

(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2014-531605

(P2014-531605A)

(43) 公表日 平成26年11月27日 (2014. 11. 27)

|                                      |                       |             |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                        | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>       | GO 1 N 33/53 D        | 4 B 0 2 4   |
| <b>GO 1 N 33/534 (2006. 01)</b>      | GO 1 N 33/534         | 4 C 0 8 4   |
| <b>GO 1 N 33/533 (2006. 01)</b>      | GO 1 N 33/533         | 4 C 0 8 6   |
| <b>GO 1 N 33/543 (2006. 01)</b>      | GO 1 N 33/543 5 4 5 A | 4 H 0 4 5   |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>      | GO 1 N 33/53 U        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|               |                              |          |                        |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2014-534814 (P2014-534814) | (71) 出願人 | 503060525              |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年10月6日 (2012. 10. 6)     |          | ザ ボード オブ トラスティーズ オブ    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成26年5月23日 (2014. 5. 23)     |          | ザ ユニバーシティ オブ イリノイ      |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2012/059150            |          | アメリカ合衆国イリノイ州 6 1 8 0 1 |
| (87) 国際公開番号   | W02013/052933                |          | アーバナ サウス ライト ストリート     |
| (87) 国際公開日    | 平成25年4月11日 (2013. 4. 11)     |          | 5 0 6 ヘンリー アドミニストレーショ  |
| (31) 優先権主張番号  | 61/658, 585                  |          | ン ビルディング 3 5 2         |
| (32) 優先日      | 平成24年6月12日 (2012. 6. 12)     |          |                        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |                        |
| (31) 優先権主張番号  | 61/544, 030                  |          |                        |
| (32) 優先日      | 平成23年10月6日 (2011. 10. 6)     |          |                        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |                        |
| (31) 優先権主張番号  | 61/677, 292                  |          |                        |
| (32) 優先日      | 平成24年7月30日 (2012. 7. 30)     |          |                        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |                        |
|               |                              |          | 最終頁に続く                 |

(54) 【発明の名称】 拡張期心不全に関連した方法で使用するためのミオシン結合タンパク質-C

## (57) 【要約】

本開示は、拡張期心不全の診断および処置に関する方法を提供する。本明細書において提供するものは、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法、心不全を患っている被験体において拡張機能障害と収縮機能障害とを区別する方法、被験体において心不全を拡張期心不全または収縮期心不全として特徴付ける方法、拡張機能障害または拡張期心不全の処置についての被験体の必要性を決定する方法、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法、拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法、拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法、ならびに他の関連する方法である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法であって、前記方法は、( i ) 前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程を含む、方法。

**【請求項 2】**

被験体において拡張期心不全を診断する方法であって、前記方法は、( i ) 前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程を含む、方法。

10

**【請求項 3】**

前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、拡張機能障害または拡張期心不全を診断する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

心不全を患っている被験体において拡張機能障害と収縮機能障害とを区別する方法であって、前記方法は、前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程を含む、方法。

**【請求項 5】**

被験体において心不全を拡張期心不全または収縮期心不全として特徴付ける方法であって、前記方法は、前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程を含む、方法。

20

**【請求項 6】**

My B P - C、前記その翻訳後に修飾された形態、または前記その断片の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体において前記心不全を拡張期心不全と特徴付ける工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

My B P - C、前記その翻訳後に修飾された形態、または前記その断片の前記レベルが、心不全を患っていない被験体からのレベルと比べて増大し、かつ拡張期心不全を患っている被験体からのレベルと比べて減少しているとき、前記被験体において前記心不全を収縮期心不全と特徴付ける工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

拡張機能障害または拡張期心不全のための処置についての被験体の必要性を決定する方法であって、前記方法は、前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程を含み、ここで前記被験体は、前記レベルが、対照レベルと比較して増加するとき、拡張機能障害または拡張期心不全のための処置を必要とする、方法。

**【請求項 9】**

拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法であって、前記方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程と、My B P - C、または前記その翻訳後に修飾された形態、または前記その断片の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体を拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある被験体として同定する工程とを含む、方法。

40

**【請求項 10】**

拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法であって、前記方法は、( i ) 前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C ( My B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程と、( i i ) My B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片

50

の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む、方法。

【請求項 1 1】

拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法であって、前記方法は、(a)第1の時点において前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)前記第1の時点の後に起こる第2の時点において前記被験体から得た生物学的試料中で、前記MyBP - C、または前記その翻訳後に修飾された形態または前記その断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、前記第2のレベルが前記第1のレベル未満であるとき、拡張機能障害または拡張期心不全についての前記被験体のリスクが減少する、方法。

10

【請求項 1 2】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は、(a)前記化合物の投与の前に前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)前記化合物の投与の後に前記被験体から得た生物学的試料中で、前記MyBP - C、または前記その翻訳後に修飾された形態または前記その断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、前記第2のレベルが前記第1のレベル未満であるとき、前記化合物は拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる、方法。

20

【請求項 1 3】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法であって、前記方法は、(a)処置前の前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)処置後の前記被験体から得た生物学的試料中で、前記MyBP - C、または前記その翻訳後に修飾された形態または前記その断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、前記第2のレベルが前記第1のレベル未満であるとき、前記処置は前記被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置するのに有効である、方法。

30

【請求項 1 4】

心不全を患っている被験体を処置する方法であって、前記方法は：

- a. 前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程と、
- b. MyBP - C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む、方法。

【請求項 1 5】

ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルについてアッセイを受けた被験体を処置する方法であって、前記方法は、MyBP - C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程を含む、方法。

40

【請求項 1 6】

前記MyBP - Cが、約144kDaの分子量を有するか、または完全長MyBP - Cであり、任意選択で、前記MyBP - Cが、S - グルタチオン付加されている、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

MyBP - Cの前記断片が、約75kDa、約40kDa、約25kDa、または約15～約20kDaの分子量を有する、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 18】

MyBP-Cの前記断片が、S-グルタチオン付加されている、請求項17に記載の方法。

## 【請求項 19】

MyBP-Cの前記レベルが、(i) MyBP-Cの1つまたは複数の断片のレベルに対して正規化したMyBP-Cのレベル、または(ii) [144kDaのMyBP-Cの濃度] : [MyBP-C断片の合計濃度] の比である、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 20】

MyBP-Cの前記レベルまたはMyBP-C断片の前記レベルが、前記試料中のMyBP-Cの総レベルに対して正規化される、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 21】

MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態の前記レベルが、(i) 翻訳後修飾を含まないMyBP-Cのレベルに対して正規化した前記翻訳後修飾を含むMyBP-Cのレベル、または(ii) MyBP-Cの総レベルに対して正規化した翻訳後修飾を含むMyBP-Cのレベルである、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 22】

MyBP-Cの前記翻訳後に修飾された形態が、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはS-グルタチオン付加されたMyBP-C断片である、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

前記MyBP-Cまたは前記MyBP-C断片が、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記MyBP-Cまたは前記MyBP-C断片が、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている、請求項23に記載の方法。

30

## 【請求項 25】

前記MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片の前記レベルが、質量分析法または免疫測定によって決定される、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記免疫測定が、放射免疫測定、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、ELISA、ウェスタンブロット、アフィニティークロマトグラフィー、またはこれらの組合せを含む、請求項25に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記免疫測定が、ELISA、任意選択で、サンドイッチELISAを含む、請求項26に記載の方法。

40

## 【請求項 28】

前記免疫測定が、請求項40から55のいずれか一項に記載の結合剤の使用を含み、任意選択で、前記結合剤が、抗体、抗体の抗原結合断片、またはアプタマーである、請求項25から27のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記生物学的試料が、血液またはその画分である、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

50

前記生物学的試料が、血漿である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記被験体が、ヒトである、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記被験体が、息切れを患っている、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記被験体が、心不全を患っている、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記被験体が、心筋梗塞を患っていない、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 35】

前記被験体が、収縮機能障害を患っていない、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記被験体が、収縮機能障害を患っている、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片の前記レベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の前記処置のための治療剤を投与する工程をさらに含む、請求項 1 から 13 および 16 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 38】

(i) 前記被験体から得た前記生物学的試料中の非対称性ジメチルアルギニン (ADM A) のレベル、(ii) 前記被験体から得た前記生物学的試料中の対称性ジメチルアルギニン (SDMA) のレベル、(iii) 前記被験体から得た前記生物学的試料中の L-アルギニンのレベル、または(iv) これらの組合せを決定する工程をさらに含む、請求項 1 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

[前記生物学的試料中の L-アルギニンの前記レベル] と [前記生物学的試料中の ADM A の前記レベル] の比を決定する工程を含む、請求項 38 に記載の方法。

30

【請求項 40】

S-グルタチオン付加された MyBP-C に特異的に結合する単離された結合剤。

【請求項 41】

前記 MyBP-C が、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys 239、Cys 249、Cys 426、Cys 436、Cys 443、Cys 475、Cys 528、Cys 566、Cys 623、Cys 651、および / または Cys 719 の 1 つまたは複数において S-グルタチオン付加されている、請求項 40 に記載の単離された結合剤。

【請求項 42】

前記 MyBP-C が、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys 475、Cys 623、および / または Cys 651 の 1 つまたは複数において S-グルタチオン付加されている、請求項 41 に記載の単離された結合剤。

40

【請求項 43】

1 つまたは複数の S-グルタチオン付加された Cys 残基を欠いている MyBP-C に結合しない、請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 44】

前記 Cys 残基が S-グルタチオン付加されていないとき、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys 239、Cys 249、Cys 426、Cys 436、Cys 443、Cys 475、Cys 528、Cys 566、Cys 623、Cys 651、および / または Cys 719 の 1 つまたは複数に結合しない、請求項 43 に記載の結合

50

剤。

【請求項 4 5】

前記 C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないとき、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 の 1 つまたは複数に結合しない、請求項 4 4 に記載の結合剤。

【請求項 4 6】

M y B P - C 内のエピトープに特異的に結合する単離された結合剤であって、前記エピトープが、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 2 3 9、C y s 2 4 9、C y s 4 2 6、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、および / または C y s 7 1 9 の 1 つまたは複数を含む、単離された結合剤。

10

【請求項 4 7】

前記エピトープが、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 の 1 つまたは複数を含む、請求項 4 6 に記載の単離された結合剤。

【請求項 4 8】

M y B P - C の C y s 残基に特異的に結合する単離された結合剤であって、前記 C y s 残基が、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 2 3 9、C y s 2 4 9、C y s 4 2 6、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、および / または C y s 7 1 9 である、結合剤。

20

【請求項 4 9】

前記 C y s 残基が、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 である、請求項 4 8 に記載の単離された結合剤。

【請求項 5 0】

前記 1 つまたは複数の C y s 残基が、S - グルタチオン付加されている、請求項 4 6 から 4 9 のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 5 1】

S - グルタチオン付加されていないときに、前記 1 つまたは複数の C y s 残基に結合しない、請求項 5 0 に記載の単離された結合剤。

30

【請求項 5 2】

抗体、抗体の抗原結合断片、またはアプタマーである、請求項 4 0 から 5 1 のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 5 3】

異種部分にコンジュゲートしている、請求項 4 0 から 5 2 のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 5 4】

前記異種部分が、検出可能な標識、酵素、酵素基質、または 2 つの結合パートナーの間に高親和性結合相互作用を有する結合パートナーである、請求項 5 3 に記載の単離された結合剤。

40

【請求項 5 5】

前記異種部分が、アビジンまたはビオチンである、請求項 5 4 に記載の単離された結合剤。

【請求項 5 6】

請求項 4 0 から 5 5 のいずれか一項に記載の単離された結合剤を含むキット。

【請求項 5 7】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法であって、前記方法は：( i ) 前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベル、ならびに ( a ) 対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) および / または ( b ) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、( i i ) A D M A の

50

前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつS D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、またはL - アルギニンとA D M Aの比が、対照比と比べて減少しているとき、拡張機能障害または拡張期心不全を診断する工程とを含む、方法。

【請求項58】

被験体において収縮期心不全の非存在下で心不全を拡張期心不全として特徴付ける方法であって、前記方法は：(i)前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(A D M A)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(S D M A)および/または(b)L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、(ii)前記生物学的試料中のL - アルギニンの前記レベルと前記生物学的試料中のA D M Aの前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、収縮期心不全の非存在下で前記心不全を拡張期心不全と特徴付ける工程とを含む、方法。

10

【請求項59】

拡張機能障害または拡張期心不全のための処置についての被験体の必要性を決定する方法であって、前記方法は、前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(A D M A)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(S D M A)および/または(b)L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含み、A D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつS D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、またはL - アルギニンの前記レベルとA D M Aの前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体は拡張機能障害または拡張期心不全のための処置を必要とする、方法。

20

【請求項60】

拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法であって、前記方法は、(i)被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(A D M A)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(S D M A)および/または(b)L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、(ii)A D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつS D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、またはL - アルギニンの前記レベルとA D M Aの前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体を拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある被験体と同定する工程とを含む、方法。

30

【請求項61】

拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法であって、前記方法は、(i)前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(A D M A)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(S D M A)および/または(b)L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、(ii)A D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつS D M Aの前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、またはL - アルギニンの前記レベルとA D M Aの前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む、方法。

40

【請求項62】

拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法であって、前記方法は、(a)第1の時点において前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(A D M A)の第1のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(S D M A)および/または(b)L - アルギニンのいずれかまたは両方の第1のレベルを決定する工程と、(b)前記第1の時点の後に起こる第2の時点において前記被験体から得た生物学的試料中で、前記A D M Aの第2のレベル、およびA D M Aの第2のレベル、ならびにS D M Aおよび/またはL - A r gのいずれかまたは両方の第2のレベルを決定する工程とを含み、A D M Aの前記第2のレベルが、A D M Aの前記第1のレベルと比べて減少し、かつS D M Aの前記第2のレベルが、S D M Aの前記第1のレベルと比べて変化しないとき、またはL - アルギニンの前記第2のレベルとA D M Aの前記第2のレベルの比が、L - アルギニンの前記第1のレベルとA D M Aの前記第1のレベルの

50

比と比べて増大するとき、拡張機能障害または拡張期心不全についての前記被験体のリスクが減少する、方法。

【請求項 6 3】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は、(a) 前記化合物の投与の前に前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の第 1 のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (SDMA) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第 1 のレベルを決定する工程と、(b) 前記化合物の投与の後に前記被験体から得た生物学的試料中で、前記 ADMA の第 2 のレベル、および ADMA の第 2 のレベル、ならびに SDMA および / または L - Arg のいずれかまたは両方の第 2 のレベルを決定する工程とを含み、ADMA の前記第 2 のレベルが、ADMA の前記第 1 のレベルと比べて減少し、かつ SDMA の前記第 2 のレベルが、SDMA の前記第 1 のレベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンの前記第 2 のレベルと ADMA の前記第 2 のレベルの比が、L - アルギニンの前記第 1 のレベルと ADMA の前記第 1 のレベルの比と比べて増大するとき、前記化合物は拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる、方法。

10

【請求項 6 4】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法であって、前記方法は、(a) 処置前の前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の第 1 のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (SDMA) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第 1 のレベルを決定する工程と、(b) 処置後の前記被験体から得た生物学的試料中で、前記 ADMA の第 2 のレベル、および ADMA の第 2 のレベル、ならびに SDMA および / または L - Arg のいずれかまたは両方の第 2 のレベルを決定する工程とを含み、ADMA の前記第 2 のレベルが、ADMA の前記第 1 のレベルと比べて減少し、かつ SDMA の前記第 2 のレベルが、SDMA の前記第 1 のレベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンの前記第 2 のレベルと ADMA の前記第 2 のレベルの比が、L - アルギニンの前記第 1 のレベルと ADMA の前記第 1 のレベルの比と比べて増大するとき、前記処置は、拡張機能障害または拡張期心不全を処置するのに有効である、方法。

20

【請求項 6 5】

心不全を患っている被験体を処置する方法であって、前記方法は：

30

a . 前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (SDMA) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、

b . ADMA の前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ SDMA の前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンの前記レベルと ADMA の前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む、方法。

40

【請求項 6 6】

非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (SDMA) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルについてアッセイを受けた被験体を処置する方法であって、前記方法は、ADMA の前記レベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ SDMA の前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンの前記レベルと ADMA の前記レベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 6 7】

前記生物学的試料が、血液またはその画分である、請求項 5 7 から 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 68】

前記生物学的試料が、血漿である、請求項 67 に記載の方法。

## 【請求項 69】

前記被験体が、ヒトである、請求項 57 から 68 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 70】

前記被験体が、息切れを患っている、請求項 69 に記載の方法。

## 【請求項 71】

前記被験体が、心不全を患っている、請求項 69 または 70 に記載の方法。

## 【請求項 72】

前記被験体が、心筋梗塞を患っていない、請求項 57 から 71 のいずれか一項に記載の方法。 10

## 【請求項 73】

前記被験体が、収縮機能障害を患っていない、請求項 57 から 72 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 74】

前記被験体が、収縮機能障害を患っている、請求項 57 から 72 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 75】

A D M A の前記レベルが、対照レベルと比較して増加し、かつ S D M A の前記レベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の前記比が、対照比と比べて減少しているとき、前記被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の前記処置のための治療剤を投与する工程をさらに含む、請求項 57 から 64 および 67 から 74 のいずれか一項に記載の方法。 20

## 【請求項 76】

A D M A、S D M A、または L - アルギニンの前記レベルを、免疫測定または質量分析法によって決定する、請求項 57 から 75 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 77】

前記免疫測定が、放射免疫測定、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、E L I S A、ウエスタンブロット、アフィニティークロマトグラフィー、またはこれらの組合せを含む、請求項 76 に記載の方法。 30

## 【請求項 78】

前記免疫測定が、E L I S A、任意選択で、サンドイッチ E L I S A を含む、請求項 73 に記載の方法。

## 【請求項 79】

前記被験体から得た前記生物学的試料において、ミオシン結合タンパク質 - C ( M y B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程をさらに含む、請求項 57 から 78 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 80】

前記 M y B P - C または前記 M y B P - C 断片が、S - グルタチオン付加されている、請求項 79 に記載の方法。 40

## 【請求項 81】

( i ) ミオシン結合タンパク質 - C ( M y B P - C )、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片に対して特異的な結合剤と、( i i ) グルタチオンに対して特異的な結合剤と、任意選択で ( i i i ) 生物学的試料を集めるためのユニットとを含む、キット。

## 【請求項 82】

S - グルタチオン付加された M y B P - C または M y B P - C の S - グルタチオン付加された断片に対して特異的な結合剤を含む、請求項 81 に記載のキット。

## 【請求項 83】

M y B P - C の C y s 残基に対して特異的な結合剤を含み、前記 C y s 残基は、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 239、C y s 249、C y s 426 50

、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、および / または C y s 7 1 9 であり、前記 C y s 残基は、任意選択で S - グルタチオン付加されている、請求項 8 1 または 8 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 4】

B N P のための結合剤を含む、請求項 8 1 から 8 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 5】

非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のための結合剤、対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のための結合剤、L - アルギニンのための結合剤、またはこれらの組合せを含む、請求項 8 1 から 8 4 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 8 6】

血漿を集めるためのユニットを含む、請求項 8 1 から 8 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8 7】

プロセッサと、

前記プロセッサにカップリングしている記憶デバイスと、

前記記憶デバイス上に記憶されている機械可読命令と

を含むシステムであって、

前記機械可読命令は、前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 被験体から得た生物学的試料から決定した、( a ) M y B P - C のレベル、( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態のレベル、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルからなる群より選択されるデータ値を受け取り、

20

( i i ) ( i ) の前記データ値と対応する対照データ値であって、前記対応する対照データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、( a ) M y B P - C、( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルである、対応する対照データ値とを比較し、

( i i i ) ( i ) の前記データ値が、前記対応する対照データ値よりも大きいとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供することを引き起こす、システム。

30

【請求項 8 8】

前記プロセッサが、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、( a ) M y B P - C、( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルである、複数の対照データ値を受け取り、前記複数の対照データ値の平均値を決定し、前記平均値を前記対応する対照データ値として割り当てることができる、請求項 8 7 に記載のシステム。

【請求項 8 9】

( i ) の前記データ値が、M y B P - C の翻訳後に修飾された形態または M y B P - C の翻訳後に修飾された断片である、請求項 8 7 または 8 8 に記載のシステム。

40

【請求項 9 0】

M y B P - C の前記翻訳後に修飾された形態が、S - グルタチオン付加された M y B P - C であるか、または M y B P - C の前記翻訳後に修飾された断片が、M y B P - C の S - グルタチオン付加された断片である、請求項 8 9 に記載のシステム。

【請求項 9 1】

前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取り、

50

( i i ) ( i ) の前記第 1 のデータ値と対照 A D M A データ値であって、前記対照 A D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである、対照 A D M A データ値とを比較し、

( i i i ) ( i ) の前記第 2 のデータ値と対照 S D M A データ値であって、前記対照 S D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、対照 S D M A データ値とを比較すること  
を引き起こす機械可読命令を含む、請求項 8 7 から 9 0 のいずれか一項に記載のシステム

10

#### 【請求項 9 2】

前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取り、

( i i ) 前記第 2 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 ( R t ) と、対照比 ( R c ) であって、 R c は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 R c とを比較し、

20

( i i i ) R t が、 R c 未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供すること

を引き起こす機械可読命令を含む、請求項 8 7 から 9 1 のいずれか一項に記載のシステム

#### 【請求項 9 3】

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、前記プロセッサが、 ( i ) の前記データ値を拡張機能障害データ値として割り当て、前記拡張機能障害データ値を前記記憶デバイス上に記憶する、請求項 9 2 に記載のシステム。

30

#### 【請求項 9 4】

請求項 8 7 から 9 3 のいずれか一項に記載のシステムの機械可読命令を記憶したコンピュータ可読ストレージ媒体。

#### 【請求項 9 5】

請求項 9 3 に記載の拡張機能障害データ値を記憶したコンピュータ可読ストレージ媒体

#### 【請求項 9 6】

コンピュータ中のプロセッサによって実装される方法であって、前記方法は：

( i ) 被験体から得た生物学的試料から決定した、 ( a ) M y B P - C のレベル、 ( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態のレベル、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルからなる群より選択されるデータ値を受け取る工程と、

40

( i i ) ( i ) の前記データ値と対応する対照データ値であって、前記対応する対照データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、 ( a ) M y B P - C 、 ( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルである、対応する対照データ値とを比較する工程と、

( i i i ) ( i ) の前記データ値が、前記対応する対照データ値よりも大きいとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供する工程と  
を含む、方法。

#### 【請求項 9 7】

50

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取る工程と、

( i i ) ( i ) の前記第 1 のデータ値と対照 A D M A データ値であって、前記対照 A D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである、対照 A D M A データ値とを比較する工程と、

( i i i ) ( i ) の前記第 2 のデータ値と対照 S D M A データ値であって、前記対照 S D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、対照 S D M A データ値とを比較する工程と  
をさらに含む、請求項 9 6 に記載の方法。

#### 【請求項 9 8】

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取る工程と、

( i i ) 前記第 2 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 (  $R_t$  ) と、対照比 (  $R_c$  ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 $R_c$  とを比較する工程と、

( i i i )  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供する工程と  
をさらに含む、請求項 9 6 または 9 7 に記載の方法。

#### 【請求項 9 9】

( i ) の前記データ値が、M y B P - C の翻訳後に修飾された形態または M y B P - C の翻訳後に修飾された断片である、請求項 9 8 に記載の方法。

#### 【請求項 1 0 0】

M y B P - C の前記翻訳後に修飾された形態が、S - グルタチオン付加された M y B P - C であるか、または M y B P - C の前記翻訳後に修飾された断片が、M y B P - C の S - グルタチオン付加された断片である、請求項 9 9 に記載の方法。

#### 【請求項 1 0 1】

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、( i ) の前記データ値を拡張機能障害データ値として割り当てる工程と、

前記拡張機能障害データ値を記憶デバイス上に記憶する工程と

をさらに含む、請求項 9 6 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 1 0 2】

プロセッサと、

前記プロセッサにカップリングしている記憶デバイスと、

前記記憶デバイス上に記憶されている機械可読命令と

を含む、システムであって、

前記機械可読命令は、前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値

10

20

30

40

50

を受け取り、

( i i ) ( i ) の前記第 1 のデータ値と対照 A D M A データ値であって、前記対照 A D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである、対照 A D M A データ値とを比較し、

( i i i ) ( i ) の前記第 2 のデータ値と対照 S D M A データ値であって、前記対照 S D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、対照 S D M A データ値とを比較し、

( i v ) ( i ) の前記第 1 のデータ値が、前記対照 A D M A データ値よりも大きいとき、および ( i ) の前記第 2 のデータ値が、前記対照 S D M A データ値と概ね同じであるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供することを引き起こす、システム。

10

#### 【請求項 1 0 3】

( i ) 前記プロセッサが、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである、複数の対照データ値を受け取り、前記複数の対照データ値の平均値を決定し、前記平均値を前記対照 A D M A データ値として割り当てることができるか、( i i ) 前記プロセッサが、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、複数の対照データ値を受け取り、前記複数の対照データ値の平均値を決定し、前記平均値を前記対照 S D M A データ値として割り当てることができる、または ( i i i ) これらの組合せを行うことができる、請求項 1 0 2 に記載のシステム。

20

#### 【請求項 1 0 4】

前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである第 3 のデータ値を受け取り、

( i i ) 前記第 3 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 (  $R_t$  ) と、対照比 (  $R_c$  ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 $R_c$  とを比較し、

30

( i i i )  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供すること

を引き起こす機械可読命令を含む、請求項 1 0 2 または 1 0 3 に記載のシステム。

#### 【請求項 1 0 5】

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、前記プロセッサが、 $R_t$  を拡張機能障害の比として割り当て、前記拡張機能障害の比を前記記憶デバイス上に記憶する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

#### 【請求項 1 0 6】

40

請求項 1 0 2 から 1 0 5 のいずれか一項に記載のシステムの機械可読命令を記憶したコンピュータ可読ストレージ媒体。

#### 【請求項 1 0 7】

コンピュータ中のプロセッサによって実装される方法であって、前記方法は：

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取る工程と、

( i i ) ( i ) の前記第 1 のデータ値と対照 A D M A データ値であって、前記対照 A D

50

M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである、対照 A D M A データ値とを比較する工程と、

( i i i ) ( i ) の前記第 2 のデータ値と対照 S D M A データ値であって、前記対照 S D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、対照 S D M A データ値とを比較する工程と、

( i v ) ( i ) の前記第 1 のデータ値が、前記対照 A D M A データ値よりも大きいとき、および ( i ) の前記第 2 のデータ値が、前記対照 S D M A データ値と概ね同じであるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供する工程とを含む、方法。

#### 【請求項 108】

( i ) 前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである第 3 のデータ値を受け取る工程と、

( i i ) 前記第 3 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 (  $R_t$  ) と、対照比 (  $R_c$  ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 $R_c$  とを比較する工程と、

( i i i )  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供する工程とをさらに含む、請求項 107 に記載の方法。

#### 【請求項 109】

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、 $R_t$  を拡張機能障害の比として割り当てる工程と、前記拡張機能障害の比を記憶デバイス上に記憶する工程とをさらに含む、請求項 108 に記載の方法。

#### 【請求項 110】

プロセッサと、

前記プロセッサにカップリングしている記憶デバイスと、

前記記憶デバイス上に記憶されている機械可読命令と

を含むシステムであって、

前記機械可読命令は、前記プロセッサによって実行されるとき、前記プロセッサが、

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取り、

( i i ) 前記第 2 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 (  $R_t$  ) と、対照比 (  $R_c$  ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 $R_c$  とを比較し、

( i i i )  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供することを引き起こす、システム。

#### 【請求項 111】

前記プロセッサが、複数の対照比を受け取ることができ、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、請求項 110 に記載のシステム。

#### 【請求項 112】

10

20

30

40

50

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、前記プロセッサが、 $R_t$ を拡張機能障害の比として割り当て、前記拡張機能障害の比を前記記憶デバイス上に記憶する、請求項 110 または 111 に記載のシステム。

【請求項 113】

請求項 110 から 112 のいずれか一項に記載のシステムの機械可読命令を記憶したコンピュータ可読ストレージ媒体。

【請求項 114】

コンピュータ中のプロセッサによって実装される方法であって、前記方法は：

(i) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値であって、前記第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) のレベルであり、前記第 2 のデータ値は、前記被験体から得た前記生物学的試料から決定した L - アルギニン (L - Arg) のレベルである、第 1 のデータ値および第 2 のデータ値を受け取る工程と、

(ii) 前記第 2 のデータ値と前記第 1 のデータ値の比 ( $R_t$ ) と、対照比 ( $R_c$ ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した ADMA のレベルの比である、 $R_c$  とを比較する工程と、

(iii)  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、前記被験体における拡張機能障害の出力診断を提供する工程とを含む、方法。

【請求項 115】

前記被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、 $R_t$ を拡張機能障害の比として割り当てる工程と、前記拡張機能障害の比を記憶デバイス上に記憶する工程とをさらに含む、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は：

a. 前記被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第 1 のレベルを決定する工程と、

b. 前記被験体に前記化合物を投与する工程と、

c. 前記化合物の投与の後に前記被験体から得た生物学的試料中で、前記ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP - C)、または前記その翻訳後に修飾された形態または前記その断片の第 2 のレベルを決定する工程と

を含み、

前記第 2 のレベルが、前記第 1 のレベル未満であるとき、前記化合物は拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる、方法。

【請求項 117】

被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法であって、前記方法は：

a. 前記化合物の投与の前に前記被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の第 1 のレベル、対称性ジメチルアルギニン (SDMA) の第 1 のレベル、および任意選択で、L - アルギニンの第 1 のレベルを決定する工程と、

b. 前記被験体に前記化合物を投与する工程と、

c. 前記化合物の投与の後に前記被験体から得た生物学的試料中で、ADMA の第 2 のレベル、SDMA の第 2 のレベル、および任意選択で、L - アルギニンの第 2 のレベルを決定する工程と

を含み、

L - アルギニンの第 1 のレベルおよび L - アルギニンの第 2 のレベルを決定する場合、

前記方法は、L - アルギニンの前記第 1 のレベルと A D M A の前記第 1 のレベルの第 1 の比、および L - アルギニンの前記第 2 のレベルと A D M A の前記第 2 のレベルの第 2 の比を決定する工程を含み、

A D M A の前記第 2 のレベルが、A D M A の前記第 1 のレベル未満であり、かつ S D M A の前記第 2 のレベルが、S D M A の前記第 1 のレベルから変化しないとき、または前記第 1 の比が、前記第 2 の比よりも大きいとき、前記化合物は拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願への相互参照

この出願は、2011年10月6日に提出された米国仮特許出願第61/544,030号；2012年4月2日に提出された米国仮特許出願第61/618,900号；2012年5月29日に提出された米国仮特許出願第61/652,734号；2012年6月12日に提出された米国仮特許出願第61/658,585号；および2012年7月30日に提出された米国仮特許出願第61/677,292号（これらの各々の出願は、その全体が参考として援用される）への優先権を主張する。

【0002】

米国政府の権利についての声明

本発明は、National Institutes of Health (NIH) National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) 助成金第2 P01 HL058000号の下、米国政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

20

【0003】

電子的に提出された材料の参考としての援用

参照によりその全体が組み込まれているのは、本明細書と併行的に提出され、下記のように同定されたコンピュータ可読ヌクレオチド/アミノ酸配列一覧である。「47002\_\_SeqListing.txt」という名称の2012年10月5日に作製された2メガバイトASCII（テキスト）ファイル。

【背景技術】

30

【0004】

現在、米国において約570万人が心不全（HF）を患っており、毎年約67万人がこの状態であると診断を受ける。HF患者の50%までが拡張期心不全を有し、米国において概ね230万人の患者集団が生じている。拡張期心不全の臨床所見は、正常な左心室（LV）拡張末期容量、正常な駆出分画、能動的弛緩の遅延、およびLVの受動的スティフネスの増加を示す<sup>1</sup>（非特許文献1）。

【0005】

HFを有する5人のうち約1人が診断から1年以内に死亡し、毎年28万人超が死亡している。拡張期心不全の処置は、収縮期心不全を患っている患者のために使用される処置と非常に異なるため、心不全を患っている患者の処置の成功は、示された心臓の機能障害のタイプによって決まる。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Zile MRら、Diastolic heart failure: definitions and terminology. Prog Cardiovasc Dis (2005); 47(5): 307~13

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

50

拡張機能障害を診断する方法は当技術分野において公知であり、例えば、ドップラー心エコー法、心臓カテーテル、磁気共鳴イメージング、組織ドップラーイメージング、ならびに左心室拡張末期圧および収縮機能の測定が含まれる。しかし、これらの方法は侵襲的で時間がかかり、高価であり得る。したがって、拡張期心不全を正確に診断する非侵襲的で対時間効果が高く、対費用効果の高い方法が当技術分野で必要とされている。

#### 【0008】

さらに、心不全を診断するための市販されている診断用薬が存在する一方、収縮機能障害と拡張機能障害とを、または収縮期心不全と拡張期心不全とを区別する試験は存在しない。したがって、収縮機能障害と拡張機能障害とを、または収縮期心不全と拡張期心不全とを区別する非侵襲的で対時間効果が高く、対費用効果の高い方法が当技術分野で必要とされている。

10

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本明細書において提供するものは、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法、心不全を患っている被験体において拡張機能障害と収縮機能障害とを区別する方法、被験体において心不全を拡張期心不全または収縮期心不全として特徴付ける方法、拡張機能障害または拡張期心不全の処置についての被験体の必要性を決定する方法、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法、拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法、拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法、ならびに他の関連する方法である。

20

#### 【0010】

例示的な実施形態において、方法のそれぞれは、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体は、拡張機能障害もしくは拡張期心不全と診断され、または拡張期心不全もしくは拡張機能障害の処置が必要であると決定される。これらの方法の例示的な態様において、生物学的試料のMyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルが、対照と比べて増大するとき、方法は、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程をさらに含む。

30

#### 【0011】

代わりのまたはさらなる実施形態において、方法のそれぞれは、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) のレベル、ならびに対称性ジメチルアルギニン (SDMA) および / または L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、生物学的試料中の L - アルギニンのレベルと生物学的試料中の ADMA のレベルの比を決定する工程を含む。ADMA のレベルが、ADMA の対照レベルと比べて増大し、かつ SDMA のレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンと ADMA の比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体は、拡張機能障害もしくは拡張期心不全と診断され、または拡張期心不全もしくは拡張機能障害の処置が必要であると決定される。

40

#### 【0012】

本発明はまた、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法を提供する。方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程と、被験体から得た生物学的試料中で、B型ナトリウム利尿タンパク質 (BNP) のレベルを決定する工程とを含む。

#### 【0013】

本発明は、被験体を処置する方法をさらに提供する。例示的な実施形態において、被験

50

体は心不全を患っており、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程と、生物学的試料のMyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルが、対照と比べて増大するとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。他の例示的な実施形態において、被験体は、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルについてアッセイを受けており、方法は、被験体が増加したレベルのMyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片を有すると決定されたとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程を含む。

10

#### 【0014】

発明性のある処置方法の代わりにまたはさらなる実施形態において、被験体は心不全を患っており、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ADMAのレベル、ならびにSDMAおよび/またはL-アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、生物学的試料のADMAのレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ生物学的試料のSDMAのレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または生物学的試料のL-アルギニンのレベルと生物学的試料のADMAのレベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。発明性のある処置方法の他のさらなるまたは例示的な実施形態において、被験体は、ADMAのレベル、ならびにSDMAおよび/またはL-アルギニンのいずれかまたは両方のレベルについてアッセイを受けており、方法は、生物学的試料のADMAのレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ生物学的試料のSDMAのレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または生物学的試料のL-アルギニンのレベルと生物学的試料のADMAのレベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程を含む。

20

#### 【0015】

発明性のある方法において有用な単離された結合剤をまた本明細書において提供する。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cに特異的に結合する。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-C内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数を含む。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-CのCys残基に特異的に結合し、Cys残基は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719である。

30

40

#### 【0016】

被験体において拡張期心不全または拡張機能障害を診断するためのキットをまた本明細書において提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】シャムおよびDOCA-塩の心臓からの筋フィラメントの翻訳後修飾における比較。A：シャムおよびDOCA-塩で処置された心臓からの筋フィラメント試料を比較するときの、グルタチオン付加されたタンパク質の検出を示すウエスタンブロット分析。ブロットをまた、ミオシン結合タンパク質Cについて分析したが、このタンパク質が主要な

50

修飾であったことを示した。一対の比較が、ゲルから除去されたことを留意されたい。B : シャムおよび D O C A - 塩筋フィラメントにおけるミオシン結合タンパク質 C ( M y B P - C ) に対して正規化したグルタチオン付加されたタンパク質 ( G S H ) の間の差異の定量化。 ( \* p < 0 . 0 5 、 n = 3 ) 。

