

(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2015-528562

(P2015-528562A)

(43) 公表日 平成27年9月28日(2015.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 5
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 E	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 D	
	GO 1 N 27/62 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)		

(21) 出願番号 特願2015-525897 (P2015-525897)  
 (86) (22) 出願日 平成25年8月9日 (2013.8.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月6日 (2015.4.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/066697  
 (87) 国際公開番号 W02014/023820  
 (87) 国際公開日 平成26年2月13日 (2014.2.13)  
 (31) 優先権主張番号 12305988.3  
 (32) 優先日 平成24年8月9日 (2012.8.9)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591100596  
 アンスティチュ ナショナル ドウ ラ  
 サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ  
 ディカル  
 フランス国、エフー75013 パリ、リ  
 ュ・ドウ・トルビアク 101  
 (71) 出願人 510139564  
 ユニヴェルシテ ポール サバティエ ト  
 ウールーズ トロワ  
 フランス共和国 エフー31062 トウ  
 ールーズ セデックス 9, ルート ド  
 ウ ナルボンヌ 118

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心不全の診断

(57) 【要約】

本発明は、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、(i) 前記患者から得られたサンプル中の I G F B P 2 の濃度を測定する工程、並びに (ii) 工程 (i) で測定した I G F B P 2 の濃度を、特定の心不全病期にある患者由来のサンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値、及び/又は健常患者由来の血液サンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値と比較する工程を含む方法に関する。

。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、

i . 前記患者から得られたサンプル中の I G F B P 2 の濃度を測定する工程、

i i . 工程 ( i ) で測定した I G F B P 2 の濃度を、特定の心不全病期にある患者由来のサンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値、及び / 又は健常患者由来の血液サンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値と比較する工程を含む、方法。

## 【請求項 2】

患者における心不全を診断するための方法であって、

i . 前記患者から得られたサンプル中の I G F B P 2 の濃度を決定すること ; 及び

i i . 前記濃度をコントロール値と比較すること

を含む、方法。

10

## 【請求項 3】

心不全が、無症候性心不全、慢性心不全又は急性心不全である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記サンプルが、血漿及び尿サンプルからなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

サンプル中の I G F B P 2 タンパク質のレベルを定量することによって、I G F B P 2 の濃度を測定する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 6】

I G F B P 2 に対する抗体セットを使用することによって、I G F B P 2 タンパク質のレベルの定量を実施する、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

ELISAによって、I G F B P 2 タンパク質のレベルの定量を実施する、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

キャピラリー電気泳動 - 質量分析技術によって、I G F B P 2 タンパク質のレベルの定量を実施する、請求項 5 に記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野：

本発明は、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、( i ) 前記患者から得られたサンプル中の I G F B P 2 の濃度を測定する工程、並びに ( i i ) 工程 ( i ) で測定した I G F B P 2 の濃度を、特定の心不全病期にある患者由来のサンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値、及び / 又は健常患者由来の血液サンプル中の I G F B P 2 の濃度から得られたコントロール値と比較する工程を含む方法に関する。

40

## 【0002】

発明の背景：

心不全 ( H F ) の有病率は、一般集団では老化及び心血管リスク因子により増加している [ Delahaye, F. et al., 2001 ]。症状が非定型であり特殊なケアを受ける必要があるため、H F の診断は依然として非常に複雑であることが多い。臨床医が心不全を診断するのに助けるために、ナトリウム利尿ペプチド ( N P ) などの血液 H F バイオマーカーが提案されている。しかしながら、N P には限界があり、容易な大規模 H F スクリーニングを可能にするより特異的かつより正確なバイオマーカーの必要性がある。加えて、急性呼吸困難のために救急治療室に収容された患者の 30 % が、診断不可能な < < グレーゾーン >

50

> の脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 濃度を有する。これらの事例では、HF の診断は、費用及び時間のかかる検査を必要とするであろう。しかしながら、患者の迅速な診断及び早期の医療ケアは患者の健康に良い影響を与え、また処置コストを下げると認識されている。

【0003】

Hassfeld S.らの2007年の論文には、病因学的なHF患者サブセットを表す拡張型心筋症患者の予後バイオマーカーとしてIGFBP2を使用することが開示されているが、IGFBP2を心不全の診断に使用することは開示されていない。

【0004】

発明の概要：

本発明者らは、前向き単一施設ケースコントロール研究を開始し、キャピラリー電気泳動-質量分析技術(CE-MS)を使用することによる全体的な分析戦略を用いて、急性心不全(AHF)又は慢性心不全(CHF)に特異的な尿ポリペプチドを調査した。本発明者らは、心不全バイオマーカーとして、すなわち、心不全患者を分類するためのバイオマーカーとしてIGFBP2濃度を使用し得ることを見出した。

【0005】

従って、本発明は、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、(i)前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定する工程、並びに(ii)工程(i)で測定したIGFBP2の濃度を、特定の心不全病期にある患者由来のサンプル中のIGFBP2の濃度から得られたコントロール値、及び/又は健常患者由来の血液サンプル中のIGFBP2の濃度から得られたコントロール値と比較する工程を含む方法に関する。

【0006】

発明の詳細な説明：

分類及び診断方法

本発明は、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定することを含む方法に関する。

【0007】

特定の実施態様では、前記方法は、

(i)前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定する工程、  
(ii)工程(i)で測定したIGFBP2の濃度を、特定の心不全病期にある患者由来のサンプル中のIGFBP2の濃度から得られた閾値、及び/又は健常患者由来のサンプル中のIGFBP2の濃度から得られた閾値と比較する工程  
をさらに含む。

【0008】

本発明はまた、患者における心不全を診断するための方法であって、i)前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を決定すること；及びii)前記濃度をコントロール値と比較することからなる工程を含む方法に関する。

【0009】

特定の実施態様では、患者は、高血圧、冠動脈性心疾患及び糖尿病、例えば真性糖尿病を含む重大な併存症状を有する。

【0010】

別の特定の実施態様では、患者は、利尿薬又は抗血小板薬を受ける。

【0011】

別の特定の実施態様では、患者は、50歳超である。別の特定の実施態様では、患者は、60歳超である。

【0012】

一実施態様では、心不全は、無症候性心不全、慢性心不全又は急性心不全であり得る。

【0013】

典型的には、本発明のサンプルは、血液、血漿、血清、リンパ液、尿サンプル、心房若

10

20

30

40

50

しくは心室のような心臓組織又は肝臓であり得る。特定の実施態様では、前記サンプルは、血漿又は尿である。

【0014】

本明細書で使用される「IGFBP2」又は「インスリン様成長因子結合タンパク質2」という用語は、インスリン様成長因子1 (IGF1) 又はインスリン様成長因子2 (IGF2) の運搬タンパク質として働くタンパク質を表す。本明細書で使用される「IGFBP2」という用語はまた、IGFBP2のフラグメントを表す。本明細書で使用される「IGFBP2のフラグメント」という用語は、IGFBP2の化学的又は生化学的な加水分解から得られるより短いペプチドを表す。

【0015】

従って、特定の実施態様では、本発明は、IGFBP2のフラグメントの濃度を決定することによって、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法、又は患者における心不全を診断するための方法に関する。

【0016】

本明細書で使用される「心不全」という用語は、心臓が、体の必要を満たすのに十分な血流を供給することができないことを表し、この病状は医療プラクティスで十分に説明されている。この用語は、慢性心不全、急性心不全、心筋梗塞、不安定狭心症、拡張機能障害、収縮機能障害及び糖尿病性心筋症を包含する。

【0017】

本明細書で使用される「慢性心不全」という用語は、通常は、安定的な処置症候を伴う長期的な状況を表す。

【0018】

本明細書で使用される「急性心不全」という用語は、公知の慢性心不全を有する患者又は慢性心不全を持たない患者が症候の悪化を突然示して入院が必要になるエピソードに関する突発的心不全及び急性「悪化」又は「非代償性」心不全を表す。急性心不全による合併症の一般的な症候としては、限定されないが、肺鬱血による呼吸困難又は低心拍出量による心原性ショック、易疲労性 (easy fatigueability) (運動不耐性)、末梢性浮腫、全身浮腫 (顕著な全身性浮腫)、夜間頻尿 (頻繁な夜間の排尿)、徐脈、心ブロック、低血圧、眩暈、失神、糖尿病、乏尿又は無尿、低カリウム血症、気管支痙攣、冷汗及び喘息が挙げられる。

【0019】

心不全患者は、国際的な等級、すなわちNew York Heart Association (NYHA)の機能分類に従って分類される。心不全の機能分類は、一般に、New York Heart Association Functional Classification (基準委員会、New York Heart Association。心臓及び血管の疾患)によって行われる。命名法及び診断基準、6th ed. Boston: Little, Brown and co, 1964;114)。この分類は、心不全の重症度を4つのクラス (I ~ IV) に病期分類する。

【0020】

身体活動の制限をもたらさない心疾患を有する患者は、NYHAクラスIに分類される。通常身体活動は、過度の疲労、動悸、呼吸困難又は狭心痛を引き起こさない。無症候性患者は、NYHAクラスIに分類される。

【0021】

身体活動のわずかな制限をもたらす心疾患を有する患者は、NYHAクラスIIに分類される。通常身体活動が、疲労、動悸、呼吸困難又は狭心痛をもたらす。この患者は、安静時には快適である。

【0022】

身体活動の著しい制限をもたらす心疾患を有する患者は、NYHAクラスIIIに分類される。通常未満の活動が、疲労、動悸、呼吸困難又は狭心痛を引き起こす。この患者は、安静時には快適である。

【0023】

不快感なしにはいかなる身体活動も継続不可能にする心疾患を有する患者は、NYHA

10

20

30

40

50

クラスⅣに分類される。安静時であっても、心不全又は狭心症症候群の症候が存在し得る。任意の身体活動を行うと、不快感が増加する。

【0024】

心不全のリスクを有する患者を分類するための方法によれば、患者が高いIGFBP2の濃度を有するほど、その患者の心不全はより重度であろう。

【0025】

例えば、本発明者らが決定した閾値によれば、例えば、1300ng/ml超の高い血漿IGFBP2濃度を有する患者は、クラスⅣの心不全を有すると分類されるであろう。

【0026】

上で使用される「検出する」又は「決定する」という用語は、コントロールを参照するか否かにかかわらず、定性的及び/又は定量的な検出（レベルの測定）を含む。典型的には、IGFBP2濃度は、例えば、サンプルに対して実施するキャピラリー電気泳動 - 質量分析技術（CE - MS）又はELISAによって測定され得る。

10

【0027】

好ましくは、本発明は、患者における心不全を診断するための方法であって、前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定することからなる工程a)を含む方法に関する。好ましくは、本発明の方法は、工程a)で得られたIGFBP2の濃度を閾値レベルと比較する工程をさらに含む。

【0028】

「コントロール」は、健常被験体、すなわち、いかなる心不全も患っていない被験体であり得る。コントロールはまた、心不全を患っている被験体であり得る。好ましくは、前記コントロールは、健常被験体である。

20

【0029】

サンプル中のIGFBP2濃度の検出はまた、IGFBP2タンパク質のレベルを測定することによって実施され得る。本出願では、「IGFBP2タンパク質のレベル」は、前記IGFBP2タンパク質の量又は濃度を意味する。別の実施態様では、「IGFBP2のレベル」は、IGFBP2フラグメントのレベルを意味する。

【0030】

このような方法は、サンプルと、サンプル中に存在するIGFBP2タンパク質ペプチドと選択的に相互作用することができる結合パートナーとを接触させることを含む。結合パートナーは、一般に、ポリクローナル又はモノクローナル、好ましくはモノクローナルであり得る抗体である。

30

【0031】

タンパク質の存在は、競合、直接反応又はサンドイッチ型アッセイなどのイムノアッセイを含む標準的な電気泳動及び免疫診断技術を使用して検出され得る。このようなアッセイとしては、限定されないが、ウエスタンブロット；凝集試験；酵素標識媒介イムノアッセイ、例えばELISA；ピオチン/アビジン型アッセイ；ラジオイムノアッセイ；免疫電気泳動；免疫沈降、キャピラリー電気泳動 - 質量分析技術（CE - MS）などが挙げられる。反応は、一般に、蛍光、化学発光、放射性、酵素標識若しくは色素分子などの標識を明らかにすること、又は抗原と、抗体若しくはそれと反応した抗体との間の複合体の形成を検出するための他の方法を含む。

40

【0032】

上記アッセイは、一般に、抗原 - 抗体複合体が結合した固相支持体から、液相中の未結合タンパク質を分離することを含む。本発明の実施に使用され得る固体支持体としては、ニトロセルロース（例えば、膜又はマイクロタイターウェル形態）；ポリ塩化ビニル（例えば、シート又はマイクロタイターウェル）；ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイタープレート）；ポリフッ化ビニリデン；ジアゾ化紙；ナイロン膜；活性化ビーズ、磁気応答性ビーズなどの基材が挙げられる。

