

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6096669号
(P6096669)

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017.3.15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017.2.24)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 33/53	P
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1
		GO 1 N 27/62	V

請求項の数 34 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2013-542239 (P2013-542239)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月5日 (2011.12.5)
 (65) 公表番号 特表2014-502358 (P2014-502358A)
 (43) 公表日 平成26年1月30日 (2014.1.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/063267
 (87) 国際公開番号 W02012/078502
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012.6.14)
 審査請求日 平成26年10月6日 (2014.10.6)
 (31) 優先権主張番号 61/420,158
 (32) 優先日 平成22年12月6日 (2010.12.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/505,896
 (32) 優先日 平成23年7月8日 (2011.7.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500091313
 ユニヴァーシティ オヴ ピッツバーグ
 オヴ ザ コモンウェルス システム オヴ
 ハイアー エデュケーション
 アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 1
 5 2 6 0、ピッツバーグ、サッカレー ア
 ンド オハラ ストリーツ、ガードナー
 スティール コンファレンス センター
 2 0 0
 (73) 特許権者 513140798
 プリベンシオ, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 9 8 0 3 4 ワシントン
 州, カークランド, スイート 1 0 5, エ
 ヌイー 1 2 2 エヌディー ウェイ 1 1
 3 3 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性冠動脈症候群のバイオマーカー検査

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) オステオポンチン、レジスチン、インターロイキン1、インターフェロン、ミエロペルオキシダーゼ、血管細胞接着分子、フィブリノーゲン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、アポリポタンパク質B100、C反応性タンパク質、および30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質からなる群から選択される少なくとも2種のバイオマーカーの血清中レベルを測定するステップ、ここで前記バイオマーカーの血清中レベル測定は少なくとも1つの捕捉剤、試薬、技術的プラットフォームまたはその組み合わせの使用を含む;

(b) (a)で測定されたバイオマーカーの組み合わせについてオフセット値を決定するステップ;

(c) (a)で測定された各バイオマーカーの係数を決定するステップ;

(d) 以下の式I:

【数 1】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \text{Ln}(M_i(p) + C_i)$$

(式中、S(p)は患者pのITスコアであり、

定数 A_0 は「オフセット」であり

N はパネル中のマーカーの数であり

指数 i はパネル中のマーカーをリストし

係数 A_i は i 番目のITバイオマーカーの「係数」であり

$M_i(p)$ は患者 p の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_i は i 番目のバイオマーカーの「ローカットオフ」である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコアに変換するステップ;
および

(e) ITスコアをカットオフスコアと比較するステップ

を含み、ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いことを示し、またカットオフスコアより小さいITスコアは患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が高いことを示し、該重大な冠動脈疾患は、狭心症、息切れ、発汗、吐き気、意識朦朧、動悸、陽性の運動負荷試験、標準運動負荷試験中のEKGによるST下降、または少なくとも1つの冠動脈の少なくとも70%の狭窄のいずれか1種以上を生じさせる重大な冠動脈疾患である、方法。

10

【請求項 2】

オステオポンチンおよびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

インターロイキン1 およびオステオポンチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 4】

インターフェロン およびオステオポンチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

オステオポンチンおよびミエロペルオキシダーゼの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

オステオポンチン、血管細胞接着分子、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

オステオポンチン、フィブリノーゲン、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 8】

オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

オステオポンチン、レジスチン、およびアポリポタンパク質B100の血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、血管細胞接着分子およびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 11】

インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびミエロペルオキシダーゼの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびレジスチンの血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質の血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

50

【請求項 1 4】

インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質の血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 5】

インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよび30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質の血清中レベルを測定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

インターロイキン-6、インターロイキン10またはN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチドの血清中レベルが増加しているかどうか、またはアポリポタンパク質A-1の血清中レベルが減少しているどうかを測定するステップをさらに含み、ここで該増加および/または減少は重大な冠動脈疾患をさらに示すことを補助する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いかどうかを判定するためのキットであって、オステオポンチン、レジスチン、インターロイキン1、インターフェロン、ミエロペルオキシダーゼ、血管細胞接着分子、フィブリノーゲン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、アポリポタンパク質B100、C反応性タンパク質、30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質、インターロイキン-6、インターロイキン-10、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド、およびアポリポタンパク質A1からなる群から選択される少なくとも2種のITバイオマーカーを含むバイオマーカーのパネルの血清中レベルを測定するための少なくとも1つの捕捉剤、試薬、技術的プラットフォームまたはその組み合わせを含み、さらに前記キットは、ソフトウェアであって

(a) キットで使用されるITバイオマーカーの組み合わせについてオフセット値を決定するかまたは割り当て;

(b) キットで使用される各ITバイオマーカーの係数を決定するかまたは割り当て;

(c) 以下の式I:

【数 2】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

(式中、S(p)は症例pのITスコアであり、

定数A₀は「オフセット値」であり

Nはパネル中のマーカーの数であり

指数iはパネル中のマーカーをリストし

係数A_iはi番目のITバイオマーカーの「係数」であり

M_i(p)は症例pのi番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_iはi番目のバイオマーカーの「ローカットオフ」である)

を使用して、キットを使用して測定された血清中レベルをITスコアに変換し;

および

(d) ITスコアをカットオフスコアと比較する

前記ソフトウェアを含み、

ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは患者がさらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなくても有害心イベントの増大したリスクがないことを示し、カットオフスコアより小さいITスコアは患者がさらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなければ有害心イベントの増大したリスクがあることを示し、

該重大な冠動脈疾患は、狭心症、息切れ、発汗、吐き気、意識朦朧、動悸、陽性の運動負荷試験、標準運動負荷試験中のEKGによるST下降、または少なくとも1つの冠動脈の少なくとも70%の狭窄のいずれか1種以上を生じさせる重大な冠動脈疾患である、キット。

【請求項 1 8】

ITバイオマーカーがオステオポンチンおよびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 19】

ITバイオマーカーがインターロイキン1 およびオステオポンチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 20】

ITバイオマーカーがインターフェロン およびオステオポンチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 21】

ITバイオマーカーがオステオポンチンおよびミエロペルオキシダーゼである、請求項 17 記載のキット。

10

【請求項 22】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、血管細胞接着分子、およびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 23】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、フィブリノーゲン、およびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 24】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、およびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

20

【請求項 25】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、レジスチン、およびアポリポタンパク質B100である、請求項 17 記載のキット。

【請求項 26】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、血管細胞接着分子およびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 27】

ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびミエロペルオキシダーゼである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 28】

30

ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびレジスチンである、請求項 17 記載のキット。

【請求項 29】

ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質である、請求項 17 記載のキット。

【請求項 30】

ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質である、請求項 17 記載のキット。

【請求項 31】

ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよび30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質である、請求項 17 に記載のキット。

40

【請求項 32】

検出のための少なくとも1つの捕捉剤、試薬、技術的プラットフォームまたはその組み合わせが、抗体、または可変領域を含むそのフラグメントを含む、請求項 17 ~ 31 のいずれかに記載のキット。

【請求項 33】

検出のための少なくとも1つの捕捉剤、試薬、技術的プラットフォームまたはその組み合わせが微小流体デバイスを利用する、請求項 17 ~ 31 のいずれかに記載のキット。

【請求項 34】

50

検出のための少なくとも1つの捕捉剤、試薬、技術的プラットフォームまたはその組み合わせが質量分析を利用する、請求項17~31のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願情報

本出願は、2011年7月8日出願の米国仮特許出願第61/505,896号および2010年12月6日出願の米国仮特許出願第61/420,158号の優先権を主張する。該仮特許出願の内容は参照によりここに明示的に組み入れられる。

【0002】

10

助成金情報

該当なし。

【0003】

1. 序論

本発明は、バイオマーカーシグネチャ(signature)、および関連する重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低い患者の特定方法に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 発明の背景

欧米では、根底にひそむアテローム性動脈硬化症を典型的に伴う循環器病は死因の第1位である(Martin-Ventura et al., 2009, Rev. Esp. Cardiol 62(6):677-688, citing Murray and Lopez, 1997, Lancet 349:1269-1276)。心臓病の危険因子は周知であり、それには、高血圧症、高コレステロール、肥満症、および家族歴が含まれる。しかし、冠動脈疾患(「CAD」)の有病率およびその危険因子の認識にもかかわらず、症状と、介入を必要とする心イベントとの関連が依然として捕らえにくい。症状は非特異的であることがあり、胸の重苦しさの感覚はCADを反映することがあるが、胃の障害によって説明されることもあり; 左腕の痛みは狭心症であるか、または関節炎に起因することがある。痛みの起源が心臓であることがわかっている場合でさえ、どのレベルの治療が必要とされるかに関する疑問があることがあり; 一部のシナリオでは、投薬で十分であり、他のシナリオでは、悲惨な結果を回避するために外科的介入が必要である。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

有害な心イベントのリスクが高い患者を特定するためのいくつかのテクノロジーが開発されている。冠動脈造影は「最も基準になる検査(gold standard)」であるとみなされているが、侵襲的で、高価であり、かつ手術者に依存して変動しやすい(Sharma et al., 2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:307-316)。他の、探求されている低侵襲性の選択肢には、冠血管コンピュータ断層血管撮影(Sharma et al., supra; Cury et al., 2008, J. Nucl. Cardiol. 15(4):564-575)、バイオマーカー(例えば、Martin-Ventura et al., 2009, Rev. Esp. Cardiol 62(6):677-688)、アデノシン負荷磁気共鳴(adenosine stress magnetic resonance)(Ingkanisorn et al., 2006, J. Am. Coll. Cardiol. 47(7):1427-1432)、臨床予測因子(clinical predictors)の使用(Tadros et al., 2003, South Med. J. 96(11):1113-1120; Schillinger et al., 2004, Wien Klin. Wochenschr. 116(3):83-89)、および血小板活性の指標(Marcucci et al., 2009, Circulation 119:237-242 (originally published online Dec. 31, 2008); Selvaraj et al., 2004, J. Throm. Thrombolysis 18(2):109-115)が含まれる。現在、一般に許容される、緊急侵襲性介入を保証する症候性CADの非侵襲性マーカーは存在しない。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

3. 発明の要旨

50

本発明は、バイオマーカーシグネチャ、および関連する重大なCADを有する可能性が高い(したがって介入治療によって恩恵を受けうる)患者に対して、重大なCADを発症する可能性が低い患者の特定方法に関する。それは、少なくとも部分的に、心臓の障害または急性冠動脈症候群の臨床症状を有する239人の患者の血清サンプルで行われた研究に基づく。該患者の一部は侵襲性介入(ステント留置またはバイパス移植手術)を必要とした。重大なCADを有(し、かつ侵襲性介入を必要と)する被験体を、そうでない患者と識別する、異なる発現レベルを示す1セットのバイオマーカーが特定された。CADの存在およびその後の治療的な侵襲性介入の必要性の判定は各患者での冠動脈造影研究の実施に基づくものであった。さらに、これらのバイオマーカーの血清中レベルを使用して、各患者に、該患者が侵襲性介入を必要とするかどうかを示すスコアを割り当てるためのアルゴリズムが開発された。アルゴリズムによって処理されたバイオマーカー知見と冠動脈造影の結果との相関は、バイオマーカーシグネチャを使用して重大なCADを有さない患者を線引きできることを示した。

【0007】

4. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、CAD患者の検出に関する95%特異性を有する、健常患者の特定のための2~5種の血清タンパク質に関する受信者動作特性(ROC)を示す。4つの個別のパネルから得られたROC曲線を、CADを有する患者に関する95%の特異性を維持しつつ最高感度で健常患者を検出するよう最適化した。ROC曲線は、データセットのランダムに除外された部分(20%)の分類のために各バイオマーカーパネルを反復して(100回)検査することによって得られる。曲線下面積(AUC)は2、3、4および5種のタンパク質に関して同等であった。CAD患者に関する95%特異性での健常患者の検出感度は、2タンパク質= 44%、3タンパク質= 41%、4タンパク質= 50%および5タンパク質= 48%であった。

【図2】図2は、健常患者およびCAD患者由来の血清中のアポリポタンパク質(apolipoprotein) B-100、アポリポタンパク質-A1およびフィブリノーゲンの有意差を示す。黒い棒グラフは、健常患者から得られたアポリポタンパク質B-100 (Apo-B100)、アポリポタンパク質-A1 (Apo-A1)およびフィブリノーゲンに関する平均+標準偏差で表された値である。白い棒グラフは、冠動脈疾患(CAD)を有する患者から得られた結果である。値は、対数縦座標スケールでマイクログラム/ミリリットルで表され、各値はグループ間で有意に異なった(*) (表2を参照のこと)。

【図3】図3は、健常患者およびCAD患者由来の血清中の血管細胞接着分子、ミエロペルオキシダーゼ、c反応性タンパク質、レジスチンおよびオステオポンチンの有意差を示す。健常およびCADデータは図2にしたがって表示されるが、対数縦座標スケールでナノグラム/ミリリットルで表される。すべての比較は、血管細胞接着分子(VCAM-1)、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、c反応性タンパク質(CRP)、レジスチンおよびオステオポンチン(OPN)に関して表7 (*)で示される有意な統計学的差異を示す。

【図4】図4は、健常患者およびCAD患者由来の血清中のインターロイキン-6、1、10およびNT-pBNPの有意差を示す。健常およびCADデータは図2にしたがって表示されるが、対数縦座標スケールでピコグラム/ミリリットルで表される。すべての比較は、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-1 (IL-1b)、インターロイキン-10 (IL-10)およびNT末端フラグメントプロ脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-pBNP)に関して表2に報告される有意な統計学的差異(*)を示す。

【図5】図5は、CAD患者の検出に関する95%特異性を有する、健常患者の特定のための2~5種のタンパク質のパネルに関する受信者動作特性(ROC)を示す。ROC曲線は、CADを有する患者(138サンプル)に関する95%の感度を維持しつつ101人の健常患者(この図における真の陽性)を最高の特異性で検出するよう最適化された4つの個別のパネルから得られる。ROC曲線は、データセットのランダムに除外された部分(20%)の分類のために各バイオマーカーパネルを反復して検査することによって得られる。2タンパク質(OPNおよびレジスチン:

10

20

30

40

50

AUC=.839)、3タンパク質(OPN、レジスチン、apo-B100: AUC=.845)、4タンパク質(IFNg、OPN、MMP-7およびレジスチン: AUC=.839)および5タンパク質(IFNg、OPN、MMP-7、レジスチンおよびCRP: AUC=.827)に関する曲線で示されるように曲線下面積(AUC)は同等であった。CAD患者に関する95%感度での健常患者の検出の予測特異性は、2タンパク質= 50%、3タンパク質= 52%、4タンパク質= 63%および5タンパク質= 64%であった。

