

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4741249号

(P4741249)

(45) 発行日 平成23年8月3日(2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日(2011.5.13)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
A 6 1 P 7/02	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A

請求項の数 25 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-570272 (P2004-570272)	(73) 特許権者	398032751
(86) (22) 出願日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(65) 公表番号	特表2006-508367 (P2006-508367A)		ィックス・プロダクツ・ゲーエムベーハー
(43) 公表日	平成18年3月9日 (2006.3.9)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/012531		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02004/046722	(74) 代理人	100091731
(87) 国際公開日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		弁理士 高木 千嘉
審査請求日	平成18年10月20日 (2006.10.20)	(74) 代理人	100127926
(31) 優先権主張番号	10253525.6		弁理士 結田 純次
(32) 優先日	平成14年11月16日 (2002.11.16)	(74) 代理人	100105290
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 三輪 昭次
(31) 優先権主張番号	10316059.0	(72) 発明者	アンドレーアス・エム・ツァイエ
(32) 優先日	平成15年4月8日 (2003.4.8)		ドイツ連邦共和国 60594 フランクフル
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ト・アム・マイン、ドイチュヘルンウーフ
			ァー47

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患における生化学的マーカーの組合せとしての sCD40L, PAPP-A および胎盤増殖因子 (PIGF)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 被験体からの分析すべき生物学的サンプルを用意するステップ；
 (b) そのサンプル中の P I G F のマーカーの濃度を決定するステップ、または (b) そのサンプル中の P I G F のマーカーの濃度を決定し、ここでさらに、ステップ (c) として、可溶性 CD 4 0 リガンド (s C D 4 0 L)、P A P P - A、トロポニン T (T n T)、M P O、N T - p r o B N P、V E G F、B N P およびさらなる炎症マーカーから選択される少なくとも 1 つのさらなるマーカーの濃度を決定するステップ；ならびに
 (d) 上記分析すべきサンプルについて得られた結果を、参照値および/または参照サンプルからの値と比較するステップ、
 を含む、急性心血管疾患の診断または予後診断のために、または急性心血管疾患の治療のモニタリングのために、サンプルを分析する方法。

【請求項 2】

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

【請求項 3】

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

【請求項 4】

分析すべきサンプルが血漿または血清である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

凝固阻害物質が末梢血に添加される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

凝固阻害物質がヘパリンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

さらなる炎症マーカーが、CRP、hsCRPおよびIL-10から選択される、請求項 1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、PLGF; PLGF+TnT; sCD40L+PLGF; PAPP-A+PLGF; sCD40L+PLGF+TnT; PAPP-A+PLGF+TnT; sCD40L+PAPP-A+PLGFおよびsCD40L+PAPP-A+PLGF+TnTから選択される、請求項 1～6のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 9】

MPO、NT-proBNP、BNP、CRP、hsCRPおよびIL-10のうち少なくとも1つのマーカーの分析をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

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

【請求項 11】

20

マーカー結合分子が、抗マーカー抗体またはその部分およびマーカー・レセプターまたはその部分からなる群より選択される、請求項 1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

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

【請求項 13】

マーカーおよび/またはマーカー結合分子が、溶液中に存在するかまたはマトリックスに固定化されている、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

マーカー結合分子が、フルオレセインチオイソシアネート、フィコエリスリン、酵素および磁性ビーズからなる群より選択される1つまたは幾つかの検出グループに結合する、請求項 11～13のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 15】

マーカー結合分子が、1つまたは幾つかの検出グループが結合する抗体を用いて検出される、請求項 11～14のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

免疫学的方法が、サンドイッチ酵素イムノアッセイ、ELISAおよび固相イムノアッセイからなる群より選択される、請求項 11～15のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

心血管疾患が、不安定アンギナ、心筋梗塞、急性冠症候群、冠状動脈疾患および心不全からなる群から選択される、請求項 1～16のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 18】

検査されるサンプルの結果についての閾値が、血清または血漿中27.0 ng/lのPLGFにおいて存在する、請求項 1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

検査されるサンプルの結果についての閾値が、血清または血漿中10.0 mg/lのhsCRPにおいて存在する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1～19のいずれかに記載の方法を実施するための、患者のサンプル中のPLGFを検出するための少なくとも1つの抗体を含む、診断キット。

50

【請求項 2 1】

患者のリスク・プロフィールに関するアッセイの結果の解釈について、およびそれぞれの対抗手段および治療のための提案についてのマニュアルを含む、請求項 2 0 に記載の診断キット。

【請求項 2 2】

金標識されたポリクローナル・マウス指標抗体、ビオチン化ポリクローナル検出抗体、およびガラス繊維フリースを含む試験デバイスを含む、請求項 2 0 に記載の診断キット。

【請求項 2 3】

hsCRP 血清レベルまたは血漿レベルが低いが PLGF 血清レベルまたは血漿レベルが高い患者のサブグループを同定するための、請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

血清または血漿中の hsCRP レベルが 10.0 mg/l 以下である群を識別するための、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

アブキシマブによる処置に対して応答する患者と応答しない患者とを識別するための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

20

【背景技術】

【0002】

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

30

【0003】

心血管疾患に罹患している個体は、症状を示さない個体と胸部疼痛を示す個体とに分類することができる。後者の群は、安定狭心症 (SAP) を示す個体と急性冠症候群 (ACS) を有する個体とに分類することができる。ACS 患者は、不安定狭心症 (UAP) を示し得るか、またはこれらの患者は心筋梗塞 (MI) にすでに罹患している。MI は、ST 上昇 MI または非 ST 上昇 MI であり得る。MI の発症には、左心室機能不全 (LVD) が伴うことがある。最後に、LVD 患者は、約 15% の死亡率でうっ血性心不全 (CHF) を経験するか、または症状を全く示さない。

40

【0004】

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

【0005】

基礎研究における最近の進歩によって、その開始から進行、最終的には動脈硬化症病変の血栓性合併症までの動脈硬化症の全ての相の媒介における炎症の基本的な役割が確立さ

50

れた [Libby P、Ridker PM、Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(9): 1135~43頁. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115~26頁. Davies MJ、Thomas AC. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53(4): 363~73頁. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91(11): 2844~50頁]。炎症と動脈硬化症との関係から得られた結果は、急性冠症候群を有する患者における潜在的な予測の道具としての循環炎症マーカーの使用についての合理性を形成する。実際、上昇したレベルの炎症マーカー（例えば、高感度C反応性タンパク質(hsCRP)、血清アミロイドAおよびインターロイキン-6(IL-6)）は、一般に急性冠症候群と関連するだけではなく [Berk BC、Weintraub WS、Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 65(3): 168~72頁、Biasucci LM、Vitelli A、Liuzzo Gら、Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94(5): 874~7頁]、しかしこれはより重要なことであるが、急性冠症候群を有する患者の臨床転帰に関する記述を予測することもできる [Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JRら、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331(7): 417~24頁、Biasucci LM、Liuzzo G、Grillo RLら、Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99(7): 855~60頁、Toss H、Lindahl B、Siegbahn A、Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997; 96(12): 4204~10頁]。「古典的な」急性相タンパク質hsCRPは、臨床的使用について最も有望な生体マーカーと考えられるが、急性冠症候群を有する患者における上昇したhsCRPレベルの出現率に関して実質的な不均質が存在する [Biasucci LM、Liuzzo G、Colizzi C、Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001; 2(3): 164~71頁]。

【0006】

したがって、重篤な不安定アングナを有する患者の30%超は、高いhsCRPレベルを示さない [Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JRら、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in sever

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

10

20

【0007】

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

30

【0008】

急性冠症候群を有する患者におけるプラークの破裂および引き続く血栓の形成が、循環血小板におけるCD40Lの露出の活性化を引き起こし得ることが、新たな知見により示されている (Lee Y、Lee WH、Lee SC、Ahn KJ、Choi YH、Park SW、Seo JD、Park JE. *Cardiology*. 1999; 92: 11~6頁)。さらに、高い濃度のsCD40LがアングINAを有する患者において検出され、それにより、これらの濃度は不安定アングINAを有する患者において特に高かった (Aukrust P、Muller F、Ueland T、Berget T、Aaser E、Brunsvig A、Solum NO、Forfang K、Froland SS、Gullestad L. *Circulation* 1999; 10: 614~20頁)。これらの結果は、CD40L-CD40相互作用が動脈硬化症の進行の病原および冠症候群の発症の間に重要な役割を果たすことを示唆する。

40

【0009】

STストレッチの上昇と関連しない急性冠症候群を有する患者の適切な処置に関連する正確な診断を確立することは、非常に厄介であり得る。実際の標準に従う急性心筋梗塞の排除は、満足のいくものではない。近年、生命を脅かす心臓病学的な事象を発症するリスク

50

が存在しかつ特に改善された治療ストラテジーおよび介入ストラテジーによる利益を受ける患者を同定する目的で、リスク層別および処置の制御に焦点を当てることが注目された (Hamm CW、Bertrand M、Braunwald E. *Lancet* 2001; 358: 1533~8頁)。これに関して、ECGは、重要な異常が稀でありかつそれらの検出の感度および特異性が乏しいので、限定された予後診断的関連性のみを有する (Kaul P、Fu Y、Chang WCら、*J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 64~71頁および Savonitto S、Ardissino D、Granger CBら、*JAMA* 1999; 281: 707~13頁)。したがって、心筋細胞の壊死のマーカー (特に心臓トロポニン) は、急性冠症候群を有する患者の評価における有益なツールとなった (Hamm CW、Braunwald E. *Circulation* 2000; 102: 118~22頁)。それにもかかわらず、トロポニンは急性冠症候群の病態生理に能動的に関与せず、むしろ脆い血栓の形成についてのある種の代理マーカーに相当する (Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L. *J Am Coll Cardio*. 2001; 38: 979~86頁、Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML. *Circulation* 1999; 100: 1509~14頁; Benamer H、Steg PG、Benessiano Jら、*Am Heart J* 1999; 137: 815~20頁)。これに関して、ECGは、重要な異常が稀でありかつそれらの検出の感度および特異性が乏しいので、限定された予後診断的関連性のみを有する (Kaul P、Fu Y、Chang WCら、*J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 64~71頁および Savonitto S、Ardissino D、Granger CBら、*JAMA* 1999; 281: 707~13頁)。

【0010】

疾患の活性を好ましくは心筋壊死が生じる前に判定する血小板活性化のマーカーは、急性冠症候群を有する患者における診断的および治療的な層別のために重要なさらなる情報を示し得る。CD40リガンド (CD40L、最近CD154と改名された) もまた、疾患の発症およびプラーク不安定化において重要な役割を果たすという証拠が増えてきている (Mach F、Schonbeck U、Sukhova GK、Atkinson E、Libby P. *Nature* 1998; 394: 200~3頁および Lutgens E、Gorelik L、Daemen MJら、*Nat Med* 1999; 5: 1313~6頁)。CD40-CD40L系は、多数の白血球および非白血球細胞 (内皮細胞および平滑筋細胞を含む) (Schonbeck U、Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4~43頁) ならびに活性化された血小板 (Henn V、Slupsky JR、Grafe Mら、*Nature* 1998; 391: 591~4頁) において共通する。細胞結合型の39kDaの形態に加えて、CD40Lは可溶性の生物学的に完全に活性な形態 (すなわち、sCD40L) でも存在する (Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczyk RA. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749~54頁)。sCD40Lは、刺激されたリンパ球によって与えられ、血小板の活性化の際に活発に放出される (Lee Y、Lee WH、Lee SCら、*Cardiology* 1999; 92: 11~6頁および Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczyk RA. *Blood* 2001; 98: 1047~54頁)。sCD40Lは、内皮細胞に対して炎症促進的に作用し、単球 (Mach F、Schonbeck U、Bennefoy JY、Pober JS、Libby P. *Circulation* 1997; 96: 396~9頁) および内皮細胞 (Urbich C、Mallat Z、Tedgui A、Clauss M、Zeicher AM、Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001; 108: 1451~8頁) による組織因子の発現を誘導することによって凝固を促進する。さらにsCD40Lは、優勢な血小板インテグリン I Ib 3

10

20

30

40

50

(Scarborough RM、Naughton MA、Teng Wら、J Biol Chem 1993; 268: 1066~73頁)に特異的な公知の結合モチーフであるKGD配列(Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczeck RA. Eur J Immunol 1995; 25: 1749~54頁)を含む。CD40Lが実際、血小板アゴニストであるIIb3リガンドに相当し、動脈血栓の安定性のために必要であることが示され得る(Andre P、Prasad KS、Denis CVら、Nat Med 2002; 8: 247~52頁)。

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

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

【0015】

De Falcoら(De Falco S、Gigante B、Persico MG. 「Structure and function of placental growth factor」、Trends Cardiovasc Med 2002 Aug; 12(6): 241~6頁)は、マウスにおける病理学的状態(例えば、虚血および腫瘍形成)の間の血管新生および動脈形成の減少の関係を記載している。それにより、PLGFは、病理学的条件下での血管新生に必須の因子として記載される。PLGFは、血管新生治療のための代替的標的として提案される。

