

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-527772

(P2013-527772A)

(43) 公表日 平成25年7月4日 (2013. 7. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/44 (2006.01)	C 1 2 Q 1/44	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/455 (2006.01)	A 6 1 K 31/455	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-510163 (P2013-510163)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月2日 (2011. 5. 2)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月28日 (2012. 12. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/034728
 (87) 国際公開番号 W02011/137419
 (87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011. 11. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/330, 193
 (32) 優先日 平成22年4月30日 (2010. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502160545
 ディアデクサス インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 080、サウス サン フランシスコ、オ
 イスター ポイント ブルバード 349
 (71) 出願人 512280851
 フンダシオ インスティトゥト デ レセ
 ルカ デ ロスピタル ウニヴェルシタリ
 ヴァル デブロン
 スペイン国 エー08035 バルセロナ
 、119-129、パセッチ ヴァル デ
 ブロン
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性期ケア環境においてリボタンパク質関連ホスホリパーゼA2を使用する方法

(57) 【要約】

本発明は、急性期ケア環境において対象をケアするために、リボタンパク質関連ホスホリパーゼA2 (Lp-PLA2) を使用するための方法に関する。特に、脳卒中または心臓発作などの血管イベントを有する対象が、急性期ケア環境における治療から利益を得るか否かを決定するために、Lp-PLA2を用いることができる。さらに、本発明は、Lp-PLA2レベルを単独で、または他の評価法と組み合わせて評価することにより、脳卒中のリスクおよび重篤度を評価する方法に関する。さらに、本発明は、脳卒中または心臓発作などの血管イベントを有する対象における機能的転帰を予測するためにLp-PLA2を用いる方法に関する。

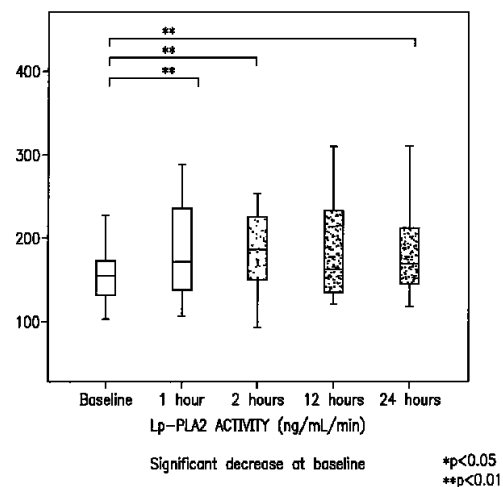


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象のための血栓溶解療法を選択する方法であって、
対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルを決定することを含み、

ここで、低レベルのLp-PLA2は、血栓溶解療法から利益を受ける可能性がある対象を示し、高レベルのLp-PLA2は、積極的血栓溶解療法、薬物の組み合わせまたは介入的および外科的アプローチから利益を受ける可能性がある対象を示す、
前記方法。

【請求項 2】

Lp-PLA2の質量のレベルが決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

Lp-PLA2の活性レベルが決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

低レベルのLp-PLA2が、 201.5 ng/ml 以下である、請求項 1 に記載の方法

【請求項 5】

高レベルのLp-PLA2が 201.5 ng/ml より高い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

対象が、冠血管疾患 (CVD) を有するかまたはこれを有する疑いがある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

CVDが、高血圧、冠動脈心疾患 (CHD)、心筋梗塞、脳卒中、一過性脳虚血発作 (TIA)、脳血管障害 (CVA)、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

対象が、心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAを有するかまたはこれを有する疑いがある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

対象が、急性期ケア環境にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

Lp-PLA2のレベルが、急性期ケア環境において決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

血栓溶解療法が、心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAを有するか、または心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAが疑われる 4 時間以内に、対象のために選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

血栓溶解療法が、心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAを有するか、または心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAが疑われる 3 時間以内に、対象のために選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

対象が近位血管病変または近位血管閉塞を有するか否かを決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

近位血管病変または近位血管閉塞が、経頭蓋ドップラー法 (TCD) により決定される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

低レベルのLp-PLA2を有すると決定された対象に、血栓溶解療法を施すことをさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

高レベルのLp-PLA2を有すると決定された対象に、積極的血栓溶解療法、薬物の組み合

10

20

30

40

50

わせまたは介入的および外科的アプローチを施すことをさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

対象が、血栓溶解薬、ナイアシン、スタチン類および / または Lp-PLA2 阻害剤の薬物の組み合わせを投与される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

外科的介入をさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

心筋梗塞、脳卒中、TIA または CVA を有するかまたはそれを有する疑いがある対象の機能的転帰を予測する方法であって、前記対象における Lp-PLA2 のレベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞の存在を決定することを含み、ここで、高い Lp-PLA2 レベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞を有する対象の機能的転帰は機能的依存である、前記方法。

10

【請求項 20】

Lp-PLA2 の質量レベルが決定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

Lp-PLA2 の活性レベルが決定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

高レベルの Lp-PLA2 が、 201.5 ng/ml より高い、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

対象が冠血管疾患 (CVD) を有するかまたはこれを有する疑いがある、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 24】

CVD が、高血圧、冠動脈心疾患 (CHD)、心筋梗塞、脳卒中、一過性脳虚血発作 (TIA)、脳血管障害 (CVA)、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

対象の機能的転帰が急性期ケア環境において評価される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 26】

Lp-PLA2 のレベルが急性期ケア環境において決定される、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 27】

近位血管病変または近位血管閉塞の存在が、経頭蓋ドップラー法 (TCD) により決定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 28】

近位血管病変または近位血管閉塞の存在が急性期ケア環境において決定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 29】

対象における神経機能を評価することをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 30】

治療的介入のために対象を選択する方法であって、請求項 28 に記載の方法に従って対象を機能的転帰について予測することを含み、ここで、機能的依存の転帰を有すると予測された対象を、治療的介入のために選択する、前記方法。

40

【請求項 31】

治療的介入が、積極的血栓溶解治療薬、薬物の組み合わせまたは介入的および外科的アプローチを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

治療的介入が、血栓溶解薬、ナイアシン、スタチン類および / または Lp-PLA2 阻害剤を含む薬物の組み合わせを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

治療的介入が、外科的介入を含む、請求項 31 に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

対象が、冠血管疾患（CVD）を有するかまたはこれを有する疑いがある、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

CVDが、高血圧、冠動脈心疾患（CHD）、心筋梗塞、脳卒中、一過性脳虚血発作（TIA）、脳血管障害（CVA）、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

対象が、心筋梗塞、脳卒中、TIAまたはCVAを有するかまたはこれを有する疑いがある、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

対象が、急性期ケア環境において治療的介入のために選択する、請求項 3 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本特許出願は、2010年4月30日に出願された米国仮出願第61/330,193号の利益を主張し、当該出願は、本明細書にその全体が参照により組み込まれる。

【0 0 0 2】

発明の分野

20

本発明は、急性期ケア環境において、対象をケアするためにリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2（Lp-PLA2）を用いるための方法に関する。具体的には、脳卒中または心臓発作などの血管イベントを有する対象が急性期ケア環境における治療から利益を受けるか否かを決定するために、Lp-PLA2を用いることができる。さらに、本発明は、Lp-PLA2レベルを単独でまたは他の評価と組み合わせて評価することにより脳卒中のリスクおよび重篤度を評価する方法に関する。さらに、本発明は、脳卒中または心臓発作などの血管イベントを有する対象において機能的転帰を予測するためにLp-PLA2を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の背景

30

序論

リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2（Lp-PLA2）は、酵素活性を有する 5 0 k D のタンパク質であり、冠動脈心疾患（CHD）および脳卒中を含む冠血管疾患（CVD）と関連づけられてきた。Lp-PLA2は、Tewら(1996)、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16:591-599、Tjoelkerら(1995)、Nature 374(6522):549-53、およびCaslakeら(2000)、Atherosclerosis 150(2): 413-9により文献において先に同定され特徴づけられている。さらに、そのタンパク質、アッセイおよび使用の方法は、特許文献WO 95/00649-A1：米国特許第5,981,252号、同第5,968,818号、同第6,177,257号、同第7,052,862号、同第7,045,329号、同第7,217,535号、同第7,416,853号；WO 00/24910-A1：米国特許第5,532,152号；同第5,605,801号；同第5,641,669号；同第,656,431号；5,698,403；同第5,977,308号；and同第5,847,088号；WO 04/089184；WO 05/001416：米国特許第号7,531,316；WO 05/074604；WO 05/113797に記載されており、これらの内容は、本明細書にその全体が参照として組み込まれる。Lp-PLA2は、マクロファージにより発現され、動脈硬化病変において発現が増大する（Hakkinen (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19(12): 2909-17）。Lp-PLA2は、血液中を、主にLDLに結合して循環し、LDLと共に精製され、LDLと関連するホスホリパーゼ活性の > 9 5 % の原因である（Caslake 2000）。

40

【0 0 0 4】

米国食品医薬品局（FDA）は、臨床的評価および患者のリスク評価と組み合わせて、冠動脈心疾患、およびアテローム性動脈硬化に伴う虚血性脳卒中についてのリスクを予測する上での補助として用いるための、ヒト血漿または血清中のLp-PLA2の定量的決定のため

50

のPLAC (登録商標) Test (diaDexus, South San Francisco, CA) に認可を与えた。

【0005】

Lp-PLA2タンパク質を検出するための多様な方法が報告されており、それらは、免疫アッセイ (Caslake, 2000)、活性アッセイ (PAFアセチルヒドラーゼアッセイキット、カタログ番号760901製品カタログ、Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 12/18/97 (www.caymanchem.com) ; Nesco Company (Alfresa, 2-24-3 Sho, Ibaraki, Osaka, Japan) またはKarlan Chemicals (Cottonwood, Arizona) から市販されているAzwell/Alfresa Auto PAF-AHキット (またKosaka (2000) を参照)、血清の血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ活性についての分光光度アッセイ (Clin Chem Acta 296: 151-161、WO 00/32808 (Azwellに対するもの)) を含む。Lp-PLA2を検出するための他の公開された方法として、WO 00/032808、WO 03/048172、WO 2005/001416、WO 05/074604、WO 05/113797が挙げられる。当該公開出願の内容は、本明細書にその全体が参照として組み込まれる。

【0006】

脳卒中

脳卒中は、世界における死および能力障害の主要な原因である。全世界において毎年1600万の初回脳卒中および570万の脳卒中死が存在する。これらの死の87%は、低および中所得国において生ずる。世界では、5000万を超える脳卒中および一過性脳虚血発作 (TIA) の生存者が存在する。これらの生存者のうち、少なくとも5人に1人は、5年以内に別の脳卒中を有することになる (Strong K (2007) Lancet Neurol. 6:182-187)。

米国において、脳卒中は、第3の主要な死因であり、1年あたり約150,000人である。これより多くの人々を死に至らしめるのは、心疾患および癌のみである。

【0007】

1年あたり約780,000の脳卒中が存在し、そのうちの600,000は、患者において初めて起こった脳卒中であり、180,000は、再発の脳卒中である。これらの発作は、多数の生存者に能力障害を残す。米国における5~600万人の脳卒中の生存者のうち、脳卒中の犠牲者の15%~30%は、恒久的能力障害を経験し、20%は、発症の3か月後の時点において入院加療を必要とする。米国における脳卒中の年間合計費用は、2004年において627億ドルとなると推定された。Heron (2007) National Vital Statistics Reports. 56(5):1-96 およびRosamond (2008) Circulation. 117:e25- e146を参照。したがって、脳卒中についての個体のリスクを評価する、および脳卒中を有する個体のための適切なケアを提供する、多大な必要性が存在する。

【0008】

Rotterdam研究 (Oeiら (2004年8月におけるEuropean Society of Cardiology)) から、およびARIC研究 (Ballantyneら (2004年11月におけるAmerican Heart Association (AHA) の学術集会)) から提示されたデータは、Lp-PLA2が脳卒中についての独立したリスク因子であることを示す。さらに、ARICの脳卒中研究は、hsCRPとLp-PLA2との両方の測定が、脳卒中のリスク評価のために特に有用であったことを示した。伝統的な心血管系リスク因子である脂質およびhsCRPについて調節した後で、Lp-PLA2のレベルが上昇していることは、虚血性脳卒中についてのリスクの増進に関連した。他の脳卒中の疫学的研究におけるように、LDLコレステロール (LDL-C) は、脳卒中の症例を、ARICにおける対照から区別しなかった。興味深いことに、LDL-Cは脳卒中の信頼できる前兆ではないにも関わらず、スタチン類は、虚血性脳卒中のリスク (およびLp-PLA2のレベル) を低下させる (Ballantyne (2005) Arch Intern Med. 165:2479-2484)。

【0009】

幾つかの研究は、Lp-PLA2および急性期環境における脳卒中を評価して来た。Elkindら (Arch Intern Med. 2006;166:2073-2080) は、初めての虚血性脳卒中を有し、急性脳卒中の環境において測定された (84%が脳卒中の72時間以内に測定された) hs-CRPおよびLp-PLA2のレベルが脳卒中の再発のリスクを予測するか否か決定するために4年間追跡された467人の患者を評価した。Lp-PLA2およびhs-CRPのレベルは、弱く相関していた。多変数解析の後で、最も高いLp-PLA2レベルを有していた患者は、再発脳卒中についての、

および脳卒中、M Iまたは血管死の複合転帰 (combined outcome) についての、2 倍のリスクを有した。Lp-PLA2は、2 度目のイベントを予防するために最も積極的な処置を必要とする脳卒中患者を同定する。Cucchiaraら (Stroke. 2009 Jul;40(7):2332-6) は、TIAを有する多数の患者は、高リスクの機構 (大血管狭窄または心塞栓) を有するか、または90日以内に脳卒中/死を経験するであろうと結論付けた。彼らの研究からの結果は、急性TIAを有する患者の短期のリスクの層別化のためにLp-PLA2を測定することについての潜在的な役割を示唆する。Philip Gorelick (Am J Cardiol. 2008;101[suppl]:34F-40F) による総説論文は、Lp-PLA2および脳卒中のリスクの幾つかの重要なプロスペクティブな疫学的研究の、最初の公開された総説を提供する。彼は、「Lp-PLA2の免疫アッセイは、中程度のリスクであると見出される脳卒中または心血管疾患を有する個体の正しいリスク分類のために、特に有用であり得ることを証明する可能性がある。それは、全体的な心血管リスク分類において有用であると考えられ、脂質制御のためのスタチン剤による、または心血管疾患の減衰のための他の高リスク患者のアプローチによる、より積極的な治療アプローチをもたらし得る」ことを見出す。Gorlick博士は、急性虚血性脳卒中を有する患者におけるLp-PLA2を評価する研究におけるFurieら (Stroke 2007;38:458) の知見を、「Lp-PLA2は、6 か月における初期の脳卒中再発のリスクの重要な予測因子であり、糖尿病、高血圧、高脂血症、心房細動、喫煙および脳卒中のサブタイプについての多変数の調整の後で重要であり続けた」と述べて特徴づける。

10

【0010】

Lp-PLA2は、先に、原発および再発脳卒中に関連しており、脳卒中のリスクを評価するためのマーカーとして有用であると示されている一方で、Lp-PLA2が、急性期環境における治療から利益を受けるであろう患者を選択するためのマーカーとして有用であることを示すデータはない。

20

【0011】

冠動脈心疾患

リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルは、血管造影により証明された冠動脈心疾患 (CHD) を有する男性において有意に相関していること (Caslake 2000)、高コレステロール血症を有する男性において心臓のイベントと関連していること (Packard (2000) N Engl J Med 343(16): 1148-55) が示されている。

30

【0012】

冠動脈心疾患 (CHD) は、米国において最も蔓延している致死性疾患の一つである。2003年において、推定110万人の米国人が新たなまたは再発性の冠血管の発作を有すると予測される (American Heart Associationのウェブサイト参照: www.americanheart.org)。これらの個体の約60%は、先に知られていたリスク因子を有していない。CHDを発症するリスクにある個体を診断し、治療に適した患者を選択し、当該個体のリスクを軽減することを目的とする治療に対する応答をモニタリングする多大な必要性があることは明らかである。

【0013】

冠血管疾患 (CVD) は、高血圧、冠動脈心疾患 (CHD)、脳卒中、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全を含む、全ての脈管系の疾患を包含する。研究により、CHDがCVDの大部分の原因であることが示されている。CHDの罹患率は、年齢の関数として著しく増加し、殆どの年齢群内で男性が女性よりも高い罹患率を有する。

40

【0014】

心臓疾患についてのリスクを有する個体を同定するために用いられているケアの現在の標準は、トリグリセリド類、全コレステロール、低密度リポタンパク質 (LDL) - コレステロールおよび高密度リポタンパク質 (HDL) - コレステロール (Adult Treatment Panel III) を含む、脂質パネルの測定である。全米コレステロール教育プログラム (NCEP) の、成人における高血中コレステロールの検出、評価および処置専門委員会の第3回報告書の要旨 (Adult Treatment Panel III) (JAMA (2001) 285(19): 2486-97)。最近のAdult Treatment Panel III (ATP III) ガイドライン (2001) によれば、リスク因子のスコア

50

に応じて、LDL - コレステロールレベルが $\geq 100 \sim \leq 130 \text{ mg/dL}$ の個体は、治療的な生活スタイルの改変を推奨される。LDL - コレステロールが $> 130 \text{ mg/dL}$ の個体は、 $< 100 \text{ mg/dL}$ の LDL - コレステロールのゴールを達成するために、広範な生活スタイルの治療および LDL - コレステロール低下薬治療を推奨される。LDL レベルが $> 160 \text{ mg/dL}$ の患者は、脂質低下薬による治療について考慮されるべきである。米国心臓学会 (American Stroke Association) は、米国における1億人を超える成人が、全コレステロールの最適レベルを超えていると推定している。www.americanheart.orgを参照。

【0015】

研究が、上昇した LDL - コレステロールレベルを CHD のリスクと結び付けることを続ける一方で、正常な LDL - コレステロールレベルを有する個体のうちの多数が、心臓イベントを経験することはよく理解されており、このことは、現在認識されていない他の因子が関与しているかもしれないことを示唆している (Eaton (1998) J Am Board Fam Pract 11(3): 180-6)。新たなリスク因子についての探索において、近年、アテローム発生における炎症の役割に関する基礎および臨床的研究の集積が明らかとなるにつれて、炎症のマーカーに対して、多大な注目が集められてきた (Lusis (2000) Atherosclerosis. Nature 407(6801): 233-41; Lindahl (2000) N Engl J Med 343(16): 1139-47)。研究中的炎症マーカーの幾つかとして、細胞接着分子、CD-40リガンド、インターロイキン6およびC反応性タンパク質 (CRP、高感度法により測定されるもの、またはhsCRP) が挙げられる。非特異的な急性期炎症マーカーであるCRPは、近年、CHDについての潜在的なリスク指標として、多大な注目を受けてきている (Ridker (2002) N Engl J Med 347(20): 1557-65; Blake (2002)); J Intern Med 252(4): 283-94)。CRPは、しかし、炎症の多数のソースに対して応答性であることが周知であり、これは、動脈の関与についてのより特異的なマーカーを同定するためのさらなる研究を正当化する。

