(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第5528461号
(P5528461)
(45)発行日 平成26年6月25日(2014.6.25)　(24)登録日 平成26年4月25日(2014.4.25)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/68 (2006.01)　G01N 33/68

請求項の数 8 (全 40 頁)

(21)出願番号 特願2011-531396(P2011-531396)
(86)(22)出願日 平成21年10月15日(2009.10.15)
(65)公表番号 特表2012-506031(P2012-506031A)
(43)公表日 平成24年3月8日(2012.3.8)
(86)国際出願番号 PCT/EP2009/007399
(87)国際公開番号 WO2010/043393
(87)国際公開日 平成22年4月22日(2010.4.22)
審査請求日 平成24年5月15日(2012.5.15)
(31)優先権主張番号 08018196.9
(32)優先日 平成20年10月17日(2008.10.17)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 591003013
エフ．ホフマン－ラ ロシュ アーゲー
Ｆ．ＨＯＦＦＭＡＮＮ－ＬＡ ＲＯＣＨＥ ＡＫＴＩＥＮＧＥＳＥＬＬＳＣＨＡＦＴ
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(73)特許権者 501318567
ザ ガバニング カウンシル オブ ザ ユニバーシティ オブ トロント
カナダ国 オンタリオ エム５エス １エイ１ トロント，キングス カレッジ サークル ２７
(74)代理人 100095832
弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】心不全の評価におけるビグリカンの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

a)個体から得られた血清、血漿および全血からなる群より選択される試料中のマーカータンパク質ビグリカンの濃度を測定する工程、ならびに

b)工程(a)で測定された濃度を、対照試料において確立された該タンパク質ビグリカンの濃度と比較することによって心不全を評価する工程

を含む、個体における心不全を評価するための方法。

【請求項２】

a')該試料中の心不全の1つ以上の他のマーカーの濃度を測定する工程、および

b')工程(a')で測定された濃度を、対照試料において確立された該１つ以上の他のマーカーの濃度と比較することによって心不全を評価する工程

をさらに含む、請求項１記載の方法。

【請求項３】

前記１つ以上の他のマーカーが、ナトリウム排泄増加性ペプチドマーカー、心臓トロポニンマーカー、および炎症マーカーからなる群より選択されることをさらに特徴とする、請求項２記載の方法。

【請求項４】

前記1つ以上の他のマーカーがNT-proBNPであることをさらに特徴とする、請求項３記載の方法。

【請求項５】

前記1つ以上の他のマーカーがトロポニンTであることをさらに特徴とする、請求項３記載の方法。

【請求項６】

前記試料が、血清および血漿からなる群より選択されることをさらに特徴とする、請求項１～５いずれか記載の方法。

【請求項７】

心不全の評価におけるマーカー分子としての、試料中のタンパク質ビグリカンの使用であって、該試料は、血清、血漿、および全血からなる群より選択される、使用。

【請求項８】

マーカータンパク質ビグリカンが、心不全のリスクがある個体から得られた試料中で測定される、請求項１～６いずれか記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の分野

本発明は、a)個体から得られた試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、b)任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびに工程(a)で測定された濃度および任意に工程(b)で測定された濃度（1つまたは複数）を、対照試料において確立されたこのマーカー（1つまたは複数）の濃度と比較することにより心不全を評価する工程を含む、個体における心不全を評価する方法に関する。心不全の評価におけるマーカータンパク質としてのビグリカンの使用、ビグリカンを含むマーカー組合せおよびビグリカンを測定するためのキットも開示される。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

心不全（HF）は、増大している主要な公衆衛生課題である。例えば、米国では、およそ500万人の患者がHFを有しており、毎年、新たに55万人を超える患者がHFと診断されている（In: American Heart Association、Heart Disease and Stroke Statistics: 2008年最新版、Dallas、Texas、American Heart Association（2008））。同様に、米国の統計によると、HFは、1200万～1500万件の来診の主な理由であり、毎年650万人が在院していると示されている。1990年から1999年に、年間の入院件数は、初診でHFに関して約81万人から100万人を超えるまで増加し、初診または二次診断でHFに関して、240万人から360万人まで増加している。2001年には、ほぼ53,000人の患者が、HFが主な原因として死亡している。心不全は主に高齢者の病気であるので、「人口の高齢化」もHFの発病の増加に寄与していると広く認識されている。HFの発病率は、65歳を超える集団では1000人当たり10人に達している。米国単独では、2005年にHFにかかった直接および間接的な推定総額はおよそ279億ドルであり、年間29億ドルがHFの治療薬に費やされている（上述のAHA統計を参照）。

【０００３】

心不全

心不全は、身体が必要とするだけ多くの血液をポンプ輸送する心臓の能力の低下を特徴とする。機能不全は心臓のポンプ輸送が停止することを意味するものではないが、通常ほど効率的には血液をポンプ輸送することができなくなることを意味する。

【０００４】

NYHA [New York Heart Association(ニューヨーク心臓協会)]およびACC/AHA[American Association of Cardiology/American Heart Association(米国心臓学会/米国心臓協会)]は共に、疾患の進行を評価するためのHFの機能的クラスを確立した。NYHA分類体系は病状の4つのクラスを有する：クラス1は任意の労作レベルで無症候である。クラス2は重労作時に症候性であり、クラスIIIおよびIVはそれぞれ軽い労作時および無労作時に症候性で

ある。

【０００５】

ACC/AHA体系の4つの病期において、病期Aは無症候であるがHFを発症するリスクがある。病期Bでは、症状はないが心臓機能不全の徴候がある。病期Cでは、症状があり心臓機能不全の徴候がある。病期Dでは、被検体は最大限の治療にも関わらずHFの症状を有する。

【０００６】

HFの病因

医学的に、心不全（HF）は複雑な疾患であると認識されるべきである。心不全は、心筋梗塞（心臓発作）などの誘発事象が生じることで引き起こされることがあるか、または高血圧、糖尿病もしくは心臓形成異常、例えば心臓弁膜症などの他の原因に続発性であることがある。心筋梗塞またはHFの他の原因は、例えば心筋の損傷により心臓のポンプ輸送能力の最初の低下が引き起こされる。1つ以上の代償機構が活性化するために、ポンプ輸送能力の低下は気づかれないことがある。しかし、HFの進行は患者の血流力学的状態とは独立していることが分かった。そのため、該疾患により引き起こされる損傷の変化は、患者が無症候のままであっても存在し、進行している。実際に、HFの初期の段階で正常な心臓血管機能を維持する代償機構は、実際に、例えば循環中に充分なレベルの血流を維持し得る心臓およびその能力に悪影響を及ぼすことによって、長期的に疾患の進行に寄与することがある。

【０００７】

HFを引き起こすさらに重要な病態生理学的変化のいくつかは、(i)視床下部-下垂体-副腎軸の活性化、(ii)全身性の内皮機能不全および（iii）心筋リモデリングである。

【０００８】

(i)視床下部-下垂体-副腎軸の活性化を拮抗するように特異的に指向される治療としては、β-アドレナリン作動性遮断剤（B-ブロッカー）、アンジオテンシン転換酵素（ACE）インヒビター、特定のカルシウムチャネル遮断薬、硝酸塩およびエンドセリン-1遮断剤が挙げられる。カルシウムチャネル遮断薬および硝酸塩は臨床的改善を生じるが生存を延長することは明確には示されておらず、一方でB-ブロッカーおよびACEインヒビターは、アルドステロンアンタゴニストと同様に有意に寿命を延長することが示されている。エンドセリン-1遮断剤を使用した実験的研究により有益な効果が示された。

【０００９】

(ii)全身性の内皮機能不全は、充分に認識されたHFの特徴であり、左心室機能不全の徴候が現れる時点までに明白に存在する。内皮機能不全は、心筋微小循環と心筋細胞の密接な関係について、重要である。その証拠は、微小血管機能不全が、進行性心筋不全を引き起こす心筋機能不全および形態学的変化に大きく寄与していることを示唆する。

【００１０】

基礎となる病態生理に関して、証拠により、NADH依存性オキシダーゼによる血管O_2形成の増加およびその後のNOの過剰な除去に起因し得るNOの相対的欠如により内皮機能不全が引き起こされ得ることが示唆される。O_2生成の増加の潜在的な寄与因子としては、交感神経系の緊張、ノルエピネフリン、アンギオテンシンII、エンドセリン-1およびTNF-αの増加が挙げられる。また、重要な抗炎症性サイトカインであるIL-10のレベルは、TNF-αのレベルに関係して不適切に低い。現在、IL-6などの前炎症性サイトカインと関連するTNF-αおよび可溶性TNF-α受容体のレベルの上昇は、心筋収縮性の低下、両心室の拡張および緊張低下を引き起こしてHFの進行に大きな役割を果たし、おそらく内皮の活性化および機能不全に関与していると考えられる。また、TNF-αは、重度のHF患者で生じるこれまで説明されていなかった筋肉の消耗において、ある役割を果たしている可能性があるとも考えられる。可溶性TNF受容体療法による少数の患者における予備研究では、生活の質指数で測定した場合、NYHA機能分類の改善および患者の改善が示された。

【００１１】

(iii)心筋リモデリングは、無症候性から症候性の心不全への変化を伴う複雑なプロセスであり、心室の形状、大きさおよび容積の変化などの心筋内の一連の適応変化として説

明され得る（Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23；Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426）。心筋リモデリングの主な構成要素は、筋細胞生物学的変化、例えば心筋肥大、壊死またはアポトーシスによる筋細胞の欠損、細胞外マトリックスの変化、左心室構造の変化である。心筋リモデリングは長期間の神経ホルモン性刺激の毒性効果への曝露の数年後に起こる単純な標的器官の応答であるのか、または心筋リモデリングは心不全の進行に独立して寄与するのかは不明である。これまでの証拠により、適切な治療によって心筋リモデリングの進行を遅延または停止することができることが示唆されている。

【００１２】

マーカーおよび疾患状態

上記のように、心筋肥大はHFへの第1段階の1つを表していると思われる。心筋肥大は、p-ミオシン重鎖およびトロポニンT（TnT）などの収縮タンパク質、ならびにA型およびB型ナトリウム利尿ペプチド等のいくつかの非収縮タンパク質をコードするいくつかの遺伝子の発現の増加、細胞の大きさの増加、かつ細胞骨格の変化を特徴とする（Piano, M.R., et al., J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23；Molkentin, J.D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426）。

【００１３】

心不全のヒトおよび動物モデルの研究により、心不全の後期病期における筋細胞機能の低下が示唆されている。筋細胞機能不全の基礎となる機構は、カルシウム操作ネットワーク、筋フィラメントおよび細胞骨格の変化を伴うことが示唆されている（de Tombe, P.P., Cardiovasc. Res. 37 (1998) 367-380）。例えば、心不全のヒトおよび動物モデルにおいて、筋小胞体カルシウムATPase酵素活性は減少しているが、筋線維膜Na+/Ca2+交換体のmRNAおよびタンパク質のレベルは共に増加している。さらに、心不全のヒトおよび動物モデルの両方においてTnTのアイソフォームスイッチング、トロポニンI（TnI）のリン酸化の減少、筋原繊維アクトミオシンATPase活性の減少および微小管形成の増強が見られる。

【００１４】

最初に、心筋リモデリングを引き起こす心臓の変化は、身体の酸素および栄養要求を持続するために、心筋の疾患部分の代償が意図される。しかしながら、心不全の代償期は限られており、最終的に、心不全の心臓は、身体の要求に答えるための適切な心拍出量を維持することができなくなる。従って、代償期から代償不全期への変化が生じる。代償不全期において、心臓の変化のカスケードは継続するがもはや有益ではなく、患者は心不全へと進行し、慢性状態となり最終的に死亡する。

【００１５】

「ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult」（S. Hunt et al., www.acc.org = the ACC/AHA practice guidelines）によると、心不全の分野での疾患の連続体は、現在では上記のように4つの病期に分類される。病期AおよびBでは、心不全を発症するリスクのある個体が見られ、病期CおよびDでは心不全の徴候および症候を示す患者の群が表される。上記参考文献に示した異なる病期A～Dを定義する詳細は、参照により本明細書に含まれる。

【００１６】

心不全の診断方法

HFを有する患者の評価における最も有用な単一の診断試験は、心筋層、心臓弁または心膜の異常が存在するか、どの房室が関与しているかを調べるためのドップラー血流検査と組み合わせた包括的な二次元心エコー図である。3つの基本的な質問に取り組まなければならない：1)LVEFは保たれているか、低下しているか、2)LVの構造は正常であるか、異常であるか、および3)弁、心膜または右心室の異常など臨床所見の原因となり得る他の構造の異常はあるか？この情報は、EFの数値予測、心室の寸法および/または容積の測定、壁の厚さの測定、ならびに房室構造および局所壁運動の評価により定量すべきである。右心室の大きさおよび心収縮期の振る舞いを評価すべきである。心房の大きさも半定量的に測定すべきであり、左心房の寸法および/または容積も測定されるべきである。

【００１７】
　心エコー検査時に得られた非侵襲性血流力学のデータは、EFが保たれているかまたは低下している患者について、さらなる重要な相関因子である。僧帽弁流入パターン、肺静脈流入パターン、僧帽弁環状速度の定量を組み合わせると、LV充填および左心房圧の特性についてのデータが提供される。下大静脈の寸法および呼吸時のその応答の測定と組み合わせた三尖弁逆流勾配の評価により、肺動脈収縮圧中心静脈圧の評価が提供される。
【００１８】
　1回拍出量は、寸法の測定とLV流出路のパルスドップラーの組合せにより決定され得る。しかし、HFが非存在の場合は、これらのパラメータのいずれかに異常が存在し得る。必ずしもこれらの1つがHFと特異的に相関するとは限らないが、全体的に正常な充填パターンは、臨床的HFの反証となる。
【００１９】
　臨床的観点から、該疾患は、代償期および初期代償不全期において臨床的には無症候である（病期Aでは完全に無症候であり、病期Bでは構造的心臓疾患を有するがHFの徴候および症候はない、ACC/AHA実施ガイドライン参照）。該疾患の外観的な徴候（例えば息切れ）は、代償不全期（すなわち、ACC/AHAガイドラインによると病期CおよびD）に移行するまで充分に現れない。現在の診断は、病期CおよびDの患者の外観的症状に基づいている。
【００２０】
　典型的に、心不全を有する患者は、心不全に関与する特異的な機構と相互作用する薬剤による標準的な治療を受ける。これらの特異的な機構を確実に反映し、正しい患者に対して医師が正しい薬物（および用量）（例えばACEインヒビター、AT II、βブロッカー等）を選択することを補助する診断試験はない。
【００２１】
マーカーによるHFの従来の診断
　心不全のリスクがある患者の早期評価は、この病期では、心不全を発症するリスクのある個体はまだ臨床的HF症状がないため、生化学的マーカーのみによって可能なようである。該疾患の症状が出る前の確実な評価に現在利用可能な確立された生化学的マーカーはない。現在、HFの診断が確立される時点までに、該疾患はすでに進行している。
【００２２】
　ナトリウム利尿ペプチドファミリー、特に心房性ナトリウム利尿ペプチドファミリーおよび脳ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、HFの評価に重要な価値があることがここ数年で証明された。
【００２３】
HF予後および必要性
　少なくとも一部は、診断の遅れにより、HFの患者の50％は診断の2年以内に死亡する。5年生存率は30％未満である。現在、心不全の初期診断を補助する新規の生化学マーカーに関して大きな必要性がある。
【００２４】
　心不全のリスクのある個体、すなわち心不全について臨床的に無症候な個体の早期評価の改善は当然である。
【００２５】
　近年、B型ナトリウム利尿ペプチドマーカーはHFの患者における疾患の進行のモニタリングおよび心臓発作などの心臓血管合併症のリスクの評価に優れたツールを表すことが確立された。
【００２６】
　しかしながら、多くの他の診断領域について、単一マーカーでは充分でない。
【００２７】
　NT-proBNPの低い値はHFまたはLVDを除外するための非常に高い負の予測値を有するが、前述および他の研究（Triepels R.H., et al., Clin. Chem. 49, Suppl. A (2003) 37-38参照）においては、心不全についての正の予測値は50～60％の範囲であることが見出され

