

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531687

(P2004-531687A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 37/00

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

GO 1 N 37/00

テーマコード (参考)

D

M

102

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 157 頁)

(21) 出願番号 特願2002-527787 (P2002-527787)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月12日 (2001. 9. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月11日 (2004. 3. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2001/001141
 (87) 国際公開番号 W02002/023191
 (87) 国際公開日 平成14年3月21日 (2002. 3. 21)
 (81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 501254014
 ユニバーシティ オブ シドニー
 オーストラリア国, 2006, ニュー サウス ウェールズ, ジョン ウーリー ビルディング エイ 20, ビジネス リエゾン オフィス気付け
 (74) 代理人 100107685
 弁理士 高橋 健
 (72) 発明者 クリストファーソン, リチャード, イアン
 オーストラリア国, ニュー サウス ウェールズ 2021, パディングトン, サザラランド ストリート 137

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断的検定法

(57) 【要約】

本発明は一般的に、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を示すパラメータについての予後検定を含む診断装置に関する。より具体的には、本発明は、急性心筋梗塞、心不全、アテローム (atheromoma) 症または血栓症の状態など (これらに限定されないが) の急性冠状症候群を含む、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む、血管病に関連するパラメータを検出するための検定法を提供する。これらのパラメータのパターンの特定は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の診断を可能にし、これらの状態若しくは事象の発症の危険性の判定を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全身の脈管構造の状態若しくは事象と関連するパラメータを評価する方法、又は状態若しくは事象が発生する危険性を評価する方法であって、テスト対象の被検体から、該状態若しくは事象の前、間、後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化され、または高レベル調節若しくは低レベル調節される一つ以上の構成要素を含む生体試料を採取する工程、及び該生体試料を第二の組の構成要素と接触させる工程を含む方法であって、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上の結合相手であり、該一組目と二組目の間の相互作用の欠如を含む相互作用パターンが、該状態若しくは事象、又は該状態若しくは事象の発症の危険性を示すものである方法。

10

【請求項 2】

生体試料中の構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MH C)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニン I と T (それぞれ、cTn-I と cTn-T) 並びに cTn-I と cTn-T の RNA、FABP1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質 FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C 反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイド A、P-セレクトリン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性 TNF 受容体 2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブリンオリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/Apo1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 IIIa 遺伝子多型、因子 V IIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas 並びに Fas リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の二つ以上から選択されるものであり、該生体試料を第二の組の構成要素と接触させるものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が結合相手である、請求項 1 に記載の方法。

20

30

【請求項 3】

生体試料の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

40

【請求項 4】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第二の組の構成要素が固体担体に固定されている、請求項 1 から請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

結合相手への構成要素の結合が、生体試料中の構成要素に対する標識抗体により検出されるものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

結合相手への結合構成要素の結合が、

(i) 全ての血漿タンパク質のビオチン化、その後の抗体マイクロアレイへの結合、

50

及びその後のストレプトアビジン - A P / H R P 結合への結合、

(ii) 全ての血漿タンパク質の蛍光標識化、

(iii) 蛍光で標識した異なるエピトープに特異的な抗体、及び、

(iv) 固定化抗体の希釈を用いて決定した血漿マーカーの濃度

により検出されるものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

状態若しくは事象が、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病である、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

被検体由来の生体試料中の構成要素に対する結合相手のアレイであって、該構成要素が全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の後に該被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化されるものであり、その結合相手が、アレイが n 個の結合相手を座標 (x, y) 、 (x_2, y_2) 、 (x_n, y_n) に含むような (x, y) 座標で定義されるものであり、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象を示すものである、結合相手のアレイ。

【請求項 10】

生体試料の構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (M L C)、ミオシン重鎖 (M H C)、C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K)、乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、心臓トロポニン I と T (それぞ
れ、c T n - I と c T N - T) 並びに c T n - I と c T N - I の R N A、F A B P 1 とヒ
トの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質)、グリコーゲンホスホ
リラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、細胞質 F
A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P)、アドレノメデュリン (A D M)、低密度
リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク
質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L)、C 反応性タンパク質 (C R P)、
血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (P A F)
、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (T N F)、可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2)、
フィブリン、フィブリノゲン、フィブロノリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (H b
A 1 c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分
子 (I C A M)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若し
くはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、
ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊
死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、
メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、
アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細
胞接着分子 - 1 (V C A M 1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I
型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V
I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s
リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれら
の断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の二つ以上から選択され
るものである、請求項 9 に記載のアレイ。

【請求項 11】

生体試料中の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項 9 又は請求項 10 に記載のアレイ。

【請求項 12】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項 11 に記載のアレイ。

【請求項 13】

第二の組の構成要素が固体担体に固定されている、請求項 9 から請求項 12 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

状態若しくは事象が、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病である、請求項 9 から請求項 13 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 15】

被検体の梗塞若しくは関連状態の大きさを推定する方法であって、梗塞の大きさ (I s) が次式：

【数 1】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

10

上式中、

I s は梗塞の大きさであり、

F (t) d t は生体試料中の、梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の放出速度であり [f (t) は、構成要素出現関数としても知られる]、

20

B w は被検体の体重であり、

K w は構成要素が放出される先の体重の比率であり、

E d は評価からの構成要素の除去速度であり、

K r は放出された構成要素の総量を梗塞に至った組織から放出された構成要素の数で割ったものである、

で測定され、該方法が、心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化される構成要素を含む該被検体由来の生体試料を、該構成要素の結合相手の一つ以上と接触させる工程を含み、その結合相手が固体担体に固定されており、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが梗塞の大きさの指標となるか、またそうでなければ梗塞の大きさを評価するためのデータ入力を提供するものである方法。

30

【請求項 16】

全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が生体試料中の二つ以上の m R N A 分子の存在をスクリーニングする工程を含み、該 m R N A 分子が、心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化される構成要素に翻訳可能であり、該スクリーニング工程が、生体試料を、該 m R N A 分子とハイブリッド形成できるか又そうでなければ m R N A 分子を捕捉できるオリゴヌクレオチドのアレイと接触させる工程を含むものであり、該 m R N A 分子の存在若しくは不存在が該状態若しくは事象を示すか又はそれらの発生の危険性を示すものである方法。

40

【請求項 17】

m R N A 分子が、最初に c D N A を読み取るための逆転写を受けるものである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

状態若しくは事象が、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病である、請求項 15 または請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

全身の脈管構造の状態若しくは事象を評価するデータの処理方法であって、

(1) 指標としてのレポーター分子、又は固定された構成要素又はバイオチップアレイと

50

の相互作用若しくは相互作用の不存在を検出する工程、

(2) (1) で得られたデータを分析して生体試料中の構成要素を同定する工程、

(3) (2) から得られた構成要素の量を任意選択的に定量化する工程、及び

(4) 状態若しくは事象の起こりやすさ若しくは危険性の原因となるデータを分析する工程、

を実行するデータの処理方法。

【請求項20】

治療法であって、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する工程、又は状態若しくは事象が発生する危険性を評価する工程を含み、該状態若しくは事象又はその他の異常に関連する状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化される一つ以上の構成要素を含むテスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程であって、該構成要素がミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T) 並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクトリン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブリンリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択される工程、及び、該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素と結合できるその免疫学的等価物と接触させる工程であって、相互作用の不存在を含む該構成要素と抗体の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象を示すものであり、次いで適切な治療法を行なう工程を含む、治療法。

【請求項21】

状態若しくは事象が、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の起こりやすさ若しくは危険性を評価するためのコンピュータプログラム産物であって、

(1) 次のリストから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード、

(a) ミオグロビンの存在又は不存在

(b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在

(c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在

10

20

30

40

50

- (d) C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K) の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4) の存在又は不存在
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、 c T n - I と c T N - T) 並びに c T n - I と c T N - I の R N A の存在又は不存在
- (h) F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質) の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイムの存在又は不存在
- (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) の存在又は不存在
- (k) 細胞質 F A B P 10
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P) の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン (A D M) の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質 (L D L) 、超低密度リポタンパク質 (V L D L) 、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L) の存在又は不存在
- (o) C 反応性タンパク質 (C R P) の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイド A の存在又は不存在
- (q) P - セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子 (P A F) の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在 20
- (u) 腫瘍壊死因子 (T N F) の存在又は不存在
- (v) 可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2) の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) フィブリンオリグペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (H b A 1 c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在 30
- (dd) アポ B 、アポ A 、アポ E の存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在 40
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在 50

- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) Fas 並びに Fas リガンドの存在又は不存在
- (zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、及び、
- (2) コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体、を含む、コンピュータプログラム産物。

【請求項 23】

全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を有する被検体の発症の可能性を評価するコンピュータシステムであって、

(1) データ記憶装置を含む、機械で読取可能なデータが書込まれた機械で読取可能なデータ記憶媒体であって、次のリストから選択される特性の一つ以上に対する数値を含む記憶媒体、

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
- (b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在
- (c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在
- (d) CK-MB を含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素 (LDH-H4) の存在又は不存在
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、cTn-I と cTn-T) 並びに cTn-I と cTn-T の RNA の存在又は不存在
- (h) FABP1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FAB タンパク質) の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - BB アイソザイムの存在又は不存在
- (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の存在又は不存在
- (k) 細胞質 FABP
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン (ADM) の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL) の存在又は不存在
- (o) C 反応性タンパク質 (CRP) の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイド A の存在又は不存在
- (q) P - セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子 (PAF) の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子 (TNF) の存在又は不存在
- (v) 可溶性 TNF 受容体 2 (sTNFR2) の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) フィブロリティックペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (HbA1c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバ

10

20

30

40

50

クター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、の存在又は不存在

(gg) 壊死と血小板マーカの存在又は不存在

(hh) レプチンの存在又は不存在

(ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在

(jj) ヘパリンの存在又は不存在

(kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在

(ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在

(mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在

(nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在

10

(oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在

(pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在

(qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在

(rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在

(ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在

(tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在

(uu) 因子 V I I a の存在又は不存在

(vv) トロンビンの存在又は不存在

(ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在

(xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在

20

(yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在

(zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、

(2) 該機械で読取可能なデータを処理するための命令を記憶するための作業メモリ、

(3) 該機械で読取可能なデータを処理して該候補の配列の予測値に対応する該値を集計するための、該作業メモリ及び該機械で読取り可能なデータと連動する中央演算処理装置、及び、

(4) 該予測値を受け取るための、該中央演算処理装置と連動する出力装置、を含むコンピュータシステム。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を示すパラメータにいついての予後検定を含む診断装置に関する。より具体的には、本発明は、急性心筋梗塞、心不全、アテローム (atheromoma) 症または血栓症の状態など (これらに限定されないが) の急性冠状症候群を含む、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む、血管病に関連するパラメータを検出するための検定法を提供する。これらのパラメータの特定、又はより具体的にはパラメータのパターンの特定は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の診断を可能にし、これらの状態若しくは事象の発症の危険性の判定を可能にする。さらに具体的には、本発明は一組の構成要素を含む診断装置であって、該構成要素の一つ以上がヒト被験者を含む動物からの生体試料に特異的な若しくは一般的な結合相手を有するものであり、この結合相手への該構成要素の結合パターンが全身の脈管構造内におけるある状態若しくは事象の起こり易さを示し、予想し、若しくはその他の方法で関連付けるものである診断装置に向けられる。特異的な又は一般的な結合相手を検出できないことも、指標としての又は予想としての価値を有する。このことは、外科手術の間、又は患者が昏睡状態などで患者が自身の状態について情報を医師に伝えられない場合には、特に重要である。健康な被験者若しくは外科手術若しくは化学療法などの危険に曝されようとしている被験者における、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病の危険性を決定する際にも有用である。本発明は、心臓病、心臓障害、心

40

50

臓感染、心拍、血栓症などの全身の脈管構造における状態若しくは事象の生化学的マーカーの同定及び/又は定量化において、並びに障害が無いが又は障害の発生の危険が無い場合を含むこれらの状態の発生の危険性の決定において、とりわけ有用である。このような状態の評価は、治療優先順位付けの一部として、日常的試験計画及び/又は研究室手順の一部として、臨床における設定においてなされても良い。

【背景技術】

【0002】

本明細書で参照する文献の書誌的詳細は、本明細書の末尾にまとめる。

【0003】

本明細書における先行技術の参照は、その先行技術がオーストラリア及び他のどの国においても共通する一般知識の一部を形成することを認めるもの又は示唆するものではなく、そのように解釈されるべきではない。

【0004】

冠状動脈疾患や急性心筋梗塞(AMI)などの心血管疾患は全身脈管構造に関連する状態若しくは事象の例である。心血管疾患自体は、西欧世界における7000万以上の人々を冒している。AMIは1年間に約150万人の患者を冒している心血管疾患への最大の貢献者である。AMIを患う患者は二つの範疇のいずれかに分類される。

【0005】

第一の範疇には患者の約20~30%が含まれ、「無症状の」梗塞を特徴とする。このような梗塞は、痛みがないために患者が梗塞に気付かないことが多いので、「無症状」である。第二の範疇には残りの3分の2の患者が含まれ、医者に激しい胸の痛みを訴える患者である。

【0006】

AMIのいずれの範疇の診断にも、潜在的な心筋組織の損傷を判定するのに独立した複数の血液に基づく検定が必要となる一連の誘発テストを必要とする。典型的なAMIは激しい長期的な胸の痛みを伴い、そうでなければ狭心症と呼ばれる。現在の診断にはS-T部分の上昇を通常含む心電図(ECG)上の変化を含み、これには、Q波又はQS波があり血清酵素レベルに変化がある。

【0007】

無症状虚血と無症状梗塞も、重大な臨床的問題である。息切れは梗塞のせいである場合があり、これが発生したときは迅速に心臓の損傷を査定する必要がある。しかしながら、無症状梗塞の検出は厄介な場合がある。この検出は、24時間以上の継続的なECG監視によってECGの性能をモニターする実習によって引き出されうる。ECGのSTセグメントの低下(>1mm)は診断可能であるが、AMI患者の約3分の1は見掛け上ECGが正常であった。また、血管造影スクリーニングを実施することがある。小さな梗塞(通常は無症状梗塞の蓄積に寄与する)の検出は、一部の生化学的マーカーの感度が比較的弱いことにより制限される。小さな梗塞に関連する死亡率の発生率は増加している。クレアチンキナーゼのMBイソ型(CK-MB)の測定は、無症状梗塞の特に有用なマーカーであるが、一般的には他の様々なマーカーとの関連性がない。

【0008】

AMIの原因は複数あり得るが、はっきりとは分かっていない。最近、AMIが歯周感染など他の場所で明らかである(非特許文献1を参照)が心臓で現れ得る感染に対する心臓の炎症反応であるという考えに弾みがついた。

【0009】

アテローム性動脈硬化症及び血管内皮損傷は、微生物感染により生産されたタンパク質に対する、患者の免疫反応の結果である場合がある。大腸菌やクラミジアなどの微生物に由来する熱ショックタンパク質(HSP)は高度に保存され、内皮細胞などの心血管系の細胞により発現される関連性のあるヒトタンパク質との免疫的交差反応を生ずる(非特許文献2を参照)。

【0010】

10

20

30

40

50

上で述べたように、心血管状態は全身の脈管構造に関する状態及び事象の一例である。全身の脈管構造には、特に毛細血管、静脈、細動脈、細静脈 (venuoles)、心臓及びその他の器官が含まれる。腎不全、血栓症、器官移植拒絶、感染及び腫瘍や癌の増殖の血管新生などの様々な状態は、全身の脈管構造に関連する。

【非特許文献 1】

ハーツバーグとマイアー, M. W., Ann. Periodontol. 3: 151-160, 1998.

【非特許文献 2】

マイアー, Circulation 99: 1560-6, 1999.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

全身の脈管構造の状態若しくは事象を評価するために必要な複数のパラメータを同時に決定する検定法の開発が必要である。この文脈での用語「複数の」は、二つ以上を意味する。本発明者らは、ヒトを含む被験者で発生する状態若しくは事象の危険性、過去の事象若しくは状態の存在、並びに術後の予後診断、及び将来の事象を決定するのに有用な検定法を開発した。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の概要

本明細書を通じて、論旨が別意を要求しない限り、語「含む (comprise)」、又はその変化形である「含む (comprises)」、若しくは「含む (comprising)」などは、述べられた要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群の含有を意味するが他の如何なる要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群の排除を意味するものではないと解する。

【0013】

本発明は、部分的には、全身の脈管構造に関連する特定の状態若しくは事象の診断若しくは予後診断を支援する複数のマーカー若しくはパラメータの使用に基づいている。このような診断又は予後診断が有用である例は、ヒト被験者を含む健康な動物及び健康でない動物の検査する場合、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病又は腎不全若しくは心不全などの特定の状態若しくは事象を診断する場合、及び、例えば健康な被験者、又は特に外科手術、一連の治療若しくはワクチン接種などの特定の危険に曝される被験者におけるある状態若しくは事象が発症する危険性を判断する場合などにおける例である。

【0014】

従って本発明の一つの側面は、全身の脈管構造の状態若しくは事象に関連するパラメータの評価する方法、又は発生する状態若しくは事象の危険性の査定する方法あって、該方法がテスト対象の被検体から生体試料を得る工程、及び、該生体試料を第二の組の構成要素と接触させる工程を含み、該生体試料が該状態若しくは事象の前、間、若しくは後に、該被検体で存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化され、又は高レベル若しくは低レベルで調節される一つ以上の構成要素を含むものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が第一の組の構成要素の結合相手であり、相互作用の欠如を含む該第一の組と第二の組の間の相互作用パターンが、該状態若しくは事象又は該状態若しくは事象が発症する危険性を示すものである方法を意図する。

【0015】

本発明の別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を第二の組の構成要素と接触させる工程を含むものであり、該生体試料が該状態若しくは事象に続いて被検体で存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される要素の一つ以上を含むものであり、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (

10

20

30

40

50

A S T)、心臓トロポニン I と T (それぞれ、c T n - I と c T N - I) 並びに c T n - I と c T N - I · R N A、F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、細胞質 F A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P)、アドレノメデュリン (A D M)、低密度リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L)、C 反応性タンパク質 (C R P)、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (P A F)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (T N F)、可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロノリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (H b A 1 c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板のマーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ阻害物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、その組織の阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 及び F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択されるものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上の結合相手であり、相互作用がないことを含む該第一の組と第二の組の構成要素の間の相互作用パターンが該状態若しくは事象、若しくはある状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる一側面は治療法であって、該方法が全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する工程、又は状態若しくは事象が発生する危険性を評価する工程を含み、該方法がテスト対象の被検体に由来する生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素に結合できる抗体の免疫学的等価物と接触させる工程、次いで適切な治療計画を実行する工程を含み、該生体試料が該状態若しくは事象又は異常と別の仕方で関連する状態若しくは事象の後に、被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される一つ以上の構成要素を含むものであり、該構成要素がミオグロビン、ミオシン軽鎖 (M L C)、ミオシン重鎖 (M H C)、C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K)、乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、心臓トロポニン I と T (それぞれ、c T n - I と c T N - I) 並びに c T n - I と c T N - I R N A、F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、細胞質 F A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P)、アドレノメデュリン (A D M)、低密度リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L)、C 反応性タンパク質 (C R P)、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (P A F)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (T N F)、可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロノリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (H b A 1 c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板のマーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペ

チダーゼ阻害物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、その組織阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうち二つ以上から選択されるものであり、相互作用の欠如を含む該構成要素と抗体の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象を示すものである、治療法を意図する。

【0017】

本発明のまた別の側面は、被検体由来の生体試料中の構成要素に対する結合相手のアレイであって、該構成要素が全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の後に該被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化されるものであり、アレイが座標 (x, y) 、 (x_2, y_2) ... (x_n, y_n) に n 個の結合相手を含むように該結合相手が (x, y) 座標で定義されるものであり、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象を示すものである、アレイを含む。

【0018】

本発明のさらに別の側面は、被検体における梗塞若しくは関連状態の大きさを推定する方法であって、梗塞の大きさ (I_s) が次の式

【数1】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

上式において、

I_s は梗塞の大きさであり、

$F(t) dt$ は、梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の生体試料における遊離速度であり、 $[f(t)]$ は、構成要素出願関数としても知られる、

B_w は被検体の体重であり、

K_w は構成要素が遊離される先の体重の比率であり、

E_d は評価からの構成要素の除去速度であり、

K_r は遊離した構成要素の総量を梗塞に至った組織から遊離した構成要素の量で割ったものであり、

で決定され、該方法が該被験体由来の生体試料を該構成要素の一つ以上の結合相手と接触させる工程を含み、該試料が心血管状態若しくは事象、又他の方法で心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素を含むものであり、その結合相手が固体担体に固定されているものであり、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが梗塞の大きさを示すか又はそうでなければ梗塞の大きさを評価するためのデータ入力を提供するものである方法を提供する。

【0019】

本発明のまたさらに別の側面は、全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が生体試料中の二つ以上の mRNA 分子の存在をスクリーニングする工程を含み、該 mRNA 分子が、心血管状態若しくは事象、又は他の方法で心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素に翻訳可能なものであり、該スクリーニング工

10

20

30

40

50

程が該mRNA分子とハイブリッド形成できるか又そうでなければ該mRNA分子を捕捉できるオリゴヌクレオチドのアレイと生体試料を接触させる工程、及び該ハイブリッド形成若しくは該捕捉を検出する工程を含むものであり、該mRNA分子の存在若しくは非存在が該状態若しくは事象又はそれらの発生の危険性を示すものである方法を意図する。

【0020】

本発明のさらに別の側面は、被検体の全身の脈管構造の状態若しくは事象が発生する危険性を推定する方法であって、この危険性が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖(MLC)、ミオシン重鎖(MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ(CK)、乳酸脱水素酵素(LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、心臓トロポニンIとT(それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-T RNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、アドレノメデュリン(ADM)、低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)並びに中密度リポタンパク質(IDL)、C反応性タンパク質(CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子(PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子(TNF)、可溶性TNF受容体2(sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロノリティックペプチド、修飾ヘモグロビン(HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/Apo1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1(VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の一つ以上の存在若しくは不存在の関数である、方法を提供する。

【0021】

本発明の別の側面は、被検体におけるAMI若しくは関連状態を含むACSの発症の危険性を推定する方法であって、該方法が生体試料中にある二つ以上のmRNA分子の存在についてスクリーニングする工程を含むものであり、このmRNA分子が心血管状態若しくは事象の後に、又は心血管異常に他の方法で関連する状態若しくは事象の後に、存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素に翻訳可能であり、該スクリーニング工程が、該生体試料を、該mRNA分子とハイブリッド形成でき若しくは他の方法で捕捉できるオリゴヌクレオチドのアレイと接触させる工程、及び、該ハイブリッド形成若しくは該捕捉を検出する工程を含むものであり、該mRNA分子の存在若しくは不存在が心血管状態若しくは事象、又は別の方法で心血管異常に関連する状態若しくは事象、又はこれらが発症する危険性を示すものである方法を意図する。

【0022】

本発明の更なる側面は、全身の脈管構造の状態若しくは事象を評価するためのデータ処理法であって、

- (1) バイオチップアレイ上に固定された構成要素との相互作用又は相互作用の不存在の指標としてのレポーター分子を検出する工程、
- (2) (1)で得たデータを分析して生体試料中に存在する構成要素を同定する工程、
- (3) (2)から得た構成要素の量を任意選択的に定量する工程、
- (4) データを解析して状態若しくは事象の起こりやすさ若しくは危険性の原因を突き

止める工程、
 を実行するデータ処理法に向けられる。

【 0 0 2 3 】

本発明のまた別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の起こりやすさ若しくは危険性を評価するためのコンピュータプログラム製品を意図する。この製品には次のものが含まれる。即ち

- (1) 次のリストから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード、
- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
 - (b) ミオシン軽鎖 (M L C) の存在又は不存在
 - (c) ミオシン重鎖 (M H C) の存在又は不存在 10
 - (d) C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K) の存在又は不存在
 - (e) 乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4) の存在又は不存在
 - (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) の存在又は不存在
 - (g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、 c T n - I と c T N - I) 並びに c T n - I と c T N - I の R N A の存在又は不存在
 - (h) F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質) の存在又は不存在
 - (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイムの存在又は不存在
 - (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) の存在又は不存在
 - (k) 細胞質 F A B P 20
 - (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P) の存在又は不存在
 - (m) アドレノメデュリン (A D M) の存在又は不存在
 - (n) 低密度リポタンパク質 (L D L) 、超低密度リポタンパク質 (V L D L) 、高密度リポタンパク質 (H D L) 及び中密度リポタンパク質 (I D L) の存在又は不存在
 - (o) C 反応性タンパク質 (C R P) の存在又は不存在
 - (p) 血清アミロイド A の存在又は不存在
 - (q) P - セレクチンの存在又は不存在
 - (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
 - (s) 血小板活性化因子 (P A F) の存在又は不存在
 - (t) ヒスタミンの存在又は不存在 30
 - (u) 腫瘍壊死因子 (T N F) の存在又は不存在
 - (v) 可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2) の存在又は不存在
 - (w) フィブリンの存在又は不存在
 - (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
 - (y) フィブリンオリティックペプチドの存在又は不存在
 - (z) 修飾ヘモグロビン (H b A 1 c) の存在又は不存在
 - (aa) フェリチンの存在又は不存在
 - (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M) の存在又は不存在
 - (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在 40
 - (dd) アポ B 、アポ A 、アポ E の存在又は不存在
 - (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
 - (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ボルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
 - (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
 - (hh) レプチンの存在又は不存在
 - (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ阻害物質の存在又は不存在
 - (jj) ヘパリンの存在又は不存在
 - (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在 50

- (ll) 自身の組織阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
 (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
 (nn) CD95 / アポ1 / Fas の存在又は不存在
 (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
 (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1) の存在又は不存在
 (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
 (rr) アンジオテンシンII型受容体の存在又は不存在
 (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
 (tt) 糖タンパク質IIIa 遺伝子多型の存在又は不存在
 (uu) 因子VIIa の存在又は不存在
 (vv) トロンビンの存在又は不存在
 (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
 (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
 (yy) Fas 及び Fas リガンドの存在又は不存在
 (zz) そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、及び、
 (2) 該コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体。

10

【0024】

本発明のさらに別の一側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を有する被検体の発症の可能性を評価するための、以下のものを含むコンピュータシステムに及ぶ。

20

(1) 機械で読取可能なデータを書き込まれたデータ記憶材料を含む機械で読取可能なデータ記憶媒体であって、該機械で読み取り可能なデータが次のリストから選択される特性の一つ以上に対する値を含むものである機械で読取可能なデータ記憶媒体：

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
 (b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在
 (c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在
 (d) CK-MB を含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在
 (e) 乳酸脱水素酵素 (LDH-H4) の存在又は不存在
 (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在
 (g) 心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T) 並びにcTn-IとcTn-T RNA の存在又は不存在
 (h) FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質) の存在又は不存在
 (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - BBアイソザイムの存在又は不存在
 (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の存在又は不存在
 (k) 細胞質 FABP
 (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の存在又は不存在
 (m) アドレノメデュリン (ADM) の存在又は不存在
 (n) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL) の存在又は不存在
 (o) C反応性タンパク質 (CRP) の存在又は不存在
 (p) 血清アミロイドAの存在又は不存在
 (q) P-セレクチンの存在又は不存在
 (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
 (s) 血小板活性化因子 (PAF) の存在又は不存在
 (t) ヒスタミンの存在又は不存在
 (u) 腫瘍壊死因子 (TNF) の存在又は不存在
 (v) 可溶性TNF受容体2 (sTNFR2) の存在又は不存在
 (w) フィブリンの存在又は不存在
 (x) フィブリノゲンの存在又は不存在

30

40

50

- (y) フィブリンリティックペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (HbA1c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在 10
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) CD95 / アポ 1 / Fas の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在 20
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシン II 型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質 III a 遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) Fas 並びに Fas リガンドの存在又は不存在 30
- (zz) そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、
- (2) 該機械で読取可能なデータを処理するための命令を記憶するための作業メモリ、
- (3) 該機械で読取可能なデータを処理して該候補の配列の予測値に対応する数値を集計するための、該作業メモリ及び該機械で読取り可能なデータ記憶媒体と連動する中央演算処理装置、及び、
- (4) 該予測値を受け取るための、該中央演算処理装置と連動する出力装置。
- 【発明を実施するための最良の形態】
- 【0025】
- 本発明は、部分的には、全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連する二つ以上のパラメータを評価できる検定装置の開発に基づく。パラメータが検出できると、予測的及び診断的な分析が実行できるようになる。この文意での用語「予測的」には、状態の発症したヒト若しくは事象に曝されているヒトを含む健康な若しくは健康でない被検体に対する危険因子の決定が含まれる。
- 【0026】
- 従って、本発明の一つの側面は、全身の脈管構造の状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法、又は状態若しくは事象が発症する危険性を評価する方法であって、テスト対象の被検体から、該状態若しくは事象の前、間、若しくは後に被検体に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化され、又は高レベル調節若しくは低レベル調節される構成要素を一つ以上含む生体試料を取得する工程、及び、該生体試料を第二の組の 50

