

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-508367

(P2006-508367A)

(43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | D 2GO45 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | M 4CO85 |
| A 6 1 P 7/02 (2006.01) | A 6 1 P 7/02 | |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2004-570272 (P2004-570272) | (71) 出願人 | 398032751 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年11月10日 (2003.11.10) | | デイド・ペーリング・マルブルク・ゲゼル |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年7月8日 (2005.7.8) | | シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2003/012531 | | フツング |
| (87) 国際公開番号 | W02004/046722 | | ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (|
| (87) 国際公開日 | 平成16年6月3日 (2004.6.3) | | 番地なし) |
| (31) 優先権主張番号 | 10253525.6 | (74) 代理人 | 100091731 |
| (32) 優先日 | 平成14年11月16日 (2002.11.16) | | 弁理士 高木 千嘉 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | (74) 代理人 | 100127926 |
| (31) 優先権主張番号 | 10316059.0 | | 弁理士 結田 純次 |
| (32) 優先日 | 平成15年4月8日 (2003.4.8) | (74) 代理人 | 100105290 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | | 弁理士 三輪 昭次 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患における生化学的マーカーの組合せとしての sCD4OL, PAPP-A および胎盤増殖因子 (PIGF)

(57) 【要約】

本発明は、心血管疾患に罹患している患者において診断ツールおよび予後診断ツールとして使用される、脈管炎症の新規マーカーおよびそれらの組合せに関する。これらのマーカーはまた、このタイプの疾患を処置するための活性成分の選択を容易にするためのツールとして作用し、心血管疾患の処置のための出発点を構成する。本発明はまた、動脈硬化症の進行に関連するネガティブな事象の個体リスク・プロフィールの生成に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 分析すべき生物学的サンプルを被験体から得るステップ；

(b) 可溶性 CD 40 リガンド (s CD 40 L)、P APP - A および P L G F から選択される少なくとも 1 つのマーカーの濃度を決定するステップ；

(c) 場合により、トロポニン T (T n T)、M P O、NT - p r o B N P、V E G F、BNP およびさらなる炎症マーカーから選択される少なくとも 1 つのさらなるマーカーの濃度を決定するステップ；ならびに

(d) 分析すべきサンプルについて得られた結果を、参照値および / または参照サンプルからの値と比較するステップ、

を含む、急性心血管疾患に関してサンプルを分析するための方法。

10

【請求項 2】

分析すべきサンプルおよび / または参照サンプルがヒト由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

分析すべきサンプルが、末梢血またはその画分および細胞培養物懸濁液またはその画分からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

分析すべきサンプルが血漿である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

凝固阻害物質、特にヘパリンが末梢血に添加される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 6】

さらなる炎症マーカーが、CRP、(hs) CRP および IL - 10 から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、s CD 40 L ; P APP - A ; P L G F ; s CD 40 L + T n T ; P APP - A + T n T ; P L G F + T n T ; s CD 40 L + P APP - A ; s CD 40 L + P L G F ; P APP - A + P L G F ; s CD 40 L + P APP - A + T n T ; s CD 40 L + P L G F + T n T ; P APP - A + P L G F + T n T ; s CD 40 L + P APP - A + P L G F および s CD 40 L + P APP - A + P L G F + T n T から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

M P O、NT - p r o B N P、BNP、CRP、(hs) CRP および IL - 10 のうちの少なくとも 1 つのマーカーの分析をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、CRP、T n T、P APP - A ; CRP、T n T、P APP - A、IL - 10 ; CRP、T n T、P APP - A、IL - 10、s CD 40 L ; および T n T、P APP - A、IL - 10、s CD 40 L、V E G F から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

濃度の決定が、マーカー結合分子による免疫学的方法によって行われる、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 11】

マーカー結合分子が、抗マーカー抗体またはその部分およびマーカー・レセプターまたはその部分からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

抗体、その部分または断片が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、F a b 断片、s c F v 断片および二重特異性抗体を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

マーカーおよび / またはマーカー結合分子が、溶液中に存在するかまたはマトリッ

50

クスに固定化されている、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

s C D 4 0 L に結合する分子が、フルオレセインチオイソシアネート、フィコエリスリン、酵素および磁性ビーズからなる群より選択される 1 つまたは幾つかの検出グループに結合する、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

マーカー結合分子が、1 つまたは幾つかの検出グループが結合する抗体を用いて検出される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

免疫学的方法が、サンドイッチ酵素イムノアッセイ、E L I S A および固相イムノアッセイからなる群から選択される、請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 1 7】

心血管疾患が、不安定アングナ、心筋梗塞、急性冠症候群、冠状動脈疾患および心不全からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

場合によりさらなる成分および/または賦形剤と共に、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法を実施するための手段を含む、診断キット。

【請求項 1 9】

金標識されたポリクローナル・マウス指標抗体、ビオチン化ポリクローナル検出抗体、およびガラス繊維フリースを含む試験デバイスを含む、請求項 1 8 に記載の診断キット。 20

【請求項 2 0】

急性心血管疾患の診断および/もしくは予後診断のため、ならびに/またはそれらの治療のモニタリングのための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法の使用。

【請求項 2 1】

治療が、スタチンおよび/または糖タンパク質 I I b / I I I レセプターの阻害物質の投与を含む、請求項 2 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、心血管疾患を有する患者における診断ツールおよび予後診断ツールとしての、脈管炎症の新規マーカーおよびそれらの組合せに関する。これらのマーカーはまた、このような疾患の処置のための活性成分の選択を容易にするツールとして作用し、心血管疾患の処置のための出発点として最終的に作用する。さらに、本発明は、動脈硬化症の進行に関連するネガティブな事象の個体リスク・プロフィールの作成に関する。 30

【背景技術】

【0 0 0 2】

冠血管における血栓の形成は、不安定冠状動脈性心疾患の誘引事象である。不安定冠状動脈性心疾患を有する患者において、血小板活性化の中心的役割は、血小板から放出されるトロンボキサンおよびプロスタグランジン代謝物によってさらに増強される。したがって、血小板の活性化は一般的な治療目標である。現在まで、このような治療は、アスピリン、チエノピリジンおよび直接的糖タンパク質 I I b / I I I a 阻害物質の使用から構成された。それにもかかわらず、今日まで、血小板の活性化についての信頼性のある生化学的マーカーは同定できていない。血小板の活性化について現時点で最も有望なマーカーである P - セレクチンでの結果は、今日まで議論のあるところである。 40

【0 0 0 3】

心血管疾患に罹患している個体は、症状を示さない個体と胸部疼痛を示す個体とに分類することができる。後者の群は、安定狭心症 (S A P) を示す個体と急性冠症候群 (A C S) を有する個体とに分類することができる。A C S 患者は、不安定狭心症 (U A P) を示し得るか、またはこれらの患者は心筋梗塞 (M I) にすでに罹患している。M I は、S T 上昇 M I または非 S T 上昇 M I であり得る。M I の発症には、左心室機能不全 (L V D 50

)が伴うことがある。最後に、LVD患者は、約15%の死亡率でうっ血性心不全(CHF)を経験するか、または症状を全く示さない。

【0004】

胸部疼痛で入院した患者は、STの上昇または低下について分析される。この場合、この個体は、ほぼ100%の確率で入院したままとなる。MIを有する全ての個体がST異常を示すわけではないので、トロポニン(TnT)レベルが決定され、このレベルが異常に高い場合には、MIを発症している確率が高いことを示す。

【0005】

基礎研究における最近の進歩によって、その開始から進行、最終的には動脈硬化症病変の血栓性合併症までの動脈硬化症の全ての相の媒介における炎症の基本的な役割が確立された [Libby P、Ridker PM、Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(9):1135~43頁. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115~26頁. Davies MJ、Thomas AC. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53(4):363~73頁. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91(11):2844~50頁]。炎症と動脈硬化症との関係から得られた結果は、急性冠症候群を有する患者における潜在的な予測の道具としての循環炎症マーカーの使用についての合理性を形成する。実際、上昇したレベルの炎症マーカー(例えば、高感度C反応性タンパク質(hsCRP)、血清アミロイドAおよびインターロイキン-6(IL-6))は、一般に急性冠症候群と関連するだけでなく [Berk BC、Weintraub WS、Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 65(3):168~72頁、Biasucci LM、Vitelli A、Liuzzo Gら、Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94(5):874~7頁]、しかしこれはより重要なことであるが、急性冠症候群を有する患者の臨床転帰に関する記述を予測することもできる [Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JRら、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331(7):417~24頁、Biasucci LM、Liuzzo G、Grillo RLら、Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99(7):855~60頁、Toss H、Lindahl B、Siegbahn A、Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fibrin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997; 96(12):4204~10頁]。「古典的な」急性相タンパク質hsCRPは、臨床的使用について最も有望な生体マーカーと考えられるが、急性冠症候群を有する患者における上昇したhsCRPレベルの出現率に関して実質的な不均質が存在する [Biasucci LM、Liu 10

zzo G、Colizzi C、Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001; 2(3): 164~71頁]。

【0006】

したがって、重篤な不安定アングナを有する患者の30%超は、高いhsCRPレベルを示さない[Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JRら、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331(7): 417~24頁、Heeschen C、Hamm CW、Bruemmer J、Simeons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 Anti-Platelet Therapy in unstable angina refractory to standard treatment trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6): 1535~42頁]。さらに、特定の炎症刺激に対する応答の程度における個々の差異は、おそらく、「下流の」急性相反応体(例えば、hsCRP)のレベルに影響を与え得る[Pepys MB、Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2001、2(11): 804~6頁、Liuzzo G、Biasucci LM、Rebuzzi AGら、plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996; 94(10): 2373~80頁]。したがって、冠状動脈硬化症を有する患者においてリスク予測血清マーカーとして使用され得る脈管炎症についての近位の刺激を同定するための重要な挑戦が、なお存在する。

【0007】

一方で、CD40-CD40L系が、不安定冠状動脈性心疾患を有する患者の病態生理学において重要な役割を果たすという証拠が増えてきている。細胞結合形態とは別に、CD40Lは、可溶性の生物学的に完全に活性化形態(すなわち、sCD40L)でも存在する。sCD40Lは、刺激されたリンパ球によって与えられ、血小板刺激の際に活発に放出される。単球および内皮細胞は刺激されて組織因子を発現するので、sCD40Lは、内皮細胞に対して炎症促進的に作用し、凝固を促進する。さらにsCD40Lは、優勢な血小板インテグリン IIb₃に特異的な公知の結合モチーフであるKGD配列を含む。CD40Lは実際、血小板アゴニストである II₃リガンドであり、動脈血栓の安定性のために必要である。sCD40Lの増加は、急性冠症候群を有する患者の血清中で検出され得る。高い血漿sCD40L濃度を示した見かけ上健康な女性が、同時に心血管事象の高いリスクを有することが報告された(Schonbeck U、Varo N、Libby P、Buring J、Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266~8頁)。

【0008】

急性冠症候群を有する患者におけるプラークの破裂および引き続く血栓の形成が、循環血小板におけるCD40Lの露出の活性化を引き起こし得ることが、新たな知見により示されている(Lee Y、Lee WH、Lee SC、Ahn KJ、Choi YH、Park SW、Seo JD、Park JE. *Cardiology* . 1999; 92: 11~6頁)。さらに、高い濃度のsCD40Lがアングナを有する患者において

検出され、それにより、これらの濃度は不安定アングリナを有する患者において特に高かった (Aukrust P、Muller F、Ueland T、Berget T、Aaser E、Brunsvig A、Solum NO、Forfang K、Froland SS、Gullestad L. *Circulation* 1999; 10: 614~20頁)。これらの結果は、CD40L-CD40相互作用が動脈硬化症の進行の病原および冠症候群の発症の間に重要な役割を果たすことを示唆する。

【0009】

STストレッチの上昇と関連しない急性冠症候群を有する患者の適切な処置に関連する正確な診断を確立することは、非常に厄介であり得る。実際の標準に従う急性心筋梗塞の排除は、満足のいくものではない。近年、生命を脅かす心臓病学的事象を発症するリスクが存在しかつ特に改善された治療ストラテジーおよび介入ストラテジーによる利益を受ける患者を同定する目的で、リスク層別および処置の制御に焦点を当てることが注目された (Hamm CW、Bertrand M、Braunwald E. *Lancet* 2001; 358: 1533~8頁)。これに関して、ECGは、重要な異常が稀でありかつそれらの検出の感度および特異性が乏しいので、限定された予後診断的関連性のみを有する (Kaul P、Fu Y、Chang WCら、*J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 64~71頁および Savonitto S、Ardisino D、Granger C Bら、*JAMA* 1999; 281: 707~13頁)。したがって、心筋細胞の壊死のマーカー (特に心臓トロポニン) は、急性冠症候群を有する患者の評価における有益なツールとなった (Hamm CW、Braunwald E. *Circulation* 2000; 102: 118~22頁)。それにもかかわらず、トロポニンは急性冠症候群の病態生理に能動的に関与せず、むしろ脆い血栓の形成についてのある種の代理マーカーに相当する (Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L. *J Am Coll Cardio.* 2001; 38: 979~86頁、Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML. *Circulation* 1999; 100: 1509~14頁; Benamer H、Steg PG、Benessiano Jら、*Am Heart J* 1999; 137: 815~20頁)。これに関して、ECGは、重要な異常が稀でありかつそれらの検出の感度および特異性が乏しいので、限定された予後診断的関連性のみを有する (Kaul P、Fu Y、Chang WCら、*J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 64~71頁および Savonitto S、Ardisino D、Granger C Bら、*JAMA* 1999; 281: 707~13頁)。

【0010】

疾患の活性を好ましくは心筋壊死が生じる前に判定する血小板活性化のマーカーは、急性冠症候群を有する患者における診断的および治療的な層別のために重要なさらなる情報を示し得る。CD40リガンド (CD40L、最近CD154と改名された) もまた、疾患の発症およびプラーク不安定化において重要な役割を果たすという証拠が増えてきている (Mach F、Schonbeck U、Sukhova GK、Atkinson E、Libby P. *Nature* 1998; 394: 200~3頁および Lutgens E、Gorelik L、Daemen MJら、*Nat Med* 1999; 5: 1313~6頁)。CD40-CD40L系は、多数の白血球および非白血球細胞 (内皮細胞および平滑筋細胞を含む) (Schonbeck U、Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4~43頁) ならびに活性化された血小板 (Henn V、Slupsky JR、Grafe Mら、*Nature* 1998; 391: 591~4頁) において共通する。細胞結合型の39kDaの形態に加えて、CD40Lは可溶性の生物学的に完全に活性な形態 (すなわち、sCD40L) でも存在する (Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczyk RA. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749~54頁)。sCD40Lは、刺激されたリンパ球によって与えら

10

20

30

40

50

れ、血小板の活性化の際に活発に放出される (Lee Y、Lee WH、Lee SCら、*Cardiology* 1999; 92: 11~6頁およびHenn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczeck RA. *Blood* 2001; 98: 1047~54頁)。sCD40Lは、内皮細胞に対して炎症促進的に作用し、単球 (Mach F、Schonbeck U、Bennefoy JY、Poerber JS、Libby P. *Circulation* 1997; 96: 396~9頁) および内皮細胞 (Urbich C、Mallat Z、Tedgui A、Clauss M、Zeicher AM、Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001; 108: 1451~8頁) による組織因子の発現を誘導することによって凝固を促進する。さらにsCD40Lは、優勢な血小板インテグリン I Ib 3 (Scarborough RM、Naughton MA、Teng Wら、*J Biol Chem* 1993; 268: 1066~73頁) に特異的な公知の結合モチーフであるKGD配列 (Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749~54頁) を含む。CD40Lが実際、血小板アゴニストである I Ib 3リガンドに相当し、動脈血栓の安定性のために必要であることが示され得る (Andre P、Prasad KS、Denis CVら、*Nat Med* 2002; 8: 247~52頁)。

【0011】

これらの知見は、急性冠症候群の病態生理においてsCD40Lが重要な役割を果たすことを説得力を持って示す。興味深いことに、sCD40Lの増大は、急性冠症候群を有する患者の血清中で検出され得る (Aukrust P、Muller F、Ueland Tら、*Circulation* 1999; 100: 614~20頁)。上昇した血漿濃度のsCD40Lを示した見かけ上健康な女性が、心血管事象についての増大したりスクを有することが報告された (Schonbeck U、Varo N、Libby P、Buring J、Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266~8頁)。本発明の目的は、心臓事象に関するsCD40L濃度の予測値および急性冠症候群を有する患者における糖タンパク質 I Ib / I I I a 阻害物質であるアブキシマブ (abciximab) の治療効果を試験することであり、ここで、CAPTURE研究 (c7E3 Anti-Platelet Therapy in Unstable Refractory Angina (不安定難治性アングナのc7E3抗血小板治療)) のデータ・ベースを使用した (CAPTURE. *Lancet* 1997; 349: 1429~35頁)。

【0012】

疾患の活性を、恐らくは心筋壊死が生じる前に、判定する炎症マーカーは、急性冠症候群を有する患者における診断的および治療的な層別のために重要なさらなる情報を示し得る。プラークの安定性に必須なサイトカインの特異的な治療的阻害は、不安定冠状動脈性心疾患を有する患者および安定冠状動脈性心疾患を有する患者の処置のための新規ストラテジーであり得る。

【0013】

増殖因子の血管内皮増殖因子ファミリー (VEGFファミリー) のメンバーである胎盤増殖因子 (PLGF) は、初期および進行した動脈硬化症病変においてアップレギュレートされることが最近示された。

【0014】

米国特許第6225088号は、増殖性疾患に関してPLGFを記載しているが、その一方でWO 92/06194号では、PLGFは血管新生因子として記載されている。

【0015】

De Falcoら (De Falco S、Gigante B、Persico MG. 「Structure and function of placental growth factor」、*Trends Cardiovasc Med* 200 50

2 Aug; 12 (6) : 241 ~ 6頁) は、マウスにおける病理学的状態 (例えば、虚血および腫瘍形成) の間の血管新生および動脈形成の減少の関係を記載している。それにより、PLGFは、病理学的条件下での血管新生に必須の因子として記載される。PLGFは、血管新生治療のための代替的標的として提案される。

【0016】

Luttunら (Luttun A、Tjwa M、Moons L、Wu Y、Angelillo-Scherrer A、Liao F、Nagy JA、Hooper A、Priller J、De Klerck B、Comperolle V、Daci E、Bohlen P、Dewerchin M、Herbert JM、Fava R、Matthys P、Carmeliet G、Collen D、Dvorak HF、Hicklin DJ、Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 Nat Med 2002 Aug; 8 (8) : 831 ~ 40頁) は、血管新生に関するPLGFおよびFlt-1の治療的方法を記載している。PLGFの障害が動脈硬化症プラークの成長および脆弱性を低下させることがさらに記載されている。

【0017】

Ouraら (Oura H、Bertoncini J、Velasco P、Brown LF、Carmeliet P、Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and oedema formation. Blood 2003 Jan 15; 101 (2) : 560 ~ 7頁) は、皮膚の炎症および血管新生におけるPLGFの役割を記載している。さらに、PLGFのレベルの上昇および低下の影響、ならびに炎症状態とのそれらの比較が記載されている。

【0018】

炎症促進性サイトカインCD40Lは、活性化された血小板によって放出される。CD40Lの可溶性形態 (すなわちsCD40L) は、急性冠症候群を有する患者において漸増的に存在する。したがって、血小板の活性化についてのマーカーとしてのsCD40Lの予後診断的な値もまた、糖タンパク質IIb/IIIaレセプターの障害の治療的效果に関して試験された。

【0019】

妊娠関連血漿タンパク質A (PAPP-A) は、メタロプロテイナーゼのメトジンシン (metzincin) スーパーファミリーに属する高分子量の亜鉛結合マトリックス・メタロプロテイナーゼであり、妊娠女性の血漿において最初に同定された。これは、妊娠の最初の3カ月における胎児三染色体性のスクリーニングのために広く使用されている。PAPP-Aについて、これが糜爛したプラークおよび緩んだプラークにおいてそれぞれ発現されるが、安定なプラーク中およびACSを有する患者と同様の症状による再発が仮定されるプラーク中で最小に発現されるのみであることもまた、最近見出された。それにもかかわらず、厳しい終点 (例えば、死または心筋梗塞) の予測のための循環PAPP-A血漿レベルの正確な役割は、ACSを有する患者において正確には決定されていない。さらに、PAPP-A血漿レベルが、最近確立された生体マーカーと比較して、ACSを有する患者においてさらなる予後情報を提供するか否かは完全に未知である。したがって、本発明者らは、ACSを有する患者における全身的炎症、血小板の活性化、虚血および心筋壊死のマーカーと、PAPP-A血漿レベルの予後診断的な重要性を比較した。

【0020】

心血管疾患の診断に適切であり得る多数の異なる分子マーカーが、最新の技術において見出され得る。このようなマーカーの例としては、とりわけ以下のものがある：

妊娠関連血漿タンパク質A (PAPP-A) ; C反応性タンパク質 (CRP) ; hs-CRP ; 胎盤増殖因子 (PLGF) ; インターロイキン-18 (IL-18 / IL-18

b) ; 脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) ; NT-pro脳性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proNP) ; sCD40L、cTnI/T、IL-10、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン、P-セレクトリン、IL-6、VEGF、血清アミロイドA (SAA)、CKMB、MPO、LpPLAz、GP-BB、IL1RA、TAF1、可溶性フィブリン、抗oxLDL、MCP-1、組織因子(TF)、MMP-9、Ang-2、Tffl-2、IL-P、bFGF、PCMおよびVEGF-A。

【0021】

上に示されたマーカーのいくつかは公知のマーカーであり、冠疾患の検査について特徴付けられているが、それでもなお、その他は未だ対応して試験されていない。

【0022】

与えられたマーカーのほぼ全てが、特定の心血管事象に関して診断上の価値を有する。例えばTnTは、MIの診断および予測について特に価値がある(上記を参照のこと)。炎症マーカー(例えばCRP)は、プラークの破裂およびMIを引き起こし得る炎症の診断および予測に有益である。

【0023】

上に示したマーカーの多くは、心血管疾患についての診断上の価値を有する。マーカーの組合せの使用は、非常に控えめに記載されただけである。

【0024】

Lundら、Circulation. 2003、108:1924~1926頁は、PAPP-AとTnI(トロポニンI)との組合せを記載し; Pengら、Clinica Chimica Acta 319(2002)19~26頁は、sICAM-1およびsVCAM-1とのsCD40Lの組合せを記載している。Lenderinkら、European Heart Journal(2003)24、77~85頁は、TnTのCRPとの組合せを記載している。Heeschenら、Journal of the American College of Cardiology; Vol. 35、No. 6、2000は、TnTのCRPとの組合せに言及している。

【0025】

Heeschenら、Circulation. 2003; 107:2109~2114頁は、TnT、CRPおよびIL-10の組合せを記載している。Blankenbergerら、Circulation. 2002; 106:24~30頁は、CRPおよびIL-6の組合せを記載している。Autieroら、Journal of Thrombosis and Haemostasis、1:1356~1370頁は、PlGFおよびVEGFの組合せを記載している。

【非特許文献1】Libby P、Ridker PM、Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002; 105(9):1135~43頁

【非特許文献2】Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340(2):115~26頁

【非特許文献3】Davies MJ、Thomas AC. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. Br Heart J 1985; 53(4):363~73頁

【非特許文献4】Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation 1995; 91(11):2844~50頁

【非特許文献5】Berk BC、Weintraub WS、Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. Am J Cardiol 1990; 65(3):168~72頁

10

20

30

40

50

- 【非特許文献6】Biasucci LM、Vitelli A、Liuzzo G、Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94(5): 874~7頁
- 【非特許文献7】Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JR、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331(7): 417~24頁
- 【非特許文献8】Biasucci LM、Liuzzo G、Grillo RL、Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99(7): 855~60頁 10
- 【非特許文献9】Toss H、Lindh B、Siegbahn A、Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. *FRIESC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. Circulation* 1997; 96(12): 4204~10頁 20
- 【非特許文献10】Biasucci LM、Liuzzo G、Colizzi C、Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001; 2(3): 164~71頁
- 【非特許文献11】Heeschen C、Hamm CW、Bruegger J、Simeons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. *CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 Anti-Platelet Therapy in unstable angina refractory to standard treatment trial. J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6): 1535~42頁 30
- 【非特許文献12】Pepys MB、Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2001; 2(11): 804~6頁
- 【非特許文献13】Liuzzo G、Biasucci LM、Rebuzzi AG、plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996; 94(10): 2373~80頁 40
- 【非特許文献14】Schonbeck U、Varo N、Libby P、Buring J、Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266~8頁
- 【非特許文献15】Lee Y、Lee WH、Lee SC、Ahn KJ、Choi YH、Park SW、Seo JD、Park JE. *Cardiology*. 1999; 92: 11~6頁
- 【非特許文献16】Aukrust P、Muller F、Ueland T、Ber 50

