



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0057534
(43) 공개일자 2022년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7006316
(22) 출원일자(국제) 2022년09월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/048981
(87) 국제공개번호 WO 2021/046074
국제공개일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
62/895,383 2019년09월03일 미국(US)

(71) 출원인
소마로직 오퍼레이팅 컴퍼니, 인코포레이티드
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 월터니스 플레이스 2945
(72) 발명자
힌터베르그, 미카엘
미국 80301 콜로라도주 보울더 월터니스 플레이스 2945 소마로직, 인크. 내
다타, 가르기
미국 80301 콜로라도주 보울더 월터니스 플레이스 2945 소마로직, 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 김영

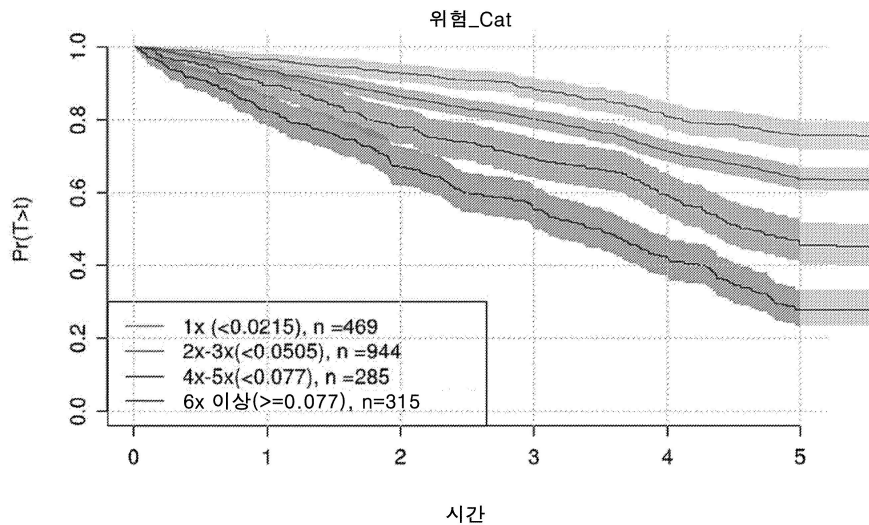
전체 청구항 수 : 총 81 항

(54) 발명의 명칭 심혈관 위험 사건 예측 및 이의 용도

(57) 요약

4년의 기간에 걸쳐 1차 또는 2차 심혈관(CV) 사건이 발생할 위험을 예측하기 위해 개체를 평가하는 데 사용되는 바이오마커, 방법, 장치, 시약, 시스템 및 키트가 제공된다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

심혈관 사건(CV) 사건의 위험에 대해 대상체를 스크리닝하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) N-말단 프로-BNP, sTREM-1, MMP-12, 안티트롬빈 III, GPR56, 젤솔린, ST4S6, CHSTC, FSH, IL-1 sRII, PLXB2, SAP 및 TFPI로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 3 내지 13의 정수인, 단계; 및

(b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.

청구항 2

심혈관 사건(CV) 사건의 위험에 대해 대상체를 스크리닝하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) BNP, sTREM-1, MMP-12, SVEP1, ARL11, ANTR2, CA125, GOLM1, PPR1A, ERBB3, suPAR, GDF-11/8, JAM-B, ATS13, 스폰딘-1, NCAM-120, TFF3, SIRT2, ANP, NELL1, LRP11, NDST1, PTPRJ, CILP2, CA2D3, ITI 중쇄 H2 및 IGDC4로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 8 내지 27의 정수인, 단계; 및

(b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.

청구항 3

대상체가 CV 사건을 가질 가능성을 예측하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) BNP, sTREM-1, MMP-12, 안티트롬빈 III, GPR56, 젤솔린, ST4S6, CHSTC, FSH, IL-1 sRII, PLXB2, SAP, 및 TFPI로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 3 내지 13의 정수인, 단계; 및

(b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.

청구항 4

대상체가 CV 사건을 가질 가능성을 예측하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) BNP, sTREM-1, MMP-12, SVEP1, ARL11, ANTR2, CA125, GOLM1, PPR1A, ERBB3, suPAR, GDF-11/8, JAM-B, ATS13, 스폰딘-1, NCAM-120, TFF3, SIRT2, ANP, NELL1, LRP11, NDST1, PTPRJ, CILP2, CA2D3, ITI 중쇄 H2 및 IGDC4로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 8 내지 27의 정수인, 단계; 및

(b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, N이 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 또는 13인 방법.

청구항 6

제2항 또는 제4항에 있어서, N이 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 또는 27인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 4년 내에 CV 사건을 가질 위험 또는 가능성은 바이오마커

세트의 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 또는 적어도 13개의 바이오마커 수준이 각각의 바이오마커의 대조군 수준에 비해 각각 비정상적인 경우에 높은 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, CV 사건이 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원 또는 사망인 방법.

청구항 9

제2항, 제4항 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 관상 동맥 질환을 갖는 방법.

청구항 10

제1항, 제3항, 제5항, 제7항 또는 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 CV 사건의 이력을 갖지 않는 방법.

청구항 11

제2항, 제4항 또는 제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 적어도 하나의 CV 사건을 가졌던 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 혈액 샘플, 혈청 샘플, 혈장 샘플 및 소변 샘플로부터 선택 되는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 샘플이 혈액 샘플인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 시험관내 수행되는 방법.

청구항 15

제1항, 제3항, 제5항, 제7항, 제8항, 제10항 또는 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 대상체로부터의 샘플의 바이오마커를 포획 시약 세트와 접촉시키는 단계를 포함하고, 포획 시약 세트의 각각의 포획 시약은 검출되는 상이한 바이오마커에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 16

제2항, 제4항, 제6항 내지 제9항 또는 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 대상체로부터의 샘플의 바이오마커를 포획 시약 세트와 접촉시키는 단계를 포함하고, 포획 시약 세트의 각각의 포획 시약은 검출 되는 상이한 바이오마커에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 각각의 포획 시약이 항체 또는 압타머인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 각각의 바이오마커 포획 시약이 압타머인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 적어도 하나의 압타머가 느린 오프-레이트 압타머인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 적어도 하나의 느린 오프-레이트 압타머가 변형이 있는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 뉴클레오타이드를

포함하는 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 각각의 느린 오프-레이트 압타머가 ≥ 30 분, ≥ 60 분, ≥ 90 분, ≥ 120 분, ≥ 150 분, ≥ 180 분, ≥ 210 분, 또는 ≥ 240 분의 오프-레이트($t_{1/2}$)로 그 표적 단백질에 결합하는 방법.

청구항 22

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 sTREM1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 23

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 MMP-12에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 24

제15항 또는 제17항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 N-말단 프로-BNP에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 25

제15항 또는 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 안티트롬빈 III에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 26

제15항 또는 제17항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 GPR56에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 27

제15항 또는 제17항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 젤솔린에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 28

제15항 또는 제17항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ST4S6에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 29

제15항 또는 제17항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 CHSTC에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 30

제15항 또는 제17항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 FSH에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 31

제15항 또는 제17항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 IL-1 sRII에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 32

제15항 또는 제17항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 PLXB2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 33

제15항 또는 제17항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 SAP에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 34

제15항 또는 제17항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 TFPI에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 13개의 바이오마커를 포함하는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오마커 세트가 13개의 바이오마커로 구성되는 방법.

청구항 37

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 SVEP1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 38

제16항 내지 제23항 또는 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ARL11에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 39

제16항 내지 제23항, 제37항 또는 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ANTR2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 40

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 CA125에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 41

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 GOLM1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 42

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 PPR1A에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 43

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ERBB3에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 44

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 suPAR에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 45

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 GDF-11/8에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 46

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 JAM-B에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 47

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ATS13에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 48

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 스폰딘-1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 49

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 NCAM-120에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 50

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 TFF3에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 51

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 SIRT2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 52

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ANP에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 53

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 NELL1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 54

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 LRP11에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 55

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 NDST1에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 56

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 PTPRJ에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 57

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 CILP2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 58

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 CA2D3에 특이적으로

결합하는 방법.

청구항 59

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 ITI 중쇄 H2에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 60

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 IGDC4에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 61

제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 포획 시약이 BNP에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 62

제2항, 제4항, 제6항 내지 제9항, 제11항 내지 제14항, 제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 27개의 바이오마커를 포함하는 방법.

청구항 63

제2항, 제4항, 제6항 내지 제9항, 제11항 내지 제14항, 제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오마커 세트가 27개의 바이오마커로 구성되는 방법.

청구항 64

제2항, 제4항, 제6항 내지 제9항, 제11항 내지 제14항, 제16항 내지 제23항 또는 제37항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 명백히 안정한 심혈관 질환을 갖는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 명백히 안정한 심혈관 질환이 심근경색, 뇌졸중, 심부전, 재혈관화, 비정상적 스트레스 시험, 관상 심장 질환을 제시하는 조영, 또는 비정상적인 관상 칼슘 점수의 이력을 포함하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 심근경색 또는 뇌졸중이 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 적어도 6개월 전에 발생한 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 비정상적 스트레스 시험이 트레드밀 또는 핵의학 기반 시험인 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, 관상 심장 질환을 제시하는 조영이 50% 이상의 관상 동맥 협착을 나타내는 혈관조영술인 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 적어도 40세인 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 4년 이내에 대상체가 심혈관 사건을 가질 위험 또는 가능성을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 대상체가 심혈관 사건을 가질 위험 또는 가능성이 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 1년, 2년, 3년 또는 4년 이내인 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 심혈관 사건이 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원, 또는 심혈관 질환으로 인한 사망인 방법.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 위험이 정량적 확률로 결정되는 방법.

청구항 74

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 위험이 위험의 정성적 수준으로 결정되는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 위험의 정성적 수준이 낮음, 보통 또는 높음인 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, CV 사건의 위험 또는 가능성이 바이오마커 수준 및 하기로부터 선택되는 추가적인 생의학 정보 중 적어도 하나의 항목에 기반하는 방법:

- a) 이전의 심근경색, 하나 이상의 관상 혈관에서 50% 초과 협착의 혈관조영학적 증거, 트레드밀 또는 핵 시험에 의한 운동 유발 허혈 또는 이전의 관상 재혈관화로 구성되는 군으로부터 선택된 심혈관 위험 요인의 존재에 해당하는 정보,
- b) 대상체의 신체 기술어에 해당하는 정보,
- c) 대상체의 체중 변화에 해당하는 정보,
- d) 대상체의 민족에 해당하는 정보,
- e) 대상체의 성별에 해당하는 정보,
- f) 대상체의 흡연 이력에 해당하는 정보,
- g) 대상체의 알코올 사용 이력에 해당하는 정보,
- h) 대상체의 직업 이력에 해당하는 정보,
- i) 심혈관 질환 또는 다른 순환계 병태에 대한 대상체의 가족력에 해당하는 정보,
- j) 대상체 또는 대상체의 가족 구성원에서 심혈관 질환의 고위험과 상관관계가 있는 적어도 하나의 유전적 마커의 대상체 내 존재 또는 부재에 해당하는 정보,
- k) 대상체의 임상 증상에 해당하는 정보,
- l) 다른 실험실 시험에 해당하는 정보,
- m) 대상체의 유전자 발현 값에 해당하는 정보,
- n) 고포화 지방, 고염분, 고콜레스테롤 식단과 같은 알려진 심혈관 위험 요인의 대상체 소비에 해당하는 정보,
- o) 심전도, 심초음파, 내막 두께에 대한 경동맥 초음파, 유동 매개 팽창, 맥파 속도, 발목-상완 지수, 스트레스 심초음파, 심근 관류 조영, CT에 의한 관상 칼슘, 고해상 CT 혈관조영술, MRI 조영 및 다른 조영 기법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 기술에 의해 수득되는 대상체의 조영 결과에 해당하는 정보,
- p) 대상체의 약물에 관한 정보,
- q) 대상체의 나이에 해당하는 정보, 및
- r) 대상체의 신장 기능에 관한 정보.

청구항 77

제76항에 있어서, 추가적인 생의학 정보 중 적어도 하나의 항목이 대상체의 연령에 해당하는 정보인 방법.

청구항 78

제1항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 의료 보험료 또는 생명 보험료를 결정할 목적으로 CV 사건의 위험 또는 가능성을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 방법이 의료 보험 또는 생명 보험에 대한 보장 또는 보험료를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 의료 자원의 활용을 예측 및/또는 관리하기 위해 상기 방법으로부터 생성된 정보를 사용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 의료 행위, 병원 또는 회사를 인수하거나 구매하는 결정을 가능하게 하기 위해 상기 방법으로부터 생성된 정보를 사용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 9월 3일에 출원된 미국 가출원 번호 62/895,383의 우선권을 주장하며, 이는 임의의 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 출원은 일반적으로 바이오마커의 검출 및 개체의 향후 심혈관 사건의 위험을 평가하는 방법, 보다 구체적으로 4년의 기간에 걸쳐 1차 또는 2차 심혈관(CV) 사건이 발생할 위험을 예측하기 위해 개체를 평가하기 위해 사용되는 하나 이상의 바이오마커, 방법, 장치, 시약, 시스템 및 키트에 관한 것이다. 이러한 사건에는 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원 및 사망이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

배경 기술

[0005] 심혈관 질환은 미국의 주요 사망 원인이다. 임상 행위 및 치료 시험에서 널리 사용되는 1차 사건(D'Agostino, R et al., "General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care: The Framingham Heart Study" Circulation 117:743-53 (2008); 및 Ridker, P. et al., "Development and Validation of Improved Algorithms for the Assessment of Global Cardiovascular Risk in Women" JAMA 297(6):611-619(2007)) 및 이차 사건(Shlipak, M. et al. "Biomarkers to Predict Recurrent Cardiovascular Disease: The Heart & Soul Study" Am. J. Med. 121:50-57 (2008))의 위험에 대해 기존의 중요한 예측인자가 많이 있다. 불행히도 수신기 작동 특성 곡선, 위험 비율 및 일치하는 기존 위험 요인 및 바이오마커의 성능이 중등도임을 나타낸다(~0.75의 AUC는 이러한 요인이 동전 던지기와 완벽함의 중간에 불과함을 의미함). 개선된 진단 성능에 대한 요구 외에도 유익한(그리고 파괴적인) 개입 및 생활방식 변화에 대해 개체 내에서 단기적으로 그리고 개인적으로 모두 반응하는 위험 제품에 대한 요구가 존재한다. 일반적으로 사용되는 Framingham 방정식에는 세 가지 주요 문제가 있다. 첫째, 이는 너무 장기적이다: 이것이 10년 간의 위험 계산을 제공하지만 인간은 미래의 위험을 무시하고 이를 기반으로 행동 및 생활방식을 수정하는 것을 꺼린다. 둘째, 이는 개입에 크게 반응하지 않는다: 이는 감소시킬 수 없는 연대기적 연령; 및 변화시킬 수 없는 성별에 크게 의존한다. 셋째, 여기에서 고려되는 고위험 집단 내에서, Framingham 요인은 고위험과 저위험을 잘 구별하지 못한다: 고 사분위수와 저 사분위수 사이의 위험 비율은 2에 불과하고 Framingham 점수를 사용하여 대상체를 더 미세한 층(예로, 십분위수)으로 계층화하여 위험을 개인화하려고 시도할 때 관찰되는 사건 비율은 많은 십분위수에 있어서 유사하다.

- [0006] 심혈관 질환의 위험 요인은 의학적 치료의 강도와 성격을 결정하는 데 널리 사용되며, 이러한 사용은 의심할 여지 없이 지난 20년 동안 관찰된 심혈관 이환율 및 사망률 감소에 기여했다. 이러한 요인은 일상적으로 알고리즘과 조합되지만 불행히도 모든 위험을 포획하지는 못한다(심장 질환의 가장 흔한 초기 증상은 여전히 사망임). 사실 그들은 아마도 위험의 절반만 포획할 것이다. ~0.76의 ROC 곡선 하 면적은 1차 예방에서 이러한 위험 요인에 대해 전형적이며 2차 예방에서는 훨씬 더 나쁜 성능(0.62가 전형적임)을 가져서, 수치는 0.5의 동전 던지기 및 1.0의 완벽함 사이 성능의 약 1/4에서 1/2에 불과하다.
- [0007] 또한 3209명에서의 Framingham 연구(Wang et al., "Multiple Biomarkers for the Prediction of First Major Cardiovascular Events and Death" N. Eng. J. Med. 355:2631-2637(2006))에서, 10가지 바이오마커(CRP, BNP, NT-프로BNP, 알도스테론, 레닌, 피브리노겐, D-이량체, 플라스미노겐-활성화제 억제제 유형 1, 호모시스테인 및 소변 알부민 대 크레아티닌 비)의 추가는 기존 위험 요인에 추가되는 경우 AUC를 유의미하게 개선하지 않았다: 0-5년 사건에 대한 AUC는 연령, 성별 및 기존 위험 요인을 가지며 0.76이었고 최적 바이오마커 조합이 혼합에 추가된 경우 0.77이었고, 2차 예방에 있어서는 상황이 더 나쁘다.
- [0008] 심혈관 사건의 위험이 더 높은 환자를 1-5년의 윈도우 내에 조기에 식별하는 것은 고위험 개체에 대한 보다 적극적인 치료가 결과를 개선할 수 있기 때문에 중요하다. 따라서 최적의 관리의 위험이 더 높은 것으로 간주되는 환자에서 심혈관 사건의 위험을 줄이기 위해 적극적인 개입이 필요한 반면 심혈관 사건의 위험이 더 낮은 환자는 비용이 많이 들고 환자에게 유익한 효과를 갖지 않을 수 있는, 잠재적으로 침습적인 치료를 피할 수 있다.
- [0009] 정의된 기간 내에 특정 질환 상태 또는 병태를 가질 위험을 예측하기 위한 바이오마커 선택에는 먼저 특정 의료 적용을 위한 사건의 확률 및/또는 타이밍과 측정 가능하고 통계적으로 유의미한 관계가 있는 마커의 식별이 관여된다. 바이오마커에는 관심 병태에 대한 인과적 경로 상에 있거나, 질환 또는 병태 발생 또는 진행, 또는 둘 모두에 대해 하류이거나 병렬적인 분비되거나 방출된 분자가 포함될 수 있다. 이들은 심혈관계 사건을 일으키기 쉬운 생물학적 공정에 대한 반응으로 심혈관 조직이나 다른 기관, 주변 조직 및 순환 세포에서 혈류로 방출되거나 신장 기능 저하와 같은 병태생리의 하류 효과를 반영할 수 있다. 바이오마커에는 소분자, 펩티드, 단백질 및 핵산이 포함될 수 있다. 바이오마커 식별에 영향을 미치는 주요 문제 중 일부에는 사용 가능한 데이터의 과적합(over-fitting) 및 데이터의 편향이 포함된다.
- [0010] 바이오마커를 식별하고 질환이나 병태를 가질 위험을 진단하거나 예측하기 위한 시도로 다양한 방법이 사용되었다. 단백질 기반 마커의 경우, 이들에 2차원 전기영동, 질량 분광측정 및 면역검정 방법이 포함된다. 핵산 마커의 경우, 이들에 mRNA 발현 프로파일, 마이크로RNA 프로파일, FISH, 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), 대규모 유전자 발현 어레이, 유전자 시퀀싱 및 유전형분석(SNP 또는 소규모 변이체 분석)이 포함된다.
- [0011] 2차원 전기영동의 유용성은 낮은 검출 민감도; 단백질 용해도, 전하 및 소수성 문제; 겔 재현성; 및 하나의 점이 여러 단백질을 나타낼 가능성으로 인해 제한된다. 질량 분광측정의 경우 사용된 형식에 따라, 샘플 처리 및 분리, 저농도 단백질에 대한 민감도, 신호 대 노이즈 고려사항 및 검출된 단백질의 즉시 식별 불가능에 관련된 제한이 있다. 바이오마커 발견에 대한 면역검정 접근의 한계는 항체 기반 멀티플렉스 검정이 많은 수의 분석물질을 측정할 수 없다는 점에 중점을 두고 있다. 고품질 항체 배열을 간단히 인쇄하고 샌드위치 없이 해당 항체에 결합된 분석물질을 측정할 수 있다. (이것은 유기체 또는 세포의 모든 DNA 또는 RNA 서열을 혼성화하여 측정하기 위해 핵산 서열의 전체 게놈을 사용하는 것과 형식적으로 동등할 것이다. 혼성화 실험은 혼성화가 동일성에 대한 엄격한 시험이 될 수 있기 때문에 효과가 있다.) 그러나 매우 우수한 항체라도 이들 매트릭스 내 단백질 양상불이 매우 다양한 존재비를 가지며, 이것이 불량한 신호 대 노이즈 비율을 야기할 수 있으므로, 전형적으로 혈액 또는 세포 추출물의 맥락에서 작용하도록 이의 결합 파트너를 선택하는 데 충분히 엄격하지 않다. 따라서 바이오마커 발견에 대한 면역검정 기반 접근과 상이한 접근을 사용해야 한다 - 멀티플렉스와 ELISA 검정(즉, 샌드위치)을 사용하여 어떤 분석물질이 실제로 바이오마커인지 결정하기 위해 많은 분석물질을 동시에 측정하기에 충분한 엄격성을 얻을 필요가 있다. 샌드위치 면역검정은 높은 함량으로 확장되지 않으므로, 엄격한 샌드위치 면역검정을 사용한 바이오마커 발견은 표준 어레이 형식을 사용하는 것이 불가능하다. 마지막으로, 항체 시약은 상당한 로트 가변성과 시약 불안정성의 영향을 받는다. 단백질 바이오마커 발견을 위한 본 발명의 플랫폼으로 이러한 문제를 극복한다.
- [0012] 이러한 방법 중 다수는 분석 전에 일부 유형의 샘플 분획화에 의존하거나 이를 요구한다. 따라서 일련의 잘 정의된 샘플 집단에서 통계적으로 관련된 바이오마커를 식별하고 발견하도록 설계된 충분한 파워의 연구를 수행하는 데 필요한 샘플 제조는 매우 어렵고 비용이 많이 들고 시간이 많이 소요된다. 분획화 동안 다양한 샘플에 광범위한 가변성이 도입될 수 있다. 예를 들어, 잠재적인 마커는 공정에 대해 불안정할 수 있고, 마커의 농도가

변화될 수 있으며, 부적절한 응집 또는 분해가 발생할 수 있으며, 부주의한 샘플 오염이 발생하여 초기 질환에서 예상되는 미묘한 변화가 불분명할 수 있다.

[0013] 이러한 기술을 사용한 바이오마커 발견 및 검출 방법은 진단 또는 예측 바이오마커의 식별에 심각한 제한이 있다는 것이 널리 받아들여지고 있다. 이러한 제한에는 풍부하지 않은 바이오마커의 검출 불가능, 프로테오믹 전체 동적 범위의 일관된 포괄 불가능, 샘플 처리 및 분획화의 재현 불가능, 전반적인 재현 불가능 및 방법의 견고성 부족이 포함된다. 또한, 이러한 연구는 데이터에 편향을 도입했으며 표적 질환 집단 내에서 바이오마커를 식별하고 검증하는 데 필요한 분포 및 무작위화 측면에서 적절한 대조군이 포함되는 샘플 집단의 복잡성을 적절하게 다루지 않았다.

[0014] 신규의 효과적인 바이오마커의 발견을 목표로 한 노력이 수십 년 동안 계속되었지만, 그 노력은 대체로 성공적이지 못했다. 다양한 질환에 대한 바이오마커는 일반적으로 일부 질환 과정에 대한 기초 연구를 수행하는 동안 우연한 발견을 통해 학술 실험실에서 식별되었다. 이러한 발견과 적은 양의 임상 데이터를 바탕으로 새로운 바이오마커의 식별을 제안하는 논문이 발표되었다. 그러나 이러한 제안된 바이오마커의 대부분은 실제 또는 유용한 바이오마커로 확인되지 않으며, 그 이유는 주로 시험된 소수의 임상 샘플이 효과적인 바이오마커가 실제로 발견되었다는 약한 통계적 증거만을 제공하기 때문이다. 즉, 최초 식별은 통계의 기본 요소에 대해 엄격하지 않았다.

[0015] 실패한 바이오마커 발견 노력의 역사에 기반하여, 질환 및 병태의 진단, 예후 또는 발생 위험 예측을 위한 바이오마커가 드물고 찾기 어렵다는 일반적인 이해를 더욱 촉진하는 이론이 제안되었다. 2D 겔 또는 질량 분광측정에 기반한 바이오마커 연구는 이러한 개념을 뒷받침한다. 이러한 접근을 통해 식별된 유용한 바이오마커는 거의 없다. 그러나 일반적으로 2D 겔 및 질량 분광측정이 대략 1 nM 농도 이상에서 혈액에 존재하는 단백질을 측정하고 이러한 단백질 양상들이 질환 또는 특정 병태의 발생에 따라 가장 적게 변할 수 있다는 점은 간과된다. 본 발명의 바이오마커 발견 플랫폼 외에, 훨씬 낮은 농도에서 단백질 발현 수준을 정확하게 측정할 수 있는 프로테오믹 바이오마커 발견 플랫폼은 존재하지 않는다.

[0016] 복잡한 인간 생물학의 생화학적 경로에 대해서는 많이 알려져 있다. 많은 생화학적 경로는 병리학 내에서 국부적으로 작용하는 분비 단백질로 이어지거나 이에 의해 시작된다; 예를 들어, 성장 인자는 병리학에서 다른 세포의 복제를 자극하기 위해 분비되고 다른 인자는 면역계를 방어하기 위해 분비되는 식이다. 이러한 분비된 단백질의 대부분은 결분비 방식으로 작용하지만 일부는 신체의 말단에서 작용한다. 생화학적 경로에 대한 기본적인 이해를 가진 당업자는 많은 병리학 특이적 단백질이 2D 겔 및 질량 분광측정의 검출 한계 미만(심지어 훨씬 더 낮은) 농도에서 혈액에 존재해야 함을 이해할 것이다. 이 비교적 풍부한 수의 질환 바이오마커를 식별하기 전에 필요한 것은 2D 겔 또는 질량 분광측정으로 검출할 수 있는 농도보다 낮은 농도에서 단백질을 분석할 수 있는 프로테오믹 플랫폼이다.

