻害剤に基づく医療レジメンを開始することを決断するまたは推奨するために、可溶性 N E P の量を基準値と比較する方法であって、

( a ) 請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法により、前記対象者の検査試料中の可溶性 N E P の量をインビトロで測定するステップ、および

20

( b ) ステップ ( a ) で得たレベルと基準値を比較するステップ  
を含み、

ステップ ( a ) で検出された可溶性 N E P の量が、前記基準値より高い場合、それが、前記対象者が N E P 阻害剤に基づく医療レジメンの恩恵を受けることになることを示すものである、方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、臨床予後の分野に存する。詳細には、本発明は、心不全 ( H F ( Heart Failure ) ) 患者の有害事象 ( 例えば新血管死亡 ) の予後に関する。

30

**【背景技術】****【0002】**

心不全 ( H F ) は、うっ血性 H F ( C H F ) と呼ばれ、心臓の構造または機能に関する問題によって身体を要求を満たすのに十分な血流を供給するその能力が損なわれたときに起こる心臓の状態である。心不全は、多種多様な症状、特に、安静時または労作および / もしくは疲労しているときの息切れ ( S O B ( shortness of breath ) )、体液貯留の兆候、例えば肺うっ血またはくるぶし腫脹、ならびに安静時の心臓の構造または機能の異常の客観的証拠の原因になりうる。しかし、一部の患者には全く症候がないこともあり、心臓の無症候性構造または機能異常は、症候性心不全の前兆であり、高い死亡率を伴う。

**【0003】**

40

心不全は、よく見られる疾患であり、米国人口の 2 % より多くが、またはほぼ 5 百万人が罹患しており、患者の 30 ~ 40 % は、診断を受けた後 1 年以内に心不全がもとで死亡する。

**【0004】**

心不全は、普遍的に合意された定義がなく、特に早期の場合、確定診断が困難であるため、診断されないことが多い。適切な治療法で大多数の患者の心不全は管理することができるが、心不全は生命を脅かす可能性があり、進行性疾患は 10 % という年間全死亡率を伴う。加えて、心不全は、65 歳より上の高齢者の入院の主因である。結果として、欧州諸国では心不全の管理に医療費の 1 ~ 2 % が費やされている。

**【0005】**

50

慢性HFは、治療される症状(symptomatology)が通常は安定している、何ヶ月にも、何年にもわたって発症する長期にわたる状態である。この状態は、心臓の適応応答に関連づけられるが、この適応応答は、長期的には有害であり、状態の悪化につながることもある。急性HF(AHF)は、心不全兆候および症状の変化があり、その結果、緊急治療または入院が必要であると患者を特徴づけることができるエピソードを指す、心不全増悪または非代償性心不全を記述するために使用される用語である。AHFは、数時間または数日のうちに急に発症し、代償適応する時間が心臓にないため直ちに生命を脅かすことがある。慢性HFもまた非代償性であることがあり、併発する病気(例えば肺炎)、心筋梗塞、不整脈、管理不良高血圧、または患者の水分制限、食事制限もしくは薬物療法の維持の失敗の結果として生じることが最も一般的である。

10

#### 【0006】

リスクを早期に認識することは、有害事象の発生の予防に役立つ対策を開始するための必要条件であるので、患者の受診時に有害事象を予測できることは重要である。これに関連して、正確な予後情報を提供することができるマーカーを発見するための試みがいくつかなされている。

#### 【0007】

臨床的には、いくつかのバイオマーカーがHFの予後の予測因子として大きな注目を集めており、ナトリウム利尿ペプチドが最も広範に使用されているが、他のもの、例えばST2および高感度トロポニンTも、ナトリウム利尿ペプチドに相加的な形で、有望な結果を示している。バイオマーカーのレベルを測定するとき、臨床医が、その検査の精度を弱めるまたは未確定にする可能性のある交絡因子を承知していることも非常に重要である。この古典的な例は、HFの際のナトリウム利尿ペプチドの血中濃度に対するボディー・マス・インデックスまたは腎機能障害の影響の仕方である。

20

#### 【0008】

したがって、なされた努力にもかかわらず、HF疾患を管理する上で有用な情報を与えることができるさらなる予後マーカーがなお必要とされている。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

【非特許文献1】Bayes-Genis A、de Antonio M、Galan A、Sanz H、Urrutia A、Cabanes R、Combined Use of High Sensitivity ST2 and NTproBNP to Improve the Prediction of Death in Heart Failure、Eur J Heart Fail 2012年、14巻、32～8頁。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明者らは、HFに罹患している患者の試料において循環可溶性ネプリライシン(本明細書では以降「NEP」とも呼ぶ)レベルを発見した。特に、循環可溶性NEPレベルが慢性HF患者の血清において広範に検出された。加えて、下で例証するように、NEPと心血管アウトカムの明らかな関連性が見つかった。NEPは、下で詳細に説明するように、大きい細胞外触媒ドメインと、単一の膜貫通領域と、短い(27アミノ酸)細胞質側N末端ドメインとを有する、膜結合型酵素である。この酵素は、従来技術では知られている、いくつかのタイプの癌または腎疾患に関する診断または予後マーカーとして開示されている。

40

#### 【0011】

驚くべきことに、本発明者らは、この酵素がHFの予後マーカーとして有用であることを見いだした。

#### 【0012】

その一方で、いくつかの以前の報告は、生体液中でNEPの存在を確認している。しか

50

し、HF患者における病理生物学的サロゲート (pathobiological surrogate) としての循環可溶性NEPの証拠は存在しない。

【0013】

したがって、第一の態様では、本発明は、インビトロで心不全疾患に罹患している患者の予後を判定するための方法であって、この患者の検査試料中の可溶性ネプリライシン (NEP) レベルを判定するステップを含むインビトロでの方法を提供する。

