(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월07일
(11) 등록번호 10-2248900
(24) 등록일자 2021년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G16H 10/40* (2018.01)
G16H 50/20 (2018.01) *G16H 50/30* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G16H 10/40 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7013434(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년09월28일
심사청구일자 2020년05월28일
(85) 번역문제출일자 2020년05월11일
(65) 공개번호 10-2020-0055804
(43) 공개일자 2020년05월21일
(62) 원출원 특허 10-2014-7011813
원출원일자(국제) 2012년09월28일
심사청구일자 2017년09월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/058060
(87) 국제공개번호 WO 2013/049674
국제공개일자 2013년04월04일
(30) 우선권주장
61/541,828 2011년09월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060031809 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
소마로직, 인크.
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 윌더니스 플레이스 2945
(72) 발명자
질 로잘린 다이앤
357 캐년사이드 드라이브 볼더, 콜로라도 80302, 미국
윌리암스 스테판 얼라릭
1188 포레스트 아베뉴 볼더, 콜로라도 80304 미국
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 **심혈관 위험 사건 예측 및 그것의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 5년 이내의 심혈관(CV) 질환의 위험을 예측하기 위한 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트에 관한 것이다. 상기 바이오마커는 5년 이내의 심혈관 질환의 위험을 예측하기 위해 단독 또는 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 본 발명은 개인에서의 5년 이내의 심혈관 질환의 위험을 예측하기 위한 방법을 제공하며, 여기에서 상기 방법은 개인으로부터 얻은 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 바이오마커 값을 검출하는 것을 포함하며, 상기 바이오마커는 바이오마커의 군으로부터 선택된다.

대 표 도 - 도1a

(52) CPC특허분류
G16H 50/20 (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01)
G01N 2333/96494 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자
스튜어트 알렉스 에이 이
175 스톤크레스트 드라이브 샌프란시스코, 캘리포니아 94132 미국
메홀러 로버트
4702 엘도라도 스프링 드라이브 볼더 콜로라도 80303 미국
포먼 트루디
2608 캐리지 힐스 드라이브 볼더 콜로라도 80302 미국
싱어 브리타
2090 다트마우스 아베뉴 볼더 콜로라도 80305 미국

(56) 선행기술조사문헌
KR1020080091185 A*
US20080057590 A1*
US20110003707 A1*
US20110015865 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

개인으로부터의 생물학적 샘플에서 바이오마커들의 값을 검출하는 단계, 및 상기 바이오마커들의 값에 기초하여 개인이 심혈관 사건(cardiovascular event)에 대한 증가된 위험 가능성이 있는지를 결정하는 단계를 포함하는 심혈관 사건에 대한 위험성 평가를 위한 개인을 모니터링하는 방법으로,

상기 바이오마커들은 suPAR, GDF-11, ATS13, Spondin-1, MMP-12 및 TFF3을 포함하는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 값을 검출하는 것은 시험관 내(*in vitro*) 검정을 수행하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 시험관 내 검정은 각각의 바이오마커에 대응하는 적어도 하나의 포획 시약(capture reagent)을 포함하며, 압타머(aptamers), 항체(antibodies) 및 핵산 프로브(nucleic acid probe)로 이루어진 군으로부터의 적어도 하나의 포획 시약을 선택하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 전혈(whole blood), 건조 혈액 표본(dried blood spot), 혈장(plasma), 혈청(serum) 및 소변(urine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 개인은 상기 바이오마커 값 및 적어도 한 항목의 상기 개인에 해당하는 추가 생물학적 정보에 기초하여 심혈관 사건의 위험에 대하여 평가되며,

여기에서 상기 적어도 한 항목의 추가 생물학적 정보는

(a) 이전 심근경색증(myocardial infarction), 하나 또는 그 이상의 관상 동맥(coronary vessel)에서의 50%를 넘는 혈관 조영의 증거(angiographic evidence), 트레드밀(treadmill) 또는 핵실험(nuclear testing) 또는 이전의 관상동맥 재개술(coronary revascularization)에 의한 운동 유발 허혈(exercise-induced ischemia)로 이루어진 군으로부터 선택된 심혈관 위험 인자의 존재에 해당하는 정보;

(b) 상기 개인의 신체 설명서(physical descriptor)에 해당하는 정보;

(c) 상기 개인의 체중 변화에 해당하는 정보;

(d) 상기 개인의 민족성에 해당하는 정보;

(e) 상기 개인의 성별에 해당하는 정보;

(f) 상기 개인의 흡연력에 해당하는 정보;

(g) 상기 개인의 음주력에 해당하는 정보;

(h) 상기 개인의 직업 경력에 해당하는 정보;

(i) 상기 개인의 심혈관질환 또는 다른 순환계(circulatory system) 질환의 가족력에 해당하는 정보;

(j) 상기 개인 또는 상기 개인의 가족 구성원에서 심혈관 질환의 고위험과 관련이 있는 적어도 하나의 유전적 마커(genetic marker)의 상기 개인에서의 존재 또는 부재에 해당하는 정보;

(k) 상기 개인의 임상적 증상에 해당하는 정보;

(l) 다른 실험실 실험(laboratory test)에 해당하는 정보;

(m) 상기 개인의 유전자 발현값에 해당하는 정보;

(n) 상기 개인의 포화지방이 많이 든(saturated fats), 고염(high salt) 식이와 같은 공지의 심혈관질환 위험 인자의 섭취에 해당하는 정보;

(o) 심전도(electrocardiogram), 심장 초음파(echocardiography), 경동맥 내중막 두께(intima-media thickness)에 대한 경동맥 초음파(carotid ultrasound), 혈류매개 혈관확장(flow mediated dilation), 동맥 맥파 속도(pulse wave velocity), 발목 상완 지수(ankle-brachial index), 스트레스 심장초음파 검사(stress echocardiography), 심근 관류 영상(myocardial perfusion imaging), CT에 의한 관상동맥의 칼슘(coronary calcium), 고해상도의 CT 혈관조영(high resolution CT angiography), MRI 영상 및 다른 영상 기법을 포함하는 개인의 영상 연구에 해당하는 정보; 및

(p) 상기 개인의 투약(medication)에 대한 정보;

로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

집단의 개인으로부터의 생물학적 샘플에서, 바이오마커들의 값을 검출하는 단계를 포함하며, 집단에서 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 방법으로,

상기 개인은 상기 바이오마커들의 값에 기초하여 심혈관 사건의 위험에 대하여 평가되고, 상기 바이오마커들은 suPAR, GDF-11, ATS13, Spondin-1, MMP-12 및 TFF3을 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

a) 심혈관 질환의 이전 병력을 가지거나 가지지 않는 집단; 및

b) 변이(mutations), 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism) 및/또는 삽입/결실을 포함하는 유전적 위험 인자를 가지거나 가지지 않는 집단;

으로 이루어지는 군으로부터 선택된 특징을 기초로 집단을 선별하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 개인에 대한 심혈관 사건에 대하여 평가된 위험은

a) 증가되거나 감소되는 질병 관리 프로그램에 대한 다른 카테고리;

b) 생명 보험 적용 범위에 관하여 다른 위험 카테고리;

c) 건강 보험 적용 범위에 관하여 다른 위험 카테고리;

d) 협력(partnership)을 위한 후보(candidacy)의 다른 카테고리;

e) 심혈관 치료의 임상시험에 들어가기 위한 자격의 다른 카테고리;

f) 심혈관 치료 또는 임의의 치료에 대한 심장 혈관의 안전성에 관한 다른 위험 카테고리;

로 이루어진 군으로부터 선택되는 카테고리로 그것들의 계층화(stratification)를 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

바이오마커 값을 검출하는 것은 시험관 내(*in vitro*) 검정을 수행하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시험관 내 검정은 각각의 상기 바이오마커에 대응하는 적어도 하나의 포획 시약(capture reagent)을 포함하며, 압타머(aptamers), 항체(antibodies) 및 핵산 프로브(nucleic acid probe)로 이루어진 군으로부터의 적어도 하나의 포획 시약을 선택하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 전혈(whole blood), 건조 혈액 표본(dried blood spot), 혈장(plasma), 혈청(serum) 및 소변(urine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

개인에 대한 바이오마커 정보를 컴퓨터상에서 검색하는 단계로, 상기 바이오마커 정보는 바이오마커들의 값을 포함하고;

각각의 상기 바이오마커들의 값의 분류를 컴퓨터로 수행하는 단계; 및

복수개의 분류에 기초하여 상기 개인에 대한 심혈관 사건 위험의 평가 결과를 보여주는 단계; 를 포함하는, 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 컴퓨터에 의해 실행되는(computer-implemented) 방법으로,

상기 바이오마커들은 suPAR, GDF-11, ATS13, Spondin-1, MMP-12 및 TFF3을 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

개인에 대한 심혈관 사건의 위험 평가 결과를 보여주는 것은 컴퓨터 디스플레이 상에 결과를 보여주는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

개인으로부터의 생물학적 샘플로부터 얻은 데이터를 검색하는 코드로, 상기 데이터는 바이오마커 값을 포함하며, 여기에서 상기 바이오마커는 상기 생물학적 샘플에서 검출되고; 및

상기 바이오마커 값의 함수로서 개인의 심혈관 사건에 대한 위험 평가 결과를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드; 를 포함하는 혈관 사건 위험을 평가하기 위한 프로그램을 포함하는, 컴퓨터 판독가능한 매체(computer readable medium)로,

상기 바이오마커들은 suPAR, GDF-11, ATS13, Spondin-1, MMP-12 및 TFF3을 포함하는 것인, 컴퓨터 판독가능한 매체.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 분류 방법은 연속 측정 스코어(continuous measurement score)를 사용하거나 두 개 또는 그 이상의 종류로 분류하는 것을 특징으로 하는, 컴퓨터 판독가능한 매체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 그 전체가 본원에 통합되어 있는 2011년 9월 30일자로 출원된 동시 계류중인 미국 특허출원번호 제 61/541.828호로부터 우선권의 이점을 청구한다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 바이오마커의 검출 및 개인에게서 미래의 심혈관(Cardiovascular, CV) 사건의 위험을 평가하는 방법에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 5년의 기간에 걸쳐 심혈관 사건이 발생할 위험의 예측을 위해 개개인을 평가하는데 사용되는 하나 또는 그 이상의 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트에 관한 것이다. 이와 같은 질환은 심근경색증(myocardial infarction), 뇌졸중(stroke), 울혈성 심부전(congestive heart failure) 또는 사망을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

배 경 기 술

[0003] 하기의 설명은 본 발명에 관련된 정보의 요약을 제공하며, 본원에 제공된 임의의 정보 또는 인용된 문헌들이 본 출원의 선행기술임을 인정하는 것은 아니다.

[0004] 심혈관 질환(Cardiovascular disease)은 미국에서의 사망의 주된 원인이다. 임상시험 및 치료의 시도에 널리 사용되는 최초 사건(primary events)(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 fo rthe Assessment of Global Cardiovascular Risk in Women" JAMA 297(6):611-619 (2007)) 및 2차 사건(secondary events)(Shlipak, M. et al. "Biomarkers to Predict Recurrent Cardiovascular Disease: The Heart & Soul Study" Am. J. Med. 121:50-57 (2008))의 위험에 대한 수많은 기존의 중요한 예측 변수가 존재한다. 유감스럽게도, 수신자 조작 특성 곡선(receiver operating characteristic curve), 위험률(hazard ratio) 및 일치(concordance)는 기존의 위험 인자 및 바이오마커의 성능이 보통임을 보여준다(0.75까지의 AUC는 이 인자들이 코인 플립(coin-flip)과 완벽 사이의 중간일 뿐임을 의미한다). 향상된 진단 성능에 대한 필요 이외에, 개인에 대한 유익한(그리고 파괴적인) 개입(intervention) 및 생활방식의 변화 내에서 근시일 내에 개인적으로 반응하는 위험 제품(risk product)이 필요하다. 통상적으로 사용되는 프래밍햄 방정식(framingham equation)은 세 가지 주된 문제를 가진다. 첫째, 그것은 너무 장기적이다: 그것은 10년의 위험 판단(risk calculations)을 제공하지만, 인간은 미래 위험을 무시하며 그것들에 기초하여 거동 및 생활방식을 변경하는 것을 꺼린다. 둘째, 그것은 개입에 즉각 대응하지 않는다: 그것의 가장 비중이 높은 인자는 변화시킬 수 없는 생활 연령(chronological age)이다. 셋째, 본원에서 구상된 고위험 집단 내에서, 프래밍햄 인자는 고위험 및 저위험을 잘 구별하지 못한다: 상위 사분위수(high quartile)와 하위(low) 사분위수 사이의 위험률은 단지 2이다.

[0005] 심혈관 질환에 대한 위험 인자는 의학적 치료의 강도 및 특성을 동인(drive)하는데 널리 사용되며, 그것의 사용은 확실히 지난 20년간에 걸쳐 관찰된 심혈관질환 이환율(morbidity) 및 사망률(mortality)을 감소시키는데 공헌하였다. 이들 인자는 관례대로 알고리즘으로 통합되지만, 불행히도 그것들은 모든 위험을 포착하지 않는다(심장 질환에 대한 가장 흔한 초기 지표(initial presentation)는 여전히 사망이다). 사실, 그것들은 아마도 단지 위험의 절반만을 포착할 것이다. 0.76까지의 ROC 곡선 아래 면적은 이러한 위험 인자에서 흔히 볼 수 있으며, 이따금 단지 0.5에서의 코인 플립 및 1.0에서의 완벽 사이의 중간쯤에 있다.

[0006] 임상적 위험 스코어(clinical risk score)를 위한 신규한 바이오마커의 추가는 기대에 미치지 못하였다. 예를 들면, 3209 명을 대상으로 한 프래밍햄 연구에서, 10개의 바이오마커(CRP, BNP, NT-proBNP, 알도스테론(aldosterone), 레닌(renin), 피브리노겐(fibrinogen), D-이합체(D-dimer), 플라스미노겐-활성화인자 억제자 타입 1(plasminogen-activator inhibitor type 1), 호모시스테인(homocysteine) 및 뇨중 알부민-크레아티닌 비율(urinary albumin to creatinine ratio))의 추가는 기존의 위험 인자에 추가되었을 때 AUC를 현저하게 향상시키지는 못하였다: 0-5년간 사건에 대한 AUC는 나이, 성별 및 기존의 위험 인자를 사용하여 0.76이었고, 조합에 추가된 최고의 조합의 바이오마커를 사용하여 0.77이었다(Wang et al., "Multiple Biomarkers for the Prediction of First Major Cardiovascular Events and Death" N. Eng. J. Med. 355:2631-2637 (2006)).

[0007] 보다 높은 위험을 가지는 개인에 대한 더 적극적인 치료는 결과를 개선시킬 수 있으므로, 1-10년 내 심혈관질환 위험이 높은 환자의 조기 확인은 중요하다. 따라서, 최적의 관리는 심혈관질환 위험이 높은 것으로 여겨지는 환자들에게 심혈관질환의 위험을 감소시키기 위한 적극적인 개입을 요구하는데 반하여, 심혈관질환 위험이 보다 낮은 환자들은 환자에게 어떠한 이로운 영향도 미치지 않을, 비용이 많이 들고 아마도 외과적인 치료를 겪지 않

아도 될 것이다.

[0008] 정해진 기간 내에 특정 질병 상태 또는 질환을 가질 위험의 예측을 위한 바이오마커의 선별은 첫째로 특정 의료의 적용을 위한 기간 동안 질환이 발생하거나 발생하지 않은 집단 내에서 측정가능하고 통계학적으로 현저한 차이를 가지는 마커의 확인을 포함한다. 바이오마커는 질병 또는 질환의 발생(development) 또는 진행(progression)과 병행하며, 심혈관 조직 또는 주변 조직 및 심혈관질환에 반응하는 순환 세포(circulating cells)로부터 혈류 내로 쉽게 분산되는, 분비되거나 발산되는 분자들을 포함할 수 있다. 확인된 바이오마커 또는 일련의 바이오마커는 일반적으로 임상적으로 입증되거나, 그것이 선별된 원래의 의도된 용도를 위한 믿을만한 지표(indicator) 임을 보여준다. 바이오마커는 소분자(small molecules), 펩티드(peptides), 단백질(proteins) 및 핵산(nucleic acids)을 포함할 수 있다. 바이오마커의 확인에 영향을 미치는 몇몇의 주요 문제들은 이용가능한 데이터의 오버-피팅(over-fitting) 및 데이터에서의 편견(bias)을 포함한다.

[0009] 다양한 방법들이 바이오마커를 확인하고 질병 또는 질환을 가질 위험을 진단 또는 예측하기 위한 시도에 사용되어 왔다. 단백질-기반 마커(protein-based markers)에 대하여, 이것들은 2차원 전기영동법(two-dimensional electrophoresis), 질량 분석법(mass spectrometry) 및 면역학적 검정법(immunoassay methods)을 포함한다. 핵산 마커(nucleic acid markers)에 대하여, 이것들은 mRNA 발현 프로파일(mRNA expression profiles), 마이크로 RNA 프로파일(microRNA profiles), FISH, 유전자 발현 연속분석(serial analysis of gene expression; SAGE) 및 대규모 유전자 발현 어레이(large scale gene expression array), 유전자 서열분석(sequencing) 및 유전자형 분류(genotyping)(SNP 또는 소 변이체 분석)를 포함한다.

[0010] 2차원 전기영동법의 유용성은 낮은 검출 민감도; 단백질 용해도(protein solubility), 전하(charge) 및 소수성(hydrophobicity)의 문제점; 겔 재생력(gel reproducibility); 및 다중 단백질(multiple proteins)을 나타내는 단일 스팟(single spot)의 가능성에 의해 제한된다. 질량 분석에 대하여, 사용된 포맷에 따라, 제한사항은 샘플 처리 및 분리, 존재비가 낮은(low abundance) 단백질에 대한 민감도, 신호에 대한 잡음의 고려 및 검출된 단백질을 즉시 확인할 수 없음에 중점을 두고 있다. 바이오마커 발굴에 대한 면역학적 검정법 접근에서의 제한사항은 다수의 분석물(analytes)을 측정하기 위한 항체-기반 다중 분석(antibody-based multiplex assay)의 불가능에 중점을 두고 있다. 어떤 것은 고성능 항체의 어레이를 간단하게 찍을 수 있고, 샌드위치 검정을 사용하지 않고 그 항체들에 결합한 분석물을 측정할 수 있다. (이것은 생물 또는 세포에서 모든 DNA 또는 RNA 서열을 혼성화(hybridization)에 의해 측정하기 위하여 핵산 서열의 모든 게놈을 사용하는 것과 형식적으로 일치할 것이다. 혼성화는 확인을 위한 엄격한 테스트이기 때문에 상기 혼성화 실험은 도움이 된다. 그 매트릭스와 함께 단백질은 극도로 상이한 존재비(abundances)를 가지기 때문에, 오히려 매우 우수한 항체는 혈액 또는 오히려 세포 추출물의 맥락에서 작동하기 위한 그것들의 결합 파트너를 선택하는 데 충분히 엄격하지 않다.) 따라서, 그것은 바이오마커 발굴에 대한 면역학적 검정법에 기초한 접근법과는 상이한 접근법을 사용하여야만 한다 - 그것은 많은 분석물을 측정하는데 충분한 엄격함을 가짐과 동시에 분석물이 정말로 바이오마커인가를 결정하기 위한 다중 ELISA 검정법(즉, 샌드위치 검정법)을 사용할 필요가 있을 것이다. 샌드위치 면역학적 검정(sandwiches immunoassays)은 높은 함량에 대해서는 평가할 수 없으므로, 엄격한 샌드위치 면역검정법을 사용하는 바이오마커 발굴은 표준 어레이 포맷을 사용할 수 없다. 마지막으로, 항체 시약(antibody reagents)은 실질적인 로트(lot)의 변경(variability) 및 시약 불안정(instability)에 영향을 받기 쉽다. 단백질 바이오마커 발굴에 대한 즉석 플랫폼(instant platform)은 이 문제를 극복한다.

[0011] 이 방법들 중 다수는 분석 이전에 어떤 형태의 샘플 분리(sample fractionation)를 요하거나 그것에 의존한다. 따라서, 일련의 잘 확립된 샘플 집단에서 통계적으로 유의한 바이오마커를 확인/발굴하도록 설계된 충분히 효력이 있는 연구를 수행하기 위하여 요구되는 샘플의 조제는 매우 어렵고, 비용이 들며 시간이 소요된다. 분리(fractionation)하는 동안, 다양한 변경들이 다양한 샘플들에 도입될 수 있다. 예를 들어, 잠재적인 마커는 처리에 대하여 불안정할 수 있고, 상기 마커의 농도가 변경될 수 있고, 부적절한 응집(aggregation) 또는 분해(disaggregation)가 발생할 수 있으며, 우발적인 샘플 오염이 발생할 수 있으므로, 분명하지 않고 미세한 변화는 질병 초기에 예견된다.

