

(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2004-520598

(P2004-520598A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/25	C 1 2 Q 1/25	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/50	C 1 2 Q 1/50	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 197 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-586802 (P2002-586802)	(71) 出願人	500204577
(86) (22) 出願日	平成14年5月4日 (2002.5.4)		バイオサイト インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月28日 (2003.2.28)		アメリカ合衆国92121カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014219		州サン・ディエゴ、ローゼル・ストリート
(87) 国際公開番号	W02002/089657		11030番 スウィート・ディ
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002.11.14)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	60/288, 871		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成13年5月4日 (2001.5.4)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	60/315, 642	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成13年8月28日 (2001.8.28)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 急性冠状動脈症候群の診断マーカーおよびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、急性冠状動脈症候群の診断および評価の方法に関連する。特に、患者の試験サンプルは、1またはそれ以上の心筋傷害に特異的なマーカーおよび1又はそれ以上の心筋傷害に非特異的なマーカーを含むマーカーのパネルの構成員の存在および量について分析される。種々のマーカーは、このような診断および評価のためのマーカーのパネルの組み立てについて開示される。種々の見地として、本発明は、安定狭心症、不安定狭心症および心筋梗塞の早期の検出および識別の方法を提供する。本発明の方法は、有益な処置および治療を受けられる患者の数を非常に増加させ、間違った診断に関係した費用を減少させる、迅速で、高感度の特異的なアッセイを提供し、また、患者の予後についての重要な情報を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から得たサンプル中の B 型ナトリウム排泄増加性ペプチド (BNP) の濃度を決定すること；および、
前記 BNP 濃度を前記患者の心筋虚血の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋虚血の診断方法。

【請求項 2】

前記サンプルがストレス試験後の前記患者から得られる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記関連づけの工程が、前記 BNP 濃度を閾値 BNP 濃度と比較することを含み、ここで、前記 BNP 濃度が前記閾値 BNP 濃度を超える場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記閾値 BNP 濃度が、少なくとも約 60 pg/mL である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記関連づけの工程が、前記 BNP 濃度を前記患者から得られた第 2 のサンプル中で測定された第 2 の BNP 濃度と比較することを含み、ここで、前記 BNP 濃度が前記第 2 の BNP 濃度より大きい場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記第 2 のサンプルが、ストレス試験の前に得られる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

患者から得たサンプル中の BNP に関連するマーカーの濃度を決定すること；および、
前記 BNP 関連マーカー濃度を前記患者の心筋虚血の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋虚血の診断方法。

【請求項 9】

前記サンプルが、ストレス試験後の前記患者から得られる、請求項 8 に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記関連づけの工程が、前記 BNP 関連マーカー濃度を閾値 BNP 関連マーカー濃度と比較することを含み、ここで、前記 BNP 関連マーカー濃度が前記閾値 BNP 関連マーカー濃度を超える場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記閾値 BNP 関連マーカー濃度が、少なくとも約 60 pg/mL である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 13】

前記関連づけの工程が、前記 BNP 関連マーカー濃度を前記患者から得られた第 2 のサンプルで測定された第 2 の BNP 関連マーカー濃度と比較することを含み、ここで、前記 BNP 関連マーカー濃度が前記第 2 の BNP 関連マーカー濃度より大きい場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 のサンプルが、ストレス試験の前に得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 B N P 関連マーカーが N T プロ B N P である、請求項 8 ないし 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

患者から得たサンプル中の B N P および B N P に関連するマーカーから成る群より選ばれた診断指標の濃度を決定すること；および、
前記診断指標濃度を前記患者の心筋虚血の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋虚血の診断方法。

【請求項 1 7】

前記サンプルが、ストレス試験後の前記患者から得られる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記関連づけの工程が、前記診断指標濃度を前記診断指標の閾値濃度と比較することを含み、ここで、前記診断指標濃度が前記閾値診断指標濃度を超える場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記閾値診断指標濃度が、少なくとも約 6 0 p g / m L である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記関連づけの工程が、前記診断指標濃度を前記患者から得られた第 2 のサンプル中で測定された第 2 の診断指標濃度と比較することを含み、前記第 2 の診断指標が B N P および B N P に関連したマーカーから成る群より選ばれ、ここで、前記診断指標濃度が前記第 2 の診断指標濃度より大きい場合に、前記患者は心筋虚血を有すると診断される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 2 のサンプルが、ストレス試験の前に得られる、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

患者から得たサンプル中の B 型ナトリウム排泄増加性ペプチド (B N P) の濃度を決定すること；および、
前記 B N P 濃度を前記患者の心筋壊死の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋壊死の診断方法。

【請求項 2 4】

前記関連づけの工程が、前記 B N P 濃度を閾値 B N P 濃度と比較することを含み、ここで、前記 B N P 濃度が前記閾値 B N P 濃度を超える場合に、前記患者は心筋壊死を有すると診断される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記閾値 B N P 濃度が、少なくとも約 6 0 p g / m L である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

患者から得たサンプル中の B N P に関連するマーカーの濃度を決定すること；および、
前記 B N P 関連マーカー濃度を前記患者の心筋壊死の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋壊死の診断方法。

【請求項 2 8】

前記関連づけの工程が、前記 B N P 濃度を閾値 B N P 濃度と比較し、ここで、前記 B N P 濃度が前記閾値 B N P 濃度を超える場合に、前記患者は心筋壊死を有すると診断されることを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記閾値 BNP 濃度が、少なくとも約 80 pg/mL である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 BNP 関連マーカーが NTプロBNP である、請求項 27 ないし 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

患者から得たサンプル中の BNP および BNP に関連するマーカーから成る群より選ばれる診断指標の濃度を決定すること；および、
前記診断指標濃度を前記患者の心筋壊死の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋壊死の診断方法。 10

【請求項 33】

前記関連づけの工程が、前記 BNP 濃度を閾値 BNP 濃度と比較することを含み、ここで、前記 BNP 濃度が前記閾値 BNP 濃度を超える場合に、前記患者は心筋壊死を有すると診断される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記閾値 BNP 濃度が、少なくとも約 80 pg/mL である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 32 に記載の方法。 20

【請求項 36】

患者から得たサンプル中の BNP の濃度および BNP に関連するマーカーの濃度から成る群より選ばれる第 1 の診断指標を決定すること；
前記患者の 1 またはそれ以上の第 2 の診断指標を決定すること；および、
前記第 1 および前記第 2 の診断指標を前記患者の心筋虚血の存在または不存在と関連づけること；
を含む、患者の心筋虚血の診断方法。

【請求項 37】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 36 に記載の方法。 30

【請求項 38】

前記第 2 の診断指標が、MMP-9 濃度、TpP 濃度、MCP-1 濃度、FABP 濃度、CRP 濃度、クレアチンキナーゼ濃度、MB アイソエンザイム濃度、心臓トロポニン I 濃度、心臓トロポニン T 濃度、および、心臓トロポニン I と心臓トロポニン T を含む複合体の濃度、から成る群より選ばれる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

1 またはそれ以上の前記第 2 の診断指標が、壊死マーカーである、請求項 36 に記載の方法。 40

【請求項 40】

前記方法が、前記患者の心筋壊死と心筋虚血とを識別する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

患者から得られた試験サンプルを、心筋傷害に特異的な 1 またはそれ以上のマーカー、および、心筋傷害に非特異的な 1 またはそれ以上のマーカー、の存在または量について分析すること、
を含む、急性冠状動脈症候群の診断方法。

【請求項 42】

前記心筋傷害に特異的なマーカーが、アネキシン V、B 型ナトリウム排泄増加性ペプチド、 β -エノラーゼ、心臓トロポニン I、クレアチンキナーゼ-MB、グリコーゲンホスホ 50

リラーゼーBB、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼーMB、およびS-100aから成る群より選ばれる、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記心筋傷害に非特異的なマーカーが、アテローム硬化症プラーク破裂のマーカー、凝固のマーカー、C-反応性タンパク質、キャスパーゼー3、ヘモグロビン α_2 、ヒトリポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、インターロイキン-1 β 、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターロイキン-6、単球走化性タンパク質-1、溶解性細胞間接着分子-1、溶解性血管細胞接着分子-1、MMP-9、TpP、および主要壊死因子 α から成る群より選ばれる、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記アテローム硬化症プラーク破裂のマーカーが、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1、マトリックスメタロプロテイナーゼ-2、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9から成る群より選ばれる、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記凝固のマーカーが、 β -トロンボグロブリン、D-ダイマー、フィブリノペプチドA、血小板由来増殖因子、プラスミン- α -2-抗プラスミン複合体、血小板第4因子、プロトロンビンフラグメント1+2、P-セレクトリン、トロンビン-抗トロンビンIII複合体、血栓前駆体タンパク質、組織因子、およびフォン・ビルブラント因子から成る群より選ばれる、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記特異的および非特異的マーカーの濃度を健常人の前記特異的および非特異的マーカーの濃度と比較することをさらに含み、
ここで、患者から得られた試験サンプル中の前記濃度の健常人と比較した場合の変化が、急性冠状動脈症候群の発症を経験した患者を示す、請求項41に記載の方法。

【請求項47】

患者から得られた試験サンプルの少なくとも2つの前記特異的および非特異的マーカーの濃度の健常人と比較した場合の上昇が、急性冠状動脈症候群の発症を経験した患者を示す、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

患者から得られた試験サンプルを、心筋傷害に特異的な1またはそれ以上のマーカー、および、心筋傷害に非特異的な1またはそれ以上のマーカー、の存在または量について分析すること、
前記特異的および非特異的マーカー濃度を健常人の前記特異的および非特異的マーカー濃度と比較すること、
を含み、
ここで、患者から得られた試験サンプル中の前記濃度の健常人と比較した場合の変化が、急性冠状動脈症候群の犠牲となる可能性を示す、
急性冠状動脈症候群による狭窄性胸部痛を経験する患者のスクリーニング方法。

【請求項49】

前記試験サンプルが、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿および唾液から成る群より選ばれる、請求項41に記載の方法。

【請求項50】

前記試験サンプルが、分析される前に分画される、請求項41に記載の方法。

【請求項51】

前記試験サンプルが、イムノアッセイを用いて分析される、請求項41に記載の方法。

【請求項52】

安定狭心症、不安定狭心症および心筋梗塞を識別することをさらに含む、請求項41に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

安定狭心症の診断方法である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

不安定狭心症の診断方法である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

心筋梗塞の診断方法である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

患者から得られた複数の試験サンプルを、心筋傷害に特異的な 1 またはそれ以上のマーカー、および、心筋傷害に非特異的な 1 またはそれ以上のマーカー、の存在または量について分析および比較することを含み、

10

ここで、前記試験サンプルが同一の患者から異なる時間に得られたものである、患者の処置の経過をモニターする方法。

【請求項 5 7】

前記患者が、安定狭心症の徴候または症状を示す、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記患者が、不安定狭心症の徴候または症状を示す、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記患者が、心筋梗塞の徴候または症状を示す、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 0】

患者から得られたサンプル中のマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9)、MMP-9 関連マーカー、TpP、MCP-1、FABP、C-反応性タンパク質、クレアチンキナーゼ、MBアイソエンザイム、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、心臓トロポニン I と心臓トロポニン T を含む複合体、および B 型ナトリウム排泄増加性タンパク質から成る群より選ばれる 1 またはそれ以上のマーカーの濃度を、前記マーカー濃度が前記急性冠状動脈症候群の不利な結果に対する疾病素質と関係するかどうかを決定することにより、前記患者の予後と関連づけること、を含む、急性冠状動脈症候群と診断された患者の予後を決定する方法。

20

【請求項 6 1】

前記不利な結果が、死亡、心筋梗塞、および鬱血性心不全から成る群より選ばれる、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記関連づけの工程が、前記マーカー濃度を閾値マーカー濃度と比較することを含み、ここで、前記マーカー濃度が前記閾値マーカー濃度を超える場合に、前記患者は前記不利な結果に対する疾病素質がある、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記患者から得られたサンプル中のマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9)、MMP-9 関連マーカー、TpP、MCP-1、FABP、C-反応性タンパク質、クレアチンキナーゼ、MBアイソエンザイム、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、心臓トロポニン I と心臓トロポニン T を含む複合体、および B 型ナトリウム排泄増加性タンパク質から成る群より選ばれる 2 またはそれ以上のマーカーの濃度を、前記マーカー濃度が前記急性冠状動脈症候群の不利な結果に対する疾病素質と関係するかどうかを決定することにより、前記患者の予後と関連づけること、を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記患者から得られたサンプル中のマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9)、MMP-9 関連マーカー、TpP、MCP-1、FABP、C-反応性タンパク質、クレアチンキナーゼ、MBアイソエンザイム、心臓トロポニン I、心臓トロポニン T、心臓

50

トロポニン I と心臓トロポニン T を含む複合体、および B 型ナトリウム排泄増加性タンパク質から成る群より選ばれる 3 またはそれ以上のマーカーの濃度を、前記マーカー濃度が前記急性冠状動脈症候群の不利な結果に対する疾病素質と関係するかどうかを決定することにより、前記患者の予後と関連づけること、を含む、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 66】

患者から得られたサンプル中の MMP-9、MMP-9 関連マーカー、BNP、BNP 関連マーカー、C-反応性タンパク質、遊離心臓トロポニン I、トロポニン T とトロポニン C から成る群より選ばれる 1 つの他のトロポニン成分を含む複合体中の心臓トロポニン I、トロポニン T とトロポニン C を含む複合体中の心臓トロポニン I、遊離心臓トロポニン T、トロポニン I とトロポニン C から成る群より選ばれる 1 つの他のトロポニン成分を含む複合体中の心臓トロポニン T、トロポニン I とトロポニン C を含む複合体中の心臓トロポニン T、MCP-1、MCP-1 関連マーカー、FABP、FABP 関連マーカー、TpP、TpP 関連マーカーから成る群より選ばれる 1 またはそれ以上の予後マーカー濃度を、1 またはそれ以上のマーカーまたは関連マーカー濃度が前記急性冠状動脈症候群の不利な結果に対する疾病素質と関係するかどうかを決定することにより、前記患者の予後と関連づけること、を含む、急性冠状動脈症候群と診断された患者の予後を決定する方法。

【請求項 67】

前記不利な結果が、死亡、心筋梗塞、および鬱血性心不全から成る群より選ばれる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、および血漿サンプルから成る群より選ばれる、請求項 66 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

この出願は、2001 年 5 月 4 日に出願された米国仮特許出願番号 60/288,871 (Attorney 整理番号 071949-6501) ; および 2001 年 8 月 28 日に出願された米国仮特許出願番号 60/315,642 (Attorney 整理番号 071949-5501) に関連し、かつこれらの優先権を主張するものであり、引用することによりそのすべてをそれぞれ本明細書の 1 部として取り込むものである。

【0002】

【発明の属する技術分野】

本発明は、急性冠状動脈症候群 (ACS) の診断マーカーの同定と使用に関連する。種々の見地において、この発明は、ACS の早期の検出および識別の方法に関し、また、ACS 症状の状態の不利な事象の危険性についての個々人の同定に関する。

【0003】

(発明の背景)

本発明の背景に関する以下の議論は、単に本発明を理解する上で読み手を助けるために提供するものであり、本発明の先行技術を記述または構成するものと認めるものではない。

【0004】

ACS は、心臓への血管傷害の発現であり、また心筋傷害または心筋損傷とも呼ばれ、これは、一般にアテローム硬化症や高血圧症に従属的なものであり、米国における主要な死亡原因である。ACS は、一般にアテローム硬化症のプラーク形成による冠状動脈疾患に関連した閉塞、およびさらなる閉塞または裂のいずれかの進行に起因する。ACS は、安定狭心症、不安定狭心症、または心筋梗塞として発現しうる。

【0005】

「急性冠状動脈症候群」(「ACS」) の用語は、心臓への虚血性の傷害から生じる冠状動脈疾患のグループに適用されてきた。ACS の患者は、病態生理学、臨床的状态、および不利な事象の危険性において異なった、異種のグループを形成する。このような患者は

、不安定狭心症、非－ST－上昇（「NST」） 非－Q波心筋梗塞（「MI」）、ST－上昇 非－Q波MI、および経壁（Q波）MI等の連続体を形成する状態を医師に示す。ACSは、1またはそれ以上の冠状動脈中での血栓の沈着と成長に大きく起因すると考えられており、動脈の部分的若しくは完全な閉塞をもたらす、そして頻繁にプラークの破裂を伴い、虚血性傷害をもたらす。ACSは、冠状動脈痙攣や心筋への要求の増加によっても引き起こされうる。総説として、例えばDavis, Clin. Cardiol. 20（増補I）：I2－I7（1997）を参照のこと。

【0006】

ACSの重大さは、虚血性傷害の結果としての罹患率と死亡率により強調される。例えば、ACSの状態の4から6週間以内で、死亡またはこれに続く心筋梗塞（MI）の危険性は8～14%であり、死亡、MI、または難治性虚血の割合は15～25%であると、研究者は推定している（TherouxおよびFuster, Circulation 97：1195－1206、1998）。米国における急性MIによる死亡者の総数は約600,000とされ、ACSの診断、予後、および対処に関連する情報のこの分野の調査は、当然のことながら広範囲に渡っている。循環している心臓トロポニン濃度（例えば、Antman et al., N. Eng. J. Med. 335：1342－9, 1996を参照；また、米国特許番号6,147,688、6,156,521、5,947,124、および5,795,725を参照。これらは、引用することによりそのすべてをそれぞれ本明細書の1部として取り込むものである。）、ST部分の降下（例えば、Savonitto et al., JAMA 281：707－13, 1999を参照。）、循環しているクレアチンキナーゼ濃度（例えば、Alexander et al., Circulation（増補）1629, 1998を参照）、および循環しているc－反応性タンパク質濃度（例えば、Morrow et al., J. Am. Coll. Cardiol. 31：1460－5, 1998参照）等の、ある患者集団においてこのような情報を提供しうるいくつかの可能性のあるマーカーが確認されている。

【0007】

安定狭心症は、激しい活動やストレスによって起こる狭窄した胸部痛により特徴づけられ、休息や舌下のニトログリセリンにより軽減される。不安定狭心症は、舌下のニトログリセリンにより軽減される休息時の狭窄した胸部痛により特徴づけられる。狭心症の胸部痛は、通常舌下のニトログリセリンにより軽減され、痛みは、通常30分以内に治まる。心筋梗塞は、診断の心電図検査（ECG）のQ波を伴いうる、30分以上続く狭窄した胸部痛により特徴づけられる。不安定狭心症は、安定狭心症と心筋梗塞との間の臨床的状态を示すと考えられており、通常アテローム硬化症のプラーク破裂および血栓の形成に関係する。この点において、アテローム硬化症のプラーク破裂は、心筋梗塞の最も一般的な原因となる。

【0008】

安定狭心症の間に炎症が起こり、プラーク破裂のマーカー、血小板の活性化、および早期血栓症が、不安定狭心症の重篤度の進行の同定とモニターに用いられる。定義によれば、狭心症の発作の間に起こる心筋損傷は可逆であり、一方、心筋梗塞の間に起こる損傷は不可逆である。この形式によれば、心筋傷害の特異的マーカーは、心筋梗塞を同定するために用いることができる。穏和な不安定狭心症から重篤な不安定狭心症および心筋梗塞への冠状動脈疾患の進行は、プラークの不安定さおよび動脈の閉塞の度合いに関連する。安定なプラークが増大してより閉塞的になるとこの進行はゆっくりと起こり、不安定なプラークが破裂し、血小板の活性化および閉塞性血栓の形成をもたらすと、これは急激に起こりうる。心筋梗塞は、不安定狭心症と同様の病態生理を最も頻繁に共有するので、これら2つの事象間の唯一の区別が心筋損傷の可逆性とすることが可能である。しかし、重篤な不安定狭心症と穏和な心筋梗塞との間の唯一の区別が臨床的診断に基づいているので、心筋損傷のマーカーは不安定狭心症を有していると診断された患者の末梢循環においても現れるであろう。

【0009】

現在のACSの診断方法は、一般的に臨床的症状、心電図検査（ECG）、および末梢循環の心臓マーカーの測定を含むものである。血管造影も、通常不安定狭心症および急性心筋梗塞（AMI）に関係する重篤な胸部痛の場合に用いられる。ACSの患者は、頻繁に首、あご、肩、または左若しくは両方の腕の内側にしばしば広がる狭窄した胸部痛を有し、呼吸困難、発汗、動悸、頭のふらつき、および吐き気の症状を伴いうる。心筋虚血は、Q波およびST部分の変化等の診断のECGの変化を引き起こしうる。心臓酵素の血漿濃度の上昇は、重篤な不安定狭心症および心筋梗塞に関係した心臓組織壊死の度合いを反映するであろう。

【0010】

従って、この技術分野において、ACSの型を識別し、遅発の不利な事象の危険性を有するこれら個体をも同定できる、ACSの迅速、高感度で特異的な診断方法が現在求められている。このような診断方法は、有益な処置および治療を受けられる患者の数を非常に増加させ、間違った診断に関係する費用を減少させることとなる。

【0011】

（発明の概要）

本発明は、ACS、虚血、および／または壊死の診断および／または予後のマーカーの同定および使用に関連する。ここに記載された方法および組成物は、種々の形態のACSの診断、識別および予後に用いるために、迅速、高感度で特異的な診断方法に対するこの技術分野の要求に合致しうるものである。さらに、本発明の方法および組成物は、ACS患者の処置およびさらなる診断指標の発展を容易にするために用いることもできるものである。

【0012】

「虚血および虚血性の」の用語は、心臓への血流の減少の結果としての心筋への損傷と関連する。「狭心症」、「安定狭心症」、「不安定狭心症」、「無症候性虚血」の用語は、一般的に心筋虚血に関連する。当業者はこれらの用語を認識するはずであり、そしてこれらは「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」第17版、1999、Ed. Keryn A. G. Lane、pp. 1662-1668に記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。虚血の用語は、当業者が軽症の心筋傷害または損傷と見なすであろうものにも関連する。虚血の用語は、Journal of the American College of Cardiology 36、959-969（2000）にさらに記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。

【0013】

「壊死および壊死性の」の用語は、心臓への血流の減少または停止の結果としての心筋細胞死と関係する。心筋壊死は、心筋虚血より重篤な心臓の状態である。「心筋梗塞」の用語は、一般的に心筋壊死と関連する。当業者はこれらの用語を認識するはずであり、そしてこれらは「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」第17版、1999、Ed. Keryn A. G. Lane、pp. 1668-1677に記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。壊死の用語は、当業者が重症の心筋傷害または損傷と見なすであろうものにも関連する。心筋梗塞および壊死の用語は、Journal of the American College of Cardiology 36、959-969（2000）にさらに記載されており、これはここに引用することのみにより本明細書に取り込まれる。

【0014】

種々の知見として、この発明は、患者のACSの診断、予後、または識別に関係するマーカーを同定する物質および工程に関係し、これらのマーカーを用いて、患者を診断および処置し、および／または処置計画の経過をモニターし、これらの状態の処置や予防の利益を提供しうる化合物および医薬組成物をスクリーニングする物質および工程に関連する。

【0015】

最初の知見として、この発明は、患者から得た試験サンプルを心筋傷害の1またはそれ以

上のマーカーの存在または量について分析することによるACSの診断方法の特徴とする。これらの方法は、その存在または量がACSの診断、予後、または識別に関係する、1またはそれ以上のマーカーを同定することを含みうる。このようなマーカーが同定されると、患者サンプル中のこれらのマーカーの濃度が測定できる。ある態様では、これらのマーカーは、ACSの診断、予後、または識別に関係する診断濃度と比較できる。患者の濃度を診断濃度と関連づけることにより、ACSの存在または不存在、および患者における将来の不利な結果の可能性を迅速かつ正確に決定できうる。

【0016】

以下の議論の目的として、心筋梗塞の診断および予後に適用できるとして記載されている方法は、一般的に安定狭心症および不安定狭心症の診断および予後に適用できると考えられる。 10

【0017】

ある態様では、複数のマーカーから個別にまたは小グループとして得られたものと比較して、分析の予測価を増加させるために、これらの複数のマーカーが組み合わされる。好ましくは、記載された方法の予測価を増強するために、心筋傷害の1またはそれ以上の特異的マーカーが、心筋傷害の1またはそれ以上の非特異的マーカーと組み合わされる。

【0018】

ここで用いられる「マーカー」の用語は、患者の試験サンプルをスクリーニングする標的として用いられる分子を指す。このような分子標的の例としては、タンパク質またはポリペプチドがある。本発明でマーカーとして用いられる「タンパク質またはポリペプチド」は、これらのいずれのフラグメント、特に、免疫学的に検出可能なフラグメントをも含むことを企図されている。当業者は、血管傷害により損傷した心臓の細胞から放出されるタンパク質が、このようなフラグメントに分解または切断されることを認識できるはずである。さらに、あるマーカーは、不活性な形態で合成され、タンパク質分解によりその後活性化されうる。このようなマーカーの例は、以下に記載される。ここで用いられる「関連したマーカー」の用語は、マーカーそれ自身の代理として検出されうる特定のマーカーの1またはそれ以上のフラグメントを指す。 20

【0019】

現在のところ、BNPおよびBNP関連ペプチドは、心筋虚血のマーカーとしては用いられてこなかった。さらに、炎症、凝固、およびプラーク破裂等の種々の病態進行の他のマーカーは、心筋虚血のマーカーの大きなパネルの部分集合としては用いられてこなかった。この発明の好ましいマーカーは、心筋梗塞、不安定狭心症、および安定狭心症の患者の診断、識別、および予後を助けることができる。 30

【0020】

ここで用いられる「試験サンプル」の用語は、診断、予後、または評価の目的で得られた生物学サンプルを指す。ある態様では、このようなサンプルは、進行している状態の結果または状態の処置計画の効果を決定する目的のために得られるであろう。好ましい試験サンプルには、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿および唾液が含まれる。さらに、当業者は、いくつかの試験サンプルが分画や精製工程、例えば、全血液を血清または血漿成分に分離すること、の後に、容易に分析できることを認識できるはずである。 40

【0021】

ここで用いられる「心筋傷害の特異的マーカー」の用語は、心臓組織に典型的に関係する分子であり、そしてそれは心臓傷害に関連づけられるが、他の型の傷害には関連づけられないものを指す。このような心臓傷害の特異的マーカーには、アネキシンV、B型ナトリウム排泄増加性ペプチド、 β -エノラーゼ、心臓トロポニンI（遊離および／または複合体）、心臓トロポニンT（遊離および／または複合体）、クレアチンキナーゼMB、グリコーゲンホスホリラーゼBB、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼMB、およびS-100a_oが含まれる。これらの特異的マーカーは、以下に詳細に記載される。

【0022】

ここで用いられる「心筋傷害の非特異的マーカー」の用語は、凝固および鬱血または急性期反応物質の典型的な一般的マーカーである分子を指す。このようなマーカーは、心臓傷害の事象において上昇しうるが、非心臓の事象によっても上昇しうる。血小板の活性化および凝固の機構の因子には、 β -トロンボグロブリン、D-ダイマー、フィブリノペプチドA、血小板由来増殖因子、プラスミン- α -2-抗プラスミン複合体、血小板第4因子、プロトロンビンフラグメント1+2、P-セレクチン、トロンビン-抗トロンビンII複合体、血栓前駆体タンパク質、組織因子、およびフォン・ビルブラント因子が含まれる。これらの非特異的マーカーは、以下に詳細に記載される。

【0023】

ここで用いられる「急性期反応物質」の用語は、感染、傷害、手術、外傷、組織壊死等を含む種々の傷害で起こるストレスの多いまたは炎症性の状態に応じてその濃度が上昇するタンパク質を指す。急性期反応物質の発現および血清濃度の上昇は、傷害の型に特異的ではなく、むしろ傷害に対する恒常性反応の一部である。

【0024】

いくつかの成分が必要でない場合でも、恐らく広範囲の傷害を処理するために、すべての急性期反応物質は傷害に応じて産生される。古典的急性期タンパク質の例には、C-反応性タンパク質、セルロプラスミン、フィブリノーゲン、 α 1-酸性糖タンパク質、 α 1-アンチトリプシン、およびハプトグロビンを含む。インスリン様成長因子-1、インターロイキン-1 β 、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターロイキン-6、インターロイキン-8、トランスホーミング増殖因子 β 、単球走化性タンパク質-1、および腫瘍壊死因子 α のような種々のサイトカインおよび関連分子は、急性期反応にも深く関与する炎症反応の成分である。このようなサイトカインは、傷害部位から血流に放出され、それ自身他の急性期タンパク質の発現を誘導する能力を有する。

【0025】

心筋傷害の他の非特異的マーカーには、アテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーを含む。アテローム硬化症のプラークは、蓄積した脂質、平滑筋細胞、結合組織、およびグリコサミノグリカンからなる。このようなプラークを含む血管は、プラーク形成が進行すると、収縮期の膨張を減少させ、異常急激波伝播を起こし、次第に弾力性を減少させる。プラークは、重篤な狭窄と全体的な動脈閉塞を進行させうる。いくつかのプラークは安定であるが、脂質と炎症細胞を多く含む他のものは典型的に薄い繊維性の被覆を有しており、自然な破裂を受けうる。これらの不安定プラークは、急性虚血事象の発症により緊密に係る。従って、アテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーは、可能性あるACSの犠牲の診断および評価に有用であろう。このようなアテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーには、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1、マトリックスメタロプロテイナーゼ-2、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-9が含まれる。

【0026】

心筋傷害の他の非特異的マーカーには、キャスパーゼ-3、ヘモグロビン α_2 、溶解性細胞間接着分子-1および溶解性血管細胞接着分子-1が含まれる。

【0027】

ここで用いられる「診断」の語は、所定の疾患や状態を患者が患っているかどうかを、当業者が見積もりおよび決定することができる方法を指す。当業者はしばしば、1またはそれ以上の診断指標、即ち、その状態の存在、重篤度、または不存在の表示となるマーカー、その存在、不存在、または量、に基づいて診断を行う。

【0028】

同様に、予後はしばしば、1またはそれ以上の「予後の指標」を試験することにより決定される。これらはマーカーであり、患者（または患者から得たサンプル）中でのその存在または量は、所定の経過または結果が起こる可能性を表示するものである。例えば、1またはそれ以上の予後の指標がこのような患者から得たサンプル中で十分に高い濃度に達し

10

20

30

40

50

た場合、その濃度は、より低いマーカー濃度を示す同様の患者と比較して、その患者が将来事象を経験する増大した可能性を有することを示すこととなる。予後の指標の濃度および濃度の変化は、次に罹患率または死亡の増大した可能性と関係し、患者に「不利な結果となる増大した疾病素因と関係する」ものとみなされる。好ましい予後のマーカーは、患者の遅発の不利な事象の発症、または将来のACSの可能性を予測できる。

【0029】

診断および予後の指標の使用に関連してここで用いられる「関連づけ」の用語は、患者の指標の存在または量を、所定の状態で患うと知られている人若しくはその危険性がある人、または、所定の状態に影響されない、即ち、「健常人」として知られる人の指標の存在または量と比較するものを指す。例えば、患者のサンプルのマーカー濃度は、特異的な型のACSと関係しているとして知られた濃度と比較できる。サンプルのマーカー濃度は、診断と関連づけられたといわれ、これは、当業者が特異的な型のACSを患っている患者かどうかを決定するためにマーカー濃度を使用でき、これに従って対応できることを示すものである。あるいは、サンプルのマーカー濃度は、健常人の集合で見られる平均的な濃度のように、よい結果（例えばACSの不存在）に関係しているとして知られたマーカー濃度と比較することもできる。

【0030】

ある態様では、診断または予後の指標は、単にその存在または不存在によって、状態または疾患と関連づけられる。他の態様では、診断または予後の指標の閾値濃度が確立され、そして患者サンプル中の指標の濃度が単純に閾値濃度と比較されうる。本発明のマーカーの好ましい閾値濃度は、約25 pg/mL、約50 pg/mL、約60 pg/mL、約75 pg/mL、約100 pg/mL、約150 pg/mL、約200 pg/mL、約300 pg/mL、約400 pg/mL、約500 pg/mL、約600 pg/mL、約750 pg/mL、約1000 pg/mL、および約2500 pg/mLである。この文脈で「約」の用語は、+/-10%を指す。

【0031】

また他の態様では、1またはそれ以上の診断または予後のマーカーの複合的決定が行われ、マーカーの一時的変化が診断または予後の決定に用いられうる。例えば、診断指標が1回目に決定され、そして2回目にも決定されうる。このような態様では、1回目から2回目へのマーカーの増加は、特定の型のACSの診断または所定の予後となりうる。同様に、1回目から2回目へのマーカーの減少は、特定の型のACSの表示または所定の予後となりうる。さらに、1またはそれ以上のマーカーの変化の度合いは、ACSの重篤度および将来の不利な事象に関連しうる。

【0032】

また他の態様では、1またはそれ以上の診断または予後のマーカーの複合的決定が行われ、マーカーの一時的変化が適切な治療の効果をモニターするために用いられうる。このような態様では、効果的な治療の経過の間にわたって、マーカーの減少または増加を観察することが期待される。

【0033】

ある態様では、比較測定が複数の時点で同一の診断マーカーについて行われるが、所定のマーカーを1時点で、第2のマーカーを第2の時点で測定し、これらのマーカーの比較が診断情報を提供しうることを、当業者は理解するであろう。

【0034】

ここで用いられる「予後を決定すること」の語は、当業者が患者の状態の経過や結果を予測できる方法を指す。「予後」の用語は、100%の正確さで状態の経過や結果を予測できるものを指さず、また、所定の経過や結果が試験マーカーの存在、不存在または濃度に基づいておよそ起こりそうであると予測できるものを指すものでもない。その代わりに、当業者は、「予後」の用語がある特定の経過や結果が起こることの増大した可能性を指すものと理解できるであろうし、これは、その状態を示していない個体と比較したときに、経過や結果が所定の状態を示す患者において、より起こりそうなものである。例えば、

その状態を示していない個体において、所定の結果を示す可能性は、約 3 % である。好ましい態様では、予後は、所定の結果を示す約 5 % の可能性、約 7 % の可能性、約 10 % の可能性、約 12 % の可能性、約 15 % の可能性、約 20 % の可能性、約 25 % の可能性、約 30 % の可能性、約 40 % の可能性、約 50 % の可能性、約 60 % の可能性、約 75 % の可能性、約 90 % の可能性、および約 95 % の可能性である。この文脈において「約」の用語は、+ / - 1 % を指す。

【0035】

当業者は、予後の指標を不利な結果の疾病素因と関係づけることは統計分析であると理解するであろう。例えば、統計的優位さの濃度によって決定されるような、80 pg / mL より大きなマーカー濃度は、80 pg / mL より少ないかまたは同等の濃度の患者より不利な結果を思いやすい。さらに、ベースライン濃度からのマーカー濃度の変化は、患者の予後を反映するものであり、マーカー濃度の変化の度合いは不利な事象の重篤度と関連するであろう。統計的優位さは、2 またはそれ以上の集団を比較することによりしばしば決定され、信頼区間および / または p 値が決定される。例えば、Dowdy および Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983 を参照のこと。この発明の好ましい信頼区間は、90 %、95 %、97.5 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 % および 99.99 % であり、一方好ましい p 値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001 および 0.0001 である。予後の指標を不利な結果の疾病素因と関係づける典型的な統計検定は、以下に記載される。

10

20

【0036】

他の態様では、予後または診断指標の濃度の変化の閾値度合いが確立され、患者サンプル中の指標の濃度の変化の度合いが、濃度の変化の閾値度合いと単純に比較されうる。この発明のマーカーの濃度の好ましい閾値変化は、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 50 %、約 75 %、約 100 % および約 150 % である。この文脈において「約」の用語は、+ / - 10 % を指す。また他の態様では、「ノモグラム」が確立され、これにより、予後または診断指標の濃度を所定の結果に関係した疾病素因と直接関連づけることができる。集団の平均ではなく個々のサンプル測定結果が参照されるので、2 つの数値をこの測定の不確定性がマーカー濃度の不確定性と同様であるとの理解と関連させるように、当業者はこのようなノモグラムの使用に熟知している。

30

【0037】

また他の知見として、この発明は、ACS と診断された患者に用いる処置計画を決定する方法に関連する。この方法は、好ましくは以下に記載されるように 1 またはそれ以上の診断若しくは予後のマーカーの濃度を決定すること、および患者の診断を決定するためにそのマーカーを用いることを含む。診断に関係する不利な結果の増大する疾病素因を減少させることにより患者の予後を改善する 1 またはそれ以上の処置計画は、患者を処置するために用いることができる。このような方法は、上述のように、患者の予後を改善できる物質の薬理学的な化合物のスクリーニングにも用いられうる。

【0038】

さらなる知見として、この発明は、患者の診断または予後を決定するためのキットに関連する。これらのキットは、好ましくは患者サンプル中の 1 またはそれ以上のマーカー濃度を測定する装置および試薬、また分析を行うための使用説明書を含む。任意に、このキットは、マーカー濃度を予後に変換する 1 またはそれ以上の方法を含みうる。このようなキットは、好ましくは 1 またはそれ以上のこのような決定を行うのに十分な試薬を含む。

40

【0039】

(発明の詳細な記載)

本発明に従って、患者の ACS の診断、予後、または識別に関係するマーカーの同定と使用のための方法および組成物が提供される。このようなマーカーは、患者の診断および処置および / または処置計画の経過のモニター；このような状態の処置または予防に有益なものを提供する化合物および医薬組成物のスクリーニングに使用できるものである。

50

【0040】

心筋虚血は、心筋の酸素の供給と要求との平行失調によって起こるものである。特に、不十分な血液供給により要求が供給を超える。心臓は、全体重に対して少ない割合を占めるが、身体の酸素消費の7%の原因となる。心臓組織の代謝は、非常に酸素を消費し、不十分な血液供給に対して補償する蓄えをほとんど有していない。血液供給が心筋の要求に不十分なレベルに減少した場合、その組織は急激に低酸素となり、毒性の細胞代謝産物を取り除かれなくなる。心筋細胞は局所の微小血管内に残存している酸素供給物を急速に使用し、酸素を消費する代謝が持続する時間の長さは動脈閉塞の度合いに間接的に比例する。酸素供給物を使い果たすと、電子受容体としての酸素がもはや利用不可能なので、酸化的リン酸化が持続できなくなり、ピルビン酸はアセチルC o Aに変換できず、クエン酸回路に入れなくなる。心筋の代謝は、蓄えられたグリコーゲンとグルコースを用いた無酸素代謝に転換し、ピルビン酸が乳酸に発酵される。乳酸の蓄積は、ACSの個体の胸部痛の主要な原因である。虚血が持続すると、乳酸および他の酸性中間物質が蓄積するので心臓組織はより酸性となり、ATP濃度が低下し、利用可能なエネルギー源が涸渇する。心臓組織は、虚血事象の15～20分後に再灌流されれば回復できる。細胞の蓄えられたグリコーゲンが涸渇すると、細胞は徐々にミトコンドリアの膨張および細胞膜の完全性の損失等の壊死の特徴を示す。再灌流により、おそらくイオン平衡を維持する細胞の不能の結果として、これらの損傷した細胞は死ぬ。細胞膜の完全性の損失は、細胞質内容物を循環系に放出する原因となる。

10

【0041】

安定狭心症、不安定狭心症、および心筋梗塞はすべて、心筋虚血に関係する狭窄した胸部痛という1つの共通する特徴を共有する。狭心症は、診断のECGの変化を伴う若しくは伴わない臨床的症状の医師による解釈を通じて安定若しくは不安定に分類される。「安定」または「不安定」という狭心症の分類は、プラークそのものの安定性を指すものではなく、むしろ胸部痛を顕在化させるのに必要な激しい活動の度合いを指す。最も注目になるものとして、明白な心筋梗塞の場合の他は、安定または不安定（または軽症の心筋梗塞でさえ）としての胸部痛の分類は、完全に主観的なものである。診断およびこの場合の区別は、動脈の閉塞度合いを定量しうる血管造影によるのではなく、むしろ臨床的症状の医師の解釈によりなされるのである。

20

【0042】

安定狭心症は、激しい活動やストレスで起こる狭窄した胸部痛により特徴づけられ、休息や舌下のニトログリセリンにより軽減される。安定狭心症の患者の冠状動脈血管造影により、少なくとも1つの冠状動脈において50～70%の遮断が通常見られる。安定狭心症は、通常臨床的症状とECGの変化の評価により診断される。安定狭心症の患者は、一時的なST部分の異常を有するが、安定狭心症に関係したこれらの変化の感度と特異性は低い。

30

【0043】

不安定狭心症は、舌下のニトログリセリンにより軽減される休息時の狭窄した胸部痛により特徴づけられる。狭心症の胸部痛は、通常舌下のニトログリセリンにより軽減され、痛みは通常30分以内に治まる。不安定狭心症には：クラスI、新規の発症で、重篤で、または促進された狭心症として特徴づけられる；クラスII、重篤度が増し、持続し、またはニトログリセリンを必要とすることを特徴とする休息時の亜急性の狭心症；そしてクラスIII、休息時の急性狭心症として特徴づけられる；の3つの分類がある。不安定狭心症は、安定狭心症とAMIとの間の臨床的状态を示し、主として、アテローム硬化症、冠状動脈痙攣、または続いて起こる血栓閉塞を伴う非閉塞性プラークへの出血の重篤度および範囲の進行によるものと考えられている。不安定狭心症の患者の冠状動脈血管造影により、少なくとも1つの冠状動脈において90%またはそれ以上の遮断が通常見られ、ベースラインの心筋の酸素要求を満たす酸素供給でさえ不能となる結果もたらす。安定なアテローム硬化症プラークの遅い成長または後に続く血栓の形成を伴う不安定なアテローム硬化症プラークの破裂は、不安定狭心症の原因となる。これらの原因の両方が、冠状動脈の

40

50

致命的な狭小をもたらす。不安定狭心症は、通常アテローム硬化症プラークの破裂、血小板の活性化、および血栓の形成に関係する。不安定狭心症は、通常臨床的症状、ECG変化、および（もし存在すれば）心臓マーカーの変化によって診断される。不安定狭心症の患者の処置には、硝酸塩、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、およびベータ遮断薬が含まれる。血栓崩壊治療は、不安定狭心症患者に有益であるとは示されておらず、カルシウムチャネル遮断薬も効果がないであろう。患者は、血管形成術およびステントも受けうる。最後に、不安定狭心症患者は、AMIに発展する危険性がある。

【0044】

心筋梗塞は、診断のECGのQ波を伴いうる30分以上継続する狭窄した胸部痛により特徴づけられる。AMIのほとんどの患者は、冠状動脈疾患を有しており、AMIの25%の場合で「無症候性」(silent)または無症候の梗塞であり、糖尿病の個体は無症候性梗塞の疑いがよりつよい傾向にある。集団調査により、20~60%の非致命的な心筋梗塞が患者に認識されない無症候性梗塞であることが示されている。AMIの非定型的臨床的状态には、鬱血性心不全、重篤または持続した発作を伴わない狭心症、非定型的局所の痛み、脳卒中に似た中枢神経系の発現、不安および神経質、突然性躁病または精神病、失神、虚弱、急性消化障害、および末梢血栓形成が含まれる。AMIは、通常臨床的症状、ECGの変化、および心臓性タンパク質で最も顕著には心臓トロポニン、クレアチンキナーゼ-MBおよびミオグロビンの上昇、により診断される。AMIの処置は、過去10年の間改善し、患者の結果を改善し、AMIに関係した死亡率を30%減少させることとなった。AMI患者の処置は、梗塞の大きさを制限し、および、閉塞物質を除去し、心臓組織への酸素供給を増加させ、または心臓組織の酸素要求を減少させることにより結果を改善する、薬を投与することにより成し遂げられる。処置には、酸素の補給、アスピリン、GPIIb/IIIa阻害剤、ヘパリン、血栓崩壊剤(tPA)、硝酸塩(ニトログリセリン)、マグネシウム、カルシウムチャネルアンタゴニスト、 β -アドレナリンレセプター遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血管形成(PTCA)、および管内冠状動脈ステントが含まれる。

【0045】

胸部痛発症から30分の時点は、虚血による可逆性心筋損傷の時期を示すものと考えられる。安定狭心症および不安定狭心症は、血管造影により動脈の閉塞がそれぞれ50~70%および90%以上のものとして特徴づけられ、心筋梗塞は、完全若しくはほぼ完全な閉塞により特徴づけられる。一般的な誤解は、安定狭心症および不安定狭心症はプラークの安定性を指すもの、または、心筋梗塞と一緒に、別個の疾患であるというものである。安定狭心症はしばしば不安定狭心症に進行し、不安定狭心症はしばしば心筋梗塞に進行するので、安定狭心症、不安定狭心症、心筋梗塞はすべて、重篤度の変化した冠状動脈疾患として特徴づけることができる。近年、次の冠状動脈疾患の進行の生理学的モデルが提唱された：炎症→プラーク破裂→血小板活性化→早期血栓症→早期壊死。このモデルは、安定狭心症の間に炎症が起こり、プラーク破裂、血小板活性化、および早期血栓症のマーカーが不安定狭心症の重篤度の進行を同定しモニターするのに用いることができるとの理論に合致させて設計されたものである。狭心症の発作の間に起こる心筋損傷は、定義上可逆性であるが、心筋梗塞の間に起こる損傷は、不可逆性である。従って、安定狭心症、不安定狭心症、およびAMIの区別のためのこのモデルには、2つの提唱された区切りがある。第1のものは、安定狭心症ではプラーク破裂が起こらないとする理論のもとで、炎症とプラーク破裂との間に起こる。第2のものは、不安定狭心症の間に受けた心筋損傷は可逆性のものであるとの理論のもとで、早期血栓症と早期壊死との間で起こる。早期心筋壊死を除いては、これらの事象が冠状動脈疾患のすべての形態と関係でき、この診断経路に沿った進行が必ずしも疾患の進行を示すものではないとうことを理解するのは重要である。軽症の不安定狭心症から重篤な不安定狭心症および心筋梗塞への冠状動脈疾患の進行は、プラークの不安定性と動脈閉塞の度合いに関連する。安定なプラークが増大しより閉塞的になると、この進行はゆっくりと起こり、血小板活性化および閉塞性血栓の形成により不安定なプラークが破裂すると、これは急激に起こりうる。心筋梗塞は、最も頻繁に不安定狭

心症と同一の病態生理を共有するので、これら2つの事象の唯一の区別が心筋損傷の可逆性であるとする事は可能である。定義上、不安定狭心症は可逆性損傷を起こし、一方心筋梗塞は不可逆的損傷を起こす。不安定狭心症の患者には心筋壊死の存在が示されると公表した報告があった。定義上、これらの患者は、実際に早期のAMIを経験するかもしれない。にもかかわらず、これらの患者が早期AMIの代わりに不安定狭心症であると診断されたとしても、高い度合いの重篤度は、早期の集中的な処理により彼らが大いに利益を受けうることを示す。心筋虚血は、安定狭心症、不安定狭心症、および心筋梗塞の病因の主要な決定因子であり、これらは個々の疾患であると考えるべきではない。むしろ、これらは、虚血による心筋損傷の増大する重篤度を反映するものである。

【0046】

10

A C S の凝固カスケード

血管の損傷に続く血液の損失を止めまたは防ぐために用いられる、基本的な2つのメカニズムがある。第1のメカニズムは、血管傷害部位への付着を容易にする血小板の活性化を伴う。活性化した血小板は、次いで血液の損失を減少させまたは一時的に止める血小板栓を形成するように凝集する。活性化した血小板から分泌される多数の因子によって、血小板の凝集の進行、栓の形成および組織の修復がすべて促進され、増強される。血小板の凝集および栓の形成は、活性化した血小板同士の間のフィブリノーゲン架橋の形成により媒介される。第2のメカニズムにより同時に起こる活性化である凝固カスケードは、フィブリノーゲンからのフィブリンの発生および血小板栓を強固にする不溶性のフィブリン血塊の形成をもたらす。

20

【0047】

凝固カスケードは、不活性またはチモーゲンの形態で通常存在する多数のセリンプロテイナーゼを伴う酵素による経路である。血管構造または血管の傷害の異質な表面の存在は、それぞれ、内因性および外因性の凝固経路の活性化をもたらす。最終の共通の経路が続く、これは、セリンプロテイナーゼトロンビンによるフィブリン、および最終的には架橋したフィブリン血塊の発生をもたらすものである。凝固カスケードにおいて、1つの活性化酵素が最初に形成され、これは他のものを活性化する他の酵素を活性化できるものであり、この工程は、調整されずにおかれれば、すべての凝固酵素が活性化されるまで続くこととなる。都合のよいことに、フィブリン溶解並びに凝固経路および血塊形成の活性を調整する内因性のプロテイナーゼ阻害因子の作用等の、適切なメカニズムがある。

30

【0048】

フィブリン溶解は、タンパク質分解による血塊溶解工程である。凝固に類似した方法により、フィブリン溶解は、チモーゲンから活性化したセリンプロテイナーゼにより媒介される。セリンプロテイナーゼプラスミンは、フィブリンを血塊から遊離された小さい分解物に分解する原因となり、血塊の溶解をもたらす。フィブリン溶解は、血塊形成を調整するために凝固のすぐ後に活性化される。内因性セリンプロテイナーゼ阻害因子も、フィブリン溶解の調整剤として機能する。

【0049】

血小板は、2～4 μm の平均直径を有する円形または楕円形の円盤であり、通常血液中に200,000～300,000/ μl の濃度で見出される。これらは、血管の完全性を維持し、血管の傷害部位で血小板栓を形成することにより出血を最初に止め、血小板栓を安定化するフィブリン形成の工程に寄与することにより、止血を維持する基本的な役割を果たす。血管傷害が起こると、血小板は傷害部位および互いに付着し、付着した血小板および傷害が起こった内皮細胞から放出される種々の物質により凝集するように刺激される。これは、放出反応に次ぐものであり、この放出反応では血小板から細胞内顆粒の内容物を分泌し、血小板栓を形成する。凝固カスケードにおいてトロンビンによるフィブリンの形成は、血塊反応に続く栓の硬化およびフィブリンの架橋による栓の安定化を可能にさせる。活性トロンビンは、同時に起こる凝固カスケードで発生し、血小板の活性化および凝集を誘導する能力も有する。

40

【0050】

50

凝固カスケードは、外因性または内因性のいずれかの経路を通じて活性化されうる。これらの酵素の経路は、1つの最終の共通経路を共有する。凝固活性化の結果は、架橋したフィブリン血塊の形成である。フィブリン溶解は、凝固活性化のすぐ後に活性化されるタンパク質分解による血塊の溶解工程であり、おそらく血塊形成の速度と量を制御する作用である。ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA）および組織型プラスミノゲン活性化因子（tPA）は、タンパク質分解によりプラスミノゲンを切断し、活性セリンプロテイナーゼプラスミンを発生させる。プラスミンは、タンパク質分解により架橋フィブリンを消化し、血塊溶解およびフィブリン分解物の産生と放出をもたらす。

【0051】

凝固カスケードの共通経路の第1の工程は、活性トロンビンを生成する第Xa因子／第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビンのタンパク質分解による切断を伴う。トロンビンは、フィブリンを形成するようにフィブリノーゲンをタンパク質分解により切断するセリンプロテイナーゼであり、これは血塊形成の間の架橋ネットワーク中に最終的に蓄積される。

【0052】

マーカーの具体例

（i）心筋傷害の特異的マーカー

アネキシンVは、リポカルチンV、エンドネキシンII、カルホビンジンI、カルシウム結合タンパク質33、胎盤抗凝固タンパク質I、トロンボプラスミン阻害因子、血管抗凝固因子-α、およびアンコリンCIIとも呼ばれ、間接阻害因子であり組織因子の調整因子である33kDaのカルシウム結合タンパク質である。アネキシンVは、すべてのアネキシンファミリー構成員に共通するコンセンサス配列を有する4つの相同繰り返しから構成され、カルシウムおよびホスファチジルセリンに結合し、心臓、骨格筋、肝臓、および内皮細胞等の広く種々の組織で発現する（Giambanco, I. et al., J. Histochem. Cytochem. 39: P1189-1198, 1991; Doubell, A. F. et al., Cardiovasc. Res. 27: 1359-1367, 1993）。アネキシンVの正常血漿濃度は、 $<2\text{ ng/ml}$ である（Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996）。アネキシンVの血漿濃度は、AMIの個体では上昇する（Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996）。広い組織への分布により、アネキシンVの血漿濃度の上昇は、非心臓組織の傷害を含むいずれの状態とも関係するであろう。しかし、血漿アネキシンV濃度が以前の心筋梗塞、胸部痛症候群、弁の心臓疾患、肺疾患、および腎臓疾患の患者では、有意には上昇しないことが1つの研究により見出された（Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996）。これらの先行する結果は、ACSマーカーとしてのアネキシンVの臨床的利用が決定される前に、確認を必要とする。アネキシンVは、AMI発症のすぐ後に血流に放出される。AMI患者の血漿中のアネキシンV濃度は、最初の（入院時の）値から減少し、これが血流から急速に除去されることを示す（Kaneko, N. et al., Clin. Chim. Acta 251: 65-80, 1996）。

【0053】

B型ナトリウム排泄増加性ペプチド（BNP）は、脳型ナトリウム排泄増加性ペプチドとも呼ばれ、32のアミノ酸であり、血圧および液体平衡を調整するためのナトリウム排泄増加系に関係する4kDaのペプチドである（Bonow, R. O., Circulation 93: 1946-1950, 1996）。BNPの前駆体は、「プレプロBNP」と呼ばれる108のアミノ酸分子として合成され、これは、「NTプロBNP」と呼ばれる76のアミノ酸N末端ペプチド（アミノ酸1-76）と、BNPまたはBNP32と呼ばれる32のアミノ酸の成熟ホルモン（アミノ酸77-108）とに、タンパク質分解によりプロセッシングされる。これは、これらの種-NTPプロBNP、BNP32、およびプレプロBNP-の各々がヒト血漿中で循環できることを示している（Tateyam

a et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 185: 760-7 (1992); Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 1175-83 (1995))。プレプロBNPおよびNTプロBNPの2つの形態、並びにBNP、プレプロBNP、およびNTプロBNP由来のペプチド、並びにBNP、NTプロBNPおよびプレプロBNPのタンパク質分解の結果として血液中に存在するペプチドは、BNPに関連しまたは関係したマーカーとして集合的に記載される。BNPおよびBNPに関連したペプチドのタンパク質分解による分解は、文献にも記載されており、これらのタンパク質分解によるフラグメントも、「BNP関連ペプチド」の用語に含まれる。BNPおよびBNP関連ペプチドは、心室の分泌顆粒中に主に見出され、心室体積の拡張および圧力の過負荷の双方に応じて心臓から放出される(Wilkins, M. et al., Lancet 349: 1307-1310, 1997)。BNPの上昇は、増大した心房および肺の楔入圧、心室の収縮期および拡張期の低下した機能、左心室肥大、および心筋梗塞に関係している(Sagnella, G. A., Clinical Science 95: 519-529, 1998)。さらに、鬱血性心不全および腎不全に関係した上昇したBNP濃度についての多数の報告がある。BNPおよびBNP関連ペプチドはACSに特異的なものではないが、これらが虚血による細胞損傷のみではなく、ACSに関係したナトリウム排泄増加系の混乱をも示すのであり得るので、これらはACSの高感度のマーカーとなりうる。ここで用いられる「BNP」の用語は、成熟32アミノ酸のBNP分子そのものを指す。当業者が認識するように、しかし、BNPに関連した他のマーカーも、ACSの患者の診断または予後の指標として役に立ちうる。例えば、BNPは、76アミノ酸の「NTプロBNP」と32アミノ酸のBNP分子とにタンパク質分解によりプロセシングされる108アミノ酸のプレプロBNP分子として合成される。BNPとのその関係によって、NTプロBNP分子の濃度も、患者の診断または予後の情報を提供しうる。「BNPに関連するマーカーまたはBNP関連ペプチド」の語は、32アミノ酸のBNP分子そのものの以外の、プレプロBNP分子を起源とするいずれのポリペプチドをも指す。従って、BNPに関連しまたは関係したマーカーには、NTプロBNP分子、プロドメイン、全32アミノ酸配列よりも小さいBNPのフラグメント、BNP以外のプレプロBNPのフラグメント、およびプロドメインのフラグメントが含まれる。当業者は、循環系がBNPおよびBNP関連分子をタンパク質分解できるプロテアーゼを含んでおり、これらのタンパク質分解された分子(ペプチド)も「BNP関連」とみなされ、そしてこの発明のさらなる主題であることをも認識するであろう。

【0054】

エノラーゼは、 α 、 β 、および γ サブユニットから産生される78kDaのホモまたはヘテロダイマーの細胞質タンパク質である。エノラーゼは、解糖経路における2-ホスホグリセレートとホスホエノールピルベートとの変換を触媒する。エノラーゼは、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、および $\gamma\gamma$ アイソフォームとして存在する。 α サブユニットはほとんどの組織で見出され、 β サブユニットは心臓および骨格筋で見出され、 γ サブユニットはニューロンおよび神経内分泌組織で主として見出される。 β -エノラーゼは、 $\alpha\beta$ および $\beta\beta$ エノラーゼから構成され、筋肉に特異的なものである。 β -エノラーゼの正常血漿濃度は、 $<10\text{ ng/ml}$ (120 pM)である。 β -エノラーゼは、AMIの個体の血清中で上昇するが、狭心症の個体では上昇しない(Nomura, M. et al., Br. Heart J. 58: 29-33, 1987; Herraiez-Dominguez, M. V. et al., Clin. Chim. Acta 64: 307-315, 1975)。不安定狭心症および安定狭心症に関係した血漿 β -エノラーゼ濃度の起こりうる変化についてのさらなる研究が、必要である。 β -エノラーゼの血漿濃度は、心臓手術、筋ジストロフィー、および骨格筋傷害の間で上昇する(Usui, A. et al., Cardiovasc. Res. 23: 737-740, 1989; Kato, K. et al., Clin. Chim. Acta 131: 75-85, 1983; Matsuda, H. et al., Forensic Sci. Int 40 50

． 99：197－208， 1999）。 β -エノラーゼは、心臓または骨格筋傷害に続いて直ちに血流に放出される。血漿 β -エノラーゼ濃度は、心臓手術の手術時段階で150 ng/ml以上に上昇し、1週間上昇したまま維持した。血清 β -エノラーゼ濃度は胸痛およびAMIの発症の約12～14時間後に最大となり、発症から1週間経過後にベースラインに近づき、最大濃度は1 μ g/mlに近づいた（Kato, K. et al., Clin. Chim. Acta 131：75－85, 1983；Nomura, M. et al., Br. Heart J. 58：29－33, 1987）。

【0055】

トロポニンI（TnI）は、25 kDaのトロポニン複合体の阻害要素であり、すべての横紋筋組織で見出される。TnIは、 Ca^{2+} の不存在下でアクチンに結合し、アクチン 10
オシンのATPアーゼ活性を阻害する。心臓組織で見出されるTnIアイソフォーム（cTnI）は、骨格筋TnIから40%分岐したものであり、双方のアイソフォームは免疫学的に識別可能である。cTnIの正常血漿濃度は、<0.1 ng/ml（4 pM）である。血漿cTnI濃度は、AMIの患者で上昇する。不安定狭心症の患者の血漿cTnI濃度の変化についての研究では、相反した結果が得られたが、cTnIは、安定狭心症の 20
個体の血漿では上昇しない（Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82：845－850, 1998；Bertinchant, J. P. et al., Clin. Biochem. 29：587－594, 1996；Tanasijevic, M. J. et al., Clin. Cardiol. 22：13－16, 1999；Musso, P. et al., J. Ital. Cardiol. 26：1013－1023, 1996；Holvoet, P. et al., JAMA 281：1718－1721, 1999；Holvoet, P. et al., Circulation 98：1487－1494, 1998）。心筋虚血の程度が不安定狭心症の重篤度と直接比例するので、不安定狭心症に関係した相反した結果は、cTnIが不安定狭心症の重篤度を決定するために役立ちうることを示している。血漿cTnI濃度は、心臓外傷、鬱血性心不全、および心臓手術、非虚血性拡張型心筋症、筋障害、CNS障害、HIV感染、慢性腎不全、敗血症、肺疾患、および内分泌障害と連動して上昇しうる（Khan, I. A. et al., Am. J. Emerg. Med. 17：225－229, 1999）。この明らかな非特異性は、免疫アッセイ 30
に用いられる抗体の品質と特異性に関連するであろう。cTnIは、心臓細胞死に続いて血流に放出される。AMIの患者のcTnIの血漿濃度は、発症の4～6時間後に有意に上昇し、12～16時間の間に最大となり、1週間上昇したまま持続しうる。不安定狭心症に関係するcTnIの放出の動態も同様であろう。遊離心臓トロポニンI並びに心臓トロポニンIとトロポニンCおよび／またはTとの複合体等の、心臓トロポニンの特異的形態の測定は、ACSの種々の段階を同定する能力を使用者に提供しうる。

【0056】

遊離および複合体化した心臓トロポニンTは、上述の心臓トロポニンIと類似の方法により用いることができるであろう。心臓トロポニンT複合体は、単独でも、あるいは、全心臓トロポニンIとの一部として発現している時でも、進行している心筋損傷の存在と関連した情報を提供し、有用であろう。進行中の虚血は心臓トロポニンTIC複合体の放出を 40
もたらし、心臓トロポニンTIC：全心臓トロポニンIの高い比率が、解決していない虚血による継続性の損傷の表示となり得ることを示すであろう。