[0017] 위에서 논의한 바와 같이 심혈관 사건은 그러한 사건에 대한 경향이 정확하게 결정될 수 있다면 적극적인 치료에 의해 예방할 수 있으며, 그러한 개입을 가장 필요로 하는 사람에게 그러한 개입을 표적화하고/하거나 이를 가장 적게 필요로 하는 사람으로부터 제거함으로써, 의학 자원소달 효율을 개선할 수 있는 동시에 비용을 낮출 수 있다. 또한 환자가 심혈관 사건의 개인적 가능성에 대한 정확하고 단기적인 정보에 대한 지식을 가지고 있을 때, 이는 장기간의 집단 기반 정보보다 부정할 수 없으며 개선된 생활방식 선택 및 이익으로 부가될 개선될 약물 순응도를 야기할 수 있다. 기존의 다중 표지자 시험은 개체로부터 여러 샘플을 수집해야 하거나 여러 분석간에 샘플을 분할해야 한다. 최적의 경우 개선된 시험은 단일 혈액, 소변 또는 다른 샘플과 단일 검정만을 필요로 할 것이다. 따라서, 5년 기간 내에 심혈관 사건을 예측할 수 있는 바이오마커, 방법, 장치, 시약, 시스템 및 키트에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0018] 본 출원에는, 예를 들어, 4년 기간 또는 다른 기간 내에 심혈관(CV) 사건을 가질 위험을 예측하기 위한 바이오마커, 방법, 시약, 장치, 시스템 및 키트가 포함된다. 일부 구현예에서, CV 사건은 1차 CV 사건이다. 일부 구현예에서, CV 사건은 2차 CV 사건이다.

[0019] 심혈관 질환에는 여러 생물학적 과정과 조직이 관여된다. 심혈관 질환과 관련된 생물학적 시스템 및 과정의 예는 염증, 혈전증, 질환 관련 혈관신생, 혈소판 활성화, 대식세포 활성화, 간 급성 반응, 세포외 기질 리모델링 및 신장 기능이다. 이러한 과정은 성별, 갱년기 상태, 및 나이의 함수로, 그리고 응고 상태와 혈관 기능에 따라 관찰할 수 있다. 이러한 시스템은 단백질 기반 신호전달 시스템을 통해 부분적으로 통신하고 단일 혈액 샘플에

서 여러 단백질을 측정할 수 있기 때문에 본 발명은 심혈관 질환에 관여된 특정 생물학적 시스템 및 과정의 단백질에 초점을 맞춘 단일 샘플, 단일 검정, 다중 단백질 기반 시험을 제공한다.

- [0020] 일부 구현예에서, 바이오마커 세트의 수준을 검출하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 하기와 같다:
- [0021] 구현예 1. 하기 단계를 포함하는, 대상체로부터의 샘플에서 바이오마커 단백질 세트의 수준을 검출하는 방법:
- [0022] a. 대상체로부터의 샘플을 포획 시약 세트와 접촉시키는 단계로서, 각각의 포획 시약은 상이한 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하며, 하나의 포획 시약은 sTREM1에 특이적으로 결합하는, 단계; 및
- [0023] b. 특이적으로 결합하는 바이오마커 단백질에 결합된 각각의 포획 시약의 양을 검출하는 단계.
- [0024] 구현예 2. 구현예 1에 있어서, 하나의 포획 시약이 MMP-12에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0025] 구현예 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 하나의 포획 시약이 N-말단 프로-BNP에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0026] 구현예 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 안티트롬빈 III에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0027] 구현예 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 GPR56에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0028] 구현예 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 겔솔린(Gelsolin)에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0029] 구현예 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ST4S6에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0030] 구현예 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 CHSTC에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0031] 구현예 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 FSH에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0032] 구현예 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 IL-1 sRII에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0033] 구현예 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 PLXB2에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0034] 구현예 12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 SAP에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0035] 구현예 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 TFPI에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0036] 구현예 14. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 3개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0037] 구현예 15. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 또는 적어도 13개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0038] 구현예 16. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 2-13개의 바이오마커로 구성되는 방법.
- [0039] 구현예 17. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 13개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0040] 구현예 18. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 13개의 바이오마커로 구성되는 방법.
- [0041] 구현예 19. 구현예 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 적어도 40세인 방법.
- [0042] 구현예 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 심혈관 질환의 알려진 이력이 없는 방법.
- [0043] 구현예 21. 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 4년 내에 1차 심혈관 사건을 가질 대상체의 위험을 결정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0044] 구현예 22. 구현예 21에 있어서, 대상체가 1차 심혈관 사건을 가질 위험이 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 1년, 2년, 3년 또는 4년 내인 방법.
- [0045] 구현예 23. 구현예 21 또는 22에 있어서, 1차 심혈관 사건이 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한

입원, 또는 심혈관 질환으로 인한 사망인 방법.

- [0046] 구현예 24. 구현예 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 위험이 정량적 확률로 결정되는 방법.
- [0047] 구현예 25. 구현예 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 위험이 위험의 정성적 수준으로 결정되는 방법.
- [0048] 구현예 26. 구현예 25에 있어서, 위험의 정성적 수준이 낮거나, 보통이거나, 높은 방법.
- [0049] 구현예 27. 구현예 1 또는 2에 있어서, 하나의 포획 시약이 SVEP1에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0050] 구현예 28. 구현예 1, 2 또는 27 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ARL11에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0051] 구현예 29. 구현예 1, 2, 27, 또는 28 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ANTR2에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0052] 구현예 30. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 CA125에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0053] 구현예 31. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 GOLM1에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0054] 구현예 32. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 PPR1A에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0055] 구현예 33. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ERBB3에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0056] 구현예 34. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 suPAR에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0057] 구현예 35. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 GDF-11/8에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0058] 구현예 36. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 JAM-B에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0059] 구현예 37. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ATS13에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0060] 구현예 38. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 스폰딘(Spondin)-1에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0061] 구현예 39. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 NCAM-120에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0062] 구현예 40. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 TFF3에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0063] 구현예 41. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 SIRT2에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0064] 구현예 42. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ANP에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0065] 구현예 43. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 NELL1에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0066] 구현예 44. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 LRP11에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0067] 구현예 45. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 NDST1에 특이적으로 결합하는 방법.

- [0068] 구현예 46. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 PTPRI에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0069] 구현예 47. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 CILP2에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0070] 구현예 48. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 CA2D3에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0071] 구현예 49. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 ITI 중쇄 H2에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0072] 구현예 50. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 IGDC4에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0073] 구현예 51. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 하나의 포획 시약이 BNP에 특이적으로 결합하는 방법.
- [0074] 구현예 52. 구현예 27 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 3개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0075] 구현예 53. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 또는 적어도 27개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0076] 구현예 54. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 2-27개의 바이오마커로 구성되는 방법.
- [0077] 구현예 55. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 적어도 27개의 바이오마커를 포함하는 방법.
- [0078] 구현예 56. 구현예 1, 2, 또는 27 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 바이오마커 세트가 27개의 바이오마커로 구성되는 방법.
- [0079] 구현예 57. 구현예 27 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 적어도 40세인 방법.
- [0080] 구현예 58. 구현예 27 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 명백히 안정한 심혈관 질환을 갖는 방법.
- [0081] 구현예 59. 구현예 58에 있어서, 명백히 안정한 심혈관 질환이 심근경색, 뇌졸중, 심부전, 재혈관화, 비정상적 스트레스 시험, 관상 심장 질환을 제시하는 조영, 또는 비정상적인 관상 칼슘 점수의 이력을 포함하는 방법.
- [0082] 구현예 60. 구현예 59에 있어서, 심근경색 또는 뇌졸중이 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 적어도 6개월 전에 발생한 방법.
- [0083] 구현예 61. 구현예 59에 있어서, 비정상적 스트레스 시험이 트레드밀 또는 핵의학 기반 시험인 방법.
- [0084] 구현예 62. 구현예 59에 있어서, 관상 심장 질환을 제시하는 조영이 50% 이상의 관상 동맥 협착을 나타내는 혈관조영술인 방법.
- [0085] 구현예 63. 구현예 27 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 4년 내에 대상체가 2차 심혈관 사건을 가질 위험을 결정하는 단계를 포함하는 방법.
- [0086] 구현예 64. 구현예 63에 있어서, 대상체가 2차 심혈관 사건을 가질 위험이 대상체로부터 샘플을 채취한 날로부터 1년, 2년, 3년 또는 4년 내인 방법.
- [0087] 구현예 65. 구현예 63 또는 64에 있어서, 2차 심혈관 사건이 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원 또는 사망인 방법.
- [0088] 구현예 66. 구현예 63 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 위험이 정량적 확률로 결정되는 방법.
- [0089] 구현예 67. 구현예 63 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 위험이 위험의 정성적 수준으로 결정되는 방법.

- [0090] 구현예 68. 구현예 67에 있어서, 위험의 정성적 수준이 낮거나, 보통이거나, 높은 방법.
- [0091] 일부 구현예에서, 심혈관 사건(CV) 사건의 위험에 대해 대상체를 스크리닝하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0092] (a) N-말단 프로-BNP, sTREM-1, MMP-12, 안티트롬빈 III, GPR56, 겔솔린, ST4S6, CHSTC, FSH, IL-1 sRII, PLXB2, SAP 및 TFPI로부터 선택된 N개의 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 3 내지 13의 정수인, 단계; 및
- [0093] (b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.
- [0094] 일부 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0095] (a) BNP, sTREM-1, MMP-12, SVEP1, ARL11, ANTR2, CA125, GOLM1, PPR1A, ERBB3, suPAR, GDF-11/8, JAM-B, ATS13, 스폰딘-1, NCAM-120, TFF3, SIRT2, ANP, NELL1, LRP11, NDST1, PTPRJ, CILP2, CA2D3, ITI 중쇄 H2 및 IGDC4로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 8 내지 27의 정수인, 단계; 및
- [0096] (b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.
- [0097] 일부 구현예에서, 대상체가 CV 사건을 가질 가능성을 예측하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0098] (a) N-말단 프로-BNP, sTREM-1, MMP-12, 안티트롬빈 III, GPR56, 겔솔린, ST4S6, CHSTC, FSH, IL-1 sRII, PLXB2, SAP, 및 TFPI로부터 선택된 N개의 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 3 내지 13의 정수인, 단계; 및
- [0099] (b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.
- [0100] 일부 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0101] (a) BNP, sTREM-1, MMP-12, SVEP1, ARL11, ANTR2, CA125, GOLM1, PPR1A, ERBB3, suPAR, GDF-11/8, JAM-B, ATS13, 스폰딘-1, NCAM-120, TFF3, SIRT2, ANP, NELL1, LRP11, NDST1, PTPRJ, CILP2, CA2D3, ITI 중쇄 H2 및 IGDC4로부터 선택된 N개의 단백질 바이오마커를 포함하는 바이오마커 패널을 형성하는 단계로서, N은 8 내지 27의 정수인, 단계; 및
- [0102] (b) 대상체로부터의 샘플에서 패널의 N개의 바이오마커 각각의 수준을 검출하는 단계.
- [0103] 일부 구현예에서, N개의 바이오마커를 포함하는 패널에서 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 또는 27개의 바이오마커의 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 심혈관 사건(CV)의 위험 또는 가능성에 대해 대상체를 스크리닝하는 방법이 제공된다.
- [0104] 일부 구현예에서, 4년 내에 CV 사건을 가질 대상체의 위험 또는 가능성은 바이오마커 세트의 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 또는 적어도 13개의 바이오마커의 수준이 각각의 바이오마커의 대조군 수준에 비해 각각 비정상적인 경우에 높다.
- [0105] 일부 구현예에서, 방법은 표 1에서 하나 이상의 바이오마커의 수준을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 표 2에서 하나 이상의 바이오마커의 수준을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0106] 일부 구현예에서, 대상체는 관상 동맥 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 CV 사건의 이력이 없다. 일부 구현예에서, 대상체는 ACC(American College of Cardiology) 통합 코호트 방정식(PCE)에서 고위험 분류를 갖는다. 문헌(Goff DC, Jr. et al., "ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines" *Circulation*. 2013)을 참고한다. 일부 구현예에서, 대상체는 PCE에서 중간 위험 분류를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 PCE에서 저위험 분류를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 하나의 CV 사건을 갖는다. 일부 구현예에서, CV 사건은 심근경색, 뇌졸중, 심부전으로 인한 입원, 경허혈 발작, 및 사망으로부터 선택된다.
- [0107] 일부 구현예에서, 샘플은 혈액 샘플, 혈청 샘플, 혈장 샘플 및 소변 샘플로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 샘플

플은 혈장 샘플이다. 일부 구현예에서, 방법은 시험관내 수행된다.

- [0108] 일부 구현예에서, 각각의 바이오마커는 단백질 바이오마커이다. 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 샘플의 바이오마커를 바이오마커 포획 시약 세트와 접촉시키는 단계를 포함하고, 바이오마커 포획 시약 세트의 각각의 바이오마커 포획 시약은 검출되는 상이한 바이오마커에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 각각의 바이오마커 포획 시약은 항체 또는 압타머이다. 일부 구현예에서, 각각의 바이오마커 포획 시약은 압타머이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 압타머는 느린 오프-레이트(slow off-rate) 압타머이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 느린 오프-레이트 압타머는 변형이 있는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 느린 오프-레이트 압타머는 ≥ 30 분, ≥ 60 분, ≥ 90 분, ≥ 120 분, ≥ 150 분, ≥ 180 분, ≥ 210 분, 또는 ≥ 240 분의 오프 레이트($t_{1/2}$)로 그의 표적 단백질에 결합한다.
- [0109] 일부 구현예에서, CV 사건의 위험 또는 가능성은 바이오마커 수준 및 하기로부터 선택되는 추가적인 생의학 정보 중 적어도 하나의 항목에 기반한다:
- [0110] a) 이전의 심근경색, 하나 이상의 관상 혈관에서 50% 초과 협착의 혈관조영학적 증거, 트레드밀 또는 비정상적 스트레스 시험검사에 의한 운동 유발성 허혈 또는 이전의 관상 재혈관화로 구성되는 군으로부터 선택된 심혈관 위험 인자의 존재에 해당하는 정보,
- [0111] b) 대상체의 신체 기술어에 해당하는 정보,
- [0112] c) 대상체의 체중 변화에 해당하는 정보,
- [0113] d) 대상체의 민족에 해당하는 정보,
- [0114] e) 대상체의 성별에 해당하는 정보,
- [0115] f) 대상체의 흡연 이력에 해당하는 정보,
- [0116] g) 대상체의 알코올 사용 이력에 해당하는 정보,
- [0117] h) 대상체의 직업 이력에 해당하는 정보,
- [0118] i) 심혈관 질환 또는 다른 순환계 병태에 대한 대상체의 가족력에 해당하는 정보,
- [0119] j) 대상체 또는 대상체의 가족 구성원에서 심혈관 질환의 고위험과 상관관계가 있는 적어도 하나의 유전적 마커의 대상체 내 존재 또는 부재에 해당하는 정보,
- [0120] k) 대상체의 임상 증상에 해당하는 정보,
- [0121] l) 다른 실험실 시험에 해당하는 정보,
- [0122] m) 대상체의 유전자 발현 값에 해당하는 정보,
- [0123] n) 고포화 지방, 고염분, 고콜레스테롤 식단과 같은 알려진 심혈관 위험 요인의 대상체의 소비에 해당하는 정보,
- [0124] o) 심전도, 심초음파, 내막 두께에 대한 경동맥 초음파, 유동 매개 확장, 맥파 속도, 발목-상완 지수, 스트레스 심초음파, 심근 관류 조영, CT에 의한 관상 칼슘, 고해상 CT 혈관조영술, MRI 조영 및 다른 조영 기법으로 구성되는 군으로부터 선택된 기술로 얻은 대상체의 조영 결과에 해당하는 정보,
- [0125] p) 대상체의 약물에 관한 정보,
- [0126] q) 대상체의 나이에 해당하는 정보, 및
- [0127] r) 대상체의 신장 기능에 관한 정보.
- [0128] 일부 구현예에서, CV 사건의 위험 또는 가능성은 바이오마커 수준 및 적어도 대상체의 연령에 기반한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 방법은 의료 보험료 또는 생명 보험료를 결정할 목적으로 CV 사건의 위험 또는 가능성을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 의료 보험 또는 생명 보험에 대한 보장 또는 보험료를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 의료 자원의 활용을 예측 및/또는 관리하기 위해 방법으로부터 생성된 정보를 사용하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 의료 행위, 병원 또는 회사

를 인수하거나 구매하는 결정을 가능하게 하기 위해 방법으로부터 생성된 정보를 사용하는 단계를 추가로 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, 심혈관(CV) 사건의 위험 또는 가능성을 평가하기 위한 컴퓨터 구현 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 컴퓨터 상에서 대상체에 대한 바이오마커 정보를 검색하는 단계로서, 바이오마커 정보는 (a) 대상체로부터의 샘플에서 표 1로부터 선택된 3 내지 13개의 바이오마커의 수준; 또는 (b) 표 2로부터 선택된 8 내지 27개의 바이오마커의 수준을 포함하는, 단계; 상기 바이오마커 값 각각의 분류를 컴퓨터로 수행하는 단계; 복수의 분류에 기반하여 대상체에 대한 CV 사건에 대한 위험 평가 결과를 나타내는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체에 대한 CV 사건의 위험 또는 가능성의 평가 결과를 나타내는 단계는 컴퓨터 디스플레이에 결과를 표시하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0131] **도 1**은 HUNT3훈련 세트에 대해 1차 CVD 모델의 4가지 위험 구간으로 계층화된 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 나타내며, 음영 처리된 영역은 카플란-마이어 추정치의 95% 신뢰도 구간을 나타낸다. 선은 위에서 아래로 $1x(<0.0215)$, $n=469$ 이며; $2x-3x(<0.0505)$, $n=944$ 이고; $4x-5x(<0.077)$, $n=285$ 이고; $6x$ 이상(>0.077), $n=315$ 이다.

도 2는 HUNT3훈련 세트에 대해 2차 CVD 모델의 4개의 위험 구간으로 계층화된 카플란-마이어 생존 곡선을 나타내며, 음영 처리된 영역은 카플란-마이어 추정치의 95% 신뢰도 구간을 나타낸다. 선은 위에서 아래로 <0.075 , $n=117$ 이며; <0.25 , $n=285$ 이고; >0.5 , $n=121$ 이고; >0.5 , $n=82$ 이다.

도 3은 ARIC 5차 방문 확인 세트에 대해 2차 CVD 모델의 4개 위험 구간으로 계층화된 카플란-마이어 생존 곡선을 나타내며, 음영 처리된 영역은 카플란-마이어 추정치의 95% 신뢰도 구간을 나타낸다. 선은 위에서 아래로 <0.075 , $n=35$ 이며; <0.25 , $n=103$ 이고; <0.5 , $n=43$ 이고; >0.5 , $n=27$ 이다.

도 4는 컷오프로 계층화된 HUNT3 검증 세트에 대한 생존 곡선을 나타낸다. 선은 위에서 아래로 <0.075 , $n=24$ 이며; <0.25 , $n=61$ 이고; <0.5 , $n=25$ 이고; >0.5 , $n=29$ 이다.

도 5는 컷오프로 계층화된 ARIC 5차 방문 검증 세트에 대한 생존 곡선을 나타낸다. 선은 위에서 아래로 <0.075 , $n=13$ 이며; <0.25 , $n=202$ 이고; <0.5 , $n=271$ 이고; >0.5 , $n=345$ 이다.

도 6은 본원에 기재된 다양한 컴퓨터 구현 방법과 함께 사용하기 위한 비제한적인 예시적인 컴퓨터 시스템을 도시한다.

도 7은 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 검출하기 위해 사용될 수 있는 비제한적인 예시적인 압타머 검정을 예시한다.

도 8a 및 도 8b는 느린 오프-레이트 압타머와 같은 압타머에 혼입될 수 있는 특정 예시적인 변형된 피리미딘을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 본 발명은 특정의 대표적인 구현예와 관련하여 기재될 것이지만, 본 발명이 청구범위에 의해 정의되고 이러한 구현예로 제한되지 않는다는 것이 이해될 것이다.

[0133] 당업자는 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질이 본 발명의 실시예에 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 본 발명은 결코 기재된 방법 및 물질로 제한되지 않는다.

[0134] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치 및 물질이 본 발명의 실시예에 사용될 수 있지만, 특정 방법, 장치 및 물질이 본원에 기재되어 있다.

[0135] 본원에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문서 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 공개된 특허 문서 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 나타낸 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0136] 본원에서 사용되는 용어 "포함한다", "포함하는", "포함된다", "포함되는", "함한다", "함유하는" 및 이의 임의의 변이형은 요소 또는 요소의 목록을 포함하거나 이것이 포함되거나 이를 함유하는 공정, 방법, 공정-별-산물, 또는 요지 구성에 명시적으로 나열되지 않은 다른 요소가 포함될 수 있도록, 비-배타적 방식을 포괄하려는 것이

다.

- [0137] 본 출원에는 1년 내, 2년 내, 3년 내 또는 4년 내와 같이, 정의된 시기 내에 단기간 CV 사건의 위험 예측을 위한 바이오마커, 방법, 장치, 시약, 시스템, 및 키트가 포함된다.
- [0138] "심혈관 사건" 또는 "CV 사건"은 순환계의 모든 부분의 고장 또는 부전을 의미한다. 일부 구현예에서, "심혈관 사건"은 뇌졸중, 경허혈 발작(TIA), 심근경색(MI), 순환계의 부전으로 인한 돌연사, 및/또는 심부전으로 인한 입원, 또는 가장 가능성이 높은 원인이 심혈관인 집단에서 미지 원인의 돌연사를 의미한다. 1차 CV 사건은 대상체가 경험한 첫 번째 CV 사건이다. 2차 CV 사건은 대상체가 경험한 두 번째 또는 추가 CV 사건이다.
- [0139] 심혈관 사건에는 MI, 경허혈 발작(TIA), 뇌졸중, 급성 관상 증후군 및 관상 재혈관화의 필요성과 같은 혈전성 사건이 포함될 수 있다.
- [0140] 일부 구현예에서, 바이오마커는 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 사망 및 입원으로 정의된 CV 사건과 함께 4년 기간 내에 급사 또는 미래 CV 사건의 위험 또는 가능성을 평가하기 위해 단독으로 또는 다양한 조합으로 사용하기 위해 제공된다. 하기에 상세히 기재된 바와 같이, 예시적인 구현예에는 표 1 또는 표 2에 제공된 바이오마커가 포함된다.
- [0141] 기재된 CV 사건 바이오마커 중 일부는 CV 사건의 위험 또는 가능성을 평가하는 데 단독으로 유용할 수 있지만, CV 사건 바이오마커의 다중 서브세트를 그룹화하기 위한 방법도 본원에 기재되어 있으며, 여기서 각각의 그룹화 또는 서브세트 선택은 본원에서 "바이오마커 패널" 및 패널로 상호 교환가능하게 나타내는 3개 이상의 바이오마커의 패널로 유용하다. 따라서, 다양한 구현예에는 표 1의 바이오마커 중 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개 또는 13개 모두를 포함하는 조합을 제공한다. 다른 다양한 구현예에는 표 2의 바이오마커 중 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 또는 27개 모두를 포함하는 조합을 제공한다.
- [0142] "생물학적 샘플", "샘플" 및 "시험 샘플"은 본원에서 상호 교환가능하게 사용되어 개체로부터 얻거나 달리 유래된 임의의 물질, 생물학적 유체, 조직 또는 세포를 나타낸다. 여기에는 혈액(전혈, 백혈구, 말초혈 단핵구, 비피 코트, 혈장 및 혈청 포함), 가래, 눈물, 점액, 비강 세척액, 비강 흡인물, 소변, 타액, 복강 세척액, 복수, 낭액, 샘액, 림프액, 기관지 흡인물, 활액, 관절 흡인물, 장기 분비물, 세포, 세포 추출물 및 뇌척수액이 포함된다. 여기에는 이전의 모든 것의 실험적으로 분리된 분획도 포함된다. 예를 들어, 혈액 샘플은 혈청, 혈장 또는 적혈구 또는 백혈 세포(백혈구)와 같은 특정 유형의 혈액 세포를 함유하는 분획으로 분획화될 수 있다. 일부 구현예에서, 혈액 샘플은 건조된 혈액 반점이다. 일부 구현예에서, 혈장 샘플은 건조된 혈장 반점이다. 일부 구현예에서, 샘플은 조직 및 체액 샘플의 조합과 같은 개체로부터의 샘플의 조합일 수 있다. 용어 "생물학적 샘플"은 또한, 예를 들어 대변 샘플, 조직 샘플 또는 조직 생검과 같은 균질화된 고체 물질을 함유하는 물질이 포함된다. 용어 "생물학적 샘플"에는 조직 배양 또는 세포 배양으로부터 유래된 물질도 포함된다. 생물학적 샘플을 얻기 위한 모든 적합한 방법을 사용할 수 있다; 예시적인 방법에는, 예를 들어 정맥절개술, 면봉(예로, 협측 면봉) 및 미세 바늘 흡인 생검 절차가 포함된다. 미세 바늘 흡인에 적합한 예시적인 조직에는 림프절, 폐, 갑상샘, 유방, 채장 및 간 포함된다. 샘플은 또한 예를 들어, 미세 절개(예를 들어, 레이저 포획 미세 절개(LCM) 또는 레이저 미세 절개(LMD)), 방광 세척, 도말(예를 들어, PAP 도말), 또는 도관 세척에 의해 수집될 수 있다. 대상체로부터 얻거나 유래된 "생물학적 샘플"에는 대상체로부터 얻은 후 임의의 적합한 방식으로 처리된 임의의 이러한 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈장 샘플이다.
- [0143] 또한, 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 다수의 대상체로부터 생물학적 샘플을 취하여 이를 풀링하거나, 각각의 대상체의 생물학적 샘플의 분취량을 풀링함으로써 유래될 수 있다. 풀링된 샘플은 단일 대상체로부터의 샘플에 대해 본원에 기재된 대로 처리될 수 있으며, 예를 들어 풀링된 샘플에서 불량한 예후가 확립된 경우 각각의 대상체의 생물학적 샘플을 재시험하여 어떤 대상체(들)에서 CV 사건의 위험이 증가하거나 감소하는지를 결정할 수 있다.
- [0144] 본 명세서의 목적을 위해, "대상체로부터의 생물학적 샘플에 기인한 데이터"라는 문구는 대상체의 생물학적 샘플로부터 유래되거나 이를 사용하여 생성된 일부 형태의 데이터를 의미한다. 데이터는 한 측정 시스템의 단위에서 또 다른 측정 시스템의 단위로 변환하는 것과 같이, 생성된 후 어느 정도 형식이 변경되거나 수정되거나 수학적으로 변경되었을 수 있다; 그러나 데이터는 생물학적 샘플로부터 유래되었거나 생물학적 샘플을 사용하여

생성된 것으로 이해된다.