【0014】

下で詳細に説明するように、患者1069名の大規模実生活継続コホートを335の複合エンドポイント事象に関して平均4.1年間経過観察し、HF予後に関してより広範に使用されているバイオマーカーの1つであるNT-proBNPを含む予後に有意な12の変数を含む、非常に包括的な多変量モデルでの補正後でさえ、NEPがCV死亡および罹患の良好な病理生物学的サロゲートであることを見いだした。その多変量解析の結果を要約する表2に示すように、NEPによって提供される予後情報は (p値が0.05未満であるため) 有意であり、そのような解析中に考慮に入れた他のパラメータから独立している。多変量解析を行うとき、最初に見たときは疾患の診断または予後に適切であるように思われるバイオマーカーが、他のバイオマーカーによってまたは他のパラメータ (例えば、数ある中でも年齢もしくは性別) を考慮することによって統計的に負の干渉を受けるため、最後には無視されることは、当業者には既知である。別の多変量統計解析である下の表3は、可溶性NEPによって提供される予後情報が、他の予後HFマーカー、ST2および高感度トロポニンT、をその解析に含めたとき、その統計的有意性を失うNT-proBNPとは対照的に影響を受けないことを例証するものである。

【0015】

したがって、表2および表3からのデータから、可溶性NEPが、アッセイにおいて考慮されるパラメータおよび他のバイオマーカーから独立して予後情報を提供すると結論づけることができる。また、その結果として、下で提供するデータは、HF患者の予後ツールとしてのNEPの大きな価値を裏づける。

【0016】

第二の態様では、本発明は、HFの予後マーカーとしての可溶性NEPの使用を提供する。

【0017】

第三の態様では、本発明は、本発明の第一の態様で定義の方法における心不全疾患の予後のための単離された試料中の可溶性NEPの存在を検出する手段の使用を提供する。

【0018】

第四の態様では、本発明は、NEP阻害剤に基づく医療レジメンを開始するかどうかを決定するまたは推奨する方法であって、

(a) 患者の検査試料中の可溶性NEPの量をインビトロで判定するステップ、および

(b) ステップ(a)で得たレベルと基準値を比較するステップ  
を含み、ステップ(a)で検出された可溶性NEPの量が、この基準値より高い場合、それが、この患者がNEP阻害剤に基づく医療レジメン (medical regimen、医療上の計画又は処方) の恩恵を受けることになることを示すものである方法を提供する。

【0019】

検査試料中の可溶性NEPレベルを判定することにより、当業者は、推奨することができる最も好適な治療法はどれであるのかをさらに確証 (establish) することができる。なぜなら、この試料中の検出されるレベルは、症状の拡大 (すなわち重症度) を反映しているからである。検査試料中で判定される可溶性NEPレベルが高いほど、HF患者へのNEP阻害剤の投与は有益でありうる。

【0020】

さらに、対象 (対象者、被験者) がHF症候群に罹患しているため (本発明の第二の態様で定義した方法に従って) 医療レジメンを開始する決断をしたら、そのレジメンにどの

10

20

30

40

50

程度効果があるのかをモニターすることができる。正常な可溶性NEPレベルに低下するまたは戻ることは、そのHF患者が、この医療レジメンに好適に反応したこと、したがって、このレジメンが有効であることを示すことができ、可溶性NEPレベルが有意に変化しなかった場合、または増加した場合、これは、この医療レジメンが有効でないことを示すことができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】年齢調整コックス回帰曲線を示す図である。A図はCV死またはHF入院の主要複合エンドポイントについての無再発生存率を示す図である。B図はCV死についての生存率曲線を示す図である。NEPの中央値 = 0.642 ng/mL。黒線 = ネプリライシン < 中央値、灰色線 = ネプリライシン 中央値。

10

【発明を実施するための形態】

【0022】

上で述べたように、本発明は、HFに罹患している患者の予後を判定する方法を提供する。

【0023】

「予後」は、心不全患者の有害事象（例えば、死亡）の予測に関する。これは、この患者の回復の可能性または死の可能性の推定を含む。「有害事象」は、心不全の増悪または代償不全、および死亡と定義する。「死亡」は、新血管死（例えば、心筋虚血および梗塞、心不全、心停止または脳血管発作に起因しうる）および非血管死亡（他のすべての死因、例えば感染症、悪性腫瘍を含む）と定義する。そのため、一実施形態では、「予後不良」は、心不全の増悪または代償不全、および血管死亡からなる群から選択される。別の実施形態では、予後不良は、死亡のリスクである。

20

【0024】

HFは、CHFとも呼ばれ、心臓の構造または機能に関する問題によって身体の要求を満たすのに十分な血流を供給するその能力が損なわれたときに起こる心臓の状態である。

【0025】

一実施形態では、患者は、慢性HFに罹患している。

【0026】

「慢性HF」は、増悪原因に対する心臓の適応応答（例えば、拡張、肥大）に関連づけられる、治療される総体症状が通常は安定している長期にわたる状態（数ヶ月/数年）である。しかし、これらの適応応答は、長期的には有害であり、状態の悪化につながることもある。慢性HFの患者は、安定期、増悪期および非代償期慢性HF患者に分類することができる。慢性HF患者の代償不全は、併発する病気（例えば肺炎）、心筋梗塞、不整脈、管理不良高血圧、または患者の水分制限、ダイエットもしくは薬物療法の維持の失敗の結果として生じることが最も一般的である。増悪期または非代償期である慢性HFは、HF兆候および症状の変化があり、その結果、緊急治療または治療調整が必要となり、入院を要することを特徴とする。