【0016】

不安定プラークの形成をもたらすアテローム性動脈硬化の病変形成は、CHDの主要な原因の一つであると認識されている (Lusis 2000)。最近では、アテローム性動脈硬化の病変形成の新たな理解は、不安定プラークの形成の重要な原因として炎症プロセスに重点を置いてきている。狭窄の程度よりも寧ろ、アテローム硬化性プラークの不安定性が、心筋梗塞 (MI) の大多数の第一の原因であると考えられている。この理解が、プラークの生物学の研究、および炎症のマーカーが心血管のリスクの予測因子として有用であり得るという認識をもたらしてきた。多様な炎症の候補マーカーの中でも、非特異的な急性期炎症マーカーであるCRP (高感度法により測定されるもの、またはhsCRP) が、CHDの予測因子として注目を受けてきている (Ridker 2002)。

【0017】

末梢血管疾患およびさらなる疾患

末梢血管疾患 (PVD) は、四肢の喪失、または生命の喪失すら引き起こす可能性を有する、ほぼ汎発性の状態である。PVDは、存在するアテローム性動脈硬化により引き起こされる不十分な組織灌流として現れ、塞栓または血栓のいずれかにより急性に悪化し得る。Lp-PLA2、アテローム性動脈硬化と血管炎症との間の関連性により、Lp-PLA2レベルの測定は、PVDを検出し、診断しまたはモニタリングするために有用であり得る。最近では、Santosらが、Lp-PLA2および末梢血管疾患の尺度である足関節・上腕血圧指数 (ABI) の研究を報告した。彼らは、Lp-PLA2が、より低いABIの境界線的に有意な予測因子である ($p = 0.05$) のに対して、研究された他のマーカーであるCRPおよび白血球数 (WBC) は、有意ではなかったことを見出した (Santos (2004) Vasc Med. 9(3):171-6)。

【0018】

Lp-PLA2は、呼吸窮迫症候群 (Grissom (2003) Crit Care Med. 31(3):770-5)、免疫グロブリンA腎症 (Yoon (2002) Clin Genet. 62(2):128-34)、大腿膝窩動脈バイパスの移植片開存性 (graft patency) (Unno (2002) Surgery 132(1):66-71)、口腔の炎症 (McManus and Pinckard (2000) Crit Rev Oral Biol Med. 11(2):240-58)、気道の炎症および反応性亢進 (Henderson (2000) J. Immunol. 15; 164(6):3360-7)、HIVおよびAIDS (

Khovidhunkit (1999) *Metabolism* 48(12):1524-31)、喘息 (Sato (1999) *Am J Respir Crit Care Med.* 159(3):974-9)、若年性関節リウマチ (Tselepis (1999) *Arthritis Rheum.* 42(2):373-83)、ヒト滲出性中耳炎 (Tsuji (1998) *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 60(1):25-9)、統合失調症 (Bell (1997) *Biochem Biophys Res Commun.* 29;241(3):630-59)、壊死性小腸結腸炎の発症 (Muguruma, (1997) *Adv Exp Med Biol.* 407:3 79-82)、ならびに虚血性の腸壊死 (Furukawa (1993) *Pediatr Res.* 34(2):237-41)を含む、幾つかの他の疾患に関与していると考えられている。

【 0 0 1 9 】

疾患の分子学的基盤

動脈の内皮空間におけるLDLの酸化は、アテローム性動脈硬化の発症における重要な段階であると考えられる。酸化されたLDLは、ネイティブなLDLとは異なり、多くの炎症促進的およびアテローム生成促進的な作用に関連することが示されており、これは、最終的には、アテローム硬化性プラークの形成をもたらす (Glass (2001) *Cell* 104(4): 503-16; Witztum (1994) *Lancet* 344(8925): 793-5)。基礎研究からの証拠の集積は、アテローム性動脈硬化が炎症性成分を有し、単純な血管壁における脂質の集積よりはるかに多くのものを表わすことを示唆する。最も初期の病変の所見は、脂肪線条であり、これは主に泡沫細胞として知られる脂肪を運ぶマクロファージからなる。これらの細胞の前駆体は、循環する単球である。後に続く炎症性応答は、中間型病変を形成するための損傷部位への平滑筋細胞および単球の遊走および増殖を、さらに刺激し得る。マクロファージおよび平滑筋細胞の層が蓄積するにつれて、線維性プラークが形成され、これは、細胞デブリ、脂質、コレステロール、カルシウム塩からなる壊死性のコア、および平滑筋、コラーゲンおよびプロテオグリカンの線維性皮膚 (fibrous cap) により特徴づけられる。この進行性病変の段階的な成長は、最終的には、動脈の管腔中へと突出し、血液の流れを妨害する。アテローム性動脈硬化のさらなる進行は、プラークの破裂および続く血栓形成をもたらす、不安定狭心症、M Iまたは突然の虚血性死などの急性の冠血管症候群をもたらす (Davies (2000) *Heart* 83:361-366; Libby (1996) *Curr Opin Lipidol* 7(5): 330-5)。

【 0 0 2 0 】

Lp-PLA2は、酸化的に修飾されたLDLの sn - 2 脂肪酸を加水分解することによりアテローム発生のプロセスにおける重要な役割を果たし、リゾホスファチジルコリンおよび酸化された遊離脂肪酸の形成をもたらす (Macphee (1999) *Biochem J* 338 (Pt 2): 479-87)。Lp-PLA2の作用のこれらの酸化された脂質生成物はいずれも、他の炎症促進性作用の中でも、単球を誘引し泡沫細胞形成に寄与するそれらの能力により、アテローム性動脈硬化の発症および進行に寄与すると考えられる (Macphee (2001) *Curr Opin Pharmacol* 1(2): 121-5; Macphee (2002) *Expert Opin Ther Targets* 6(3): 309-14)。

【 0 0 2 1 】

臨床的研究

Lp-PLA2は、CHDについての潜在的なリスク因子として先に報告されている。Lp-PLA2の血漿レベルのCHDについての予測的価値は、West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) (Packard 2000) として知られる、高コレステロール血症を有する6,595人を含む、大規模プロスペクティブ症例対照臨床試験において報告されている。Lp-PLA2は、580のCHD症例 (非致死性のM Iとして定義されたもの、CHDまたは血管再建手法から死亡) および1,160の適合する対照において測定された。結果は、一変数および多変数解析により、Lp-PLA2の血漿レベルが、CHDイベントの発症と有意に関連していたことを示し、Lp-PLA2の最も高い五分位点について、最も低い五分位点と比較して、CHDイベントについての相対的リスクは、ほぼ2倍であった。Lp-PLA2とCHDとの関連は、LDL - コレステロールおよび他の変数などの伝統的なリスク因子とは独立していた。この研究は、CHDについてのリスク因子としてのLp-PLA2の臨床的有用性の有望な予備的指標を提供した。

【 0 0 2 2 】

さらに、血管造影的に証明されたCHDの研究において、Lp-PLA2は、冠動脈狭窄の程度と有意に関連することが示された (Caslake 2000)。

10

20

30

40

50

女性のみを試験した別の研究において ($n = 246$ 、123の症例および123の対照)、Lp-PLA2の基線 (baseline) レベルは、症例の間で対照よりも高かった ($p = 0.016$) が、他の心血管リスク因子について調整された場合、CHDと有意に関連しなかった。この研究において、症例は、脳卒中を有する女性を 40 %、非致死性の心筋梗塞を 51 %、致死性CHDを 9 % 含んだ (Blake (2001) J Am Coll Cardiol 38(5): 1302-6)。

【 0 0 2 3 】

最近、幾つかの大規模な研究が、臨床的証拠を追加している。例えば、Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC) は、10年の期間にわたり、アテローム性動脈硬化についての病因学、リスク因子、臨床的後遺症、および処置の選択肢を研究するために設計された。これは、国立保健研究所 (NIH) により資金提供され、米国における4つの共同体において、15,792人の外見的に健康な45 ~ 64歳の男性および女性を含む。保存された試料を用いたレトロスペクティブ研究において、LDLは $< 130 \text{ mg / dL}$ であるがLp-PLA2のレベルが高い (最も高い三分位点) 個体は、Lp-PLA2のレベルが低い個体と比較して、2.08倍高い冠血管イベントのリスクを有した (Ballantyne (2004) Circulation. 109(7):837-42)。

10

【 0 0 2 4 】

Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases Study (MONICA) は、最近の世界保健機関のプロジェクトであり、21カ国における都市および非都市地域からの282,279人の外見上健康な男性からデータを収集している。MONICAプロジェクトの亜集団からの血清試料を用いたその後の研究において、Lp-PLA2と冠血管イベントとの間の関連が研究された。このサブ研究において、45 ~ 64歳の934人の男性が、14年間追跡された。平均のLp-PLA2の基線レベルは、症例において、非症例に対して、有意に高かった ($p = 0.01$)。ELISAにより測定されたLp-PLA2の濃度における1標準偏差の増大は、一変数解析において1.37の相対的リスクと関連しており ($p = 0.0002$)、そのリスクの関連は、年齢、糖尿病、喫煙、血圧、脂質レベル、BMIおよびCRPレベルなどの他の因子について調整した後でも、統計学的に有意であり続けた (相対的リスク : 1.21 ; $p < 0.04$)。この研究において、Lp-PLA2およびCRPの両方のレベルが最も高い個体は、両方のマーカーのレベルが低い個体より1.9倍高いリスクを有した。

20

【 0 0 2 5 】

Lp-PLA2は、冠動脈心疾患、およびアテローム性動脈硬化に伴う虚血性脳卒中についてのリスクを予測するために、FDAにより認可されており、これらのデータは、1回目の脳卒中を予測するためのLp-PLA2の有用性を支持し、1回目の脳血管イベントの後の2回目の脳卒中または血管イベントを予測するためのマーカーとして示唆され始めている。

30

【 0 0 2 6 】

Albertsらは、ニューオーリンズにおけるISC (Stroke. 2008;39(2):642) において、5つの公開されたプロスペクティブな疫学的研究を再調査し、高いLp-PLA2と脳卒中のリスクとの関連を確認するメタ解析を示した (Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)、2005年、健康な中年の成人 ; Rotterdam Study、2005年、健康な男性および女性 ; Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT)、2006年、再発C V イベント、低LDLおよび低HDL ; Women's Health Initiative Observational Study、2008年、閉経後の女性 ; Malmö Diet and Cancer Study、2008年、5393人 (60 % 女性) の健康な対象)。

40

【 0 0 2 7 】

再発脳卒中を評価する研究 (Elkind et al, 2006) において、Lp-PLA2は、再発脳卒中のリスクの増大と関連し (調整されたハザード比、2.08 ; 95 % 信頼区間、1.04 ~ 4.18)、再発脳卒中、M I または血管死の複合転帰のリスクと関連した (調整されたハザード比、1.86 ; 95 % 信頼区間、1.01 ~ 3.42)。しかし、ISC 2007において提示されたFurieによる研究において、1回目の脳卒中の後続く6か月以内の再発脳卒中について、関連が見出された (1.014 (1.3 ~ 6.6) が、脳卒中、M I または血管死の組み合わせられたエンドポイントについては関連は見出されなかった。

【 0 0 2 8 】

50

急性期環境におけるケア

米国心臓学会および米国脳卒中学会（American Stroke Association）は、人々に、彼らが脳卒中または心臓発作を有すると考えられる場合、可能な限り速やかに治療を求めるよう、強く要請する。血栓溶解剤または他の適切な処置が開始されるのが早ければ早い程、回復のチャンスは大きい。かかる血栓溶解剤の一つは、組織プラスミノゲンアクチベーター（tPA）であり、これは血栓を粉砕する薬物である。tPAは、心臓発作または脳卒中を有する特定の患者における使用について承認されている。当該薬物は、殆どの心臓発作および脳卒中を引き起こす血栓を溶解することができる。tPAは、虚血性脳卒中の急性（緊急）の処置のための、米国食品医薬品局により承認された唯一の薬物である。

【0029】

米国心臓学会の研究によれば、tPAなどの血栓溶解剤は、心筋に対する損傷の量を低減し、生命を救うことができることが示されている。しかし、有効であるためには、それらは症状が始まった後数時間以内に投与されなければならない。tPAまたは他の血栓溶解剤を投与することは複雑であり、病院職員により腕における静脈（IV）ラインを通して行われる。tPAはまた、虚血性脳卒中を処置する上でも有効であることが示されている。この種類の脳卒中は、脳への血流を遮断する血栓により引き起こされる。

【0030】

1996年に、米国食品医薬品局（FDA）は、虚血性脳卒中を処置するための、症状の開始後初めの3時間におけるtPAの使用を承認した。このことは、脳卒中を有すると考える人々が迅速に救助を求めることを、非常に重要なものとする。遅滞なく投与された場合、tPAは、脳卒中の影響を著しく低減し、恒久的な能力障害を低減することができる。tPAは、脳卒中の症状の開始後初めの数時間以内にのみ投与することができる。国立神経疾患・脳卒中研究所（NINDS）の研究は、厳格なプロトコルに従ってtPAを投与された18人の脳卒中患者のうちの8人は、イベントの3か月後において、重大な能力障害なしに回復するであろうことを示唆した。このことは、実質的に処置に関係なく回復する18人の脳卒中患者のうちの6人（3分の1）と比較される（N Engl J Med 333:1581-1587, 1995.）。

【0031】

tPAまたは他の血栓溶解剤は、心臓発作または脳卒中からの能力障害を低減することができる一方で、より高い出血のリスクもまた存在する。合併症の可能性を予測する上で、研究は異なり、合併症は、脳内への出血、他の型の重篤な出血（例えば、胃腸管のもの）、および死亡を含む。NINDSの研究は、脳内への出血は、tPAを投与された18人の患者のうち約1人において起こった（具体的には5.8%）。これが起こる場合、死亡率は45%であった。幾つかの研究は、「血栓溶解」医薬による処置は、脳卒中の後で死亡する患者の数を増大させることを示唆した（JAMA 274(13):1017, 1995; Lancet 346:1509-1514, 1995; JAMA 276(12):961-6, 1996; NEJM 335(3):145, 1996; Lancet 352:1245-1251, 1998; JAMA 282(21):2019-26, 1999）。その後の研究により、tPAを、NINDSのプロトコルにおいて推奨されるよりも自由に用いることは、より高い率の頭蓋内出血をもたらしたことが示された（JAMA 283:1151-1158, 2000; Cerebrovasc Dis 8(suppl 4):48, 1998; Arch Intern Med 162:1994-2001, 2002; Cochrane Database Syst Rev. 2000:CD000213; Cochrane Database Syst Rev. 2000:CD000029）。合併症は、70歳を超える患者、より重篤な脳卒中を有する患者、またはグルコースが300mg/dlを超える患者においてtPAを用いる場合に、より起こり易い。

【0032】

血栓溶解剤に関連する重大なリスクに起因して、医師が、害（重篤な出血または死亡）の可能性に対して、利益の可能性（例えば、3か月における機能の改善）を重みづけすることは重要である。脳卒中を診断するためには、脳卒中の症状のみでは不十分であり、脳卒中に類似した症状を有する患者において、tPAの使用は、いかなる利益の可能性もなく、潜在的な有害作用のみをもたらす。心血管イベントを有すると疑われる患者であって、血栓溶解剤（例えばtPA）の投与から利益を受けるであろう患者を同定する必要性が存在することは明らかである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

Lp-PLA2阻害剤

冠動脈疾患およびアテローム性動脈硬化の処置のための治療標的としてのLp-PLA2の可能性に言及する幾つかの論文が公開されている (Caslake 2000; Macphee 2001; Carpenter (2001) FEBS Lett. 505(3):357-63.; Leach (2001) Farmaco 56(1-2): 45-50)。Lp-PLA2がCHDの処置のための治療標的であるという証拠は、幾つかの属 (genuses) のLp-PLA2の阻害剤およびそれらの使用を記載する多くの論文において公開されている。これらの属として、限定されないが、以下が挙げられる：アゼチジノン阻害剤、SB-222657、SB-22377 (MacPhee 1999)；可逆的な 2 - (アルキルチオ) - ピリミジン - 4 - オン類 (Boyd et al. (2000) Bioorg Med Chem Lett. 10(4):395-8)；天然物由来阻害剤、SB-253514およびアナログ (Pinto (2000); Bioorg Med Chem Lett. 10(17):2015-7)；Pseudomonas fluorescensにより生成される阻害剤、DSM 11579、SB-253514およびアナログ (Thirkettle (2000) et al. J Antibiot (Tokyo). 53(7):664-9; Busby (2000) J Antibiot (Tokyo). 53(7):670-6.; Thirkettle (2000) J Antibiot (Tokyo). 53(7):733-5)；2 - (アルキルチオ) - ピリミドン類、経口で活性な 1 - ((アミド架橋) - アルキル) - ピリミドン類 (Boyd et al. (2000) Bioorg Med Chem Lett. 10(22):2557-61)；1 - ((アミド架橋) - アルキル) - ピリミドン類中の修飾ピリミドン 5 - 置換基が高度に水溶性であるもの (Boyd, et al. (2001) Bioorg Med Chem Lett. 2001 11(5):701-4)；1 - ((アミド架橋) - アルキル) - ピリミドン類中の親油性の 1 - 置換基のフェニルピペラジニアセタミド誘導体 (Bloomer (2001) Bioorg Med Chem Lett. 11(14):1925-9.)；1 - (ピフェニルメチルアミドアルキル) - ピリミドン類の 5 - (ピラゾリルメチル) 誘導体および 5 - (メトキシピリミジニルメチル) 誘導体 (Boyd et al. (2002) Bioorg Med Chem Lett. 12(1):51-5)；臨床的候補SB-435495中のピリミドン 5 - 置換基のシクロペンチル縮合誘導体、SB-480848 (Blackie (2003) Bioorg Med Chem Lett. 2003 Mar 24;13(6):1067-70)。今日まで、GlaxoSmithKline (GSK) が、Lp-PLA2の活性を劇的に低下させる新規化合物であるダラプラディブについての正の臨床データを発表している。ダラプラディブ、およびララプラディブ (ralapladib) を含む他のLp-PLA2阻害剤は、心血管系の疾患および死を低減する新たな世代の薬物を代表し得る。

【 0 0 3 4 】

Lp-PLA2および他の治療分子

Winklerは、最近、2型糖尿病を有する89人 (42人のフルバスタチンおよび47人のプラセボ) の患者におけるLp-PLA2のレベルに対する、フルバスタチンXL対プラセボの効果を評価する、多施設の二重盲検の無作為化試験を報告した (Winkler (2004) J Clin Endocrinol Metab. 89(3) 1153-1159)。これらの対象の間で、より高いLp-PLA2の活性は、CADの病歴と有意に関連していた。Lp-PLA2の活性に関して最も高い四分位は、最も低い四分位よりも有意により高いリスクを有していた (リスク比：2.09；95%CI：1.02～4.29；p = 0.043)。フルバスタチン処置は、Lp-PLA2の活性を22.8%低下させた。Blankenbergはまた、スタチン類の服用が、測定可能なLp-PLA2の活性を低下させたことを報告した (Blankenberg (2003) J of Lipid Research 44: 1381-1386)。

【 0 0 3 5 】

Albertらは、リポタンパク質関連ホスホリパーゼa2のレベルに対するスタチン治療の効果について報告した。研究者たちは、PRINCE試験に由来する心血管疾患フリーの集団における、1日40mgのプラバスタチン対プラセボのLp-PLA2レベルに対する効果を評価した。12週間後、Lp-PLA2レベルは、処置された患者の間で22.1% (プラセボ群の間で7.8%であったことに對して) 低下した。プラバスタチンによる僅か6%のLp-PLA2の低下は、LDL-Cの低下が原因であるかもしれない (Albert (2005) Atherosclerosis. 182:193-198)。

