

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6419794号  
(P6419794)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 D

請求項の数 17 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2016-519364 (P2016-519364)	(73) 特許権者	514122524
(86) (22) 出願日	平成26年9月30日 (2014. 9. 30)		シュピーングテック ゲゼルシャフト ミ
(65) 公表番号	特表2016-532093 (P2016-532093A)		ット ベシュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ヘニッヒ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/070962		ストルフ, ノイエンドルフシュトラーセ
(87) 国際公開番号	W02015/049243		1 5 アー
(87) 国際公開日	平成27年4月9日 (2015. 4. 9)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成28年7月6日 (2016. 7. 6)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	13186938.0	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成25年10月1日 (2013. 10. 1)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(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】 主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性心筋梗塞を患った対象における主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を予測する方法であって、デバイスにより行われる以下の工程：

・該対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；そして

・主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡の危険性と、該プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測となるように関連付けること、

を含み、

前記主要な心臓有害事象が、心筋梗塞、脳卒中、及び急性心不全を含む群から選択される急性の主要な心臓有害事象である、方法。

【請求項 2】

前記対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；ここで、PTA 1 - 37、配列番号2、EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHL LQRIAに結合する少なくとも1つの結合剤が使用され、そして、ここで、該結合剤がPTA 1 - 37に対して少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象からの前記体液サンプルが、急性心筋梗塞発生後の特定の時間枠内で採取され、この時間枠が2カ月である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記対象からの前記体液サンプルが、急性心筋梗塞発生後の特定の時間枠内で採取され、この時間枠が1カ月である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】

前記対象からの前記体液サンプルが、急性心筋梗塞発生後の特定の時間枠内で採取され、この時間枠が1週間である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項6】

前記対象からの前記体液サンプルが、急性心筋梗塞発生後の特定の時間枠内で採取され、この時間枠が24時間以内である、請求項1又は2に記載の方法。

10

【請求項7】

前記高いレベルが、ここ6カ月以内又はここ2年以内の主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測である、請求項1～6のいずれか1項に記載の急性心筋梗塞を患った対象における主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を予測する方法。

【請求項8】

更に、以下のマーカー：トロポニンI、トロポニンT、CRP、LpLA2、サイスタチンC及びA型及びB型のナトリウム利尿ペプチド、それらの前駆体、及びそれらの断片、ANP、proANP、NT-proANP、MR-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNPトリグリセリド、HDLコレステロール又はその副画分、LDLコレステロール又はその副画分、GDF15、ST2、コペプチン、並びにPURSUIT、TIMI、GRACE及びFRISC危険性スコアから選択されるいずれかのスコアのうちの1若しくは複数のレベルがデバイスにより判定され、そして、使用される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項9】

追加で少なくとも1つの臨床的パラメーターがデバイスにより判定され、該パラメーターとして：年齢、収縮期血圧、拡張期血圧、抗高血圧治療、ポディーマスインデックス、糖尿病の存在、現在の喫煙が含まれる、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルが、免疫学的アッセイによって評価される、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項11】

前記方法が、対象における主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を観察するために複数回実施される、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記観察が、採用した予防的対策及び/又は治療的対策に対する前記対象の応答を評価するために実施される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記対象を危険群に分類するための、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項に記載の方法を実施するためのデバイスの使用。

【請求項15】

前記デバイスがポイントオブケアデバイスである、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

次の：

・プロBNP、又は少なくとも5つのアミノ酸を有するその断片若しくは前駆体に対する結合剤、及び

・プロタキニン若しくは少なくとも5アミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドに対する結合剤、及び/又はCRPに対する結合剤、

50

を含んでいる、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測する方法のためのデバイスの使用。

【請求項 17】

前記結合剤が、抗体、抗体断片及び非 I g 足場を含む群から選択される、請求項 16 に記載の主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測する方法のためのデバイスの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の対象は、急性心筋梗塞を患った対象が主要な心臓有害事象に罹患するか又は死亡する危険性を予測するための方法であって、

- ・該対象から得られた体液中の、プロタキニン又は少なくとも 5 つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；及び

- ・主要な心臓有害事象に罹患するか又は死亡する危険性と、該プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが主要な心臓有害事象に罹患するか又は死亡する高い危険性の予測となるように関連付けること、を含む。

「高いレベル」という用語は、特定の閾値レベルを上回るレベルを意味する。

【背景技術】

【0002】

サブスタンス P ( S P ) は神経ペプチドであり：神経伝達物質として、及び神経調節物質として機能するウンデカペプチドである。これは、タキニン神経ペプチドファミリーに属する。サブスタンス P 及びその密接に関連した神経ペプチドニューロキニン A ( N K A ) は、プレプロ - タキニン A 遺伝子の異なるスプライシング後に、ポリタンパク質前駆体から産生される。C N S において、サブスタンス P は疼痛伝達系に参与する。

S P は、痛覚、炎症、血漿漏出、後毛細血管細静脈における血小板及び白血球凝集、並びに血管壁を透過する白血球走化性移動で役割を果たす ( Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* 1993 Apr;73(2):229-308. ) 。

【0003】

ニューロキニン ( N K ) 受容体は、主に冠状血管及び心臓内の神経節に存在し、心室心筋又は心房心筋には存在しない ( Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Dec;84(4):367-73. ) 。冠状動脈における N K 1 受容体に対する直接的な作用は、N O 媒介性血管拡張を引き起こし得るか ( Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* 1993 Apr;73(2):229-308. ) 、或いは、この効果は冠動脈疾患を患っている患者では弱められる可能性があり ( Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5' -monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1987 Jan; 79(1):170-4. ) 、優位な N K 2 媒介性血管収縮を引き起こす。S P 及びニューロキニン A は、コリン作動性ニューロンを介して負の心筋収縮作用及び周期変動作用をおよぼす ( Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Dec;84(4):367-73. ) 。対照的に、N K 1 拮抗薬がラット心筋梗塞 ( A M I ) モデルにおいて心筋収縮作用及び心筋弛緩作用を改善する一方で、S P はノルエピネフリンの正の心筋収縮作用を減弱する ( Wang LL, Guo Z, Han Y, Wang PF, Zhang RL, Zhao YL, Zhao FP, Zhao XY. Implication of Substance P in myocardial contractile function during ischemia in rats. *Regul Pept.* 2011 Apr 11;167(2-3):185-91. ) 。S P ( N K 1 受容体を介して ) は、モルモットにおいて A M I 後の気絶心筋に関わった ( Chiao H, Caldwell RW. The role of substance P in myocardial dysfunction during ischemia and reperf

10

20

30

40

50

usion. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1996 Mar; 353(4):400-7.)。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、S Pのいくつかの作用は、A M Iにおいて潜在的に有益であり得る。S Pは虚血ポストコンディショニングに参与し (Ren JY, Song JX, Lu MY, Chen H. Cardio protection by ischemic postconditioning is lost in isolated perfused heart from diabetic rats: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide and substance P. Regul Pept. 2011 Aug 8;169(1-3):49-57.)、そしてNK 1拮抗薬は、動物モデルにおける増大したA M Iサイズの傾向をもたらし得る (Zhang RL, Guo Z, Wang LL, Wu J. Degeneration of capsaicin sensitive sensory nerves enhances myocardial injury in acute myocardial infarction in rats. Int J Cardiol. 2012 Sep 20;160(1):41-7.)。虚血中の侵害受容知覚は、虚血領域の血管新生に役割を果たし得るNK 1受容体発現性骨髄前駆細胞の動員を引き起こし得る (Amadesi S, Reni C, Katare R, Meloni M, Oikawa A, Beltrami AP, Avolio E, Cesselli D, Fortunato O, Spinetti G, Ascione R, Cangiano E, Valgimigli M, Hunt SP, Emanuelli C, Madeddu P. Role for substance p-based nociceptive signaling in progenitor cell activation and angiogenesis during ischemia in mice and in human subjects. Circulation. 2012 Apr 10;125(14):1774-86, S1-19.)。

【 0 0 0 5 】

心筋 (Morrey C, Brazin J, Seyedi N, Corti F, Silver RB, Levi R. Interaction between sensory C-fibers and cardiac mast cells in ischemia/reperfusion: activation of a local renin-angiotensin system culminating in severe arrhythmic dysfunction. 1. J Pharmacol Exp Ther. 2010 Oct;335(1):76-84.) 及び肺 (Guo Z, Wang XP, Wang JP, Zhou RH, Wang LL, Wu J. Up-regulation of substance P in the lungs during acute myocardial ischemia and infarction in rats. Regul Pept. 2010 Feb 25;160(1-3):160-7.) のS Pは、A M Iの動物モデルにおいて増強されることが観察され、A M Iにおける役割が示唆された。

NK - 1 Rの刺激によってサブスタンスPがヒト臍細胞のTNF誘発アポトーシスを低減する能力を有することが示された (Br J Sports Med doi:10.1136/bjsports-2013-092438)。

男性における調査は、S Pの非常に短い半減期 (12分) によって妨げられた (Conlon, J.M., Sheehan, L. Conversion of substance P to C-terminal fragments in human plasma. Regul. Pept. 1983; 7:335-345.)。不安定なS Pの代用品である安定したPTA (N末端プロ - サブスタンスP; 以前はN末端プロタキニンA又はNT - PTAとも呼ばれた) に関するアッセイの最近の発展 (Ernst, A., Suhr, J., Kohrle, J., Bergmann, A. Detection of stable N-terminal protachykinin A immunoreactivity in human plasma and cerebrospinal fluid. Peptides 2008; 29 : 1201-1206.) は、ヒトの疾病におけるこのタキニン系の役割に対する試験を可能にした。プロタキニン断片PTA 1 - 37は、サブスタンスPの代用マーカーになり得る。