た。従って、単独で、またはNT-proBNPと組み合わせて、NT-proBNP単独と比較して、高いまたは改善されたHFの正の予測値を有する、心不全のリスクのある個体の評価に有用なマーカーが臨床/実施において非常に重要である。

【００２８】

心不全を有する患者の評価を補助するマーカーはまた、この臨床的に非常に重要で要求の厳しい診断領域において、さらなる技術的進歩を達成するために非常に重要である。

【発明の概要】

【００２９】

発明の概要

本発明で、マーカービグリカンは心不全の評価を補助し得るということが見出され、確立された。一態様において、該マーカーは、個体が心不全を発症するリスクを有するかどうかの評価に役立ち得る。さらなる局面において、該マーカーは、疾患の進行の評価を補助し得る。別の態様において、該マーカーは、心不全の発症の予測を補助し得る。別の態様において、該マーカーは、心不全を予防または治療するための適切な治療計画の評価および選択を補助し得る。

【００３０】

個体から得られた試料中でマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、該試料中で1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにビグリカンの濃度および任意に1種類以上の他のマーカーの濃度を、対照試料中で確立されたこのマーカーまたはこれ他のマーカーの濃度と比較することにより心不全を評価する工程を含む、個体における心不全を評価する方法が本明細書に開示される。

【００３１】

本発明はまた、心不全の評価におけるマーカー分子としてのタンパク質ビグリカンの使用に関する。

【００３２】

さらに、心不全の評価におけるビグリカンおよび1種類以上の心不全の他のマーカーを含むマーカー組合せの使用が開示される。

【００３３】

試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにビグリカンの濃度および任意に1種類以上の他のマーカーを、参照集団中で確立された一種類以上のマーカーの濃度と比較することにより心不全を評価する工程を含む、インビトロで心不全を評価する方法を実施するためのキットであって、ビグリカンおよび任意に1種類以上の他の心不全のマーカーを特異的に測定するために必要な試薬を含むキットも提供される。

【００３４】

本発明のさらなる局面および利点は、以下の記載を参照して明白である。しかしながら、本発明の精神および範囲内の種々の変更および改変は、本発明の詳細な説明から当業者に明白であるので、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示すが、単なる例示として示されることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１Ａ】図１は、野生型およびR9Cマウスの表現型解析である。(A)野生型マウス(n=79)およびR9Cマウス(n=44)の生存曲線は、24週間後に作成される。

【図１Ｂ】図１は、野生型およびR9Cマウスの表現型解析である。(B)超音波心臓検査によって評価される心臓短縮(=短縮割合(fractional shortening))。R9Cトランスジェニック動物の有意な機能障害が8週齢ほどで早く始まる。

【図２】図２は、野生型マウスおよびABマウスにおける超音波心臓検査および血行力学パラメータである。(A)手術後2週、4週、8週での最大血圧mmHgの変化。(B)手術後2週、4週、8週での左心室駆出率(LVEF)%の変化。(黒丸は偽手術マウスのデータを示し、白丸は大動脈バンディング(binding)(AB)を有するマウスのデータを示す。

【図３】図３は、それぞれ、242名のHF患者由来の試料および118個の対照試料において測定されたビグリカンである。濃度をng/mlでy軸上に示す。それぞれ、心不全を有する患者由来の試料をHF(HF=正方形)および健常対照をNHS(正常ヒト血清=NHS=ひし形)と表示する。

【図４】図４は、それぞれ、臨床的日常手順によるHF試料中、および拡張対照パネルにおいて検出されたビグリカン値である。計算された濃度を、心不全を有する患者由来の(HF)と表示した試料、および健常対照由来の正常ヒト血清=NHSと表示した試料それぞれで測定されたビグリカンについて示す。ボックスおよび箱髭図は、下および上四分(ボックス)ならびに最大および最低値(髭)を示す。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

発明の詳細な説明

第一の態様において、本発明は、a)個体から得られた試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、b)任意に、試料中の1種類以上の他の心不全のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにc)工程(a)で測定された濃度および任意に工程(b)で測定された濃度（1つまたは複数）を、対照試料中で確立された一種類以上のこれらのマーカーの濃度と比較することにより心不全を評価する工程を含む、個体における心不全を評価する方法に関する。

【００３７】

本明細書で使用する場合、以下のそれぞれの用語は、このセクションにおける意味と関連する意味を有する。

【００３８】

冠詞「a」および「an」は、本明細書で使用する場合、1つまたは1つより多く（すなわち少なくとも1つ）の該冠詞の文法上の対象をいう。例として、「an antibody（抗体）」は、1つの抗体または1つより多くの抗体を意味する。

【００３９】

表現「1（種類）以上」は、1～50、好ましくは1～20、また好適には2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または15を表す。

【００４０】

用語「マーカー」または「生化学マーカー」は、本明細書で使用される場合、患者の試験試料を分析するための標的として使用される分子のことをいう。一態様において、かかる分子標的の例はタンパク質またはポリヌクレオチドである。本発明においてマーカーとして使用されるタンパク質またはポリヌクレオチドは、前記タンパク質の天然に存在する断片、特に免疫学的に検出可能な断片を含むことを企図する。免疫学的に検出可能な断片は、好ましくは、前記マーカーポリペプチドの少なくとも6、7、8、10、12、15または20個の連続したアミノ酸を含む。当業者は、細胞により放出されるかまたは細胞外マトリックスに存在するタンパク質は、例えば炎症の際に損傷して、かかる断片に分解または切断され得ることを理解しよう。ある種のマーカーは不活性形態で合成され、その後タンパク質分解により活性化され得る。当業者が理解するように、タンパク質またはその断片は複合体の一部としても存在し得る。かかる複合体が本発明の意味におけるマーカーとして使用されることもある。また、あるいは代替的に、マーカーポリペプチドは翻訳後修飾を有することもある。翻訳後修飾の例は、特に、グリコシル化、アシル化および/またはリン酸化である。

【００４１】

用語「心不全を評価する」は、本発明の方法により、個体が心不全を発症するリスクを有するかどうかを医師が評価することが補助されること、またはHFの診断に関連のある1つまたは複数の他の分野における医師のHF患者の評価において、医師を補助することを示すために使用される。HFを有する個体の評価に診断的に関連のある好ましい分野は、心不全の病期分類、急性心不全と慢性心不全の鑑別診断、疾患進行のリスクの判断、適切な薬物の選択の手引き、治療に対する応答のモニタリング、およびHF患者の追跡である。

【００４２】
本発明の意味における「心不全のマーカー」は、マーカービグリカンと組み合わせた場合、HFの評価において調査中の診断問題に関連情報を付加するマーカーである。HFの評価に関して、一定の特異性での感度、または一定の感度での特異性のそれぞれが、既にマーカービグリカンを含むマーカー組合せに前記マーカーを含むことで改善され得る場合には、該情報は、関連があるまたは付加価値であると見なされる。好ましくは、感度または特異性の改善はそれぞれ、p=0.05、0.02、0.01以下の有意性のレベルで統計学的に有意である。好ましくは、1種類以上の心不全の他のマーカーは、ナトリウム利尿ペプチドマーカー、心臓トロポニンマーカー、および炎症のマーカーからなる群より選択される。

【００４３】
用語「試料」は、本明細書で使用される場合、インビトロでの評価目的で得られた生物学的試料をいう。本発明の方法において、好ましくは試料または患者試料は、任意の体液を含み得る。好ましい試験試料としては、血液、血清、血漿、尿、唾液および滑液が挙げられ得る。好ましい試料は、全血、血清、血漿または滑液であり、血漿または血清が最も簡便な種類の試料である。当業者が理解するように、任意のかかる評価はインビトロでなされる。患者試料はその後廃棄される。患者試料は本発明のインビトロ方法のみに使用され、患者体内には戻されない。典型的に、試料は液体試料、例えば全血、血清または血漿である。

【００４４】
表現「～の濃度を対照試料中で確立された濃度と比較する」は、何らかの方法において当業者に明らかであることをさらに説明するためだけに使用される。対照試料は、内部または外部対照試料であり得る。一態様において、内部対照試料が使用され、すなわち、（1つまたは複数の）マーカーの（1つまたは複数の）レベルに何らかの変化があるかどうかを決定するために、前記マーカーレベル(１つまたは複数)が試験試料中および同一の被検体から得られた1種類以上の他の試料中で評価される。別の態様において、外部対照試料が使用される。外部対照試料に関して、個体由来の試料中のマーカーの存在または量は、所定の状態に罹患することがわかっているかまたは該状態のリスクを有することがわかっている個体あるいは所定の状態を有さないことがわかっている個体、すなわち「正常個体」中のマーカーの存在または量と比較される。例えば、患者試料中のマーカーレベルは、HFにおける特定の疾患の経過と関連することが知られるレベルと比較することができる。通常、試料のマーカーレベルは、直接または間接的に診断と相関し、マーカーレベルは、例えば個体がHFのリスクを有するかどうかを決定するために使用される。あるいは、試料のマーカーレベルは、例えば、疾患進行のリスクの判断またはHF患者の追跡において、HF患者における治療に対する応答、急性心不全と慢性心不全の鑑別診断、HFを治療するための適切な薬物の選択の手引き、疾患進行と関連があることがわかっているマーカーレベルと比較することができる。意図される診断使用目的に応じて適切な対照試料が選択され、それに対してマーカーについての対照値または参照値が確立される。一態様におけるかかる対照試料は、年齢が一致し、混同性疾患を有さない参照集団から得られることが当業者には理解されよう。また、当業者に明白なように、対照試料において確立される絶対マーカー値は、使用されるアッセイに依存する。好ましくは、対照（参照）値を確立するために、適切な参照集団由来の100個の充分に特徴付けされた個体由来の試料が使用される。また、好ましい参照集団は、20、30、50、200、500または1000の個体からなるように選択され得る。健常個体は、対照値を確立するための好ましい参照集団である。

【００４５】
ビグリカン

ビグリカンは、二本のグリコサミノグリカン鎖で置換された分子量約40kDのコアタンパク質からなる小分泌プロテオグリカンである。ビグリカンの他の名称は、BGN、DSPG1、PG-I、PG-S1、プロテオグリカン-I、SLRP1A、ビグリカンプロテオグリカン、骨/軟骨プロテオグリカン-I、デルマタン硫酸プロテオグリカンI、小ロイシンリッチタンパク質1Aである。ヒトビグリカンポリペプチドは、368アミノ酸（配列番号:1参照）のプレ-プロペプチ

ド（=前駆体ポリペプチド）として形成される。アミノ酸1～19はシグナルペプチドを表す。アミノ酸1～37はプレ-プロペプチドのプロセッシングの際に切除されるので、成熟ビグリカンタンパク質は、配列番号:1のアミノ酸38～368からなる。

【００４６】

ビグリカンは、小ロイシンリッチプロテオグリカン（SLRP）ファミリーの一員であり、繰り返しロイシンリッチアミノ酸モチーフがあることを特徴とする（Fisher, L.W. et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 4571-4576）。ビグリカンおよびデコリンは、遺伝子重複の結果であると考えられている。デコリンは、一本の付加されたグリコサミノグリカン鎖を含むが、ビグリカンは二本含む。このため、後者のタンパク質はビグリカンと称される。

【００４７】

ビグリカンは、ほぼ全てのヒト組織に見られるが、器官内では均一に分布していない。その発現パターンは、種々の病理状態で変化する。ビグリカンの生物学的役割に関するデータの量は増えているが、その生物学的機能の多くは、依然としてほとんど明らかになっていないようである。

【００４８】

ビグリカンは、細胞外マトリックスの多機能成分である。ビグリカンは、成長因子（TGF-β、TNF-α）ならびに細胞外マトリックスタンパク質（コラーゲン-IおよびV、フィブロネクチン、ジストログリカンおよびホスホリパーゼA2 II型）などの種々の他のタンパク質に結合する。これらの多様な結合活性が、多くの組織において多様な機能を発揮するビグリカンの能力の原因となっている。ビグリカンは、コラーゲン小繊維および転移成長因子-βに結合することで、結合組織代謝に関与している。また、ビグリカンは、神経生存においても機能することが記載されている。ビグリカンは、骨格筋成長/リモデリングにも働く。ビグリカン欠損マウスは、骨粗しょう症様表現型を発現することが示された（Xu, T. et al., Nat. Genet. 20 (1998) 78-82）。ビグリカンは、Happle症候群の候補遺伝子である。ビグリカンは、子かん前症において上方制御されることが示されている（Gogiel, T., et al., European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 134 (2007) 51-56）。

【００４９】

ビグリカンは、癌においても役割/機能を有すると記載されている。いくつかの出願では、ビグリカンのmRNAまたはタンパク質レベルでの識別的発現による腫瘍診断を論じている。JP 2008072952では、いくつかの候補マーカー遺伝子（そのうちの1つがビグリカンをコードする）による肝内胆管癌（ICC）の鑑別診断を論じている。US 2006/0210975では、心血管形成の診断に有用である多くの遺伝子（そのうちの1つがビグリカンである）を記載している。WO 2001/036674は、前立腺癌において異常な発現レベルを有する26の遺伝子の1つ以上（そのうちの1つがビグリカンである）を検出することによる、癌などのヒト前立腺障害の検出に関する。

【００５０】

ビグリカンは、アテローム硬化症においてある役割を果たしているようである（Fedarko, N.S. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 12200-12209; Klezovitch, O. and Scanu, A.M., Trends Cardiovasc. Med. 11 (2001) 263-268）。動脈血管において、平滑筋細胞でビグリカンが合成される。血管内のアテローム硬化症斑の形成は、ビグリカン発現の増加と関連している（Riessen, R. et al., Am. J. Pathol. 144 (1994) 962-974）。アテローム硬化症斑に関連する因子は、ビグリカン発現の増加を引き起こすことも示されている（Chang, M.Y. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23 (2003) 809-815）。

【００５１】

ビグリカンの発現は、炎症メディエーターの一酸化窒素（NO）によって下方制御されることも示された（Schaefer, L. et al., J. Biol. Chem. 278 (2003) 26227-26237）。

【００５２】

数百の遺伝子（特に心臓ビグリカンのmRNA）の上方制御は、ラットの心不全において実

験的に誘導されると報告された（Ahmed, M.S. et al., Cardiovascular Research 60 (2003) 557-568）。トランスジェニックマウスにおけるヒトビグリカンタンパク質の過剰発現は、プロテオミクスにより解析されたいくつかの候補遺伝子の発現の変化を生じた（Bereczki, E. et al., J. Proteome Research 6 (2007) 854-861）。

【００５３】

WO 2008/084268は、ビグリカンまたはビグリカン活性の促進因子の治療的使用（抗アテローム硬化症効果および抗虚血効果）、ならびにアテローム硬化症および虚血（例えば心臓）疾患の予防および治療のための方法におけるそれらの使用に関する。US 2003/0032591では、薬物の有効成分としてのビグリカンの使用による瘢痕化の予防または低減のための方法が提供される。EP 0 686 397では、神経細胞の再生におけるビグリカンの治療効果が特許請求されている。

【００５４】

先行技術において、体液中のタンパク質ビグリカンの存在またはレベルが心不全の評価に診断有用性を有するとは知られていないかまたは示唆されていないようである。

【００５５】

本発明の発明者らは、個体由来の体液試料から測定した場合のビグリカンの値の増加が心不全を示すということを見出し、確立し得た。

【００５６】

対照群または対照集団において測定されたビグリカンの値は、例えばカットオフ値または参照範囲を確立するために使用される。かかるカットオフ値よりも高い値または参照範囲の外側の値、またはその高い末端は上昇したと見なされる。

