

(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2014-523533  
(P2014-523533A)

(43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 21/27 A	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	2 G O 5 9
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	
	GO 1 N 21/64 E	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 76 頁)

(21) 出願番号 特願2014-519085 (P2014-519085)  
 (86) (22) 出願日 平成24年7月6日(2012.7.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月31日(2014.1.31)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/045832  
 (87) 国際公開番号 W02013/006828  
 (87) 国際公開日 平成25年1月10日(2013.1.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/505,481  
 (32) 優先日 平成23年7月7日(2011.7.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514005652  
 スクリップス ヘルス  
 アメリカ合衆国 92121 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイ  
 ント・コート 4275  
 (71) 出願人 505060347  
 ジャンセン ダイアグノスティックス, エ  
 ルエルシー  
 アメリカ合衆国 08869 ニュージャ  
 ーシー州 ラリタン 202 ユーエス・  
 ハイウェイ 700  
 (74) 代理人 100082072  
 弁理士 清原 義博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管障害を分析する方法及びその用途

(57) 【要約】

循環内皮細胞 (CEC) を含む組成物、システム及び方法が提供される。本明細書に記載される前記組成物は、CECの分析を許容する形態の組成物を含む、単離したCECを用いる。本明細書中に記載される前記システムは、単離したCEC及び分析ツール又は分析ツールからのアウトプットを用いる。本明細書中に記載される前記方法は、医療従事者又はCECドナーへ、CECドナーの心血管の健康に関する情報を提供するための単離したCEC及び分析ツールの使用に関する。よって、本明細書中に記載される前記化合物、前記システム及び前記方法は転換 (非単離CECから単離CEC、又は単離CECから分析CEC) 及び機械 (単離ツール及び分析ツール) の両方を含む。

【選択図】 図 1

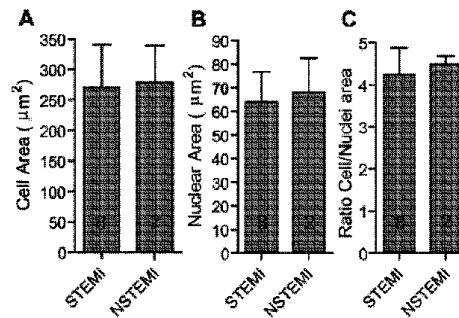


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

心血管障害を分析するためのシステムであって、該システムは、

(a) 個体から得られた、循環内皮細胞 (CEC) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離した CEC の一群、及び

(b) CEC の一群中の単一の CEC の形態的特徴を視覚化するために十分な倍率を有している顕微鏡、を含み、

ここで前記形態的特徴は、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はこれらの組み合わせから選択されるシステム。

**【請求項 2】**

前記 CEC の一群又は前記 CEC の一群中の単一の CEC の拡大された画像を取り込む及び保存するための電子メモリをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 記載のシステム。

10

**【請求項 3】**

コンピュータネットワークに随意に接続された、コンピュータ処理デバイスをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のシステム。

**【請求項 4】**

前記循環内皮細胞 (CEC) の一群の形態的特徴を分析するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のシステム。

20

**【請求項 5】**

前記循環内皮細胞 (CEC) の一群の前記形態的特徴を標準または対照と比較するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のシステム。

**【請求項 6】**

前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の濃度を決定するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のシステム。

**【請求項 7】**

前記循環内皮細胞の一群の前記濃度を標準または対照の前記濃度と比較するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 6 記載のシステム。

30

**【請求項 8】**

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するための機械をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載のシステム。

**【請求項 9】**

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載のシステム。

**【請求項 10】**

CD146 に特異的に結合するラベル、CD105 に特異的に結合するラベル、CD45 に特異的に結合するラベル、CD34 に特異的に結合するラベル、CD31 に特異的に結合するラベル、VEGF2 に特異的に結合するラベル、CD144 に特異的に結合するラベル、CD106 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載のシステム。

40

**【請求項 11】**

抗 - CD146 抗体、抗 - CD105 抗体、抗 - CD45 抗体、抗 - CD34 抗体、抗 - CD31 抗体、抗 - VEGF2 抗体、抗 - CD144 抗体、抗 - CD106 抗体又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載のシステム。

**【請求項 12】**

50

前記抗体が標識化されていることを特徴とする、請求項 10 記載のシステム。

【請求項 13】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されていることを特徴とする、請求項 10 記載のシステム。

【請求項 14】

前記個体又は前記個体を治療する医療専門家に、CECの一群の前記形態的特徴についての分析結果を送信するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のシステム。

【請求項 15】

前記個体又は前記個体を治療する医療専門家に、診断結果及び予後診断結果を送信するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 14 のいずれかに記載のシステム。

10

【請求項 16】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 乃至 15 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 17】

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 1 乃至 16 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 18】

前記心血管障害が、ST上昇型心筋梗塞 (STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞 (NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 乃至 17 のいずれかに記載のシステム。

20

【請求項 19】

前記心血管障害が虚血発作であることを特徴とする、請求項 1 乃至 18 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 20】

前記心血管障害がアテローム性動脈硬化であることを特徴とする、請求項 1 乃至 19 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 21】

治療を必要としている個体中の心血管障害を分析するための方法であって、該方法は、  
(a) 前記個体から得られた、循環内皮細胞 (CEC) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞 (CEC) の一群の拡大された画像を得る工程、及び

30

(b) 前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、  
を含む方法。

【請求項 22】

前記循環内皮細胞の一群の 2 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 21 記載の方法。

40

【請求項 23】

前記循環内皮細胞の一群の 3 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

前記循環内皮細胞の一群の 4 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】

前記形態的特徴が細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせであることを特徴とする、請求項 21 乃至 24 のいずれかに記載の方法。

50

**【請求項 26】**

コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールが、前記形態的特徴を比較することを特徴とする、請求項 21 乃至 25 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 27】**

前記比較に基づいて前記心血管障害に関して前記個体に診断又は予後の情報を提供する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 26 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 28】**

前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴が、

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた前記対照又は標準から逸脱している場合、又は

(b) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた前記対照又は標準と一致している場合、

心血管障害を持つ前記個体を診断する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 27 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 29】**

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準と比較した、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は

(b) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と比較した、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴との類似、

に基づいて前記個体の心血管障害の発症に対する感受性を予測する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 28 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 30】**

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は

(b) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、

に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 29 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 31】**

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は

(b) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、

に基づいて、前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 30 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 32】**

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は

(b) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、

に基づいた治療計画に対する個体の反応を予測する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 31 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 33】**

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域よりも大きい前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 34】**

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 35】

前記逸脱が、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 36】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 37】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 38】

前記逸脱が、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 39】

前記逸脱が、核領域に対する細胞領域の比の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 40】

前記逸脱が、核数の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 41】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 42】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 43】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 44】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 27 乃至 32 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 45】

(a) 前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度、及び  
(b) 対照又は標準の前記濃度、  
を比較する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 44 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 46】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 45 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 47】

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 21 乃至 46 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 48】

50

C D 1 4 6 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 5 に特異的に結合するラベル、C D 4 5 に特異的に結合するラベル、C D 3 4 に特異的に結合するラベル、C D 3 1 に特異的に結合するラベル、V E G F 2 に特異的に結合するラベル、C D 1 4 4 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 6 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 2 1 乃至 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

抗 - C D 1 4 6 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 2 1 乃至 4 8 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 5 0】

前記抗体が標識化されていることを特徴とする、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されていることを特徴とする、請求項 4 9 又は 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、  
( a ) 磁気又は蛍光で標識化された抗 - C D 1 4 6 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び  
( b ) 前記抗 - C D 1 4 6 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、C D 1 4 6 + 細胞の一群を作成する工程、  
を含むことを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 1 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5 3】

蛍光で標識化された、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体、D A P I 又はその組み合わせに前記 C D 1 4 6 + 細胞の一群を接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗 - C D 4 5 抗体が特異的に結合した C D 1 4 6 + 細胞を廃棄し、抗 - C D 4 5 抗体が結合しなかった C D 1 4 6 + 細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 5 2 又は 5 3 記載の方法。

30

【請求項 5 5】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

前記心血管障害が、S T 上昇型心筋梗塞 ( S T E M I )、非 S T 上昇型心筋梗塞 ( N S T E M I )、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 5 8】

前記心血管障害が、虚血発作であることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 9】

前記個体が、心血管障害と診断されていることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 0】

50

前記個体が、心血管障害である疑いがあることを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 1】

前記個体が、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中への痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の一部の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目に見ることに対する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示すことを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 2】

前記個体が、心血管障害の症状を示さないことを特徴とする、請求項 2 1 乃至 5 8 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 6 3】

治療を必要としている個体中の心血管障害を診断するための方法であって、該方法は、  
( a ) 前記個体から得られた、循環内皮細胞 ( C E C ) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞 ( C E C ) の一群の拡大された画像を得る工程、

( b ) 前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び

( c ) 循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴が、( i ) 健康な個体又は健康な個体一群から得られた対照又は標準から逸脱している場合、又は( i i ) 現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体一群から得られた対照又は標準と一致している場合、個体中の心血管障害の診断をする工程、

20

を含む方法。

【請求項 6 4】

前記循環内皮細胞の一群の 2 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 5】

前記循環内皮細胞の一群の 3 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 6】

前記循環内皮細胞の一群の 4 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 6 3 記載の方法。

30

【請求項 6 7】

前記形態的特徴が、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせであることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 6 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 8】

コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールが、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較することを特徴とする、請求項 6 3 乃至 6 7 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6 9】

前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

前記診断に基づいて、前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 1】

逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体一群から得られた対照又は標準からの C E C の該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 7 2】

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 30 % 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7 3】

前記逸脱が、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7 4】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 7 5】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域の平均よりも少なくとも約 30 % 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7 6】

前記逸脱が、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7 7】

前記逸脱が、核領域に対する細胞領域の比の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 7 8】

前記逸脱が、核数の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7 9】

前記逸脱が、核数の平均が一つの C E C につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 8 0】

前記逸脱が、核数の平均が一つの C E C につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8 1】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8 2】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 7 0 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 8 3】

( a ) 前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度、及び  
( b ) 対照又は標準の前記濃度、  
を比較する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 2 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8 4】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8 5】

50

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 6】

C D 1 4 6 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 5 に特異的に結合するラベル、C D 4 5 に特異的に結合するラベル、C D 3 4 に特異的に結合するラベル、C D 3 1 に特異的に結合するラベル、V E G F 2 に特異的に結合するラベル、C D 1 4 4 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 6 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 8 7】

抗 - C D 1 4 6 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 8】

前記抗体が標識化されていることを特徴とする、請求項 8 7 記載の方法。

【請求項 8 9】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されていることを特徴とする、請求項 8 7 又は 8 8 記載の方法。

20

【請求項 9 0】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、( a ) 磁気又は蛍光で標識化された抗 - C D 1 4 6 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び ( b ) 前記抗 - C D 1 4 6 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、C D 1 4 6 + 細胞の一群を作成する工程、を含むことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 8 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 1】

蛍光で標識化された、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体、D A P I 又はその組み合わせに、前記 C D 1 4 6 + 細胞の一群を接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 9 0 記載の方法。

30

【請求項 9 2】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗 - C D 4 5 抗体が特異的に結合した C D 1 4 6 + 細胞を廃棄し、抗 - C D 4 5 抗体が結合しなかった C D 1 4 6 + 細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 9 0 又は 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 4】

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 2 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 9 5】

前記心血管障害が、S T 上昇型心筋梗塞 ( S T E M I )、非 S T 上昇型心筋梗塞 ( N S T E M I )、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 6】

前記心血管障害が、虚血発作であることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 7】

前記個体が、心血管障害と診断されていることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 6 のい

50

ずれかに記載の方法。

【請求項 9 8】

前記個体が、心血管障害である疑いがあることを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 9】

前記個体が、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中への痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに対する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示すことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 6 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 0 0】

前記個体が、心血管障害の症状を示さないことを特徴とする、請求項 6 3 乃至 9 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 1】

個体の心血管障害の発症に対する感受性があるか否かを予測する方法であって、該方法は、

( a ) 前記個体から得られた、循環内皮細胞 ( C E C ) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞 ( C E C ) の一群の拡大された画像を得る工程、

( b ) 前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び

20

( c ) 循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、( i ) 健康な個体又は健康な個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は( i i ) 現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との一致、に基づいて前記個体の心血管障害の発症に対する感受性があるか否かを予測する工程、

を含む方法。

【請求項 1 0 2】

前記循環内皮細胞の一群の 2 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 記載の方法。

30

【請求項 1 0 3】

前記循環内皮細胞の一群の 3 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記循環内皮細胞の一群の 4 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記形態的特徴が、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 0 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 0 6】

コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較することを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 0 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む、請求項 1 0 1 乃至 1 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさ

50

らに含むことを特徴とする、請求項 101 乃至 107 のいずれかに記載の方法。

【請求項 109】

逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 110】

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 111】

前記逸脱が、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 112】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 113】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 114】

前記逸脱が、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 115】

前記逸脱が、核領域に対する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 116】

前記逸脱が、核数の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 117】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 118】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 119】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 120】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 101 乃至 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 121】

(a) 前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度、及び  
(b) 対照又は標準の前記濃度を比較する工程、  
をさらに含むことを特徴とする、請求項 101 乃至 120 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 2 2】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 3】

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 4】

C D 1 4 6 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 5 に特異的に結合するラベル、C D 4 5 に特異的に結合するラベル、C D 3 4 に特異的に結合するラベル、C D 3 1 に特異的に結合するラベル、V E G F 2 に特異的に結合するラベル、C D 1 4 4 に特異的に結合するラベル、C D 1 0 6 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 1 2 5】

抗 - C D 1 4 6 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 6】

前記抗体が標識化されることを特徴とする、請求項 1 2 5 記載の方法。

20

## 【請求項 1 2 7】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されることを特徴とする、請求項 1 2 5 又は 1 2 6 記載の方法。

## 【請求項 1 2 8】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、

( a ) 磁気又は蛍光で標識化された抗 - C D 1 4 6 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び

( b ) 前記抗 - C D 1 4 6 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、C D 1 4 6 + 細胞の一群を作成する工程、

30

を含むことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 2 7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 9】

幾蛍光で標識化された、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体、D A P I 又はその組み合わせに前記 C D 1 4 6 + 細胞の一群を接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 2 8 記載の方法。

## 【請求項 1 3 0】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗 - C D 4 5 抗体が特異的に結合した C D 1 4 6 + 細胞を廃棄し、抗 - C D 4 5 抗体が結合しなかった C D 1 4 6 + 細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 2 8 又は 1 2 9 記載の方法。

40

## 【請求項 1 3 1】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3 2】

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3 3】

前記心血管障害が、S T 上昇型心筋梗塞 ( S T E M I )、非 S T 上昇型心筋梗塞 ( N S T E M I )、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求

50

項 1 0 1 乃至 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記心血管障害が、虚血発作であることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記個体が、心血管障害と診断されていることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記個体が、心血管障害である疑いがあることを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 3 7】

前記個体が、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中の痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難；片目又は両目で見ることにに対する困難；めまい；バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示すことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記個体が、心血管障害の症状を示さないことを特徴とする、請求項 1 0 1 乃至 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 9】

心血管障害のための治療計画に対する個体の反応を予測する方法であって、該方法は、  
 ( a ) 前記個体から得られた、循環内皮細胞 ( C E C ) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞 ( C E C ) の一群の拡大された画像を得る工程、

20

( b ) 前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び

( c ) 循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、( a ) 健康な個体又は健康な個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は ( b ) 現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との一致、に基づいて、治療計画に対する前記個体の反応を予測する工程、

30

を含む方法。

【請求項 1 4 0】

前記循環内皮細胞の一群の 2 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 3 9 記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記循環内皮細胞の一群の 3 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 3 9 記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記循環内皮細胞の一群の 4 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 3 9 記載の方法。

40

【請求項 1 4 3】

前記形態的特徴が、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 4】

コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較することを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 5】

50

前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 144 のいずれかに記載の方法。

【請求項 146】

前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 144 のいずれかに記載の方法。

【請求項 147】

逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 148】

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 149】

前記逸脱が、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 150】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 151】

前記逸脱が、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 152】

前記逸脱が、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 153】

前記逸脱が、核領域に対する細胞領域の比の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 154】

前記逸脱が、核数の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 155】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 156】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 157】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

【請求項 158】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 139 乃至 146 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 159】

(a) 前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度、及び  
 (b) 対照又は標準の前記濃度、  
 を比較する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 158 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 160】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 159 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 161】

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 160 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 162】

CD146 に特異的に結合するラベル、CD105 に特異的に結合するラベル、CD45 に特異的に結合するラベル、CD34 に特異的に結合するラベル、CD31 に特異的に結合するラベル、VEGF2 に特異的に結合するラベル、CD144 に特異的に結合するラベル、CD106 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 160 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 163】

抗-CD146 抗体、抗-CD105 抗体、抗-CD45 抗体、抗-CD34 抗体、抗-CD31 抗体、抗-VEGF2 抗体、抗-CD144 抗体、抗-CD106 抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 162 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 164】

前記抗体が標識化されることを特徴とする、請求項 163 記載の方法。

## 【請求項 165】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されることを特徴とする、請求項 163 又は 164 記載の方法。

## 【請求項 166】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程が、CD146 + 細胞の一群を作成するため、

30

(a) 磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び

(b) 前記抗-CD146 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離する工程、  
 を含むことを特徴とする、請求項 139 乃至 165 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 167】

蛍光で標識化された、抗-CD45 抗体、抗-CD105 抗体、抗-CD34 抗体、抗-CD31 抗体、抗-VEGF2 抗体、抗-CD144 抗体、抗-CD106 抗体、DAPI 又はその組み合わせに前記 CD146 + 細胞の一群を接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 166 記載の方法。

40

## 【請求項 168】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45 抗体が特異的に結合した CD146 + 細胞を廃棄し、抗-CD45 抗体が結合しなかった CD146 + 細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 166 又は 167 記載の方法。

## 【請求項 169】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 139 乃至 168 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 170】

50

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記心血管障害が、ST 上昇型心筋梗塞 (STEMI)、非 ST 上昇型心筋梗塞 (NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記心血管障害が、虚血発作であることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 3】

前記個体が心血管障害と診断されていることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記個体が、心血管障害である疑いがあることを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 5】

前記個体が、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中での痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示すことを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 6】

前記個体が、心血管障害の症状を示さないことを特徴とする、請求項 1 3 9 乃至 1 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 7】

治療を必要としている個体に心血管障害のための治療計画を処方する方法であって、該方法は、

(a) 前記個体から得られた、循環内皮細胞 (CEC) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞 (CEC) の一群の拡大された画像を得る工程、

(b) 前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び

(c) 循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、(a) 健康な個体又は健康な個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は (b) 現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との一致に基づいて、治療計画を処方する工程、

を含む方法。

【請求項 1 7 8】

前記循環内皮細胞の一群の 2 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 7 7 記載の方法。

【請求項 1 7 9】

前記循環内皮細胞の一群の 3 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 7 7 記載の方法。

【請求項 1 8 0】

前記循環内皮細胞の一群の 4 つの形態的特徴を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 7 7 記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記形態的特徴が、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 7 7 乃至 1 8 0 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 182】

コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールが、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較することを特徴とする、請求項 177 乃至 181 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 183】

逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 184】

前記逸脱が、細胞領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 185】

前記逸脱が、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 186】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 187】

前記逸脱が、核領域の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域の平均よりも少なくとも約 30% 大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 188】

前記逸脱が、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 189】

前記逸脱が、核領域に対する細胞領域の比の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 190】

前記逸脱が、核数の平均が健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 191】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 192】

前記逸脱が、核数の平均が一つの CEC につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 193】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 194】

前記逸脱が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの CEC の核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 182 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 195】

(a) 前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度、及び  
 (b) 対照又は標準の前記濃度、  
 を比較する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 194 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 196】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 195 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 197】

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 196 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 198】

CD146 に特異的に結合するラベル、CD105 に特異的に結合するラベル、CD45 に特異的に結合するラベル、CD34 に特異的に結合するラベル、CD31 に特異的に結合するラベル、VEGF2 に特異的に結合するラベル、CD144 に特異的に結合するラベル、CD106 に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 197 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 199】

抗-CD146 抗体、抗-CD105 抗体、抗-CD45 抗体、抗-CD34 抗体、抗-CD31 抗体、抗-VEGF2 抗体、抗-CD144 抗体、抗-CD106 抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 198 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 200】

前記抗体が標識化されることを特徴とする、請求項 199 記載の方法。

## 【請求項 201】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されることを特徴とする、請求項 199 又は 200 記載の方法。

## 【請求項 202】

前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程が、  
 (a) 磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び  
 (b) 前記抗-CD146 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、  
 を含むことを特徴とする、請求項 177 乃至 201 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 203】