【 0 0 3 6 】

Schaeferらは、他のスタチン類に対して、アトルバスタチンの、冠動脈心疾患を有する患者対対照の対象における絶食および摂食後のC反応性タンパク質およびLp-PLA2に対す

る効果を報告した。この研究において、40 mg / 日の投与量における多様なスタチンの Lp-PLA2 に対する影響が比較された。研究により、「アトルバスタチンは、低密度リポタンパク質コレステロールのみではなく、hs-CRP および Lp-PLA2 もまた低下させることから、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチンまたはシンバスタチンよりも有効である」ことが見出された (Schaefer (2005) Am J Cardiol. 95:1025-1032)。

【0037】

Saougos らは、Lp-PLA2 に対する脂質低下薬の効果について報告している。これは、エゼチミブおよびロスバスタチンがいずれも Lp-PLA2 の質量を低下させることを実証する初めての研究である。スタチン不耐性 I I a 型脂質異常症は、10 mg / 日のエゼチミブにより Lp-PLA2 の質量が 18 % 低下し、I I a 型脂質異常症は、10 mg / 日のロスバスタチンにより Lp-PLA2 の質量が 29 % 低下した。200 mg / 日のフェノフィブラートが Lp-PLA2 の質量を 32 % 低下させることもまた示され、この発見は、2 型 DM における Lp-PLA2 の質量に対するフェノフィブラートの効果に類似する (Saogos (2007) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27:2236-2243)。

10

【0038】

Muhlestein らは、混合脂質異常症を有する糖尿病患者の間での、スタチン、フィブラートおよび組み合わせ治療による、Lp-PLA2 の減少について報告した。この研究は、混合脂質異常症を有する 2 型糖尿病患者における、シンバスタチン 20 mg およびフェノフィブラート 160 mg の Lp-PLA2 および CRP に対する効果を評価した。フェノフィブラート、シンバスタチンおよび組み合わせは各々、Lp-PLA2 を低下させ、基線レベルが中央値よりも高い患者の間で、効果が最大であった。この研究において、脂質調節剤 (lipid-modifying agent) は、Lp-PLA2 を 25 % より多く低下させた (フェノフィブラート: 27 % ; シンバスタチン: 35 %) (Muhlestein (2006) J Am Coll Cardiol. 48:396-401)。

20

【0039】

Rosenson らは、メタボリックシンドロームを有する非糖尿病患者におけるフェノフィブラートの Lp-PLA2 レベルに対する効果について、最近報告した。この研究において、小型 LDL-P 粒子の減少は、Lp-PLA2 の減少と有意に関連しており、このことは、フェノフィブラートが、小型 LDL-P を減少させることにより媒介されるプラークの安定化を介して、Lp-PLA2 を低下させ得ることを示唆していた (Rosenson (2008) Am Heart J. 155(3):499.e9-16)。

30

【0040】

Schmidt らは、冠動脈疾患 (CAD) が疑われるために待機的冠血管造影を受けた患者における、エイコサペンタエン酸 (EPA) の Lp-PLA2 レベルに対する効果について報告した。脂肪組織中の海洋性 n - 3 脂肪酸、エイコサペンタエン酸 (EPA) の含有量は、海産物の長期摂取の尺度であり、独立して、Lp-PLA2 の血漿レベルと逆相関した ($r = -0.18$, $p < 0.01$)。この結果は、Lp-PLA2 が CAD に関連し得ること、および海洋性 n - 3 脂肪酸の摂取が血漿 Lp-PLA2 を低下させる可能性があることを支持し、これは、それにより n - 3 脂肪酸が心血管疾患のリスクを低減し得る別の機構を示唆している。

【0041】

Kuvin らは、冠動脈疾患を有する患者における、徐放性ナイアシンの、リポタンパク質の粒子サイズ、分布および炎症マーカーに対する効果について報告した。この研究は、76 mg / d L のよく管理された基線 LDL レベルを有する安定な冠動脈心疾患患者に対してナイアシンを加えることの、Lp-PLA2 に対する効果を評価した。3 か月後において、基線 LDL レベルには何らの有意な変化は存在しなかったが、ナイアシンは、Lp-PLA2 を 20 % 有意に低下させた (Kuvin (2006) Am J Cardiol. 98:743-745)。

40

【0042】

この研究から、Lp-PLA2 の低下は、LDL (これは変化しなかった) に非依存性であること、および、低 LDL コレステロールが達成されている患者において Lp-PLA2 を低下させる機会がまだ残っていると考えられることが明らかとなり、このことは、低 LDL の達成のみでは、プラークが安定化したことを保証し得ないという概念と一致する。

50

これらの研究は、冠動脈心疾患および脳卒中を含むCVDの高いリスクを有する患者を利用する治療を同定する。

本明細書において記載される全ての刊行物および他の資料は、本発明の理解を容易にするため、または実施に関するさらなる詳細を提供するために用いられ、本明細書にその全体が参照により組み込まれる。

【発明の概要】

【0043】

発明の要旨

本発明の一側面は、対象のために血栓溶解療法を選択するための方法であって、対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルを決定する工程を含む、前記方法に関する。

10

本発明の別の側面は、冠血管疾患 (CVD) を有するかまたはこれを有する疑いがある対象のために血栓溶解療法を選択するための方法であって、対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルを決定する工程を含む、前記方法に関する。

【0044】

本発明の別の側面は、対象のために血栓溶解療法を選択するための方法であって、対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルを決定する工程、および前記対象が近位血管病変または近位血管閉塞を有するか否かを決定する工程を含む、前記方法に関する。

これらの方法において、低レベルのLp-PLA2は、対象が血栓溶解療法から利益を受ける可能性があることを示し、一方、高レベルのLp-PLA2は、積極的血栓溶解療法、薬物の組み合わせ、ならびに / または介入的および外科的アプローチから利益を受ける可能性があることを示す。

20

【0045】

本発明の別の側面は、治療的介入のための対象を選択する方法であって、対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞の存在を決定すること、ならびに、高いLp-PLA2レベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞を有する対象を治療的介入のために選択することを含む、前記方法に関する。

本発明の別の側面は、冠血管疾患 (CVD) を有するかまたはこれを有する疑いがある対象を治療的介入のために選択する方法であって、対象におけるリポタンパク質関連ホスホリパーゼ A 2 (Lp-PLA2) のレベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞の存在を決定すること、ならびに、高いLp-PLA2レベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞を有する対象を治療的介入のために選択することを含む、前記方法に関する。

30

【0046】

本発明の別の側面は、心筋梗塞、脳卒中、TIAまたは脳血管障害 (CVA) を有するかまたはこれを有することが疑われる対象の機能的転帰を予測する方法であって、前記対象におけるLp-PLA2のレベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞の存在を決定することを含み、ここで、高いLp-PLA2レベルおよび近位血管病変または近位血管閉塞を有する対象の機能的転帰は、機能的依存 (functional dependence) である、前記方法に関する。

40

本発明のさらに別の側面は、治療的介入のための対象を選択する方法であって、機能的転帰について対象を評価することを含み、ここで、機能的依存の転帰を有すると予測された患者が、治療的介入のために選択される、前記方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1Aおよび1Bは、急性脳卒中におけるLp-PLA2の質量および活性の時間的プロファイルを示す。

【図2】図2Aおよび2Bは、基線から3か月目までのLp-PLA2の質量および活性の時間的プロファイルを示す。

【図3】図3Aおよび3Bは、健康な対照 (n = 135)、ならびに基線、基線から1時

50

間後および24時間後（各時間において、 $n = 35$ ）からプールされた試料における、Lp-PLA2レベルを示す。

【0048】

【図4A - B】図4Aおよび4Bは、Lp-PLA2の質量および活性のレベルの、入院時NIHSSスコアおよび脳卒中の病因との関連を示す。

【図4C - D】図4Cおよび4Dは、Lp-PLA2の質量および活性のレベルの、閉塞の位置および1時間後の再開通との関連を示す。

【図4E - F】図4Eおよび4Fは、Lp-PLA2の質量および活性のレベルの、初期の神経の状態および追跡（3か月目）における機能的転帰との関連を示す。

【0049】

【図5】図5は、血管閉塞の位置およびLp-PLA2レベルおよび1時間後の完全な再開通の成功の間の関係を示す。

【図6】図6は、血管閉塞の位置およびLp-PLA2レベルおよび3か月目の機能的転帰の間の関係を示す。

【図7】図7は、TIAの症例および対照におけるLp-PLA2の質量および活性のレベル（ボックスプロット）を示す。

【0050】

【図8】図8Aおよび8Bは、ABCD2スコアを考慮したさらなる血管イベントまたは脳卒中/TIAの存在についての生存率分析を示すカプラン・マイヤー曲線を示す。

【図9A - D】図9A、9B、9Cおよび9Dは、Lp-PLA2の活性を考慮した、さらなる血管イベントまたは脳卒中/TIAの存在についての生存率分析を示す、カプラン・マイヤー曲線を示す（Lp-PLA2の活性が最高の四分位対最低の四分位）。

【図9E - H】図9E、9F、9Gおよび9Hは、Lp-PLA2の活性を考慮した、さらなる血管イベントまたは脳卒中/TIAの存在についての生存率分析を示すカプラン・マイヤー曲線を示す（Lp-PLA2の活性の最適カットオフ点の上または下の症例）。

【0051】

【図10】図10Aおよび10Bは、Lp-PLA2の質量および活性と全コレステロールとの間の相関を示す分散プロットを示す。

【図11】図11Aおよび11Bは、Lp-PLA2の質量および活性とLDL - コレステロールとの間の相関を示す分散プロットを示す。

【図12】図12は、追跡の間のLp-PLA2の活性の第1の四分位および第3の四分位と第4の四分位との組合せの間の、任意の血管イベントの累積生存率を示す。

【0052】

【図13】図13は、カプラン・マイヤー曲線を示す。Lp-PLA2の活性のカットポイント（cutpoint）レベルの上の群と下の群との間の、追跡の間の任意の血管イベントの累積生存率を示す、カプラン・マイヤー曲線を示す。

【図14】図14は、Lp-PLA2とABIとの組合せを用いた血管リスクの層別化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

発明の詳細な説明

Lp-PLA2は、血栓溶解薬の投与から利益を得るであろう患者を同定するために用いることができる。Lp-PLA2の発現は、心臓イベントを有する患者の頸動脈プラークにおいて、心臓イベントを有さない患者よりも高いことが示されている（Herrmann (2009) Eur Heart J. 30(23):2930-8）。プラークの破裂および血管の血栓のイベントにおいて、高レベルのLp-PLA2が破裂部位から循環中へ放出される場合がある。脳卒中または心筋梗塞を有することが疑われる個体（例えば、脳卒中またはM Iの症状を示す個体）のLp-PLA2レベルを測定することにより、標準的な血栓溶解療法から利益を得るであろう個体、ならびに、積極的血栓溶解薬の投与、薬物の併用、ならびに/または介入的および外科的治療を含む積極的治療を必要とし得る個体を同定することができる。

本発明は、治療のために患者を選択するため、脳血管障害（CVA）のリスクを評価する

10

20

30

40

50

ため、および患者についての機能的転帰を予測するために、Lp-PLA2のレベルを用いる方法に関する。

【0054】

本明細書において用いられる場合、用語「態様」および「側面」は、交換可能に用いられる。

本明細書において用いられる場合、用語「冠血管疾患 (coronary vascular disease)」または「CVD」とは、高血圧、冠動脈心疾患 (CHD)、心筋梗塞、脳卒中、一過性脳虚血発作 (TIA)、脳血管障害 (CVA)、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全を含む、脈管構造の疾患を意味する。冠血管疾患として、心筋梗塞、脳卒中、TIAおよびCVAを含む、原発および続発性の急性イベントが挙げられる。

10

【0055】

「リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A2」、「Lp-PLA2」、「LpPLA2」、「Lp-PLA₂」、「血小板活性化因子 - アセチルヒドラーゼ」、「PAF-AH」および「LDL-PLA2」は、本明細書においておよび文献中で交換可能に用いられ、ネイティブなLp-PLA2およびその対立遺伝子のバリエーションを指し、これは例えば、Tew et al. (1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16:591-599、Tjoelker, et al. (1995) Nature 374(6522):549-53)、Caslake et al. (2000) Atherosclerosis 150(2): 413-9、Genbank RefSeq IDs: NM_005084、NP_005075、NM_001168357およびNP_001161829ならびに Genbank Entrez GeneID: 7941 (PLA2G7) において記載され、これらは本明細書にその全体が参照により組み込まれる。他に示されない限りにおいて、用語「リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A2」、「Lp-PLA2」、「LpPLA2」、「Lp-PLA₂」、「血小板活性化因子 - アセチルヒドラーゼ」、「PAF-AH」および「LDL-PLA2」は、本明細書において用いられる場合、ヒトのタンパク質を指す。

20

【0056】

本明細書において用いられる場合、用語「急性期ケア」とは、患者が、CVD、心筋梗塞および脳卒中などの、短いが重篤な疾患のエピソードのために処置される、短期の間のヘルスケアまたは必要な疾患の処置を指す。急性期ケアは、代表的には、救急部、外来診療医院 (ambulatory care clinic)、または他の短期滞在型施設において与えられる。急性期ケア環境または時間枠とは、半時間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間または6時間以内を意味する。

【0057】

本明細書において用いられる場合、用語「機能的転帰 (functional outcome)」とは、脳卒中などの血管イベントの後で起こる神経機能障害、能力障害およびハンディキャップを合わせた分類系を意味する。脳卒中についての機能的転帰は、広範な能力障害および機能障害、ならびに独立した機能に対する能力障害と機能障害との関係を包含する。代表的には、機能的転帰の指標は、脳卒中などの急性血管イベントの1か月、3か月または6か月後において測定される。本明細書にその全体が参照により組み込まれるStroke. 1998;29:1274-1280を参照。一般には、機能的依存の機能的転帰は、脳卒中などの血管イベントからの転帰不良 (poor outcome) であり、ここで対象は、機能障害、能力障害、ハンディキャップまたは損なわれたクオリティ・オブ・ライフに苦しむ。脳卒中などの血管イベントの後で、対象が機能的依存の機能的転帰を有する可能性は、急性期ケア環境における血管イベントの時点で、外科手術を含む積極的治療により低減することができる。

30

40

【0058】

「高い」とは、正常より高い、予め決定された尺度もしくはサブグループの尺度などの標準より高い、または、別のサブグループの尺度よりも相対的に高い尺度を指す。例えば、高いLp-PLA2とは、正常なLp-PLA2の尺度よりも高いLp-PLA2の尺度を指す。正常なLp-PLA2の尺度は、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。高いLp-PLA2とはまた、予め決定されたカットオフなどの予め決定された尺度と同等であるかまたはそれより高い尺度をも指す。高いLp-PLA2はまた、高Lp-PLA2のサブグループが別のサブグループよりも相対的に高いレベルのLp-PLA2を有する場合の、Lp-PLA2の尺度をも指す。例えば、限定することなく、本明細書に従って、2つの区別し得る患者のサブグループを作

50

成し、数学的に決定された点（限定することなく中央値など）の周囲でサンプルを分割し、尺度が高いサブグループ（すなわち、中央値よりも高い）と尺度が低いサブグループとを作成する。Lp-PLA2は、例えば、限定することなく、PLAC（登録商標）Test、Lp-PLA2の活性アッセイ、免疫組織化学（IHC）アッセイを用いるか、またはLp-PLA2の質量およびLp-PLA2の活性を含む、Lp-PLA2を検出するための任意の標準的な方法を用いるなどの、当業者に公知の任意の方法により測定することができる。一部の案件において、「高い」発現レベルは、非常に高い発現の範囲、および「中程度に高い」発現の範囲を含み、ここで、中程度に高いとは、通常よりも高いが、「非常に高い」よりも低い発現のレベルである。高い（非常に高いおよび中程度に高いを含む）Lp-PLA2発現についての例の範囲は、本明細書において引用される文献、PLAC Test製品仕様書において、本願において提供され、 $> 200 \text{ ng/mL}$ 、 $> 201 \text{ ng/mL}$ 、 $> 201.5 \text{ ng/mL}$ 、 $> 210 \text{ ng/mL}$ 、 $> 220 \text{ ng/mL}$ 、 $> 230 \text{ ng/mL}$ 、 $> 240 \text{ ng/mL}$ 、 $> 250 \text{ ng/mL}$ 、 $> 260 \text{ ng/mL}$ 、 $> 270 \text{ ng/mL}$ 、 $> 280 \text{ ng/mL}$ 、 $> 290 \text{ ng/mL}$ 、 $> 300 \text{ ng/mL}$ 、 $> 100 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 110 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 120 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 130 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 140 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 150 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 160 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 170 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 180 \text{ ng/mL/分}$ 、 $> 190 \text{ ng/mL/分}$ 、および $> 200 \text{ ng/mL/分}$ を含む。

【0059】

「可能性がある（likely to）」（および「可能性が低い（unlikely to）」）とは、本明細書において用いられる場合、ある項目、物体、物または人が生じる確率が高いこと（または低いこと）を指す。したがって、一例において、血栓溶解剤による処置から利益を受ける可能性がある対象は、参照対象または対象の群と比較して、血栓溶解剤による処置から利益を受ける高い確率を有する。

【0060】

「長い」とは、本明細書において用いられる場合、通常より長い、予め決定された尺度または別のサブグループの尺度よりも相対的に長いサブグループの尺度などの標準より長い、時間の尺度を指す。例えば、患者の寿命延長に関して、長い時間進行とは、通常的时间進行よりも長い時間進行を指す。時間進行が長いかな否かは、当業者に利用可能な任意の方法により決定することができる。一態様において、「長い」とは、疾患において重要なイベントが起こるために必要とされる時間経過の中央値よりも長い時間を指す。

【0061】

「低い」とは、正常よりも低い、予め決定された尺度または別のサブグループの尺度よりも相対的に低いサブグループの尺度などの標準よりも低い尺度を指す。例えば、低いLp-PLA2とは、患者の試料の特定のセットにおいて、正常なLp-PLA2の尺度よりも低いLp-PLA2の尺度を意味する。正常なLp-PLA2の尺度は、当業者に利用可能な任意の方法により決定することができる。低いLp-PLA2はまた、予め決定されたカットオフなどの、予め決定された尺度よりも低い尺度を意味する。低いLp-PLA2はまた、低いLp-PLA2のサブグループが、別のサブグループよりも相対的に低い尺度を意味する。例えば、限定することなく、本明細書に従って、数学的に決定された点（限定することなく、中央値など）の周囲でサンプルを分割することにより、2つの区別し得る患者のサブグループを作成し、尺度が高い（すなわち、中央値よりも高い）別の群に対して尺度が低い（すなわち、中央値よりも低い）群を作成することができる。Lp-PLA2は、例えば、限定することなく、PLAC（登録商標）Test、Lp-PLA2の活性アッセイ、免疫組織化学（IHC）アッセイを用いるか、またはLp-PLA2の質量およびLp-PLA2の活性を含む、Lp-PLA2を検出するための任意の標準的な方法を用いるなどの、当業者に公知の任意の方法により測定することができる。低いLp-PLA2発現についての例の範囲は、本明細書において引用される文献、PLAC Test製品仕様書において、本願において提供され、 $\leq 200 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 201 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 201.5 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 210 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 220 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 230 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 240 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 250 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 260 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 270 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 280 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 290 \text{ ng/mL}$ 、 $\leq 300 \text{ ng/mL}$ 、 $< 100 \text{ ng/mL/分}$ 、 $<$

