

(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2008-545139

(P2008-545139A)

(43) 公表日 平成20年12月11日(2008.12.11)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/53 (2006.01)

F I

GO 1 N 33/53

テーマコード (参考)

D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2008-519490 (P2008-519490)  
 (86) (22) 出願日 平成18年6月27日 (2006.6.27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月28日 (2008.2.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/025008  
 (87) 国際公開番号 W02007/005426  
 (87) 国際公開日 平成19年1月11日 (2007.1.11)  
 (31) 優先権主張番号 60/694,666  
 (32) 優先日 平成17年6月29日 (2005.6.29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

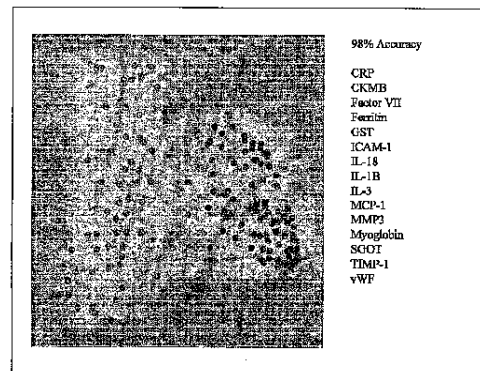
(71) 出願人 508002597  
 ルールズベースド メディシン, インコーポレーテッド  
 RULES-BASED MEDICINE, INC.  
 アメリカ合衆国、テキサス州 78759、オースティン、デュバル ロード 3300、スイート 110  
 (74) 代理人 100078330  
 弁理士 符島 富二雄  
 (74) 代理人 100087505  
 弁理士 西山 春之  
 (74) 代理人 100129425  
 弁理士 小川 護晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性冠症候群の診断方法及び診断キット

(57) 【要約】

急性冠症候群 (ACS) を検出及び診断する方法を提供する。本方法は、ACS のリスクのある患者のサンプル液中、代表的には血液サンプル中において、選択した分析対象物質の濃度が異常であることが ACS の診断を支持するという発見に基づくものである。ACS の少なくとも2つの新規バイオマーカー (MMP 3 及び SGO T) を開示する。12 分析対象物質の濃度の全体が、患者の状態、即ち、患者が心臓発作を患っているか否か、についての敏感で選択的な画像を提供する。ACS についての他の重要なバイオマーカーについても開示する。これには、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンS トランスフェラーゼ、前立腺特異抗原 (遊離型)、IL 3、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、

（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、

（b）前記液体サンプル中のMMP-3の濃度を測定すること、

（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記MMP-3の濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定すること

を含んで構成され、

前記MMP-3の濃度が前記対照濃度と統計的に異なる高値であることにより、ACSが陽性であると診断する

ことを特徴とするACSの診断方法。

**【請求項 2】**

前記被験者は、胸痛を訴えていることを特徴とする請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記液体サンプルは、全血、血漿、血清及び尿からなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記液体サンプルにおいて測定したMMP-3の濃度が約1 ng/mL以上であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、

（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、

（b）前記液体サンプル中のSGOTの濃度を測定すること、

（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記SGOTの濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定すること

を含んで構成され、

前記SGOTの濃度が前記対照濃度と統計的に異なる低値であることにより、ACSが陽性であると診断する

ことを特徴とするACSの診断方法。

**【請求項 6】**

前記被験者は、胸痛を訴えていることを特徴とする請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記液体サンプルは、全血、血漿、血清及び尿からなる群から選択されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記液体サンプルにおいて測定したSGOTの濃度が約10 µg/mL以下であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする請求項5に記載の方法。

**【請求項 9】**

急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、

（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、

（b）前記液体サンプル中のMMP-3及びSGOTの濃度を測定すること、

（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記MMP-3及びSGOTの濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定すること

を含んで構成され、

前記MMP-3の濃度が前記対照濃度と統計的に異なる高値であること及び前記SGOTの濃度が前記対照濃度と統計的に異なる低値であることにより、ACSが陽性であると診断する

10

20

30

40

50

ことを特徴とするACSの診断方法。

【請求項10】

IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン又はグルタチオンSトランスフェラーゼ、又はこれらの組み合わせ、の少なくとも1つについて、前記液体サンプル中の濃度を測定すること、を更に含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

SGOTを除く全ての前記分析対象物質の濃度が、前記対照濃度と比較して統計的に異なった高値であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする請求項10に記載の方法。

10

【請求項12】

濃度は、1以上のイムノアッセイを行うことにより測定されることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項13】

IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンSトランスフェラーゼ、前立腺特異抗原(遊離型)、IL 3、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A I、血清アミロイドP、成長ホルモン、

20

【請求項14】

SGOTを除く全ての前記分析対象物質の濃度が、前記対照濃度と比較して統計的に異なって高値であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記被験者の前記液体サンプル中における分析対象物質の測定濃度は、近接マップに表示され、

30

前記被験者の前記測定濃度が、ACSであると事前に診断された他の被験者の測定濃度のクラスターに近接することが、ACSの陽性診断に寄与することを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項16】

MMP 3及びSGOT、並びに、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン又はグルタチオンSトランスフェラーゼの1以上、を含む分析対象物質群について、液体サンプル中の濃度を測定する試薬を含んで構成されることを特徴とするキット。

【請求項17】

40

MMP 3、SGOT、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン又はグルタチオンSトランスフェラーゼ、を含む分析対象物質群に対する抗体を含んで構成されることを特徴とする請求項16に記載のキット。

【請求項18】

基材に固定化された試薬を含んで構成されることを特徴とする請求項16に記載のキット。

【請求項19】

前記基材は、二次元配列、マイクロタイタープレート又はマルチピースセットを含んで構成されることを特徴とする請求項18に記載のキット。

50

**【請求項 20】**

線形回帰分析、分類ツリー分析及びヒューリスティクス単純ベイズ分析からなる群から選択される統計的手法を適用することを含むことを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記液体サンプルにおいて測定した 1 以上の分析対象物質の濃度が、IL 18 (約 300 pg/mL 以上)、第 V I I 因子 (約 320 ng/mL 以上)、I C A M 1 (約 170 ng/mL 以上)、クレアチンキナーゼ M B (約 5 ng/mL 以上)、M C P 1 (約 275 pg/mL 以上)、ミオグロビン (約 30 ng/mL 以上)、C 反応性蛋白 (約 11 μg/mL 以上)、T I M P 1 (約 120 ng/mL 以上)、フェリチン (約 300 ng/mL 以上) 又はグルタチオン S トランスフェラーゼ (約 2 ng/mL 以上)、又はこれらの組み合わせ、であることにより、A C S が陽性であると診断することを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2005年6月29日に申請した米国仮出願第 60/694,666 号の便益を主張し、その全ての内容は参照により本開示に含まれるものである。

**【0002】**

本発明は、急性冠症候群 (acute coronary syndrome、ACS) を検出及び診断する方法、キット並びに試薬に関する。

20

**【背景技術】****【0003】**

米国では、循環器疾患の死亡率が最も高い。犠牲者の多くは重度の心臓発作に倒れ、緊急治療室に辿りつく前に亡くなってしまう。運の良い者は、胸痛、頭痛、めまいを訴えて、病院に急送されることになる。しかしながら、急性冠症候群 (ACS) を患う患者の全てが、適切な診断を受けられるとは限らない。毎年、病院を訪ねた心臓発作患者の内、数千もの心臓発作患者が自宅に送り返されている。米国では、胸痛を訴える 800 万人の患者のうち 300 万人が、心臓性の痛みではないとして自宅に送り返されている。しかし、このうちの 4 万人が心筋梗塞を患っている。心臓病因が疑われて病院に収容された 500 万人のうち、250 万人 (50%) は非心臓性であり、100 万人は心筋梗塞 (M I)、120 万人は不安定狭心症、30 万人は心停止である。このような統計結果が、ACS のリスクがある患者のスクリーニング及び診断を改善する必要性についての第 1 の根拠である。

30

**【0004】**

現行の ACS アッセイは、選択性及び敏感度に欠けており、偽陽性及び偽陰性を示す回数が好ましくないレベルに達している。したがって、循環器疾患を早期に検出し、特に、心臓発作を正確に診断するさらなるバイオマーカーの開発が急務である。

**【発明の開示】****【課題を解決するための手段】****【0005】**

本発明は、ACS を速やかに検出し、正確に診断する方法を提供する。この方法では、患者の液体サンプル中の 1 又は 2 つのバイオマーカーについてその濃度を測定する。この 1 又は 2 つのバイオマーカーの濃度が、「正常」(つまり、ACS ではない対照被験者) 時の濃度と統計的に異なる高値 (又は、場合によっては低値) であることが、ACS の陽性診断を支持することになる。好ましくは、この方法は、ACS の陽性又は陰性診断を助ける分析対象物質群又は「バイオマーカー」群を利用する。ここで、この分析対象物質群又は「バイオマーカー」群は、液体サンプル (例えば、白血球、血清、血漿又は尿) 中に確認される最大 12 又はそれ以上の物質である。この方法によれば、最高で 99% の精度で正しい診断が下せるようになる。

40

**【0006】**

50

本発明は、急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、（b）前記液体サンプル中のMMP-3の濃度を測定すること、（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記MMP-3の濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定すること、を含んで構成される方法を提供する。代表的には、被験者は、胸痛を訴えている。また、数ある液体サンプルのうち、いずれをテストしてもよい。好ましくは、前記液体サンプルは、全血、血漿、血清又は尿から選択される。液体サンプルにおいて測定したMMP-3の濃度が約1 ng/mL以上であることにより、ACSが陽性であると診断されることがわかっている。

【0007】

本発明の他の態様では、急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、（b）前記液体サンプル中のSGOTの濃度を測定すること、（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記SGOTの濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定することを含んで構成され、前記SGOTの濃度が前記対照濃度と統計的に異なる低値であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする方法を提供する。液体サンプルにおいて測定したSGOTの濃度が約10 µg/mL以下であることにより、ACSが陽性であると診断されることがわかっている。

【0008】

更に、本発明の他の態様では、急性冠症候群（ACS）であることが疑われるヒト被験者において、ACSを診断する方法であって、（a）液体サンプルをACSであることが疑われる被験者から採取すること、（b）前記液体サンプル中のMMP-3及びSGOT濃度を測定すること、（c）前記液体サンプルにおいて測定した前記MMP-3及びSGOTの濃度が、対照被験者群から得られる対照濃度と統計的に異なるか否かを判定することを含んで構成され、前記MMP-3の濃度が前記対照濃度と統計的に異なる高値であること及び前記SGOTの濃度が前記対照濃度と統計的に異なる低値であることにより、ACSが陽性であると診断することを特徴とする方法を提供する。

【0009】

好ましい態様では、本発明の方法は、更に、インターロイキン 18（IL 18）、第VII因子、細胞間接着分子 1（ICAM 1）、クレアチンキナーゼMB、単球走化性タンパク質1（MCP 1）、ミオグロビン、C反応性蛋白、メタロプロテアーゼインヒビター1（TIMP 1）、フェリチン又はグルタチオンS トランスフェラーゼ、又はこれらの組み合わせ、の少なくとも1つについて、前記液体サンプル中の濃度を測定することを含む。SGOTを除く全ての前記分析対象物質の濃度が、前記対照濃度と比較して統計的に異なった高値であることにより、ACSが陽性であると診断されることがわかっている。特に、サンプル液中の分析対象物質の特定の閾値濃度がACSの検出又は診断において重要であることがわかっており、これには、IL 18（約300 pg/mL以上）、第VII因子（約320 ng/mL以上）、ICAM 1（約170 ng/mL以上）、クレアチンキナーゼMB（約5 ng/mL以上）、MCP 1（約275 pg/mL以上）、ミオグロビン（約30 ng/mL以上）、C反応性蛋白（約11 µg/mL以上）、TIMP 1（約120 ng/mL以上）、フェリチン（約300 ng/mL以上）又はグルタチオンS トランスフェラーゼ（約2 ng/mL以上）が挙げられる。

【0010】

他のバイオマーカーも、ACSの陽性診断又は陰性診断を下す上で有用であることがわかっている。これらのバイオマーカーには、上述したものに加え、前立腺特異抗原（遊離型）、インターロイキン 3（IL 3）、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP 1）、癌胎児抗原、インターロイキン 13（IL 13）、腫瘍壊死因子（TNF）、免疫グロブリンE（IgE）、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、インターロイキ

10

20

30

40

50

ン 1 ( I L 1 )、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白 A I、血清アミロイド P、成長ホルモン、 2 ミクログロブリン、リポ蛋白 ( a )、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 ( M M P 9 )、甲状腺刺激ホルモン、 2 マクログロブリン、補体 3 ( C 3 )、インターロイキン 7 ( I L 7 )、レプチン及びインターロイキン 6 ( I L 6 ) が含まれる。