蛍光で標識化された、抗-CD45 抗体、抗-CD105 抗体、抗-CD34 抗体、抗-CD31 抗体、抗-VEGF2 抗体、抗-CD144 抗体、抗-CD106 抗体、DAPI 又はその組み合わせに前記 CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 202 記載の方法。

40

## 【請求項 204】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45 抗体が特異的に結合した CD146+細胞を廃棄し、抗-CD45 抗体が結合しなかった CD146+細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 202 又は 203 記載の方法。

## 【請求項 205】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 177 乃至 204 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 206】

50

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 177 乃至 204 のいずれかに記載の方法。

【請求項 207】

前記心血管障害が、ST 上昇型心筋梗塞 (STEMI)、非 ST 上昇型心筋梗塞 (NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 177 乃至 204 のいずれかに記載の方法。

【請求項 208】

前記心血管障害が、虚血発作であることを特徴とする、請求項 177 乃至 204 のいずれかに記載の方法。

【請求項 209】

前記個体が、心血管障害と診断されていることを特徴とする、請求項 177 乃至 208 のいずれかに記載の方法。

【請求項 210】

前記個体が心血管障害である疑いがあることを特徴とする、請求項 177 乃至 208 のいずれかに記載の方法。

【請求項 211】

前記個体が、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中への痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示すことを特徴とする、請求項 177 乃至 208 のいずれかに記載の方法。

【請求項 212】

前記個体が、心血管障害の症状を示さないことを特徴とする、請求項 177 乃至 208 のいずれかに記載の方法。

【請求項 213】

単離した循環内皮細胞であって、該単離した循環内皮細胞は、

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は

(b) 現在又は過去に對象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、

少なくとも 1 つの形態的特徴を含む、単離した循環内皮細胞。

【請求項 214】

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は

(b) 現在又は過去に對象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、

2 つの形態的特徴を含むことを特徴とする、請求項 213 記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項 215】

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は

(b) 現在又は過去に對象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、

3 つの形態的特徴を含むことを特徴とする、請求項 213 記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項 216】

(a) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は

(b) 現在又は過去に對象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、

10

20

30

40

50

4つの形態的特徴を含むことを特徴とする、請求項213記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項217】

逸脱が、定性的偏差、定量的偏差又はその組み合わせを含むことを特徴とする、請求項213乃至216のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項218】

前記形態的特徴が、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数から選択されることを特徴とする、請求項213乃至217のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項219】

前記単離された循環内皮細胞が2つの核を含むことを特徴とする、請求項213乃至218のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項220】

前記単離された循環内皮細胞が3つの核を含むことを特徴とする、請求項213乃至219のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項221】

前記単離された循環内皮細胞の前記核領域が、対照又は標準の前記核領域よりも少なくとも約30%大きいことを特徴とする、請求項213乃至220のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項222】

前記単離された循環内皮細胞の前記細胞領域が、対照又は標準の前記細胞領域よりも少なくとも約30%大きいことを特徴とする、請求項213乃至221のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項223】

前記単離された循環内皮細胞が、心血管障害であると診断された個体から単離したものであることを特徴とする、請求項213乃至222のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項224】

前記単離された循環内皮細胞が、心血管障害である疑いがある個体から単離したものであることを特徴とする、請求項213乃至222のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項225】

前記単離された循環内皮細胞が、心血管障害の症状を示さない個体から単離したものであることを特徴とする、請求項213乃至222のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項226】

前記循環内皮細胞が、機械の使用により単離されたものであることを特徴とする、請求項213乃至225のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項227】

前記循環内皮細胞が、  
 (a) 磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び  
 (b) 前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、  
 により単離されることを特徴とする、請求項213乃至226のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

【請求項228】

蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含むこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする、請求項 2 2 7 記載の工程をさらに含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 2 2 9】

単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗 - C D 4 5 抗体が特異的に結合した C D 1 4 6 + 細胞を廃棄し、抗 - C D 4 5 抗体が結合しなかった C D 1 4 6 + 細胞を保持する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 2 2 6 又は 2 2 7 記載の工程をさらに含んでなることを特徴とする方法。

【請求項 2 3 0】

結合した抗 - C D 1 4 6 抗体、結合した抗 - C D 1 0 5 抗体、結合した抗 - C D 3 4 抗体、結合した抗 - C D 3 1 抗体、結合した抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体、D A P I 又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項 2 1 3 乃至 2 2 6 のいずれかに記載の単離した循環内皮細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

< 相互参照 >

本出願は、2 0 1 1 年 7 月 7 日に本願の米国仮特許出願第 6 1 / 5 0 5 , 4 8 1 ( 発明の名称「心血管障害を分析する方法及びその用途」) の優先権を主張するものであり、その全体が引用によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

急性心筋梗塞 ( M I ) 及び虚血性脳梗塞は未だに世界的に主要な死因及び障害である。米国では毎年 2 5 0 万人以上が、新たな又は再発した心臓発作又は虚血性脳梗塞を経験する。現在、安定型冠動脈疾患 ( C A D ) は、機能的ストレステスト及び冠動脈硬化を通じて容易に診断される。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 3】

本明細書中には、特定の実施形態において、心血管障害を分析するためのシステムが開示されており、該システムは、( a ) 個体から得られた、循環内皮細胞 ( C E C ) 及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離した C E C の一群、及び ( b ) C E C の一群中の単一の C E C の形態的特徴を視覚化するために十分な倍率を有している顕微鏡、を含み、ここで前記形態的特徴は、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はこれらの組み合わせから選択される。

30

幾つかの実施形態では、前記システムは前記 C E C の一群又は前記 C E C の一群中の単一の C E C の拡大された画像を取り込む及び保存するための電子メモリをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムはコンピュータネットワークに随意に接続された、コンピュータ処理デバイスをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは前記循環内皮細胞 ( C E C ) の一群の形態的特徴を分析するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

40

幾つかの実施形態では、前記システムは前記循環内皮細胞 ( C E C ) の一群の前記形態的特徴を標準または対照と比較するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の濃度を決定するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは前記循環内皮細胞の一群の前記濃度を標準または対照の前記濃度と比較するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

50

幾つかの実施形態では、前記システムは前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するための機械をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムはCD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせをさらに含む。

10

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記システムは前記個体又は前記個体を治療する医療専門家に、CECの一群の前記形態的特徴についての分析結果を送信するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記システムは前記個体又は前記個体を治療する医療専門家に、診断結果及び予後診断結果を送信するための、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールをさらに含む。

20

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害はアテローム性動脈硬化である。

#### 【0004】

30

本明細書中には、特定の実施形態において、治療を必要としている個体中の心血管障害を分析するための方法が開示されており、該方法は、(a)前記個体から得られた、循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞(CEC)の一群の拡大された画像を得る工程、及び(b)前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の2つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の3つの形態的特徴を比較する工程を含む。

40

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の4つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせである。

幾つかの実施形態では、コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記形態的特徴を比較する。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記比較に基づいて前記心血管障害に関して前記個体に診断又は予後の情報を提供する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴が、(a)健康な個体又は健康な個体の一群から得られた前記対照又は標準から逸脱している場

50

合、又は ( b ) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた前記対照又は標準と一致している場合、心血管障害を持つ前記個体を診断する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準と比較した、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は ( b ) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と比較した、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、に基づいて前記個体の心血管障害の発症に対する感受性を予測する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は ( b ) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は ( b ) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似、に基づいて、前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準に対する、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の逸脱、又は ( b ) 現在又は過去に前記心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準との、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の類似に基づいた治療計画に対する個体の反応を予測する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該細胞領域の平均よりも少なくとも約 3 0 % 大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が約  $100 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域の平均よりも少なくとも約 3 0 % 大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が約  $40 \mu\text{m}^2$  よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域に対する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からの C E C の該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つの C E C につき少なくとも 2 つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つの C E C につき少なくとも 3 つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対

10

20

30

40

50

照又は標準からのCECの細胞形状と比較して、異常な細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの核形状と比較して、異常な核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記方法は(a)前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度及び(b)対照又は標準の前記濃度を比較する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45抗体が特異的に結合したCD146+細胞を廃棄し、抗-CD45抗体が結合しなかったCD146+細胞を保持する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害と診断されている。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害である疑いがある。

幾つかの実施形態では、前記個体は、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中での痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示す。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害の症状を示さない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

本明細書中には、特定の実施形態において、治療を必要としている個体中の心血管障害を診断するための方法が開示されており、該方法は、(a)前記個体から得られた、循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞(CEC)の一群の拡大された画像を得る工程、(b)前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び(c)循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴が、(i)健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している場合、又は(ii)現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と一致している場合、個体中の心血管障害の診断をする工程、を含む。

10

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の2つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の3つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の4つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせである。

幾つかの実施形態では、コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する。

20

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

30

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が約 $100\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が約 $40\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

40

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域に対する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも2つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも3つ

50

である、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記方法は(a)前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度及び(b)対照又は標準の前記濃度を比較する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45抗体が特異的に結合したCD146+細胞を廃棄し、抗-CD45抗体が結合しなかったCD146+細胞を保持する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害と診断されている。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害である疑いがある。

幾つかの実施形態では、前記個体は、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中での痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその

10

20

30

40

50

組み合わせから選択される症状を示す。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害の症状を示さない。

【0006】

本明細書中には、特定の実施形態において、個体の心血管障害の発症に対する感受性があるか否かを予測する方法が開示されており、該方法は、(a)前記個体から得られた、循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞(CEC)の一群の拡大された画像を得る工程、(b)前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び(c)循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、(i)健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は(ii)現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との類似、に基づいて心血管障害の発症に対して前記個体が感受性を有するか否かを予測する工程、を含む。

10

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の2つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の3つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の4つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせである。

20

幾つかの実施形態では、コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

30

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が約100 $\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

40

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が約40 $\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域に対する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

50

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも2つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも3つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

10

幾つかの実施形態では、前記方法は(a)前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度及び(b)対照又は標準の前記濃度を比較する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

20

幾つかの実施形態では、前記方法は、抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、を含む。

30

幾つかの実施形態では、前記方法は、蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45抗体が特異的に結合したCD146+細胞を廃棄し、抗-CD45抗体が結合しなかったCD146+細胞を保持する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

40

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害と診断されている。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害である疑いがある。

幾つかの実施形態では、前記個体は、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首

50

、顎、肩又は背中の痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示す。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害の症状を示さない。

【0007】

本明細書中には、特定の実施形態において、心血管障害のための治療計画に對する個体の反応を予測する方法が開示されており、該方法は、(a)前記個体から得られた、循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞(CEC)の一群の拡大された画像を得る工程、(b)前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び(c)循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、(a)健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は(b)現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との類似、に基づいて、治療計画に對する前記個体の反応を予測する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の2つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の3つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の4つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に對する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせである。

幾つかの実施形態では、コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が約 $100\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が約 $40\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域に對する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域に對する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも2つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも3つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

10

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記方法は(a)前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度及び(b)対照又は標準の前記濃度を比較する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

20

幾つかの実施形態では、前記方法は、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

30

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45抗体が特異的に結合したCD146+細胞を廃棄し、抗-CD45抗体が結合しなかったCD146+細胞を保持する工程をさらに含む。

40

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非ST上昇型心筋梗塞(NSTEMI)、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

50

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害と診断されている。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害である疑いがある。

幾つかの実施形態では、前記個体は、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中での痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに對する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示す。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害の症状を示さない。

#### 【0008】

本明細書中には、特定の実施形態において、治療を必要としている個体に心血管障害のための治療計画を処方する方法が開示されており、該方法は、(a)前記個体から得られた、循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞から選択された細胞を含む血液サンプルから単離された循環内皮細胞(CEC)の一群の拡大された画像を得る工程、(b)前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する工程、及び(c)循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴の、(a)健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴からの逸脱、又は(b)現在又は過去に心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準の前記形態的特徴との類似、に基づいて、治療計画を処方する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の2つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の3つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は前記循環内皮細胞の一群の4つの形態的特徴を比較する工程を含む。

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、循環内皮細胞数又はその組み合わせである。

幾つかの実施形態では、コンピュータ処理デバイスによって実行されるソフトウェアモジュールは、前記拡大された画像において、前記循環内皮細胞の一群の前記形態的特徴と、対照又は標準の同様の形態的特徴を比較する。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて治療計画を処方する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記診断に基づいて前記個体に処方された又は投与された治療計画を変更する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該細胞領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、細胞領域の平均が約100 $\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域の平均よりも少なくとも約30%大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域の平均が約40 $\mu\text{m}^2$ よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核領域に対する細胞領域の比の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核領域に対する細胞領域の比の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの該核数の平均よりも大きい、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも2つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、核数の平均が一つのCECにつき少なくとも3つである、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの細胞形状と比較して、異常な該細胞形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記逸脱は、健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準からのCECの核形状と比較して、異常な該核形状を持つ、前記循環内皮細胞の一群である。

幾つかの実施形態では、前記方法は(a)前記血液サンプルから単離した前記循環内皮細胞の一群の前記濃度及び(b)対照又は標準の前記濃度を比較する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離するために機械を使用する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、抗-CD146抗体、抗-CD105抗体、抗-CD45抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体又はその組み合わせを前記血液サンプルと接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記抗体は標識化される。

幾つかの実施形態では、前記抗体は蛍光部分又は磁気部分により標識化される。

幾つかの実施形態では、前記血液サンプルから前記循環内皮細胞の一群を単離する工程は、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程、を含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記方法は、単離された循環内皮細胞の一群を作成するために、抗-CD45抗体が特異的に結合したCD146+細胞を廃棄し、抗-CD45抗体が結合しなかったCD146+細胞を保持する工程をさらに含む。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、急性冠症候群である。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は、ST上昇型心筋梗塞(STEMI)、非S

10

20

30

40

50

T 上昇型心筋梗塞 ( N S T E M I )、不安定狭心症またはその組み合わせから選択される。

幾つかの実施形態では、前記心血管障害は虚血発作である。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害と診断されている。

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害である疑いがある。

幾つかの実施形態では、前記個体は、胸部の痛み又は不快感；胸部の痛みを伴う腕、首、顎、肩又は背中の痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に身体の片側の顔、腕又は足のしびれ又は脱力；錯乱、会話又は理解の困難；歩行困難、片目又は両目で見ることに対する困難、めまい、バランス又は協調の欠如；原因不明の激しい頭痛；又はその組み合わせから選択される症状を示す。

10

幾つかの実施形態では、前記個体は心血管障害の症状を示さない。

#### 【 0 0 0 9 】

本明細書中には、特定の実施形態において、循環内皮細胞 ( C E C ) を単離する工程が開示されており、該循環内皮細胞 ( C E C ) は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は ( b ) 現在又は過去に対象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、少なくとも1つの形態的特徴を含む。

幾つかの実施形態では、前記 C E C は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は ( b ) 現在又は過去に対象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、2つの形態的特徴を含む。

20

幾つかの実施形態では、前記 C E C は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は ( b ) 現在又は過去に対象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、3つの形態的特徴を含む。

幾つかの実施形態では、前記 C E C は、( a ) 健康な個体又は健康な個体の一群から得られた対照又は標準から逸脱している、又は ( b ) 現在又は過去に対象の心血管障害を持っていた個体又はその個体の一群から得られた対照又は標準と類似している、4つの形態的特徴を含む。

幾つかの実施形態では、逸脱は、定性的偏差、定量的偏差又はその組み合わせを含む。

30

幾つかの実施形態では、前記形態的特徴は細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数から選択される。

幾つかの実施形態では、単離された循環内皮細胞は2つの核を含む。

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞は3つの核を含む。

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞の前記核領域は、対照又は標準の前記核領域よりも少なくとも約30%大きい。

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞の前記細胞領域は、対照又は標準の前記細胞領域よりも少なくとも約30%大きい。

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞は、心血管障害であると診断された個体から単離したものである。

40

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞は、心血管障害である疑いがある個体から単離したものである。

幾つかの実施形態では、前記単離された循環内皮細胞は、心血管障害の症状を示さない個体から単離したものである。

幾つかの実施形態では、前記循環内皮細胞は、機械の使用により単離されたものである。

幾つかの実施形態では、前記循環内皮細胞は、( a ) 磁気又は蛍光で標識化された抗 - C D 1 4 6 抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、及び ( b ) 前記抗 - C D 1 4 6 抗体が特異的に結合した前記細胞を単離し、C D 1 4 6 + 細胞の一群を作成する工程、により単離される。

50

幾つかの実施形態では、前記循環内皮細胞は、CD146+細胞の一群を作成するため、(a)磁気又は蛍光で標識化された抗-CD146抗体と前記血液サンプルを接触させる工程、(b)前記抗-CD146抗体が特異的に結合した前記細胞を単離する工程、及び(c)蛍光で標識化された、抗-CD45抗体、抗-CD105抗体、抗-CD34抗体、抗-CD31抗体、抗-VEGF2抗体、抗-CD144抗体、抗-CD106抗体、DAPI又はその組み合わせに前記CD146+細胞の一群を接触させる工程、により単離される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、STEMIとNSTEMIの患者の例示的なCECのサイズ分析を提供する。(A)各患者群(平均±SD)からの細胞に対する細胞領域( $\mu\text{m}^2$ )。P値:0.8842。(B)各患者群(平均±SD)からの細胞に対する核領域( $\mu\text{m}^2$ )。P値:0.7114。(C)各患者群(平均±SD)からの細胞に対する細胞領域と核領域との間の比率。P値:0.6131。(A)-(C)に対する各バーの数字は、各群から分析された患者の数を表し;各対照個体からのすべてのCECおよび各MI患者から無作為に選択された50-100のCECが分析された。

10

【図2】図2は、健康な対照とSTEMIの患者におけるCECの例示の計数を提供する。(A)44の連続する健康な対照と50のSTEMIの患者におけるCECの定量化。健康な対照におけるCECの中央値(median number)は、2CEC/mlと5CEC/mlの、それぞれ、高四分位と低四分位を有する4CEC/mlであった。STEMIの患者におけるCECの中央値は、12CEC/mlと51CEC/ml( $p=1.1 \times 10^{-10}$ )の、それぞれ、高四分位と低四分位を有する19であった。(B)受信者操作特性曲線(AUC)の下の面積は、0.95に等しかった。赤い点は、16.5CEC/mlの分類閾値を表わし、これは、60%の感受性および98%の特異性に関係し;青は、9CEC/mlの分類閾値に等しく、90%の感受性および93%の特異性に関係し;および緑は、4.3CEC/mlの閾値に等しく、MIの事例あるいは対照を正確に分類するために、98%の感受性および64%の特異性を有する。

20

【図3】図3は、心筋壊死のCECカウントと典型的なマーカーとの間の例示的な相関性を提供する。(A)スピアマンの順位相関( $\rho$ )係数を使用して、MI患者におけるCECカウントは、最初の主要な血清心筋トロポニン値に対する相関性のために評価された。相関性の証拠は見られなかった( $\rho=0.02$ 、 $p=0.9$ )。(B)CECカウントと最初のCK-MB値との間の相関性は示されなかった( $\rho=0.03$ 、 $p=0.9$ )。

30

【図4】図4は、経時的なCECカウントの安定性の例を提供する。2か月の時間枠によって分けられた訪問での連続する25の対照個体においてCEC測定を2回繰り返す。同じ個体で行われた測定は、灰色の線でつながれている。最初の訪問で測定されたCECカウントは、1CEC/mlから16.75CEC/mlまでの範囲であり、3.38CEC/mlの中央値(median value)であった。第2の訪問では、同じ24の個体で測定されたCECカウントは、1CEC/mlから19.5CEC/mlまでの範囲であり、3.25CEC/mlに等しい中央値であった。対のウィルコクソンの符号付き順位検定を使用して、2つの時間点でのCECカウント間の相違の証拠は見られなかった。

40

【図5】図5は、CellTracks Analyzer II(登録商標)による例示的な画像分析およびCECの識別を提供する。(A)CTA IIによるサンプルおよび画像の分析のために必要な工程。AutoPrepで処理されたサンプルを包含しているMagnestは、CTA IIに入れられる。CTA IIは、サンプルチャンバーの作用面全体のための4色の各々において画像を記録する。その後、ソフトウェアモジュールは、 $4\mu\text{m}$ よりも大きく、DAPIおよびCD105-PEの両方にとって陽性であるように見えるこれらの画像内の対象を選択する。これらの選択された候補CECの画像は、訓練された検査員が、CECとして識別し採点するための、あるいはBで示されるように