[0012] 이 기술들을 사용하는 바이오마커 발굴 및 검출 방법이 진단적 바이오마커의 확인에 심각한 한계를 가진다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다. 이 한계들은 존재비가 낮은(low-abundance) 바이오마커의 검출 불가능, 전체 동적 범위(entire dynamic range)의 프로테옴(proteome)을 지속적으로 포함하는 것의 불가능, 샘플 처리 및 분리에서의 비재현성(irreproducibility) 및 방법의 전체적인 비재현성 및 견고성(robustness)의 결여를 포함한다. 게다가, 이러한 연구들은 데이터에 편견이 개입되어 있으며, 표적 질병 집단 내에서 바이오마커를 확인하고 입증하는 데 요구되는 분포(distribution) 및 랜덤화(randomization)의 관점에서, 적절한 대조군을 포함하는

샘플 집단의 복잡성을 충분하게 처리할 수 없다.

[0013] 비록 신규하고 효과적인 바이오마커의 발굴을 목표로 한 노력들이 수십 년 동안 계속되고 있지만, 이 노력들은 대체적으로 성공하지 못하였다. 다양한 질병들에 대한 바이오마커들은 전형적으로 학술 실험실에서, 주로 어떤 질병 과정에 대한 기초 연구를 하는 동안에 우연한 발견을 통하여 확인되어 왔다. 이러한 발견과 적은 양의 임상 데이터들에 기초하여, 신규한 바이오마커의 확인을 시사하는 논문들이 공개되었다. 그러나, 테스트된 적은 수의 임상 샘플들은 단지 효과적인 바이오마커가 실제 발굴되었는지에 대한 설득력이 없는 통계적인 증거만을 제공하기 때문에, 이들 제안된 바이오마커들 중 대부분은 실제로 또는 유용한 바이오마커로서 확인되지 않았다. 즉, 초기의 확인은 통계학의 기본적인 요소에 대하여 엄격하지 않았다. 각각 1994년에서 2003년도에 있어서, 과학 문헌의 검색은 바이오마커에 대한 수천의 참조문헌들이 공개되어 있음을 보여준다. 그러나, 같은 시기 동안 FDA는 기껏해야 1년에 3개의 신규한 단백질 바이오마커만을 진단용으로 승인했을 뿐이며, 몇 년간 어떠한 신규한 단백질 바이오마커도 승인되지 않았다.

[0014] 실패한 바이오마커 발굴에 대한 노력의 역사에 기초하여, 질병 및 질환이 발생할 위험의 진단(diagnosis), 예후 예측(prognosis) 또는 예측(prediction)을 위한 바이오마커는 희귀하며 발굴하기 어렵다는 일반적인 이해를 더 촉진하는 수학적 이론들이 제안되었다. 2D 겔 또는 질량 분석법에 기초한 바이오마커 연구는 이러한 개념들을 지지한다. 매우 적은 수의 유용한 바이오마커들이 이러한 접근법을 통하여 확인되었다. 그러나, 2D 겔 및 질량 분석법은 대략 1nM 농도 및 그보다 높은 농도로 혈액에 존재하는 단백질을 측정하며, 이 단백질의 앙상블은 아마도 질병과 함께 변하지 않을 것이라는 것이 주로 간과되었다. 즉석 바이오마커 발굴 플랫폼(instant biomarker discovery platform) 외에, 더욱 낮은 농도에서 단백질 발현 수준을 정확하게 측정할 수 있는 프로테오믹 바이오마커 발굴 플랫폼은 존재하지 않는다.

[0015] 복잡한 인간 생물학에 대한 생화학적 경로들은 대부분 알려져 있다. 많은 생화학적 경로들은 결국 병리학 내에서 국소적으로 작용하는 분비된 단백질들, 예를 들어 병리학에서 다른 세포들의 복제를 자극하도록 분비되는 성장 인자에 의해 개시되며, 다른 인자들은 면역계 등을 피해 분비된다. 많은 이러한 분비된 단백질들이 측분비 방식(paracrine fashion)으로 작용하는 반면, 몇몇은 신체에서 말초적으로(distally)으로 작용한다. 생화학적 경로에 대한 기초적인 이해를 가진 당업자들은 많은 병인-특이적(pathology-specific) 단백질들이 2D 겔 및 질량 분석법의 검출 한계 이하(심지어는 그보다 더 낮은)의 농도로 혈액에 존재한다는 것을 이해할 것이다. 이 상대적으로 풍부한 수의 질병 바이오마커의 확인에 선행되어야만 하는 것은 2D 겔 또는 질량 분석법에 의해 검출가능한 정도 이하의 농도에서 단백질을 분석할 수 있는 프로테오믹 플랫폼이다.

[0016] 상기 언급한 바와 같이, 심혈관 사건은 이와 같은 사건에 대한 경향이 정확하게 측정될 수 있다면 적극적인 치료에 의해 예방될 수 있다. 기존의 다중-마커 테스트들은 개인으로부터의 다중 샘플의 수집을 요하거나 샘플이 다중 검정법 사이에서 분리될 것을 요한다. 최적으로는, 개선된 테스트는 단지 단일 혈액, 소변 또는 다른 샘플 및 단일 검정법만을 필요로 할 것이다. 따라서, 5년 내의 심혈관질환을 예측할 수 있는 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트의 존재를 필요로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 따라서, 본 발명은 5년 내의 심혈관질환을 예측할 수 있는 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0018] **발명의 요약**

[0019] 본 발명은 5년 내에 심혈관 사건을 가질 위험을 예측하기 위한 바이오마커, 방법, 시약, 기구, 시스템 및 키트를 포함한다. 본 발명의 바이오마커는 실시예 1 및 2에 상세히 기술되어 있는 다중 소마머-기반 검정법(multiple SOMAmer-based assay)을 사용하여 확인되었다. 본원에 기술된 소마머-기반 바이오마커 확인 방법을 사용함으로써, 본 발명은 놀랍게도 심혈관 사건의 예측에 유용한 다수의 심혈관사건 바이오마커를 기술한다. 심혈관 사건의 위험과 관련된 바이오마커를 발견하는데 사용된 샘플 집단은 이전의 심근경색증(myocardial infarction), 하나 또는 그 이상의 관상 동맥(coronary vessel)에서의 50%를 넘는 협착의 발생, 트레드밀(treadmill) 또는 핵실험(nuclear testing) 또는 이전의 관상동맥 재개술(coronary revascularization)에 의한 운동 유발 허혈(exercise-induced ischemia)을 포함하는, 이미 심혈관 질환을 가지는 집단에서 관상동맥질환

(coronary artery disease)을 연구하는 전향적 코호트 연구(cohort study)인 하트 앤 소울 연구(Heart & Soul study)로부터 얻었다. 연구 집단에 대한 심혈관 사건의 형태 및 시기는 표 4에 나타내었다. 이들 심혈관 사건의 바이오마커를 확인하는데 있어서, 900명이 넘는 개개인의 샘플로부터 얻어진 1000개가 넘는 단백질을 측정하였으며, 그것들 중 몇몇은 극히 낮은(femtomolar) 수준의 낮은 농도로 측정되었다. 이는 2D 겔 및/또는 질량 분석법으로 처리되는 바이오마커 발굴 실험보다 약 10의 4승 정도 낮은 것이다.

[0020] 기술된 심혈관 사건 바이오마커 중 어떤 것은 심혈관 사건을 가질 위험을 예측하는데 단독으로 유용하긴 하지만, 바이오마커의 패널로서 유용한 심혈관 사건 바이오마커의 다중 서브셋(multiple subsets)의 분류를 위한 방법을 본원에 기술하였다. 일단 개개인의 바이오마커 또는 바이오마커의 서브셋이 확인되면, 개인에서의 심혈관 사건을 가질 위험의 예측은 생물학적 샘플에서 선별된 바이오마커 또는 바이오마커들의 레벨 차이를 측정할 수 있는 임의의 검정 플랫폼(assay platform) 또는 포맷(format)을 사용하여 달성될 수 있다.

[0021] 그러나, 그것은 본원에 기재된 소마머-기반 바이오마커 확인 방법을 사용함으로써만 가능하며, 여기에서 1000개가 넘는 별개의 잠재적인 바이오마커 값들이 본원에 기재된 심혈관 사건 바이오마커를 확인할 수 있는, 5년의 기간 내에 심혈관 사건을 가지거나 심혈관 사건이 아닌 것으로 진단된 다수의 개인들로부터 개별적으로 선별된다. 이 발견적 접근은 인체 병리학에 대한 해석을 필요로 하지 않는 환자 중심의 시스템(patient-relevant system)에 대해 더욱 많은 문의를 제기하므로, 조건 배지(conditioned media) 또는 용해된 세포(lysed cells)로부터의 바이오마커의 발견과는 극명히 대조된다.

[0022] 따라서, 본 발명의 일 양상에서, 본 발명은 5년의 기간 내에 심혈관 사건이 발생할 위험을 예측하기 위하여 단독 또는 다양한 조합으로 사용하기 위한 하나 또는 그 이상의 바이오마커를 제공한다. 예시적 구현은 상기 언급한 바와 같이 표 1, Col. 7, "PUBLIC_NAME"에 제공되며, 실시예 1에서 일반적으로 기술되고 실시예 2에서 더욱 특별히 기술되는 다중 소마머-기반 검정법을 사용하여 확인되는 바이오마커를 포함한다. 표 1에 제공된 마커들은 5년의 기간 내에 심혈관 사건을 가질 위험의 예측에 유용하다. 표 2 및 표 3으로부터의 바이오마커들은 각각 기술적으로 덜 복잡하며 보다 적은 비용으로 동일한 일을 수행하도록 수를 줄이기 위한 표 1로부터의 155개의 바이오마커의 감소를 보여주지만, 유사한 효능을 가지는 다른 조합들은 표 1로부터 편집될 수 있다.

[0023] 기술된 심혈관 사건 바이오마커 중 어떤 것은 5년 내의 심혈관 사건의 위험을 예측하는데 단독으로 유용하긴 하지만, 두 개 또는 그 이상의 바이오마커의 패널로서 각각 유용한 심혈관 사건 위험 바이오마커의 다중 서브셋의 분류를 위한 방법을 본원에 기술하였다. 따라서, 본 발명의 다양한 구현들은 N의 바이오마커를 포함하는 조합을 제공하며, 여기에서 N은 적어도 두 개의 바이오마커이다. 다른 구현에서, N은 2-155의 바이오마커로부터 임의의 수로 선택된다.

[0024] 여전히 다른 구현에서, N은 2-7, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 2-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 3-7, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 3-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 4-7, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 4-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 5-7, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 5-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 6-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 7-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-35, 8-40, 8-45, 8-50, 8-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 8-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 9-15, 9-20, 9-25, 9-30, 9-35, 9-40, 9-45, 9-50, 9-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 9-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 10-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. N은 유사한 범위를 포함하나 더 고차의 범위를 포함하도록 선택될 수 있음을 알 수 있을 것이다.

[0025] 상기 언급한 바와 같이, 심혈관 사건은 이와 같은 질환에 대한 경향이 정확하게 측정될 수 있다면 적극적인 치료에 의해 예방될 수 있다. 기존의 다중-마커 테스트들은 개인으로부터의 다중 샘플의 수집을 요하거나 샘플이 다중 검정법 사이에서 분리될 것을 요한다. 서로 다른 분석물 형태(지질, 단백질, 대사물질) 또는 분석물의 패

널들에 대한 다중 샘플보다는 단일 검정법으로 측정되는 단일의 생물학적 샘플만을 필요로 하는 예후 평가(prognostic assay)를 제공하는 것이 바람직할 것이다. 다중 샘플 수집을 이용한 테스트는 수행하는 사람에게 더욱 복잡하며, 이것은 채택에 대한 장애를 형성하기 때문에, 단일 샘플 테스트의 가장 중심이 되는 이점은 사용 현장에서의 간단함(simplicity)이다. 추가적인 이점은 다중 단백질을 위한 단일 검정에서 그 단일 샘플을 분석하는 것으로부터 얻어진다. 단일 검정법은 다중 검정 결과를 함께 조정하기 때문에 원하지 않는 변화를 경감시켜야 한다. 본 발명의 기초를 형성하는 테스트는 이와 같은 "단일 샘플(single sample), 단일 검정(single assay)" 테스트이다. 이 단일 샘플과 단일 검정의 조합은 다중 샘플을 수집하는 것의 실행 복잡성과 다중의 독립된 분석 절차를 위하여 다중의 앨리컷으로 샘플을 나누는데 관련된 문제들 및 생물학적 위험을 해결하는 이 심혈관 사건 위험 테스트의 신규한 특성이다.

[0026] 심혈관 질환은 다양한 생물학적 프로세스와 조직을 포함하는 것으로 알려져 있다. 심혈관 질환과 관련하여 잘 알려져 있는 생물학적 시스템과 프로세스의 예는 염증(inflammation), 혈전증(thrombosis), 질병-관련 혈관신생(disease-associated angiogenesis), 혈소판 활성화(platelet activation), 대식세포 활성화(macrophage activation), 간 급성 반응(liver acute response), 세포외 기질 재형성(extracellular matrix remodelling) 및 신장 기능(renal function)이다. 이들 프로세스는 성별(gender), 폐경기 상태(menopausal status) 및 연령(age)의 기능으로서 관찰될 수 있으며, 응고(coagulation) 및 혈관 기능(vascular function)의 상태에 따른다. 이들 시스템은 부분적으로 단백질에 기초한 신호전달 시스템을 통해 전달되며, 다중 단백질은 단일 혈액 샘플에서 측정될 수 있으므로, 본 발명은 심혈관 질환에 관련된 특정 생물학적 시스템과 프로세스에서의 단백질에 초점을 맞춘 단일 샘플, 단일 검정, 다중 단백질에 기반한 테스트를 제공한다.

[0027] 본원에 언급한 바와 같이, 심혈관 사건에 대한 위험을 측정하는 것의 중요한 기능 중 하나는 치료 및 식이(diet) 및 운동(exercise)과 같은 행동 변화에 대응하여 프로세스를 평가할 수 있는 것이다. 프래밍햄 방정식과 같은 현재의 위험 예측 방법은 명백하게 관련이 있는 임상학적 공변량 정보(covariate information)를 포함하며, 가장 큰 이와 같은 인자는 피험자의 연령이다. 이것은 비록 그것이 집단에 대해서는 정확할 수 있다 할지라도, 개개인의 위험에서의 변화를 관찰하는데 있어서 프래밍햄 방정식을 덜 유용하게 만든다. 이 심혈관 사건 위험 테스트의 신규한 특성은 그것이 예상 모델(prognostic model)의 일부로서 연령을 필요로 하지 않는다는 것이다. 본 발명은 노화의 생물학적 변화 내에 가변적이므로 위험을 평가하는데 사용하기에 훨씬 나은 유발 물질(causal factor)이 있다는 전제를 기반으로 하고 있다. 본 발명은 연령 그 자체는 질병의 유발 물질이 아니며, 이 연령은 근본적인 생명작용에 대한 대용(surrogate) 또는 대리(proxy)로서 작용한다는 믿음을 전제로 한다. 연령은 사실 심혈관질환의 예후이긴 하지만, 그것은 개인의 개선을 평가하는데 사용될 수 없으며, 짐작컨대 연령의 영향은 생물학적 기능을 통해 매개된다. 이 영향은 관련 생명작용의 측정을 통하여 훨씬 잘 측정될 수 있다. 본 발명에서, 대상이 되는 단백질은 질병의 생명작용에 관련된 것이다. 따라서, 본 발명은 심혈관질환의 연령과 위험 간의 연관성에 반영된 생물학적 정보를 수집한다. 사실, 단백질에 기반한 우리의 위험 모델에 연령에 대한 인자를 추가하는 것은 질환을 예측하는 성능을 향상시키지 못한다.

[0028] 심혈관 질환에 관련된 다수의 프로세스로부터 단백질을 확인하기 위한 전략은 다양한 사건 또는 증상을 가지는 광범위/다양한 심혈관 질환 환자를 제공하는 파라미터를 선택해야만 한다. 심혈관 질환은 다양한 종류로 이루어져 있기 때문에, 사건은 두 가지의 주된 사건의 종류: 혈전증(thrombotic) 및 심부전(CHF) 관련 사건을 포함한다. 몇몇의 표출된 사건들은 특정 진단 정보(예를 들어, 집에서 사망)가 부족할 수 있다. 이들 심혈관 질환의 특성을 고려하여, 본 발명의 테스트는 넓은 범위의 사건들로부터 얻은 혈액 샘플에서 심혈관 질환과 관련된 생물학적 프로세스에 관여하는 단백질을 측정함으로써 개발되었다. 이 전략은 결과적으로 질병에 관련된 다양한 프로세스(예를 들어, 혈관신생, 혈소판 활성화, 대식세포 활성화, 간 급성 반응, 다른 림프구 염증, 세포외 기질 재형성 및 신장 기능)로부터 얻은 정보를 포함하게 되었다. 심혈관 질환을 위한 다중 단백질 기반 예측 단일 샘플 테스트를 개발하기 위하여 선택된 연구 집단은 "하트 앤 소울" 연구로부터의 고위험 피험자군이었다. 심혈관 질환의 비율이 높은 이 일련의 피험자들을 선택함으로써, (사건이 극히 드문) 일반 집단에서 가능한 것보다 더 정확하게 위험과 관련된 단백질을 측정할 수 있었다. 이 고위험군에서의 피험자 테스트의 개발은 공통의 생명작용 때문에 일반화될 수 있는 단백질 바이오마커 조합의 확인이 가능하다. 그 결과, 본 발명의 테스트 및 바이오마커는 "하트 앤 소울" 연구의 엔트리 기준(entry criteria)과 매칭되는 개인들보다 더 큰 집단에서 사건을 예측하는데 생각보다 효과적일 것이다.

[0029] 상기 언급한 바와 같이, 심혈관 질환은 혈관 응고 시스템(blood coagulation system), 염증성 백혈구(inflammatory white blood cells) 및 혈소판 활성화를 포함한다. 신체에서 이들 시스템의 활성화로부터의 신호는 혈장 샘플로부터 혈소판 및 백혈구가 단지 부분적으로만 스핀 다운되는 샘플 제조에 있어서의 흔한 실수

때문에 잘 알려져 있지 않다. 만약 이들 세포들이 완전하게 스핀 다운되지 않는다면, 그것들은 샘플이 발송되고 분석될 때 동결-융해(freeze-thaw)에 의해 용해될 수 있다. 대상 바이오마커를 확인하는 동안, 적어도 몇몇의 경우에 있어서, 전통적으로 제조된 샘플들은 동결-융해 후 전 세포(whole cells) 및 혈소판을 포함한다는 것이 분명해질 것이다. 추후 단백질 분석(proteomic assay)을 하는 동안, 어떤 전 세포는 용해되어, 혈소판 및 단핵구의 생체 내(*in vivo*) 활성화의 질병 프로세스에 특유한 단백질의 검출을 방해할 것이다. 따라서, 본 발명의 일 구현에서, 융해 후 샘플을 재 스피닝(re-spinning)하는 추가 단계가 분석 전에 수행된다. 이 추가적인 스핀 단계는 그렇지 않으면 혈소판 및 단핵구 활성화에 관련된 바이오마커의 확인을 방해하는 혈소판과 단핵구를 제거할 수 있다. (스피닝 또는 여과에 의하여) 샘플의 불용성인 세포 성분들을 제거하기 위한 추가적인 단계는 종래 기술에는 기술되어 있지 않은 것으로 믿어지는 심혈관 사건 위험 테스트에 대한 진전을 나타낸다.