- get T、Aaser E、Brunsvig A、Solum NO、Forfang K、Froland SS、Gullestad L. *Circulation* 1999; 100: 614~20頁
- 【非特許文献17】Hamm CW、Bertrand M、Braunwald E. *Lancet* 2001; 358: 1533~8頁
- 【非特許文献18】Kaul P、Fu Y、Chang WC、J Am Coll Cardiol 2001; 38: 64~71頁
- 【非特許文献19】Savonitto S、Ardissino D、Granger CB、JAMA 1999; 281: 707~13頁
- 【非特許文献20】Hamm CW、Braunwald E. *Circulation* 2000; 102: 118~22頁 10
- 【非特許文献21】Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L. *J Am Coll Cardio* . 2001; 38: 979~86頁
- 【非特許文献22】Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML. *Circulation* 1999; 100: 1509~14頁
- 【非特許文献23】Benamer H、Steg PG、Benessiano JB、Am Heart J 1999; 137: 815~20頁
- 【非特許文献24】Mach F、Schonbeck U、Sukhova GK、Atkinson E、Libby P. *Nature* 1998; 394: 200~3頁 20
- 【非特許文献25】Lutgens E、Gorelik L、Daemen MJ、Nat Med 1999; 5: 1313~6頁
- 【非特許文献26】Schonbeck U、Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4~43頁
- 【非特許文献27】Henn V、Slupsky JR、Grafe M、Nature 1998; 391: 591~4頁
- 【非特許文献28】Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczyk RA. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749~54頁 30
- 【非特許文献29】Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczyk RA. *Blood* 2001; 98: 1047~54頁
- 【非特許文献30】Mach F、Schonbeck U、Bennefoy JY、Pober JS、Libby P. *Circulation* 1997; 96: 396~9頁
- 【非特許文献31】Urbich C、Mallat Z、Tedgui A、Clauss M、Zeicher AM、Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001; 108: 1451~8頁
- 【非特許文献32】Scarborough RM、Naughton MA、Teng W、J Biol Chem 1993; 268: 1066~73頁 40
- 【非特許文献33】Andre P、Prasad KS、Denis CV、Nat Med 2002; 8: 247~52頁
- 【非特許文献34】CAPTURE. *Lancet* 1997; 349: 1429~35頁
- 【特許文献1】米国特許第6225088号
- 【特許文献2】WO 92/06194号
- 【非特許文献35】De Falco S、Gigante B、Persico MG. 「Structure and function of placental growth factor」、*Trends Cardiovasc Med* 2002 Aug; 12(6): 241~6頁 50

- 【非特許文献36】Luttun A、Tjwa M、Moons L、Wu Y、Angelillo-Scherer A、Liao F、Nagy JA、Hooper A、Priller J、De Klerck B、Comperolle V、Daci E、Bohlen P、Dewerchin M、Herbert JM、Fava R、Matthys P、Carmeliet G、Collen D、Dvorak HF、Hicklin DJ、Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 *Nat Med* 2002 Aug; 8(8): 831~40頁 10
- 【非特許文献37】Oura H、Bertoncini J、Velasco P、Brown LF、Carmeliet P、Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and oedema formation. *Blood* 2003 Jan 15; 101(2): 560~7頁
- 【非特許文献38】Lundb、*Circulation*. 2003、108: 1924~1926頁
- 【非特許文献39】Pengb、*Clinica Chimica Acta* 319(2002) 19~26頁
- 【非特許文献40】Lenderinkb、*European Heart Journal* (2003) 24、77~85頁 20
- 【非特許文献41】Heeschenb、*Journal of the American College of Cardiology*; Vol. 35、No. 6, 2000
- 【非特許文献42】Heeschenb、*Circulation*. 2003; 107: 2109~2114頁
- 【非特許文献43】Blankenbergb、*Circulation*. 2002; 106: 24~30頁
- 【非特許文献44】Autierob、*Journal of Thrombosis and Haemostasis*、1: 1356~1370頁 30
- 【特許文献3】WO 03/040692号
- 【非特許文献45】Andre P.、Nannizzi-Alaimo L、Prasad SK、Phillips DR.; *Circulation* 2002; 106: 896~9頁
- 【非特許文献46】Farb A、Burke AP、Tang ALb; *Circulation* 1996; 93: 1354~63頁
- 【非特許文献47】Davies MJ; *N. Engl J Med* 1997; 336: 1312~4頁
- 【非特許文献48】Miller DL; Yaron R、Yellin MJ; *J Leukoc Biol* 1998; 63-373~9頁 40
- 【非特許文献49】Kotowicz K、Dixon GL、Klein NJ、Peters MJ、Callard RE; *Immunology* 2000; 100: 441~8頁
- 【非特許文献50】Nannizzi-Alaimo L、Rubenstein MH、Alves VL、Leong GY、Phillips DR、Gold HK; *Circulation* 2002、105: 2849~2854頁
- 【非特許文献51】Cipollone F、Mezzetti A、Porreca Eb; *Circulation* 2002; 106: 399~402頁
- 【非特許文献52】Hamm CW、Heeschen C、Goldmann Bb; *N Engl J Med* 1999; 340: 1623~9頁 50

- 【非特許文献53】Antman EM、Tanasijevic MJ、Thompson B⁵; N Engl J Med 1996; 335: 1342~9頁
- 【非特許文献54】Ohman EM、Armstrong PW、Christenson RH⁵; N Engl J Med 1996; 335: 1333~41頁
- 【非特許文献55】Hamm CW、Ravkilde J、Gerhardt W⁵; N Engl J Med 1992; 327: 146~50頁
- 【非特許文献56】Hamm CW、Goldmann BU、Heeschen C、Kreymann G、Berger J、Meinertz T; N Engl J Med 1997; 337: 1648~53頁
- 【非特許文献57】Newby LK、Ohman EM、Christenson R 10
H⁵; Circulation 2001; 103: 2891~6頁
- 【非特許文献58】Januzzi JL、Chae CU、Sabatine MS、Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11: 211~5頁
- 【非特許文献59】Heeschen C、Hamm CW、Goldmann B、Deu A、Langenbrink L、White HD; Lancet 1999; 354: 1757~62頁
- 【非特許文献60】Braunwald E、Maseri A、Armstrong PW⁵; Eur Heart J 1998; 19: D22~30頁
- 【非特許文献61】Lee SH、Wolf PL、Escudero R、Deuts 20
ch R、Jamieson SW、Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med 2000; 342(9): 626~33頁
- 【非特許文献62】Khaliq A、Dunk C、Jiang J⁵、Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. Lab 30
Invest 1999; 79(2): 151~70頁
- 【非特許文献63】Cao Y、Linden P、Shima D、Browne F、Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. J Clin Invest 1996; 98(11): 2507~11頁
- 【非特許文献64】Heeschen C、Dimmeler S、Hamm CW、Boersma E、Zeiher AM、Simoons ML. Prognostic 40
significance of angiogenic growth factor r serum levels in patients with acute coronary syndromes. Circulation 2003; 107: 524~530頁
- 【非特許文献65】Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JR⁵、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. J Am Coll Cardiol 1999; 34(6): 1696~703頁
- 【非特許文献66】Liuzzo G、Buffon A、Biasucci LM⁵、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe u 50

unstable angina. Circulation 1998; 98(22): 2370~6頁

【非特許文献67】Liuzzo G、Angiolillo DJ、Buffon Aら、Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. Circulation 2001; 103(18): 2236~41頁

【非特許文献68】Westendorp RG、Langermans JA、Huijzinga TW、Verweij CL、Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. Lancet 1997; 349(9069): 1912~3頁 10

【非特許文献69】Luttun A、Tjwa M、Canneliet P. Placental Growth Factor (PlGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. Ann N Y Acad Sci 2002; 979: 80~93頁

【非特許文献70】Michelson AD、Barnard MR、Krueger LA、Valeri CR、Furman MI、Circulation 2001; 104: 1533~7頁 20

【非特許文献71】Harrell FE, Jr., Lee KL、Pollock BG. J Natl Cancer Inst 1988; 80: 1198~202頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

しかし現在まで、この組合せによる改善された分析の可能性は試験されておらず、選択的な優れたマーカー・アッセイの開発も完了していない。したがって、どのマーカーが有効な診断に適切であるかは、上に示した刊行物から容易に誘導することはできない。

【0027】

したがって上記の観点から、本発明の目的は、冠血栓症に起因する有害な心血管事象のリスクを、個体リスク・プロフィールを用いて概算できる方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、胎盤増殖因子(P1GF)阻害用の活性成分での処置が有利であるか否かの可能性の評価のための方法を開発することである。この方法を用いて、担当医は、患者にポジティブな影響を与えるためおよび/または有害事象を予防するため、または罹患した患者についてその重症度を少なくとも低下させるために適切な手段を従前よりも良好に選択することが可能となるはずである。 30

【0028】

本発明の目的は、冠血栓症に起因する有害な心血管事象に罹患するリスクが、個体リスク・プロフィールを用いて概算され得る方法を提供することである。これは、血小板の活性化のマーカーの濃度を測定することによって行われる。さらに、本発明の目的は、血小板活性化を阻害する活性成分での処置が有利であるか否かの可能性を評価するための方法を開発することである。この方法により、担当医は、患者にポジティブな影響を与えるためおよび/または有害事象を予防するため、または罹患した患者についてその重症度を少なくとも低下させるために適切な測定を従前よりも良好に選択することが可能となるはずである。 40

【0029】

本発明のさらなる目的は、どの心血管事象に患者がすでに罹患しているか、どの心血管事象に患者が将来罹患する可能性があるかの正確な診断を可能にする、心血管事象についての診断マーカーの一般的な組合せを見出すことである。特定の目的は、平行して有利に実施され得るマーカーの組合せを見出すことである。理想的には、これらの測定により、 50

T n Tと同時に胸部疼痛を有する患者を測定することが可能である。

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明の目的は、急性心血管疾患に関してサンプルを分析するための方法によって解決される。本発明の方法は、以下のステップを含む：(a)分析すべき生物学的サンプルを被験体から得るステップ；(b)可溶性CD40リガンド(sCD40L)、PAPP-AおよびPLGFから選択される少なくとも1つのマーカーの濃度を決定するステップ；(c)場合により、トロポニンT(TnT)、MPO、NT-proBNP、VEGF、BNPおよびさらなる炎症マーカーから選択される少なくとも1つのさらなるマーカーの濃度を決定するステップ；ならびに(d)分析すべきサンプルについて得られた結果を、参照値および/または参照サンプルからの値と比較するステップ。

10

【0031】

本発明に関して分析のために使用されるマーカーは、大部分まで、周知でありかつ最新の技術から特徴付けられたマーカーであるが、今日まで、急性心血管疾患の診断における使用について不十分にしか特徴付けられていない。

【0032】

即ち、C反応性タンパク質(CRP)およびhsCRPは全身的炎症のマーカーとして特徴付けられ、トロポニンcTnI/Tは壊死のマーカーとして特徴付けられ、妊娠関連血漿タンパク質A(PAPP-A)はマクロファージの活性化のマーカーとして特徴付けられ、IL-10(インターロイキン10)は炎症のバランスのマーカーとして特徴付けられ、sCD40Lは血栓-炎症活性化のマーカーとして特徴付けられ、MPO(ミエロペルオキシダーゼ)は酸化ストレスのマーカーとして特徴付けられ、胎盤増殖因子(PLGF)は脈管炎症のマーカーとして特徴付けられ、そしてマーカー脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)およびNT-pro脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-proNP)は、神経液性活性化および虚血のマーカーとして特徴付けられる。

20

【0033】

同様に有用な、その他の類似のマーカーは、インターロイキン-18(IL-18/I L-18b)、ICAM-1、VCAN-1、E-セレクトリン、P-セレクトリン、IL-6、VEGF、血清アミロイドA(SAA)、CKMB、LpPLAz、GP-BB、IL-1RA、TAF-1、可溶性フィブリン、抗oxLDL、MCP-1、組織因子(TF)、MMP-9、Ang-2、Tffl-2、bFGF、PCMおよびVEGF-Aである。

30

【0034】

WO 03/040692号(およびCirculation 2001;104:2266~2268頁)は、sCD40Lが、炎症マーカー(特にCRP)と組み合わせて有利に使用され得ることを記載している。しかし、この組合せは、非急性の心疾患の診断のためにのみ使用され、疑わしい結果のために、WO 03/040692号によって層別が却下されている。

【0035】

分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルが、哺乳動物(特にヒト)に由来する、本発明の方法が好ましい。分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルが、末梢血またはその画分および細胞培養物懸濁液またはその画分からなる群から選択される、本発明の方法がさらに好ましい。分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルが、血漿または血清であることがさらに好ましい。末梢全血は、分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルとして特に好ましい。

40

【0036】

本発明の方法のさらなる態様によれば、分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルは予め処理され得、この際、例えば凝固阻害物質、特にヘパリンがこの末梢血に添加される。

【0037】

50

本発明によれば、上記いくつかのマーカーの個々の分析に加えて、このようなマーカーの組合せもまた、急性心臓事象の診断またはモニタリングが可能であり、顕著に改善された分析を可能にする、ということが驚くべきことに見出され得る。これを行う際に、マーカーの組合せは、有害な心臓事象の異なる様相に関して特に好ましいとして同定され得るが、同時に（すなわち、同時かまたは多少の時間間隔をあけた一連の測定で）分析することができる。本発明の1態様において、さらなるマーカーは、例えばCRP、(hs)CRPおよびIL-10のような炎症マーカーから選択される。

【0038】

本発明の方法のさらなる態様によれば、分析されるマーカーおよびそれらの組合せは、sCD40L；PAPP-A；PLGF；sCD40L+TnT；PAPP-A+TnT 10
；PLGF+TnT；sCD40L+PAPP-A；sCD40L+PLGF；PAPP-A+PLGF；sCD40L+PAPP-A+TnT；sCD40L+PLGF+TnT；PAPP-A+PLGF+TnT；sCD40L+PAPP-A+PLGF；およびsCD40L+PAPP-A+PLGF+TnTから選択される。次いで、さらなるマーカーとしてMPO、NT-proBNP、BNP、CRP、(hs)CRPおよびIL-10の少なくとも1つとのさらなる組合せが好ましい。

【0039】

次いで、分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、CRP、TnT、PAPP-A；CRP、TnT、PAPP-A、IL-10；CRP、TnT、PAPP-A、IL-10、sCD40LおよびTnT、PAPP-A、IL-10、sCD40L、VEGF 20
から選択される方法が、本発明に従って特に好ましい。

【0040】

分析されるマーカーの濃度を決定するために本発明に従って使用される方法は、当業者に公知の生物学的サンプル中のタンパク質を検出するのに適切な全ての方法から選択され得る。本発明に関して、実際の方法は、その方法がこれらのマーカーの濃度の正確な決定のために必要な検出レベルを下回るように十分な感度がある限り、重要ではない。適切な方法は、決定すべきマーカーへの標識の結合と、続けてこの標識の検出に通常基づく。それによって、この結合は共有結合でも非共有結合でもよく、かつ/または直接的もしくは間接的に生じ得る。本発明に従う測定のための適切な方法には、例えば、電気化学ルミネセンスが含まれる。濁度測定、比濁分析およびラテックス増強濁度測定または比濁分析も 30
また使用され得る。

【0041】

濃度の決定がマーカー結合分子による免疫学的方法によって行われる本発明の方法は、高い感度を有し、また高スループット環境にも適合され得るため好ましい。このような方法の例は、ELISA（酵素結合免疫ソルベント検定法）、サンドイッチ酵素免疫アッセイまたは固相免疫アッセイである。したがって、マーカー結合分子が抗マーカー抗体またはその部分およびマーカー・レセプターまたはその部分からなる群から選択されることが好ましい。

【0042】

これらの分子は、非常に多数のマーカー特異的分子から選択され得る。これらのマーカー結合分子が、特にマーカーもしくはその部分を標的とした抗体、またはその部分もしくは断片、およびマーカー・レセプターもしくはその部分、またはインテグリン（例えば、血小板インテグリン I I b 3）もしくはその部分からなる群から選択されることが好ましい。抗体、その部分または断片がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab断片、scFv抗体および二重特異性抗体を含む、本発明の方法が特に好ましい。

【0043】

本発明の方法のさらなる態様によれば、この方法の成分は、固相に結合して存在し得、したがって、これらのマーカー結合分子は、溶液中に存在するかまたはマトリックスに固定化された状態で存在し得る。当業者に公知の多数の材料がマトリックス（例えば、樹脂マトリックスおよび/または一般的なカラム・マトリックス）として使用される。さらに 50

、これらのマーカー結合分子がフルオレセインチオイソシアネート、フィコエリスリン、酵素（例えば、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ）および磁性ビーズからなる群からの1つまたはいくつかの検出分子に結合される、本発明の方法が特に好ましい。

【0044】

本発明の方法のさらなる態様によれば、これらのマーカー結合分子は、1つまたはいくつかの検出分子に結合される抗体を用いて検出され得る。したがって、これは、この分子の結合の間接的な検出を示す。このような2段階の検出は、例えば抗抗体検出の技術から、当業者に非常に周知である。

【0045】

本発明の方法のさらなる態様によれば、免疫細胞学的方法がサンプルの分析のために使用され得る。このために、マーカー/分子相互作用に基づく特異的な決定を可能にする全ての方法が適切である。サンドイッチ酵素イムノアッセイ、ELISAおよび固相イムノアッセイからなる群から選択される方法が好ましい。

10

【0046】

分析すべきサンプルから得られる結果は、通常参照サンプルと比較される。特に、どのサンプルが参照サンプルとして働き得るかは、分析されるサンプルの種類、分析すべきサンプルが由来する個体の病歴に依存する。参照サンプルが、心血管疾患を有しない1匹の哺乳動物または数匹の哺乳動物の平均値に由来する、本発明の方法が好ましい。それでもなお、これは義務ではないが、例えば疾患の進行が決定される場合、同じ患者の「古い」サンプルもまた参照サンプルとして使用され得る。どのサンプルが本発明の方法のための参照サンプルとして適切であるかは、当業者に明らかである。

20

【0047】

本発明の方法のさらなる態様によれば、診断および/もしくは予後診断すべき急性心血管疾患ならびに/またはその治療がモニタリングされる急性心血管疾患は、不安定アンギナ、心筋梗塞、急性心症候群（acute heart syndromes）、冠状動脈疾患および心不全からなる群から選択され得る。それでもなお、本発明の方法がさらなる急性心疾患状態に適切であり、かつこの状態において使用され得ることは、無視すべきではない。

【0048】

本発明のさらなる態様は、場合によりさらなる成分および/または賦形剤と共に、本発明の方法を実施するための手段を含む診断キットに関する。好ましくは、このような手段は、マーカーを検出するための少なくとも1つの抗体およびこのマーカーの引き続く定量のための手段である。さらに、このキットは、本発明の方法を実施するための他の成分および/または酵素（例えば、患者のリスク・プロフィールに関するアッセイの結果の解釈について、ならびに対応する対抗手段および治療のための提案についての指示マニュアル）を含み得る。

30

【0049】

金標識されたポリクローナル・マウス指標抗体、ビオチン化ポリクローナル検出抗体、およびガラス繊維フリースを含むアッセイ・デバイス、を含む診断キットにより、本発明の方法を実施することが好ましい。

【0050】

したがって、本発明のさらなる態様は、急性心血管疾患の診断および/もしくは予後診断、ならびに/またはそれらの治療のモニタリングのための本発明の方法の使用に関する。これは、マーカーの定量的かつ決定的な決定により行われる。次いで作成され得るリスク・プロフィールに基づいて、患者にポジティブな影響を与えるため、および有害事象を予防するため、または罹患した患者についてその重症度を少なくとも低下させるために、適切な対抗手段が担当医によって実施され得る。本発明に従うこのような治療は、例えばスタチンまたは糖タンパク質IIb/IIIレセプターの阻害物質（特にアブシキシマブ）の投与を含み得る。しかし、当業者は、生じ得る心血管疾患を処置するための一般的なスキームに従う、さらなる可能な治療を認識している。

40

【0051】

50

本発明のさらなる実施形態において、抗炎症手段が同時投与される。これらの手段は、非ステロイド型またはステロイド型の抗炎症手段から選択され得、これには例えば以下が含まれ得る：アルクロフェナク (alclufenac)；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド (algestonacetoneide)；-アミラーゼ；アムシナファル (amcinafal)；アムシナフィド (amcinafid)；アムフェナクナトリウム (amfenac sodium)；塩酸アミプリロース；アナキンラ；アニロラク (anirrolac)；アニトラザフェン (anitrazafen)；アパゾン (apazon)；バルサラジドニナトリウム (balsalazid disodium)；ベンダザック；ベノキサプロフェン (benoxaprofen)；塩酸ベンジダミン (benzydamin hydrochloride)；プロメライン；プロペラモール (broperamol)；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン (cicloprofen)；シントゾン (cintazon)；クリプロフェン (cliprofen)；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラク (clopirac)；プロピオン酸クロチカゾン (cloticasonpropionate)；酢酸コルメタゾン (cormethasonacetate)；コルトドキソン (cortodoxon)；デフラザコート；デソニド (desonid)；デソキシメタゾン (desoximetason)；ジプロピオン酸デキサメタゾン (dexamethasondi propionate)；ジクロフェナクナトリウム；ジクロフェナクナトリウム；二酢酸ジフロラゾン (diflorasondiacetate)；ジフルヌドンナトリウム (diflunudon sodium)；ジフルニサル (diflunisal)；ジフルブレドナト (difluprednat)；ジフタロン (difitalon)；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド (drocinonid)；エンドリソン (endryson)；エンリモマブ (enlimomab)；エノリカムナトリウム (enolicam sodium)；エピリゾール (epirizol)；エトドラク；エトフェナマト (etofenammat)；フェルピナク；フェナモール (fenamol)；フェンブフェン；フェンクロフェナク (fenclofenac)；フェンクロラク (fenclorac)；フェンドサル (fendosal)；フェンピパロン (fenpipalon)；フェンチアザク (fentiazac)；フラザロン (flazalon)；フルアザコート (fluazacort)；フルフェナミン酸；フルミゾール (flumizol)；酢酸ルニソリド (runisolidacetate)；ブルニキシム (plunixin)；フルニキシムメグルミン；フルオコルチンブチル (fluocortin butyl)；酢酸フルオロメトロン (fluorometholonacetate)；フルカゾン (fluquazon)；フルルビプロフェン；フルレトフェン (fluretofen)；プロピオン酸フルチカゾン；プラプロフェン (puraprofen)；フロブフェン (furobufen)；ハルシノニド (halcinonid)；プロピオン酸ハロベタゾール (halobetasolpropionate)；酢酸ハロプレドン (halopredonacetate)；イブフェナク (ibufenac)；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダブ (ilonidap)；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン (indoprofen)；インドキゾール (indoxol)；ミトラゾール (mitrazol)；酢酸イソフルプレドン (isoflupredonacetate)；イソキセパク (isoxepac)；イソキシカム (isoxicam)；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール (lofemizol hydrochloride)；ロモキシカム (lomoxicam)；エタボン酸ロテプレドノール (losteprednol etabonate)；メクロフェナマトナトリウム (meclofenamat sodium)；メクロフェナミン酸 (meclofenamine acid)；メクロリゾンジブチレート (meclorison dibutyrate)；メフェナミン酸 (mefenamine acid)；メサラミン；メセクラゾン (mesecclazon)；スレプタン酸メチルプレドニゾロン (methylprednisolon suleptanate)；モミフルマト (momiflumate)；

10

20

30

40

50

ナブメトン (nabumeton); ナプロキセン; ナプロキセンナトリウム; ナプロキ
 ソル (naproxol); ニマゾン (nimazon); オルサラジンナトリウム (olsalazin sodium); オルゴテイン (orgotein); オルパノキシ
 ン (orpanoxin); オキサプロジン; オキシフェンブタゾン (oxyphenbutazon); 塩酸パラニリン (paranylin hydrochloride)
 ; ペントサン多硫酸ナトリウム; フェンブタゾンナトリウムグリセレート (phenbutazon sodium glycerate); ピルフェニドン; ピロキシカム; ピ
 ロキシカムシンナマート; ピロキシカムオラミン (piroxicam olamin)
 ; ピルプロフェン (pirprofen); プレドナザト (prednazat); プリ
 フェロン (prifelon); プロドリ酸 (prodolinic acid); プ
 ロカゾン (proquazon); プロキサゾール (proxazolol); クエン酸プロ
 キサゾール (proxazolcitraate); リメキソロン (rimexolon)
 ; ロマザリト (romazarit); サルコレックス (salcolex); サルナセ
 ジン (salnacedin); サルサラート (salsalat); サリチレート; サ
 ングイナリウムクロライド (sanguinariumchloride); セクラゾン
 (seclazon); セルメタシン (sermetacin); スドキシカム (sud
 oxycam); スリンダク; スプロフェン; タルメタシン (talmetacin);
 タルニフルマト (talniflummat); タロサラト (talosalat); テブ
 フェロン (tebufelone); テニダップ (tenidap); テニダップナトリウ
 ム; テノキシカム; テシカム (tesicam); テシミド (tesimid); テトリ
 ダミン (tetrydamine); チオピナク (tiopinac); チキソコルトル
 ピバレート (tixocortol pivalate); トルメチン (tolmetin)
 n); トルメチンナトリウム; トリクロニド (tricloneid); トリフルミダート
 (triflumidate); ジドメタシン (zidometacin); グルココル
 チコイド; ゾメピラクナトリウム (zomepirac sodium)。

【0052】

本発明に関して、「診断」は、個体が特定の心血管事象に罹患しているか否かを確認す
 ることに関する。本発明に関して、「予後診断」は、個体が将来特定の心血管事象に罹患
 するか否かの確率 (%) の予測に関する。本発明に関して、「治療の層別」は、将来生じ
 るかまたはすでに生じた心血管事象に適切な治療的処置の決定に関する。本発明に関して
 「治療のモニタリング」は、個体のための治療的処置の制御および場合によりその調整
 に関する。本発明に関して、「治療的処置」は、個体の病態生理学的状態を改善する可能
 性が高い全ての処置を含み、例えば、薬剤の投与ならびに外科的処置 (例えば、バルーン
 拡張) が含まれる。

【0053】

sCD40L 濃度のベース・ライン値は、心筋壊死の発生とは独立して、急性冠症候群
 を有する患者における予後診断的な値の情報を利用可能とする。さらに、アブシキシマブ
 による抗血小板処置から最大の利益を得ることができる高リスク群の患者を、sCD40L
 によって同定することができる。

【0054】

本研究は、sCD40L が血小板の活性化の有益な生化学的マーカーであるという事実
 についての直接的な証拠を提供する。CD40L の濃度の増大は、心臓事象に罹患する深
 刻なリスクを保有しかつ糖タンパク質 IIb / IIIa レセプター・アンタゴニストであ
 るアブシキシマブでの処置から最大の利益を得る、急性冠症候群を有する患者の特定
 のサブグループを信頼性高く同定する。対応して、CD40L は急性冠症候群の病態生理に本
 質的に寄与するだけでなく、高リスク病変の形成および / または冠血栓症を有する患者を
 同定することができる、信頼性がありかつ有益な臨床的マーカーを提供する (Andre
 P、Prasad KS、Denis CVら、Nat Med 2002; 8: 24
 7 ~ 52 頁; Andre P、Nannizzi-Alaimo L、Prasad
 SK、Phillips DR.; Circulation 2002; 106: 896