【図 2】M y B P - C のグルタチオン付加レベル。( A ) 代表的な抗グルタチオンゲル。( B ) 代表的なボンソー像。( C ) 総レーンに対して正規化した M y B P - C のグルタチオン付加レベル。バンドのデンストメトリーデータは、平均 ± S E M として表した。群毎に N = 8 匹のマウス。データを、二元配置 A N O V A 、それに続くスチューデント t 検定によって、J M P 統計ソフトウェアを使用して統計的に分析した。\* P < 0 . 0 5 。

【図 3 - 1】図 3 A ~ 3 F。M y B P - C のグルタチオン付加、拡張機能障害、および張力損失の間の関係。( A ~ B ) 心エコーパラメーター、E / E ' 比は、正規化した M y B P - C のグルタチオン付加レベルと正相関した。( C ~ D ) 心エコーパラメーター、E ' / A ' 比は、正規化した M y B P - C のグルタチオン付加レベルと逆相関した。張力損失に対する正規化した M y B P - C のグルタチオン付加レベル ( E ) 、および張力損失に対する心エコーの E / E ' ( F ) は、逆相関した。群毎に N = 7 ~ 8 匹のマウス。\* は、線形回帰を示す ( \* \* P < 0 . 0 1 ) 。

【図 3 - 2】図 3 G ~ 3 M。B H 4 で処置された、または処置されていない W T および D O C A - 塩マウスにおける胸部心エコーパラメーター。( G ) 駆出分画 ( % 、 E F ) および ( H ) 短縮率 ( % 、 F S ) は、短軸 M モード像で決定した。( I ) 僧帽弁流入パルス波ドプラ比 ( E / A ) 、( J ) 僧帽弁組織ドプラ比、E ' / A ' 、( K ) E / E ' 、( L & M ) パルス波 ( L ) および T D I ( M ) の心尖部四腔断層像からの代表的像。データは、平均 ± S E M として表した。群毎に N = 7 ~ 9 匹。\* は、スチューデント t 検定によって比較した示された群を示す ( \* P < 0 . 0 5 ' 、 \* \* P < 0 . 0 1 ' 、 \* \* \* P < 0 . 0 0 1 、 n s 、有意差なし) 。

【図 3 - 3】図 3 G ~ 3 M。B H 4 で処置された、または処置されていない W T および D O C A - 塩マウスにおける胸部心エコーパラメーター。( G ) 駆出分画 ( % 、 E F ) および ( H ) 短縮率 ( % 、 F S ) は、短軸 M モード像で決定した。( I ) 僧帽弁流入パルス波ドプラ比 ( E / A ) 、( J ) 僧帽弁組織ドプラ比、E ' / A ' 、( K ) E / E ' 、( L & M ) パルス波 ( L ) および T D I ( M ) の心尖部四腔断層像からの代表的像。データは、平均 ± S E M として表した。群毎に N = 7 ~ 9 匹。\* は、スチューデント t 検定によって比較した示された群を示す ( \* P < 0 . 0 5 ' 、 \* \* P < 0 . 0 1 ' 、 \* \* \* P < 0 . 0 0 1 、 n s 、有意差なし) 。

【図 4】図 4 は、D D についてのバイオマーカーとして血清 M y B P - C アイソフォームおよび断片を示す像のコレクションを表す。( 上 ) ウエスタンブロッティングは心臓の M y B P - C A b を検出した。( 下 ) デンストメトリーの結果。データは、平均 ± S E M を表す。N = 3 ~ 4。シャムに対して P < 0 . 0 5 、スチューデント t 検定

【図 5】図 5 ( 左のパネル ) は、D O C A - 塩マウスまたはシャム対照マウスから得た血漿試料からのグルタチオン免疫沈降物の M y B P - C のウエスタンブロットである。図 5 ( 右のパネル ) は、左のパネルのウエスタンブロットにおけるバンドの定量化のグラフである。データは、平均 ± S E M として表す。対応のないスチューデント t 検定において P < 0 . 0 5 。

【図 6】図 6 ( 左上のパネル ) は、対照患者または保全された駆出分画を伴う心不全患者 ( H F p E F ; 拡張期心不全 ) から得た血漿試料の 7 5 k D a のバンドの M y B P - C のウエスタンブロットであり、( 左下のパネル ) は、左上のパネルのウエスタンブロットにおけるバンドの定量化のグラフである。

【図 7】図 7 A および 7 B : ミオシン結合タンパク質 - C の S - グルタチオン付加の変化を示す代表的なゲル ( A ) 、ラノラジンの慢性投与の後、または投与なしの D O C A - 塩またはシャムマウスからの心臓におけるミオシン結合タンパク質 C ( M y B P - C ) の S - グルタチオン付加の比較 ( B ) 。値は 5 回の決定についての平均 ± S E M として示す。

【図 8】図 8 A : シャムおよび D O C A - 塩心臓からの筋フィラメントのリン酸化の代表

10

20

30

40

50

的な比較。A：シャムおよびDOCA - 塩心臓からの線維束におけるミオシン結合タンパク質C (MyBP - C) のリン酸化の比較。有意差は存在しなかった。値は6～9回の決定についての平均±SEMとして示す。図8B：ProQによって評価した、筋フィラメントにおけるMyBP - Cのリン酸化レベル。

【図9】図9A～9D：対照群と比較した、拡張機能障害(DD)および収縮機能障害(SD)の患者からのヒト血漿ADMAレベル。図9A、ADMA；図9B、SDMS；図9C、アルギニン；および図9D、アルギニン/ADMA比。データは平均±SEMとして表した。各群における対応のないスチューデントt検定で定義した有意性。( \* P < 0.05、\* \* P < 0.01)。

【図10】図10A～10D：急性および慢性HF患者群からのADMA(図10A)、SDMA(図10B)、L - アルギニン(図10C)、および[L - アルギニン/ADMA]の比(図10D)のヒト血漿レベル。

【図11】図11A：ADMAのヒト血漿レベルと患者のBMIとの間の相関のグラフ(勾配 = 24.27 ± 7.84、 $R^2 = 0.205$ 、 $P = 0.0038$ )。図11B：BMIとL - アルギニン/ADMAの比との間の相関のグラフ(勾配 = - 2.38 ± 1.16、 $R^2 = 0.099$ 、 $P = 0.048$ )。

【図12】図12は、埋め込まれた心臓除細動器(ICD)についての被験体の必要性を評価するための、システム100の例示的な実施形態101の略図である。

【図13】図13(上のパネル)は、対照患者、拡張機能障害患者、および収縮機能障害患者から得た血漿のMyBP - Cのウエスタンブロットである。ウエスタンブロットのデータを、下のパネルのグラフにおいて定量化およびプロットした。MyBP - Cの75 kDaの断片(左下のパネル)およびMyBP - Cの総血漿レベル(右下のパネル)。

【図14】図14(上のパネル)は、対照患者、拡張機能障害患者、および収縮機能障害患者から得た血漿からのS - グルタチオン免疫沈降物のMyBP - Cのウエスタンブロットである(75 kDaのMWを示す)。ウエスタンブロットのデータを、下のグラフにおいて定量化およびプロットした。

【図15】DDおよびSD患者のヒト血漿からのS - グルタチオン付加されたMyBP - C断片(75 kD)の比、およびMyBP - C(75 kD)のタンパク質量。S - グルタチオン付加およびMyBP - Cの免疫沈降データを、MyBP - C(75 kD)を検出する免疫プロット法データで正規化した。データは、平均±SEMとして表した。N = 8～22。ボンフェローニの事後検定と共に一元配置ANOVAは、有意性を定義した。( \* P < 0.05)。

【図16】図16である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

心不全

心不全(HF)は、心臓が体の残りに十分な血液をもはやポンピングすることができない状態である。いくつかの実施形態において、心不全の徴候および症状には、呼吸困難(例えば、起座呼吸、発作性夜間呼吸困難)、咳嗽、心臓性喘息、喘鳴、浮動性めまい、混乱、安静時に冷たい四肢、慢性静脈性うっ血、くるぶし腫脹、末梢浮腫もしくは全身浮腫、夜間多尿、腹水、肝腫大(heptomegaly)、黄疸、凝固障害、疲労、運動不耐性、頸静脈拡張、肺ラ音、末梢浮腫、肺血管の再分布、間質浮腫、胸水、またはこれらの組合せが含まれる。いくつかの実施形態において、心不全の徴候および症状には、呼吸困難(例えば、起座呼吸、発作性夜間呼吸困難)、疲労、運動不耐性、頸静脈拡張、肺ラ音、末梢浮腫、肺血管の再分布、間質浮腫、胸水、またはこれらの組合せが含まれる。いくつかの実施形態において、心不全の症状は、下記の表において一覧表示した症状の1つである(これはニューヨーク心臓協会(NYHA)による心不全の分類についての基礎を提供する)。

【0019】

10

20

30

40

【表 1 - 1】

| NYHA<br>クラス | 症状                                                                   |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|
| I           | 歩く、階段を登るなどのとき、症状はなく、通常の身体活動の制限、例えば、息切れはない。                           |
| II          | 通常の活動の間に、軽度の症状(軽度の息切れおよび/または狭心症)、ならびに僅かな制限。                          |
| III         | 通常の活動に満たない活動、例えば、短距離を歩くこと(20~100m)の間でさえ症状によって活動における顕著な制限。安静時のみ苦痛がない。 |
| IV          | 重度の制限。安静時においてさえも症状を経験する。大部分が寝たきりの患者。                                 |

10

## 【0020】

心不全の徴候および/または症状を示す患者は、収縮機能障害、拡張機能障害、または2つの組合せを患っていてもよい。拡張期心不全の処置は、収縮期心不全、例えば、拡張機能障害の非存在下での収縮期心不全を患っている患者について使用される処置と非常に異なるため、心不全を患っている患者の処置の成功は、示される心臓の機能障害のタイプによって決まる。

## 【0021】

20

## 拡張機能障害

本明細書において使用する場合、「拡張機能障害」という用語は、機械的機能における異常が拡張期の間に示される状態を指す。拡張機能障害は心不全の存在下または非存在下で起こることがあり、収縮機能の異常を伴って、または伴わずに共存することができる(Zileら、JACC、41巻:1519~1522頁(2003年))。収縮機能障害の非存在下での拡張機能障害は、「保全された駆出分画を伴う拡張機能障害」と称してもよい。本明細書において使用する場合、「保全された駆出分画」という用語は、約45%以上、例えば、約50%以上である左室駆出分画を指す。いくつかの態様において、保全された駆出分画は、約50%以上であるものである。いくつかの実施形態において、拡張機能障害は、拡張早期機能障害である。本明細書において使用する場合、「拡張早期機能障害」という用語は、早期充満の拡張期における僧帽弁を通る血液のピーク速度(E波)と、心房収縮の間の僧帽弁を通る血液のピーク速度(A波)との比(E/A比)1、ならびに通常のパルス波ドブラ法によって記録される早期ピーク(E')および後期ピーク(A')僧帽弁輪速度(また1)によって証明される心室充満が損なわれた医学的状态を指す(Vasanら、J Am Coll Cardiol、26巻:1565~1574頁(1995年);Xieら、J Am Coll Cardiol、24巻:132~139頁(1994年);Mollerら、J Am Coll Cardiol、35巻:363~370頁(2000年))。

30

## 【0022】

拡張期心不全(DHF)は、拡張機能障害によってもたらされる、または拡張機能障害と連結する心不全を指す。DHFは、拡張機能障害の臨床所見である。

40

## 【0023】

## 収縮機能障害

簡単に言えば、収縮機能障害は、心臓のポンプ機能または収縮(すなわち、収縮期)が機能しなくなる状態である。収縮機能障害は、駆出分画の減少または低減、例えば、45%未満である駆出分画、ならびに心室拡張末期圧および容量の増加によって特徴付けてもよい。いくつかの態様において、心室収縮の強度が弱まり、適当な一回拍出量を生じさせるのには不十分であり、より少ない心拍出量がもたらされる。収縮機能障害は、拡張機能障害の存在下または非存在下で起こり得る。

## 【0024】

50

収縮期心不全（SHF）は、収縮機能障害によってもたらされる、または収縮機能障害と連結する心不全を指す。

【0025】

ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）に関する方法

本発明は、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、拡張機能障害または拡張期心不全を診断する工程をさらに含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS - グルタチオン付加された断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-Cの75 kDaの断片のレベルを決定する工程を含む。

10

【0026】

例示的な態様において、発明性のある方法は、被験体において拡張機能障害を診断する方法であり、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。この発明性のある方法の例示的な態様において、方法は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、拡張機能障害を診断する工程をさらに含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS - グルタチオン付加された断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-Cの75 kDaの断片のレベルを決定する工程を含む。

20

【0027】

代わりの例示的な態様において、発明性のある方法は、被験体において拡張期心不全を診断する方法であり、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。この発明性のある方法の例示的な態様において、方法は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、拡張期心不全を診断する工程をさらに含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS - グルタチオン付加された断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-Cの75 kDaの断片のレベルを決定する工程を含む。

30

【0028】

本発明はまた、心不全を患っている被験体において拡張機能障害と収縮機能障害とを区別する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、拡張機能障害を収縮機能障害から区別し、方法は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、拡張機能障害を患っている被験体として被験体を同定する。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたMyBP-Cの75 kDaの断片のレベルを決定する工程を含む。

40

【0029】

本発明は、被験体において心不全を拡張期心不全または収縮期心不全として特徴付ける方法をさらに提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C（MyBP-C）、またはその翻訳後に修飾された

50

形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体において心不全を拡張期心不全として特徴付ける工程を含む。例示的な態様において、方法は、M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、心不全を患っていない被験体からのレベルと比べて増大し、かつ拡張期心不全を患っている被験体からのレベルと比べて減少しているとき、被験体において心不全を収縮期心不全と特徴付ける工程を含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたM y B P - CまたはM y B P - CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - Cの75 k D aの断片のレベルを決定する工程を含む。

10

#### 【0030】

本発明はさらに、拡張機能障害または拡張期心不全の処置についての被験体の必要性を決定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (M y B P - C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体は、拡張期心不全についての処置が必要であると決定される。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたM y B P - CまたはM y B P - CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - Cの75 k D aの断片のレベルを決定する工程を含む。

20

#### 【0031】

本発明はさらに、拡張機能障害の処置についての被験体の必要性を決定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (M y B P - C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体は、拡張機能障害のための処置が必要であると決定される。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたM y B P - CまたはM y B P - CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - Cの75 k D aの断片のレベルを決定する工程を含む。

30

#### 【0032】

本発明はその上、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (M y B P - C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含む。M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体は、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者として同定される。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたM y B P - CまたはM y B P - CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - Cの75 k D aの断片のレベルを決定する工程を含む。

40

#### 【0033】

本発明はさらに、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、(i) 被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (M y B P - C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程と、(ii) M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加されたM y B P - CまたはM y B P - CのS - グルタチオン付加された断片、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - Cの75 k D aの断片のレベルを決定する工程を含む。

50

## 【 0 0 3 4 】

本発明は、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(a)被験体から得た生物学的試料中で第1の時点において、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)被験体から得た生物学的試料中で第1の時点の後に起こる第2の時点において、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、第2のレベルが第1のレベル未満であるとき、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクは減少する。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片である。

10

## 【 0 0 3 5 】

本発明はさらに、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(a)化合物の投与の前に被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)化合物の投与の後に被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、第2のレベルが第1のレベル未満であるとき、化合物は拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片である。

20

## 【 0 0 3 6 】

本発明はまた、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(a)処置前の被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第1のレベルを決定する工程と、(b)処置後の被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態またはその断片の第2のレベルを決定する工程とを含み、第2のレベルが第1のレベル未満であるとき、処置は、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置するのに有効である。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片である。

30

## 【 0 0 3 7 】

本発明はその上、心不全を患っている被験体を処置する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、(a)被験体から得た生物学的試料中で、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルを決定する工程と、(b)MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片である。

40

## 【 0 0 3 8 】

本発明はまた、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルについてアッセイを受けた被験体を処置する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾さ

50

れた形態もしくは断片のレベルが、対照レベルと比べて増大しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程を含む。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cの75 kDaの断片である。

#### 【0039】

発明性のある処置の方法に関して、当技術分野において公知の拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための適切な治療剤（これらのいくつかは本明細書に記載されている）を使用し得る。拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤と表題を付けられているサブセクションを参照されたい。例示的な態様において、治療は、BH<sub>4</sub>またはラノジンである。

10

#### 【0040】

本明細書において使用する場合、「ミオシン結合タンパク質-C」または「MyBP-C」という用語は、脊椎動物心臓の太いフィラメントと関連する心臓型ミオシン結合タンパク質（cMyBP-C）を指し、心筋においてもっぱら発現している。cMyBP-Cは、骨格筋においてもっぱら発現している速骨格MyBP-Cおよび遅骨格MyBP-Cと異なる。心臓のサルコメアにおいて、cMyBP-Cは、Aバンドの内側の3分の2内、すなわち、Cゾーン中に局在化している。cMyBP-Cは、タンパク質の細胞内免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーに属する。他のサルコメアタンパク質、例えば、タイチン、ミオシン、およびM-タンパク質と同様に、cMyBP-Cは、Igおよびフィブ्रोネクチン3型の繰返しドメインからなる。（BarefieldおよびSadayappan、J Molec Cell Cardiol、48巻：866～875頁（2010年））。参照配列NP\_000247.2として国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）ウェブサイトから公的に入手可能であり、また本明細書において配列番号21として記載するヒトcMyBP-Cの完全長アミノ酸配列は、概ね140 kDaまたは144 kDaの分子量を有する1274個のアミノ酸のタンパク質をコードする。

20

#### 【0041】

特定の条件下で、cMyBP-Cは、翻訳後修飾、例えば、リン酸化、S-グルタチオン付加を受ける。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、ストレス、例えば、酸化ストレスの条件下で起こる。例示的な態様において、MyBP-Cは、タンパク質、例えば、配列番号21の最初の720個のアミノ酸のN末端ポーション内の1つまたは複数のCys残基においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys475において起こる。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys623において起こる。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys651において起こる。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys475およびCys623において、またはCys475およびCys651において起こる。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys623およびCys651において起こる。例示的な態様において、cMyBP-CのS-グルタチオン付加は、Cys475、Cys623、およびCys651において起こる。

30

40

#### 【0042】

特定の条件下で、cMyBP-Cは分解し、または種々のサイズの断片に切断される。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、ストレス、例えば、酸化ストレスの条件下で、cMyBP-Cは分解し、または断片に切断され、断片は細胞（例えば、心臓細胞）から血漿中に分泌される。cMyBP-C断片は、例示的な態様において、約70 kD

50

a ~ 約 80 kDa の分子量を有する。c MyBP-C 断片は、例示的な態様において、約 75 kDa または約 79 kDa の分子量を有する。他の例示的な態様において、c MyBP-C 断片は、約 40 kDa の分子量を有する。他の例示的な態様において、c MyBP-C 断片は、約 25 kDa の分子量を有する。他の例示的な態様において、c MyBP-C 断片は、約 15 ~ 20 kDa の分子量を有する。例示的な態様において、上記の MyBP-C 断片の任意の 1 つは、S - グルタチオン付加されている。

#### 【0043】

発明性のある方法の目的のために、方法が、ミオシン結合タンパク質 - C (MyBP-C)、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定する工程を含むとき、方法は、例示的な態様において、完全長またはインタクトな MyBP-C のレベルを決定する工程を含み、または約 140 kDa または 144 kDa の分子量を有する MyBP-C を決定する工程を含む。代わりにまたはさらに、方法は、例示的な態様において、MyBP-C の翻訳後に修飾された形態または MyBP-C 断片の翻訳後に修飾された形態を決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、S - グルタチオン付加された MyBP-C または MyBP-C の S - グルタチオン付加された断片のレベルを決定する工程を含む。代替のまたはさらなる態様において、方法は、これらに限定されないが、約 75 kDa または 79 kDa の分子量を有する MyBP-C 断片、約 40 kDa の分子量を有する MyBP-C 断片、約 25 kDa の分子量を有する MyBP-C 断片、約 15 ~ 20 kDa の分子量を有する MyBP-C 断片、またはこれらの組合せを含めた MyBP-C 断片のレベルを決定する工程を含む。代替のまたはさらなる態様において、方法は、S - グルタチオン付加された MyBP-C 断片のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、(a) 完全長もしくはインタクトな MyBP-C、または約 140 kDa もしくは 144 kDa の分子量を有する MyBP-C のレベル、(b) MyBP-C の翻訳後に修飾された形態、例えば、S - グルタチオン付加された MyBP-C のレベル、(c) MyBP-C 断片のレベル (任意選択で、断片は、S - グルタチオン付加されている)、あるいは (d) これらの組合せを決定する工程を含む。

#### 【0044】

例示的な態様において、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルは、絶対レベルである。代替の態様において、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルは、正規化されたまたは相対的レベルである。例示的な態様において、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルは、対照試料の MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルに対するものであり、対照試料は、拡張機能障害または拡張期心不全を有さないことが既知である被験体から得る。例示的な態様において、対照試料の MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを 1 に設定し、被験体 (試験試料、未知試料、非対照試料) のレベルを、対照試料と比べて表す。相対的レベルが 1 超であるとき、例えば、相対的レベルが 1 + 1 標準偏差超であるとき、このような態様において、増加したレベルが決定される。

#### 【0045】

例示的な態様において、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを、別のタンパク質、例えば、ハウスキーピング遺伝子の遺伝子産物に対して正規化する。代替の例示的な態様において、MyBP-C のレベルは、MyBP-C の 1 つまたは複数の断片のレベルに対して正規化した MyBP-C のレベルである。例示的な態様において、MyBP-C のレベルは、[ 144 kDa の MyBP-C の濃度 ] : [ MyBP-C 断片の合計濃度 ] の比である。例示的な態様において、MyBP-C のレベルまたは MyBP-C 断片のレベルは、試料中の MyBP-C の総レベルに対して正規化する。本明細書において使用する場合、「MyBP-C の総レベル」という用語は、翻訳後に修飾された完全長 MyBP-C のレベル、修飾されていない完全長 MyBP-C のレベル、全ての翻訳後に修飾された MyBP-C 断片の合計レベル、および全ての修飾されていない MyBP-C 断片の合計レベルの合計を指す。例示的な態様において、My

B P - C の翻訳後に修飾された形態のレベルは、翻訳後修飾を含まない M y B P - C のレベルに対して正規化した翻訳後修飾を含む M y B P - C のレベルであるか、または M y B P - C の総レベルに対して正規化した翻訳後修飾を含む M y B P - C のレベルである。さらに他の例示的な態様において、本発明の方法において決定するレベルは、S - グルタチオン付加された M y B P - C の 7 5 k D a の断片のレベルと、インタクトな S - グルタチオン付加された M y B P - C タンパク質および S - グルタチオン付加された M y B P - C 断片の総レベルの比である。

#### 【 0 0 4 6 】

##### ジメチルアルギニンに関する方法

本発明は、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を診断する方法を提供し、例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベル、ならびに ( a ) 対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) および / または ( b ) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、拡張機能障害または拡張期心不全を診断する工程をさらに含む。特定の態様において、A D M A のレベルが、0 . 6 5  $\mu$  M 超または約 0 . 6 5  $\mu$  M であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、1 7 0 未満であるとき、拡張機能障害または拡張期心不全が診断される。

10

20

#### 【 0 0 4 7 】

例示的な態様において、発明性のある方法は、被験体において拡張機能障害を診断する方法であり、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベル、ならびに ( a ) 対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) および / または ( b ) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、拡張機能障害を診断する工程をさらに含む。特定の態様において、A D M A のレベルが、0 . 6 5  $\mu$  M 超または約 0 . 6 5  $\mu$  M であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、1 7 0 未満であるとき、拡張機能障害が診断される。

30

#### 【 0 0 4 8 】

代わりの例示的な態様において、発明性のある方法は、被験体において拡張期心不全を診断する方法であり、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベル、ならびに ( a ) 対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) および / または ( b ) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、拡張期心不全を診断する工程をさらに含む。特定の態様において、A D M A のレベルが、0 . 6 5  $\mu$  M 超または約 0 . 6 5  $\mu$  M であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、1 7 0 未満であるとき、拡張期心不全が診断される。

40

#### 【 0 0 4 9 】

本発明はまた、心不全を患っている被験体において拡張機能障害と収縮機能障害とを区別する方法を提供し、例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベル、ならびに ( a ) 対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) および / または ( b ) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、拡張機能障害を収縮機能障害から区別し、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M

50

A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、拡張機能障害を患っている被験体として被験体を同定する。特定の態様において、被験体は、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、拡張機能障害を患っていると同定される。

【0050】

本発明はさらに、被験体において心不全を拡張期心不全または収縮期心不全として特徴付ける方法を提供し、例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体において心不全を拡張期心不全として特徴付ける工程を含む。例示的な態様において、方法は、L - アルギニンのレベルと A D M A のレベルの比が、心不全を患っていない被験体からのレベルと比べて低減しないとき、被験体において心不全を収縮期心不全と特徴付ける工程を含む。特定の態様において、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、心不全は、拡張期心不全と特徴付けられる。

10

20

【0051】

本発明はさらに、拡張期心不全の処置について被験体の必要性を決定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体は、拡張期心不全についての処置を必要とすると決定される。特定の態様において、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、被験体は、拡張期心不全についての処置を必要とすると決定される。

30

【0052】

本発明はさらに、拡張機能障害の処置についての被験体の必要性を決定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程を含む。A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体は、拡張機能障害のための処置を必要とすると決定される。特定の態様において、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、被験体は、拡張機能障害のための処置を必要とすると決定される。

40

【0053】

本発明はその上、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者を同定する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを

50

決定する工程を含む。A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、被験体は、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者として同定される。代わりに、L - アルギニンのレベルと A D M A のレベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体は、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがある患者として同定される。特定の態様において、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、患者は、拡張機能障害または拡張期心不全のリスクがあると決定される。

#### 【0054】

本発明はさらに、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクを低減させる方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、(i) 被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、(ii) A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンのレベルと A D M A のレベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。特定の態様において、A D M A のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を被験体に投与する。

#### 【0055】

本発明は、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクをモニターする方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(i) 被験体から得た生物学的試料中で第1の時点において、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) の第1のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第1のレベルを決定する工程と、(ii) 被験体から得た生物学的試料中で第1の時点の後に起こる第2の時点において、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) の第2のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第2のレベルを決定する工程とを含み、A D M A の第2のレベルが、A D M A の第1のレベル超であり、かつ S D M A の第2のレベルが、第1のレベルと比べて実質的に変化しないとき、または L - アルギニンの第2のレベルと A D M A の第2のレベルの比が、L - アルギニンの第1のレベルと A D M A の第1のレベルの比未満であるとき、拡張機能障害または拡張期心不全についての被験体のリスクが増加する。

#### 【0056】

本発明はさらに、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置する能力について化合物をスクリーニングする方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(i) 化合物の投与の前に被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) の第1のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第1のレベルを決定する工程と、(ii) 化合物の投与の後に被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン (A D M A) の第2のレベル、ならびに (a) 対称性ジメチルアルギニン (S D M A) および / または (b) L - アルギニンのいずれかまたは両方の第2のレベルを決定する工程とを含み、化合物は、A D M A の第2のレベルが、A D M A の第1のレベル未満であり、かつ S D M A の第2のレベルが、S D M A の第1のレベルから実質的に変化しないとき、または L - アルギニンの第2のレベルと A D M A の第2のレベルの比が、L - アルギニンの第1のレベルと A D M A の第1のレベルの比よりも大きいとき、拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる。特定の態様において、A D M A の第1のレベルが、 $0.65 \mu\text{M}$  超または約  $0.65 \mu\text{M}$  であり、かつ A D M A の第2のレベルが、0

・ 65  $\mu$ M未満であり、かつSDMAの第2のレベルが、第1のレベルと比べて実質的に変化しないとき、化合物は、拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる。特定の態様において、L-アルギニンとADMAの、L-アルギニンの第2のレベルとADMAの第2のレベルの比が、170未満であり、かつL-アルギニンの第1のレベルとADMAの第1のレベルの比が、170超であるとき、化合物は、拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる。

【0057】

本発明はまた、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の処置の有効性を決定する方法を提供する。例示的な態様において、方法は、(i)処置前の被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)の第1のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(SDMA)および/または(b)L-アルギニンのいずれかまたは両方の第1のレベルを決定する工程と、(ii)処置後の被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)の第2のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(SDMA)および/または(b)L-アルギニンのいずれかまたは両方の第2のレベルを決定する工程とを含み、処置は、ADMAの第2のレベルが、ADMAの第1のレベル未満であり、かつSDMAの第2のレベルが、SDMAの第1のレベルから実質的に変化しないとき、またはL-アルギニンの第2のレベルとADMAの第2のレベルの比が、L-アルギニンの第1のレベルとADMAの第1のレベルの比よりも大きいとき、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置するのに有効である。特定の態様において、ADMAの第1のレベルが、0.65  $\mu$ M超または約0.65  $\mu$ Mであり、かつADMAの第2のレベルが、0.65  $\mu$ M未満であり、かつSDMAの第2のレベルが、第1のレベルと比べて実質的に変化しないとき、化合物は、拡張機能障害または拡張期心不全を処置することができる。特定の態様において、ADMAの第1のレベルが、0.65  $\mu$ M超または約0.65  $\mu$ Mであり、かつADMAの第2のレベルが、0.65  $\mu$ M未満であり、かつSDMAの第2のレベルが、第1のレベルと比べて実質的に変化しないとき、処置は被験体において拡張機能障害または拡張期心不全を処置するのに有効である。特定の態様において、L-アルギニンとADMAの、L-アルギニンの第2のレベルとADMAの第2のレベルの比が、170未満であり、かつL-アルギニンの第1のレベルとADMAの第1のレベルの比が、170超であるとき、処置は有効である。

【0058】

本発明はその上、心不全を患っている被験体を処置する方法を提供し、例示的な実施形態において、方法は、(a)被験体から得た生物学的試料中で、非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(SDMA)および/または(b)L-アルギニンのいずれかまたは両方のレベルを決定する工程と、(b)ADMAのレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつSDMAのレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、またはL-アルギニンとADMAの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程とを含む。特定の態様において、ADMAのレベルが、0.65  $\mu$ M超であり、かつSDMAのレベルが、対照と比べて実質的に変化しないとき、またはL-アルギニンとADMAの比が、170未満であるとき、治療剤を被験体に投与する。

【0059】

本発明はまた、非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベル、ならびに(a)対称性ジメチルアルギニン(SDMA)および/または(b)L-アルギニンのいずれかまたは両方のレベルについてアッセイを受けた被験体を処置する方法を提供する。例示的な実施形態において、方法は、ADMAのレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつSDMAのレベルが、対照レベルと比べて実質的に変化しないとき、またはL-アルギニンとADMAの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤を投与する工程を含む。特定の態様において、ADMAのレベルが、0.65  $\mu$ M超であり、かつSDMAのレベルが、対照と比べて実質的に変化し

ないとき、または L - アルギニンと A D M A の比が、170 未満であるとき、治療剤を被験体に投与する。

【0060】

発明性のある処置の方法に関して、当技術分野において公知の拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための適切な治療剤（これらのいくつかは本明細書に記載されている）を使用し得る。拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤と表題を付けられているサブセクションを参照されたい。例示的な態様において、治療は、B H<sub>4</sub> またはラノジンである。

【0061】

本明細書において使用する場合、「非対称性ジメチルアルギニン」または「A D M A」という用語は、2 - アミノ - 5 - [ ( アミノ - ジメチルアミノメチレン ) アミノ ] ペンタン酸を指す。A D M A は、一酸化窒素の産生において L - アルギニンに干渉する血漿に見出される天然の化学物質である。本明細書において使用する場合、「対称性ジメチルアルギニン」または「S D M A」という用語は、( 2 S ) - 2 - アミノ - 5 - [ ( N , N' - ジメチルカルバムイミドイル ) アミノ ] ペンタン酸を指す。S D M A は内因的に産生され、一酸化窒素シンターゼを阻害する。本明細書において使用する場合、「L - アルギニン」または「L - A r g」は、化学名 2 - アミノ - 5 - グアニジノペンタン酸を有する必須アミノ酸を指す。

10

【0062】

本明細書において使用する場合、「実質的に変化しない」という用語は、生物学的試料の S D M A のレベルが、対照レベルまたはコンパレーターレベルの S D M A のレベルと統計的に異なることを意味する。例示的な態様において、S D M A のレベルは、1 標準偏差 ± 対照レベルまたはコンパレーターレベル以内である。例示的な態様において、S D M A のレベルは、10 % 以下 ± 対照レベルまたはコンパレーターレベル以内である。例えば、対照レベルまたはコンパレーターレベルが 10 である場合、対照レベルまたはコンパレーターレベルから実質的に未変化である S D M A のレベルは、約 9 および約 11 内のレベルである。

20

【0063】

例示的な態様において、A D M A、S D M A、および / または L - A r g のレベルは、絶対レベルである。代わりの態様において、A D M A、S D M A、および / または L - A r g のレベルは、正規化されたまたは相対的レベルである。例示的な態様において、A D M A、S D M A、および / または L - A r g のレベルは、対照試料の A D M A、S D M A、および / または L - A r g のレベルに対するものであり、対照試料は、拡張機能障害または拡張期心不全を有さないことが既知である被験体から得る。例示的な態様において、対照試料の A D M A、S D M A、および / または L - A r g のレベルを 1 に設定し、被験体（試験試料、未知試料、非対照試料）のレベルを、対照試料と比べて表す。相対的レベルが 1 超であるとき、例えば、相対的レベルが 1 + 1 標準偏差超であるとき、このような態様において、増加したレベルが決定される。

30

【0064】

分析物のレベル

40

発明性のある方法に関して、M y B P - C、M y B P - C の翻訳後に修飾された形態、M y B P - C の断片、A D M A、S D M A、および / または L - アルギニン（本明細書において「分析物」と集合的に称する）のレベル（複数可）は、当技術分野において公知の任意の適切な手段によって、生物学的試料中で決定し得る。

【0065】

例示的な態様において、分析物のレベルを、生物学的試料からのレベルを測定することによって決定する。タンパク質のレベルを決定する適切な方法は当技術分野において公知であり、免疫測定（例えば、ウエスタンブロッティング、酵素連結免疫吸着アッセイ（E L I S A）、放射免疫測定（R I A）、および免疫組織化学アッセイ）を含む。

【0066】

50

例えば、分析物のレベル（複数可）は、これらに限定されないが、免疫測定（例えば、放射免疫測定、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、免疫染色、免疫蛍光、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）（例えば、サンドイッチELISA、間接的ELISA、競合的ELISA法）、磁気免疫測定など）を含めた任意の公知のタンパク質をベースとする検出法によって決定し得る。MyBP-C、グルタチオン、ADMA、およびSDMAに対する抗体は、ベンダー、例えば、United States Biological（Marblehead、MA）、Acris Antibodies（San Diego、CA）、Antibodies-online.com（Atlanta、GA）、およびAbcam（Cambridge、MA）から市販されている。例示的な実施形態において、MyBP-C、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態、MyBP-Cの断片のレベル（複数可）を決定する工程において使用される抗体は、（a）S-グルタチオン付加されたMyBP-C、（b）MyBP-C内のエピトープ（エピトープは、MyBP-CのCys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数を含み、任意選択で、Cys残基は、S-グルタチオン付加されている）、あるいは（c）MyBP-CのCys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数（Cys残基は、S-グルタチオン付加されている）に特異的に結合する、本明細書に記載されている発明性のある抗体である。例示的な態様において、決定ステップにおいて使用される抗体は、2つの結合パートナーの間に高親和性結合相互作用を有する結合パートナーにコンジュゲートした本発明の結合剤の1つである。例示的な態様において、決定ステップにおいて使用される抗体は、アビジンにコンジュゲートした本発明の結合剤の1つである。MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルは、例えば、免疫沈降、それに続くウエスタンブロッティングの組合せによって決定し得る。例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片のレベルは、例えば、抗グルタチオン抗体、それに続くMyBP-C特異的抗体による免疫沈降によって、または抗MyBP-C抗体、それに続くグルタチオン-特異的抗体による免疫沈降によって決定し得る。インタクトなMyBP-Cおよび/またはMyBP-C断片のレベルは、抗MyBP-C抗体による免疫沈降、それに続く免疫沈降物のゲル電気泳動およびこのように得られたゲルの染色によって決定し得る。ゲルのタンパク質染色のためのいくつかのキットは、ベンダー、例えば、Promegaから市販されている。

#### 【0067】

分析技術、例えば、質量分析法をまた使用して、生物学的試料中の分析物のレベルを決定し得る。ADMA、SDMA、およびL-アルギニンのレベルの決定のために利用されるタンデム質量分析法は、当技術分野で記載されている。例えば、Tangら、Euro Heart J、29巻：2506～2513頁（2008年）を参照されたい。質量分析法をまた使用して、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態、またはその断片のレベルを決定し得る。