[0030] 아포리포단백질(apolipoprotein) B, 아포리포단백질 A-1, BNP 및 CRP와 같은 심혈관 질환에 대한 예후로 알려져 있으며, 심혈관 질환에 관련된 것으로 공지되어 있는 문헌으로부터 얻어진 특정 단백질이 있지만, 특정 단백질 세트의 측정은 다중 단백질 측정값으로 나타나는 공통의 생물학적 정보 때문에 예측 성능면에서 최적으로 수행되도록 조합될 수 있다. 심혈관 질환 동안 달라지는 것으로 관찰된 단백질의 조합이 어떻게 최적의 예측 성능을 제공하지 못할 수 있는지의 특정 예는 사구체 여과율(Glomerular Filtration Rate, GFR)에 의해 측정되는 것으로서 신장 기능에 관련된 뇨에 분비된 많은 작은 혈청 단백질(small serum proteins)을 포함한다. 낮은 GFR로 나타내어지는 것과 같은 나쁜 신장 기능은 심혈관 질환 위험과 관련이 있다. 따라서, 낮은 GFR과 관련된 많은 작은 혈청 단백질은 심혈관 질환과 관련이 있는 것으로 보이나, 독립적인 것은 아니다. 피험자 테스트를 개발하는 동안, 단백질이 GFR을 뛰어넘는 추가적인 예후적 가치를 제공하는지를 측정하기 위하여, 추정 GFR에 대한 단백질 측정을 위해 교정(corrections)이 이루어졌다.

[0031] GFR의 측정은 심혈관 사건의 위험을 예측하는데 명백하게 유용하다. 그러나, GFR의 임상적인 측정은 "단일 샘플, 단일 검정" 테스트의 대상 기준을 충족시키지 않는 24시간에 걸친 소변의 채취를 포함한다. 다른 GFR의 추정은 덜 부담스러우나, "단일 샘플" 예후 테스트의 목표를 충족시키기 위하여, 본 발명의 기본적인 전략은 위험 분석을 위한 GFR 정보를 제공하기 위하여 단백질 측정 그 자체의 사용을 추구한다. 예를 들면, 표 3의 10개의 마커 모델에서, 단백질 ESAM은 그것의 GFR과의 연관성 때문에 심혈관 사건의 위험을 강력하게 예측한다. 추정 GFR과의 연관성을 제거하기 위하여 단백질 ESAM의 측청값을 교정한 후, ESAM은 더 이상 위험을 예측할 수 없다. "단일 샘플, 단일 검정"에서 GFR과 관련된 생물학적 신호를 전달하기 위한 ESAM과 같은 단백질의 사용은 심혈관 사건의 예후 예측에 대한 신규한 진전을 나타낸다.

[0032] 표 3의 바이오마커의 확인은 심혈관 사건의 예후예측과 함께 작용하는 단백질에 대한 선별이 포함된다. Wang과 같은 연구는 바이오마커의 조합이 연령 및 지질 레벨과 같은 흔한 임상학적 정보를 사용하는 간단한 위험 계산에 비해 추가적인 성능을 제공하는데 실패하기도 한다는 것을 보여준다(Wang, T. et al., (2006) N. Eng. J. Med. 355:2631-9). 임시의 바이오마커의 조합을 피하기 위하여, 본 발명은 그것들 각각의 예후예측 능력(prognostic power) 및 또한 결정적으로 조합의 예후예측의 가치를 향상시키기 위하여 함께 작용하기 위한 단백질의 능력 모두에 대한 단백질이 선별되는 통계학적 분석 방법을 제공한다. 다양한 독립적인 생물학적 프로세스는 본원에 제공된 표 3의 10개의 마커 단백질 모델에 나타내었다.

[0033] 일 구현에서, 본 발명은 집단에서 5년의 기간 내의 향후 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 방법을 포함한다. 이 방법은 집단의 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 표 1로부터 선택된 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 검출하는 것을 포함하며, 여기에서 개인의 심혈관 사건에 대한 위험은 상기 바이오마커 값에 기초하여 평가되며, 여기에서 N = 2-155이다. 다른 구현에서, 바이오마커는 표 2로부터 선택되며, N = 2-46이다. 다른 구현에서, 바이오마커는 표 3으로부터 선택되며, N = 2-10이다.

[0034] 일 구현에서, 집단의 선택은 그 집단이 심혈관 질환의 이전 병력을 가지지 않는 것을 특징으로 한다. 대안적으로, 상기 집단은 심혈관 질환의 이전 병력을 가지도록 선택될 수 있다.

[0035] 상기 이전 병력은 이전의 심근경색증(myocardial infarction), 하나 또는 그 이상의 관상 동맥(coronary vessel)에서의 50%를 넘는 협착의 혈관 조영의 증거(angiographic evidence), 트레드밀(treadmill) 또는 핵실험(nuclear testing) 또는 이전의 관상동맥 재개술(coronary revascularization)에 의한 운동 유발 허혈(exercise-induced ischemia)을 포함할 수 있다.

[0036] 게다가, 상기 집단은 변이(mutations), 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism) 및 삽입/결실을 포함하는 유전적 위험 인자로 특징지어지도록 선택될 수 있다. 이와 같은 유전적 위험 인자는 위험의 평가를 보완하는데 사용될 수 있다.

[0037] 심혈관 질환 위험의 평가는 치료(therapeutics), 영양중재 프로그램(nutritional program), 보충(supplementation), 생활방식의 변경(lifestyle modification), 금연 프로그램(smoking cessation programs) 및 질병 관리 프로토콜(disease management protocols)을 포함하는 개입에 대응하는 시간에 걸친 변화에 빠른 반응을 보이는 동력학적 규모(dynamic scale)로 측정될 수 있다.

[0038] 5년의 기간에 걸친 심혈관 사건 위험의 평가에 관하여 앞서 언급한 방법은 그것들의 바이오마커 값에 기초하여 증가되거나 감소되는 질병 관리 프로그램으로 개개인을 배정하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 또한 상기 바이오마커 값에 따라 생명 보험 적용 범위에 관하여 서로 다른 위험대(risk band)로 개개인을 계층별로 분류하는데 사용될 수 있다. 또한, 그것은 상기 바이오마커 값에 따라 건강 보험 적용 범위에 관하여 서로 다른 위험대로 개개인을 계층별로 분리하기 위하여, 심혈관 사건 위험의 평가를 위해 사용될 수 있다. 게다가, 그것은 바이오마커 값에 따라 협력을 위한 잠재적 후보 물질을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0039] 또한, 심혈관 사건의 위험 예측을 위한 앞서 말한 방법은 바이오마커 값에 기초하여 집단의 의료자원 소비를 예측하고; 심혈관 질환 치료제의 임상 시험을 위한 엔트리 기준으로서 개인의 바이오마커 값을 사용하고; 상기 바이오마커 값에 기초하여 임상 시험 결과의 효능을 예측하고; 심혈관 질환 치료제 또는 임의의 치료제의 심혈관계 안정성 감시를 위하여 바이오마커 값을 사용하고; 심혈관 질환 치료제의 효능의 대리 결과변수(surrogate endpoint)로서 바이오마커 값을 사용하고/하거나; 상기 바이오마커 값에 기초하여 임의의 개입(intervention), 식이요법(dietary) 또는 치료학적 프로토콜을 따르도록 관찰하는데 사용될 수 있다. 심혈관질환 치료 또는 임의의 치료제의 심혈관질환 안정성의 감시와 관련하여, 이와 같은 감시는 거의 매일의 장기 사용을 위한 심혈관질환 치료 약물 및 비-심혈관계 약물에 대한 규모가 크고, 많은 비용이 들며, 필수적인 임상 3상의 심혈관질환 안전성 연구에 중요하다.

[0040] 본 발명의 심혈관 사건 위험을 평가하기 위한 발명은 또한 상기 바이오마커 값에 기초하여 다른 진단 방법을 위한 개인을 선택하거나 조회하는데 사용될 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 방법은 바이오마커 값에 기초하여 심혈관질환 치료법을 선택하는데 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 심혈관 사건 위험을 평가하기 위한 방법에서, 상기 바이오마커 값은 시험관 내(*in vitro*) 검정을 수행하는 것에 의하여 검출될 수 있다. 상기 시험관 내 검정은 각각의 바이오마커에 대응하는 적어도 하나의 포획 시약(capture reagent)을 포함할 수 있고, 또한 소마머(SOMAmers), 항체(antibodies) 및 핵산 프로브(nucleic acid probe)로 이루어진 군으로부터의 적어도 하나의 포획 시약을 포함할 수 있다. 바람직한 구현에서, 상기 포획 시약은 소마머이다.

[0042] 다른 구현에서, 상기 시험관 내 검정은 면역검정법(immunoassay), 소마머 기반 검정법(SOMAmer-based assay), 조직학적 또는 세포학적 검정법(histological or cytological assay) 및 mRNA 발현 레벨 검정법(mRNA expression level assay)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0043] 본 발명의 방법에서, 생물학적 샘플은 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 소변(urine) 등일 수 있다. 바람직한 구현에서, 상기 생물학적 샘플은 혈청, 혈장 또는 소변일 수 있다.

[0044] 추가적으로, 본 발명의 방법에서 개인은 포유동물, 및 특히 인간일 수 있다.

[0045] 본 발명의 방법의 대안적인 구현에서, N = 3-10; N = 3-15; N = 2-10; N = 4-10; 또는 N = 5-10이다.

[0046] 다른 구현에서, 본 발명은 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 컴퓨터에 의해 실행되는(computer-implemented) 방법을 제공한다. 이 방법은 개인에 대한 바이오마커 정보를 컴퓨터상에서 검색하는 것, 여기에서 상기 바이오마커 정보는 표 1로부터 선택되는 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 포함하고; 각각의 바이오마커 값의 분류를 컴퓨터로 수행하는 것; 수많은 분류에 기초하여 상기 개인에 대한 심혈관 사건 위험의 평가 결과를 보여주는 것을 포함하며, 여기에서 N = 2-155이다. 이 방법의 대안적인 구현에서, 상기 바이오마커는 표 2(N = 2-46) 또는 표 3(N = 2-10)으로부터 선택될 수 있다.

[0047] 개인에 대한 심혈관 사건 위험의 평가 결과는 컴퓨터 디스플레이로 보여질 수 있다.

[0048] 다른 구현에서, 본 발명은 심혈관 사건 위험을 평가하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품을 포함한다. 상기 컴퓨터 프로그램 제품은 컴퓨팅 장치(computing device) 또는 시스템의 프로세서(processor)에 의해 실행가능한 프로그램 코드(program code)를 포함하고 있는 컴퓨터 판독가능한 매체(computer readable medium)를 포함하며, 상기 프로그램 코드는 개인으로부터의 생물학적 샘플로부터 얻은 데이터를 검색하는 코드, 여기에서 상기 데이터는 표 1로부터 선택되는 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 포함하며, 여기에서 상

기 바이오마커는 상기 생물학적 샘플에서 검출되고; 그리고 상기 바이오마커 값의 함수로서 개인의 심혈관 사건에 대한 위험 평가 결과를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드를 포함한다. 이때, 상기 바이오마커는 표 1, col. 7, N = 2-155로부터 선택된다. 다른 구현에서, 상기 바이오마커는 표 2(N = 2-46) 또는 표 3(N = 2-10)으로부터 선택될 수 있다.

[0049] 상기 분류 방법은 연속적인 스코어(score) 또는 기준(measure) 또는 위험 측정기법(risk metric)을 사용할 수 있다. 상기 분류 방법은 또한 두 개 또는 그 이상의 분류를 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 개인을 선별하기 위한 방법을 포함한다. 이 방법은 개인으로부터의 생물학적 샘플에서, 표 1로부터 선택된 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 검출하는 것을 포함하며, 여기에서 상기 개인은 상기 바이오마커 값에 기초하여 심혈관 사건에 대한 위험이 평가되며, 여기에서 N = 2-155이다. 다른 구현에서, 상기 바이오마커는 표 2(N = 2-46) 또는 표 3(N = 2-10)으로부터 각각 선택될 수 있다.

[0051] 본 발명의 방법에서, 바이오마커 값의 검출은 시험관 내 검정법으로 수행될 수 있다. 이와 같은 시험관 내 검정법은 각각의 바이오마커에 대응하는 적어도 하나의 포획 시약을 포함하며, 소마머, 항체 및 핵산 프로브로 이루어지는 군으로부터의 적어도 하나의 포획 시약의 선택을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 적어도 하나의 포획 시약은 소마머이다. 상기 시험관 내 검정법은 면역검정법, 소마머 기반 검정법, 조직학적 또는 세포학적 검정법 및 mRNA 발현 레벨 검정법으로부터 선택될 수 있다.

[0052] 생물학적 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 소변 등으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 생물학적 샘플은 혈청, 혈장 또는 소변이다. 본 발명의 방법에서, 개인은 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 인간이다.

[0053] 본 발명의 구현 중 하나에서, 개인은 상기 바이오마커 값 및 상기 개인에 대응하는 적어도 하나의 추가적인 생물의학적 정보 항목에 기초하여 심혈관질환의 위험에 대하여 평가되도록 규정되어 있다. 적어도 하나의 추가적인 생물의학적 정보 항목은 하기: (a) 한 번 또는 그 이상의 이전 심근경색증(myocardial infarction), 하나 또는 그 이상의 관상 동맥(coronary vessel)에서의 50%를 넘는 협착의 혈관 조영의 증거(angiographic evidence), 트레드밀(treadmill) 또는 핵실험(nuclear testing) 또는 이전의 관상동맥 재개술(coronary revascularization)에 의한 운동 유발 허혈(exercise-induced ischemia)을 포함하는 심혈관 위험 인자의 존재에 해당하는 정보; (b) 개인의 신체 설명서(physical descriptor); (c) 개인의 체중 변화에 해당하는 정보; (d) 개인의 민족성에 해당하는 정보; (e) 개인의 성별에 해당하는 정보; (f) 개인의 흡연력에 해당하는 정보; (g) 개인의 음주력에 해당하는 정보; (h) 개인의 직업 경력에 해당하는 정보; (i) 개인의 심혈관질환 또는 다른 순환계(circulatory system) 질환의 가족력에 해당하는 정보; (j) 상기 개인 또는 상기 개인의 가족 구성원에서 심혈관 질환의 고위험과 관련이 있는 적어도 하나의 유전적 마커(genetic marker)의 상기 개인에서의 존재 또는 부재에 해당하는 정보; (k) 개인의 임상적 증상에 해당하는 정보; (l) 다른 실험실 실험(laboratory test)에 해당하는 정보; (m) 개인의 유전자 발현값에 해당하는 정보; (n) 개인의 포화지방이 많이 든(saturated fats), 고염(high salt) 식이와 같은 공지의 심혈관질환 위험 인자의 섭취에 해당하는 정보; (o) 심전도(electrocardiogram), 심장 초음파(echocardiography), 경동맥 내중막 두께(intima-media thickness)에 대한 경동맥 초음파(carotid ultrasound), 혈류매개 혈관확장(flow mediated dilation), 동맥 맥파 속도(pulse wave velocity), 발목 상완 지수(ankle-brachial index), 스트레스 심장초음파 검사(stress echocardiography), 심근 관류 영상(myocardial perfusion imaging), CT에 의한 관상동맥의 칼슘(coronary calcium), 고해상도의 CT 혈관조영(high resolution CT angiography), MRI 영상 및 다른 영상 기법을 포함하는 개인의 영상 연구에 해당하는 정보; 및 (p) 투약(medication)에 대한 정보를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0054] 본 발명은 또한 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 바이오마커의 패널을 포함하며, 여기에서 상기 패널은 표 1의 바이오마커로 이루어지는 군으로부터 선택되는 N의 바이오마커를 포함하며, 여기에서 N = 2-155이다. 대안적인 구현에서, 상기 바이오마커는 표 2로부터 선택되고, 여기에서 N = 2 - 46이거나, 표 3으로부터 선택되고, 여기에서 N = 2-10이다.

[0055] 다른 양상에서, 본 발명은 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 안지오포이에틴 2에 대한 바이오마커 값을 검출하고, 상기 안지오포이에틴(angiopoietin) 2 바이오마커 값을 기초로 하여 미래의 심혈관 사건의 위험을 결정하는 것에 의하여, 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하거나 예후 예측함으로써 집단에서 개인을 선별하기 위한 방법을 포함한다. 상기 바이오마커 값은 측정 스코어(measurement score) 또는 수많은 분류들 중 하나의 분류로서 나타낼 수 있다.

[0056] 안지오포이에틴 2를 사용하는 선별 방법의 변형에서, 본 발명은 또한 결정 단계 전, 개인의 스타틴(statin)의 사용에 관한 정보를 제공하는 것을 포함하는 단계를 상기 방법에 추가하는 것을 포함한다. 따라서, 미래의 심혈관 사건의 위험을 결정하는 것은 안지오포이에틴 2 바이오마커 값 및 스타틴 정보에 기초하고 있다.

[0057] 안지오포이에틴 2는 놀랍게도 스타틴을 복용하는 개인의 2차적 심혈관 사건을 예후예측하는데 유용하다. 스타틴은 2차적 심혈관 사건의 위험을 감소시킬 뿐만 아니라, 안지오포이에틴 2를 증가시키는 것으로 종래에 보고되어 있다. 이 안지오포이에틴 2의 상승은 바이오마커로서 그것의 용도를 무효화시키는 것으로 예상되어 왔다. 뜻밖에도, 안지오포이에틴 2는 고위험 개인에게서 2차적 심혈관 사건의 예측을 위한 우수한 마커인 것으로 입증되었다.

[0058] 안지오포이에틴 2 바이오마커 값을 검출하는 방법은 생물학적 샘플에서 하나 또는 그 이상의 MMP7, CHRDL1, MATN2, PSA-ACT 바이오마커 또는 그것들의 조합에 대한 바이오마커 값을 검출하는 추가 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 추가적으로 생물학적 샘플에서 표 3의 바이오마커로부터 선택된 N의 바이오마커에 각각 대응하는 바이오마커 값의 측정을 포함할 수 있고, 여기에서 N = 2-10이다.

[0059] 다른 양상에서, 본 발명은 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하거나 예후 예측함으로써 집단에서 개인을 선별하기 위한 바이오마커의 패널을 제공한다. 상기 패널은 적어도 안지오포이에틴 2 바이오마커를 포함한다. 이 패널은 하나 또는 그 이상의 MMP7, CHRDL1, MATN2, PSA-ACT 바이오마커 또는 그것들의 임의의 조합을 더 포함할 수 있다. 게다가, 상기 패널은 표 3으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 바이오마커를 포함할 수 있으며, 여기에서 N = 2-10이다.

[0060] 다른 구현에서, 본 발명은 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가함으로써 개인을 선별하기 위한 방법을 제공하며, 여기에서 상기 평가는 혈전성(thrombotic) 사건 또는 울혈성 심부전(cognitive heart failure, CHF) 사건의 차별적 예후 예측을 포함한다. 이 방법은 집단의 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 혈전성 사건의 예후예측을 위한 GPVI 바이오마커 및 울혈성 심부전 사건의 예후 예측을 위한 MATN2에 각각 대응하는 바이오마커 값을 검출하는 것을 포함한다. 상기 방법은 생물학적 샘플에서 표 3에 기재된 바이오마커의 군으로부터 선택된 N의 바이오마커에 대한 바이오마커 값을 검출하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 여기에서 N = 3-10이다. 혈전성 사건은 심근경색증(myocardial infarction, MI), 일과성 뇌허혈 발작(transient ischemic attack, TIA), 뇌졸중(stroke), 급성 관동맥 증후군(acute coronary syndrome) 중 어느 것을 포함할 수 있으며, 관상동맥 재개술(coronary re-vascularization)을 필요로 한다.

[0061] 본 발명은 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하거나 예후 예측함으로서 집단에서 개인을 선별하기 위한 바이오마커의 패널을 더 제공하며, 여기에서 상기 패널은 GPVI 바이오마커 및 MATN2 바이오마커를 포함한다. 상기 패널은 표 3에 기재된 바이오마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 N의 바이오마커를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0062] 다양한 관련 생물학적 시스템을 반영하는 여러 가지 종류의 심혈관질환에 대한 치료가 이용 가능하다. 예를 들어, 항혈전제(anti-thrombotic), 혈소판 억제제(platelet inhibitor), 지질 대사(lipid metabolism), 체액(fluid) 및 전해질 균형 약물, 및 베타 차단제(beta blockers)가 심혈관질환의 치료에 사용되어 왔다. 치료를 지도하기 위하여, 그것은 전체적인 위험을 확인하는데 있어서 뿐만 아니라 생명작용에 의해 나타난 사건들의 종류를 구별하는데 유용하다. 앞서 언급한 MATN2 및 GPVI를 사용하는 방법은 혈전성 사건 및 CHF 사건의 예상 사건 종류를 구별할 수 있게 한다. GPVIsms 혈전성 사건의 발명(development)에 대해 더 특이적이며, MATN2는 CHF 사건에 대해 더 특이적이다. 혈전성 사건에 대한 GPVI의 특이도는 도 8a 및 8b에 나타내었다. CHF의 예후 예측에 대한 MATN2의 특이도는 9a 및 9b에 나타내었다. 이것들의 차이는 관련된 생물학적 프로세스의 면에서 해석될 수 있다. 이 다중 단백질에 기반한 테스트는 따라서 CHF 발병의 위험과 혈전성 사건의 위험을 구별하기 위한 정보를 가진 환자를 제공할 수 있다. 이것은 선행 기술에는 기재되어 있지 않은 것으로 믿어지는 본 발명의 의미가 있는 중요한 특징이다.