【0033】

より具体的には、ELISA法を使用することができ、試験すべきタンパク質に対する抗体

50

セットでマイクロタイタープレートのウェルをコーディングする。次いで、マーカートンタンパク質を含有するか又はこれを含有すると疑われるサンプルをコーディングウェルに追加する。抗体 - 抗原複合体の形成を可能にするのに十分なインキュベーション期間の後、プレートを洗浄して未結合部分を除去することができ、検出可能に標識された二次結合分子を追加する。二次結合分子を任意の捕捉サンプルマーカートンタンパク質と反応させ、プレートを洗浄し、当技術分野で周知の方法を使用して二次結合分子の存在を検出する。

【0034】

本発明の方法は、循環細胞中のIGFBP2タンパク質及びフラグメント濃度をコントロール値と比較することからなる工程を含み得る。本明細書で使用される「IGFBP2の濃度」は、転写産物、例えばタンパク質IGFBP2の量又は濃度を指す。典型的には、タンパク質レベルは、例えば、組織1マイクログラム当たりのナノグラム、又は培養培地1ミリリットル当たりのナノグラムとして表され得る。あるいは、相対単位を用いて、濃度を記載し得る。特定の実施態様では、「IGFBP2の濃度」は、IGFBP2のフラグメントを指し得る。従って、特定の実施態様では、IGFBP2のフラグメントも測定され得る。

10

【0035】

一実施態様では、本発明は、心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定することを含む方法に関する。既に説明したように患者が高いIGFBP2の濃度を有するほど、その患者の心不全はより重度であろう。

20

【0036】

本発明者らは、心不全を有する患者を分類することができる閾値を確立した。

【0037】

血漿中でElisa法によってIGFBP2濃度の測定を実施する場合、600ng/ml未満、好ましくは500ng/ml未満、さらに好ましくは400ng/ml未満、最も好ましくは300ng/ml未満のIGFBP2の濃度を有する患者は、NYHA心不全分類による病期Iの心不全を示す。

【0038】

血漿中でElisa法によってIGFBP2濃度の測定を実施する場合、約600ng/ml～約1100ng/ml、好ましくは約800ng/ml～約1050ng/ml、好ましくは約900ng/ml～約1000ng/ml、最も好ましくは約925ng/ml～約975ng/mlに含まれるIGFBP2の濃度を有する患者は、NYHA心不全分類による病期IIの心不全を示す。

30

【0039】

血漿中でElisa法によってIGFBP2濃度の測定を実施する場合、約1100ng/ml～約1300ng/ml、好ましくは約1150ng/ml～約1250ng/ml、最も好ましくは約1175ng/ml～約1225ng/mlに含まれるIGFBP2の濃度を有する患者は、NYHA心不全分類による病期IIIの心不全を示す。

【0040】

血漿中でElisa法によってIGFBP2濃度の測定を実施し、キャピラリー電気泳動 - 質量分析技術(CE-MS)によって実施する場合、1300ng/ml超、好ましくは1350ng/ml超、さらに好ましくは1400ng/ml超、最も好ましくは1450ng/ml超のIGFBP2の濃度を有する患者は、NYHA心不全分類による病期IVの心不全を示す。

40

【0041】

別の実施態様では、本発明は、患者における心不全を診断するための方法であって、前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を決定すること、及び前記濃度を閾値と比較することを含む方法に関する。

【0042】

Elisa法によってIGFBP2タンパク質の測定を実施する場合、心不全を患っている患者におけるIGFBP2のレベルは、コントロール基準と比較して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも100%；好ましくは少なくとも1

50

50%、好ましくは少なくとも200%、好ましくは少なくとも250%、より好ましくは少なくとも300%、さらにより少なくとも400%増加している。換言すれば、好ましくは、Elisa法によってIGFBP2タンパク質を測定する場合、心不全を患っている患者におけるIGFBP2タンパク質の量は、コントロール基準と比較して少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも100%；好ましくは少なくとも150%、好ましくは少なくとも200%、好ましくは少なくとも250%、より好ましくは少なくとも300%、さらにより少なくとも400%増加している。

【0043】

Elisa技術によって血漿中のIGFBP2の濃度を測定した。本発明者らは、心不全を容易に診断するためのIGFBP2の濃度の閾値を確立した。好ましくは、この閾値は、150ng/ml超、好ましくは200ng/ml超、さらに最も好ましくは250ng/ml超であり、最も好ましくは、前記閾値は300ng/ml超である。

10

【0044】

尿中でElisa技術によって尿中のIGFBP2の濃度を測定した。本発明者らは、心不全を容易に診断するためのIGFBP2の濃度の閾値を確立した。好ましくは、この閾値は2.5ng/ml超であり、最も好ましくは、前記閾値は3ng/ml超である。

【0045】

典型的には、「閾値」、「閾値レベル」又は「カットオフ値」は、実験的、経験的又は理論的に決定され得る。当業者によって認識されているように、閾値はまた、既存の実験的及び/又は臨床的な条件に基づいて任意に選択され得る。好ましくは、当業者であれば、本発明の方法に従って得られたIGFBP2の濃度を規定の閾値と比較し得る。

20

【0046】

好ましくは、前記閾値は、健常個体集団のIGFBP2の平均濃度である。本明細書で使用される「健常個体」という用語は、健康であることが公知の（すなわち、心不全を患っておらず、このような慢性心不全にかかったことがなく、いかなる医療ケアも必要としない）ヒトを表す。

【0047】

好ましくは、前記閾値は、病気個体集団のIGFBP2の平均濃度である。本明細書で使用される「病気個体」という用語は、病気であることが公知の（すなわち、NYHA心不全分類による任意の心不全病期の心不全を患っている）ヒトを表す。

30

【0048】

典型的には、当業者であれば、健常又は病気であることが公知の個体100人の生物学的サンプル、好ましくは血漿又は尿中のIGFBP2の濃度を決定し得る。次いで、IGFBP2の平均濃度を求めるためには、周知の統計分析に従って、得られた濃度の平均値を求める。次いで、前記値を正常であり、従って閾値を構成するとみなす。次いで、IGFBP2の濃度をこの閾値と比較することによって、医師は心不全を診断し、又は患者を分類することができる。実際、所定の被験体の生物学的サンプル、好ましくは血漿又は尿中で得られたIGFBP2の濃度を閾値と比較することによって、前記被験体が心不全を患っているか否かを容易に決定することができ、又はNYHA心不全分類による心不全病期を容易に決定することができる。

40

【0049】

従って、医師は、心不全を患っている、危機的な命に関わる状態にある被験体の適切な医療ケアを適合及び最適化することができるであろう。前記予後を決定することは、経過観察ケア及び臨床意思決定のために極めて適切である。

【0050】

従って、本発明は、患者における心不全を診断するための、又は心不全のリスクを有する患者を分類するための方法であって、以下の工程：

- a) 前記患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を決定すること；
- b) 健常又は病気個体集団、好ましくは健常個体100人の生物学的サンプル中のIGFBP2の平均濃度を決定すること；及び

50

c) a) で得られた I G F B P 2 の濃度を、b) で得られた I G F B P 2 の平均濃度と比較する工程を含む方法に関する。

【0051】

本発明のさらなる実施態様では、本発明の方法は、少なくとも1つのさらなるバイオマーカーの濃度を測定することを含む。

【0052】

本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は、一般に、患者由来のサンプルにおけるその発現を、当技術分野における標準的な方法（並びに本明細書に開示されるもの）によって検出することができる分子を指し、それが得られた被験体の状態を予測するものであるか、又はこれを表すものである。

10

【0053】

例えば、他のバイオマーカーは、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アミノ末端プロ脳ナトリウム利尿ペプチド（NT-プロBNP）、ノルエピネフリン、トロポニン、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ミオシン軽鎖1、マトリックスメタロプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼの組織阻害因子、C反応性タンパク質（CRP）、TNFアルファ、可溶性腫瘍壊死因子レセプター1（sTNFR1）、可溶性TNFR2レセプター、可溶性IL-2レセプター、CD40-CD154、CCAM-I、P-セレクチン、組織因子及びフォンビルブランド因子、ウロコルチン、ミエロペルオキシダーゼ及び尿酸からなる心不全バイオマーカーの群より選択され得る。

20

【0054】

好ましい実施態様では、さらなる心不全バイオマーカーは、BNP又はNT-プロBNPである。

【0055】

本発明のさらに別の目的は、本発明の方法を実施するためのキットであって、患者から得られたサンプル中のIGFBP2の濃度を測定するための手段を含むキットに関する。キットは、上記抗体又は抗体セットを含み得る。特定の実施態様では、抗体又は抗体セットは、上記のように標識されている。キットはまた、特定の検出プロトコールに必要な適切にパッケージされた他の試薬及び材料（固相マトリックスを含む）と、適用可能な場合には標準とを含有し得る。キットはまた、さらなるバイオマーカーの検出のための1つ以上の手段を含有し得る。典型的には、キットはまた、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アミノ末端プロ脳ナトリウム利尿ペプチド（NT-プロBNP）、ノルエピネフリン、トロポニン、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ミオシン軽鎖1、マトリックスメタロプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼの組織阻害因子、C反応性タンパク質（CRP）、TNFアルファ、可溶性腫瘍壊死因子レセプター1（sTNFR1）、可溶性T2レセプター、可溶性IL-2レセプター、CD40-CD154、CCAM-I、P-セレクチン、組織因子及びフォンビルブランド因子、ウロコルチン、ミエロペルオキシダーゼ、ガレクチン-3及び尿酸からなる群より選択される1つ以上の心不全バイオマーカーの検出のための手段を含有し得る。

30

【0056】

一実施態様では、本発明のキットは、IGFBP2の濃度を測定するための手段と、BNP又はNT-プロBNPの濃度を測定するための手段とを含む。

40

【0057】

本発明のさらなる目的は、心不全バイオマーカーとしてのIGFBP2の使用に関する。

【0058】

以下の図面及び実施例によって本発明をさらに説明する。しかしながら、これらの実施例及び図面は、何ら本発明の範囲を限定するものと解すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0059】

50

【図1】CHF患者及びAHF患者(n=80)対コントロール被験体(n=50)のIGFBP2レベルのROC曲線分析。

【図2】コントロール；慢性心不全(CHF)患者及び急性心不全(AHF)患者におけるIGFBP2の血漿濃度(ng/ml)。Anova及びBonferroni事後検定を用いて多重比較を実施した(\*\*\* $p < 0.001$ )。

【図3】IGFBP2の尿濃度(ng/ml)。コントロール、n=21；慢性心不全(CHF)、n=19。Studentのt検定を使用して比較を実施した。\*は $p < 0.001$ である。

【図4】心不全病期のNYHA分類によるIGFBP2の血漿濃度。Anova及びBonferroni事後検定を用いて多重比較を実施した(\* $p < 0.01$ )。

【図5】血漿中のIGFBP2対BNP濃度の散布図。その95%信頼区間(破線)を含め、推定回帰直線をプロットする。

【図6】IGFBP2の血漿濃度及び左室駆出率は相関する。ELISAによってIGFBP2血漿濃度を測定し、経胸壁心エコー検査によって左室駆出率(LVEF)を測定した。

【図7】発見試験セットからの血漿中のIGFBP2及びBNPレベル。心血管リスク因子(CRF)を有するコントロール患者又は心不全(HF)患者(急性及び慢性、図1を参照のこと)由来の血漿を用いて、バイオマーカーの測定を実施した。\*有意差； $p < 0.05$ 。

【図8】検証セットからの血漿中のIGFBP2及びBNPレベル。(A)心血管リスク因子患者(CRF)、非心臓性呼吸困難(NCD)患者、慢性心不全(CHF)患者及び急性心不全(AHF)患者において、IGFBP2及びBNPレベルを評価した。\*有意差； $p < 0.05$ 。水平の破線は、556ng/mlにおける最適カットポイントに対応する。

【図9】検証セットからのNCD患者及びAHF患者由来の血漿中のIGFBP2及びBNPレベル。BNPによるNCD患者(n=17)対AHF患者(n=24)のROC曲線分析は、100~600pg/mlを含む。IGFBP2については、AUCは0.838(CI95%:0.690~0.934)であり、AUC=0.5、 $p < 0.0001$ と有意差があったが、BNPについては、0.653(CI95%:0.895~0.969)であり、AUC=0.5、 $p = 0.109$ と有意差がなかった。\*ROC曲線のペアワイズ比較は、BNPとIGFBP2との間で有意であった( $p = 0.034$ )。

【図10A】虚血性心不全のラットモデルの分析。(A)心エコー分析。(B)ラットの心臓及び肝臓におけるIGFBP2 mRNAレベルのqPCR分析。N=5/群。\* $p < 0.05$ 。14日目にラットを手術し、70日目にmRNA分析用の組織を採取した。

【図10B】虚血性心不全のラットモデルの分析。(A)心エコー分析。(B)ラットの心臓及び肝臓におけるIGFBP2 mRNAレベルのqPCR分析。N=5/群。\* $p < 0.05$ 。14日目にラットを手術し、70日目にmRNA分析用の組織を採取した。