#### 【0068】

例示的な代替りの態様において、レベルは、医療記録からのレベルを得ることによって決定する。例えば、レベルは、本発明の方法のステップが行われるときの前の時点において測定および記録されていてもよい。例示的な態様において、レベルは、本発明の方法のステップが行われる時点の前の6カ月以下で測定および記録したレベルを含有する被験体の医療記録から得る。例示的な態様において、レベルは、本発明の方法のステップが行われる時点の前5カ月以下または4カ月以下または3カ月以下または2カ月以下で測定および記録したレベルを含有する被験体の医療記録から得る。例示的な態様において、レベルは、本発明の方法のステップが行われる時点の前1カ月以下または3週間以下または2週間以下または1週間以下で測定および記録したレベルを含有する被験体の医療記録から得

る。例示的な態様において、レベルのいくつかは、医療記録からのレベルを得ることによって決定し、いくつかは、測定する。例示的な態様において、レベルは、生物学的試料のレベルを測定すること、医療記録から得ることの両方によって決定する。分析物のレベルを医療記録からのレベルを得ることによって決定する例示的な態様において、方法はさらに、本明細書に記載のような生物学的試料からのレベル（複数可）を測定することによって、同じまたは異なる分析物のレベルを決定する工程を含む。

#### 【0069】

さらなるステップおよび態様

本明細書において提供する方法のいくつかの実施形態において、方法は、さらなるステップを含み、または本明細書において開示する工程の組合せを含む。いくつかの実施形態において、発明性のある方法のステップを、1回または複数回繰り返す。

10

#### 【0070】

例示的な態様において、方法は、MyBP-Cのレベル、およびMyBP-Cの翻訳後に修飾された形態、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cのレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法は、MyBP-C、およびMyBP-Cの1つまたは複数の断片のレベルを決定する工程を含み、任意選択で、MyBP-Cおよび/またはMyBP-Cの1つもしくは複数の断片は、S-グルタチオン付加されている。

#### 【0071】

例示的な態様において、方法は、BNP、ADMA、SDMA、およびL-アルギニンの1つまたは複数のレベルを決定する工程と組み合わせた、MyBP-C、その翻訳後に修飾された形態、および/またはその断片のレベルを決定することの組合せを含む。例示的な態様において、方法はさらに、ADMAおよびL-アルギニンのレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法はさらに、ADMAおよびSDMAのレベルを決定する工程を含む。例示的な態様において、方法はさらに、ADMA、SDMA、およびL-アルギニンのレベルを決定する工程を含む。

20

#### 【0072】

例示的な態様において、方法は、1つまたは複数のさらなる診断ステップを含む。例示的な態様において、方法は、国際出願第WO/2011/056572号として2011年5月12日に公開された国際出願第PCT/US2010/54096号（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている）において教示されているような、1つまたは複数の拡張機能障害のバイオマーカーの測定を含む。例えば、本明細書において提供する方法は、レニン、アンジオテンシンII、アルドステロン、アンジオテンシン-変換酵素（ACE）、NADPHオキシダーゼ、活性酸素種、グルタチオンジスルフィド（GSSG）、酸化シスチン（CysS）、脂質ペルオキシダーゼ、イソプロスタノール、トリット、ニトレート、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤1（PAI-1）、ジヒドロピオブテリン（BH<sub>2</sub>）、カップリングされていない一酸化窒素シンターゼ（synthase）（カップリングされていないNOS）、グルタチオン（GSH）、シスチン（Cys）、一酸化窒素（NO）、カップリングされている一酸化窒素シンターゼ（カップリングされているNOS）、テトラヒドロピオブテリン（BH<sub>4</sub>）、Cys、DROM、イソプロスタノール、アンジオテンシンI、アンジオテンシノーゲン、抗利尿ホルモン（ADH）、レブチン、レジスチン、または上記の2つ以上の組合せの測定を含み得る。

30

40

#### 【0073】

いくつかの実施形態において、方法は、左心室（LV）圧、容量、および/または壁の厚さを測定する工程を含む。いくつかの実施形態において、方法は、能動的弛緩（等容性LV圧およびLV充満の速度）の過程を反映する計算、ならびに受動的スティフネス（心室腔コンプライアンスおよび心筋の粘弾性スティフネス）を反映する計算を行う工程を含む（Zileら、（2010年）、前述）。

#### 【0074】

いくつかの実施形態において、方法は、Silbermanら、Circulation、121巻：519～528頁（2010年）において記載されているような心エコー

50

法を行う工程を含む。いくつかの態様において、L V 組織ドップラーおよび僧帽弁流入速度を、心エコー法によって測定する。いくつかの態様において、方法は、組織ドップラーイメージング (T D I) によって、初期拡張期速度 (E') より高い後期拡張期速度 (A') についてアッセイを行う工程を含む。

【0075】

代わりのまたはさらなる実施形態において、方法は、磁気共鳴イメージング (M R I)、心臓カテーテル、または L V 拡張末期圧および収縮機能の測定を行う工程を含む。

【0076】

いくつかの実施形態において、方法は、被験体をさらに特徴付けるさらなるステップを含む。例示的な態様において、方法は、被験体の肥満度指数 (B M I) を決定すること、身体検査を行うこと、胸部 X 線を行うこと、またはこれらの組合せを含む。

10

【0077】

例示的な態様において、本発明の方法は、個人 (例えば、そこから生物学的試料を得た被験体、医師、医療保険提供者など) に、M y B P - C、その翻訳後に修飾された形態、またはその断片、または A D M A、S D M A、または L - アルギニンの決定されたレベルを通知するさらなるステップを含む。例示的な態様において、そこから生物学的試料を得た被験体の医師が通知を受け、医師は抗拡張期心不全または抗拡張機能障害剤を被験体に処方する。例示的な態様において、そこから生物学的試料を得た被験体が通知を受け、被験体は拡張機能障害もしくは拡張期心不全処置についてのリスクの定期的モニタリングのルーチンを開始し、かつ/または拡張期心不全もしくは拡張機能障害の処置を開始する。

20

【0078】

例示的な態様において、発明性のあるシステム、コンピュータ可読ストレージ媒体、コンピュータ中のプロセッサ、キット、またはこれらの組合せ (これらのそれぞれは下記に記載する) によって実装される方法は、本発明の方法のいずれかにおいて利用し得る。例えば、拡張機能障害または拡張期心不全を診断する発明性のある方法の診断ステップは、発明性のあるシステム、コンピュータ可読ストレージ媒体、コンピュータ中のプロセッサによって実装される方法、キット、またはこれらの組合せの 1 つの使用によって達成し得る。

【0079】

発明性のある方法の例示的な態様において、方法は、生物学的試料の M y B P - C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルが、対照と比べて増大するとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程をさらに含む。A D M A、S D M A、および任意選択で、L - アルギニンのレベルを決定する工程を含む他の発明性のある方法の例示的な態様において、方法は、A D M A のレベルが、対照レベルと比べて増大し、かつ S D M A のレベルが、対照レベルと比べて変化しないとき、または L - アルギニンのレベルと A D M A のレベルの比が、対照比と比べて減少しているとき、被験体に拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための治療剤を投与する工程をさらに含む。拡張期心不全または拡張機能障害の処置のための適切な治療剤は、当技術分野において公知であり、これらのいくつかを下記に記載する。

30

【0080】

拡張機能障害または拡張期心不全の処置のための治療剤

拡張機能障害を処置する、または拡張期心不全を処置するのに適した治療剤は、収縮機能障害または拡張期心不全の非存在下での拡張機能障害についての任意の標準医療でよい。いくつかの態様において、治療剤は、テトラヒドロピオブテリン、またはその誘導体、例えば、米国特許出願公開第 2008-0075666 A 1 号に記載されているもののいずれかである。いくつかの態様において、治療剤は、被験体においてアディポネクチンのレベルを増加させる薬剤、例えば、本明細書に記載されているもののいずれかである。いくつかの態様において、治療剤は、同時係属中の国際出願第 P C T / U S 2010/048650 号 (その内容は参照によりその全体が組み込まれている) による心代謝性モディファイヤーである。したがって、治療剤は、いくつかの実施形態において、式 I の構造を

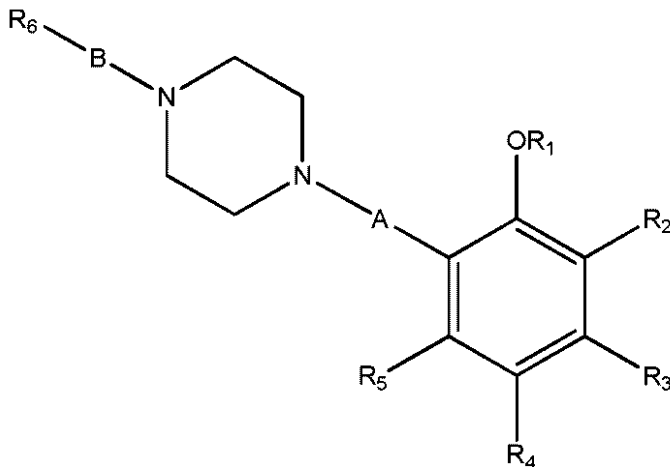
40

50

含み、

【 0 0 8 1 】

【 化 1 】



[ 式 I ]

10

【 0 0 8 2 】

式中、Aは、1～8個の原子の主鎖を含み、この各原子は、独立に、C、O、N、またはSであり、この各原子は、C1～C8アルキル、C1～C8アルコキシ、OH、NH<sub>2</sub>、NH(C1～C4アルキル)およびSHより選択されるさらなる基に任意選択で結合しており、

20

R<sub>1</sub>は、HまたはC1～C8アルキルであり、

R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、およびR<sub>5</sub>のそれぞれは、独立に、H、C1～C8アルキル、またはC1～C8アルコキシであり、

Bは、Hであるか、または1～8個の原子の主鎖を含み、この各原子は、独立に、C、O、N、またはSであり、この各原子は、さらなる基に任意選択で結合しており、

R<sub>6</sub>は、存在せず、またはフェニルであり、フェニルは、1～5個の基で任意選択で置換されており、この各基は、独立に、C1～C8アルキル、C1～C8アルコキシ、またはOHである。

30

【 0 0 8 3 】

本明細書において使用する場合、「アルキル」は、直鎖状および分岐状の飽和炭化水素基を指し、この非限定的例には、示した数の炭素原子を含有するメチル、エチル、ならびに直鎖状および分岐状プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、およびオクチル基が含まれる。C<sub>n</sub>という用語は、アルキル基が「n」個の炭素原子を有することを意味する。例えば、C1～C7アルキルは、全範囲を包含するいくつかの炭素原子（すなわち、1～7個の炭素原子）、ならびに全ての部分群（例えば、1～6個、2～7個、1～5個、3～6個、1個、2個、3個、4個、5個、6個、および7個の炭素原子）を有するアルキル基を指す。したがって、C1～C8アルキルは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、C5アルキル、C6アルキル、C7アルキル、またはC8アルキルでよく、この中で、プロピル、ブチル、C5アルキル、C6アルキル、C7アルキル、またはC8アルキルは、直鎖アルキルまたは分岐状アルキルである。

40

【 0 0 8 4 】

本明細書において使用する場合、「アルコキシ」は、-ORを指し、Rは、アルキル（例えば、直鎖または分岐鎖アルキル基）である。アルコキシ基の例には、これらに限定されないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、n-ブトキシ、sec-ブトキシ、t-ブトキシなどが含まれる。したがって、C1～C8アルコキシは、メトキシ、エトキシ、C3アルコキシ、C4アルコキシ、C5アルコキシ、C6アルコキシ、C7アルコキシ、またはC8アルコキシでよく、この中で、C3アルコキシ、C

50

4 アルコキシ、C 5 アルコキシ、C 6 アルコキシ、C 7 アルコキシ、または C 8 アルコキシは、直鎖アルコキシまたは分岐状アルコキシである。

【 0 0 8 5 】

本明細書において使用する場合、「NH ( C 1 ~ C 4 アルキル )」は、H および C 1 ~ C 4 アルキルの両方に結合している窒素を指す。

【 0 0 8 6 】

式 I に関して、A は、1 ~ 8 個の原子の主鎖を含み、この各原子は、独立に、C、O、N、または S である。いくつかの態様において、A は、C、O、N、および S より選択される単一の原子の主鎖を含む。いくつかの態様において、A は、2 ~ 8 個の原子（例えば、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、または 8 個の原子）の主鎖を含み、この各原子は、独立に、C、O、N、または S である。

10

【 0 0 8 7 】

A の主鎖の各原子は、さらなる基に任意選択で結合している。いくつかの態様において、さらなる基は、C 1 ~ C 8 アルキル、C 1 ~ C 8 アルコキシ、OH、NH<sub>2</sub>、NH ( C 1 ~ C 4 アルキル ) および SH より選択される。いくつかの態様において、主鎖の全ての原子は、さらなる基に結合している。他の態様において、主鎖の 1 個または複数の（しかし全てではない）原子は、さらなる基に結合している。場合によっては、主鎖の 1 個の原子は、さらなる基に結合している。場合によっては、主鎖の 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、または 7 個の原子は、さらなる基に結合している。

20

【 0 0 8 8 】

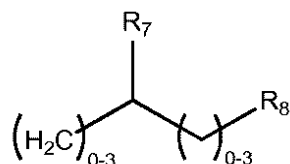
いくつかの態様において、A は、( CH<sub>2</sub> )<sub>1 ~ 8</sub> である。いくつかの態様において、A は、( CH<sub>2</sub> )<sub>1 ~ 6</sub> である。いくつかの態様において、A は、( CH<sub>2</sub> )<sub>1 ~ 4</sub> である。いくつかの態様において、A は、( CH<sub>2</sub> )<sub>1</sub> または ( CH<sub>2</sub> )<sub>2</sub> である。いくつかの態様において、A は、( CH<sub>2</sub> )<sub>1</sub> である。

【 0 0 8 9 】

他の態様において、A は、式 I V の構造を含み、

【 0 0 9 0 】

【 化 2 】



30

[ 式 IV];

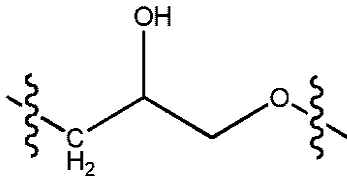
【 0 0 9 1 】

式中、R<sub>7</sub> は、OH、C 1 ~ C 4 アルキル、C 1 ~ C 4 アルコキシ、NH<sub>2</sub>、または NH ( C 1 ~ C 4 アルキル ) であり、R<sub>8</sub> は、O または NH である。いくつかの態様において、A が式 I V の構造を含むとき、R<sub>7</sub> は、OH であり、R<sub>8</sub> は、O または NH である。いくつかの態様において、A が式 I V の構造を含むとき、R<sub>7</sub> は、OH、C 1 ~ C 4 アルキル、C 1 ~ C 4 アルコキシ、NH<sub>2</sub>、または NH ( C 1 ~ C 4 アルキル ) であり、R<sub>8</sub> は、O である。特定の態様において、A が式 I V の構造を含むとき、R<sub>7</sub> は、OH であり、R<sub>8</sub> は、O である。いくつかの態様において、A は、

40

【 0 0 9 2 】

## 【化 3】



## 【 0 0 9 3 】

を含む。

## 【 0 0 9 4 】

式 I に関して、 $R_1$  は、H または C 1 ~ C 8 アルキルである。特定の態様において、 $R_1$  は、 $CH_3$  である。

## 【 0 0 9 5 】

式 I に関して、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および  $R_5$  のそれぞれは、独立に、H、C 1 ~ C 8 アルキル、または C 1 ~ C 8 アルコキシである。いくつかの態様において、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、および  $R_5$  のそれぞれは、独立に、H または メトキシである。代替の実施形態において、 $R_2$  および  $R_3$  のそれぞれは、メトキシであり、 $R_4$  および  $R_5$  のそれぞれは、H である。

## 【 0 0 9 6 】

式 I に関して、B は、H であるか、または 1 ~ 8 個の原子の主鎖を含み、この各原子は、独立に、C、O、N、または S である。いくつかの態様において、B は、C、O、N、および S より選択される単一の原子の主鎖を含み、一方、他の態様において、B は、2 ~ 8 個の原子（例えば、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、または 8 個の原子）の主鎖を含み、この各原子は、C、O、N、および S から独立に選択される。

## 【 0 0 9 7 】

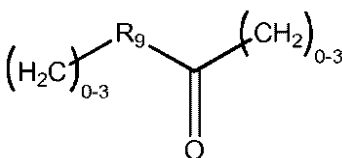
B の主鎖の各原子は、さらなる基に任意選択で結合している。いくつかの態様において、さらなる基は、C 1 ~ C 8 アルキル、C 1 ~ C 8 アルコキシ、OH、NH<sub>2</sub>、NH (C 1 ~ C 4 アルキル) および SH より選択される。いくつかの態様において、主鎖の全ての原子は、さらなる基に結合している。他の態様において、主鎖の 1 個または複数の（しかし全てではない）原子は、さらなる基に結合している。場合によっては、主鎖の 1 個の原子は、さらなる基に結合している。場合によっては、主鎖の 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、または 7 個の原子は、さらなる基に結合している。

## 【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態において、B は、H を含み、 $R_6$  は、存在しない。代替の実施形態において、B は、式 V の構造を含み、

## 【 0 0 9 9 】

## 【化 4】



[ 式 V ],

## 【 0 1 0 0 】

式中、 $R_9$  は、NH または O である。

## 【 0 1 0 1 】

いくつかの実施形態において、B が、式 V の構造を含むとき、 $R_9$  は、NH である。さらなる態様において、B は、

## 【 0 1 0 2 】

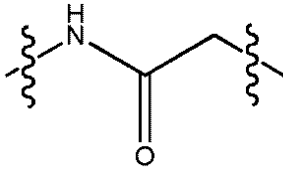
10

20

30

40

## 【化 5】



## 【 0 1 0 3 】

の構造を含む。

## 【 0 1 0 4 】

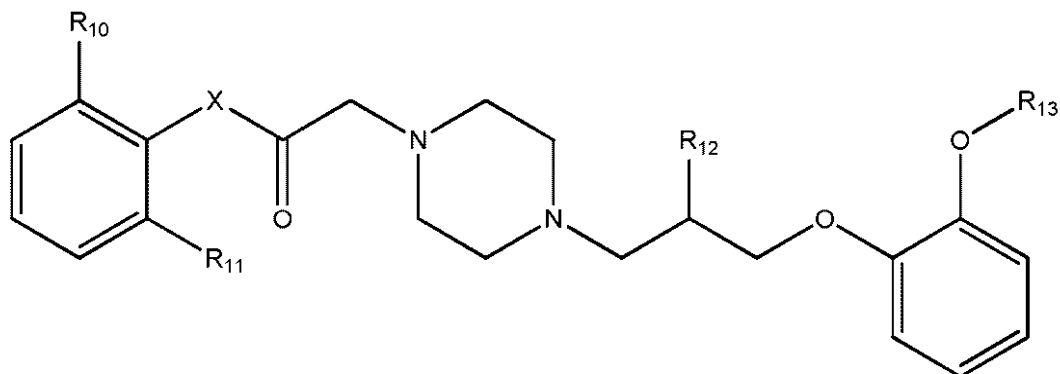
式 I に関して、 $R_6$  は、存在せず、またはフェニルであり、フェニルは、1 ~ 5 個（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個）の基で任意選択で置換されており、この各基は、C 1 ~ C 8 アルキル、C 1 ~ C 8 アルコキシ、および OH から独立に選択される。いくつかの態様において、 $R_6$  は、存在しない。代替りの態様において、 $R_6$  が存在し、1 ~ 5 個（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個）のメチル基で置換されているフェニルを含むとき。特定の態様において、 $R_6$  は、2 個のメチル基（オルト位のそれぞれに 1 個）で置換されているフェニルを含む。

## 【 0 1 0 5 】

いくつかの態様において、心代謝性モディファイヤーは、式 II の化合物、または薬学的に許容されるその塩もしくはそのコンジュゲートを含み、

## 【 0 1 0 6 】

## 【化 6】



[ 式 II ]

## 【 0 1 0 7 】

式中、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、および  $R_{13}$  のそれぞれは、独立に、C 1 ~ C 3 アルキルであり、

$X$  は、NH または O であり、

$R_{12}$  は、OH または C 1 ~ C 3 アルキルである。

## 【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態において、式 II の化合物は、下記の構造を含む。

## 【 0 1 0 9 】

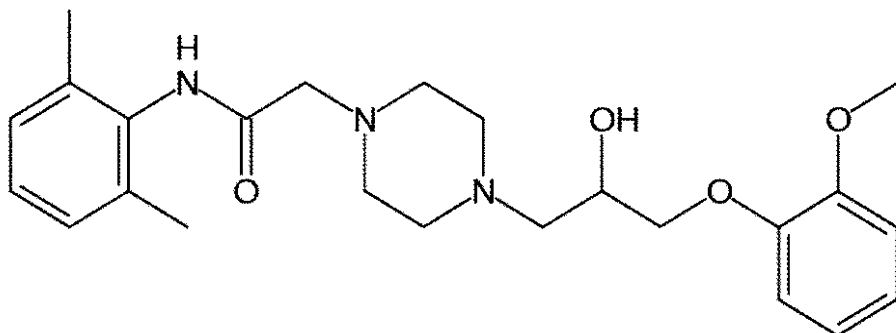
10

20

30

40

## 【化 7】



10

## 【 0 1 1 0 】

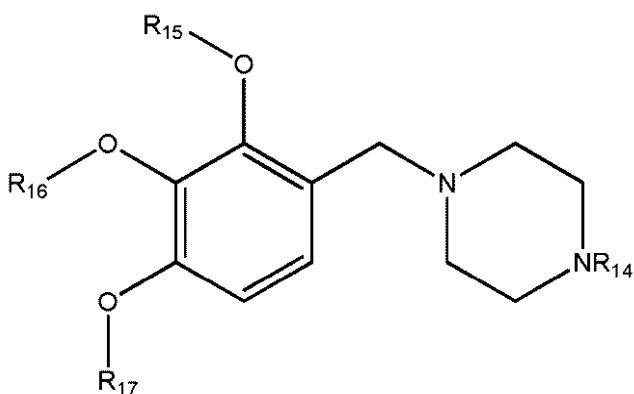
いくつかの態様において、式 I I の化合物は、ラノラジン、またはラノラジンの薬学的に許容される塩もしくはコンジュゲートである。

## 【 0 1 1 1 】

いくつかの態様において、心代謝性モディファイヤーは、式 I I I の化合物、または薬学的に許容されるその塩もしくはそのコンジュゲートであり、

## 【 0 1 1 2 】

## 【化 8】



20

[ 式 III]

30

## 【 0 1 1 3 】

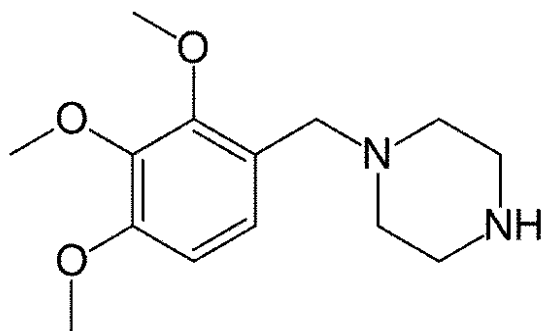
式中、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $R_{16}$ 、および  $R_{17}$  のそれぞれは、独立に、HまたはC 1 ~ C 3アルキルである。

## 【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態において、式 I I の化合物は、下記の構造を含む。

## 【 0 1 1 5 】

## 【化 9】



40

## 【 0 1 1 6 】

50

いくつかの態様において、式 I I I の化合物は、トリメタジジン、またはトリメタジジンの薬学的に許容される塩もしくはコンジュゲートである。

#### 【0117】

##### 処置および予防

「処置する」および「予防する」という用語、ならびにそこに起因する語は、本明細書において使用する場合、100%または完全な処置または予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的な利点または治療効果を有すると認識する、変化する程度の処置または予防が存在する。この点において、発明性のある方法は、哺乳動物において任意の量の任意のレベルの拡張機能障害または心不全の処置または予防を実現することができる。さらに、発明性のある方法によって実現される処置または予防は、処置または予防される疾患、例えば、がんの1つまたは複数の状態または症状の処置または予防を含むことができる。また、本明細書における目的のために、「予防」は、疾患、またはその症状もしくは状態の発症を遅延させることを包含することができる。

10

#### 【0118】

##### 生物学的試料

本明細書において開示されている方法に関して、いくつかの実施形態において、生物学的試料は、これらに限定されないが、被験体から得た全血、またはその画分（例えば、血漿、血清）、リンパ、母乳、唾液、粘膜、精液、腔分泌物、細胞抽出物、炎症液、脳脊髄液、糞便、硝子体液、または尿を含めた体液を含む。いくつかの態様において、試料は、上記の試料の少なくとも2つの複合パネルである。いくつかの態様において、試料は、血液試料、血漿試料、血清試料、および尿試料の少なくとも2つの複合パネルである。例示的な態様において、生物学的試料は、血漿である。

20

#### 【0119】

##### 被験体

本発明のいくつかの実施形態において、被験体は、これらに限定されないが、齧歯目の哺乳動物、例えば、マウスおよびハムスター、ならびにウサギ目の哺乳動物、例えば、ウサギ、食肉目からの哺乳動物（猫（ネコ）および犬（イヌ）を含めた）、偶蹄目からの哺乳動物（牛（ウシ）および豚（ブタ）を含めた）、または奇蹄目の哺乳動物（馬（ウマ）を含めた）を含めた哺乳動物である。いくつかの態様において、哺乳動物は、霊長目、オマキザル、もしくはシモイド（サル）、または真猿目（ヒトおよび類人猿）である。いくつかの態様において、哺乳動物は、ヒトである。特定の態様において、ヒトは、雄のヒトである。さらなるまたは代替りの態様において、ヒトは、約29以上のBMIを有する。

30

#### 【0120】

いくつかの実施形態において、被験体は、拡張機能障害の徴候もしくは症状を示し、または提示する。例示的な実施形態において、被験体は、約45%以上、例えば、約50%以上、例えば、50~75%である駆出分画を示す。

#### 【0121】

いくつかの態様において、被験体は、収縮機能障害の存在下で拡張機能障害を患っている。いくつかの態様において、被験体は、収縮機能障害の非存在下で拡張機能障害を患っている。

40

#### 【0122】

いくつかの実施形態において、被験体は、心不全の徴候もしくは症状を示し、または提示する。いくつかの態様において、心不全の徴候または症状は、本明細書の上記に記載されているものの1つである。心不全と表題を付けられているセクションを参照されたい。

#### 【0123】

いくつかの実施形態において、被験体は、心不全、例えば、拡張期心不全、本明細書に記載されている心不全のタイプのいずれかを患っている。心不全と表題を付けられているセクションを参照されたい。例示的な態様において、被験体は、心筋梗塞を患っていない。例示的な態様において、被験体は、収縮機能障害または収縮期心不全を患っていない。

#### 【0124】

50

例示的な態様において、被験体は、息切れを患っている。

【0125】

いくつかの実施形態において、被験体は、高血圧を患っている。高血圧は、全身動脈圧が上昇している慢性の医学的状態である。高血圧は、いくつかの実施形態において、医学的原因が見出されない原発性高血圧として分類される。いくつかの実施形態において、高血圧は、腎臓、動脈、心臓、または内分泌系に影響を与える別の状態によってもたらされる二次性高血圧である。

【0126】

個人の年齢にしては受け入れられている正常値より高い収縮期または拡張期血圧の測定値は、前高血圧または高血圧と分類される。

【0127】

【表1-2】

| 分類                    | 収縮期血圧   |           | 拡張期血圧 |           |
|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------|
|                       | mmHg    | kPa       | mmHg  | kPa       |
| 正常                    | 90-119  | 12-15.9   | 60-79 | 8.0-10.5  |
| 前高血圧                  | 120-139 | 16.0-18.5 | 80-89 | 10.7-11.9 |
| ステージ1                 | 140-159 | 18.7-21.2 | 90-99 | 12.0-13.2 |
| ステージ2                 | ≥160    | ≥21.3     | ≥100  | ≥13.3     |
| 孤立性収縮期高血圧             | ≥140    | ≥18.7     | <90   | <12.0     |
| 出典:Chobanian ら(2003年) |         |           |       |           |

【0128】

高血圧は、高血圧ステージⅠ、高血圧ステージⅡ、および孤立性収縮期高血圧を含めたいくつかのサブ分類を有する。孤立性収縮期高血圧は、正常な拡張期血圧を伴う上昇した収縮期血圧を指し、高齢者において一般である。これらの分類は、2回以上の来院において取った患者の安静時血圧の読取り値を平均した後で行われる。50歳超の個人は、これらの血圧が一貫して少なくとも収縮期に140mmHgまたは拡張期に90mmHgである場合、高血圧を有すると分類される。真性糖尿病または腎臓疾患が付随して存在する130/80mmHgより高い血圧を有する患者は、さらなる処置を必要とする(Chobanianら(2003年12月)、「Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure」、Hypertension、42巻(6号):1206~52頁。)

いくつかの態様において、被験体は、代謝性疾患または代謝症候群を患っている。代謝症候群(代謝症候群Xとしてまた公知である)、インスリン抵抗性症候群またはレブン症候群(Reaven's syndrome)は、5千万人超の米国人に影響を与えている障害である。代謝症候群は典型的には、下記の危険因子の少なくとも3つ以上のクラスター化によって特徴付けられる。(1)腹部肥満(腹部中および腹部の周りの過剰な脂肪組織)、(2)アテローム生成的異脂肪血症(動脈壁へのプラークの蓄積を増強させる、高トリグリセリド、低HDLコレステロールおよび高LDLコレステロールを含めた血中脂肪障害)、(3)血圧上昇、(4)インスリン抵抗性またはグルコース不耐性、(5)プロトロンビンの状況(例えば、血液中的高フィブリノゲンまたはプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤-1)、ならびに(6)炎症誘発性状況(例えば、血液中的の上昇したC反応性タンパク質)。他の危険因子は、加齢、ホルモンの不均衡および遺伝的素因を含み得る。

【0129】

代謝症候群は、冠動脈心疾患、および血管のプラークの蓄積と関連する他の障害、例えば、脳卒中および末梢血管疾患(アテローム動脈硬化性心血管疾患(ASCVD))と称さ

れる)のリスクの増加と関連する。代謝症候群を有する患者は、その初期ステージのインスリン抵抗性状況から、ASCVDのリスクがさらに増加した本格的なII型糖尿病へと進行し得る。任意の特定の理論に縛られることを意図するものではないが、インスリン抵抗性、代謝症候群および血管性疾患の間の関係は、損なわれたインスリン刺激血管拡張、増強された酸化ストレスによるインスリン抵抗性が関連するNO利用可能性の低減、および脂肪細胞由来ホルモン、例えば、アディポネクチンの異常を含めた1つまたは複数の併行的な発症機序が関与し得る(LteifおよびMather、Can. J. Cardiol. 20巻(suppl. B): 66B~76B頁(2004年))。

#### 【0130】

2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel(ATPIII)によると、同じ個人における下記の特質の任意の3つは、代謝症候群についての基準に合致する。(a)腹部肥満(男性において102cm超の胴囲、および女性において88cm超の胴囲);(b)血清トリグリセリド(150mg/dl以上);(c)HDLコレステロール(男性において40mg/dl以下、および女性において50mg/dl以下);(d)血圧(130/85以上);ならびに(e)空腹時血中グルコース(110mg/dl以上)。世界保健機構(WHO)によると、下記の基準の少なくとも2つと共に高インスリン値(上昇した空腹時血中グルコースまたは上昇した食事後グルコース単独)を有する個人は、代謝症候群についての基準に合致する。(a)腹部肥満(0.9超のウエストヒップ比、少なくとも30kg/m<sup>2</sup>の肥満度指数、または37インチ超のウエスト測定値);(b)少なくとも150mg/dlのトリグリセリドレベル、または35mg/dl未満のHDLコレステロールを示すコレステロールパネル;(c)140/90以上の血圧、または高血圧。(Mathur、Ruchi、「Metabolic Syndrome」、編Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com、2009年5月11日)。

#### 【0131】

本明細書における目的のために、個人が2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment PanelまたはWHOによって記載された基準のいずれかまたは両方の基準に合致する場合、その個人は代謝症候群に苦しんでいると考えられる。

#### 【0132】

本発明の方法に関して、いくつかの実施形態において、被験体は、糖尿病もしくは肥満症を患っており、または糖尿病および肥満症の両方を患っている。

#### 【0133】

いくつかの実施形態において、被験体は、発明性のある方法によって処置または予防または診断される拡張機能障害または心不全以外の心臓傷害または器質的心疾患を患っていない。「心臓傷害」とは、細胞外空間中への損失、または検出可能なレベルの生物活性のある細胞質タンパク質および構造タンパク質(例えば、トロポニン、クレアチンキナーゼ、ミオグロビン、心臓型脂肪酸結合タンパク質、乳酸デヒドロゲナーゼ)を含めた細胞内の構成要素への損失をもたらす、正常な心筋細胞膜の完全性の攪乱を意味する。「器質的心疾患」とは、心筋に影響を与え、または心臓の構造を変化させる任意の疾患を意味する。いくつかの態様において、被験体は、虚血性心疾患、慢性安定狭心症、慢性狭心症を患っていない。いくつかの態様において、被験体は、虚血、虚血再灌流または冠動脈閉塞-再灌流、虚血性心疾患、心筋傷害、心筋毒性、心筋梗塞、先天性の心臓病変、弁膜狭窄または弁膜逆流、冠動脈疾患、慢性狭心症、慢性安定狭心症、不整脈を患っていない。いくつかの態様において、被験体は、心筋外傷、心筋毒性、ウイルス感染、栄養素の欠乏を患っていない。いくつかの態様において、被験体は、心筋炎を患っていない。

#### 【0134】

本明細書において提供する処置の方法に関して、いくつかの実施形態において、被験体は、それを必要としている被験体である。いくつかの態様において、被験体は、拡張機能

障害、例えば、本明細書において「拡張機能障害」と表題を付けられて記載されているセクションにおいて記載されている拡張機能障害の形態のいずれかを患っている被験体である。いくつかの態様において、被験体は、心不全、例えば、拡張期心不全、保全された駆出分画を伴う心不全、本明細書において「心不全」と表題を付けられて記載されているセクションにおいて記載されている心不全のタイプのいずれかを患っている被験体である。

#### 【0135】

##### 対照レベル

本発明の方法に関して、被験体から得た生物学的試料の分析物（MyBP-C、その翻訳後に修飾された形態またはその断片、ADMA、SDMA、および/またはL-アルギニン）のレベルを、1つまたは複数の対照レベルと比較する。例示的な態様において、対照レベルは、同じ分析物（複数可）のレベルであるが、これは、対照被験体から得た生物学的試料のレベルである。

10

#### 【0136】

いくつかの実施形態において、対照被験体は、同じ種、性別、民族性、年齢群、喫煙実態、BMI、現在の治療レジメンの実態、病歴、またはこれらの組合せの対照であるが、対照は拡張機能障害を患っていないという点で診断される被験体とは異なる。いくつかの実施形態において、対照被験体は、同じ種、性別、民族性、年齢群、喫煙実態、BMI、現在の治療レジメンの実態、病歴、またはこれらの組合せの対照であるが、対照被験体は拡張機能障害も収縮機能障害も患っていないという点で診断される被験体とは異なる。代わりの態様において、対照被験体は、同じ種、性別、民族性、年齢群、喫煙実態、BMI、現在の治療レジメンの実態、病歴、またはこれらの組合せの対照であるが、対照は拡張機能障害を患っていないが、収縮機能障害を患っているという点で診断される被験体とは異なる。代わりの態様において、対照被験体は、同じ種、性別、民族性、年齢群、喫煙実態、BMI、現在の治療レジメンの実態、病歴、またはこれらの組合せの対照であるが、対照は収縮機能障害を患っていないが、拡張機能障害を患っているという点で診断される被験体とは異なる。代わりの態様において、対照被験体は、同じ種、性別、民族性、年齢群、喫煙実態、BMI、現在の治療レジメンの実態、病歴、またはこれらの組合せの対照であるが、対照は心不全を患っていないという点で診断される被験体とは異なる。

20

#### 【0137】

心不全のタイプを診断する方法に関して、診断される被験体が心不全を患っている被験体であるとき、対照被験体は、いくつかの実施形態において、心不全を患っている対照被験体である。いくつかの態様において、対照被験体は、収縮期心不全または低減した駆出分画を有する心不全を患っている。代わりの態様において、対照被験体は、心不全を患っていない。

30

#### 【0138】

本発明の発明性のある方法に関して、対照レベルは、例示的な態様において、他に示さない限り、心不全を患っていない患者における分析物のレベルである。

#### 【0139】

いくつかの態様において、ADMAの対照レベルは、生物学的試料が血漿であるとき、0.65  $\mu$ M未満であるレベルであり、この数を超える血漿中のADMAのレベルは、拡張機能障害もしくは拡張期心不全の状況、またはそのリスクと考えられる。いくつかの態様において、L-アルギニン（L-Arginine）とADMAの対照比は、170超である比であり、170未満のL-Arg : ADMAの比は、拡張機能障害もしくは拡張期心不全の状況、またはそのリスクと考えられる。