110 ng / mL / 分、< 120 ng / mL / 分、< 130 ng / mL / 分、< 140 ng / mL / 分、< 150 ng / mL / 分、< 160 ng / mL / 分、< 170 ng / mL / 分、< 180 ng / mL / 分、< 190 ng / mL / 分、および< 200 ng / mL / 分を含む。

【0062】

「全生存」または「OS」とは、処置の開始から死または打ち切りまでに測定された時間を指す。打ち切りは、研究の終了または処置の変更から発生し得る。全生存とは、例えば、 Kaplan-Meierプロットにおいて表わされる、処置の開始と死または打ち切りとの間に存在する特定の時間において生存している確率として、言及することができる。

【0063】

10

「予め決定されたカットオフ」とは、本明細書において用いられる場合、特定の性状を示す対象について、2または3以上の分類の性状の間を最もよく区別する、予め決定された尺度の値を指す。例えば、全生存を決定するために、高いLp-PLA2発現および低いLp-PLA2発現などの2つの分類の間を区別することを可能にする、予め決定されたカットオフを用いてもよい。予め決定されたカットオフは、予測モデルを最適化するために、予め決定されたカットオフよりも低いまたは高い値を有する対象を分離するために用いてもよい。

【0064】

処置に対する「応答」、およびこの動詞の他の形態は、本明細書において用いられる場合、ある剤による処置に対する対象の反応を指す。例として、当該対象が、処置を投与されない場合に予測された平均余命を5%、10%、20%、30%、40%、50%またはそれより長く延長した平均余命を経験する場合に、対象はある剤による処置に応答する。別の例において、当該対象が全生存または延長された無増悪期間を有する場合に、対象はある剤による処置に応答する。患者が処置に応答するか否かを決定するために、幾つかの方法を用いることができる。

20

【0065】

「試料」または「組織試料」または「患者試料」または「患者の細胞または組織の試料」または「標本」は、各々、対象または患者から得られた類似の細胞の集合物を指す。組織試料のソースは、新鮮な組織、凍結および/または保存された臓器もしくは組織、または生検もしくは吸引液からのもののような固形組織；血液もしくは任意の血液成分、脳脊髄液、羊水、腹水または間質液などの体液、または対象の妊娠期間もしくは発達の任意の時点からの細胞であり得る。組織試料は、保存剤、抗凝固剤、緩衝化剤、固定剤、栄養剤、抗生物質などの、自然界においては天然では組織と混合されない化合物を含んでもよい。細胞は、FFPE法におけるものなどの、従来の方法において固定することができる。

30

【0066】

「短い」とは、本明細書において用いられる場合、正常よりも短い、予め決定された尺度または別のサブグループの尺度よりも相対的に短いサブグループの尺度などの標準よりも短い時間の尺度を指す。例えば、患者の寿命延長に関して、短い時間の進行とは、正常な時間の進行よりも短い、または予測されるよりも短い時間の進行を指す。時間の進行が短いか否かは、当業者に利用可能な任意の方法により決定することができる。一態様において、「短い」とは、疾患において重要なイベントが起こるために必要とされる時間経過の中間値よりも短い時間を指す。

40

【0067】

「重要なイベント」とは、本明細書において用いられる場合、当業者により重要であると決定された、患者の疾患におけるあるイベントを指し得る。重要なイベントの例として、例えば、限定することなく、一時診断、心筋梗塞、脳卒中、TIA、CVA、死、再発 (recurrence)、患者の疾患が転移性であるという決定、患者の疾患の再発 (relapse) または、上記の段階のいずれか1つから別の段階への患者の疾患の進行が挙げられる。重要なイベントは、当業者により決定される、OS、TTPおよび/または他の応答基準を評価するために用いられる、任意の重要なイベントであってよい。

【0068】

50

本明細書において用いられる場合、用語「対象」および「患者」は、交換可能に用いられる。本明細書において用いられる場合、用語「対象」は、動物、好ましくは、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ラクダ、ネコ、イヌ、モルモット、ラット、マウスまたはヒツジ）および霊長類（例えば、カニクイザル、ゴリラ、チンパンジーなどのサルまたはヒト）を含む哺乳動物を指す。

【0069】

本明細書において用いられる場合、「時間経過」とは、最初のイベントと続くイベントとの間の時間の量を指し得る。例えば、患者の癌に関して、時間経過は、患者の疾患に関し得、当該疾患の経過における重要なイベントを計測することにより測定することができ、ここで、例えば、最初のイベントは、診断であり得、続くイベントは、重要なイベントであり得る。

10

【0070】

「無増悪期間（time to progression）」または「TTP」とは、処置の開始から進行または重要なイベントまたは打ち切りまでに測定される時間を指す。打ち切りは、研究の終了から、または処置の変更から発生し得る。無増悪期間はまた、例えば、無増悪期間が特定の時間にわたって進行がない状態である確率を表わす Kaplan-Meier プロットにおいて、確率として表わすことができ、その時間は、処置の開始と進行または打ち切りとの間の時間である。

【0071】

「処置」、および「治療」を含むこの語の他の形態は、CVDの進行などの疾患を妨害するため、CVDについてのリスクの軽減を引き起こすため、対象の期待される生存期間および/またはCVDの進行までの時間を延長するためなどの薬剤の投与を指す。処置はまた、当業者、例えば処置をする医師が、適切であるとみなす任意の経過をも指し得る。

20

「化学療法剤」とは、状態、特に心血管疾患を処置するために用いられる化学物質を意味する。

【0072】

本明細書において用いられる場合、用語「代謝障害」は、対象における異常な代謝（すなわち、生命維持のプロセスおよび活性のためにエネルギーを供給する生細胞における化学変化）により引き起こされる化合物またはこれに特徴づけられる障害、疾患または状態を含む。代謝障害は、高血糖または異常な脂肪細胞（例えば褐色または白色脂肪細胞）の表現型または機能と関連する疾患、障害または状態を含む。代謝障害は、細胞の増殖、成長、分化または遊走、恒常性の細胞性調節、細胞間または細胞内のコミュニケーションなどの細胞機能；肝機能、腎機能、または脂肪細胞の機能などの組織機能；ホルモン性応答（例えばインシュリン応答）などの生体内の全身性応答に有害に作用し得る。代謝障害の例として、肥満、糖尿病、過食症、内分泌異常、トリグリセリド貯蔵疾患（triglyceride storage disease）、バルデ・ビードル症候群、ローレンス・ムーン症候群、ブラダー・ラブハート・ウィリー症候群、食欲不振および悪液質が挙げられる。肥満は、 30 kg/m^2 またはそれより高い肥満度指数（BMI）として定義される（国立保健研究所、成人における体重過多および肥満の同定、評価および処置に関する臨床的ガイドライン（1998））。しかし、本発明はまた、 25 kg/m^2 またはそれより高い、 26 kg/m^2 またはそれより高い、 27 kg/m^2 またはそれより高い、 28 kg/m^2 またはそれより高い、 29 kg/m^2 またはそれより高い、 29.5 kg/m^2 またはそれより高い、または 29.9 kg/m^2 またはそれより高い肥満度指数（BMI）により特徴づけられる疾患、傷害または状態をも包含することを意図される。これらの指数の全ては、典型的に体重過多として言及される（国立保健研究所、成人における体重過多および肥満の同定、評価および処置に関する臨床的ガイドライン（1998））。

30

40

【0073】

本明細書において用いられる場合、「～以上」（すなわち、または \geq ）は、特定の代替的な態様において、「～より高い」（ $>$ ）を意味することができる。また、本明細書において用いられる場合、「～以下」（すなわち、または \leq ）は、特定の代替的な態

50

様において、「～より低い」(<)を意味することができる。

【0074】

冠血管障害のリスクを軽減するための剤として、Lp-PLA2阻害剤(Leach 2001)、抗炎症剤、抗血栓剤、抗血小板剤、線維素溶解剤、脂質低下剤、ナイアシン、直接的なトロンビン阻害剤、および糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害剤、および細胞接着分子に結合して白血球がかかる分子に結合する能力を阻害する剤(例えば、抗細胞接着分子抗体)からなる群より選択されるものが挙げられる。

【0075】

抗炎症剤として、アルクロフェナク；ジプロピオン酸アルクロメタゾン；アルゲストンアセトニド；アルファアミラーゼ；アムシナファル(Amcinafal)；アムシナフィド(Amcinafide)；アンフェナクナトリウム；塩酸アミプリロズ(Amiprilose Hydrochloride)；アナキンラ；アニロラック；アニオトラザフェン；アバゾン；バルサラジド2ナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；塩酸ベンジダミン；プロメライン；プロペラモール；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン；シントゾン；クリプロフェン；クロベタゾールプロピオネート；クロベタゾンブチレート；クロピラック；クロチカゾンプロピオネート；コルメタゾンアセテート；コルトドキソン；デフラザコート；デソニド；デソキシメタゾン；デキサメタゾンジプロピオネート；ジクロフェナクカリウム；ジクロフェナクナトリウム；ジフロラソンジアセテート；ジフルミドンナトリウム；ジフルニザール；ジフブレドネート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド；エンドリソン；エンリモマブ；エノリカムナトリウム；エビリゾール；エトドラック；エトフェナメート；フェルピナク；フェナモール；フェンブフェン；フェンクロフェナック；フェンクロラック；フェンドサール；フェンピパロン；フェンチアザック；フラザロン；フルアザコート；フルフェナミン酸；フルミゾール；フルニソリドアセテート；フルニキシン；フルニキシメグルミン；フルオコルチンブチル；フルオロメトロンアセテート；フルクアゾン；フルルビプロフェン；フルレトフェン；フルチカゾンプロピオネート；フラプロフェン；フロブフェン；ハルシノニド；ハロベタゾールプロピオネート；ハロブレドンアセテート；イブフェナク；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール；イントラゾール；イソフルブレドンアセテート；イソキセパック；イソキシカム；ケトプロフェン；塩酸ロフェミゾール；ロルノキシカム；ロテブレドノールエタボネート；メクロフェナメートナトリウム；メクロフェナム酸；メクロリゾンジブチレート；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；メチルブレドニソロンスルエブタネート；モルニフルメート；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシシン；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；塩酸パラニリン；ペンドサンボリスルフェートナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセレート；ビルフェニドン；ピロキシカム；ピロキシカムシンナメート；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；ブレドナゼート；プリフェロン；プロドール酸；プロケアゾン；プロキサゾール；プロキサゾールシトレート；リメキシロン；ロマザリト；サルコレックス；サルナセジン；サルサレート；サリチレート(Salicylates)；サンギナリウムクロリド；セクラゾン；セルメタシン；スドキシカム；スリンダック；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルメート；タロサレート；テブフェロン；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テトリダミン；チオピナック；チキソコルトールピバレート；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロニド；トリフルミデート；ジドメタシン；糖質コルチコイド；ゾメピラクナトリウムが挙げられる。

【0076】

抗血栓剤および/または線維素溶解剤として、プラスミノゲン(プレカリクレイン、キニノーゲン、第XII因子、第XIIIa因子、プラスミノゲンプロアクチベーター、および組織プラスミノゲンアクチベーター[TPA]の相互作用を介して血漿へ)ストレプトキナーゼ；ウロキナーゼ；アニソイル化プラスミノゲン-ストレプトキナーゼアクチベーター

ター複合体；プロウロキナーゼ（Pro-UK）；rTPA（アルテプラーゼまたはアクチバーゼ；rは組み換えを表わす）；rPro-UK；アボキナーゼ（Abbokinase）；エミナーゼ（Eminase）；塩酸アナグレリドストレプターゼ；ビバリルジン；ダルテパリンナトリウム；ダナバロイドナトリウム；塩酸ダゾキシベン（Dazoxiben Hydrochloride）；硫酸エフェガトラン（Efegatran Sulfate）；エノキサパリンナトリウム；イフェトロバン（Ifetroban）；イフェトロバンナトリウム；チンザパリンナトリウム；レタプラーゼ（retaplastase）；トリフェナグレレル（Trifenagrel）；ワルファリン；デキストラン類が挙げられる。

【0077】

抗血小板剤として、クロピドグレル；スルフィンピラゾン；アスピリン；ジピリダモール；クロフィブラート；ピリジノールカルバメート；PGE；グルカゴン；抗セロトニン薬；カフェイン；テオフィリン；ペントキシフィリン；チクロピジン；アナグレライドが挙げられる。脂質低下剤として、ゲムフィブロジル、コレステラミン、コレステボール、ニコチン酸、プロブコール、ロバスタチン、フルバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、シリバスタチン（cirivastatin）（スタチン類については、Crough 2000を参照）が挙げられる。直接的なトロンビン阻害剤として、ヒルジン、ヒルゲン、ヒルログ、アルガトロバン、PPACK、トロンビンアプタマーが挙げられる。糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害剤は、抗体または非抗体の両方であり、限定されないが、ReoPro（abcixamab）、ラミフィパン（lamifiban）、チロフィパンが挙げられる。一つの好ましい剤は、アスピリンである。

【0078】

CRPなどの全身性炎症のマーカーは、当業者に周知である。全身性炎症のマーカーは、C反応性タンパク質、サイトカインおよび細胞接着分子からなる群より選択されることが好ましい。サイトカインは、当業者に周知であり、ヒトインターロイキン1～17を含む。細胞接着分子は、当業者に周知であり、インテグリン、ICAM-1、ICAM-3、BL-CAM、LFA-2、VCAM-1、NCAMおよびPECAMを含む。好ましい接着分子は、可溶性細胞間接着分子（sICAM-1）である。

【0079】

本発明のマーカーのレベルは、多様なよく認識された方法により得ることができる。代表的には、レベルは、体液、例えば、血液、リンパ液、唾液、尿などにおけるマーカーのレベルを測定することにより決定する。好ましい体液は、血液である。レベルは、ELISA、または免疫アッセイまたはマーカーの存在を検出するための他の従来技術により決定することができる。従来技術の方法は、患者の体液の試料を測定のために商業的な研究所に送ることを含む。Lp-PLA2の測定のために、酵素アッセイもまた用いることができる。米国特許第5,981,252号または同第5,880,273号を参照。これらの内容は、本明細書により対象の出願中へ参照により組み込まれる。

【0080】

本発明はまた、個体についてのマーカーのレベルを予め決定された値と比較することを含む。予め決定された値は、多様な形態をとることができる。それは、中央値または平均値などの単一のカットオフ値であってもよい。それは、一既定群におけるリスクが別の既定群におけるリスクの2倍である場合などの、比較群に基づいて確立してもよい。それは、範囲であってもよく、この場合、例えば、試験される集団が、平等に（または不平等に）群、例えば、三分位（低リスク群、中リスク群および高リスク群など）へ、または四分位（最も低い四分位点は最も低いリスクを有する個体であり、最も高い四分位点は最も高いリスクを有する個体である）へ、分割される。

【0081】

好ましい態様において、本発明は、新規のキットまたはアッセイを提供する。これは、本発明に基づいて選択された予め決定された値に特異的であり、およびこれに対して適切な感度を有する。好ましいキットは、したがって、例えば、異なるカットオフ、特定のカットオフにおける異なる感度、ならびにアッセイの結果に基づいてリスクを特徴づけるための説明または他の印刷物を含むことにより、現在市販されているものとは異なる。

【0082】

上記のとおり、本発明は、将来的な心血管障害のリスクを軽減するための剤による処置から個体が利益を受ける可能性を評価するための方法を提供する。この方法は、患者の処置のために、および新規治療薬の臨床的開発のためにも重要な意味を有する。医師は、患者に対する期待される正味の利益に基づいて、患者の処置のための治療レジメンを選択する。正味の利益は、リスクと利益の比から導かれる。本発明は、介入により利益を受ける可能性がより高い個体の選択を可能にし、それにより、医師が治療レジメンを選択することを補助する。このことは、期待される利益の可能性が増大する、より高いリスクプロファイルを有する薬物を用いることを含む。同様に、臨床研究者は、臨床試験のために、正味の利益を得る可能性が高い集団を選択することを所望する。本発明は、臨床研究者がか

10

【0083】

有効量は、医学的に所望される結果を提供するために十分な治療剤の投与量である。有効量は、治療される特定の状態、処置されている対象の年齢および身体的状態、状態の重篤度、処置の期間、併用治療（もしあれば）の性質、具体的な投与の経路などの、保健実施者の知識および専門知識内の要因により異なるであろう。例えば、有効量は、個体が異常に高い全身性炎症マーカーのレベルを有する程度に依存し得る。本発明の抗炎症剤が、心血管障害を予防するために用いられること、すなわち、これらは心血管障害を発症するリスクがある対象において予防的に用いられることが理解されるべきである。したがって、有効量は、心血管障害のリスクを低下させる、心血管障害を発症を遅延させるかまたは恐らくはこれを完全に予防する量である。剤が、細胞接着分子に結合するものであり、白血球がかかる分子に結合する能力を阻害するものである場合、当該剤を予防的に用いることができるか、または急性の状況、例えば心筋梗塞後もしくは血管形成術後において用いることができる。剤が急性の状況において用いられる場合、それは、かかる有害イベントから典型的に生じ得る、1または2以上の医学的に望ましくない結果を予防するために用いられることが認識されるべきである。心筋梗塞の場合、剤は、心筋梗塞の結果として発生し得る心血管組織に対する傷害を限定するために用いることができ、再狭窄の場合、剤は、封鎖の再発を阻害、防止または遅延させるために有効な量において用いることができる。いずれの場合においても、それは、白血球の浸潤、および白血球を損傷を受けた組織中への遊出を阻害するために十分な量である（これらの白血球は、傷害に関するさらなる損傷および/または合併症をもたらし得る）。

20

30

【0084】

一般に、活性化合物の用量は、1日当たり約0.01mg/kg～1000mg/kgである。好ましくは経口で、1日当たり1～数回の投与において、50～500mg/kgの範囲の用量が好適であることが期待される。静脈内投与などの他の投与の形態から、より低い用量がもたらされるであろう。適用された最初の用量において、対象における応答が不十分である場合、より高い用量（または異なる、より局所的な送達経路により、有効により高い用量）を、患者の耐容性が許容する程度まで用いてもよい。適切な化合物の全身性レベルを達成するために、1日当たり複数の用量が企図される。

40

【0085】

投与される場合、本発明の医薬製剤は、薬学的に受容可能な量で、薬学的に受容可能な組成物にて適用される。かかる製剤は、慣用的に、塩、緩衝化剤、保存剤、適合性キャリア、および任意に他の治療剤を含み得る。医薬において用いられる場合、塩は、薬学的に受容可能なものであるべきであるが、薬学的に受容可能でない塩を便宜上用いてその薬学的に受容可能な塩を調製してもよく、これらは本発明の範囲から除外されない。かかる薬理学的におよび薬学的に受容可能な塩として、限定されないが、以下の酸から調製されるものが挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、コハク酸、マロン酸、ギ酸、クエン酸、サリチル酸、酢酸、マレイン酸など。また、薬学的に受容可能な塩は、ナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類塩として、

50

調製することができる。

【0086】

抗炎症剤、抗Lp-PLA2剤、またはスタチン類は、任意に、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせてもよい。用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、本明細書において用いられる場合、1または2以上の適合性の固体または液体の充填剤、希釈剤または封入物質であって、ヒトへの投与に好適なものを意味する。用語「キャリア」は、投与を容易にするためにそれと活性成分を組み合わせる、有機または無機の成分であって、天然または合成のものを表わす。医薬組成物の成分はまた、本発明の分子と、および互いに、所望の薬学的効力を実質的に損なうような相互作用が存在しないような様式において、混合されることができる。