【0016】

Luttunら(Luttun A、Tjwa M、Moons L、Wu Y、Angelillo-Scherrer A、Liao F、Nagy JA、Hooper A、Priller J、De Klerck B、Compernelle V、Daci E、Bohlen P、Dewerchin M、Herbert JM、Fava R、Matthys P、Carmeliet G、Collen D、Dvor

10

20

30

40

50

ak HF、Hicklin DJ、Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 Nat Med 2002 Aug; 8(8): 831~40頁)は、血管新生に関するPlGFおよびFlt-1の治療的方法を記載している。PlGFの阻害が動脈硬化症プラークの成長および脆弱性を低下させることがさらに記載されている。

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

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

【0020】

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

妊娠関連血漿タンパク質A(PAPP-A)；C反応性タンパク質(CRP)；hs-CRP；胎盤増殖因子(PlGF)；インターロイキン-18(IL-18/IL-18b)；脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)；NT-pro脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-proNP)；sCD40L、cTnI/T、IL-10、ICAM-1、VCAN-1、E-セレクトリン、P-セレクトリン、IL-6、VEGF、血清アミロイドA(SAA)、CKMB、MPO、LpPLAz、GP-BB、IL1RA、TAF1、可溶性フィブリン、抗oxLDL、MCP-1、組織因子(TF)、MMP-9、Ang-2、Tff1-2、IL-P、bFGF、PCMおよびVEGF-A。

【0021】

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

【0022】

10

20

30

40

50

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

【0023】

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

【0024】

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

10

【0025】

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

20

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

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

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

30

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

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

40

【非特許文献6】Biasucci LM、Vitelli A、Liuzzo Gら、Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. Circulation 1996; 94(5):874~7頁

【非特許文献7】Liuzzo G、Biasucci LM、Gallimore JRら、The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. N Engl J Med 1994; 331(7):417~24頁

【非特許文献8】Biasucci LM、Liuzzo G、Grillo RLら、

50

- Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99(7): 855~60頁
- 【非特許文献9】Toss H、Lindhahl B、Siegbahn A、Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. F RISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. Circulation* 1997; 96(12): 4204~10頁 10
- 【非特許文献10】Biasucci LM、Liuzzo G、Colizzi C、Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001; 2(3): 164~71頁
- 【非特許文献11】Heeschen C、Hamm CW、Bruegger J、Simeons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. *Chimeric c7E3 Anti-Platelet Therapy in unstable angina refractory to standard treatment trial. J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6): 1535~42頁 20
- 【非特許文献12】Pepys MB、Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2001; 2(11): 804~6頁
- 【非特許文献13】Liuzzo G、Biasucci LM、Rebuzzi AG、plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996; 94(10): 2373~80頁 30
- 【非特許文献14】Schonbeck U、Varo N、Libby P、Buring J、Ridker PM. *Circulation* 2001; 104: 2266~8頁
- 【非特許文献15】Lee Y、Lee WH、Lee SC、Ahn KJ、Choi YH、Park SW、Seo JD、Park JE. *Cardiology*. 1999; 92: 11~6頁
- 【非特許文献16】Aukrust P、Muller F、Ueland T、Berget T、Aaser E、Brunsvig A、Solum NO、Forfang K、Froland SS、Gullestad L. *Circulation* 1999; 100: 614~20頁 40
- 【非特許文献17】Hamm CW、Bertrand M、Braunwald E. *Lancet* 2001; 358: 1533~8頁
- 【非特許文献18】Kaul P、Fu Y、Chang WC、*J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 64~71頁
- 【非特許文献19】Savonitto S、Ardissino D、Granger CB、*JAMA* 1999; 281: 707~13頁
- 【非特許文献20】Hamm CW、Braunwald E. *Circulation* 50

- 2000;102:118~22頁
- 【非特許文献21】Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L. *J Am Coll Cardio* . 2001;38:979~86頁
- 【非特許文献22】Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML. *Circulation* 1999;100:1509~14頁
- 【非特許文献23】Benamer H、Steg PG、Benessiano JB、Am Heart J 1999;137:815~20頁
- 【非特許文献24】Mach F、Schonbeck U、Sukhova GK、Atkinson E、Libby P. *Nature* 1998;394:200~3頁 10
- 【非特許文献25】Lutgens E、Gorelik L、Daemen MJB、Nat Med 1999;5:1313~6頁
- 【非特許文献26】Schonbeck U、Libby P. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4~43頁
- 【非特許文献27】Henn V、Slupsky JR、Grafe MB、Nature 1998;391:591~4頁
- 【非特許文献28】Graf D、Muller S、Korthauer U、van Kooten C、Weise C、Kroczeck RA. *Eur J Immunol* 1995;25:1749~54頁 20
- 【非特許文献29】Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczeck RA. *Blood* 2001;98:1047~54頁
- 【非特許文献30】Mach F、Schonbeck U、Bennefoy JY、Poerber JS、Libby P. *Circulation* 1997;96:396~9頁
- 【非特許文献31】Urbich C、Mallat Z、Tedgui A、Clauss M、Zeicher AM、Dimmeler S. *J Clin Invest* 2001;108:1451~8頁
- 【非特許文献32】Scarborough RM、Naughton MA、Teng W、J Biol Chem 1993;268:1066~73頁 30
- 【非特許文献33】Andre P、Prasad KS、Denis CVB、Nat Med 2002;8:247~52頁
- 【非特許文献34】CAPTURE. *Lancet* 1997;349:1429~35頁
- 【特許文献1】米国特許第6225088号
- 【特許文献2】WO 92/06194号
- 【非特許文献35】De Falco S、Gigante B、Persico MG. 「Structure and function of placental growth factor」、*Trends Cardiovasc Med* 2002 Aug;12(6):241~6頁 40
- 【非特許文献36】Luttun A、Tjwa M、Moons L、Wu Y、Angelillo-Scherrer A、Liao F、Nagy JA、Hooper A、Priller J、De Klerck B、Compernelle V、Daci E、Bohlen P、Dewerchin M、Herbert JM、Fava R、Matthys P、Carmeliet G、Collen D、Dvorak HF、Hicklin DJ、Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002 Aug;8(8):831~40頁 50

- 【非特許文献37】Oura H、Bertoncini J、Velasco P、Brown LF、Carmeliet P、Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and oedema formation. *Blood* 2003 Jan 15; 101(2): 560~7頁
- 【非特許文献38】Lundb、*Circulation*. 2003、108: 1924~1926頁
- 【非特許文献39】Pengb、*Clinica Chimica Acta* 319(2002) 19~26頁
- 【非特許文献40】Lenderinkb、*European Heart Journal* (2003) 24、77~85頁 10
- 【非特許文献41】Heeschenb、*Journal of the American College of Cardiology*; Vol. 35、No. 6, 2000
- 【非特許文献42】Heeschenb、*Circulation*. 2003; 107: 2109~2114頁
- 【非特許文献43】Blankenbergb、*Circulation*. 2002; 106: 24~30頁
- 【非特許文献44】Autierob、*Journal of Thrombosis and Haemostasis*、1: 1356~1370頁 20
- 【特許文献3】WO 03/040692号
- 【非特許文献45】Andre P.、Nannizzi-Alaimo L、Prasad SK、Phillips DR.; *Circulation* 2002; 106: 896~9頁
- 【非特許文献46】Farb A、Burke AP、Tang ALb; *Circulation* 1996; 93: 1354~63頁
- 【非特許文献47】Davies MJ; *N. Engl J Med* 1997; 336: 1312~4頁
- 【非特許文献48】Miller DL; Yaron R、Yellin MJ; *J Leukoc Biol* 1998; 63-373~9頁 30
- 【非特許文献49】Kotowicz K、Dixon GL、Klein NJ、Peters MJ、Callard RE; *Immunology* 2000; 100: 441~8頁
- 【非特許文献50】Nannizzi-Alaimo L、Rubenstein MH、Alves VL、Leong GY、Phillips DR、Gold HK; *Circulation* 2002、105: 2849~2854頁
- 【非特許文献51】Cipollone F、Mezzetti A、Porreca Eb; *Circulation* 2002; 106: 399~402頁
- 【非特許文献52】Hamm CW、Heeschen C、Goldmann Bb; *N Engl J Med* 1999; 340: 1623~9頁 40
- 【非特許文献53】Antman EM、Tanasijevic MJ、Thompson Bb; *N Engl J Med* 1996; 335: 1342~9頁
- 【非特許文献54】Ohman EM、Armstrong PW、Christenson RHb; *N Engl J Med* 1996; 335: 1333~41頁
- 【非特許文献55】Hamm CW、Ravkilde J、Gerhardt Wb; *N Engl J Med* 1992; 327: 146~50頁
- 【非特許文献56】Hamm CW、Goldmann BU、Heeschen C、Kreymann G、Berger J、Meinertz T; *N Engl J Med* 1997; 337: 1648~53頁
- 【非特許文献57】Newby LK、Ohman EM、Christenson R 50

- H \bar{b} ; Circulation 2001; 103: 2891 ~ 6 頁
- 【非特許文献58】Januzzi JL、Chae CU、Sabatine MS、Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11: 211 ~ 5 頁
- 【非特許文献59】Heeschen C、Hamm CW、Goldmann B、Deu A、Langenbrink L、White HD; Lancet 1999; 354: 1757 ~ 62 頁
- 【非特許文献60】Braunwald E、Maseri A、Armstrong PW \bar{b} ; Eur Heart J 1998; 19: D22 ~ 30 頁
- 【非特許文献61】Lee SH、Wolf PL、Escudero R、Deutsch R、Jamieson SW、Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med 2000; 342(9): 626 ~ 33 頁 10
- 【非特許文献62】Khaliq A、Dunk C、Jiang J \bar{b} 、Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. Lab Invest 1999; 79(2): 151 ~ 70 頁 20
- 【非特許文献63】Cao Y、Linden P、Shima D、Browne F、Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. J Clin Invest 1996; 98(11): 2507 ~ 11 頁
- 【非特許文献64】Heeschen C、Dimmeler S、Hamm CW、Boersma E、Zeicher AM、Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. Circulation 2003; 107: 524 ~ 530 頁 30
- 【非特許文献65】Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JR \bar{b} 、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. J Am Coll Cardiol 1999; 34(6): 1696 ~ 703 頁
- 【非特許文献66】Liuzzo G、Buffon A、Biasucci LM \bar{b} 、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. Circulation 1998; 98(22): 2370 ~ 6 頁 40
- 【非特許文献67】Liuzzo G、Angiolillo DJ、Buffon A \bar{b} 、Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. Circulation 2001; 103(18): 2236 ~ 41 頁
- 【非特許文献68】Westendorp RG、Langermans JA、Huijzinga TW、Verweij CL、Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningoc 50

occal disease. Lancet 1997; 349(9069): 1912
~ 3頁

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

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

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

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明の目的は、急性心血管疾患に関してサンプルを分析するための方法によって解決される。本発明の方法は、以下のステップを含む：(a)分析すべき生物学的サンプルを被験体から得るステップ；(b)可溶性CD40リガンド(sCD40L)、PAPP-AおよびP1GFから選択される少なくとも1つのマーカーの濃度を決定するステップ；(c)場合により、トロポニンT(TnT)、MPO、NT-proBNP、VEGF、BNPおよびさらなる炎症マーカーから選択される少なくとも1つのさらなるマーカーの濃度を決定するステップ；ならびに(d)分析すべきサンプルについて得られた結果を、

10

20

30

40

50

参照値および/または参照サンプルからの値と比較するステップ。

【0031】

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

【0032】

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

10

【0033】

同様に有用な、その他の類似のマーカーは、インターロイキン-18(IL-18/IL-18b)、ICAM-1、VCAN-1、E-セレクトリン、P-セレクトリン、IL-6、VEGF、血清アミロイドA(SAA)、CKMB、LpPLAz、GP-BB、IL-1RA、TAF-1、可溶性フィブリン、抗oxLDL、MCP-1、組織因子(TF)、MMP-9、Ang-2、Tff1-2、bFGF、PCMおよびVEGF-Aである。

20

【0034】

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

【0035】

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

30

【0036】

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

【0037】

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

40

【0038】

本発明の方法のさらなる態様によれば、分析されるマーカーおよびそれらの組合せは、sCD40L; PAPP-A; PLGF; sCD40L+TnT; PAPP-A+TnT

50

; P I G F + T n T ; s C D 4 0 L + P A P P - A ; s C D 4 0 L + P I G F ; P A P P - A + P I G F ; s C D 4 0 L + P A P P - A + T n T ; s C D 4 0 L + P I G F + T n T ; P A P P - A + P I G F + T n T ; s C D 4 0 L + P A P P - A + P I G F ; および s C D 4 0 L + P A P P - A + P I G F + T n T から選択される。次いで、さらなるマーカーとして M P O 、 N T - p r o B N P 、 B N P 、 C R P 、 (h s) C R P および I L - 1 0 の少なくとも1つとのさらなる組合せが好ましい。