40

#### 【0140】

対照レベルと比べて、決定される分析物のレベルは、増加したレベルでよい。本明細書において使用する場合、「増加した」という用語は、レベルに関して、対照レベルを超える任意の増加%を指す。増加したレベルは、対照レベルと比べて、少なくとも5%または約5%の増加、少なくとも10%または約10%の増加、少なくとも15%または約15

50

%の増加、少なくとも20%または約20%の増加、少なくとも25%または約25%の増加、少なくとも30%または約30%の増加、少なくとも35%または約35%の増加、少なくとも40%または約40%の増加、少なくとも45%または約45%の増加、少なくとも50%または約50%の増加、少なくとも55%または約55%の増加、少なくとも60%または約60%の増加、少なくとも65%または約65%の増加、少なくとも70%または約70%の増加、少なくとも75%または約75%の増加、少なくとも80%または約80%の増加、少なくとも85%または約85%の増加、少なくとも90%または約90%の増加、少なくとも95%または約95%の増加でよい。例示的な態様において、増加したレベルは、対照レベルを超える少なくとも50%の増加である。増加したレベルは、対照レベルと比べて、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍またはそれを超える増加でよい。

10

#### 【0141】

対照レベルと比べて、決定されるレベルは、減少したレベルであり得る。本明細書において使用する場合、「減少した」という用語は、レベル（例えば、発現レベル、生物活性レベル）に関して、対照レベル未満の任意の減少%を指す。減少したレベルは、対照レベルと比べて、少なくとも5%または約5%の減少、少なくとも10%または約10%の減少、少なくとも15%または約15%の減少、少なくとも20%または約20%の減少、少なくとも25%または約25%の減少、少なくとも30%または約30%の減少、少なくとも35%または約35%の減少、少なくとも40%または約40%の減少、少なくとも45%または約45%の減少、少なくとも50%または約50%の減少、少なくとも55%または約55%の減少、少なくとも60%または約60%の減少、少なくとも65%または約65%の減少、少なくとも70%または約70%の減少、少なくとも75%または約75%の減少、少なくとも80%または約80%の減少、少なくとも85%または約85%の減少、少なくとも90%または約90%の減少、少なくとも95%または約95%の減少でよい。例示的な態様において、減少したレベルは、対照レベル未満の少なくとも50%の減少である。減少したレベルは、対照レベルと比べて、1.1分の1、1.2分の1、1.3分の1、1.4分の1、1.5分の1、1.6分の1、1.7分の1、2.0分の1、2.5分の1、3.0分の1、3.5分の1、4.0分の1、4.5分の1、5.0分の1、6.0分の1、7.0分の1、8.0分の1、9.0分の1、10分の1、15分の1、20分の1、30分の1、40分の1、50分の1またはそれを超える減少でよい。

20

30

#### 【0142】

例示的な態様において、生物学的試料のL-アルギニンのレベルと生物学的試料のADMAのレベルの比は、対照レベルと比べて減少する。例示的な態様において、比は、対照レベル未満の少なくとも50%の減少である。

#### 【0143】

抗体および他の結合剤

発明性のある方法において有用な単離された結合剤をまた、本明細書において提供する。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cに特異的に結合する。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、623、および/または651の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、結合剤は、1つまたは複数のS-グルタチオン付加されたCys残基を欠いているMyBP-Cに結合しない。例示的な態様において、結合剤は、S-グルタチオン付加されていないMyBP-Cに結合し

40

50

ない。例示的な態様において、C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 2 3 9、C y s 2 4 9、C y s 4 2 6、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、C y s 7 1 9 の 1 つまたは複数に結合しない。例示的な態様において、C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 の 1 つまたは複数に結合しない。

#### 【 0 1 4 4 】

例示的な実施形態において、単離された結合剤は、M y B P - C 内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 2 3 9、C y s 2 4 9、C y s 4 2 6、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、C y s 7 1 9 の 1 つまたは複数を含む。例示的な態様において、エピトープは、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 の 1 つまたは複数を含む。例示的な態様において、1 つまたは複数の C y s 残基は、S - グルタチオン付加されている。例示的な態様において、1 つまたは複数の C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、1 つまたは複数の C y s 残基に結合しない。代わりの態様において、1 つまたは複数の C y s 残基は、S - グルタチオン付加されておらず、C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないときのみ、結合剤は 1 つまたは複数の C y s 残基に結合する。

10

20

#### 【 0 1 4 5 】

例示的な実施形態において、単離された結合剤は、M y B P - C の C y s 残基に特異的に結合し、C y s 残基は、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 2 3 9、C y s 2 4 9、C y s 4 2 6、C y s 4 3 6、C y s 4 4 3、C y s 4 7 5、C y s 5 2 8、C y s 5 6 6、C y s 6 2 3、C y s 6 5 1、C y s 7 1 9 である。例示的な態様において、C y s 残基は、配列番号 2 1 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、C y s 4 7 5、C y s 6 2 3、および / または C y s 6 5 1 である。例示的な態様において、C y s 残基は、S - グルタチオン付加されている。例示的な態様において、C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、C y s 残基に結合しない。代わりの態様において、C y s 残基は、S - グルタチオン付加されておらず、C y s 残基が S - グルタチオン付加されていないときのみ、結合剤は C y s 残基に結合する。

30

#### 【 0 1 4 6 】

本明細書において使用する場合、「結合剤」という用語は、共有結合または非共有結合によって互いに（直接的または間接的に）関連する 1 つまたは複数の結合ユニットを含む分子を指す。本明細書において使用する場合、「結合ユニット」という用語は、M y B P - C、例えば、S - グルタチオン付加された M y B P - C、M y B P - C の C y s 残基、M y B P - C 内のエピトープに特異的に結合する結合剤のポーションを指す。例示的な態様において、結合ユニットは、高親和性を伴って結合する。「高親和性」という用語は、哺乳動物、例えば、臨床検査用動物、飼育慣らされた家畜もしくはペット動物、またはヒトにおける *i n v i v o* での、M y B P - C、例えば、S - グルタチオン付加された M y B P - C、M y B P - C の C y s 残基、M y B P - C 内のエピトープに対する結合剤の相対的親和性に関連して、生理学的文脈において使用される。特定の実施形態において、結合ユニットは、ナノモル未満（例えば、ピコモル）、ナノモル範囲、またはマイクロモル範囲である、M y B P - C、例えば、S - グルタチオン付加された M y B P - C、M y B P - C の C y s 残基、M y B P - C 内のエピトープについての解離定数 ( $K_D$ ) を有する。いくつかの実施形態において、 $K_D$  は、約  $0.0001 \text{ nM}$  ~ 約  $100 \text{ nM}$  である。いくつかの実施形態において、 $K_D$  は、少なくとも  $0.0001 \text{ nM}$  もしくは約  $0.0001 \text{ nM}$ 、少なくとも  $0.001 \text{ nM}$  もしくは約  $0.001 \text{ nM}$ 、少なくとも  $0.01 \text{ nM}$  もしくは約  $0.01 \text{ nM}$ 、少なくとも  $0.1 \text{ nM}$  または約  $0.1 \text{ nM}$ 、少なくとも  $1 \text{ nM}$  もしくは約  $1 \text{ nM}$ 、または少なくとも  $10 \text{ nM}$  もしくは約  $10 \text{ nM}$  である。いくつかの

40

50

実施形態において、 $K_D$  は、 $100\text{ nM}$  以下もしくは約  $100\text{ nM}$ 、 $75\text{ nM}$  以下もしくは約  $75\text{ nM}$ 、 $50\text{ nM}$  以下もしくは約  $50\text{ nM}$ 、または  $25\text{ nM}$  以下もしくは約  $25\text{ nM}$  である。

#### 【0147】

特定の態様において、結合剤の各結合ユニットまたは結合ユニットの少なくとも1つは、少なくとも1つのペプチドまたはポリペプチドを含む。他の態様において、結合ユニットは、共有結合的または非共有結合的に一緒に接合している複数のペプチドまたはポリペプチドを含む。特定の態様において、結合剤が少なくとも1つの抗体、またはその抗原結合断片を含むように、結合ユニットは、少なくとも1つの抗体、またはその抗原結合断片を含む。いくつかの実施形態において、結合剤は、複数の結合ユニットを含み、特定の態様において、結合剤の結合ユニットのいくつかまたは全ては、抗体、またはその抗原結合断片である。このような実施形態のさらなる記載は、本明細書に記載されている。例えば、抗体および抗原結合断片と表題を付けられているセクションを参照されたい。

10

#### 【0148】

特定の態様において、結合剤は、抗体またはその抗原結合断片を含むポリペプチドではない1つまたは複数の結合ユニットを含む。いくつかの実施形態において、結合剤は、抗体またはその抗原結合断片ではない少なくとも1つの結合ユニットを含む。代わりの実施形態において、結合ユニットは、ペプチドでもなく、ポリペプチドでもない。例示的な特定の態様において、結合ユニットは、有機小分子、アプタマー、およびこれらの組合せの1つまたは複数を含む。

20

#### 【0149】

いくつかの実施形態において、結合ユニット（例えば、ペプチド、ポリペプチド、またはその他）は、リンカーの非存在下で一緒に直接接合している。代わりの態様において、結合剤の結合ユニットは、1つまたは複数のリンカーを介して間接的に接続している。直接的に一緒に接合していようと、またはリンカーを通して間接的に接合していようと、結合ユニットは、共有結合（例えば、ペプチド、エステル、アミド、もしくはスルフヒドリル結合）、または非共有結合（例えば、疎水的相互作用、水素結合、ファンデルワールス結合、静電的もしくはイオン相互作用を介した）、またはこれらの組合せによって接続し得る。結合ユニットは、これらに限定されないが、本明細書において第2の部分への結合剤のコンジュゲーションに関して教示されたもののいずれかを含めた当技術分野において公知の任意の手段を介して接続し得る。

30

#### 【0150】

抗体およびその抗原結合断片

本発明のいくつかの態様において、結合剤は、本明細書における開示による、 $MyBP-C$ 、例えば、 $S$ -グルタチオン付加された  $MyBP-C$ 、 $MyBP-C$  の  $Cys$  残基、 $MyBP-C$  内のエピトープに特異的に結合する、抗体、またはその抗原結合断片である。抗体は、当技術分野において公知の任意のタイプの免疫グロブリンでよい。例えば、抗体は、任意のアイソタイプのもの、例えば、 $IgA$ 、 $IgD$ 、 $IgE$ 、 $IgG$ 、 $IgM$  などよい。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルでよい。抗体は、天然抗体、例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなどから単離および/または精製した抗体でよい。これに関しては、抗体は、哺乳動物または鳥の抗体、例えば、マウス抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ウマ抗体、ニワトリ抗体、ハムスター抗体、ヒト抗体などとして考えてもよい。「単離した」という用語は、本明細書において使用する場合、その自然環境から取り出されたことを意味する。「精製した」という用語は、本明細書において使用する場合、未変性または自然環境中の分子または化合物と通常関連する汚染物質が実質的に非含有である形態での分子または化合物の単離に関し、当初の組成物の他の成分から分離された結果として純度が増加していることを意味する。「純度」は相対的用語であり、絶対的純度または絶対的濃縮または絶対的選択と必ずしも解釈されないことが認識される。いくつかの態様において、純度は、少なくとも  $50\%$  もしくは約  $50\%$ 、少なくとも  $60\%$  もしくは約  $60\%$ 、少なくとも  $70\%$  もしくは約

40

50

70%、少なくとも80%もしくは約80%、または少なくとも90%もしくは約90%、例えば、少なくとも91%もしくは約91%、少なくとも92%もしくは約92%、少なくとも93%もしくは約93%、少なくとも94%もしくは約94%、少なくとも95%もしくは約95%、少なくとも96%もしくは約96%、少なくとも97%もしくは約97%、少なくとも98%もしくは約98%、少なくとも99%もしくは約99%であるか、または概ね100%である。

#### 【0151】

抗体は、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープについての任意のレベルの親和性またはアビディティを有することができる。解離定数( $K_D$ )は、結合ユニットに関して、本明細書に記載されているそれらの例示的な解離定数のいずれかであり。解離定数を含めた結合定数は、例えば、表面プラズモン共鳴の原理を利用する方法、例えば、Biacore(商標)システムを利用する方法を含めて当技術分野において公知の方法によって決定し得る。上記によると、いくつかの実施形態において、抗体は、モノマー形態であり、一方他の実施形態において、抗体は、ポリマー形態である。抗体が2つ以上の別個の抗原結合領域断片を含む特定の実施形態において、抗体は、結合剤によって認識および結合される別個のエピトープの数によって、二重特異性、三重特異性もしくは多重特異性、または二価、三価もしくは多価と考えられる。

#### 【0152】

結合剤が、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープと、結合パートナーとの間の相互作用を低減させる場合、いくつかの実施形態において、抗体は、遮断抗体または中和抗体と考えられる。いくつかの態様において、結合剤の $K_D$ は、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープの結合パートナーの $K_D$ とほぼ同じである。いくつかの態様において、結合剤の $K_D$ は、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープの結合パートナーの $K_D$ より低い(例えば、少なくとも0.5分の1低い、少なくとも1分の1低い、少なくとも2分の1低い、少なくとも5分の1低い、少なくとも10分の1低い、少なくとも25分の1低い、少なくとも50分の1低い、少なくとも75分の1低い、少なくとも100分の1低い)。

#### 【0153】

いくつかの実施形態において、抗体は、遺伝的に改変された抗体、例えば、単鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体；MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープなどに対して特異的なCDR配列のポーションを含む抗体；ヒューマニア化抗体、二重特異性抗体、三重特異的抗体であり。遺伝子工学技術はまた、非ヒト源において完全ヒト抗体を作製する能力を実現する。

#### 【0154】

いくつかの態様において、抗体は、キメラ抗体である。「キメラ抗体」という用語は、本明細書において、1つの種からの定常ドメインおよび第2の種からの可変ドメインを含有するか、またはより一般に、少なくとも2つの種からの一続きのアミノ酸配列を含有する抗体を指すために使用される。

#### 【0155】

いくつかの態様において、抗体は、ヒト化抗体である。「ヒト化」という用語は、抗体に関連して使用されるとき、本来の源の抗体より真のヒト抗体により類似した構造および免疫学的機能を有するように改変された、少なくとも非ヒト源からのCDR領域を有する抗体を指すために使用される。例えば、ヒト化は、非ヒト抗体、例えば、マウス抗体から、ヒト抗体中にCDRをグラフトすることを伴うことができる。ヒト化することはまた、非ヒト配列をよりヒト配列のように見えるようにするためのアミノ酸置換を選択することが関与し得る。

## 【0156】

「キメラまたはヒト化」という用語の使用は、本明細書において、相互排他的であることを意味せず、むしろ、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびさらにヒト化されてきたキメラ抗体を包含することを意味する。文脈が他に示す場合を除いて、本発明のキメラ抗体（の特性、使用、試験など）についての記述は、本開示のヒト化抗体に適用され、本開示のヒト化抗体についての記述はまた、キメラ抗体に関する。同様に、文脈が指示する場合を除いて、このような記述はまた、抗体、および本発明のこのような抗体の抗原結合断片に適用可能であると理解すべきである。

## 【0157】

本発明のいくつかの態様において、結合剤は、本明細書における開示による、M y B P - C、例えば、S - グルタチオン付加されたM y B P - C、M y B P - CのC y s残基、M y B P - C内のエピトープに特異的に結合する、抗体の抗原結合断片である。抗原結合断片（本明細書において、「抗原結合ポーション」とまた称される）は、本明細書に記載されている抗体のいずれかの抗原結合断片でよい。抗原結合断片は、これらに限定されないが、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、d s F v、s F v、二特異性抗体、三特異性抗体、ビス - s c F v、F a b発現ライブラリーによって発現される断片、ドメイン抗体、V h Hドメイン、V - N A Rドメイン、V Hドメイン、V Lドメインなどを含めた少なくとも1つの抗原結合部位を有する、抗体の任意のパートでよい。しかし、本発明の抗体断片は、これらの例示的なタイプの抗体断片に限定されない。

## 【0158】

ドメイン抗体は抗体の機能的結合ユニットを含み、抗体の重鎖（V<sub>H</sub>）または軽鎖（V<sub>L</sub>）の可変領域に対応することができる。ドメイン抗体は、概ね13 k D a、または完全抗体の概ね10分の1の分子量を有することができる。ドメイン抗体は、完全抗体、例えば、本明細書に記載されているものから由来し得る。いくつかの実施形態において、抗原結合断片は、モノマーまたはポリマー、二重特異性または三重特異性、二価または三価である。

## 【0159】

抗体分子の、抗原結合性を含有する抗体断片、またはイディオタイプは、当技術分野で公知の技術によって生成し得る。例えば、このような断片は、これらに限定されないが、抗体分子のペプシン消化によって産生し得るF ( a b ' )<sub>2</sub>断片；F ( a b ' )<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を低減させることによって生成し得るF a b '断片、および抗体分子をパインおよび還元剤で処置することによって生成し得る2つのF a b '断片を含む。

## 【0160】

合成ペプチドを介して抗体軽鎖のVドメインに連結している抗体重鎖の可変（V）ドメインを含む切断型F a b断片からなる単鎖可変領域断片（s F v）抗体断片は、通例の組換えDNAテクノロジー技術（例えば、J a n e w a yら（前述）を参照されたい）を使用して生成することができる。同様に、ジスルフィド - 安定化可変領域断片（d s F v）は、組換えDNAテクノロジー（例えば、R e i t e rら、P r o t e i n E n g i n e e r i n g、7巻、697～704頁（1994年）を参照されたい）によって調製することができる。

## 【0161】

組換え抗体断片、例えば、s c F vをまた改変して、異なる標的抗原への高結合アビディティーおよび特異性のある安定的な多量体のオリゴマーに組み立てることができる。このような二特異性抗体（二量体）、三特異性抗体（三量体）または四特異性抗体（四量体）は、当技術分野で周知である。例えば、K o r t tら、B i o m o l E n g .、2001年、18巻：95～108頁、（2001年）およびT o d o r o v s k aら、J I m m u n o l M e t h o d s .、248巻：47～66頁、（2001年）を参照されたい。

## 【0162】

二重特異性抗体（b s c A b）は、組換え法を使用してグリシン - セリンリンカーを介

10

20

30

40

50

した接合している2つの単鎖Fv断片を含む分子である。例示的な実施形態において、目的の2つの抗体のV軽鎖(V<sub>L</sub>)およびV重鎖(V<sub>H</sub>)ドメインを、標準的PCR方法を使用して単離する。次いで、各ハイブリドーマから得たV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub> cDNAを接合して、2ステップ融合PCRにおいて単鎖断片を形成させる。二重特異性融合タンパク質を、同様の様式で調製する。二重特異性単鎖抗体および二重特異性融合タンパク質は、本発明の範囲内に含まれる抗体物質である。例示的な二重特異性抗体は、米国特許出願公開第2005-0282233A1号および国際出願第WO2005/087812号(この両方の出願は全内容が参照により本明細書中に組み込まれている)に教示されている。

#### 【0163】

抗体を作製する適切な方法は、当技術分野において公知である。例えば、標準的ハイブリドーマ方法は、例えば、HarlowおよびLane(編)、Antibodies: A Laboratory Manual、CSH Press(1988年)、およびCA. Janewayら(編)、Immunobiology、第5版、Garland Publishing、New York、NY(2001年)に記載されている。

#### 【0164】

手短に言えば、本発明のポリペプチドを含む免疫原で動物を免疫化し、その免疫化された動物からの抗血清を集めることによって、ポリクローナル抗体を調製する。広範囲の動物種を、抗血清の産生のために使用することができる。いくつかの態様において、抗血清の産生のために使用する動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ブタまたはウマを含めたヒトではない動物である。ウサギの相対的に大量の血液量のために、ウサギは、ポリクローナル抗体の産生のために好ましい選択である。選択したMyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープと免疫反応性のポリクローナル抗血清を生成する例示的な方法において、MyBP-C抗原の20~30個のアミノ酸ポーションを、ウサギの免疫化のためにフロイント完全アジュバントに乳化する。例えば、21日の間隔で、追加免疫のために、エピトープをフロイント不完全アジュバント中で乳化させる。単純に動物を出血させ、全血からの血清試料を調製することによって、抗体生成のための時間を考慮に入れた後、ポリクローナル抗血清を得てもよい。

#### 【0165】

本発明において使用するためのモノクローナル抗体は、培養液中の連続細胞系による抗体分子の産生を実現する任意の技術を使用して調製し得る。これらには、これらに限定されないが、KoehlerおよびMilstein(Nature、256巻:495~497頁、1975年)によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、Immunol Today、4巻:72号、1983年;Coteら、Proc Natl Acad Sci、80巻:2026~2030頁、1983年)およびEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R Liss Inc、New York N.Y.、77~96頁、(1985年)が含まれる。

#### 【0166】

手短に言えば、例示的な実施形態において、モノクローナル抗体を生成するために、マウスに、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープを周期的に注射し、これに対して抗体が生じる(例えば、10~20μg、フロイント完全アジュバントに乳化)。マウスに、PBS中のリンパ管内皮細胞の特異的認識を可能とするエピトープを含有する、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープの最終的な融合前追加免疫を与え、4日後、マウスを屠殺し、その脾臓を取り出す。脾臓を10mlの無血清RPMI 1640中に入れ、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、100ユニット/mlのペニシリン、および

100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン (RPMI) (Gibco, Canada) を補充した無血清 RPMI 1640 に浸した2つのガラス製顕微鏡用スライドのすり板末端の間で脾臓を粉砕することによって単一の細胞懸濁液を形成させる。細胞懸濁液を無菌の70メッシュ Nitetex 細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Parsippany, N.J.) を通して濾過し、200g で5分間遠心分離することによって2回洗浄し、ペレットを20ml の無血清 RPMI に再懸濁させる。3匹の未処理 Balb/c マウスから採取した脾細胞を同様の様式で調製し、対照として使用する。融合の前3日間、11% ウシ胎仔血清 (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah) を有する RPMI 中で対数期に維持した NS-1 骨髄腫細胞を、200g で5分間遠心分離し、ペレットを2回洗浄する。

10

**【0167】**

脾臓細胞 ( $1 \times 10^8$  個) を  $2.0 \times 10^7$  個の NS-1 細胞と合わせ、遠心分離し、上清を吸引する。チューブを軽く叩くことによって細胞ペレットを取り除き、37 の 1ml の PEG 1500 (75mM の HEPES 中 50%、pH 8.0) (Boehringer Mannheim) を1分に亘って攪拌しながら加え、それに続いて7ml の無血清 RPMI を7分に亘って加える。さらなる8ml の RPMI を加え、細胞を200g で10分間遠心分離する。上清を廃棄した後、ペレットを15% FBS、100  $\mu$ M のヒポキサンチンナトリウム、0.4  $\mu$ M のアミノプテリン、16  $\mu$ M のチミジン (HAT) (Gibco)、25 ユニット/ml の IL-6 (Boehringer Mannheim) および  $1.5 \times 10^6$  個の脾細胞/ml を含有する200ml の RPMI に再懸濁させ、10 Corning フラットボトム 96 ウェル組織培養プレート (Corning, Corning N.Y.) 中に蒔く。

20

**【0168】**

融合後2日目、4日目、および6日目に、100  $\mu$ l の媒体を融合プレートのウェルから除去し、新鮮な媒体と置き換える。8日目に、ELISA によって融合物をスクリーニングし、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加された MyBP-C、MyBP-C の Cys 残基、MyBP-C 内のエピトープに結合したマウス IgG の存在について試験する。

**【0169】**

選択した融合ウェルを、96ウェルプレート中への希釈によって2回クローン化し、5日後のコロニー/ウェルの数の視覚的スコアリングを行う。ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体を、IsoStrip システム (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) を使用してアイソタイプを判定する。

30

**【0170】**

ハイブリドーマ技術を用いるとき、骨髄腫細胞系を使用し得る。ハイブリドーマ産生融合手順において使用するのに適したこのような細胞系は好ましくは、抗体産生性でなく、高融合の効率性を有し、特定の選択的媒体中で増殖できなくするように酵素が欠損しており、これは細胞系が所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) のみを増殖することを支持する。例えば、免疫化した動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7 および S194/15XX0Bul を使用してもよく、ラットについて、R210、RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F および 4B210 を使用してもよく、U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2 および UC729-6 は、細胞融合に関連して全て有用である。モノクローナル抗体を産生するためのこのような技術によって産生されたハイブリドーマおよび細胞系は、本開示の新規な組成物であると意図されることに留意すべきである。

40

**【0171】**

宿主動物種によって、様々なアジュバントを使用して、免疫反応を増加させ得る。このようなアジュバントには、これらに限定されないが、フロイント、鉱物ゲル、例えば、水酸化アルミニウム、および表面活性物質、例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオー

50

ル、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが含まれる。BCG（カルメットゲラン菌）および *Corynebacterium parvum* は、潜在的に有用なヒトアジュバントである。

【0172】

代わりに、他の方法、例えば、EBV-ハイブリドーマ方法（HaskardおよびArcher、J. Immunol. Methods、74巻（2号）、361～67頁（1984年）、およびRoderら、Methods Enzymol.、121巻、140～67頁（1986年））、およびバクテリオファージベクター発現系（例えば、Huseら、Science、246巻、1275～81頁（1989年）を参照されたい）は、当技術分野において公知である。さらに、ヒトではない動物において抗体を産生する方法は、例えば、米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、および同第5,714,352号、ならびに米国特許出願公開第2002/0197266A1号）に記載されている。

10

【0173】

Orlandiら（Proc Natl Acad Sci、86巻：3833～3837頁；1989年）、およびWinter GおよびMilstein C（Nature、349巻：293～299頁、1991年）に開示されているように、リンパ球集団において *in vivo* の産生を誘発することによって、または組換え免疫グロブリンライブラリーもしくは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、抗体をまた産生し得る。

20

【0174】

ファージディスプレイをさらに使用して、本開示の抗体を生成することができる。これに関して、標準的分子生物学および組換えDNA技術を使用して、抗体の抗原結合性可変（V）ドメインをコードするファージライブラリーを生成することができ（例えば、Sambrookら（編）、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York（2001年）を参照されたい）、所望の特異性を有する可変領域をコードするファージを、所望の抗原への特異的結合のために選択し、選択した可変ドメインを含む完全な抗体または部分抗体を再構成する。モノクローナル抗体の特徴を有する抗体が細胞によって分泌されるように、再構成された抗体をコードする核酸配列を、適切な細胞系、例えば、ハイブリドーマの産生のために使用される骨髓腫細胞中に導入する（例えば、Janewayら（前述）、Huseら（前述）、および米国特許第6,265,150号を参照されたい）。関連する方法はまた、米国特許第5,403,484号；米国特許第5,571,698号；米国特許第5,837,500号；米国特許第5,702,892号に記載されている。米国特許第5,780,279号；米国特許第5,821,047号；米国特許第5,824,520号；米国特許第5,855,885号；米国特許第5,858,657号；米国特許第5,871,907号；米国特許第5,969,108号；米国特許第6,057,098号；米国特許第6,225,447号に記載されている技術。

30

【0175】

抗体は、特定の重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックなトランスジェニックマウスによって産生することができる。このような方法は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,545,806号および同第5,569,825号、およびJanewayら（前述）に記載されている。

40

【0176】

ヒト化抗体を生成するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、Janewayら（前述）、米国特許第5,225,539号、同第5,585,089号および同第5,693,761号、欧州特許第0239400B1号、および英国特許第2188638号において詳細に記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,639,641号およびPedersenら、J. Mol. Biol.、235巻、959～973頁

50

(1994年)に記載されている抗体リサーフェイシングテクノロジーを使用して生成することができる。

【0177】

「キメラ抗体」の産生のために開発された技術である、適当な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングを使用することができる(Morrisonら、Proc Natl Acad Sci、81巻:6851~6855頁、1984年;Neubergerら、Nature、312巻:604~608頁、1984年;Takedaら、Nature、314巻:452~454頁、1985年)。代わりに、単鎖抗体の産生について記載されている技術(米国特許第4,946,778号)を適応して、VEGFR-3-特異的単鎖抗体を産生することができる。

10

【0178】

好ましいキメラまたはヒト化抗体は、ヒト定常領域を有し、一方、抗体の可変領域、または少なくともCDRは、非ヒト種に由来する。非ヒト抗体をヒト化する方法は、当技術分野で周知である。(米国特許第5,585,089号、および同第5,693,762号を参照されたい)。一般に、ヒト化抗体は、ヒトではない源からのそのフレームワーク領域中に導入した1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。例えば、Jonesら(Nature、321巻:522~525頁、1986年)、Riechmannら(Nature、332巻:323~327頁、1988年)およびVerhoeyenら(Science、239巻:1534~1536頁、1988年)において記載されている方法を使用して、ヒト抗体の対応する領域を、げっ歯類相補性決定領域(CDR)の少なくともポーションで置換することによって、ヒト化を行うことができる。改変された抗体を調製するための多数の技術は、例えば、OwensおよびYoung、J. Immunol. Meth.、168巻:149~165頁(1994年)に記載されている。次いで、さらなる変化を、抗体フレームワーク中に導入し、親和性または免疫原性をモジュレートすることができる。

20

【0179】

同様に、CDRを単離するための当技術分野で公知の技術を使用して、CDRを含む組成物が生成される。相補性決定領域は、6つのポリペプチドループ(重鎖または軽鎖の可変領域のそれぞれに対して3つのループ)によって特徴付けられる。CDR中のアミノ酸の位置は、参照により本明細書中に組み込まれているKabatra、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」、U.S. Department of Health and Human Services、(1983年)に定義されている。例えば、ヒト抗体の超可変領域は、重鎖および軽鎖の可変領域の残基28~35、49~59および残基92~103において見出されると概ね定義される(JanewayおよびTravers、Immunobiology、第2版、Garland Publishing、New York、(1996年))。マウスCDRはまた、概ねこれらのアミノ酸残基において見出される。CDR領域は、上記に記載されたこれらの接近した残基のいくつかのアミノ酸内に見出し得ることが当技術分野で理解される。免疫グロブリン可変領域はまた、CDRを取り囲む4つの「フレームワーク」領域(FR1~4)からなる。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は種において高度に保存されており、またヒトおよびマウス配列の間で保存されている。

30

40

【0180】

マウス抗体のフレームワーク領域(FR)は、1200超のヒトV<sub>H</sub>配列および1000超のV<sub>L</sub>配列を含めたヒト抗体の可変配列の大きなデータベースより選択される適合性ヒトフレームワーク領域を置換することによってヒト化される。比較のために使用した抗体配列のデータベースは、Andrew C. R. Martin's Kabat Man ウェブページ(<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>)からダウンロードする。CDRを同定するためのKabat法は、任意のヒト抗体からの概

50

ねのCDRおよびフレームワーク領域を記述し、類似性についてマウス抗体の配列を比較し、CDRおよびFRを決定するための手段を提供する。最良に対応したヒトV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列は、高い全体的フレームワークのマッチング、同様のCDR長、ならびにカノニカルおよびV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>接触残基の最小のミスマッチングに基づいて選択される。マウス配列と最も同様のヒトフレームワーク領域をマウスCDRの間に挿入する。代わりに、マウスフレームワーク領域は、ヒト抗体のフレームワーク領域により密接に似ている未変性フレームワーク領域の全てまたはパートのアミノ酸置換を作製することによって修飾し得る。

#### 【0181】

「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の性質における類似性に基づいて行われる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン（Ala、A）、ロイシン（Leu、L）、イソロイシン（Ile、I）、バリン（Val、V）、プロリン（Pro、P）、フェニルアラニン（Phe、F）、トリプトファン（Trp、W）、およびメチオニン（Met、M）が含まれ、極性の中性アミノ酸には、グリシン（Gly、G）、セリン（Ser、S）、トレオニン（Thr、T）、システイン（Cys、C）、チロシン（Tyr、Y）、アスパラギン（Asn、N）、およびグルタミン（Gln、Q）が含まれ、正に帯電している（塩基性）アミノ酸には、アルギニン（Arg、R）、リシン（Lys、K）、およびヒスチジン（His、H）が含まれ、負に帯電している（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸（Asp、D）およびグルタミン酸（Glu、E）が含まれる。「挿入」または「欠失」は好ましくは、約1～20個のアミノ酸、より好ましくは1～10個のアミノ酸の範囲である。組換えDNA技術を使用してポリペプチド分子中のアミノ酸の置換を系統的に行い、このように得られた組換え変異体を活性についてアッセイすることによって、バリエーションを導入し得る。核酸の変更は、異なる種からの核酸の異なる部位（可変位置）において、または高度に保存領域（定常領域）において行うことができる。本発明において有用なポリペプチド組成物を発現する方法を、下記でより詳細に記載する。

#### 【0182】

さらに、本発明において使用するための抗体を生成するための別の有用な技術は、合理的設計タイプのアプローチを使用するものであり得る。合理的設計のゴールは、これらが相互作用する生物活性のあるポリペプチドまたは化合物の構造的類似体（アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、ペプチド模倣物、結合パートナーなど）を産生することである。1つのアプローチにおいて、抗体またはそのエピトープ結合断片についての三次元構造を生成する。これは、X線結晶構造解析、コンピューターモデリングによって、または両方のアプローチの組合せによって達成することができる。代替のアプローチである「アラニンスキャン」は、分子の全体に亘る残基をアラニンとランダムに置き換えることが関与し、機能に対する結果として生じた影響を決定する。

#### 【0183】

特異的抗体の結晶構造を解析することもまた可能である。原理上は、このアプローチは、ファルマコフォア（pharmacore）を生じさせ、それに続くドラッグデザインはこれに基づくことができる。機能的な薬理学的に活性の抗体に対する抗イディオタイプ抗体を生成することによって、タンパク質結晶学を全体で迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は、当初の抗原の類似体であると予想される。次いで、抗イディオタイプを使用して、化学的または生物学的に産生されたペプチドのバンクからさらなる抗体を同定および単離することができる。

#### 【0184】

化学的に構築された二重特異性抗体は、化学物質、例えば、ヘテロ二官能性試薬スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)-プロピオネート（SPDP、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.）を用いて、異種FabまたはF(ab')<sub>2</sub>断片を化学的に架橋することによって調製し得る。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、それぞれ、パパインまたはペプシンによりインタクトな抗体を消化すること

によって、インタクトな抗体から得ることができる (Karpovskiyら、J. Exp. Med. 160巻: 1686~701頁、1984年; Titusら、J. Immunol. 138巻: 4018~22頁、1987年)。

#### 【0185】

抗体がどのように産生されたかに関わらず、MyBP-Cのエピトープ、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープに結合する能力について抗体を試験する方法は当技術分野において公知であり、任意の抗体-抗原結合アッセイ、例えば、放射免疫測定(RIA)、ELISA、ウエスタンブロット、免疫沈降、および競争的阻害アッセイ(例えば、Janewayら(下記)、および米国特許出願公開第2002/0197266A1号を参照されたい)を含む。

10

#### 【0186】

##### アプタマー

例示的な態様において、本発明の結合剤は、アプタマーである。コンビナトリアル科学の分野における最近の進歩によって、所与の標的に対して高親和性および特異性を有する短いポリマー配列(例えば、オリゴ核酸またはペプチド分子)が同定されてきた。例えば、SELEXテクノロジーを使用して、哺乳動物の抗体に対抗する結合特性を有するDNAおよびRNAアプタマーが同定されてきており、免疫学の分野では、無数の化合物に結合する抗体または抗体断片を生成および単離してきており、ファージディスプレイが利用され、非常に好ましい結合特性を有する新規なペプチド配列が発見されてきた。これらの分子進化技術の成功に基づいて、任意の標的分子に結合する分子を生じさせることができることは確実である。ループ構造は、相補的塩基対形成を伴わない短い領域から生じたヘアピンループを利用することが多いアプタマー、ループ状超可変領域のコンビナトリアル配列を利用する天然由来の抗体、および線形ペプチドファージディスプレイの結果と比較したとき改善された結果を示した環状ペプチドを利用する新規なファージディスプレイライブラリーの場合のように、所望の結合性状を実現することに関与していることが多い。このように、コンビナトリアル分子進化技術によって高親和性リガンドを生じさせ、同定することができることを示唆する十分な証拠が生成されてきた。本開示のために、分子進化技術を使用して、本明細書に記載されているMyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープに対して特異的な結合剤を単離することができる。アプタマーについてさらには、一般に、Gold, L., Singer, B., He, Y., Brody, E., 「Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents」、J. Biotechnol. 74巻: 5~13頁(2000年)を参照されたい。アプタマーを生成するための関連する技術は、参照によりその全体が組み込まれている米国特許第6,699,843号において見出し得る。

20

30

#### 【0187】

いくつかの実施形態において、アプタマーは、核酸のライブラリーを調製し、核酸のライブラリーと増殖因子とを接触させることによって生成してもよく、増殖因子に対して(他のライブラリー核酸と比べて)より大きな結合親和性を有する核酸を選択および増幅し、増殖因子に結合するための相対的に高い親和性および特異性を有する核酸について濃縮された核酸の混合物が生じる。この工程は繰り返してもよく、選択した核酸を変異させ、再スクリーニングし、それによって増殖因子アプタマーが同定される。核酸をスクリーニングして、複数の標的MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープに結合する分子を選択し得る。複数の標的MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープを結合することは、同時にまたは競合的に複数のMyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープを結合することを指すことができる。

