

(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2016-507743

(P2016-507743A)

(43) 公表日 平成28年3月10日(2016.3.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/74 (2006.01)	GO 1 N 33/74	2 GO 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2015-552040 (P2015-552040)	(71) 出願人	514122524 シュピーングテック ゲゼルシャフト ミ ット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国, 16761 ヘニッヒ スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ 15アー
(86) (22) 出願日	平成26年1月7日 (2014.1.7)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月20日 (2015.8.20)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/050143	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02014/108396	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成26年7月17日 (2014.7.17)		
(31) 優先権主張番号	13150566.1		
(32) 優先日	平成25年1月8日 (2013.1.8)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管系疾患発症リスクの予測的マーカーとしての成長ホルモンの空腹時レベル

(57) 【要約】

本発明の主題は、被験者における心血管系リスク、又は総死亡リスクを予測するための方法であって、前記被験者から得られた体液中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルを決定し、及び、該成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルと、心血管系リスク又は総死亡リスクとを関連付けることを含み、増強したレベルは増強したリスクとして予測される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者における 10 年以内の心血管系リスク又は総死亡リスクを予測するための方法であって、

・前記被験者から得られた体液中の成長ホルモン (hGH)、及び / 又はそのアイソフォームの空腹時レベルを決定し ; 及び

・前記成長ホルモン (hGH)、及び / 又はそのアイソフォームの空腹時レベルと、心血管系リスク又は総死亡リスクとを関連付け、ここで、増強されるレベルは、増強されるリスクを予測し、

ここで、前記血管系リスクは、有害事象又は総死亡リスクとして定義され、前記有害事象リスク又は前記総死亡リスクは 10 年以内に予測される方法。

10

【請求項 2】

心血管系リスクが、脳卒中、CVD (心血管系疾患) による死、及び冠状動脈疾患 (CAD) を含む群から選択される有害事象として定義され、ここで、後者は、致命的若しくは非致命的な心筋梗塞、虚血性心疾患による死、経皮冠動脈形成術 (PCI) 又は冠動脈バイパス術 (CABG) を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記心血管系リスク又は総死亡リスクが 5 年又は 2 . 5 年の期間に予測される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

CVD による死のリスクが予測され、ここで、CVD による死が、心筋梗塞、心不全、又は脳梗塞による死である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記被験者が男性である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

体液中の成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームの前記空腹時レベルが、100 pg / mL 未満、好ましくは 50 pg / mL 未満、好ましくは 30 pg / mL 未満、好ましくは 20 pg / mL 未満、好ましくは 10 pg / mL 未満、好ましくは 5 pg / mL 未満、好ましくは 2 pg / mL 未満の分析的アッセイ感度を有する超高感度アッセイによって決定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7】

体液中の成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームの前記空腹時レベルが、400 pg / mL 未満、好ましくは 200 pg / mL 未満、好ましくは 120 pg / mL 未満、好ましくは 80 pg / mL 未満、好ましくは 40 pg / mL 未満、好ましくは 20 pg / mL 未満、好ましくは 10 pg / mL 未満、最も好ましくは 8 . 5 pg / mL 未満の機能的アッセイ感度を有する超高感度アッセイによって決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記アッセイが、前記体液中の分泌型 hGH アイソマーの 1 つ若しくは 2 以上のいずれかに対して特異的であり、又は前記体液中の、アイソマー 1、アイソマー 2、アイソマー 3 及びアイソマー 4 (配列番号 1 ~ 4) を含む群から選択される、hGH の全ての分泌型アイソマーに特異的であり、かつ、決定する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記方法は、被験者における心血管系リスク若しくは総死亡リスクを監視するために、又は治療経過を監視するために、2 度以上実施される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記監視は、採用される予防的及び / 又は治療的手段に対する、前記被験者の反応を評価するために実施される、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

前記被験者をリスクグループへ階級化するため、及び/又は心血管系リスク若しくは総死亡リスクのために前記被験者を再分類するための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記体液は血液、血漿、又は血清である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記被験者は男性であり、閾値は 3 4 0 p g / m L ~ 6 0 p g / m L であって、3 4 0 p g / m L を超える成長ホルモン (h G H) 及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルを高リスクと予測し、6 0 p g / m L 未満の空腹時レベルを低リスクと予測する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記被験者は女性であり、閾値は 3 1 5 0 p g / m L ~ 4 0 0 p g / m L であって、3 1 5 0 p g / m L を超える成長ホルモン (h G H) 及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルを高リスクと予測し、4 0 0 p g / m L 未満の空腹時レベルを低リスクと予測する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 C V D (心血管系疾患) が、心筋梗塞、心不全、及び脳卒中から選択される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

付加的に、年齢、糖尿病の存在、現在の喫煙を含む群から選択される、少なくとも 1 つの臨床パラメーターが決定される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

付加的に、前記被験者の体液中の少なくとも 1 つのさらなるバイオマーカーが決定され、前記心血管系リスク又は前記総死亡リスクと関連付けられ、ここで、前記付加的なバイオマーカーは、プロニューロテンシン (P N T) 1 - 1 1 7 及び少なくとも 5 アミノ酸長を有するそのフラグメント、C 反応性タンパク (C R P) 、プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド (p r o - B N P) 1 - 1 0 8 、プロ B N P 、 B N P 、プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド 1 - 9 8 (p r o A N P - N - 末端フラグメント) 、 P r o - A N P 、アドレノメデュリン、プロアドレノメデュリン (p r o A D M) 2 4 - 7 1 、プロ A D M 1 2 7 - 1 6 4 、プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (p r o - A N P) 及び少なくとも 5 アミノ酸長を有するそのフラグメント、S T - 2 、 G D F 1 5 、ガレクチン - 3 及びコペプチンを含む群から選択される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

前記被験者は女性であり、付加的に、前記女性被験者の体液中の 1 つのさらなるバイオマーカーが決定され、前記心血管系リスク又は前記総死亡リスクと関連付けられ、前記付加的バイオマーカーがプロニューロテンシン (P N T) 及び少なくとも 5 アミノ酸長を有するそのフラグメントである、請求項 1 ~ 4 及び請求項 6 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

前記被験者は疾病を有する、又はアテローム性動脈硬化、高血圧、心不全、心筋梗塞を含む群から選択される事象を有していた、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記成長ホルモン (h G H) 及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルが、免疫アッセイで測定される、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記免疫アッセイが、 10^{-8} M 以下の結合親和性を有する、少なくとも 1 つの抗体、好ましくは 2 つの抗体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

50

hGH及びそのアイソフォームに対する結合親和性が 10^{-8} M以下である、少なくとも1つの単一特異的バインダー、好ましくは2つの単一特異的バインダーを含む超高感度hGHアッセイであって、ここで、前記バインダー(単数又は複数)は、分泌型hGHアイソマーの1つ若しくは2以上に対して特異的であり、又はアイソマー1、アイソマー2、アイソマー3及びアイソマー4(配列1~4)を含む群から選択されるhGHの全ての分泌型アイソマーに対して特異的であり、かつ、結合し、超高感度アッセイが、100pg/mL未満、好ましくは50pg/mL未満、好ましくは30pg/mL未満、好ましくは20pg/mL未満、好ましくは10pg/mL未満、好ましくは5pg/mL未満、好ましくは2pg/mL未満の分析的アッセイ感度を有し、又は400pg/mL未満、好ましくは200pg/mL未満、好ましくは120pg/mL未満、好ましくは80pg/mL未満、好ましくは40pg/mL未満、好ましくは20pg/mL未満、好ましくは10pg/mL未満、最も好ましくは8.5pg/mL未満の機能的アッセイ感度を有する超高感度hGHアッセイ。

10

【請求項23】

前記単一特異的バインダーがモノクローナル抗体である、請求項22に記載の超高感度hGHアッセイ。

【請求項24】

請求項1~18のいずれか1項に記載の方法における、請求項22又は23に記載の超高感度hGHアッセイの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の主題は、被験者の心血管系リスク又は全体的な死亡リスクを予測するための方法であって、

- ・該被験者由来の体液中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルを決定し、及び
- ・該成長ホルモン及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルと、心血管系リスク又は全体的な死亡リスクとを関連付けて、増強されるレベルは増強されるリスクを予測する。

【背景技術】

【0002】

成長ホルモン(hGH)は脳下垂体前葉から分泌され、全てではないが多くの代謝活動はIGF-1を介して行われる{1}。幼児期及び青年期の縦方向の骨の成長とは別に、hGHは生涯を通して代謝効果を発揮する。例えば、同化する状況において、代謝効果を発揮し、IGF-1を刺激するためにインシュリンとともに働き、その結果としてタンパク合成やタンパク同化を行う。異化作用を行う状況において、hGHは脂肪分解を刺激し、それによりタンパク質の分解やグリコーゲン貯蔵の消費を防いでいる{1}。最近の数十年において、主にhGH欠乏やhGH過剰の状況での成人心血管系システムにおけるhGHの役割について関心が高まっている。

30

【0003】

下垂体機能が低下した成人(hypopituitary adults)は、心血管疾患及び脳血管疾患における死亡率が上昇しており、これは、一部例外{5}はあるものの、多くの文献{2}、{3}、{4}により、成長ホルモン分泌不全(GHD)が関連していると認識されている。GHD患者と健常者を比較したとき、GHD患者は、心血管系リスク特性と、低密度リポタンパクコレステロール(LDL-C)の増加{6}、{7}、肥満度指数(BMI)の増加{6}、ウエスト・ヒップ比の増加{6}、{8}及び高密度リポタンパクコレステロール(HDL-C)の減少{4}との間には逆相関があることが示されている。これらの患者に対するhGH補充療法は、心血管系リスク特性のいくつかの側面において良好な効果を示している。例えば、CRP、体脂肪、ウエスト・ヒップ比、体幹脂肪の減少、及びHDL-Cの増加{9}、{6}、{10}並びにLDL-Cの減少、及び拡張期血圧の低下等である{11}。グルコースの恒常性における効果

40

50

は否定的であるかもしれないが { 1 1 }、{ 1 }、この背景において、hGH補充療法が有益であるかどうかは仮説であり、しかしながら今のところ、心血管系疾病率又は死亡率に対するhGH補充療法の効果を証明するための大規模なプラセボ対照、ランダム化前向き (p r o s p e c t i v e) 試験は存在しない。

【 0 0 0 4 】

一方において、成長ホルモンを過剰に分泌する症状を呈する先端巨大症の患者もまた、心血管系及び脳血管疾患における死亡率の上昇を示す { 1 2 }。この死亡率に寄与する因子は、高血圧、糖尿病、不整脈及び心臓肥大を伴う心筋症において高頻度で見られる { 1 3 }、{ 1 4 }。これらの患者において、ソマトスタチン同族体を用いたhGH分泌の抑制は、心臓の構造及びパフォーマンスに有益な効果を示している { 1 5 }。さらに、hGH過剰分泌の有害な効果の証明は、1999年にTakalらの研究によって示されており、それによると、集中治療室の重症患者に対するhGHの大量投与が、プラセボ群と比較して死亡率を2倍にすることを報告している { 1 6 }。