10

20

30

40

50

～ 9 頁)。

【 0 0 5 5 】

C A P T U R E 患者の 4 0 . 5 % において、循環 s C D 4 0 L 濃度は、計算された閾値濃度、即ち 5 . 0 μ g / l を上回った。高い s C D 4 0 L 濃度を有するこれらの患者は、致死性または非致死性の心筋梗塞を経験する深刻な心臓リスクを保有する。高 s C D 4 0 L 濃度を有する患者にプラセボを投与した場合、この心臓リスクの上昇は、最初の 7 2 時間の間に特に明らかであった (図 2 a)。しかし、全 6 カ月間の事象の頻度は、さらに離れた (図 2 b)。s C D 4 0 L は、心筋壊死の検出から独立し、かつ炎症マーカー (C R P および T N F -) ならびに接着分子 I C A M - 1 から独立した、有益な予後マーカーと考えることができる。T n T、C R P および s C D 4 0 L は、多変量回帰モデルにおいて信頼性のある予後情報を提供した (表 2)。s C D 4 0 L 濃度を使用して、心筋壊死の兆候を有しないが、増大した心臓リスクを示す患者が同定された。T n T および C R P についての所定の閾値濃度を、上昇した心臓マーカーの数に基づく患者の分類と一緒に使用することによって、これらの病態生理学的に異なる生化学的マーカーを患者に投与する時点で同時に評価することが、この患者が次の 6 カ月間に有害な心臓事象に罹患するリスクの有益な予測を可能にすることが見出された。

10

【 0 0 5 6 】

トロポニン は心筋壊死のマーカーに相当するが、それにもかかわらず、これらは急性冠症候群の病態生理に能動的に関与しない。むしろ、トロポニンは、血栓の脆い形成についての代理マーカーである (L i n d a h l B、D i d e r h o l m E、L a g e r q v i s t B、V e n g e P、W a l l e n t i n L ; J A m C o l l C a r d i o l 2 0 0 1 ; 3 8 : 9 7 9 ~ 8 6 頁 ; H e e s c h e n C、v a n D e n B r a n d M J、H a m m C W、S i m o o n s M L ; C i r c u l a t i o n 1 9 9 9 ; 1 0 0 : 1 5 0 9 ~ 1 4 頁 ; B e n a m e r H、S t e g P G、B e n e s s i a n o J ら ; A m H e a r t J 1 9 9 9 ; 1 3 7 : 8 1 5 ~ 2 0 頁)。急性冠症候群を有する患者に対する死後の研究において、病態生理学の基礎である動脈硬化症プラークの繊維性キャップの糜爛または破裂が同定された (L i n d a h l B、D i d e r h o l m E、L a g e r q v i s t B、V e n g e P、W a l l e n t i n L ; J A m C o l l C a r d i o l 2 0 0 1 ; 3 8 : 9 7 9 ~ 8 6 頁 ; H e e s c h e n C、v a n D e n B r a n d M J、H a m m C W、S i m o o n s M L ; C i r c u l a t i o n 1 9 9 9 ; 1 0 0 : 1 5 0 9 ~ 1 4 頁)。プラークの成分、コラーゲンおよび血管壁の他の成分の露出は、血管緊張の増大および血小板の活性化を引き起こす (F a r b A、B u r k e A P、T a n g A L ら ; C i r c u l a t i o n 1 9 9 6 ; 9 3 : 1 3 5 4 ~ 6 3 頁 ; D a v i e s M J、T h o m a s A C ; B r H e a r t J 1 9 8 5 ; 5 3 : 3 6 3 ~ 7 3 頁 ; D a v i e s M J ; N . E n g l J M e d 1 9 9 7 ; 3 3 6 : 1 3 1 2 ~ 4 頁)。増大した微小血管灌流および壊死を有する冠状動脈の血栓性塞栓症は、急性冠症候群の必須の構成要素である (H e e s c h e n C、v a n D e n B r a n d M J、H a m m C W、S i m o o n s M L ; C i r c u l a t i o n 1 9 9 9 ; 1 0 0 : 1 5 0 9 ~ 1 4 頁 ; B e n a m e r H、S t e g P G、B e n e s s i a n o J ら ; A m H e a r t J 1 9 9 9 ; 1 3 7 : 8 1 5 ~ 2 0 頁)。対応して、基礎となる病変における活性化血栓プロセスから生じる動脈血栓性塞栓症の代理マーカーとして敏感なマーカー (特にトロポニン) は、心筋の小さい損傷の検出のために働く。

20

30

40

【 0 0 5 7 】

これとは対照的に、s C D 4 0 L は、いくつかの方法で急性冠症候群の病態生理に直接関与し得る。最近の証拠は、C D 4 0 L が動脈硬化症の進行に本質的に寄与し、対応して動脈硬化症プラークの不安定化に寄与することを示唆する (M a c h F、S c h o n b e c k U、S u k h o v a G K、A t k i n s o n E、L i b b y P ; N a t u r e 1 9 9 8 ; 3 9 4 : 2 0 0 ~ 3 頁 ; L u t g e n s E、G o r e l i k L、D a e m e n M J ら ; N a t M e d 1 9 9 9 ; 5 : 1 3 1 3 ~ 6 頁)。C D 4 0 / C

50

D40L相互作用は、異なるアテローム関連細胞型におけるサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、マトリックス・メタロプロテイナーゼおよび凝固促進因子の発現を誘導するので、アテロームによる合併症を促進すると提唱された (Schonbeck U、Libby P.; Cell Mol Life Sci 2001; 58: 4~43頁; Henn V、Slupsky JR、Grafe Mら; Nature 1998; 391: 591~4頁; Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczeck RA; Blood 2001; 98: 1047~54頁; Mach F、Schonbeck U、Bonneyfoy JY、Pober JS、Libby P.; Circulation 1997; 96: 396~9頁; Miller DL; Yaron R、Yellin MJ; J Leukoc Biol 1998; 63-373~9頁; Kotowicz K、Dixon GL、Klein NJ、Peters MJ、Callard RE; Immunology 2000; 100: 441~8頁)。新規な研究は、顆粒球、単核食細胞、内皮細胞および平滑筋細胞を含む白血球および非白血球細胞 (Schonbeck U、Libby P.; Cell Mol Life Sci 2001; 58: 4~43頁)に加えて、活性化された血小板は、大量のsCD40Lを産生して放出することを示している (Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczeck RA; Blood 2001; 98: 1047~54頁)。別の研究は、心肺バイパスが、血小板中のCD40Lの含量の低下に対応する血漿中のsCD40L濃度の増加を引き起こすことを示しており、これは、sCD40Lが主に血小板に由来し、このようなバイパスに関連する血栓性合併症に寄与し得ることを示唆する (Nannizzi-Alaimo L、Rubenstein MH、Alves VL、Leong GY、Phillips DR、Gold HK; Circulation 2002、105: 2849~2854頁)。sCD40Lが血漿中の可溶性P-セレクチンおよび尿中の11-デヒドロトロンボキサンB₂濃度とポジティブに相関することがさらに見出された (Cipollone F、Mezzetti A、Porreca Eら; Circulation 2002; 106: 399~402頁)。さらに、実験的分析は、CD40Lが動脈血栓の安定化に必要であることを示した (Andre P、Prasad KS、Deniss CVら; Nat Med 2002; 8: 247~52頁)。本研究はここで、CD40Lが実際に血小板の活性化のマーカーであるという事実について直接的な証拠を提供する。急性冠症候群を有する患者においてフロー・サイトメトリーにより決定される血小板の活性化は、血清中のsCD40Lの濃度と有意に相関した (図7)。興味深いことに、sCD40Lは、血小板の活性化について最も高い有意性を示す独立した予測因子として見出された。本研究の結果は、血栓症に罹患する危険性がある急性冠症候群を有する患者における高度に有益な予後マーカーとしてsCD40L濃度を確立した。これらの知見は、アブシキシマブによる糖タンパク質IIb/IIIaレセプターの阻害が急性冠症候群および上昇したsCD40L濃度を有する患者においてリスクの増大を排除したという事実によって支持される。トロポニン_Tは、血栓が塞栓症を引き起こして心筋壊死を導く傾向をポジティブに示したが、急性冠症候群を有する患者におけるsCD40Lの濃度の上昇は、血小板を補充して活性化する引き金となる病変の血栓活性を反映する。

【0058】

CAPTURE研究の患者のサブグループの初期の分析において、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブによるさらなる処置が、トロポニン陽性の患者の上昇したリスクを、トロポニン陰性の患者の程度にまで低下させたことが示された (Hamm CW、Heeschen C、Goldmann Bら; N Engl J Med 1999; 340: 1623~9頁)。これらの患者は、急性冠症候群を有する患者の約3分の1を構成する (Hamm CW、Braunwald E; Circulation 2000; 102: 118~22頁; Antman EM、Tanasijevic MJ、Thompson Bら; N Engl J Med 1996; 335: 1342~9頁; Ohman EM、Armstrong PW、

Christenson RH⁵; N Engl J Med 1996; 335: 1333~41頁; Hamm CW、Ravkilde J、Gerhardt W⁵; N Engl J Med 1992; 327: 146~50頁; Hamm CW、Goldmann BU、Heeschen C、Kreymann G、Berger J、Meinertz T; N Engl J Med 1997; 337: 1648~53頁)。トロポニンTおよびトロポニンIに関する類似の知見が後に他の研究(Newby LK、Ohman EM、Christenson RH⁵; Circulation 2001; 103: 2891~6頁; Januzzi JL、Chae CU、Sabatine MS、Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11: 211~5頁; Heeschen C、Hamm CW、Goldmann B、Deu A、Langenbrink L、White HD; Lancet 1999; 354: 1757~62頁)から得られ、トロポニンは引き続いて急性冠症候群を有する患者におけるリスク層別の一部として新規ガイドライン中に含まれた(Hamm CW、Bertrand M、Braundwald E; Lancet 2001; 358: 1533~8頁; Braunwald E、Maseri A、Armstrong PW⁵; Eur Heart J 1998; 19: D22~30頁)。本研究において、抗血小板治療のこのような顕著なプラス効果は、上昇したsCD40L濃度を有する患者においても明らかであることが示されている。本分析は、sCD40Lの濃度の上昇を示す急性冠症候群を有する患者が、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブによって有効に安定化されることを示唆する(図4a、b)。5.0 μ g/lの計算された閾値濃度で、それぞれ、第2の五分位数についてそのリスク指数は0.87であり、第3の五分位数については1.12であり、これらが第4の五分位数について0.36、そして第5の五分位数について0.38と有意に低い値に急変した(図3)。興味深いことに、TnTおよびsCD40Lの濃度は、虚血事象のリスクならびにアブシキシマブによる糖タンパク質IIb/IIIaレセプター阻害のプラス効果の両方に関して独立した予測値を提供した。心筋損傷の兆候を有しない(トロポニンの増大が欠如している)にもかかわらず、sCD40Lの濃度の増大を示した患者は、糖タンパク質IIb/IIIa阻害物質であるアブシキシマブでの処置から実質的な利益を得た。したがって、sCD40L濃度の増大またはTnT濃度の増大のいずれかによって示される、冠血管の血栓症について高いリスクを有する患者は、CAPTURE研究に含まれた全患者の54%を最終的に構成し、0.38[0.21~0.72]のリスク指数($p < 0.001$)で、アブシキシマブでの処置から顕著な利益を有した。

【0059】

まとめると、本研究は診断的および治療的なリスク層別のための血小板の活性化のマーカーとしてのsCD40Lの重要かつ独立した役割を報告していると言うことができる。ヘパリンおよびアスピリンでの標準的な治療を受けた高いsCD40L濃度を有する患者の増大した心臓リスクは、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブによって、元のレベルに戻った。トロポニンおよびsCD40Lは、共に急性冠症候群を有する患者における病態生理の必須成分であり、これらの組み合わせ使用は、この疾患の活性、心臓学的リスクおよびアブシキシマブによる糖タンパク質IIb/IIIa阻害による処置の有効性について、単一のマーカーの使用よりも優れた、重要な洞察を提供する。

【0060】

本研究の結果は、急性冠症候群を有する患者における臨床転帰の新規かつ有効な独立した予後決定因子としてPLGF血清レベルを確立する。より低いhsCRP血清レベルを有する患者において、上昇したPLGF血清レベルは、有意に増大した心臓リスク(あてはめたハザード率3.58[95% CI 1.48~7.72]; $p = 0.001$)を有する患者のサブグループを同定することに、特に留意すべきである。

【0061】

PLGF血清レベルの予測値は、トロポニン血清レベルによって判定されるような心筋

壊死についての証拠とは独立している。最後に、上昇した P L G F 血清レベルは、急性冠症候群を発症させる急性胸部疼痛を有する患者を同定するのみならず、退院後に初期急性冠症候群から不安定性を再発するリスクの高い患者をも同定する。したがって、P L G F 血清レベルの測定は、病変形成についての高リスクを有する患者の同定だけでなく、冠循環の持続性の脈管炎症の同定のための、信頼性のある有効な臨床的ツールであり得る。

【 0 0 6 2 】

動脈硬化症病変の不安定性の一次的炎症マーカーとしての P L G F の役割は、動脈硬化症または関節炎の動物モデルにおけるその充分報告された炎症促進効果によって説明され得る [Luttun A、Tjwa M、Moons Lら、Revascularization of ischemic tissues by P L G F treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med 2002; 8(8): 831~40頁]。P L G F は、V E G F のファミリーに属するものの、その原因病理学的役割は、血管新生よりもむしろ炎症と関連するようである [Luttun A、Tjwa M、Moons Lら、Revascularization of ischemic tissues by P L G F treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med 2002; 8(8): 831~40頁]。実際、低酸素症および V E G F 血清レベルの増大に起因する V E G F の増大は、血流の低下に対する心筋の初期の適応と考えられるが [Lee SH、Wolf PL、Escudero R、Deutsch R、Jamieson SW、Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med 2000; 342(9): 626~33頁]、P L G F は、低酸素症によって影響されも、ダウンレギュレーションされもしない [Khalik A、Dunk C、Jiang Jら、Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. Lab Invest 1999; 79(2): 151~70頁、Cao Y、Linden P、Shima D、Browne F、Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. J Clin Invest 1996; 98(11): 2507~11頁]。これらのデータと一致して、この研究の結果は、P L G F 血清レベルと心筋壊死のマーカーとしてのトロポニン T 血清レベルとの間の相関を生じないが、その一方で、V E G F 血清レベルはトロポニン T 血清レベルと正の相関を示した。これと一致して、P L G F は V E G F 血清レベルと相関しなかった。

【 0 0 6 3 】

したがって、P L G F 血清レベルは、心筋壊死によって影響を受けないようである。対照的に、V E G F 血清レベルは、トロポニン T の増大、影響された T I M I フローおよび心筋虚血の臨床的徴候と関連する [Heeschen C、Dimmeler S、Hamm CW、Boersma E、Zeicher AM、Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. Circulation 2003 50

；107：524～530頁]。より小さい心筋損傷に対して感度の低いP1GF血清レベルは、急性冠症候群を有する患者において特に重要であり得、その患者の約3分の1は、診察時にトロポニン陽性を示す[Hamm CW、Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000；102(1)：118～22頁]。

【0064】

同様に、心筋損傷はまた、急性冠症候群を有する患者の転帰を予測可能にするために、hsCRP血清レベルの値を妥協して処理することがある。古典的な非特異的な下流の急性相マーカーとして、心筋損傷を有する患者におけるhsCRP血清レベルは、トロポニンTの上昇によって測定されるのと同様に上昇する。不安定アンギナが梗塞の前に生じるほぼ全ての患者において、心筋壊死のマーカーの発生の前に、hsCRPの血清レベルの上昇が見出されることは、充分確立されている[Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JRら、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999；34(6)：1696～703頁]。したがって、心筋損傷の存在下で増強された脈管炎症を確認する上昇したhsCRP血清レベルの特異性は、非常に限定されている。

10

【0065】

したがって、トロポニン陽性の患者における上昇したhsCRP血清レベルは、現存する脈管炎症よりもむしろ原因となる病変内の活性化血栓プロセスに由来する血栓性塞栓症についての代理マーカーとして、心筋損傷に対して二次的なリスクの上昇を提示し得るに過ぎない。

20

【0066】

実際、心筋壊死および虚血のマーカーとしてのトロポニンTおよびVEGFの各々が多変量分析に含まれる場合、上昇したhsCRP血清レベルはもはや、急性冠症候群を有する患者におけるリスクの上昇について予測的ではない。

【0067】

より重要なことに、上昇したhsCRP血清レベルの報告された有病率は、急性冠症候群においてかなり変動する(重篤な不安定アンギナを有する患者の30%超および急性心筋梗塞を有する患者の50%超は、hsCRP血清レベルの上昇を示さない)。上昇したhsCRP血清レベルは、重篤な不安定アンギナを有する患者の30%より多くおよび不安定アンギナの後に続かない急性心筋梗塞を有する患者の50%より多くにおいて欠如しており[Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JRら、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999；34(6)：1696～703頁]、このことは冠不安定性の臨床的症状の炎症誘引の役割の重要な不均質性を示唆する[Libby P、Ridker PM、Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002；105(9)：1135～43頁]。しかし、個体が特定の炎症刺激に対するその全身的な応答において変動し得ることもまた、充分確立されている[Liuzzo G、Buffon A、Baisucci LMら、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998；98(22)：2370～6頁、Liuzzo G、Angiolillo DJ、Buffon Aら、Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001；103(18)：2236～41頁、Baisucci LM、Vitelli A、Liuzzo Gら、El

30

40

50

elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94(5): 874~7頁]。
 バルーン拡張または複雑でない心臓カテーテル法によって誘導された脈管外傷に
 応答して観察されたhsCRPまたはIL-6の増加は、ベース・ラインのhsCRPまたは
 インターロイキン-6の血清レベルと線形に相関する[Liuazzo G、Buffon
 A、Biasucci LMら、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in
 patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998; 98(22): 2370~6頁]。
 さらに、不安定アングナを有する患者から単離された単球によるIL-6産生は、
 正常なhsCRP血清レベルを有する患者と比較して上昇したhsCRP血清レベルを
 有する患者において有意に増加した[Liuazzo G、Angiolillo DJ、Buffon Aら、
 Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-
 challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;
 103(18): 2236~41頁]。特定の炎症刺激に対する応答の程度におけるこれら
 の個々の差異は、遺伝学的基礎を有し得る[Westendorp RG、Langermans JA、
 Huizinga TW、Verweij CL、Sturk A. Genetic influence on cytokine production
 in meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349(9069): 1912~3頁]。
 不幸にも、このような不均質な応答は、リスク層別のための炎症マーカーとし
 て、例えばhsCRPのような下流の急性相反応体の有用性を限定する。これとは
 対照的に、PLGFは、血管壁内の炎症プロセスについての直接の近位の刺激であ
 るようである[Luttun A、Tjwa M、Moon S ら、Revascularization of ischemic
 tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis
 and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002; 8(8): 831~40頁]。
 実際、上昇したPLGF血清レベルは、特に急性冠症候群を有する患者におい
 て非常に有益であるが、上昇していないhsCRP血清レベルはそうではない。
 この集団の患者において、上昇したPLGF血清レベルは、上昇したトロポニン血
 清レベルによって規定された高リスク患者と類似の、顕著に上昇した心臓リ
 スクを有する患者のサブグループを同定した。したがって、実際には、上昇
 したPLGF血清レベルは、冠不安定の一次的炎症指標に相当し得る。

【0068】

さらに、PLGFの炎症促進効果はそのレセプターFlt-1を遮断することによ
 って特異的に阻害され得るので、これらの結果はまた、冠状動脈疾患を有する
 患者における新規抗炎症治療標的についてのアプローチを提供し得る[Luttun
 A、Tjwa M、Canneliet P. Placental Growth Factor (PLGF) and Its Receptor
 Flt-1 (VEGFR-I): Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. *Ann
 N Y Acad Sci* 2002; 979: 80~93頁]。PLGFの炎症促進効果は、そのレセ
 プターFlt-1を遮断することによって特異的に阻害され得、冠状動脈疾患
 を有する患者における新規抗炎症治療選択肢を提供する。

【0069】

本研究の結果は、メタロプロテイナーゼPAPP-Aの上昇した血中レベルがACS
 を有する患者におけるマイナスの結果と関連することを示す。ごく最近実施
 された試験と一致して、PAPP-A血漿レベルの予測値は、トロポニンの増大
 を示さない患者において最も顕著であった。したがって、上昇したPAPP-A
 血漿レベルは、ACSの発症を促進するプラーク不安定性のマーカーである
 だけでなく、より重要なことに、プラーク不安

定性によって引き起こされる急性虚血事象の発症前に悪い予後を示す。さらに、上昇した P A P P - A レベルは、上昇した h s C R P 血漿レベルを有する患者においてさえさらなる予後情報を提供し、このことは、少なくとも幾人かの患者において、上昇した h s C R P レベルが脈管炎症と関連しないことを示唆する。P A P P - A の予測値が、低いレベルの抗炎症性サイトカインであるインターロイキン - 10 を有する患者に限定されたという結果は、炎症促進性サイトカインと抗炎症性サイトカインとの間のバランスが、A C S 患者の転帰について [重要] であるという概念をさらに支持する。多変量回帰分析を使用して、いくつかの生化学的マーカー (トロポニン T、可溶性 C D 40 リガンド、インターロイキン - 10 および P A P P - A を含む) が、引き続き 6 カ月の追跡の間に患者の転帰に関する独立した予測マーカーとして同定された。

10

【0070】

心臓トロポニンは、急性冠症候群の間の血栓性合併症に対して二次的な心筋壊死の、敏感かつ特異的なマーカーであり、A C S の突然発症後の初期の臨床的進行について高度に予測的である。しかし、急性冠症候群を有するトロポニン陰性患者におけるリスク層別は、未だ困難なものである。

【0071】

A C S を有するが S T 部分の上昇を示さない患者の約 3 分の 2 は正常値のトロポニンを示し、患者の半数より多くは決定的でない心電図結果を示す。急性冠症候群の突然発症後の最初の 1 週間の間、トロポニン陰性の患者における死亡率または非致死性の心筋梗塞のリスクは、約 5 % ~ 8 % である。したがって、基本的心血管事象の短期発生は、心筋壊死の証拠を有さない患者において比較はかなり起こり得、さらなる診断処理についての必要性を喚起する。連続的な S T 部分のモニタリング、ストレス試験および灌流画像化方法は、急性冠症候群を示すことが仮定される患者の即座のリスク層別のための利用可能性が限定され得る。本研究は、P A P P - A レベルが、トロポニンの上昇を示さないが症状の突然発生後の初期進行の間に心臓事象について本質的により高いリスクを示す患者のサブグループを指示することを示す (72 時間 O R 3.17 ; 30 日 : O R 3.33)。これとは対照的に、T n T および P A P P - A の両方について陰性であり、S T 部分における変化を示さない患者は、非常に低いリスク (0.9% の発症率) に従った。したがって、A C S を有する患者における P A P P - A の決定は、トロポニン・レベルの上昇を示さない患者の短期リスク層別のための有効なツールである。

20

30

【0072】

動脈硬化症プラークの進行および引き続き不安定化は、動脈壁の構造における重要な変化を含む。A C S を有する患者における炎症の局所的状態の発生は、炎症マーカー (例えば、C R P) によって決定されるように充分確立されている。メタロプロテイナーゼもまた動脈炎症の潜在的な指標であり、細胞外マトリックスの分解によって脂質に富んだ動脈硬化症プラークの脆弱性に寄与し得、最終的にその破裂に寄与する。他のいくつかのメタロプロテイナーゼ (M M P - 1、M M P - 3、M M P - 12 または M M P - 13) について以前に記載されたように、P A P P - A について、糜爛および放出されたプラークにおいてこれが発現されることがごく最近見出されたが、その一方で、P A P P - A の発現は、安定なプラークにおいては検出できなかった。他の研究はまた、高エコー (h y p e r e c h o n i c) または等エコー (i s o e c h o i n i c) の頸動脈プラークを有する患者が、低エコー (h y p o e c h o n i c) の初期頸動脈病変を有する患者よりも有意に上昇したレベルの P A P P - A を呈することを示している。A C S の病態生理における P A P P - A の特定の役割は不明のままである。P A P P - A について、これが動脈硬化症の強力なメディエータであるインスリン様増殖因子 - I (I G F - I) の特異的アクチベータであることが示された。マトリックス・メタロプロテイナーゼとして、P A P P - A は、プラークの細胞外マトリックスのプロセッシングに関与し得、結果として線維性キャップに影響を与え得る。これは、糜爛、破裂および引き続き血栓症に対して敏感なプラークの形態学を導く。本研究は、症状の発生の 8.7 時間後に得た単一の P A P P - A 決定が、引き続き 6 カ月の追跡の間の死亡および非致死性の心筋梗塞の発生についての有意な