【 0 0 0 6 】

WO 2 0 1 0 / 1 2 8 0 7 1 は、心筋梗塞後患者のような急性又は慢性疾患を有する対象の、ACE阻害薬、利尿剤、及びβ-ブロッカーのような薬剤に対する応答者と不応答者、並びに薬剤を受けたとき有害影響を受ける者への分類について記載している。バイオマーカーとして、内皮機能/機能不全に影響するか又は関連する血管作用性ホルモンが使用される。血管作用性ホルモンは低レベルでは、(ホルモンがproANPであるときには血栓溶解剤を除いた) 薬剤の投与は、心筋梗塞を患った患者に対して好ましくない効果を有するのに対して、高レベルでは、薬物の投与が心筋梗塞を患った患者に対して有益な効果を有する。WO 2 0 1 0 / 1 2 8 0 7 1 によると、これは、低レベルのバイオマーカー (proANPを除く) が、(ホルモンがproANPであるときには血栓溶解剤を除いた) 薬剤の投与により心筋梗塞を患った患者に好ましくない効果を生じる、患者にとってより高い危険性を示唆することを意味している。さらにWO 2 0 1 0 / 1 2 8 0 7 1 に

10

20

30

40

50

よると、バイオマーカー（p r o A N Pを除いた）のより高いレベルは、（ホルモンが p r o A N Pであるときには血栓溶解剤を除いた）薬剤の投与により心筋梗塞を患った患者に有益な効果を生じる、患者にとって低い危険性を示唆する。

【 0 0 0 7 】

心臓病学的疾患に罹患している患者の効果的な処置及び管理には、重症度分類システムが必要である。ツール（N T p r o B N P、危険性スコア）が説明されているが、それらは不完全である。よって、現在の危険性の分類技術を改善する代替又は追加のツールが必要である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明の対象は、急性心筋梗塞（A M I）を患った対象の主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を予測する方法であって：

- ・該対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；そして

- ・主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡の危険性と、該プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測となるように関連付けること、を含む。

【 0 0 0 9 】

好ましい実施形態において、本発明の主題は、急性心筋梗塞を患った対象における主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を予測する方法であって：

- ・該対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；ここで、P T A 1 - 3 7、配列番号2、E E I G A N D D L N Y W S D W Y D S D Q I K E E L P E P F E H L L Q R I Aに結合する少なくとも1つの結合剤が使用され、そして、ここで、該結合剤はP T A 1 - 3 7に対して少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性を有し；そして

- ・主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性と、該プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測となるように関連付け；

- ・これにより、プロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのより高いレベル、或いはP T A 1 - 3 7、配列番号2に結合する少なくとも1つの結合剤が使用されて判定される断片のより高いレベルが、主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡するより高い危険性を示すこと、を含む。

【 0 0 1 0 】

具体的な実施形態において、本発明によるこの予測は、前記対象が薬剤によって引き起こされる好ましくない効果を示すか否か、又は前記対象が薬剤に対する応答者であるか又は不応答者であるかという予測ではない。

具体的な一実施形態において、本発明による予測は、前記対象が血栓溶解剤によって引き起こされる好ましくない効果を示すか否か、又は前記対象が血栓溶解剤に対して応答者であるか又は不応答者であるかという予測ではない。

よって、本発明の主題は、具体的な一実施形態において、薬剤に対する応答者、薬剤に対する不応答者、該薬剤を受けた後に好ましくない効果を示す対象への対象の分類を除く。特定の実施形態において、前記薬剤は血栓溶解剤である。急性心筋梗塞（A M I）を患った対象の主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する本発明による方法は、本発明の一実施形態において、薬剤とは無関係であり、特に血栓溶解剤の効果とは無関係である。

【 0 0 1 1 】

主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性の予測は、疾患、病態又は事象の診断と同じでない。危険性の予測とは、バイオマーカーが計測及び予測の時点では存在しておらず、将来現れるであろう事象又は病態に罹患する危険性を予測又は判定することを意

10

20

30

40

50

味し、ここで、診断とは、現れた現在の事象又は現在の病態を判定することを意味する。事象が起こった場合にのみそれらは変化するので、診断マーカーとして適している可能性があっても、予測力を全く有していないバイオマーカーが多く存在する。診断力を全く有していない多くの予測マーカーも存在する。どのような場合であっても、生体分子がいずれかの診断力又は予測力を呈する可能性があるか否か予測できない。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明の具体的な実施形態において、前記の主要な心臓有害事象は、心筋梗塞、脳卒中、急性心不全、及び死亡を含む群から選択される急性の主要な心臓有害事象である。具体的な一実施形態において、今後6カ月又は2年以内に前記の急性有害事象に罹患する危険性が予測される。具体的な一実施形態において、前記AMIは、前記患者からサンプル体液を採取する前のここ24時間以内に起こった。具体的な一実施形態において、前記AMIは、前記患者からサンプル体液を採取する前のここ1週間以内に起こった。具体的な一実施形態において、前記AMIは、前記患者からサンプル体液を採取する前のここ1カ月以内に起こった。具体的な一実施形態において、前記AMIは、前記患者からサンプル体液を採取する前のここ2カ月以内に起こった。

10

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の具体的な実施形態において、急性心筋梗塞を患った対象における主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性を予測する方法であって：

- ・該対象から得られた体液中の又はプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はのプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定し；そして

20

- ・主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する危険性と、前記プロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測となるように関連付けること、を含む。

#### 【 0 0 1 4 】

具体的な一実施形態において、対象は、体液を採取した時点で、及び/又は該対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルが判定される時点で、心不全を患っていない。

本発明による主要複合エンドポイントは、全死因死亡、心不全(HF)入院又は再発性AMI(re-AMI)を含めた主要な心臓有害事象(MACE)であって、それらは2年以内に評価されたものである。このことは、一実施形態において、主要な心臓有害事象が、全死因死亡、心不全(HF)入院又は再発性AMI(re-AMI)を含む群から選択されることを意味している。具体的な一実施形態において、主要な心臓有害事象は、2年以内の全死因死亡、心不全(HF)入院又は再発性AMI(re-AMI)を含む群から選択される。

30

#### 【 0 0 1 5 】

HFによる入院は、高用量の利尿剤、循環作動薬又は静脈内硝酸塩での処置を必要とする主な理由がHFである再入院と規定された。再発性AMIは、一般的な定義を使用して診断された(Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Circulation 2007;116:2634-53.)。第二のエンドポイントは、死亡及び/又はre-AMIと死亡及び/又はHF再入院の複合、並びに個別のre-AMIであった。6カ月時点での死亡及び/又はre-AMIのエンドポイントは、この時点が危険性スコアの作成に使用される場合、GRACEスコアに関する分析に使用された。エンドポイントは、その地域の病院のデータベース及びOffice of National Statistics Registryを参照し、並びに患者への電話によって得た。このことは、一実施形態において、主要な心臓有害事象が死亡及び/又はre-AMI及び死亡及び/又はHF再入院の複合、並びに個別のre-AMIを含む群から選択されることを意味する。具体的な一実施形態において、主要な心臓有害事象は、6カ月以内の死亡及び/又はre-AMI及び死亡及び/又はHF再入院の複合、並びに個別のre-AMIを含む群から選択される。

40

50

## 【0016】

具体的な一実施形態において、主要な心臓有害事象は、死亡及び/又はre-AMIである。具体的な一実施形態において、主要な心臓有害事象は、6カ月の時点での死亡及び/又はre-AMIである。

サブスタンスP/ニューロキニン、並びにプロタキニン及びその断片又はプロタキニン含有ペプチドはプロタキニンから等モル量で放出されるので、プロタキニン及びその断片又はプロタキニン含有ペプチドは、放出されたサブスタンスP及び/又は放出されたニューロキニンの代用マーカーとして使用されてもよい。一実施形態において、サブスタンスP又はニューロキニンを除いたプロタキニン及びその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルが判定される。別の実施形態において、サブスタンスP又はニューロキニンのレベルが判定される。特定のペプチド又はペプチド断片のレベルは、例えば、前記プロタキニン及びその断片又はプロタキニン含有ペプチドに結合する少なくとも1つの結合剤を使用するいずれかの利用可能な解析法によって判定され得る。斯かる結合剤は抗体であってもよい。前記のレベルは、例えば、質量分析法によって判定されてもよい。

10

## 【0017】

上記の方法の一実施形態において、高レベルのプロ-タキニン、そのスプライス変異体又はその断片は、閾値を超えたレベルであり、ここで、該閾値は、(約)100 pmol/L又は100 pmol/L超、好ましくは(約)80 pmol/L又は80 pmol/L超、好ましくは(約)70 pmol/L又は70 pmol/L超である。

20

閾値は使用した較正方法を考慮して見られるべきであり、そして、上記の値は該実施例1、2及び3で使用されるアッセイ及び較正方法を考慮して見られるべきである。実施例1に従って本発明に使用される較正方法により、健康な対象のプロ-タキニンの中央レベルは53 pmol/Lに判定された。

## 【0018】

本発明の一実施形態において、前記の主要な心臓有害事象は、心筋梗塞、脳卒中、急性心不全を含む群から選択される急性の主要な心臓有害事象である。

本発明の一実施形態において、該対象からの前記体液サンプルは、AMIが起こった後の特定の時間枠内で採取され、この時間枠は、2カ月、より好ましくは1カ月、より好ましくは1週間、最も好ましくは24時間以内である。

30

本発明の一実施形態において、前記高いレベルは、ここ6カ月以内又はここ2年以内の主要な心臓有害事象に罹患する又は死亡する高い危険性の予測である。

## 【0019】

明細書を通じて、プロ-タキニン及びプロ-タキニンA(PTA)なる用語は、同義的に使用される。該用語は、プロ-タキニンAの全ての種スプライス改変体、すなわち、及びを含む。明細書を通じて、別段の記述がない限り、プロ-タキニンの断片なる用語はまた、サブスタンスP及びニューロキニンを含むことが理解されるべきである。

## 【0020】

用語「サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキニン、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片を判定すること」とは、通常、前述の分子内の領域に対する免疫反応性が判定されることを意味する。これは、特定の断片が選択的に測定されることは必要ないことを意味する。サブスタンスP及びニューロキニンを含む、プロ-タキニン又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片のレベルを判定するために使用される結合剤は、該結合剤の結合領域を含む任意の断片に結合することが理解される。該結合剤は、抗体又は抗体断片又は非IgG足場であってもよい。