【００５７】

一態様において、固定カットオフ値が確立される。かかるカットオフ値は目的の診断問題に見合うように選択される。

【００５８】

一態様において、対照群または対照集団中で測定したビグリカンの値は、参照範囲を確立するために使用される。好ましい態様において、ビグリカン濃度は、測定した値が参照範囲の90パーセンタイル（%-percentile）より高い場合に上昇したと見なされる。さらに好ましい態様において、ビグリカン濃度は、測定した値が参照範囲の95パーセンタイル、96パーセンタイル、97パーセンタイルまたは97.5パーセンタイルよりも高い場合に上昇したと見なされる。

【００５９】

一態様において、対照試料は内部試料である。この態様において、一連の試料は調査中の個体から得られ、マーカーレベルが比較される。例えば、これは治療の有効性の評価に有用であり得る。

【００６０】

本発明の方法は、個体から得られた液体試料およびかかる試料中のビグリカンの測定に基づく。本明細書で使用される場合、「個体」は単一のヒトまたは非ヒト生物をいう。したがって、本明細書に記載される方法および組成物はヒトおよび獣医学的疾患の両方に適用可能である。好ましくは、個体はヒトである。

【００６１】

好ましくは、マーカービグリカンは特異的結合剤の使用により、液体試料から特異的に測定される。

【００６２】

特異的結合剤は、例えばビグリカンに対するレセプター、ビグリカンに結合するレクチンまたはビグリカンに対する抗体である。特異的結合剤は、その対応する標的分子に対して少なくとも10^7 l/molの親和性を有する。特異的な結合剤は、その標的分子に対して、好ましくは10^8 l/mol、さらにより好ましくは10^9 l/molの親和性を有する。当業者が理解するように、用語特異的は、試料中に存在する他の生体分子がビグリカンに特異的な結合剤に有意に結合しないことを示すために使用される。好ましくは、標的分子以外の生体分子へ

の結合のレベルはわずか10％以下、より好ましくはわずか5％以下のそれぞれの標的分子に対する親和性である結合親和性を生じる。好ましい特異的結合剤は、親和性および特異性について上述の最低基準の両方を満たす。

【００６３】

好ましくは、特異的結合剤は、ビグリカンに反応性の抗体である。用語抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、かかる抗体の抗原結合断片、単鎖抗体、ならびに抗体の結合ドメインを含む遺伝子構築物をいう。

【００６４】

特異的結合剤の上述の基準を有する任意の抗体断片を使用することができる。例えばTijssen（Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam(1990)、書籍全体、特に43～78頁）に記載されるように、当該技術分野の技術水準の手法により抗体を生成する。また、当業者は、抗体の特異的な単離に使用できる免疫吸着に基づく方法を熟知している。これらの手段により、免疫アッセイにおけるポリクローナル抗体の質およびそれらの性能を高めることができる（Tijssen, P.，前掲、108～115頁）。

【００６５】

本発明に開示される成果のために、ヤギで生成したポリクローナル抗体を使用してもよい。しかしながら、明白に、異なる種、例えばラット、ウサギまたはモルモット由来のポリクローナル抗体ならびにモノクローナル抗体を使用することもできる。モノクローナル抗体は一定の性質で、任意の必要量で生成することができるので、臨床的常套手段のアッセイの開発における理想的なツールである。

【００６６】

本発明の方法における、ビグリカンに対するモノクローナル抗体の生成および使用はそれぞれ、さらなる他の好ましい態様を表す。

【００６７】

天然供給源からビグリカンを精製することは容易ではない。ビグリカンの組換え生成は、より多量のビグリカンを得るために選択される方法である。好ましい態様において、真核生物発現系を使用して、組み換え発現によりビグリカンを生成する。真核生物発現系の例は、バキュロウイルス発現、酵母での発現および哺乳動物発現系での発現である。好ましい一態様において、ビグリカンの発現は、哺乳動物発現系で行われる。哺乳動物発現系の例は、CHO細胞、HEK細胞、骨髄腫細胞等である。さらに好ましい態様において、組み換え生成したビグリカンは、ビグリカンに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の生成において抗原として使用される。また、本明細書に上述される組換えにより生成したビグリカンを使用して、ビグリカン免疫吸着物質に対する免疫吸着によりポリクローナル抗体を精製することも好ましい。

【００６８】

当業者が本発明において、ビグリカンは、HFの評価に有用なマーカーとして同定されたことを認識したため、本発明の成果と同等の結果を達成するために代替的な方法を使用してもよいことが理解されよう。例えば、抗体を生成するための代替的なストラテジーを使用してもよい。かかるストラテジーは、特に、免疫のために臨床的に関連のあるビグリカンのエピトープを提示する合成または組換えペプチドの使用を含む。あるいは、DNAワクチン接種として公知であるDNA免疫を使用してもよい。

【００６９】

測定のために、個体から得られた液体試料を、結合剤ビグリカン複合体の形成に適した条件下でビグリカンに対する特異的結合剤とインキュベートする。当業者は任意の創意努力を必要とせずにかかる適切なインキュベーション条件を容易に特定できるので、かかる条件を明記する必要はない。結合剤ビグリカン複合体の量を測定して、HFの評価に使用する。当業者が理解するように、特異的結合剤ビグリカン複合体の量を測定するために多くの方法があり、全ては関連の教本に詳細に記載される（例えば、Tijssen P.、前掲、またはDiamandis, E. P. and Christopoulos, T.K. (編), Immunoassay, Academic Press, Bo

ston (1996)参照）。

【００７０】

好ましくは、ビグリカンはサンドイッチ型アッセイ形式で検出される。かかるアッセイにおいて、第1の特異的結合剤は一方側でビグリカンを捕捉するために使用され、直接または間接的に検出可能に標識された第2の特異的結合剤は他方側で使用される。好ましくは、定性的（ビグリカンの存在もしくは非存在）または定量的（ビグリカンの量を測定する）免疫アッセイにビグリカンに対する抗体を使用する。

【００７１】

実施例のセクションに詳細に記載されるように、2種類のマウスモデルを使用した最新のマイクロアレイおよびプロテオミクス法により、実験動物の心臓組織中に見られたmRNAおよびポリペプチドを同定した。しかしながら、これらのモデルは、少なくとも一部矛盾するデータを生じ、当然のことながら、mRNAまたはそれぞれのポリペプチドについての組織データは循環中のこれらのポリペプチドの存在または非存在を示さない。1つのモデルで識別発現することが見出されたマーカーは、第2のモデルでは識別発現されないことがあるか、さらなるモデルにおいて矛盾するデータを示すことさえある。識別発現したmRNAは、循環中のそれぞれのポリペプチドのレベルの増加と一致しないことがあるように思われる。タンパク質が組織中で識別発現されることがあったとしても、ほとんどの場合においてこのタンパク質は、体液から測定された場合、該タンパク質が、循環に放出されないことがある、例えば細胞もしくは組織からの放出の際に断片化もしくは修飾されることがある、循環中で安定でないことがある、循環中で測定可能でないことがある、所定の疾患に対して特異的でないことがある等の理由で、診断的関係性を何ら有さない。

【００７２】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、体液試料中でタンパク質ビグリカンを検出することができる。さらにより驚くべきことに、本発明者らは、個体から得られたかかる液体試料中のビグリカンの存在をHFと相関し得ることを示すことができる。HFの評価においてマーカービグリカンを使用するために組織も生検試料も必要とされない。タンパク質ビグリカンのレベルを測定することは、HFの分野において非常に有利であると思われる。

【００７３】

好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として血清を用いて実施される。さらに好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として血漿を用いて実施される。さらに好ましい態様において、本発明の方法は、液体試料材料として全血を用いて実施される。

【００７４】

さらに好ましい態様において、本発明は、個体から得られた液体試料からの心不全の評価におけるマーカー分子としてのタンパク質ビグリカンの使用に関する。

【００７５】

診断の理想的なシナリオは、感染性疾患のように単一の事象またはプロセスによりそれぞれの疾患が引き起こされるような状況である。全ての他の場合において、特に、例えばHFの場合のように、疾患の病因が十分に理解されていない場合、正確な診断は非常に困難であり得る。当業者が認識するように、HFの分野において、ある種の診断上の疑問に関して、100％の特異性と同時に100％の感度で診断される生化学マーカーはない。むしろ、生化学マーカーは、一定の可能性または予測値で、存在する診断上の疑問を評価するために使用される。当業者は、評価対象の診断上の疑問について、相対的なリスクまたは尤度を計算するための常套的に使用される数学的/統計学的方法に精通している。日常的な臨床実務において、一般的に、医師は、既存の疾患の診断、治療および管理において種々の臨床徴候および生物学的マーカーを一緒に考慮する。

【００７６】

好ましくは、本発明のさらに好ましい態様において、HFの評価方法は、ビグリカンおよび1種類以上の他のマーカーの濃度を測定すること、ならびにHFの評価においてビグリカンおよび1種類以上の他のマーカーの濃度を使用することにより実施される。

【００７７】
HFの評価において、マーカービグリカンは、以下の状況：心不全について個体のリスクを評価すること、または心不全を有する患者を例えば心不全の病期を同定する目的で評価すること、急性心不全と慢性心不全を区別すること、疾患進行のリスクを判断すること、適切な治療の選択のガイダンスを提供すること、治療に対する患者の応答をモニタリングすること、および疾患の経過をモニタリングすること、すなわちHF患者の追跡の1つ以上において医師を補助する。

【００７８】
スクリーニング（個体が心不全を発症するリスクを有するかどうかの評価）：
好ましい態様において、本発明は、試料中でマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、試料中の1種類以上の他の心不全のマーカーを測定する工程、ならびにビグリカンの濃度および任意に1種類以上の他のマーカーについて任意に測定された濃度（1つまたは複数）を、その参照値（1つまたは複数）に対する該マーカー（1つまたは複数）の濃度と比較することにより心不全を発症する前記個体のリスクを評価する工程を含む、個体が心不全を発症するリスクを有するかどうかを評価するインビトロ方法に関する。

【００７９】
本発明の意味において、スクリーニングは、心不全を発症する個体のリスクに関する個体の不偏な評価に関する。理論的に、かかるスクリーニングは任意の試料で実施されるが、臨床実務においては、通常、心不全を発症する何らかのリスクを有する個体に対してかかるスクリーニングの選択肢が提供される。上述のように、かかる個体は臨床的に無症候であり、すなわち、HFの徴候または症候を有さない。好ましい一態様において、HFのスクリーニングは、心不全を発症するリスクを有する個体、例えばACC/AHA実務ガイドラインに規定される病期AまたはBに該当する個体に対して行われる。

【００８０】
上述のように、先進国において、心不全は最も一般的に見られ、費用がかかり生命を脅かす疾患の1つである。その高い有病率および長い無症候期のために、HFを発症するリスクを有する個体の特定には、疾患に介入することおよび可能な場合は疾患の経過を止めることが最も重要である。非常に早期のリスク評価がなければ、無症候状態から症候状態への疾患の進行を予防することは不可能であると思われる。

【００８１】
心不全のリスクは、当業者に充分知られ、理解されている数学的/統計学的な方法により評価される。好ましくは、個体の心不全のリスクは、相対的観点で示される、いわゆる相対リスク（=RR）として示される。心不全のためのかかるRRを計算するために、ビグリカンについての個体の値を参照集団、好ましくは心不全を発症していない健常個体において確立されたビグリカンの値と比較する。また、心不全についてのかかるRRの好ましい評価は、研究期間中、好ましくは一年、同様に好ましくは二年以内に心不全を発症した個体の群および同じ研究期間中に心不全を発症しなかった個体の群に基づくものである。

【００８２】
別の好ましい態様において、本発明は心不全のスクリーニングにおけるマーカービグリカンの使用に関する。当業者に公知のように、用語「マーカーとしての使用」は、マーカー分子の濃度が適切な手段により定量されること、およびかかるマーカーについて測定値が、その後疾患または臨床状態の存在または非存在を示すため、すなわち徴候を示すために使用されることを示唆する。例えば、定量のための適切な手段は、抗体などの特異的結合剤である。

【００８３】
好ましくは、HFのスクリーニングは、将来心不全を発症するリスクを有することが疑われる個体において実施される。この意味において、将来の心不全のリスクを有する患者は、高血圧、アテローム性動脈硬化疾患、糖尿病、肥満およびメタボリックシンドロームを有すると診断された患者である。好ましくは、将来の心不全のリスクは、高血圧、アテローム性動脈硬化疾患、糖尿病、および/またはメタボリックシンドロームに苦しむ個体で

評価される。

【００８４】

ACC/AHA実務ガイドラインに従った病期Bの個体、すなわち心不全の症候は示さないが心臓の構造変化を示す個体についての将来の心不全のリスクの評価におけるマーカービグリカンの使用も好ましい。

【００８５】

さらに好ましい態様において、本発明は、HFスクリーニング目的のHFマーカー組合せのマーカーの1つとしてのビグリカンの使用に関する。

【００８６】

スクリーニングの状況において、ビグリカンのレベルの上昇は、個体の心不全を発症する高いリスクについての陽性指標となる。

【００８７】

患者の病期分類

好ましい態様において、本発明は、a)試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、b)任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびに工程(a)で測定した濃度および任意に工程(b)で測定した（1つまたは複数の）濃度を、その参照値（1つまたは複数）に対するこのマーカーの濃度と比較することにより心不全を病期分類する工程を含む、インビトロにおける心不全患者の病期分類を補助する方法に関する。好ましくは、マーカービグリカンのレベルは、調査される個体を、臨床的に「正常な」（すなわち、ACC/AHA分類に従った病期Aの個体）、構造的心臓疾患を有する無症候患者（ACC/AHA分類に従った病期B）および心不全を有する患者（すなわち、ACC/AHA分類に従った病期Cまたは病期Dの患者）の群に分類すことの補助として使用される。

【００８８】

急性心臓事象と慢性心臓疾患の識別

好ましい態様において、本発明は、試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびに工程(a)で測定した濃度および任意に工程(b)で測定した（1つまたは複数の）濃度を、その参照値（1つまたは複数）に対するこのマーカーの濃度と比較することにより、急性心臓事象と慢性心臓疾患の鑑別診断を確立する工程を含む、急性心臓事象と慢性心臓疾患の鑑別診断を補助するインビトロ方法に関する。

【００８９】

当業者は、「急性心臓事象」と「慢性心臓疾患」の意味に精通している。

【００９０】

好ましくは、「急性心臓事象」は、心臓の急性状態、疾患または機能異常、特に急性心不全、例えば心筋梗塞（MI）または不整脈に関する。MIの程度に応じて、LVDおよびCHFが続いて起こり得る。

【００９１】

好ましくは、「慢性心臓疾患」は、例えば心臓の虚血、冠動脈疾患、または以前の、特に小心筋梗塞（1つまたは複数）（その後LVDが続くことがある）のために心臓機能が弱まることである。炎症性疾患、心臓弁欠陥（例えば僧帽弁欠陥）、拡張型心筋症、肥大型心筋症、心臓脈欠損（不整脈）および慢性閉塞性肺疾患のためにも弱まることがある。従って、慢性心臓疾患に急性冠動脈症候群、例えばMIに苦しんだが現時点では急性心臓事象に苦しんでいない患者が含まれ得ることは明白である。

【００９２】

急性心臓事象と慢性心臓疾患は全く異なる治療計画が必要とされ得るので、急性心臓事象と慢性心臓疾患を識別することは重要である。例えば、急性心筋梗塞を示す患者には、再灌流の早期治療が最も重要であり得る。しかし、慢性心不全を有する患者に実施される再灌流の治療は、この患者にとってはせいぜい有害でないかまたはほとんど有害でないにすぎない。