50

非 C E C の細胞または関連した物質を捨てるための、一連のサムネイルのブラウザ画像として示される。( B ) C T A I I によって潜在的な候補 C E C として検知され示された、対象のブラウザ画像。本例では、3つの対象が検査員に示される。サムネイル画像は、右から左に、未使用の ( F I T C ) チャネル、C D 4 5 - A P C シグナル、D A P I 染色された核、C D 1 0 5 - P E 反応性、および最終的に C D 1 0 5 - P E 及び D A P I の染色の上塗りを示す。C E C として採点されるために、細胞は、核を有し、C D 1 0 5 を発現し、細胞の形態を有し、また C D 4 5 に対して陰性でなければならない。最初の2つの対象は、これらの基準を満たし、C E C として採点された ( チェックされたボックス )。第3の対象は、C D 4 5 陽性であったため、白血球と判断された ( ボックスはチェックされず )。ソフトウェアモジュールは、チェックされたボックスを各サンプル内で自動的に作表し、結果は、4 m L の血液当たりの C E C の数として表わされる。

【図6】図6は、( A ) の年齢が一致した対照、および ( B ) 代表的な S T E M I の患者 ( C E C 0 3 0 4 0 ) から単離した個々の C E C の例示的な蛍光顕微鏡画像を提供する。C E C は、C D 1 0 5 ( 緑 ) および D A P I ( 紫 ) で、それぞれ、それらの細胞分画および核分画のためのマーカーとして標識される。C E C は、C D 1 0 5 および D A P I の染色の共存に基づいて、これらの画像において識別され、結果的に緑の細胞体は紫の核に重なる。緑の C D 1 0 5 染色と共存していない紫の核は、視野に共に存在する汚染している白血球である ( C D 4 5 のための陽性染色に基づいて ( 図示せず ) )。S T E M I 患者からの C E C は、大きさと形状において不均質であり、それらの多くは、対照からの C E C よりもはるかに大きく、複数の核を有する。画像倍率は、すべての画像に関して一定である。3つの年齢が一致した対照個体からのすべての C E C 画像が示され、69の C E C 画像が、この研究の M I 患者に対する C E C / m l の中央範囲において、58 C E C / m l の血液を有する S T E M I 患者の C E C 0 3 0 4 0 からの提示のために無作為に選択された。バー、20  $\mu$  m。アスタリスク、1つの C D 1 0 5 染色された細胞体に関する複数の核。

【図7】図7は、対照 ( 年齢が一致し、健康であった )、血管 ( v a s c u l a r )、および M I ( S T E M I と N S T E M I ) の患者のための例示的な C E C のサイズ分析を提供する。( A ) 各群 ( 平均  $\pm$  S D ) からの細胞に対する細胞領域 (  $\mu$  m <sup>2</sup> )。P 値: 0 . 0 1 3 3 ; ( 健康対年齢一致 ) ; < 0 . 0 0 0 1 ( 年齢一致対 M I ) ; 0 . 0 0 3 ( 血管対 M I )。( B ) 各群 ( 平均  $\pm$  S D ) からの細胞に対する核領域 (  $\mu$  m <sup>2</sup> )。P 値: 0 . 0 0 6 9 ( 健康対年齢一致 ) ; < 0 . 0 0 0 1 ( 年齢一致対 M I ) ; 0 . 0 0 5 9 ( 血管対 M I )。( C ) 各群 ( 平均  $\pm$  S D ) からの細胞に対する細胞領域と核領域との間の比率。P 値: 0 . 4 8 4 8 ; ( 健康対年齢一致 ) ; < 0 . 0 0 0 1 ( 年齢一致対 M I ) ; 0 . 0 0 2 1 ( 血管対 M I )。( A ) - ( C ) に対する各バーの数字は、各群から分析された患者の数を表わし; 各対照個体からのすべての C E C および各 M I 患者から無作為に選択された 5 0 - 1 0 0 の C E C が分析された。画像倍率は、すべての画像に関して一定である。バー、5  $\mu$  m。( D ) 典型的な C E C ( すなわち、平均的な領域の大きさ ) を例証する、対照 ( 年齢が一致し、健康であった ) および M I ( S T E M I と N S T E M I ) の患者からの C E C の代表的な画像、およびこれらの群からの C E C の領域の大きさの変異の範囲。C E C は、細胞分画および核分画のためのマーカーとして、それぞれ、C D 1 0 5 ( 緑 ) および D A P I ( 紫 ) の染色と同定された。

【図8】図8は、対照、無作為の年齢が一致した群サンプル、血管、および M I ( S T E M I と N S T E M I ) の患者からの複数の核を有する C E C の数の例示的な分析を提供する。( A ) 細胞分画および核分画を識別するための、それぞれ、C D 1 0 5 ( 緑 ) および D A P I ( 紫、白いアスタリスク ) によって染色された S T E M I 患者の群からの複数の核を有する C E C の画像。C D 1 0 5 染色された細胞体当たりの核の数は、各画像の右上に明示される。画像倍率は、すべての画像に関して一定である。バー、15  $\mu$  m。( B ) 各群 ( 平均  $\pm$  S D ) における複数の核 ( 2 つ以上の核 / 画像 ) を有する C E C 画像のパーセント。各バーの数字は、分析された個体の数を表わす。( C ) 異なる群 ( 平均  $\pm$  S D ) に対する核 / 画像の数の分布。バーは、健康 ( 白 ) および年齢が一致した ( 灰色 ) 対照、

10

20

30

40

50

血管（赤）、およびMI（黒）の患者を示す。P値：0.2295；（健康対年齢一致）；0.0008（年齢一致対MI）；0.0231（血管対MI）。

【図9】図9は、Cell tracks analyzer IIによって取り込まれたCECの細胞体および核の検出および定量化のための自動化した画像処理の例を提供する。患者と対照からのCell tracks analyzer IIによって単離したCECは、DNA量（DAPI）およびCD105発現（CD-105-PE）のために固定され、染色された。概略図は、多くの核/画像の数および細胞領域および核領域の決定に使用される自動化した画像化プロセスに関係する工程を示す。取得後、ネイティブシグナルは、カスタムソフトウェアモジュールで処理され、細分化した画像を作成する（方法（Method）を参照）。CECに関係しない核は、DAPIとCD105のチャンネルの2値マスクの比較によって除去された。細分化した画像チャンネルのための領域は、フィルター処理した核および細胞の2値マスクから計算された。細分化したDAPIチャンネル（CECに関係する）における検出された対象の数が決定され、それは、あらゆる画像に対して核および細胞の領域を平均化するために使用された。

【発明を実施するための形態】

【0011】

重大な心血管系疾患（心筋梗塞（MI）および虚血性脳血管障害など）は、しばしば致命的である。あるいは、生存者がいたとしても、これらの疾患は、永続する、および生活の質を低下させる効果を有する（例えば部分的または完全な麻痺、失語、記憶喪失）。多くの重大な心血管系疾患は、動脈のプラーク断裂によって誘発される。多くの場合、切迫断裂の徴候がないか、あるいは、徴候は決定的でない。例えば、動脈損傷ではないが心筋壊死の特徴のある心筋トロポニンは、特異性を欠いており、心房細動、肺炎、敗血症、肺塞栓症および慢性腎疾患を含む、MIと無関係な多くの疾病の上昇した徴候（signal）を示し得る。さらに、特定のタイプの心筋梗塞（NSTEMI）では、心電図（ECG）に対する変化はない。

【0012】

重症の心血管系疾患に関係する深刻な危険およびそれらの予測不能な性質を考えると、動脈のプラーク断裂の危険がある個体をそれが臨床的に明らかになる前に識別する方法が必要とされている。さらに、これらの方法は、非侵襲性であり、容易に実行され（例えば、臨床現場において）、および解釈することが容易であるべきである。

【0013】

本明細書には、特定の実施形態において、CECを分析する工程を含む、臨床的に明らかになる前に動脈のプラーク断裂を予測する方法が開示される。

【0014】

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において、心血管障害を分析する方法が開示され、該方法は、（a）循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の形態的特徴と；（b）対照または標準の形態的特徴を比較する工程を含む。

【0015】

さらに本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において、心血管障害を診断する方法が開示され、該方法は、（a）（i）循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の形態的特徴と；（ii）対照または標準の形態的特徴を比較する工程；および（b）循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、少なくとも所定量によって対照または標準から逸脱する場合に、個体を心血管障害と診断する工程を含む。

【0016】

さらに、本明細書には、特定の実施形態において、個体が心血管障害を進行させやすいことを予測する方法が開示され、該方法は、（a）（i）循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の形態的特徴と；（ii）対照または標準の形態的特徴を比較する工程；および

10

20

30

40

50

(b) 循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、少なくとも所定量によって対照または標準から逸脱する場合に、個体が心血管障害を進行させやすいことを予測する工程を含む。

【0017】

本明細書には、特定の実施形態において、心血管障害に関する治療計画に対する個体の反応を予測する方法が開示され、該方法は、(a)(i) 循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の形態的特徴と；(ii) 対照または標準の形態的特徴を比較する工程；および(b) 循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、少なくとも所定量によって対照または標準から逸脱する場合に、個体が心血管障害に関する治療計画に対して反応することを予測する工程を含む。

10

【0018】

本明細書には、特定の実施形態において、心血管障害を分析する方法が開示され、該方法は、(a) 循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離したCECの形態的特徴を識別する工程；(b) 心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴が、心血管障害に関連する形態的特徴であることを決定する工程；および(c) 識別に基づいて心血管障害に関する診断的または予後の情報を提供する工程を含み；ここで、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECに関連する大きな細胞領域、対照または標準からのCECに関連する大きな核領域、対照または標準からのCECに関連する核領域に対する細胞領域の大きな比率、細胞形状、核形状、および1つを超える核の存在から選択される。

20

【0019】

さらに本明細書には、特定の実施形態において、対照または標準の形態的特徴から逸脱する1つの形態的特徴を含む、単離した循環内皮細胞が開示される。また、本明細書には、単離したCECを含む組成物が開示される。

【0020】

さらに本明細書には、特定の実施形態において、対照または標準の形態的特徴から逸脱する1つの形態的特徴を含む、単離した循環内皮細胞、および(i) 前述の形態的特徴の分析を可能にする分析ツール、あるいは(ii) 医療従事者が前述の形態的特徴を分析することを可能にする分析ツールからのアウトプットを含む、システムが開示される。

【0021】

< 特定の専門用語 >

用語「個体」、又は「被験体」は、交換可能に使用される。本明細書で使用されるように、それらは、任意の哺乳動物（すなわち系統学的分類の動物界：脊索動物門：脊椎動物亜門：哺乳類内の任意の目、科および属の種）を意味する。幾つかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。幾つかの実施形態において、哺乳動物は、非ヒトである。用語はどれも、医療の専門家（例えば医者、正看護婦、実地看護婦、医師助手、看護助手、またはホスピス職員）の監督（例えば、持続的または断続的）によって特徴付けられた状況を必要としない、またはその状況に限定されない。

30

【0022】

用語「健康な個体」は、心血管障害のない個体を意味する。これは、個体が、あらゆる疾患、障害、または疾病を患っていない必要はない。

40

【0023】

用語「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」または「処置(treatment)」、および文法上の同義語は、本明細書に使用されるように、疾患又は疾病の症状を緩和、阻止するまたは低下させる、疾患又は疾病の症状の、重症度を低下または阻害する、発病を減少させる、予防的に処置する、再発を阻止する、予防する、発症を遅らせる、再発を遅らせる、疾患又は疾病の症状を軽減または改善する、症状の根底にある代謝の原因を改善する、疾患又は疾病を阻害する、例えば、疾患又は疾病の進行を阻止する、疾患又は疾病を和らげる、疾患又は疾病を退行させる、疾患又は疾病により生じる疾病を和らげる、あるいは疾患又は疾病の症状を止めることを含む。用語はさ

50

らに、治療効果を達成することを含む。治療効果は、処置されている根本的な障害の根絶又は寛解、及び/又は個体において改善が観察されるような、基礎疾患 (underlying disorder) に関連する1つ以上の生理学的な症状の根絶又は寛解を意味する。

【0024】

用語「予防する (prevent)」、「予防すること (preventing)」または「予防 (prevention)」、および本明細書に使用されるような他の文法上の同義語は、さらなる症状を予防する、症状の根底にある代謝の原因を予防する、疾患または疾病を阻害する、例えば、疾患または疾病の進行を阻止することを含み、予防法を含むように意図される。用語はさらに、予防効果を達成することを含む。予防効果に関して

10

【0025】

用語「投与する (administer)」、「投与する (administering)」、「投与 (administration)」、などは、本明細書に使用されるように、生物作の所望部位に対する薬剤または組成物の送達を可能にするために使用され得る方法を指す。これらの方法、限定されないが、経口経路、十二指腸内の経路、非経口的注射 (静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、血管内、あるいは注入を含む)、局所のおよび直腸内の投与を含む。本明細書に記載される薬剤および方法と随意に使用される投与技術は、例えば、議論されるように、Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current ed.; Pergamon; and Remington's, Pharmaceutical Sciences (current edition), Mack Publishing Co., Easton, Paに含まれる。特定の実施形態では、本明細書に記載される薬剤および組成物は経口で投与される。

20

【0026】

本明細書で使用されるように、用語「抗体 (antibody)」および「抗体 (antibodies)」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二特異性抗体、多重特異性抗体、移植抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ抗体 (camelized antibodies)、単鎖のFvs (scFv)、単鎖の抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合したFvs (sdFv)、細胞内抗体、および上述のいずれかの抗イデオタイプの (抗Id) 抗体および抗原結合フラグメントを指す。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、抗原結合部位を包含する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス (例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>) またはサブクラスの分子である。用語「抗体」および免疫グロブリンは、最も広範囲の意味で交換可能に使用される。幾つかの実施形態において、抗体は、1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの抗体の共有結合または非共有結合との関連によって形成された、より大きな融合分子の一部である。

30

40

【0027】

抗体または他の結合分子とタンパク質またはポリペプチドまたはエピトープとの間の相互作用を言及するときの句「特異的に結合する」は、典型的に、対象の標的に高親和性を有して認識する且つ検知可能に結合する抗体または他の結合分子を指す。好ましくは、指定された又は生理学的な条件下において、特定された抗体または結合分子は、特有のポリペプチド、タンパク質またはエピトープに結合するが、かなりの又は望ましくない量では、サンプルに存在する他の分子に結合しない。言い換えれば、特定された抗体または結合分子は、生標的の抗原及び/又はエピトープとは不必要に交差反応しない。さらに、幾つかの実施形態では、特異的に結合する抗体は、抗体の可変ドメインまたは定常ドメインを介して結合する。その可変ドメインを介して特異的に結合する抗体は、凝集されない、す

50

なわち、モノマーである。様々な免疫学的アッセイのフォーマットが、特有のポリペプチドと免疫反応性であり、所望の特異性を有する抗体または他の結合分子を選択するために使用される。例えば、固相のELISA免疫学的アッセイ、BIAcore、フローサイトメトリーおよびラジオイムノアッセイが、所望の免疫反応性および特異性を有するモノクローナル抗体を選択するために使用される。免疫反応性と特異性を測定する又は評価するために使用される免疫学的アッセイのフォーマットおよび条件の記載に関しては、Harlow, 1988, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York (以下 "Harlow") を参照。「選択的結合」、「選択性」などは、別の分子と比較して1つの分子と相互に作用する抗体の優先度 (preference) を指す。好ましくは、抗体、特にモジュレーターとタンパク質との間の相互作用は、特異的且つ選択的の両方である。いくつかの実施形態では、小さな抗体が、他の望ましくない標的に結合することなく、2つの別々の、しかし類似した標的に「特異的に結合する」および「選択的に結合する」ように設計されることを留意されたい。

10

#### 【0028】

用語「心血管障害」は、心臓血管系の疾患、障害、または望まれない疾病を意味する。幾つかの実施形態では、心血管障害は、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、虚血性脳血管障害、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再灌流傷害、血栓症、狭心症 (例えば、安定したまたは不安定な狭心症)、ST部分上昇型心筋梗塞 (STEMI)、非ST部分上昇型心筋梗塞 (NSTEMI)、またはその組み合わせである。

20

#### 【0029】

用語「形態的特徴」は、細胞の形態及び/又は構造と関係する細胞の特徴を意味する。細胞の形態的特徴は、限定されないが、細胞形状、核形状、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比率、および核の数を含む。

#### 【0030】

用語「循環内皮細胞」は、血管の壁から引き離され、血液中で循環内皮細胞を意味する。心腔の内表面に並ぶ (lining) 内皮細胞は、心内膜細胞と呼ばれる。

#### 【0031】

用語「対照」または「標準」は、交換可能に使用される。心血管障害を有する個体から単離したCECに対する比較の平均のCEC標準が比較される。幾つかの実施形態では、対照は、CECあるいは健康な個体から得られる複数のCECである。幾つかの実施形態では、対照は、CECあるいは対象の心血管障害を有する又は有した個体から得られる複数のCECである。幾つかの実施形態において、対照は、CECあるいは複数のCECである。幾つかの実施形態では、対照は、CECあるいは複数のCECに関する測定 (例えば、細胞領域、細胞形状、核領域、核形状、核の数、または核領域に対する細胞領域の比率などの、CECの形態的特徴; あるいは血液中のCECの濃度) である。幾つかの実施形態では、対照または標準は、複数の個体から得られた測定から派生した平均CEC測定である。

30

#### 【0032】

用語「診断情報」は、疾患、障害、または疾病の同定を可能にする疾患、障害または疾病の特徴に関連する情報を意味する。幾つかの実施形態では、診断情報は、CECまたは複数のCECの形態的特徴、または血液中のCECの濃度である。

40

#### 【0033】

用語「予後情報」は、今後の事象を予測することを可能にする情報を意味する。予後情報は、疾患、障害、または疾病の起こり得る結果を予測し得る。あるいは、予後情報は、疾患、障害、または疾病が処置にどのように反応するかを予測し得る。幾つかの実施形態では、予後情報は、CECまたは複数のCECの形態的特徴、または血液中のCECの濃度である。

#### 【0034】

< 心血管障害とプラーク断裂 >

50

本明細書には、特定の実施形態で、治療を必要とする個体においてプラーク断裂を診断するまたは予測する方法が開示される。本明細書にはさらに、特定の実施形態で、治療を必要とする個体において心血管障害を分析する、診断する、または予測する方法が開示される。さらに、本明細書には、特定の実施形態で、心血管障害の治療計画に対する個体の反応を予測する方法が開示される。

【0035】

個体には、心血管障害と診断される個体もいる。幾つかの実施形態において、個体は、心血管障害を有する疑いがある。幾つかの実施形態では、個体は、心血管障害の症状がない。

【0036】

幾つかの実施形態において、個体は、以下から選択される症状を示す：胸痛または不快感；胸痛に付随する腕、首、顎、肩または背中の痛み；吐き気；疲労；息切れ；発汗；めまい；特に本体の片側上の、顔、腕または脚のしびれまたは衰弱；錯乱、発話困難、あるいは理解困難；片目または両目で見ることの困難；歩行困難、めまい、バランスまたは整合の喪失；未知の原因を有する重度の頭痛、またはそれらの任意の組み合わせ。

【0037】

幾つかの実施形態では、心血管障害は、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、虚血性脳血管障害、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再灌流傷害、血栓症、狭心症（例えば、安定したまたは不安定な狭心症）、ST部分上昇型心筋梗塞（STEMI）、非ST部分上昇型心筋梗塞（NSTEMI）、またはその組み合わせである。

【0038】

本明細書で使用されるように、用語「アテローム性動脈硬化（*therosclerosis*）」は、脂質の沈着および結果として生じる炎症および白血球反応が原因である動脈壁の硬化および厚化を指す。アテローム動脈硬化性プラークを未処置にしておく、最終的に動脈の部分的または完全な閉塞につながりかねない。

【0039】

用語、心筋梗塞および心臓発作は交換可能に使用される。本明細書で使用されるように、両方の用語は、心臓に対する血液供給の妨害を指す。心臓に対する血液供給の妨害は、しばしば、断裂したアテローム動脈硬化性プラークによる冠状動脈の閉塞に起因する。さらに、心筋梗塞は、しばしば、電気インパルスの伝導の遅れを結果的にもたらしかねない心筋組織の癒痕化につながる。癒痕化した組織と癒痕化していない組織との間の伝導速度の差は、しばしば、心室細動または心室頻脈につながる。

【0040】

本明細書で使用されるように、用語「虚血性脳血管障害」は、（部分的にまたは完全に）脳への血液供給（例えば虚血）の障害から結果として生じる脳機能の損失（例えば、脳組織の壊死）を指す。特定の例では、脳卒中は、（部分的にまたは完全に）プラーク断裂、血栓症または塞栓症から結果として生じる。