30

【0027】

心不全での入院を誘発する一般的な要因は、例えば、急性心筋虚血、医療レジメン（ナトリウムおよび/または水分制限）の非遵守、高血圧未修正、心房細動および他の不整脈、肺塞栓症または併発感染症である。

40

【0028】

ネプリライシン（NEP）は、大きい細胞外触媒ドメインと、単一の膜貫通領域と、短い（27アミノ酸）細胞質側N末端ドメインとを有する、膜結合型酵素である。その配列は、UniProtデータベース（バージョン180、最終更新日2014年7月9日）において参照コードP08473で入手することができる。この酵素は、ナトリウム利尿ペプチドをはじめとする多数の血管拡張ペプチドの分解を触媒し、アンジオテンシンIIの分解にも寄与する。

【0029】

50

本発明の方法で検出されるものである、NEPの可溶性形態は、膜と結合していないNEPの形態である。一実施形態では、可溶性NEP形態は、参照コードP08473を有する野生型とは膜貫通および細胞内ドメインがない点で異なり、配列番号1に対応する。

【0030】

用語「患者」は、本明細書で使用する場合、疾患のため診療を受けているまたは診療を受けるべきである、生存しているヒトまたは非ヒト生物を指す。これは、病態の兆候について調査されることになる、定義された病気のない人物を含む。したがって、本明細書に記載する方法およびアッセイは、ヒト疾患にも獣医学的疾患にも適用可能である。

【0031】

本発明の第一の態様の一実施形態では、可溶性NEPレベルが基準値より高い場合、それは予後不良を示す。

10

【0032】

下に示す結果から導出できるように、有害事象疾患に罹患するリスクは、NEPレベルの増加に伴って比例的に増加する。NEP対数変換の1標準偏差につき、有害事象に罹患するリスクが約18%増加する。

【0033】

第一の態様の方法の中で言及した用語「基準値」は、分子マーカー可溶性NEPの被定義値であって、試料または試料群におけるこの分子マーカーのレベルから導出される値であると解されたい。この試料は、何らかの有害アウトカムを示した/いかなる有害アウトカムもまだ示していない対象または対象群から採取される。当業者は、一般知識を用いて、基準値を得るためにより適切な対象または対象群を選択することができる。

20

【0034】

一実施形態では、基準値は、そのような状況で、HFに罹患している患者集団から決定され、可溶性NEPレベルが基準値と比較して増加された場合、それはその患者が悪化していることを示すことになる。また、このデータから、臨床医は、患者を治療して彼を延命するための適切な決断を下すことができる。

【0035】

別の実施形態では、HFに罹患している患者が臨床医によって日常的にモニターされている場合、「基準値」は、患者のモニタリングの開始時の可溶性NEPレベルに対応することもあり、または最後の検診で判定された可溶性NEPレベルに対応することもある。または代替的に、基準値は、上で述べたような、いかなる有害アウトカムもまだ示していない、HFに罹患している患者集団から決定されることもある。このようにして、可溶性NEPレベルの増加を見つけた場合、それは、患者が悪化していること、および有害アウトカムが発生する可能性が高いことを示すことになる。この情報によって、臨床医は、患者の治療を最適化することが可能になる。

30

【0036】

従来技術では、選択された対象の群から基準値を得る方法は周知である。

【0037】

例えば、下の実施例では、基準値、 $0.642 \text{ ng/mL}$ は、外来環境でHF患者集団から判定された可溶性NEPレベルの中央値に対応する。可溶性NEPレベルがこの基準値より高いHF患者は、有害事象のリスクが37%増加したと判定することができるだろう。

40

【0038】

本発明の実施形態では、試料は、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液からなる群から、および細胞上清の中で選択される。別の実施形態では、試料は、血液、血漿または血清である。さらに別の実施形態では、試料は血清である。

【0039】

本発明の第一の態様の方法の別の実施形態では、可溶性NEPの濃度が判定される。

【0040】

一実施形態では、可能性NEPレベルは、免疫アッセイ技術によって判定される。

50

## 【 0 0 4 1 】

「イムノアッセイ」は、抗体、免疫グロブリン、またはその断片の使用によって溶液中の高分子の存在または濃度を測定する生化学的検定である。イムノアッセイは、多くの異なる形式および変形形態で行われる。イムノアッセイは、アッセイ中の異なる時点で添加および洗浄除去または分離される試薬を用いて複数のステップで実行されうる。マルチステップアッセイは、分離イムノアッセイまたは不均一イムノアッセイと呼ばれることが多い。一部のイムノアッセイは、単に、試薬と試料を混合し、物理的測定を行うことによって、行うことができる。そのようなアッセイは、均一イムノアッセイまたは低頻度非分離イムノアッセイと呼ばれる。標準物質の使用が採用されることがイムノアッセイでは多い。標準物質は、問題の分析物を含有することが分かっている溶液であって、その分析物の濃度も一般に分かっている溶液である。実際の試料に対するアッセイ応答と標準物質によって生ずるアッセイ応答の比較によって、該試料中の分析物の存在または濃度の観点からシグナル強度を解釈することが可能になる。

10

## 【 0 0 4 2 】

有利なこととして、タンパク質の濃度を判定することによって、試料中のNEPの総量が、それが活性であるか否かに関係なく判定されるため、体液中で循環している実際の可溶性NEPレベルについてのより正確な情報が得られ、結果として疾患の適切な予後に有利になる。