【発明を実施するための形態】

【0009】

5. 発明の詳細な説明

限定のためではなく、明確さを目的として、発明の詳細な説明を以下のサブセクションに分ける:

- (i) バイオマーカーパネル;
- (ii) 診断アルゴリズム;
- (iii) キット、および
- (iv) 方法。

【0010】

5.1 バイオマーカーパネル

本発明は、以下のバイオマーカー:

- オステオポンチン(「OPN」);
- レジスチン;
- インターロイキン1 (「IL1b」);
- インターフェロン (「IFNg」);
- ミエロペルオキシダーゼ(「MPO」);
- 血管細胞接着分子(「VCAM」);
- フィブリノーゲン;
- マトリックスメタロプロテイナーゼ7 (「MMP7」);
- アポリポタンパク質B100 (「APO-B100」);
- C反応性タンパク質(「CRP」); および
- 30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質 (「ACRP30」)

のうちの少なくとも2つを含むIT (「侵襲性治療(Invasive Treatment)」)バイオマーカーのパネルを提供する。

【0011】

パネルは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、または少なくとも11のITバイオマーカーを含んでよい。本発明の非限定的な実施形態では、該パネルは、上に列挙されるITバイオマーカーに加えて、追加バイオマーカー、例えば1種の追加バイオマーカー、2種の追加バイオマーカー、5種までの追加バイオマーカー、10種までの追加バイオマーカー、20種までの追加バイオマーカー、または50種までの追加バイオマーカーを含んでよく、ここで、パネル中の上記に列挙されるITバイオマーカー自体が、患者が侵襲性CAD介入の恩恵を受ける可能性が高いかどうか、かつ/または、さらなる侵襲性CAD介入がなければ有害心イベントのリスクが増加するかどうかに関する、統計学的に有意な情報を提供する。したがって、非限定的な実施形態では、パネルは、2~10、または1~20、または5~10、または5~20、または5~50種の総バイオマーカーで構成されてよい。

【0012】

別の非限定的な実施形態では、パネルは、上記の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、または少なくとも11種のITバイオマーカーを含んでよく、かつ以下の血清バイオマーカー: インターロイキン6 (「IL-6」)、インターロイキン-10 (「IL-10」)、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド(「NT-pBNP」)および/またはアポリポタンパク質A1 (「Apo-A1」)の少なくとも1または少なくとも2または少なくとも3または4種をさらに含んでよく、ここで、IL-6、IL-10およびNT-pBNPの血清中レベルは、CADを有する被験体で増加するこ

10

20

30

40

50

とが観察されており、かつApo-A1は減少することが観察されている(下記の実施例セクション7および8を参照のこと)。特定の非限定的な本発明の実施形態では、フィブリノーゲンの血清中レベルの4倍以上の増加、および/またはVCAM-1、MPO、CRP、レジスチンおよび/またはオステオポンチンの血清中レベルの約1.3~2.5倍の増加は重大なCADの診断と矛盾しない。

【0013】

重大なCADは、狭心症、息切れ、発汗、吐き気、意識朦朧、動悸、陽性の運動負荷試験、標準運動負荷試験中のEKGによるST下降、および/または少なくとも1つの冠動脈の少なくとも約70%の狭窄の1種以上を含む臨床症状および/または徴候を生じさせるCADである。

【0014】

有害心イベントは、心筋の永久的な損傷を生じさせる心臓の灌流の減少である。

【0015】

バイオマーカーはタンパク質であり、その血清中レベルは特定の生物学的状態と関連する。ITバイオマーカーはタンパク質であり、その血清中レベルは、患者が侵襲性CAD介入の恩恵を受ける可能性が高いかどうか、かつ/または、さらなる侵襲性CAD介入がなければ、有害心イベントのリスクが増加するかどうかと関連する。ITバイオマーカーの発現の予測値は、本明細書中で特定される少なくとも1種の付加ITバイオマーカーの発現レベルとともに考慮された場合に得られる。

【0016】

特定の非限定的な本発明の実施形態では、パネルは以下のITバイオマーカー：

OPNおよびレジスチン；

IL1bおよびOPN；

IFNgおよびOPN；

OPNおよびMPO；

OPN、VCAM、およびレジスチン；

OPN、フィブリノーゲン、およびレジスチン；

OPN、MMP7、およびレジスチン；

OPN、レジスチン、およびAPO-B100；

OPN、MMP7、VCAM、およびレジスチン；

IFNg、OPN、MMP7およびMPO；

IFNg、OPN、MMP7およびレジスチン；

OPN、MMP7、レジスチンおよびCRP；

IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびCRP；ならびに

IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびACRP30

を含んでよい。

【0017】

5.2 診断アルゴリズム

本発明は、さらに、上記ITバイオマーカーのパネルのレベルを、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定するために使用することができるスコア(以後、「ITスコア」または「SF」(採点関数(scoring function)))に変換するために使用することができるアルゴリズムを提供する。

【0018】

本発明では、以下の式1を使用してITスコアを計算することができる：

【数1】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0019】

式中、S(p)は症例pのITスコアであり、

10

20

30

40

50

定数 A_0 は「オフセット値」であり

N はパネル中のマーカーの数であり

指数 i はパネル中のマーカーをリストし

係数 A_i は i 番目のITバイオマーカーの「係数」であり

$M_i(p)$ は症例 p の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_i は i 番目のマーカーの「ローカットオフ(LowCutoff)」である。

【0020】

オフセット値(A_0)は所望の特異性(SP)、例えば、95%、85%、80%、などを維持するように選択することができ、かつ係数(A_i , $i=1, \dots, N$)は、式Iの感度を最適化するために最適化技術、例えば、Metropolisアルゴリズムを使用するMonte Carlo最適化を利用して決定することができる。一部の実施形態では、所望の特異性は、とりわけ、罹患患者を特定しそこなうという損失および健常患者を誤診するという損失などの評価事項を利用して選択することができる。特定の特異性のレベル、例えば、95%に関して、85% SPで最高のSNをもたらす採点関数を見出すことによって「カットオフスコア」(S_0)を決定することができ、次いで95%特異性をもたらすカットオフスコアを決定した。被験体 $S(p)$ のITスコアがカットオフスコア(S_0)より大きい場合、被験体 p をNIT(侵襲性CAD介入の恩恵を受ける可能性が高くないかまたはその可能性が低く、かつ/または、さらなる侵襲性CAD介入がなくても、有害心イベントのリスクが実質的に増加するわけではない患者)として分類する。 $S(p) < S_0$ の場合、被験体 p をIT(侵襲性CAD介入の恩恵を受ける可能性が高く、かつ/または、さらなる侵襲性CAD介入がなければ、有害心イベントのリスクが増加する患者)として分類する。ローカットオフ(C_i)は低いマーカー値での「不安定性」を低減するために式に含まれる。 C_i の値は各平均マーカー値の1/10に固定した。

10

20

【0021】

所定のマーカーパネル、例えば、2、3、4または5マーカーのパネルに関する式Iの性能を決定するために、係数(A_i)、およびカットオフ(C_i)を調節するためのトレーニングデータセットとしてデータセットの選択パーセンテージを使用して交差検定を実施することができる。調節された式Iをデータセットの別の選択部分に関して試験することができる。101人の健常患者および138人の罹患患者に関する24マーカーを含む一実施形態では、データの80%をトレーニングデータセットとして使用し、データの残りの20%を使用して、調節された採点関数の特異性および感度を試験した。パネルの平均特異性および感度が所望の精度、例えば、約1%に評価されるまで、交差検定を何回も繰り返すことができる。一部の実施形態では、交差検定を500回実施した。パネルの交差検定された特異性および感度の平均はパネル性能の指標であり、異なるパネルを格付けするために使用することができる。さらに、交差検定を利用して最適パネルサイズを決定することができる。一実施形態では、交差検定技術を使用して決定された3マーカーより大きいパネルの性能は、所定のサンプルサイズ、例えば、101人の健常患者および138人の罹患患者に対して該パネルが大き過ぎることを示した。より大きいデータセットを利用して、所望の性能を有する、より大きいパネル、例えば、4-および5-マーカーパネル、またはさらに大きいパネルを特定できることを当業者は理解する。

30

【0022】

一実施形態では、2、3、4および5マーカーのパネルを選択し、101人の健常患者および138人のCADを有する患者のグループに関して式Iを利用して試験した。各パネルサイズで、式Iを使用して、95%特異性での各パネルの感度を決定し、最高感度を有する50パネルを特定した。次いで、上で詳しく述べたように、選択パネルに関して交差検定を実施し、各パネルの性能を決定し、それに応じてパネルを格付けした。

40

【0023】

同一または別の実施形態では、式Iの交差検定の有効性を例証するために人工マーカー(例えば、調査対象の疾患と無関係のマーカー)をデータセットに導入することができる。各パネルの性能を決定しかつパネルを格付けした後、人工マーカーを有する最終順位の上位にあるパネルを特定することができる。例えば、一実施形態では、2-、3-、および4-マ

50

ーカーパネルに関していかなる人工マーカ―も含まない上位4パネルを特定し、かつ5-マーカ―パネルに関していかなる人工マーカ―も含まない上位2パネルを特定した。2-マーカ―パネルの上位4つはいかなる人工マーカ―も含まず；3-マーカ―パネルの上位6つのうちの4つはいかなる人工マーカ―も含まず；4-マーカ―パネルの上位6つのうちの4つはいかなる人工マーカ―も含まず；5-マーカ―パネルの上位38個のうちの2つはいかなる人工マーカ―も含まなかった。人工マーカ―は、当然、標的疾患の可能性を予測することができないので、上位パネルの1つに人工マーカ―が存在することにより、そのパネルの性能が偶然の一致である可能性が高いことを示すことができる。

【0024】

本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) OPN、レジスチン、IL1b、IFNg、MPO、VCAM、フィブリノーゲン、MMP7、APO-B100、CRP、ACRP30からなる群から選択される少なくとも2種のバイオマーカ―の血清中レベルを測定するステップ；

(b) (a)で測定されたバイオマーカ―の組み合わせについてオフセット値を決定するステップ；

(c) (a)で測定された各バイオマーカ―の係数を決定するステップ；

(d) 以下の式I：

【数2】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0025】

[式中、S(p)は症例pのITスコアであり、

定数A₀は「オフセット値」であり

Nはパネル中のマーカ―の数であり

指数iはパネル中のマーカ―をリストし

係数A_iはi番目のITバイオマーカ―の「係数」であり

M_i(p)は症例pのi番目のITバイオマーカ―のピコグラム/ml単位の濃度であり

C_iはi番目のマーカ―の「ローカットオフ」である

(ローカットオフ(C_i)は低いマーカ―値での「不安定性」を低減するために含ませる。C_iの正確な値は平均マーカ―値の1/10に固定する。)]

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコアに変換するステップ；
および

(e) ITスコアをカットオフスコアと比較するステップ

ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつカットオフスコアより小さいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す、を含む方法を提供する。

【0026】

特定の非限定的な本発明の実施形態では、式Iを使用する計算および14の異なるパネルのITバイオマーカ―のいずれかに基づく患者のITスコアの解釈に使用することができるオフセット値、係数、およびカットオフスコアは下記の表2に記載される。

【0027】

したがって、特定の非限定的な一実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) OPNおよびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ；

(b) 以下の式I：

10

20

30

40

【数3】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0028】

(式中、オフセット値 A_0 は16.35であり、

N=2であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、OPNの係数 A_1 は-0.70であり、かつレジスチンの係数 A_2 は-0.82であり、 $M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、およびOPNのローカットオフ C_1 は3533であり、かつレジスチンの C_2 は9378.3である)を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ；

ここに、0.47より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.47より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

【0029】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) IL1bおよびOPNの血清中レベルを測定するステップ；

(b) 以下の式I：

【数4】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0030】

(式中、オフセット値 A_0 は14.66であり、

N=2であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、IL1bの係数 A_1 は-1.12であり、かつOPNの係数 A_2 は-1.06であり、 $M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、およびIL1bのローカットオフ C_1 は8.6であり、かつOPNの C_2 は3533である)を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ；

ここで、1.39より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ1.39より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

【0031】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) IFNgおよびOPNの血清中レベルを測定するステップ；

(b) 以下の式I：

【数5】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0032】

10

20

30

40

50

(式中、オフセット値 A_0 は11.91であり、
N=2であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

IFNgの係数 A_1 は-0.60であり、かつOPNの係数 A_2 は-1.14であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および
IFNgのローカットオフ C_1 は0.4123であり、かつOPNの C_2 は3533である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ;

ここで、0.97より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.97より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

10

【0033】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPNおよびMPOの血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数6】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

20

【0034】

(式中、オフセット値 A_0 は16.28であり、

N=2であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.68であり、かつMPOの係数 A_2 は-0.72であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および
OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、かつMPOの C_2 は54192である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ;

ここで、0.57より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.57より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

30

【0035】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPN、VCAMおよびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数7】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

40

【0036】

(式中、オフセット値 A_0 は19.72であり、

N=3であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.60であり、VCAMの係数 A_2 は-0.37であり、かつレジスチンの係数 A_3 は-0.75であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および

50

OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、VCAMの C_2 は102448であり、かつレジスチンの C_3 は9378.3である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ;

ここで、0.44より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.44より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

【0037】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPN、フィブリノーゲンおよびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数8】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0038】

(式中、オフセット値 A_0 は19.38であり、

$N=3$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.60であり、フィブリノーゲンの係数 A_2 は-0.28であり、かつレジスチンの係数 A_3 は-0.79であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、およびOPNのローカットオフ C_1 は3533であり、フィブリノーゲンの C_2 は1236057であり、かつレジスチンの C_3 は9378.3である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ;

ここで、0.5より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.5より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

【0039】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPN、MMP7およびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数9】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0040】

(式中、オフセット値 A_0 は18.96であり、

$N=3$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.74であり、MMP7の係数 A_2 は-0.36であり、かつレジスチンの係数 A_3 は-0.74であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および

OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、MMP7の C_2 は519.89であり、かつレジスチンの C_3

は9378.3である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ;

ここで、0.49より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.49より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【0041】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPN、レジスチン、およびAPO-B100の血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数10】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0042】

(式中、オフセット値 A_0 は19.88であり、

$N=3$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.50であり、レジスチンの係数 A_2 は-0.57であり、かつAPO-B100の係数 A_3 は-0.42であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および

OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、レジスチンの C_2 は9378.3であり、かつAPO-B100の C_3 は32404058である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ;

ここで、0.35より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.35より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【0043】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) OPN、MMP7、VCAMおよびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ;

(b) 以下の式I:

【数11】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【0044】

(式中、オフセット値 A_0 は21.98であり、

$N=4$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.60であり、MMP7の係数 A_2 は-0.37であり、VCAMの係数 A_3 は-0.32であり、かつレジスチンの係数 A_4 は-0.73であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および

OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、MMP7の C_2 は519.89であり、VCAMの C_3 は102448であり、かつレジスチンの C_4 は9378.3である)

10

20

30

40

50

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ；

ここで、0.41より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.41より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【0045】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) IFNg、OPN、MMP7およびMPOの血清中レベルを測定するステップ；

(b) 以下の式I：

【数12】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \text{Ln}(M_i(p) + C_i)$$

【0046】

(式中、オフセット値 A_0 は19.05であり、

$N=4$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

IFNgの係数 A_1 は-0.38であり、OPNの係数 A_2 は-0.80であり、MMP7の係数 A_3 は-0.35であり、かつMPOの係数 A_4 は-0.59であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、およびIFNgのローカットオフ C_1 は0.4123であり、OPNの C_2 は3533であり、MMP7の C_3 は519.89であり、かつMPOの C_4 は54192である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ；

ここで、0.56より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.56より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【0047】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ：

(a) IFNg、OPN、MMP7、およびレジスチンの血清中レベルを測定するステップ；

(b) 以下の式I：

【数13】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \text{Ln}(M_i(p) + C_i)$$

【0048】

(式中、オフセット値 A_0 は19.57であり、

$N=4$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

IFNgの係数 A_1 は-0.22であり、OPNの係数 A_2 は-0.88であり、MMP7の係数 A_3 は-0.61であり、かつレジスチンの係数 A_4 は-0.47であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、およびIFNgのローカットオフ C_1 は0.4123であり、OPNの C_2 は3533であり、MMP7の C_3 は519.89であり、かつレジスチンの C_4 は9378.3である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア(S(p))に変換するステップ；

ここで、0.58より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示

10

20

30

40

50

し、かつ0.58より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【 0 0 4 9 】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

- (a) OPN、MMP7、レジスチンおよびCRPの血清中レベルを測定するステップ;
- (b) 以下の式I:

【数 1 4】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

10

【 0 0 5 0 】

(式中、オフセット値 A_0 は22.50であり、

$N=4$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

OPNの係数 A_1 は-0.69であり、MMP7の係数 A_2 は-0.73であり、レジスチンの係数 A_3 は-0.55であり、かつCRPの係数 A_4 は-0.25であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および OPNのローカットオフ C_1 は3533であり、MMP7の C_2 は519.89であり、レジスチンの C_3 は9378.3であり、かつCRPの C_4 は51754である)

20

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ;

ここで、0.56より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.56より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示すを含む方法を提供する。

【 0 0 5 1 】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

- (a) IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびCRPの血清中レベルを測定するステップ;
- (b) 以下の式I:

【数 1 5】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

30

【 0 0 5 2 】

(式中、オフセット値 A_0 は21.77であり、

$N=5$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

IFNgの係数 A_1 は-0.18であり、OPNの係数 A_2 は-0.74であり、MMP7の係数 A_3 は-0.76であり、レジスチンの係数 A_4 は-0.50であり、かつCRPの係数 A_5 は-0.16であり、

40

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および IFNgのローカットオフ C_1 は0.4123であり、OPNの C_2 は3533であり、MMP7の C_3 は519.89であり、レジスチンの C_4 は9378.3であり、CRPの C_5 は51754である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ;

ここで、0.47より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.47より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

50

を含む方法を提供する。

【0053】

別の特定の非限定的な実施形態では、本発明は、患者が重大なCADを発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

- (a) IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびACRP30の血清中レベルを測定するステップ;
- (b) 以下の式I:

【数16】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i) \quad 10$$

【0054】

(式中、オフセット値 A_0 は11.41であり、

$N=5$ であり、

指数 i はパネル中のマーカーをリストし、

IFNgの係数 A_1 は-0.35であり、OPNの係数 A_2 は-0.82であり、MMP7の係数 A_3 は-0.22であり、レジスチンの係数 A_4 は-0.53であり、かつACRP30の係数 A_5 は0.33であり、

$M_i(p)$ は患者の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり、および

IFNgのローカットオフ C_1 は0.4123であり、OPNの C_2 は3533であり、MMP7の C_3 は519.89であり、レジスチンの C_4 は9378.3であり、ACRP30の C_5 は493266である) 20

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコア($S(p)$)に変換するステップ;

ここで、0.61より大きいITスコアは患者が重大なCADを発症する可能性が低いことを示し、かつ0.61より小さいITスコアは、95%特異性で、患者が重大なCADを発症する可能性が高く、かつ侵襲性介入の恩恵を受けるかもしれないことを示す

を含む方法を提供する。

【0055】

5.3 キット

本発明は、上で考察されるITバイオマーカーを検出するためのキットを提供する。そのようなキットは、OPN、レジスチン、IL1b、IFNg、MPO、VCAM、フィブリノーゲン、MMP7、APO-B100、CRP、ACRP30からなる群から選択される少なくとも2種のITバイオマーカーを含むバイオマーカーパネルの血清中レベルを測定するための手段を含んでよい。該キットは、場合により、IL-6、IL-10、NT-pBNPおよびApo-A1からなる群から選択される血清バイオマーカーの血清中レベルを測定するための手段をさらに含んでよい。非限定的な実施形態では、パネルは、2~10、または1~20、または5~10、または5~20、または5~50種の総バイオマーカーからなるものであってもよい。そのような血清中レベルを測定するための手段は当技術分野において公知であり、それには、例えば、場合により検出可能に標識されている、捕捉剤(capture agent)の使用が含まれ、ここに、捕捉剤はバイオマーカーおよび/または捕捉剤と結合する検出剤とともに使用することができる。捕捉剤は、例えば、非限定的に、抗体、FabまたはFab2フラグメントなどの抗体の部分、単鎖抗体、バイオマーカーもしくはその部分の受容体またはバイオマーカーもしくはその部分のリガンドであってよい。同様に、検出剤は、例えば、非限定的に、抗体、FabまたはFab2フラグメントなどの抗体の部分、単鎖抗体、バイオマーカーもしくは捕捉剤またはその部分の受容体またはバイオマーカーもしくは捕捉剤またはその部分のリガンドであってよい。捕捉剤および/または検出剤は、放射性標識、蛍光標識、化学標識、オリゴヌクレオチド標識、酵素標識、またはタンパク質標識(例えば、緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質)を使用して検出可能に標識することができる。使用することができる標準的技術には、例えば、酵素結合免疫吸着検定(「ELISA」)またはウエスタンブロットが含まれる。 40

【0056】

上記方法に加えて、サンプル中のタンパク質のレベルを定量的に測定するための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、抗体に基づかない方法を本発明の方法およびキットで 50

使用することができる。例えば、質量分析ベース(例えば、多重反応モニタリング(MRM)質量分析)またはHPLCベースの方法を使用することができる。タンパク質定量の方法は、例えば、Ling-Na Zheng et al., 2011, J. of Analytical Atomic Spectrometry, 26, 1233-1236; Vaudel, M., et al., 2010, Proteomics, Vol. 10: 4; Pan, S., 2009 J. Proteome Research, Feb; 8(2):787-97; Westermeier and Marouga, 2005, Bioscience Reports, Vol. 25, Nos. 1/2; Carr and Anderson, 2008, Clinical Chemistry. 54:1749-1752; およびAebersold and Mann, 2003, Nature, Vol. 422に記載される。

【 0 0 5 7 】

追加の、より最近のテクノロジー、例えばプロテオミクス分野で使用されるテクノロジーを本発明のキットで具現化してもよい。そのようなテクノロジーには、例えば、米国特許出願第US 2008/0202927号; Sorger, 2008, Nature Biotechnol. 26:1345-1346; Li et al., 2002, Mol. Cell. Proteomics 1.2:157; Hou et al., 2006, J. Proteome Res. 5(10):2754-2759; Li et al., 2001, Proteomics 1(8):975-986; Ramsey et al., 2003, Anal. Chem. 75(15):3758-3764; Armenta et al., 2009, Electrophoresis 30(7): 1145-1156; Lynch et al., 2004, Proteomics 4(6):1695-1702; Kingsmore et al., 2003, Curr. Opin. Biotechnol. 14(1):74-81)に記載される、微小流体チップおよび関連テクノロジーの使用が含まれる。

10

【 0 0 5 8 】

非限定的な本発明の実施形態では、キットは、ITバイオマーカーの以下の組み合わせ:

OPNおよびレジスチン;

IL1bおよびOPN;

IFNgおよびOPN;

OPNおよびMPO;

OPN、VCAM、およびレジスチン;

OPN、フィブリノーゲン、およびレジスチン;

OPN、MMP7、およびレジスチン;

OPN、レジスチン、およびAPO-B100;

OPN、MMP7、VCAM、およびレジスチン;

IFNg、OPN、MMP7およびMPO;

IFNg、OPN、MMP7およびレジスチン;

OPN、MMP7、レジスチンおよびCRP;

IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびCRP; ならびに

IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびACRP30

のうちの1つを含むバイオマーカーパネルの血清中レベルを測定するための手段を提供する。

20

30

【 0 0 5 9 】

特定の非限定的な例では、検出のための手段はITバイオマーカーと結合する抗体または可変領域を含むそのフラグメントであり、ここで、該抗体またはフラグメントは直接または間接的に検出可能に標識されている。当技術分野で公知のように、間接的標識は二次抗体または標識型のITバイオマーカーであってよい。

40

【 0 0 6 0 】

非限定的な本発明の実施形態では、キットは、(i) キット中で使用されるITバイオマーカーの組み合わせに関するオフセット値を決定するかまたは割り当て; (ii) キット中で使用される各ITバイオマーカーの係数を決定するかまたは割り当て; (iii) 以下の式I:

【 数 1 7 】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

【 0 0 6 1 】

50

(式中、 $S(p)$ は症例 p のITスコアであり、

定数 A_0 は「オフセット値」であり

N はパネル中のマーカ-の数であり

指数 i はパネル中のマーカ-をリストし

係数 A_i は i 番目のITバイオマーカ-の「係数」であり

$M_i(p)$ は症例 p の i 番目のITバイオマーカ-のピコグラム/ml単位の濃度であり

C_i は i 番目のマーカ-の「ローカットオフ」である)

を使用して、キットを使用して測定された血清中レベルをITスコアに変換し; および

(iv) ITスコアをカットオフスコアと比較する

ソフトウェアをさらに含んでよく、

10

ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは、患者が、さらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなくても有害心イベントのリスクが増加しないことを示し、かつカットオフスコアより小さいITスコアは、患者が、さらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなければ有害心イベントのリスクが増加することを示す。特定の非限定的な本発明の実施形態では、式1を使用する計算および14の異なるITバイオマーカ-パネルのいずれかに基づく患者のITスコアの解釈のためにこのソフトウェアによって使用することができる、オフセット値、係数、およびカットオフスコアは下記の表2に記載される。

【0062】

5.4 方法

本発明は、非限定的に、胸痛、顎痛、肩痛、腕痛、息切れ、発汗、脱力、および吐き気の1種以上を含む、冠動脈疾患と合致する1種以上の症状を患っている患者を治療する方法であって、上記診断方法を実施するステップ、およびITスコアが、患者が重大なCADを発症する可能性が高い(したがって、さらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなければ、有害心イベントのリスクが増加している)ことを示す場合、侵襲性CAD介入処置を患者に推奨するステップを含む方法を提供する。好適な侵襲性CAD介入処置には、非限定的に、ステント留置、バルーン拡張術、レーザー血管形成術、ロータリーアテレクトミー、バイパス移植留置、およびペースメーカー留置の1種以上が含まれる。本発明はまた、該処置を実施するさらなるステップを提供する。

20

【0063】

関連の実施形態では、本発明は、非限定的に、胸痛、顎痛、肩痛、腕痛、息切れ、発汗、脱力、および吐き気の1種以上を含む冠動脈疾患と合致する1種以上の症状を患っている患者を治療する方法であって、患者において、以下のタンパク質:Apo-B100、フィブリノーゲン、VCAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、CRP、レジスチン、オステオポンチン、IL-6、IL-1b、IL-10およびNT-pBNPのうちの1または2または3または4または5または6または7または8または9または10または11種の血清中レベルが増加しているかどうか、および/またはApo-A1のレベルが減少しているかどうかを判定するステップを含み、ここで該増加および/または減少は重大なCADを有する患者と一致する、方法を提供する。そのような方法は、独立して、または上記ITスコアの作製と併せて実施してよい。結果が重大なCADを有する患者と一致すれば、侵襲性CAD介入処置を推奨または実施してよい。

30

【0064】

一部の実施形態では、本発明の方法を1種以上の追加の臨床採点システムと併せて使用して、患者の適切な臨床方針を決定する。例えば、上記方法を実施し、かつ結果が、患者は侵襲性CAD介入を必要とするCADを有さないことを示すが、患者がCADの他の危険因子(例えば、高齢または肥満症)または追加の健康問題を有する場合、医師は全体のリスクを考慮し、侵襲性CAD介入処置を推奨するかまたは実施することができる。

40

【実施例】

【0065】

6. 実施例:CADバイオマーカ-の特定

心臓負荷の臨床症状を有する239人の患者由来の血清サンプルを評価した。全患者は冠動脈疾患(CAD)の診断のための冠動脈造影検査を受けた。これらの患者のうち138人は、そ

50

の後のCADの医療処置、すなわち、ステントの留置または冠動脈バイパス移植手術を含む経皮介入(PCI)を必要とした。これらの患者をP群と称する。すべての血清標本を、96ウェルマイクロプレートにスポットされたモノクローナル捕捉抗体の使用を通して24種のタンパク質を標的にする多重サンドイッチELISAプロトコールを使用してアッセイした。最初の標的捕捉後のアッセイで蛍光マーカで標識された異なるセットのモノクローナル検出抗体の使用を通して二次レベルの特異性を得る。表1に、P群(PCI) 対 CADに関する経皮介入を受けなかった101人の被験体のN群の、ピコグラム/ミリリットル単位の平均濃度値で結果を表す。対応のない標準学生t検定由来の最も低いp値に従ってタンパク質を格付けする。7つの検体は、P対N被験体から得られた値の24種の標的に関するBonferoni補正後に統計的に有意であった(0.05/n:24= 0.0020)。