10

【 0 0 0 5 】

ほとんどの文献は、hGHの過剰又は欠乏する患者に関するものである。しかしながら、1960年度後半及び1970年代前半に開始された18年間追跡を行うフランスの警察官に対する前向き (p r o s p e c t i v e) 試験は、hGHの空腹時レベル及び若年死亡率を調査した。これらの発見は、2時間の経口ブドウ糖負荷試験後のhGHの高レベルは、全原因での若年性死亡率のリスク上昇、及び心血管系疾患を有する人の空腹時hGHのリスク上昇と関連していることを示すものである (標準hGHテストで測定したものは、死亡率の予測に対して有意差は無かった) { 1 7 }。0.5 ng / mLのカットオフ値を用い、Maisonらは、ハザードリスクが1.79で、18年心臓死亡率が増加することを見出した。

20

【 0 0 0 6 】

hGHが日中の大部分にわたりパルスで放出されているという事実や、血漿濃度が比較的安定する朝の時間帯に、従来のhGHアッセイを使った測定を行っても、hGH濃度が低く、時々検出限界以下であるという事実により、血漿中のhGH濃度の正確な判断が阻害されている { 3 2 }、{ 3 3 }、{ 3 4 }。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

30

【 0 0 0 7 】

本発明の主題は、血漿hGH測定 (hGH) に対する新規な超感度アッセイであり、低hGH血漿濃度であっても正確な測定を提供する (例えば、アッセイ感度 2 p g / m l)。本発明の主題は、心血管系罹患率及び死亡率の発生と、被験者の空腹時血漿中のhGHとの関連付けである。本発明の主題は、被験者の空腹時血漿におけるhGHと、冠動脈疾患 (C A D)、脳卒中、全ての原因の死亡率 (総死亡率) 及び心血管系 (C V D) 死亡率の関連性に関する。

【 0 0 0 8 】

本発明の主題は、被験者における心血管系リスク又は総死亡率リスクの予測を行うための方法であって、

40

- ・ 該被験者から得られた体液中の成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームの空腹時レベルを決定し、及び
- ・ 該成長ホルモン及び / 又はそのアイソフォームの空腹時レベルと、心血管系リスク又は総死亡リスクとを関連付け、増強されるレベルは、増強されるリスクを予測すること、を含んでいる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 9 】

【 図 1 】 典型的な u s - hGHアッセイの投薬量 (d o s e) / シグナル曲線を示す。

【 図 2 】 男性のCVD死亡率予測のhGH四分位数のカプラン・マイヤー生存分析 (K a p l a n M e i e r A n a l y s i s) (表 3 参 照)。Y 軸 : 1 - 生存時間関数 (%

50

事象 / 100)、X軸: ベースラインから移住、死亡、又は最後のフォローアップ日(2009年6月30日)までのフォローアップ期間(年)。

【発明を実施するための形態】

【0010】

心血管系リスク又は総死亡率リスクとは、心血管系の原因により引き起こされる事象で得るリスク、又は、ある一定期間中に全てが原因で死亡するリスクを意味する。具体的な実施形態においては、該期間とは、20年以内、15年以内、10年以内、5年以内、又は2.5年以内である。

【0011】

本発明の主題は、被験者の10年以内、5年以内、又は2.5年以内における血管系リスク又は総死亡リスクを予測するための方法であって、

・該被験者から得られた体液中の成長ホルモン(hGH)、及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルを決定し、及び

・該成長ホルモン(hGH)、及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルと、心血管系リスク又は総死亡リスクとを関連付けことを含み、増強されるレベルは、増強されるリスクを予測し、

ここで、心血管系リスクが、有害事象又は総死亡リスクと定義されるものであって、該有害事象リスク又は総死亡リスクが、該被験者から該体液を採取後の10年以内、5年以内、又は2.5年以内に予測される。

【0012】

一実施形態において、該被験者とは、測定時において健康な被験者、又は測定時において心血管系疾患を有していない被験者である。一実施形態において、該被験者とは、測定時において脳卒中、心筋梗塞、及び/又は急性心不全の既往歴が無い者である。一実施形態において、該被験者とは、測定時において、冠状動脈疾患(CAD)、及び/又は虚血性心疾患、及び/又は経皮的冠動脈形成術(PCI)、又は冠状動脈バイパス術(CABG)を受けたことが無い者である。

【0013】

総死亡リスクとは、全ての原因により死亡するリスクであって、ある期間中に死亡するリスクのことをいう。

【0014】

発明の特定の実施形態において、心血管系リスクとは、脳卒中、CVD(心血管疾患)による死、及び冠状動脈疾患(CAD)を含む群から選択される事象として定義されるものであって、後者は、致命的又は非致命的な心筋梗塞、虚血性心疾患、経皮冠動脈形成術又は冠状動脈バイパス術(CABG)による死を含んでいる。一実施形態において、CVD(心血管疾患)による死とは、心筋梗塞、急性心不全又は脳卒中を原因とする死のことをいう。CVD(心血管疾患)による死とは、心血管疾患による死を意味している。特定の実施形態において、CVD(心血管疾患)による死とは、心筋梗塞、急性心不全及び脳卒中が含まれる群から選択される。

【0015】

特定の実施形態において、心血管系リスク又は総死亡リスクの予測とは、該リスクの短期間予測のことである。

【0016】

特定の実施形態において、短期間中に、心血管リスクに関連した事象を有する被験者のリスク、又は、全ての原因(総死亡率)によって死亡する被験者のリスクが予測されるものであって、該短期間とは、10年以内、さらに具体的には5年以内、さらに具体的には2.5年以内を意味している。

【0017】

心血管系リスク又は総死亡リスクの短期間予測が、体液中の成長ホルモン(hGH)、又は/及びそのアイソフォームの空腹時レベルの測定により可能であるということは、本発明における驚くべき発見である。短期間とは、該被験者の該体液を採取後、10年以内

10

20

30

40

50

、5年以内、又は2.5年以内を意味する。

【0018】

さらに特定の実施形態において、CVDによる死の予測とは、短期間予測である。これは、さらに特定の実施形態において、短期間における心筋梗塞、急性心不全、又は脳卒中による被験者の死亡リスクが予測されることを意味しており、該短期間とは、10年以内、さらに具体的には5年以内、さらに具体的には2.5年以内を意味している。

【0019】

さらに特定の実施形態において、CVDによる死の予測とは、男性被験者に対する短期間予測のことである。これは、さらに特定の実施形態において、短期間における心筋梗塞、急性心不全又は脳卒中による男性被験者の死亡リスクが予測されることを意味しており、該短期間とは、10年以内、さらに具体的には5年以内、さらに具体的には2.5年以内であることを意味している。

10

【0020】

成長ホルモン(hGH)のアイソフォームは、hGHアイソフォーム1(22KD)、hGHアイソフォーム2、hGHアイソフォーム3及びhGHアイソフォーム4が含まれる群から選択されてもよい。

【0021】

アイソフォームの配列：

配列番号1：hGH アイソフォーム1(22KD)

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAM
LRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR
SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQ TLMGRLEDGSPR
TGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRDKMDKVE
TFLRIVQCRSVEGSCGF

20

【0022】

配列番号2：hGH アイソフォーム2

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAM
LRAHRLHQLAFDTYQEFNPNQTS LCFSES IPTPSNREETQQ
KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSN
VYDLLKDLEEGIQ TLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTN
SHNDDALLKNYGLLYCFRDKMDKVE TFLRIVQCRSVEGSC
GF

30

【0023】

配列番号3：hGH アイソフォーム3

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAM
LRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQ TLMGRLEDGS
PRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRDKMDK
VETFLRIVQCRSVEGSCGF

40

【0024】

配列番号4：hGH アイソフォーム4

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAM
LRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQIFK
QTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRDKMDKVE TFLRIV
QCRSVEGSCGF

【0025】

成長ホルモン(hGH)の空腹時レベルとは、絶食した被験者(サンプル採取前12時間の絶食)の血液、血清又は血漿中で決定される成長ホルモン(hGH)レベルを意味す

50

る。絶食した被験者とは、サンプル採取前12時間絶食した被験者を意味する。

【0026】

本明細書で使われる用語「被験者 (subject)」は、生存しているヒト又は非ヒト生物を意味している。本明細書では好ましくは、該被験者とはヒト被験者である。被験者とは、他で言及されていなければ、健康又は疾患を有する被験者であってもよい。用語「上昇したレベル (elevated level)」とは、ある閾値レベルを超えたレベルを意味する。

【0027】

体液とは、血液、血漿、血清、唾液、尿及び髄液を含む群から選択されるものであってもよい。特定の実施形態において、該体液とは、血液、血漿及び血清を含む群から選択される。

10

【0028】

アッセイ感度は「分析的 (analytical)」アッセイ感度により決定されるものであってもよく、例えば、20のhGH除去サンプル+2標準偏差 (SD) の測定結果の平均値におけるhGH濃度 (標準曲線読み取り) として定義されるものであってもよい。

【0029】

あるいは、アッセイ感度は、臨床で日常的に用いられている検出限界を超えるものを反映する「機能的 (functional)」アッセイ感度によって定義されてもよい。機能的アッセイ感度とは、異なるhGH濃度を有する多様な個別サンプル中における、血漿 (患者サンプル) のアッセイ間の変動係数 (CV) を測定することで定義される。機能的アッセイ感度は、20%未満のアッセイ間CVとなる最も低いhGH濃度である。

20

【0030】

アッセイ感度は、キャリブレーションで使用した方法及びhGH測定で使用した方法によるものであってもよい。異なるhGHアッセイは、hGHアイソフォームの異なるセットを検出してもよく、これにより異なる量的結果を導く。これは、使用されるアッセイやキャリブレーション方法によって、異なった閾値や感度が必要となることを意味する。

【0031】

異なるhGHアッセイのこの可能な不均質性を克服するために、アッセイキャリブレーションは、個々の被験者の血漿hGH値の相関によって補正されるものであってもよい。もし、相関曲線の傾きが1と異なる場合、hGH値 (キャリブレーション) は、相当するキャリブレーション、相当する感度解析及び相当する閾値に導く異なる因子によって補正されることが出来る。

30

【0032】

上述の補正は、異なったアッセイで得られた結果と比較するために行われてもよい。

【0033】

実施例1に記載されているアッセイは、主にhGH1アイソフォーム1を認識するものであり、組換えヒト成長ホルモン (NIBSCコード 98/574、国立生物製品基準規制機構 (National Institute for Biological Standards and Control、NIBSC、ハートフォードシャー、英国) でキャリブレーションされる。

40

【0034】

本発明の特定の方法において、体液中の成長ホルモン (hGH) 及び/又はそのアイソフォームの該空腹時レベルは、分析的アッセイ感度 (20のhGH除去サンプル+2標準偏差 (SD) の測定結果の平均値におけるhGH濃度として定義される) を備えた超高感度解析法によって決定されるものであって、その感度は、100pg/mL未満、好ましくは50pg/mL未満、好ましくは30pg/mL未満、好ましくは20pg/mL未満、好ましくは10pg/mL未満、好ましくは5pg/mL未満、好ましくは2pg/mL未満である。hGHの測定は、ng/mLとして表現される (1ng/mL = 2.6mU/L)。

【0035】

50

あるいは、400 pg/mL未満、好ましくは200 pg/mL未満、好ましくは120 pg/mL未満、好ましくは80 pg/mL未満、好ましくは40 pg/mL未満、好ましくは20 pg/mL未満、好ましくは10 pg/mL未満、最も好ましくは8.5 pg/mL未満である機能的アッセイ感度(上述参照)を備えた超高感度アッセイである。hGHの測定はng/mLとして表現される。