#### 【 0 0 1 1 】

更に本明細書には、診断に際して特定のバイオマーカーの有意性を評価するための幾つかの技術についても記載する。このような技術の一つは、結果を編集し、近接マップ上に投影するもので、被験者の測定濃度が、A C S であると事前に診断された他の被験者の測定濃度のクラスターに近接することが、A C S の陽性診断に寄与するものである。他の技術には、1 つ以上の統計的手法 (例えば、線形回帰分析、分類ツリー分析、ヒューリスティック単純ベイズ分析など) の適用が含まれる。

10

#### 【 0 0 1 2 】

更に、本発明は、液体サンプル中の分析対象物質群の濃度を測定する試薬を含んで構成されるキットを提供する。この分析対象物質群には、M M P 3 及び S G O T、並びに I L 1 8、第 V I I 因子、I C A M 1、クレアチンキナーゼ M B、M C P 1、ミオグロビン、C 反応性蛋白、T I M P 1、フェリチン又はグルタチオン S トランスフェラーゼ、の 1 つ以上が含まれる。前記試薬には、選択された分析対象物質群に含まれる物質の抗体を含んでもよい。更に、前記試薬は、基材に固定化されてもよく、この基材には、二次元配列、マイクロタイタープレート又はマルチピースセットを含んでもよい。

20

#### 【 0 0 1 3 】

更に前記の方法は、患者の血液中の 1、2 又はそれ以上のバイオマーカーの濃度を、統計的手法、例えば、線形回帰分析、分類ツリー分析及びヒューリスティック単純ベイズ分析など、を用いて比較することを含む。この統計的手法は、市販の統計分析ソフトウェアを用いるなど、コンピュータ処理で行ってもよく、また、代表的にはコンピュータ処理で行われる。一態様では、前記統計的手法には、分類ツリー分析、例えば C A R T (クラシフィケーションツリーと回帰ツリー)、が用いられる。これにより、本方法によりバイオマーカー群について試験したサンプル液を採取した特定の患者又は被験者についての結果を、近接マップに投影することができる。特定の患者のバイオマーカー濃度結果が少なくとも 2 つの母集団の 1 つに近接することにより、A C S の陽性診断又は陰性診断が支持される。

30

#### 【 0 0 1 4 】

本発明は、M M P 3 及び S G O T の少なくとも一方に、好ましくは両方のバイオマーカーに、特異的に結合する試薬を含んで構成される製品を提供する。より好ましくは、M M P 3、S G O T、I L 1 8、第 V I I 因子、I C A M 1、クレアチンキナーゼ M B、M C P 1、ミオグロビン、C 反応性蛋白、T I M P 1、フェリチン又はグルタチオン S トランスフェラーゼ、に特異的に結合する試薬 (結合試薬) を含んで構成されるキットを提供する。好ましい態様では、結合試薬はそれぞれが基材上に固定化される。例えば、M M P 3、S G O T 及び本明細書中に開示される他のバイオマーカーのモノクローナル抗体が、1 以上の基材における 1 以上の表面上に 1 以上の離散位置において互いに独立して固定化される。この基材は、同定可能なバイオマーカーを含んで構成されるピースであってもよい。このとき、結合試薬はそれぞれが、異なる結合試薬が付着したピースではなく、異なる同定可能バイオマーカーを含んで構成されたピースに、付着するように構成される。同定可能バイオマーカーは、蛍光化合物、量子ドット等を含んで構成されてもよい。

40

#### 【 0 0 1 5 】

他の態様では、患者における心臓発作の発生を検出する方法であって、M M P 3 濃度及び S G O T 濃度の少なくとも一方を測定することを含んで構成される方法を提供する。

#### 【 0 0 1 6 】

更に、他の態様では、循環器疾患の発病を予測する方法であって、患者の血液中の 2 以

50

上のマーカーについて、時間軸上の2以上の点における濃度変化を測定することを含んで構成される方法を提供する。このとき、患者の血液中において、測定時間の異なる2点間でそれぞれ観察されたMMP 3濃度の上昇、SGOT濃度の減少、又は両方が、循環器疾患の発病の前兆となる。

【0017】

本発明の他の態様は、本明細書において記載される詳細な説明を鑑みることにより、当業者であれば明らかである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本明細書で明記する種々の範囲に使用される数値は、特に明記しない限り、記載される範囲の最小値及び最大値が共に「約」を伴うように記載された近似値である。したがって、記載した範囲に対して僅かに上下した値であっても、その範囲内の値と実質的に同一結果を実現できるものとする。また、本開示では、これらの範囲は、最小値～最大値の間における全ての値を含む連続した範囲であることを意図するものである。

10

【0019】

ここでは、心臓発作患者を速やかに特定する多因子分析を提供する。以下では、ACSの検出及び診断の少なくとも一方に有用なサンプル液（例えば、血液）中の分析対象物質又はバイオマーカーを特定する。心臓発作を起こしているか又は既に起こした患者の血液中で、以下のバイオマーカーが過剰に発現することがわかっている。また、SGOTは、心臓発作を起こしているか又は既に起こした患者では、低発現となることがわかっている。

20

【0020】

また、心臓発作を起こしているか又は既に起こした被験者の検出又は適切な診断に有用であるとして特定されるバイオマーカーには、MMP 3、SGOT、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンS トランスフェラーゼ、前立腺特異抗原（遊離型）、IL 3、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A I、血清アミロイドP、成長ホルモン、 $\alpha_2$  ミクログロブリン、リポ蛋白(a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、 $\alpha_2$  マクログロブリン、補体3(C3)、IL 7、レプチン又はIL 6がある。

30

【0021】

ACSを診断するための1以上のバイオマーカーの有意性を確定するパラメータは、これらバイオマーカーの正常血又は対照血（好ましくは血清又は血漿）中濃度と、心臓発作を既に起こしたか又は起こしているとして臨床的に及び適切に診断された患者の血中濃度と、を比較して統計的に決定される。これは、後述する表1の統計データから、心臓発作患者及び正常時における前記各バイオマーカーの血中濃度の特定平均値及びそれに伴う標準偏差が特定される。ACSが陽性であると診断する有意な閾値を確定する一例として、以下の濃度が挙げられる（以下の例による限定を意図しない）。MMP 3（約1 ng/mL以上）、SGOT（約10  $\mu$ g/mL以下）、IL 18（約300 pg/mL以上）、第VII因子（約320 ng/mL以上）、ICAM 1（約170 ng/mL以上）、クレアチンキナーゼMB（約5 ng/mL以上）、MCP 1（約275 pg/mL以上）、ミオグロビン（約30 ng/mL以上）、C反応性蛋白（約11  $\mu$ g/mL以上）、TIMP 1（約120 ng/mL以上）、フェリチン（約300 ng/mL以上）又はグルタチオンS トランスフェラーゼ（約2 ng/mL以上）。

40

【0022】

これらの数値が近似値であることは理解されることである。数値の臨界範囲（クリティカルレンジ）を定めるために、統計的手法を用いてもよい。代表的には、これら近似値 $\pm$ 1標準偏差の範囲内の値を、統計的に有意な差異を決定するための統計的に有意な値と

50

して考慮し、好ましくは $\pm 2$ 標準偏差を用いる。このため、「約」の用語を、記載する数値に用いることとする。「統計的分類法」は、正常な患者をACSを患う患者から識別することが可能なバイオマーカーを特定するために用いられ、更には、このような患者同士を識別するバイオマーカーのそれぞれについての臨界血中値を決定するためにも用いられる。特定の統計的手法を、識別バイオマーカー及びその群を特定するために用いることができる。これらの統計的手法には、以下のものが含まれる（以下による限定を意図しない）。1) 線形回帰、2) 分類ツリー方式、及び3) 予測アルゴリズムの不偏的パフォーマンスを最適化する統計的機械学習。これらの統計的手法は、それぞれが生物統計学における当業者に知られたものであり、コンピュータでプロセスとして処理可能なものである。統計的手法を実行するためのソフトウェア製品が数多く市販されており、例えば、限定を意図するものではないが、Insightful社（米国、ワシントン州、シアトル）から購入可能なS PLUS（登録商標）がある。

10

#### 【0023】

ACSの決定及び診断の少なくとも一方に有用なバイオマーカーを特定することにより、又、ACSのリスクがある患者を特定するために特に有用なバイオマーカー及びバイオマーカー群を特定する統計的手法の使用により、当業者であれば、本明細書中の開示に基づいて、優れた選択性と感度を有するバイオマーカー群を構成することができる。優れた識別能力を提供するバイオマーカー群に含ませることができるバイオマーカーの例として、MMP 3、SGOT、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンS トランスフェラーゼ、前立腺特異抗原（遊離型）、IL 3、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A I、血清アミロイドP、成長ホルモン、 $\alpha 2$  ミクログロブリン、リポ蛋白(a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、 $\alpha 2$  マクログロブリン、補体3(C3)、IL 7、レプチン及びIL 6が挙げられる。上記一覧より選択されたバイオマーカーを含んで構成される特定のバイオマーカー群の具体例として（これによる限定を意図するものではない）、(i) C反応性蛋白(CRP)、クレアチンキナーゼMB(CKMB)、第VII因子、フェリチン、グルタチオンS トランスフェラーゼ(GST)、ICAM 1、IL 18、IL 1B、IL 3、MCP 1、MMP 3、ミオグロビン、SGOT、TIMP 1及びフォン・ビルブランド因子(vWF)、(ii) CRP、CKMB、第VII因子、フェリチン、GST、ICAM 1、IL 18、MCP 1、MMP 3、ミオグロビン、SGOT、TIMP 1、組織因子及びvWF、(iii) CRP、CKMB、第VII因子、フェリチン、GST、ICAM 1、IL 18、MCP 1、MMP 3、ミオグロビン、SGOT及びTIMP 1、(iv) SGOT、CKMB、MMP 3、GST、第VII因子、IL 18、IL 3、MCP 1、ICAM 1及びIL 1B、(v) SGOT、CKMB、MMP 3、GST及び第VII因子、並びに(vi) SGOT及びMMP 3、が挙げられる。尚、生物統計学における当業者であれば認識されるように、任意のバイオマーカー群におけるバイオマーカーの数は、バイオマーカーの組み合わせにより異なってくる。最適な感度及び特異度を目標として、1つのバイオマーカー群が、バイオマーカーを2つ含んでもよく、又は5つ含んでもよく、更には、同様の結果をもたらす12以上のバイオマーカーを含んでもよい。

20

30

40

#### 【0024】

本発明は、急性冠症候群（不安定狭心症、急性心筋梗塞、心臓性突然死、冠プラーク破綻又は血栓症）が発症する全てのステージにおいて、急性冠症候群を診断するために、血清中に存在する少なくともMMP 3濃度単独の評価に基づいて構成されるか、又は、血清中に存在する少なくともMMP 3濃度と、免疫学的SGOT濃度及び他のバイオマーカー濃度の少なくとも1つの濃度と、の組み合わせの評価に基づいて構成される。また、本発明は、少なくとも免疫学的SGOT濃度の評価に基づいて構成されるか、又は、少な

50

くとも MMP 3 濃度との組み合わせの評価に基づいて構成される。急性冠症候群の患者は、死亡のリスクや深刻な合併症のリスクが極めて高いが、その転帰は、適切な診断や治療により改善することができる。したがって、胸痛を訴える患者を迅速且つ正確に診断することが、患者を治療する上で重要である。

【0025】

本明細書に記載した結果には、不安定狭心症及び急性心筋梗塞において、血清 MMP 3 濃度が上昇することが示されている。したがって、MMP 3 を、炎症性心臓疾患、特に急性冠症候群の早期バイオマーカーとして用いることができる。さらに、SGOT 濃度は、不安定狭心症及び急性心筋梗塞において減少する。したがって、SGOT を、急性冠症候群の早期バイオマーカーとして用いることができる。

10

【0026】

本発明による方法は、患者から採取した生体サンプル（例えば、全血、血漿、血清、尿など）中の MMP 3 濃度及び SGOT 濃度の少なくとも一方を測定すること、各濃度を対照被験者のものとそれぞれ比較すること、対照被験者のものと比較して MMP 3 濃度又は SGOT 濃度に基づいて病状を診断すること、を含んで構成される。MMP 3 濃度が対照被験者のものと比較して上昇している場合、又は、SGOT 濃度が対照と比較して減少している場合、患者は ACS であると診断される。