【 0 0 3 9 】

次いで、分析されるマーカーおよびそれらの組合せが、C R P 、 T n T 、 P A P P - A ; C R P 、 T n T 、 P A P P - A 、 I L - 1 0 ; C R P 、 T n T 、 P A P P - A 、 I L - 1 0 、 s C D 4 0 L および T n T 、 P A P P - A 、 I L - 1 0 、 s C D 4 0 L 、 V E G F から選択される方法が、本発明に従って特に好ましい。

10

【 0 0 4 0 】

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

20

【 0 0 4 1 】

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

【 0 0 4 2 】

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

30

【 0 0 4 3 】

本発明の方法のさらなる態様によれば、この方法の成分は、固相に結合して存在し得、したがって、これらのマーカー結合分子は、溶液中に存在するかまたはマトリックスに固定化された状態で存在し得る。当業者に公知の多数の材料がマトリックス (例えば、樹脂マトリックスおよび/または一般的なカラム・マトリックス) として使用される。さらに、これらのマーカー結合分子がフルオレセインチオイソシアネート、フィコエリスリン、酵素 (例えば、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ) および磁性ビーズからなる群からの1つまたはいくつかの検出分子に結合される、本発明の方法が特に好ましい。

40

【 0 0 4 4 】

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

【 0 0 4 5 】

本発明の方法のさらなる態様によれば、免疫細胞学的方法がサンプルの分析のために使

50

用され得る。このために、マーカー／分子相互作用に基づく特異的な決定を可能にする全ての方法が適切である。サンドイッチ酵素イムノアッセイ、E L I S A および固相イムノアッセイからなる群から選択される方法が好ましい。

【 0 0 4 6 】

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

10

【 0 0 4 7 】

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

【 0 0 4 8 】

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

20

【 0 0 4 9 】

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

【 0 0 5 0 】

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

30

【 0 0 5 1 】

本発明のさらなる実施形態において、抗炎症手段が同時投与される。これらの手段は、非ステロイド型またはステロイド型の抗炎症手段から選択され得、これには例えば以下が含まれ得る：アルクロフェナク (alclufenac)；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド (algestonacetone)；-アミラーゼ；アムシナファル (amcinafal)；アムシナフィド (amcinafid)；アムフェナクナトリウム (amfenac sodium)；塩酸アンプリロース；アナキンラ；アニロラク (anirolac)；アニトラザフェン (anitrazafen)；アパゾン (apazon)；バルサラジドニナトリウム (balsalazid disodium)；ベンダザック；ベノキサプロフェン (benoxaprofen)；塩酸ベンジダミン (benzydamin hydrochloride)；プロメライ

40

50

ン；プロペラモール (broperamol) ；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロ
 フェン (cicloprofen) ；シнтаゾン (cintazon) ；クリプロフェ
 ン (cliprofen) ；プロピオン酸クロベタゾール；酪酸クロベタゾン；クロピラ
 ク (clopirac) ；プロピオン酸クロチカゾン (cloticasonpropio
 nate) ；酢酸コルメタゾン (cormethasonacetate) ；コルトド
 キソン (cortodoxon) ；デフラザコート；デソニド (desonid) ；デス
 オキシメタゾン (desoximetason) ；ジプロピオン酸デキサメタゾン (de
 xamethasondipropionate) ；ジクロフェナクカリウム；ジクロフ
 エナクナトリウム；二酢酸ジフロラゾン (diflorasondiacetate) ；
 ジフルヌドンナトリウム (diflunudon sodium) ；ジフルニサル (di
 flunisal) ；ジフルブレドナト (difluprednat) ；ジフタロン (di
 ftalon) ；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド (drocinonid) ；エン
 ドリソン (endryson) ；エンリモマブ (enlimomab) ；エノリカムナ
 トリウム (enolicam sodium) ；エピリゾール (epirizol) ；エ
 トドラク；エトフェナマト (etofenammat) ；フェルピナク；フェナモール (f
 enamol) ；フェンブフェン；フェンクロフェナク (fenclufenac) ；フェ
 ンクロラク (fenclorac) ；フェンドサル (fendosal) ；フェンピバ
 ロン (fenpipalon) ；フェンチアザク (fentiazac) ；フラザロン (f
 lazalon) ；フルアザコート (fluazacort) ；フルフェナミン酸；フル
 ミゾール (flumizol) ；酢酸ルニソリド (runisolidacetate) ；
 プルニキシ (plunixin) ；フルニキシメグルミン；フルオコルチンブチ
 ル (fluocortin butyl) ；酢酸フルオロメトロン (fluoromet
 holonacetate) ；フルカゾン (fluquazon) ；フルルビプロフェン
 ；フルレトフェン (fluretofen) ；プロピオン酸フルチカゾン；プラプロフェ
 ン (puraprofen) ；フロブフェン (furobufen) ；ハルシノニド (h
 alcinonid) ；プロピオン酸ハロベタゾール (halobetasolpropio
 nate) ；酢酸ハロプレドン (halopredonacetate) ；イブフェ
 ナク (ibufenac) ；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフ
 ェンピコノール；イロニダブ (ilonidap) ；インドメタシン；インドメタシンナ
 トリウム；インドプロフェン (indoprofen) ；インドキソール (indoxo
 l) ；ミトラゾール (mitrazol) ；酢酸イソフルブレドン (isoflupre
 donacetate) ；イソキシパク (isoxepac) ；イソキシカム (isox
 icam) ；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール (lofemizol hydroc
 hloride) ；ロモキシカム (lomoxicam) ；エタボン酸ロテプレドノール
 (loteprednol etabonat) ；メクロフェナマトナトリウム (mec
 lofenamat sodium) ；メクロフェナミン酸 (meclofenamin
 e acid) ；メクロリゾンジブチレート (meclorison dibutyra
 te) ；メフェナミン酸 (mefenamin acid) ；メサラミン；メセクラゾン
 (meseclazon) ；スレプタン酸メチルプレドニゾロン (methylpred
 nisolon suleptanate) ；モミフルマト (momiflumat) ；
 ナブメトン (nabumeton) ；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキ
 ソル (naproxol) ；ニマゾン (nimazon) ；オルサラジンナトリウム (o
 lsalazin sodium) ；オルゴテイン (orgotein) ；オルパノキシ
 ン (orpanoxin) ；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン (oxyphenb
 utazon) ；塩酸パラニリン (paranylin hydrochloride)
 ；ペントサン多硫酸ナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセレート (phenbu
 tazon sodium glycerate) ；ピルフェニドン；ピロキシカム；ピ
 ロキシカムシンナマート；ピロキシカムオラミン (piroxicam olamin)
 ；ピルプロフェン (pirprofen) ；プレドナザト (prednazat) ；プリ
 フェロン (prifelon) ；プロドリン酸 (prodolinic acid) ；ブ

10

20

30

40

50

ロカゾン (proquazon) ; プロキサゾール (proxazol) ; クエン酸プロキサゾール (proxazol citrate) ; リメキソロン (rimexolon) ; ロマザリト (romazarit) ; サルコレックス (salcolex) ; サルナセジン (salnacedin) ; サルサラート (salsalat) ; サリチレート ; サングイナリウムクロライド (sanguinariumchloride) ; セクラゾン (seclazon) ; セルメタシン (sermetacin) ; スドキシカム (sudoxicam) ; スリンダク ; スプロフェン ; タルメタシン (talmetacin) ; タルニフルマト (talniflummat) ; タロサラト (talosalat) ; テブフェロン (tebufelon) ; テニダップ (tenidap) ; テニダップナトリウム ; テノキシカム ; テシカム (tesicam) ; テシミド (tesimid) ; テトリダミン (tetrydamine) ; チオピナク (tiopinac) ; チキソコルトルピバレート (tixocortol pivalate) ; トルメチン (tolmetin) ; トルメチンナトリウム ; トリクロニド (triclomid) ; トリフルミダート (triflumidate) ; ズドメタシン (zidometacin) ; グルココルトコイド ; ゴメピラクナトリウム (zomepirac sodium) .

10

【0052】

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

20

【0053】

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

【0054】

本研究は、sCD40L が血小板の活性化の有益な生化学的マーカーであるという事実についての直接的な証拠を提供する。CD40L の濃度の増大は、心臓事象に罹患する深刻なリスクを保有しかつ糖タンパク質 IIb / IIIa レセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブでの処置から最大の利益を得る、急性冠症候群を有する患者の特定のサブグループを信頼性高く同定する。対応して、CD40L は急性冠症候群の病態生理に本質的に寄与するだけでなく、高リスク病変の形成および / または冠血栓症を有する患者を同定することができる、信頼性がありかつ有益な臨床的マーカーを提供する (Andre P、Prasad KS、Denis CVら、Nat Med 2002 ; 8 : 247 ~ 52 頁 ; Andre P、Nannizzi-Alaimo L、Prasad SK、Phillips DR、Circulation 2002 ; 106 : 896 ~ 9 頁)。

30

【0055】

CAPTURE 患者の 40.5% において、循環 sCD40L 濃度は、計算された閾値濃度、即ち 5.0 μg / l を上回った。高い sCD40L 濃度を有するこれらの患者は、致死性または非致死性の心筋梗塞を経験する深刻な心臓リスクを保有する。高 sCD40L 濃度を有する患者にプラセボを投与した場合、この心臓リスクの上昇は、最初の 72 時間の間に特に明らかであった (図 2a)。しかし、全 6 カ月間の事象の頻度は、さらに離れた (図 2b)。sCD40L は、心筋壊死の検出から独立し、かつ炎症マーカー (CRP および TNF-) ならびに接着分子 ICAM-1 から独立した、有益な予後マーカーと考えることができる。TnT、CRP および sCD40L は、多変量回帰モデルにおい

40

50

て信頼性のある予後情報を提供した(表2)。sCD40L濃度を使用して、心筋壊死の兆候を有しないが、増大した心臓リスクを示す患者が同定された。TnTおよびCRPについての所定の閾値濃度を、上昇した心臓マーカーの数に基づく患者の分類と一緒に使用することによって、これらの病態生理学的に異なる生化学的マーカーを患者に投与する時点で同時に評価することが、この患者が次の6カ月間に有害な心臓事象に罹患するリスクの有益な予測を可能にすることが見出された。

【0056】

トロポニン_Iは心筋壊死のマーカーに相当するが、それにもかかわらず、これらは急性冠症候群の病態生理に能動的に関与しない。むしろ、トロポニン_Iは、血栓の脆い形成についての代理マーカーである(Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L; J Am Coll Cardiol 2001; 38: 979~86頁; Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML; Circulation 1999; 100: 1509~14頁; Benamer H、Steg PG、Benessiano Jら; Am Heart J 1999; 137: 815~20頁)。急性冠症候群を有する患者に対する死後の研究において、病態生理学の基礎である動脈硬化症プラークの繊維性キャップの糜爛または破裂が同定された(Lindhahl B、Diderholm E、Lagerqvist B、Venge P、Wallentin L; J Am Coll Cardiol 2001; 38: 979~86頁; Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML; Circulation 1999; 100: 1509~14頁)。プラークの成分、コラーゲンおよび血管壁の他の成分の露出は、血管緊張の増大および血小板の活性化を引き起こす(Farb A、Burke AP、Tang ALら; Circulation 1996; 93: 1354~63頁; Davies MJ、Thomas AC; Br Heart J 1985; 53: 363~73頁; Davies MJ; N. Engl J Med 1997; 336: 1312~4頁)。増大した微小血管灌流および壊死を有する冠状動脈の血栓性塞栓症は、急性冠症候群の必須の構成要素である(Heeschen C、van Den Brand MJ、Hamm CW、Simoons ML; Circulation 1999; 100: 1509~14頁; Benamer H、Steg PG、Benessiano Jら; Am Heart J 1999; 137: 815~20頁)。対応して、基礎となる病変における活性な血栓プロセスから生じる動脈血栓性塞栓症の代理マーカーとして敏感なマーカー(特にトロポニン_I)は、心筋の小さい損傷の検出のために働く。

【0057】

これとは対照的に、sCD40Lは、いくつかの方法で急性冠症候群の病態生理に直接関与し得る。最近の証拠は、CD40Lが動脈硬化症の進行に本質的に寄与し、対応して動脈硬化症プラークの不安定化に寄与することを示唆する(Mach F、Schonbeck U、Sukhova GK、Atkinson E、Libby P; Nature 1998; 394: 200~3頁; Lutgens E、Gorelik L、Daemen MJら; Nat Med 1999; 5: 1313~6頁)。CD40/C

D40L相互作用は、異なるアテローム関連細胞型におけるサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、マトリックス・メタロプロテイナーゼおよび凝固促進因子の発現を誘導するので、アテロームによる合併症を促進すると提唱された(Schonbeck U、Libby P.; Cell Mol Life Sci 2001; 58: 4~43頁; Henn V、Slupsky JR、Grafe Mら; Nature 1998; 391: 591~4頁; Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczyk RA; Blood 2001; 98: 1047~54頁; Mach F、Schonbeck U、Bonneyfoy JY、Pober JS、Libby P.; Circulation 1997; 96: 396~9頁; Miller DL; Yaron R、Yellin MJ; J Leukoc Biol 19

