

(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2012-507021

(P2012-507021A)

(43) 公表日 平成24年3月22日(2012.3.22)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	B	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/29	(2006.01)	A 2 3 L 1/29	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2011-533627 (P2011-533627)	(71) 出願人	508093584
(86) (22) 出願日	平成21年10月29日 (2009.10.29)		ベー. エル. アー. ハー. エム. エス. ゲ
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月26日 (2011.5.26)		ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/007924		ハフツング
(87) 国際公開番号	W02010/049180		ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		ヘニヒス
(31) 優先権主張番号	08168107.4		ドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ 2
(32) 優先日	平成20年10月31日 (2008.10.31)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓血管系に対する影響に関して食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤を分類するための方法及びアッセイ

## (57) 【要約】

本発明の主題は、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤を分類するためのインピトロの方法であって、前記対象中の1つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルを決定する工程を含む、前記方法である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤を分類するためのインビトロの方法であって、前記対象中の 1 つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルを決定する工程を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

前記 1 つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルが食後に決定される、請求項 1 に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 3】

前記 1 つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルが、 $1 \text{ nmol/L}$  以下、好ましくは  $100 \text{ pmol/L}$  以下、より好ましくは  $10 \text{ pmol/L}$  以下、更に好ましくは  $1 \text{ pmol/L}$  以下、最も好ましくは  $0.5 \text{ pmol/L}$  以下の感度を有するアッセイを用いて決定される、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロの方法。

10

## 【請求項 4】

更に：

a. 前記対象中の 1 つ以上の心臓血管マーカーの基底レベルを決定する工程、  
b. 前記 1 つ以上の心臓血管マーカーの食後のレベルを決定する工程、  
c. 工程 a 及び b で取得した数値から、前記 1 つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルを計算する工程

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

20

## 【請求項 5】

前記対象中の前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの 5 % 超、好ましくは 5 ~ 20 % の食後の相対的な増大が、前記食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する正の影響と関連付けられ、前記対象中の前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの約 5 % の食後の相対的な増大又は低下が、前記食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する中程度の影響と関連付けられ、そして前記対象中の前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの 5 % 超の食後の相対的な低下が、前記食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する負の影響と関連付けられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

30

## 【請求項 6】

前記対象中の心臓血管マーカーの基底レベル及び食後のレベルが、免疫アッセイを用いて決定される、請求項 4 又は 5 に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 7】

前記心臓血管マーカーの 1 つがプロ ANP 又はその断片であって、より好ましくは MR - プロ ANP であって、最も好ましくは MR - プロ ANP<sub>53-90</sub> である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 8】

前記対象の 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する変化を決定するためのアッセイの使用であって、前記アッセイが、前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの低下の検出を可能とし、且つ前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの増大の検出を可能とする、前記使用。

40

## 【請求項 9】

前記変化が増大又は低下であり、前記アッセイが  $1 \text{ nmol/L}$  以下の感度を有する、請求項 8 に記載のアッセイの使用。

## 【請求項 10】

前記対象の 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する食後の変化を決定するための、請求項 8 又は 9 に記載のアッセイの使用。

## 【請求項 11】

前記アッセイが免疫アッセイである、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用。

50

## 【請求項 1 2】

前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの変化が、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び / 又は飲料及び / 又は食事及び / 又は栄養計画及び / 又は薬剤を分類するのに使用される、請求項 8 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のアッセイの使用。

## 【請求項 1 3】

前記 1 つ以上の心臓血管マーカーのレベルの変化が、糖尿病の薬剤を分類するのに使用される、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のアッセイの使用、又は請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 1 4】

前記対象が、心臓血管系及び / 又は代謝系に関連する医学的状态に罹患している人類である、請求項 8 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のアッセイの使用、又は請求項 1 ~ 7 及び 1 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

10

## 【請求項 1 5】

前記対象が、糖尿病に罹患している人類である、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のアッセイの使用、又は請求項 1 ~ 7 及び 1 3 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 1 6】

1 つ以上の前記マーカーが、ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン - 1、バソプレシン、アドレノメデュリン (adrenomedullin) ペプチド、それらのプロペプチド、及びそれらの 3 アミノ酸以上の断片からなる群から選択される、請求項 8 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のアッセイの使用、又は請求項 1 ~ 7 及び 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明の主題は、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び / 又は飲料及び / 又は食事及び / 又は栄養計画及び / 又は薬剤を分類するためのインビトロの方法であって、前記 1 つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルを決定する工程を含む、前記方法、並びに当該方法の使用である。

## 【背景技術】

30

## 【0002】

高血圧は、しばしば肥満、インスリン過剰症及びインスリン耐性を伴う。この種類の高血圧は、ナトリウム貯留、血管内容積の増大、並びに心拍体積 (cardiac stroke volume) 及び心拍出量 (cardiac output) の増大を特徴とする (Messerli FH, et al. 1981 Obesity and essential hypertension. Hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion, and plasma renin activity. Arch Intern Med 141 : 81 - 5; Stelfox HT, et al. 2006 Hemodynamic monitoring in obese patients: the impact of body mass index on cardiac output and stroke volume. Crit Care Med 34 : 1243 - 6)。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 及び脳型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は、心疾患又は急性心筋梗塞に関連する壁張力 (wall stress) に応答して、それぞれ ANP と N 末端プロ ANP (NT - プロ ANP)、そして BNP と N 末端 proBNP (NT - proBNP) に切断されるプロホルモンとして、心筋細胞中で合成される (Ruskoaho H 2003 Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. Endocr Rev 24 : 341 - 56; Potter LR, et al. 2006 Natriuretic peptides, their recep

40

50

tors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72)。高いレベルのナトリウム利尿ペプチドは、新しい有望な心血管(CV)リスクマーカーであり、且つ高い血圧(BP)、左心室肥大、及びタンパク尿と関連している(Olsen MH, et al. 2005 N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome. *Hypertension* 46:660-6)。実際に、幾つかの大掛かりな研究において、死亡率とナトリウム利尿ペプチドレベルとの間に、独立した関連性が見出された(Wang TJ, et al. 2004 Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 350:655-63; Bibbins-Domingo K, et al. 2007 N-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide (NT-proBNP), cardiovascular events, and mortality in patients with stable coronary heart disease. *Jama* 297:169-76; Kistorp C, et al. 2005 N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein, and urinary albumin levels as predictors of mortality and cardiovascular events in older adults. *Jama* 293:1609-16; von Haehling, et al. 2007 Comparison of midregional pro-atrial natriuretic peptide with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting survival in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50:1973-80)。

#### 【0003】

最近の研究では、肥満においてナトリウム利尿ペプチドのレベルは抑制されることが報告されている(Wang TJ, et al. 2004 Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 109:594-600; Das SR, et al. 2005 Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Circulation* 112:2163-8)。肥満は塩の滞留及び心拍出量の増大に関連しているため、ナトリウム利尿ペプチドレベルの増大を引き起こすものと予想されていた。肥満がこれと反対の作用を有するという事実は、直感に反するよう見え、非血行力学的要因によるものとされていた。そこで、Wangらは、この逆の関係は、肥満の対象中のナトリウム利尿ペプチドのクリアランスの増大を引き起こす、脂肪組織におけるナトリウム利尿ペプチドクリアランス受容体(NPR-C)の発現の増大によるものと推察した(Wang TJ, et al. 2004 Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 109:594-600)。しかしながら、Dasらは、Dallas心臓研究において、DEXAにより除脂肪体重(lean mass)及び脂肪体重(fat mass)を決定し、脂肪体重よりもむしろ除脂肪体重の方が、BNPレベルの低下と関連していることを観察した(Das