【0027】

MMP 3 の場合、代表的な対照値は約 0.1 ~ 0.8 ng/mL の範囲にあり、患者のサンプル中の濃度が約 1 ng/mL 以上であると、陽性と診断される。MMP 3 の上昇値は、代表的には約 1.5 ~ 2.0 ng/mL の範囲にある。

20

【0028】

SGOT の場合、代表的な対照値は約 17 ~ 25 µg/mL の範囲であり、患者のサンプル中の免疫学的濃度が約 10 µg/mL 以下であると、陽性と診断される。SGOT は、多くの場合、酵素学的に測定される。しかしながら、ここでは、酵素的に非活性な SGOT 及び酵素的に活性な SGOT を含むタンパク質の存在量を測定する。免疫学的 SGOT 濃度の減少値がとりうる代表的な範囲は、約 15 ~ 1 µg/mL である。

【0029】

MMP 3 及び SGOT は、それぞれ抗 MMP 3 ポリクローナル抗体及び抗 SGOT ポリクローナル抗体によって、又は対応するモノクローナル抗体によって、捕捉される。この診断方法は、IL 18、第 VII 因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼ MB、MCP 1、ミオグロビン、C 反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオン S 転スフェラーゼ、前立腺特異抗原（遊離型）、IL 3、組織因子、アルファフェトプロテイン、前立腺酸性フォスファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白 A I、血清アミロイド P、成長ホルモン、2 ミクログロブリン、リポ蛋白 (a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、2 マクログロブリン、補体 3 (C3)、IL 7、レプチン及び IL 6 からなる群から選択される 1 以上の追加分析対象物質を測定すること、追加分析対象物質の濃度と、MMP 3 濃度及び SGOT 濃度の少なくとも一方と、に基づいて対照被験者のそれと比較して患者の状態を診断すること、を含んでもよい。

30

40

【0030】

【表 1】

ACS 試験における有意分析対象物質						
	単位	ACS 平均	ACS 標準偏差	対 照 平均	対 照 標準偏差	P 値 (t 検定)
I L - 1 8	pg/mL	378	184	128	88	8.7E-22
第V I I 因子	ng/mL	523	170	205	58	1.7E-21
S G O T	ug/mL	5.7	9.8	21	4.4	6.3E-21
I C A M - 1	ng/mL	216	92	108	31	2.0E-19
クレアチンキナーゼMB	ng/mL	32	25	0.69	0.70	2.0E-19
M C P - 1	pg/mL	349	159	151	124	9.4E-15
ミオグロビン	ng/mL	73	71	16	7.8	2.8E-13
M M P - 3	ng/mL	10	8.5	0.41	0.31	4.9E-11
C 反応性蛋白	ug/mL	17	19	3.4	4.1	9.5E-11
フォン・ビルブラント因子	ug/mL	25	14	12	9.4	2.2E-10
T I M P - 1	ng/mL	136	50	100	18	1.6E-09
フェリチン	ng/mL	355	292	178	124	1.2E-07
グルタチオンS-トランスフェラーゼ	ng/mL	22	25	0.62	0.55	1.5E-07
前立腺特異抗原 (遊離型)	ng/mL	0.47	0.35	0.20	0.24	3.5E-07
I L - 3	ng/mL	0.46	0.28	0.087	0.059	8.2E-07
組織因子	ng/mL	5.4	3.6	2.9	2.1	2.0E-06
アルファフェト蛋白	ng/mL	7.5	3.7	4.7	2.7	3.6E-06
前立腺酸性フォスファターゼ	ng/mL	0.41	0.30	0.24	0.15	6.4E-06
幹細胞因子	pg/mL	98	54	44	37	3.3E-05
M I P - 1 $\beta$	pg/mL	147	159	79	52	7.5E-05
癌胎児抗原	ng/mL	3.5	4.4	1.7	1.3	1.3E-04
I L - 1 3	pg/mL	57	35	41	14	1.9E-04
T N F - $\alpha$	pg/mL	17	27	7.3	5.7	6.3E-04
I g E	ng/mL	260	327	108	161	1.4E-03
脂肪酸結合蛋白	ng/mL	20	26	6.6	6.7	1.5E-03
E N A - 7 8	ng/mL	1.2	1.3	0.64	0.70	1.9E-03
I L - 1 $\beta$	pg/mL	7.0	6.9	4.0	3.1	2.2E-03
脳由来神経栄養因子	ng/mL	3.6	4.7	2.2	1.8	3.2E-03
アポリポ蛋白 A - I	mg/mL	0.68	0.48	0.84	0.21	4.0E-03
血清アミロイドP	ug/mL	34	7.0	30	8.7	5.0E-03
成長ホルモン	ng/mL	1.5	1.5	0.72	1.4	5.2E-03
$\beta$ 2 - ミクログロブリン	ug/mL	2.3	0.98	2.0	0.55	5.7E-03
リポ蛋白 (a)	ug/mL	99	112	52	84	7.5E-03
M M P - 9	ng/mL	217	159	313	235	9.3E-03
甲状腺刺激ホルモン	ulU/mL	2.1	1.4	1.5	1.1	1.0E-02
$\alpha$ 2 - マクログロブリン	mg/mL	0.39	0.65	0.23	0.078	1.0E-02
補体 3 (C 3)	mg/mL	1.4	0.65	1.2	0.26	1.2E-02
I L - 7	pg/mL	37	22	44	16	1.9E-02
レプチン	ng/mL	18	30	11	10	2.5E-02
I L - 6	pg/mL	54	43	30	18	3.1E-02

## 【 0 0 3 1 】

分析対象物質濃度は、E L I S A 又は後述の多重法などによるイムノアッセイを用いて測定することができる。詳細はChandler等による米国特許第 5 , 9 8 1 , 1 8 0 号 (Luminex社) に記載がある。

## 【 0 0 3 2 】

10

20

30

40

50

不安定狭心症患者と心筋梗塞患者において、約  $1 \text{ ng/mL}$  を超える MMP-3 濃度が確認された。一方、不安定狭心症患者においては、心筋特異性トロポニン及び C 反応性蛋白の診断上の敏感度は低かった。公表された研究では、患者の 22% のみがトロポニン T で陽性を示し、患者の 36% がトロポニン I で陽性を示し、患者の 65% が C 反応性蛋白濃度の上昇を示した。これは、Hamm 等, *N. Engl. J. Med.*, 1997, 337: 1648-1653、及び Liuzzo 等, *N. Engl. J. Med.*, 1994, 331:417-424 を参照されたい。しかし、両バイオマーカーは、上昇時に好ましくない結果を伴っている。したがって、MMP-3 は、トロポニン及び C 反応性蛋白が上昇しないときであっても、診断未確定のままにされかねない高リスク患者を、潜在的に特定しうる有用な不安定プラークバイオマーカーである。特定のメカニズムに限定することを意図するものではないが、MMP-3 は、急性冠症候群の病態生理に直接的に関係していると考えられる。

10

## 【0033】

不安定狭心症患者及び心筋梗塞患者において、 $10 \mu\text{g/mL}$  未満の SGOT 濃度が確認された。しかし、SGOT が、急性冠症候群の病態生理学的に果たす役割は知られていない。

## 【0034】

本発明の方法に用いられる分析対象物質は、例えば、結合アッセイにより測定することができる。例えば、サンドイッチイムノアッセイでは、生体サンプルから MMP-3 及び SGOT を、それぞれのタンパク質に対して特異的な結合親和性を有する抗体で捕捉し、その後、それぞれの分析対象物質に対して特異的な結合親和性を有する標識抗体を用いて検出することができる。あるいは、標準免疫組織化学法 (standard immunohistochemical techniques) を、このような抗体を用いた MMP-3 及び SGOT の検出に用いることもできる。MMP-3 及び SGOT に親和性を有する抗体が利用可能である。

20

## 【0035】

本明細書において、「結合試薬 (binding reagent)」及びこれに関連する用語は、特異的に又は実質特異的に (即ち交叉反応性が制限されて)、他の化合物又は分子 (免疫認識ではエピトープ) と結合することが可能な任意の化合物、組成物又は分子を意味する。結合試薬は、代表的には、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であり、又はその誘導体若しくは類似体であって、限定を意図するものではないが、例として、 $F_v$  フラグメント、一本鎖  $F_v$  ( $scF_v$ ) フラグメント、 $Fab'$  フラグメント、 $(Fab')_2$  フラグメント、ヒト化抗体及び抗体フラグメント、ラクダ化抗体及び抗体フラグメントが挙げられ、及び前述の多価も挙げられる。また、必要に応じて、多価結合試薬を用いてもよく、限定を意図するものではないが、例として、単一特異性又は二重特異性抗体、例えば、ジスルフィド安定化  $F_v$  フラグメント、 $scF_v$  タンデム ( $(scF_v)_2$  フラグメント)、ダイアボディ (diabodies)、トリボディ (tribodies) 又はテトラボディ (tetrabodies) (代表的には、共有結合した又は安定化された (即ちロイシンジッパー又はヘリックス安定化)  $scF_v$  フラグメント)、が挙げられる。「結合試薬」は、更に、当該技術分野において記載されているようなアダマーを含む。

30

## 【0036】

抗体及び、その誘導体及び類似体、並びにアダマーを含む抗原特異性結合試薬を作製する方法は、当該技術分野において周知である。ポリクローナル抗体は、動物を免疫化することで作製することができる。モノクローナル抗体は、標準 (ハイブリドーマ) 法によって作製することができる。ヒト化抗体を含む抗体誘導体及び類似体は、モノクローナル抗体をエンコードする DNA から DNA フラグメントを単離し、標準法により適切な発現ベクター内で適切な V 領域をサブクローニングすることにより、組み換え技術により作製することができる。ファージディスプレイ及びアダマー技術は、文献に記載されており、極めて親和力の弱い交差反応性を有する抗原特異性結合試薬の *in vitro* クローン増幅が可能である。ファージディスプレイの試薬及びシステムは市販されており、これには、Amersham Pharmacia Biotech 社 (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) 製の組み換えファージ抗体システム (Recombinant Phage Antibody System: RPAS)、及び MoBiT

40

50

ec社（米国、フロリダ州、マルコアイランド）製の pSKAN フェージミドディスプレイシステム（pSKAN Phagemid Display System）がある。アプタマー技術は、限定を意図するものではないが、例えば、米国特許第 5,270,163 号、第 5,475,096 号、第 5,840,867 号及び第 6,544,776 号に開示されている。

【0037】

後述する ELISA 及び Luminescence LabMAP イムノアッセイは、サンドイッチアッセイの例である。本明細書において、「サンドイッチアッセイ」の用語は、抗原が 2 つの結合試薬（代表的には抗体）の間にサンドイッチされるイムノアッセイを意味する。このとき、第 1 の結合試薬又は抗体は表面に付着し、第 2 の結合試薬又は抗体は検出可能な原子団を含んで構成される。検出可能な原子団の例としては、例えば、限定を意図するものではないが、蛍光色素、酵素、第 2 の結合試薬に結合するエピトープ（例えば、第 2 の結合試薬又は抗体がマウス抗体の場合、蛍光標識抗マウス抗体により検出される）、例えば、抗原又はビオチンなどの結合ペアメンバー、が挙げられる。前記表面は、本明細書に記載するような典型的な格子型アレイ（限定を意図しないが、例えば 96 穴プレート及び平面マイクロアレイ）の場合、平面であってもよく、又は、ビーズの「種（species）」のそれぞれが例えば蛍光色素で標識される被覆ビーズアレイ技術（例えば、本明細書並びに米国特許第 6,599,331 号、第 6,592,822 号及び第 6,268,222 号に記載された Luminescence 技術）若しくは量子ドット技術（例えば、米国特許第 6,306,610 号に記載）のように、非平面であってもよい。

【0038】

後述する実施例のビーズタイプイムノアッセイでは、Luminax LabMAP システムを利用する。この LabMAP システムには、スペクトル的に異なる 2 つの蛍光色素で内部が染色されたポリスチレンマイクロスフィアが含まれる。この 2 つの蛍光色素の正確な割合を利用して、固有のスペクトルアドレスを有する 100 の異なるマイクロスフィアセットを含むアレイが作製される。マイクロスフィアセットのそれぞれは、その表面上に異なる反応物質を保持することができる。各マイクロスフィアセットは、それぞれのスペクトルアドレスにより区別可能であるため、最大で 100 の異なる分析対象物質を 1 つの反応槽で同時に測定するように組み合わせることができる。レポーター分子にカップリングした第 3 の蛍光色素で、マイクロスフィア表面で起きた生体分子の相互作用を定量する。各マイクロスフィアは、急速に流れる流体ストリームの状態で Luminescence アナライザの 2 つの異なるレーザを通り過ぎる際に、個々に調べられる。ここでは、マイクロスフィアビーズを、スペクトルアドレスを基に高速デジタル信号処理により分類し、その表面上で起きた反応を 1 サンプルあたり数秒間で定量する。