【0060】

10

20

30

【表 1】

	CRF	HF	P
	(n= 28)	(n=21)	
年齢, 年	53 ± 12	70 ± 15	<0.001
性別, 女性, % (F/M)	36 (10/18)	52 (11/10)	0.262
BMI	28.0 ± 4.6	25.2 ± 5.8	0.076
<b>心血管リスク因子</b>			
高血圧, % (n)	50 (14)	52 (11)	1.000
糖尿病 T2, % (n)	14 (5)	38 (8)	0.190
脂質異常症, % (n)	79 (22)	62 (13)	0.222
肥満, % (n)	28 (8)	24 (5)	0.528
喫煙, % (n)	14 (1)	19 (4)	0.150
<b>心臓血管の病歴</b>			
冠動脈疾患, % (n)	0 (0)	43 (9)	< 0.001
高血圧 HCM, % (n)	0 (0)	14 (3)	0.072
遺伝性 HCM, % (n)	0 (0)	5 (1)	0.428
心臓弁膜症, % (n)	0 (0)	9 (2)	0.178
拡張型心筋症, % (n)	0 (0)	20 (4)	0.028
毒性心筋症, % (n)	0 (0)	20 (4)	0.028
<b>投薬</b>			
ACE 阻害剤, % (n)	4 (1)	38 (8)	0.003
ARAI, % (n)	14 (4)	20 (4)	0.710
ベータ遮断薬, % (n)	7 (2)	52 (11)	< 0.001
利尿薬, % (n)	4 (1)	90 (19)	< 0.001
ビタミン K アンタゴニスト, % (n)	0 (0)	28 (6)	0.003
抗血小板剤, % (n)	10 (3)	67 (14)	< 0.001
スタチン, % (n)	32 (9)	52 (11)	0.147
<b>入院時 lab</b>			
BNP, pmol/ml	30 [21-57]	595 [333-1063]	< 0.001
クレアチニンクリアランス, ml/分	102 [87-122]	56 [45-60]	< 0.001
C 反応性タンパク質, mg/l	1.9 [1.4-2.3]	31.0 [12.9-63.3]	< 0.001
Na <sup>+</sup> , mM	140 ± 1	135 ± 6	< 0.001
ALT, U/ml	30 [26-40]	40 [23-66]	0.281
入院時バイタル			
平均血圧, mmHg	101 ± 11	83 ± 20	<0.001
心拍数, Bpm	70 [68-75]	85 [81-104]	<0.001
<b>心エコー検査</b>			
LVEF, %	70 ± 9	31 ± 12	<0.001
LVEF < 40%, % (n)	0 (0)	81 (17)	<0.001

表 1 : 発見試験セットの人口学的及び臨床的特性。このセットは、「症例」としての急性心不全 ( A H F ) 患者 1 2 人及び慢性心不全 ( C H F ) 患者 9 人と比較した、「コントロール」としての心血管リスク因子患者 ( C R F ) 2 8 人から構成されていた。L V E F : 左室駆出率。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

ポリペプチド	未調整 wilcox-p 値	調整 Bonferroni	調整 BH	AUC
x64054	6.40e-09	1.39e-05	1.39e-05	0.988
x53078	6.05e-08	1.32e-04	4.39e-05	0.947
x102021	1.19e-07	2.58e-04	5.17e-05	0.945
x69979	2.62e-07	5.69e-04	6.44e-05	0.934
x52446	3.35e-07	7.28e-04	6.44e-05	0.929
x13188	1.54e-08	3.35e-05	1.67e-05	0.929
x3806	4.15e-07	9.02e-04	6.44e-05	0.925
x140665	3.62e-07	7.86e-04	6.44e-05	0.925
x91463	1.15e-07	2.49e-04	5.17e-05	0.923

10

表 2 : ディファレンシャルに発現したポリペプチドの CE - MS による決定。  
 曲線下面積 ( AUC ) は、これら 9 個のポリペプチドが優れた HF 予測因子であることを示している。未調整の及び Bonferroni 又は Benjamini Hochberg (BH) 調整後の「p」値。

【 0 0 6 2 】

【表 3】

	CRF (n= 39)	NCD (n= 43)	P	CHF (n=58)	P	AHF (n= 39)	P
年齢, 年	57 ± 11	66 ± 16	<b>0.022</b>	62 ± 13	<b>0.022</b>	73 ± 15	<b>&lt;0.001</b>
性別, 女性, % (F/M)	41 (16/23)	54 (23/20)	0.364	32 (19/40)	0.498	54 (21/18)	0.364
BMI	26.8 ± 4.3	25.0 ± 6.0	0.181	25.6 ± 4.2	0.173	27.4 ± 4.3	0.688
<b>心血管リスク因子</b>							
高血圧, % (n)	31 (12)	49 (21)	0.150	38 (22)	0.612	81 (31)	<b>&lt;0.001</b>
糖尿病 T2, % (n)	15 (6)	21 (9)	0.717	30 (17)	0.181	24 (9)	0.567
脂質異常症, % (n)	80 (32)	33 (14)	<b>&lt;0.001</b>	59 (34)	<b>0.027</b>	55 (21)	<b>0.015</b>
肥満, % (n)	31(12)	14 (6)	0.116	14 (8)	0.077	20 (8)	0.437
喫煙, % (n)	10 (4)	30 (13)	<b>0.050</b>	14 (8)	0.838	10 (4)	0.709
<b>心臓血管の病歴</b>							
冠動脈疾患, % (n)	5 (2)	14 (6)	0.331	51 (30)	<b>&lt;0.001</b>	52 (20)	<b>&lt;0.001</b>
高血圧 HCM, % (n)	0 (0)	9 (4)	0.150	8 (5)	0.157	13 (5)	<b>0.044</b>
遺伝性 HCM, % (n)	0 (0)	0 (0)	0.740	8 (5)	0.157	0 (0)	0.740
心臓弁膜症, % (n)	0 (0)	9 (4)	0.150	20 (12)	<b>0.007</b>	16 (6)	<b>0.033</b>
拡張型心筋症, % (n)	0 (0)	0 (0)	0.740	24 (14)	<b>&lt;0.001</b>	8 (3)	0.239
毒性心筋症, % (n)	0 (0)	0 (0)	0.740	8 (5)	0.157	8 (3)	0.239
<b>投薬</b>							
ACE 阻害剤, % (n)	10 (4)	21 (9)	0.308	64 (37)	<b>&lt;0.001</b>	37 (14)	<b>0.016</b>
ARII, % (n)	13 (5)	19 (8)	0.679	10 (6)	0.960	21 (8)	0.543
ベータ遮断薬, % (n)	18 (7)	23 (10)	0.749	73 (42)	<b>&lt;0.001</b>	55 (21)	<b>0.002</b>
利尿薬, % (n)	10 (4)	56 (24)	<b>&lt; 0.001</b>	74 (43)	<b>&lt;0.001</b>	89 (35)	<b>&lt; 0.001</b>
ビタミン K アンタゴニスト, % (n)	0 (0)	30 (13)	<b>&lt; 0.001</b>	46 (27)	<b>&lt;0.001</b>	29 (11)	<b>0.001</b>
抗血小板剤, % (n)	10 (4)	23 (10)	0.205	55 (32)	<b>&lt;0.001</b>	60 (23)	<b>&lt; 0.001</b>
スタチン, % (n)	38 (15)	21 (9)	0.134	60 (35)	0.056	37 (14)	1.000

20

30

40

50

<b>入院時 lab</b>							
BNP, pmol/ml	25 [21-48]	95 [61-169]	<b>&lt;0.001</b>	423 [303-636]	<b>&lt;0.001</b>	686 [370-1207]	<b>&lt;0.001</b>
クレアチニンクリアランス, ml/分	86 [83-96]	73 [58-87]	<b>0.013</b>	58 [51-72]	<b>&lt;0.001</b>	42 [31-53]	<b>&lt;0.001</b>
C 反応性タンパク質, mg/l	1.9 [1.2-2.7] (39)	9.6 [4.6-23.5]	<b>&lt;0.001</b>	8.6 [6.3-13.0]	<b>&lt;0.001</b>	26.0 [19.7-47.3]	<b>&lt;0.001</b>
Na <sup>+</sup> , mM	140 ± 2	138 ± 4.3	<b>0.005</b>	138 ± 3	<b>&lt;0.001</b>	137 ± 6	<b>&lt;0.001</b>
ALT, U/ml	31 [26-38]	23 [19-28]	<b>0.006</b>	30 [25-38]	0.982	38 [24-51]	0.471
入院時バイタル							
平均血圧, mmHg	98 ± 11	94 ± 14	<b>0.120</b>	85 ± 12	<b>&lt;0.001</b>	89 ± 24	<b>0.037</b>
心拍数, Bpm	65 [60-67]	88 [81-95]	<b>0.006</b>	76 [70-84]	<b>&lt;0.001</b>	91 [84-99]	<b>&lt;0.001</b>
<b>心エコー検査</b>							
LVEF, %	70 ± 10	64 ± 12	<b>0.010</b>	36 ± 13	<b>&lt;0.001</b>	42 ± 19	<b>&lt;0.001</b>
LVEF < 40%, % (n)	0 (0)	0 (0)	0.740	60 (35)	<b>&lt;0.001</b>	50 (23)	<b>&lt;0.001</b>

10

20

表 3 : 検証セットの人口学的及び臨床的特性。心血管リスク因子 ( C R F ) 患者 ; 非心臓性呼吸困難 ( N C D ) 患者、慢性心不全 ( C H F ) 患者及び急性心不全 ( A H F ) 患者を募集した。L V E F : 左室駆出率。

【 0 0 6 3 】

【表 4】

	IGFBP2			BNP		
	rho	p	n	rho	p	n
年齢, 年(n)	0.397	<0.0001	179	0.331	<0.0001	177
性別, 女性, % (F/M)	0.006	0.9358	180	0.053	0.4832	178
BMI (n)	-0.288	0.0002	166	-0.209	0.0071	165
<b>心血管リスク因子</b>						
高血圧, % (n)	0.130	0.0839	179	0.081	0.2834	178
糖尿病, % (n)	0.180	0.0161	179	0.090	0.2335	178
脂質異常症, % (n)	-0.228	0.0021	179	-0.250	0.0007	178
肥満, % (n)	-0.243	0.0010	180	-0.158	0.0357	178
喫煙, % (n)	0.011	0.8834	180	0.047	0.5370	178
<b>心臓血管の病歴</b>						
冠動脈疾患, % (n)	0.381	<0.0001	179	0.371	<0.0001	178
高血圧 HCM, % (n)	0.156	0.0368	179	0.067	0.3740	178
遺伝性 HCM, % (n)	0.141	0.0595	179	0.204	0.0063	178
心臓弁膜症, % (n)	0.302	<0.0001	179	0.281	0.0001	178
拡張型心筋症, % (n)	0.182	0.0147	179	0.211	0.0046	178
毒性心筋症, % (n)	0.205	0.0060	179	0.184	0.0140	178
<b>投薬</b>						
ACE 阻害剤, % (n)	0.256	0.0005	179	0.245	0.0010	178
ARII, % (n)	-0.044	0.5616	179	-0.022	0.7736	178
ベータ遮断薬, % (n)	0.325	<0.0001	179	0.364	<0.0001	178
利尿薬, % (n)	<b>0.704</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>179</b>	<b>0.674</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>178</b>
ビタミン K アンタゴ ニスト, % (n)	0.268	0.0003	179	0.311	<0.0001	178
抗血小板剤, % (n)	0.380	<0.0001	179	0.311	<0.0001	178
スタチン, % (n)	0.074	0.3232	179	0.061	0.4155	178
<b>入院時 lab</b>						
BNP, pmol/ml (n)	<b>0.773</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>178</b>	—	—	—
クレアチンクリア ランス, $\mu\text{mol/l}$ (n)	<b>-0.681</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>178</b>	<b>-0.587</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>177</b>
C 反応性タンパク質, mg/l (n)	<b>0.615</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>179</b>	<b>0.614</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>177</b>
Na <sup>+</sup> , mM (N)	-0.331	<0.0001	179	-0.409	<0.0001	178
ALT, U/ml (N)	0.075	0.3245	174	0.115	0.1316	173
平均血圧, mmHg (n)						
心拍数, Bpm (n)	-0.419	<0.0001	169	-0.397	<0.0001	168
<b>心エコー検査</b>						
LVEF, % (n)	<b>-0.653</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>178</b>	<b>-0.669</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>176</b>

表 4 : I G F B P 2 及び B N P レベルと臨床的特徴との相関関係。Rho : Spearman 順位相関係数、n = 2 2 8。Rho > 0 . 5、中度～高度の関連性を太字で示す。