【 0 0 6 6 】

表 1

タンパク質	平均 N	標準偏差	平均 P	標準偏差	P 値	タンパク質
OPN	16227.3	15964.3	49567.6	40913.3	2.47E-13	OPN
Apo-A1	3.01E+08	2.59E+08	1.54E+08	1.35E+08	3.93E-08	Apo-A1
VCAM	8.38E+05	3.69E+05	1.17E+06	4.99E+05	5.08E-08	VCAM
Apo-B100	3.01E+08	8.26E+07	3.43E+08	7.87E+07	5.53E-05	Apo-B100
MPO	4.46E+05	2.64E+05	6.16E+05	3.69E+05	9.41E-05	MPO
IL1b	48.0	117.7	113.7	168.8	0.0009	IL1b
CRP	2.75E+05	5.49E+05	6.99E+05	1.24E+06	0.0016	CRP
NT-pBNP	41.1	111.1	101.7	202.5	0.0070	NT-pBNP
レジスチン	8.10E+04	6.20E+04	1.04E+05	7.00E+04	0.0094	レジスチン
フィブリノーゲン	3.95E+06	6.27E+06	1.86E+07	5.91E+07	0.0139	フィブリノーゲン
IL6	578.3	1135.9	942.3	1154.5	0.0163	IL6
IL10	3.2	3.5	7.5	18.2	0.0183	IL10
MMP1	4751.2	2249.5	5341.6	2404.8	0.0541	MMP1
MMP7	4896.7	3018.6	5457.7	2408.6	0.1106	MMP7
レプチン	13941.2	17598.7	10612.3	15495.5	0.1232	レプチン
TNFa	22.4	73.4	15.0	19.4	0.2603	TNFa
L-セレクチン	1.15E+06	2.99E+05	1.11E+06	2.71E+05	0.3189	L-セレクチン
Acrp30	5.21E+06	3.86E+06	4.77E+06	3.46E+06	0.3536	Acrp30
PECAM-1	32059.6	28990.9	35035.6	25334.5	0.3997	PECAM-1
TIMP1	3.20E+05	1.15E+05	3.29E+05	8.79E+04	0.4804	TIMP1
MCP1	3069.1	3518.0	3347.3	3418.7	0.5402	MCP1
TM	1444.0	864.4	1391.7	444.4	0.5414	TM
IFNg	3.9	12.9	4.3	7.7	0.7831	IFNg
E-セレクチン	33942.6	19238.4	34308.7	16525.3	0.8743	E-セレクチン

表1で、列に表示されたタンパク質は、OPN: オステオポンチン、Apo-A1: アポリポタンパク質A1、VCAM: 血管細胞接着分子、Apo-B100: アポリポタンパク質B100、MPO: ミエロペルオキシダーゼ、IL1b: インターロイキン1ベータ、CRP: c反応性タンパク質、NT-pBNP: N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド、レジスチン、フィブリノーゲン、IL6: インタ

10

20

30

40

50

ーロイキン6、IL10: インターロイキン10、MMP1: マトリックスメタロプロテイナーゼ1、MMP7: マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レプチン、TNF α : 腫瘍壊死因子アルファ、L-セレクチン: 白血球細胞接着分子1、Acrp30: 30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質、PECAM-1: 血小板内皮細胞接着分子1、TIMP1: メタロプロテイナーゼ1の組織インヒビター、MCP1: 単球走化性タンパク質1、TM: トロポモジュリン、IFN γ : インターフェロンガンマ、E-セレクチン: 内皮接着分子1を含む患者血清群中で検査されたマーカーを示す。N群(n=101サンプル)およびP群(n=138サンプル)の平均および標準偏差をピコグラム/ml単位で報告し、対応のない値のシュューデントT検定によってp値を得た。複数回の検定のボンフェローニ補正に基づいてp<0.002未満の値を有意とし、それを強調表示している。

【0067】

10

これらの24マーカーをpost hocベースで評価して、バイオマーカーシグネチャを、P群由来の患者(PCIを受けた患者)をN群(PCIなし)と識別するそれらの能力に関して選択した。P群に関する高い特異性(SP)を維持しつつ、すなわちSPをトータル138のうち7つの誤分類P症例しか生じない95%で固定して、N群のメンバーを分類する最高感度(SN)に基づき、2、3、4または5マーカーから構成されるマルチマーカーパネルを線引きした。パネルの最終選択はSP=95%での最高の性能に基づき、予測性能が85%および90% SPでも良好であることを追加の必要条件とした。ほぼ等しい数の誤分類PおよびN症例を生じさせ、ならびにPとNとを識別するパネルの選択のために最高の条件を提供する条件であるSP=85%でパネルの予備的評価を実施した。

【0068】

20

各バイオマーカー群に関して、85% SPで最高のSNを提供する採点関数(SF)を定義し、次いでSP=95%を提供するカットオフスコアを決定した。トレーニングセットから20%の症例をランダムに除去し、残りの80%の症例のSFを最適化し、かつSFを使用して除去された症例を診断することによってパネルを交差検定した。交差検定処理を100回繰り返し、平均ROC曲線を蓄積し、曲線下面積(AUC)およびSP=90%、95%および98%での感度を決定した。

【0069】

採点法(SF) (「ITスコア」)を計算するために使用される分析型のアルゴリズムは:

【数18】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \text{Ln}(M_i(p) + C_i)$$

30

【0070】

S(p)は症例pのスコアであり、

定数A₀は「オフセット」であり

Nはパネル中のマーカーの数であり

指数iはパネル中のマーカーをリストし

係数A_iはi番目のマーカーの「係数」であり

M_i(p)は症例pのi番目のマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_iはi番目のマーカーの「ローカットオフ」である

である。

40

【0071】

最適化アルゴリズムは、P群とN群とを最も良く識別するスコアを提供するオフセット(A₀)および係数(A_i, i=1, . . . N)を決定した。特定のSP、例えば95%で、「カットオフ」S₀を決定することができる。S(p) > S₀の場合、症例pをNに分類する。S(p) < S₀の場合、症例pをPに分類する。低いマーカー値での「不安定さ」を低減するためにローカットオフ(C_i)を式に含める。C_iの値を各平均マーカー値の1/10に固定した。

【0072】

採点関数(SF)アルゴリズムは、高い感度でN値とP値とを識別する能力を有する、2~5種の個別のマーカーを含む一連のマーカーパネルを記述した。14の組み合わせでの12種の個

50

別のマーカーを、これらマーカーパネルで示した。各バイオマーカーパネル内の各マーカーの係数およびそのオフセット値を表2に表示する。

【0073】

表2

	オフセット Ao	マーカー	係数 Ai	マーカー	係数 Ai	マーカー	係数 Ai	マーカー	係数 Ai	マーカー	係数 Ai
1	16.35	OPN	-0.70	レジスチン	-0.82						
2	14.66	IL1b	-1.12	OPN	-1.06						
3	11.91	IFNg	-0.60	OPN	-1.14						
3	16.28	OPN	-0.68	MPO	-0.72						
5	19.72	OPN	-0.60	VCAM	-0.37	レジスチン	-0.75				
6	19.38	OPN	-0.60	フィブリノーゲン	-0.28	レジスチン	-0.79				
7	18.96	OPN	-0.74	MMP7	-0.36	レジスチン	-0.74				
8	19.88	OPN	-0.50	レジスチン	-0.57	Apo-B100	-0.42				
9	21.98	OPN	-0.60	MMP7	-0.37	VCAM	-0.32	レジスチン	-0.73		
10	19.05	IFNg	-0.38	OPN	-0.80	MMP7	-0.35	MPO	-0.59		
11	19.57	IFNg	-0.22	OPN	-0.88	MMP7	-0.61	レジスチン	-0.47		
12	22.50	OPN	-0.69	MMP7	-0.73	レジスチン	-0.55	CRP	-0.25		
13	21.77	IFNg	-0.18	OPN	-0.74	MMP7	-0.76	レジスチン	-0.50	CRP	-0.16
14	11.41	IFNg	-0.35	OPN	-0.82	MMP7	-0.22	レジスチン	-0.53	ACRP30	0.33

						カットオフ値			
					SP	85%	90%	95%	99%
1	OPN	レジスチン				0.29	0.34	0.47	0.90
2	IL1b	OPN				0.85	1.03	1.39	1.80
3	IFNg	OPN				0.45	0.60	0.97	1.45
4	OPN	MPO				0.20	0.35	0.57	0.77
5	OPN	VCAM	レジスチン			0.21	0.33	0.44	0.84
6	OPN	フィブリノーゲン	レジスチン			0.29	0.40	0.50	0.73
7	OPN	MMP7	レジスチン			0.25	0.40	0.49	0.86
8	OPN	レジスチン	APO-B100			0.20	0.26	0.35	0.80
9	OPN	MMP7	VCAM	レジスチン		0.22	0.31	0.41	0.81
10	IFNg	OPN	MMP7	MPO		0.20	0.44	0.56	1.15
11	IFNg	OPN	MMP7	レジスチン		0.22	0.38	0.58	0.89
12	OPN	MMP7	レジスチン	CRP		0.25	0.36	0.56	0.88
13	IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	CRP	0.26	0.36	0.47	1.06
14	IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	ACRP30	0.15	0.31	0.61	1.08

【0074】

表2中、表の最上部の列は、個別のマーカーパネルを使用して血清サンプルを分類するための、採点関数アルゴリズムによって得られたオフセット値および係数コンポーネントを提供する。下の表は、85%~99%の範囲のPに関する種々の特異性でのN対P分類の判定の

10

20

30

40

50

ためのカットオフ値を提供する。SPが高いほど、少ないNサンプルが分類され、低下していくP値しか誤分類されない(15%~1%)。

【 0 0 7 5 】

表2の数字13で表示される5種のバイオマーカーシグネチャに関して、濃度データを処理してPの分類に関する95%感度でスコアを得る例を表3に記載する。N0010およびP0088で表示された行は、2人の代表的な患者で得られた血清サンプル濃度値であり、IFNg、OPN、MMP7、レジスチンおよびCRPに関するピコグラム/ml単位の5つの計測値を含む。黄色の強調表示は、採点アルゴリズムで使用される値を示す。

【 0 0 7 6 】

表 3

マーカー	係数	ロー カ ット オ フ											
IFNg	-0.18	0.4123											
OPN	-0.74	3533											
MMP7	-0.76	519.89											
レジスチン	-0.5	9378.3											
CRP	-0.16	51754											
オフセット:	21.77												
カットオフ:	0.466												
						LN (IFNg +Cut)	LN (OPN +Cut)	LN (MMP7 +Cut)	LN (レジ スチン +Cut)	LN (CRP +Cut)	スコ ア	DIAGN	
ローカ ットオ フ	0.41	3533.04	519.89	9378.30	51753.58								
N0010	0.4	8317.9	4234.6	62707.3	65147.3	-0.208	9.3802	8.4668	11.185	11.67	0.972	N	
P0088	5	4925.5	5599.3	296331	2062691	1.689	9.0429	8.7192	12.630	14.56	-0.497	P	

【 0 0 7 7 】

表3中、N0010行の強調表示された血清値に続く5つのセルは各バイオマーカーに関する濃度およびローカットオフ値の和の自然対数(LN)として得られた値である[例えばLN (IFNg + Cut)= LN (0.40+0.41)=-0.208]。これらの値を、各マーカーおよびそのローカットオフ値に関して逐次導き出す。そして、各マーカーの係数と、各マーカーおよびそのカットオフ値に関して以前に得られた自然対数計算値との積の合計にオフセット値を加算することによって全体のスコアを得る。

【 0 0 7 8 】

表3に挙げる例でかつ患者N0010に関する値の場合:
スコア= 21.77+(-0.18)(-0.208)+(-0.74)(9.3802)+(-0.76)(8.4668)+(-0.5)(11.185)+(-0.16)(11.67)
スコア=0.972
診断分類=N。

【 0 0 7 9 】

患者P0088に関する値の場合:
スコア= 21.77+(-0.18)(1.689)+(-0.74)(9.0429)+(-0.76)(8.7192)+(-0.5)(12.630)+(-0.16)(14.56)
スコア=-0.497

診断分類=P。

【 0 0 8 0 】

スコアがバイオマーカーシグネチャのカットオフ値(このパネルでは、Pに関する95%感度でカットオフ=0.466)より大きければ、サンプルを「診断」列(DIAGN)でNに分類する。それがカットオフより小さければ、Pに分類する。その結果、試験セットの患者に関するNおよびPの診断を取得し、臨床知見を確認した。一連の濃度値をバイオマーカーエントリ列に入力し、かつサブルーチンをその後のセルに適用して、最終採点値を得るソフトウェアプログラムまたはマクロサブルーチンを使用して任意のセットの指定マーカーパネルをこの様式で適用することができる。マーカーパネルが5エントリより少ないエントリからなる場合、余剰の位置にゼロを入力する。表3で得られた値を計算するために使用されるサブルーチンを以下で強調して示す。ここでは、プログラムされたサブルーチンに座標を指定するために行および列をラベルした。

10

【 0 0 8 1 】

表 3 A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	マーカー	Coeff	ローカット										
2	IFNg	-0.18	0.4123										
3	OPN	-0.74	3533										
4	MMP7	-0.76	519.89										
5	レジスチン	-0.5	9378.3										
6	CRP	-0.16	51754										
7	オフセット:	21.7 7											
8	カットオフ:	0.46 6											
9		IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	CRP	LN (IFNg +Cut)	LN (OPN +Cut)	LN (MMP7 +Cut)	LN (レジスチン +Cut)	LN (CRP +Cut)	スコア	DIA
10	ローカットオフ	0.41	3533.0 4	519.8 9	9378.30 8	51753.5 8							
11	N0010	0.4	8317.9 6	4234. 6	62707.3 6	65147.3 6	-0.208 0	9.38 0	8.467 0	11.185 0	11.6 7	0.972 0	N

20

30

【 0 0 8 2 】

表3を、データエントリに対して採点関数アルゴリズムを実行するためのマクロサブルーチンを含むセル上の強調部分を示す表3Aとして上に再現する。セルは以下、表3で相応にラベルされるエントリの値を計算するために得られた基礎となるサブルーチン(強調表示)を含む。これらのサブルーチンは、採点関数アルゴリズムを、患者血清値の入力時にスコアおよび診断(DIA)を自動的に計算するスプレッドシートに翻訳する。この場合、ゼロ値を入力することによって5種のこれらの特定のマーカーより少ないマーカーしか含まないパネルからスコアおよび診断を得ることができる。検査のためのアルゴリズムによって定義される適切な係数、オフセットおよびカットオフならびに異なるバイオマーカーを含む他のパネルの使用によってパネルを改変する必要がある(表3Bを参照のこと)。

40

【 0 0 8 3 】

表 3 B

LN (IFNg+Cut)	LN (OPN+Cut)	LN (MMP7+Cut)	LN (レジスチン+Cut)	LN (CRP+Cut)
=LN(B11+B\$10)	=LN(C11+C\$10)	=LN(D11+D\$10)	=LN(E11+E\$10)	=LN(F11+F\$10)