【0039】

本明細書に記載されるアッセイには、以下の幾つかの理由から、ビーズタイプイムノアッセイを用いることが好ましい。まず、ELISA 等と比較すると、コストと処理量との面でビーズの方が格段に優れている。代表的な平面抗体マイクロアレイ技術（例えば、BD Biosciences Clontech 社（米国、カリフォルニア州、バロアルト）製の BD Clontech 抗体アレイの性質）と比較すると、ビーズ技術では、血漿サンプルや血清サンプルについて、再現性、コスト及び作業時間の面で固有の困難性を伴う前処理や力価測定が要求されないため、定量化を目的としたときに、ビーズの方が格段に優れている。本発明において他のイムノアッセイ（限定を意図しないが、例えば、ELISA、RIA 及び抗体マイクロアレイ技術）を用いることも可能ではあるが、以上の理由から好ましくない。本明細書において「イムノアッセイ」とは、サンドイッチアッセイのみではなく、典型的には、所望の血液バイオマーカー、すなわち、MMP-3、SGOT、IL-18、第 VII 因子、ICAM-1、クレアチンキナーゼ MB、MCP-1、ミオグロビン、C 反応性蛋白、TIMP-1、フェリチン及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ、又はこれらの組み合わせ、の少なくとも 1 つを検出及び定量することが可能な免疫分析を意味する。

【0040】

1、2、3、4 又はそれ以上のバイオマーカー（MMP-3、SGOT、IL-18、

10

20

30

40

50

第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンSトランスフェラーゼ、前立腺特異抗原(遊離型)、IL 3、組織因子、アルファフェト蛋白、前立腺酸性fosファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A I、血清アミロイドP、成長ホルモン、2 ミクログロブリン、リポ蛋白(a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、2 マクログロブリン、補体3(C3)、IL 7、レプチン及びIL 6)の血中濃度測定アッセイにより得られたデータは、心臓発作患者である可能性を判断するために利用することができる。本明細書に示されるように、以下の条件のうち患者の血中において、1以上、2以上、代表的には、3又は4以上の条件が満たされると、その患者は心臓発作を起こしているか又は既に起こした可能性が極めて高いといえる。MMP 3(約1 ng/mL以上)、SGOT(約10 µg/mL以下)、IL 18(約300 pg/mL以上)、第VII因子(約320 ng/mL以上)、ICAM 1(約170 ng/mL以上)、クレアチンキナーゼMB(約5 ng/mL以上)、MCP 1(約275 pg/mL以上)、ミオグロビン(約30 ng/mL以上)、C反応性蛋白(約11 µg/mL以上)、TIMP 1(約120 ng/mL以上)、フェリチン(約300 ng/mL以上)又はグルタチオンSトランスフェラーゼ(約2 ng/mL以上)。一実施形態では、正常患者又は対照患者の母集団における任意のバイオマーカーの濃度と比較したMMP 3の上昇濃度又はSGOTの減少濃度は、それぞれが単独で、97~99%レベルの確実性をもって、患者にACSが存在することを示している(本明細書において後述する表2を参照)。

10

20

#### 【0041】

本明細書の開示において、「血液」とは、本明細書に記載される方法によって分析されるあらゆる血液分画(例えば、血清)をも含むものである。血清は、試験可能な血液分画であって、後述する実施例でも試験される標準的な血液分画である。ここでは、特定のバイオマーカーの血中濃度を測定するため、あらゆる適切な血液分画を用いても、血中濃度の測定試験を行うことができる。また、この場合、データはその分画中に存在する値として報告される。限定を意図しない例として、バイオマーカーの血中濃度は、50 pg/mL血清と表記される。

#### 【0042】

上述のように、本発明は、特異的に特定される血液バイオマーカーの濃度を測定することによりACSを診断する方法を提供する。更に、症状発現前のACSを検出する方法であって、患者の血中において特異的に特定されるバイオマーカーの存在及び速度(velocity)の少なくとも一方を測定すること、を含んで構成される方法を提供する。ここで、「速度」とは、患者の血中におけるバイオマーカー濃度の経時変化を意味する。時系列のデータは、ACSの臨床的な発症を予測するために、患者の血中における特異的なバイオマーカーの速度を測定する際に有用である。症状発現前のACSの指標となる実証可能な速度を有するバイオマーカーには、MMP 3、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、フォン・ビルブランド因子、TIMP 1、フェリチン、グルタチオンSトランスフェラーゼ、前立腺特異抗原(遊離型)、IL 3、組織因子、アルファフェト蛋白、前立腺酸性fosファターゼ、幹細胞因子、MIP 1、癌胎児抗原、IL 13、TNF、IgE、脂肪酸結合蛋白、ENA 78、IL 1、脳由来神経栄養因子、アポリポ蛋白A I、血清アミロイドP、成長ホルモン、2 ミクログロブリン、リポ蛋白(a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、2 マクログロブリン、補体3(C3)、IL 7、レプチン及びIL 6、(これらは、ACSの臨床的発症前の約1~24ヶ月から濃度が上昇する)、及びSGOT(これは、ACSの臨床的発症前の約1~24ヶ月から濃度が減少する)が挙げられる。

30

40

#### 【実施例1】

#### 【0043】

50

### 患者母集団

患者母集団は、C K M B 及びトロポニンの濃度上昇を基に選択した。これら両酵素を、各患者に対し、病院においてA C S の確定的な診断が下されるまでを経時的に追跡した。試験を行った血液のサンプルは、病院の入院時に採取した。正常患者又は対照患者の母集団は、ウェルネスクリニック (wellness clinic) から選択した。対照患者は、循環器疾患を患っている兆候がない患者である。全ての参加者の同意及び血液検体は、I R B (倫理調査委員会) プロトコルの下に得た。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 血液検体の採取及び保存

1 0 m L の末梢血を、標準静脈切開法を用いて被験者から採取した。血液サンプルは、抗凝血薬を用いずに2つの5 m L レッドトップバキュテナー (vacutainer) に採取し、血清を遠心分離した後、全ての検体を直ちに凍結し、- 8 0 の専用フリーザーに保存した。全ての血液サンプルについて、例えば、保存日、凍結解凍サイクル及び区分 (distribution) などの追跡情報を研究用コンピュータに記録した。

10

#### 【 0 0 4 5 】

##### L u m i n e x アッセイの開発

多重システムの試薬は、R&D Systems社 (米国、ミネソタ州、ミネアポリス)、Fitzgerald Industries International社 (米国、マサチューセッツ州、コンコード) から購入した抗体ペア、又は、周知の免疫学的方法により調製した抗体ペアを用いて開発した。捕捉抗体はモノクローナル抗体、検出抗体はポリクローナル抗体とした。捕捉抗体を、Lumine x社 (米国、テキサス州、オースティン) から購入したカルボキシル化ポリスチレンマイクロスフィアの74番と共有結合させた。マイクロスフィアに対する捕捉抗体の共有結合は、Luminex社の推奨する方法で行った。つまり、マイクロスフィアの保存液を、超音波槽 (Sonicor Instrument社製、米国、ニューヨーク州、コーペイグ) で2分間分散させた。2 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> マイクロスフィアのアリコート、最終的な体積が80 μ L となるようにp H 6 . 1 の0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (リン酸緩衝液) を含んだマイクロタイターチューブ内に再懸濁した。この懸濁液を、マイクロスフィアが均一に分散したことが確認されるまで、超音波にかけた。N - ヒドロキシ - スルフォシスクシンイミド (S u l f o - N H S ) 及び1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 塩酸カルボジイミド (Pierce社製) の各溶液 (各50 m g / m L ) を、リン酸緩衝液中で調製し、それぞれの溶液を10 μ L ずつ、反応の安定化とマイクロスフィアの活性化のために、懸濁液に順次加えた。この懸濁液を10分間、室温でインキュベートし、その後、50 μ g の抗体を含む250 μ L のP B S に再懸濁した。この混合物を、一晚、暗所で振盪しながらインキュベートした。その後、マイクロスフィアを250 μ L のP B S 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 で4時間インキュベートした。吸引後、ビーズを1 m L のP B S 1 % B S A 0 . 1 % アジ化ナトリウムでブロックした。マイクロスフィアを血球計で計数し、その最終的な濃度を1 m L あたり1 0 <sup>6</sup> マイクロスフィアとして4 の暗所で保存した。モノクローナル抗体のカップリング効率は、2000のマイクロスフィアをP E 結合ヤギ抗マウスI g G (PE-conjugated goat anti-mouse IgG) (BD Biosciences社製、米国、カリフォルニア州、サンディエゴ) で染色して試験した。一方、検出抗体は、E Z - L i n k - S u l f o - N H S ビオチン標識キット (Pierce社製、米国、イリノイ州、ロックフォード) を用い、製造者のプロトコルに従ってビオチン化した。ビオチンの結合の程度は、H A B A アッセイを用いて測定し、その結果、タンパク質の1モルあたり、ビオチンが20モルであった。更に、このアッセイでは、検出抗体の濃度とインキュベーション時間を最適化した。新たに開発したアッセイの感度は、連続的に希釈した精製タンパク質を用いて測定した。変動係数で表されるアッセイ内変動は、患者のサンプルの平均値を基に計算し、2つの異なる時点で、それぞれ2回ずつ測定した。繰り返した際のアッセイ内変動は、変動平均係数で表される。アッセイ間変動は、標準物質とサンプルとをそれぞれ4連で試験し、評価した。平均値は16 . 5 % (データは示さず) であった。新たに開発したキットを多重に組み合わせ、交差反応性がないことをL u m i n e x プロトコルにしたがって確認した。

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

適合した抗体サイトカイン対の商業的供給源の例としては、MAB636 EGF (R&D Systems社製、米国、ミネソタ州、ミネアポリス)、BAF236 G-CSF (R&D Systems社製)、DY214 IL-6 (R&D Systems社製)、DY206 IL-8 (R&D Systems社製)、DY208 IL-12p40 (R&D Systems社製)、DY1240 MCP-1 (R&D Systems社製)、DY279 VEGF (R&D Systems社製)、DY293 CA-125 (M002201、M002203、Fitzgerald Industries International社製、米国、マサチューセッツ州、コンコード)が挙げられる。

## 【 0 0 4 7 】

更に、多重システム用のCA 125試薬は、Fitzgerald Industries International社(米国、マサチューセッツ州、コンコード)から購入した抗体ペアを用いて開発した。捕捉抗体はモノクローナル抗体、検出抗体はヒツジポリクローナル抗体とした。捕捉抗体は、EZ Link Sulfo NHSビオチン標識キット(Pierce社製、米国、イリノイ州、ロックフォード)を用い、製造者のプロトコルに従って、ビオチン化した。ビオチンの取り込みの程度は、HABAアッセイを用いて測定し、その結果、タンパク質1モルあたりビオチン20モルであった。捕捉抗体は、Luminex社(米国、テキサス州、オースティン)から購入したカルボキシル化ポリスチレンマイクロスフィアの74番と共有結合させた。マイクロスフィアに対する捕捉抗体の共有結合は、Luminex社の推奨する方法で行った。つまり、マイクロスフィアの保存液を、超音波槽(Sonicor Instrument社製、米国、ニューヨーク州、コーペイグ)で2分間分散させた。2.5 × 10<sup>6</sup>マイクロスフィアのアリコート、最終的な体積が80 μLとなるようにpH 6.1の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(リン酸緩衝液)を含んだマイクロタイターチューブ内に再懸濁した。この懸濁液を、マイクロスフィアが均一に分散したことが確認されるまで、超音波にかけた。N-ヒドロキシスルフォシスクシンイミド(Sulfo-NHS)及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)塩酸カルボジイミド(Pierce社製)の各溶液(各50 mg/mL)を、リン酸緩衝液中で調製し、それぞれの溶液を10 μLずつ、反応の安定化とマイクロスフィアの活性化のために、懸濁液に順次加えた。この懸濁液を10分間、室温でインキュベートし、その後、50 μgの抗体を含む250 μLのPBSに再懸濁した。この混合物を、一晩、暗所で振盪しながらインキュベートした。その後、マイクロスフィアを250 μLのPBS 0.05% Tween 20で4時間インキュベートした。吸引後、ビーズを1 mLのPBS 1% BSA 0.1%アジ化ナトリウムでブロックした。マイクロスフィアを血球計で計数し、その最終的な濃度を1 mLあたり10<sup>6</sup>マイクロスフィアとして4時間の暗所で保存した。モノクローナル抗体のカップリング効率は、2000のマイクロスフィアをPE結合ヤギ抗マウスIgG(PE-conjugated goat anti-mouse IgG)(BD Biosciences社製、米国、カリフォルニア州、サンディエゴ)で染色して試験した。更に、このアッセイは、検出抗体の濃度とインキュベーション時間を最適化した。新たに開発したアッセイの感度は、連続的に希釈した精製CA 125を用いてLuminexアッセイで測定し、その結果は、20 IUであった。変動係数で表されるアッセイ内変動は、患者のサンプルの平均値を基に計算し、少なくとも2つの異なる時点で、それぞれを2回ずつ測定した。繰り返しにおけるアッセイ内変動は、変動平均係数で表され、8.5%であった。アッセイ間変動は、それぞれの標準物質と10サンプルを4連で試験し、評価した。これらのサンプルの変動は、10~22%の間であり、平均は16.5%であった。次に、抗CA 125マイクロスフィアを、現在の多重キットと組み合わせた。