構成要素と接触させる工程を含む方法であり、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上に対する結合相手であり、相互作用をしないことを含む該第一の組と第二の組の構成要素の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象、又は該状態若しくは事象の発症の危険性を示すものである方法を意図する。

【0027】

全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象には、心血管、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の、動脈若しくは静脈の状態若しくは事象を含む血管病、肝不全、腎不全、若しくは心不全を含む器官不全、器官移植拒絶反応などの組織拒絶反応、深部静脈血栓を含む血栓性事象、感染症、循環系の血管に対する損傷、ステント、ペースメーカー若しくはその他の人工装置によって生じるステント不全若しくは外傷、腫瘍の血管新生、人工股関節置換や膝の再建などの外科手術の後の事象若しくは症状、損傷若しくは加齢関連疾患及び内皮損傷が含まれる。

10

【0028】

本明細書で言う「心血管状態若しくは事象」には、心臓病、心臓発作、心臓障害、及び心臓内感染症、並びに心不全が含まれる。特に好ましい実施態様では、心血管状態若しくは事象は急性冠症候群（ACS）、又はバルーン血管形性若しくは血栓溶解療法などの治療上の処置の後の冠動脈疾患や再灌流など（これらに限定されない）の関連する障害である。用語「ACS」には、急性心筋梗塞（AMI）が含まれる。心血管状態若しくは事象には、心臓が身体の代謝の要求に見合うだけの十分な拍出量を出せないときに起こる鬱血性心不全が含まれる。このような不全には、次の四つの範疇がある。

20

クラスI： 普通の身体活動で疲労、動悸、息切れ、又は狭心痛（心痛）が起きない冠動脈疾患（CAD）及び他の障害を持つ患者

クラスII： クラスIと同様であるが、安静時には落ち着いているものの、運動には僅かな限界がある。

クラスIII： クラスIIと同様であるが、今度は身体活動に著しい限界がある。

クラスIV： クラスIIIと同様であるが、いかなる身体活動も狭心症及び不快感を惹き起こす。

【0029】

このような症状及び事象は全て、用語「心血管状態若しくは事象」に包含され、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象にも包含される。心血管状態若しくは事象には、微生物やウイルスによる感染で惹起されるものなどの心血管異常が含まれる。微生物感染の例には、クラミジア・ニューモニエ（肺）、ポルフィロモナス・ジンジバリス（口腔）、ストレプトコッカス・サンギス又はヘリコバクター・ピロリ（腸）による感染で惹起されるもの又はこれらによる感染と関連するものが含まれる。ウイルス感染症の例には、サイトメガロウイルス若しくはコクサッキーウイルスによって惹起されるか又はこれらと関連するものが含まれる。

30

【0030】

用語「生体試料」は、その最も広い意味で用いられ、血液、血清、唾液、組織液、関節液、リンパ液、組織若しくは組織抽出物、心臓組織、粘液、脳脊髄液、尿、精液、糞便試料又は被検体から誘導される他の任意の試料であって、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の一つ以上含むかも知れない試料が含まれる。生体試料は、感染性因子若しくはそれに由来する生産物を含んでも良い。生体試料は、例えば被検体若しくは患者が医学的保護を受けられる地点から離れている場合、救命士の手当てを受ける場合、治療の優先順位を決める間、及び外科手術若しくはその他の干渉処置の間を含む如何なる時にも得られうる。「生体試料」は、血液バンクや器官バンクなどでの血液、血液産物又は組織の供給を含んでもよい。

40

【0031】

「被検体」又は「患者」への言及には、ヒト、霊長類、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、ロバ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）及び

50

愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ）が含まれる。従って本発明は、ヒト、医療産業、獣医産業、及び家畜産業での適用がある。

【0032】

生体試料中の「構成要素」には、酵素（アイソザイムなど）、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、脂質、及びリポタンパク質及び／又は炭水化物を含む脂質を含む複合体、並びに、炭水化物だけでなくRNA又はDNA又はその断片を含む核酸分子を含む複合体、及び、核酸分子を含む複合体が含まれる。「構成要素」は、本明細書では「マーカー」とも呼ばれる。この構成要素は、微生物若しくはウイルス、又はそれらの部分若しくはそれらに由来する産物であっても良い。微生物若しくはウイルスの「部分」には、細胞壁、細胞壁断片若しくは成分、細胞膜、鞭毛、炭水化物複合体、及び抗原が含まれる。「産物」には、代謝副産物、及び、細胞質や膜に関連する成分が含まれる。RNA又はDNAは細胞の壊死から生じる事があり、またmRNAのレベルの変化はDNA発現が増加若しくは減少したときに検出されることがある。

10

【0033】

生体試料中の構成要素は、心臓組織若しくは他の器官の組織で有意に若しくは実質的に存在するか若しくは存在せず、又は他の組織で有意に分布し、心筋損傷の最も早い可能な指標となるのが好ましく、心血管状態若しくは事象など（例えば、心筋損傷）のような全身の脈管構造に関連する事象若しくは状態の中期的な指標となるのが好ましい。

【0034】

従って、構成要素の検定は状態若しくは事象の存在及び／又は重大性の指標を与え、又は無症状の状態若しくは事象の指標を与えるべきである。例えば本発明の検定法は、梗塞又は無症状の虚血若しくは不安定狭心症の、存在並びに大きさを測定することが可能になる。

20

【0035】

上で述べたように、多くの異なる場所でこの検定が実施され、試料が採取されることがあるが、介護の場所で実施できることが好ましい。

【0036】

生体試料中の特に好ましい構成要素には、ミオグロビン、ミオシン軽鎖（MLC）、ミオシン重鎖（MHC）、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）、乳酸脱水素酵素（LDH-H4）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、心臓トロポニンIとT（それぞれ、cTn-IとcTn-T）並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質（FABタンパク質）、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、-心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アドレノメデュリン（ADM）、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）並びに中密度リポタンパク質（IDL）、C反応性タンパク質（CRP）、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子（PAF）、ヒスタミン、腫瘍壊死因子（TNF）、可溶性TNF受容体2（sTNFR2）、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロリティックペプチド、修飾ヘモグロビン（HbA1c）、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1（ICAM1）を含む可溶性細胞接着分子（ICAM）、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1（VCAM1）、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはそ

30

40

50

の断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子が含まれる。

【0037】

ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエの検出についての言及は、好ましい実施態様では、これらの微生物由来の抗原若しくは細胞特異的分子を検出する工程が含まれる。

【0038】

上記の構成要素は生体試料中にあるが、これらはまた、第二の組の構成要素の部分としても含まれることがある。このような場合、これらの構成要素の結合相手は、生体試料中に求められる。本質的には、一つの組の一つ以上の構成要素は他の組の構成要素中に結合相手を有することになる。

10

【0039】

上で述べた構成要素は、第一の組又は第二の組のいずれに属していても良い。第二の組の構成要素は、一般的には固体支持体など（これに限定されないが）の支持体に固定されている。

【0040】

この固体支持体は、一般的にはガラス、又はセルロース、セラミック素材、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン及びその誘導体、ニフッ化ポリビニリデン（PVDf）、メタクリル酸並びにその誘導体、塩化ポリビニル、又はポリプロピレンなど（これらに限定されないが）の重合体である。ニトロセルロースは、本発明によれば特に有用であり好ましい。固体支持体は、ガラス又は重合体の媒体に支えられたニトロセルロース薄膜などの混成物であっても良い。「混成物」と言う場合、上に列挙したガラス又は重合体面の二つ以上を層状に配置したものへの言及が含まれる。固体支持体は、膜又は管、ビーズ、円盤若しくはマイクロプレート、又は検定の実施に適した他の任意の表面の形状であっても良い。分子を固定化するための結合方法は当分野では良く知られており、一般的には共有結合（例えば、架橋結合）や分子を固体基体に物理的に吸着させる方法から成る。一般的に、固体支持体は、脱脂乳、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、トチャカ（Irish moss）抽出物、又はカラゲナン若しくはゼラチンの他の供与源などのような遮断物質と接触させる。

20

【0041】

語句「相互作用のパターン」はその最も広い意味で用いられ、次のようなものを含む。即ち、バックグラウンド相互作用と比べて相互作用の存在若しくは不存在、固体支持体上の結合相手に結合する構成要素のバックグラウンドと比べた相対密度などの相互作用の相対密度、支持体上の分散したスポット上で溶解した細胞内の内部分子の存在若しくは不存在、生体試料中の構成要素の相対数、及び/又は、特定の構成要素の差異のある発現が含まれる。上記の基準のいずれか又は全てを用いて固定された分子とその結合相手の間の相互作用を評価しうる。発現若しくは相互作用のパターンは、定量化されることもある。「存在」及び「不存在」への言及は、実質的な「存在」又は「不存在」だけでなく、相互に比較され若しくは他の何らかのマーカーと比較された場合の、相対的な「存在」又は「不存在」をも含む。

30

【0042】

「パラメータの評価」と言うときは、生体試料内の構成要素の測定が含まれ、この測定は今度は全身の脈管構造に関連する心血管状態若しくは事象の存在を示す。この評価はこれらの状態若しくは事象の危険性分析の一部となる。

40

【0043】

従って、本発明の別の側面は、全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が、該状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素を一つ以上含む、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を二組目の構成要素と接触させる工程を含み、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖（MLC）、ミオシン重鎖（MHC）、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）、乳酸脱水素酵素

50

(LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、心臓トロポニンIとT(それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、アドレノメデュリン(ADM)、低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)並びに中密度リポタンパク質(IDL)、C反応性タンパク質(CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子(PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子(TNF)、可溶性TNF受容体2(sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロリティックペプチド、修飾ヘモグロビン(HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1(VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子、のうち二つ以上から選択されるものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上に対する結合相手であり、相互作用がないことを含む該第一の組と第二の組の構成要素との間の相互作用パターンが該状態若しくは事象、又はある状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

10

20

【0044】

特に好ましい実施態様では、固定支持体に固定された第二の組の構成要素は生体試料内のそれぞれの結合構成要素に潜在的に特異的であるか一般的である抗体を含む。後者には、その類似体若しくは抗原性断片又はその断片を含むエピトープなどの免疫相互作用分子が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0045】

本発明に基づき、発明者らは、全身の脈管構造と関連する心血管状態若しくは事象に関連する多数のマーカーの同時同定が、該状態若しくは事象を検出し、そのような事象が例えば梗塞の場合には、該事象の時間及び大きさを推定し、再灌流とその後のバルーン血管形成性又は血栓溶解療法などの介入治療を検出し、並びに該状態若しくは事象に関連する危険因子を決定する場合に、より効果的な提供することを確定した。一つ以上のパラメータを同時に測定すると、一つずつ測定する場合とは対照的に、診断及び/又は誤診の危険性の回数が減り(例えば、ある特定の診断の確実性が向上する)、心臓抗凝固薬(例えば、組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)やストレプトキナーゼ)などの薬物の投与、並びに外科的介入、又は優先順位付けを含む救急緊急病棟、救急緊急センター又は救急緊急現場からの退院を含む、治療計画のより迅速な実行が可能になる

40

【0046】

従って、本発明のまた別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する、又は発生する状態若しくは事象の危険性を評価する工程を含む治療法であって、該方法が、該状態若しくは事象、又は異常に関連するその他の状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素の一つ以上を含む、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程であって、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖(MLC)、ミオシン重鎖(MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ(CK)、乳酸脱水素酵素(LDH-H4)、

50

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、-心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロノリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択される工程、及び該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素と結合できるその免疫学的等価物と接触させる工程、及び、次いで適切な治療計画を実施する工程を含むのであり、相互作用がないことを含む該構成要素と抗体の間の相互作用パターンが該状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

【0047】

本発明は、tPA (即ち、血栓溶解療法)の注入、バルーン血管形成、ステント挿入及び/又は冠動脈移植外科手術 (CAGS)などの処置を補完するものとして、特に有用である。従って本発明は、臨床業務の重要な補助となる。

【0048】

全身の脈管構造に関連する事象及び症状には、とりわけ心血管状態若しくは事象、外科手術後を含む外傷、心不全、肝不全若しくは腎不全を含む器官不全、心拍、深部静脈血栓を含む血栓事象、肺の状態、腫瘍もしくは癌組織の血栓事象及び血管形成が含まれる。この検定法は、状態若しくは事象を発症しているそれ以外は健康な被検者、又は外科手術や薬物投与などの危険性に直面している健康でない被験者の危険性を測定するために実施しても良い。本発明が意図する特に重要な状態若しくは事象は、心血管状態、肺の状態及び血栓事象であり、これらの状態の発症の危険性の評価である。

【0049】

特定のマーカーはある特定の状態にも用いられる。例えば、心拍又は脳損傷又は外傷のマーカーには、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17)及びTGF- β 、アミロイド-1-42、アミロイド-1-40、タウ、アポE、アポE4、S-100B、ニューロン特異性エノラーゼ及びユビキチンを含む神経性マーカーだけでなく、又は、上に列挙したその他のマーカーの代替物が含まれる。腎臓損傷若しくは腎臓病は、尿グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、-GST、クレアチン、メラニンA、前立腺特異性抗原、クエン酸、酢酸塩、及びエリスロポエチンなどのマーカーにより同定できる。例えば、肺や他の肺性症状などには、他に特異的なマーカーを採用しても良い。

【0050】

本発明の方法は、便宜的に生体試料内の構成要素に対する結合相手を固定化したアレイを

用いて実施する。用語「アレイ」は、アレイの結合相手の形状や順序やパターンに関するいかなる制限を意味するものではなく、この結合相手は決められたパターンで並べても良く、または無作為に若しくは半無作為に並べても良い。一般的にアレイには二つ以上の結合相手が含まれるが、好ましくは約2から約10,000まで、より好ましくは約10から約5000まで、さらに好ましくは約20から約1000までの結合相手が含まれる。アレイのスポットは、長方形、三角形、又は球形のマトリックスなどの並びで配置され、免疫グロブリン領域の位置は、例えば行と列による座標で定義する。免疫グロブリンのアレイは、約0.1mm²から約100mm²まで、好ましくは約0.5mm²から約15mm²までなどの任意の便宜的な領域をカバーしてよい。一般的に、各領域若しくはスポットは、一つの明確な特異性を有する免疫グロブリン（単数又は複数）で構成される。この文意での特異性は、異なる抗原、又は一つの抗原の異なる領域に関するものである。免疫グロブリンスポットの好ましい数は、約7から約1000までであり、約10から約1000までであるのがもっと好ましい。最も好ましいのは、免疫グロブリンが二重、三重以上など、多重で配置されることである。このアレイは、nが生体試料中の構成要素に対する結合相手の数で、各結合相手が座標(x₁, y₁)、(x₂, y₂)、(x_n, y_n)で定義されるよう、相手(x, y)座標で定義される結合相手を含むのが好ましい。相互作用のパターンは二つ以上の相互作用を用いて得られる。

10

【0051】

従って、本発明の別の側面は、被検体由来の生体試料中に存在する構成要素の結合相手のアレイであって、該構成要素が全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の後に被検体で存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化されるものであり、その結合相手が、該アレイが座標(x₁, y₁)、(x₂, y₂)、(x_n, y_n)座標でn個の結合相手を含むよう(x, y)座標で定義されるものであり、構成要素と結合相手の間の相互作用パターンが該状態若しくは事象を示すものであるアレイを含む。上の座標の下付き文字「1」、「2」並びに「n」は、座標xとyの値が同じでないことを意味する。

20

【0052】

一つの有用な実施態様では、本発明は、AMIを含むACSで発生するような心筋組織損傷を検出する。本発明はまた、梗塞の大きさを判定するのにも役立つ。実際の心臓損傷の存在が分かれば、早期且つ迅速な治療介入が可能になる。

【0053】

従って本発明の別の側面は、被検体の梗塞若しくは関連状態の大きさを推定する方法であって、梗塞(I_s)の大きさが次の式

30

【数2】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

40

上式において、

I_sは梗塞の大きさであり、

F(t)dtは生体試料中への、梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の放出速度であり[f(t)は、構成要素出現関数としても知られる]、

B_wは被検体の体重であり、

K_wは構成要素が遊離される先の体重の比率であり、

E_dは評価からの構成要素の除去速度であり、

K_rは放出された構成要素の総量を梗塞に至った組織から放出された構成要素の数で割ったものである。

50

で決定されるものであり、

該方法が、心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常と関連する状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素を含む該被検体由来の生体試料を、該構成要素の結合相手の一つ以上と接触させる工程を含む方法であり、その結合相手が固体支持体に固定されており、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが梗塞の大きさを示すか、又はそうでなければ梗塞の大きさを評価するためのデータ入力を提供するものである方法を提供する。

【0054】

上の方程式は、 K_d を形成する定数と組合わせ、 $f(t)$ を

【数3】

$$\frac{dE}{dt} + K_d E$$

と定義することにより単純化しても良い。従ってこの式は、

【数4】

$$K_d \int_0^t E(t) dt + E(T)$$

となり、この式において、パラメータの結果をベースライン条件と比較した場合には、 $E(T)$ は構成要素の活性若しくはレベルを表す。

【0055】

この生体試料中の構成要素は、ミオグロビン、ミオシン軽鎖(MLC)、ミオシン重鎖(MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ(CK)、乳酸脱水素酵素(LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、心臓トロポニンIとT(それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP 1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、アドレノメデュリン(ADM)、低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)並びに中密度リポタンパク質(IDL)、C反応性タンパク質(CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子(PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子(TNF)、可溶性TNF受容体2(sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロリティックペプチド、修飾ヘモグロビン(HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1(VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又はこれら若しくはその断片若しくはそのリガンド若しくはその結合相手をコードする核酸分子、又はこれら若しくはその断

10

20

30

40

50

片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子を一つ以上を含むのが好ましい。

【0056】

複数の心筋マーカーが定量化され、その血漿レベルの比率が計算される場合は、時点が一つであっても心筋損傷の存在を検出するのに有用である。しかしながら、時点は複数（例えば二つ以上）であるのが好ましい。数秒、数分、数時間、数日、数週、及び数カ月にわたって採られる複数の時点は、例えば開始時期、損傷の程度、及び/又は治療方法の有効性などの更なる情報をもたらすかも知れない。約2から約10時点までを選択することが好ましい。この検定法は、好ましくは二つ以上の構成要素の相対的量、又は定量的量、又は定性的量を経時的に測定するのに有用である。一連の曲線ができ、曲線の下面積は、実質的に塞栓の大きさに比例する。0時間に戻る外挿法では、該梗塞のおよその時期が判定できる。

10

【0057】

深部静脈血栓を含む血栓症、内皮損傷、新規の腫瘍若しくは癌組織の血管新生、肺性症状、並びに動脈若しくは静脈の状態を含む全身の脈管構造に関連する他の状態若しくは事象の検出で、同様の結果が生じる。

【0058】

上で記したように、本発明の検定法は、生体試料中の核酸分子を分析することによって行うことができる。一つの側面では、血清又は細胞壊死の結果生ずるその他の組織液で総核酸（例えば、mRNA、RNA、及びDNAを含む）が検出される。別の側面では、遺伝子配列の発現レベルの上昇又は減少の後にmRNAレベルを検出する。この状況においての「発現」は、それぞれmRNA配列及びアミノ酸配列を生産する、ヌクレオチド配列の転写及び/又は翻訳を含む。如何なる事象においても、核酸分子のレベルは心血管状態若しくは事象の後で変化しうる。

20

【0059】

従って本発明の別の側面は、全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が該心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素に翻訳可能な生体試料中の二つ以上のmRNA分子の存在をスクリーニングする工程を含み、該スクリーニング工程が生体試料を、該mRNA若しくはmRNA分子に対応するcDNAとハイブリッド形成できるか又は他の方法でこれを捕捉できるオリゴヌクレオチドのアレイと接触させる工程、及び該ハイブリッド形成若しくは捕捉を検出する工程を含む工程であり、該mRNA分子若しくはcDNA分子の存在若しくは不存在が該状態若しくは事象又はそれらの発生の危険性を示すものである方法を意図する。

30

【0060】

mRNA分子は、最初に逆転写酵素にかけて相補的（又はコピー）DNA（cDNA）を形成するのが好ましい。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）は特に有用であり、本発明で意図するものである。

【0061】

実時間PCRは、遺伝子配列の発現レベルの変化を経時的に研究するのに有用である。PEバイオシステムズ（フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）が開発したTaqMan（登録商標）システムを用いた実時間PCRでは、ゲル電気泳動法や放射性ハイブリッド形成などの労力を要するPCR後の処理の必要がなくDNAの検出と定量化が迅速に行える（ハイドラ、1996）。加えて、一体型96穴構成で同時に分析できる試料の数が大幅に増大する。この方法は、Taqポリメラーゼ（アンプリタック ゴールド、PEバイオシステムズ、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）の5'エキソヌクレアーゼ活性を用いて、プライマー伸長の際に、PCRプライマー間の標的DNAとハイブリッド形成した二重標識の蛍光発生プローブを切断する。切断前に、プローブの5'末端にある6-カルボキシフルオレセイン（6-FAM）などのレポーター色素を、6-カル

40

50

ボキシ - テトラメチルローダミン (T A M R A) により、蛍光共鳴エネルギー移動を介して消光させる。消化後に F A M が遊離される。この結果得られる蛍光を、生産物蓄積の対数期の間、518 nm で実時間で連続的に測定する。それは標的配列のコピー数に比例する。

【0062】

構成要素と結合相手の間の相互作用の検出は、レポーター分子を用いて行うのが便利である。例えば、検定装置は免疫グロブリンのアレイを含んでも良い。免疫グロブリンを固定化したアレイを次いで生体試料に接触させる。この接触は、抗原が固定された免疫グロブリンに捕捉されるのに十分な時間及び条件の下で行う。捕捉された抗原は、次いで生化学的、組織化学的、免疫学的、若しくは顕微鏡的などの任意の便利な手段で検出して良い。免疫学的な検出がとりわけ便利である。例えば、捕捉抗原に特異的な、レポーター分子で標識した第二の免疫グロブリンを添加しても良い。このレポーター分子を同定すれば、抗原が捕捉されたことが示される。または、第二の免疫グロブリンを添加し、それが捕捉された抗原と複合体を形成した後、レポーター分子で標識した抗免疫グロブリンを添加し、そのレポーター分子からのシグナルの存在を測定する。一般的な方法を図1aに示す。より特異的で好ましい方法を図1b~1eに示す。

10

【0063】

本明細書で用いる「レポーター分子」とは、その化学的特性により免疫グロブリン結合抗原を検出可能とする、分析的に同定可能なシグナルを提供する分子を意味する。検出は定性的又は定量的のいずれであっても良い。この種の検定法で最も一般的に用いられるレポーター分子には、発光性分子と結合した酵素などの酵素、発蛍光団、又は放射性核種を含む分子（即ち、放射性同位元素）が含まれる。酵素免疫学的検定法の場合、酵素は一般的には、例えばグルタルアルデヒド、コハク酸イミド誘導体などの物質を用いた二官能性架橋結合により、第二若しくは第三の免疫グロブリンに結合させる。しかしながら、容易に分かるように、当業者らが容易に使用可能な様々な異なる結合技術が存在する。普通に用いられる酵素には、数ある中でも西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、及びアルカリホスファターゼが含まれる。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的には、対応する酵素による加水分解の際、検出可能な色変化の発生で選択される。発光性産物又は閃光などの他の光シグナルを発する発蛍光性基質を採用することもできる。

20

30

【0064】

または、フルオレセインやローダミンなどの発光性化合物を、その結合能力を変えることなく、免疫グロブリンに化学的に結合させても良い。ある特定の波長の光を照射して活性化すると、発蛍光団で標識した免疫グロブリンは光エネルギーを吸収し、分子内で励起状態を誘発し、次いで顕微鏡で又は共焦点顕微鏡若しくは2次元レーザーキャナ（例えば、フルオリメジャー若しくはタイプーン、モレキュラーダイナミクス社、サニーベール、米国）などの他の画像化装置を用いて可視的に検出できる特徴的な色の光を発する。

【0065】

一つの特に有用な方法では、固定化した免疫グロブリンが一つの構成要素を捕捉する。次いで、異なる若しくは重複するエピトープに対する第二抗体を免疫相互作用させて、抗体-構成要素-抗体の複合体を形成させる。第二抗体は、同定可能なシグナルの生産が可能な、例えばストレプトアビジンやアルカリホスファターゼと連結する。

40

【0066】

検定装置及び本発明の検定を実行するための方法は、自動化に容易に適應される。例えば、ロボットシステムを用いて、ナノリットルやピコリットルの容量を含む適切な量の免疫グロブリンを、ニトロセルロース薄膜又はマイクロタイタープレートなどの固体支持体に送達しても良い。適切な処置の後、この固定化した免疫グロブリンを次いで任意の検定で用いて良い。ここでも、この工程は自動化又はロボット工学を用いても良い。

【0067】

本発明はさらに、心血管状態又は全身の脈管構造に関連する事象若しくは状態を検出する

50

ための検定装置の製造における、本明細書で記述した結合相手のアレイの使用を意図する。

【0068】

本発明のアレイはまた、マイクロチップ上での使用にも適応する。マイクロチップ技術は、様々な状態に対する何千もの結合相手の形成を可能にし、さらに自動化及び/又はコンピュータ解析をも可能にする。「マイクロチップ」には、アダプター分子、リガンド、若しくは結合相手と思われるもののアレイを含むマトリックス支持体が含まれる。

【0069】

マトリックス支持体は、バイオチップとも呼ばれる。「バイオチップ」と言う場合、「遺伝子チップ」も含まれる。遺伝子チップには、固体支持体に固定された二つ以上のオリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチドの任意のアレイが含まれる。このオリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチドは、特定の心臓マーカーをコードする遺伝子若しくはmRNAの配列に対応する。実時間PCRは、マーカーの上昇及び/又は下降をスクリーニングするための一つのメカニズムである。RT-PCRも、mRNA配列を読み、対応するcDNA配列に戻るにより、標的ヌクレオチド配列の存在又は不存在を検出するのに用いられる。実時間PCR、とりわけ実時間-RT-PCRは、該マーカーの発現のパターンの変化を測定するのに特に有用である。

【0070】

本発明は、構成要素とその結合相手の間の相互作用を分析し及び/又はスクリーニングするためのデータ処理手段をさらに意図する。このデータ処理手段は、適切にプログラムされたコンピュータを含むのが好ましく、この方法の工程はこの適切にプログラムされたコンピュータを用いて行われるのが好ましい。本発明の様々な形態において、入力情報は、相互作用の相手の同定又は相互作用の不存在に関する数値、識別子、又はその他のデータの形態であって良い。この入力データはデジタル化しても良い。または、本発明の実行のため、処理手段の少なくとも一部として、専用の高速フーリエ変換チップを採用することも可能である。

【0071】

本発明の好ましい形態では、表示的測定 (representational measurements) を行って、構成要素と結合相手の間の相互作用の存在を同定又は評価する。

【0072】

従って本発明の別の側面は、全身の脈管構造の状態若しくは事象を評価するためのデータ処理手段であって、

(1) バイオチップアレイ上に固定化した構成要素との相互作用の指標として、又は相互作用の不存在の指標として、レポーター分子を検出する工程、

(2) (1) で得られたデータを解析して生体試料に存在する構成要素を同定する工程、

(3) (2) から得られた構成要素の量を任意選択的に定量化する工程、及び

(4) データを分析してある状態若しくは事象の起こりやすさ又は危険性を解明する工程、

上記の工程を実行するデータ処理手段に向けられる。

【0073】

特に有用な実施態様では、本発明はAMIなどのACSの発症の可能性の指標を提供する。

【0074】

従って、本発明の別の有用な側面は、被検体における全身の脈管構造の状態若しくは事象を発症する危険性であって、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T) 並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲン

ホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質 F A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C 反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性 TNF 受容体 2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、フィブロリティックペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ 1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン II 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 III a 遺伝子多型、因子 V III a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas 並びに Fas リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の一つ以上の存在若しくは不存在の関数である危険性を推定する方法を供する。

10

20

【0075】

特に有益な実施態様では、本発明は、被検体における AMI 若しくは関連状態を含む ACS が発生する危険性を推定する方法であって、該方法が心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素に翻訳可能な生体試料中の二つ以上の mRNA 分子の存在をスクリーニングする工程を含むものであり、該スクリーニング工程が、生体試料を、該 mRNA 分子若しくはその対応する cDNA 分子とハイブリッド形成できるか若しくはそうでなければこれらを検出できるオリゴヌクレオチドのアレイと接触させる工程、及び該ハイブリッド形成又は検出を検出する工程を含むものであり、該 mRNA 分子若しくは cDNA 分子の存在若しくは不存在がある心血管状態若しくは事象又は心血管異常と他の方法で関連する状態若しくは事象又はこれらの状態若しくは事象の発症の危険性を示すものである方法を意図する。

30

【0076】

心臓異常又は全身の脈管構造に関連する他の状態若しくは事象の危険性の判定は、危険性の不存在が確認される場合には商業的な利益である。例えば、病院のベッド又は救急用ベッド又は救急車両を用いる必要がなくなることがある。これは、被検体の一般的な健康状態、若しくは他の状態を検査するために有用である。コンピュータスクリーニングは、危険分析に特に有用である。