10

20

30

40

50

98; 63-373~9頁; Kotowicz K、Dixon GL、Klein NJ、Peters MJ、Callard RE; *Immunology* 2000; 100: 441~8頁)。新規な研究は、顆粒球、単核食細胞、内皮細胞および平滑筋細胞を含む白血球および非白血球細胞 (Schonbeck U、Libby P; *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4~43頁)に加えて、活性化された血小板は、大量のsCD40Lを産生して放出することを示している (Henn V、Steinbach S、Buchner K、Presek P、Kroczyk RA; *Blood* 2001; 98: 1047~54頁)。別の研究は、心肺バイパスが、血小板中のCD40Lの含量の低下に対応する血漿中のsCD40L濃度の増加を引き起こすことを示しており、これは、sCD40Lが主に血小板に由来し、このようなバイパスに
10
関連する血栓性合併症に寄与し得ることを示唆する (Nannizzi-Alaimo L、Rubenstein MH、Alves VL、Leong GY、Phillips DR、Gold HK; *Circulation* 2002、105: 2849~2854頁)。sCD40Lが血漿中の可溶性P-セレクチンおよび尿中の11-デヒドロトロンボキサンB₂濃度とポジティブに相関することがさらに見出された (Cipollone F、Mezzetti A、Porreca E; *Circulation* 2002; 106: 399~402頁)。さらに、実験的分析は、CD40Lが動脈血栓の安定化に必要なことを示した (Andre P、Prasad KS、Deniscv; *Nat Med* 2002; 8: 247~52頁)。本研究はここで、CD40Lが実際に血小板の活性化のマーカーであるという事実について直接的な証拠を提供
20
する。急性冠症候群を有する患者においてフロー・サイトメトリーにより決定される血小板の活性化は、血清中のsCD40Lの濃度と有意に相関した (図7)。興味深いことに、sCD40Lは、血小板の活性化について最も高い有意性を示す独立した予測因子として見出された。本研究の結果は、血栓症に罹患する危険性がある急性冠症候群を有する患者における高度に有益な予後マーカーとしてsCD40L濃度を確立した。これらの知見は、アブシキシマブによる糖タンパク質IIb/IIIaレセプターの阻害が急性冠症候群および上昇したsCD40L濃度を有する患者においてリスクの増大を排除したという事実によって支持される。トロポニン_Tは、血栓が塞栓症を引き起こして心筋壊死を導く傾向をポジティブに示したが、急性冠症候群を有する患者におけるsCD40Lの濃度の上昇は、血小板を補充して活性化する引き金となる病変の血栓活性を反映する。
30

【0058】

CAPTURE研究の患者のサブグループの初期の分析において、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター・アンタゴニストであるアブシキシマブによるさらなる処置が、トロポニン陽性の患者の上昇したリスクを、トロポニン陰性の患者の程度にまで低下させたことが示された (Hamm CW、Heeschen C、Goldmann B; *N Engl J Med* 1999; 340: 1623~9頁)。これらの患者は、急性冠症候群を有する患者の約3分の1を構成する (Hamm CW、Braunwald E; *Circulation* 2000; 102: 118~22頁; Antman EM、Tanasijevic MJ、Thompson B; *N Engl J Med* 1996; 335: 1342~9頁; Ohman EM、Armstrong PW、Christenson RH; *N Engl J Med* 1996; 335: 1333~41頁; Hamm CW、Ravkilde J、Gerhardt W; *N Engl J Med* 1992; 327: 146~50頁; Hamm CW、Goldmann BU、Heeschen C、Kreymann G、Berger J、Meinertz T; *N Engl J Med* 1997; 337: 1648~53頁)。トロポニン_Tおよびトロポニン_Iに関する類似の知見が後に他の研究 (Newby LK、Ohman EM、Christenson RH; *Circulation* 2001; 103: 2891~6頁; Januzzi JL、Chae CU、Sabatine MS、Jang IK; *J Thromb Thrombolysis* 2001; 11: 211~5頁; Heeschen C、Hamm CW、Goldmann
40
50

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

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

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

【0062】

動脈硬化症病変の不安定性の一次的炎症マーカーとしてのPLGFの役割は、動脈硬化症または関節炎の動物モデルにおけるその充分報告された炎症促進効果によって説明され得る[Luttun A、Tjwa M、Moons Lら、Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatm

10

20

30

40

50

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

【0063】

したがって、PlGF血清レベルは、心筋壊死によって影響を受けないようである。対照的に、VEGF血清レベルは、トロポニンTの増大、影響されたTIMIフローおよび心筋虚血の臨床的徴候と関連する[Heeschen C、Dimmeler S、Hamm CW、Boersma E、Zeiger AM、Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107: 524~530頁]。より小さい心筋損傷に対して感度の低いPlGF血清レベルは、急性冠症候群を有する患者において特に重要であり得、その患者の約3分の1は、診察時にトロポニン陽性を示す[Hamm CW、Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000; 102(1): 118~22頁]。

【0064】

同様に、心筋損傷はまた、急性冠症候群を有する患者の転帰を予測可能にするために、hsCRP血清レベルの値を妥協して処理することがある。古典的な非特異的な下流の急性相マーカーとして、心筋損傷を有する患者におけるhsCRP血清レベルは、トロポニンTの上昇によって測定されるのと同様に上昇する。不安定アンギナが梗塞の前に生じる

10

20

30

40

50

ほぼ全ての患者において、心筋壊死のマーカーの発生の前に、hsCRPの血清レベルの上昇が見出されることは、充分確立されている [Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JRら、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. J Am Coll Cardiol 1999; 34(6): 1696~703頁]。したがって、心筋損傷の存在下で増強された脈管炎症を確認する上昇したhsCRP血清レベルの特異性は、非常に限定されている。

【0065】

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

10

【0066】

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

【0067】

より重要なことに、上昇したhsCRP血清レベルの報告された有病率は、急性冠症候群においてかなり変動する(重篤な不安定アンギナを有する患者の30%超および急性心筋梗塞を有する患者の50%超は、hsCRP血清レベルの上昇を示さない)。上昇したhsCRP血清レベルは、重篤な不安定アンギナを有する患者の30%より多くおよび不安定アンギナの後に続かない急性心筋梗塞を有する患者の50%より多くにおいて欠如しており [Liuzzo G、Baisucci LM、Gallimore JRら、Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. J Am Coll Cardiol 1999; 34(6): 1696~703頁]、このことは冠不安定性の臨床的症状の炎症誘引の役割の重要な不均質性を示唆する [Libby P、Ridker PM、Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002; 105(9): 1135~43頁]。しかし、個体が特定の炎症刺激に対するその全身的な応答において変動し得ることもまた、充分確立されている [Liuzzo G、Buffon A、Baisucci LMら、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. Circulation 1998; 98(22): 2370~6頁、Liuzzo G、Angiolillo DJ、Buffon Aら、Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide challenge in patients with recurrent unstable angina. Circulation 2001; 103(18): 2236~41頁、Baisucci LM、Vitelli A、Liuzzo Gら、Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. Circulation 1996; 94(5): 874~7頁]。バルーン拡張または複雑でない心臓カテーテル法によって誘導された脈管外傷に应答して観察されたhsCRPまたはIL-6の増加は、ベース・ラインのhsCRPまたはインターロイキン-6の血清レベルと線形に相関する [Liuzzo G、Buffon A、Baisucci LMら、Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. Circulation 1998; 98(22): 2370~6頁]。さらに、不安定アンギナを有する患者から単離された単球によるIL-6産生は、正常なhsCRP血清レベルを有する患者と

20

30

40

50

比較して上昇したhsCRP血清レベルを有する患者において有意に増加した [Liuzzo G, Angiolillo DJ, Buffon Aら、Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001; 103(18): 2236~41頁]。特定の炎症刺激に対する応答の程度におけるこれらの個々の差異は、遺伝学的基礎を有し得る [Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349(9069): 1912~3頁]。不幸にも、このような不均質な応答は、リスク層別のための炎症マーカーとして、例えばhsCRPのような下流の急性相反応体の有用性を限定する。これとは対照的に、PLGFは、血管壁内の炎症プロセスについての直接の近位の刺激であるようである [Luttun A, Tjwa M, Moon S ら、Revascularization of ischemic tissues by PLGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002; 8(8): 831~40頁]。実際、上昇したPLGF血清レベルは、特に急性冠症候群を有する患者において非常に有益であるが、上昇していないhsCRP血清レベルはそうではない。この集団の患者において、上昇したPLGF血清レベルは、上昇したトロポニン血清レベルによって規定された高リスク患者と類似の、顕著に上昇した心臓リスクを有する患者のサブグループを同定した。したがって、実際には、上昇したPLGF血清レベルは、冠不安定の一次的炎症指標に相当し得る。

【0068】

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

【0069】

本研究の結果は、メタロプロテイナーゼPAPP-Aの上昇した血中レベルがACSを有する患者におけるマイナスの結果と関連することを示す。ごく最近実施された試験と一致して、PAPP-A血漿レベルの予測値は、トロポニンの増大を示さない患者において最も顕著であった。したがって、上昇したPAPP-A血漿レベルは、ACSの発症を促進するプラーク不安定性のマーカーであるだけでなく、より重要なことに、プラーク不安定性によって引き起こされる急性虚血事象の発症前に悪い予後を示す。さらに、上昇したPAPP-Aレベルは、上昇したhsCRP血漿レベルを有する患者においてさえさらなる予後情報を提供し、このことは、少なくとも幾人かの患者において、上昇したhsCRPレベルが脈管炎症と関連しないことを示唆する。PAPP-Aの予測値が、低いレベルの抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10を有する患者に限定されたという結果は、炎症促進性サイトカインと抗炎症性サイトカインとの間のバランスが、ACS患者の転帰について [重要] であるという概念をさらに支持する。多変量回帰分析を使用して、いくつかの生化学的マーカー (トロポニンT、可溶性CD40リガンド、インターロイキン-10およびPAPP-Aを含む) が、引き続き6カ月の追跡の間に患者の転帰に関する独立した予測マーカーとして同定された。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

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

【 0 0 7 1 】

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

【 0 0 7 2 】

動脈硬化症プラークの進行および引き続く不安定化は、動脈壁の構造における重要な変化を含む。ACSを有する患者における炎症の局所的状態の発生は、炎症マーカー(例えば、CRP)によって決定されるように充分確立されている。メタロプロテイナーゼもまた動脈炎症の潜在的な指標であり、細胞外マトリックスの分解によって脂質に富んだ動脈硬化症プラークの脆弱性に寄与し得、最終的にその破裂に寄与する。他のいくつかのメタロプロテイナーゼ(MMP-1、MMP-3、MMP-12またはMMP-13)について以前に記載されたように、PAPP-Aについて、糜爛および放出されたプラークにおいてこれが発現されることがごく最近見出されたが、その一方で、PAPP-Aの発現は、安定なプラークにおいては検出できなかった。他の研究はまた、高エコー(hyper echogenic)または等エコー(isoechogenic)の頸動脈プラークを有する患者が、低エコー(hypo echogenic)の初期頸動脈病変を有する患者よりも有意に上昇したレベルのPAPP-Aを呈することを示している。ACSの病態生理におけるPAPP-Aの特定の役割は不明のままである。PAPP-Aについて、これが動脈硬化症の強力なメディエータであるインスリン様増殖因子-1(IGF-1)の特異的アクチベータであることが示された。マトリックス・メタロプロテイナーゼとして、PAPP-Aは、プラークの細胞外マトリックスのプロセッシングに関与し得、結果として線維性キャップに影響を与え得る。これは、糜爛、破裂および引き続く血栓症に対して敏感なプラークの形態学を導く。本研究は、症状の発生後の8.7時間後に得た単一のPAPP-A決定が、引き続く6カ月の追跡の間の死亡および非致死性の心筋梗塞の発生についての有意な予測値を提供することを示す。これらのデータは、PAPP-Aが、ACSの間の動脈硬化症プラークの不安定化において重要な病態生理学的役割を果たすことを示唆する。動脈硬化症病変内の活性化された細胞によるPAPP-Aの産生および細胞外マトリックスへのその放出は、CRPレベルとPAPP-Aレベルとの間で観察された有意な正の相関によって示されるように、動脈壁内で発生する局所的炎症プロセスと緊密に関連するようである。実際、PAPP-Aレベルは上昇したCRPレベルを有する患者において高度に予測的であるが、その一方で、低いCRPレベルを有する患者において、PAPP-Aは患者の転帰についての有意な予測子として働かなかった(図26a)。CRPレベルはトロポニン_Tの増大と関連するが、PAPP-Aレベルは、ACSを有する患者において特に重要であり得るより小さい心筋損傷に対してあまり敏感でないようであり、この患者のうち