[0063] 단백질 측정에만 기반한 심혈관 사건 위험의 예후 예측을 제공하는데 더하여, 본 발명의 방법은 또한 성별(gender), 투약(medication)과 같은 단순 정보, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 총 콜레스테롤과 같은 다른 마커 및 당뇨병과 같은 다른 질환을 고려하여 얻어지는 더욱 완전한 상황의 이점을 제공한다. 이와 같은 방법은 본원에 소개된 현재 사용되는 표 3의 10개의 단백질 모델을 구축할 수 있다.

[0064] 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하거나 예후 예측함으로써 집단에서 개인을 선별하기 위한 키트 또한 본원에 제공된다. 상기 키트는 하기의 성분: 적어도 하나의 표 1에 제시된 바이오마커, 적어도 하나

의 대응 포획 시약(capture reagents) 및 신호 생성 물질(signal generating material)을 포함하며, 여기에서 각각의 대응 포획 시약은 선택된 바이오마커에 특이적이고, 상기 물질은 상기 선택된 대응 바이오마커 및/또는 대응 포획 시약에 특이적이며, 여기에서 각각의 신호는 대응 바이오마커에 대한 각 포획 시약의 결합으로 활성화된다.

[0065] 다른 양상에서, 상기 키트는 안지오포이에틴 2 바이오마커; 안지오포이에틴 2 바이오마커 및 MMP7, CHRDL1, MATN2, PSA-ACT 및 그것들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 바이오마커; GPVI 바이오마커, MATN2 바이오마커 및 그것들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 바이오마커; 표 3에 제시된 바이오마커(여기에서 N = 2-10)로 이루어진 군으로부터 선택된 N의 바이오마커; 및 그것의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 바이오마커를 포함할 수 있다.

[0066] 상기 키트의 포획 시약은 임의의 하나 또는 그 이상의 소마머, 항체 및 핵산 프로브 또는 그것들의 조합일 수 있다. 상기 키트는 또한 설명서 또는 심혈관질환의 위험이 증가하거나 증가하지 않는 것 중 하나로서 생물학적 샘플이 얻어진 개인을 분류하기 위한 하나 또는 그 이상의 소프트웨어 또는 컴퓨터 프로그램 제품을 포함할 수 있다.

[0067] 다른 구현에서, 본 발명은 표 1, Col. 7, 표 2 또는 표 3의 바이오마커를 포함하는 분류기(classifier)를 포함한다.

발명의 효과

[0068] 본 발명에 의하면 개인에게서 미래의 심혈관(Cardiovascular, CV) 사건의 위험을 평가하는 방법 및 5년의 기간에 걸쳐 심혈관 사건이 발생할 위험의 예측을 위해 개개인을 평가하는데 사용되는 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1a는 생물학적 샘플에서의 심혈관 사건의 예측을 위한 예시적 방법에 대한 흐름도이다. 도 1b는 나이브 베이즈(naive Bayes) 분류 방법을 사용하여 생물학적 샘프에서의 심혈관 사건의 예측을 위한 예시적 방법에 대한 흐름도이다.

도 2a는 6개월 내에 사건을 가진 사례와 심혈관 사건을 가지지 않은 대조군의 소집단에 대한 주성분 분석(principle component analysis)을 나타낸 것이다. 상기 사건을 가진 사례는 수직축을 따라 대조군과 부분적으로 분리된다.

도 2b는 6개월 내에 사건을 가진 사례와 심혈관 사건을 가지지 않은 대조군의 소집단에 대한 DSGA 분석을 나타낸 것이다. 상기 사건을 가진 사례는 수평축을 따라 대조군과 부분적으로 분리된다.

도 3은 연구 집단에 대한 위험 스코어 분석을 제공한다. 이 스코어는 표 3에 있는 10개의 단백질의 측정의 로그(logarithm)를 사용하여 단순한 Cox의 비례위험모델(cox proportional hazards model)을 구축함으로써 계산된다. 상기 집단은 이 스코어에 기초하여 5분위수(quintiles)로 나뉜다. 도 3의 카플란-마이어 곡선(Kaplan Meier plots)은 이 5분위수가 심혈관 사건을 겪고 있는 개인 또는 다양한 사건 형태에 대한 사망의 비율에서 어떻게 다른지를 보여준다.

도 3a는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 연구 집단의 모든 사망 및 심혈관 사건의 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 3b는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 심혈관 사건의 사례: MI 또는 CHF(심부전)과 같은 공지의 직접적인 원인(proximal cause)을 가지지 않는 분류되지 않는 사망에 대한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 3c는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 심혈관 사건의 사례: 긴급(incident) 심부전에 대한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 3d는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 심혈관 사건의 사례: 만성 심부전 환자(이전에 심부전으로 진단된 환자)의 심부전의 재발에 대한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 3e는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 심혈관 사건의 사례: 혈전성 사건(심

근경색증 + 뇌졸중)에 대한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 3f는 표 3의 단백질 스코어에 기초하여 5분위수로 나뉜 집단을 가지는 심혈관 사건의 사례: 모든 심부전에 대한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이다.

도 4는 본원에 기재된 다양한 컴퓨터에 의해 실행되는 방법과 함께 사용하기 위한 예시적인 컴퓨터 시스템을 나타낸 것이다.

도 5는 일 구현에 따른 심혈관 사건의 위험을 평가하는 방법에 대한 흐름도이다.

도 6은 일 구현에 따른 심혈관 사건의 위험을 평가하는 방법에 대한 흐름도이다.

도 7은 생물학적 샘플에서 하나 또는 그 이상의 심혈관 사건 바이오마커를 검출하는데 사용될 수 있는 예시적 압타머 검정법을 나타낸 것이다.

도 8은 표 3의 10개의 단백질 중 하나인 GPVI에 기초한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이며, 이 단백질은 혈전성 사건과 심부전 사건을 구별한다는 것을 보여준다. 집단은 GPVI의 4분위수로 나뉜다. 도 8a는 GPVI의 상위 4분위수가 혈전성 심혈관 사건에 대한 예후임을 보여준다. 도 8b는 GPVI의 4분위수가 심부전 사건을 예측하기 위한 구별 능력이 거의 없음을 보여준다.

도 9는 표 3의 10 개의 단백질 중 하나인 MATN2에 기초한 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이며, 이 단백질은 혈전성 사건과 심부전 사건을 구별한다는 것을 보여준다. 집단은 MATN2의 4분위수로 나뉜다. 도 9a는 MATN2의 4분위수가 혈전성 심혈관 사건에 대한 예후가 아님을 보여준다. 도 9b는 MATN2의 상위 4분위수로부터의 개인은 더 높은 비율의 CHF 사건을 가짐을 보여준다.

도 10은 스타틴 약물을 복용하는 모든 538명의 피험자의 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이며, 안지오포이에틴-2에 대한 모집단분포(population distribution)의 4사분위수(4th Quartile)에 있는 개인들은 안지오포이에틴-2에 대한 4사분위수에 있지 않은 개인들과 비교하여 증가된 비율로 심혈관 사건을 겪고 있음을 보여준다. 따라서, 스타틴을 이용한 치료의 효과에도 불구하고, 안지오포이에틴-2는 심혈관 사건 위험의 유용한 바이오마커이다.

도 11은 스타틴 약물을 복용하는 모든 538명의 피험자의 카플란 마이어 곡선을 나타낸 것이며, 스타틴으로 치료된 개인에서 CHRDL1이 심혈관 사건의 무합병증 생존율(event free survival)과 관련이 있다는 것을 보여준다. 따라서, 스타틴을 이용한 치료의 효과에도 불구하고, CHRDL1은 심혈관 사건 위험의 유용한 바이오마커이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 참조는 본 발명의 대표적인 구현을 상세하게 해줄 것이다. 본 발명은 열거된 구현들과 함께 기술될 수 있음과 동시에, 본 발명을 그 구현들로 제한하고자 하는 것이 아님을 이해할 것이다. 이에 반하여, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 것과 같은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변경 및 동등물을 포함한다.

[0071] 당업자들은 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질들이 본 발명의 실시에 사용될 수 있고 본 발명의 실시 범위 내에 있음을 알 것이다. 본 발명은 기술된 방법 및 물질들을 결코 한정하지 않는다.

[0072] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자들에게 일반적으로 통용되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 기구 및 물질이 본 발명의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있다 할지라도, 바람직한 방법, 기구 및 물질을 지금 기술한다.

[0073] 본 발명에 인용된 모든 문헌, 공개된 특허 문서 및 특허 명세서들은 그 명세서가 속하는 기술분야의 수준을 나타낸다. 본원에 인용된 모든 문헌, 공개된 특허 문서 및 특허 명세서들은 비록 각각의 문헌, 공개된 특허 문서 또는 특허 명세서가 참조에 의해 통합되는 것으로 명확하고 개별적으로 나타내었을 지라도 이와 마찬가지로 참조에 의해 통합되어 있다.

[0074] 첨부된 청구항을 포함하는 이 명세서에서 사용된 것으로서, 단수형태 "하나("a", "an" 및 "the")"는 달리 그 내용을 명확하게 지시하지 않는 한 복수의 참조(plural reference)를 포함하며, "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 또는 그 이상(one or more)"과 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 참고로 "소마머(a SOMAmer)"는 소마머의 혼합물을 포함하고, 참고로 "프로브(a probe)"는 프로브의 혼합물을 포함한다.

[0075] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약(about)"은 수치가 관련되어 있는 항목의 기본 기능이 변경되지 않는 한, 대

수롭지 않은 수치의 변경 또는 변화를 나타낸다.

[0076] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "포함하다("comprises", "comprising", "includes", "including", "contains", "containing")" 및 그것의 임의의 변화들은 공정, 방법, 제법 한정 제품(product-by-process) 또는 물질의 조성물(composition of matter)이 단지 그 성분만을 포함하지는 않지만 특별히 열거되지 않은 다른 성분 또는 이와 같은 공정, 방법, 제법 한정 제품 또는 물질의 조성물에 본래 포함될 수 있는 한, 비배타적인 포함(nonexclusive inclusion)을 포함한다.

[0077] 본 발명은 5년과 같은 정해진 기간 내의 심혈관 사건의 위험의 예측을 위한 바이오마커, 방법, 기구, 시약, 시스템 및 키트를 포함한다.

[0078] "심혈관 사건(Cardiovascular Event)"은 어떤 순환 시스템(circulatory system)의 일부분의 부전(failure) 또는 기능부전(malfunction)을 의미한다. 일 구현에서, "심혈관 사건"은 뇌졸중(stroke), 일과성 뇌허혈 발작(transient ischemic attack, TIA), 심근경색증(myocardial infarction, MI), 순환 시스템의 기능부전 및/또는 심부전에 기인하는 갑작스런 사망을 의미한다. 다른 구현에서, "심혈관 사건"은 스텐트(stent) 또는 혈관 형성술(angioplasty) 등을 필요로 하는, 임의의 앞서 언급한 기능부전 및/또는 불안정 협심증(unstable angina)을 의미한다.

[0079] 심혈관 사건은 "울혈성 심부전(congestive heart failure or CHF)" 및 "혈전성 사건(thrombotic events)"을 포함한다. 혈전성 사건은 심근경색증(MI), 일과성 뇌허혈 발작(TIA), 뇌졸중, 급성 관동맥 증후군(acute coronary syndrome)을 포함하며, 관상동맥 재개술(coronary re-vascularization)을 필요로 한다.

[0080] 일 양상에서, 심근경색, 뇌졸중, 사망 및 울혈성 심부전으로 정의되는 심혈관 사건에 대해 5년의 기간 내의 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위하여 하나 또는 그 이상의 바이오마커가 단독 또는 다양한 조합으로 사용하기 위해 제공된다. 심근경생 및 뇌졸중으로 이루어지는 혈전성 사건(도 3e)도 결합되었다. 하기에 상세히 기술된 바와 같이, 예시적 구현은 일반적으로 실시예 1 및 더욱 특별하게는 실시예 2에 기술된 다중 소마머-기반 검정법을 사용하여 확인된 표 1, Col.7에 제공된 바이오마커를 포함한다.

[0081] 표 1, Col. 7은 초기 채혈(initial blood draw)(시점(time point) 1)후 6개월 내지 10년의 시간 내에 심혈관 사건을 겪은 수백 명의 개인들의 혈액 샘플(사건 양성(Event Positive)) 및 6개월 내지 10년의 시간 내에 심혈관 사건을 겪지 않은 동일한 수백 명의 개인들로부터 얻은 혈액 샘플(사건 음성(Event Negative))을 분석하여 얻어진 결과를 제시한다. 잠재적 바이오마커는 사건 양성 및 사건 음성 혈액 샘플을 풀링(pooling)하기 보다는 각각의 샘플에서 측정하였으며; 이는 심혈관 사건의 존재 또는 부재와 관련된 표현형(phenotypes)이 다른 개인과 그룹을 더 잘 이해할 수 있게 한다. 100개가 넘는 단백질 측정값이 각 샘플에서 얻어졌고, 각각의 사건 양성 및 사건 음성 집단으로부터의 몇백의 샘플이 개별적으로 측정되었기 때문에, 표 1, Col. 7에 기재된 바이오마커는 굉장히 큰 규모의 데이터의 분석으로부터 얻어진 것이다. 상기 측정값은 본원의 섹션 "바이오마커의 분류 및 위험 스코어의 계산(Classification of Biomarkers and Calculation of Risk Scores)"에 기술된 방법을 사용하여 분석되었다. 표 1, Col. 7은 혈액 샘플을 채혈한 후 0 - 5년의 기간 내에 미래의 심혈관 사건을 나타내는 그들의 경향에 따라 개인의 집단을 분류하는데 유용한 것으로 밝혀진 155개의 바이오마커를 열거한 것이다. 도 3a - 3f의 마플란-마이어 곡선은 표 3에 열거된 것과 같은 바이오마커의 작은 서브셋에 의해 측정된 스코어의 5분위수에 대한 사건 위험의 강한 의존성을 나타낸다.

[0082] 기술된 심혈관 사건 바이오마커 중 어떤 것은 심혈관 사건의 위험을 평가하는데 단독으로 유용할 수 있으나, 각각의 분류(grouping) 또는 서브셋(subset) 선별이 "바이오마커 패널(biomarker panel)" 및 패널로서 본원에서 상호교환적으로 칭해지는 세 개 또는 그 이상의 바이오마커의 패널로서 유용한 경우, 심혈관 사건 바이오마커의 다중 서브셋의 분류를 위한 방법 또한 본원에 기술된다. 따라서, 본 발명의 다양한 구현들은 N의 바이오마커를 포함하는 조합들을 제공하며, 여기에서 N은 적어도 두 개의 바이오마커이다. 다른 구현에서, N은 2-155의 바이오마커로부터 선택된다.

[0083] 또 다른 구현에서, N은 2-7, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 2-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 3-7, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 3-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 4-7, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 4-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 5-7, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-

35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 5-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 6-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 7-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-35, 8-40, 8-45, 8-50, 8-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 8-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 9-15, 9-20, 9-25, 9-30, 9-35, 9-40, 9-45, 9-50, 9-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 9-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. 다른 구현에서, N은 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55로부터 임의의 수로 선택되거나, 10-155를 포함한 그 이상의 범위의 상한치에 대해 5씩 연속적으로 증가한다. N은 유사한 범위를 포함하나 더 고차의 범위를 포함하도록 선택될 수 있음을 알 수 있을 것이다.

[0084] 일 구현에서, 바이오마커 서브셋 또는 패널에 유용한 수많은 바이오마커들은 바이오마커 값의 특정 조합에 대한 민감도 및 특이도 값에 기초한다. 상기 용어 "민감도(sensitivity)" 및 "특이도(specificity)"는 개인의 생물학적 샘플에서 측정된 하나 또는 그 이상의 바이오마커 값에 기초하여, 5년 내에 심혈관 사건을 겪을 위험성이 증가하거나 동일한 기간 내에 심혈관 사건을 겪을 위험성이 증가하지 않은 것으로 개인을 정확하게 분류하는 능력에 관해서 본원에서 사용된다. "민감도"는 심혈관 사건의 위험성이 증가된 개인을 정확하게 분류하는 것에 관한 바이오마커의 성능을 나타낸다. "특이도"는 심혈관 사건의 위험성이 증가하지 않은 개인을 정확하게 분류하는 것에 관한 바이오마커의 성능을 나타낸다. 예를 들면, 일련의 사건 음성 샘플 및 사건 양성 샘플을 테스트하는데 사용된 마커의 패널에 대한 85%의 특이도 및 90%의 민감도는 대조 샘플의 85%가 패널에 의해 사건 음성 샘플로서 정확하게 분류되었으며, 사건 양성 샘플의 90%가 패널에 의해 사건 양성 샘플로서 정확하게 분류되었음을 나타낸다.

[0085] 대안적인 방법에서, 스코어는 임상 소견에 기초하여 측정된 역치(thresholds)와 함께, 심혈관 사건의 높은, 중간 또는 낮은 위험의 역치를 가지는 연속적인 범위로 기록될 수 있다.

[0086] 본원에서 확인된 심혈관 사건 바이오마커는 심혈관 사건의 위험을 예측하는데 사용될 수 있는 바이오마커의 서브셋 또는 패널에 대한 대단히 많은 수의 선택을 제시한다. 원하는 수의 이와 같은 바이오마커의 선택은 선택된 바이오마커의 특정 조합에 의존한다. 심혈관 사건의 위험을 예측하기 위한 바이오마커의 패널은 또한 표 1, Col. 7에서 발견되지 않은 바이오마커를 포함할 수 있으며, 표 1, Col. 7에서 발견되지 않은 추가적인 바이오마커의 포함은 표 1, Col. 7로부터 선택된 특정 서브셋 또는 패널에서 바이오마커의 수를 감소시킬 수 있다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 서브셋 또는 패널에 사용된 표 1, Col. 7로부터의 바이오마커의 수는 또한 추가적인 생물의학적 정보가 주어진 검정법에 대하여 허용가능한 역치값을 확립하기 위하여 바이오마커 값과 함께 사용된다면 감소될 수 있다.

[0087] 바이오마커의 서브셋 또는 패널에 사용될 바이오마커의 수에 영향을 줄 수 있는 다른 인자는 심혈관 사건의 위험에 대해 평가될 개인으로부터 생물학적 샘플을 얻는데 사용되는 방법이다. 신중하게 제어된 샘플 입수 환경에서, 원하는 민감도 및 특이도 및/또는 역치값을 충족시키는데 필요한 바이오마커의 수는 샘플 수집, 조작 및 저장이 더욱 다양해질 수 있는 상황에서보다 더 낮아질 것이다.

[0088] 본 발명의 일 양상은 일반적으로 도 1a 및 1b를 참고로 하여 기술될 수 있다. 생물학적 샘플은 관심있는 개인 또는 개인들로부터 얻어진다. 상기 생물학적 샘플은 그 후 하나 또는 그 이상(N)의 관심 바이오마커의 존재를 검출하고, 상기 N의 바이오마커(도 1b에 마커 RFU로서 나타냄) 각각에 대한 바이오마커 값을 측정하기 위하여 분석된다. 일단 바이오마커가 검출되고, 각 마커에 대한 바이오마커값이 매겨지거나 본원에 상세히 기술된 것과 같이 분류된다. 마커 스코어는 그 후 샘플이 얻어진 개인이 심혈관 사건의 높은, 중간의 또는 낮은 위험을 가질 가능성을 나타내는 총 진단 스코어를 제공하기 위하여 조합되며, 특별히 연속 범위로 제시된다.