## 【 0 0 4 3 】

有利なこととして、イムノアッセイは、基質に起因するのはもちろん、酵素の触媒部位が異なる病期中に変更されうることに起因する脆弱性などの、酵素的方法によって示される欠点の一部を克服する。

20

## 【 0 0 4 4 】

イムノアッセイは、一般に、競合的均一イムノアッセイ、競合的不均一イムノアッセイ、1サイト非競合イムノアッセイおよび2サイト非競合イムノアッセイとして分類することができる。

## 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、イムノアッセイは、競合的均一イムノアッセイである。別の実施形態では、イムノアッセイは、ELISAである。

## 【 0 0 4 6 】

可溶性NEPの濃度を判定するための市販のいくつかのELISAキット、例えば、数あるなかでも、R & D Systems、Ray biotechまたはAviscera Bioscienceによって販売されているものが利用可能である。

30

## 【 0 0 4 7 】

一実施形態では、ELISA分析が行われる場合、試料は、インキュベーション前に1/10~1/2希釈される。別の実施形態では、試料は、インキュベーション前に1/4希釈される。

## 【 0 0 4 8 】

別の実施形態では、ELISAが行われる場合、インキュベーションステップは、25~37 からなる温度範囲から選択される一定温度で、1000rpmで混合しながら行われる。別の実施形態では、インキュベーションステップの一定温度は30 である。

40

## 【 0 0 4 9 】

別の実施形態では、ELISAが行われる場合のインキュベーションステップは、120~180時間からなる。別の実施形態では、インキュベーションステップは、150分のステップである。

## 【 0 0 5 0 】

さらに別の実施形態では、(a)インキュベーション前に血清試料を1/4希釈し、150分間、30 で、1000rpmで混合物をインキュベートする、ELISA検出が行われる。そのような条件下で、本発明者らは、感度の向上が達成されることを見いだした。

50

## 【 0 0 5 1 】

第三の態様では、本発明は、本発明の第一の態様の方法のいずれか 1 つを行うための手段の使用を提供する。

## 【 0 0 5 2 】

本発明では、「可溶性 NEP と結合する能力がある抗体または断片」という用語は、可溶性 NEP によって規定される抗原に結合することができるあらゆる免疫グロブリンまたはその断片と解するものとする。この用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む。「その断片」という用語は、NEP のエピトープへの結合に好適なサイズおよび高次構造を有する、抗体のあらゆる部分を包含する。好適な断片としては、F ( a b )、F ( a b ' ) および F v が挙げられる。「エピトープ」は、免疫系 ( B 細胞、T 細胞

10

## 【 0 0 5 3 】

従来技術で、抗体を調製および特性づけするための周知の手段がある。従来技術では、ポリクローナル抗体を産生する方法は周知である。簡単に言うと、ポリクローナル抗体は、動物を免疫原性組成物で免疫し、免疫された動物から血清を採取することによって調製される。広範な動物種を抗血清の産生に使用することができる。抗血清の産生に典型的に使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギでありうる。

## 【 0 0 5 4 】

その一方で、モノクローナル抗体 ( M A b ) は、周知の技術を使用して容易に調製することができる。モノクローナル抗体を調製するための手順は、一般に、ポリクローナル抗体の調製と同じように開始される。上で示したような抗原を動物に注射する。抗原をフロイント完全または不完全アジュバントなどのアジュバントと混合することができる。同じ抗原でワクチン接種をおおよそ 2 週間ごとに反復する。免疫処置後、抗体産生の可能性がある体細胞、特に B リンパ球 ( B 細胞 ) を M A b 産生プロトコルでの使用のために選択する。これらの細胞は、生検脾臓、リンパ節もしくは扁桃から、または末梢血試料から得ることができる。その後、免疫動物からの抗体産生 B リンパ球を、一般には免疫動物と同じ種からの、不死骨髄腫細胞株からの細胞からの細胞と融合させる。ハイブリドーマ産生のための融合手順での使用に適切である骨髄腫細胞株は、好ましくは抗体産生細胞ではなく、高い融合効率および酵素欠損を有し、この酵素欠損のため、それらは、所望の融合細胞 ( ハイブリドーマ ) の増殖のみを支持する特定の培養培地では増殖できない。

20

30

## 【 0 0 5 5 】

一実施形態では、可溶性 NEP は、数ある中でも U S C N L i f e S c i e n c e s I n c、L i f e s p a n B i o s c i e n c e s または R a y B i o t e c h によって提供されているものなどの、ポリクローナル抗体を使用して検出される。

## 【 0 0 5 6 】

一実施形態では、この手段は、可溶性 NEP と特異的に結合する抗体またはその断片である。

## 【 0 0 5 7 】

さらに別の実施形態では、この手段は、キットの一部を構成する。

40

## 【 0 0 5 8 】

このキットは、相互作用を可視化するためのさらなる手段 ( 添加剤、溶媒 ) をさらに含む ( 尿試験紙、化学発光試薬、比濁試薬等 )。抗原 - 抗体相互作用の可視化のための好適な添加剤、溶媒および試薬は、実施例で開示する。

## 【 0 0 5 9 】

本発明の方法は、インビトロで予後情報を提供するものである。一実施形態では、予後情報は、好適なデータ記憶媒体に収集することができる。好適なデータ記憶媒体の例は、紙、C D、U S B、P C のコンピュータアーカイブ、または同情報の音声登録である。