【0077】

従って、別の側面では、本発明は全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の起こりやすさ又はかかる状態の発症の危険性を評価するためのコンピュータプログラム産物であって、

40

(3) 次のものから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード、

(a) ミオグロビンの存在又は不存在

(b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在

(c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在

(d) CK - MB を含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在

(e) 乳酸脱水素酵素 (LDH - H4) の存在又は不存在

(f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在

(g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、cTn - I と cTn - T) 並びに cTn - I と

50

c T N - I の R N A の存在又は不存在

(h) F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質) の存在又は不存在

(i) グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイムの存在又は不存在

(j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) の存在又は不存在

(k) 細胞質 F A B P

(l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P) の存在又は不存在

(m) アドレノメデュリン (A D M) の存在又は不存在

(n) 低密度リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L) の存在又は不存在

10

(o) C 反応性タンパク質 (C R P) の存在又は不存在

(p) 血清アミロイド A の存在又は不存在

(q) P - セレクチンの存在又は不存在

(r) プロスタグランジンの存在又は不存在

(s) 血小板活性化因子 (P A F) の存在又は不存在

(t) ヒスタミンの存在又は不存在

(u) 腫瘍壊死因子 (T N F) の存在又は不存在

(v) 可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2) の存在又は不存在

(w) フィブリンの存在又は不存在

(x) フィブリノゲンの存在又は不存在

20

(y) フィブリンノリティックペプチドの存在又は不存在

(z) 修飾ヘモグロビン (H b A 1 c) の存在又は不存在

(aa) フェリチンの存在又は不存在

(bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M) の存在又は不存在

(cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在

(dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在

(ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在

(ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在

30

(gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在

(hh) レプチンの存在又は不存在

(ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在

(jj) ヘパリンの存在又は不存在

(kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在

(ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在

(mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在

(nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在

(oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在

40

(pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在

(qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在

(rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在

(ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在

(tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在

(uu) 因子 V I I a の存在又は不存在

(vv) トロンビンの存在又は不存在

(ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在

(xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在

(yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在

50

(zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、及び

(4) コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体。

を含むコンピュータプログラム産物を意図する。

【0078】

本発明のまた別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を保有する被検体の起こりやすさを評価するためのコンピュータシステムであって、

(1) 機械で読取可能なデータを書き込んだデータ記憶材料を含む機械で読取可能なデータ記憶媒体であって、下記のリストから選択される特性の一つ以上に対する数値を含むものである機械で読取可能なデータ記憶媒体、

(a) ミオグロビンの存在又は不存在

(b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在

(c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在

(d) CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在

(e) 乳酸脱水素酵素 (LDH-H4) の存在又は不存在

(f) アスパラギアポミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在

(g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、cTn-I と cTn-T) 並びに cTn-I と cTn-T の RNA の存在又は不存在

(h) FABP1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質) の存在又は不存在

(i) グリコーゲンホスホリラーゼ - BB アイソザイムの存在又は不存在

(j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の存在又は不存在

(k) 細胞質 FABP

(l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の存在又は不存在

(m) アドレノメデュリン (ADM) の存在又は不存在

(n) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL) の存在又は不存在

(o) C 反応性タンパク質 (CRP) の存在又は不存在

(p) 血清アミロイド A の存在又は不存在

(q) P - セレクチンの存在又は不存在

(r) プロスタグランジンの存在又は不存在

(s) 血小板活性化因子 (PAF) の存在又は不存在

(t) ヒスタミンの存在又は不存在

(u) 腫瘍壊死因子 (TNF) の存在又は不存在

(v) 可溶性 TNF 受容体 2 (sTNFR2) の存在又は不存在

(w) フィブリンの存在又は不存在

(x) フィブリノゲンの存在又は不存在

(y) フィブリンオリグオマーの存在又は不存在

(z) 修飾ヘモグロビン (HbA1c) の存在又は不存在

(aa) フェリチンの存在又は不存在

(bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM) の存在又は不存在

(cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在

(dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在

(ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在

(ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在

(gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在

(hh) レプチンの存在又は不存在

10

20

30

40

50

- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在 10
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在
- (zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、
- (2) 該機械で読取可能なデータを処理するための命令を記憶するための作業メモリ、 20
- (3) 該機械で読取可能なデータを処理して該候補配列の予測値に対応する該数値を集計するための、該作業メモリ及び該機械で読取り可能なデータ記憶媒体と連動する中央演算処理装置、及び、
- (4) 該予測値を受け取るための、該中央演算処理装置と連動する出力装置、を含むコンピュータシステムにも及ぶ。

【 0 0 7 9 】

これらの実施態様の例を図 3 に示す。これは、中央演算処理装置 (「 C P U 」) 2 0 、例えば R A M (ランダムアクセスメモリ) 又は「コア」メモリなどであって良い作業メモリ 2 2 、大容量記憶メモリ 2 4 (一つ以上のディスクドライブや C D - R O M ドライブなど) 、一つ以上のブラウン管 (陰極線管) (「 C R T 」) ディスプレイ端末 2 6 、一つ以上の 30
のキーボード 2 8 、一つ以上の入力ライン 3 0 、及び一つ以上の出力ライン 4 0 を含み、これらの全てが標準的な双方向性システムバス 5 0 で相互接続しているコンピュータ 1 1 を含むシステム 1 0 を示す。

【 0 0 8 0 】

入力装置 3 6 は、入力ライン 3 0 でコンピュータ 1 1 と接続するが、これは様々な方法で実行してよい。例えば、本発明の機械読取可能データは電話線又は専用データ線 3 4 により接続したモデム (単数又は複数) 3 2 の使用を介して入力しても良い。代わりに又は加えて、入力装置 3 6 は C D を含んでも良い。または、ディスプレイ端末 2 6 と結合している R O M ドライブ又はディスクドライブ 2 4 、キーボード 2 8 を入力装置として用いても 40
良い。

【 0 0 8 1 】

出力装置 4 6 は、出力ライン 4 0 でコンピュータ 1 1 と連結するが、これは同様に通常の装置で実行して良い。例えば、出力装置 4 6 は、本明細書に記載の合成ポリヌクレオチド配列又は合成ポリペプチド配列を表示するための C R T ディスプレイ端末 2 6 を含んで良い。出力装置には、ハードコピー出力が取れるようにプリンタ 4 2 が含まれることもあり、システム出力を後で使用するために記憶しておくディスクドライブ 2 4 が含まれること 40
もある。

【 0 0 8 2 】

作動中、 C P U 2 0 は様々な入力装置 3 6 及び出力装置 4 6 の使用を調整し、大容量記憶装置 2 4 からのデータアクセスと作業メモリ 2 4 へのアクセス及び作業メモリ 2 4 からの 50

データアクセスを調整し、そしてデータ処理工程の順序を決定する。本発明の機械で読取可能なデータの処理に、幾つかのプログラムを用いて良い。例示的なプログラムは、例えば次のような工程を使用することがある、

(1) 標的遺伝子の発現に関連する、次のリストから選択される少なくとも一つの特性に対する数値を入力する工程、

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
- (b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在
- (c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在
- (d) CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素 (LDH-H4) の存在又は不存在 10
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T) 並びにcTn-IとcTn-TのRNAの存在又は不存在
- (h) FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質) の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイムの存在又は不存在
- (j) -心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の存在又は不存在
- (k) 細胞質FABP
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン (ADM) の存在又は不存在 20
- (n) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL) の存在又は不存在
- (o) C反応性タンパク質 (CRP) の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイドAの存在又は不存在
- (q) P-セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子 (PAF) の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子 (TNF) の存在又は不存在
- (v) 可溶性TNF受容体2 (sTNFR2) の存在又は不存在 30
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) フィブリンオリグマーの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (HbA1c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポB、アポA、アポEの存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在 40
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ-9の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在 50

- (nn) CD95 / アポ1 / Fas の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシンII型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質IIIa遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子VIIaの存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) Fas並びにFasリガンドの存在又は不存在

10

(zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、

- (2) 該特性に対する数値を加えて該配列の推定値を求める工程、及び
- (3) 該推定値を出力する工程。

【0083】

図4は、図5のシステム10などのシステムで実行できる、本発明の合成分子を設計するための機械で読取可能なデータ、又は一連の命令を書き込むことができる磁気データ記憶媒体100の断面図である。媒体100は、通常のものであって良い適切な基板101、及び、通常のもので、その極性又は極の方向を磁気的に変えることができる磁気領域(見えない)を含む片面又は両面上の適切な被覆102を有する、通常のプロッピー(登録商標)ディスク若しくはハードディスクであって良い。媒体100には、ディスクドライブ又は他のデータ記憶装置24の軸(スピンドル)を受ける穴(図示せず)もある。媒体100の被覆102の磁気領域は、図3のシステム10などのシステムで実行するため、本明細書に記載したような通常の機械で読取可能なデータで書きこめるよう、極性が与えられ又は極の方向が決められる。

20

【0084】

図4は、光学読取可能データ記憶媒体110の断面図である。これも、本発明の候補分子をスクリーニングするためのそのような機械で読取可能なデータ、又は一組の命令を書き込むことができる。このスクリーニングは図3のシステム10などのシステムにより実行することができる。媒体110はリードオンリーメモリ(CD-ROM)を有する通常のコンパクトディスクや、光学的に読取ができ且つ磁気光学的に書込める光磁気ディスクなどの再書き込み可能な媒体であって良い。媒体100は、通常のものであって良い適切な基板111、及び、通常の普通は基板111の片面であって良い、適切な被膜112を有するのが好ましい。

30

【0085】

CD-ROMの場合は、良く知られているように、被膜112は反射性のものであり、機械で読取可能なデータを書き込むための複数の窪み113が焼き付けられている。窪みの並びを被膜112の表面でレーザー光を反射させて読取る。実質的に透明であるのが好ましい保護被膜114は、被膜112の上面に施される。

40

【0086】

光磁気ディスクの場合は、良く知られているように、被膜112には窪み113はないが、レーザー(図示せず)により一定の温度を超えて過熱されるとその極性又は極の方向が磁気的に変化することができる複数の磁気領域がある。この領域の極方向は、被膜112から反射するレーザー光の偏光を測って読取ることができる。上で述べたように、この領域の並びがデータを記号化する。

【0087】

本発明のシステムは、これらのものから特性を取り出し、複合的特性を形成する。一つ以上の特性が様々な異なる方法で組み合わせられてこれらの複合的特性を形成することができ

50

る。特に複合的特性は、単一の特性及び他の複合的な特性の関数であっても良く、また単一の特性及び他の複合的な特性の組み合わせであっても良い。この関数は、代数的、論理的、シノソイド的、対数的、直線的、双曲線的、統計的なものなどであっても良い。または、二つ以上の特性が関数的な形（例えば、算術的、代数的）で得られることがある。例としては、複合的特性は二つ以上の特性の合計と等価である場合があり、または複合的特性は別の特性と一つ以上の特性の重なりの下位部分に相当する場合がある。また、複合特性は一つ以上の特性の定数倍に等しい場合がある。当然、複合特性を定義する他の多くの方法が存在する。

【0088】

本発明は、以下の限定的でない実施例により更に説明する。

10

【実施例1】

【0089】

心臓状態若しくは事象の初期の生化学マーカー

ミオグロビン、CK-MB、心臓トロポニン-T及び心臓トロポニン-I

初期マーカーの主な要求は、テストの実施が短期間で容易に実施されるべきであること、及びマーカーがAMIを含むACSの後間もなく放出されることである。AMIを含むACSの早期診断は、治療現場用装置（Point-of-Care device）、即ち、AMIを含むACSの可能性のある患者が病院や一般の診療所を含む診療室に最初に来たときに使用する、小さくて好ましくは手に収まる装置であるのが理想的である。

【0090】

20

初期マーカーのうち、ミオグロビン、クレアチンキナーゼMBイソ型（CK-MB）を含む総クレアチンキナーゼ（CK）、心臓トロポニン-I（cTn-I）及び心臓トロポニン-I（cTn-I）の初期マーカーはそれぞれ、次のリストに基づく僅かに異なる特性を有する。即ち

- (1) それが心臓組織に特異的であるか否か
- (2) 血清レベルがピークに達する時間
- (3) ピークレベルが持続する期間
- (4) 臨床上的感度、及び
- (5) 臨床上的特異性（ディーン、1998）。

【0091】

30

図2は、心臓マーカーの出現の複数の時間経過を表す。

【0092】

ミオグロビンは心臓特異的ではないが、ピークに達するのが最も早い（図2）。これは通常は免疫検定で検査する。ミオグロビン検定は通常はモノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体、またはそれらの組み合わせを用いて測定する。胸痛が始まってから4～5時間での血清レベルピークになるが、このピークは一過性のものであり、10～12時間後には非診断レベルにまで下がることがある。CK-MBは、AMIを含むACSの信頼できるマーカーである。これは約12時間でピークレベルにまで上昇し、胸痛の開始後20～24時間で急速に非診断レベルにまで降下する。

【0093】

40

cTn-IとcTn-Iは、共に心臓特異的である。cTn-Iは実験的損傷の後に骨格筋により発現されることがあり、ヒトの再生中の骨格筋で検出された（ボルデットら、1997）ので、cTn-Iが有利である。しかしながら、cTn-Iは、臨床的に極めて感度が良く、64%の真のAMI患者を検出できる。梗塞が小さい場合は、cTn-Iテストは重大な数の偽陽性の結果をもたらすことがある。しかしながら、cTn-Iは、胸痛開始から5～11時間でレベルが有意に上昇するという利点がある。このレベルは上昇し続け、5～8日間、比較的一定である。

【0094】

胸痛は、救急科に来る最も普通の原因であるが、胸痛のある患者の75%ではその痛みは元来は心臓性のものではない。従って、ACSのテストで陰性の推定値を得て、安全な早

50

期退院又は患者を病院に受け入れないという安全な決断を可能にすることも重要である。

【0095】

利用できる初期マーカーの殆どは相互に関係がある。従って、偽陽性の結果を得ることで直面する問題は、試験（例えば、CK-MB抗体テスト）をミオグロビンテストなどの他の試験と関連させることで、大部分克服される。現在では、特に所要時間の短縮が求められ、専門スタッフが病院の生化学科で診断装置を操作する必要がある場合には、これは不便でもあり費用も嵩む。これらのマーカーには、CK-MB、cTn-I及びcTn-IIが含まれる。本発明のマイクロアレイ法を用いて幾つかの初期マーカーをテストできることは、信頼性が顕著に増加するので、有利である。

【0096】

中期及び長期の生化学マーカー

これらのマーカーは、1.5～3日又はそれ以降にピークに達する。これらのマーカーには総クレアチンキナーゼ（CK）、心臓トロポニンI（cTn-I）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、乳酸脱水素酵素（LDH）、ミオシン軽鎖（MLC）及びミオシン重鎖（MHC）、脂肪酸結合（FAB）タンパク質及びABCが含まれる。これらの初期マーカーのように、後期マーカーは梗塞の大きさを推定するのに用いることができる。複数の中期/長期マーカーは、診察を受けるのが遅かったため短期マーカーについて試験できない患者に有用である。

【0097】

AMIの価値ある初期（<10h）マーカーであると思われる脂肪酸結合タンパク質などの他の血清マーカーが利用できる。

【実施例2】

【0098】

装置の診断性能の有効性の評価

診断検定の有効性（E）は次の式を用いて求める。

【数5】

$$E = \frac{TP}{TO} \times 100$$

上式では、TP = 真の陽性、TO = テストの総数である。TOは、式 $TO = TP + FP + FN + TN$ で計算し、FP = 偽陽性、FN = 偽陰性、及びTN = 真の陰性である。Eの値の範囲は次のとおりである。 $0 < E \leq 100$ 。

【実施例3】

【0099】

梗塞の大きさの推定

時間の関数としての生化学マーカーの変化の大きさは、剖検で測定した梗塞の大きさと相關する。明らかに、これらの積分の信頼性は、複数のテストが利用できる場合には高まる。

【0100】

梗塞の大きさ（体積）は、

- (1) 生化学マーカーが放出される時間スケール
- (2) 生化学マーカーの放出速度（ $f(t)$ ）
- (3) 患者の体重（ Bw ）
- (4) 生化学マーカーが放出される体重の比率（ Kw ）
- (5) 生化学マーカーの循環からの除去速度（ Ed ）
- (6) 放出された生化学マーカーの総数を梗塞した心筋から放出されたマーカーの量で割ったもの（ Kr ）

10

20

30

40

50

の関数である。

【 0 1 0 1 】

従って、梗塞の大きさ (I s) は次の式を用いて求める。

【 数 6 】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

【 実施例 4 】

【 0 1 0 2 】

心筋炎症の一因となる又は心筋炎症に関連する物質の評価

心血管疾患の発生は、統計的に一定の感染性物質に結び付けられてきた。細菌（例えば、ポルフィロモナス及びクラミジア）、ある種の細菌（例えば、ヘリコバクター・ピロリ、はおそらく最も広範囲の病気を引き起こす物質である）及びある種のウイルス（コクサッキーウイルス及びサイトメガロウイルス）を含む、ある種の微生物は、AMIなどのACSを含む心血管疾患の傾向に寄与する効果がある。これらの物質は炎症性単球（inflammatory monocyte）を通して心血管系にその効果を及ぼすことがある。

【 0 1 0 3 】

これらの微生物及びウイルスの存在は、これらの病原体の表面にある特異的エピトープに対する抗体を用いて検出する。

【 実施例 5 】

【 0 1 0 4 】

生化学マーカー装置の性質

本発明は体液の試料から大量の抗原を同時に測定する装置を提供する。AMIを含むACSに対する生化学マーカーの組み合わせは疑う余地のない診断を可能とする。

【 0 1 0 5 】

テストは、少量（10～100マイクロリットル）の血清で行い、誤差を最小限にし、ACSの信頼できる診断を行なうために短時間で測定を数回行うことを可能にする。

【 0 1 0 6 】

本発明はまた、病原体（ポルフィロモナスや他の微生物）が存在し、それ故に炎症反応の可能性の原因の証拠がある場合には他の体液（唾液など）も検定する。

【 0 1 0 7 】

ACS、及び拡張型心筋症（DCM）を含む鬱血性心不全（CCF）の遺伝的感受性のパターンが知られているので、そのテストは心血管症の遺伝的傾向を推定するため患者の白血球由来のDNAに対するmRNA及びcDNAマーカーを含むよう修飾可能である。

【 実施例 6 】

【 0 1 0 8 】

固体支持体上のアレイとしての抗体の吸着若しくはカップリング

マーカータンパク質（例えば、心臓組織から誘導したタンパク質）に対する特異的な抗体を固体表面に捕捉し又は固定する。タンパク質抗体の固定化は、静電力で行っても良く、またはビオチン化した抗体が付着できる固体支持体上の活性化部位に付着したストレプトアビジンの助けにより行っても良い。捕捉スポットを形成するのに用いる抗体の量は少なく、約10pL～100ナノリットルである。これらはアラビノースや低分子量（3000～5000Da）のポリエチレングリコールなどの保護用化学物質の存在下で乾燥させる。心臓マーカーに特異的な抗体のマイクロアレイは、バイオドット3000（カルテクノロジーズ、アービン、カリフォルニア州、米国）などの高精度アプリケーションを用いて、固体支持体上のアドレス可能な場所に各抗体の小さな（10pL～10nL）スポットを適用して二次元で構築する。抗体はナイロン若しくはニトロセルロースの面に

10

20

30

40

50

吸着させるか、又は確立された手法で共有結合的にイモビロンP（ミリポアコーポレーション）などの膜に連結する。固体支持体は、一般的には脱脂粉乳、トチャカ抽出物、又は他のカラギナン若しくはゼラチンの供与源など（これらに限定されないが）の遮断物質に浸漬するかその他の方法で接触させる。

【0109】

抗体アレイに結合した血液試料由来の血漿中の抗原を検出するための、次に挙げる幾つかの選択肢がある（図1）。

【0110】

(i) この血漿を、それぞれリジン及びシステイン残基を共有結合的に修飾するN-ヒドロキシコハク酸イミドビオチン、若しくはN-エチルマレイミドビオチンと反応させる。残留する修飾試薬を含む血漿中の低分子量の成分を、セファデックスG-10などの分子ふるいを通して遠心脱塩により除去する。脱塩血漿中のビオチン化タンパク質を次に心臓マーカーに対する抗体のアレイに適用し、37で30分間インキュベートする。未結合のタンパク質溶液をデカントし、アレイをリン酸緩衝化食塩水（PBS）で数回洗浄する。抗体スポットに結合したビオチン化タンパク質は、ストレプトアビジンと西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）の結合物か、ストレプトアビジンとアルカリホスファターゼ（AP）との結合物〔図1b〕か、又はフルオレセイン（FITC）又はテキサスレッドで修飾したストレプトアビジンで検出する。HRPとAPによる最も感度の良い検出形態には、化学蛍光性産物の酵素合成が含まれる。結合したHRPやAPの活性からの化学蛍光を生ずる基質キットは、アマシャム・フォルマシア・バイオテク（リトルチャルフォント、英国）、バイオ・ラッド・ラボラトリーズ（ハーキュリーズ、米国）及びピアス・ケミカル・カンパニー（ロックフォード、米国）から市販されている。これらの基質をアレイに適用した後、湿った膜を2～5分間、X線フィルムと接触させ、次いで心臓マーカーに結合した抗体スポットを明らかにするために現像する。アレイに結合したビオチン化心臓マーカーは、フルオレセイン（FITC）若しくはテキサスレッドで修飾したストレプトアビジンを適用することにより直接可視化することができる。これらの3つの手順の一つを用いたアレイ上のスポットの強度は、濃度測定スキヤナ（例えば、モレキュラー・ダイナミクス、サニーベル、カリフォルニア州、米国の製品）又は蛍光定量スキヤナ（例えば、STORM、モレキュラー・ダイナミクス）を用いて定量化でき、血液試料中のこれらのタンパク質の濃度の算出が可能になる。

10

20

30

【0111】

(ii) または、血漿を、試料中の全てのタンパク質上のアミノ基又はスルフヒドリル基に蛍光基を共有結合的に接着する試薬と反応させる（図1e）。タンパク質標識キットとして入手できる適切な発蛍光団は、アルゴンレーザーを用いて488nmで励起することができるAlexa488及びCBQCAである。抗体アレイに結合した蛍光標識血漿タンパク質は、走査蛍光光度計又は共焦点顕微鏡を用いて定量化することができよう。抗原結合部位の大部分が影響を受けないように中反応条件を用いるべきである。異なる心臓マーカーは、異なる数の発蛍光団で異なる程度に標識される。血漿試料は発蛍光団との反応の前に透析する必要があり、化学的誘導体化の後に脱塩しなければならない。

【0112】

(iii) アレイに結合した非標識の抗原は、結合した心臓マーカーの異なるエピトープに結合する可溶性の蛍光標識抗体と反応させることができ、結合した抗原の定量化が可能になる（図1e）。多くの試料で、血漿抗原のレベルが特定のスポットに利用できる抗体の数を超える場合がある。最初のスクリーニングで得られた目的の陽性抗原は、続いて一連の特定の抗体の希釈を用いて定量化することもある。このアレイ上のスポットにある抗体の数が試料中の適用した抗原の数を超えると、蛍光はもはや増加しないであろう。蛍光対抗体レベルのプロットにより、血漿試料中の抗原レベルが得られる。この定量的アレイ上の結合抗原のレベルは、上の(i)又は(ii)の手順を用いて測定することができ、又はアレイ上の空抗体の数は、標準的な、蛍光標識抗原を用いて測定することができるであろう。

40

50

【実施例 7】

【0113】

A M I 発症の検出

本装置は、患者が A M I を自覚している（胸痛の発症）か否か、またストレス試験などの試験と関連する無症状の梗塞であるか否かとは関係のない、A M I の発症時期の指標を提供する。患者は比較的高い頻度で試料採取され、結果的に生化学的マーカー曲線の形状の明確さ向上する（図 2）。テストの結果は非対称で、如何なる特定の患者でも最も感受性が高いことが証明された抗体に、より大きな重みを置く。初期マーカーに対する試験の組み合わせは A M I の発症を決定するためのより良い根拠を提供する。患者が遅く来た場合（胸痛発症後 > 24 時間）、発症時期はアレイ中の後期マーカーを用いて決定する。

10

【実施例 8】

【0114】

梗塞の大きさの検出

心臓ミオシン重鎖（c M H C）は、長期の遅延の後に放出され、A M I 後約 2 日間、血漿中に現れない。これは梗塞の大きさを推定するための信頼性の高いマーカーであると考えられている（メアら、1994）。心臓トロポニン - T（c T n - T）のピークが後期である場合、血清濃度は梗塞の大きさについての放射性核種造影法に基づく評価と良く相関する。心臓ミオシン軽鎖（M L C）レベルも、梗塞の大きさと相関する（オームラら、1995）。

【実施例 9】

【0115】

急性冠状症候群発症後の心筋再灌流の検出

患者が A M I などの急性冠状症候群で診察を受ける場合、治療目的は閉塞した冠動脈を再び開くことであることが非常に多い。これは通常は T P A などの血栓溶解剤により、バルーン血管成形術などの人工的手段により、ステントあり又はステントなしで行われる。これらの治療の目的は、切迫した心筋の再灌流をもたらすことである。しかしながら、再灌流の時間及び救済できた心筋の程度の両方の点で、再灌流が成功したのかどうかを判定するのは難しいことが多い。今のところ、再灌流を評価するための臨床ツールは感度が低く特異的でもない。これらには、胸痛の消失などの臨床的な特性、及び S T セグメントの上昇量の減少などの E C G 特性が含まれる。血清マーカーは時には役に立つが、通常は遑及的でしかない。

20

30

【0116】

従って、再灌流は現在の臨床現場では簡単に診断できるものではないが、大いに関心がもたれている。再灌流が成功した後に、C K - M B やトロポニンなどの心損傷の伝統的なマーカーのレベルが短時間で極めて劇的に上昇する、「洗い流し（washout）」期があることが多い。これは、マーカーの放出パターン、及び / 又はこの放出期中の一つのマーカーの別のマーカーとの比率が、再灌流の時間及び程度に関する情報量の多いデータとなることがありうる。これは、提案した方法論のもう一つの可能な適用である。

【実施例 10】

【0117】

心筋炎症と関連する病原体の存在の検出

感染がアテローム性動脈硬化形成における補助因子であることがある。微生物などの感染体（クラミジア、ポルフィロモナス、ヘリコバクター及びストレプトコッカス）及びある種のウイルス（サイトメガロウイルス、コクサッキーウイルス）は、心臓マイクロアレイ装置の使用に適應できる、現存の免疫学的方法で検出して良い。

【実施例 11】

【0118】

冠状動脈危険因子の測定

アテローム性動脈硬化の危険性は、様々な血清マーカーを用いて評価できる。これらのうち、次のものが抗体に基づくマイクロアレイを用いてモニターできる、アポリポタンパ

40

50

ク質、リポタンパク質、酵素、受容体及び転移タンパク質のリストである。

【0119】

血漿リポタンパク質は、その密度、浮揚率、平均直径及び電気泳動移動度に基づいて特性決定される。主な種類の血漿リポタンパク質には、カイロミクロン、VLDL（前 - リポタンパク質）、LDL（ - リポタンパク質）及びHDLが含まれる。これらの種類のリポタンパク質を特徴付けるアポタンパク質の組成を表1に挙げる。

【0120】

【表1】

アポタンパク質	MW (Da)	カイロミクロン	VLDL	LDL	HDL
		(総タンパク質の%)			
ApoA-I	28,300	微量	微量	微量	66
ApoA-II	17,000	微量	微量	微量	20
ApoB ₁₀₀	512,000	5-20	37	97	-
ApoC-I	6,631	15	7	微量	3
ApoC-II	8,851	15	7	微量	微量
ApoC-III	8,864	40-50	40	2	4
ApoD	-	-	-	-	5
ApoE	~34,000	4	13	1	1

【0121】

アポリポタンパク質は、リン脂質との相互作用によりコレステロールエステル及びトリグリセリドを可溶化するのを助ける。アポタンパク質は、リン脂質の脂肪アシル鎖とアポタンパク質の非極性領域の間の疎水性相互作用に主に基づいて脂質と結合し、それよりは低い度合いでリン脂質の荷電した頭部基とアポタンパク質の逆に荷電した領域のイオン性相互作用に基づいて結合する。

【0122】

アポタンパク質A（アポA-I及びアポA-II）はHDLの主な成分である。これはアポA-I（MW28,300Da）及びアポA-II（MW17,000Da）に再分割できる。

【0123】

アポリポタンパク質B（アポB）は異質である。アポB₁₀₀は主にカイロミクロン、VLDL、及びLDLで見られる。アポB₄₈はアポB₁₀₀のアミノ末端半分を表し、LDL受容体のリガンドではない。

【0124】

アポリポタンパク質C（アポC）は少なくとも三つの成分を含み、その成分はVLDLの主成分として、及びHDLの微量成分として生ずる。アポC-Iは6,631DaのMWを有し、アポC-IIは8,837DaのMWを有し、アポC-IIIは8,767Daを有する。アポC-IIIも、タンパク質がその炭水化物部分に0、1、又は2個のシアル酸残基を持つかどうかによって、三つのアイソフォームを有する。

