

本発明の主題は、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPのレベルを検出することを含む、急性冠症候群を経験した患者におけるその後の心血管イベント（例えば、冠状動脈性心疾患による死亡、非致死性心筋梗塞、虚血性脳卒中、不安定狭心症の反復入院加療、心停止）のリスクを同定するためのバイオマーカー及び方法である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

具体的には文書化された最近の急性冠症候群（ACS）、より具体的には急性期後冠症候群（ACS）（post Acute Coronary Syndrome）、最も具体的には最近のACSを経験した、安定なCHDに罹患している被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

a）被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端（NT-proBNP）、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質（CRP）の量を検出すること、

b）前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c）前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

を含む方法。

【請求項 2】

前記心血管イベントが、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞（MI）、虚血由来の非致死性脳卒中、不安定狭心症の入院加療、及び冠血行再建、及び心停止から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記検出が、インビトロで前記サンプルを検出剤の組合せと接触させることを含み、各剤が、バイオマーカーのうちの 1 つに対して特異的結合親和性を有する、請求項 2 又は 3 記載の方法。

【請求項 4】

前記剤が、抗体又はその断片である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが、血清又は血液のサンプルである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の中央値よりも多い場合、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高いと同定される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の中央値よりも少ない場合、前記被験体が、その後の心血管イベントのリスクが低いと同定される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の第四四分位範囲内である場合、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するための療法を推奨する工程を更に含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するために薬剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 1】

前記療法が、研究用新薬療法を含む、請求項 9 又は 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項記載の方法の実行に適応した装置であって、

a) NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPに特異的に結合する検出剤の組合せを含む分析ユニットであって、インピトロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；

b) データベース及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカーの量を測定し、そして、測定されたNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量に対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、前記対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットと

を含む装置。

【請求項 1 3】

前記データベースが、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量を更に含む、請求項 1 1 記載の装置。

【請求項 1 4】

NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤と、前記方法を実行するための指示書とを含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項記載の方法の実行に適応したキット。

【請求項 1 5】

NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤の組合せを更に含む、請求項 1 4 記載のキット。

【請求項 1 6】

急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端 (NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質 (CRP) の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

を含む方法。

【請求項 1 7】

具体的には文書化された最近の急性冠症候群 (ACS)、より具体的には急性期後冠症候群 (ACS)、最も具体的には最近のACSを経験した、安定なCHDに罹患している被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端 (NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質 (CRP) の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP

10

20

30

40

50

、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

からなる方法。

【請求項 18】

前記心血管イベントが、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞（MI）、虚血由来の非致死性脳卒中、不安定狭心症の入院加療、及び冠血行再建、及び心停止から選択される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

前記検出が、インビトロで前記サンプルを検出剤の組合せと接触させることを含み、各剤が、バイオマーカーのうちの 1 つに対して特異的結合親和性を有する、請求項 17 又は 18 記載の方法。

10

【請求項 20】

前記剤が、抗体又はその断片である、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記サンプルが、血清又は血液のサンプルである、請求項 17 ~ 20 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

前記サンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の中央値よりも多い場合、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高いと同定される、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 23】

前記サンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の中央値よりも少ない場合、前記被験体が、その後の心血管イベントのリスクが低いと同定される、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 24】

前記サンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の第四四分位範囲内である場合、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定される、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 25】

前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するための療法を推奨する工程を更に含む、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するために薬剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 27】

前記療法が、研究用新薬療法を含む、請求項 25 又は 26 記載の方法。

【請求項 28】

請求項 17 ~ 26 のいずれか一項記載の方法の実行に適応した装置であって、

a) NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPに特異的に結合する検出剤の組合せからなる分析ユニットであって、インビトロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；

b) データベース及びコンピュータによって実施される前記データベースにおけるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプ

50

ル中のバイオマーカーの量を測定し、そして、測定されたNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、前記対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットと

を含む装置。

【請求項 29】

前記データベースが、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量を更に含む、請求項 28 記載の装置。

【請求項 30】

NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤と、前記方法を実行するための指示書とを含む、請求項 17 ~ 27 のいずれか一項記載の方法の実行に適応したキット。

【請求項 31】

NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤の組合せを更に含む、請求項 30 記載のキット。

【請求項 32】

急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端 (NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質 (CRP) の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

からなる方法。

【請求項 33】

前記基準量が、CRPについては 1.51 mg/L 、ホモシステインについては $12.16 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 、そして、NT-proBNPについては 263 pg/mL である、請求項 1 ~ 11、16 ~ 27、又は 32 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

本明細書に記載される発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、冠状動脈性心疾患 (CHD) 後、具体的には急性冠症候群 (ACS)、より具体的には最近のACS後に、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞、虚血性脳卒中、不安定狭心症の反復入院加療、冠血行再建、又は心停止等の心血管イベントを経験するリスクが高まりやすい集団を同定することに関する。

【0002】

これら心血管リスク因子の積極的薬理的処置を通じて低密度リボタンパク質 (LDL) コレステロール、血圧、及び血糖の目標を達成したにもかかわらず、急性冠症候群を経験した患者は、冠状動脈性心疾患に起因する死、非致死性心筋梗塞、虚血性脳卒中、不安定狭心症の反復入院加療、又は心停止等の二次性心血管イベントに罹患するリスクが依然として高い。心血管リスク因子の最適な療法にもかかわらず残存するリスクを「残存心血管リスク」と呼ぶ。スタチンをスタチン無しと比較した 14 個の無作為化試験における心血管疾患 (CVD) を有する約 29,000 人の患者を含むメタ分析では、処置された患者の

10

20

30

40

50

21.2パーセントが、5年間のフォローアップ中に主な心血管イベントを経験した (Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90056 patients in 14 randomized trials of statins. The Lancet 2005; 366: 1267-1278.)。米国だけで毎年ACSの一次又は二次診断を受けて病院から退院する患者1億1400万人において、残存リスクの診断及び処置の両方を含むACS後ケアを改善する、未だ満たされていない医療上の必要性が高い (Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A report from the American Heart Association. Circulation 2014; 129: e28-e292.)。

【0003】

残存リスクの高い患者の同定は、臨床的な患者のモニタリング通院並びに未来の診断的及び処置的介入のタイミング及び量を個々に調整するために必須である。病院への入院時にACSを有する患者の緊急時に適用するために、HEART、TIMI、又はGRACE等の公開されているリスクスコアが開発された。これらは、それぞれ、6ヶ月間死亡リスク (GRACE)、24時間～6週間以内の二次性心血管イベントのリスク (HEART、TIMI) についての情報を提供する (GRACE: Fox, KAA, et al. BMJ 2006; 333: 1091-1094.; HEART: Backus, BE, et al. Int J Cardio 2013; 168: 2153-2158.; TIMI: Wiviott, SD, et al. J Am Coll Cardiol 2006; 47: 1553-1558.)。しかし、これらスコアは、最近ACSを経験した、二次性心血管イベントを予防するための最適な療法下で安定している患者における個々の残存リスクを予測するには設計されていなかったため、この患者集団における適用では役に立たない。リスク層別化のための臨床的に適用可能なツールが存在しないので、国内及び国際的な指針では、アセチルサリチル酸 (ASA)、スタチン、βブロッカー、及びアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤 / アンギオテンシン受容体ブロッカー (適用可能な場合) によって、ACS後の患者における心血管リスク因子を積極的に処置することが推奨された。臨床的モニタリングの頻度及びタイミングに関する指針は存在しない。更に、それぞれ、ストレス試験手順、侵襲的診断手順、例えば、冠動脈造影法の頻度及びタイミングは明らかではないが、根底にある疾患の進行の早期検出によって、アウトカムに対して後に有益な効果を有する早期処置が可能になるであろう。

【0004】

したがって、急性冠症候群後の二次性心血管イベントのリスクが高い患者を同定することができる簡便な臨床的ツールは、未だ満たされていない医療上の必要性が高い。

【0005】

本開示は、具体的には文書化された最近の急性冠症候群 (ACS)、より具体的には急性期後冠症候群 (ACS) (post Acute Coronary Syndrome)、最も具体的には最近のACSを経験した、安定な冠動脈性心疾患 (CHD) に罹患している被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法を提供する。

【0006】

本開示は、急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法を提供する。

【0007】

本開示は、急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、別の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法を提供する。

【0008】

本発明の1つの態様は、具体的には文書化された最近の急性冠症候群 (ACS)、より具体的には急性期後冠症候群 (ACS)、最も具体的には最近のACSを経験した、安定な冠動脈性心疾患 (CHD) に罹患している被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端 (NT-pro

10

20

30

40

50

BNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

を含む方法を提供する。

【0009】

本発明の第2の態様は、具体的には文書化された最近の急性冠症候群(ACS)、より具体的には急性期後冠症候群(ACS)、最も具体的には最近のACSを経験した、安定な冠状動脈性心疾患(CHD)に罹患している被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

10

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

20

からなる方法を提供する。

【0010】

本発明の他の態様は、最近のACSに罹患している被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、

30

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

を含む方法を提供する。

【0011】

本発明の他の態様は、最近のACSに罹患している被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

40

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

からなる方法を提供する。

【0012】

本発明の他の態様は、急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-pro

50

BNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

を含む方法を提供する。

【0013】

本発明の他の態様は、急性冠症候群後、より具体的には最近の急性冠症候群後、被験体を、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

からなる方法を提供する。

【0014】

本発明の他の態様は、最近の急性冠症候群後、被験体を二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定することを含む方法を提供する。

【0015】

本発明の他の態様は、最近の急性冠症候群後、被験体を二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定する方法であって、

a) 被験体のサンプル中のプロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端(NT-proBNP)、ホモシステイン、及びC反応性タンパク質(CRP)の量を検出すること、

b) 前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較すること、並びに

c) 前記サンプル中の前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、前記被験体を二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定すること

とからなる方法を提供する。

【0016】

特定の実施態様では、本発明は、前記心血管イベントが、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞(MI)、虚血由来の非致死性脳卒中、不安定狭心症の入院加療、冠血行再建、及び心停止から選択される、本明細書に記載の方法を提供する。

【0017】

上記態様の特定の実施態様では、前記検出は、インビトロで前記サンプルを検出剤の組合せと接触させることを含み、各剤は、バイオマーカーのうちの1つに対して特異的結合親和性を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

上記態様の特定の実施態様では、前記剤は、抗体又はその断片である。

【 0 0 1 9 】

上記態様の特定の実施態様では、前記サンプルは、血液、血漿、血清、又は尿、より具体的には、血液、血漿、又は血清、最も具体的には、血液である。

【 0 0 2 0 】

上記態様の特定の実施態様では、前記サンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の中央値よりも多い場合、前記被験体は、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっている、具体的にはリスクが低い（3．6％未満）又は高い（7．7％超）、より具体的には（7．7％超）リスクが高いと同定される。

10

【 0 0 2 1 】

上記態様の特定の実施態様では、前記サンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、これらのそれぞれの基準量の第四四分位範囲内である場合、前記被験体は、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定される。

【 0 0 2 2 】

上記態様の特定の実施態様では、前記方法は、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するための療法を推奨する工程を更に含む。

20

【 0 0 2 3 】

上記態様のより具体的な実施態様では、前記方法は、前記被験体が二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するための療法を推奨する工程を更に含む。

【 0 0 2 4 】

上記態様の特定の実施態様では、前記方法は、前記被験体が、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、特に二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するために前記被験体に薬剤を投与する工程を更に含む。

【 0 0 2 5 】

上記態様のより具体的な実施態様では、前記方法は、前記被験体が二次性心血管イベントのリスクが高まっていると同定された場合、心血管疾患を処置するために前記被験体に薬剤を投与する工程を更に含む。

30

【 0 0 2 6 】

上記態様の特定の実施態様では、前記療方は、研究用新薬療法を含む。

【 0 0 2 7 】

別の実施態様では、本願は、上記方法の実行に適応した装置であって、

a) NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPに特異的に結合する検出剤の組合せを含む分析ユニットであって、インピットロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；

b) データベース及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカーの量を測定し、そして、測定されたNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量を対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、前記対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットとを含む装置を開示する。

40

【 0 0 2 8 】

50

別の実施態様では、本願は、上記方法の実行に適応した装置であって、

a) NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPに特異的に結合する検出剤の組合せを含む分析ユニットであって、インビトロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；

b) データベース及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカの量を測定し、そして、測定されたNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量に対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの量が、前記対応するNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量よりも多い場合、心血管イベント、具体的には他の心血管イベント、より具体的には二次性心血管イベントのリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットと

からなる装置を開示する。

【0029】

本明細書に定義する装置の特定の実施態様では、前記データベースは、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPの基準量を更に含む。

【0030】

別の実施態様では、本願は、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤と、前記方法を実行するための指示書とを含む、本明細書に記載の方法の実行に適応したキットを開示する。

【0031】

具体的な実施態様では、本明細書に記載のキットは、NT-proBNP、ホモシステイン、及びCRP用の検出剤の組合せを更に含む。

【0032】

上記態様の特定の実施態様では、前記検出は、インビトロで前記サンプルを検出剤の組合せと接触させることを含み、各剤は、バイオマーカのうちの1つに対して特異的結合親和性を有する。特定の実施態様では、前記剤は、抗体又はその断片である。上記態様の特定の実施態様では、前記サンプルは、血清又は血液のサンプルである。

【0033】

上記態様の特定の実施態様では、前記サンプル中のバイオマーカの量が基準量の中央値よりも多い場合、前記被験体は、疾患進行のリスクが高まっていると同定される。上記態様の特定の実施態様では、前記サンプル中のバイオマーカの量が基準量の第四四分位範囲内である場合、前記被験体は、疾患進行のリスクが高まっていると同定される。

【0034】

本発明の別の態様は、前述の方法の実行に適応した装置であって、a) バイオマーカに特異的に結合する検出剤の組合せを含む分析ユニットであって、インビトロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；b) データベース及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカの量を測定し、そして、測定されたバイオマーカの量をバイオマーカの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記バイオマーカの量が前記バイオマーカの基準量よりも多い場合、疾患進行のリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットとを含む装置を提供する。1つの実施態様では、前記データベースは、バイオマーカの基準量を更に含む。

【0035】

本発明の別の態様は、前述の方法の実行に適応した装置であって、a) バイオマーカに特異的に結合する検出剤の組合せを含む分析ユニットであって、インビトロで被験体由来のサンプルを前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；b) データベース

及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカの量を測定し、そして、測定されたバイオマーカの量をバイオマーカの基準量と比較し、そして、測定工程において測定された前記バイオマーカの量が前記バイオマーカの基準量よりも多い場合、疾患進行のリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットとからなる装置を提供する。1つの実施態様では、前記データベースは、バイオマーカの基準量を更に含む。

【0036】

本発明の別の態様は、前述の方法の実行に適応したキットであって、前記バイオマーカ用の検出剤と、前記方法を実行するための指示書とを含むキットを提供する。1つの実施態様では、前記キットは、前記バイオマーカ用の検出剤の組合せを更に含む。

10

【0037】

用語「プロホルモン脳性ナトリウム利尿ペプチドのN末端」又は「NT-proBNP」とは、配列番号1 (Swiss Protアクセッション番号NP_002512.1、Gene ID NCB1 4879)、国際公開公報第02/089657号、同第02/083913号、欧州特許第0648228号によって例示されるアミノ末端proBNPを指す。「NT-proBNP」は、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質に加えて、その変異体、ホモログ、及びアイソフォームを包含する。このような変異体、ホモログ、及びアイソフォームは、特定のNT-proBNPと同一の必須の生物学的及び免疫学的特性を少なくとも有する。例えば、これらは、本明細書において言及される同一の特異的アッセイ、例えば、NT-proBNPポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いるELISAアッセイによって検出可能である場合、同一の必須の生物学的及び免疫学的特性を共有している。例示的なアッセイは、添付の実施例に記載する。上に言及した変異体は、アレル変異体であってもよく、又は任意の他の種の特定のホモログ、パラログ、若しくはオルソログであってもよい。更に、本明細書において言及する変異体は、これら断片が上に言及した必須の免疫学的及び生物学的特性を有する限り、特定のNT-proBNPポリペプチド又は前述の種類の変異体の断片を含む。このような断片は、例えば、NT-proBNPポリペプチドの分解産物であってよい。更に、リン酸化又はミリスチル化等の翻訳後修飾に起因して異なる変異体も含まれる。

20

30

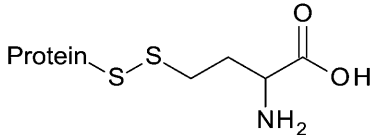
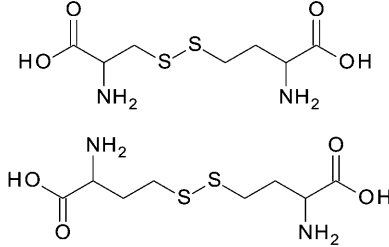
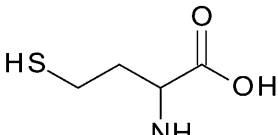
【0038】

用語「ホモシステイン」は、食物タンパク質由来のメチオニンの代謝によって細胞内で生成される。細胞内濃度は、血漿への流出によって維持され、そこで、急速に酸化され、そして、3つの形態のうちの1つとして循環する(表1)。臨床検査室で最も頻繁に測定されるパラメータは、3つの形態全てを合わせた合計であり、これは「合計ホモシステイン」と呼ばれる。本発明によれば、「合計ホモシステイン」及び「ホモシステイン」は、互換的であると理解すべきである。本発明に従って測定される実際のホモシステインレベルは、表1による合計ホモシステインレベルである。

【0039】

【表 1】

表 1：循環内に存在するホモシステインの 3 つの形態

	タンパク質－ホモシステイン 混合（mixed）ジスルフィド	ホモシステイン－システイン 混合ジスルフィド	ホモシステイン
構造			
全体のうちの比率	70-90%	8-19%	< 2%
用語	タンパク質が結合している	タンパク質が結合していない（遊離）	
	合計ホモシステイン		

参考文献：Cobas（登録商標）についての ROChe ホモシステイン酵素アッセイの添付文書、Roche Diagnostics International Ltd

【 0 0 4 0 】

用語「C 反応性タンパク質」又は「CRP」とは、配列番号 2 (Swiss Prot アクセション番号 NP_000558) によって例示される 1 番染色体上にみられる環状五量体タンパク質を指す。本発明によれば、CRP の濃度を決定するために高感度 CRP (hs-CRP) を用いることが推奨される。hs-CRP 試験は、レーザーネフェロメトリーを用いて低レベルの CRP を測定する。このような方法を使用する利点は、速度及び高感度である。

【 0 0 4 1 】

用語「心血管イベントを経験するリスクが高まっている」とは、本明細書で使用する時、本開示の方法によって分析される被験体が、心血管イベントを経験するリスクが低い（すなわち、上昇していない）集団の被験体の群、又はリスクが著しく上昇している被験体の群（高リスク群）のいずれかに割り当てられることを意味する。リスクが高まっているとは、本開示に従って言及されるとき、所定の予測時間枠内に心血管イベントを経験するリスクが、被験体の集団における疾患進行の平均リスクに対して、被験体について著しく上昇していることを意味する。

【 0 0 4 2 】

用語「アプタマー」とは、RNA、DNA、及び RNA / DNA の分子を含むオリゴヌクレオチド、又はペプチド分子を指し、これらは、所望の生物活性を示し、特に、対応する標的分子に結合する。

【 0 0 4 3 】

用語「サンプル」とは、体液のサンプル、分離細胞のサンプル、又は組織若しくは器官由来のサンプルを指す。体液のサンプルは、周知の技術によって得ることができ、そして、血液、血漿、血清、尿、リンパ液、痰、腹水、気管支肺胞洗浄液、若しくは任意の他の

体分泌液、又はこれらの誘導体のサンプルを含む。組織又は器官のサンプルは、例えば、生検によって、任意の組織又は器官から得ることができる。分離細胞は、遠心分離又は細胞選別等の分離技術によって体液又は組織若しくは器官から得ることができる。例えば、細胞、組織、又は器官のサンプルは、バイオマーカーを発現又は産生する細胞、組織、又は器官から得ることができる。サンプルは、凍結、新鮮、固定（例えば、ホルマリン固定）、遠心分離、及び／又は包埋（例えば、パラフィン包埋）等されてもよい。細胞サンプルは、無論、サンプル中のマーカーの量を評価する前に、様々な周知の採取後調製及び保存技術（例えば、核酸及び／又はタンパク質の抽出、固定、保存、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離等）に供してよい。同様に、生検材料も、採取後調製及び保存技術、例えば、固定に供してよい。具体的には、サンプルは、血液、血漿、血清、又は尿、より具体的には、血液、血漿、又は血清のサンプル由来の体液のサンプルを指す。

10

【0044】

用語「診断」又は「同定」又は「評価」とは、本明細書で使用する時、「残存心血管リスク」又は別の心血管イベントを経験するリスクが、心血管イベント、より具体的には、最近の心血管イベント後の被験体において高まっているか否かを予測することを意味する。当業者であれば理解する通り、このような予測は、通常、診断される被験体の100%について正確であることを意図するものではない。しかし、この用語は、疾患進行のリスクが高まっているか否かの予測が、被験体の統計的に有意な部分（例えば、コホート研究におけるコホート）について正確である必要がある。ある部分が統計的に有意であるか否かは、様々な周知の統計評価ツール、例えば、信頼区間の決定、p値の決定、スチューデントt検定、マンホイットニー検定等を用いて当業者による更なる労力を必要とすることなく決定することができる。詳細は、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983にみられる。信頼区間の例は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%である。p値は、0.1、0.05、0.01、0.005、又は0.0001を含む。

20

【0045】

語句「診断／評価を下す」とは、本明細書で使用する時、患者における「残存心血管リスク」又は別の心血管イベントを経験するリスクを診断／評価するために患者のサンプル中のバイオマーカーのレベル又は存在に関連して作成された情報又はデータを使用することを指す。該情報又はデータは、文書、口頭、又は電子の任意の形態であってよい。幾つかの実施態様では、作成された情報又はデータの使用は、連絡、提示、報告、保存、送信、転送、供給、伝達、分配、又はこれらの組合せを含む。幾つかの実施態様では、連絡、提示、報告、保存、送信、転送、供給、伝達、分配、又はこれらの組合せは、演算装置、分析ユニット、又はこれらの組合せによって実施される。幾つかの更なる実施態様では、連絡、提示、報告、保存、送信、転送、供給、伝達、分配、又はこれらの組合せは、検査技師又は医師によって実施される。幾つかの実施態様では、該情報又はデータは、バイオマーカーのレベルと基準レベルとの比較を含む。幾つかの実施態様では、該情報又はデータは、サンプル中のバイオマーカーの有無を示すことを含む。幾つかの実施態様では、該情報又はデータは、患者が「残存心血管リスク」又は別の心血管イベントを経験するリスクが高まっていると診断／評価されたことを示すことを含む。

30

40

【0046】

バイオマーカーであるペプチド又はポリペプチドの量を「検出する」という用語は、本明細書で使用する時、例えば、量又は濃度を半定量的に又は定量的に測定することを指す。測定は、直接又は間接的に、より具体的には間接的に行ってよい。直接測定は、該ペプチド又はポリペプチド自体から得られ、そして、その強度がサンプル中に存在するペプチドの分子数と直接相関するシグナルに基づいて該ペプチド又はポリペプチドの量又は濃度を測定することに関する。このようなシグナル（時に、本明細書では強度シグナルと呼ばれる）は、例えば、該ペプチド又はポリペプチドの特定の物理的又は化学的特性の強度値を測定することによって得ることができる。間接測定は、二次成分（すなわち、ペプチド又はポリペプチド自体ではない成分）又は生物学的読み出しシステム、例えば、測定可

50

能な細胞応答、リガンド、標識、又は酵素反応生成物から得られるシグナルの測定を含む。

【0047】

用語「被験体」とは、本明細書で使用する時、動物、例えば、哺乳類（例えば、ヒト）に関する。本開示に係る被験体は、本明細書の他の箇所に記載する心血管疾患、安定心血管疾患、又は急性冠症候群に罹患しているものとする。

【0048】

「心血管イベント」とは、本明細書で使用する時、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞（M I）、虚血由来の非致死性脳卒中、不安定狭心症の入院加療、及び冠血行再建を指す。