40

## 【0021】

これは明細書及び請求項を通じて、「プロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルを判定する」という用語が、「先に言及した分子内の領域に対する免疫反応性を判定する」と同等であり、且つ、「

50

プロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドに含まれる領域に結合する結合剤、例えば抗体のレベルを判定する」と同等であることを意味する。

【0022】

用語「対象」とは、本明細書で使用するとき、生きているヒト又はヒト以外の生物を意味する。好ましくは、本明細書では、対象はヒト対象である。

【0023】

該対象から得られた体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5のアミノ酸から成るその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルと、主要な心臓有害事象に罹患する危険性との関連は連続的である、すなわち、レベルが高ければ高いほど危険性もより高い。これは、例えば、表2のデータから分かる。第一の四分位数、第二の四分位数、第三の四分位数及び第四の四分位数の比較では、それぞれ高い危険性を示している。

実用性のために、当業者は閾値を使用してもよい。

よって、「高いレベル」という用語は、閾値レベルを上回るレベルを意味し得る。

体液とは、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液(csf)、及び唾液を含む群から選択され得る。

【0024】

具体的な実施形態において、該対象から体液サンプルを採取した時点での心血管疾患は急性心筋梗塞(AMI)である。具体的な一実施形態において、AMIは、STEMI(STセグメント上昇型心筋梗塞)又はNSTEMI(非STセグメント上昇型心筋梗塞)である。本発明の一実施形態において、該対象はAMIを患っていた、ここで、一実施形態において、患者は、次の：20分以上継続する胸痛、又は新規の病理学的Q波又はSTセグメント及びT波変化から成る診断的連続心電図変化、のうちの少なくとも1つと共に99パーセントイルを超える心臓トロポニンレベルを有した。

【0025】

本発明の別の具体的な実施形態において、対象における有害事象の予想、又はAMIを患った後に別の有害事象に罹患する危険性が高い対象の同定は：トロポニンI、トロポニンT、CRP、LpLA2、サイスタチンC及びA型及びB型のナトリウム利尿ペプチド、それらの前駆体、及びそれらの断片、ANP、proANP、NT-proANP、MR-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNPトリグリセリド、HDLコレステロール又はその副画分、LDLコレステロール又はその副画分、GDF15、ST2、コペプチン、並びに例えばPURSUIT、TIMI、GRACE及びFRISC危険性スコアなどのいずれかのスコア(B.E Backus, A.J Six, J.H Kelder, W.B Gibler, F.L Moll,1 and P.A Doevendans, Risk Scores for Patients with Chest Pain: Evaluation in the Emergency Department, Curr Cardiol Rev. 2011 February; 7(1): 2-8.)からなる群から選択される、1つ以上の更なるマーカーのレベルを追加で判定することにより改善される。

【0026】

本発明の特定の実施形態において、体液中のプロタキニン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロタキニン含有ペプチドのレベルに加えて、以下のマーカー：proBNP又はその12アミノ酸以上の断片又は前駆体、及び/又はCRPのレベルが判定され、使用される。

【0027】

本発明の他の特定の実施形態において、追加で1つ以上の臨床的パラメーターが判定され、当該パラメーターとして：年齢、収縮期血圧、拡張期血圧、抗高血圧治療、ボディーマスインデックス、糖尿病の存在、現在の喫煙が含まれる。

【0028】

プロ-タキキニンは、以下の(単数若しくは複数の)配列を有してもよい：

配列番号1(プロ-タキキニンA(1-107))

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFELLLQRIARR

PKPQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHK  
KTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

体液において判定され得るプロ-タキキニンの断片は、例えば、以下の断片の群から選択されてもよい：

【0029】

配列番号2 (プロ-タキキニン1-37、P37)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRI A

配列番号3 (サブスタンスP)

PKPQQFFGLM(-NH2)

配列番号4 (神経ペプチドK)

DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKKTDSFVGLM(-NH2)

配列番号5 (神経ペプチドガンマ)

GHGQISHKRHKKTDSFVGLM(-NH2)

配列番号6 (ニューロキニン1)

HKTDSFVGLM(-NH2)

【0030】

配列番号7 (C末端フランキングペプチド、PTA192-107)

ALNSVAYERSAMQNYE

配列番号8 (PTAアイソフォーム)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARR  
PKPQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKMA  
YERSAMQNYERRR

【0031】

配列番号9 (PTAアイソフォームベータ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARR  
PKPQQFFGLMGKRDADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHK  
KTDSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

配列番号10 (PTAアイソフォームデルタ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARR  
PKPQQFFGLMGKRDAGHGQISHKMAYERSAMQNYERRR

【0032】

配列番号11 (PTAアイソフォームガンマ)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARR  
PKPQQFFGLMGKRDAGHGQISHKRHKKTDSFVGLMGKRALN  
SVAYERSAMQNYERRRSEQ

配列番号12 (PTA3-22)

GANDDLNYWSDWYDSDQIK

配列番号13 (PTA21-36)

IKEELPEPFEHLLQRI

【0033】

PTA、そのスプライス改変体又はその断片のレベルを判定することは、サブスタンスP及びニューロキニンを含む、PTA又はその断片に対する免疫反応性が判定されることを意味し得る。結合領域に依存して、PTA、又はそのスプライス改変体又はその断片を判定するために使用される結合剤は、上記で示された分子の1個を超えて結合してもよい。これは、当業者に明らかである。

【0034】

本発明に方法のより具体的な実施形態において、p37 (PTA1-37、配列番号2、EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRI A)のレベルが判定される。本発明のさらにより具体的な実施形態において、PTA1-37、

10

20

30

40

50

配列番号2、E E I G A N D D L N Y W S D W Y D S D Q I K E E L P E P F E H L L Q R I A内の2つの異なる領域に好ましくは結合する1を超える結合剤の場合において、P T A 1 - 37、配列番号2、E E I G A N D D L N Y W S D W Y D S D Q I K E E L P E P F E H L L Q R I Aに結合する少なくとも1又は2つの結合剤が使用される。該結合剤(単数又は複数)は、好ましくは、抗体又はその結合断片であってもよい。

【0035】

さらにより具体的な実施形態において、(単数若しくは複数の)結合剤は、P T A 1 - 37内の以下の領域の、それぞれ、1つ又は両方に結合するP T A、その改変体又は断片を判定するために使用される。

【0036】

【表1】

GANDDLNYWSDWYSDQIK	PTA 3-22 (配列番号12)
IKEELPEPFEHLLQRI	PTA 21-36 (配列番号13)

【0037】

具体的な実施形態において、P T A、そのスプライス改変体又はその断片のレベルは、P T A、そのスプライス改変体又はその断片に結合する抗体又は抗体の断片を用いたイムノアッセイにより測定される。P T A、そのスプライス改変体又はその少なくとも5つのアミノ酸の断片の判定に有用であり得るイムノアッセイは、実施例1に概説されるステップを含んでもよい。全ての閾値及び値は、実施例1に従って使用される試験及び校正に相関して見る必要がある。当業者は、閾値の絶対値が使用される校正によって影響される可能性があることを知っている可能性がある。これは、本明細書で与えられる値及び閾値が、本明細書で使用される校正との関連で理解されるべきであることを意味する(実施例1)。

本発明による方法のより具体的な実施形態において、プロタキキニンのレベルが判定される。

【0038】

本発明によれば、P T Aに対する診断的結合剤又は他の追加のバイオマーカーは、抗体、例えば、I g G、典型的な全長イムノグロブリン、又は、例えば、化学的に結合された抗体(断片抗原結合)のように、重鎖及び/又は軽鎖の少なくともF可変領域を含有する抗体断片、例えば、限定されないが、F a b断片、例えばF a bミニボディ、一本鎖F a b抗体、エピトープタグを有する一価F a b抗体、例えば、F a b - V 5 S x 2 ; C H 3ドメインで二量体化された二価F a b(ミニ抗体); 二価F a b又は多価F a b、例えば、異種ドメインの助けを借りた多量体化を介して形成されたもの、例えばd H L Xドメインの二量体化を介したもの、例えば、F a b - d H L X - F S x 2 ; F ( a b ' ) 2 - 断片、s c F v - 断片、多量体化された多価又は/及び多重特異的s c F v - 断片、二価及び/又は二重特異的ダイアボディ、B I T E(登録商標)(二重特異的T細胞エンゲージャー(engager))、三機能性抗体、多価抗体、例えば、Gとは異なるクラス由来のもの; 単ドメイン抗体、例えば、ラクダ又は魚類のイムノグロブリン由来のナノボディからなる群から選択される。具体的な実施形態において、P T A、そのスプライス改変体若しくはその断片、又は他の更なるバイオマーカーのレベルは、P T A、そのスプライス改変体若しくはその断片、又はあるいは更なるバイオマーカーに結合する、より詳細には以下に記載される、アダプター、非I g足場を含む群から選択される結合剤を用いたアッセイにより測定される。

【0039】

プロタキキニン(P T A)、そのスプライス改変体又はその断片のレベルを判定するために使用され得る結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは $10^8 M^{-1}$ のP T A、そのスプライス改変体又はその断片に対する親和性定数を示し、好ましい親和性定数は、10

10

20

30

40

50

$10^9 M^{-1}$ より大きく、最も好ましくは $10^{10} M^{-1}$ を超える。当業者は、より高い用量の化合物を適用することによって、より低い親和性を相殺されることが考えられる可能性があり、この測定が、本発明の範囲外をもたらさないことを知っている。結合親和性は、サービス分析、例えば、Biaffm, Kassel, Germany (<http://www.biaffm.com/de/>)として提供される、Biacore法を用いて判定されてもよい、上記も参照のこと。

【0040】

P T A、そのスプライス改変体又はその断片のレベルを判定するために使用され得る結合剤は、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは $10^8 M^{-1}$ のP T A、そのスプライス改変体又はその断片に対する親和性定数を示し、好ましい親和性定数は、 $10^9 M^{-1}$ より大きく、最も好ましくは $10^{10} M^{-1}$ を超える。当業者は、より高い用量の化合物を適用することによって、より低い親和性を相殺されることが考えられる可能性があり、この測定が、本発明の範囲外をもたらさないことを知っている。結合親和性は、サービス分析、例えば、Biaffm, Kassel, Germany (<http://www.biaffm.com/de/>)として提供される、Biacore法を用いて判定されてもよい。

10

【0041】

親和性定数

抗体の親和性を判定するために、固定された抗体に対する、P T A、そのスプライス改変体又はその断片の結合の動力学は、Biacore 2000システム (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) を用いて、標識なしの表面プラズモン共鳴によって判定された。抗体の可逆的固定化は、製造業者の説明書 (マウス抗体捕捉キット; GE Healthcare) に従って、C M 5 センサー表面に高密度で共有結合させた抗マウス F c 抗体を用いて実施した。(Lorenz et al., " Functional Antibodies Targeting IsaA of Staphylococcus aureus Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy " ; Antimicrob Agents Chemother. 2011 January; 55(1): 165-173.)