## 【 0 0 6 0 】

最後に、第四の態様では、本発明は、H F に罹患している患者の NEP 阻害剤に基づく

50



医療レジメンを開始するかどうかを決断または推奨する方法を提供する。

【0061】

本発明の第四の態様の一実施形態では、対象は、HFに罹患している患者である。

【0062】

本発明の第四の態様の別の実施形態では、対象は、HFに罹患している患者であり、基準値と比較して高い可溶性NEPレベルが予後不良を示す。

【0063】

NEP阻害剤の説明に役立つ非限定的な例は、AHU-377、LCZ696の成分；Omapatrilat；RB-101；およびUK-414.495である。

【0064】

本明細書および特許請求の範囲を通して、「含む」という語およびこの語の語尾変化形は、他の技術的特徴、添加物、構成要素またはステップを除外しないことを意図したものである。さらに「含む」という語は、「からなる」の場合を包含する。本発明のさらなる目的、利点および特徴は、本明細書を検討することによって当業者に明らかになり、本発明を実施することで知ることができるだろう。以下の実施例および図面は、実例として提供するものであり、本発明の限定を意図したものではない。図面に関するおよび請求項で丸括弧に入っている参照符号は、単に請求項の理解度を増そうとするためのものであり、請求項の範囲を限定するものと解釈してはならない。さらに、本発明は、本明細書に記載の特定のおよび好ましい実施形態の可能なすべての組合せを包含する。

【0065】

<実施例>

<1.方法>

<研究対象集団>

2006年5月から2013年5月まで、総合HFクリニック(multidisciplinary HF clinic)で治療を受けた外来患者を継続的にこの研究に組み入れた。照会組み入れ基準および血液試料採取は、Bayes-Genis A.ら(Bayes-Genis A.ら、2012年)による記載の通りに行った。要約すると、患者は、心臓科または内科によって、およびより少ない程度に、救急科または病院の他の科から、HFクリニックに照会された。主要照会基準は、病因に関係なくヨーロッパ心臓病学会ガイドラインによるHF、少なくとも1回のHF入院、または左室駆出率(LVEF)低下であった。以前に凍結融解サイクルに付されていない-80で保存された同じ血液試料からNEPおよびNT-proBNPを分析した。すべての試料は、09:00am~12:00pmに採取した。

【0066】

すべての参加者は、書面によるインフォームドコンセントを提出し、地方倫理委員会がこの研究を承認した。すべての研究手順は、1983年改正の1975年のヘルシンキ宣言で概要が述べられた倫理基準に従った。

【0067】

<経過観察およびアウトカム>

すべての患者を、前もって定義した規則的な間隔で経過観察し、患者は、代償不全の場合、必要に応じて来診した。定期面会スケジュールは、最低年4回の看護師との面会、年2回の内科医との面会、および老年科医、精神科医およびリハビリテーション科医との随意面会を含んだ。定期面会に参加しなかった患者には電話で連絡を取った。

【0068】

主要アウトカムは、新血管(CV)死またはHF入院の複合アウトカムであった。CV死および原因を問わない死も副次アウトカムとして調査した。死は、次のことによって起こる場合、CV由来と考えた。すなわち、心不全(別の原因の不在下での、非代償性心不全または治療抵抗性心不全)、突然死(心不全増悪の証拠もいずれの他の死因もない、以前は安定していた患者の、目撃者が存在するまたはしない、予想外の死)、急性心筋梗塞(AMI)(器質的な合併症に起因しようと、血行動態の合併症に起因しようと、または

10

20

30

40

50

不整脈の合併症に起因しようと、いずれはAMIと直接関係づけられるもの)、脳卒中(急性神経障害の最近の出現に関連づけられるもの)、手技に関わるもの(診断後のまたは治療手技による死)、および他の心血管の原因(例えば、動脈瘤破裂、末梢性虚血、または大動脈解離)によって起こる場合、CV由来と考えた。入院は、HF臨床記録、他の病棟から、およびカタルーニャ州病歴電子記録から特定した。致命的事象は、HF臨床記録、他の病棟、緊急治療室、一般開業医から、および患者の親類に問い合わせることによって特定した。さらに、カタルーニャ州およびスペインの医療システムのデータベースからのデータを検証した。

#### 【0069】

##### <ネブリライシンアッセイ>

改良型サンドイッチイムノアッセイ(HUMAN NEP/CD10 ELISA KIT、Aviscera Biosciences、Santa Clara、USA、参照番号SK00724-01、ロット番号:20111893)を使用してヒトNEPを測定した。この方法の分析感度を向上させるために、および試料定量の下限を得るために、いくつかの改良を行った。

a) インキュベーション前に血清アリコートとその製造業者によって提供された希釈バッファー(DB09)で1/4希釈した。

b) キットを自動ロボットプラットフォーム(Basic Radim Immunooassay Operator 2[BRIO 2]、Radim spa、Pomezia、Italy)に移して、すべてのインキュベーションを30の一定温度で、1000rpmで混合しながら行った。

c) 最初の試料インキュベーションを150分に延長することによって、校正曲線のより大きい傾きおよびより良好なアッセイ感度を達成した。この改良プロトコルは、0.250~16ng/mLの分析測定範囲を示した。アッセイ内およびアッセイ間変動係数は、それぞれ、3.7%および8.9%であった。

#### 【0070】

##### <NT-proBNPアッセイ>

Modular Analytics E170(Roche Diagnostics)での免疫電気化学発光アッセイを使用して、血清からNT-proBNPレベルを判定した。このアッセイには生体活性BNPとの0.001%未満の交差反応性があり、この報告の構成研究では、このアッセイは、0.9%~5.5%の範囲の実験間変動係数を有した。