- [0145] "표적", "표적 분자" 및 "분석물질"은 생물학적 샘플에 존재할 수 있는 임의의 관심 분자를 나타내기 위해 본원에서 상호 교환가능하게 사용된다. "관심 분자"에는 단백질의 경우, 예를 들어 아미노산 서열의 사소한 변이형, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화와 같은 특정 분자의 임의의 사소한 변이형, 또는 분자의 동일성을 실질적으로 변경하지 않는, 표지 성분과의 접합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변형이 포함된다. "표적 분자", "표적" 또는 "분석물질"은 분자 또는 다중 분자 구조의 한 유형 또는 종의 사본 세트를 나타낸다. 예시적인 표적 분자에는 단백질, 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질, 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 아피바디, 항체 모방체, 바이러스, 병원체, 독성 물질, 기질, 대사산물, 전이 상태 유사체, 보조인자, 억제제, 약물, 염료, 영양소, 성장 인자, 세포, 조직 및 임의의 전술한 것의 임의의 단편 또는 부분이 포함된다. 일부 구현예에서, 표적 분자는 단백질이고, 이 경우 표적 분자는 "표적 단백질"로 나타낼 수 있다.
- [0146] 본원에서 사용된 "포획 제제" 또는 "포획 시약"은 바이오마커에 특이적으로 결합할 수 있는 분자를 나타낸다. "표적 단백질 포획 시약"은 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 분자를 나타낸다. 비제한적인 예시적인 포획 시약에는 압타머, 항체, 애드넥틴, 안키린, 다른 항체 모방체 및 다른 단백질 스캐폴드, 자가항체, 키메라, 소분자, 핵산, 렉틴, 리간드-결합 수용체, 각인된 중합체, 아비머, 펩티드모방체, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체, 합성 수용체, 및 임의의 전술한 포획 시약의 변형 및 단편이 포함된다. 일부 구현예에서, 포획 시약은 압타머 및 항체로부터 선택된다.
- [0147] 용어 "항체"는 임의의 종의 전장 항체 및 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 단일 사슬 항체, Fv 단편, 및 단일 사슬 Fv 단편이 포함되는 이러한 항체의 단편 및 유도체를 나타낸다. 용어 "항체"는 또한 파지 디스플레이 유래 항체 및 단편, 아피바디, 나노바디 등과 같은 합성 유래 항체를 나타낸다.
- [0148] 본원에서 사용된 "마커" 및 "바이오마커"는 대상체에서의 정상 또는 비정상 과정 또는 대상체의 질환 또는 다른 병태를 나타내거나 그 징후인 표적 분자를 나타내기 위해 상호 교환가능하게 사용된다. 보다 구체적으로, "마커" 또는 "바이오마커"는 정상이든 비정상이든, 그리고 비정상인 경우 만성이든 급성이든, 특정 생리적 상태 또는 과정의 존재와 관련된 해부학적, 생리학적, 생화학적 또는 분자적 파라미터이다. 바이오마커는 실험실 검정 및 의료 조영을 포함한 다양한 방법으로 검출하고 측정할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이오마커는 표적 단백질이다.
- [0149] 본원에서 사용된 "바이오마커 수준" 및 "수준"은 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출하기 위한 임의의 분석 방법을 사용하여 수행되고 생물학적 샘플에서 바이오마커의, 이에 대한, 또는 이에 해당하는 존재, 부재, 절대량 또는 절대 농도, 상대량 또는 상대 농도, 역가, 수준, 발현 수준, 측정된 수준의 비율 등을 나타내는 측정을 나타낸다. "수준"의 정확한 특성은 바이오마커를 검출하기 위해 사용된 특정 분석 방법의 구체적 설계 및 구성 요소에 따라 다르다.
- [0150] 바이오마커가 대상체에서의 비정상적인 과정이나 질환 또는 다른 병태를 나타내거나 그 징후일 때, 해당 바이오마커는 일반적으로 대상체에서의 정상적인 과정 또는 질환 또는 다른 병태의 부재를 나타내거나 그 징후인 바이오마커의 발현 수준 또는 값과 비교하여 과발현되거나 과소발현되는 것으로 기재된다. "상향조절", "상향조절된", "과발현", "과발현된" 및 이의 모든 변이형은 건강하거나 정상인 대상체로부터의 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출되는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위) 초과인 생물학적 샘플 중 바이오마커의 값 또는 수준을 나타내기 위해 상호 교환가능하게 사용된다. 용어는 또한 특정 질환의 상이한 단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위)보다 큰 생물학적 샘플 중 바이오마커의 값 또는 수준을 나타낼 수 있다.
- [0151] "하향조절", "하향조절된", "과소발현", "과소발현된" 및 이의 모든 변이형은 건강하거나 정상인 대상체로부터의 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출되는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위) 미만인 생물학적 샘플 중 바이오마커의 값 또는 수준을 나타내기 위해 상호 교환가능하게 사용된다. 용어는 또한 특정 질환의 상이한 단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위) 미만인 생물학적 샘플 중 바이오마커의 값 또는 수준을 나타낼 수 있다.
- [0152] 추가로, 과발현되거나 과소발현되는 바이오마커는 대상체에서의 정상적인 과정 또는 질환 또는 다른 병태의 부재를 나타내거나 그 징후인 바이오마커의 "정상" 발현 수준 또는 값과 비교하여 "차별적으로 발현되는" 또는 "차별적 수준" 또는 "차별적 값"을 갖는 것으로도 나타낼 수 있다. 따라서, 바이오마커의 "차별적 발현"은 또한 바이오마커의 "정상" 발현 수준으로부터의 변이형으로서 나타낼 수 있다.

- [0153] 표적 분자의 "대조군 수준"은 질환 또는 병태가 없는 대상체, 또는 질환 또는 질환 또는 병태를 가질 위험이 없거나 의심되지 않는 대상체, 또는 병태, 또는 1차 또는 첫 번째 심혈관 사건이 있었지만 2차 심혈관 사건이 없는 대상체, 또는 안정한 심혈관 질환이 있는 대상체로부터의 동일한 샘플 유형에서 표적 분자의 수준을 나타낸다. 대조군 수준은 질환이나 병태가 없거나 질환이나 병태가 의심되지 않거나 가질 위험이 없거나 1차 또는 첫 번째 심혈관 사건이 있었지만 2차 심혈관 사건이 없는, 또는 안정한 심혈관 질환을 갖거나 이의 조합인 대상체의 집단으로부터의 샘플 중 표적 분자의 평균 수준을 나타낼 수 있다.
- [0154] 본원에서 사용된 바와 같이, "개체", "대상체" 및 "환자"는 포유동물을 지칭하기 위해 상호 교환가능하게 사용된다. 포유동물 대상체는 인간 또는 비인간일 수 있다. 다양한 구현예에서, 대상체는 인간이다. 건강하거나 정상인 대상체는 관심 질환 또는 병태(예를 들어, 심근경색, 뇌졸중 및 심부전으로 인한 입원과 같은 심혈관 사건이 포함됨)가 기존 진단 방법에 의해 검출될 수 없는 대상체이다.
- [0155] "진단하다", "진단하는", "진단" 및 그 변이형은 그 대상체에 관한 하나 이상의 징후, 증상, 데이터 또는 다른 정보에 기반하는 대상체의 건강 상태 또는 병태의 검출, 결정 또는 인식을 나타낸다. 대상체의 건강 상태는 건강/정상으로 진단되거나(즉, 질환 또는 병태의 부재 진단) 질환/비정상적으로 진단될 수 있다(즉, 질환 또는 병태의 존재 진단, 또는 특성 평가). "진단하다", "진단하는", "진단" 등의 용어는 특정 질환 또는 병태와 관련하여 질환의 초기 검출; 질환의 특성규명 또는 분류; 질환의 진행, 관해 또는 재발의 검출; 및 대상체에 대한 치료 또는 치료법의 투여 후 질환 반응의 검출을 포괄한다. CV 사건의 위험 예측에는 CV 사건의 위험이 증가된 대상체와 그렇지 않은 대상체를 구별하는 것이 포함된다.
- [0156] "예후를 내리다", "예후를 내리는", "예후" 및 이의 변이형은 질환 또는 병태가 있는 대상체에서 질환 또는 병태의 미래 경과에 대한 예측(예로, 환자 생존 예측)을 나타내며, 이러한 용어는 대상체에 대한 치료 또는 치료법의 투여 후 질환 또는 병태 반응의 평가를 포괄한다.
- [0157] "평가하다", "평가하는", "평가" 및 이의 변이형은 "진단하다" 및 "예후를 내리다"를 모두 포괄하고 또한 질환이 없는 대상체에서 질환 또는 병태의 미래 경과에 대한 결정 또는 예측뿐만 아니라 질환이 명백히 치유되었거나 병태가 해결된 대상체에서 질환 또는 병태가 재발할 위험에 관한 결정 또는 예측을 포괄한다. 용어 "평가하다"는 또한, 예를 들어 대상체가 치료제에 호의적으로 반응할 가능성이 있는지 또는 치료제에 반응하지 않을 것인지의(또는 예를 들어, 독성 또는 다른 바람직하지 않은 부작용을 경험할 것인지의) 예측과 같은 치료법에 대한 대상체의 반응 평가, 대상체에 투여하기 위한 치료제 선택, 또는 대상체에게 투여된 치료법에 대한 대상체의 반응 모니터링 또는 결정을 포괄한다. 따라서, CV 사건의 위험을 "평가하는" 것에는 예를 들어 하기 중 임의의 것이 포함될 수 있다: 대상체에서 CV 사건의 미래 위험 예측; 명백히 CV 문제가 없는 대상체에서 CV 사건의 위험 예측; 특정 유형의 CV 사건 예측; CV 사건까지의 시간 예측; 또는 CV 치료에 대한 대상체의 반응 결정 또는 예측 또는 대상체의 생물학적 샘플로부터 유래된 바이오마커 값의 결정에 기반하여 대상체에게 투여할 CV 치료 선택. CV 사건의 위험 평가에는 연속적인 규모에서 CV 사건의 위험 평가, 또는 분류를 확대함에 있어 CV 사건의 위험 분류와 같은 구현예가 포함될 수 있다. 위험 분류에는, 예를 들어 "CV 사건의 중간 위험", "CV 사건의 고위험" 및/또는 "CV 사건의 저위험"과 같은 두 가지 이상의 분류로 분류하는 것이 포함된다. 일부 구현예에서, CV 사건의 위험 평가는 정의된 기간 동안이다. 비제한적인 예시적인 정의된 기간에는 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 및 5년 초과가 포함된다.
- [0158] 본원에서 사용된 바와 같은 "추가적인 생의학 정보"는 본원에 기재된 임의의 바이오마커를 사용하는 것 외에 CV 위험 또는 더 구체적으로 CV 사건 위험과 관련된 대상체에 대한 하나 이상의 평가를 나타낸다. "추가적인 생의학 정보"에는 하기 중 임의의 것이 포함된다: 대상의 키 및/또는 체중을 포함한 대상의 신체 기술어; 대상체의 나이; 대상체의 성별; 체중 변화; 대상체의 민족; 직업 이력; 심혈관 질환(또는 다른 순환계 장애)의 가족력; 대상체에서 심혈관 질환(또는 다른 순환계 장애)의 더 고위험과 상관관계가 있는 유전적 마커(들)의 존재 또는 경동맥 내막 두께의 가족 구성원 변경; 흉통, 체중 증가 또는 감소 유전자 발현 값과 같은 임상 증상; 방사선 조영에 의해 관찰된 신체 기술어가 포함되는 대상체의 신체 기술어; 흡연 상태; 알코올 사용 이력; 직업 이력;식이 습관 - 소금, 포화 지방 및 콜레스테롤 섭취; 카페인 소비; 및 심전도, 심초음파, 내막 두께에 대한 경동맥 초음파, 유동 매개 확장, 맥파 속도, 발목-상완지수, 스트레스 심초음파, 심근 관류 조영, CT에 의한 관상 칼슘, 고해상 CT 혈관조영술, MRI 조영, 및 다른 조영 방식; 및 대상의 약물. 다른 실험실 시험(예로, HDL, LDL 시험, CRP 수준, Nt-프로BNP 시험, BNP 시험, 고감도 트로포닌 시험, 갈락틴-3 시험, 혈청 알부민 시험, 크레아틴 시험)이 포함되는 추가적인 생의학 정보에 대한 평가와 함께 바이오마커 수준 시험은, 예를 들어 바이오마커 시험 단독 또는 추가적인 생의학 정보의 임의의 특정 항목 평가 단독(예로, 경동맥 내막 두께 조영 단독)과 비교하여 CV 사건 예측에 대한 민감도, 특이성 및/또는 AUC를 개선할 수 있다. 추가적인 생의학 정보는 일상적인

환자 설문지 또는 건강 이력 설문지 등을 사용하여 대상체 자신으로부터, 또는 의료 종사자 등으로부터와 같이 당분야에 알려진 일상적인 기술을 사용하여 대상체로부터 얻을 수 있다. 임의의 추가적인 생의학 정보 평가와 함께 바이오마커 수준 시험은, 예를 들어 바이오마커 시험 단독 또는 추가적인 생의학 정보 단독의 임의의 특정 항목 평가(예로, CT 조영 단독)와 비교하여 CV 사건(또는 다른 심혈관 관련 용도) 예측에 대한 민감도, 특이성 및/또는 역치를 개선할 수 있다.

[0159] 본원에서 사용된 바와 같이, 바이오마커 값과 관련하여 "검출하는" 또는 "결정하는"에는 바이오마커 수준에 해당하는 신호를 관찰하고 기록하는 데 사용되는 기기 및 해당 신호를 생성하는 데 필요한 물질(들) 모두의 사용이 포함된다. 다양한 구현예에서, 바이오마커 수준은 형광, 화학발광, 표면 플라즈몬 공명, 표면 음파, 질량 분광측정, 적외선 분광측정, 라만 분광측정, 원자력 현미경측정, 주사 터널링 현미경측정, 전기화학적 검출 방법, 핵 자기 공명, 양자점 등이 포함되는 임의의 적합한 방법을 사용하여 검출된다.

[0160] 본원에서 사용된 바와 같은 PCE 위험 분류는 문헌(Goff et al., "2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines" *Circulation*에서 온라인 공개됨, November 12, 2013(인쇄물 ISSN: 0009-7322, 온라인 ISSN: 1524-4539))에 따라 결정된다. 본원에서 사용된 바와 같은 "높은" PCE 위험 분류는 경질 죽상동맥 경화증/심혈관 질환(ASCVD) 사건에 대한 20.0% 이상의 예측 10년 위험(치명적이지 않은 심근경색 또는 관상 심장병(CHD) 사망의 첫 번째 발생, 또는 치명적이거나 비치명적인 뇌졸중으로 정의됨)이며; "중간" PCE 위험 분류는 10.0-19.9%의 경질 ASCVD 사건에 대한 예측 10년 위험이고; "낮은" PCE 위험 분류는 경질 ASCVD 사건에 대한 <10.0% 예측 10년 위험이다. 문헌(Goff, 16페이지, 표 5)을 참고한다.

[0161] "고체 지지체"는 본원에서 공유 또는 비공유 결합을 통해 분자가 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있는 표면을 갖는 임의의 기재를 나타낸다. "고체 지지체"는 다양한 물리적 형식을 가질 수 있으며, 예를 들어 멤브레인; 칩(예로, 단백질 칩); 슬라이드(예로, 유리 슬라이드 또는 커버슬립); 칼럼; 예를 들어, 비드와 같은 중공, 고체, 반고체, 기공 또는 공동 함유 입자; 젤; 광섬유 물질이 포함되는 섬유; 매트릭스; 및 샘플 리셉터클이 포함될 수 있다. 예시적인 샘플 리셉터클에는 샘플 웰, 튜브, 모세관, 바이알, 및 샘플을 보유할 수 있는 다른 상이한 용기, 홈 또는 만입부가 포함된다. 샘플 리셉터클은 마이크로타이터 플레이트, 슬라이드, 미세유체 장치 등과 같은 다중 샘플 플랫폼에 함유될 수 있다. 지지체는 천연 또는 합성 물질, 유기 또는 무기 물질로 이루어질 수 있다. 포획 시약이 부착되는 고체 지지체의 조성은 일반적으로 부착 방법(예로, 공유 부착)에 의존한다. 다른 예시적인 리셉터클에는 검정 및 관련 조작이 발생할 수 있는 미세액적 및 미세유체 제어 또는 벌크 오일/수성 에멀전이 포함된다. 적합한 고체 지지체에는 예를 들어 플라스틱, 수지, 다당류, 실리카 또는 실리카 기반 물질, 기능화된 유리, 개질된 실리콘, 탄소, 금속, 무기 유리, 멤브레인, 나일론, 천연 섬유(예로, 실크, 양모 및 면), 중합체 등이 포함된다. 고체 지지체를 이루는 물질에는 예를 들어 포획 시약의 부착에 사용되는 카복시, 아미노 또는 하이드록실기와 같은 반응기가 포함될 수 있다. 중합체성 고체 지지체에는 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌 글리콜 테트라프탈레이트, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴로니트릴, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리테트라플루오로에틸렌, 부틸 고무, 스티렌부타디엔 고무, 천연 고무, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, (폴리)테트라플루오로에틸렌, (폴리)비닐리덴플루오라이드, 폴리카보네이트 및 폴리메틸렌텐이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 고체 지지체 입자에는 예를 들어 Luminex® 유형 암호화 입자, 자성 입자 및 유리 입자와 같은 암호화 입자가 포함된다.

[0162] **바이오마커의 예시적 용도**

[0163] 다양한 예시적인 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 분석 방법이 포함되는 임의의 수의 여러 분석 방법을 통해 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 대상체의 순환에 존재하는 하나 이상의 바이오마커에 해당하는 하나 이상의 바이오마커 값을 검출함으로써 대상체에서 CV 사건의 위험 또는 가능성을 평가하는 방법이 제공된다. 이들 바이오마커는, 예를 들어 CV 사건의 위험이 증가하지 않은 대상체와 비교하여 CV 사건의 위험이 증가된 대상체에서 차별적으로 발현된다. 대상체에서 바이오마커의 차별적 발현의 검출은 예를 들어 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년 시기 내에 CV 사건의 위험 예측을 허용하는 데 사용될 수 있다.

[0164] 독립형 진단 시험으로서 바이오마커 수준을 시험하는 것 외에도, 바이오마커 수준은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 또는 다른 유전적 병변 또는 질환 또는 병태의 감수성의 위험 증가를 나타내는 가변성의 결정과 함께 수행될 수도 있다(예를 들어, Amos et al., *Nature Genetics* 40, 616-622 (2009) 참고). 바이오마커 수준은 방사선 스크리닝과 함께 사용할 수도 있다. 바이오마커 수준은 관련 증상 또는 유전자 시험과 함께 사용할 수도 있다. 본원에 기재된 임의의 바이오마커의 검출은 CV 사건 위험이 결정된 후 고위험 대상체에서 보다 적극적인 케

어 수준으로 증가시키는 것이 포함되는, CV 사건의 위험이 대상의 적절한 임상 케어를 안내하기 위해 평가된 후에 유용할 수 있다. 관련 증상 또는 위험 요인과 함께 바이오마커 수준을 시험하는 것 외에도, 바이오마커에 관한 정보는 다른 유형의 데이터, 특히 심혈관 사건에 대한 대상체의 위험을 나타내는 데이터(예로, 환자의 임상 병력, 증상, 심혈관 질환의 가족력, 흡연 또는 알코올 사용 이력, 유전적 마커(들)의 존재 및/또는 다른 바이오마커의 상태와 같은 위험 요인)와 함께 평가될 수 있다. 이러한 다양한 데이터는 컴퓨터 또는 다른 기구/장치에서 구현될 수 있는 컴퓨터 프로그램/소프트웨어와 같은 자동화된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0165] 고위험 대상체에서 방사선 스크리닝과 함께 바이오마커 수준을 시험하는 것(예로, 관상 혈관조영술에서 검출된 폐색과 함께 바이오마커 수준 평가) 외에도 바이오마커에 관한 정보는 다른 유형의 데이터, 특히 CV 사건을 갖는 대상체의 위험을 나타내는 데이터(예로, 환자의 임상 병력, 증상, 심혈관 질환의 가족력, 대상체가 흡연자, 과음 사용자인지 여부와 같은 위험 요인 및/또는 다른 바이오마커의 상태 등)과 함께 평가될 수 있다. 이러한 다양한 데이터는 컴퓨터 또는 다른 기구/장치에서 구현될 수 있는 컴퓨터 프로그램/소프트웨어와 같은 자동화된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0166] 바이오마커의 시험은 또한 현재 임상 행위에서 사용되는 가이드라인 및 심혈관 위험 알고리즘과 관련될 수 있다. 예를 들어, Framingham 위험 점수는 LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 수준, 손상된 포도당 수준, 흡연, 수축기 혈압 및 당뇨병이 포함되는 위험 요인과 같은 위험 요인들을 사용하여 위험 점수를 제공한다. 고위험 환자의 빈도는 나이가 들수록 증가하며 남성은 여성보다 고위험 환자의 비율이 더 높다.

[0167] 기재된 모든 바이오마커는 조영 시험에도 사용할 수 있다. 예를 들어, 조영제는 다른 용도 중에서 심혈관 사건의 위험 예측을 돕고, 치료 개입에 대한 반응을 모니터링하고, 임상 시험에서 표적 집단을 선택하는 데 사용할 수 있는 기재된 바이오마커 중 어느 것과도 커플링될 수 있다.

[0168] 바이오마커 및 바이오마커 수준의 검출 및 결정

[0169] 본원에 기재된 바이오마커에 대한 바이오마커 수준은 임의의 다양한 알려진 분석 방법을 사용하여 검출할 수 있다. 하나의 구현예에서, 바이오마커 값은 포획 시약을 사용하여 검출된다. 다양한 구현예에서, 포획 시약은 용액 내 바이오마커에 노출될 수 있거나 포획 시약이 고체 지지체 상에 고정되는 동안 바이오마커에 노출될 수 있다. 다른 구현예에서, 포획 시약은 고체 지지체 상의 2차 특징부와 반응성인 특징부를 함유한다. 이러한 구현예에서, 포획 시약은 용액 내 바이오마커에 노출될 수 있고, 이어서 포획 시약 상의 특징부는 고체 지지체 상의 바이오마커를 고정하기 위해 고체 지지체 상의 2차 특징부와 함께 사용될 수 있다. 포획 시약은 수행할 분석 유형에 따라 선택된다. 포획 시약에는 압타머, 항체, 애드벡틴, 안키린, 다른 항체 모방체 및 다른 단백질 스캐폴드, 자가항체, 키메라, 소분자, $F(ab')_2$ 단편, 단일 사슬 항체 단편, Fv 단편, 단일 사슬 Fv 단편, 핵산, 렉틴, 리간드 결합 수용체, 아피마디, 나노바디, 각인된 폴리머, 아비머, 펩티드모방체, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체 및 합성 수용체, 및 이의 변형 및 단편이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0170] 일부 구현예에서, 바이오마커 수준은 바이오마커/포획 시약 복합체를 사용하여 검출된다.

[0171] 일부 구현예에서, 바이오마커 수준은 바이오마커/포획 시약 복합체로부터 유래되고, 예를 들어 바이오마커/포획 시약 상호작용에 후속하지만 바이오마커/포획 시약 형성에 의존하는 반응의 결과와 같이 간접적으로 검출된다.

[0172] 일부 구현예에서, 바이오마커 수준은 생물학적 샘플에서의 바이오마커로부터 직접 검출된다.

[0173] 일부 구현예에서, 바이오마커는 생물학적 샘플에서 2개 이상의 바이오마커의 동시 검출을 허용하는 멀티플렉스화 형식을 사용하여 검출된다. 멀티플렉스화 형식의 일부 구현예에서, 포획 시약은 고체 지지체 상의 별개의 위치에서 직접적으로 또는 간접적으로, 공유적으로 또는 비공유적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 멀티플렉스화 형식은 개별 고체 지지체를 사용하며, 여기서 각각의 고체 지지체는 예를 들어 양자점과 같은 고체 지지체와 관련된 고유한 포획 시약을 갖는다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플에서 검출될 다수의 바이오마커 각각의 검출을 위해 개별 장치가 사용된다. 생물학적 샘플에서의 각각의 바이오마커가 동시에 처리되도록 개별 장치를 구성할 수 있다. 예를 들어, 플레이트의 각각의 웰이 생물학적 샘플에서 검출될 하나 이상의 바이오마커를 고유하게 분석하는 데 사용되도록 마이크로타이터 플레이트를 사용할 수 있다.

[0174] 하나 이상의 전술한 구현예에서, 형광 태그는 바이오마커 수준의 검출을 가능하게 하기 위해 바이오마커/포획 시약 복합체의 성분을 표지하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 형광 표지는 알려진 기술을 사용하여 본원에 기재된 임의의 바이오마커에 특이적인 포획 시약에 접합될 수 있고, 이어서 형광 표지를 사용하여 해당하는 바이오마커 수준을 검출할 수 있다. 적합한 형광 표지에는 희토류 킬레이트, 플루오레신 및 이의 유도체,

로다민 및 이의 유도체, 단실, 알로피코시아닌, PBXL-3, Qdot 605, 리사민(Lissamine), 피코에리트린, 텍사스 레드(Texas Red) 및 다른 이러한 화합물이 포함된다.

[0175] 일부 구현예에서, 형광 표지는 형광 염료 분자이다. 일부 구현예에서, 형광 염료 분자에는 인돌류 고리의 3-탄소 상의 치환기가 화학적 반응기 또는 접합된 물질을 함유하는 적어도 하나의 치환된 인돌류 고리 시스템이 포함된다. 일부 구현예에서, 염료 분자에는 AlexaFluor 분자, 예를 들어 AlexaFluor 488, AlexaFluor 532, AlexaFluor 647, AlexaFluor 680, 또는 AlexaFluor 700이 포함된다. 다른 구현예에서, 염료 분자에는 예를 들어 2개의 상이한 AlexaFluor 분자와 같은 제1 유형 및 제2 유형의 염료 분자가 포함된다. 일부 구현예에서, 염료 분자에는 제1 유형 및 제2 유형의 염료 분자가 포함되고, 2개의 염료 분자는 상이한 방출 스펙트럼을 갖는다.