20

【0042】

ヒトP T A 対照試料は、ICI-Diagnostics, Berlin, Germany <http://www.ici-diagnostics.com/>によって利用可能である。また、アッセイは、合成 (本発明者らの実験では、合成のP 3 7、配列番号2) 又は組換えP T A、そのスプライス改変体又はその断片によって較正されてもよい。

【0043】

本発明の一実施形態において、該方法は、対象において主要な心臓有害事象に罹患する危険性をモニターするため、又は治療経過をモニターするために、1回を超えて行われる。具体的な一実施形態において、該モニターリングは、採用された予防的及び/又は治療的測定に対して、該対象の応答を評価するために行われる。

30

【0044】

本発明の一実施形態において、該方法は、危険群に該対象を分類するために使用される。

【0045】

さらに、本発明の主題は、それぞれの領域が少なくとも4又は5つのアミノ酸を含む、アミノ酸3 - 2 2 ( G A N D D L N Y W S D W Y D S D Q I K、配列番号1 2 ) とアミノ酸2 1 - 3 6 ( I K E E L P E P F E H L L Q R I、配列番号1 3 ) であるP T Aの領域内の2つの異なる領域に結合する2つの結合剤を含む試料において、P T A、そのスプライス改変体又はその断片を判定するためのアッセイである。

40

【0046】

本発明による試料中のP T A、そのスプライス改変体又はその断片を判定するためのアッセイの一実施形態において、該アッセイのその分析的アッセイ感受性は、健全な対象のP T A、そのスプライス改変体又はP T A断片を定量することができ、 $< 20 \text{ pmol/L}$ 、好ましくは $< 10 \text{ pmol/L}$ 、及びより好ましくは $< 5 \text{ pmol/L}$ である。

【0047】

本発明に従って試料中のP T A、そのスプライス改変体又は断片を判定するためのアッ

50

セイの一実施形態において、このようなアッセイは、サンドイッチアッセイ、好ましくは完全に自動化されたアッセイである。それは、E L I S A、完全に自動化されたアッセイ又は手動アッセイであってもよい。それは、いわゆるP O C検定（ポイントオブケア）であってもよい。自動化又は完全に自動化されたアッセイの例としては、以下のシステム：Roche Elecsys（登録商標）、Abbott Architect（登録商標）、Siemens Centauer（登録商標）、Brahms Kryptor（登録商標）、Biomerieux Vidas（登録商標）、Alere Triage（登録商標）の1つについて使用されてもよいアッセイが挙げられる。試験フォーマットの例は、上記で与えられている。

【0048】

本発明に従って試料中のP T A、そのスプライス改変体又は断片を判定するためのアッセイの一実施形態において、該2つの結合剤のうちの少なくとも1つは、検出されるために標識される。標識の例は、上記で与えられている。

10

【0049】

本発明に従って試料中のP T A、そのスプライス改変体又は断片を判定するためのアッセイの一実施形態において、該2つの結合剤のうちの少なくとも1つは、固相に結合される。固相の例は、磁気ビーズ、ポリスチレンチューブ又はマイクロタイタープレートである。一実施形態において、均質アッセイが使用され、例えば、Time Resolved Amplified Cryptate Emission（T R A C E）が使用される。

【0050】

本発明に従って試料中のP T A、そのスプライス改変体又は断片を判定するためのアッセイの一実施形態において、該標識は、化学発光標識、酵素標識、蛍光標識、放射性ヨウ素標識を含む群から選択される。

20

【0051】

本発明のさらなる主題は、該アッセイの成分が、1つ以上の容器に含まれていてもよい本発明のアッセイを含むキットである。

【0052】

本発明による方法の具体的な実施形態において、年齢、性別、収縮期血圧、拡張期血圧、抗高血圧治療（A H T）、ボディーマスインデックス、胴囲、ウエスト-ヒップ比、現在の喫煙者、糖尿病の遺伝、及びこれまでの心血管疾患（C V D）を含む群から選択される、さらなる少なくとも1つの臨床パラメーターが測定される。

30

【0053】

本発明の主題はさらに、A M Iに罹患した対象における主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測し、又は本発明による主要な心臓有害事象に罹患する危険性が高いA M Iに罹患した対象を同定するための方法であり、ここで、単独で又は他の診断に有用な実験室若しくは臨床パラメーターと併せて、プロタキニン若しくはその少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片のレベルは、以下の選択肢から選択されてもよい方法によって、対象が主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測するために使用される：

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め判定された試料一式において、対象から得られた体液中のプロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルの中央値との比較、

40

- 「健常な」又は「見かけ上健常な」対象の集団において予め判定された試料一式において、対象から得られた体液中のプロタキニン若しくはその断片又はプロタキニン含有ペプチドのレベルの変位値との比較、

- コックス比例ハザード分析に基づく、又はN R I（純再分類指数）若しくはI D I（統合判別指数）などの危険性指標計算を用いることによる計算。

【0054】

本発明による方法の一実施形態において、前記方法は、A M Iに罹患した対象における主要な心臓有害事象に罹患する危険性を観察するために複数回おこなわれる。

本発明による方法の別の実施形態において、前記観察は、採用した予防的対策及び/又は治療学的対策に対するA M Iに罹患した該対象の応答を評価するために実施される。

50

本発明による方法の別の実施形態において、前記方法は、AMIに罹患している前記対象を危険群に分類するのに使用される。

また、本発明は、本発明による方法を実施するためのポイントオブケアデバイスをも想定する。

また、本発明は、本発明による方法を実施するためにアッセイ及び/又はキットも想定する。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】典型的なPTA用量/シグナルカーブを示す。検量線PTA。

【図2】2年時にMACEを患った(赤色)又は患っていない(緑色)ヒトのAMI後5日間にわたる血漿PTAプロファイル。

【図3】6カ月時点で死亡及び/又はMIエンドポイントを有する生存者及び患者における事象の確率の上下再分類を示す再分類プロット。

【図4】6カ月時点での死亡及び/又はMIエンドポイントに関するデシジョンツリー。

【図5】6カ月時点での死亡及び/又はMIエンドポイントのための、初期の分級子としてPTAを使用したデシジョンツリー。

【図6】 $72.1 \text{ pmol/L}$ より低いか又は高い血漿PTAに従って分類した時間と共に死亡及び/又はMI事象を示した Kaplan-Meier プロット。生存時間関数。

【図7】MEASURE\_1の推定周辺平均。

【実施例】

【0056】

実施例1

PTA-イムノアッセイ

抗PTA抗体の生成

免疫化のためのペプチド/コンジュゲート:

免疫化のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン(BSA)へのペプチドのコンジュゲートのために、追加のN末端システイン残基を用いて合成した(JPT Technologies, Berlin, Germany)。そのペプチドを、Sulf-SMCC(Perbio-science, Bonn, Germany)を使用することによってBSAに共有結合で連結した。カップリング手順を、Perbioのマニュアルに従って実施した。

【0057】

【表2】

表1:

免疫化のためのペプチド	PTA配列
(C) GANDDLNYWSDWYSDQIK	3-22 (配列番号12)
(C) IKEELPEPFHLLQRI	21-36 (配列番号13)

【0058】

抗体を、以下の方法に従って作製した:

BALB/cマウスを、0及び14日目に $100 \mu\text{g}$ のペプチド-BSAコンジュゲート( $100 \mu\text{l}$ の完全フロイントアジュバント中に乳化)、21及び28日目に $50 \mu\text{g}$ ( $100 \mu\text{l}$ の不完全フロイントアジュバント中)で免疫した。融合実験を実施する3日前に、動物に、1回の腹腔内注射及び1回の静脈内注射として与えられる、 $100 \mu\text{l}$ の生理食塩水中に溶解した $50 \mu\text{g}$ のコンジュゲートを与えた。

【0059】

免疫したマウスからの脾細胞と、骨髄腫細胞株SP2/0の細胞を37にて30分間、 $1 \text{ ml}$ の50%ポリエチレングリコールを用いて融合した。洗浄後に、細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンをHAT培地中での成長によって

10

20

30

40

50

選択した [ 20% のウシ胎仔血清及び H A T サプリメントを補った R P M I 1 6 4 0 培地 ]。2 週間後に、H A T 培地を、3 回の継代の間、H T 培地に置き換え、それに続いて正常細胞培養培地に置き換えた。

【 0 0 6 0 】

融合の 3 週間後に、細胞培養上清を抗原に特異的な I g G 抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験微量培養を繁殖のために 2 4 ウェルプレートに移した。再試験後に、選択した培養物をクローニングし、限界希釈を使用することで再びクローニングし、アイソタイプを判定した。

【 0 0 6 1 】

(Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. et al. "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996)).