【0125】

アポリポタンパク質D（アポD）は、HDLの微量成分であり、通常は有用な血漿マーカであるとは考えられない。

【0126】

アポリポタンパク質E（アポE）はVLDL、LDL（VLDLからLDLへの変換時に

10

20

30

40

50

形成される粒子)及びHDLで見られる。このタンパク質は異質で、約34,000DaのMWを有する。アポE2を含むサブタイプも幾つかある。

【0127】

従って、アポリポタンパク質に対する次の抗体が、カイロミクロン、VLDL、LDL、及びHDLのモニターに使用できる(アルポヴィックら、1971)。

アポA-I(対HDL)、リサーチダイアグノスティックス社製(RDI-PRO6182)、

アポB₁₀₀(対LDL)、リサーチダイアグノスティックス社製(RI-PRO610800及びLDLの酸化型用のRDI-OXLDL abm)、

アポC-I(対カイロミクロン及び低度のVLDL並びにHDL)、

アポC-II(対カイロミクロン及び低度のVLDL)、

アポC-III(対カイロミクロン並びにVLDL、及び低度のLDLとHDL)、

アポD、リサーチダイアグノスティックス社製(RDI-APOD abm)及び

アポE(対VLDL及び低度のカイロミクロン)、リサーチダイアグノスティックス社製(RDI-PRO61085/61086、並びにRDI-APOE abGX)

、及びアポE2(RDI-APO61088)を同定するためのアポE2。

【0128】

アポリポタンパク質は、「サンドイッチ」検定で検出する。2種類の検定を実施できる。

(i) 抗体に基づく捕捉検定: これは、特定のポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体を用いてアポリポタンパク質抗体を捕捉し、次に西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などの検出/レポーター部分に結合させた第二抗体を用いて検出し、その後呈色反応を発生させて可視化する場合のサンドイッチ検定法である、及び、

(ii) 受容体に基づく捕捉検定: ここでは、アポリポタンパク質は特異的受容体タンパク質により捕捉され、次にHRPなどのレポーター分子に結合した第二抗体を用いて特異的に同定し、そして上で述べたように検出する。

【0129】

抗体に基づく捕捉検定は、ニトロセルロースで被覆されたガラスの顕微鏡スライド又は他の固体表面に固定した抗体を用いて、次のように実施できる。

(1) 精製した抗体をPBS(pH7.2の0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液、0.137Mの塩化ナトリウム)で希釈するか又は希釈せずに用い、ニトロセルロースに加えてバイオドットアレイヤーを用いて長方形のアレイを形成し、4で一晩放置する、

(2) 過剰な抗体をPBSで3回洗浄して除去し、ドットを乾燥させる、

(3) 少量の血漿(~0.1mlを1:100に希釈するか標準)を適当に希釈し、次にアレイに加えて37で1~2時間インキュベートする、

(4) 抗体アレイをPBSで洗浄し、乾燥させる、

(5) 第二ポリクローナル抗体(1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで1:15,000まで希釈したビオチンペルオキシダーゼに結合したアポリポタンパク質に対する抗体が好ましい)を加える、

(6) 37で2時間インキュベートする、

(7) 洗浄する、

(8) アレイを基質(3gのo-フェニレンジアミン・ジヒドロキシクロリドを含む、3.5mMの過酸化水素水を含むリン酸緩衝化クエン酸、pH5.5)と共に30分間(暗所で)インキュベートする、

(9) 0.1MのHClで反応を停止させる、そして

(10) OD_{492nm}を読み、血漿試料をアポリポタンパク質を省いた試料と比較する。通常、アポBは、アポBをイソプロパノールを用いて沈殿させた標準的なりポタンパク質として用いられる。

【0130】

受容体に基づく捕捉検定は、工程(1)の抗体が組換え受容タンパク質に置き換えられ、工程(5)で用いる第二抗体が特定のアポリポタンパク質に対する第一抗体に置き換えら

10

20

30

40

50

れる以外は、上のように行われる。

【0131】

カイロミクロン、HDL、VLDL、及びLDLと結び付いたアポリポタンパク質ばかりでなく、血漿（例えば、リポタンパク質リパーゼ（LPL）、肝リパーゼ（HPL）及びレシチン・コレステロール・アシルトランスフェラーゼ（LCAT, 60kDa）中の特異的抗体を用いて検出されうる一連の関連酵素が存在する。

【実施例12】

【0132】

他の循環系の「危険因子」タンパク質

次のタンパク質は、心臓異常の「危険状態」にあると考えられる患者の血清においてその量の有意の変化が検出されることがある（オーデルモッタラら、1999参照）。 10

(i) グリコシル化ヘモグロビン（HbA1c）、

(ii) インスリン、

(iii) フィブリノゲン、

(iv) 因子VII、

(v) 可溶性ICAM-1、及び

(vi) C反応性タンパク質（Cタンパク質）。

【0133】

これらのタンパク質は、上述の抗体に基づき捕捉検定を用いてモニターできる。

【実施例13】

【0134】

アレイの調製

アレイは、急性心筋梗塞の既知の生化学的マーカー、並びに冠状動脈病に関連があると分かっている因子を全て含んでも良い。アレイは、2次元のマトリックスの複数のスポットとして膜に共有結合するモノクローナル抗体を含んでも良い。

【0135】

スポットは、極めて小粒の抗体溶液（例えば、10ナノリットル）を適用した結果、顕微鏡で見える大きさであり、隣接スポットからは十分に離れている（100ミクロン離れたドット）。

【0136】

当業者らは、本明細書に記載の発明が具体的に記載したもの以外の変形や改良が可能であることを認めるであろう。本発明はこのような変形及び改良を全て含むことを理解されたい。本発明はまた、明細書で個別に又は集合的に記した工程、特性、組成物及び化合物の全て、及び、該工程若しくは特性の任意の二つ以上の組み合わせのいずれか及び全てをも含む。 30

【0137】

引用文献

1. オーデルモッタラら、Am. Heart J. 137: 346-51, 1999。

2. アルポヴィックら、Atherosclerosis 13: 141, 1971。

3. ボーダーら、Clin. Chem. 43: 476-484, 1997。 40

4. ディーン、「心筋外傷のマーカーとしての心臓トロポニン - T」、Cardiac Markers (AHB Wu編)、Humana Press, トトワ、ニュージャージー) 205-227, 1998。

5. ハイドら、Genome Res. 6: 986-994, 1996。

【0138】

6. ハーツバーグとマイアー, M. W., Ann. Periodontol. 3: 151-60, 1998。

7. メアら、Circulation 99: 1560-6, 1999。

8. オームラら、Int. Jpn. Circ. J. 59: 154-9, 1995。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1a】図1aは、固体支持体（SS）に固定した結合相手（BP）と相互作用した心 50

臓マーカー（CM）の検出を示す図式である。レポーター分子（RM）はCMに付着し、RMは同定可能なシグナル（IS）を発する。

【図1b】図1b～図1eは、固定化された構成要素（抗体、Ab）とその結合相手（心臓マーカー、CM）の間の相互作用プロトコルの様々な検出を示す図式である。一つの側面（図1b）では、CMを標識するためにビオチン（-）を用いる。ストレプトアビジン（SA）及びアルカリホスファターゼ（AP）から成る融合タンパク質を用いて、ビオチンで標識したCMのビオチン部分に付着させる。APは基質（S）を検出可能産物（P）に変換する。Abは、固体基板に固定されている。

【図1c】図1cでは、捕捉されたCMは、蛍光性（Fl）AP/HRPにより又は放射性で（Rad）標識した抗CM抗体により検出する。

【図1d】図1dでは、可溶性抗CM抗体を用いて固定されたCMに結合し、次いでそれ自体を蛍光タグ又は他のRMで標識した抗免疫グロブリン抗体で検出する。

【図1e】図1eでは、CMは蛍光性構成要素又は他のRMで標識する。

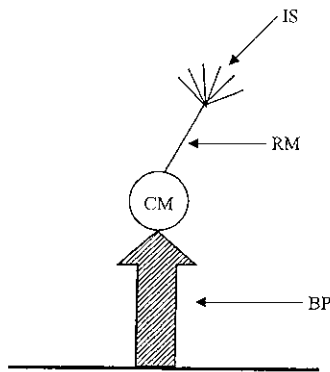
【図2】図2は、胸痛の開始に続く心臓マーカーの血液中への放出の時間経過を示すグラフである。

【図3】図3は、全身の脈管構造の特定の状態若しくは事象を診断するための命令を実行するのに用いられる、命令が記憶媒体に書込まれているシステムの図である。

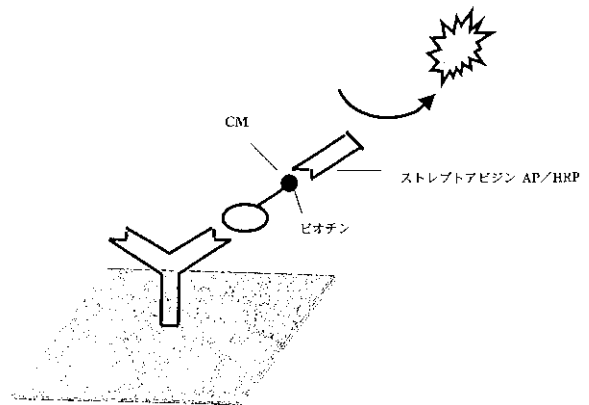
【図4】図4は、全身の脈管構造の特定の状態若しくは事象を診断するための磁気記憶媒体の断面を表す図である。

【図5】図5は、全身の脈管構造の特定の状態若しくは事象を診断するための光学読取可能データ記憶システムの断面図である。

【図1a】



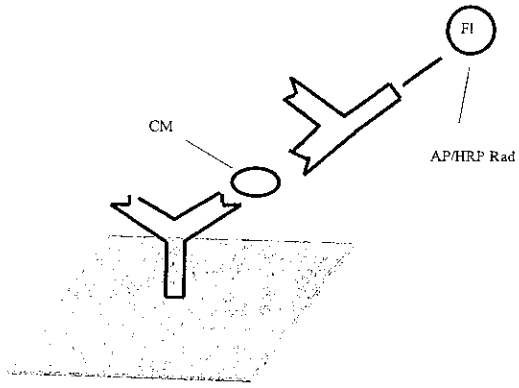
【図1b】



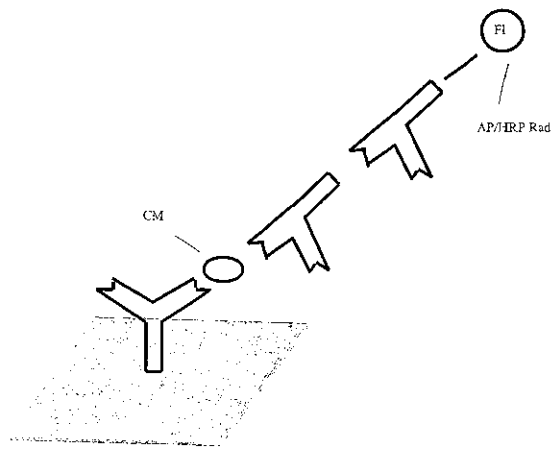
10

20

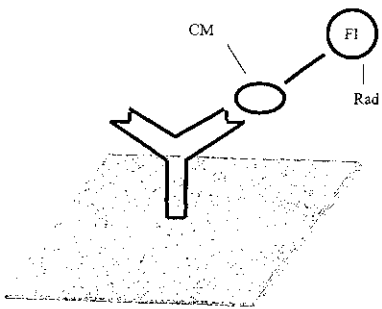
【図 1 c】



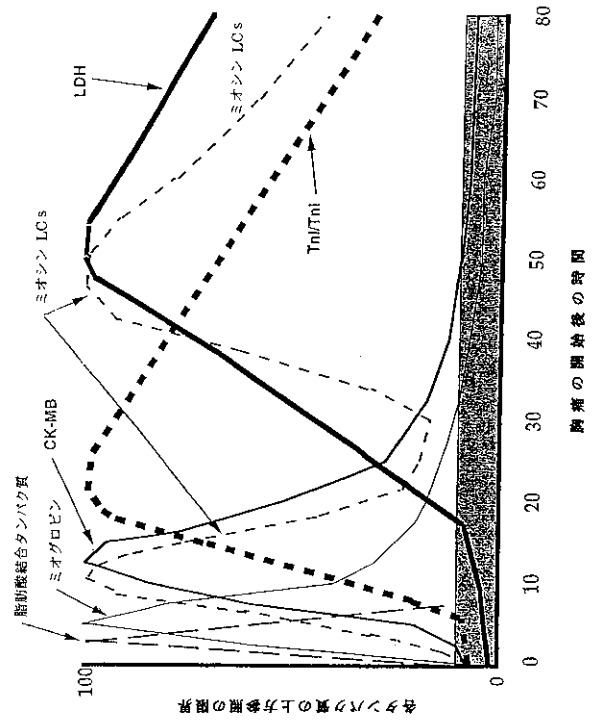
【図 1 d】



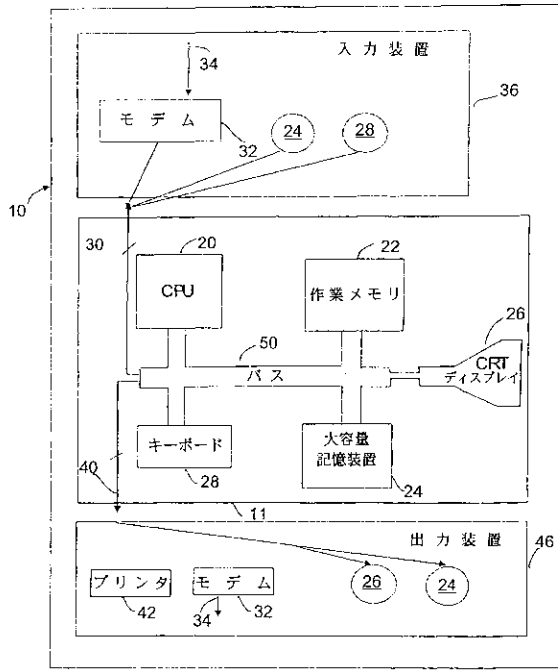
【図 1 e】



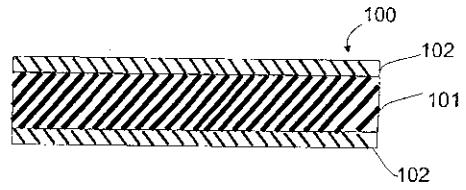
【図 2】



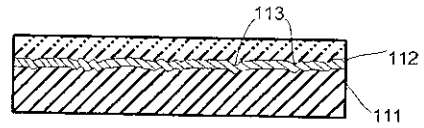
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/23191 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/68, 33/569 (74) Agents: HUGHES, F, John, L, et al., Davies Collison Cave, Level 3, 303 Consonant Drive, Milton, Queensland 4061 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU01/01141

(22) International Filing Date: 12 September 2001 (12.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: PR 0056 12 September 2000 (12.09.2000) AU

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF SYDNEY [AU/AU], Sydney, New South Wales 2000 (AU).

(81) Designated States (regionally): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PT, PL, PR, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regionally): AR/PO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHRISTOPHERSON, Richard, Ian [AU/AU], 137 Suberbiul Street, Paddington, New South Wales 2021 (AU); DIOS, RENE, DIOS, Cristobal, Guillermo [AU/AU], 130A Waverley Street, Paddington, New South Wales 2021 (AU); CELERMAYER, David, Stephen [AU/AU], 45 Oloia Avenue, Vaucluse, New South Wales 2030 (AU).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DIAGNOSTIC ASSAY

(57) Abstract: The present invention relates generally to a diagnostic device including a prognostic assay for parameters which are indicative of a condition or event associated with the systemic vasculature. More particularly, the present invention provides an assay to detect parameters associated with a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event including acute coronary syndrome such as but not limited to acute myocardial infarction, heart failure, atherosclerosis or a thrombotic condition. The identification of these parameters or more particularly a pattern of parameters enables the diagnosis of a condition or event or the determination of the risk of development of a condition or event associated to the systemic vasculature. Still more particularly, the present invention is directed to a diagnostic device comprising a set of members wherein one or more of said members has or have specific or genetic binding partners in a biological sample from an animal including human subject wherein the pattern of binding of the members to the binding partners is indicative, predictive or otherwise associated with a likelihood of a condition or event within the systemic vasculature. The absence of detection of specific or genetic binding partners is also of indicative or predictive value. This is particularly important in cases where patients are unable to communicate advice to a physician on their own condition, such as during surgery or for patients in a coma. It is also useful in determining the risk of a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous conditions or events in a healthy subject or a subject entering into an exposure to risk such as surgery or chemotherapy. The present invention is useful *in vivo* for the identification and/or quantitation of biochemical markers of conditions or events in the systemic vasculature such as heart disease, heart disorders, infections of the heart, stroke and thrombosis as well as the determination of a risk of development of these conditions including the absence of disorders or absence of risk of the development of a disorder. The assessment of such conditions may be made in a clinical setting, as part of a routine testing protocol and/or as a laboratory procedure.

WO 02/23191 A1

- 1 -

DIAGNOSTIC ASSAY**FIELD OF THE INVENTION**

5 The present invention relates generally to a diagnostic device including a prognostic assay for parameters which are indicative of a condition or event associated with the systemic vasculature. More particularly, the present invention provides an assay to detect parameters associated with a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or
10 event including acute coronary syndrome such as but not limited to acute myocardial infarction, heart failure, atheroma or a thrombotic condition. The identification of these parameters or more particularly a pattern of parameters enables the diagnosis of a condition or event or the determination of the risk of development of a condition or event associated to the systemic vasculature. Still more particularly, the present invention is directed to a diagnostic device comprising a set of members wherein one or more of said
15 members has or have specific or generic binding partners in a biological sample from an animal including a human subject wherein the pattern of binding of the members to the binding partners is indicative, predictive or otherwise associated with a likelihood of a condition or event within the systemic vasculature. The absence of detection of specific or
20 generic binding partners is also of indicative or predictive value. This is particularly important in cases where patients are unable to communicate advice to a physician on their own condition, such as during surgery or for patients in a coma. It is also useful in determining the risk of vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous conditions or
25 events in a healthy subject or a subject entering into an exposure to risk such as surgery or chemotherapy. The present invention is useful *inter alia* for the identification and/or quantitation of biochemical markers of conditions or events in the systemic vasculature such as heart disease, heart disorders, infections of the heart, stroke and thrombosis as well as the determination of a risk of development of these conditions including the absence of
30 disorders or absence of risk of the development of a disorder. The assessment of such conditions may be made in a clinical setting, as part of triage, as part of a routine testing

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 2 -

protocol and/or as a laboratory procedure.

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 Bibliographic details of the publications referred to by author in this specification are collected at the end of the description.

Reference to any prior art in this specification is not, and should not be taken as, an acknowledgment or any form of suggestion that this prior art forms part of the common
10 general knowledge in Australia or any other country.

Cardiovascular disease such as coronary arterial disease and acute myocardial infarctions (AMI) are examples of conditions or events associated with the systemic vasculature. Cardiovascular disease itself affects over 70 million people in the Western World. AMI is
15 the largest contributor to cardiovascular disease affecting approximately 1.5 million patients per year. Patients with AMI fall into one of two categories.

A first category comprises approximately 20-30% of patients and is characterized by "silent" infarctions. Such infarctions are "silent" as patients are frequently unaware of the
20 infarction due to an absence of pain. A second category comprises the remaining two thirds of patients and represents those patients who present to physicians with severe chest pain.

The diagnosis of either category of AMI requires a series of induced tests requiring multiple independent blood-based analyses to determine potential myocardial tissue
25 damage. Typical AMI is associated with severe and prolonged chest pain, otherwise referred to as angina. Current diagnosis involves changes in electrocardiograms (ECG) usually including elevated S-T segments where there are Q or QS waves and changes in serum enzyme levels.

30 Silent ischemia and infarction are also important clinical problems. Breathlessness can be due to an infarction and there is a need to rapidly assess cardiac damage when this occurs.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 3 -

However, detection of silent infarctions can be problematic. It may be induced by exercise where ECG performance is monitored by continuous ECG monitoring over 24 hours. Depression (>1 mm) of the ST segment of an ECG is diagnostic but about one third of AMI patients have apparently normal ECGs. Alternatively, angiographic screening can be performed. The detection of small infarcts (which commonly contribute to the pool of silent infarcts) is limited by the comparatively poor sensitivity of some biochemical markers. There is an increased incidence of mortality associated with small infarcts. Determination of the MB isoform of creatine kinase (CK-MB) is a particularly useful marker of silent infarcts but is generally not correlated with a range of other markers.

10

The causes of AMI can be multiple and they are not clearly understood. A recent impetus was given to the concept that AMI is an inflammatory response by the heart to an infection that may be evident elsewhere such as a periodontal infection (Herzberg & Meyer, 1998), but which can manifest itself in the heart.

15

Atherosclerosis and vascular endothelial injury can be the result of an immunological response by the patient to proteins produced by microbiological infections. Heat shock proteins (HSPs) from microorganisms such as *Escherichia coli* and *Chlamydia* are highly conserved and result in immunological cross-reactions with related human proteins expressed by cells in the cardiovascular system such as endothelial cells (Mayr *et al.*, 1999).

As stated above, cardiovascular conditions are one example of conditions and events involving the systemic vasculature. The systemic vasculature comprises *inter alia* capillaries, veins, arteries, arterioles, venuoles, the heart and other organs. A range of conditions such as renal failure, thrombosis, organ transplant rejection, infection and vascularization of tumorous and cancerous growths are associated with the systemic vasculature.

There is a need to develop an assay which simultaneously determines multiple parameters required to assess a condition or event of the systemic vasculature. The term "multiple" in

25
30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 4 -

this context means two or more. The present inventors have developed an assay useful in determining the risk of a condition or event arising, the presence of a previous event or condition as well as post-operative prognoses and future events in a subject including a human.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 5 -

SUMMARY OF THE INVENTION

Throughout this specification, unless the context requires otherwise, the word "comprise", or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the
5 inclusion of a stated element or integer or group of elements or integers but not the exclusion of any other element or integer or group of elements or integers.

The present invention is predicated in part on the use of multiple markers or parameters to assist in the diagnosis or prognosis of a particular condition or event associated with the
10 systemic vasculature. Examples where such diagnoses or prognoses are useful is in assessing healthy and unhealthy animals including human subjects, diagnosing particular conditions or events such as a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event or renal or heart failure and in determining the risk of development of
15 such a condition or event in, for example, healthy subjects or subjects to be exposed to certain risks such as *inter alia* surgery, a course of therapy or vaccination.

Accordingly, one aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event of the systemic vasculature or assessing a
20 risk of a condition or event occurring, said method comprising obtaining a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated or up or down regulated in a subject prior to, during or following said condition or event and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second
25 set of members are binding partners to one or more of said first set of members and wherein the pattern of interaction between said first and second sets of members including the absence of interaction is indicative of said condition or event or the risk of development of same.

30 Another aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature, said method

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 6 -

comprising contacting a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following said condition or event, said members being selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), 5 aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low 10 density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular 15 adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-I 20 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners 25 thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second set of members are binding partners to one or more of said first set of members and wherein the pattern of interaction between said first and second sets of members including the absence of interaction is indicative of said condition or event or a 30 condition or event.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 7 -

A further aspect of the present invention contemplates a method of treatment, said method comprising assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature or assessing a risk of a condition or event occurring, said method comprising contacting a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following said condition or event or a condition or event otherwise associated with an aberration wherein said members are selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-T RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1A2, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with one or more antibodies or immunological equivalents thereof capable of binding to said one or more members in the biological sample and wherein the pattern of

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 8 -

interaction between said members and antibodies including the absence of interaction is indicative of said condition or event and then effecting a suitable treatment regimen.

Yet another aspect of the present invention comprises an array of binding partners for members in a biological sample from a subject said members being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a condition or event associated with the systemic vasculature wherein the binding partners are defined by (x,y) coordinates such that the array comprises n binding partners at coordinates (x₁,y₁), (x₂, y₂) ... (x_n,y_n) and wherein the pattern of interaction between the members and the binding partners is indicative of said condition or event.

Still another aspect of the present invention provides a method for estimating the size of an infarct or related condition in a subject wherein the size of the infarct (Is) is determined by the formula:-

15

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times Bw \times Kw}{Ed \times Kr}$$

wherein Is is infarct size
 20 F(t)dt is the rate of release of a member in a biological sample, said member being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a cardiovascular condition or event leading to the infarct [f(t) is also known as the member appearance function];
 Bw is the body weight of the subject;
 25 Kw is the proportion of the body weight into which the member is released;
 Ed is the rate of removal of the member from evaluation; and
 Kr is the total amount of member released divided by the amount of the member released from the infarcted tissue;

30 said method comprising contacting a biological sample from said subject wherein said

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 9 -

sample comprises members present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration with one or more binding partners of said members wherein the binding partners are immobilized to a solid support and wherein the pattern of interaction between the members and binding partners is indicative of the size of the infarct or otherwise provides data input for assessment of the size of the infarct.

Even still another aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vascularization, said method comprising screening for the presence of two or more mRNA molecules in a biological sample which mRNA molecules are translatable to members which are present, absent, elevated or otherwise activated following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration said screening comprising contacting the biological sample with an array of oligonucleotides capable of hybridizing or otherwise capturing said mRNA molecule and detecting said hybridization or capture and wherein presence or absence of said mRNA molecule is indicative of a said condition or event or a risk of development of same.

Even yet another aspect of the present invention provides a method for estimating the risk of developing a condition or event of the systemic vasculature in a subject wherein the risk is a function of the presence or absence of one or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FAEP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibrinolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c),

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 10 -

ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers,

5 leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa,

10 thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners.

Another aspect of the present invention contemplates a method of estimating the risk of

15 developing ACS including AMI or a related condition in a subject said method comprising screening for the presence of two or more mRNA molecules in a biological sample which mRNA molecules are translatable to members which are present, absent, elevated or otherwise activated following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration said screening comprising contacting

20 the biological sample with an array of oligonucleotides capable of hybridizing or otherwise capturing said mRNA molecule and detecting said hybridization or capture and wherein the presence or absence of said mRNA molecule is indicative of a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration or a risk of development of same.

25

A further aspect of the invention is directed to a data processing means for assessing a condition or event of the systemic vasculature, said data processing means executing the steps of:-

30 (1) detecting a reporter molecule as an indicator of interaction or absence of interaction with an immobilized member on a biochip array;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 11 -

- (2) analyzing the data obtained in (1) to identify members present in a biological sample;
- 5 (3) optionally quantitating the amount of members from (2); and
- (4) analyzing the data to attribute a likelihood or risk of a condition or event.

Yet another aspect of the present invention contemplates a computer program product for
10 assessing the likelihood of or risk of development of a condition or event associated with
the systemic vasculature, said product comprising:-

- (1) code that receives an input value for one or more of features wherein said features
are selected from:-
- 15
- (a) absence or presence of myoglobin;
 - (b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
 - (c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
 - (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
 - 20 (e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
 - (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
 - (g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T,
respectively) and cTn-I and cTn-I-RNA;
 - (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including
25 FABP1 and human heart-type;
 - (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
 - (j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
 - (k) cytoplasmic FABP;
 - (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
 - 30 (m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
 - (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 12 -

- lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
- (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- (p) absence or presence of serum amyloid A;
- 5 (q) absence or presence of P-selectin;
- (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- (t) absence or presence of histamine;
- (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- 10 (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;
- (y) absence or presence of fibrinolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- 15 (aa) absence or presence of ferritin;
- (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- 20 (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
- (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
- 25 (hh) absence or presence of leptin;
- (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
- (jj) absence or presence of heparin;
- (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
- 30 (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
- (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 13 -

- (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
 (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
 (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
 5 (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
 (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
 (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
 (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
 (uu) absence or presence of factor VIIa;
 10 (vv) absence or presence of thrombin;
 (ww) absence or presence of endothelin-1;
 (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
 (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
 15 (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners; and
- (2) a computer readable medium that stores the code.
- 20 Still another aspect of the invention extends to a computer system for assessing the likelihood of a subject having a condition or event associated with the systemic vascularization wherein said computer system comprises:-
- (1) a machine-readable data storage medium comprising a data storage material
 25 encoded with machine-readable data, wherein said machine-readable data comprise values for one or more features, wherein said features are selected from:-
- (a) absence or presence of myoglobin;
 (b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
 30 (c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
 (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 14 -

- (e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
- (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
- (g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I-RNA;
- 5 (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;
- (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
- (j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
- (k) cytoplasmic FABP;
- 10 (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
- (m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
- (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
- 15 (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- (p) absence or presence of serum amyloid A;
- (q) absence or presence of P-selectin;
- (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- 20 (t) absence or presence of histamine;
- (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;
- 25 (y) absence or presence of fibrinolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- 30 (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 15 -

- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
 - (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
 - 5 (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
 - (hh) absence or presence of leptin;
 - (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
 - (jj) absence or presence of heparin;
 - 10 (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
 - (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
 - (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
 - (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
 - (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
 - 15 (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
 - (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
 - (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
 - (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
 - 20 (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
 - (uu) absence or presence of factor VIIa;
 - (vv) absence or presence of thrombin;
 - (ww) absence or presence of endothelin-1;
 - (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
 - 25 (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
 - (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners;
- 30 (2) a working memory for storing instructions for processing said machine-readable data;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 16 -

- (3) a central-processing unit coupled to said working memory and to said machine-readable data storage medium, for processing said machine readable data to provide a sum of said values corresponding to a predictive value for said candidate sequences; and
- 5
- (4) an output hardware coupled to said central processing unit for receiving said predictive value.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 17 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1a is a diagrammatic representation showing the detection of a cardiac marker (CM) which has interacted with a binding partner (BP) immobilized to a solid support (SS). A reporter molecule (RM) is attached to the CM and the RM provides an identifiable signal (IS).