SR, et al. 2005 Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. Circulation 112:2163-8)。

【0004】

幾つかの研究において、ナトリウム利尿ペプチドと代謝症候群の更なる因子との間の関連性が観察された(Olsen MH, et al. 2008 Cardiovascular risk prediction by N-terminal pro brain natriuretic peptide and high sensitivity C-reactive protein is affected by age and sex. J Hypertens 26:26-34; Wang TJ, et al. 2007 Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. Circulation 115:1345-53)。胸囲の増大、トリグリセリドの増加、HDLの低下及び空腹時グルコースの増大(Wang TJ, et al. 2007 Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals. Circulation 115:1345-53)が、血漿ANPレベルの低下と関連しており、その関連性は、Framingham心臓研究におけるBNPレベルの低下よりも若干弱かった。Danishの研究において、BNPとBMI、インスリン、グルコース、トリグリセリド及び高血圧との関連性が観察された(Olsen MH, et al. 2005 N-terminal pro brain natriuretic peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome. Hypertension 46:660-6)。これらの研究は、ナトリウム利尿ペプチドと幾つかの代謝症候群の特性との間の密接な関連性を実証したが、これらの関連性の背後のメカニズムは、解明されていない。

【0005】

食後のインスリンレベルを低下させる食事的なアプローチは、血圧の減少において非常に効果的であり(Appel LJ, et al. 2005 Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. JAMA 294:2455-64)、食後の状態は、代謝症候群の初期において、特に動脈硬化の発症において、重要な役割を果たすと考えられている(Hanefeld M, et al. 1999 Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. Atherosclerosis 144:229-35; Hanefeld M, et al. 2007 The challenge of the Metabolic Syndrome. Horm Metab Res 39:625-6)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的は、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤を分類することであった。

## 【 0 0 0 7 】

驚くべきことに、インスリンは、ANPの抑制を誘導することが見出された。この関係は、代謝症候群における、インスリン耐性と高血圧との直接的な関連性を提供する。この関係の発見は、更に、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤を分類するための方法、及びその使用を導き出す。

## 【 0 0 0 8 】

故に、本発明の主題は、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は薬剤を分類するためのインピトロの方法であって、前記対象中の1つ以上の心臓血管マーカの相対レベルを決定する工程を含む、前記方法である。

10

## 【 0 0 0 9 】

本発明において、「相対レベル」は、基底値に基づく相対濃度として規定され、数式として以下のように表現される：

## 【 化 1 】

$$X=100 \times \frac{\text{[食後]}}{\text{[基底]}}$$

20

ここで、Xは、1つ以上の心臓血管マーカのレベルの変化のパーセントの値である。

## 【 0 0 1 0 】

基底値に対する濃度の変化のパーセンテージとして特定される場合もあり、数式として以下のように表現される：

## 【 化 2 】

$$X=100 - \frac{\text{[食後]}}{\text{[基底]}} * 100 \quad \text{又は} \quad X = \frac{\text{[食後]}}{\text{[基底]}} * 100 - 100$$

30

## 【 0 0 1 1 】

本発明に係る方法の好ましい態様において、1つ以上の心臓血管マーカの食後の相対レベルが決定される。

## 【 0 0 1 2 】

本発明の文脈において、「食後」という用語は、食品及び／又は飲料及び／又は薬剤が対象に摂取され、あるいは投与された後の時間を意味し、食事及び／又は栄養計画の文脈において同様であってもよい。

## 【 0 0 1 3 】

本発明の文脈において、心臓血管マーカは、ナトリウム利尿ペプチド（例えば心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳型ナトリウム利尿ペプチド）、アドレノメデュリン（adrenomedullin）、エンドセリン、バソプレシンからなる群から選択される、心臓血管疾患（例えば心筋梗塞、冠動脈疾患、心不全等）の診断及び／又は予測及び／又はモニタリングを提供するペプチド及び／又はタンパク質を意味する。前記心臓血管マーカの基底レベルは、患者である対象の年齢、肥満度指数、特定の症状／家族歴の遺伝的素因、性別及び民族的背景等の要素に、並びに当該対象の全体的健康状態に依存する。しかしながら、本発明は、これとは対照的に、心臓血管マーカの基底レベルから心臓血管マーカの食後のレベルにかけての相対的な変化は、これらの要素から本質的に独立しており、対象に投与された食品及び／又は飲料及び／又は食事及び／又は栄養計画及び／又は

40

50

薬剤に強く依存するという知見に基づく。

【0014】

本発明の方法の特に好ましい態様において、1つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルは、 $1\text{ nmol/L}$ 以下、好ましくは $100\text{ pmol/L}$ 以下、より好ましくは $10\text{ pmol/L}$ 以下、なおもより好ましくは $1\text{ pmol/L}$ 以下、最も好ましくは $0.5\text{ pmol/L}$ 以下の検出感度の下限を有するアッセイを用いて決定される。更に、前記アッセイのアッセイ間の正確性は、通常の範囲内で、好ましくは $<30\%$ 、より好ましくは $<20\%$ である。更に、前記アッセイのアッセイ内の正確性は、測定範囲内で、好ましくは $<10\%$ 、より好ましくは $<5\%$ である。ここで、「アッセイ内の正確性」は、特定のアッセイの単一バッチ内の測定間のばらつきを意味し、そして「アッセイ間の正確性」は、特定の

10

【0015】

前記アッセイは、少なくとも、変化及び差異 (variance) の増大及び減少を検出するのに十分な感度である。健康な対象において、所定のバイオマーカーの通常の範囲は、ガウス分布に対応する。

【0016】

更に、本発明の態様は：

20

- a) 前記対象中の1つ以上の心臓血管マーカーの基底レベルを決定する工程、
- b) 前記1つ以上の心臓血管マーカーの食後のレベルを決定する工程、
- c) 工程a及びbで取得した数値から、前記1つ以上の心臓血管マーカーの相対レベルを計算する工程

を更に含む、本発明のインピトロの方法である。

【0017】

ここで、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤の摂取、吸収又は他の方法での適用は、前記レベルの相対的な低下又は増大に関して、前記対象中の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルに対する影響に関連する。

30

【0018】

本発明の文脈において、「基底レベル」という用語は、食物、飲料、食事、栄養計画又は薬剤等の因子の影響を受けていない対象の、心臓血管ペプチド等の特定の化合物、分子又は代謝物の個体内のレベルを意味する。前記基底レベルは、絶食の約12時間後の各対象について個別に決定される。ここで、絶食とは、対象が、水及び/又は必須の医薬を除き、一定の時間にわたり、食物、飲料又は薬剤を摂取あるいは消費しないことを意味する。

【0019】

本発明の好ましい態様において、前記対象中の前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの5%超、好ましくは5~20%の食後の相対的な増大は、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する正の影響と関連付けられ、前記対象中の前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの約5%の食後の相対的な増大又は減少は、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する中程度の影響と関連付けられ、そして前記対象中の前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの5%超の食後の相対的な低下は、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤の前記対象の心臓血管系に対する負の影響と関連付けられる。

40

【0020】

前記心臓血管系に対する正の影響は、医学的には、前記対象の心臓血管系の改善、あるいは対象が健康な場合は、当該対象の健康状態の維持である。

【0021】

50

前記心臓血管系に対する中程度の影響は、医学的には、前記対象の心臓血管系の健康状態の維持である。

【0022】

前記心臓血管系に対する負の影響は、医学的には、前記対象の心臓血管系の健康状態の悪化である。

【0023】

前記対象の心臓血管系の正の影響は、心臓血管のリモデリング及び心臓血管の機能の改善を含んでもよく、具体的には、及び好ましくは、心筋梗塞、高血圧、並びに心臓及び血管の機能不全及び心不全の発症を含んでもよい。