40

50

## 【0188】

## エピトープ

例示的な実施形態において、本発明の結合剤は、MyBP-Cのエピトープ、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープに結合する。「MyBP-Cのエピトープ」とは、本明細書において使用する場合、結合剤の結合ユニット（複数可）が結合するMyBP-Cの領域またはMyBP-C中の領域を意味する。いくつかの実施形態において、エピトープは、線形エピトープである。「線形エピトープ」とは、本明細書において使用する場合、結合剤の結合ユニット（複数可）が結合するMyBP-Cの領域またはMyBP-C中の領域を意味し、この領域は、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープのアミノ酸配列の近接するアミノ酸からなる。線形エピトープのアミノ酸は、抗原の一次構造、ならびに抗原の二次および/または三次構造（複数可）において互いに極めて接近して配置されている。例えば、抗原、例えば、MyBP-C、例えば、S-グルタチオン付加されたMyBP-C、MyBP-CのCys残基、MyBP-C内のエピトープが、その適正に折り畳まれた状況（例えば、その未変性立体構造）にあるとき、線形エピトープの近接するアミノ酸は、互いに極めて接近して配置されている。

10

## 【0189】

他の例示的な態様において、結合剤のエピトープは、立体構造エピトープである。「立体構造エピトープ」とは、MyBP-Cがその適正に折り畳まれた状況にあるときのみに、互いに極めて接近して配置されているが、MyBP-Cのアミノ酸配列の近接するアミノ酸ではない、アミノ酸からなるエピトープを意味する。

20

## 【0190】

例示的な態様において、結合剤は、MyBP-C内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数を含む。例示的な態様において、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数は、S-グルタチオン付加されており、結合剤は、1つまたは複数のCys残基を含むMyBP-CのS-グルタチオン付加された形態、またはそのS-グルタチオン付加された断片に特異的に結合する。

30

## 【0191】

例示的な態様において、結合剤は、MyBP-C内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数を含む。例示的な態様において、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数は、S-グルタチオン付加されており、結合剤は、1つまたは複数のCys残基を含むMyBP-CのS-グルタチオン付加された形態、またはそのS-グルタチオン付加された断片に特異的に結合する。

40

## 【0192】

例示的な態様において、結合剤は、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cに結合する。いくつかの態様において、結合剤は、MyBP-CのS-グルタチオン付加された形態に特異的に結合し、MyBP-Cのグルタチオン付加されていない形態に特異的に結合しない。いくつかの態様において、S-グルタチオン付加は、MyBP-CのCys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数において起こり、Cys残基の位置は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けによる。いくつかの態様において、S-グルタチオン付加は、MyBP-CのCys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数において起こり、C

50

y s 残基の位置は、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けによる。

【0193】

例示的な態様において、結合剤は、MyBP-C の Cys 239、Cys 249、Cys 426、Cys 436、Cys 443、Cys 475、Cys 528、Cys 566、Cys 623、Cys 651、および / または Cys 719 の 1 つに特異的に結合し、Cys 残基の位置は、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けによる。例示的な態様において、結合剤は、MyBP-C の Cys 475、Cys 623、および / または Cys 651 の 1 つに特異的に結合し、Cys 残基の位置は、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けによる。いくつかの態様において、結合剤は、「部位特異的抗体」と考えられる。例示的な態様において、MyBP-C の Cys 239、Cys 249、Cys 426、Cys 436、Cys 443、Cys 475、Cys 528、Cys 566、Cys 623、Cys 651、および / または Cys 719 の 1 つまたは複数は S - グルタチオン付加されており、結合剤は、1 つまたは複数の Cys 残基を含む MyBP-C の S - グルタチオン付加された形態、またはその S - グルタチオン付加された断片に特異的に結合する。例示的な態様において、MyBP-C の Cys 475、Cys 623、および / または Cys 651 の 1 つまたは複数は、S - グルタチオン付加されており、結合剤は、1 つまたは複数の Cys 残基を含む MyBP-C の S - グルタチオン付加された形態、またはその S - グルタチオン付加された断片に特異的に結合する。いくつかの態様において、結合剤は、MyBP-C の部位特異的およびグルタチオン付加特異的抗体であり、これは、MyBP-C 上の他の部位を認識せず、グルタチオン付加されていない部位を認識しない。

10

20

【0194】

例示的な態様において、結合剤は、抗体、抗体の抗原結合断片、またはアプタマー、例えば、本明細書に記載されているもののいずれかである。

【0195】

コンジュゲート

例示的な実施形態において、結合剤は、第 2 の部分または異種部分にコンジュゲートしている。本明細書において使用する場合、「異種部分」という用語は「コンジュゲート部分」という用語と同義であり、本明細書に記載されている本発明の結合剤とは異なる、任意の分子（化学的または生化学的、天然またはコードされていない）を指す。本明細書に記載されている結合剤のいずれかに連結することができる例示的なコンジュゲート部分には、これらに限定されないが、異種ペプチドまたはポリペプチド（例えば、酵素、酵素基質、2 つの結合パートナーの間に高親和性結合相互作用を有する結合パートナーを含めた）、ターゲティング剤、異種免疫グロブリンまたはそのポーション（例えば、可変領域、CDR、または Fc 領域）、診断用または検出可能な標識、例えば、放射性同位体、フルオロフォアまたは酵素標識、ポリマー（水溶性ポリマーを含めた）、または他の治療もしくは診断用薬剤が含まれる。いくつかの実施形態において、本発明は、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはその断片、ポリマー、量子ドット、小分子、毒素、診断用薬剤、炭水化物、アミノ酸に連結している発明性のある結合剤を含むコンジュゲートを提供する。

30

【0196】

いくつかの実施形態において、異種部分は、ポリマーである。いくつかの実施形態において、ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびその誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート（terephthalates）を含めた）、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー（ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）、およびポリ（アクリル酸オクタデシル）を含めた）、ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ハロゲン化ポリビニル、ポリ（酢酸ビニル）、およびポリビニルピロリドンを含めた）、ポリグリ

40

50

コリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、セルロース（アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、および硫酸セルロースナトリウム塩を含めた）、ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、およびポリ（エチレンテレフタレート）を含めた）、ならびにポリスチレンからなる群より選択される。

#### 【0197】

いくつかの態様において、ポリマーは、合成生分解性ポリマー（例えば、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸（butyric acid））、ポリ（吉草酸）、およびポリ（ラクチド-coカプロラクトン））、ならびに天然生分解性ポリマー（例えば、アルギネート、ならびにデキストランおよびセルロース、コラーゲン、その化学誘導体（化学基、例えば、アルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者によって通例行われる他の修飾）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質（例えば、ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性タンパク質）を含めた他の多糖類）、ならびに任意のコポリマーまたはその混合物を含めた生分解性ポリマーである。一般に、これらの材料は、酵素加水分解または水への *in vivo* での曝露によって、表面またはバルクの侵食によって分解する。

#### 【0198】

いくつかの態様において、ポリマーは、生体付着性ポリマー、例えば、生体侵食性ヒドロゲル（その教示が本明細書において組み込まれている H. S. Sawhney, C. P. Pathak および J. A. Hubbell, *Macromolecules*, 1993 年、26 巻、581~587 頁に記載されている）、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルテン（glutelin）、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）、およびポリ（アクリル酸オクタデシル）である。

#### 【0199】

いくつかの実施形態において、ポリマーは、水溶性ポリマーまたは親水性ポリマーである。親水性ポリマーは、本明細書の「親水性部分」においてさらに記載されている。適切な水溶性ポリマーは当技術分野において公知であり、例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC; Klucel）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC; Methocel）、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース（Ethocel）、ヒドロキシエチルセルロース、様々なアルキルセルロースおよびヒドロキシアルキルセルロース、様々なセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリ-メタクリル酸ヒドロキシアルキル、メタクリル酸ヒドロキシメチル、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ナトリウムおよびカルシウムポリアクリル酸（sodium and calcium polyacrylic acid）、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテル-co-無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、メタクリル酸カリウムジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、

ならびにこれらの誘導体、塩、および組合せが含まれる。

【0200】

特定の実施形態において、ポリマーは、ポリアルキレングリコール（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）を含めた）である。

【0201】

いくつかの実施形態において、異種部分は、炭水化物である。いくつかの実施形態において、炭水化物は、単糖類（例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース）、二糖類（例えば、スクロース、ラクトース、マルトース）、オリゴ糖（例えば、ラフィノース、スタキオース）、または多糖類（例えば、デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、もしくはガラクトマンナン）である。

10

【0202】

いくつかの実施形態において、異種部分は、脂質である。脂質は、いくつかの実施形態において、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン、グリセロ脂質（例えば、モノ-、ジ-、トリ-置換グリセロール）、グリセロリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン）、スフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴシン、セラミド）、ステロール脂質（例えば、ステロイド、コレステロール）、プレノール脂質（prenol lipid）、サッカロ脂質（saccharolipid）、またはポリケチド、油、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

20

【0203】

いくつかの実施形態において、異種部分は、ポリペプチドまたはペプチド、任意選択で、酵素、酵素基質、または公知の結合相互作用の結合タンパク質である。例示的な態様において、異種部分は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、その基質、アビジン、ビオチン、放射性標識または蛍光標識である。いくつかの態様において、蛍光標識は、イソチオシアネート、フルオレセイン、ローダミン、alex fluor、dylight fluor、ATT0染料、BODIPY染料などである。

【0204】

いくつかの実施形態において、異種部分は、本発明の結合剤に非共有結合または共有結合を介して付着している。例示的な態様において、異種部分は、本発明の結合剤にリンカーを介して付着している。連結は、共有化学結合、物理的力、例えば、静電気、水素、イオン、ファンデルワールス、または疎水性もしくは親水性相互作用によって達成することができる。ビオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞接着分子パートナー；または互いに親和性を有する任意の結合パートナーもしくはその断片を含めた、種々の非共有結合性カップリング系を使用し得る。

30

【0205】

いくつかの実施形態において、結合剤は、結合剤の標的とされるアミノ酸残基と、これらの標的とされるアミノ酸の選択した側鎖またはN-もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤とを反応させることによって、コンジュゲート部分に直接の共有結合的連結を介して連結している。結合剤またはコンジュゲート部分上の反応性基には、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 $\alpha$ -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基が含まれる。誘導体化剤には、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基によるコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基による）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当技術分野において公知の他の薬剤が含まれる。代わりに、コンジュゲート部分は、中間担体、例えば、多糖類またはポリペプチド担体によって結合剤に間接的に連結することができる。多糖類担体の例には、アミノデキストランが含まれる。適切なポリペプチド担体の例には、結果として生じた添加担体に望ましい溶解度特性を与える、ポリリシン、ポリグルタミン

40

50

酸、ポリアスパラギン酸、そのコポリマー、ならびにこれらのアミノ酸およびその他、例えば、セリンの混合ポリマーが含まれる。

#### 【0206】

システニル残基は、 $\alpha$ -ハロアセテート（および対応するアミン）、例えば、クロロ酢酸、クロロアセトアミドと最も一般に反応し、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体が得られる。システニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 $\alpha$ -ブromo- $\beta$ -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

10

#### 【0207】

ヒスチジル残基は、pH 5.5 ~ 7.0でのジエチルピロカルボネートとの反応によって誘導体化される（この作用剤がヒスチジル側鎖に対して相対的に特異的であるため）。パラ-ブromoフェナシルブロミドがまた有用である。反応は好ましくは、0.1Mのカコジル酸ナトリウム中でpH 6.0にて行う。

#### 【0208】

リシニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応する。これらの作用剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。 $\alpha$ -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬には、イミドエステル、例えば、ピコリンイミド酸メチル、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロ水素化ホウ素、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオン、およびグリオキシレートによるトランスアミナーゼ-触媒反応が含まれる。

20

#### 【0209】

アルギニル残基は、1種またはいくつかの通常の試薬（中でも、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリン）との反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高pKaによって、反応がアルカリ性条件において行われることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リシン基およびアルギニン $\epsilon$ -アミノ基と反応し得る。

#### 【0210】

チロシル残基の特異的修飾を行ってもよく、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基中にスペクトル標識を導入することに特別な関心を有する。最も一般に、N-アセチルイミダゾール(acetyl imidazole)およびテトラニトロメタンを使用して、それぞれ、O-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体が形成される。

30

#### 【0211】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド( $R-N=C=N-R'$ )との反応によって選択的に修飾され、RおよびR'は、異なるアルキル基、例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-ホルホルニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドである。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

40

#### 【0212】

他の修飾には、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の $\alpha$ -アミノ基のメチル化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79~86頁(1983年))、アスパラギンまたはグルタミンの脱アミド、N末端アミンのアセチル化、ならびに/あるいはC末端カルボン酸基のアミド化またはエステル化が含まれる。

50

## 【0213】

別のタイプの共有結合的修飾は、グリコシドを結合剤に化学的または酵素的にカップリングすることが関与する。糖（複数可）は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基、（d）遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基、（e）芳香族残基、例えば、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基、あるいは（f）グルタミンのアミド基に付着し得る。これらの方法は、1987年9月11日に公開されたWO87/05330、およびAppl inおよびWriston、CRC Crit. Rev. Biochem.、259~306頁（1981年）に記載されている。

10

## 【0214】

## 多量体

本発明は、ホモ - もしくはヘテロ - 多量体またはホモ - もしくはヘテロ - 二量体を含めた、本明細書において開示する結合剤の多量体または二量体をさらに提供する。結合剤の2つ以上は、当業者には公知の標準的連結剤および手順を使用して一緒に連結することができる。例えば、二量体は、二官能性チオール架橋剤および二官能性アミン架橋剤の使用によって2つの結合剤（特に、システイン、リシン、オルニチン、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニン残基で置換されている結合剤について）の間に形成することができる。二量体はホモ二量体でよく、または代わりにヘテロ二量体でよい。いくつかの態様において、モノマーは、末端アミノ酸（例えば、N末端もしくはC末端）を介して、内部アミノ酸を介して、または少なくとも1つのモノマーの末端アミノ酸、および少なくとも1つの他のモノマーの内部アミノ酸を介して接続している。特定の態様において、モノマーは、N末端アミノ酸を介して接続していない。いくつかの態様において、多量体のモノマーは、「尾 - 対 - 尾」の配向で一緒に付着しており、各モノマーのC末端アミノ酸は、一緒に付着している。

20

## 【0215】

システム、コンピュータ可読ストレージ媒体、およびコンピュータプロセッサによって実装される方法

図12は、拡張期心不全の拡張機能障害のための治療剤についての被験体の必要性を評価するためのシステム100の例示的な実施形態101を例示する。一般に、システム100は、1つまたは複数のクライアントデバイス102、ネットワーク104、およびデータベース108を含み得る。各クライアントデバイス102は、1つまたは複数の有線または無線ネットワーク接続112（例えば、IEEE802.11規格（「Wi-Fi」）の1つ、イーサネット（登録商標）規格などの規格に従った接続、または任意の他の適当なネットワーク接続でよい）を介して通信によってネットワーク104へとカップリングし得る。同様に、データベース108は、1つまたは複数の接続114を介して通信によってネットワーク104へとカップリングし得る。（当然ながら、データベースは、代わりに、クライアントデバイス102の1つまたは複数の内部でよい。）データベース108は、これらに限定されないが、被験体から得た生物学的試料のデータ、対照または試験集団から得た生物学的試料のデータ、生物学的試料のデータと関連するガウス分布のデータ、生物学的試料（複数可）および/またはガウス分布のデータと関連する1つまたは複数の閾値のデータなどを含めた、拡張期心不全の拡張機能障害のための治療剤についての被験体の必要性の決定に関するデータを記憶し得る。生物学的試料のデータは、例えば、下記でより詳細に記載するような、MyBP-C、その翻訳後に修飾された形態、もしくはその断片のレベル、またはADMA、SDMA、またはL-アルギニンなどのレベルの1つまたは複数と関連し得る。

30

40

## 【0216】

理解されるように、ネットワーク104は、ローカルエリアネットワーク（LAN）または広域ネットワーク（WAN）でよい。すなわち、ネットワーク104は、ローカル（例えば、組織間）接続のみを含んでもよく、または代わりに、ネットワーク104は、組

50

織を超えて拡張する接続、および1つまたは複数の公衆ネットワークへの接続（例えば、インターネット）を含み得る。いくつかの実施形態において、例えば、クライアントデバイス102およびデータベース108は、単一の会社（会社A）によってオペレーションされるネットワーク内でもよい。他の実施形態において、例えば、クライアントデバイス（複数可）102は、会社Aによってオペレーションされるネットワーク上でよく、一方、データベース108は、第2の会社（会社B）によってオペレーションされるネットワーク上でよく、会社Aおよび会社Bのネットワークは、第3のネットワーク、例えば、インターネットによってカップリングしてもよい。

#### 【0217】

また図12を参照すると、クライアントデバイス102は、プロセッサ128（CPU）、RAM130、および不揮発性メモリ132を含む。不揮発性メモリ132は、限定のためではなく例として、磁気ディスク（例えば、ハードディスクドライブ）、ソリッドステートドライブ（例えば、フラッシュメモリ）などを含めた任意の適当な記憶デバイスでよい。さらに、少なくとも図12に関して、データベース108は、クライアントデバイス102から分離する必要はないことが理解される。代わりに、いくつかの実施形態において、データベース108は、不揮発性メモリ132のパートであり、データ122、124、126は、メモリ132内のデータとして記憶し得る。例えば、データ122は、データベース108中のデータとしての代わりに、メモリ132中に記憶されたスプレッドシートファイル中のデータとして含み得る。データベース108の記録を記憶することに加えて（いくつかの実施形態において）、メモリ132は、プログラムデータ、および1つまたは複数の試料および/または対照集団のデータを分析するのに必要な他のデータを記憶し、データについてのガウスフィットを決定し、被験体のデータを比較し得る閾を決定し、かつ/または拡張期心不全の拡張機能障害のための治療剤についての被験体の必要性を決定する。例えば、一実施形態において、メモリ132は、第1のルーチン134、第2のルーチン136、および第3のルーチン138を記憶する。第1のルーチン134は、1つまたは複数の試料および/または対照集団に関するデータ値を受け取ってもよく、ルーチン134が受け取ったデータ値をガウス分布にフィットさせてもよい。第2のルーチン136は、第1のルーチン134によって集めたデータの1つまたは複数の統計パラメータをコンピュータ処理（ガウス分布の平均値、標準偏差値などを決定するなど）し得る。さらにおよび/または代わりに、第2のルーチン136は、各被験体が拡張期心不全の拡張機能障害のための治療剤を受け取るべきかどうかを決定するために、1つまたは複数の被験体からのデータを比較し得る第1の閾を設定し得る。第3のルーチン138は、例えば、1つまたは複数の被験体についてのデータを受け取り、1つまたは複数の被験体のデータと第2のルーチン136が決定した閾値（複数可）とを比較し、かつ/あるいは被験体のデータと閾値との比較によって各被験体が拡張期心不全の拡張機能障害のための治療剤を受け取るべきかどうかを決定し得る。とにかく、ルーチンのそれぞれは、プロセッサ128によって実行可能であり、メモリ132中に記憶された一連のコンパイルした、またはコンパイル可能な機械可読命令を含む。さらに、メモリ132は、生成した報告、またはルーチン134もしくは136の1つによるデータ出力の記録を記憶し得る。代わりに、報告または記録は、データベース108に出力し得る。1つまたは複数のディスプレイ/出力デバイス140（例えば、プリンター、ディスプレイなど）および1つまたは複数の入力デバイス142（例えば、マウス、キーボード、タブレット、タッチセンシティブインターフェースなど）はまた、一般に公知のように、クライアントデバイス102にカップリングし得る。

#### 【0218】

理解されるように、1つまたは複数の方法の個々のオペレーションを、別々のオペレーションとして例示および記載するが、個々のオペレーションの1つまたは複数はいくつも行ってもよく、オペレーションが例示した順序で行われる必要はない。環境設定例において別々の成分として示した構造および機能性は、合わせた構造または成分として実装し得る。同様に、単一の成分として示される構造および機能性は、別々の成分として実装し得

10

20

30

40

50

る。これらおよび他のバリエーション、修飾、付加、および改善は、本明細書において主題の範囲内に入る。

【0219】

例えば、ネットワーク104は、LAN、MAN、WAN、モバイル、有線もしくは無線ネットワーク、プライベートネットワーク、または仮想プライベートネットワークの任意の組合せを含み得るが、これらに限定されない。その上、記載を単純化および明確化するために2つのクライアント102のみが図12において例示されている一方、任意の数のクライアントコンピュータがサポートされ、1つまたは複数のサーバー（図示せず）と通信することができることが理解される。

【0220】

さらに、特定の実施形態は、ロジックまたはいくつかのルーチンを含むと本明細書に記載する。ルーチンは、ソフトウェアルーチン（例えば、機械可読媒体上または伝送信号において具体化されるコード）、またはハードウェアルーチンを構成し得る。ハードウェアルーチンは、特定のオペレーションを行うことができる有体のユニットであり、特定の様式で環境設定または配列し得る。実施形態例において、1つもしくは複数のコンピュータシステム（例えば、スタンドアロン、クライアントもしくはサーバーコンピュータシステム）、またはコンピュータシステムの1つもしくは複数のハードウェアルーチン（例えば、プロセッサもしくはプロセッサの群）は、本明細書に記載のような特定のオペレーションを行うようにオペレーションするハードウェアルーチンとして、ソフトウェア（例えば、アプリケーションまたはアプリケーションのポーション）によって環境設定し得る。

【0221】

同様に、本明細書に記載されている方法またはルーチンは、少なくとも部分的にプロセッサにより実装されてよい。例えば、方法のオペレーションの少なくともいくつかは、1つまたは複数のプロセッサ、またはプロセッサにより実装されるハードウェアモジュールによって行い得る。特定のオペレーションの実行は、単一の機械内に帰属するだけでなく、いくつかの機械に亘って配備されている、1つまたは複数のプロセッサの間に分布し得る。いくつかの実施形態例において、プロセッサ（複数可）は、単一の場所（例えば、住居環境、オフィス環境内、またはサーバーファームとして）に配置してもよく、一方、他の実施形態において、プロセッサは、いくつかの場所に亘って分布させてもよい。

【0222】

特定のオペレーションの実行は、単一の機械内に帰属するだけでなく、いくつかの機械に亘って配備されている、1つまたは複数のプロセッサの間で分布し得る。いくつかの実施形態例において、1つまたは複数のプロセッサ、またはプロセッサにより実装されるモジュールは、単一の地理的場所（例えば、住居環境、オフィス環境、またはサーバーファーム内）に配置してもよい。他の実施形態例において、1つまたは複数のプロセッサ、またはプロセッサにより実装されるモジュールは、いくつかの地理的場所に亘って分布させてもよい。

【0223】

いくつかの実施形態を、「カップリングした」および「接続した」という表現をそれらの派生語と共に使用して記載し得る。例えば、いくつかの実施形態は、「カップリングした」という用語を使用して記載して、2つ以上の要素が直接物理的接触または電氣的接触していることを示し得る。しかし、「カップリングした」という用語はまた、2つ以上の要素が互いに直接接触していないが、さらにまた互いに同時にオペレーションまたは相互作用することを意味し得る。実施形態は、この文脈に限定されない。

【0224】

本明細書において使用する場合、「含む」、「含むこと」、「含めた」、「含めて」、「有する」、「有すること」という用語、または任意の他のそのバリエーションは、非排他的に含むことを包含することを意図する。例えば、要素の一覧を含む工程、方法、物品、または器具は、これらの要素のみに必ずしも限定されないが、明らかに一覧表示されていない、あるいはこのような工程、方法、物品、または器具に固有ではない他の要素を含

10

20

30

40

50

み得る。さらに、他に明白に断りのない限り、「または」とは、包括的な「または」を指し、排他的な「または」を指さない。例えば、条件 A または B は、下記の任意の 1 つによって満たされる。A は真であり（または存在し）、かつ B は偽であり（または存在せず）、A は偽であり（または存在せず）、かつ B は真であり（または存在し）、A および B の両方は真である（または存在する）。

【0225】

さらに、「a」または「an」の使用を用いて、本明細書における実施形態の要素および成分を記載する。単に便宜のため、および記載の一般的意味を与えるためにこれを行う。この記載は、1 つまたは少なくとも 1 つを含むと読むべきであり、単数はまた、これがそうではないことを意味することが明らかな限り複数を含む。

10

【0226】

またさらに、例示の目的のみのために、図はマップエディターシステムの好ましい実施形態を示す。本明細書において例示する構造および方法の代わりの実施形態を、本明細書に記載されている趣旨から逸脱することなしに用いてもよいことを、当業者は下記の考察から容易に認識する。

【0227】

当業者はこの開示を読んで、本明細書において開示した原理によってターミナルロードセグメントを同定するための、システムおよび工程についてのまたさらなる代わりの構造設計および機能設計を認識する。このように、特定の実施形態および用途を例示および記載してきた一方で、開示された実施形態は、本明細書において開示する正確な構築物および成分に限定されないことを理解すべきである。当業者には明らかであろう様々な修飾、変化およびバリエーションを、添付の特許請求の範囲において定義する精神および範囲から逸脱することなしに、本明細書において開示する方法および器具の、配列、オペレーションおよび詳細において行い得る。

20

【0228】

本発明は、プロセッサ；プロセッサにカップリングしている記憶デバイス、および記憶デバイス上に記憶されている機械可読命令を含むシステムを提供する。例示的な実施形態において、機械可読命令は、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサが、

(i) 被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C のレベル、(b) MyBP-C の翻訳後に修飾された形態のレベル、または (c) MyBP-C 断片のレベルからなる群より選択されるデータ値を受け取り、

30

(ii) (i) のデータ値と対応する対照データ値（対応する対照データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C、(b) MyBP-C の翻訳後に修飾された形態、または (c) MyBP-C 断片のレベルである）とを比較し、

(iii) (i) のデータ値が、対応する対照データ値よりも大きいとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供することを引き起こす。

40

【0229】

例示的な態様において、プロセッサは、複数の対照データ値を受け取ることができ、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C、(b) MyBP-C の翻訳後に修飾された形態、または (c) MyBP-C 断片のレベルである。次いで、プロセッサは、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対応する対照データ値として割り当ててもよい。例示的な態様において、プロセッサは、複数の各対照データ値を対照データ値として割り当てる。例示的な態様において、プロセッサは、新規な対照データ値を受け取るたびに、平均値を計算または再計算する。例示的な態様において、プロセッサは、各対照データ値および各平均値を記憶デバイス上に記憶する。

【0230】

50

例示的な態様において、プロセッサは、被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、(i)のデータ値を拡張機能障害データ値として割り当て、拡張機能障害データ値を記憶デバイス上に記憶する。

【0231】

代わりのまたはさらなる態様において、本発明のシステムは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサが、

(i)第1のデータ値および第2のデータ値(第1のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベルであり、第2のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン(SDMA)のレベルである)を受け取り、

10

(ii)(i)の第1のデータ値と対照ADMAデータ値(対照ADMAデータ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルである)とを比較し、

(iii)(i)の第2のデータ値と対照SDMAデータ値(対照SDMAデータ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したSDMAのレベルである)とを比較する

ことを引き起こす、機械可読命令を含む。

【0232】

20

例示的な態様において、(i)プロセッサは、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルである、複数の対照データ値を受け取り、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対照ADMAデータ値として割り当てることができ、(ii)プロセッサは、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したSDMAのレベルである、複数の対照データ値を受け取り、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対照SDMAデータ値として割り当てることができ、または(iii)これらの組合せである。

【0233】

例示的な態様において、プロセッサは、複数の各対照データ値(これは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルである)を対照データ値(ADMA)として割り当てる。例示的な態様において、プロセッサは、新規な対照データ値(ADMA)を受け取るたびに、平均値を対照ADMAデータ値として計算または再計算する。例示的な態様において、プロセッサは、各対照データ値(ADMA)および各平均値(対照ADMAデータ値)を記憶デバイス上に記憶する。

30

【0234】

例示的な態様において、プロセッサは、複数の各対照データ値(これは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したSDMAのレベルである)を対照データ値(SDMA)として割り当てる。例示的な態様において、プロセッサは、新規な対照データ値(SDMA)を受け取るたびに、平均値を対照ADMAデータ値として計算または再計算する。例示的な態様において、プロセッサは、各対照データ値(SDMA)および各平均値(対照SDMAデータ値)を記憶デバイス上に記憶する。

40

【0235】

代わりのまたはさらなる態様において、本発明のシステムは、プロセッサによって実行されるとき、プロセッサが、

(i)第1のデータ値および第2のデータ値(第1のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベルであり、第2のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定したL-アルギニン(L-Arg)のレベルである)を受け取り、

(ii)第2のデータ値と第1のデータ値の比(Rt)と、対照比(Rc)であって、

50

R<sub>c</sub>は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したL-アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルの比である、R<sub>c</sub>とを比較し、

(iii) R<sub>t</sub>が、R<sub>c</sub>未満であるとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供する

ことを引き起こす、機械可読命令を含む。

【0236】

例示的な態様において、プロセッサは、複数の対照比を受け取ることができ、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したL-アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルの比である。例示的な態様において、プロセッサは、各対照比を対照比として割り当てる。例示的な態様において、プロセッサは、新規な対照比を受け取るたびに、平均対照比を計算または再計算する。例示的な態様において、プロセッサは、各対照比および各平均対照比を記憶デバイス上に記憶する。

【0237】

例示的な態様において、プロセッサは、被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、R<sub>t</sub>を拡張機能障害の比として割り当て、拡張機能障害の比を記憶デバイス上に記憶する。

【0238】

本明細書においてまた提供するの、プロセッサによって実行可能な機械可読命令をその上に記憶したコンピュータ可読ストレージ媒体である。例示的な実施形態において、機械可読命令は、発明性のあるシステムの上記の指示のいずれかである。例示的な実施形態において、指示は、

(i) プロセッサが、被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-Cのレベル、(b) MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態のレベル、または(c) MyBP-C断片のレベルからなる群より選択されるデータ値を受け取ること引き起こすための指示；

(ii) プロセッサが、(i)のデータ値と対応する対照データ値(対応する対照データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C、(b) MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態、または(c) MyBP-C断片のレベルである)とを比較すること引き起こすための指示、ならびに

(iii) プロセッサが、(i)のデータ値が対応する対照データ値よりも大きいとき、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供すること引き起こすための指示

を含む。

【0239】

例示的な態様において、コンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C、(b) MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態、または(c) MyBP-C断片のレベルである、複数の対照データ値を受け取り、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対応する対照データ値として割り当てることを引き起こすための指示を含む。例示的な態様において、コンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、(i)のデータ値を拡張機能障害データ値として割り当て、拡張機能障害データ値を記憶デバイス上に記憶すること引き起こすための指示を含む。

【0240】

代わりのまたはさらなる実施形態において、本発明のコンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、

( i ) 第 1 のデータ値および第 2 のデータ値 ( 第 1 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン ( A D M A ) のレベルであり、第 2 のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン ( S D M A ) のレベルである ) を受け取り、

( i i ) ( i ) の第 1 のデータ値と対照 A D M A データ値 ( 対照 A D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである ) とを比較し、

( i i i ) ( i ) の第 2 のデータ値と対照 S D M A データ値 ( 対照 S D M A データ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである ) とを比較し、

( i v ) ( i ) の第 1 のデータ値が、対照 A D M A データ値よりも大きいとき、および ( i ) の第 2 のデータ値が、対照 S D M A データ値と概ね同じであるとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供することを引き起こすための指示を含む。

#### 【 0 2 4 1 】

例示的な態様において、コンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、複数の対照データ値を受け取り ( これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルである ) 、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対照 A D M A データ値として割り当てることを引き起こすための指示を含み、( i i ) プロセッサは、複数の対照データ値であって、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した S D M A のレベルである、複数の対照データ値を受け取り、複数の対照データ値の平均値を決定し、平均値を対照 S D M A データ値として割り当てることができ、または ( i i i ) これらの組合せである。

#### 【 0 2 4 2 】

代わりのまたはさらなる実施形態において、コンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、

( i ) 被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニン ( L - A r g ) のレベルである第 3 のデータ値を受け取り、

( i i ) 第 3 のデータ値と第 1 のデータ値の比 (  $R_t$  ) と、対照比 (  $R_c$  ) であって、 $R_c$  は、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した L - アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した A D M A のレベルの比である、 $R_c$  とを比較し、

( i i i )  $R_t$  が、 $R_c$  未満であるとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供する

ことを引き起こすための指示を含む。

#### 【 0 2 4 3 】

例示的な態様において、コンピュータ可読ストレージ媒体は、プロセッサが、被験体における拡張機能障害の出力診断が提供されるとき、 $R_t$  を拡張機能障害の比として割り当て、拡張機能障害の比を記憶デバイス上に記憶することを引き起こすための指示を含む。

#### 【 0 2 4 4 】

本明細書においてさらに提供するののは、コンピュータ中のプロセッサによって実装される方法である。例示的な実施形態において、方法は、

( i ) 被験体から得た生物学的試料から決定した、( a ) M y B P - C のレベル、( b ) M y B P - C の翻訳後に修飾された形態のレベル、または ( c ) M y B P - C 断片のレベルからなる群より選択されるデータ値を受け取る工程と、

( i i ) ( i ) のデータ値と対応する対照データ値 ( 対応する対照データ値は、複数の

10

20

30

40

50

対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定した、(a) MyBP-C、(b) MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態、または(c) MyBP-C断片のレベルである)とを比較する工程と、

(iii)(i)のデータ値が対応する対照データ値よりも大きいとき、被験体において拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供する工程とを含む。

#### 【0245】

例示的な実施形態において、方法は、

(i)第1のデータ値および第2のデータ値(第1のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベルであり、第2のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した対称性ジメチルアルギニン(SDMA)のレベルである)を受け取る工程と、

(ii)(i)の第1のデータ値と対照ADMAデータ値(対照ADMAデータ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルである)とを比較する工程と、

(iii)(i)の第2のデータ値と対照SDMAデータ値(対照SDMAデータ値は、複数の対照データ値の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したSDMAのレベルである)とを比較する工程と、

(iv)(i)の第1のデータ値が、対照ADMAデータ値よりも大きいとき、および(i)の第2のデータ値が、対照SDMAデータ値と概ね同じであるとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供する工程とを含む。

#### 【0246】

代わりのまたはさらなる実施形態において、方法は、

(i)第1のデータ値および第2のデータ値(第1のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定した非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)のレベルであり、第2のデータ値は、被験体から得た生物学的試料から決定したL-アルギニン(L-Arg)のレベルである)を受け取る工程と、

(ii)第2のデータ値と第1のデータ値の比(Rt)と、対照比(Rc)であって、Rcは、複数の対照比の平均であり、これらのそれぞれは、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したL-アルギニンのレベルと、心不全を患っていないことが既知である被験体から得た生物学的試料から決定したADMAのレベルの比である、Rcとを比較する工程と、

(iii)Rtが、Rc未満であるとき、被験体における拡張機能障害または拡張期心不全の出力診断を提供する工程とを含む。

#### 【0247】

発明性のあるシステム、コンピュータ可読ストレージ媒体、およびコンピュータ中のプロセッサによって実装される方法の例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片である。

#### 【0248】

キット

本明細書において提供するものは、MyBP-C、その翻訳後に修飾された形態または断片に対して特異的な結合剤または基質を含むキット、例えば、診断キットである。例示的な態様において、MyBP-Cの翻訳後に修飾された形態は、S-グルタチオン付加されたMyBP-CまたはMyBP-CのS-グルタチオン付加された断片である。結合剤が

10

20

30

40

50

MyBP-CのS-グルタチオン付加された形態またはS-グルタチオン付加されたMyBP-C断片を特異的に認識しないいくつかの態様において、キットは、グルタチオン特異的結合剤を含み得る。いくつかの態様において、結合剤は、抗体、抗原結合断片、アプタマー、ペプチド、または核酸プローブである。例示的な態様において、結合剤は、本明細書に記載されている本発明の結合剤の1つである。例示的な態様において、結合剤は、S-グルタチオン付加されたMyBP-Cに特異的に結合する。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、MyBP-Cは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数においてS-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、結合剤は、1つまたは複数のS-グルタチオン付加されたCys残基を欠いているMyBP-Cに結合しない。例示的な態様において、結合剤は、S-グルタチオン付加されていないMyBP-Cに結合しない。例示的な態様において、Cys残基がS-グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数に結合しない。例示的な態様において、Cys残基がS-グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数に結合しない。