【0036】

免疫とキャリブレーションのために、本発明者らは、組換えヒト成長ホルモン(NIBSC コード98/574、国立生物製品基準規制機構、ハートフォードシャー、英国)を使用した。

【0037】

本発明の一実施形態において、該アッセイは実施例1において記述するように行われる。

【0038】

該アッセイは、1つの特異的hGHに対して選択されるものであってもよく、該体液中のhGHアイソフォーム1、アイソフォーム2、アイソフォーム3及びアイソフォーム4(配列番号1-4参照)を含む群から選択される1以上、又は全ての分泌されるhGHアイソフォームに特異的であり、決定するものであってもよい。

【0039】

本発明による方法の一実施形態において、該方法は、被験者における心血管系リスクを監視するため、又は治療の経過を監視するために2度以上実施される。

【0040】

本発明による方法の一実施形態において、該監視とは、採用される予防的及び/又は治療的手段に対する、該被験者の反応を評価するために実施される。

【0041】

本発明による方法の一実施形態において、該方法は、該被験者をリスク群に階級化するため、及び/又は古典的なリスクマーカーの頂点の該被験者を再分類するために用いられる。

【0042】

本発明の一実施形態において、該被験者は男性であって、その閾値は400 pg/mL以上、好ましくは340 pg/mL、から100 pg/mL、好ましくは60 pg/mLであって、400 pg/mL以上、好ましくは340 pg/mL以上の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルは、高リスクと予測され、空腹時レベルが100 pg/mLの閾値以下、好ましく60 pg/mL未満であると低リスクであると予測される。

【0043】

本発明の他の実施形態において、該被験者は女性であって、その閾値は3150 pg/mLから好ましくは400 pg/mLであって、成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時レベルが3150 pg/mLの閾値以上の場合は高リスクと予測され、好ましくは400 pg/mLの閾値未満であると低リスクであると予測される。

【0044】

本発明の一実施形態において、該心血管系リスクは心筋梗塞、急性心不全及び脳卒中から選択される。

【0045】

他の実施形態において、少なくとも1つの臨床パラメーターは付加的に決定され、該臨床パラメーターは、年齢、糖尿病の有無及び現在の喫煙を含む群から選択される。

【0046】

本発明の方法の特定の実施形態において、該被験者の体液中で付加的に少なくとも1つのさらなるバイオマーカーが決定され、該心血管系リスクと関連付けられるものであって、該付加的なバイオマーカーは、プロニューロテンシン1-117(PNT1-117)、C反応性タンパク(CRP)、プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド1-108(pro-

10

20

30

40

50

BNP 1 - 108)、プロBNP、BNP、プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド 1 - 98 (proANP - N - 末端フラグメント)、Pro - ANP、アドレノメデュリン、プロアドレノメデュリン 24 - 71 (proADM) 24 - 71)、プロADM 127 - 164、プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド (pro - ANP) 及び少なくとも 5 アミノ酸長を有するそのフラグメント、ST - 2、GDF 15、ガレクチン - 3、コペプチンを含む群から選択される。

【0047】

本発明による主題は方法であって、成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームの空腹時レベルは、成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームに対するバインダー (binder) を使用することにより決定される。追加的な上述のバイオマーカーは、上述されているような該バイオマーカー又はそれらのフラグメントに対するバインダーによって決定されるものであってもよい。

10

【0048】

本発明の一実施形態において、該バインダーは、成長ホルモン (hGH) 及び / 又はそのアイソフォームに結合する抗体、抗体フラグメント又は非イムノグロブリン スキャフォールド (non - Ig - Scaffold) を含む群から選択される。

【0049】

本発明によれば、診断バインダーとは、以下からなる群から選択される：抗体、例えば IgG、典型的な全長イムノグロブリン、又は少なくとも重鎖及び / 又は軽鎖の F - 可変領域を含む抗体フラグメント、例えば、限定されないが、Fab ミニボディー (mini body) などの Fab フラグメントを含む化学的に結合された抗体 (フラグメント抗原結合)、単鎖 Fab 抗体、エピトープタグを有する単価 Fab 抗体、例えば Fab - V5Sx2；CH3ドメインと二量体を形成した二価 Fab (mini - antibody)；二価 Fab 又は多価 Fab、例えば、dHLXドメインの二量体化を介するもの、例えば Fab - dHkX - FSx2、F (ab')₂ - フラグメント、scFv フラグメント、多量体した多価又は / 及び多特異的 scFv フラグメント、二価及び / 又は二重特異的抗体、BITE (登録商標) (二重特異的 T 細胞誘導)、三重機能性抗体、多価抗体、例えば G 以外の他のクラス、シングルドメイン抗体、例えば、ラクダ科又は魚類の免疫グロブリン由来ナノボディー。

20

【0050】

特定の実施形態において、上記バイオマーカー又はそのフラグメントのレベルは、hGH 又はそのフラグメントと結合する、後述するアプタマー、非免疫グロブリン スキャフォールド (non - IgG scaffold) を含む群から選択されるバインダーを用いたアッセイにより測定される。

30

【0051】

上述のバイオマーカー又はそれらのフラグメントのレベルを決定するために用いられてもよいバインダーは、上述のバイオマーカーのいずれかの結合領域に対する親和定数として、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは $10^8 M^{-1}$ を示し、好ましい親和定数は $10^9 M^{-1}$ 超、最も好ましくは $10^{10} M^{-1}$ 超である。当業者であれば、低親和力は、高濃度の化合物を加えることで補正することは当然であることを知っており、この方法は、本発明の範囲外に導くものではない。結合親和力は、例えば、ドイツ カッセルのピアフィン社 (<http://www.biaffin.com/de/>) において解析サービスとして提供されるピアコアメソッド (Biacore method) を利用して決定されるものであってもよい。

40

【0052】

(親和定数)

抗体の親和性を決定するために、固定化された抗体に対する hGH の結合の反応速度論を Biacore 2000 システム (GEヘルスケア ヨーロッパ有限会社、フレイバーク、ドイツ) を用い、無標識の表面プラズモン共鳴法により決定した。製造業者の使用説明書に従い、CM5 センサー表面に高密度に共有結合された抗マウス Fc 抗体 (マウス抗体

50

捕捉キット；GEヘルスケ）を用いて、抗体の可逆的固定を行った{59}。

【0053】

抗体に加え、他の生体高分子スキャフォールドは、当該技術分野において、標的分子を複合化することが周知であり、より標的特異性に優れた生体高分子の生産に用いられている。例としては、アプタマー、スピエゲルマー、アンチカリン、及びコノトキシンである。非イムノグロブリン(non-Ig)スキャフォールドは、タンパク質スキャフォールドであってもよく、リガンド又は抗原と結合できるような抗体模倣体として使用されるものであってもよい。非免疫グロブリンスキャフォールドは、テトラネクチンを基にした非免疫グロブリン(non-Ig)スキャフォールド(例えば、US2010/0028995の記述)、フィブロネクチンスキャフォールド(例えば、EP1266025の記述)、リポカリンを基にしたスキャフォールド(例えば、WO2011/154420の記述)、ユビキチンスキャフォールド(例えば、WO2011/073214の記述)、トランスフェリンスキャフォールド(例えば、US2004/0023334の記述)、プロテインAスキャフォールド(例えば、EP2231860の記述)、アンキリンリピートを基にしたスキャフォールド(例えば、WO2010/060748の記述)、マイクロプロテイン、好ましくはシスチンノットを形成するマイクロプロテインスキャフォールド(例えば、EP2314308の記述)、Fyn SH3ドメインを基にしたスキャフォールド(例えば、WO2011/023685の記述)、EGFR-Aドメインを基にしたスキャフォールド(例えば、WO2005/040229の記述)、クニッツドメイン(Kunits domain)を基にしたスキャフォールド(例えば、EP1941867の記述)を含む群から選択されてもよい。

【0054】

本発明の主題は、先行する実施形態のいずれかによる、被験者の心血管系リスク、心血管系事象を原因とする死、又は総死亡リスクを予測するための方法でもあって、該被験者から得られた体液中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームのレベルは、単独、又は予後的に役立つ実験的若しくは臨床のパラメーターと共に使用されるものであって、以下の選択肢から選択されるものであってもよい：

【0055】

・「健康」又は「見かけ上健康」な被験者集団で所定のサンプル母集団中における、該被験者から得られた体液中のhGH、又はその少なくとも5アミノ酸のフラグメントのレベルの中央値の比較、

【0056】

・「健康」又は「見かけ上健康」な被験者集団で所定のサンプル母集団中における、該被験者から得られた体液中のhGH、又はその少なくとも5アミノ酸のフラグメントのレベルの分位点の比較、

【0057】

・コックス比例ハザード解析を基礎とした計算、又はリスクインデックス算出法、例えばNRI(総再分類インデックス(Net Reclassification Index))若しくはIDA(統合識別インデックス(Integrated Discrimination Index))等を使用した計算。

【0058】

本発明による方法の特定の実施形態において、該被験者は女性であり、1つのさらなるバイオマーカーは、該女性被験者の体液中のhGH及びそのアイソマーの他に決定されて、該心血管系リスクと関連付けられるものであって、該追加的なバイオマーカーとは、プロニューロテンシン(PNT)、及び少なくとも5アミノ酸の長さを有したそのフラグメントである。

【0059】

本発明の一実施形態において、いわゆるPOCテスト(point-of-care)であってもよく、POCテストとは完全自動化された解析システムの必要がなく、患者の近くで1時間以内にテストを実行することが可能なテスト技術である。本技術の一例が免

疫クロマトグラフィーテスト技術である。

【0060】

本発明の一実施形態において、このようなアッセイとは、何等かの検出技術を有したサンドイッチ免疫アッセイであって、それらは酵素標識、化学発光標識、電気化学発光標識を含んだアッセイであるがこれに限定されず、完全自動化アッセイであることが好ましい。本発明の一実施形態において、そのアッセイは酵素標識サンドイッチアッセイである。自動化又は完全自動化アッセイの例としては、以下に挙げるシステムをその1つとして使用することができるものであってもよい。ロッシュ社のE l e c s y s（登録商標）、アボット社のA r c h i t e s t（登録商標）、シーメンス社のC e n t a u e r（登録商標）、B r a h m社のK r y p t o r（登録商標）、B i o m e r i e u x社のV i d a s（登録商標）及び、A l e r e社のT r i a g e（登録商標）。

10

【0061】

多様な免疫アッセイが知られており、本発明におけるアッセイや方法として使用されるものであってもよく、以下のものを含む：放射免疫アッセイ（R I A）、同種酵素増幅免疫アッセイ（E M I T）、酵素結合免疫アッセイ（E L I S A）、アポ酵素再活性化免疫アッセイ（A R I S）、ディップスティック免疫アッセイ及び免疫クロマトグラフィーアッセイ。

【0062】

本発明の一実施形態において、該2つのバインダーの少なくとも1つは検出されるために標識されている。

20

【0063】

好ましい検出方法とは、例えば、放射免疫アッセイ（R I A）、化学発光及び蛍光発光免疫アッセイ、酵素結合免疫アッセイ（E L I S A）、ルミネックス系ビーズアレイ、タンパク質マイクロアレイアッセイのような様々な形式における免疫アッセイや、例えば免疫クロマトグラフィーストリップ試験のような迅速テスト形式を含む免疫アッセイである。