、病院に到達した時点で約3分の1がトロポニンについて陽性である。さらに、PAPP-Aレベルは、ACSを有する患者における血小板の活性化のマーカーであるsCD40Lの予測力を妨害せず、これらに影響を与えることもなかった。多変量分析によって、PAPP-A、sCD40LおよびTnTは全て、有害な結果の独立した予測子として見出された(表2)。PAPP-AおよびsCD40Lの組合せは、TnT陰性患者において特に明らかであり、このことは、両方のマーカーが冠循環における炎症促進環境および凝固促進環境に最終的に寄与する別個のシグナル経路を反映することを示唆する。ACSを有する患者において有害な転帰を予測するための競合的役割以外の補足分を支持することが、アブシキシマブによる血小板の凝集の積極的な阻害がsCD40Lレベルの上昇した患者において特に適切であったという本発明者らの結果である。

10

【0073】

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

【0074】

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

20

【0075】

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

30

【0076】

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

【0077】

添付図面において：

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

40

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

図3は、sCD40L五分位数に従うアブシキシマブでの処置における適合されたリスク指数(95%信頼区画を含む)を示す図である。処置の成功は、6カ月の過程における

50

致死性または非致死性の心筋梗塞の減少として規定される。1.0未満のリスク指数は、プラセボ処置と比較したアブシキシマブでの処置の成功を示す。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

図16は、PAPP-Aプラセボ群(n=547)に従う24時間、72時間、30日および6カ月でのPAPP-A血漿レベルと心臓事象の率との間の関連を示す図である。PAPP-Aの範囲は以下の通りであった: (PAPP-A__1) < 4.5mIU/l (n=111); (PAPP-A__2) 4.5~7.5mIU/l (n=108); (PAPP-A__3) 7.6~12.6mIU/l (n=109); (PAPP-A__4) 12.7~24.0mIU/l (n=110)および(PAPP-A__5) > 24.0mIU/l。発生率は72時間(p=0.019)、30日(p=0.008)および6カ月(

10

20

30

40

50

$p = 0.004$) で有意であった。

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

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

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

10

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

【0078】

〔実施例〕

I. sCD40L

20

1. 患者

CAPTURE研究は、1993年5月から1995年12月の間に、難治性の不安定アンギナを有する患者1265人を登録した(61%が男性、61歳[48~72、95%信頼区間])。全てのCAPTURE患者は、平均14時間の静脈内ヘパリンおよびグリセロールトリニトレートでの処置の間に、ECGの変化を伴う安静状態での再発する胸部疼痛を訴えていた。完全な患者集団を、血管形成術に適した17%以上の誘引病変を有する顕著な冠状動脈疾患の発生が報告される前に動脈造影に付した。これらの患者を、アプシキマブまたはプラセボによる処置に無作為に割りつけた。処置を、割りつけ後2時間以内に開始した。冠介入を、処置の開始後18~24時間以内に全ての患者において計画した(CAPTURE. Lancet 1997; 349: 1429~35頁)。平均して、血液サンプル($n = 1096$)を、症状の発生の8.7(3.6~11.3)時間後に得た(ベース・ライン)。

30

【0079】

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

40

【0080】

2. 急性胸部疼痛を有する患者の検証

12時間未満(平均5.1[2.1~10.4]時間)にわたって持続した急性の胸部疼痛を有する、連続的に救急救命室に来院した胸部疼痛を有する626人の患者の別個の群(161人の女性および465人の男性、平均年齢61[38~82]歳)。先行する2週間の間にベース・ラインECGにおいて特徴的なST上昇を有する患者または報告さ

50

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

【0081】

3. 生化学的分析

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

【0082】

5. sCD40Lの定量的決定

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

【0083】

6. CD40Lの検出のための速いアッセイ

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

10

20

30

40

50

合された。シグナリング線から下流のこのコントロール線の発生により、血漿の妨害されない流れを含む正確な試験機能が確認された。

【0084】

7. 血小板の *in vivo* 活性化

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

【0085】

8. 統計的方法

アッセイ結果を、生化学的マーカーおよび血小板活性化の盲検評価後にデータ・ベースと比較した。異なる等級の心臓リスクを有する患者を識別できるようにするために、指向性データ分析を選択した。CAPTURE患者を、五分位数のsCD40L濃度に従って分類した。ロジスティック回帰分析を、4つの時点(24時間、72時間、30日および6カ月)の各々について実施し、第1の五分位数(2.0µg/l未満のsCD40L)中の患者は参照として機能した。sCD40L試験のダイナミック・レンジにわたる受診者動作特性(ROC)曲線分析を、急性冠症候群を有する患者のリスク層別についての最も高い予測値を提供するsCD40Lについての閾値濃度を同定するために使用した。患者の運命に対する生化学的マーカーの増大の効果を、予後因子(例えば、ECGの所見、心臓リスク因子、年齢および性別)のベース・ライン値を含むCox比例ハザード回帰モデルおよび無作為に選択された処置を使用することによって評価した(Harrell FE, Jr., Lee KL, Pollock BG. J Natl Cancer Inst 1988; 80:1198~202頁)。連続変数についての全ての結果を、95%信頼区画でメジアンとして表した。2つより多いサブグループでの実験において、同一の中間群をT検定(両側)またはANOVAによって分析した。Post hoc-レンジ・テストおよびパワイズ多重比較を、Bonferroni調整を伴うT検定(両側)を用いて実施した。カテゴリー変数の比較を、Pearsonの²検定を用いて実施した。全ての分析を、SPSS 11.0(SPSS, Inc.)を用いて実施した。p<0.05の値を統計的に有意であるとみなした。

【0086】

(実施例 1 a)

心臓リスクと sCD40L 濃度との間の関連

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

【0087】

sCD40L を、 $4.5 \mu\text{g}/\text{l}$ の平均 ($0.003 \sim 20.4$ の範囲) で、1088 人全ての患者のベース・ライン血清サンプルにおいて検出できた。sCD40L 濃度は、TnT ($r = 0.14$) および CRP ($r = 0.11$) の測定した濃度と相関しなかった。プラセボ群の患者 (n = 544) を、測定したそれらの sCD40L 濃度に従って以下の五分位数に分類した: (sCD40L 1) $< 1.93 \mu\text{g}/\text{l}$ (n = 100)、(sCD40L 2) $1.93 \sim 3.50 \mu\text{g}/\text{l}$ (n = 102)、(sCD40L 3) $3.50 \sim 5.00 \mu\text{g}/\text{l}$ (n = 121)、(sCD40L 4) $5.00 \sim 6.30 \mu\text{g}/\text{l}$ (n = 115) または (sCD40L 5) $> 6.30 \mu\text{g}/\text{l}$ (n = 106)。最初の 24 時間の間、複合的な終点である死亡率および非致死の心筋梗塞は、第 1 の五分位数と比較して第 5 の sCD40L 五分位数においてのみ僅かに上昇した ($p = 0.13$) (図 1)。後の時点 (72 時間、30 日、6 カ月) において、これらの事象は、第 4 および第 5 の五分位数の両方において有意により頻繁に発生した ($p = 0.003$ 、 $p = 0.0004$ または $p = 0.001$)。

【0088】

上記の結果に基づいて、これらの患者のサンプルを、計算された閾値濃度に従って分類した。221 人の患者 (40.6%) は、 $5.0 \mu\text{g}/\text{l}$ 以上の sCD40L 濃度を示し、323 人の患者は、 $5.0 \mu\text{g}/\text{l}$ 未満の値を示した。表 1 に示されるように、両方の群の転帰の特徴に有意な差異は生じなかった。より低い sCD40L 濃度を有する患者において、複合的な終点である致死性および非致死性の心筋梗塞は、この方法の 24 時間前 (4.1% 対 0.9%; $p = 0.016$) およびその後 72 時間 (全ての患者における冠介入を含む) (13.1% 対 4.3%; 対 4.3%; $p < 0.001$) の両方で、上昇した sCD40L 濃度を有する患者のものとは有意に異なった (図 2 a)。6 カ月の追跡期間の間、高い sCD40L 濃度または低い sCD40L 濃度を有する患者における事象の頻度を示した曲線 (図 2 b) は、さらに分岐した。有意な差異が、30 日後 (14.5% 対 5.3%; $p < 0.001$) および 6 カ月後 (18.6% 対 7.1%; $p < 0.001$) の両方で見出された。CAPTURE 群の比較的低い死亡率に起因して、6 カ月後の終点の死亡率は、両方の群間で有意に異ならなかった (2.3% 対 1.5%; $p = 0.72$)。sCD40L の予測値は、心筋壊死とは独立していた。上昇した心臓リスクを有する患者の群 (13.6%) が、sCD40L 濃度によって、TnT 陰性の患者において同定され、これは、TnT 陽性の患者 (14.0%; $p = 1.00$) の心臓リスクと有意に異なる。受診者動作特性曲線分析により、sCD40L の最大化された予測的な値について $5.0 \mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度が確認された。高い sCD40L 濃度を有する患者における最初の 6 カ月間の反復された非緊急の心臓学的介入は、より低い sCD40L 濃度を有する患者におけるものと有意に異ならなかった (6.2% 対 4.5%; $p = 0.45$)。

【0089】

急性胸部疼痛を有する救急救命室に入室した ST 上昇を有さない患者 626 人のうち、308 人の患者が急性冠症候群に罹患した (117 人の患者が急性心筋梗塞に罹患しており、これは $0.1 \mu\text{g}/\text{l}$ 以上のトロポニン増大によって支持された)。以下の診断を、他の患者において行った: n = 91 安定アンギナ、n = 10 肺塞栓症、n = 11 うっ血性心不全、n = 7 心筋炎および n = 199 心疾患の証拠なし。sCD40L 濃度

10

20

30

40

50

は、安定アンギナを有する患者(2.41 [1.99 ~ 3.52] $\mu\text{g}/\text{l}$; $p < 0.001$)または心疾患を示さない患者(1.57 [0.88 ~ 1.76] $\mu\text{g}/\text{l}$; $p < 0.001$)と比較して、急性冠症候群を有する患者において有意に高かった(4.53 [3.19 ~ 5.87] $\mu\text{g}/\text{l}$)。心臓障害を示さない患者における97.5の参照上限(URL)についての平均値は4.7 $\mu\text{g}/\text{l}$ であり、99のURL平均値は6.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で見出された。CAPTURE研究において得られた結果と同様に、sCD40L血清濃度は、壊死マーカー(トロポニンT)、炎症マーカー(CRP、TNF-)および接着分子(ICAM-1)と関連しなかった。急性冠症候群を有する患者において、43.5%が97.5のURL平均値を上回るsCD40L血清濃度を示し、21.8%が99のURL平均値を上回るsCD40L血清濃度を示した。5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ のsCD40Lについて規定された閾値濃度を使用することによって、上昇したsCD40L血清濃度を有する患者が高リスク集団と同定された(規定されたリスク指数3.00 [1.35 ~ 6.71]; $p = 0.009$)。胸部疼痛を有する患者の全不均質集団では、5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ の規定された閾値濃度はまた、引き続き30日の間に心臓学的事象についての深刻なリスクを示した患者を同定する際にも信頼性があった(規定されたリスク指数6.65 [3.18 ~ 13.89]; $p < 0.001$)。ROC曲線下の面積は0.75 [0.67 ~ 0.83]であり、最大化された予測値には4.8 $\mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度で到達した。

【0090】

(実施例2a)

血管造影図の結果およびsCD40L濃度

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

(実施例3a)

sCD40L濃度に対するアブシキシマブの効果

ロジスティック回帰分析を、アブシキシマブによる処置の有効性とsCD40L濃度との間の有意な関連に向けた($p < 0.001$)。これらの患者を上記のように五分位数に分類した。最初の2つの五分位数について、プラセボまたはアブシキシマブでの処置の時点で心臓リスクに関して差異は観察されなかった(図3)。心臓事象の有意かつ比較できるほどに顕著な低下が、上位2つの五分位数について報告された。第2の五分位数とこれらの五分位数との間に0.35までの相違の変化が見られたことは、この範囲におけるsCD40L濃度の有利な閾値濃度を示唆する。したがって、致死性または非致死性の心筋梗塞の形態での心臓事象の頻度を示す曲線を、5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ の閾値濃度を使用することによって作成した。これらの方法の前の事象は、プラセボを受けた低いsCD40L濃度を有する患者において稀であったが(0.9%)、その一方で、患者の3.4%において、事象は冠介入と関連して発生した(図4a)。低いsCD40L濃度を有する患者において、アブシキシマブを受けた患者とプラセボを受けた患者との間に差異は観察されな

10

20

30

40

50

った(24時間:1.2%対0.9%;72時間:3.8%対4.3%)。引き続き6カ月において、非常に少ないさらなる事象が記録されたに過ぎなかった。全体的な頻度は7.1%であった(図4b)。

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

(実施例4a)