10

【0049】

用語「比較」とは、本明細書で使用する時、個体又は患者由来のサンプル中のバイオマーカーのレベルを、この明細書の他の箇所で指定するバイオマーカーの基準レベルと比較することを指す。本明細書で使用する時、比較とは、通常、対応するパラメータ又は値の比較を指すと理解すべきであり、例えば、濃度を基準濃度と比較すると同時に絶対量を絶対基準量と比較するか、又はサンプル中のバイオマーカーから得られる強度シグナルを基準サンプルから得られる同種の強度シグナルと比較する。比較は、手動で行ってもよく、コンピュータを使用して行ってもよい。したがって、比較は、（例えば、本明細書に開示するシステムの）演算装置によって実行してよい。個体又は患者由来のサンプル中のバイオマーカーの測定又は検出されたレベルの値と基準レベルとを、例えば、互いに比較してよく、そして、前記比較は、前記比較のためのアルゴリズムを実行するコンピュータプログラムによって自動的に実行してよい。前記評価を実行するコンピュータプログラムは、好適な出力フォーマットで所望の評価を下す。コンピュータを使用する比較の場合、決定された量の値を、コンピュータプログラムによってデータベースに保存された好適な基準に対応する値と比較してよい。コンピュータプログラムは、更に、比較の結果を評価することができ、すなわち、好適な出力フォーマットで所望の評価を自動的に下すことができる。コンピュータを使用する比較の場合、決定された量の値を、コンピュータプログラムによってデータベースに保存された好適な基準に対応する値と比較してよい。コンピュータプログラムは、更に、比較の結果を評価することができ、すなわち、好適な出力フォーマットで所望の評価を自動的に下す。

20

30

【0050】

用語「基準量」とは、本明細書で使用する時、心血管疾患に罹患している被験体の心血管イベントのリスクが高まっているか否かを評価することを可能にする量を指す。基準は、例えば、任意の心血管イベントに罹患したことがない母集団由来の被験体のプールに由来し得る。更に、基準量は、閾値の量又は範囲を規定することができ、それによって、基準の種類に依存して、閾値に対する決定された量の変化が、疾患進行のリスクが高まっているか又は通常のリスクであるかの指標となる。あるいは、本質的に同一の量は、好適な基準量を用いた場合、同様に、疾患進行のリスクが高まっているか又は通常のリスクであるかの指標となり得る。個々の被験体に適用可能な基準量は、例えば、年齢、性別、又は亜集団等の様々な生理学的パラメータに加えて、本明細書において言及するポリペプチド又はペプチドを測定するために用いられる手段に依存して変動し得る。好適な基準量は、試験サンプルと一緒に、すなわち、同時に又は試験サンプル後に分析される基準サンプルから決定され得る。

40

【0051】

用語「結合剤」とは、対応する標的バイオマーカー分子に特異的に結合する結合部分を含む分子を指す。「結合剤」の例は、核酸プローブ、核酸プライマー、DNA分子、RNA分子、アプタマー、抗体、抗体断片、ペプチド、ペプチド核酸（PNA）、又は化学化合物である。

【0052】

用語「プローブ」又は「核酸プローブ」とは、標的核酸分子（例えば、ゲノム標的核酸

50

分子)とハイブリダイズすることができ、そして、標的にハイブリダイズしたときに、直接又は間接的に検出することができる核酸分子を指す。したがって、プローブによって、標的核酸分子の検出、そして、一部の例では定量が可能になる。特定の例では、プローブは、複数の核酸分子を含み、これは、標的核酸分子に由来する結合領域を含むので、標的核酸分子の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができる。プローブは、「標識された核酸プローブ」と呼ばれることもあり、これは、プローブが、該プローブを検出可能にする検出可能な部分、すなわち「標識」に直接又は間接的に結合していることを示す。

【0053】

用語「プライマー」又は「核酸プライマー」とは、一般的に遊離3'-OH基を有する、短い単鎖ポリヌクレオチドを指し、これは、標的配列にハイブリダイズすることによって対象となるサンプル中に存在する可能性のある標的分子に結合し、その後、該標的に相補的なポリヌクレオチドの重合を促進する。

10

【0054】

用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」とは、他の分子にはそれほど結合しない条件下で結合対分子が互いに対して結合を示す結合反応を指す。

【0055】

用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」とは、結合剤としてタンパク質又はペプチドに言及するとき、結合剤が少なくとも10-7Mの親和性で、対応する標的分子に結合する結合反応を指す。用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」とは、好ましくは、その標的分子について、少なくとも10-8M、又は更にはより好ましくは少なくとも10-9Mの親和性を指す。用語「特異的」又は「特異的に」は、サンプル中に存在する他の分子が、標的分子に対して特異的な結合剤にはそれほど結合しないことを示すために用いられる。好ましくは、標的分子以外の分子に対する結合のレベルでは、標的分子に対する親和性は、わずか10%以下、より好ましくはわずか5%以下である結合親和性になる。

20

【0056】

用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」とは、結合剤として核酸に言及するとき、結合剤又はプローブが、対象となる標的配列に対して正確に又は実質的に相補的なハイブリダイゼーション領域を含有するハイブリダイゼーション反応を指す。十分にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で結合剤又はプローブを用いて実行されるハイブリダイゼーションアッセイによって、特異的標的配列の選択的検出が可能になる。ハイブリダイズ領域は、好ましくは、約10~約35ヌクレオチド長、より好ましくは約15~約35ヌクレオチド長である。ハイブリダイゼーションの安定性に影響を与える修飾塩基又は塩基アナログの使用(これは、当技術分野において周知である)によって、同等の安定性を有するより短い又はより長いプローブを使用することが可能になり得る。結合剤又はプローブは、全体がハイブリダイズ領域からなってもよく、又はプローブの検出若しくは固定化を可能にするが、ハイブリダイズ領域のハイブリダイゼーション特性はそれほど変化させない追加の機構を含有していてもよい。

30

【0057】

用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」とは、結合剤として核酸アプタマーに言及するとき、核酸アプタマーが低いnM~pMの範囲の親和性で対応する標的分子に結合する結合反応を指す。

40

【0058】

用語「抗体」とは、本明細書では最も広い意味で用いられ、そして、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体(例えば、二重特異的抗体)、及び抗体断片を含むがこれらに限定されない様々な抗体構造を包含する。

【0059】

用語「最近」とは、本明細書で使用するとき、過去6ヶ月間、より具体的には3ヶ月間

50

以内に生じた事象を指す。例えば、本発明に係る「最近」では、最近の事象は、過去３ヶ月間に生じた事象である。

【００６０】

用語「量」とは、本明細書で使用する時、ポリペプチド又はペプチドの絶対量、該ポリペプチド又はペプチドの相対量又は濃度に加えて、これらに相関するか又はこれらから導くことができる任意の値又はパラメータを包含する。このような値又はパラメータは、直接測定、例えば、質量スペクトル又はNMRスペクトルの強度値によって前記ペプチドから得られる全ての特定の物理的又は化学的特性からの強度シグナル値を含む。更に、本明細書の他の箇所に指定する間接測定によって得られる全ての値又はパラメータ、例えば、ペプチドに応答する生物学的読み出しシステムから決定される応答レベル、又は特異的に結合したリガンドから得られる強度シグナルも包含される。全ての標準的な数学的手法によって、前述の量又はパラメータと相関する値を得ることもできることを理解すべきである。

10

【００６１】

用語「装置」とは、本明細書で使用する時、本開示の方法に係る診断を可能にするために互いに動作可能に連結された前述のユニットを含むシステムに関する。分析ユニットに用いることができる検出剤の例については、本明細書の他の箇所に開示する。分析ユニットは、その量を決定するバイオマーカーを含むサンプルに接触させる固体支持体上に固定化された形態の前記検出剤を含んでいてよい。更に、分析ユニットは、バイオマーカーに特異的に結合している検出剤の量を決定する検出器も含んでいてよい。決定された量は、評価ユニットに伝達してよい。前記評価ユニットは、決定された量と好適な基準との比較を実行するために実行されるアルゴリズムを有する、コンピュータ等のデータ処理エレメントを含む。

20

【００６２】

用語「キット」とは、本明細書で使用する時、別々に又は単一の容器内に提供され得る前述の成分の集合体を指す。容器は、本開示の方法を実行するための指示書も含む。これら指示書は、マニュアルの形態であってもよく、又は本開示の方法において、そして、コンピュータ若しくはデータ処理装置において実行されたときに適宜診断を確立するために参照される比較を実行することができるコンピュータプログラムコードによって提供されてもよい。該コンピュータプログラムコードは、データ記憶媒体若しくは装置、例えば、光学記憶媒体（例えば、コンパクトディスク）に、又はコンピュータ若しくはデータ処理装置に直接提供され得る。

30

【００６３】

臨床リスク予測モデルには、個々の患者についての有害事象のリスクを予知するための複数の変数が組み込まれる。年齢、脈拍数（PBM）、LDLコレステロールレベル、動脈性高血圧、糖尿病、末梢血管疾患、うっ血性心不全、急性冠症候群の既往、血行再建の既往、脳卒中の既往、冠状動脈性心疾患、利尿剤による処置は、急性冠症候群の強力なリスク要因である。本明細書に記載するバイオマーカーアプローチは、心血管イベントの病因に関与する様々な経路を反映し、そして、二次性心血管イベントの予測を与える。このアプローチの使用及び実行は、新規処置から恩恵を受けるであろうCHD、特に、急性冠症候群の集団のセグメントを同定するために用いることができる。本明細書に記載するバイオマーカー及び方法の臨床使用は、どの患者が異なる処置を必要とし得るかを同定するのに有用であり、そして、進行のリスクが最も低い患者において追加の処置選択肢が避けられる。更に、本発明は、リスクを有する集団のよりよい診断にとって有益であり得る。また、本開示の実施態様は、前述の方法を実行するための診断装置及びキットも包含する。

40

【００６４】

本開示の１つの態様は、急性冠症候群又は最近の心血管イベントに罹患している被験体の心血管イベントを経験するリスクが高まっているか否かを診断する方法に関する。１つの実施態様では、該方法は、該被験体のサンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPバイオマーカーの量を検出し、そして、該量を基準と比較することを含む。特に、該方

50

法は、該被験体のサンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPバイオマーカの量を検出し、そして、該量を基準と比較することからなる。前記被験体は、サンプル中のバイオマーカの量がそれぞれのバイオマーカの基準量よりも多い場合、心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定される。より具体的な実施態様では、基準量は、CRPについて1.51 mg/L、ホモシステインについては12.16 µmol/L、NT-proBNPについては263 pg/mLである。

【0065】

本開示の別の態様は、急性期後冠症候群に罹患している被験体が、心血管疾患、特に、急性冠症候群の処置の過程に心血管イベントのリスクが高まっているか否かをモニタリングする方法に関する。1つの実施態様では、該方法は、該被験体のサンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPバイオマーカの量を検出し、そして、該量を基準と比較することを含む。特に、該方法は、該被験体のサンプル中のNT-proBNP、ホモシステイン、及びCRPバイオマーカの量を検出し、そして、該量を基準と比較することからなる。該被験体は、該サンプル中の該バイオマーカの量が該バイオマーカの基準量よりも多い場合、心血管イベントのリスクが高まっていると同定される。1つの実施態様では、前記基準は、心血管疾患、特に、急性冠症候群に罹患していない被験体のサンプルから得られる。別の実施態様では、前記基準は、心血管疾患、特に、急性冠症候群の新たな追加の処置を開始する前に被験体から採取されたサンプル、又は新たな追加の処置過程のある時点で被験体から採取されたサンプルである。この方法の結果に基づいて該処置を変更してもよい。例えば、該基準と比較したときに該被験体が該バイオマーカの量の減少を示す場合、該処置を継続してよい。逆に、該基準と比較したときに該被験体が該バイオマーカの量の増加を示す場合、該処置を別の処置に代えてよい。

【0066】

上に及び本明細書に与える方法の実行に適応した装置に関する本発明の別の態様を提供する。前記装置の例示的な実施態様は、a) 本発明のバイオマーカに特異的に結合する検出剤を含む分析ユニットであって、インピットで被験体由来のサンプルの一部を前記検出剤と接触させるのに適応した分析ユニットと；b) データベース及び前記データベースにおけるコンピュータによって実施されるアルゴリズムを有する演算装置を含む評価ユニットであって、前記コンピュータによって実施されるアルゴリズムが、前記演算装置によって実行されたとき、前記被験体由来のサンプル中のバイオマーカの量を測定し、そして、測定されたバイオマーカの量をバイオマーカの基準量と比較し、そして、前記測定工程において測定された前記バイオマーカの量が前記バイオマーカの基準量よりも多い場合、疾患進行のリスクが高まっているという診断を下す評価ユニットとを含む。幾つかの実施態様によれば、前記データベースは、バイオマーカの基準量を更に含む。

【0067】

本発明の別の態様は、本開示の上の開示した方法の実行に適応したキットであって、前記バイオマーカ用の検出剤に加えて、前記方法を実行するための指示書を含むキットを提供する。1つの実施態様では、前記キットは、急性冠症候群、特に、最近の心血管イベントに罹患している被験体が他の心血管イベント、特に、二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっているか否かを診断するためのものである。