40

50

予測値を提供することを示す。これらのデータは、PAPP-Aが、ACSの間の動脈硬化症プラークの不安定化において重要な病態生理学的役割を果たすことを示唆する。動脈硬化症病変内の活性化された細胞によるPAPP-Aの産生および細胞外マトリックスへのその放出は、CRPレベルとPAPP-Aレベルとの間で観察された有意な正の相関によって示されるように、動脈壁内で発生する局所的炎症プロセスと緊密に関連するようである。実際、PAPP-Aレベルは上昇したCRPレベルを有する患者において高度に予測的であるが、その一方で、低いCRPレベルを有する患者において、PAPP-Aは患者の転帰についての有意な予測子として働かなかった(図26a)。CRPレベルはトロポニンの増大と関連するが、PAPP-Aレベルは、ACSを有する患者において特に重要であり得るより小さい心筋損傷に対してあまり敏感でないようであり、この患者のうち、病院に到達した時点で約3分の1がトロポニンについて陽性である。さらに、PAPP-Aレベルは、ACSを有する患者における血小板の活性化のマーカであるsCD40Lの予測力を妨害せず、これらに影響を与えることもなかった。多変量分析によって、PAPP-A、sCD40LおよびTnTは全て、有害な結果の独立した予測子として見出された(表2)。PAPP-AおよびsCD40Lの組合せは、TnT陰性患者において特に明らかであり、このことは、両方のマーカが冠循環における炎症促進環境および凝固促進環境に最終的に寄与する別個のシグナル経路を反映することを示唆する。ACSを有する患者において有害な転帰を予測するための競合的役割以外の補足分を支持することが、アブシキシマブによる血小板の凝集の積極的な阻害がsCD40Lレベルの上昇した患者において特に適切であったという本発明者らの結果である。

10

20

【0073】

まとめると、本発明の結果は、脈管炎症のマーカとしてのPAPP-Aの上昇した血漿レベルが引き続く心臓事象についての上昇したリスクと関連することを示す。PAPP-A血漿レベルの予測値は、急性冠症候群の間に心筋損傷を引き起こす血栓性合併症に対して二次的な実際のリスクを反映する上昇したトロポニン・レベルとは独立であった。したがって、上昇したPAPP-A血漿レベルは、心筋梗塞への進行に関するプラークの不安定性のマーカであるのみならず、プラークの不安定性によって引き起こされる急性虚血事象の発症後にさえ悪い予後を示す。

【0074】

まとめると、本研究が診断的および治療的なリスク層別についてのマーカとしてのPLGFの重要かつ独立した役割を報告すると言い得る。ヘパリンおよびアスピリンを用いた標準的処置を受けた高いPLGF濃度を有する患者の上昇した心臓リスクは、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブによって、元のレベルに戻った。トロポニンおよびPLGFは、共に急性冠症候群を有する患者における病態生理の必須成分であり、これらの組み合わせ使用は、この疾患の活性、心臓学的リスクおよびアブシキシマブを使用した糖タンパク質IIb/IIIa阻害による処置の有効性について、単一のマーカの使用よりも優れた、重要な洞察を提供する。

30

【0075】

まとめると、PLGF血清レベルは、急性冠症候群を有する患者における脈管炎症および負の転帰の有効かつ信頼性のある生体マーカである。PLGF血清レベルの決定は、急性冠症候群における一般的な炎症マーカから得られる予測情報および予後情報を有意に広げる。

40

【0076】

以下に、本発明は、添付の図面に関する実施例に基づいてここでさらに説明されるがそれによって限定されない。

【0077】

添付図面において：

図1は、プラセボを受けた患者群(n=544)における、24時間後、72時間後、30日後および6カ月後の、sCD40Lの血清濃度と心臓事象の発生率との間の関連を示す図である。これらの患者を5つの五分位数に分類した。sCD40L濃度の範囲は以

50

下の通りであった：0.003～1.9 $\mu\text{g}/\text{l}$ （五分位数 1）、1.9～3.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ （五分位数 2）、3.5～5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ （五分位数 3）、5.0～6.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ （五分位数 4）および > 6.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ （五分位数 5）。72時間後、30日後および6カ月後に $p < 0.001$ 。

図2はプラセボ群（ $n = 544$ ）におけるsCD40L濃度のベース・ライン値（診断閾値5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ ）に従う、72時間後（a）および6カ月後（b）の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率のKaplan-Meierに従う図である。

図3は、sCD40L五分位数に従うアブシキシマブでの処置における適合されたリスク指数（95%信頼区画を含む）を示す図である。処置の成功は、6カ月の過程における致死性または非致死性の心筋梗塞の減少として規定される。1.0未満のリスク指数は、プラセボ処置と比較したアブシキシマブでの処置の成功を示す。 10

図4は、プラセボまたはアブシキシマブのいずれかを受けた患者における、sCD40L濃度に従う72時間（a）および6カ月（b）の死亡率および非致死性の心筋梗塞のKaplan-Meier図である。

図5は、疾患の活性に依存した血小板の活性化を示す図である。単球-血小板凝集物によって決定される血小板の活性は、安定冠動脈性心疾患を有する患者において有意に増大した。血小板の活性化のさらなる有意な増大が、急性冠症候群を有する患者において観察された。

図6は、sCD40L血清濃度が急性冠症候群を有する患者および急性冠症候群を有さない患者における血小板の活性化の程度と厳密に相関することを示す図である。破線は、これらの患者を血小板の活性化（< 15%、15%～30%、> 30%）またはsCD40L血清濃度（< 2.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ ；2.5～4.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ ；> 4.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ ）に従って三分位数に分割する。 20

図7は、PLGFと下流の急性相反応物としてのhsCRPとの間の関連を示す図である（ $n = 1088$ ）。

図8は、ベース・ライン・トロポニンT状態に従ってPLGF血清レベルおよびhsCRP血清レベルの各々を示す図である（ $n = 1088$ ）。

図9は、プラセボを受けた患者群（ $n = 547$ ）における24時間後、72時間後、30日後および6カ月後のPLGFの血清濃度と心臓事象の発生率との間の関連を示す図である。PLGF濃度の範囲は以下の通りであった：13.3 ng/l 以下（第1の五分位数）、13.4～19.2 ng/l （第2の五分位数）、19.3～27.3 ng/l （第3の五分位数）、27.4～40.0 ng/l （第4の五分位数）および40.0 ng/l より上（第5の五分位数）。これらの五分位数間の事象の率における差異は、30日（ $p = 0.001$ ）および6カ月（ $p < 0.001$ ）の追跡試験で有意であった。 30

図10は、6カ月の追跡試験での死亡率または非致死性の心筋梗塞の発生率についてのPLGF血清レベルの予測値についての受診者動作特性曲線分析を示す図である。

図11は、PLGF血清レベルのベース・ライン値に従う、72時間後（a）および6カ月後（b）の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率のKaplan-Meierに従う図である（診断的な閾値27.0 ng/l ； $n = 547$ ）。 40

図12は、hsCRP血清レベル（a）およびトロポニンT血清レベル（b）に従う致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の発生率についてのPLGFの予測値を示す図である。診断的な閾値はPLGFについて27.0 ng/l であり、トロポニンTについて0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ であり、そしてhsCRPについて10 mg/l であった（ $n = 547$ ）。

図13は、6カ月の追跡試験での患者-結果についての退院-PLGF血清レベルの予測値を示す図である。上昇したPLGF血清レベルを有する患者は、27.0 ng/l 未満のPLGF血清レベルを有する患者についての2.2%と比較して7.4%の発生率で、より高い心臓リスクに従った（ $p = 0.005$ ）。

図14は、ベース・ラインのトロポニンT状態に従うPAPP-AレベルおよびhsC 50

R P レベルの各々を示す図である。丸はアウトライアーを示す。

図 15 は、ベース・ラインの P A P P - A 状態に従う、それぞれ可溶性 C D 4 0 リガン ド・レベルおよび h s C R P レベルを示す図である。丸はアウトライアーを示す。

図 16 は、P A P P - A プラセボ群 (n = 5 4 7) に従う 2 4 時間、7 2 時間、3 0 日 および 6 カ月での P A P P - A 血漿レベルと心臓事象の率との間の関連を示す図である。 P A P P - A の範囲は以下の通りであった：(P A P P - A _ 1) < 4 . 5 m I U / l (n = 1 1 1) ; (P A P P - A _ 2) 4 . 5 ~ 7 . 5 m I U / l (n = 1 0 8) ; (P A P P - A _ 3) 7 . 6 ~ 1 2 . 6 m I U / l (n = 1 0 9) ; (P A P P - A _ 4) 1 2 . 7 ~ 2 4 . 0 m I U / l (n = 1 1 0) および (P A P P - A _ 5) > 2 4 . 0 m I U / l 。発生率は 7 2 時間 (p = 0 . 0 1 9) 、3 0 日 (p = 0 . 0 0 8) および 6 カ月 (p = 0 . 0 0 4) で有意であった。 10

図 17 は、6 カ月の追跡試験での死亡率または非致死性の心筋梗塞の発生率についての P A P P - A 血漿レベルの予測値についての受診者動作特性曲線分析を示す図である。

図 18 は、P A P P - A ベース・ライン血漿レベルに従う 7 2 時間 (a) および 6 カ月 (b) での死亡および非致死性の心筋梗塞の累積発生率を示す K a p l a n - M e i e r 事象率曲線を示す図である。診断的な閾値 1 2 . 6 m I U / l ; n = 5 4 7 。

図 19 は、死亡および非致死性の心筋梗塞の発生率についての P A P P - A の予測値が、上昇した h s C R P レベルを有する患者 (a) および低レベルの抗炎症性サイトカイン I L - 1 0 を有する患者 (b) に限定されたことを示す図である。診断的な閾値は、P A P P - A について 1 2 . 6 m I U / l 、h s C R P について 1 0 m g / l および I L - 1 0 について 3 . 5 n g / l であった ; n = 5 4 7 。

図 20 は、死亡および非致死性の心筋梗塞の発生率についての P A P P - A の予測値が、トロポニン T の増大を有さない患者において特に有益であったことを示す図である (a) 。T n T および s C D 4 0 L の両方について陰性であった患者において、P A P P - A は、6 カ月の追跡で上昇した心血管リスクに罹患したサブグループを同定した (b) 。診断的な閾値は、P A P P - A について 1 2 . 6 m I U / l 、T n T について 0 . 1 μ g / l および s C D 4 0 L について 5 . 0 μ g / l であった ; n = 5 4 7 。

【 0 0 7 8 】

〔実施例〕

I . s C D 4 0 L

1 . 患者

C A P T U R E 研究は、1 9 9 3 年 5 月から 1 9 9 5 年 1 2 月の間に、難治性の不安定 アンギナを有する患者 1 2 6 5 人を登録した (6 1 % が男性、6 1 歳 [4 8 ~ 7 2 、9 5 % 信頼区間]) 。全ての C A P T U R E 患者は、平均 1 4 時間の静脈内ヘパリンおよびグリセロールトリニトレートでの処置の間に、E C G の変化を伴う安静状態での再発する胸部疼痛を訴えていた。完全な患者集団を、血管形成術に適した 1 7 % 以上の誘引病変を有する顕著な冠状動脈疾患の発生が報告される前に動脈造影に付した。これらの患者を、アブシキシマブまたはプラセボによる処置に無作為に割りつけた。処置を、割りつけ後 2 時間以内に開始した。冠介入を、処置の開始後 1 8 ~ 2 4 時間以内に全ての患者において計画した (C A P T U R E . L a n c e t 1 9 9 7 ; 3 4 9 : 1 4 2 9 ~ 3 5 頁) 。平均して、血液サンプル (n = 1 0 9 6) を、症状の発生の 8 . 7 (3 . 6 ~ 1 1 . 3) 時間後に得た (ベース・ライン) 。 40

【 0 0 7 9 】

研究の一次的終点は、3 0 日間または 6 カ月間の不安定性に起因する、死亡率、心筋梗塞または即時の介入 (血管形成術、冠状動脈のバイパス手術) の必要性であった。入院期間中に心臓発作を起こした患者において、少なくとも 2 つのサンプル中のクレアチン・キナーゼの酵素活性の値が正常範囲の上限より 3 倍を超えて高い場合、またはそれらの E C G が 2 つより多い連続間隔で新規の別個の Q 波を示した場合に、それに応じてこれを診断した。P T C A 後のクレアチン・キナーゼの任意の重要な小さい増大を排除するために、この厳密な規定を選択した。退院後に心筋梗塞を有する患者において、クレアチン・ 50

キナーゼの酵素活性の値が正常範囲の上限より2倍を超えて高い場合、またはそれらのECGが2つ以上の連続間隔で新規の別個のQ波を示した場合に、それに応じてこれを規定した。副次的評価項目は、70%以上の狭窄の直径を有する処置された病変の症候性の冠再狭窄、および引き続く6カ月の間の反復された再血管化の必要性であった。

【0080】

2. 急性胸部疼痛を有する患者の検証

12時間未満(平均5.1[2.1~10.4]時間)にわたって持続した急性の胸部疼痛を有する、連続的に救急救命室に来院した胸部疼痛を有する626人の患者の別個の群(161人の女性および465人の男性、平均年齢61[38~82]歳)。先行する2週間の間にベース・ラインECGにおいて特徴的なST上昇を有する患者または報告された急性心筋梗塞を有する患者は考慮しなかった。血液サンプルを入室の時点(処置の開始前)および4時間後に採取し、氷上に維持し、サンプルの収集後に20分間以内で遠心分離し、後の分析まで-80で保存した。この処理は、sCD40L濃度の決定の間に再現性のある結果を導くことが見出された(Nannizzi-Alaimo L、Rubenstein MH、Alves VL、Leong GY、Phillips DR、Gold HK. *Circulation* 2002; 105: 2849~54頁)。致死性または非致死性の心筋梗塞を記録するために、これらの患者を病院から退院するまでおよびその後30日間観察した。冠状動脈疾患の存在を、以下の基準の1つによって検出した: 心筋虚血のECG指示(STストレッチにおける新規の変化またはT波の逆転)、既往歴中の冠状動脈性心疾患(心筋梗塞もしくは冠再血管化、ポジティブ・ストレス試験または初期血管造影図中の少なくとも50%の主冠状動脈の直径の制限)。冠状動脈性心疾患を有さない患者は、正常な冠血管造影図を示さなければならない。血小板の活性化を、急性冠症候群を有する患者131人、安定冠状動脈性心疾患を有する患者20人および冠状動脈性心疾患を有しない患者10人を含む患者のサブグループにおいてフロー・サイトメトリーによって検出した。

10

20

【0081】

3. 生化学的分析

ナトリウム・ヘパリンで抗凝固処理した血漿サンプルを、主に-80で保存した。心臓マーカーの決定を、患者の病歴および指図された処置の知識を持たずに、Frankfurt大学の研究実験室で実施した。sCD40L(検出限界0.005 μ g/l)、可溶性P-セレクチン(0.5 μ g/l)、腫瘍壊死因子-(TNF-、高度に敏感; 0.12ng/l)および可溶性細胞内接着分子-1(ICAM-1; 0.35 μ g/l)の血漿レベルを、ELISA(R&D Systems、Wiesbaden)によって測定した。トロポニンT(TnT)の定量のために、電気化学ルミネセンス技術(Electsys 2010、Roche Diagnostics; 検出限界0.01 μ g/l)に基づくワンステップ酵素免疫アッセイを使用した。C反応性タンパク質(CRP)を、Behring BN II比濁計(Behring Diagnostics; 検出限界0.2 μ g/l)を用いて測定した。

30

【0082】

5. sCD40Lの定量的決定

sCD40L濃度を、サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術(R&D Systems、Wiesbaden)を使用することによって決定した。マイクロタイター・プレートを、sCD40Lに対して特異的なポリクローナル抗体で被覆した。標準およびサンプルをウェル中にピペティングし、存在するsCD40Lを固定化抗体によって結合させた。未結合の材料を洗浄して除いた後、sCD40Lに対して特異的な酵素結合ポリクローナル抗体をウェルに添加した。未結合の抗体-酵素-試薬を除去するための洗浄ステップの後、基質溶液をウェルに添加し、最初のステップで結合されたsCD40Lの量に関して発色させた。発色を停止させ、色の強度を測定した。

40

【0083】

6. CD40Lの検出のための速いアッセイ

50

マウス由来の金標識したポリクローナル指標抗体およびビオチン化ポリクローナル捕捉抗体からなるカクテルを用いたクロマトグラフィー - 固相技術に基づく迅速なアッセイを開発した。このアッセイ系は、少なくとも $0.3 \mu\text{g}$ の各抗体を含んだ。 $200 \mu\text{l}$ のヘパリン化全血または遠心分離した血漿を試験デバイスに添加した。ガラス繊維フリースを介した血漿画分からの細胞性血液成分の分離の後、フリース中を移動する血漿を緩衝液中に取り、吸着した抗体に添加した。抗体およびサンプルの sCD40L 分子は、サンドイッチ複合体を形成し、該複合体はシグナリング領域に移動し、ビオチン - ストレプトアビジンとの相互作用によって映像パネル中に蓄積した。陽性結果 ($4.7 \mu\text{g/l}$ 以上の sCD40L) は、15 分以内に発色した着色線によって示された。未結合の指標抗体はさらに移動し、固相 - 抗マウス IgG 抗体 ($0.2 \mu\text{g}$ 以上) からなるコントロール線で結合された。シグナリング線から下流のこのコントロール線の発生により、血漿の妨害されない流れを含む正確な試験機能が確認された。

10

【0084】

7. 血小板の *in vivo* 活性化

クエン酸ナトリウムで抗凝固処理した血液サンプルを、赤血球の溶解のために蒸留水で 4.6 倍希釈した PBS 中 1.1% のパラホルムアルデヒドで 10 分間即座に処理し、固定された細胞を PBS で洗浄した。血小板中の P - セレクチンを決定するために、再懸濁したペレットを、フィコエリスリン (PE) 結合糖タンパク質 IIb 特異的モノクローナル抗体 (CD41; Dako Carpinteria, California) およびフルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) 結合 P - セレクチン特異的モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, California) と共に 60 分間インキュベートした。血小板を、それらの特徴的な前方への光散乱および側方への光散乱ならびに PE 結合糖タンパク質 IIb 特異的抗体の結合によって特徴付けた。血小板の活性化は、P - セレクチン・ポジティブな血小板の % で表す。循環する単球 - 血小板凝集物を同定するために、これらの細胞を FITC 結合糖タンパク質 IIIa 特異的モノクローナル抗体 (CD61; Dako) および CD14 に対する PE 結合モノクローナル抗体 (BD Pharmingen) で染色した。単球を、それらの特徴的な前方への光散乱特性および側方への光散乱特性ならびに PE 結合 CD14 特異的抗体の結合によって同定した。単球 - 血小板凝集物を、糖タンパク質 IIIa が検出され得る単球として規定し、単球の総数の % で示した (Michelson AD, Barnard M R, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI, Circulation 2001; 104: 1533 ~ 7 頁)。全ての染色を、非特異的結合を低下させるために、飽和濃度の Fc レセプターに対する非結合モノクローナル・ラット抗体 (抗 CD16/32, BD Pharmingen) およびコントロールとして働くアイソタイプ同一な抗体 (IgG₁ - PE および IgG_{2a} - FITC; BD Pharmingen) の存在下でインキュベートした。合計して 50,000 のシグナルを、FACS - Calibur (Becton/Dickinson, Heidelberg) および CellQuest - software (BD Pharmingen) を用いて分析した。

20

30

【0085】

8. 統計的方法

アッセイ結果を、生化学的マーカーおよび血小板活性化の盲検評価後にデータ・ベースと比較した。異なる等級の心臓リスクを有する患者を識別できるようにするために、指向性データ分析を選択した。CAPTURE 患者を、五分位数の sCD40L 濃度に従って分類した。ロジスティック回帰分析を、4 つの時点 (24 時間、72 時間、30 日および 6 カ月) の各々について実施し、第 1 の五分位数 ($2.0 \mu\text{g/l}$ 未満の sCD40L) 中の患者は参照として機能した。sCD40L 試験のダイナミック・レンジにわたる受診者動作特性 (ROC) 曲線分析を、急性冠症候群を有する患者のリスク層別についての最も高い予測値を提供する sCD40L についての閾値濃度を同定するために使用した。患者の運命に対する生化学的マーカーの増大の効果を、予後因子 (例えば、ECG の所見、心臓リスク因子、年齢および性別) のベース・ライン値を含む Cox 比例ハザード回帰モ

40

50

デルおよび無作為に選択された処置を使用することによって評価した (Harrell FE, Jr., Lee KL, Pollock BG. J Natl Cancer Inst 1988; 80: 1198~202頁)。連続変数についての全ての結果を、95%信頼区画でメジアンとして表した。2つより多いサブグループでの実験において、同一の中間群をT検定(両側)またはANOVAによって分析した。Post hoc-レンジ・テストおよびパワイズ多重比較を、Bonferroni調整を伴うT検定(両側)を用いて実施した。カテゴリ変数の比較を、Pearsonの²検定を用いて実施した。全ての分析を、SPSS 11.0 (SPSS, Inc.)を用いて実施した。p < 0.05の値を統計的に有意であるとみなした。

【0086】

(実施例1a)

心臓リスクとsCD40L濃度との間の関連

この研究のために選択した集団(n = 1088、CAPTURE患者の86%)についての転帰の特徴は、年齢、性別、心血管リスク・プロフィールならびに無作為選択の前および後の付随する処置に関して、研究の全集団と異ならなかった。アブシキシマブ群の集団における心臓事象の低下は、CAPTURE集団全体と匹敵した(PTCA前; プラセボ 2.2%対アブシキシマブ0.9%、p = 0.094; PTCA後: 7.9%対3.5%、p = 0.002; 30日後: 9.0%対4.2%、p = 0.002)(CAPTURE. Lancet 1997; 349: 1429~35頁)。

【0087】

sCD40Lを、4.5 μg/lの平均(0.003~20.4の範囲)で、1088人全ての患者のベース・ライン血清サンプルにおいて検出できた。sCD40L濃度は、TnT(r = 0.14)およびCRP(r = 0.11)の測定した濃度と相関しなかった。プラセボ群の患者(n = 544)を、測定したそれらのsCD40L濃度に従って以下の五分位数に分類した: (sCD40L 1) < 1.93 μg/l (n = 100)、(sCD40L 2) 1.93~3.50 μg/l (n = 102)、(sCD40L 3) 3.50~5.00 μg/l (n = 121)、(sCD40L 4) 5.00~6.30 μg/l (n = 115)または(sCD40L 5) > 6.30 μg/l (n = 106)。最初の24時間の間、複合的な終点である死亡率および非致死の心筋梗塞は、第1の五分位数と比較して第5のsCD40L五分位数においてのみ僅かに上昇した(p = 0.13)

【0088】

上記の結果に基づいて、これらの患者のサンプルを、計算された閾値濃度に従って分類した。221人の患者(40.6%)は、5.0 μg/l以上のsCD40L濃度を示し、323人の患者は、5.0 μg/l未満の値を示した。表1に示されるように、両方の群の転帰の特徴に有意な差異は生じなかった。より低いsCD40L濃度を有する患者において、複合的な終点である致死性および非致死性の心筋梗塞は、この方法の24時間前(4.1%対0.9%; p = 0.016)およびその後72時間(全ての患者における冠介入を含む)(13.1%対4.3%; 対4.3%; p < 0.001)の両方で、上昇したsCD40L濃度を有する患者のものとは有意に異なった(図2a)。6カ月の追跡期間の間、高いsCD40L濃度または低いsCD40L濃度を有する患者における事象の頻度を示した曲線(図2b)は、さらに分岐した。有意な差異が、30日後(14.5%対5.3%; p < 0.001)および6カ月後(18.6%対7.1%; p < 0.001)の両方で見出された。CAPTURE群の比較的低い死亡率に起因して、6カ月後の終点の死亡率は、両方の群間で有意に異ならなかった(2.3%対1.5%; p = 0.72)。sCD40Lの予測値は、心筋壊死とは独立していた。上昇した心臓リスクを有する患者の群(13.6%)が、sCD40L濃度によって、TnT陰性の患者において同定され、これは、TnT陽性の患者(14.0%; p = 1.00)の心臓リスクと有意に異

10

20

30

40

50

ならない。受診者動作特性曲線分析により、sCD40Lの最大化された予測的な値について5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度が確認された。高いsCD40L濃度を有する患者における最初の6カ月間の反復された非緊急の心臓学的介入は、より低いsCD40L濃度を有する患者におけるものと有意に異ならなかった(6.2%対4.5%; $p = 0.45$)。

【0089】

急性胸部疼痛を有する救急救命室に入室したST上昇を有さない患者626人のうち、308人の患者が急性冠症候群に罹患した(117人の患者が急性心筋梗塞に罹患しており、これは0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ 以上のトロポニン増大によって支持された)。以下の診断を、他の患者において行った: $n = 91$ 安定アンギナ、 $n = 10$ 肺塞栓症、 $n = 11$ うっ血性心不全、 $n = 7$ 心筋炎および $n = 199$ 心疾患の証拠なし。sCD40L濃度は、安定アンギナを有する患者(2.41 [1.99 ~ 3.52] $\mu\text{g}/\text{l}$; $p < 0.001$)または心疾患を示さない患者(1.57 [0.88 ~ 1.76] $\mu\text{g}/\text{l}$; $p < 0.001$)と比較して、急性冠症候群を有する患者において有意に高かった(4.53 [3.19 ~ 5.87] $\mu\text{g}/\text{l}$)。心臓障害を示さない患者における97.5の参照上限(URL)についての平均値は4.7 $\mu\text{g}/\text{l}$ であり、99のURL平均値は6.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で見出された。CAPTURE研究において得られた結果と同様に、sCD40L血清濃度は、壊死マーカー(トロポニンT)、炎症マーカー(CRP、TNF-)および接着分子(ICAM-1)と関連しなかった。急性冠症候群を有する患者において、43.5%が97.5のURL平均値を上回るsCD40L血清濃度を示し、21.8%が99のURL平均値を上回るsCD40L血清濃度を示した。5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ のsCD40Lについて規定された閾値濃度を使用することによって、上昇したsCD40L血清濃度を有する患者が高リスク集団と同定された(規定されたリスク指数3.00 [1.35 ~ 6.71]; $p = 0.009$)。胸部疼痛を有する患者の全不均質集団では、5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ の規定された閾値濃度はまた、引き続き30日の間に心臓学的事象についての深刻なリスクを示した患者を同定する際にも信頼性があった(規定されたリスク指数6.65 [3.18 ~ 13.89]; $p < 0.001$)。ROC曲線下の面積は0.75 [0.67 ~ 0.83]であり、最大化された予測値には4.8 $\mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度で到達した。