#### 【0071】

##### <hs-cTnTアッセイ>

製造業者の説明書を使用するModular Analytics E170(Roche Diagnostics)でのhs-cTnTアッセイを使用して、電気化学発光イムノアッセイによって血清からトロポニンレベルを測定した。このhs-cTnTアッセイは、3~10,000ng/Lの分析範囲を有した。13ng/Lの99パーセントイル値で、変動係数は9%であった。このアッセイの分析性能を心筋壊死の診断における使用についての特別委員会の推奨基準で検証し、このアッセイの分析性能は、その推奨基準に適合した。

#### 【0072】

##### <hs-ST2アッセイ>

高感度サンドイッチモノクローナルイムノアッセイ(Presage(商標)sST2 assay、Critical Diagnostics、San Diego、CA、USA)を製造業者の説明書に従って使用して、血清試料からST2を測定した。このhs-ST2アッセイは、2.5%未満の実験内係数、および4%の全変動係数を有した。

#### 【0073】

##### <統計解析>

カテゴリー変数を百分率として表した。連続変数を、正規分布か非正規分布かによって平均±標準偏差または中央値(Q1～Q3)として表した。正規分布は、正規Q-Qプロットで評定した。NEPレベルと、年齢、左室駆出率(LVEF)、NT-proBNPおよび推定糸状態濾過率(CKD-EPI)との相関を、スピアマン係数を使用して解析した。性別および病因群間のNEP濃度の差をマン・ホイットニーU検定で評定した。ニューヨーク心臓協会(NYHA)機能クラス群についてのNEPレベルの統計的差異(傾向性のP値)を、スピアマン検定を使用して計算した。年齢調整コックス回帰分析を行い、NEP中央値に対する複合主要エンドポイントについてのおよびCV死亡についての生存率曲線をプロットした。コックス回帰モデルを使用して多変量生存率解析も行った。NEP値をlog変換し、1SDをハザード比(HR)算定に使用した。次の変数をモデルに組み入れた: 年齢、性別、HFの虚血性病因、LVEF、NYHA機能クラス、糖尿病の存在、ヘモグロビン(g/dL)、血清ナトリウム(mmol/L)、推定糸状態濾過率、NT-proBNP、ブロッカー治療、アンジオテンシン転換酵素阻害剤(ACEI)またはアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)治療、ならびにNEP。SPSS 15 (SPSS Inc., Chicago, IL)を使用して統計解析を行った。両側 $P < 0.05$ を有意と見なした。

#### 【0074】

##### <結果>

2006年5月から2013年5月まで継続的に参加したHF患者1069名で循環可溶性NEPを測定した。表1は、全試料についての、およびPARADIGM-HF研究組み入れ基準を満たした患者のサブグループ(NYHAクラスII～IV、LVEF 35%、NT-proBNP 600 ng/L、または前年にHF入院した場合はNT-proBNP 400 ng/L、忌避の場合または耐容されない場合を除きACEIまたはARBおよびブロッカーでの治療を受けた; PARADIGM様コホート、 $N = 480$ )についての、ベースライン特性を示すものである。4.1±2.4年の平均経過観察期間中に、CV原因で247名、非CV原因で169名(37.6%)および原因不明の33名(7.3%)の、患者449名が死亡した。既知CV死因のうち、難治性HFは患者128名(51.8%)における原因であり、突然死は患者53名(21.4%)における原因であり、急性心筋梗塞は患者23名(9.3%)における原因であった。患者235名は、経過観察中にHF入院し、患者335名は、CV死またはHF入院の主要エンドポイントを満たした。患者5名は、経過観察不能であり、不適切に打ち切られた。

#### 【0075】

##### <循環可溶性NEP>

中央値可溶性NEPレベルは、0.642 ng/mL (Q1～Q3 0.385～1.219 ng/mL)であった。患者156名(14.6%)は、分析測定範囲未満のNEPレベルを有した。NEPレベルは、中等度に、しかし有意に年齢と相関し( $r = 0.16$ 、 $p < 0.001$ )、対照的に、NETとLVEFの間( $r = 0.02$ 、 $p = 0.35$ )にも、推定糸状態濾過率の間( $r = 0.05$ 、 $p = 0.1$ )にも、NT-proBNPの間( $r = -0.01$ 、 $p = 0.68$ )にも、NYHA機能クラスの間(傾向性のp値 0.72)にも、相関は見いだされなかった。NEPレベルには性別差はなかった( $p = 0.28$ )が、非虚血患者におけるNEPレベルは、虚血患者におけるNEPレベルに対して有意に高かった(それぞれ、0.690 ng/mL [0.450～1.401]対0.611 ng/mL [0.328～1.046]、 $p = 0.002$ )。

#### 【0076】

##### <NEPおよびアウトカム>

中央値に対する年齢調整NEP値は、CV死またはHF入院の複合主要エンドポイント(HR 1.37 [95%CI 1.11～1.69]、 $p = 0.003$ )、CV死(HR 1.60 [95%CI 1.24～2.06]、 $p < 0.001$ )および原因を問わない死(HR 1.27 [95%CI 1.06～1.53]、 $p = 0.01$ )と有意に関連していた。図1は、NEP中央値に対する複合エンドポイントについてのおよびCV