10

【0087】

医薬組成物はまた、塩中の酢酸；塩中のクエン酸；塩中のホウ酸；および塩中のリン酸を含む、好適な緩衝化剤を含んでもよい。医薬組成物はまた、任意に、塩化ベンザルコニウム；クロロブタノール；パラベン類；およびチメロサルなどの好適な保存剤を含んでもよい。

【0088】

非経口投与に好適な組成物は、無菌の水性の抗炎症剤の製剤を便宜上含んでもよく、これは好ましくはレシipientの血液と等張である。この水性製剤は、好適な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて、公知の方法に従って処方され得る。無菌の注射可能な製剤はまた、非毒性の非経口投与により受容可能な希釈剤または溶媒中で、例えば、1, 3-ブタノールジオール中の溶液としての、無菌の注射可能な溶液または懸濁液であってよい。使用することができる注射可能なビヒクルおよび溶媒の中では、水、リンガー溶液、および等張の塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の硬化油が、溶媒または懸濁媒として便利に用いられる。この目的のために、合成のモノ-またはジ-グリセリドを含む、任意の無刺激性の硬化油を用いることができる。さらに、注射可能物の調製において、オレイン酸などの脂肪酸を用いてもよい。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に好適なキャリア製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) において見出すことができる。

20

【0089】

多様な投与経路が利用可能である。選択される特定の形態は、無論、選択される特定の薬物、処置される状態の重篤度、および治療の効力のために必要とされる投与量に依存するであろう。本発明の方法は、一般的に言及すると、医学的に受容可能である任意の投与の形態、すなわち、臨床において受容可能でない効果を引き起こすことなく活性化化合物の有効なレベルをもたらす任意の形態を用いて実施することができる。かかる投与の形態として、経口、直腸、局所、鼻内、皮内 (interdermal)、または非経口経路が挙げられる。用語「非経口」は、皮下、静脈内、筋肉内、または注入を含む。静脈内または筋肉内経路は、長期の治療および予防には特に好適ではない。それらは、しかし、緊急の状況において好ましい。経口投与は、患者に対する利便性ならびに投与スケジュールのために、予防的処置のために好ましい。

30

【0090】

医薬組成物は、便宜上、単位投与形態において提示することができ、製薬分野において周知の方法のいずれを用いて調製してもよい。全ての方法は、抗炎症剤を、1または2以上の副成分を構成するキャリアと組み合わせる工程を含む。一般に、組成物は、抗炎症剤を、液体のキャリア、粉碎された固体のキャリアまたは両方と均質にかつ緊密に組み合わせ、その後、必要であれば、生成物を成型することにより、調製される。

40

【0091】

経口投与に好適な組成物は、各々が予め決定された量の抗炎症剤を含有するカプセル、錠剤、ロゼンジなどの別々の単位として提示することができる。

【0092】

他の送達系は、時間放出、遅延放出または持続放出送達系を含み得る。かかる系により

50

、抗炎症剤の投与の繰り返しを回避することができ、対象および医師にとっての利便性を増大する。多くの型の放出送達系が利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリ(ラクチド-グリコシド)、コポリシュウ酸(copolyoxalate)、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ酸無水物などのポリマーベースの系を含み、薬物を含む前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば米国特許第5,075,109号において記載される。送達系はまた、非ポリマー系を含み、これは：コレステロール、コレステロールエステルおよび脂肪酸などの脂質含有ステロール、または、モノ-、ジ-およびトリ-グリセリドなどの中性脂肪；ハイドロゲル放出系；ペプチドベースの系；ロウコーティング；従来の結合剤および賦形剤を用いる圧縮錠剤；部分的に融合したインプラントなどである。具体例として、限定されないが：(a) 米国特許第4,452,775号、4,667,014号、4,748,034号および同第5,239,660号において記載されるもののような、抗炎症剤がマトリックス内の形態において含有される腐食系、ならびに(b) 米国特許第3,832,253号および同第3,854,480号において記載されるもののような、活性成分が制御された速度においてポリマーから浸透する拡散系が挙げられる。さらに、ポンプベースのハードウェア送達系を用いてもよく、その一部は、移植に適合している。

10

20

30

40

50

【0093】

長期持続放出インプラントの使用は、慢性状態の処置に特に好適であり得る。長期放出は、本明細書において用いられ、インプラントが治療レベルの活性成分を少なくとも30日間、および好ましくは60日間にわたって送達するために構築および配置されることを意味する。長期持続送達インプラントは、当業者に周知であり、上記の放出系の一部を含む。

【0094】

本発明の一側面は、試料中の個体のLp-PLA2活性を決定するために上記の方法を利用して血管疾患を検出するための方法を含み、ここで、前記試料中のLp-PLA2の活性の増大は、血管疾患の指標である。好ましい態様において、血管疾患は、冠血管疾患(CVD)、冠動脈心疾患(CHD)、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、高血圧、脳卒中、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される。

【0095】

本発明の別の側面は、個体のために血管疾患を処置するための治療を選択するための方法を含み、該方法は、試料中の個体のLp-PLA2活性を決定するために上記の方法を利用することを含み、ここで、前記試料中のLp-PLA2の質量の増加は、血管疾患を処置するための治療から利益を受けるであろう個体の指標である。特に、低レベルのLp-PLA2は、血栓溶解療法から利益を受ける可能性がある対象を示し、一方、高レベルのLp-PLA2は、積極的血栓溶解療法、薬物の組み合わせ、ならびに/または介入的および外科的アプローチから利益を受ける可能性がある対象を示す。好ましい態様において、血管疾患は、冠血管疾患(CVD)、冠動脈心疾患(CHD)、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、高血圧、脳卒中、続発性脳卒中、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される。別の好ましい態様において、治療は、血栓溶解薬、ナイアシン、スタチン類およびLp-PLA2阻害剤からなる群より選択される。

【0096】

本発明のさらなる側面は、血管疾患を処置するための治療に対する個体の応答をモニタリングするための方法を含み、該方法は、試料中の個体のLp-PLA2活性を決定するために上記の方法を利用することを含み、ここで、該試料中のLp-PLA2の活性の低下は、血管疾患を処置するための治療に対して有利に応答する個体の指標である。好ましい態様において、血管疾患は、冠血管疾患(CVD)、冠動脈心疾患(CHD)、末梢血管疾患、末梢動脈疾患、高血圧、脳卒中、続発性脳卒中、先天性の心血管の欠陥および鬱血性心不全からなる群より選択される。別の好ましい態様において、治療は、血栓溶解薬、ナイアシン、スタチン類およびLp-PLA2阻害剤からなる群より選択される。

【0097】

本明細書において他に定義されない限り、本発明に関して用いられる医学、科学および技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有する。さらに、文脈により他に必要とされない限り、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含む。一般に、本明細書において記載される細胞および組織の培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリダイゼーションに関して用いられる命名法およびその技術は、当該分野において周知であり一般に用いられるものである。本発明の方法および技術は、他に示されない限り、一般に、当該分野において周知の従来の方法に従って、および本明細書を通して引用され議論される多様な一般的およびより特定の参考文献において記載されるように行われる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) およびSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Press (2001) ; Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates (1992, and Supplements to 2000) ; Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology - 第4版、Wiley & Sons (1999) ; HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990) ; ならびにHarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999) を参照。

10

【0098】

Lp-PLA2レベルを測定する方法は、当該分野において公知である。例えば、抗Lp-PLA2抗体を固体支持体に結合させ、割り当てられた量の標識されたLp-PLA2と目的の試料とを前記の固体支持体と共にインキュベートする競合アッセイを用いてもよい。固体支持体に結合した標識Lp-PLA2の量は、試料中のLp-PLA2の量と相関し得る。これらのアッセイおよびバリエーションは、したがって、本発明のさらなる態様を含む。

20

【0099】

本明細書において記載される方法は、さらに、Lp-PLA2の発現レベルの増大または低下に関連する疾患または障害を有するかまたはこれを発症するリスクがある対象を同定するための診断アッセイとして利用することができる。正常なヒト対照と比較してより高い（またはより低い）Lp-PLA2レベルの存在は、CVDを発症するリスクがあるヒト患者についての診断である。本発明のLp-PLA2の発現または活性を増大（または低下）させるための治療剤の有効性はまた、臨床試験、またはヒト細胞におけるものなどのin vitroスクリーニングアッセイにおいて、ヒト患者におけるLp-PLA2の発現のレベルを分析することによりモニタリングすることができる。このようにして、遺伝子発現パターンを、場合によっては、試験される剤に対するヒト患者または細胞の生理学的応答のマーカー、指標として、役立てることができる。

30

【0100】

本明細書において記載される方法は、さらに、急性期ケア環境または時間枠において利用することができる。

上記の試験は、患者から得られた多様な細胞、体液、および/またはホモジェネートもしくは可溶化した組織などの組織抽出物に由来する試料に対して行うことができる。組織抽出物は、組織生検および剖検材料から慣用的に得られる。本発明において有用な体液として、血液、尿、唾液または任意の他の生体分泌物もしくはその派生物が挙げられる。本明細書において用いられる場合、「血液」とは、全血、血漿、血清、循環上皮細胞、血液の構成成分または任意の派生物を含む。

40

【0101】

体液における検出に加えて、Lp-PLA2のタンパク質および核酸が、細胞捕獲技術による検出に好適である。ホールセルは、多様な方法、例えば磁気による分離、米国特許第5,200,084号；同第5,186,827号；同第5,108,933号；同第4,925,788号（これらの開示はその全体が本明細書に参照により組み込まれる）により捕獲することができる。上皮細胞は、Dynabeads（登録商標）またはCELLlection（商標）（Dynal Biotech, Oslo, Norway）など

50

の製品を用いて捕獲することができる。あるいは、上皮細胞を含む血液の画分、例えばバフィーコート画分（5 ml の血液から 50 mm の細胞を単離する）を捕獲してもよい。細胞はまた、WO 00/47998（その開示はその全体において本明細書において参考として組み込まれる）において記載される技術を用いて捕獲してもよい。一旦細胞を捕獲して濃縮したら、タンパク質または核酸を、本出願において記載される手段により検出する。あるいは、核酸を血液試料から直接捕獲してもよい。米国特許第号 6,156,504 号、同第 5,501,963 号；または WO 01/42504 を参照。これらの開示はその全体において本明細書において参考として組み込まれる。

【0102】

例

10

本発明は、以下の非限定的な例を参照することによってより良く理解することができる。

例 1：序論および研究対象集団

利用可能な貯蔵試料からの表現型がよく理解されている脳卒中コホートにおいて Lp-PLA2 レベルを評価した。血液バイオマーカーの研究について予後診断の研究を許可するインフォームド・コンセントを患者から受けた。

脳卒中の後の Lp-PLA2 の時間的プロファイルを評価するために、および急性期環境における Lp-PLA2 の予後診断的価値を試験するために、脳卒中の「急性期」において、Lp-PLA2 レベルを評価した。

20

【0103】

また、二次性脳卒中（または任意の血管イベント）を Lp-PLA2 の有用性を評価するために、一過性脳虚血発作（TIA）の後の二次性脳卒中を予測するために、および特定の脳卒中のサブタイプ（すなわち、頭蓋内の狭窄に起因するアテローム硬化性脳卒中）の間で二次性脳卒中を予測するために、脳卒中の「亜急性期」において Lp-PLA2 レベルを評価した。

【0104】

急性期研究

急性期研究のために評価されたコホートは、(i) 4 つの時点において血液を採取した 20 人の患者（80 試料）（脳卒中後の Lp-PLA2 の時間的プロファイルを評価するため）、および (ii) 脳卒中を有した 3 時間以内に血液を採取した 100 人の患者（急性期環境において Lp-PLA2 の予後診断的価値を試験するため）であった。この研究のための類似のプロトコルは、Montaner J らにより先に記載されており（Stroke. 2006;37(5):1205-10）、その開示は、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。

30

【0105】

亜急性期研究

亜急性期研究のために評価されたコホートは、(i) 脳卒中後に再発イベントを有した 77 人の患者および脳卒中後に再発イベントを有しなかった 77 人の患者（二次性脳卒中を予測するため）、(ii) TIA を有した 135 人の患者（TIA 後の二次性脳卒中を予測するため）、および (iii) サブタイプにより特徴づけられている脳卒中を有した 135 人の患者（特定の脳卒中サブタイプの間の二次性脳卒中を予測するため）であった。この研究のための類似のプロトコルは、それぞれ、Castillo J ら（J Neurol. 2009 Feb;256(2):217-24）、Purroy F ら（Acta Neurol Scand. 2007;115(1):60-6）、および Arenillas J F ら（Stroke. 2003;34(10):2463-8）により先に記載されており、その開示は、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。

40

【0106】

Lp-PLA2 の測定

Lp-PLA2 の質量は、PLAC（登録商標）Test（diaDexus, Inc.）を用いてアッセイし、Lp-PLA2 の活性は、比色活性法（diaDexus, Inc.）を用いてアッセイした。

【0107】

例 2：脳卒中後の Lp-PLA2 の時間的プロファイル（急性期）

50

研究プロトコルおよび結果

末梢血試料を、基線（脳卒中の発症から 3 時間未満）において、およびその後連続的に採取した。具体的には、一連の 19 人の患者において、急性期の間（基線）、1 時間後（t-PA 処置の終了までに）、t-PA の 2 時間後、ならびに脳卒中の発症の 12 および 24 時間後に、血液試料を採取した。図 1 A および 1 B は、Lp-PLA2 の活性レベルが、基線において、より後の時点と比較して低かったこと、および Lp-PLA2 の質量レベルが、基線において、より後の時点と比較して高かったことを示す。

【0108】

また、15 人の患者において、基線、1 時間後（t-PA 注入の終了までに）、脳卒中の発症の 24 時間後において、退院までに、および 3 か月目の来院時において血液試料を得た。図 2 A および 2 B は、Lp-PLA2 の質量が基線の 1 時間後と退院時との間で有意に低かったことを示す。しかし、基線と退院との間、または基線と 3 か月の時点との間で、有意差は存在しなかった。

【0109】

最後に、両方の群における基線、1 時間および 24 時間からの結果をプールし（各時点において $n = 35$ ）、プールされた対照群（ $n = 135$ ）と比較した。図 3 A は、Lp-PLA2 のレベルが、基線において、脳卒中を有する対象において、より後の時点および対照と比較して、有意に低かったことを示す。図 3 B もまた、Lp-PLA2 の質量が、脳卒中を有する対象において、基線およびより後の時点において、対象と比較して有意に高かったことを示す。

【0110】

例 3：急性期環境における Lp-PLA2 の予後診断的価値

研究プロトコル

本発明者らの研究プロトコルは、確認された動脈閉塞を有し、症状の発症の初めの 3 時間以内に血栓溶解剤の処置を受けた、100 人の治療継続中の脳卒中患者を含んだ。この研究の目的のために、中大脳動脈（MCA）閉塞を有する 92 人の患者のみを分析した。

【0111】

血管リスク因子の詳細な病歴を各患者から得、大脳梗塞の潜在的な病因を同定するために、全ての患者を、心電図、胸部 X 線、頸動脈超音波検査、全血球計算および生化学を含む 1 セットの診断試験に供した。

【0112】

入院時、および症状の発症から 12、24 および 48 時間において、国立保健研究所脳卒中スケール（NIHSS）スコアにより臨床的試験を行った。神経学的悪化を、基線と追跡期間を通しての任意の他の時点との間の NIHSS スコアにおける 4 またはそれより多くのポイントの増加として定義した。同様に、神経学的改善を、追跡期間の間のこのスケールにおける 4 またはそれより多くのポイントの低下として定義した。最後に、機能的転帰を、修正ランキンスケール（mRS）スコアに従って定義した。3 またはそれより多くのポイントを得点する患者を、機能的依存とみなした。

【0113】

血管の状態を評価するために、t-PA 投与の前、およびその（1、2、6 および 24 時間）後に連続的に、経験のある神経学者により、Multi-Dop X4（DWL Elektronische Systeme GmbH, Sipplingen, Germany）デバイスを用いて、ハンドヘルド式トランスデューサーにより、レンジゲート式のパルス波モードにおいて、2 MHz の周波数で、経頭蓋ドップラー測定を行った。入院時において、MCA 閉塞の位置を近位または遠位として記録した。追跡 TCD 試験における再開通の存在を、Thrombolysis in Brain Ischemia（TIBI）血流グレード付けシステムに従って評価した。完全な再開通を、狭窄の改善または正常な（4～5 の TIBI 血流グレード）波形として、部分的な再開通を、少なくとも 1 の TIBI 血流グレードから 2～3 の TIBI 血流グレードにより、残りの血流シグナルにおける改善として、再開通の不在を、基線 TCD からの残りの血流シグナルの改善の不在として診断した。

各患者から、基線（tPA 投与の前および発症から 3 時間以内）において、末梢血試料を

10

20

30

40

50

採取した。

【 0 1 1 4 】

結果

Lp-PLA2レベルに関連する基線の特徴

基線のLp-PLA2の質量および活性に関連する全ての要因を決定した。個体群統計および血管のリスク因子に関する結果を表 1 に示す。脂質異常の患者は、非脂質異常の患者よりも高いLp-PLA2の活性を示し（182.2対157.2、 $p = 0.058$ ）、また、スタチン類を服用している患者は、脳卒中の時点までにスタチン類を服用していない患者より低いLp-PLA2の質量濃度を有した（244.5対283、 $p = 0.17$ ）。

【 0 1 1 5 】

【表 1】

表 1. Lp-PLA2 に関連する個体群統計学的特徴および血管のリスク因子。

	Lp-PLA2 の 質 量 (ng/mL)	p	Lp-PLA2 の 活 性 (ng/mL/分)	p
合計	211 (204.2-350.2)	-	161.4 (131.3-189.3)	-
性別				
- 男性	292 (236.5-352.2)	0.56	162.9 (136.1-198)	0.62
- 女性	247 (200.5-350)		161.6 (122.3-161.6)	
年齢				
- ≤76	277.5 (201.7-347)	0.78	157.6 (130.6-185)	0.53
- >76	256 (202-390)		162.3 (130-197.4)	
タバコ使用				
- 無	259.5 (201.3-350.7)	0.17	162.4 (133.4-197.9)	0.26
- 有	288 (271-367.5)		152.9 (125.6-176.4)	
高血圧				
- 無	294 (236.5-370.5)	0.6	162.3 (130-196.7)	0.99
- 有	264 (202-346)		161.6 (131-189.3)	
糖尿病				
- 無	283 (214-353)	0.1	162 (134-194.5)	0.37
- 有	237 (202-309.5)		158.4 (119.4-195.5)	
脂質異常症				
- 無	275 (209-349)	0.68	157.2 (127-181.7)	0.058
- 有	279 (198-380)		182.2 (157.5-182)	
以前の脳卒中				
-無	272 (202-349)	0.79	161.6 (130-194.7)	0.76
-有	331 (215.5-386.5)		165.7 (150.2-165.7)	
CAD				
-無	261.5 (203.7-350.7)	0.64	161.4 (133.4-186.8)	0.85
-有	296 (232.5-361.5)		168.4 (119.6-214.5)	
抗血小板剤				
-無	247 (201.346)	0.74	159 (130.3-184.2)	0.47
-有	291 (236-359)		165.9 (134.6-165.9)	
スタチン類				
-無	283 (214-354)	0.17	162.1 (130.3-194.5)	0.89
-有	244.5 (198-323.5)		162 (132.1-195)	