【0024】

他の好ましい態様において、前記対象中の心臓血管マーカーの基底レベル及び心臓血管マーカーの食後レベルは、免疫アッセイを用いて決定される。

【0025】

前記診断的アッセイは、診断分野で利用される任意の種類のものであり、酵素反応、発光、蛍光、又は放射化学に基づくアッセイ方法を含むが、それらに限定されない。好ましい検出方法として、ストリップ試験、放射性免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイ、イムノプロットアッセイ、酵素連結免疫アッセイ(ELISA)、Luminexベースピースアッセイ、及びタンパク質マイクロアレイアッセイ等が挙げられる。更に、前記の種類のアッセイは、マイクロタイタープレートベース、チップベース、ピースベースで行われることができ、ここでバイオマーカータンパク質は、表面に結合され、又は溶液であることができる。前記アッセイは、均一又は不均一なアッセイ、サンドウィッチアッセイ、競合及び非競合アッセイであることができる(The Immunoassay Handbook, Ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3rd ed. (May 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig et al., Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb; 10(1): 4-10. PMID: 16376134)。

【0026】

本発明の最も好ましい態様において、免疫アッセイとして、(Morgenthaler NG et al; 2004 Clin Chem 50: 234-6)に記載されるものが使用される。

【0027】

本発明のインビトロの方法の特に好ましい態様において、前記心臓血管マーカーの1つは、プロANPである。なおもより好ましくは、前記マーカーの1つは、プロANPの中央領域(midregional)である。最も好ましくは、中央領域プロANP<sub>53-90</sub>である。

【0028】

本発明のインビトロ方法の他の好ましい態様において、前記1つ以上の心臓血管マーカーの食後レベルは、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画の投与後4時間以内、好ましくは2時間以内、より好ましくは15~60分以内に決定される。

【0029】

本発明のインビトロ方法の他の好ましい態様において、前記食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画の前記1つ以上の心臓血管ペプチドの相対レベルに対する食後の影響は、長期間にわたり、好ましくは1週間、より好ましくは1ヶ月、なおもより好ましくは2ヶ月、なおもより好ましくは半年の期間にわたりモニタリングされる。

【0030】

本発明の主題は、更に、本発明の方法における、1nmol/L以下、好ましくは100pmol/L以下、より好ましくは10pmol/L以下、なおもより好ましくは1pmol/L以下、最も好ましくは0.5pmol/L以下の感度を有するアッセイの使用である。

10

20

30

40

50

## 【0031】

本発明の方法の1つの側面において、前記対象の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する変化が決定され、当該変化は低下である。

## 【0032】

更に、本発明の主題は、前記対象の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する変化を決定するためのアッセイの使用であって、ここで前記アッセイは、前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの低下を検出でき、且つ前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの増大を検出できる。

## 【0033】

本発明において使用されるアッセイの1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの低下を測定する能力は、とりわけ重要であることに留意されたい。特に健康な対象では、当該低下によって、前記1つ以上の心臓血管マーカーが非常に低いレベルになる。故に、ここで使用されるアッセイは、健康な集団中で基底レベルが第97.5パーセントイル以内の対象において、前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの低下の測定が可能であるように、超高感度であることが好ましい。

10

## 【0034】

更に、本発明の主題は、前記変化が増大又は低下であり、且つ前記アッセイが1 nmol/L以下の感度を有する、上記アッセイの使用である。

## 【0035】

更に、本発明の主題は、前記対象の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する食後の変化を決定するための、上記アッセイの使用である。

20

## 【0036】

更に、本発明の主題は、前記対象の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する変化(増大又は低下)を決定するための、1 nmol/L以下、好ましくは100 pmol/L以下、より好ましくは10 pmol/L以下、なおもより好ましくは1 pmol/L以下、最も好ましくは0.5 pmol/L以下の検出感度を有するアッセイの使用である。本発明の好ましい態様において、前記1つ以上の心臓血管マーカーの食後の相対レベルが決定される。特に好ましい態様において、前記心臓血管マーカーの1つはプロANPである。なおもより好ましくは、前記マーカーの1つは、プロANPの中央領域である。最も好ましくは、中央領域プロANP<sub>53-90</sub>である。

30

## 【0037】

MR-プロANP<sub>53-90</sub>は、プロ心房性利尿ペプチドの中央領域を意味し、プロ心房性利尿ペプチド(プロANP)の第53~90アミノ酸を含む。図1を参照されたい。

## 【0038】

更に、本発明の主題は、前記対象の1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの基底レベルに対する食後の変化(増大又は低下)を決定するための、好ましくは、1 nmol/L以下、好ましくは100 pmol/L以下、より好ましくは10 pmol/L以下、なおもより好ましくは1 pmol/L以下、最も好ましくは0.5 pmol/L以下の検出感度を有するアッセイの使用である。

## 【0039】

前記アッセイは、免疫アッセイが好ましい。

40

## 【0040】

更に、本発明の主題は、前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの変化が、対象の心臓血管系に対する影響に関して、食品及び/又は飲料及び/又は食事及び/又は栄養計画及び/又は薬剤を分類するのに使用される、上記で述べたアッセイの使用である。

## 【0041】

特定の態様において、前記1つ以上の心臓血管マーカーのレベルの変化は、糖尿病薬剤を分類するのに使用される。

## 【0042】

本発明の1つの態様において、前記対象は、健康な、又は症候の無い人類である。

50

## 【0043】

本発明の他の態様において、前記対象は、心臓血管系及び／又は代謝症候群に関連する医学的状態に罹患した人類である。

## 【0044】

本明細書中で使用されるとき、「代謝症候群」という用語は、心臓血管疾患及びII型糖尿病の幾つかのリスク因子の蓄積を意味し、American Heart Association (AHA) and National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) (Grundy et al. 2005. Circulation 112: 2735-3752)により定義され、当該文献は、本明細書中に参照により援用される。前記代謝症候群の重要な要素は、とりわけ、グルコース不寛容性及び脂質異常症、高血圧及び中心性肥満である。以下の5つの基準：胴囲の増大（女性で $>102\text{ cm}$ 、男性で $>88\text{ cm}$ ）、トリグリセリドの増大（それぞれ $150\text{ mg/dL}$  /  $1.7\text{ mmol/L}$ 、又は増大したトリグリセリドのための薬剤処理）、HDL-コレステロールの低下（男性でそれぞれ $<40\text{ mg/dL}$  /  $1.03\text{ mmol/L}$ ；女性でそれぞれ $<50\text{ mg/dL}$  /  $1.3\text{ mmol/L}$ ；又は低下したHDL-コレステロールのための薬物処理）、血圧の増大（最高血圧 $130\text{ mmHg}$ 、又は最低血圧 $85\text{ mmHg}$ 、又は高血圧の病歴を持つ対象における抗高血圧薬物治療）、及び空腹時血糖の増大（ $>100\text{ mg/dL}$ 又は増大したグルコースのための薬物処理）の中で3つが該当した場合、代謝症候群と診断される。

10

## 【0045】

幾つかの変更が加えられたより最近の定義は、International Diabetes Federation ([http://www.idf.org/webdata/docs/IDF\\_Meta\\_def\\_final.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf))により提供されている。