#### 【0249】

例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-C内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719の1つまたは複数を含む。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-C内のエピトープに特異的に結合し、エピトープは、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651の1つまたは複数を含む。例示的な態様において、1つまたは複数のCys残基は、S-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、1つまたは複数のCys残基がS-グルタチオン付加されていないとき、結合剤は、1つまたは複数のCys残基に結合しない。代わりの態様において、1つまたは複数のCys残基は、S-グルタチオン付加されておらず、Cys残基がS-グルタチオン付加されていないときのみ、結合剤は1つまたは複数のCys残基に結合する。

#### 【0250】

例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-CのCys残基に特異的に結合し、Cys残基は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys239、Cys249、Cys426、Cys436、Cys443、Cys475、Cys528、Cys566、Cys623、Cys651、および/またはCys719である。例示的な実施形態において、単離された結合剤は、MyBP-CのCys残基に特異的に結合し、Cys残基は、配列番号21のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys475、Cys623、および/またはCys651である。例示的な態様において、Cys残基は、S-グルタチオン付加されている。例示的な態様において、結合剤は、Cys残基がS-グルタチオン付加されていないときにCys残基に結合しない。代わりの態様において、Cys残基はS-グルタチオン付加されておらず、Cys残基がS-グルタチオン付加されていないときのみ、結合剤はCys残基に結合する。

#### 【0251】

例示的な態様において、結合剤は、検出可能な標識、例えば、フルオロフォア、発色団

、放射性同位体などにコンジュゲートしている。例示的な態様において、結合剤は、酵素または酵素基質にコンジュゲートしている。例示的な態様において、結合剤は、2つの結合パートナーの間に高親和性結合相互作用を有する結合パートナーにコンジュゲートしている。例示的な態様において、結合剤は、アビジンまたはビオチンにコンジュゲートしている。

【0252】

例示的な態様において、キットは、一次抗体（例示的な態様において、MyBP-C、その翻訳後に修飾された形態、またはその断片のための、結合剤である）に結合する二次抗体を含む。いくつかの態様における二次抗体は、検出可能な標識（例えば、フルオロフォア、発色団、放射性同位体など）、酵素、酵素基質、2つの結合パートナーの間に高親和性結合相互作用を有する結合パートナー（例えば、アビジン、ビオチン）にコンジュゲートしている。

10

【0253】

例示的な態様において、キットは、免疫測定のためのさらなる成分、例えば、マイクロタイタープレート、ビーズ、ブロッキング溶液、チューブ、フラスコ、膜、フィルター、洗浄溶液、酵素、酵素基質、検出可能な標識を含む。

【0254】

例示的な態様において、キットは、ELISA、例えば、サンドイッチELISAのための成分を含む。例えば、キットは、マイクロタイタープレート、MyBP-C特異的抗体、抗グルタチオン特異的抗体、二次抗体、洗浄溶液、ブロッキング溶液、および増強された化学発光（ECL）キットを含み得る。

20

【0255】

発明性のあるキットの代わりにまたはさらなる実施形態において、キットは、ADMAのための結合剤および/またはSDMAのための結合剤を含む。例示的な態様において、ADMAに対して特異的な結合剤、および/またはSDMAのための結合剤は、抗体である。

【0256】

いくつかの態様において、結合剤（複数可）は、固体支持体、例えば、ビーズ、ウェル、ディッシュ、チューブ、濾紙、膜などに結合する。他の態様において、結合剤は、溶液で提供される。さらにさらなる態様において、結合剤は、凍結乾燥した形態で提供される。

30

【0257】

いくつかの態様において、キットは、MyBP-C、またはその断片をコードする遺伝子またはmRNAに特異的に結合する核酸プローブのコレクションを含む。いくつかの態様において、核酸プローブのコレクションは、固体支持体、例えば、遺伝子チップ上にアレイでフォーマットされる。

【0258】

いくつかの態様において、キットは、使用説明書、例えば、本発明の方法を行うための指示をさらに含む。いくつかの態様において、指示は、指示の紙のコピー、指示の電子コピー、例えば、コンパクトディスク、フラッシュドライブ、または他の電子媒体として提供される。いくつかの態様において、指示は、インターネットサイトへ指図を提供することを通して提供され、ここでユーザーは指示にアクセスし得る。

40

【0259】

いくつかの態様において、指示は、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベル、データの間の相関データを含むデータベース、および拡張期心不全の診断に関するデータを、ユーザーが比較する工程を含む。いくつかの態様において、キットは、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベル、および拡張期心不全の診断に関するデータの間の相関データを含むデータベースの電子コピーを含む。いくつかの態様において、キットは、ユーザーが、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルと、対照被験体のレベルとを比較

50

することを可能とする、コンピュータソフトウェアプログラムの電子コピーを含む。例示的な態様において、キットは、本発明のシステムまたはコンピュータ可読ストレージ媒体を含む。

【0260】

代わりの態様において、指示は、ユーザーが、MyBP-C、またはその翻訳後に修飾された形態もしくは断片のレベルに関するデータをプロバイダーに提供し、プロバイダーが、データを分析した後、診断情報をユーザーに提供する工程を含む。

【0261】

いくつかの態様において、キットは、被験体の試料、例えば、本明細書に記載されている試料のいずれかを集めるためのユニットをさらに含む。いくつかの態様において、試料を集めるためのユニットは、バイアル、ピーカー、チューブ、マイクロタイタープレート、ペトリ皿、バッグ、カップなどである。

10

【0262】

決してその範囲を限定するためでなく、本発明を単に例示するため、下記の実施例を提示する。

【実施例】

【0263】

(実施例1)

下記の実施例は、拡張機能障害を有する動物におけるミオシン結合タンパク質Cのグルタチオン付加における有意な増加を示す。

20

【0264】

DOCA-塩マウスモデルの生成：従前、本発明者らは、このモデルは軽度の高血圧、心筋の酸化ストレス、および拡張機能障害に至ることを示した。血圧の徐々に軽度の上昇は、片側腎摘出術、制御放出の酢酸デオキシコルチコステロン(DOCA)ペレット(0.7mg/d; Innovative Research of America, Sarasota, FL)の皮下埋込、および飲料水を1.05%食塩水で置換することによって誘発された。シャム手術を受けた対照動物は、プラセボペレットの埋込を有し、塩を含まない水を受けた。

【0265】

DOCA-塩および対照マウスについて、侵襲的血行動態研究、非侵襲的心エコー法、および筋細胞単離を、術後14~18日目に行った。全ての実験は、イリノイ大学シカゴ校の動物実験委員会によって承認された。

30

【0266】

ラノラジンの慢性投与：5mgのラノラジン、0.3mgのP450阻害剤、および0.25mgの赤色食品色素を含有する特別食餌を、1gの栄養的に完全な穀物をベースとする錠剤(Harlan, Madison, WI)中にプレスした。対照食餌は、同じタイプの1gの錠剤中にプレスした0.3mgのP450阻害剤および0.25mgの黄色食品色素を含有した。DOCA-塩およびシャムマウスは、術後11~18日目から約1gの特別な食餌を毎日消費した。

【0267】

40

翻訳後修飾の分析：除膜線維を1%(v/v)Triton X-100と共に、振盪機上での30分間のインキュベーション、それに続くインキュベーション間に30秒のボルテックスを伴う超音波処理浴中での2サイクルの10分のインキュベーションによって、15μLの試料緩衝液(8Mの尿素、2Mのチオ尿素、0.05Mのトリス(pH6.8)、75mMのDTT、3%SDS、および0.05%プロモフェノールブルー)に可溶化した。試料を100℃で3分間加熱し、10分のスピン清澄の後に、上清の全てを12%分解1D SDS-PAGEゲル上に添加した。ゲルを、Typhoon9410スキャナー(GE Healthcare)によるイメージングに先行して、メーカーの推奨によってPro-Q Diamond(Invitrogen)で染色および脱染色した。タンパク質の光学密度をImageQuant TL(GE Healthcare

50

ソフトウェアを使用して決定し、Comma s s i e R - 2 5 0 染色ゲルを使用して、タンパク質添加をアクチンおよび全レーンの両方に対して正規化した。結果をE x c e l にエクスポートし、J M P 統計ソフトウェア ( C a r y 、 N C ) で分析した。

#### 【 0 2 6 8 】

ウエスタンブロット分析を使用して、グルタチオン付加されたタンパク質を検出した。筋原線維をD O C A およびシャムマウス心臓から調製し、ペレットを非還元性 2 × L a e m m l i 緩衝液 ( 4 % S D S 、 2 0 % グリセロール、0 . 0 0 4 % プロモフェノールブルー、および 0 . 1 2 5 M のトリスH C l ( p H 6 . 8 ) ) に可溶化した。2 5 m M の N - エチルマレイミド ( N E M ) を、標準的硬直緩衝液 ( T r i t o n X - 1 0 0 を有する )、標準的硬直洗浄緩衝液および 2 × L a e m m l i 緩衝液に加えた。R C - D C ( B i o - R a d ) アッセイから決定したタンパク質濃度を使用して、4 0 μ g の総タンパク質を 1 D 1 2 % 分解 S D S - P A G E ゲルに加え、0 . 2 μ M のポリフッ化ビニリデン ( P V D F ) 膜上に移した。ブロットを 2 . 5 m M の N E M を有する 5 % 脱脂粉乳中で 1 時間ブロックした。1 : 1 0 0 , 0 0 0 希釈での抗マウス H R P - コンジュゲート二次抗体 ( S i g m a ) と共に、抗グルタチオンマウスモノクローナル一次抗体 ( V i r o g e n 、 W a t e r t o w n 、 M A ) を 1 : 1 0 0 0 希釈で使用し、S - グルタチオン付加を検出した。バンドの光学密度を I m a g e Q u a n t T L ( G E H e a l t h c a r e ) で測定し、さらなる分析のために E x c e l にエクスポートした。ミオシン結合タンパク質 C への抗体を、修飾されていると同定されているバンドの同定のために使用した。

10

#### 【 0 2 6 9 】

米国特許仮出願第 6 1 / 5 4 4 , 0 3 0 号 ( 2 0 1 1 年 1 0 月 6 日に出版 )、米国特許仮出願第 6 1 / 6 1 8 , 9 0 0 号 ( 2 0 1 2 年 4 月 2 日に出版 )、および L o v e l o c k 氏ら、C i r c R e s 、 1 1 0 巻 ( 6 号 ) : 8 4 1 ~ 8 5 0 頁 ( e - p u b 、 2 0 1 2 年 2 月 1 6 日 ) において報告されているように、本発明者らは、拡張機能障害を有する動物におけるミオシン結合タンパク質 C のグルタチオン付加における有意な増加を示した。図 1 は、シャムおよび D O C A - 塩心臓からの筋フィラメントの翻訳後修飾を示すこの公開資料からのデータを表す。図 1 A : シャムおよび D O C A - 塩で処置された心臓からの筋フィラメント試料を比較したときの、グルタチオン付加されたタンパク質の検出を示すウエスタンブロット分析。ブロットをまたミオシン結合タンパク質 C について分析したが、このタンパク質が主要な修飾であったことを示した。一対の比較が、ゲルから除去されたことを留意されたい。図 1 B : シャムおよび D O C A - 塩筋フィラメントにおけるミオシン結合タンパク質 C ( M y B P - C ) に対して正規化したグルタチオン付加されたタンパク質 ( G S H ) の間の差異の定量化。 ( \* p < 0 . 0 5 、 n = 3 )。

20

30

#### 【 0 2 7 0 】

##### ( 実施例 2 )

##### D O C A - 塩マウスモデルの生成 :

従前、本発明者らは、D O C A - 塩マウスモデルが、軽度の高血圧、N O S アンカップリング、心筋の酸化ストレス、および拡張機能障害に至ることを示した [ 1 0 ]。血圧の徐々に軽度の上昇は、片側腎摘出術、制御放出の酢酸デオキシコルチコステロン ( D O C A ) ペレット ( 0 . 7 m g / d ; I n n o v a t i v e R e s e a r c h o f A m e r i c a 、 S a r a s o t a 、 F L ) の皮下埋込、および飲料水を 1 . 0 5 % 食塩水で置換することによって誘発された。対照動物はシャム手術を受け、プラセボペレットを埋め込まれ、塩を有さない水を受けた。

40

#### 【 0 2 7 1 】

##### B H <sub>4</sub> の投与 :

マウスを、対照食餌を受ける 2 つの群 ( シャム、N = 7 ; D O C A - 塩、N = 1 0 )、および 5 m g の B H <sub>4</sub> / 日の B H <sub>4</sub> 補充食餌を受ける 2 つの群に分割した ( R e s e a r c h D i e t s I n c 、 N e w B r u n s w i c k 、 N J ; シャム + B H <sub>4</sub>、N = 8 ; D O C A - 塩 + B H <sub>4</sub>、N = 8 )。補充食餌は手術の 1 1 日後に開始し、1 8 日目まで継続し、この時点でマウスを分析し、屠殺した。

50

## 【0272】

ウエスタン免疫ブロット法によるサルコメアタンパク質グルタチオン付加の分析：

筋原線維をDOCA-塩およびシャムモデルの心臓から調製し、ペレットを非還元性2×Laemmli緩衝液(4%SDS、20%グリセロール、0.004%プロモフェノールブルー、および0.125MのトリスHCl(pH6.8))に可溶化した。25mMのN-エチルマレイミド(NEM)を、標準的硬直緩衝液(Triton X-100を有する)、標準的硬直洗浄緩衝液および2×Laemmli緩衝液に加えた。[21]RC-DC(Bio-Rad)アッセイから決定したタンパク質濃度を使用して、40pgの総タンパク質を12%SDS-PAGEゲルに加え、0.2pmのPVDF膜上に移した。ブロットを2.5mMのNEMを有する5%脱脂粉乳中で1時間ブロックした。1:100,000希釈での抗マウスHRPコンジュゲート二次抗体(Sigma)と共に、抗グルタチオンマウスモノクローナル一次抗体(Virogen)を1:1000希釈で使用し、S-グルタチオン付加を検出した。バンドの光学密度をImageQuant TL(GE Healthcare)で測定し、さらなる分析のためにExcelにエクスポートした。

10

## 【0273】

統計解析：

心エコー法、単離した心筋細胞、除膜線維張力、ATPアーゼ測定、および筋フィラメントタンパク質の翻訳後修飾データを、一元配置または二元配置ANOVA、それに続いてスチューデントt検定を使用して、GraphPad PrismまたはJMP統計ソフトウェアを使用して統計的に分析した。 $Ca^{2+}$ および張力またはATPアーゼ活性の間の関係の分析を、従前記載した通り修正したヒルの式を使用してフィットさせた。MyBP-Cのグルタチオン付加および心エコーのE/E'比の間の関係の分析は、線形回帰分析において相関した。 $P < 0.05$ の値は、有意に異なると考えられた。データは平均±SEMとして示す。

20

## 【0274】

ミオシン結合タンパク質C翻訳後修飾

DOCA-塩マウスからの心臓の筋フィラメントにおけるMyBP-CのS-グルタチオン付加の増加を示す本発明者らの以前の知見を考慮して、本発明者らは、BH<sub>4</sub>食餌がこの修飾を逆転させることができるかどうかを決定した。代表的なゲルおよび総タンパク質添加量に対して正規化したブロットデータを図2に示す。MyBP-Cのグルタチオン付加は、全ての他の群(互いに有意差があるとはいえなかった)と比較して、DOCA-塩群において有意に増加した。

30

## 【0275】

図3A~3Dにおいて示したデータにおいて、本発明者らは、正規化したMyBP-Cのグルタチオン付加に応じた、拡張機能パラメーター(E/E'またはE'/A'比)をプロットした。図3AおよびBに示すように、E/E'比は、MyBP-Cのグルタチオン付加と有意に正相関した(勾配=3.23±0.90、 $R^2=0.305$ 、\*\* $P<0.01$ )。その上、TDI E'/A'比は、MyBP-Cのグルタチオン付加と逆相関した(勾配=-0.08±0.02、 $R^2=0.257$ 、\*\* $P<0.01$ )。筋フィラメントの張力損失はまた、MyBP-Cのグルタチオン付加およびE/E'、心エコーのデータの両方と逆に相関した。

40

## 【0276】

手術の10日後に、本発明者らは心エコー法を用い、拡張機能障害を特徴付けた。Vevo770高解像度in vivoイメージングシステム(Visual Sonics、Toronto、Canada)を使用して、僧帽弁パルス波ドブラ流および組織ドブライメージング(TDI)を行った。拡張機能の測定が心拍数および添加量条件に対して感受性であるため、概ね350~390拍/分の心拍数が達成されるまでマウスを1~1.5%イソフルランで麻酔した。乳頭中央レベルにおける傍胸骨長軸像および左心室(LV)短軸像のMモード像を取った。測定は、呼気の間の5回の連続した拍動から平均化し

50

た。各マウスについての像を、少なくとも5秒間(30~40回の心臓周期)記録し、そこから最も高い質のイメージングの3~5の代表的な周期を選択した。短縮パーセント(FS%)は、 $100 \times (LVEDd) - (LVESd) / (LVEDd)$ として計算し、LV駆出分画パーセント(EF%)は、 $100 \times [(7/2.4 + LVEDd) \times LEDd^3] - [(7/2.4 + LVESd) \times LVESd^3] / [(7/2.4 + LVEDd) \times LEDd^3]$ として計算した。心尖部四腔断層像における拡張期充满プロファイルのために、ドブラ測定を僧帽弁先端において行った。僧帽弁流入速度、早期ピーク(E)および後期ピーク(A)を、通常のパルス波ドブラによって測定した。TDIを使用して、僧帽弁輪の縦速度(Sm、E'、およびA')を決定した。処置前のベースライン像を得て、DOCA-塩マウスにおける拡張機能障害を確認した。続いて、マウスにBH<sub>4</sub>を与え、それに続いて18日目に心エコー法を行った。

#### 【0277】

BH<sub>4</sub>補充食餌による処置を術後11日目に開始し、心エコー法を術後18日目に繰り返した。結果は図3および表1において見ることができる。シャムおよびDOCA-塩における7日のBH<sub>4</sub>投与は、LV駆出分画(図3G)または短縮率(図3H)に影響を与えなかった。

#### 【0278】

僧帽弁ドブラ流を、全てのマウスにおいて同程度の心拍数(平均約370拍/分)で測定した。本発明者らがこのモデルにおいて報告してきたように、僧帽弁E速度、A速度、およびE/A比は、全ての群において有意に変化しなかった(図3Iおよび3L)。それにも関わらず、僧帽弁組織ドブラE'は、DOCA-塩マウスにおいて有意に減少したが、これは準正常拡張機能障害ステージを示す。E'/A'の比は、DOCA-塩マウスにおいて有意に減少し、BH<sub>4</sub>処置によって回復した(DOCA-塩+BH<sub>4</sub>、 $1.12 \pm 1.10$ 、それに対してDOCA-塩、 $0.74 \pm 0.05$ 、 $P < 0.001$ )。シャムおよびシャム+BH<sub>4</sub>群は、E'/A'において有意差を示さなかった(図3Jおよび3M)。E/E'比、左心房圧の測定値は、DOCA-塩マウスにおいて有意に増加し、BH<sub>4</sub>投与の後に対照レベルに回復した(図3K、DOCA-塩+BH<sub>4</sub>、 $34.5 \pm 2.2$ 、それに対してDOCA-塩、 $43.7 \pm 2.7$ 、 $P < 0.01$ )。

#### 【0279】

##### (実施例3)

DOCA-塩マウスまたはシャム対照マウス血漿を集め、グルタチオン-特異的抗体を有する試料を免疫沈降させ、それに続くMyBP-C-特異的抗体によるウェスタンブロッティングによって、グルタチオン付加されたMyBP-Cおよびそのグルタチオン付加された断片のレベルを測定した。図4は、MyBP-Cの総血清レベルが増加し、インタクトまたは完全長のグルタチオン付加されたMyBP-C(144kD)がDOCA-塩DDマウス(N=4)の血漿中で増加したことを示す。MyBP-Cのグルタチオン付加された40kDの断片およびグルタチオン付加された15~20kDaの断片はまた、シャム対照マウスと比較して、DOCA-塩マウスの血漿中で上昇した。

#### 【0280】

##### (実施例4)

合計でN=120人の被験体(3群(収縮期HF、拡張期HFおよび健康な対照患者)のそれぞれにおいてN=40人)からの血漿を集める。試料が各群において20人の患者について利用できるときに中間分析を行い、より大きなコホートに継続するかどうかを決定する。潜在的な被験体は、イリノイ大学シカゴ校およびJesse Brown Veterans Affairs Medical Centerによって追跡される数千人の患者のコホートからである。適格性基準には、1)年齢18歳以上、および2)この1年間心エコー図によって実証されるSDまたはDD心不全を有することが含まれる。非適格性基準には、先天性心疾患、先天性不整脈障害の既往、がん処置を受けている患者が含まれる。登録した全ての患者は、書面による同意を提出する。

#### 【0281】

データは、被験体の問診、ならびに病院および診療所カルテの調査から集める。得た人口統計データは、年齢、人種、肥満度指数、ニューヨーク心臓協会（N Y H A）の機能クラス、および従前の心筋梗塞、高血圧症、糖尿病、喫煙、またはアルコール使用の既往を含む。さらに、登録時に摂取している全ての医薬品、ならびにE F決定のデータおよび方法を記録する。

#### 【0282】

単一の採血を、登録の時に行う。M y B P - Cのグルタチオン付加を、非還元条件下で測定する。全ての患者試料は、本発明者らの動物試験と同様の様式で加工する。

#### 【0283】

0.05の両側 $\alpha$ レベルおよび0.80の検定検出力で、予備的動物データの平均値および標準偏差に基づいて必要とされる試料サイズは、群毎に約30人の被験体であることを検出力分析は示す。6つまでの共変数を補正するための十分な数を有するために、40人の患者が各群にいる。

10

#### 【0284】

血漿M y B P - Cのグルタチオン付加の分析：

群からの血漿試料を集め、ウエスタンブロット分析を使用して、M y B P - CおよびS - グルタチオン付加を以下の通りに検出する。

#### 【0285】

血漿M y B P - Cのグルタチオン付加の分析：

群からの血漿試料を集め、還元性および非還元性アリコートに分割する。還元性試料は、還元性2 × L a e m m l i 試料緩衝液（2%  $\beta$  -メルカプトエタノール、4% S D S、20%グリセロール、0.004%プロモフェノールブルー、および0.125 MのトリスH C l（p H 6.8））中で調製し、5分間95℃で煮沸する。グルタチオン付加についての非還元性試料は、2 × L a e m m l i 緩衝液（25 m MのN - エチルマレイミド、4% S D S、20%グリセロール、0.004%プロモフェノールブルー、および0.125 MのトリスH C l（p H 6.8））中で調製する<sup>5</sup>。血漿試料を、4 ~ 20%勾配のS D S - P A G Eゲルで分析し、ニトロセルロースブロットに移す。ブロットを、2.5 m MのN E Mを有する5%脱脂粉乳中で1時間ブロックする。1 : 20, 000希釈での抗マウスH R Pコンジュゲート二次抗体（S i g m a）と共に、抗グルタチオンモノクローナル一次抗体（V i r o g e n）または抗M y B P - C抗体を1 : 1000 ~ 1 : 5000希釈で使用し、M y B P - CまたはS - グルタチオン付加を検出する<sup>5</sup>。バンドの光学密度を、I m a g e Jで測定する。

20

30

#### 【0286】

データ分析および予測結果：

グルタチオン付加されたM y B P - Cのレベルを、対照、D D、およびS D患者の間で比較する。グルタチオン付加されたM y B P - CはD D患者において最も高いことが予想される。ベースラインデータは、連続変数については平均 $\pm$  S D、およびカテゴリー変数については度数として表す。群の間のベースライン特性の差異を、それぞれ、カテゴリー変数および連続変数についてのフィッシャー直接検定およびマン - ホイットニー検定の使用によって調査する。回帰を使用して、独立変数について調節し、ここでは分布は群間でバランスを取らない。変数増減手順を使用する。結果を、変数増減手順と比較する。多重共線性の可能性を評価する。線形および非線形条件を考える。モデルの識別を、全体的なC指数によって評価し、ブートストラップ方法によって検証する。非線形性が検出される場合、変数の変換または非線形モデルのフィッティングを試み、条件をモデルのこれらの改善について評価する。可変分布の正規性を、正規確率プロットによって、およびシャピロ - ウィルク検定によって検定する。これに関して回帰が違反に対してかなり寛大である一方、変換を必要に応じて調査する。等分散性を、残差対予測値のプロットによって評価する。仮定が破られたように見える場合、ノンパラメトリック法を考える。

40

#### 【0287】

データ分析および予測結果：

50

グルタチオン付加されたMyBP-Cのレベルを、上記に記載したような統計解析を使用して、対照、DD、およびSD患者の間で比較する。グルタチオン付加されたMyBP-Cは、DD患者において最も高いことが予測される。

【0288】

(実施例5)

この実施例は、DOCA-塩マウス血漿試料中のS-グルタチオン付加されたMyBP-Cの増加を示す。

【0289】

血漿試料を、非還元条件下でシャムまたはDOCA-塩マウスから集めた。試料をグルタチオン-特異的抗体で免疫沈降を行い、MyBP-C-特異的抗体でウェスタンブロットした。

10

【0290】

グルタチオン付加されたインタクトなMyBP-C(144kDa)、およびそのグルタチオン付加された断片(75kDaおよび25kDa)の血漿レベルは、DOCA-塩マウスにおいて有意に増加した。図5に示すように、グルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片は、シャム対照マウスと比較してDOCA-塩マウスにおいて有意に増加した(3.7±0.6倍、P=0.011、N=3)。データは、平均±SEMとして表した。対応のないスチューデントt検定においてP<0.05。

【0291】

(実施例6)

保全された左心室機能を有する拡張機能障害患者からの血漿を集めた。試料を、MyBP-C-特異的抗体でウェスタンブロットした。図6Aに示すように、MyBP-Cの75kDaの断片は、保全された駆出分画を伴う心不全(HFpEF)患者(すなわち、保全された左心室機能を有する拡張機能障害患者)からの血漿中で有意に上昇した(2.6±0.6倍、P<0.05、N=8)。

20

【0292】

健康な患者群またはHFpEF群からの同等の容量の血漿試料を、グルタチオン-特異的抗体で免疫沈降を行い、次いで抗MyBP-C抗体で免疫ブロットした。図6Bに示すように、HFpEF患者の血漿からのグルタチオン付加されたMyBP-Cの75kDaの断片は、健康な患者と比較して有意に増加した(2.5±0.3倍、P<0.05、N=8)。image Jから取得したデンシトメトリデータは、平均±SEMとして表した。対応のないスチューデントt検定においてP<0.05。

30

【0293】

(実施例7)

この実施例は、MyBP-CのS-グルタチオン付加の増加が拡張機能障害の代表的なものであることを示し、拡張機能障害の処置がS-グルタチオン付加されたMyBP-Cレベルの後退をもたらすことを示唆する。

【0294】

マウスからのDOCA-塩およびシャム心臓におけるS-グルタチオン付加レベルは、ラノラジンの慢性投与の後、または慢性投与を伴わずに決定した。ラノラジンのマウスへの投与および翻訳後修飾の分析は、実施例1において本質的に記載したように分析した。

40

【0295】

MyBP-CのS-グルタチオン付加の変化を示す代表的なゲルを、図7Aに示す。MyBP-Cのグルタチオン付加は、全ての他の群と比較してDOCA-塩群において有意に増加した。ラノラジンを投与したときに、MyBP-Cのグルタチオン付加の後退したレベルが、DOCA-塩動物において観察された。

【0296】

(実施例8)

この実施例は、DOCA-塩マウスにおけるS-グルタチオン付加されたMyBP-Cの増加が、このタイプの翻訳後修飾に特異的であり、またこのタンパク質に特異的である

50

ことを示す。

【0297】

それぞれ、実施例1および2において本質的に記載されているように、DOCA-塩またはシャムマウスに、ラノラジンまたはBH4を投与した。Pro-Q Diamond (Invitrogen)ゲル染色を使用して、MyBP-Cのリン酸化状況における変化を検出した。筋原線維は、マウス心臓のDOCA-塩およびシャムモデルから調製し、ペレットを非還元性2×Laemmli緩衝液(4%SDS、20%グリセロール、0.004%プロモフェノールブルー、および0.125MのトリスHCl(pH6.8))に可溶化した。25mMのN-エチルマレイミド(NEM)を、標準的硬直緩衝液(Triton X-100を有する)、標準的硬直洗浄緩衝液、および2×Laemmli緩衝液に加えた。RC-DCアッセイ(BioRad)を使用して、タンパク質濃度を決定した。試料を還元性試料緩衝液(8Mの尿素、2Mのチオ尿素、0.05Mのトリス(pH6.8)、75mMのDTT、3%SDS、および0.05%プロモフェノールブルー)中にて1:1比で希釈し、概ね10μgのタンパク質を12%分解1D SDS-PAGEゲル上に添加した。ゲルを、Typhoon 9410スキャナー(GE Healthcare)によるイメージングの前に、メーカーの推奨によってPro-Q Diamondで染色および脱染色した。クーマシーR-250染色を使用して、タンパク質添加をアクチンおよび全レーンの両方に対して正規化した。タンパク質の光学密度をImageQuant TL(GE Healthcare)ソフトウェアを使用して決定し、さらなる分析のために結果をExcelにエクスポートした。

10

20

【0298】

図8Aに示すように、シャムおよびDOCA-塩マウスにおいてMyBP-Cのリン酸化のレベルにおいて変化はなかった。ラノラジンまたはBH4によるマウスの処置はまた、MyBP-Cのリン酸化レベルに影響を与えなかった(図8Aおよび8B)。したがって、DOCA-塩マウスにおいて観察されたS-グルタチオン付加されたMyBP-Cレベルの増加と対照的に、MyBP-Cのリン酸化は、健康な動物および拡張機能障害の動物モデルにおいて変化しない。

【0299】

(実施例9)

この実施例は、MyBP-C上のS-グルタチオン付加の部位を示す。

30

【0300】

タンデム質量分析法を使用して、140kDaのバンドをcMyBP-Cとして同定し、グルタチオン付加の部位は、655、479、および627位におけるシステインと決定した。8%非還元性1D SDS-PAGEゲルを上記のように実施し、メーカーのプロトコルによってImperial Protein Stain(Thermo)で染色した。140kDa前後のバンド(MyBP-C)をゲルから切り取り、Trypsin Gold(Promega)によるゲル内消化に供した。還元およびアルキル化ステップを省略し、タンパク質のS-グルタチオン付加を保全した。ブールした消化抽出物をSpeed Vacによって20μl未満まで濃縮し、移動相溶液(5%ACNおよび0.1%ギ酸)で40μlにした。ペプチドを0.22μmのPVDF Millipore Ultrafree-MCスピンフィルターで濾過し、35μlの試料をThermo Finnigan LTQ FTハイブリッドリニアイオントラップ-Dionex U3000ナノLCにカップリングしたフーリエ変換ICR質量分析計で分析した。Dionex acclaim PepMap100 C18トラッピングカラム(5μmの100Å Symmetry C18材料を充填した500μm×5mmのカラム)を使用して50μl/分の流量で試料を濃縮し、0.250μl/分の流量での分離のためにAgilent Zorbax 300SB-C18 Nano flowカラム(3.5μmのC18材料を充填した75μm×150mmのカラム)を使用した。ペプチドを、New Objective未コーティングSilica Tips(商標)(5cm長、チュービングOD360/75μm、チップID8μm)を通して5~45%の溶液B(9

40

50

5 % A C N、0 . 1 % ギ酸) の線形勾配で溶出した。ペプチドを、1 . 0 k V に設定した L T Q 電源電圧、および 2 0 0 に設定したキャピラリー温度によるエレクトロスプレーイオン化によってイオン化した。質量スペクトルは、5 0 , 0 0 0 の解像度で 4 0 0 ~ 1 8 0 0 の m / z 範囲に亘り陽イオンモードで得て、1 0 の最も強力なイオンをタンデム M S のために選択した。M S / M S は、必要とされる最小シグナル 5 0 0 0 、分離幅 3 、および正規化した衝突エネルギーを伴う衝突誘起解離モードで得た。

#### 【 0 3 0 1 】

質量分析法データを、生ファイルとして X c a l i b u r 2 . 0 . 7 ソフトウェアで集め、これを M a s s M a t r i x M S データファイル変換ツールを使用して m z X M L および M G F ファイルに変換した。M a s c o t サーチエンジンを使用して、M S / M S データを分析した。N C B I n r M u s m u s c u l u s およびデコイ ( 自動的に生成される逆のタンパク質配列 ) データベース ( ± 1 5 p p m のペプチド許容誤差を伴う ) を使用してサーチを行った。可変修飾をグルタチオン ( C ) に設定した。結果は、3 回の同様および別々の質量分析法の実施を表す。

#### 【 0 3 0 2 】

タンデム質量分析法を使用して、グルタチオン付加されたタンパク質を同定し、c M y B P - C のグルタチオン付加の部位を決定した。約 1 4 0 k D a のバンドの L C / M S / M S によって生じる質量スペクトルは、4 3 ~ 5 0 % の配列包括度でミオシン結合タンパク質 C、心臓型 ( g i | 1 3 4 0 3 1 9 4 7 ) を第 1 番のヒットとして同定した。c M y B P - C のトリプシンペプチドを、3 0 5 D a の質量シフトについて分析したが、ペプチド残基の 1 つへの G S H の共有結合的付着を示した。3 つの別々のペプチド ( <sup>6 5 1</sup> I H L D C P G S T P D T I V V V A G N K <sup>6 7 0</sup>、<sup>4 7 5</sup> V E F E C E V S E E G A Q V K <sup>4 8 9</sup>、および <sup>6 0 5</sup> L T I D D V T P A D E A D Y S F V P E G F A C N L S A K <sup>6 3 2</sup> ) が、グルタチオン付加されていることが見出された ( 表 2 )。筋原線維を 1 m M の G S S G で処置したとき、ペプチド <sup>6 5 1</sup> I H L D C P G S T P D T I V V V A G N K <sup>6 7 0</sup> のみが、c y s 6 5 5 においてグルタチオン付加されていることが見出された。m / z 6 7 9 . 3 5 <sup>3 +</sup> において観察された修飾されていない前駆体ペプチドと比較して、三重荷電グルタチオン付加されたペプチドについての前駆体イオンは、m / z 7 8 1 . 0 4 <sup>3 +</sup> において観察された。グルタチオン付加されたおよび修飾されていないペプチドの選択した b および y プロダクトイオンの間の比較は、3 0 5 D a ( 単荷電イオン ) または 1 5 2 . 5 D a ( 二重荷電イオン ) の質量シフトを示す。5 m M の G S S G の処置によって、本発明者らは、上記のペプチドの 3 つ全てが、c y s 6 5 5、c y s 4 7 9、および c y s 6 2 7 においてグルタチオン付加されていることを同定した。<sup>4 7 5</sup> V E F E C E V S E E G A Q V K <sup>4 8 9</sup> 三重荷電グルタチオン付加されたペプチドは、m / z 6 6 3 . 2 8 <sup>3 +</sup> において観察され、<sup>6 0 5</sup> L T I D D V T P A D E A D Y S F V P E G F A C N L S A K <sup>6 3 2</sup> グルタチオン付加された前駆体ペプチドは、m / z 1 0 9 8 . 4 9 <sup>3 +</sup> において観察された。0 . 1 未満の予想値は、それぞれの個々のペプチドの有意な同定であると考えた。グルタチオン付加された c M y B P - C ペプチドの有意な同定は、対照の処置されていない筋原線維試料において行われなかった。

#### 【 0 3 0 3 】

【表 2】

表 2

| GSSG | 受託番号         | 記載                              | スコア  | 包括パーセント | グルタチオン付加されたペプチド                   | 電荷 | 質量観測値   | ペプチド質量許容誤差(ppm) | 未切断 | イオンスコア | 予想      |
|------|--------------|---------------------------------|------|---------|-----------------------------------|----|---------|-----------------|-----|--------|---------|
| 1 mM | gi 134031947 | ミオシン結合タンパク質 C、心臓型[Mus musculus] | 7820 | 42.9    | K.IHLDC*PGSTPDTIVVVAGNK.L         | 3+ | 781.04  | -5              | 0   | 41     | 0.0033  |
| 5 mM | gi 134031947 | ミオシン結合タンパク質 C、心臓型[Mus musculus] | 8033 | 49.7    | K.IHLDC*PGSTPDTIVVVAGNK.L         | 3+ | 781.04  | -5              | 0   | 51     | 0.00033 |
|      |              |                                 |      |         | K.IHLDC*PGSTPDTIVVVAGNK.L         | 3+ | 781.04  | -5              | 0   | 48     | 0.00071 |
|      |              |                                 |      |         | K.IHLDC*PGSTPDTIVVVAGNK.L         | 3+ | 781.04  | -2              | 0   | 51     | 0.00041 |
|      |              |                                 |      |         | K.IHLDC*PGSTPDTIVVVAGNK.L         | 3+ | 781.04  | -2              | 0   | 50     | 0.00049 |
|      |              |                                 |      |         | R.VEFEC*EVSEEGAQVK.W              | 3+ | 663.28  | 0               | 0   | 45     | 0.00066 |
|      |              |                                 |      |         | R.VEFEC*EVSEEGAQVK.W              | 3+ | 663.28  | 0               | 0   | 36     | 0.0051  |
|      |              |                                 |      |         | R.VEFEC*EVSEEGAQVK.W              | 3+ | 663.28  | 1               | 0   | 30     | 0.018   |
|      |              |                                 |      |         | K.LTIDDVTPADEADYSFVPEGFAC*NLSAK.L | 3+ | 1098.49 | 5               | 0   | 40     | 0.0034  |
|      |              |                                 |      |         | K.LTIDDVTPADEADYSFVPEGFAC*NLSAK.L | 3+ | 1098.49 | 3               | 0   | 40     | 0.0031  |