【0041】

本明細書で使用されるように、用語「血栓症」は、凝血の形成を指す。凝血が静脈に生じるとき、これは静脈血栓症と呼ばれる。凝血が動脈に生じるとき、これは動脈血栓症と呼ばれる。凝血（あるいはその一部）が肺に運ばれると（すなわち、塞栓症）、肺塞栓症が進行しかねない。

【0042】

本明細書で使用されるように、用語「狭心症」は、（例えば、アテローム動脈硬化性プラークの膨張後の血管または動脈の閉塞が原因の）心臓の虚血から結果として生じる重度の胸痛を指す。安定狭心症の胸部は、休息時に、症状が最小限または存在しない状態での活動（例えば、ランニング、ウォーキング）によって誘発された胸痛を指す。症状は、典型的に、活動の中止の数分後に軽減し、活動が再開すると再び始まる。不安定狭心症は、休息または睡眠中に進行し、通常 > 10 分間続く胸痛を指す。関係する胸痛は、重度であり、新たに進行している。

10

20

30

40

50

## 【0043】

本明細書で使用されるように、用語「STEMI」は、ST部分上昇型心筋梗塞（例えば、ECGに対するST部分上昇を結果的にもたらず心筋梗塞）を意味する。STEMIは、しばしば、冠状動脈の完全な閉塞に起因する。結果として生じるST部分は、心筋のかなりの部分が損傷される又は死んでいることを示す。すべての心筋梗塞の約45%は、STEMIとして分類される。

## 【0044】

本明細書で使用されるように、用語「NSTEMI」は、非ST部分上昇型心筋梗塞（例えば、ECGに対するST部分上昇を結果的にはもたらさない心筋梗塞）を意味する。NSTEMIでは、冠状動脈は、単に部分的に閉塞され、したがって、心筋の一部のみが損傷される。

10

## 【0045】

本明細書で使用されるように、用語「狭窄症」は、血管の狭窄を意味する。狭窄症は、しばしば、プラークの断裂および血栓の続く形成に対するアテローム動脈硬化性プラークの膨張に起因する。

## 【0046】

本明細書で使用されるように、用語「虚血」は、血液供給での制限を意味する。虚血は、しばしば、（例えば、プラークの断裂後の血栓の形成が原因の）アテローム動脈硬化性プラークの膨張後の血管または動脈の閉塞を結果的にもたらず。

## 【0047】

20

< 病理生物学 >

心臓は、循環系を有する動物に見られる筋原性の筋肉器官である。哺乳動物では、心臓の右側の拍動によって、結果的に脱酸素化した血液は、右心房を通過して、肺へ移動し、肺では、二酸化炭素が取り除かれ、血液が酸化される。左側の拍動によって、酸化した血液は、動脈経路で、肺から心臓に移動し、その後、身体の残りの部分に分配される。

## 【0048】

3つの主冠状動脈（左前下行枝（LAD）、回旋枝（Circ）および右冠状動脈（RCA））およびそれぞれの分枝は、各々、心臓の指定された部分に血液を供給する。LADは、心臓の前面（前方）部分、および隔壁（左心室（LV）および右心室（RV）を分離する筋肉隔壁）に血液を提供する。Circは、LVの背面（後方）部分に血液を提供する。RCAは、事例の90%で、心室およびRVの下部（下方）に血液を提供する。他の10%で、CircはLVの下壁に向かった分枝に血液を送る。

30

## 【0049】

時々、動脈を通る血流は、（例えば、冠状動脈閉塞が原因で）減少させられる。血流の一時的な減少は、胸部不快感をもたらしかねない。持続的な減少は、結果的に、永続的な筋損傷、心臓発作、または脳卒中をもたらしかねない。

## 【0050】

アテローム性動脈硬化は、冠状動脈閉塞の最も一般的な原因である。アテローム性動脈硬化は、動脈壁の厚化を特徴とする。アテローム性動脈硬化は、しばしば、動脈壁における低密度リポタンパク質分子（LDL）の蓄積で始まる。最終的に、LDL分子は、フリーラジカル（例えば、ROS）によって酸化される。動脈壁と接触した時、酸化したLDLは動脈壁を損傷する。身体は、マクロファージとTリンパ球でこの損傷を修復する試みによって反応する。これらの白血球は、エンドサイトーシスによって酸化した低密度リポタンパク質（LDL）を飲み込む。酸化したLDLは、泡沫細胞に形質転換される白血球において蓄積する。泡沫細胞は、その積み上がったまわりに蓄積し、最終的に断裂する。泡沫細胞の断裂は、結果的に、動脈壁上へと戻る酸化したLDLの沈着をもたらす。その後、これは、進行するプラークへのさらなる白血球の移動を引き起こす。最終的に、プラークのまわりの領域は炎症を起こす。これによって、筋細胞は、大きくなり、影響を受けた領域にわたって硬い覆い（hard cover）を形成する。この硬い覆いは、動脈の狭細をもたらす、血流を減少させ、血圧を増加させ得る。

40

50

## 【 0 0 5 1 】

アテローム性動脈硬化は、通常、「不安定」となったより薄い/弱い線維性被膜の部位で、プラークが断裂するまで、しばしば無症候性である。血流から柔軟なプラークを分離する線維性被膜が断裂すると、組織フラグメントが晒され放出される。これらの組織フラグメントは、血小板を活性化し、凝結を活性化するコラーゲンおよび組織因子を包含している。結果的に、プラークに重なる血栓が形成され、これはさらに血流を妨害する。血栓の形成が数時間以内に生じ得る。

## 【 0 0 5 2 】

プラークが心臓の上流にあり、不完全な閉塞があるとき、結果として生じる心臓への血流の減少は、結果的に重度で長引く胸痛（例えば、不安定狭心症）をもたらし得る。幾つかの実施形態では、心血管障害は不安定狭心症である。あるいは、完全な閉塞があるとき、心臓は酸素を奪われ、M I が進行する。幾つかの実施形態では、心血管障害は心筋梗塞である。

10

## 【 0 0 5 3 】

断裂が脳の上流にあるとき、脳は酸素を必要とし、虚血性脳血管障害が進行する。幾つかの実施形態では、心血管障害は虚血発作である。

## 【 0 0 5 4 】

## &lt; C E C &gt;

内皮は、血管の内表面に並ぶ細胞の層であり、内腔における循環血液と血管壁の残りとの間で界面を形成する。内皮細胞は循環系全体に並ぶ。特定の例において、内皮細胞は、血管壁から引き離され、結果的に循環内皮細胞をもたらす。

20

## 【 0 0 5 5 】

循環内皮細胞は、健康な個体において見られる。

## 【 0 0 5 6 】

正常な内皮の完全性の欠如（したがって循環内皮細胞の存在）は、他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象と同様に、アテローム動脈硬化性プラークの断裂に対する感受性のためのマーカーとして以前に識別された。したがって、幾つかの実施形態では、循環内皮細胞の存在は、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象に対する感受性を示している。さらに、幾つかの実施形態では、健康な個体（あるいは所定の対照）で見られる濃度と比較した、循環内皮細胞の濃度の増加は、来たる（*u p c o m i n g t o*）、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象を示している。

30

## 【 0 0 5 7 】

## &lt; C E C の分析 &gt;

心血管障害を有する個体（例えば、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象の危険性のある又はそれを患う個体）からの C E C は、健康な個体または所定の対照と比較したときの、形態学的パラメーター、すなわち、細胞領域および核領域、細胞/核領域の比率、および複数の核との関連性の測定可能な差を示す。

## 【 0 0 5 8 】

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を分析する方法が開示され、該方法は、（ a ）循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離された循環内皮細胞（ C E C ）の一群の拡大された画像を得る工程；および（ b ）拡大された画像において循環内皮細胞の一群の形態的特徴を、対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程を含む。本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を診断する方法が開示され、該方法は、（ a ）循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離された循環内皮細胞（ C E C ）の一群の拡大された画像を得る工程；（ b ）拡大された画像において循環内皮細胞の一群の形態的特徴を、対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および（ c ）循環内皮細胞

40

50

胞の一群の形態的特徴が、( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群からの対照または標準から逸脱する、または( i i ) 心血管障害を有している又は有した、健康な個体あるいは健康な個体の一群からの対照または標準と一致する場合に、個体において心血管障害を診断する工程を含む。本明細書には、特定の実施形態において、個体が、心血管障害を進行させやすいかどうかを予測する方法が開示され、該方法は、( a ) 循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離された循環内皮細胞( C E C )の一群の拡大された画像を得る工程；( b ) 拡大された画像において循環内皮細胞の一群の形態的特徴を、対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および( c ) ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または( i i ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、心血管障害を進行する個体の感受性を予測する工程を含む。本明細書には、特定の実施形態において、心血管障害に関する治療計画に対する個体の反応を予測する方法が開示され、該方法は、( a ) 循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離された循環内皮細胞( C E C )の一群の拡大された画像を得る工程；( b ) 拡大された画像において循環内皮細胞の一群の形態的特徴を、対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および( c ) ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または( i i ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画に対する個体の反応を予測する工程を含む。本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体に対して心血管障害に関する治療計画を処方する方法が開示され、該方法は、( a ) 循環内皮細胞および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離された循環内皮細胞( C E C )の一群の拡大された画像を得る工程；( b ) 拡大された画像において循環内皮細胞の一群の形態的特徴を、対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および( c ) ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または( i i ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画を処方する工程を含む。

10

20

30

#### 【 0 0 5 9 】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からの C E C の少なくとも 1 つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、心血管障害を患う個体(例えば、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象の危険性のある又はそれを患う個体)内での C E C は、異常な内皮の生態を示す別々の形態学的性質を有する。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からの C E C の少なくとも 1 つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、心血管障害を患う個体(例えば、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象の危険性のある又はそれを患う個体)内での C E C は、動脈の内皮におけるより古い及び故により大きい細胞から生じる。幾つかの実施形態では、心血管障害を患う個体(例えば、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象の危険性のある又はそれを患う個体)内での C E C は、プラーク断裂の間に、単独で、または多重細胞の群またはシートとして損傷した領域から放出される。幾つかの実施形態では、心血管障害を患う個体(例えば、プラーク断裂、または他の動脈の、非アテローム性動脈硬化の血管壁の断裂または亀裂の事象の危険性のある又はそれを患う個体)内での C E C は、異常に凝集された(例えば、循環を介してそれらの継代の間に凝集された)、損傷した細胞または妨害された細胞から生じる。幾つかの実施形態では、健康な個体における C E C は、再構築する( r e m o d e l i n g )または増殖する血管の領域からのより若い、および故により小さい E C のまれな放出から生じる。

40

50

## 【0060】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からのCECの少なくとも2つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からのCECの少なくとも3つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からのCECの少なくとも4つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からのCECの少なくとも5つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、個体からのCECの少なくとも6つの形態的特徴を対照または標準と比較する工程を含む。

10

## 【0061】

幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は：細胞領域；核領域；核領域に対する細胞領域の比率；細胞形状；核形状；核の数；またはそれらの組み合わせである。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、核領域に対する細胞領域の比率である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、細胞形状である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、核形状である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、核の数である。

20

## 【0062】

幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は：対照または標準からのCECに対する大きな細胞領域；対照または標準からのCECに対する大きな核領域；あるいは対照または標準からのCECに関する核領域に対する細胞領域の大きな比率；またはそれらの組み合わせである。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECに対する大きな細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECに対する大きな核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECに関する核領域に対する細胞領域の大きな比率であり；またはそれらの組み合わせである。

30

## 【0063】

心血管障害のない個体からのCECは、小さく、形状が細長い傾向がある。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECは、不均質である傾向があり、小さいものもあれば、大きいものもある。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECは、異常に形作られる傾向がある。さらに、幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの核は、通常より大きく、異常に形作られる傾向がある。

## 【0064】

幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%または100%大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約30%と約50%の間で大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約30%大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約35%大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約40%大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対

40

50

照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約45%大きい細胞領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも約50%大きい細胞領域である。

【0065】

心血管障害のない個体内でのCECの平均の細胞領域は、約100mm<sup>2</sup>である。したがって、幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約100μm<sup>2</sup>、約150μm<sup>2</sup>、約200μm<sup>2</sup>、約210μm<sup>2</sup>、約220μm<sup>2</sup>、約230μm<sup>2</sup>、約240μm<sup>2</sup>、約250μm<sup>2</sup>、約260μm<sup>2</sup>、約270μm<sup>2</sup>、約280μm<sup>2</sup>、約290μm<sup>2</sup>、または約300μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約100μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約150μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約200μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約200μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約250μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約250μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約255μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約255μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約260μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約260μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約265μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約265μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示すCECの細胞領域は、約270μm<sup>2</sup>である。

10

20

【0066】

幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%または100%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも30%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも35%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも40%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも45%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、少なくとも50%大きい核領域である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECの平均の細胞領域よりも、約30%と約50%の間で大きい核領域である。

30

40

【0067】

心血管障害のない個体内でのCECの平均の細胞領域は、約30と約40mm<sup>2</sup>の間である。幾つかの実施形態では、核領域は、約30μm<sup>2</sup>、約31μm<sup>2</sup>、約32μm<sup>2</sup>、約33μm<sup>2</sup>、約34μm<sup>2</sup>、約35μm<sup>2</sup>、約36μm<sup>2</sup>、約37μm<sup>2</sup>、約38μm<sup>2</sup>、約39μm<sup>2</sup>、約40μm<sup>2</sup>、約50μm<sup>2</sup>、約60μm<sup>2</sup>、約70μm<sup>2</sup>、約80μm<sup>2</sup>、約90μm<sup>2</sup>、または約100μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約30μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約35μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約35μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、核領域は、約40μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約40μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、核領域は、約45μm<sup>2</sup>より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約45μm<sup>2</sup>である。幾つかの実施形態では、核領域は、約50μm<sup>2</sup>より

50

り大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約  $50 \mu\text{m}^2$  である。幾つかの実施形態では、核領域は、約  $55 \mu\text{m}^2$  より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約  $55 \mu\text{m}^2$  である。幾つかの実施形態では、核領域は、約  $60 \mu\text{m}^2$  より大きい。幾つかの実施形態では、核領域は、約  $60 \mu\text{m}^2$  である。幾つかの実施形態では、心血管障害を示す CEC の核領域は、約  $65 \mu\text{m}^2$  である。

【0068】

心血管障害のない個体からの CEC は、1つの細胞体に関係する2つの核を有し、これは、2つの付着した細胞のクラスター、または2つの核を有する1つの細胞を表わし得る。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC は、しばしば、1つの連続的な細胞体に関係するいくつかの核を包含している。これらの細胞体は、単一細胞または複数の細胞の凝集であってもよい。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、1つを超える核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、2つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、3つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、4つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、5つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、6つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、7つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、8つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、9つの核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、10の核の存在である。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体からの CEC の形態的特徴は、対照または標準からの CEC の核の平均数よりも少なくとも10%多い核の存在である。

10

20

【0069】

幾つかの実施形態では、健康な個体間での、細胞および核の大きさ、比率、または複数の核の存在における統計的有意差はない。幾つかの実施形態では、ST部分上昇型心筋梗塞 (STEMI) と非ST部分上昇型心筋梗塞 (NSTEMI) の CEC との間に統計的有意差はない。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法はさらに、(a) 血液サンプルから単離された循環内皮細胞の一群の濃度を；(b) 対照または標準の濃度と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体内での CEC の濃度は、健康な個体または所定の対照において見られる CEC の濃度よりも、少なくとも50%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650% または 700% 大きい。幾つかの実施形態では、心血管障害を有する個体内での CEC の濃度は、健康な個体または所定の対照において見られる CEC の濃度よりも、約200%と約400%の間で大きい。

30

【0070】

幾つかの実施形態では、循環内皮細胞 (あるいは、単一の CEC) の一群の形態的特徴の比較は、任意の適切な顕微鏡の使用によって得られた単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像 (例えば、蛍光画像) を分析する工程を含む。幾つかの実施形態では、循環内皮細胞 (あるいは、単一の CEC) の一群の形態的特徴の比較は、単離した循環内皮細胞の一群の拡大された蛍光画像を分析する工程を含む。幾つかの実施形態では、顕微鏡は、CEC の一群における単一の CEC の形態的特徴を視覚化するのに十分な倍率を有する。

40

【0071】

幾つかの実施形態では、CEC の拡大された画像は、顕微鏡に関係するコンピュータ処理デバイスの電子メモリに保存される。

【0072】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによ

50

って実行された、任意の適切なソフトウェアモジュールが、循環内皮細胞の少なくとも1つの形態的特徴を分析する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによって実行された、任意の適切なコンピュータソフトウェアモジュールが、循環内皮細胞の少なくとも1つの形態的特徴を、対照または標準と比較する工程を含み、ここで、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、細胞領域；核領域；核領域に対する細胞領域の比率；細胞形状；核形状；核の数；またはそれらの組み合わせであってもよい。幾つかの実施形態では、循環内皮細胞の一群の形態的特徴の比較は、コンピュータ処理デバイスによって実行された、任意の適切なソフトウェアモジュールが、循環内皮細胞の少なくとも1つの形態的特徴を分析する工程を含み、ここで、心血管障害を有する個体からのCECの形態的特徴は、対照または標準からのCECに対する大きな細胞領域；対照または標準からのCECに対する大きな核領域；あるいは対照または標準からのCECに関する核領域に対する細胞領域の大きな比率；またはそれらの組み合わせである。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールが、血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の濃度を測定する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールが、循環内皮細胞の一群の濃度を、対照または標準の濃度と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールが、個体または個体を処置する医療の専門家に、CECの一群の形態的特徴の分析を送信する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールが、個体または個体を処置する医療の専門家に、診断結果または予後結果を送信する工程を含む。

10

20

#### 【0073】

本明細書に開示される方法は、任意の適切なシステムによって実行される。幾つかの実施形態では、システムは、(a)内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択される細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環CECの一群；および(b)CECの一群における単一のCECの形態的特徴を視覚化するのに十分な倍率を有している顕微鏡を含み、ここで、形態的特徴は、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比率、細胞形状、核形状、核の数、循環内皮細胞の数、またはそれらの組み合わせから選択される。幾つかの実施形態では、システムは、CECの一群、またはCECの一群における単一のCECの拡大された画像を取り込む且つ保存するための電子メモリをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、随意にコンピュータネットワークに接続される、コンピュータ処理デバイスをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、循環内皮細胞(CEC)の一群の形態的特徴を分析するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、循環内皮細胞(CEC)の一群の形態的特徴を標準または対照と比較するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、血液サンプルから単離された循環内皮細胞の一群の濃度を測定するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、循環内皮細胞の一群の濃度を対照または標準の濃度と比較するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、個体または個体を処置する医療の専門家に、CECの一群の形態的特徴の分析を送信するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、個体または個体を処置する医療の専門家に、診断結果または予後結果を送信するための、コンピュータ処理デバイスによって実行されたソフトウェアモジュールをさらに含む。

30

40

#### 【0074】

幾つかの実施形態では、システムは、血液サンプルから循環内皮細胞の一群を単離する

50

ための機械をさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル、またはその組み合わせをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合する、あるいはそれらの組み合わせをさらに含む。幾つかの実施形態では、システムは、抗CD146抗体、抗CD105抗体、抗CD45抗体、抗CD34抗体、抗CD31抗体、抗VEGF2抗体、抗CD144抗体、抗CD106抗体、またはそれらの組み合わせをさらに含む。幾つかの実施形態において、抗体は、標識化される。幾つかの実施形態では、抗体は、蛍光部分または磁気部分により標識化される。

10

**【0075】****<CECの単離>**

CECを単離する現在の方法は、結果的に変異性をもたらす。この変異性は、主として高度に分岐した(*divergent*)CECの単離方法およびCECの可変的な免疫表現型の定義の使用から生じる。

**【0076】**

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を分析する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；および(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、CECを単離する方法をさらに含む。幾つかの実施形態では、方法は、ポジティブおよびネガティブ選択の基準を使用して、CECを単離する工程をさらに含む。

20

**【0077】**

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を診断する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および(c)循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、(i)健康な個体あるいは健康な個体の一群からの対照または標準から逸脱する、または(ii)心血管障害を有している又は有した、個体あるいは個体の一群からの対照または標準と一致する場合に、個体において心血管障害を診断する工程を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、CECを単離する方法をさらに含む。幾つかの実施形態では、方法は、ポジティブおよびネガティブ選択の基準を使用して、CECを単離する工程をさらに含む。

30

**【0078】**

本明細書には、特定の実施形態において、個体が心血管障害を進行させやすいかどうかを予測する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および(c)(i)健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または(ii)心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画に対する個体の反応を予測する工程を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、CECを単離する方法をさらに含む。幾つかの実施形態では、方法は、ポジティブおよびネガティブ選択の基準を使用して、CECを単離する工程をさらに含む。