【0068】

1つの実施態様では、バイオマーカの基準量と比較したときに試験サンプル中で測定された3つのバイオマーカの量が増加していることは、他の心血管イベント、特に、二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっている被験体の指標である。

【0069】

1つの実施態様では、バイオマーカの基準量と比較したときに試験サンプル中で測定された臨床バイオマーカを含む全てのバイオマーカの量が増加していることは、他の心血管イベント、特に、二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっている被験体の指標である。

【0070】

10

20

30

40

50

1つの実施態様では、前記被験体は、試験サンプル中で測定されたバイオマーカーの量が基準量よりも多い場合、他の心血管イベント、特に、二次性心血管イベントを経験するリスクが高まっていると同定される。1つの実施態様では、前記基準量は、心血管疾患、特に、急性冠症候群に罹患していない被験体のコホートに由来する中央量である。

【0071】

バイオマーカーを検出する方法

タンパク質又は核酸を含むバイオマーカーは、当技術分野において一般的に知られている方法を用いて検出することができる。検出方法は、一般的に、サンプル中のバイオマーカーのレベルを定量する方法（定量的方法）、又はバイオマーカーがサンプル中に存在するか否かを決定する方法（定性的方法）を包含する。以下の方法がバイオマーカーの定性的及び/又は定量的な検出に好適であることは、当業者に一般的に知られている。サンプルは、例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光ベースのイムノアッセイ等のウエスタン及びイムノアッセイを用いてタンパク質について、並びにノーザン、ドットプロット、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、アレイハイブリダイゼーション、RNase保護アッセイを用いて、又はDNAマイクロアレイスナップショットを含む市販されているDNA SNPチップマイクロアレイを用いて、対象となる遺伝子バイオマーカー由来のmRNA又はDNAについて簡便にアッセイすることができる。バイオマーカーを検出するための更なる好適な方法は、その正確な分子質量又はNMRスペクトル等、ペプチド又はポリペプチドに特異的な物理的又は化学的特性を測定することを含む。前記方法は、例えば、バイオセンサ、イムノアッセイに連結された光学装置、バイオチップ、分析装置、例えば、質量分析計、NMR分析機、又はクロマトグラフィー装置を含む。更に、方法は、マイクロプレートELISAベースの方法、完全自動又はロボットイムノアッセイ（例えば、Elecsys（商標）分析機で利用可能）、CBA（酵素コバルト結合アッセイ、例えば、Roche-Hitachi（商標）分析機で利用可能）、及びラテックス凝集アッセイ（例えば、Roche-Hitachi（商標）分析機で利用可能）を含む。

【0072】

バイオマーカータンパク質の検出については、例えば、アッセイフォーマットを使用する広範なイムノアッセイ技術が利用可能である。例えば、米国特許第4,016,043号、同第4,424,279号、及び同第4,018,653号を参照。これらは、非競合タイプの単一部位及び二部位、すなわち、サンドイッチアッセイに加えて、従来の競合結合アッセイも含む。また、これらアッセイは、標的バイオマーカーに標識抗体を直接結合させることを含む。

【0073】

サンドイッチアッセイは、最も有用であり、そして、一般的に用いられているイムノアッセイである。

【0074】

電気化学発光現象を測定する方法は、周知である。このような方法は、酸化を用いて、そこから基底状態に減衰する励起状態を達成して、電気化学発光を放出する特殊な金属錯体の能力を利用する。概説については、Richter, M.M., Chem. Rev. 104 (2004) 3003-3036を参照されたい。

【0075】

また、バイオマーカーは、磁気共鳴分光法（NMR分光法）、ガスクロマトグラフィー-質量分析（GC-MS）、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）、高及び超HPLC HP LC、例えば、逆相HPLC、例えば、二重UV波長検出を含むイオン対合HPLC、レーザー誘起蛍光検出を含むキャピラリー電気泳動、アニオン交換クロマトグラフィー及び蛍光検出、薄層クロマトグラフィーを含む、一般的に公知の方法によって検出することができる。

【0076】

本開示によれば、バイオマーカーであるペプチド又はポリペプチドの量の検出は、サンプル中のペプチドの量を測定するための全ての公知の手段によって達成することができる。このような手段の例は、様々なサンドイッチ、競合、又は他のアッセイフォーマットに

において標識分子を使用することができるイムノアッセイ装置及び方法を含む。これらアッセイは、ペプチド又はポリペプチドの有無の指標となるシグナルを発現する。更に、シグナル強度は、サンプル中に存在するポリペプチドの量に直接又は間接的に（例えば、逆比例）関連し得る。更なる好適な方法は、その正確な分子質量又はNMRスペクトル等、ペプチド又はポリペプチドに特異的な物理的又は化学的特性を測定することを含む。これら方法は、バイオセンサ、イムノアッセイに連結された光学装置、バイオチップ、分析装置、例えば、質量分析計、NMR分析機、又はクロマトグラフィー装置を含み得る。更に、方法は、マイクロプレートELISAベースの方法、完全自動又はロボットイムノアッセイ（例えば、Elecsys（商標）分析機で利用可能）、CBA（酵素コバルト結合アッセイ、例えば、Roche-Hitachi（商標）分析機で利用可能）、及びラテックス凝集アッセイ（例えば、Roche-Hitachi（商標）分析機で利用可能）を含む。

10

【0077】

本開示によれば、バイオマーカーであるペプチド又はポリペプチドの量の決定は、（a）その強度が該ペプチド又はポリペプチドの量の指標となる細胞応答を誘発することができる細胞を、適切な期間、該ペプチド又はポリペプチドと接触させる工程と、（b）該細胞応答を測定する工程とを含んでいてよい。該細胞応答の測定については、サンプル又は加工サンプルを細胞培養物に添加してよく、そして、内部又は外部の細胞応答を測定する。該細胞応答は、レポーター遺伝子の測定可能な発現、又は物質、例えば、ペプチド、ポリペプチド、又は低分子の分泌を含んでいてよい。該発現又は物質は、前記ペプチド又はポリペプチドの量と関連する強度シグナルを生成する。

20

【0078】

また、バイオマーカーであるペプチド又はポリペプチドの量の検出は、サンプル中の該ペプチド又はポリペプチドから得ることができる特定の強度シグナルを測定する工程を含む。上記の通り、このようなシグナルは、前記ペプチド又はポリペプチドに特異的な質量スペクトル又はNMRスペクトルで観察される前記ペプチド又はポリペプチドに特異的な m/z 変数において観察されるシグナル強度であってよい。

【0079】

バイオマーカーであるペプチド又はポリペプチドの量の検出は、（a）該ペプチドを特異的リガンドと接触させる工程と、（b）（場合により）未結合リガンドを除去する工程と、（c）結合リガンドの量を測定する工程とを含んでいてよい。該結合リガンドは、強度シグナルを生成する。本開示に係る結合は、共有結合及び非競合結合の両方を含む。本開示に係るリガンドは、本明細書に記載する前記ペプチド又はポリペプチドに結合する任意の化合物、例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸、又は低分子であってよい。例示的なリガンドは、抗体、核酸、ペプチド又はポリペプチド、例えば、該ペプチド又はポリペプチドの受容体又は結合パートナー、及び該ペプチドの結合ドメインを含むこれらの断片、並びにアプタマー、例えば、核酸又はペプチドのアプタマーを含む。このようなりガンドを調製する方法は、当技術分野において周知である。例えば、好適な抗体又はアプタマーの同定及び生成も商業的供給元によって提供される。当業者は、高い親和性又は特異性を有するこのようなりガンドの誘導体を開発する方法をよく知っている。例えば、ランダム突然変異を核酸、ペプチド、又はポリペプチドに導入してよい。次いで、当技術分野において公知のスクリーニング手順、例えば、ファージディスプレイに従って、これら誘導体を結合について試験してよい。本明細書で言及する抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体に加えて、これらの断片、例えば、抗原又はハプテンに結合することができる F_v 、 F_{ab} 、及び $F(ab)_{sub.2}$ 断片を含む。

30

40

【0080】

また、本開示は、単鎖抗体、及び所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプタ抗体の配列と組み合わせたヒト化ハイブリッド抗体も含む。ドナー配列は、通常、ドナーの抗原結合アミノ酸残基を少なくとも含むが、更にドナー抗体の他の構造的及び/又は機能的に関連するアミノ酸残基を含んでいてもよい。このようなハイブリッドは、当技術分野において周知の幾つかの方法によって調製することができる。リ

50

リガンド又は剤は、前記ペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する。本開示に係る特異的結合とは、該リガンド又は剤が、分析されるサンプル中に存在する別のペプチド、ポリペプチド、又は物質に実質的に結合（「交差反応」）しないはずであることを意味する。特異的に結合したペプチド又はポリペプチドは、任意の他の関連するペプチド又はポリペプチドよりも少なくとも3倍高い、そして、幾つかの実施態様では、少なくとも10倍高い、又は更には少なくとも50倍高い親和性で結合しているはずである。非特異的結合は、例えば、ウエスタンブロットではそのサイズに従って又はサンプル中の比較的高い存在量によって、依然として明確に区別され、そして、測定され得る場合、許容できる。リガンドの結合は、当技術分野において公知の任意の方法によって測定することができる。前記方法は、半定量的又は定量的であってよい。好適な方法については、以下に記載する。

10

【0081】

第1に、リガンドの結合は、例えば、NMR又は表面プラズモン共鳴によって直接測定してよい。第2に、リガンドが対象となるペプチド又はポリペプチドの酵素活性の基質としても機能する場合、酵素反応生成物を測定してよい（例えば、プロテアーゼの量は、例えば、ウエスタンブロットにおいて、切断された基質の量を測定することによって測定することができる）。あるいは、リガンドは、酵素特性自体を示す場合もあり、そして、「リガンド/ペプチド又はポリペプチド」複合体又はそれぞれペプチド又はポリペプチドが結合したリガンドを、強度シグナルの生成による検出を可能にする好適な基質と接触させてもよい。酵素反応生成物を測定する場合、基質の量は、飽和してよい。また、反応前に、検出可能な標識で基質を標識してもよい。例えば、サンプルを適切な期間基質と接触させる。適切な期間とは、検出可能な、そして、幾つかの実施態様では、測定可能な量の生成物が生成されるのに必要な時間を指す。生成物の量を測定する代わりに、所与の（例えば、検出可能な）量の生成物の出現に必要な時間を測定することもできる。第3に、リガンドは、該リガンドの検出及び測定を可能にする標識に共有結合又は非共有結合し得る。標識は、直接又は間接的な方法によって行ってもよい。直接標識は、リガンドに標識を直接（共有又は非共有的に）結合させることを含む。間接標識は、第1のリガンドに二次リガンドを（共有又は非共有的に）結合させることを含む。二次リガンドは、第1のリガンドに特異的に結合しなければならない。前記二次リガンドは、好適な標識と結合し得、及び/又は二次リガンドに結合する三次リガンドの標的（受容体）であり得る。二次、三次、又は更に高次のリガンドの使用は、多くの場合、シグナルを増大させるために用いられる。好適な二次以上のリガンドは、抗体、二次抗体、及び周知のストレプトアビジン-ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）を含んでよい。

20

30

【0082】

リガンド又は基質は、当技術分野において公知の通り1つ以上のタグで「タグ付け」してもよい。次いで、このようなタグは、より高次のリガンドの標的となり得る。好適なタグは、ビオチン、ジゴキシゲニン、Hisタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、mycタグ、インフルエンザウイルスA型赤血球凝集素（HA）、マルトース結合タンパク質等を含む。ペプチド又はポリペプチドの場合、該タグは、N末端及び/又はC末端に存在してよい。好適な標識は、適切な検出方法によって検出可能な任意の標識である。典型的な標識は、金粒子、ラテックスビーズ、アクリダンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素活性標識、放射性標識、磁気標識（「例えば、磁気ビーズ」、常磁性及び超常磁性の標識を含む）、及び蛍光標識を含む。酵素活性標識は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、及びこれらの誘導体を含む。検出に好適な基質は、ジアミノベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド及び5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスファート、ROCHE Diagnosticsから既製の原液として入手可能）、CDP-Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）を含む。好適な酵素-基質の組合せによって、着色反応生成物、蛍光、又は化学発光が生じ得、これらは、（例えば、感光性フィルム又は好適なカメラシステムを用いて）当技術分野において公知の方法に従って測定することができる。