10

## 【0304】

心臓の MyBP-C (NCBI 参照配列 CAA58882.1; 配列番号 21) のヒト配列への、配列 <sup>6 5 1</sup> IHLDCPGSTPDTIVVVAGNK <sup>6 7 0</sup>、<sup>4 7 5</sup> VEFEC <sup>4 8 9</sup> EVSEEGAQVK、および <sup>6 0 5</sup> LTIDDVTPADEADYSFVP <sup>6 3 2</sup> EGFACNLSAK のアラインメントは、ヒト心臓の MyBP-C における S-グルタチオン付加された Cys 残基が、配列番号 21 のアミノ酸位置番号付けにしたがう、Cys 475、Cys 623、および Cys 651であることを示唆した。

20

## 【0305】

(実施例 10)

この実施例は、拡張機能障害の患者における非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) のレベルの増加を示す。

## 【0306】

NOS アンカップリングは、非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) によって増強される。本発明者らは、血漿 ADMA の上昇が NOS 機能障害および拡張期心不全 (DHF) の一因となることができると仮説を立てた。

30

## 【0307】

血漿 ADMA、L-アルギニン、および対称性ジメチルアルギニン (SDMA) レベルを、DHF を有する患者、収縮期 HF (SHF) を有する患者からの、および健康な対照群からのヒト血漿試料から決定した。レベルは ELISA によって決定した。図 9A に示すように、血漿 ADMA レベルは、対照群 ( $0.57 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) と比較して、DHF 患者 ( $0.77 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$ ) および SHF 患者 ( $0.68 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$ ) の両方において上昇した。血漿 SDMA および L-アルギニンレベルは、任意の群において変化を示さなかった (図 9B および 9C)。図 9D に示すように、L-アルギニン / ADMA の比は、DHF 群において有意に低減した ( $139.5 \pm 9.5$ 、 $P < 0.05$ ) が、SHF 群において有意に低減しなかった。

40

## 【0308】

急性 HF 患者および慢性 HF 患者の血漿を分析した。ADMA レベルは、対照と比較して、両方の患者群 (急性および慢性 HF 患者) の血漿中で増加した ( $0.71 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$ 、急性;  $0.74 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$ 、慢性) (図 10A) が、疾病の急性的をベースとする差異はなかった。血漿 SDMA、L-アルギニン、および L-アルギニン / ADMA 比は、急性および慢性群の間で変化しなかった (図 10B ~ 10D)。

## 【0309】

血漿 ADMA レベルは、BMI と有意に相関した (勾配 =  $24.27 \pm 7.84$ 、 $R^2$

50

= 0.205、 $P = 0.0038$ ) (図 11A)。その上、図 11B に示すように、L - アルギニン / ADMA 比は、BMI と逆に相関した (勾配 =  $-2.38 \pm 1.16$ 、 $R^2 = 0.099$ 、 $P < 0.048$ )。

#### 【0310】

これらのデータは、ADMA が DHF の病態の一因となり得、上昇した血漿 ADMA レベルまたは L - アルギニン / ADMA の比が拡張機能障害についてのバイオマーカーとして有用であり得ることを示唆する。

#### 【0311】

##### (実施例 11)

心不全を有さない健康な患者、拡張機能障害 (DD) を有する患者、収縮機能障害 (SD) を有する患者からのヒト血漿を、実施例 4 において本質的に記載したように集めた。等しい容量の血漿試料を、電気泳動ゲル中に添加し、膜に移し、MyBP-C によってウエスタンブロットした。MyBP-C の総血漿レベルは、DD 患者において最も高く、健康な対照患者について最も低く、SD 患者について中間であった。(図 13、右下のグラフ)。MyBP-C の 75 kDa の断片の血漿レベルは、対照と比べて DD 患者において最も高かった (図 13、左下のグラフ)。

10

#### 【0312】

等しい容量の血漿試料を、S - グルタチオン - 特異的抗体で免疫沈降を行い、免疫沈降物を MyBP-C - 特異的抗体を使用してウエスタンブロットした。図 14 の下のグラフに示すように、S - グルタチオン付加された MyBP-C の 75 kDa の断片のレベルは、DD 患者において最も高く、対照患者において最も低く、SD 患者において中間であった。

20

#### 【0313】

DD および SD 患者のヒト血漿からの S - グルタチオン付加された MyBP-C 断片 (75 kD) の比、および MyBP-C (75 kD) のタンパク質量を計算し、図 15 に表した。S - グルタチオン付加および MyBP-C (75 kD) の免疫沈降データを、MyBP-C (75 kD) を検出する免疫ブロットデータで正規化した。S - グルタチオン付加の比および MyBP-C (75 kD) 断片のタンパク質量は、対照群と比較して、DD 患者において有意に増加し、SD 患者において中間であった。

#### 【0314】

30

##### (実施例 12)

この実施例は、サンドイッチ ELISA によってグルタチオン付加された cMyBP-C のレベルを検出する方法を示す。

#### 【0315】

マルチウェルマイクロタイタープレートの表面を、心臓の MyBP-C - 特異的抗体で事前コーティングする。この抗体は、捕獲抗体と考えられる。次いで、表面をブロックして、表面への非特異的結合を防止する。次いで、試験または対照試料をプレートに加え、プレートを洗浄し、結合していない MyBP-C を除去する。グルタチオン付加された心臓の MyBP-C に特異的な抗体 (この抗体はビオチンにコンジュゲートしている) (検出抗体) を、次いで、ウェルに加える。アビジンコンジュゲート西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を続いてウェルに加える。HRP の色素生産性基質を加え、発色を停止させる。増強された化学発光に基づいて色の強度を測定する。

40

#### 【0316】

## 【化 1 0】

## 参考文献：

- (1) Zile MR, Baicu CF, Bonema DD. Diastolic heart failure: definitions and terminology. *Prog Cardiovasc Dis* 2005 March;47(5):307-13.
- (2) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991 April;40(4):405-12.
- (3) Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999 January;48(1):1-9.
- (4) Silberman GA, Fan TH, Liu H, Jiao Z, Xiao HD, Lovelock JD, Boulden BM, Widder J, Fredd S, Bernstein KE, Wolska BM, Dikalov S, Harrison DG, Dudley SC Jr. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation* 2010 February 2;121(4):519-28. 10
- (5) Lovelock JD, Monasky MM, Jeong EM, Lardin HA, Liu H, Patel BG, Taglieri DM, Gu L, Kumar P, Pokhrel N, Zeng D, Belardinelli L, Sorescu D, Solaro RJ, Dudley SC Jr. Ranolazine Improves Cardiac Diastolic Dysfunction Through Modulation of Myofilament Calcium Sensitivity. *Circ Res* 2012 February 16.
- (6) Jacquet S, Yin X, Sicard P, Clark J, Kanaganayagam GS, Mayr M, Marber MS. Identification of cardiac myosin-binding protein C as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics* 2009 December;8(12):2687-99. 20
- (7) Barefield D, Sadayappan S. Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2010 May; 48(5):866-75.
- (8) Govindan S, McElligott A, Muthusamy S, Nair N, Barefield D, Martin JL, Gongora E, Greis KD, Luther PK, Winegrad S, Henderson KK, Sadayappan S. Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2012 Jan; 52(1):154-64.
- (9) McConnell BK, Jones KA, Fatkin D, Arroyo LH, Lee RT, Aristizabal O, Turnbull DH, Georgakopoulos D, Kass D, Bond M, Niimura H, Schoen FJ, Conner D, Fischman DA, Seidman CE, Seidman JG. Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice. *J Clin Invest* 1999 December; 104(12):1771. 30
- (10) Poutanen T, Tikanoja T, Jääskeläinen P, Jokinen E, Silvast A, Laakso M, Kuusisto J. Diastolic dysfunction without left ventricular hypertrophy is an early finding in children with hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in the beta-myosin heavy chain, alpha-tropomyosin, and myosin-binding protein C genes. *Mol Cell Proteomics American Heart Journal* 2006 February; 151(3):725.e1-725.e9.
- (11) Mayr M, Jacquet S, Marber M, Gautel M. CMYBP-C AND MLC2 AS DIAGNOSTIC MARKERS OF CARDIAC INJURY. PCT/GB2010/000935 filed 5/11/2010; published as WO/2010/130985 on 11/18/2010; nationalized in Europe 11/15/2011 as application #10718654.6.

## 【 0 3 1 7】

40

本明細書において引用した公開資料、特許出願、および特許を含めた全ての参照文献は、あたかも各参照文献が、個々におよび特に参照により組み込まれていることが示され、かつ本明細書においてその全体が記載されているかのように、参照により本明細書に同じ程度に組み込まれている。

## 【 0 3 1 8】

「a」および「an」および「the」という用語、ならびに同様の指示対象の使用は、本明細書において他に示さない限り、または他に文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明を記載する文脈において（特に、下記の特許請求の範囲の文脈において）、単数および複数の両方を包含すると解釈される。「含むこと」、「有すること」、「含めること」および「含有すること」という用語は、特に断りのない限り、限度を設定しない用語

50

と解釈される（すなわち、「これらに限定されないが、以下を含めた」を意味する）。

【0319】

本明細書において値の範囲を列挙することは、本明細書において他に示さない限り、範囲に入るそれぞれの別々の値、およびそれぞれのエンドポイントを個々に言及する省略表現法としての役割を果たすことを単に意図し、それぞれの別々の値およびエンドポイントは、これらが本明細書において個々に列挙されているように明細書に組み込まれる。

【0320】

本明細書に記載されている全ての方法は、本明細書において他に示さない限り、または他に文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で行うことができる。本明細書において提供するありとあらゆる例、または例示的な言語（例えば、「例えば」）の使用は、他に断らない限り、本発明をよりよく説明することを意図するのみであり、本発明の範囲に対する限定を提起しない。明細書における言語は、本発明の実施にとって不可欠なものとして、任意の特許請求していない要素を示すと解釈されるべきではない。

【0321】

本発明の好ましい実施形態は、本発明を実施するために、本発明者らには公知の最良の態様を含めて本明細書に記載されている。上記の記載を読むと、これらの好ましい実施形態のバリエーションが当業者には明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がこのようなバリエーションを必要に応じて用いることを予想し、本発明者らは、本明細書に特に記載されている通りではなく本発明が実施されることを意図する。したがって、本発明は、準拠法によって許容されるように、本明細書に添付の特許請求において詳述する主題の全ての修正形態および同等物を含む。その上、本明細書において他に示さない限り、または他に文脈によって明らかに矛盾しない限り、全ての可能性のあるそのバリエーションにおける上記の要素の任意の組合せは本発明に包含される。

【図1】

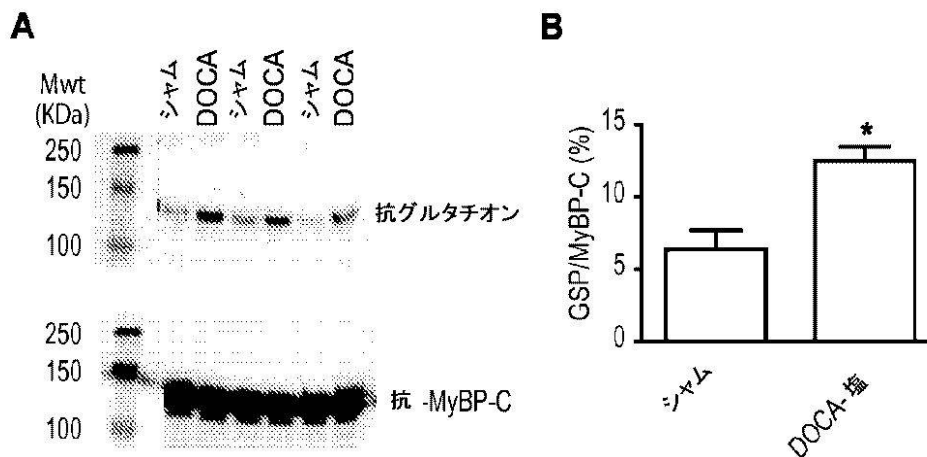


FIGURE 1

【 図 2 】

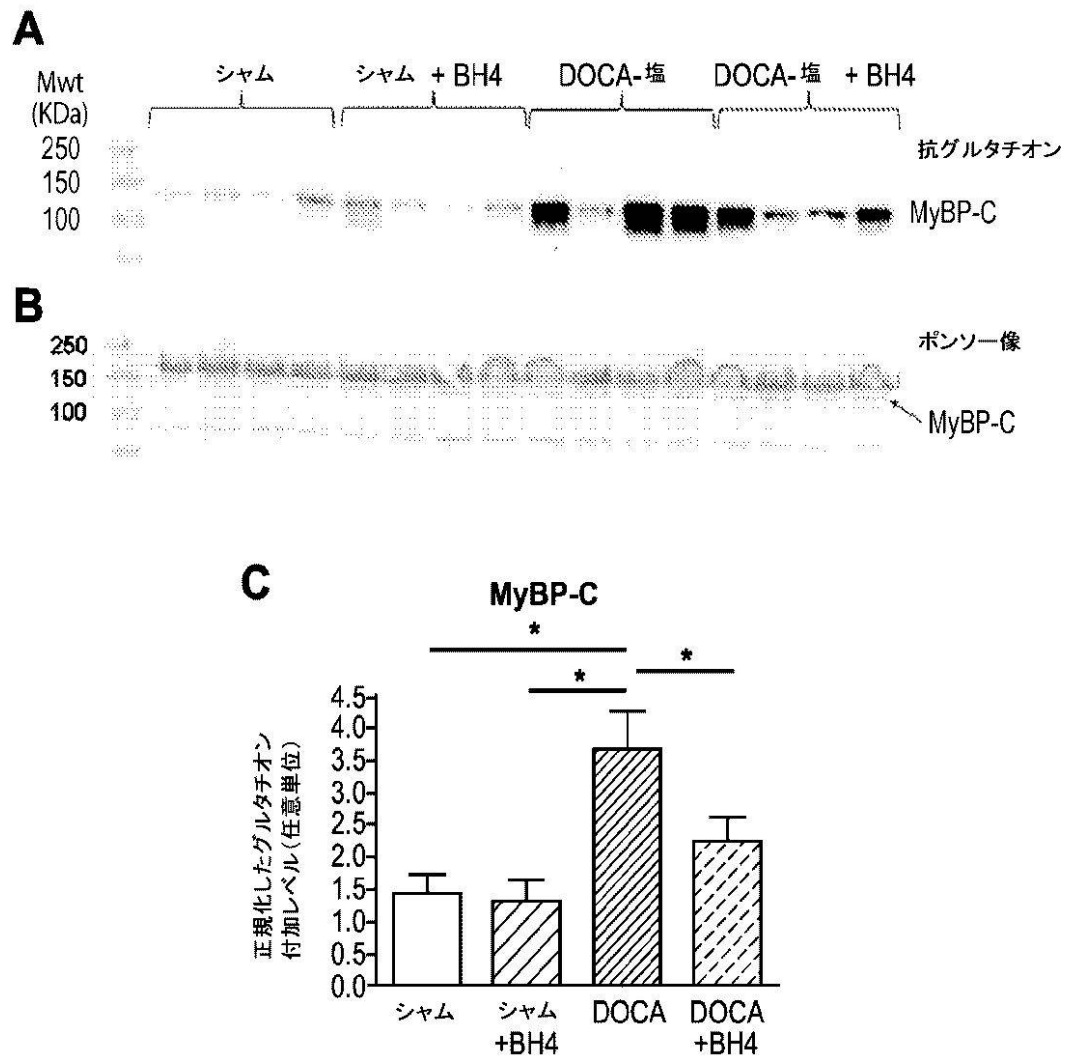


FIGURE 2

【図 3 - 1】

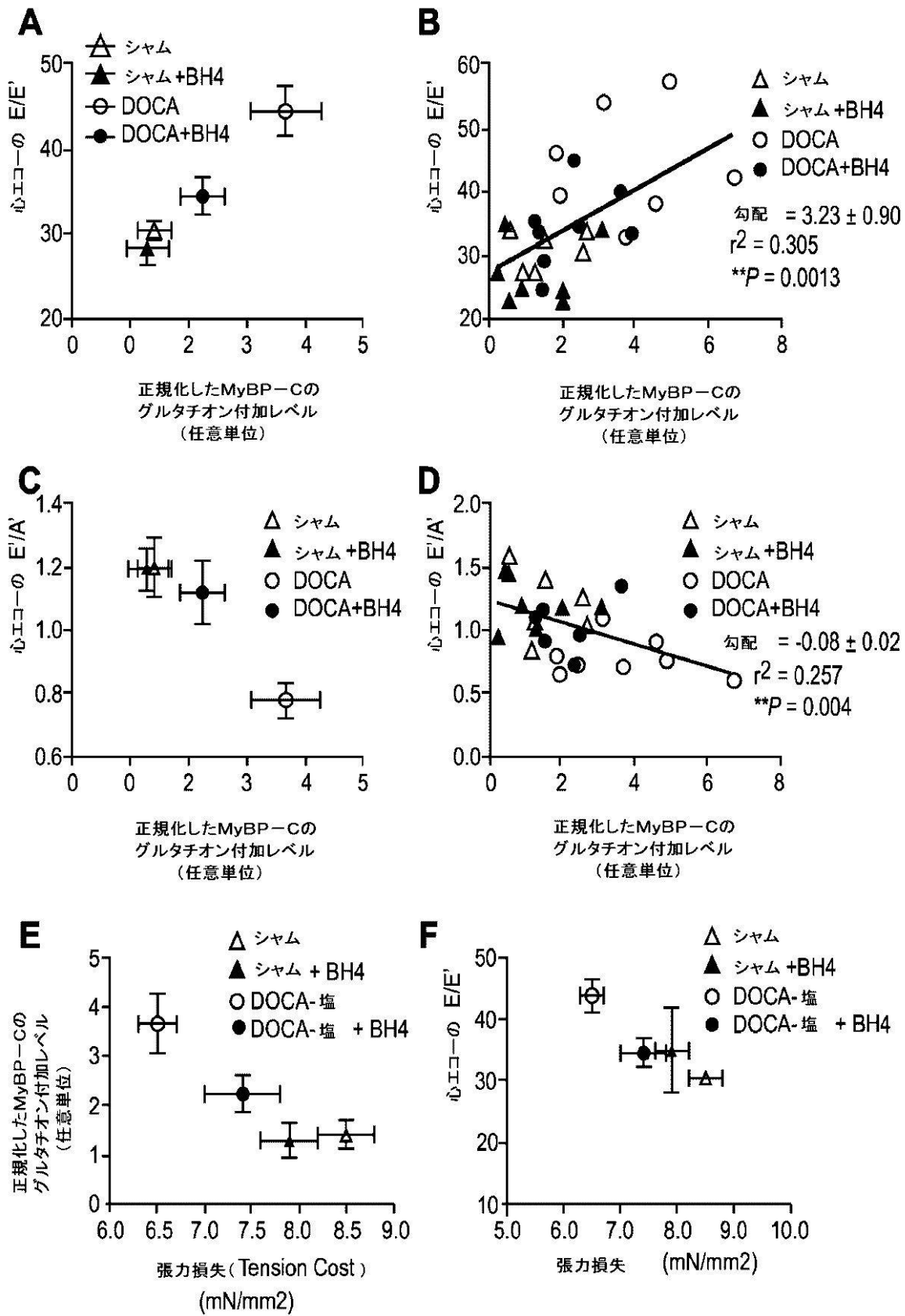


FIGURE 3

【図 3 - 2】

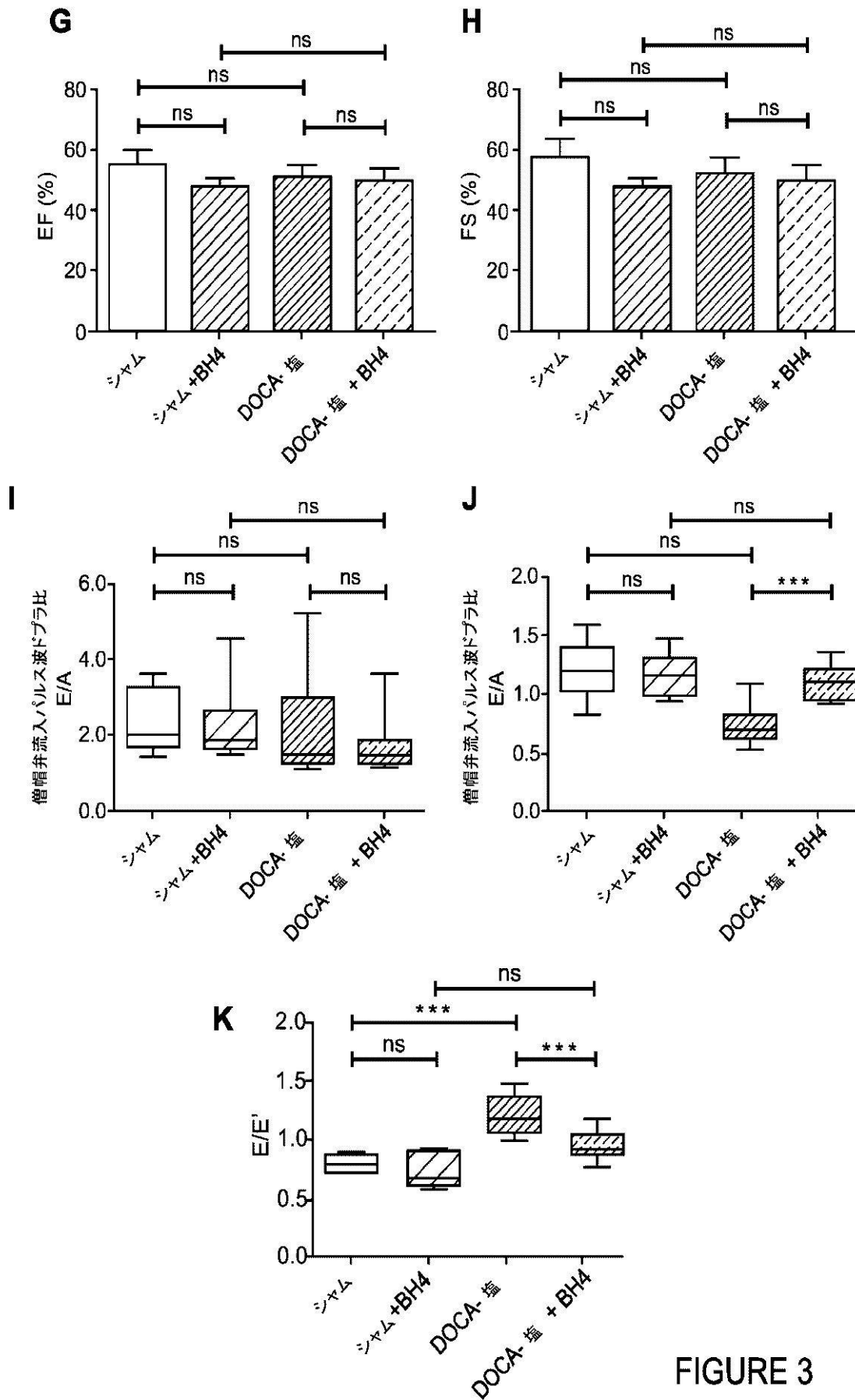


FIGURE 3

【図 3 - 3】

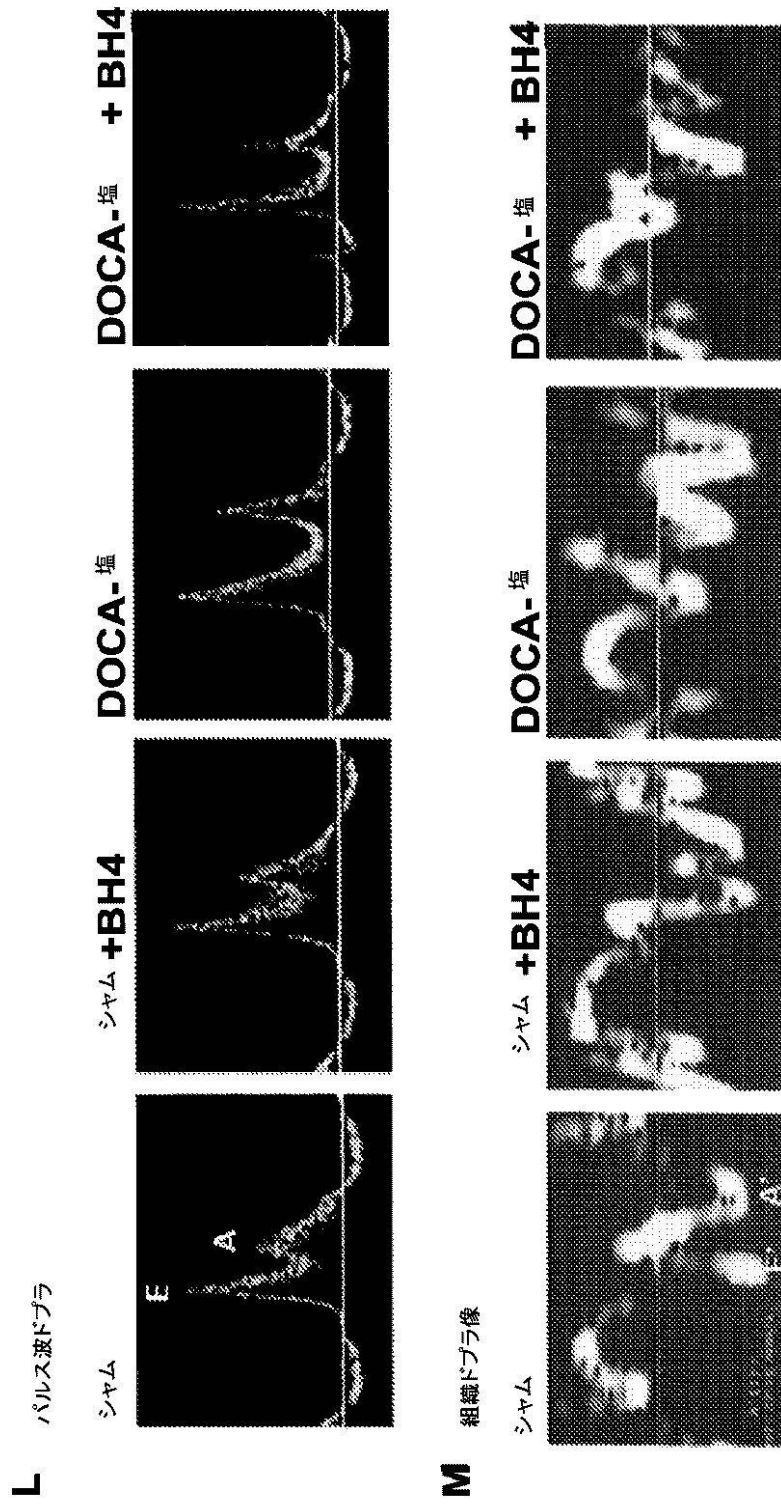


FIGURE 3

【 図 4 】

拡張機能障害についての血清バイオマーカー;  
MyBP-Cおよびその断片

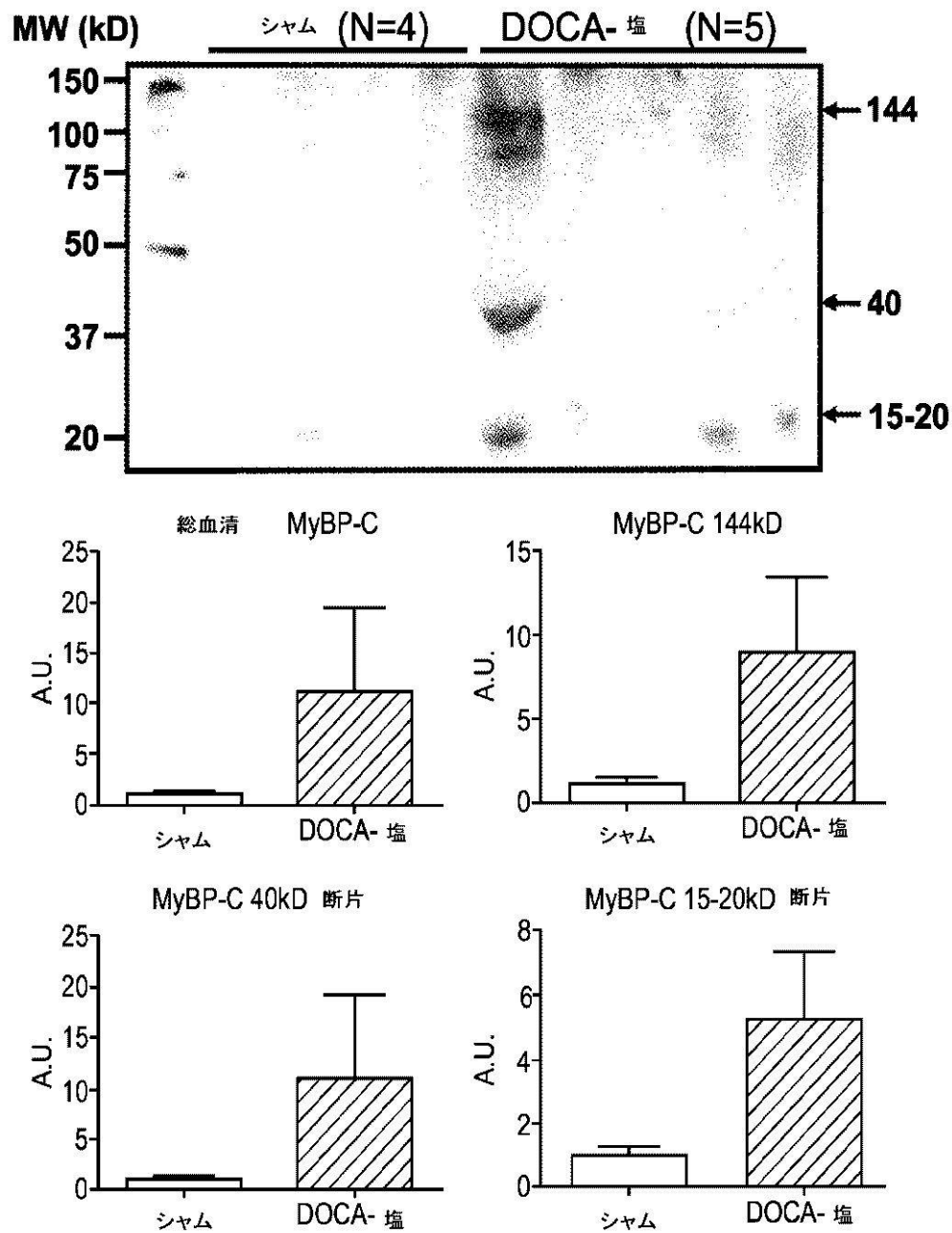


FIGURE 4

【 図 5 】

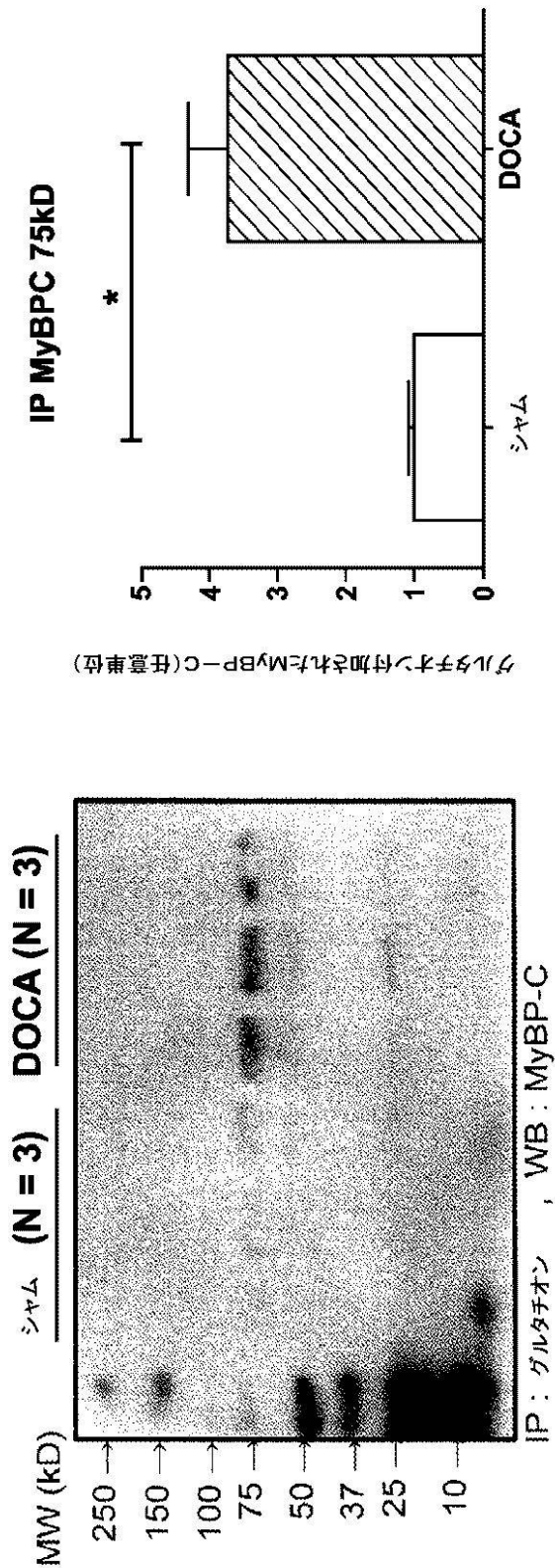


FIGURE 5

【 図 6 】

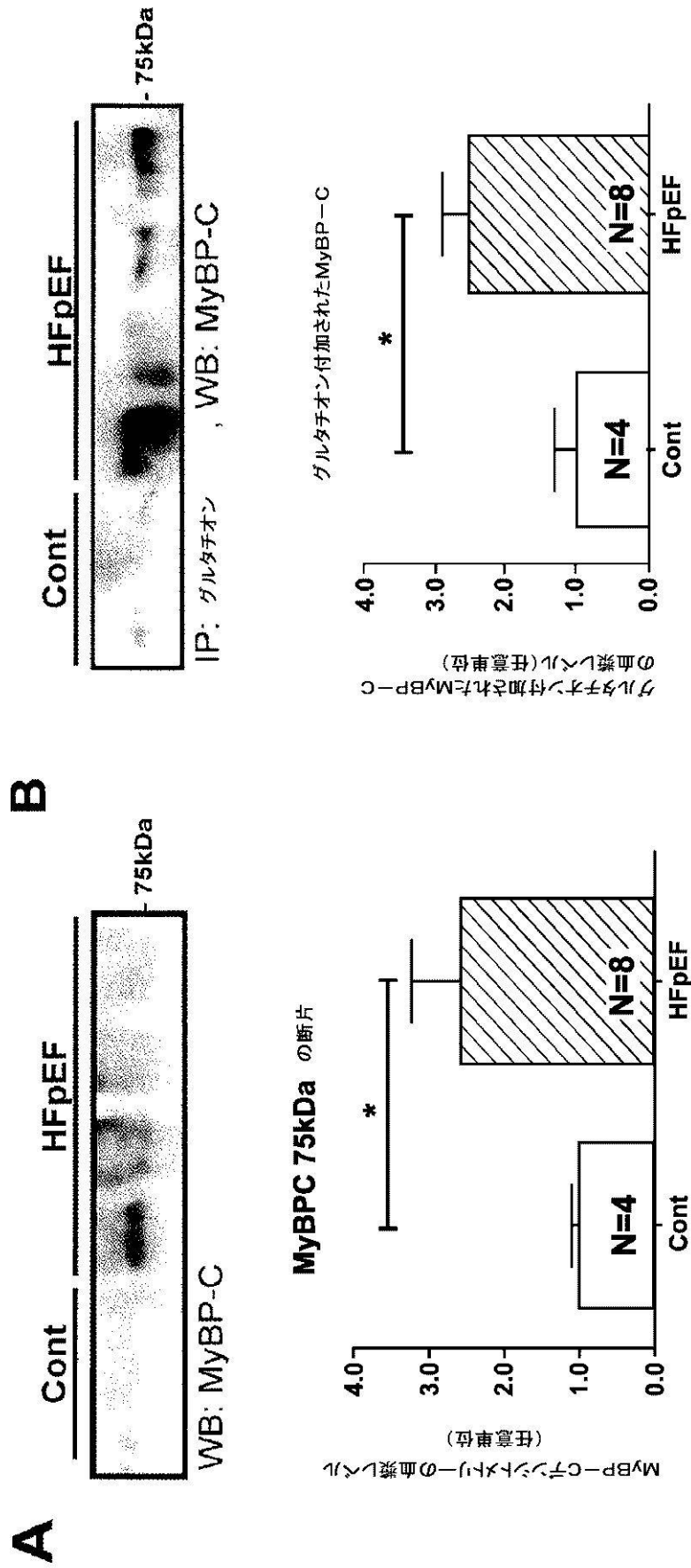


FIGURE 6

【 図 7 】

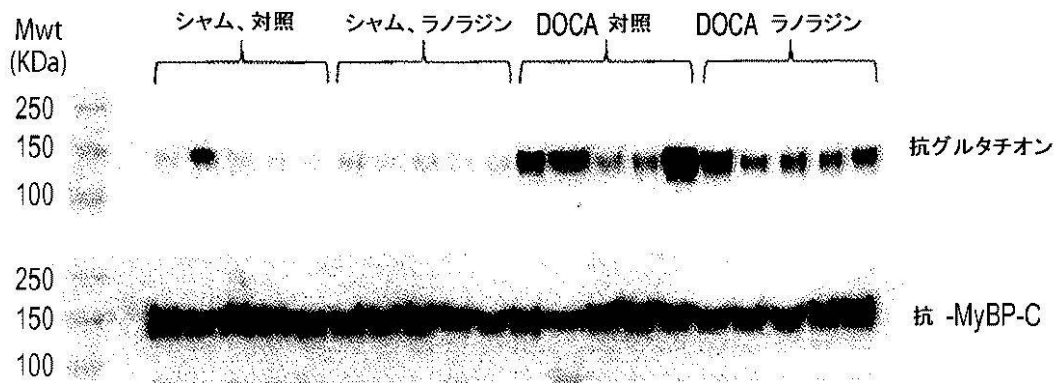
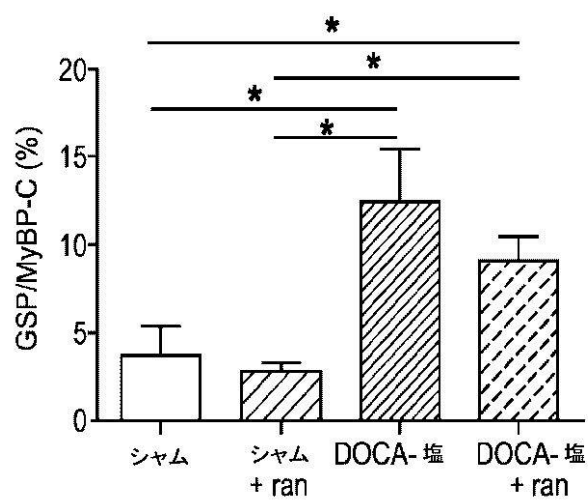
**A****B**