【0057】

クレアチンキナーゼ（CK）は、ATPおよびクレアチンからADPおよびホスホクレアチンの可逆的な形成を触媒する85 kDaの細胞質ゾル酵素である。CKは、MおよびB鎖から構成されるホモまたはヘテロダイマーである。CK-MBは、心臓組織に最も特異的であるが、骨格筋および他の組織にも存在するアイソフォームである。CK-MBの正常血漿濃度は、<5 g/mlである。血漿CK-MB濃度は、AMIの患者では有意に上昇する。血漿CK-MBは、安定狭心症の患者では上昇せず、不安定狭心症の患者における血漿CK-MB濃度の上昇に関する研究では、相反した結果が得られた（Thyges 50

en, K. et al., Eur. J. Clin. Invest. 16:1-4, 1986; Koukkunen, H. et al., Ann. Med. 30:488-496, 1998; Bertinchant, J. P. et al., Clin. Biochem. 29:587-594, 1996; Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Norregaard-Hansen, K. et al., Eur. Heart J. 13:188-193, 1992)。心筋虚血の範囲が直接不安定狭心症の重篤度に比例するので、不安定狭心症に関連した相反した結果は、CK-MBが不安定狭心症の重篤度を決定するのに役に立ちうることを示している。血漿CK-MB濃度の上昇は、骨格筋の傷害および腎疾患に関係している。CK-MBは、心臓細胞死に続いて血流に放出される。AMIの患者のCK-MBの血漿濃度は、発症の4~6時間後に有意に上昇し、12~14時間の間に最大となり、3日後にベースラインに戻る。不安定狭心症に係るCK-MB放出の動態も、同様であろう。

【0058】

グリコーゲンホスホリラーゼ (GP) は、糖原分解の間無機リン酸の存在下でグリコーゲンの非還元末端からグルコースの除去 (グルコース-1-リン酸として遊離される) を触媒する188 kDaの細胞間アロステリック酵素である。GPはホモダイマーとして存在し、これは4量体の酵素的に活性なホスホリラーゼAを形成するように、もう一つのホモダイマーと結びつく。免疫学的に識別できる、GPの3つのアイソフォームがある。BBアイソフォームは脳および心臓組織で見出され、MMアイソフォームは骨格筋および心臓組織で見出され、LLアイソフォームは肝臓で優位に見出される (Mair, J. et al., Br. Heart J. 72:125-127, 1994)。GP-BBは、通常筋小胞体糖原分解複合体に係し、この関係は、心筋の代謝状態に依存する (Mair, J., Clin. Chim. Acta 272:79-86, 1998)。低酸素症の発症時にはグリコーゲンが切断され、GP-BBが結合形態から遊離細胞質形態に転換される (Krause, E. G. et al., Mol. Cell Biochem. 160-161:289-295, 1996)。正常血漿GP-BB濃度は、 $<7\text{ ng/ml}$ (36 pM) である。血漿GP-BB濃度は、AMIおよび一時的ST-T上昇の不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Mair, J. et al., Br. Heart J. 72:125-127, 1994; Mair, J., Clin. Chim. Acta 272:79-86, 1998; Rabbitzsch, G. et al., Clin. Chem. 41:966-978, 1995; Rabbitzsch, G. et al., Lancet 341:1032-1033, 1993)。さらに、GP-BBは、冠動脈バイパス手術を受けている患者の手術中のAMIおよび心筋虚血の検出にも用いることができる (Rabbitzsch, G. et al., Biomed. Biochim. Acta 46:S584-S588, 1987; Mair, P. et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32:543-547, 1994)。GP-BBは、CK-MB、心臓トロポニンT、およびミオグロビンに比べ、発症後早期の不安定狭心症およびAMIのより高感度のマーカーであることが示された (Rabbitzsch, G. et al., Clin. Chem. 41:966-978, 1995)。これは脳でも見出されるので、血漿GP-BB濃度は、虚血性脳傷害の間でも上昇しうる。GP-BBは、通常は細胞壊死の結果である細胞膜の透過性の増加も伴う虚血状態下で血流に放出される。GP-BBは、不安定狭心症および一時的ST-T ECG変化を有する個体の胸部痛の4時間以内に有意に上昇し、ミオグロビン、CK-MB、および心臓トロポニンTが正常濃度にとどまる一方で、有意に上昇する (Mair, J. et al., Br. Heart J. 72:125-127, 1994)。さらに、GP-BBは、AMIの患者の胸部痛の発症後1~2時間で有意に上昇しうる (Rabbitzsch, G. et al., Lancet 341:1032-1033, 1993)。不安定狭心症およびAMIの患者の血漿GP-BB濃度は、 50 ng/ml (25

0 pM) を超える (Mair, J. et al., Br. Heart J. 72: 125-127, 1994; Mair, J., Clin. Chim. Acta 272: 79-86, 1998; Krause, E. G. et al., Mol. Cell Biochem. 160-161: 289-295, 1996; Rabbitzsch, G. et al., Clin. Chem. 41: 966-978, 1995; Rabbitzsch, G. et al., Lancet 341: 1032-1033, 1993)。GP-BBは、CK-BBの特異性と同様に、心筋虚血の非常に高感度のマーカーと思われる。GP-BB血漿濃度は、AMI発症後の最初の4時間以内に上昇し、これは心筋損傷の早期のマーカーとして非常に役に立ちうることを示している。さらに、GP-BBは心臓虚血の間に非結合形態に放出され、外傷性傷害では通常放出されないため、これは心臓組織損傷だけではなく虚血のより特異的のマーカーである。これが、心臓手術中の心筋虚血の検出において、GP-BBの有用性として示される最良のものである。GP-BBは、AMIおよび重篤な不安定狭心症の間の早期の心筋虚血の非常に有用なマーカーであろう。

【0059】

心臓型脂肪酸結合タンパク質 (H-FABP) は、脂質代謝を伴う細胞質ゾルの15 kDaの脂質結合タンパク質である。心臓型FABP抗原は、心臓組織だけでなく、腎臓、骨格筋、大動脈、副腎、胎盤、および脳でも見出されている (Veerkamp, J. H. and Maatman, R. G., Prog. Lipid Res. 34: 17-52, 1995; Yoshimoto, K. et al., Heart Vessels 10: 304-309, 1995)。さらに、心臓型FABP mRNAは、精巣、卵巣、肺、乳腺、および胃に見出される (Veerkamp, J. H. and Maatman, R. G., Prog. Lipid Res. 34: 17-52, 1995)。FABPの正常血漿濃度は、 $< 6 \text{ ng/ml}$ (400 pM) である。血漿H-FABP濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で上昇する (Ishii, J. et al., Clin. Chem. 43: 1372-1378, 1997; Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41: 209-217, 1993)。さらに、H-FABPは、AMIの患者の梗塞の大きさを見積もるのに有用であろう (Glatz, J. F. et al., Br. Heart J. 71: 135-140, 1994)。H-FABP源としての心筋組織は、ミオグロビン/FABP (グラム/グラム) 比を決定することにより確かめることができる。約5の比は、FABPが心筋源のものであり、より高い比は骨格筋源であることを示す (Van Nieuwenhoven, F. A. et al., Circulation 92: 2848-2854, 1995)。骨格筋、腎臓および脳のH-FABPの存在のために、血漿H-FABP濃度の上昇は、骨格筋傷害、腎臓疾患、または脳卒中等と関係しうる。H-FABPは、心臓組織壊死に続いて血流に放出される。血漿H-FABP濃度は、CK-MBおよびミオグロビンよりも早く、胸部痛の発症後1~2時間で有意に上昇する (Tsuji, R. et al., Int. J. Cardiol. 41: 209-217, 1993; Van Nieuwenhoven, F. A. et al., Circulation 92: 2848-2854, 1995; Tanaka, T. et al., Clin. Biochem. 24: 195-201, 1991)。さらに、H-FABPは急速に血流から除去され、血漿濃度はAMI発症後24時間後にベースラインに戻る (Glatz, J. F. et al., Br. Heart J. 71: 135-140, 1994; Tanaka, T. et al., Clin. Biochem. 24: 195-201, 1991)。

【0060】

ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM) は、マグネシウムの存在下で3-ホスホグリセリン酸の2-ホスホグリセリン酸への転換を触媒する、29 kDaのMまたはBサブユニットから構成される57 kDaのホモまたはヘテロダイマーの細胞間糖分解酵素である。心臓組織はアイソザイムMM、MB、およびBBを含有し、骨格筋は主としてPGAM-

MMを、他のほとんどの組織はPGAM-BBを含有する(Durany, N. and Carreras, J., Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 114:217-223, 1996)。従って、PGAM-MBは、心臓組織に最も特異的なアイソザイムである。PGAMは、AMIの患者の血漿中で上昇するが、AMI、不安定狭心症および安定狭心症に関係する血漿PGAM濃度の変化を決定するためにはさらなる研究がなされる必要がある(Mair, J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 34:1-66, 1997)。血漿PGAM-MB濃度の上昇は、関連のない心筋のまたは恐らく骨格組織の損傷と関係するかもしれない。PGAM-MBは、細胞壊死に続いて循環系に最も放出されやすい。PGAMは、ラットの血流中では2時間以下の半減期である(Grisolia, S. et al., Physiol. Chem. Phys. 8:37-52, 1976)。

10

【0061】

S-100は、 α および β サブユニットから産生される21kDaのホモまたはヘテロダイマーの細胞質ゾルの Ca^{2+} 結合タンパク質である。これは、 Ca^{2+} 依存シグナル導入経路に沿った細胞工程の活性化に関与すると考えられる(Bonfrer, J. M. et al., Br. J. Cancer 77:2210-2214, 1998)。S-100a($\alpha\alpha$ アイソフォーム)は横紋筋、心臓および腎臓で見出され、S-100a($\alpha\beta$ アイソフォーム)はグリア細胞で見出されるがシュヴァン細胞では見出されず、そしてS-100b($\beta\beta$ アイソフォーム)はグリア細胞およびシュヴァン細胞で高濃度で見出され、ここではこれが主要な細胞質ゾルの構成要素である(Kato, K. and Kimura, S., Biochim. Biophys. Acta 842:146-150, 1985; Hasegawa, S. et al., Eur. Urol. 24:393-396, 1993)。S-100aの正常血清濃度は、 <0.25 ng/ml(12 pM)であり、その濃度は年齢および性別により影響され、男性および年をとった個体では高い濃度となる(Kikuchi, T. et al., Hinyokika Kyo 36:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 81:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。S-100aの血清濃度は、AMIの患者で上昇するが、疑似AMIの狭心症患者では上昇しない(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。不安定および安定狭心症と関係するS-100aの血漿濃度の変化を決定するためには、さらなる研究が必要である。血清S-100aは、腎細胞癌、膀胱癌、腎不全、および前立腺癌、並びに切開心臓手術を受けている患者の血清中で上昇する(Hasegawa, S. et al., Eur. Urol. 24:393-396, 1993; Kikuchi, T. et al., Hinyokika Kyo 36:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 81:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., Clin. Chem. 35:1942-1944, 1989)。S-100aは、細胞死に続いて細胞外空間に放出されるであろう細胞質ゾルタンパク質である。S-100aの血清濃度は、AMIの患者の入院時に有意に上昇し、入院後8時間で最大に増加し、1週間後に減少してベースラインに戻る(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。さらに、S-100aは、CK-MBと比べ、AMI発症後の早期に有意に上昇すると思われる(Usui, A. et al., Clin. Chem. 36:639-641, 1990)。最大血清S-100a濃度は、100 ng/mlを超えうる。再灌流およびその尿素濃度の上昇に続いて心臓手術患者の血清S-100a濃度の急速な減少により示されるように、S-100aは腎臓により血流から急速に除去されうるが、ACSとの関連でS-100aの血流への放出および血流からのクリアランスの動態を決定するためにさらなる研究が必要

20

30

40

50

である (Usui, A. et al., Clin. Chem. 35:1942-1944, 1989)。S-100a α は、心臓組織中で高濃度で見出され、心臓傷害の高感度のマーカーと思われる。ACSのためのこのマーカーの非特異性の主要な供給源には、骨格筋および腎臓組織の傷害が含まれる。S-100a α は、AMI発症のすぐ後に有意に上昇し、不安定狭心症からのAMIの区別を可能に示す。虚血性エピソードと関係した胸部痛で苦しんでいることを示す狭心症および疑似AMIの患者は、有意に上昇したS-100a α 濃度を有していなかった。非特異性の危険性にもかかわらず、CK-MBおよびミオグロビンのものとの区別がないと思われるが、S-100a α は、医師が不安定狭心症からAMIを区別することを可能に示す。

【0062】

(i i) 凝固に関連する心筋傷害のための非特異的マーカー

プラスミンは、タンパク質分解により架橋フィブリンを消化し、血塊溶解をもたらす78 kDaのセリンプロテイナーゼである。70 kDaのセリンプロテイナーゼ阻害因子 α 2-アンチプラスミン (α 2AP)は、プラスミンと共有結合の1:1化学量論的複合体を形成することによりプラスミンの活性を調整する。得られる $\sim$ 150 kDaのプラスミン- α 2AP複合体 (PAP)は、プラスミン阻害複合体 (PIC)とも呼ばれ、 α 2APがフィブリン溶解の間に活性化されたプラスミンと接触した後直ぐに形成される。PAPの正常血清濃度は、 $<1 \mu\text{g/ml}$ (6.9 nM)である。PAPの血清濃度の上昇は、フィブリン溶解の活性化の結果であると考えられる。PAPの血清濃度の上昇は、血塊の存在、またはフィブリン溶解に起因し若しくはフィブリン溶解の結果であるいずれの状態にも関係する。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、AMI、手術、外傷、不安定狭心症、脳卒中、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む。PAPは、プラスミンのタンパク質分解による活性化に続いて直ぐに形成される。PAPは、フィブリン溶解活性化および最近の若しくは継続的な凝固能亢進性状態の存在の特異的マーカーである。これはACSに特異的なものではなく、多数の他の疾患状態でも上昇する。

【0063】

β -トロンボグロブリン (β TG)は、血小板の活性化によって放出される36 kDaの血小板 α 顆粒成分である。 β TGの正常血漿濃度は、 $<40 \text{ ng/ml}$ (1.1 nM)である。 β TGの血漿濃度は、不安定狭心症およびAMIの患者では上昇しているように見えるが、安定狭心症では上昇していない (De Caterina, R. et al., Eur. Heart J. 9:913-922, 1988; Bazzan, M. et al., Cardiologia 34, 217-220, 1989)。血漿 β TGの上昇は、不安定狭心症の患者の虚血エピソードに関連づけられるように見える (Sobel, M. et al., Circulation 63:300-306, 1981)。 β TGの血漿濃度の上昇は、血塊の存在と関係し、または血小板の活性化の原因となるいずれの状態とも関係する。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および脳卒中を含めることができる (Landi, G. et al., Neurology 37:1667-1671, 1987)。 β TGは、血小板の活性化および凝集の直後に循環系に放出される。これは、血漿中で延長された1時間の半減期に続く、10分間の2相半減期を有する (Switalska, H. I. et al., J. Lab. Clin. Med. 106:690-700, 1985)。血漿 β TG濃度は、伝えるところによれば不安定狭心症およびAMIの間で上昇するが、これらの研究は完全に信頼できるものではないであろう。血液採取工程の間の血小板の活性化を避けるために、特別な予防措置が必要である。血小板の活性化は、通常の血液採取の間に一般的なものであり、血漿 β TG濃度の人為的な上昇を導くこととなる。さらに、血流に放出された β TGの量は、個体の血小板数に依存し、これは非常に変動するものである。ACSに関係した β TGの血漿濃度は、 70 ng/ml (2 nM)に近づきうるが、この値は、採取工程の間の血小板の活性化に影響されるであろう。

10

20

30

40

50

【0064】

血小板第4因子(PF4)は、血小板の活性化により放出される40kDaの血小板 α 顆粒成分である。PF4は、血小板活性化のマーカーであり、ヘパリンに結合し中和する能力を有する。PF4の正常血漿濃度は、 $<7\text{ ng/ml}$ (175 pM)である。PF4の血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者では上昇しているように思えるが、安定狭心症では上昇していない(Gallino, A. et al., Am. Heart J. 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., Jpn. Circ. J. 60:277-284, 1996; Bazzan, M. et al., Cardiologia 34:217-220, 1989)。血漿PF4の上昇も、不安定狭心症の患者の虚血のエピソードと関連づけられるように見える(Sobel, M. et al., Circulation 63:300-306, 1981)。PF4の血漿濃度の上昇は、血塊の存在、または血小板の活性化の原因となるいずれの状態とも関連づけらるであろう。これらの状態には、アテローム硬化症、播種性血管内凝固症候群、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および急性脳卒中を含めることができる(Carter, A. M. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1124-1131, 1998)。PF4は、血小板の活性化および凝集の直後に循環系に放出される。血漿中で延長した20分の半減期に続く、1分間の2相半減期を有する。血漿中のPF4の半減期は、ヘパリンの存在により20~40分間延長されうる(Rucinski, B. et al., Am. J. Physiol. 251:H800-H807, 1986)。血漿PF4濃度は、伝えるところによれば不安定狭心症およびAMIの間で上昇するが、これらの研究は完全に信頼できるものではないであろう。血液採取工程の間の血小板の活性化を避けるために、特別な予防措置が必要である。血小板の活性化は、通常の血液採取の間に一般的なものであり、血漿PF4濃度の人為的な上昇を導くこととなる。さらに、血流に放出されたPF4の量は、個体の血小板数に依存し、これは非常に変動しうるものである。疾患に関係したPF4の血漿濃度は、 100 ng/ml (2.5 nM)を超えうるが、この値は、採取工程の間の血小板の活性化に影響されうるであろう。

【0065】

フィブリノペプチドA(FPA)は、16アミノ酸の、トロンビンの作用によりフィブリノーゲンのアミノ末端から遊離した1.5kDaのペプチドである。フィブリノーゲンは、肝臓により合成され分泌される。FPAの正常血漿濃度は、 $<5\text{ ng/ml}$ (3.3 nM)である。血漿FPA濃度は、AMI、不安定狭心症、および異型狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Gensini, G. F. et al., Thromb. Res. 50:517-525, 1988; Gallino, A. et al., Am. Heart J. 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., Jpn. Circ. J. 60:277-284, 1996; Theroux, P. et al., Circulation 75:156-162, 1987; Merlini, P. A. et al., Circulation 90:61-68, 1994; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。さらに、血漿FPAは狭心症の重篤度を示しうる(Gensini, G. F. et al., Thromb. Res. 50:517-525, 1988)。FPAの血漿濃度の上昇は、脳卒中、手術、癌、播種性血管内凝固症候群、ネフローゼ、および血栓性血小板減少性紫斑病等の、凝固経路の活性化を伴ういずれの状態にも関係する。FPAは、トロンビンの活性化およびフィブリノーゲンの切断に続いて循環系に放出される。FPAは小さなペプチドであるので、血流から急速に除去されやすい。FPAは、血塊形成に続いて1ヶ月以上上昇していることが示され、活性な狭心症では最大血漿FPA濃度が 40 ng/ml を超えうる(Gensini, G. F. et al., Thromb. Res. 50:517-525, 1988; Tohgi, H. et al., Stroke 21:1663-1667, 1990)。

【0066】

血小板由来増殖因子 (PDGF) は、相同性サブユニット A および／または B から構成される、28 kDa の分泌されたホモまたはヘテロダイマータンパク質である (Mahadevan, D. et al., J. Biol. Chem. 270:27595-27600, 1995)。PDGF は、間葉細胞のための能力のあるマイトジェンであり、アテローム硬化症の病因に関係している。PDGF は、凝集した血小板および血管傷害部位の近くの単球から放出される。PDGF の正常血漿濃度は、 $< 0.4 \text{ ng/ml}$ (15 pM) である。血漿 PDGF 濃度は、健康な対象や安定狭心症の個体に比べ、AMI および不安定狭心症の個体では、高い (Ogawa, H. et al., Am. J. Cardiol. 69:453-456, 1992; Wallace, J. M. et al., Ann. Clin. Biochem. 35:236-241, 1998; Ogawa, H. et al., Coron. Artery Dis. 4:437-442, 1993)。これらの個体での血漿 PDGF 濃度の変化は、増加した血小板および単球の活性化により最も起こりうる。血漿 PDGF は、脳腫瘍、乳癌、および高血圧の個体で上昇する (Kurimoto, M. et al., Acta Neurochir. (Wien) 137:182-187, 1995; Seymour, L. et al., Breast Cancer Res. Treat. 26:247-252, 1993; Rossi, E. et al., Am. J. Hypertens. 11:1239-1243, 1998)。血漿 PDGF は、いずれの前炎症性状態または、手術、外傷、播種性血管内凝固症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病等の血小板の活性化の原因となるいずれの状態でも上昇しうる。PDGF は、活性化により血小板および単球の分泌性顆粒から放出される。PDGF は、動物では、約 5 分間および 1 時間の 2 相半減期を有する (Cohen, A. M. et al., J. Surg. Res. 49:447-452, 1990; Bowen-Pope, D. F. et al., Blood 64:458469, 1984)。ACS での血漿 PDGF 濃度は、 0.6 ng/ml (22 pM) を超えうる (Ogawa, H. et al., Am. J. Cardiol. 69:453-456, 1992)。PDGF は、血小板活性化の高感度かつ特異的マーカーであり得る。さらに、血管傷害並びに付随する単球および血小板活性化の高感度のマーカーであり得る。

【0067】

プロトロンビンフラグメント 1+2 は、トロンビンの活性化の間にトロンビンのアミノ末端から遊離する 32 kDa のポリペプチドである。F1+2 の正常血漿濃度は、 $< 32 \text{ ng/ml}$ (1 nM) である。ACS に関係する血漿 F1+2 濃度上昇の研究報告は、対立している。F1+2 の血漿濃度は、伝えるところによれば AMI および不安定狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇せず、その変化は大きくない (Merlini, P. A. et al., Circulation 90:61-68, 1994)。他の報告では、心臓血管疾患で血漿 F1+2 濃度の有意な変化がないことを示している (Biasucci, L. M. et al., Circulation 93:2121-2127, 1996; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。血漿中の F1+2 の濃度は、脳卒中、手術、外傷、血栓性血小板減少性紫斑病、および播種性血管内凝固症候群等の凝固活性化に関係したいずれの状態の間でも、上昇しうる。F1+2 は、トロンビンの活性化により直ぐに血流に放出される。F1+2 は、血漿中で約 90 分間の半減期を有し、この長い半減期がトロンビン形成の突発を遮蔽しうることを示された (Biasucci, L. M. et al., Circulation 93:2121-2127, 1996)。

【0068】

P-セレクチンは、顆粒膜タンパク質-140、GMP-140、PADGEM、および CD-62P と呼ばれ、血小板および内皮細胞で発現する ~140 kDa の接着分子である。P-セレクチンは、血小板のアルファ顆粒および内皮細胞のヴァイベル-パラデ体に蓄えられる。活性化により、P-セレクチンは内皮細胞および血小板の表面に急速に

移行し、好中球および単球との「ローリング (rolling)」細胞表面相互作用を容易にする。P-セレクトインの膜結合性および溶解性の型が、同定されている。溶解性P-セレクトインは、細胞外P-セレクトイン分子のタンパク質分解または表面結合性P-セレクトイン分子の極近傍での細胞内骨格細胞成分のタンパク質分解のいずれかによる、膜結合性P-セレクトインの発散により産生されうる (Fox, J. E., Blood Coagul. Fibrinolysis 5:291-304, 1994)。さらに、溶解性P-セレクトインは、N-末端膜内外ドメインをエンコードしないmRNAから翻訳されうる (Dunlop, L. C. et al., J. Exp. Med. 175:1147-1150, 1992; Johnston, G. I. et al., J. Biol. Chem. 265:21381-21385, 1990)。活性化血小板は、膜結合性P-セレクトインを発散して循環系にとどまることができ、P-セレクトインの発散は、血漿P-セレクトイン濃度を約70 ng/mlに上昇させることができる (Michelson, A. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:11877-11882, 1996)。溶解性P-セレクトインは、膜結合性P-セレクトインと異なったコンフォメーションにも適合しうる。溶解性P-セレクトインは、1つの末端に球状ドメインを有するモノマーの棒状構造であり、膜結合分子は、外側に向けた球状ドメインを有するロゼット構造を形成する (Ushiyama, S. et al., J. Biol. Chem. 268:15229-15237, 1993)。溶解性P-セレクトインは、白血球と活性化した血小板および内皮細胞との相互作用を遮蔽することにより炎症と血栓症を調整する重要な役割を果たすであろう (Gamble, J. R. et al., Science 249:414-417, 1990)。溶解性P-セレクトインの正常血漿濃度は、<200 ng/mlである。血液は、通常抗凝固剤としてクエン酸を用いて採取されるが、いくつかの研究では血小板の活性化を防ぐためにプロスタグランジンEのような添加剤を加えたEDTA血漿を用いていた。EDTAは、クエン酸を用いて得たものと比較しうる結果をもたらす適切な抗凝固剤であろう。さらに、溶解性P-セレクトインの血漿濃度は、採取工程の間の潜在的な血小板活性化によっては、影響されないであろう。血漿の溶解性P-セレクトイン濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者では有意に上昇したが、安定狭心症では、運動ストレス試験の後であっても上昇しなかった (Ikeda, H. et al., Circulation 92:1693-1696, 1995; Tomoda, H. and Aoki, N., Angiology 49:807-813, 1998; Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:95-105, 1999; Kaikita, K. et al., Circulation 92:1726-1730, 1995; Ikeda, H. et al., Coron. Artery Dis. 5:515-518, 1994)。AMIについて、膜結合性P-セレクトイン対溶解性P-セレクトインの感度および特異性は、71%対76%および32%対45%であった (Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:95-105, 1999)。不安定狭心症+AMIについて、膜結合性P-セレクトイン対溶解性P-セレクトインの感度および特異性は、71%対79%および30%対35%であった (Hollander, J. E. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:95-105, 1999)。P-セレクトイン発現は、安定狭心症のものと比べ、不安定狭心症の個体からの冠状動脈内粥腫切除標本の方が大きい (Tenaglia, A. N. et al., Am. J. Cardiol. 79:742-747, 1997)。さらに、血漿の溶解性P-セレクトインは、不安定狭心症の患者に比べ、AMIの患者の方が大きい度合いで上昇しうる。血漿の溶解性および膜結合性P-セレクトインは、非インスリン依存性糖尿病および鬱血性心不全の個体でも上昇する (Nomura, S. et al., Thromb. Haemost. 80:388392, 1998; O'Connor, C. M. et al., Am. J. Cardiol. 83:1345-1349, 1999)。溶解性P-セレクトイン濃度は、特発性血小板減少性紫斑病、慢性関節リュウマチ、高コレステロール血症、急性

脳卒中、アテローム硬化症、高血圧、急性肺傷害、結合組織疾患、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、播種性血管内凝固症候群、および慢性腎不全の個体の血漿で上昇する (Katayama, M. et al., Br. J. Haematol. 84:702-710, 1993; Haznedaroglu, I. C. et al., Acta Haematol. 101:16-20, 1999; Ertenli, I. et al., J. Rheumatol. 25:1054-1058, 1998; Davi, G. et al., Circulation 97:953-957, 1998; Frijns, C. J. et al., Stroke 28:2214-2218, 1997; Blann, A. D. et al., Thromb. Haemost. 77:1077-1080, 1997; Blann, A. D. et al., J. Hum. Hypertens. 11:607-609, 1997; Sakamaki, F. et al., A. J. Respir. Crit. Care Med. 151:1821-1826, 1995; Takeda, I. et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 105:128-134, 1994; Chong, B. H. et al., Blood 83:1535-1541, 1994; Bonomini, M. et al., Nephron 79:399-407, 1998)。さらに、血小板の活性化を伴ういずれの状態も、潜在的にはP-セレクチンの血漿上昇の供給源となりうる。P-セレクチンは、内皮細胞血小板の活性化に続いて細胞表面に即座に現れる。膜内外ドメインを欠いた代替mRNAから翻訳された溶解性P-セレクチンも、この活性化に続いて細胞外空間に放出される。溶解性P-セレクチンは、膜結合性P-セレクチンを伴う直接および間接のいずれかによるタンパク質分解によっても形成されうる。血漿の溶解性P-セレクチンは、tPAまたは冠状動脈形成の処置をされたAMIの患者の入院時に上昇し、発症後4時間で最大上昇が起こる (Shimomura, H. et al., Am. J. Cardiol. 81:397-400, 1998)。血漿の溶解性P-セレクチンは、不安定狭心症の患者の狭心症の発作に続いて1時間以内に上昇し、その濃度は時間経過とともに減少し、発作の発症後5時間以上でベースラインに近づいた (Ikeda, H. et al., Circulation 92:1693-1696, 1995)。溶解性P-セレクチンの血漿濃度は、ACSで1 μ g/mlに近づく (Ikeda, H. et al., Coron. Artery Dis. 5:515-518, 1994)。血流への溶解性P-セレクチンの放出および血流から除去に関するさらなる研究が必要がある。P-セレクチンは、血小板および内皮細胞の活性化、血栓の形成を支持する状態、および炎症、の高感度かつ特異的なマーカーでありうる。しかし、これはACSの特異的なマーカーではない。心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに用いた場合、P-セレクチンは、不安定狭心症およびAMIを安定狭心症から識別するのに有用であろう。さらに、溶解性P-セレクチンは、不安定狭心症よりAMIにおいて大きな度合いで上昇しうる。P-セレクチンは、通常は膜結合性と溶解性の2つの型で存在する。公表された研究では、P-セレクチンの溶解型は、血小板および内皮細胞により、膜結合性P-セレクチンを遮蔽することにより、潜在的にはタンパク質分解機構により産生されられている。その血漿濃度が、PF4および β TGのような他の血小板活性化マーカーのように血液採取工程によって影響されないので、溶解性P-セレクチンは、血小板活性化の現在同定されている最も有用なマーカーであることが証明される。

【0069】

トロンビンは、フィブリノーゲンをタンパク質分解により切断してフィブリンを形成する37kDaのセリンプロテイナーゼであり、これは最終的には血塊形成の間に架橋したネットワーク中に蓄積される。アンチトロンビンIII (ATIII) は、トロンビン、第XIa因子、第XIIa因子、および第IXa因子のタンパク質分解による活性化の生理学的調整因子である65kDaのセリンプロテイナーゼ阻害因子である。ATIIIの阻害活性は、ヘパリンの結合に依存する。ヘパリンは、2~3桁の大きさとATIIIの阻害活性を増強し、ATIIIにより阻害されるプロテイナーゼのほとんど瞬時の不活性化

をもたらす。A T I I I は、共有結合の 1 : 1 化学量論的複合体の形成を通じて、その標的プロテイナーゼを阻害する。約 100 kDa のトロンビン A T I I I 複合体 (T A T) の正常血漿濃度は、 $< 5 \text{ ng/ml}$ (50 pM) である。T A T 濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で、特に突発性虚血エピソードの間で上昇する (B i a s u c c i, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996; K i e n a s t, J. et al., Thromb. Haemost. 70:550-553, 1993)。さらに、T A T は、安定狭心症の個体の血漿でも上昇する (M a n t e n, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。他の公表された報告では、A C S 患者の血漿の T A T 濃度に有意な違いはないことが見出された (M a n t e n, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998; H o f f m e i s t e r, H. M. et al., Atherosclerosis 144:151-157, 1999)。A C S に関係した血漿 T A T 濃度の変化を決定するためには、さらなる研究が必要である。血漿 T A T 濃度の上昇は、脳卒中、手術、外傷、播種性血管内凝固症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病等の凝固活性化に関係したいずれの状態にも関係する。T A T は、ヘパリンの存在下でトロンビンの活性化に続いて直ぐに形成され、これはこの相互作用の限定因子である。T A T は、血流中で約 5 分間の半減期を有する (B i a s u c c i, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。T A T 濃度は上昇し、15 分後に急激な落ち込みを示して、凝固活性化に続いて 1 時間以内にベースラインに戻る。T A T の血漿濃度は、A C S で 50 ng/ml に近づく (B i a s u c c i, L. M. et al., Circulation 93:2121-2127, 1996)。T A T は、凝固活性化、特にトロンビンの活性化の特異的マーカーである。T A T は、プラーク破裂および／または心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに診断パネルの凝固活性化のマーカーとして有用であろう。

【0070】

D-ダイマーは、200 kDa の概算分子量を有する架橋フィブリン分解物である。D-ダイマーの正常血漿濃度は、 $< 150 \text{ ng/ml}$ (750 pM) である。D-ダイマーの血漿濃度は、A M I および不安定狭心症の患者で上昇するが、安定狭心症では上昇しない (H o f f m e i s t e r, H. M. et al., Circulation 91:2520-2527, 1995; B a y e s - G e n i s, A. et al., Thromb. Haemost. 81:865-868, 1999; G u r f i n k e l, E. et al., Br. Heart J. 71:151-155, 1994; K r u s k a l, J. B. et al., N. Engl. J. Med. 317:1361-1365, 1987; T a n a k a, M. and S u z u k i, A., Thromb. Res. 76:289-298, 1994)。D-ダイマーの血漿濃度は、脳卒中、手術、アテローム硬化症、外傷、および血栓性血小板減少性紫斑病等の凝固およびフィブリン溶解活性化に関係したいずれの状態の間でも上昇するであろう。D-ダイマーは、プラスミンによるタンパク質分解による血塊溶解に続いて直ぐに血流中に放出される。血漿 D-ダイマー濃度は、A C S 発症後直ぐに上昇し (6 時間以内に)、個体の凝固能亢進の度合いに比例して上昇したまま維持するであろう。この点で、A C S に続く血流からの D-ダイマーの除去の動態を決定するためには、さらなる研究が必要である。D-ダイマーの血漿濃度は、不安定狭心症の患者では $2 \mu\text{g/ml}$ を超える (G u r f i n k e l, E. et al., Br. Heart J. 71:151-155, 1994)。血漿 D-ダイマーは、フィブリン溶解の特異的マーカーであり、A M I および不安定狭心症に関係したプロトロンビンの状態の存在を示すものである。D-ダイマーは、A C S に特異的ではなく、D-ダイマーの血漿上昇は、A C S の様々な危険因子に関係するであろう。しかし、心臓傷害に特異的なマーカーを含むパネルの構成員として用いる場合、D-ダイマーは、安定狭心症からの不安定狭心症および A M I の区別を可能にする。この識別は、医師が急性の胸部痛を示している患者をより効率的に処置することを可能にする。

【0071】

フォン・ビルブラント因子 (vWF) は、一連の高分子量多量体を形成することに関係する 220 kDa のモノマーから構成される、血小板、巨核球、および内皮細胞により産生される血漿タンパク質である。これらの多量体は、通常 600 ~ 20,000 kDa の分子量の範囲に入る。vWF は、循環している凝固因子 V III を安定化すること、および他の血小板と同様に、露出した内皮下層への血小板の接着を媒介することにより、凝固工程に参加する。vWF の A1 ドメインは、血小板糖タンパク質 I b - I X - V 複合体および非原繊維 V I 型コラーゲンに結合し、A3 ドメインは、原繊維 I および I I I 型コラーゲンに結合する (Emsley, J. et al., J. Biol. Chem. 273:10396-10401, 1998)。vWF 分子に存在する他のドメインには、血小板-血小板相互作用を媒介するインテグリン結合ドメイン、11A 型フォン・ビルブラント疾患の病因に関連すると思われるプロテイナーゼ切断ドメイン、が含まれる。vWF の血小板との相互作用は、正常の生理状態では、vWF と血小板との相互作用を避けるために厳しく調整される。vWF は、通常球状の状態で存在し、高い剪断応力の状態で伸長した鎖構造へのコンフォメーション転移を受け、これは通常血管傷害部位に見出される。このコンフォメーションの変化は、分子の分子内ドメインを露出し、vWF が血小板と相互作用することを可能にする。さらに、剪断応力は、内皮細胞からの vWF の放出の原因となり、非常に多数の vWF 分子を血小板と相互作用可能にする。vWF のコンフォメーションの変化は、リストセチンおよびボトロセチンのような非生理学的調整因子の添加により *in vitro* で誘発されうる (Miyata, S. et al., J. Biol. Chem. 271:9046-9053, 1996)。血管傷害部位では、vWF は、内皮下層マトリックスのコラーゲンと迅速に結合し、実質上不可逆的に血小板に結合し、傷害部位において血小板と血管内皮下層との間の架橋を効果的に形成する。vWF のコンフォメーションの変化が内皮下層マトリックスとの相互作用に必要ないかもしいという証拠も示されている (Sixma, J. J. and de Groot, P. G., Mayo Clin. Proc. 66:628-633, 1991)。これは、vWF が、血管傷害部位において露出した内皮下層マトリックスに結合し、非常に局在化した剪断応力のためにコンフォメーションの変化を受け、循環している血小板に迅速に結合し、新しく形成した血栓中に蓄積されるであろうことを示している。vWF の全量の測定は、当業者が脳卒中や心臓血管疾患に関係した全 vWF 濃度の変化を同定することを可能にする。この測定は、種々の形態の vWF 分子を測定することを通じて行われる。A1 ドメインの測定は、循環系の活性 vWF の測定を可能にし、A1 ドメインが血小板の結合に近づきやすいので、凝固促進性の状態が存在することを示すこととなる。この点において、露出した A1 ドメインと、インテグリン結合ドメイン若しくは A3 ドメインのいずれかと、の双方において vWF 分子を特異的に測定するアッセイは、それぞれ、血小板-血小板相互作用を媒介することを可能にするか、または血小板の血管内皮下層への架橋を媒介する、活性 vWF の同定をも可能に示う。これらの vWF 形態のいずれかの測定は、プロテアーゼ切断ドメインに特異的な抗体を用いるアッセイを用いた場合に、フォン・ビルブラント疾患の存在にかかわらず、いずれの個体においても種々の vWF 形態の循環している濃度を決定するために用いるアッセイを可能に示う。vWF の正常血漿濃度は、血小板凝集物として測定した場合、5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または 60 ~ 110 % の活性度である。vWF の特異的形態の測定は、脳卒中および心臓血管疾患等のいずれの型の血管疾患においても重要であろう。血漿 vWF 濃度は、伝えるところによれば AMI および不安定狭心症の患者では上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Goto, S. et al., Circulation 99:608-613, 1999; Tousoulis, D. et al., Int. J. Cardiol. 56:259-262, 1996; Yazdani, S. et al., J Am Coll Cardiol 30:1284-1287, 1997; Montalescot, G. et al., Circulation 98:294-299)。さらに、血漿 vWF 濃度の上昇は、不安定狭心症の患者の不利な臨床的結果の予測量になりうる (Montalescot 10

, G. et al., Circulation 98:294-299)。vWF濃度は、脳卒中およびクモ膜下出血の患者でも上昇することが示されており、脳卒中に続く死亡の危険の評価にも有用と思われる(Blann, A. et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 10:277-284, 1999; Hirashima, Y. et al., Neurochem Res. 22:1249-1255, 1997; Catto, A. J. et al., Thromb. Hemost. 77:1104-1108, 1997)。vWFの血漿濃度は、内皮細胞の損傷または血小板の活性化に関係するいずれの事象とも連動して上昇しうる。vWFは、血流中で高濃度で存在し、活性化により血小板および内皮細胞から放出される。vWFは、血小板の活性化、または、特に血小板の活性化および血管傷害部位への接着に好ましい状態、のマーカーとして最良の有益がありそうである。vWFのコンフォメーションは、部分的に狭窄した血管に関係するような、高い剪断応力により変化することも知られている。血液が狭窄した血管を流れると、疾患を有しない個体の循環系で遭遇するものよりも相当高い剪断応力を受ける。この発明の他の知見は、剪断応力から生じるvWFの形態およびACSの存在に対するその形態の相関を測定することである。

【0072】

組織因子(TF)は、脳、腎臓および心臓で発現する45kDaの細胞表面タンパク質であり、血管周辺の細胞および単球上で転写により調整される。TFは、 Ca^{2+} イオンの存在下で第VIIa因子と複合体を形成し、それが膜結合の場合に生理学的に活性である。この複合体は、第X因子を、第Xa因子を形成するようにタンパク質分解により切断する。これは、通常血流から隔離されている。組織因子は、血流中で溶解型、第VIIa因子に結合したもの、または第VIIa因子との複合体、および第Xa因子をも含むうる組織因子経路阻害因子、として検出されうる。TFは、マクロファージの表面でも発現し、これは通常アテローム硬化症プラーク中に見出される。TFの正常血清濃度は、 $<0.2\text{ ng/ml}$ (4.5 pM)である。血漿TF濃度は、虚血性心臓疾患の患者で上昇する(Falciani, M. et al., Thromb. Haemost. 79:495-499, 1998)。TFは、不安定狭心症およびAMIの患者で上昇するが、安定狭心症の患者では上昇しない(Falciani, M. et al., Thromb. Haemost. 79:495-499, 1998; Suefujii, H. et al., Am. Heart J. 134:253-259, 1997; Misumi, K. et al., Am. J. Cardiol. 81:2226, 1998)。さらに、マクロファージでのTFの発現およびアテローム硬化症プラークでのTFの活性は、安定狭心症より不安定狭心症においてより一般的である(Soejima, H. et al., Circulation 99:2908-2913, 1999; Kikitani, K. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17:2232-2237, 1997; Ardissino, D. et al., Lancet 349:769-771, 1997)。不安定狭心症に対する安定狭心症の血漿TF濃度の違いは、統計的に有意なものではないであろう。TFの血清濃度の上昇は、外因性経路を通じた凝固活性化の原因となるまたはその結果であるいずれの状態にも関係する。これらの状態には、クモ膜下出血、播種性血管内凝固症候群、腎不全、脈管炎、および鎌状赤血球症を含めることができる(Hirashima, Y. et al., Stroke 28:1666-1670, 1997; Takahashi, H. et al., Am. J. Hematol. 46:333-337, 1994; Koyama, T. et al., Br. J. Haematol. 87:343-347, 1994)。TFは、血管傷害が血管外細胞障害と結びつくと、直ぐに放出される。虚血性心臓疾患患者のTF濃度は、発症の2日以内に 800 pg/ml を超えうる(Falciani, M. et al., Thromb. Haemost. 79:495-499, 1998)。TF濃度は、慢性期と比べて、AMIの慢性期では減少した(Suefujii, H. et al., Am. Heart J. 134:253-259, 1997)。TFは、外因性凝固経路の活性化および一般的な凝固

能亢進性状態の存在の特異的マーカーである。これは、プラーク破裂による血管傷害の高感度のマーカーとなり、パネル構成員として有益であろう。これは、ACSに特異的ではなく、多くの疾患状態でも上昇し、血液採取工程により人為的にも上昇しうる。しかし、血栓崩壊治療の患者を除外するためのマーカーとしてTFを用いることは可能であろう。血栓崩壊治療の間の組織型プラスミノゲン活性化因子(tPA)の注入は、フィブリン溶解の活性化をもたらし、患者は、血塊を維持できなくなる。血管傷害の個体へのtPAの投与は、最終的には出血をもたらすこととなる。

【0073】

凝固カスケードは、外因性または内因性のいずれかの経路を通じて活性化されうる。これらの酵素的経路は、1つの最終の共通経路を共有する。共通経路の第1の工程は、第Xa因子/第Va因子プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビンのタンパク質分解による切断を伴い、活性トロンピンを生成する。トロンピンは、フィブリノーゲンをタンパク質分解により切断するセリンプロテイナーゼである。トロンピンは、フィブリノーゲンからフィブリノペプチドAを最初に取り除いてdesAAフィブリンモノマーを生成し、これは、フィブリン分解物、フィブリノーゲン分解物、desAAフィブリン、およびフィブリノーゲン等のすべの他のフィブリノーゲン由来タンパク質と複合体を形成しうる。desAAフィブリンモノマーは、フィブリノーゲン切断の最初の産物であるので、一般的には溶解性フィブリンを指すが、第XIIa因子を介して不溶性フィブリン血塊に未だ架橋していない。desAAフィブリンモノマーは、トロンピンによるさらなるタンパク質分解による切断を受けて、フィブリノペプチドBを取り除き、desAABBフィブリンモノマーを生成する。このモノマーは、他のdesAABBフィブリンモノマーと重合して溶解性desAABBフィブリンポリマーを形成し、これは溶解性フィブリンまたは血栓前駆体タンパク質(TpTTM)とも呼ばれる。TpTTMは、溶解性フィブリンの直近の前駆体であり、これは「網状」構造を形成して新しく形成した血栓に構造的な強固さを提供する。この点において、血漿中のTpTTMの測定は、活性な血塊形成の直接的な測定となる。TpTTMの正常血漿濃度は、 $<6\text{ ng/ml}$ である(Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズは、TpTTMのアッセイを開発し(米国特許番号5453359および5843690)、TpTTMアッセイは、AMIの早期診断、胸部痛を有する患者のAMIの除外、およびAMIに進行するであろう不安定狭心症の患者の同定、を補助できると述べている。他の研究により、TpTTMがAMIの患者において、発症の6時間以内に最もしばしば上昇することが確認された(Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997; Carville, D. G. et al., Clin. Chem. 42:1537-1541, 1996)。TpTTMの血漿濃度は、不安定狭心症の患者でも上昇するが、これらの上昇は、狭心症の重篤度および来るべきAMIの進行の表示となりうる(Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。血漿中のTpTTMの濃度は、播種性血管内凝固症候群、深層静脈血栓症、鬱血性心不全、手術、癌、胃腸炎、およびコカインの過剰投与等の凝固活性化の原因となるまたはその結果であるいずれの状態の間にも、理論的には上昇するであろう(Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。TpTTMは、トロンピンの活性化に続いて直ぐに血流に放出される。TpTTMは、血塊形成部位において不溶性フィブリンに即座に転換されるので、血流中では短い半減期を有することとなる。血漿TpTTM濃度は、AMI発症の3時間以内に最大となり、発症から12時間後に正常に戻る。TpTTMの血漿濃度は、CVDで 30 ng/ml を超えうる(Laurino, J. P. et al., Ann. Clin. Lab. Sci. 27:338-345, 1997)。TpTTMは、凝固活性化の高感度かつ特異的マーカーである。心臓組織傷害の特異的マーカーと併せて用いた場合のみであるが、TpTTMがAMIの診断に有用であることが示された。TpTTMは、ACSに特異

的なマーカーではなく、その濃度は、ACSの発展の危険因子と見なされる状態等の凝固活性化を伴う多数の疾患状態において上昇するであろう。TpTTMは、不安定狭心症の重篤度を決定するのににも有用であろう。アメリカンバイオジェネティックサイエンシーズ社は、TpTTMELISAアッセイキットの使用者に抗凝固剤としてクエン酸を用いて血液を採取することを指示しており、彼らはEDTAを用いることに反対の提言をしている。血漿TpTTM濃度に対する血液採取の間に用いられる抗凝固剤の効果は、現状では不明確である。血液採取工程が制御できれば、TpTTMは凝固活性化の利用可能な最良のマーカーであろう。

【0074】

(iii) アテローム硬化症のプラーク破裂に関連した心筋傷害の非特異的マーカー

アテローム硬化症のプラーク破裂に関連したマーカーの出現は、ACSがアテローム硬化症のプラーク破裂による場合、心筋傷害の特異的マーカーに先行するであろう。アテローム硬化症のプラーク破裂の可能性のあるマーカーには、ヒト好中球エラスターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファチド酸、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質、並びにMMP-1、-2、-3および-9等のマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）ファミリーの種々の構成員が含まれる。

【0075】

ヒト好中球エラスターゼ（HNE）は、好中球のアズール親和顆粒に通常含まれる30 kDaのセリンプロテイナーゼである。HNEは、好中球の活性化により放出され、その活性は循環している $\alpha 1$ -プロテイナーゼ阻害因子により調整される。活性化した好中球は、アテローム硬化症プラーク中で通常見出され、これらのプラークの破裂はHNEの放出をもたらす。血漿HNE濃度は、通常HNE- $\alpha 1$ -PI複合体を検出することにより測定される。これらの複合体の正常濃度は、50 ng/mlであり、これはHNEについては約25 ng/ml（0.8 nM）の正常濃度であることを示す。HNEの放出は、血漿中で、特異的HNE由来フィブリノペプチドである、フィブリノペプチドB β_{30-43} の特異的検出を通じて測定される。血漿HNEは、冠動脈狭窄の患者で上昇し、その上昇は単純プラークを有するものよりも複合プラークを有する患者の方が大きい（Kosar, F. et al., *Angiology* 49:193-201, 1998; Amaro, A. et al., *Eur. Heart J.* 16:615-622, 1995）。血漿HNEは、安定狭心症の患者では有意に上昇しないが、不安定狭心症およびAMIの患者では上昇し、フィブリノペプチドB β_{30-43} の測定による決定では、不安定狭心症での濃度は、AMIに関連したものに比べ2.5倍高い（Dinnerman, J. L. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:1559-1563, 1990; Mehta, J. et al., *Circulation* 79:549-556, 1989）。血清HNEは、心臓手術、運動に誘導される筋肉の損傷、巨細胞性動脈炎、急性呼吸窮迫症候群、虫垂炎、膵臓炎、敗血症、喫煙に係した気腫、および嚢胞性繊維症で上昇する（Genereau, T. et al., *J. Rheumatol.* 25:710-713, 1998; Mooser, V. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1060-1065, 1999; Gleeson, M. et al., *Eur. J. Appl. Physiol.* 77:543-546, 1998; Gando, S. et al., *J Trauma* 42:1068-1072, 1997; Eriksson, S. et al., *Eur. J. Surg.* 161:901-905, 1995; Liras, G. et al., *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 87:641-652, 1995; Endo, S. et al., *J. Inflamm.* 45:136-142, 1995; Janoff, A., *Annu Rev Med* 36:207-216, 1985）。HNEは、血液凝固の間で放出される（Plow, E. F. and Plescia, J., *Thromb. Haemost.* 59:360-363, 1988; Plow, E. F., *J. Clin. Invest.* 69:564-572, 1982）。HNEの血清上昇は、好中級の

10

20

30

40

50

リクルートメントおよび活性化を伴ういずれの非特異的感染または炎症にも関係しうる。活性化した好中級がアテローム硬化症プラークに存在するので、これはプラーク破裂により最も放出されやすい。HNEは、おそらく $\alpha 1$ -PIとの複合体を形成した後に肝臓により除去される。

【0076】

誘導型一酸化窒素シンターゼ (iNOS) は、その発現がインターフェロン- γ 、インターロイキン- 1β 、インターロイキン-6、および腫瘍壊死因子 α 等のサイトカイン並びにリポ多糖類により調整される、上皮細胞マクロファージの130kDaの細胞質ゾルタンパク質である。iNOSは、L-アルギニンからの一酸化窒素(NO)の合成を触媒し、その誘導は持続した高出力のNO産生をもたらす、これは抗菌活性を有し、様々な生理的および炎症性事象の媒介物である。iNOSによるNO産生は、構成的発現型NOSにより産生される量の約100倍以上である(Depre, C. et al., Cardiovasc. Res. 41:465-472, 1999)。ACSに関連した血漿iNOS濃度変化についての公表された研究はない。iNOSは、冠状動脈アテローム硬化症プラークで発現し、過酸化窒素の産生を通じてプラークの安定性を妨害し、これはNOと過氧化物との産物であり血小板の接着と凝固を増進するものである(Depre, C. et al., Cardiovasc. Res. 41:465-472, 1999)。心臓虚血の間のiNOSの発現は上昇せず、iNOSがAMIから狭心症を識別するために有用であり得ることを示している(Hammerman, S. I. et al., Am. J. Physiol. 277:H1579-H1592, 1999; Kaye, D. M. et al., Life Sci 62:883-887, 1998)。血漿iNOS濃度の上昇は、肝硬変、鉄欠乏性貧血、または細菌感染等のマクロファージの活性化をもたらすいずれの他の状態にも関係しうる(Jimenez, W. et al., Hepatology 30:670-676, 1999; Ni, Z. et al., Kidney Int. 52:195-201, 1997)。iNOSは、アテローム硬化症のプラーク破裂の結果として血流に放出され、血流中のiNOSの増加した量の存在は、プラーク破裂が起こっただけでなく、血小板の接着を促進するための理想的な環境が創生されたことを示すであろう。しかし、iNOSは、アテローム硬化症のプラーク破裂に特異的ではなく、その発現は、非特異的な炎症状態の間にも誘導されうる。

【0077】

リゾホスファチド酸(LPA)は、ホスホグリセリド類およびトリアシルグリセロールの合成において形成されるリゾリン脂質の中間体である。これは、アシル-補酵素Aによるグリセロール-3リン酸のアシル化により、低密度リポタンパク質(LDL)の穏やかな酸化の間に形成される。LPAは、血管作用性の性質を有する脂質の第2メッセンジャーであり、血小板活性化因子として機能できる。LPAは、アテローム硬化症病巣の成分であり、特に中心部にあり、最も破裂しやすい(Sieess, W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 6931-6936, 1999)。正常血漿LPA濃度は、540nMである。血清LPAは、腎不全並びに卵巣癌および他の婦人科の癌で上昇する(Sasagawa, T. et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 44:809-818, 1998; Xu, Y. et al., JAMA 280:719-723, 1998)。不安定狭心症との関連で、LPAは、プラーク破裂の直接の結果として最も放出されやすい。血漿LPA濃度は、婦人科の癌の患者において60 μ Mを超えうる(Xu, Y. et al., JAMA 280:719-723, 1998)。血清LPAは、アテローム硬化症のプラーク破裂の有用なマーカーであり、安定狭心症からの不安定狭心症の区別を可能にしうる。しかし、LPAは、プラーク破裂の他のマーカーのように特異的ではないであろう。

【0078】

マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質(MDA-修飾LDL)は、ホスホリパー

ゼ活性、プロスタグランジン合成、または血小板の活性化の結果としてのLDLのapo B-100部分の酸化の間に形成される。LDLのMDA修飾が脂質の過酸化の不存在下で起こるので、MDA-修飾LDLは、酸化LDLから識別できる(Holvoet, P., Acta Cardiol. 53:253-260, 1998)。MDA-修飾LDLの正常血漿濃度は、 $4\mu\text{g/ml}$ ($\sim 10\mu\text{M}$)以下である。酸化LDLの血漿濃度は、安定狭心症、不安定狭心症、およびAMIで上昇し、アテローム硬化症のマーカーであり得ることを示す(Holvoet, P., Acta Cardiol. 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., Circulation 98:1487-1494, 1998)。血漿MDA-修飾LDLは、安定狭心症では上昇しないが、不安定狭心症およびAMIでは有意に上昇する(Holvoet, P., Acta Cardiol. 53:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., Circulation 98:1487-1494, 1998; Holvoet, P. et al., JAMA 281:1718-1721, 1999)。血漿MDA-修飾LDLは、ベーターサラセミアの個体および腎臓移植患者において上昇する(Livrea, M. A. et al., Blood 92:3936-3942, 1998; Ghanem, H. et al., Kidney Int. 49:488-493, 1996; van den Dorpel, M. A. et al., Transpl. Int. 9 Suppl. 1:S54-S57, 1996)。さらに、血清MDA-修飾LDLは、低酸素症の間に上昇する(Balagopal akrishna, C. et al., Adv. Exp. Med. Biol. 411:337-345, 1997)。MDA-修飾LDLの血漿濃度は、胸部痛の発症から6~8時間以内に上昇する。MDA-修飾LDLの血漿濃度は、AMIの患者では $20\mu\text{g/ml}$ ($\sim 50\mu\text{M}$)に、不安定狭心症の患者では $15\mu\text{g/ml}$ ($\sim 40\mu\text{M}$)に近づきうる(Holvoet, P. et al., Circulation 98:1487-1494, 1998)。血漿MDA-修飾LDLは、マウスで5分以下の半減期を有する(Ling, W. et al., J. Clin. Invest. 100:244-252, 1997)。MDA-修飾LDLは、急性冠状動脈症候群のアテローム硬化症のプラーク破裂の特異的マーカーと思われる。しかし、MDA-修飾LDLの血漿濃度の上昇がプラーク破裂の結果であるのか、または血小板の活性化の結果であるのかは、不明確である。最も妥当な説明は、MDA-修飾LDLの増大した量の存在は両方の事象の表示であるというものである。MDA-修飾LDLは、安定狭心症からの不安定狭心症およびAMIの区別に有用でありうるが、それ単独では不安定狭心症からのAMIを識別できない。この点において、MDA-修飾LDLは、特に不安定狭心症からAMIを区別できる他のマーカーとともに用いた場合に、マーカーのパネルの一部として最も有用であろう。

【0079】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-1(MMP-1)は、コラゲナーゼ-1とも呼ばれ、主としてI型コラーゲンを切断するがII、III、VIIおよびX型コラーゲンも切断する、 $41/44\text{kDa}$ の亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。活性な $41/44\text{kDa}$ の酵素は、自己分解を受けなお活性な $22/27\text{kDa}$ の形態になりうる。MMP-1は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される(Johnson, J. L. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1707-1715, 1998)。MMP-1は、他のMMPと同様に、細胞外マトリックスの再構築に関係しており、これは傷害に続いて、または血管間細胞移動の間に起こりうる。MMP-1は、遊離またはその天然阻害因子であるTIMP-1との複合体のいずれかの形態で血流中に見出される。MMP-1は、血漿中で通常 $<25\text{ng/ml}$ の濃度で見出される。ACSに関係したMMP-1の血清または血漿濃度変化についての結論的な公表された研究はない。しかし、MMP-1は、アテローム硬化症プラークの肩領域で見出され、これは最も破裂しやすい領域であり、アテローム硬化症プラークの不安定化に

関係しうる (Johnson, J. L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。さらに、MMP-1は、心筋再灌流傷害の病因に関連する (Shibata, M. et al., *Angiology* 50:573-582, 1999)。血清MMP-1は、マスト細胞の分解を誘導する炎症性状態で上昇しうる。血清MMP-1濃度は、関節炎および全身性エリテマトーデスの患者で上昇する (Keyszer, G. et al., *Z Rheumatol* 57:392-398, 1998; Keyszer, G. J. *Rheumatol.* 26:251-258, 1999)。血清MMP-1は、前立腺癌の患者でも上昇し、その上昇の度合いは、腫瘍の転移の可能性に対応する (Baker, T. et al., *Br. J. Cancer* 70:506-512, 1994)。MMP-1の血清濃度は、他の型の癌の患者においても上昇する。血清MMP-1は、ヘモクロマトーシスの患者および慢性ウイルス性肝炎の患者で減少し、ここではその濃度が重篤度に反比例している (George, D. K. et al., *Gut* 42:715-720, 1998; Murawaki, Y. et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:138-145, 1999)。MMP-1は、マスト細胞の脱顆粒の間で放出され、おそらくアテローム硬化症のプラーク破裂の間で放出される。MMP-1濃度は、EDTA血漿または血清に比べヘパリンを加えた血漿では低く、希釈したサンプルは、希釈しないサンプルに比べELISAアッセイで高い濃度値を示し、タンパク質MMP阻害因子またはマトリックス成分の阻害効果の減少によるものと考えられる (Lein, M. et al., *Clin. Biochem.* 30:491-496, 1997)。血清MMP-1は、AMIに続く最初の4日間で減少し、その後増加し、AMI発症の2週間後に最大濃度に達した (George, D. K. et al., *Gut* 42:715-720, 1998)。

【0080】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-2 (MMP-2) は、ゼラチナーゼAとも呼ばれ、不活性な72 kDaの前駆体として合成される、66 kDaの亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟MMP-2は、I型ゼラチン並びにIV、V、VIIおよびX型コラーゲンを切断する。MMP-2は、血管平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される (Johnson, J. L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1707-1715, 1998)。MMP-2は、血漿中で通常その生理学的調整因子であるTIMP-2との複合体として見出される (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* 30:1090-1098, 1999)。MMP-2の正常血漿濃度は、 $< \sim 550 \text{ ng/ml}$ (8 nM) である。MMP-2の発現は、アテローム硬化症の病巣の血管平滑筋細胞で上昇し、これはプラークが不安定の場合に血流に放出されうる (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。さらに、MMP-2は、プラークの不安定性および破裂に寄与するものとして関係する (Shah, P. K. et al., *Circulation* 92:1565-1569, 1995)。血清MMP-2濃度は、安定狭心症、不安定狭心症、およびAMIの患者で上昇し、不安定狭心症およびAMIでは、安定狭心症に比べその上昇は有意に高かった (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。トレッドミル運動試験後の安定狭心症の個体における血清MMP-2濃度の変化はなかった (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:368-372, 1998)。血清および血漿MMP-2は、胃癌、幹細胞癌、肝硬変、尿路上皮癌、リウマチ様関節炎、および肺癌の患者で上昇する (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* 30:1090-1098, 1999; Endo, K. et al., *Anticancer Res.* 17:2253-2258, 1997; Gohji, K. et al., *Cancer* 78:2379-2387, 1996; Gruber, B. L. et al., *Clin. I*

mmunol. Immunopathol. 78:161-171, 1996; Garbisa, S. et al., Cancer Res. 52:4548-4549, 1992)。さらに、MMP-2は、血小板凝集の間に血小板細胞質ゾルから細胞外空間にも転移しうる(Sawicki, G. et al., Thromb. Haemost. 80:836-839, 1998)。MMP-2は、不安定狭心症およびAMIの個体の血清で入院時に上昇し、最大濃度は $1.5 \mu\text{g/ml}$ (25 nM) に近づいた(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。血清MMP-2濃度は、不安定狭心症およびAMIの双方において発症の1~3日後に最大となり、1週間後に正常に戻り始めた(Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。