スコア
=B\$7+B\$2*G11+B\$3*H11+B\$4*I11+B\$5*J11+B\$6*K11

10

DIAGN
=IF(L11>B\$8,"N","P")

【 0 0 8 4 】

交差検定試験を実施することによって239サンプルに対して14の各パネルの感度を計算した。20%の症例をランダムに除去し、残りの80%の症例に関して採点関数を最適化し、次いで除去された症例に対してSFを試験することによってこの試験を実施した。これを100回繰り返し、平均ROC曲線を蓄積し、曲線下面積を計算し、かつSP=90%、95%および98%で

20

の感度を決定した(表4)。計算された感度は、数が少ないゆえに、全体のデータセットに関して予測されるより低い。

【 0 0 8 5 】

表 4

				SP=85%に関して最適化			交差検定試験			
				Pに関するSP	Nに関するSN	AUC	Sens90	Sens95	Sens98	
OPN	レジスチン			94.9	48.5	0.83	0.53	0.44	0.20	
IL1b	OPN			94.9	44.6	0.80	0.52	0.39	0.30	
IFNg	OPN			94.2	38.6	0.81	0.49	0.32	0.29	
OPN	MPO			94.2	39.6	0.83	0.51	0.29	0.17	
OPN	VCAM	レジスチン		95.7	50.5	0.83	0.53	0.42	0.18	
OPN	フィブリノーゲン	レジスチン		94.9	53.5	0.82	0.49	0.37	0.18	
OPN	MMP7	レジスチン		94.9	50.5	0.84	0.54	0.42	0.29	
OPN	レジスチン	APO-B100		95.7	48.5	0.83	0.49	0.41	0.17	
OPN	MMP7	VCAM	レジスチン	94.9	54.5	0.84	0.57	0.50	0.37	
IFNg	OPN	MMP7	MPO	94.2	57.4	0.81	0.50	0.33	0.24	
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	93.5	56.4	0.85	0.60	0.50	0.36	
OPN	MMP7	レジスチン	CRP	93.5	49.5	0.84	0.54	0.43	0.26	
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	CRP	94.2	61.4	0.83	0.59	0.48	0.36
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	ACRP30	94.2	58.4	0.82	0.60	0.45	0.25

10

20

30

【 0 0 8 6 】

表4中、Nに関するSNの列は、85%でのPサンプル分類の感度に関して最適化された採点関数アルゴリズムに基づいて正しく分類されたNサンプルのパーセンテージを示す。P分類が正確にサンプルの95%を示す場合のNの分類を判定した。サンプル集団の20%に対する交差検定によって得られた結果は最後の3列に記載される。ラベルsens90、sens95、およびsens98の列は、N被験体に関して正しく分類された症例を示し、一方、Pに関するSPは95%で一定であった。

【 0 0 8 7 】

結論として、ユニークな採点関数アルゴリズムは、特定のバイオマーカーパネル(2~5マーカーのパネル、11血清マーカーを含む14種の異なるシグネチャ)の血清アッセイとともに、経皮治療を必要とする冠動脈疾患を有する患者の特定のためのスクリーニングツールを提供する。該アルゴリズムを、採点関数値およびデータエントリに対する分類診断を自動的に計算することができるマクロサブルーチンに翻訳した。血液検査は、治療を必要としない最小の冠動脈疾患しか有さないかまたは冠動脈疾患を有さない患者の特定に役立つ。ゆえに、検査は、CADの存在を除外するための冠動脈造影または冠動脈の電子ビームCTスキャンを必要としない患者の識別にも役立つ。検査は、救急処置室または胸部クリニックでCADに関連する症状を示す患者間で、この能力を提供する。この検査の効力は、一般集団での冠動脈疾患の可能性を有する無症候性被験体のポイントオブケアでの特定に及ぶ。該適用では、検査は、利用可能な血液または血清検査によって現在入手可能なものよ

40

50

りも高い陽性適中率を有する。

【0088】

7. 実施例:血清タンパク質プロファイルは心臓カテーテル法に関する患者間での冠動脈開存性と相関する

背景:冠動脈性心疾患は米国で毎年1654億ドルのコストで1680万人の患者に影響を及ぼし、近年、世界中で死因の第1位になっている(Lloyd-Jones et al., 2010, Circulation 121(7):948-954)。冠動脈コンピュータ断層撮影(CT)血管造影法および心臓カテーテル法への照会は、潜在的な罹患率、電離放射線への曝露およびコストの増加にもかかわらず、毎年増加している。しかし、臨床的にカテーテル法を指示される多数の患者は、最小の冠動脈疾患(CAD)しか有さないか、または冠動脈疾患を有さず、その後の治療的介入を必要としない。心血管造影に差し向けられるがCADに関して陰性である患者間でカテーテル法を除外するための非侵襲性血清バイオマーカー検査は大きな医学的および経済的価値を有する。

10

【0089】

方法: 発明者らは、CADの評価のために冠動脈造影を受けている239人の患者の、標的化血清プロテオームのプロファイリングを実施した。患者のうち、138人は、血行動態的に重大なCADを治療するために経皮介入または冠動脈バイパス移植手術を受け、残りの101人は重大な疾患を有さず(無CAD群)、かつCADに関する追跡治療を必要としなかった。2群は、性別、BSA、コレステロール、LDL、糖尿病および高血圧症に関して同等であり、年齢のわずかな差しかなかった(無CAD: 58+/-12 対 CAD: 62 +/-12歳, $p<0.01$)。56サンプルトレーニングセットに対して33タンパク質を調べ、さらに2つのマルチ抗体プラットフォームを使用して239サンプルに対して24検体を検証した。

20

【0090】

結果: 確認されたCADを有する患者の血清中で、Apo-B100、フィブリノーゲン、VCAM-1、ミエロペルオキシダーゼ、CRP、レジスチン、オステオポンチン、IL-6、IL-1b、IL-10およびNT-pBNPに関する非常に顕著な増加を検出した(誤検出レベル=0.018)。この群でApo-A1は顕著に減少した。2~4検体のマーカーパネルを使用する、これらの患者の分類(CAD vs. 無CAD)のための予測採点アルゴリズムを導き出した。前記バイオマーカーパネルを使用してCADを有さない患者の識別を達成(86%陰性的中率: NPV)し、一方、CADを有する患者の95% (PPV)を正しく分類した(図1を参照のこと)。オステオポンチン、レジスチン、MMP7およびインターフェロン-gは診断パネル内で最も頻度の高い分類バイオマーカーであった。

30

【0091】

結論: 心臓カテーテル法に差し向けられた患者間で高い適中率を有する血清バイオマーカー検査および採点関数アルゴリズムを開発した。検査は、診断のための冠動脈造影検査および追跡介入治療の必要性に関する患者の新規評価基準を提供する。

【0092】

8. 実施例:血清プロテオームプロファイルは、冠動脈造影に差し向けられた症候性患者での血管造影的冠動脈疾患を予測する

8.1 材料および方法

40

患者群: 患者サンプルは、冠動脈疾患に関連する症状に関して心臓カテーテル法に差し向けられた359人の被験体由来の血清を含んでいた。患者の同意後、IRB認可遺伝子バンキングプロトコール(IRB #990835)にしたがう患者のインフォームドコンセントを得て、血液を集めた:(1) 静脈全血15mlを採取し、(2) 白血球遠心分離をすぐに実施して細胞をペレット化し(300 x g)、(3) 250 μ l ~ 2.0 mlの上清血清を1.5 mlクライオチューブに移し、(4) サンプルを-80 で保存した。全359人の患者は診断のための冠動脈造影を受け、208人は介入治療、すなわち経皮介入(ステントまたは血管形成術)または冠動脈バイパス移植手術(CABG)を必要としたが、残りの患者は、冠動脈介入を保証する重大なアテローム性動脈硬化症を有さなかった。ゆえに、臨床症状に基づいて単一の患者群から得られた血清サンプルであるが、治療的介入の必要性に基づく2つの転帰群を示した。

50

【 0 0 9 3 】

プロテオミクス分析： 血清サンプルを氷上で最初の解凍に付し、それらを処理用の200 μ lアリコートに分配した。次にこれらのアリコートを次の解凍サイクルでタンパク質分析を実施するまで-80 で保存した。すべての血清サンプルを患者の特徴および診断分類に関して無作為化、盲検様式で処理した。56血清サンプルの調査研究をLuminex 100プラットフォーム(Luminex, Austin, TX)で33検体のフルオロカインマルチアナライトプロファイリング(xMAP)を使用して実施し、血清希釈係数を決定し、かつ統計学的識別の見込みを欠く標的を除外した。このアッセイテクノロジーは、異なる比の2つのスペクトルが異なるフルオロフォアで内部染色されたポリスチレンマイクロスフェアを含み、異なるスペクトルでアドレス指定されるビーズセットを創出した。各ビーズセットを、標的に特異的な10
 ビオチン化捕捉抗体でコンジュゲートした。このアッセイは96ウェルマイクロプレートフォーマットを利用し、4倍希釈範囲にわたる組み換え標的タンパク質を使用する標準曲線の作製を含む、製造元のプロトコールにしたがって処理した。標準および試験サンプルを25 μ l/ウェルで二重にピペティングし、25 μ lのビーズ混合物と混合した。各マイクロプレートをマイクロタイターシェーカー上で4 で一晩インキュベートした。液体除去のためにバキュームマニホールドを使用してウェルをバッファーで洗浄(3回)し、各ウェルに二次抗体を加え、室温で2時間インキュベートした。ストレプトアビジン-PEをウェルに加え、室温で一定に攪拌しながら、30分インキュベートした。ウェルを2回洗浄し、各ウェルにアッセイバッファーを加え、Bio-PlexサスペンションアレイシステムおよびBio-Plex
 Managerソフトウェア4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用してサンプル20
 を分析した。各検体に関する5点標準曲線との比較によって絶対量を決定した。

【 0 0 9 4 】

Aushon-Searchlight Protein Array System (Aushon Biosystems, Inc, Billerica, MA)を使用して、2つの異なるステージおよび検体構成で359の固有の患者血清サンプルをすべて調べた(ステージ1: 239サンプル: 24検体; ステージ2: 120サンプル: 10検体)。まず、以前に分析された56サンプルを含む予備研究によって定義された濃度範囲にわたる24検体に関して239サンプルを評価した。このアッセイは、平面アレイの96ウェルマイクロタイタープレートのウェルにスポットされたモノクローナル捕捉抗体のカスタムパネルを使用する多重サンドイッチELISAを含んだ。血清のインキュベーションおよび洗浄後、捕獲エピトープの異なる部位を標的にする二次ビオチン化モノクローナル抗体を血清検体の化学発光シグナル検出のために導入した。化学発光反応は、二次抗体のビオチン部位に結合する30
 ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(SA-HRP)を含んだ。Luminol Enhancer/Peroxidase溶液を加え、ルミノールから3-アミノフタレートへのHRP触媒酸化により、428 nmでの発光が生じた。SearchLight Array Analyst Softwareによる処理のために、冷却CCD16ビットカメラで化学発光イメージを取得した。このソフトウェアは、4パラメータカーブフィットアルゴリズムを用いて、未知のサンプルのタンパク質濃度を計算した。別個のウェルの組み換えタンパク質標的の検量線は、患者血清タンパク質の絶対濃度を計算するための基準を提供した。個別の検体の反復の値、平均値、標準偏差、変異係数、希釈に応じて調整された平均値および品質値を得た。ソフトウェア内のカーブフィット品質プログラムを使用して、報告前に較正および実験データを再調査した。この方法論は、0.40
 1 pg/mlほどの低濃度で低い存在量のタンパク質の検出をもたらした。

【 0 0 9 5 】

最終容量50 μ lを使用する希釈後にタンパク質検出アッセイを二重に実施した。品質管理手順は、高感度であるが標的および検出抗体間での最小の交差反応性に関する多重パネルのプレスクリーニングを含んだ。最大パネルは、インターフェロン- (IFN γ)、インターロイキン-1 (IL-1b)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、マトリックスメタロプロテイナーゼタンパク質-1 (MMP-1)、トロンボモジュリン(TM)および腫瘍壊死因子- (TNF α) (df=2x)を含むアッセイバッファー(バッファー: RPMI1640 w/o フェノールレッド+ 10%非働化FBS)中で1:1 (容量/容量)希釈(希釈係数: df=2x)された7検体に関して同時に定量的データを提供した。レプチン、血小板内皮細胞接着分子-1 (PECA 50

M-1)、内皮白血球接着分子-1 (E-セレクチン)、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1)、マトリックスメタロプロテイナーゼ7および血管細胞接着分子-1 (VCAM-1)を25x希釈係数で同時にアッセイした。メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター(TIMP-1)、フィブリノーゲン、レジスチン、白血球セレクチン(L-セレクチン)およびミエロペルオキシダーゼ(MPO) (df=1000x)を5検体の単一パネルで分析した。アディポネクチン(ACRP-30)およびC反応性タンパク質(CRP)を血清希釈係数5,000xで一緒にアッセイした。アポリポタンパク質-A1 (APO-A1, df=50,000x)、アポリポタンパク質-B100 (APO B100, df=10,000x)、オステオポンチン(OPN: df=10x)およびN末端フラグメントタンパク質前駆体脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-pBNP, df=2x)を含むいくつかの検体を独立して調べた。

【0096】

第2ステージの120血清サンプルの研究を実施し、239血清サンプルの研究に含まれる初期24検体の中から10標的検体のサブセットを追加のサンプルを使用して調べた。サンプル調製、QC、組み換えタンパク質校正プロファイルの方法論的プロトコール、段階希釈および血清アッセイを、少ないパネル、およびウェルあたり3検体の最大多重構成の異なる検体構成の使用を除き、正確に以前の研究の通りに実施した。これらのアッセイは、3重構成で評価されたMPO、フィブリノーゲンおよびレジスチン(df=1000x)に関して同時に定量的データを提供した。ACRP-30およびApo-B100検体をアッセイバッファーで希釈(df=10,000x)された多重構成で評価した。同様に、MMP-7およびVCAM-1を25x希釈係数で一緒に評価し、IFNgおよびIL-1 を、より低い希釈率(df=2x)で単一パネルにまとめた。以前の通り、オステオポンチン(OPN: df=10x)を独立してアッセイした。