【００９３】

本発明のさらに好ましい態様において、急性および慢性心不全の鑑別診断においてマーカービグリカンが使用される。
【００９４】
疾患進行のリスクの評価
好ましい態様において、本発明は、試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにビグリカンの濃度および任意に1種類以上の他のマーカーについて任意に測定された濃度（1つまたは複数）を、その参照値（1つまたは複数）に対するこのマーカーの濃度と比較することにより前記個体の疾患進行のリスクを確立する工程を含む、HF患者の疾患進行のリスクを評価するインビトロ方法に関する。
【００９５】
現在、HFであると診断された患者がいくぶん安定な状態を有するかどうか、または疾患が進行して結果的に患者の健康状態が悪化しそうであるかどうかを妥当な尤度で評価またはさらには予測することは非常に困難である。心不全の重症度および進行は、通常、臨床的症候を評価することまたは心エコー検査などの画像化技術を使用した有害な変化の同定により臨床的に確立される。一態様において、心不全の悪化は、左心室駆出率（LVEF）をモニタリングすることにより確立される。LVEFの5％以上の悪化は、疾患進行と見なされる。
【００９６】
従って、さらに好ましい態様において、本発明は、HFに苦しむ患者の疾患進行のリスクの評価におけるマーカービグリカンの使用に関する。HFに苦しむ患者の疾患進行の評価において、ビグリカンのレベルの上昇は、疾患進行のリスクの増加の指標である。
【００９７】
適切なHF治療の選択における手引き
好ましい態様において、本発明は、試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにビグリカンの濃度および任意に1種類以上の他のマーカーについて任意に測定された（1つまたは複数の）濃度を、その参照値（1つまたは複数）に対するこのマーカーの濃度と比較することにより、適切な治療を選択する工程を含む、適切なHF治療の選択を補助するインビトロ方法に関する。
【００９８】
マーカービグリカンは、医師が心不全の領域ですぐに使える種々の治療計画から最も適切な治療計画を選択することの補助に有用であることが予想される。従って、さらに好ましい態様において、HFに苦しむ患者の治療計画の選択におけるマーカービグリカンの使用に関する。
【００９９】
治療に対する患者の応答のモニタリング
好ましい態様において、本発明は、a)試料中のマーカービグリカンの濃度を測定する工程、b)任意に、試料中の1種類以上の心不全の他のマーカーを測定する工程、ならびに工程(a)で測定された濃度および任意に工程(b)で測定された（1つまたは複数の）濃度を、その参照値（1つまたは複数）に対するこのマーカーの濃度と比較することにより、HF治療に対する患者の応答をモニタリングする工程を含む、HF治療に対する患者の応答をモニタリングするインビトロ方法に関する。
【０１００】
あるいは、治療に対する患者の応答をモニタリングするための前記方法は、ビグリカンおよび任意の1種類以上の他のマーカーについての治療前および治療後のマーカーレベルを確立すること、ならびに（1つまたは複数の）治療前および治療後のマーカーレベルを比較することにより実施され得る。
【０１０１】
心不全の診断は臨床的に確立される。本発明によると、患者がACC/AHA実務ガイドライ

ンにより規定された病期CまたはDの基準を満たす場合、HFは臨床的に確立されたとみなされる。このガイドラインによると、病期Cは構造的心臓疾患を有し、以前または現在心不全の症候を有する患者をいう。病期Dの患者は、特殊な介入を必要とする難治性心不全を有する患者である。

【０１０２】

さらに上述されるように、NT-proBNPの測定値は心不全の重症度と高度に相関する。しかしながら、BNPとNT-proBNPは両方、治療に対する患者の応答をモニタリングするには理想的ではないように思われる。例えばBeck-da-Silva, L., et al., Congest. Heart Fail. 11 (2005) 248-253, quiz 254-255参照。

【０１０３】

マーカービグリカンは、治療に対する患者の応答をモニタリングするために適切であると思われる。従って、本発明は、治療に対する患者の応答のモニタリングにおけるビグリカンの使用にも関する。この診断領域において、マーカービグリカンは治療前のベースライン値を確立するため、および治療後の1つまたはいくつかの時点でビグリカンを測定するためにも使用できる。HF患者の追跡において、ビグリカンのレベルの低下は、HFの有効な治療の陽性指標である。

【０１０４】

マーカー組合せ

生化学的マーカーは、個々に測定され得るか、または本発明の好ましい態様においてチップ系またはビーズ系アレイ技術を用いて同時に測定され得るかのいずれかである。次いで、バイオマーカーの濃度は、各マーカーの個々のカットオフを用いて独立して解釈されるか、または解釈のために組合される、すなわち、マーカー組合せを形成する。

【０１０５】

当業者には認識されるように、マーカーレベルを一定の尤度またはリスクに相関させる工程は、種々の様式で行なわれ、達成され得る。好ましくは、マーカービグリカンおよび1種類以上の他のマーカーの測定値を数学的に組み合わせ、組み合せた値を根本の診断上の疑問と相関させる。マーカー値は、任意の適切な当該分野の技術水準の数学的方法によってビグリカンの測定値と組み合わされ得る。

【０１０６】

好ましくは、マーカーの組合せに適用される数学的アルゴリズムは、ロジスティック関数である。かかる数学的アルゴリズムまたはかかるロジスティック関数を適用した結果は、好ましくは単一の値である。根本の診断上の疑問に応じて、かかる値は、例えば、個体の心不全のリスクまたはHFの患者の評価に有用な他の意図される診断上の使用に容易に相関され得る。好ましい様式において、かかるロジスティック関数は、a)例えば、正常群、心不全のリスクのある個体群、急性または慢性心不全を有する患者群などへの個体の分類、b)単変量解析によってこれらの群間で有意に異なるマーカーの同定、c)これらの異なる群の評価に有用なマーカーの独立した識別値を評価するためのロジスティック回帰分析、ならびにd)独立した識別値を組み合わせるためのロジスティック関数の構築によって得られる。この型の解析において、マーカーはもはや独立ではなく、マーカー組合せを表す。

【０１０７】

好ましい態様において、ビグリカンの値と少なくとも1つのさらなるマーカーの値を組み合わせるために使用されるロジスティック関数は、a)正常群および心不全のリスクのある個体群それぞれへの個体の分類、b)ビグリカンの値および少なくとも1つのさらなるマーカーの値の確立、c)ロジスティック回帰分析の実施、ならびにd)マーカービグリカンの値と少なくとも1つのさらなるマーカーの値を組み合わせるためのロジスティック関数の構築によって得られる。

【０１０８】

マーカー組み合わせを疾患に相関させるロジスティック関数は、好ましくは統計的方法を適用することによって開発されかつ得られたアルゴリズムを使用する。適切な統計的方法は、例えば、識別分析(DA)(即ち、線形-、四分-、正規-DA)、カーネル法(即ち、SVM)、

ノンパラメトリック法(即ち、k-最近接分類)、PLS(部分最小二乗)、ツリーベース法(即ち、ロジック回帰、CART、ランダムフォレスト法、ブースティング/バギング法)、一般化線形モデル(即ち、ロジスティック回帰)、主要成分ベース法(即ち、SIMCA)、一般化付加モデル、ファジーロジックベース法、ニューラルネットワークおよび遺伝的アルゴリズムベース法である。当業者は、本発明のマーカー組み合わせを評価して、それによって適切な数学的アルゴリズムを得るための適切な統計的方法を問題なく選択する。好ましくは心不全の評価に使用される数学的アルゴリズムを得るために使用される統計的方法は、DA(即ち、線形-、四分-、正規識別分析)、カーネル法(即ち、SVM)、ノンパラメトリック法(即ち、k-最近接分類)、PLS(部分最小二乗)、ツリーベース法(即ち、ロジック回帰、CART、ランダムフォレスト法、ブースティング法)、または一般化線形モデル(即ち、ロジスティック回帰)から選択される。これらの統計的方法に関する詳細は、以下の文献: Ruczinski, I.ら, J. of Computational and Graphical Statistics 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., J. of the AmericanStatistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, T.ら, The Elements of Statistical Learning, Springer Verlag (2001); Breiman, L.ら Classification and regression trees, Wadsworth International Group, California (1984); Breiman, L., Machine Learning 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, Oxford University Press (2003); およびDuda, R.O.ら, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc.,第2版(2001)に見られる。

【０１０９】

本発明の好ましい態様は、生物マーカーの基礎となる組み合わせのための最適化多変量カットオフを使用すること、および状態Aと状態B、例えば、正常と心不全のリスクがある個体、療法に応答するHF患者と療法不応答、急性心不全を有する患者と慢性心不全を有するHF患者、疾患進行を示すHF患者と疾患進行を示さないHF患者それぞれを区別することである。

【０１１０】

受信者動作曲線下の面積(=AUC)は、診断手順の性能または精度の指標である。診断方法の精度は、受信者動作特性(ROC)によって最もよく記載される(特にZweig, M.H.,およびCampbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577を参照)。ROCグラフは、観察されたデータの範囲全体に対して判定閾値を連続して変化させることでもたらされる感度／特異性対の全てのプロットである。

【０１１１】

研究室試験の臨床性能は、その診断精度、または被験体を臨床的に関連する亜群に正確に分類する能力に依存する。診断精度は、調査される被験体の2つの異なる状態を正確に区別する試験の能力を評価する。かかる状態は、例えば、健康と疾患または疾患進行対疾患進行なしである。

【０１１２】

それぞれの場合において、ROCプロットは、判定閾値の完全範囲に対する感度対1-特異性のプロットによる2つの分布間の重複を示す。y軸は感度、即ち真陽性部分[(真陽性試験結果の数)/(真陽性の数+偽陰性試験結果の数)として定義される]である。これは、疾患または状態の存在下の陽性度とも呼ばれる。これは、罹患亜群のみから計算される。x軸は、偽陽性部分、即ち1-特異性[(偽陽性結果の数)/(真陰性の数+偽陽性結果の数)として定義される]である。これは、特異性の指標であり、罹患していない亜群全体から計算される。2つの異なる亜群の試験結果を使用することで、真陽性部分および偽陽性部分が完全に別々に計算されるために、ROCプロットは、試料中の疾患の有病率とは独立している。ROCプロット上の各点は、特定の判定閾値に対応する感度/1-特異性対を表す。完全識別を有する試験(2つの結果の分布に重複はない)は、左上隅を通過するROCプロットを有し、この場合真陽性部分は1.0、即ち100%(完全感度)であり、偽陽性部分は0(完全特異性)である。識別のない試験の理論的プロット(2つの群の結果の同一分布)は、左下隅から右上隅の45°の対角線である。ほとんどのプロットは、これらの2つの両端の間に入る。(ROCプロッ

トが45°対角線より下に完全に入る場合、これは「陽性度」の基準を「より大きい」から「より小さい」またはその逆に変換することによって容易に直される。)定性的に、プロットが左上隅に近づくほど、試験の全体精度は高くなる。

【０１１３】

研究室試験の診断精度を定量する1つの都合のよい目標は、1つの数によってその結果を表すことである。最も一般的で包括的な方法は、ROCプロット下の面積(AUC)である。約束事で、この面積は常に≧0.5である(そうでない場合、そうなるように判定規則を逆転し得る)。値は1.0(2つの群の試験値が完全に分離する)～0.5(2つの群の試験値間の明白な分布の違いはない)の範囲である。面積は、対角線に最も近い点または90%特異性での感度などのプロットの特定の部分だけに依存するのでなく、プロット全体にも依存する。これは、ROCプロットが完全なもの(面積=1.0)にどれくらい近いかを定量的に記述した表現である。

【０１１４】

アッセイ全体の感度は、本明細書に開示される方法を行なうために必要な特異性に依存する。特定の好ましい設定において、75%の特異性が十分であり得、統計的方法および得られるアルゴリズムは、この特異性要件に基づき得る。好ましい一態様において、心不全のリスクがある個体を評価するために使用される方法は、80%、85%、または好ましくは90%もしくは95%の特異性に基づく。

【０１１５】

上記のように、マーカービグリカンは、心不全を発症する個体のリスクの評価および心不全を有する患者のさらなるインビトロ診断評価を補助する。従って、好ましい態様は、心不全の評価におけるマーカー分子としてのビグリカンの使用である。

【０１１６】

HF患者の評価またはHFのリスクがある個体の評価におけるビグリカンおよびHFの１つ以上の他のマーカーを含むマーカー組み合わせの使用は、本発明のさらに好ましい態様を表す。かかるマーカー組み合わせにおいて、１つ以上の他のマーカーは、好ましくはナトリウム排泄増加性ペプチドマーカー、心臓トロポニンマーカー、および炎症マーカーからなる群より選択される。

【０１１７】

ビグリカンの測定と合わせられ得る好ましく選択された1つ以上の他のHFマーカーは、好ましくはナトリウム排泄増加性ペプチドマーカー、心臓トロポニンマーカー、および炎症マーカーからなる群より選択される。好ましくは(1つまたは複数の)測定値をビグリカンの測定値と合わせるまたはビグリカンを含むHFマーカー組み合わせの一部を形成する、これらの好ましい他のマーカーそれぞれが、以下でより詳細に議論される。

【０１１８】

ナトリウム排泄増加性ペプチドマーカー

ナトリウム排泄増加性ペプチドマーカーは、本発明の意味において、心房ナトリウム排泄増加性ペプチド(ANP)ファミリーから選択されるマーカーまたは脳ナトリウム排泄増加性ペプチド(BNP)ファミリーから選択されるマーカーのいずれかである。

【０１１９】

心房ナトリウム排泄増加性ペプチドファミリーまたは脳ナトリウム排泄増加性ペプチドファミリーのいずれかのポリペプチドマーカーは、対応する活性ホルモンのプレプロ形態に由来する。

【０１２０】

本発明による好ましいナトリウム排泄増加性ペプチドマーカーは、NT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNP、およびその免疫学的に検出可能な生理学的断片である。当業者が容易に理解するように、免疫学的に検出可能な断片は、かかる生理学的断片の特異的検出を可能にする少なくとも1つのエピトープを含まなければならない。生理学的断片は、個体の循環系中で天然に存在する断片である。

【０１２１】

両方のナトリウム排泄増加性ペプチドファミリーのマーカーは、対応のプロホルモンの断片、即ちproANPおよびproBNPそれぞれを表す。同様な考慮が両方のファミリーに適用されるために、BNPマーカーファミリーだけを、幾分詳細に記載する。BNPファミリーのプロホルモン、即ち、proBNPは、108個のアミノ酸からなる。proBNPは、生物活性ホルモンBNPを表す32個のC-末端アミノ酸(77～108)およびN-末端proBNP(またはNT-proBNP)と呼ばれるN-末端アミノ酸1～76に切断される。BNP、N-末端proBNP(1～76)ならびにさらなる分解産物(Hunt, P.J.ら, Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183)は、血液中で循環する。また、完全な前駆分子(proBNP1～108)が血漿中で生じるかどうかは、完全に解決されていない。しかし、血漿中のproBNP(1～108)の低い放出が検出可能であるが、N-末端での非常に早い部分分解のためにいくつかのアミノ酸がなくなることが記載されている(Hunt, P.J.ら, Peptides 18(1997) 1475-1481)。今日、例えば、NT-proBNPについて、アミノ酸10～50の間にある分子の中心部分が、生理学的にかなり安定な部分を表すことが一般的に受け入れられている。このNT-proBNPの中心部分を含むNT-proBNP分子が体液から確かに測定され得る。このNT-proBNP分子の中心部分の免疫学的検出に基づいた方法に関連する詳細な開示が、WO 00/45176に示され、読者は詳細についてそれを参照されたい。用語天然NT-proBNPが提案されるNT-proBNPの特定の亜分画だけを測定することがさらに有利であり得る。このNT-proBNPの亜分画に関連する詳細な開示がWO 2004/099253に見られる。当業者は、そこに全て必要な説明を見出す。好ましくは測定されるNT-proBNPは、Roche Diagnostics, GermanyのElecsys（登録商標）NT-proBNPアッセイで測定されるNT-proBNPであるか、またはこれに対応するものである。