10

20

【0090】

(実施例2a)

血管造影図の結果およびsCD40L濃度

30

上昇したsCD40L濃度を有する患者におけるベース・ラインの冠血管造影図は、病変のより複雑な特徴を示した。B2+タイプまたはCタイプの病変が高いsCD40L濃度を有する患者の40.6%において報告されたが、その一方で、低いsCD40L濃度を有する患者の27.5%のみが、病変のより複雑な特徴を示した($p = 0.004$)。

【0091】

高いsCD40L濃度を有する患者の59.6%および低いsCD40L濃度を有する患者の58.9%において、TIMIフロー・スルーについてのベース・ライン値は正常であった($p = 0.049$)。高いsCD40L濃度を有する患者の7.8%について、TIMIフロー・スルー = 1が報告され、一方、低いsCD40L濃度を有する患者では5.7%であった($p = 0.67$)。

40

【0092】

提示の時点での血栓は、高いsCD40L濃度を有する患者の11.1%において現れ、一方、低いsCD40L濃度を有する患者については4.8%であった($p = 0.009$)。明白な血栓形成を有する全ての患者が、2.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ より高いsCD40L濃度を示した。

【0093】

(実施例3a)

sCD40L濃度に対するアブシキシマブの効果

ロジスティック回帰分析を、アブシキシマブによる処置の有効性とsCD40L濃度との間の有意な関連に向けた($p < 0.001$)。これらの患者を上記のように五分位数に

50

分類した。最初の2つの五分位数について、プラセボまたはアブシキシマブでの処置の時点で心臓リスクに関して差異は観察されなかった(図3)。心臓事象の有意かつ比較できるほどに顕著な低下が、上位2つの五分位数について報告された。第2の五分位数とこれらの五分位数との間に0.35までの相違の変化が見られたことは、この範囲におけるsCD40L濃度の有利な閾値濃度を示唆する。したがって、致死性または非致死性の心筋梗塞の形態での心臓事象の頻度を示す曲線を、 $5.0 \mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度を使用することによって作成した。これらの方法の前の事象は、プラセボを受けた低いsCD40L濃度を有する患者において稀であったが(0.9%)、その一方で、患者の3.4%において、事象は冠介入と関連して発生した(図4a)。低いsCD40L濃度を有する患者において、アブシキシマブを受けた患者とプラセボを受けた患者との間に差異は観察されなかった(24時間: 1.2%対0.9%; 72時間: 3.8%対4.3%)。引き続き6カ月において、非常に少ないさらなる事象が記録されたに過ぎなかった。全体的な頻度は7.1%であった(図4b)。

10

【0094】

これとは対照的に、プラセボを受けている高いsCD40L濃度を有する患者において、発作の頻度は、PTCA前(4.1%)およびPTCA下(9.0%)の両方ならびに退院後の引き続き時間において有意に高く、6カ月後の全体的な頻度は18.6%に至った。PTCAの前およびPTCA下で生じた事象は、アブシキシマブでの処置によって、PTCA前に0.5%にまで有効に低下し(リスク指数0.12[0.01~0.92]; $p = 0.013$)およびPTCA関連事象について2.9%にまで有効に低下した(リスク指数0.19[0.08~0.49]; $p < 0.001$)。この改善は、この事象の後6カ月間にわたって維持され、プラセボ群において7.8%対18.6%の事象の累積頻度を導いた(リスク指数0.37[0.20~0.68]; $p = 0.001$)。この値は、低いsCD40L濃度を有する患者において観察された値と匹敵する(7.1%)。さらに、心筋壊死の発生を伴わない糖タンパク質IIB/IIIa阻害の効果が明白であった。TnT陰性の患者において、患者のサブグループを、アブシキシマブを受けたときに心臓事象の有意な低下を示したsCD40L濃度によって同定した(2.8%対10.2%; プラセボ対アブシキシマブ; $p = 0.022$)。

20

【0095】

冠介入の前の指示された処置の間の血栓の溶解は、アブシキシマブで処置した場合に高いsCD40L濃度を有する患者において特に顕著であり、63%の相対的な低下であった(プラセボ: -21%; $p < 0.01$)。低いsCD40L濃度を有する患者における血栓形成は稀であり、有意な溶解はプラセボ群($p = 0.75$)でもアブシキシマブ群($p = 0.82$)でも達成されなかった。

30

【0096】

(実施例4a)

in vivoでの血小板の活性化のマーカーとしてのsCD40L

血小板の活性化についてのマーカーをsCD40Lが実際に構成するという仮説を確認するために、血小板の活性化およびsCD40L血清濃度の比率を、急性胸部疼痛を有する患者のサブグループ($n = 151$)において、将来を見越して分析した。急性冠症候群を有する患者における血小板の活性化の程度は、安定冠状動脈性心疾患を有する患者および冠状動脈性心疾患を有さない患者の両方と比較して有意に上昇した(図5)。単球-血小板-凝集物によって決定される血小板の活性化(%)とsCD40L濃度との間の厳密な相関が観察された($r = 0.75$; $p < 0.0001$)(図6)。P-セレクチンについて類似の結果が得られた($p < 0.001$)。これらの患者を、それらの測定されたsCD40L濃度に従って、それぞれ以下の三分位数に分類した: (sCD40L 1) $< 2.5 \mu\text{g}/\text{l}$ ($n = 55$)、(sCD40L 2) $2.5 \sim 4.5 \mu\text{g}/\text{l}$ ($n = 50$)および(sCD40L 3) $> 4.5 \mu\text{g}/\text{l}$ ($n = 56$)。第1のsCD40L三分位数の患者において、単球-血小板-凝集物の割合は11.3%[9.6~12.9]であった。第2および第3のsCD40L三分位数において、血小板の活性化は有意により

40

50

高かった（それぞれ、22.3 [19.8 ~ 24.8] % および 34.1 [30.0 ~ 38.3] % ; $p < 0.001$ ）。 $4.5 \mu\text{g/l}$ より高い sCD40L 血清濃度を示した全ての患者（1人の患者を除く）において、少なくとも15%の単球が血小板と凝集したことは特に興味深く、このことは、これらの患者における血小板の顕著な活性化を示す。それとは対照的に、可溶性P-セレクチンの血清濃度は、血小板の活性化との顕著な関連を示さなかった（それぞれ、単球-血小板-凝集物について $r = 0.41$ および P-セレクチンについて $r = 0.36$ ）。重分散回帰分析において、糖尿病（ $p = 0.015$ ）、高コレステロール血症（ $p = 0.006$ ）および sCD40L 濃度（ $p < 0.0001$ ）は、血小板の活性化と有意に関連したが（単球-血小板-凝集体 $> 30\%$ ）、可溶性P-セレクチンの濃度は関連しなかった。

10

【0097】

【表1】

表1：プラセボ群における sCD40L のベース・ライン特徴

| | sCD40L 低い | sCD40L 高い |
|--------------------------|------------|-------------|
| n | 323 | 221 |
| 男性 | 73.3% | 70.2% |
| 年齢 | 60.5 ± 9.9 | 62.3 ± 10.5 |
| 既往歴 | | |
| 4週間より長きにわたる アンギナ | 57.5% | 54.6% |
| 梗塞 14~30日間 | 3.5% | 2.4% |
| 30日より長い梗塞 | 19.5% | 21.0% |
| PTCA | 19.1% | 15.9% |
| CABG | 3.5% | 3.4% |
| リスク因子 | | |
| 糖尿病 | 12.1% | 9.6% |
| 高コレステロール血症 | 32.5% | 33.6% |
| 高血圧 | 39.3% | 34.5% |
| 喫煙者 | 40.9% | 42.1% |
| 登録前の投薬 | | |
| アスピリン | 98.1% | 97.7% |
| ヘパリン 静脈内 | 99.2% | 98.6% |
| ニトレート 静脈内 | 98.8% | 99.7% |
| β ブロッカー | 65.0% | 61.4% |
| Ca^{2+} アンタゴニスト | 56.0% | 55.2% |

20

30

40

【0098】

50

【表 2】

表 2：最初の 6 ヶ月以内の致死性および非致死性の心筋梗塞
(重分散回帰分析)

| 変数 | OR | 95% CI | p 値 |
|-------------------|------|-----------|---------|
| 性別 | 0.91 | 0.68-1.39 | 0.16 |
| 65 歳より高齢 | 1.36 | 0.91-1.82 | 0.34 |
| 真性糖尿病 | 1.22 | 0.83-1.49 | 0.61 |
| 高コレステロール血症 | 0.90 | 0.68-1.13 | 0.59 |
| 高血圧 | 1.00 | 0.89-1.04 | 1.00 |
| CHDの履歴 | 0.86 | 0.65-1.19 | 0.72 |
| ST低下 | 1.04 | 0.76-1.54 | 0.74 |
| TnT > 0.1 µg/l | 2.94 | 1.75-7.26 | < 0.001 |
| CRP > 10 mg/l | 2.03 | 1.11-3.59 | 0.018 |
| sCD40L > 5.0 µg/l | 2.71 | 1.51-5.35 | 0.001 |

10

20

【0099】

I I . P I G F

P I G F は胎盤において最初に同定され、血管平滑筋の増殖を刺激し、動脈硬化症病変においてマクロファージを補充し、マクロファージによる T N F - および M C P - 1 の産生をアップレギュレートし、病理的血管新生を刺激する。かなりより重要なことに、そのレセプター・チロシン・キナーゼ F l t - 1 を遮断することによる P I G F の効果の阻害から、これが動脈硬化症プラークの成長および細胞の炎症性浸潤の阻害による脆弱性の両方を抑制するということが実験的に示された。これらのデータは、P I G F が動脈硬化症プラークの不安定性の一次的炎症指標として作用し得ることを示唆する。

30

【0100】

したがって、急性冠症候群を有する患者における P I G F の予後診断的な重要性を、C A P T U R E (c 7 E 3 「不安定難治性アンギナにおける抗血小板治療」) 研究に含められた急性冠症候群を有する患者のデータを使用することによって用い、次いで診断的および予後診断的な重要性を、胸部に疼痛を有する入室した患者の大きい集団において予備的に確認した。P I G F 血清レベルを、急性冠症候群を有する C A P T U R E 研究由来の 1 0 8 8 人の患者において測定した。さらに、P I G F 血清レベルの診断的および予後診断的な重要性を、胸部に急性疼痛を有する 6 1 9 人の患者の不均質群において予備的に確認した。致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の発生率を、追跡期間の間に記録した。

40

【0101】

1 . 患者

急性冠症候群を有する患者のセットの設計。C A P T U R E 研究は、急性冠症候群を有する患者 1 2 6 5 人を登録した (6 1 % が男性、6 1 ± 1 0 歳の年齢) 。全ての C A P T U R E 患者が、静脈内ヘパリンおよびグリセロールトリニトレートでの処置の間に、安静状態で E C G 変化を伴う再発性胸部疼痛を訴えていた。全患者集団を、無作為化の前に冠血管造影に付し、これは、血管形成術に適切な 7 0 % より高い誘引病変を有する顕著な冠状動脈疾患の発生を有意に示した。ヘパリンを、無作為化の前に開始して P T C A 手順の

50

少なくとも1時間後まで適用した。冠介入を、処置の開始後18～24時間以内に全ての患者において計画した。これらの患者を、アブシキシマブまたはプラセボによる処置に無作為に割りつけた。研究の一次的終点は、6カ月の追跡期間の間の死亡率または非致死性の心筋梗塞であった。血清サンプルを、症状の発生の8.7 [75% C I 3.6～11.3] 時間後に採取した。

【0102】

2. 急性胸部疼痛を有する患者の確認

12時間未満(平均5.1 [2.1～10.4] 時間)にわたって持続した急性胸部疼痛を有する、連続的に救急救命室に入室した胸部疼痛を有する患者626人(161人の女性および465人の男性、平均年齢61 [38～82] 歳)の別個の群を1セットとして確立した。先行する2週間の間基底ECGにおける特徴的なST上昇または報告された急性心筋梗塞を有する患者は考慮しなかった。血清サンプルを入室の時点(処置の開始前)および4時間後に得、氷上に維持し、サンプル採集後20分間以内で遠心分離し、後の分析まで-80 で保存した。致死性および非致死性の心筋梗塞を記録するために、これらの患者を病院から退院するまでおよびその後30日間観察した。冠状動脈疾患の存在を、以下の基準の1つによって検出した: 心筋虚血のECG指示(STストレッチにおける新規の変化またはT波の逆転)、既往歴中の冠状動脈性心疾患(心筋梗塞もしくは冠再血管化、ポジティブ・ストレス試験または初期血管造影図中の少なくとも50%の主冠状動脈の直径の制限)。冠状動脈性心疾患を有さない患者は、正常な冠血管造影図を示すべきである。

10

20

【0103】

研究の一次的終点は、30日間または6カ月間の不安定性に起因した、死亡率、心筋梗塞または即時の介入(血管形成術、冠状動脈のバイパス手術)の必要性であった。入院期間の間に心臓発作に罹患した患者において、少なくとも2つのサンプル中のクレアチン・キナーゼの酵素活性の値が正常範囲の上限より3倍を超えて高い場合、またはそれらのECGが2つより多い連続間隔で新規の別個のQ波を示した場合に、それに応じてこれを診断した。PTCA後のクレアチン・キナーゼの任意の重要な小さい増大を排除するために、この厳密な規定を選択した。退院後に心筋梗塞を有する患者において、クレアチン・キナーゼの酵素活性の値が正常範囲の上限より2倍を超えて高い場合、またはそれらのECGが2つ以上の連続間隔で新規の別個のQ波を示した場合に、それに応じてこれを規定した。二次的な終点は、70%以上の狭窄の直径を有する処置された病変の症候性の冠再狭窄、引き続く6カ月の間の反復された再血管化の必要性であった。

30

【0104】

3. 生化学的分析

血清サンプルを、主に-80 で保存した。心臓マーカーの決定を、患者の病歴および指図された処置の知識を持たずに、Frankfurt大学の研究実験室で実施した。PLGFおよびVEGFの血清レベルを、ELISA(R&D Systems、Wiesbaden)によって測定した。心臓トロポニンT(TnT)の定量のために、電気化学ルミネセンス技術(Elecsys 2010、Roche Diagnostics)に基づくワンステップ酵素免疫アッセイを使用した。高感度C反応性タンパク質(hsCRP)を、Behring BN II比濁計(Behring Diagnostics)を用いて測定した。10.0 mg/lの診断閾値を使用した [9、18]。

40

【0105】

4. PLGFの定量的決定

PLGF濃度を、サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術(R&D Systems、Wiesbaden)を使用することによって決定した。マイクロタイター・プレートを、PLGFに対して特異的なポリクローナル抗体で被覆した。標準およびサンプルをウェル中にピペティングし、存在するPLGFを固定化抗体によって結合させた。未結合の材料を洗浄して除いた後、PLGFに対して特異的な酵素結合ポリクローナル抗体をウェルに添加した。未結合の抗体-酵素-試薬を除去するための洗浄ステップの後、基質溶液を

50

ウェルに添加し、最初のステップで結合された P L G F の量に関して発色させた。発色を停止させ、色の強度を測定した。

【 0 1 0 6 】

5 . 統計的方法

アッセイ結果を、生化学的マーカーの盲検評価後にデータ・ベースと比較した。異なる等級の心臓リスクを有する患者を識別できるようにするために、指向性データ分析を選択した。心血管事象の相対的リスクを概算するために、C o x 比例ハザード回帰モデルを使用し、これらの患者を五分位数の P L G F 濃度に従って分類した。五分位数の P o s t - h o c 分析を、カテゴリー変数として P L G F 五分位数を用いて C o x 比例ハザード回帰モデルを使用することによって実施し、第 1 の五分位数中の患者は参照として機能した。P L G F アッセイのダイナミック・レンジにわたる受診者動作特性 (R O C) 曲線分析を、急性冠症候群を有する患者のリスク層別についての最も高い予測値を提供する P L G F についての閾値濃度を同定するために使用した。観察された P L G F レベルと心血管事象との間の任意の関連に対する、ベース・ライン特徴 (それにより、このモデル中に変数を含めるために $p = 0 . 1 0$ が必要であった) および他の生化学的マーカーの効果を、段階的な C o x 比例ハザード回帰モデルを使用することによって実施した。連続変数の全ての結果を平均 \pm 標準偏差として表す。群間の比較を t 検定 (両側) によって分析した。カテゴリー変数の比較を、P e a r s o n の ² 検定によって実施した。0 . 0 5 未満の p 値を統計的に有意であるとみなした。全ての分析を、S P S S 1 1 . 0 (S P S S I n c . 、 C h i c a g o) を用いて実施した。

10

20

【 0 1 0 7 】

(実施例 1 b)

心臓リスクと P L G F 濃度との間の関連

この研究のために選択した集団 ($n = 1 0 8 8$ 、C A P T U R E 患者の 8 6 %) についての転帰の特徴は、年齢、性別、心血管リスク・プロフィールならびに無作為選択の前および後の付随する処置に関して、研究の全集団と異ならなかった。アブシキシマブ群の集団における心臓事象の減少は、P T C A 前 (プラセボ 2 . 2 % 対 アブシキシマブ 0 . 9 % ; $p = 0 . 0 7$) ならびに P T C A 後 (7 . 9 % 対 3 . 5 % ; $p = 0 . 0 0 1$) および 3 0 日 (9 . 0 % 対 4 . 2 % ; $p = 0 . 0 0 1$) の両方で、C A P T U R E 集団全体と匹敵した。

30

【 0 1 0 8 】

P L G F を、2 3 . 0 n g / l の平均 (7 . 0 ~ 1 8 1 . 2 の範囲) で、この研究の患者の 9 5 . 6 % のベース・ライン血清サンプルにおいて検出できた。P L G F 血清レベルは、トロポニン T レベル ($r = 0 . 1 4$) および V E G F レベル ($r = 0 . 0 7$) の測定された濃度と相関しなかったが、h s C R P 血清レベル ($r = 0 . 4 8$) との有意な相関を示した (図 7) 。P L G F 血清レベルは、トロポニン T 陽性の患者とトロポニン T 陰性の患者との間で異ならなかったが、その一方で h s C R P 血清レベルは、トロポニン T 陽性の患者において有意により高かった (図 8) 。プラセボ群の患者 ($n = 5 4 7$) をそれぞれ、測定したその P L G F 血清レベルに従って以下の五分位数に分類した : (P L G F 1) $< 1 3 . 3$ n g / l ($n = 1 0 9$)、(P L G F 2) 1 3 . 4 ~ 1 9 . 2 n g / l ($n = 1 1 0$)、(P L G F 3) 1 9 . 3 ~ 2 7 . 3 n g / l ($n = 1 1 0$)、(P L G F 4) 2 7 . 3 ~ 4 0 . 0 n g / l ($n = 1 0 9$) および (P L G F 5) $> 4 0 . 0$ n g / l ($n = 1 0 9$)。最初の 2 4 時間の間、複合的終点である死亡率および非致死の心筋梗塞は、P L G F 五分位数間で異ならなかった ($p = 0 . 1 1$) (図 9)。後の時点 (7 2 時間、3 0 日、6 カ月) において、この事象の率は、P L G F 五分位数間で有意な差異を示した。7 2 時間の追跡試験で、この事象の率は、第 1 の五分位数と比較して、第 4 および第 5 の五分位数において有意により高かった (それぞれ、 $p = 0 . 0 3 8$ および $p = 0 . 0 1 1$)。引き続き 6 カ月の追跡試験の間、この事象の率はさらに分岐して、3 0 日 (それぞれ、 $p = 0 . 0 0 5$ および $p = 0 . 0 1 7$) および 6 カ月の追跡試験 (それぞれ、 $p = 0 . 0 0 2$ および $p = 0 . 0 0 1$) で、第 4 および第 5 の五分位数につい

40

50

て有意な差異を引き起こした。

【0109】

受診者動作特性曲線分析により、P1GFの最大化された予測値について27.0 ng/lの閾値が確認された(図10)。この閾値に基づいて、223人の患者(40.8%)が、27.0 ng/l以上のP1GF血清レベルを有し、324人の患者は27.0 ng/lを下回るP1GF血清レベルを有した。表3に示されるように、両方の群に特徴的な結果において小さい差異が存在した。上昇したP1GF血清レベルを有する患者は、より頻りに糖尿病でありかつ高血圧を有し、有意により高いhsCRP血清レベルを示した(表3)。高いP1GF血清レベルを有する患者において、複合的終点である致死性または非致死性の心筋梗塞は、低いP1GF血清レベルを有する患者とは有意に異なった。72時間後(全ての患者における冠介入を含む)、低いP1GF血清レベルを有する患者についての4.9%と比較して、高いP1GF血清レベルを有する患者の12.1%がネガティブ事象を経験した($p = 0.002$)(図11a)。6カ月の追跡期間の間、事象の頻度を示す曲線は、高いP1GF血清レベルを有する患者または低いP1GF血清レベルを有する患者間でさらに分岐した(図11b)。30日後(15.8%対3.6%; $p = 0.001$)および6カ月後(20.3%対4.9%; $p < 0.001$)の両方で有意な差異が見出された。CAPTURE群の比較的低い死亡率にもかかわらず、両方の群間の終点の死亡率(4.0%対0.9%; $p = 0.021$)は、6カ月後に有意に異なった。ベース・ライン特徴および生化学的マーカー(トロポニンT、VEGF、hsCRP)を含んだ多変量分析において、P1GFは、30日の追跡試験(調整されたハザード率3.34 [95% CI 1.79~6.24]; $p < 0.001$)および6カ月の追跡試験(調整されたハザード率3.58 [95% CI 1.48~7.72]; $p < 0.001$)の両方で、上昇した心臓リスクの独立して有効な予測子のままであった(表4)。P1GFレベルおよびhsCRPレベルに基づく4つの群への患者の分離は、P1GFが、有意に上昇した心臓リスクに罹患した低いhsCRP血清レベルを有する患者のサブグループを同定したことを示した。低いhsCRP血清レベルを有するが27.0 ng/lを上回るP1GF血清レベルを有する患者は、hsCRPおよびP1GFの両方について低いレベルを示した患者と比較して、有意により高いリスクを有した(23.6%対3.9%; $p = 0.001$)(図12a)。

【0110】

さらに、P1GFの予測値は、心筋壊死とは独立であった。高いP1GF血清レベルは、トロポニンT陽性の患者(15.4%対4.1%; $p = 0.005$)およびトロポニンT陰性の患者(26.1%対10.1%; $p = 0.001$)の両方において上昇した心臓リスクを示した(図12b)。

【0111】

(実施例2b)

P1GF血清レベルに対するアブシキシマブの効果

ロジスティック回帰分析を、アブシキシマブでの処置の有効性とP1GF濃度との間の境界線の有意な関連に向けた($p = 0.043$)。アブシキシマブを投与した高いP1GF血清レベルを有する患者は、30日の追跡試験で有意により低いリスクを有した(調整されたハザード率0.38 [0.19~0.74]; $p = 0.005$)。この有意な差は、6カ月の追跡試験で維持された(0.57 [0.34~0.96]; $p = 0.037$)。これとは対照的に、低いP1GF血清レベルを有する患者は、アブシキシマブでの処置から有意な治療的利益を得なかった(30日の追跡試験:調整されたハザード率0.59 [0.27~1.33]; $p = 0.23$)。

【0112】

(実施例3b)

退院時のP1GF血清レベルは長期の転帰を予測する

退院前に採取した第2の血液サンプル(無作為化の7.2 ± 4.5日後)を、547人のプラセボ患者のうち489人の患者について得ることができた(89.4%)。P1G

10

20

30

40

50

F血清レベルは、ベース・ラインでの $27.12 \pm 19.56 \text{ ng/l}$ の平均から退院時の $23.4 \pm 26.2 \text{ ng/l}$ まで減少した ($p = 0.012$)。 27.0 ng/l を上回る退院時のPLGF血清レベルを有する患者について、死亡率および非致死性の心筋梗塞の発生率は、30日 (4.6% 対 0.8% ; $p = 0.019$) および6カ月 (7.4% 対 2.2% ; $p = 0.005$)の両方の追跡試験で、低いPLGF血清レベルを有する患者と比較して有意により高かった (図13)。

【0113】

(実施例4b)

急性胸部疼痛を有する患者におけるPLGF閾値の確認

急性胸部疼痛を有する患者626人のうち、308人の患者が急性冠症候群に罹患した (117人の患者は、非ST上昇心筋梗塞を有した)。他の患者を、以下の診断に従って分類した: $n = 91$ 安定アンギナ、 $n = 10$ 肺塞栓症、 $n = 11$ うっ血性心不全、 $n = 7$ 心筋炎および $n = 199$ 心疾患の証拠なし。PLGF血清レベルは、安定アンギナを有する患者 (平均 16.2 [95% CI $13.8 \sim 18.6 \text{ ng/l}$; $p = 0.001$) および心疾患を示さない患者 (平均 9.6 [95% CI $10.4 \sim 12.9 \text{ ng/l}$; $p = 0.001$) と各々比較した場合に、急性冠症候群を有する患者において有意に増大した (平均 28.3 [95% CI $21.3 \sim 2.2$] ng/l)。非ST上昇心筋梗塞を有する患者におけるPLGF血清レベルは、不安定アンギナを有する患者におけるPLGF血清レベルから有意に異ならなかった (30.5 [95% CI $26.9 \sim 34.1$] 対 28.3 [95% CI $21.3 \sim 32.3$] ng/l ; $p = 0.42$)。心疾患を示さない患者における97.5%の参照上限は 24.9 ng/l であり、99%の参照上限は 27.3 ng/l であった。PLGF血清レベルは、壊死のマーカー (トロポニンT [$r = 0.07$]) と関連しなかったが、炎症マーカー (C反応性タンパク質 [$r = 0.43$]) と有意に関連した。