FIGURE 7

【 図 8 】

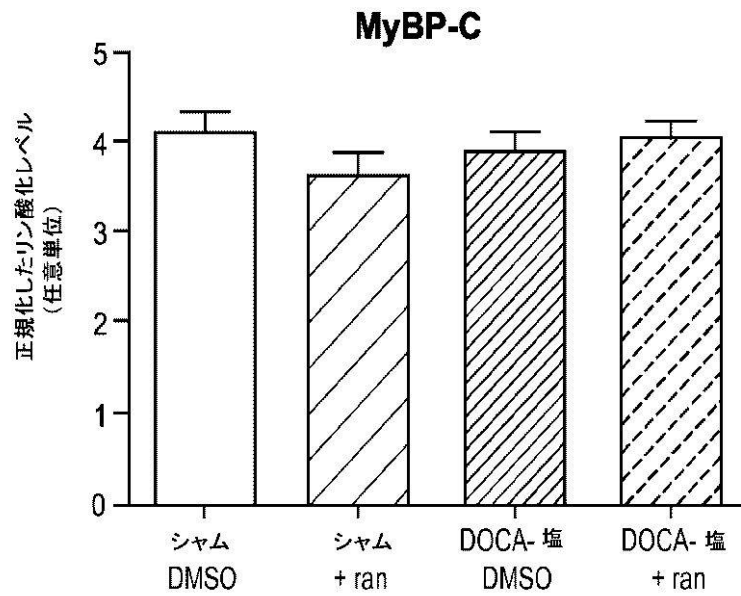


FIGURE 8A

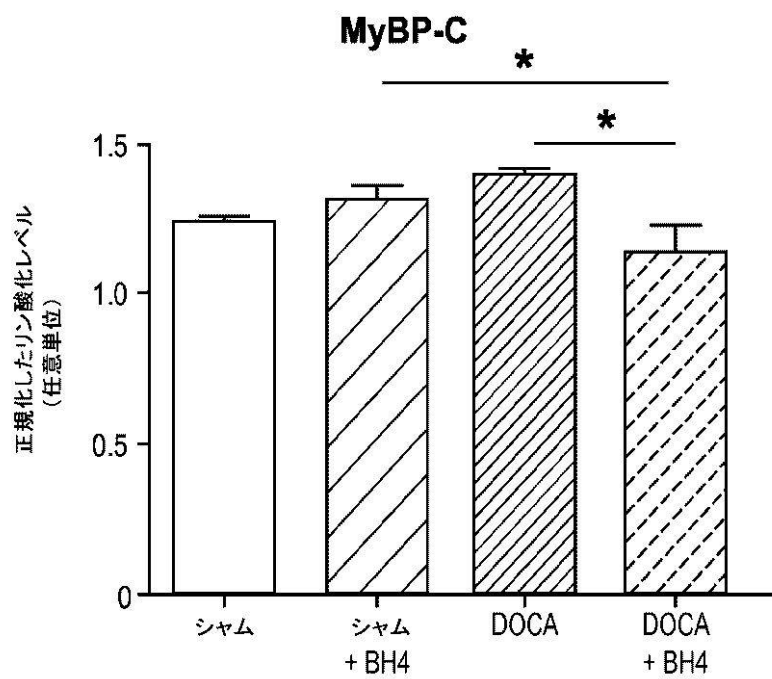


FIGURE 8B

【図 9】

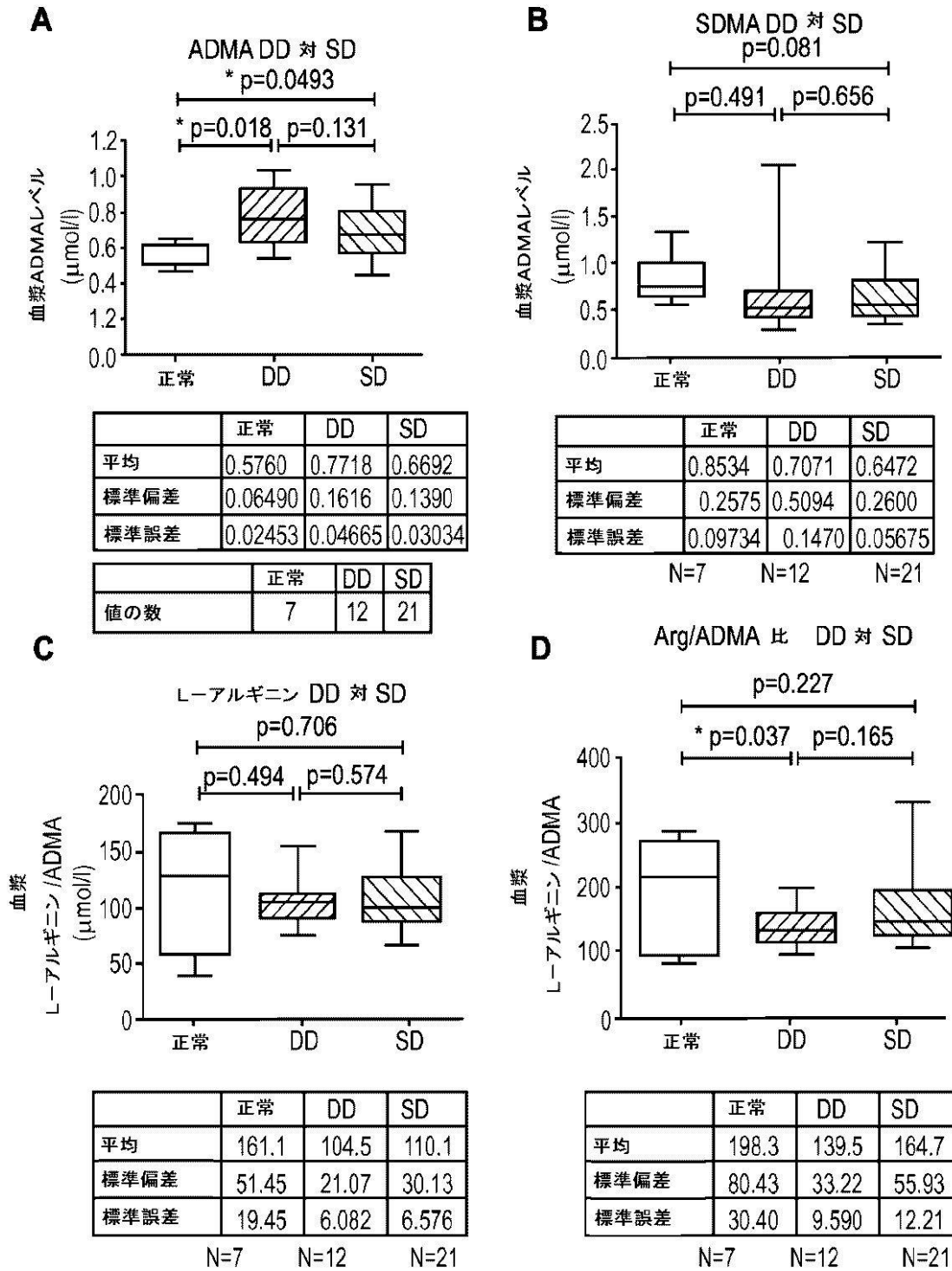


FIGURE 9

【図 10】

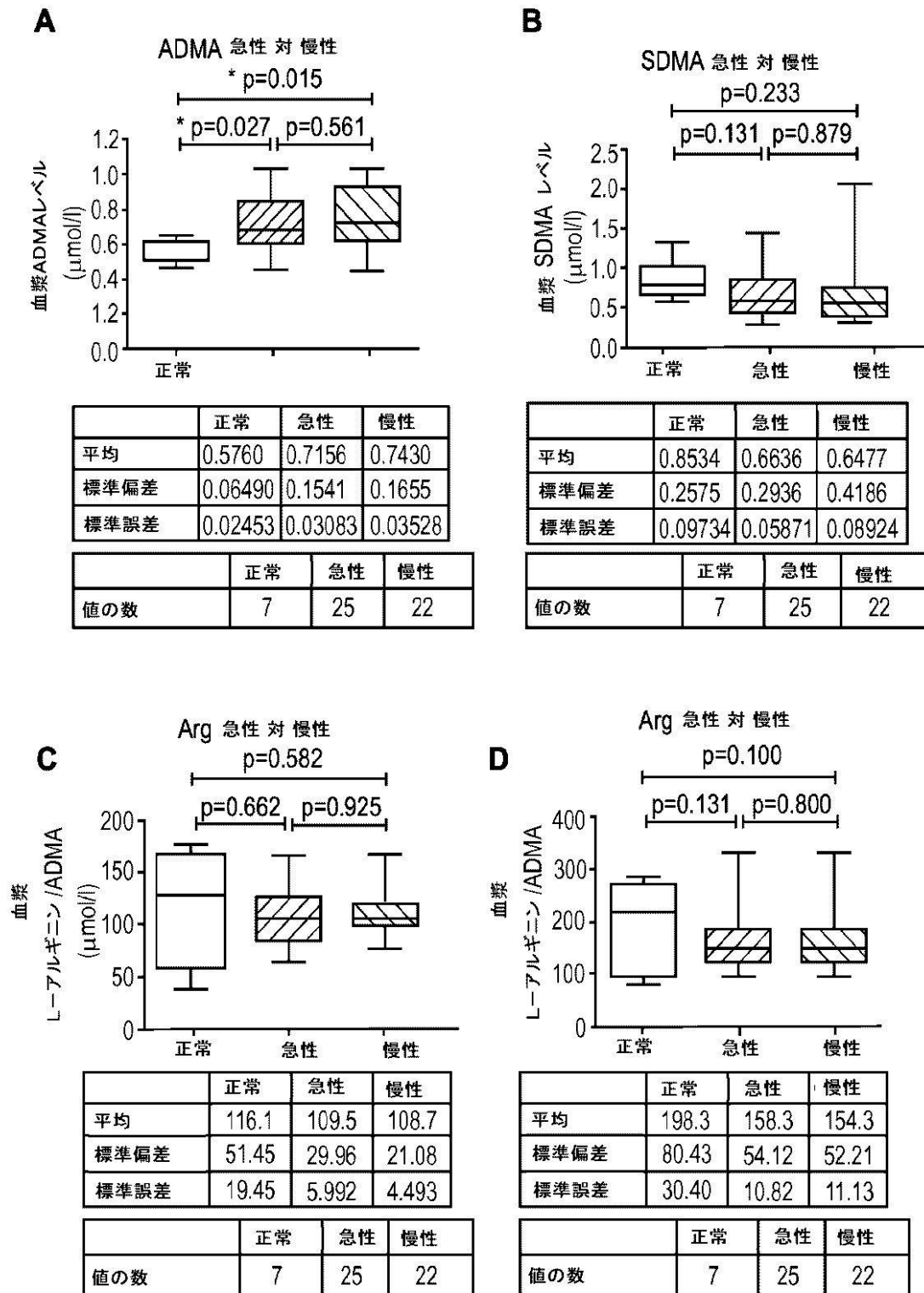


FIGURE 10

【図 11】

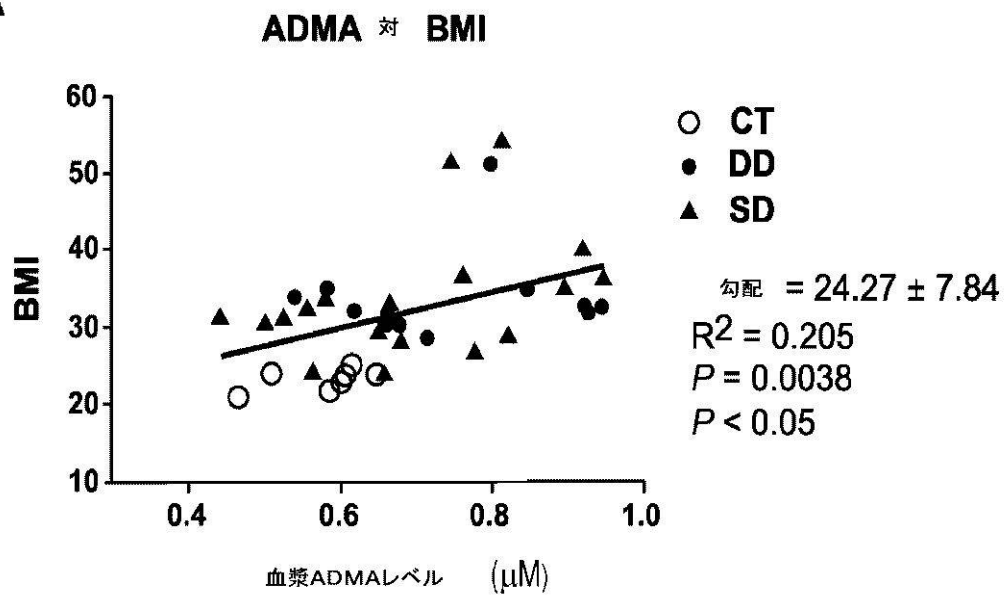
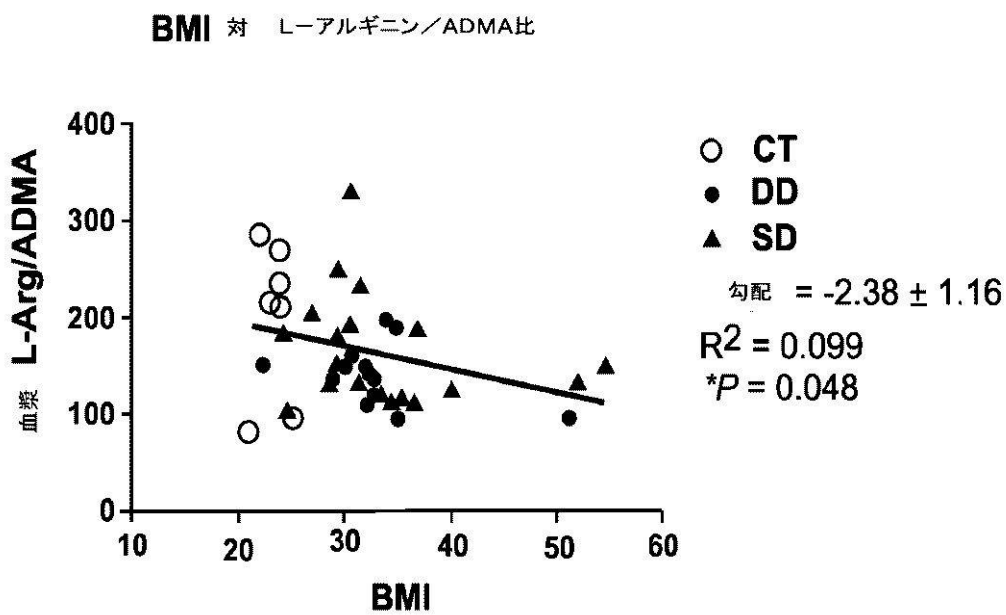
**A****B**

FIGURE 11

【図 12】

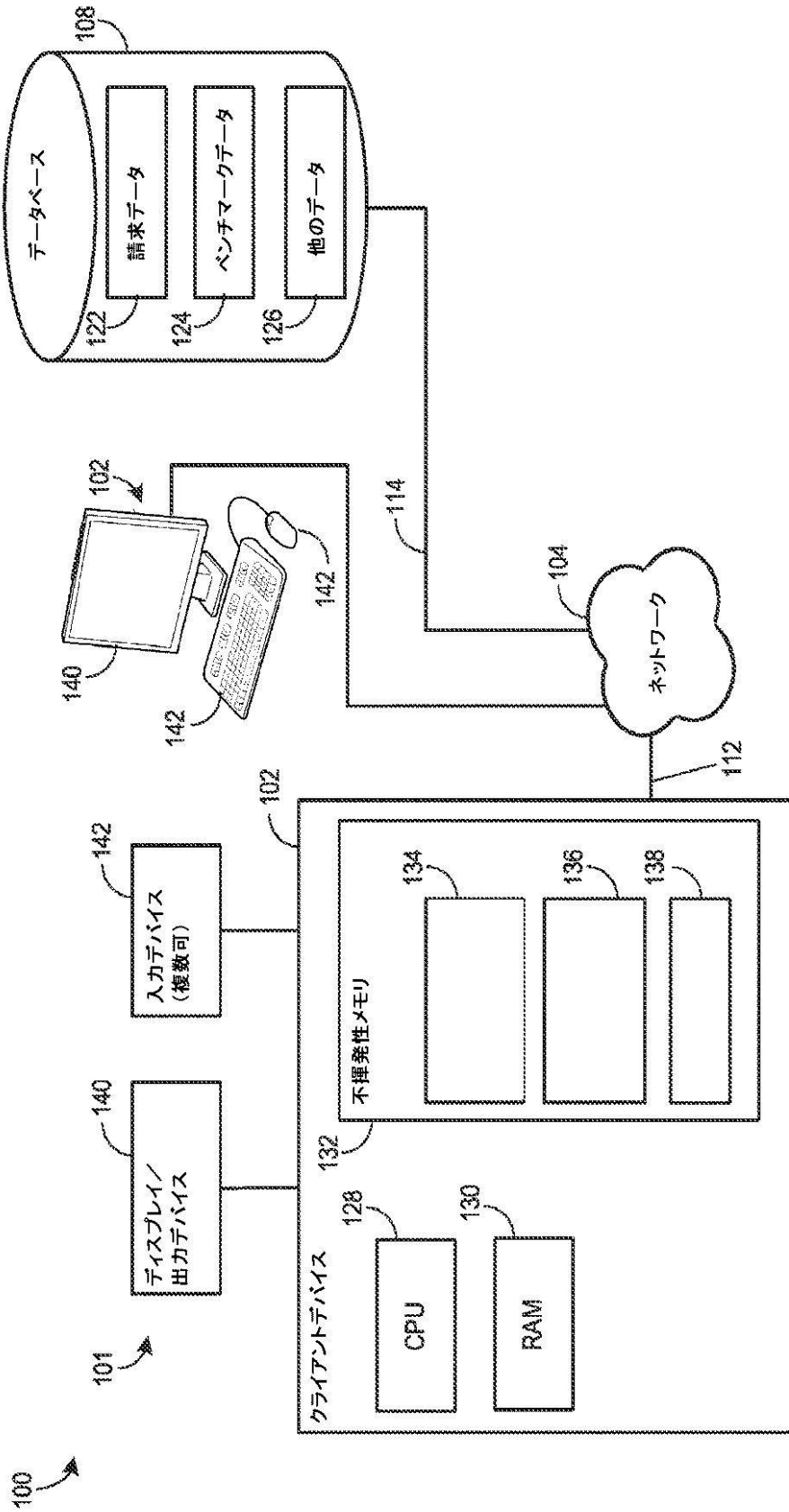


FIGURE 12

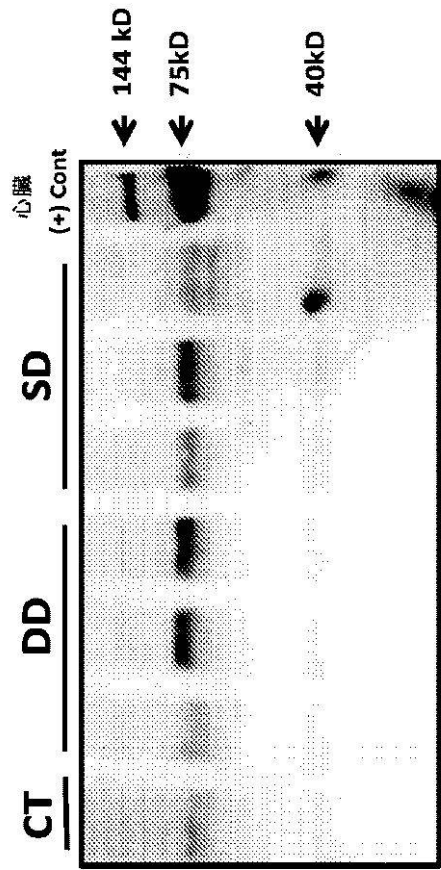
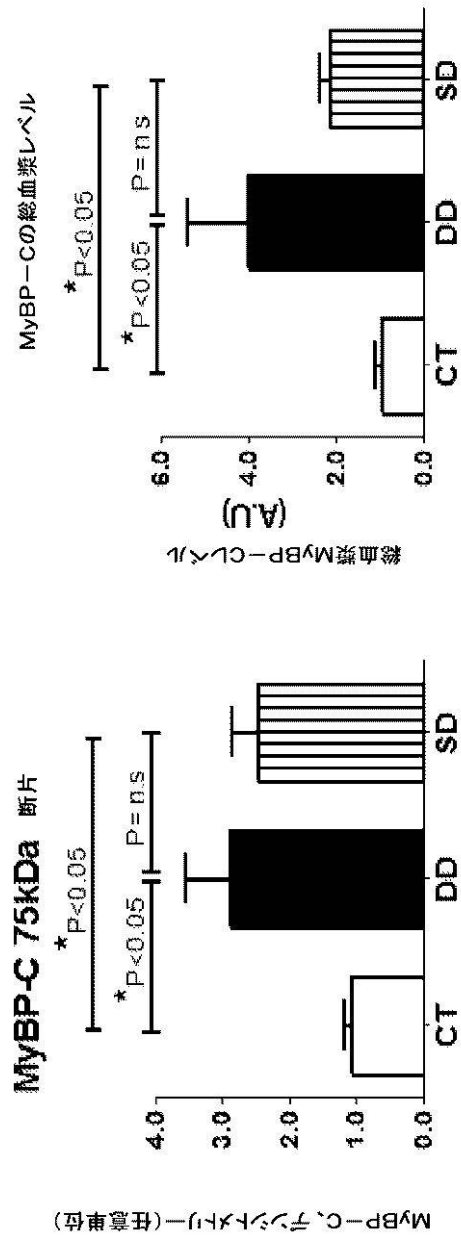


FIGURE 13



【 図 1 4 】

MyBP-C断片 (75kD)の血漿S-グルタチオン付加

IP: S-グルタチオン  
WB: MyBP-C

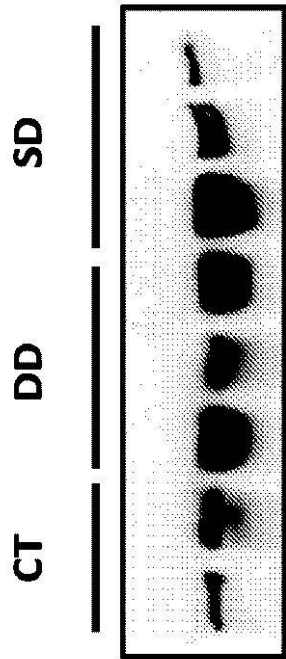
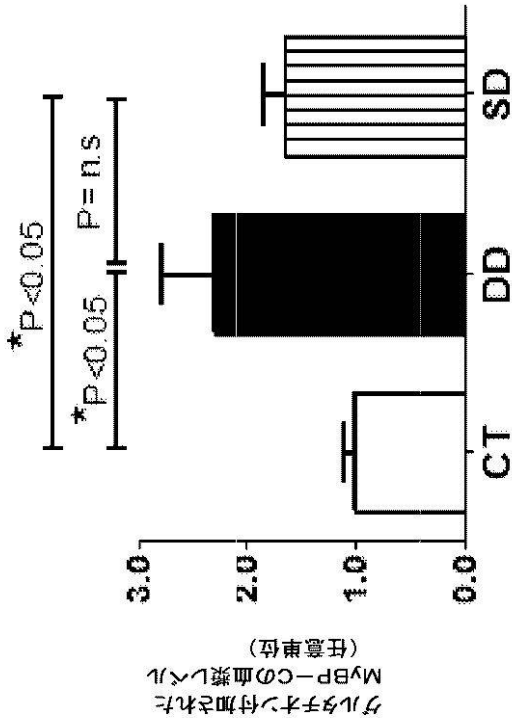


FIGURE 14

S-グルタチオン付加の血漿MyBP-C断片



【 図 1 5 】

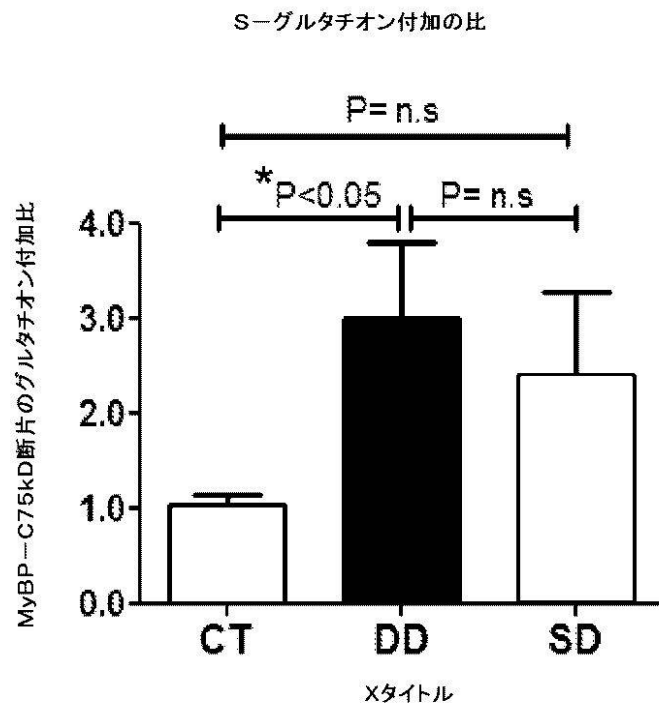
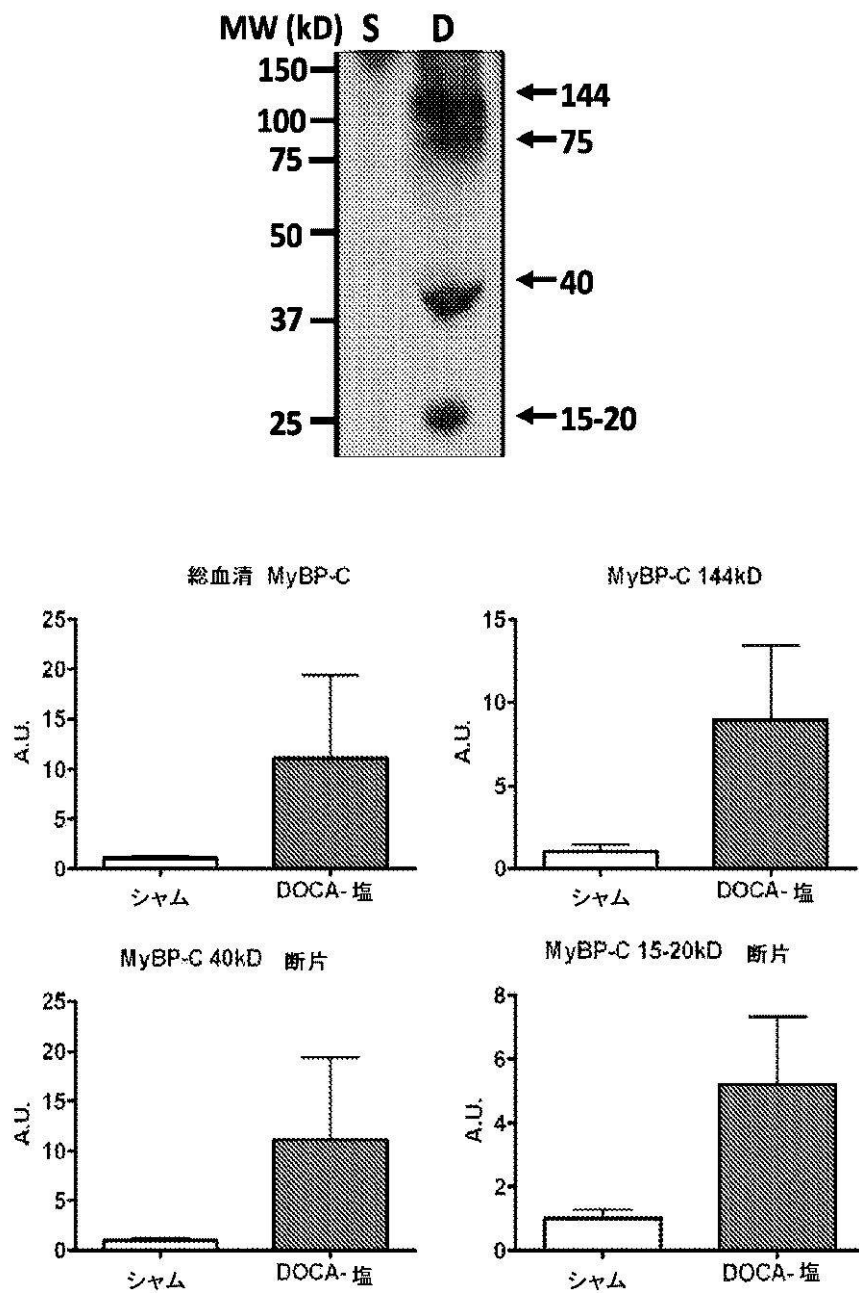


FIGURE 15

【 図 1 6 】

**Figure 16**

【 配 列 表 】

[2014531605000001.app](#)

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2012/059150

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/68  
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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No.            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| A         | <p>PALMER BRADLEY M ET AL: "Role of cardiac myosin binding protein C in sustaining left ventricular systolic stiffening", CIRCULATION RESEARCH, GRUNE AND STRATTON, BALTIMORE, US, vol. 94, no. 9, 14 May 2004 (2004-05-14), pages 1249-1255, XP002482093, ISSN: 0009-7330, DOI: 10.1161/01.RES.0000126898.95550.31 abstract</p> <p>-----<br/>-/--</p> | <p>1-56,<br/>81-101,<br/>116</p> |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

15 January 2013

Date of mailing of the international search report

12/07/2013

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno de Vega, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2012/059150

| (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                  |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Category*                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.            |
| A                                                   | <p>STAHRENBURG RAOUL ET AL: "The novel biomarker growth differentiation factor 15 in heart failure with normal ejection fraction.", EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE DEC 2010, vol. 12, no. 12, December 2010 (2010-12), pages 1309-1316, XP009166146, ISSN: 1879-0844</p> <p>-----</p> | <p>1-56,<br/>81-101,<br/>116</p> |
| A                                                   | <p>WO 2010/130985 A1 (KING S COLLEGE LONDON [GB]; MAYR MANUEL [GB]; JACQUET SEBASTIEN [FR];) 18 November 2010 (2010-11-18) claims 1-12</p> <p>-----</p>                                                                                                                                  | <p>1-56,<br/>81-101,<br/>116</p> |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2012/059150

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-56, 81-101, 116

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2012/059150

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-56, 81-101, 116

Methods of diagnosing diastolic dysfunction or diastolic heart failure, or of differentiating diastolic from systolic dysfunction in a subject, methods for screening compounds useful in the treatment of diastolic dysfunction of diastolic heart failure, methods of treating a subject suffering from heart failure, based on the determination of myosin binding protein-C, binding agents, kits and devices therefor.

---

2. claims: 57-80, 102-115, 117

Methods of diagnosing diastolic dysfunction or diastolic heart failure, or of differentiating diastolic from systolic dysfunction in a subject, methods for screening compounds useful in the treatment of diastolic dysfunction of diastolic heart failure, methods of treating a subject suffering from heart failure, based on the determination of asymmetric dimethylarginine, binding agents, kits and devices therefor.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/059150

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2010130985 A1                          | 18-11-2010          | EP 2430453 A1              | 21-03-2012          |
|                                           |                     | US 2012156702 A1           | 21-06-2012          |
|                                           |                     | WO 2010130985 A1           | 18-11-2010          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl.                   | F I            | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| <b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 15/00  | Z N A A     |
| <b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>   | C 0 7 K 16/18  |             |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 9/10   |             |
| <b>A 6 1 K 31/495 (2006.01)</b> | A 6 1 K 45/00  |             |
|                                 | A 6 1 K 31/495 |             |

(31)優先権主張番号 61/618,900  
 (32)優先日 平成24年4月2日(2012.4.2)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/652,734  
 (32)優先日 平成24年5月29日(2012.5.29)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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, 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, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(71)出願人 513171172  
 ザ ユナイテッド ステイツ ガバメント アズ レプリゼンテッド バイ ザ デパートメント  
 オブ ベテランズ アフェアーズ  
 アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー 20420, パーモント アベニュー エヌ.ダブ  
 リュー. 023 810, オフィス オブ ジェネラル カウンセル

(74)代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ダッドリー, サミュエル  
 アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, イースト スーペリア ストリート 25  
 , ナンバー 3002

(72)発明者 ソラロ, ロス ジョン  
 アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, ノース レーク ショア ドライブ 11  
 00 ナンバー 35ピー

(72)発明者 ジョン, ユイ - ミョン  
 アメリカ合衆国 イリノイ 60091, ウィルメット, チャールズ プレイス 236

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA12  
 4C084 AA17 NA14 ZA362  
 4C086 AA01 AA02 BC50 MA01 MA04 NA14 ZA36  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50

|                |                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014531605A5</a>                                                                                                                                                                                                                     | 公开(公告)日 | 2015-11-26 |
| 申请号            | JP2014534814                                                                                                                                                                                                                                       | 申请日     | 2012-10-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 美国政府为复制子禅特德遮阳退伍军人事务部                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 伊利诺伊大学的董事会<br>美国政府为复制子禅特德退伍军人事务部                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| [标]发明人         | ダッドリーサミュエル<br>ソラロロスジョン<br>ジョンユイミョン                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 发明人            | ダッドリー, サミュエル<br>ソラロ, ロス ジョン<br>ジョン, ユイ-ミョン                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/534 G01N33/533 G01N33/543 C12N15/09 C07K16/18 A61P9/10 A61K45/00 A61K31/495                                                                                                                                                       |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/4866 A61P9/10 C12Y304/21069 G01N33/6887 G01N2333/4712 G01N2500/00 G01N2800/325 G01N2800/54                                                                                                                                                  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D G01N33/534 G01N33/533 G01N33/543.545.A G01N33/53.U C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 A61P9/10 A61K45/00 A61K31/495                                                                                                                             |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA12 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC50 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| 优先权            | 61/658585 2012-06-12 US<br>61/544030 2011-10-06 US<br>61/677292 2012-07-30 US<br>61/618900 2012-04-02 US<br>61/652734 2012-05-29 US                                                                                                                |         |            |
| 其他公开文献         | JP2014531605A                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |

# 摘要(译)

本公开提供了与舒张性心力衰竭的诊断和治疗有关的方法。