【0064】

好ましい実施形態において、該標識とは、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨウ素標識を含む群から選択される。

【0065】

アッセイは、同種又は異種アッセイであってよく、競合的及び非競合的アッセイであってよい。一実施形態において、アッセイはサンドイッチアッセイの形式であって、非競合的免疫アッセイであり、検出及び/又は定量される分子は、一次抗体及び二次抗体に結合するものである。一次抗体は、固相、例えばビーズ、ウェルや他の容器の表面、チップ又は小片（s t r i p）に結合されるものであってもよく、二次抗体は、例えば色素や、放射性同位体で標識されたものや、反応性又は触媒的に活性する成分で標識されている抗体である。分析対象に結合する標識抗体の量は適切な方法によって測定される。「サンドイッチアッセイ」に関わる一般的な構成や手順は確立されており、当業者に知られているものである{ 2 3 }。

30

【0066】

他の実施形態において、アッセイとは、2つの捕捉分子を含むものであって、溶液反応混合物中において両者とも拡散して存在する抗体であることが好ましく、第一の標識した構成成分は第一の捕捉分子に結合するものであって、該第一の標識した構成成分は、蛍光、若しくは化学発光 - 消光、又は増幅する標識システムの一部であって、該標識システムの第二の標識した構成成分は、第二の捕捉分子に結合するものであって、その結果、分析対象への両方の捕捉分子の結合により、測定可能なシグナルが検出され、サンプルを含む溶液中において形成されたサンドイッチ複合体を検出することが出来るようになる。

40

【0067】

他の実施形態において、該標識システムとは、蛍光色素又は化学発光色素、特にシアニンタイプ色素と共に、希土類クリプテート又は希土類キレートを含むものである。

50

【0068】

本発明の文脈では、蛍光発光を基礎としたアッセイは、色素の利用を含むものであって、例えば、FAM(5-又は6-カルボキシフルオレセイン)、VIC、NED、フルオレセイン、フルオロセインチオイソシアネート(FITC)、IRD-700/800、シアン染料、例えばCY3、CY5、CY3.5、Cy5.5、Cy7等、キサンテン、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロフルオレセイン(HEX)、TET、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、5-カルボキシローダミン-6G(R6G5)、6-カルボキシローダミン-6G(RG6)、ローダミン、ローダミングリーン、ローダミンレッド、ローダミン110、BODIPY染料、例えばBODIPY TMR等、オレゴングリーン、クマリン、例えばウンベリフェロン等、ベンズイジド、例えばHoechst 33258等、フェナントリジン、例えばテキサスレッド等、ヤキマイエロー、アレクサフルオール(Alexa Fluor)、PET、臭化エチジウム、アクリジニウム染料、カルバゾール染料、フェノキサジン染料、ポルフィリン染料、ポリメチン染料等が含まれる群から選択されるものであってもよい。

10

【0069】

本発明の文脈において、化学発光を基礎としたアッセイとしては、色素を使用した方法を含むものであって、{24}中の化学発光材料として記述されている物理学的原理に基づいたものである。好ましい蛍光発光色素はアクリジニウムである。

20

【0070】

ここで言及されるように、「アッセイ」又は「診断アッセイ」とは、診断領域において適用されるいずれの種類のものであってもよい。このようなアッセイとは、ある親和性を有する1以上の捕捉プローブに対して結合する分析物の結合を基にするものであってもよい。捕捉分子及び標的分子又は目的の分子間の相互作用に関して、親和定数としては、好ましくは 10^8 M^{-1} 以上である。

【0071】

本発明の文脈において、「バインダー分子」とは、対象分子、又は関心がある分子、つまり、サンプル由来の分析物(つまり、本発明の文脈においては、PCT及びそのフラグメント)に結合するために使用される分子をいう。バインダー分子は、標的分子又は目的の分子に特異的に結合するために、空間的及び、表面特徴の観点、例えば表面電荷、疎水性、親水性、ルイス供与体及び/又は受容体の有無の両方から、適切に形成されなければならない。これによって、結合は、例えばイオン結合、ファンデルワールス結合、 $\pi-\pi$ 結合、シグマ- π 結合、疎水結合又は水素結合の相互作用、或いは捕捉分子及び標的分子又は目的の分子間の2以上の前述の相互作用の組み合わせによって媒介されてもよい。本発明の文脈において、バインダー分子は、例えば、核酸分子、炭水化物分子、PNA分子、タンパク質、抗体、ペプチド、又は糖タンパクを含む群から選択されるものであってよい。好ましくは、バインダー分子は抗体であり、標的又は目的の分子と十分に親和性がある抗体のフラグメントが含まれるものであり、さらに組換え抗体又は組換え抗体フラグメント、並びに化学的に及び/又は生化学的に改変した該抗体の誘導體、又は該抗体の少なくとも12アミノ酸長を有する変異鎖(variant chain)由来のフラグメントが含まれる。

30

40

【0072】

化学発光標識は、アクリジニウムエステル標識、イソルミノール標識を含むステロイド標識等であってもよい。

【0073】

酵素標識は、乳酸脱水素酵素(LDH)、クレアチンキナーゼ(CPK)、アルカリフォスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、酸性フォスファターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ等であってよい。

50

【0074】

本発明の一実施形態において、該2つのバインダーの少なくとも1つは、磁気粒子やポリスチレン表面のような固相に結合する。

【0075】

本発明によるサンプル中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームのレベルを決定するために行われるアッセイの一実施形態において、このようなアッセイはサンドイッチアッセイであって、好ましくは完全に自動化されたアッセイである。それは完全に自動化された又は手動で行われるELISAであってよい。それは、いわゆるPOCテスト(point-of-care)であってよい。自動又は完全自動化したアッセイの例としては、以下に挙げられるシステムの1つを利用するようなシステムを含む：ロッシュ社 Elecsys (登録商標)、アボット社 Architect (登録商標)、シーメンス社 Centaur (登録商標)、ブラハムズ社 Kryptor (登録商標)、Biomerieux社 Vidas (登録商標)、Alere社 Triage (登録商標)。テストフォーマットの例は上述されている。

10

【0076】

本発明によるサンプル中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームのレベルを決定するためのアッセイの一実施形態において、該2つのバインダーの少なくとも1つは検出されるために標識されている。標識の例は上述されている。

【0077】

本発明によるサンプル中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームのレベルを決定するためのアッセイの一実施形態において、該2つのバインダーの少なくとも1つは固相に結合されている。固相の例は上述されている。

20

【0078】

本発明によるサンプル中の成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームのレベルを決定するためのアッセイの一実施形態において、該標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨウ素標識を含む群から選択される。

【0079】

本発明のさらなる主題は、本発明によるアッセイを含むキットであって、該アッセイの構成要素は、1以上の容器に含まれてもよい。

【0080】

本発明によれば、該被験者は合併症を有していてもよく、それは疾患、又はアテローム性動脈硬化症、高血圧、心不全、心筋梗塞を含む群より選択される事象であってよい。

30

【0081】

本発明の好ましい実施形態において、成長ホルモン(hGH)及び/又はそのアイソフォームの空腹時のレベルは免疫アッセイで測定される。さらに好ましい実施形態において、該免疫アッセイは、少なくとも1つの抗体、好ましくは2つの抗体を含み、が 10^{-8} M以下の結合親和性を有する。

【0082】

本発明の主題は、少なくとも1つの単一特異的なバインダー、好ましくは2つの単一特異的バインダーを含む超高感度(us-hGH)アッセイでもあって、hGH及び/又はそのアイソフォームに対する 10^{-8} M以下の結合親和性を有し、該超高感度アッセイは100pg/mL未満、好ましくは50pg/mL未満、好ましくは30pg/mL未満、好ましくは20pg/mL未満、好ましくは10pg/mL未満、好ましくは5pg/mL未満、好ましくは2pg/mL未満の分析的アッセイ感度を備える。

40

【0083】

超高感度hGHアッセイの1つの特定の実施形態において、該単一特異的バインダーはモノクローナル抗体である。

【0084】

本発明による超高感度hGHアッセイは、本発明による方法として使用される。

【実施例】

50

【 0 0 8 5 】

実施例 1、u s - h G H アッセイ

【 0 0 8 6 】

試薬

他に言及がなければ、試薬はメルク社（ダルムシュタット、ドイツ）より p . a グレードで購入されてものである。

【 0 0 8 7 】

抗原

免疫とキャリブレーションのために、組換えヒト成長ホルモン（N I B C コード 9 8 / 5 7 4、国立生物製品基準規制機構（National Institute for Biological Standards and Control）、ハートフォードシャー、英国）を使用した。

【 0 0 8 8 】

抗体開発

h G H に対するマウスモノクローナル抗体は U N I C U により開発された（カールスブルグ、ドイツ）。

【 0 0 8 9 】

抗体は以下の方法によって作製された：

0 日目及び 1 4 日目において、B A L B / c マウスは 1 0 0 μ g の h G H が免疫され（完全フロイトアジュバント 1 0 0 μ L 中に乳化）、2 1 日目及び 2 8 日に 5 0 μ g の h G H （完全フロイトアジュバント 1 0 0 μ L 中）が免疫された。細胞融合実験を行う 3 日前、当該動物には 1 0 0 μ L 生理食塩中に溶解された 5 0 μ g の抱合体（c o n j u g a t e ）が腹腔内及び静脈に注射で投与された。

【 0 0 9 0 】

免疫したマウス由来の脾臓細胞、及びミエローマ細胞株 S P 2 / 0 の細胞は、1 m L の 5 0 % ポリエチレングリコールを用いて 3 0 秒間、3 7 °C にて融合された。洗浄後、細胞は 9 6 ウェル細胞培養皿に播種された。融合クローンは H T A 培地（2 0 % ウシ胎児血清及び H A T サプリメント含有 R P M I 1 6 4 0 培養液）にて生育することで選択された。2 週間後、H A T 培地は H T 培地と交換されて 3 回継代され、続いて通常の細胞培養液へと交換された。

【 0 0 9 1 】

3 週間後、細胞培養上清は、抗原特異的 I g G 抗体のための最初のスクリーニングが行われた。陽性となった微小培養液は、増殖のために 2 4 ウェル細胞培養皿へと移された。再度確認後、選択された培養物は、限界希釈法を使用したクローン化及び再クローン化が行われ、アイソタイプが決定された { 6 0 }、{ 6 1 }。

【 0 0 9 2 】

モノクローナル抗体作製

本発明者らはさらなる探索のために 5 つの抗体を選択した。

【 0 0 9 3 】

抗体は、標準的な抗体作製法により作製され（Marx et al.、Monoclonal Antibody Production（1997）、ATLA 25、121）、プロテインAクロマトグラフィーにより精製された。SDSゲル電気泳動解析によれば、抗体純度は 9 5 % 以上であった。

【 0 0 9 4 】

抗体の標識及びコーティング

全ての抗体は、以下の手順に沿って、アクリジニウムエステルで標識された：

【 0 0 9 5 】

標識された化合物（トレーサー）：1 0 0 μ g （1 0 0 μ L ）抗体（1 m g / m L p H 7 . 4 P B S 中）は 1 0 μ L アクリジニウム N H S - エステル（1 m g / m L アセトニトリル（インベント社、ドイツ）中）（E P 0 3 5 3 9 7 1 ）と混合され、室温で