10

【0081】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) は、ストメリシン-1とも呼ばれ、不活性な60 kDaの前駆体として合成される45 kDaの亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟MMP-3は、プロテオグリカン、フィブリネクチン、ラミニニン、およびIV型コラーゲンを切断するが、I型コラーゲンを切断しない。MMP-3は、平滑筋細胞、マスト細胞、マクロファージ由来泡沫細胞、Tリンパ球、および内皮細胞等の種々の細胞により合成される(Johnson, J. L. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1707-1715, 1998)。MMP-3は、他のMMPと同様に、細胞外マトリックスの再構築に関係しており、これは傷害に続いて、または血管間細胞移動の間に起こりうる。MMP-3は、血漿中で通常 $<125 \text{ ng/ml}$ の濃度で見出される。血清MMP-3濃度も年齢とともに増加することが示され、男性における濃度は、女性よりも約2倍高い(Manicourt, D. H. et al., Arthritis Rheum. 37:1774-1783, 1994)。ACSに関係したMMP-3の血清または血漿濃度変化についての結論的な公表された研究はない。しかし、MMP-3は、アテローム硬化症プラークの肩領域で見出され、これは最も破裂しやすい領域であり、アテローム硬化症プラークの不安定化に関係しうる(Johnson, J. L. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:1707-1715, 1998)。従って、MMP-3濃度は、不安定狭心症のアテローム硬化症のプラーク破裂の結果として上昇しうる。血清MMP-3は、マスト細胞の脱顆粒を誘導する炎症状態で上昇しうる。血清MMP-3濃度は、関節炎および全身性エリテマトーデスの患者で上昇する(Zucker, S. et al., J. Rheumatol. 26:78-80, 1999; Keyszer, G. et al., Z Rheumatol. 57:392-398, 1998; Keyszer, G. et al., J. Rheumatol. 26:251-258, 1999)。血清MMP-3は、前立腺および尿路上皮の癌並びに糸球体腎炎の患者でも上昇する(Lein, M. et al., Urologie A 37:377-381, 1998; Gohji, K. et al., Cancer 78:2379-2387, 1996; Akiyama, K. et al., Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 95:115-128, 1997)。MMP-3の血清濃度は、他の型の癌の患者でも上昇しうる。血清MMP-3は、ヘモクロマトーシスの患者で減少する(George, D. K. et al., Gut 42:715-720, 1998)。

20

30

40

【0082】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) は、ゼラチナーゼBとも呼ばれ、不活性な92 kDaの前駆体として合成される84 kDaの亜鉛およびカルシウム結合プロテイナーゼである。成熟MMP-9は、IおよびV型ゼラチン、並びにIVおよびV型コラーゲンを切断する。MMP-9は、モノマー、ホモダイマー、および25 kDaの $\alpha 2$ -ミクログロブリン-関連タンパク質とのヘテロダイマーとして存在する(Triebel, S. et al., FEBS Lett. 314:386-388, 1992)。

50

）。MMP-9は、種々の細胞型により、最も顕著には好中球により合成される。MMP-9の正常血漿濃度は、 $< 35 \text{ ng/ml}$ (400 pM)である。MMP-9の発現は、アテローム硬化症病巣の血管平滑筋細胞で上昇し、これはプラークが不安定の場合に血流に放出されうる (Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。さらに、MMP-9は、ACSの発生に病原の役割を有しうる (Brown, D. L. et al., Circulation 91:2125-2131, 1995)。血漿MMP-9濃度は、不安定狭心症およびAMIの患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。AMIの患者での上昇は、これらの個体が不安定狭心症を患っていたことも示しうる。MMP-9の血漿濃度の上昇は、不安定狭心症がAMIに比べ大きいであろうが、これらの違いは統計的に有意ではないであろう。安定狭心症の患者のトレッドミル運動試験後の血漿MMP-9濃度の有意な変化はなかった (Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。血漿MMP-9は、リウマチ性関節炎、敗血症性ショック、巨細胞性動脈炎および種々の癌腫の個体で上昇する (Gruber, B. L. et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 78:161-171, 1996; Nakamura, T. et al., Am. J. Med. Sci. 316:355-360, 1998; Blankaert, D. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 18:203-209, 1998; Endo, K. et al., Anticancer Res. 17:2253-2258, 1997; Hayasaka, A. et al., Hepatology 24:1058-1062, 1996; Moore, D. H. et al., Gynecol. Oncol. 65:78-82, 1997; Sorbi, D. et al., Arthritis Rheum. 39:1747-1753, 1996; Iizasa, T. et al., Clin. Cancer Res. 5:149-153, 1999)。さらに、血漿MMP-9濃度は、脳卒中および脳出血で上昇しうる (Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G. A., J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:1163-1172, 1998; Romanic, A. M. et al., Stroke 29:1020-1030, 1998; Rosenberg, G. A., J. Neurotrauma 12:833-842, 1995)。MMP-9は、不安定狭心症およびAMIの個体の血清で入院時に上昇し、最大濃度は 150 ng/ml (1.7 nM)に近づいた (Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。血清MMP-9濃度は、不安定狭心症の患者の入院時に最高であり、その濃度は処置後徐々に減少し、発症の1週間以上後にベースラインに近づいた (Kai, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:368-372, 1998)。

【0083】

(iv) 心筋傷害の他の非特異的マーカー

炎症性反応の活性化は、ACSの初期段階で明白であろう。この点において、炎症および急性期反応物の非特異的マーカーの循環系濃度の測定は、ACSの個体および発生するACSの危険性を有する個体を同定するために用いられるであろう。炎症および急性期反応物に関係するこのようなマーカーの例には、C-反応性タンパク質、インターロイキン- 1β 、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターロイキン-6、単球走化性タンパク質-1、溶解性細胞間接着分子-1、溶解性血管細胞接着分子-1、腫瘍壊死因子 α 、キャスパーゼ-3およびヘモグロビン α_2 がある。

【0084】

C-反応性タンパク質 (CRP) は、宿主の防御に関連する 21 kDa のサブユニットを有するホモ5量体の Ca^{2+} 結合急性期タンパク質である。CRPは、微生物の膜の一般

的な構成成分であるホスホリルコリンに選択的に結合する。ホスホリルコリンは、動物細胞膜でも見出されるが、CRPと反応しうる形態では存在しない。CRPのホスホリルコリンとの相互作用は、補体カスケードを活性化すると同様に、細菌の凝集反応およびオプソニン作用を促進し、これらすべては細菌のクリアランスに関連する。さらに、CRPは、DNAおよびヒストンと相互作用でき、これはCRPが損傷細胞から循環系に放出された核物質のスカベンジャーであることを示す(Robey, F. A. et al., J. Biol. Chem. 259:7311-7316, 1984)。CRP合成はIL-6により誘導され、IL-1が肝臓洞様血管のクップファー細胞によるIL-6の合成の引き金となりうるため、IL-1により間接的に誘導される。CRPの正常血漿濃度は、健康な集団の90%では $<3\mu\text{g}/\text{ml}$ (30nM)であり、健康な個体の99%では $<10\mu\text{g}/\text{ml}$ (100nM)である。血漿CRP濃度は、比濁法またはELISAにより測定できる。CRPの血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない(Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Biasucci, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996; Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:1295-1304, 1998; Curzen, N. P. et al., Heart 80:23-27, 1998; Dangas, G. et al., Am. J. Cardiol. 83:583-5, A7, 1999)。CRPは、変異体(variant)または消散型(resolving)の不安定狭心症の個体の血漿でも上昇するが、相反した結果が報告されている(Benamer, H. et al., Am. J. Cardiol. 82:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 32:1295-1304, 1998)。CRPは、AMIまたは不安定狭心症の患者の結果を予測するためには有用ではないであろう(Curzen, N. P. et al., Heart 80:23-27, 1998; Rebuzzi, A. G. et al., Am. J. Cardiol. 82:715-719, 1998; Oltrona, L. et al., Am. J. Cardiol. 80:1002-1006, 1997)。CRPの濃度は、感染、手術、外傷、および脳卒中のような急性期反応を顕在化させうるいずれの状態の個体でも、血漿において上昇するであろう。CRPは、合成直後に血流に放出される分泌性タンパク質である。CRP合成は、IL-6により調整され、血漿CRP濃度は、刺激の6時間以内に有意に上昇する(Biasucci, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。血漿CRP濃度は、刺激後約50時間で最大となり、血流において約19時間の半減期で減少し始める(Biasucci, L. M. et al., Am. J. Cardiol. 77:85-87, 1996)。他の研究により、不安定狭心症の個体の血漿CRP濃度が確認された(Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996)。CRPの血漿濃度は、ACSの個体で $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1\mu\text{M}$)に近づく(Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Liuzzo, G. et al., Circulation 94:2373-2380, 1996)。CRPは、急性期反応の特異的マーカーである。CRPの上昇は、AMIおよび不安定狭心症の個体の血漿で同定され、アテローム硬化症のプラーク破裂または心臓組織傷害と関係した急性期反応の活性化の結果として最もあり得ることである。CRPは、ACSに極めて非特異的なマーカーであり、血漿におけるCRP濃度の上昇は、免疫系の活性化を伴う状態に関連せず起こるであろう。ACSに対する非特異性のその高い度合いにもかかわらず、心臓組織傷害に特異的な他のマーカーとともに使用された場合に、CRPは不安定狭心症およびAMIの同定に有用であろう。血漿は、高濃度のCRPを有し、報告された健康な個体の血液中のCRP濃度には、高い変動性がある。明らかに健康な個体の血漿のCRP濃度の上限

を決定するためには、競合イムノアッセイが最も可能性が高いが、様々な血漿サンプルについての単一のアッセイを用いたさらなる研究が必要である。

【0085】

インターロイキン-1 β (IL-1 β) は、急性期反応に関連する17 kDaの分泌性前炎症性サイトカインであり、多くの疾患の病原性媒介物である。IL-1 β は、通常マクロファージおよび上皮細胞により産生される。IL-1 β は、アポトーシスが進行中の細胞からも放出される。IL-1 β の正常血清濃度は、 $< 30 \text{ pg/ml}$ (1.8 pM)である。ACSの個体のIL-1 β の血漿濃度の潜在的上昇についての結論的な研究はなく、おそらくアッセイの感度限界またはACS発症直後の血流からのIL-1 β のクリアランスによるものであろう。IL-1 β は急性期反応の早期の関係物であるので、理論的には、IL-1 β は不安定狭心症およびAMIにおけるCRPのような他の急性期反応タンパク質に比べ早期に上昇するであろう。さらに、IL-1 β は、アポトーシスが進行中の細胞から放出され、これは虚血の早期の段階で活性化されうる。この点において、ACSに関係した血漿IL-1 β 濃度の上昇については、高感度のアッセイを用いたさらなる研究が必要である。血漿IL-1 β 濃度の上昇は、外傷および感染のような前炎症性状態における急性期反応の活性化に関係する。IL-1 β は、4時間に続く5分間の2相生理学的半減期を有する(Kudo, S. et al., Cancer Res. 50:5751-5755, 1990)。IL-1 β は、炎症性反応またはアポトーシスの活性化により細胞外環境に放出される。AMIおよび不安定狭心症エピソード後のわずかな短い時間だけIL-1 β が上昇する可能性があり、入院時のACSの患者から採取されたほとんどの血液サンプルが、発作に続くIL-1 β 上昇の時期の範囲外となる。

【0086】

インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)は、肝細胞、上皮細胞、単球、マクロファージ、および好中級において優勢的に発現する17 kDaのIL-1ファミリーの構成員である。IL-1raは、選択的スプラッシングを通じて産生される細胞内および細胞外形態の両方を有する。IL-1raは、生理的IL-1活性の調整に関係すると考えられている。IL-1raは、IL-1様の生理的活性を有していないが、IL-1 α およびIL-1 β の結合を遮蔽してそれらの生化学的活性を阻害して、IL-1 β と同様の親和性によりT細胞および繊維芽細胞のIL-1レセプターに結合することができる(Stockman, B. J. et al., Biochemistry 31:5237-5245, 1992; Eisenberg, S. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:5232-5236, 1991; Carter, D. B. et al., Nature 344:633-638, 1990)。IL-1raは、通常血漿中でIL-1に比べて高濃度で存在し、IL-1ra濃度がIL-1に比べて疾患の重篤度とより相関していることが示された(Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。さらに、IL-1raが急性期タンパク質であるという証拠がある(Gabay, C. et al., J. Clin. Invest. 99:2930-2940, 1997)。IL-1raの正常血漿濃度は、 $< 200 \text{ pg/ml}$ (12 pM)である。IL-1raの血漿濃度は、AMIおよびAMI、死亡、または難治性狭心症に進行する不安定狭心症の患者で上昇する(Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999; Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994)。さらに、IL-1raは、合併症を伴わないAMIと比較して重篤なAMIで有意に上昇する(Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994)。これは、IL-1raが不安定狭心症およびAMIにおいてACSの重篤度の有用なマーカーであり得ることを示す。IL-1raの血漿濃度の上昇は、感染、外傷、および関節炎等の炎症性または急性期反応の活性化を伴ういずれの状態にも関係する。IL-1raは、前炎症性状態の血流に放出され、急性期反応の関連物としても放出されうる。血流からのIL-1r

aのクリアランスの主要な起点は、腎臓および肝臓であると思われる (Kim, D. C. et al., J. Pharm. Sci. 84:575-580, 1995)。IL-1ra濃度は、不安定狭心症の個体の血漿で発症の24時間以内に上昇し、これらの上昇は発症の2時間以内でさえも明白であろう (Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。不安定狭心症が重度に進行した患者では、IL-1raの血漿濃度は、入院時の濃度に比べ発症の48時間後の方が高いが、一方平穩に進行した患者では、その濃度が減少した (Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。さらに、不安定狭心症に関係したIL-1raの血漿濃度は、1.4 ng/ml (80 pM) に近づきうる。IL-1raは、ACSの重篤度の有用なマーカーであろう。これはACSの特異的マーカーではないが、IL-1raの血漿濃度の変化は、疾患の重篤度に関連していると思われる。さらに、これは、前炎症性状態においてIL-1の放出と連動してまたはその直後に放出されやすく、IL-1に比べ高い濃度で見出される。これは、IL-1raがIL-1活性の有用な間接的なマーカーであり得ることを示し、IL-1はIL-6の産生を顕在化させるものである。従って、IL-1raは、不安定狭心症およびAMIの重篤度を等級付けするのみならず、IL-6濃度が有意に上昇する前に、急性期反応の早期の段階を同定するのに有用であろう。

【0087】

インターロイキン-6 (IL-6) は、ヘマトポエチンファミリーの前炎症性サイトカインである20 kDaの分泌性タンパク質である。IL-6は、急性期の反応物であり、接着分子等の種々のタンパク質の合成を刺激する。その主要な機能は、肝臓タンパク質の急性期産生を媒介することであり、その合成はサイトカインIL-1により誘導される。IL-6は、通常マクロファージおよびTリンパ球により産生される。IL-6の正常血清濃度は、 $<3 \text{ pg/ml}$ (0.15 pM) である。IL-6の血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で上昇し、AMIにおいて大きい度合いである (Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998; Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。IL-6は、安定狭心症の患者の血漿では有意には上昇しない (Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。さらに、IL-6濃度は、重篤な進行の不安定狭心症患者の血漿では、発症の48時間以降に増加するが、平穩の進行のものでは減少する (Biasucci, L. M. et al., Circulation 99:2079-2084, 1999)。これは、IL-6が疾患の進行の有用な指標となりうることを示している。IL-6の血漿上昇は、外傷、感染、または急性期反応を顕在化させる他の疾患のようないずれの非特異的前炎症性状態にも関係する。IL-6は、血流中で4.2時間の半減期を有し、AMIおよび不安定狭心症に続いて上昇する (Manten, A. et al., Cardiovasc. Res. 40:389-395, 1998)。IL-6の血漿濃度は、AMI発症の8~12時間以内に上昇し、 100 pg/ml に近づきうる。不安定狭心症の患者のIL-6の血漿濃度は、発症の72時間後に最大濃度に上昇し、おそらく発作の重篤度によるものである (Biasucci, L. M. et al., Circulation 94:874-877, 1996)。IL-6は、ACSに関係した炎症の高感度のマーカーと思われる。しかし、これはACSに特異的ではなく、ACSの危険因子と見なされる種々の状態で上昇しうる。しかし、IL-6は、AMIまたは不安定狭心症の重篤度を同定するのに有用であり、医師が疾患の進行についてこれらの患者を詳しくモニターすることを可能にしうる。さらに、IL-6は、不安定狭心症およびAMIを安定狭心症から識別するのに有用であろう。

【0088】

腫瘍壊死因子 α (TNF α)は、急性期反応に関連した17kDaの分泌性前炎症性サイトカインであり、多くの疾患の病原性の媒介物である。TNF α は、通常マクロファージおよびナチュラルキラー細胞により産生される。TNF α の正常血清濃度は、40pg/ml (2pM)である。TNF α の血漿濃度は、AMIの患者で上昇し、不安定狭心症の患者でわずかに上昇する (Li, D. et al., Am. Heart J. 137:1145-1152, 1999; Squadrito, F. et al., Inflamm. Res. 45:1419, 1996; Latini, R. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 23:1-6, 1994; Carlstedt, F. et al., J. Intern. Med. 242:361-365, 1997)。TNF α の血漿濃度の上昇は、外傷、脳卒中、および感染等のいずれの前炎症性状態にも関係する。TNF α は、血流中で約1時間の半減期を有し、症状の発症直後に循環系から除去されうること示す。AMIの患者では、TNF α は、胸部痛の後4時間で上昇し、発症の48時間以内に正常濃度に徐々に減少する (Li, D. et al., Am. Heart J. 137:1145-1152, 1999)。AMI患者の血漿中のTNF α の濃度は、300pg/ml (15pM)を超えた (Squadrito, F. et al., Inflamm. Res. 45:14-19, 1996)。

【0089】

溶解性細胞間接着分子 (sICAM-1)は、CD54とも呼ばれ、白血球のリクルートメントおよび移動の間の白血球の抗原存在細胞および内皮細胞への結合を促進する、85~110kDaの細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。sICAM-1は、血管内皮、造血幹細胞および、非造血幹細胞により通常産生され、これは腸および表皮で見出されるものである。sICAM-1は、細胞死の間またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出されう。sICAM-1の正常血漿濃度は、約250ng/ml (2.9nM)である。sICAM-1の血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の患者で有意に上昇するが、安定狭心症では上昇しない (Pellegatta, F. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997; Miwa, K. et al., Cardiovasc. Res. 36:37-44, 1997; Ghaisas, N. K. et al., Am. J. Cardiol. 80:617-619, 1997; Ogawa, H. et al., Am. J. Cardiol. 83:38-42, 1999)。さらに、ICAM-1は、アテローム硬化症の病巣および病巣の形成を受けやすい範囲で発現し、このためこれはプラーク破裂により血流に放出されう (Iiyama, K. et al., Circ. Res. 85:199-207, 1999; Tenaglia, A. N. et al., Am. J. Cardiol. 79:742-747, 1997)。sICAM-1の血漿濃度の上昇は、虚血性脳卒中、頭部の外傷、アテローム硬化症、癌、子癇前症、多発性硬化症、嚢胞性線維症、および他の非特異的炎症性状態に関係する (Kim, J. S., J. Neurol. Sci. 137:69-78, 1996; Laskowitz, D. T. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 7:234-241, 1998)。sICAM-1の血漿濃度は、AMIおよび不安定狭心症の急性段階の間で上昇する。血漿sICAM-1の上昇は、AMI発症の9~12時間以内にその最大に達し、24時間以内に正常濃度に戻る (Pellegatta, F. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997)。sICAMの血漿濃度は、AMIの患者で700ng/ml (8nM)に近づく (Pellegatta, F. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 30:455-460, 1997)。sICAM-1は、AMIおよび不安定狭心症の個体の血漿で上昇するが、これらの疾患に特異的ではない。しかし、血漿上昇が安定狭心症に関係しないため、これは安定狭心症からのAMIおよび不安定狭心症の識別に有用なマーカーであろう。興味深いことに、ICAM-1は、アテローム硬化症プラーク中に存在し、プラーク破裂により

血流に放出されうる。従って、s I C A Mは、炎症のみならず、A C Sに関係したプラーク破裂のマーカーとしても有用であろう。

【0090】

血管細胞接着分子（V C A M）は、C D 1 0 6とも呼ばれ、リンパ球のリクルートメントの間のBリンパ球および発生中のTリンパ球の抗原存在細胞への結合を促進する、100～110 k D aの細胞表面結合免疫グロブリン様インテグリンリガンドである。V C A Mは、通常内皮細胞により産生され、これは血管およびリンパ管、心臓、並びに他の体腔の内側を覆うものである。V C A M-1は、細胞死の間またはタンパク質分解活性の結果として細胞表面から放出されうる。s V A C Mの正常血清濃度は、約650 ng/ml（6.5 nM）である。s V C A M-1の血漿濃度は、A M I、不安定狭心症、および安定狭心症の患者でわずかに上昇する（Mulvihill, N. et al., Am. J. Cardiol. 83:1265-7, 1999; Ghaisas, N. K. et al., Am. J. Cardiol. 80:617619, 1997）。しかし、s V C A M-1は、アテローム硬化症の病巣で発現し、その血漿濃度は、アテローム硬化症の範囲に関連づけられる（Iiyama, K. et al., Circ. Res. 85:199-207, 1999; Peter, K. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17:505-512, 1997）。s V C A M-1の血漿濃度の上昇は、虚血性脳卒中、癌、糖尿病、子癇前症、血管傷害、および他の非特異的炎症性状態に関係する（Bitsch, A. et al., Stroke 29:2129-2135, 1998; Otsuki, M. et al., Diabetes 46:20962101, 1997; Banks, R. E. et al., Br. J. Cancer 68:122-124, 1993; Steiner, M. et al., Thromb. Haemost. 72:979-984, 1994; Austgulen, R. et al., Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 71:53-58, 1997）。

【0091】

単球走化性タンパク質-1（M C P-1）は、単球および好塩基球を引き寄せるが、好中級および好酸球を引き寄せない10 k D aの走化性因子である。M C P-1は、通常モノマーおよびホモダイマーの形態の間で平衡して見出され、通常単球および血管内皮細胞中で産生され、かつ分泌される（Yoshimura, T. et al., FEBS Lett. 244:487-493, 1989; Li, Y. S. et al., Mol. Cell. Biochem. 126:61-68, 1993）。M C P-1は、乾癬、リウマチ性関節炎、およびアテローム硬化症等の単球浸潤を伴う種々の疾患の病原と関係する。血漿中のM C P-1の正常濃度は、<0.1 ng/mlである。M C P-1の血漿濃度は、A M I患者で上昇し、不安定狭心症の患者の血漿ではおそらく上昇するが、安定狭心症に関係しては上昇しない（Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:983-988, 1999; Nishiyama, K. et al., Jpn. Circ. J. 62:710-712, 1998; Matsumori, A. et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 29:419-423, 1997）。興味深いことに、M C P-1は、アテローム硬化症の間で動脈血管壁への単球のリクルートメントにも関係しうる。M C P-1の血清濃度の上昇は、アルコール性肝臓疾患、間隙性肺疾患、敗血症、および全身性エリテマトーデス等の炎症に関係する種々の状態に関係する（Fisher, N. C. et al., Gut 45:416-420, 1999; Suga, M. et al., Eur. Respir. J. 14:376-382, 1999; Bossink, A. W. et al., Blood 86:3841-3847, 1995; Kaneko, H. et al., J. Rheumatol. 26:568-573, 1999）。M C P-1は、単球および内皮細胞の活性化により血流中に放出される。A M Iの患者からの血漿中のM C P-1の濃度は、1 ng/ml（100 pM）に近づくことが

報告され、1ヶ月間上昇したまま維持されうる (Soejima, H. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 34:983-988, 1999)。ACSとの関連でMCP-1の血流への放出および血流からのクリアランスの動態は、現在不明である。MCP-1は、単球の移動を伴う前炎症性状態の存在の特異的マーカーである。MCP-1は、ACSに特異的ではないが、伝えるところによればその濃度がAMIの患者の血漿中で上昇する。さらに、MCP-1濃度は、不安定狭心症または安定狭心症の患者の血漿では上昇せず、これはMCP-1がAMIを不安定および安定狭心症から区別するのに有用であろうことを示す。

【0092】

カスパーゼ-3は、CPP-32、YAMA、およびアポパインとも呼ばれ、細胞アポトーシスの間で活性化されるインターロイキン-1 β 転換酵素 (ICE) 様細胞内システインプロテイナーゼである。カスパーゼ-3は、アポトーシス誘導の間にタンパク質分解により20kDaと11kDaのサブユニットのヘテロダイマーに活性化される、不活性の32kDaの前駆体として存在する (Fernandes-Alnemri, T. et al., J. Biol. Chem. 269:30761-30764, 1994)。その細胞基質には、ポリ (ADPリボース) ポリメラーゼ (PARP) およびステロール調整因子結合タンパク質 (SREBPs) が含まれる (Liu, X. et al., J. Biol. Chem. 271:13371-13376, 1996)。カスパーゼ-3の正常血漿濃度は、不明である。ACSに関係したカスパーゼ-3の血漿濃度の変化に関する公表された研究はない。虚血および低酸素症に関係した心臓筋細胞のアポトーシス誘導の仮説を支持する増加する量の証拠がある (Saraste, A., Herz 24:189-195, 1999; Ohtsuka, T. et al., Coron. Artery Dis. 10:221-225, 1999; James, T. N., Coron. Artery Dis. 9:291-307, 1998; Bialik, S. et al., J. Clin. Invest. 100:1363-1372, 1997; Long, X. et al., J. Clin. Invest. 99:2635-2643, 1997)。血漿カスパーゼ-3濃度の上昇は、アポトーシスを伴ういずれの生理的事象にも関係しうる。アポトーシスが、運動の間およびその後の骨格筋中で、および大脳虚血で誘導されることを示唆する証拠がある (Carraro, U. and Franceschi, C., Aging (Milano) 9:19-34, 1997; MacManus, J. P. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 19:502-510, 1999)。AMIの患者の末梢血液中でのカスパーゼ-3の発見に関する公表された報告がないので、心臓細胞死のマーカーとしてのカスパーゼ-3の有用性は、現在不明である。興味深いことに、虚血誘導アポトーシスは、それを他の形態のアポトーシスから識別する特徴を有しうるが、カスパーゼ-3の誘導は、すべてのアポトーシス経路に共通である。これらのマーカーのすべてが血漿の膜の完全性の損失に続いて放出されるので、カスパーゼ-3は心臓細胞死の他の細胞質ゾルのマーカーより有用であるとは証明されないであろう。アポトーシスを受けている細胞が、壊死の特徴である、膜の完全性を失うということがないことを示唆する証拠もあるが、むしろ、これらは最終的にはマクロファージおよび他の近接細胞により摂取される完全な膜を有するアポトーシス体を形成する (Saraste, A., Herz 24:189-195, 1999; James, T. N., Coron. Artery Dis. 9:291-307, 1998)。この点において、細胞内容物の放出は、壊死の結果であり、カスパーゼ-3は、特にアポトーシスの結果としての、心臓細胞死の同定に適したマーカーではないであろう。

【0093】

ヘモグロビン (Hb) は、赤血球に見出される酸素運搬鉄含有球状タンパク質である。これは、2つのグロブリンユニットのヘテロダイマーである。 $\alpha_2\gamma_2$ は胎児Hbと呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$ は成人HbAと呼ばれ、そして $\alpha_2\delta_2$ は成人HbA₂と呼ばれる。ヘモグロビンの90~95%はHbAであり、 α_2 グロブリン鎖はすべてのHb型で、鎌状赤血球

ヘモグロビンでも、見出される。Hbは、身体全体にわたり細胞に酸素を運搬する責任を有する。Hb α_2 は、通常は血清中では検出されない。ACSパネルでのHb α_2 の有用性は、溶血の範囲を決定すること、および赤血球起源タンパク質の、測定された血清濃度への寄与をもたらすことにある。溶血の許容濃度は、赤血球に存在する血清マーカーの測定で確立されるべきものである。

【0094】

ヒトリボカリン型プロスタグランジンDシンターゼ(hPDGS)は、 β -トレースとも呼ばれ、プロスタグランジンHからのプロスタグランジンD₂の形成を触媒する30kDaの糖タンパク質である。明らかに健康な個体のhPDGS濃度の上限は、約420ng/mlであると報告されている(欧州特許公開番号EP0999447A1)。hPDGSの上昇は、不安定狭心症および脳梗塞の患者からの血液中で同定された(欧州特許公開番号EP0999447A1)。さらに、hPDGSは、虚血性エピソードの有用なマーカーと思われ、hPDGSの濃度は、経皮的経管的冠状動脈形成(PTCA)の後の狭心症の患者において経時的に減少することが見出され、虚血としてのhPDGS濃度減少が解決することを示している(欧州特許公開番号EP0999447A1)。

10

【0095】

好ましい態様として、心筋傷害の1またはそれ以上の特異的マーカーは、ACSの診断パネルを作成するために、心筋傷害の1またはそれ以上の非特異的マーカーと組み合わせられる。さらに、本発明は、このような複数のマーカーの成分を決定する方法を提供する。このようなパネルが組み立てられると、種々のマーカーそれぞれの存在または濃度が1またはそれ以上の患者サンプルにおいて決定され、そして任意にそれぞれのマーカーの診断濃度とまたは正常濃度と比較される。

20

【0096】

アッセイ測定方策

本発明のマーカーの検出および分析のために、非常に多くの方法および装置が当業者によく知られている。患者試験サンプルにおけるポリペプチドまたはタンパク質に関しては、イムノアッセイの装置および方法がしばしば用いられる。例えば、米国特許6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; および5,480,792を参照のこと。これらのそれぞれは、すべての表、図面および請求の範囲を含めてその全体を、引用することにより本明細書に取り込まれる。これらの装置および方法は、種々のサンドイッチ、競合、または非競合のアッセイ形態においてラベル化された分子に利用でき、目的とする分析物の存在または量と関連するシグナルを発生する。さらに、バイオセンサーおよびオプティカルイムノアッセイのような、ある特定の方法および装置は、ラベル化された分子を必要とせずに分析物の存在または量を決定するために使用することができる。米国特許5,631,171および5,955,377を参照のこと。これらのそれぞれは、すべての表、図面および請求の範囲を含めてその全体を、引用することにより本明細書に取り込まれる。

30

【0097】

好ましくは、マーカーはイムノアッセイを用いて分析されるが、他の方法も当業者にはよく知られている(例えば、マーカーRNA濃度の測定)。マーカーの存在または量は、一般的には、各々のマーカーに特異的な抗体を用いて特異的結合を検出することにより決定される。例えば、酵素結合イムノアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、競合結合アッセイ等の、いずれの適当なイムノアッセイも利用しうる。マーカーへの抗体の特異的免疫的結合は、直接的または間接的に検出できる。直接ラベルには、抗体に結合した、蛍光若しくは発光タグ、金属、染料、放射性核種等が含まれる。間接ラベルには、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等のような、この技術分野でよく知られた種々の酵素が含まれる。

40

【0098】

50

マーカーに特異的な固定化抗体の使用も、本発明により企図されたものである。抗体は、磁気またはクロマトグラフィーのマトリックス粒子、（マイクロタイターウェルのような）アッセイ場所の表面、（プラスチック、ナイロン、紙のような）固体基質物質の断片等のような、種々の固体担体上で固定化される。アッセイ片は、抗体や固体担体上に配列した複数の抗体を被覆することにより調製される。この片は、その後試験サンプル中に浸漬され、そして、洗浄および検出工程を通じて即座に処理され、着色した点のような測定可能なシグナルを発生させる。

【0099】

複数のマーカーの分析は、1つの試験サンプルで別個にまたは同時に実行されうる。いくつかのマーカーは、多数のサンプルの効率的な処理のために1つの試験に併合されうる。さらに、当業者は、同一の個体からの（例えば、経時的な時点での）多数のサンプルを試験することの価値を認識するであろう。一連のサンプルのこのような試験は、経時的なマーカー濃度の変化の同定を可能にするであろう。マーカー濃度の増加または減少は、マーカー濃度の変化の不存在と同様に、これらに限定されないが、事象の発症からのおおよその時間、救出可能な組織の存在および量、投薬治療の適切さ、再灌流や症状の消散により示されるような種々の治療効果、種々の型のACSの識別、事象の重篤度の同定、疾患の重篤度の同定、および将来の事象の危険性等の患者の結果の同定、を同定することを含む疾患の状態についての有用な情報を提供しうる。

【0100】

上述したマーカーからなるパネルは、ACSの診断若しくは予後およびACSの患者の管理に関連した適切な情報を提供するために構築されうる。このようなパネルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15または20の個体のマーカーを用いて構築されうる。単一のマーカー、またはマーカーの多数のパネルを含むマーカーの部分集合の分析は、種々の臨床的環境において臨床的な感度または特異性を最適化することにより当業者により実行されうる。これらには、限定されないが、通院、緊急治療、危機治療、集中治療、監視室、入院患者、外来患者、医院、医療診療所、および健康診断環境が含まれる。さらに、当業者は、前述した環境の各々において臨床的感度および特異性を最適化するために、単一のマーカー、またはマーカーの多数のパネルを含むマーカーの部分集合を、診断閾値の調整と組み合わせる用いることができる。アッセイの臨床的感度は、アッセイが正確に予測する疾患を有するものの割合として定義され、アッセイの特異性は、アッセイが正確に予測する疾患を有しないものの割合により定義される（Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W. B. Saunders and Company, p. 496）。

【0101】

なお、マーカーの分析は、種々の実際的な形態において実行されうる。例えば、マイクロタイタープレートやオートメーションの使用は、多数の試験サンプルの処理を容易にしうる。あるいは、単一のサンプルの形態は、例えば、通院移動または緊急室の環境において、適時の仕方で即座の処理および診断を促進するために構築される。

【0102】

他の態様として、本発明は、マーカーの分析のためのキットを提供する。このようなキットは、好ましくは、少なくとも1つの試験サンプルの分析のための装置および試薬並びにアッセイ実行のための指示書を含む。任意に、キットは、患者の診断または予後のためにマーカー濃度を変換する1またはそれ以上の方法を含みうる。

【0103】

【実施例】

実施例1 血液の採取

血液標本は、訓練した研究職員により採取された。サンプルは、既述のように採取され処理された。de Lemos et al., The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients w

10

20

30

40

50

with acute coronary syndromes (急性冠状動脈症候群の患者のB型ナトリウム排泄増加性ペプチドの予後の価値)、N Engl J Med 345:1014-21 (2001)を参照のこと。血漿サンプルは、クエン酸抗凝固剤中で採取され、採取から60分以内に研究現場において-20℃またはそれより冷たくして凍結された。標本は、TIMI小児病院心臓マーカーコア研究所(ボストン、マサチューセッツ州)にドライアイスを用いて輸送され、そこでは、これらは-70℃で保存された。OPUS-TIMI16試験の完了に続き、50/50の処置アームからのすべての血漿標本は、バイオサイトインコーポレーテッド(サンディエゴ、カリフォルニア州)にドライアイスを用いて輸送され、そこでアッセイが行われた。

【0104】

10

実施例2 生化学的分析

マーカーは、標準的なイムノアッセイ技術を用いて測定された。これらの技術には、タンパク質標的に特異的に結合する抗体の使用が含まれた。選択されたマーカーに対して誘導されたモノクローナル抗体は、N-ヒドロキシサクシニミドビオチン(NHS-ビオチン)を用いて、抗体当たり約5のNHS-ビオチン部分の割合で、ビオチン化された。そして、抗体-ビオチンコンジュゲートは、標準アビジン384ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加えられ、プレートに結合していない抗体コンジュゲートは除去された。これは、マイクロタイタープレートの「抗マーカー」を形成した。同一のマーカーに対して誘導された他のモノクローナル抗体は、サクシニミジル4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)およびN-サクシニミジル3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート(SPDP)(ピアース、ロックフォード、イリノイ州)を用いてアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた。

20

【0105】

イムノアッセイは、TECANジェネシスRSP 200/8ワークステーションを用いて行われた。ビオチン化された抗体は、あらかじめアビジンで被覆されたマイクロタイタープレートのウェルにピペットで移され、60分間インキュベートされた。結合していない抗体を含む溶液は除去され、細胞は、150mMのNaCl、0.1%のアジ化ナトリウム、および0.02%のTween-20を含む20mMのホウ酸塩(pH7.42)からなる洗浄バッファーを用いて洗浄された。血漿サンプル(10μL)は、マイクロタイタープレートのウェルにピペットで移され、60分間インキュベートされた。そして、サンプルは取り出され、ウェルは洗浄バッファーにより洗浄された。そして、抗体-アルカリホスファターゼコンジュゲートがウェルに加えられ、さらに60分間インキュベートされ、その後、抗体コンジュゲートは取り除かれ、ウェルは洗浄バッファーにより洗浄された。基質(AttoPhos(登録商標)、プロメガ、マジソン、ウイスコンシン州)がウェルに加えられ、蛍光産物の形成速度は、患者サンプルのマーカーの濃度と関連づけられた。

30

【0106】

BNPのアッセイは、サイオスインコーポレーテッド(サニーヴェール、カリフォルニア州)から得たネズミ抗BNPモノクローナル抗体106.3を用いて行った。mAb106.3を分泌するハイブリドーマ細胞系は、FOX-NY細胞と、BSAにコンジュゲートされたヒトBNP1-32により免疫されたBalb/cマウスからの脾臓細胞との融合により発生させた。第2のネズミ抗BNP抗体は、バイオサイトインコーポレーテッド(サンディエゴ、カリフォルニア州)により、既述(米国特許番号6,057,098)のように抗原ファージディスプレイにより、標準技術によりKLHにコンジュゲートしたヒトBNP抗原(サイオスインコーポレーテッド、サニーヴェール、カリフォルニア州;米国特許番号5,114,923)を用いて、産生された。ヒトBNP抗原は、アッセイの標準化のためにも用いた。

40

【0107】

MMP-9のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドにより、既述(米国特許番号6,057,098)のようにファージディスプレイおよび組み換えタンパク質発現を

50

用いて発生させたネズミ抗MMP-9抗体を用いて行った。市販のMMP-9抗原は、アッセイの標準化のために用いた（カルバイオケム-ノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州）。抗体産生のために用いた免疫原は、バイオサイトインコーポレーテッドにより調製された。PCRプライマーは、ヒトMMP-9の5'-末端の配列およびヒトMMP-9の3'-末端のコード配列に対応して作製した（ジェンバンク取得番号J05070）。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる組み換えタンパク質の精製を補助するために、6つのヒスチジンコドンが、コード配列の終端と終止コドンとの間に挿入された。5'-末端MMP-9プライマーは、プライマーAと表され、以下のヌクレオチド配列からなる；5'-AGGTGTCGTAAAGCTTGAATTCAGACACCTCTGCCGCCACCATGAG-3'（SEQ ID NO: 1）。5'プライマーは、その5'-末端において、EcoRI部位および直ぐ上流の配列に対応するpEAK12ベクター配列（エッジバイオシステムズ、ガイサーバーグ、メリーランド州）の21塩基対をも含む。3'-末端MMP-9プライマーは、プライマーBと表され、以下のヌクレオチド配列からなる；5'-GGCTGGCTTACCTGCGGCCCTTAGTGATGGTGGATGGTGGATGGTCCCTCAGG GCACTGCAGGATG-3'（SEQ ID NO: 2）。3'プライマーは、その5'-末端において、NotI部位の6塩基および直ぐ下流の配列等のベクター配列のさらなる20塩基対を含む。これらのプライマーの5'-末端におけるベクター配列は、T4DNAポリメラーゼ処理により、pEAK12ベクターのものに特異的で相補的な一本鎖オーバーハングを形成するであろう。MMP-9遺伝子挿入のPCR増幅は、100 pmolの5'プライマー（A）、100 pmolの3'プライマー（B）、2.5単位のエクスパンドポリメラーゼ、10 μlの2 mM dNTPs、10 μlの10xエクスパンド反応バッファー、テンプレートとしての1 μlのクロンテック-クイック-クロンヒト脾臓cDNA（クロンテックラボラトリーズ、パロアルト、カリフォルニア州）、および100 μlの水を含む、2x100 μlの反応スケールで行われた。反応は、（米国特許6,057,098の）実施例18に記載されたように、パーキナーエルマーサーマルサイクラー中で実行された。PCR産物は、沈殿され、アガロースゲル電気泳動により分画され、完全長産物がゲルから切除され、精製され、水中に再懸濁された（米国特許6,057,098の実施例17）。pEAK12ベクターは、NotIおよびEcoRI（ニューヨークバイオラボ、ピバリー、マサチューセッツ州）を用いた消化による挿入物を受け取るために調製された。挿入物およびEcoRI/NotI消化pEAK12ベクターは、1.0 μlの10xバッファーAを1.0 μgのDNAに添加して水により最終容積が9 μlとすることによるT4エキソヌクレアーゼ消化のために、調製した。サンプルは、1 μl（1U/μl）のT4DNAポリメラーゼにより30℃で4分間消化された。T4DNAポリメラーゼは、70℃で10分間インキュベートすることにより加熱不活性化された。サンプルは冷却され、短時間遠心分離され、新しいマイクロヒュージチューブ中で45 ngの消化挿入物が100 ngの消化されたpEAK12ベクターに添加された。1.0 μlの10xアニーリングバッファーの添加後、容積は、水により10 μlとされた。混合物は、70℃で2分間加熱され、20分以上室温にまで冷却され、挿入物とベクターがアニーリングできるようにした。アニーリングされたDNAは、蒸留水で4倍に希釈され、30 μlのエレクトロコンポーネントE. coli株、DH10B（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州）中にエレクトロポレーションされた。形質転換された細胞は、2xYT培養液により1.0 mlに希釈され、アンピシリン（75 μg/ml）を補給されたLB寒天プレートに10 μl、100 μl、300 μlを培養し、37℃で一夜成長させた。コロニーを取り出し、37℃で2xYT（75 μg/mlのアンピシリン）中で一夜成長させた。翌日グリセロール凍結保存物を-80℃での長期保存のために作製した。これらのクローン（MMP peak 12）の配列は、マコーネルリサーチ（サンディエゴ、カリフォルニア州）で、ジデオキシ鎖終了法により、シークワタームシーケンシングキット（エピセンターテクノロジー、マジソン、ウィスコンシン州）、オリゴヌクレオチドプライマーC、5'-TTCTCAAGCCTCAGACAGT

G-3' (SEQ ID NO: 3)、およびD、5'-CCTGGATGCAGGCTACTCTAG-3' (SEQ ID NO: 4)を用い、これらはpEAK12ベクターの挿入物の5'および3'側にそれぞれ結合し、そしてLICOR4000L自動シーケンサー(LICOR、リンカーン、ネブラスカ州)を用いて確認した。トランスフェクションに適したプラスミドおよびこれに続くヒトMMP-9の発現と精製は、製造者の提案に従いエンドフリープラスミドメガキット(キアジェン、ヴァレンシア、カリフォルニア州)を用いて、クローンMMP9 peak12.2から調製した。HEK293(「Peak」)細胞は、1mlの凍結バイアル保存物(5×10^6 細胞/ml)からT-75フラスコに、5%胎児ウシ血清(FBS)(JRHバイオサイエンシーズ、レネキサ、カンザス州)、20単位/mlのヘパリン、0.1%のプルロニックF-68(JRHバイオサイエンシーズ、レネキサ、カンザス州)、および50 μ l/mlのゲンタマイシン(シグマ、セントルイス、ミズーリ州)を含むIS293培地(アーバインサイエンティフィック、サンタアナ、カリフォルニア州)中で拡張された。37 $^{\circ}$ C、湿度85%、5%CO₂で2~3日間インキュベートした後、FBSを培地中2%に減少させて細胞はT-175フラスコに拡張された。そして細胞は、2~3週間にわたって連続的に1:2に拡張され、接着した細胞の均一な単層を確立した。上記の方法により成長したPeak細胞は、1000rpmで6分間遠心分離され、上清が捨てられた。密度を確立するために細胞を数え、標準染色試験により少なくとも90%の生存力を確認した後、細胞は、 5×10^5 細胞/mlで、2%FBSおよび50 μ l/mlゲンタマイシンを含む400mlのIS293中で再懸濁され、1Lのスピナーフラスコに加えた。そして、コンカルチュープに、400mlスピナーフラスコ当たり5mlのIS293および320 μ gのMMP-9を加えた。これは、混合され、室温で2分間インキュベートされた。スピナー当たり400 μ lのX-tremeGENE RO-1539トランスフェクション試薬(ロシュディアグノスティックス、インディアナポリス、インディアナ州)が、チューブに加えられ、そして混合され、室温で20分間インキュベートされた。混合物は、スピナーフラスコに加えられ、37 $^{\circ}$ C、湿度85%、5%CO₂、100rpmで、4日間インキュベートされた。上記のスピナーフラスコからの細胞培養液は、3500rpmで20分間沈降され、上清がMMP-9の精製のために確保された。20mlのキレーティングファーストフロー樹脂(アマシャムファルマシアバイオテック、ピスケータウェイ、ニュージャージー州)を含むNiCl₂で充填されたカラムは、BBSで平衡化された。そして、スピナーフラスコからの上清は、カラムに投入され、BBS+10mMイミダゾールで洗浄され、200mMイミダゾールで溶出された。溶出液は、10mMにCaCl₂を添加した後次の精製工程の投入のために使用された。5mlのゼラチンセファロース4B樹脂(アマシャムファルマシアバイオテック、ピスケータウェイ、ニュージャージー州)のカラムは、BBS+10mMCaCl₂で平衡化された。抗原を投入後、カラムは平衡バッファーにより洗浄され、MMP-9は平衡バッファー+2%ジメチルスルフォキシド(DMSO)を用いて溶出された。ポリオキシエチレングリコールドデシルエーテル(BRIJ-35)(0.005%)およびEDTA(10mM)は、溶出液に添加され、これは最終バッファー(50mMTris、400mMNaCl、10mMCaCl₂、0.01%NaN₃、pH7.5、0.005%BRIJ-35、10mMEDTA)中に透析された。最後に、タンパク質は、4 $^{\circ}$ Cでの保存のために約0.25mg/mlに濃縮された。ザイモグラムゲルは、MMP-9の産生および精製の確認に用いられた。ウエスタンブロットも、タンパク質の活性を確認するために用いられた。MMP-9(オンコジーンリサーチプロダクツ、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)は、PEAK細胞系を用いて作製された精製抗原と既知の標準との比較のために用いられた。

【0108】

MMP-9のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドで発生させたネズミ抗MMP-9抗体を用い、ファージディスプレイおよび組み換えタンパク質発現技術を用いて行った。市販のMMP-9抗原を、アッセイの標準化のために用いた(カルバイオケムノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)。MMP-9の濃度

は、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体の結合を検出することにより定量した。このアッセイの最小検出可能濃度は、 0.3 ng/mL であり、報告可能範囲の上限は、 2000 ng/mL である。

【0109】

血栓前駆体タンパク質 (TpT^{TM}) のアッセイは、アメリカンバイオジェネティックスサイエンシーズインコーポレーテッド、コロンビア、メリーランド州から得た試薬を用いて行った。溶解性フィブリンポリマーの異なるエピトープを認識する2つのネズミモノクローナル抗体は、アッセイに使用された。アッセイは、アメリカンバイオジェネティックスサイエンシーズにより供給された TpT^{TM} を用いて検定された。サンプルは、アッセイに先立ち $1:4$ に希釈された。最小検出可能濃度は、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ であり、報告可能範囲の上限は、 $25 \mu\text{g/mL}$ である。従って、 $1 \mu\text{g/mL}$ と $100 \mu\text{g/mL}$ の間のサンプルは、報告可能な範囲でアッセイされうる。

【0110】

単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) のアッセイは、バイオサイトにおいて開発された抗体を用いて行われた。アッセイは、免疫学的測定 (サンドイッチ) 形態で開発された。アッセイは、社内 MCP-1 リファレンス調製物を用いて検定された。このアッセイの最小検出可能濃度は、 20 pg/mL であり、報告可能範囲の上限は、 $10,000 \text{ pg/mL}$ であった。

【0111】

種々の形態のトロポニン I (TIC 複合体および全 TnI) のアッセイは、捕捉のために市販のヤギ抗 TnI を用い、酵素ラベル化コンジュゲートとしてバイオサイトで開発された抗体を用いて行われた。アッセイは、社内 TIC 複合体および TnI リファレンス溶液を用いて検定された。最小検出可能濃度は、 TnI が 40 pg/mL 、 TIC 複合体が 50 pg/mL であった。報告可能範囲の上限は、両方のアッセイで $10,000 \text{ pg/mL}$ であった。

【0112】

脂肪酸結合タンパク質 (FABP) のアッセイは、市販のモノクローナル抗体および市販の FABP 抗原を用いて行われた。最小検出可能濃度は、 6 ng/mL であり、報告可能範囲の上限は $10,000 \text{ ng/mL}$ であった。

【0113】

C-反応性タンパク質 (CRP) およびフィブリノーゲンは、市販のアッセイ (デードベアリングインコーポレーテッド、ニューアーク、デラウェア州) を用いて測定された。

【0114】

実施例 3 例示的マーカーパネル

心筋損傷をもたらす種々の病理学的事象のマーカーを含むマーカーパネルを、構築することができる。このようなパネルには、炎症、アテローム硬化症のプラーク破裂、血小板の活性化、血栓症、および心筋の傷害または壊死のマーカーが含まれうる。このパネルに現れるであろう適切なマーカーは、 IL-6 、マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質 (MDA-修飾LDL)、P-セレクチン、トロンビノー抗トロンビン III (TAT) 複合体、 BNP 、遊離心臓トロポニン I、全心臓トロポニン I、トロポニン T および/または C の複合体の心臓トロポニン I、遊離心臓トロポニン T、全心臓トロポニン T、トロポニン I および/または C の複合体の心臓トロポニン T、C-反応性タンパク質、および/または MMP-9 である。マーカーパネルは、患者の臨床的な徴候および症状との関連で評価されるであろう。典型的には、 ACS の患者は、胸部痛の有力な症状を有する。

【表 1】

マーカー陽性	解釈
I L - 6	炎症反応の存在。 A C S に特異的ではないが、早期事象の表示となりうる。
M D A - 修飾 L D L	プラーク破裂の表示。 進行中の事象の表示であり、プラーク破裂が胸部痛の原因でありうる。
P - セレクチン	血小板活性化の表示。 血小板栓が形成中若しくは形成済みである。血小板栓およびその結果の閉塞が胸部痛の原因でありうる。
T A T 複合体	凝固活性化の表示。 血塊が形成中若しくは形成済みであり、その結果の閉塞が胸部痛の原因でありうる。
B N P	心室機能不全の表示 心臓虚血により生じる損傷と関連しうる。
全 c T n I	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。
全 c T n T I C	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。全 c T n I に対する c T n T I C の高い割合は、進行中の事象または継続的虚血の表示となりうる。

10

20

【0115】

パネルの1つ以上のマーカーの経時的上昇および変化は、A C S の進行の表示となりうる。例えば、I L - 6、M D - 修飾 L D L、P - セレクチン、および T A T 複合体の上昇は、アテローム硬化症のプラーク破裂が起こったことを示し、そして、この破裂は血小板の凝集及び凝固の活性化の原因となり、血管の狭小をもたらさう。さらに、P - セレクチンおよび T A T 複合体の上昇は、状態が血塊形成に有利であることを示さう。経時的なその後のマーカー濃度の減少は、病的工程が遅くなったかまたは停止したことを示さう。例えば、経時的な T A T 複合体濃度の減少は、凝固工程が遅くなったかまたは停止したことを示さう。この点において、経時的な M D A - 修飾 L D L 濃度の減少は、プラーク破裂が継続していないことを示さう。

30

【0116】

他のマーカーが、上記の例に挙げられたマーカーに置き換え、または加えられうる。代替のまたはさらなる心筋傷害のマーカーには、アネキシン V、B N P および／または B N P 関連ペプチド、β - エノラーゼ、クレアチンキナーゼ - M B、グリコーゲンホスホリラーゼ - B B、心臓型脂肪酸結合タンパク質、ホスホグリセリン酸ムターゼ - M B、および S - 1 0 0 a o が含まれる。

40

【0117】

代替のまたはさらなる凝固活性化のマーカーには、プラスミン - α - 2 - 抗プラスミン複合体、フィブリノペプチド A、プロトロンビンフラグメント 1 + 2、D - ダイマー、1 またはそれ以上の形態のフォン・ビルブラント因子、組織因子、および血栓前駆体タンパク質 (T p P) が含まれる。

【0118】

代替のまたはさらなる血小板活性化のマーカーには、β - トロンボグロブリン、血小板第 4 因子および血小板由来増殖因子が含まれる。

【0119】

代替のまたはさらなるアテローム硬化症のプラーク破裂のマーカーには、ヒト好中球エラ

50

スターゼ、誘導型一酸化窒素シンターゼ、リゾホスファジチン酸、マトリックスメタロプロテイナーゼー1、マトリックスメタロプロテイナーゼー2、マトリックスメタロプロテイナーゼー3、およびマトリックスメタロプロテイナーゼー9 (MMP-9) が含まれる。

【0120】

代替のまたはさらなる炎症または急性期反応のマーカーには、C-反応性タンパク質、インターロイキン-1 β 、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、腫瘍壊死因子 α 、溶解性細胞間接着分子-1、溶解性血管細胞接着分子-1、および単球走化性タンパク質-1が含まれる。

【0121】

さらに、他のマーカーがパネルの診断力を増強するためにパネルに加えられることができる。

【0122】

実施例4：ACSの予後マーカーとしてのMMP-9、全cTnI、cTnTIC、BNP、CRP、FABP、TpP、およびMCP-1

研究母集団

不安定冠状動脈症候群の患者のオーボフィバンによる経口糖タンパク質IIb/IIa阻害 (OPUS-TIMI16) 試験は、10,288人のACS患者における経口糖タンパク質IIb/IIa阻害因子、オーボフィバンをプラセボと比較した、無作為化した複数の研究機関にまたがった試験である。Cannon et al., Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI16) trial (不安定冠状動脈症候群の患者のオーボフィバンによる経口糖タンパク質IIb/IIa阻害 (OPUS-TIMI16) 試験)、Circulation 102:149-56 (2000) を参照のこと。患者は、彼らが虚血症状の発症から72時間以内に現れ、次の基準の1つに適合するならば、登録する資格があるとした：糖尿病または血管疾患を有する65歳以上；以前に冠状動脈疾患であった；動的なECG変化を有する；または上昇した心臓マーカーを有する。研究は、各々の病院の倫理調査委員会により承認され、すべての患者から書面のインフォームドコンセントが提供された。患者は、次の3つの処置アームの1つに無作為化された：オーボフィバン50mgを1日2回 (50/50グループ)、オーボフィバン50mgを1日2回1月間、その後オーボフィバン30mgを1日2回 (50/30グループ)、またはプラセボ。OPUS-TIMI16研究は、50/30グループにおいて増加した死亡率が見出されたため、時期尚早に終了した。50/50グループでは死亡率の上昇はなかった。本研究は、50/50グループに割り当てられた患者により実施され、MMP-9、全cTnI、cTnTIC、BNP、CRP、FABP、TpP、およびMCP-1の分析に適したベースライン血漿標本が提供された。

【0123】

OPUS-TIMI16に登録した症状の発症からの中央値時間は、40時間であった。

【0124】

MMP-9アッセイ

MMP-9のアッセイは、バイオサイトインコーポレーテッドで発生させたネズミ抗MMP-9抗体を用いて、ファージディスプレイおよび組み換えタンパク質技術を用いて行われた。市販のMMP-9抗原を、アッセイの標準化のために用いた (カルバイオケムノババイオケムコーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)。アッセイは、自動ハイスループットプラットフォームの348ウェルマイクロタイタープレートで行った (TECANジェネシスRSP200/8)。MMP-9の濃度は、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗体の結合を検出することにより定量した。すべてのサンプルは、2回実行した。このアッセイの最小検出可能濃度は、3.0 ng/mLであり、報告可能範囲の上限は、2000 ng/mLであった。

10

20

30

40

50

【0125】

クリニカルエンドポイント

死亡、致命的でないMI、および鬱血性心不全のすべての原因は、30日目および10ヶ月の追跡期間の終了まで評価された。MIは、すでに報告された基準を用いて定義され、臨床事象委員会により判断された。Antman et al., Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11B trial (エノキサパリンは不安定狭心症／非Q波心筋梗塞の死亡および心臓虚血事象を防ぐ：心筋梗塞の血栓症の結果 (TIMI) 11B試験)、Circulation 100:1593-601 (1999)を参照のこと。新規若しくは悪化しているCHF、または心臓性のショックのエンドポイントは、症例記録用紙から集め、判定されていない。

【0126】

統計的分析

被験者は、試験に登録した時点のマーカー濃度に基づいて四分位に分けた。平均値およびベースライン変数に対する割合は、連続変数についてのANOVAおよびカテゴリー変数についての χ^2 トレンド検定を用いて四分位の間で比較した。マーカーと他の連続ベースライン変数との直接の相関は、ピアソンの積率相関係数を用いて評価された。マーカー濃度は、研究のエンドポイントに合致した患者と合致していない患者との間で、ウィルコクソンランクサム検定を用いて比較した。累積ハザード関数を用いて、不利な事象の頻度を10ヶ月の追跡調査期間の終了時点で評価した。ログランク検定を用いて、四分位の間の結果を比較した。

【0127】

分析は、年齢、性別、糖尿病の存在、および徴候診断により定義されたあらかじめ特定されたサブグループにおいて行われた。追跡調査(10ヶ月)の終了まで死亡のすべての原因について、コックスの比例ハザードモデルがフォワードステップワイズ変数選択を用いて構築された。不変のp値が <0.1 で、データが $>75\%$ の患者で利用可能な場合は、臨床的変数がモデルに入れられ、多重変化p値が >0.1 の場合は、変数が除かれた。そして、全cTnI、BNP、およびMMP-9のベースライン濃度は、完成モデルに加えられた。すべての変数について完全なデータを有する患者のみが、これらの多重変化分析に含められた($n=2068$)。モデルは、C-反応性タンパク質の測定を受けている患者の部分集合について、続いて繰り返された($n=736$)。

【0128】

MMP-9とベースライン臨床的変数との関係

MMP-9の高いベースライン濃度は、女性、非白人種および現在のたばこ使用者に関係するが、老齢、糖尿病、または以前の高コレステロール血症、冠状動脈疾患若しくは鬱血性心不全には関係しなかった。高MMP-9濃度は、早い心拍、キリップクラス $>I$ 、並びにトロポニンIおよびC-反応性タンパク質の上昇した濃度と関係した(表1)。対照的に、MMP-9は、ボディマス指標、腎機能、心電図の変化、上昇したBNP、LVEF、または冠状動脈血管造影で測定された冠状動脈疾患の範囲には関係しなかった。MMP-9濃度と、試験への登録のための症状発症からの時間との間には、関係はなかった。MMP-9と、CRP($R=0.16$ 、 $p<0.001$)、cTnI($R=0.07$ 、 $p=0.001$)、および記録された最大のCKMB($R=0.05$ 、 $p=0.04$)との濃度の相関は、わずかであった。MMP-9と、BNP($R=0.005$ 、 $p=0.82$)またはフィブリノーゲン($R=-0.05$ 、 $p=0.12$)との濃度の関係はなかった。

【表2】

表 1. MMP-9 の四分位によるベースラインの臨床的特徴 (ng/mL)

	四分位 1 (Q1)	四分位 2 (Q2)	四分位 3 (Q3)	四分位 4 (Q4)	p トレンド*	pQ1 対 Q4
範囲、 ng/mL	3.0-24.3	24.4-43.1	43.2-85.2	85.3-2000		
n	580	573	581	577		
無作為化までの時間 (時)	43 ± 19	40 ± 20	41 ± 20	39 ± 20	0.09	0.02
年齢 (歳)	61 ± 12	60 ± 12	61 ± 11	61 ± 12	0.48	0.94
男性	441 (76%)	404 (71%)	418 (72%)	397 (69%)	0.02	0.006
白人	558 (96%)	537 (94%)	557 (96%)	519 (90%)	<0.001	<0.001
過去の医療履歴						
高血圧症	240 (41%)	244 (43%)	237 (41%)	256 (44%)	0.42	0.29
鬱血性心不全	22 (4%)	34 (6%)	31 (5%)	32 (6%)	0.26	0.16
冠状動脈疾患	280 (48%)	305 (53%)	291 (51%)	276 (48%)	0.64	0.88
末梢血管疾患	32 (6%)	41 (7%)	49 (8%)	34 (6%)	0.60	0.78
脳血管疾患	10 (2%)	20 (3%)	22 (4%)	16 (3%)	0.27	0.23
糖尿病	127 (22%)	111 (19%)	125 (22%)	133 (23%)	0.46	0.63
高コレステロール血症	156 (27%)	162 (28%)	180 (31%)	152 (26%)	0.89	0.83
喫煙の状態:						
現在の喫煙者	182 (31%)	201 (35%)	210 (36%)	241 (42%)	<0.001	<0.001
非喫煙者	216 (37%)	181 (32%)	173 (30%)	164 (29%)	0.005	0.005
過去の喫煙者	180 (31%)	191 (33%)	197 (34%)	170 (30%)	0.64	0.56
徴候による診断:						
ST 上昇MI	183 (32%)	165 (29%)	184 (32%)	218 (38%)	0.02	0.03
非ST 上昇MI	127 (22%)	119 (21%)	145 (25%)	127 (22%)	0.56	0.96
不安定狭心症	270 (46%)	288 (50%)	252 (43%)	232 (40%)	0.005	0.03
身体的所見						
BMI kg/m ²	28 ± 15	28 ± 5	29 ± 13	28 ± 5	0.84	0.87
収縮期の BP (mm Hg)	130 ± 21	129 ± 21	127 ± 21	129 ± 21	0.27	0.73
HR (BPM)	72 ± 14	71 ± 13	73 ± 14	75 ± 15	<0.001	<0.001
キリップクラス II-IV	34 (6%)	42 (7%)	66 (12%)	64 (11%)	<0.001	0.001