【 0 1 1 6 】

また、Lp-PLA2の質量および活性と脳卒中の重篤度（NIHSSスコアにより測定される）、病因、ならびに基線TCDにおける閉塞の位置（近位の閉塞対遠位の閉塞）、および閉塞した血管の再開通との間の関連を研究した（図 4 A ~ 4 F）。

【 0 1 1 7 】

入院時におけるLp-PLA2活性およびNIHSSスコアは、弱い負の相関を示し（ $r = -0.23$ 、

10

20

30

40

50

p = 0.032)、より重篤に発症した患者が、最も低いLp-PLA2活性を示した。病因に関しては、最も低い質量および活性のレベルが、動脈解離などの他の特定の脳卒中の病因を有する患者の間で、最も高いレベルが、アテローム血栓症の脳卒中の病因を有する患者において見出された。

【0118】

再開通に関しては、質量および活性の両方のより高いレベルが、血栓溶解療法（tPA処置）の終了までに完全な再開通を達成しなかった患者の間で見出され、年齢、性別および血管リスク因子により調整された多変数解析（表2）の後で、基線TCDにおける近位の閉塞の存在と組み合わせられたLp-PLA2の質量は、閉塞の持続、したがって血栓溶解剤処置に対する抵抗性の、最も強力な予測因子であった。さらに、近位の閉塞を201.5 ng / mLより高いLp-PLA2の質量と組み合わせた場合、1時間において完全な再開通を達成した患者は、近位の閉塞が存在しない場合およびLp-PLA2の質量がそのレベルよりも低い場合に50%であったことと比較して、殆ど存在しなかった（図5を参照；傾向についてのp < 0.001）。

【0119】

【表2】

表2. 多変数解析の後での、tPA処置の終了時における完全な再開通の欠如についての重要な予測因子。

	OR	p
基線 TCD における近位閉塞	6.75 (1.11-40)	0.037
基線 Lp-PLA2 の質量	1.016 (1.004-1.028)	0.011
基線 Lp-PLA2 の活性	1.022 (0.99-1.05)	0.12

年齢、性別および血管のリスク因子について調整されている。

【0120】

これらの結果は、高いLp-PLA2レベルを有する患者、ならびに低いLp-PLA2レベルを有する患者が血栓溶解療法から利益を受けないことを示す。したがって、Lp-PLA2レベルが高く血管イベントを有しているかまたは血管イベントを有していることが疑われる患者は、より積極的な薬物の投与（例えば、血栓溶解療法）および薬物の組み合わせならびに介入的および外科的アプローチから利益を受けるであろう。

【0121】

さらに、高いLp-PLA2および近位の閉塞を有する患者にとっては、血栓溶解療法からは殆ど何らの利益も得られない。したがって、近位の閉塞および高いLp-PLA2レベルを有し、血管イベントを有しているかまたは血管イベントを有していることが疑われる患者は、より積極的な薬物の投与（例えば、血栓溶解療法）および薬物の組み合わせならびに介入的および外科的アプローチから利益を受けるであろう。

【0122】

最後に、脳卒中の急性期の間の神経の状態および3か月目における機能的状態を調査し、結果を図4Eおよび4Fに示す。最初の48時間の間に、Lp-PLA2の質量または活性と神経の状態との間には何らの関係も見出されなかった。さらに、Lp-PLA2の質量または活性のいずれも、それ自体は、3か月目における機能的転帰と関係しなかった。

【0123】

Lp-PLA2レベルは、近位閉塞の存在と組み合わせられた場合に、重要な予後診断的情報を付け加える。Lp-PLA2レベルおよび近位閉塞の存在 / 不在は、患者の3か月の機能的転帰を予測する。高いLp-PLA2レベル（質量または活性）および近位閉塞を有する患者は、血管イベントの3か月後において、機能的依存となる可能性がより高い（図6）。機能的依存となる可能性がより高い患者は、血栓溶解薬（例えばtPA）および外科的 / PCI介入を含むさらなるまたはより積極的な治療から利益を受ける場合がある。

【0124】

例4：Lp-PLA2は、TIA後の二次性脳卒中（または再発性の非致死性の脳卒中、非致死性の

心筋梗塞および血管死の組み合わせエンドポイント) - 亜急性期を予測する。

研究プロトコル

この場合、本発明者らは、救急部の神経学者により注意された一過性の神経障害を有する166人の治療継続中の患者をプロスペクティブに研究した。TIAを、虚血に起因する可逆性の神経障害のエピソードであって24時間以内に完全に回復するものとして定義した。全部で11の臨床エピソードが、脳虚血以外の原因に起因し得、本研究から除外された。

【0125】

個体群統計および古典的な血管のリスク因子、ならびに臨床的特徴を記録した。試験時の臨床的症状および神経学的徴候を評価し、各エピソードに關与する血管領域を、上記の知見の存在およびその組み合わせに応じて、頸動脈、椎骨脳底または未決定の領域として記録した。最後に、TIAの期間および臨床的エピソードの数を記録した。TIAを、単一のTIAまたはTIAのクラスターとして(指標となるイベントの1週間以内にTIAの繰り返しが起こった場合)分類した。

必ず症状の発症後初めの24時間以内に、救急科においてLp-PLA2の決定のための血液試料を採取した。

【0126】

入院中の他の試験は、病歴、身体検査、通常の血液生化学、心電図(ECG)、胸部X線、経胸壁心エコー、および示す場合はホルターECG、頸部頸動脈超音波および経頭蓋ドップラー法(TCD)超音波検査;およびCTスキャンを含んだ。入院時、症状の発症後初めの24時間以内に、Multi-Dop-X/TCDデバイス(DWL Elektronische Systeme GmbH; Compumedics Germany GmbH, Lindau, Germany)を用いて、TCD記録を行った。限局した超音波照射深度における平均血流速度が $> 80 \text{ cm/s}$ であり、左右差が $> 30 \text{ cm/s}$ であり、血流の乱れの徴候があった場合に、頭蓋内狭窄を診断した。基線の頸部内頸動脈(ICA)アテローム性動脈硬化を、エコー・ドップラーにより以下のとおり分類した: 不在; 穏和、一方または両方のICAが $< 50\%$ の狭窄を有した場合; 中程度、ICAのいずれかが $< 70\%$ の狭窄を表わした場合; および、重篤、いずれかのICAが $> 70\%$ の狭窄を表わし、頸動脈手術の病歴がある場合。頸部および頭蓋の超音波検査による研究により中程度または重篤な狭窄が検出された場合、患者を大動脈閉塞疾患を有するものとして分類した。

【0127】

全ての診断試験が行われた後、一過性虚血性発作を、ORG 10172(2)の試験に従って、大動脈閉塞性疾患(アテローム性血栓症)、小血管疾患、心塞栓、一般的でないまたは未決定の原因に起因するものとして、病原学的に分類した。患者を12か月にわたり追跡し、追跡の間、7日目、1か月、および3か月毎に、問診を行った。エンドポイントイベントは、さらなる脳卒中またはTIA、および脳卒中、心筋梗塞または血管死の組み合わせられたエンドポイントを含んだ。

【0128】

統計学的分析

分布の試験を分析した後で、Lp-PLA2の質量および活性を、さらなる分析のために四分位に分類した。脳卒中または任意の血管イベントまでの時間についての累積のイベントフリー率を、カプラン・マイヤー積極限法により推定し、最も高いおよび最も低い四分位のLp-PLA2の質量および活性を有する患者を、ログランク検定により比較した。

【0129】

再発性脳卒中または組み合わせられたエンドポイントまでの時間を、非血管性死亡または最後の追跡のいずれかまでの時間における打ち切りにより分析した。

また、新たな再発イベントの存在と不在との間を最もよく区別するLp-PLA2の活性の最適なカットオフ点を同定するために、受信者動作特性(ROC)曲線を行った。

【0130】

年齢および古典的な血管のリスク因子についての調整の後での、初めの1週間および1か月間における、再発脳卒中、および再発脳卒中、心筋梗塞または血管死の組み合わせられ

10

20

30

40

50

たエンドポイントの予測因子としてのLp-PLA2の潜在的な役割のハザード比（HR）および95%信頼区間（95%CI）を推定するために、Cox比例ハザードモデルを行った。P<0.05を有意とみなした。最後に、これは先に集積されたコホートの事後分析であるため、検出力は、形式的にはプロスペクティブに計算されなかった。

【0131】

結果

基線の特徴およびLp-PLA2レベル

研究された166人のTIA患者の間で、その70%が、1回目の脳卒中の患者であり、残りは、指標となるイベントの前に、1または2以上の以前の脳卒中を有していた。個体群統計学的要因の分布、古典的な血管のリスク因子および同時罹患する血管疾患を、表3に示す。病因に関して、TIAの殆どは、適切な診断試験が行われた後で未決定の病因のものであり、前方循環で発症した。

【0132】

【表3】

表3. 研究参加者の特徴

特徴	値
個体群統計学的特徴	
年齢、平均値±SD、y	74 (66-81)
性別、男性	86 (52%)
リスク因子	
高血圧	88 (53%)
真性糖尿病	41 (25%)
高脂血症	44 (27%)
現在喫煙中	25 (15%)
アルコール	7 (4%)
冠動脈疾患	25 (15%)
末梢動脈疾患	10 (6%)
心房細動	38 (23%)
以前の脳卒中	48 (30%)
脳卒中の病因	
• アテローム性血栓症	38 (23%)
• 心塞栓	50 (30%)
• 小血管閉塞	7 (4%)
• 未決定	71 (43%)
以前の処置	
抗血小板剤処置	53 (32%)
脂質低下剤処置	18 (11%)
経口の抗凝固剤	18 (11%)

データを、必要に応じて平均値±SDまたはn (%)として表わす。

【0133】

図7において示すとおり、Lp-PLA2の質量および活性は、本発明者らの集団においては正規分布しておらず、TIA症例において、健康な対象においてよりも有意に高かった（Lp-PLA2の質量については[347 (273~414)]対[199 (167~243)]、p<0.001；Lp-PLA2の活性については[187 (151~228)]対[160 (130~195)]、p<0.001）。

【0134】

基線の特徴および既往歴の間で、幾つかの要因がLp-PLA2の質量および/または活性と関連することが見出された（表4）。高脂血症の既往歴を有する患者は、それを有しない患者よりも低いLp-PLA2の質量および活性を有し、TIAの前に抗血小板剤を服用していた患者もまた、低いLp-PLA2の活性を有した。他のリスク因子または以前の処置を考慮した場合には、Lp-PLA2レベルに差異は存在しなかった。

【 0 1 3 5 】

【 表 4 】

表 4. Lp-PLA2 レベルに従う個体群統計学的特徴&血管のリスク因子

リスク因子	Lp-PLA2 の質量 (ng/mL)	P値	Lp-PLA2の活性 (ng/mL/分)	P値
全体(n=166)	347 (273-414)	-	187 (151-228)	-
年齢 <ul style="list-style-type: none"> ・ <74 歳(n=) ・ ≥74 歳(n=) 	390 (289-482) 350 (264-416)	0.35	205 (158-237) 196 (167-240)	0.54
性別 <ul style="list-style-type: none"> ・ 男性(n=86) ・ 女性(n=80) 	352 (274-407) 341 (272-433)	0.71	193 (161-232) 176 (142-221)	0.067
高血圧 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=78) ・ 有(n=88) 	353 (275-419) 347 (266-434)	0.57	187 (162-225) 187 (143-235)	0.85
真性糖尿病 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=125) ・ 有(n=41) 	354 (277-434) 333 (264-392)	0.47	188 (160-228) 186 (145-236)	0.78
高脂血症 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=122) ・ 有(n=44) 	360 (277-446) 316 (238-364)	0.03	197 (277-446) 167 (149-197)	0.007
喫煙 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=141) ・ 有(n=25) 	344 (269-411) 378 (294-448)	0.67	187 (150-229) 194 (158-215)	0.87
心房細動 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=128) ・ 有(n=38) 	354 (268-419) 338 (276-432)	0.8	184 (150-230) 202 (161-228)	0.26
抗血小板剤 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=113) ・ 有(n=53) 	381 (277-482) 347 (259-398)	0.18	213 (173-241) 180 (148-233)	0.039
冠動脈疾患 <ul style="list-style-type: none"> ・ 無(n=141) ・ 有(n=25) 	354 (276-435) 340 (264-361)	0.095	191 (152-230) 174 (149-206)	0.19
脳卒中の病因 <ul style="list-style-type: none"> ・ アテローム血栓症性(n=38) ・ 心塞栓(n=50) ・ 小血管閉塞(n=7) ・ 未決定(n=71) 	389 (333-454) 339 (268-410) 372 (282-529) 359 (266-456)	0.7	226 (175-298) 197 (150-226) 179 (120-248) 187 (155-235)	0.11

データは、中央値(四分位間範囲)として表わす。

【 0 1 3 6 】

頭蓋内循環または頭蓋内および頭蓋外の血管のいずれかにおける確定した大動脈狭窄の存在は、より高いLp-PLA2の活性と関連した。

【 0 1 3 7 】

追跡および転帰イベント

追跡の間に、指標となるTIA後の初期に（最初の週の間に）、および後から最初の1か月において、および1年の追跡の後で、新たな血管イベント（冠動脈疾患、脳卒中またはTIAおよび末梢血管疾患）の存在を評価した。新たな血管イベントを、経験を有する神経学者により、外来診療の評価の一部として、および電話のインタビューにより、分類および記録した。表5は、新規のイベントの割合を、それらの検証の時間に従って示す。最初の週の間の全ての血管イベントは、脳卒中/TIAであった。

【 0 1 3 8 】

【表 5】

表 5. 評価された時間に依存する新たな血管イベントの割合

追跡	任意の血管イベント	脳卒中または TIA
1 年	41 (25%)	33 (19.9%)
1 か月	23 (13.9%)	21 (12.7%)
1 週間	9 (5.4%)	9 (5.4%)

【0139】

10

最初の 1 週間以内および最初の 1 か月以内の両方の脳卒中 / TIA または任意の血管イベントの存在と関連する全ての要因を同定するために、一変数解析を行った。超音波検査による研究の後で、アテローム血栓性脳卒中の病因（すなわち、他に脳卒中の原因がない指標となるイベントの原因である頭蓋内または頭蓋外狭窄の検出）は、再発イベントの存在と関連する最も重要な要因である（全ての転帰について $p < 0.01$ ）。一変数解析において $p < 0.1$ を示す他の基線の関連要因は、最初の 1 週間以内における任意の血管イベントについては、末梢動脈疾患の既往歴であり、当該イベントが最初の 1 か月以内において起こった場合は、冠動脈疾患、脂質異常症および末梢動脈疾患の既往歴であった。

【0140】

転帰のイベントおよび ABCD2

20

指標となる TIA イベントについての臨床情報が利用可能な 96 人の患者のサブグループをまた、ABCD2 スコアに従って、さらなるイベントのリスクを層別化するために分類した。ABCD2 群（低い、中程度および中間のリスク）において、最初の 1 週間については有意差は観察されず、最初の 1 か月に関して得られた結果を、図 8 A および 8 B に示す。高リスクを有すると分類された患者は、最大数のイベントを示したが、統計学的有意には達しなかった。さらに、低リスク群と中程度のリスクの群において、イベントの数に関して著しい重複が観察された。

【0141】

転帰のイベントおよび Lp-PLA2 の質量および活性

Lp-PLA2 の質量および活性と任意のさらなる血管イベントまたは脳卒中 / TIA の存在との間の関係を、生存分析により分析した。Lp-PLA2 の質量および活性の最も低い四分位値にある患者を、最も高い四分位値にある患者に対して、ログランク検定を用いて比較した。図 9 A ~ 9 D は、Lp-PLA2 の活性の四分位に関する Kaplan-Meier 曲線を示す。Lp-PLA2 の質量の四分位に関して新たなイベントの割合に有意差は見出されなかった（データは示さず）。

【0142】

最後に、受信者動作特性（ROC）曲線により、 207 ng/mL / 分の Lp-PLA2 活性を、新たな（1 週目の）脳卒中または TIA の存在を区別するための最適なカットオフ点として同定し、感度は 78% であり、特異度は 66% であった（曲線の下面積は 0.71 に等しかった）。同カットオフ点を、全ての他の転帰について用いた。図 9 E ~ 9 H は、1 週目および 1 か月目の脳卒中 / TIA または任意の血管イベントについての、 207 ng/mL / 分のカットオフ点の上下の群を比較する、Kaplan-Meier 曲線を示す。

40

【0143】

最後に、初期の（1 週目）血管イベントまたは後期（1 か月目）の脳卒中 / TIA もしくは血管イベントの出現についての潜在的予測因子を同定するために、Cox 回帰モデルを行い、結果を表 6 に示す。

【0144】

【表 6】

表 6. 初期および後期の再発イベントの潜在的予測因子を同定するための Cox 回帰分析

	HR (CI 95%)	p
初期の脳卒中/TIAまたは任意の血管イベント		
アテローム血栓性脳卒中の病因	9.3 (1.81-48.2)	0.008
後期(1か月)の脳卒中/TIA		
脂質異常症	3.68 (1.04-7.07)	0.008
アテローム血栓症の病因	3.28 (1.32-8.15)	0.011
Lp-PLA2の活性>207 ng/mL/分	2.7 (1.04-7.07)	0.042
後期(1か月)の血管イベント		
アテローム血栓性脳卒中の病因	3.33 (1.39-7.94)	0.007
冠動脈疾患	3.38 (1.36-8.41)	0.009

全てのモデルを、年齢、性別、血管のリスク因子および一変数解析において $p < 0.1$ を示す因子により調整した。

【0145】

例 5 : Lp-PAL2は、二次性脳卒中または組み合わされたエンドポイントを予測する - 亜急性期

組み合わされたエンドポイントは、特定の脳卒中サブタイプ（頭蓋内狭窄に起因するアテローム硬化性脳卒中）における、再発性の非致死性の脳卒中、非致死性の心筋梗塞および血管死である。

患者および方法

研究参加者

2001年6月～2004年1月の間に、本発明者らの脳卒中ユニットに入院したTIAまたは虚血性脳卒中を有する196人の治療継続中の患者であって、TCD記録において大脳虚血性イベントの潜在的な原因となる頭蓋内狭窄を示すものを評価した。

入院中の診断プロトコル試験は、病歴、身体検査、通常の血液生化学および血球計数、EKG、胸部X線、甲状腺機能、免疫学的調査、経胸壁心エコー、および示す場合はEKGホルター、血管造影シーケンスを含む頭蓋MRIまたはCTスキャン、および頸部頸動脈超音波検査を含んだ。

【0146】

この研究に含まれたのは、頭蓋内狭窄の血管造影による確認がMR血管造影法またはCT血管造影法により達成された75人の治療継続中の患者であった。同コホートは、本発明者らのグループによる先の研究において詳細に記載されている（Arenillas JF (2008) Stroke 39: 1456-1463; Juan F (2009) Cerebrovasc Dis 28:95-102）。