10

【 0 0 6 2 】

モノクローナル抗体産生

抗体を標準的な抗体製造法によって産生させ (Marx et al., Monoclonal Antibody Production (1997), ATLA 25, 121)、Protein A - クロマトグラフィーによって精製した。抗体純度は、S D S ゲル電気泳動分析に基づき > 95% であった。

20

【 0 0 6 3 】

抗体の標識及びコーティング

以下の手法に従って、アクリジニウムエステルを用いて全ての抗体を標識した：

標識された化合物 (トレーサー、抗 P T A 3 - 2 2 ) : 1 0 0 μ g ( 1 0 0 μ l ) 抗体 ( P B S 中 1 m g / m l 、 p H 7 . 4 ) を 1 0 μ l のアクリジニウム N H S - エステル ( アセトニトリル中 1 m g / m l 、 In Vent GmbH, Germany ) ( E P 0 3 5 3 9 7 1 ) と混合し、室温で 2 0 分間インキュベートした。標識された抗体を Bio-Sil SEC400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上のゲル濾過 H P L C によって精製した。精製された標識抗体を ( 3 0 0 m m o l / l のリン酸カリウム、1 0 0 m m o l / l の N a C l 、 1 0 m m o l / l の N a - E D T A 、 5 g / l ウシ血清アルブミン、p H 7 . 0 ) に希釈した。最終濃度は、2 0 0 μ l あたり、標識化合物の約 8 0 0 , 0 0 0 相対光単位 ( R L U ) ( 約 2 0 n g の標識抗体 ) であった。アクリジニウムエステルの化学発光は、AutoLumat LB953 (Berthold Technologies GmbH & Co.KG) を用いて測定された。

30

【 0 0 6 4 】

固相抗体 (コーティングされた抗体) :

固相 : ポリスチレンチューブ (Greiner Bio-One International AG, Austria) を抗 P T A 2 2 - 3 6 抗体 ( 1 . 5 μ g 抗体 / 0 . 3 m l 1 0 0 m m o l / l N a C l 、 5 0 m m o l / l T r i s / H C l 、 p H 7 . 8 ) でコーティングした ( 1 8 時間室温 ) 。 5 % ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、チューブを P B S 、 p H 7 . 4 で洗浄し、真空乾燥させた。

40

【 0 0 6 5 】

P T A イムノアッセイ :

5 0 μ l のサンプル (又は較正因子) をコーティングしたチューブにピペットで入れ、標識抗体 ( 2 0 0 μ l ) を添加後、チューブを 2 時間 1 8 ~ 2 5 ° でインキュベートした。非結合のトレーサーを洗浄溶液 ( 2 0 m m o l / l P B S 、 p H 7 . 4 、 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 ) で 5 回 ( 各 1 m l ) 洗浄することによって除去した。チューブに結合した標識抗体は、Luminometer LB953、Berthold、Germany を用いて測定された。

【 0 0 6 6 】

較正 :

2 0 m M の K 2 P O 4 、 6 m M の E D T A 、 0 . 5 % B S A 、 5 0 μ M アムスタチン、

50

100 μMロイペプチン、pH 8.0中で希釈した合成P37の希釈物を用いてアッセイを較正した。PTA対照血漿は、ICI-diagnostics、Berlin、Germanyで入手可能である。

【0067】

分析アッセイ感度は、(0 - 較正因子 (PTAの添加なし) + 2SD) 標準偏差 (SD) の20個の判定によって生じた中央値シグナル、対応するPTA濃度は標準曲線から計算される) 4.4 pmol/Lであった。

実施例2

【0068】

急性心筋梗塞を患っている患者の研究

研究集団：

我々は、2004年8月から2007年4月の間に大学病院のレスターNHSトラストに入院した1148人のSTEMI (= STセグメント上昇型心筋梗塞) 及びNSTEMI (= 非STセグメント上昇型心筋梗塞) 患者を試験した。この観察コホート研究は、ヘルシンキ宣言を順守し、且つ、地域の倫理委員会によって承認された。患者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。99パーセント以上を越える心臓トロポニンIレベルを次の：20分以上継続する胸痛、又は新規の病理学的Q波又はSTセグメント及びT波変化から成る診断的連続心電図変化、のうちの少なくとも1つと共に患者が示した場合に、AMIを診断した (Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACC/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007;116:2634-53.)。前月に既知の悪性腫瘍を患っていた、腎代償療法を受けた又は外科手術を受けた患者を除外した。概算腎糸球体濾過率 (eGFR) をModification of Diet in Renal Diseaseの式から算定した (Smilde TD, van Veldhuisen DJ, Navis G, Voors AA, Hillege HL. Drawbacks and prognostic value of formulas estimating renal function in patients with chronic heart failure and systolic dysfunction. *Circulation* 2006;114:1572-80.)。すべての患者が主治医の裁量で標準的治療と血管再生術を受けた。

【0069】

血漿サンプル：

血液サンプル (EDTA及びアプロチニンで抗凝固した) を、15分間の床上安静後、診断直後、及び症状発症の36時間以内を採血した。血漿を、血漿PTA及びNTproBNPの盲検測定向けの一つのバッチで、アッセイするまで - 80 °Cにて保存した。

【0070】

心エコー図：

経胸壁超音波心エコー図検査を、Sonos5500又はIE33装置 (Philips Medical Systems, Reigate, UK) のいずれかを使用して、最初の入院中に895人 (77.9%) の患者に実施した。16セグメントの左室壁運動指数 (LVWMI) スコアをAmerican Society of Echocardiography法に基づいて実施した (Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989; 2: 358-367.)。好適な患者では、左室駆出分画 (LVEF) を、ディスク式の二方向法を使用して計算した。LV収縮機能障害 (LVSD) を、LVEF < 40% 又は LVWMI > 1.8と定義した。

【0071】

急性冠状動脈性事象 (GRACE) スコアの包括的登録：

急性冠症候群患者の国際的な観察データベースに基づいて、院内死亡率を予測するために (Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O, et al. Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med.* 2003; 163 : 2345-53.) 又は6カ月間の死亡及び/又は再MIと規定した主要な心臓有害事象 (MACE) に関して (Eagle KA, Li

10

20

30

40

50

m MJ, Dabbous OH, et al. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month post discharge death in an international registry. JAMA 2004;291:2727-33. )、G R A C Eスコアを最初の概要説明のときに計算できる。我々は、6カ月の死亡及び/又はre - A M Iエンドポイントとの比較のために退院に対するG R A C Eスコアを使用した。

#### 【0072】

エンドポイント：

本発明による主要複合エンドポイントは、全死因死亡、心不全(HF)入院又は再発性A M I (re - A M I)を含めた主要な心臓有害事象(MACE)であって、それらは2年以内に評価されたものである。HFによる入院は、高用量の利尿剤、循環作動薬又は静脈内硝酸塩での処置を必要とする主な理由がHFである再入院と規定された。再発性A M Iは、一般的な定義を使用して診断された(Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Circulation 2007;116:2634-53.)。第二のエンドポイントは、死亡及び/又はre - A M Iと死亡及び/又はHF再入院の複合、並びに個別のre - A M Iであった。6カ月時点での死亡及び/又はre - A M Iのエンドポイントは、この時点が危険性スコアの作成に使用される場合、G R A C Eスコアに関する分析に使用された。エンドポイントは、その地域の病院のデータベース及びOffice of National Statistics Registryを参照し、並びに患者への電話によって得た。我々は100%の経過観察を達成した。

#### 【0073】

統計解析：

統計的分析を、SPSSバージョン20 (SPSS Inc, Chicago, Illinois)及びStat 12.1 (Texas, USA)で実施した。15%の事象率及び共変量が最大30%のバイオマーカーの変化を予測すると仮定すれば、600人の患者のサンプルサイズは、1.5のバイオマーカーのハザード比を検出するために動かされる( $p < 0.05$ にて90%)。バイオマーカーレベルを $\log_{10}$ 変換したので、そのためハザード比はこれらのマーカーのレベルで十倍増を指す。G R A C Eスコアを元のスコアとして使用した。ノンパラメトリック検定法を、非Gauss形データ(マン-ホイットニーのU検定、クラスカルワリスの検定、及びスピアマン(rs)関連付け)に対して用いた。PTAレベルの独立予測因子を、一変量の一般線形モデルを使用して評価した。バイオマーカーの予後的価値を評価するために、「ベース」モデルをコックス生存分析を使用して作り出し、そしてそれは、一変量解析法の任意の試験エンドポイントに有意( $p < 0.10$ )に関係する変数(年齢、性別、虚血性心疾患(IHD)、高血圧又は糖尿病に関する既往歴、Killip分類、eGFR、及びロフトロポニンI)を含んでいた。バイオマーカー(NTproBNP、PTA)をこのベースモデルに追加して、すべての変数が同時に入力されたそれぞれの相対予後的価値を評価する。第二の「比較」コックスモデルを、これらのバイオマーカーの相対予後力とG R A C Eスコアを評価するのに使用した。G R A C Eスコアに対するPTAの追加予後的価値は、Pencinaら(Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. Stat Med. 2011; 30:11-21.)によって記載された無カテゴリ純再分類改善度(NRI)の計算による再分類分析によって評価した。我々は、カイニ乗自動反復検出(CHAID、SPSSを使用して実施した分析)を使用してデシジョンツリーを構築し、そしてそれは、従属変数を伴った最も強い相互作用を有するバイオマーカーを各ステップで選択した。

#### 【0074】

患者特性

PTAの四分位数による調査対象集団の特徴を表2に示す。より高いPTAレベルを有する患者は、高齢の、女性で、高血圧、IHD、糖尿病、HFの既往歴があり、より高いG R A C Eスコア、NTproBNP、及びグルコースレベルを有する。彼らはまた、よ

10

20

30

40

50

り損なわれた心臓及び腎臓機能も有していた。

【 0 0 7 5 】

【 表 3 】

表 2 :