10

20

30

40

50

20分間保温された。標識された抗体は、Bio-Sil SEC400-5 (バイオラッド ラボラトリー社、米国)を使用したゲル濾過HPLCで精製された。精製された抗体は、(300 mmol/L リン酸カリウム、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Na-EDTA、5 g/L 牛血清アルブミン、pH 7.0)中で希釈された。最終濃度は、200 µLあたり、標識化合物(約20 ng 標識抗体)約800.000 相対発光ユニット(RLU)だった。アクリジウムエステル化学発光はAutoLumat LB953 (ベルトルテクノロジー社)にて測定された。

【0096】

固相抗体(コートされた抗体)：

固相：ポリスチレンチューブ(グライナー バイオ ワン インターナショナル社、オーストリア)は、抗体(1.5 µg抗体/0.3 mL 100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris/HCl、pH 7.8)でコートされた(18時間、室温)。5%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、チューブはPBS、pH 7.4で洗浄され、真空乾燥された。

【0097】

hGH イムノアッセイ：

50 µL サンプル(又はキャリブレーター)はコートしたチューブヘビペットにて添加され、標識抗体(200 µL)を加え、チューブは2時間、18-25 で保温された。結合されなかったトレーサーは、洗浄液(20 mmol/L PBS、pH 7.4、0.1% Triton X-100)で5回洗浄されることで除かれた。チューブに結合された標識抗体はLB953で測定された。濃度が1 ng/mLに固定されているhGHが使用された。異なった抗体の組み合わせにおけるノイズ(us-hGH非含有のRLU)に対するシグナル(1 ng/mLにおけるRLU)の比を表1に示す。全ての抗体は他の抗体と共にサンドイッチ複合体を形成可能であった。ノイズに対する強力なシグナルを伴った抗体ペア(ベスト感度)は、続いて行うus-hGH-イムノアッセイを実施するために使用された：hGH G12抗体はチューブコート抗体として使用され、hGH H4抗体は標識抗体として使用された。

【0098】

【表1】

表1：hGH抗体の異なったペア間のノイズ比決定の結果

hGH抗体	固相抗体	H2	H8	G12	H4	D7
標識抗体						
H2		/	9.665	11.005	9.259	10.102
H8		8.512	/	7.833	8.446	6.384
G12		10.112	9.846	/	10.905	7.751
H4		11.213	8.675	12.225	/	6.843
D7		2.488	2.761	3.954	2.717	/

【0099】

キャリブレーション：

アッセイは、20 mM K₂PO₄、6 mM EDTA、0.5% BSA、50 µM アマスタチン(Amastatin)、100 µM ロイペプチン(Leupeptin)、pH 8.5中に溶解された組換えhGH(WHO国際標準、NIBSCコード98/574)の希釈物によりキャリブレーションが行われた(図1)。

【0100】

アッセイの詳細

分析的アッセイ感度(hGH非含有サンプルの20検体のRLUの平均値+2SD)は

10

20

30

40

50

hGH 2 pg/mLであって、機能的アッセイ感度(上述参照)は8.5 pg/mLであった。復元率と希釈率は、5 - 10,000 pg/mL hGHの内部測定範囲の>85%であった。組換えhGH(22KD)特異的us-hGHアッセイ及びhGHアッセイ間のN=997サンプルの相関関数は $r=0.98$ であって、0.95のrは、脳下垂体から天然に産生するhGHアイソフォームを優先的に認識するアッセイで見られる{20}。これらデータは、本発明中で、全てのhGHアイソフォーム測定の適合性を示している。

【0101】

実施例2 集団研究

対象及び方法

研究集団

マルメダイエットアンドキャンサースタディー(MDC)は、1991年から1996年の間に実施された28499人の母集団によるプロスペクティブ(prospective)疫学的コホートである{18}。このコホート由来のランダムサンプルには、1991年11月から1994年2月($n=6103$)に調べられたMDC心血管系コホート(MDC-CC)が含まれており、MDC-CCは、当初、頸動脈疾患の疫学調査を目的とするものであった{19}。空腹時の血漿サンプルの値が欠けているものや、糖尿病の罹患率又は空腹時HDL-C、LDL-C若しくはhGHの値のデータが無い被験者を除外すると、4454人が残り、一次研究コホートを構成する。

【0102】

全ての参加者は書面による同意書を提供し、本研究はランド大学(ランド、スウェーデン)の倫理委員会で承認された。

【0103】

臨床試験及びアッセイ

参加者は既往歴、健康診断及び研究所事前評価を受けた。血圧は、仰向きの姿勢にて10分間休んだ後、水銀コラム血圧計にて測定した。ウエスト周りはへその位置で測定した。現在のタバコの喫煙は、過去1年以内に喫煙していたかどうかで定義し、自己管理アンケートによって調査された。ベースラインにおける降圧薬服用の普及を記録するために、日記と組み合わせた同様のアンケートが使用された。糖尿病は、医者が行った診断の自己申告、糖尿病薬の使用、又は空腹時の全血グルコースが 6.0 mmol/L (109 mg/dL)より高い場合のいずれかとして定義された。

【0104】

血漿及び全血の全てのサンプルは、一晩の絶食後に採取されたものであり、仰向けで15分間休憩後、午前7時30分~9時の間に採取された。HDL-C及び総コレステロールのレベルは、マルメ大学病院 臨床化学部門の標準的手順に沿って測定された。LDL-Cのレベルは、フライドワルド法則(Friedewald formula)に従って算出された。

【0105】

hGHレベルは、MDC-CCベースライン試験において80で即座に凍結し、保存された空腹時の血漿サンプルで測定された。測定は、超高感度化学発光イムノアッセイ(実施例1 us-hGHアッセイ参照)を用いて行われた。検出限界は 2 pg/mL 、機能的アッセイ感度は 8.5 ng/mL であった。hGHの測定結果は ng/mL ($1\text{ ng/mL}=2.6\text{ mU/L}$)で表現される。

【0106】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 本研究母集団の臨床的特徴

	男性	女性
数(コホートにおける%)	1873 (42.1)	2580 (57.9)
年齢、平均(SD)、歳	57.9 (6.0)	57.6 (5.9)
収縮期血圧、平均(SD)、mmHg	144 (19)	141 (19)
肥満指数、平均(SD)、kg/m ²	26.2 (3.5)	25.5 (4.2)
抗高血圧療法、数(%)	345 (18.4)	402 (15.6)
糖尿病、数(%)	216 (11.5)	166 (6.4)
LDL-C、平均(SD)、mmol/L	4.11 (0.90)	4.20 (1.04)
HDL-C、平均(SD)、mmol/L	1.22 (0.30)	1.51 (0.37)
現在の喫煙、数(%)	512 (27.3)	661 (25.6)
成長ホルモン、中央値(IQR)、ng/mL	0.11 (0.06-0.34)	1.22 (0.39-3.15)*

*有意差 vs 男性(P < .001)。他の変数に対するPは算出せず。

略語: BMI、肥満指数; LDL-C、低密度リポタンパク質コレステロール; HDL、高密度リポタンパク質コレステロール

【0107】

男性及び女性におけるhGHの分布

【表 3】

表 3. 男性及び女性におけるhGHの頻度分布 全ての原因及びCVDによる死に対する四分位数におけるhGH値の範囲				
性別	Q1	Q2	Q3	Q4
男性				
最小hGH	0.02	0.06	0.12	0.34
最大hGH	0.05	0.11	0.33	23.94
最小Ln hGH	-3.91	-2.81	-2.12	-1.10
最大Ln hGH	-3.00	-2.21	-1.11	3.18
女性				
最小hGH	0.01	0.40	1.22	3.15
最大hGH	0.39	1.21	3.14	40.60
最小Ln hGH	-4.61	-0.92	0.20	1.15
最大Ln hGH	-0.94	0.19	1.14	3.70

【0108】

観察された最も低いhGH濃度は、男性においては0.02ng/mL、女性において

は 0.01 ng/mL であって、これは、全ての被験者における空腹時 hGH 検出のために用いられた us-hGH テスト (分析的感度: 0.002 ng/mL (2 pg/mL)、機能的アッセイ感度: 0.0085 ng/mL (8.5 pg/mL)) が適合することを示している。男性の CVD による死に対するカットオフ値は、高リスク被験者の場合は 0.34 ng/mL より高くてもよく、低リスクの場合は 0.06 ng/mL 未満であってもよい。

【0109】

臨床エンドポイント

本発明者らは4つの主要な結果、冠状動脈疾患、脳卒中、心臓血管系死亡率、総死亡率を調べた。それぞれのスウェーデン人個別ID番号と、スウェーデン人病院退院記録 (Swedish Hospital Discharge Register (SHDR))、スウェーデン人死因記録 (Swedish Cause of Death Register (SCDR))、マルメ脳卒中記録 (the Stroke in Malmo Register) 及び、心臓病における推奨された治療法により評価された根拠に基づく治療の強化及び開発のためのスウェーデンウェブシステム (Swedish Web-system for Enhancement and Development of Evidence-based care in Heart disease Evaluated According to Recommended Therapies (SWEDEHEART)) の記録の関連付けを通してエンドポイントが検索された。結果を分類するためのこれらの記録の使用は、以前有効性が確認されており、心筋梗塞のような事象を検出するための感度は90%を超えることが示されている {21}、{22}、{23}。CADは、致命的又は非致命的な心筋梗塞、虚血性心疾患による死、経皮的冠動脈形成術 (PCI) 又は冠動脈バイパス術のうち、いずれか早い方と定義されており、SHDR、又はSCDRのそれぞれにおいて、国際疾病分類 第9版及び10版 (ICD-9、ICD-10) コード410及びI21、SCDRのコード412及び414 (ICD-9) 又はI22、I23及びI25 (ICD-10) に基づいている。脳卒中は、コード430、431、434及び436 (ICD-9)、又はI60、I61、I63及びI64 (ICD-10) に基づき、致命的又は非致命的脳卒中と定義された。心血管系の死はSCDRにおいて、コード390-459 (ICD-9) 又はI00-I99 (ICD-10) に基づき定義された。結果に対するフォローアップは2009年6月30日まで延長した。

【0110】

統計解析

空腹時のhGHの値は、右歪曲分布 (right-skewed distribution) を示し、解析前に自然対数へと変換された。hGHが、従前の心血管系リスク因子 {24} と相関があるかどうか確かめるために、ベースラインにおいて線形回帰モデルを用い、従属変数としてのhGHと、非従属変数としての年齢、性別、現在の喫煙状況、降圧剤摂取、糖尿病、並びに、収縮期血圧、BMI、HDL-C及びLDL-Cのための標準化された値を、独立 (未処理 (include)) 又は同時 (多変量補正) に導入した横断的解析 (cross sectional analyses) を実施した。

【0111】

多変量コックス比例ハザードモデル (Multivariable Cox proportional hazard model) は、hGHと、心血管系事象及び死亡のインシデントとの間の関連性を調べるために用いられた。CAD及び脳卒中の解析において、本発明者らは、それぞれの解析におけるベースラインの前に、CAD ($n=94$) 又は脳卒中 ($n=35$) の既往歴がある個人を除いた。全てのモデルは、年齢、性別、収縮期血圧、降圧剤の使用、現在の喫煙、糖尿病、LDL-Cのレベル、HDL-Cのレベルで補正された。本発明者らは、比較ハザード仮説が、使用するショーンフィールド残差 (Schoenfeld residuals) (時間におけるショーンフィールド残差の一般化された線形回帰の非ゼロ傾きテスト) と適合することを確認した。hGHに対する