【0097】

統計解析: 作業上、臨床的に必要とされるカテーテル法への照会によって患者を「症候性」と定義した。冠動脈造影研究の転帰に基づいて、「正常な」冠動脈を有する、すなわち重大な冠動脈疾患を有さない150人の患者から血清サンプルを採取し、ステント留置、血管形成術またはバイパス移植手術を含む緊急治療を必要とする冠動脈疾患を有する患者から209血清標本を採取した。当日作製した組み換えタンパク質検量線との比較によって、全359サンプルの血清検体の絶対濃度を得た。異なるタンパク質パネル構成を問わず、解析を実施した。統計学的評価に付された仮説は、2つの患者エンドポイント分類間で、すなわち冠動脈造影後にCADの診断を有する患者の臨床治療の必要性に基づいて、血清タンパク質が有意に異なることであった。まず、正常な冠動脈を有する患者由来の101血清サンプルおよび経皮介入(PCI)を必要とする患者由来の138サンプルを含む24検体に関して評価されたステージ1の239サンプルに関して統計解析を実施した。これらは、採点関数アルゴリズムを開発するために使用されたサンプルであった。10検体を調べる第2ステージの確認試験から得られた101サンプルを、次いで、ステージ1の結果とまとめ、該検体に関する統計学的比較に利用可能なサンプルの数を拡大した。統計学的比較を実施して、24種の調べられたタンパク質の中での患者群間の有意差を決定し、かつ患者群を分類するための、期待されるタンパク質シグネチャの予測強度を別途評価した。このデータを、多重検定から生じるタイプ1エラーに関してコントロールに対する誤検出率(q値)の算出を含む、各検体に関する2患者群を横断した対応のない学生t検定を使用する統計学的比較のためにPartek (Partek Genomics Suite, St. Louis, MO)にインポートした。

【0098】

アルゴリズム開発および検証: ステージ1の239血清サンプル中で調べられた全24マーカーを、治療を必要とするCADを有する患者と、冠動脈造影および追跡治療によって判定された場合に臨床的に重大なCADを有さない患者とを分類するためにマルチバイオマーカーシグネチャにおいて評価した。データをランダムにスクランブルすることによって得られた等価な数の24「人工」マーカーを含む、疾患「シグネチャ」としてのタンパク質のすべての可能な組み合わせに関して採点関数(SF)アルゴリズムを作製した。各シグネチャに関する採点関数(SF)をバイオマーカー濃度の自然対数の線形結合として構築した。Monte Carlo最適化を使用して、冠動脈疾患を有する患者に関する95%感度(SN: 介入治療を必要とするCADに関する真の陽性の特定)を維持しつつ、正常な冠動脈を有する患者を検出する

10

20

30

40

50

ための最も高い診断精度、すなわち特異性(SP: 重大なCADに関する真の陰性の特定)を提供する、線形結合における係数を決定した。

【0099】

各パネルを、冠動脈疾患を有する患者由来のサンプルの線引きでの95%感度を維持しつつ、冠動脈疾患を有さない患者から得られた血清サンプルを識別する際のその特異性に関して評価した。健康患者に関する最も高い検出率を得るための最適な採点関数を開発した。

【0100】

分析型の採点関数は以下の通りであった：

【数19】

$$S(\rho) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(\rho) + C_i) \quad (1)$$

10

【0101】

(式中、 $M_i(\rho)$ は参加者に関するパネル中のi番目のバイオマーカの濃度であり、またAおよびCは数値係数である。係数Cは、マーカ値が比較的小さい場合にエラーの影響を打ち消すように選択することができる)。係数 C_i は、対応するi番目のバイオマーカの平均値の1/10であるよう選択した。参加者に関して計算されたスコア $S(\rho)$ が正である場合、該参加者はCADを有すると予測され、それが負である場合、該参加者はCADを欠くと予測される。CADを有さない患者を検出するための採点関数の最適化を実施した。これは、CADを有する患者の分類に関する95%特異性を維持するように係数 A_0 を選択した場合の係数 A_i を決定するために、Metropolisアルゴリズムを使用するMonte Carlo最適化を必要とした。採点関数の性能を見積もるために、データの80%をトレーニングデータセットとして使用して交差検定試験を実施し、残りの20%のデータを使用して、調整された採点関数の特異性および感度を試験した。24マーカに関するすべての可能なパネルを、経皮介入を必要とする冠動脈疾患を有する患者の95%を首尾よく特定しつつ、2つの患者群を識別するそれらの能力に関して試験した。

20

【0102】

人工マーカ値を作製し、データセットに導入して、最良のマーカパネルの線引きでの採点関数の有効性を判定した。上位に格付けされたパネル中の人工マーカの存在は、パネルの性能が偶然である可能性が高いことを示した。これは人工マーカは標的疾患の可能性を予測できないからである。交差検定分析によるパネル性能の格付け後、人工マーカを含まない、最終順位が上位のパネルを特定した。2、3、および4マーカパネルに関していかなる人工マーカも含まない上位4パネルを特定し、かつ5-マーカパネルに関していかなる人工マーカも含まない上位2パネルを特定した。結果を表5に記載する。

30

【0103】

表 5

					SN	AUC	SP90	SP95	SP98
OPN	レジスチン				94. 2	0.84	0.548	0.393	0.117
IL1b	OPN				94. 2	0.82	0.449	0.304	0.217
IFNg	OPN				94. 9	0.77	0.379	0.314	0.247
OPN	MPO				94. 9	0.80	0.364	0.226	0.151
OPN	VCAM	レジスチン			94. 9	0.84	0.540	0.424	0.286
OPN	フィブリノーゲン	レジスチン			94. 9	0.83	0.500	0.365	0.237
OPN	MMP7	レジスチン			94. 2	0.82	0.492	0.394	0.312
OPN	レジスチン	APO-B100			94. 9	0.85	0.537	0.451	0.199
OPN	MMP7	VCAM	レジスチン		95. 7	0.82	0.533	0.436	0.326
IFNg	OPN	MMP7	MPO		95. 7	0.84	0.669	0.584	0.278
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン		94. 9	0.82	0.586	0.463	0.343
OPN	MMP7	レジスチン	CRP		94. 9	0.83	0.474	0.393	0.250
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	CRP	95. 7	0.83	0.639	0.501	0.274
IFNg	OPN	MMP7	レジスチン	ACRP30	94. 9	0.82	0.635	0.499	0.304

【 0 1 0 4 】

表5. 交差検定試験によって得られた上位格付けパネル。数値は、2~5マーカーの範囲の種々のパネルに関して示される、感度(90%、95%、98%)で冠動脈疾患を有さない患者を検出するための上位格付けパネルの特異性(SP)を示す。結果を、冠動脈疾患を有する患者を正しく分類する約95%の感度(SN)で測定した。AUC: ROC曲線下の面積(n=239トータル, CAD=138, 無CAD=101)。

【 0 1 0 5 】

発明者らは、24種の実際のマーカーおよび24種の「人工」マーカーを含む2、3、4および5マーカーシグネチャの200万を超える組み合わせを、この研究で患者を分類する最大能力に関して格付けした。2~5マーカーの各シグネチャに関して、(CAD患者の少なくとも95%を正しく検出しつつ)健常者に関して最高のSPを有する上位50パネルを、参加者の80%を最適なSFを構築するためのトレーニングセットとしてランダムに選択し、次いで残りの20%の参加者をこのSFを使用して分類する交差検定を使用して再調査した。交差検定処理を500回繰り返し、平均SPおよびSNを使用して、重大な冠動脈疾患を有さない患者を検出するために最良に機能するシグネチャを特定した。最高の分類を提供するシグネチャの成分としての人工(ランダム)マーカーの出現は、これらのパネルが多すぎるマーカーを含み、かつ確率変数に基づいて群を識別したことを示すと解された。

【 0 1 0 6 】

239患者サンプルの研究で特定された最良のバイオマーカーシグネチャを含む10のマー

カーに関する120血清標本の独立した評価から得られた結果を使用して採点関数アルゴリズムの臨床確認を実施した。以前の239人の患者と適合する臨床的特徴を有する症候性患者から120サンプルを取得し、同一プロトコールにしたがって血清を採取した。これらの血清サンプルに関して得られた絶対濃度値を、239人の患者の研究で採点関数アルゴリズムから得られた患者転帰に基づいてCADの存在または不存在を検出するためのオフセット、係数およびカットオフを使用するマクロサブルーチンプログラムのアルゴリズムに入力した。120サンプル確認研究の結果を、冠動脈カテーテル法および追跡治療に基づく各患者の最終診断分類と比較して、期待される各診断シグネチャの感度および特異性を決定した。

【0107】

10

8.2 結果

診断のための冠動脈造影で、この研究の患者209人が、治療的介入を要求する重大な冠動脈疾患を示し、一方、150人の患者は、心臓カテーテル法の紹介に結びついた症状または他の知見にもかかわらず、重大な冠動脈疾患を示さないことがわかった。冠動脈造影に基づくこれらの2つの異なる転帰群は、その他の点では、性別、糖尿病状態、喫煙歴、高血圧症の診断、体表面積、基礎代謝率、コレステロール、LDLおよびクレアチニン値を含む臨床症状および身体的特徴に関する承認に際して同一であった(表6を参照のこと)。これらの群間で年齢、HDLレベルおよび駆出率に、小さいが有意な差異が存在したが、これらの差異は最小診断値の差異であり、すべての患者は冠動脈造影評価を必要とした。

【0108】

20

介入を必要とするCADと診断された患者由来のサンプルと、診断のための冠動脈造影によって判定された場合に正常な冠動脈を有する患者との間で12血清タンパク質において有意差を検出した(q 値誤検出率=0.018)。これらの差異は、239人の患者のステージ1の研究で存在し、研究の確認ステージで120人の患者が加わっても結果は変化しなかった(表7を参照のこと)。Apo-B100およびApo-A1は最も高度に発現されるタンパク質に含まれ、血清中で平均約300 μ g/mlであった(図2)。Apo-B100は、正常な冠動脈を有する患者と比較してCADを有する患者で顕著に増加し、一方、Apo-A1はCAD群で顕著に減少した。同動的濃度範囲内で、フィブリノーゲンは典型的にマイクログラム/ミリリットルを超えるレベルで存在し、CADを有する患者で4.6倍高い値を有した(図2)。血清1ミリリットルあたり1ナノグラム~1マイクログラムの範囲の血清濃度で、5種のタンパク質がCAD患者において顕著

30

【0109】

統計解析で、ビーズベースまたは平面プラットフォームを使用して調べられた41種の標的のうち他の検体が2つの患者サンプル群間で有意に変化しないことがわかった。例えば、E-セレクトイン、MMP-7、MCP-1、トロンボモジュリンおよびTIMP-1の血清値は2群間の比較において p 値>0.50を生じた。MMP-1レベルのみが統計学的有意に近づき(無CAD: 平均 \pm S.D.= 4.8 \pm 2.2 pg/ml, n =101 vs. CAD: 5.3 \pm 2.4 pg/ml, p = 0.054, n =138)、CADを有する患者で小さい増加を示した(1.12倍)。

40

【0110】

類のない採点関数アルゴリズムを使用して2~5バイオマーカーの組み合わせに基づいてCAD患者と健常患者とを識別する239サンプル研究ですべてのタンパク質標的を試験することによって予測マルチマーカーシグネチャを得た。発明者らは、CAD群の95%を検出しつつ(95% SN)、正常な冠動脈を有する患者を検出するための最高の鋭さ(42~65% SP)を有する14シグネチャを特定した(「追加の方法-パネル選択」を参照のこと)。11タンパク質が14シグネチャを構成し、オステオポンチン、レジスチン、MMP7、およびIFNgが最も頻繁に現れた。受信者動作特性分析は、CAD患者の最小誤分類(5%)でのCADを有さない患者の識別においてこれらの各シグネチャが同様に有効であることを示した。上位シグネチャの曲線下

50

面積(AUC)は2タンパク質シグネチャに関する 0.839 ± 0.028 (平均 \pm S.D.) ~ 3バイオマーカー(OPN、レジスチン、Apo B100)を使用する最大AUC 0.845の範囲であった(図5)。これらのROC曲線を、同データセットに関してBayesian複合共変予測(compound covariate predictor)アルゴリズムによって作製されたものと比較した。採点関数アルゴリズムによって作製された曲線下面積は、すべての症例でBayesian予測によって得られたものを超えた。その後の120の別個の血清サンプル(健常49、介入を必要とする患者71)の臨床確認試験によって第1ステージの結果が確認された。確認試験で患者サンプルを分類するための最高の能力を有する血清シグネチャは、オステオポンチン、レジスチン、MMP7、IFNgおよびACRP 30を含んだ。このシグネチャは、CADを有する患者の92%以上を首尾よく分類し、一方、重大なCADを欠き、したがって経皮的冠動脈介入またはバイパス移植手術を必要としない35%の患者を正しく線引きした。

【0111】

表6

	AVE NOR	S.D.	N	AVE PCI	S.D.	N	P
AGE	57.9	10.3	150	62.8	10.6	204	0.0006
WT	90.5	21.9	150	87.5	15.6	204	NS
HT	171.4	9.5	150	171.6	10.1	204	NS
BSA	2.0	0.3	150	2.0	0.2	204	NS
BMI	30.7	8.2	150	29.7	5.1	204	NS
CHOL	196.2	36.3	150	189.9	48.3	95	NS
LDL	120.9	37.8	134	119.4	42.5	90	NS
HDL	50.5	18.2	134	41.9	11.3	95	0.0001
CREAT	1.0	0.7	85	1.0	1.0	123	NS
EF%	57.9	8.4	148	53.5	10.8	106	0.0006
GEND	81 M	69 F	150	126 M	78 F	204	
DIAB	16 YES	134 NO	150	31 YES	173 NO	204	
HYPTX	76 YES	74 NO	150	125 YES	79 NO	204	

【0112】

NOR患者(正常な冠動脈)およびPCI患者(経皮的治療介入を必要とする冠動脈疾患と診断される)に関するAVE(平均)およびS.D.(標準偏差)。

【0113】

N: パラメータが入手可能であったサンプルの数。

【0114】

P: NORおよびPCI群間の個別のパラメータに関する統計学的P値。誤検出率=0.018

NSは有意な統計学的差異が検出されなかったことを示す。

【0115】

M/Fは、各群の男性および女性の数を示し、年齢は歳単位で示し、Wt(体重)はキログラム単位で示し、HT(身長)はセンチメートル単位で示す。

【0116】

BSA: メートル²単位で算出された体表面積

BMI: 肥満度指数= wt(kg)/(ht(メートル))²

CHOL: コレステロール、LDL: 低密度リポタンパク質、HDL: 高密度リポタンパク質およびCREAT(クレアチニン)はmg/dl(ミリグラム/デシリットル)単位で報告する