Figures 1b to 1e are diagrammatic representations showing various detection of interaction protocols between an immobilized member (an antibody; Ab) and its binding partner (cardiac marker; CM). In one aspect, (Figure 1b) biotin (—•) is used to label CM. A fusion protein consisting of streptavidin (SA) and alkaline phosphatase (AP) is used to attach to the biotin portion of the biotin-labeled CM. The AP converts a substrate (S) to a detectable product (P). The Ab, is immobilized to a solid substrate. In Figure 1c, the captured CM is detected by a fluorescent (F) AP/HRP or radioactively (Rad) labeled anti-CM antibody. In Figure 1d, soluble anti-CM antibody is used to bind to the immobilized CM and then itself detected by an anti-immunoglobulin antibody labeled with a fluorescent tag or other RMs. In Figure 1e, the CM is labeled with a fluorescent member or other RM.

Figure 2 is a graphical representation showing the time-courses for release of cardiac markers into the blood following onset of chest pain.

Figure 3 is a diagrammatic representation of a system used to carry out the instructions to diagnose a particular condition or event of the systemic vasculature wherein the instructions are encoded by the storage medium.

Figure 4 is a diagrammatic representation of a cross-section of a magnetic storage medium to diagnose a particular condition or event of the systemic vasculature.

Figure 5 is a diagrammatic representation of a cross-section of an optically readable data storage system to diagnose a particular condition or event of the systemic vasculature.

- 18 -

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is predicated in part on the development of an assay device which is capable of assessing two or more parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature. The detection of parameters permits both predictive and diagnostic analyses to be undertaken. The term "predictive" in this context includes determining the risk factor for a healthy or unhealthy subject including a human of development of a condition or experiencing an event.

10 Accordingly, one aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event of the systemic vasculature or assessing a risk of a condition or event occurring, said method comprising obtaining a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated or up or down
15 regulated in a subject prior to, during or following said condition or event and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second set of members are binding partners to one or more of said first set of members and wherein the pattern of interaction between said first and second sets of members including the absence of interaction is indicative of said condition or event or the risk of
20 development of same.

A condition or event associated with the systemic vasculature includes a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event, organ failure including liver, kidney or
25 heart failure, tissue rejection such as organ transplant rejection, a thrombotic event including deep vein thrombosis, an infection, damage to vessels of the circulatory system, stent failure or trauma caused by a stent, pace-maker or other prosthetic device, vascularization of a tumor, events or conditions following surgery such as a hip replacement or knee reconstruction, trauma or age-related disease and endothelial damage.

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 19 -

Reference herein to a "cardiovascular condition or event" includes heart diseases, heart attack, heart disorders and infections in the heart as well as heart failure. In a particularly preferred embodiment, the cardiovascular condition or event is acute coronary syndrome (ACS) or a related disorder such as but not limited to coronary arterial disease and reperfusion following therapeutic intervention such as balloon angioplasty or thrombolytic therapy. The term "ACS" includes acute myocardial infarction (AMI). A cardiovascular condition or event includes congestive heart failure which occurs when the heart is unable to produce sufficient output to meet the needs of the body's metabolism. There are four categories of such failure:-

10

Class I: patients with coronary artery disease (CAD) and other disorders where ordinary physical activity does not cause fatigue, palpitations, shortness of breath or anginal (heart) pain;

15

Class II: as in Class I but where patients are comfortable at rest but where there is slight limitation resulting from exercise;

Class III: as in Class II but where there is now a marked limitation to physical activity; and

20

Class IV: as in Class III but where any physical activity causes angina and discomfort.

All such conditions and events are encompassed by the term "cardiovascular condition or event" and are also encompassed by a condition or event associated with the systemic vasculature. A cardiovascular condition or event includes cardiovascular aberration such as caused by infections by microorganisms and viruses. Examples of microbial infections include those caused by or associated with infections by *Chlamydia pneumoniae* (lungs), *Porphyromonas gingivalis* (mouth), *Streptococcus sanguis* or *Helicobacter pylori* (gut). Examples of viral infections include those caused by or associated with Cytomegalovirus or Coxsackie virus.

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 20 -

The term "biological sample" is used in its broadest sense and includes blood, serum, saliva, tissue fluid, synovial fluid, lymph, tissue or tissue extract, heart tissue, mucus, cerebrospinal fluid, urine, semen, fecal sample or any other sample derived from the subject and which might contain one or more members which are present, absent, elevated
5 or otherwise activated in a subject following a condition or event associated with the systemic vasculature. A biological sample may also contain infectious agents or products therefrom. A biological sample may be obtained at any time including when a subject or patient is away from a point of medical care, when attended to by emergency care operators, during triage and during surgery or other interventionist procedure amongst
10 other times. A "biological sample" may also include a supply of blood, blood products or tissue such as at a blood bank or organ bank.

Reference to a "subject" or "patient" includes a human, primate, livestock animal (e.g. sheep, horses, pigs, cows, donkeys), laboratory test animal (e.g. mice, rats, rabbits, guinea
15 pigs) and companion animals (e.g. dogs, cats). The present invention has, therefore, application in the human, medical, veterinary and livestock industries.

The "members" in the biological sample include enzymes (such as isoenzymes), peptides, polypeptides, proteins, antibodies, lipids and complexes containing lipids including
20 lipoproteins and/or carbohydrates and complexes containing carbohydrates as well as nucleic acid molecules including RNA or DNA or fragments thereof and complexes containing nucleic acid molecules. A "member" is also referred to herein as a "marker". The members may also be microorganisms or viruses or parts thereof or products therefrom. A "part" of a microorganism or virus includes cell wall, cell wall fragments or
25 components, cell membrane, flagella, carbohydrate complexes and antigens. A "product" includes metabolic by-products and cytoplasmic and membrane associated components. The RNA or DNA may arise from cell necrosis or changes in levels of mRNA may be detected when expression of DNA is increased or decreased.

30 Members in the biological sample preferably have a significant or substantial presence or absence in heart tissue or in the tissue of other organs or have a significant distribution in

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 21 -

other tissues and provide the earliest possible indication of myocardial injury; provide a medium term indication of an event or condition associated with the systemic vasculature such as a cardiovascular condition or event (e.g. myocardial injury).

- 5 An assay of the members should, therefore, provide an indication of the existence and/or seriousness of a condition or event or provide an indication of a silent condition or event. For example, the assay of the present invention permits the determination of the existence and size of an infarct or a silent ischemia or an unstable angina.
- 10 Preferably, the assay should be capable of operating at the point of care although, as stated above, the assay may be performed or samples collected at a number of different locations.

Particularly preferred members in the biological sample include myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibrinolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 22 -

constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners.

5

Reference to detecting *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* includes in a preferred embodiment, detecting antigens or other cell-specific molecules from the organisms.

10 Although the above members are in the biological sample, they may also be included as part of the second set of members. In such a case, their binding partners are sought in a biological sample. In essence, one or more members in one set will have a binding partner in the other set of members.

15 The above-mentioned members may be either in the first set or in the second set. The second set of members is generally immobilized to a support such as but not limited to a solid support.

The solid support is typically glass or a polymer, such as but not limited to cellulose, ceramic material, nitrocellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene and its derivatives, 20 polyvinylidene difluoride (PVDF), methacrylate and its derivatives, polyvinyl chloride or polypropylene. Nitrocellulose is particularly useful and preferred in accordance with the present invention. A solid support may also be a hybrid such as a nitrocellulose film supported on a glass or polymer matrix. Reference to a "hybrid" includes reference to a 25 layered arrangement of two or more glass or polymer surfaces listed above. The solid support may be in the form of a membrane or tubes, beads, discs or microplates, or any other surface suitable for conducting an assay. Binding processes to immobilize the molecules are well-known in the art and generally consist of covalently binding (e.g. cross linking) or physically adsorbing the molecules to the solid substrate. Generally, solid 30 supports are contacted with a blocking agent such as but not limited to skim milk, bovine

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 23 -

serum albumin, human serum albumin, Irish moss extract or other sources of carrageenan or gelatin.

The expression "pattern of interaction" is used in its broadest context to include: the presence or absence of interaction relative to background interaction; the relative density of interaction such as the relative density of members bound to a binding partner on the solid support relative to background; the presence or absence of internal molecules in cells lysed on a discrete spot on the support; the relative number of members in a biological sample and/or; the differential expression of particular members. Any or all of the above criteria may be used to assess the interaction between an immobilized molecule and its binding partner. The pattern of expression or interaction may also be subject to quantitation. Reference to "presence" and "absence" includes substantial "presence" or "absence" as well as relative "presence" or "absence" compared to each other or any other marker.

Reference to "assessing the parameters" includes the determination of members within the biological sample which in turn is indicative of the presence of a cardiovascular condition or event associated with a systemic vasculature. The assessment becomes part of a risk analysis for the condition or event.

Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature, said method comprising contacting a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following said condition or event, said members being selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP),

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 24 -

adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second set of members are binding partners to one or more of said first set of members and wherein the pattern of interaction between said first and second sets of members including the absence of interaction is indicative of said condition or event or a condition or event.

In a particularly preferred embodiment, the second set of members immobilized to a solid support comprises antibodies which are potentially specific or generic for respective binding members in the biological sample. The latter includes immunointeractive molecules such as but not limited to analogues or antigenic fragments thereof or epitope containing fragments thereof.

In accordance with the present invention, the inventors have determined that the simultaneous identification of a range of markers associated with a cardiovascular condition or event associated with the systemic vasculature provides a more efficacious

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 25 -

means of detecting the condition or event, estimating the time and size of the event when such an event is, for example, an infarction, detecting reperfusion and following interventional treatment such as balloon angioplasty or thrombolytic therapy as well as determining the risk factors associated with the conditions or events. The determination of
5 more than one parameter simultaneously as opposed to singularly reduces the time of diagnosis and/or risk of misdiagnosis (e.g. improves the certainty of a particular diagnosis) and enables the more rapid implementation of a treatment protocol including administration of drugs, such as heart anti-clotting drugs (e.g. tissue plasminogen activator (tPA) or streptokinase) as well as surgical intervention or discharge from accident and
10 emergency wards, centres or scenes including triage.

Accordingly, yet another aspect of the present invention contemplates a method of treatment, said method comprising assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature or assessing a risk of a condition or event
15 occurring, said method comprising contacting a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following said condition or event or a condition or event otherwise associated with an aberration wherein said members are selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain
20 (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low
25 density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular
30 adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp.,

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 26 -

Porphyromonas gingivalis, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endochein-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with one or more antibodies or immunological equivalents thereof capable of binding to said one or more members in the biological sample and wherein the pattern of interaction between said members and antibodies including the absence of interaction is indicative of said condition or event and then effecting a suitable treatment regimen.

15

The present invention is particularly useful as a complement to treatments such as infusion of tPA (i.e. thrombolytic therapy), balloon angioplasty, stent insertion and/or coronary artery graft surgery(CAGS). The present invention is, therefore, an important adjunct to clinical practice.

20

Events and conditions associated with the systemic vasculature include *inter alia* a cardiovascular condition or event, trauma including following surgery, organ failure including heart, liver or kidney failure, stroke, thrombotic events including deep vein thrombosis, a pulmonary condition, a thrombotic event and vascularization of tumor or cancer tissue. The assay may be practiced to determine the risk of an otherwise healthy subject of developing a condition or event or an unhealthy person who is exposed to risk such as surgery or administration of drugs. Particularly important conditions and events contemplated by the present invention are cardiovascular conditions, pulmonary conditions and thrombotic events and risk assessments of developing same.

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 27 -

Particular markers may also be used for certain conditions. For example, stroke or brain injury or trauma markers include interleukins (e.g. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17) and TGF β ; neurological markers including amyloid β -1-42, amyloid β -1-40, tau, apoE, apoE4, S-100B, neuron-specific enolase and ubiquitin as well as or an alternative to the other 5 markers listed above. Kidney trauma or disease may be identified by markers such as urinary glutathione S-transferase (GST), α -GST, creatine, melanin A, prostate specific antigen, citrate, acetate and erythropoietin. Other specific markers may also be employed, for example, lung or other pulmonary conditions.

10 The method of the present invention is conveniently practised using an array of immobilized binding partners to members in the biological sample. The term "array" is not to imply any limitation as to shape or order or pattern of the binding partners of the array and the binding partners may be arranged in a defined pattern or may be randomly or semi-randomly arranged. Generally, the array comprises two or more binding partners but more 15 preferably comprises from about 2 to about 10,000, more preferably from about 10 to about 5000 and even more preferably from about 20 to about 1000. Preferably, the spots of the array are arranged in a sequence such as a rectangular, triangular or spherical matrix where the position of an immunoglobulin region is defined by coordinates based on, for example, row and column. The array of immunoglobulins may cover any convenient 20 region such as from about 0.1 mm² to about 100 mm², preferably about 0.5 mm² to about 15 mm². Generally, each region or spot is made up of immunoglobulin(s) having a single distinct specificity. Specificity in this context is with respect to different antigens or different regions of the one antigen. The preferred number of immunoglobulin spots is from about 7 to about 1000 and more preferably from about 10 to about 1000. Most 25 preferably, the immunoglobulins are arranged in multiples such as duplicates, triplicates or greater. Preferably, the array comprises the binding partners defined by partner (x,y) coordinates such that each binding partner is defined by coordinates (x₁,y₁) ... (x_n,y_n) wherein n is the number of binding partners for members in a biological sample. A pattern of interaction is obtained using two or more interactions.

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 28 -

Accordingly, another aspect of the present invention comprises an array of binding partners for members in a biological sample from a subject said members being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a condition or event associated with the systemic vasculature wherein the binding partners are defined by (x,y) coordinates such that the array comprises n binding partners at coordinates (x,y), (x₂, y₂) ... (x_n, y_n) and wherein the pattern of interaction between the members and the binding partners is indicative of said condition or event. The subscripts "1", "2" and "n" in the above coordinates are not to imply that the x and y coordinate values are the same.

10 In one useful embodiment, the instant invention detects myocardial tissue damage such as occurs in ACS including AMI. The present invention is also useful for determining the infarct size. Knowledge of the existence of real cardiac damage facilitates early and rapid therapeutic intervention.

15 Accordingly, another aspect of the present invention provides a method for estimating the size of an infarct or related condition in a subject wherein the size of the infarct (Is) is determined by the formula:-

$$Is = \frac{\int_0^t f(t) dt \times Bw \times Kw}{Ed \times Kr}$$

20

wherein Is is infarct size

F(t)dt is the rate of release of a member in a biological sample, said member being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a cardiovascular condition or event leading to the infarct [f(t) is also known as the member appearance function];

25

Bw is the body weight of the subject;

Kw is the proportion of the body weight into which the member is released;

Ed is the rate of removal of the member from evaluation; and

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 29 -

Kr is the total amount of member released divided by the amount of the member released from the infarcted tissue.

said method comprising contacting a biological sample from said subject wherein said
 5 sample comprises members present, absent, elevated or otherwise activated in a subject
 following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated
 with a cardiovascular aberration with one or more binding partners of said members
 wherein the binding partners are immobilized to a solid support and wherein the pattern of
 interaction between the members and binding partners is indicative of the size of the
 10 infarct or otherwise provides data input for assessment of the size of the infarct.

The above equation may be simplified by combining constants to form Kd and defining
 f(t) as $\frac{dB}{dt} + KdE$. Accordingly, the equation becomes $Kd \int_0^t E(t)dt + E(T)$ where E(T) is
 the activity or level of the member when the results of the parameters have been referred to
 15 base line conditions.

Preferably, the members in the biological sample comprise one or more of myoglobin,
 myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK)
 including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST),
 20 cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty
 acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen
 phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain
 natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very
 low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density
 25 lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins,
 platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF
 receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibrinolytic peptides, modified haemoglobin
 (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble
 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE,
 30 homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter*

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 30 -

pylori and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners.

Even one time point is useful to detect the presence of myocardial damage where multiple cardiac markers are quantitated and the ratios of their plasma levels are calculated. However, multiple (e.g. two or more) time points are preferred. Multiple time points taken over seconds, minutes, hours, days, weeks and months might provide further information, for example, the time of onset, extent of damage and/or the efficacy of therapeutic measures. Preferably, from about two to about ten time points are selected. The assay is useful for determining the relative amounts or quantitative amounts or qualitative amounts of preferably two or more members over time. A series of curves are produced and the area under the curve is substantially proportional to the infarct size. An extrapolation back to time zero permits determination of the approximate time of the infarct.

Similar issues arise in the detection of other conditions or events associated with the systemic vasculature including thrombosis including deep vein thrombosis, endothelial damage, vascularization of *de novo* tumor or cancer tissue, pulmonary conditions and conditions of the arteries or veins.

As indicated above, the assay of the present invention may be conducted by analyzing nucleic acid molecules in the biological sample. In one aspect, total nucleic acids (e.g. including mRNA, RNA and DNA) are detected in the serum or other tissue fluid resulting from cell necrosis. In another aspect, mRNA levels are detected following increased or

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 31 -

decreased levels of expression of gene sequences. "Expression" in this context includes transcription and/or translation of nucleotide sequences to produce mRNA and amino acid sequences respectively. In any event, levels of nucleic acid molecules may be altered following a cardiovascular condition or event.

5

Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method of assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature, said method comprising screening for the presence of two or more mRNA molecules in a biological sample which mRNA molecules are translatable to members
10 which are present, absent, elevated or otherwise activated following said condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration said screening comprising contacting the biological sample with an array of oligonucleotides capable of hybridizing or otherwise capturing said mRNA or a cDNA corresponding to said mRNA molecule and detecting said hybridization or capture and wherein the presence
15 or absence of said mRNA or cDNA molecule is indicative of a said condition or event or a risk of development of same.

Preferably, mRNA molecules are first subjected to reverse transcriptase to form complementary (or copy) DNA (cDNA). Reverse transcription polymerase chain reactions
20 (RT-PCR) are particularly useful and are contemplated by the instant invention.

Real-time PCR is also useful to study the changing levels of expression of genetic sequences over time. Real-time PCR using the TaqMan (registered trade mark) system developed by PE Biosystems (Foster City, CA, USA) allows rapid detection and
25 quantitation of DNA without the need for labour intensive post-PCR processing such as gel electrophoresis and radioactive hybridization (Heid *et al.*, 1996). In addition, the built-in 96-well format greatly increases the number of samples which can be simultaneously analyzed. The method uses the 5' exonuclease activity of a *Taq* polymerase (AmpliQ Gold, PE Biosystems, Foster City, CA, USA) during primer extension to cleave a dual-
30 labelled, fluorogenic probe hybridized to the target DNA between the PCR primers. Prior to cleavage, a reporter dye, such as 6-carboxyfluorescein (6-FAM) at the 5' end of the

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 32 -

probe is quenched by 6-carboxy-tetraethylrhodamine (TAMRA) through fluorescent resonance energy transfer. Following digestion, FAM is released. The resulting fluorescence is continuously measured in real-time at 518 nm during the log phase of product accumulation and is proportional to the number of copies of the target sequence.

5

The detection of interaction between members and binding partners is conveniently accomplished using a reporter molecule. For example, the assay device may comprise an array of immunoglobulins. The immobilized array of immunoglobulins is then contacted by a biological sample. The contact is for a time and under conditions sufficient for antigens to be captured by the immobilized immunoglobulin. The captured antigens may then be detected by any convenient means such as biochemically, histochemically, immunologically or microscopically. Immunologic detection is particularly convenient. For example, a second immunoglobulin specific for a captured antigen, labelled with a reporter molecule, may be added. The identification of the reporter molecule indicates that the antigen is captured. Alternatively, after the second immunoglobulin is added and it forms a complex with the captured antigen, an anti-immunoglobulin labelled with a reporter molecule is added and the presence of a signal from the reporter molecule determined. A generalized method is shown in Figure 1a. More specific and preferred methods are shown in Figures 1b-1e.

20

By "reporter molecule", as used in the present specification, is meant a molecule which, by its chemical nature, provides an analytically identifiable signal which allows the detection of immunoglobulin bound antigen. Detection may be either qualitative or quantitative. The most commonly used reporter molecules in this type of assay include enzymes such as enzymes combined with light emitting molecules, fluorophores or radionuclide containing molecules (i.e. radioisotopes). In the case of an enzyme immunoassay, an enzyme is conjugated to the second or third immunoglobulin, generally by means of bifunctional cross-linking using, for example, agents such as glutaraldehyde, succinimide derivatives and the like. As will be readily recognized, however, a wide variety of different conjugation techniques exist which are readily available to one skilled in the art. Commonly used enzymes include horseradish peroxidase, glucose oxidase, β -galactosidase

25

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 33 -

and alkaline phosphatase, amongst others. The substrates to be used with specific enzymes are generally chosen for the production, upon hydrolysis by the corresponding enzyme, of a detectable colour change. It is also possible to employ fluorogenic substrates which yield a fluorescent product or other photonic signal such as a flash of light.

5

Alternatively, fluorescent compounds, such as fluorescein and rhodamine, may be chemically coupled to immunoglobulins without altering their binding capacity. When activated by illumination with light of a particular wavelength, the fluorochrome-labelled immunoglobulin adsorbs the light energy, inducing a state of excitability in the molecule, followed by emission of the light at a characteristic colour visually detectable microscopically or using other imaging devices such as a confocal microscope or 2 dimensional laser scanner (e.g. FluorImager or Typhoon, Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, USA).

10

15 In one particularly useful method, an immobilized immunoglobulin captures a member. A second antibody directed to a different or overlapping epitope is then immunointeracted to form an antibody-member-antibody complex. The second antibody is linked to, for example, streptavidin and alkaline phosphatase which permits production of an identifiable signal.

20

The assay device and the methods for conducting the assays of the present invention are readily adapted for automation. For example, robotic systems may be used to deliver appropriate amounts including nanolitre or picolitre volumes of immunoglobulins to a solid support such as a nitrocellulose film or microtitre plate. After appropriate treatment, 25 the immobilized immunoglobulins may then be used in any assay. Again, this may be automated or conducted using robotics.

The present invention further contemplates the use of a binding partner array as herein described in the manufacture of an assay device for the detection of a cardiovascular 30 condition or event or a condition associated with systemic vasculature.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 34 -

The array of the present invention may also be adapted for use on a microchip. Microchip technology permits the generation of thousands of binding partners for a range of conditions and further permits automation and/or computer analysis. A "microchip" includes a matrix support comprising an array of adapter molecules, ligands or potential
5 binding partners.

The matrix support may also be referred to as a biochip. Reference to a "biochip" also includes a "gene chip". A gene chip includes any array of two or more oligonucleotides or polynucleotides immobilized to a solid support. The oligonucleotide or polynucleotide
10 corresponds to a gene or mRNA sequence encoding a particular cardiac marker. Real-time PCR is one mechanism to screen for the rise and/or fall of markers. RT-PCR may also be used to detect the presence or absence of target nucleotide sequences by reading mRNA sequences back to corresponding cDNA sequences. Real-time PCR and in particular real-time-RT-PCR are particularly useful in determining changing patterns of expression of the
15 markers.

The present invention further contemplates a data processing means to analyze and/or screen interaction between members and their binding partners. The data processing means preferably comprises a suitably programmed computer and the steps of the method are
20 preferably performed using the suitably programmed computer. In various forms of the invention, the input information may take the form of values, identifiers or other data in respect of the identity of the interacting partners or the absence of interaction. The input data may be digitized. Alternatively, for implementation of the invention, a dedicated Fast Fourier transform chip can be employed as at least part of the processing means.
25

In a preferred form of the invention, representation measurements are made identifying or valuing the presence of an interaction between a member and a binding partner.

Accordingly, another aspect of the invention is directed to a data processing means for
30 assessing a condition or event of the systemic vasculature, said data processing means executing the steps of:-

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 35 -

- (1) detecting a reporter molecule as an indicator of interaction or absence of interaction with an immobilized member on a biochip array;
- 5 (2) analyzing the data obtained in (1) to identify members present in a biological sample;
- (3) optionally quantitating the amount of members from (2); and
- 10 (4) analyzing the data to attribute a likelihood or risk of a condition or event.

In a particularly useful embodiment, the instant invention provides an indication of the likelihood of developing ACS such as AMI.

- 15 Accordingly, another useful aspect of the present invention provides a method for estimating the risk of developing a condition or event of the systemic vasculature in a subject wherein the risk is a function of the presence or absence of one or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-LH4), aspartate aminotransferase
- 20 (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density
- 25 lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibrinolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE,
- 30 homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 36 -

platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type 5 receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners.

10 In a particularly useful embodiment, the present invention contemplates a method of estimating the risk of developing ACS including AMI or a related condition in a subject said method comprising screening for the presence of two or more mRNA molecules in a biological sample which mRNA molecules are translatable to members which are present, absent, elevated or otherwise activated following a cardiovascular condition or event or a
15 condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration said screening comprising contacting the biological sample with an array of oligonucleotides capable of hybridizing or otherwise capturing said mRNA or its corresponding cDNA molecule and detecting said hybridization or capture and wherein the presence or absence of said mRNA or cDNA molecule is indicative of a cardiovascular condition or event or a condition or
20 event otherwise associated with a cardiovascular aberration or a risk of development of same.

The determination of risk of cardiac aberration or other condition or event associated with the systemic vasculature has commercial benefits when an absence of risk is identified. For
25 example, a hospital or emergency bed or emergency vehicle may not need to be employed. It is also useful to examine the general state of health or otherwise of a subject. Computer screening is particularly useful in determining risk analysis.

Thus, in another aspect, the invention contemplates a computer program product for
30 assessing the likelihood of or risk of development of a condition or event associated with the systemic vasculature, said product comprising:-

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 37 -

- (3) code that receives an input value for one or more of features wherein said features are selected from:-
- 5 (a) absence or presence of myoglobin;
(b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
(c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
(d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
(e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
10 (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
(g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA;
(h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;
15 (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
(j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
(k) cytoplasmic FABP;
(l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
(m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
20 (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
(o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
(p) absence or presence of serum amyloid A;
25 (q) absence or presence of P-selectin;
(r) absence or presence of prostaglandins;
(s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
(t) absence or presence of histamine;
(u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
30 (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
(w) absence or presence of fibrin;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 38 -

- (x) absence or presence of fibrinogen;
- (y) absence or presence of fibronolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- 5 (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- 10 (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
- (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
- (hh) absence or presence of leptin;
- 15 (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
- (jj) absence or presence of heparin;
- (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
- (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
- 20 (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
- (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
- (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
- (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
- 25 (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
- (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
- (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
- (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
- (uu) absence or presence of factor VIIa;
- 30 (vv) absence or presence of thrombin;
- (ww) absence or presence of endothelin-1;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 39 -

- (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
(yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
(zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners; and

- 5 (4) a computer readable medium that stores the code.

Yet another aspect of the invention extends to a computer system for assessing the likelihood of a subject having a condition or event associated with the systemic vasculature wherein said computer system comprises:-

- 10 (1) a machine-readable data storage medium comprising a data storage material encoded with machine-readable data, wherein said machine-readable data comprise values for one or more features, wherein said features are selected from:-

- (a) absence or presence of myoglobin;
(b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
(c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
20 (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
(e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
(f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
(g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA;
25 (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;
(i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
(j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
(k) cytoplasmic FABP;
30 (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
(m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 40 -

- (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
- (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- 5 (p) absence or presence of serum amyloid A;
- (q) absence or presence of P-selectin;
- (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- (t) absence or presence of histamine;
- 10 (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;
- (y) absence or presence of fibronolytic peptides;
- 15 (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- 20 (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
- 25 (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
- (hh) absence or presence of leptin;
- (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
- (jj) absence or presence of heparin;
- 30 (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
- (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 41 -

- (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
- (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
- (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
- 5 (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
- (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
- (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
- (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
- (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
- 10 (uu) absence or presence of factor VIIa;
- (vv) absence or presence of thrombin;
- (ww) absence or presence of endothelin-1;
- (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
- (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
- 15 (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners;
- (2) a working memory for storing instructions for processing said machine-readable data;
- 20
- (3) a central-processing unit coupled to said working memory and to said machine-readable data storage medium, for processing said machine readable data to provide a sum of said values corresponding to a predictive value for said candidate sequences; and
- 25
- (4) an output hardware coupled to said central processing unit for receiving said predictive value.
- 30 A version of these embodiments is presented in Figure 3, which shows a system 10 including a computer 11 comprising a central processing unit ("CPU") 20, a working

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 42 -

memory 22 which may be, e.g. RAM (random-access memory) or "core" memory, mass storage memory 24 (such as one or more disk drives or CD-ROM drives), one or more cathode-ray tube ("CRT") display terminals 26, one or more keyboards 28, one or more input lines 30, and one or more output lines 40, all of which are interconnected by a conventional bidirectional system bus 50.