【0147】

残りの候補を除外するための理由は、以下の分類に属する：（1）大脳虚血の他の潜在的原因の存在（ $n = 46$ ）、（2）非アテローム硬化性による頭蓋内狭窄（ $n = 23$ ）、（3）炎症性状態の存在（ $n = 20$ ）、および（4）脳卒中関連死または重篤な能力障害（ $n = 10$ ）、適切な音響窓の欠如（ $n = 21$ ）またはインフォームド・コンセントの否定（ $n = 1$ ）のために追跡を実施することが不可能。条件を満たすイベント（qualifying event）の少なくとも3か月後に行われた組み入れのための来診（inclusion visit）時において、症候性の頭蓋内アテローム性狭窄（atherostenoses）を有した75人の患者全員からインフォームド・コンセントを得た。

【0148】

血液試料は、必ず一晩の絶食の後に採取した。以前の3か月間の間の急性の感染症、外科手術または外傷、および偶発的な新生物または炎症性状態は、慎重な既往歴および身体検査によりサンプリングの前に除外した。

健康な志願者および患者の親族から得た 135 の試料を、本研究のための対照として用いた。

本研究は、地域の倫理委員会により承認された。

【0149】

臨床的変数および長期追跡

組み入れのための来診時において、喫煙、ならびに高血圧、高コレステロール血症および2型真性糖尿病の病歴を記録した。入院の間、国立保健研究所の脳卒中スケールスコアを用いて、脳卒中の重篤度を評価した。90日目における機能的状態を、修正ランキンスケールスコア(mRS)により評価した。研究期間の間に利用可能な米国心臓学会のガイドラインの推奨に従って、二次予防治療を確立した。各患者に対して責任を有する脳卒中チームの分類に従って、個別化の様式において、血栓溶解剤処置を指示した。アセノクマロール、アスピリン、クロピドグレル、スタチン類、アンジオテンシン変換酵素阻害剤およびアンジオテンシン受容体遮断薬を登録した。

10

【0150】

組み入れ後、研究期間を通して患者の生化学データを知らされない脳卒中神経学者(J.F.A.)により、6か月ごとの来診が指示された。その後の、所定のエンドポイント：急性虚血性脳卒中；脳卒中神経学者により診断されるTIA；急性心筋梗塞または入院を必要とする狭心症、および血管死までの主要な血管イベントを考慮した。

【0151】

超音波プロトコル

20

Multi-Dop-X/TCD(DWL Elektronische Systeme GmbH, Germany)デバイスを用いて、ハンドヘルド式トランスデューサーにより、レンジゲート式のパルス波モードにおいて、2MHzの周波数で、TCD記録を行った。本発明者らは、先に記載されるように、圧縮試験なしで、側頭部、後頭部および眼窩のウィンドウを通して標準的な超音波照射の方法を用いた。評価が確立した分類に従って、限局した超音波照射深度における平均血流速度が $>80\text{ cm/s}$ であって、左右差が $>30\text{ cm/s}$ であり、血流の乱れの兆候があった場合に、頭蓋内狭窄を診断した。入院時にTCD試験を行い、組み入れのための外来において、狭窄の持続を確認するために繰り返した。基線の頸部ICAアテローム性動脈硬化を、不在として；両方のICAが穏和な $<50\%$ の狭窄を有した場合は穏和として；ICAのいずれかが中程度の $<70\%$ の狭窄を表わした場合は中程度として；およびいずれかのICAが重篤な無症候性の狭窄を有した場合は重篤として分類した。

30

【0152】

Lp-PLA2の質量および活性の決定

全コレステロール、高密度リポタンパク質(HDL)-コレステロールおよび低密度リポタンパク質(LDL)-コレステロールのレベルを、血清試料において、自動化された酵素による方法により決定した。

Lp-PLA2の質量および活性を、EDTA-血漿試料において、自動化されたOlympus分析器におけるPLAC試験により、および比色活性法(diaDexus)により、決定した。全ての試料を2回ずつ実行した。

【0153】

40

統計学的分析

分析は、SPSS統計パッケージ(Chicago, Ill., USA)バージョン15.0により行った。群間の差異についての統計学的有意性を、カテゴリー変数については χ^2 検定またはフィッシャー直接検定により、連続型変数についてはマン・ホイットニーU検定により評価した。

データの過剰モデル化および偽陽性の結果を防止するために、臨床的再発のみを研究のエンドポイントとみなした。

【0154】

Lp-PLA2の質量および活性ならびにさらなる虚血性イベントの発生に関連する変数を検出するために、一変数解析を行った。

50

一変数検定において年齢、性別、現在の喫煙、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症および p 値 < 0.05 を示す変数を含めたCox比例ハザード多変数解析を用いて、追跡の間のさらなる虚血性イベントの予測因子を同定した。結果を、調整したハザード比および対応する 95%信頼区間として表わした。

【0155】

結果

基線の臨床的変数

研究集団の基線の特徴および血管のリスク因子を表7に示す。研究試料は、55人の男性(73%)と20人の女性(27%)から構成された。平均年齢は、 66.2 ± 8.3 歳であった。頭蓋内アテローム性狭窄に起因する、条件を満たすイベントは、54人の患者(72%)における虚血性脳卒中および残りの21人(28%)におけるTIAであった。症候性病変は、17人の患者(23%)においては頭蓋内内頸動脈中に、25人(33%)においては中大脳動脈中に、2人(3%)においては前大脳動脈中に、9人(12%)においては後大脳動脈中に、および14人(19%)においては椎骨脳底中に位置した。TIAを表わす複数の狭窄を有する8人の患者においては、いずれの頭蓋内狭窄が徴候性であったかを決定することは可能でなかった。26人の患者において、入院中の非常に初期の再発が観察された；12人の患者において、TIAが虚血性脳卒中に先行し、14人の患者は、繰り返されるTIAを表わした。

【0156】

脳卒中の患者について、入院時の国立保健研究所の脳卒中スケールスコアの中央値は2であった(四分位間範囲0~4)。全ての研究された対象は、退院と組み入れのための外来との間の期間中、虚血性イベントフリーであった。二次予防治療に関して、追跡期間を通して、58人の患者(77%)は抗血小板剤を与えられ、17人(23%)は経口の抗凝固剤を与えられ、53人(71%)はスタチン類により処置された。MRAにより66人の患者(88%)において、CTAにより9人(12%)において、頭蓋内狭窄を確認した。75の症候性狭窄の他に、全部で165の無症候性狭窄を検出した。患者1人あたりの頭蓋内狭窄の数の中央値は、3であった(四分位間範囲2~4)。

【0157】

10

20

【表 7】

表 7. 研究試料の基線の特徴 (n=75).

特徴	値
個体群統計学的特徴	
年齢、歳	66.2±8.3
性別、男性	55 (73%)
リスク因子および同時罹患の血管疾患	
現在の喫煙	35 (47%)
高血圧	60 (80%)
真性糖尿病	40 (53%)
高コレステロール血症	55 (73%)
冠動脈心疾患	13 (17.5%)
末梢動脈疾患	15 (20%)
>2の血管リスク因子	36 (48%)
条件を満たすイベント	
• 脳卒中	54 (72%)
• TIA	21 (28%)
症候性頭蓋内狭窄の位置	
• 頭蓋内ICA	17 (23%)
• MCA	25 (33%)
• ACA	2 (3%)
• PCA	9 (12%)
• VB	14 (19%)
• 未決定	8 (10%)
無症候性頭蓋外狭窄	
• ICA >30%狭窄	28 (37%)
90日のmRSスコアが0または1	62 (83%)
抗血栓処置	
• 抗凝固剤	17 (23%)
• アスピリン	26 (35%)
• クロピドグレル	43 (57%)
スタチン類	53 (71%)
ACEI	25 (33%)
ARB	10 (13%)

結果を、必要に応じて平均値±標準偏差、n(%年齢)または中央値(四分位間範囲)として表わす。ACA=前大脳動脈、ACEI=ア

ンジオテンシン変換酵素阻害剤、ARB= アンジオテンシン受容体遮断剤、ICA=内頸動脈、MCA=中大脳動脈、mRS=修正ランキ

ンスケール、PCA=後大脳動脈;VB=頭蓋内椎骨脳底動脈。

【 0 1 5 8 】

Lp-PLA2の質量および活性

Lp-PLA2の質量レベルは、症候性頭蓋内狭窄を有する患者において、対照の対象におけるよりも有意に高かった(312.87対221.24 ng/ml、 $p < 0.001$)。活性に関しては、症例において対象におけるよりも有意に低かった(152.11対168.58、 $p = 0.008$)。症例において低下した活性は、患者のほとんどがスタチン類および抗血小板剤処置下にあったとう事実と関連していた可能性があり、これらが虚血性イベントの3か月後に測定したLp-PLA2の活性に影響を及ぼした可能性がある。

【 0 1 5 9 】

表 8 は、Lp-PLA2の質量および活性に関する一変数解析を示す。要約すると、質量は、異常な足関節・上腕血圧指数($ABI < 0.9$)を有する患者において高く、スタチン類またはクロピドグレル処置下にある患者において低いことが見出された。

Lp-PLA2の活性に関し、男性は女性よりも高い活性を有し、異常なABIを有するおよび複数のまたは両側性の狭窄を有する患者もまた、単一のまたは一側性の狭窄を有する患者により高い活性を有した。

最後に、最も低いLDL-コレステロールレベル(100 mg r s / d L 未満)を有するか、またはスタチン類下にある患者は、それを有さない患者よりも低いLp-PLA2の活性を有した。

【 0 1 6 0 】

【表 8 A】

表 8. 症候性頭蓋内狭窄を有する患者における Lp-PLA2 レベルに従った個体群統計学的特徴および血管リスク因子.

変数	Lp-PLA2 の 質 量 (ng/ml) 平均値±SD	P 値	Lp-PLA2 の 活 性 (ng/ml/分) 平均値±SD	P 値
症例対対照 • 症例 • 対照	312.87±99.67 221.24±111.83	<0.001	152.11±36.58 168.58±51.33	0.008
性別 • 男性 • 女性	312.24±99.65 314.55±102.29	0.951	158.09±31.91 135.97±43.89	0.02
年齢 • ≤66 歳 • >66 歳	315.89±108.41 310.00±92.00	0.953	146.05±40.77 157.86±31.60	0.167
現在の喫煙 • 無 • 有	303.59±90.39 323.20±109.49	0.562	147.41±40.20 157.35±31.84	0.246
HTA • 無 • 有	311.53±117.73 313.20±95.69	0.732	157.25±34.92 150.81±37.17	0.546
DM • 無 • 有	307.14±105.74 317.72±95.29	0.398	147.53±32.70 156.01±39.58	0.324
DL • 無 • 有 基底 LDL <100mg/dL • 満たさない • 満たす	327.89±113.55 307.67±95.00 314.07±94.46 311.10±108.50	0.569 0.605	157.24±44.72 150.34±33.62 162.66±34.28 136.64±34.78	0.482 0.002
冠動脈疾患 • 無 • 有 CV リスク因子 • 0-2 • >2	317.11±98.26 298.67±110.54 304.26±101.02 321.94±98.82	0.498 0.317	152.23±36.11 156.02±38.57 149.31±38.20 155.08±35.09	0.743 0.501
TIA • 単回 • 繰り返し 脳卒中に先行する TIA /繰り返しの TIA • 無 • 有	295.14±72.04 325.79±133.58 307.34±90.15 336.32±115.37	0.97 0.457	161.86±41.43 136.90±38.94 155.29±39.82 142.35±35.31	0.19 0.212

【 0 1 6 1 】

10

20

30

【表 8 B】

異常 ABI (<0.9)				
• 無	286.05±112.41	0.032	135.85±36.93	0.013
• 有	327.08±93.07		159.37±35.08	
頸動脈病変				
• 無	317.98±100.63	0.612	151.62±34.25	0.884
• 有	304.46±99.32		152.92±40.78	
TCD による頭蓋内狭窄				
• 一側性	304.26±126.06	0.172	139.82±37.02	0.051
• 両側性(脳底=両側)	316.74±86.38		157.66±35.36	
TCD による頭蓋内狭窄				
• 単一	291.64±122.99	0.176	131.96±27.40	0.047
• 複数	316.57±95.72		155.63±37.01	
DTC 進行				
• 無	311.65±99.78	0.841	150.50±35.36	0.598
• 有	315.24±101.46		155.28±39.43	
ドップラーによる頸動脈アテローム硬化の進行				
• 無	317.56±101.20	0.147	151.68±37.28	0.710
• 有	248.00± 39.41		158.04±27.39	
DWI 中の病変の数				
• 単一	311.21±99.03	0.183	152.77±38.67	0.681
• 複数	353.18±103.84		157.51±35.44	
白質病変				
• 無	315.67±92.49	0.281	154.43±35.24	0.537
• 有	347.00±98.66		160.83±37.31	
RM 中の慢性ラクナ梗塞				
• 無	320.65±100.97	0.578	159.58±37.84	0.780
• 有	333.77±99.31		156.70±36.54	
RM 中の微小出血				
• 無	322.86± 93.34	0.664	157.45±34.72	0.569
• 有	311.53±87.61		151.17±38.07	
基礎抽出までの二次予防:				
スタチン類				
• 無	333.44±90.65	0.034	161.16±35.72	0.049
• 有	295.37±104.68		144.42±35.97	
IECAs				
• 無	318.22±101.46	0.544	153.05±35.83	0.746
• 有	301.00±96.72		150.04±38.94	
予防的処置				
• 抗血小板剤	300.68±99.10	0.082	152.18±34.05	0.981
• ジクマリン類 (Dicumarinics)	338.25±98.03		151.97±42.16	
アスピリン				
• 無	310.20±99.94	0.648	151.20±38.54	0.758
• 有	318.42±101.12		154.02±32.82	
トリフルサル				
• 無	317.59±101.87	0.195	153.41±36.64	0.309
• 有	259.33±47.38		137.46±35.70	
クロピドグレル				
• 無	343.51±96.45	0.001	156.62±39.03	0.240
• 有	274.79±91.30		146.51±33.03	
基底エピソード:				
• TIA	326.30±111.08	0.647	152.70±40.26	0.926
• 確立した梗塞	308.96±96.33		151.79±35.86	

10

20

30

40

【 0 1 6 2 】

また、Lp-PLA2の質量および活性と全コレステロールとの間に、幾つかの有意な相関が見出された。質量については相関係数 = 0.225、p = 0.054、活性については相関係数 = 0.294、p = 0.011。図 1 0 A および 1 0 B を参照。LDL - コレステロール (質量については相関係数=0.372、p = 0.001、活性については相関係数 = 0.278、p = 0.016、図 1 1 A および 1 1 B を参照。

【 0 1 6 3 】

50

例 6 : Lp-PAL2は新たな主要な血管イベントを予測する - 亜急性期

中央値で 23 か月の追跡時間（四分位間範囲 17 ~ 29）の間に、18 人の患者（24 %）が主要な虚血性イベントを罹患し、これは以下のとおり分類された：10 の虚血性脳卒中、3 の TIA、および 5 の心筋梗塞。これらの主要な虚血性イベントのうち、9（50 %）は、組み入れ後の初めの 5 か月以内に起こり、4 のみが 1 年の追跡の後で起こった。

【0164】

頭蓋内アテローム性狭窄に起因する全ての再発性大脳虚血性イベントは、以下のとおり位置した：5 人の患者においては頭蓋内内頸動脈において、5 人においては中大脳動脈において、2 人においては脳底大脳脈において、1 人においては後大脳動脈において。これらの患者は、2 人は致死性脳卒中に起因して、1 人は癌に起因して、追跡の間に死亡した。

10

【0165】

生存分析において、冠動脈疾患の既往歴（ $p = 0.046$ ）、TCDにより検出された狭窄の数（ $p = 0.007$ ）、TCDにより経時的に検出された頭蓋内狭窄の進行（ $p < 0.001$ ）、異常な足関節・上腕血圧指数（ABI < 0.9 ）（ $p = 0.002$ ）、および Lp-PLA2 の活性の増大などの幾つかの要因が、予め特定された組み合わせられたエンドポイント（脳卒中 / TIA、MI / 狭心症または血管死）と有意に関連した。

【0166】

四分位にわたった Lp-PLA2 の活性に関して、本発明者らは、最も高い四分位（第 3 および第 4）における患者において、最も低い四分位における患者と比較して有意に高いイベントの割合を観察した（図 12）。

20

【0167】

また、ROC 曲線により、再発性血管イベントを経験した患者と経験しなかった患者とを区別するための最適なカットオフ点として、153.36 nmol / mL / 分を同定した（感度 0.72 および特異度 0.59）。図 13 は、このカットオフ点の上下の Lp-PLA2 を有する群における血管イベントを考慮するカプラン・マイヤー曲線を示す。

【0168】

最後に、再発性血管イベントの潜在的な予測因子を見出すために、基線の臨床的変数および Lp-PLA2 の活性を含む多変数解析（Cox 回帰）を行った。それら全ての中で、153.36 nmol / mL / 分よりも高い Lp-PLA2 の活性は、血管の再発の最も強力な予測因子であった（HR 2.89（1.029-8.096）、 $p = 0.044$ ）。

30

【0169】

したがって、Lp-PLA2 の活性の測定は、特に他の利用可能な有益なデータ（TCD または ABI など）がない患者において、血管の再発リスクの日常的な臨床評価において潜在的に有用であり得る。

【0170】

本発明者らはまた、Lp-PLA2 の活性が DTC の進行に関係しないことを示した。したがって、Lp-PLA2 の活性は、アテローム性動脈硬化の進行（すなわち、プラークの不安定性）とは異なる機構により血管の再発と関連する可能性がある。

【0171】

40

別の臨床的シナリオは、先に示されたとおり、やはり血管の再発に関連する ABI などの他の補完的な試験の結果を含み得る。したがって、本発明者らは、Lp-PLA2 の活性と ABI との間の組み合わせがどのようにリスクの層別化を改善し得るかを調査し、結果を図 14 に示す。

高レベルの Lp-PLA2 の活性は、異常な ABI（ < 0.9 ）を有する患者の間で血管の再発のリスクを増大するが、これは正常な ABI を有する患者においては起こらない。

【0172】

本明細書において記載される全ての刊行物および他の材料は、本発明の理解を容易にするため、または実施に関するさらなる詳細を提供するために用いられ、その全体が参照により組み込まれる。