## 【 0 0 4 8 】

## データの統計解析

全ての統計解析は、SPPlus統計ソフトウェア(Math Soft社製、米国、ワシントン州、シアトル、1999年)を用いて行った。データは、まず、トレーニングセット及びテストセットにランダムに分割し、テーブルCに記載した。そして、ロジスティック回帰分析(Hosmer, D W, S Lemeshow著, Applied Logistic Regression、米国、ニューヨーク州、ニューヨーク、John Wiley & Sons社、1989年)により、各バイオマーカーについての最適な重みづけと、これに続いてケース(症例)判定を行う予測確率の計算と、

10

20

30

40

50

に用いた。予測確率が0.5である場合は全て、予測ケース(症例)として分類した。予測確率が0.5未満である場合は、予測コントロール(対照)として分類した。トレーニングセットにロジスティックモデルを適用した後、疾病状態の分類をテストセットに対して計算した。

【0049】

結果

【0050】

LabMAP技術によるバイオマーカーの血清中濃度

ACSグループ患者と対照グループ患者の血液について、異なる血清バイオマーカーの血中濃度を、LabMAP技術を用いて多重アッセイで評価した。表1は、2つのグループ間で統計的に異なった分析対象物質を示している。

10

【0051】

表2は、分析対象物質をそれぞれ個別に試験し、診断ツールとしてどの程度有用であるかを判定して得られた診断の精度を示している。本発明において選択基準の一部であるCKMBの場合、89人のうち3人がACS発症の可能性があると認められたが、実際には正常であった(すなわち、3件の偽陽性)。また、6人が自宅に帰されたが、実際には心臓発作を抱えていた(すなわち、6件の偽陰性)。CKMBにより誤診断を受けた9人と比較して、MMP3による結果のみを用いると、2人のみが誤診断であった。このことから、病院に入院する際の現行基準であるCKMBよりも正確な2つの新しいバイオマーカーを見いだしたと言える。単一のバイオマーカーとして最も優れているのは、MMP3及びSGOTであるのは確実である。バイオマーカーの最良の組み合わせは、図4に示す12個の分析対象物質であることが確認された。

20

【0052】

【表 2】

ACSに関する分析対象物質の精度								
MMP - 3	陰性	陽性	精度		MCP - 1	陰性	陽性	精度
真の陰性	89	0			真の陰性	84	5	
真の陽性	2	57	99%		真の陽性	13	46	88%
SGOT	陰性	陽性	精度		IL - 18	陰性	陽性	精度
真の陰性	88	1			真の陰性	82	7	
真の陽性	3	56	97%		真の陽性	12	47	87%
CKMB	陰性	陽性	精度		ミオグロビン	陰性	陽性	精度
真の陰性	86	3			真の陰性	80	9	
真の陽性	6	53	94%		真の陽性	16	43	83%
GST	陰性	陽性	精度		CRP	陰性	陽性	精度
真の陰性	85	4			真の陰性	78	11	
真の陽性	8	51	92%		真の陽性	21	38	78%
第VII因子	陰性	陽性	精度		フェリチン	陰性	陽性	精度
真の陰性	84	5			真の陰性	79	10	
真の陽性	8	51	91%		真の陽性	25	34	76%
ICAM - 1	陰性	陽性	精度		TIMP - 1	陰性	陽性	精度
真の陰性	82	7			真の陰性	80	9	
真の陽性	9	50	89%		真の陽性	27	32	76%

## 【0053】

近接 (proximity) マップ分析

近接マップデータ分析は、分析対象物質の濃度パターンにおける類似性に基づいて、サンプルをグループ化するソフトウェアプログラムを用いて行う。固有の化学的特徴 (signature) は、各サンプルから測定された分析対象物質の濃度を用いて作成する。各々のサンプルが有する特徴間の関係は、Galaxy (登録商標) 投影 (projection) により可視化する。Galaxy (登録商標) では、可視化した際に、より近くに示された2つのオブジェクトが、より近い化学的特徴を有すること、即ち、互いにより類似したものであることを示す近接マップである。主成分分析により導かれた結果、軸は無次元であり、したがって、可視化によっては、ある1軸に沿って移動することが単一の値の増減を意味するような典型的なX-Y散布図とはならない。Galaxy (登録商標) の2軸は、最初の2主成分により定義される。これは、複合データを減らす慣用的な方法である。オブジェクトの配置 (記録位置) は、単純な投影を行った際に起こりうるオーバーラップを最小化する一方で、オリジナルデータの高次元空間内に存在する空間的関係の保存を最大化するように設計されたヒューリスティックのセットを用いて行われる。

## 【0054】

検査の図は、赤丸（薄灰色、ACS患者）が青丸（濃灰色、対照）から、全てのプロットについて、程度の差はあっても、極めて良好な分離を達成しつつ分離していることを示している。図3は、最良の分離を示している。未知のサンプルを図3に示した分析対象物質に対して試験する場合、患者（未知サンプルを採取した患者）のプロットされた位置が、その患者が心臓発作を患っているか否かを示す。2つのクラスター間のスペースは、不確定エリアである。図3では、ACS患者を示す1点が、対照母集団の中ほどに位置している。この結果については、偽陰性であるか又は元々の臨床診断結果が単に誤りであったと考えられる。

#### 【0055】

その後、（ACS患者から対照を識別する際に）分類精度率を、10重交差確認法により取得して、受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic, ROC）曲線を作成した。この方法の感度及び特異度は、被験者のそれぞれをケース又はコントロールの何れかに分類するために使用するカットポイント（即ち、分類ツリーによる予測確率）によって決定される。0.5を標準カットポイントとして用いることにより（すなわち、予測確率が0.5を超えるものを癌ケースとして分類する）、100%の感度、86%の特異度、93%のデータを正しく分類した分類率（correctly classified）が得られる。特異度を91%に固定した場合でも、95.5%の極めて高い感度が得られる（この場合も93%の分類率が得られる）。一方、95.3%の特異度は、84.1%の感度（及び90.0%の分類率）に対応する。受信者動作特性（ROC）曲線下の総面積が0.966となり、1に近似する（これは、完全に分類されていることを表す）。

10

20

#### 【実施例2】

#### 【0056】

血中抗体用LabMAPアッセイの開発

#### 【0057】

アッセイは、フィルターボトム 96穴 マイクロプレート（Millipore社製）で行った。精製した任意の抗原を、抗体について上述したように、Luminesxビーズとカップリングした。抗原カップリングビーズは、4%BSAを含むブロッキングバッファと共に、マイクロタイターシェーカー上で、室温で1時間プレインキュベートした。その後、ビーズを、真空マニホールドを用いて洗浄バッファ（PBS、1%BSA、0.05%Tween 20）で3回洗浄したのち、50 $\mu$ Lの1:250希釈血液血清と共に、4で30分間インキュベートした。この希釈溶液は、データは示していないが、前もって行った血清力価測定に基づいて、抗IL-18IgGの回収率が最適となるように選択した。次に、上述したような洗浄工程を繰り返し、ビーズを、ヒトIgG（Jackson Laboratories社製）に対するPE結合抗体4 $\mu$ g/mLの50 $\mu$ L/ウェルと共に、暗所で45分間、一定の振盪を与えながらインキュベートした。ウェルを2回洗浄し、アッセイバッファを各ウェルに加え、そして、サンプルをBio-Plexサスペンションアレイシステム（Bio-Rad Laboratories社製、米国、カリフォルニア州、ハーキュリーズ）を用いて分析した。検量線のために、抗原カップリングビーズを、特異的な抗原に対するヒト抗体を連続的に希釈したものでインキュベートした。単一特異性ヒト抗体の精製は、上述のとおりである。データ分析は、5パラメトリックカーブフィッティングを用いて行った。

30

40

#### 【0058】

本発明の他の特定の態様では、本開示による1つ又は複数のマーカーの発現プロファイルは、ACSにおける薬剤反応性の分子基盤を試験するための、又はACS用薬剤の有効性若しくはその副作用を評価するための、有用な分子ツールを提供することができる。細胞が薬剤や他の活性分子と接触するなど様々に変更される状態に暴露されている間において、ベースラインプロファイルから発現プロファイルへの変化を、このような効果の指標として用いることができる。

#### 【0059】

したがって、本発明は、ACSの治療のために薬理的に許容される薬剤が投与される個体と、ACSと診断されていない個体と、の双方から得た体サンプルを、本明細書に開

50

示した本発明の方法による診断ステップを行うこと及び薬物治療の反応性を判定することを含む治療に、ACSを患う患者が反応するか否かを判断する際に用いられる試験を提供する。

【0060】

本発明に係るマーカーの発現レベルについて薬（例えば医薬品化合物）の効果をモニタリングすることを、臨床試験に有利に適用できる。例えば、マーカー発現に影響する薬の有効性を、ACS治療を受ける被験者の臨床試験においてモニタリングできる。好ましい実施形態では、本発明は、被験者の薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子又は他の薬剤候補）による治療の有効性をモニタリングする方法を提供する。この方法は、(i)薬が投与される前の被験者から投与前サンプルを採取すること、(ii)この投与前サンプルにおける本発明に係る1以上の選択マーカーの発現レベルを検出すること、(iii)1以上の投与後サンプルを被験者から採取すること、(iv)投与後サンプルにおけるマーカーの発現レベルを検出すること、(v)投与前のサンプルにおけるマーカーの発現レベルを投与後のサンプルにおけるマーカーの発現レベルと比較すること、(vi)比較結果に従って被験者への薬の投与を変更することを含んで構成される。

10

【0061】

例えば、新規な診断マーカーの発現を検出されたものよりも高いレベルに上昇させるため、すなわち、その薬の有効性を高めるために、薬の投与を修正することが望ましい。一方、その薬の有効性を高く又は低くするために、薬の投与量をそれぞれ増加又は減少することが望ましい。

20

【0062】

本明細書では、「候補薬」又は「薬剤候補」の用語は、天然又は合成分子、例えば、タンパク質又はそのフラグメント、抗体、小分子阻害薬又はアゴニスト、核酸分子、例えば、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二本鎖RNA、有機及び無機化合物等、を意味する。

【0063】

本発明の他の特定の態様では、心臓発作（又はACS）を起こしているか又は起こすリスクのある被験者を治療するための予防的及び治療的な方法の両方についての方法を提供する。これにより、心臓発作に特徴的な症状の発現前に、予防薬を投与できるようになり、ACSの発生を防ぎ又はその進行を遅延させるようになる。

30

【0064】

限定を意図するものではないが、適切な治療薬の例としては（詳細は後述する）、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二本鎖RNA、リガンド、小分子及びアンタゴニストが挙げられる。

【0065】

特定の実施形態では、本発明は、個人においてACSを治療する方法又は防止する方法であって、1以上の遺伝子、遺伝子発現、又は、MMP 3及びSGOTの少なくとも一方の遺伝子グループによるタンパク質（protein products）の発現や活性を変更する変更化合物の治療有効量を、前記個人に投与するステップを含んで構成され、これによりACSの症状の少なくとも1つを改善する方法を提供する。

40

【0066】

他の態様では、本発明は、個人においてACSを治療する方法又は防止する方法であって、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン、及び、グルタチオンS トランスフェラーゼ、の少なくとも1つの遺伝子グループの遺伝子又は遺伝子発現産物の1以上について、その発現又は活性を変更する変更化合物の治療有効量を、前記個人に投与するステップを含んで構成され、これによりACSの症状の少なくとも1つを改善する方法を提供する。