20

## 【0046】

本発明の1つの態様において、前記対象は、糖尿病、具体的にはII型糖尿病に罹患した人類である。

## 【0047】

本発明の好ましい態様において、前記心臓血管系及び／又は代謝系に関連する症状は、代謝症候群である。

30

## 【0048】

また、前記心臓血管系及び／又は代謝系に関連する症状は、心臓血管系及び／又は代謝系の故障後の症状を含んでもよい。これらのケースにおいて、健康な食事が、対象の生存率を改善してもよい (de Lorge et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation 1999; 99(6): 779-85)。

## 【0049】

本発明の他の好ましい態様において、前記心臓血管系及び／又は代謝系に関連する症状は、心筋梗塞(MI)、冠動脈症候群、うっ血性心不全(CHF)、冠動脈疾患(アテローム性動脈硬化)、脳卒中、一過性脳虚血発作(TIA)、末梢動脈疾患(peripheral artery disease)、心筋症、II型糖尿病、腎不全及び／又は以上の疾患の1つ以上の症状を有する対象、例えば肥満、高血圧、頭痛、腰痛及び呼吸困難からなる群から選択される。

40

## 【0050】

本発明において、1つ以上のマーカーが、ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン-1(ET-1)、バソプレシン(AVP)、アドレノメデュリン(ADM)、からなる群から選択されるペプチド、並びにそれらのプロペプチド及び3以上、好ましくは5超、より

50

好ましくは6超、なおもより好ましくは7超、なおもより好ましくは10超、なおもより好ましくは12超、なおもより好ましくは15超、最も好ましくは20以上のアミノ酸の断片である。

【0051】

ナトリウム利尿ペプチドは、ナトリウム利尿（尿を介してのナトリウムの排出）を誘発するペプチドを指す。種類としては：

- ・心房性ナトリウム利尿ペプチド
- ・脳型ナトリウム利尿ペプチド
- ・C型ナトリウム利尿ペプチド

が挙げられる。

10

【0052】

本発明において、前記マーカ－は、ナトリウム利尿ペプチド、又はそのプロペプチド、又はその3以上、好ましくは5超、より好ましくは6超、最も好ましくは7超のアミノ酸の断片である。

【0053】

本発明の非常に好ましい態様において、前記心臓血管マーカ－の少なくとも1つは、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、又はそのプロペプチド、又はその3以上、好ましくは5超、より好ましくは6超、最も好ましくは7超のアミノ酸の断片である。

【0054】

特に好ましい態様において、前記心臓血管マーカ－の少なくとも1つは、MR-プロANP<sub>53-90</sub>、又はその3以上、好ましくは5超、より好ましくは6超、最も好ましくは7超のアミノ酸の断片である。

20

【0055】

本発明の文脈において、AVPは、アルギニンバソプレシン（＝バソプレシン）又はその断片、又はその前駆体若しくはその断片に関する。好ましいAVPの前駆体の断片は、C末端プロAVP（CT-プロAVP又はコペプチン）である。CT-プロAVP<sub>107-145</sub>（又はCT-プレ-プロAVP<sub>126-164</sub>）は、本発明の文脈において、特に好ましいマーカ－である。

【0056】

本発明の文脈において、ADMは、アドレノメデュリン又はその断片、又はその前駆体若しくはその断片に関する。好ましいADMの前駆体の断片は、中央領域プロADM（MR-プロADM）である。MR-プロADM<sub>24-71</sub>（又はMR-プレプロADM<sub>45-92</sub>）は、本発明の文脈において、特に好ましいマーカ－である。

30

【0057】

本発明の文脈において、ET-1は、エンドセリン1又はその断片、又はその前駆体若しくはその断片に関する。好ましいET-1の前駆体の断片は、C末端プロET-1（CT-プロET-1）である。CT-プロET-1<sub>151-195</sub>（又はCT-プレプロET-1<sub>168-212</sub>）は、本発明の文脈において、特に好ましいマーカ－である。

【図面の簡単な説明】

【0058】

40

【図1】プロANPの配列

【図2】プレ-プロADMの配列

【図3】プロADMの配列

【図4】MR-プロADMの配列

【図5】ADMの配列

【図6】プレ-プロET-1の配列

【図7】プロET-1の配列

【図8】ET-1の配列

【図9】CT-プロET-1の配列

【図10】Big-ET-1の配列

50

【図11】プレ-プロAVPの配列

【図12】プロAVPの配列

【図13】AVPの配列

【図14】CT-プレ-プロAVP(コペプチン)の配列

【図15A】非肥満且つ正常血圧の対象(黒色菱形)、正常血圧且つ中心性肥満の対象(白色菱形)、及び高血圧の対象(黒色三角形)の、血漿MR-プロANP<sub>53-90</sub>を示す。\*は非肥満対肥満且つ正常血圧対象が $p < 0.05$ であること; †は肥満且つ正常血圧対高血圧対象が $p < 0.001$ であること; ‡は高血圧対非肥満正常血圧対象が $p < 0.01$ であることを示す。

【図15B】非肥満且つ正常血圧の対象(黒色菱形)、正常血圧且つ中心性肥満の対象(白色菱形)、及び高血圧の対象(黒色三角形)の、血清インスリンを示す。\*は非肥満対肥満且つ正常血圧対象が $p < 0.05$ であること; †は肥満且つ正常血圧対高血圧対象が $p < 0.001$ であること; ‡は高血圧対非肥満正常血圧対象が $p < 0.01$ であることを示す。

【図15C】高インスリン、正常血糖クランプにおける、血漿MR-プロANP<sub>53-90</sub>の抑制を示す。

【図15D】クランプの定常状態におけるグルコース注入速度(GIR)の値がそれぞれ第25未満及び第75超のパーセントイルとして規定される、インスリン感受性が低い及び高い対象の、デルタMR-プロANP<sub>53-90</sub>を表す。データは、箱髭図により表される。前記箱は、第25から第75パーセントイルまで延びる。中央に線が引かれ第50パーセントイルを示す。髭は、最低から最高値までの範囲を表す。

【図16】N=10の対象において、oGTT後のNT-プロBNP及びMR-プロANPの相対濃度の比較を示す。

【実施例】

【0059】

実験デザイン及び方法

実験プロトコル

実験プロトコルは、Potsdam University and Charite University of Medicine, Berlin, Germanyの倫理委員会により承認された。実験の前に、全被験者から、書面による同意を得た。

【0060】

実験デザイン

対象は、実施中の代謝症候群及び2型糖尿病の原因論のケースコントロール関連実験の一部である(Metabolic Syndrome Berlin-Potsdam Study, MESY-BEPO)。ドイツのポツダム及びベルリンにおいて、一般集団からボランティアを集めた。ベースラインの試験として、人類学的測定、血液サンプリング、75g経口グルコース寛容性試験(oGTT)及び個別の生活習慣及び病歴の聞き取りを行った。この集団のサブグループ(n=31)は、高インスリン、正常血糖クランプを受け、前記oGTT後の別の日に実施された。

【0061】

対象

108人の非高血圧の対象(55人が非糖尿病で、53人が中心性肥満)、及び54人の本態性高血圧の患者について、実験を行った。高血圧は、最高血圧が $> 140$  mmHg、最低血圧が $> 90$  mmHg、又は抗高血圧治療を受けている者として定義された。薬剤処理を受けた高血圧の対象は、全員、実験前の6ヶ月間、安定な投薬を受けた。肝臓の酵素がそれぞれの正常の限度の2倍以上に増大した、又は血清クレアチニン濃度が増大した( $> 1.3$  mg/dl)、又は全身の炎症、心不全及び末期の悪性疾患等の重篤な症状が認められた対象は、実験から除外した。全ての対象は、各人の通常的身體活動を維持し、且つoGTT及びクランプ試験前の3日間、 $> 200$  gの炭水化物を含む通常の食事を摂るように指示された。抗糖尿病治療を受けた、又は新たに2型糖尿病と診断された対象は