死についての分岐している生存率曲線を示す。

【0077】

連続変数として、年齢調整NEP値も、CV死またはHF入院の複合主要エンドポイント(HR 1.17 [95%CI 1.06~1.29]、 $p=0.001$ )およびCV死(HR 1.19 [95%CI 1.06~1.32]、 $p=0.002$ )と有意に関連しており、原因を問わない死には有意性傾向があった(HR 1.09 [95%CI 1.00~1.19]、 $p=0.06$ )。NT-proBNPを含む包括的多変量解析において、可溶性NEPは、複合主要エンドポイント(HR 1.18 [95%CI 1.07~1.31]、 $p=0.001$ )およびCV死亡(HR 1.18 [95%CI 1.05~1.32]、 $p=0.006$ )との有意な関連性を維持した(表2)。

10

【0078】

この実生活HFシリーズのうちのPARADIGM様コホートも調査し、循環NEPレベルは、包括的多変量解析でのCV死またはHF入院の複合主要エンドポイントと有意な関連性を維持した(HR 1.23 [95%CI 1.05~1.43]、 $p=0.008$ )。

【0079】

結論として、HFは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系およびナトリウム利尿ペプチドをはじめとする複数の神経ホルモン経路のアップレギュレーションと特徴とする臨床疾患である。ナトリウム利尿ペプチドの中で、軸NEPは、極めて重要な酵素である。本発明者らは、高いNEPレベルがHF患者の血行路で見いだされること、およびNEP濃度が、有害アウトカム、CV死亡および罹患の両方、の指標であることを初めて立証した。

20

【0080】

加えて、報告するデータは、ARNi LCZ696中に既に存在するNEP阻害剤が、HFの新規病理生物学的寄与因子の標的化に必要であり、患者アウトカムを向上させるために極めて重要であることを示す。

【0081】

【表 1】

	全コホート N=1069	PARADIGM様 N=480	
年齢、歳*	66.2 ± 12.8	67.5 ± 11.5	
男性一数(%)	768 (71.8)	371 (77.3)	
白人一数(%)	1061 (99.3)	476 (99.2)	
病因一数(%)			10
- 虚血性心疾患	545 (51)	288 (60.0)	
- 拡張型心筋症	123 (11.5)	64 (13.3)	
- 高血圧	97 (9.1)	26 (5.4)	
- Etoh	58 (5.4)	26 (5.4)	
- 毒(薬)	31 (2.9)	12 (2.5)	
- 心臓弁	117 (10.8)	33 (6.9)	
- その他	98 (9.3)	31 (6.5)	
HF継続期間、月†	24 (3-70)	20 (2-72)	20
LVEF (%)*	33.5 ± 13.3	26.01 ± 6.4	
NYHA機能性クラス一数(%)			
- I	62 (5.8)	0 (0)	
- II	746 (69.8)	362 (75.4)	
- III	254 (23.7)	115 (24)	
- IV	7 (0.7)	3 (0.6)	
ナトリウム、mmol/L*	138.7 ± 5.7	138.5 ± 3.5	
ヘモグロビン、g/dL*	12.9 ± 1.9	13.0 ± 1.8	30
eGFR、mL/分/1.73m <sup>2</sup> *	55.2 ± 26.6	54.2 ± 25.2	
NT-proBNP ng/L <sup>†,‡</sup>	1302 (531-2935)	1824 (971-3829)	
ネブリライシン、ng/mL <sup>†</sup>	0.642 (0.385-1.219)	0.637 (0.389-1.220)	
高血圧、数(%)	668 (62.5)	292	
糖尿病、数(%)	385 (36.0)	188 (39.2)	
治療(経過観察)、数(%)			
- ACEIまたはARB	952 (89.1)	480 (100)	
- βブロッカー	964 (90.2)	447 (93.1)	40
MRA	623 (58.3)	336 (70)	
ループ利尿薬	970 (90.7)	447 (93.1)	
ジゴキシン	413 (38.6)	197 (41)	

【 0 0 8 2 】

&lt; 表 1 欄外に記載の注釈 &gt;

## 【表 1 A】

表1中、\*は平均±標準偏差、†は中央値(Q1～Q3)、‡は患者1030名で入手可能なNTproBNPを示す。ACEIはアンジオテンシン転換酵素阻害剤、ARBはアンジオテンシンII受容体拮抗薬、eGFRは推定糸状濾過率(CKD-EPI)、Etohはアルコール性心筋症、HFは心不全、LVEFは左室駆出率、MRAはミネラルコルチコイド受容体遮断薬、NT-proBNPはN末端プロ脳ナトリウム利尿ペプチド、NYHAはニューヨーク心臓協会。

## 【0083】

## 【表 2】

複合主要エンドポイント				心血管死		
	HR	95%CI	P値	HR	95%CI	P値
年齢	1.03	1.02-1.04	<0.001	1.04	1.02-1.05	<0.001
女性	0.74	0.58-0.95	<0.001	0.63	0.46-0.86	0.003
HFの虚血性病因	1.09	0.86-1.38	0.5	1.06	0.80-1.40	0.71
LVEF	1.01	1.00-1.02	0.08	1.01	1.00-1.02	0.21
NYHA機能クラス	1.61	1.31-1.98	<0.001	1.75	1.37-2.22	<0.001
eGFR、ml／分／ 1.73 m <sup>2</sup>	0.99	0.98-1.00	0.002	0.99	0.99-1.00	0.004
糖尿病	1.42	1.14-1.77	0.002	1.42	1.09-1.85	0.009
ACEIまたはARB 治療	0.87	0.62-1.21	0.4	0.7	0.48-1.03	0.07
βブロッカー治療	0.54	0.39-0.76	<0.001	0.44	0.30-0.65	<0.001
ナトリウム	0.99	0.98-1.01	0.37	0.99	0.97-1.00	0.1
ヘモグロビン	0.93	0.87-0.99	0.03	0.97	0.90-1.05	0.44
NT-proBNP*	1.32	1.15-1.51	<0.001	1.43	1.21-1.69	<0.001
ネプリライシン*	1.18	1.07-1.31	0.001	1.18	1.05-1.32	0.006