40

50

## 【 0 0 7 9 】

本明細書には、特定の実施形態において、心血管障害に関する治療計画に対する個体の反応を予測する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および(c)(i)健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または(ii)心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画に対する個体の反応を予測する工程を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、CECを単離する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、方法は、ポジティブおよびネガティブ選択の基準を使用して、CECを単離する工程をさらに含む。

10

## 【 0 0 8 0 】

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体に心血管障害に対する治療計画を処方する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程；および(c)(i)健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または(ii)心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画を処方する工程を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、CECを単離する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、方法は、ポジティブおよびネガティブ選択の基準を使用して、CECを単離する工程をさらに含む。

20

## 【 0 0 8 1 】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、血液サンプルを、循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル、またはその組み合わせと接触させる工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、ラベルを有する血液サンプルを、CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合する、あるいはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。

30

## 【 0 0 8 2 】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、血液サンプルを、抗CD146抗体、抗CD105抗体、抗CD45抗体、抗CD34抗体、抗CD31抗体、抗VEGF2抗体、抗CD144抗体、抗CD106抗体、またはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。

40

## 【 0 0 8 3 】

幾つかの実施形態では、抗体は、任意の適切なラベルによって標識化される。幾つかの実施形態において、抗体は、蛍光部分によって標識化される。幾つかの実施形態において、抗体は、磁気部分によって標識化される。

## 【 0 0 8 4 】

幾つかの実施形態では、血液サンプルからの循環内皮細胞の一群の単離は、(a)血液サンプルを抗CD146抗体と接触させる工程；および(b)抗CD146抗体が特異的に結合する細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程を含む。幾つかの実施形態では、血液サンプルからの循環内皮細胞の一群の単離は、(a)血液サンプルを抗CD146抗体と接触させる工程であって、抗体を磁氣的に標識化する工程；および(b)

50

抗CD146抗体が特異的に結合する細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程を含む。幾つかの実施形態では、血液サンプルからの循環内皮細胞の一群の単離は、(a)血液サンプルを抗CD146抗体と接触させる工程であって、抗体を蛍光で標識化する工程；および(b)抗CD146抗体が特異的に結合する細胞を単離し、CD146+細胞の一群を作成する工程を含む。

【0085】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、CD146+細胞の一群を、抗CD45抗体、抗CD105抗体、DAPI、またはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、CD146+細胞の一群を、標識化された抗CD45抗体、標識化された抗CD105抗体、標識化された抗CD34抗体、標識化された抗CD31抗体、標識化された抗VEGFR2抗体、標識化された抗CD-144抗体、標識化された抗CD106抗体、DAPI、またはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、CD146+細胞の一群を、磁氣的に標識化された抗CD45抗体、磁氣的に標識化された抗CD105抗体、磁氣的に標識化された抗CD34抗体、磁氣的に標識化された抗CD31抗体、磁氣的に標識化された抗VEGFR2抗体、磁氣的に標識化された抗CD-144抗体、磁氣的に標識化された抗CD106抗体、DAPI、またはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、CD146+細胞の一群を、蛍光で標識化された抗CD45抗体、蛍光で標識化された抗CD105抗体、蛍光で標識化された抗CD34抗体、蛍光で標識化された抗CD31抗体、蛍光で標識化された抗VEGFR2抗体、蛍光で標識化された抗CD-144抗体、蛍光で標識化された抗CD106抗体、DAPI、またはそれらの組み合わせと接触させる工程をさらに含む。

10

20

【0086】

幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、抗CD45抗体に特異的に結合するCD146+細胞を捨て、単離した循環内皮細胞の一群を作成する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、抗CD45抗体に特異的に結合しないCD146+細胞を保持し、単離した循環内皮細胞の一群を作成する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、抗CD45抗体に特異的に結合するCD146+細胞を捨て、抗CD45抗体に特異的に結合しないCD146+細胞を保持し、単離した循環内皮細胞の一群を作成する工程をさらに含む。

30

【0087】

CECの、例えば大きさ、電荷(charge)、および密度の物理的性質に基づいて、CECを単離する他の方法が使用されてもよい。大きさは、ろ過によって選択され得、密度は、Ficoll分離によって選択され得、電荷は、電気泳動または誘電泳動によって選択され得る。幾つかの実施形態では、本明細書に開示される単離方法は、大きなサンプルボリュームの処理に付随し得る変異性を除去するか又は減少させる。幾つかの実施形態において、本明細書に開示される単離方法は、オペレーター間の変動を減少させることによって、よりよい再現性の結果を可能にする。

40

【0088】

< 心血管障害の処置 >

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を分析する方法が開示され、該方法は、(a)循環内皮細胞(CEC)および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程；および(b)拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程を含む。幾つかの実施形態では、方法は、循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、対照または標準から逸脱する量に基づいて、個体に対して治療計画を処方する工程をさらに含む。

【0089】

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体において心血管障害を

50

診断する方法が開示され、該方法は ( a ) 循環内皮細胞 ( C E C ) および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程 ; ( b ) 拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程 ; および ( c ) 循環内皮細胞の一群の形態的特徴が、 ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群からの対照または標準から逸脱する、または ( i i ) 心血管障害を有している又は有した、個体あるいは個体の一群からの対照または標準と一致する場合に、個体において心血管障害を診断する工程を含む。幾つかの実施形態では、方法は、診断に基づいて個体に対して治療計画を処方する工程をさらに含む。

**【 0 0 9 0 】**

本明細書には、特定の実施形態において、個体が心血管障害を進行させやすいかどうかを予測する方法が開示され、該方法は、 ( a ) 循環内皮細胞 ( C E C ) および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程 ; ( b ) 拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程 ; および ( c ) ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または ( i i ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画に対する個体の反応を予測する工程を含む。幾つかの実施形態では、方法は、予測に基づいて個体に対して治療計画を処方する工程をさらに含む。

**【 0 0 9 1 】**

本明細書には、特定の実施形態において、心血管障害に関して治療計画に対する個体の反応を予測する方法が開示され、該方法は、 ( a ) 循環内皮細胞 ( C E C ) および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程 ; ( b ) 拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程 ; および ( c ) ( i ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または ( i i ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画に対する個体の反応を予測する工程を含む。幾つかの実施形態では、方法は、個体に対して治療計画を処方する工程、または循環内皮細胞の一群の形態的特徴が対照または標準から逸脱する量に基づいて、個体に対する治療計画を変更する工程をさらに含む。

**【 0 0 9 2 】**

本明細書には、特定の実施形態において、治療を必要とする個体に心血管障害に対する治療計画を処方する方法が開示され、該方法は、 ( a ) 循環内皮細胞 ( C E C ) および循環非内皮細胞から選択された細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の拡大された画像を得る工程 ; ( b ) 拡大された画像中の循環内皮細胞の一群の形態的特徴を対照または標準の同じ形態的特徴と比較する工程 ; および ( c ) ( a ) 健康な個体あるいは健康な個体の一群に由来する対照または標準からの循環内皮細胞の一群の形態的特徴の逸脱、または ( b ) 心血管障害を有している又は有した、循環内皮細胞の一群および個体または個体の一群に由来する対照または標準の形態的特徴の類似性に基づいて、治療計画を処方する工程を含む。

**【 0 0 9 3 】**

幾つかの実施形態では、治療計画は、薬物療法 ; 外的動脈加圧強化法 ( E E C P ) ; 手術 ; またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、治療計画は、血管形成術 ; 冠動脈バイパス手術 ; またはそれらの組み合わせである。

**【 0 0 9 4 】**

幾つかの実施形態において、治療計画は、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、ナイアシン ; フィブラート ; スタチン ; アポリポ蛋白 A - 1 モジュレーター ;

10

20

30

40

50

A C A Tモジュレーター；C E T Pモジュレーター；糖タンパク質I I b / I I I aモジュレーター；P 2 Y 1 2モジュレーター；L p - P L A 2モジュレーター；又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、アトルバスタチン；セリバスタチン；フルバスタチン；ロバスタチン；メバスタチン；ピタバスタチン；プラバスタチン；ロスバスタチン；シンバスタチン；シンバスタチンおよびエゼチミベ；ロバスタチンおよびナイアシン（徐放）；アトルバスタチンおよびベシル酸アムロジピン；シンバスタチンおよびナイアシン（徐放）；又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。

【0095】

幾つかの実施形態では、治療計画は、ベザフィブラート；シプロフィブラート；クロフィブレート；ゲムフィプロジル；フェノフィブラート；又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、D F 4 ( A c - D - W - F - K - A - F - Y - D - K - V - A E - K - F - K - E - A - F - N H 2 ) ; D F 5 ; R V X 2 0 8 ( R e s v e r l o g i x ) ; 又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、アバシミベ；バクチミベ硫酸塩 ( C S - 5 0 5 ) ; C I - 1 0 1 1 ( 2 , 6 - ジイソプロピルフェニル [ ( 2 , 4 , 6 - トリイソプロピルフェニル ) アセチル ] スルファミン酸塩 ) ; C I - 9 7 6 ( 2 , 2 - ジメチル - N - ( 2 , 4 , 6 - トリメトキシフェニル ) ドデカンアミド ) ; V U L M 1 4 5 7 ( 1 - ( 2 , 6 - ジイソプロピル - フェニル ) - 3 - [ 4 - ( 4 ' - ニトロフェニルチオ ) フェニル ] 尿素 ) ; C I - 9 7 6 ( 2 , 2 - ジメチル - N - ( 2 , 4 , 6 - トリメトキシフェニル ) ドデカンアミド ) ; E - 5 3 2 4 ( n - ブチル - N ' - ( 2 - ( 3 - ( 5 - エチル - 4 - フェニル - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) プロボキシ ) - 6 - メチルフェニル ) 尿素 ) ; H L - 0 0 4 ( N - ( 2 , 6 - ジイソプロピルフェニル ) テトラデシルチオアセトアミド ) ; K Y - 4 5 5 ( N - ( 4 , 6 - ジメチル 1 - ペンチルインドリン - 7 - イル ) - 2 , 2 - ジメチルプロパンアミド ) ; F Y - 0 8 7 ( N - [ 2 - [ N ' - ペンチル - ( 6 , 6 - ジメチル - 2 , 4 - ヘプタジニル ) アミノ ] エチル ] - ( 2 - メチル - 1 - ナフチル - チオ ) アセトアミド ) ; M C C - 1 4 7 ( M i t s u b i s h i P H a r m a ) ; F 1 2 5 1 1 ( ( S ) - 2 ' , 3 ' , 5 ' - トリメチル - 4 ' - ヒドロキシ - アルファ - ドデシルチオアセトアニリド ) ; S M P - 5 0 0 ( S u m i t o m o P h a r m a c e u t i c a l s ) ; C L 2 7 7 0 8 2 ( 2 , 4 - ジフルオロ - フェニル - N [ [ 4 - ( 2 , 2 - ジメチルプロピル ) フェニル ] メチル ] - N - ( h e p t h y l ) 尿素 ) ; F - 1 3 9 4 ( ( 1 s , 2 s ) - 2 - [ 3 - ( 2 , 2 - ジメチルプロピル ) - 3 - ノニルウレイド ] アミノシクロヘキサン - 1 - イル ( 3 - [ N - ( 2 , 2 , 5 , 5 - テトラメチル - 1 , 3 - ジオキサン - 4 - カルボニル ) アミノ ] プロピオン酸塩 ) ; C P - 1 1 3 8 1 8 ( N - ( 2 , 4 - ビス ( メチルチオ ) - 6 - メチルピリジン - 3 - イル ) - 2 - ( ヘキシルチオ ) デカン酸アミド ) ; Y M - 7 5 0 ; 又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、トルセトラピブ；アナセトラピブ ( a n a c e t r a p i d ) ; J T T - 7 0 5 ( J a p a n T o b a c c o / R o c h e ) ; 又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、アブキシマブ；エプチフィバチド；チロフィバン；ロキシフィバン；バリアピリン ( v a r i a b i l i n ) ; X V 4 5 9 ( N ( 3 ) - ( 2 - ( 3 - ( 4 - フォルムアミジノフェニル ( f o r m a m i d i n o p h e n y l ) ) イソキサゾリン ( i s o x a z o l i n ) - 5 - イル ) アセチル ) - N ( 2 ) - ( 1 - ブチルオキシカルボニル ) - 2 , 3 - ジアミノプロピオネート ( d i a m i n o p r o p i o n a t e ) ) ; S R 1 2 1 5 6 6 A ( 3 - [ N - { 4 - [ 4 - ( アミノイミノメチル ) フェニル ] - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル } - N - ( 1 - カルボキシメチルピペリド ( c a r b o x y m e t h y l p i p e r i d ) - 4 - イル ) アミノールプロピオン酸 , トリヒドロクロリド ) ; F K 4 1 9 ( ( S ) - 2 - アセチルアミノ - 3 - [ ( R ) - [ 1 - [ 3 - ( ピペリジン - 4 - イル ) プロピオニル ] ピペリジン - 3 - イルカルボニル ] アミノ ] プロピオン酸三水酸基化合物 ) ; 又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法であ

10

20

30

40

50

る。幾つかの実施形態では、治療計画は、クロピドグレル；プラスグレル；カングレロー  
 ル；AZD6140 (AstraZeneca) MRS 2395 (2, 2 - ジメチル -  
 プロピオン酸 3 - (2 - クロロ - 6 - メチルアミノプリン - 9 - イル) - (2 - (2,  
 2 - ジメチル - プロピオニルオキシメチル) - プロピルエステル)；Bx 667 (Be  
 rlex Biosciences)；BX 048 (Berlex Bioscienc  
 es) 又はそれらの組み合わせから選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では  
 、治療計画は、ダラブラディブ (SB 480848)；SB 435495 (Glax  
 oSmithKline)；SB 222657 (GlaxoSmithKline)；  
 SB 253514 (GlaxoSmithKline)；又はそれらの組み合わせから  
 選択される、薬物療法である。幾つかの実施形態では、治療計画は、A - 81834 (3  
 - (3 - (1, 1 - ジメチルエチルチオ - 5 - (キノリン - 2 - (イルメトキシ - 1 -  
 (4 - クロロメチルフェニル) インドール - 2 - イル) - 2, 2 - ジメチルプロピオンア  
 ルデヒド オキシム - O - 2 - 酢酸)；AME103 (Amira)；AME803 (Am  
 ira)；アトレロイトン；BAY - x - 1005 (R) - (+) - アルファ - シクロペ  
 ンチル - 4 - (2 - キノリニルメトキシ) - ベンゼン酢酸)；CJ - 13610 (4 - (3  
 - (4 - (2 - メチル - イミダゾール - 1 - イル) - フェニルスルファニル) - フェニ  
 ル) - テトラヒドロ - ピラン - 4 - カルボキシル酸アミド)；DG 031 (DeCod  
 e)；DG 051 (DeCode)；MK886 (1 - [(4 - クロロフェニル)メチ  
 ル]3 - [(1, 1 - ジメチルエチル)チオ] - , - ジメチル - 5 - (1 - メチルエ  
 チル) - 1H - インドール - 2 - プロパン酸, ナトリウム塩)；MK591 (3 - (1 -  
 4 [(4 - クロロフェニル)メチル] - 3 - [(t - ブチルチオ) - 5 - ((2 - キノリ  
 ル (quinoly))メトキシ) - 1H - インドール - 2] - , ジメチルプロパン酸 (dimehtylpropanoic acid)；RP64966 ([4 - [5 - (3  
 - フェニル - プロピル)チオフエン - 2 - イル]プトキシ]酢酸)；SA6541 ((  
 R) - S - [[4 - (ジメチルアミノ)フェニル]メチル] - N - (3 - メルカプト - 2  
 メチル - 1 - オキソプロピル - L - システイン)；SC - 56938 (エチル - 1 - [2  
 - [4 - (フェニルメチル)フェノキシ]エチル] - 4 - ピペリジン - カルボン酸塩)；  
 VIA - 2291 (Via Pharmaceuticals)；WY - 47, 288 (2 - [(1 - ナフタレニルオキシ)メチル]キノリン)；ジレウトン；ZD - 2138 (6  
 - (3 - フルオロ - 5 - (テトラヒドロ - 4 - メトキシ - 2H - ピラン - 4 イル)フェ  
 ノキシ)メチル) - 1 - メチル - 2 (1H) - キノリノン)；又はそれらの組み合わせか  
 ら選択される、薬物療法である。

#### 【0096】

幾つかの実施形態では、治療計画はEECPである。EECPは、空気カフを脚の上に  
 置くことを含む。空気カフは、心拍度数およびリズムをモニタリングし、個体の心電図に  
 基づいて膨張し収縮するように設定される、遠隔測定モニターに接続される。空気カフは  
 、心拡張期の初めに膨張し、心収縮期の初めに収縮するべきである。幾つかの実施形態で  
 は、治療計画は血管形成術である。血管形成術は、動脈へのバルーンカテーテルの挿入を  
 含む。カテーテルは、アテローム動脈硬化性プラークの部位に位置付けられ、固定サイズ  
 まで膨張される。バルーンは血管を開くので、プラークを砕く。

#### 【0097】

幾つかの実施形態では、治療計画は、冠動脈バイパス手術である。冠動脈バイパス手術  
 は、患者 (あるいはドナー) からの動脈または静脈が、アテローム性動脈硬化の狭窄のあ  
 る冠状動脈に移植される、外科手術である。

#### 【実施例】

#### 【0098】

< 実施例 1 および 2 の材料と方法 >

< 患者の選択および検体収集 >

2010年1月から2011年2月の間に、San Diego Countyの4つの  
 地域医療センターでSTEMIを有して緊急処置室へ来る患者の血液を、CECの特徴づ

10

20

30

40

50

けのために採取した。すべてのSTEMIの血液サンプルを、動脈シースを介して、および診断上の冠動脈造影または介入のためのカテーテルの挿入前に心臓カテーテルの検査室で得た。患者はすべて、2つの近接する胸部の誘導における少なくとも0.2mVまたは近接する四肢の誘導における0.1mVのST部分上昇を含む、STEMIの基準を満たした。心筋虚血の陽性マーカー（CK-MBまたはトロポニン）および閉塞性の冠動脈疾患の血管造影の証拠も必要であった。最初の心筋トロポニンおよびCK-MB値を得て、90分間の提示（presentation）の間に記録した。続くCK-MBおよびトロポニン値は記録されなかった。

#### 【0099】

CECのレベルおよび形態を、STEMIの患者から得たものと比較する目的で、健康な対照を、The Scripps Research Instituteでの正常な血液ドナープログラムから採用した。すべての健康な対照は、18歳と35歳の間であり、自己報告によって任意の慢性障害がないと考えられた。健康な無作為の年齢が一致したサンプルにおけるCECの確認のための血液を、静脈穿刺を介して得た。自己報告を介して任意の急性の疾患または症状の存在を否定した、年齢が一致した対照の無作為に選択したサンプルを、研究のCEC形態の分析の一部に含んだ。喫煙状態、肥満症、心血管障害の家族歴、または急性発熱疾患は、排他的な基準として使用しなかった。非ST部分上昇型心筋梗塞（NSTEMI）の患者と共に開かれた（open）動脈内膜切除手術を最近受けた、既存の血管疾患の個体も、CECの形態的特徴づけの唯一の目的のために採用した。NSTEMIの一群におけるMIの基準は、MIと一致する症状、高いレベルの心筋トロポニンとCK-MBによって測定されるような、心筋壊死の血清学的証拠、および閉塞性の冠動脈疾患の血管造影の証拠を含んだ。

#### 【0100】

事例および対照からのすべての血液を、72時間までCECレベルを安定させると知られる軽度の細胞固定液（cellular fixative）を含有しているチューブに集めた。続いて、サンプルを、室温で維持し、収集の48時間以内に処理するために配達便を介して中央の研究所に輸送した。治験審査委員会の認可をすべての採用する場合（recruiting sites）から得て、すべての患者から同意書を得た。