10

20

30

40

50

、本実験から除外された。

【0062】

グルコース代謝におけるかく乱の定義は、1997 American Diabetes Associationの、一昼夜の絶食後2時間の75g oGTTで得られるグルコース値の基準を基礎とした(2000 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 23 Suppl 1 : S4 - 19)。

【0063】

実験手順

全ての試験は、12時間の一昼夜の絶食後の朝に実施された。BPは、患者を座らせて、Omron(登録商標)HEM705CP血圧計(Omron, Germany)を使用して、訓練された看護師により測定された。2分置きに3回測定を行い、それらの平均から臨床的最高及び最低血圧を求めた。oGTTのために、経口グルコース投与から0、30、60、90、120及び180分後に静脈血液サンプルを採取した。正常グルコース、高インスリン血クランプ:

高インスリン血正常グルコースクランプは、1分間に身体表面積1m<sup>2</sup>あたり100mUのヒトインスリンを使用して(Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)、且つ20%のグルコースを可変供給(variable infusion)して(Serag Wiessner, Naila, Germany)、120分間実施された(DeFronzo RA, et al. 1979 Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol 237: E214 - 23)。当該クランプの定常状態において、毛細血管中の血糖を、60分間以上、5.5mmol/lに調整した。推定された定常状態の間で1つの毛細血管中のグルコース濃度が>10%の偏差を有する状態を、非定常状態と定義した。当該クランプの毛細血管の血糖値を5分置きにモニタリングし、そのデータを使用して、グルコースの可変供給の調整による血漿グルコースを制御した。

【0064】

解析手順

静脈血液サンプルを直ちに遠心分離し、解析するまで-70で凍結した。毛細血管グルコース濃度は、Dr. Muller G-Lのグルコースオキシダーゼ法を使用して決定した(Dr. Muller Glucose analyzer, Freital, Germany)。血清トリグリセリド、全コレステロール及びHDL-コレステロールを標準的な酵素アッセイにより決定し、そしてこれらのデータからLDL-コレステロールを算出した(臨床化学の認定研究施設)。HbA1cは、Hi-Auto A1C HA-8140システム(Menarini Diagnostics, Germany)を使用して決定された。血清インスリンは、市販のELISAアッセイ(Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden)を使用して測定した。ホメオスタシスモデル評価インスリン耐性(HOMA-IR)は、空腹時インスリン(ILVL) x 空腹時グルコース(mmol/L) / 22.5で算出した(Matthews DR, et al. 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412 - 9)。

【0065】

ヒト血漿MR-プロANP<sub>53-90</sub>は、既に記載された方法で決定した(Morghenthaler NG, et al. 2004 Immunoluminometr

10

20

30

40

50

ic assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. Clin Chem 50:234-6)。

【0066】

NT-プロBNPは、電気化学発光免疫アッセイ(ELICIA, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を使用して決定した。

【0067】

統計解析

出願人らは、実験集団を3つのグループ：本態性高血圧患者(n=54)、非高血圧中心性肥満対象(n=53)、及び非高血圧非中心性肥満対象(n=53)に分けた。中心性肥満は、ATP I IIが定義する代謝症候群の基準(National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the national Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. Circulation 2002; 106:3143-3421)に従い診断した。

【0068】

一般的特徴は、平均±SDとして表示する。他のデータは、平均±SEMとして表示する。全てのデータを、解析前に対数変換した。oGTTにおいて、0~180分のデルタMR-プロANP<sub>53-90</sub>を計算した。ANOVA及びその後の多重グループ比較としてのSidak試験により、グループの比較を行った。oGTTの過程でのMR-プロANP<sub>53-90</sub>のタイムコースの3つのグループ間での比較に、反復測定ANOVA解析を使用した。Pearson相関により、相関解析を行った。クランプ実験において、インスリン感受性は、クランプ試験の定常状態(30分以上)におけるグルコース注入速度(GIR; mg/体重kg・分<sup>-1</sup>)を定常状態での循環インスリン濃度(pmol/l)で割った値として求めた。対のサンプルにおいて、ノンパラメトリックWilcoxon符号付き検定を使用して、ベースラインのデータ及び定常状態のデータを比較した。全ての解析において、p<0.05で有意と見做した。全ての統計解析は、Windows(登録商標)14用のSPSSを使用して実行した(SPSS Inc., Chicago, Illinois)。

【0069】

結果

試験集団の特徴を、表1にまとめている。肥満正常血圧対象は、非肥満正常血圧対象と比較して、よりインスリン耐性が高く：空腹時インスリン及び血中グルコース濃度が高く、HDL-コレステロール濃度及びトリグリセリドレベルが低く、そしてSBP及びDBPが高かった。年齢、HbA1cレベル及びSBPを除き、肥満かつ高血圧の対象は、肥満だが正常血圧の対象と比較して、BMI、胴囲及びインスリン耐性において、同程度であった。

【0070】

MR-プロANP<sub>53-90</sub>の空腹時濃度は、非肥満正常血圧対象及び肥満高血圧対象(それぞれ64.1±25.6 pmol/l及び77.5±30.8 pmol/l)と比較して、肥満正常血圧対象で最低値となった(53.9±28.0 pmol/l)。年齢及びBMIで補正を行った後も、その差は顕著であった。正常血圧の対象において、空腹時MR-プロANP<sub>53-90</sub>レベルは、有意に、年齢(r=0.429, p<0.0001)、HDL-コレステロール(r=0.270, p=0.006)と正に相関し、そ

10

20

30

40

50

してBMI ( $r = -0.313$ ,  $p = 0.001$ )、DBP ( $r = -0.251$ ,  $p = 0.009$ )、空腹時インスリン ( $r = -0.276$ ,  $p = 0.004$ )、及びHOMA-IR指数 ( $r = -0.268$ ,  $p = 0.005$ )と負に相関していた。対照的に、肥満で高血圧の対象において、MR-プロANP<sub>53-90</sub>との正の相関は、年齢に限定されていた ( $r = 0.546$ ,  $p < 0.0001$ )。

#### 【0071】

全ての試験対象において、MR-プロANP<sub>53-90</sub>のレベルは、経口グルコース投与後30分で急速に低下し、そして試験期間中継続的に抑制されていた ( $p < 0.0001$ ; 基底レベル対oGTT後30、60、90、120及び180分のレベル)。MR-プロANP<sub>53-90</sub>の試験後の濃度は、非肥満正常血圧対象及び肥満高血圧対象と比較して、肥満正常血圧対象において、90~180分から顕著に低下した (図15A)。180分時点でのMR-プロANP<sub>53-90</sub>の相対的な抑制は、非肥満正常血圧対象が $20.0 \pm 13.4\%$ で、肥満正常血圧が $21.4 \pm 19.5\%$ で、高血圧対象が $21.2 \pm 13.4\%$ であった (顕著ではない)。肥満正常血圧対象において、インスリンの空腹時及びグルコース投与時のレベルは顕著に低下し (図15B)、そして60~180分で正常血圧対象の空腹時及び投与後のMR-プロANP<sub>53-90</sub>レベルと負に相関し ( $r = -0.198 \sim -0.358$ ;  $p < 0.0001 \sim 0.05$ )、一方これらの相関は、高血圧の対象の場合よりも格段に弱かった。正常血圧及び高血圧の対象において、空腹時及び投与後の血液グルコースレベルと、oGTT中のMR-プロANP<sub>53-90</sub>レベルとの間に、相関は無かった (データ無し)。