[0176] 형광은 광범위한 분석 형식과 호환되는 다양한 기기로 측정할 수 있다. 예를 들어, 분광형광계는 마이크로타이터 플레이트, 현미경 슬라이드, 인쇄된 어레이, 큐벳 등을 분석하도록 설계되었다. 문헌(Principles of Fluorescence Spectroscopy, by J.R. Lakowicz, Springer Science + Business Media, Inc., 2004)을 참고한다. 문헌(Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications; Philip E. Stanley and Larry J. Kricka editors, World Scientific Publishing Company, January 2002)을 참고한다.

[0177] 하나 이상의 구현예에서, 화학발광 태그는 임의로 바이오마커 수준의 검출을 가능하게 하기 위해 바이오마커/포획 복합체의 성분을 표지하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 화학발광 물질에는 옥살릴 클로라이드, 로다민(Rodamin) 6G, Ru(비피)₃²⁺, TMAE(테트라키스(디메틸아미노)에틸렌), 피로갈롤(1,2,3-트리하이드록시벤젠), 루시게닌(Lucigenin), 퍼옥시옥살레이트, 아릴 옥살레이트, 아크리디늄 에스테르, 디옥세탄 등 중 임의의 것이 포함된다.

[0178] 일부 구현예에서, 검출 방법에는 바이오마커 수준에 해당하는 검출 가능한 신호를 생성하는 효소/기질 조합이 포함된다. 일반적으로 효소는 분광광도법, 형광 및 화학발광이 포함되는 다양한 기술을 사용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변형을 촉매한다. 적합한 효소에는 예를 들어 루시페라제, 루시페린, 말레이트 탈수소효소, 우레아제, 양고추냉이 퍼옥시다제(HRPO), 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제, 우리카제, 잔틴 옥시다제, 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 포함된다.

[0179] 일부 구현예에서, 검출 방법은 측정가능한 신호를 생성하는 형광, 화학발광, 방사성핵종 또는 효소/기질 조합의 조합일 수 있다. 일부 구현예에서, 다중모드 신호전달은 바이오마커 검정 형식에서 독특하고 유리한 특성을 가질 수 있다.

[0180] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바이오마커에 대한 바이오마커 수준은 아래에서 논의되는 바와 같은 단일체 압타머 검정, 멀티플렉스화 압타머 검정, 단일체 또는 멀티플렉스화 면역검정, mRNA 발현 프로파일링, miRNA 발현 프로파일링, 질량 분광측정 분석, 조직학적/세포학적 방법 등을 비롯한 임의의 분석 방법을 사용하여 검출할 수 있다.

[0181] **압타머 기반 검정을 사용한 바이오마커 수준 결정**

[0182] 생물학적 샘플 및 다른 샘플에서 생리학적으로 유의미한 분자의 검출 및 정량에 대한 검정은 과학 연구 및 헬스케어 분야에서 중요한 도구이다. 그러한 검정의 한 부류에는 고체 지지체에 고정된 하나 이상의 압타머가 포함되는 마이크로어레이의 사용이 관여된다. 압타머는 각각 매우 특이적 방식으로 그리고 매우 높은 친화도로 표적 분자에 결합할 수 있다. 예를 들어, "핵산 리간드"라는 제목의 미국 특허 번호 5,475,096; 또한 각각이 "핵산 리간드 진단 바이오칩"이라는 제목의 미국 특허 번호 6,242,246, 미국 특허 번호 6,458,543 및 미국 특허 번호 6,503,715를 참고한다. 마이크로어레이가 샘플과 접촉되면 압타머는 샘플에 존재하는 각각의 표적 분자에 결합하여 바이오마커에 해당하는 바이오마커 수준의 결정을 가능하게 할 수 있다.

[0183] 본원에서 사용된 바와 같이, "압타머"는 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화도를 갖는 핵산을 나타낸다. 친화도 상호작용은 정도의 문제라는 것이 인식되고 있다; 그러나, 이러한 맥락에서, 그의 표적에 대한 압타머의 "특이적 결합 친화도"는 압타머가 일반적으로 시험 샘플의 다른 성분에 결합하는 것보다 훨씬 더 높은 정도의 친화도로 그의 표적에 결합한다는 것을 의미한다. "압타머"는 특정 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자의 한 유형 또는 종의 사본 세트이다. 압타머에는 임의의 수의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드가 포함되는 임의의 적합한 수의 뉴클레오티드가 포함될 수 있다. "압타머"는 하나 초과와 그러한 분자 세트를 나타낸다. 상이한 압타

머는 같거나 상이한 수의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 압타머는 DNA 또는 RNA 또는 화학적으로 변형된 핵산일 수 있으며 단일 가닥, 이중 가닥이거나 이중 가닥 영역을 함유할 수 있으며 고차 구조가 포함될 수 있다. 압타머는 또한 광반응성 또는 화학적 반응성 작용기가 압타머에 포함되어 해당 표적에 공유 결합될 수 있도록 하는 광압타머일 수 있다. 본원에 개시된 임의의 압타머 방법에는 동일한 표적 분자에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 압타머의 사용이 포함될 수 있다. 후술하는 바와 같이, 압타머에는 태그가 포함될 수 있다. 압타머에 태그가 포함된 경우 압타머의 모든 사본에 동일한 태그가 있을 필요는 없다. 또한, 서로 상이한 압타머에 각각 태그가 포함되는 경우 이러한 상이한 압타머는 동일한 태그 또는 상이한 태그를 가질 수 있다.

[0184] 압타머는 SELEX 공정이 포함되는 알려진 모든 방법을 사용하여 식별할 수 있다. 일단 식별되면, 압타머는 화학적 합성 방법 및 효소적 합성 방법을 비롯한 임의의 알려진 방법에 따라 제조 또는 합성될 수 있다.

[0185] 용어 "SELEX" 및 "SELEX 공정"은 일반적으로 (1) 바람직한 방식으로 표적 분자와 상호작용하는, 예를 들어 단백질에 대한 높은 친화도로 결합하는, 압타머의 선택과 (2) 선택된 핵산의 증폭의 조합을 나타낸다. SELEX 공정을 사용하여 특정 표적 또는 바이오마커에 높은 친화도를 갖는 압타머를 식별할 수 있다.

[0186] SELEX에는 일반적으로 핵산의 후보 혼합물을 준비하는 단계, 후보 혼합물을 원하는 표적 분자에 결합시켜 친화도 복합체를 형성하는 단계, 결합되지 않은 후보 핵산으로부터 친화도 복합체를 분리하는 단계, 친화도 복합체로부터 핵산을 분리 및 단리하는 단계, 핵산을 정제하는 단계, 및 특정 압타머 서열을 식별하는 단계가 포함된다. 공정에는 선택된 압타머의 친화도를 추가로 개량하기 위해 여러 라운드가 포함될 수 있다. 공정에는 공정의 하나 이상의 지점에서 증폭 단계가 포함될 수 있다. 예를 들어, "핵산 리간드"라는 제목의 미국 특허 번호 5,475,096을 참고한다. SELEX 공정은 그 표적에 공유적으로 결합하는 압타머뿐만 아니라 그 표적에 비공유적으로 결합하는 압타머를 생성하는 데 사용할 수 있다. 예를 들어, "지수적 농축에 의한 핵산 리간드의 체계적 진화: 케미(Chemi)-SELEX"라는 제목의 미국 특허 번호 5,705,337을 참고한다.

[0187] SELEX 공정은, 예를 들어 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 전달 특성과 같은 개선된 특성을 압타머에 부여하는 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화도 압타머를 식별하는 데 사용할 수 있다. 이러한 변형의 예에는 리보스 및/또는 포스페이트 및/또는 염기 위치에서의 화학적 치환이 포함된다. 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 SELEX 공정 식별 압타머는 "변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화도 핵산 리간드"라는 제목의 미국 특허 번호 5,660,985에 기재되어 있으며, 이는 피리미딘의 5' 및 2' 위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 유도체를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 기재한다. 미국 특허 5,580,737(상기 참고)은 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F), 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변형된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 고도로 특이적인 압타머를 기재한다. 또한 확장된 물리적 및 화학적 특성을 갖는 핵산 라이브러리 및 SELEX 및 포토SELEX에서의 이의 용도를 기재하는 "SELEX 및 포토SELEX"라는 제목의 미국 특허 출원 공개 20090098549를 참고한다.

[0188] SELEX는 또한 바람직한 오프 레이트 특성을 갖는 압타머를 식별하는 데 사용할 수 있다. 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머를 생성하기 위한 개선된 SELEX 방법을 기재하는 "개선된 오프 레이트의 압타머 생성 방법"이라는 제목의 미국 공개 번호 20090004667을 참고한다. 이의 각각의 표적 분자로부터 더 느린 해리 속도를 갖는 압타머 및 광압타머를 생산하는 방법이 기재되어 있다. 방법에는 후보 혼합물을 표적 분자와 접촉시키는 단계, 핵산-표적 복합체의 형성이 일어나도록 하는 단계, 및 해리 속도가 느린 복합체는 그대로 유지될 것인 반면 빠른 해리 속도를 갖는 핵산-표적 복합체가 해리되고 재형성되지 않는 느린 오프-레이트 농축 공정을 수행하는 단계가 관여된다. 추가로, 방법에는 개선된 오프-레이트 성능을 갖는 압타머를 생성하기 위해 후보 핵산 혼합물의 생산에서 변형된 뉴클레오타이드를 사용하는 단계가 포함된다. 비제한적인 예시적인 변형된 뉴클레오타이드에는, 예를 들어 도 8에 나타난 변형된 피리미딘이 포함된다. 일부 구현예에서, 압타머는 염기 변형과 같은 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 압타머는 표적 단백질과의 소수성 접촉을 허용하는 소수성 염기 변형과 같은 소수성 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 소수성 접촉은 압타머에 의한 더 큰 친화도 및/또는 더 느린 오프-레이트 결합에 기여한다. 소수성 변형이 있는 비제한적인 예시적인 뉴클레오타이드가 도 8에 나와 있다. 일부 구현예에서, 압타머는 소수성 변형을 갖는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 각각의 소수성 변형은 다른 것과 같거나 다를 수 있다. 일부 구현예에서, 압타머에서 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 소수성 변형은 도 8에 나타난 소수성 변형에서 독립적으로 선택될 수 있다.

[0189] 일부 구현예에서, 느린 오프-레이트 압타머(소수성 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하는 압타머

포함)는 ≥ 30 분, ≥ 60 분, ≥ 90 분, ≥ 120 분, ≥ 150 분, ≥ 180 분, ≥ 210 분 또는 ≥ 240 분의 오프-레이트($t_{1/2}$)를 갖는다.

[0190] 일부 구현예에서, 검정은 압타머가 이의 표적 분자에 공유 결합하거나 "광가교"할 수 있게 하는 광반응성 작용기가 포함되는 압타머를 사용한다. 예를 들어, "핵산 리간드 진단 바이오칩"이라는 제목의 미국 특허 6,544,776을 참고한다. 이러한 광반응성 압타머를 광압타머라고도 한다. 예를 들어, 각각 "지수적 농축에 의한 핵산 리간드의 체계적 진화: 핵산 리간드 및 용액 SELEX의 광선택"이라는 제목의 미국 특허 번호 5,763,177, 미국 특허 번호 6,001,577 및 미국 특허 번호 6,291,184; 또한, 예를 들어 "핵산 리간드의 광선택"이라는 제목의 미국 특허 번호 6,458,539를 참고한다. 마이크로어레이가 샘플과 접촉되고 광압타머가 이의 표적 분자에 결합할 기회가 생긴 후 광압타머가 광활성화되고 고체 지지체를 세척하여 비특이적으로 결합된 분자를 제거한다. 광압타머의 광활성화된 작용기(들)에 의해 생성된 공유 결합으로 인해 광압타머에 결합된 표적 분자가 일반적으로 제거되지 않기 때문에 가혹한 세척 조건이 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 검정은 시험 샘플에서 바이오마커에 해당하는 바이오마커 수준의 검출을 가능하게 한다.

[0191] 일부 분석 형식에서 압타머는 샘플과 접촉하기 전에 고체 지지체에 고정된다. 그러나 특정 상황에서 샘플과 접촉하기 전에 압타머를 고정하면 최적의 검정이 제공되지 않을 수 있다. 예를 들어, 압타머의 사전 고정은 고체 지지체 표면의 표적 분자와 압타머의 비효율적인 혼합을 초래할 수 있으며, 이는 아마도 긴 반응 시간을 초래할 수 있고 따라서 그들의 표적 분자에 대한 압타머의 효율적인 결합을 허용하는 인큐베이션 시간을 연장할 수 있다. 또한, 광압타머가 검정에 사용될 때 그리고 고체 지지체로 사용되는 물질에 따라 고체 지지체는 광압타머와 이의 표적 분자 사이의 공유 결합 형성에 영향을 미치는 데 사용되는 빛을 산란시키거나 흡수하는 경향이 있을 수 있다. 더욱이, 사용된 방법에 따라, 그들의 압타머에 결합된 표적 분자의 검출은 부정확할 수 있는데, 그 이유는 고체 지지체의 표면이 또한 사용된 임의의 표지 체제에 노출되고 영향을 받을 수 있기 때문이다. 마지막으로, 고체 지지체에 대한 압타머의 고정에는 일반적으로 샘플에 압타머를 노출시키기 전에 압타머 준비 단계(즉, 고정)가 관여되며, 이 준비 단계는 압타머의 활성 또는 기능에 영향을 미칠 수 있다.

[0192] 압타머가 용액에서 그 표적을 포획할 수 있게 한 다음 검출 전에 압타머-표적 혼합물의 특정 성분을 제거하도록 설계된 분리 단계를 사용하는 압타머 검정도 기재되어 있다("시험 샘플의 다중화 분석"이라는 제목의 미국 공개 번호 20090042206 참고). 기재된 압타머 검정 방법은 핵산(즉, 압타머)을 검출하고 정량함으로써 시험 샘플에서 비핵산 표적(예를 들어, 단백질 표적)의 검출 및 정량을 가능하게 한다. 기재된 방법은 비핵산 표적을 검출하고 정량하기 위한 핵산 대용물(즉, 압타머)을 생성하여 증폭을 비롯한 다양한 핵산 기술이 단백질 표적을 비롯한 더욱 광범위한 요망되는 표적에 적용될 수 있도록 허용한다.

[0193] 압타머는 압타머 바이오마커 복합체(또는 광압타머 바이오마커 공유 복합체)로부터 검정 성분의 분리를 용이하게 하고 검출 및/또는 정량을 위한 압타머의 단리를 허용하도록 구성될 수 있다. 하나의 구현예에서, 이들 작제물에는 압타머 서열 내에 절단 가능한 또는 방출 가능한 요소가 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 예를 들어 표지되거나 검출 가능한 성분, 스페이서 성분, 또는 특이적 결합 태그 또는 고정 요소와 같은 추가 기능이 압타머에 도입될 수 있다. 예를 들어, 압타머에는 절단 가능한 모이어티, 표지, 표지를 분리하는 스페이서 성분, 및 절단 가능한 모이어티를 통해 압타머에 연결된 태그가 포함될 수 있다. 하나의 구현예에서, 절단 가능한 요소는 광절단 가능한 링커이다. 광절단 가능한 링커는 바이오틴 모이어티 및 스페이서 섹션에 부착될 수 있고, 아민의 유도체화를 위한 NHS 기가 포함될 수 있으며, 압타머에 바이오틴기를 도입하는 데 사용될 수 있으며, 이에 따라 검정 방법에서 이후 압타머의 방출을 허용한다.

[0194] 용액의 모든 검정 구성요소를 사용하여 수행되는 균질 검정에서는 신호를 검출하기 전에 샘플과 시약을 분리할 필요가 없다. 이러한 방법은 빠르고 사용하기 쉽다. 이러한 방법은 그 특정 표적과 반응하는 분자 포획 또는 결합 시약을 기반으로 신호를 생성한다. 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 분자 포획 시약은 하나 이상의 압타머 또는 항체 등을 포함하고, 하나 이상의 압타머 또는 항체 등의 각각의 특이적 표적은 표 1 또는 표 2에 제시된 바이오마커일 수 있다.

[0195] 일부 구현예에서, 신호 생성 방법은 형광단-표지된 포획 시약과 그의 특이적 바이오마커 표적의 상호작용으로 인한 이방성 신호 변화를 이용한다. 표지된 포획이 표적과 반응할 때 증가된 분자량으로 인해 복합체에 부착된 형광단의 회전 운동이 이방성 값을 변화시키는 속도가 훨씬 느려진다. 이방성 변화를 모니터링함으로써, 결합 사건을 사용하여 용액의 바이오마커를 정량적으로 측정할 수 있다. 다른 방법에는 형광 편광 검정, 분자 비콘 방법, 시간 분해 형광 소광, 화학발광, 형광 공명 에너지 전달 등이 포함된다.

[0196] 생물학적 샘플에서 바이오마커 수준을 검출하는 데 사용할 수 있는 예시적인 용액 기반 압타머 검정에는 하기가

포함된다: (a) 제1 태그가 포함되고 바이오마커에 대해 특정 친화도를 갖는 압타머와 생물학적 샘플을 접촉시킴으로써 혼합물을 제조하는 단계로서, 바이오마커가 샘플에 존재할 때 압타머 친화도 복합체가 형성되는, 단계; (b) 혼합물을 제1 포획 요소가 포함되는 제1 고체 지지체에 노출시키고, 제1 태그가 제1 포획 요소와 결합되도록 하는 단계; (c) 제1 고체 지지체와 관련되지 않은 혼합물의 임의의 성분을 제거하는 단계; (d) 제2 태그를 압타머 친화도 복합체의 바이오마커 성분에 부착하는 단계; (e) 제1 고체 지지체로부터 압타머 친화도 복합체를 방출하는 단계; (f) 방출된 압타머 친화도 복합체를 제2 포획 요소가 포함되는 제2 고체 지지체에 노출시키고 제2 태그가 제2 포획 요소와 결합되도록 하는 단계; (g) 비작물 압타머를 압타머 친화도 복합체로부터 분할함으로써 혼합물로부터 임의의 비작물 압타머를 제거하는 단계; (h) 고체 지지체로부터 압타머를 용출시키는 단계; 및 (i) 압타머 친화도 복합체의 압타머 성분을 검출함으로써 바이오마커를 검출하는 단계.

[0197] 당분야에 알려진 임의의 수단을 사용하여 압타머 친화도 복합체의 압타머 성분을 검출함으로써 바이오마커 값을 검출할 수 있다. 예를 들어, 혼성화 검정, 질량 분광측정 또는 QPCR과 같은 다수의 상이한 검출 방법을 사용하여 친화도 복합체의 압타머 성분을 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 시퀀싱 방법을 사용하여 압타머 친화도 복합체의 압타머 성분을 검출함으로써 바이오마커 값을 검출할 수 있다. 간단히 말해서, 시험 샘플은 시험 샘플에 존재하는 하나 이상의 압타머의 서열 또는 서열들을 식별하고 정량하기 위해 임의의 종류의 핵산 시퀀싱 방법을 거칠 수 있다. 일부 구현예에서, 서열에는 전체 압타머 분자 또는 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 분자의 임의의 부분이 포함된다. 다른 구현예에서, 식별 시퀀싱은 압타머에 추가된 특정 서열이고; 이러한 시퀀싱은 종종 "태그", "바코드" 또는 "우편번호"로 나타난다. 일부 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 압타머 서열을 증폭하거나 임의의 위치에 대한 화학적 변형을 함유하는 RNA 및 DNA를 비롯한 임의의 종류의 핵산을 시퀀싱에 적합한 임의의 다른 종류의 핵산으로 전환하는 효소 단계가 포함된다.

[0198] 일부 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 하나 이상의 클로닝 단계가 포함된다. 다른 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 클로닝이 없는 직접 시퀀싱 방법이 포함된다.

[0199] 일부 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 시험 샘플에서 하나 이상의 압타머를 표적으로 하는 특정 프라이머를 사용하여 지시적 접근이 포함된다. 다른 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 시험 샘플 내의 모든 압타머를 표적으로 하는 샷건 (shotgun) 접근이 포함된다.

[0200] 일부 구현예에서, 시퀀싱 방법에는 시퀀싱을 위해 표적화된 분자를 증폭하기 위한 효소 단계가 포함된다. 다른 구현예에서, 시퀀싱 방법은 단일 분자를 직접 시퀀싱한다. 생물학적 샘플에서 바이오마커에 해당하는 바이오마커 값을 검출하는 데 사용할 수 있는 예시적인 핵산 시퀀싱 기반 방법에는 하기가 포함된다: (a) 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 함유하는 압타머 혼합물을 효소 단계로 변형되지 않은 핵산으로 전환시키는 단계; (b) 454 시퀀싱 시스템(454 Life Sciences/Roche), Illumina 시퀀싱 시스템(Illumina), ABI SOLiD 시퀀싱 시스템(Applied Biosystems), HeliScope 단일 분자 시퀀서(Helicos Biosciences) 또는 Pacific Biosciences 실시간 단일 분자 시퀀싱 시스템(Pacific BioSciences) 또는 Polonator G 시퀀싱 시스템(Dover Systems)과 같은 대규모 병렬 시퀀싱 플랫폼을 사용하는 생성된 비변형 핵산의 샷건 시퀀싱 단계; 및 (c) 특정 서열 및 서열 카운트에 의해 혼합물에 존재하는 압타머를 식별 및 정량하는 단계.

[0201] 압타머를 사용하여 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출하는 비제한적인 예시적인 방법은 실시예 1에 기재되어 있다. 또한 문헌(Kraemer et al., 2011, *PLoS One* 6(10): e26332)을 참고한다.

[0202] 면역검정을 사용한 바이오마커 수준 결정

[0203] 면역검정 방법은 항체가 그 해당 표적이나 분석물질에 반응하는 것을 기반으로 하며 특정 검정 형식에 따라 샘플에서 분석물질을 검출할 수 있다. 면역 반응성에 기반한 검정 방법의 특이성 및 민감도를 개선하기 위해 모노클로날 항체 및 이의 단편이 이의 특이적 에피토프 인식 때문에 종종 사용된다. 폴리클로날 항체는 모노클로날 항체에 비해 표적에 대한 이의 친화도가 높아 다양한 면역검정에서 성공적으로 사용되었다. 면역검정은 광범위한 생물학적 샘플 매트릭스와 함께 사용하도록 설계되었다. 면역검정 형식은 정성적, 반정량적 및 정량적 결과를 제공하도록 설계되었다.

[0204] 정량적 결과는 검출할 특정 분석물질의 알려진 농도로 생성된 표준 곡선을 사용하여 생성된다. 알려지지 않은 샘플의 반응 또는 신호가 표준 곡선에 그려지고 알려지지 않은 샘플의 표적에 해당하는 양이나 수준이 설정된다.

[0205] 수많은 면역검정 형식이 설계되었다. ELISA 또는 EIA는 분석물질의 검출을 위해 정량적일 수 있다. 이 방법은 분석물질 또는 항체에 표지를 부착하는 것에 의존하며 표지 구성요소에는 효소가 직접적으로 또는 간접적으로

포함된다. ELISA 시험은 분석물질의 직접, 간접, 경쟁 또는 샌드위치 검출을 위해 형식화될 수 있다. 다른 방법은 예를 들어 방사성 동위원소(^{125}) 또는 형광과 같은 표지에 의존한다. 추가 기술에는 예를 들어 응집, 네펠로메트리, 탁도계측, 웨스턴 블롯, 면역침전, 면역세포화학, 면역조직화학, 유세포측정, Luminex 검정 등이 포함된다(ImmunoAssay: A Practical Guide, edited by Brian Law, published by Taylor & Francis, Ltd., 2005 edition 참고).

[0206] 예시적인 검정 형식에는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정, 형광, 화학발광, 및 형광 공명 에너지 전달(FRET) 또는 시간 분해 FRET(TR-FRET) 면역검정이 포함된다. 바이오마커를 검출하기 위한 절차의 예로는 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 평면 전기크로마토그래피 등과 같이 크기 및 펩티드 수준 구별을 허용하는 정량적 방법이 뒤따르는 바이오마커 면역침전이 포함된다.

[0207] 검출 가능한 표지 또는 신호 생성 물질을 검출 및/또는 정량하는 방법은 표지의 특성에 의존한다. 적절한 효소(검출 가능한 표지가 효소인 경우; 상기 참고)에 의해 촉매되는 반응 산물은 비제한적으로 형광, 발광 또는 방사활성일 수 있거나 가시광선 또는 자외선을 흡수할 수 있다. 이러한 검출 가능한 표지를 검출하기에 적합한 검출기의 예에는 X선 필름, 방사활성 계수기, 섬광 계수기, 분광 광도계, 비색계, 형광계, 발광계 및 농도계가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0208] 모든 검출 방법은 반응의 임의의 적합한 준비, 처리 및 분석을 허용하는 임의의 형식으로 수행할 수 있다. 이것은 예를 들어 다중 웰 검정 플레이트(예로, 96웰 또는 386웰)에서거나 임의의 적합한 어레이 또는 마이크로어레이를 사용할 수 있다. 다양한 제제에 대한 스톱 용액은 수동 또는 로봇 방식으로 만들 수 있으며 모든 후속 피펫팅, 희석, 혼합, 분배, 세척, 인큐베이션, 샘플 판독, 데이터 수집 및 분석은 검출 가능한 표지를 검출할 수 있는 상용 분석 소프트웨어, 로봇공학 및 검출 기기를 사용하여 로봇 방식으로 수행할 수 있다.

[0209] **유전자 발현 프로파일링을 사용한 바이오마커 수준 결정**

[0210] 생물학적 샘플에서 mRNA를 측정하는 것은 일부 구현예에서 생물학적 샘플에서 해당하는 단백질의 수준을 검출하기 위한 대용물로 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바이오마커 또는 바이오마커 패널은 적절한 RNA를 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0211] 일부 구현예에서, mRNA 발현 수준은 역전사 정량적 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR에 이어 qPCR)에 의해 측정된다. RT-PCR은 mRNA에서 cDNA를 만드는 데 사용된다. cDNA는 DNA 증폭 공정이 진행됨에 따라 형광을 생성하기 위해 qPCR 검정에 사용될 수 있다. 표준 곡선과 비교하여 qPCR은 세포당 mRNA 사본 수와 같은 절대 측정값을 생성할 수 있다. 노던 블롯, 마이크로어레이, 인베이터 검정 및 모세관 전기영동과 조합된 RT-PCR은 모두 샘플에서 mRNA의 발현 수준을 측정하는 데 사용되었다. 문헌(Gene Expression Profiling: Methods and Protocols, Richard A. Shinkets, editor, Humana Press, 2004)을 참고한다.