【０１２２】

前分析物は、NT-proBNPについて丈夫（robust）であり、中央研究室への試料の簡易輸送を可能にする(Mueller, T.ら, Clin. Chem. Lab. Med. 42 (2004) 942-944)。血液試料は、数日間室温で保存され得、あるいは回収を損失することなく郵送または配達され得る。対照的に、室温または摂氏4℃での48時間のBNPの保存は、少なくとも20％の濃度低下をもたらす(Mueller, T.ら, 上掲; Wu, A.H.ら, Clin. Chem. 50 (2004) 867-873)。

【０１２３】

脳由来ナトリウム排泄増加性ペプチドファミリー(特にBNPおよびNT-proBNP)は、HFに対する特定の集団のスクリーニングにおいて徹底的に調査された。これらのマーカー、特にNT-proBNPを用いた発見は、かなり有望である。無症候「患者」でもNT-proBNPの上昇値は、「心臓問題」を明らかに示す(Gremmler, B.ら, Exp. Clin. Cardiol. 8 (2003) 91-94)。この著者らは、上昇したNT-proBNPが「心臓-腎臓窮迫」の存在を示し、更なる調査のための参照(refferal)が促進されるはずであることを示した。他のいくつかのグループの研究者と一致して、Gremmlerらは、また、異常なNT-proBNP濃度が、集団におけるHFの排除および呼吸のない被験体における左心室機能不全(=LVD)の可能性の排除の両方で正確な診断試験であることを発見した。HFまたはLVDの可能性を排除するネガティブBNPまたはNT-proBNP値の役割が、他のグループの研究者ら、例えば、McDonagh, T.A.ら, Eur. J. Heart Fail. 6 (2004) 269-273およびGustafsson, F.ら, J. Card. Fail. 11, Suppl. 5 (2005) S15-20参照によって実験されている。

【０１２４】

BNPは、心室で主に(だが専らではない)産生され、壁の緊張が増大する際に放出される。従って、放出されたBNPの増大は、心室の機能不全、または例えば、流入障害もしくは過負荷血液容量によって心房に起因するが、心室に影響を及ぼす機能不全を主に反映する。BNPとは対照的に、ANPは、主に心房から産生され、放出される。従って、ANPのレベルは、心房機能を主に反映し得る。

【０１２５】

ANPおよびBNPは、活性ホルモンであり、それぞれの不活性対応物NT-proANPおよびNT-proBNPよりも短い半減期を有する。BNPは、血液中で代謝されるが、NT-proBNPは、インタクト分子として血中で循環し、従って腎臓で排除される。NT-proBNPのインビボ半減期は、BNPの20分よりも長い120分である(Smith, M.W.ら, J. Endocrinol. 167 (2000) 239-246)

。
【０１２６】
従って、目的の時間経過または特性に応じて、ナトリウム排泄増加性ペプチドの活性形態または不活性形態のいずれかの測定が有利であり得る。
【０１２７】
心不全のリスクがある個体の評価において、ビグリカンについて測定された値は、好ましくはNT-proANPおよび/またはNT-proBNPの値と合わされる。好ましくはNT-proBNPの値は、ビグリカンの値と合わされる。同様の考慮が、適切な療法の選択、疾患進行のリスクの判断、および疾患の経過のモニタリングに適用される。
【０１２８】
療法に対する患者の応答の評価にビグリカンを使用する場合、その測定値は好ましくはANPまたはBNPの測定値と合わされる。
【０１２９】
急性と慢性の心不全を区別するためにビグリカンを使用する場合、好ましいマーカー組み合わせはビグリカン、ANPまたはproANPおよびBNPまたはproBNPを含む。
【０１３０】
心臓トロポニンマーカー
用語心臓トロポニンは、心臓アイソフォームのトロポニンIおよびトロポニンTに関する。既に先に示したように、用語マーカーはまた、生理学的断片または複合体等のマーカー分子の生理学的バリアントに関する。心臓トロポニンマーカーについて、生理学的に生じる複合体は、診断に関連することが公知であり、本明細書に表現上含まれる。
【０１３１】
トロポニンTは、約37,000Daの分子量を有する。心臓組織に見られるトロポニンTアイソフォーム(cTnT)は、骨格筋TnTと十分に異なっており、これらTnTアイソフォームの両方を区別する抗体の作製を可能にする。TnTは、急性心筋損傷のマーカーとみなされる; Katus, H.A.ら, J. Mol. Cell. Cardiol. 21 (1989) 1349-1353; Hamm, C.W.ら, N. Engl. J. Med. 327 (1992) 146-150; Ohman, E.M.ら, N. Engl. J. Med. 335 (1996) 1333-1341; Christenson, R.H.ら, Clin. Chem. 44 (1998) 494-501;およびEP 0 394 819参照。
【０１３２】
トロポニンI(TnI)は、トロポニン複合体の25kDa阻害性エレメントであり、筋肉組織に見られる。TnIは、Ca^{2+}の非存在下でアクチンと結合し、アクトミオシンのATPase活性を阻害する。心臓組織に見られるTnIアイソフォーム(cTnI)は、骨格筋TnIと40%異なっており、両方のアイソフォームを免疫学的に区別することができる。cTnIの正常血漿濃度は、<0.1 ng/ml(4 pM)である。cTnIは、心臓細胞死の後に血流に放出される; 従って、血漿cTnI濃度は、急性心筋梗塞を有する患者で上昇する(Benamer, H.ら, Am. J. Cardiol. 82 (1998) 845-850)。
【０１３３】
特有の心臓アイソフォームのトロポニンIおよびTは、他方の骨格筋のトロポニンと免疫学的に区別することができる。従って、損傷した心筋からのトロポニンIおよびTの血液への放出は、心臓組織の損傷と特異的に関連付けられ得る。また、今日では、心臓トロポニンが遊離形態または複合体の一部のいずれかとして循環から検出され得ることを当業者は理解している(例えば、米国特許第6,333,397号、米国特許第6,376,206号および米国特許第6,174,686号参照)。
【０１３４】
心不全のリスクがある個体の評価および心不全に罹患する患者の評価において、ビグリカンについて測定された値は、好ましくは心臓アイソフォームのトロポニンTおよび/またはトロポニンIの値と合わされる。マーカービグリカンと組み合わせて使用される好ましい心臓トロポニンは、心臓トロポニンTである。
【０１３５】
炎症マーカー

当業者は、用語炎症マーカーに精通している。好ましい炎症マーカーは、インターロイキン-6、C反応性タンパク質、血清アミロイドAおよびS100タンパク質である。

【０１３６】

インターロイキン-6(IL-6)は、多くの生物活性を有する21kDa分泌型タンパク質であり、造血に関与するものおよび先天性免疫応答の活性化に関与するものに分けることができる。IL-6は、急性期反応体であり、結合分子等の様々なタンパク質の合成を刺激する。その主な機能は肝臓タンパク質の急性期産生を媒介することであり、その合成はサイトカインIL-1およびTNF-αによって誘導される。IL-6は、マクロファージおよびTリンパ球によって通常産生される。IL-6の正常血清濃度は、<5pg/mlである。

【０１３７】

C反応性タンパク質(CRP)は、宿主防御に関与する21kDaサブユニットを有するホモ五量体Ca^{2+}結合急性期タンパク質である。CRP合成は、IL-6によって誘導され、IL-1が肝臓洞様血管のクップファー細胞によるIL-6の合成を誘発し得るために間接的にIL-1によって誘導される。CRPの正常血漿濃度は、健常集団の90％で<3μg/ml(30nM)であり、健常個体の99％で<10μg/ml(100nM)である。血漿CRP濃度は、例えば、ELISAによって測定され得る。

【０１３８】

低分子量11.7kDaの急性期タンパク質である血清アミロイドA(=SAA)は、IL-1、IL-6またはTNF-α刺激に応答して肝臓によって主に合成され、T細胞依存的免疫応答の調節に関与する。急性事象の際、SAAの濃度は、1000倍まで増加し、1ミリリットルあたり1ミリグラムに達する。SAAは、嚢胞性線維症、腎臓移植回復、外傷または感染のような多様な疾患の炎症をモニターするために使用される。関節リウマチでは、特定の場合にCRPの代用物として使用されているが、SAAはまだ広く受け入れられていない。

【０１３９】

S100タンパク質は、一定して増えているCa^{2+}結合タンパク質のファミリーを形成し、今日では20種類より多くを含む。S100タンパク質の生理学的に関連する構造は、ホモダイマーであるが、一部、例えばS100A8およびS100A9は、互いにヘテロダイマーも形成し得る。細胞内機能は、タンパク質リン酸化、酵素活性の調節、または細胞骨格の力学の調節から細胞増殖および分化における関与までの範囲である。いくつかのS100タンパク質がまた、細胞から放出されるために、例えば、神経生存、星状細胞増殖、アポトーシスの誘導および炎症プロセスの調節の細胞外機能も記載されている。S100A8、S100A9、ヘテロダイマーS100A8/A9およびS100A12は炎症に見られ、S100A8は慢性炎症に応答し、S100A9、S100A8/A9およびS100A12は急性炎症で増加する。S100A8、S100A9、S100A8/A9およびS100A12は、ある癌、腎臓同種移植片拒絶、大腸炎および最も重要にはRAなどの炎症成分を有する種々の疾患と関連している(Burmeister, G.,およびGallacchi, G., Inflammopharmacology 3 (1995) 221-230; Foell, D.ら, Rheumathology 42 (2003) 1383-1389)。例えば、本発明によるマーカー組み合わせにおける使用のための、HFのリスクがある個体またはHFを有する患者の評価のための最も好ましいS100マーカーは、S100A8、S100A9、S100A8/A9ヘテロダイマーおよびS100A12である。

【０１４０】

sE-セレクチン(可溶性内皮白血球接着分子-1、ELAM-1)は、内皮細胞のみで発現し、炎症サイトカイン(IL-1β、TNF-α)またはエンドトキシンによる活性化の後だけに発現する、115kDaのI型膜貫通糖タンパク質である。細胞表面E-セレクチンは、炎症の部位での白血球侵出の不可欠な工程である、内皮への白血球の回転接着のメディエーターであり、それによって局在した炎症応答において重要な役割を果たしている。可溶性E-セレクチンは、健常個体の血液中に見られ、おそらくは表面発現分子のタンパク質分解性切断から生じる。血清中のsE-セレクチンの上昇したレベルが、様々な病理学状態で報告されている(Gearing, A.J.およびHemingway, I., Ann. N.Y. Acad. Sci. 667 (1992) 324-331)。

【０１４１】

好ましい態様において、本発明は、個体から得られた液体試料からのHFの評価における1つ以上のHF用マーカー分子と組み合わせたHF用マーカー分子としてのビグリカンの使用

に関する。
【０１４２】
先に示したように、本発明による好ましい方法において、ビグリカンについて測定した値は、ナトリウム排泄増加性ペプチドマーカー、心臓トロポニンマーカー、および炎症マーカー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値と少なくとも合わされる。
【０１４３】
好ましい態様において、本発明は、心不全の評価におけるマーカー組み合わせビグリカンおよびNT-proBNPの使用に関する。
【０１４４】
好ましい態様において、本発明は、心不全の評価におけるマーカー組み合わせビグリカンおよびトロポニンTの使用に関する。
【０１４５】
好ましい態様において、本発明は、心不全の評価におけるマーカー組み合わせビグリカンおよびCRPの使用に関する。
【０１４６】
さらに好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカン、トロポニンT、NT-proBNPおよびCRPを含むマーカー組み合わせに関する。
【０１４７】
なおさらに好ましい態様において、本発明は、試料中のビグリカンおよびHFの1つ以上の他のマーカーの濃度を測定する工程、ならびにHFの評価で測定された濃度を使用する工程を含む、生化学マーカーによるインビトロでのHFの評価方法に使用されるマーカーパネルに関する。
【０１４８】
本発明によるマーカーパネルは、好ましくはタンパク質アレイ技術を用いて測定される。アレイは、アドレス可能な個々のマーカーの集合物である。かかるマーカーは、空間的にアドレス可能であり得、例えばアレイがマイクロタイタープレート内に含まれ、または各マーカーが別々のX座標およびY座標に存在する平面表面に印刷される。あるいは、マーカーは、タグ、ビーズ、ナノ粒子、または物理的特性に基づいてアドレス可能であり得る。マイクロアレイは、当業者に公知な方法によって調製され得る(例えば、米国特許第5,807,522号; Robinson, W.H.ら, Nat. Med. 8 (2002) 295-301; Robinson, W.H.ら, Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893を参照)。本明細書で使用されるアレイは、多数のアドレス可能なマーカーを用いた任意の免疫学的アッセイのことをいう。一態様において、アドレス可能なマーカーは抗原である。別の態様において、アドレス可能な構成要素は自己抗体である。マイクロアレイは、ミニチュア化形態のアレイである。本明細書で使用される抗原は、抗体と特異的に結合し得る任意の分子のことをいう。用語自己抗体は、当該技術分野で十分定義されている。
【０１４９】
好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカンおよび任意にHFの１つ以上の他のマーカーを含むタンパク質アレイに関する。
【０１５０】
好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカンおよびNT-proBNPを含むタンパク質アレイに関する。
【０１５１】
好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカンおよびトロポニンTを含むタンパク質アレイに関する。
【０１５２】
好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカンおよびCRPを含むタンパク質アレイに関する。
【０１５３】

さらに好ましい態様において、本発明は、マーカービグリカン、トロポニンT、NT-proBNPおよびCRPを含むタンパク質アレイに関する。

【０１５４】

なおさらに好ましい態様において、本発明は、ビグリカンを特異的に測定するために必要な試薬を含むキットに関する。また、ビグリカンを特異的に測定するために必要な試薬およびHFマーカー組み合わせにおいて共に使用される心不全の1つ以上の他のマーカーを測定するために必要な試薬を含むキットが好ましい。

【０１５５】

以下の実施例、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供され、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に示される。本発明の精神を逸脱することなく改変が以下に示される手順で行なわれ得ることが理解される。

【実施例】

【０１５６】

実施例1

心不全のマウスモデル

1.1　R9Cマウスモデル

遺伝性ヒト拡張型心筋症は、ヒトホスホランバン(PLN)遺伝子(PLN-R9C)のArg9からCysへの変換から生じることが報告されている(Schmitt, J.P.ら, Science 299 (2003) 1410-1413)。罹患患者における拡張型心筋症の発症は、典型的に青年期に始まり、重症および致死をもたらす心臓機能の進行性悪化が後に続く。この変異のトランスジェニックマウスモデルは、罹患患者と同様な心臓表現型を示し、拡張型心筋症を発現し、心臓収縮を減少し、早熟な死を示した(Schmitt, 2003, 上掲)。

【０１５７】

本発明者らは、トランスジェニックマウスの生存曲線を確立した。PLN-R9Cマウスは、わずか約20週の中位生存を有し24週後に15％未満が残る(図1A)。PLN-R9C系統で最初に記録された死は12週齢で観察されたが、野生型対照マウス1匹だけが24週を超えて死んだ。最初に記録された致死の前に「初期」段階疾患の代表的な時点として8週目を選択して、8～24週(古典的DCM)の中点として16週目を選ぶ。単離された心臓の病因の詳細な解析によって、PLN-R9Cマウスの8週齢でも心室および心房拡大の証拠が示される。また、野生型およびPLN-R9Cマウスから得られた単離心筋の横断切片後のヘマトキシリンおよびエオシン染色は、8週齢初期のトランスジェニック動物において、左心室拡張または心室壁が薄くなることの証拠を示し、加齢と共に拡張の進行が続いた。