10

20

#### 【0072】

BNPは、健康な対象において生理的に軽微な役割しか果たさないと考えられているが、通常、ANPと同様に制御されている。そこで、我々は、NT-プロBNPレベルが、経口グルコース投与に反応して減少するか否かを試験した。NT-プロBNPレベルを10人の対象において評価し、このサブグループ中で、MR-プロANP<sub>53-90</sub>と比較した。実際に、グルコース投与後に、NT-プロBNPの相対濃度も低下したが、MR-プロANP<sub>53-90</sub>と比較して、反応は一時的で、僅かであった (図16)。

#### 【0073】

31人の肥満の対象 (17人の正常血圧対象及び14人の高血圧対象)に、正常血糖高インスリン血クランプを実行した。正常血圧対象は、年齢、BMI、胴囲及びインスリン感受性で、高血圧対象と同等であった (それぞれ平均 $\pm$ SEで;  $30.6 \pm 3.5$  kg/m<sup>2</sup>対 $32.0 \pm 3.4$  kg/m<sup>2</sup>,  $p = 0.341$ ;  $101.0 \pm 7.3$  cm対 $103.6 \pm 8.8$  cm,  $p = 0.526$ ;  $6.1 \pm 1.6$  mg/体重kg x分<sup>-1</sup>対 $5.5 \pm 2.0$  mg/体重kg x分<sup>-1</sup>,  $p = 0.388$ )。空腹時血糖、インスリン及びMR-プロANP<sub>53-90</sub>レベルは、正常血圧と高血圧の対象との間で差は無かった (それぞれ平均 $\pm$ SEで;  $5.2 \pm 0.5$  mmol/l対 $5.4 \pm 0.6$  mmol/l,  $p = 0.147$ ;  $66.0 \pm 40.2$  pmol/l対 $76.2 \pm 39.0$  pmol/l,  $p = 0.470$ ;  $59.5 \pm 18.3$  pmol/l対 $61.0 \pm 31.5$  pmol/l,  $p = 0.874$ )。正常血糖クランプにおいて、循環インスリンレベルは、120分のクランプで、正常血糖対象で $1223$  pmol/lまで ( $708 \sim 2106$ )、そして高血圧対象で $1247$  pmol/lまで ( $430 \sim 1476$ )増大した ( $p = 0.489$ )。両方のグループにおいて、120分のクランプで、MR-プロANP<sub>53-90</sub>レベルは基底値と比較して顕著に低下したが、両方のグループ間で差は無かった groups (MR-プロANP<sub>53-90</sub>は120分のクランプで、正常血圧対象が $11.1$  ( $-1.3 \sim 25.1$ ) pmol/l、高血圧対象で $8.5$  ( $-35.2 \sim 34.6$ ) pmol/l,  $p = 0.297$ ) (図15C)。インスリン感受性が高い対象と低い対象 (グルコース注入速度がそれぞれ第25パーセントイル未満及び第75パーセントイル超であるものとして決定される)との間で、MR-プロANP<sub>53-90</sub>の抑制の差は無かった (図15D)。

30

40

50

## 【0074】

健康な対象 (n = 264) における平均のMR - プロADMは、0.33 nmol/L (標準偏差0.07 nmol/L)、範囲0.1~0.64 nmol/L、第99パーセンタイルが0.52 nmol/L、第97.5パーセンタイルが0.49 nmol/L、第2.5パーセンタイルが0.17 nmol/L、第1パーセンタイルが0.14 nmol/Lであった。このアッセイの検出の下限は、0.08 nmol/Lであった (Morgenthaler et al. 2005. Clin Chem 51(10):1823-1829)。

## 【0075】

健康な対象 (n = 325) におけるMR - プロANP<sub>53-90</sub>濃度の中央値は、45 pmol/L、範囲9.6~313 pmol/L、第99パーセンタイルが197.5 pmol/L、第97.5パーセンタイルが163.9 pmol/L、第2.5パーセンタイルが18.4 pmol/L、第1パーセンタイルが13.6 pmol/Lであった。このアッセイの検出の下限は、6.0 pmol/Lであった (Morgenthaler et al. 2004. Clin Chem 50(1):234-236)。

10

## 【0076】

健康な対象 (n = 359) におけるCT - プロAVP濃度の中央値は、4.2 pmol/L、範囲1~13.8 pmol/L、第99パーセンタイルが13.5 pmol/L、第97.5パーセンタイルが11.25 pmol/L、第2.5パーセンタイルが1.7 pmol/Lであった。このアッセイの検出の下限は、1.7 pmol/Lであった (Morgenthaler et al. 2006. Clin Chem 52(1):112-119)。359人中9人は、CT - プロAVP値が検出限界を下回り、それらは1.0 pmol/Lとした。

20

## 【0077】

健康な対象 (n = 326) における平均のCT - プロET-1は、44.3 pmol/L (標準偏差10.6 pmol/L)、範囲10.5~77.4 pmol/L、第99パーセンタイルが72.8 pmol/L、第97.5パーセンタイルが66.6 pmol/L、第2.5パーセンタイルが24.8 pmol/L、第1パーセンタイルが17.4 pmol/Lであった。このアッセイの検出の下限は、0.4 pmol/Lであった (Papasotiriou et al. 2006. Clin Chem 52(6):1144-1151)。

30

## 【0078】

健康な対象 (n = 2264) における平均のNT - プロBNP濃度は、5.94 pmol/L (標準偏差7.36 pmol/L)、中央値が3.25 pmol/L、第97.5パーセンタイルが19.94 pmol/L、そして第95パーセンタイルが17.58 pmol/Lであった。このアッセイの検出の下限は、0.59 pmol/Lであった (Assay proBNP I I cobas by Roche; manual 2007-09 V2)。

## 【0079】

【表 1】

表 1 試験対象の臨床的及び生化学的特徴

	非肥満 非高血圧 対象 (n=55)	肥満 非高血圧 対象 (n=53)	肥満 高血圧 対象 (n=54)
臨床的特徴			
年齢(歳)	47.1±13.7	47.9±10.5	60.1±8.8 <sup>a,d</sup>
性別(女性;%)	74.2	73.4	66.2
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	23.4±2.3	30.0±5.0 <sup>a</sup>	30.0±4.0 <sup>a</sup>
胴囲(cm)	79.8±8.7	100.0±10.4 <sup>a</sup>	100.1±11.4 <sup>a</sup>
最高血圧(mm Hg)	111.3±12.1	119.5±13.6 <sup>a</sup>	130.9±16.8 <sup>a,d</sup>
最低血圧(mm Hg)	70.6±8.2	78.5±8.3 <sup>a</sup>	81.6±10.9 <sup>a</sup>
生化学的特徴			
空腹時血中グルコース(mmol/l)	4.7±0.4	5.0±0.5 <sup>b</sup>	5.0±0.6 <sup>b</sup>
HbA1c(%)	5.3±0.4	5.3±0.4	5.6±0.4 <sup>a,d</sup>
HDLコレステロール(mmol/l)	1.5±0.3	1.3±0.3 <sup>a</sup>	1.3±0.3 <sup>a</sup>
トリグリセリド(mmol/l)	1.0±0.6	1.6±0.9 <sup>b</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>
空腹時インスリン(pmol/l)	36.8±47.0	52.9±34.9 <sup>a</sup>	54.1±35.8 <sup>a</sup>
HOMA <sub>IR</sub> (mU mmol/l)	1.3±1.9	2.0±1.4 <sup>a</sup>	2.0±1.5 <sup>a</sup>
プロANP(pmol/l) 0 min	64.1±25.6	53.9±28.0 <sup>c</sup>	77.5±30.8 <sup>d</sup>
デルタプロANP <sub>(0-180 min)</sub> (pmol/l)	14.7±11.9	10.9±11.0 <sup>c</sup>	18.2±15.3 <sup>d</sup>