【 0 0 6 4 】

【表 5】

	COPD	AHF	P
	(n= 10)	(n= 30)	
年齢, 年	57 ± 10	73 ± 10	<0.001
性別, 女性, % (F/M)	30 (3/7)	23 (7/23)	0.689
<b>心血管リスク因子</b>			
高血圧, % (n)	30 (3)	63 (19)	0.140
糖尿病 T2, % (n)	40 (4)	43 (13)	1.000
脂質異常症, % (n)	30 (3)	47 (14)	0.470
肥満, % (n)	10 (1)	6 (2)	1.000
<b>心臓血管の病歴</b>			
冠動脈疾患, % (n)	10 (1)	43 (13)	0.069
心臓弁膜症, % (n)	0 (0)	30 (9)	0.080
<b>臨床症状</b>			
急性心不全	–	30 (9)	–
急性非代償性心不全, % (n)	–	60 (18)	–
肺水腫, % (n)	–	10 (3)	–
<b>投薬</b>			
ACE 阻害剤又は ARII, % (n)	30 (3)	63 (19)	0.140
ベータ遮断薬, % (n)	0 (0)	57 (17)	0.010
利尿薬, % (n)	40 (4)	80 (24)	0.041
ビタミン K アンタゴニスト, % (n)	10 (1)	47 (14)	0.059
抗血小板剤, % (n)	30 (3)	60 (18)	0.148
スタチン, % (n)	20 (2)	57 (17)	0.691
<b>入院時 lab</b>			
BNP, pmol/ml	14 [10-19]	1782 [1340-2773]	<0.001
クレアチニン, μmol/l	80 [65-100]	120 [98-142]	0.015
C 反応性タンパク質, mg/l	4.0 [0.0-14.5]	10 [0.7-19.5]	0.209
Na <sup>+</sup> , mM	139 ± 3	136 ± 7	<0.043
<b>入院時バイタル</b>			
平均血圧, mmHg	98 ± 13	93 ± 17	0.443
心拍数, Bpm	104 ± 28	88 ± 26	0.107
<b>心エコー検査</b>			
LVEF, %	–	35 [20-60]	–

表 5 : 外部検証コホートの人口学的及び臨床的特性。LVEF : 左室駆出率。

【 0 0 6 5 】

実施例

実施例 1 : 第 1 の患者分析

材料及び方法

患者 :

1 . 集団 :

本発明者らは、2010年11月～2011年3月に、Toulouse Rangueil University Hospitalの患者200人超を組み入れて横断的単一施設研究を実施した。3つの患者群は、慢性心不全（CHF）、急性心不全（AHF）及びコントロールから構成されていた。患者全員が承諾書に署名し、フランス保健省、CCTIR、CNIL及び倫理委員会（

10

20

30

40

50

C P P ) によって生体サンプルの採取が承認された。18歳未満の患者又は承諾書を理解不可能な患者若しくは承諾書に署名不可能な患者、並びに腎不全又は移植患者を除外した。

#### 【0066】

##### a. 慢性心不全患者 ( C H F ) :

本発明者らは、種々の病因 ( 虚血性心臓病 ( C M I )、弁膜 ( C M V )、高血圧後 ( H T A 後 C M H )、肥大型遺伝性心筋症 ( C M H 遺伝子)、原発性拡張型心筋症又は毒性 ( C M D ) )、不整脈源性右室異形成 ( Right ventricle arrhythmogenic dysplasia arrhythmogen ) 及び先天性心筋症による N Y H A 病期 I ~ I V の範囲の公知の安定 C H F を有する患者 ( 3 カ月超にわたっていかなる代償不全も有しない ) を組み入れた。組み入れには、心不全の確診 ( 疾患の病歴、経胸壁心エコー検査 ( T T E ) 及び / 又は B N P ) が必要であった。心不全による入院後に、これらの患者をいくつかの心臓病施設に収容した ( 入院、受診票、Pr Galinier 及び Pr Carrie の部署 ) 。

10

#### 【0067】

##### b. 急性心不全 ( A H F ) :

推定 C H F 及び A H F バイオマーカーを同定し得るために、本発明者らは、その種類にかかわらず ( 左、右、混合型、低心拍出量性、心原性ショック ( cardiogenic choc ) )、急性心臓代償不全のために入院した患者を組み入れた。

#### 【0068】

##### c. コントロール :

入院日に Ranguel University Hospital のアテローム性動脈硬化症予防部を通じて、コントロール患者を組み入れた。

20

#### 【0069】

##### 2. 臨床データ :

患者全員について、人体計測データ ( 体重、身長、性別 )、病歴、心電図及び生物学的データ ( 血漿ナトリウム、クレアチニン、肝臓の状態、プロトロンビン、C R P、ヘマトクリット及びヘモグロビン ) を収集した。C H F 患者及び A H F 患者について、B N P レベルのデータを収集した。これらの検査は全て、患者の担当医による処置中に依頼し、心不全の病期だけでなく腎臓及び肝臓の機能、水和及び炎症レベルをモニタリングするために実施した。全ての投薬を記録した。

30

#### 【0070】

##### 3. 心エコー検査 :

各患者用のソフトウェア My Lab Desk - Kontron を使用して、検査中及びデータ処理後のデータ収集を可能にする専用機械 ( Kontron ) で、1人の心臓医が、組み入れた被験体全員について経胸壁心エコー検査 ( T T E ) を実施した。

#### 【0071】

T T E により、体積及び直径 ( 左室の収縮及び拡張機能 ) の系統的測定が可能になった。加えて、右室機能並びに大動脈、僧帽弁又は三尖弁の弁膜症を分析した。T T E は、心不全診断の < < ゴールドスタンダード > > と考えられており、欧州及び米国における現在の推奨に従ってその病因を決定した。

40

#### 【0072】

##### 生物学的サンプル :

尿を標準的なポリプロピレンチューブに採取して直ぐに凍結し、- 80 に維持した。血漿を E D T A チューブに採取し、遠心分離し、氷上で分注し、直ぐに - 80 で凍結した。

#### 【0073】

##### 分析方法 :

標準的な手順を使用して C E - M S を実施した [ Mischak, H. et al., 2010 ]。簡潔に言えば、E S I - T O F 質量分析計 ( エレクトロスプレーイオン化 - 飛行時間型 ) ( Micr o T O F, Brucker-Daltonic, Bremen, Germany ) に接続した長さ 90 cm 直径 50  $\mu$ m の silice

50

capilar (Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA)で、ペプチドを電気泳動分離した。CE - MS緩衝液は、20% (v/v) アセトニトリル及び250 mMギ酸のHPLC水溶液であった。13  $\mu$ Aの強度をもたらす電場 (+35 ~ -40 kV) の下で、電気泳動分離を60分間実施する。実行中は、キャピラリー温度を+35 に維持する。

【0074】

製造業者のELISA試薬プロトコールに従ってR&D SYSTEMS EUROPE LTD試薬を使用して、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるIGFBP2の定量を実施した。

【0075】

#### 結果

本発明者らは最初に、患者50人 (CHF 9人、AHF 13人、年齢性別及びリスク因子適合健常コントロール28人) の尿プロテオームをスクリーニングしたところ、HFに特異的なポリペプチドのパネルが明らかになった。CE - MSデータによれば、あるポリペプチド (x64054、質量1878, 792 Da; キャピラリー電気泳動時間  $t = 20.72$  分) が高い特異性及び感度でAHF及びCHFを識別することができたので (AUC = 0,99;  $p < 0,0001$ )、非常に関連性があると思われた。MALDI - TOF分析を使用して、本発明者らは、この推定バイオマーカーをインスリン様成長因子結合タンパク質2 (IGFBP2) のフラグメントと同定した。

【0076】

患者200人において、血漿及び尿濃度測定のため両方を使用してELISAによって、推定バイオマーカーとしてのIGFBP2の検証を実施した。ROC曲線分析により、0,988のAUC値 ( $p < 0,0001$ ) が得られた (図1)。CHF患者及びAHF患者では、血漿 (図2) 及び尿 (図3) のIGFBP2の濃度が明らかに大きく上昇している。また、NYHA分類によって示されるように、血漿中のIGFBP2濃度の上昇は、心不全の重症度に依存していた (図4)。さらに、本発明者らは、IGFBP2及びBNPレベルが弱く相関していたことを認めたが、これは、この新たなバイオマーカーがほぼ独立した指標としてより重要であることを示している (図5)。最後に、本発明者らは、IGFBP2血漿レベル及び左室駆出率が負に相関していたことを観察したが、これは、血流IGFBP2レベルと心臓機能との間の生理学的な関連性を示しており、IGFBP2レベルは心臓ポンプステータスの予測因子候補になる (図6)。従って、本発明者らは、IGFBP2濃度の上昇を心不全バイオマーカーとして使用し得ることを提案する。

【0077】

実施例2：第2の患者分析

#### 材料及び方法

##### 患者の組み入れ

本研究では、2つの独立したコホートをを使用した。発見 - 検証コホートは、2010年11月 ~ 2011年11月にRangueil University Hospital (Toulouse, France) で募集した患者228人であり、外部検証コホートは、2009年 ~ 2011年にLariboisiere University Hospital (Paris, France) で募集した患者40人であった。

【0078】

心不全の病因又は重症度について偏見なく、特定の心不全バイオマーカーに注目するために、発見 - 検証コホートの症例群は、慢性心不全 (CHF) 又は急性心不全 (AHF) を患っている患者から構成されていた。臨床的重症度の病期にかかわらず (NYHA分類の病期 I ~ IV)、及び病因にかかわらず、CHF患者は公知の安定HFを有しており、3カ月超にわたっていかなる代償不全エピソードもなかった。臨床観察結果、心疾患の経過観察、経胸壁心エコー検査 (TTE) 及びBNPのモニタリングから、心不全の診断を正式に確立した。これらの患者は、定期的な予定来院時に組み入れた。臨床所見にかかわらず (左、右、混合型、低流量 - 心原性ショック)、AHF患者を募集した。

【0079】

それぞれ発見工程及び検証工程について、発見 - 検証コホートのコントロール群は、HFを有しないが心血管リスク因子 (CRF) を有する患者、又はCRF及び非心臓性呼吸

10

20

30

40

50

困難（NCD）を有する患者から構成されていた。CRF患者は、Rangueil University Hospitalのアテローム性動脈硬化症予防センターへの予定来院時に募集した。この群に組み入れるには、心不全（収縮又は拡張機能障害）の病歴、臨床徴候、生物学的な又は心エコー検査の証拠を有する患者全員を除外する必要があった。

【0080】

Lariboisiere University Hospital (Paris, France)における外部検証コホートは、コントロール患者としてCOPD患者（いかなる右心又は左心負荷も与えずに「純粋な」COPDを試験するためにBNPが20pg/ml未満である）、及び症例患者としてAHF患者から構成されていた。

【0081】

被験体全員について、人体計測データ（体重、身長、性別）、病歴、生物学的データ及び心電図を収集した（表1、3、5）。これらの検査は全て、患者の担当医による処置中に実施し、心不全の病期だけではなく腎臓及び肝臓の機能、水和及び炎症レベルをモニタリングするために実施した。全ての投薬を記録した。

【0082】

1人の心臓医が、組み入れた被験体全員についてTTEを実施した。心エコー検査（Knton Imagic, Kontron, Saint German en Laye, France）により、体積及び直径（左室の収縮及び拡張機能）の系統的測定並びに駆出率の測定が可能になった。腎臓透析又は移植（病期5D及び5T）の患者を除外した。

【0083】

研究プロトコルを臨床データベース（ClinicalTrials.gov NCT01024049）に登録し、1975年のヘルシンキ宣言の倫理指針を順守した。このプロトコルは、institution's human research (COSSEC)及びregional ethics committee (Comite de Protection des Personnes (CPP) # DC 2008-452)によって承認された。参加者全員及び/又はその法的な委任代理人から、書面によるインフォームドコンセントを得た。

【0084】

発見及び検証セット

本発明者らは最初に、発見 - 検証コホートの患者228人から被験体49人の発見 - 試験セットをランダムに構成した。HF患者21人（AHF67人のうちの9人及びAHF51人のうちの12人）が症例サブセットを構成し、CRF患者67人のうちの28人がコントロールサブセットを構成した。これらの被験体49人の尿をCE-MSプロテオーム分析に使用した（表1）。この分析によって単離したX64054ペプチドをさらに以下のようにIGFBP2と同定し、発見 - 試験セットの血漿中で試験した。さらなる2つの検証コホートを構成した。Toulouse university hospitalの患者を含む第1のコホート（表3）；この検証セットは患者179人を含んでおり、コントロールサブセットはCRF39人及びNCD43人から構成され、症例サブセットはAHF39人及びCHF58人から構成されていた。

【0085】

第2の検証コホートは、Paris Lariboisiere University Hospitalの患者40人から構成されていた。この外部検証コホートは、COPD患者10人及びAHF患者30人を含んでいた（表5）。

【0086】

生物学的サンプル

被験体全員を静脈切開し、末梢静脈血をナトリウム/EDTAチューブに吸引した。1500g、4で10分間遠心分離した後、血漿を分離して分注し、アッセイまで-80で保存した。また、被験体から早朝尿サンプルを入手し、20mlをポリプロピレン回収ポットに回収して分注し、上記のように保存した。

【0087】

分析方法

サンプルの調製、及びキャピラリー電気泳動と質量分析とを組み合わせた（CE-MS）

10

20

30

40

50

## 分析

心エコー検査の日に、参加者全員から早朝尿サンプルを採取した。

### 【0088】

アリコート処理時まで - 80 で保存した。次いで、以前に記載されているように (13) 尿サンプルを処理し、次いで、CE - MS分析の直前にHPLCグレードの水に再懸濁した。記載のように、MicroQTOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) にオンライン接続したP/ACE MDQキャピラリー電気泳動システム (Beckman Coulter, Villepinte, France) を使用して、CE - MS分析を実施した。ESI噴霧器 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を接地し、イオンプレー界面電位を - 4.0 ~ - 4.5 kVに設定した。コンタクト・クローズ・リレー (contact-close-relays) によるCEによって、データ取得及びMS取得方法を自動的にコントロールした。350 ~ 3000 m/zの範囲にわたって、スペクトルを3秒間ごとに蓄積した。CE - MS法の正確度、精度、選択性、感度、再現性及び安定性についての詳細は以前に提供されている。