【０１５８】

機能的心臓測定を、8週齢、16週齢および24週齢の雄マウスでの超音波心臓検査によって行なう(表1に要約される)。前部および後部壁の厚さの超音波心臓検査の測定は、R9Cマウスが8週で有意な拡張を有し、マウスの一生を通じて悪化し続けることを示す。心臓短縮によって評価される収縮(図1B)は、わずかではあるが有意に8週で減少し、より顕著な減少が16週までに明白になる。解析された雌マウスは、雄と同じ所見を示す(データ示さず)。

【０１５９】

表 1:
雄マウスにおける8週齢、16週齢、24週齢での
野生型とRC9マウスの超音波心臓検査および
血行力学検査のパラメータ

	野生型	R9C	野生型	R9C	野生型	R9C
年齢	8 週齢	8 週齢	16 週齢	16 週齢	24 週齢	24 週齢
性別	雄	雄	雄	雄	雄	雄
HR (bpm)	560±6	567±5	569±5	552±15	565±9	502±15*
AW (mm)	0.66±0.01	0.60±0.01*	0.70±0.01	0.58±0.01*	0.71±0.01	0.57±0.01*
PW (mm)	0.66±0.01	0.61±0.01*	0.70±0.01	0.59±0.01*	0.71±0.01	0.57±0.01*
LVEDD (mm)	3.82±0.05	4.01±0.03*	3.92±0.07	5.01±0.06*	3.99±0.05	5.48±0.08*
LVESD (mm)	1.82±0.05	2.13±0.04*	1.84±0.06	3.36±0.09*	1.89±0.03	4.23±0.09*
FS (%)	52.7±0.9	47.6±1.2*	53.1±0.7	32.9±1.9*	52.9±1.5	22.6±2.1*
VCFc (circ/s)	10.5±0.2	9.1±0.2*	10.5±0.1	7.0±0.5*	10.9±0.3	5.1±0.5*
PAVc (cm/s)	102.4±2.4	97.8±2.6	110.1±3.7	85.3±3.2*	111.3±2.9	73.6±3.1*
AVA (m/s2)	65.7±1.3	60.6±1.6	66±3.2	47.9±2.5*	67.1±3.1	40±2.2*
試料(n)	6	9	6	9	5	5

【０１６０】
表1の値は、平均±SEMである。表1に使用される記号: HR=心拍数; AW、PW=前部および後部壁厚さ(左心室); LVEDD、LVESD=それぞれ左心室拡張末期および収縮末期大きさ; FS=短縮割合=(LVEDD-LVESD)/LVEDDx100%; ETC=HRについて補正した駆出時間; VCFC=HR=FS/ETCについて補正したみかけ短縮の速度; PAVC=HRについて補正したピーク心房速度; E波=初期-充填伝播(transmitral)拡張波; LVESP、LVEDP=左心室収縮末期および拡張末期血圧; +dP/dt最大=左心室血圧の最大正1次導関数; -dP/dt最大=左心室血圧の最大負1次導関数; AVA=大動脈速度加速度(PAVc/加速時間); * WTと比較してP<0.05。
【０１６１】
1.2　大動脈バンディング(AB)マウスモデル
このマウスモデルでは、大動脈バンディング(AB)によって生じた負荷圧が心臓肥大および心不全を誘導する。
【０１６２】
外科介入によって、負荷圧をC57BLマウスで行なう。上行大動脈の狭窄（大動脈バンディングとして公知）は、特に大動脈の狭窄に対する一次応答として左心室において、心臓肥大および心筋の成長を誘導する。このマウスモデルの後の段階で、心臓は肥大し、最終的には拡張する。このモデルは、十分に特徴付けられ、実験に基づいた10～15%以下の低い致死率で再現性が高いと証明された。狭窄後に、この動物モデルによって、血行力学ストレスに応答した左心室肥大および心不全の発症の進行の評価が可能になる。
【０１６３】
簡単に、C57BLマウスを、ケタミン(90mg/kg)およびロンプン(Rompun)(10mg/Kg)の混合で麻酔し、大動脈を、25ゲージ針を用いて結紮する。結紮を針に対して結ばないことを除いて、偽操作マウスは同じ外科手順を受ける。
【０１６４】
実験時間点
肥大応答を調べるために、バンディングした動物および偽操作対照を、介入後1週、2週、4週、および8週で屠殺する。心臓機能および肥大の発生を、超音波心臓検査分析で評価し、組織学を調べることによって死後確認する。表2は、超音波心臓検査による様々な時点で評価した心臓機能に対する概説を示す。表2に示す超音波心臓検査パラメータの詳細は、当業者に公知であり、例えば、Asahi, M.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 9199-9204、およびOudit, G.Y.ら, Nat. Med. 9 (2003) 1187-1194に見ることができる。
【０１６５】

表2

パラメーター	2週偽	2週AB	4週偽	4週AB	8週偽	8週AB
心拍数(bpm)	271.6 ± 31.2	286.3 ± 39.1	275.3 ± 25.8	276.5 ± 28.1	255.5 ± 23.9	310.8 ± 18.0
最大容積(uL)	32.2 ± 2.3	36.4 ± 3.4	36.9 ± 1.1	40.8 ± 1.6	38.1 ± 1.5	48.9 ± 4.4
最小容積(uL)	13.7 ± 2.4	15.8 ± 3.3	14.7 ± 1.9	25.7 ± 0.9	18.4 ± 0.5	36.5 ± 3.7
収縮末期容積(uL)	14.7 ± 2.8	16.9 ± 3.3	15.5 ± 2.1	28.0 ± 0.7	19.3 ± 0.5	40.2 ± 4.3
拡張末期容積(uL)	30.6 ± 2.4	34.5 ± 3.2	35.2 ± 1.1	39.8 ± 1.6	36.8 ± 1.4	47.2 ± 4.1
最大血圧(mmHg)	93.1 ± 3.5	149.2 ± 4.8	92.6 ± 0.8	153.5 ± 6.1	93.6 ± 5.0	169.8 ± 10.2
最小血圧(mmHg)	4.9 ± 1.3	3.2 ± 0.4	3.6 ± 0.1	7.3 ± 3.6	4.1 ± 0.5	6.2 ± 1.9
収縮末期血圧(mmHg)	87.3 ± 4.3	139.4 ± 2.8	89.2 ± 1.0	149.6 ± 5.0	90.5 ± 4.9	168.3 ± 9.8
拡張末期血圧(mmHg)	14.0 ± 3.2	10.6 ± 2.7	13.0 ± 0.7	16.8 ± 4.8	16.5 ± 1.4	16.9 ± 3.1
一回拍出量(uL)	18.6 ± 1.0	20.6 ± 0.7	22.2 ± 2.3	15.1 ± 1.2	19.7 ± 1.4	12.4 ± 1.0
駆出率(%)	58.7 ± 5.1	57.9 ± 4.5	60.0 ± 5.3	36.8 ± 1.9	51.5 ± 1.6	25.8 ± 2.0
心拍出量(uL/分)	5113.5 ± 819.2	5879.1 ± 714.0	6114.8 ± 897.0	4108.6 ± 310.3	5066.0 ± 653.3	3893.8 ± 466.1
一回仕事量(mmHg*uL)	1339.6 ± 134.0	2196.3 ± 94.6	1577.8 ± 134.4	1477.8 ± 99.6	1451.8 ± 130.4	1179.2 ± 104.1
動脈エラスタンス(Ea)(mmHg/uL)	4.8 ± 0.4	6.8 ± 0.3	4.1 ± 0.4	10.1 ± 0.7	4.7 ± 0.4	14.1 ± 1.7
dPdt 最大(mmHg/秒)	5481.6 ± 491.1	6785.3 ± 434.2	6036.0 ± 352.9	5133.2 ± 621.4	5755.8 ± 652.9	6454.4 ± 712.0
dPdt 最小(mmHg/秒)	-5049.6 ± 426.9	-7427.5 ± 685.3	-4743.3 ± 287.7	-5484.75 ± 412.2	-4564.5 ± 525.8	-7625 ± 586.5
dVdt 最大(uL/秒)	883.0 ± 61.2	758.0 ± 29.8	856.5 ± 27.4	1152.8 ± 206.3	1188.0 ± 114.1	1041.2 ± 109.6
dVdt 最小(uL/秒)	-679.6 ± 71.4	-696.3 ± 30.6	-703.5 ± 52.2	-921.0 ± 158.0	-1000.5 ± 76.8	-938.4 ± 126.2
P@dVdt 最大(mmHg)	9.0 ± 2.5	7.4 ± 2.6	4.6 ± 0.4	10.3 ± 3.4	6.2 ± 1.0	13.3 ± 4.5
P@dPdt 最大(mmHg)	44.1 ± 2.1	46.3 ± 3.5	49.0 ± 2.6	47.1 ± 2.8	49.6 ± 5.6	52.8 ± 3.6
V@dPdt 最大(uL)	31.2 ± 2.4	35.5 ± 3.5	35.0 ± 1.1	39.7 ± 1.6	37.0 ± 1.5	47.3 ± 4.4
V@dPdt 最小(uL)	14.7 ± 2.6	17.1 ± 3.2	15.6 ± 1.9	27.0 ± 0.7	19.2 ± 0.4	39.0 ± 4.3
Tau_w(ミリ秒)	11.4 ± 1.2	8.6 ± 0.7	10.7 ± 0.9	11.2 ± 1.3	11.3 ± 0.5	8.8 ± 0.4
Tau_g(ミリ秒)	15.8 ± 1.5	12.1 ± 1.2	17.5 ± 0.7	17.4 ± 1.0	17.5 ± 1.0	15.6 ± 1.0
最大力(ミリワット)	6.4 ± 0.6	9.5 ± 0.4	6.8 ± 0.5	8.8 ± 0.5	7.3 ± 0.7	9.0 ± 0.5
前負荷調節最大力(ミリワット/ul^2)	74.8 ± 16.5	85.0 ± 12.9	55.5 ± 2.4	57.3 ± 7.4	53.6 ± 3.0	46.1 ± 11.5

【０１６６】

機能性パラメーターの他に、ヘマトキシリン/エオシン(HE)染色による組織学を、2週目、4週目および8週目のABマウスおよび対照マウスの心臓組織で行なう。組織学によって、ABマウスの予測された壊死プロセスおよびリモデリングプロセスが確認され、偽操作マウスの心臓組織はいかなる有意な変化も示さない。手術の2週後に、結紮したマウスの心室は有意な左心室肥大を示し、4週後にさらに進行し、手術の8週後に末期拡張心筋症と密接に類似する。

【０１６７】

実施例2

マイクロアレイ解析

粗製組織調製物を、小器官のさらなる単離なしでマイクロアレイ解析に使用する。マイクロアレイデータ解析の方法論は、文献に記載されている(例えば、US 5,807,522; Robin

son, W.H., et al., Nat. Med. 8 (2002) 295-301 ; Robinson, W.H., et al., Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893参照)。

【０１６８】

試料の調製および質量分析

心臓ホモジナイゼーションおよび細胞小器官単離：

心臓を単離し、大動脈を除去し、心室を剃刀で注意深く細かくきざみ、氷冷PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）で徹底的にすすぎ、過剰血液を除去する。ゆるく取り付けられた手動ガラスホモジナイザーを用いて、組織を10mlの溶解バッファ（250mMスクロース、50mM Tris-HCl pH7.6、1mM MgCl2、1mM DDT（ジチオスレイトール）、および1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)中で30秒間ホモジナイズする。次の全ての工程を4℃で行なう。溶解物を15分間800xgでベンチトップの遠心分離機で遠心分離する；上清は、細胞質、ミトコンドリア、およびミクロソーム分画の供給源として使用する。核を含むペレットを、8mlの溶解バッファに希釈し、4mlの0.9Mスクロースバッファ(0.9Mスクロース、50mM Tris-HCl pH7.6、1mM MgCl2、1mM DDT、および1mM PMSF)に重層し、4℃で20分間1000xgで遠心分離する。得られたペレットを、8mlの2Mスクロースバッファ（2Mスクロース、50mM Tris-HCl pH7.4、5mM MgCl2、1mM DTT、および1mM PMSF）中に再懸濁し、4mlの2Mスクロースバッファ上に重層し、超遠心分離（Beckman SW40.1ローター）によって1時間150,000xgでペレット化する。核をペレットとして回収する。ミトコンドリアは4℃20分間で7500xgでの上清の再遠心分離から単離され、得られたペレットを、溶解バッファで2回洗浄する。Beckman SW41ローター中で、ミクロソームを、1時間100,000xgでミトコンドリア後細胞質の超遠心分離によってペレット化する。上清は細胞質分画(=サイト(cyto))として使用した。

【０１６９】

細胞小器官抽出：

可溶性ミトコンドリアタンパク質を、低張溶解バッファ(10mM HEPES、pH7.9、1mM DTT、1mM PMSF)中でミトコンドリアを氷上で30分間インキュベートすることによって抽出する。懸濁液は簡単に超音波処理され、残屑を30分間13,000xgでの遠心分離によって除去する。上清は「ミト(mito)1」分画として使用する。得られた不溶性ペレットを膜界面活性剤抽出バッファ(20mM Tris-HCl、pH7.8、0.4M NaCl、15%グリセロール、1mM DTT、1mM PMSF、1.5%Triton-X-100)中に再懸濁し、30分間温和に振って、次に30分間13,000xgでの遠心分離を行ない；上清は「ミト2」分画として使用した。

【０１７０】

膜関連タンパク質を、膜界面活性剤抽出バッファ中にミクロソームを再懸濁することによって抽出する。懸濁液を、1時間温和に振りながらインキュベートし、不溶性残屑を、30分間13,000xgでの遠心分離によって除去する。上清は「ミクロ(micro)」分画として使用する。

【０１７１】

細胞小器官抽出物の消化およびMudPIT解析：

各分画からの約100μg全タンパク質(Bradfordアッセイによって測定される)のアリコートを、約20℃での5倍容量の氷冷アセトンで一晩沈殿させ、次に13,000xgで15分間遠心分離を行う。タンパク質ペレットを、小容量の8M尿素、50mM Tris-HCl、pH8.5、1mM DTT中37℃で1時間可溶化し、次に暗所で5mMのヨードアセトアミドを用いたカルボキシアミドメチル化を37℃で1時間行なう。次に試料を、等容量の100mM 重炭酸アンモニウム，pH8.5を含む4Mの尿素に希釈し、1:150倍比のエンドプロテイナーゼLys-C(Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada)で37℃で一晩消化する。翌日、試料を、等容量の50mM重炭酸アンモニウムpH8.5を含む2M尿素に希釈し、最終濃度の1mMまでCaCl2を添加し、30℃で撹拌しながらPoroszymeトリプシンビーズ(Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada)と一晩インキュベートする。得られたペプチド混合物は、製造業者の説明書によってSPEC-Plus PT C18カートリッジ(Ansys Diagnostics, Lake Forest, CA)を用いて固相抽出され、更なる使用まで-80℃で保存する。完全自動化20時間12段階多数サイクルMudPIT手順を

記載(Kislinger, T., et al., Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106)の通りに設定する。簡単に、HPLCの4個のポンプが１つになったポンプを、LCQ DECA XPイオン捕捉質量分析器(Thermo Finnigan, San Jose, CA)と接続する。100-μm内径溶融シリカキャピラリーマイクロカラム(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ)を、P-2000レーザープラー(Sutter Instruments, Novato, CA)を用いて微細なチップに引っ張り、8cmの5μm Zorbax Eclipse XDB-C18樹脂(Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada)を充填し、次に6cmの5μm不完全球(Partisphere)強力カチオン交換樹脂(Whatman, Clifton, NJ)を充填する。圧力容器を用いて、個々の試料を、別々のカラムに手動で負荷する。クロマトグラフィー溶媒条件は、正確にKislinger, T.ら, Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106に記載される通りである。