【0067】

50

本発明の他の特定の態様では、本発明による診断マーカーの異なる発現の効力により、ある患者における特定の薬物治療がACS治療に関して有効となりうるか否かを予測する際の確実性を高めるために、そのマーカーを利用することが可能である。即ち、本発明は、ACS治療に用いる候補薬を特定する方法を提供する。この方法は、a) 毒性に曝された組織サンプル、好ましくは心臓組織のサンプルを候補薬に接触させること、b) MMP 3及びSGOTの少なくとも1つから選択される1以上の遺伝子に対応する遺伝子又はタンパク質の発現レベルを前記組織から測定して、第1セットの値を得ること、c) 前記第1セットの値を、ステップb)と同一の遺伝子について同一の条件下(但し、候補薬は含まない)で毒性に曝された組織において評価して得た遺伝子発現レベルに対応する第2セットの値と比較することを含んで構成され、ここで、第1の値が、実質的に、MMP 3及びSGOTの少なくとも一方の発現に関して、第2の値以上であることが、候補薬がACSの症状を改善する指標となることを特徴とする。同様に、第1の値が、実質的に、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン、及びグルタチオンS トランスフェラーゼの少なくとも1つの発現に関して、第2の値以下であることが、候補薬がACSの症状を改善する指標となる。

10

本発明の他の特定の態様では、ACSの治療に使用される候補薬を特定する方法を提供する。この方法は、(a) 毒性に曝された組織サンプル、好ましくは心臓組織サンプルを候補薬に接触させること、(b) MMP 3、SGOT、IL 18、第VII因子、ICAM 1、クレアチンキナーゼMB、MCP 1、ミオグロビン、C反応性蛋白、TIMP 1、フェリチン及びグルタチオンS トランスフェラーゼから選択される1以上の遺伝子に対応する組織における遺伝子又はタンパク質の発現レベルを前記組織から測定して、第1セットの値を得ること、(c) 前記第1セットの値を、ステップb)と同一の遺伝子について同一の条件下(但し、候補薬は含まない)で毒性に曝された組織において評価して得た発現レベルに対応した第2セットの値と比較することを含んで構成され、ここで、第1の値が、実質的に、前記遺伝子発現に関して、第2の値よりも大きいことが、候補薬がACSの症状を改善する指標となることを特徴とする。好ましい実施形態では、MMP 3及びSGOTの遺伝子の少なくとも1つが、このアッセイで用いられる。

20

#### 【0068】

好ましい実施形態において、遺伝子発現レベルを測定する手段は、マーカー遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドを含んで構成される。更に好ましい実施形態は、ノーザンブロット分析、逆転写PCR又はリアルタイム定量PCR、枝分かれ(branched)DNA法、NASBA法(nucleic acid sequence based amplification)、TMA法(transcription-mediated amplification)、RPA(ribonuclease protection assay)、及びマイクロアレイから選択される方法である。本明細書で開示されるマーカー遺伝子の配列は、GENBANKなどの公的にアクセス可能な遺伝子バンクから確実に入手可能であり、本明細書中では、簡潔に記載するため詳述しない。

30

#### 【0069】

本明細書に開示する新規マーカーにより得られるmRNA転写レベルを測定する際に特に有用な方法には、オリゴヌクレオチドの配列アレイに対する標識mRNAのハイブリダイゼーションが含まれる。このような方法では、複数のこれら遺伝子の転写レベルを同時に測定して、遺伝子発現プロファイル又はパターンを作成することができる。他の実施形態では、被験者から採取したサンプルから得られた遺伝子発現プロファイルを、無病被験者から採取したサンプルから得られた遺伝子発現プロファイルと比較することができ、これにより、被験者がACSを発症しているか又はACSの発症リスクを有しているか否かを判断することができる。

40

#### 【0070】

マーカーの遺伝子発現は、RT PCR、ハイスループット技術を用いたキットの形で評価されることが好ましい。周知技術のRT PCR反応では、PCRの間にTaqManプローブを分割するために、AmpliTaqGoldDNAポリメラーゼの5'ヌク

50

レアーゼ活性を利用する。このプローブは、5'レポーター色素及び3'クエンチャー色素を有するオリゴヌクレオチド（通常は>20mer）を含む。蛍光レポーター色素、例えばFAM（6カルボキシフルオレセイン）、は、オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合して連結する。このレポーターは、3'末端に位置するリンカーアーム（linker arm）を介してTAMURA（6カルボキシN,N,N',N'テトラメチルローダミン）により消光される。

#### 【0071】

それぞれのマーカーに用いられるオリゴヌクレオチドプローブは、それらマーカーの遺伝子のヌクレオチド配列から得られるものであるが、現在、適切なオリゴヌクレオチド配列の選択は、当業者にとって標準ルーチン技術的な事項である。また、本明細書に記載される遺伝子のそれぞれのDNA配列は、自由に入手可能であるので、本明細書では記述しない。

10

#### 【0072】

また、薬物スクリーニング法に加えて、周知の無細胞アッセイを、タンパク質やその結合パートナーの活性を変化させるために、本明細書中に記載したマーカー（例えばMMP3、SGOT）によりコードされるタンパク質と相互に作用することのできる化合物の特定に用いることもできる。さらに、無細胞アッセイを、コードされたタンパク質と、その結合パートナー、例えば、標的ペプチドと、の間の相互作用を変更する化合物の特定に用いることもできる。

#### 【0073】

一実施形態では、このような化合物を特定する無細胞アッセイは、結合パートナー（例えば、生物活性のない標的ペプチド又は小分子）の存在下又は非存在下におけるマーカータンパク質及び試験化合物若しくは試験化合物のライブラリを含む反応混合物を含んで構成される。また、分子間の相互反応は、光学現象である表面プラズモン共鳴を検出するリアルタイムBIA（生物分子相互作用解析）、Pharmacia Biosensor（AB）を用いて評価することができる。タンパク質とその結合パートナーとの間の複合体の構成は、検出可能に標識されたタンパク質、例えば、放射性標識、蛍光標識又は酵素標識タンパク質、又はその結合パートナーを用いて、イムノアッセイ又はクロマトグラフ検出により検出することができる。

20

#### 【0074】

他の実施形態では、標的RNA（好ましくはmRNA）種の活性、特にその翻訳速度を、アンチセンス核酸で制御可能に処理することにより制御可能に阻害することができる。本明細書において用いる「アンチセンス」核酸は、コード又は非コード領域に相補的な幾つかの配列により、標的RNAの配列特異的な（例えば、non-poly A）タンパク質、例えば翻訳開始領域とハイブリダイズすることができる核酸を意味する。本発明のアンチセンス核酸は、オリゴヌクレオチドであってもよく、このオリゴヌクレオチドは、二本鎖若しくは一本鎖RNA若しくはDNA又はその修飾若しくは誘導体であり、制御可能な方法で細胞に直接投与されるか、又は、標的RNAの翻訳を攪乱（perturb）するために十分に制御可能な量の外因性導入配列の転写により細胞内に生産される。

30

#### 【0075】

好ましくは、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドであり、好ましくはオリゴヌクレオチドである（6～約200オリゴヌクレオチドの範囲）。

40

#### 【0076】

上述のように、アンチセンスヌクレオチドを、様々な技術により、本明細書中に記載した遺伝子を発現する細胞へin vivoで送達することができる。この技術としては、例えば、細胞表面に発現するレセプター又は抗原と特異的に結合するペプチド又は抗体にアンチセンスヌクレオチドを連結し心臓細胞を標的とした修飾アンチセンスヌクレオチドを投与することで、リポソーム内に封入されたアンチセンスヌクレオチドを心臓組織に直接注入するものがある。

#### 【0077】

50

しかしながら、上記の送達方法では、内因性 mRNA の翻訳を阻害するために十分な細胞内濃度を達成することが難しい。したがって、他の実施形態では、発現構造体を形成するために、アンチセンスヌクレオチド配列を含んで構成される核酸を、プロモータ（即ち、特定遺伝子の転写を開始するために要求される DNA 配列）の転写制御下に位置させる。本発明のアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写により細胞内に制御可能に発現する。発現が高いレベルで起こるように制御される場合、飽和状態の攪乱又は修飾が起こる。結論として、アンチセンス核酸を、本文中に記載したマーカー遺伝子を含むあらゆる mRNA 配列のほとんどを標的にするためにルーチンで設計することができ、そして、有効量且つ制御可能な量又は飽和量のアンチセンス核酸を発現させるように、細胞を、このようなアンチセンス配列をコードする核酸でルーチンに形質転換すること又は暴露することができる。したがって、細胞中のほとんどのあらゆる RNA 種の翻訳であっても修飾又は攪乱することができる。

10

**【0078】**

また、マーカータンパク質の活性は、外因性薬又はリガンドに暴露する制御方法又は飽和方法により修飾又は攪乱することができる。本発明の方法は、多くの場合、様々な心疾患治療薬の有用性の試験又は確認に適用されるため、薬物暴露は、mRNA 及び発現タンパク質の双方の細胞構成要素を修飾・攪乱する重要な方法である。

**【0079】**

好ましいケースでは、薬は、細胞内のただ1つのマーカータンパク質とだけ相互に作用し、その1つのマーカータンパク質の活性だけを変化させること、即ち、活性を上昇又は下降させることが知られている。薬の量を変化させるための細胞の段階的な暴露により、マーカータンパク質をインプットとするネットワークモデルの段階的な攪乱が引き起こされる。飽和暴露により飽和修飾又は攪乱が引き起こされる。

20

**【0080】**

「アンタゴニスト」の用語は、遺伝子によってコードされたタンパク質に結合したときに、その活性を阻害する分子を意味する。アンタゴニストには、限定を意図するものではないが、ペプチド、タンパク質、炭水化物及び小分子が含まれる。特に有用な実施形態において、アンタゴニストは、開示したマーカー（例えば、MMP 3 及び S G O T の少なくとも一方）に特異的な抗体である。この抗体は単体では、治療のエフェクターとして働いてもよく、また、殺細胞効果を実際に生じるために他の細胞を補充してもよい。

30

**【0081】**

アンチセンスヌクレオチドを用いて治療する場合、本方法は、上記特定された少なくとも1つのマーカーから得られるアンチセンスヌクレオチド配列を含んで構成される分離核酸分子の治療有効量を投与することを含んで構成される。このアンチセンスヌクレオチドは少なくとも1つの遺伝子の転写・翻訳を変化させる能力を有する。アンタゴニストを用いて治療する場合、本方法は、被験者に、上記特定された少なくとも1つのマーカーによりコードされたタンパク質を阻害する又は活性化するアンタゴニストの治療有効量を投与することを含んで構成される。

**【0082】**

アンチセンスヌクレオチド、リボザイムをコードするヌクレオチド配列、二本鎖 RNA 又はアンタゴニストを含んで構成される分離核酸分子の「治療有効量」とは、これら治療薬について、ACS を治療するために十分な量を意味する。この治療有効量は、当業者によって適切に決定されるものである。あらゆる治療法について、治療有効量（therapeutically effective dose）が、初期に、細胞培養アッセイ（例えば新生細胞の細胞培養アッセイ）又は動物モデル（一般的には、ラット、マウス、ウサギ、イヌ又はブタ）において推定される。また、動物モデルは、適切な濃度範囲又は投与経路を決定するために用いてもよい。このような情報は、その後、ヒトに投与する際に、有用な用量及び経路を決定するために用いることができる。

40

**【0083】**

治療効果及び毒性は、細胞培養又は実験動物での標準的な薬理学的方法、例えば、E D

50

50 (母集団の50%に治療効果が現れる用量)及びLD50 (母集団の50%が致死する用量)などにより確認してもよい。毒性作用と治療効果との間の用量比が治療指数であり、LD50/ED50の比として表される。高い治療指数を示すアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二本鎖RNA及びアンタゴニストが好ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験により得られたデータは、ヒトに使用する際の用量範囲を作成するために用いられる。このような組成を含む用量は、毒性がほとんどないか又は全くないED50を考慮した血中濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、採用される剤形、患者の感度、投与経路によって、その範囲内で変化する。

#### 【0084】

正確な用量は、治療を必要とする被験者に関するファクターを考慮して、医師により決定されてもよい。用量及び用法は、活性部分の十分な濃度を提供するように又は所望の効果を維持するように、調節される。考慮されるファクターには、病状の重症度、被験者の全体的な健康状態、被験者の年齢、体重及び性別、食事、投与の時間及び頻度、複合薬、反応感度、並びに治療に対する耐性と反応、が含まれる。

10

#### 【0085】

標準的な用量は、投与経路によって、0.1~100,000マイクログラムの範囲にあり、最大で総用量は約1gである。特定の用量及び送達方法に関するガイドラインは、文献により提供されており、当技術分野における医師であれば一般的に入手可能である。当業者であれば、アンタゴニストの処方とは異なるヌクレオチドの処方を採用することもできる。