Input hardware 36, coupled to computer 11 by input lines 30, may be implemented in a variety of ways. For example, machine-readable data of this invention may be inputted via the use of a modem or modems 32 connected by a telephone line or dedicated data line 34. Alternatively or additionally, the input hardware 36 may comprise a CD. Alternatively, ROM drives or disk drives 24 in conjunction with display terminal 26, keyboard 28 may also be used as an input device.

Output hardware 46, coupled to computer 11 by output lines 40, may similarly be implemented by conventional devices. By way of example, output hardware 46 may include CRT display terminal 26 for displaying a synthetic polynucleotide sequence or a synthetic polypeptide sequence as described herein. Output hardware might also include a printer 42, so that hard copy output may be produced, or a disk drive 24, to store system output for later use.

In operation, CPU 20 coordinates the use of the various input and output devices 36, 46 coordinates data accesses from mass storage 24 and accesses to and from working memory 22, and determines the sequence of data processing steps. A number of programs may be used to process the machine readable data of this invention. Exemplary programs may use for example the following steps:-

(1) inputting values for at least one feature associated with an expression of a target gene, wherein said features are selected from:-

- (a) absence or presence of myoglobin;
- (b) absence or presence of myosin light chain (MLC);

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 43 -

- (c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
- (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
- (e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
- (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
- 5 (g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA;
- (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;
- (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
- 10 (j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
- (k) cytoplasmic FABP;
- (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
- (m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
- (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density
15 lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate
density lipoprotein (IDL);
- (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- (p) absence or presence of serum amyloid A;
- (q) absence or presence of P-selectin;
- 20 (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- (t) absence or presence of histamine;
- (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- 25 (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;
- (y) absence or presence of fibronolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- 30 (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)
including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 44 -

- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- 5 (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*,
Helicobacter pylori and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
- (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
- (hh) absence or presence of leptin;
- (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous
10 kinins;
- (jj) absence or presence of heparin;
- (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
- (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
- (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
- 15 (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
- (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
- (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1
(VCAM1);
- (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
- 20 (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
- (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
- (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
- (uu) absence or presence of factor VIIa;
- (vv) absence or presence of thrombin;
- 25 (ww) absence or presence of endothelin-1;
- (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
- (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
- (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic
30 acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 45 -

- (2) adding the values for said features to provide a predictive value for said sequence;
and
- (3) outputting said predictive value.

5

Figure 4 shows a cross section of a magnetic data storage medium 100 which can be encoded with machine readable data, or a set of instructions, for designing a synthetic molecule of the invention, which can be carried out by a system such as system 10 of Figure 5. Medium 100 can be a conventional floppy diskette or hard disk, having a suitable substrate 101, which may be conventional, and a suitable coating 102, which may be conventional, on one or both sides, containing magnetic domains (not visible) whose polarity or orientation can be altered magnetically. Medium 100 may also have an opening (not shown) for receiving the spindle of a disk drive or other data storage device 24. The magnetic domains of coating 102 of medium 100 are polarized or oriented so as to encode
15 in manner which may be conventional, machine readable data such as that described herein, for execution by a system such as system 10 of Figure 3.

Figure 4 shows a cross section of an optically readable data storage medium 110 which also can be encoded with such machine-readable data, or set of instructions, for screening a
20 candidate molecule of the present invention, which can be carried out by a system such as system 10 of Figure 3. Medium 110 can be a conventional compact disk with read only memory (CD-ROM) or a rewritable medium such as a magneto-optical disk, which is optically readable and magneto-optically writable. Medium 100 preferably has a suitable substrate 111, which may be conventional, and a suitable coating 112, which may be
25 conventional, usually of one side of substrate 111.

In the case of a CD-ROM, as is well known, coating 112 is reflective and is impressed with a plurality of pits 113 to encode the machine-readable data. The arrangement of pits is read by reflecting laser light off the surface of coating 112. A protective coating 114, which
30 preferably is substantially transparent, is provided on top of coating 112.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 46 -

In the case of a magneto-optical disk, as is well known, coating 112 has no pits 113, but has a plurality of magnetic domains whose polarity or orientation can be changed magnetically when heated above a certain temperature, as by a laser (not shown). The orientation of the domains can be read by measuring the polarisation of laser light reflected
5 from coating 112. The arrangement of the domains encodes the data as described above.

The present system retrieves features and forms composite features from them. More than one feature can be combined in a variety of different ways to form these composite features. In particular, the composite feature can be any function or combination of a
10 simple feature and other composite features. The function can be algebraic, logical, sinusoidal, logarithmic, linear, hyperbolic, statistical and the like. Alternatively, more than one feature can be obtained in a functional manner (e.g. arithmetic, algebraic). By way of example, a composite feature may equal the sum of two or more features or a composite feature may correspond to a sub-fraction of overlap of one or more features from another
15 feature. Alternatively, a composite feature may equal a constant times one or more features. Of course, there are many other ways composite features can be defined.

The present invention is further described by the following non-limiting Examples.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 47 -

EXAMPLE 1***Early Biochemical Markers of a cardiac condition or event****Myoglobin, CK-MB, Cardiac Troponin-T and Cardiac Troponin-I*

5

The prime requisite for an early marker is that the development of the test should be readily performed in a short time period and that the marker be released soon after the ACS including AML. Ideally, an early diagnostic for ACS including AMI is a Point-of-Care device, namely a small, preferably hand-held device which is used when a potential

10 ACS including AMI patient first presents at a clinic including a hospital or general physician's practice.

Of the early markers, each of myoglobin, total creatine kinase (CK) including creatine kinase MB isoform (CK-MB), cardiac troponin-T (cTn-T) and cardiac troponin-I (cTn-I),

15 has slightly different characteristics based on:-

- (1) whether it is specific to cardiac tissue;
- (2) time to reach peak serum levels;
- (3) the period during which peak level is maintained;
- 20 (4) clinical sensitivity; and
- (5) clinical specificity (Dean, 1998).

Figure 2 shows multiple time courses of the appearance of cardiac markers.

25 Myoglobin is not cardiac-specific but is the first to reach a peak (Figure 2). It is usually assayed by an immunoassay. Myoglobin assays are conveniently determined using either monoclonal or polyclonal antibodies or combinations of these. Serum levels peak at 4-5 hours from the onset of chest pain but the peak is transient and may fall to non-diagnostic levels after 10-12 hours. CK-MB is a reliable marker of ACS including AMI. It rises to

30 peak levels at about 12 hours and falls rapidly to non-diagnostic levels at 20-24 hours after the onset of chest pain.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 48 -

Both cTn-I and cTn-T are cardiac specific. cTn-I has an advantage since cTn-T may be expressed by skeletal muscle following experimental injury and has been detected in regenerating skeletal muscle in man (Bordet *et al.*, 1997). cTn-T is, however, clinically quite sensitive and is capable of detecting 64% of true AMI patients. When the infarct is small, the cTn-T test can result in a significant number of false negative results. cTn-T has, however, an advantage of rising to significantly elevated levels at 5-11 hours from the onset of chest pain. It remains elevated and fairly constant for 5-8 days.

10 Chest pain is the commonest cause of presentations to Emergency Departments, but for 75% of patients with chest pain, the pain is non-cardiac in origin. Thus, it is also important to have a negative predictive value in tests for ACS to allow for safe early discharge or a safe decision not to admit a patient to hospital.

15 Most of the available early markers are interrelated. Thus, the difficulties faced by obtaining false-positives are largely overcome by correlating a test (e.g. CK-MB antibody test) with other tests such as the myoglobin test. At present, this is both inconvenient and expensive, especially where short turn-around times are required and specialist staff are needed to operate the diagnostic instruments in hospital biochemistry departments. They include CK-MB, cTn-T and cTn-I. The ability to test a number of early markers using the microarray method of the present invention is an advantage because the reliability is significantly increased.

Medium-term and long-term biochemical markers

25 These markers peak at day 1.5-3 or later. They include total creatine kinase (CK), cardiac troponin I (cTn-I), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), myosin light chain (MLC) and myosin heavy chain (MHC), fatty acid binding (FAB) protein and ABC. Like the early markers, the late markers can be used to estimate the size of the infarct. Multiple medium/long term markers are valuable for patients who present late and so cannot be tested for short-term markers.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 49 -

Other serum markers are available such as fatty acid binding protein which appears to be a valuable early (<10 h) marker of AML.

5

EXAMPLE 2*Evaluation of the Efficiency of the Diagnostic Performance of the Device*

The efficiency (E) of the diagnostic assay is determined using the formula:

10

$$E = \frac{TP}{TO} \times 100$$

where TP = true positives and TO = total number of tests. TO is calculated by the expression $TO = TP + FP + FN + TN$ where FP = false positives; FN = false negatives and TN = true negatives. E has the following range of values: $0 < E \leq 100$.

15

EXAMPLE 3*Estimation of Infarct Size*

The magnitude of the change of a biochemical marker as a function of time correlates with the size of the infarct determined at autopsy. Clearly the reliability of these integrations is enhanced if a multiplicity of tests is available.

The size (volume) of an infarct is a function of:-

25

- (1) the time scale over which the biochemical marker is released;
- (2) the rate of release of the biochemical marker ($\dot{R}(t)$);
- (3) the body weight (Bw) of the patient;
- (4) the proportion of the body weight into which the biochemical marker is released (K_w);

30

- (5) the rate of removal of the biochemical marker from circulation (E_d);

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 50 -

- (6) the total biochemical marker released divided by the amount of that marker released from the infarcted myocardium (K_r).

Accordingly, infarct size (I_s) is determined using the formula:-

5

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

EXAMPLE 4

10 *Assessment of Agents Which Contribute to or are Associated with Myocardial Inflammation*

The incidence of cardiovascular diseases has been statistically connected to certain infectious agents. Certain microorganisms including bacteria (for example, *Porphyromonas* and *Chlamydia*), certain bacteria (for example, *Helicobacter pylori*, is probably the most widespread disease-causing agent), and certain viruses (Coxsackie virus and Cytomegalo virus) have a contributing effect on the propensity for cardiovascular disease including ACS such as AMI. These agents may achieve their effects on the cardiovascular system through an inflammatory monocyte.

20 The presence of these microorganisms and viruses is detected using antibodies directed against specific epitopes on the surfaces of these pathogens.

EXAMPLE 5

25 *The Nature of the Biochemical Marker Device*

The present invention provides a device which simultaneously determines a large number of antigens from a sample of body fluid. The combination of biochemical markers for ACS including AMI provides an unequivocal diagnosis.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 51 -

The test is performed on a small (10-100 microlitres) volume of serum enabling the measurement to be performed several times within a short period to minimize errors providing reliable diagnosis of ACS.

- 5 The invention may also assay other body fluids (such as saliva) where pathogens (such as *Porphyromonas* and other microorganisms) reside and thus provide evidence for the origin of potential inflammatory responses.

- 10 As the patterns of genetic susceptibility of ACS and congestive cardiac failure (CCF) including dilated cardiomyopathy (DCM) are known, the test is modifiable to include mRNA and cDNA markers for DNA derived from patient leukocytes to evaluate their genetic propensity for cardiovascular disease.

EXAMPLE 6

- 15 *Adsorption or Coupling of Antibodies as an Array on a Solid Support*

- Specific antibodies for marker proteins (for example, proteins derived from heart tissue) are trapped or immobilized on a solid surface. Immobilization of protein antibodies also may be achieved by electrostatic forces or by the assistance of streptavidin attached to
20 activated spots on the solid support to which biotinylated antibodies can attach. The volume of antibody used to form the capturing spot is small, approximately 10 pL-100 nanolitres. They are allowed to dry in the presence of protecting chemicals such as arabinose and low molecular weight (3000-5000 Da) polyethylene glycol. A micro-array of antibodies specific for cardiac markers is constructed in two dimensions by application
25 of tiny (10 pL-10 nL) spots of each antibody at addressable locations on a solid support using a high precision applicator such as a Biodot 3000 (Cartesian Technologies, Irvine, CA, USA). Antibodies are adsorbed to a surface of nylon or nitro-cellulose, or covalently linked to a membrane such as Immobilon P (Millipore Corporation) using established procedures. The solid supports are generally immersed or otherwise contacted with
30 blocking agents such as but not limited to skin milk powder, Irish moss extracts, or other sources of carrageenan or gelatin.

- 52 -

There are several options for detecting antigens in plasma from a blood sample which have bound to an antibody array (Figure 1):-

- 5 (i) The plasma is reacted with N-hydroxy succinimide biotin or N-ethyl maleimide biotin which covalently modify lysine and cysteine residues, respectively. Components of low molecular weight in the plasma, including residual modification reagents, are removed by centrifugal desalting through a molecular sieve such as Sephadex G-10. The biotinylated proteins in the desalted plasma are
10 then applied to an array of antibodies against cardiac markers and incubated for 30 min at 37°C. Unbound protein solution is decanted and the array is washed several times with phosphate buffered saline (PBS). Biotinylated proteins bound to antibody spots are detected by application of a conjugate of streptavidin with horse radish peroxidase (HRP), streptavidin with alkaline phosphatase (AP) [Figure 1b],
15 or streptavidin modified with fluorescein (FITC) or Texas Red. The most sensitive forms of detection with HRP and AP involve the enzymic synthesis of products which are chemiluminescent. Substrate kits which produce chemiluminescence from bound HRP or AP activity are available from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK), Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) and Pierce Chemical
20 Company (Rockford, USA). After application of the substrate to the array, the moist membrane is put in contact with X-ray film for 2-5 min and then developed to reveal the antibody spots which bound a cardiac marker. Biotinylated cardiac markers bound to the array could be visualized directly by application of streptavidin modified with fluorescein (FITC) or Texas Red. The intensity of the
25 spots on the array using one of these three procedures could be quantified using a densitometric scanner (e.g. from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) or fluorometric scanner (e.g. STORM, Molecular Dynamics), enabling calculation of concentrations of these proteins in the blood sample.
- 30 (ii) Alternatively, the plasma is reacted with a reagent which covalently attaches fluorescent groups to amino or sulfhydryl groups on all proteins in the sample

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 53 -

(Figure 1e). Suitable fluorophores available as protein labelling kits are Alexa 488 and CBQCA which may be excited at 488 nm using an argon laser. Fluorescently-labelled plasma proteins bound to an antibody array could be quantified using a scanning fluorimeter or a confocal microscope. Mild reaction conditions should be used so that the majority of antigen binding sites are not affected. Different cardiac markers will be labelled to different extents with different numbers of fluorophores. Plasma samples may need to be dialyzed prior to reaction with the fluorophore, and should be desalted after chemical derivatization.

10 (iii) Unlabelled antigens bound to an array are reactable with soluble, fluorescently-labelled antibodies which bind to a different epitope of the bound cardiac marker, enabling quantitation of bound antigens (Figure 1e). For many samples, the level of plasma antigen may exceed the number of antibodies available in a particular spot. Positive antigens of interest from an initial screen may be quantitated subsequently using a row of dilutions of a particular antibody. When the number of antibodies in 15 a spot on this array exceed the number of antigens applied in the sample, there would be no further increase in fluorescence. A plot of fluorescence versus antibody level would give the level of antigen in the plasma sample. Levels of bound antigens on this quantitative array could be determined using procedures (i) 20 or (ii) above or the number of vacant antibodies on the array could be determined using standard, fluorescently-labelled antigen.

EXAMPLE 7

Detecting the Onset of AMI

25 The device provides an indication of the time of onset of the AMI even independent of whether the AMI is sensed by the patient (onset of chest pain) or whether it is a silent infarct associated with a test such as a stress test. Patients are sampled at comparatively high frequencies resulting in an improved definition of the shape of the biochemical 30 marker curve (Figure 2). The results of the test may be skewed to place greater weight on antibodies that proved to be the most sensitive in any particular patient. Combinations of

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 54 -

tests for early markers provides a better basis for determining the onset of AMI. If a patient presents later (>24 hours following the onset of chest pain), the time of onset is determined using late markers in the array.

5

EXAMPLE 9*Detecting the Size of the Infarct*

Cardiac myosin heavy chain (cMHC) is released after a prolonged delay and does not appear in the serum for about two days after an AMI. It is considered to be a reliable marker for estimating infarct size (Mair *et al.*, 1994). When cardiac troponin-T (cTn-T) has a late peak, the serum concentrations correlate well with estimates based on radionuclide imaging methods for infarct size. Cardiac myosin light chain (MLC) levels also correlate with infarct size (Omura *et al.*, 1995).

10

EXAMPLE 10*Detecting Myocardial Reperfusion After an Acute Coronary Syndrome Incident*

When a patient does present with acute coronary syndrome such as AMI, very often the therapeutic aim is to re-open an occluded coronary artery. This is usually done by thrombolytic agents such as TPA or by mechanical means, such as balloon angioplasty, with or without stenting. The aim of these therapies is to achieve reperfusion of the threatened myocardium. It is often difficult, however, to determine whether reperfusion has been successful, both in terms of the time of reperfusion and the extent of myocardium successfully salvaged. At the moment, the clinical tools for assessing reperfusion are insensitive and non-specific. They include clinical features, such as the disappearance of chest pain, and ECG features such as decrease in the amount of ST segment elevation. Serum markers are sometimes helpful, but usually only in retrospect.

Therefore, reperfusion is not easily diagnosed in current clinical practice, but is of great interest. After successful reperfusion, there is often a "washout" phase, where the level of traditional markers of cardiac injury such as CK-MB and troponin rise very dramatically

15

20

25

30

- 55 -

for a short period of time. It may be that the pattern of release of markers, and/or the ratio of one marker to another during this release phase, may give informative data about the timing and extent of reperfusion. This is another possible application of the proposed methodology.

5

EXAMPLE 11

Detecting the Presence of Pathogens Associated with Myocardial Inflammation

Infection may be a cofactor in the formation of atherosclerosis. Infectious agents such as
10 microorganisms (*Chlamydia*, *Porphyromonas*, *Helicobacter* and *Streptococcus*) and certain viruses (Cytomegalovirus, Coxsackie virus) may be detected using existing immunological methods which can be adapted for use in the cardiac microarray device.

EXAMPLE 12

15

Determination of Coronary Risk Factors

The risk of atherosclerotic disease can be evaluated using a variety of serum markers. Of these, the following is a list of potential apolipoproteins, lipoproteins, enzymes, receptors and transfer proteins that can be monitored using antibody based microarrays.

20

Plasma lipoproteins are characterized according to their density, flotation rate, mean diameter and electrophoretic mobility. The major classes of plasma lipoprotein include: chylomicrons, VLDL (pre β -lipoprotein), LDL (β -lipoprotein) and HDL. The apoprotein compositions which characterize these classes of lipoproteins are set out in Table 1 .

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 56 -

TABLE 1

Apoproteins	MW (Da)	Chylomicron	(% of total protein)		
			VLDL	LDL	HDL
ApoA-I	28,300	trace	trace	trace	66
ApoA-II	17,000	trace	trace	trace	20
ApoB ₁₀₀	512,000	5-20	37	97	-
ApoC-I	6,631	15	7	trace	3
ApoC-II	8,851	15	7	trace	trace
ApoC-III	8,864	40-50	40	2	4
ApoD	-	-	-	-	5
ApoE	~34,000	4	13	1	1

5 Apolipoproteins help to solubilize cholesterol esters and triglycerides by interacting with phospholipids. Apoproteins bind lipids largely on hydrophobic interaction between the fatty acyl chains of phospholipids and the non-polar regions of the apoproteins and to a lesser extent on the ionic interactions of the charged head groups of phospholipids and oppositely charged regions of the apoprotein.

10

Apolipoprotein A (ApoA-I and ApoA-II) is the major component of HDL. It can be subdivided into ApoA-I (MW 28,300 Da) and ApoA-II (MW 17,000 Da).

Apolipoprotein B (ApoB) is heterogeneous. ApoB₁₀₀ is mainly found in chylomicrons, VLDL and LDL. ApoB₄₈ represents the amino terminal half of ApoB₁₀₀ and is not a ligand for the LDL receptor.

Apolipoprotein C (ApoC) comprises at least three components, which occur as major components of VLDL and as minor components of HDL. ApoC-I has a MW of 6,631 Da, ApoC-II has a MW of 8,837 Da and ApoC-III is 8,767 Da. ApoC-III also has three

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 57 -

isoforms depending on whether the protein has 0, 1 or 2 sialic acid residues in its carbohydrate moiety.

Apolipoprotein D (ApoD) is a minor component of HDL and is not normally considered to
5 be a useful plasma marker.

Apolipoprotein E (ApoE) is found in VLDL, LDL (particles formed during the conversion
of VLDL to LDL) and HDL. This protein is heterogeneous and has a MW of
approximately 34,000 Da. There are several subtypes including ApoE2.
10

Thus, the following antibodies to apolipoproteins can be used to monitor chylomicrons,
VLDL, LDL and HDL (see Alaupovic *et al.*, 1971):-

ApoA-I (for HDL) available from Research Diagnostics Inc. (RDI-PRO6182);
15 ApoB₁₀₀ (for LDL) available from Research Diagnostics Inc (RI-PRO610800 and
RDI-OXLDLAbn for the oxidized form of LDL);
ApoC-I (for chylomicrons and to a lesser extent VLDL and HDL);
ApoC-II (for chylomicrons and to a lesser extent VLDL);
ApoC-III (for chylomicrons and VLDL and to a lesser extent LDL and HDL);
20 ApoD available from Research Diagnostics Inc. (RDI-APODabn) and
ApoE (for VLDL and to a lesser extent chylomicrons) available from Research
Diagnostics Inc. (RDI-PRO61085/61086 and RDI-APOEabGX) and ApoE2
to identify ApoE2 (RDI-APO61088).

25 Apolipoproteins are detected with a "sandwich" assay. Two types of assay can be
conducted:-

(i) *An antibody-based capture assay:* This is a sandwich assay where a specific
polyclonal or monoclonal antibody is used to capture an apolipoprotein antigen
30 which is then detected using a second antibody conjugated to a detector/reporter

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 58 -

moiety such as horse radish peroxidase (HRP) which is then visualized by developing a colour reaction; and

- 5 (ii) *A receptor-based capture assay*; Here, the apolipoprotein is captured by a specific receptor protein and then specifically identified using a secondary antibody conjugated to a reporter molecule such as HRP and detected as above.

The antibody-based capture assay can be performed using an immobilized antibody on a nitrocellulose-coated glass microscope slide or other solid surface as follows:-

10

- (1) purified antibodies are diluted in PBS (0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7.2, 0.137 M sodium chloride) or used undiluted and applied to the nitrocellulose to form a rectangular array using the *BioDot* arrayer and left overnight at 4°C;
- 15 (2) the excess antibody is removed by three washes with PBS and the dots are allowed to dry;
- (3) a small volume of plasma (~0.1 ml diluted up to 1:100 or a standard) appropriately diluted is then applied to the array and incubated at 37°C for 1-2 hours;
- 20 (4) the antibody array is then washed with PBS and allowed to dry;
- (5) add a second polyclonal antibody (preferably directed against the apolipoprotein conjugated to biotin peroxidase diluted up to 1:15,000 in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA));
- 25 (6) incubate at 37°C for two hours;
- (7) wash;

30

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 59 -

- (8) incubate the array with substrate (3 g *o*-phenylenediamine dihydroxychloride in phosphate buffered citrate pH 5.5 containing 3.5 mM hydrogen peroxide) for 30 min (in the dark);
- 5 (9) stop the reaction with 0.1 M HCl; and
- (10) read the OD_{492 nm} and compare the plasma samples with a sample in which the apolipoprotein was omitted. Usually, ApoB is used as a standard lipoprotein where the ApoB is precipitated using isopropanol.
- 10 The receptor-based capture assay is performed as above except that the antibody in step (1) is replaced with a recombinant receptor protein and the second antibody used in step (5) is replaced by a primary antibody directed against the particular apolipoprotein.
- 15 As well as the apolipoproteins associated with the chylomicrons, HDLs, VLDL and LDL, there is a series of associated enzymes in the plasma (for example, lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HPL) and lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT, 60 kDa) which may be detected using specific antibodies.

20

EXAMPLE 13*Other circulating "risk-factor" proteins*

The following proteins may be detected in significantly altered amounts in the serum of patients who are considered to be "at risk" of a cardiac aberration (see al Audehmottalab *et*

25 *al*, 1999):-

- (i) glycosylated haemoglobin (HbA_{1c});
- (ii) insulin;
- (iii) fibrinogen;
- 30 (iv) Factor VII;
- (v) soluble ICAM-1; and

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 60 -

(vi) C-reactive protein (C protein).

These proteins can be monitored using the antibody-based capture assay described above.

5

EXAMPLE 14*Preparation of the Array*

The array may include all known biochemical markers of acute myocardial infarction as well as factors known to be associated with coronary disease. The array may comprise
10 monoclonal antibodies covalently linked to a membrane as multiple spots in a 2-dimensional matrix.

The spots are of a microscopic size, resulting from the application of a very small drop of antibody solution (e.g. 10 nanolitres) and are well separated from adjacent spots (100
15 microns separating the dots).

Those skilled in the art will appreciate that the invention described herein is susceptible to variations and modifications other than those specifically described. It is to be understood that the invention includes all such variations and modifications. The invention also
20 includes all of the steps, features, compositions and compounds referred to or indicated in this specification, individually or collectively, and any and all combinations of any two or more of said steps or features.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 61 -

BIBLIOGRAPHY

Abdelkottaleb *et al.*, *Am. Heart J.* 137: 346-51, 1999

Alupovic, *Atherosclerosis* 13: 141, 1971

Border *et al.*, *Clin. Chem.* 43: 476-484, 1997

Dean, Cardiac Troponin-T as a marker of myocardial injury. In *Cardiac Markers* (ed AFB Wu) Humana Press, Totowa New Jersey) pp 205-227, 1998

Heid *et al.*, 1996, *Genome Res.* 6: 986-994

Herzberg and Meyer, M. W., *Ann. Periodontol.* 3: 151-60, 1998

Mayr *et al.* *Circulation* 99: 1560-6, 1999

Omura *et al.*, *Int. Jpn. Circ. J.* 59: 154-9, 1995

- 62 -

CLAIMS

1. A method of assessing the parameters associated with a condition or event of the systemic vasculature or assessing a risk of a condition or event occurring, said method comprising obtaining a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated or up or down regulated in a subject prior to, during or following said condition or event and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second set of members are binding partners to one or more of said first set of members and wherein the pattern of interaction between said first and second sets of members including the absence of interaction is indicative of said condition or event or the risk of development of same.

2. A method according to Claim 1 wherein members in the biological sample are selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzymic, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 63 -

growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with a second set of members wherein one or more of said second set of members are binding partners.

3. A method according to Claim 1 or 2 wherein the binding partners of the members of the biological sample are immunointeractive molecules.

4. A method according to Claim 3 wherein the immunointeractive molecules are antibodies.

5. A method according to any one of Claims 1 to 4 wherein the second set of members are immobilized to a solid support.

6. A method according to Claim 5 wherein binding of members to binding partners is detected by a labeled antibody to the member in the biological sample.

7. A method according to Claim 6 wherein the binding of a binding member to a binding partner is detected by:-

- (i) biotinylation of all plasma proteins, which are then bound to an antibody microarray and then to a streptavidin-AP/HRP conjugate;
- (ii) fluorescent labeling of all plasma proteins;
- (iii) fluorescently-labeled antibodies specific for a different epitope; and
- (iv) concentrations of plasma markers determined using dilutions of

- 64 -

immobilized antibodies.

8. A method according to any one of Claims 1 to 7 wherein the condition or event is a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event.

9. An array of binding partners for members in a biological sample from a subject said members being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a condition or event associated with the systemic vasculature wherein the binding partners are defined by (x,y) coordinates such that the array comprises n binding partners at coordinates (x_1, y_1) , (x_2, y_2) ... (x_n, y_n) and wherein the pattern of interaction between the members and the binding partners is indicative of said condition or event.

10. An array according to Claim 9 wherein members of the biological sample are selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-T RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibronolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 65 -

growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners.

11. An array according to Claim 9 or 10 wherein the binding partners of the members in the biological sample are immunointeractive molecules.

12. An array according to Claim 11 wherein the immunointeractive molecules are antibodies.

13. An array according to any one of Claims 9 to 12 wherein the second set of members are immobilized to a solid support.

14. An array according to any one of Claims 9 to 13 wherein the condition or event is a vascular disease including, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event.