【０１７２】
タンパク質同定および確認：
　SEQUESTデータベース検索アルゴリズムを使用して、Swiss-Prot/TrEMBLおよびIPIデータベースから得られたマウスおよびヒトタンパク質配列を集団とする局所管理された最小余剰FASTA形式データベース中のペプチド配列に、ペプチドタンデム質量スペクトルを適合させる。対照に対する実験偽発見率を統計的に評価するために、つまり、偽陽性確認を最小化するために、スペクトルの全てを、正常(フォワード)および逆(リバース)アミノ酸方向の両方のタンパク質配列に対して検索する(Kislinger, T.ら, Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96-106)。次に、STATQUESTフィルター化アルゴリズムを全ての推定検索結果に適用し、各候補確認について統計的信頼性の評価(信頼スコア)を得る(カットオフp値≦15、85％以上の正確な適合である可能性に対応する)。高い信頼適合が、Perl系スクリプトを用いたインハウスSQL型データベースに構文解析される。データベースは、試料名、実験番号、MudPITステップ、細胞小器官供給源、アミノ酸配列、分子質量、等電点、電荷、および信頼レベルに関する情報と共に、所定のタンパク質に適合する多数のペプチドのためのデータベース検索結果およびスペクトル情報(スキャンヘッダー)を収容するように設計される。予測信頼度p値が95%以上を有し、少なくとも2つのスペクトルが集合的に検出されるタンパク質だけを、さらなる解析のために保持する。

【０１７３】
実施例3
モデル系で得られたデータの統計評価
3.1 R9Cマウスモデルでの識別的発現(differential expression)のp値を得るために使用される統計的方法
　実施例2に記載される方法で得られた生データは、137の異なる実験実施(run)のそれぞれについて、スペクトル数(count)、タンパク質と関連する全てのスペクトルの合計それぞれを有する6190個のタンパク質からなる。6190サブセットのタンパク質である生データは、スペクトル数に基づいて本発明の分析のために100に設定した等しい数の群に各実施のデータをまず分ける包括正規化に供される。次に、LOESS(Cleveland, W.S.およびDevlin, S.J., Journal of the American Statistical Association 83 (1988) 596-610)を各群(1～100)について行い、同様なスペクトル数を有する一組の遺伝子に対してスペクトル数の差異を調節する。

【０１７４】
　本発明者らの生データに基づいて、本発明者らは、2つの線形モデルを構築し、第一モデルは、因子として対照/疾患、時間(8W、16W、終了)および位置(サイト(cyto)、ミクロ(micro)、ミト(mito)I、ミトII)を使用し、
　実施数=β0+β1時間+β2時間^2+β3位置+β4対照　(1)
を用いて示され、
第二モデルは、因子として時間(8W、16W、終了)および位置(サイト、ミクロ、ミトI、ミトII)だけを使用し、
　実施数=β0+β1時間+β2時間^2+β3位置　(2)
を用いて示され、

ここで、β0は切片の項(intercept term)であり、β1、β2、β3、およびβ4は、変数である時間、時間二乗、位置、および対照／疾患のための勾配推定値である。

【０１７５】

2つのモデルはAnovaを用いて比較され、ヌル仮説は2つのモデル間で違いはないことである。次に、低いp値は、2つのモデルが同じであるという十分な証拠がないことを示す。その他の情報は、状態(即ち、対照/疾患)がモデルの有意な構成成分であるように思われることを示す。対照と疾患モデルとの間で相対的なタンパク質存在量において有意な変化を有するタンパク質を抽出するために、本発明者らのリストの6190個のタンパク質を、コンピュータ処理されたp値に基づいてランク付けする。これによって、p値< 0.05を有する一組の593個のタンパク質が作製される。

【０１７６】

上記モデルからの多重仮説試験(multiple hypothesis testing)を説明するために、p値は、次に偽発見割合(FDR)補正、具体的にBenjamini-Hochberg FDR補正を用いて、補正される(Benjamini, Y.,およびHochberg, Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57 (1995) 289-300)。これによって、R9Cマウスモデルについて補正p値< 0.05を有する一組の40個のタンパク質が作製される。

【０１７７】

3.2 大動脈バンディングマウスモデルでの識別的発現のp値を得るために使用される統計的方法

大動脈バンディングマウスモデルにおける68回の実験の実施から、スペクトル数を有する3152種類のタンパク質が同定される。R9Cマウスモデルについて先に記載されるものと同じデータ解析が、大動脈バンディングマウスモデルのデータセットに適用される。

【０１７８】

実施例4

4.1. ヒト血清および血漿試料中のビグリカンの測定のためのELISA

ヒト血清または血漿中のビグリカンの検出のために、サンドイッチELISAを開発する。抗原の捕捉および検出のため、Roche and R&D Systems製の2種類の抗ビグリカンポリクローナル抗体(カタログ番号: AF 2667)のアリコートを、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させる。Rocheの抗ビグリカン抗体の作製のため、368個のアミノ酸からなり、HEK細胞内で発現させた組換えビグリカンタンパク質である。この抗原をウサギの免疫化に使用する。精製後、ポリクローナル内部抗ビグリカン抗体をビオチンで標識する。

【０１７９】

ストレプトアビジン被覆96ウェルマイクロタイタープレートを、1xPBS溶液中0.5μg/mlで100μlのビオチン化抗ビグリカンポリクローナル抗体と60分間インキュベートする。インキュベートした後に、プレートを、1x PBS + 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、次に1x PBS+0.02%Tween-20で再度3回洗浄する。次に、ウェルを、標準抗原としての組み換えビグリカンの連続希釈物もしくは患者または対照個体それぞれの希釈血清または血漿試料(1x PBS + 1%BSA中1:10)のいずれか100μlと1時間インキュベートする。ビグリカンの結合後に、プレートを、1x PBS+0.02%Tween-20で3回洗浄する。結合したビグリカンの特異的検出のために、ウェルを、1x PBS+1%BSA中1μg/mlで100μlのジゴキシゲニン化抗ビグリカンポリクローナル抗体と45分間インキュベートする。その後、プレートを、3回洗浄して結合していない抗体を除去する。次の工程で、ウェルを、1x PBS+1%BSA中100μlの75mU/ml抗ジゴキシゲニンPODコンジュゲート(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 1633716)と30分間インキュベートする。続いて、プレートを上記のものと同じ洗浄バッファで6回洗浄する。抗原-抗体複合体の検出のために、ウェルを、100μl ABTS溶液(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, カタログ番号 11685767)とインキュベートし、20分後に光学密度(OD)を、ELISAリーダーを用いて405nmおよび492nmで測定する。

【０１８０】

4.2. それぞれ、臨床的日常手順により得たHFを有する患者および明らかに健常なドナーの血清を用いたビグリカン ELISA

通常の臨床条件下でのビグリカンアッセイの有用性をさらに評価するため、HF患者由来の血清(n=242)および明らかに健常な対照患者由来の118の血清の一団を調べる。先に記載のように、血清は、1×PBS + 1%BSA中で1:10に希釈する。表3は、この大きな一団の結果を示す。

【０１８１】

表 3: ビグリカン ELISA 結果(臨床的日常手順によるHF試料の一団)

心不全患者

試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
4143	0,493	155,4
4144	0,465	144,4
4145	0,321	86,5
4146	0,223	51,2
4150	0,370	106,1
4151	0,118	15,2
4152	0,264	65,8
4153	0,173	34,1
4154	0,199	42,8
4155	0,144	23,5
4157	0,207	45,8
4158	0,158	28,8
4159	0,395	116,3
4161	0,274	69,5
4162	0,741	255,0
4163	0,420	126,3
4164	0,174	34,4
4170	0,103	11,5
4171	0,135	20,4
4172	0,147	24,8
4173	0,272	68,6
4174	0,164	30,9
4175	0,090	8,5
4176	0,123	16,5
4178	0,300	68,4
4181	0,295	66,9

正常ヒト血清

試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
1	0,365	87,3
2	0,187	53,7
3	0,237	64,2
4	0,136	40,7
5	0,120	35,9
6	0,147	43,8
7	0,138	41,5
8	0,092	24,5
9	0,146	43,6
10	0,279	72,3
11	0,175	51,0
12	0,150	44,8
13	0,146	43,8
14	0,229	62,7
15	0,205	57,7
16	0,152	43,3
17	0,134	38,4
18	0,250	63,6
19	0,148	42,3
20	0,273	67,6
21	0,300	72,4
22	0,297	71,9
23	0,193	52,5
24	0,175	48,6
25	0,223	58,4
26	0,231	60,1

表 3 （続き）

HFS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
4182	0,326	76,9
4187	0,348	84,3
4189	0,424	110,6
4190	0,594	171,9
4191	0,261	55,6
4192	1,011	336,3
4193	0,182	31,6
4194	0,752	232,2
4196	0,298	67,8
4198	0,200	36,8
4199	0,150	22,4
4200	0,419	108,6
4202	0,722	220,9
4203	0,210	39,8
4204	0,594	172,0
4205	0,322	75,4
4206	0,607	176,9
4212	0,338	80,8
4213	0,161	25,6
4588	0,224	61,7
4589	0,570	121,7
4590	0,341	83,2
4591	0,503	110,4
4594	0,240	65,0
4595	0,235	63,9
4597	0,298	75,8
4606	0,345	83,8
4607	0,357	86,0
4608	0,462	103,4
4613	0,191	54,7
4622	0,620	130,5
4623	0,306	77,2
4624	0,542	116,9
4625	0,269	70,4
4633	0,286	73,5
4640	0,274	71,2
4641	0,223	61,5
4643	0,554	118,9
4676	0,528	114,5
4677	0,494	108,9

NS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
27	0,080	18,1
28	0,184	50,5
29	0,081	18,5
30	0,185	50,8
31	0,189	39,5
32	0,127	17,8
33	0,115	14,4
44	0,122	16,0
45	0,132	19,3
46	0,073	4,7
47	0,068	3,6
48	0,105	12,1
49	0,107	12,7
50	0,093	9,3
51	0,238	56,7
52	0,155	27,4
53	0,146	24,4
54	0,202	44,1
55	0,151	26,0
56	0,172	33,7
57	0,191	34,1
58	0,324	76,1
59	0,193	34,9
60	0,132	17,6
61	0,127	16,3
62	0,110	11,7
63	0,126	16,0
64	0,211	40,3
65	0,124	15,5
66	0,099	9,1
67	0,165	26,9
68	0,345	83,1
69	0,127	16,3
70	0,285	63,6
71	0,186	32,8
72	0,207	38,9
73	0,236	48,1
74	0,103	10,1
75	0,368	91,0
76	0,312	80,1

表 3 （続き）

HFS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]	NS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
4678	0,388	91,1	77	0,222	49,1
4680	0,255	67,8	78	0,379	103,7
4681	0,306	77,2	79	0,196	40,4
4684	0,415	95,8	80	0,176	34,0
4685	0,367	83,5	81	0,152	26,5
4687	0,530	109,3	82	0,227	50,7
4688	0,228	59,5	83	0,354	95,0
4690	0,220	57,9	84	0,235	53,7
4691	0,409	90,2	85	0,142	23,1
4692	0,764	149,5	86	0,194	32,1
4693	0,384	86,2	87	0,259	52,2
4694	0,229	59,6	88	0,149	19,1
4695	0,258	65,0	89	0,140	16,6
4696	0,494	103,5	90	0,186	29,6
4697	0,317	75,2	91	0,328	75,3
4698	0,318	75,3	92	0,218	39,4
4699	0,428	93,2	93	0,351	83,1
4700	0,325	76,5	94	0,165	23,6
4701	0,274	67,9	95	0,132	14,4
4702	0,386	86,5	96	0,309	76,2
4703	0,578	117,1	97	0,411	113,1
4704	0,840	165,2	98	0,181	34,2
4705	0,367	83,4	99	0,276	65,2
4706	0,222	58,3	100	0,291	70,3
4707	0,563	114,6	101	0,152	25,2
4708	0,279	68,8	102	0,132	19,3
4711	0,182	50,1	103	0,116	14,8
4712	0,202	54,4	104	0,186	35,4
4713	0,298	72,1	105	0,349	90,5
4714	0,410	115,1	106	0,195	54,2
4715	0,281	69,3	107	0,228	61,4
4717	0,473	138,1	108	0,282	72,4
4720	0,496	146,7	109	0,409	96,4
4726	0,273	66,4	110	0,293	74,6
4728	0,760	247,4	111	0,693	154,7
4729	0,376	103,0	112	0,279	71,8
4730	0,622	194,2	113	0,296	75,1
4732	0,345	91,7	114	0,503	114,2
4736	0,302	76,6	115	0,383	91,5
4737	0,548	165,9	116	0,398	91,9

表 3 （続き）

HFS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
4738	0,711	228,5
4739	0,370	219,2
4790	0,356	95,7
4795	0,392	108,8
4799	0,312	79,9
4805	0,394	109,5
4806	0,326	84,9
4807	0,197	40,9
4808	0,343	90,9
4811	0,494	145,9
4813	0,862	288,0
4815	0,887	297,9
4819	0,719	231,4
4820	0,872	292,1
4821	0,570	174,4
4822	0,439	125,7
4823	0,394	109,3
4827	0,511	152,1
4830	1,080	376,3
4831	0,627	186,0
4832	0,791	251,7
4836	0,551	156,3
4837	0,297	64,8
4838	0,488	132,6
4843	0,119	11,1
4845	0,598	174,3
4846	0,655	197,2
4847	0,390	97,1
4849	0,323	73,4
4850	0,709	218,4
4851	0,460	122,0
4853	0,262	53,2
4855	0,721	223,1
4857	0,559	159,3
4858	0,862	281,1
4860	0,517	143,4
4862	0,577	166,4
4867	0,684	208,3
4868	0,855	278,2
4869	0,278	59,0

NS 試料	MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
117	0,497	124,1
118	0,302	62,2
119	0,442	106,0
120	0,329	70,2
121	0,334	71,8
122	0,244	45,0
123	0,095	6,6
124	0,189	29,6
125	0,341	73,9
126	0,342	74,1
127	0,314	65,7
128	0,300	61,6
計	118	

表 3 （続き）
HFS

試料	MW δ OD	x（10倍）濃度 [ng/mL]
4871	0,239	45,8
4872	0,603	176,4
4873	0,361	86,7
4876	0,367	88,8
4878	0,499	136,7
4879	0,572	164,2
4880	0,396	99,0
4881	0,224	41,1
4882	0,730	226,6
4886	0,415	114,4
4889	0,897	306,2
4893	0,804	267,2
4894	0,815	271,6
4895	0,489	142,0
4896	1,009	353,6
4900	1,192	420,0
4902	1,129	406,2
4904	1,507	420,0
4905	0,218	45,6
4906	0,173	31,7
4907	0,383	102,5
4911	0,371	98,3
4912	0,368	97,3
4913	0,871	295,2
4914	0,509	149,6
4916	0,711	229,2
4917	1,434	420,0
4928	0,905	309,7
4929	1,690	420,0
4930	1,162	414,3
4937	0,645	202,9
4940	0,611	189,4
4941	1,107	396,3
4942	0,566	171,6
4943	0,178	33,3
4944	0,454	128,6
4945	0,975	339,2
4948	0,470	135,0
4949	0,823	275,2
4950	1,268	420,0