#### 【0101】

##### < CECの識別 >

簡潔に述べると、全血中のCECを、抗CD146抗体が結合した磁気ナノ粒子によって結合し、繰り返しの磁気のインキュベーションおよび自動化した洗浄によって集積した。CD146+で集積した細胞を、CD105とCD45に対する蛍光抗体で染色し、磁気的に集積した及び蛍光抗体で標識化した細胞を、MagNest（登録商標）のCell Presentation Deviceに入れた。図1のAは、CellTracks Analyzer II（CTAII）による、サンプルおよび画像の分析中の工程を示す。MagNest（登録商標）の装置は、蛍光画像分析用に単層中で磁気で標識化した細胞を方向付けるために、2つの永久磁石間に位置付けした、使い捨てのサンプルカートリッジから成る。MagNest（登録商標）を、4色の半自動化の蛍光顕微鏡である、CTAIIに入れる。その後、アナライザーは、4つの蛍光色の各々に関する画像を集めるカートリッジ表面全体をスキャンする。これは、各蛍光のチャンネルに対して180の画像を記録する（1スキャン当たり720の画像）。CTAIIのソフトウェアは、各フレームを自動的に分析し、それらのDAPIおよびCD105の蛍光に基づいて起こり得る候補CECであったフレーム内のこれらの対象を識別する。候補CECを、訓練されたオペレーターによるレビューと識別のために一連のサムネイルとして画像ギャラリーに入れる（補足の図2のA）。サムネイル画像は、右から左に、未使用の（FITC）チャンネル、CD45-APCシグナル、DAPI染色された核、CD105-PE反応性、および最終的にCD105-PE及びDAPI染色の上塗りを示す。FITCチャンネルは、対象の追加のマーカーを有するCEC表現型に対して使用され得る。CECとして採点されるために、細胞は、核を有し、CD105を表現し、細胞の形態を有し、CD45

に対して陰性でなければならなかった。補足の図2のBは、CTA IIソフトウェアによって検査員に提示されるような3つの対象の例を示す。最初の2つの対象は、基準を満たし、オペレーターによってCECとして採点された(チェックされたボックス)。CD45陽性であったため、3番目の対象を白血球と判断した(チェックされていないボックス)。ソフトウェアモジュールは、チェックされたボックスを各サンプル内で自動的に作表し、結果を4mLの血液当たりのCECの数として表わした。

#### 【0102】

##### <CEC形態分析>

CECの画像分析を、カスタマイズしたMatlabプログラムを使用して行った。データ分析を、MatlabまたはGraphPad Prism(release 4.00)のいずれかを使用して行った。CellSearch(Veridex)からの固定したCECの蛍光強度測定を、以下の4工程のプロセスで実行した:(1)単一のCECのカラー画像をクロッピングし、それらの個々のチャンネル(CD105とDAPI)へと分離し、その後、tifとして保存する工程。(2)細胞体(CD105)および核(DAPI)を分割する工程。(3)分割した画像の領域を算出する工程。(4)単一細胞および核の領域を算出する工程。標準偏差、 $\sigma_1$ および $\sigma_2$ を有する2つのガウス変換を、各CEC画像のCD105とDAPIのチャンネルに対して計算した。背景のピクセルを、単一モードの閾値(28)を使用して取り除き、CECの細胞体および核に対応する最終的な対象を、2つのガウス画像の閾値の差として測定した。ガウス変換で使用される一連の $\sigma_1$ と $\sigma_2$ を、目視検査によって最も正確なマスクをもたらすために選択した。各CEC画像に対するCD105チャンネルの領域を、CD105の領域内で包含される核のマスクにおいて確認された核の数で割った。データ分析を、MatlabまたはGraphPad Prismのいずれかを使用して行った。すべての統計的な比較を、GraphPad Prismにおいて対のt検定(両側)を使用して行った。

10

20

#### 【0103】

##### <CECカウントの統計分析>

STEMIの事例が対照と比較してCECのより高いカウントを示したかどうかを確かめるために、ノンパラメトリックのBehrens-Fisherの問題に対する2つのサンプル試験を使用した。CECの数と、MB、トロポニン、および年齢のレベルとの間の比例関係を測定するために、スピアマンの順位相関を使用した。患者を、観察されたCECカウントに基づいて、2つの群、STEMIおよび対照に分類した、10倍の交差検定でのロジスティック回帰を使用して、数理モデルを構築した。正確に分類された例の数および受信者動作特性(ROC)の曲線下の面積を評価するために、Wekaのソフトウェアで生じたこのモデルを使用した。図2のBで示されるROC曲線は、すべての利用可能なデータを使用した、ロジスティック回帰モデルに基づき(すなわち、交差検定がない)、Rの統計的な計算環境のROCRパッケージを使用してもたらされた。ROC曲線(AUC)下の領域を、Rの統計的な計算環境においてHmiscパッケージのsomers2の機能を使用して計算した。

30

#### 【0104】

##### <実施例1:CECレベルは、急性心筋梗塞における動脈損傷の症状を示す>

CECを、3つの基準:核に対する陽性染色、CD-105(ECマーカー)に対する陽性染色、およびCD-45(白血球マーカー)に対する陰性染色、に基づいて明白に識別した(図1)。

40

#### 【0105】

50の連続するSTEMI患者(82%が男性)が、CECのレベルの確認のために先を見越して登録された。STEMI患者における中間のCECカウントは、12CEC/mLと51CEC/mL(2.5-465のCEC/mLの範囲)の、それぞれ、高四分位と低四分位を有する19CEC/mLであった(表1、図2)。

#### 【0106】

【表 1】

	数	年齢	% 男性	CECs/mL	トロポニン	CK-MB
STEMI	50	58.5 (39-80)	82%	19.4 (11.6, 51.1)	5.2 (1.7, 17.8)	26.9 (8.4, 81.9)
対照	44	30 (22-34)	51%	3.8 (2.3, 5.1)	---	---

10

## 【0107】

中間値の年齢は、58.5歳(39-80歳の範囲)であって、中間値の心筋トロポニンおよびCK-MBの値は、それぞれ、5.7ng/mlおよび27.9ng/mlであった。

すべてのSTEMIの事例における心筋トロポニンおよびCK-MBの値の四分位および範囲を、表1に示す。とりわけ、STEMIの事例は、臨床的に許容な正常値(トロポニン $< 0.1 \text{ ng/ml}$ ; CK-MB $< 3.0 \text{ ng/ml}$ )より対数比的な平均が高く、STEMIの事例に対して期待される範囲内で適切なCK-MBおよびトロポニンのレベルを有した。重要なことに、これらの値は、この表現型に典型的に付随する深刻な心筋壊死を浮き彫りにしている。CECカウントと初期の心筋内の酵素レベルとの間に相関性は観察されなかった( $r = 0.02$ 、CK-MB;  $r = -0.03$ 、トロポニン)(図3)。

20

## 【0108】

CECの計数のための血液サンプルも、44の連続する健康な対照から先を見越して得た。健康な対照の中間値の年齢は、30歳(22-34の範囲)であった。CEC/mLの中央値は、3.8 CEC/mL(0.75-16.75の範囲)であって、高四分位と低四分位の閾値は、それぞれ、2.25 CEC/mLおよび5.06 CEC/mLであった(表1、図2)。重要なことに、登録された最初の24の健康な対照を、2か月でCEC数の繰り返しの測定のために戻した(図4)。とりわけ、CEC/mLの中間数は、第1と第2の訪問の間で変わらず、中間値は、第1と第2の訪問の間で、それぞれ、3.4 CEC/mLおよび3.25 CEC/mLであった( $P = 0.5$ )。これらのデータは、CECレベルが、健康な個体において時間とともに安定したままである傾向があることを示唆する。さらに、健康な対照におけるCECカウントおよび年齢と、研究のCEC形態の一部のために含まれた、無作為の年齢が一致した一群のサンプルとの間に相関性はなかった( $r = -0.12$ )(図5)。

30

## 【0109】

CECカウントが、健康な対照と比較したときに、STEMIの一群で劇的に高まることを、我々は観察した(図2( $P = 1.1 \times 10^{-10}$ ))。ロジスティック回帰に基づいて分類するもの(classifier)に関係する受信者動作特性(ROC)の曲線は、0.95のROC曲線下の領域を実証した(1のAUCは完全な分類を示し、0.5に等しいAUCは無作為な選抜を示すであろう)(図2のB)。この分類するものは、MIの事例または10倍の交差検定での健康な対照として、すべての例の86(91.5%)(すなわち、STEMIを有する50の患者および44の健康な対照に対するCEC/mLカウント)を正確に分類することができた。例示目的で、16.5 CEC/mLの値は、60%の感受性を有したが、STEMIの診断において印象的な98%の特異性を有した(図2のB)。あるいは、9 CEC/mLの分類閾値では、関係する感受性は、90%に等しく、一方で特異性はわずかに93%まで下がった。要約すると、CECカウントは、急性心筋梗塞の個体において、独立しており、動脈損傷の予測的バイオマーカーであるように見える。

40

## 【0110】

50

<実施例 2 : M I 患者からの C E C は、異常に大きく、変形しており、しばしば、複数の核とともに現われる >

8 の S T E M I の事例および 1 0 の健康な対照からの単離した C E C の蛍光画像の詳細な分析を行った。低範囲、中範囲、および高範囲の C E C 数を有する、S T E M I の事例および健康な対照を、分析のために選択した (表 2 )。

【 0 1 1 1 】

【表 2】

カテゴリー	MI 事例 / 対照 識別番号	年齢(年)	CEC/1ml 血液
<b>MI 事例</b>			
STEMI	CEC03067	39	4.5
STEMI	CEC2A040	70	11.5
STEMI	CEC03040	53	58.5
STEMI	CEC1D004	58	114
STEMI	CEC03063	54	16.75
STEMI	CEC2B003	56	465.25
STEMI	CEC03048	56	107.25
STEMI	CEC03062	39	12
<b>MI 事例</b>			
NSTEMI	CEC03035	57	99
NSTEMI	CEC2A027	71	109.75
<b>健康な対照</b>	CEC1B006	31	2.5
	CEC1B013	33	1.25
	CEC1B017	29	1.25
	CEC1B001	32	5
	CEC1B003	33	12
	CEC1B014	27	2.5
	CEC1B009	31	9.75
	CEC1B044	26	3.5
	CEC1B023	28	8.75
	CEC1B026	34	1.25
<b>年齢が一致した対照</b>	Pt 219	63	4.75
	Pt 223	57	3.75
	Pt 259	51	4.25
	Pt 265	62	2.25
	Pt 206	51	8.25
	Pt 266	50	1
	Pt 267	62	2.25
	Pt 268	54	10.25
	Pt 274	63	6.25
	Pt 275	63	1
<b>血管の対照</b>	CEC1A012	74	1.75
	CEC1A013	67	1

## 【0112】

さらなる対照の群も、研究のこの部分のために含まれ、その結果、STEMI CECの形態の様相に由来する任意の結論が、現実の臨床的な群の文脈において出された。具体的に、我々のSTEMIの患者群と年齢が一致した10の連続する群の対照を選択した。さらに、開かれた血管手順を最近受けた、文書で証明された末梢動脈疾患を有する2人の

10

20

30

40

50

患者を、血管疾患の対照群として含んだ。非ST部分上昇型心筋梗塞（NSTEMI）の2人の患者も、2つのMI表現型（STEMI対NSTEMI）間で識別され得るCEC形態の任意の潜在的な差を評価するために含んだ。

#### 【0113】

個々の蛍光のCEC画像の目視検査は、MI患者から単離したCECの形態が、対照からのCECの形と著しく異なることを明らかにした。図6は、代表的なSTEMI患者（CEC03040）から単離したCECと比較した、健康な対照と、年齢が一致した対照から単離した個々のCECを示す。対照からのCECは、比較的小さく、形状が細長い傾向があり、1つの細胞体に関係する2つの核を場合によって有し、これは、2つの付着した細胞のクラスター、または2つの核を有する1つの細胞を表わし得る（図6のA）。対照的に、STEMI患者からのCECは、様相がより不均質であり、多くの細胞は、明らかに大きく、ひどく変形しているが、一方で他の細胞はより小さい（図6のB）。STEMI患者からのCECの核も、対照個体からのCECの核と比較して、より大きく、異常な形状である傾向がある（図6のBおよび図7のDを参照）。このSTEMI患者からの最大のCECの画像の多くは、しばしば、一続きのCD105染色された細胞体領域に関係するいくつかの核を含み、それ故、6つまでの核を有する多核のクラスターとして現われる（図6のB）（以下の図8も参照）。細胞間の境界がこれらの蛍光画像で明らかに区別されないため、これらが多細胞のクラスター、あるいは多核の個々の細胞であるかどうかを厳密に決定することは不可能である。

10

#### 【0114】

CECの個々の画像のための細胞領域および核領域を測定した（図5）。50 - 100の無作為に選択された画像におけるCECの形態を、各MI患者に対して分析し、対照患者からのすべてのCEC画像と比較した。これは、MI患者からのCECの平均の細胞領域が、健康な対照又は年齢が一致した対照のいずれかからのCECの平均の $\sim 100\text{mm}^2$ の細胞領域よりも2.5倍大きな、 $\sim 270\text{mm}^2$ であることを明らかにした（ $P < 0.0001$ ）（図7のA）。同様に、MI患者からのCEC核の平均領域は、健康な対照又は年齢が一致した対照からのCEC核に対する30乃至40 $\text{mm}^2$ の領域よりも著しく大きい、 $\sim 65\text{mm}^2$ であった（ $P < 0.0001$ ）（図7のB）。対照では心臓の関連しない疾病に関する血管手術を受ける患者からのCECに対する形態的パラメーターは、対照とは著しく異なっていた（図7のAおよびB）。最終的に、細胞/核領域の比率は、対照群のいずれかからのCECと比較して、MI患者からのCECに関して $\sim 1.5$ 倍大きく、 $P < 0.0001$ で有意水準であった。分析された対照およびMI患者からの単一細胞のCEC画像に対する細胞および核の大きさの変異の範囲の代表的な例は、図7のDで示される。

20

30

#### 【0115】

年齢が一致した対照からのCECの細胞領域および核領域が、健康で、より若い対照からのCECの領域より大きい傾向があった一方で（図7のAおよびB）、細胞/核領域の比率は、これらの2つの対照群間で異なっていた（図7のD）。したがって、細胞領域および核領域は、健康な対照と比較して、年齢が一致した対照からのCECに対して比例して増加し、一方で、細胞領域は、MI患者からのCECに関する核領域に対して不相応に増加した。それ故、増加した細胞/核領域の比率は、MI患者に特異的な形態的異常であり、なぜなら、それが、健康な対照と比較して、年齢が一致した又は血管の対照患者のいずれにおいても観察されなかったからである。細胞領域および核領域の他に、細胞/核領域の比率のために分析されたMIの群を構成する、STEMIとNSTEMI CECとの比較は、2つの群の間での有意差を示さなかった（図9）。

40

#### 【0116】

MI患者および対照からのCECに対する、1つの核を有する単一細胞、または2つ以上の核を有する細胞として存在するCECのパーセントを測定した。（MI患者からの）複数の核を有する個々のCEC画像の例を、図8のAで例証する。定量分析は、平均で、MI患者からのCEC画像の $\sim 25\%$ が、2つ以上の核を包含することを明らかにし、こ

50

れは、健康な対照又は年齢が一致した対照からのCEC画像の5 - 10%と比較して、1画像当たりの核の数において数倍の増加である( $P = 0.0008$ ) (図9のB)。複数の核を有するCEC画像のパーセントも、健康な対照または血管の群に対して年齢が一致した対照群において増加するように見えたが、この差は、これらの2つの群( $P = 0.22$ ) (図9のB)におけるこのパラメーターの多様性が原因の統計的な有意性ではなかった。2乃至10までの核を含むCEC画像の分布は、MI患者が、3つを超える核/画像を包含している唯一の群であることを実証する。対照的に、健康な患者、年齢が一致した患者、または血管の患者からのCEC画像の大部分は、2つおよび4つのCEC画像が、それぞれ、健康な対照及び年齢が一致した対照群から、3つの核を有したことを除いて、1つまたは2つの核のみを含んだ(図9のC)。対照およびMI患者の両方におけるCEC画像の10 - 15%は、2つの核を包含し、これは、個々の二核の細胞(成熟した内皮の特性)を表わし得る。しかしながら、複数の( $> 2$ )核を有するMI患者からの個々のCEC画像の検査は、多くの場合、多小葉の形態を明らかにし、これは、これらの画像の少なくともいくつかは、互いに結合したいくつかのCECの群によるものであることを示唆している。以前の研究は、複数の核を示すMI患者からのCECの画像が、多細胞のクラスターを構成し得ることも示した。

10

## 【0117】

## &lt;実施例3：定期健診中の個体の分析&gt;

個体(35歳)は、定期健診を受けている。個体は、心血管障害の徴候を示していない。血液サンプルを得る。個体の血液中のCECの濃度は、標準濃度より200%高い。CECを検査する。平均の細胞領域は、標準的な細胞領域よりも40%大きい。平均の核領域は、標準的な核領域よりも40%大きい。さらに、CECのほとんどは異常な形状である。最終的に、CECの45%は多核である。個体が心血管障害を持つことを示す(flagged)。さらなる試験が行われ、個体は、アテローム性動脈硬化症と診断される。

20

## 【0118】

## &lt;実施例4：不安定狭心症を示す個体の分析&gt;

個体(65歳)は、胸痛を患う。個体は、胸痛が、5週間前に始まり、休んでいるか眠っているときに生じることを示す。個体は、胸痛が、なくなるまで30分以上の間続く傾向があることをさらに示す。血液サンプルが得られる。個体の血液中のCECの濃度は、標準濃度より350%高い。CECが検査される。平均の細胞領域は、標準的な細胞領域よりも50%大きい。平均の核領域は、標準的な核領域よりも30%大きい。さらに、CECのほとんどは、異常な形状である。最終的に、CECの40%は多核である。個体が心血管障害を持つことを示す。さらなる試験が行われ、個体は、アテローム性動脈硬化症と診断され、心筋梗塞の高いリスクがある。個体は手術を受け、血管形成術が行われる。