[0212] **생체내 분자 조영 기술을 사용한 바이오마커 검출**

[0213] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바이오마커는 분자 조영 시험에 사용될 수 있다. 예를 들어, 조영제는 생체내 바이오마커를 검출하는 데 사용할 수 있는 포획 시약에 커플링될 수 있다.

[0214] 생체내 조영 기술은 대상체의 신체에서 특정 질환의 상태를 결정하기 위한 비침습적 방법을 제공한다. 예를 들어, 신체의 전체 부분 또는 심지어 신체 전체를 3차원 이미지로 볼 수 있으므로 신체의 형태 및 구조에 관한 귀중한 정보를 제공할 수 있다. 이러한 기술은 생체내 바이오마커에 관한 정보를 제공하기 위해 본원에 기재된 바이오마커의 검출과 조합될 수 있다.

[0215] 다양한 기술의 발전으로 인해 생체내 분자 조영 기술의 사용이 확대되고 있다. 이러한 발전에는 신체 내에서 강력한 신호를 제공할 수 있는 방사성 표지 및/또는 형광 표지와 같은 새로운 조영제 또는 표지의 개발; 및 유용한 정보를 제공하기에 충분한 민감도와 정확도로 신체 외부에서 이러한 신호를 검출하고 분석할 수 있는 강력한 새로운 조영 기술의 개발이 포함된다. 조영제는 적절한 조영 시스템에서 시각화될 수 있으며, 이에 의해 조영제가 위치하는 신체의 일부 또는 부분들의 이미지를 제공할 수 있다. 조영제는 예를 들어, 압타머 또는 항체와 같은 포획 시약, 및/또는 펩티드 또는 단백질, 또는 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 유전자 발현의 검출을 위해), 또는 하나 이상의 거대분자 및/또는 다른 미립자 형태를 갖는 이들 중 임의의 것을 함유하는 복합체에 결합되거나 결합될 수 있다.

[0216] 조영제는 조영에 유용한 방사활성 원자를 특징으로 할 수도 있다. 적합한 방사활성 원자에는 신티그래픽 연구를 위한 테크네튬-99m 또는 요오드-123이 포함된다. 다른 용이하게 검출 가능한 모이어티에는 예를 들어 자기 공명

조영(MRI)용 스핀 표지, 예를 들어 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철이 포함된다. 이러한 표지는 당분야에 잘 알려져 있고 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

[0217] 표준 조영 기술에는 자기 공명 조영, 컴퓨터 단층 촬영 스캐닝, 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT) 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 진단 생체내 조영의 경우, 이용 가능한 검출 기기의 유형은 주어진 방사성핵종 및 그것이 표적화하는 데 사용되는 특정 바이오마커(단백질, mRNA 등)와 같은 주어진 조영제를 선택하는 주요 요인이다. 선택된 방사성핵종은 전형적으로 주어진 유형의 기기로 검출할 수 있는 붕괴 유형을 가지고 있다. 또한 생체내 진단을 위한 방사성핵종을 선택할 때 그 반감기는 표적 조직이 최대한 흡수할 때 검출할 수 있을 만큼 길어야 하지만 숙주의 유해한 방사선을 최소화할 수 있을 만큼 짧아야 한다.

[0218] 예시적인 조영 기술에는 PET 및 SPECT가 포함되지만 이에 제한되지 않으며, 이는 방사성핵종이 대상체에게 합성적으로 또는 국부적으로 투여되는 조영 기술이다. 방사성추적자의 후속 흡수는 시간 경과에 따라 측정되고 표적 조직 및 바이오마커에 대한 정보를 얻는 데 사용된다. 사용된 특정 동위원소의 고에너지(감마선) 방출과 이를 탐지하는 데 사용되는 기기의 민감도와 정교함 때문에 방사활성의 2차원 분포는 신체 외부에서 추정할 수 있다.

[0219] PET에서 일반적으로 사용되는 양전자 방출 핵종에는, 예를 들어 탄소-11, 질소-13, 산소-15 및 불소-18이 포함된다. 전자 포획 및/또는 감마 방출에 의해 붕괴되는 동위원소가 SPECT에 사용되며 예를 들어 요오드-123 및 테크네튬-99m이 포함된다. 테크네튬-99m으로 아미노산을 표지하는 예시적인 방법은 킬레이트 전구체의 존재 하에 퍼테크네이트 이온을 환원시켜 불안정한 테크네튬-99m-전구체 복합체를 형성하고, 이는 차례로 이중 기능적으로 변형된 화학주성 펩티드와 금속 결합기와 반응하여 테크네튬-99m-화학주성 펩티드 접합체를 형성한다.

[0220] 이러한 생체내 조영 진단 방법에는 항체가 자주 사용된다. 생체내 진단을 위한 항체의 제조 및 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 유사하게, 압타머는 이러한 생체내 조영 진단 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 특정 바이오마커를 식별하기 위해 사용된 압타머는 생체내 바이오마커를 검출하기 위해 적절하게 표지되고 대상체에 주입될 수 있다. 사용된 표지는 이전에 기재된 대로 사용할 조영 방식에 따라 선택될 수 있다. 압타머-유도 조영제는 다른 조영제와 비교하여 조직 침투, 조직 분포, 동역학, 제거, 효능 및 선택성과 관련하여 독특하고 유리한 특성을 가질 수 있다.

[0221] 이러한 기술은 또한 임의로, 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용한 조영을 통한 유전자 발현의 검출을 위해 표지된 올리고뉴클레오타이드로 수행될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 형광 분자 또는 방사성핵종을 표지로 사용하여 원위치 혼성화에 사용된다. 유전자 발현의 검출을 위한 다른 방법에는 예를 들어 리포터 유전자의 활성 검출이 포함된다.

[0222] 또 다른 일반적인 유형의 조영 기술은 대상체 내부의 형광 신호가 대상체 외부의 광학 장치에 의해 검출되는 광학 조영이다. 이러한 신호는 실제 형광 및/또는 생체발광으로 인한 것일 수 있다. 광학 검출 장치의 민감도 개선은 생체내 진단 검정을 위한 광학 조영의 유용성을 증가시켰다.

[0223] 다른 기술에 대한 검토는 문헌(N. Blow, Nature Methods, 6, 465-469, 2009)을 참고한다.

[0224] 질량 분광측정 방법을 사용한 바이오마커 수준 결정

[0225] 다양한 구성의 질량 분광계를 사용하여 바이오마커 수준을 검출할 수 있다. 여러 유형의 질량 분광계를 사용할 수 있거나 다양한 구성으로 생산할 수 있다. 일반적으로 질량 분광계는 샘플 주입구, 이온 소스, 질량 분광계, 검출기, 진공 시스템, 기기-제어 시스템, 및 데이터 시스템과 같은 주요 구성요소를 가지고 있다. 샘플 주입구, 이온 소스 및 질량 분광계의 차이가 일반적으로 기기 유형과 그 기능을 정의한다. 예를 들어, 입구는 모세관-칼럼 액체 크로마토그래피 소스일 수 있거나 매트릭스-보조 레이저 탈착에 사용되는 것과 같은 직접 프로브 또는 스테이지일 수 있다. 일반적인 이온 소스는 예를 들어 나노스프레이 및 마이크로스프레이 또는 매트릭스 보조 레이저 탈착이 포함되는 전자스프레이이다. 일반적인 질량 분광계에는 사중극자 질량 필터, 이온 트랩 질량 분광계 및 비행 시간(time-of-flight) 질량 분광계가 포함된다. 추가적인 질량 분광측정 방법은 당분야에 잘 알려져 있다(Burlingame et al. Anal. Chem. 70:647 R-716R (1998); Kinter and Sherman, New York (2000) 참고).

[0226] 단백질 바이오마커 및 바이오마커 수준은 하기: 전자스프레이 이온화 질량 분광측정(ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)_n, 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 비행 질량 분광측정(MALDI-TOF-MS), 표면-강화 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분광측정(SELDI-TOF-MS), 실리콘 상의 탈착/이온화(DIOS), 2차 이온 질량 분광측정(SIMS), 사중극자 비행 시간(Q-TOF), 울트라플렉스 III TOF/TOF로 불리는, 탠덤 비행 시간(TOF/TOF) 기술, 대기압 화학 이온화 질량 분광측정(APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-(MS)_N, 대기압 광이온화 질량 분광측정(APPI-MS), APPI-

MS/MS 및 APPI-(MS)^N, 사중극자 질량 분광측정, 푸리에 변환 질량 분광측정(FTMS), 정량적 질량 분광측정 및 이온 트랩 질량 분광측정 중 임의의 것으로 검출 및 측정할 수 있다.

[0227] 샘플 준비 전략은 단백질 바이오마커의 질량 분광 특성규명 및 바이오마커 수준 결정 전에 샘플을 표지하고 농축하는 데 사용된다. 표지 방법에는 상대 및 절대 정량을 위한 동중 원소 태그(iTRAQ) 및 세포 배양 내 아미노산을 사용한 안정 동위원소 표지화(SILAC)가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 질량 분광측정 분석 전에 후보 바이오마커 단백질에 대해 샘플을 선택적으로 농축하는 데 사용되는 포획 시약에는 압타머, 항체, 핵산 프로브, 키메라, 소분자, F(ab')₂ 단편, 단일 사슬 항체 단편, Fv 단편, 단일 사슬 Fv 단편, 핵산, 렉틴, 리간드 결합 수용체, 아피바디, 나노바디, 안키린, 도메인 항체, 대체 항체 스캐폴드(예로, 디아바디 등) 각인된 폴리머, 아비머, 펩티드모방체, 펩티드, 펩티드 핵산, 트레오스 핵산, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체 및 합성 수용체, 및 이의 변형 및 단편이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0228] **근접 결찰 검정을 사용한 바이오마커 수준 결정**

[0229] 근접 결찰 검정을 사용하여 바이오마커 값을 결정할 수 있다. 간단히 말해서, 시험 샘플은 한 쌍의 항체 또는 한 쌍의 압타머일 수 있는 한 쌍의 친화도 프로브와 접촉되며, 한 쌍의 각각의 구성원은 올리고뉴클레오타이드로 연장된다. 한 쌍의 친화도 프로브에 대한 표적은 하나의 단백질에 있는 2개의 별개의 결정인자 또는 2개의 상이한 단백질 각각에 대한 하나의 결정인자일 수 있으며, 이는 동중 또는 이종 다량체 복합체로 존재할 수 있다. 프로브가 표적 결정인자에 결합할 때 올리고뉴클레오타이드 연장부의 자유 말단은 함께 혼성화하기에 충분히 가까이 근접하게 된다. 올리고뉴클레오타이드 연장부의 혼성화는 올리고뉴클레오타이드 연장부가 충분히 근접하여 위치할 때 올리고뉴클레오타이드 연장부를 함께 연결하는 역할을 하는 공통 연결 올리고뉴클레오타이드에 의해 촉진된다. 프로브의 올리고뉴클레오타이드 연장부가 혼성화되면 연장부의 말단이 효소 DNA 결찰에 의해 함께 연결된다.

[0230] 각각의 올리고뉴클레오타이드 연장부는 PCR 증폭을 위한 프라이머 부위를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드 연장부가 함께 결찰되면, 올리고뉴클레오타이드는 PCR 증폭을 통해 표적 단백질의 정체 및 양에 관한 정보 뿐만 아니라 표적 결정인자가 2개의 상이한 단백질 상에 존재하는 단백질-단백질 상호작용에 관한 정보를 나타내는 연속 DNA 서열을 형성한다. 근접 결찰은 실시간 PCR을 사용하여 실시간 단백질 농도 및 상호작용 정보에 대해 매우 민감하고 특이적인 검정을 제공할 수 있다. 관심 결정인자에 결합하지 않는 프로브는 해당 올리고뉴클레오타이드 연장부가 근접하지 않으며 결찰 또는 PCR 증폭이 진행될 수 없어서 신호가 생성되지 않는다.

[0231] 전술한 검정은 CV 사건의 위험을 예측하기 위한 방법에 유용한 바이오마커 값의 검출을 가능하게 하며, 여기서 방법은 대상체의 생물학적 샘플에서 표 1의 바이오마커로부터 선택된 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 또는 13개의 바이오마커; 또는 표 2의 바이오마커 중 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 또는 27개 모두를 포함하고; 바이오마커 값을 사용하는 하기에 기재된 분류는 대상체가 1년, 2년, 3년 또는 4년 기간 내에 CV 사건이 발생할 상승된 위험을 갖는지 여부를 나타낸다. 본원에 기재된 임의의 방법에 따라, 바이오마커 값은 개별적으로 검출 및 분류될 수 있거나, 예를 들어 멀티플렉스 검정 형식에서와 같이 집합적으로 검출 및 분류될 수 있다.

[0232] **바이오마커 분류 및 질환 점수 계산**

[0233] 일부 구현예에서, 주어진 진단 시험에 대한 바이오마커 "특성부(signature)"는 바이오마커 세트를 함유하고, 각각의 바이오마커는 관심 집단에서 특징적인 수준을 갖는다. 일부 구현예에서, 특징적 수준은 특정 그룹의 대상체에 대한 바이오마커 수준의 평균 또는 보통을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 진단 방법을 사용하여 대상체로부터 미지의 샘플을 CV 사건의 위험이 증가하거나 그렇지 않은 두 그룹 중 하나로 할당할 수 있다.

[0234] 두 개 이상의 그룹 중 하나로 샘플을 할당하는 것은 분류로 알려져 있으며 이 할당을 수행하는 데 사용되는 절차는 분류기 또는 분류 방법으로 알려져 있다. 분류 방법은 채점 방법이라고도 한다. 바이오마커 수준 세트로부터 진단 분류기를 구성하는 데 사용할 수 있는 많은 분류 방법이 있다. 일부 사례에서 분류 방법은 구별하고자 하는 두 개(또는 그 이상, 다중 분류 상태의 경우)의 개별 그룹 내의 대상체로부터 얻은 샘플을 사용하여 데이터 세트를 수집하는 감독 학습 기술을 사용하여 수행된다. 각각의 샘플이 속한 클래스(그룹 또는 집단)는 각각의 샘플에 대해 미리 알려져 있으므로 원하는 분류 반응을 제공하도록 분류 방법을 훈련할 수 있다. 비감독 학

습 기술을 사용하여 진단 분류기를 생성하는 것도 가능하다.

- [0235] 진단 분류기를 개발하기 위한 일반적인 접근에는 의사 결정 트리; 배깅 + 부스팅 + 포레스트; 규칙 추론 기반 학습; 파젠(Parzen) 윈도우; 선형 모델; 로지스틱; 신경망 방법; 비감독 클러스터링; K-수단; 계층적 오름차순/내림차순; 반 감독 학습; 프로토타입 방법; 가장 가까운 이웃; 커널 밀도 추정; 지원 벡터 기계; 숨겨진 마르코프(Markov) 모델; 볼츠만(Boltzmann) 학습이 포함되며; 분류기는 단순히 또는 특정 개체 함수를 최소화하는 방식으로 조합될 수 있다. 검토를 위해, 예를 들어 문헌(Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001; 또한, The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science+Business Media, LLC, 2nd edition, 2009)을 참고한다.
- [0236] 감독 학습 기술을 사용하여 분류기를 생성하기 위해 훈련 데이터라고 하는 샘플 세트가 얻어진다. 진단 시험의 맥락에서 훈련 데이터에는 나중에 미지 샘플이 할당될 개별 그룹(클래스)으로부터의 샘플이 포함된다. 예를 들어, 대조군 집단의 대상체 및 특정 질환 집단의 대상체로부터 수집된 샘플은 훈련 데이터를 구성하여 미지 샘플 (또는 보다 구체적으로 샘플을 얻은 대상체)을 질환이 있거나 질환이 없는 것으로 분류할 수 있는 분류기를 개발할 수 있다. 훈련 데이터로부터의 분류기의 개발은 분류기 훈련으로 알려져 있다. 분류기 훈련에 대한 구체적인 세부사항은 감독 학습 기술의 특성에 따라 다르다. 나이브 베이지안(Bayesian) 분류기를 훈련하는 것은 이러한 감독 학습 기술의 한 예이다(예로, Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001 참고; 또한 The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science+Business Media, LLC, 2판, 2009 참고). 나이브 베이지안 분류기의 훈련은 예를 들어 미국 공개 번호: 2012/0101002 및 2012/0077695에 기재되어 있다.
- [0237] 전형적으로 훈련 세트의 샘플보다 잠재적으로 더 많은 바이오마커 수준이 존재하기 때문에 과적합을 방지하기 위해 주의해야 한다. 과적합은 통계 모델이 기본 관계 대신 무작위 오류 또는 노이즈를 설명할 때 발생한다. 과적합은 예를 들어 분류기를 개발하는 데 사용되는 바이오마커의 수를 제한하고, 바이오마커 반응이 서로 독립적이라고 가정하고, 사용되는 기본 통계 모델의 복잡성을 제한하고 기본 통계 모델이 데이터를 준수하는지 확인하는 것이 포함되는, 다양한 방법으로 방지할 수 있다.
- [0238] 바이오마커 세트를 사용한 진단 시험 개발의 예시적인 예에는 바이오마커를 엄격하게 독립적으로 처리하는 베이즈(Bayes) 정리를 기반으로 하는 단순한 확률 분류기인 나이브 베이즈 분류기의 적용이 포함된다. 각각의 바이오마커는 각각의 클래스에서 측정된 RFU 값 또는 log RFU(상대 형광 단위) 값에 대한 클래스 종속 확률 밀도 함수(pdf)로 기재된다. 한 클래스의 바이오마커 세트에 대한 공동 pdf는 각각의 바이오마커에 대한 개별 클래스 종속 pdf의 산물로 가정된다. 상기 맥락에서 나이브 베이즈 분류기의 훈련은 클래스 종속 pdf를 특성규명하기 위해 파라미터를 할당하는 것과 같다("파라미터화"). 클래스 종속 pdf에 대한 임의의 기본 모델을 사용할 수 있지만 모델은 일반적으로 훈련 세트에서 관찰된 데이터를 준수해야 한다.
- [0239] 나이브 베이즈 분류기의 성능은 분류기를 구성하고 훈련하는 데 사용되는 바이오마커의 수와 품질에 의존한다. 단일 바이오마커는 KS 거리(Kolmogorov-Smirnov)에 따라 수행할 것이다. 양호한 KS 거리(예로, >0.3)를 갖는 후속 바이오마커를 추가하면 일반적으로 후속적으로 추가된 바이오마커가 첫 번째 바이오마커와 독립적인 경우 분류 성능이 개선될 것이다. 민감도와 특이성을 분류기 점수로 사용하여 그리디(greedy) 알고리즘의 변이형으로 많은 고득점 분류기를 생성할 수 있다 (그리디 알고리즘은 전역 최적값을 찾기 위해 각각의 단계에서 로컬 최적 선택을 하는 문제 해결 메타 휴리스틱을 따르는 알고리즘이다).
- [0240] 분류기 성능을 나타내는 또 다른 방법은 ROC(수신기 작동 특성) 또는 단순히 ROC 곡선 또는 ROC 플롯을 사용하는 것이다. ROC는 그 판별 임계값이 변할 때 이진 분류기 시스템에 대한 민감도 또는 진양성 비율 대 위양성 비율($1 - \text{특이성}$ 또는 $1 - \text{진음성 비율}$)의 그래픽 플롯이다. ROC는 양성 중에서 진양성의 비율($\text{TPR} = \text{진양성 비율}$) 대 음성 중 위양성의 비율($\text{FPR} = \text{위양성 비율}$)을 도표화하여 동등하게 나타낼 수도 있다. 기준이 변화함에 따라 두 가지 작동 특성(TPR 및 FPR)을 비교하기 때문에 상대 작동 특성 곡선이라고도 알려져 있다. ROC 곡선 하 면적(AUC)은 일반적으로 진단 정확도의 요약 척도로 사용된다. 이는 0.0에서 1.0사이의 값을 취할 수 있다. AUC에는 중요한 통계적 속성이 있다. 분류기의 AUC는 분류기가 무작위로 선택된 음성 경우보다 무작위로 선택된 양성 경우의 순위를 매길 확률과 동일하다(Fawcett T, 2006. An introduction to ROC analysis. Pattern Recognition Letters. 27: 861-874). 이것은 순위의 윌콕슨(Wilcoxon) 시험과 동일하다(Hanley, JA, McNeil, BJ, 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. Radiology 143, 29-36). 알려진 참조 표준과 관련하여 진단 시험의 성능을 설명하는 또 다른 방법은 순(net) 제

분류 지수: 참조 표준 시험과 비교할 때 위험을 올바르게 업그레이드하거나 다운그레이드하는 새 시험의 능력이다. 예로, 문헌(Pencina et al., 2011, *Stat. Med.* 30:11-21)을 참고한다. ROC 곡선 하 AUC는 2개 등급 분류기의 성능을 평가하는 데 최적이지만, 계층화 및 개인화 의학은 집단이 2개 초과 등급을 함유한다는 추론에 의존한다. 이러한 비교를 위해 상위 대 하위 사분위수(또는 십분위수와 같은 다른 계층)의 위험 비율을 더 적절하게 사용할 수 있다.

[0241] 여기에서 사용 가능한 위험 및 가능성 예측은 1차 진료 또는 심혈관 전문 센터의 대상체에게 적용되거나 심지어 소비자에게 직접 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 사건을 예측하는 데 사용되는 분류기에는 사건이 적용되는 집단에 대한 일부 보정이 관여될 수 있다 - 예를 들어 민족 또는 지리로 인한 변이형이 있을 수 있다. 일부 구현예에서 이러한 보정은 대규모 집단 연구로부터 미리 설정될 수 있으므로 개별 환자에게 적용될 때 위험 예측을 하기 전에 통합된다. 정맥혈 샘플을 채취하여 적절하게 처리하고 본원에 기재된 바와 같이 분석한다. 분석이 완료되면 유전 또는 인구통계와 같이 본원에 기재된 의료 기록으로부터의 다른 메타데이터를 포함하거나 포함하지 않고 위험 예측을 수학적으로 수행할 수 있다. 소비자의 전문성 수준에 따라 다양한 형태의 정보 출력이 가능하다. 가장 단순한 유형의 출력을 찾는 소비자의 경우 정보는 일부 구현예에서 "이 사람이 향후 x년(여기서 x는 1-4)에 사건을 가질 가능성이 있는가, 예/아니오"이거나 대안적으로 "신호등" 빨간색/주황색/녹색 또는 고/중간/저위험과 같은 그 구두 또는 서면 동등물과 유사할 수 있다. 더 자세한 정보를 원하는 소비자의 경우, 일부 구현예에서 위험은 연속 점수로 단위 시간 당 사건 확률을 나타내는 숫자 또는 그래프 또는 더 많은 수의 계층(예로, 십분위수), 및/또는 사건 발생까지의 평균 시간 및/또는 가장 가능성이 높은 사건 유형으로 출력될 수 있다. 일부 구현예에서, 출력에는 치료 권고가 포함될 수 있다. 시간이 지남에 따라 동일한 환자에 대한 종단적 모니터링을 통해 개입 또는 생활방식 변화에 대한 반응을 보여주는 그래픽을 사용할 수 있을 것이다. 일부 구현예에서, 환자 및 다양한 수준의 전문성을 가진 케어 팀의 개별 구성원의 요구를 충족시키기 위해 하나를 초과하는 유형의 출력이 동시에 제공될 수 있다.

[0242] 일부 구현예에서, 표 1 또는 표 2에 나타난 바이오마커는 예를 들어 느린 오프-레이트 압타머와 같은 압타머를 사용하여 대상체로부터의 혈액 샘플(예로, 혈장 샘플 또는 혈청 샘플)에서 검출된다. log RFU 값은 CV 사건을 가질 대상체의 위험 또는 가능성 또는 예후 지수(PI)를 계산하는 데 사용된다.

[0243] PI가 주어지면 대상체가 향후 "t"년 동안 심혈관 사건(CV 사건)을 겪을 확률은 하기 공식으로 제공된다.

[0244]
$$\Pr[T \leq t] = 1 - e^{-e^{\left(\frac{\log(t) - PI}{s}\right)}}$$

[0245] 여기서 PI는 예후 지수(또는 선형 예측변수)이고 s는 극단값 분포에 대한 관련 척도 파라미터이다. 다양한 구현예에서, "t"는 5년 이하, 4년 이하, 3년 이하, 또는 2년 이하이다.

[0246] 키트

[0247] 본원에 기재된 바이오마커의 임의의 조합은 예를 들어 본원에 개시된 방법을 수행하는 데 사용하기 위한 것과 같은 적합한 키트를 사용하여 검출될 수 있다. 또한, 임의의 키트는 형광 모이어티 등과 같은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 검출 가능한 표지를 함유할 수 있다.

[0248] 일부 구현예에서, 키트에는 (a) 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 검출하기 위한 하나 이상의 포획 시약(예를 들어, 하나 이상의 압타머 또는 항체)으로서, 바이오마커에는 표 1의 바이오마커로부터 선택된 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 또는 13개의 바이오마커; 또는 표 2의 바이오마커 중 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 또는 27개 모두가 포함되는, 시약; 및 임의로 (b) 본원에서 추가로 기재된 바와 같이, 생물학적 샘플을 얻은 대상체를 CV 사건의 위험이 증가했는지 여부를 분류하거나 대상체에서 CV 사건의 위험이 증가했을 가능성을 결정하기 위한 하나 이상의 소프트웨어 또는 컴퓨터 프로그램 제품이 포함된다. 대안적으로, 하나 이상의 컴퓨터 프로그램 제품보다, 인간에 의해 상기 단계를 수동으로 수행하기 위한 하나 이상의 명령이 제공될 수 있다.

[0249] 일부 구현예에서, 키트는 고체 지지체, 포획 시약, 및 신호 생성 물질을 포함한다. 키트에는 장치 및 시약 사용, 샘플 취급 및 데이터 분석에 대한 지침도 포함될 수 있다. 또한 키트는 생물학적 샘플의 분석 결과를 분석하고 보고하기 위해 컴퓨터 시스템 또는 소프트웨어와 함께 사용할 수 있다.

[0250] 키트는 또한 생물학적 샘플을 처리하기 위한 하나 이상의 시약(예로, 가용화 완충액, 세제, 세척제 또는 완충액)을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 키트에는 또한 예를 들어 완충액, 차단제, 질량 분광측정 매트릭스 물질, 항체 포획 체제, 양성 대조군 샘플, 음성 대조군 샘플, 소프트웨어 및 프로토콜, 가이드 및 참조 데이터와 같은 정보가 포함될 수 있다.