50

【図 1】

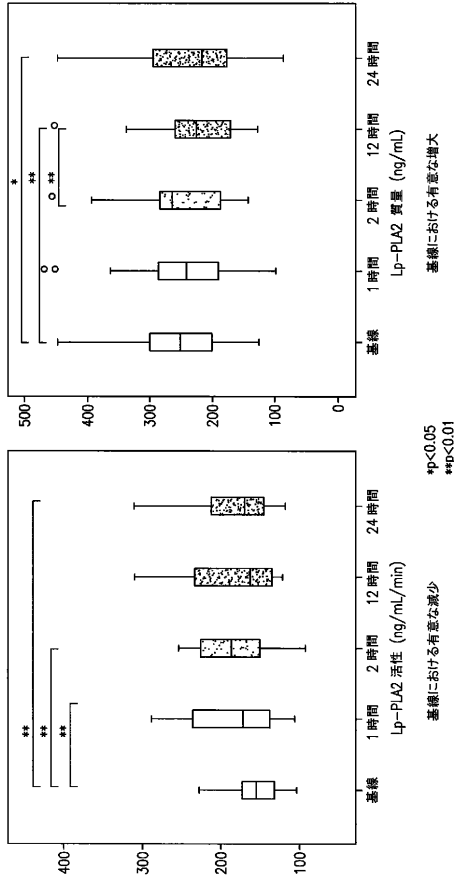


図1B

図1A

【図 2】

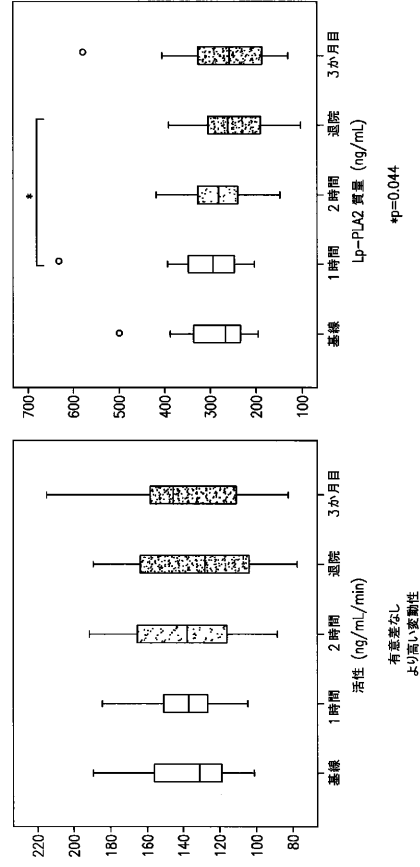


図2B

図2A

【図 3】

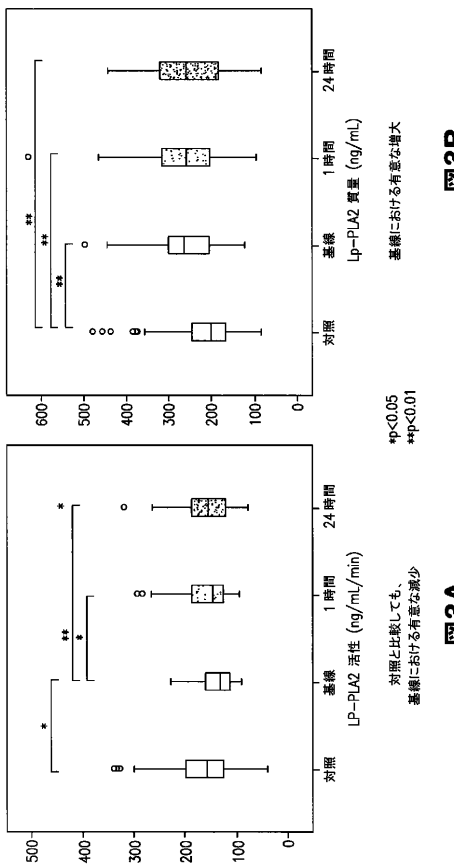


図3A

図3B

【図 4 A - B】

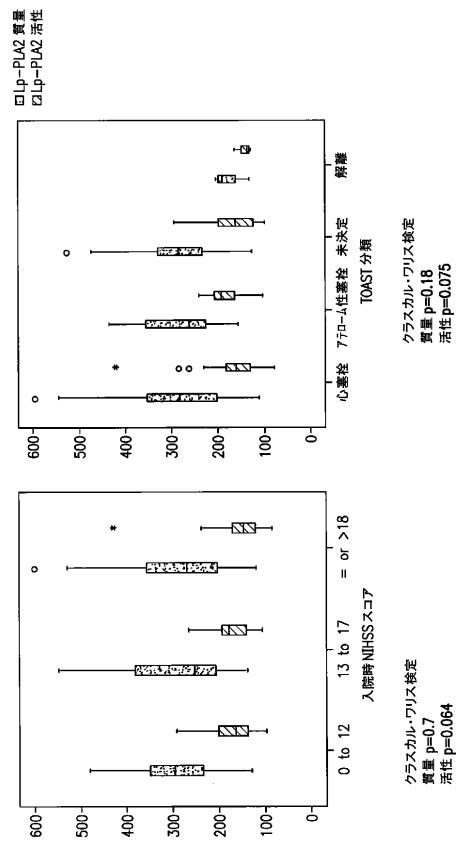


図4A

図4B

【図 4 C - D】

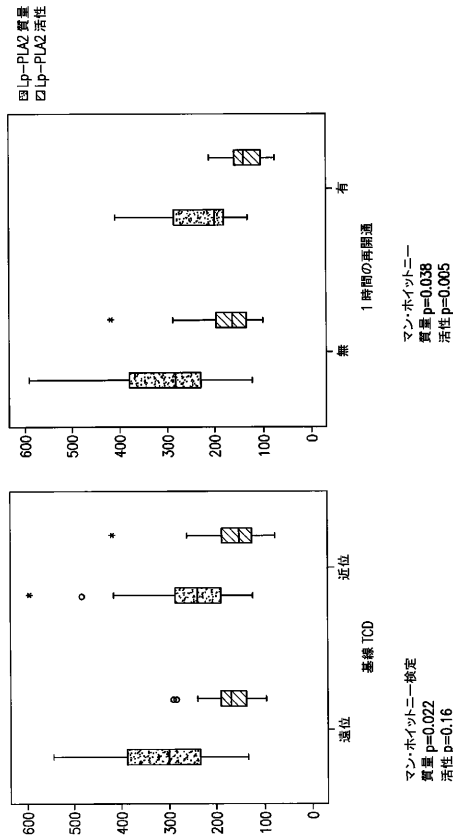


図 4D

図 4C

【図 4 E - F】

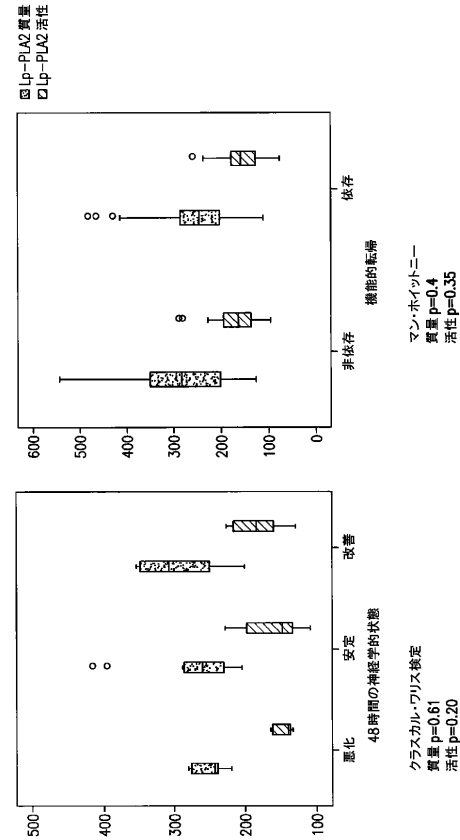


図 4F

図 4E

【図 5】

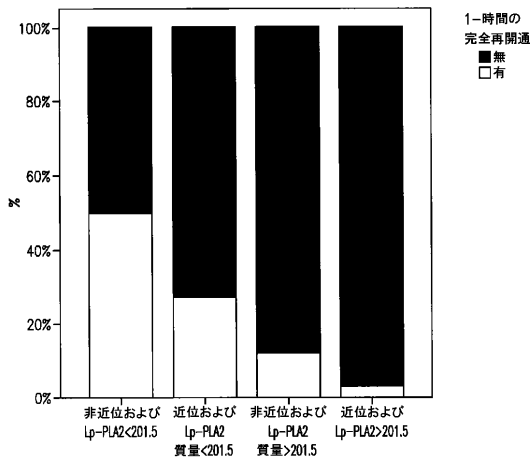


図 5

【図 6】

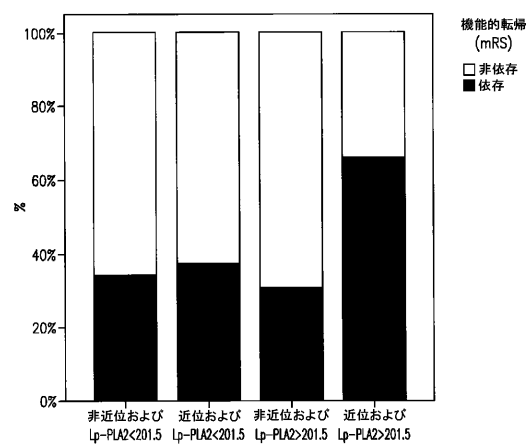


図 6

【 図 7 】

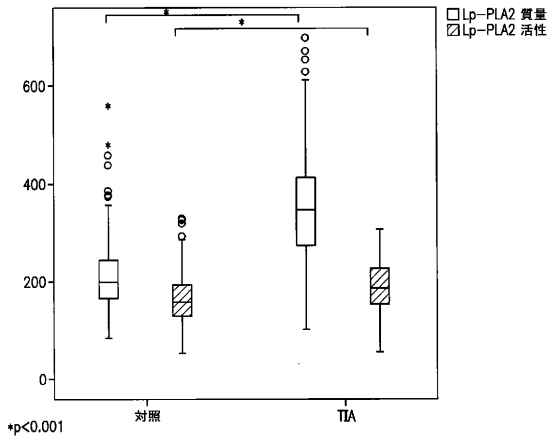


図 7

【 図 8 】

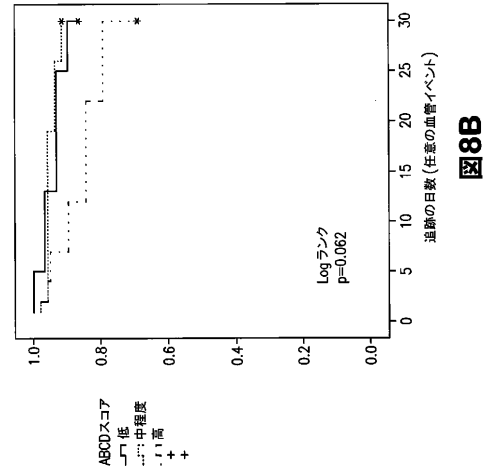


図8B

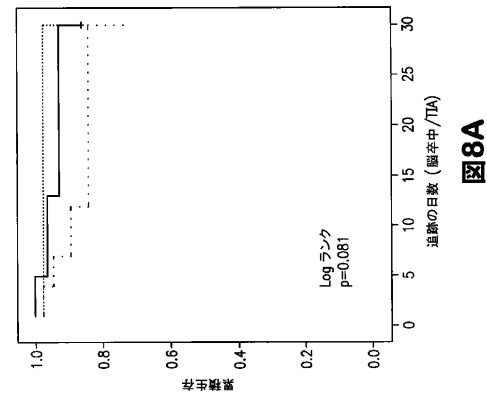


図8A

【 図 9 A - D 】

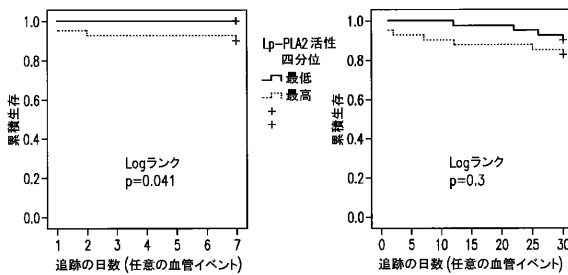


図9A

図9B

【 図 9 E - H 】

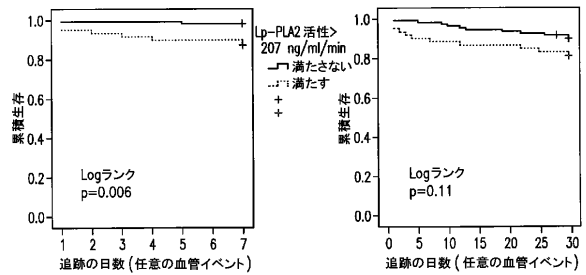


図9E

図9F

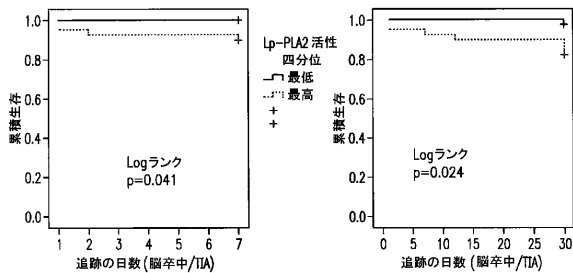


図9C

図9D

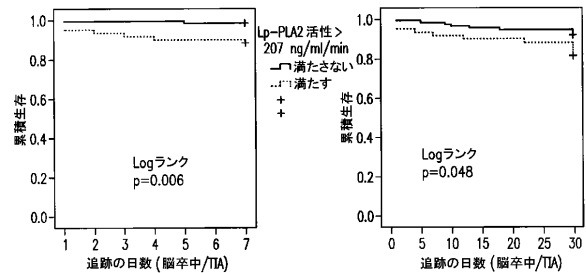
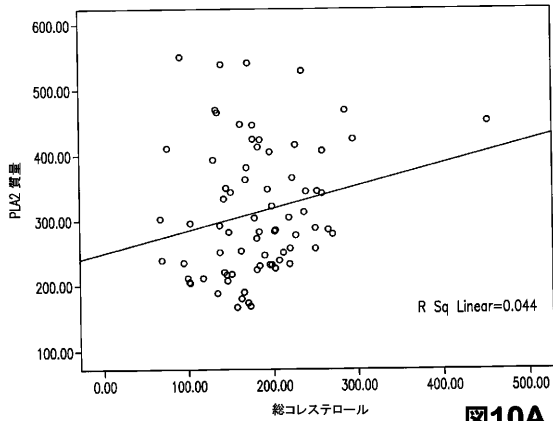


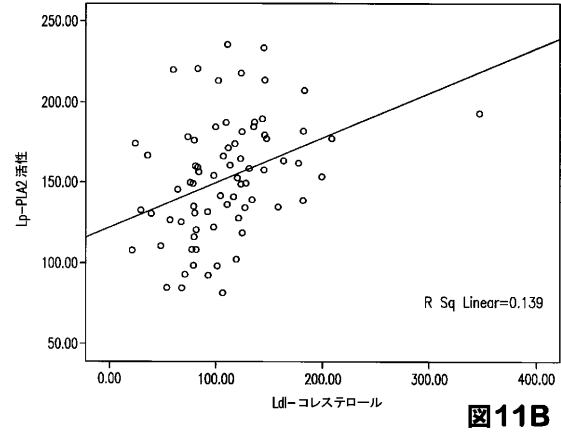
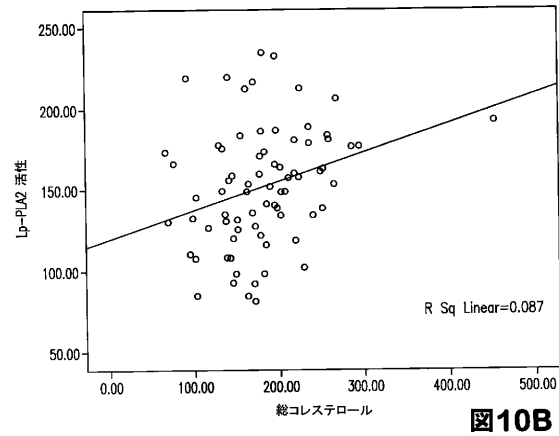
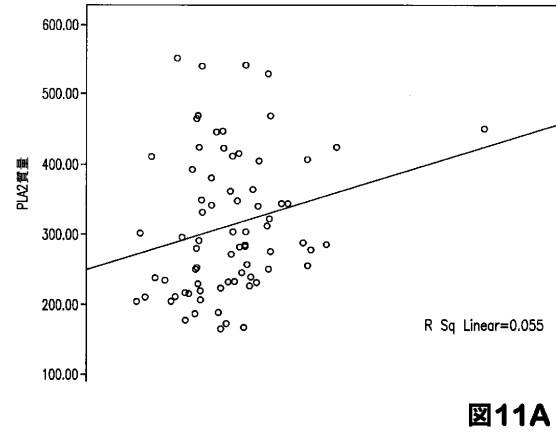
図9G

図9H

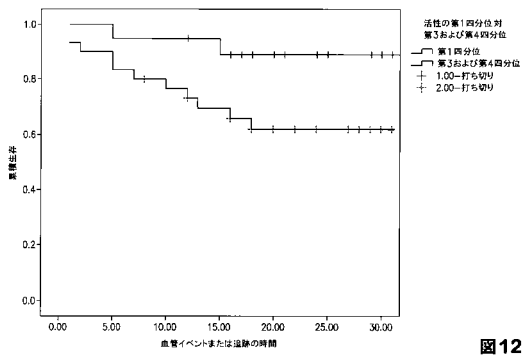
【図 10】



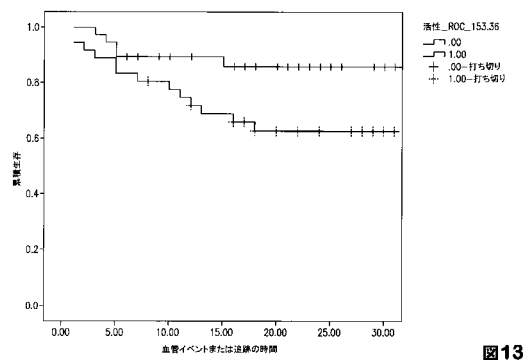
【図 11】



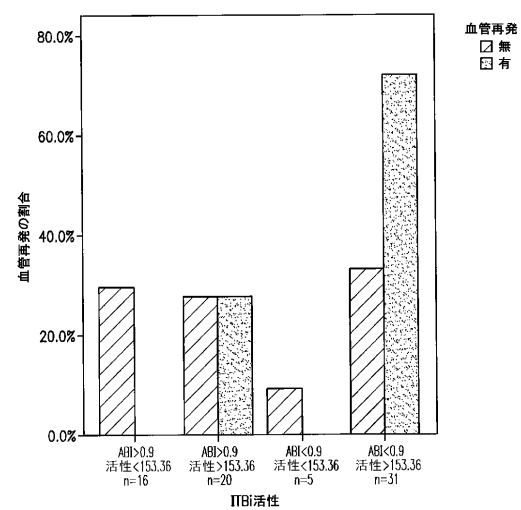
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AUS 11/34728
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 9/20 (2011.01) USPC - 435/198 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/198 (text search)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/11,18; 424/130.1 (text search) Find search terms below		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Database Searched: PUBWEST (PGPUB, EPAB, JPAB, USPT), Google. Search Terms Used: Lipoprotein near2 Phospholipase, Lp-PLA2, myocardial infarctio, stroke,TIA, CVA, surgical intervention, coronary heart disease, CHD		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0077614 A1 (WOLFERT et al.) 05 April 2007 (05.04.2007)	1-12 and 15
-	entire document especially abstract; figure 7; para [0001]; [0015]; [0020]; [0022]; [0034]-[0037]; [0048]-[0049]; [0052]; [0065]; [0109];	13-14 and 16-37
Y	US 6,161,547 A (BARBUT) 19 December 2000 (19.12.2000) especially col 7, ln 13-29	13-14 and 16-37
Y	US 2007/0032736 A1 (FINNIGAN et al.) 08 February 2007 (08.02.2007) especially para [0042]-[0043]	19-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2011 (28.06.2011)		Date of mailing of the international search report 08 JUL 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSF: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573 A	

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

(72)発明者 モンターナー, ホアン

スペイン国 エ - 0 8 0 3 7 バルセロナ、5° 1ア、1 4 9、パセッチ サン ホアン

(72)発明者 デルガード マルティネス, マリア, ビラール

スペイン国 エ - 0 8 9 7 0 サン ホアン デスピ、3° 4°、2 5、カレール バルタザール
デスパニーヤ

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ32 QR72 QS39 QX04

4C084 AA17 AA19 AA20 MA02 NA05 NA14 ZA36 ZA42 ZA54 ZC20

4C086 AA01 AA02 BC19 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA36 ZA42

ZA54 ZC20