10

### 【0089】

#### データ処理

ピークピッキング、デコンボリューション及びデアイソトピング (de-isotoping) を含め、MosaiquesVisuソフトウェア (Mosaiques, Hannover, Germany) を使用して、質量スペクトルを処理した。内部ポリペプチド標準を使用して、移動時間及びピーク強度を標準化した。これらのフラグメントは通常の生物学的プロセスの結果であると考えられ、本発明者らのデータベースにおける20,000個のサンプルに基づいてこれまでに研究したいかなる疾患状態によっても影響されないと思われる。得られたピークリストは、その分子量、標準化したキャピラリー電気泳動移動時間、及び標準化した信号強度によって各ポリペプチドの特性を示す。Microsoft SQLデータベースにおいて、検出された全てのポリペプチドをデポジットし、マッチし、アノテーションすることにより、複数の患者群をさらに分析及び比較することができた。

20

### 【0090】

#### 統計方法及びバイオマーカーの同定

本発明者らは、SASソフトウェア (バージョン9.1.3) (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用して、それぞれt検定及び $\chi^2$ 統計によって、発見サンプル及び試験サンプルの臨床的特性及び心エコー特性の平均及び割合を比較した。発見段階では、本発明者らは、Wilcoxon順位和検定を使用して、患者とコントロールとの間のCE - MS尿ポリペプチドプロファイルの自然対数変換した信号振幅を比較した。このノンパラメトリック検定は、スキュープロテオミクスデータに適切である。本発明者らは、患者及びコントロールが、CE - MS尿ポリペプチドプロファイルの信号振幅について同じ連続分布を有するという帰無仮説を試験した。信号振幅は、質量分析装置によって記録された較正カウント (強度) を表す。Benjamini-Hochberg補正を適用することによって、多重検定のための統計的調整を実施した。本発明者らは、個々の被験体におけるバイオマーカーの分布に基づいて、症例とコントロールとを識別する尿ポリペプチドのクラスタを探索した。各症例及び各コントロールについて、サポート - ベクターマシンベースのMosaClusterソフトウェア (バージョン1.6.5) を使用して、選択したポリペプチドをまとめて単一のサマリ変数にした。試験セットでは、研究参加者の臨床状態を把握していない研究者が、クラスタポリペプチドを測定した。コードの解読後、本発明者らは、受信者動作特性 (ROC) プロットを使用して、試験セットにおける正しく分類されたサンプルの数を集計することによって、感度及び特異性を計算した。ROC曲線下面積 (AUC) により、任意の特定の閾値とは独立した全体的な精度に関する単一の尺度が得られる。

30

40

### 【0091】

#### 配列決定

基本的には記載されているように (Carty et al., 2011; Metzger et al., 2012)、Dionex Ultimate 3000 RSLSナノフローシステム (Dionex, Camberly UK) で尿サンプルを分析した。Ultimate 3000 RSオートサンプラー (Dionex, Camberly UK) によって流速5  $\mu$

50

1 / 分で、サンプル ( 5  $\mu$  l ) を Dionex100  $\mu$  m x 2 cm 5  $\mu$  m C18 ナノトラップカラムにロードした。ローディング溶液の組成は、0 . 1 % ギ酸及びアセトニトリル ( 9 8 : 2 ) であった。トラップカラムにロードしたら、次いで、サンプルを洗い流して、流速 0 . 3  $\mu$  m / 分で Acclaim PepMap C18 ナノカラム 75  $\mu$  m x 15 cm, 2  $\mu$  m 100A に入れた。溶媒 B ( 0 . 1 % ギ酸及びアセトニトリル ( 2 0 : 8 0 ) ) に対する溶媒 A ( 0 . 1 % ギ酸及びアセトニトリル ( 9 8 : 2 ) ) の直線勾配を 1 % B ( 5 分間 ) から開始して 9 0 分の時点で 3 0 % まで増加させ、次いで 1 2 0 分の時点で 5 0 % B まで増加させることによって、溶出を実施した。Ultimate 3000 RSLC のカラムオープン内で、トラップ及びナノフローカラムを 3 5 に維持した。カラムからの溶出液を、陽イオンモードで作動する Proxeon nano spray ESI source (Thermo Fisher Hemel UK) に向けて、次いで、Orbitrap Velos FTMS に入れた。イオン化電圧は 2 . 5 kV であり、キャピラリー温度は 2 0 0 であった。3 8 0 ~ 2 0 0 0 amu をスキャンする MS / MS モードで、質量分析計を操作した。フラグメント化方法は、3 5 % 衝突エネルギーの HCD であった。反復数 1 回並びに反復及び除外時間 1 5 秒間でデータ依存的な方法を使用して、MS 2 についてイオンを選択した。電荷状態 1 の前駆イオンを排除した。MS 1 のイオン分解能は 6 0 , 0 0 0 であり、HCD MS 2 については 7 , 5 0 0 であった。いかなる酵素特異性も用いずに Thermo Proteome Discoverer を使用して、HCD 対応の LTQ で実施した実験からのデータファイルを IP I ヒト非冗長データベースに対して検索した。不定の改変を選択し、メチオニン及びプロリンの酸化を可変改変に設定した。それぞれ MS 及び MS / MS について 1 0 p p m 及び 0 . 0 5 Da の質量誤差範囲を許容した。得られたペプチド同定結果をさらに検証するために、p H 2 で実行した際のペプチド電荷と CE 移動時間との間の厳密な相関関係を用いて、偽陽性判定率 ( 1 7 ) を最小限にした。そのペプチド配列 ( 塩基性アミノ酸の数 ) に基づいて計算した配列候補の CE 移動時間を実験的な移動時間と比較した。CE - MS 測定に対応する  $\pm$  2 分間未満の CE 移動時間偏差を許容した。

【 0 0 9 2 】

#### 免疫方法

既に公開されているように ( 1 8 ) 、ウサギモノクローナル抗ヒト I G F B P 2 抗体クローン E P R 3 3 8 0 ( 2 ) ( Clinisciences, Nanterre, France ) を使用して、ウエスタンブロットを実施した。製造業者の仕様書に従って I G F B P 2 酵素結合免疫吸着アッセイ ( R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA ) を使用して、ヒト I G F B P 2 を測定した。

【 0 0 9 3 】

#### m R N A 抽出、逆転写 ( R T ) 及びリアルタイム定量 P C R ( q P C R )

既に実施されているように [ Harmancey R et al, 2007 ] 異なるプライマーを使用して、既に記載されているように、m R N A 抽出及び R T - q P C R を実施した。

【 0 0 9 4 】

#### 統計分析

CE - MS 分析で試験した患者数と比較して、信号の量が非常に大量であるため、バックグラウンドの 4 倍超の信号対雑音比を有する信号のみを維持した。特に指定しない限り、連続変数は、平均 (  $\pm$  S D ) カテゴリ変数としてパーセンテージで示す。連続変数については Student の t 検定若しくは Mann-Whitney 順位和検定 ( 正規性検定が失敗した場合 ) を使用して、又はカテゴリ変数についてはカイ二乗検定を使用して、群間の統計的差異を決定した。R 計算言語 ( <http://www.R-project.org> ) 及び Medcalc ( Medcalc, version 11 . 6 . 0 . 0, Medcalc software bva, Belgium ) を使用して、統計分析を実施した。

【 0 0 9 5 】

#### 結果

##### 発見研究

発見 - 試験セットの人口学的及び臨床的データを表 1 に示す。投薬、入院時 lab、心エコー検査及び入院時バイタルのパラメータに関するコントロールと HF 患者との間の有意差は、臨床状態と一致している。従って、HF 患者では、血漿 B N P 及び C R P 濃度が有

意に高かったのに対して、クレアチニンクリアランス、ナトリウム濃度は減少した。また、HF患者では、平均血圧及び駆出率（EF）が減少した。HF患者はまた、心拍数が増加した。HF患者は、コントロール被験体よりも高齢であった（ $70 \pm 15$  対  $53 \pm 12$ ； $p < 0.001$ ）。HF患者の43%は、CADの病歴があった。2つの群では、心血管リスク因子が同様に示された。

#### 【0096】

ディファレンシャルに発現したポリペプチドのCE-MSによる決定、及び新たな推定HFバイオマーカーの同定。

本発明者らは、最初の工程として尿サンプルのCE-MS分析を使用して、HF兆候の可能性のある推定バイオマーカープロファイルを検出しようとした。AHF患者及びCHF患者（全ての病期及び病因）並びにCRFコントロール被験体の尿プロテオーム分析に基づいて、本発明者らは、HF（AUCが0.923以上の9個のポリペプチド、 $p < 0.001$ （Benjamini Hochberg多重検定補正））に特異的なポリペプチドセットを定義した（表2）。あるポリペプチド（ $x64054$ 、質量 $1878.792$  Da；電気泳動時間 $t = 20.7224$  秒間）が優れたHF識別力（0.988のAUC、 $p = 1.39 \cdot 10^{-5}$ ）を示したので、非常に興味深いと思われた。従って、本発明者らはこのペプチドに注目し、それをインスリン様成長因子結合タンパク質2（IPI：IPI00297284.1）と同定することに成功した。本発明者らは最初に、ヒト尿及び血液中のIGFBP2の存在を検査したところ、IGFBP2は尿中よりも血漿中に豊富にあることを観察した（データは示さず）。IGFBP2尿濃度のELISA分析により、この濃度は、血漿中よりも $505 \pm 198$ （ $n = 35$ ）倍低いことが明らかになった（示さず）。この観察結果により、本発明者らは、ELISAによって血漿サンプル中のIGFBP2をさらに分析した。

#### 【0097】

##### IGFBP2血漿濃度

血漿中のIGFBP2の分析により、心不全患者では、コントロール個体と対比して有意に増加していることが示され、それぞれ $1350 \pm 635$ （ $p < 0.001$ ）及び $214 \pm 136$  ng/mlであった（図7）。これらの患者におけるBNPレベルは、HFでは、コントロール患者よりも高濃度で示された；それぞれ $806 \pm 693$ 及び $39 \pm 28$ （ $p < 0.001$ ）（図7）。

#### 【0098】

##### 検証研究

検証セットに組み入れた患者の人口学的及び臨床的データを表3に示す。CRF患者は心血管リスク因子を有し、HFに関するいかなる症候及び客観的パラメータも有しない。AHF患者は最高齢の群であった。AHF患者は、高血圧（81%）、冠動脈性心疾患（52%）及び真性糖尿病（24%）を含む有意な併存症状を有していた。ほとんどの患者は、利尿薬（89%）及び抗血小板薬（60%）を受けていた。CHF群の患者の年齢分布は、CRF群とNCD群との間のコントロール群に位置する。CHF患者は $62 \pm 13$  歳であり（男性68%）、42人の患者でLVEFが45%以下であった。患者は、高血圧（37%）、冠動脈性心疾患（51%）及び真性糖尿病（30%）を含む有意な併存症状を有していた。やはり、ほとんどの患者は、利尿薬（78%）及び抗血小板薬（54%）を受けていた。群間では、性別の有意差はない。IGFBP2濃度は、CHF患者及びAHF患者では、CRF患者又はNCD患者と対比して有意に増加した。IGFBP2レベルのこの増加は、この患者セットにおけるBNPレベルと類似のパターンに従った（図8）。CRF患者及びNCD患者対CHF患者及びAHF患者のROC曲線分析により、IGFBP2の曲線下面積（AUC）は0.933であり（この場合のYouden指標は0.81であり、 $556$  ng/ml超のIGFBP2に関連する）、BNP（ $0.870$ ； $p = 0.038$ ）よりも高かった。IGFBP2 + BNPのロジスティック回帰により、AUCが0.942に増加したが、IGFBP2の性能は有意に増加しなかった（データは示さず）。

10

20

30

40

50

## 【0099】

急性呼吸困難患者の心臓診断のために、IGFBP2をさらに試験した。これらの急性呼吸困難患者からのIGFBP2濃度及びBNP濃度の値を示して、患者の全体分布を表す（データは示さず）。NCD患者対AHF患者のROC曲線分析により、IGFBP2 + BNPのAUCは、BNPと対比して増加したことが示された（0.925対0.859； $p = 0.04$ ）。これらの患者群では、IGFBP2の識別性能は、BNPの識別性能と有意差がなかった（データは示さず）。血漿BNPレベルが診断不良範囲（これは100～600pg/mlに及び、その低レベルでの除外濃度に相当する）であった場合には、BNPとIGFBP2との間で診断性能について明らかな差異が見られ、600pg/mlを、HFを確定するための合理的な高カットオフ値と定義した。この濃度範囲において診断価値がなかったBNP（AUC = 0.643；95%CI：0.479～0.787）とは対照的にIGFBP2は0.838のAUCに達した（95%CI：0.690～0.934）（図9）。