	全体	PTA四分位数				p値
		1 <52.0 pmol/L	2 52.0-65.19 pmol/L	3 65.19-89.1 pmol/L	4 >89.1 pmol/L	
	n=1148	n=288	n=286	n=288	n=286	
PTA (pmol/L)	77.2 ± 55.7	42.2 ± 7.43	58.4 ± 4.0	75.6 ± 7.1	132.9 ± 87.4	<0.0005
NTproBNP (pmol/L)	1849 ± 2108	891.3 ± 1062	1339 ± 1641	1874 ± 2030	3300 ± 2569	<0.0005
人口						
年齢(歳)	66.2 ± 12.8	58.3 ± 11.2	63.1 ± 11.0	68.1 ± 11.9	75.4 ± 10.3	<0.001
男性 (%)	825 (72)	235 (82)	214 (75)	208 (72)	168 (58)	<0.001
ST 上昇 MI	545 (47)	144 (50)	132 (46)	149 (52)	120 (42)	NS
既往歴						
IHD	379 (33)	67 (23)	80 (28)	91 (31)	141 (49)	<0.001
心不全	46 (4)	3 (1)	8 (3)	10 (3)	19 (7)	<0.003
高血圧	596 (52)	125 (44)	134 (47)	152 (53)	185 (65)	<0.001
糖尿病	266 (23)	53 (18)	71 (25)	61 (21)	81 (28)	0.032
Killipクラス>1	426 (40)	61 (24)	92 (35)	121 (45)	152 (56)	<0.001
グルコース (mmol/L)	8.9 ± 4.2	8.5 ± 3.9	8.7 ± 3.9	8.4 ± 3.5	9.9 ± 5.4	<0.001
トロポニン I (ng/mL)	13.1 ± 25.8	13.2 ± 26.7	12.0 ± 24.4	15.0 ± 27.9	12.1 ± 24.2	NS
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	65.6 ± 20.1	77.9 ± 17.7	71.4 ± 15.5	64.4 ± 16.6	48.9 ± 17.9	<0.001
退院に対する危険性 マーカー						
心エコー LVSD [n=893]						
LV壁運動指数	1.47 ± 0.42	1.38 ± 0.37	1.46 ± 0.42	1.46 ± 0.41	1.60 ± 0.43	<0.001
LV駆出分画	42.1 ± 14.5	44.8 ± 13.8	43.8 ± 14.3	41.4 ± 13.8	38.3 ± 15.2	<0.001
GRACEスコア	120.0 ± 32.7	99.7 ± 26.6	109.6 ± 26.9	125.6 ± 28.4	144.5 ± 29.9	<0.001
処置						
アスピリン	963 (84)	255 (89)	255(89)	238 (82)	215 (75)	<0.001
β-ブロッカー	920 (80)	256 (89)	238 (83)	230 (80)	196 (69)	<0.001
ACE阻害剤又は ARB*	940 (82)	249 (87)	234 (82)	245(85)	212 (74)	<0.001
スタチン	1002 (87)	270 (94)	258 (90)	260(90)	214(75)	<0.001
ループ利尿薬	289 (25)	39 (14)	59 (21)	69(24)	122(43)	<0.001
エンドポイント(2年)						
主要な心臓有害事象	324 (28)	45 (16)	53 (18)	77 (27)	149 (52)	<0.001
死亡	140 (12)	11 (4)	11 (4)	31 (11)	87 (30)	<0.001
致命的な主要な心臓 有害事象なし	230 (20)	41 (14)	46 (16)	56 (19)	87 (30)	<0.001
心不全	112 (9.8)	13 (5)	19 (7)	28 (10)	52 (18)	<0.001
Re-AMI	149 (13)	29 (10)	35 (12)	33 (11)	52 (18)	<0.021

【 0 0 7 6 】

入院時のPTA四分位数による1148人のAMI患者の特徴。数値データをn(%)として提示する。P値は、連続変数又はカテゴリ変数のそれぞれに関するANOVA(F統計値)又はクラスカル・ウォリス検定のために引用する。数値(%)又は平均±SDを

10

20

30

40

50

報告する。

【 0 0 7 7 】

相関分析

スピアマン分析 ( r s ) は、 P T A が年齢 ( 0 . 5 2 1 )、 e G F R ( - 0 . 5 5 5 )、拡張期 B P ( - 0 . 1 7 8 )、 N T p r o B N P ( 0 . 4 2 8 )、 駆出分画 ( - 0 . 1 7 5 ) ( すべて P < 0 . 0 0 0 5 )、 及び心拍数 ( 0 . 1 0 0、 P < 0 . 0 0 1 ) に有意に創刊することを明らかにした。 P T A は、 トロポニン又はピーククレアチンキナーゼレベルとは相関しなかった。

【 0 0 7 8 】

一変量の一般線形モデルは、モデルにおいて説明される変化に従って降順で、次の P T A レベルの独立予測因子を示した ( 表 3 ) : e G F R、 年齢、 糖尿病及び I H D の既往歴、 1 を超える K i l l i p クラス、 L V 壁運動スコア、 女性、 及び拡張期 B P。 e G F R は変化の大部分を占めた ( 2 0 . 7 % )。

10

【 0 0 7 9 】

【 表 4 】

表 3 :

変数	タイプIIIの平方和	F統計値	P値
eGFR	2.299	107.384	.000
年齢	.688	32.141	.000
糖尿病の既往歴	.275	12.859	.000
IHDの既往歴	.217	10.112	.002
Killip クラス>1	.176	8.198	.004
WMSI (壁運動スコア)	.119	5.554	.019
女性	.112	5.242	.022
拡張期 BP	.100	4.649	.031
高血圧の既往歴	.071	3.332	NS
心拍数	.011	.499	NS
	調整した R <sup>2</sup> 0.38		

20

30

P T A レベルの独立予測因子を示す一変量の一般線形モデル

【 0 0 8 0 】

P T A の日曲線

その 2 9 人が 2 年以内に M A C E を患っている 1 1 0 人の患者に関して、 5 日間の連続した血漿サンプルを利用可能であった。 図 2 は、 血漿プロファイルが期間を通じて P T A の有意な変化を示し ( p < 0 . 0 0 1 )、 且つ、 M A C E を患っているヒトで高いレベルを示す ( p < 0 . 0 3 ) 頻回測定による一般線形モデルを実証している。

40

h o c 後試験では、 1 日目の P T A レベルは 3、 4 又は 5 日目より高かった (それぞれ p < 0 . 0 0 1、 0 . 0 0 4 及び 0 . 0 0 2、 多重比較のためにボンフェローニ補正した)。 1 日目と 2 日目の P T A レベルは類似していた。 M A C E と P T A の時間プロファイルとの統計的に有意な相互作用は存在しなかった。

【 0 0 8 1 】

生存分析

2 年間にわたる経過観察中、 ( l o g 1 0 変換及び連続的変量として表された ) 高い P T A レベルを有する患者は、 追加の M A C E、 死亡、 及び H F 又は r e - A M I を患って再入院した ( 表 2 )。 表 4 は、 2 年時点にて M A C E の転帰に影響した様々な因子の一変

50

量及び多変量のハザード比を報告している。

【 0 0 8 2 】

【 表 5 】

表 4 :

	一変量 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 1 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 2 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 3 HR (95% CI)	P
年齢	1.05 (1.04-1.06)	0.000	1.02 (1.00-1.03)	0.023	1.02 (1.00-1.03)	0.027	1.02 (1.00-1.04)	0.024
性別	0.63 (0.50-0.79)	0.000		NS		NS		NS
ST上昇	0.43 (0.88-1.36)	NS						
GRACE スコア	1.02 (1.02-1.03)	0.000						
Killip クラス>1	2.68 (2.12-3.37)	0.000	1.63 (1.26-2.11)	0.000		NS	1.75 (1.27-2.42)	0.001
eGFR	0.97 (0.96-0.98)	0.000		NS		NS		NS
トロポニン	1.15 (0.98-1.34)	NS						
LV収縮機能障害 (エコー)	2.24 (1.74-2.88)	0.000						
過去の既往歴								
虚血性心疾患	1.52 (1.22-1.90)	0.000		NS		NS		NS
高血圧	1.64 (1.31-2.05)	0.000		NS		NS		NS
糖尿病	1.55 (1.22-1.96)	0.000		NS		NS		NS
退院時の処置								
アスピリン	0.57 (0.44-0.75)	0.000		NS		NS		NS
β-ブロッカー	0.52 (0.41-0.66)	0.000		NS		NS	0.64 (0.47-0.88)	0.006
ACE阻害薬/ARB	0.55 (0.43-0.71)	0.000	0.74 (0.56-0.99)	0.045	0.65 (0.48-0.89)	0.007		NS
スタチン	0.40 (0.31-0.52)	0.000	0.66 (0.47-0.92)	0.014	0.61 (0.43-0.88)	0.008	0.54 (0.38-0.78)	0.001
利尿剤	2.36 (1.89-2.94)	0.000	1.34 (1.03-1.74)	0.03		NS	1.65 (1.21-2.26)	0.002
バイオマーカー								
ログ NTproBNP	2.32 (1.90-2.84)	0.000		NS		NS	1.74 (1.25-2.42)	0.001
ログ PTA	19.96 (12.29-32.42)	0.000	3.87 (1.82-8.22)	0.000	6.22 (2.82-13.72)	0.000	4.10 (1.69-9.94)	0.002

【 0 0 8 3 】

A M I 後 2 年時点での M A C E のコックス回帰分析。多変量解析結果は、( G R A C E 及び L V 収縮機能障害を除いた) M A C E の予測のための一変量解析法により有意であった変数及びバイオマーカーを含めたモデル 1 について報告されている。多変量モデル 2 及び 3 は、死亡及び/又は r e - M I (モデル 2) と死亡及び/又は H F 再入院 (モデル 3) の複合エンドポイントに関するものである。有意なハザード比だけが報告されている。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