20

#### 【0086】

治療への応用では、アンチセンスヌクレオチド、リボザイムをコードするヌクレオチド配列、二本鎖RNA (リボソームに封入されているか又はウイルスベクターに組み込まれている)及び抗体が、1以上の薬理的に許容される担体と共に治療薬を含む薬理的な組成物として、好ましく投与される。この組成物は、単体で、又は、少なくとも1つの他の薬剤 (agent) (例えば安定化化合物等)との組み合わせで、投与されてもよく、限定を意図するものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、ブドウ糖及び水を含むあらゆる無菌の生体適合性薬理的担体によって投与されてもよい。この組成物は、単体で、又は、少なくとも1つの他の薬剤、治療薬 (drug)若しくはホルモンとの組み合わせで、患者に投与してもよい。

30

#### 【0087】

薬理的組成物は、複数の経路で投与されてもよく、これには、限定を意図するものではないが、経口、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所性、舌下、又は直腸による投与手段が含まれる。活性成分に加え、これらの薬理的組成物は、活性化学物質を、薬として用いることのできる製剤に加工することを容易にする賦形剤及び助剤を含む薬理的に許容される適当な担体を含んでもよい。

#### 【0088】

経口投与用の薬理的な組成物は、経口投与に適した用量で、当該技術分野において周知の薬理的に許容される担体を用いて、製剤化される。このような担体は、患者の経口摂取のために、薬理的な組成物を、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤することができる。

40

#### 【0089】

本明細書においては本発明の特定の実施形態について、本発明を説明する目的で記述したが、これは限定を目的としたものではなく、当業者であれば、本発明の原理及び範囲内で特許請求の範囲に記載された発明から逸脱することなく、細部、材料、部分ごとの並びについて変更を様々に加え得ることが理解されるものとする。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0090】

【図1】右余白に示すバイオマーカー群について試験した液体サンプルを採取した患者に

50

おける、近接マップの投影図である。近接マップ分析の結果は、挙げられた全てのバイオマーカーを検討すると、ACSの正しい診断に関して、正確度は約98%であることを示している。ここで、心臓発作（又はACS）を起こしている被験者は図の左手（赤又は薄灰色で示された点）に、心臓発作を起こしていない被験者は図の右手に（青又は濃灰色で示された点）に示されている。

【図2】右余白に示すバイオマーカー群について試験した液体サンプルを採取した患者における、近接マップの投影図である。近接マップ分析の結果は、挙げられた全てのバイオマーカーを検討すると、ACSの正しい診断に関して、正確度は約97%であることを示している。ここで、心臓発作（又はACS）を起こしている被験者は図の左手（赤又は薄灰色で示された点）に、心臓発作を起こしていない被験者は図の右手に（青又は濃灰色で示された点）に示されている。

10

【図3】右余白に示すバイオマーカー群について試験した液体サンプルを採取した患者における近接マップの投影図である（但し、バイオマーカー、組織因子及びvWF、の結果は分析から除外した）。近接マップ分析の結果は、挙げられた全てのバイオマーカーを検討すると、ACSの正しい診断に関して、正確度は約99%であることを示している。ここで、心臓発作（又はACS）を起こしている被験者は図の左手（赤又は薄灰色で示された点）に、心臓発作を起こしていない被験者は図の右手に（青又は濃灰色で示された点）に示されている。

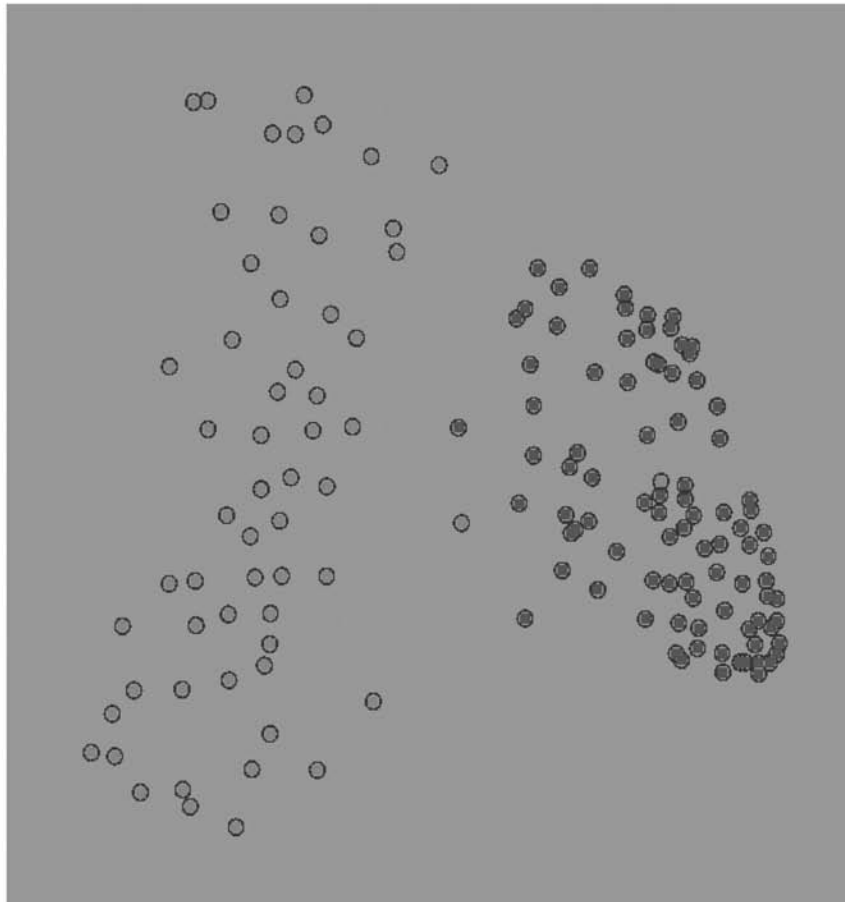
【図4】右余白に示すバイオマーカー群について試験した液体サンプルを採取した患者における、近接マップの投影図である。近接マップ分析の結果は、挙げられた全てのバイオマーカーを検討すると、ACSの正しい診断に関して、正確度は約94%であることを示している。ここで、心臓発作（又はACS）を起こしている被験者は図の左手（赤又は薄灰色で示された点）に、心臓発作を起こしていない被験者は図の右手に（青又は濃灰色で示された点）に示されている。

20

【図5】右余白に示すバイオマーカー群について試験した液体サンプルを採取した患者における、近接マップの投影図である。近接マップ分析の結果は、挙げられた全てのバイオマーカーを検討すると、ACSの正しい診断に関して、正確度は約97%であることを示している。ここで、心臓発作（又はACS）を起こしている被験者は図の左手（赤又は薄灰色で示された点）に、心臓発作を起こしていない被験者は図の右手に（青又は濃灰色で示された点）に示されている。

30

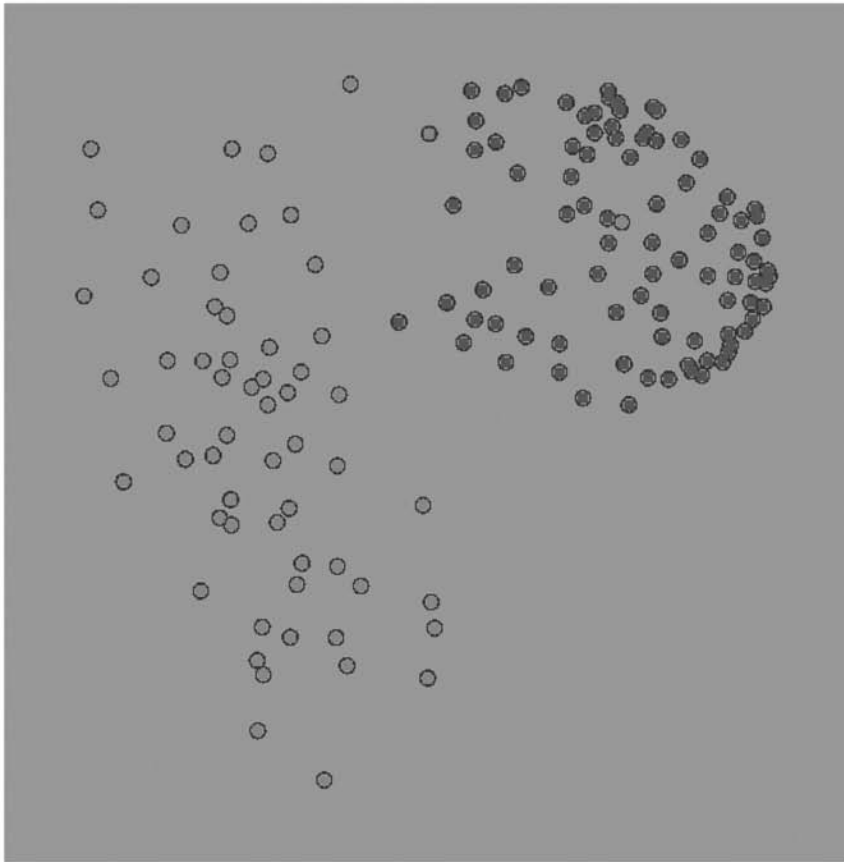
【 図 1 】



精度 98%

- CRP
- CKMB
- 第VII因子
- フェリチン
- GST
- ICAM - 1
- IL - 18
- IL - 1B
- IL - 3
- MCP - 1
- MMP - 3
- ミオグロビン
- SGOT
- TIMP - 1
- vWF

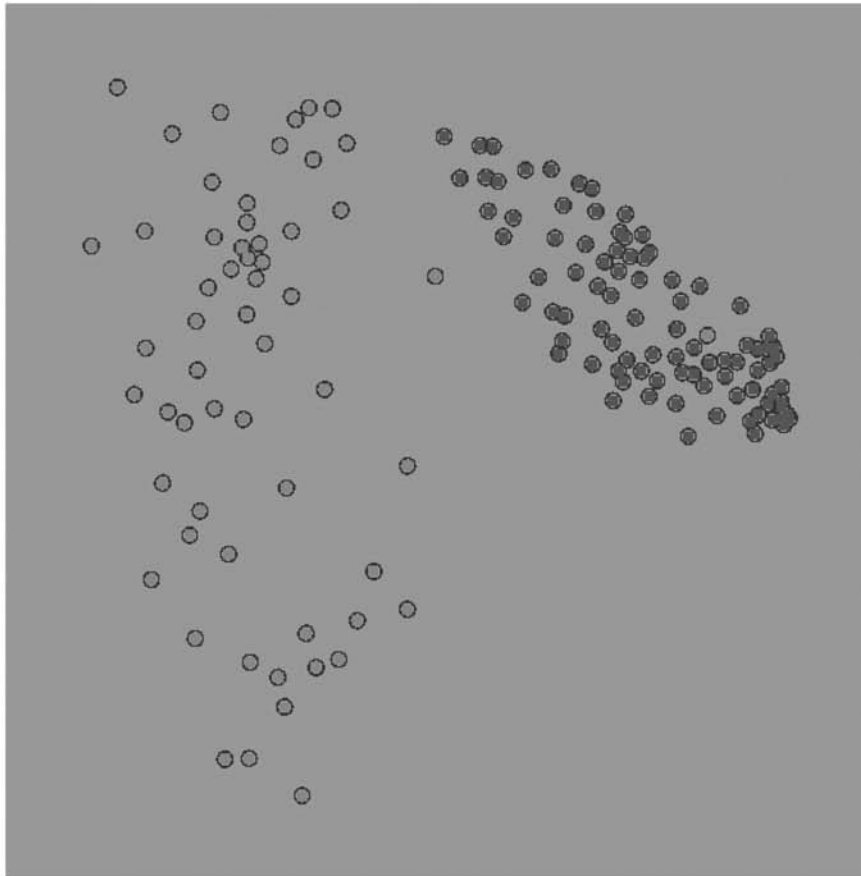
【 図 2 】



精度 97%

- CRP
- CKMB
- 第VII因子
- フェリチン
- GST
- ICAM-1
- IL-18
- MCP-1
- MMP-3
- ミオグロビン
- SGOT
- TIMP-1
- 組織因子
- vWF