[0089] "생물학적 샘플(biological sample)", "샘플(sample)" 및 "시료(test sample)"는 개인으로부터 얻어지거나 만약 그렇지 않으면 개인으로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 말하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이것은 (전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는) 혈액, (예를 들어, 유아로부터 얻어진) 건조 혈액 표본(dried blood spot), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복막세척액(peritoneal washing), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수

(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 기관지 찰과물(bronchial brushing), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함한다. 이것은 또한 모든 절차 중 실험적으로 분리된 단편(fractions)을 포함한다. 예를 들어, 혈액 샘플은 혈청 또는 적혈구 세포 또는 백혈구 세포(white blood cells; leukocytes)와 같은 특정 형태의 혈액 세포를 포함하는 단편으로 단편화될 수 있다. 만일 원한다면, 샘플은 조직 및 체액 샘플의 조합과 같은 개인으로부터의 샘플 조합일 수 있다. 상기 용어 "생물학적 샘플(biological sample)"은 또한 예를 들어, 대변 샘플, 조직 샘플 또는 조직 생검으로부터의 샘플과 같은 균질화된 고체 물질을 포함하는 물질을 포함한다. 상기 용어 "생물학적 샘플"은 또한 조직 배양 또는 세포 배양으로부터 유래된 물질을 포함한다. 생물학적 샘플을 얻기 위한 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있고; 대표적인 방법은 예를 들어, 채혈(phlebotomy), 면봉법(swab)(예를 들어, 구강상피세포 면봉법(buccal swab)) 및 세침 흡인 조직검사(fine needle aspirate biopsy procedure)를 포함한다. 세침 흡인에 적합한 대표적인 조직은 림프절, 폐, 폐 세척액, BAL(기관지폐포 세척액, bronchoalveolar lavage), 갑상선(thyroid), 유방(breast), 췌장(pancreas) 및 간(liver)을 포함한다. 샘플들은 또한 예를 들어, 미세절개(micro dissection)(예를 들어, 레이저 포획 미세절개(laser capture microdissection; LCM) 또는 레이저 미세 절개(laser micro dissection; LMD)), 방광 세척(bladder wash), 도말(smear)(예를 들어, PAP 도말) 또는 유즙도관 세척법(ductal lavage)에 의해 수집될 수 있다. 개인으로부터 얻어지거나 유래된 "생물학적 샘플"은 개인으로부터 얻어진 후 임의의 적절한 방법으로 처리된 임의의 이러한 샘플을 포함한다.

[0090] 게다가, 생물학적 샘플은 다수의 개인들로부터 생물학적 샘플을 취하고 그것들을 합치거나(pooling) 각 개인의 생물학적 샘플의 앨리컷을 합침(pooling)으로써 얻어질 수 있다. 상기 합쳐진 샘플은 개인으로부터의 샘플로서 처리될 수 있고, 만약 합쳐진 샘플에서 심혈관 사건의 위험성이 증가되거나 감소된 것으로 밝혀지면, 그 후 각 개인의 생물학적 샘플은 심혈관 사건의 위험이 증가되거나 감소된 개인을 결정하기 위하여 재조사될 수 있다.

[0091] 상기 언급한 바와 같이, 생물학적 샘플은 소변일 수 있다. 소변 샘플은 혈액 또는 혈청 샘플에 비해 확실한 이점을 제공한다. 정맥 천자(venipuncture)를 통하여 혈액 또는 혈장 샘플을 수집하는 것은 원하는 것보다 더 복잡하며, 용량에 변동이 심할 수 있고, 환자를 걱정스럽게 만들 수 있으며, 몇몇의 (작은) 감염 위험을 포함한다. 또한, 정맥 절개술(phlebotomy)은 숙련된 직원을 필요로 한다. 소변 샘플을 수집하는 것의 간단함은 대상 방법의 더욱 광범위한 적용을 가능하게 할 수 있다.

[0092] 샘플로서 소변을 사용하는 것의 적합성을 측정하기 위하여, 건강한 피험자로부터 얻은 이와 같은 샘플을 각 단백질의 정량 및 정성에 대하여 평가하고, 이 정보를 심혈관 사건 위험 예후예측에서 표 1-3의 바이오마커의 특성과 조합하였다. 소변은 혈장의 한외 여과액(ultra-filtrate)이므로, 소변으로 분비된 특정 단백질의 양은 혈액에 있는 단백질의 농도에 비례한다. 만약 표 1-3 중 어떤 바이오마커의 양이 소변에서 충분한 양으로 이용가능하다면, 그 후 그것들은 심혈관 사건의 위험의 평가를 위한 개인을 선별하기 위한 방법에 사용하기에 적합하다. 소변에서 발견된 심혈관 사건의 바이오마커 예측은 강한 신호를 나타내는 ESAM, MMP7 및 GP6를 포함한다. 이들 바이오마커는 더 작으며, 신장에 의해 소변 내로 자유롭게 여과된다. 게다가, PSA-ACT 및 플라스미노겐은 소변에서 개인들 간의 가변성(variability)을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이것은 소변에서의 이들 바이오마커의 정량 또한 심혈관 사건의 위험에 대하여 개인을 선별하는 방법에 유용할 수 있음을 나타낸다. 따라서, 이들 5개의 단백질은 심혈관 사건의 위험에 대하여 개인을 선별하는 방법에 사용되는 간단한 소변-기반 테스트를 제공한다.

[0093] 설명을 위한 목적으로, 문구 "개인으로부터의 생물학적 샘플로부터 얻은 데이터(data attributed to a biological sample form an individual)"는 개인의 생물학적 샘플로부터 유래되거나 그것을 이용하여 생성된 어떤 형태의 데이터를 의미하기 위한 것이다. 상기 데이터는 하나의 측정 시스템에서의 단위를 다른 측정 시스템으로의 단위로 전환시키는 것에 의한 것과 같이, 생성된 후 어느 정도 재구성(reformatted), 정정(revised) 또는 수학적으로 변경(mathematically altered)될 수 있으나, 상기 데이터는 상기 생물학적 샘플로부터 유래되거나 그것을 사용하여 생성된 것으로 이해된다.

[0094] "표적(target)", "표적 분자(target molecule)" 및 "분석물(analyte)"은 생물학적 샘플에 존재할 수 있는 관심있는 임의의 분자를 칭하기 위하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다. "관심 분자(molecule of interest)"는 예를 들어, 단백질의 경우에 아미노산 서열에서의 경미한 변화, 이황화 결합 형성(disulfide bond formation), 글리코실화(glycosylation), 지질화(lipidation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation), 또는 분자의 본질을 실질적으로 변경시키지 않는 표지 성분(labeling component)과의 결합과 같은 임의의 다른 조작

(manipulation) 또는 변경(modification)과 같은 특정 분자의 임의의 경미한 변화(minor variation)를 포함한다. "표적 분자", "표적" 또는 "분석물"은 하나의 형태 또는 종류의 분자의 복제 세트 또는 다중-분자 구조이다. "표적 분자들", "표적들" 및 "분석물들"은 하나 이상의 이러한 분자들의 세트를 말한다. 대표적인 표적 분자는 단백질(proteins), 폴리펩티드(polypeptides), 핵산(nucleic acids), 탄수화물(carbohydrates), 지질(lipids), 다당류(polysaccharides), 당단백(glycoproteins), 호르몬(hormones), 수용체(receptors), 항원(antigens), 항체(antibodies), 애피바디(affibodies), 항체 모방체(antibody mimics), 바이러스(viruses), 병원체(antibody mimics), 독성 물질(toxic substances), 기질(substrates), 대사물질(metabolites), 전이상태 유사체(transition state analogs), 보조인자(cofoactors), 억제제(inhibitors), 약물(drugs), 염료(dyes), 영양분(nutrients), 성장 인자(growth factors), 세포(cells), 조직(tissues) 및 임의의 앞서 말한 것들의 임의의 단편 또는 부분을 포함한다.

[0095] 본원에 사용된 것으로서, "폴리펩티드(polypeptide)", "펩티드(peptide)" 및 "단백질(protein)은 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 칭하기 위하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 폴리머는 선형(linear) 또는 분지형(branched)일 수 있고, 변경된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 개입(intervention)에 의하여; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 표지 성분과의 결합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변경에 의하여 변경된 아미노산 폴리머를 포함한다. 예를 들어, (예를 들어, 비천연형(unnatural) 아미노산 등을 포함하는) 하나 또는 그 이상의 아미노산의 유사체뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 변경들을 포함하는 폴리펩티드 또한 상기 정의 내에 포함된다. 폴리펩티드는 단일 사슬 또는 연결된 사슬일 수 있다. 단백질 전구체(preprotein) 또는 완전한 성숙 단백질(intact mature protein); 성숙 단백질로부터 유래된 펩티드 또는 폴리펩티드; 단백질의 단편; 스플라이스 변이체(splice variant); 단백질의 재조합 형태; 아미노산 변경, 결실 또는 치환을 가지는 단백질 변이체; 소화물(digests); 및 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등과 같은 전사 후 변경(post-translational modification) 또한 상기 정의 내에 포함된다.

[0096] 본원에 사용된 것으로서, "마커(marker)" 및 "바이오마커(biomarker)"는 개인에서 정상 또는 비정상적 진행의 표지(sign) 또는 개인에서 질병 또는 다른 상태의 표지이거나 그것을 나타내는 표적 분자를 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 더욱 상세하게는, "마커" 또는 "바이오마커"는 정상 또는 비정상이든지 간에, 만약 비정상이라면 만성인지 급성인지, 특정 생리학적 상태 또는 진행의 존재와 관련된 해부, 생리, 생화학 또는 분자학적 파라미터이다. 바이오마커는 실험실 검정법 및 의료용 영상을 포함하는 다양한 방법에 의하여 검출가능하고 측정가능하다. 바이오마커가 단백질인 경우, 그것은 또한 생물학적 샘플에서 대응하는 단백질 바이오마커의 양 또는 존재 또는 부재의 대리지표(surrogate measure) 만큼에 해당하는 발현 또는 바이오마커 또는 상기 바이오마커의 발현을 조절하는 단백질을 암호화하는 유전자의 메틸화 상태를 사용할 수 있다.

[0097] 본원에 사용된 것으로서, "바이오마커 값(biomarker value)","값(value)", "바이오마커 레벨(biomarker level)" 및 "레벨(level)"은 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출하기 위한 임의의 분석 방법을 사용하여 만들어진 측정값을 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용되며, 생물학적 샘플에서 바이오마커에 대응하는 것에 대한 존재, 부재, 절대량 또는 농도, 상대적인 양 또는 농도, 역가(titer), 레벨(level), 발현 레벨, 측정된 레벨의 비율 등을 나타낸다. "값" 또는 "레벨"의 정확한 특성은 바이오마커를 검출하는 데 사용된 특정 분석 방법의 특정 설계 및 성분에 의존한다.

[0098] 바이오마커가 개인에서의 비정상적인 진행 또는 질병 또는 다른 상태의 표지이거나 그것을 나타내는 경우, 그 바이오마커는 일반적으로 개인에서의 정상적인 진행 또는 질병 또는 다른 상태의 부재의 표지이거나 그것을 나타내는 바이오마커의 발현 레벨 또는 값과 비교하여 과발현(over-expressed) 또는 발현 감소(under expressed) 중 하나로서 설명된다. "상향 조절(up-regulation)", "상향 조절된(up-regulated)", "과발현(over-expression)", "과발현된(over-expressed)" 및 그것들의 임의의 변화들은 건강하거나 정상적인 개인으로부터의 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출된 바이오마커의 값 또는 레벨(또는 값 또는 레벨의 범위)보다 더욱 큰 생물학적 샘플에서의 바이오마커 값 또는 레벨을 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 특정 질병의 서로 다른 단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 레벨(또는 값 또는 레벨의 범위)보다 더욱 큰 생물학적 샘플에서의 바이오마커 값 또는 레벨을 칭할 수 있다.

[0099] "하향 조절(down-regulation),"하향 조절된(down-regulated)", "발현 감소(under-expression)", "발현 감소된(under-expressed)" 및 그것들의 임의의 변화들은 건강하거나 정상적인 개인으로부터의 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출된 바이오마커의 값 또는 레벨(또는 값 또는 레벨의 범위)보다 적은 생물학적 샘플에서의 바이오마커 값 또는 레벨을 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 특정 질병의 서로 다른

단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 레벨(또는 값 또는 레벨의 범위)보다 적은 생물학적 샘플에서의 바이오마커 값 또는 레벨을 칭할 수 있다.

[0100] 게다가, 과발현되거나 발현 감소된 바이오마커는 또한 개인에서 정상적인 진행 또는 질병 또는 다른 상태의 부재의 표지이거나 그것을 나타내는 바이오마커의 "정상적인" 발현 레벨 또는 값과 비교하여, "차별적으로 발현(differentially expressed)"되거나 "차별적인 레벨(differential level)" 또는 "차별적인 값(differential value)"을 가지는 것으로 칭해질 수 있다. 따라서, 바이오마커의 "차별적인 발현" 또한 바이오마커의 "정상적인" 발현 레벨로부터 변화로서 말해질 수 있다.

[0101] 상기 용어 "차별적인 유전자 발현(differential gene expression)" 및 "차별적인 발현(differential expression)"은 정상 또는 대조 대상에서 그것의 발현에 관하여, 특정 질병으로 고통받는 피험자에게서 높거나 낮은 레벨로 발현이 활성화된 유전자(또는 그것의 대응하는 단백질 발현 산물)를 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 동일한 질병의 서로 다른 단계에서 높거나 낮은 레벨로 발현이 활성화된 유전자(또는 대응하는 단백질 발현 산물)를 포함한다. 그것은 또한 차별적으로 발현된 유전자가 핵산 레벨 또는 단백질 레벨에서 활성화되거나 억제될 수 있거나, 서로 다른 폴리펩티드 산물을 만들어내는 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 영향을 받을 수 있다. 이러한 차이점들은 폴리펩티드의 mRNA 레벨, 표면 발현(surface expression), 분비 또는 다른 분할(partitioning)을 포함하는 다양한 변화에 의해 명백해질 것이다. 차별적인 유전자 발현은 두 개 또는 그 이상의 유전자 또는 그것들의 유전자 산물 간의 발현의 비교; 또는 두 개 또는 그 이상의 유전자 또는 그것들의 유전자 산물 간의 발현 비율의 비교; 또는 오히려 정상 피험자와 질병으로 고통받는 피험자 사이 또는 동일한 질병의 다양한 단계 사이에서 상이한, 동일 유전자의 두 개의 다르게 처리된 산물의 비교를 포함할 수 있다. 차별적인 발현은 예를 들어, 정상 및 병든 세포, 또는 서로 다른 질병 사건 또는 질병 단계를 겪은 세포들 사이에서의 유전자 또는 그것의 발현 산물에서 일시적(temporal) 또는 세포적(cellular) 발현 패턴에서의 정량적(quantitative) 뿐만 아니라 정성적(qualitative) 차이 모두를 포함한다.

[0102] 본원에 사용된 것으로서, "개인(individual)"은 피시험자(test subject) 또는 환자를 말한다. 상기 개인은 포유동물 또는 비포유동물일 수 있다. 다양한 구현에서, 상기 개인은 포유동물이다. 포유류 개인은 인간 또는 비인간일 수 있다. 다양한 구현에서, 상기 개인은 인간이다. 건강하거나 정상인 개인은 (예를 들어, 심근경색, 뇌졸중 및 울혈성 심부전과 같은 심혈관 사건을 포함하는) 관심 질병 또는 상태를 기존의 진단 방법에 의해 검출할 수 없는 개인이다.

[0103] "진단하다(diagnose)", "진단하는 것(diagnosing)", "진단(diagnosis)" 및 그것들의 변화형은 개인에게 관련된 하나 또는 그 이상의 징후, 증상, 데이터 또는 다른 정보에 기초하여, 개인의 건강 상태 또는 상황의 발견, 판단 또는 인지를 말한다. 개인의 건강 상태는 건강한(healthy)/정상(normal)(즉, 질병 또는 질환이 없음의 진단)으로 진단되거나, 건강이 나쁜(ill)/비정상(abnormal)(즉, 질병 또는 질환의 존재 또는 특성의 판단의 진단)으로 진단될 수 있다. 상기 용어 "진단하다", "진단하는 것", "진단" 등은 특정 질병 또는 질환에 관하여 질병의 초기 발견; 질병의 특성 또는 분류; 질병의 진행(progress), 차도(remission) 또는 재발(recurrence)의 발견; 개인에 대한 처치 또는 치료의 시행 후 질병 반응의 발견을 포함한다. 심혈관 사건의 위험의 예측은 그렇지 않은 개인들로부터 심혈관 사건의 위험성이 증가된 개인을 구별하는 것을 포함한다.

[0104] "예후예측하다(prognose)", "예후예측하는 것(prognosing)", "예후예측(prognosis)" 및 그것들의 변화형은 질병 또는 질환을 가지는 개인에서 질병 또는 질환의 진행 과정의 예측(예를 들어, 환자 생존율을 예측하는 것)을 말하며, 이러한 용어는 개인에 대한 처치 또는 치료의 시행 후 질병 반응의 평가를 포함한다.

[0105] "평가하다(evaluate)", "평가하는 것(evaluating)', "평가(evaluation)" 및 그것들의 변화형은 "진단하다(diagnose)" 및 "예측하다(prognose)" 모두를 포함하며, 또한 질병을 가지지 않은 개인에서의 질병 또는 질환의 진행 과정에 대한 판단 또는 예측뿐만 아니라, 질병이 분명히 치료된 개인에서의 질병 및 질환이 재발할 가능성에 관한 판단 또는 예측을 포함한다. 상기 용어 "평가하다"는 또한 예를 들어, 개인이 치료제에 대하여 순조롭게 반응할 것인지 아니면 치료제에 대하여 반응하지 않을 것인지(또는, 예를 들어, 독성을 경험하거나 다른 바람직하지 않은 부작용을 경험할 것인지)를 예측하는 것, 개인에게 투여하기 위한 치료제를 선택하는 것 또는 개인에 대하여 시행된 치료에 대한 개인의 반응을 관찰하거나 발견하는 것과 같은 치료에 대한 개인의 반응을 평가하는 것을 포함한다. 따라서, 심혈관 사건의 위험을 "평가하는 것"은 예를 들어 임의의 하기의 것: 개인에게서 심혈관 사건의 미래의 위험을 예측하는 것; 심혈관 문제가 없는 것으로 보이는 개인에게서 심혈관 사건의 위험을 예측하는 것; 또는 심혈관 치료에 대한 개인의 반응을 판단하거나 예측하는 것 또는 개인의 생물학적 샘플로부터 유래된 바이오마커 값의 측정에 기초하여 개인에게 시행하기 위한 심혈관 치료를 선택하는 것을 포함할

수 있다. 심혈관 사건의 위험의 평가는 연속적인 범위(continuous scale)로의 심혈관 사건의 위험의 평가 또는 확대되는 분류로의 심혈관 사건의 위험의 분류와 같은 구현을 포함할 수 있다. 위험의 분류는 예를 들어, "심혈관 사건의 위험이 높지 않음" 및 "심혈관 사건의 위험이 높음"과 같은 두 개 또는 그 이상의 분류로의 분류를 포함한다. 심혈관 사건의 위험의 평가는 정해진 기간 동안 이뤄지며; 이와 같은 기간은 예를 들어, 5년일 수 있다.