【表 3】

10

20

30

40

(表 1 つづき)

診断試験

クレアチンクリアランス	223 (40%)	203 (37%)	214 (38%)	221 (40%)	0.83	0.92
≤ 90						
CK-MB > ULN	279 (72%)	264 (73%)	305 (76%)	311 (76%)	0.15	0.23
cTnI > 1.5 ng/ml	144 (25%)	137 (24%)	159 (28%)	187 (33%)	0.002	0.006
BNP > 80 pg/ml	278 (49%)	274 (48%)	313 (55%)	290 (51%)	0.18	0.48
CRP > 1.5 ng/ml	55 (38%)	74 (34%)	102 (43%)	128 (55%)	<0.001	0.002
ST 異常 > 1mm	288 (50%)	262 (46%)	264 (45%)	267 (46%)	0.26	0.25
CAD の範囲 (50% 狭窄症)						
0 血管	17 (7%)	18 (6%)	22 (7%)	26 (8%)	0.42	0.49
1 血管	77 (30%)	100 (34%)	113 (35%)	110 (34%)	0.29	0.26
2 血管	70 (27%)	90 (31%)	89 (28%)	85 (27%)	0.60	0.85
3 血管	92 (36%)	83 (29%)	98 (30%)	98 (31%)	0.31	0.19
陽性運動試験	77 (36%)	62 (36%)	74 (41%)	69 (38%)	0.44	0.63
駆出率 (%)	55 + 12	55 + 13	53 + 13	53 + 14	0.09	0.07

10

20

【 0 1 2 9 】

MMP-9 と臨床的結果との関係

MMP-9 の濃度は、次のいずれの時点でも生存していた患者に対し、30 日以内 ($p = 0.002$) または 10 ヶ月以内 ($p < 0.0001$) に死亡した患者では、有意に高かった。同様に、MMP-9 濃度は、非致命的 MI および CHF を有する患者は、これらのエンドポイントを有しないものに比べ、高かった。(30 日および 10 ヶ月の双方におけるそれぞれのエンドポイントは、 $p < 0.01$)

30

【表 4】

表 2. ベースラインMMP-9濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	中央値 [25, 75]	p 値	
30日				
死亡	34	65 [39, 151]	0.002	
生存	2277	43 [24, 85]		10
非致命的MI	61	65 [37, 110]	0.006	
非MI	2250	43 [24, 85]		
CHF	46	65 [35, 147]	0.008	
非CHF	2265	43 [24, 85]		
死亡、MI、またはCHF	116	65 [36, 145]	<0.001	20
非死亡MI、またはCHF	2195	42 [24, 84]		
10ヶ月				
死亡	78	64 [39, 142]	<0.001	
生存	2233	43 [24, 85]		30
非致命的MI	112	57 [33, 109]	0.002	
非MI	2199	43 [24, 84]		
CHF	67	64 [37, 142]	0.002	
非CHF	2244	43 [24, 85]		
死亡、MI、またはCHF	205	64 [35, 118]	<0.001	40
非死亡MI、またはCHF	2106	42 [24, 83]		

【0130】

調整していない死亡率が、それぞれMMP-9濃度の連続する四分位で増加した ($p < 0.001$)。同様の関係が、MMP-9と死亡および非致命的MIの混合との間 ($p < 0.001$)、並びに、MMP-9と鬱血性心不全との間 ($p < 0.001$)に観察された。方向性を持つ一致した関係が、MMP-9と、症状の発症から処置までの時間、徴候による診断、性別、糖尿病、および年齢により定義された患者のサブグループにおける死亡

率との間に、観察された。

【表 5】

表 3. 10ヶ月の死亡率についてのサブグループ分析

グループ	n	四分位 1 (Q1)	四分位 2 (Q2)	四分位 3 (Q3)	四分位 4 (Q4)	pトレンド	pQ1 対 Q4
全部分	2311	3 (0.5%)	20 (4.3%)	27 (6.1%)	28 (6.3%)	<0.001	<0.001
無作為化までの時間 C P							
0-24 時間	508	0 (0%)	4 (4.8%)	10 (12.9%)	7 (5.3%)	0.02	0.02
>24-48 時間	915	0 (0%)	9 (4.6%)	9 (4.5%)	15 (8.5%)	0.003	<0.001
> 48 時間	862	2 (0.9%)	6 (2.9%)	8 (4.3%)	6 (4.9%)	0.28	0.11
徴候 dx							
STEMI	750	0 (0%)	4 (2.5%)	8 (5.1%)	9 (6.2%)	<0.05	0.008
NSTEMI	518	1 (0.8%)	7 (8.7%)	7 (5.5%)	10 (9.8%)	0.07	0.008
UAP	1042	2 (0.8%)	9 (3.7%)	12 (6.7%)	9 (4.7%)	0.07	0.02
性別							
男性	1660	2 (0.5%)	12 (3.9%)	20 (6.5%)	16 (5.7%)	0.002	<0.001
女性	651	1 (0.7%)	8 (5.0%)	7 (5.1%)	12 (7.3%)	0.08	0.008
糖尿病							
存在	496	1 (0.8%)	6 (5.8%)	6 (5.5%)	12 (11.6%)	0.03	0.003
不存在	1814	2 (0.5%)	14 (3.9%)	21 (6.3%)	16 (4.7%)	0.003	0.001
年齢							
< 65	1402	0 (0%)	4 (1.4%)	14 (4.9%)	8 (3.4%)	0.001	0.006
> 65	896	3 (1.4%)	16 (9.2%)	13 (8.1%)	20 (10.9%)	0.007	<0.001

パーセンテージは、生存見積もりを表す。

【0131】

全 c T n I とベースライン臨床的変数との関係

データは、2523人の患者から評価した。全 c T n I の高いベースライン濃度は、男性、糖尿病の不存在、以前の冠動脈疾患の不存在、処置を必要とする高血圧症の不存在、およびこの使用に関係したが、老齢または人種には関係しなかった。高い全 c T n I 濃度は、腎機能、心電図の変化、キリップクラス> I、および C K-M B の上昇した濃度に関係した（表 4）。対照的に、全 c T n I は、ボディマス指標、冠動脈血管造影で測定された冠動脈疾患の範囲、ストレス試験、または人種とは関係しなかった。全 c T n I の濃度と症状の発症から試験への登録までの時間との間には、関係がなかった。全 c T n I と C R P ($R=0.05$ 、 $p=0.16$) またはフィブリノーゲン ($R=0.04$ 、 $p=0.18$) の濃度との間には、関係がなかった（表 5）。

【表 6】

10

20

30

40

50

表 4

ベースライン変数とベースラインマーカー濃度の四分位との関係
全トロポニン I

	≤ 53.6	53.6-346	346-1816	>1816	p トレント*	p Q4 対 Q1
マーカー濃度の範囲	0-53.6	53.8-346	346.6-1811.5	1820.3-69719		
発症から無作為化までの時間 (時)	36.99 ± 20.53	41.29 ± 20.7	44.28 ± 20.06	37.74 ± 17.74	0.1518	0.5085
年齢 (歳)	61.66 ± 11.41	61.58 ± 11.49	60.04 ± 11.45	59.24 ± 11.65	0	0.0002
男性	409 (64.7%)	437 (69.4%)	464 (73.7%)	506 (80.2%)	0	0
白人	596 (94.3%)	590 (93.7%)	589 (93.5%)	597 (94.6%)	0.8565	0.811
処置が必要な高血圧症	308 (48.7%)	297 (47.2%)	223 (35.5%)	230 (36.5%)	0	0
以前に CAD ⁵	441 (69.8%)	367 (58.3%)	258 (41%)	194 (30.7%)	0	0
徴候事象の PCI	120 (19%)	179 (28.4%)	170 (27%)	206 (32.6%)	0	0
末梢 AVD	58 (9.2%)	54 (8.6%)	39 (6.2%)	28 (4.4%)	0.0003	0.001
以前に CVA/TIA ⁺	45 (7.1%)	46 (7.3%)	34 (5.4%)	30 (4.8%)	0.0359	0.0771
糖尿病	158 (25%)	147 (23.3%)	131 (20.8%)	118 (18.7%)	0.0038	0.0071
CAD の家族履歴	258 (41.2%)	273 (43.8%)	237 (37.9%)	240 (38.3%)	0.098	0.2985
高コレステロール血症	225 (35.7%)	210 (33.4%)	154 (24.5%)	121 (19.2%)	0	0
現在の喫煙者	169 (26.9%)	220 (34.9%)	256 (40.7%)	276 (43.9%)	0	0
非喫煙者	223 (35.5%)	203 (32.2%)	191 (30.4%)	178 (28.3%)		
過去の喫煙者	236 (37.6%)	207 (32.9%)	182 (28.9%)	175 (27.8%)		
STEMI	38 (6%)	99 (15.7%)	262 (41.7%)	428 (67.8%)	0	0
NSTEMI	36 (5.7%)	114 (18.1%)	240 (38.2%)	172 (27.3%)		
UA	557 (88.3%)	417 (66.2%)	127 (20.2%)	31 (4.9%)		
以前にアスピリン	353 (55.9%)	309 (49.2%)	205 (32.5%)	144 (22.8%)	0	0
以前にヘパリン	502 (79.4%)	551 (87.6%)	568 (90.2%)	590 (93.5%)	0	0
以前に β 遮断薬	242 (38.4%)	201 (31.9%)	139 (22.1%)	112 (17.8%)	0	0
以前に低脂肪血症薬	178 (28.3%)	160 (25.6%)	109 (17.4%)	84 (13.3%)	0	0

10

20

30

40

【表 7】

(表 4 つづき)

BMI	28.84 ± 14.67	28.62 ± 12.23	27.96 ± 4.71	27.9 ± 4.58	0.0568	0.1028
収縮期の BP (mm Hg)	132.16 ± 20.76	131.93 ± 21.19	126.62 ± 20.01	124.58 ± 19.98	0	0
拡張期の BP (mm Hg)	75.33 ± 12.28	74.71 ± 12.16	73.58 ± 12.52	73.28 ± 12.97	0.0011	0.0037
キリップ II-IV	53(8.5%)	52(8.4%)	52(8.3%)	76(12.1%)	0.0433	0.0407
クレアチニンアテンス ≤ 90	260 (43%)	227 (38.3%)	217 (35.9%)	202 (33.9%)	0.0008	0.0012
CK > ULN	99 (17.6%)	210 (36%)	503 (83.6%)	603 (97.7%)	0	0
CK-MB > ULN	93 (29.7%)	200 (55.9%)	445 (90.8%)	516 (98.1%)	0	0
CTnI ≥ 0.4 ng/mg	42 (32.3%)	114 (62.6%)	126 (84%)	123 (83.7%)	0	0
ST 低下 > 0.5mm	269 (42.6%)	292 (46.3%)	313 (49.7%)	354 (56.1%)	0	0
T 波転移 > 3mm	176 (27.8%)	170 (27%)	154 (24.4%)	124 (19.7%)	0.0004	0.0006
新 LBBB	12 (2%)	14 (2.3%)	7 (1.1%)	8 (1.3%)	0.1663	0.3411
血管造影 : ≥ 50% 狭窄						
症の血管の数						
なし	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.9572	1
1 血管	3 (18.8%)	1 (5%)	4 (17.4%)	2 (6.5%)		
2 血管	10 (62.5%)	12 (60%)	8 (34.8%)	22 (71%)		
≥ 3 血管	3 (18.8%)	7 (35%)	11 (47.8%)	7 (22.6%)		
LVEF (%)	53.98 ± 13.35	56.13 ± 11.82	55.88 ± 12.55	50.42 ± 12.01	0.043	0.0556
ストレス試験 陽性	67 (39.4%)	61 (34.5%)	87 (38.8%)	79 (36.7%)	0.5179	0.4108
ストレス試験 中間	29 (17.1%)	29 (16.4%)	28 (12.5%)	31 (14.4%)		
ストレス試験 陰性	74 (43.5%)	87 (49.2%)	109 (48.7%)	105 (48.8%)		

\$ 以前に CAD: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

+ 以前に CVA/TIA: 脳血管動脈疾患、以前に非出血性脳卒中または以前に T I A

【表 8】

表 5.

ベースラインマーカー濃度と連続的ベースライン変数との単純相関
全トロポニン I

	R 値	p *
年齢 (歳)	0.05	0.0113
BMI	0.02	0.3959
最大記録 CK-MB (ULN の%)	0.36	0
CRP (mg/dl)	0.05	0.1591
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.04	0.1752
LVEF (%)	0.19	0.0003
クレアチンクリアランス	0.03	0.1333

10

20

* ピアソンの積率相関係数に基づく p 値

30

マーカーとベースライン変化との線形関係が有効であるかどうかのピアソ
ン積率相関係数試験に基づいた p 値。R 値は、観測点が適合した線にいか
に近いかを示す。

【 0 1 3 2 】

全 c T n I と臨床的結果との関係

全 c T n I の濃度は、同時点で生存していた患者に対して 3 0 日以内に死亡した患者で有意に高かった ($p = 0.004$) 。同様に、全 c T n I 濃度は、死亡や非致命的 M I の組み合わされたエンドポイントを有する患者の方が、これらのエンドポイントを有さないものに比べ高かった。(3 0 日および 1 0 ヶ月の両方における各々のエンドポイントについて $p < 0.01$ (表 6 および 7))

40

【表 9】

表 6

ベースラインマーカー濃度と 30 日の結果との相関
全トロポニン I

結果	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	40	4656.93 ± 10309.66	1293.5 (104.3,4990.12)	0.0041
生存	2483	2144.1 ± 5384.8	335.4 (53.45,1775.8)	
MI	70	3248.72 ± 10172.18	219.9 (67.9,1820.75)	0.1006
非 MI	2453	2153.55 ± 5310.15	346.6 (53.2,1811.5)	
虚血 -> 緊急血管再生	81	2226.51 ± 5366.63	470.8 (70.1,1744.4)	0.9436
非虚血 ->緊急血管再生	2442	2182.52 ± 5508.1	338.5 (53.52,1818.1)	
死亡／MI	103	3901.2 ± 10514.31	387.3 (69.6,3380.4)	0.0012
非死亡／MI	2420	2110.84 ± 5174.48	337 (52.68,1761.45)	
死亡／MI／虚血 ->緊急血管再生	180	3181.58 ± 8743.16	433.85 (69.77,2287.88)	0.0116
非死亡／MI／虚血 ->緊急血管再生	2343	2107.29 ± 5165.32	333.7 (52.55,1775.8)	

10

20

30

【表 10】

表 7

ベースラインマーカー濃度と 10 ヶ月の結果との相関
全トロポニン I

	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	86	3309.64 ± 7830.37	541.95 (94.72, 3882.3)	0.0535
生存	2437	2144.21 ± 5400.14	335.4 (52.9, 1744.4)	
MI	123	2758.01 ± 8494.07	200.7 (66.7, 1497.6)	0.2356
非 MI	2400	2154.51 ± 5305.09	351.3 (52.92, 1829.52)	
虚血 -> 緊急血管再生	145	1981.8 ± 4703.86	335.4 (70.1, 1519.8)	0.6488
非虚血 -> 緊急血管再生	2378	2196.26 ± 5548.18	346.3 (53.42, 1826.83)	
死亡 / MI	190	3181.92 ± 8575.64	340.45 (69.8, 2632.88)	0.0093
非死亡 / MI	2333	2102.66 ± 5166.94	346 (52.4, 1766.1)	
死亡 / MI / 虚血 -> 緊急血管再生	328	2678.37 ± 7245.55	346.5 (69.97, 1876.8)	0.081
非死亡 / MI / 虚血 -> 緊急血管再生	2195	2110.05 ± 5190.23	346 (52.1, 1804.2)	

10

20

30

40

【0133】

c T n T I C とベースライン臨床的变化との関係

データは、2439 人の患者から評価した。c T n T I C の高いベースライン濃度は、男性、糖尿病の不存在、以前の冠状動脈疾患の不存在、処置が必要な高血圧症の不存在、およびたばこの使用に関連したが、年齢または人種には関係しなかった。高い c T n T I C 濃度は、腎機能、心電図の変化、キリップクラス > I、c T n I の上昇した濃度、および C K - M B の上昇した濃度に関係した (表 8)。対照的に、c T n T I C は、ボディマス指数、冠状動脈血管造影により測定された冠状動脈疾患の範囲、ストレス試験、または人種には関係しなかった。c T n T I C と C R P ($R = 0.03$ 、 $p = 0.36$) またはフィブリノーゲン ($R = 0.04$ 、 $p = 0.29$) の濃度との間には、関係がなかった (表 9)。

【表 11】

表 8

ベースライン変数とベースラインマーカー濃度の四分位との関係
トロポニンT I C複合体

	≤16.65	16.65-65.8	65.8-195	>195	p トロ ン	p Q4 対 Q1
マーカー濃度の範囲	0-16.6	16.7-65.8	65.9-193.4	196.6-58658.8		
発症から無作為化までの時間 (時)	41.05 ± 20.31	43.25 ± 20.49	42.53 ± 20.82	33.35 ± 16.43	0	0
年齢 (歳)	61.8 ± 11.64	60.76 ± 11.53	60.69 ± 11.35	59.75 ± 11.69	0.003	0.002
男性	381 (62.5%)	437 (71.6%)	437 (71.8%)	484 (79.3%)	0	0
白人	579 (94.9%)	570 (93.4%)	571 (93.8%)	583 (95.6%)	0.5822	0.5904
処置が必要な高血圧症	282 (46.3%)	269 (44.2%)	253 (41.5%)	226 (37.1%)	0.0008	0.0012
以前に CAD ^s	383 (62.8%)	356 (58.4%)	282 (46.3%)	207 (33.9%)	0	0
徴候事象の PCI	149 (24.4%)	134 (22%)	175 (28.7%)	185 (30.3%)	0.0022	0.021
末梢 AVD	56 (9.2%)	56 (9.2%)	32 (5.3%)	30 (4.9%)	0.0004	0.0041
以前に CVA/TIA ⁺	47 (7.7%)	38 (6.2%)	32 (5.3%)	33 (5.4%)	0.0715	0.1071
糖尿病	154 (25.2%)	118 (19.3%)	142 (23.3%)	119 (19.5%)	0.0789	0.017
CAD の家族履歴	252 (41.7%)	245 (40.4%)	254 (42.1%)	226 (37.4%)	0.2088	0.1261
高コレステロール血症	192 (31.5%)	200 (32.8%)	162 (26.6%)	125 (20.6%)	0	0
現在の喫煙者	196 (32.3%)	212 (34.8%)	219 (36.1%)	255 (41.9%)	0.0026	0.0118
非喫煙者	220 (36.3%)	180 (29.5%)	193 (31.8%)	181 (29.7%)		
過去の喫煙者	190 (31.4%)	218 (35.7%)	195 (32.1%)	173 (28.4%)		
STEMI	74 (12.2%)	125 (20.5%)	222 (36.5%)	374 (61.3%)	0	0
NSTEMI	99 (16.3%)	117 (19.2%)	146 (24%)	182 (29.8%)		
UA	436 (71.6%)	367 (60.3%)	241 (39.6%)	54 (8.9%)		
以前にアスピリン	288 (47.3%)	305 (50%)	235 (38.7%)	149 (24.5%)	0	0
以前にヘパリン	520 (85.2%)	505 (82.8%)	537 (88.2%)	572 (93.9%)	0	0
以前にβ遮断薬	200 (32.8%)	199 (32.6%)	168 (27.6%)	110 (18%)	0	0
以前に低脂肪血症薬	152 (25.1%)	149 (24.5%)	116 (19.1%)	88 (14.4%)	0	0

10

20

30

40

【表 1 2】

(表 8 つづき)

BMI	28.76 ± 14.91	28.26 ± 5.15	28.41 ± 12.33	27.92 ± 4.55	0.2118	0.162
収縮期の BP (mm Hg)	131.87 ± 21.13	129.72 ± 20.49	128.98 ± 20.62	125.55 ± 20.25	0	0
拡張期の BP (mm Hg)	74.95 ± 12.5	74.75 ± 11.88	74.32 ± 12.44	73.38 ± 13.3	0.0244	0.0296
キリップ II-IV	40 (6.7%)	49 (8.1%)	62 (10.3%)	77 (12.7%)	0.0002	0.0005
クレアチニンクリアランス ≤ 90	239 (41.6%)	230 (39.4%)	222 (38.9%)	193 (33%)	0.0036	0.0025
CK > ULN	161 (29%)	253 (45.2%)	373 (65.7%)	570 (95%)	0	0
CK-MB > ULN	173 (50.6%)	211 (59.6%)	336 (78.9%)	484 (96.8%)	0	0
CTnl ≥ 0.4 ng/mg	81 (54%)	78 (55.3%)	109 (73.6%)	117 (81.8%)	0	0
ST 低下 > 0.5mm	274 (44.9%)	271 (44.4%)	309 (50.7%)	344 (56.4%)	0	0.0001
T 波転移 > 3mm	170 (27.9%)	169 (27.7%)	138 (22.7%)	126 (20.7%)	0.0007	0.0034
新 LBBB	10 (1.7%)	13 (2.2%)	8 (1.3%)	10 (1.7%)	0.6932	0.9698
血管造影 : ≥ 50%狭窄症の血管の数						
なし	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.3038	1
1 血管	5 (45.5%)	1 (4.3%)	2 (8%)	2 (8%)		
2 血管	5 (45.5%)	13 (56.5%)	15 (60%)	15 (60%)		
≥3 血管	1 (9.1%)	9 (39.1%)	8 (32%)	8 (32%)		
LVEF (%)	53.49 ± 11.36	58.29 ± 12.34	53.84 ± 13.35	50.53 ± 12.17	0.0203	0.1235
ストレス試験 陽性	70 (40.5%)	79 (38%)	60 (32.8%)	71 (37.4%)	0.6382	0.5086
ストレス試験 中間	25 (14.5%)	34 (16.3%)	31 (16.9%)	27 (14.2%)		
ストレス試験 陰性	78 (45.1%)	95 (45.7%)	92 (50.3%)	92 (48.4%)		

§ 以前に CAD: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

+ 以前に CVA/TIA: 脳血管動脈疾患、以前に非出血性脳卒中または以前に T I A

【表 1 3】

表 9

ベースラインマーカー濃度と連続的ベースライン変数との単純相関
トロポニンT I C複合体

	R 値	p [*]
年齢 (歳)	0.02	0.3448
BMI	0	0.9317
最大記録 CK-MB (ULN の%)	0.22	0
CRP (mg/dl)	0.03	0.3579
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.04	0.2861
LVEF (%)	0.07	0.186
クレアチンクリアランス	0.03	0.1679

10

20

* ピアソンの積率相関係数に基づく p 値

30

マーカーとベースライン変化との線形関係が有効であるかどうかのピアソン積率相関係数試験についての p 値。R 値は、観測点が適合した線にいか
に近いかを示す。

【0134】

c T n T I C と臨床的結果との関係

c T n T I C の濃度は、同時点で生存していた患者に対して 30 日以内に死亡した患者で
有意に高かった ($p < 0.05$) (表 10)。低い四分位の c T n T I C 濃度のトレンド
は、10ヶ月で緊急血管再生を必要とする虚血の増加した頻度と関係があった (表 11)
。対照的に、高い四分位の c T n T I C 濃度のトレンドは、喫煙の履歴を有しない患者に
おいて、死亡、緊急血管再生を必要とする虚血、および、死亡、非致命的 M I、若しくは
事象後 30 日で緊急血管再生を必要とする虚血の組み合わせられたエンドポイント、に関係
した (表 12)。

40

【表 14】

表 10

ベースラインマーカー濃度と30日の結果との相関
トロポニン TIC 複合体

結果	n	平均 ± SD	中央値 (25, 75)	p
死亡	40	1255.76 ± 3208.86	163.3 (23.15, 973.55)	0.0492
生存	2399	479.48 ± 2460.34	65.5 (16.65, 188.85)	
MI	70	685.68 ± 2837.65	50.75 (6.25, 287.27)	0.5071
非MI	2369	486.49 ± 2464.51	66.3 (17, 193.2)	
虚血 -> 緊急血管再生	82	411.49 ± 1422.44	82.95 (15.7, 260.42)	0.764
非虚血 -> 緊急血管再生	2357	495.02 ± 2504.38	65.6 (16.7, 189.6)	
死亡/MI	103	933.03 ± 3070.43	64.3 (12.35, 442.65)	0.0648
非死亡/MI	2336	472.77 ± 2444.99	65.85 (16.95, 188.42)	
死亡/MI/虚血 -> 緊急血管再生	181	710.78 ± 2513.32	66.1 (12.8, 334.3)	0.2171
非死亡/MI/虚血 -> 緊急血管再生	2258	474.69 ± 2472.24	65.7 (17, 187.05)	

10

20

30

【表 15】

表 11

ベースラインマーカー濃度と10ヶ月の結果との関係
トロポニンTIC複合体

	≤ 16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		p トレ ンド	p Q4 対 Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	610		610		609		610			
死亡	23	5	16	3.5	15	3.1	32	6.3	0.1619	0.1678
MI	44	8.6	32	5.9	21	4.6	27	5.7	0.0162	0.059
虚血 -> 緊急血管再生	40	7.7	40	8.8	30	5.6	36	6.1	0.4682	0.7325
死亡またはMI	56	10.9	45	8.7	35	7.5	55	11.1	0.7577	0.9498
死亡/MI/虚血 -> 緊急血 管再生	93	17.7	85	17.4	64	12.9	88	16.6	0.439	0.853

死亡の場合を除き、パーセンテージは、10ヶ月で打ち切った追跡調査による Kaplan-Meier 事象割合である。

p 値は、Cox 回帰分析からのものである。

10

20

30

【表 16】

表 12

ベースラインマーカー濃度と30日の結果との関係

トロポニンTIC複合体

喫煙: 非喫煙

	≤16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		pトレ ンド	pQ4 対Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	220		180		193		181			
死亡	4	1.8	2	1.2	3	1.6	11	6.1	0.0178	0.0351
MI	9	4.1	7	4.1	4	2.1	6	3.5	0.4843	0.7361
虚血 → 緊急血管再生	1	0.5	7	4.1	7	3.7	11	6.2	0.0042	0.0111
死亡またはMI	11	5	8	4.6	6	3.1	16	8.9	0.1884	0.1254
死亡/MI/虚血 → 緊急血管再生	12	5.5	15	8.7	13	6.8	26	14.5	0.0054	0.0029

10

20

30

【0135】

BNPとベースラインの臨床的变化との関係

データは、2525人の患者から評価した。BNPの高いベースラインの四分位の濃度は、年齢、高血圧症、およびたばこの使用に関係した。高い四分位のBNP濃度は、鬱血性心不全、腎機能、心電図の変化、キリップクラス>I、およびCK-MBの上昇した濃度に関係した(表13)。対照的に、四分位のBNP濃度は、冠状動脈疾患の以前の履歴、ボディマス指標、および糖尿病とは関係しなかった。BNPと連続したベースライン変化のCRP ($R=0.2$, $p<0.0001$)、フィブリノーゲン ($R=0.18$, $p<0.0001$)、LVEF ($R=0.23$, $p<0.0001$)との濃度の間で有意な相関があった。BNP濃度とボディマス指数との相関は、わずかであった ($R=0.06$) (表14)。さらに、高い平均BNP濃度は、50%またはそれ以上の狭窄症の血管の数、低い駆出率、および陽性ストレス試験結果と有意に関係した(表15)。

【表17】

表 13

BNP の四分位によるベースラインの臨床的特徴(pg/mL)

	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	p トレン ド	p Q4 対 Q1
BNP 濃度の範囲, pg/mL	0-43.6	43.7-81.2	81.3-137.8	137.9-1456.6		
n	631	632	632	630		
無作為化までの時間 (時)	39 ± 21	40 ± 21	41 ± 20	41 ± 19	0.04	0.10
年齢 (歳)	57 ± 10	59 ± 11	61 ± 12	66 ± 11	<0.0001	<0.0001
男性	474 (75%)	465 (74%)	472 (75%)	405 (64%)	0.0001	<0.0001
白人	575 (91%)	592 (94%)	605 (96%)	603 (96%)	0.0002	0.001
過去の医療履歴						
高血圧症	246 (39%)	254 (40%)	263 (42%)	298 (47%)	0.003	0.003
鬱血性心不全	26	28				
	(4%)	(4%)	26 (4%)	56 (9%)	0.0006	0.0008
冠動脈疾患*	329 (52%)	312 (49%)	294 (47%)	327 (52%)	0.7	0.9
末梢血管疾患	33 (5%)	43 (7%)	48 (8%)	57 (9%)	0.008	0.009
脳血管疾患	24 (4%)	32 (5%)	39 (6%)	60 (10%)	<0.0001	0.0001
糖尿病	138 (22%)	133 (21%)	132 (21%)	152 (24%)	0.4	0.3
CAD の家族履歴	268 (43%)	260 (41%)	253 (41%)	232 (37%)	0.045	0.04
高コレステロール血症	199 (32%)	191 (30%)	173 (28%)	149 (24%)	0.0009	0.002
喫煙の状態:						
					0.0002	0.001
現在の喫煙者	233 (37%)	263 (42%)	236 (38%)	189 (30%)		
非喫煙者	193 (31%)	161 (26%)	185 (29%)	254 (40%)		
過去の喫煙者	204 (32%)	205 (33%)	209 (33%)	186 (30%)		
徴候による診断:						
					<0.0001	<0.0001
ST 上昇MI	141 (22%)	189 (30%)	231 (37%)	264 (42%)		
非ST 上昇MI	87 (64%)	137 (22%)	159 (25%)	182 (29%)		
不安定狭心症	402 (64%)	306 (48%)	241 (38%)	184 (29%)		

10

20

30

40

【表 18】

(表 13 つづき)

身体的所見

BMI kg/m ²	29 ± 5	28 ± 5	28 ± 14	28 ± 12	0.1	0.08
収縮期の B P (mm Hg)	130 ± 20	129 ± 19	128 ± 22	129 ± 21	0.3	0.4
キリップクラス II-IV	31 (5%)	36 (6%)	56 (9%)	109 (18%)	<0.0001	<0.0001

診断試験

クレアチンクリアランス ≤ 90	146 (24%)	185 (31%)	229 (38%)	350 (58%)	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	212 (58%)	308 (72%)	349 (79%)	388 (86%)	<0.0001	<0.0001
S T 低下 > 0.5mm	270 (43%)	297 (47%)	311 (49%)	356 (57%)	<0.0001	<0.0001
T 波転移 > 3mm	137 (22%)	146 (23%)	171 (27%)	167 (27%)	0.02	0.047

* 以前の冠状動脈疾患: 以前に MI、報告された不安定狭心症、狭心症、血管造影的に確認された CAD、以前に徴候事象ではない PTCR または CABG

【表 19】

表 14

BNP 濃度と連続的ベースライン変数との相関

	R 値	p 値
年齢 (歳)	0.28	<0.0001
BMI	0.06	0.006
最大記録 CK-MB (ULN の%)	0.09	0.0005
CRP (mg/dl)	0.2	<0.0001
フィブリノーゲン (mg/dl)	0.18	<0.0001
LVEF (%)	0.23	<0.0001
クレアチンクリアランス	0.28	<0.0001

【表 2 0】

表 15. 心臓試験結果とBNP濃度との関係

試験	結果	n	BNP	
			(平均 ± SD)	p 値
冠状動脈血管造影:	なし	27	68 ± 48	<0.0001
	≥50% 狭窄症	1	83 ± 65	
	の血管数	2	98 ± 98	
	≥3	79	143 ± 145	
LV 駆出率	≤ 50%	156	136 ± 161	0.003
	> 50%	189	96 ± 78	
ストレス試験	陽性	296	118 ± 118	0.003
	中間	118	118 ± 128	
	陰性	374	91 ± 95	

10

20

30

【0 1 3 6】

BNP と臨床的結果との関係

BNP の濃度は、同時点で生存していた患者に対して、30 日以内 ($p < 0.0001$) および 10 ヶ月以内 ($p < 0.0001$) に死亡した患者で有意に高かった (表 16)。さらに、BNP 濃度は、非致命的 M I を経験していない患者に対して、これを 30 日以内 ($p = 0.01$) および 10 ヶ月以内 ($p = 0.02$) に経験した患者で有意に高かった (表 16)。高い BNP 濃度と 30 日および 10 ヶ月以内の死亡との関係は、徴候による診断に基づいたサブグループの分析でも観察された (表 17)。

40

【表 2 1】

表 16. ベースラインBNP濃度 (pg/mL)と結果との関係

結果	n	中央値 [25,75]	平均 ± SD	p 値	
30日					
死亡	39	153 [79,294]	226 ± 204	<0.0001	10
生存	2486	80 [43,135]	113 ± 124		
MI	70	109 [50,159]	152 ± 159	0.01	
非 MI	2455	80 [44,137]	113 ± 125		
10ヶ月					
死亡	85	143 [88,308]	228 ± 228	<0.0001	20
生存	2440	79 [43,133]	110 ± 120		
MI	124	101 [50,161]	141 ± 140	0.02	
非 MI	2401	80 [43,134]	113 ± 126		

【表 2 2】

表 17. 徴候による診断に基づくサブグループにおけるベースラインBNP濃度 (pg/ml)と

10ヶ月の結果との関係

結果	n	中央値 [25,75]	平均 $\pm$ SD	p 値
ST上昇MI	825	96 [56,161]	131 $\pm$	
30日までの死亡	13	153 [77,265]	236 $\pm$ 220	0.002
30日での生存	812	95 [56,161]		
10ヶ月までの死亡	23	150 [90,227]	199 $\pm$ 176	0.008
10ヶ月での生存	802	95 [55,161)	129 $\pm$ 123	
非ST上昇ACS	1698	72 [39,124]	106 $\pm$	
30日までの死亡	26	149 [84,307]	220 $\pm$ 200	<0.0001
30日での生存	1672	71 [39,123]	105 $\pm$ 124	
30日までの死亡	62	142 [88,320]	239 $\pm$ 245	<0.0001
30日での生存	1636	70 [38,121]	101 $\pm$ 117	
不安定狭心症	1133	60 [33,105]	92 $\pm$	
30日までの死亡	14	94[69,237]	182 $\pm$ 195	0.002
30日での生存	1119	60 [33,105]	90 $\pm$ 109	
10ヶ月までの死亡	34	96 [70,265]	233 $\pm$ 292	<0.0001
10ヶ月での生存	1099	58 [33,104]	87 $\pm$ 97	

10

20

30

【0137】

FABPとベースライン臨床的変数との関係

データは、2287人の患者から評価した。FABPとベースライン臨床的変数との関係づけは、8ng/mlのFABPの切点を用いて行った。FABPの高いベースライン濃度は、年齢、鬱血性心不全の履歴、腎機能、心電図の変化、キリップクラス>I、並びにCK-MB、cTnI、BNP、およびCRPの上昇した濃度に関係した(表18)。対照的に、四分位のFABP濃度は、冠状動脈疾患の以前の履歴、ボディマス指数、高血圧症、および糖尿病には関係しなかった。FABPの濃度とcTnI濃度との間に有意な相関があった($R=0.21$ 、 $p<0.0001$)。FABP濃度と他の連続変数の間の相関は、わずかであった($R^2<0.03$) (表19)。

40

【表23】

表 18. ベースライン FABP (ng/mL)によるベースラインの臨床的特徴

	FABP ≤8	FABP >8	p	
範囲、 ng/mL	<8	8 -434.2		
n	1955	332		
無作為化までの時間 (時)	42 ± 19	33 ± 19	<0.0001	
年齢 (歳)	60 ± 11	65 ± 12	<0.0001	10
男性	1401 (72%)	244 (73%)	0.5	
白人	1833 (94%)	315 (95%)	0.4	
過去の医療履歴				
高血圧症	820 (42%)	140 (42%)	1.0	
鬱血性心不全	89 (5%)	29 (9%)	0.001	
冠状動脈疾患*	983 (50%)	155 (47%)	0.2	
徴候事象の PCI	670 (34%)	105 (32%)	0.3	20
末梢血管疾患	132 (7%)	24 (7%)	0.8	
脳血管疾患	57 (3%)	10 (3%)	0.9	
糖尿病	428 (22%)	65 (20%)	0.3	
CADの家族履歴	793 (41%)	111 (34%)	0.02	
高コレステロール血症	576 (30%)	72 (22%)	0.003	
2週間以前のアスピリン	799 (41%)	120 (36%)	0.1	
2週間以前の脂質の処方	426 (22%)	53 (16%)	0.01	
無作為化以前のヘパリン	1734 (89%)	278 (84%)	0.009	30
ACE 管理	1577 (81%)	248 (75%)	0.01	
以前にβ遮断薬	538 (28%)	86 (26%)	0.5	
喫煙の状態：			0.08	
現在の喫煙者	37%	31%		
非喫煙者	31%	36%		
過去の喫煙者	32%	33%		
徴候による診断:			<0.001	40
ST上昇MI	29%	52%		
非ST上昇MI	22%	24%		
不安定狭心症	49%	24%		

【表 2 4】

(表 18 つづき)

身体的所見

BMI kg/m ²	28 ± 11	28 ± 5	0.4
収縮期の B P (mm Hg)	129 ± 21	130 ± 22	0.2
HR (BPM)	72 ± 14	74 ± 16	0.03
キリップクラス II-IV	150 (8%)	56 (17%)	<0.001

10

診断試験

クレアチンクリアランス	679 (36%)	167 (53%)	<0.001
-------------	-----------	-----------	--------

ス ≤ 90

ClCr (cc/min)	106 ± 40	92 ± 40	<0.0001
CK-MB > ULN	909 (71%)	240 (91%)	<0.001
CTnI > 1.5 ng/ml	232 (22%)	194 (59%)	<0.001
BNP > 80 pg/ml	908 (47%)	240 (73%)	<0.001
CRP > 1.5 ng/ml	262 (40%)	79 (50%)	0.03
ST 異常 > 1mm	857 (44%)	212 (64%)	<0.001
T 波転移 > 3mm	278 (24%)	82 (25%)	0.9

20

CAD 範囲 (50% 狭窄症)

0.3

0 血管	7%	4%
1 血管	33%	35%
2 血管	28%	30%
3 血管	32%	32%

30

Pos ETT	245 (37%)	32 (37%)	0.2
EF (%)	55 ± 12	49 ± 13	<0.0001

【表 25】

表 19. FABP と連続変数との相関

変数	R ²	P 値
無作為化までの時間	0.02	<0.0001
年齢	0.007	0.0001
BMI	0.0006	0.25
CKMB 最大値	0.024	<0.0001
バイオサイト cTnI	0.21	<0.0001
CRP	0.0001	0.75
フィブリノーゲン	0.003	0.002
BNP	0.006	0.0002
クレアチンクリアランス	0.008	0.008
LVEF	0.02	<0.0001

10

【0138】

20

FABP と臨床的結果との関係

FABP の平均濃度は、同時点で生存していた患者に対して、30 日以内 ($p < 0.0001$) および 10 ヶ月以内 ($p < 0.0001$) に死亡した患者で有意に高かった (表 20)。平均 FABP 濃度は、エンドポイントを有しない患者に対して、30 日以内 ($p < 0.0001$) および 10 ヶ月以内 ($p < 0.0001$) の死亡、非致命的 MI、または血管再生の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった (表 20)。さらに、平均 FABP 濃度は、CHF を有しないものに対し、30 日以内 ($p < 0.0001$) および 10 ヶ月以内 ($p < 0.0001$) に CHF を有した患者で有意に高かった (表 20)。FABP 濃度が陽性 ($FABP > 8$) または陰性 ($FABP = 8$ またはそれ以下) のいずれかに分類されたときに、これらの関係は統計的な有意さを維持した (表 21)

30

【表 26】

表 20. ベースライン FABP 濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	平均 ± SD	p 値*
30 日			
死亡	33	22.8 ± 27.5	<0.0001
生存	2254	10.5 ± 14.7	
死亡または MI	86	17.2 ± 22.0	<0.0001
非死亡または MI	2201	10.4 ± 14.6	
D/MI/UR	157	16.2 ± 37.6	<0.0001
非 D/MI/UR	2130	10.3 ± 11.7	
CHF	46	20.2 ± 21.0	<0.0001
非 CHF	2241	10.5 ± 14.8	
10 ヶ月			
死亡	76	18.3 ± 22.7	<0.0001
生存	2211	10.5 ± 14.6	
死亡または MI	169	14.5 ± 18.3	<0.0001
非死亡または MI	2118	10.4 ± 14.7	
D/MI/UR	294	13.7 ± 28.5	<0.0001
非 D/MI/UR	1993	10.3 ± 11.7	
CHF	66	17.5 ± 18.5	<0.0001
非 CHF	2221	10.5 ± 14.8	

* ウィコクソンランクサム検定

【表 27】

10

20

30

40

表 21. ベースライン FABP と結果との関係

結果	FABP 陰性	FABP 陽性	P 値
n	1955	332	
30 日			
死亡	19 (1.0%)	14 (4.2%)	<0.001
MI	45 (2.3%)	14 (4.2%)	0.04
UR	58 (3.0%)	16 (4.8%)	0.08
D/MI	59 (3.0%)	27 (8.1%)	<0.001
D/MI/UR	116 (5.9%)	41 (12.4%)	<0.001
CHF	24 (1.2%)	22 (6.3%)	<0.001
10 ヶ月 (推定値)			
死亡	46 (3.1%)	30 (12.4%)	<0.0001
MI	88 (5.6%)	22 (9.4%)	0.05
UR	109 (6.4%)	22 (7.4%)	0.34
D/MI	120 (7.8%)	49 (21.4%)	<0.0001
D/MI/UR	226 (14.4%)	68 (29.0%)	<0.0001
CHF	30 (2.0%)	21 (8.1%)	<0.0001
D/MI/CHF	140 (9.3%)	56 (23.5%)	<0.0001

10

20

30

【0139】

T p P とベースライン臨床的変数との関係

データは、2349人の患者から評価した。T p Pの高いベースライン濃度は、年齢、冠状動脈疾患の履歴、腎機能、CHFの履歴、アスピリンの使用に関係し、白人の人種およびヘパリン治療に逆に関係した（表22）。対照的に、T p P濃度は、心拍数、キリッブクラス> I、ボディマス指数、高血圧症、冠状動脈疾患の範囲、および糖尿病には関係しなかった。

【表28】

表 22. OPUS-TIMI 16 における TpP の四分位によるベースラインの臨床的特徴

エンドポイント	TpP 四分位				p 値
	第 1	第 2	第 3	第 4	全体の χ^2
範囲	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160	
N	596	590	577	586	
無作為化までの時間	39	41	43	40	0.07
<i>人口統計</i>					
年齢 (歳)	59	60	62	62	0.002
男性	76%	70%	71%	69%	0.01
白人	94%	93%	96%	93%	0.1
<i>PMH</i>					
高血圧症	37%	43%	44%	43%	0.076
糖尿病	18%	22%	22%	24%	0.06
現在の喫煙者	39%	38%	35%	34%	
高脂血症	25%	30%	28%	31%	0.1
FHx	39%	40%	39%	42%	0.69
以前に CAD	41%	49%	53%	56%	<0.001
以前に MI					
以前に CHF	2.0%	5.7%	5.6%	7.5%	<0.001
<i>徴候による診断</i>					
STEMI	44%	28%	30%	29%	
NSTEMI	23%	24%	24%	19%	
UA	33%	48%	47%	52%	
<i>無作為以前の医療</i>					
アスピリン	33%	39%	43%	46%	<0.001
ヘパリン	93%	88%	88%	83%	<0.001
<i>身体的所見</i>					
BMI (kg/m ²)	27	29	28	29	0.19
SBP (mm Hg)	127	129	130	129	0.16
HR (bpm)	72	73	72	73	0.3

10

20

30

40

(表 2 2 つづき)

キリップクラス	7.5%	8.3%	8.6%	11.2%	0.14	
II-IV						
診断試験						
CrCl ≤ 90 ml/min	35%	37%	44%	40%	0.02	
TnI > 1.5 ng/mL	36%	25%	26%	23%	<0.001	10
CRP > 1.5 mg/dL	42%	46%	38%	46%	0.24	
BNP > 80 pg/mL	52%	49%	56%	46%	0.01	
ST 異常 > 1 mm	49%	45%	47%	46%	0.47	
CAD の範囲						
0VD	7%	8%	5%	7%		
1VD	39%	27%	39%	33%		
2VD	30%	30%	24%	28%		20
3VD	23%	35%	32%	32%		

【 0 1 4 0 】

T p P と臨床的結果との関係

T p P 濃度は、同時点で生存した患者に対して、10ヶ月以内に死亡した患者で有意に高かった ($p < 0.05$) (表 2 3)。T p P 濃度は、入院を必要とする虚血を経験しないものに対し、10ヶ月以内に入院を必要とする虚血を経験した患者で有意に高かった ($p = 0.0062$) (表 2 3)。T p P 濃度は、エンドポイントを経験しない患者に対して、10ヶ月以内に、死亡若しくは非致命的 M I、または、死亡、非致命的 M I 若しくは緊急血管再生の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった ($p < 0.02$) (表 2 3)。

【表 3 0】

表 23. OPUS-TIMI 16 における死亡、MI、CHF、緊急血管再生、および虚血の割合

エンドポイント	TpP 四分位				p 値 トレンド の χ^2
	第 1	第 2	第 3	第 4	
範囲	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160	
N	596	590	577	586	
10ヶ月の結果					
死亡	2.68	2.37	3.64	4.44	0.047
MI	4.03	4.75	5.03	5.46	0.24
CHF	2.35	2.37	3.64	2.90	0.34
緊急血管再生	4.53	5.08	7.45	6.31	0.074
虚血 → 再入院	4.70	5.93	8.67	8.02	0.0062
D/MI	5.87	6.44	7.97	9.22	0.016
D/MI/CHF	7.38	7.97	9.36	10.24	0.055
D/MI/UR	10.40	11.36	14.90	15.19	0.0038

10

20

【0141】

MCP-1 とベースライン臨床的変数との関係

データは、2270 人の患者から評価した。MCP-1 の高いベースライン濃度は、年齢、冠状動脈疾患の履歴、腎機能、CHF の履歴、糖尿病、高血圧症、キリップクラス > I、およびアスピリンの使用に関係した（表 24）。対照的に、MCP-1 濃度は、心拍数、ボディマス指数、冠状動脈疾患の範囲、および喫煙には関係しなかった。

30

【表 31】

表 24. MCP-1 (ng/mL)の四分位によるベースラインの臨床的特徴

	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	p トレンド	p Q4 対 Q
範囲, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	238.5-7016.3		
n	567	568	568	567		
無作為化までの時間 (時)	41 ± 20	40 ± 19	42 ± 20	40 ± 20	0.45	0.54
年齢 (歳)	57 ± 11	59 ± 12	62 ± 11	65 ± 11	<0.0001	<0.0001
男性	433 (76%)	414 (73%)	406 (72%)	375 (66%)	0.0001	<0.0001
白人	531 (94%)	532 (94%)	539 (95%)	533 (94%)	0.61	0.81
過去の医療履歴						
高血圧症	224 (40%)	223 (39%)	238 (42%)	276 (49%)	0.001	0.002
鬱血性心不全	18 (3%)	25 (4%)	26 (5%)	45 (8%)	0.0004	<0.0001
冠状動脈疾患*	245 (43%)	274 (48%)	291 (51%)	318 (56%)	<0.0001	<0.0001
徴候事象の PCI	201 (35%)	186 (33%)	186 (33%)	199 (35%)	0.91	0.90
末梢血管疾患	32 (6%)	32 (6%)	43 (8%)	47 (8%)	0.04	0.08
脳血管疾患	15 (3%)	18 (3%)	16 (3%)	19 (3%)	0.58	0.49
糖尿病	115 (20%)	105 (19%)	124 (22%)	145 (26%)	0.01	0.03
CADの家族履歴	242 (43%)	231 (41%)	214 (38%)	211 (38%)	0.21	0.08
高コレステロール血症	161 (28%)	167 (29%)	163 (29%)	168 (26%)	0.39	0.41
2週間以前のアスピリン	203 (36%)	230 (40%)	228 (40%)	252 (45%)	0.004	0.002
2週間以前の脂質の処方	121 (21%)	122 (22%)	115 (20%)	116 (21%)	0.65	0.76
無作為化以前のヘパリン	508 (90%)	495 (87%)	489 (86%)	506 (89%)	0.75	0.85
喫煙の状態:						
現在の喫煙者	215 (38%)	216 (38%)	204 (36%)	177 (31%)	0.24	0.06
非喫煙者	178 (31%)	175 (31%)	176 (31%)	196 (35%)		
過去の喫煙者	173 (31%)	175 (31%)	188 (33%)	192 (34%)		
徴候による診断:						
ST上昇MI	176 (31%)	187 (33%)	178 (31%)	196 (35%)	0.01	0.02
非ST上昇MI	160 (28%)	111 (20%)	120 (21%)	120 (21%)		
不安定狭心症	231 (41%)	269 (47%)	270 (48%)	251 (44%)		

10

20

30

40

【表 3 2】

(表 2 4 つづき)

身体的所見

BMI kg/m ²	28 ± 6	28 ± 4	29 ± 15	29 ± 13	0.28	0.96
収縮期の B P (mm Hg)	127 ± 19	129 ± 20	129 ± 22	130 ± 22	0.04	0.004
HR (BPM)	72 ± 14	72 ± 13	73 ± 14	73 ± 15	0.66	0.26
キリップクラス II-IV	46 (8%)	37 (7%)	46 (8%)	69 (12%)	0.02	0.003

診断試験

クレアチンクリアランス ≤ 90	143 (26%)	191 (35%)	229 (42%)	280 (52%)	<0.0001	<0.0001
ClCr (cc/min)	116 ± 42	107 ± 40	103 ± 41	93 ± 37	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	300 (79%)	280 (72%)	278 (72%)	284 (75%)	0.25	0.21
CTnI > 1.5 ng/ml	176 (31%)	156 (28%)	138 (25%)	149 (27%)	0.04	0.08
BNP > 80 pg/ml	265 (47%)	260 (47%)	276 (49%)	334 (59%)	<0.0001	<0.0001
CRP > 1.5 ng/ml	83 (43%)	83 (42%)	89 (42%)	94 (47%)	0.51	0.51
ST 異常 > 1mm	239 (42%)	267 (47%)	267 (47%)	289 (51%)	0.005	0.003

CAD の範囲 (50% 狭窄症)

0 血管	26 (8%)	20 (7%)	19 (7%)	18 (6%)	0.49	0.07
1 血管	120 (38%)	91 (32%)	90 (32%)	90 (30%)		
2 血管	80 (26%)	84 (30%)	78 (28%)	87 (29%)		
3 血管	86 (28%)	84 (30%)	82 (33%)	102 (34%)		
Pos ETT	96 (46%)	95 (54%)	87 (44%)	65 (44%)	0.45	0.75
EF (%)	55 ± 13	54 ± 13	53 ± 13	53 ± 14	0.11	0.06

10

20

【 0 1 4 2 】

30

M C P - 1 と臨床的結果との関係

平均 M C P - 1 濃度は、同時点で非致命的 M I を経験していない患者に対して、30 日以内 ($p = 0.01$) または 10 ヶ月以内 ($p = 0.04$) に経験した患者で有意に高かった (表 2 5)。さらに、平均 M C P - 1 濃度は、エンドポイントを経験しない患者に対して、10 ヶ月以内に、死亡若しくは非致命的 M I ($p = 0.05$)、または、死亡、非致命的 M I 若しくは C H F の組み合わせたエンドポイントを有する患者で有意に高かった ($p < 0.02$) (表 2 5)。これらの所見は、四分位 M C P - 1 濃度および結果の分析でも観察された (表 2 6)。

【表 3 3】

表 25. ベースライン MCP-1 濃度 (ng/mL) と結果との関係

結果	n	中央値 [25,75]	平均 ± SD	p 値*
30 日				
死亡	34	147 [116,227]	184 ± 117	0.19
生存	2236	178 [128,239]	206 ± 212	
MI	59	209 [146,279]	235 ± 130	0.01
非 MI	2211	177 [128,237]	205 ± 213	
死亡または MI	88	197 [135,268]	221 ± 129	0.13
非死亡または MI	2182	177 [128,236]	205 ± 213	
D/MI/UR	153	185 [140,251]	229 ± 284	0.12
非 D/MI/UR	2117	177 [127,237]	204 ± 205	
CHF	44	182 [134,236]	260 ± 468	0.79
非 CHF	2226	177 [128,238]	204 ± 203	
D/MI/CHF	114	197 [136,264]	243 ± 308	0.06
非 D/MI/CHF	2156	177 [128,236]	203 ± 204	
10 ヶ月				
死亡	78	181 [136,248]	205 ± 213	0.41
生存	2192	177 [128,237]	208 ± 110	
MI	110	202 [136,268]	221 ± 122	0.04
非 MI	2160	177 [128,236]	205 ± 214	
死亡または MI	172	192 [134,265]	216 ± 120	0.05
非死亡または MI	2098	177 [128,235]	205 ± 216	

【表 3 4】

(表 2 5 つづき)

D/MI/UR	293	180 [133,253]	217 ± 225	0.23
非 D/MI/UR	1977	177 [127,235]	204 ± 209	
CHF	65	192 [147,242]	246 ± 387	0.25
非 CHF	2205	177 [128,239]	204 ± 203	
D/MI/CHF	203	196 [136,264]	229 ± 242	0.02
非 D/MI/CHF	2067	176 [127,235]	203 ± 207	

10

* ウイコクソンランクサム検定

【表 3 5】

表 26. ベースライン MCP-1 四分位と結果との関係

結果	四分位 1	四分位 2	四分位 3	四分位 4	P トレ ンド	P Q4 Q1 対
範囲, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	>238		
n	567	568	568	567		
30日						
死亡	10 (1.8%)	12 (2.1%)	5 (0.9%)	7 (1.2%)	0.22	0.46
MI	10 (1.8%)	14 (2.5%)	11 (1.9%)	24 (4.2%)	0.02	0.02
UR	8 (1.4%)	24 (4.2%)	19 (3.3%)	17 (3.0%)	0.23	0.07
D/MI	19 (3.4%)	22 (3.9%)	16 (2.8%)	31 (5.5%)	0.14	0.08
D/MI/UR	27 (4.8%)	46 (8.1%)	35 (6.2%)	45 (7.9%)	0.11	0.03
CHF	9 (1.6%)	12 (2.1%)	12 (2.1%)	11 (1.9%)	0.68	0.65
D/MI/CHF	23 (4.1%)	27 (4.8%)	25 (4.4%)	39 (6.9%)	0.048	0.04
10ヶ月推 定値						
死亡	14 (2.7%)	24 (5.2%)	15 (3.1%)	25 (7.0%)	0.21	0.07
MI	23 (4.8%)	24 (5.2%)	23 (5.1%)	40 (9.8%)	0.03	0.03
UR	25 (5.3%)	43 (8.3%)	28 (6.0%)	31 (6.2%)	0.89	0.42
D/MI	36 (7.4%)	42 (9.4%)	33 (7.0%)	61 (15.6%)	0.02	0.008
D/MI/UR	61 (13.0%)	84 (18.2%)	60 (12.9%)	88 (21.7%)	0.11	0.02
CHF	11 (2.2%)	9 (1.9%)	15 (3.9%)	16 (3.4%)	0.17	0.33
D/MI/CHF	41 (8.4%)	46 (10.1%)	43 (10.1%)	68 (17.2%)	0.009	0.007

20

30

40

【0143】

年齢、糖尿病、腎機能、CHFの徴候、ECGの変化、並びにcTnIおよびBNPの濃 50

度等、長期の死亡率の他の独立した予測値で調整した多変量モデルにおいて、増加するMMP-9の濃度は、高い10ヶ月の死亡率と関係したまま維持された。MMP-9の第2、第3、および第4の四分位の患者の10ヶ月での死亡の調整された確率比は、4.5 (1.3-15.6)、6.4 (1.9-21.4)、7.6 (2.3-25.5)であった。CRP等のすべての変数について完全なデータで736人の患者においてモデルを繰り返した場合、MMP-9は、10ヶ月の死亡率と有意に関係したまま維持された。調整した確率比は、第2、第3、および第4の四分位において、3.1 (0.9-10.7)、3.9 (1.1-13.1)および4.2 (1.3-14.4)であった。

【表36】

表 27. 10ヶ月の死亡率についての多変量モデル

変数	モデル 1 (n=2068)		モデル 2 (n=736)	
	HR	95% CI	HR	95% CI
年齢 > 75	2.25	1.03-4.92	1.91	0.83-4.40
糖尿病	1.59	0.69-2.43	1.30	0.73-2.31
キリップクラス > 1	2.98	1.71-5.21	2.37	1.27-4.45
左脚ブロック	4.96	2.21-11.12	5.32	2.19-12.90
クレアチンクリアランス < 90 cc/min	1.28	0.67-2.48	1.61	0.81-3.23
cTnI > 1.5 ng/mL	2.12	1.15-3.93	2.54	1.29-5.02
BNP > 40 pg/mL	5.70	1.35-24.04	5.58	1.29-24.15
CRP > 1.5 ng/mL	-	-	2.18	1.22-3.90
MMP-9 四分位 1 (リファレンス 四分位)	1.0	-	1.0	-
MMP-9 四分位 2	4.47	1.28-15.57	3.05	0.87-10.76
MMP-9 四分位 3	6.39	1.90-21.42	3.89	1.15-13.15
MMP-9 四分位 4	7.64	2.29-25.51	4.25	1.25-14.42

【0144】

モデル1は、C-反応性タンパク質を除きすべての変数について完全なデータを有する患者を含む。モデル2は、C-反応性タンパク質を含むすべての変数について完全なデータ

10

20

30

40

50

を有する患者を含む。列挙された変数に加えて、モデルは、高コレステロール血症、鬱血性心不全、または末梢動脈疾患；ヘパリン、硝酸塩、または利尿剤の以前の使用；徴候による診断（不安定狭心症、非ST上昇MI、ST上昇MI）；徴候事象の管理のための硝酸塩またはACE抑制剤の使用；血圧；および心電図のSTの変化、の以前の徴候について調整した。

【0145】

MMP-9の血漿濃度は、急性冠状動脈症候群の状態後の最初の数日以内に測定され、死亡率、非致命的MI、および鬱血性心不全の危険性の予測となる。MMP-9と死亡率の関係は、ベースライン臨床的変数、ECG所見、およびトロポニンI、C-反応性タンパク質、およびB型ナトリウム排泄増加性ペプチドのような確立された心臓生体マーカーの濃度と独立している。多変量解析により、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9、C-反応性タンパク質、B型ナトリウム排泄増加性ペプチド、およびトロポニンIの上昇した濃度は、増加した10ヶ月の死亡率の予測値からそれぞれ有意に独立していた。

10

【0146】

以前の研究において、MMP-9濃度は、虚血についての症状および心電図の徴候にもかかわらず、安定狭心症の患者における運動の後では増加しなかった（Kai H et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndrome*, *J Am Coll Cardiol* 32:368-372 (1998)）。本研究において、MMP-9とアテローム硬化症の範囲との間に関係はなく、MMP-9とCKMBおよびcTnIのような心臓壊死のマーカーとの間に、一般的に貧弱な相関が観察された。MMP-9と結果との間の関係は、不安定狭心症の患者と心筋梗塞の患者との間のものと同様であった。

20

【0147】

本実施例は、個々のマーカーの上昇と結果との間の関係の臨床的な利用を示している。さらに、危険性の層別化のための固有の病理学的工程に関連した異なる独立したマーカーを導入するという、多重マーカー方策を用いることによる利益も示される。この実施例で選択されたマーカーは、心筋損傷（cTnI、cTnT IC、およびFABP）、心室機能不全（BNP）、マトリックス分解またはプラーク破裂（MMP-9）、炎症（MCP-1およびCRP）、および凝固活性化（TpP）を示すものである。当業者は、これらの病理学的工程がこの実施例で記載された不利な事象に独立して関係していると承知している。この点において、それぞれのこれらの種々の病理学的工程の代替マーカーは、ACS患者の危険性の層別化のためのこの実施例のマーカーに置き換えうる。さらに、種々の病理学的工程のためのマーカーの種々の組み合わせは、ACSの患者の危険性の層別化に有用であろう。

30

【0148】

実施例5：診断的利用

MMP-9は、不安定狭心症からST部上昇心筋梗塞（STEMI）まで、急性冠状動脈系のすべての濃度で上昇する。TIMI OPUS-16研究集団は、不安定狭心症（UA）、非ST部上昇心筋梗塞（NSTEMI）、およびSTEMIの3つのグループに分離できる。特に興味深いこととは、不安定狭心症の正常健康ドナーからの区別において、95%の特異性における感度の水準（97.8~100%）である（表28）。心臓損傷の最も広く受け入れられたマーカーであるTnIは、急性冠状動脈症候群のこの部分集合においてわずかに50%を超える感度を達成したにすぎない。

40

【表37】

表 28. 不安定狭心症の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	不安定狭心症 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	60.9%	5.3%	10.5%	100.0%	45.0%	0.0%	43.8%
0-6 時間	94.8%	65.5%	9.1%	13.3%	100.0%	50.0%	10.5%	33.0%
0-12 時間	94.8%	69.7%	9.0%	13.7%	98.0%	53.4%	18.0%	53.2%
0-24 時間	94.8%	34.8%	7.5%	83.5%	97.8%	56.0%	17.7%	54.9%

10

【0149】

NSTEMI または STEMI のいずれかの個体において、TnI は、特に症状発症時から6時間から24時間の間において、優れた感度および特異性を有する（表29および30）。不安定狭心症においてTnIがほんのわずかしき上昇しえない一方、MMP-9が上昇するという事実は、深刻でない不安定狭心症とより深刻な心筋梗塞との間の区別の有用な方法を提供するものである。医師がこの情報を利用可能であれば、治療の選択肢は影響されることとなる。

20

【表38】

表 29. NSTEMI の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	NSTEMI 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	100.0%	0.0%	25.0%	100.0%	50.0%	25.0%	75.0%
0-6 時間	94.8%	75.0%	14.3%	14.3%	100.0%	28.6%	42.9%	71.4%
0-12 時間	94.8%	64.4%	23.1%	15.4%	100.0%	42.9%	50.0%	83.3%
0-24 時間	94.8%	76.7%	24.6%	20.6%	98.5%	50.0%	62.9%	91.2%

30

【表39】

表 30. STEMI の患者におけるマーカーの感度および特異性

症状発症からの時間	特異性	STEMI 感度						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 時間	94.8%	83.3%	25.0%	25.0%	100.0%	25.0%	0.0%	66.7%
0-6 時間	94.8%	61.1%	35.7%	14.3%	100.0%	46.2%	72.7%	90.9%
0-12 時間	94.8%	50.0%	48.9%	20.0%	97.8%	43.5%	86.5%	94.6%
0-24 時間	94.8%	68.2%	61.5%	22.2%	99.3%	49.3%	86.1%	97.0%

40

【0150】

BNP は、不安定狭心症においても幾分上昇するが、これは、心筋梗塞の、特に事象の早

50

期において、より表示となるものである。MMP-9とTnIの組み合わせで用いた場合、BNPは、急性冠状動脈症候群の診断の有用な情報を加えうる。

【0151】

TpP、MCP-1、およびFABPはすべて、急性冠状動脈症候群の間の種々の時点で度合いを変化させて上昇し、その結果、診断を形成するのに使用される情報を加えうる。

【0152】

これらのマーカーのすべてが異なる機能を供給し、種々の供給源から由来するので、急性冠状動脈症候群の間の循環系へのこれらのマーカーの出現は、お互い独立しているようである。したがって、2またはそれ以上のマーカーを用いる診断パネルは、治療を導くことを助ける情報を提供する臨床医にとって有益であろう。

10

【0153】

実施例6： 患者の治療におけるマーカーの使用

MMP-9、cTnI、BNP、およびCRPがそれぞれ独立に10ヶ月の患者の死亡率に関係しているという所見は、ACSと疑われる患者における多重マーカー試験方策が個々のマーカーの測定と比べて危険予測を有利に改善できることを示す。このような予後および診断の利用に加え、本発明のマーカーは、ACS患者への治療の実施を助けるために用いることもできる。例えば、これらの生体マーカーの危険「プロフィール」は、異なった基礎をなす病態生理学的機構の標的特異的治療に用いられるであろう。この「危険プロフィール」は、MMP-9、cTnI、BNP、およびCRPの種々の組み合わせにより、上記マーカーに加えて、またはその置き換えとして用いる他のマーカーと同様に、決定

20

【0154】

加えて、アテローム硬化症およびその合併症において直接の病因の役割を果たすMMP-9のようなマーカーは、薬剤発見のための新規な治療の標的を提供できる。例えば、MMP系は、少なくとも4つの水準で調整されている：遺伝子転写、メッセージの翻訳、前酵素の活性化、およびメタロプロテアーゼの組織阻害因子(TIMPs)による阻害。これらの工程の1またはそれ以上の修飾は、アテローム硬化症のプラーク破裂を防ぎ、不利な血管および心臓の再構築を修正するであろう。

【0155】

治療方策には、例えば、MMP-9の合成を妨害するためのアンチセンス組成物の実施；レセプターを基礎とする治療の実施（例えばMMP-9またはそのフラグメントに向けられた抗体組成物）；および／または小分子治療の実施（例えばヘパリンはMMP-9合成を減少させることができ、テトラサイクリン抗体は亜鉛をキレートすることによりMMPを不活性化でき、そしてHMG Co-Aレダクターゼ阻害因子およびペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター（PPAR）-ガンマはマクロファージからのMMP-9の発現を減少させることができる）を、含めることができる。このような方策は、標的分子そのものに向けられ（この実施例のMMP-9）、または、その代わりに標的の活性化若しくは活性のために必要な上流の分子に向けられる（例えば、プラスミンのようなプロテアーゼで、これはMMP-9チモージェンをその活性形態に切断する）。

30

【0156】

この発明は当業者がこれを作製し、使用するために充分詳細に既述され、例示されているが、種々の代替、修正、および改良がこの発明の精神および範囲から離れることなく明白であろう。

40

【0157】

当業者は、本発明が、これらに内在するものと同様に、その目的を実行し、言及された目的および有利な点を得るのによく適していることを、容易に認識する。ここに提供された実施例は、好ましい態様の代表であり、例示であり、この発明の範囲の限定として意図するものではない。これらの修正および他の使用は、当業者に思い浮かぶものである。これらの修正は、この発明の精神の範囲に入るものであり、請求の範囲により定義されるものである。

50

【0158】

当業者にとって、様々な置き換えや修正がこの発明の範囲および精神から離れることなくここに記載された発明に対してなされうことは、容易で明白であろう。

【0159】

明細書に言及されたすべての特許および刊行物は、この発明の属する通常の知識を有するものの水準を示すものである。すべての特許および刊行物は、各々の個々の刊行物が特別に個別に参照により取り込まれることを示したように、同様の範囲で参照することによりここに取り込まれる。

【0160】

ここに適して例証的に記載された発明は、ここに特別に開示されていないいずれもの要素、限定の存在なしに実施されうる。したがって、例えば、ここの各々の事例において、「含む」、「本質的に～からなる」および「～からなる」のいずれの用語も、他の2つのいずれの用語にも置き換えることができる。使用された用語および表現は、記述の用語として用いられ、限定のものではなく、そしてこのような用語および表現の使用において、示され、記載された特徴またはその部分のいずれの均等物をも排除する意図はないが、種々の修正がこの請求された発明の範囲に入ることが可能であると認識できる。したがって、本発明は好ましい態様および任意の特徴により特に記載されているが、ここに開示された概念の修正および多様化が当業者によって行われ、このような修正および多様化が添付の請求の範囲により定義されるこの発明の範囲に入ると見なされることを、理解すべきである。

10

20

【0161】

他の態様は、特許請求の範囲により明らかにされる。

【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
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/089657 A2

- (51) International Patent Classification: A61B (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/14219
- (22) International Filing Date: 4 May 2002 (04.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/288,871 4 May 2001 (04.05.2001) US
60/315,642 28 August 2001 (28.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOSITE, INC. [US/US]; 11030 Roselle Street, San Diego, CA 92121 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): VALKIRS, Gunars, E. [US/US]; 2803 Paseo del Sol, Escondido, CA 92025 (US); DAHLEN, Jeffrey, R. [US/US]; 10555 Kemmerlein Road, San Diego, CA 92126 (US); KIRCHICK, Howard [US/US]; 5449 Panoramic Lane, San Diego, CA 92121 (US); BUECHLER, Kenneth, F. [US/US]; 12523 Manifesto Place, San Diego, CA 92130 (US).
- (74) Agents: WARBURG, Richard, J. et al.; Foley & Lardner, P.O. Box 80278, San Diego, CA 92138-0278 (US).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
— entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau
- 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.