*in vivo*での血小板の活性化のマーカーとしてのsCD40L

血小板の活性化についてのマーカーをsCD40Lが実際に構成するという仮説を確認するために、血小板の活性化およびsCD40L血清濃度の比率を、急性胸部疼痛を有する患者のサブグループ($n=151$)において、将来を見越して分析した。急性冠症候群を有する患者における血小板の活性化の程度は、安定冠状動脈性心疾患を有する患者および冠状動脈性心疾患を有さない患者の両方と比較して有意に上昇した(図5)。単球-血小板-凝集物によって決定される血小板の活性化(%)とsCD40L濃度との間の厳密な相関が観察された($r=0.75$; $p<0.0001$)(図6)。P-セレクチンについて類似の結果が得られた($p<0.001$)。これらの患者を、それらの測定されたsCD40L濃度に従って、それぞれ以下の三分位数に分類した:(sCD40L 1) $<2.5\mu\text{g/l}$ ($n=55$)、(sCD40L 2) $2.5\sim4.5\mu\text{g/l}$ ($n=50$)および(sCD40L 3) $>4.5\mu\text{g/l}$ ($n=56$)。第1のsCD40L三分位数の患者において、単球-血小板-凝集物の割合は11.3%[9.6~12.9]であった。第2および第3のsCD40L三分位数において、血小板の活性化は有意により高かった(それぞれ、22.3[19.8~24.8]%および34.1[30.0~38.3]%; $p<0.001$)。4.5 $\mu\text{g/l}$ より高いsCD40L血清濃度を示した全ての患者(1人の患者を除く)において、少なくとも15%の単球が血小板と凝集したことは特に興味深く、このことは、これらの患者における血小板の顕著な活性化を示す。それとは対照的に、可溶性P-セレクチンの血清濃度は、血小板の活性化との顕著な関連を示さなかった(それぞれ、単球-血小板-凝集物について $r=0.41$ およびP-セレクチンについて $r=0.36$)。重分散回帰分析において、糖尿病($p=0.015$)、高コレステロール血症($p=0.006$)およびsCD40L濃度($p<0.0001$)は、血小板の活性化と有意に関連したが(単球-血小板-凝集体 $>30\%$)、可溶性P-セレクチンの濃度は関連しなかった。

【 0 0 9 7 】

【表 1】

表 1 : プラセボ群における sCD40L のベース・ライン特徴

	sCD40L 低い	sCD40L 高い	
n	323	221	
男性	73.3%	70.2%	
年齢	60.5 ± 9.9	62.3 ± 10.5	10
既往歴			
4 週間より長きにわたる アンギナ	57.5%	54.6%	
梗塞 14~30 日間	3.5%	2.4%	
30 日より長い梗塞	19.5%	21.0%	
PTCA	19.1%	15.9%	
CABG	3.5%	3.4%	20
リスク因子			
糖尿病	12.1%	9.6%	
高コレステロール血症	32.5%	33.6%	
高血圧	39.3%	34.5%	
喫煙者	40.9%	42.1%	
登録前の投薬			
アスピリン	98.1%	97.7%	30
ヘパリン 静脈内	99.2%	98.6%	
ニトレート 静脈内	98.8%	99.7%	
β ブロッカー	65.0%	61.4%	
Ca ²⁺ アンタゴニスト	56.0%	55.2%	

【 0 0 9 8 】

40

【表 2】

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

変数	OR	95% CI	p 値	
性別	0.91	0.68-1.39	0.16	
65 歳より高齢	1.36	0.91-1.82	0.34	
真性糖尿病	1.22	0.83-1.49	0.61	10
高コレステロール血症	0.90	0.68-1.13	0.59	
高血圧	1.00	0.89-1.04	1.00	
CHDの履歴	0.86	0.65-1.19	0.72	
ST低下	1.04	0.76-1.54	0.74	
TnT > 0.1 µg/l	2.94	1.75-7.26	< 0.001	
CRP > 10 mg/l	2.03	1.11-3.59	0.018	20
sCD40L > 5.0 µg/l	2.71	1.51-5.35	0.001	

【 0 0 9 9 】

I I . P I G F

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

30

【 0 1 0 0 】

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

40

【 0 1 0 1 】

1 . 患者

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

50

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

【0102】

2. 急性胸部疼痛を有する患者の確認

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

【0103】

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

【0104】

3. 生化学的分析

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

【0105】

4. PLGFの定量的決定

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

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

【 0 1 0 6 】

5 . 統計的方法

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

【 0 1 0 7 】

(実施例 1 b)

心臓リスクと P L G F 濃度との間の関連

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

【 0 1 0 8 】

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

て有意な差異を引き起こした。

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

(実施例2b)

P1GF血清レベルに対するアブシキシマブの効果

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

【0112】

(実施例3b)

退院時のP1GF血清レベルは長期の転帰を予測する

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

10

20

30

40

50

F血清レベルは、ベース・ラインでの $27.12 \pm 19.56 \text{ ng/l}$ の平均から退院時の $23.4 \pm 26.2 \text{ ng/l}$ まで減少した ($p = 0.012$)。 27.0 ng/l を上回る退院時のP1GF血清レベルを有する患者について、死亡率および非致死性の心筋梗塞の発生率は、30日 (4.6% 対 0.8% ; $p = 0.019$) および6カ月 (7.4% 対 2.2% ; $p = 0.005$)の両方の追跡試験で、低いP1GF血清レベルを有する患者と比較して有意により高かった (図13)。

【0113】

(実施例4b)

急性胸部疼痛を有する患者におけるP1GF閾値の確認

急性胸部疼痛を有する患者626人のうち、308人の患者が急性冠症候群に罹患した (117人の患者は、非ST上昇心筋梗塞を有した)。他の患者を、以下の診断に従って分類した: $n = 91$ 安定アンギナ、 $n = 10$ 肺塞栓症、 $n = 11$ うっ血性心不全、 $n = 7$ 心筋炎および $n = 199$ 心疾患の証拠なし。P1GF血清レベルは、安定アンギナを有する患者 (平均 $16.2 [95\% \text{ CI } 13.8 \sim 18.6 \text{ ng/l}$; $p = 0.001$) および心疾患を示さない患者 (平均 $9.6 [95\% \text{ CI } 10.4 \sim 12.9 \text{ ng/l}$; $p = 0.001$) と各々比較した場合に、急性冠症候群を有する患者において有意に増大した (平均 $28.3 [95\% \text{ CI } 21.3 \sim 2.2] \text{ ng/l}$)。非ST上昇心筋梗塞を有する患者におけるP1GF血清レベルは、不安定アンギナを有する患者におけるP1GF血清レベルから有意に異ならなかった ($30.5 [95\% \text{ CI } 26.9 \sim 34.1]$ 対 $28.3 [95\% \text{ CI } 21.3 \sim 32.3] \text{ ng/l}$; $p = 0.42$)。心疾患を示さない患者における97.5%の参照上限は 24.9 ng/l であり、99%の参照上限は 27.3 ng/l であった。P1GF血清レベルは、壊死のマーカー (トロポニンT [$r = 0.07$]) と関連しなかったが、炎症マーカー (C反応性タンパク質 [$r = 0.43$]) と有意に関連した。

10

20

【0114】

急性冠症候群を有する患者において、44.8%の患者が、99%の参照上限を上回るP1GF血清レベルを示した。 27.0 ng/l のP1GFについての閾値を使用することによって、上昇したP1GF血清レベルを有する患者に、死亡および心筋梗塞についての有意により高いリスクが潜在していた (調整されたハザード率 $2.97 [95\% \text{ CI } 1.74 \sim 9.06$; $p = 0.014$)。胸部疼痛を有する患者の不均質集団全体において、 27.0 ng/l の閾値もまた、死亡および心筋梗塞についての最も高いリスクに従う患者を確実に同定した (調整されたハザード率 $4.95 [95\% \text{ CI } 2.50 \sim 9.79$; $P = 0.001$)。

30

【0115】

実施例1b~4bのまとめ

ACSを有する患者において、P1GFは、VEGF、トロポニンTおよびST部分の変化と関連しないが、hsCRPとの有意な相関を示した ($p = 0.001$)。上昇したP1GF血清レベルを有する患者 ($> 27.0 \text{ ng/l}$; 40.8%) は、ACSの30日後 (調整されたハザード率 $3.34 [95\% \text{ CI } 1.79 \sim 6.24]$; $p = 0.001$) および6カ月後 (調整されたハザード率 $3.58 [95\% \text{ CI } 1.48 \sim 7.72]$; $p = 0.001$) の両方で、強烈に上昇した心臓リスク (死亡および非致死性の心筋梗塞) を経験した。P1GF血清レベルは、低いhsCRPレベルを有する患者において特に有益であった。急性胸部疼痛を有する患者における予備的な確認により、 27 ng/l より高いP1GF血清レベルが、死亡および心筋梗塞についての最も高いリスク (調整されたハザード率 $4.95 [95\% \text{ CI } 2.50 \sim 9.79$; $p = 0.001$) に従う患者を確実に同定した。より高いP1GF血清レベルを有する患者における上昇したリスクは、糖タンパク質IIb/IIIaレセプター阻害物質であるアブシキシマブでの処置によって低下した (調整されたハザード率 $0.38 [0.19 \sim 0.74]$; $p = 0.005$)。

40

【0116】

50

【表3】

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

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

【0117】

【表4】

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

変数	調整されたハザード率	95% CI	p 値	
性別	0.95	0.72 – 1.68	0.38	
年齢 > 65 歳	1.22	0.65 – 1.47	0.50	10
真性糖尿病	1.22	0.83 – 1.49	0.61	
高コレステロール血症	0.90	0.68 – 1.13	0.59	
重度の喫煙者	0.66	0.42 – 1.25	0.18	
高血圧	1.04	0.91 – 1.25	0.95	
冠再血管化の履歴	0.86	0.65 – 1.19	0.72	
ST 低下	0.96	0.55 – 1.42	0.81	20
hsCRP > 10.0 mg/l	0.95	0.62 – 1.57	0.88	
トロポニン T > 0.1 µg/l	1.76	0.98 – 3.46	0.084	
VEGF > 300 ng/l	2.16	1.05 – 4.11	0.031	
PIGF > 27,0 ng/l	3.58	1.48 – 7.72	<0.001	

【0118】

III. PAPP-A および組合せ

急性冠症候群を有する患者における PAPP-A の予後診断的な重要性を、CAPTURE (c7e3「不安定難治性アンギナにおける抗血小板治療」) 研究に含められた急性冠症候群を有する患者のデータを使用することによって用い、次いで診断的および予後診断的な重要性を、胸部に疼痛を有する入室した患者の大きい集団において予備的に確認した。PAPP-A 血清レベルを、急性冠症候群を有する CAPTURE 研究由来の患者において測定した。致死性または非致死性の転帰を伴う心筋梗塞の発生率を、追跡期間の間記録した。

【0119】

1. 患者

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

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

【0120】

2. 生化学的分析

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

【0121】

3. 統計的方法

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

【0122】

結果のまとめ

ベース・ラインPAPP-A血漿レベルは、14.8 ± 13.8 mIU/lの平均レベル (0.2 ~ 105.4の範囲) を示した。PAPP-A血漿レベルが一般的なりスク・マーカーと関連した場合、PAPP-A濃度はTnTレベルと相関せず (Spearman順位相関係数 r = 0.11 ; P = 0.16)、高いTnT血漿レベルを有する患者および低いTnT血漿レベルを有する患者において類似であった (図14)。同様に、VEGF血漿レベル (r = 0.08 ; P = 0.07) およびIL-10血漿レベル (r = -0.04 ; P = 35) は、PAPP-A血漿レベルとの関連を示さなかった。これとは対照的に、hsCRP血漿レベルは、上昇したTnT血漿レベルを有する患者において有意により高かった。二変量相関分析により、PAPP-AとhsCRPとの間ならびにPAPP-AとsCD40Lとの間の有意な相関が得られたが、この相関係数は低く、hsCRPについて r = 0.21 (P = 0.001) およびsCD40Lについて r = 0.18 (P