ハザード比率 (HR) は、hGH の自然対数の 1 - SD 増加ごとに示された。性別の違いに有意差があるかどうか証明するために、性別相互作用テストが実施された。

【0112】

Kaplan-Meier 曲線 (Kaplan-Meier curves) を得るために、コホートは性別特異的な四分位値へと分割された。

【0113】

表 3 は、男性及び女性における異なった四分位のカットオフ濃度を示す。1 以上の hGH アイソフォームの異なったセットを認識する hGH アッセイが使用されれば、カットオフ濃度は適合するかもしれない。

【0114】

hGH アイソフォームの異なったセットを認識する異なるアッセイを使用することにより、異なる結果が得られる可能性を評価するために、本発明者らはアッセイ (実施例 1 中に記載された組換え hGH (アイソフォーム 1) に結合するために作製された抗体) と、アイソフォーム 2 - 4 を主に認識するアッセイ (Pit-hGH アッセイ) { 29 } とを比較した。997 名の健康な被験者の hGH の結果は相関しており、相関係数は 0.95 ($r = 0.95$) であって、異なる hGH アイソフォームに結合するアッセイを使用してもほとんど同一の結果であることを示している。

【0115】

hGH は、リスクを再分類するために使用できるかどうか評価するために、本発明者らは以前報告された方法に従って、総再分類改善度 (net reclassification improvement, NRI) を算出した { 25 }。本発明者らは、心血管系事象の 10 年間の上昇リスクを見積もり、参加者を 5% 未満、5% 以上 10% 未満、10% 以上 20% 未満、20% 以上のグループに分類するために、上述したパラメーターとともに多変数リスクスコア (multivariable risk score) を用いた。hGH の値を追加することにより、参加者は異なるグループへと再分類されることができた。本発明者らは被験者の再分類を評価し、モデルの成功性の評価として、NRI を算出した。モデル判別は、C-統計 (ハレル (Harrell's)) を算出することで評価した。C 統計とは、異なったモデルに対し、受信者動作特性 (ROC) 曲線の下部の領域を示す { 25 }。

【0116】

NRI 及び C-統計を除く全ての解析は SPSS 統計ソフトウェア (バージョン 20.0.2、SPSS 社、シカゴ、イリノイ州) を使用して行われた。NRI 及び C 統計解析は、ステートソフトウェア バージョン 11 (ステート社、カレッジステーション、テキサス州) を用いて行われた。0.05 未満の 2-サイド P 値は、統計的に有意差があるものとみなした。

【0117】

結果

横断的解析 (Cross-sectional analysis)

コホートのベースライン特性は表 2 に示している。期待された通り、女性は、男性よりも hGH の空腹時の値が有意に高かった (表 3)。クルード回帰モデルにおいて、女性の年齢を除き、全ての変数は、両方の性別における hGH レベルの重要な決定要因であった (表 4)。補正したモデルにおいては、年齢、現在の喫煙及び HDL-C は、hGH と有意な正の相関関係があり、一方で、LDL-C 及び BMI は男女ともに有意に負の相関関係があった (表 4)。収縮期血圧は女性において、有意に負の相関関係があったが、男性ではなかった。女性において、糖尿病は、単純な解析では hGH と強い負の相関関係があったが、補正した解析においては、有意差はないボーダーラインであった。逆に、男性における hGH と糖尿病との間の相関関係は、いずれのモデルを用いた場合においても正であり、有意であった。重回帰モデルでは、男性に対しては 9.5% の R^2 値、女性に対しては 11.8% であった。全コホートを解析し、性別で補正すると、 R^2 値は 39% であった。hGH に関連した変数、ウエスト、インシュリン (自然対数) 及び体脂肪率の追加

10

20

30

40

50

は、男性に対しては10.4%、女性に対しては12.6%の R^2 値を与えた。これらの追加変数を含んだクルード回帰モデルは、全て空腹時hGHレベルと有意な負の相関関係を示した。

【0118】

成長ホルモン及びCADのリスク

フォローアップ期間の中央値が16.1年(IQR、15.4 - 16.7)の期間中、CADの既往歴が無い4358人(男性1799人、女性2559人)のうち、401人(男性249人、女性152人)はCAD事象を経験した。全コホートにおいて、ベースラインhGHのそれぞれのSD増加は、1.14($P = 0.08$)の多変量補正(multivariate adjusted)HRと関連性があった(表5)。HRは、男性の独立した解析結果と同様であったが(HR、1.17; $p = .01$)、女性では有意な上昇はなかった。CADの結果において、有意な性別間相互作用はなかった($p = .37$)。hGHの最高四分位対最低四分位数は、総合解析においてHRが1.33(95%CI、0.99 - 1.78; $p = .05$)、男性では1.49(95%CI、1.01 - 2.09; $p = .04$)と関連していたが、女性では有意差がなかった($p = .91$) (表6)。

10

【0119】

成長ホルモン及び脳卒中リスク(表5及び6)

コホート中の4417人(男性1849人、女性2568人)は脳卒中の既往歴が無かった。フォローアップ期間の中央値が16.2年(IQR、15.5 - 16.7)の間、265人(男性152人、女性123人)が脳卒中を罹患した。ベースラインにおけるそれぞれの空腹時hGHのSD増加は、全体コホートにおける多変量補正したHRが1.19と関連性があり、性別特異的解析では、男性においてHRが1.18であり、女性では有意差は無かった。結果において性別間相互作用に有意差は無かった($p = .81$)。hGHの最高四分位数対最低四分位数は、総合解析において、HRが1.47(95%CI、1.03 - 2.11; $p = .04$)と関連しており、男性では1.48(95%CI、0.91 - 2.42; $p = .11$)、女性では1.46(95%CI、0.83 - 2.58; $p = .19$)であった。

20

【0120】

成長ホルモン及び総死亡率(表5及び6)

コホート中の4452人(男性1872人、女性2568人)のうち、698人(男性383人、女性315人)はフォローアップ期間の中央値16.2年(IQR、15.6 - 16.7)の後、死亡した。ベースラインにおける空腹時hGHのそれぞれのSD増加は、全体コホートにおいて、多変量補正したHRが1.21と関連しており、男性のHR1.26と一致していたが、女性では有意差は無かった。性別の相互作用の解析は、結果における性別間の有意な差を示した($p = .01$)。hGHの最高四分位数対最低四分位数は、総合解析におけるHRが1.46(95%CI、1.17 - 1.84; $p < .001$)、男性におけるHRが2.05(95%CI、1.47 - 2.86; $p < .001$)と関連していたが、女性では有意差が無かった($p = .96$)

30

【0121】

成長因子及び心血管系死亡率(表5及び6)

コホートにおいて、ベースライン時およびフォローアップ期間中において、4452人は解析可能であって、総死亡率におけるコホートと一致しており、これらのうち215人(男性126人、女性89人)は主要な死因として心血管系事象により死亡した。ベースラインにおけるそれぞれの空腹時hGHのSD増加は、全コホートにおける、多変量補正したHR1.51と関連していた。性別特異的なHRは、男性では1.41、女性では1.38であった。この結果においては、性別間相互作用には有意差は無かった($p = .81$)。hGHの最高四分位数対最低四分位数は、総合解析においてHRが2.68(95%CI、1.70 - 4.23; $p < .001$)、男性では3.41(95%CI、1.76 - 6.61; $p < .001$)と関連しており、女性では、1.98(95%CI

40

50

、0.98 - 3.81 ; $p = .06$)であった。図2は、男性におけるCVD死亡事象の時間依存的な発生を示す。

【0122】

成長ホルモンはCVD死亡率の短期間予想因子である
CVDによる死の時間依存的発生は図2に記載されている。

【0123】

驚くことに、観察期間が短くされると、低リスク者と高リスク者の間の予測判別がより強くなった(表7)。

男性のCVDによる死の短期間リスク予測において、hGHは特に強く示す。事象の相対的リスク(ベースラインにおける四分位数4対四分位数1)は、男性のCVDによる死の2.5年リスク予測に対しては>15、5年リスク予測に対しては、9.1、10年リスク予測に対しては7.9、15年リスク予測に対しては4.2である。これらのデータは、hGHの強力な短期間予測能力及びhGHの連続測定の適合性を示す。

【0124】

【表4】

表7. 男性のCVDによる死の予測に対するhGH四分位数、観察期間の変動。表7は男性におけるCVDによる死の短期間リスクを示す。観察期間が短くなるほど、最低hGH四分位数と最高hGH四分位数の間における相対的リスクの違いが強くなる：

	ベースラインhGH <0.06ng/mL (最低四分位数)	ベースラインhGH >0.34ng/mL (最高四分位数)	相対リスク 四分位数4/四分位数1
2.5年フォローアップ	0% CVD死亡率	1.2% CVD死亡率	>15
5年フォローアップ	0.35% CVD死亡率	3.2% CVD死亡率	9.1
10年フォローアップ	0.9% CVD死亡率	7.1% CVD死亡率	7.9
15年フォローアップ	2.5% CVD死亡率	10.6% CVD死亡率	4.2

【0125】

判別とリスク再分類

総合CAD解析及び脳卒中解析においては、NRI解析は、CAD及び脳卒中に対しては有意差が無かったが、改善傾向が確認できた。総死亡率の結果において、NRIは男性では有意であったが(4.5% ; $p = 0.005$)、女性では有意ではなかった。改善の大部分は、無事象の下位分類から生じた(8.6%)。心血管系の死において、NRIは全ての被験者において11.1% ($p < .001$)であり、女性コホートでは10.2% ($p = .05$)であり、インシデント事象の上位分類で特に改善が見られた(総合サンプルでは、イベントの14.4%が向上、女性では16.9%)。

【0126】

ベーシックモデルに対するhGHの追加は、CAD、脳卒中、CVDによる死及び総死亡率に対し、全てのC-統計を改善した。男性の総死亡率に対し、70.5%から71.4%への改善が見られた。最も大きな改善がCVDによる死で見られ、C-統計が全コホートでは78.1%から79.8%へ増加、男性では75.7%から77.1%へ増加、女性では80.4%から81.2%へ増加した。

【0127】

【表 5】

表 4. 空腹時の成長ホルモンの値と従前の心血管系リスクマーカーとの間の相関関係を調査する多変量線形回帰モデルの結果

リスクマーカー	男性			女性		
	B係数	95%CI	P	B係数	95%CI	P
年齢	0.02	0.01~0.03	<.001	0.02	0.01~0.02	<.001
収縮期血圧	0.03	-0.02~0.08	.19	-0.04	-0.08~0.00	.05*
降圧剤摂取	0.12	0.00~0.24	.05	0.07	-0.03~0.18	.18
BMI	-0.07	-0.12~-0.02	.004	-0.25	-0.29~-0.21	<.001
現在の喫煙	0.30	0.20~0.40	<.001	0.19	0.01~0.27	<.001
LDL-C	-0.08	-0.12~-0.04	<.001	-0.10	-0.14~-0.06	<.001
HDL-C	0.20	0.15~0.25	<.001	0.08	0.05~0.12	<.001
糖尿病	0.22	0.08~0.36	.002	-0.15	-0.30~0.01	.06

10

20

B係数は、当該リスクマーカーの基準値の1増加(又は、二分されるリスクマーカーの1存在)につき、hGHの自然対数の基準値増加として示される。NB年齢は標準化されていない。BMI(高さ(m)の二乗で除された体重(kg))、収縮期血圧、空腹時HDL値、LDL値は標準化されている。糖尿病罹患率、現在の喫煙、降圧剤の使用は二分変数である。

略語：BMI、肥満指数；LDL-C、低密度リポタンパク質コレステロール；HDL、高密度リポタンパク質コレステロール

【0128】

【表 6】

表5. ベースラインの空腹時hGH値 vs CADインシデント、脳卒中、全要因死亡率及び心血管系の死に対する多変量補正コックス比例ハザードモデル(Multivariate adjusted Cox proportional hazard model).