[0106] 본원에 사용된 것으로서, "추가적인 생물의학 정보(additional biomedical information)"는 본원에 기술된 임의의 바이오마커를 사용하는 것을 제외한, 심혈관 위험 또는 더욱 상세하게는, 심혈관 사건의 위험과 관련된 하나 또는 그 이상의 개인의 평가를 말한다. "추가적인 생물의학 정보"는 임의의 하기의 것들: 개인의 키 및/또는 체중을 포함하는 개인의 신체 기술서(physical description); 개인의 연령; 개인의 성별; 체중의 변화; 개인의 민족성; 직업 경력; 심혈관 질병(또는 다른 순환계 질환)의 가족력; 경동맥 내막중막두께(carotid intima media thickness)에 있어서의 변형에 있어서 개인 또는 가족 구성원에서 심혈관 질병(또는 다른 순환계 질환)의 고위험과 관련 있는 유전적 마커의 존재; 흉통(chest pain)과 같은 임상적 증상, 체중 증가 또는 감소 유전자 발현값; 방사선 영상(radiologic imaging)에 의해 발견된 신체 기술서를 포함하는 개인의 신체 기술서; 흡연 상태; 음주력; 직업 경력; 식습관 - 염, 포화 지방 및 콜레스테롤 섭취; 카페인 소비; 및 심전도(electrocardiogram), 심장 초음파(echocardiography), 내막중막두께에 대한 경동맥 초음파(carotid ultrasound), 혈관확장반응(flow mediated dilation), 동맥 맥파 속도(pulse wave velocity), 발목상완지수(ankle brachial index), 부하 심초음파(stress echocardiography), 심근 관류 영상(myocardial perfusion imaging), CT에 의한 관상동맥 칼슘, 고해상도 혈관 전산화단층촬영(high resolution CT angiography), MRI 영상, 및 다른 영상 양식과 같은 영상 정보; 및 개인의 약물치료를 포함한다. 다른 실험실 테스트(예를 들어, HDL, LDL 테스트, CRP 레벨, Nt-proBNP 테스트, 혈청 알부민 테스트, 크레아틴 테스트)를 포함하는 임의의 추가적인 생물학적 정보의 평가와 함께 바이오마커 레벨을 테스트하는 것은 예를 들어, 바이오마커를 단독으로 테스트하거나 임의의 특정 항목의 추가적인 생물학적 정보 를 단독으로 평가하는 것(예를 들어, 내막중막두께 영상 단독)과 비교하여 심혈관 사건의 예측에 대한 민감도, 특이도 및/또는 AUC를 향상시킬 수 있다. 추가적인 생물의학 정보는 일상적인 환자 질문사항 또는 건강력 질문사항 등의 사용에 의해 개인들 그 자신으로부터 또는 의료 종사자 등으로부터 당업계에 공지된 일반적인 기술을 사용하여 개인들로부터 얻어질 수 있다. 임의의 추가적인 생물학적 정보의 평가와 함께 바이오마커 레벨을 테스트하는 것은 예를 들어, 바이오마커를 단독으로 테스트하거나 임의의 특정 항목의 추가적인 생물의학 정보를 단독으로 평가하는 것(예를 들어, CT 영상 단독)과 비교하여 심혈관 사건의 예측(또는 다른 심혈관 관련 용도)을 위한 민감도, 특이도 및 역치를 향상시킬 수 있다.

[0107] 본원에 사용된 것으로서, 바이오마커 값에 대한 "검출(detecting)" 또는 "측정(determining)"은 바이오마커 값에 대응하는 시그널을 발견하고 기록하는데 필요한 기구 및 그 시그널을 생성하는데 필요한 물질(들) 모두의 사용을 포함한다. 다양한 구현에서, 상기 바이오마커 값은 형광(fluorescence), 화학발광(chemiluminescence), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 표면 탄성파(surface acoustic waves), 질량 분석법(mass spectrometry), 적외선 분광법(infrared spectroscopy), 라만 분광법(raman spectroscopy), 원자 현미경(atomic force microscopy), 주사 터널링 현미경(scanning tunneling microscopy), 전기화학 검출법(electrochemical detection methods), 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance), 양자점(quantum dots) 등을 포함하는 임의의 적절한 방법을 사용하여 검출된다.

[0108] "고체 지지체(solid support)"는 본원에서 분자가 공유결합 또는 비공유결합 중 하나를 통하여 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 표면을 가지는 임의의 기질을 말하는 것이다. "고체 지지체"는 예를 들어, 막(membrane); 칩(chip)(예를 들어, 단백질 칩); 슬라이드(slide)(예를 들어, 유리 슬라이드 또는 커버슬립(coverslip)); 컬럼(column); 속이 빈 형태(hollow), 고체(solid), 반고체(semi-solid), 예를 들어 비드(bead)와 같은 세공(pore) 또는 공동(cravity)을 가지는 입자; 겔(gel); 광섬유 물질(fiber optic material)을 포함하는 섬유(fiber); 매트릭스(matrix); 및 샘플 용기(receptacle)를 포함할 수 있는 다양한 물리적 형태를 가질 수 있다. 대표적인 샘플 용기는 샘플 웰(sample wells), 튜브(tubes), 모세관(capillaries), 바이알(vials) 및 샘플을 고정할 수 있는 임의의 다른 관(vessel), 홈(groove) 또는 굴곡(indentation)을 포함한다. 샘플 용기는 미세역가 플레이트(microtiter plate), 슬라이드, 미세유동 장치(microfluidics device) 등과 같은 다중-샘플 플랫폼 상에 포함될 수 있다. 지지체는 천연 또는 합성 물질, 유기 또는 무기 물질로 이루어질 수 있다. 시약을 포획하는 고체 지지체 조성물은 일반적으로 부착 방법(예를 들어, 공유 부착(covalent attachment)에 따라 부착된다. 다른 대표적 용기는 그 안에서 검정 및 관련 조작이 일어날 수 있는 미세액적(microdroplet) 및 미세유체(microfluid)가 조절되거나 부피가 커진 오일(bulk oil)/수성 유제(aqueous emulsion)를 포함한다. 적절한 고체 지지체는 예를 들어, 플라스틱(plastics), 레진(resins), 다당류

(polysaccharide), 실리카(silica) 또는 실리카-기재의 물질(silica-based materials), 기능화된 유리(functionalized glass), 개질된 실리콘(modified silicon), 탄소(carbon), 금속(metals), 무기 유리(inorganic glasses), 막(membranes), 나일론(nylon), (예를 들어, 실크, 울 및 코튼과 같은) 천연 섬유(natural fibers), 폴리머(polymers) 등을 포함한다. 상기 물질은 예를 들어, 포획 시약의 부착을 위해 사용되는 카르복시(carboxy), 아미노(amino) 또는 하이드록실(hydroxyl)기와 같은 반응성 기를 포함할 수 있는 고체 지지체로 구성된다. 고분자성 고체 지지체는 예를 들어, 폴리스티렌(polystyrene), 폴리에틸렌 글리콜 테트라프탈레이트(polyethylene glycol tetraphthalate), 폴리비닐 아세테이트(polyvinyl acetate), 폴리비닐 클로라이드(polyvinyl chloride), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile), 폴리메틸 메타크릴레이트(polymethyl methacrylate), 폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene), 부틸 고무(butyl rubber), 스티렌부타디엔 고무(styrenebutadiene rubber), 천연 고무(natural rubber), 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리프로필렌(polypropylene), (폴리)테트라플루오로에틸렌((poly)tetrafluoroethylene), (폴리)비닐리덴플루오라이드((poly)vinylidenefluoride), 폴리카보네이트(polycarbonate) 및 폴리메틸펜텐(polymethylpentene)을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 적절한 고체 지지체 입자는 예를 들어, 루미넥스®-타입 인코딩된 입자(Luminex®-type encoded particles), 자성 입자(magnetic particles) 및 유리 입자(glass particles)와 같은 인코딩된 입자(encoded particles)를 포함한다.

[0110] **바이오마커의 예시적 사용**

[0111] 다양한 예시적 구현에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 분석 방법을 포함하는 임의의 수의 분석 방법에 의해, 혈청 또는 혈장에서와 같은 개인의 순환기에 존재하는 하나 또는 그 이상의 바이오마커에 대응하는 하나 또는 그 이상의 바이오마커 값을 검출함으로써 개인에서 심혈관 사건의 위험을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 이 바이오마커는 예를 들어, 심혈관 사건의 위험이 높지 않은 개인과 비교하여 심혈관 사건의 위험이 높아진 개인에게서 차별적으로 발현된다. 개인에게서 바이오마커의 차별적 발현의 검출은 예를 들어, 5년의 기간 내의 심혈관 사건의 위험의 예측을 가능하게 하기 위하여 사용될 수 있다.

[0112] 독립형(stand-alone) 진단 테스트로서 바이오마커 레벨을 테스트하는 것 외에, 바이오마커 레벨은 또한 질병 또는 질환 감수성(susceptibility)의 증가된 위험의 징후인 SNPs 또는 다른 유전적 병변(lesions) 또는 변형(variability)의 측정과 함께 테스트 될 수 있다(예를 들어, Amos et al., Nature Genetics 40, 616-622(2009)를 참조).

[0113] 독립형 진단 테스트로서 바이오마커 레벨을 테스트하는 것 외에, 바이오마커 레벨은 또한 방사선학적 선별(radiologic screening)과 함께 사용될 수 있다. 바이오마커 레벨은 또한 관련 증상 또는 유전자 검사(genetic testing)와 함께 사용될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 바이오마커의 검출은 심혈관 사건의 위험이 측정된 후 고위험 개인에게 더욱 적극적인 수준의 간호를 증가시키는 것을 포함하는, 개인의 적절한 임상 관리(clinical care)를 제시하기 위하여 평가되었다. 관련 증상 또는 위험 인자와 함께 바이오마커 레벨을 테스트하는 것 외에, 바이오마커에 관한 정보는 또한 다른 형태의 데이터, 특히 심혈관 사건에 대한 개인의 위험을 나타내는 데이터(예를 들어, 환자의 병력, 증상, 심혈관 질환의 가족력, 흡연력 또는 음주력, 유전적 마커(들)의 존재, 및/또는 다른 바이오마커의 상태 등)와 함께 평가될 수 있다. 이들 다양한 데이터는 컴퓨터 또는 다른 기기/기구에 포함될 수 있는 컴퓨터 프로그램/소프트웨어와 같은 자동화 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0114] 고위험 개인에게서 방사선학적 선별과 함께 바이오마커 레벨을 테스트하는 것 외에(예를 들어, 관상동맥 조영술에서 검출된 폐색(blockage)과 함께 바이오마커 레벨을 평가하는 것), 바이오마커에 대한 정보는 또한 다른 형태의 데이터, 특히 심혈관 사건을 겪는 것에 대한 개인의 위험을 나타내는 데이터(예를 들어, 환자의 병력, 개인이 흡연자(smoker), 과 음주자(heavy alcohol user) 인지 아닌지와 같은 위험 인자 및/또는 다른 바이오마커의 상태 등)와 함께 평가될 수 있다. 이들 다양한 데이터는 컴퓨터 또는 다른 기기/기구에 포함될 수 있는 컴퓨터 프로그램/소프트웨어와 같은 자동화 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0115] 바이오마커의 테스트는 또한 임상 시험에서 현재 사용중인 가이드라인과 심혈관 위험 알고리즘과 관련될 수 있다. 예를 들면, 프래밍햄 위험 스코어(Framingham Risk score)는 위험 스코어를 얻기 위하여 하기 위험 인자: 혈관 긴장도(vascular tone), LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 레벨, 손상된 글루코스 레벨, 흡연, 최대혈압(systolic blood pressure) 및 당뇨병을 사용한다. 고위험 환자의 빈도는 연령에 따라 증가하고, 남성은 여성보다 더 높은 비율의 고위험 환자를 포함한다.

[0116] 기재된 바이오마커들 중 어떤 것이라도 영상 테스트에 또한 사용될 수 있다. 예를 들면, 영상 제제(imaging agent)는 심혈관 사건의 위험 예측에 도움을 주기 위하여, 치료학적 개입(therapeutic intervention)에 대한 반

응을 관찰하기 위하여, 다른 용도들 중에서 임상 시험에서 표적 집단을 선별하기 위하여 사용될 수 있는 기재된 바이오마커들 중 어떤 것에라도 결합될 수 있다.

[0118] **바이오마커 및 바이오마커 값의 검출 및 측정**

[0119] 본원에 기재된 바이오마커에 대한 바이오마커 값은 임의의 다양한 공지의 분석 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일 구현에서, 바이오마커 값은 포획 시약을 사용하여 검출된다. 본원에 사용된 것으로서, "포획제(capture agent)" 또는 "포획 시약(capture reagent)"은 바이오마커에 특이적으로 결합할 수 있는 분자를 말한다. 다양한 구현에서, 상기 포획 시약은 용액 내에서 바이오마커에 노출될 수 있고, 또는 포획 시약이 고체 지지체 상에 고정화되어 있는 동안 바이오마커에 노출될 수 있다. 다른 구현에서, 상기 포획 시약은 고체 지지체 상의 제2의 특징부(feature)와 반응하는 특징부를 포함한다. 이 구현들에서, 상기 포획 시약은 용액 내에서 바이오마커에 노출될 수 있고, 그 후 포획 시약 상의 특징부는 고체 지지체 상의 바이오마커를 고정화시키기 위하여 고체 지지체 상의 제2의 특징부와 함께 사용될 수 있다. 상기 포획 시약은 수행될 분석의 형태에 기초하여 선택된다. 포획 시약은 소마머(SOMAmer), 항체(antibodies), 애드넥틴(adnectins), 안키린(ankyrins), 다른 항체 모조물(antibody mimetics) 및 다른 단백질 스캐폴드(protein scaffolds), 자가항체(autoantibodies), 키메라(chimeras), 소분자(small molecules), $F(ab')_2$ 단편, 단일 사슬 항체 단편(single chain anbibody fragment), Fv 단편(Fv fragment), 단일 사슬 Fv 단편(single chain Fv fragment), 핵산(nucleic acid), 렉틴(lectin), 리간드 결합 수용체(ligand-binding receptor), 애피바디(affybodies), 나노바디(nanobodies), 각인된 고분자(imprinted polymer), 아비머(avimers), 펩티드 모조물(peptidomimetics), 호르몬 수용체(hormone receptor), 시토카인 수용체(cytokine receptor), 및 합성 수용체(synthetic receptors) 및 이것들의 변경 및 단편을 포함하나 이로 한정되는 것은 아니다.

[0120] 어떤 구현에서, 바이오마커 값은 바이오마커/포획 시약 복합체(complex)를 사용하여 검출된다.

[0121] 다른 구현에서, 상기 바이오마커 값은 바이오마커/포획 시약 복합체로부터 유래되며, 예를 들어 바이오마커/포획 시약 상호작용 후의 반응 결과와 같이 간접적으로 검출되지만, 상기 바이오마커/포획 시약 복합체의 형성에 의존한다.

[0122] 어떤 구현에서, 상기 바이오마커 값은 생물학적 샘플에서 바이오마커로부터 직접적으로 검출된다.

[0123] 일 구현에서, 상기 바이오마커는 생물학적 샘플에서 두 개 또는 그 이상의 바이오마커의 연속적 검출을 가능하게 하는 다중화된 포맷(multiplexd format)을 사용하여 검출된다. 다중화된 포맷의 일 구현에서, 포획 시약은 고체 지지체 상의 이산 위치(discrete location)에서 직접 또는 간접적으로, 공유결합 또는 비공유결합적으로 고정화된다. 다른 구현에서, 다중화된 포맷은 각각의 고체 지지체가 예를 들어, 양자점(quantum dot)과 같은 그 고체 지지체와 결합된 독특한 포획 시약을 가지는 이산 고체 지지체를 사용한다. 다른 구현에서, 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 검출될 각각의 다중 바이오마커 중 하나의 검출을 위하여 사용된다. 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 각 바이오마커를 동시에 처리할 수 있도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 미세역가 플레이트(microtiter plate)는 플레이트 내의 각 웰이 생물학적 샘플에서 검출될 다중의 바이오마커 중 하나를 특별하게 분석하는데 사용되는 것처럼 사용될 수 있다.

[0124] 하나 또는 그 이상의 앞서 말한 구현들에서, 형광 태그(fluorescent tag)는 바이오마커 값을 검출할 수 있도록 바이오마커/포획 복합체의 성분을 표지하는데 사용될 수 있다. 다양한 구현에서, 상기 형광 태그는 공지의 기술을 사용하여 포획 시약이 본원에 기재된 임의의 바이오마커에 대하여 특이적이도록 구성될 수 있고, 형광 표지는 그 후 대응하는 바이오마커 값을 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 적절한 형광 표지(fluorescent label)는 희토류 킬레이트(rare earth chelates), 플루오르세인(fluorescein) 및 그것의 유도체, 로다민(rhodamine) 및 그것의 유도체, 단실(dansyl), 알로피코시아닌(allophycocyanin), PBXL-3, Qdot 605, 리사민(Lissamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 텍사스 레드(Texas Red) 및 다른 이와 같은 화합물들을 포함한다.

[0125] 일 구현에서, 상기 형광 표지는 형광 염료 분자(fluorescent dye molecule)이다. 어떤 구현에서, 상기 형광 염료 분자는 인돌륨 고리의 3-탄소 상의 치환기가 화학적 반응기(chemically reactive group) 또는 복합 물질(conjugated substance)을 포함하는, 적어도 하나의 치환된 인돌륨 고리 시스템(indolium ring system)을 포함한다. 어떤 구현에서, 상기 염료 분자는 예를 들어, 알렉사플루오르 488(AlexaFluor 488), 알렉사플루오르 532(AlexaFluor 532), 알렉사플루오르 647(AlexaFluor 647), 알렉사플루오르 680(AlexaFluor 680) 또는 알렉사플루오르 700(AlexaFluor 700)과 같은 알렉사플루오르 분자를 포함한다. 다른 구현에서, 상기 염료 분자는 예를 들어, 두 개의 상이한 알렉사플루오르 분자와 같은 제1형 및 제2형의 염료 분자를 포함한다. 다른

구현에서, 상기 염료 분자는 제1형 및 제2형 염료 분자를 포함하고, 두 개의 염료 분자는 서로 다른 방출 스펙트럼(emission spectra)를 가진다.

[0126] 형광 발광(fluorescence)은 넓은 범위의 검정 포맷에 적합한 다양한 수단(instrumentation)을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들면, 분량 형광계(spectrofluorimeter)는 미세역가 플레이트, 현미경 슬라이드, 프린팅된 어레이(printed arrary), 큐벳(cuvettes) 등을 분석하도록 설계된다(Principles of Fluorescence Spectroscopy by J.R. Lakowicz, Springer Science + Business Media, Inc., 2004; Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications; Philip E. Stanley and Larry J. Kricka editors, World Scientific Publishing Company, January 2002.를 참조).

[0127] 하나 또는 그 이상의 앞서 말한 구현에서, 화학발광 태그는 바이오마커 값의 검출이 가능하도록 바이오마커/포획 복합체의 성분을 표지하는데 선택적으로 사용될 수 있다. 적절한 화학발광 물질은 임의의 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride), 로다민 6G, $Ru(bipy)3^{2+}$, TMAE(tetrakis(dimethylamino)ethylene), 피로갈롤(1,2,3-트리히드록시벤젠)(Pyrogallol(1,2,3-trihydroxibenzene)), 루시레닌(Lucigenin), 퍼록시옥살레이트(peroxyosalates), 아릴 옥살레이트(Aryl oxalates), 아크리디늄 에스테르(Acridinium esters), 디오세테인(dioxetanes) 및 그 이외의 것들을 포함한다.

[0128] 또 다른 구현에서, 상기 검출 방법은 상기 바이오마커 값에 대응하는 검출가능한 시그널을 생성하는 효소/기질 화합물을 포함한다. 일반적으로, 상기 효소는 분광광도법(spectrophotometry), 형광발광(fluorescence) 및 화학발광(chemiluminescence)을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 측정될 수 있는 발색성(chromogenic) 기질의 화학적 변경을 촉진한다. 적절한 효소는 예를 들어, 루시퍼라아제(luciferases), 루시페린(luciferin), 말레이트 디하이드로게나아제(malate dehydrogenase), 우레아제(urease), 서양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase; HRPO), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 라이소자임(lysozyme), 글루코스 옥시다아제(glucose oxidase), 갈락토스 옥시다아제(galactose oxidase) 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase), 유리카아제(uricase), 크산틴 옥시다아제(xanthine oxidase), 락토퍼록시다아제(lactoperoxidase), 마이크로퍼록시다아제(microperoxidase) 등을 포함한다.

[0129] 또 다른 구현에서, 상기 검출 방법은 측정가능한 시그널을 생성하는 형광발광, 화학발광, 방사성 핵종(radionuclide) 또는 효소/기질 화합물의 조합일 수 있다. 멀티모달 시그널링(multimodal signaling)은 바이오마커 검정 포맷에서 유일하고 유리한 특성을 가질 수 있다.

[0130] 더욱 상세하게는, 본원에 기재된 바이오마커에 대한 바이오마커 값은 하기에 기재된 것과 같은 싱글플렉스 소마머 검정법(singleplex SOMAmer assays), 다중화된 소마머 검정법(multiplexed SOMAmer assays), 싱글플렉스 또는 다중화된 면역검정법(immunoassays), mRNA 발현 프로파일링(mRNA expression profiling), miRNA 발현 프로파일링(miRNA expression profiling), 질량 분광 분석법(mass spectrometric analysis), 조직(histological)/세포학적(cytological) 방법 등을 포함하는 공지의 분석 방법을 사용하여 검출될 수 있다.