[0251] 일부 구현예에서 키트는 CV 사건 위험 상태의 분석을 위해 제공되며, 여기서 키트는 본원에 기재된 바이오마커에 특이적인 하나 이상의 압타머에 대한 PCR 프라이머를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트에는 사용 및 바이오마커와 CV 사건의 위험 예측 간의 상관화 지침이 추가로 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트에는 또한 본원에 기재된 바이오마커에 특이적인 하나 이상의 압타머의 상보체를 함유하는 DNA 어레이, 시약 및/또는 샘플 DNA를 증폭 또는 분리하기 위한 효소가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트에는 실시간 PCR을 위한 시약, 예를 들어 TaqMan 프로브 및/또는 프라이머, 및 효소가 포함될 수 있다.

[0252] 예를 들어, 키트는 (a) 시험 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 수준을 결정하기 위한 하나 이상의 포획 시약을 포함하는 시약, 및 임의로 (b) 시험 샘플에서 정량된 각각의 바이오마커의 양을 하나 이상의 미리 결정된 컷오프와 비교하는 단계를 수행하기 위한 하나 이상의 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램은 상기 비교에 기반하여 정량된 각각의 바이오마커에 대한 점수를 할당하고, 일부 구현예에서, 총 점수를 얻기 위해 정량된 각각의 바이오마커에 대한 할당된 점수를 조합한다. 또한, 일부 구현예에서, 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램은 총 점수를 미리 결정된 점수와 비교하고, 대상체가 CV 사건의 증가된 위험을 갖는지 여부를 결정하기 위해 비교를 사용한다. 대안적으로, 하나 이상의 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램보다, 인간에 의해 상기 단계를 수동으로 수행하기 위한 하나 이상의 명령이 제공될 수 있다.

[0253] 바이오마커 패널

[0254] 일부 구현예에서, 표 1에 나열된 바이오마커 중 하나 이상이 검출된다. 일부 구현예에서, 하기 표에 나열된 모든 바이오마커가 검출된다. 일부 구현예에서, 표 1에 나열된 각각의 단백질의 수준이 검출된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이오마커 또는 모든 바이오마커의 검출은 대상체가 정의된 기간 내에 1차 CV 사건을 가질 위험 또는 가능성을 결정하기 위해 수행된다. 일부 이러한 구현예에서, 정의된 기간은 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년이다. 일부 구현예에서, 정의된 기간은 4년이다.

표 1

단백질	유전자	UniProt ID	이름
N-말단 프로BNP	NPPB	P16860	N-말단 프로BNP
MMP-12	MMP12	P39900	대식세포 메탈로엘라스타제
sTREM-1	TREM1	Q9NP99	골수 세포 상에서 발현된 트리거링 수용체 1
안티트롬빈 III	SERPINC1	P01008	안티트롬빈-III
GPR56	GPR56	Q9Y653	접착 G 단백질 커플링 수용체 G1
겔솔린	GSN	P06396	겔솔린
ST4S6	CHST15	Q7LFX5	탄수화물 설포트랜스퍼라제 15
CHTSC	CHST12	Q9NRB3	탄수화물 설포트랜스퍼라제 12
FSH	FSHB	P01225	난포 자극 호르몬
IL-1 sRII	IL1R2	P27930	인터루킨-1 수용체 유형 2
PLXB2	PLXNB2	O15031	플렉신(Plexin)-B2
SAP	APCS	P02743	혈청 아밀로이드 P-성분
TFPI	TFPI	P10646	조직 인자 경로 억제제

[0255]

[0256] 일부 구현예에서, 표 2에 나열된 바이오마커 중 하나 이상이 검출된다. 일부 구현예에서, 하기 표에 나열된 모든 바이오마커가 검출된다. 일부 구현예에서, 표 2에 나열된 각각의 단백질의 수준이 검출된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 바이오마커 또는 모든 바이오마커의 검출은 대상체가 정의된 기간 내에 2차 CV 사건을 가질 위험 또는 가능성을 결정하기 위해 수행된다. 일부 이러한 구현예에서, 정의된 기간은 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년이다.

년이다. 일부 구현예에서, 정의된 기간은 4년이다.

표 2

단백질	유전자	UniProt ID	이름
BNP	NPPB	P16860	나트륨 이노 펩티드 B
MMF-12	MMF12	P39900	대식세포 메탈로엘라스타제
sTREM-1	TREM1	Q9NFP9	골수 세포 상에서 발현된 트리거링 수용체 1
SVEP1	SVEP1	Q4LDE5	Sushi: 폰 빌레브란트 인자 유형 A: EGF 및 펜트락신 도메인 함유 단백질 1
ARL11	ARL11	Q969Q4	ADP-리보실화 인자 유사 단백질 11
ANTR2	ANTXR2	P58335	탄저병 독소 수용체 2
CA125	MUC16	Q8WX17	뮤신-16
GOLM1	GOLM1	Q8NBJ4	골지 막 단백질 1
PPR1A	PPP1R1A	Q13522	단백질 포스파타제 1 조절 서브유닛 1A
ERBB3	ERBB3	P21860	수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-3
suPAR	PLAUR	Q03405	유로키나제 플라스미노겐 활성화제 표면 수용체
GDF-11/8	GDF11 MSTN	O95390 O14793	성장/분화 인자 11/8
JAM-B	JAM2	P57087	접합부 접착 분자 B
ATS13	ADAMTS13	Q76LX8	트롬보스폰딘 모티프가 있는 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 13
스폰딘-1	SPON1	Q9HCB6	스폰딘-1
NCAM-120	NCAM1	P13591	신경 세포 접착 분자 1: 120 kDa 이소폼
TFF3	TFF3	Q07654	트레포일 인자 3
SIRT2	SIRT2	Q8IXJ6	NAD 의존성 단백질 메아세틸라제 시르투인-2
ANP	NPPA	P01160	심방 나트륨 이노 인자
NELL1	NELL1	Q92832	단백질 키나제 C 결합 단백질 NELL1
LRP11	LRP11	Q86VZ4	저밀도 지단백질 수용체 관련 단백질 11
NDST1	NDST1	P52848	이중기능성 헤파탄 설페이트 N-메아세틸라제/N-설포트랜스퍼라제 1
PTPRJ	PTPRJ	Q12913	수용체-유형 티로신-단백질 포스파타제 에타
CILP2	CILP2	Q8IUL8	연골 중간층 단백질 2
CA2D3	CACNA2D3	Q8IZS8	전압 의존성 칼슘 채널 서브유닛 알파-2/델타-3
ITI 중쇄 H2	ITI2H2	P19823	인터 알파 트립신 억제제 중쇄 H2
IGDC4	IGDCC4	Q8TDY8	면역글로불린 슈퍼패밀리 DCC 서브클래스 구성원 4

[0257]

[0258]

컴퓨터 방법 및 소프트웨어

[0259]

대상체에서 CV 사건의 위험 또는 가능성을 평가하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다: 1) 생물학적 샘플을 획득하는 단계; 2) 생물학적 샘플의 패널에서 바이오마커 또는 바이오마커 세트를 검출 및 측정하기 위한 분석 방법을 수행하는 단계; 3) 임의로 임의의 데이터 정규화 또는 표준화를 수행하는 단계; 4) 각각의 바이오마커 수준을 결정하는 단계; 및 5) 결과를 보고하는 단계. 일부 구현예에서, 결과는 대상체의 인구/민족에 대해 보정된다. 일부 구현예에서, 바이오마커 수준은 일부 방식으로 조합되고 조합된 바이오마커 수준에 대한 단일 값이 보고된다. 이 접근에서, 일부 구현예에서, 점수는 질환의 존재 또는 부재의 표시인 미리 설정된 역치 값과 비교되는 모든 바이오마커의 통합으로부터 결정된 단일 수치일 수 있다. 또는 진단 또는 예측 점수는 각각 바이오마커 값을 나타내는 일련의 막대일 수 있고, 반응 패턴은 질환, 병태 또는 사건의 증가된 위험(또는 이것이 아

님)의 존재 또는 부재의 결정을 위한 미리-설정된 패턴과 비교될 수 있다.

- [0260] 본원에 기재된 방법의 적어도 일부 구현에는 컴퓨터를 사용하여 구현될 수 있다. 컴퓨터 시스템(100)의 예가 도 6에 도시되어 있다. 도 6을 참조하면, 프로세서(101), 입력 장치(102), 출력 장치(103), 저장 장치(104), 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체 판독기(105a), 통신 시스템(106), 처리 가속부(예로, DSP 또는 특수 목적 프로세서)(107) 및 메모리(109)가 포함되는 버스(108)를 통해 전기적으로 연결된 하드웨어 요소로 구성된 시스템(100)이 도시되어 있다. 컴퓨터 판독 가능 저장 매체 판독기(105a)는 컴퓨터 판독 가능 저장 매체(105b)에 추가로 연결되며, 이 조합은 일시적으로 및/또는 보다 영구적으로 컴퓨터로 판독 가능한 정보를 함유하기 위한 저장 매체, 메모리 등과 원격, 로컬, 고정식 및/또는 이동식 저장 장치를 포괄적으로 나타내고, 여기에는 저장 장치(104), 메모리(109) 및/또는 임의의 다른 상기 액세스 가능한 시스템(100) 리소스가 포함될 수 있다. 시스템(100)은 또한 운영 체제(192) 및 프로그램, 데이터 등과 같은 다른 코드(193)가 포함되는 소프트웨어 요소(현재 작업 메모리(191) 내에 위치하는 것으로 도시됨)를 포함한다.
- [0261] 도 6과 관련하여, 시스템(100)은 광범위한 유연성 및 구성 가능성을 갖는다. 따라서, 예를 들어, 단일 아키텍처는 현재 바람직한 프로토콜, 프로토콜 변이형, 확장 등에 따라 추가로 구성될 수 있는 하나 이상의 서버를 구현하는 데 활용될 수 있다. 그러나 구현예가 보다 구체적인 적용 요구사항에 따라 잘 활용될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다. 예를 들어, 하나 이상의 시스템 요소는 시스템(100) 구성요소 내(예를 들어, 통신 시스템(106) 내) 하위 요소로서 구현될 수 있다. 맞춤형 하드웨어도 활용될 수 있고/있거나 특정 요소가 하드웨어, 소프트웨어 또는 둘 다에서 구현될 수 있다. 또한, 네트워크 입력/출력 장치(도시되지 않음)와 같은 다른 컴퓨팅 장치에 대한 연결이 사용될 수 있지만, 유선, 무선, 모뎀, 및/또는 다른 컴퓨팅 장치에 대한 다른 연결 또는 연결들이 또한 활용될 수 있음을 이해해야 한다.
- [0262] 하나의 측면에서, 시스템은 CV 사건의 위험 예측을 특징으로 하는 바이오마커의 특징부를 포함하는 데이터베이스를 포함할 수 있다. 바이오마커 데이터(또는 바이오마커 정보)는 컴퓨터 구현 방법의 일부로 사용하기 위해 컴퓨터에 대한 입력으로 활용될 수 있다. 바이오마커 데이터에는 본원에 기재된 바와 같은 데이터가 포함될 수 있다.
- [0263] 하나의 양태에서, 시스템은 입력 데이터를 하나 이상의 프로세서에 제공하기 위한 하나 이상의 장치를 더 포함한다.
- [0264] 시스템은 순위가 매겨진 데이터 요소의 데이터 세트를 저장하기 위한 메모리를 더 포함한다.
- [0265] 또 다른 양태에서, 입력 데이터를 제공하기 위한 장치는 예를 들어, 질량 분광계 또는 유전자 칩 판독기와 같은 데이터 요소의 특성을 검출하기 위한 검출기를 포함한다.
- [0266] 시스템은 데이터베이스 관리 시스템을 추가로 포함할 수 있다. 사용자 요청 또는 쿼리는 쿼리를 처리하여 훈련 세트 데이터베이스로부터 관련 정보를 추출하는 데이터베이스 관리 시스템이 이해하는 적절한 언어로 형식화될 수 있다.
- [0267] 시스템은 네트워크 서버와 하나 이상의 클라이언트가 연결된 네트워크에 연결할 수 있다. 네트워크는 당분야에 알려진 바와 같이 근거리 통신망(LAN) 또는 광역 통신망(WAN)일 수 있다. 바람직하게는, 서버에는 사용자 요청을 처리하기 위한 데이터베이스 데이터에 액세스하기 위해 컴퓨터 프로그램 제품(예로, 소프트웨어)을 실행하는데 필요한 하드웨어가 포함된다.
- [0268] 시스템에는 데이터베이스 관리 시스템의 명령을 실행하기 위한 운영 체제(예로, UNIX 또는 Linux)가 포함될 수 있다. 하나의 양태에서, 운영 체제는 인터넷과 같은 글로벌 통신 네트워크에서 작동할 수 있고 글로벌 통신 네트워크 서버를 활용하여 이러한 네트워크에 연결할 수 있다.
- [0269] 시스템에는 버튼, 풀다운 메뉴, 스크롤 바, 텍스트를 입력하기 위한 필드 등과 같은 인터페이스 요소를 포함하는 그래픽 디스플레이 인터페이스를 포함하는 하나 이상의 장치가 포함될 수 있으며, 이는 당분야에 알려진 그래픽 사용자 인터페이스에서 일상적으로 발견된다. 사용자 인터페이스에 입력된 요청은 하나 이상의 시스템 데이터베이스에서 관련 정보를 검색하기 위한 형식화를 위해 시스템의 응용 프로그램으로 전송될 수 있다. 사용자가 입력한 요청이나 쿼리는 임의의 적합한 데이터베이스 언어로 구성할 수 있다.
- [0270] 그래픽 사용자 인터페이스는 운영 체제의 일부로 그래픽 사용자 인터페이스 코드에 의해 생성될 수 있으며 데이터를 입력하고/하거나 입력된 데이터를 표시하는 데 사용할 수 있다. 처리된 데이터의 결과는 인터페이스에 표시되거나, 시스템과 통신하는 프린터에 인쇄되거나, 메모리 장치에 저장되거나, 및/또는 네트워크를 통해 전송

되거나 컴퓨터가 읽을 수 있는 매체의 형태로 제공될 수 있다.

- [0271] 시스템은 데이터 요소에 관한 데이터(예로, 표현 값)를 시스템에 제공하기 위해 입력 장치와 통신할 수 있다. 하나의 양태에서, 입력 장치에는 예를 들어 질량 분광계, 유전자 칩 또는 어레이 판독기 등이 포함되는 유전자 발현 프로파일링 시스템이 포함될 수 있다.
- [0272] 다양한 구현예에 따른 CV 사건 위험 예측 바이오마커 정보를 분석하기 위한 방법 및 장치는, 예를 들어, 컴퓨터 시스템에서 동작하는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 임의의 적합한 방식으로 구현될 수 있다. 프로세서 및 원격 액세스 가능한 애플리케이션 서버, 네트워크 서버, 개인용 컴퓨터 또는 워크스테이션과 같은 랜덤 액세스 메모리를 포함하는 종래의 컴퓨터 시스템이 사용될 수 있다. 추가적인 컴퓨터 시스템 구성요소에는 대용량 저장 시스템 및 사용자 인터페이스, 예를 들어 기존의 모니터, 키보드 및 추적 장치와 같은 메모리 장치 또는 정보 저장 시스템이 포함될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 독립형 시스템이거나 서버와 하나 이상의 데이터베이스가 포함되는 컴퓨터 네트워크의 일부일 수 있다.
- [0273] CV 사건 위험 예측 바이오마커 분석 시스템은 데이터 수집, 처리, 분석, 보고 및/또는 진단과 같은 데이터 분석을 완료하기 위한 기능 및 작업을 제공할 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 컴퓨터 시스템은 CV 사건 위험 예측 바이오마커에 관한 정보를 수신, 저장, 검색, 분석 및 보고할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 실행할 수 있다. 컴퓨터 프로그램은 원시 데이터를 처리하고 추가 데이터를 생성하기 위한 처리 모듈 및 CV 사건 위험 예측 상태 및/또는 진단 또는 위험 계산을 생성하기 위해 원시 데이터 및 추가 데이터를 분석하기 위한 분석 모듈과 같은 다양한 기능 또는 작업을 수행하는 다중 모듈을 포함할 수 있다. CV 사건에 대한 위험 상태 계산은 질환, 병태 또는 사건과 관련된 대상체의 병태에 관한 추가적인 생의학 정보가 포함되는 임의의 다른 정보를 생성 또는 수집하고, 추가 시험이 바람직할 수 있는지 여부를 식별하거나, 그렇지 않으면 대상체의 건강 상태를 평가하는 것을 임의로 포함할 수 있다.
- [0274] 본원에 기재된 일부 구현예는 컴퓨터 프로그램 제품을 포함하도록 구현될 수 있다. 컴퓨터 프로그램 제품에는 응용 프로그램이 데이터베이스를 가진 컴퓨터 상에서 실행되게 하기 위해 매체에 구현된 컴퓨터 판독 가능 프로그램 코드를 갖는 컴퓨터 판독 가능 매체가 포함될 수 있다.
- [0275] 본원에 사용된 바와 같은 "컴퓨터 프로그램 제품"은 모든 성격의 물리적 매체(예로, 서면, 전자, 자기, 광학 등)에 함유되고 컴퓨터 또는 다른 자동화된 데이터 처리 시스템과 함께 사용할 수 있는 자연어 또는 프로그래밍 언어 문장의 형태로 조직화된 명령 세트를 나타낸다. 그러한 프로그래밍 언어 문장은 컴퓨터 또는 데이터 처리 시스템에 의해 실행될 때 컴퓨터 또는 데이터 처리 시스템이 문장의 특정 내용에 따라 작동하도록 한다. 컴퓨터 프로그램 제품에는 소스 및 목적 코드의 프로그램 및/또는 컴퓨터 판독 가능 매체에 내장된 시험 또는 데이터 라이브러리가 포함되며 이에 제한되지 않는다. 또한, 컴퓨터 시스템 또는 데이터 처리 장비 장치가 미리 선택된 방식으로 작동할 수 있게 하는 컴퓨터 프로그램 제품은 원본 소스 코드, 어셈블리 코드, 개체 코드, 기계 언어, 암호화 또는 압축된 버전의 상기 것들과 임의의 모든 동등물이 포함되지만 이에 제한되지 않는 여러 형태로 제공될 수 있다.
- [0276] 하나의 양태에서, CV 사건의 위험 평가를 위해 컴퓨터 프로그램 제품이 제공된다. 컴퓨터 프로그램 제품에는 컴퓨팅 장치 또는 시스템의 프로세서에 의해 실행 가능한 프로그램 코드를 구현하는 컴퓨터 판독 가능 매체가 포함되고, 프로그램 코드는 대상체로부터의 생물학적 샘플에 기인한 데이터를 검색하는 코드로서, 데이터는 각각 표 1 또는 표 2의 바이오마커 중 하나에 해당하는 바이오마커 수준을 포함하는, 코드; 및 바이오마커 값의 함수로서 대상체의 CV 사건 위험 상태를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드를 포함한다.
- [0277] 또 다른 양태에서, CV 사건의 가능성 또는 위험을 표시하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품이 제공된다. 컴퓨터 프로그램 제품에는 컴퓨팅 장치 또는 시스템의 프로세서에 의해 실행 가능한 프로그램 코드를 구현하는 컴퓨터 판독 가능 매체가 포함되며, 프로그램 코드는 대상체로부터의 생물학적 샘플에 기인한 데이터를 검색하는 코드로서, 데이터는 표 1 또는 표 2에 제공된 바이오마커로부터 선택된 생물학적 샘플의 적어도 하나의 바이오마커에 해당하는 적어도 하나의 바이오마커 값을 포함하는, 코드; 및 바이오마커 값의 함수로서 대상체의 CV 사건 위험 상태를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드를 포함한다.
- [0278] 다양한 구현예가 방법 또는 장치로서 기재되었지만, 구현예는 컴퓨터와 커플링된 코드, 예를 들어 컴퓨터에 상주하거나 컴퓨터에 의해 액세스 가능한 코드를 통해 구현될 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 소프트웨어와 데이터베이스는 위에서 논의한 많은 방법을 구현하는 데 활용될 수 있다. 따라서, 하드웨어에 의해 달성되는 구현예에 더하여, 이들 구현예는 내부에 구현된 컴퓨터 판독 가능 프로그램 코드를 갖는 컴퓨터 사용 가능 매체로

구성된 제조 물품의 사용을 통해 달성될 수 있으며, 이는 본 기재에 개시되는 기능이 가능하도록 야기한다. 따라서, 구현예는 이의 프로그램 코드 수단에서도 이 특허에 의해 보호되는 것으로 간주되는 것이 요망된다. 또한, 구현예는 RAM, ROM, 자기 매체, 광학 매체, 또는 광자기 매체가 포함하지만 이에 제한되지 않는 실질적으로 모든 종류의 컴퓨터 판독 가능 메모리에 저장된 코드로서 구현될 수 있다. 훨씬 더 일반적으로, 구현예는 범용 프로세서, 마이크로코드, 프로그래머블 로직 어레이(PLA) 또는 애플리케이션 특이적 집적 회로(ASIC)에서 실행되는 소프트웨어가 포함되지만 이에 제한되지 않는 소프트웨어, 하드웨어, 또는 이의 임의의 조합으로 구현될 수 있다.

[0279] 또한, 구현예는 전송 매체를 통해 전파되는 신호(예를 들어, 전기적 및 광학적)뿐만 아니라 반송파로 구현된 컴퓨터 신호로서 달성될 수 있다는 것이 구상된다. 따라서, 상술한 다양한 유형의 정보는 데이터 구조와 같은 구조로 형식화되어 전기 신호로 전송 매체를 통해 전송되거나 컴퓨터 판독 가능 매체에 저장될 수 있다.

[0280] 또한, 본원에 인용된 많은 구조, 물질 및 행위가 기능을 수행하기 위한 수단 또는 기능을 수행하기 위한 단계로서 인용될 수 있음을 주목한다. 따라서, 그러한 언어는 참조로 포함된 문제를 포함하여 본 명세서 및 그 등가물 내에 개시된 모든 구조, 물질 또는 행위를 포함할 자격이 있음을 이해해야 한다.

[0281] 본원에 개시된 바이오마커의 활용, 및 바이오마커 값을 결정하기 위한 다양한 방법은 CV 사건의 위험 평가와 관련하여 위에서 상세하게 기재되어 있다. 그러나 공정의 적용, 식별된 바이오마커의 사용 및 바이오마커 값을 결정하는 방법은 다른 특정 유형의 심혈관 질환, 임의의 다른 질환 또는 의학적 병태, 또는 부수적인 의학 치료로부터 이익을 얻을 수 있거나 없는 대상체의 식별에 모두 적용 가능하다.

[0282] 다른 방법

[0283] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바이오마커 및 방법은 의료 보험료 또는 보장 결정 및/또는 생명 보험료 또는 보장 결정을 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법의 결과는 의료 보험료 및/또는 생명 보험료를 결정하는 데 사용된다. 일부 그러한 경우에, 의료 보험 또는 생명 보험을 제공하는 조직은 대상체의 CV 사건의 위험 또는 가능성에 관한 정보를 요청하거나 달리 얻고 해당 정보를 사용하여 대상체에 대한 적절한 의료 보험료 또는 생명 보험료를 결정한다. 일부 구현예에서, 시험은 의료 보험 또는 생명 보험을 제공하는 조직에서 요청하고 비용을 지불한다. 일부 구현예에서, 시험은 인수가 진행되는 경우 미래의 부채 또는 비용을 예측하기 위해 행위 또는 건강 시스템 또는 회사의 잠재적 인수자가 사용한다.

[0284] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바이오마커 및 방법은 의료 자원의 활용을 예측 및/또는 관리하는 데 사용된다. 일부 그러한 구현예에서, 방법은 그러한 예측을 위해 수행되지 않지만, 방법으로부터 얻은 정보는 의료 자원의 활용에 대한 예측 및/또는 관리에 사용된다. 예를 들어, 시험 시설 또는 병원은 특정 시설 또는 특정 지리적 영역에서 의료 자원의 활용을 예측 및/또는 관리하기 위해 많은 대상체에 대해 본 발명의 방법에서 정보를 수집할 수 있다.

[0285] 실시예

[0286] 하기 실시예는 설명의 목적으로만 제공되며 첨부된 청구범위에 의해 정의된 적용의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 하기 실시예에 기재된 일상적인 분자 생물학 기술은 문헌(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001))와 같은 표준 실험실 매뉴얼에 기재된 대로 수행할 수 있다.

[0287] 실시예 1: 압타머를 사용한 예시적인 바이오마커 검출

[0288] 샘플에서 하나 이상의 바이오마커 단백질을 검출하는 예시적인 방법은 예를 들어 문헌(Kraemer et al., *PLoS One* 6(10): e26332)에 기재되어 있고, 하기에 기재되어 있다. 세 가지 다른 정량 방법: 마이크로어레이 기반 혼성화, Luminex 비드 기반 방법 및 qPCR이 기재된다.

[0289] 시약

[0290] HEPES, NaCl, KCl, EDTA, EGTA, MgCl₂ 및 Tween-20은 예를 들어 Fisher Biosciences에서 구입할 수 있다. 명목상 8000 분자량의 텍스트란 설페이트 나트륨 염(DxS04)은 예를 들어 AIC에서 구입할 수 있으며 한 번 교환하며 적어도 20시간 동안 탈이온수에 대해 투석한다. KOD EX DNA 폴리머라제는 예를 들어 VWR에서 구입할 수 있다. 테트라메틸암모늄 클로라이드 및 CAPSO는 예를 들어 Sigma-Aldrich로부터 구입할 수 있고 스트렙타비딘-피코에리트린(SAPE)은 예를 들어 Moss Inc.로부터 구입할 수 있다. 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐플루오라이드 하이드

로클로라이드(AEBSF)는 예를 들어 Gold Biotechnology로부터 구입할 수 있다. 스트렙타비딘 코팅된 96웰 플레이트는 예를 들어 Thermo Scientific(Pierce 스트렙타비딘 코팅 플레이트 HBC, 투명, 96웰, 제품 번호 15500 또는 15501)에서 구입할 수 있다. NHS-PEO4-바이오틴은 예를 들어 Thermo Scientific(EZ-Link NHS-PEO4-바이오틴, 제품 번호 21329)에서 구입할 수 있으며 무수 DMSO에 용해시켜 일회용 분취량으로 냉동 보관할 수 있다. IL-8, MIP-4, 리포칼린(Lipocalin)-2, RANTES, MMP-7 및 MMP-9는 예를 들어 R&D Systems로부터 구입할 수 있다. 레지스틴(Resistin) 및 MCP-1은 예를 들어 PeproTech에서 구입할 수 있고 tPA는 예를 들어 VWR에서 구입할 수 있다.