WO 02/089657 A2

(54) Title: DIAGNOSTIC MARKERS OF ACUTE CORONARY SYNDROMES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to methods for the diagnosis and evaluation of acute coronary syndromes. In particular, patient test samples are analyzed for the presence and amount of members of a panel of markers comprising one or more specific markers for myocardial injury and one or more non-specific markers for myocardial injury. A variety of markers are disclosed for assembling a panel of markers for such diagnosis and evaluation. In various aspects, the invention provides methods for the early detection and differentiation of stable angina, unstable angina, and myocardial infarction. Invention methods provide rapid, sensitive and specific assays that can greatly increase the number of patients that can receive beneficial treatment and therapy, reduce the costs associated with incorrect diagnosis, and provide important information about the prognosis of the patient.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

**DIAGNOSTIC MARKERS OF ACUTE CORONARY SYNDROMES
AND METHODS OF USE THEREOF**

5 [0001] This application is related to and claims priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/288,871, filed on May 4, 2001 (Atty Docket No. 071949-6501) ; and U.S. Provisional Patent Application No. 60/315,642, filed on August 28, 2001 (Atty Docket No. 071949-5501), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 [0002] The present invention relates to the identification and use of diagnostic markers for acute coronary syndromes (ACS). In various aspects, the invention relates to methods for the early detection and differentiation of ACS and the identification of individuals at risk for adverse events upon presentation with ACS symptoms.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 [0003] The following discussion of the background of the invention is merely provided to aid the reader in understanding the invention and is not admitted to describe or constitute prior art to the present invention.

20 [0004] ACS is a manifestation of vascular injury to the heart, also referred to as myocardial injury or myocardial damage, that is commonly secondary to atherosclerosis or hypertension, and is the leading cause of death in the United States. ACS is commonly caused by occlusion associated with coronary artery disease cause by atherosclerotic plaque formation and progression to either further occlusion or fissure. ACS can be manifested as stable angina, unstable angina, or myocardial infarction.

25 [0005] The term "acute coronary syndromes" ("ACS") has been applied to a group of coronary disorders that result from ischemic insult to the heart. Patients with ACS form a heterogeneous group, with differences in pathophysiology, clinical presentation, and risk for adverse events. Such patients present to the physician with conditions that span a continuum that includes unstable angina, non-ST-elevation non-Q wave myocardial infarction ("NST"- "MI"), ST-elevation non-Q wave MI, and transmural (Q-wave) MI. ACS is believed to result largely from thrombus deposition and growth

30

WO 02/089657

PCT/US02/14219

within one or more coronary arteries, resulting in a partial or complete occlusion of the artery, and frequently involves rupture of the plaque, resulting in an ischemic injury. ACS may also be precipitated by a coronary vasospasm or increased myocardial demand. For review, *see, e.g., Davies, Clin. Cardiol.* **20** (Supp. I): I2-I7 (1997).

- 5 **[0006]** The seriousness of ACS is underlined by the morbidity and mortality that follow the ischemic insult. For example, workers have estimated that within four to six weeks of presentation with ACS, the risk of death or a subsequent myocardial infarction (MI) is 8-14%, and the rate of death, MI, or refractory ischemia is 15-25% (Theroux and Fuster, *Circulation* **97**: 1195-1206, 1998). Given that the total number of
- 10 deaths in the U.S. from acute MI is about 600,000, the search within the art for information that relates to the diagnosis, prognosis, and management of ACS has understandably been extensive. Several potential markers that may provide such information in certain patient populations have been identified, including circulating cardiac troponin levels (*see, e.g., Antman et al., N. Eng. J. Med.* **335**: 1342-9, 1996; *see*
- 15 also U.S. Patent Nos. 6,147,688, 6,156,521, 5,947,124, and 5,795,725, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety), ST-segment depression (*see, e.g., Savonitto et al., JAMA* **281**: 707-13, 1999), circulating creatine kinase levels (*see, e.g., Alexander et al., Circulation* (Suppl.) 1629, 1998), and circulating c-reactive protein levels (*see, e.g., Morrow et al., J. Am. Coll. Cardiol.* **31**: 1460-5, 1998).
- 20 **[0007]** Stable angina is characterized by constricting chest pain that occurs upon exertion or stress, and is relieved by rest or sublingual nitroglycerin. Unstable angina is characterized by constricting chest pain at rest that is relieved by sublingual nitroglycerin. Anginal chest pain is usually relieved by sublingual nitroglycerin, and the pain usually subsides within 30 minutes. Myocardial infarction is characterized by
- 25 constricting chest pain lasting longer than 30 minutes that can be accompanied by diagnostic electrocardiography (ECG) Q waves. Unstable angina is thought to represent the clinical state between stable angina and myocardial infarction, and is commonly associated with atherosclerotic plaque rupture and thrombus formation. In this regard, atherosclerotic plaque rupture is the most common cause of myocardial
- 30 infarction.
- [0008]** Inflammation occurs during stable angina, and markers of plaque rupture, platelet activation, and early thrombosis can be used to identify and monitor the

WO 02/089657

PCT/US02/14219

progressing severity of unstable angina. The myocardial damage caused during an anginal attack is, by definition, reversible, while damage caused during a myocardial infarction is irreversible. According to this model, a specific marker of myocardial injury can be used to identify myocardial infarction. The progression of coronary artery disease from mild unstable angina to severe unstable angina and myocardial infarction is related to plaque instability and the degree of arterial occlusion. This progression can occur slowly, as stable plaques enlarge and become more occlusive, or it can occur rapidly, as unstable plaques rupture, causing platelet activation and occlusive thrombus formation. Because myocardial infarction most frequently shares the same pathophysiology as unstable angina, it is possible that the only distinction between these two events is the reversibility of myocardial damage. However, since the only distinction between severe unstable angina and mild myocardial infarction is based on clinical judgement, markers of myocardial damage may also appear in the peripheral circulation of patients diagnosed as having unstable angina.

[0009] Current diagnostic methods for ACS commonly include clinical symptoms, electrocardiography (ECG), and the measurement of cardiac markers in the peripheral circulation. Angiography is also used in cases of severe chest pain usually associated with unstable angina and acute myocardial infarction (AMI). Patients with ACS frequently have constricting chest pain that often radiates to the neck, jaw, shoulders, or down the inside of the left or both arms and can have accompanying symptoms of dyspnea, diaphoresis, palpitations, light-headedness, and nausea. Myocardial ischemia can produce diagnostic ECG changes including Q waves and ST segment changes. Elevations of the plasma concentration of cardiac enzymes may reflect the degree of cardiac tissue necrosis associated with severe unstable angina and myocardial infarction.

[0010] Accordingly, there is a present need in the art for a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for ACS that can also differentiate the type of ACS and identify those individuals at risk for delayed adverse events. Such a diagnostic assay would greatly increase the number of patients that can receive beneficial treatment and therapy, and reduce the costs associated with incorrect diagnosis.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

SUMMARY OF THE INVENTION

- [0011] The present invention relates to the identification and use of diagnostic and/or prognostic markers for ACS, ischemia, and/or necrosis. The methods and compositions described herein can meet the need in the art for a rapid, sensitive and specific diagnostic assay to be used in the diagnosis, differentiation and prognosis of various forms of ACS. Moreover, the methods and compositions of the present invention can also be used to facilitate the treatment of ACS patients and the development of additional diagnostic indicators.
- [0012] The terms "ischemia and ischemic" relate to damage to the myocardium as a result of a reduction of blood flow to the heart. The terms "angina pectoris", "stable angina", "unstable angina", "silent ischemia" are generally related to myocardial ischemia. One skilled in the art will recognize these terms, which are described in "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Edition, 1999, Ed. Keryn A.G. Lane, pp. 1662-1668, incorporated by reference only. The term ischemia is also related to what one skilled in the art would consider as minor myocardial injury or damage. The term ischemia is further described in the Journal of the American College of Cardiology 36, 959-969 (2000), incorporated by reference only.
- [0013] The terms "necrosis and necrotic" relate to myocardial cell death as a result of a reduction or stoppage of blood flow to the heart. Myocardial necrosis is a condition of the heart which is more severe than myocardial ischemia. The term "myocardial infarction" is generally related to myocardial necrosis. One skilled in the art will recognize these terms, which are described in "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Edition, 1999, Ed. Keryn A.G. Lane, pp. 1668-1677, incorporated by reference only. The term necrosis is also related to what one skilled in the art would consider as major myocardial injury or damage. The terms myocardial infarction and necrosis are further described in the Journal of the American College of Cardiology 36, 959-969 (2000), incorporated by reference only.
- [0014] In various aspects, the invention relates to materials and procedures for identifying markers that are associated with the diagnosis, prognosis, or differentiation of ACS in a patient; to using such markers in diagnosing and treating a patient and/or to monitor the course of a treatment regimen; and for screening compounds and

WO 02/089657

PCT/US02/14219

pharmaceutical compositions that might provide a benefit in treating or preventing such conditions.

[0015] In a first aspect, the invention features methods of diagnosing ACS by analyzing a test sample obtained from a patient for the presence or amount of one or more markers for myocardial injury. These methods can include identifying one or more markers, the presence or amount of which is associated with the diagnosis, prognosis, or differentiation of ACS. Once such a marker(s) is identified, the level of such a marker(s) in a patient sample can be measured. In certain embodiments, these markers can be compared to a diagnostic level that is associated with the diagnosis, prognosis, or differentiation of ACS. By correlating the patient level to the diagnostic level, the presence or absence of ACS, and the probability of future adverse outcomes in a patient may be rapidly and accurately determined.

[0016] For purposes of the following discussion, the methods described as applicable to the diagnosis and prognosis of myocardial infarction generally may be considered applicable to the diagnosis and prognosis of stable angina and unstable angina.

[0017] In certain embodiments, a plurality of markers are combined to increase the predictive value of the analysis in comparison to that obtained from the markers individually or in smaller groups. Preferably, one or more specific markers for myocardial injury can be combined with one or more non-specific markers for myocardial injury to enhance the predictive value of the described methods.

[0018] The term "marker" as used herein refers to molecules to be used as targets for screening patient test samples. Examples of such molecular targets are proteins or polypeptides. "Proteins or polypeptides" used as markers in the present invention are contemplated to include any fragments thereof, in particular, immunologically detectable fragments. One of skill in the art would recognize that proteins which are released by cells of the heart which become damaged during vascular injury could become degraded or cleaved into such fragments. Additionally, certain markers are synthesized in an inactive form, which may be subsequently activated by proteolysis. Examples of such markers are described hereinafter. The term "related marker" as used

WO 02/089657

PCT/US02/14219

herein refers to one or more fragments of a particular marker that may be detected as a surrogate for the marker itself.

[0019] To date, BNP and BNP related peptides have not been used as markers of myocardial ischemia. Additionally, other markers of various pathological processes including inflammation, coagulation, and plaque rupture have not been used as subsets of a larger panel of markers of myocardial ischemia. Preferred markers of the invention can aid in the diagnosis, differentiation, and prognosis of patients with myocardial infarction, unstable angina, and stable angina.

[0020] The term "test sample" as used herein refers to a biological sample obtained for the purpose of diagnosis, prognosis, or evaluation. In certain embodiments, such a sample may be obtained for the purpose of determining the outcome of an ongoing condition or the effect of a treatment regimen on a condition. Preferred test samples include blood, serum, plasma, cerebrospinal fluid, urine and saliva. In addition, one of skill in the art would realize that some test samples would be more readily analyzed following a fractionation or purification procedure, for example, separation of whole blood into serum or plasma components.

[0021] The term "specific marker of myocardial injury" as used herein refers to molecules that are typically associated with cardiac tissue, and which can be correlated with a cardiac injury, but are not correlated with other types of injury. Such specific markers of cardiac injury include annexin V, B-type natriuretic peptide, β -enolase, cardiac troponin I (free and/or complexed), cardiac troponin T (free and/or complexed), creatine kinase-MB, glycogen phosphorylase-BB, heart-type fatty acid binding protein, phosphoglyceric acid mutase-MB, and S-100a. These specific markers are described in detail hereinafter.

[0022] The term "non-specific marker of myocardial injury" as used herein refers to molecules that are typically general markers of coagulation and hemostasis or acute phase reactants. Such markers may be elevated in the event of cardiac injury, but may also be elevated due to non-cardiac events. Factors in the activation of platelets and the mechanisms of coagulation include β -thromboglobulin, D-dimer, fibrinopeptide A, platelet-derived growth factor, plasmin- α -2-antiplasmin complex, platelet factor 4, prothrombin fragment 1+2, P-selectin, thrombin-antithrombin III complex, thrombus

WO 02/089657

PCT/US02/14219

precursor protein, tissue factor, and von Willebrand factor. These non-specific markers are described in detail hereinafter.

[0023] The term "acute phase reactants" as used herein refers to proteins whose concentrations are elevated in response to stressful or inflammatory states that occur during various insults that include infection, injury, surgery, trauma, tissue necrosis, and the like. Acute phase reactant expression and serum concentration elevations are not specific for the type of insult, but rather as a part of the homeostatic response to the insult.

[0024] All acute phase reactants are produced in response to insult, perhaps in order to handle extensive insult, even though some components may not be needed. Examples of classical acute phase proteins include C-reactive protein, ceruloplasmin, fibrinogen, α 1-acid glycoprotein, α 1-antitrypsin, and haptoglobin. Various cytokines and related molecules such as insulin-like growth factor-1, interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-8, transforming growth factor β , monocyte chemotactic protein-1, and tumor necrosis factor α are components of the inflammatory response that are also intimately involved in the acute phase reaction. Such cytokines are released into the bloodstream from the site of insult and are capable of themselves inducing expression of other acute phase proteins.

[0025] Other non-specific markers of myocardial injury include markers of atherosclerotic plaque rupture. An atherosclerotic plaque consists of accumulated lipids, smooth muscle cells, connective tissue, and glycosaminoglycans. Vessels containing such plaques have reduced systolic expansion, abnormally rapid wave propagation, and progressively reduced elasticity as plaque formation progresses. A plaque may progress to severe stenosis and total arterial occlusion. Some plaques are stable, but others which are rich in lipids and inflammatory cells typically have a thin fibrous cap and may undergo spontaneous rupture. These unstable plaques are more closely associated with the onset of an acute ischemic event. Therefore, markers of atherosclerotic plaque rupture may be useful in the diagnosis and evaluation of potential ACS victims. Such markers of atherosclerotic plaque rupture included human neutrophil elastase, inducible nitric oxide synthase, lysophosphatidic acid, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-3, and matrix metalloproteinase-9.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0026] Other non-specific markers of myocardial injury may include caspase-3, hemoglobin α_2 , soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble vascular cell adhesion molecule-1.

5 [0027] The phrase "diagnosis" as used herein refers to methods by which the skilled artisan can estimate and even determine whether or not a patient is suffering from a given disease or condition. The skilled artisan often makes a diagnosis on the basis of one or more diagnostic indicators, i.e., a marker, the presence, absence, or amount of which is indicative of the presence, severity, or absence of the condition.

10 [0028] Similarly, a prognosis is often determined by examining one or more "prognostic indicators." These are markers, the presence or amount of which in a patient (or a sample obtained from the patient) signal a probability that a given course or outcome will occur. For example, when one or more prognostic indicators reach a sufficiently high level in samples obtained from such patients, the level may signal that the patient is at an increased probability for experiencing a future event in comparison
15 to a similar patient exhibiting a lower marker level. A level or a change in level of a prognostic indicator, which in turn is associated with an increased probability of morbidity or death, is referred to as being "associated with an increased predisposition to an adverse outcome" in a patient. Preferred prognostic markers can predict the onset of delayed adverse events in a patient, or the chance of future ACS.

20 [0029] The term "correlating," as used herein in reference to the use of diagnostic and prognostic indicators, refers to comparing the presence or amount of the indicator in a patient to its presence or amount in persons known to suffer from, or known to be at risk of, a given condition; or in persons known to be free of a given condition, i.e. "normal individuals". For example, a marker level in a patient sample can be compared
25 to a level known to be associated with a specific type of ACS. The sample's marker level is said to have been correlated with a diagnosis; that is, the skilled artisan can use the marker level to determine whether the patient suffers from a specific type of ACS, and respond accordingly. Alternatively, the sample's marker level can be compared to a marker level known to be associated with a good outcome (e.g., the absence of ACS),
30 such as an average level found in a population of normal individuals.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- [0030] In certain embodiments, a diagnostic or prognostic indicator is correlated to a condition or disease by merely its presence or absence. In other embodiments, a threshold level of a diagnostic or prognostic indicator can be established, and the level of the indicator in a patient sample can simply be compared to the threshold level. A preferred threshold level for markers of the present invention is about 25 pg/mL, about 50 pg/mL, about 60 pg/mL, about 75 pg/mL, about 100 pg/mL, about 150 pg/mL, about 200 pg/mL, about 300 pg/mL, about 400 pg/mL, about 500 pg/mL, about 600 pg/mL, about 750 pg/mL, about 1000 pg/mL, and about 2500 pg/mL. The term "about" in this context refers to +/- 10%.
- 10 [0031] In yet other embodiments, multiple determination of one or more diagnostic or prognostic markers can be made, and a temporal change in the marker can be used to determine a diagnosis or prognosis. For example, a diagnostic indicator may be determined at an initial time, and again at a second time. In such embodiments, an increase in the marker from the initial time to the second time may be diagnostic of a particular type of ACS, or a given prognosis. Likewise, a decrease in the marker from the initial time to the second time may be indicative of a particular type of ACS, or a given prognosis. Furthermore, the degree of change of one or more markers may be related to the severity of ACS and future adverse events.
- 15 [0032] In yet another embodiment, multiple determination of one or more diagnostic or prognostic markers can be made, and a temporal change in the marker can be used to monitor the efficacy of appropriate therapies. In such an embodiment, one might expect to see a decrease or an increase in the marker(s) over time during the course of effective therapy.
- 20 [0033] The skilled artisan will understand that, while in certain embodiments comparative measurements are made of the same diagnostic marker at multiple time points, one could also measure a given marker at one time point, and a second marker at a second time point, and a comparison of these markers may provide diagnostic information.
- 25 [0034] The phrase "determining the prognosis" as used herein refers to methods by which the skilled artisan can predict the course or outcome of a condition in a patient. The term "prognosis" does not refer to the ability to predict the course or outcome of a
- 30

WO 02/089657

PCT/US02/14219

condition with 100% accuracy, or even that a given course or outcome is predictably more or less likely to occur based on the presence, absence or levels of test markers. Instead, the skilled artisan will understand that the term "prognosis" refers to an increased probability that a certain course or outcome will occur; that is, that a course or outcome is more likely to occur in a patient exhibiting a given condition, when compared to those individuals not exhibiting the condition. For example, in individuals not exhibiting the condition, the chance of a given outcome may be about 3%. In preferred embodiments, a prognosis is about a 5% chance of a given outcome, about a 7% chance, about a 10% chance, about a 12% chance, about a 15% chance, about a 20% chance, about a 25% chance, about a 30% chance, about a 40% chance, about a 50% chance, about a 60% chance, about a 75% chance, about a 90% chance, and about a 95% chance. The term "about" in this context refers to +/- 1%.

[0035] The skilled artisan will understand that associating a prognostic indicator with a predisposition to an adverse outcome is a statistical analysis. For example, a marker level of greater than 80 pg/mL may signal that a patient is more likely to suffer from an adverse outcome than patients with a level less than or equal to 80 pg/mL, as determined by a level of statistical significance. Additionally, a change in marker concentration from baseline levels may be reflective of patient prognosis, and the degree of change in marker level may be related to the severity of adverse events. Statistical significance is often determined by comparing two or more populations, and determining a confidence interval and/or a p value. See, e.g., Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983. Preferred confidence intervals of the invention are 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% and 99.99%, while preferred p values are 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, and 0.0001. Exemplary statistical tests for associating a prognostic indicator with a predisposition to an adverse outcome are described hereinafter.

[0036] In other embodiments, a threshold degree of change in the level of a prognostic or diagnostic indicator can be established, and the degree of change in the level of the indicator in a patient sample can simply be compared to the threshold degree of change in the level. A preferred threshold change in the level for markers of the invention is about 5%, about 10%, about 15%, about 20%, about 25%, about 30%, about 50%, about 75%, about 100%, and about 150%. The term "about" in this context

WO 02/089657

PCT/US02/14219

refers to +/- 10%. In yet other embodiments, a "nomogram" can be established, by which a level of a prognostic or diagnostic indicator can be directly related to an associated disposition towards a given outcome. The skilled artisan is acquainted with the use of such nomograms to relate two numeric values with the understanding that the uncertainty in this measurement is the same as the uncertainty in the marker concentration because individual sample measurements are referenced, not population averages.

[0037] In yet another aspect, the invention relates to methods for determining a treatment regimen for use in a patient diagnosed with ACS. The methods preferably comprise determining a level of one or more diagnostic or prognostic markers as described herein, and using the markers to determine a diagnosis for a patient. One or more treatment regimens that improve the patient's prognosis by reducing the increased disposition for an adverse outcome associated with the diagnosis can then be used to treat the patient. Such methods may also be used to screen pharmacological compounds for agents capable of improving the patients prognosis as above.

[0038] In a further aspect, the invention relates to kits for determining the diagnosis or prognosis of a patient. These kits preferably comprise devices and reagents for measuring one or more marker levels in a patient sample, and instructions for performing the assay. Optionally, the kits may contain one or more means for converting marker level(s) to a prognosis. Such kits preferably contain sufficient reagents to perform one or more such determinations.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0039] In accordance with the present invention, there are provided methods and compositions for the identification and use of markers that are associated with the diagnosis, prognosis, or differentiation of ACS in a patient. Such markers can be used in diagnosing and treating a patient and/or to monitor the course of a treatment regimen; and for screening compounds and pharmaceutical compositions that might provide a benefit in treating or preventing such conditions.

[0040] Myocardial ischemia is caused by an imbalance of myocardial oxygen supply and demand. Specifically, demand exceeds supply due to inadequate blood supply. The heart accounts for a small percentage of total body weight, but is

WO 02/089657

PCT/US02/14219

responsible for 7% of body oxygen consumption. Cardiac tissue metabolism is highly aerobic and has very little reserve to compensate for inadequate blood supply. When the blood supply is reduced to levels that are inadequate for myocardial demand, the tissue rapidly becomes hypoxic and toxic cellular metabolites can not be removed.

5 Myocardial cells rapidly use oxygen supplies remaining in the local microvasculature, and the length of time that aerobic metabolism continues is indirectly proportional to the degree of arterial occlusion. Once the oxygen supply has been exhausted, oxidative phosphorylation can not continue because oxygen is no longer available as an electron acceptor, pyruvate can not be converted to acetyl coenzyme A and enter the citric acid

10 cycle. Myocardial metabolism switches to anaerobic metabolism using glycogen and glucose stores, and pyruvate is fermented to lactate. Lactate accumulation is the primary cause of chest pain in individuals with ACS. As ischemia continues, cardiac tissue becomes more acidic as lactate and other acidic intermediates accumulate, ATP levels decrease, and available energy sources are depleted. Cardiac tissue can recover

15 if it is reperfused 15-20 minutes after an ischemic event. After the cellular glycogen stores have been depleted, the cell gradually displays features of necrosis, including mitochondrial swelling and loss of cell membrane integrity. Upon reperfusion, these damaged cells die, possibly as a result of the cell's inability to maintain ionic equilibrium. A loss of membrane integrity causes the cell's cytosolic contents to be

20 released into the circulation.

[0041] Stable angina, unstable angina, and myocardial infarction all share one common feature: constricting chest pain associated with myocardial ischemia. Angina is classified as stable or unstable through a physician's interpretation of clinical symptoms, with or without diagnostic ECG changes. The classification of angina as

25 "stable" or "unstable" does not refer to the stability of the plaque itself, but rather, the degree of exertion that is required to elicit chest pain. Most notably, the classification of chest pain as stable or unstable angina (or even mild myocardial infarction) in cases other than definitive myocardial infarction is completely subjective. The diagnosis, and in this case the distinction, is made not by angiography, which may quantify the degree

30 of arterial occlusion, but rather by a physician's interpretation of clinical symptoms.

[0042] Stable angina is characterized by constricting chest pain that occurs upon exertion or stress, and is relieved by rest or sublingual nitroglycerin. Coronary

WO 02/089657

PCT/US02/14219

angiography of patients with stable angina usually reveals 50-70% obstruction of at least one coronary artery. Stable angina is usually diagnosed by the evaluation of clinical symptoms and ECG changes. Patients with stable angina may have transient ST segment abnormalities, but the sensitivity and specificity of these changes associated with stable angina are low.

[0043] Unstable angina is characterized by constricting chest pain at rest that is relieved by sublingual nitroglycerin. Anginal chest pain is usually relieved by sublingual nitroglycerin, and the pain usually subsides within 30 minutes. There are three classes of unstable angina severity: class I, characterized as new onset, severe, or accelerated angina; class II, subacute angina at rest characterized by increasing severity, duration, or requirement for nitroglycerin; and class III, characterized as acute angina at rest. Unstable angina represents the clinical state between stable angina and AMI and is thought to be primarily due to the progression in the severity and extent of atherosclerosis, coronary artery spasm, or hemorrhage into non-occluding plaques with subsequent thrombotic occlusion. Coronary angiography of patients with unstable angina usually reveals 90% or greater obstruction of at least one coronary artery, resulting in an inability of oxygen supply to meet even baseline myocardial oxygen demand. Slow growth of stable atherosclerotic plaques or rupture of unstable atherosclerotic plaques with subsequent thrombus formation can cause unstable angina. Both of these causes result in critical narrowing of the coronary artery. Unstable angina is usually associated with atherosclerotic plaque rupture, platelet activation, and thrombus formation. Unstable angina is usually diagnosed by clinical symptoms, ECG changes, and changes in cardiac markers (if any). Treatments for patients with unstable angina include nitrates, aspirin, GPIIb/IIIa inhibitors, heparin, and beta-blockers. Thrombolytic therapy has not been demonstrated to be beneficial for unstable angina patients, and calcium channel blockers may have no effect. Patients may also receive angioplasty and stents. Finally, patients with unstable angina are at risk for developing AMI.

[0044] Myocardial infarction is characterized by constricting chest pain lasting longer than 30 minutes that can be accompanied by diagnostic ECG Q waves. Most patients with AMI have coronary artery disease, and as many as 25% of AMI cases are "silent" or asymptomatic infarctions, and individuals with diabetes tend to be more

WO 02/089657

PCT/US02/14219

susceptible to silent infarctions. Population studies suggest that 20-60% of nonfatal myocardial infarctions are silent infarctions that are not recognized by the patient. Atypical clinical presentations of AMI can include congestive heart failure, angina pectoris without a severe or prolonged attack, atypical location of pain, central nervous system manifestations resembling stroke, apprehension and nervousness, sudden mania or psychosis, syncope, weakness, acute indigestion, and peripheral embolization. AMI is usually diagnosed by clinical symptoms, ECG changes, and elevations of cardiac proteins, most notably cardiac troponin, creatine kinase-MB and myoglobin.

Treatments of AMI have improved over the past decade, resulting in improved patient outcome and a 30% decrease in the death rate associated with AMI. Treatment of AMI patients is accomplished by administering agents that limit infarct size and improve outcome by removing occlusive material, increasing the oxygen supply to cardiac tissue, or decreasing the oxygen demand of cardiac tissue. Treatments can include the following: supplemental oxygen, aspirin, GPIIb/IIIa inhibitors, heparin, thrombolytics (tPA), nitrates (nitroglycerin), magnesium, calcium channel antagonists, β -adrenergic receptor blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angioplasty (PTCA), and intraluminal coronary artery stents.

[0045] The 30 minute time point from chest pain onset is thought to represent the window of reversible myocardial damage caused by ischemia. Stable angina and unstable angina are characterized angiographically as 50-70% and 90% or greater arterial occlusion, respectively, and myocardial infarction is characterized by complete or nearly complete occlusion. A common misconception is that stable angina and unstable angina refer to plaque stability, or that they, along with myocardial infarction, are separate diseases. Because stable angina often progresses to unstable angina, and unstable angina often progresses to myocardial infarction, stable angina, unstable angina, and myocardial infarction can all be characterized as coronary artery disease of varying severity. Recently, the following physiological model of coronary artery disease progression has been proposed: Inflammation $\rightarrow$ Plaque Rupture $\rightarrow$ Platelet Activation $\rightarrow$ Early Thrombosis $\rightarrow$ Early Necrosis. This model is designed to fit the theory that inflammation occurs during stable angina, and that markers of plaque rupture, platelet activation, and early thrombosis can be used to identify and monitor the progressing severity of unstable angina. The myocardial damage caused during an anginal attack is, by definition, reversible, while damage caused during a myocardial

WO 02/089657

PCT/US02/14219

infarction is irreversible. Therefore, there are two proposed break points in this model for the discrimination of stable angina, unstable angina, and AMI. The first occurs between inflammation and plaque rupture, with the theory that plaque rupture does not occur in stable angina. The second occurs between early thrombosis and early necrosis, with the theory that myocardial damage incurred during unstable angina is reversible. It is important to realize that these events, with the exception of early myocardial necrosis, can be associated with all forms of coronary artery disease, and that progression along this diagnostic pathway does not necessarily indicate disease progression. The progression of coronary artery disease from mild unstable angina to severe unstable angina and myocardial infarction is related to plaque instability and the degree of arterial occlusion. This progression can occur slowly, as stable plaques enlarge and become more occlusive, or it can occur rapidly, as unstable plaques rupture, causing platelet activation and occlusive thrombus formation. Because myocardial infarction most frequently shares the same pathophysiology as unstable angina, it is possible that the only distinction between these two events is the reversibility of myocardial damage. By definition, unstable angina causes reversible damage, while myocardial infarction causes irreversible damage. There have been published reports that indicate the presence of myocardial necrosis in patients with unstable angina. By definition, these patients may actually be experiencing early AMI. Nevertheless, even if these patients are diagnosed with unstable angina instead of early AMI, the high degree of severity suggests that they will benefit greatly from early aggressive treatment. Myocardial ischemia is the major determinant in the pathogenesis of stable angina, unstable angina, and myocardial infarction, and they should not be thought of as individual diseases. Rather, they reflect the increasing severity of myocardial damage from ischemia.

The Coagulation Cascade in ACS

[0046] There are essentially two mechanisms that are used to halt or prevent blood loss following vessel injury. The first mechanism involves the activation of platelets to facilitate adherence to the site of vessel injury. The activated platelets then aggregate to form a platelet plug that reduces or temporarily stops blood loss. The processes of platelet aggregation, plug formation and tissue repair are all accelerated and enhanced by numerous factors secreted by activated platelets. Platelet aggregation and plug

WO 02/089657

PCT/US02/14219

formation is mediated by the formation of a fibrinogen bridge between activated platelets. Concurrent activation of the second mechanism, the coagulation cascade, results in the generation of fibrin from fibrinogen and the formation of an insoluble fibrin clot that strengthens the platelet plug.

- 5 [0047] The coagulation cascade is an enzymatic pathway that involves numerous serine proteinases normally present in an inactive, or zymogen, form. The presence of a foreign surface in the vasculature or vascular injury results in the activation of the intrinsic and extrinsic coagulation pathways, respectively. A final common pathway is then followed, which results in the generation of fibrin by the serine proteinase
- 10 thrombin and, ultimately, a crosslinked fibrin clot. In the coagulation cascade, one active enzyme is formed initially, which can activate other enzymes that activate others, and this process, if left unregulated, can continue until all coagulation enzymes are activated. Fortunately, there are mechanisms in place, including fibrinolysis and the action of endogenous proteinase inhibitors that can regulate the activity of the
- 15 coagulation pathway and clot formation.

- [0048] Fibrinolysis is the process of proteolytic clot dissolution. In a manner analogous to coagulation, fibrinolysis is mediated by serine proteinases that are activated from their zymogen form. The serine proteinase plasmin is responsible for the degradation of fibrin into smaller degradation products that are liberated from the
- 20 clot, resulting in clot dissolution. Fibrinolysis is activated soon after coagulation in order to regulate clot formation. Endogenous serine proteinase inhibitors also function as regulators of fibrinolysis.

- [0049] Platelets are round or oval disks with an average diameter of 2-4 μm that are normally found in blood at a concentration of 200,000-300,000/ μl . They play an
- 25 essential role in maintaining hemostasis by maintaining vascular integrity, initially stopping bleeding by forming a platelet plug at the site of vascular injury, and by contributing to the process of fibrin formation to stabilize the platelet plug. When vascular injury occurs, platelets adhere to the site of injury and each other and are stimulated to aggregate by various agents released from adherent platelets and injured
- 30 endothelial cells. This is followed by the release reaction, in which platelets secrete the contents of their intracellular granules, and formation of the platelet plug. The formation of fibrin by thrombin in the coagulation cascade allows for consolidation of

WO 02/089657

PCT/US02/14219

the plug, followed by clot retraction and stabilization of the plug by crosslinked fibrin. Active thrombin, generated in the concurrent coagulation cascade, also has the ability to induce platelet activation and aggregation.

- [0050] The coagulation cascade can be activated through either the extrinsic or intrinsic pathways. These enzymatic pathways share one final common pathway. The result of coagulation activation is the formation of a crosslinked fibrin clot. Fibrinolysis is the process of proteolytic clot dissolution that is activated soon after coagulation activation, perhaps in an effort to control the rate and amount of clot formation. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (tPA) proteolytically cleave plasminogen, generating the active serine proteinase plasmin. Plasmin proteolytically digests crosslinked fibrin, resulting in clot dissolution and the production and release of fibrin degradation products.

- [0051] The first step of the common pathway of the coagulation cascade involves the proteolytic cleavage of prothrombin by the factor Xa/factor Va prothrombinase complex to yield active thrombin. Thrombin is a serine proteinase that proteolytically cleaves fibrinogen to form fibrin, which is ultimately integrated into a crosslinked network during clot formation.

Exemplary Markers

(i) Specific Markers for Myocardial Injury

- [0052] Annexin V, also called lipocortin V, endonexin II, calphobindin I, calcium binding protein 33, placental anticoagulant protein I, thromboplastin inhibitor, vascular anticoagulant- α , and anchorin CII, is a 33 kDa calcium-binding protein that is an indirect inhibitor and regulator of tissue factor. Annexin V is composed of four homologous repeats with a consensus sequence common to all annexin family members, binds calcium and phosphatidyl serine, and is expressed in a wide variety of tissues, including heart, skeletal muscle, liver, and endothelial cells (Giambanco, I. et al., *J. Histochem. Cytochem.* **39**:P1189-1198, 1991; Doubell, A.F. et al., *Cardiovasc. Res.* **27**:1359-1367, 1993). The normal plasma concentration of annexin V is < 2 ng/ml (Kaneko, N. et al., *Clin. Chim. Acta* **251**:65-80, 1996). The plasma concentration of annexin V is elevated in individuals with AMI (Kaneko, N. et al., *Clin. Chim. Acta* **251**:65-80, 1996). Due to its wide tissue distribution, elevation of the plasma

WO 02/089657

PCT/US02/14219

concentration of annexin V may be associated with any condition involving non-cardiac tissue injury. However, one study has found that plasma annexin V concentrations were not significantly elevated in patients with old myocardial infarction, chest pain syndrome, valvular heart disease, lung disease, and kidney disease (Kaneko, N. et al., *Clin. Chim. Acta* **251**:65-80, 1996). These previous results require confirmation before the clinical utility of annexin V as an ACS marker can be determined. Annexin V is released into the bloodstream soon after AMI onset. The annexin V concentration in the plasma of AMI patients decreased from initial (admission) values, suggesting that it is rapidly cleared from the bloodstream (Kaneko, N. et al., *Clin. Chim. Acta* **251**:65-80, 1996).

[0053] B-type natriuretic peptide (BNP), also called brain-type natriuretic peptide is a 32 amino acid, 4 kDa peptide that is involved in the natriuresis system to regulate blood pressure and fluid balance (Bonow, R.O., *Circulation* **93**:1946-1950, 1996). The precursor to BNP is synthesized as a 108-amino acid molecule, referred to as "pre pro BNP," that is proteolytically processed into a 76-amino acid N-terminal peptide (amino acids 1-76), referred to as "NT pro BNP" and the 32-amino acid mature hormone, referred to as BNP or BNP 32 (amino acids 77-108). It has been suggested that each of these species – NT pro-BNP, BNP-32, and the pre pro BNP – can circulate in human plasma (Tateyama et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 760-7 (1992); Hunt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 1175-83 (1995)). The 2 forms, pre pro BNP and NT pro BNP, and peptides which are derived from BNP, pre pro BNP and NT pro BNP and which are present in the blood as a result of proteolyses of BNP, NT pro BNP and pre pro BNP, are collectively described as markers related to or associated with BNP. Proteolytic degradation of BNP and of peptides related to BNP have also been described in the literature and these proteolytic fragments are also encompassed in the term "BNP related peptides". BNP and BNP-related peptides are predominantly found in the secretory granules of the cardiac ventricles, and are released from the heart in response to both ventricular volume expansion and pressure overload (Wilkins, M. et al., *Lancet* **349**:1307-1310, 1997). Elevations of BNP are associated with raised atrial and pulmonary wedge pressures, reduced ventricular systolic and diastolic function, left ventricular hypertrophy, and myocardial infarction (Sagnella, G.A., *Clinical Science* **95**:519-529, 1998). Furthermore, there are numerous reports of elevated BNP concentration associated with congestive heart failure and

WO 02/089657

PCT/US02/14219

renal failure. While BNP and BNP-related peptides are likely not specific for ACS, they may be sensitive markers of ACS because they may indicate not only cellular damage due to ischemia, but also a perturbation of the natriuretic system associated with ACS. The term "BNP" as used herein refers to the mature 32-amino acid BNP molecule itself. As the skilled artisan will recognize, however, other markers related to BNP may also serve as diagnostic or prognostic indicators in patients with ACS. For example, BNP is synthesized as a 108-amino acid pre pro-BNP molecule that is proteolytically processed into a 76-amino acid "NT pro BNP" and the 32-amino acid BNP molecule. Because of its relationship to BNP, the concentration of NT pro-BNP molecule can also provide diagnostic or prognostic information in patients. The phrase "marker related to BNP or BNP related peptide" refers to any polypeptide that originates from the pre pro-BNP molecule, other than the 32-amino acid BNP molecule itself. Thus, a marker related to or associated with BNP includes the NT pro-BNP molecule, the pro domain, a fragment of BNP that is smaller than the entire 32-amino acid sequence, a fragment of pre pro-BNP other than BNP, and a fragment of the pro domain. One skilled in the art will also recognize that the circulation contains proteases which can proteolyze BNP and BNP related molecules and that these proteolyzed molecules (peptides) are also considered to be "BNP related" and are additionally subjects of this invention.

20 [0054] Enolase is a 78 kDa homo- or heterodimeric cytosolic protein produced from α , β , and γ subunits. Enolase catalyzes the interconversion of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate in the glycolytic pathway. Enolase is present as $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\alpha\gamma$, and $\gamma\gamma$ isoforms. The α subunit is found in most tissues, the β subunit is found in cardiac and skeletal muscle, and the γ subunit is found primarily in neuronal and neuroendocrine tissues. β -enolase is composed of $\alpha\beta$ and $\beta\beta$ enolase, and is specific for muscle. The normal plasma concentration of β -enolase is < 10 ng/ml (120 pM). β -enolase is elevated in the serum of individuals with AMI, but not in individuals with angina (Nomura, M. et al., *Br. Heart J.* **58**:29-33, 1987; Herraez-Dominguez, M.V. et al., *Clin. Chim. Acta* **64**:307-315, 1975). Further investigations into possible changes in plasma β -enolase concentration associated with unstable and stable angina need to be performed. The plasma concentration of β -enolase is elevated during heart surgery, muscular dystrophy, and skeletal muscle injury (Usui, A. et al., *Cardiovasc. Res.* **23**:737-740, 1989; Kato, K. et al., *Clin. Chim. Acta* **131**:75-85, 1983; Matsuda, H. et

WO 02/089657

PCT/US02/14219

al., *Forensic Sci. Int.* **99**:197-208, 1999). β -enolase is released into the bloodstream immediately following cardiac or skeletal muscle injury. The plasma β -enolase concentration was elevated to more than 150 ng/ml in the perioperative stage of cardiac surgery, and remained elevated for 1 week. Serum β -enolase concentrations peaked approximately 12-14 hours after the onset of chest pain and AMI and approached baseline after 1 week had elapsed from onset, with maximum levels approaching 1 μ g/ml (Kato, K. et al., *Clin. Chim. Acta* **131**:75-85, 1983; Nomura, M. et al., *Br. Heart J.* **58**:29-33, 1987).

[0055] Troponin I (TnI) is a 25 kDa inhibitory element of the troponin complex, found in all striated muscle tissue. TnI binds to actin in the absence of Ca^{2+} , inhibiting the ATPase activity of actomyosin. A TnI isoform that is found in cardiac tissue (cTnI) is 40% divergent from skeletal muscle TnI, allowing both isoforms to be immunologically distinguished. The normal plasma concentration of cTnI is < 0.1 ng/ml (4 pM). The plasma cTnI concentration is elevated in patients with AMI.

Investigations into changes in the plasma cTnI concentration in patients with unstable angina have yielded mixed results, but cTnI is not elevated in the plasma of individuals with stable angina (Benamer, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **82**:845-850, 1998; Bertinchant, J.P. et al., *Clin. Biochem.* **29**:587-594, 1996; Tanasijevic, M.J. et al., *Clin. Cardiol.* **22**:13-16, 1999; Musso, P. et al., *J. Ital. Cardiol.* **26**:1013-1023, 1996; Holvoet, P. et al., *JAMA* **281**:1718-1721, 1999; Holvoet, P. et al., *Circulation* **98**:1487-1494, 1998). The mixed results associated with unstable angina suggest that cTnI may be useful in determining the severity of unstable angina because the extent of myocardial ischemia is directly proportional to unstable angina severity. The plasma cTnI concentration may be elevated in conjunction with cardiac trauma, congestive heart failure, and cardiac surgery, non-ischemic dilated cardiomyopathy, muscular disorders, CNS disorders, HIV infection, chronic renal failure, sepsis, lung disease, and endocrine disorders (Khan, I.A. et al., *Am. J. Emerg. Med.* **17**:225-229, 1999). This apparent non-specificity may be related to the quality and specificity of the antibodies used in the immunoassay. cTnI is released into the bloodstream following cardiac cell death. The plasma concentration of cTnI in patients with AMI is significantly elevated 4-6 hours after onset, peaks between 12-16 hours, and can remain elevated for one week. The release kinetics of cTnI associated with unstable angina may be similar. The measurement of specific forms of cardiac troponin, including free cardiac troponin I

WO 02/089657

PCT/US02/14219

and complexes of cardiac troponin I with troponin C and/or T may provide the user with the ability to identify various stages of ACS.

- [0056] Free and complexed cardiac-troponin T may be used in a manner analogous to that described above for cardiac troponin I. Cardiac troponin T complex may be useful either alone or when expressed as a ratio with total cardiac troponin I to provide information related to the presence of progressing myocardial damage. Ongoing ischemia may result in the release of the cardiac troponin TIC complex, indicating that higher ratios of cardiac troponin TIC:total cardiac troponin I may be indicative of continual damage caused by unresolved ischemia.
- [0057] Creatine kinase (CK) is a 85 kDa cytosolic enzyme that catalyzes the reversible formation ADP and phosphocreatine from ATP and creatine. CK is a homo- or heterodimer composed of M and B chains. CK-MB is the isoform that is most specific for cardiac tissue, but it is also present in skeletal muscle and other tissues. The normal plasma concentration of CK-MB is < 5 ng/ml. The plasma CK-MB concentration is significantly elevated in patients with AML. Plasma CK-MB is not elevated in patients with stable angina, and investigation into plasma CK-MB concentration elevations in patients with unstable angina have yielded mixed results (Thygesen, K. et al., *Eur. J. Clin. Invest.* 16:1-4, 1986; Koukkunen, H. et al., *Ann. Med.* 30:488-496, 1998; Bertinchant, J.P. et al., *Clin. Biochem.* 29:587-594, 1996; Benamer, H. et al., *Am. J. Cardiol.* 82:845-850, 1998; Norregaard-Hansen, K. et al., *Eur. Heart J.* 13:188-193, 1992). The mixed results associated with unstable angina suggest that CK-MB may be useful in determining the severity of unstable angina because the extent of myocardial ischemia is directly proportional to unstable angina severity. Elevations of the plasma CK-MB concentration are associated with skeletal muscle injury and renal disease. CK-MB is released into the bloodstream following cardiac cell death. The plasma concentration of CK-MB in patients with AML is significantly elevated 4-6 hours after onset, peaks between 12-24 hours, and returns to baseline after 3 days. The release kinetics of CK-MB associated with unstable angina may be similar.
- [0058] Glycogen phosphorylase (GP) is a 188 kDa intracellular allosteric enzyme that catalyzes the removal of glucose (liberated as glucose-1-phosphate) from the nonreducing ends of glycogen in the presence of inorganic phosphate during glycogenolysis. GP is present as a homodimer, which associates with another

WO 02/089657

PCT/US02/14219

homodimer to form a tetrameric enzymatically active phosphorylase A. There are three isoforms of GP that can be immunologically distinguished. The BB isoform is found in brain and cardiac tissue, the MM isoform is found in skeletal muscle and cardiac tissue, and the LL isoform is predominantly found in liver (Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994). GP-BB is normally associated with the sarcoplasmic reticulum glycogenolysis complex, and this association is dependent upon the metabolic state of the myocardium (Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998). At the onset of hypoxia, glycogen is broken down, and GP-BB is converted from a bound form to a free cytoplasmic form (Krause, E.G. et al., *Mol. Cell Biochem.* 160-161:289-295, 1996).

The normal plasma GP-BB concentration is < 7 ng/ml (36 pM). The plasma GP-BB concentration is significantly elevated in patients with AMI and unstable angina with transient ST-T elevations, but not stable angina (Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994; Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998; Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995; Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993). Furthermore, GP-BB also can be used to detect perioperative AMI and myocardial ischemia in patients undergoing coronary artery bypass surgery (Rabitzsch, G. et al., *Biomed. Biochim. Acta* 46:S584-S588, 1987; Mair, P. et al., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32:543-547, 1994). GP-BB has been demonstrated to be a more sensitive marker of unstable angina and AMI early after onset than CK-MB, cardiac troponin T, and myoglobin (Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995). Because it is also found in the brain, the plasma GP-BB concentration also may be elevated during ischemic cerebral injury. GP-BB is released into the bloodstream under ischemic conditions that also involve an increase in the permeability of the cell membrane, usually a result of cellular necrosis. GP-BB is significantly elevated within 4 hours of chest pain onset in individuals with unstable angina and transient ST-T ECG alterations, and is significantly elevated while myoglobin, CK-MB, and cardiac troponin T are still within normal levels (Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994). Furthermore, GP-BB can be significantly elevated 1-2 hours after chest pain onset in patients with AMI (Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993). The plasma GP-BB concentration in patients with unstable angina and AMI can exceed 50 ng/ml (250 pM) (Mair, J. et al., *Br. Heart J.* 72:125-127, 1994; Mair, J., *Clin. Chim. Acta* 272:79-86, 1998; Krause, E.G. et al., *Mol. Cell Biochem.* 160-161:289-295, 1996; Rabitzsch, G. et al., *Clin. Chem.* 41:966-978, 1995; Rabitzsch, G. et al., *Lancet* 341:1032-1033, 1993). GP-BB appears to be a very sensitive marker of myocardial ischemia, with

WO 02/089657

PCT/US02/14219

specificity similar to that of CK-BB. GP-BB plasma concentrations are elevated within the first 4 hours after AMI onset, which suggests that it may be a very useful early marker of myocardial damage. Furthermore, GP-BB is not only a more specific marker of cardiac tissue damage, but also ischemia, since it is released to an unbound form during cardiac ischemia and would not normally be released upon traumatic injury. This is best illustrated by the usefulness of GP-BB in detecting myocardial ischemia during cardiac surgery. GP-BB may be a very useful marker of early myocardial ischemia during AMI and severe unstable angina.

[0059] Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) is a cytosolic 15 kDa lipid-binding protein involved in lipid metabolism. Heart-type FABP antigen is found not only in heart tissue, but also in kidney, skeletal muscle, aorta, adrenals, placenta, and brain (Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G., *Prog. Lipid Res.* **34**:17-52, 1995; Yoshimoto, K. et al., *Heart Vessels* **10**:304-309, 1995). Furthermore, heart-type FABP mRNA can be found in testes, ovary, lung, mammary gland, and stomach (Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G., *Prog. Lipid Res.* **34**:17-52, 1995). The normal plasma concentration of FABP is < 6 ng/ml (400 pM). The plasma H-FABP concentration is elevated in patients with AMI and unstable angina (Ishii, J. et al., *Clin. Chem.* **43**:1372-1378, 1997; Tsuji, R. et al., *Int. J. Cardiol.* **41**:209-217, 1993). Furthermore, H-FABP may be useful in estimating infarct size in patients with AMI (Glatz, J.F. et al., *Br. Heart J.* **71**:135-140, 1994). Myocardial tissue as a source of H-FABP can be confirmed by determining the ratio of myoglobin/FABP (grams/grams). A ratio of approximately 5 indicates that FABP is of myocardial origin, while a higher ratio indicates skeletal muscle sources (Van Nieuwenhoven, F.A. et al., *Circulation* **92**:2848-2854, 1995). Because of the presence of H-FABP in skeletal muscle, kidney and brain, elevations in the plasma H-FABP concentration may be associated with skeletal muscle injury, renal disease, or stroke. H-FABP is released into the bloodstream following cardiac tissue necrosis. The plasma H-FABP concentration can be significantly elevated 1-2 hours after the onset of chest pain, earlier than CK-MB and myoglobin (Tsuji, R. et al., *Int. J. Cardiol.* **41**:209-217, 1993; Van Nieuwenhoven, F.A. et al., *Circulation* **92**:2848-2854, 1995; Tanaka, T. et al., *Clin. Biochem.* **24**:195-201, 1991). Additionally, H-FABP is rapidly cleared from the bloodstream, and plasma concentrations return to baseline after 24 hours after AMI onset (Glatz, J.F. et al., *Br. Heart J.* **71**:135-140, 1994; Tanaka, T. et al., *Clin. Biochem.* **24**:195-201, 1991).

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- [0060] Phosphoglyceric acid mutase (PGAM) is a 57 kDa homo- or heterodimeric intracellular glycolytic enzyme composed of 29 kDa M or B subunits that catalyzes the interconversion of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate in the presence of magnesium. Cardiac tissue contains isozymes MM, MB, and BB, skeletal muscle contains primarily PGAM-MM, and most other tissues contain PGAM-BB (Durany, N. and Carreras, J., *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **114**:217-223, 1996). Thus, PGAM-MB is the most specific isozyme for cardiac tissue. PGAM is elevated in the plasma of patients with AMI, but further studies need to be performed to determine changes in the plasma PGAM concentration associated with AMI, unstable angina and stable angina (Mair, J., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **34**:1-66, 1997). Plasma PGAM-MB concentration elevations may be associated with unrelated myocardial or possibly skeletal tissue damage. PGAM-MB is most likely released into the circulation following cellular necrosis. PGAM has a half-life of less than 2 hours in the bloodstream of rats (Grisolia, S. et al., *Physiol. Chem. Phys.* **8**:37-52, 1976).
- [0061] S-100 is a 21 kDa homo- or heterodimeric cytosolic Ca^{2+} -binding protein produced from α and β subunits. It is thought to participate in the activation of cellular processes along the Ca^{2+} -dependent signal transduction pathway (Bonfrer, J.M. et al., *Br. J. Cancer* **77**:2210-2214, 1998). S-100ao ($\alpha\alpha$ isoform) is found in striated muscles, heart and kidney, S-100a ($\alpha\beta$ isoform) is found in glial cells, but not in Schwann cells, and S-100b ($\beta\beta$ isoform) is found in high concentrations in glial cells and Schwann cells, where it is a major cytosolic component (Kato, K. and Kimura, S., *Biochim. Biophys. Acta* **842**:146-150, 1985; Hasegawa, S. et al., *Eur. Urol.* **24**:393-396, 1993). The normal serum concentration of S-100ao is < 0.25 ng/ml (12 pM), and its concentration may be influenced by age and sex, with higher concentrations in males and older individuals (Kikuchi, T. et al., *Hinyokika Kyo* **36**:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **81**:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., *Clin. Chem.* **36**:639-641, 1990). The serum concentration of S-100ao is elevated in patients with AMI, but not in patients with angina pectoris with suspected AMI (Usui, A. et al., *Clin. Chem.* **36**:639-641, 1990). Further investigation is needed to determine changes in the plasma concentration of S-100ao associated with unstable and stable angina. Serum S-100ao is elevated in the serum of patients with renal cell carcinoma, bladder tumor, renal failure, and prostate cancer, as well as in patients undergoing open heart surgery (Hasegawa, S. et al., *Eur. Urol.* **24**:393-396, 1993; Kikuchi, T. et al., *Hinyokika*

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Kiyo 36:1117-1123, 1990; Morita, T. et al., *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 81:1162-1167, 1990; Usui, A. et al., *Clin. Chem.* 35:1942-1944, 1989). S-100ao is a cytosolic protein that will be released into the extracellular space following cell death. The serum concentration of S-100ao is significantly elevated on admission in patients with AMI, increases to peak levels 8 hours after admission, decreases and returns to baseline one week later (Usui, A. et al., *Clin. Chem.* 36:639-641, 1990). Furthermore, S-100ao appears to be significantly elevated earlier after AMI onset than CK-MB (Usui, A. et al., *Clin. Chem.* 36:639-641, 1990). The maximum serum S-100ao concentration can exceed 100 ng/ml. S-100ao may be rapidly cleared from the bloodstream by the kidney, as suggested by the rapid decrease of the serum S-100ao concentration of heart surgery patients following reperfusion and its increased urine concentration, but further investigation is needed to determine the kinetics of S-100ao release into and clearance from the bloodstream in the context of ACS (Usui, A. et al., *Clin. Chem.* 35:1942-1944, 1989). S-100ao is found in high concentration in cardiac tissue and appears to be a sensitive marker of cardiac injury. Major sources of non-specificity of this marker for ACS include skeletal muscle and renal tissue injury. S-100ao may be significantly elevated soon after AMI onset, and it may allow for the discrimination of AMI from unstable angina. Patients with angina pectoris and suspected AMI, indicating that they were suffering chest pain associated with an ischemic episode, did not have a significantly elevated S-100ao concentration. In spite of its risk of non-specificity, which appears to be no different from that of CK-MB and myoglobin, S-100ao may allow physicians to distinguish AMI from unstable angina.