2年時点でのMACEを予測するための多変量解析では、有意な独立予測因子は、年齢、1を超えるKillipクラス、スタチンを用いた治療法、ACE/ARB及び利尿剤、並びにPTAを含んでいた。死亡及び/又はre-AMI（モデル2）及び死亡及び/又はHF再入院（モデル3）の第二の複合エンドポイントの予測のための他のモデルでは、PTAが独立予測因子である（それぞれ $p < 0.0005$ 及び $p < 0.002$ ）。MACE及びLVSDの心エコー徴候（データ未掲載）を含めたこれらの第二の複合エンドポイントのモデルにおいて、PTAは、LVSDと一緒に有意な独立予測因子（すべてのための $P < 0.005$ ）である（p値は0.015～0.025の範囲に及ぶ）。

【0085】

表5は、2年時点のre-AMIのエンドポイントに関する一変量及び多変量ハザード比を報告する。

10

【0086】

【表6】

	一変量 HR (95% CI)	P	多変量 モデル1 HR (95% CI)	P	多変量 モデル2 HR (95% CI)	P	多変量 モデル3 HR (95% CI)	P
年齢	1.02 (1.01-1.03)	0.004		NS		NS		NS
性別	0.85 (0.60-1.21)	NS						
ST上昇	1.15 (0.83-1.58)	NS						
GRACE スコア	1.01 (1.00-1.01)	0.003						
Killip クラス>1	1.64 (1.18-2.27)	0.003		NS		NS		NS
eGFR	0.99 (0.98-0.99)	0.016		NS		NS		NS
トロポニン	1.01 (0.81-1.27)	NS						
LV収縮機能障害 (エコー)	1.60 (1.12-2.29)	0.010						NS
過去の既往歴								
虚血性心疾患	1.73 (1.25-2.39)	0.001	1.42 (0.99-2.03)	0.055		NS		NS
高血圧	1.56 (1.12-2.18)	0.008		NS		NS		NS
糖尿病	1.60 (1.13-2.26)	0.008		NS		NS		NS
退院時の処置								
アスピリン	0.99 (0.63-1.55)	NS						
β-ブロッカー	1.29 (0.82-2.03)	NS						
ACE阻害薬/ARB	0.74 (0.50-1.09)	NS						
スタチン	1.03 (0.61-1.76)	NS						
利尿剤	1.51 (1.07-2.13)	0.018		NS		NS		NS
バイオマーカー								
ログ NTproBNP	1.34 (1.05-1.71)	0.019		NS		NS		NS
ログ PTA	4.45 (2.00-9.91)	0.000			3.11 (1.06-9.11)	0.039	3.06 (0.92-10.13)	0.068

## 【0087】

表5：AMI後2年時点でのre-MIエンドポイントに関するコックス回帰分析。多変量解析結果は、(GRACE及びLV収縮機能障害を除いた)一変量解析法に対して有意であった変数及びNTproBNPを含めたモデル1について報告した。多変量モデル2は、モデル1にpro-SPを追加した後のハザード比を報告する。多変量モデル3は、モデル2に心エコーLVSDを追加した後のハザード比を報告する。有意なハザード比だけを報告する。

有意な一変量予測因子及びNTproBNPを含むモデルでは、虚血性心疾患の過去の既往歴に関して有意(p=0.055)な傾向があった。これへのPTAの追加は、PTAがre-AMIの有意な予測因子であることを明らかにした(モデル2、表5)。心エコーLVSDが追加されたとき、PTAは有意な傾向を示した(モデル3、表5)。

## 【 0 0 8 8 】

## G R A C E スコアとの比較

広く使用した G R A C E 危険性スコア (Eagle KA, Lim MJ, Dabbous OH, et al. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month post discharge death in an international registry. JAMA 2004;291:2727-33.) を、6 カ月時点での死亡及び / 又は M I の予測のために初めに得た。G R A C E スコア、並びにバイオマーカー N T p r o B N P 及び P T A は、一変量解析法における M A C E の予測因子であった (表 6)。

## 【 0 0 8 9 】

## 【表 7】

10

表 6 :

	一変量 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 1 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 2 HR (95% CI)	P	多変量 モデル 3 HR (95% CI)	P
GRACE スコア	1.02 (1.02-1.03)	0.000	1.02 (1.01-1.02)	0.000	1.01 (1.01-1.02)	0.000	1.02 (1.02-1.03)	0.000
バイオマーカー								
ログ NTproBNP	2.50 (1.97-3.18)	0.000	1.39 (1.05-1.83)	0.02		NS	2.21 (1.46-3.35)	0.000
ログ PTA	17.19 (9.85-29.99)	0.000	3.90 (1.72-8.84)	0.001	5.93 (2.64-13.33)	0.000	3.46 (1.29-9.28)	0.014

20

## 【 0 0 9 0 】

6 カ月時点でのエンドポイントに関するコックス回帰分析。一変量 HR は、6 カ月時点での M A C E を指す。多変量モデルは、M A C E の予測のための G R A C E スコアとバイオマーカー (モデル 1)、死亡及び / 又は M I (モデル 2)、並びに死亡及び / 又は H F (モデル 3) を含んでいた。有意なハザード比だけを報告する。

6 カ月時点での M A C E、死亡及び / 又は M I、並びに死亡及び / 又は H F の多変量解析では、G R A C E スコア及び P T A が予測因子であり、その一方で、N T p r o B N P は、M A C E 及び死亡及び / 又は H F モデルのためだけに保持された (表 6 のモデル 1 と 3)。

30

## 【 0 0 9 1 】

6 カ月時点での死亡及び / 又は M I に関する受容者動作特性曲線 (R O C) 分析を使用すると、濃度曲線下面積 (A U C) は P T A の追加により G R A C E スコアだけに関して 0.695 (95% C I 0.649 - 0.741) から 0.722 (0.677 - 0.768) に増加した (G R A C E スコアのみと比較して P = 0.016)。この R O C への N T p r o B N P の追加により、A U C の更なる増大はなかったが (0.722 (0.676 - 0.768))、この A U C は、G R A C E スコアのみのもより有意に大きかった (P = 0.027)。

40

## 【 0 0 9 2 】

分析に勝手なカットオフ確率が選ばれないように N R I (> 0) を計算するために、無カテゴリー再分類分析を、Pencina ら (Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. Stat Med. 2011; 30:11-21.) によって記載されたように用いた。図 3 は、P T A 調整 G R A C E スコアを使用した事象確率に対してプロットされた G R A C E スコアのみを使用した事象確率を用いて、Steyerberg (Steyerberg EW, Vickers AJ, Cook NR, Gerds T, Gonen M, Obuchowski N, Pencina MJ, Kattan MW. Assessing the performance of prediction models. A framework for traditional and novel measures. Epidemiology 2010; 21:128-138.) によって提案された再分類プロットを示す。不利な転

50

帰のなかったヒトにおけるPTAによって調整した確率が下位に（すなわち、図3の対角線の下に）分類される。6カ月時点で死亡及び／又はMIエンドポイントのなかったヒトのNRIは、22.3（95%CI 15.6 - 29.0、 $P < 0.0005$ ）であり、エンドポイントを有するヒトでは9.3（95%CI -6.7 - 25.3、 $P = NS$ ）であって、31.6（95%CI 14.3 - 49.0、 $P < 0.0005$ ）の全体的なNRI（ $> 0$ ）を有して、PTAがエンドポイントを有していないヒトの下位分類によって、GRACEスコア化からの危険性の分類を改善した（表7）。

【0093】

【表8】

10

表7：  
連続

	増	減	NRI	p	CI上限	CI下限
エンドポイントなし	329	518	22.3	.000	15.6	29.0
エンドポイントあり	82	68	9.3	.253	-6.7	25.3
合計			31.6	.000	14.3	49.0

【0094】

【表9】

20

三分位値

	増	減	NRI	p	CI上限	CI下限
エンドポイントなし	86	135	5.8	.001	2.3	9.2
エンドポイントあり	21	15	4.0	.317	-3.8	11.8
合計			9.8	.025	1.2	18.3

【0095】

【表10】

30

危険性の閾値0.05及び0.1

	増	減	NRI	p	CI上限	CI下限
エンドポイントなし	58	157	11.7	.000	8.3	15.1
エンドポイントあり	6	10	-2.7	.317	-7.9	2.6
合計			9.0	.005	2.8	15.3

【0096】

連続した再分類、三分位値又は0.05及び0.1の2つの指定危険性閾値を使用した再分類分析は、6カ月時点での死亡及び／又はMIエンドポイントに関する、GRACEスコア化のみを使用した分類へのPTAの追加について純再分類改善度（NRI）及びNRIの有意性を示す。

40

三分位値を6カ月時点での死亡及び／又はMIの確率に関する2つのカットオフに選んだ場合、再分類分析は、PTAが有意な純NRI（9.8、 $P < 0.025$ ）でエンドポイントなしのヒトを主に下位分類したことを示した。

6カ月時点での死亡及び／又はMIの確率に関して2つのカットオフ（5%及び10%）が選ばれた場合、6カ月時点での死亡及び／又はMIエンドポイントのないヒトのNRIは、11.7（ $P < 0.0005$ ）であり、エンドポイントを有するヒトのNRIは有意ではなく、9.0（ $P < 0.0005$ ）の全体的なNRIに至った。

50

【 0 0 9 7 】

デシジョンツリー解析

バイオマーカーの最適な切り取り点を判定するために、我々は、患者を生存者又はエンドポイントを有する者に分類するために（PTA及びNTproBNPレベル、並びにGRACEスコアを使用して）デシジョンツリーを構築した。6カ月時点での死亡及び/又はMIのエンドポイントに関しては（図4）、82.8 pmol/L未満のPTAを、死亡及び/又はMIに関して低い危険性を有する（本来の集団における15.5%と比較して6.3%）、2256 pmol/L未満の低いNTproBNP及び137未満のGRACEスコアを有するヒトのサブグループ（n = 583、全体の50.8%）に選択した。