10

20

30

40

【0114】

急性冠症候群を有する患者において、44.8%の患者が、99%の参照上限を上回るPLGF血清レベルを示した。 27.0 ng/l のPLGFについての閾値を使用することによって、上昇したPLGF血清レベルを有する患者に、死亡および心筋梗塞についての有意により高いリスクが潜在していた (調整されたハザード率 2.97 [95% CI $1.74 \sim 9.06$; $p = 0.014$)。胸部疼痛を有する患者の不均質集団全体において、 27.0 ng/l の閾値もまた、死亡および心筋梗塞についての最も高いリスクに従う患者を確実に同定した (調整されたハザード率 4.95 [95% CI $2.50 \sim 9.79$; $P = 0.001$)。

【0115】

実施例1b~4bのまとめ

ACSを有する患者において、PLGFは、VEGF、トロポニンTおよびST部分の変化と関連しないが、hsCRPとの有意な相関を示した ($p = 0.001$)。上昇したPLGF血清レベルを有する患者 ($> 27.0 \text{ ng/l}$; 40.8%) は、ACSの30日後 (調整されたハザード率 3.34 [95% CI $1.79 \sim 6.24$]; $p = 0.001$) および6カ月後 (調整されたハザード率 3.58 [95% CI $1.48 \sim 7.72$]; $p = 0.001$) の両方で、強烈に上昇した心臓リスク (死亡および非致死性の心筋梗塞) を経験した。PLGF血清レベルは、低いhsCRPレベルを有する患者において特に有益であった。急性胸部疼痛を有する患者における予備的な確認により、 27 ng/l より高いPLGF血清レベルが、死亡および心筋梗塞についての最も高いリスク (調整されたハザード率 4.95 [95% CI $2.50 \sim 9.79$; $p = 0.001$) に従う患者を確実に同定した。より高いPLGF血清レベルを有する患者における上昇したリスクは、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター阻害物質であるアブシキシマブでの処置によって低下した (調整されたハザード率 0.38 [0.19~0.74]; $p = 0.005$)。

【0116】

50

【表 3】

表 3：CAPTURE 研究のプラセボ群 (n = 547) についてのPIGF状態に従うベース・ライン特徴

| | PIGF 低い | PIGF 高い | p 値 | |
|--------------------|-------------|-------------|---------|----|
| n | 324 | 223 | | |
| 男性 | 71.4 % | 69.2 % | 0.34 | |
| 年齢 | 61.4 ± 10.5 | 62.3 ± 10.5 | 0.32 | 10 |
| トロポニン T ≥ 0.1 µg/l | 33.8 % | 40.4 % | 0.12 | |
| CRP ≥ 10.0 µg/l | 29.1 % | 67.7 % | < 0.001 | |
| ST部分の低下 | 46.0 % | 52.1 % | 0.18 | |
| T波の逆転 | 51.4 % | 52.1 % | 0.93 | |
| 以下の病歴 | | | | |
| アンギナ > 4 週間 | 55.3 % | 57.4 % | 0.64 | 20 |
| 梗塞 < 30 日 | 12.5 % | 13.6 % | 0.84 | |
| 梗塞 > 30 日 | 20.3 % | 20.4 % | 0.97 | |
| PTCA | 16.5 % | 18.4 % | 0.56 | |
| CABG | 3.2 % | 3.7 % | 0.88 | |
| リスク因子 | | | | |
| 糖尿病 | 8.2 % | 12.5 % | 0.034 | 30 |
| 高血圧 | 33.4 % | 39.9 % | 0.019 | |
| 重度の喫煙者 | 39.6 % | 41.8 % | 0.48 | |
| 登録前の投薬 | | | | |
| アスピリン | 97.9 % | 98.1 % | 1.00 | |
| ヘパリン静脈内 | 99.0 % | 98.9 % | 0.98 | |
| ニトレート静脈内 | 99.4 % | 99.3 % | 1.00 | |
| βブロッカー | 63.5 % | 62.9 % | 0.91 | 40 |

【 0 1 1 7 】

【表 4】

表 4：CAPTURE 研究のプラセボ群由来の、追跡試験の最初の 6 ヶ月以内の致死性および非致死性の心筋梗塞についての多変量 Cox 比例ハザード回帰モデル

| 変数 | 調整されたハザード率 | 95% CI | p 値 |
|--------------------|------------|-------------|--------|
| 性別 | 0.95 | 0.72 - 1.68 | 0.38 |
| 年齢 > 65 歳 | 1.22 | 0.65 - 1.47 | 0.50 |
| 真性糖尿病 | 1.22 | 0.83 - 1.49 | 0.61 |
| 高コレステロール血症 | 0.90 | 0.68 - 1.13 | 0.59 |
| 重度の喫煙者 | 0.66 | 0.42 - 1.25 | 0.18 |
| 高血圧 | 1.04 | 0.91 - 1.25 | 0.95 |
| 冠再血管化の履歴 | 0.86 | 0.65 - 1.19 | 0.72 |
| ST 低下 | 0.96 | 0.55 - 1.42 | 0.81 |
| hsCRP > 10.0 mg/l | 0.95 | 0.62 - 1.57 | 0.88 |
| トロポニン T > 0.1 µg/l | 1.76 | 0.98 - 3.46 | 0.084 |
| VEGF > 300 ng/l | 2.16 | 1.05 - 4.11 | 0.031 |
| PIGF > 27,0 ng/l | 3.58 | 1.48 - 7.72 | <0.001 |

10

20

【0118】

I I I . P A P P - A および組合せ

急性冠症候群を有する患者における P A P P - A の予後診断的な重要性を、CAPTURE (c7E3「不安定難治性アンギナにおける抗血小板治療」) 研究に含められた急性冠症候群を有する患者のデータを使用することによって用い、次いで診断的および予後診断的な重要性を、胸部に疼痛を有する入室した患者の大きい集団において予備的に確認した。P A P P - A 血清レベルを、急性冠症候群を有する CAPTURE 研究由来の患者において測定した。致死性または非致死性の転帰を伴う心筋梗塞の発生率を、追跡期間の間記録した。

30

【0119】

1. 患者

急性冠症候群を有する患者のセットの設計。CAPTURE 研究は、急性冠症候群を有する患者 1265 人を登録した (61% が男性、61 ± 10 歳の年齢)。全ての CAPTURE 患者が、静脈内ヘパリンおよびグリセロールトリニトレートでの処置の間に、安静状態で ECG 変化を伴う再発性胸部疼痛を訴えていた。全患者集団を、無作為化の前に冠血管造影に付し、これは血管形成術に適切な 70% より高い誘引病変を有する顕著な冠状動脈疾患の発生を有意に示した。ヘパリンを、無作為化の前に開始して P T C A 手順の少なくとも 1 時間後まで適用した。冠介入を、処置の開始後 18 ~ 24 時間以内に全ての患者において計画した。これらの患者を、アブシキシマブまたはプラセボによる処置に無作為に割りつけた。研究の一次的終点は、6 カ月の追跡期間の間の死亡率および非致死性の心筋梗塞であった。血管形成術の方法を含む入院中の心筋梗塞を、少なくとも 2 つのサンプル中の正常の上限より 3 倍を超えて高い C K の酵素活性の値および / または 2 つまたは

40

50

それ以上の連続リードにおける新規の有意なQ波によって規定した。退院後の心筋梗塞を、少なくとも2つのサンプル中の正常の上限より2倍を超えて高いCKの酵素活性の値および/または2またはそれ以上の連続リードにおける新規の有意なQ波として規定した。例えばトロポニンT (TnT) および可溶性CD40リガンド (sCD40L) のような他のマーカーについて、これらが糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブの処置効果を妨害することが示されたので、本分析は、入手可能な血液サンプルを有するプラセボ患者に限定された (n = 547; プラセボ患者の86%)。血液サンプルを、症状の突然発生の 8.7 ± 4.9 時間後に収集した。

【0120】

2. 生化学的分析

血清サンプルを、主に -80 で保存した。心臓マーカーの決定を、患者の病歴および指図された処置の知識を持たずに、Frankfurt大学の研究実験室で実施した。PLGFおよびVEGFの血清レベルを、ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) によって測定した。心臓トロポニンT (TnT) の定量のために、電気化学ルミネセンス技術 (Elec Sys 2010, Roche Diagnostics) に基づくワンステップ酵素免疫アッセイを使用した。高感度C反応性タンパク質 (hsCRP) を、Behring BN II比濁計 (Behring Diagnostics) を用いて測定した。10.0 mg/lの診断閾値を使用した。高度に敏感なインターロイキン-10 (IL-10)、血管内皮増殖因子 (VEGF) およびsCD40Lを、ELISA (両方ともR&D Systems, Wiesbaden, Germany) によって測定した。本発明者らは以下の、より初期に確立された診断閾値を使用した: sCD40Lについて $5.0 \mu\text{g/l}$ 、VEGFについて 300 ng/l 、IL-10について 3.5 ng/l 。心臓PAPP-Aを、電気化学ルミネセンス技術 (Elec Sys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) に基づくワンステップ酵素免疫アッセイを使用して測定した。内部コントロールを使用することによって、8週間の期間にわたるPAPP-Aについての全体の不正確さは8.5%であった。

【0121】

3. 統計的方法

患者を、五分位数のPAPP-A血漿濃度に従って分類した。各時点 (24時間、72時間、30日および6カ月) について、死亡および心筋梗塞についての相対的リスクを決定するためにロジスティック回帰モデルを使用した。観察されたPAPP-Aレベルと心血管事象との間の任意の関連に対するベース・ライン特徴および他の生化学的マーカーの効果を、段階的なCox比例ハザード回帰モデルを使用することによって実施した。連続変数の全ての結果を平均 \pm 標準偏差として表す。群間の比較をt検定 (両側) によって分析した。カテゴリ変数の比較を、Pearsonの²検定を用いて実施した。0.05未満のp値を統計的に有意であるとみなした。全ての分析を、SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago) を用いて実施した。

【0122】

結果のまとめ

ベース・ラインPAPP-A血漿レベルは、 $14.8 \pm 13.8 \text{ mIU/l}$ の平均レベル (0.2 ~ 105.4の範囲) を示した。PAPP-A血漿レベルが一般的なりスク・マーカーと関連した場合、PAPP-A濃度はTnTレベルと相関せず (Spearman順位相関係数 $r = 0.11$; $P = 0.16$)、高いTnT血漿レベルを有する患者および低いTnT血漿レベルを有する患者において類似であった (図14)。同様に、VEGF血漿レベル ($r = 0.08$; $P = 0.07$) およびIL-10血漿レベル ($r = -0.04$; $P = 35$) は、PAPP-A血漿レベルとの関連を示さなかった。これとは対照的に、hsCRP血漿レベルは、上昇したTnT血漿レベルを有する患者において有意により高かった。二変量相関分析により、PAPP-AとhsCRPとの間ならびにPAPP-AとsCD40Lとの間の有意な相関が得られたが、この相関係数は低く、hsCRP

10

20

30

40

50

について $r = 0.21$ ($P = 0.001$) および $sCD40L$ について $r = 0.18$ ($P = 0.001$) であった。しかし、この分析を心筋壊死を有さない(トロポニン増大なし)患者に限定した場合、 $hsCRP$ と $PAPP-A$ との間の相関はより明白になり、 0.68 の r 値であった ($P = 0.001$)。結果として、上昇した $PAPP-A$ レベルを有する患者は各々、有意により高い $hsCRP$ レベルおよび $sCD40L$ レベルを示した(図15)。

【0123】

$PAPP-A$ 血漿レベルと心臓リスクとの間の相互作用

患者を、その測定した $PAPP-A$ レベルに従って、それぞれ以下の五分位数に層別した： $(PAPP-A_{1}) < 4.5 \text{ mIU/L}$ ($n = 111$)、 $(PAPP-A_{2}) 4.5 \sim 7.5 \text{ mIU/L}$ ($n = 108$)、 $(PAPP-A_{3}) 7.6 \sim 12.6 \text{ mIU/L}$ ($n = 109$)、 $(PAPP-A_{4}) 12.7 \sim 24.0 \text{ mIU/L}$ ($n = 110$) および $(PAPP-A_{5}) > 24.0 \text{ mIU/L}$ ($n = 109$)。最初の24時間の期間について、複合的終点である死亡率および非致死性の心筋梗塞は、これらの五分位数間で異ならなかった ($P = 0.69$) (図16)。72時間の追跡について、周囲介入事象を含めて、これらの五分位数において到達されたレベル間の心臓事象における差異は、統計的に有意に達した ($P = 0.019$)。30日および6カ月の追跡の間、事象率曲線は互いに分岐し続け、30日の追跡 ($P = 0.008$) および6カ月の追跡 ($P = 0.004$) の両方で五分位数間の高度に有意な差異を引き起こした。6カ月の追跡データについて、ロジスティック回帰モデルを使用した $PAPP-A$ 五分位数の $Post-hoc$ 分析により、上位2つの $PAPP-A$ 五分位数(第4の五分位数： $P = 0.034$ ；第5の五分位数： $P = 0.002$)のみが参照として働く第1の $PAPP-A$ 五分位数から有意に異なったという結果が導かれた。これらの結果と一致して、受診者動作特性曲線の分析は、最大化した予測値についての 12.6 mIU/L の $PAPP-A$ の閾値を確認した(図17)。

【0124】

$PAPP-A$ 状態に従う層別

上記結果に基づいて、研究集団を、 12.6 mIU/L の計算された閾値に従って二分して、上昇した $PAPP-A$ レベルを有する患者219人を導いた(40.0%)。上昇した $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者における高レベルの $hsCRP$ および $sCD40L$ の各々に加えて、上昇した $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者におけるベース・ライン特徴は、低い $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者から有意に異ならなかった(表5)。死亡および心筋梗塞についてのオッズ比(ベース・ライン特徴における差異に調整した)は24時間で 1.15 (95% CI $0.36 \sim 3.67$; $P = 1.00$)、72時間で 2.96 (95% CI $1.55 \sim 5.64$; $P = 0.002$) (図18a)、30日で 2.84 (95% CI $1.55 \sim 5.22$; $P = 0.001$) および6カ月で 2.64 (95% CI $1.55 \sim 4.50$; $P = 0.001$) (図18b)であった。低い $PAPP-A$ レベルを有する患者における6カ月の累積事象率は7.9%であり、それに対して高い $PAPP-A$ レベルを有する患者については17.4%であった。事象率におけるこれらの差異は、高率の非致死性の心筋梗塞に起因するだけでなく、低下した $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者における高い死亡率にも起因する(3.2%対1.2%; $P = 0.098$)。対応して、経皮的冠介入および冠状動脈バイパス移植を含む再血管化のための緊急プロセスは、上昇した $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者において有意により高かった(13.6%対7.9%; $P = 0.012$)。6カ月の追跡の間の再血管化のための非緊急プロセスは、より低い $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者と比較して、高い $PAPP-A$ 血漿レベルを有する患者においてより高い発生率を示した(34.4%対19.7%; $P = 0.005$)。

【0125】

多マーカーの考慮

本発明者らは、心筋壊死のマーカー(TnT)、虚血のマーカー($VEGF$)、炎症の

マーカー (hsCRP、PAPP-A)、抗炎症活性のマーカー (IL-10) および血小板の活性化のマーカー (sCD40L) を同時に測定した。注目すべきことに、PAPP-A の予測値は、上昇した hsCRP レベルを有する患者に限定された (図 19a)。hsCRP 血漿レベルが (10 mg/l より上に) 上昇した場合、12.6 mIU/l の計算された閾値を上回る PAPP-A 血漿レベルを有する患者は、死亡および非致死性の心筋梗塞についての上昇した心臓リスクを示した (調整されたオッズ比 2.61 [1.25 ~ 5.62]; $P = 0.007$) を示した (図 19a)。これとは対照的に、10 mg/l を下回る hsCRP 値を有する患者について、PAPP-A は、心血管リスクについての有意な予測子として作用しなかった ($P = 0.073$)。さらに、PAPP-A の予測値は、抗炎症性サイトカイン IL-10 の血漿レベルと緊密に関連した (図 19b)。

IL-10 血漿レベルが 3.5 ng/l の計算された閾値を上回った場合、上昇した PAPP-A 血漿レベル (12.6 mIU/l を上回る) を有する患者は、上昇した心臓リスクから保護された (調整されたオッズ比 1.40 [0.60 ~ 3.23]; $P < 0.001$) (図 19b)。しかし、低い IL-10 血漿レベルを有する患者について、12.6 mIU/l を上回る PAPP-A 値は、特に高い心血管リスクに罹患した患者のサブグループを同定した (調整されたオッズ比 3.52 [1.71 ~ 7.23]; $P = 0.001$)。まとめると、これらのデータは、PAPP-A 血漿レベルの予測値が、炎症促進性サイトカインの血漿レベルと抗炎症性サイトカインの血漿レベルとの間のバランスによって重要に調節されていることを示す。重要なことに、PAPP-A の予測値はまた、心筋壊死についての証拠を有さない患者においても見ることができた。上昇した PAPP-A レベルを有する TnT 陰性の患者 (閾値 0.1 $\mu\text{g/l}$) は、低い PAPP-A レベルを有する TnT 陰性の患者と比較して有意により高いリスクがあった (調整されたオッズ比 2.72 [1.25 ~ 5.89]; $P = 0.009$) (図 20a)。これとは対照的に、TnT 陽性の患者は、PAPP-A 血漿レベルから独立した上昇した心血管リスクに罹患した。PAPP-A の予測値は、TnT について 0.01 $\mu\text{g/l}$ の低下した閾値についても観察された (調整されたオッズ比 3.97 [1.24 ~ 12.68]; $P = 0.016$)。TnT および sCD40L の両方について陰性であった患者において、PAPP-A は、6 カ月の追跡の間に上昇した心血管リスクに罹患したサブグループを同定した (図 20b)。

個々の生化学的マーカーの潜在的に独立した予後診断的な重要性をさらに導出するために、生化学的マーカー TnT、VEGF、hsCRP、PAPP-A、IL-10 および sCD40L ならびに一変量モデルにおける有意な予測値を導いたベース・ライン特徴を含んだ段階的な多変量ロジスティック回帰分析を実施した。30 日および 6 カ月の追跡での終点である死亡および非致死性心筋梗塞について、確立されたリスク因子のいずれも、二分された生化学的マーカー TnT、hsCRP および sCD40L をこのモデルに導入した後に独立した予測子ではなかった (表 6)。したがって、段階的な多変量分析は生化学的マーカーに限定された。TnT ($P = 0.008$) および PAPP-A ($P = 0.007$) は、これらの患者の転帰の独立して有意な予測子のままであったが、その一方で hsCRP は、PAPP-A をこのモデルに導入した後に有意性を喪失した (PAPP-A なしで $P = 0.003$; PAPP-A の導入後に $P = 0.16$) (表 7; ステップ I)。PAPP-A は、抗炎症性サイトカイン IL-10 を含めた後 (表 7; ステップ II; $P = 0.006$) および血小板の活性化のマーカーとして sCD40L を含めた後 (表 7; ステップ III; $P = 0.015$) に、患者の転帰の有意な予測子のままであった。心筋虚血のマーカーとして VEGF を含めた後、TnT は、6 カ月の転帰についてのその予測力を喪失した (表 7; ステップ IV; VEGF を含めた後 $P = 0.24$ 対 VEGF を含める前 $P = 0.16$) が、その一方で PAPP-A は、有意な独立した予測子のままであった ($P = 0.014$)。

【0126】

別個の病態生理学的プロフィールを有する生体マーカーの同時の決定は、ACS を有する患者においてリスク層別を劇的に改善する。PAPP-A、PLGF および sCD40L のレベルは比較的安定でありかつ PAPP-A、PLGF および sCD40L について

特定のサンプル条件は必要ないので、これらのマーカーは、慣用的な臨床的使用に適切であるようである。冠状動脈および/または心筋に対して特異的でないというマーカーについての固有の制限が残るものの、P A P P - A、P I G Fおよびs C D 4 0 Lは、心筋壊死の証拠を有さないA C Sを有する患者の診断的および治療的な層別のための重要なツールとなることができる。

【 0 1 2 7 】

【表5】

表5: PAPP-A 状態に従うベース・ライン特徴

| | PAPP-A 低い | PAPP-A 高い | p 値 |
|-------------------|-----------|-------------|---------|
| n | 328 | 219 | |
| 男性 | 70.2 % | 71.9 % | 0.62 |
| 年齢 | 60.5 ± 11 | 62.2 ± 10.4 | 0.39 |
| トロポニンT ≥ 0.1 µg/l | 36.4 % | 39.2 % | 0.23 |
| VEGF > 300 ng/l | 50.8 % | 54.3 % | 0.43 |
| CRP ≥ 10.0 µg/l | 37.3 % | 56.2 % | < 0.001 |
| IL-10 < 3.5 ng/l | 57.3 % | 53.4 % | 0.38 |
| sCD40L > 5.0 µg/l | 33.4 % | 51.4 % | < 0.001 |
| ST 部分低下 | 45.1 % | 53.6 % | 0.062 |
| T 波の逆転 | 51.7 % | 51.7 % | 1.00 |
| 以下の病歴 | | | |
| アンギナ > 4 週間 | 55.5 % | 56.3 % | 0.64 |
| 梗塞 < 30 日 | 13.3 % | 12.5 % | 0.89 |
| 梗塞 > 30 日 | 20.3 % | 20.6 % | 0.90 |
| PTCA | 17.6 % | 17.4 % | 0.75 |
| CABG | 3.4 % | 3.5 % | 0.98 |
| リスク因子 | | | |
| 糖尿病 | 9.5 % | 10.7 % | 0.97 |
| 高血圧 | 34.6 % | 37.4 % | 0.64 |
| 重度の喫煙者 | 40.9 % | 42.6 % | 0.41 |
| 登録前の投薬 | | | |
| アスピリン | 98.1 % | 97.8 % | 1.00 |
| ヘパリン 静脈内 | 99.0 % | 98.8 % | 1.00 |
| ニトレート 静脈内 | 99.5 % | 99.2 % | 1.00 |
| β ブロッカー | 63.5 % | 62.9 % | 0.94 |

10

20

30

40

【表 6】

表 6： 追跡試験の最初の 6 ヶ月以内の致死性および非致死性の心筋梗塞についての多変量 Cox 比例ハザード回帰モデル

| 変数 | 調整された ハザード率 | 95% CI | p 値 |
|---------------------|----------------|-------------|-------|
| 性別 | 0.91 | 0.68 – 1.39 | 0.16 |
| 年齢 > 65 歳 | 1.36 | 0.91 – 1.82 | 0.34 |
| 真性糖尿病 | 1.22 | 0.83 – 1.49 | 0.61 |
| 高コレステロール血症 | 0.90 | 0.68 – 1.13 | 0.59 |
| 高血圧 | 1.00 | 0.89 – 1.04 | 1.00 |
| 冠再血管化の履歴 | 0.86 | 0.65 – 1.19 | 0.72 |
| ST 低下 | 1.29 | 0.72 – 2.31 | 0.39 |
| トロポニン T > 0.1 µg/l | 2.23 | 1.25 – 3.98 | 0.007 |
| hsCRP > 10.0 mg/l | 2.03 | 1.11 – 3.59 | 0.018 |
| PAPP-A > 12.6 mIU/l | 2.33 | 1.30 – 4.17 | 0.005 |

10

20

【 0 1 2 9 】

【表 7】

表 7: 多マーカー試験-追跡試験の最初の6ヵ月以内の致死性および非致死性の心筋梗塞についての段階的な多変量/ロジスティック回帰モデル

ステップ I

| 変数 | 回帰係数 B | SE | ワルド | P 値 | 期待値 (B) | 95% CI |
|--------|--------|------|------|-------|---------|-------------|
| CRP | 0.38 | 0.28 | 1.82 | 0.16 | 1.49 | 0.86 - 2.59 |
| TnT | 0.72 | 0.27 | 6.88 | 0.008 | 2.07 | 1.21 - 3.56 |
| PAPP-A | 0.83 | 0.27 | 9.01 | 0.007 | 2.13 | 1.24 - 3.68 |

10

ステップ II

| 変数 | 回帰係数 B | SE | ワルド | P 値 | 期待値 (B) | 95% CI |
|--------|--------|------|------|-------|---------|-------------|
| CRP | 0.20 | 0.29 | 0.46 | 0.50 | 1.44 | 0.67 - 2.17 |
| TnT | 0.75 | 0.27 | 7.44 | 0.006 | 2.13 | 1.24 - 3.69 |
| PAPP-A | 0.78 | 0.28 | 7.70 | 0.006 | 2.18 | 1.25 - 3.78 |
| IL-10 | -0.76 | 0.29 | 6.99 | 0.008 | 0.47 | 0.26 - 0.82 |

20

ステップ III

| 変数 | 回帰係数 B | SE | ワルド | P 値 | 期待値 (B) | 95% CI |
|--------|--------|------|------|-------|---------|-------------|
| CRP | 0.20 | 0.30 | 0.47 | 0.49 | 1.23 | 0.68 - 2.19 |
| TnT | 0.66 | 0.28 | 5.51 | 0.019 | 1.93 | 1.12 - 3.35 |
| PAPP-A | 0.70 | 0.29 | 5.60 | 0.015 | 2.05 | 1.18 - 3.32 |
| IL-10 | -0.86 | 0.28 | 9.29 | 0.002 | 0.42 | 0.24 - 0.74 |
| SCD40L | 0.90 | 0.30 | 9.61 | 0.002 | 2.45 | 1.39 - 4.32 |

30

ステップ IV

| 変数 | 回帰係数 B | SE | ワルド | P 値 | 期待値 (B) | 95% CI |
|--------|--------|------|------|-------|---------|-------------|
| TnT | 0.36 | 0.31 | 1.38 | 0.24 | 1.43 | 0.79 - 2.60 |
| PAPP-A | 0.69 | 0.29 | 5.85 | 0.014 | 2.01 | 1.14 - 3.49 |
| IL-10 | -0.84 | 0.28 | 8.66 | 0.003 | 0.43 | 0.25 - 0.76 |
| SCD40L | 0.86 | 0.29 | 8.76 | 0.003 | 2.37 | 1.34 - 4.18 |
| VEGF | 0.78 | 0.33 | 5.63 | 0.018 | 2.29 | 1.14 - 4.18 |