(ii) Non-specific Markers for Myocardial Injury Related to Coagulation

[0062] Plasmin is a 78 kDa serine proteinase that proteolytically digests crosslinked fibrin, resulting in clot dissolution. The 70 kDa serine proteinase inhibitor α 2-antiplasmin (α 2AP) regulates plasmin activity by forming a covalent 1:1 stoichiometric complex with plasmin. The resulting ~150 kDa plasmin- α 2AP complex (PAP), also called plasmin inhibitory complex (PIC) is formed immediately after α 2AP comes in contact with plasmin that is activated during fibrinolysis. The normal serum concentration of PAP is <1 μ g/ml (6.9 nM). Elevations in the serum concentration of PAP can be attributed to the activation of fibrinolysis. Elevations in the serum concentration of PAP may be associated with clot presence, or any condition that

WO 02/089657

PCT/US02/14219

causes or is a result of fibrinolysis activation. These conditions can include atherosclerosis, disseminated intravascular coagulation, AMI, surgery, trauma, unstable angina, stroke, and thrombotic thrombocytopenic purpura. PAP is formed immediately following proteolytic activation of plasmin. PAP is a specific marker for fibrinolysis activation and the presence of a recent or continual hypercoagulable state. It is not specific for ACS and can be elevated in many other disease states.

[0063] β -thromboglobulin (β TG) is a 36 kDa platelet α granule component that is released upon platelet activation. The normal plasma concentration of β TG is < 40 ng/ml (1.1 nM). Plasma levels of β -TG appear to be elevated in patients with unstable angina and AMI, but not stable angina (De Caterina, R. et al., *Eur. Heart J.* 9:913-922, 1988; Bazzan, M. et al., *Cardiologia* 34, 217-220, 1989). Plasma β -TG elevations also seem to be correlated with episodes of ischemia in patients with unstable angina (Sobel, M. et al., *Circulation* 63:300-306, 1981). Elevations in the plasma concentration of β TG may be associated with clot presence, or any condition that causes platelet activation. These conditions can include atherosclerosis, disseminated intravascular coagulation, surgery, trauma, and thrombotic thrombocytopenic purpura, and stroke (Landi, G. et al., *Neurology* 37:1667-1671, 1987). β TG is released into the circulation immediately after platelet activation and aggregation. It has a biphasic half-life of 10 minutes, followed by an extended 1 hour half-life in plasma (Switalska, H.I. et al., *J. Lab. Clin. Med.* 106:690-700, 1985). Plasma β TG concentration is reportedly elevated during unstable angina and AMI, but these studies may not be completely reliable. Special precautions must be taken to avoid platelet activation during the blood sampling process. Platelet activation is common during regular blood sampling, and could lead to artificial elevations of plasma β TG concentration. In addition, the amount of β TG released into the bloodstream is dependent on the platelet count of the individual, which can be quite variable. Plasma concentrations of β TG associated with ACS can approach 70 ng/ml (2 nM), but this value may be influenced by platelet activation during the sampling procedure.

[0064] Platelet factor 4 (PF4) is a 40 kDa platelet α granule component that is released upon platelet activation. PF4 is a marker of platelet activation and has the ability to bind and neutralize heparin. The normal plasma concentration of PF4 is < 7 ng/ml (175 pM). The plasma concentration of PF4 appears to be elevated in patients

WO 02/089657

PCT/US02/14219

with AMI and unstable angina, but not stable angina (Gallino, A. et al., *Am. Heart J.* 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., *Jpn. Circ. J.* 60:277-284, 1996; Bazzan, M. et al., *Cardiologia* 34:217-220, 1989). Plasma PF4 elevations also seem to be correlated with episodes of ischemia in patients with unstable angina (Sobel, M. et al., *Circulation* 5 63:300-306, 1981). Elevations in the plasma concentration of PF4 may be associated with clot presence, or any condition that causes platelet activation. These conditions can include atherosclerosis, disseminated intravascular coagulation, surgery, trauma, thrombotic thrombocytopenic purpura, and acute stroke (Carter, A.M. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1124-1131, 1998). PF4 is released into the 10 circulation immediately after platelet activation and aggregation. It has a biphasic half-life of 1 minute, followed by an extended 20 minute half-life in plasma. The half-life of PF4 in plasma can be extended to 20-40 minutes by the presence of heparin (Rucinski, B. et al., *Am. J. Physiol.* 251:H800-H807, 1986). Plasma PF4 concentration is reportedly elevated during unstable angina and AMI, but these studies may not be 15 completely reliable. Special precautions must be taken to avoid platelet activation during the blood sampling process. Platelet activation is common during regular blood sampling, and could lead to artificial elevations of plasma PF4 concentration. In addition, the amount of PF4 released into the bloodstream is dependent on the platelet count of the individual, which can be quite variable. Plasma concentrations of PF4 20 associated with disease can exceed 100 ng/ml (2.5 nM), but it is likely that this value may be influenced by platelet activation during the sampling procedure.

[0065] Fibrinopeptide A (FPA) is a 16 amino acid, 1.5 kDa peptide that is liberated from amino terminus of fibrinogen by the action of thrombin. Fibrinogen is synthesized and secreted by the liver. The normal plasma concentration of FPA is < 5 25 ng/ml (3.3 nM). The plasma FPA concentration is elevated in patients with AMI, unstable angina, and variant angina, but not stable angina (Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* 50:517-525, 1988; Gallino, A. et al., *Am. Heart J.* 112:285-290, 1986; Sakata, K. et al., *Jpn. Circ. J.* 60:277-284, 1996; Theroux, P. et al., *Circulation* 75:156-162, 1987; Merlini, P.A. et al., *Circulation* 90:61-68, 1994; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 30 40:389-395, 1998). Furthermore, plasma FPA may indicate the severity of angina (Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* 50:517-525, 1988). Elevations in the plasma concentration of FPA are associated with any condition that involves activation of the coagulation pathway, including stroke, surgery, cancer, disseminated intravascular

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- coagulation, nephrosis, and thrombotic thrombocytopenic purpura. FPA is released into the circulation following thrombin activation and cleavage of fibrinogen. Because FPA is a small polypeptide, it is likely cleared from the bloodstream rapidly. FPA has been demonstrated to be elevated for more than one month following clot formation,
- 5 and maximum plasma FPA concentrations can exceed 40 ng/ml in active angina (Gensini, G.F. et al., *Thromb. Res.* **50**:517-525, 1988; Tohgi, H. et al., *Stroke* **21**:1663-1667, 1990).
- [0066] Platelet-derived growth factor (PDGF) is a 28 kDa secreted homo- or heterodimeric protein composed of the homologous subunits A and/or B (Mahadevan, D. et al., *J. Biol. Chem.* **270**:27595-27600, 1995). PDGF is a potent mitogen for
- 10 mesenchymal cells, and has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. PDGF is released by aggregating platelets and monocytes near sites of vascular injury. The normal plasma concentration of PDGF is < 0.4 ng/ml (15 pM). Plasma PDGF concentrations are higher in individuals with AMI and unstable angina than in healthy
- 15 controls or individuals with stable angina (Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **69**:453-456, 1992; Wallace, J.M. et al., *Ann. Clin. Biochem.* **35**:236-241, 1998; Ogawa, H. et al., *Coron. Artery Dis.* **4**:437-442, 1993). Changes in the plasma PDGF concentration in these individuals is most likely due to increased platelet and monocyte activation. Plasma PDGF is elevated in individuals with brain tumors, breast cancer, and
- 20 hypertension (Kurimoto, M. et al., *Acta Neurochir. (Wien)* **137**:182-187, 1995; Seymour, L. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* **26**:247-252, 1993; Rossi, E. et al., *Am. J. Hypertens.* **11**:1239-1243, 1998). Plasma PDGF may also be elevated in any pro-inflammatory condition or any condition that causes platelet activation including surgery, trauma, disseminated intravascular coagulation, and thrombotic
- 25 thrombocytopenic purpura. PDGF is released from the secretory granules of platelets and monocytes upon activation. PDGF has a biphasic half-life of approximately 5 minutes and 1 hour in animals (Cohen, A.M. et al., *J. Surg. Res.* **49**:447-452, 1990; Bowen-Pope, D.F. et al., *Blood* **64**:458-469, 1984). The plasma PDGF concentration in ACS can exceed 0.6 ng/ml (22 pM) (Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **69**:453-456,
- 30 1992). PDGF may be a sensitive and specific marker of platelet activation. In addition, it may be a sensitive marker of vascular injury, and the accompanying monocyte and platelet activation.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0067] Prothrombin fragment 1+2 is a 32 kDa polypeptide that is liberated from the amino terminus of thrombin during thrombin activation. The normal plasma concentration of F1+2 is < 32 ng/ml (1 nM). Reports from investigations of plasma F1+2 concentration elevations that are associated with ACS are conflicting. The plasma concentration of F1+2 is reportedly elevated in patients with AMI and unstable angina, but not stable angina, but the changes were not robust (Merlini, P.A. et al., *Circulation* 90:61-68, 1994). Other reports have indicated that there is no significant change in the plasma F1+2 concentration in cardiovascular disease (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 93:2121-2127, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998). The concentration of F1+2 in plasma can be elevated during any condition associated with coagulation activation, including stroke, surgery, trauma, thrombotic thrombocytopenic purpura, and disseminated intravascular coagulation. F1+2 is released into the bloodstream immediately upon thrombin activation. F1+2 has a half-life of approximately 90 minutes in plasma, and it has been suggested that this long half-life may mask bursts of thrombin formation (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 93:2121-2127, 1996).

[0068] P-selectin, also called granule membrane protein-140, GMP-140, PADGEM, and CD-62P, is a ~140 kDa adhesion molecule expressed in platelets and endothelial cells. P-selectin is stored in the alpha granules of platelets and in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. Upon activation, P-selectin is rapidly translocated to the surface of endothelial cells and platelets to facilitate the "rolling" cell surface interaction with neutrophils and monocytes. Membrane-bound and soluble forms of P-selectin have been identified. Soluble P-selectin may be produced by shedding of membrane-bound P-selectin, either by proteolysis of the extracellular P-selectin molecule, or by proteolysis of components of the intracellular cytoskeleton in close proximity to the surface-bound P-selectin molecule (Fox, J.E., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 5:291-304, 1994). Additionally, soluble P-selectin may be translated from mRNA that does not encode the N-terminal transmembrane domain (Dunlop, L.C. et al., *J. Exp. Med.* 175:1147-1150, 1992; Johnston, G.I. et al., *J. Biol. Chem.* 265:21381-21385, 1990). Activated platelets can shed membrane-bound P-selectin and remain in the circulation, and the shedding of P-selectin can elevate the plasma P-selectin concentration by approximately 70 ng/ml (Michelson, A.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:11877-11882, 1996). Soluble P-selectin may also adopt a different

WO 02/089657

PCT/US02/14219

conformation than membrane-bound P-selectin. Soluble P-selectin has a monomeric rod-like structure with a globular domain at one end, and the membrane-bound molecule forms rosette structures with the globular domain facing outward (Ushiyama, S. et al., *J. Biol. Chem.* **268**:15229-15237, 1993). Soluble P-selectin may play an

5 important role in regulating inflammation and thrombosis by blocking interactions between leukocytes and activated platelets and endothelial cells (Gamble, J.R. et al., *Science* **249**:414-417, 1990). The normal plasma concentration of soluble P-selectin is < 200 ng/ml. Blood is normally collected using citrate as an anticoagulant, but some

10 studies have used EDTA plasma with additives such as prostaglandin E to prevent platelet activation. EDTA may be a suitable anticoagulant that will yield results comparable to those obtained using citrate. Furthermore, the plasma concentration of soluble P-selectin may not be affected by potential platelet activation during the

15 sampling procedure. The plasma soluble P-selectin concentration was significantly elevated in patients with AMI and unstable angina, but not stable angina, even following an exercise stress test (Ikeda, H. et al., *Circulation* **92**:1693-1696, 1995; Tomoda, H. and Aoki, N., *Angiology* **49**:807-813, 1998; Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**:95-105, 1999; Kaikita, K. et al., *Circulation* **92**:1726-1730, 1995; Ikeda, H. et al., *Coron. Artery Dis.* **5**:515-518, 1994). The sensitivity and specificity of

20 membrane-bound P-selectin versus soluble P-selectin for AMI is 71% versus 76% and 32% versus 45% (Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**:95-105, 1999). The sensitivity and specificity of membrane-bound P-selectin versus soluble P-selectin for unstable angina + AMI is 71% versus 79% and 30% versus 35% (Hollander, J.E. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**:95-105, 1999). P-selectin expression is greater in coronary

25 atherectomy specimens from individuals with unstable angina than stable angina (Tenaglia, A.N. et al., *Am. J. Cardiol.* **79**:742-747, 1997). Furthermore, plasma soluble P-selectin may be elevated to a greater degree in patients with AMI than in patients with unstable angina. Plasma soluble and membrane-bound P-selectin also is elevated

30 in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus and congestive heart failure (Nomura, S. et al., *Thromb. Haemost.* **80**:388-392, 1998; O'Connor, C.M. et al., *Am. J. Cardiol.* **83**:1345-1349, 1999). Soluble P-selectin concentration is elevated in the plasma of individuals with idiopathic thrombocytopenic purpura, rheumatoid arthritis, hypercholesterolemia, acute stroke, atherosclerosis, hypertension, acute lung injury, connective tissue disease, thrombotic thrombocytopenic purpura, hemolytic uremic syndrome, disseminated intravascular coagulation, and chronic renal failure (Katayama,

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- M. et al., *Br. J. Haematol.* **84**:702-710, 1993; Haznedaroglu, I.C. et al., *Acta Haematol.* **101**:16-20, 1999; Ertenli, I. et al., *J. Rheumatol.* **25**:1054-1058, 1998; Davi, G. et al., *Circulation* **97**:953-957, 1998; Frijns, C.J. et al., *Stroke* **28**:2214-2218, 1997; Blann, A.D. et al., *Thromb. Haemost.* **77**:1077-1080, 1997; Blann, A.D. et al., *J. Hum. Hypertens.* **11**:607-609, 1997; Sakamaki, F. et al., *A. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**:1821-1826, 1995; Takeda, I. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**:128-134, 1994; Chong, B.H. et al., *Blood* **83**:1535-1541, 1994; Bonomini, M. et al., *Nephron* **79**:399-407, 1998). Additionally, any condition that involves platelet activation can potentially be a source of plasma elevations in P-selectin. P-selectin is rapidly presented on the cell surface following platelet of endothelial cell activation. Soluble P-selectin that has been translated from an alternative mRNA lacking a transmembrane domain is also released into the extracellular space following this activation. Soluble P-selectin can also be formed by proteolysis involving membrane-bound P-selectin, either directly or indirectly. Plasma soluble P-selectin is elevated on admission in patients with AMI treated with tPA or coronary angioplasty, with a peak elevation occurring 4 hours after onset (Shimomura, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **81**:397-400, 1998). Plasma soluble P-selectin was elevated less than one hour following an anginal attack in patients with unstable angina, and the concentration decreased with time, approaching baseline more than 5 hours after attack onset (Ikeda, H. et al., *Circulation* **92**:1693-1696, 1995). The plasma concentration of soluble P-selectin can approach 1 µg/ml in ACS (Ikeda, H. et al., *Coron. Artery Dis.* **5**:515-518, 1994). Further investigation into the release of soluble P-selectin into and its removal from the bloodstream need to be conducted. P-selectin may be a sensitive and specific marker of platelet and endothelial cell activation, conditions that support thrombus formation and inflammation. It is not, however, a specific marker of ACS. When used with another marker that is specific for cardiac tissue injury, P-selectin may be useful in the discrimination of unstable angina and AMI from stable angina. Furthermore, soluble P-selectin may be elevated to a greater degree in AMI than in unstable angina. P-selectin normally exists in two forms, membrane-bound and soluble. Published investigations note that a soluble form of P-selectin is produced by platelets and endothelial cells, and by shedding of membrane-bound P-selectin, potentially through a proteolytic mechanism. Soluble P-selectin may prove to be the most useful currently identified marker of platelet activation, since its plasma concentration may not be as influenced

WO 02/089657

PCT/US02/14219

by the blood sampling procedure as other markers of platelet activation, such as PF4 and β -TG.

[0069] Thrombin is a 37 kDa serine proteinase that proteolytically cleaves fibrinogen to form fibrin, which is ultimately integrated into a crosslinked network during clot formation. Antithrombin III (ATIII) is a 65 kDa serine proteinase inhibitor that is a physiological regulator of thrombin, factor XIa, factor XIIa, and factor IXa proteolytic activity. The inhibitory activity of ATIII is dependent upon the binding of heparin. Heparin enhances the inhibitory activity of ATIII by 2-3 orders of magnitude, resulting in almost instantaneous inactivation of proteinases inhibited by ATIII. ATIII inhibits its target proteinases through the formation of a covalent 1:1 stoichiometric complex. The normal plasma concentration of the approximately 100 kDa thrombin-ATIII complex (TAT) is < 5 ng/ml (50 pM). TAT concentration is elevated in patients with AMI and unstable angina, especially during spontaneous ischemic episodes (Biasucci, L.M. et al., *Am. J. Cardiol.* 77:85-87, 1996; Kienast, J. et al., *Thromb. Haemost.* 70:550-553, 1993). Furthermore, TAT may be elevated in the plasma of individuals with stable angina (Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998). Other published reports have found no significant differences in the concentration of TAT in the plasma of patients with ACS (Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998; Hoffmeister, H.M. et al., *Atherosclerosis* 144:151-157, 1999). Further investigation is needed to determine plasma TAT concentration changes associated with ACS. Elevation of the plasma TAT concentration is associated with any condition associated with coagulation activation, including stroke, surgery, trauma, disseminated intravascular coagulation, and thrombotic thrombocytopenic purpura. TAT is formed immediately following thrombin activation in the presence of heparin, which is the limiting factor in this interaction. TAT has a half-life of approximately 5 minutes in the bloodstream (Biasucci, L.M. et al., *Am. J. Cardiol.* 77:85-87, 1996). TAT concentration is elevated in, exhibits a sharp drop after 15 minutes, and returns to baseline less than 1 hour following coagulation activation. The plasma concentration of TAT can approach 50 ng/ml in ACS (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 93:2121-2127, 1996). TAT is a specific marker of coagulation activation, specifically, thrombin activation. TAT may be useful as a marker of coagulation activation on a diagnostic panel with other markers that are specific for plaque rupture and/or cardiac tissue injury.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- [0070] D-dimer is a crosslinked fibrin degradation product with an approximate molecular mass of 200 kDa. The normal plasma concentration of D-dimer is < 150 ng/ml (750 pM). The plasma concentration of D-dimer is elevated in patients with AMI and unstable angina, but not stable angina (Hoffmeister, H.M. et al., *Circulation* 91:2520-2527, 1995; Bayes-Genis, A. et al., *Thromb. Haemost.* 81:865-868, 1999; Gurfinkel, E. et al., *Br. Heart J.* 71:151-155, 1994; Kruskal, J.B. et al., *N. Engl. J. Med.* 317:1361-1365, 1987; Tanaka, M. and Suzuki, A., *Thromb. Res.* 76:289-298, 1994). The plasma concentration of D-dimer also will be elevated during any condition associated with coagulation and fibrinolysis activation, including stroke, surgery, atherosclerosis, trauma, and thrombotic thrombocytopenic purpura. D-dimer is released into the bloodstream immediately following proteolytic clot dissolution by plasmin. Plasma D-dimer concentrations are elevated soon after ACS onset (within 6 hours), and will remain elevated in proportion to the degree of hypercoagulability of the individual. In this regard, further investigation is needed to determine the kinetics of D-dimer removal from the bloodstream following ACS. The plasma concentration of D-dimer can exceed 2 µg/ml in patients with unstable angina (Gurfinkel, E. et al., *Br. Heart J.* 71:151-155, 1994). Plasma D-dimer is a specific marker of fibrinolysis and indicates the presence of a prothrombotic state associated with AMI and unstable angina. D-dimer is not specific for ACS, and plasma elevations of D-dimer may be associated with various risk factors for ACS. However, when used as a member of a panel that contains markers specific for cardiac injury, D-dimer may allow that discrimination of unstable angina and AMI from stable angina. This differentiation may allow physicians to more effectively treat patients presenting with acute chest pain.
- [0071] von Willebrand factor (vWF) is a plasma protein produced by platelets, megakaryocytes, and endothelial cells composed of 220 kDa monomers that associate to form a series of high molecular weight multimers. These multimers normally range in molecular weight from 600-20,000 kDa. vWF participates in the coagulation process by stabilizing circulating coagulation factor VIII and by mediating platelet adhesion to exposed subendothelium, as well as to other platelets. The A1 domain of vWF binds to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex and non-fibrillar collagen type VI, and the A3 domain binds fibrillar collagen types I and III (Emsley, J. et al., *J. Biol. Chem.* 273:10396-10401, 1998). Other domains present in the vWF molecule include the

WO 02/089657

PCT/US02/14219

integrin binding domain, which mediates platelet-platelet interactions, the the protease
 cleavage domain, which appears to be relevant to the pathogenesis of type 11A von
 Willebrand disease. The interaction of vWF with platelets is tightly regulated to avoid
 interactions between vWF and platelets in normal physiologic conditions. vWF
 5 normally exists in a globular state, and it undergoes a conformation transition to an
 extended chain structure under conditions of high sheer stress, commonly found at sites
 of vascular injury. This conformational change exposes intramolecular domains of the
 molecule and allows vWF to interact with platelets. Furthermore, shear stress may
 cause vWF release from endothelial cells, making a larger number of vWF molecules
 10 available for interactions with platelets. The conformational change in vWF can be
 induced in vitro by the addition of non-physiological modulators like ristocetin and
 botrocetin (Miyata, S. et al., *J. Biol. Chem.* **271**:9046-9053, 1996). At sites of vascular
 injury, vWF rapidly associates with collagen in the subendothelial matrix, and virtually
 irreversibly binds platelets, effectively forming a bridge between platelets and the
 15 vascular subendothelium at the site of injury. Evidence also suggests that a
 conformational change in vWF may not be required for its interaction with the
 subendothelial matrix (Sixma, J.J. and de Groot, P.G., *Mayo Clin. Proc.* **66**:628-633,
 1991). This suggests that vWF may bind to the exposed subendothelial matrix at sites
 of vascular injury, undergo a conformational change because of the high localized shear
 20 stress, and rapidly bind circulating platelets, which will be integrated into the newly
 formed thrombus. Measurement of the total amount of vWF would allow one who is
 skilled in the art to identify changes in total vWF concentration associated with stroke
 or cardiovascular disease. This measurement could be performed through the
 measurement of various forms of the vWF molecule. Measurement of the A1 domain
 25 would allow the measurement of active vWF in the circulation, indicating that a pro-
 coagulant state exists because the A1 domain is accessible for platelet binding. In this
 regard, an assay that specifically measures vWF molecules with both the exposed A1
 domain and either the integrin binding domain or the A3 domain would also allow for
 the identification of active vWF that would be available for mediating platelet-platelet
 30 interactions or mediate crosslinking of platelets to vascular subendothelium,
 respectively. Measurement of any of these vWF forms, when used in an assay that
 employs antibodies specific for the protease cleavage domain may allow assays to be
 used to determine the circulating concentration of various vWF forms in any individual,
 regardless of the presence of von Willebrand disease. The normal plasma

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- concentration of vWF is 5-10 $\mu\text{g/ml}$, or 60-110% activity, as measured by platelet aggregation. The measurement of specific forms of vWF may be of importance in any type of vascular disease, including stroke and cardiovascular disease. The plasma vWF concentration is reportedly elevated in individuals with AMI and unstable angina, but not stable angina (Goto, S. et al., *Circulation* 99:608-613, 1999; Tousoulis, D. et al., *Int. J. Cardiol.* 56:259-262, 1996; Yazdani, S. et al., *J Am Coll Cardiol* 30:1284-1287, 1997; Montalescot, G. et al., *Circulation* 98:294-299). Furthermore, elevations of the plasma vWF concentration may be a predictor of adverse clinical outcome in patients with unstable angina (Montalescot, G. et al., *Circulation* 98:294-299). vWF concentrations also have been demonstrated to be elevated in patients with stroke and subarachnoid hemorrhage, and also appear to be useful in assessing risk of mortality following stroke (Blann, A. et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 10:277-284, 1999; Hirashima, Y. et al., *Neurochem Res.* 22:1249-1255, 1997; Catto, A.J. et al., *Thromb. Hemost.* 77:1104-1108, 1997). The plasma concentration of vWF may be elevated in conjunction with any event that is associated with endothelial cell damage or platelet activation. vWF is present at high concentration in the bloodstream, and it is released from platelets and endothelial cells upon activation. vWF would likely have the greatest utility as a marker of platelet activation or, specifically, conditions that favor platelet activation and adhesion to sites of vascular injury. The conformation of VWF is also known to be altered by high shear stress, as would be associated with a partially stenosed blood vessel. As the blood flows past a stenosed vessel, it is subjected to shear stress considerably higher than what it encounters in the circulation of an undiseased individual. Another aspect of this invention measures the forms of vWF that arise from shear stress and the correlation of the forms to the presence of ACS.
- [0072] Tissue factor (TF) is a 45 kDa cell surface protein expressed in brain, kidney, and heart, and in a transcriptionally regulated manner on perivascular cells and monocytes. TF forms a complex with factor VIIa in the presence of Ca^{2+} ions, and it is physiologically active when it is membrane bound. This complex proteolytically cleaves factor X to form factor Xa. It is normally sequestered from the bloodstream. Tissue factor can be detected in the bloodstream in a soluble form, bound to factor VIIa, or in a complex with factor VIIa, and tissue factor pathway inhibitor that can also include factor Xa. TF also is expressed on the surface of macrophages, which are commonly found in atherosclerotic plaques. The normal serum concentration of TF is

WO 02/089657

PCT/US02/14219

< 0.2 ng/ml (4.5 pM). The plasma TF concentration is elevated in patients with ischemic heart disease (Falciani, M. et al., *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998). TF is elevated in patients with unstable angina and AMI, but not in patients with stable angina (Falciani, M. et al., *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998; Suefuji, H. et al., *Am. Heart J.* 134:253-259, 1997; Misumi, K. et al., *Am. J. Cardiol.* 81:22-26, 1998).

Furthermore, TF expression on macrophages and TF activity in atherosclerotic plaques is more common in unstable angina than stable angina (Soejima, H. et al., *Circulation* 99:2908-2913, 1999; Kaikita, K. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2232-2237, 1997; Ardissino, D. et al., *Lancet* 349:769-771, 1997). The differences in plasma TF concentration in stable versus unstable angina may not be of statistical significance. Elevations in the serum concentration of TF are associated with any condition that causes or is a result of coagulation activation through the extrinsic pathway. These conditions can include subarachnoid hemorrhage, disseminated intravascular coagulation, renal failure, vasculitis, and sickle cell disease (Hirashima, Y. et al., *Stroke* 28:1666-1670, 1997; Takahashi, H. et al., *Am. J. Hematol.* 46:333-337, 1994; Koyama, T. et al., *Br. J. Haematol.* 87:343-347, 1994). TF is released immediately when vascular injury is coupled with extravascular cell injury. TF levels in ischemic heart disease patients can exceed 800 pg/ml within 2 days of onset (Falciani, M. et al., *Thromb. Haemost.* 79:495-499, 1998). TF levels were decreased in the chronic phase of AMI, as compared with the chronic phase (Suefuji, H. et al., *Am. Heart J.* 134:253-259, 1997). TF is a specific marker for activation of the extrinsic coagulation pathway and the presence of a general hypercoagulable state. It may be a sensitive marker of vascular injury resulting from plaque rupture and could have some benefit as a member of a panel. It is not specific for ACS, can be elevated in many disease states, and may even be artificially elevated by the blood sampling procedure. However, it may be possible to use TF as a marker to rule out patients for thrombolytic therapy. The infusion of tissue-type plasminogen activator (tPA) during thrombolytic therapy results in an activation of fibrinolysis, and the patient is unable to maintain blood clots. The administration of tPA to an individual with vascular injury could ultimately result in hemorrhage.

[0073] The coagulation cascade can be activated through either the extrinsic or intrinsic pathways. These enzymatic pathways share one final common pathway. The first step of the common pathway involves the proteolytic cleavage of prothrombin by

WO 02/089657

PCT/US02/14219

the factor Xa/factor Va prothrombinase complex to yield active thrombin. Thrombin is a serine proteinase that proteolytically cleaves fibrinogen. Thrombin first removes fibrinopeptide A from fibrinogen, yielding desAA fibrin monomer, which can form complexes with all other fibrinogen-derived proteins, including fibrin degradation products, fibrinogen degradation products, desAA fibrin, and fibrinogen. The desAA fibrin monomer is generically referred to as soluble fibrin, as it is the first product of fibrinogen cleavage, but it is not yet crosslinked via factor XIIIa into an insoluble fibrin clot. DesAA fibrin monomer also can undergo further proteolytic cleavage by thrombin to remove fibrinopeptide B, yielding desAABB fibrin monomer. This monomer can polymerize with other desAABB fibrin monomers to form soluble desAABB fibrin polymer, also referred to as soluble fibrin or thrombus precursor protein (TpPTM). TpPTM is the immediate precursor to insoluble fibrin, which forms a "mesh-like" structure to provide structural rigidity to the newly formed thrombus. In this regard, measurement of TpPTM in plasma is a direct measurement of active clot formation. The normal plasma concentration of TpPTM is < 6 ng/ml (Laurino, J.P. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27:338-345, 1997). American Biogenetic Sciences has developed an assay for TpPTM (US Patent Nos. 5453359 and 5843690) and states that its TpPTM assay can assist in the early diagnosis of AMI, the ruling out of AMI in chest pain patients, and the identification of patients with unstable angina that will progress to AMI. Other studies have confirmed that TpPTM is elevated in patients with AMI, most often within 6 hours of onset (Laurino, J.P. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27:338-345, 1997; Carville, D.G. et al., *Clin. Chem.* 42:1537-1541, 1996). The plasma concentration of TpPTM is also elevated in patients with unstable angina, but these elevations may be indicative of the severity of angina and the eventual progression to AMI (Laurino, J.P. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27:338-345, 1997). The concentration of TpPTM in plasma will theoretically be elevated during any condition that causes or is a result of coagulation activation, including disseminated intravascular coagulation, deep venous thrombosis, congestive heart failure, surgery, cancer, gastroenteritis, and cocaine overdose (Laurino, J.P. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27:338-345, 1997). TpPTM is released into the bloodstream immediately following thrombin activation. TpPTM likely has a short half-life in the bloodstream because it will be rapidly converted to insoluble fibrin at the site of clot formation. Plasma TpPTM concentrations peak within 3 hours of AMI onset, returning to normal after 12 hours from onset. The plasma concentration of TpPTM can exceed 30 ng/ml in CVD (Laurino, J.P. et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27:338-

WO 02/089657

PCT/US02/14219

345, 1997). TpPTM is a sensitive and specific marker of coagulation activation. It has been demonstrated that TpPTM is useful in the diagnosis of AMI, but only when it is used in conjunction with a specific marker of cardiac tissue injury. TpPTM is not a specific marker of ACS, and its concentration will be elevated in numerous disease states that involve coagulation activation, including conditions that are considered risk factors for the development of ACS.. TpPTM may also be useful in determining the severity of unstable angina. American Biogenetic Sciences, Inc. instructs users of the TpPTM ELISA assay kit to collect blood using citrate as an anticoagulant, and they recommend against using EDTA. The effect of the anticoagulant used during blood sampling on plasma TpPTM levels is currently unclear. If the blood sampling procedure can be controlled, TpPTM may be the best available marker for coagulation activation.

(iii) Non-specific Markers for Myocardial Injury Related to Atherosclerotic Plaque Rupture

[0074] The appearance of markers related to atherosclerotic plaque rupture may precede specific markers of myocardial injury when ACS is due to atherosclerotic plaque rupture. Potential markers of atherosclerotic plaque rupture include human neutrophil elastase, inducible nitric oxide synthase, lysophosphatidic acid, malondialdehyde-modified low density lipoprotein, and various members of the matrix metalloproteinase (MMP) family, including MMP-1, -2, -3, and -9.

[0075] Human neutrophil elastase (HNE) is a 30 kDa serine proteinase that is normally contained within the azurophilic granules of neutrophils. HNE is released upon neutrophil activation, and its activity is regulated by circulating α_1 -proteinase inhibitor. Activated neutrophils are commonly found in atherosclerotic plaques, and rupture of these plaques may result in the release of HNE. The plasma HNE concentration is usually measured by detecting HNE- α_1 -PI complexes. The normal concentration of these complexes is 50 ng/ml, which indicates a normal concentration of approximately 25 ng/ml (0.8 nM) for HNE. HNE release also can be measured through the specific detection of fibrinopeptide B β ₃₀₋₄₃, a specific HNE-derived fibrinopeptide, in plasma. Plasma HNE is elevated in patients with coronary stenosis, and its elevation is greater in patients with complex plaques than those with simple plaques (Kosar, F. et al., *Angiology* 49:193-201, 1998; Amaro, A. et al., *Eur. Heart J.* 16:615-622, 1995). Plasma HNE is not significantly elevated in patients with stable

WO 02/089657

PCT/US02/14219

angina, but is elevated in patients with unstable angina and AMI, as determined by measuring fibrinogen B β ₃₀₋₄₃, with concentrations in unstable angina being 2.5-fold higher than those associated with AMI (Dinerman, J.L. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:1559-1563, 1990; Mehta, J. et al., *Circulation* 79:549-556, 1989). Serum HNE is elevated in cardiac surgery, exercise-induced muscle damage, giant cell arteritis, acute respiratory distress syndrome, appendicitis, pancreatitis, sepsis, smoking-associated emphysema, and cystic fibrosis (Genereau, T. et al., *J. Rheumatol.* 25:710-713, 1998; Mooser, V. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1060-1065, 1999; Gleeson, M. et al., *Eur. J. Appl. Physiol.* 77:543-546, 1998; Gando, S. et al., *J. Trauma* 42:1068-1072, 1997; Eriksson, S. et al., *Eur. J. Surg.* 161:901-905, 1995; Liras, G. et al., *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 87:641-652, 1995; Endo, S. et al., *J. Inflamm.* 45:136-142, 1995; Janoff, A., *Annu Rev Med* 36:207-216, 1985). HNE may also be released during blood coagulation (Plow, E.F. and Plescia, J., *Thromb. Haemost.* 59:360-363, 1988; Plow, E.F., *J. Clin. Invest.* 69:564-572, 1982). Serum elevations of HNE could also be associated with any non-specific infection or inflammatory state that involves neutrophil recruitment and activation. It is most likely released upon plaque rupture, since activated neutrophils are present in atherosclerotic plaques. HNE is presumably cleared by the liver after it has formed a complex with α_1 -PI.

[0076] Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a 130 kDa cytosolic protein in epithelial cells and macrophages whose expression is regulated by cytokines, including interferon- γ , interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor α , and lipopolysaccharide. iNOS catalyzes the synthesis of nitric oxide (NO) from L-arginine, and its induction results in a sustained high-output production of NO, which has antimicrobial activity and is a mediator of a variety of physiological and inflammatory events. NO production by iNOS is approximately 100 fold more than the amount produced by constitutively-expressed NOS (Depre, C. et al., *Cardiovasc. Res.* 41:465-472, 1999). There are no published investigations of plasma iNOS concentration changes associated with ACS. iNOS is expressed in coronary atherosclerotic plaque, and it may interfere with plaque stability through the production of peroxynitrate, which is a product of NO and superoxide and enhances platelet adhesion and aggregation (Depre, C. et al., *Cardiovasc. Res.* 41:465-472, 1999). iNOS expression during cardiac ischemia may not be elevated, suggesting that iNOS may be useful in the differentiation of angina from AMI (Hammerman, S.I. et al., *Am. J. Physiol.*

WO 02/089657

PCT/US02/14219

277:H1579-H1592, 1999; Kaye, D.M. et al., *Life Sci* **62**:883-887, 1998). Elevations in the plasma iNOS concentration may be associated with cirrhosis, iron-deficiency anemia, or any other condition that results in macrophage activation, including bacterial infection (Jimenez, W. et al., *Hepatology* **30**:670-676, 1999; Ni, Z. et al., *Kidney Int.* **52**:195-201, 1997). iNOS may be released into the bloodstream as a result of atherosclerotic plaque rupture, and the presence of increased amounts of iNOS in the bloodstream may not only indicate that plaque rupture has occurred, but also that an ideal environment has been created to promote platelet adhesion. However, iNOS is not specific for atherosclerotic plaque rupture, and its expression can be induced during non-specific inflammatory conditions.

[0077] Lysophosphatidic acid (LPA) is a lysophospholipid intermediate formed in the synthesis of phosphoglycerides and triacylglycerols. It is formed by the acylation of glycerol-3 phosphate by acyl-coenzyme A and during mild oxidation of low-density lipoprotein (LDL). LPA is a lipid second messenger with vasoactive properties, and it can function as a platelet activator. LPA is a component of atherosclerotic lesions, particularly in the core, which is most prone to rupture (Siess, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6931-6936, 1999). The normal plasma LPA concentration is 540 nM. Serum LPA is elevated in renal failure and in ovarian cancer and other gynecologic cancers (Sasagawa, T. et al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) **44**:809-818, 1998; Xu, Y. et al., *JAMA* **280**:719-723, 1998). In the context of unstable angina, LPA is most likely released as a direct result of plaque rupture. The plasma LPA concentration can exceed 60 μ M in patients with gynecologic cancers (Xu, Y. et al., *JAMA* **280**:719-723, 1998). Serum LPA may be a useful marker of atherosclerotic plaque rupture, which may allow the discrimination of unstable angina from stable angina. However, LPA may not be as specific as other markers of plaque rupture.

[0078] Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-modified LDL) is formed during the oxidation of the apoB-100 moiety of LDL as a result of phospholipase activity, prostaglandin synthesis, or platelet activation. MDA-modified LDL can be distinguished from oxidized LDL because MDA modifications of LDL occur in the absence of lipid peroxidation (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* **53**:253-260, 1998). The normal plasma concentration of MDA-modified LDL is less than 4 μ g/ml (~10 μ M). Plasma concentrations of oxidized LDL are elevated in stable angina,

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- unstable angina, and AMI, indicating that it may be a marker of atherosclerosis (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* **53**:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* **98**:1487-1494, 1998). Plasma MDA-modified LDL is not elevated in stable angina, but is significantly elevated in unstable angina and AMI (Holvoet, P., *Acta Cardiol.* **53**:253-260, 1998; Holvoet, P. et al., *Circulation* **98**:1487-1494, 1998; Holvoet, P. et al., *JAMA* **281**:1718-1721, 1999). Plasma MDA-modified LDL is elevated in individuals with beta-thalassemia and in renal transplant patients (Livrea, M.A. et al., *Blood* **92**:3936-3942, 1998; Ghanem, H. et al., *Kidney Int.* **49**:488-493, 1996; van den Dorpel, M.A. et al., *Transpl. Int.* **9 Suppl.** 1:S54-S57, 1996). Furthermore, serum MDA-modified LDL may be elevated during hypoxia (Balagopalakrishna, C. et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **411**:337-345, 1997). The plasma concentration of MDA-modified LDL is elevated within 6-8 hours from the onset of chest pain. Plasma concentrations of MDA-modified LDL can approach 20 µg/ml (~50 µM) in patients with AMI, and 15 µg/ml (~40 µM) in patients with unstable angina (Holvoet, P. et al., *Circulation* **98**:1487-1494, 1998).
- Plasma MDA-modified LDL has a half-life of less than 5 minutes in mice (Ling, W. et al., *J. Clin. Invest.* **100**:244-252, 1997). MDA-modified LDL appears to be a specific marker of atherosclerotic plaque rupture in acute coronary symptoms. It is unclear, however, if elevations in the plasma concentration of MDA-modified LDL are a result of plaque rupture or platelet activation. The most reasonable explanation is that the presence of increased amounts of MDA-modified LDL is an indication of both events. MDA-modified LDL may be useful in discriminating unstable angina and AMI from stable angina, but it alone can not distinguish AMI from unstable angina. In this regard, MDA-modified LDL would be most useful as part of a panel of markers, particularly with another marker that can distinguish AMI from unstable angina.
- [0079]** Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), also called collagenase-1, is a 41/44 kDa zinc- and calcium-binding proteinase that cleaves primarily type I collagen, but can also cleave collagen types II, III, VII and X. The active 41/44 kDa enzyme can undergo autolysis to the still active 22/27 kDa form. MMP-1 is synthesized by a variety of cells, including smooth muscle cells, mast cells, macrophage-derived foam cells, T lymphocytes, and endothelial cells (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1707-1715, 1998). MMP-1, like other MMPs, is involved in extracellular matrix remodeling, which can occur following injury or during intervascular cell migration. MMP-1 can be found in the bloodstream either in a free

WO 02/089657

PCT/US02/14219

form or in complex with TIMP-1, its natural inhibitor. MMP-1 is normally found at a concentration of < 25 ng/ml in plasma. There have been no conclusive published investigations into changes in the serum or plasma concentration of MMP-1 associated with ACS. However, MMP-1 is found in the shoulder region of atherosclerotic plaques, which is the region most prone to rupture, and may be involved in atherosclerotic plaque destabilization (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1707-1715, 1998). Furthermore, MMP-1 has been implicated in the pathogenesis of myocardial reperfusion injury (Shibata, M. et al., *Angiology* **50**:573-582, 1999). Serum MMP-1 may be elevated in inflammatory conditions that induce mast cell degranulation. Serum MMP-1 concentrations are elevated in patients with arthritis and systemic lupus erythematosus (Keyszer, G. et al., *Z Rheumatol* **57**:392-398, 1998; Keyszer, G. *J. Rheumatol.* **26**:251-258, 1999). Serum MMP-1 also is elevated in patients with prostate cancer, and the degree of elevation corresponds to the metastatic potential of the tumor (Baker, T. et al., *Br. J. Cancer* **70**:506-512, 1994). The serum concentration of MMP-1 may also be elevated in patients with other types of cancer. Serum MMP-1 is decreased in patients with hemochromatosis and also in patients with chronic viral hepatitis, where the concentration is inversely related to the severity (George, D.K. et al., *Gut* **42**:715-720, 1998; Murawaki, Y. et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**:138-145, 1999). MMP-1 is released during mast cell degranulation, and is presumably released during atherosclerotic plaque rupture. MMP-1 concentrations are lower in heparinized plasma than in EDTA plasma or serum, and diluted samples give higher concentration values in an ELISA assay than undiluted samples, presumably due to reduction of the inhibitory effects of protein MMP inhibitors or matrix components (Lein, M. et al., *Clin. Biochem.* **30**:491-496, 1997). Serum MMP-1 was decreased in the first four days following AMI, and increased thereafter, reaching peak levels 2 weeks after the onset of AMI (George, D.K. et al., *Gut* **42**:715-720, 1998).

[0080] Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), also called gelatinase A, is a 66 kDa zinc- and calcium-binding proteinase that is synthesized as an inactive 72 kDa precursor. Mature MMP-3 cleaves type I gelatin and collagen of types IV, V, VII, and X. MMP-2 is synthesized by a variety of cells, including vascular smooth muscle cells, mast cells, macrophage-derived foam cells, T lymphocytes, and endothelial cells (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1707-1715, 1998). MMP-2 is usually found in plasma in complex with TIMP-2, its physiological regulator

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* **30**:1090-1098, 1999). The normal plasma concentration of MMP-2 is < ~550 ng/ml (8 nM). MMP-2 expression is elevated in vascular smooth muscle cells within atherosclerotic lesions, and it may be released into the bloodstream in cases of plaque instability (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). Furthermore, MMP-2 has been implicated as a contributor to plaque instability and rupture (Shah, P.K. et al., *Circulation* **92**:1565-1569, 1995). Serum MMP-2 concentrations were elevated in patients with stable angina, unstable angina, and AMI, with elevations being significantly greater in unstable angina and AMI than in stable angina (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998).
- There was no change in the serum MMP-2 concentration in individuals with stable angina following a treadmill exercise test (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). Serum and plasma MMP-2 is elevated in patients with gastric cancer, hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, urothelial carcinoma, rheumatoid arthritis, and lung cancer (Murawaki, Y. et al., *J. Hepatol.* **30**:1090-1098, 1999; Endo, K. et al., *Anticancer Res.* **17**:2253-2258, 1997; Gohji, K. et al., *Cancer* **78**:2379-2387, 1996; Gruber, B.L. et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* **78**:161-171, 1996; Garbisa, S. et al., *Cancer Res.* **52**:4548-4549, 1992). Furthermore, MMP-2 may also be translocated from the platelet cytosol to the extracellular space during platelet aggregation (Sawicki, G. et al., *Thromb. Haemost.* **80**:836-839, 1998). MMP-2 was elevated on admission in the serum of individuals with unstable angina and AMI, with maximum levels approaching 1.5 µg/ml (25 nM) (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). The serum MMP-2 concentration peaked 1-3 days after onset in both unstable angina and AMI, and started to return to normal after 1 week (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998).
- [0081]** Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), also called stromelysin-1, is a 45 kDa zinc- and calcium-binding proteinase that is synthesized as an inactive 60 kDa precursor. Mature MMP-3 cleaves proteoglycan, fibrinectin, laminin, and type IV collagen, but not type I collagen. MMP-3 is synthesized by a variety of cells, including smooth muscle cells, mast cells, macrophage-derived foam cells, T lymphocytes, and endothelial cells (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1707-1715, 1998). MMP-3, like other MMPs, is involved in extracellular matrix remodeling, which can occur following injury or during intervascular cell migration. MMP-3 is normally found at a concentration of < 125 ng/ml in plasma. The serum MMP-3

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- concentration also has been shown to increase with age, and the concentration in males is approximately 2 times higher in males than in females (Manicourt, D.H. et al., *Arthritis Rheum.* **37**:1774-1783, 1994). There have been no conclusive published investigations into changes in the serum or plasma concentration of MMP-3 associated with ACS. However, MMP-3 is found in the shoulder region of atherosclerotic plaques, which is the region most prone to rupture, and may be involved in atherosclerotic plaque destabilization (Johnson, J.L. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:1707-1715, 1998). Therefore, MMP-3 concentration may be elevated as a result of atherosclerotic plaque rupture in unstable angina. Serum MMP-3 may be elevated in inflammatory conditions that induce mast cell degranulation. Serum MMP-3 concentrations are elevated in patients with arthritis and systemic lupus erythematosus (Zucker, S. et al. *J. Rheumatol.* **26**:78-80, 1999; Keyszer, G. et al., *Z Rheumatol.* **57**:392-398, 1998; Keyszer, G. et al. *J. Rheumatol.* **26**:251-258, 1999). Serum MMP-3 also is elevated in patients with prostate and urothelial cancer, and also glomerulonephritis (Lein, M. et al., *Urology* **53**:377-381, 1998; Gohji, K. et al., *Cancer* **78**:2379-2387, 1996; Akiyama, K. et al., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **95**:115-128, 1997). The serum concentration of MMP-3 may also be elevated in patients with other types of cancer. Serum MMP-3 is decreased in patients with hemochromatosis (George, D.K. et al., *Gut* **42**:715-720, 1998).
- [0082] Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) also called gelatinase B, is an 84 kDa zinc- and calcium-binding proteinase that is synthesized as an inactive 92 kDa precursor. Mature MMP-9 cleaves gelatin types I and V, and collagen types IV and V. MMP-9 exists as a monomer, a homodimer, and a heterodimer with a 25 kDa α_2 -microglobulin-related protein (Triebel, S. et al., *FEBS Lett.* **314**:386-388, 1992).
- MMP-9 is synthesized by a variety of cell types, most notably by neutrophils. The normal plasma concentration of MMP-9 is < 35 ng/ml (400 pM). MMP-9 expression is elevated in vascular smooth muscle cells within atherosclerotic lesions, and it may be released into the bloodstream in cases of plaque instability (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). Furthermore, MMP-9 may have a pathogenic role in the development of ACS (Brown, D.L. et al., *Circulation* **91**:2125-2131, 1995). Plasma MMP-9 concentrations are significantly elevated in patients with unstable angina and AMI, but not stable angina (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). The elevations in patients with AMI may also indicate that those individuals were

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- suffering from unstable angina. Elevations in the plasma concentration of MMP-9 may also be greater in unstable angina than in AMI, but these differences may not be statistically significant. There was no significant change in plasma MMP-9 levels after a treadmill exercise test in patients with stable angina (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). Plasma MMP-9 is elevated in individuals with rheumatoid arthritis, septic shock, giant cell arteritis and various carcinomas (Gruber, B.L. et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* **78**:161-171, 1996; Nakamura, T. et al., *Am. J. Med. Sci.* **316**:355-360, 1998; Blankaert, D. et al., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **18**:203-209, 1998; Endo, K. et al., *Anticancer Res.* **17**:2253-2258, 1997; Hayasaka, A. et al., *Hepatology* **24**:1058-1062, 1996; Moore, D.H. et al., *Gynecol. Oncol.* **65**:78-82, 1997; Sorbi, D. et al., *Arthritis Rheum.* **39**:1747-1753, 1996; Iizasa, T. et al., *Clin. Cancer Res.* **5**:149-153, 1999). Furthermore, the plasma MMP-9 concentration may be elevated in stroke and cerebral hemorrhage (Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G.A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**:1163-1172, 1998; Romanic, A.M. et al., *Stroke* **29**:1020-1030, 1998; Rosenberg, G.A., *J. Neurotrauma* **12**:833-842, 1995). MMP-9 was elevated on admission in the serum of individuals with unstable angina and AMI, with maximum levels approaching 150 ng/ml (1.7 nM) (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998). The serum MMP-9 concentration was highest on admission in patients unstable angina, and the concentration decreased gradually after treatment, approaching baseline more than 1 week after onset (Kai, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:368-372, 1998).

(iv) Other Non-specific Markers of Myocardial Injury

- [0083] Activation of the inflammatory response may be manifested in the early stages of ACS. In this regard, measurement of the circulating concentrations of non-specific markers of inflammation and acute phase reactants may be of use in identifying individuals with ACS, as well as individuals at risk for developing ACS. Examples of such markers associated with inflammation and the acute phase response include C-reactive protein, interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1, soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, tumor necrosis factor α , caspase-3 and hemoglobin α_2 .

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0084] C-reactive protein is a (CRP) is a homopentameric Ca^{2+} -binding acute phase protein with 21 kDa subunits that is involved in host defense. CRP preferentially binds to phosphorylcholine, a common constituent of microbial membranes.

Phosphorylcholine is also found in mammalian cell membranes, but it is not present in a form that is reactive with CRP. The interaction of CRP with phosphorylcholine promotes agglutination and opsonization of bacteria, as well as activation of the complement cascade, all of which are involved in bacterial clearance. Furthermore, CRP can interact with DNA and histones, and it has been suggested that CRP is a scavenger of nuclear material released from damaged cells into the circulation (Robey, F.A. et al., *J. Biol. Chem.* **259**:7311-7316, 1984). CRP synthesis is induced by IL-6, and indirectly by IL-1, since IL-1 can trigger the synthesis of IL-6 by Kupffer cells in the hepatic sinusoids. The normal plasma concentration of CRP is $< 3 \mu\text{g/ml}$ (30 nM) in 90% of the healthy population, and $< 10 \mu\text{g/ml}$ (100 nM) in 99% of healthy individuals. Plasma CRP concentrations can be measured by rate nephelometry or ELISA. The plasma CRP concentration of CRP is significantly elevated in patients with AMI and unstable angina, but not stable angina (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* **94**:874-877, 1996; Biasucci, L.M. et al., *Am. J. Cardiol.* **77**:85-87, 1996; Benamer, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **82**:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:1295-1304, 1998; Curzen, N.P. et al., *Heart* **80**:23-27, 1998; Dangas, G. et al., *Am. J. Cardiol.* **83**:583-5, A7, 1999). CRP may also be elevated in the plasma of individuals with variant or resolving unstable angina, but mixed results have been reported (Benamer, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **82**:845-850, 1998; Caligiuri, G. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**:1295-1304, 1998). CRP may not be useful in predicting the outcome of patients with AMI or unstable angina (Curzen, N.P. et al., *Heart* **80**:23-27, 1998; Rebuzzi, A.G. et al., *Am. J. Cardiol.* **82**:715-719, 1998; Oltrona, L. et al., *Am. J. Cardiol.* **80**:1002-1006, 1997). The concentration of CRP will be elevated in the plasma from individuals with any condition that may elicit an acute phase response, such as infection, surgery, trauma, and stroke. CRP is a secreted protein that is released into the bloodstream soon after synthesis. CRP synthesis is upregulated by IL-6, and the plasma CRP concentration is significantly elevated within 6 hours of stimulation (Biasucci, L.M. et al., *Am. J. Cardiol.* **77**:85-87, 1996). The plasma CRP concentration peaks approximately 50 hours after stimulation, and begins to decrease with a half-life of approximately 19 hours in the bloodstream (Biasucci, L.M. et al., *Am. J. Cardiol.* **77**:85-87, 1996). Other investigations have confirmed that the plasma CRP

WO 02/089657

PCT/US02/14219

concentration in individuals with unstable angina (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996). The plasma concentration of CRP can approach 100 µg/ml (1 µM) in individuals with ACS (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996; Liuzzo, G. et al., *Circulation* 94:2373-2380, 1996). CRP is a specific marker of the acute phase response. Elevations of CRP have been identified in the plasma of individuals with AMI and unstable angina, most likely as a result of activation of the acute phase response associated with atherosclerotic plaque rupture or cardiac tissue injury. CRP is a highly nonspecific marker for ACS, and elevations of the CRP concentration in plasma may occur from unrelated conditions involving activation of the immune system. Despite its high degree of non-specificity for ACS, CRP may be useful in the identification of unstable angina and AMI when used with another marker that is specific for cardiac tissue injury. Plasma has a high concentration of CRP and there is much variability in the reported concentration of CRP in the blood of healthy individuals. Further investigation using a uniform assay, most likely a competitive immunoassay, on a range of plasma samples is necessary to determine the upper limits of the concentration of CRP in the plasma of apparently healthy individuals.

[0085] Interleukin-1β (IL-1β) is a 17 kDa secreted proinflammatory cytokine that is involved in the acute phase response and is a pathogenic mediator of many diseases. IL-1β is normally produced by macrophages and epithelial cells. IL-1β is also released from cells undergoing apoptosis. The normal serum concentration of IL-1β is < 30 pg/ml (1.8 pM). There have been no conclusive investigations into potential elevations of the plasma concentration of IL-1β in individuals with ACS, possibly due to sensitivity limitations of the assay or clearance of IL-1β from the bloodstream soon after ACS onset. In theory, IL-1β would be elevated earlier than other acute phase proteins such as CRP in unstable angina and AMI, since IL-1β is an early participant in the acute phase response. Furthermore, IL-1β is released from cells undergoing apoptosis, which may be activated in the early stages of ischemia. In this regard, elevation of the plasma IL-1β concentration associated with ACS requires further investigation using a high-sensitivity assay. Elevations of the plasma IL-1β concentration are associated with activation of the acute phase response in proinflammatory conditions such as trauma and infection. IL-1β has a biphasic physiological half-life of 5 minutes followed by 4 hours (Kudo, S. et al., *Cancer Res.* 50:5751-5755, 1990). IL-1β is released into the extracellular milieu upon activation of

WO 02/089657

PCT/US02/14219

the inflammatory response or apoptosis. It is possible that IL-1 β is elevated for only a short time after AMI and unstable angina episodes, and most blood samples taken on admission from patients with ACS are outside the window of IL-1 β elevation following insult.

- 5 [0086] Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is a 17 kDa member of the IL-1 family predominantly expressed in hepatocytes, epithelial cells, monocytes, macrophages, and neutrophils. IL-1ra has both intracellular and extracellular forms produced through alternative splicing. IL-1ra is thought to participate in the regulation of physiological IL-1 activity. IL-1ra has no IL-1-like physiological activity, but is
- 10 able to bind the IL-1 receptor on T-cells and fibroblasts with an affinity similar to that of IL-1 β , blocking the binding of IL-1 α and IL-1 β and inhibiting their bioactivity (Stockman, B.J. et al., *Biochemistry* 31:5237-5245, 1992; Eisenberg, S.P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5232-5236, 1991; Carter, D.B. et al., *Nature* 344:633-638, 1990). IL-1ra is normally present in higher concentrations than IL-1 in plasma, and it
- 15 has been suggested that IL-1ra levels are a better correlate of disease severity than IL-1 (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999). Furthermore, there is evidence that IL-1ra is an acute phase protein (Gabay, C. et al., *J. Clin. Invest.* 99:2930-2940, 1997). The normal plasma concentration of IL-1ra is < 200 pg/ml (12 pM). The plasma concentration of IL-1ra is elevated in patients with AMI and unstable angina
- 20 that proceeded to AMI, death, or refractory angina (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999; Latini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994). Furthermore, IL-1ra was significantly elevated in severe AMI as compared to uncomplicated AMI (Latini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994). This indicates that IL-1ra may be a useful marker of ACS severity in unstable angina and
- 25 AMI. Elevations in the plasma concentration of IL-1ra are associated with any condition that involves activation of the inflammatory or acute phase response, including infection, trauma, and arthritis. IL-1ra is released into the bloodstream in pro-inflammatory conditions, and it may also be released as a participant in the acute phase response. The major sources of clearance of IL-1ra from the bloodstream appear
- 30 to be kidney and liver (Kim, D.C. et al., *J. Pharm. Sci.* 84:575-580, 1995). IL-1ra concentrations were elevated in the plasma of individuals with unstable angina within 24 hours of onset, and these elevations may even be evident within 2 hours of onset (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999). In patients with severe

WO 02/089657

PCT/US02/14219

progression of unstable angina, the plasma concentration of IL-1ra was higher 48 hours after onset than levels at admission, while the concentration decreased in patients with uneventful progression (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999). In addition, the plasma concentration of IL-1ra associated with unstable angina can approach 1.4 ng/ml (80 pM). IL-1ra may be a useful marker of ACS severity. It is not a specific marker of ACS, but changes in the plasma concentration of IL-1ra appear to be related to disease severity. Furthermore, it is likely released in conjunction with or soon after IL-1 release in pro-inflammatory conditions, and it is found at higher concentrations than IL-1. This indicates that IL-1ra may be a useful indirect marker of IL-1 activity, which elicits the production of IL-6. Thus, IL-1ra may be useful not only in grading the severity of unstable angina and AMI, but also in the identification of the early stages of the acute phase response, before IL-6 concentrations are significantly elevated.