15. A method for estimating the size of an infarct or related condition in a subject wherein the size of the infarct (Is) is determined by the formula:-

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times Bw \times Kw}{Ed \times Kr}$$

wherein Is is infarct size

F(t)dt is the rate of release of a member in a biological sample, said member being present, absent, elevated or otherwise activated in a subject

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 66 -

following a cardiovascular condition or event leading to the infarct
[$f(t)$ is also known as the member appearance function];

Bw is the body weight of the subject;

Kw is the proportion of the body weight into which the member is released;

Ed is the rate of removal of the member from evaluation; and

Kr is the total amount of member released divided by the amount of the
member released from the infarcted tissue;

said method comprising contacting a biological sample from said subject wherein said sample comprises members present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration with one or more binding partners of said members wherein the binding partners are immobilized to a solid support and wherein the pattern of interaction between the members and binding partners is indicative of the size of the infarct or otherwise provides data input for assessment of the size of the infarct.

16. A method of assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vascularization, said method comprising screening for the presence of two or more mRNA molecules in a biological sample which mRNA molecules are translatable to members which are present, absent, elevated or otherwise activated following a cardiovascular condition or event or a condition or event otherwise associated with a cardiovascular aberration said screening comprising contacting the biological sample with an array of oligonucleotides capable of hybridizing or otherwise capturing said mRNA molecule and detecting said hybridization or capture and wherein presence or absence of said mRNA molecule is indicative of a said condition or event or a risk of development of same.

17. A method according to Claim 16 wherein the mRNA molecules are first subjected to reverse transcription to read cDNA.

18. A method according to Claim 15 or 16 wherein the condition or event is a

- 67 -

vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event.

19. A data processing means for assessing a condition or event of the systemic vasculature, said data processing means executing the steps of:-

- (1) detecting a reporter molecule as an indicator of interaction or absence of interaction with an immobilized member of a biochip array;
- (2) analyzing the data obtained in (1) to identify members present in a biological sample;
- (3) optionally quantitating the amount of members from (2); and
- (4) analyzing the data to attribute a likelihood or risk of a condition or event.

20. A method of treatment, said method comprising assessing the parameters associated with a condition or event associated with the systemic vasculature or assessing a risk of a condition or event occurring, said method comprising contacting a biological sample from a subject to be tested wherein said biological sample comprises one or more members which are present, absent, elevated or otherwise activated in a subject following said condition or event or a condition or event otherwise associated with an aberration wherein said members are selected from two or more of myoglobin, myosin light chain (MLC), myosin heavy chain (MHC), total creatine kinase (CK) including CK-MB, lactate dehydrogenase (LDH-H4), aspartate aminotransferase (AST), cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA, fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type, glycogen phosphorylase-BB isoenzyme, α -atrial natriuretic peptide (ANP), cytoplasmic FABP, brain natriuretic peptide (BNP), adrenomedullin (ADM), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein

- 68 -

(VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL), C reactive protein (CRP), serum amyloid A, P-selectin, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), histamine, tumor necrosis factor α (TNF α), soluble TNF receptor 2 (sTNFR2), fibrin, fibrinogen, fibrinolytic peptides, modified haemoglobin (HbA1c), ferritin, soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), heat shock proteins, apoB, apoA, apoE, homocysteine or parts thereof, *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof, necrosis and platelet markers, leptin, vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins, heparin, metalloproteinase-9, metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor, angiotensin-converting enzyme, CD95/Apo1/Fas, hepatocyte growth factor, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), plasma brain natriuretic peptide, angiotensin II type receptor, endothelial constitutive nitric oxide synthase, glycoprotein IIIa genetic polymorphisms, factor VIIa, thrombin, endothelin-1, cardiac myofibrillar proteins, Fas and Fas ligand, ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners and contacting said biological sample with one or more antibodies or immunological equivalents thereof capable of binding to said one or more members in the biological sample and wherein the pattern of interaction between said members and antibodies including the absence of interaction is indicative of said condition or event and then effecting a suitable treatment regimen.

21. A method according to Claim 20 wherein the condition or event is a vascular disease including cardiovascular, stroke, pulmonary, renovascular, cerebrovascular, thrombotic or generalized arterial or venous condition or event.

22. A computer program product for assessing the likelihood of or risk of development of a condition or event associated with the systemic vasculature, said product comprising:-

- (1) code that receives an input value for one or more of features wherein said features are selected from:-

- (a) absence or presence of myoglobin;
- (b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
- (c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
- (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
- (e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
- (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
- (g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-T RNA;
- (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;
- (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
- (j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
- (k) cytoplasmic FABP;
- (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
- (m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
- (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
- (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- (p) absence or presence of serum amyloid A;
- (q) absence or presence of P-selectin;
- (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- (t) absence or presence of histamine;
- (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;

- 70 -

- (y) absence or presence of fibrinolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;
- (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
- (hh) absence or presence of leptin;
- (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
- (jj) absence or presence of heparin;
- (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
- (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
- (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
- (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
- (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
- (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
- (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
- (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
- (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
- (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

- 71 -

- (tu) absence or presence of factor VIIa;
- (vv) absence or presence of thrombin;
- (ww) absence or presence of endothelin-1;
- (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
- (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
- (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners; and

- (2) a computer readable medium that stores the code.

23. A computer system for assessing the likelihood of a subject having a condition or event associated with the systemic vascularization wherein said computer system comprises:-

- (1) a machine-readable data storage medium comprising a data storage material encoded with machine-readable data, wherein said machine-readable data comprise values for one or more features, wherein said features are selected from:-
 - (a) absence or presence of myoglobin;
 - (b) absence or presence of myosin light chain (MLC);
 - (c) absence or presence of myosin heavy chain (MHC);
 - (d) absence or presence of total creatine kinase (CK) including CK-MB;
 - (e) absence or presence of lactate dehydrogenase (LDH-H4);
 - (f) absence or presence of aspartate aminotransferase (AST);
 - (g) absence or presence of cardiac troponin I and T (cTn-I and cTn-T, respectively) and cTn-I and cTn-I RNA;
 - (h) absence or presence of fatty acid binding protein (FAB protein) including FABP1 and human heart-type;

- 72 -

- (i) absence or presence of glycogen phosphorylase-BB isoenzyme;
- (j) absence or presence of α -atrial natriuretic peptide (ANP);
- (k) cytoplasmic FABP;
- (l) absence or presence of brain natriuretic peptide (BNP);
- (m) absence or presence of adrenomedullin (ADM);
- (n) absence or presence of low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL) and intermediate density lipoprotein (IDL);
- (o) absence or presence of C reactive protein (CRP);
- (p) absence or presence of serum amyloid A;
- (q) absence or presence of P-selectin;
- (r) absence or presence of prostaglandins;
- (s) absence or presence of platelet-activating factor (PAF);
- (t) absence or presence of histamine;
- (u) absence or presence of tumor necrosis factor α (TNF α);
- (v) absence or presence of soluble TNF receptor 2 (sTNFR2);
- (w) absence or presence of fibrin;
- (x) absence or presence of fibrinogen;
- (y) absence or presence of fibrinolytic peptides;
- (z) absence or presence of modified haemoglobin (HbA1c);
- (aa) absence or presence of ferritin;
- (bb) absence or presence of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM) including soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1);
- (cc) absence or presence of heat shock proteins;
- (dd) absence or presence of apoB, apoA, apoE;
- (ee) absence or presence of homocysteine or parts thereof;
- (ff) absence or presence of *Streptococcus* sp., *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* or *Chlamydia pneumoniae* or immunological relatives thereof;

- 73 -

- (gg) absence or presence of necrosis and platelet markers;
 - (hh) absence or presence of leptin;
 - (ii) absence or presence of vasopeptidase inhibitor of cardiac endogenous kinins;
 - (jj) absence or presence of heparin;
 - (kk) absence or presence of metalloproteinase-9;
 - (ll) absence or presence of metalloproteinase-1 including its tissue inhibitor;
 - (mm) absence or presence of angiotensin-converting enzyme;
 - (nn) absence or presence of CD95/Apo1/Fas;
 - (oo) absence or presence of hepatocyte growth factor;
 - (pp) absence or presence of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1);
 - (qq) absence or presence of plasma brain natriuretic peptide;
 - (rr) absence or presence of angiotensin II type receptor;
 - (ss) absence or presence of endothelial constitutive nitric oxide synthase;
 - (tt) absence or presence of glycoprotein IIIa genetic polymorphisms;
 - (uu) absence or presence of factor VIIa;
 - (vv) absence or presence of thrombin;
 - (ww) absence or presence of endothelin-1;
 - (xx) absence or presence of cardiac myofibrillar proteins;
 - (yy) absence or presence of Fas and Fas ligand; and
 - (zz) absence or presence of ligands thereof or binding partners thereof or nucleic acid molecules encoding same or their fragments or ligands or binding partners;
- (2) a working memory for storing instructions for processing said machine-readable data;

- 74 -

- (3) a central-processing unit coupled to said working memory and to said machine-readable data storage medium, for processing said machine readable data to provide a sum of said values corresponding to a predictive value for said candidate sequences;
and
- (4) an output hardware coupled to said central processing unit for receiving said predictive value.

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

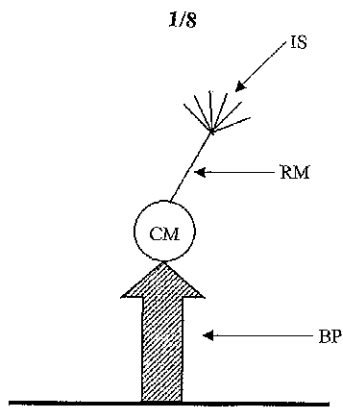


Figure 1a

WO 02/23191

PCT/AU01/01141

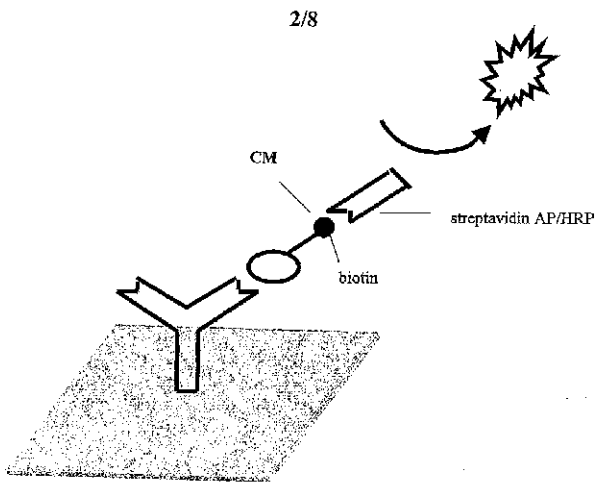


Figure 1b

WO 02/23191

PC/T/AU01/01141

3/8

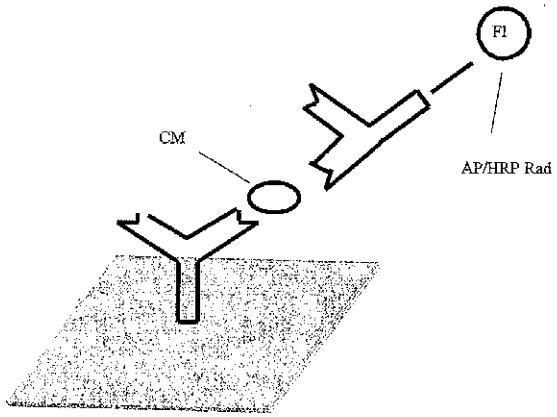


Figure 1c

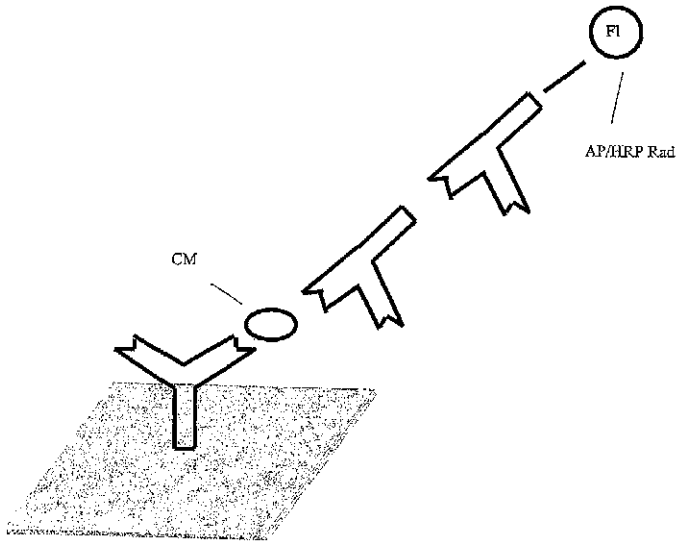


Figure 1d

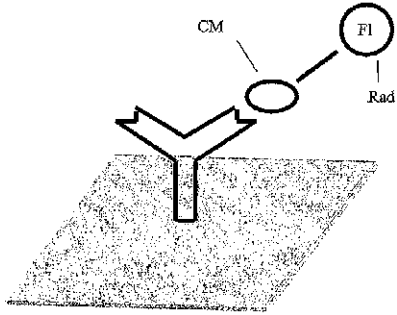


Figure 1e

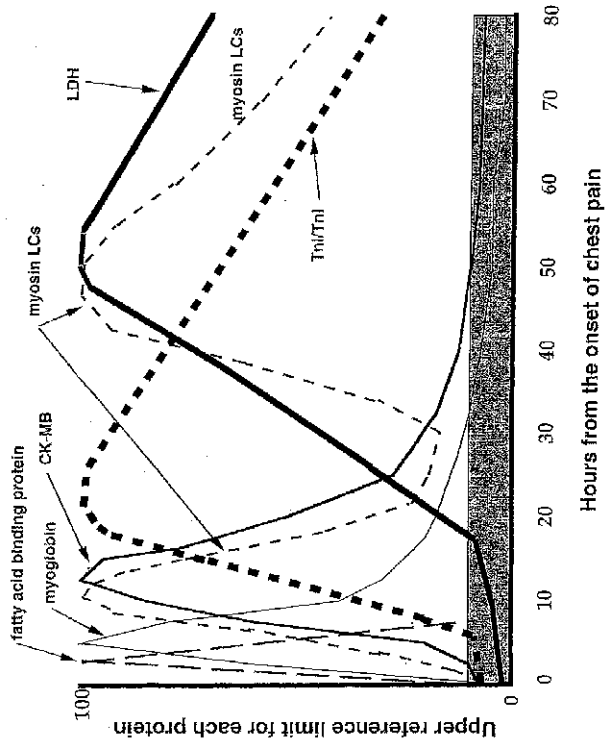


Figure 2

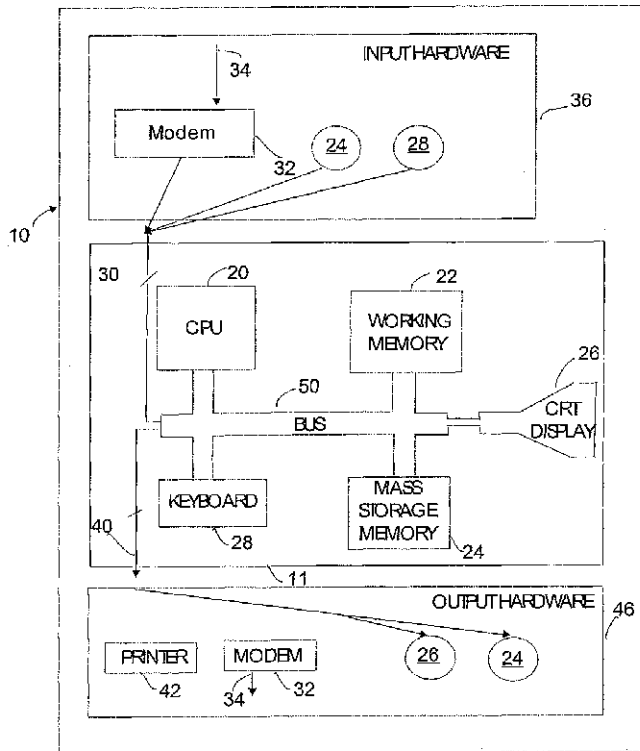


Figure 3

8/8

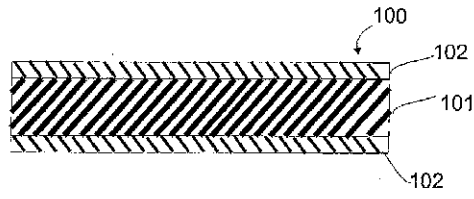


Figure 4

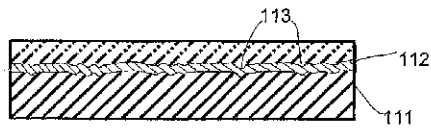


Figure 5

【手続補正書】

【提出日】平成14年10月31日(2002.10.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の基準

(i) 脈管構造の事象(急性)を前に経験していること、

(ii) 脈管構造の事象を前に経験していないこと、及び/又は

(iii) クラスI~クラスIVから選択される疾病レベルをもたらす脈管構造の事象(慢性)を前に経験していること

に基づいて被検体を分類する方法であって、

クラスIは、普通の身体活動で疲労、動悸、息切れ、又は狭心痛(心痛)が起きない冠動脈疾患(CAD)及び他の障害を持つ被検体を含み、

クラスIIは、クラスIと同様であるが、安静時には落ち着いているものの、運動には僅かな限界がある被検体を含み、

クラスIIIは、クラスIIと同様であるが、今度は身体活動に著しい限界がある被検体を含み、及び、

クラスIVは、クラスIIIと同様であるが、いかなる身体活動も狭心症及び不快感を惹き起こす被検体を含むものであり、

該脈管構造の事象の前、間又は後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化され、または高レベル調節若しくは低レベル調節される構成要素を含む該被検体由来の試料を該構成要素の結合相手の一つ以上と接触させる工程を含み、その結合相手が固体支持体に固定化されており、該構成要素とその結合相手の間の相互作用のパターンが、

(i) ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ-MB、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、脂肪酸結合タンパク質(FABP)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、
-心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C反応性タンパク質、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性TNF受容体2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/Apo1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子から選択される少なくとも五つの構成要素であって、この五つの構成要素の少なくとも一つが、ミオグロビン、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ-MB、乳酸脱水素酵素、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、脳ナトリウム利尿ペプチド

、及びC反応性タンパク質から選択されるものである構成要素の存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの上昇が、急性症状を示すものであり、

(ii) (i) に挙げた構成要素の組み合わせが存在しないこと又はレベルの変化がないことが、脈管構造の事象の不存在を示すものであり、及び

(iii) ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - MB、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、脂肪酸結合タンパク質 (FABP)、グリコーゲンホスホリラーゼ - BBアイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C反応性タンパク質、血清アミロイドA、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性TNF受容体2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子から選択される、少なくとも10の構成要素の存在若しくは実際のレベル若しくは上昇が、慢性症状を示すものであるように、

脈管構造の事象の存在若しくは不存在、又はこれらの実際のレベル若しくはレベルの変化の評価をもたらすものである方法。

【請求項2】

脈管構造と関連する事象が、血管病、心血管病、心拍、肺、腎血管、脳血管、血栓、若しくは全身の動脈若しくは静脈の状態若しくは事象、肝不全、腎不全、若しくは心不全を含む器官不全、器官移植拒絶反応などの組織拒絶反応、深部静脈血栓を含む血栓性事象、感染症、循環系の血管に対する損傷、ステント、ペースメーカー若しくはその他の人工装置によって生じるステント不全若しくは外傷、腫瘍の血管新生、外科手術、損傷若しくは加齢関連疾患及び内皮損傷の後の事象若しくは状態から選択されるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

脈管構造と関連する事象が心血管状態である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

心血管状態が、急性冠状症候群である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

生体試料の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

結合相手への構成要素の結合が、生体試料中の構成要素に特異的な標識抗体により検出されるものである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

結合相手への結合構成要素の結合が、

(i) 全ての血漿タンパク質のピオチン化、その後の抗体マイクロアレイへの結合、及びその後のストレプトアビジン - AP / HRPコンジュゲートへの結合、

- (ii) 全ての血漿タンパク質の蛍光標識化、
 (iii) 異なるエピトープに特異的な蛍光で標識した抗体、及び、
 (iv) 固定化抗体の希釈を用いて決定した血漿マーカーの濃度
から選択される方法により検出されるものである、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

被検体が最近若しくは以前に血管と関連する組織損傷、脈管構造不全又は梗塞又は関連状態を経験しているか否かに基づいて階層化を同時決定する方法であって、血管と関連する組織損傷、脈管構造不全又は梗塞の大きさが、次式：

【数1】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

上式中、

I s は血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、又は梗塞の大きさであり、
f (t) d t は生体試料中の、血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、又は梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の放出速度であり、
B w は被検体の体重であり、
K w は構成要素が放出される先の体重の比率であり、
E d は評価からの構成要素の除去速度であり、
K r は放出された構成要素の総量を血管組織若しくは梗塞に至った組織から放出された構成要素の数で割ったものである、
で測定されるものであり、該方法が、心血管状態若しくは事象、又その他の心血管異常に関連する状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化される構成要素を含む該被検体由来の生体試料を、該構成要素の結合相手の一つ以上と接触させる工程を含み、その結合相手が固体支持体に固定されており、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが被検体が梗塞に関して急性であるか慢性であるかの指標となるものであり、生体試料の構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若

しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の五つ以上から選択されるものであり、

(i) ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子から選択される、少なくとも五つの構成要素であって、この五つの構成要素の少なくとも一つが、ミオグロビン、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脳ナトリウム利尿ペプチド、及び C 反応性タンパク質から選択されるものである五つの構成要素の存在又は実際のレベル若しくはレベルの上昇が、急性症状を示すものであり、

(ii) (i) に挙げた構成要素の組み合わせが存在しないこと又はレベルの変化がないことが、脈管構造の事象の不存在を示すものであり、及び、

(iii) ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子から選択される、少なくとも 10 の構成要素の存在若しくは実際のレベル若しくは上昇が、慢性症状を示すものである、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

生体試料の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

結合相手への構成要素の結合が、生体試料中の構成要素に対する標識抗体により検出されるものである、請求項 9 又は請求項 10 又は請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

結合相手への結合構成要素の結合が、

(i) 全ての血漿タンパク質のビオチン化、その後の抗体マイクロアレイへの結合、及びその後のストレプトアビジン - A P / H R P コンジュゲートへの結合、

(ii) 全ての血漿タンパク質の蛍光標識化、

(iii) 異なるエピトープに特異的な蛍光で標識した抗体、及び、

(iv) 固定化抗体の希釈を用いて決定した血漿マーカーの濃度

から選択される方法により検出されるものである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

被検体由来の生体試料中の構成要素に対する結合相手のアレイであって、該構成要素が次式：

【数 2】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

上式中、

I_s は血管と関連する組織損傷、脈管構造不全又は梗塞の大きさであり、

$f(t) dt$ は生体試料中の、血管と関連する組織損傷を、脈管構造不全を、若しくは梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇若しくは他の方法で活性化される構成要素の放出速度であり、

B_w は被検体の体重であり、

K_w は構成要素が放出される先の体重の比率であり、

E_d は評価からの構成要素の除去速度であり、

K_r は放出された構成要素の総量を、血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、若しくは梗塞に至った組織から放出された構成要素の数で割ったものである、

で測定される大きさの血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、若しくは梗塞の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化されるものであり、その結合相手が、アレイが n 個の結合相手を座標 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 、 (x_n, y_n) に含むような (x, y) 座標で定義されるものであり、構成要素と結合相手の間の相互作用のパターンが該梗塞の指標となるか又はその他の方法で梗塞の大きさを評価するためのデータ入力をもたらすものであり、生体試料の構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、心臓性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分

子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンビン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の五つ以上から選択されるものである、結合相手のアレイ。

【請求項 1 5】

生体試料中の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項 1 4 に記載のアレイ。

【請求項 1 6】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項 1 5 に記載のアレイ。

【請求項 1 7】

第二の組の構成要素が固体支持体に固定されているものである、請求項 1 3 又は請求項 1 4 又は請求項 1 5 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 1 8】

被検体を下記の基準、

(i) 脈管構造の事象 (急性) を前に経験していること、

(ii) 脈管構造の事象を前に経験していないこと、及び / 又は

(iii) クラス I ~ クラス I V から選択される疾病レベルをもたらず脈管構造の事象 (慢性) を前に経験していること、

クラス I は、普通の身体活動で疲労、動悸、息切れ、又は狭心痛 (心痛) が起きない冠動脈疾患 (C A D) 及び他の障害を持つ被検体を含むものであり、

クラス I I は、クラス I と同様であるが、安静時には落ち着いているものの、運動には僅かな限界がある被検体を含むものであり、

クラス I I I は、クラス I I と同様であるが、今度は身体活動に著しい限界がある被検体を含むものであり、及び、

クラス I V は、クラス I I I と同様であるが、いかなる身体活動も狭心症及び不快感を惹き起こす被検体を含むものである、

に基づいて評価するためのコンピュータプログラム産物であって、

(1) 次のリストから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード :

(a) ミオグロビンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(b) ミオシン軽鎖の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(c) ミオシン重鎖の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(d) 総クレアチンキナーゼの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(e) 総クレアチンキナーゼ - M B の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(f) 乳酸脱水素酵素の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(g) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(h) 心臓トロポニン I と心臓トロポニン T の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(i) 脂肪酸結合タンパク質 (F A B P) の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

- (j) グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイムの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (k) - 心房性ナトリウム利尿ペプチドの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチドの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (m) アドレノメデュリンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (n) 低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (o) C 反応性タンパク質の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (p) 血清アミロイド A の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (q) P - セレクチンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (r) プロスタグランジンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (s) 血小板活性化因子の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (t) ヒスタミンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (u) 腫瘍壊死因子 の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (v) 可溶性 T N F 受容体 2 の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (w) フィブリンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (x) フィブリノゲンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (y) 繊維溶性ペプチドの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (z) 修飾ヘモグロビンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (aa) フェリチンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ若しくはクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (hh) レプチンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (jj) ヘパリンの存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(mm) アンジオテンシン変換酵素の存在若しくは不存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの変化

(nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(oo) 肝細胞増殖因子の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(uu) 因子 V I I a の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(vv) トロンビンの存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(ww) エンドセリン - 1 の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化

(zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在若しくは不存在若しくはレベルの変化若しくは絶対量の変化、及び、

(2) コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体であって、

(3) これらのコードがこれらのコードの存在又は不存在のパターンが下記のように上昇するか否かを決定するものであり、

(1) ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンビン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子から選択される少なくとも五つの構成要素であって、この五つの構成要素の少なくとも一つが、ミオグロビン、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B

、乳酸脱水素酵素、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、脳ナトリウム利尿ペプチド、及びC反応性タンパク質から選択されるものである構成要素の存在若しくは実際のレベル若しくはレベルの上昇が、急性症状の指標となり、

(2)(1)に挙げた構成要素の組み合わせが存在しないこと、又はレベルの変化がないことが、脈管構造の事象の不存在の指標となり、及び、

(3)ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ-MB、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニンI、心臓トロポニンT、脂肪酸結合タンパク質(FABP)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C反応性タンパク質、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性TNF受容体2、フィブリン、フィブリノゲン、織溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/Apo1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の二つ以上から選択される、少なくとも10の構成要素の存在、若しくは実際のレベル若しくは上昇が、慢性症状の指標となるように、上昇するものであるコードを含む、コンピュータプログラム産物。

【請求項19】

脈管構造と関連する損傷、脈管構造不全又は梗塞又は関連症状を有する被検体の治療法であって、脈管構造に関連する損傷、脈管構造不全又は梗塞の大きさが、次式：

【数3】

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$

上式中、

I sは血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、又は梗塞の大きさであり、

f(t)dtは生体試料中の、血管と関連する組織損傷、脈管構造不全、又は梗塞をもたらす心血管状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素の放出速度であり、

B wは被検体の体重であり、

K wは構成要素が放出される先の体重の比率であり、

E dは評価からの構成要素の除去速度であり、

K rは放出された構成要素の総量を脈管構造と関連する損傷、脈管構造不全、若しくは梗塞に至った組織から放出された構成要素の数で割ったものである、

で測定され、該状態若しくは事象又はその他の異常に関連する状態若しくは事象の後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化される一つ以上の構成要素

を含むテスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程であって、該構成要素がミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択される工程、及び、該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素と結合できるその免疫学的等価物と接触させる工程であって、相互作用の不存在を含む該構成要素と抗体の間の相互作用のパターンが脈管構造と関連する損傷、脈管構造不全又は梗塞の大きさを示すものであり、次いで適切な治療法を行なう工程を含む、治療法。

【請求項 2 0】

脈管構造の状態若しくは事象の存在若しくは不存在を決定する方法、又は状態若しくは事象が発生する危険性を決定する方法であって、テスト対象の被検体から、該状態若しくは事象の前、間、後に被検体に存在し、存在せず、上昇し、又はその他の方法で活性化され、または高レベル調節若しくは低レベル調節される一つ以上の構成要素を含む生体試料を採取する工程、及び該生体試料を第二の組の構成要素と接触させる工程を含む方法であって、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上の結合相手であり、該一組目と二組目の間の相互作用の欠如を含む相互作用パターンが、該状態若しくは事象、又は該状態若しくは事象の発症の危険性を示すものである方法。