40

50

。酵素反応の測定については、上に与えた基準を同様に適用する。典型的な蛍光標識は、蛍光タンパク質（例えば、GFP及びその誘導体）、Cy3、Cy5、Texas Red、Fluorescein、及びAlexa色素（例えば、Alexa 568）を含む。更なる蛍光標識は、例えば、Molecular Probes（Oregon）から入手可能である。また、蛍光標識としての量子ドットの使用も想到される。典型的な放射性標識は、³⁵S、¹²⁵I、³²P、³³P等を含む。放射性標識は、公知であり、そして、適切な任意の方法、例えば、感光性フィルム又はphosphor imagerによって検出することができる。また、本開示に係る好適な測定方法は、沈殿（特に、免疫沈降）、電気化学発光（電気によって生成される化学発光）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチ免疫測定法（ECLIA）、解離促進ランタニドフルオロイムノアッセイ（DELFI A）、シンチレーション近接アッセイ（SPA）、比濁法、ネフェロメトリー、ラテックス促進比濁法若しくはネフェロメトリー、又は固相免疫試験を含む。当技術分野において公知の更なる方法（例えば、ゲル電気泳動、2 Dゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、ウエスタンブロッティング、及び質量分析）は、上記の通り、単独で又は標識若しくは他の検出方法と組み合わせて使用してよい。

10

20

30

40

50

【0083】

本開示の実施態様によれば、ペプチド又はポリペプチドの量は、以下の通り検出することができる：（a）上で指定したペプチド又はポリペプチドのリガンドを含む固体支持体を、該ペプチド又はポリペプチドを含むサンプルと接触させ、そして、（b）該支持体に結合しているペプチド又はポリペプチドの量を測定する。該リガンドは、核酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、及びアプタマーからなる群から選択してよい。幾つかの実施態様では、該リガンドは、固定化されている形態の固体支持体上に存在する。固体支持体を製造するための材料は、当技術分野において周知であり、そして、特に、市販されているカラム材料、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、コロイド状金属粒子、ガラス及び／又はシリコンのチップ及び表面、ニトロセルロースストリップ、メンブレン、シート、デュラサイト（duracytes）、反応トレーのウェル及び壁、プラスチックチューブ等を含む。該リガンド又は剤は、多くの異なる担体に結合し得る。周知の担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボナート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、及びマグネタイトを含む。担体の性質は、本開示の目的のために可溶性又は不溶性であってよい。前記リガンドを固定／固定化する好適な方法は、周知であり、そして、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用等を含むが、これらに限定されない。また、本開示に係るアレイとして「サスペンションアレイ」を使用することも想到される（Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12）。このようなサスペンションアレイでは、担体、例えば、マイクロビーズ又はミクロスフィアが懸濁液中に存在する。該アレイは、異なるリガンドを担持している、標識されていてもよい異なるマイクロビーズ又はミクロスフィアからなる。例えば、固相化学及び感光性保護基に基づいてこのようなアレイを作製する方法は、一般的に知られている（米国特許第5,744,305号）。

【0084】

基準量：

基準量は、標準的な統計的方法を適用することによって、所与のバイオマーカーについての平均値に基づいて、被験体のコホート（すなわち、CHDを有することが知られている被験体）について計算することができる。1つの実施態様では、該基準は、多変数比例ハザード（Cox）回帰分析を用いてCHDに罹患している被験体のコホートにおいて決定される（Cox DR. Regression models and life tables. J R Stat Soc (B). 1972; 34(series B):187 - 220）。この種の分析において有用な技術及びアッセイは、本明細書で参照する実施例及び図面に記載されている。

【0085】

表2は、実施例1に従って得られたデータに基づいて計算した平均値及び中央値を与える。

【 0 0 8 6 】

【 表 2 】

表 2 : バイオマーカー hsCRP、ホモシステイン、NT-proBNP : 平均、中央値、四分位数範囲 (IQR) 、単位 ;

バイオマーカー	プラセボ			単位
	平均 +/- SD	中央値 [I Q R]	N	
hsCRP	3.64 +/- 8.68	1.51 [0.81-3.61]	7501	mg/l
ホモシステイン	13.33 +/- 5.61	12.16 [9.99-14.98]	2062	μmol/l
NT-proBNP	573 +/- 1329	263 [122-595]	2072	pg/ml

10

【 0 0 8 7 】

患者のコホートにおいて決定されるバイオマーカーの中央値は、基準レベルを確立するための基礎としても使用することができる。

【 0 0 8 8 】

特定の実施態様では、用語「基準レベル」は、本明細書では、所定の値を指す。この状況では、「レベル」は、絶対量、相対量、又は濃度に加えて、これらに相関するか又はこれらから導くことができる任意の値又はパラメータを包含する。当業者は、基準レベルが、例えば、特異性及び / 又は感度の観点で日常的な要件を満たすように予め定められ、そして、設定されることを理解するであろう。これら要件は、例えば、規制機関によって変化し得る。例えば、アッセイの感度又は特異性は、それぞれ、特定の限度、例えば、80 %、90 %、95 %、又は98 %に設定しなければならない場合がある。これら要件は、陽性又は陰性の予測値の観点で定義される場合もある。それにもかかわらず、本発明に与えられる教示に基づいて、当業者は、これら要件を満たす基準レベルに到達することが常に可能であろう。1つの実施態様では、基準レベルは、健常個体由来の基準サンプルにおいて決定される。基準レベルは、1つの実施態様では、患者が属する疾病由来の基準サンプルにおいて予め定められている。特定の実施態様では、基準レベルは、例えば、調べられる疾病における値の全体的な分布の25 % ~ 75 %の任意の百分率に設定してよい。他の実施態様では、基準レベルは、例えば、調べられる疾病由来の基準サンプルにおける値の全体的な分布から決定するとき、中央値、三分位数、又は四分位数に設定してよい。特に、基準レベルは、CRPについて1.51 mg/L、ホモシステインについては12.16 μmol/L、NT-proBNPについては263 pg/mLである。

20

30

【 0 0 8 9 】

1つの実施態様では、基準レベルは、調べられる疾病における値の全体的な分布から決定するとき、中央値に設定される。基準レベルは、例えば、年齢、性別、又は亜集団等の様々な生理学的パラメータに加えて、本明細書において言及するバイオマーカーYを測定するために用いられる手段に依存して変動し得る。1つの実施態様では、基準サンプルは、本発明の方法に供される個体又は患者由来のサンプルと本質的に同じ種類の細胞、組織、器官、又は体液源に由来し、例えば、本発明に従って、個体におけるバイオマーカーYのレベルを決定するためのサンプルとして血液を用いる場合、基準レベルも血液又はその一部において決定される。

40

【 0 0 9 0 】

特定の実施態様では、用語「基準レベルで」とは、基準レベルと本質的に同一である、個体若しくは患者由来のサンプル中のバイオマーカーのレベル、又は該基準レベルと1 % 以下、2 % 以下、3 % 以下、4 % 以下、5 % 以下だけ異なるレベルを指す。

50

【 0 0 9 1 】

特定の実施態様では、用語「基準レベルよりも多い」とは、基準レベルと比べたとき、本明細書に記載の方法によって決定された、基準レベルを上回る個体若しくは患者由来のサンプル中のバイオマーカーのレベル、又は5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%、若しくはそれ以上の全体的な増加を指す。特定の実施態様では、増加という用語は、個体又は患者由来のサンプル中のバイオマーカーのレベルの増加であって、例えば、基準サンプルから予め定められる基準レベルと比べたとき、少なくとも約1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、75倍、80倍、90倍、又は100倍高い増加を指す。

10

【 0 0 9 2 】

特定の実施態様では、用語「減少」又は「下回る」とは、本明細書では、基準レベルと比べたとき、本明細書に記載の方法によって決定された、基準レベルを下回る個体若しくは患者由来のサンプル中のバイオマーカーのレベル、又は5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の全体的な低減を指す。特定の実施態様では、減少という用語は、減少したレベルが、例えば、基準サンプルから予め定められる基準レベルの最高約0.9倍、0.8倍、0.7倍、0.6倍、0.5倍、0.4倍、0.3倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、若しくは0.01倍、又はそれ以下である、個体又は患者由来のサンプル中のバイオマーカーレベルである。

20

【 0 0 9 3 】

他の実施態様では、本発明は、表3に示す通り、二次予防試験のサンプルサイズを低減することができる。

【 0 0 9 4 】

【表3】

表3：二次予防試験のサンプルサイズの低減

	相対的なサンプルサイズ 低減 プラセボ推定	d a l Oにおける絶対サンプルサイズ 低減 (濃縮有りのサンプルサイズ／濃縮無 しのサンプルサイズ) プラセボ推定
最低バイオマーカー (3マーカー)	45.70%	7254 (8618/15872)
Framingham	27.90%	4431 (11441/15872)
Reynolds	24.40%	3866 (12006/15872)

30

40

【 0 0 9 5 】

以下の実施例は、単に本発明の実施を例証することを意図し、そして、限定の目的で提供されるものではない。

【 0 0 9 6 】

実施例 1

Dal-OUTCOMES試験 (NC20971) は、急性冠症候群 (ACS) について最近入院加療を受けた患者におけるCETP阻害剤ダルセトラピブの安全性及び効果を評価するための二重盲検無作為化プラセボ対照平行群多施設第III相試験であった。中間分析時に、該試験は、2つの処置アーム：プラセボ (7933人の患者) 及びダルセトラピブ (毎日600mg; 793

50

8 人の患者) に分配された 1 5 8 7 1 人の無作為化患者を含んでいた。該試験は、プラセボアームと比べてダルセトラピブアームにおいて主要効果評価項目における事象率が低減するという証拠を示さなかった。dal-OUTCOMES試験の詳細は、G. Schwartz et al., N. Engl. J. Med.367;22, 2012に見出すことができる。

【 0 0 9 7 】

サンプル回収

一晩絶食後、SSTチューブに血液を回収し、静かに 5 回反転させることによって混合し、続いて、30 分間サンプルを凝血させた。次いで、回収から 1 時間以内に 1 5 0 0 ~ 2 0 0 0 g (約 4 0 0 0 ~ 5 0 0 0 rpm) で 1 5 分間遠心分離した。血清をプレインキャプトランスファーチューブに移し、そして、直ちに冷凍した。

10

【 0 0 9 8 】

患者のサンプルをアッセイして、被験体がその後に心血管イベントを経験する可能性が高まっていると割り当ての役に立てるために幾つかのバイオマーカーの有用性を評価した。

【 0 0 9 9 】

各患者から得られたサンプルをイムノアッセイによって分析して、各バイオマーカーのレベルを決定した。イムノアッセイは、サンドイッチアッセイフォーマットで、又は、NT-proBNPについては、Elecsys (登録商標) proBNPプラットフォーム (Elecsys 20.10 immunoanalyzer) を用いて行った。

【 0 1 0 0 】

20

それぞれのバイオマーカーについて用いたアッセイ (essays) は、以下の通りである :

NT-proBNP - Roche Immunoassay (Elecsys (登録商標))

高感度CRP - Roche Clinical Chemistry Assay ; Cardiac C-Reactive Protein (Latex) High Sensitive on COBAS (登録商標)

ホモシステイン - Roche Clinical Chemistry Assay Roche Homocysteine enzymatic assay on COBAS (登録商標) 。

【 0 1 0 1 】

製造業者のプロトコールに従って市販のアッセイキットを用いて、血清サンプル中のホモシステインの濃度、「合計ホモシステイン」を測定した。

【 0 1 0 2 】

30

製造業者のプロトコールに従って市販の酵素結合免疫吸着測定法キットを用いて、血清サンプル中のCRP (高感度CRP) の濃度をデュープリケートで測定した。血漿サンプルを X 倍希釈した。定量の下限を決定し、そして、X ng/mL に設定した。

【 0 1 0 3 】

製造業者の指示書に従って市販の C E 認証試験キットを用いて血清中のNT-proBNP (カタログ番号 04842464190、Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を測定した。

【 0 1 0 4 】

以下の特徴を評価した :

動的濃度範囲 ; 定量の上限及び下限 ; マトリクス効果 ; 正確さ ; 精度 ; 安定性 ; 選択性及び特異性 ; 希釈平行性 ; 並びに干渉剤。

40

【 0 1 0 5 】

サンプルサイズ

時間及びコストの効率を高めるために、患者の選択されたサブセットに対してバイオマーカー測定を実施した。ベースライン血清サンプルを入手可能な患者のうちのわずか約 7 % しかイベントを経験していないとすると、ネステッドケースコントロール (NCC) デザインを適用することによって、ほぼ完全な検出力を保持しながら、分析するサンプル数を劇的に低減することが可能であった。NCCデザインは、主要複合評価項目 (PCE) イベント又は心血管系 (C V) 死亡を経験し、そして、血清サンプルを入手可能な全ての患者を含んでいた。選択された各イベントについて、それぞれのイベント時に依然としてイベントを経験するリスクを有していた対照患者に一致する患者を無作為に選択した。一次分析集