10

## 【0100】

IGFBP2レベル及び臨床パラメータとの相関

IGFBP2及びBNPと患者の主な特徴パラメータとの間の相関関係の単変量分析を表4に報告する。IGFBP2及びBNPレベルは、共に強く相関していた（ $\rho = 0.722$ ； $p < 0.001$ ）。さらに、BNP及びIGFBP2レベルは、利尿薬及びC反応性タンパク質、クレアチンクリアランス並びにLVEFとも同様に相関していた。

20

## 【0101】

AHFバイオマーカーとしてのIGFBP2の外部検証

本発明者らは、Paris Lariboisiere Hospitalで募集した患者コホートにおいて、AHF診断に関するIGFBP2の予測価値を試験した。このコホートにはAHF患者及びCOPD患者が含まれており、表5に記載されている。上記発見 - 検証コホートにおいて予め独立して決定した閾値556ng/mlを使用すると、AHF診断については80%の感度及びCOPD患者については90%の特異性が得られた（データ示さず）。

## 【0102】

## 実施例3：動物分析

材料及び方法ラットHFモデル及び経胸壁心エコー検査

National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animalsに従った調査が、Inserm Animal Ethics Committeeによって許可された。2月齢のSprague-Dawleyラット（Janvier labs）において冠動脈結紮による心筋梗塞を使用する研究が、Local Animal Ethics Committeeによって承認された（#MP/03/03/01/12）。既に実施されたようにVivid 7 pro 7心エコーシステム（GE Medical System）を使用して、左室駆出率の測定のために経胸壁心エコー分析を実施した。

30

## 【0103】

結果虚血性HFのラットモデルにおけるIGFBP2の試験

20日目（すなわち、手術によって虚血を誘発した4日後）において動物の駆出率は低く（図10A）、この状態は、動物を安楽死させて器官を回収した70日目まで続いた。組織における遺伝子発現レベルの分析により、虚血動物の心房では、IGFBP2 mRNAレベルが偽手術と比較して増加したことが示された（図10B）。興味深いことに、この時点において、HF動物由来の心房のIGFBP2 mRNAレベルは、心室との対比では10倍高く、肝臓との対比では4倍増加していた。

40

## 【0104】

考察

血漿BNP又はNT-プロBNPレベルは、HFを有する患者を診断するのに有益なツールである（2）。従って、本発明者らは、IGFBP2の診断価値をBNPの診断価値と比較し、IGFBP2の推定付加価値をBNPと比較した。IGFBP2測定の診断性

50

能により、本発明者らは、BNPと比較して増加したAUCを用いて、HF症例を、非心疾患コントロール症例(CRF患者及びNCD患者)と識別した。NCD患者とAHF患者との識別においてIGFBP2及びBNPの使用を試験したところ、IGFBP2及びBNPのロジスティックな組み合わせにより、BNP単独と比較して増加したAUCが得られた。BNPが中度に(すなわち、100~600pg/mlの濃度範囲で)上昇している患者では、IGFBP2診断性能の付加価値がさらにより明白であった。

#### 【0105】

IGFBP2のアップレギュレーションは、HFにおけるインスリン様成長因子(IGF)結合タンパク質(IGFBP)の潜在的な役割を指し示しており、視床下部ホルモン、例えば視床下部成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、脳下垂体(hypohyse)成長ホルモン並びにIGF1及び2を包含する成長ホルモン軸(somatotrope axis)により大きく関与する。IGFBPは、IGF生物活性に対するレギュレーションを付与するが、直接的な役割も有し得る。明らかに、IGF1のアペイラビリティは、インスリン成長因子結合タンパク質IGFBPによってレギュレーションされている。IGF1の1~5%のみが血流中で遊離しており、残りのIGF1は、そのレセプターに対する親和性以上の親和性でIGFBPに堅く結合している。従って、IGFBPは、IGF1とIGF1レセプターとの相互作用をモデュレーションする。しかしながら、最近、いくつかのIGFBPは、IGFの非存在下であっても、転写因子との直接的な相互作用及び遺伝子発現のモデュレーションを介して、独自の活性を有することが見出された。

10

#### 【0106】

IGFBP2は、ヒト血漿中で2番目に豊富なIGFBPである。IGFBP2は、ほとんどがIGF1阻害因子である。本発明者らの相関データにより、BNP及びIGFBP2血漿レベルは性別に依存しないが、年齢と共に正に増加し、ボディマス指数と共に負に増加することが確認された。

20

#### 【0107】

IGF1は、成長及び心筋の発達に関与することが認められた(28)。IGF1及びそのレセプターは胎児段階以後に心臓で発現され、MAPキナーゼ経路及びPI-3キナーゼ経路を介して心筋肥大(myocardial hypertrophy)を誘発する。IGF1はまた、トロポニン及びアクチンなどの収縮機能を有するものを含む心筋タンパク質の産生を刺激する。従って、IGF1は心臓収縮機能に関係し、IGF1レベルは左室駆出率(LVEF)と相関する。IGF1はまた、心筋細胞の生存及びアポトーシスに関与している。マウスモデル、及びさらにはGH又はIGF1注射を伴う小規模な臨床試験により、心臓の早期リモデリングの減少、収縮及び拡張機能の改善、並びに収縮性の改善が明らかになった。最近、細胞分化時に中和IGFBP2抗体を追加することにより、重大な筋芽細胞肥大がもたらされた。

30

#### 【0108】

本研究により、本発明者らは、HFと血漿IGFBP2との間の関連性、及び新たなバイオマーカーとしてのIGFBP2の使用可能性を分析することができた。本発明者らは明らかに、HF患者では、IGFBP2血漿濃度が7倍近く上昇していることを観察した。また、BNP「グレーゾーン」におけるIGFBP2の試験により、この新たなバイオマーカーの高い識別力が明らかになった。

40

#### 【0109】

IGFBP2は、肝臓及び心臓で主に産生されるので、肝臓又は心臓の機能の指標である可能性が高い。HFの虚血ラットモデルにおいてこれらの点を評価したところ、心房では、IGFBP2 mRNAレベルが、心室又は肝臓と対比して強いことも明らかになった。中でも、HF動物由来の心房では、IGFBP2 mRNAレベルが有意に増加していた。この観察結果により、心房におけるIGFBP2の推定上の役割に関する疑問が生じる。筋芽細胞分化時にin vitro抗体によるIGFBP2の中和を減少させると肥大がもたらされたことから(34)、IGFBP2が増加した合成は、心臓における過度のリモデリングに対する防御機構に関与し得ると推測することができる。加えて、マウスでは、I

50

G F B P 2 の過剰発現が筋肉量の減少をもたらした ( 3 6 ) 。しかしながら、確かなバックグラウンドにもかかわらず、この仮説を H F の動物モデルでさらに試験しなければならない。

【 0 1 1 0 】

最後に、本発明者らは、患者において、I G F B P 2 レベルと L V E F 値との有意な負の相関関係を観察した。これらの観察結果は、安定性及び心不全の重症度を推定するのに使用することができる潜在的な経過観察バイオマーカーとして I G F B P 2 を使用することを提案する傾向がある。しかしながら、心臓起源又は非心臓起源の急性呼吸困難を有する患者集団における H F 診断では、H F におけるその感度及び特異性により、I G F B P 2 の最初の使用を B N P で補完することができる。

10

【 0 1 1 1 】

本研究は、いくつかの制限に悩まされている。小規模な外部患者コホートをを用いて、新たな I G F B P 2 バイオマーカー ( biomaker ) の検証を実施した。しかしながら、A H F 患者における I G F B P 2 濃度の上昇には信頼性があったので、I G F B P 2 は新たなバイオマーカーとして適任である。本発明者らは現在、さらなる検証のために、非常に大規模な多施設国際コホートで I G F B P 2 を試験しようとしている。さらに、H F における I G F B P 2 の機能的役割が、齧歯類動物モデルで定義されるであろう。

【 0 1 1 2 】

I G F B P 2 を H F バイオマーカーとして使用することは有望であり、特に、軽度から中度の H F を示す B N P 値域における H F 診断を改善し得る。I G F B P 2 合成は心臓によって主に行われるにもかかわらず、それは肝臓によっても分泌される。この観察結果は、I G F B P 2 を H F 診断に使用することの障害にはならないはずである。明らかに、H F は症候群であり、本発明者らのデータは、I G F B P 2 が、心臓機能の状態を明らかにし得る信頼性のあるバイオマーカーであることを提案している。

20

【 0 1 1 3 】

参考文献：

本出願を通して、本発明に関連する技術水準が様々な参考文献に記載されている。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み込まれる。

## 【表 6】

Delahaye, F., Roth, O., Aupetit, J. F. & de Gevigney, G. [Epidemiology and prognosis of cardiac insufficiency]. Arch Mal Coeur Vaiss 94, 1393-1403 (2001).

Harmancey R, Senard J-M, Rouet P, Pathak A, Smih F. Adrenomedullin inhibits adipogenesis under transcriptional control of insulin. Diabetes. 2007; 56:553-63.

Hassfeld S, Eichhorn C, Stehr K, Naegele H, Geier C, Steeg M, Ranke MB, Oezcelik C, Osterziel KJ. Insulin-like growth factor-binding proteins 2 and 3 are independent predictors of a poor prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. Heart. 2007 Mar;93(3):359-60.

Mischak, H. et al. Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis. Proteomics Clin Appl 4, 464-478, doi:10.1002/prca.200900189 (2010).

Phillips K, M A Park, L H Quarrie, M Boutinaud, J D Lochrie, D J Flint, G J Allan, J Beattie. Hormonal control of IGF-binding protein (IGFBP)-5 and IGFBP-2 secretion during differentiation of the HC11 mouse mammary epithelial cell line. Journal of molecular endocrinology, 31:197-208 (2003).