## 【0084】

10

20

30

【表 3】

複合主要エンドポイント				心血管死		
	HR	95%CI	P値	HR	95%CI	P値
年齢	1.03	1.02-1.04	<0.001	1.03	1.02-1.05	<0.001
女性	0.84	0.64-1.10	0.21	0.75	0.54-1.04	0.09
HFの虚血性病因	1.01	0.78-1.29	0.97	0.96	0.71-1.29	0.78
LVEF	1.01	1.00-1.02	0.1	1.01	1.00-1.02	0.02
NYHA機能性クラス	1.48	1.18-1.96	0.001	1.56	1.20-2.03	0.001
eGFR、ml／分／ 1.73 m <sup>2</sup>	1	0.99-1.00	0.114	0.99	0.99-1.00	0.08
糖尿病	1.35	1.07-1.71	0.01	1.42	1.08-1.87	0.01
ACEIまたはARB治 療	0.76	0.51-1.11	0.16	0.75	0.47-1.17	0.2
βブロッカー治療	0.64	0.45-0.89	0.009	0.53	0.36-0.78	0.001
ナトリウム	0.97	0.94-1.01	0.12	0.95	0.92-0.99	0.03
ヘモグロビン	0.9	0.84-0.96	0.002	0.96	0.88-1.04	0.34
NT-proBNP*	1.11	0.94-1.31	0.21	1.19	0.97-1.45	0.09
Hs-cTnT* #	1.7	1.43-2.03	<0.001	1.54	1.22-1.93	<0.001
ST2 <sup>#†</sup>	1.12	1.02-1.23	0.02	1.11	0.99-1.24	0.06
ネブリライシン*	1.16	1.04-1.30	0.009	1.17	1.03-1.32	0.02

【 0 0 8 5 】

&lt; 表 3 欄外に記載の注釈 &gt;

【表 3 A】

HR、95%CI(CI:信頼区画)およびp値は、この変数を有する最後のステップで得たものである。

複合エンドポイントは、新血管死またはHF入院と定義した。

\*: 1SD当り、log(NT-proBNP)、log(hs-cTnT)およびlog(ネブリライシン)としてのNT-proBNP、hs-cTnTおよびネブリライシン。

#: 独立変数と従属変数の二次関係のため、このモデルには二次項も含まれる。

†: 10ng/ml当り。

HRはハザード比、HFは心不全、LVEFは左室駆出率、NYHAはニューヨーク心臓協会、eGFRは推定糸状  
 態濾過率(CKD-EP1)、ACEIはアンジオテンシン転換酵素阻害剤、ARBはアンジオテンシンII受容体拮抗  
 薬、NT-proBNPは脳ナトリウム利尿ペプチドのN末端プロホルモン、Hs-cTnTは高感度心筋トロポニンT、  
 ST2は可溶性ST2。

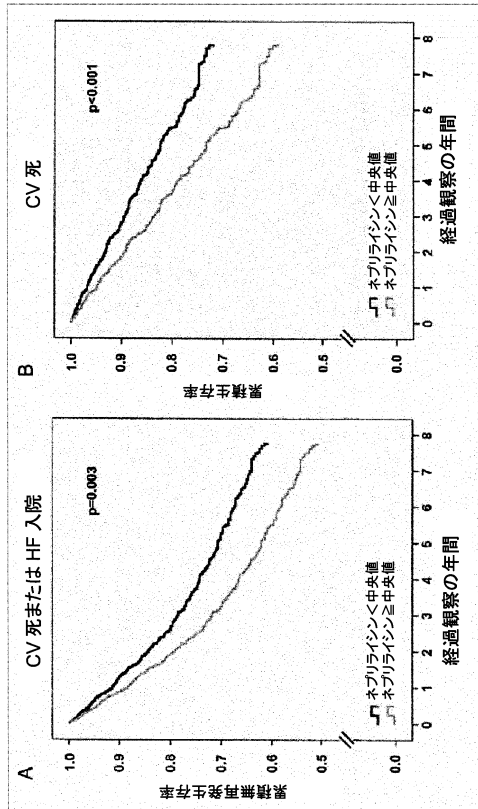
10

20

30

40

【図 1】



【配列表】

0006661216000001.app



---

フロントページの続き

- (72)発明者 ルボン ロザス, ヨゼフ  
スペイン国 サン クガ デル バリエス イー - 08195, カレル デ ブラジル ヌメロ  
7
- (72)発明者 ガラン オルテガ, アンパロ  
スペイン国 バルセロナ イー - 08023, カレル デ ロマ, ヌメロ 4, 4オ - 3ア
- (72)発明者 バララット マルティネス デ オサバ, ハウメ  
スペイン国 バルセロナ イー - 08013, カレル デ ルジェ デ フロル, 124, 8オ  
2ア

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第2014/029848(WO, A1)  
米国特許出願公開第2014/0228323(US, A1)  
米国特許出願公開第2014/0228415(US, A1)  
特表2013-510322(JP, A)  
Role of neutral endopeptidase 24.11 in AV fistular rat model of heart failure, Cardiovascular Research, 1996年, 31, 891-898  
Renal and Antihypertensive Effects of Neutral Endopeptidase Inhibition in Transgenic Rats With an Extra Renin Gene, American Journal of Hypertension, 1996年, 9, 795-802

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)