50

団については、対照対イベントの4：1マッチングを実施した。

【0106】

サンプルサイズの計算は、二値説明変数を用いる単変量比例ハザード回帰におけるスコア検定と等価なログランク検定に基づいていた。分析は、ITT集団全体ではなく、選択されたNCCデザインによって選択されたサブセットを含んでおり、集団全体と比べて検出力が低下していた。4：1マッチングの場合、検出力は、完全なITT集団における検出力の約80%であった。全ての報告する検出力の図は、NCCデザインに起因する相対的な検出力の低下によって補正した。

【0107】

プラセボ群では、476のPCEイベントが観察された。選択された4：1マッチングでは、これは、25%のリスク低減を検出するために70%の検出力を与え、19%のリスク低減の検出については50%の検出力であった。数字は、5%の両側第1種の過誤を指す。

10

【0108】

統計解析

分析集団

結果は、第3相臨床試験NC20971の第2の中間解析に基づいていた。中間解析時に、試験は、15872人の無作為化患者を含んでおり、2つの処置アーム：プラセボ（7934人の患者）及びダルセトラピブ（毎日600mg；7938人の患者）に分布していた。該試験は、プラセボアームと比べてダルセトラピブアームにおい主要効果評価項目における事象率が低減するという証拠を全く示さなかった。

20

【0109】

包括解析集団（ITT）

試験の説明力に影響を与える虚偽データを有するか又は処置する意図のない研究者によって誤って無作為化されたと特定された患者を除く全ての無作為化患者が、包括解析集団に含まれていた。

【0110】

ITT集団は、15871人の患者を含み、1135人がPCEイベントを経験し、そして、1101人がDMSイベント（CHD死亡、非致死性MI、又は脳卒中のイベント）を経験していた。全ての更に選択される解析集団は、ITT集団に基づいていた。

30

【0111】

自動アッセイ集団

PCEイベント又はCV死亡を経験し、そして、ベースライン血清サンプルを入手可能であるITT集団の全ての患者、及び対応する対照を、4：1ネステッドケースコントロールマッチングによって選択した。補充を伴う無作為サンプリングによってケースコントロールマッチングを実施したので、サンプルは異なるリスクセットについて1回超選択された可能性がある。したがって、一部の患者サンプルは、解析データセットにおいて数回列挙されるが、1回しか測定しなかった。

【0112】

2つの解析評価項目に対応して、本発明者らは、2つの異なる集団を規定した：

40

- ・自動アッセイPCE集団 - 全ての測定されたPCEイベント及びマッチング対照を含む。
- ・自動アッセイDMS集団 - 全ての測定されたDMSイベント及びマッチング対照を含む。

【0113】

ベースライン血清サンプルは、961のPCEイベント及び851のDMSイベントから入手可能であった。自動アッセイのために用いられる4：1マッチングでは、これによって、自動アッセイPCE集団において4805人の患者（重複無しで4112人）及び自動アッセイDMS集団において4255人の患者（重複無しで3712人）の合計数が導かれた。自動アッセイPCE集団は、一次解析集団であった。

【0114】

バイオマーカーデータの前処理

50

切り捨て値の取り扱い

バイオマーカー測定値は、File Format Specification (FFS) 文書において指定されたフォーマットで与えられた。データファイルは、実際のサンプル測定値と、測定単位に関する情報（例えば、ng/mL）とを含んでいた。測定範囲を下回る値は、「 $< Y$ 」（ Y は、下限である）と報告した。測定範囲を上回る値は、「 $> X$ 」（ X は、上限である）と報告した。

【0115】

測定データを以下の通り前処理した：

1. 「 $< Y$ 」エントリーを $Y / 2$ に置き換えた。
2. 「 $> X$ 」エントリーを X に置き換えた。

10

【0116】

70%超の切り捨て値を有するバイオマーカーを解析から除外した。

【0117】

欠測値の取り扱い

20%超の欠測値を有するバイオマーカーを解析から除外した。回帰解析では、残りの欠測値をデータマトリクスにおけるそれぞれのバイオマーカーの中央値に置き換えた。

【0118】

変換及び変化の計算

全てのバイオマーカー測定値を $\log_2$ 変換した。濃度変化の分析では、ベースラインと3ヶ月目の通院時との間の相対 $\log_2$ 変化を $\log_2(V3/BL)$ として計算した。

20

【0119】

特徴縮小

この試験でアッセイされるバイオマーカーのセットは、同じアナライトを評価したか、又は他のアナライト（例えば、LDL-c及びsdLDL）の小成分を評価する幾つかのアッセイを含んでいた。これらバイオマーカー対の多くは、非常に高い相関を示すと予測され、このことは、統計的検出力を低下させ、そして、予測モデルの推定及び特徴選択において問題を引き起こす可能性がある。

【0120】

類似性の尺度としてSpearman相関係数を用いる階層的クラスタ分析によって、バイオマーカー候補の高相関群を同定した。高相関タンパク質のクラスタが同定された場合、これらクラスタを一次解析のための1つの単変数に縮小した。優先度（例えば、分析アッセイ性能又は生物学的推論）に基づいて、又は全ての他のクラスタメンバーまでの最短距離に基づいて、クラスタの1つの代表的なバイオマーカーを選択することによって縮小を行った。

30

【0121】

バイオマーカー及び処理群の比較可能性の解析

人口統計学データ

以下の人口統計学データ及びベースライン特性について、完全試験ITT、自動アッセイPCE、及び手動アッセイPCE集団内の両処理群の要約統計量を提示する：性別、年齢、人種、民族、地理的領域、体重、身長、及びボディー・マス・インデックス（BMI）。

40

【0122】

ベースライン疾患特性

以下のベースライン疾患特性について、完全試験ITT、自動アッセイPCE、及び手動アッセイPCE集団内の両処理群の要約統計量を提示する：高血圧、糖尿病、メタボリックシンドローム、MI/U Aの既往、及び地理的起源。

【0123】

欠測データ

回帰解析では、連続ベースライン特性の欠測値及びバイオマーカー値をデータマトリクスにおけるそれぞれの変数の中央値に置き換えた。カテゴリーベースライン変数については、最も頻度の高いカテゴリーを入力した。

50

【 0 1 2 4 】

全ての使用した統計学的方法が打ち切りデータを取り扱うことができるので、評価項目のインピュテーションは必要なかった。

【 0 1 2 5 】

予測精度の尺度

絶対尺度

本発明者らは、未来の心血管イベントのリスクを予測するためのモデルの精度を評価するために、以下のモデルの当てはまりの尺度を使用した：

【 0 1 2 6 】

一致指数

10

一致指数 C は、以下の通り定義した：

【 数 1 】

$$C = \Pr[Z_i > Z_j | D_i = 1, t_i < t_j],$$

(式中、 Z_i は、予測モデルリスクスコアであり、 t_i は、生存時間であり、そして、 D_i は、 i 番目の患者のイベントの観察についての指標変数である (Pencina, M. J. (2008)., *Statistics in Medicine*, 27(2), pp. 157-172.)(Chambless, L. E. et al. (2011). *Statistics in Medicine*, 30(1), pp. 22-38)。

【 0 1 2 7 】

20

C 指数は、モデル予測と観察されたアウトカムとが一致する全ての患者対の比率のノンパラメトリック推定量である。

【 0 1 2 8 】

時間依存性AUC

イベントまでの時間データの解析では、感度、特異性、及びROC曲線下面積 (AUC) の古典的な診断尺度が時間の関数となる。所与の時点でイベントを経験するリスクのある患者の所与のセットについて、これら尺度は、所与のリスクスコア又はバイオマーカー及びカットオフ値に基づいて直前ケース (imminent case) と短期対照 (near term controls) との間の識別を定量する。

【 0 1 2 9 】

30

時間依存性AUCは、以下の通り定義した：

【 数 2 】

$$AUC(t) = \Pr[Z_i > Z_j | D_i = 1, t_i = t, t_i < t_j],$$

(式中、 Z_i は、予測モデルリスクスコアであり、 t は、対象となる時点であり、 t_i は、生存時間であり、そして、 D_i は、 i 番目の患者のイベントの観察についての指標変数である (Saha-Chaudhuri, P. et al. (2012). Non-parametric estimation of a time-dependent predictive accuracy curve. *Biostatistics*.) $AUC(t)$ は、対象となる規定の時間枠内でモデル予測と観察されたアウトカムとが一致する患者対の比率のノンパラメトリック推定量である。

40

【 0 1 3 0 】

モデル比較のための相対尺度

本発明者らは、予測精度に関して2つのモデルを比較するために以下の尺度を使用した：

【 0 1 3 1 】

一致指数の差

2つのモデルの C 指数間の差は、モデル予測の精度を改善するためのノンパラメトリック尺度である。

【 0 1 3 2 】

50

時間依存性AUC値の差

2つのモデルのAUC(t)間の差は、所与の時点におけるモデル予測の精度を改善するためのノンパラメトリック尺度である。

【0133】

逸脱度

逸脱度は、尤度比に基づいて2つのネステッドパラメトリックモデルの当てはまりを比較する。逸脱度は、以下の通り定義した：

【数3】

$$D(y) = -2(\log(p(y|\hat{\theta}_0)) - \log(p(y|\hat{\theta}_1))), \quad 10$$

(式中、 y は、観察されたデータであり、そして、 θ_0 及び θ_1 は、それぞれベースライン及びフルモデルの推定パラメータである)。逸脱度はモデル尤度に直接基づいているので、モデル当てはめのために使用される最適化基準に直接関連している。それは、モデル校正に依存し、そして、任意の臨床的解釈を有しないという問題点がある。

【0134】

予後バイオマーカーの発見

予後バイオマーカーの発見の目的は、患者のリスク予測を著しく改善するバイオマーカーのセットの同定であった。同定されたバイオマーカーは、十分に確立されたリスクマーカー（例えば、HDL、LDL）及び他の予後因子（例えば、糖尿病又は喫煙）に追加情報を付加するはずである。

20

【0135】

一次解析

一次複合評価項目に対して一次解析を実施した。解析データセットは、PCEリスクセットについて選択された全ての患者を含んでいた。一次解析は、リスクセットによって層別化せず；各選択された患者は、1回だけ解析された。層別解析は、本明細書に記載する通り一次解析の潜在的バイアスについて確認するために、感度分析として最終的に選択されたモデルについて実施した。

【0136】

この解析の潜在的説明変数は、検査のベースライン濃度と、表8及び9に列挙する自動アッセイバイオマーカーと、人口統計学的変数とに加えて、ベースラインにおける健康状態及び病歴に関連する臨床的変数であった。

30

【0137】

本明細書に定義する自動アッセイPCE集団のプラセボ群に対して一次解析を実施した。治癒処理シナリオの標準を表すために、分析集団は、プラセボ群に限定した。

【0138】

一次解析は、最適予後モデルの選択と、選択されたモデルのリスク予測性能の決定とを包含していた。これは、プラセボ群に対するネステッドクロス検証によって実施した（最適なモデル複雑さの決定のための内部クロス検証、リスク予測性能の決定のための外部クロス検証）。更に、本発明者らは、処理群におけるモデルのリスク予測性能を決定した。ダルセトラピブが完全に効果を有しないと仮定すると、これは、独立患者コホートに対するリスク予測性能推定を与えるであろう。

40

【0139】

モデル選択

イベントまでの時間は、非層別Cox比例ハザードモデルでモデル化した。変数選択は、Cox回帰のための経路状巡回座標降下法（Simon, N. et al. (2011). Journal of Statistical Software, 39(5), pp. 1-13を用いてLASSO法によって実施した（Tibshirani, R. et al. (1996). J. Royal. Statist. Soc B., 1, pp. 267-288）。

【0140】

新規バイオマーカーによって得られる追加情報の値を評価するために、2つのモデルを

50

選択することが必要であった。第 1 のモデルは、全ての非バイオマーカー変数及び十分に確立された CV リスクバイオマーカーから選択した。第 2 のモデルは、第 1 のモデルに基づいていたが、新規バイオマーカー候補を用いて拡大した。第 1 のモデルを「基準モデル」と呼び、そして、第 2 のモデルを「バイオマーカーモデル」と呼んだ。まず基準モデルを作成し、そして、基準モデルに基づいて、バイオマーカーモデルを構築した。バイオマーカーモデルは、基準モデルによって選択された全ての変数を含んでいた。