30

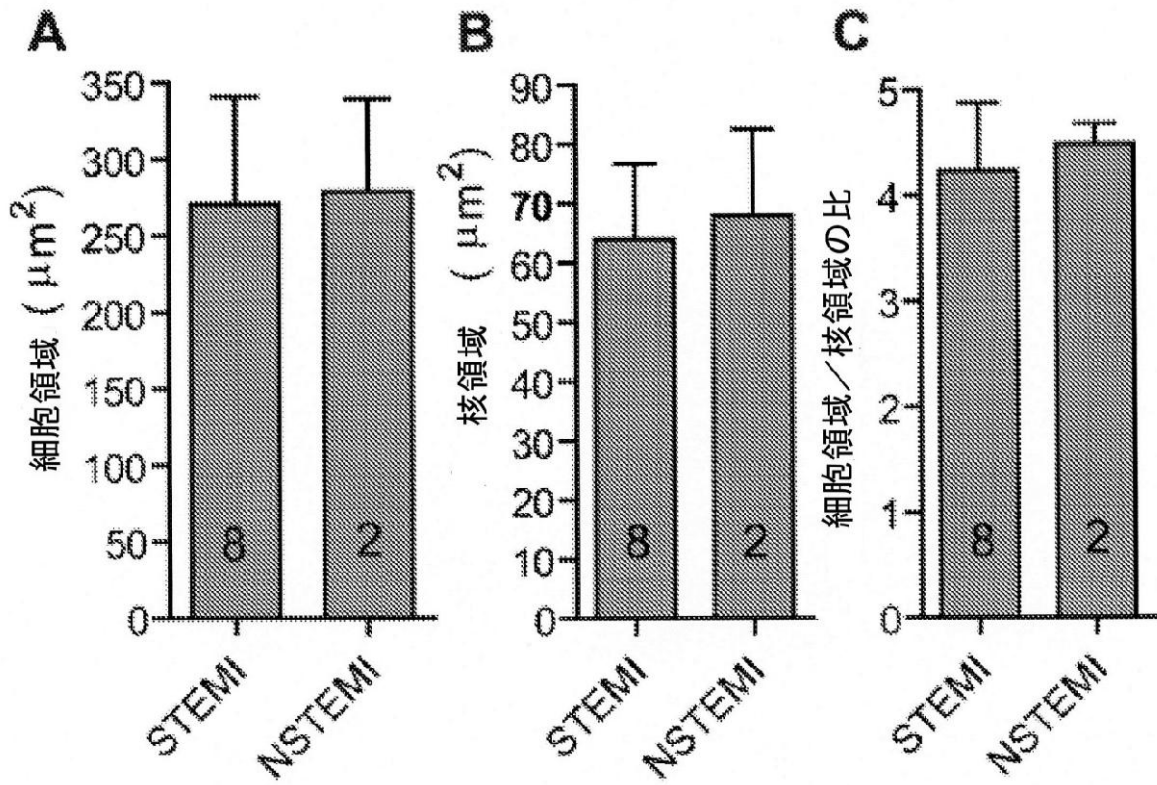
## 【0119】

## &lt;実施例5：狭心症を有する個体の分析&gt;

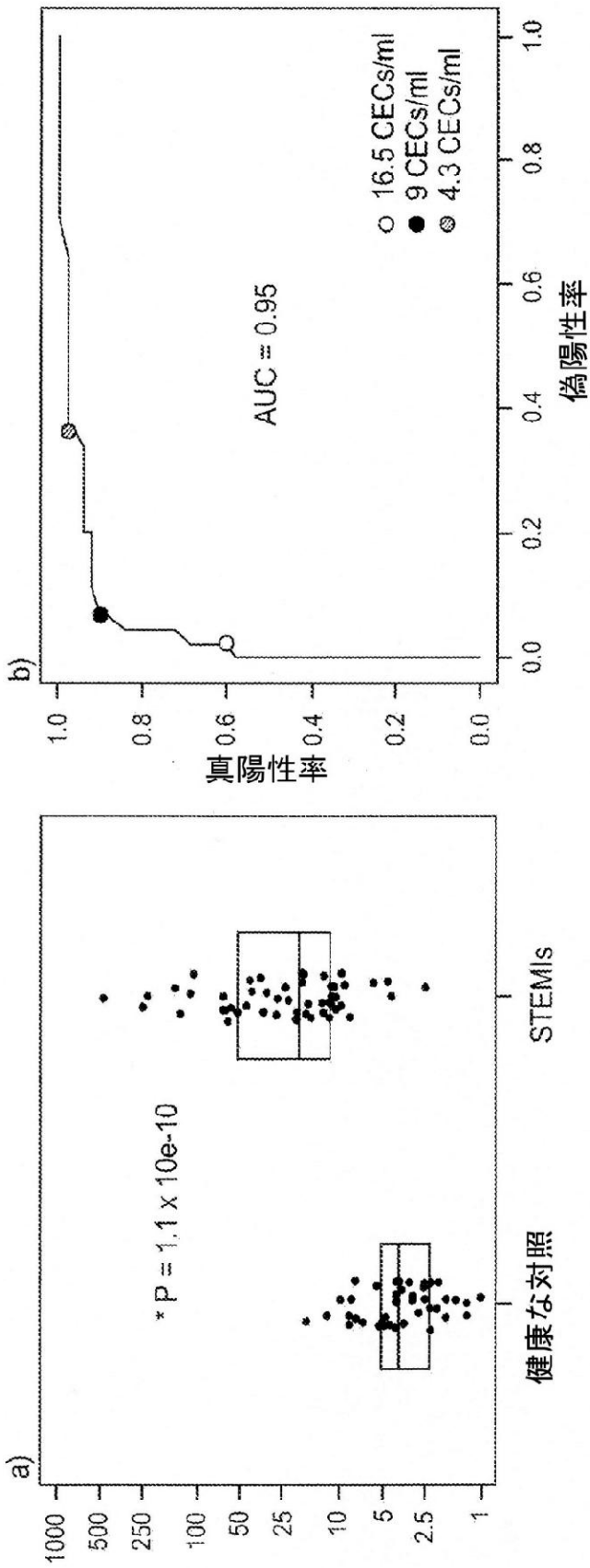
個体(40歳)は、胸痛を患っている。個体は、胸痛が、1か月前に始まり、運動中に生じることを示す。個体は、胸痛が、運動の終了時に消える傾向があることをさらに示す。血液サンプルが得られる。個体の血液中のCECの濃度は、標準濃度より200%高い。CECが検査される。平均の細胞領域は、標準的な細胞領域よりも30%大きい。平均の核領域は標準的な核領域よりも20%大きい。さらに、CECのほとんどは、異常な形状である。最終的に、CECの10%は多核である。個体が心血管障害を持つことを示す。さらなる試験が行われ、個体は、軽度のアテローム性動脈硬化症と診断される。CEC分析に基づいて、個体は、スタチンの投与および低脂肪食に十分に反応すると予想される。スタチンを処方する。個体は、1か月後のフォローアップのために戻り、アテローム動脈硬化性プラークが減少する。