[0132] **소마머 기반 검정법을 사용하는 바이오마커 값의 측정**

[0133] 생물학적 샘플 및 다른 샘플에서 생리학적으로 중요한 분자의 검출 및 정량을 위한 검정법은 과학적 연구 및 보건 분야에서 중요한 수단이다. 이와 같은 검정법의 하나의 종류는 고체 지지체 상에 고정화된 하나 또는 그 이상의 압타머를 포함하는 마이크로어레이의 사용을 포함한다. 상기 압타머는 각각 매우 특이적인 방식 및 매우 높은 친화력으로 표적 분자에 결합할 수 있다("Nucleic Acid Ligands"라는 제목의 U.S. Patent No. 5,475,543 및 "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip"이라는 제목의 U.S. Patent No. 6,503,715을 참조). 일단 마이크로어레이가 샘플과 접촉하면, 압타머는 샘플에 존재하는 그것들 각각의 표적 분자에 결합하여 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 측정할 수 있게 한다.

[0134] 본원에 사용된 것으로서, "압타머(aptamer)"는 표적 분자에 대한 특정 결합 친화력을 가지는 핵산을 말한다. 친화 상호작용(affinity interaction)은 그러나 이 상황에서는 정도(degree)의 문제이며, 그것의 표적에 대한 압타머의 "특정 결합 친화력(specific binding affinity)"은 압타머는 시료에서의 다른 성분에 결합하는 것보다 일반적으로 더 높은 정도의 친화력으로 그것의 표적에 결합함을 의미한다는 것을 알 수 있다. "압타머"는 특정 뉴클레오티드 서열을 가지는 하나의 형태 또는 종류의 핵산 분자의 복제 세트를 말한다. 서로 다른 압타머는 동일하거나 서로 다른 수의 뉴클레오티드 중 하나를 가질 수 있다. 압타머는 DNA 또는 RNA 또는 화학적으로 변경된 핵산일 수 있고, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 이중 가닥 영역을 포함하는 것일 수 있고, 매우 질서정연한

(higher ordered) 구조를 포함할 수 있다. 광반응성(photoreactive) 또는 화학적 반응성 기능기(chemically reactive functional group)가 그것의 대응하는 표적에 공유적으로 결합될 수 있도록 압타머에 포함되어 있는 한, 압타머는 또한 광압타머(photoaptamer)일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 압타머 방법은 동일한 표적 분자와 특이적으로 결합하는 두 개 또는 그 이상의 압타머의 사용을 포함할 수 있다. 하기에 더 기재된 바와 같이, 압타머는 태그를 포함할 수 있다. 만약 압타머가 태그를 포함한다면, 모든 압타머의 복제는 동일한 태그를 가질 필요가 없다. 더욱이, 만약 서로 다른 압타머가 각각 태그를 포함한다면, 이 서로 다른 압타머들은 서로 동일한 태그 또는 서로 다른 태그 중 하나를 가질 수 있다.

[0135] 압타머는 SELEX를 포함하는 임의의 공지의 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 일단 확인되면, 압타머는 화학 합성 방법 및 효소 합성 방법을 포함하는 임의의 공지의 방법에 따라 제조되거나 합성될 수 있다.

[0136] 본원에 사용된 것으로서, "소마머(SOMAmer)" 또는 느린 오프-레이트의 변경된 압타머(Slow Off-Rate Modified Aptamer)는 향상된 오프-레이트 특성을 가지는 압타머를 말한다. 소마머는 "향상된 오프-레이트를 가지는 압타머를 만들기 위한 방법(Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates)"이라는 제목의 미국 공개특허번호 제2009/0004667호에 기재된 향상된 SELEX 방법을 사용하여 만들 수 있다.

[0137] 상기 용어 "SELEX" 및 "SELEX 공정(SELEX process)"은 (1) 바람직한 방식, 예를 들어 단백질에 고친화력을 가지는 결합으로 표적 분자와 상호작용하는 압타머의 선별과 (2) 그 선택된 핵산의 증폭(amplification)의 조합을 일반적으로 칭하기 위하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 SELEX 공정은 특정 표적 또는 바이오마커에 대하여 고친화력을 가지는 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0138] SELEX는 일반적으로 핵산의 후보물질 혼합물을 제조하고, 친화 복합체(affinity complex)를 형성하기 위하여 원하는 표적 분자에 후보물질 혼합물을 결합시키고, 결합되지 않은 후보물질 핵산으로부터 친화 복합체를 분리하고, 친화 복합체로부터 핵산을 분리 및 단리시키고, 핵산을 정제하고, 특정 압타머 서열을 증폭하는 것을 포함한다. 상기 공정은 선별된 압타머의 친화력을 더 개선하기 위한 다중 라운드(multiple rounds)를 포함할 수 있다. 상기 공정은 공정에서의 하나 또는 그 이상의 지점에서 증폭 단계를 포함할 수 있다(예를 들어, "Nucleic Acid ligands"라는 제목의 U.S. Patent No. 5,475,096를 참조). 상기 SELEX 공정은 그것의 표적에 공유적으로 결합하는 압타머 뿐만 아니라 그것의 표적에 비공유적으로 결합하는 압타머를 생성하기 위하여 사용될 수 있다(예를 들어, "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX"라는 제목의 U.S. Patent No. 5,705,337을 참조).

[0139] 상기 SELEX 공정은 예를 들어, 생체 내(*in vivo*) 안정성을 향상시키거나 운반 특성을 향상시키는 것과 같은, 압타머 상에 향상된 특성을 부여하는 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 고친화성 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 변경의 예는 리보오스(ribose) 및/또는 포스페이트(phosphate) 및/또는 염기 위치(base position)에서의 화학적 치환을 포함한다. SELEX 공정에서 확인된 압타머는 피리딘의 5'- 및 2'-위치에서 화학적으로 변경된 뉴클레오티드 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 기술하고 있는 미국특허번호 제5,660,985호("High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides")에 기재되어 있다. 상기를 참고하여, 미국특허번호 제5,580,737호는 2'-아미노(2'-NH_2), 2'-플루오로(2'-F) 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변경된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 고특이성 압타머를 기술하고 있다. 또한, SELEX 및 광SELEX에서 확장된 물리 및 화학적 특성을 가지는 핵산 라이브러리 및 그것들의 용도를 기술하고 있는 미국특허공개번호 제20090098549호("SELEX 및 PHOTOSELEX")를 참고하라.

[0140] SELEX는 또한 바람직한 오프-레이트(off-rate) 특성을 가지는 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머를 생성하기 위한 향상된 SELEX 방법을 기술하고 있는 미국특허출원공개번호 제20090004667호("Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates")를 참고하라. 상기 언급한 바와 같이, 이들 느린 오프-레이트 압타머는 "소마머(SOMAmer)"로 알려져 있다. 그것들 각각의 표적 분자들로부터 더욱 느린 해리(dissociation) 속도를 가지는 압타머 또는 소마머 및 광압타머 또는 광소마머를 생성하기 위한 방법이 기재되어 있다. 상기 방법은 표적 분자와 후보물질 혼합물을 접촉시키고; 핵산-표적 복합체의 형성이 일어나도록 하고; 느린 오프-레이트 증폭(enrichment) 공정을 수행하는 것을 포함하며, 여기에서 빠른 해리 속도를 가지는 핵산-표적 복합체는 해리되어 재생성되지 않을 것인 반면, 느린 해리 속도를 가지는 복합체는 온전하게 유지될 것이다. 부가적으로, 상기 방법은 향상된 오프-레이트 성능을 가지는 압타머 또는 소마머를 생성하기 위하여 후보물질 핵산 혼합물의 생성에서 변경된 뉴클레오티드의 사용을 포함한다.

[0141] 이 검정법의 변화는 압타머가 그것의 표적 분자에 공유적으로 결합 또는 "광가교(photocrosslink)" 결합할 수 있게 하는 광반응성 작용기를 포함하는 압타머를 사용한다(예를 들어, U.S. Patent No. 6,544,776, "Nucleic

Acid Ligand Diagnostic Biochip"을 참고하라). 이 광반응성(photoreactive) 압타머는 또한 광압타머로(photoaptamer)도 불린다(예를 들어, 각각 "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: PHotoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"라는 제목의 U.S. Patent NO. 5,763,177, U.S. Patent No. 6,001,577 및 U.S. Patent No. 6.291,184; "Photoselection of Nucleic Acid Ligands"라는 제목의 U.S. Patent No. 6,458,539를 참고하라). 상기 마이크로어레이가 샘플과 접촉한 후, 광압타머는 그것들의 표적 분자에 결합할 수 있는 기회를 가지며, 상기 광압타머는 광활성화되고, 고체 지지체는 임의의 비특이적으로 결합된 분자를 제거하기 위하여 세척된다. 광압타머 상의 광활성화된 작용기에 의해 생성된 공유 결합 때문에 광압타머에 결합된 표적 분자는 일반적으로 제거되지 않으므로, 가혹한 세척 조건이 사용될 수 있다. 이 방법으로, 상기 검정법은 시료에서 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 검출할 수 있게 한다.

[0142] 이 검정 포맷들 모두에서, 상기 압타머 또는 소마머는 샘플과 접촉하기 이전에 고체 지지체 상에 고정화된다. 그러나, 어떤 환경하에서, 샘플과 접촉하기 전 압타머 또는 소마머의 고정화는 최적의 검정을 제공하지 않을 수도 있다. 예를 들면, 압타머 또는 소마머의 전-고정화(pre-immobilization)는 아마도 긴 반응시간에 따른 고체 지지체 표면상의 표적 분자와 압타머 또는 소마머의 비효율적인 혼합을 야기할 수 있으므로, 그것의 표적 분자에 대한 압타머 또는 소마머의 효율적인 결합을 위하여 긴 배양기간을 요한다. 게다가, 광압타머 또는 광소마머가 검정법에 사용되고 고체 지지체로서 사용된 물질에 의존하는 경우, 상기 고체 지지체는 광압타머 또는 광소마머와 그것의 표적 분자 간의 공유 결합의 형성을 이루기 위하여 사용되는 빛을 산란시키거나 흡수하는 경향이 있을 수 있다. 더욱이, 사용된 방법에 따라, 고체 지지체의 표면은 또한 임의의 표지 시약에 노출되고 그것에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에, 그것의 압타머 또는 광소마머에 결합된 표적 분자의 검출은 부정밀도(imprecision)에 영향을 받기 쉽다. 마지막으로, 고체 지지체 상의 압타머 또는 소마머의 고정화는 일반적으로 샘플에 대한 압타머 또는 소마머의 노출 이전에 압타머 또는 소마머-제조 단계(즉, 고정화)를 포함하며, 이 제조 단계는 상기 압타머 또는 소마머의 활성 또는 기능성에 영향을 미칠 수 있다.

[0143] 용액에서 소마머가 그것의 표적을 포획할 수 있게 한 후, 검출 전 소마머-표적 혼합물의 특정 성분을 제거하기 위하여 설계된 분리 단계를 사용하는 소마머 검정법 또한 기술되어 있다("Multiplexed Analyses of Test Samples"라는 제목의 U.S. Patent Application Publication 20090042206을 참조). 상기 기술된 소마머 검정법은 핵산(즉, 소마머)을 검출하고 정량화하는 것에 의하여 시료에서의 비-핵산 표적(예를 들어, 단백질 표적)의 검출 및 정량화를 가능하게 한다. 상기 기술된 방법은 비-핵산 표적을 검출하고 정량화하기 위한 핵산 대리물(surrogate)(즉, 소마머)을 생성하므로, 단백질 표적을 포함하는 넓은 범위의 바람직한 표적에 적용될, 증폭을 포함하는 다양한 핵산 기술을 가능하게 한다.

[0144] 소마머는 소마머 바이오마커 복합체(SOMAmer biomarker complex)(또는 광소마머 바이오마커 공유결합 복합체)로부터 검정 성분(assay components)의 분리를 용이하게 하고, 검출 및/또는 정량화를 위한 소마머의 단리가 가능하도록 구성될 수 있다. 일 구현에서, 이 구조체(constructs)는 소마머 서열 내에 절단가능하거나(cleavable) 방출가능한(releasable) 구성요소를 포함할 수 있다. 다른 구현에서, 부가적인 기능성, 예를 들어 표지되거나 검출가능한 성분, 스페이서(spacer) 성분 또는 특정 결합 태그(tag) 또는 고정화 구성요소가 소마머 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 소마머는 절단가능한 부분(moiety), 표지(label), 표지를 분리하는 스페이서 성분 및 방출가능한 부분을 통하여 소마머에 연결된 태그를 포함할 수 있다. 일 구현에서, 절단가능한 구성요소는 광절단가능한 링커(photocleavable linker)이다. 상기 광절단가능한 링커는 비오틴 부분(biotin moiety) 및 스페이서 부분(spacer section)에 부착될 수 있고, 아민의 유도체화를 위한 NHS기를 포함할 수 있으며, 소마머에 비오틴기를 도입하는데 사용될 수 있고, 그것에 의하여 검정 방법 이후 소마머의 방출을 가능하게 한다.

[0145] 용액에서 모든 검정 성분을 처리하는 균질 검정법(homogenous assays)은 시그널의 검출 이전에 샘플 및 시약의 분리를 요하지 않는다. 이 방법은 빠르며 사용이 용이하다. 이 방법은 그것의 특정 표적과 반응하는 분자 포획 또는 결합 시약에 기초한 시그널을 생성한다. 심혈관 사건의 예측에 대하여, 상기 분자 포획 시약은 소마머 또는 항체 또는 그 밖의 유사한 것일 수 있고, 상기 특정 표적은 표 1, Col. 7의 심혈관 사건 바이오마커 일 것이다.

[0146] 일 구현에서, 시그널 생성을 위한 방법은 플루오로포어-표지된(fluorophore-labeled) 포획 시약과 그것의 특정 바이오마커 표적의 상호작용에 기인하는 이방성(anisotropy) 시그널 변화를 이용한다. 상기 표지된 포획제가 그것의 표적과 반응할 때, 증가된 분자량은 이방성 값이 더욱 느리게 변하도록 복합체에 부착된 플로오로포어의 회전운동(rotational motion)을 야기한다. 이방성 변화를 관찰하는 것에 의하여, 결합 반응(binding events)은 용액에서 바이오마커를 정량적으로 측정하는데 사용될 수 있다. 다른 방법은 형광편광 검정법(fluorescence

polarization assay), 분자 비콘 방법(molecular beacon methods), 시분할 형광 퀀칭(time resolved fluorescene quenching), 화학발광(chemiluminescence), 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer) 등을 포함한다.

[0147] 생물학적 샘플에서 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있는 예시적인 용액에 기초한 소마머 검정법(solution-based SOMAmer assay)은 하기: (a) 제1의 태그를 포함하고 바이오마커에 대한 특이적 친화력을 가지는 소마머와 생물학적 샘플을 접촉시킴으로써 혼합물을 제조하는 것, 여기에서 바이오마커가 샘플에 존재하는 경우 소마머 친화 복합체(SOMAmer affinity complex)가 형성되며; (b) 제1의 포획 구성요소를 포함하는 제1의 고체 지지체에 상기 혼합물을 노출시켜 제1의 태그가 상기 제1의 고체 지지체에 결합하도록 하는 것; (c) 상기 제1의 고체 지지체에 결합되지 않은 혼합물의 임의의 성분을 제거하는 것; (d) 상기 소마머 친화 복합체의 바이오마커 성분에 제2의 태그를 부착하는 것; (e) 상기 제1의 고체 지지체로부터 상기 소마머 친화 복합체를 분리시키는 것; (f) 제2의 포획 구성요소를 포함하는 제2의 고체 지지체에 분리된 소마머 친화 복합체를 노출시켜 제2의 태그가 제2의 포획 구성요소에 결합하도록 하는 것; (g) 상기 소마머 친화 복합체로부터 비착물화된(non-complexed) 소마머를 분할함으로써 혼합물로부터 임의의 비착물화된 소마머를 제거하는 것; (h) 상기 고체 지지체로부터 소마머를 용출하는 것; 및 (i) 상기 소마머 친화 복합체의 소마머 성분을 검출함으로써 바이오마커를 검출하는 것을 포함한다.

[0148] 임의의 당업계에 공지된 방법들이 상기 소마머 친화 복합체의 소마머 성분을 검출함으로써 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있다. 친화 복합체의 소마머 성분을 검출하기 위하여 다수의 서로 다른 검출 방법, 예를 들어 혼성화 검정(hybridization assays), 질량 분석(mass spectroscopy) 또는 QPCR과 같은 검출 방법이 사용될 수 있다. 어떤 구현에서, 핵산 염기서열 분석 방법(nucleic acid sequencing methods)이 소마머 친화 복합체의 소마머 성분을 검출하여 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있다. 간단하게는, 시료는 시료에 존재하는 하나 또는 그 이상의 소마머의 서열(들)을 확인하고 정량하기 위하여 임의의 종류의 핵산 염기서열 분석 방법의 대상이 될 수 있다. 어떤 구현에서, 상기 서열은 전체 소마머 분자 또는 상기 분자를 고유하게 확인하는데 사용될 수 있는 분자의 임의의 부분을 포함한다. 다른 구현에서, 염기서열을 확인하는 것은 소마머에 첨가된 특이적 서열이며; 이와 같은 서열은 종종 "태그(tags)", 바코드(barcodes)" 또는 "집코드(zipcodes)"로 칭해진다. 어떤 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 소마머 서열을 증폭하거나 RNA 및 임의의 부위에 화학적 변경을 포함하는 DNA를 포함하는 임의의 종류의 핵산을 염기서열 분석에 적절한 임의의 다른 종류의 핵산으로 전환시키기 위한 효소적 단계(enzymatic steps)를 포함한다.

[0149] 어떤 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 하나 또는 그 이상의 클로닝 단계(cloning steps)를 포함한다. 다른 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 클로닝을 사용하지 않는 직접 염기서열 분석 방법(direct sequencing method)을 포함한다.

[0150] 어떤 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 시료에서 하나 또는 그 이상의 소마머를 표적으로 하는 특정 프라이머(specific primer)를 사용하는 직접 접근법(direct approach)을 포함한다. 다른 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 시료에 있는 모든 소마머를 표적으로 하는 동시다발적 접근법(shotgun approach)을 포함한다.

[0151] 어떤 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 염기서열 분석을 위해 표적화된 분자를 증폭하기 위한 효소적 단계를 포함한다. 다른 구현에서, 상기 염기서열 분석 방법은 단일 분자의 서열을 직접적으로 분석한다. 생물학적 샘플에서 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있는 예시적인 핵산 염기서열 분석에 기반한 방법은 하기: (a) 효소적 단계를 사용하여 화학적으로 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 소마머의 혼합물을 변경되지 않은 핵산으로 전환하는 것; (b) 그 결과 생성된 변경되지 않은 핵산을 예를 들어, 454 염기서열 분석 시스템(454 Sequencing System)(454 Life Sciences/Roche), 일루미나 염기서열 분석 시스템(Illumina Sequencing System)(Illumina), ABI SOLiD 염기서열 분석 시스템(Applied Biosystems), 헬리스코프 단일 분자 시퀀서(HeliScope Single Molecule Sequencer)(Helicos Biosciences), 또는 퍼시픽 바이오사이언스 리얼 타임 단일 분자 염기서열 분석 시스템(Pacific Biosciences Real Time Single Molecule Sequencing System)(Pacific BioSciences) 또는 폴로네이터 지 염기서열 분석 시스템(Polonator G Sequencing System)(Dover Systems)과 같은 대량 병렬적 염기서열 분석 플랫폼(massively parallel sequencing platform)을 사용하여 동시다발적으로 염기서열 분석하는 것, 및 (c) 특정 서열(specific sequence)과 서열 계수(sequence count)에 의해 혼합물에 존재하는 소마머를 확인하고 정량하는 것을 포함한다.

[0153] **면역검정법을 이용한 바이오마커 값의 측정**

[0154] 면역검정 방법(immunoassay)은 그것의 대응하는 표적 또는 분석물에 대한 항체의 반응에 기초하고 있으며, 특정

검정 포맷에 의존하여 샘플에서 분석물을 검출할 수 있다. 면역-반응성(immuno-reactivity)에 기초한 검정 방법의 특이도 및 민감도를 향상시키기 위하여, 단일클론항체(monoclonal antibodies)가 그것의 특이적인 에피토프 인식(epitope recognition) 때문에 종종 사용된다. 다중클론항체(polyclonal antibodies) 또한 단일클론항체에 비해 표적에 대하여 증가된 친화력 때문에 다양한 면역검정법에서 성공적으로 사용되고 있다. 면역검정법은 넓은 범위의 생물학적 샘플 매트릭스(biological sample matrices)와 함께 사용하도록 설계되어 왔다. 면역검정법의 포맷은 정성적(qualitative), 반정량적(semi-quantitative) 및 정량적(quantitative) 결과를 제공하도록 설계되어 왔다.