[0291] 핵산

[0292] 기존(아민- 및 바이오틴-치환 포함) 올리고데옥시뉴클레오타이드는 예를 들어 Integrated DNA technologies(IDT)에서 구입할 수 있다. Z-블록(Block)은 서열 5'-(AC-BnBn)7-AC-3'의 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드이며, 여기서 Bn은 벤질 치환된 데옥시우리딘 잔기를 나타낸다. Z-블록은 기존 포스포라미다이트 화학을 사용하여 합성될 수 있다. 압타머 포획 시약은 또한 기존 포스포라미다이트 화학에 의해 합성할 수 있고, 예를 들어 Waters Autopurification 2767 시스템(또는 Waters 600 시리즈 반자동화 시스템)에서 80℃에서 작동하는 21.5 x 75 mm PRP-3 칼럼에서 예를 들어 팀버라인 TL-600 또는 TL-150 히터와 트리에틸암모늄 바이카보네이트(TEAB)/ACN의 구배를 사용하여 제품을 용출하여 정제할 수 있다. 검출은 260 nm에서 수행하고 최고의 분획을 풀링하기 전에 주요 피크에 걸쳐 분획을 수집한다.

[0293] 완충액

[0294] 완충액 SB18은 NaOH를 사용하여 pH 7.5로 조정된 40 mM HEPES, 101 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 및 0.05%(v/v) Tween 20으로 구성된다. 완충액 SB17은 1 mM 삼나트륨 EDTA가 보충된 SB18이다. 완충액 PB1은 NaOH를 사용하여 pH 7.5로 조정된 10 mM HEPES, 101 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 삼나트륨 EDTA 및 0.05%(v/v) Tween-20으로 구성된다. CAPSO 용출 완충액은 100 mM CAPSO pH 10.0과 1M NaCl로 구성된다. 중화 완충액은 500 mM HEPES, 500 mM HCl 및 0.05%(v/v) Tween-20을 함유한다. Agilent 혼성화 완충액은 키트(올리고 aCGH/ChIP-온-칩 혼성화 키트)의 일부로 제공되는 독점 제형물이다. Agilent 세척 완충액 1은 독점 제형물이다(올리고 aCGH/ChIP-온-칩 세척 완충액 1, Agilent). Agilent 세척 완충액 2는 독점 제형물이다(올리고 aCGH/ChIP-온-칩 세척 완충액 2, Agilent). TMAC 혼성화 용액은 4.5 M 테트라메틸암모늄 클로라이드, 6 mM 삼나트륨 EDTA, 75 mM 트리스-HCl(pH 8.0) 및 0.15%(v/v) 사르코실(Sarkosyl)로 구성된다. KOD 완충액(10배 농축)은 1200 mM 트리스-HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 1% v/v Triton-X 100 및 1 mg/mL BSA로 구성된다.

[0295] 샘플 준비

[0296] 혈청(-80℃에서 100 μL 분취량으로 보관)을 25℃ 수조에서 10분 동안 해동한 후 샘플 희석 전에 얼음에 보관한다. 샘플을 8초 동안 부드럽게 볼텍싱하여 혼합한다. 6% 혈청 샘플 용액은 0.6 mM MgCl₂, 1 mM 삼나트륨 EGTA, 0.8 mM AEBSF 및 2 μM Z-블록이 보충된 0.94x SB17로 희석하여 준비한다. 6% 혈청 스톱 용액의 일부를 SB17에서 10배 희석하여 0.6% 혈청 스톱을 생성한다. 일부 구현예에서 6% 및 0.6% 스톱이 각각 고농도 및 저농도 분석 물질을 검출하는 데 사용된다.

[0297] 포획 시약(압타머) 및 스트렙타비딘 플레이트 준비

[0298] 압타머는 이의 인지체 분석물질(또는 바이오마커)의 상대적 풍부도에 따라 2가지 믹스로 분류한다. 스톱 농도는 각각의 압타머에 대해 4 nM이며, 각각의 압타머의 최종 농도는 0.5 nM이다. 압타머 스톱 믹스는 SB17 완충액에서 4배 희석하고 5분 동안 95℃로 가열하고 사용 전에 15분 동안의 기간 동안 37℃로 냉각한다. 이 변성-재생 주기는 압타머 이형체 분포를 정규화하여 다양한 이력에도 불구하고 재현 가능한 압타머 활성을 보장하기 위한 것이다. 스트렙타비딘 플레이트는 사용하기 전에 150 μL 완충액 PB1로 두 번 세척한다.

[0299] 배양 및 플레이트 포획

[0300] 가열 냉각된 2x 압타머 믹스(55 μL)를 동일한 부피의 6% 또는 0.6% 혈청 희석액과 조합하여 3% 및 0.3% 혈청을 함유하는 믹스를 생성한다. 플레이트를 실리콘 밀봉 매트(Axymat 실리콘 밀봉 매트, VWR)로 밀봉하고 37℃에서 1.5시간 동안 인큐베이션한다. 그런 다음 믹스를 세척된 96웰 스트렙타비딘 플레이트의 웰로 옮기고 37℃로 설정된 에펜도르프 열혼합기에서 800 rpm으로 진탕하면서 2시간 동안 추가로 인큐베이션한다.

[0301] 수동 분석

[0302] 달리 명시되지 않는 한, 액체를 덤핑에 의해 제거한 다음 겹친 종이 타월에 두 번 두드린다. 세척 부피는 150 μ L이고 모든 진탕 인큐베이션은 25°C, 800 rpm으로 설정된 에펜도르프 열혼합기에서 수행된다. 믹스를 피펫팅으로 제거하고 플레이트를 1 mM 텍스트란 설페이트 및 500 μ M 바이오틴이 보충된 완충액 PB1로 1분 동안 2회 세척한 다음 완충액 PB1로 15초 동안 4회 세척한다. 완충액 PB1 중 1 mM NHS-PEO4-바이오틴의 새로 만든 용액 (150 μ L/웰)을 첨가하고 플레이트를 진탕하며 5분 동안 인큐베이션한다. NHS-바이오틴 용액을 제거하고 플레이트를 20 mM 글리신이 보충된 완충액 PB1로 3회, 및 완충액 PB1로 3회 세척하였다. 그런 다음 1 mM D_xSO₄가 보충된 완충액 PB1 85 μ L를 각각의 웰에 첨가하고 플레이트를 진탕하며 5 cm 거리에서 BlackRay UV 램프(공칭 파장 365 nm) 아래에서 20분 동안 조사한다. 샘플을 새로운 세척된 스트렙타비딘 코팅 플레이트 또는 기존 세척된 스트렙타비딘 플레이트의 사용하지 않은 웰로 옮기고 고희석 및 저희석 샘플 혼합물을 단일 웰로 조합한다. 샘플을 실온에서 10분 동안 진탕하면서 인큐베이션한다. 흡착되지 않은 물질을 제거하고 플레이트를 30% 글리세롤이 보충된 완충액 PB1로 각각 15초 동안 8회 세척한다. 그런 다음 플레이트를 완충액 PB1로 한 번 세척한다. 압타머는 100 μ L CAPSO 용출 완충액을 사용하여 실온에서 5분 동안 용출한다. 90 μ L의 용출액을 96웰 HybAid 플레이트로 옮기고 10 μ L 중화 완충액을 첨가한다.

[0303] 반자동 검증

[0304] 흡착된 혼합물이 포함된 스트렙타비딘 플레이트를 BioTek EL406 플레이트 세척기의 데크에 놓고, 이는 하기 단계를 수행하도록 프로그래밍되었다: 흡착되지 않은 물질을 흡인으로 제거하고 웰을 1 mM 텍스트란 설페이트 및 500 μ M 바이오틴이 보충된 300 μ L의 완충액 PB1로 4회 세척한다. 그런 다음 웰을 300 μ L 완충액 PB1로 3회 세척한다. 완충액 PB1에서 1 mM NHS-PEO4-바이오틴의 새로 제조한(DMSO의 100 mM 스톱에서) 용액 150 μ L를 첨가한다. 플레이트를 진탕하며 5분 동안 인큐베이션한다. 액체를 흡인하고 웰을 10 mM 글리신이 보충된 300 μ L 완충액 PB1로 8회 세척한다. 1 mM 텍스트란 설페이트가 보충된 완충액 PB1 100 μ L를 첨가한다. 이러한 자동화 단계 후, 플레이트를 플레이트 세척기에서 제거하고 20분 동안 5 cm 거리에서 UV 광원(BlackRay, 공칭 파장 365 nm) 하에 장착된 열진탕기 위에 놓는다. 열진탕기는 800 rpm 및 25°C로 설정한다. 20분 조사 후, 샘플을 새로운, 세척된 스트렙타비딘 플레이트(또는 기존 세척된 플레이트의 사용하지 않은 웰)로 수동으로 옮긴다. 이 시점에서 고농도(3% 혈청 + 3% 압타머 믹스) 및 저농도 반응 믹스(0.3% 혈청 + 0.3% 압타머 믹스)를 단일 웰로 조합한다. 이 "Catch-2" 플레이트를 하기 단계를 수행하도록 프로그래밍된, BioTek EL406 플레이트 세척기의 데크에 놓는다: 플레이트를 진탕하며 10분 동안 인큐베이션한다. 액체를 흡인하고 웰을 30% 글리세롤이 보충된 300 μ L 완충액 PB1로 21회 세척한다. 웰은 300 μ L 완충액 PB1로 5회 세척하고 최종 세척을 흡인한다. 100 μ L CAPSO 용출 완충액을 첨가하고 5분간 진탕하며 압타머를 용출한다. 이러한 자동화 단계 후, 플레이트를 플레이트 세척기의 데크에서 제거하고 샘플의 90 μ L 분취량을 10 μ L 중화 완충액이 함유된 HybAid 96웰 플레이트의 웰로 수동으로 옮긴다.

[0305] 맞춤형 Agilent 8X15k 마이크로어레이의 혼성화

[0306] 24 μ L의 중화된 용출액을 새로운 96웰 플레이트로 옮기고 10개의 Cy3압타머로 구성된 혼성화 대조군 세트를 함유하는 6 μ L의 10X Agilent 블록(올리고 aCGH/ChIP-온-칩 혼성화 키트, 대규모 부피, Agilent 5188-5380)을 각각의 웰에 첨가한다. 30 μ L 2X Agilent 혼성화 완충액을 각각의 샘플에 첨가하고 혼합한다. 생성된 혼성화 용액 40 μ L를 혼성화 개스킷 슬라이드(혼성화 개스킷 슬라이드, 슬라이드 형식당 8-마이크로어레이, Agilent)의 각각의 "웰"에 수동으로 피펫팅한다. 20x dT 링커가 있는 각각의 압타머의 40개 뉴클레오타이드 무작위 영역에 상보적인 어레이당 10개의 프로브를 포함하는 맞춤형 Agilent 마이크로어레이 슬라이드를 제조업체의 프로토콜에 따라 개스킷 슬라이드에 배치한다. 어셈블리(혼성화 챔버 키트 - SureHyb 지원, Agilent)를 클램프로 고정하고 20 rpm으로 회전하면서 60°C에서 19시간 동안 인큐베이션한다.

[0307] 혼성화 후 세척

[0308] 대략 400 mL의 Agilent 세척 완충액 1을 두 개의 개별 유리 염색 접시에 각각 넣는다. 슬라이드(한 번에 2개 이하)를 세척 완충액 1에 담그면서 분해 및 분리한 다음 세척 완충액 1을 함유하는 두 번째 염색 접시의 슬라이드 랙으로 옮긴다. 슬라이드를 교반하면서 세척 완충액 1에서 추가로 5분 동안 인큐베이션한다. 슬라이드를 37°C로 미리 평형화된 세척 완충액 2로 옮기고 교반하면서 5분 동안 인큐베이션한다. 슬라이드를 아세토니트릴을 함유하는 네 번째 염색 접시로 옮기고 교반하면서 5분 동안 인큐베이션한다.

[0309] 마이크로어레이 조영

[0310] 마이크로어레이 슬라이드는 100% PMT 설정에서 5 μ m 해상도의 Cy3 채널을 사용하고 0.05에서 지원된 XRD 옵션

을 사용하는 Agilent G2565CA 마이크로어레이 스캐너 시스템으로 조영한다. 생성 TIFF 이미지는 GE1_105_Dec08 프로토콜과 함께 Agilent 특징부 추출 소프트웨어 버전 10.5.1.1을 사용하여 처리한다.

[0311] Luminex 프로브 설계

[0312] 비드에 고정된 프로브는 표적 압타머의 40개 뉴클레오타이드 무작위 영역의 3' 말단에 상보적인 40개의 데옥시뉴클레오타이드를 가지고 있다. 압타머 상보적 영역은 5' 아미노 말단을 갖는 헥사에틸렌글리콜(HEG) 링커를 통해 Luminex 마이크로스피어에 커플링된다. 바이오틴화된 검출 데옥시올리고뉴클레오타이드는 표적 압타머의 5' 프라이머 영역에 상보적인 17-21개의 데옥시뉴클레오타이드를 포함한다. 바이오틴 모이어티를 검출 올리고의 3' 말단에 첨부한다.

[0313] Luminex 마이크로스피어와의 프로브 커플링

[0314] 프로브는 본질적으로 제조업체의 지침에 따라 Luminex 마이크로플렉스 마이크로스피어에 커플링하지만 하기와 같이 변형한다. 아미노 말단 올리고뉴클레오타이드 양은 2.5×10^6 마이크로스피어 당 0.08 nMol이고 두 번째 EDC 첨가는 10 mg/mL에서 5 μ L이다. 커플링 반응은 25°C 및 600 rpm으로 설정된 에펜도르프 열진탕기에서 수행한다.

[0315] 마이크로스피어 혼성화

[0316] 마이크로스피어 스톡 용액(약 40000 마이크로스피어/ μ L)을 볼텍싱하고 Health Sonics 초음파 세척기(모델: T1.9C)에서 60초 동안 초음파처리하여 마이크로스피어를 현탁한다. 현탁된 마이크로스피어는 1.5X TMAC 혼성화 용액에서 반응 당 2000개의 마이크로스피어로 희석하고 볼텍싱 및 초음파 처리에 의해 혼합한다. 비드 혼합물의 반응 당 33 μ L을 96웰 HybAid 플레이트로 옮긴다. 1X TE 완충액에 7 μ L의 15 nM 바이오틴화된 검출 올리고뉴클레오타이드 스톡을 각각의 반응에 첨가하고 혼합한다. 10 μ L의 중화된 검정 샘플을 첨가하고 플레이트를 실리콘 캡 매트 썰로 밀봉한다. 플레이트를 먼저 96°C에서 5분 동안 인큐베이션하고 기존의 혼성화 오븐에서 밤새 진탕하지 않고 50°C에서 인큐베이션한다. 필터 플레이트(Dura pore, Millipore 부품 번호 MSBVN1250, 1.2 μ m 기공 크기)는 0.5%(w/v) BSA가 보충된 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 미리 수화한다. 혼성화 반응의 전체 샘플 부피를 필터 플레이트로 옮긴다. 혼성화 플레이트는 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 헹구고 남아있는 모든 물질은 필터 플레이트로 옮긴다. 샘플은 느린 진공에서 여과하며, 약 8초에 걸쳐 150 μ L 완충액을 비운다. 필터 플레이트를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 한 번 세척하고 필터 플레이트의 마이크로스피어를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액에 재현탁한다. 필터 플레이트는 빛으로부터 보호하고 에펜도르프 열혼합기 R에서 1000 rpm에서 5분 동안 인큐베이션한다. 그런 다음 필터 플레이트를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 한 번 세척한다. 1X TMAC 혼성화 용액에 75 μ L의 10 μ g/mL 스트렙타비딘 피코에리트린(SAPE-100, MOSS, Inc.)을 각각의 반응에 첨가하고 에펜도르프 열혼합기 R에서 25°C, 1000 rpm에서 60분 동안 인큐베이션한다. 필터 플레이트를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 두 번 세척하고 필터 플레이트의 마이크로스피어를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액에 재현탁한다. 그런 다음 필터 플레이트를 1000 rpm에서 5분 동안 에펜도르프 열혼합기 R에서 빛으로부터 보호하며 인큐베이션한다. 그런 다음 필터 플레이트를 0.5% BSA를 함유하는 75 μ L 1x TMAC 혼성화 용액으로 한 번 세척한다. 마이크로스피어를 0.5% BSA가 보충된 75 μ L 1X TMAC 혼성화 용액에 재현탁하고 XPonent 3.0 소프트웨어를 실행하는 Luminex 100 기기에서 분석한다. 높은 PMT 보정 및 7500-18000의 이중선 판별기 설정에서 비드 유형 당 적어도 100개의 마이크로스피어를 계산한다.

[0317] qPCR 판독

[0318] qPCR에 대한 표준 곡선은 10배 희석 및 템플릿이 없는 대조군으로 108 내지 102개 사본수 범위로 물에서 준비한다. 중화된 분석 샘플은 diH2O로 40배 희석한다. qPCR 마스터 믹스는 2x 최종 농도로 준비한다(2x KOD 완충액, 400 μ M dNTP 믹스, 400 nM 정방향 및 역방향 프라이머 믹스, 2x SYBR Green I 및 0.5U KOD EX). 10 μ L의 2x qPCR 마스터 믹스를 10 μ L의 희석된 검정 샘플에 첨가한다. qPCR은 96°C에서 2분 동안 BioRad MyIQ iCycler에서 실행한 다음 96°C에서 5초, 72°C에서 30초로 40회 실행한다.

[0319] **실시예 2. 1차 심혈관 사건 예측을 위한 심혈관 사건 모델**

[0320] 심혈관 질환의 병력이 없는 대상체가 4년 내에 1차 CV 사건을 겪을 위험 또는 가능성을 예측하기 위해 13개의 바이오마커 단백질 패널을 함유하는 심혈관 질환(CVD) 1차 모델을 개발하였다. 1차 CV 사건은 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원 또는 CVD로 인한 사망으로 정의되었다. 훈련/확인 분석은 CVD 1차

사건에 대해 강화된 사례-코호트 연구 설계인 HUNT3 데이터 세트를 사용하여 개발하였다. 이 연구에는 2,515명의 사람들이 포함되며, 이 중 41.51%가 5년 내에 CVD 사건을 겪었다(Krokstad et al., *Int J Epidemiol.* 2013;42:968-977). 데이터는 훈련용 80% 및 확인용 20%로 분할하였다. Whitehall II 연구(Marmot et al., "Health inequalities among British Civil Servants: the Whitehall II study." *Lancet* 1991;337: 1387-1393 참고)에서 독립적인 복제 세트의 예측이 검증 단계에서 수행하였다.

모델

심혈관 질환(CVD) 1차 모델은 Weibull 분포를 사용하는 가속 실패 시간(AFT) 파라미터 생존 모델이다. 이 모델은 13개의 바이오마커, 연령 및 연령과의 상호작용을 특징으로 한다. 4년 위험을 보고하였다. 예측은 4개의 위험 구간과 3개의 위험 범주로 분류하였다. 4년에 걸친 훈련 세트의 점수 및 해당 실제 사건 비율은 표 3에 보고한다.

표 3

위험 범주	위험 구간	최소 위험 백분율	최대 위험 백분율	관찰된 사건 비율	보고할 비율
저위험	1x	0	≤ 2.15	1.9%	100분의 2
중간 위험	2x-3x	> 2.15	≤ 5.05	3.2%	100분의 3
	4x-5x	> 5.05	≤ 7.7	5.3%	100분의 5
위험	6x 이상	> 7.7	≤ 100	10%	100분의 10

결과

5년 예측에 대한 수정 PCE 모델(HUNT3 훈련 데이터에 대한 수정) 및 공개된 PCE 모델에 대한 일치 지수(C-지수), ROC 곡선 하 면적(AUC), 및 무범주 순 재분류 지수(NRI)는 아래 표 4에 나타낸다. 최종 모델은 20% 홀드아웃 HUNT3 확인 데이터 세트에서도 평가하였다.

표 4

모델	데이터세트	AUC	C-지수	NRI(NRI+/NRI-)
CVD 기본 모델	훈련 데이터	0.7	0.7	0.218(0.127/0.091)
	확인 데이터	0.64	0.64	0.009(0.005/0.004)
수정 PCE 모델	훈련 데이터	0.67	0.67	-0.067(-0.039/-0.028)
	확인 데이터	0.65	0.65	-0.28(-0.16/-0.12)

HUNT3 훈련 세트에서 468명의 환자는 7.5% 미만의 PCE 위험 점수를 가졌다. 4년째에 가장 근접하게 계산된 프로테오믹 위험 컷오프는 2.15%였으며 469명의 환자가 2.15% 미만의 예측 위험을 가졌다. 따라서 건강한 기준선 계층은 4년째에 예측된 프로테오믹 위험이 2.15% 미만인 개체로 정의되었다. 이 집단의 평균 프로테오믹 위험은 1.53%였다. 4개의 위험 구간은 1x, 2x-3x, 4x-5x 및 6x 이상으로 계산하였다(표 3 참고). 도 1은 HUNT3 훈련 세트에 대한 4개의 위험 구간으로 계층화된 카플란-마이어 생존 곡선을 보여준다. 도 1은 카플란-마이어 추정치의 95% 신뢰도 구간을 나타내는 음영처리된 영역과 함께 시간 경과에 따른 CVD 1차 사건의 경험적 분포가 상이한 예측된 위험 구간 그룹 사이를 어떻게 분리하는지에 대한 개요를 제공한다. 도 1은 4년째에 겹치지 않는 생존 분포와 함께 위험 구간 사이의 분리를 명확하게 보여준다.

최종 모델은 또한 훈련 및 확인 데이터세트의 모든 개체(< 0.05 를 포함한 모든 PCE 위험 점수)에 대해 평가하였다. 결과는 표 5에 나타낸다. 최종 모델은 모든 개체에 대해서도 경쟁하는 수정 임상 PCE 모델보다 나은 성능을 보였다.

표 5

모델	데이터세트	AUC	C-지수	NRI(NRI+/NRI-)
최종 CVD 기본 모델	훈련 데이터	0.69	0.69	0.217(0.127/0.091)
	확인 데이터	0.64	0.64	-0.036(-0.019/-0.017)
수정 PCE 모델	훈련 데이터	0.65	0.65	-0.094(-0.055/-0.039)
	확인 데이터	0.64	0.65	-0.33(-0.19/-0.14)

[0329]

[0330]

CVD 1차 모델은 여러 파라미터에 대한 정련을 추가 특성으로 하였다. 성별이나 예비 간섭 성분 평가를 기반으로 한 유의미한 영향은 나타나지 않았다. 이 모델은 검정 QC 샘플의 2005개 복제에 적용되었으며 평균 0.05 및 표준 편차 0.008로 예측을 재현할 수 있었다. 샘플 처리 시간을 기반으로 한 큰 변이형은 없었다.

[0331]

검증

[0332]

모델 검증은 265명의 개체로 Whitehall II 데이터세트에서 수행하였으며, 이 중 101명은 CV 사건(38.11%)을 가졌다. 데이터세트의 분석물질 RFU 값은 분석 전에 log10으로 변환하였다. 범위를 벗어난 log10 RFU 값은 HUNT3 훈련 데이터를 사용하여 모델 개발 중에 윈저화(winsorization)를 통해 계산된 압타머 특이적 최대값 및 최소값을 사용하여 귀속시켰다. 그런 다음 5년 시점의 데이터세트에서 최종 프로테오믹 모델을 평가하고, 표 6에 표시된 것처럼 공개된 PCE 모델과 비교하여 순 재분류 지수(NRI)를 계산했다.

표 6

계측	값
NRI(NRI+/NRI-)	0.176(0.120/0.055)
C-지수	0.66

[0333]

[0334]

Whitehall II 검증 데이터세트에 대한 프로테오믹 모델을 사용한 예측의 NRI는 양성이었고, 결과는 HUNT3 확인 데이터에 대한 수정 PCE 모델(HUNT3 훈련 데이터에서 개발됨) 결과보다 좋았다.

[0335]

실시예 3. 이차 심혈관 사건 예측을 위한 심혈관 사건 패널

[0336]

명백히 안정한 심혈관 질환이 있는 것으로 알려진 대상체가 4년 내에 2차 CV 사건을 가질 위험 또는 가능성을 예측하기 위해 27개의 바이오마커 단백질 패널을 함유하는 심혈관 질환(CVD) 2차 모델을 개발하였다. 이차 CV 사건은 심근경색, 뇌졸중, 경허혈 발작, 심부전으로 인한 입원 또는 사망으로 정의되었다. 훈련/확인 분석은 HUNT3 데이터 세트의 하위 코호트를 사용하여 개발하였으며, 명백히 안정한 CVD가 알려진 적격 기준을 충족한 개체로 구성되었다. HUNT3 연구에는 4년 내에 관찰된 208건(28%)의 CV 사건과 함께 QC 계측을 통과한 샘플을 가진 754명의 개체가 포함된다. 데이터는 훈련을 위해 80% 및 검증을 위해 20%로 분할하였다. 지역사회와 임상동맥경화 위험(ARIC) 5차 방문 데이터 세트의 20% 확인 하위세트에 의해 분석을 강화하였다(문헌 The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. *Am. J. Epidemiol.* 1989;129(4):687-702 참고) ARIC 5차 방문의 나머지 80%와 HUNT3 데이터 세트의 20%를 사용한 독립 복제 세트의 예측은 검증 동안 맹검처리하지 않았다.

[0337]

모델

[0338]

심혈관 질환(CVD) 2차 모델은 Weibull 분포를 갖는 AFT 파라미터 생존 모델이다. 이 모델은 특징부로 27개의 바이오마커(log-10 및 중앙 척도) 패널을 갖는다. 4년 위험을 보고하였다. 예측은 4개의 위험 구간 및 3개의 위험 범주로 분류되었다. 4년에 걸친 훈련 세트의 점수 및 해당 실제 사건 비율은 표 7에서 보고한다.