【請求項 2 1】

生体試料中の構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖、ミオシン重鎖、総クレアチンキナーゼ、総クレアチンキナーゼ - M B、乳酸脱水素酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、脂肪酸結合タンパク質 (F A B P)、ヒトの心臓タイプ、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質並びに中密度リポタンパク質、C 反応性タンパク質、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子、ヒスタミン、腫瘍壊死因子、可溶性 T N F 受容体 2、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 を含む可溶性細胞接着分子、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、C D 9 5 / アポ 1 / F a s、肝細胞増殖因子、可溶

性血管細胞接着分子 - 1、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン I I 型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型、因子 V I I a、トロニン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、F a s 並びに F a s リガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の二つ以上から選択されるものである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

生体試料の構成要素の結合相手が免疫相互作用分子である、請求項 2 0 又は請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

第二の組の構成要素が固体支持体に固定されている、請求項 2 0 又は請求項 2 1 又は請求項 2 2 又は請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

結合相手への構成要素の結合が、生体試料中の構成要素に対する標識抗体により検出されるものである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

結合相手への結合構成要素の結合が、

(i) 全ての血漿タンパク質のビオチン化、その後の抗体マイクロアレイへの結合、及びその後のストレプトアビジン - A P / H R P 結合への結合、

(ii) 全ての血漿タンパク質の蛍光標識化、

(iii) 蛍光で標識した異なるエピトープに特異的な抗体、及び、

(iv) 固定化抗体の希釈を用いて決定した血漿マーカーの濃度

から選択される方法により検出されるものである、請求項 2 5 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 5】

本発明の別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を第二の組の構成要素と接触させる工程を含むものであり、該生体試料が該状態若しくは事象に続いて被検体で存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される要素を一つ以上含むものであり、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (M L C)、ミオシン重鎖 (M H C)、C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K)、乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、心臓トロポニン I と T (それぞれ、c T n - I と c T N - I) 並びに c T n - I と c T N - I · R N A、F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、細胞質 F A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P)、アドレノメデュリン (A D M)、低密度リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L)、C 反応性タンパク質 (C R P)、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (P A F)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (T N F)、可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維性ペプチド、修飾ヘモグロビン (H b A 1 c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィ

ロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板のマーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ阻害物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、その組織の阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択されるものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上の結合相手であり、相互作用がないことを含む該第一の組と第二の組の構成要素の間の相互作用パターンが該状態若しくは事象、若しくはある状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明のさらなる一側面は治療法であって、該方法が全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する工程、又は状態若しくは事象が発生する危険性を評価する工程を含み、該方法がテスト対象の被検体に由来する生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素に結合できる抗体の免疫学的等価物と接触させる工程、次いで適切な治療計画を実行する工程を含み、該生体試料が該状態若しくは事象又は異常と別の仕方で関連する状態若しくは事象の後に、被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される一つ以上の構成要素を含むものであり、該構成要素がミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-T RNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - BBアイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板のマーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ阻害物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、その組織阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から

選択されるものであり、相互作用の欠如を含む該構成要素と抗体の間の相互作用のパターンが該状態若しくは事象を示すものである、治療法を意図する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明のさらに別の側面は、被検体の全身の脈管構造の状態若しくは事象が発生する危険性を推定する方法であって、この危険性が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖（MLC）、ミオシン重鎖（MHC）、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）、乳酸脱水素酵素（LDH-H4）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、心臓トロポニンIとT（それぞれ、cTn-IとcTn-T）並びにcTn-IとcTn-T RNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質（FABタンパク質）、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、-心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アドレノメデュリン（ADM）、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）並びに中密度リポタンパク質（IDL）、C反応性タンパク質（CRP）、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子（PAF）、ヒスタミン、腫瘍壊死因子（TNF）、可溶性TNF受容体2（sTNFR2）、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン（HbA1c）、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1（ICAM1）を含む可溶性細胞接着分子（ICAM）、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/Apo1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1（VCAM1）、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の一つ以上の存在若しくは不存在の関数である、方法を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

本発明のまた別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の起こりやすさ若しくは危険性を評価するためのコンピュータプログラム製品を意図する。この製品には次のものが含まれる。即ち

- (1) 次のリストから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード、
- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
 - (b) ミオシン軽鎖（MLC）の存在又は不存在
 - (c) ミオシン重鎖（MHC）の存在又は不存在
 - (d) CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）の存在又は不存在
 - (e) 乳酸脱水素酵素（LDH-H4）の存在又は不存在
 - (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の存在又は不存在

- (g) 心臓トロポニンIとT(それぞれ、c T n - Iとc T N - T)並びにc T n - Iとc T N - IのRNAの存在又は不存在
- (h) FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - BBアイソザイムの存在又は不存在
- (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の存在又は不存在
- (k) 細胞質FABP
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン(ADM)の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)及び中密度リポタンパク質(IDL)の存在又は不存在
- (o) C反応性タンパク質(CRP)の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイドAの存在又は不存在
- (q) P - セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子(PAF)の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子(TNF)の存在又は不存在
- (v) 可溶性TNF受容体2(sTNFR2)の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) 繊維溶性ペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン(HbA1c)の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポB、アポA、アポEの存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのパソペプチダーゼ阻害物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織阻害物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) CD95 / アポ1 / Fasの存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1(VCAM1)の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシンII型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質IIIa遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子VIIaの存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在

- (yy) Fas 及び Fas リガンドの存在又は不存在
 (zz) そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、及び、
 (2) 該コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

本発明のさらに別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を有する被検体の発症の可能性を評価するための、以下のものを含むコンピュータシステムに及ぶ。

(1) 機械で読取可能なデータを書き込まれたデータ記憶材料を含む機械で読取可能なデータ記憶媒体であって、該機械で読み取り可能なデータが次のリストから選択される特性の一つ以上に対する値を含むものである機械で読取可能なデータ記憶媒体：

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
- (b) ミオシン軽鎖 (MLC) の存在又は不存在
- (c) ミオシン重鎖 (MHC) の存在又は不存在
- (d) CK-MB を含む総クレアチンキナーゼ (CK) の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素 (LDH-H4) の存在又は不存在
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、cTn-I と cTn-T) 並びに cTn-I と cTn-T RNA の存在又は不存在
- (h) FABP1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質) の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - BB アイソザイムの存在又は不存在
- (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の存在又は不存在
- (k) 細胞質 FABP
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン (ADM) の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL) の存在又は不存在
- (o) C 反応性タンパク質 (CRP) の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイド A の存在又は不存在
- (q) P - セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子 (PAF) の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子 (TNF) の存在又は不存在
- (v) 可溶性 TNF 受容体 2 (sTNFR2) の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) 繊維溶性ペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (HbA1c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在

(ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在

(gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在

(hh) レプチンの存在又は不存在

(ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在

(jj) ヘパリンの存在又は不存在

(kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在

(ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在

(mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在

(nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在

(oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在

(pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在

(qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在

(rr) アンジオテンシンII型受容体の存在又は不存在

(ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在

(tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在

(uu) 因子 V I I a の存在又は不存在

(vv) トロンビンの存在又は不存在

(ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在

(xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在

(yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在

(zz) そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、

(2) 該機械で読取可能なデータを処理するための命令を記憶するための作業メモリ、

(3) 該機械で読取可能なデータを処理して該候補の配列の予測値に対応する数値を集計するための、該作業メモリ及び該機械で読取り可能なデータ記憶媒体と連動する中央演算処理装置、及び、

(4) 該予測値を受け取るための、該中央演算処理装置と連動する出力装置。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

生体試料中の特に好ましい構成要素には、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (M L C)、ミオシン重鎖 (M H C)、C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K)、乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T)、心臓トロポニン I と T (それぞれ、c T n - I と c T N - I) 並びに c T n - I と c T N - I の R N A、F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P)、細胞質 F A B P、脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P)、アドレノメデュリン (A D M)、低密度リポタンパク質 (L D L)、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L)、C 反応性タンパク質 (C R P)、血清アミロイド A、P - セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (P A F)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (T N F)、可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン (H b A 1 c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M)、熱ショックタンパク質、アポ B、アポ A、アポ E、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス

、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子が含まれる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

従って、本発明の別の側面は、全身の脈管構造と関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する方法であって、該方法が、該状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し若しくは他の方法で活性化される構成要素を一つ以上含む、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程、及び該生体試料を二組目の構成要素と接触させる工程を含み、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ - BBアイソザイム、 - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶解性ペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子 - 1 (ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ - 9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1、アンジオテンシン変換酵素、CD95 / アポ1 / Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子 - 1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンI型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン - 1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子、のうち二つ以上から選択されるものであり、該第二の組の構成要素の一つ以上が該第一の組の構成要素の一つ以上に対する結合相手であり、相互作用がないことを含む該第一の組と第二の組の構成要素との間の相互作用パターンが該状態若しくは事象、又はある状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

従って、本発明のまた別の側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象に関連するパラメータを評価する、又は発生する状態若しくは事象の危険性を評価する工程を含む治療法であって、該方法が、該状態若しくは事象、又は異常に関連するその他の状態若しくは事象の後に被検体において存在し、存在せず、上昇し、若しくは他の方法で活性化される構成要素を一つ以上含む、テスト対象の被検体由来の生体試料を接触させる工程であって、該構成要素が、ミオグロビン、ミオシン軽鎖（MLC）、ミオシン重鎖（MHC）、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）、乳酸脱水素酵素（LDH-H4）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、心臓トロポニンIとT（それぞれ、cTn-IとcTn-T）並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質（FABタンパク質）、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、 -心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アドレノメデュリン（ADM）、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタンパク質（HDL）並びに中密度リポタンパク質（IDL）、C反応性タンパク質（CRP）、血清アミロイドA、P-セレクチン、プロスタグランジン、血小板活性化因子（PAF）、ヒスタミン、腫瘍壊死因子（TNF）、可溶性TNF受容体2（sTNFR2）、フィブリン、フィブリノゲン、 織溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン（HbA1c）、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1（ICAM1）を含む可溶性細胞接着分子（ICAM）、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1（VCAM1）、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又は上記のもの若しくはその断片又はリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子のうちの一つ以上から選択される工程、及び該生体試料を一つ以上の抗体若しくは生体試料中の該一つ以上の構成要素と結合できるその免疫学的等価物と接触させる工程、及び、次いで適切な治療計画を実施する工程を含むものであり、相互作用がないことを含む該構成要素と抗体の間の相互作用パターンが該状態若しくは事象を示すものである方法を意図する。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

この生体試料中の構成要素は、ミオグロビン、ミオシン軽鎖（MLC）、ミオシン重鎖（MHC）、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ（CK）、乳酸脱水素酵素（LDH-H4）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、心臓トロポニンIとT（それぞれ、cTn-IとcTn-T）並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質（FABタンパク質）、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、 -心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、アドレノメデュリン（ADM）、低密度リポタンパク質（LDL）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、高密度リポタ

ンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクトリン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas及びFasリガンド、そのリガンド若しくはその結合相手、又はこれら若しくはその断片若しくはそのリガンド若しくはその結合相手をコードする核酸分子、又はこれら若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子を一つ以上を含むのが好ましい。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

従って、本発明の別の有用な一側面は、被検体における全身の脈管構造の状態若しくは事象を発症する危険性であって、ミオグロビン、ミオシン軽鎖 (MLC)、ミオシン重鎖 (MHC)、CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH-H4)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、心臓トロポニンIとT (それぞれ、cTn-IとcTn-T) 並びにcTn-IとcTn-TのRNA、FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (FABタンパク質)、グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイム、心臓性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、細胞質FABP、脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、アドレノメデュリン (ADM)、低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 並びに中密度リポタンパク質 (IDL)、C反応性タンパク質 (CRP)、血清アミロイドA、P-セレクトリン、プロスタグランジン、血小板活性化因子 (PAF)、ヒスタミン、腫瘍壊死因子 (TNF)、可溶性TNF受容体2 (sTNFR2)、フィブリン、フィブリノゲン、繊維溶性ペプチド、修飾ヘモグロビン (HbA1c)、フェリチン、可溶性細胞接着分子-1 (ICAM1) を含む可溶性細胞接着分子 (ICAM)、熱ショックタンパク質、アポB、アポA、アポE、ホモシステイン若しくはその部分、ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体、壊死と血小板マーカー、レプチン、心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質、ヘパリン、メタロプロテイナーゼ-9、自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ-1、アンジオテンシン変換酵素、CD95/アポ1/Fas、肝細胞増殖因子、可溶性血管細胞接着分子-1 (VCAM1)、血漿脳ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシンII型受容体、構成的内皮一酸化窒素シンターゼ、糖タンパク質IIIa遺伝子多型、因子VIIa、トロンピン、エンドセリン-1、心臓筋原線維タンパク質、Fas並びにFasリガンド、それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の一つ以上の存在若しくは不存在の関数である危険性を推定する方法を供する。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

従って、別の側面では、本発明は全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象の起こりやすさ又はかかる状態の発症の危険性を評価するためのコンピュータプログラム産物であって、

(3) 次のものから選択される特性の一つ以上に対する入力値を受け取るコード、

(a) ミオグロビンの存在又は不存在

(b) ミオシン軽鎖(MLC)の存在又は不存在

(c) ミオシン重鎖(MHC)の存在又は不存在

(d) CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ(CK)の存在又は不存在

(e) 乳酸脱水素酵素(LDH-H4)の存在又は不存在

(f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の存在又は不存在

(g) 心臓トロポニンIとT(それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNAの存在又は不存在

(h) FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)の存在又は不存在

(i) グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイムの存在又は不存在

(j) -心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の存在又は不存在

(k) 細胞質FABP

(l) 脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の存在又は不存在

(m) アドレノメデュリン(ADM)の存在又は不存在

(n) 低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)並びに中密度リポタンパク質(IDL)の存在又は不存在

(o) C反応性タンパク質(CRP)の存在又は不存在

(p) 血清アミロイドAの存在又は不存在

(q) P-セレクトインの存在又は不存在

(r) プロスタグランジンの存在又は不存在

(s) 血小板活性化因子(PAF)の存在又は不存在

(t) ヒスタミンの存在又は不存在

(u) 腫瘍壊死因子(TNF)の存在又は不存在

(v) 可溶性TNF受容体2(sTNFR2)の存在又は不存在

(w) フィブリンの存在又は不存在

(x) フィブリノゲンの存在又は不存在

(y) 繊維溶性ペプチドの存在又は不存在

(z) 修飾ヘモグロビン(HbA1c)の存在又は不存在

(aa) フェリチンの存在又は不存在

(bb) 可溶性細胞接着分子-1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)の存在又は不存在

(cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在

(dd) アポB、アポA、アポEの存在又は不存在

(ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在

(ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在

(gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在

(hh) レプチンの存在又は不存在

(ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在

- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
 - (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在
 - (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
 - (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
 - (nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在
 - (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
 - (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在
 - (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
 - (rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在
 - (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
 - (tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在
 - (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在
 - (vv) トロンビンの存在又は不存在
 - (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
 - (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
 - (yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在
 - (zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、及び
 - (4) コードを記憶するコンピュータで読取可能な媒体。
- を含むコンピュータプログラム産物を意図する。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 8】

本発明のまた別の一側面は、全身の脈管構造に関連する状態若しくは事象を保有する被検体の起こりやすさを評価するためのコンピュータシステムであって、

(1) 機械で読取可能なデータを書き込んだデータ記憶材料を含む機械で読取可能なデータ記憶媒体であって、下記のリストから選択される特性の一つ以上に対する数値を含むものである機械で読取可能なデータ記憶媒体、

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
- (b) ミオシン軽鎖 (M L C) の存在又は不存在
- (c) ミオシン重鎖 (M H C) の存在又は不存在
- (d) C K - M B を含む総クレアチンキナーゼ (C K) の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素 (L D H - H 4) の存在又は不存在
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニン I と T (それぞれ、 c T n - I と c T N - T) 並びに c T n - I と c T N - I の R N A の存在又は不存在
- (h) F A B P 1 とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質 (F A B タンパク質) の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ - B B アイソザイムの存在又は不存在
- (j) - 心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) の存在又は不存在
- (k) 細胞質 F A B P
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド (B N P) の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン (A D M) の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質 (L D L) 、超低密度リポタンパク質 (V L D L) 、高密度リポタンパク質 (H D L) 並びに中密度リポタンパク質 (I D L) の存在又は不存在
- (o) C 反応性タンパク質 (C R P) の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイド A の存在又は不存在

- (q) P - セレクチンの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子 (P A F) の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子 (T N F) の存在又は不存在
- (v) 可溶性 T N F 受容体 2 (s T N F R 2) の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) 繊維溶性ペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン (H b A 1 c) の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子 - 1 (I C A M 1) を含む可溶性細胞接着分子 (I C A M) の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポ B、アポ A、アポ E の存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在
- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在
- (zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはその断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、
- (2) 該機械で読取可能なデータを処理するための命令を記憶するための作業メモリ、
- (3) 該機械で読取可能なデータを処理して該候補配列の予測値に対応する該数値を集計するための、該作業メモリ及び該機械で読取り可能なデータ記憶媒体と連動する中央演算処理装置、及び、
- (4) 該予測値を受け取るための、該中央演算処理装置と連動する出力装置、を含むコンピュータシステムにも及ぶ。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

作動中、CPU 20は様々な入力装置36及び出力装置46の使用を調整し、大容量記憶装置24からのデータアクセスと作業メモリ24へのアクセス及び作業メモリ24からのデータアクセスを調整し、そしてデータ処理工程の順序を決定する。本発明の機械で読取可能なデータの処理に、幾つかのプログラムを用いて良い。例示的なプログラムは、例えば次のような工程を使用することがある、

(1) 標的遺伝子の発現に関連する、次のリストから選択される少なくとも一つの特性に対する数値を入力する工程、

- (a) ミオグロビンの存在又は不存在
- (b) ミオシン軽鎖(MLC)の存在又は不存在
- (c) ミオシン重鎖(MHC)の存在又は不存在
- (d) CK-MBを含む総クレアチンキナーゼ(CK)の存在又は不存在
- (e) 乳酸脱水素酵素(LDH-H4)の存在又は不存在
- (f) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の存在又は不存在
- (g) 心臓トロポニンIとT(それぞれ、cTn-IとcTn-T)並びにcTn-IとcTn-TのRNAの存在又は不存在
- (h) FABP1とヒトの心臓タイプを含む脂肪酸結合タンパク質(FABタンパク質)の存在又は不存在
- (i) グリコーゲンホスホリラーゼ-BBアイソザイムの存在又は不存在
- (j) -心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の存在又は不存在
- (k) 細胞質FABP
- (l) 脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の存在又は不存在
- (m) アドレノメデュリン(ADM)の存在又は不存在
- (n) 低密度リポタンパク質(LDL)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、高密度リポタンパク質(HDL)並びに中密度リポタンパク質(IDL)の存在又は不存在
- (o) C反応性タンパク質(CRP)の存在又は不存在
- (p) 血清アミロイドAの存在又は不存在
- (q) P-セレクトインの存在又は不存在
- (r) プロスタグランジンの存在又は不存在
- (s) 血小板活性化因子(PAF)の存在又は不存在
- (t) ヒスタミンの存在又は不存在
- (u) 腫瘍壊死因子(TNF)の存在又は不存在
- (v) 可溶性TNF受容体2(sTNFR2)の存在又は不存在
- (w) フィブリンの存在又は不存在
- (x) フィブリノゲンの存在又は不存在
- (y) フィブロノリティックペプチドの存在又は不存在
- (z) 修飾ヘモグロビン(HbA1c)の存在又は不存在
- (aa) フェリチンの存在又は不存在
- (bb) 可溶性細胞接着分子-1(ICAM1)を含む可溶性細胞接着分子(ICAM)の存在又は不存在
- (cc) 熱ショックタンパク質の存在又は不存在
- (dd) アポB、アポA、アポEの存在又は不存在
- (ee) ホモシステイン若しくはその部分の存在又は不存在
- (ff) ストレプトコッカス・スピーシーズ、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ヘリコバクター・ピロリ及びクラミジア・ニューモニエ若しくはその免疫学的類似体の存在又は不存在
- (gg) 壊死と血小板マーカーの存在又は不存在
- (hh) レプチンの存在又は不存在
- (ii) 心臓内因性キニンのバソペプチダーゼ抑制物質の存在又は不存在

- (jj) ヘパリンの存在又は不存在
- (kk) メタロプロテイナーゼ - 9 の存在又は不存在
- (ll) 自身の組織抑制物質を含むメタロプロテイナーゼ - 1 の存在又は不存在
- (mm) アンジオテンシン変換酵素の存在又は不存在
- (nn) C D 9 5 / アポ 1 / F a s の存在又は不存在
- (oo) 肝細胞増殖因子の存在又は不存在
- (pp) 可溶性血管細胞接着分子 - 1 (V C A M 1) の存在又は不存在
- (qq) 血漿脳ナトリウム利尿ペプチドの存在又は不存在
- (rr) アンジオテンシン I I 型受容体の存在又は不存在
- (ss) 構成的内皮一酸化窒素シンターゼの存在又は不存在
- (tt) 糖タンパク質 I I I a 遺伝子多型の存在又は不存在
- (uu) 因子 V I I a の存在又は不存在
- (vv) トロンビンの存在又は不存在
- (ww) エンドセリン - 1 の存在又は不存在
- (xx) 心臓筋原線維タンパク質の存在又は不存在
- (yy) F a s 並びに F a s リガンドの存在又は不存在
- (zz) それらのリガンド若しくはそれらの結合相手、又は上記のもの若しくはそれらの断片若しくはリガンド若しくは結合相手をコードする核酸分子の存在又は不存在、
- (2) 該特性に対する数値を加えて該配列の推定値を求める工程、及び
- (3) 該推定値を出力する工程。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01141
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : G01N 33/53, 33/68, 33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: G01N 33/53, 33/68, 33/569		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline; WPAT; Japiv; CAPlus		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/32648 A1 (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC.) 17 October 1996 Whole document.	1-6, 20-23
X	WO 97/58311 A1 (TURJIN PATENTITOIMISTO OY) 16 October 1997 Whole document.	1-6, 20-23
P,X	WO 00/54046 A2 (The Government of the USA) 14 September 2000 Whole document.	1-14, 16-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 13 November 2001		Date of mailing of the international search report 23 NOV 2001
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929		Authorized officer J. BODEGRAVEN Telephone No : (02) 6283 2281

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU/01/01141
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92/21973 A1 (PHARMACIA BIOSENSOR AB) 10 December 1992 Whole document.	1-6, 9-14, 20-23
X	US 5,874,219 A (AFFYMETRIX INC.) 23 February 1999 Whole document, in particular claims.	1-14, 16-23
X	GB 2 324 866 A (RANDOX LABORATORIES LTD.) 4 November 1998 Whole document, in particular claims 16-20 and page 10 lines 33-34.	1-14, 16-23
X	WO 99/40434 A1 (INVITROGEN) 12 August 1999 In particular, pages 30-31; claims 28-30; claim 37.	1-14, 16-23
X	WO 00/49412 A1 (CARBOZYME NT LTD.) 24 August 2000 Whole document, in particular page 44 lines 9-12.	1-14, 16-23
X	WO 00/39580 A1 (UNIVERSITY OF SYDNEY) 6 July 2000 Whole document.	1-14, 19-23
X	Joos, T. O. et al. July (2000) Electrophoresis, Vol. 21, pp 2641-2650 'A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics'. Whole document.	1-14, 16-23
X	Mendoza, L.G. et al. (1999) BioTechniques, Vol. 27, pp 778-783 'High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)'. Whole document.	1-6, 9-14, 16, 20-23
X	Pichani, M. and Zaninotto, M. (1999) Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vol. 37, pp 1113-1117 'Cardiac Markers: Centralized or Decentralized Testing?' Whole document.	1-6, 20-23
X	Hudson, M.P. et al. (1999) Clinica Chimica Acta, Vol. 284, pp 223-237. 'Cardiac markers: point of care testing'. Whole document.	1-6, 20-23
X	Apple, F. S. et al. (1999) Clinical Chemistry, Vol. 45, pp 199-205 'Simultaneous rapid measurement of whole blood myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin I by the triage cardiac panel for detection of myocardial infarction'. [Retrieved on 11 October 2001 from http://www.clinchem.org/cgi/content/full/45/2/199] Whole document.	1-6, 20-23
X	Ekins, R.P. (1998) Clinical Chemistry, Vol. 44, pp 2015-2030 'Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays'. [Retrieved on 13 November 2001 from http://www.clinchem.org/cgi/content/full/44/9/2015] Whole document, in particular pages 12-20.	1-7, 9-14, 19-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/01141
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,690,103 A (Groth, T.L. and Eberhart J.) 25 November 1997 Whole document.	15
A	Sobel, B. F. et al. (1976) The American Journal of Cardiology, Vol. 37, pp 474-485 "Estimation of infarct size from serum MB creatine phosphokinase activity: applications and limitations". See the appendix in particular.	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/01141
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : 1, 20-23 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: No meaningful search was possible for the above claims because they cover such a vast and almost unlimited field such that it was impossible to comprehensively cover the entire field. For details see Extra Page.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU01/01141

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: I

A search strategy was established which included "an array" (for example, microarray/biochip/gene chip) of binding partners which could be used to simultaneously measure multiple binding partners (e.g. markers) in a biological sample with an emphasis on the assessment of parameters which are indicative of a condition or event associated with the cardiovascular system (including "cardiac markers").

*A preferred embodiment of the simultaneous measurement of 10 or more markers was indicated by the Applicant.

Claim 1 relates to the measurement of any one or more "members" in a biological sample wherein the presence, absence, elevation or otherwise activated or up or down regulated of that member is assessed using a complementary binding partner and any resulting "pattern of interaction" is indicative of a condition or event associated with the systemic vasculature. Such measurement of markers is well known and commonly used in the assessment of conditions or events associated with the systemic vasculature. As such claim 1 has not been searched.

Claims 22 and 23 involve "a computer program product" and "a computer system" respectively. These claims appear merely to refer to the entry of data (which may be a single or multiple feature) which is then processed using conventional computer devices. The measurement of markers of an event or condition of the systemic vasculature is well known and the analysis of such data using a computer system is considered obvious and therefore lacking in inventiveness. As such these claims have not been searched.

It is to be noted that wherever citations were determined to have some relevance to the above claims this has been noted. However it is to be understood that claims 1, 22 and 23 were not searched due to the vast scope encompassed by these claims.

フロントページの続き

- (72)発明者 ドス レメディオス, クリストバル, ギレルモ
オーストラリア国, ニュー サウス ウェールズ 2021, パディングトン, ウィンザー スト
リート 120エイ
- (72)発明者 セラーメイジャー, デイヴィッド, スチーブン
オーストラリア国, ニュー サウス ウェールズ 2030, ヴォークルース, オーロラ アベニ
ュー 45

专利名称(译)	诊断分析		
公开(公告)号	JP2004531687A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002527787	申请日	2001-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	悉尼大学		
申请(专利权)人(译)	悉尼大学		
[标]发明人	クリストファーソンリチャードイアン ドスレメディオスクリストバルギレルモ セラージェイデーヴィッドスチープン		
发明人	クリストファーソン,リチャード,イアン ドスレメディオス,クリストバル,ギレルモ セラージェイ,デーヴィッド,スチープン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/68 G01N37/00 G06F19/00		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/324 Y02A90/24		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102		
代理人(译)	高桥 健		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及诊断装置，其包括用于指示与全身脉管系统相关的病症或事件的参数的预后测定。更具体地，本发明提供了用于检测与血管疾病相关的参数的测定，所述血管疾病包括心血管疾病，中风，肺，肾血管，脑血管，血栓形成或全身动脉或静脉疾病或事件，包括急性冠状动脉综合征，例如但不限于急性心肌梗塞，心力衰竭，动脉粥样硬化或血栓形成。这些参数的识别或更具体地参数模式使得能够诊断病症或事件或确定与全身性脉管系统相关的病症或事件的发展风险。更具体地，本发明涉及包含一组成员的诊断装置，其中一个或多个所述成员在来自包括人受试者的动物的生物样品中具有或具有特异性或通用的结合配偶体，其中所述成员具有结合模式。绑定伙伴的成员是指示性的，预测性的或以其他方式与a相关系统脉管系统内病症或事件的可能性。没有检测到特异性或通用结合配偶体也具有指示性或预测价值。这在患者无法根据自身状况（例如手术期间或昏迷患者）向医生提供建议的情况下尤为重要。它还可用于确定血管疾病的风险，包括心血管疾病，中风，肺血管，肾血管疾病，脑血管疾病，血栓形成或全身动脉或静脉疾病或健康受试者或接受手术或化疗等风险的受试者的事件。本发明尤其可用于鉴定和/或定量系统性脉管系统中的病症或事件的生化标志物，例如心脏病，心脏病，心脏感染，中风和血栓形成以及确定风险。这些病症的发展包括没有病症或没有发展病症的风险。这些病症的评估可以在临床环境中进行，作为分诊的一部分，作为常规检测方案的一部分和/或作为实验室程序。

$$I_s = \frac{\int_0^t f(t) dt \times B_w \times K_w}{E_d \times K_r}$$