10

20

【图 5】

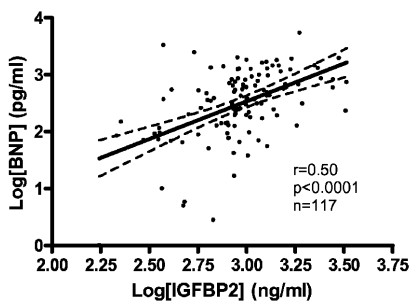


Figure 5

【图 6】

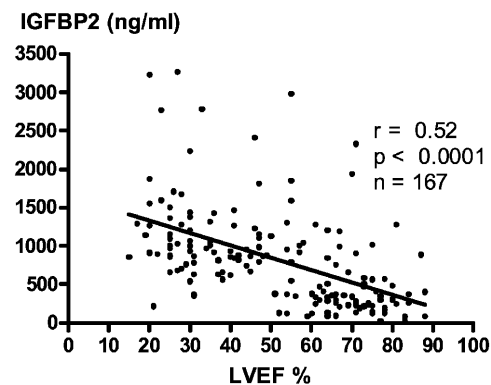


Figure 6

【 7 】

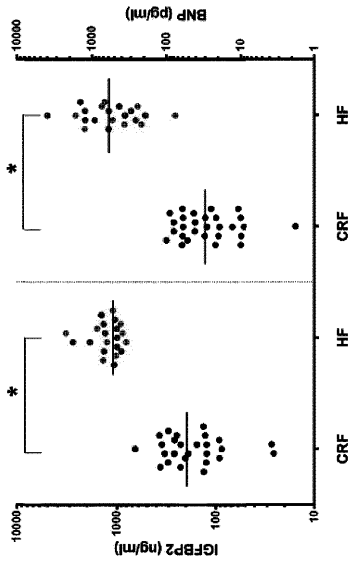


Figure 7

【 8 】

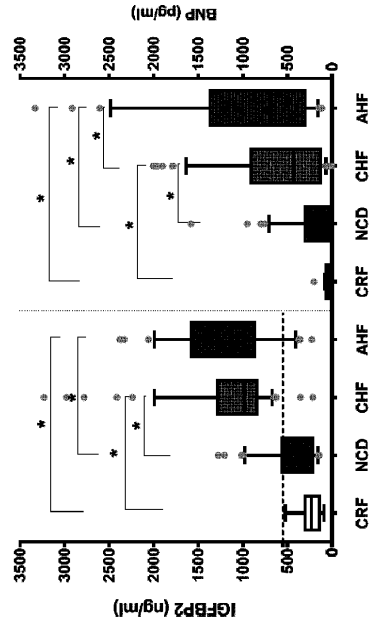
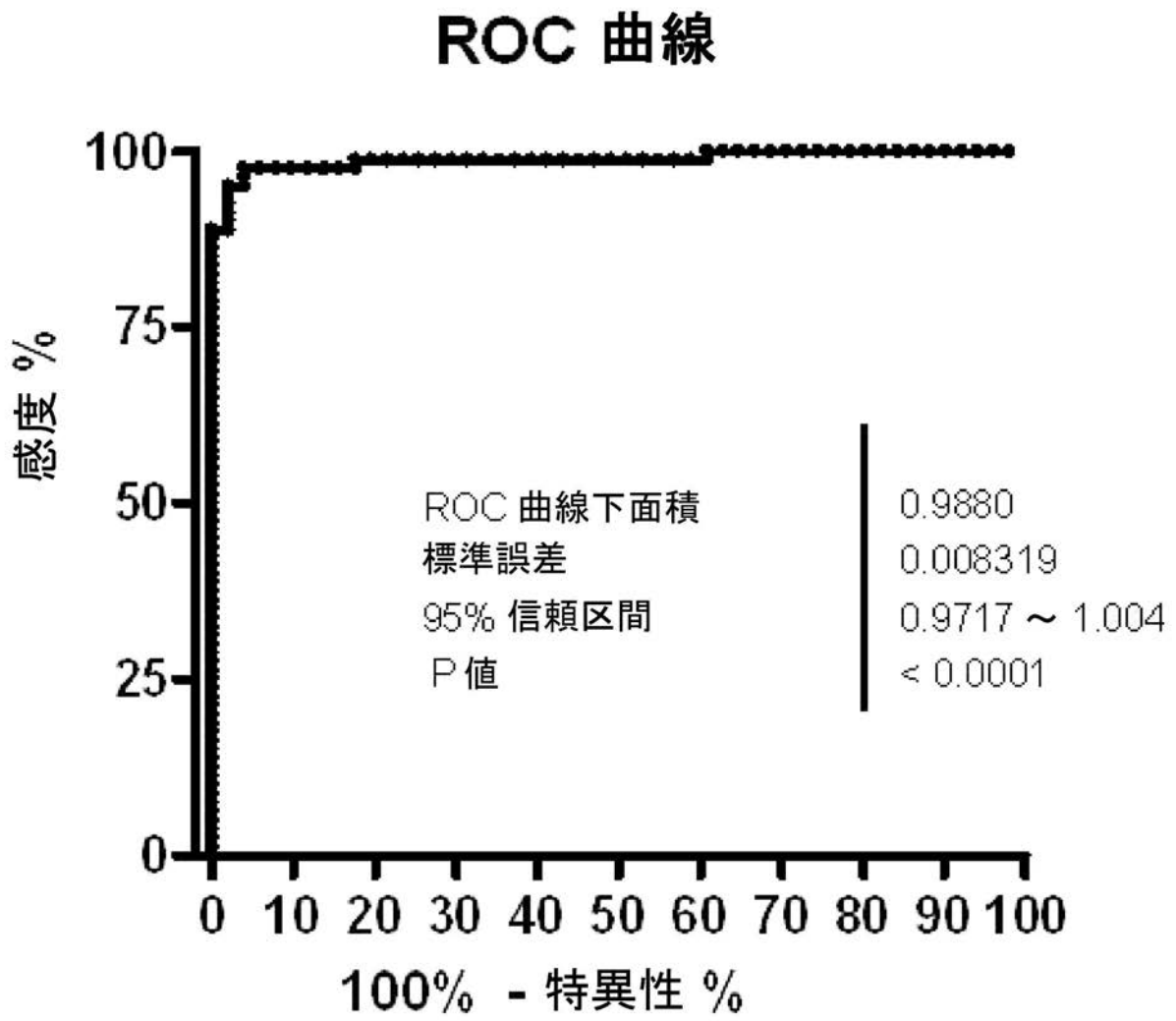
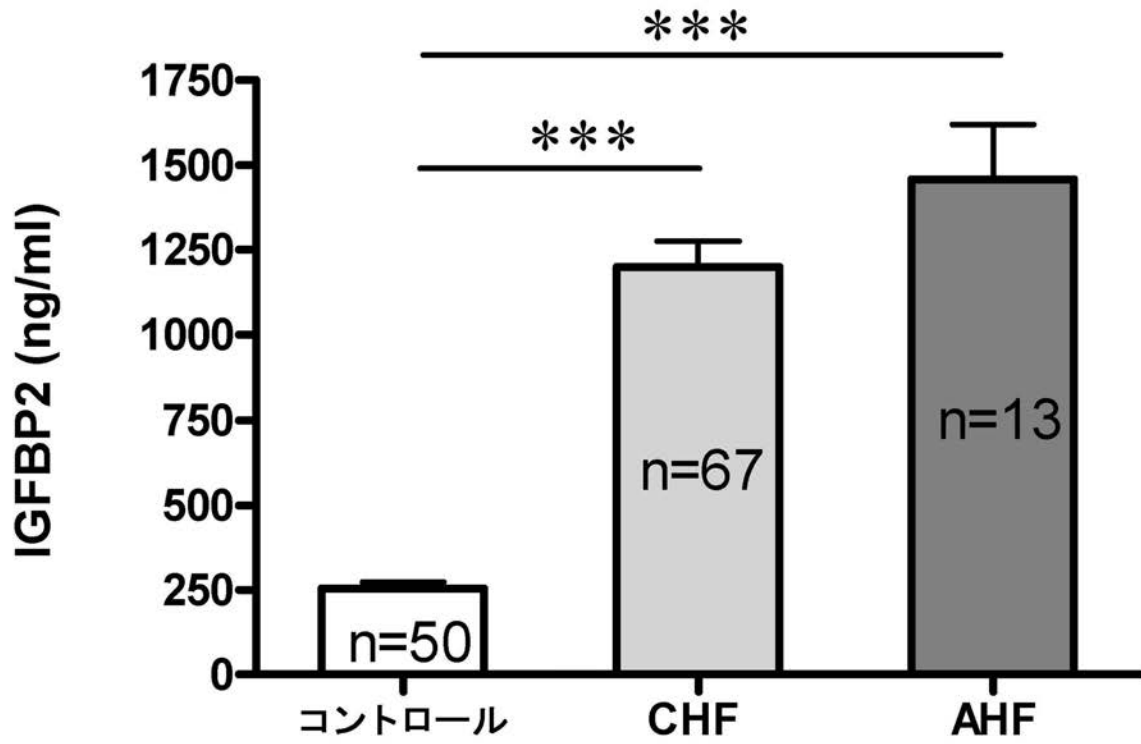