10

20

30

40

50

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

【0123】

PAPP-A血漿レベルと心臓リスクとの間の相互作用

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

【0124】

PAPP-A状態に従う層別

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

【0125】

多マーカーの考慮

本発明者らは、心筋壊死のマーカー(TnT)、虚血のマーカー(VEGF)、炎症のマーカー(hsCRP、PAPP-A)、抗炎症活性のマーカー(IL-10)および血

10

20

30

40

50

血小板の活性化のマーカー (sCD40L) を同時に測定した。注目すべきことに、PAPP-Aの予測値は、上昇したhsCRPレベルを有する患者に限定された(図19a)。hsCRP血漿レベルが(10mg/lより上に)上昇した場合、12.6mIU/lの計算された閾値を上回るPAPP-A血漿レベルを有する患者は、死亡および非致死性の心筋梗塞についての上昇した心臓リスクを示した(調整されたオッズ比2.61[1.25~5.62]; P=0.007)を示した(図19a)。これとは対照的に、10mg/lを下回るhsCRP値を有する患者について、PAPP-Aは、心血管リスクについての有意な予測子として作用しなかった(P=0.073)。さらに、PAPP-Aの予測値は、抗炎症性サイトカインIL-10の血漿レベルと緊密に関連した(図19b)。IL-10血漿レベルが3.5ng/lの計算された閾値を上回った場合、上昇したPAPP-A血漿レベル(12.6mIU/lを上回る)を有する患者は、上昇した心臓リスクから保護された(調整されたオッズ比1.40[0.60~3.23]; P<0.001)(図19b)。しかし、低いIL-10血漿レベルを有する患者について、12.6mIU/lを上回るPAPP-A値は、特に高い心血管リスクに罹患した患者のサブグループを同定した(調整されたオッズ比3.52[1.71~7.23]; P=0.001)。まとめると、これらのデータは、PAPP-A血漿レベルの予測値が、炎症促進性サイトカインの血漿レベルと抗炎症性サイトカインの血漿レベルとの間のバランスによって重要に調節されていることを示す。重要なことに、PAPP-Aの予測値はまた、心筋壊死についての証拠を有さない患者においても見ることができた。上昇したPAPP-Aレベルを有するTnT陰性の患者(閾値0.1μg/l)は、低いPAPP-Aレベルを有するTnT陰性の患者と比較して有意により高いリスクがあった(調整されたオッズ比2.72[1.25~5.89]; P=0.009)(図20a)。これとは対照的に、TnT陽性の患者は、PAPP-A血漿レベルから独立した上昇した心血管リスクに罹患した。PAPP-Aの予測値は、TnTについて0.01μg/lの低下した閾値についても観察された(調整されたオッズ比3.97[1.24~12.68]; P=0.016)。TnTおよびsCD40Lの両方について陰性であった患者において、PAPP-Aは、6カ月の追跡の間に上昇した心血管リスクに罹患したサブグループを同定した(図20b)。個々の生化学的マーカーの潜在的に独立した予後診断的な重要性をさらに導出するために、生化学的マーカーTnT、VEGF、hsCRP、PAPP-A、IL-10およびsCD40Lならびに一変量モデルにおける有意な予測値を導いたベース・ライン特徴を含んだ段階的な多変量ロジスティック回帰分析を実施した。30日および6カ月の追跡での終点である死亡および非致死性心筋梗塞について、確立されたリスク因子のいずれも、二分された生化学的マーカーTnT、hsCRPおよびsCD40Lをこのモデルに導入した後に独立した予測子ではなかった(表6)。したがって、段階的な多変量分析は生化学的マーカーに限定された。TnT(P=0.008)およびPAPP-A(P=0.007)は、これらの患者の転帰の独立して有意な予測子のままであったが、その一方でhsCRPは、PAPP-Aをこのモデルに導入した後に有意性を喪失した(PAPP-AなしでP=0.003; PAPP-Aの導入後にP=0.16)(表7; ステップI)。PAPP-Aは、抗炎症性サイトカインIL-10を含めた後(表7; ステップII; P=0.006)および血小板の活性化のマーカーとしてsCD40Lを含めた後(表7; ステップIII; P=0.015)に、患者の転帰の有意な予測子のままであった。心筋虚血のマーカーとしてVEGFを含めた後、TnTは、6カ月の転帰についてのその予測力を喪失した(表7; ステップIV; VEGFを含めた後P=0.24対VEGFを含める前P=0.16)が、その一方でPAPP-Aは、有意な独立した予測子のままであった(P=0.014)。

【0126】

別個の病態生理学的プロフィールを有する生体マーカーの同時の決定は、ACSを有する患者においてリスク層別を劇的に改善する。PAPP-A、PLGFおよびsCD40Lのレベルは比較的安定でありかつPAPP-A、PLGFおよびsCD40Lについて特定のサンプル条件は必要ないので、これらのマーカーは、慣用的な臨床的使用に適切で

10

20

30

40

50

あるようである。冠状動脈および/または心筋に対して特異的でないというマーカーについての固有の制限が残るものの、PAPP-A、PLGFおよびsCD40Lは、心筋壊死の証拠を有さないACSを有する患者の診断的および治療的な層別のための重要なツールとなることができる。

【0127】

【表5】

表5: PAPP-A 状態に従うベース・ライン特徴

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

【0128】

10

20

30

40

50

【表 6】

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

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

【 0 1 2 9 】

【表 7】

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

ステップ I

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

10

ステップ II

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

20

ステップ III

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

30

ステップ IV

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

40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 0 】

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

【図 2 a】プラセボ群 (n = 544) における sCD40L 濃度のベース・ライン値 (診

50

断閾値 $5.0 \mu\text{g}/\text{l}$) に従う、72時間後の致死性または非致死性の転帰を有する心筋梗塞の累積発生率のKaplan-Meierに従う図である。

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

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

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

10

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

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

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

20

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

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

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

30

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

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

40

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

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

【図14】ベース・ラインのトロポニンT状態に従うPAPP-AレベルおよびhsCR

50

Pレベルの各々を示す図である。丸はアウトライアーを示す。

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

【図16】PAPP-Aプラセボ群(n=547)に従う24時間、72時間、30日および6カ月でのPAPP-A血漿レベルと心臓事象の率との間の関連を示す図である。PAPP-Aの範囲は以下の通りであった：(PAPP-A₁) < 4.5 mIU/l (n = 111)；(PAPP-A₂) 4.5 ~ 7.5 mIU/l (n = 108)；(PAPP-A₃) 7.6 ~ 12.6 mIU/l (n = 109)；(PAPP-A₄) 12.7 ~ 24.0 mIU/l (n = 110) および (PAPP-A₅) > 24.0 mIU/l。発生率は72時間(p = 0.019)、30日(p = 0.008)および6カ月(p = 0.004)で有意であった。

10

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

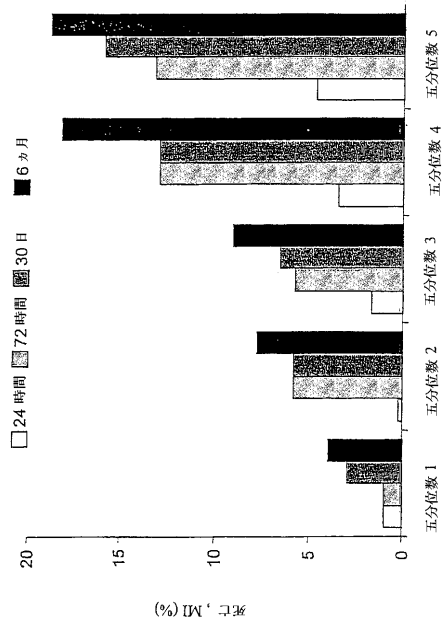
【図18】PAPP-Aベース・ライン血漿レベルに従う72時間(a)および6カ月(b)での死亡および非致死性の心筋梗塞の累積発生率を示すKaplan-Meier事象率曲線を示す図である。診断的な閾値12.6 mIU/l；n = 547。