10

【 0 0 9 8 】

初期の分級子としてPTAを使用したデシジョンツリー（図5）では、72.08 pmol/L未満のPTAレベル及び137未満のGRACEスコアを、事象率が6.8%である低危険性群の患者（n = 512、全体の44.6%）と規定する。そのうち、3人の患者（0.26%）だけが6カ月以内に死亡し、そして、1人（0.09%）が30日以内に死亡した。121.6 pmol/L超のPTAレベルを、37.7%の死亡/MI率及び30.7%の死亡率を有する高危険性患者群と規定した（図5）。

【 0 0 9 9 】

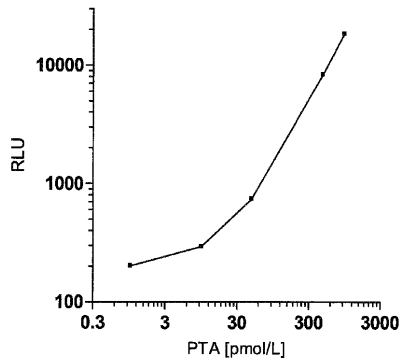
カプランマイヤー分析

72.1 pmol/Lのカットオフ値を使用することで、死亡及び/又はMIの複合エンドポイントに関するカプランマイヤー生存分析により、このカットオフ未満のレベルを有する者（n = 689、全体の60%）と、このカットオフを超えたレベルを有する者の間の有意差を実証した（ログランク検定に関するP値 < 0.0005）（図6）。

20

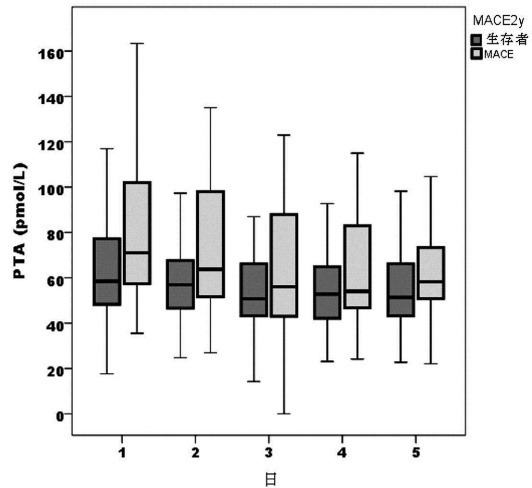
【 図 1 】

Fig. 1:



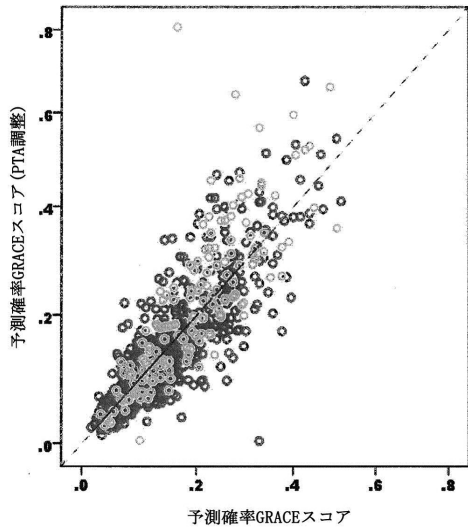
【 図 2 】

図2



【図3】

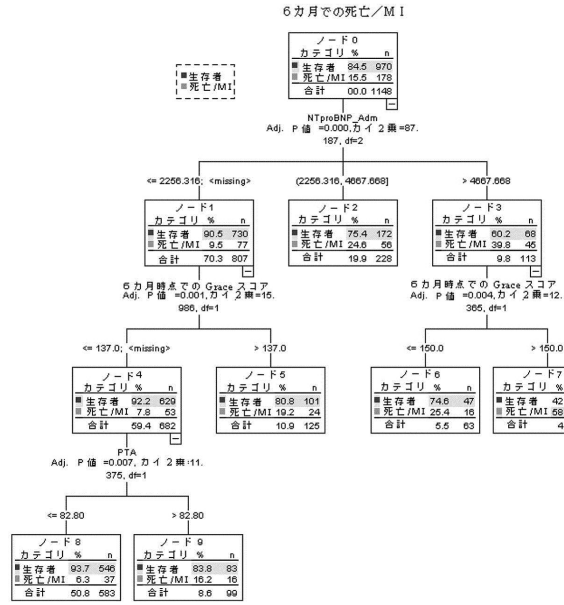
図3



6か月での死亡/MI  
 ● 生存者  
 ○ 死亡/MI

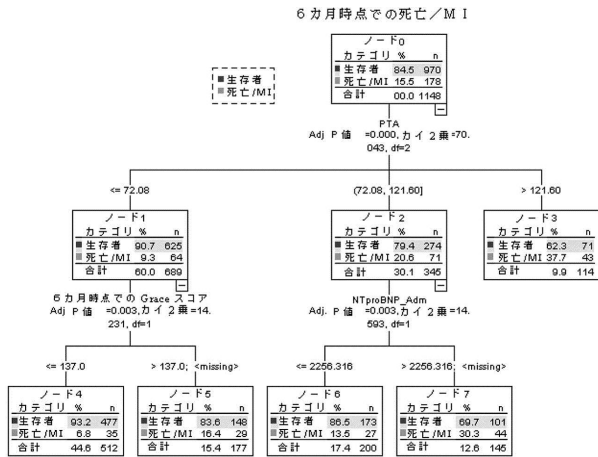
【図4】

図4



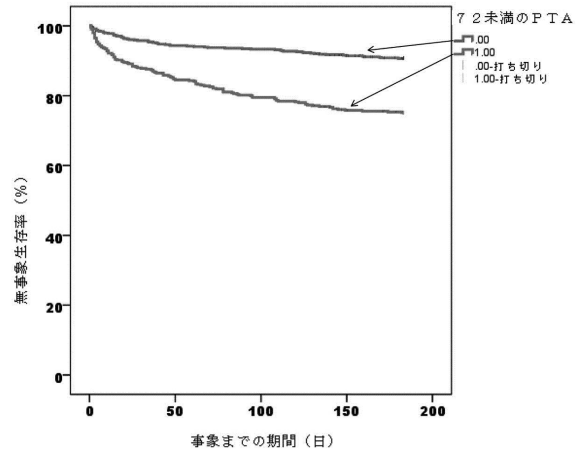
【図5】

図5



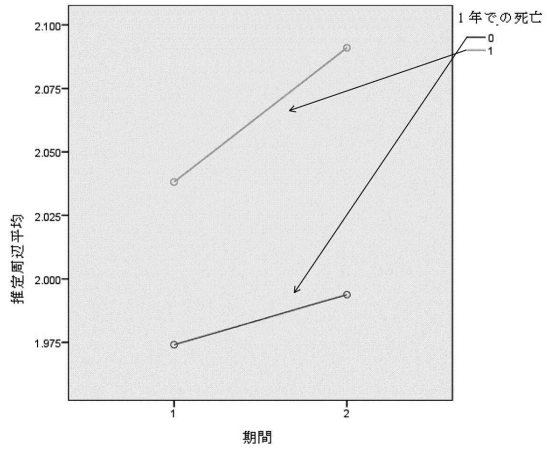
【図6】

図6



【図7】

図7



## フロントページの続き

- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝
- (74)代理人 100138210  
弁理士 池田 達則
- (72)発明者 アンドレアス ベルクマン  
ドイツ連邦共和国, 13645, ベルリン, アム ローゼンアンガー 78
- (72)発明者 リヨン ウン  
イギリス国, レスターシャー エルイー17アールエイチ, レスター, ユニバーシティ ロード  
, シーノオー ユニバーシティ オブ レスター

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表2012-526271(JP, A)  
特表2007-533985(JP, A)  
米国特許出願公開第2011/0213209(US, A1)  
S.VALDEMARSSON 外4名, Increased Plasma Level of Substance P in Patients with Severe Congestive Heart Failure Treated with ACE Inhibitors, Journal of Internal Medicine, 1991年, Vol.230, No.4, Page.325-331  
G.C.MELENDZ、外5名, Substance P Induces Adverse Myocardial Remodelling via a Mechanism Involving Cardiac Mast Cells, Cardiovascular Research, 2011年, Vol.92, No.3, Page.420-429
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	预测患有严重心脏不良事件的风险的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6419794B2</a>	公开(公告)日	2018-11-07
申请号	JP2016519364	申请日	2014-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン リヨンウン		
发明人	アンドレアスベルクマン リヨンウン		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/324 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 池田 达则		
优先权	2013186938 2013-10-01 EP		
其他公开文献	JP2016532093A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了一种用于预测由主要不良心脏事件或在急性心肌梗死的受试者患死亡的风险，在从被检体Purotakikinin或至少五个获得的体液该片段的水平由氨基酸组成;并预测患有或发生重大心脏不良事件的风险，以及从主要心脏不良事件中死亡或死亡的高水平的protachykinin或其片段的風險如图1所示。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6419794号 (P6419794)
(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)	(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)	F I G O 1 N 33/53 D	
請求項の数 17 (全 27 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-519364 (P2016-519364)	(73) 特許権者 514122524	
(86) (22) 出願日 平成26年9月30日(2014.9.30)	シュビーゴテック ゲゼルシャフト ミ	
(65) 公表番号 特表2016-532093 (P2016-532093A)	ット ベシュレンクテル ハフツング	
(43) 公表日 平成28年10月13日(2016.10.13)	ドイツ連邦共和国, 1 6 7 6 1 ベニヒ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2014/070962	スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ	
(87) 国際公開番号 W02015/049243	1 5ア	
(87) 国際公開日 平成27年4月9日(2015.4.9)	(74) 代理人 10009759	
審査請求日 平成28年7月6日(2016.7.6)	弁理士 青木 篤	
(31) 優先権主張番号 13186938.0	(74) 代理人 100077517	
(32) 優先日 平成25年10月1日(2013.10.1)	弁理士 石田 敬	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)	(74) 代理人 100087871	
	弁理士 福本 稔	
	(74) 代理人 100087413	
	弁理士 古賀 晋次	
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 主要な心臓有害事象に罹患する危険性を予測する方法