40

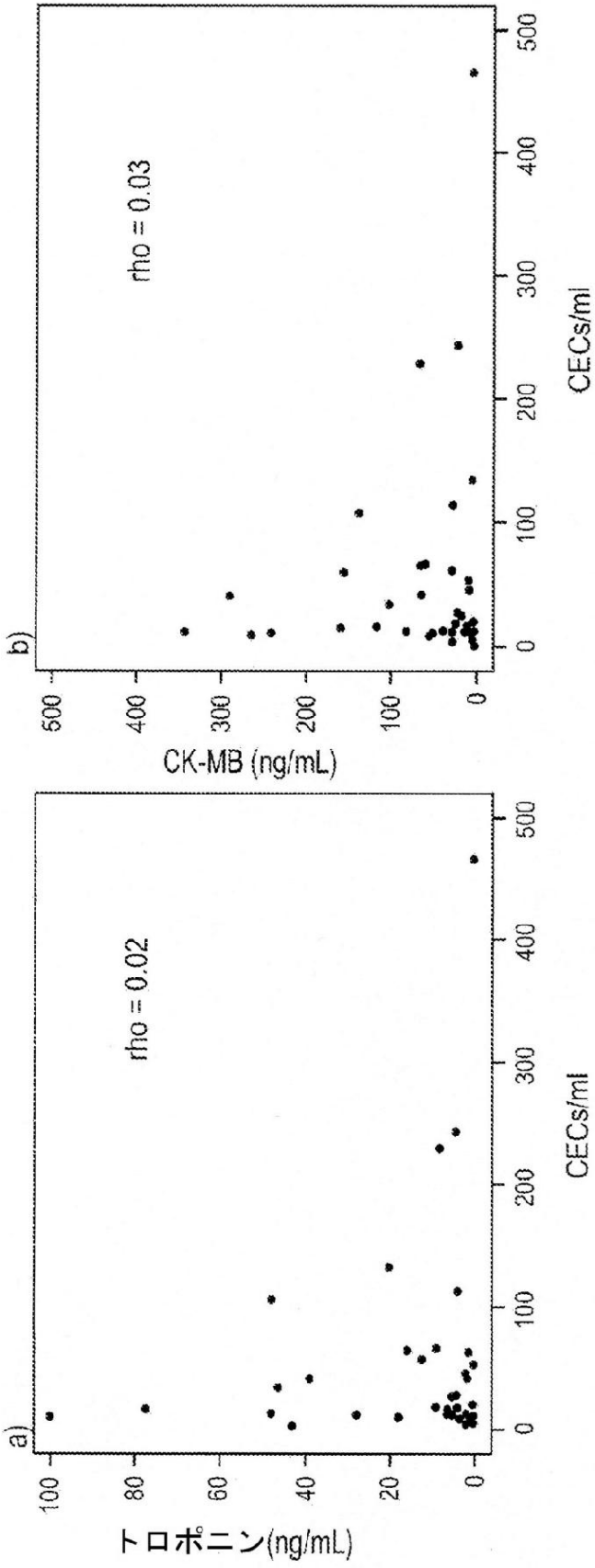
【図1】



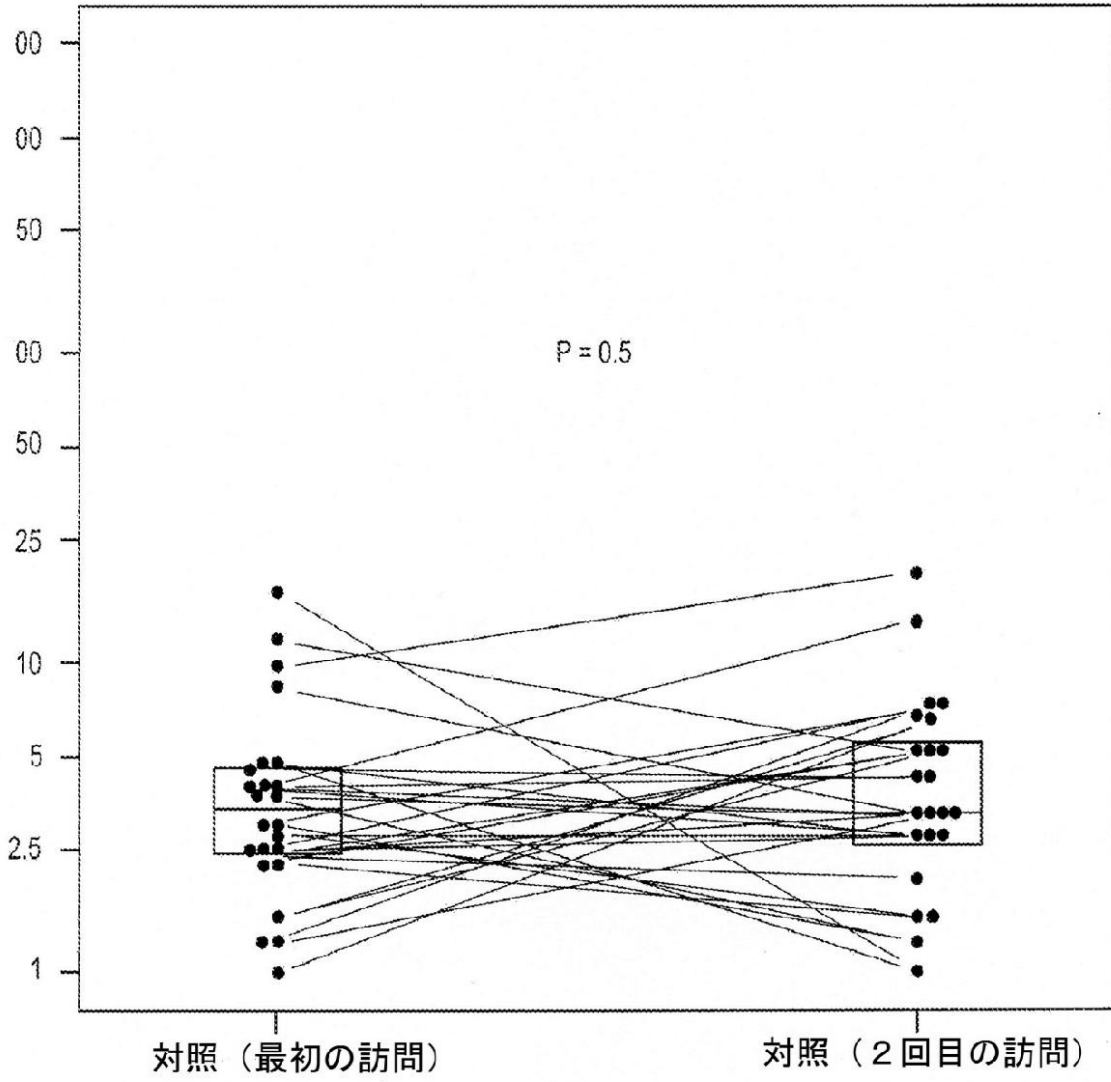
【 図 2 】



【 図 3 】

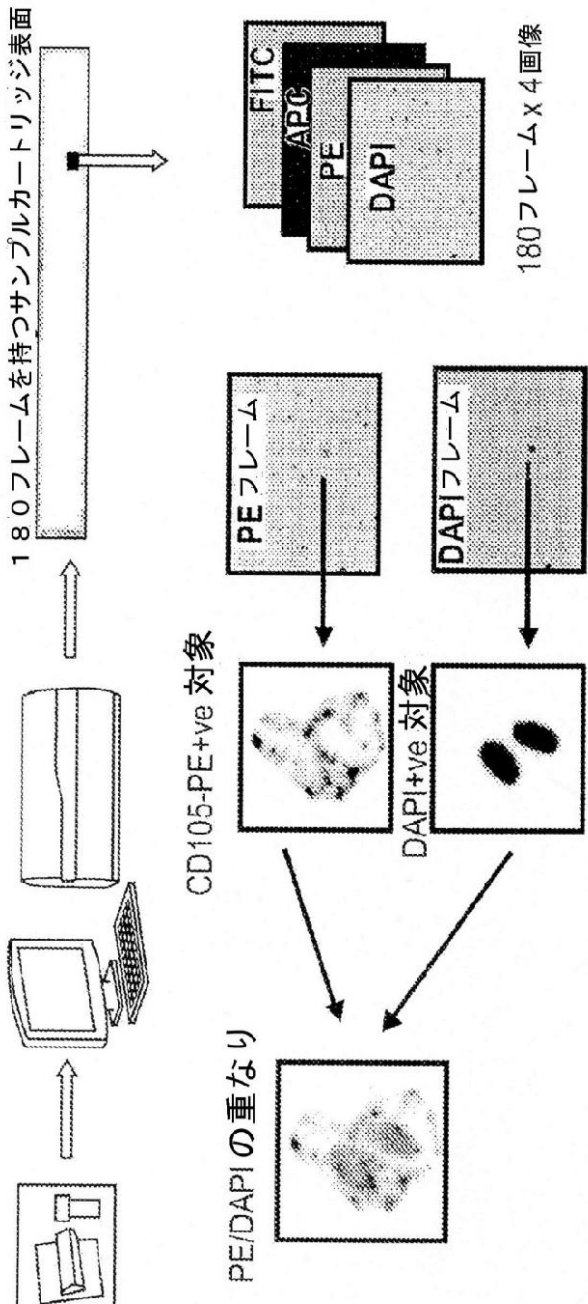


【 図 4 】

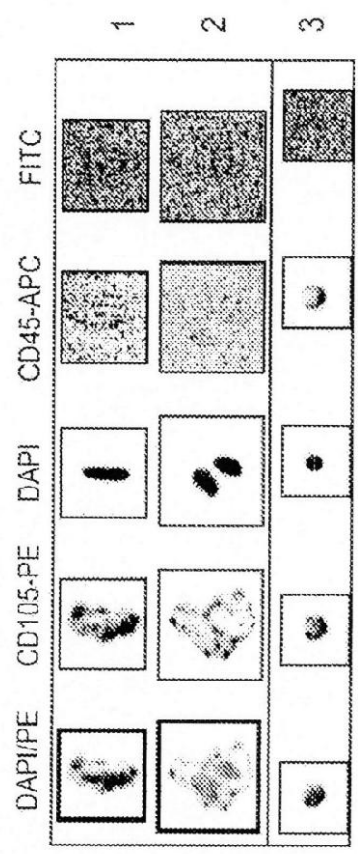


【 図 5 】

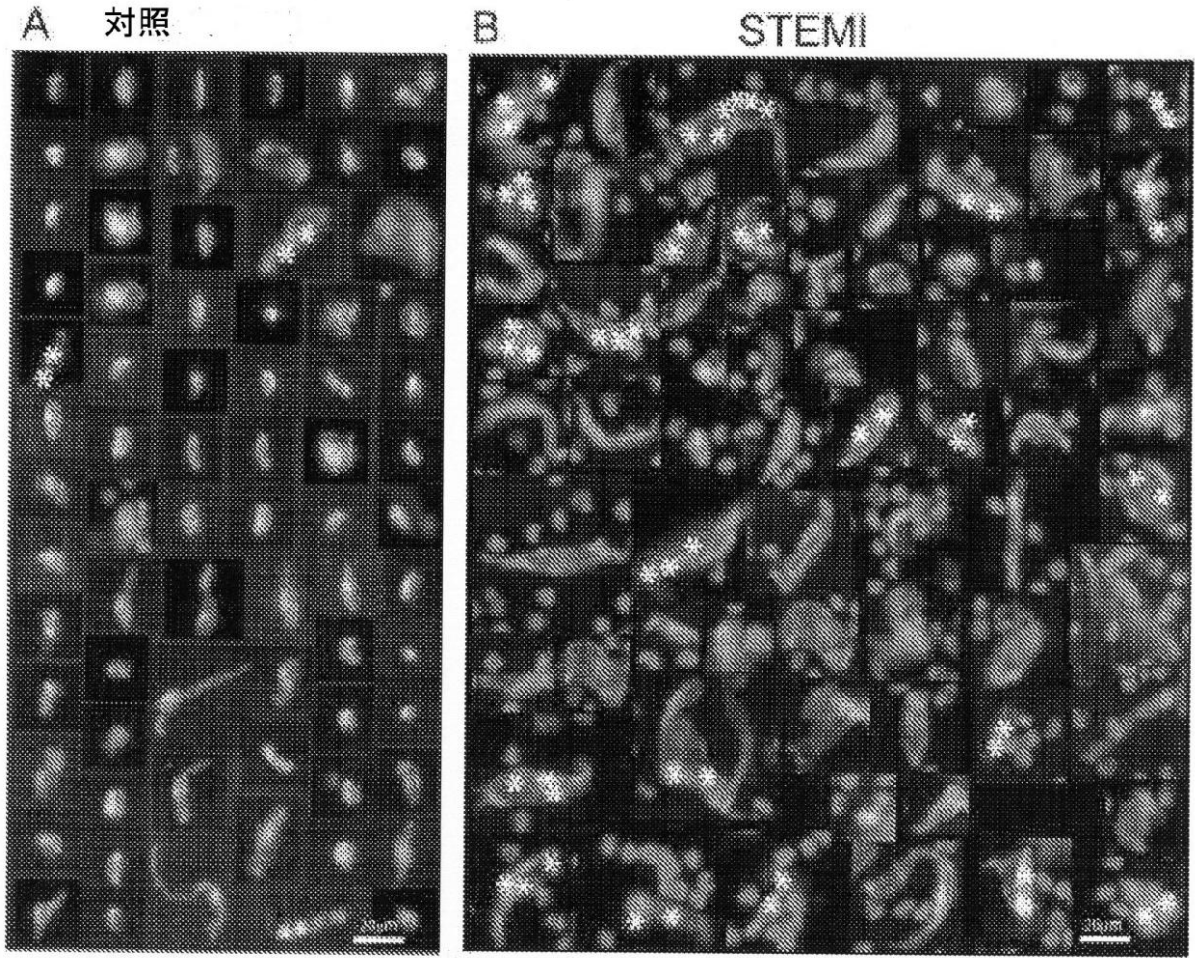
A. サンプル及び画像の分析



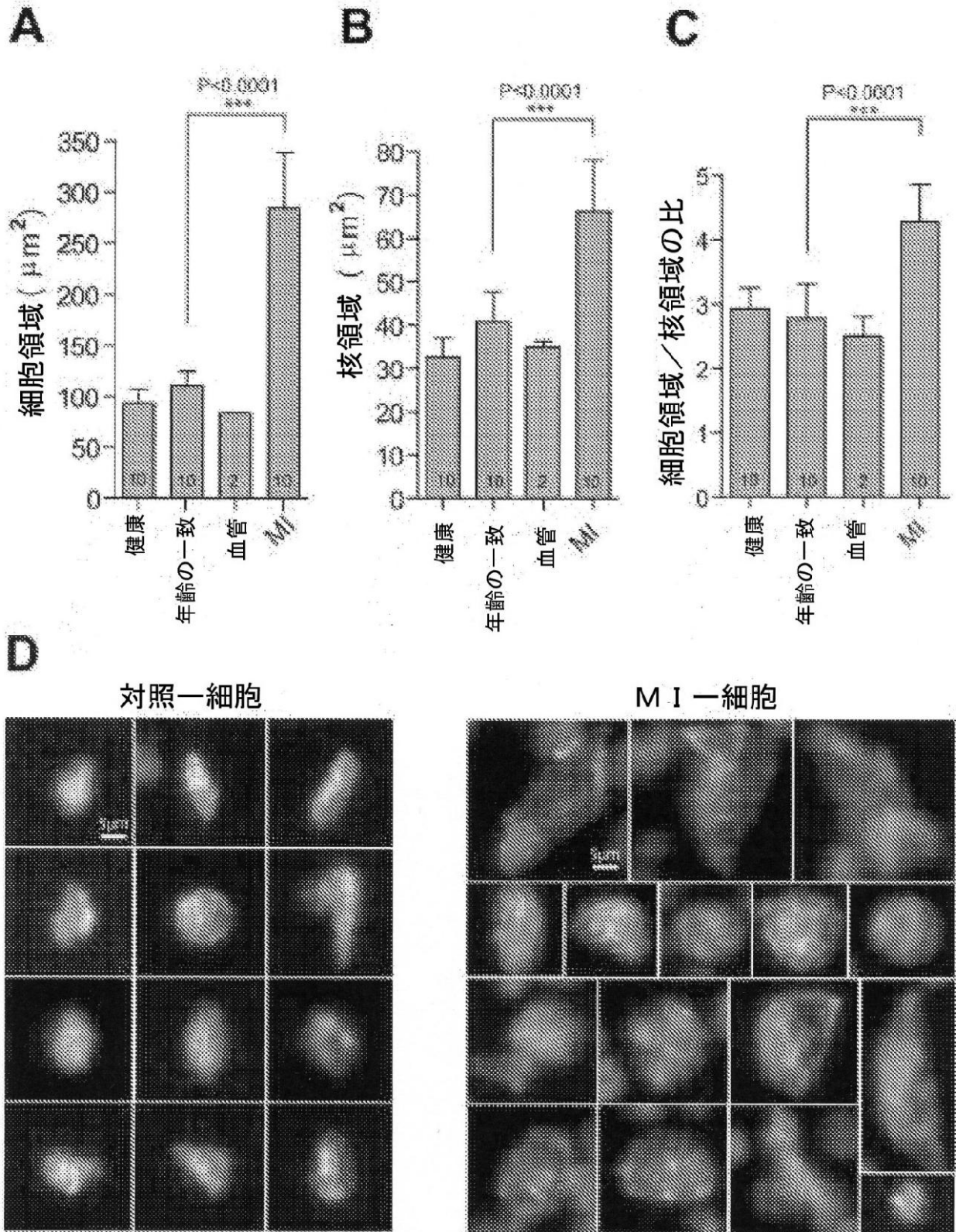
B. CEC 同定



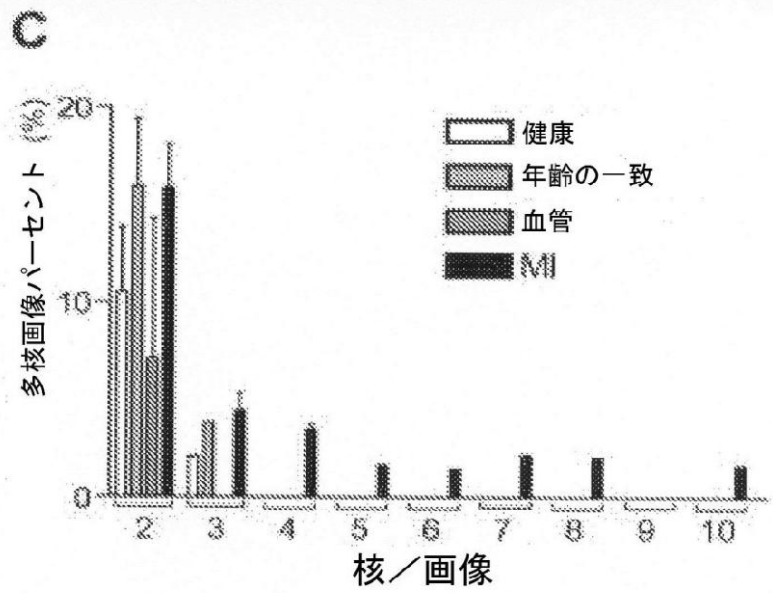
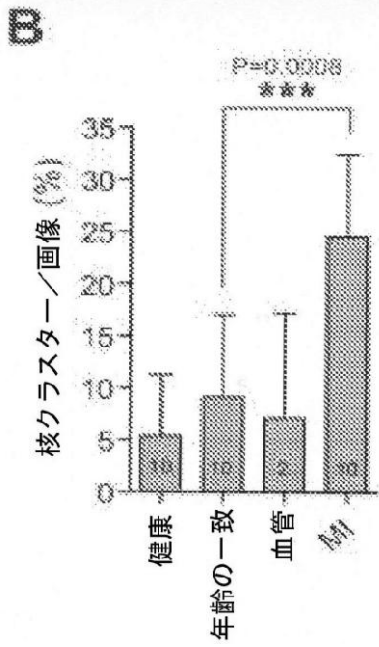
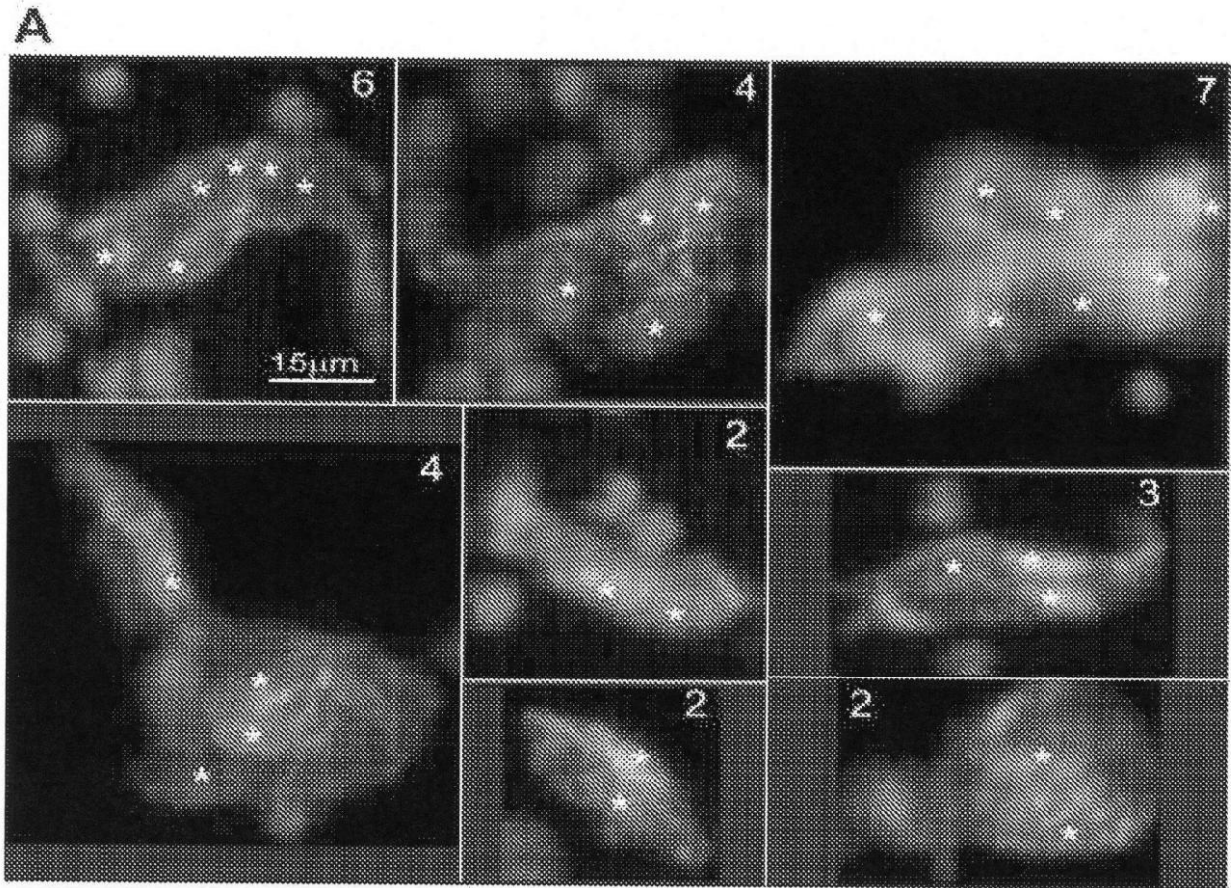
【 図 6 】



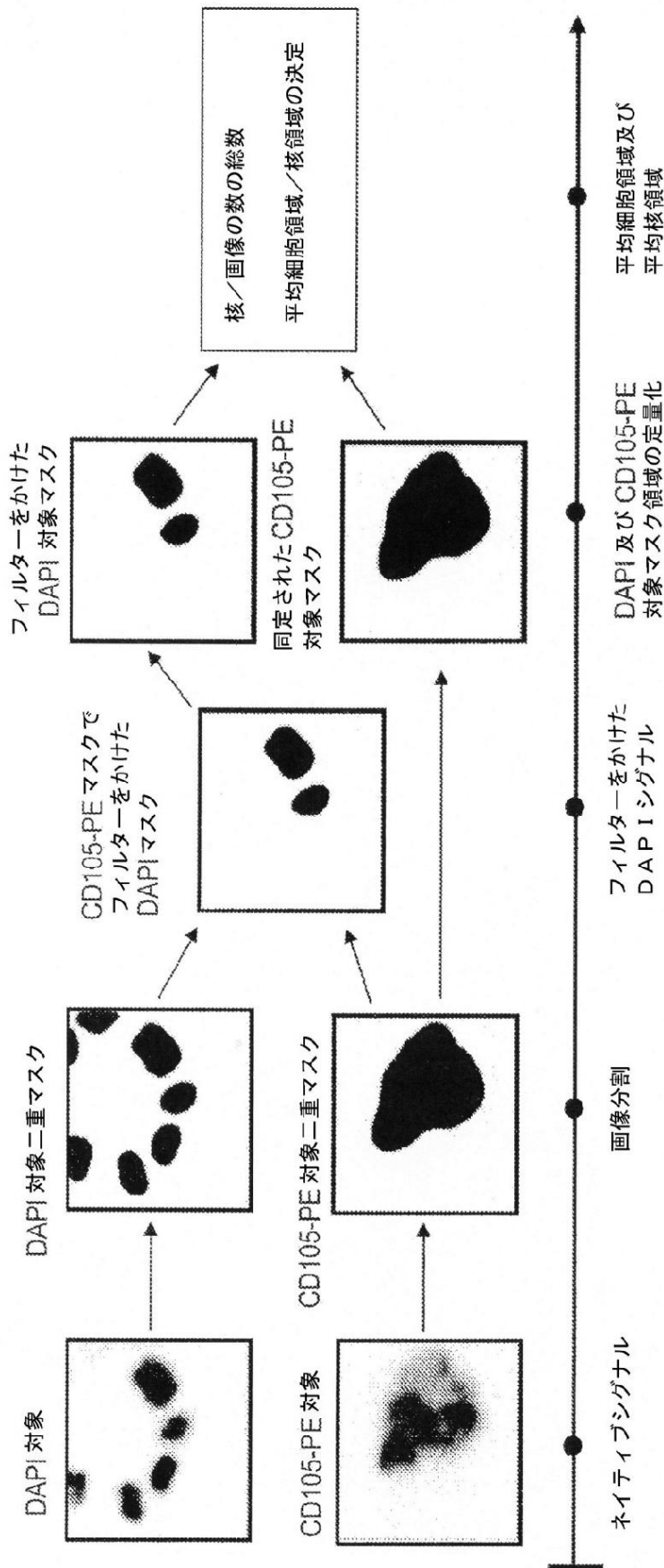
【図7】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 手続補正書 】

【提出日】平成26年5月30日(2014.5.30)

【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】

個体の循環内皮細胞を分析するためのシステムであって、該システムは、

(a) 循環内皮細胞(CEC)及び循環非内皮細胞を含む、個体から得られた血液サンプルから単離した、CECの一群、及び

(b) CECの一群中の単一のCECの形態的特徴を視覚化するために十分な倍率を有している顕微鏡、を含み、

ここで前記形態的特徴は、細胞領域、核領域、核領域に対する細胞領域の比、細胞形状、核形状、核数、又はこれらの組み合わせであるシステム。

【請求項2】

CECの一群又はCECの一群中の単一のCECの拡大された画像を取り込む及び保存する電子メモリをさらに含むことを特徴とする、請求項1記載のシステム。

【請求項3】

コンピュータネットワークに随意に接続された、コンピュータ処理デバイスをさらに含むことを特徴とする、請求項1記載のシステム。

【請求項4】

前記形態的特徴を分析し、前記形態的特徴の分析を作り出すソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項3記載のシステム。

【請求項5】

循環内皮細胞(CEC)の一群の前記形態的特徴を標準または対照と比較するソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項3記載のシステム。

【請求項6】

前記血液サンプルから単離した循環内皮細胞の一群の濃度を決定するソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項3記載のシステム。

【請求項7】

循環内皮細胞の一群の前記濃度を標準または対照の濃度と比較するソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項6記載のシステム。

【請求項8】

前記血液サンプルから循環内皮細胞の一群を単離する機械をさらに含むことを特徴とする、請求項1乃至7のいずれかに記載のシステム。

【請求項9】

循環内皮細胞に特異的に結合するラベル、循環内皮細胞に結合しないラベル又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項1乃至8のいずれかに記載のシステム。

【請求項10】

CD146に特異的に結合するラベル、CD105に特異的に結合するラベル、CD45に特異的に結合するラベル、CD34に特異的に結合するラベル、CD31に特異的に結合するラベル、VEGF2に特異的に結合するラベル、CD144に特異的に結合するラベル、CD106に特異的に結合するラベル又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項1乃至9のいずれかに記載のシステム。

【請求項11】

抗 - C D 1 4 6 抗体、抗 - C D 1 0 5 抗体、抗 - C D 4 5 抗体、抗 - C D 3 4 抗体、抗 - C D 3 1 抗体、抗 - V E G F 2 抗体、抗 - C D 1 4 4 抗体、抗 - C D 1 0 6 抗体又はその組み合わせをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 1 0 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 1 2】

前記抗体が標識化されていることを特徴とする、請求項 1 1記載のシステム。

【請求項 1 3】

前記抗体が蛍光部分又は磁気部分により標識化されていることを特徴とする、請求項 1 1記載のシステム。

【請求項 1 4】

個体又は個体を治療する医療専門家に、C E C の一群の前記形態的特徴の分析を送信するソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項 3 記載のシステム。

【請求項 1 5】

個体又は個体を治療する医療専門家に、C E C の一群の前記形態的特徴の分析に基づく心血管障害の診断または予後を送信するソフトウェアモジュールをさらに含み、該ソフトウェアモジュールは、前記コンピュータ処理デバイスによって実行されることを特徴とする、請求項 1 乃至 1 4 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 1 6】

前記心血管障害が、プラーク断裂、プラーク浸食、心臓の虚血、心臓に対する再かん流傷害、アテローム性動脈硬化またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 5記載のシステム。

【請求項 1 7】

前記心血管障害が、急性冠症候群であることを特徴とする、請求項 1 5記載のシステム。

【請求項 1 8】

前記心血管障害が、S T 上昇型心筋梗塞 ( S T E M I )、非 S T 上昇型心筋梗塞 ( N S T E M I )、不安定狭心症またはその組み合わせから選択されることを特徴とする、請求項 1 5記載のシステム。

【請求項 1 9】

前記心血管障害が虚血発作であることを特徴とする、請求項 1 5記載のシステム。

【請求項 2 0】

前記心血管障害がアテローム性動脈硬化であることを特徴とする、請求項 1 5記載のシステム。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/045832
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N1/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T B WILLS ET AL: "Immunomagnetic isolation of canine circulating endothelial and endothelial progenitor cells", VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY, vol. 38, no. 4, 2009, pages 437-442, XP55041567, page 438, left-hand column, paragraph 3; figure 2	1-20, 212-230
X	----- KELLY A S ET AL: "Circulating Activated Endothelial Cells in Pediatric Obesity", JOURNAL OF PEDIATRICS, vol. 157, no. 4, 2010, pages 547-551, XP027256202, [retrieved on 2010-06-14] page 548, left-hand column, paragraph 3 ----- -/--	1-20, 101, 105-138
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 October 2012		09/11/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Gunster, Marco

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/045832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. WOYWODT ET AL: "An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells", ANNALS OF HEMATOLOGY, vol. 83, no. 8, 2004, pages 491-494, XP55042176, figures 1-3 -----	1-21, 25-63, 67-100, 212-230
X A	WO 2009/143478 A2 (WEISENTHAL LARRY MARK [US]) 26 November 2009 (2009-11-26) claims 1-7 -----	1-20 139
X	MUTIN M ET AL: "DIRECT EVIDENCE OF ENDOTHELIAL INJURY IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION AND UNSTABLE ANGINE BY DEMONSTRATION OF CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS", BLOOD, vol. 93, no. 9, 1999, pages 2951-2958, XP001180171, page 2953, left-hand column, paragraph 5; figures 1-3 page 2957, left-hand column, paragraph 4 -----	1-21, 25-63, 67-100, 139, 143-177, 181-230
X	C. J. BOOS ET AL: "Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes", EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 28, no. 9, 2007, pages 1092-1101, XP55042170, page 1094, right-hand column, paragraph 2; figures 2-4 -----	1-21, 25-63, 67-101, 105-138
X	QUILICI J ET AL: "Circulating Endothelial Cell Count as a Diagnostic Marker for Non-ST-Elevation Acute Coronary syndromes", CIRCULATION, vol. 110, no. 12, 2004, pages 1586-1591, XP008121979, [retrieved on 2004-09-13] page 1587, left-hand column, last paragraph page 1590, left-hand column, last paragraph ----- -/--	1-21, 25-63, 67-100

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/045832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE [Online]            US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),            BETHESDA, MD, US;            March 2011 (2011-03),            SONG TIE-NIU ET AL: "[Circulating            endothelial cell injury in on-pump and            off-pump coronary-artery bypass            grafting].",            XP002686078,            Database accession no. NLM21421501            abstract            &amp; NAN FANG YI KE DA XUE XUE BAO = JOURNAL            OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY,            vol. 31, no. 3, March 2011 (2011-03),            pages 535-538,</p>	1-230
X,P	<p>-----            DAMANI S ET AL: "Characterization of            Circulating Endothelial Cells in Acute            Myocardial Infarction",            SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE,            vol. 4, no. 126, March 2012 (2012-03),            pages 139-147, XP8157357,            the whole document</p>	1-230
X,P	<p>-----            US 2011/195413 A1 (LIN PING [CN])            11 August 2011 (2011-08-11)            paragraphs [0030] - [0032]            -----</p>	1-20, 213-230

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/045832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009143478 A2	26-11-2009	CA 2725203 A1 EP 2294210 A2 JP 2011522528 A US 2011171214 A1 WO 2009143478 A2	26-11-2009 16-03-2011 04-08-2011 14-07-2011 26-11-2009
US 2011195413 A1	11-08-2011	CN 101587043 A US 2011195413 A1 WO 2009140876 A1	25-11-2009 11-08-2011 26-11-2009

## フロントページの続き

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

(72)発明者 トポル, エリック

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ カミーノ・デ・ラ・コスタ 5 9  
2 0

(72)発明者 ダマニ, サミール

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サンディエゴ メドウズ・デル・マー 5 5 6  
5

(72)発明者 コネリー, マーク

アメリカ合衆国 1 8 9 0 1 ペンシルベニア州 ドイルズタウン ノッティンガム・ウェイ 4  
7 7 0

(72)発明者 ラオ, ガーラ, チャンドラ

アメリカ合衆国 0 8 5 5 0 ニュージャージー州 ジャンクション プリンストン ハバーフォ  
ード・ロード 9

Fターム(参考) 2G043 AA06 BA16 DA02 EA01 FA02 NA06

2G059 AA06 BB13 DD03 EE11 FF01 FF03 KK04 MM10 PP06

专利名称(译)	用于分析心血管病症的方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014523533A</a>	公开(公告)日	2014-09-11
申请号	JP2014519085	申请日	2012-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	斯克里普斯健康 詹森诊断器材有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	斯克里普斯健康 扬森诊断, LLC		
[标]发明人	トポルエリック ダマニサミール コネリーマーク ラオガーラチャンドラ		
发明人	トポル,エリック ダマニ,サミール コネリー,マーク ラオ,ガーラ,チャンドラ		
IPC分类号	G01N21/27 G01N33/53 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	C12Q1/04 G01N15/1475 G01N33/5026 G01N33/5064 G01N2800/32 G01N2800/52		
FI分类号	G01N21/27.A G01N33/53.Y G01N33/533 G01N21/64.F G01N21/64.E		
F-TERM分类号	2G043/AA06 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/NA06 2G059/AA06 2G059/BB13 2G059/DD03 2G059/EE11 2G059/FF01 2G059/FF03 2G059/KK04 2G059/MM10 2G059/PP06		
优先权	61/505481 2011-07-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了包括循环内皮细胞 (CEC) 的组合物, 系统和方法。本文所述的组合物使用分离的CEC, 包括允许分析CEC的组合物形式。本文描述的系统使用隔离的CEC和分析工具或分析工具的输出。本文所述的方法涉及使用分离的CEC和分析工具来向保健专业人员或CEC供体提供与CEC供体的心血管健康有关的信息。因此, 本文所述的化合物, 系统和方法既是转化 (非分离的CEC到分离的CEC, 或者是分离的CEC到分析CEC) 和机器 (分离和分析工具)。包括。[选型图]图1

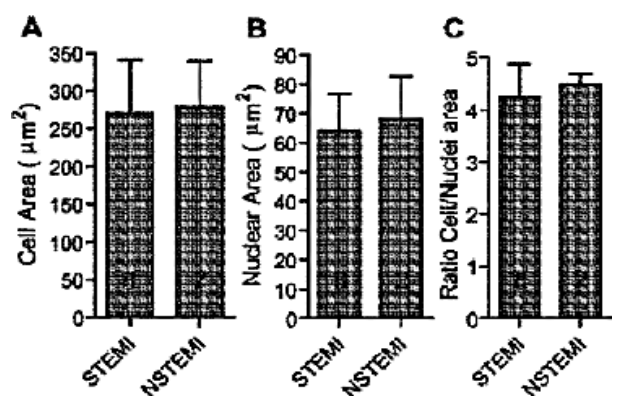


FIG. 1