事象	サブグループ	数/事象	HR	95%CI	P
CAD	全て	4358/401	1.14	1.10-1.29	.04
	男性	1799/249	1.17	1.04-1.33	.01
	女性	2559/152	1.02	0.86-1.21	.81
脳卒中	全て	4417/265	1.19	1.02-1.39	.02
	男性	1849/152	1.18	1.01-1.39	.04
	女性	2568/123	1.14	0.94-1.39	.18
総死亡率	全て	4452/698	1.21	1.11-1.33	<.001
	男性	1872/383	1.26	1.14-1.39	<.001
	女性	2580/315	1.04	0.92-1.17	.53
CVDによる死	全て	4452/215	1.51	1.28-1.78	<.001
	男性	1872/126	1.41	1.20-1.66	<.001
	女性	2580/89	1.38	1.08-1.76	.009

10

20

ハザード比率(HR)(95%CI)はhGHの自然対数の1SD増加あたりで示されている。解析において補正された変数：年齢、収縮期血圧、降圧剤の使用、BMI(高さ(m)の二乗で除された体重(kg))、糖尿病罹患率、現在の喫煙、空腹時HDL値及びLDL値。加えて、性別結合解析では性別を補正した。

30

【0129】

【表 7】

四分位数解析
表 6. コックス回帰 hGH. 四分位数.

事象	数/事象	男/女	Q1			Q2			Q3			Q4			傾向		
			HR	P	95% CI	HR	P	95% CI	HR	P	95% CI	HR	P	95% CI	HR	P	95% CI
CAD	4358/401	1799/2559	1 (ref)	.21	0.83-1.46	1,097	.52	0.78-1.43	1,057	.72	0.99-1.78	1,331	.05	0.99-1.20	1,088	.08	0.99-1.20
			1 (ref)	.02	0.64-1.33	.923	.67	0.63-1.39	.938	.75	1.01-2.09	1,457	.04	1.02-1.29	1,145	.03	1.02-1.29
			1 (ref)	.45	0.88-2.14	1,374	.16	0.78-1.98	1,241	.37	1.02-1.73	1,032	.91	0.86-1.17	1,002	.98	0.86-1.17
脳卒中	4417/265	1849/2568	1 (ref)	.22	0.82-1.70	1,181	.37	0.88-1.85	1,279	.19	1.02-2.11	1,466	.04	1.01-1.27	1,129	.04	1.01-1.27
			1 (ref)	.19	0.66-1.77	1,077	.77	0.55-1.61	.938	.82	0.91-2.42	1,482	.11	0.97-1.32	1,130	.13	0.97-1.32
			1 (ref)	.21	0.76-2.21	1,294	.34	1.04-2.91	1,736	.04	0.83-2.58	1,460	.19	0.97-1.37	1,154	.10	0.97-1.37
総死亡率	4452/698	1872/2580	1 (ref)	<.001	0.76-1.22	.964	.76	1.07-1.69	1,342	.01	1.17-1.84	1,463	<.001	1.09-1.25	1,165	<.001	1.09-1.25
			1 (ref)	<.001	0.86-1.73	1,220	.27	1.25-2.48	1,756	.001	1.47-2.86	2,049	<.001	1.16-1.42	1,283	<.001	1.16-1.42
			1 (ref)	.24	0.57-1.09	.785	.15	0.80-1.48	1,086	.60	0.71-1.38	.992	.96	0.93-1.15	1,032	.56	0.93-1.15
CAD による死	4452/215	1872/2580	1 (ref)	<.001	0.85-2.27	1,391	.19	1.48-3.72	2,346	<.001	1.70-4.23	2,677	<.001	1.22-1.59	1,393	<.001	1.22-1.59
			1 (ref)	<.001	0.87-3.57	1,764	.12	1.36-5.37	2,702	.005	1.76-6.61	3,410	<.001	1.22-1.73	1,454	<.001	1.22-1.73
			1 (ref)	.03	0.51-2.06	1,022	.95	1.09-3.86	2,050	.03	0.98-3.81	1,936	.06	1.06-1.61	1,310	.01	1.06-1.61

Q1-Q4は異なる四分位数を表し、Q1は最低hGH値を伴うコホートの25%である。Q1-Q4におけるHRは、Q1のHR(リアレンス)を1.00のセットとした場合の値を示している。四分位数は、性別特異的、つまり男性及び女性を別々にした四分位数として分けたものであり、全てのコホート中で男女比を同じにしているが、カットオフ値は男女で異なる(表3参照)。傾向(Trend)は、標準コックス比例ハザード解析であり、HRは、四分位数の増加あたりで示されている。異なる四分位数に対するカットオフ濃度は表3で示されている。

【表 8】

Literature

1. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocrine reviews*. 2009;30(2):152-77.
2. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet*. 1990;336(8710):285-8. Epub 1990/08/04. 10
3. Svensson J, Bengtsson BA, Rosen T, Oden A, Johannsson G. Malignant disease and cardiovascular morbidity in hypopituitary adults with or without growth hormone replacement therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(7):3306-12. Epub 2004/07/09.
4. Bulow B, Hagmar L, Mikoczy Z, Nordstrom CH, Erfurth EM. Increased cerebrovascular mortality in patients with hypopituitarism. *Clinical endocrinology*. 1997;46(1):75-81. Epub 1997/01/01.
5. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, et al. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. *Lancet*. 2001;357(9254):425-31. Epub 2001/03/29. 20
6. Abs R, Feldt-Rasmussen U, Mattsson AF, Monson JP, Bengtsson BA, Goth MI, et al. Determinants of cardiovascular risk in 2589 hypopituitary GH-deficient adults - a KIMS database analysis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2006;155(1):79-90. Epub 2006/06/24.
7. de Boer H, Blok GJ, Voerman HJ, Phillips M, Schouten JA. Serum lipid levels in growth hormone-deficient men. *Metabolism: clinical and experimental*. 1994;43(2):199-203. Epub 1994/02/01. 30
8. Bulow B, Hagmar L, Eskilsson J, Erfurth EM. Hypopituitary females have a high incidence of cardiovascular morbidity and an increased prevalence of cardiovascular risk factors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(2):574-84. Epub 2000/02/26.
9. Sesmilo G, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N, et al. Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk markers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. *Annals of internal medicine*. 2000;133(2):111-22. Epub 2000/07/15. 40
10. Beauregard C, Utz AL, Schaub AE, Nachtigall L, Biller BM, Miller KK, et al. Growth hormone decreases visceral fat and improves cardiovascular risk markers in women with

【表 9】

- hypopituitarism: a randomized, placebo-controlled study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(6):2063-71. Epub 2008/04/03.
11. Maison P, Griffin S, Nicoue-Beglah M, Haddad N, Balkau B, Chanson P. Impact of growth hormone (GH) treatment on cardiovascular risk factors in GH-deficient adults: a Metaanalysis of Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(5):2192-9. Epub 2004/05/06. 10
 12. Orme SM, McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(8):2730-4. Epub 1998/08/26.
 13. Melmed S, Casanueva FF, Klibanski A, Bronstein MD, Chanson P, Lamberts SW, et al. A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications. *Pituitary*. 2012. Epub 2012/08/21.
 14. Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G. Growth hormone and the heart. *Clinical endocrinology*. 2001;54(2):137-54. Epub 2001/02/24. 20
 15. Maison P, Tropeano AI, Macquin-Mavier I, Giustina A, Chanson P. Impact of somatostatin analogs on the heart in acromegaly: a metaanalysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(5):1743-7. Epub 2007/02/22.
 16. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *The New England journal of medicine*. 1999;341(11):785-92. Epub 1999/09/09.
 17. Maison P, Balkau B, Simon D, Chanson P, Rosselin G, Eschwege E. Growth hormone as a risk for premature mortality in healthy subjects: data from the Paris prospective study. *BMJ (Clinical research ed)*. 1998;316(7138):1132-3. Epub 1998/04/29. 30
 18. Berglund G, Elmstahl S, Janzon L, Larsson SA. The Malmo Diet and Cancer Study. Design and feasibility. *Journal of internal medicine*. 1993;233(1):45-51. Epub 1993/01/01.
 19. Rosvall M, Janzon L, Berglund G, Engstrom G, Hedblad B. Incidence of stroke is related to carotid IMT even in the absence of plaque. *Atherosclerosis*. 2005;179(2):325-31. Epub 2005/03/22. 40
 20. Bidlingmaier M, Suhr J, Ernst A, Wu Z, Keller A, Strasburger CJ, et al. High-sensitivity chemiluminescence immunoassays for detection of growth hormone doping in sports. *Clinical chemistry*. 2009;55(3):445-53. Epub 2009/01/27.
 21. Jerntorp P, Berglund G. Stroke registry in Malmö, Sweden. *Stroke*. 1992;23(3):357-61.

【表 1 0】

22. Hammar N, Alfredsson L, Rosén M, Spetz CL, Kahan T, Ysberg AS. A national record linkage to study acute myocardial infarction incidence and case fatality in Sweden. *International Journal of Epidemiology*. 2001;30(suppl 1):S30.
23. Ludvigsson J, Andersson E, Ekblom A, Feychting M, Kim J-L, Reuterwall C, et al. External review and validation of the Swedish national inpatient register. *BMC Public Health*. 2011;11(1):450. 10
24. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53. Epub 2008/01/24.
25. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in medicine*. 2008;27(2):157-72; discussion 207-12. Epub 2007/06/15.
26. Pencina MJ, D'Agostino RB. Overall C as a measure of discrimination in survival analysis: model specific population value and confidence interval estimation. *Statistics in medicine*. 2004;23(13):2109-23. 20
27. Engstrom BE, Karlsson FA, Wide L. Marked gender differences in ambulatory morning growth hormone values in young adults. *Clinical chemistry*. 1998;44(6 Pt 1):1289-95. Epub 1998/06/13.
28. Eden Engstrom B, Karlsson FA, Naessen T, Gillberg P, Wide L. Ambulatory morning growth hormone concentrations increase in men and decrease in women with age. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(1):25-31. Epub 2002/05/11. 30
29. Pincus SM, Gevers EF, Robinson IC, van den Berg G, Roelfsema F, Hartman ML, et al. Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *The American journal of physiology*. 1996;270(1 Pt 1):E107-15. Epub 1996/01/01.
30. Hindmarsh PC, Dennison E, Pincus SM, Cooper C, Fall CH, Matthews DR, et al. A sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion in the elderly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(8):2679-85. Epub 1999/08/12. 40
31. Veldhuis JD, Roelfsema F, Keenan DM, Pincus S. Gender, age, body mass index, and IGF-I individually and jointly determine distinct GH dynamics: analyses in one hundred healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(1):115-21. Epub 2010/10/12.