【 0 1 4 1 】

$X_1, \dots, X_n$ は、全ての非バイオマーカー及び確立された CV リスクバイオマーカーの変数を表し、そして、 $Z_1, \dots, Z_m$ は、全ての新規バイオマーカーの変数を表す。A は、全ての非バイオマーカー及び LASSO によって選択された確立された CV リスクバイオマーカーの変数の指数セットのサイズ k を表す。したがって、A は、以下の通り定義した：

$A = \{ i \mid X_i \text{ は、予後モデルについて選択される} \}$ 、
したがって、 $X_{A1}, \dots, X_{Ak}$ は、全ての選択された非バイオマーカー及び確立された CV リスクバイオマーカーの変数であった。次いで、基準モデルは、
 $Y = X_{A1} + \dots + X_{Ak}$ である。

【 0 1 4 2 】

次いで、基準モデルに基づいて、LASSO 手順は、第 2 の工程で、新規バイオマーカー候補 $Z_1, \dots, Z_m$ から、モデルに含める更なる変数を選択することができた。B は、基準モデルに加えて LASSO によって選択された全ての新規バイオマーカー候補の変数の指数セットのサイズ p を表す：

$B = \{ i \mid Z_i \text{ は、予後モデルに含まれる予後バイオマーカーである} \}$ 。

【 0 1 4 3 】

次いで、 $X_{A1}, \dots, X_{Ak}$ 及び $Z_{B1}, \dots, Z_{Bp}$ の合計が予後バイオマーカーモデルを構成する：

$Y = X_{A1} + \dots + X_{Ak} + Z_{B1} + \dots + Z_{Bp}$ 。

【 0 1 4 4 】

LASSO 手順では、モデルの複雑さ（選択された特徴の数）は、罰則付きパラメータラムダによって正則化される。大きなラムダ（高罰則）によって、わずかな変数が含まれるようになり、そして、小さなラムダ（低罰則）によって、より多くの変数が含まれるようになる。最適なラムダの選択については、10 倍クロス検証を用いた。これは、データセットを 10（等しいサイズ）の部分に分けることを意味し：9 個をトレーニングのために使用し、10 番目を試験のために使用した。次いで、トレーニング / 試験セットの割当ての順序を変え、その結果、10 個の部分がそれぞれトレーニングセットに 9 回属し、そして、試験セットに 1 回属する。各試験セットにおいて、各ラムダについてアウトカムを予測し、そして、実際のアウトカムと比較した。モデル予測品質を c 指数によって各ラムダについて評価し、そして、保存した。記載する k 倍クロス検証手順を、ランダムな順序のサンプルセットにおいて 5 回繰り返した。各ラムダについて、クロス検証結果の中央値によって予測品質を要約した（ $10 \times 5 =$ 試験セットにおける 50 個の c 指数）。最大値に対応する中央値を有するラムダを選択し、そして、 λ_{opt} と呼んだ。この「最小損失」 λ_{opt} は、多くの場合、複雑さの低いモデルに対して有意な又は臨床的に意義のある改善を示さない複雑なモデルを導くので、追加の補正工程が含まれていた。本発明者らは、 c 指数の有意な改善を、 λ_{opt} における観察されたクロス検証 c 指数の 1 つの標準的な偏差として定義した。本発明者らは、 c 指数の臨床的に意義のある改善を、0.0025 のデルタとして定義した（増大した一致を示す患者対の 0.25% に相当）。この数は、HDL（ $\Delta C = 0.013 \sim 0.023$ ）又は喫煙（ $\Delta C = 0.006 \sim 0.024$ ）等の確立されたリスク因子の公開されている c 指数から導いた（Chambless, L. E. et al. (2011). *Statistics in Medicine*, 30(1), pp. 22-38）。

【 0 1 4 5 】

選択したラムダは、以下の通りであった：

$\lambda_{se1} = \max(\lambda \mid \text{中央値}(c \text{ 指数}[\lambda]) \geq \text{中央値}(c \text{ 指数}[\lambda_{opt}]) - \max(sd(c \text{ 指数}[\lambda_{opt}]), 0.0025))$ 。

【0146】

これは、本発明者らが、性能(c 指数の中央値)が、 λ_{opt} モデルの性能からその標準偏差を減じたもの以上である最大ラムダ(最小モデル)をとったことを意味する。標準偏差が0.0025を下回っていた場合、0.025を減じた。標準偏差 $sd(c \text{ 指数}[\lambda_{opt}])$ は、クロス検証の実行から推定した。

【0147】

ラムダ λ_{se1} を有するLASSOを用いて最終モデルを選択した。最終モデルの回帰係数を罰則無しのCox回帰によって推定した。

【0148】

まず、記載したLASSO手順に従って基準モデルを構築した。次いで、追加のバイオマーカーを追加するために同じLASSO手順を用いてバイオマーカーモデルを構築した。基準モデルにおいて選択される変数の全ての係数が罰則付きではないので、ラムダに関係しないモデルに常に含まれるのは、第2のLASSO相における差のみである。

【0149】

次いで、患者の応答を予測する能力において2つのモデルを比較した。

【0150】

一般化手順

モデルの当てはまりの評価と同じデータセットにおいてモデルの選択を実施したので、モデルの当てはまりに関する2つのモデルの比較は、より複雑なモデルを好むであろう。したがって、外部クロス検証工程が必要であった。

【0151】

これは、データが上記「内部」クロス検証工程に入る前に、データを外部試験及びトレーニングセットに分けたことを意味する。トレーニングセットは、ケースの80%を含んでいた。トレーニングセットに含まれるケースは、無作為に選択した(Monte Carloクロス検証)。試験セットは、全ての選択されていないケースを含んでいた。次いで、「モデル選択」に記載したアプローチを外部トレーニングセットに適用した。その結果、本発明者らは2つのモデル、基準モデル及びバイオマーカーモデルを得た。これら2つのモデルに基づいて、対応変数に対する予測を試験セットにおいて行い、そして、各モデルについてc 指数を計算した。基準モデルとバイオマーカーモデルとの間の予測品質の差をc 指数の絶対差によって評価した。

$c \text{ 指数}_{Diff} = c \text{ 指数}_{Biom} - c \text{ 指数}_{Ref}$ 。外側クロス検証工程を少なくとも100回繰り返した。

【0152】

全てのクロス検証の実行から得られた $c \text{ 指数}_{Diff}$ の中央値は、新規バイオマーカーを含むことによって改善されたモデル性能の不偏尺度である。平均モデル当てはめ改善の信頼区間は、クロス検証結果の90%サンプル四分位数から推定する。同定されたバイオマーカーパネルの使用によって、計算されたクロス検証信頼区間の下限がゼロを上回る場合、リスク推定が著しく改善される。

【0153】

絶対リスクを計算するためのモデル：

Coxモデルの一般的な形態は、 $h(t) = h_0(t) \times \exp(b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots)$ (式中、 b は、HR値の自然対数に等しい)である。本発明者らによるモデルでは、 X_1 は、年齢に等しく、 X_2 は、脈拍数に等しく、 X_3 は、LDLに等しく、...

【0154】

年齢のHRは、1.004であり、自然対数は、0.004であり、これは、表4の1行目のcoefの列に見出すことができる。脈拍数のHRは、1.016であり、自然対数は、0.016である(表4の2行目のcoefの列を参照)。

【0155】

10

20

30

40

50

ベースラインハザード比 (ration) (ベースラインHR) である $h_0(t)$ は、リスクモデルに含まれる変数からの情報を含まない時間依存性関数である。

【0156】

【表4】

表4：多変数予後モデルの統計値の要約（最小バイオマーカーモデル）。分析集団は、自動分析集団である。観察数：2080²（489イベントを含む）C指数：0.7081.

10

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z)
年齢	0.004	1.004	0.005	0.689	0.491
脈拍数	0.016	1.016	0.004	3.581	0.000
LDL コレステロール	0.285	1.330	0.099	2.886	0.004
糖尿病＝「有り」	0.102	1.107	0.101	1.000	0.317
末梢血管疾患＝有り	0.361	1.435	0.126	2.865	0.004
うっ血性心不全＝有り	0.028	1.028	0.113	0.244	0.807
血行再建の既往＝有り	0.328	1.388	0.136	2.419	0.016
指数イベント前の冠状動脈性心疾患＝有り	0.317	1.374	0.187	1.699	0.089
ACS の既往＝有り	0.282	1.326	0.172	1.642	0.101
利尿剤療法＝有り	0.284	1.329	0.106	2.669	0.008
高感度 CRP	0.055	1.056	0.029	1.858	0.063
ホモシステイン	0.230	1.259	0.096	2.389	0.017
NT-proBNP	0.168	1.183	0.030	5.681	0.000

20

【0157】

予後モデルを表5に示す。

【0158】

バイオマーカーは、連続変数としてモデルに入力される。HRは、logステップ当たり、この場合、底2で与えられる。ホモシステインの場合（HR 1.259）、これは、ホモシステインのレベルの倍加当たり、それぞれlogステップ当たりリスクが25.9%増加することを意味する。NT-proBNBのそれぞれの数は、logステップ（倍加）当たり18.3%であり、そして、hsCRPについては、logステップ（倍加）当たり5.6%である。

30

【0159】

これは、年齢、脈拍数、及びLDLにも当てはまり、同時に、糖尿病（HR 1.107）、末梢血管疾患（HR 1.435）、うっ血性心不全（HR 1.028）、ACSの既往（HR 1.326）、血行再建の既往（HR 1.388）、指数イベント前の冠状動脈性心疾患（HR 1.374）、及び利尿剤による処置（HR 1.329）の存在はリスクを10.7%、43.5%、2.8%、32.6%、38.8%、37.4%、及び32.9%増加させる。

40

【0160】

【表 5】

表 5：予後モデル

リスク因子	最小バイオマーカーモデル HR (95% CI)
年齢－才	1.004 (0.993 - 1.014)
脈拍数－BPM	1.016 (1.007 - 1.025)
LDL- $\log_2$ ng/ml	1.330 (1.096 - 1.615)
糖尿病	1.107 (0.907 - 1.350)
末梢血管疾患	1.435 (1.121 - 1.837)
うっ血性心不全 (CHF I 型又は II 型)	1.028 (0.823 - 1.284)
急性冠症候群 (M I 又は不安定狭心症) の既往	1.326 (0.947 - 1.856)
血行再建 (PCI、CABG) の既往、脳卒中又は TIA の既往	1.388 (1.064 - 1.811)
I E 前の冠状動脈性心疾患	1.374 (0.952 - 1.981)
利尿剤による処置	1.329 (1.078 - 1.637)
CRP	1.056 (0.997 - 1.119)
ホモシステイン	1.259 (1.042 - 1.521)
ProBNP II	1.183 (1.116 - 1.254)

【 0 1 6 1 】

【表 6】

表 6：予後モデル性能

予後モデル	プラセボ (再代入)		プラセボ (クロス検証)	
	C 指数	Royston D	C 指数	Royston D
Framingham	0.616 (0.593-0.638)	1.91 (1.69-2.16)	-	-
Reynolds	0.609 (0.587-0.631)	1.88 (1.66-2.13)	-	-
最小バイオマーカー (3つのマーカー： ホモシステイン、 CRP、NT-proBNP)	0.708 (0.682-0.734)	3.53 (3.03-4.10)	0.697	3.26

上記方法に従った記載のモデルのクロス検証の結果

【 0 1 6 2 】

【表 7】

表 7：確立されたモデル対新規モデルの性能

	C 指数	Δ C 指数 vs. Framingham	Royston D	NRI vs. Framingham
Framingham	0.616	----	1.91	----
Reynolds	0.609	- 0.007	1.88	+ 0.011
最小 バイオマーカー	0.708	+ 0.092	3.53	+ 0.337

10

Royston D=多変数スコア中央値カットオフについてのハザード比の近似

NRI=Net 再分類の改善

20

【 0 1 6 3 】

【表 8】

表 8：予後モデル比較、

予後 モデル	アーム	イベント カテゴリー	リスクカテゴリー（2年目）			NRI 対基準 モデル （2年目）
			$\leq 3.6\%$	3.6-7.7%	$> 7.7\%$	
Framingham	プラセボ	対照	20% (166/824)	43% (355/824)	37% (303/824)	-0.260
		ケース	13% (59/455)	34% (153/455)	53% (243/455)	
Reynolds	プラセボ	対照	16% (135/824)	33% (275/824)	43% (353/824)	-0.249
		ケース	14% (65/455)	28% (129/455)	57% (261/455)	
最小バイオマーカー （3つのマーカー： ホモシステイン、 proBNP、CRP）	○プラセボ	対照	46% (380/824)	32% (267/824)	21% (177/824)	0.077
		ケース	16% (73/455)	30% (135/455)	54% (247/455)	