他に言及されていない限り、数値は、平均±SDである。全ての数値は調整されていない。非肥満非高血圧対象では、<sup>a</sup>は $p < 0.0001$ ；<sup>b</sup>は $p < 0.01$ ；<sup>c</sup>は $p < 0.05$ であり、肥満非高血圧対象では、<sup>d</sup>は $p < 0.0001$ ；<sup>e</sup>は $p < 0.05$ である。肥満は、代謝症候群におけるA T I I I基準（胴囲が女性で $> 88$ cm、男性で $> 102$ cm）による「中心性肥満」を指す。

## 【 図 1 】

Fig. 1

配列番号：1(プロ-ANPのアミノ酸配列)：

```

1   NPMYNVAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED EVVPPQVLSE PNEEAGAALS
51  PLPEVPPFTG EVSPAQRDGG ALGRGFWDS DRSALLKSKL RALLTAPRSL
101 RRSSCFGGRM DRIGAQSGLG CNSFRY

```

## 【 図 2 】

Fig. 2

配列番号：2(プレ-プロ-ADMのアミノ酸配列)：

```

1   MKLVSVALMY LGSFLAFGLAD TARLDVASEF RKKWNKVALS RGKRELRMS
51  SYPTGLADVK AGPAQLLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RVKRYRQSMN
101 NFGQLRSPGC RFGTCTVQKL AHQIYQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYGRRR
151 RRSLEPAGFG RTLVSQKQA HGAPAPPSGS APHFL

```

## 【 図 3 】

Fig. 3

配列番号：3(プロ-ADMのアミノ酸配列)：

```

1   ARLDVASEFR KKNKVALSR GKRELRMSYS YPTGLADVKA GPAQLLIRPQ
51  DMKGASRSP E DSSPDAARIR VKRYRQSMNN FQGLRSPGCR FGTCTVQKLA
101 HQIYQFTDKD KDNVAPRSKI SPQGYGRRRR RSLPEAGPGR TLVSSKQAH
151 GAPAPPSGSA PHFL

```

## 【 図 7 】

Fig. 7

配列番号：7(プロ-ET-1のアミノ酸配列)：

```

1   APETAVLGAE LSAVGRNGGE KPTPSPFWRL RRSKRCSCSS LMDKECVYFC
51  HLDIIWVNTP EHVVPYGLGS PRSKRALENL LPTKATDREN RCQASQKDK
101 KCWNFCQAGK ELRAEDIMEK DWNHKKKGD CSKLGKCIY QQLVGRKRIR
151 RSSEHLRQT RSETMRNSVK SSFHDPKLKG KPSRERYVTH NRAHW

```

## 【 図 8 】

Fig. 8

配列番号：8(ET-1のアミノ酸配列)：

```

1   CSCSSLMCKE CVYFCHLDII W

```

## 【 図 9 】

Fig. 9

配列番号：9(CT-プロ-ET-1のアミノ酸配列)：

```

1   RSSEHLRQT RSETMRNSVK SSFHDPKLKG KPSRERYVTH NRAHW

```

## 【 図 10 】

Fig. 10

配列番号：10(Big-ET-1のアミノ酸配列)：

```

1   CSCSSLMCKE CVYFCHLDII WVNTPEHVVP YLGSPRS

```

## 【 図 4 】

Fig. 4

配列番号：4(MR-プロ-ADMのアミノ酸配列)：

```

1   ELRMSSSYPT GLADVAGPA QTLIRPQDMK GASRSPEDSS

```

## 【 図 5 】

Fig. 5

配列番号：5(ADMのアミノ酸配列)：

```

1   YRQSMNPFQ LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPO
51  GY

```

## 【 図 6 】

Fig. 6

配列番号：6(プレ-プロ-ET-1のアミノ酸配列)：

```

1   MDYLLMIFSL LRVACQGAP E TAVLGAE LSA VGENGGKPT PSPFWRLRRS
51  KRCSCSSLM D KECVYFCHLD IIVVNTPEHV VPYGLSPPRS KRALENLLPT
101 KATDRENR CQ CASQKDKCW NFCQAGKELR AEDIMEKDNW NHKKGKDCSK
151 LGKKCIYQQL VRGRKIRRSR BEHLRQTRSE TMRNSVSSSF HDPKLGKPKS
201 RERYVTHNRA HW

```

## 【 図 11 】

Fig. 11

配列番号：11(プレ-プロ-AVPのアミノ酸配列)：

```

1   MPDTMLPACF LGLLAFSSAC YFQNCPRGGK RAMSDLELRQ CLPCGPGGKG
51  RCFGPSICCA DELGCFVGT EALRCQEENY LPSPCQSGQK ACGSGGRCAA
101 FGVCCNDESC VTEPECREGF HRRARASDRS NATQLDGPAG ALLLRLVQLA
151 GAPEPFEPQA PDAY

```

## 【 図 12 】

Fig. 12

配列番号：12(プロ-AVPのアミノ酸配列)：

```

1   CYFQNCPRGG KRAMSDLELR QCLPCGPGGK GRCFGPSICC ADELGCFVGT
51  AEALRCQEN YLSPCQSGQ KACGSGGRCA AFGVCCNDES CVTEPECREG
101 FHRRARASDR SNATQLDGP A GALLLRLVQL AGAPEPFEP A QPDAY