40

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図 1】プラセボを受けた患者群 (n = 544) における、24 時間後、72 時間後、30 日後および 6 カ月後の、sCD40L の血清濃度と心臓事象の発生率との間の関連を示す図である。これらの患者を 5 つの五分位数に分類した。sCD40L 濃度の範囲は以下の通りであった: 0.003 ~ 1.9 $\mu\text{g}/\text{l}$ (五分位数 1)、1.9 ~ 3.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ (五分位数 2)、3.5 ~ 5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ (五分位数 3)、5.0 ~ 6.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ (五分位数 4) および > 6.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ (五分位数 5)。72 時間後、30 日後および 6 カ月後に $p < 0.001$ 。

50

【図 2 a】プラセボ群 (n = 544) における sCD40L 濃度のベース・ライン値 (診断閾値 $5.0 \mu\text{g/l}$) に従う、72 時間後の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率の Kaplan-Meier に従う図である。

【図 2 b】プラセボ群 (n = 544) における sCD40L 濃度のベース・ライン値 (診断閾値 $5.0 \mu\text{g/l}$) に従う、6 カ月後の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率の Kaplan-Meier に従う図である。

【図 3】sCD40L 五分位数に従うアブシキシマブでの処置における適合されたリスク指数 (95% 信頼区画を含む) を示す図である。処置の成功は、6 カ月の過程における致死性または非致死性的心筋梗塞の減少として規定される。1.0 未満のリスク指数は、プラセボ処置と比較したアブシキシマブでの処置の成功を示す。

10

【図 4 a】プラセボまたはアブシキシマブのいずれかを受けた患者における、sCD40L 濃度に従う 72 時間の死亡率および非致死性的心筋梗塞の Kaplan-Meier 図である。

【図 4 b】プラセボまたはアブシキシマブのいずれかを受けた患者における、sCD40L 濃度に従う 6 カ月の死亡率および非致死性的心筋梗塞の Kaplan-Meier 図である。

【図 5】疾患の活性に依存した血小板の活性化を示す図である。単球 - 血小板凝集物によって決定される血小板の活性は、安定冠状動脈性心疾患を有する患者において有意に増大した。血小板の活性化のさらなる有意な増大が、急性冠症候群を有する患者において観察された。

20

【図 6】sCD40L 血清濃度が急性冠症候群を有する患者および急性冠症候群を有さない患者における血小板の活性化の程度と厳密に相関することを示す図である。破線は、これらの患者を血小板の活性化 ($< 15\%$ 、 $15\% \sim 30\%$ 、 $> 30\%$) または sCD40L 血清濃度 ($< 2.5 \mu\text{g/l}$; $2.5 \sim 4.5 \mu\text{g/l}$; $> 4.5 \mu\text{g/l}$) に従って三分位数に分割する。

【図 7】PLGF と下流の急性相反応物としての hsCRP との間の関連を示す図である (n = 1088)。

【図 8】ベース・ライン・トロポニン T 状態に従って PLGF 血清レベルおよび hsCRP 血清レベルの各々を示す図である (n = 1088)。

【図 9】プラセボを受けた患者群 (n = 547) における 24 時間後、72 時間後、30 日後および 6 カ月後の PLGF の血清濃度と心臓事象の発生率との間の関連を示す図である。PLGF 濃度の範囲は以下の通りであった: 13.3 ng/l 以下 (第 1 の五分位数)、 $13.4 \sim 19.2 \text{ ng/l}$ (第 2 の五分位数)、 $19.3 \sim 27.3 \text{ ng/l}$ (第 3 の五分位数)、 $27.4 \sim 40.0 \text{ ng/l}$ (第 4 の五分位数) および 40.0 ng/l より上 (第 5 の五分位数)。これらの五分位数間の事象の率における差異は、30 日 (p = 0.001) および 6 カ月 (p < 0.001) の追跡試験で有意であった。

30

【図 10】6 カ月の追跡試験での死亡率または非致死性的心筋梗塞の発生率についての PLGF 血清レベルの予測値についての受診者動作特性曲線分析を示す図である。

【図 11】PLGF 血清レベルのベース・ライン値に従う、72 時間後 (a) および 6 カ月後 (b) の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率の Kaplan-Meier に従う図である (診断的な閾値 27.0 ng/l ; n = 547)。

40

【図 12】hsCRP 血清レベル (a) およびトロポニン T 血清レベル (b) に従う致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の発生率についての PLGF の予測値を示す図である。診断的な閾値は PLGF について 27.0 ng/l であり、トロポニン T について $0.1 \mu\text{g/l}$ であり、そして hsCRP について 10 mg/l であった (n = 547)。

【図 13】6 カ月の追跡試験での患者 - 結果についての退院 - PLGF 血清レベルの予測値を示す図である。上昇した PLGF 血清レベルを有する患者は、 27.0 ng/l 未満の PLGF 血清レベルを有する患者についての 2.2% と比較して 7.4% の発生率で、より高い心臓リスクに従った (p = 0.005)。

50

【図14】ベース・ラインのトロポニンT状態に従うPAPP-AレベルおよびhsCRPレベルの各々を示す図である。丸はアウトライアーを示す。

【図15】ベース・ラインのPAPP-A状態に従う、それぞれ可溶性CD40リガンド・レベルおよびhsCRPレベルを示す図である。丸はアウトライアーを示す。

【図16】PAPP-Aプラセボ群 ($n = 547$) に従う24時間、72時間、30日および6カ月でのPAPP-A血漿レベルと心臓事象の率との間の関連を示す図である。PAPP-Aの範囲は以下の通りであった： $(PAPP-A_1) < 4.5 \text{ mIU/l}$ ($n = 111$)； $(PAPP-A_2) 4.5 \sim 7.5 \text{ mIU/l}$ ($n = 108$)； $(PAPP-A_3) 7.6 \sim 12.6 \text{ mIU/l}$ ($n = 109$)； $(PAPP-A_4) 12.7 \sim 24.0 \text{ mIU/l}$ ($n = 110$) および $(PAPP-A_5) > 24.0 \text{ mIU/l}$ 。発生率は72時間 ($p = 0.019$)、30日 ($p = 0.008$) および6カ月 ($p = 0.004$) で有意であった。

【図17】6カ月の追跡試験での死亡率または非致死性の心筋梗塞の発生率についてのPAPP-A血漿レベルの予測値についての受診者動作特性曲線分析を示す図である。

【図18】PAPP-Aベース・ライン血漿レベルに従う72時間 (a) および6カ月 (b) での死亡および非致死性の心筋梗塞の累積発生率を示すKaplan-Meier事象率曲線を示す図である。診断的な閾値 12.6 mIU/l ； $n = 547$ 。

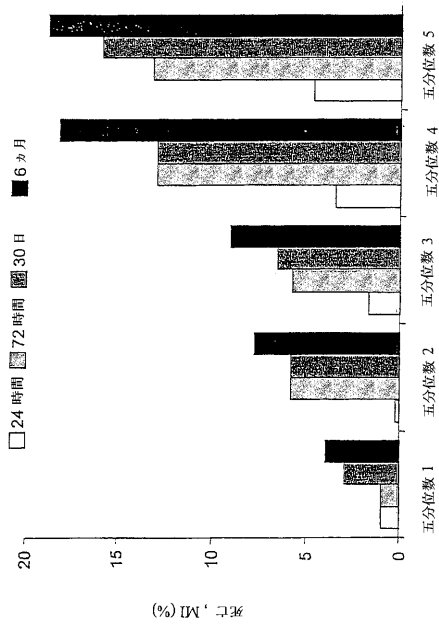
【図19】死亡および非致死性の心筋梗塞の発生率についてのPAPP-Aの予測値が、上昇したhsCRPレベルを有する患者 (a) および低レベルの抗炎症性サイトカインIL-10を有する患者 (b) に限定されたことを示す図である。診断的な閾値は、PAPP-Aについて 12.6 mIU/l 、hsCRPについて 10 mg/l およびIL-10について 3.5 ng/l であった； $n = 547$ 。

【図20】死亡および非致死性の心筋梗塞の発生率についてのPAPP-Aの予測値が、トロポニンTの増大を有さない患者において特に有益であったことを示す図である (a)。TnTおよびsCD40Lの両方について陰性であった患者において、PAPP-Aは、6カ月の追跡で上昇した心血管リスクに罹患したサブグループを同定した (b)。診断的な閾値は、PAPP-Aについて 12.6 mIU/l 、TnTについて $0.1 \mu\text{g/l}$ およびsCD40Lについて $5.0 \mu\text{g/l}$ であった； $n = 547$ 。

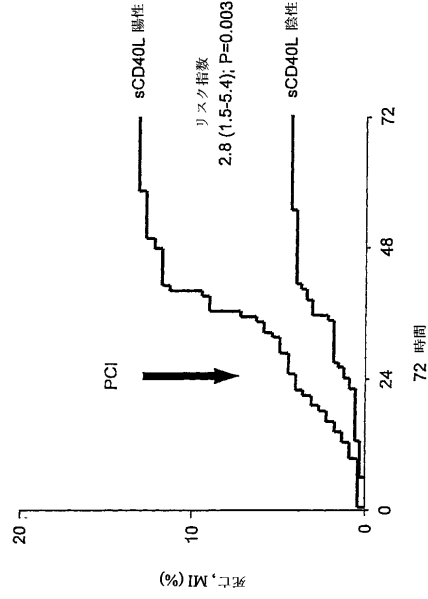
10

20

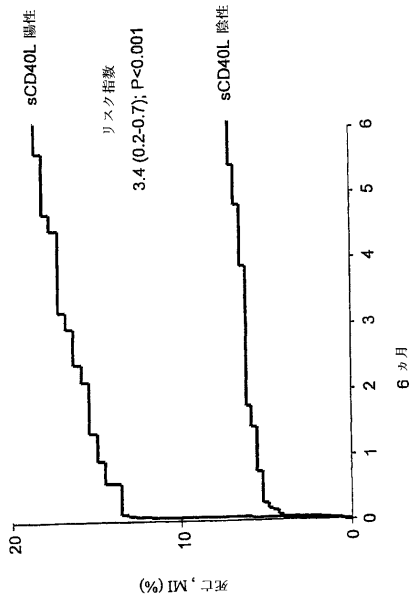
【 図 1 】



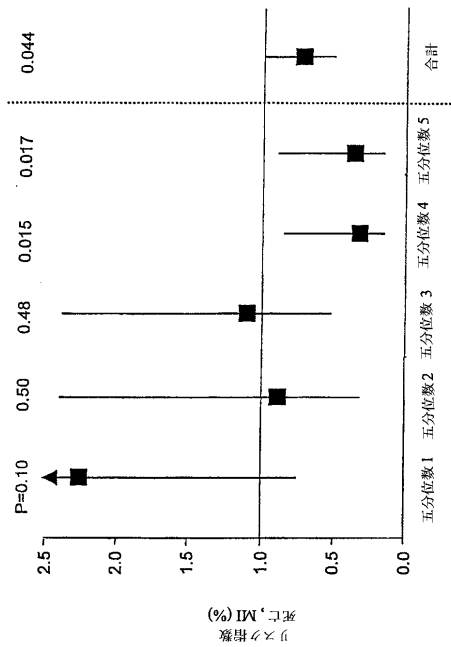
【 図 2 a 】



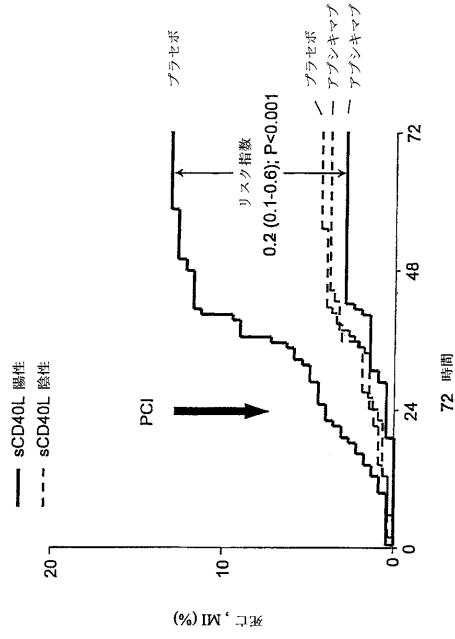
【 図 2 b 】



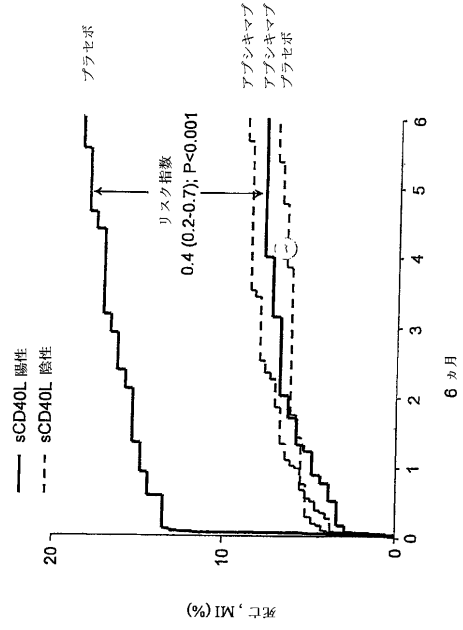
【 図 3 】



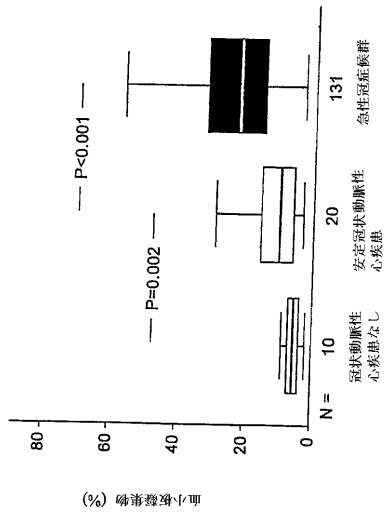
【 図 4 a 】



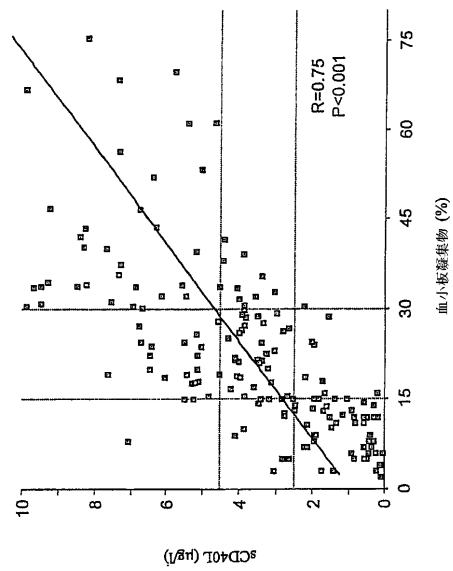
【 図 4 b 】



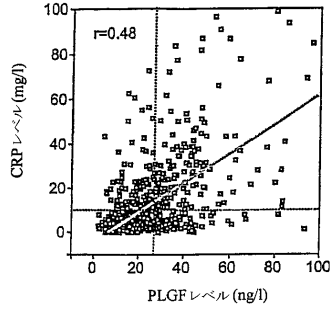
【 図 5 】



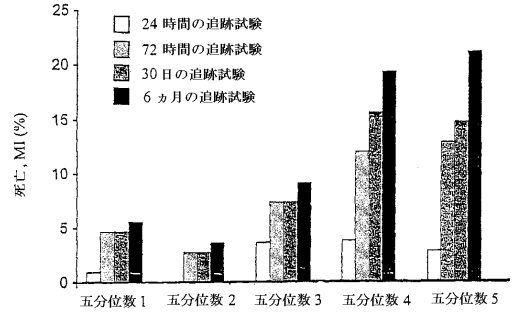
【 図 6 】



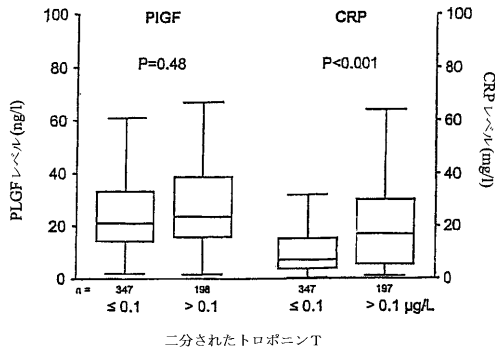
【 図 7 】



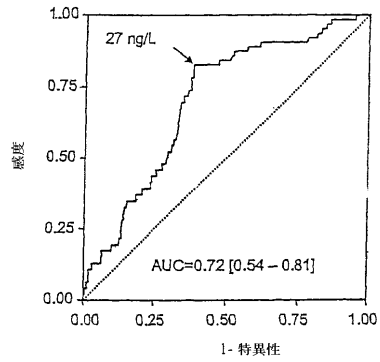
【 図 9 】



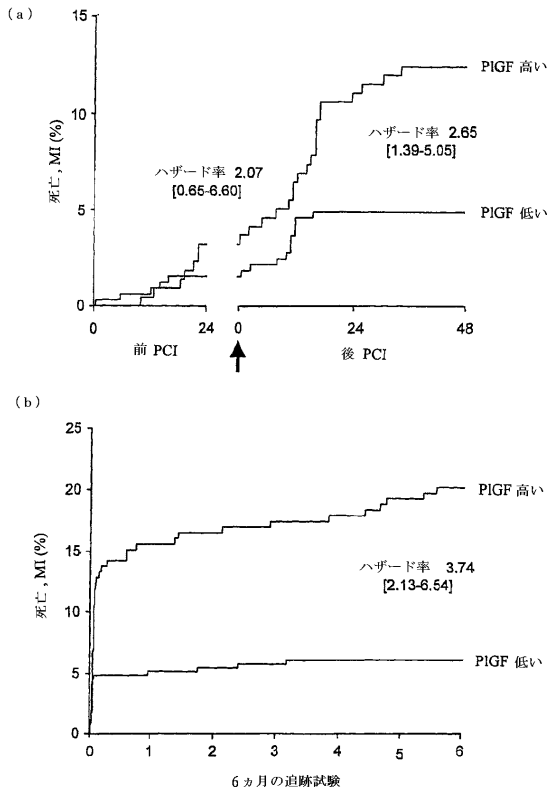
【 図 8 】



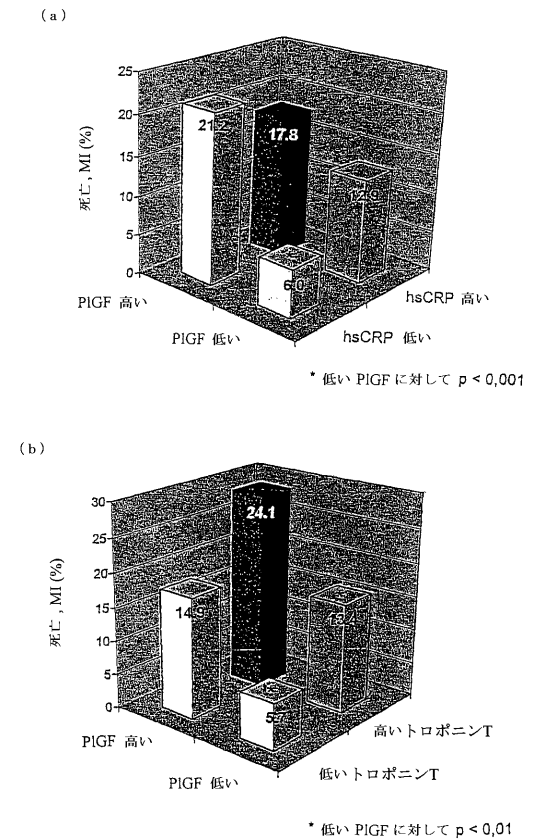
【 図 10 】



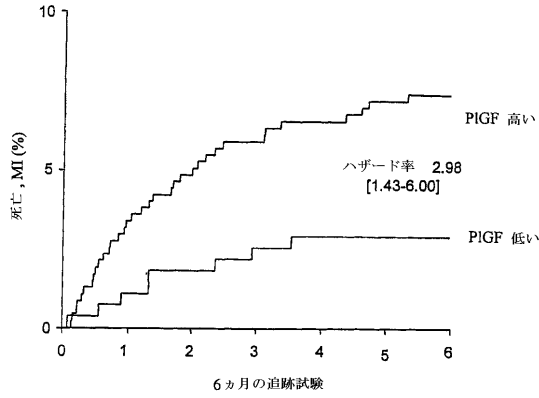
【 図 11 】



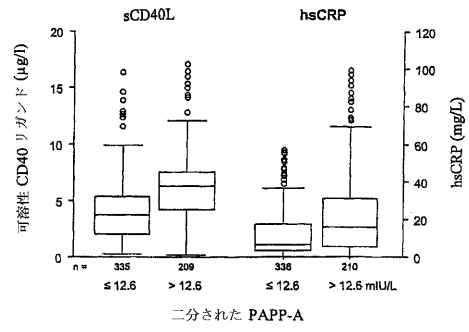
【 図 12 】



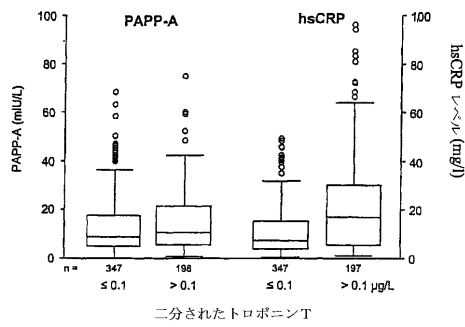
【 図 1 3 】



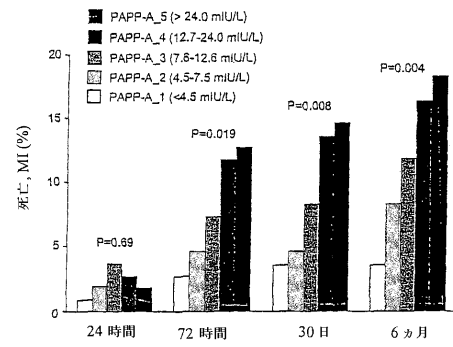
【 図 1 5 】



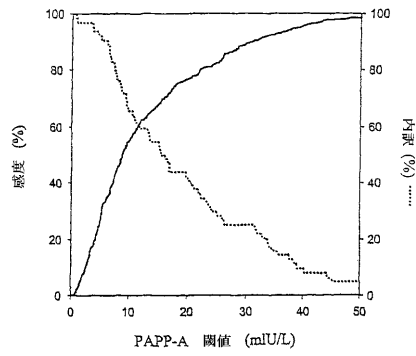
【 図 1 4 】



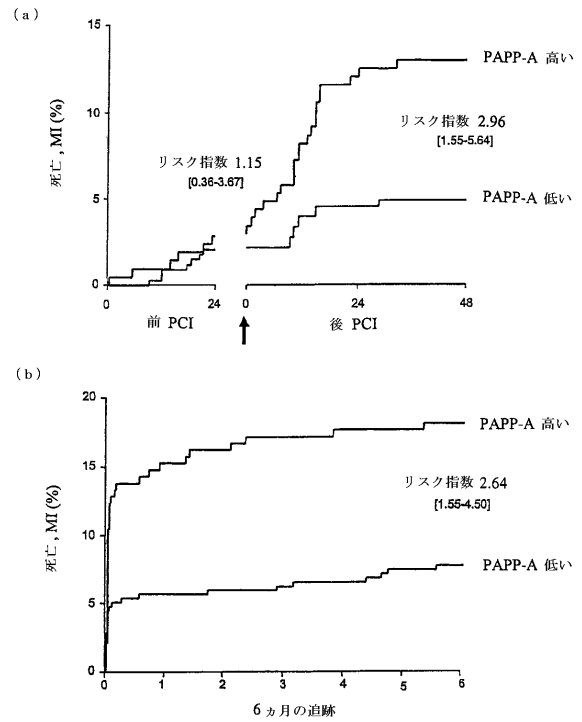
【 図 1 6 】



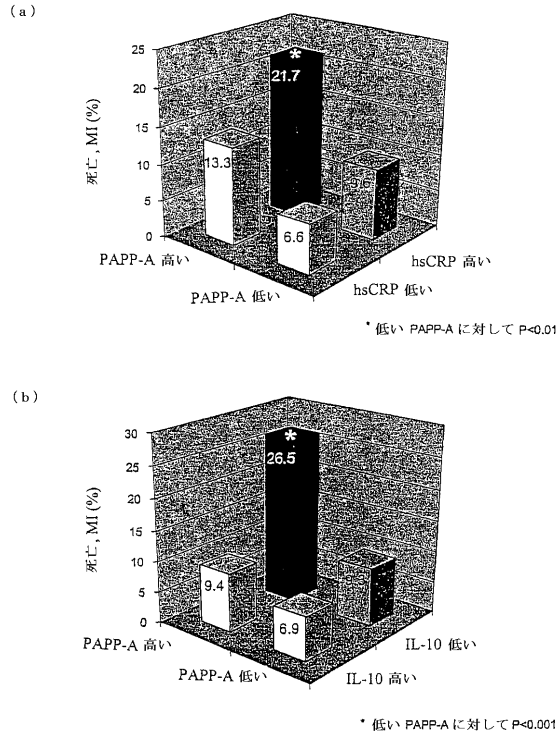
【 図 1 7 】



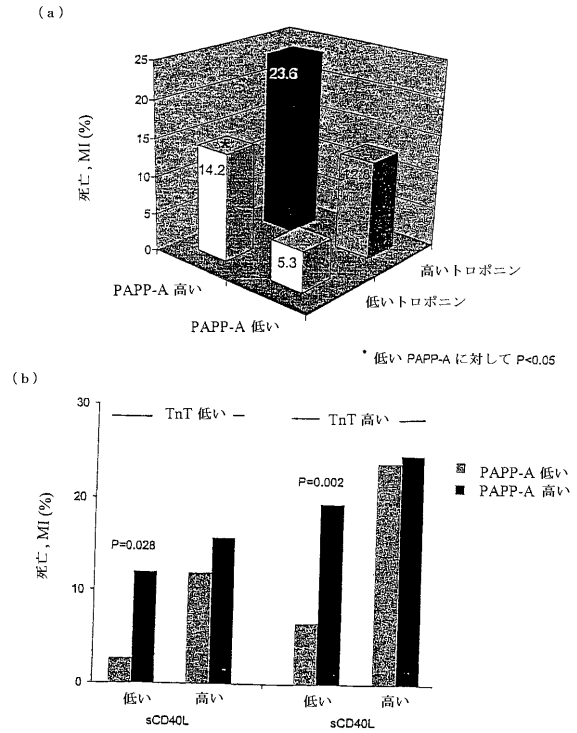
【 図 1 8 】



【図 19】



【図 20】



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月8日(2004.10.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 被験体からの分析すべき生物学的サンプルを用意するステップ;