【 0 1 3 3】

【表 1 1】

32. Saini S, Hindmarsh PC, Matthews DR, Pringle PJ, Jones J, Preece MA, et al. Reproducibility of 24-hour serum growth hormone profiles in man. *Clinical endocrinology*. 1991;34(6):455-62. Epub 1991/06/01.
33. Surya S, Symons K, Rothman E, Barkan AL. Complex rhythmicity of growth hormone secretion in humans. *Pituitary*. 2006;9(2):121-5. Epub 2006/07/18.
34. Jaffe CA, Ocampo-Lim B, Guo W, Krueger K, Sugahara I, DeMott-Friberg R, et al. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(1):153-64. Epub 1998/07/03. 10
35. Faje AT, Barkan AL. Basal, but not pulsatile, growth hormone secretion determines the ambient circulating levels of insulin-like growth factor-I. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(5):2486-91. Epub 2010/03/02.
36. Ho KY, Weissberger AJ. Characterization of 24-hour growth hormone secretion in acromegaly: implications for diagnosis and therapy. *Clinical endocrinology*. 1994;41(1):75-83. Epub 1994/07/01. 20
37. van der Klaauw AA, Pereira AM, van Thiel SW, Frolich M, Iranmanesh A, Veldhuis JD, et al. Attenuated pulse size, disorderly growth hormone and prolactin secretion with preserved nyctohemeral rhythm distinguish irradiated from surgically treated acromegaly patients. *Clinical endocrinology*. 2007;66(4):489-98.
38. Roelfsema F, Biermasz NR, Veldhuis JD. Pulsatile, nyctohemeral and entropic characteristics of GH secretion in adult GH-deficient patients: selectively decreased pulsatile release and increased secretory disorderliness with preservation of diurnal timing and gender distinctions. *Clinical endocrinology*. 2002;56(1):79-87. Epub 2002/02/19. 30
39. Bartke A. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinology*. 2003;78(4):2¹⁰-6. Epub 2003/10/30.
40. Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, Flyvbjerg A, Kopchick JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology*. 2003;144(9):3799-810. Epub 2003/08/23. 40
41. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature*. 1996;384(6604):33. Epub 1996/11/07.
42. Masternak MM, Bartke A. Growth hormone, inflammation and aging. *Pathobiology of aging & age related diseases*. 2012;2. Epub 2012/09/07.

【 0 1 3 4 】

【表 1 2】

43. Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, et al. Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Science translational medicine*. 2011;3(70):70ra13. Epub 2011/02/18.
44. Menezes Oliveira JL, Marques-Santos C, Barreto-Filho JA, Ximenes Filho R, de Oliveira Britto AV, Oliveira Souza AH, et al. Lack of evidence of premature atherosclerosis in untreated severe isolated growth hormone (GH) deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(6):2093-9. Epub 2006/03/09. 10
45. Aguiar-Oliveira MH, Oliveira FT, Pereira RM, Oliveira CR, Blackford A, Valenca EH, et al. Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(2):714-21. Epub 2009/12/08.
46. Besson A, Salemi S, Gallati S, Jenal A, Horn R, Mullis PS, et al. Reduced longevity in untreated patients with isolated growth hormone deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(8):3664-7. Epub 2003/08/14. 20
47. Rudling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson JA, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(15):6983-7. Epub 1992/08/01.
48. Rudling M, Olivecrona H, Eggertsen G, Angelin B. Regulation of rat hepatic low density lipoprotein receptors. In vivo stimulation by growth hormone is not mediated by insulin-like growth factor I. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(2):292-9. Epub 1996/01/15. 30
49. Vahl N, Klausen I, Christiansen JS, Jorgensen JO. Growth hormone (GH) status is an independent determinant of serum levels of cholesterol and triglycerides in healthy adults. *Clinical endocrinology*. 1999;51(3):309-16. Epub 1999/09/01.
50. Clasey JL, Weltman A, Patrie J, Weltman JY, Pezzoli S, Bouchard C, et al. Abdominal visceral fat and fasting insulin are important predictors of 24-hour GH release independent of age, gender, and other physiological factors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(8):3845-52. Epub 2001/08/15. 40
51. Miller KK, Biller BM, Lipman JG, Bradwin G, Rifai N, Klibanski A. Truncal adiposity, relative growth hormone deficiency, and cardiovascular risk. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(2):768-74. Epub 2004/12/02.

【 0 1 3 5 】

【表 1 3】

52. Bredella MA, Lin E, Brick DJ, Gerweck AV, Harrington LM, Torriani M, et al. Effects of GH in women with abdominal adiposity: a 6-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2012;166(4):601-11. Epub 2012/01/26.
53. Sandberg H, Roman L, Zavodnick J, Kupers N. The effect of smoking on serum somatotropin, immunoreactive insulin and blood glucose levels of young adult males. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1973;184(3):787-91. Epub 1973/03/01. 10
54. Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E, Jarvik ME. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology*. 1982;78(4):305-8. Epub 1982/01/01.
55. Veldhuis JD. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. *Ageing research reviews*. 2008;7(3):189-208. Epub 2008/03/18. 20
56. Bramnert M, Segerlantz M, Laurila E, Daugaard JR, Manhem P, Groop L. Growth hormone replacement therapy induces insulin resistance by activating the glucose-fatty acid cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(4):1455-63. Epub 2003/04/08.
57. Norrelund H, Nielsen S, Christiansen J, Jorgensen J, Moller N. Modulation of basal glucose metabolism and insulin sensitivity by growth hormone and free fatty acids during short-term fasting. *European Journal of Endocrinology*. 2004;150(6):779-87.
58. Ho KY, Evans WS, Blizzard RM, Veldhuis JD, Merriam GR, Samojlik E, et al. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1987;64(1):51-8. Epub 1987/01/01. 30
59. Lorenz et al., "Functional Antibodies Targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy"; *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 January; 55(1): 165–173.
60. Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", *J. Immunol. Meth*. 81: 223-228; (1985) 40
61. Ziegler, B. *et al.* "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent

【 0 1 3 6 】

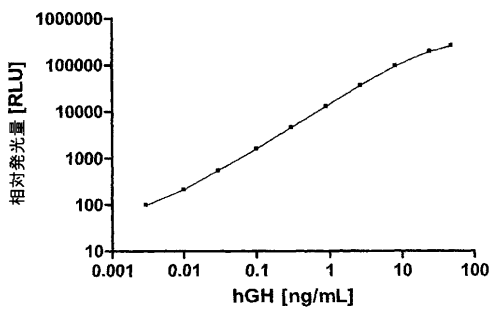
【表 1 4】

antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies”, *Horm. Metab. Res.* 28: 11-15, (1996)

【图 1】

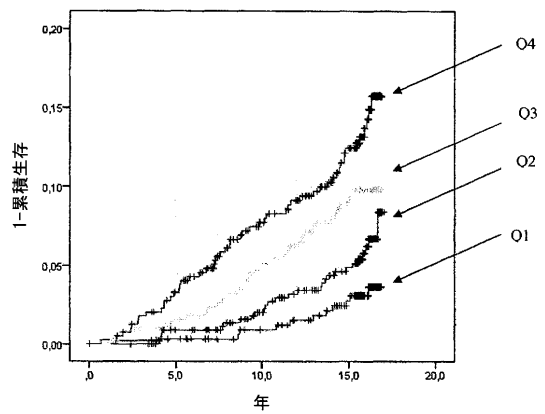
Figures

Fig. 1:



【图 2】

Figure 2



【配列表】

2016507743000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/050143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/74 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED 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, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAISON P. ET AL.: "Growth hormone as a risk for premature mortality in healthy subjects: Data from the Paris prospective study", BMJ, vol. 31, no. 7138, 11 April 1998 (1998-04-11), pages 1132-1133, XP002699120, cited in the application	1-5, 9-12,15, 16,19,20
Y	the whole document	6-8,17, 18,21-24
A	----- -/--	13,14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 January 2014		12/02/2014
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 Giry, Murielle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/050143

X(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIDLINGMAIER M. ET AL.: "High-sensitivity chemiluminescence immunoassays for detection of growth hormone doping in sports", CLIN. CHEM., vol. 55, no. 3, 15 January 2009 (2009-01-15), pages 445-453, XP055066670,	22,23
Y	abstract page 446, column 1 table 1 page 451, column 1 page 452, column 1	6-8, 21-24
Y	----- MELANDER O. ET AL.: "Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality", JAMA, vol. 308, no. 14, 10 October 2012 (2012-10-10), pages 1469-1475, XP002699121, abstract table 2	17,18
A	----- US 2011/263821 A1 (BERGMANN A. [DE] ET AL.) 27 October 2011 (2011-10-27) abstract paragraphs [0014] - [0015], [0025], [0027], [0050] - [0052] claims 1-15	1-24
A	----- WO 2007/124439 A2 (RULES-BASED MEDICINE, INC. [US]) 1 November 2007 (2007-11-01) abstract claims 1-12	1-24
A	----- PALMEIRO C.R. ET AL.: "Growth hormone and the cardiovascular system", CARDIOLOGY IN REVIEW, vol. 20, no. 4, July 2012 (2012-07), pages 197-207, XP009170373, the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/050143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011263821 A1	27-10-2011	CN 102257386 A	23-11-2011
		EP 2356450 A1	17-08-2011
		JP 2012506545 A	15-03-2012
		US 2011263821 A1	27-10-2011
		US 2014017808 A1	16-01-2014
		WO 2010046136 A1	29-04-2010

WO 2007124439 A2	01-11-2007	NONE	

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

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100197169

弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン

ドイツ連邦共和国, 1 3 6 4 5 ベルリン, アム ローゼンアンガー 7 8

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 FB03

专利名称(译)	空腹生长激素水平作为心血管疾病发病风险的预测标志物		
公开(公告)号	JP2016507743A	公开(公告)日	2016-03-10
申请号	JP2015552040	申请日	2014-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン		
发明人	アンドレアス ベルクマン		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/61 G01N2800/32 G01N33/53 G01N2800/2871 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/74 G01N33/68 G01N33/53.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03		
代理人(译)	青木 篤 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 柴田顺治		
优先权	2013150566 2013-01-08 EP		
其他公开文献	JP6430962B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 本发明的受试者是一种用于预测受试者的心血管疾病风险或总体死亡风险的方法，其是从所述受试者获得的体液中生长激素 (hGH) 和/或其同工型的禁食状态。确定生长激素 (hGH) 和/或其同种型的水平并将其禁食水平与心血管疾病风险或总死亡率风险相关联，升高的水平被预测为风险增加。它	(21) 出願番号	特願2015-552040 (P2015-552040)	(71) 出願人	514122524
	(66) (22) 出願日	平成26年1月7日 (2014.1.7)		シュベーンゴテック ゲゼルシャフト ミ
	(85) 翻訳文提出日	平成27年8月20日 (2015.8.20)		ット バシレンクテル ハフツング
	(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/050143		ドイツ連邦共和国, 16761 ヘニッヒ
	(87) 国際公開番号	WO2014/108386		スドルフ, ノイエンドルフシュトラッセ
	(87) 国際公開日	平成26年7月17日 (2014.7.17)		15アー
	(31) 優先権主張番号	13150566.1		(74) 代理人 100099759
	(32) 優先日	平成25年1月8日 (2013.1.8)		弁理士 青木 篤
	(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		(74) 代理人 100077517
				弁理士 石田 敬
			(74) 代理人 100087871	
			弁理士 福本 慎	
			(74) 代理人 100087413	
			弁理士 古賀 哲次	