```

## 【 図 13 】

Fig. 13

配列番号：13(AVPのアミノ酸配列)：

```

1   CYFQNCPRG

```

## 【 図 14 】

Fig. 14

配列番号：14(CT-プレ-プロAVP又はコペプチンのアミノ酸配列)：

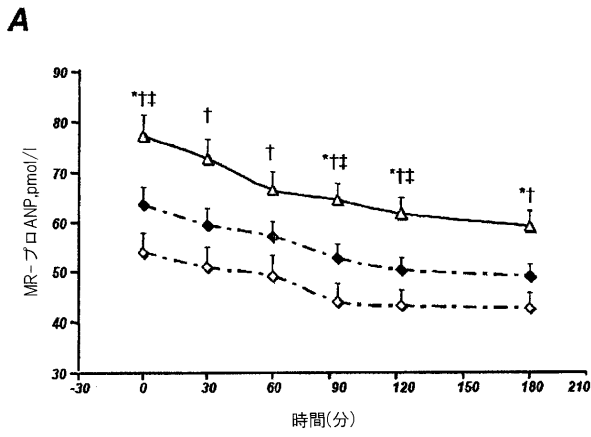
```

1   ASDRSNATQL DGPAGALLR LVQLAGAPEF FEPAQPDAY

```

【 図 1 5 A 】

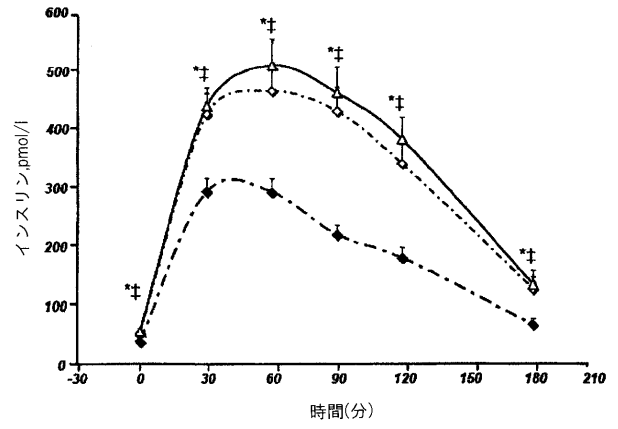
Fig. 15



【 図 1 5 B 】

Fig. 15

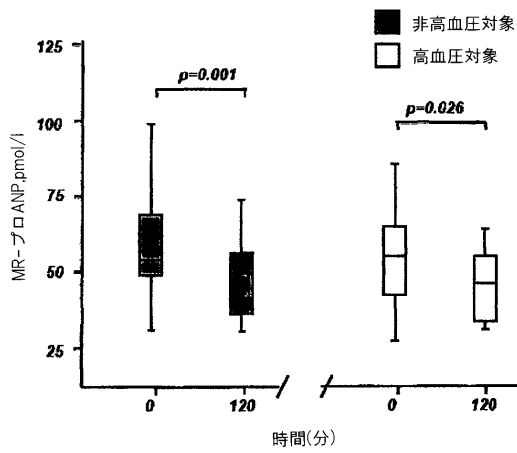
**B**



【 図 1 5 C 】

FIG. 15

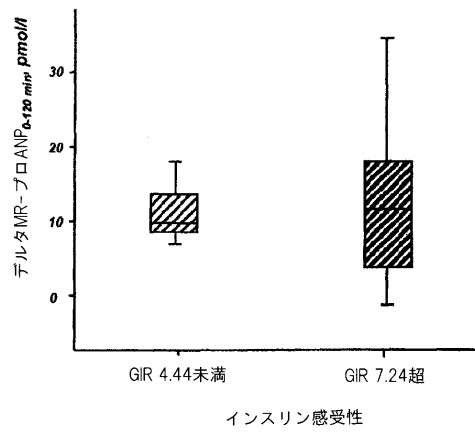
**C**



【 図 1 5 D 】

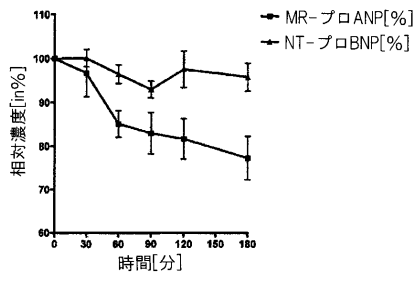
FIG. 15

**D**



【 図 1 6 】

Fig. 16



【 配 列 表 】

2012507021000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2009/007924
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NERI S. ET AL.: "Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: A single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls" CLIN. THERAP., vol. 27, no. 11, November 2005 (2005-11), pages 1764-1773, XP005215815 the whole document ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 February 2010		Date of mailing of the international search report 16/02/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giry, Murielle

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/007924
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUZUKI K. ET AL.: "Improved early-phase insulin response after Candesartan treatment in hypertensive patients with impaired glucose tolerance" CLIN. EXP. HYPERTENSION, vol. 30, no. 5, July 2008 (2008-07), pages 309-314, XP002510787 the whole document	1-16
Y	MORGENTHALER N.G. ET AL.: "Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma" CLIN. CHEM., vol. 50, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 234-236, XP002510788 cited in the application the whole document	1-16
Y	MORGENTHALER N.G. ET AL.: "Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay" CLIN. CHEM., vol. 51, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 1823-1829, XP002510789 cited in the application abstract page 1828	1-16
Y	MORGENTHALER N.G. ET AL.: "Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin" CLIN. CHEM., vol. 52, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 112-119, XP002510790 cited in the application abstract page 117, left-hand column, last paragraph - page 118, right-hand column	1-16
Y	MORGENTHALER N.G. ET AL.: "Copeptin: clinical use of a new biomarker" TRENDS ENDOCRINOL. METABOL., vol. 19, no. 2, March 2008 (2008-03), pages 43-49, XP002510791 the whole document	1-16

-/-

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/007924
---

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAPASSOTIRIOU J. ET AL.: "Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-I precursor fragment in human plasma" CLIN. CHEM., vol. 52, no. 6, June 2006 (2006-06), pages 1144-1151, XP002510792 cited in the application abstract page 1149, left-hand column, last paragraph - page 1150, right-hand column	1-16
Y	YOUSUFUDDIN M. ET AL.: "Incremental importance of peak-exercise plasma levels of endothelin-I and natriuretic peptides in chronic heart failure" J. CARDIOVASC. PHARMACOL., vol. 38, no. 3, September 2001 (2001-09), pages 468-473, XP009110790 the whole document	2,4-5,10
A	US 2008/213746 A1 (NG L.L. [GB] ET AL.) 4 September 2008 (2008-09-04) the whole document	1-16
A	DE 10 2006 052916 A1 (BRAHMS AG [DE]) 15 May 2008 (2008-05-15) the whole document	1-16

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2009/007924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008213746 A1	04-09-2008	NONE	
DE 102006052916 A1	15-05-2008	CN 101568833 A	28-10-2009
		WO 2008055491 A2	15-05-2008
		EP 2097748 A2	09-09-2009

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ベルクマン, アンドレアス

ドイツ連邦共和国, 1 2 3 5 1 ベルリン, バウムロイファー ベーク 4 7

(72)発明者 プファイファー, アンドレアス エフ.ハー.

ドイツ連邦共和国, 1 4 5 5 8 ヌーテタール, オーテール ベルゴルツ レブリュケ, アルトウー  
ル - シュウネルト - アレ 1 1 4 - 1 1 6, ツェーノオー ドイツェス インスティチュット フ  
ュール エルナルングスフォルシュンク (デーイーエフエー)

(72)発明者 ルードウィッヒ, ナタリア

ドイツ連邦共和国, 1 4 5 5 8 ヌーテタール, オーテール ベルゴルツ レブリュケ, アルトウー  
ル - シュウネルト - アレ 1 1 4 - 1 1 6, ツェーノオー ドイツェス インスティチュット フ  
ュール エルナルングスフォルシュンク (デーイーエフエー)

Fターム(参考) 4B018 LB08 LB10 ME04 ME14

专利名称(译)	用于对关于对心血管系统的影响的食物和/或饮料和/或膳食和/或营养计划和/或药物进行分类的方法和测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012507021A</a>	公开(公告)日	2012-03-22
申请号	JP2011533627	申请日	2009-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	基地.厄尔尼诺啊.哈哈.他们.居GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ベルクマンアンドレアス プファイファーアンドレアスエフハー ルードウィツヒナタリア		
发明人	ベルクマン,アンドレアス プファイファー,アンドレアス エフ.ハー. ルードウィツヒ,ナタリア		
IPC分类号	G01N33/53 A23L1/29 A23L33/00		
CPC分类号	G01N33/5088 G01N33/74 G01N2333/575 G01N2333/58		
FI分类号	G01N33/53.B A23L1/29.ZNA		
F-TERM分类号	4B018/LB08 4B018/LB10 4B018/ME04 4B018/ME14		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 中岛胜		
优先权	2008168107 2008-10-31 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的主题是鉴于对受试者的心血管系统的影响而对食品和/或饮料和/或饮食和/或营养方案和/或药物进行分类的体外方法，包括确定相对水平的一种或多种心血管标志物。

Fig. 15