DIAB: (糖尿病)およびHYPTX(高血圧症)は群あたりの陽性(YES)または陰性(NO)患者の数として報告する。

【0117】

10

20

30

40

50

表 7. CAD および健常患者群の多重プロテオミクス解析

	AVE NOR	S.D.	N	AVE PCI	S.D.	N	P 値
IL-10	3.2	3.6	101	7.5	18.2	138	0.018
IFNg	3.5	10.7	150	4.8	9.5	204	NS
TNFa	22.4	73.7	101	15	19.4	138	NS
NT-pBNP	41.1	111.6	101	101.7	202.5	138	0.007
IL-1b	55.2	123.7	150	109.9	164	204	0.0006
IL-6	578	1140	101	942	1154	138	0.016
TM	1444	859	101	1392	444	138	NS
MCP-1	3069	3525	101	3347	3419	138	NS
MMP-1	4751	2221	101	5342	2405	138	NS
MMP-7	5523	3943	150	5712	2561	204	NS
OPN	17784	16543	150	41871	37825	204	1.75E-12
レプチン	13941	17641	101	10612	15495	138	NS
PECAM-1	32060	28995	101	35036	25334	138	NS
E-セレクトチン	33943	19094	101	34309	16525	138	NS
レジスチン	87283	61810	150	113015	79080	204	0.002
CRP	275344	550939	101	698542	1242218	138	0.002
TIMP-1	320135	112187	101	329287	87929	138	NS
MPO	519904	380604	150	744547	601974	204	6.87E-05
VCAM-1	973852	488016	150	1265187	501082	204	7.54E-08
フィブリノーゲン	4659675	5734653	150	21518046	56189244	204	0.0003
L-セレクトチン	1148218	281972	101	1112136	271368	138	NS
Acrp30	6061321	4216767	150	5431911	4834458	204	NS
Apo-A1	30060763 8	25884828 9	101	15416588 7	13475782 6	138	3.93E-08
Apo-B100	29007552 7	88073018	150	31664686 1	89371624	204	0.005

【 0 1 1 8 】

タンパク質濃度はピコグラム/ml単位で報告する。ACRP-30: アディポネクチン, APO-A1: アポリポタンパク質-A1, APO B100: アポリポタンパク質-B100, CRP: c反応性タンパク質, E-セレクトチン: 内皮白血球接着分子-1, フィブリノーゲン, IFNg: インターフェロン-, IL-1b: インターロイキン-1, IL-6: インターロイキン-6, IL-10: インターロイキン-10, レプチン, L-セレクトチン: 白血球セレクトチン, MCP-1: 単球走化性タンパク質-1, MMP-1: マトリックスメタロプロテイナーゼタンパク質-1, MMP-7: マトリックスメタロプロテイナーゼタンパク質-7, MPO: ミエロペルオキシダーゼ, NT-pBNP: N末端フラグメントタンパク質前駆体脳性ナトリウム利尿ペプチド, OPN: オステオポンチン, PECAM-1: 血小板内皮細胞接着分子-1, レジスチン, TIMP-1: メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター, TM: トロンボモジュリン, TNFa: 腫瘍壊死因子-, VCAM-1: 血管細胞接着分子-1.

【 0 1 1 9 】

8.3 考察

この研究で評価された41検体のうちの12タンパク質は、心臓カテーテル法での検査に基づいて重大な冠動脈疾患を有さない症候性患者と比較して介入を必要とする冠動脈疾患を

有する患者において有意に異なる血清濃度で発現された。タンパク質は、それらが血管炎、異常な脂質調節、細胞凝集および/または血管細胞外基質(ECM)再構築を含むアテローム発生およびプラーク不安定性の根底にある重要な機構に寄与することの証拠に基づく評価のために選択された¹²。VCAM-1、IL-1b、IL-6、およびIL-10は、本研究においてCADを有する患者で有意に増加し、傷害誘発性の、炎症反応と矛盾しなかった^{13,14}。増加したIL-1bおよびIL-6はこれまでに急性期タンパク質誘導と結びつけられており、本研究で検出されたフィブリノーゲンおよびCRPの相伴う増加を説明する。増加したCRPは、この研究と同等のCAD患者コホートで左心室機能障害のマーカーとして提唱されたNT-pBNPとともに、冠動脈イベントの予測における炎症性メディエーターの代替マーカーと考えられている^{10,14-16}。CRPおよびNT-pBNPは、それぞれ、現在の研究でCADに関連して有意に増加したが、組み合わせても、他の2成分の組み合わせと比べて弱い分類指標であった。しかし、CRPは最良の単分子分類指標に含まれ、CAD患者の95%を検出し、正常なサンプルの19%を線引きした。

10

【0120】

異常な脂質輸送および蓄積をアテローム性動脈硬化症の要因として定義する以前の報告と一致して、CAD群でのApo-A1およびApo-B (Apo-B100)の有意な相互変化を検出した¹⁷。実際、Apo-B100遺伝子の突然変異は、常染色体優性の、遺伝性家族性高コレステロール血症および早発性冠動脈疾患を引き起こすことが知られている¹⁸。ミエロペルオキシダーゼもまた、炎症部位での脂質過酸化の触媒およびプラーク不安定性のマーカーとしてのその役割と関連するCAD患者で有意に増加した^{19,20}。血清レジスチン濃度はこの研究で有意に増加した。該濃度は、これまでに脂質利用での代謝変動ならびにIL-1、IL-6およびVCAMを含む炎症誘発性サイトカインのレベルの増加と結びつけられている²¹。ゆえに、本研究のCAD群で増加するタンパク質は進行中の炎症過程および脂質蓄積の変化の両者を反映した。対照的に、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP) 1、2、3、7、9およびメタロプロテイナーゼの組織インヒビター(TIMP) 1、2、3および4を含む、血管平滑筋およびECM再構築に伝統的に結びつけられている標的はいずれも、発明者らの患者群間で有意に変化しなかった。骨再構築で石灰化の負の調節因子として機能するオステオポンチンのみがこの群に適合したが、それがまた、炎症細胞蓄積のケモカイン調節因子としても機能するかもしれないという反論もある²²。

20

【0121】

正しく選択されたモノクローナル抗体を使用する多重プロテオミクス解析は、これらのアッセイを系統的に使用して、組み換え標準との比較によって臨床的に重要な血清検体を分析するところまで進歩している。このアプローチの利点には、標準臨床プロトコールにしたがって採取される小さい血清容量(<100 μl)しか必要としないこと、高速の所要時間(数分~数時間)、高感度および広いダイナミックレンジが含まれる。不都合な点には、アッセイの高いコストおよび、抗体、バッファーおよび希釈液の変動に関連するプラットフォームを横断した定量的結果の不十分な一致が含まれる。本研究では、異なるアリコートを用いてかつ逐次研究においてではあるが、56の同一サンプル中でビーズベース(Luminex)および平面(Aushon)テクノロジーの両者を使用して15タンパク質標的を同一の血清希釈率で試験した。これらの15比較のうち、12アッセイは、異なる試薬および技術的プラットフォームの使用にもかかわらず、2つの患者転帰群間で統計学的有意差の検出において一致した。これらの結果は、血清の多重免疫化学的アッセイは診断の妥当性の情報を提供することができるが、臨床応用のために厳密なプロトコールおよび最適な試薬を試験しかつ標準化する必要があることを示す。

30

40

【0122】

この研究の結果は、CADの判別手段としての予想外のタンパク質の線引きならびにアテローム発生過程において確立された役割を有するいくつかの標的の除外の両者に関して、少々驚くべきものであった。例えば、オステオポンチンはアテローム発生の過程に間接的にしか結びつけられていなかったが、患者群間で最大の統計学的差異を示し、期待されるバイオマーカーシグネチャの中で最も頻出した。オステオポンチンは、ミネラル化骨基質

50

由来のシアロタンパク質として最初に特定されたが、ごく最近になって、心臓弁および血管でのプラークの石灰化と結びつけられた^{23, 24}。同様に、レジスチンは、発明者らが開発した採点アルゴリズムを使用する診断シグネチャの中で2番目に頻出する判別手段であるが、代謝恒常性およびインスリン感受性に関する役割によって間接的にしかCADに結びつけられていなかった²⁵。これらの知見は、冠動脈疾患が、多様であるが集中する生理的過程の病理学的エンドポイントであり、かつ最良に機能する診断シグネチャはこれらの不一致を反映するという考えを強化する。しかし、結果は、ECM再構築に関連する成長因子(VEGF、レプチン、グレリン)、リポタンパク質(Apo-A2、E、血清アミロイドA: SAA)、細胞接着分子(トロンボスポンジン、PECAM-1、ICAM-1、セレクチンE、L、P)および上述のMMPおよびTIMP標的を含む、発明者らの患者コホート間で有意差を示さなかった、冠動脈疾患にかかわる多数の標的に関して注目すべきでもあった。発明者らは、これらの結果の要因として、保存中の種々のタンパク質標的の分解を除外することができないが、すべての血清サンプルを、同一の様式で、同一の時間枠で、採取、処理、保存および分析した。最も高い可能性は、心筋「イベント」を被ったことがなかった事実によって明示されるように発明者らの患者が他の研究と比較して比較的早期の冠動脈疾患を示したことであった。より進行した疾患を有するコホートは、治療介入の効力が潜在的に減少しかつ患者回復へのリスクが大きい状態ではあるが、より大きいかまたは不安定な冠動脈プラークに関連する追加の変化を示すかもしれない。

10

【 0 1 2 3 】

冠動脈疾患の同等の症状を有するが異なる治療上の転帰を有する患者由来の血清を使用して、採点関数アルゴリズムを開発し、試験し、かつ検証した。仮説駆動型バイオマーカーパネルを試験することによって選択の偏りを回避し、別個の患者コホートの交差検定および追跡試験を実施することによって過剰適合を回避した。予測シグネチャを見出すために統計学的有意性にかかわらずすべてのマーカーの効力を試験し、別個ではあるが同一の血清サンプルコホートを用いて検証を実施した^{26, 27}。

20

【 0 1 2 4 】

8.4 参考文献

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010 Feb 23;121(7):948-54.
2. Xu JQ, Kochanek KD, Murphy SL, Tejada-Vera B. Deaths: Final data for 2007. *National vital statistics reports; vol 58 no 19*. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2010.
3. Scanlon PJ, Faxon DP, Audet AM, Carabello B, Dehmer GJ, Eagle KA, Legako RD, Leon DF, Murray JA, Nissen SE, Pepine CJ, Watson RM, Ritchie JL, Gibbons RJ, Chaitlin MD, Gardner TJ, Garson A Jr, Russell RO Jr, Ryan TJ, Smith SC Jr. ACC/AHA guidelines for coronary angiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on Coronary Angiography). Developed in collaboration with the Society for Cardiac Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol*. 1999 May;33(6):1756-824.
4. Kolansky DM. Acute coronary syndromes: morbidity, mortality, and pharmacoeconomic burden. *Am J Manag Care*. 2009 Mar;15(2 Suppl):S36-41.
5. Hacioglu Y, Gupta M, Budoff MJ. Noninvasive anatomical coronary artery imaging versus myocardial perfusion imaging: which confers superior diagnostic and prognostic information? *J. Comput Assist Tomogr* 2010 34: 637-644.

30

40

50

6. Rosenberg S, Elashoff MR, Beineke P, Daniels SE, Wingrove JA, Tingley WG, Sager PT, Sehnert AJ, Yau M, Kraus WE, Newby LK, Schwartz RS, Voros S, Ellis SG, Tahirkheli N, Waksman R, McPherson J, Lansky A, Winn ME, Schork NJ, Topol EJ; PREDICT (Personalized Risk Evaluation and Diagnosis in the Coronary Tree) Investigators. Multicenter validation of the diagnostic accuracy of a blood-based gene expression test for assessing obstructive coronary artery disease in nondiabetic patients. *Ann Intern Med.* 2010 Oct 5;153(7):425-34.
7. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxe T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010 Sep 3;107(5):677-84. Epub 2010 Jul 1. 10
8. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* Online July 7, 2010.
9. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G, Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1991 Mar;83(3):902-12.
10. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, Barnathan ES, Califf R, Topol EJ, Simoons ML, Wallentin L. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation.* 2003 Jul 22;108(3):275-81. Epub 2003 Jul 7. 20
11. Moriates C, Maisel A. The utility of biomarkers in sorting out the complex patient. *Am J Med.* 2010 May;123(5):393-9.
12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature. Review.* 1993 Apr 29;362(6423):801-9.
13. Erren M, Reinecke H, Junker R, Fobker M, Schulte H, Schurek JO, Kropf J, Kerber S, Breithardt G, Assmann G, Cullen P. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Oct;19(10):2355-63. 30
14. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006 Apr;86(2):515-81.
15. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro brain natriuretic peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Aug 7;40(3):437-45.
16. Di Angelantonio E, Chowdhury R, Sarwar N, Ray KK, Gobin R, Saleheen D, Thompson A, Gudnason V, Sattar N, Danesh J. B-Type Natriuretic Peptides and Cardiovascular Risk. Systematic Review and Meta-Analysis of 40 Prospective Studies. *Circulation.* 2009 Dec 1;120(22):2177-2187.
17. Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, Holme I, Curt D, Furberg CD, Sniderman AD. The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2004 42:12, 1355-1363. 40
18. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest.* 1995 Mar;95(3):1225-34.
19. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid 50

peroxidation at sites of inflammation. J Biol Chem. 2002 Nov 29;277(48):46116-22. Epub 2002 Sep 30.

20. Naruko T, Furukawa A, Yunoki K, Komatsu R, Nakagawa M, Matsumura Y, Shirai N, Sugioka K, Takagi M, Hozumi T, Itoh A, Haze K, Yoshiyama M, Becker AE, Ueda M. Increased expression and plasma levels of myeloperoxidase are closely related to the presence of angiographically-detected complex lesion morphology in unstable angina. Heart. 2010 Nov;96(21):1716-22. Erratum in: Heart. 2010 Dec;96(24):2044-5.

21. Stofkova A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. Endocr Regul. 2010 Jan;44(1):25-36.

22. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. Science2000; 287:860-864.

23. Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. Biochem J. 1985 Dec 15;232(3):715-24.

24. Abdel-Azeez HA, Al-Zaky M. Plasma osteopontin as a predictor of coronary artery disease: association with echocardiographic characteristics of atherosclerosis. J Clin Lab Anal. 2010; 24(3):201-6.

25. Ye F, Than A, Zhao Y, Goh KH, Chen P. Vesicular storage, vesicle trafficking, and secretion of leptin and resistin: the similarities, differences, and interplays. J Endocrinol. 2010 Jul;206(1):27-36. Epub 2010 Apr 14.

26. Feng Z, Prentice R, Srivastava S. Research issues and strategies for genomic and proteomic biomarker discovery and validation: a statistical perspective. Pharmacogenomics. 2004 Sep;5(6):709-19. Review.

27. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, Rennie D, deVet HCW, Lijmer JG. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. Ann. Int. Medicine. 2003 Jan;138 (1) 40-44.