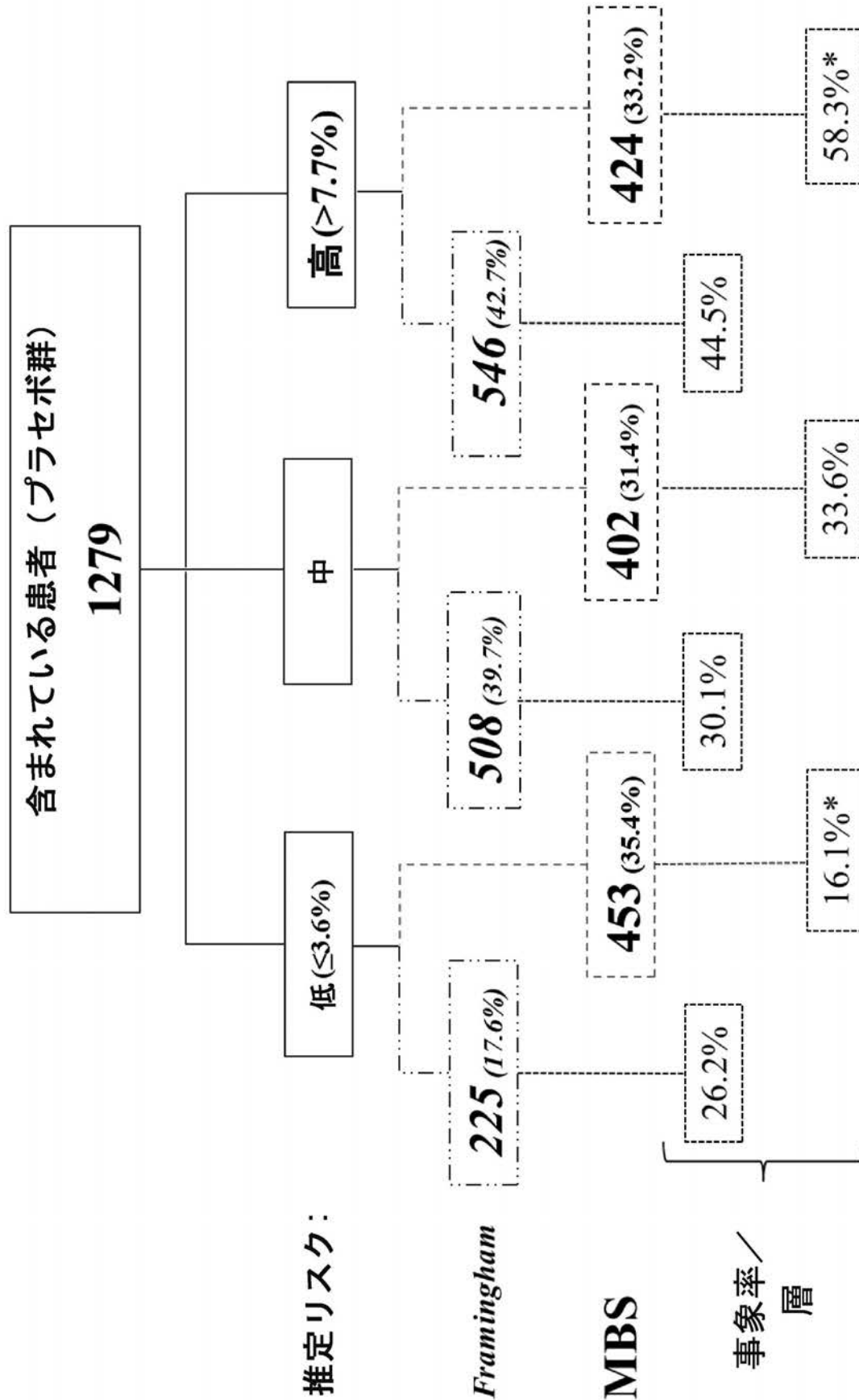
30

40

【 0 1 6 4 】

【表 9】

スキーム 1：予後モデル比較（MBS は、3 マーカーモデルである：ホモシステイン、proBNP、CRP）



【表 10】

表 9：自動アッセイにおいて測定したバイオマーカー。確立された C V リスクマーカー。

No.	マーカー	供給元
01	HDL-C	Roche
02	LDL-C	Roche
03	トリグリセリド	Roche

10

【0166】

【表 11】

表 10：自動アッセイにおいて測定したバイオマーカー。潜在的な
新規 C V リスクマーカー。

No.	マーカー	供給元
01	システイン C	Roche
02	尿酸	Roche
03	ホモシステイン	Diazyme
04	hsCRP	Roche
05	総コレステロール	Roche
06	Apo-A1	Roche
07	ApoB	Roche
08	Lp(a)	Denka
09	PON-1 活性	Roche (R&D)
10	Remnant 粒子	Kyowa
11	HDL-C3	Kyowa

No.	マーカー	供給元
12	sdLDL	Denka
13	HDL-C3	Denka
14	アディポネクチン	Denka
15	ApoA-II	Kamiya
16	ApoC-III	Kamiya
17	GDF-15	Roche (R&D)
18	hsTnT	Roche
19	NTproBNP	Roche
20	IL-6	Roche
21	C ペプチド	Roche
22	インスリン	Roche

20

30

40

【配列表】

2017533428000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/074242

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PETRA G VAN PEET ET AL: "NT-proBNP Best Predictor of Cardiovascular Events and Cardiovascular Mortality in Secondary Prevention in Very Old Age: The Leiden 85-Plus Study", PLOS ONE 8(11): E81400, 21 November 2013 (2013-11-21), XP055209814, DOI: 10.1371/journal.pone	1-16,30, 31,33,34
A	the whole document, in particular abstract; page 2, sections "new risk markers" and "composite endpoint"; page 3, column 1, lines 32-37; page 5, column 1, lines 7-11 and column 2, lines 2-5; page 6, column 2, lines 9-15; figures 1, 2; table 3 ----- -/--	17-29,32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 November 2015		25/11/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weber, Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074242

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AHLUWALIA NAMANJEET ET AL: "Prognostic value of multiple emerging biomarkers in cardiovascular risk prediction in patients with stable cardiovascular disease", ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 228, no. 2, 26 March 2013 (2013-03-26), pages 478-484, XP028564090, ISSN: 0021-9150, DOI: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2013.03.017	1-16,30, 31,33,34
A	the whole document, in particular title; abstract; page 479, column 1, lines 6-12, 41-60 and column 2, section "outcomes"; page 480, column 2, lines 10-14; page 481, column 1, lines 4-6, 12, 13; page 482, column 2, lines 13-17, 23-29, 35-39; page 483, column 1, lines 33-36; tables 1-3	17-29,32
X	Anonymous: "Bio-Rad Laboratories: Liquichek(TM) Cardiac Assessment Controls", Internet Article, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 1-6, XP055209922, Retrieved from the Internet: URL:http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/Q1521_Cardiac_Assessment.pdf [retrieved on 2015-08-27]	14,15, 30,31,34
X	US 2011/053179 A1 (DATWYLER SAUL A [US] ET AL) 3 March 2011 (2011-03-03)	1-16,30, 31,33,34
A	the whole document, in particular page 17, column 1, lines 1-3; page 18, paragraph [0154]; claims 1, 6, 7, 9; table 3	17-29,32
X	MARTIN-HERRERO FRANCISCO ET AL: "Homocysteine, Cause or Consequence?", INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, vol. 129, no. 2, 2008, pages 276-277, XP028928113, ISSN: 0167-5273, DOI: 10.1016/J.IJCARD.2007.08.091	1-16,30, 31,33,34
A	the whole document, in particular abstract; page 277, column 1, lines 11-16	17-19,32
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074242

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	N. R. COOK ET AL: "Comparison of the Framingham and Reynolds Risk Scores for Global Cardiovascular Risk Prediction in the Multiethnic Women's Health Initiative", CIRCULATION, vol. 125, no. 14, 10 April 2012 (2012-04-10), pages 1748-1756, XP055209903, ISSN: 0009-7322, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075929 the whole document -----	1-34
A	JEAN SANDERSON ET AL: "Derivation and assessment of risk prediction models using case-cohort data", BMC MEDICAL RESEARCH METHODOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 13 September 2013 (2013-09-13), page 113, XP021158734, ISSN: 1471-2288, DOI: 10.1186/1471-2288-13-113 the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/074242

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011053179 A1	03-03-2011	CA 2772014 A1	03-03-2011
		EP 2473852 A1	11-07-2012
		JP 5715137 B2	07-05-2015
		JP 2013503349 A	31-01-2013
		US 2011053179 A1	03-03-2011
		US 2013288269 A1	31-10-2013
		WO 2011026017 A1	03-03-2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ニエソル, エリック・ジ

スイス国、ツェーハー - 1 2 6 0 ニヨン、シュマン・ドゥ・ボンモン 1 3 セー

(72)発明者 キーンチュ - エンゲル, ローゼマリー

ドイツ国、8 2 3 4 0 フェルダッフィング、アウミラーシュトラッセ 9 アー

(72)発明者 クリーマ, ホルスト

ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、アム・シュヴァデルグラベン 2 3

(72)発明者 モデル, ファビアン

ドイツ国、7 9 6 1 8 ラインフェルデン、キルヒシュトラッセ 3 8

(72)発明者 ブックラー, ガブリエラ

スイス国、ツェーハー - 4 1 0 2 ビニンゲン、ドレンバッハシュトラッセ 9 7

(72)発明者 ロールニー, ヴィンツェント

ドイツ国、8 0 3 3 7 ミュンヘン、カプツィーナーシュトラッセ 2 5 アー

F ターム(参考) 4H045 BA10 CA40 DA32 EA50

专利名称(译)	生物标志物和预测方法		
公开(公告)号	JP2017533428A	公开(公告)日	2017-11-09
申请号	JP2017521488	申请日	2015-10-20
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ディターレトーマス ニエソルエリックジ キーンチュエンゲルローゼマリー クリーマホルスト モデルファビアン ブックラーガブリエラ ロールニーヴィンツェント		
发明人	ディターレ, トーマス ニエソル, エリック・ジ キーンチュ・エンゲル, ローゼマリー クリーマ, ホルスト モデル, ファビアン ブックラー, ガブリエラ ロールニー, ヴィンツェント		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/575		
CPC分类号	G01N33/6815 G01N33/6893 G01N2333/4737 G01N2333/58 G01N2800/32 G01N2800/50 G01N33/74 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.S C07K14/575.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA32 4H045/EA50		
优先权	2014189840 2014-10-22 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的主题是用于诊断经历过急性冠状动脉综合征的患者的后续心血管事件中的心血管事件的方法，包括检测NT-proBNP，同型半胱氨酸和CRP的水平（例如，由冠心病引起的死亡，非性心肌梗塞，缺血性中风，不稳定心绞痛反复住院治疗，心脏骤停）。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(2) 公表特許公報 (A)		(11) 特許出願公表番号	
				特表2017-533428 (P2017-533428A)	
				(43) 公表日 平成29年11月9日 (2017.11.9)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D 4 H 0 4 5	
C 0 7 K 14/575 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		S	
		C 0 7 K 14/575		Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)					
(21) 出願番号 特願2017-521488 (P2017-521488)		(71) 出願人 591003013			
(86) (22) 出願日 平成27年10月20日 (2015.10.20)		エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー			
(85) 翻訳文提出日 平成29年6月15日 (2017.6.15)		F. HOFFMANN-LA ROCHE			
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/074242		A K T I E N G E S E L L S C H A F T			
(87) 国際公開番号 WO2016/062709		T			
(87) 国際公開日 平成28年4月28日 (2016.4.28)		スイス・シェーイチー4 0 7 0 ハーゼル・			
(31) 優先権主張番号 14189840.3		グレンツァーヘルストラツェ 1 2 4			
(32) 優先日 平成26年10月22日 (2014.10.22)		(74) 代理人 110001508			
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		特許業務法人 津国			
		(72) 発明者			
		ディターレ、トーマス			
		ドイツ国、7 9 1 0 0 フライブルク、マ			
		ティエーヌーグリューネヴァルトーシュトラ			
		ーセ 1 5 ベー			
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 バイオマーカー及び予測方法					