(b) 可溶性CD40リガンド(sCD40L)、PAPP-AおよびPLGFから選択される少なくとも1つのマーカーの濃度を決定するステップ;

(c) 場合により、トロポニンT(TnT)、MPO、NT-proBNP、VEGF、BNPおよびさらなる炎症マーカーから選択される少なくとも1つのさらなるマーカーの濃度を決定するステップ;ならびに

(d) 上記分析すべきサンプルについて得られた結果を、参照値および/または参照サンプルからの値と比較するステップ、を含む、急性心血管疾患に関してサンプルを分析するためのインビトロ方法。

【請求項2】

分析すべきサンプルおよび/または参照サンプルがヒト由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

分析すべきサンプルが、末梢血またはその画分および細胞培養物懸濁液またはその画分からなる群より選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

分析すべきサンプルが血漿または血清である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

凝固阻害物質、特にヘパリンが末梢血に添加される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

さらなる炎症マーカーが、CRP、(hs)CRP および IL-10 から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、PLGF; PLGF + TnT; sCD40L + PLGF; PAPP-A + PLGF; sCD40L + PLGF + TnT; PAPP-A + PLGF + TnT; sCD40L + PAPP-A + PLGF および sCD40L + PAPP-A + PLGF + TnT から選択される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

MPO、NT-proBNP、BNP、CRP、(hs)CRP および IL-10 のうちの少なくとも 1 つのマーカーの分析をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

濃度の決定が、マーカー結合分子による免疫学的方法によって行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

マーカー結合分子が、抗マーカー抗体またはその部分およびマーカー・レセプターまたはその部分からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

抗体、その部分または断片が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab断片、scFv断片および二重特異性抗体を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

マーカーおよび/またはマーカー結合分子が、溶液中に存在するかまたはマトリックスに固定化されている、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

sCD40L に結合する分子が、フルオレセインチオイソシアネート、フィコエリスリン、酵素および磁性ビーズからなる群より選択される 1 つまたは幾つかの検出グループに結合する、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

マーカー結合分子が、1 つまたは幾つかの検出グループが結合する抗体を用いて検出される、請求項 10 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

免疫学的方法が、サンドイッチ酵素免疫アッセイ、ELISA および固相免疫アッセイからなる群より選択される、請求項 10 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

心血管疾患が、不安定アンギナ、心筋梗塞、急性冠症候群、冠状動脈疾患および心不全からなる群から選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

検査されるサンプルの結果についての閾値が、血清または血漿中 27.0 ng/l の PLGF において存在する、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

検査されるサンプルの結果についての閾値が、血清または血漿中 10.0 ng/l の hsCRP において存在する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

場合によりさらなる成分および/または賦形剤と共に、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法を実施するための手段を含む、診断キット。

【請求項 20】

患者のリスク・プロフィールに関するアッセイの結果の解釈について、およびそれぞれの対抗手段および治療のための提案についてのマニュアルを含む、請求項 19 に記載の診断キット。

【請求項 21】

金標識されたポリクローナル・マウス指標抗体、ビオチン化ポリクローナル検出抗体、およびガラス繊維フリースを含む試験デバイスを含む、請求項 19 に記載の診断キット。

【請求項 22】

急性心血管疾患の診断および/もしくは予後診断のため、ならびに/またはそれらの治療のモニタリングのための、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法の使用。

【請求項 23】

hsCRP 血清レベルまたは血漿レベルが低いが心臓リスクが有意に高い患者のサブグループを同定するための、請求項 17 または 18 に記載の方法の使用。

【請求項 24】

治療が、スタチンおよび/または糖タンパク質 IIb / IIIレセプター阻害物質の投与を含む、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 25】

治療が、抗炎症手段の投与および外科的処置、特にバルーン拡張を含む、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 26】

血清または血漿中の hsCRP レベルが $10.0 \mu\text{g}/\text{l}$ であるリスク群を識別するための、請求項 18 に記載の方法の使用。

【請求項 27】

アブシキシマブによる処置に対して応答する患者と応答しない患者とを識別するための、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法の使用。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/EP 03/12531 | | |
|--|---|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C07K14/705 | | | | |
| 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) IPC 7 G01N C07K | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | |
| X | SCHONBECK UWE ET AL: "Soluble CD40L and cardiovascular risk in women" CIRCULATION, vol. 104, no. 19, 6 November 2001 (2001-11-06), pages 2266-2268, XP002273044 ISSN: 0009-7322 cited in the application abstract ----- -/-- | 1-21 | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | | | |
| * Special categories of cited documents : <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> *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 </td> </tr> </table> | | | *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family | | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report | | |
| 4 June 2004 | | 22.06.2004 | | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer van der Kooij, M | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/12531

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>PENG DAO-QUAN ET AL: "Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome" CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 319, no. 1, 7 May 2002 (2002-05-07), pages 19-26, XP002273045 ISSN: 0009-8981 cited in the application the whole document</p> | 1-21 |
| X | <p>YAN JINCHUAN ET AL: "Clinical implications of increased expression of CD40L in patients with acute coronary syndromes" CHINESE MEDICAL JOURNAL (ENGLISH EDITION), vol. 115, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 491-493, XP008028508 ISSN: 0366-6999 abstract</p> | 1-21 |
| X | <p>AUKRUST PAL ET AL: "Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina: Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes" CIRCULATION, vol. 100, no. 6, 10 August 1999 (1999-08-10), pages 614-620, XP002273046 ISSN: 0009-7322 cited in the application the whole document</p> | 1-21 |
| X | <p>HEESCHEN CHRISTOPHER ET AL: "CD40 ligand serum levels independently predicts outcome and effect of anti-platelet therapy in patients with unstable angina." CIRCULATION, vol. 106, no. 19 Supplement, 5 November 2002 (2002-11-05), page II.402, XP008028499 Abstracts from Scientific Sessions; Chicago, IL, USA; November 17-20, 2002 ISSN: 0009-7322 (ISSN print) abstract</p> | 1-21 |

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/12531

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | GARLICH S C D ET AL: "Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets" HEART (LONDON), vol. 86, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 649-655, XP008028515 ISSN: 1355-6037 abstract | 1-21 |
| Y | BAYES-GENIS ANTONIO ET AL: "Identification of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) as a new marker of acute coronary syndromes" JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 37, no. 2 Supplement A, February 2001 (2001-02), page 301A, XP008028486 50th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology; Orlando, Florida, USA; March 18-21, 2001 ISSN: 0735-1097 abstract | 1-21 |
| P,X | WO 03/040691 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 15 May 2003 (2003-05-15) claims 1-29 | 1-21 |
| P,X | VARO NEREA ET AL: "Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes." CIRCULATION. UNITED STATES 2 SEP 2003, vol. 108, no. 9, 2 September 2003 (2003-09-02), pages 1049-1052, XP002273047 ISSN: 1524-4539 the whole document | 1-21 |
| A | WO 98/20155 A (NEW YORK SOCIETY FOR THE RUPTU) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document | 1-21 |
| X | WO 02/056015 A (BAYES-GENIS ANTONIO ; SCHWARTZ ROBERT S (US); HOLMES DAVID R (US); MAY) 18 July 2002 (2002-07-18) page 2, line 4 - line 10 page 5, line 7 - line 12 page 6, line 5 - line 9 page 10, line 25 - page 11, line 14 page 12, line 21 - page 13, line 19 claims 1-4,7-16 | 1-21 |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/12531

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BAYES-GENIS ANTONI ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 345, no. 14, 4 October 2001 (2001-10-04), pages 1022-1029, XP002909589 ISSN: 0028-4793 abstract page 1023, column 1, paragraph 6 | 1-21 |
| X | KHOSRAVI JAVAD ET AL: "Pregnancy associated plasma protein-A: Ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease." CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 7, October 2002 (2002-10), pages 531-538, XP001188913 ISSN: 0009-9120 abstract page 532, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 page 533, column 1, paragraph 3 - paragraph 5 | 1-21 |
| X | DENKTAS A E ET AL: "PREGNANCY ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A LEVELS ARE ELEVATED IN PATIENTS WITH UNSTABLE ANGINA" EUROPEAN HEART JOURNAL, THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, XX, vol. 23, no. ABSTR SUPPL, 31 August 2002 (2002-08-31), page 466, XP008028493 ISSN: 0195-668X abstract | 1-21 |
| X | HAJEK P ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A) in determination of unstable coronary plaque." EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 23, no. Abstract Supplement, 2002, page 293, XP008028492 & CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; BERLIN, GERMANY; AUGUST 31-SEPTEMBER 04, 2002 ISSN: 0195-668X abstract | 1-21 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/12531

| C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | FUTTERMAN LAURIE G ET AL: "Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A." AMERICAN JOURNAL OF CRITICAL CARE : AN OFFICIAL PUBLICATION, AMERICAN ASSOCIATION OF CRITICAL-CARE NURSES. MAR 2002, vol. 11, no. 2, March 2002 (2002-03), pages 168-172, XP008031012 ISSN: 1062-3264 page 170, column 1, paragraph 1 - paragraph 2 | 1-21 |
| A | WO 01/56593 A (FLANDERS INTERUNIVERSITY INST ; CARMELIET PETER (BE); LEUVEN RES AND D) 9 August 2001 (2001-08-09) claims 1,4,5 | 1-21 |
| A | MAGLIONE D ET AL: "RECOMBINANT PRODUCTION OF PIGF-1 AND ITS ACTIVITY IN ANIMAL MODELS" FARMACO, SOCIETA CHIMICA ITALIANA, PAVIA, IT, vol. 55, 2000, pages 165-167, XP001000056 ISSN: 0014-827X page 166, column 2, paragraph 3 - page 167, column 2, paragraph 2 | 1-21 |
| A | LUTTUN A ET AL: "Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 8, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 831-840, XP002258708 ISSN: 1078-8956 the whole document | 1-21 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/12531

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the Supplemental Sheet

As a result of the prior review under PCT Rule 40.2(e), no additional fees are to be refunded.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/12531

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-21 (in part)

Method for analysing samples in connection with acute cardiovascular diseases, comprising the following steps: (a) obtaining a sample; (b) determining the concentration of at least soluble CD40 ligand; (c) optionally determining the concentration of at least one other marker chosen from troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP and other inflammatory markers; and (d) comparing the results with reference values. Diagnostic kit comprising means for carrying out the said method.

2. Claims 1-21 (in part)

Method for analysing samples in connection with acute cardiovascular diseases, comprising the following steps: (a) obtaining a sample; (b) determining the concentration of at least PAPP-A; (c) optionally determining the concentration of at least one other marker chosen from troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP and other inflammatory markers; and (d) comparing the results with reference values. Diagnostic kit comprising means for carrying out the said method.

3. Claims 1-21 (in part)

Method for analysing samples in connection with acute cardiovascular diseases, comprising the following steps: (a) obtaining a sample; (b) determining the concentration of at least PIGF; (c) optionally determining the concentration of at least one other marker chosen from troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP and other inflammatory markers; and (d) comparing the results with reference values. Diagnostic kit comprising means for carrying out the said method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/12531

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 03040691 | A | 15-05-2003 | WO 03040691 A2 | 15-05-2003 |
| | | | US 2003152566 A1 | 14-08-2003 |
| WO 9820155 | A | 14-05-1998 | CA 2271243 A1 | 14-05-1998 |
| | | | WO 9820155 A1 | 14-05-1998 |
| | | | US 6117642 A | 12-09-2000 |
| WO 02056015 | A | 18-07-2002 | US 2002132278 A1 | 19-09-2002 |
| | | | CA 2434512 A1 | 18-07-2002 |
| | | | EP 1350109 A1 | 08-10-2003 |
| | | | WO 02056015 A1 | 18-07-2002 |
| | | | US 2003003521 A1 | 02-01-2003 |
| WO 0156593 | A | 09-08-2001 | AU 3024301 A | 14-08-2001 |
| | | | AU 4643501 A | 14-08-2001 |
| | | | WO 0156593 A2 | 09-08-2001 |
| | | | WO 0157181 A2 | 09-08-2001 |
| | | | EP 1253935 A2 | 06-11-2002 |
| | | | JP 2003521522 T | 15-07-2003 |
| | | | US 2003054995 A1 | 20-03-2003 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| | | |
|--|---|---|
| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 C07K14/705 | | |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RESEARCHIERTE GEBIETE | | |
| Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N C07K | | |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | SCHONBECK UWE ET AL: "Soluble CD40L and cardiovascular risk in women" CIRCULATION, Bd. 104, Nr. 19, 6. November 2001 (2001-11-06), Seiten 2266-2268, XP002273044 ISSN: 0009-7322 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ----- -/-- | 1-21 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Teil C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *t* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *C* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder des ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist *S* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | | Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts |
| 4. Juni 2004 | | 22. 06. 2004 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter van der Kooij, M |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|---------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beitr. Anspruch Nr. |
| X | <p>PENG DAO-QUAN ET AL: "Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with acute coronary syndrome"</p> <p>CLINICA CHIMICA ACTA, Bd. 319, Nr. 1, 7. Mai 2002 (2002-05-07), Seiten 19-26, XP002273045 ISSN: 0009-8981 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> | 1-21 |
| X | <p>YAN JINCHUAN ET AL: "Clinical implications of increased expression of CD40L in patients with acute coronary syndromes"</p> <p>CHINESE MEDICAL JOURNAL (ENGLISH EDITION), Bd. 115, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 491-493, XP008028508 ISSN: 0366-6999 Zusammenfassung</p> | 1-21 |
| X | <p>AUKRUST PAL ET AL: "Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina: Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes"</p> <p>CIRCULATION, Bd. 100, Nr. 6, 10. August 1999 (1999-08-10), Seiten 614-620, XP002273046 ISSN: 0009-7322 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> | 1-21 |
| X | <p>HEESCHEN CHRISTOPHER ET AL: "CD40 ligand serum levels independently predicts outcome and effect of anti-platelet therapy in patients with unstable angina."</p> <p>CIRCULATION, Bd. 106, Nr. 19 Supplement, 5. November 2002 (2002-11-05), Seite II.402, XP008028499 Abstracts from Scientific Sessions; Chicago, IL, USA; November 17-20, 2002 ISSN: 0009-7322 (ISSN print) Zusammenfassung</p> | 1-21 |

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|---------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beitr. Anspruch Nr. |
| Y | GARLICH C D ET AL: "Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets" HEART (LONDON), Bd. 86, Nr. 6, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 649-655, XP008028515 ISSN: 1355-6037 Zusammenfassung | 1-21 |
| Y | BAYES-GENIS ANTONIO ET AL: "Identification of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) as a new marker of acute coronary syndromes" JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, Bd. 37, Nr. 2 Supplement A, Februar 2001 (2001-02), Seite 301A, XP008028486 50th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology;Orlando, Florida, USA; March 18-21, 2001 ISSN: 0735-1097 Zusammenfassung | 1-21 |
| P,X | WO 03/040691 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 15. Mai 2003 (2003-05-15) Ansprüche 1-29 | 1-21 |
| P,X | VARO NEREA ET AL: "Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes." CIRCULATION. UNITED STATES 2 SEP 2003, Bd. 108, Nr. 9, 2. September 2003 (2003-09-02), Seiten 1049-1052, XP002273047 ISSN: 1524-4539 das ganze Dokument | 1-21 |
| A | WO 98/20155 A (NEW YORK SOCIETY FOR THE RUPTU) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument | 1-21 |
| X | WO 02/056015 A (BAYES-GENIS ANTONIO ; SCHWARTZ ROBERT S (US); HOLMES DAVID R (US); MAY) 18. Juli 2002 (2002-07-18) Seite 2, Zeile 4 - Zeile 10 Seite 5, Zeile 7 - Zeile 12 Seite 6, Zeile 5 - Zeile 9 Seite 10, Zeile 25 - Seite 11, Zeile 14 Seite 12, Zeile 21 - Seite 13, Zeile 19 Ansprüche 1-4,7-16 | 1-21 |
| | -/-- | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| C,(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | <p>BAYES-GENIS ANTONI ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Bd. 345, Nr. 14, 4. Oktober 2001 (2001-10-04), Seiten 1022-1029, XP002909589 ISSN: 0028-4793 Zusammenfassung Seite 1023, Spalte 1, Absatz 6</p> | 1-21 |
| X | <p>KHOSRAVI JAVAD ET AL: "Pregnancy associated plasma protein-A: Ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease." CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 7, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 531-538, XP001188913 ISSN: 0009-9120 Zusammenfassung Seite 532, Spalte 1, Absatz 3 - Spalte 2, Absatz 1 Seite 533, Spalte 1, Absatz 3 - Absatz 5</p> | 1-21 |
| X | <p>DENKTAS A E ET AL: "PREGNANCY ASSOCIATED PLASMA PROTEIN-A LEVELS ARE ELEVATED IN PATIENTS WITH UNSTABLE ANGINA" EUROPEAN HEART JOURNAL, THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, XX, Bd. 23, Nr. ABSTR SUPPL, 31. August 2002 (2002-08-31), Seite 466, XP008028493 ISSN: 0195-668X Zusammenfassung</p> | 1-21 |
| X | <p>HAJEK P ET AL: "Pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A) in determination of unstable coronary plaque." EUROPEAN HEART JOURNAL, Bd. 23, Nr. Abstract Supplement, 2002, Seite 293, XP008028492 & CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; BERLIN, GERMANY; AUGUST 31-SEPTEMBER 04, 2002 ISSN: 0195-668X Zusammenfassung</p> | 1-21 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| C,(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|---------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beitr. Anspruch Nr. |
| X | FUTTERMAN LAURIE G ET AL: "Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A." AMERICAN JOURNAL OF CRITICAL CARE : AN OFFICIAL PUBLICATION, AMERICAN ASSOCIATION OF CRITICAL-CARE NURSES. MAR 2002, Bd. 11, Nr. 2, März 2002 (2002-03), Seiten 168-172, XP008031012 ISSN: 1062-3264 Seite 170, Spalte 1, Absatz 1 - Absatz 2 | 1-21 |
| A | WO 01/56593 A (FLANDERS INTERUNIVERSITY INST ; CARMELIET PETER (BE); LEUVEN RES AND D) 9. August 2001 (2001-08-09) Ansprüche 1,4,5 | 1-21 |
| A | MAGLIONE D ET AL: "RECOMBINANT PRODUCTION OF PlGF-1 AND ITS ACTIVITY IN ANIMAL MODELS" FARMACO, SOCIETA CHIMICA ITALIANA, PAVIA, IT, Bd. 55, 2000, Seiten 165-167, XP001000056 ISSN: 0014-827X Seite 166, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 167, Spalte 2, Absatz 2 | 1-21 |
| A | LUTTUN A ET AL: "Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Fli1" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 8, Nr. 8, August 2002 (2002-08), Seiten 831-840, XP002258708 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument | 1-21 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/12531

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,
no additional fees are to be refunded.

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 03 /12531

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-21 (teilweise)

Verfahren zur Analyse von Proben in Zusammenhang mit akuten Kardiovaskulären Erkrankungen, umfassend die folgenden Schritte: (a) die Gewinnung einer Probe; (b) die Bestimmung der Konzentration von mindestens lösliches CD40-Ligand; (c) gegebenenfalls die Bestimmung der Konzentration mindestens eines weiteren Markers ausgewählt aus Troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP und weiteren entzündlichen Markern, und (d) das Vergleich dieser Ergebnisse mit Referenzwerten. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

2. Ansprüche: 1-21 (teilweise)

Verfahren zur Analyse von Proben in Zusammenhang mit akuten Kardiovaskulären Erkrankungen, umfassend die folgenden Schritte: (a) die Gewinnung einer Probe; (b) die Bestimmung der Konzentration von mindestens PAPP-A; (c) gegebenenfalls die Bestimmung der Konzentration mindestens eines weiteren Markers ausgewählt aus Troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP und weiteren entzündlichen Markern, und (d) das Vergleich dieser Ergebnisse mit Referenzwerten. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

3. Ansprüche: 1-21 (teilweise)

Verfahren zur Analyse von Proben in Zusammenhang mit akuten Kardiovaskulären Erkrankungen, umfassend die folgenden Schritte: (a) die Gewinnung einer Probe; (b) die Bestimmung der Konzentration von mindestens PIGF; (c) gegebenenfalls die Bestimmung der Konzentration mindestens eines weiteren Markers ausgewählt aus Troponin T, MPO, NT-proBNP, VEGF, BNP und weiteren entzündlichen Markern, und (d) das Vergleich dieser Ergebnisse mit Referenzwerten. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/12531

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 03040691 | A | 15-05-2003 | WO 03040691 A2 | 15-05-2003 |
| | | | US 2003152566 A1 | 14-08-2003 |
| WO 9820155 | A | 14-05-1998 | CA 2271243 A1 | 14-05-1998 |
| | | | WO 9820155 A1 | 14-05-1998 |
| | | | US 6117642 A | 12-09-2000 |
| WO 02056015 | A | 18-07-2002 | US 2002132278 A1 | 19-09-2002 |
| | | | CA 2434512 A1 | 18-07-2002 |
| | | | EP 1350109 A1 | 08-10-2003 |
| | | | WO 02056015 A1 | 18-07-2002 |
| | | | US 2003003521 A1 | 02-01-2003 |
| WO 0156593 | A | 09-08-2001 | AU 3024301 A | 14-08-2001 |
| | | | AU 4643501 A | 14-08-2001 |
| | | | WO 0156593 A2 | 09-08-2001 |
| | | | WO 0157181 A2 | 09-08-2001 |
| | | | EP 1253935 A2 | 06-11-2002 |
| | | | JP 2003521522 T | 15-07-2003 |
| US 2003054995 A1 | 20-03-2003 | | | |

フロントページの続き

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

(72) 発明者 アンドレアス・エム・ツァイエル
ドイツ連邦共和国 6 0 5 9 4 フランクフルト・アム・マイン・ドイチュヘルンウーファー 4 7

(72) 発明者 クリストファー・ヘーシェン
ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 1 フランクフルト・アム・マイン・ヴォークシュトラッセ 5

(72) 発明者 シュテファン・ディメラ
ドイツ連邦共和国 6 0 5 9 4 フランクフルト・アム・マイン・ドイチュヘルンウーファー 4 7

(72) 発明者 クリティアン・ハム
ドイツ連邦共和国 6 1 3 5 0 パートホムブルク・フィロゾーフェンヴェーク 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB20 CA26 CB01 DA36 DA77 FB01 FB03 FB07 JA01
4C085 AA14 BB11 BB41 CC23

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | SCD40L , PAPP-A和胎盘生长因子 (PIGF) 作为心血管疾病中生化标志物的组合 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006508367A | 公开(公告)日 | 2006-03-09 |
| 申请号 | JP2004570272 | 申请日 | 2003-11-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 日德白令maru堡ゲゼルシャフトミツトベシユレンクテルハフツング | | |
| 申请(专利权)人(译) | 德灵公司马尔堡 , Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司 | | |
| [标]发明人 | アンドレーアスエムツアイエル クリストファーヘーシェン シュテファンディメラ クリスティアンハム | | |
| 发明人 | アンドレーアス・エム・ツアイエル クリストファー・ヘーシェン シュテファン・ディメラ クリスティアン・ハム | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K39/395 A61P7/02 G01N33/68 C07K14/705 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6893 C07K14/70575 G01N2333/96486 G01N2800/32 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D A61K39/395.M A61P7/02 G01N33/68 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/JA01 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/CC23 | | |
| 优先权 | 10253525 2002-11-16 DE 10316059 2003-04-08 DE | | |
| 其他公开文献 | JP4741249B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明中，在患心血管疾病的患者中用作诊断工具和预后工具，它涉及新的标志物和它们的血管炎症的组合。这些标记也用作工具，以促进对这种类型的疾病的治疗的活性成分的选择，它构成用于心血管疾病的治疗的起点。本发明还涉及用动脉硬化的进展有关的负面事件的个体风险状况的产生。

| | sCD40L 低い | sCD40L 高い |
|--------------------------|------------|-------------|
| n | 323 | 221 |
| 男性 | 73.3% | 70.2% |
| 年齢 | 60.5 ± 9.9 | 62.3 ± 10.5 |
| 既往歴 | | |
| 4週間より長きにわたる アンギナ | 57.5% | 54.6% |
| 梗塞 14~30日間 | 3.5% | 2.4% |
| 30日より長い梗塞 | 19.5% | 21.0% |
| PTCA | 19.1% | 15.9% |
| CABG | 3.5% | 3.4% |
| リスク因子 | | |
| 糖尿病 | 12.1% | 9.6% |
| 高コレステロール血症 | 32.5% | 33.6% |
| 高血圧 | 39.3% | 34.5% |
| 喫煙者 | 40.9% | 42.1% |
| 登録前の投薬 | | |
| アスピリン | 98.1% | 97.7% |
| ヘパリン 静脈内 | 99.2% | 98.6% |
| ニトレート 静脈内 | 98.8% | 99.7% |
| βブロッカー | 65.0% | 61.4% |
| Ca ²⁺ アンタゴニスト | 56.0% | 55.2% |