表 3 HFS 試料	（続き） MW δ OD	x（10倍） 濃度 [ng/mL]
4952	0,621	138,4
4953	0,644	143,5
4954	0,651	145,0
4955	0,647	144,1
4956	1,166	374,8
4957	0,524	118,3
4961	1,004	272,0
4965	1,038	289,9
4967	0,330	81,5
4968	0,522	117,9
4971	0,513	116,2
4974	0,816	188,7
4975	1,076	322,8
4976	1,207	420,0
4977	0,996	296,4
4978	0,568	127,2
4979	0,577	128,9
4981	0,457	105,3
4982	0,562	125,9
4983	1,164	419,2
4986	0,568	127,2
4995	0,893	215,3
4996	1,015	290,8
4997	0,725	162,7
5004	0,732	164,8
5005	0,526	118,7
5008	0,615	137,1
5009	0,558	125,1
5010	0,386	92,1
5011	0,405	94,2
5012	0,588	154,8
5020	0,288	58,0
5021	0,582	152,9
5022	0,437	104,2
5023	0,423	99,9
5026	0,949	286,1
5030	0,247	45,9
5031	1,531	420,0
5034	0,983	299,2
5035	0,943	284,0

表 3 HFS 試料	(続き) MW δ OD	x (10倍) 濃度 [ng/mL]
5036	0,566	147,5
5042	0,590	155,6
5043	0,830	241,5
5044	0,580	152,1
5045	0,885	262,3
5046	1,277	398,9
5048	0,770	219,9
5049	0,337	72,5
5050	0,385	87,8
5055	0,223	39,0
5056	1,240	374,3
5057	0,472	115,8
5058	0,459	111,7
5063	0,770	219,9
5064	0,577	151,0
5065	0,520	131,8

試料総数　242

【０１８２】
表3に要約されたデータを図3にもグラフで示す。また、表3のデータを使用し、図4に示すボックス-ブロットを計算した。図3および4は、心不全を有する患者由来の血清中で測定された平均ビグリカン値は、明らかに健常な対照個体由来の血清中で測定されたビグリカン値と比べると、大きな差があることを示す。

【０１８３】
実施例5
心不全の評価におけるマーカービグリカンを含むマーカー組み合わせ
実施例5.1マーカー組み合わせNT-proBNPおよびビグリカン
マーカー組み合わせNT-proBNPおよびビグリカンを、病期Bならびに病期CおよびDそれぞれの患者の違いについて評価する。十分に特徴付けされた群の個体、即ち、HFの分類のACA/ACC基準による病期Bの50人の個体およびHFに罹患し、HFの分類のACA/ACC基準による病期Cを有する50人の患者から得られた個体の液体試料を分析することによって診断精度を評価する。市販アッセイ(Roche Diagnostics, NT-proBNP-アッセイ(カタログ番号 03 121 640 160 Elecsys（登録商標）Systemsイムノアッセイ分析機用)によって測定されるNT-proBNPおよび上記の通りに測定されるビグリカンを、これらの個体のそれぞれから得られた血清試料中で定量する。ROC分析を、Zweig, M.H., およびCampbell, G.,上掲に従って行なう。ビグリカンと確立されたマーカーNT-proBNPとの組み合わせについて、病期Cの患者と病期Bの個体を区別する識別力を、正規化識別分析によって計算する (Friedman, J.H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175)。

【０１８４】
実施例5.2 マーカー組み合わせトロポニンTおよびビグリカン
マーカー組み合わせトロポニンTおよびビグリカンを、急性心臓事象に罹患する患者と慢性心臓疾患に罹患する患者それぞれの違いについて評価する。十分に特徴付けされた群の個体、即ち、急性心臓事象を有すると診断された50人の個体および慢性心臓疾患を有すると診断された50人の個体から得られた個体の液体試料を分析することによって診断精度を評価する。市販アッセイ(Roche Diagnostics, トロポニンT-アッセイ(カタログ番号 20 1 76 44 Elecsys（登録商標）Systemsイムノアッセイ分析機用)によって測定されたトロポニンTおよび上記の通りに測定されたビグリカンを、これらの個体のそれぞれから得ら

れた血清試料中で定量する。ROC分析を、Zweig, M. H.,およびCampbell, G.,上掲に従って行なう。ビグリカンと確立されたマーカートロポニンTとの組み合わせについて病期Cの患者と病期Bの個体を区別する識別力を、正規化識別分析によって計算する(Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175)。

【０１８５】

実施例5.3 マーカー組み合わせビグリカンおよびCRP

マーカー組み合わせC反応性タンパク質およびビグリカンは、心筋症を有すると診断された患者対任意の混同する心疾患に罹患しない対照それぞれの違いについて評価される。心筋症を有する50人の個体および50人の健常対照個体の十分に特徴付けされた群から得られた個体の液体試料を分析することによって診断精度を評価する。市販アッセイ(Roche Diagnostics, CRP-アッセイ(Tina-quant C反応性タンパク質(latex)高感度アッセイ-Rocheカタログ番号 11972855 216)によって測定されたCRPおよび上記の通りに測定されたビグリカンを、これらの個体のそれぞれから得られた血清試料中で定量する。ROC分析を、Zweig, M.H.,およびCampbell, G.,上掲に従って行なう。ビグリカンと確立されたマーカーCRPとの組み合わせについて病期Cの患者と病期Bの個体を区別する識別力を、正規化識別分析によって計算する(Friedman, J.H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175)。

【０１８６】

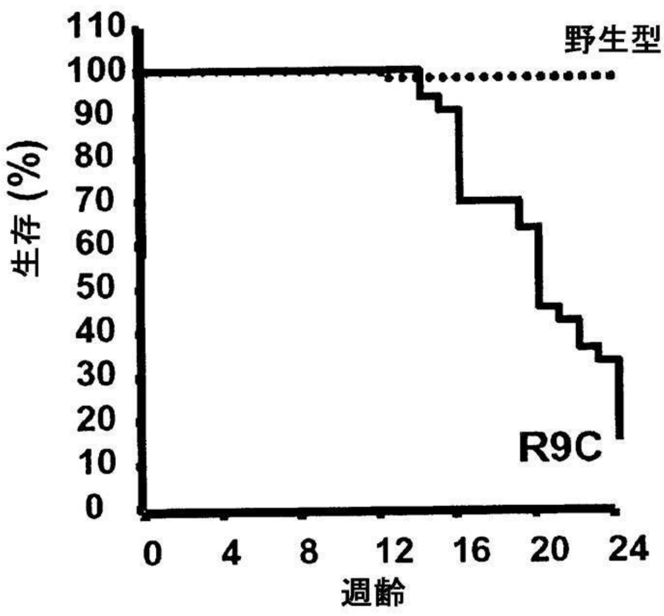
前記発明は明確性および理解の目的のために幾分詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲における本発明の真の範囲を逸脱することなく、形式および詳細における様々な変更が行なわれ得ることを本開示の解釈から当業者は理解する。

【０１８７】

公開公報、特許および出願の全ては、かかる引例のそれぞれが全体を参照することによって援用されることを具体的および個別的に示すように同じ程度で、全体を参照することによって本明細書に援用される。

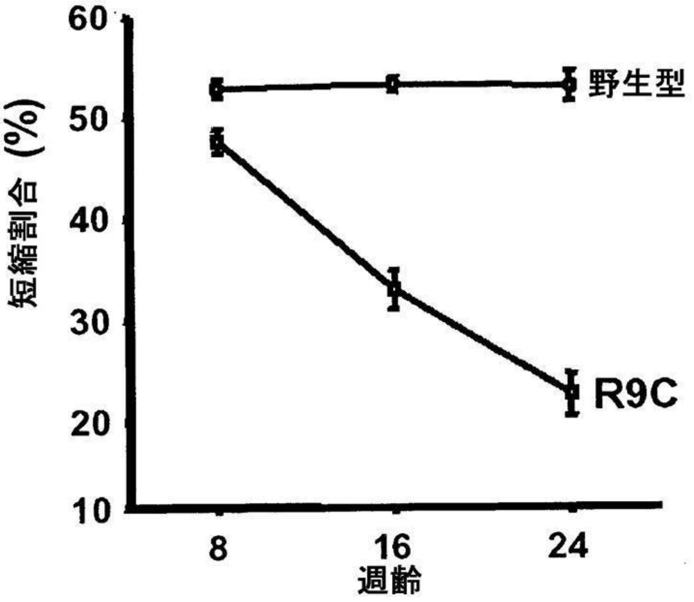
【図１Ａ】

Fig. 1A



【図１Ｂ】

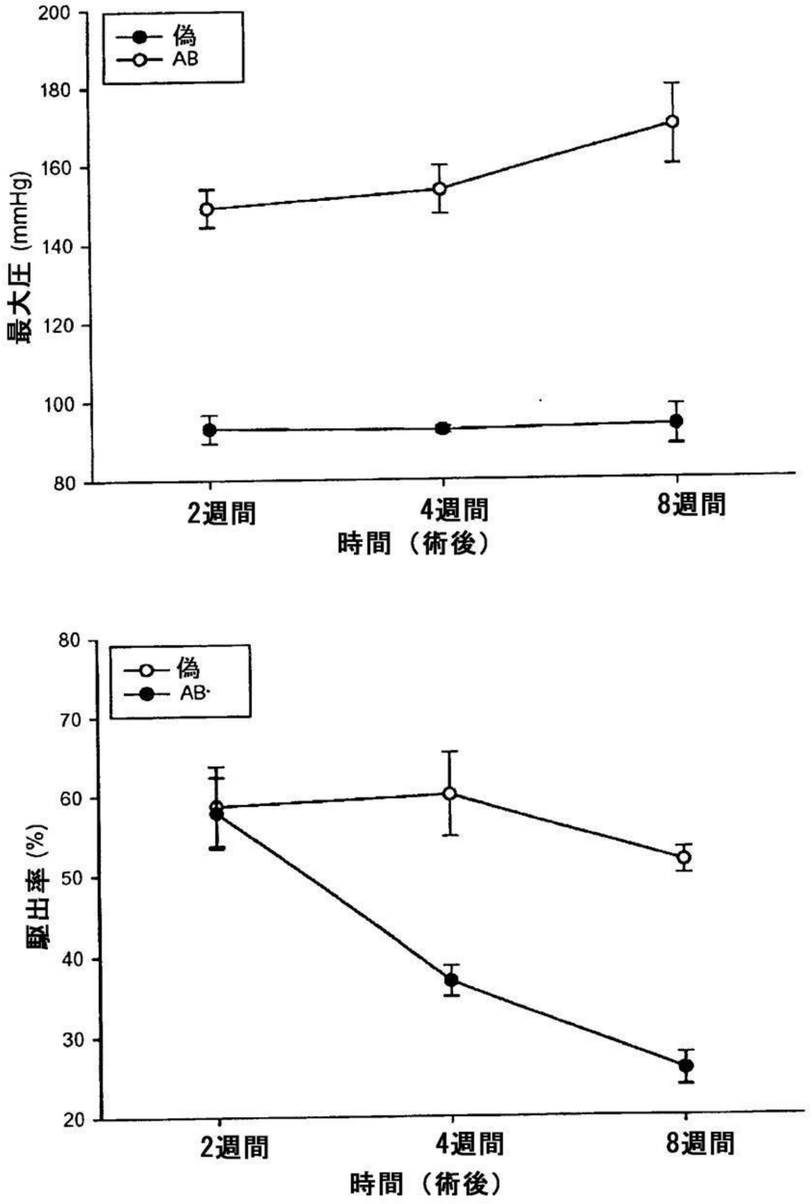
Fig. 1B



【図２】

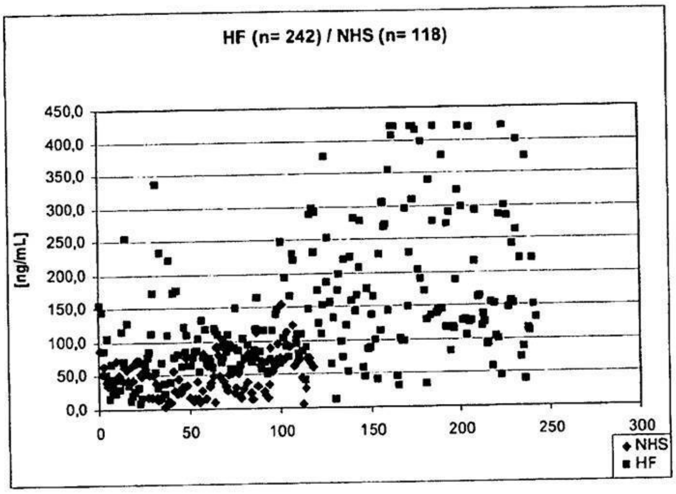
ABマウスおよび対照における心臓機能

Fig. 2



【図３】

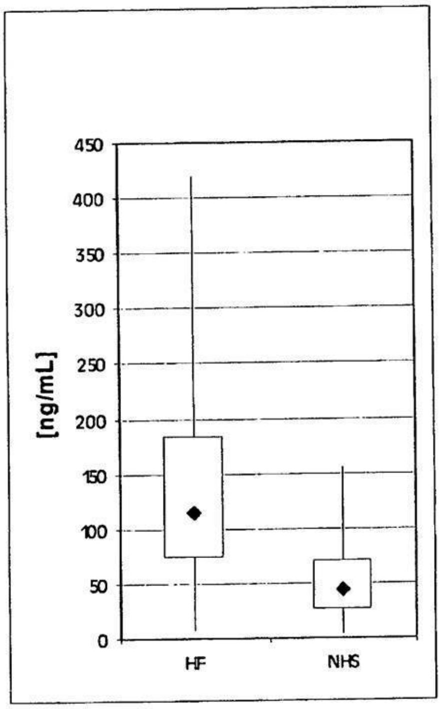
Fig. 3



NHS n= 118

【図４】

Fig. 4



【配列表】
0005528461000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　ウィーンヒュースーテーレン，ウルズラーヘンリーケ
ドイツ連邦共和国　クライリング　８２１５２　ガルテンシュトラーセ　１０
(72)発明者　アラブ，サラ
カナダ国　オンタリオ　エム３ビー　３エル３，トロント，ブランディー　シーティー　１５
(72)発明者　ブロック，ディルク
ドイツ連邦共和国　ビヒル　８３６７３　クロイトヴェーク　１０
(72)発明者　エミリ，アンドリュー
カナダ国　オンタリオ　エム４ケイ　３エム８　トロント，イー．，ホープデール　アベニュー　４７ビー
(72)発明者　グラモリーニ，アンソニー
カナダ国　オンタリオ　エム４ジー　１ピー５　トロント，ラムジー　ロード　１８０
(72)発明者　ヘス，ゲオルク
ドイツ連邦共和国　マインツ　５５１３０　オッペンハイマー　シュトラーセ　８２
(72)発明者　ヒューディク，ヘンドリーク
ドイツ連邦共和国　ペンツベルク　８２３７７　ハインツ　１３
(72)発明者　リウ，ピーター
カナダ国　オンタリオ　エム４ブイ　２エス９　トロント，ラッセル　ヒル　ロード　３３
(72)発明者　マクレナン，デビッド
カナダ国　オンタリオ　エム４ジー　アイエヌ３　トロント，エアドリ　ロード　２９２

審査官　草川　貴史

(56)参考文献　特表２００２－５０８９２３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００８／１０６９３８（WO，Ａ１）
国際公開第２００８／０５３３５８（WO，Ａ１）
特表２００９－５４４３０６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００８／１０７２０１（WO，Ａ１）
特表２０１０－５２０４６９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５２０４４２（ＪＰ，Ａ）
AHMED M S, INDUCTION OF MYOCARDIAL BIGLYCAN IN HEART FAILURE IN RATS - AN EXTRACELLULAR MATRIX 以下備考, CARDIOVASCULAR RESEARCH, ２００３年, V60 N3, P557-568, COMPONENT TARGETED BY AT1 RECEPTOR ANTAGONISM

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