[0087] Interleukin-6 (IL-6) is a 20 kDa secreted protein that is a hematopoietin family proinflammatory cytokine. IL-6 is an acute-phase reactant and stimulates the synthesis of a variety of proteins, including adhesion molecules. Its major function is to mediate the acute phase production of hepatic proteins, and its synthesis is induced by the cytokine IL-1. IL-6 is normally produced by macrophages and T lymphocytes. The normal serum concentration of IL-6 is < 3 pg/ml (0.15 pM). The plasma concentration of IL-6 is elevated in patients with AMI and unstable angina, to a greater degree in AMI (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998; Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999). IL-6 is not significantly elevated in the plasma of patients with stable angina (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996; Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998). Furthermore, IL-6 concentrations increase over 48 hours from onset in the plasma of patients with unstable angina with severe progression, but decrease in those with uneventful progression (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 99:2079-2084, 1999). This indicates that IL-6 may be a useful indicator of disease progression. Plasma elevations of IL-6 are associated with any nonspecific proinflammatory condition such as trauma, infection, or other diseases that elicit an acute phase response. IL-6 has a half-life of 4.2 hours in the bloodstream and is elevated following AMI and unstable angina (Manten, A. et al., *Cardiovasc. Res.* 40:389-395, 1998). The plasma concentration of IL-6 is elevated within 8-12 hours of

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- AMI onset, and can approach 100 pg/ml. The plasma concentration of IL-6 in patients with unstable angina was elevated at peak levels 72 hours after onset, possibly due to the severity of insult (Biasucci, L.M. et al., *Circulation* 94:874-877, 1996). IL-6 appears to be a sensitive marker of inflammation associated with ACS. However, it is not specific for ACS, and may be elevated in various conditions that are considered risk factors for ACS. However, IL-6 may be useful in identifying the severity of AMI or unstable angina, allowing physicians to monitor these patients closely for disease progression. Furthermore, IL-6 may be useful in distinguishing unstable angina and AMI from stable angina.
- 10 [0088] Tumor necrosis factor α (TNF α) is a 17 kDa secreted proinflammatory cytokine that is involved in the acute phase response and is a pathogenic mediator of many diseases. TNF α is normally produced by macrophages and natural killer cells. The normal serum concentration of TNF α is < 40 pg/ml (2 pM). The plasma concentration of TNF α is elevated in patients with AMI, and is marginally elevated in patients with unstable angina (Li, D. et al., *Am. Heart J.* 137:1145-1152, 1999; Squadrito, F. et al., *Inflamm. Res.* 45:14-19, 1996; Latini, R. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23:1-6, 1994; Carlstedt, F. et al., *J. Intern. Med.* 242:361-365, 1997). Elevations in the plasma concentration of TNF α are associated with any proinflammatory condition, including trauma, stroke, and infection. TNF α has a half-life of approximately 1 hour in the bloodstream, indicating that it may be removed from the circulation soon after symptom onset. In patients with AMI, TNF α was elevated 4 hours after the onset of chest pain, and gradually declined to normal levels within 48 hours of onset (Li, D. et al., *Am. Heart J.* 137:1145-1152, 1999). The concentration of TNF α in the plasma of AMI patients exceeded 300 pg/ml (15 pM) (Squadrito, F. et al., 25 *Inflamm. Res.* 45:14-19, 1996).
- [0089] Soluble intercellular adhesion molecule (sICAM-1), also called CD54, is a 85-110 kDa cell surface-bound immunoglobulin-like integrin ligand that facilitates binding of leukocytes to antigen-presenting cells and endothelial cells during leukocyte recruitment and migration. sICAM-1 is normally produced by vascular endothelium, hematopoietic stem cells and non-hematopoietic stem cells, which can be found in intestine and epidermis. sICAM-1 can be released from the cell surface during cell death or as a result of proteolytic activity. The normal plasma concentration of

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- sICAM-1 is approximately 250 ng/ml (2.9 nM). The plasma concentration of sICAM-1 is significantly elevated in patients with AMI and unstable angina, but not stable angina (Pellegatta, F. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **30**:455-460, 1997; Miwa, K. et al., *Cardiovasc. Res.* **36**:37-44, 1997; Ghaisas, N.K. et al., *Am. J. Cardiol.* **80**:617-619, 1997; Ogawa, H. et al., *Am. J. Cardiol.* **83**:38-42, 1999). Furthermore, ICAM-1 is expressed in atherosclerotic lesions and in areas predisposed to lesion formation, so it may be released into the bloodstream upon plaque rupture (Iiyama, K. et al., *Circ. Res.* **85**:199-207, 1999; Tenaglia, A.N. et al., *Am. J. Cardiol.* **79**:742-747, 1997). Elevations of the plasma concentration of sICAM-1 are associated with ischemic stroke, head trauma, atherosclerosis, cancer, preeclampsia, multiple sclerosis, cystic fibrosis, and other nonspecific inflammatory states (Kim, J.S., *J. Neurol. Sci.* **137**:69-78, 1996; Laskowitz, D.T. et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **7**:234-241, 1998). The plasma concentration of sICAM-1 is elevated during the acute stage of AMI and unstable angina. The elevation of plasma sICAM-1 reaches its peak within 9-12 hours of AMI onset, and returns to normal levels within 24 hours (Pellegatta, F. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **30**:455-460, 1997). The plasma concentration of sICAM can approach 700 ng/ml (8 nM) in patients with AMI (Pellegatta, F. et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **30**:455-460, 1997). sICAM-1 is elevated in the plasma of individuals with AMI and unstable angina, but it is not specific for these diseases. It may, however, be useful marker in the differentiation of AMI and unstable angina from stable angina since plasma elevations are not associated with stable angina. Interestingly, ICAM-1 is present in atherosclerotic plaques, and may be released into the bloodstream upon plaque rupture. Thus, sICAM may be useful not only as a marker of inflammation, but also plaque rupture associated with ACS.
- [0090]** Vascular cell adhesion molecule (VCAM), also called CD106, is a 100-110 kDa cell surface-bound immunoglobulin-like integrin ligand that facilitates binding of B lymphocytes and developing T lymphocytes to antigen-presenting cells during lymphocyte recruitment. VCAM is normally produced by endothelial cells, which line blood and lymph vessels, the heart, and other body cavities. VCAM-1 can be released from the cell surface during cell death or as a result of proteolytic activity. The normal serum concentration of sVCAM is approximately 650 ng/ml (6.5 nM). The plasma concentration of sVCAM-1 is marginally elevated in patients with AMI, unstable angina, and stable angina (Mulvihill, N. et al., *Am. J. Cardiol.* **83**:1265-7, A9, 1999;

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Ghaisas, N.K. et al., *Am. J. Cardiol.* **80**:617-619, 1997). However, sVCAM-1 is expressed in atherosclerotic lesions and its plasma concentration may correlate with the extent of atherosclerosis (Iiyama, K. et al., *Circ. Res.* **85**:199-207, 1999; Peter, K. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**:505-512, 1997). Elevations in the plasma concentration of sVCAM-1 are associated with ischemic stroke, cancer, diabetes, preeclampsia, vascular injury, and other nonspecific inflammatory states (Bitsch, A. et al., *Stroke* **29**:2129-2135, 1998; Otsuki, M. et al., *Diabetes* **46**:2096-2101, 1997; Banks, R.E. et al., *Br. J. Cancer* **68**:122-124, 1993; Steiner, M. et al., *Thromb. Haemost.* **72**:979-984, 1994; Austgulen, R. et al., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **71**:53-58, 1997).

[0091] Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a 10 kDa chemotactic factor that attracts monocytes and basophils, but not neutrophils or eosinophils. MCP-1 is normally found in equilibrium between a monomeric and homodimeric form, and it is normally produced in and secreted by monocytes and vascular endothelial cells (Yoshimura, T. et al., *FEBS Lett.* **244**:487-493, 1989; Li, Y.S. et al., *Mol. Cell. Biochem.* **126**:61-68, 1993). MCP-1 has been implicated in the pathogenesis of a variety of diseases that involve monocyte infiltration, including psoriasis, rheumatoid arthritis, and atherosclerosis. The normal concentration of MCP-1 in plasma is < 0.1 ng/ml. The plasma concentration of MCP-1 is elevated in patients with AMI, and may be elevated in the plasma of patients with unstable angina, but no elevations are associated with stable angina (Soejima, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**:983-988, 1999; Nishiyama, K. et al., *Jpn. Circ. J.* **62**:710-712, 1998; Matsumori, A. et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**:419-423, 1997). Interestingly, MCP-1 also may be involved in the recruitment of monocytes into the arterial wall during atherosclerosis. Elevations of the serum concentration of MCP-1 are associated with various conditions associated with inflammation, including alcoholic liver disease, interstitial lung disease, sepsis, and systemic lupus erythematosus (Fisher, N.C. et al., *Gut* **45**:416-420, 1999; Suga, M. et al., *Eur. Respir. J.* **14**:376-382, 1999; Bossink, A.W. et al., *Blood* **86**:3841-3847, 1995; Kaneko, H. et al., *J. Rheumatol.* **26**:568-573, 1999). MCP-1 is released into the bloodstream upon activation of monocytes and endothelial cells. The concentration of MCP-1 in plasma from patients with AMI has been reported to approach 1 ng/ml (100 pM), and can remain elevated for one month (Soejima, H. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**:983-988, 1999). The kinetics of MCP-1 release into and clearance from the

WO 02/089657

PCT/US02/14219

bloodstream in the context of ACS are currently unknown. MCP-1 is a specific marker of the presence of a pro-inflammatory condition that involves monocyte migration. MCP-1 is not specific for ACS, but its concentration is reportedly elevated in the plasma of patients with AMI. Furthermore, MCP-1 concentrations may not be elevated in the
 5 plasma of patients with unstable angina or stable angina, which suggests that MCP-1 may be useful in discriminating AMI from unstable and stable angina.

[0092] Caspase-3, also called CPP-32, YAMA, and apopain, is an interleukin-1 β converting enzyme (ICE)-like intracellular cysteine proteinase that is activated during cellular apoptosis. Caspase-3 is present as an inactive 32 kDa precursor that is
 10 proteolytically activated during apoptosis induction into a heterodimer of 20 kDa and 11 kDa subunits (Fernandes-Alnemri, T. et al., *J. Biol. Chem.* **269**:30761-30764, 1994). Its cellular substrates include poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and steroid regulatory element binding proteins (SREBPs) (Liu, X. et al., *J. Biol. Chem.* **271**:13371-13376, 1996). The normal plasma concentration of caspase-3 is unknown.
 15 There are no published investigations into changes in the plasma concentration of caspase-3 associated with ACS. There are increasing amounts of evidence supporting the hypothesis of apoptosis induction in cardiac myocytes associated with ischemia and hypoxia (Saraste, A., *Herz* **24**:189-195, 1999; Ohtsuka, T. et al., *Coron. Artery Dis.* **10**:221-225, 1999; James, T.N., *Coron. Artery Dis.* **9**:291-307, 1998; Bialik, S. et al., *J.*
 20 *Clin. Invest.* **100**:1363-1372, 1997; Long, X. et al., *J. Clin. Invest.* **99**:2635-2643, 1997). Elevations in the plasma caspase-3 concentration may be associated with any physiological event that involves apoptosis. There is evidence that suggests apoptosis is induced in skeletal muscle during and following exercise and in cerebral ischemia (Carraro, U. and Franceschi, C., *Aging (Milano)* **9**:19-34, 1997; MacManus, J.P. et al.,
 25 *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**:502-510, 1999). The usefulness of caspase-3 as a marker of cardiac cell death is presently unknown, since there have been no published reports finding caspase-3 in the peripheral blood of patients with AMI. Interestingly, ischemia-induced apoptosis may have characteristics that distinguish it from other forms of apoptosis, but the induction of caspase-3 is common to all apoptotic pathways.
 30 Caspase-3 may not prove to be more useful than other cytosolic markers of cardiac cell death, since all of these markers are released following a loss of plasma membrane integrity. Evidence also suggests that cells undergoing apoptosis do not lose membrane integrity, a characteristic of necrosis, but rather, they form apoptotic bodies with intact

WO 02/089657

PCT/US02/14219

membranes that are ultimately ingested by macrophages and other adjacent cells (Saraste, A., *Herz* 24:189-195, 1999; James, T.N., *Coron. Artery Dis.* 9:291-307, 1998). In this regard, the release of intracellular contents may be a result of necrosis, and caspase-3 may not be a suitable marker for the identification of cardiac cell death, particularly as a result of apoptosis.

[0093] Hemoglobin (Hb) is an oxygen-carrying iron-containing globular protein found in erythrocytes. It is a heterodimer of two globin subunits. $\alpha_2\gamma_2$ is referred to as fetal Hb, $\alpha_2\beta_2$ is called adult HbA, and $\alpha_2\delta_2$ is called adult HbA₂. 90-95% of hemoglobin is HbA, and the α_2 globin chain is found in all Hb types, even sickle cell hemoglobin. Hb is responsible for carrying oxygen to cells throughout the body. Hb α_2 is not normally detected in serum. The usefulness of Hb α_2 on a ACS panel would be to determine the extent of hemolysis and the resulting contribution of erythrocyte-
 10 originated proteins to the measured serum concentration. An accepted level of hemolysis would have to be established for the measurement of serum markers that are
 15 present in erythrocytes.

[0094] Human lipocalin-type prostaglandin D synthase (hPDGS), also called β -trace, is a 30 kDa glycoprotein that catalyzes the formation of prostaglandin D2 from prostaglandin H. The upper limit of hPDGS concentrations in apparently healthy individuals is reported to be approximately 420 ng/ml (Patent No. EP0999447A1).
 20 Elevations of hPDGS have been identified in blood from patients with unstable angina and cerebral infarction (Patent No. EP0999447A1). Furthermore, hPDGS appears to be a useful marker of ischemic episodes, and concentrations of hPDGS were found to decrease over time in a patient with angina pectoris following percutaneous
 25 transluminal coronary angioplasty (PTCA), suggesting that the hPDGS concentration decreases as ischemia is resolved (Patent No. EP0999447A1).

[0095] In a preferred embodiment, one or more specific marker of myocardial injury is combined with one or more non-specific marker of myocardial injury to create a diagnostic panel for ACS. In addition, the present invention provides methods for determining the components of such a plurality of markers. Once such a panel is
 30 assembled, the presence or level of each of the various markers is determined in one or more patient samples, and optionally compared to the diagnostic levels or normal levels of each marker.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Assay Measurement Strategies

[0096] Numerous methods and devices are well known to the skilled artisan for the detection and analysis of the markers of the instant invention. With regard to polypeptides or proteins in patient test samples, immunoassay devices and methods are often used. *See, e.g.*, U.S. Patents 6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; and 5,480,792, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety, including all tables, figures and claims. These devices and methods can utilize labeled molecules in various sandwich, competitive, or non-competitive assay formats, to generate a signal that is related to the presence or amount of an analyte of interest. Additionally, certain methods and devices, such as biosensors and optical immunoassays, may be employed to determine the presence or amount of analytes without the need for a labeled molecule. *See, e.g.*, U.S. Patents 5,631,171; and 5,955,377, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety, including all tables, figures and claims.

[0097] Preferably the markers are analyzed using an immunoassay, although other methods are well known to those skilled in the art (for example, the measurement of marker RNA levels). The presence or amount of a marker is generally determined using antibodies specific for each marker and detecting specific binding. Any suitable immunoassay may be utilized, for example, enzyme-linked immunoassays (ELISA), radioimmunoassays (RIAs), competitive binding assays, and the like. Specific immunological binding of the antibody to the marker can be detected directly or indirectly. Direct labels include fluorescent or luminescent tags, metals, dyes, radionuclides, and the like, attached to the antibody. Indirect labels include various enzymes well known in the art, such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase and the like.

[0098] The use of immobilized antibodies specific for the markers is also contemplated by the present invention. The antibodies could be immobilized onto a variety of solid supports, such as magnetic or chromatographic matrix particles, the surface of an assay place (such as microtiter wells), pieces of a solid substrate material (such as plastic, nylon, paper), and the like. An assay strip could be prepared by coating the antibody or a plurality of antibodies in an array on solid support. This strip

WO 02/089657

PCT/US02/14219

could then be dipped into the test sample and then processed quickly through washes and detection steps to generate a measurable signal, such as a colored spot.

[0099] The analysis of a plurality of markers may be carried out separately or simultaneously with one test sample. Several markers may be combined into one test for efficient processing of a multiple of samples. In addition, one skilled in the art would recognize the value of testing multiple samples (for example, at successive time points) from the same individual. Such testing of serial samples will allow the identification of changes in marker levels over time. Increases or decreases in marker levels, as well as the absence of change in marker levels, would provide useful information about the disease status that includes, but is not limited to identifying the approximate time from onset of the event, the presence and amount of salvagable tissue, the appropriateness of drug therapies, the effectiveness of various therapies as indicated by reperfusion or resolution of symptoms, differentiation of the various types of ACS, identification of the severity of the event, identification of the disease severity, and identification of the patient's outcome, including risk of future events.

[0100] A panel consisting of the markers referenced above may be constructed to provide relevant information related to the diagnosis or prognosis of ACS and management of patients with ACS. Such a panel may be constructed using 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 or 20 individual markers. The analysis of a single marker or subsets of markers comprising a larger panel of markers could be carried out by one skilled in the art to optimize clinical sensitivity or specificity in various clinical settings. These include, but are not limited to ambulatory, urgent care, critical care, intensive care, monitoring unit, inpatient, outpatient, physician office, medical clinic, and health screening settings. Furthermore, one skilled in the art can use a single marker or a subset of markers comprising a larger panel of markers in combination with an adjustment of the diagnostic threshold in each of the aforementioned settings to optimize clinical sensitivity and specificity. The clinical sensitivity of an assay is defined as the percentage of those with the disease that the assay correctly predicts, and the specificity of an assay is defined as the percentage of those without the disease that the assay correctly predicts (Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W.B. Saunders and Company, p. 496).

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0101] The analysis of markers could be carried out in a variety of physical formats as well. For example, the use of microtiter plates or automation could be used to facilitate the processing of large numbers of test samples. Alternatively, single sample formats could be developed to facilitate immediate treatment and diagnosis in a timely fashion, for example, in ambulatory transport or emergency room settings.

[0102] In another embodiment, the present invention provides a kit for the analysis of markers. Such a kit preferably comprises devices and reagents for the analysis of at least one test sample and instructions for performing the assay. Optionally the kits may contain one or more means for converting a marker level to a diagnosis or prognosis of the patient.

Examples

Example 1. Blood Sampling

[0103] Blood specimens were collected by trained study personnel. Samples were collected and processed as described previously. See, de Lemos et al., *The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes*, N Engl J Med 345:1014-21 (2001). Plasma samples were collected in citrate anticoagulant and frozen at the study site at -20° C or colder within 60 minutes of collection. The specimens were shipped on dry ice to the TIMI Cardiac Marker Core Laboratory at Children's Hospital (Boston, MA) where they were stored at -70° C. Following completion of the OPUS-TIMI 16 trial, all plasma specimens from the 50/50 treatment arm were shipped on dry ice to BIOSITE, Inc. (San Diego, CA), where assays were performed.

Example 2. Biochemical Analyses

[0104] Markers were measured using standard immunoassay techniques. These techniques involved the use of antibodies to specifically bind the protein targets. A monoclonal antibody directed against a selected marker was biotinylated using N-hydroxysuccinimide biotin (NHS-biotin) at a ratio of about 5 NHS-biotin moieties per antibody. The antibody-biotin conjugate was then added to wells of a standard avidin 384 well microtiter plate, and antibody conjugate not bound to the plate was removed. This formed the "anti-marker" in the microtiter plate. Another monoclonal

WO 02/089657

PCT/US02/14219

antibody directed against the same marker was conjugated to alkaline phosphatase using succinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) and *N*-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]propionate (SPDP) (Pierce, Rockford, IL).

- [0105] Immunoassays were performed on a TECAN Genesis RSP 200/8 Workstation. Biotinylated antibodies were pipetted into microtiter plate wells previously coated with avidin and incubated for 60 min. The solution containing unbound antibody was removed, and the cells were washed with a wash buffer, consisting of 20 mM borate (pH 7.42) containing 150 mM NaCl, 0.1% sodium azide, and 0.02% Tween-20. The plasma samples (10 μ L) were pipetted into the microtiter plate wells, and incubated for 60 min. The sample was then removed and the wells were washed with a wash buffer. The antibody-alkaline phosphatase conjugate was then added to the wells and incubated for an additional 60 min, after which time, the antibody conjugate was removed and the wells were washed with a wash buffer. A substrate, (AttoPhos®, Promega, Madison, WI) was added to the wells, and the rate of formation of the fluorescent product was related to the concentration of the marker in the patient samples.

- [0106] Assays for BNP were performed using murine anti-BNP monoclonal antibody 106.3 obtained from Scios Incorporated (Sunnyvale, CA). The hybridoma cell line secreting mAb 106.3 was generated from a fusion between FOX-NY cells and spleen cells from a Balb/c mouse immunized with human BNP 1-32 conjugated to BSA. A second murine anti-BNP antibody was produced by Biosite Incorporated (San Diego, CA) by antibody phage display as described previously (US Patent No. 6,057,098), using human BNP antigen (Scios Incorporated, Sunnyvale, CA; US Patent No. 5,114,923) conjugated to KLH by standard techniques. Human BNP antigen was also used for assay standardization.

- [0107] Assays for MMP-9 were performed using murine anti-MMP-9 antibodies generated by Biosite Incorporated using phage display and recombinant protein expression as described previously (US Patent No. 6,057,098). Commercially available MMP-9 antigen was used for assay standardization (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA). The immunogen used for antibody production was prepared by Biosite Incorporated. PCR primers were made corresponding to sequence at the 5'-end of human MMP-9 and the coding sequence at the 3'-end of human MMP-9

WO 02/089657

PCT/US02/14219

(Genbank accession number J05070). Six histidine codons inserted between the end of the coding sequence and the stop codon to assist in purification of the recombinant protein by metal-chelate affinity chromatography. The 5'-end MMP-9 primer, designated primer A, consisted of the nucleotide sequence as follows:

- 5' - AGGTGTCGTAAGCTTGAATTCAGACACCTCTGCCGCCACCATGAG - 3' (SEQ ID NO:1). The 5' primer also contains 21 base pairs of pEAK12 vector sequence (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) at its 5'-end corresponding to the *EcoRI* site and sequence immediately upstream. The 3'-end MMP-9 primer, designated primer B, consisted of the nucleotide sequence as follows:
- 5' - GGCTGGCTTACCTGCGGCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTCTCAGG GCACTGCAGGATG - 3' (SEQ ID NO:2). The 3' primer contains an additional 20 base-pairs of vector sequence, including 6 bases of the *NotI* site and the sequence immediately downstream, at its 5' end. The vector sequence at the 5'- ends of these primers will form, upon treatment with T4 DNA polymerase, single-stranded overhangs that are specific and complementary to those on the pEAK12 vector. The PCR amplification of the MMP-9 gene insert was done on a 2x 100 µl reaction scale containing 100 pmol of 5' primer (A), 100 pmol of 3' primer (B), 2.5 units of Expand polymerase, 10 µl 2 mM dNTPs, 10 µl 10x Expand reaction buffer, 1 µl of Clontech Quick-clone human spleen cDNA (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) as template, and water to 100 µl. The reaction was carried out in a Perkin-Elmer thermal cycler as described in Example 18 (U.S. Patent 6,057,098). The PCR products were precipitated and fractionated by agarose gel electrophoresis and full-length products excised from the gel, purified, and resuspended in water (Example 17, U.S. Patent 6,057,098). The pEAK12 vector was prepared to receive insert by digestion with *NotI* and *EcoRI* (New England BioLabs, Beverly, MA). The insert and *EcoRI/NotI* digested pEAK12 vector were prepared for T4 exonuclease digestion by adding 1.0µl of 10x Buffer A to 1.0µg of DNA and bringing the final volume to 9µl with water. The samples were digested for 4 minutes at 30°C with 1µl (1U/µl) of T4 DNA polymerase. The T4 DNA polymerase was heat inactivated by incubation at 70°C for 10 minutes. The samples were cooled, briefly centrifuged, and 45 ng of the digested insert added to 100 ng of digested pEAK12 vector in a fresh microfuge tube. After the addition of 1.0 µl of 10x annealing buffer, the volume was brought to 10 µl with water. The mixture was heated

WO 02/089657

PCT/US02/14219

to 70°C for 2 minutes and cooled over 20 minutes to room temperature, allowing the insert and vector to anneal. The annealed DNA was diluted one to four with distilled water and electroporated (Example 8, U.S. Patent 6,057,098) into 30µl of electrocompetent *E. coli* strain, DH10B (Invitrogen, Carlsbad, CA). The transformed

5 cells were diluted to 1.0ml with 2xYT broth and 10 µl, 100 µl, 300 µl plated on LB agar plates supplemented with ampicillin (75µg/ml) and grown overnight at 37°C. Colonies were picked and grown overnight in 2xYT (75µg/ml ampicillin at 37°C. The following day glycerol freezer stocks were made for long term storage at -80°C. The sequence of these clones (MMP9peak12) was verified at MacConnell Research (San

10 Diego, CA) by the dideoxy chain termination method using a Sequatherm sequencing kit (Epicenter Technologies, Madison, WI), oligonucleotide primers C, 5' - TTCTCAAGCCTCAGACAGTG - 3' (SEQ ID NO:3), and D, 5' - CCTGGATGCAGGCTACTCTAG - 3' (SEQ ID NO:4), that bind on the 5' and 3' side of the insert in the pEAK12 vector, respectively, and a LI-COR 4000L automated

15 sequencer (LI-COR, Lincoln, NE). Plasmid suitable for transfection and the subsequent expression and purification of human MMP-9 was prepared from clone MMP9peak12.2 using an EndoFree Plasmid Mega Kit as per manufacturer's recommendations (Qiagen, Valencia, CA). HEK 293 ("Peak") cells were expanded into a T-75 flask from a 1ml frozen vial stock (5x10⁶ cells/ml) in IS 293 medium (Irvine

20 Scientific, Santa Ana, CA) with 5% fetal bovine serum (FBS) (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 20 units/ml Heparin, 0.1% Pluronic F-68 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), and 50 µg/ml Gentamicin (Sigma, St. Louis, MO). After incubating at 37°C, 85% humidity, and 5% CO₂ for 2-3 days, the cells were expanded into a T-175 flask while reducing the FBS to 2% in the medium. The cells were then continuously expanded 1:2

25 over a period of 2-3 weeks, establishing a consistent mono-layer of attached cells. Peak cells grown with the above method were centrifuged at 1000 rpm for 6 minutes, and the supernatant was discarded. After counting the cells to establish the density and checking for at least 90% viability with a standard dye test, the cells were resuspended at 5x10⁵ cells/ml in 400ml IS 293 with 2% FBS and 50 µg/ml Gentamicin and added to

30 a 1 L spinner flask. Then, to a conical tube 5ml IS 293 and 320µg MMP-9 DNA were added per 400ml spinner flask. This was mixed and incubated at room temperature for 2 minutes. 400µl X-tremeGENE RO-1539 transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) per spinner was added to the tube that was then mixed and incubated

WO 02/089657

PCT/US02/14219

at room temperature for 20 minutes. The mixture was added to the spinner flask, and incubated at 37°C, 85% humidity, and 5% CO₂ for 4 days at 100 rpm. The cell broth from the above spinner flask was spun down at 3500 rpm for 20 minutes, and the supernatant was saved for purification of the MMP-9. A column containing 20ml

5 Chelating Fast Flow resin (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) charged with NiCl₂ was equilibrated with BBS. Then the supernatant from the spinner flask was loaded on the column, washed with BBS + 10mM imidazole, and eluted with 200mM imidazole. The elution was used for the load of the next purification step after adding CaCl₂ to 10mM. A column with 5ml gelatin sepharose 4B resin (Amersham

10 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) was equilibrated with BBS + 10mM CaCl₂. After loading the antigen, the column was washed with equilibration buffer, and the MMP-9 was eluted using equilibration buffer + 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). Polyoxyethyleneglycol dodecyl ether (BRIJ-35) (0.005%) and EDTA (10mM) were added to the elution, which was then dialyzed into the final buffer (50mM Tris, 400mM

15 NaCl, 10mM CaCl₂, 0.01% NaN₃, pH 7.5, 0.005% BRIJ-35, 10mM EDTA). Finally, the protein was concentrated to approximately 0.25 mg/ml for storage at 4°C. Zymogram gels were used to check for production and purification of MMP-9. Western blots were also used to check for activity of the protein. MMP-9 (Oncogene Research Products, Cambridge, MA) was used for comparison of the purified antigen

20 made using the PEAK cell system to known standards.

[0108] Assays for MMP-9 were performed using murine anti-MMP-9 antibodies generated at Biosite Incorporated, using phage display and recombinant protein expression techniques. Commercially available MMP-9 antigen was used for assay standardization (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA). The

25 concentration of MMP-9 was quantified by detecting the binding of alkaline phosphatase-conjugated antibody. The minimal detectable concentration for the assay was 0.3 ng/mL and the upper end of the reportable range was 2000 ng/mL.

[0109] Assays for Thrombus precursor Protein (TpTM) were performed using reagents obtained from American Biogenetic Sciences, Inc., Columbia, MD. Two

30 murine monoclonal antibodies that recognize different epitopes on the soluble fibrin polymer were employed for the assay. The assay was calibrated using TpTM supplied by American Biogenetic Sciences. Samples were diluted 1:4 prior to assay. The

WO 02/089657

PCT/US02/14219

minimal detectable concentration was 0.25 µg/ml and the upper end of the reportable range was 25 µg/ml. Thus, samples between 1 µg/ml and 100 µg/ml would assay in the reportable range.

5 [0110] Assays for Monocyte Chemotactic protein-1 (MCP-1) were performed using antibodies developed at Biosite. The assays were developed in an immunometric (sandwich) format. The assays were calibrated with an in-house MCP-1 reference preparation. The minimal detectable concentration of the assay was 20 pg/ml and the upper end of the reportable range was 10,000 pg/ml.

10 [0111] Assays for various forms of troponin I (TIC complex and total TnI) were performed using a commercially available goat anti-TnI for capture and antibodies developed at Biosite as the enzyme-labeled conjugates. The assays were calibrated with in-house TIC complex and TnI reference solutions. The minimal detectable concentration for TnI was 40 pg/ml and was 50 pg/ml for the TIC complex. The upper end of the reportable range was 10,000 pg/ml for both assays.

15 [0112] Assays for fatty acid binding protein (FABP) were performed using commercially available monoclonal antibodies and a commercially available FABP antigen. The minimal detectable concentration was 6 ng/ml and the upper end of the reportable range was 10,000 ng/ml.

20 [0113] C-reactive protein (CRP) and fibrinogen were measured using commercially available assays (Dade Behring Inc, Newark, DE).

Example 3. Exemplary Marker Panels

25 [0114] A marker panel can be constructed that contains markers of the various pathological events that result in myocardial damage. Such a panel would include markers of inflammation, atherosclerotic plaque rupture, platelet activation, thrombosis, and myocardial damage or necrosis. Suitable markers that may appear on this panel are IL-6, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-modified LDL), P-selectin, thrombin-antithrombin III (TAT) complex, BNP, free cardiac troponin I, total cardiac troponin I, cardiac troponin I in complexes with troponin T and/or C, free cardiac troponin T, total cardiac troponin T, cardiac troponin T in complexes with troponin I and/or C, C-reactive protein, and/or MMP-9. The marker panel will be

30

WO 02/089657

PCT/US02/14219

evaluated in conjunction with the clinical signs and symptoms of the patient.
Typically, patients with ACS have a predominant symptom of chest pain.

Marker(s) Positive	Interpretation
IL-6	Presence of an inflammatory response. Not specific for ACS, but may be indicative of an early event.
MDA-modified LDL	Indication of plaque rupture. May be indicative of an ongoing event, and that plaque rupture may be causing chest pain.
P-selectin	Indication of platelet activation. A platelet plug is forming or has formed. The platelet plug and the resulting occlusion may be causing chest pain.
TAT complex	Indication of coagulation activation. A clot is forming or has formed, and the resulting occlusion may be causing chest pain.
BNP	Indication of ventricular dysfunction. May be related to damage produced by cardiac ischemia.
Total cTnI	Indication of myocardial damage. Elevations are indicative of myocardial necrosis, and are produced by cardiac ischemia.
Total cTnTIC	Indication of myocardial damage. Elevations are indicative of myocardial necrosis, and are produced by cardiac ischemia. A high ratio of cTnTIC to total cTnI may be indicative of an ongoing event or continual ischemia.

- [0115] Elevations and changes over time of more than one marker on the panel may be indicative of the progression of ACS. For example, elevations of IL-6, MD-modified LDL, P-selectin, and TAT complex may indicate that atherosclerotic plaque rupture has occurred, and that the rupture has caused platelet aggregation and coagulation activation, resulting in a narrowing of the blood vessel. Furthermore, elevations of P-selectin and TAT complex may indicate that conditions are favorable for clot formation. Subsequent decreases in marker concentrations over time would indicate that the pathological process has been slowed or halted. For example, decreases in the TAT complex concentration over time would indicate that the coagulation process has been slowed or halted. In this regard, decreases in the MDA-modified LDL concentration over time would suggest that plaque rupture is not continuing.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- [0116] Other markers may be substituted for or added to the markers listed in the example above. Alternative or additional markers of myocardial injury include annexin V, BNP and/or BNP-related peptides, β -enolase, creatine kinase-MB, glycogen phosphorylase-BB, heart-type fatty acid binding protein, phosphoglyceric acid mutase-MB, and S-100ao.
- [0117] Alternative or additional markers of coagulation activation include plasmin- α -2-antiplasmin complex, fibrinopeptide A, prothrombin fragment 1+2, D-dimer, one or more forms of von Willebrand factor, tissue factor, and thrombus precursor protein (TpP).
- [0118] Alternative or additional markers of platelet activation include β -thromboglobulin, platelet factor 4 and platelet-derived growth factor.
- [0119] Alternative or additional markers of atherosclerotic plaque rupture include human neutrophil elastase, inducible nitric oxide synthase, lysophosphatidic acid, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-3, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).
- [0120] Alternative or additional markers of inflammation or the acute phase response include C-reactive protein, interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor α , soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, and monocyte chemotactic protein-1.
- [0121] In addition, other markers can be added to the panel to enhance the diagnostic power of the panel.

Example 4: MMP-9, total cTnI, cTnTIC, BNP, CRP, FABP, TpP, and MCP-1 as Prognostic Markers in ACS

Study Population

- [0122] The Oral Glycoprotein IIb/IIIa Inhibition with Orbofiban in Patients with Unstable Coronary Syndromes (OPUS-TIMI 16) Trial was a randomized multicenter trial comparing an oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitor, orbofiban, with placebo in 10,288 patients with ACS. See, Cannon et al., *Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial*,

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Circulation 102:149-56 (2000). Patients were eligible for enrollment if they presented within 72 hours of the onset of ischemic symptoms and met one of the following criteria: age > 65 with diabetes or vascular disease; prior coronary artery disease; dynamic ECG changes; or elevated cardiac markers. The study was approved by the Institutional Review Board of each hospital and all patients provided written informed consent. Patients were randomized to one of the following three treatment arms: orbofiban 50 mg twice daily (50/50 group), orbofiban 50 mg twice daily for one month, followed by orbofiban 30 mg twice daily (50/30 group), or placebo. The OPUS-TIMI 16 study was terminated prematurely because increased mortality was observed in the 50/30 group. No increase in mortality was observed in the 50/50 group. The present study was conducted in patients who were assigned to the 50/50 group and provided a baseline plasma specimen suitable for analysis of MMP-9, total cTnI, cTnTIC, BNP, CRP, FABP, TpP, and MCP-1.

[0123] The median time from the onset of symptoms to enrollment in OPUS-TIMI 16 was 40 hours.

MMP-9 assay

[0124] Assays for MMP-9 were performed using murine anti-MMP-9 antibodies generated at Biosite Incorporated, using phage display and recombinant protein expression techniques. Commercially available MMP-9 antigen was used for assay standardization (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA). Assays were performed in 384-well microtiter plates on a robotic high-throughput platform (TECAN Genesis RSP 200/8). The concentration of MMP-9 was quantified by detecting the binding of alkaline phosphatase-conjugated antibody. All samples were run in duplicate. The minimal detectable concentration for the assay was 3.0 ng/mL and the upper end of the reportable range was 2000 ng/mL.

Clinical Endpoints

[0125] All-cause mortality, nonfatal MI, and congestive heart failure were evaluated at 30 days and through the end of the 10-month follow-up period. MI was defined using previously reported criteria and adjudicated by a Clinical Events Committee. See, Antman et al., *Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction: Results of the thrombolysis in*

WO 02/089657

PCT/US02/14219

myocardial infarction (TIMI) 11B trial, *Circulation* 100:1593-601 (1999). The endpoint of new or worsening CHF or cardiogenic shock was collected from the case record forms and was not adjudicated.

Statistical Analyses

- 5 [0126] Subjects were divided into quartiles based on their marker concentration at the time of enrollment into the trial. Means and proportions for baseline variables were compared across quartiles using ANOVA for continuous variables and χ^2 trend tests for categorical variables. The direct correlation between markers and other continuous baseline variables was assessed using Pearson's product moment correlation
- 10 coefficient. The marker concentration was compared between patients who met a study endpoint and those who did not using the Wilcoxon Rank Sum Test. Cumulative hazard functions were used to estimate the frequency of adverse events at the end of the 10-month follow-up period. The log-rank test was used to compare outcomes across quartiles.
- 15 [0127] Analyses were performed in prespecified subgroups defined by age, gender, presence of diabetes, and index diagnosis. For all-cause mortality through the end of follow-up (10 months), a Cox proportional hazards model was constructed using forward stepwise selection. Clinical variables were entered into the model if they had a univariate p value < 0.1, and if data were available in > 75% of patients; variables were
- 20 removed if they had a multivariate p value > 0.1. Baseline concentrations of total cTnI, BNP, and MMP-9 were then added into the completed model. Only patients with complete data for all variables were included in these multivariate analyses (n=2068). The model was subsequently repeated in the subset of patients who had undergone measurement of C-reactive protein (n=736).
- 25 *Association of MMP-9 With Baseline Clinical Variables*
- [0128] Higher baseline levels of MMP-9 were associated with female gender, nonwhite race and current tobacco use, but not with older age, diabetes, or prior evidence of hypercholesterolemia, coronary disease or congestive heart failure. Higher MMP-9 levels were associated with faster heart rate, Killip Class > I, and elevated
- 30 levels of troponin I and C-reactive protein. (table 1) In contrast, MMP-9 was not associated with body mass index, renal function, electrocardiographic changes, elevated

WO 02/089657

PCT/US02/14219

BNP, LVEF, or the extent of coronary artery disease measured at coronary angiography. There was no association between the concentration of MMP-9 and the time from symptom onset to enrollment in the trial. The correlations between the concentrations of MMP-9 and CRP ($R=0.16$; $p<0.001$), cTnI ($R=0.07$; $p=0.001$), and peak recorded CKMB ($R=0.05$; $p=0.04$) were only modest. There was no association between the concentration of MMP-9 and BNP ($R=0.005$; $p=0.82$) or fibrinogen ($R=0.05$; $p=0.12$).

Table 1. Baseline Clinical Characteristics According to Quartiles of MMP-9 (ng/mL)

	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	p trend	p Q4 vs Q1
Range, ng/mL	3.0-24.3	24.4-43.1	43.2-85.2	85.3-2000		
n	580	573	581	577		
Time to randomization (hrs)	43 ± 19	40 ± 20	41 ± 20	39 ± 20	0.09	0.02
Age (years)	61 ± 12	60 ± 12	61 ± 11	61 ± 12	0.48	0.94
Male	341 (76%)	404 (71%)	418 (72%)	397 (69%)	0.02	0.006
White	558 (96%)	537 (94%)	557 (96%)	519 (90%)	<0.001	<0.001
Past Medical History						
Hypertension	240 (41%)	244 (43%)	237 (41%)	256 (44%)	0.42	0.29
Congestive Heart Failure	22 (4%)	34 (6%)	31 (5%)	32 (6%)	0.26	0.16
Coronary artery disease	280 (48%)	305 (53%)	291 (51%)	276 (48%)	0.64	0.88
Peripheral vascular disease	32 (6%)	41 (7%)	49 (8%)	34 (6%)	0.60	0.78
Cerebrovascular disease	10 (2%)	20 (3%)	22 (4%)	16 (3%)	0.27	0.23
Diabetes	127 (22%)	111 (19%)	125 (22%)	133 (23%)	0.46	0.64
Hypercholesterolemia	156 (27%)	162 (28%)	180 (31%)	152 (26%)	0.89	0.83
Smoking status						
Current smoker	182 (31%)	201 (35%)	210 (36%)	241 (42%)	<0.001	<0.001
Never smoker	216 (37%)	181 (32%)	173 (30%)	164 (29%)	0.005	0.005
Past smoker	180 (31%)	191 (33%)	197 (34%)	170 (30%)	0.64	0.56
Index Diagnosis						
ST elevation MI	183 (32%)	165 (29%)	184 (32%)	218 (38%)	0.02	0.03
Non ST elevation MI	127 (22%)	119 (21%)	145 (25%)	127 (22%)	0.56	0.96
Unstable angina	270 (46%)	288 (50%)	252 (43%)	232 (40%)	0.005	0.03
Physical findings						
BMI, kg/m ²	28 ± 15	28 ± 5	29 ± 13	28 ± 5	0.84	0.87
Systolic BP (mm Hg)	130 ± 21	129 ± 21	127 ± 21	129 ± 21	0.27	0.73
HR (BPM)	72 ± 14	71 ± 13	73 ± 14	75 ± 15	<0.001	<0.001
Killip Class II-IV	34 (6%)	42 (7%)	66 (12%)	64 (11%)	<0.001	0.001
Diagnostic Testing						
Creatinine clearance ≤ 90	223 (40%)	203 (37%)	214 (38%)	221 (40%)	0.83	0.92
CK-MB > ULN	279 (72%)	264 (73%)	305 (76%)	311 (76%)	0.15	0.23
cTnI > 1.5 ng/mL	144 (25%)	137 (24%)	159 (28%)	187 (33%)	0.002	0.006
BNP > 80 pg/mL	278 (49%)	274 (48%)	313 (55%)	290 (51%)	0.18	0.48
CRP > 1.5 ng/mL	55 (38%)	74 (34%)	102 (43%)	128 (55%)	<0.001	0.002
ST deviation > 1mm	288 (50%)	262 (46%)	264 (45%)	267 (46%)	0.26	0.28
Extent of CAD (50% stenosis)						
0 vessel	17 (7%)	18 (6%)	22 (7%)	26 (8%)	0.42	0.49
1 vessel	77 (30%)	100 (34%)	113 (35%)	110 (34%)	0.29	0.26
2 vessel	70 (27%)	90 (31%)	89 (28%)	85 (27%)	0.60	0.85
3 vessel	92 (36%)	83 (29%)	98 (30%)	98 (31%)	0.31	0.19

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Positive Exercise Test	77 (36%)	62 (36%)	74 (41%)	69 (38%)	0.44	0.63
Ejection Fraction (%)	55 ± 12	55 ± 13	53 ± 13	53 ± 14	0.09	0.07

Association of MMP-9 With Clinical Outcomes

[0129] The concentration of MMP-9 was significantly higher among patients who died by 30 days ($p=0.002$) or by 10 months ($p<0.0001$) vs. those who were alive at either time point. Similarly, MMP-9 concentrations were higher among patients with nonfatal MI and those with CHF than those free of these endpoints. ($p<0.01$ for each endpoint at both 30 days and 10 months.

Table 2. Association between baseline MMP-9 concentration (ng/mL) and outcomes

Outcome	n	Median [25,75]	p value
30 days			
Dead	34	65 [39,151]	0.002
Alive	2277	43 [24,85]	
Nonfatal MI	61	65 [37,110]	0.006
No MI	2250	43 [24,85]	
CHF	46	65 [35,147]	0.008
No CHF	2265	43 [24,85]	
Death, MI, or CHF	116	65 [36,145]	<0.001
No Death MI, or CHF	2195	42 [24,84]	
10 months			
Dead	78	64 [39,142]	<0.001
Alive	2233	43 [24,85]	
Nonfatal MI	112	57 [33,109]	0.002
No MI	2199	43 [24,84]	
CHF	67	64 [37,142]	0.002
No CHF	2244	43 [24,85]	
Death, MI, or CHF	205	64 [35,118]	<0.001
No Death MI, or CHF	2106	42 [24,83]	

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- [0130] Unadjusted mortality increased with each successive quartile of MMP-9 concentration ($p < 0.001$). Similar associations were observed between MMP-9 and the composite of death and nonfatal MI ($p < 0.001$) and between MMP-9 and congestive heart failure ($p < 0.001$). A directionally consistent association was observed between
- 5 MMP-9 and mortality in subgroups of patients defined by time from symptom onset to treatment, index diagnosis, gender, diabetes, and age.

Table 3. Subgroup analyses for 10-month mortality

Group	n	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	p trend	p q4 v q1
All pts	2311	3 (0.5%)	20 (4.3%)	27 (6.1%)	28 (6.3%)	<0.001	<0.001
Time CP to randomization							
0-24 hrs	508	0 (0%)	4 (4.8%)	10 (12.9%)	7 (5.3%)	0.02	0.02
>24-48 hrs	915	0 (0%)	9 (4.6%)	9 (4.5%)	15 (8.5%)	0.003	<0.001
> 48 hrs	862	2 (0.9%)	6 (2.9%)	8 (4.3%)	6 (4.9%)	0.28	0.11
Index dx							
STEMI	750	0 (0%)	4 (2.5%)	8 (5.1%)	9 (6.2%)	<0.05	0.008
NSTEMI	518	1 (0.8%)	7 (8.7%)	7 (5.5%)	10 (9.8%)	0.07	0.008
UAP	1042	2 (0.8%)	9 (3.7%)	12 (6.7%)	9 (4.7%)	0.07	0.02
Gender							
male	1660	2 (0.5%)	12 (3.9%)	20 (6.5%)	16 (5.7%)	0.002	<0.001
female	651	1 (0.7%)	8 (5.0%)	7 (5.1%)	12 (7.3%)	0.08	0.008
Diabetes							
present	496	1 (0.8%)	6 (5.8%)	6 (5.5%)	12 (11.6%)	0.03	0.003
absent	1814	2 (0.5%)	14 (3.9%)	21 (6.3%)	16 (4.7%)	0.003	0.001
Age							
< 65	1402	0 (0%)	4 (1.4%)	14 (4.9%)	8 (3.4%)	0.001	0.006
> 65	896	3 (1.4%)	16 (9.2%)	13 (8.1%)	20 (10.9%)	0.007	<0.001

The percentages represent survival estimates.

Association of total cTnI With Baseline Clinical Variables

- [0131] Data were evaluated from 2523 patients. Higher baseline levels of total cTnI were associated with male gender, absence of diabetes, absence of prior coronary artery disease, absence of hypertension requiring treatment, and tobacco use, but not with older age or race. Higher total cTnI levels were associated with renal function, electrocardiographic changes, Killip Class > I, and elevated levels of CK-MB. (Table

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- 4) In contrast, total cTnI was not associated with body mass index, the extent of coronary artery disease measured at coronary angiography, stress test, or race. There was no association between the concentration of total cTnI and the time from symptom onset to enrollment in the trial. There was no association between the concentration of total cTnI and CRP ($R=0.05$; $p=0.16$) or fibrinogen ($R=0.04$; $p=0.18$) (Table 5).
- 5

Table 4
Association between Baseline Variables and Quartiles of Baseline Marker Concentrations
Total Troponin I

	≤ 53.6	53.6-346	346-1816	>1816	p trend	p Q4 vs Q1
Range of marker levels	0-53.6	53.8-346	346.6-1811.5	1820.3-69719		
Time from onset to random (hrs)	36.99 ± 20.53	41.29 ± 20.7	44.28 ± 20.06	37.74 ± 17.74	0.1518	0.5085
Age (years)	61.66 ± 11.41	61.58 ± 11.49	60.04 ± 11.45	59.24 ± 11.65	0	0.0002
Male	409 (64.7%)	437 (69.4%)	464 (73.7%)	506 (80.2%)	0	0
White	596 (94.3%)	590 (93.7%)	589 (93.5%)	597 (94.6%)	0.8565	0.811
Hypertension req rx	308 (48.7%)	297 (47.2%)	223 (35.5%)	230 (36.5%)	0	0
Prior CAD ^a	441 (69.8%)	367 (58.3%)	258 (41%)	194 (30.7%)	0	0
PCI for index event	120 (19%)	179 (28.4%)	170 (27%)	206 (32.6%)	0	0
Periph AVD	58 (9.2%)	54 (8.6%)	39 (6.2%)	28 (4.4%)	0.0003	0.001
Prior CVA/TIA ^a	45 (7.1%)	46 (7.3%)	34 (5.4%)	30 (4.8%)	0.0359	0.0771
Diabetes	158 (25%)	147 (23.3%)	131 (20.8%)	118 (18.7%)	0.0038	0.0071
Family history of CAD	258 (41.2%)	273 (43.8%)	237 (37.9%)	240 (38.3%)	0.098	0.2985
Hypercholesterolemia	225 (35.7%)	210 (33.4%)	154 (24.5%)	121 (19.2%)	0	0
Current smoker	169 (26.9%)	220 (34.9%)	256 (40.7%)	276 (43.9%)	0	0
Never smoker	223 (35.3%)	203 (32.2%)	191 (30.4%)	175 (28.3%)		
Past smoker	236 (37.6%)	207 (32.9%)	182 (28.9%)	175 (27.8%)		
STEMI	38 (6%)	99 (15.7%)	262 (41.7%)	428 (67.8%)	0	0
NSTEMI	36 (5.7%)	114 (18.1%)	240 (38.2%)	172 (27.3%)		
UA	557 (88.3%)	417 (66.2%)	127 (20.2%)	31 (4.9%)		
Aspirin prior	353 (55.9%)	309 (49.2%)	205 (32.5%)	144 (22.8%)	0	0
Prior heparin	502 (79.4%)	551 (87.6%)	568 (90.2%)	590 (93.5%)	0	0
Beta blockers prior	242 (38.4%)	201 (31.9%)	139 (22.1%)	112 (17.8%)	0	0
Hypolipidemic agents prior	178 (28.3%)	160 (25.6%)	109 (17.4%)	84 (13.3%)	0	0
BMI	28.84 ± 14.67	28.62 ± 12.23	27.96 ± 4.71	27.9 ± 4.58	0.0568	0.1028
Systolic BP (mm Hg)	132.16 ± 20.76	131.93 ± 21.19	126.62 ± 20.01	124.58 ± 19.98	0	0
Diastolic BP (mm Hg)	75.33 ± 12.28	74.71 ± 12.16	73.58 ± 12.52	73.28 ± 12.97	0.0011	0.0037
Killip II-IV	53 (8.5%)	52 (8.4%)	52 (8.3%)	76 (12.1%)	0.0433	0.0407
Creatinine clearance ≤ 90	260 (43%)	227 (38.3%)	217 (35.9%)	202 (33.9%)	0.0008	0.0012
CK > ULN	99 (17.6%)	210 (36%)	503 (83.6%)	603 (97.7%)	0	0
CK-MB > ULN	93 (29.7%)	200 (55.9%)	445 (90.8%)	516 (98.1%)	0	0
CTnI ≥ 0.4 ng/mg	42 (32.3%)	114 (62.6%)	126 (84%)	125 (83.7%)	0	0
ST depression > 0.5mm	269 (42.6%)	292 (46.3%)	313 (49.7%)	354 (56.1%)	0	0
T wave inversion > 3mm	176 (27.8%)	170 (27%)	154 (24.4%)	124 (19.7%)	0.0004	0.0006
New LBBB	12 (2%)	14 (2.3%)	7 (1.1%)	8 (1.3%)	0.1663	0.3411
Angiography: number of vessels with ≥ 50%						

WO 02/089657

PCT/US02/14219

stenosis						
None	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.9572	1
1 vessel	3 (18.8%)	1 (5%)	4 (17.4%)	2 (6.5%)		
2 vessel	10 (62.5%)	12 (60%)	8 (34.8%)	22 (71%)		
≥3 vessels	5 (18.8%)	7 (35%)	11 (47.8%)	7 (22.6%)		
LVEF (%)	53.98 ± 13.35	56.13 ± 11.82	55.88 ± 12.55	50.42 ± 12.01	0.043	0.0556
Stress test positive	67 (39.4%)	61 (34.5%)	87 (38.8%)	79 (36.7%)	0.5179	0.4108
Stress test indeterminate	29 (17.1%)	29 (16.4%)	28 (12.5%)	31 (14.4%)		
Stress test negative	74 (43.5%)	87 (49.2%)	109 (48.7%)	105 (48.8%)		

[§] Prior CAD: previous MI, documented unstable angina, angina pectoris, angiographically confirmed CAD, prior PTCR or CABG not for index event.

[†] Prior CVA/TIA: Cerebrovascular arterial disease, prior non-haemorrhagic stroke or prior TIA.

Table 5
Simple Correlation between Baseline Marker Levels & Continuous Baseline Variables
Total Troponin I

	R value	p*
Age (years)	0.05	0.0113
BMI	0.02	0.3959
Maximum recorded CK-MB (% of ULN)	0.36	0
CRP (mg/dl)	0.05	0.1591
Fibrinogen (mg/dl)	0.04	0.1752
LVEF (%)	0.19	0.0003
Creatinine clearance	0.03	0.1333

* p value based on Pearson's product moment correlation coefficient.

The p value based on Pearson's product moment correlation coefficient tests whether a linear relationship between the marker and the baseline variable is valid. The R value indicates how closely the observed points are to the fitted line.
Association of total cTnI With Clinical Outcomes

- [0132] The concentration of total cTnI was significantly higher among patients who died by 30 days (p=0.004) vs. those who were alive at the same time point. Similarly, total cTnI concentrations were higher among patients with a combined endpoint of death or nonfatal MI than those free of these endpoints. (p<0.01 for each endpoint at both 30 days and 10 months (Tables 6 and 7).

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Table 6
Correlation between Baseline Marker Concentrations and 30 Day Outcomes
Total Troponin I

Outcome	n	mean $\pm$ SD	median (25, 75)	p
Dead	40	4656.93 $\pm$ 10309.66	1293.5 (104.3,4990.12)	0.0041
Alive	2483	2144.1 $\pm$ 5334.8	335.4 (53.45,1775.8)	
MI	70	3248.72 $\pm$ 10172.18	219.9 (67.9,1820.75)	0.1005
No MI	2453	2153.55 $\pm$ 5310.15	346.6 (53.2,1811.5)	
Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	81	2226.51 $\pm$ 5366.63	470.8 (70.1,1744.4)	0.9436
No Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2442	2182.52 $\pm$ 5508.1	338.5 (53.52,1818.1)	
Death/MI	103	3901.2 $\pm$ 10514.31	387.3 (69.6,3380.4)	0.0012
No Death/MI	2420	2110.84 $\pm$ 5174.48	337 (52.68,1761.45)	
Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	180	3181.58 $\pm$ 8743.16	433.85 (69.77,2287.88)	0.0116
No Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2343	2107.29 $\pm$ 5165.32	333.7 (52.55,1775.8)	

Table 7
Correlation between Baseline Marker Concentrations and 10 Month Outcomes
Total Troponin I

Outcome	n	mean $\pm$ SD	median (25, 75)	p
Dead	86	3309.64 $\pm$ 7830.37	541.95 (94.72,3882.3)	0.0535
Alive	2437	2144.21 $\pm$ 5400.14	335.4 (52.9,1744.4)	
MI	123	2758.01 $\pm$ 8494.07	200.7 (66.7,1497.6)	0.2356
No MI	2400	2154.51 $\pm$ 5305.09	351.3 (52.92,1829.52)	
Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	145	1981.8 $\pm$ 4703.86	335.4 (70.1,1519.8)	0.6488
No Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2378	2196.26 $\pm$ 5548.18	346.3 (53.42,1826.83)	
Death/MI	190	3181.92 $\pm$ 8575.64	340.45 (69.8,2632.88)	0.0093
No Death/MI	2333	2102.66 $\pm$ 5166.94	346 (52.4,1766.1)	
Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	328	2678.37 $\pm$ 7245.55	346.5 (69.97,1876.8)	0.081
No Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2195	2110.05 $\pm$ 5190.23	346 (52.1,1804.2)	

Association of cTnTIC With Baseline Clinical Variables

- [0133] Data were evaluated from 2439 patients. Higher baseline levels of cTnTIC were associated with male gender, absence of diabetes, absence of prior coronary artery disease, absence of hypertension requiring treatment, and tobacco use, but not with older age or race. Higher cTnTIC levels were associated with renal function, electrocardiographic changes, Killip Class $>$ I, elevated levels of cTnI, and elevated

WO 02/089657

PCT/US02/14219

levels of CK-MB. (Table 8) In contrast, cTnTIC was not associated with body mass index, the extent of coronary artery disease measured at coronary angiography, stress test, or race. There was no association between the concentration of cTnTIC and CRP (R=0.03; p=0.36) or fibrinogen (R=0.04; p=0.29) (Table 9).

5

Table 8
Association between Baseline Variables and Quartiles of Baseline Marker Concentrations
Troponin TIC Complex

	≤16.65	16.65-65.8	65.8-195	>195	p trend	p Q4 vs Q1
Range of marker levels	0-16.6	16.7-65.8	65.9-193.4	196.6-58658.8		
Time from onset to random (hrs)	41.05 ± 20.31	43.25 ± 20.49	42.53 ± 20.82	33.35 ± 16.43	0	0
Age (years)	61.8 ± 11.64	60.76 ± 11.53	60.69 ± 11.35	59.75 ± 11.69	0.003	0.002
Male	381 (62.5%)	437 (71.6%)	437 (71.8%)	484 (79.3%)	0	0
White	579 (94.9%)	570 (93.4%)	571 (93.8%)	583 (95.6%)	0.5822	0.5904
Hypertension req rx	282 (46.3%)	269 (44.2%)	253 (41.5%)	226 (37.1%)	0.0008	0.0012
Prior CAD [†]	383 (62.8%)	356 (58.4%)	282 (46.3%)	207 (33.9%)	0	0
PCI for index event	149 (24.4%)	134 (22%)	175 (28.7%)	185 (30.3%)	0.0022	0.0021
Periph AVD	56 (9.2%)	56 (9.2%)	32 (5.3%)	30 (4.9%)	0.0004	0.0041
Prior CVA/TIA [†]	47 (7.7%)	38 (6.2%)	32 (5.3%)	33 (5.4%)	0.0715	0.1071
Diabetes	154 (25.2%)	118 (19.3%)	142 (23.3%)	119 (19.5%)	0.0789	0.017
Family history of CAD	252 (41.7%)	245 (40.4%)	254 (42.1%)	226 (37.4%)	0.2088	0.1261
Hypercholesterolemia	192 (31.5%)	200 (32.8%)	162 (26.6%)	125 (20.6%)	0	0
Current smoker	196 (32.3%)	212 (34.8%)	219 (36.1%)	255 (41.9%)	0.0026	0.0118
Never smoker	220 (36.3%)	180 (29.5%)	193 (31.8%)	181 (29.7%)		
Past smoker	190 (31.4%)	218 (35.7%)	195 (32.1%)	173 (28.4%)		
STEMI	74 (12.2%)	125 (20.5%)	222 (36.5%)	374 (61.3%)	0	0
NSTEMI	99 (16.3%)	117 (19.2%)	146 (24%)	182 (29.8%)		
UA	436 (71.6%)	367 (60.3%)	241 (39.6%)	54 (8.9%)		
Aspirin prior	288 (47.3%)	305 (50%)	235 (38.7%)	149 (24.5%)	0	0
Prior heparin	520 (85.2%)	505 (82.8%)	537 (88.2%)	572 (93.9%)	0	0
Beta blockers prior	200 (32.8%)	199 (32.6%)	168 (27.6%)	110 (18%)	0	0
Hypolipidemic agents prior	152 (25.1%)	149 (24.5%)	116 (19.1%)	88 (14.4%)	0	0
BMI	28.76 ± 14.91	28.26 ± 5.15	28.41 ± 12.33	27.92 ± 4.55	0.2118	0.162
Systolic BP (mm Hg)	131.87 ± 21.13	129.72 ± 20.49	128.98 ± 20.62	125.55 ± 20.25	0	0
Diastolic BP (mm Hg)	74.95 ± 12.5	74.75 ± 11.88	74.32 ± 12.44	73.38 ± 13.3	0.0244	0.0296
Killip II-IV	40 (6.7%)	49 (8.1%)	62 (10.3%)	77 (12.7%)	0.0002	0.0005
Creatinine clearance ≤ 90	239 (41.6%)	230 (39.4%)	222 (38.9%)	193 (33%)	0.0036	0.0025
CK > ULN	161 (29%)	253 (45.2%)	373 (65.7%)	570 (95%)	0	0
CK-MB > ULN	173 (50.6%)	211 (50.6%)	336 (78.9%)	484 (96.8%)	0	0
cTnI ≥ 0.4 ng/mg	81 (54%)	78 (55.3%)	109 (73.6%)	117 (81.8%)	0	0
ST depression > 0.5mm	274 (44.9%)	271 (44.4%)	309 (50.7%)	344 (56.4%)	0	0.0001
T wave inversion > 3mm	170 (27.9%)	169 (27.7%)	138 (22.7%)	126 (20.7%)	0.0007	0.0034
New LBBB	10 (1.7%)	13 (2.2%)	8 (1.3%)	10 (1.7%)	0.6932	0.9698
Angiography: number of vessels with ≥ 50% stenosis						
None	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.3038	1
1 vessel	5 (45.5%)	1 (4.3%)	2 (8%)	2 (8%)		

73

WO 02/089657

PCT/US02/14219

2 vessel	5 (45.5%)	13 (56.5%)	15 (60%)	15 (60%)		
≥3 vessels	1 (9.1%)	9 (39.1%)	8 (32%)	8 (32%)		
LVEF (%)	53.49 ± 11.36	58.29 ± 12.34	53.84 ± 13.35	50.53 ± 12.17	0.0203	0.1235
Stress test positive	70 (40.5%)	79 (38%)	60 (32.8%)	71 (37.4%)	0.6382	0.5086
Stress test indeterminate	25 (14.5%)	34 (16.3%)	31 (16.9%)	27 (14.2%)		
Stress test negative	78 (45.1%)	95 (45.7%)	92 (50.3%)	92 (48.4%)		

³ Prior CAD: previous MI, documented unstable angina, angina pectoris, angiographically confirmed CAD, prior PTCT or CABG not for index event.

⁴ Prior CVA/TIA: Cerebrovascular arterial disease, prior non-haemorrhagic stroke or prior TIA.

Table 9
Simple Correlation between Baseline Marker Levels & Continuous Baseline Variables
Troponin TIC Complex

	R value	p [*]
Age (years)	0.02	0.3448
BMI	0	0.9317
Maximum recorded CK-MB (% of ULN)	0.22	0
CRP (mg/dl)	0.03	0.3579
Fibrinogen (mg/dl)	0.04	0.2861
LVEF (%)	0.07	0.186
Creatinine clearance	0.03	0.1679

^{*} p value based on Pearson's product moment correlation coefficient.

The p value for Pearson's product moment correlation coefficient tests whether a linear relationship between the marker and the baseline variable is valid. The R value indicates how closely the observed points are to the fitted line.

Association of cTnTIC With Clinical Outcomes

- 5 [0134] The concentration of cTnTIC was significantly higher among patients who died by 30 days ($p < 0.05$) vs. those who were alive at the same time point (Table 10). The trend of lower quartile cTnTIC concentrations was associated with an increased frequency of ischemia requiring urgent revascularization at 10 months (Table 11). In contrast, the trend of higher quartile cTnTIC concentrations was associated with an increased frequency of death, ischemia requiring urgent revascularization, and the combined endpoint of death, non-fatal MI, or ischemia requiring urgent
- 10

WO 02/089657

PCT/US02/14219

revascularization at 30 days post-event in patients with no history of smoking (Table 12).