種々の刊行物が本明細書中で引用されるが、その開示内容は参照によりその全体がここに組み入れられる。

[1] 患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いかどうかを判定する方法であって、以下のステップ:

(a) オステオポンチン、レジスチン、インターロイキン1、インターフェロン、ミエロペルオキシダーゼ、血管細胞接着分子、フィブリノーゲン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、アポリポタンパク質B100、C反応性タンパク質、および30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質からなる群から選択される少なくとも2種のバイオマーカーの血清中レベルを測定するステップ;

(b) (a)で測定されたバイオマーカーの組み合わせについてオフセット値を決定するステップ;

(c) (a)で測定された各バイオマーカーの係数を決定するステップ;

(d) 以下の式I:

【数20】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

(式中、S(p)は患者pのITスコアであり、

定数A₀は「オフセット」であり

Nはパネル中のマーカーの数であり

指数iはパネル中のマーカーをリストし

10

20

30

40

50

係数 A_i は i 番目のITバイオマーカーの「係数」であり

$M_i(p)$ は患者 p の i 番目のITバイオマーカーのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_i は i 番目のバイオマーカーの「ローカットオフ」である)

を使用して、(a)で測定された血清中レベルをITスコアに変換するステップ;
および

(e) ITスコアをカットオフスコアと比較するステップ

を含み、ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いことを示し、またカットオフスコアより小さいITスコアは患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が高いことを示す、方法。

[2] オステオポンチンおよびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[3] インターロイキン1 およびオステオポンチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[4] インターフェロン およびオステオポンチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[5] オステオポンチンおよびミエロペルオキシダーゼの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[6] オステオポンチン、血管細胞接着分子、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[7] オステオポンチン、フィブリノーゲン、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[8] オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、およびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[9] オステオポンチン、レジスチン、およびアポリポタンパク質B100の血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[10] オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、血管細胞接着分子およびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[11] インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびミエロペルオキシダーゼの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[12] インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびレジスチンの血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[13] オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質の血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[14] インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質の血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[15] インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよび30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質の血清中レベルを測定する、1記載の方法。

[16] インターロイキン-6、インターロイキン10またはN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチドの血清中レベルが増加しているかどうか、またはアポリポタンパク質A-1の血清中レベルが減少しているどうかを測定するステップをさらに含み、ここで該増加および/または減少は重大な冠動脈疾患の診断をさらに示す、1記載の方法。

[17] 冠動脈疾患と合致した症状を患う患者の治療方法であって、1~16のいずれかに記載の方法を実施するステップ、および患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が高いことをITスコアが示す場合、患者に侵襲性冠動脈疾患介入処置を推奨するステップを含む方法。

[18] 処置が、ステント留置、バルーン拡張術、バイパス移植留置およびペースメーカー留置からなる群から選択される、17記載の方法。

[19] 処置を実施するステップをさらに含む、17または18記載の方法。

[20] 患者が重大な冠動脈疾患を発症する可能性が低いかどうかを判定するためのキットであって、オステオポンチン、レジスチン、インターロイキン1、インターフェロン

10

20

30

40

50

、ミエロペルオキシダーゼ、血管細胞接着分子、フィブリノーゲン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、アポリポタンパク質B100、C反応性タンパク質、30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質、インターロイキン-6、インターロイキン-10、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド、およびアポリポタンパク質A1からなる群から選択される少なくとも2種のITバイオマーカーを含むバイオマーカーのパネルの血清中レベルを測定するための手段を含むキット。

[2 1] ITバイオマーカーがオステオポンチンおよびレジスチンである、20記載のキット。

[2 2] ITバイオマーカーがインターロイキン1 およびオステオポンチンである、20記載のキット。

[2 3] ITバイオマーカーがインターフェロン およびオステオポンチンである、20記載のキット。

[2 4] ITバイオマーカーがオステオポンチンおよびミエロペルオキシダーゼである、20記載のキット。

[2 5] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、血管細胞接着分子、およびレジスチンである、20記載のキット。

[2 6] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、フィブリノーゲン、およびレジスチンである、20記載のキット。

[2 7] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、およびレジスチンである、20記載のキット。

[2 8] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、レジスチン、およびアポリポタンパク質B100である、20記載のキット。

[2 9] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、血管細胞接着分子およびレジスチンである、20記載のキット。

[3 0] ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびミエロペルオキシダーゼである、20記載のキット。

[3 1] ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7およびレジスチンである、20記載のキット。

[3 2] ITバイオマーカーが、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質である、20記載のキット。

[3 3] ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよびC反応性タンパク質である、20記載のキット。

[3 4] ITバイオマーカーが、インターフェロン、オステオポンチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ7、レジスチンおよび30 kDaの脂肪細胞補体関連タンパク質である、20記載のキット。

[3 5] 20 ~ 34のいずれかに記載のキットであって、

(a) キットで使用されるITバイオマーカーの組み合わせについてオフセット値を決定するかまたは割り当て;

(b) キットで使用される各ITバイオマーカーの係数を決定するかまたは割り当て;

(c) 以下の式I:

【数 2 1】

$$S(p) = A_0 + \sum_{i=1}^N A_i \ln(M_i(p) + C_i)$$

(式中、S(p)は症例pのITスコアであり、

定数A₀は「オフセット値」であり

Nはパネル中のマーカーの数であり

指数iはパネル中のマーカーをリストし

10

20

30

40

50

係数 A_i はi番目のITバイオマーカの「係数」であり

$M_i(p)$ は症例pのi番目のITバイオマーカのピコグラム/ml単位の濃度であり

C_i はi番目のマーカの「ローカットオフ」である)

を使用して、キットを使用して測定された血清中レベルをITスコアに変換し
および

(d) ITスコアをカットオフスコアと比較する

ソフトウェアをさらに含み、

ここで、カットオフスコアより大きいITスコアは、患者が、さらなる侵襲性冠動脈疾患
介入がなくとも有害心イベントのリスクが増加しないことを示し、カットオフスコアより
小さいITスコアは、患者が、さらなる侵襲性冠動脈疾患介入がなければ有害心イベントの
リスクが増加することを示す、

10

キット。

[36]

検出のための手段が、抗体、または可変領域を含むそのフラグメントを含む、20~35
のいずれかに記載のキット。

[37]

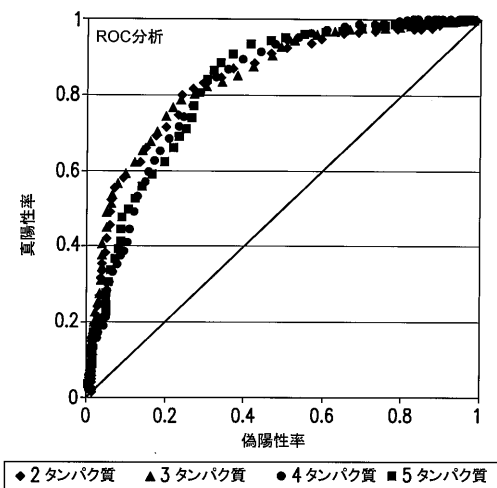
検出のための手段が微小流体デバイスを利用する、20~35のいずれかに記載のキッ
ト。

[38]

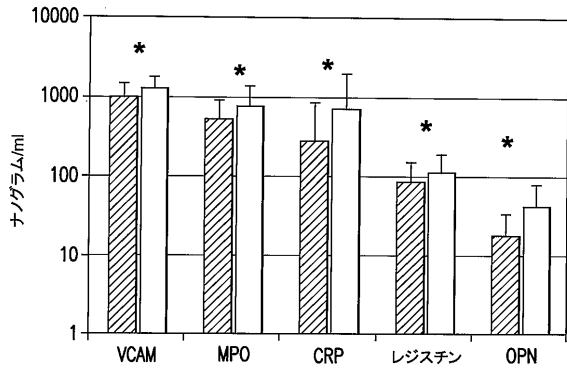
検出のための手段が質量分析を利用する、20~35のいずれかに記載のキット。

20

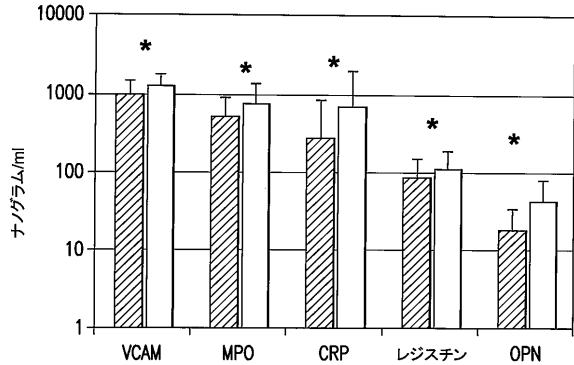
【図1】



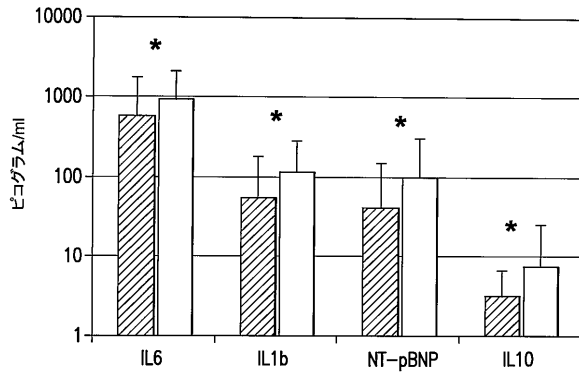
【図2】



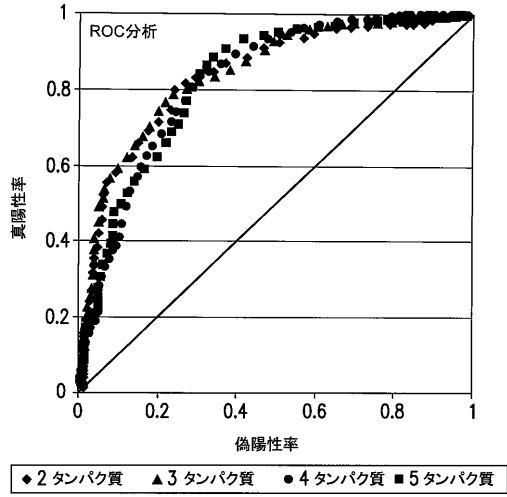
【図3】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
- (74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
- (74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
- (74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
- (74)代理人 100170221
弁理士 小瀬村 暁子
- (72)発明者 ラフランボワーズ, ウィリアム, エー.
アメリカ合衆国 1 5 0 2 4 ペンシルベニア州, チェストウィック, ダニーディン ドライブ
1 1 6
- (72)発明者 マスターソン, ロバート, ブイ.
アメリカ合衆国 9 8 1 0 3 ワシントン州, シアトル, エヌ. 3 4 ティーエイチ ストリート
4 5 4
- (72)発明者 マロックイン, オスカー, シー.
アメリカ合衆国 1 5 2 1 7 ペンシルベニア州, ピッツバーグ, マウント ロイヤル ロード
2 4 4 3
- (72)発明者 マクナマラ, デニス, エム.
アメリカ合衆国 1 5 3 6 7 ペンシルベニア州, ベネチア, スノーベリー サークル 3 3 5
- (72)発明者 ムルクトラ, スレッシュ, アール.
アメリカ合衆国 1 5 0 9 0 ペンシルベニア州, ウェスフォード, マッキーン ドライブ 4 2
9
- (72)発明者 ロマキン, アレクセイ
アメリカ合衆国 0 1 9 0 7 マサチューセッツ州, スワップスコット, ベイツ ロード 2 4

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0057590(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
G 0 1 N 2 7 / 6 2
G 0 1 N 3 7 / 0 0

专利名称(译)	急性冠脉综合征的生物标志物检测		
公开(公告)号	JP6096669B2	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	JP2013542239	申请日	2011-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学 预防SHIO公司		
申请(专利权)人(译)	盐湖城OVU匹兹堡OVU联合体系统OVU高等教育 Puribenshio公司		
当前申请(专利权)人(译)	盐湖城OVU匹兹堡OVU联合体系统OVU高等教育 Puribenshio公司		
[标]发明人	ラフランボワーズウィリアムエー マスターソンロバートブイ マロックインオスカーシー マクナマラデニスエム ムルクトラスレッシュアール ロマキンアレクセイ		
发明人	ラフランボワーズ,ウィリアム,エー. マスターソン,ロバート,ブイ. マロックイン,オスカー,シー. マクナマラ,デニス,エム. ムルクトラ,スレッシュ,アール. ロマキン,アレクセイ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N37/00 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2570/00 G01N2800/324 G01N2800/50 G01N2800/60 G16H50/30		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.P G01N37/00.101 G01N27/62.V		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/420158 2010-12-06 US 61/505896 2011-07-08 US		
其他公开文献	JP2014502358A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于鉴定不可能表现出显著冠状动脉疾病的患者的生物标志物特征和相关方法。它至少部分基于对239名患有心脏病的临床症状的患者的血清样本进行的研究，其中一些患者需要侵入性干预（支架置入或旁路移植手术）。一组生物标志物被鉴定为在进行或不进行侵入性干预的受试者中表现出不同的表达水平。此外，开发了一种算法，该算法使用这些生物标记物的血清水平，给予给定患者分数，该分数指示该患者是否需要侵入性干预。

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017. 2. 24)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 P
GO 1 N 27/62 (2006. 01)	GO 1 N 37/00 I O 1
	GO 1 N 27/62 V

請求項の数 34 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2013-542239 (P2013-542239)	(73) 特許権者	500091313
(86) (22) 出願日	平成23年12月5日 (2011. 12. 5)		ユニヴァーシティ オヴ ビッツバーグ
(65) 公表番号	特表2014-502358 (P2014-502358A)		オヴ サ コモンウェルス システム オヴ
(43) 公表日	平成26年1月30日 (2014. 1. 30)		ヴァイアー エデュケーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/063267		アメリカ合衆国、ペンシルヴァニア州 1
(87) 国際公開番号	W02012/078502		5260、ビッツバーグ、サッカレー
(87) 国際公開日	平成24年6月14日 (2012. 6. 14)		アンド オハラ ストリーツ、ガードナー
審査請求日	平成26年10月6日 (2014. 10. 6)		スティール コンファレンス センター
(31) 優先権主張番号	61/420, 158		200
(32) 優先日	平成22年12月6日 (2010. 12. 6)	(73) 特許権者	513140798
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ブリバンシオ、インコーポレーテッド
(31) 優先権主張番号	61/505, 896		アメリカ合衆国 98034 ワシントン
(32) 優先日	平成23年7月8日 (2011. 7. 8)		州、カークランド、スイート 105、エ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ヌイー 122エヌダィー ウェイ 11
			335

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性冠動脈症候群のバイオマーカー検査