표 7

위험 범주	위험 구간	최소 위험 백분율	최대 위험 백분율	관찰된 사건 비율	보고할 비율
저위험	1x	0	≤ 7.5	5.13%	100분의 5
중간 위험	1x-3x	> 7.5	≤ 25.0	14.4%	100분의 15
	3x-6x	> 25.0	≤ 50.0	36.4%	100분의 35
위험	6x 이상	> 50.0	≤ 100	64.6%	100분의 65

[0339]

[0340] 결과

[0341] 4년 예측에 대한 수정 PCE 모델(HUNT3 훈련 데이터에 대한 수정)에 대한 C-지수, AUC 및 NRI는 아래 표 8에 나 타낸다. CVD 2차 모델은 훈련(HUNT3) 및 확인(ARIC 5차 방문) 데이터세트에서 4년째에 더 높은 C-지수 및 AUC 값과 양성 NRI를 가졌다.

표 8

모델	데이터세트	AUC	C-지수	NRI(CVD 이차 대 수정 PCE)
CVD 2차 모델	훈련 데이터	0.797	0.766	0.350
	확인 데이터	0.795	0.728	0.821
수정 PCE 모델	훈련 데이터	0.740	0.718	해당 없음
	확인 데이터	0.555	0.561	해당 없음

[0342]

[0343] 그런 다음 훈련 세트의 위험 확률을 4개의 구간으로 분류하였고 기준선 그룹은 상대적으로 건강하고(5% 4년 사건 비율), 고위험 그룹은 눈에 띄게 가속화된 사건 비율(65% 4년 사건 비율)을 가졌다. 위의 표 7을 참고한다. 4개 범주 모두 4년째에 95%의 신뢰도로 구별되었다. 그룹은 HUNT3 훈련 세트(도 2) 및 ARIC 5차 방문 확인 세트(도 3)에 대해 4개의 위험 구간으로 계층화된 카플란-마이어 생존 곡선의 도 2 및 3에 나와 있다. 도 2 및 3은 카플란-마이어 추정치의 95% 신뢰도 구간을 나타내는 음영처리된 영역과 함께 시간 경과에 따른 CVD 2차 사건의 경험적 분포가 상이한 예측된 위험 구간 그룹 간에 어떻게 분리되는지에 대한 개요를 제공한다.

[0344] 검증

[0345] 모델 검증은 HUNT3 20% 홀드아웃 및 ARIC 80% 홀드아웃 검증 세트에서 수행하였다. 데이터 세트의 분석물질 RFU 값은 분석 전에 log10으로 변환하였다. 그런 다음 분석물질 RFU 값을 중심에 두고 훈련 세트의 분포만 기반으로 크기를 조정했으며 범위를 벗어난 log10 RFU 값은 원저화를 통해 계산된 값을 사용하여 귀속시켰다. 최종 CVD 2차 모델의 C-지수 및 AUC는 4년 시점의 데이터세트에서 평가했으며 수정 PCE 모델과 비교하였다. NRI는 표 9에 나와있는 수정 PCE 모델과의 비교로 계산하였다.

표 9

모델	데이터세트	AUC	C-지수	NRI(CVD 이차 대 수정 PCE) [CVD 사건 NRI, 무사건 NRI]
CVD 2차 모델	HUNT3 홀드아웃	0.77	0.73	0.60 [0.49, 0.12]
	ARIC 5차 방문 홀드아웃	0.74	0.70	0.53 [0.61, -0.08]
수정 PCE 모델	HUNT3 홀드아웃	0.64	0.63	해당 없음
	ARIC 5차 방문 홀드아웃	0.57	0.56	해당 없음

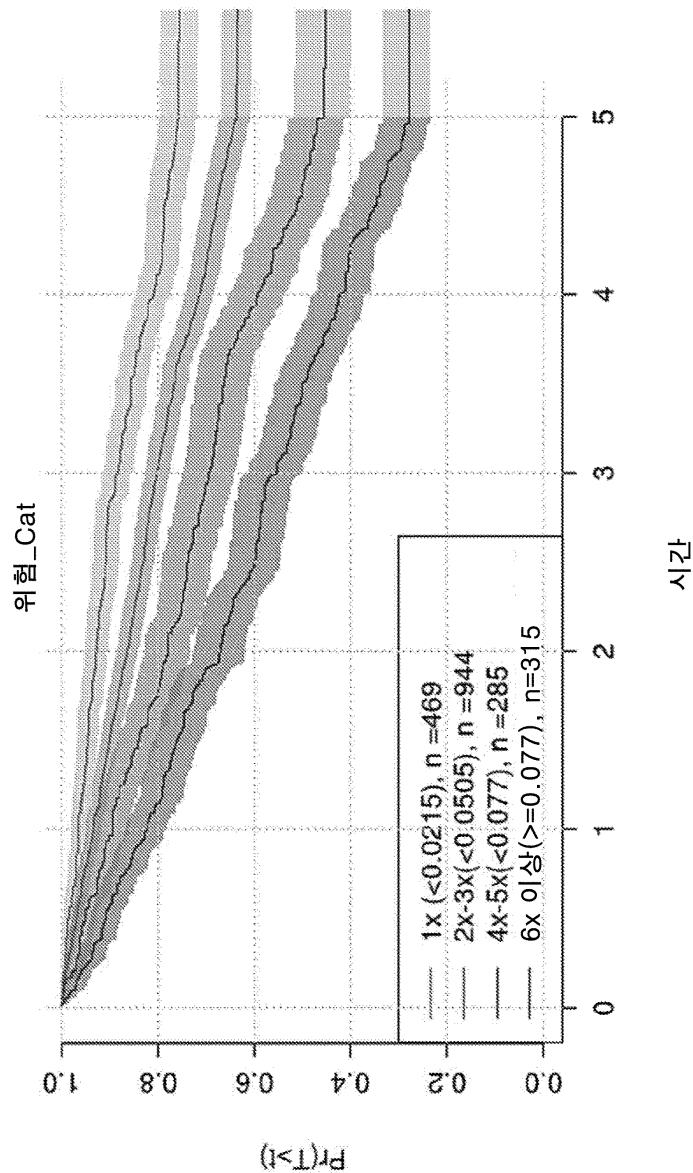
[0346]

[0347]

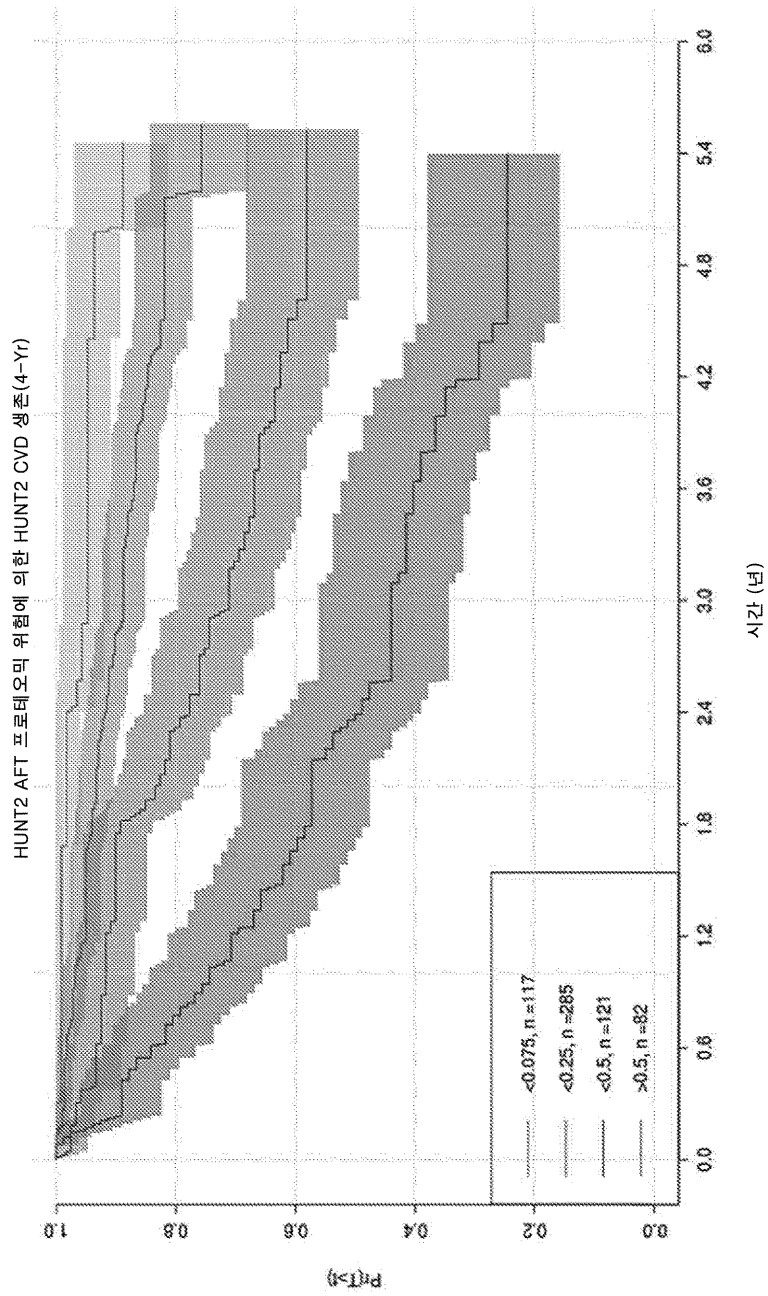
CVD 2차 모델은 4년 사건 대 무사건 대상체 분류 및 조기 사건의 예측 일치, 훈련, 확인 및 검증 세트에서 수정 PCE 수정 임상 모델(성별 및 민족 당 별도 계수가 포함되는 ACC 위험 방정식의 임상 및 인구통계 파라미터 사용)을 능가했다. NRI는 두 가지 검증 세트 모두에 대해 양성이었다(HUNT3 및 ARIC 5차 방문). 도 4와 5는 컷 오프로 계층화된 HUNT3 및 ARIC 5차 방문 검증 세트에 대한 생존 곡선을 보여준다. 범주 당 순서와 기울기는 훈련 세트 및 경험적으로 관찰된 사건 비율의 예상 분포와 유사했다. 가장 고위험 그룹이 구별하였다.

도면

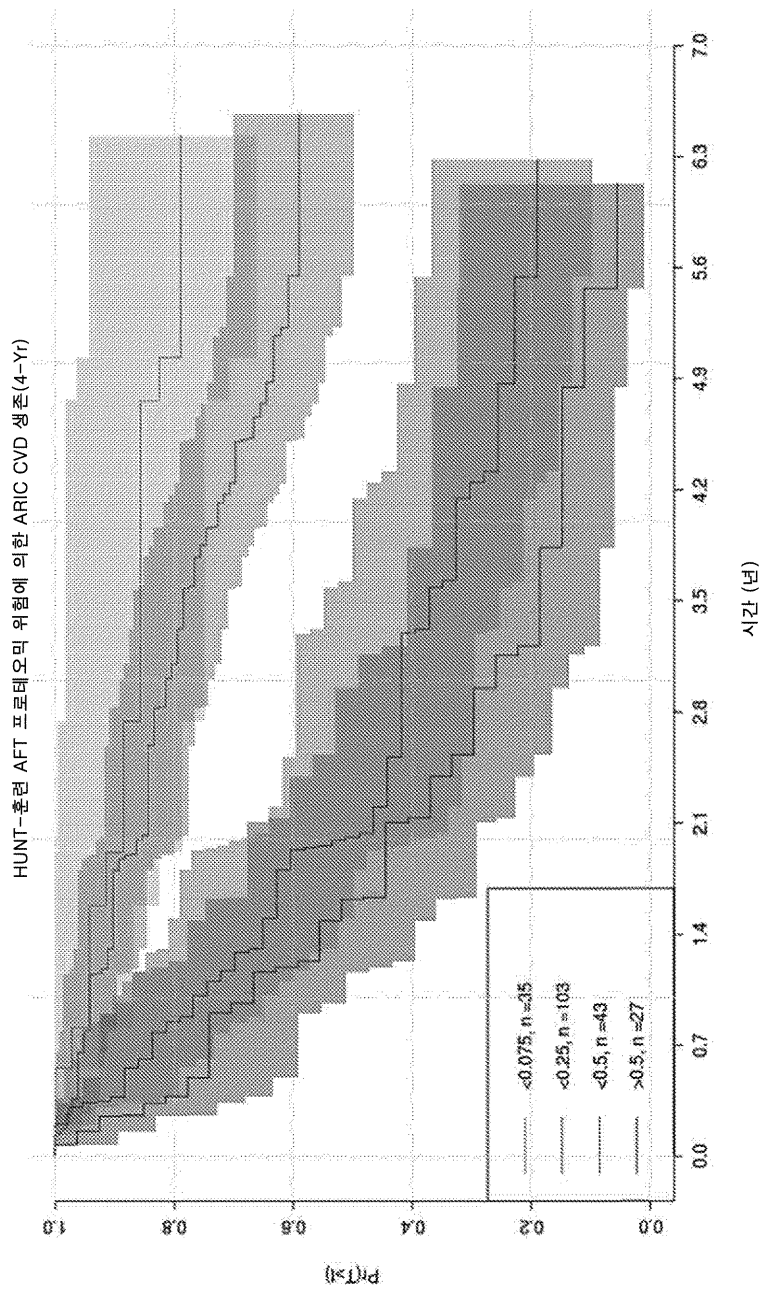
도면1



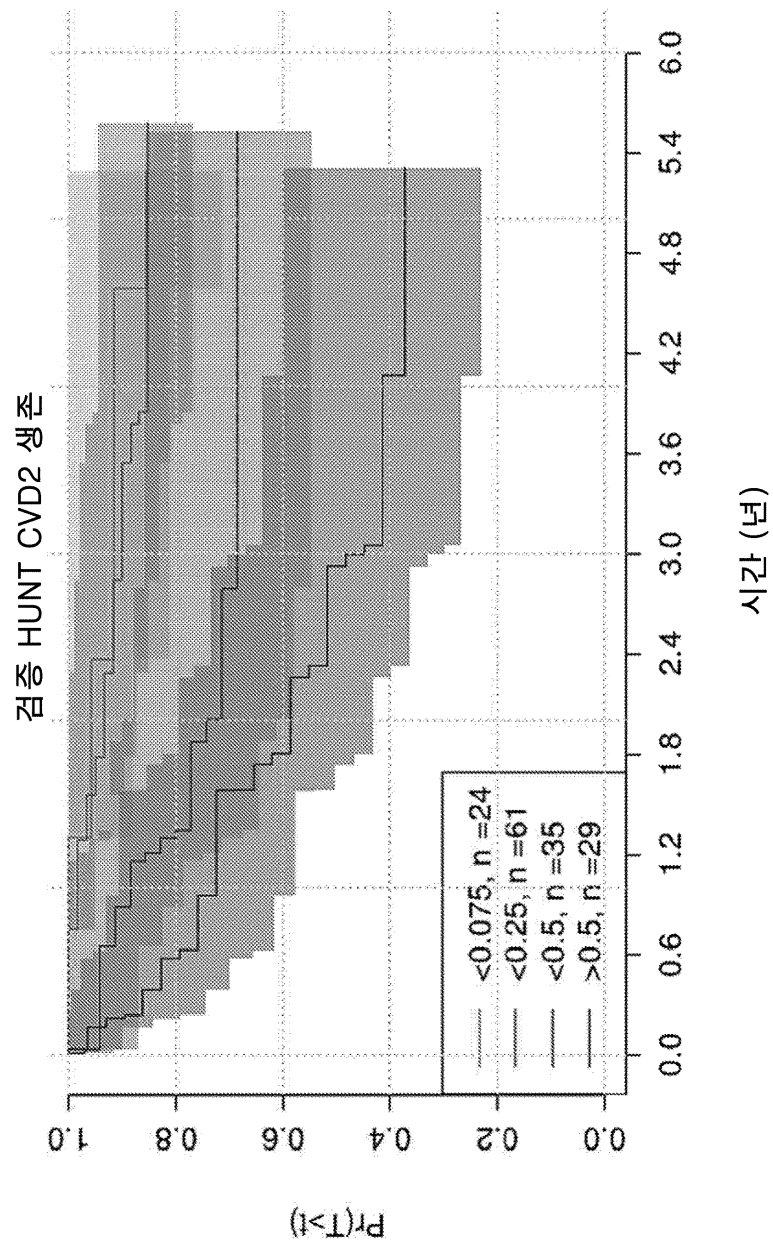
도면2



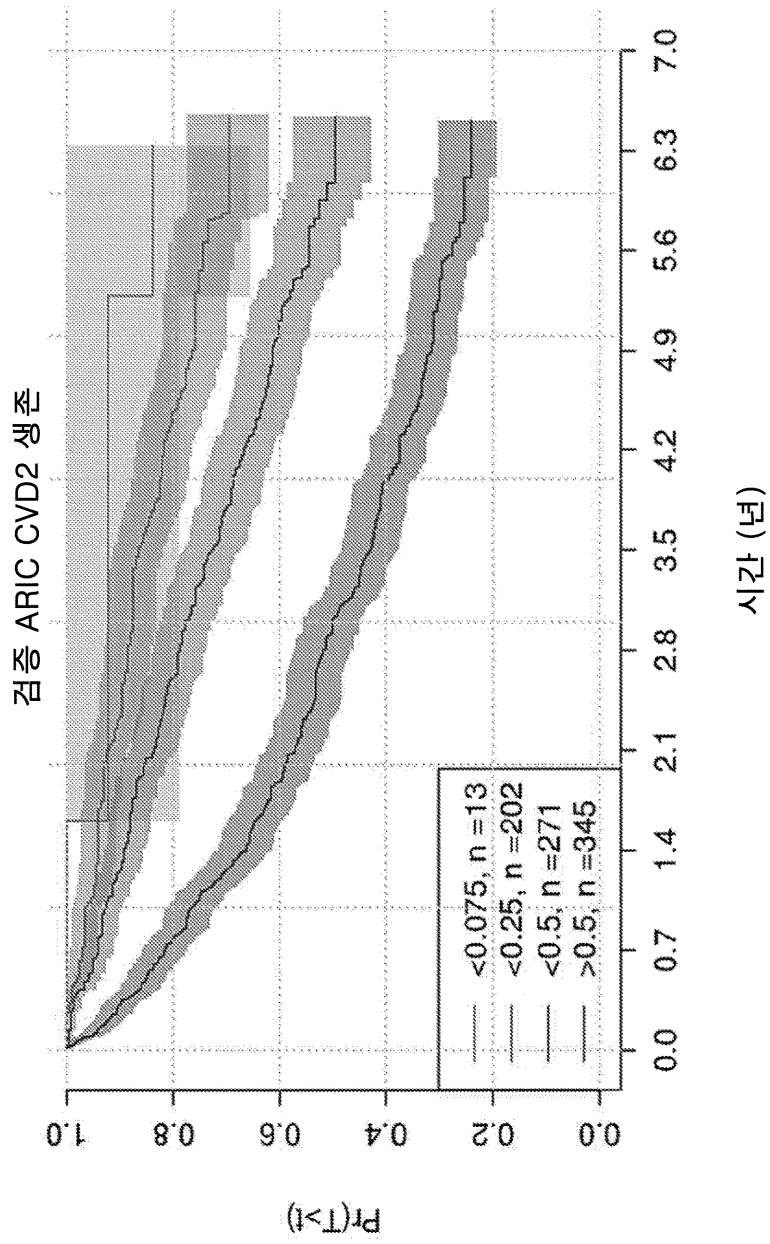
도면3



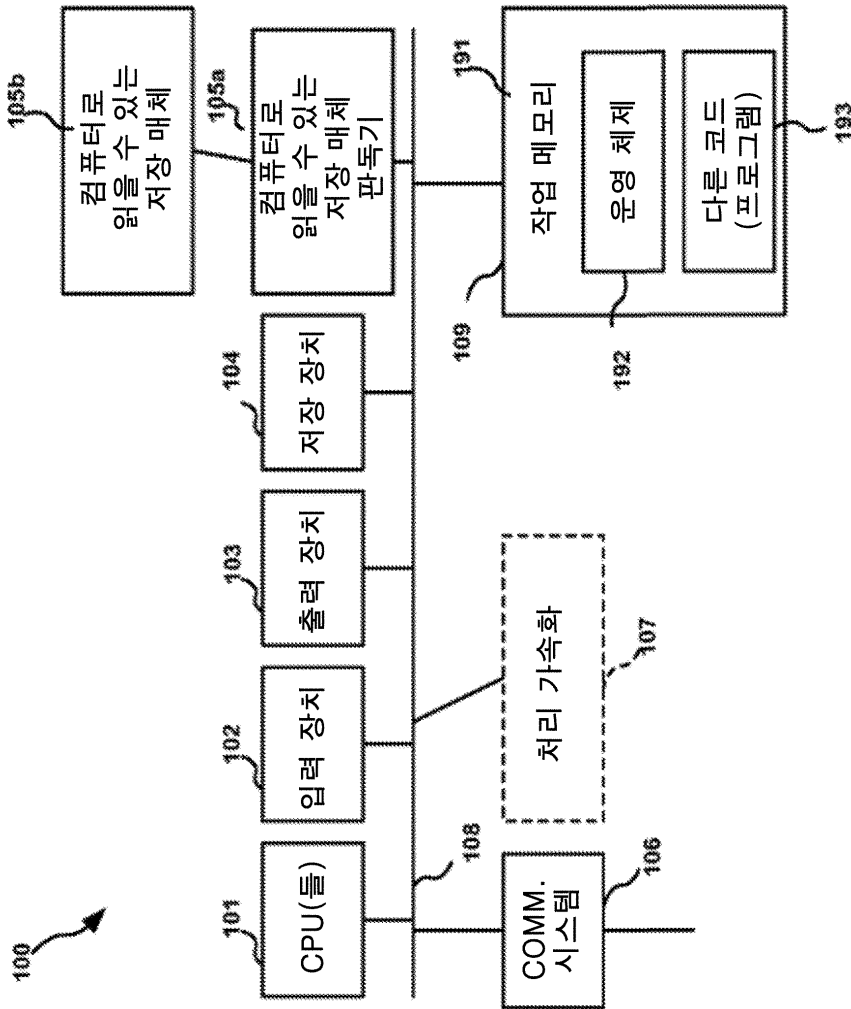
도면4



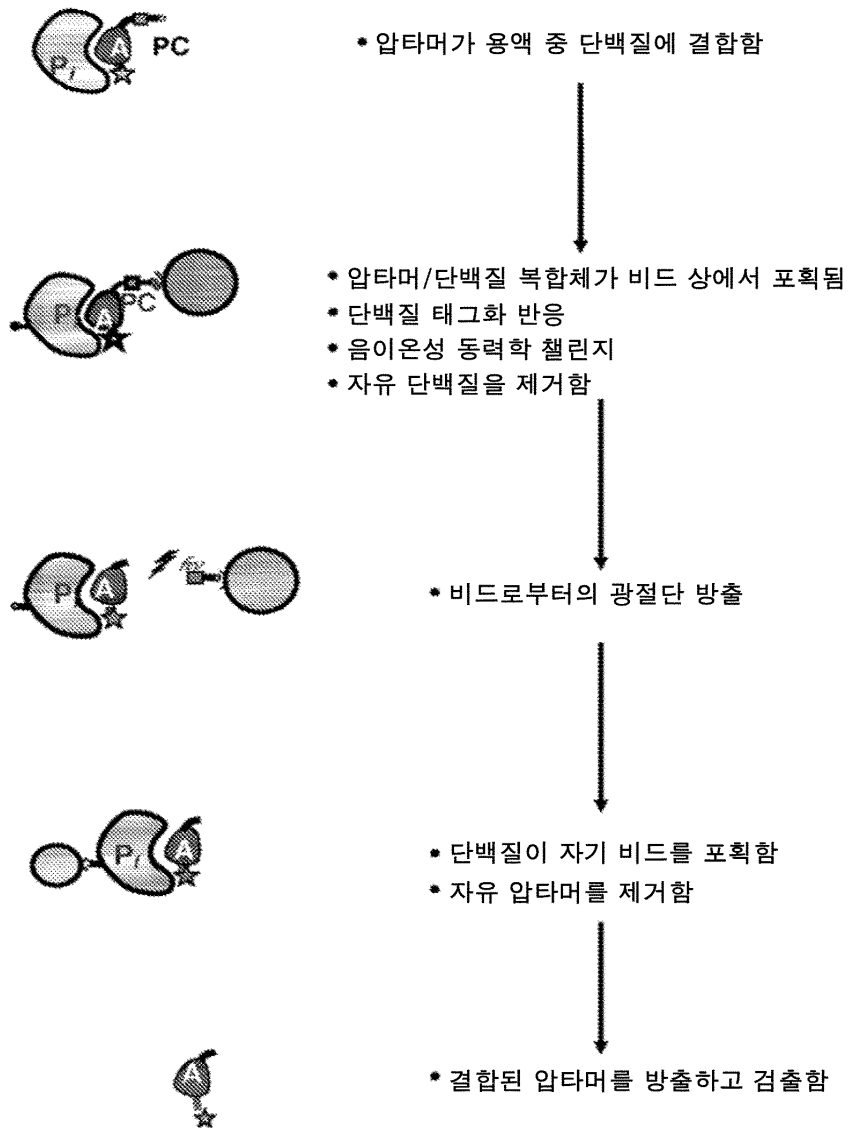
도면5



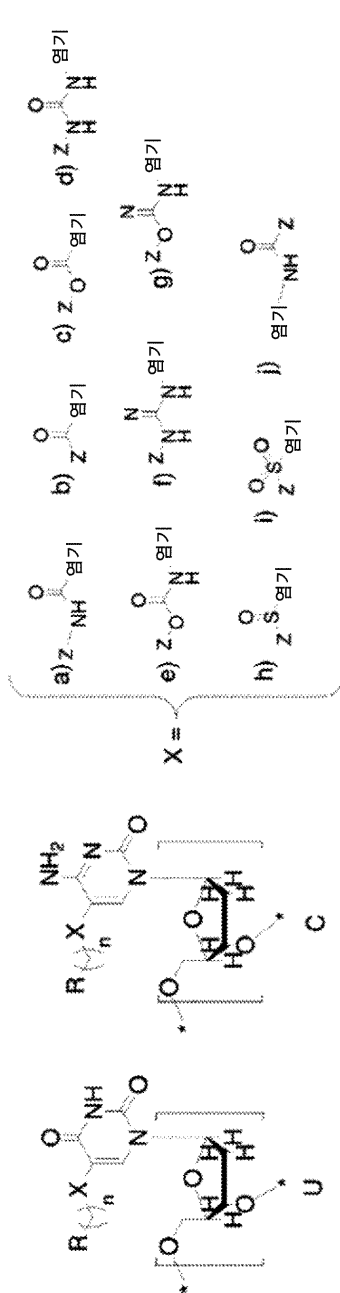
도면6



도면7



도면8a



도면 8b