Table 10
Correlation between Baseline Marker Concentrations and 30 Day Outcomes
Troponin TIC Complex

Outcome	n	mean $\pm$ SD	median (25, 75)	p
Dead	40	1255.76 $\pm$ 3208.86	163.3 (23.15, 973.55)	0.0492
Alive	2399	479.48 $\pm$ 2460.34	65.5 (16.65, 188.85)	
MI	70	685.68 $\pm$ 2837.65	50.75 (6.25, 287.27)	0.5071
No MI	2369	486.49 $\pm$ 2464.51	66.3 (17, 193.2)	
Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	82	411.49 $\pm$ 1422.44	82.95 (15.7, 260.42)	0.764
No Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2357	495.02 $\pm$ 2504.38	65.6 (16.7, 189.6)	
Death/MI	103	933.03 $\pm$ 3070.43	64.3 (12.35, 442.65)	0.0648
No Death/MI	2356	472.77 $\pm$ 2444.99	65.85 (16.95, 188.42)	
Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	181	710.78 $\pm$ 2513.32	66.1 (12.8, 334.3)	0.2171
No Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	2258	474.69 $\pm$ 2472.24	65.7 (17, 187.05)	

5

Table 11
Associations between Baseline Marker Concentrations and 10 Month Outcomes
Troponin TIC Complex

	≤ 16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		p trend	p Q4 vs Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	610		610		609		610			
Death	23	5	16	3.5	15	3.1	32	6.3	0.1619	0.1678
MI	44	8.6	32	5.9	21	4.6	27	5.7	0.0162	0.059
Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	40	7.7	40	8.8	30	5.6	36	6.1	0.4682	0.7325
Death or MI	56	10.9	45	8.7	35	7.5	55	11.1	0.7577	0.9498
Death/MI/Ischemia $\rightarrow$ Urgent Revasc	93	17.7	85	17.4	64	12.9	88	16.6	0.439	0.853

With the exception of cause of death, percentages are kaplan-meier events rates with follow up censored at 10 months.
p values are from Cox regression analysis.

Table 12
Association between Baseline Marker Concentrations and 30 Day Outcomes
Troponin TIC Complex
Smoking: Never smoked

WO 02/089657

PCT/US02/14219

	≤ 16.65		16.65-65.8		65.8-195		>195		p trend	p Q4 vs Q1
	n	%	n	%	n	%	n	%		
	220		180		193		181			
Death	4	1.8	2	1.2	3	1.6	11	6.1	0.0178	0.0351
MI	9	4.1	7	4.1	4	2.1	6	3.5	0.4843	0.7361
Ischemia → Urgent Revasc	1	0.5	7	4.1	7	3.7	11	6.2	0.0042	0.0111
Death or MI	11	5	8	4.6	6	3.1	16	8.9	0.1884	0.1254
Death/MI/Ischemia → Urgent Revasc	12	5.5	15	8.7	13	6.8	26	14.5	0.0054	0.0029

Association of BNP With Baseline Clinical Variables

[0135] Data were evaluated from 2525 patients. Higher baseline quartile levels of BNP were associated with age, hypertension, and tobacco use. Higher quartile BNP levels were associated with history of congestive heart failure, renal function, electrocardiographic changes, Killip Class > I, and elevated levels of CK-MB. (Table 13) In contrast, the quartile BNP concentration was not associated with prior history of coronary artery disease, body mass index, and diabetes. There was a significant correlation between the concentration of BNP and the continuous baseline variables CRP ($R=0.2$; $p<0.0001$), fibrinogen ($R=0.18$; $p<0.0001$), LVEF ($R=0.23$, $p<0.0001$). The correlation between BNP concentration and body mass index was modest ($R=0.06$) (Table 14). In addition, higher mean BNP concentrations were significantly associated with the number of vessels with 50% stenosis or greater, lower ejection fraction, and positive stress test results (Table 15).

Table 13
Baseline Clinical Characteristics According to Quartiles of BNP (pg/mL)

	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	p trend	p Q4 vs Q1
Range of BNP levels, pg/mL	0-43.6	43.7-81.2	81.3-137.8	137.9-1456.6		
n	631	632	632	630		
Time to randomization (hrs)	39 ± 21	40 ± 21	41 ± 20	41 ± 19	0.04	0.10
Age (years)	57 ± 10	59 ± 11	61 ± 12	66 ± 11	<0.0001	<0.0001
Male	474 (75%)	465 (74%)	472 (75%)	405 (64%)	0.0001	<0.0001
White	575 (91%)	592 (94%)	605 (96%)	603 (96%)	0.0002	0.001
Past Medical History						
Hypertension	246 (39%)	254 (40%)	263 (42%)	298 (47%)	0.003	0.003
Congestive Heart Failure	26 (4%)	28 (4%)	26 (4%)	56 (9%)	0.0006	0.0008

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Coronary artery disease*	329 (52%)	312 (49%)	294 (47%)	327 (52%)	0.7	0.9
Peripheral vascular disease	33 (5%)	43 (7%)	48 (8%)	57 (9%)	0.008	0.009
Cerebrovascular disease	24 (4%)	32 (5%)	39 (6%)	60 (10%)	<0.0001	0.0001
Diabetes	138 (22%)	133 (21%)	132 (21%)	152 (24%)	0.4	0.3
Family history of CAD	268 (43%)	260 (41%)	253 (41%)	232 (37%)	0.045	0.04
Hypercholesterolemia	199 (32%)	191 (30%)	173 (28%)	149 (24%)	0.0009	0.002
Smoking status:					0.0002	0.001
Current smoker	233 (37%)	263 (42%)	236 (38%)	189 (30%)		
Never smoker	193 (31%)	161 (26%)	185 (29%)	254 (40%)		
Past smoker	204 (32%)	205 (33%)	209 (33%)	186 (30%)		
Index Diagnosis:					<0.0001	<0.0001
ST elevation MI	141 (22%)	189 (30%)	231 (37%)	264 (42%)		
Non ST elevation MI	87 (64%)	137 (22%)	159 (25%)	182 (29%)		
Unstable angina	402 (64%)	306 (48%)	241 (38%)	184 (29%)		
Physical findings						
BMI kg/m ²	29 ± 5	28 ± 5	28 ± 14	28 ± 12	0.1	0.08
Systolic BP (mm Hg)	130 ± 20	129 ± 19	128 ± 22	129 ± 21	0.3	0.4
Killip Class II-IV	31 (5%)	36 (6%)	56 (9%)	109 (18%)	<0.0001	<0.0001
Diagnostic Testing						
Creatinine clearance ≤ 90	146 (24%)	185 (31%)	229 (38%)	350 (58%)	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	212 (58%)	308 (72%)	349 (79%)	388 (86%)	<0.0001	<0.0001
ST depression > 0.5mm	270 (43%)	297 (47%)	311 (49%)	356 (57%)	<0.0001	<0.0001
T wave inversion > 3mm	137 (22%)	146 (23%)	171 (27%)	167 (27%)	0.02	0.047

* Prior coronary artery disease: previous MI, documented unstable angina, angina pectoris, angiographically confirmed CAD, prior PTOR or CABG not for index event.

Table 14
Correlation between BNP Levels & Continuous Baseline Variables

	R value	p value
Age (years)	0.28	<0.0001
BMI	0.06	0.006
Maximum recorded CK-MB (% of ULN)	0.09	0.0005
CRP (mg/dl)	0.2	<0.0001
Fibrinogen (mg/dl)	0.18	<0.0001
LVEF (%)	0.23	<0.0001
Creatinine clearance	0.28	<0.0001

5

Table 15. Association between cardiac test results and BNP concentration

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Test	Result	n	BNP (Mean $\pm$ SD)	p value
Coronary Angiography:	None	27	68 $\pm$ 48	<0.0001
No. vessels with $\geq$	1	220	83 $\pm$ 65	
50% stenosis	2	106	98 $\pm$ 98	
	≥ 3	79	143 $\pm$ 145	
LV Ejection Fraction	$\leq 50\%$	156	136 $\pm$ 161	0.003
	$> 50\%$	189	96 $\pm$ 78	
Stress test	Positive	296	118 $\pm$ 118	0.003
	Indeterminate	118	118 $\pm$ 128	
	Negative	374	91 $\pm$ 95	

Association of BNP With Clinical Outcomes

- 5 [0136] The concentration of BNP was significantly higher among patients who died by 30 days ($p < 0.0001$) and 10 months ($p < 0.0001$) vs. those who were alive at the same time points (Table 16). Furthermore, the BNP concentration was significantly higher among patients who experienced a non-fatal MI by 30 days ($p = 0.01$) and 10 months ($p = 0.02$) vs. those who did not (Table 16). The relationship between higher BNP
- 10 concentration and death by 30 days and 10 months also was observed in an analysis of subgroups based on index diagnosis (Table 17).

Table 16. Association between baseline BNP concentration (pg/mL) and outcomes

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Outcome	n	Median [25,75]	Mean $\pm$ SD	p value
30 days				
Dead	39	153 [79,294]	226 $\pm$ 204	<0.0001
Alive	2486	80 [43,135]	113 $\pm$ 124	
MI	70	109 [50,159]	152 $\pm$ 159	0.01
No MI	2455	80 [44,137]	113 $\pm$ 125	
10 months				
Dead	85	143 [88,308]	228 $\pm$ 228	<0.0001
Alive	2440	79 [43,133]	110 $\pm$ 120	
MI	124	101 [50,161]	141 $\pm$ 140	0.02
No MI	2401	80 [43,134]	113 $\pm$ 126	

Table 17. Association between baseline BNP concentration (pg/ml) and 10-month outcomes in subgroups based on index diagnosis.

Outcome	n	Median [25,75]	Mean $\pm$ SD	p value
ST elevation MI	825	96 [56,161]	131 $\pm$	
Dead by 30 days	13	153 [77,265]	236 $\pm$ 220	0.002
Alive at 30 days	812	95 [56,161]		
Dead by 10 months	23	150 [90,227]	199 $\pm$ 176	0.008
Alive at 10 months	802	95 [55,161]	129 $\pm$ 123	
Non-ST elevation ACS	1698	72 [39,124]	106 $\pm$	
Dead by 30 days	26	149 [84,307]	220 $\pm$ 200	<0.0001
Alive at 30 days	1672	71 [39,123]	105 $\pm$ 124	
Dead by 30 days	62	142 [88,320]	239 $\pm$ 245	<0.0001
Alive at 30 days	1636	70 [38,121]	101 $\pm$ 117	
Unstable Angina	1133	60 [33,105]	92 $\pm$	
Dead by 30 days	14	94 [69,237]	182 $\pm$ 195	0.002
Alive at 30 days	1119	60 [33,105]	90 $\pm$ 109	
Dead by 10 months	34	96 [70,265]	233 $\pm$ 292	<0.0001

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Alive at 10 months	1099	58 [33,104]	87 ± 97
--------------------	------	-------------	---------

Association of FABP With Baseline Clinical Variables

- 5 [0137] Data were evaluated from 2287 patients. The association of FABP with baseline clinical variables was performed using a FABP cutpoint of 8 ng/mL. Higher baseline levels of FABP were associated with age, history of congestive heart failure, renal function, electrocardiographic changes, Killip Class > I, and elevated levels of CK-MB, cTnI, BNP, and CRP (Table 18). In contrast, the quartile FABP concentration
- 10 was not associated with prior history of coronary artery disease, body mass index, hypertension, and diabetes. There was a significant correlation between the concentration of FABP and the cTnI concentration ($R=0.21$; $p<0.0001$). The correlations between FABP concentration and other continuous variables were modest ($R^2<0.03$) (Table 19).

15 **Table 18. Baseline Clinical Characteristics According to Baseline FABP (ng/mL)**

	FABP <=8	FABP >8	p
Range, ng/mL	<8	8-434.2	
n	1955	332	
Time to randomization (hrs)	42 ± 19	33 ± 19	<0.0001
Age (years)	60 ± 11	65 ± 12	<0.0001
Male	1401 (72%)	244 (73%)	0.5
White	1833 (94%)	315 (95%)	0.4
Past Medical History			
Hypertension	820 (42%)	140 (42%)	1.0
Congestive Heart Failure	89 (5%)	29 (9%)	0.001
Coronary artery disease	983 (50%)	155 (47%)	0.2
PCI for index event	670 (34%)	105 (32%)	0.3
Peripheral vascular disease	132 (7%)	24 (7%)	0.8
Cerebrovascular disease	57 (3%)	10 (3%)	0.9
Diabetes	428 (22%)	65 (20%)	0.3
Family history of CAD	793 (41%)	111 (34%)	0.02
Hypercholesterolemia	576 (30%)	72 (22%)	0.003
ASA in 2 wks prior	799 (41%)	120 (36%)	0.1
Lipid rx 2 wks prior	426 (22%)	53 (16%)	0.01
Heparin prior to rand	1734 (89%)	278 (84%)	0.009
ACE management	1577 (81%)	248 (75%)	0.01
B-blocker prior	538 (28%)	86 (26%)	0.5
Smoking status:			0.08
Current smoker	37%	31%	
Never smoker	31%	36%	
Past smoker	32%	33%	
Index Diagnosis:			<0.001
ST elevation MI	29%	52%	
Non ST elevation MI	22%	24%	
Unstable angina	49%	24%	
Physical findings			

WO 02/089657

PCT/US02/14219

BMI kg/m ²	28 ± 11	28 ± 5	0.4
Systolic BP (mm Hg)	129 ± 21	130 ± 22	0.2
HR (BPM)	72 ± 14	74 ± 16	0.03
Killip Class II-IV	150 (8%)	56 (17%)	<0.001
Diagnostic Testing			
Creatinine clearance ≤ 90	679 (36%)	167 (53%)	<0.001
CK-Cr (cc/min)	106 ± 40	92 ± 40	<0.0001
CK-MB > ULN	909 (71%)	240 (91%)	<0.001
CTnl > 1.5 ng/ml	232 (22%)	194 (59%)	<0.001
BNP > 80 pg/ml	908 (47%)	240 (73%)	<0.001
CRP > 1.5 ng/ml	262 (40%)	79 (50%)	0.03
ST deviation > 1mm	857 (44%)	212 (64%)	<0.001
T wave inversion > 3mm	278 (24%)	82 (25%)	0.9
Extent CAD (50% stenosis)			
0 vessel	7%	4%	0.3
1 vessel	33%	35%	
2 vessel	28%	30%	
3 vessel	32%	32%	
Pos ETT	245 (37%)	32 (37%)	0.2
EF (%)	55 ± 12	49 ± 13	<0.0001

Table 19. Correlation between FABP and Continuous variables

Variable	R ²	P value
Time CP to randomization	0.02	<0.0001
Age	0.007	0.0001
BMI	0.0006	0.25
CKMB peak	0.024	<0.0001
BIOSITE cTnl	0.21	<0.0001
CRP	0.0001	0.75
Fibrinogen	0.003	0.002
BNP	0.006	0.0002
Creatinine Clearance	0.008	0.008
LVEF	0.02	<0.0001

Association of FABP With Clinical Outcomes

- 5 [0138] The mean concentration of FABP was significantly higher among patients who died by 30 days (p<0.0001) and 10 months (p<0.0001) vs. those who were alive at the same time points (Table 20). The mean FABP concentration was significantly higher among patients with the combined endpoints of death, non-fatal MI, or urgent revascularization by 30 days (p<0.0001) and 10 months (p<0.0001) vs. those who did not have these endpoints (Table 20). Furthermore, the mean FABP concentration was significantly higher among patients who had CHF by 30 days (p<0.0001) and 10 months (p<0.0001) vs. those who did not (Table 20). These relationships maintained

WO 02/089657

PCT/US02/14219

statistical significance when the FABP concentration was classified either as positive (FABP>8) or negative (FABP = 8 or less) (Table 21).

Table 20. Association between baseline FABP concentration (ng/mL) and outcomes

Outcome	n	Mean $\pm$ SD	p value*
30 days			
Dead	33	22.8 $\pm$ 27.5	
Alive	2254	10.5 $\pm$ 14.7	<0.0001
Death or MI	86	17.2 $\pm$ 22.0	<0.0001
No Death or MI	2201	10.4 $\pm$ 14.6	
D/MI/UR	157	16.2 $\pm$ 37.6	<0.0001
No D/MI/UR	2130	10.3 $\pm$ 11.7	
CHF	46	20.2 $\pm$ 21.0	<0.0001
No CHF	2241	10.5 $\pm$ 14.8	
10 months			
Dead	76	18.3 $\pm$ 22.7	<0.0001
Alive	2211	10.5 $\pm$ 14.6	
Death or MI	169	14.5 $\pm$ 18.3	<0.0001
No Death or MI	2118	10.4 $\pm$ 14.7	
D/MI/UR	294	13.7 $\pm$ 28.5	<0.0001
No D/MI/UR	1993	10.3 $\pm$ 11.7	
CHF	66	17.5 $\pm$ 18.5	<0.0001
No CHF	2221	10.5 $\pm$ 14.8	

5 * Wilcoxon rank sum test

Table 21. Association between baseline FABP and outcomes

Outcome	FABP Neg	FABP Pos	P value
n	1955	332	
30 day			
Death	19 (1.0%)	14 (4.2%)	<0.001
MI	45 (2.3%)	14 (4.2%)	0.04

WO 02/089657

PCT/US02/14219

UR	58 (3.0%)	16 (4.8%)	0.08
D/MI	59 (3.0%)	27 (8.1%)	<0.001
D/MI/UR	116 (5.9%)	41 (12.4%)	<0.001
CHF	24 (1.2%)	22 (6.3%)	<0.001
10 month			
(estimates)			
Death	46 (3.1%)	30 (12.4%)	<0.0001
MI	88 (5.6%)	22 (9.4%)	0.05
UR	109 (6.4%)	22 (7.4%)	0.34
D/MI	120 (7.8%)	49 (21.4%)	<0.0001
D/MI/UR	226 (14.4%)	68 (29.0%)	<0.0001
CHF	30 (2.0%)	21 (8.1%)	<0.0001
D/MI/CHF	140 (9.3%)	56 (23.5%)	<0.0001

Association of TpP With Baseline Clinical Variables

- [0139] Data were evaluated from 2349 patients. Higher baseline levels of TpP were associated with age, history of coronary artery disease, renal function, history of CHF, aspirin use, and inversely associated with Caucasian race, and heparin therapy (Table 22). In contrast, the TpP concentration was not associated with heart rate, Killip Class > I, body mass index, hypertension, the extent of coronary artery disease, and diabetes.

10 Table 22. Baseline Clinical Characteristics According to Quartiles of TpP in OPUS-TIMI 16

Endpoints	TpP Quartile				p value global χ^2
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	
Range	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160	
N	596	590	577	586	
Time to randomization	39	41	43	40	0.07
<i>Demographics</i>					
Age (yrs)	59	60	62	62	0.002
Male	76%	70%	71%	69%	0.01
White	94%	93%	96%	93%	0.1
<i>PMH</i>					
Hypertension	37%	43%	44%	43%	0.076
Diabetes	18%	22%	22%	24%	0.06
Current smoker	39%	38%	35%	34%	
Hyperlipidemia	25%	30%	28%	31%	0.1
FFHx	39%	40%	39%	42%	0.69
Prior CAD	41%	49%	53%	56%	<0.001

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Prior MI					
Prior CHF	2.0%	5.7%	5.6%	7.5%	<0.001
<i>Index Diagnosis</i>					
STEMI	44%	28%	30%	29%	
NSTEMI	23%	24%	24%	19%	
UA	33%	48%	47%	52%	
<i>Meds prior to random.</i>					
ASA	33%	39%	43%	46%	<0.001
Heparin	93%	88%	88%	83%	<0.001
<i>Physical Findings</i>					
BMI (kg/m ²)	27	29	28	29	0.19
SBP (mm Hg)	127	129	130	129	0.16
HR (bpm)	72	73	72	73	0.3
Killip Class II-IV	7.5%	8.3%	8.6%	11.2%	0.14
<i>Diagnostic Testing</i>					
CrCl $\leq$ 90 ml/min	35%	37%	44%	40%	0.02
TnI $>$ 1.5 ng/mL	36%	25%	26%	23%	<0.001
CRP $>$ 1.5 mg/dL	42%	46%	38%	46%	0.24
BNP $>$ 80 pg/mL	52%	49%	56%	46%	0.01
ST deviation $>$ 1 mm	49%	45%	47%	46%	0.47
<i>Extent of CAD</i>					
0VD	7%	8%	5%	7%	
1VD	39%	27%	39%	33%	
2VD	30%	30%	24%	28%	
3VD	23%	35%	32%	32%	

Association of TpP With Clinical Outcomes

- [0140] The TpP concentration was significantly higher among patients who died by 10 months ($p<0.05$) vs. those who were alive at the same time points (Table 23). The TpP concentration was significantly higher among patients who experienced ischemia requiring hospitalization by 10 months ($p=0.0062$) vs. those who did not (Table 23). The TpP concentration was significantly higher among patients with the combined endpoints of death or non-fatal MI, as well as death, non-fatal MI, or urgent revascularization by 10 months ($p<0.02$) vs. those who did not experience these endpoints (Table 23).

Table 23. Rates of Death, MI, CHF, Urgent Revasc, and Ischemia in OPUS-TIMI 16

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Endpoints	1 st	TpP Quartile			p value χ ² for trend
	2 nd	3 rd	4 th		
Range	0-4.8	4.9-8.9	9-15.9	16-160	
N	596	590	577	586	
<i>10-Month Outcomes</i>					
Death	2.68	2.37	3.64	4.44	0.047
MI	4.03	4.75	5.03	5.46	0.24
CHF	2.35	2.37	3.64	2.90	0.34
Urg Revasc	4.53	5.08	7.45	6.31	0.074
Ischemia → Re-hosp	4.70	5.93	8.67	8.02	0.0062
D/MI	5.87	6.44	7.97	9.22	0.016
D/MI/CHF	7.38	7.97	9.36	10.24	0.055
D/MI/UR	10.40	11.36	14.90	15.19	0.0038

Association of MCP-1 With Baseline Clinical Variables

[0141] Data were evaluated from 2270 patients. Higher baseline levels of MCP-1 were associated with age, history of coronary artery disease, renal function, history of CHF, diabetes, hypertension, Killip Class > I, and aspirin use (Table 24). In contrast, the MCP-1 concentration was not associated with heart rate, body mass index, the extent of coronary artery disease, and smoking.

Table 24. Baseline Clinical Characteristics According to Quartiles of MCP-1 (ng/mL)

	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	p trend	p Q4 vs Q1
Range, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	238.5-7016.3		
n	567	568	568	567		
Time to randomization (hrs)	41 ± 20	40 ± 19	42 ± 20	40 ± 20	0.45	0.54
Age (years)	57 ± 11	59 ± 12	62 ± 11	65 ± 11	<0.0001	<0.0001
Male	433 (76%)	414 (73%)	406 (72%)	375 (66%)	0.0001	<0.0001
White	531 (94%)	532 (94%)	539 (95%)	533 (94%)	0.61	0.81
Past Medical History						
Hypertension	224 (40%)	223 (39%)	238 (42%)	276 (49%)	0.001	0.002
Congestive Heart Failure	18 (3%)	25 (4%)	26 (5%)	45 (8%)	0.0004	<0.0001
Coronary artery disease*	245 (43%)	274 (48%)	291 (51%)	318 (56%)	<0.0001	<0.0001
PCI for index event	201 (35%)	186 (33%)	186 (33%)	199 (35%)	0.91	0.90
Peripheral vascular disease	32 (6%)	32 (6%)	43 (8%)	47 (8%)	0.04	0.08
Cerebrovascular disease	15 (3%)	18 (3%)	16 (3%)	19 (3%)	0.58	0.49
Diabetes	115 (20%)	105 (19%)	124 (22%)	145 (26%)	0.01	0.03
Family history of CAD	242 (43%)	231 (41%)	214 (38%)	211 (38%)	0.21	0.08
Hypercholesterolemia	161 (28%)	167 (29%)	163 (29%)	168 (29%)	0.39	0.41
ASA in 2 wks prior	203 (36%)	230 (40%)	228 (40%)	252 (45%)	0.004	0.002
Lipid rx 2 wks prior	121 (21%)	122 (22%)	115 (20%)	116 (21%)	0.65	0.76

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Heparin prior to rand	508 (90%)	495 (87%)	489 (86%)	506 (89%)	0.75	0.85
Smoking status:					0.24	0.06
Current smoker	215 (38%)	216 (38%)	204 (36%)	177 (31%)		
Never smoker	178 (31%)	175 (31%)	176 (31%)	196 (35%)		
Past smoker	173 (31%)	175 (31%)	188 (33%)	192 (34%)		
Index Diagnosis:					0.01	0.02
ST elevation MI	176 (31%)	187 (33%)	178 (31%)	196 (35%)		
Non ST elevation MI	160 (28%)	111 (20%)	120 (21%)	120 (21%)		
Unstable angina	231 (41%)	269 (47%)	270 (48%)	251 (44%)		
Physical findings						
BMI kg/m ²	28 ± 6	28 ± 4	29 ± 15	29 ± 13	0.28	0.96
Systolic BP (mm Hg)	127 ± 19	129 ± 20	129 ± 22	130 ± 22	0.04	0.004
HR (BPM)	72 ± 14	72 ± 13	73 ± 14	73 ± 15	0.66	0.26
Killip Class II-IV	46 (8%)	37 (7%)	46 (8%)	69 (12%)	0.02	0.003
Diagnostic Testing						
Creatinine clearance ≤ 90	143 (26%)	191 (35%)	225 (42%)	280 (52%)	<0.0001	<0.0001
ClCr (cc/min)	116 ± 42	107 ± 40	103 ± 41	93 ± 37	<0.0001	<0.0001
CK-MB > ULN	300 (79%)	280 (72%)	278 (72%)	284 (75%)	0.25	0.21
CTnl > 1.5 ng/ml	176 (31%)	156 (28%)	138 (25%)	149 (27%)	0.04	0.08
BNP > 80 pg/ml	265 (47%)	260 (47%)	276 (49%)	334 (59%)	<0.0001	<0.0001
CRP > 1.5 ng/ml	83 (43%)	83 (42%)	89 (42%)	94 (47%)	0.51	0.51
ST deviation > 1mm	239 (42%)	267 (47%)	267 (47%)	289 (51%)	0.005	0.003
Extent CAD (50% stenosis)					0.49	0.07
0 vessel	26 (8%)	20 (7%)	19 (7%)	18 (6%)		
1 vessel	120 (38%)	91 (32%)	90 (32%)	90 (30%)		
2 vessel	80 (26%)	84 (30%)	78 (28%)	87 (29%)		
3 vessel	86 (28%)	84 (30%)	82 (33%)	102 (34%)		
Pos ETT	96 (46%)	95 (54%)	87 (44%)	65 (44%)	0.45	0.75
EF (%)	55 ± 13	54 ± 13	53 ± 13	53 ± 14	0.11	0.06

Association of MCP-1 With Clinical Outcomes

- [0142] The mean MCP-1 concentration was significantly higher among patients who experienced a non-fatal MI by 30 days ($p=0.01$) or by 10 months ($p=0.04$) vs. those who did not at the same time points (Table 25). In addition, the mean MCP-1 concentration was significantly higher among patients with the combined endpoints of death, or non-fatal MI ($p=0.05$), as well as death, non-fatal MI, or CHF by 10 months ($p=0.02$) vs. those who did not experience these endpoints (Table 25). These findings also were observed in a analysis of quartile MCP-1 concentration and outcome (Table 26).

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Table 25. Association between baseline MCP-1 concentration (ng/mL) and outcomes

Outcome	n	Median [25,75]	Mean $\pm$ SD	p value*
30 days				
Dead	34	147 [116,227]	184 $\pm$ 117	0.19
Alive	2236	178 [128,239]	206 $\pm$ 212	
MI	59	209 [146,279]	235 $\pm$ 130	0.01
No MI	2211	177 [128,237]	205 $\pm$ 213	
Death or MI	88	197 [135,268]	221 $\pm$ 129	0.13
No Death or MI	2182	177 [128,236]	205 $\pm$ 213	
MI				
D/MI/UR	153	185 [140,251]	229 $\pm$ 284	0.12
No D/MI/UR	2117	177 [127,237]	204 $\pm$ 205	
CHF	44	182 [134,236]	260 $\pm$ 468	0.79
No CHF	2226	177 [128,238]	204 $\pm$ 203	
D/MI/CHF	114	197 [136,264]	243 $\pm$ 308	0.06
No D/MI/CHF	2156	177 [128,236]	203 $\pm$ 204	
10 months				
Dead	78	181 [136,248]	205 $\pm$ 213	0.41
Alive	2192	177 [128,237]	208 $\pm$ 110	
MI	110	202 [136,268]	221 $\pm$ 122	0.04
No MI	2160	177 [128,236]	205 $\pm$ 214	
Death or MI	172	192 [134,265]	216 $\pm$ 120	0.05
No Death or MI	2098	177 [128,235]	205 $\pm$ 216	
MI				
D/MI/UR	293	180 [133,253]	217 $\pm$ 225	0.23
No D/MI/UR	1977	177 [127,235]	204 $\pm$ 209	
CHF	65	192 [147,242]	246 $\pm$ 387	0.25
No CHF	2205	177 [128,239]	204 $\pm$ 203	
D/MI/CHF	203	196 [136,264]	229 $\pm$ 242	0.02
No D/MI/CHF	2067	176 [127,235]	203 $\pm$ 207	

* Wilcoxon rank sum test

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Table 26. Association between baseline MCP-1 quartiles and outcomes

Outcome	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	P	P Q4 vs Q1
					trend	
Range, ng/mL	40-127.9	128.1-177.3	177.4-238	>238		
n	567	568	568	567		
30 day						
Death	10 (1.8%)	12 (2.1%)	5 (0.9%)	7 (1.2%)	0.22	0.46
MI	10 (1.8%)	14 (2.5%)	11 (1.9%)	24 (4.2%)	0.02	0.02
UR	8 (1.4%)	24 (4.2%)	19 (3.3%)	17 (3.0%)	0.23	0.07
D/MI	19 (3.4%)	22 (3.9%)	16 (2.8%)	31 (5.5%)	0.14	0.08
D/MI/UR	27 (4.8%)	46 (8.1%)	35 (6.2%)	45 (7.9%)	0.11	0.03
CHF	9 (1.6%)	12 (2.1%)	12 (2.1%)	11 (1.9%)	0.68	0.65
D/MI/CHF	23 (4.1%)	27 (4.8%)	25 (4.4%)	39 (6.9%)	0.048	0.04
10 month estimates						
Death	14 (2.7%)	24 (5.2%)	15 (3.1%)	25 (7.0%)	0.21	0.07
MI	23 (4.8%)	24 (5.2%)	23 (5.1%)	40 (9.8%)	0.03	0.03
UR	25 (5.3%)	43 (8.3%)	28 (6.0%)	31 (6.2%)	0.89	0.42
D/MI	36 (7.4%)	42 (9.4%)	33 (7.0%)	61 (15.6%)	0.02	0.008
D/MI/UR	61 (13.0%)	84 (18.2%)	60 (12.9%)	88 (21.7%)	0.11	0.02
CHF	11 (2.2%)	9 (1.9%)	15 (3.9%)	16 (3.4%)	0.17	0.33
D/MI/CHF	41 (8.4%)	46 (10.1%)	43 (10.1%)	68 (17.2%)	0.009	0.007

- [0143] In a multivariate model (n=2068) adjusting for other independent predictors of long-term mortality, including age, diabetes, renal function, evidence of CHF, ECG changes, and levels of cTnI and BNP, increasing concentration of MMP-9 remained associated with higher 10-month mortality. The adjusted odds ratios for death at 10 months for patients in the second, third, and fourth quartiles of MMP-9 were 4.5 (1.3-15.6), 6.4 (1.9-21.4), and 7.6 (2.3-25.5). When the model was repeated in 736 patients with complete data for all variables including CRP, MMP-9 remained significantly associated with 10-month mortality. The adjusted odds ratios were 3.1 (0.9-10.7), 3.9 (1.1-13.1), and 4.2 (1.3-14.4) in the second, third, and fourth quartiles.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Table 27. Multivariate models for 10-month mortality

Variable	Model 1 (n=2068)		Model 2 (n=736)	
	HR	95% CI	HR	95% CI
Age > 75	2.25	1.03-4.92	1.91	0.83-4.40
Diabetes	1.59	0.69-2.43	1.30	0.73-2.31
Killip class > 1	2.98	1.71-5.21	2.37	1.27-4.45
Left bundle branch block	4.96	2.21-11.12	5.32	2.19-12.90
Creatinine clearance < 90 cc/min	1.28	0.67-2.48	1.61	0.81-3.23
cTnI > 1.5 ng/mL	2.12	1.15-3.93	2.54	1.29-5.02
BNP > 40 pg/mL	5.70	1.35-24.04	5.58	1.29-24.15
CRP > 1.5 ng/mL	-	-	2.18	1.22-3.90
MMP-9 Quartile 1 (reference quartile)	1.0	-	1.0	-
MMP-9 Quartile 2	4.47	1.28-15.57	3.05	0.87-10.76
MMP-9 Quartile 3	6.39	1.90-21.42	3.89	1.15-13.15
MMP-9 Quartile 4	7.64	2.29-25.51	4.25	1.25-14.42

[0144] Model 1 includes patients with complete data for all variables except C-reactive protein. Model 2 includes patients with complete data for all variables including C-reactive protein. In addition to the variables listed, the models were adjusted for prior evidence of hypercholesterolemia, congestive heart failure, or peripheral arterial disease; prior use of heparin, nitrates, or diuretics; index diagnosis (unstable angina, non-ST elevation MI, ST elevation MI); use of nitrates or ace inhibitors for management of the index event; heart rate; blood pressure; and ST changes on the electrocardiogram.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0145] The plasma concentration of MMP-9, measured within the first few days after presentation with an acute coronary syndrome, is predictive of the risk for mortality, nonfatal MI, and congestive heart failure. The association between MMP-9 and mortality is independent of baseline clinical variables, ECG findings, and levels of established cardiac biomarkers such as troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. In multivariate analyses, elevated levels of matrix metalloproteinase-9, C-reactive protein, B-type natriuretic peptide, and troponin I were each significant independent predictors of increased 10-month mortality.

[0146] In a prior study, MMP-9 levels did not increase following exercise in patients with stable angina, despite symptomatic and electrocardiographic evidence of ischemia. Kai H et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndrome*, J Am Coll Cardiol 32:368-372 (1998). In the present study, no association between MMP-9 and the extent of atherosclerosis, and generally poor correlations between MMP-9 and markers of cardiac necrosis, such as CKMB and cTnI were observed. The relationship between MMP-9 and outcomes was similar between patients with unstable angina and those with myocardial infarction.

[0147] The present example demonstrates the clinical utility of the association between elevations in individual markers and outcome. Furthermore, there is a demonstrated benefit of using a multimarker strategy that incorporates different independent markers related to unique pathological processes for risk stratification. The markers chosen in this example are representative of myocardial damage (cTnI, cTnTIC, and FABP), ventricular dysfunction (BNP), matrix degradation or plaque rupture (MMP-9), inflammation (MCP-1 and CRP), and coagulation activation (TpP). One who is skilled in the art is aware that these pathological processes are independently associated with the adverse events described in this example. In this regard, alternative markers of each these various pathological processes may be substituted for the markers in this example for risk stratification of ACS patients. Furthermore, various combinations of markers for the various pathological processes may be useful in risk stratification of patients with ACS.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Example 5: Diagnostic Utility

[0148] MMP-9 is elevated in all levels of acute coronary systems, from unstable angina through ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). The TIMI OPUS-16 study population could be segregated into three groups, unstable angina (UA), non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), and STEMI. Of particular interest is the level of sensitivity (97.8-100%) at a specificity of 95% in the discrimination of unstable angina from normal healthy donors (Table 28). The most widely accepted marker of cardiac damage, TnI only achieves slightly over 50% sensitivity in this subset of acute coronary syndromes.

10 Table 28. Sensitivity and specificity of markers in patients with unstable angina

Time from Symptom Onset	Specificity	Unstable Angina Sensitivity						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0- 3 hr	94.8%	60.9%	5.3%	10.5%	100.0%	45.0%	0.0%	43.8%
0- 6 hr	94.8%	65.5%	9.1%	13.3%	100.0%	50.0%	10.5%	33.0%
0-12 hr	94.8%	69.7%	9.0%	13.7%	98.0%	53.4%	18.0%	53.2%
0-24 hr	94.8%	34.8%	7.5%	83.5%	97.8%	56.0%	17.7%	54.9%

[0149] In individuals with either NSTEMI or STEMI, TnI has excellent sensitivity and specificity, particularly between 6 h and 24 h from the time of symptom onset (Tables 29 and 30). The fact that MMP-9 is elevated in unstable angina while TnI may be only slightly elevated provides a useful means of discriminating between the less serious unstable angina and the more serious myocardial infarction. Therapeutic options could be influenced if the physician had this information available.

15 Table 29. Sensitivity and specificity of markers in patients with NSTEMI

Time from Symptom Onset	Specificity	NSTEMI Sensitivity						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0- 3 hr	94.8%	100.0%	0.0%	25.0%	100.0%	50.0%	25.0%	75.0%
0- 6 hr	94.8%	75.0%	14.3%	14.3%	100.0%	28.6%	42.9%	71.4%
0-12 hr	94.8%	64.4%	23.1%	15.4%	100.0%	42.9%	50.0%	83.3%
0-24 hr	94.8%	76.7%	24.6%	20.6%	98.5%	50.0%	62.9%	91.2%

WO 02/089657

PCT/US02/14219

Table 30. Sensitivity and specificity of markers in patients with STEMI

Time from Symptom Onset	Specificity	STEMI Sensitivity						
		BNP	FABP	MCP-1	MMP-9	TpP	cTnTIC	cTnI
0-3 hr	94.8%	83.3%	25.0%	25.0%	100.0%	25.0%	0.0%	66.7%
0-6 hr	94.8%	61.1%	35.7%	14.3%	100.0%	46.2%	72.7%	90.9%
0-12 hr	94.8%	50.0%	48.9%	20.0%	97.8%	43.5%	86.5%	94.6%
0-24 hr	94.8%	68.2%	61.5%	22.2%	99.3%	49.3%	86.1%	97.0%

- [0150] BNP is also somewhat elevated in unstable angina but it is more indicative of myocardial infarction, particularly at early times in the event. When used in combination with MMP-9 and TnI, BNP may add useful information the diagnosis of acute coronary syndromes
- [0151] TpP, MCP-1, and FABP are all elevated to varying degrees at various times during acute coronary syndromes and, as a result, could add information used to form a diagnosis.
- [0152] Since all of these markers serve different functions and are derived from a variety of sources, their appearance in circulation during acute coronary syndromes is likely to be independent of one another. Therefore, a diagnostic panel using two or more of the markers would be a benefit to the clinician providing information that could help guide therapy.

Example 6: Use of Markers in Patient Therapy

- [0153] The observation that MMP-9, cTnI, BNP, and CRP are each independently associated with 10-month patient mortality indicates that multi-marker testing strategies in patients with suspected ACS can advantageously improve risk-prediction in comparison to measurement of individual markers. In addition to such prognostic and diagnostic applications, the markers of the present invention can also be used to assist in the delivery of therapy to ACS patients. For example, the use of such a biomarker risk "profile" may be used to target specific therapies to different underlying pathophysiologic mechanisms. This "risk profile" may be determined by various

WO 02/089657

PCT/US02/14219

combinations of MMP-9, cTnI, BNP, and CRP, as well as by other markers used in addition to or substituted for said markers.

- [0154] Additionally, markers such as MMP-9 that play a direct pathogenic role in atherosclerosis and its complications can provide novel therapeutic targets for drug discovery. For example, the MMP system might be regulated on at least four levels: gene transcription, message translation, proenzyme activation, and inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Modification of one or more of these steps may prevent atherosclerotic plaque rupture and modify adverse vascular and cardiac remodeling.
- [0155] Therapeutic strategies can include, *e.g.*, delivery of antisense compositions in order to disrupt the synthesis of MMP-9; delivery of receptor-based therapeutics (*e.g.*, an antibody composition directed to MMP-9 or a fragment thereof); and/or delivery of small molecule therapeutics (*e.g.*, heparin can decrease MMP-9 synthesis, tetracycline antibiotics can inactivate MMPs by chelating zinc, and HMG Co-A Reductase inhibitors and activators of Peroxisomal Proliferator-Activator Receptor (PPAR)-gamma can decrease MMP-9 expression from macrophages. Such strategies may be directed at the target molecule itself (in this example, MMP-9), or, alternatively, at an upstream molecule necessary for target activation or activity (*e.g.*, proteases such as plasmin, which cleaves the MMP-9 zymogen to its active form).
- [0156] While the invention has been described and exemplified in sufficient detail for those skilled in this art to make and use it, various alternatives, modifications, and improvements should be apparent without departing from the spirit and scope of the invention.
- [0157] One skilled in the art readily appreciates that the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. The examples provided herein are representative of preferred embodiments, are exemplary, and are not intended as limitations on the scope of the invention. Modifications therein and other uses will occur to those skilled in the art. These modifications are encompassed within the spirit of the invention and are defined by the scope of the claims.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

[0158] It will be readily apparent to a person skilled in the art that varying substitutions and modifications may be made to the invention disclosed herein without departing from the scope and spirit of the invention.

5 [0159] All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of those of ordinary skill in the art to which the invention pertains. All patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

10 [0160] The invention illustratively described herein suitably may be practiced in the absence of any element or elements, limitation or limitations which is not specifically disclosed herein. Thus, for example, in each instance herein any of the terms "comprising", "consisting essentially of" and "consisting of" may be replaced with either of the other two terms. The terms and expressions which have been employed are used as terms of description and not of limitation, and there is no intention that in the
15 use of such terms and expressions of excluding any equivalents of the features shown and described or portions thereof, but it is recognized that various modifications are possible within the scope of the invention claimed. Thus, it should be understood that although the present invention has been specifically disclosed by preferred embodiments and optional features, modification and variation of the concepts herein
20 disclosed may be resorted to by those skilled in the art, and that such modifications and variations are considered to be within the scope of this invention as defined by the appended claims.

[0161] Other embodiments are set forth within the following claims.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

We claim:

1. A method of diagnosing myocardial ischemia in a patient, the method comprising:

determining a level of B-type natriuretic peptide (BNP) in a sample obtained
5 from said patient; and

correlating said BNP level to the presence or absence of myocardial ischemia in said patient.
2. A method according to claim 1, wherein said sample is obtained from said patient following stress testing.
- 10 3. A method according to claim 1, wherein said correlating step comprises comparing said BNP level to a threshold BNP level, whereby, when said BNP level exceeds said threshold BNP level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.
- 15 4. A method according to claim 3, wherein said threshold BNP level is at least about 60 pg/mL.
5. A method according to claim 1, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
6. A method according to claim 2, wherein said correlating step comprises comparing said BNP level to a second BNP level measured in a second sample
20 obtained from said patient, whereby, when said BNP level is greater than said second BNP level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.
7. A method according to claim 2, wherein said second sample is obtained prior to stress testing.
8. A method of diagnosing myocardial ischemia in a patient, the method
25 comprising:

determining a level of a marker related to BNP in a sample obtained from said patient; and

WO 02/089657

PCT/US02/14219

correlating said BNP-related marker level to the presence or absence of myocardial ischemia in said patient.

9. A method according to claim 8, wherein said sample is obtained from said patient following stress testing.

5 10. A method according to claim 8, wherein said correlating step comprises comparing said BNP-related marker level to a threshold BNP-related marker level, whereby, when said BNP-related marker level exceeds said threshold BNP-related marker level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.

10 11. A method according to claim 10, wherein said threshold BNP-related marker level is at least about 60 pg/mL.

12. A method according to claim 8, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.

13. A method according to claim 9, wherein said correlating step comprises comparing said BNP-related marker level to a second BNP-related marker level
15 measured in a second sample obtained from said patient, whereby, when said BNP-related marker level is greater than said second BNP-related marker level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.

14. A method according to claim 13, wherein said second sample is obtained prior to stress testing.

20 15. A method according to any one of claims 8-14, wherein said BNP-related marker is NT pro-BNP.

16. A method of diagnosing myocardial ischemia in a patient, the method comprising:

25 determining a level of a diagnostic indicator selected from the group consisting of BNP and a marker related to BNP in a sample obtained from said patient; and

correlating said diagnostic indicator level to the presence or absence of myocardial ischemia in said patient.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

17. A method according to claim 16, wherein said sample is obtained from said patient following stress testing.
18. A method according to claim 16, wherein said correlating step comprises comparing said diagnostic indicator level to a threshold level of said diagnostic indicator, whereby, when said diagnostic indicator level exceeds said threshold diagnostic indicator level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.
19. A method according to claim 18, wherein said threshold diagnostic indicator level is at least about 60 pg/mL.
20. A method according to claim 16, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
21. A method according to claim 17, wherein said correlating step comprises comparing said diagnostic indicator level to a second diagnostic indicator level measured in a second sample obtained from said patient, wherein said second diagnostic indicator is selected from the group consisting of BNP and a marker related to BNP, whereby, when said diagnostic indicator level is greater than said second diagnostic indicator level, said patient is diagnosed as having myocardial ischemia.
22. A method according to claim 17, wherein said second sample is obtained prior to stress testing.
23. A method of diagnosing myocardial necrosis in a patient, the method comprising:
- determining a level of B-type natriuretic peptide (BNP) in a sample obtained from said patient; and
- correlating said BNP level to the presence or absence of myocardial necrosis in said patient.
24. A method according to claim 23, wherein said correlating step comprises comparing said BNP level to a threshold BNP level, whereby, when said BNP level exceeds said threshold BNP level, said patient is diagnosed as having myocardial necrosis.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

25. A method according to claim 24, wherein said threshold BNP level is at least about 60 pg/mL.
26. A method according to claim 23, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
- 5 27. A method of diagnosing myocardial necrosis in a patient, the method comprising:
- determining a level of a marker related to BNP in a sample obtained from said patient; and
- correlating said BNP-related marker level to the presence or absence of myocardial necrosis in said patient.
- 10 28. A method according to claim 27, wherein said correlating step comprises comparing said BNP level to a threshold BNP level, whereby, when said BNP level exceeds said threshold BNP level, said patient is diagnosed as having myocardial necrosis.
- 15 29. A method according to claim 28, wherein said threshold BNP level is at least about 80 pg/mL.
30. A method according to claim 27, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
31. A method according to any one of claims 27-30, wherein said BNP-related marker is NT pro-BNP.
- 20 32. A method of diagnosing myocardial necrosis in a patient, the method comprising:
- determining a level of a diagnostic indicator selected from the group consisting of BNP and a marker related to BNP in a sample obtained from said patient; and
- 25 correlating said diagnostic indicator level to the presence or absence of myocardial necrosis in said patient.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

33. A method according to claim 32, wherein said correlating step comprises comparing said BNP level to a threshold BNP level, whereby, when said BNP level exceeds said threshold BNP level, said patient is diagnosed as having myocardial necrosis.
- 5 34. A method according to claim 33, wherein said threshold BNP level is at least about 80 pg/mL.
35. A method according to claim 32, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
- 10 36. A method of diagnosing myocardial ischemia in a patient, the method comprising:
- determining a first diagnostic indicator selected from the group consisting of a level of BNP and a level of a marker related to BNP in a sample obtained from said patient;
- determining one or more second diagnostic indicators in said patient; and
- 15 correlating said first and said second diagnostic indicators to the presence or absence of myocardial ischemia in said patient.
37. A method according to claim 36, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
- 20 38. A method according to claim 36, wherein said second diagnostic indicator(s) are selected from the group consisting of an MMP-9 level, a TpP level, an MCP-1 level, an FABP level, a CRP level, a creatine kinase level, an MB isoenzyme level, a cardiac troponin I level, a cardiac troponin T level, and a level of complexes comprising cardiac troponin I and cardiac troponin T.
- 25 39. A method according to claim 36, wherein one or more of said second diagnostic indicators a necrosis marker.
40. A method according to claim 39, wherein said method distinguishes between myocardial necrosis and myocardial ischemia in said patient.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

41. A method of diagnosing an acute coronary syndrome, said method comprising
analyzing a test sample obtained from a patient for the presence or amount of
one or more specific markers for myocardial injury and one or more non-specific
markers for myocardial injury.
- 5 42. A method according to claim 41, wherein said specific marker for myocardial
injury is selected from the group consisting of annexin V, B-type natriuretic peptide, β -
enolase, cardiac troponin I, creatine kinase-MB, glycogen phosphorylase-BB, heart-
type fatty acid binding protein, phosphoglyceric acid mutase-MB, and S-100ao.
- 10 43. A method according to claim 41, wherein said non-specific marker for
myocardial injury is selected from the group consisting of a marker of atherosclerotic
plaque rupture, a marker of coagulation, C-reactive protein, caspase-3, hemoglobin α_2 ,
human lipocalin-type prostaglandin D synthase, interleukin-1 β , interleukin-1 receptor
antagonist, interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1, soluble intercellular
15 adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1, MMP-9, T α P, and
tumor necrosis factor α .
44. A method according to claim 43, wherein said marker of atherosclerotic plaque
rupture is selected from the group consisting of human neutrophil elastase, inducible
20 nitric oxide synthase, lysophosphatidic acid, malondialdehyde-modified low density
lipoprotein, matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2, matrix
metalloproteinase-3, and matrix metalloproteinase-9.
45. A method according to claim 43, wherein said marker of coagulation is selected
25 from the group consisting of β -thromboglobulin, D-dimer, fibrinopeptide A, platelet-
derived growth factor, plasmin- α -2-antiplasmin complex, platelet factor 4, prothrombin
fragment 1+2, P-selectin, thrombin-antithrombin III complex, thrombus precursor
protein, tissue factor, and von Willebrand factor.
- 30 46. A method according to claim 41, further comprising,
comparing the level of said specific and non-specific markers to the
level of said specific and non-specific markers in normal individuals,

WO 02/089657

PCT/US02/14219

wherein changes in said levels in the test sample obtained from a patient as compared to normal individuals is indicative of a patient who has experienced an onset of acute coronary syndrome.

- 5 47. A method according to claim 45, wherein an elevation in the level of at least two of said specific and non-specific markers in the test sample obtained from a patient as compared to normal individuals is indicative of a patient who has experienced an onset of acute coronary syndrome.
- 10 48. A method of screening a patient experiencing constricting chest pain for an acute coronary syndrome, said method comprising
analyzing a test sample obtained from a patient for the presence or amount of one or more specific markers for myocardial injury and one or more non-specific markers for myocardial injury,
15 comparing the level of said specific and non-specific markers to the level of said specific and non-specific markers in normal individuals,
wherein changes in said levels in said test sample obtained from a patient as compared to normal individuals is indicative of a potential victim of acute coronary syndrome.
- 20 49. A method according to claim 41, wherein said test sample is selected from the group consisting of blood, serum, plasma, cerebrospinal fluid, urine and saliva.
- 25 50. A method according to claim 41, wherein said test sample is fractionated prior to being analyzed.
51. A method according to claim 41, wherein said test sample is analyzed using an immunoassay.
- 30 52. A method according to claim 41, further comprising distinguishing amongst stable angina, unstable angina and myocardial infarction.
53. A method according to claim 41, wherein the method diagnoses stable angina.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

54. A method according to claim 41, wherein the method diagnoses unstable angina.
55. A method according to claim 41, wherein the method diagnoses myocardial infarction.
56. A method of monitoring a course of treatment in a patient, said method comprising:
analyzing and comparing a plurality of test samples obtained from said patient for the presence or amount of one or more specific markers for myocardial injury and one or more non-specific markers for myocardial injury,
wherein said test samples are obtained from the same patient at different times.
57. A method according to claim 56, wherein said patient shows signs or symptoms of stable angina.
58. A method according to claim 56, wherein said patient shows signs or symptoms of unstable angina.
59. A method according to claim 56, wherein said patient shows signs or symptoms of myocardial infarction.
60. A method of determining a prognosis of a patient diagnosed with acute coronary syndrome, the method comprising:
correlating a level of one or more markers selected from the group consisting of matrix metalloprotease-9 (MMP-9), an MMP-9-related marker, Ttp, MCP-1, FAAP, C-reactive protein, creatine kinase, MB isoenzyme, cardiac troponin I, cardiac troponin T, complexes comprising cardiac troponin I and cardiac troponin T, and B-type natriuretic protein in a sample obtained from said patient to said patient prognosis by determining if said marker level(s) is(are) associated with a predisposition to an adverse outcome of said acute coronary syndrome.

WO 02/089657

PCT/US02/14219

61. A method according to claim 60, wherein said adverse outcome is selected from the group consisting of death, myocardial infarction, and congestive heart failure.
62. A method according to claim 61, wherein said correlating step comprises comparing said marker level(s) to threshold marker level(s), whereby, when said
5 marker level(s) exceed said threshold marker level(s), said patient is predisposed to said adverse outcome.
63. A method according to claim 60, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.
64. A method according to claim 60, comprising correlating a level of two or more
10 markers selected from the group consisting of matrix metalloprotease-9 (MMP-9), an MMP-9-related marker, TpP, MCP-I, FABP, C-reactive protein, creatine kinase, MB isoenzyme, cardiac troponin I, cardiac troponin T, complexes comprising cardiac troponin I and cardiac troponin T, and B-type natriuretic protein in a sample obtained from said patient to said patient prognosis by determining if said marker levels are
15 associated with a predisposition to an adverse outcome of said acute coronary syndrome.
65. A method according to claim 60, comprising correlating a level of three or more markers selected from the group consisting of matrix metalloprotease-9 (MMP-9), an
20 MMP-9-related marker, TpP, MCP-I, FABP, C-reactive protein, creatine kinase, MB isoenzyme, cardiac troponin I, cardiac troponin T, complexes comprising cardiac troponin I and cardiac troponin T, and B-type natriuretic protein in a sample obtained from said patient to said patient prognosis by determining if said marker levels are associated with a predisposition to an adverse outcome of said acute coronary syndrome.
- 25 66. A method of determining a prognosis of a patient diagnosed with acute coronary syndrome, the method comprising:
correlating a level of one or more prognostic markers selected from the group consisting of MMP-9, an MMP-9-related marker, BNP, a BNP-related marker, C-reactive protein, free cardiac troponin I, cardiac troponin I in a complex comprising one
30 other troponin component selected from the group consisting of troponin T and

WO 02/089657

PCT/US02/14219

- troponin C, cardiac troponin I in a complex comprising troponin T and troponin C, free cardiac troponin T, cardiac troponin T in a complex comprising one other troponin component selected from the group consisting of troponin I and troponin C, cardiac troponin T in a complex comprising troponin I and troponin C, MCP-1, an MCP-1 related marker, FABP, an FABP related marker, TpP, a TpP related marker in a sample
- 5 obtained from said patient to said patient prognosis by determining if one or more marker or related marker level is associated with a predisposition to an adverse outcome of said acute coronary syndrome.
67. A method according to claim 66, wherein said adverse outcome is selected from
- 10 the group consisting of death, myocardial infarction, and congestive heart failure.
68. A method according to claim 66, wherein said sample is selected from the group consisting of a blood sample, a serum sample, and a plasma sample.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/089657 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, A61K 38/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/14219
- (22) International Filing Date: 4 May 2002 (04.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/288,871 4 May 2001 (04.05.2001) US
60/315,642 28 August 2001 (28.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOSITE, INC. [US/US]; 11030 Roselle Street, San Diego, CA 92121 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau
- (88) Date of publication of the international search report: 27 February 2003
- 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.
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VALKIRS, Gunars, E. [US/US]; 2893 Paseo del Sol, Escondido, CA 92025 (US); DAHLEN, Jeffrey, R. [US/US]; 10555 Kimmerton Road, San Diego, CA 92126 (US); KIRCHICK, Howard [US/US]; 5449 Panoramic Lane, San Diego, CA 92121 (US); BUECHLER, Kenneth, F. [US/US]; 12523 Manifesio Place, San Diego, CA 92130 (US).
- (74) Agents: WARBURG, Richard, J. et al.; Voley & Lardner, P.O. Box 80278, San Diego, CA 92138-0278 (US).



WO 02/089657 A3

(54) Title: DIAGNOSTIC MARKERS OF ACUTE CORONARY SYNDROMES AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to methods for the diagnosis and evaluation of acute coronary syndromes. In particular, patient test samples are analyzed for the presence and amount of members of a panel of markers comprising one or more specific markers for myocardial injury and one or more non-specific markers for myocardial injury. A variety of markers are disclosed for assembling a panel of markers for such diagnosis and evaluation. In various aspects, the invention provides methods for the early detection and differentiation of stable angina, unstable angina, and myocardial infarction. Invention methods provide rapid, sensitive and specific assays that can greatly increase the number of patients that can receive beneficial treatment and therapy, reduce the costs associated with incorrect diagnosis, and provide important information about the prognosis of the patient.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/14219
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53; A61K 38/00 US CL : 435/7.1, 7.21, 7.93, 7.94; 436/86, 518, 536, 811, 817; 514/12, 324 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) U.S. : 435/7.1, 7.21, 7.93, 7.94; 436/86, 518, 536, 811, 817; 514/12, 324 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, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TATEISHI et al. Transient increase in plasma brain (B-type) natriuretic peptide after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical Cardiology. 2000, Vol. 23, No. 10, pages 776-780, see entire document.	1-14, 16-22, 41-55
---		15, 23-40
Y		
X	DATABASE MEDLINE, Accession no. 1999335795. Complementary DNA cloning, tissue distribution, and synthesis of canine brain natriuretic peptide. American Journal of Veterinary Research. ASANO et al., July 1999, Vol. 60, No. 7, pages 860-864, Abstract.	1-14, 16-22, 41-55
---		15, 23-40
Y		
X	DATABASE EMBASE, Accession No. 2001129199. Non-viable myocardium, documented by TL-201 SPECT, is a main determinant of the increase in the secretion of cardiac natriuretic peptides. Medicine Nucleaire. 2000, HASSAN et al., Vol. 24, No. 6, pages 301-310, Abstract.	23-55
---		1-22
Y		
Y	US 6,117,644 A (DEBOLD) 12 September 2000 (12.09.2000), see entire document.	1-55
---		56-68
Y	US 6,028,055 A (LOWE et al.) 22 February 2000 (22.02.2000), see entire document.	1-55

A		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"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" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	
"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 14 July 2002 (14.07.2002)	Date of mailing of the international search report 05 NOV 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Gallene R. Gabel Telephone No. (703) 308-0196	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/527	C 1 2 Q 1/527	
C 1 2 Q 1/533	C 1 2 Q 1/533	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バルカース, ガナース・イー
アメリカ合衆国 9 2 0 2 5 カリフォルニア州 エスコンディッド, パセオ デル ソル 2 8 9
3

(72)発明者 ダーレン, ジェフェリー・アール
アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州 サン ディエゴ, ケメルトン ロード 1 0 5
5 5

(72)発明者 カーチック, ハワード
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サン ディエゴ, パノラミック レーン 5 4
4 9

(72)発明者 ビューチェラー, ケネス・エフ
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サン ディエゴ, マニフェスト プレース 1
2 5 2 3

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ21 QQ26 QQ27 QQ36 QQ38 QQ39 QR48
QR51 QS33

专利名称(译)	急性冠状动脉综合征的诊断标志物及其应用		
公开(公告)号	JP2004520598A	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2002586802	申请日	2002-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
申请(专利权)人(译)	公司的Biosite		
[标]发明人	バルカースガナースイー ダーレンジェフェリーアール カーチックハワード ビューチェラーケネスエフ		
发明人	バルカース,ガナースイー ダーレン,ジェフェリー・アール カーチック,ハワード ビューチェラー,ケネス・エフ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/25 C12Q1/37 C12Q1/48 C12Q1/50 C12Q1/527 C12Q1/533 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2333/58 G01N2800/324		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/25 C12Q1/37 C12Q1/48.Z C12Q1/50 C12Q1/527 C12Q1/533		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ21 4B063/QQ26 4B063/QQ27 4B063/QQ36 4B063/QQ38 4B063/QQ39 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS33		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	60/288871 2001-05-04 US 60/315642 2001-08-28 US		
其他公开文献	JP3806694B2 JP2004520598A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及急性冠状动脉综合征的诊断和评估方法。特别地，测试样品的患者中分析了一组标志物的成员，包括非特异性标志物特异性的标记和一个或多个心肌损伤的一个或更多个心肌损伤的存在和量。公开了各种标记用于组装用于这种诊断和评估的标记组。在各个方面，本发明提供了用于早期检测和鉴定稳定性心绞痛，不稳定型心绞痛和心肌梗塞的方法。本发明的方法提供了快速，灵敏，特异的测定，其大大增加了可以从治疗和治疗中受益的患者的数量，降低了与错误诊断相关的成本，提供有关患者预后的重要信息。

マーカー陽性	解釈
I L - 6	炎症反応の存在。 A C S に特異的ではないが、早期事象の表示となりうる。
M D A - 修飾 L D L	プラーク破裂の表示。 進行中の事象の表示であり、プラーク破裂が胸痛の原因でありうる。
P - セレクチン	血小板活性化の表示。 血小板栓が形成中若しくは形成済みである。血小板栓およびその結果の閉塞が胸痛の原因でありうる。
T A T 複合体	凝固活性化の表示。 血塊が形成中若しくは形成済みであり、その結果の閉塞が胸痛の原因でありうる。
B N P	心室機能不全の表示 心臓虚血により生じる損傷と関連しうる。
全 c T n I	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。
全 c T n T I C	心筋損傷の表示。 上昇は、心筋壊死の表示であり、心臓虚血により生じる。全 c T n I に対する c T n T I C の高い割合は、進行中の事象または継続的虚血の表示となりうる。