【 図 3 】

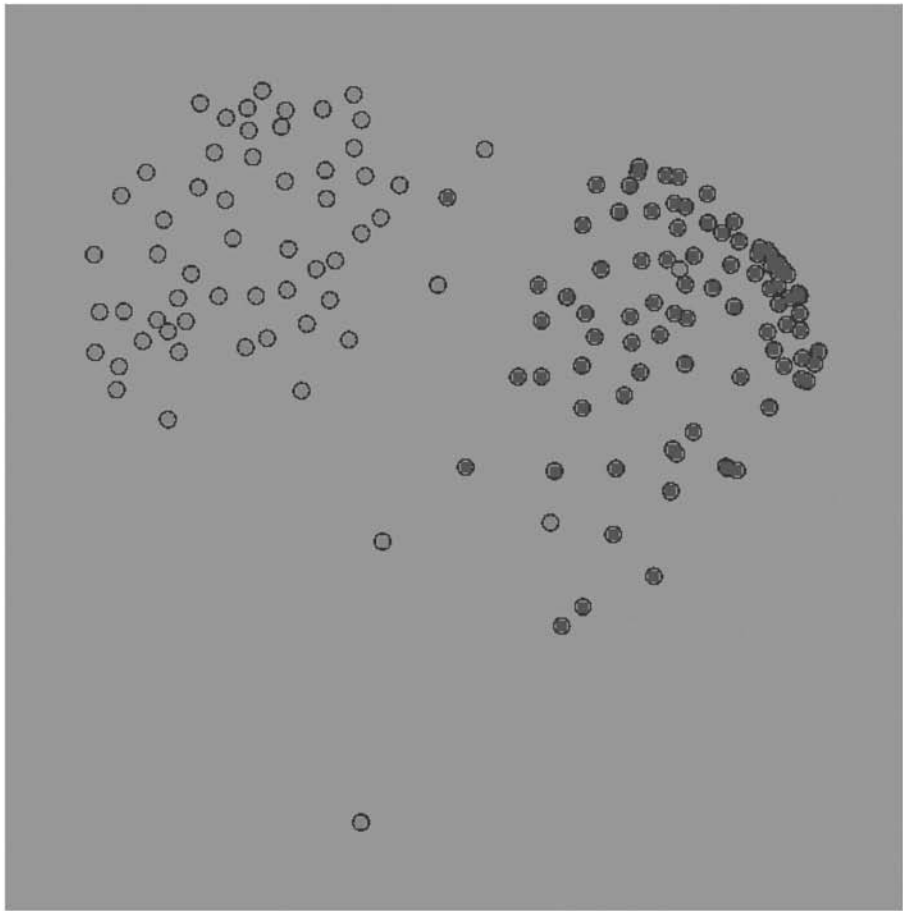


精度 99%

- CRP
- CKMB
- 第VII因子
- フェリチン
- GST
- ICAM - 1
- IL - 18
- MCP - 1
- MMP - 3
- ミオグロビン
- SGOT
- TIMP - 1

- 除く
- 組織因子
- vWF

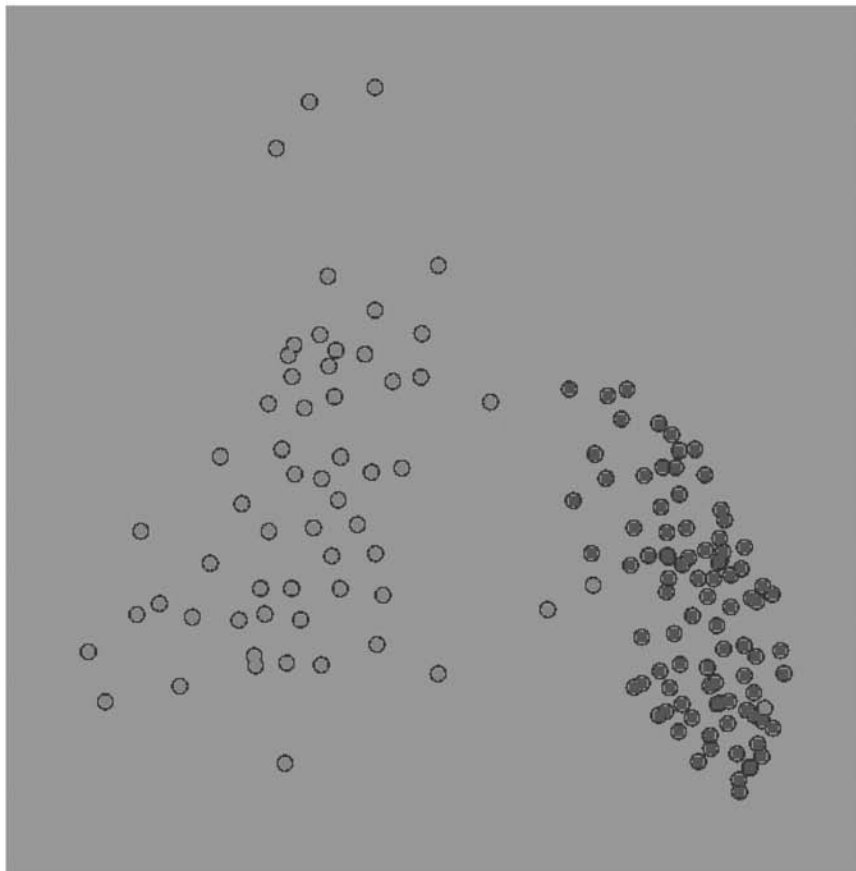
【 図 4 】



精度 94%

- SGOT
- CKMB
- MMP - 3
- GST
- 第V I I 因子
- I L - 18
- I L - 3
- MCP - 1
- I CAM - 1
- I L - 1 B

【 図 5 】



精度 97%

SGOT  
CKMB  
MMP - 3  
GST  
第VII因子

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/25008

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8): G01N 33/00, 33/53, 33/573 (2007.01) USPC: 435/7.4 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) USPC: 435/7.4  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.4, 7.6, 7.71, 7.72, 7.9, 7.91, 41, 69.2  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): acute coronary syndrome, SGOT, MMP-3, coronary, ischemia Google Scholar: acute coronary syndrome, SGOT, MMP-3, coronary, stromelysin-1; Derwent Patents Abstracts, Life Sciences: acute coronary syndrome, MMP-3, SGOT, acute myocardial ischemia; eep@canet: acute coronary syndrome, linear regression																
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X --- Y</td> <td>US 2003/0109420 A1 (VALKIRS et al.) 12 June 2003 (12.06.2003), abstract, para [0015], [0020], [0080], [0087], [0103], [0110], [0122], [0137], [0146]; Table 1</td> <td>1-4 ----- 9-15, 20-21</td> </tr> <tr> <td>X --- Y</td> <td>US 5,744,358 A (JACKOWSKI), 28 April 1998 (28.04.1998), abstract, col 1, ln 45-52; col 4, ln 62-63; col 9, ln 23-42; col 9, ln 66; col 10, ln 47-50; col 10, ln 62-col 11, ln 6; col 32, ln 2-6; col 13, ln 51-63</td> <td>5-8 ----- 9-15, 20-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,699,675 B2 (HOLMES et al.) 2 March 2004 (02.03.2004), abstract; col 11, ln 36-40</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0043637 A1 (CAPLAN et al.) 24 February 2005 (24.02.2005), para [0053]</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- Y	US 2003/0109420 A1 (VALKIRS et al.) 12 June 2003 (12.06.2003), abstract, para [0015], [0020], [0080], [0087], [0103], [0110], [0122], [0137], [0146]; Table 1	1-4 ----- 9-15, 20-21	X --- Y	US 5,744,358 A (JACKOWSKI), 28 April 1998 (28.04.1998), abstract, col 1, ln 45-52; col 4, ln 62-63; col 9, ln 23-42; col 9, ln 66; col 10, ln 47-50; col 10, ln 62-col 11, ln 6; col 32, ln 2-6; col 13, ln 51-63	5-8 ----- 9-15, 20-21	Y	US 6,699,675 B2 (HOLMES et al.) 2 March 2004 (02.03.2004), abstract; col 11, ln 36-40	20	Y	US 2005/0043637 A1 (CAPLAN et al.) 24 February 2005 (24.02.2005), para [0053]	15	<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
X --- Y	US 2003/0109420 A1 (VALKIRS et al.) 12 June 2003 (12.06.2003), abstract, para [0015], [0020], [0080], [0087], [0103], [0110], [0122], [0137], [0146]; Table 1	1-4 ----- 9-15, 20-21														
X --- Y	US 5,744,358 A (JACKOWSKI), 28 April 1998 (28.04.1998), abstract, col 1, ln 45-52; col 4, ln 62-63; col 9, ln 23-42; col 9, ln 66; col 10, ln 47-50; col 10, ln 62-col 11, ln 6; col 32, ln 2-6; col 13, ln 51-63	5-8 ----- 9-15, 20-21														
Y	US 6,699,675 B2 (HOLMES et al.) 2 March 2004 (02.03.2004), abstract; col 11, ln 36-40	20														
Y	US 2005/0043637 A1 (CAPLAN et al.) 24 February 2005 (24.02.2005), para [0053]	15														
* 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	"I" 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 21 May 2007 (21.05.2007)	Date of mailing of the international search report <b>24 SEP 2007</b>															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/25008

**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:

Group I: Claims 1-15, 20 and 21  
Group II: Claims 16-19

Claims 1-15 and 20-21 of group I are directed to diagnosing acute coronary syndrome (ACS) comprising...determining the level of MMP-3 and/or SCOT as well as other biological enzymes or factors in a fluid sample from a subject suffering from ACS, etc.

Claims 16-19 of group II are directed to a kit comprising reagents for determining the concentration in a fluid sample of a panel of analytes including MMP-3, SGOT and one or more of several other factors. There is no limitation that the kit be specific for the testing of ACS. Since testing for MMP-3 and SGOT is known in the art, there is no unknown common feature that would provide unity of invention for the claims of group I and the claims of group II.

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 additional fees, 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.:  
1-15, 20 and 21

**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.

## 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 チャンドラー, マーク, ビー.  
 アメリカ合衆国、テキサス州 78759、オースティン、デュバル ロード 3300、スイート 110、ルールズ - ベースド メディソン, インコーポレーテッド内
- (72) 発明者 スペイン, マイケル, ディー.  
 アメリカ合衆国、テキサス州 78759、オースティン、デュバル ロード 3300、スイート 110、ルールズ - ベースド メディソン, インコーポレーテッド内
- (72) 発明者 マペス, ジェームズ  
 アメリカ合衆国、テキサス州 78759、オースティン、デュバル ロード 3300、スイート 110、ルールズ - ベースド メディソン, インコーポレーテッド内
- (72) 発明者 ロジャース, ジョージ  
 アメリカ合衆国、テキサス州 78759、オースティン、デュバル ロード 3300、スイート 110、ルールズ - ベースド メディソン, インコーポレーテッド内

## 【要約の続き】

I、血清アミロイドP、成長ホルモン、 2 ミクログロブリン、リボ蛋白(a)、MMP 9、甲状腺刺激ホルモン、 2 マクログロブリン、補体3(C3)、IL 7、レプチン、及びIL 6が含まれるが、これらの限定されるものではない。更に、液体サンプルの分析を補助する試薬を含むキットを記載する。

## 【選択図】図1

专利名称(译)	急性冠状动脉综合征的诊断方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008545139A</a>	公开(公告)日	2008-12-11
申请号	JP2008519490	申请日	2006-06-27
申请(专利权)人(译)	规则 - Besudo医学网		
[标]发明人	チャンドラーマークビー スペインマイケルディー マベスジェームズ ロジャースジョージ		
发明人	チャンドラー,マーク,ビー. スペイン,マイケル,ディー. マベス,ジェームズ ロジャース,ジョージ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/48 C12Q1/37 G01N33/573 G01N33/6893 G01N2333/91188 G01N2333/96486 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	不二Sasashima 小川 护晃		
优先权	60/694666 2005-06-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了一种用于检测和诊断急性冠状动脉综合征 ( ACS ) 的方法。该方法基于以下发现 : ACS 风险患者样本溶液中选定分析物的异常浓度 ( 通常在血液样本中 ) 支持 ACS 的诊断。公开了至少两种新的 ACS 生物标志物 ( MMP-3 和 SGOT )。 12 目标分析物的总浓度提供了患者状况的敏感和选择性图像, 即患者是否患有心脏病。我们还披露了 ACS 的其他重要生物标志物。要做到这一点, IL-18, 因子 VII, ICAM-1, 肌酸激酶 MB, MCP-1, 肌红蛋白, C-反应蛋白, von Willebrand 因子, TIMP-1, 铁蛋白, 谷胱甘肽 S-转移酶, 前列腺特异性抗原 ( 免费 ), IL-3, 组织因子, 甲胎蛋白, 前列腺酸性磷酸酶, 干细胞因子, MIP-1β, 癌胚抗原, IL-13, TNF-α, IgE 的, 脂肪酸结合蛋白, ENA-78, IL 1-β, 脑源性神经营养因子, 载脂蛋白 A-I, 血清淀粉样蛋白 P, 生长激素, β2-微球蛋白, 脂蛋白 ( a ) 中, MMP-9, 促甲状腺激素, α2-巨球蛋白, 补体 3 ( C3 ), IL-7, 瘦蛋白和 IL-6, 但不限于这些。另外, 描述了包含有助于分析液体样品的试剂的试剂盒。 点域 1