Figure 8

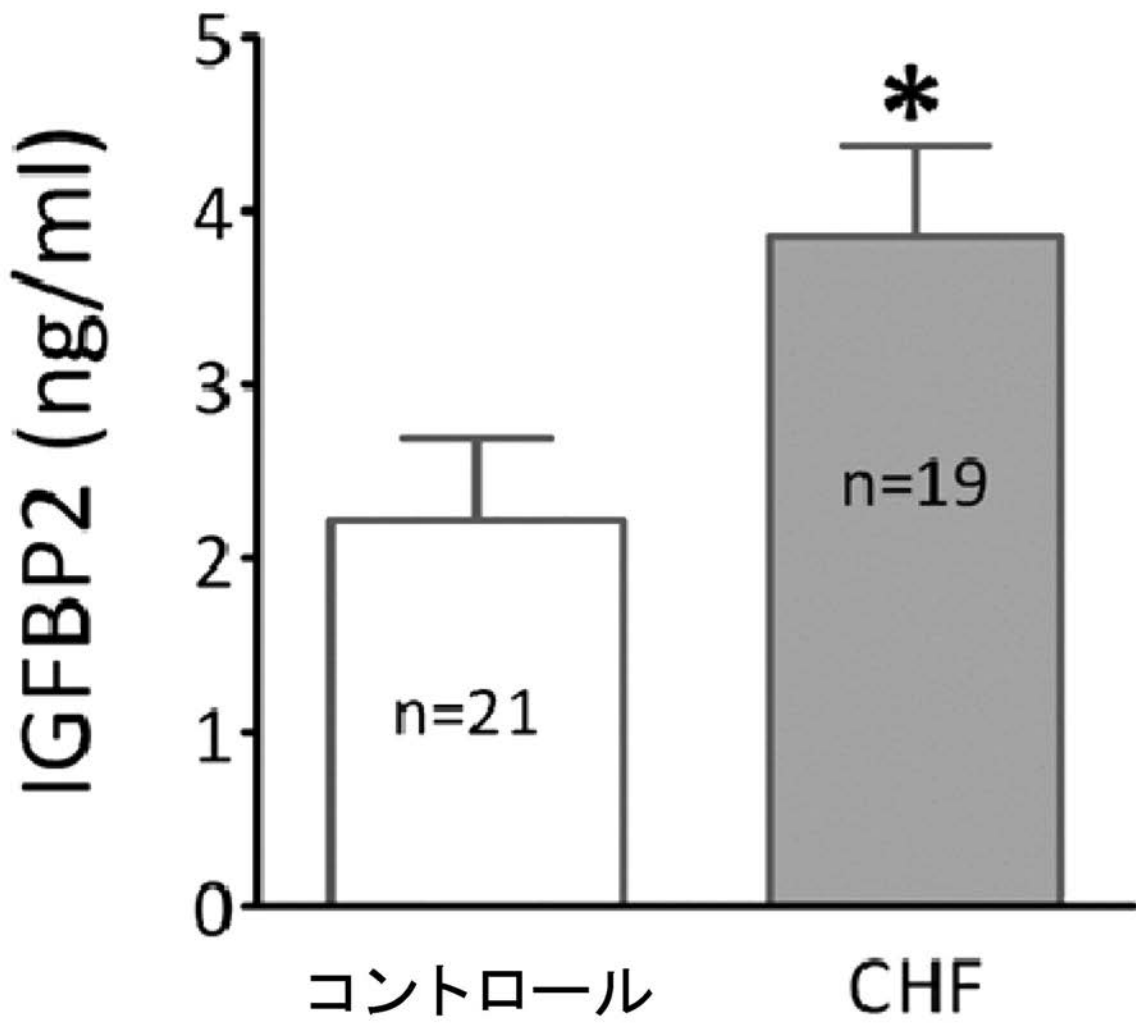
【 図 1 】



【 図 2 】

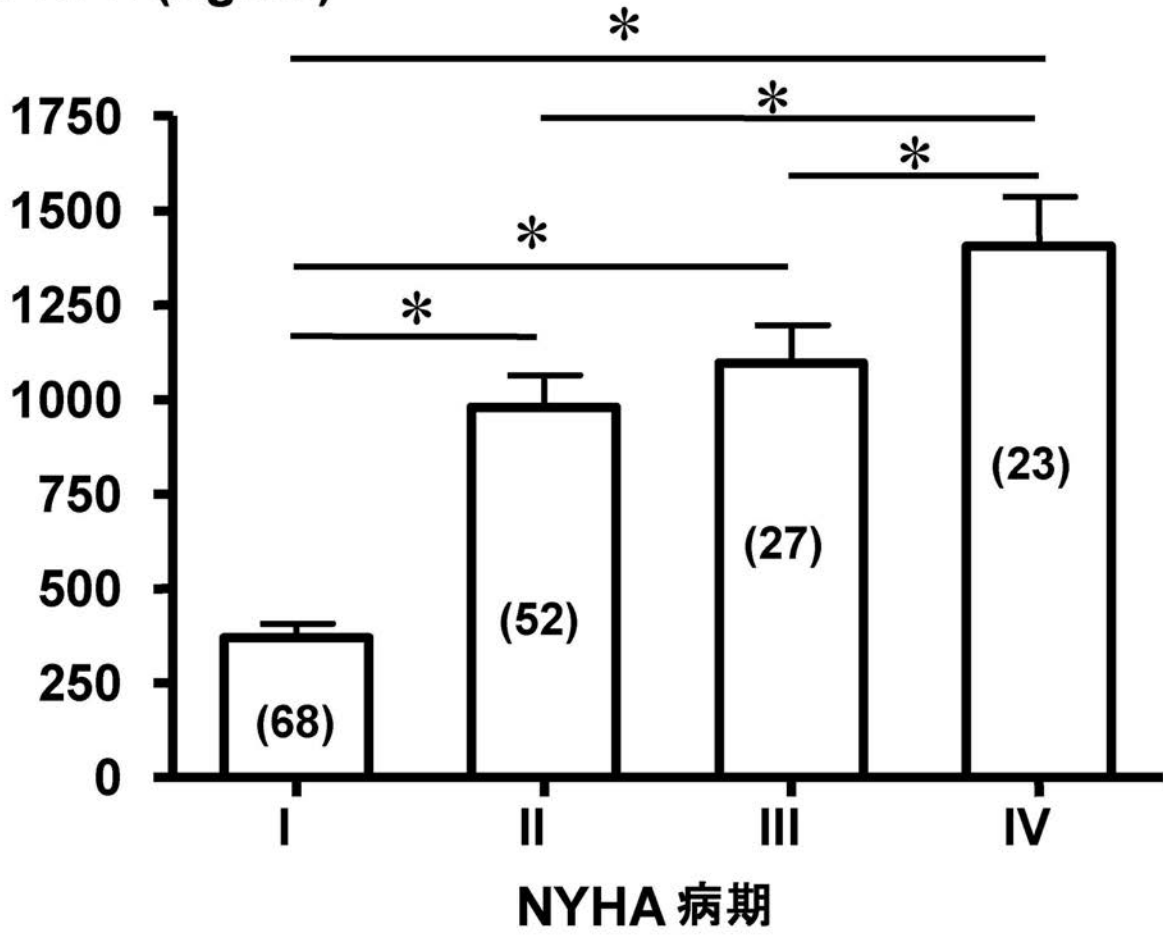


【図3】

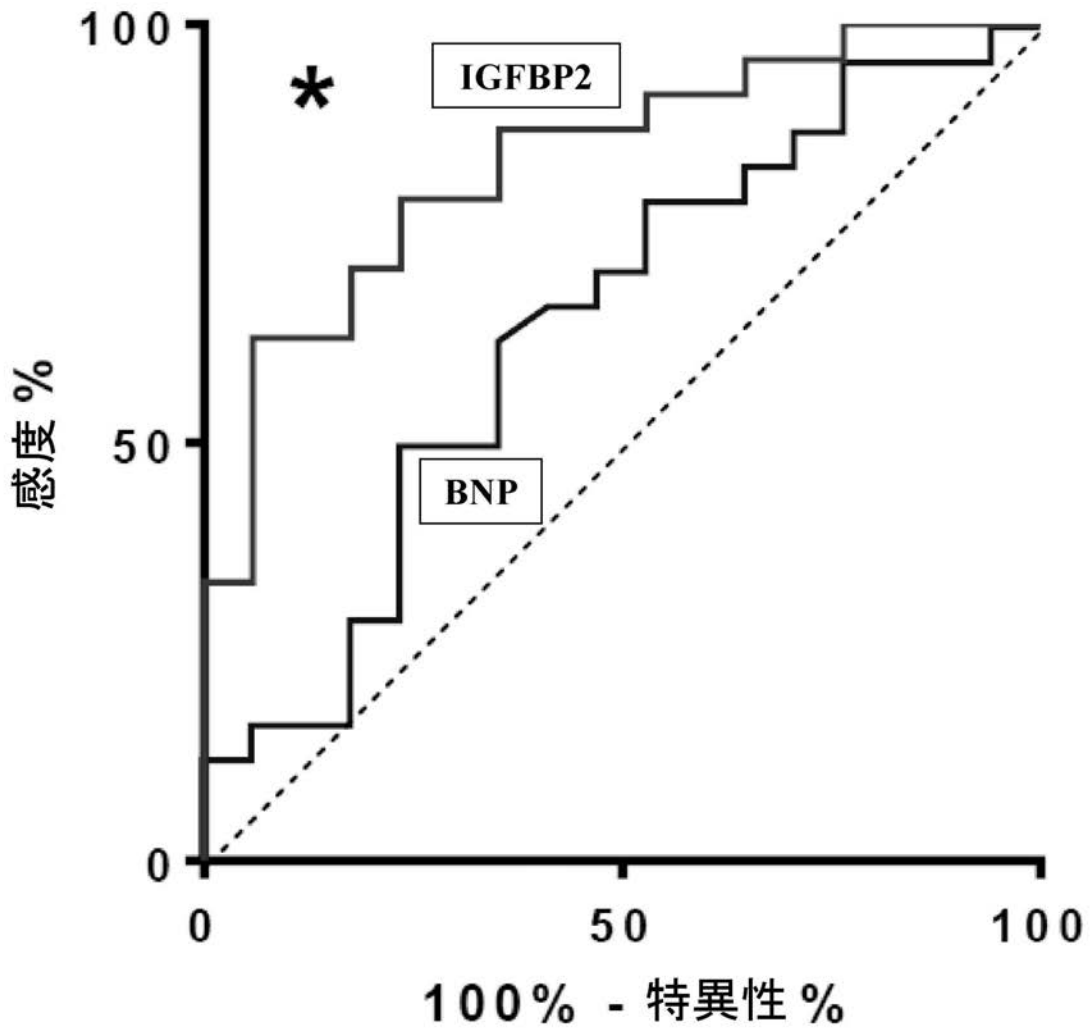


【 図 4 】

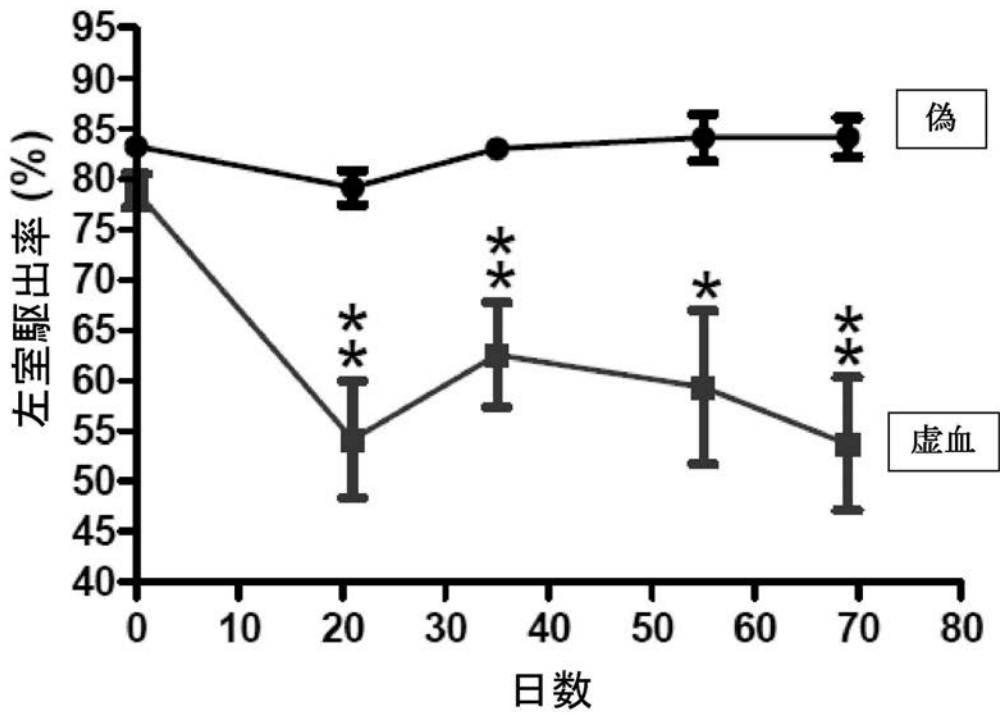
### IGFBP2 (ng/ml)



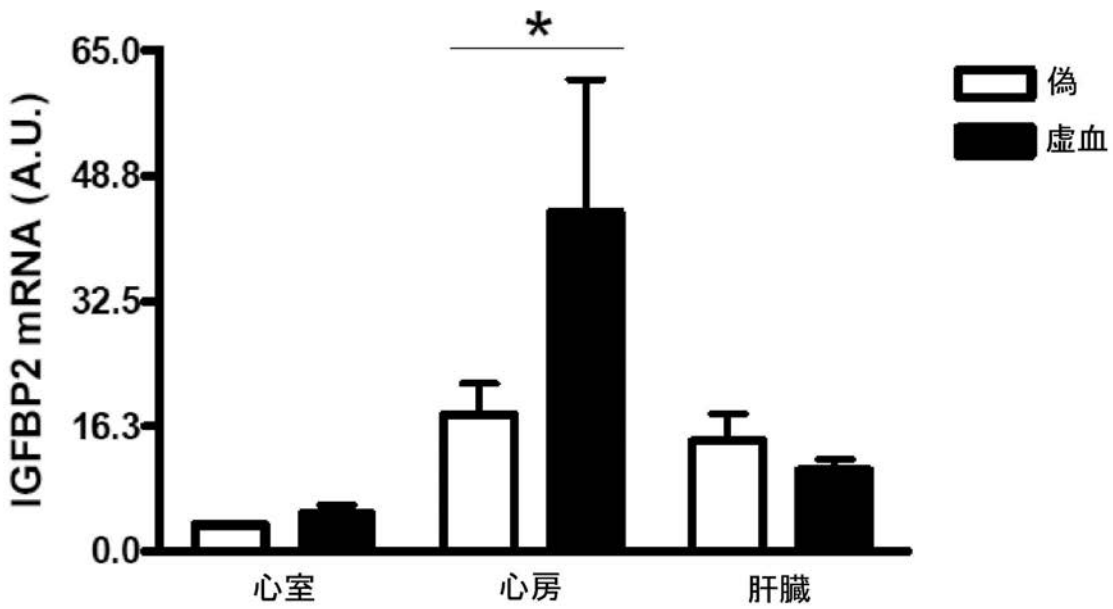
【 図 9 】



【図10A】



【図10B】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/066697

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. HASSFELD ET AL: "Insulin-like growth factor-binding proteins 2 and 3 are independent predictors of a poor prognosis in patients with dilated cardiomyopathy", HEART, vol. 93, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 359-360, XP055041582, ISSN: 1355-6037, DOI: 10.1136/hrt.2006.090092	1-3,5-7
Y	chapter "Results"; table 1  ----- -/--	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  2 September 2013		Date of mailing of the international search report  17/09/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rosin, Oliver

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/066697
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIROSLAVA STASTNA ET AL: "Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery", PROTEOMICS, vol. 12, no. 4-5, 19 January 2012 (2012-01-19), pages 722-735, XP055041585, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.201100346 figure 1; table 2 -----	1-8
Y	DONGLEI HU ET AL: "Serum Insulin-Like Growth Factor-1 Binding Proteins 1 and 2 and Mortality in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study", JAGS, vol. 57, 18 June 2009 (2009-06-18), pages 1213-1218, XP055041583, abstract -----	1-8
A	DAVID OLCHOVSKY ET AL: "Elevated Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 in Malignant Pleural Effusion", ACTA ONCOLOGICA, vol. 41, no. 2, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 182-187, XP055041584, abstract -----	1
A	HERBERT YU ET AL: "Insulin-Like Growth Factors (IGF-I, Free IGF-I, and IGF-II) and Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in Blood Circulation", JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 13, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 166-172, XP055041586, the whole document -----	1
Y	MATTSSON A ET AL: "Multidimensional reference regions for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 concentrations in serum of healthy adults", GROWTH HORMONE AND IGF RESEARCH, CHURCHILL LIVINGSTONE, LONDON, GB, vol. 18, no. 6, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 506-516, XP025504329, ISSN: 1096-6374, DOI: 10.1016/J.GHIR.2008.04.005 [retrieved on 2008-06-11] the whole document -----	1-8

1

## 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, 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, UZ

(71) 出願人 515034781

サントル・オスピタリエ・ユニヴェルシテール・ドゥ・トゥールーズ  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE  
フランス国、エフ - 3 1 3 0 0 トールーズ、オテル - デュー・ボン・ヌフ、リュ・ヴィグエリ  
- 2

(74) 代理人 110001508

特許業務法人 津国

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100145104

弁理士 膝舘 祥治

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100146422

弁理士 田中 聖

(72) 発明者 ルエ, フィリップ

フランス国、エフ - 3 1 4 3 2 トールーズ・セデックス・4、ベペ 8 4 2 2 5、アヴニュー・ジャン・プール 1、アンセルム・ユエムエール 1 0 4 8

(72) 発明者 スミー - ルエ, ファティマ

フランス国、エフ - 3 1 4 3 2 トールーズ・セデックス・4、ベペ 8 4 2 2 5、アヴニュー・ジャン・プール 1、アンセルム・ユエムエール 1 0 4 8

(72) 発明者 デムーラン, フランク

フランス国、エフ - 3 1 4 3 2 トールーズ・セデックス・4、ベペ 8 4 2 2 5、アヴニュー・ジャン・プール 1、アンセルム・ユエムエール 1 0 4 8

(72) 発明者 ガリニエ, ミシェル

フランス国、エフ - 3 1 4 3 2 トールーズ・セデックス・4、ベペ 8 4 2 2 5、アヴニュー・ジャン・プール 1、アンセルム・ユエムエール 1 0 4 8

Fターム(参考) 2G041 DA05 FA12 LA07

2G045 AA25 CA26 CB03 DA36 FA36 FB03

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015528562A5</a>	公开(公告)日	2016-09-15
申请号	JP2015525897	申请日	2013-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 男性中心南某处δ统一威赛牛油果尾图卢兹		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Üniversite电保罗萨巴蒂埃图卢兹特鲁瓦 中心 - Osupitarie统一威赛仕尾图卢兹		
[标]发明人	ルエフィリップ スミールエファティマ デムーランフランク ガリニエミシェル		
发明人	ルエ,フィリップ スミールエ,ファティマ デムーラン,フランク ガリニエ,ミシェル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N27/447 G01N27/62		
CPC分类号	G01N27/4473 G01N33/6848 G01N33/6893 G01N2333/4745 G01N2800/325 G01N2800/50 G01N27/447		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N27/26.331.E G01N27/62.D G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/DA05 2G041/FA12 2G041/LA07 2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB03		
代理人(译)	津国 肇 三宅 俊男 阿基奥·希巴达 Hizayakata正治 田中洋子 田中 圣		
优先权	2012305988 2012-08-09 EP		
其他公开文献	JP2015528562A JP6298054B2		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种对患有心力衰竭风险的患者进行分类的方法，包括以下步骤：(i) 测量从所述患者获得的样品中IGFBP2的浓度，和(ii) 在步骤(i)中测量从在特定心力衰竭阶段的患者获得的样品中的IGFBP2浓度获得的对照值获得的对照值和/或从健康患者的血液样品中获得的IGFBP2浓度获得的对照值获得的对照值并比较它们。