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

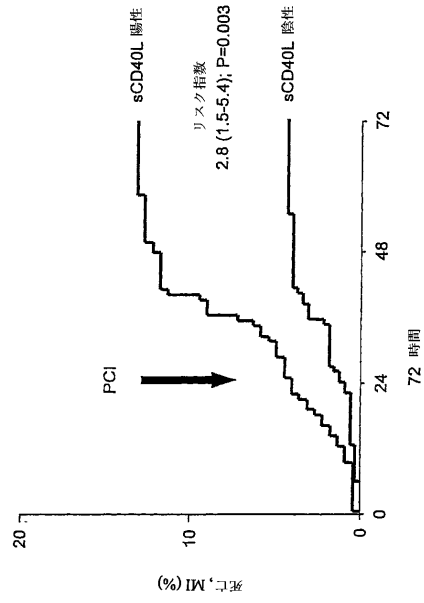
20

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

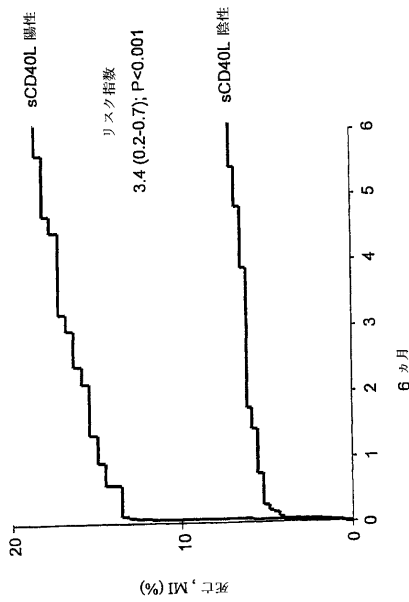
【図1】



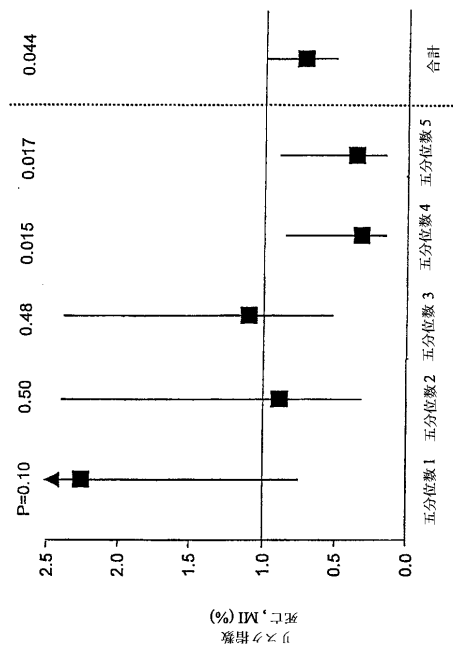
【図2 a】



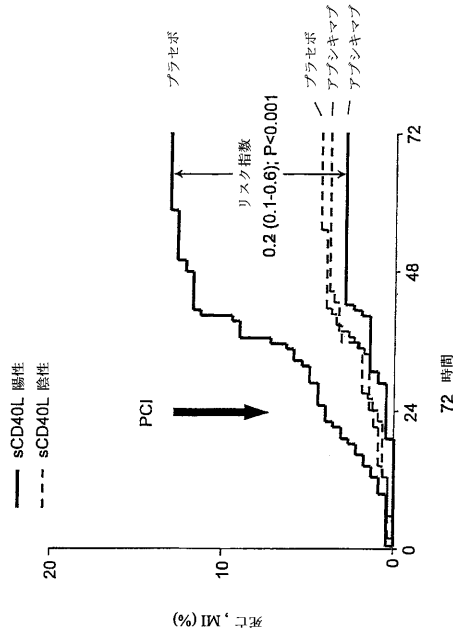
【図2 b】



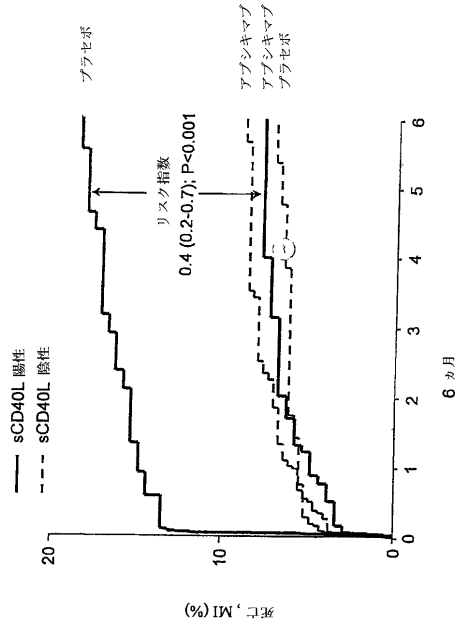
【図3】



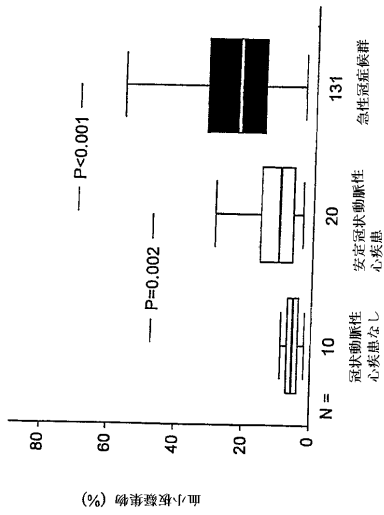
【 図 4 a 】



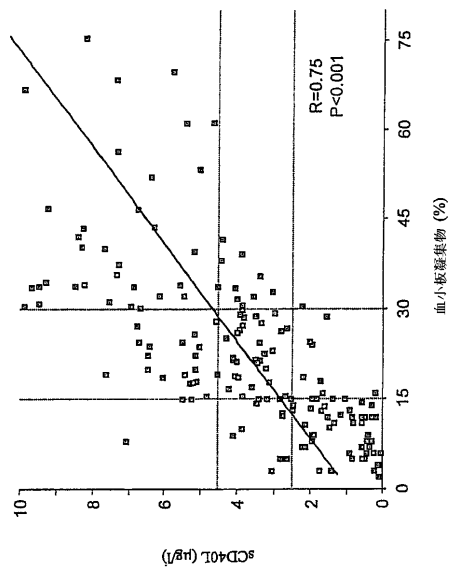
【 図 4 b 】



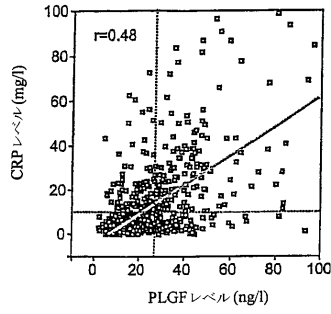
【 図 5 】



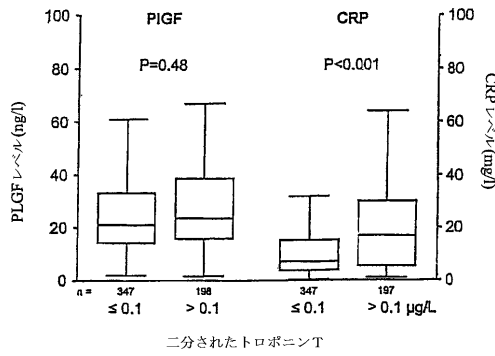
【 図 6 】



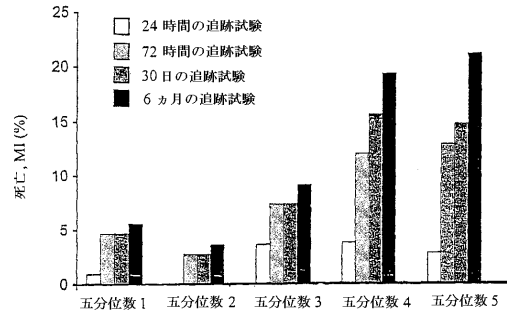
【 図 7 】



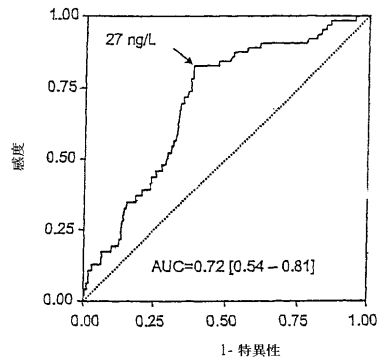
【 図 8 】



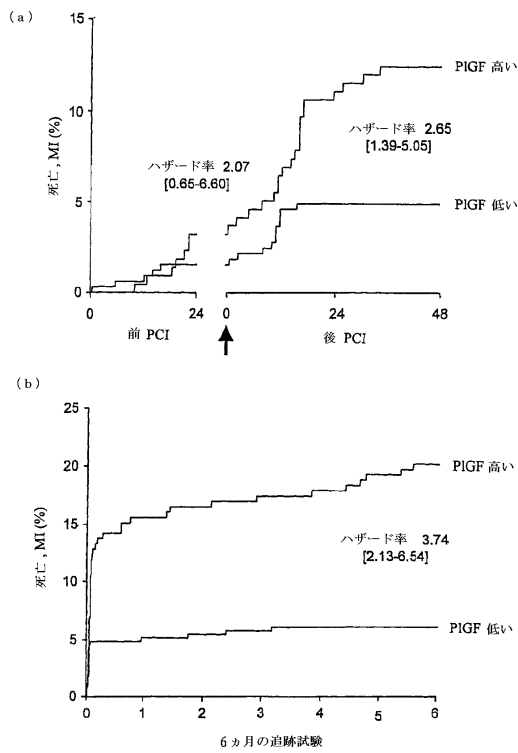
【 図 9 】



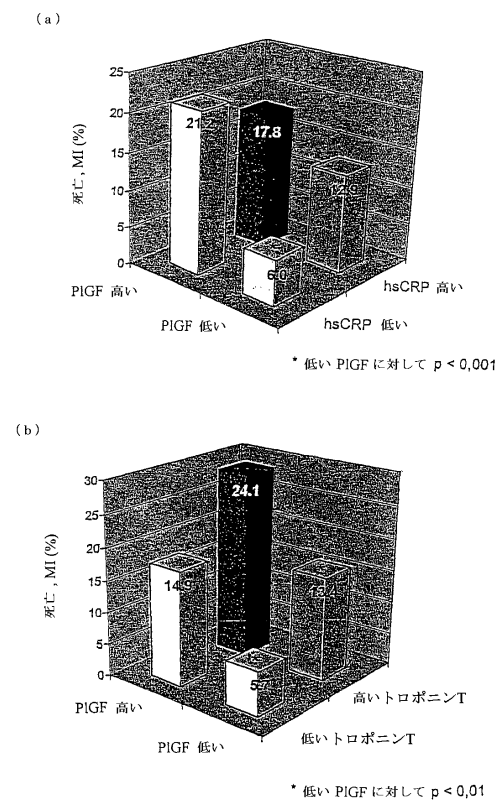
【 図 10 】



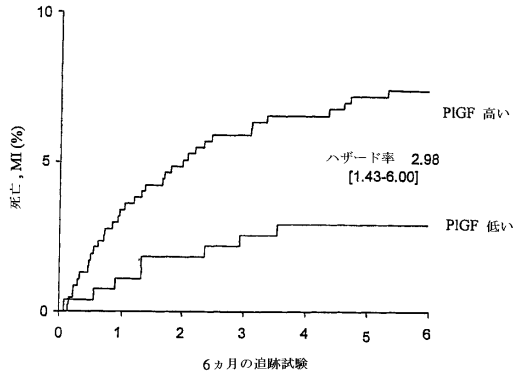
【 図 11 】



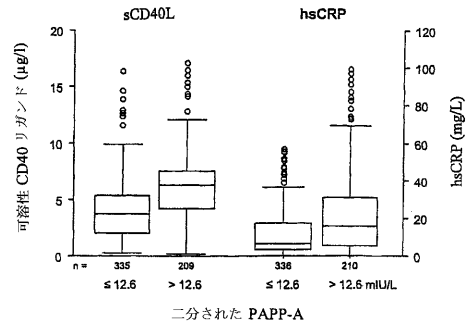
【 図 12 】



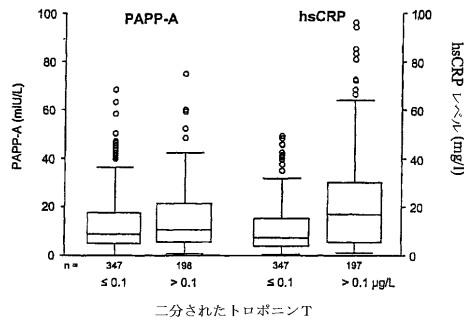
【図 13】



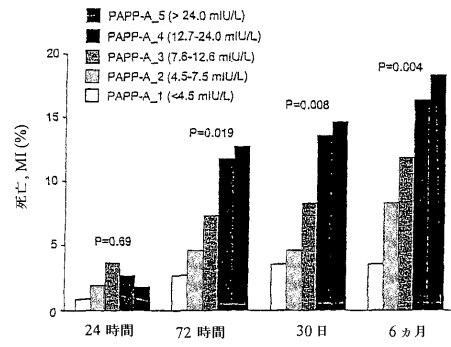
【図 15】



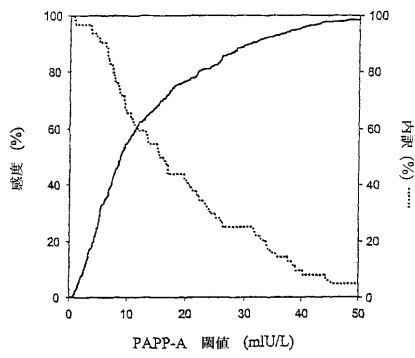
【図 14】



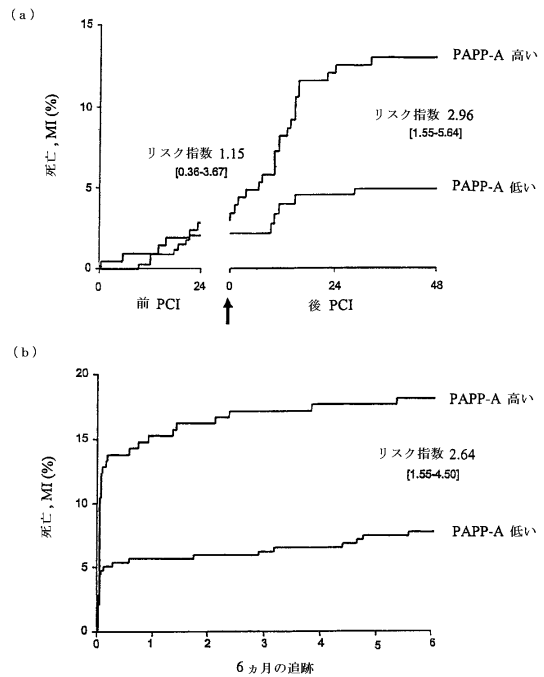
【図 16】



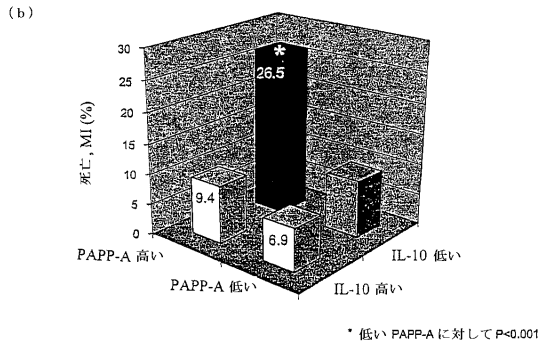
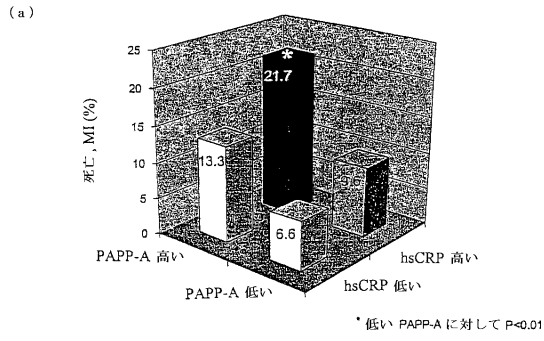
【図 17】



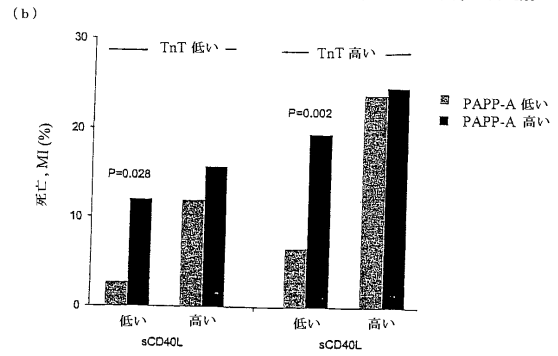
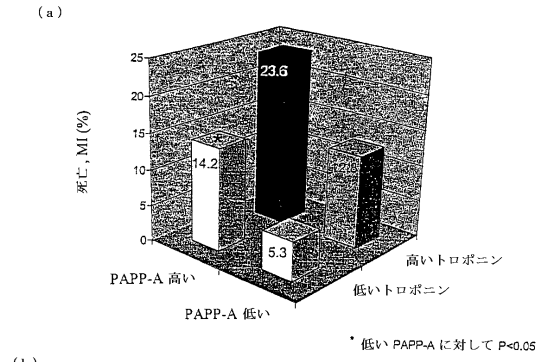
【図 18】



【 図 19 】



【 図 20 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/395 M
A 6 1 P 7/02

- (72)発明者 クリストファー・ヘーシェン
ドイツ連邦共和国60431フランクフルト・アム・マイン・ヴォークシュトラッセ5
- (72)発明者 シュテファン・ディメラ
ドイツ連邦共和国60594フランクフルト・アム・マイン・ドイチュヘルンウーファー47
- (72)発明者 クリスティアン・ハム
ドイツ連邦共和国61350パートホムブルク・フィロゾーフエンヴェーク16

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2005-515407(JP,A)
特表2004-531696(JP,A)
特表2004-535389(JP,A)
特表2004-518611(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAPlus(STN)

专利名称(译)	SCD40L , PAPP-A和胎盘生长因子 (PIGF) 作为心血管疾病中生化标志物的组合		
公开(公告)号	JP4741249B2	公开(公告)日	2011-08-03
申请号	JP2004570272	申请日	2003-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	日德白令maru堡ゲゼルシャフトミツトベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡 , Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断产品有限公司		
[标]发明人	アンドレーアスエムツアイエル クリストファーヘーシェン シュテファンディメラ クリスティアンハム		
发明人	アンドレーアス・エム・ツアイエル クリストファー・ヘーシェン シュテファン・ディメラ クリスティアン・ハム		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543 A61K39/395 A61P7/02 C07K14/705		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/70575 G01N2333/96486 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/543.541.A A61K39/395.M A61P7/02		
优先权	10253525 2002-11-16 DE 10316059 2003-04-08 DE		
其他公开文献	JP2006508367A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及血管炎症的新型标志物及其组合，用作患有心血管疾病的患者的诊断和预后工具。这些标记物还可以作为工具来促进选择活性成分来治疗这类疾病，并构成治疗心血管疾病的起点。本发明还涉及与动脉硬化进展相关的负面事件的个体风险特征的产生。

表 1 : プラセボ群における sCD40L のベース・ライン特徴

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