[0155] 정량적 결과는 공지된 농도의 검출될 특정 분석물을 사용하여 생성된 표준 곡선의 사용을 통하여 생성된다. 미지의 샘플로부터 얻은 반응 또는 시그널은 표준 곡선 위에 그려지고, 미지의 샘플에서 표적에 대응하는 양 또는 값이 확립된다.

[0156] 수많은 면역검정 포맷들이 설계되어 왔다. ELISA 또는 EIA는 분석물을 정량적으로 검출할 수 있다. 이 방법은 분석물 또는 항체 중 어느 하나에 대한 표지의 부착에 의존하며, 상기 표지 성분은 직접 또는 간접적으로 효소를 포함한다. ELISA 테스트는 분석물의 직접, 간접, 경쟁적(competitive) 또는 샌드위치(sandwich) 검출을 위한 포맷을 갖출 수 있다. 다른 방법들은 예를 들어, 방사성동위원소(radioisotope)(I^{125}) 또는 형광발광(fluorescence)과 같은 표지에 의존한다. 부가적인 기술들은 예를 들어, 응집(agglutination), 비탁법(nephelometry), 혼탁법(turbidimetry), 웨스턴 블롯(Western blot), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역세포화학법(immunocytochemistry), 면역조직화학법(immunohistochemistry), 유세포 분석법(flow cytometry), 루미넥스 검정법(Luminex assay) 및 그 외의 것들을 포함한다(ImmunoAssay : A Practical Guide, edited by Brain Law, published by Taylor & Francis, Ltd., 2005 edition을 참조).

[0157] 예시적인 검정 포맷은 효소-결합 면역흡착검정법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사성면역검정법(radioimmunoassay), 형광(fluorescent), 화학발광(chemiluminescence) 및 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET) 또는 시분할 형광 공명 에너지 전이(time resolved-FRET; TR-FRET) 면역검정법을 포함한다. 바이오마커를 검출하기 위한 방법의 예는 바이오마커 면역침강법에 이어서 겔 전기영동법(gel electrophoresis), 모세관 전기이동(capillary electrophoresis), 평면 전기크로마토그래피(planar electrochromatography) 등과 같은, 크기 및 펩티드 레벨을 구별할 수 있게 하는 정량적 방법을 포함한다.

[0158] 물질이 생성하는 검출가능한 표지 또는 시그널을 검출 및/또는 정량하기 위한 방법은 표지의 특성에 의존한다. 적절한 효소에 의해 촉매화된 반응 산물은(여기에서 검출가능한 표지가 효소인 경우, 상기를 참조) 제한 없이 형광성, 발광성 또는 방사성일 수 있거나, 그것들은 가시광선 또는 자외선을 흡수할 수 있다. 이와 같은 검출가능한 표지를 검출하는데 적합한 검출기의 예는 제한 없이 X-레이 필름(x-ray film), 방사능 계측기(radioactivity counters), 섬광 계측기(scintillation counters), 분광 광도계(spectrophotometers), 비색계(colorimeters), 형광계(fluorometers), 발광계(luminometer) 및 농도측정계(densitometers)를 포함한다.

[0159] 검출을 위한 임의의 방법은 임의의 적절한 제조, 처리 및 반응의 분석을 가능하게 하는 임의의 포맷으로 수행될 수 있다. 이것은 예를 들어, 다중-웰 검정 플레이트(multi-well assay plates)(예를 들어, 96 웰 또는 384 웰)일 수 있거나, 임의의 적절한 어레이 또는 마이크로어레이를 사용하는 것일 수 있다. 다양한 시약을 위한 저장 용액(stock solution)은 수동으로(manually) 또는 기계적으로(robotically) 만들어질 수 있고, 그 후의 모든 피펫팅(pipetting), 희석(diluting), 혼합(mixing), 분배(distribution), 세척(washing), 배양(incubating), 샘플 판독(readout), 데이터 수집(data collection) 및 분석(analysis)이 상용의 분석 소프트웨어, 로봇 공학 및 검출가능한 표지를 검출할 수 있는 검출 기계를 사용하여 기계적으로 완료될 수 있다.

[0161] **유전자 발현 프로파일링을 사용하는 바이오마커 값의 측정**

[0162] 생물학적 샘플에서 mRNA를 측정하는 것은 생물학적 샘플에서 대응하는 단백질 레벨의 검출을 위한 대리물(surrogate)로서 사용될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 임의의 바이오마커 또는 바이오마커 패널 또한 적절한 RNA를 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0163] mRNA 발현 레벨은 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; RT-PCR)(qPCR에 따른 RT-PCR)에 의해 측정될 수 있다. RT-PCR은 mRNA로부터 cDNA를 만드는데 사용된다. 상기 cDNA는 DNA 증폭 과정의 진행으로서 형광을 만들어내기 위하여 qPCR에서 사용될 수 있다. 평균 곡선과 비교하여, qPCR은 세포당 mRNA 복제의 수와 같은 절대 측정(absolute measurement)을 만들어낼 수 있다. 모세관 전

기이동과 조합된 노던 블롯(Northern blots), 마이크로어레이(microarrarys), 침입자 검정법(invader assay) 및 RT-PCR 모두 샘플에서 mRNA의 발현 레벨을 측정하는데 사용되고 있다(Gene Expression Profiling: Method and Protocols, Richard A. Shimkets, editor, Humana Press, 2004를 참조).

[0164] miRNA 분자는 비암호화(non-coding)이지만 유전자 발현을 조절하는 소형 RNA이다. mRNA 발현 레벨의 측정에 적합한 임의의 방법들도 대응하는 miRNA에 대하여 사용될 수 있다. 최근 많은 연구소들이 질병에 대한 바이오마커로서 miRNAs의 사용을 연구하고 있다. 많은 질병들이 광범위한 전자 조절(transcriptional regulation)을 수반하며, miRNA가 바이오마커로서의 역할을 한다는 것을 알 수 있다는 것은 놀랍지 않다. miRNA 농도와 질병 간의 연관성은 종종 단백질 레벨과 질병 간의 연관성보다 덜 명확하나, 그럼에도 불구하고 miRNA 바이오마커의 값은 실질적일 수 있다. 물론, 병에 걸려있는 동안 상이하게 발현된 임의의 RNA와 마찬가지로, 시험관 내(*in vitro*) 진단 산물의 개발에 직면하는 문제들은 miRNA가 병든 세포에서 견뎌내고, 분석을 위하여 쉽게 추출되거나, miRNA가 측정될 수 있을 만큼 충분히 길게 잔존해야만 하는 경우 혈액 또는 다른 매트릭스 내로 방출될 필요성을 포함할 것이다. 비록 많은 잠재적인 바이오마커들이 병에 걸려있는 동안 주변분비 방식(paracrine fashion)으로 병리 및 기능 부위에 의도적으로 분비될지라도, 단백질 바이오마커도 유사한 필요성을 가진다. 많은 잠재적인 단백질 바이오마커들이 이 단백질들이 합성되는 세포 바깥에서 기능하도록 설계된다.

[0166] **생체 내 분자 영상화 기술을 사용하는 바이오마커의 검출**

[0167] 임의의 상기 기재된 바이오마커들(표 1, Col. 7를 참조) 또한 분자 영상화 테스트에 사용될 수 있다. 예를 들면, 영상 제제(imaging agent)는 5년 내의 심혈관 사건의 위험의 예측에서 보조를 위하여, 치료학적 개입에 대한 반응을 관찰하기 위하여, 다른 용도들 중에서 임상 시험에 대한 집단을 선별하기 위하여 사용될 수 있는 임의의 상기 기재된 바이오마커와 결합될 수 있다.

[0168] 생체 내 영상화 기술은 개인의 신체에서 특정 질병의 상태를 판단하기 위한 비침습적(non-invasive) 방법을 제공한다. 예를 들면, 신체의 전 부분(entire portion) 또는 온몸(entire body)은 3차원 영상으로 검사될 수 있으며, 그것에 의해 신체에서 형태와 구조에 관한 매우 유익한 정보가 얻어진다. 이러한 기술은 개인의 심혈관 상태의 상태에 관한 정보를 제공하기 위하여, 본원에 기재된 바이오마커의 검출과 조합될 수 있다.

[0169] 기술에 있어서의 다양한 진보 덕분에 생체 내 분자 영상화 기술의 사용이 확장되고 있다. 이러한 진보는 신체 내에서 강력한 시그널을 제공할 수 있는 방사성표지 및/또는 형광성 표지와 같은 새로운 조영제(contrast agent)의 개발; 및 유용한 정보를 제공하기 위하여 현저한 민감도와 정확성을 가지는, 신체 외부로부터 이러한 시그널을 검출하고 분석할 수 있는 강력한 새로운 영상화 기술의 개발을 포함한다. 상기 조영제는 적절한 영상화 시스템에서 가시화될 수 있고, 그것에 의해 조영제가 위치된 신체의 부분(들)의 영상이 제공된다. 상기 조영제는 소마머 또는 항체와 같은 포획 시약, 예를 들어, 펩티드 또는 단백질 또는 (예를 들어, 유전자 발현의 검출을 위한) 올리고뉴클레오티드, 또는 하나 또는 그 이상의 거대분자(macromolecules) 및/또는 다른 미립자 형태(particulate forms)를 가지는 임의의 이러한 것들을 포함하는 복합체와 결합될 수 있다.

[0170] 상기 조영제는 또한 영상화에 유용한 방사성 원소(radioactive atom)의 특징을 가질 수 있다. 적절한 방사성 원소는 신티그래프(scintigraphic) 연구를 위한 테크네튬-99m(technetium-99m) 또는 이오딘-123(iodine-123)을 포함한다. 다른 손쉽게 검출가능한 부분들은 예를 들어, 이오딘-123, 이오딘-131(iodine-131), 인듐-111(indium-111), 플루오린-19(fluorine-19), 탄소-13(carbon-13), 질소-15(nitrogen-15), 산소-17(oxygen-17), 가돌리늄(gadolinium), 망간(manganese) 또는 철(iron)과 같은 자기 공명 영상(magnetic resonance imaging; MRI)을 위한 스핀 표지(spin label)를 포함한다. 이러한 표지는 당업계에 잘 알려져 있으며, 당업자들에 의해 쉽게 선택될 수 있다.

[0171] 표준 영상화 기술은 자기 공명 영상, 전산화 단층 촬영(computed tomography scanning), 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography; PET), 단일광자 방출 단층촬영(single photon emission computed tomography; SPECT) 등을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 진단적 생체 내 영상화를 위한, 사용가능한 검출 기구의 유형은 표적(단백질, mRNA 등)으로 사용되는 주어진 방사성 핵종(radionuclide) 및 특정 바이오마커와 같은, 주어진 조영제를 선택하는데 있어서의 주요 인자이다. 전형적으로, 선택된 상기 방사성 핵종은 기구의 주어진 형태에 의해 검출가능한 붕괴(decay) 유형을 가진다. 또한, 생체 내 진단을 위한 방사성 핵종을 선택할 때, 그것의 반감기는 표적 조직에 의한 최대 흡수(uptake) 시간에 검출될 수 있을 만큼 충분히 길어야 하지만, 숙주에 유해한 방사능이 최소화될 만큼 충분히 짧아야 한다.

[0172] 대표적인 영상화 기술은 방사성 핵종이 개인에게 종합적(synthetically) 또는 국부적(locally)으로 투여되는 영

상화 기술인 PET 및 SPECT를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 그 후 방사성 핵종의 흡수는 시간에 따라 측정되며, 표적화된 조직 및 바이오마커에 대한 정보를 얻기 위하여 사용된다. 사용된 특정 동위 원소의 고에너지(감마-레이) 방출 및 그것들을 검출하는데 사용되는 기구의 민감성과 정교성(sophistication) 때문에, 방사성 핵종의 2차원 분포는 신체 외부에서 추론될 수 있다.

[0173] PET에서 일반적으로 사용되는 양전자-방출 방사성 핵종(positron-emitting nuclides)은 예를 들어, 탄소-11(carbon-11), 질소-13(nitrogen-13), 산소-15(oxigen-15) 및 플루오린-18(fluorine-18)을 포함한다. 전자 포획(electron capture) 및/또는 감마선-방출에 의해 붕괴되는 동위 원소는 SPECT에 사용되며, 예를 들어 이오딘-123 및 테크네튬-99m을 포함한다. 테크네튬-99m을 사용하여 아미노산을 표지하기 위한 예시적인 방법은 테크네튬-99m-화학주성 펩티드 결합체(technetium-99m-chemotactic peptide conjugate)를 형성하기 위하여 두 기능을 가지도록 변경된(bifunctionally modified) 화학주성 펩티드의 금속 결합기와 차례로 반응하는 불안정한 테크네튬-99m-전구 복합체(technetium-99m-precursor complex)를 형성하기 위하여, 킬레이팅 전구체의 존재하에서 과테크네튬산 이온(pertechnetate ion)의 환원이다.

[0174] 항체들은 이러한 생체 내 영상화 진단 방법을 위하여 자주 사용된다. 생체 내 진단을 위한 항체의 제조 및 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 표 1, Col. 7에서의 임의의 바이오마커에 특이적으로 결합하는 표지된 항체들은 개인의 질병 상태를 진단하거나 평가하기 위한 목적으로 사용된 특정 바이오마커에 따라 검출가능한, 심혈관 사건의 위험이 증가된 것으로 의심되는 개인에게 주입될 수 있다. 사용된 표지는 이전에 기재된 것과 같이 사용될 영상화 기법에 따라 선택될 것이다. 표지의 위치는 심혈관 사건의 위험과 관련된 조직 손상 또는 다른 징후를 측정가능하게 한다. 기관 또는 조직 내에서의 표지의 양 또한 그 기관 또는 조직에서의 심혈관 사건의 위험으로 인한 심혈관 사건 바이오마커의 개입을 측정할 수 있게 한다.

[0175] 유사하게는, 소마머는 이러한 생체 내 영상화 진단 방법을 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 표 1, Col. 7에 기재된 특정 바이오마커를 확인하는데 사용되는 소마머는(그리고, 따라서 그 특정 바이오마커에 특이적으로 결합한다) 적절하게 표지될 수 있으며, 개인에게서 심혈관 사건의 위험과 관련된 조직 손상, 동맥경화성 플라크(atherosclerotic plaques), 염증성 반응의 성분 및 다른 인자들의 레벨을 진단하거나 판단하기 위한 목적으로, 특정 바이오마커에 따라 검출가능한 심혈관 사건을 겪을 것으로 의심되는 개인에게 주입된다. 사용된 표지는 이전에 기재된 것과 같이 사용될 영상화 기법에 따라 선택될 것이다. 표지의 위치는 증가된 위험에 의해 야기되는 프로세스의 부위를 측정가능하게 한다. 기관 또는 조직 내에서의 표지의 양 또한 그 기관 또는 조직에의 병리학적 프로세스의 침입을 측정할 수 있게 한다. 소마머-유도 영상 제제(aptamer-directed imaging agents)는 다른 영상 제제와 비교하여 조직 침입(penetration), 조직 분포(distribution), 동역학(kenetics), 제거(elimination), 효능(potency) 및 선택성(selectivity)에 관련된 독특하고 유리한 특성을 가질 수 있다.

[0176] 이러한 기술들은 또한 예를 들어, 역배열(antisense) 올리고뉴클레오티드를 사용하는 영상화를 통한 유전자 발현의 검출을 위하여, 표지된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 선택적으로 수행될 수 있다. 이 방법들은 예를 들어, 표지로서 형광성 분자 또는 방사성 핵종을 사용하여, 인시츄 혼성화(in situ hybridization)에 사용된다. 유전자 발현의 검출을 위한 다른 방법들은 예를 들어, 지시 유전자(reporter gene) 활성의 검출을 포함한다.

[0177] 다른 일반적인 유형의 영상화 기술은 피험자 내부의 형광 시그널이 피험자 외부에 있는 광학 기구(optical device)에 의해 검출되는 광학 영상화(optical imaging)이다. 이 시그널은 실제의 형광 및/또는 생물발광(bioluminescence)에 기인할 수 있다. 광학 검출 기구의 민감도에 있어서의 향상은 생체 내 진단 검정을 위한 광학 영상화의 유용성을 증가시킨다.

[0178] 예를 들어, 새로운 질병 또는 질환의 치료를 위한 시도에서 임상적인 효과를 더욱 빠르게 측정하고/하거나 윤리적으로 의심스러운 것으로 간주 될 수 있는, 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 질병에 대하여 플라시보(placebo)를 사용하는 장기 치료를 피하기 위한 임상실험을 포함하여, 생체 내 분자 바이오마커 영상화의 사용이 증가하고 있다.

[0179] 다른 기술의 리뷰에 대하여, 엔. 블로우 등을 참조하라(N. Blow, Nature Methods, 6, 465-469, 2009).

[0181] **질량 분석 방법을 사용하는 바이오마커 값의 측정**

[0182] 다양한 구성의 질량 분석기가 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있다. 여러 유형의 질량 분석기가 사용가능하거나, 다양한 구성을 가지도록 생산될 수 있다. 일반적으로, 질량 분석기는 하기의 주요 성분: 샘플 입구(inlet), 이온 공급원(ion source), 질량 분석기(mass analyzer), 검출기(detector), 진공 시스템(vacuum system) 및 기구-제어 시스템(instrument-control system) 및 데이터 시스템(data system)을 가진다. 샘플 입

구, 이온 공급원 및 질량 분석기에서의 차이는 일반적으로 기구의 형태 및 그것의 특성을 정의한다. 예를 들면, 상기 입구는 모세관 컬럼 리퀴드 크로마토그래피 공급원(capillary-column liquid chromatography source)이거나 매트릭스 보조 레이저 탈착(matrix-assisted laser desorption)에 사용되는 것과 같은 다이렉트 프로브(direct probe) 또는 스테이지(stage)일 수 있다. 통상적인 이온 공급원은 예를 들어, 나노분무(nanospray) 및 미세분무(microspray)를 포함하는 전기분무(electrospray) 또는 매트릭스 보조 레이저 탈착이다. 통상적인 질량 분석기는 사중극 질량 필터(quadrupole mass filter); 이온 트랩 질량 분석기(ion trap mass analyzer) 및 비행 시간 질량 분석기(time-of-flight mass analyzer)를 포함한다. 부가적인 질량 분석 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Burlingame et al., Anal. Chem. 70:647 R-716R(1998); Kinter and Sherman, New York (2000)을 참조).

[0183] 단백질 바이오마커 및 바이오마커 값은 임의의 하기: 전자분무 이온화 질량 분석법(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)n, 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간 질량 분석법(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 표면 강화 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분석법(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS), 실리콘상에서의 탈착/이온화(desorption/ionization on silicon, DIOS), 2차 이온 질량분석(secondary ion mass spectroscopy, SIMS), 사중극 비행 시간(quadrupole time-of-flight; Q-TOF), 울트라플렉스(ultraflex) III TOF/TOF라 불리는 탠덤 비행 시간(tandem time-of-flight)(TOF/TOF) 기술, 대기압 화학 이온화 질량 분석법(atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-$(MS)^N$, 대기압 광이온화 질량 분석법(atmospheric pressure photoionization mass spectrometry; APPI-MS), APPI-MS/MS 및 APPI-$(MS)^N$, 사중극 질량 분석법(quadrupole mass spectrometry), 푸리에 변환 질량 분석법(Fourier transform mass spectrometry; FTMS), 정량적 질량 분석법(quantitiative mass spectrometry) 및 이온 트랩 질량 분석법(ion trap mass spectrometry)에 의하여 검출되고 측정될 수 있다.

[0184] 샘플 제조 전략은 단백질 바이오마커의 질량 분석적 특성화 및 바이오마커 값의 검출 이전에 샘플을 표지하고 양을 늘리는데 사용된다. 표지 방법은 상대적이고 절대적인 정량을 위한 등압 태그(isobaric tag)(isobaric tag for relative and absolute quantitation; iTRAQ) 및 세포 배양에서의 아미노산을 사용한 안정한 동위 원소 표지(stable isotope labeling with amino acid in cell culture; SILAC)를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 질량 분석적 분석 이전에 후보 바이오마커 단백질에 대하여 선택적으로 부유한(enrich) 샘플에 사용되는 포획 시약은 소마머, 항체, 핵산 프로브, 키메라, 소분자, $F(ab')_2$ 단편, 단일 사슬 항체 단편(single chain anbibody fragment), Fv 단편(Fv fragment), 단일 사슬 Fv 단편(single chain Fv fragment), 핵산(nucleic acid), 렉틴(lectin), 리간드 결합 수용체(ligand-binding receptor), 애피바디(affybodies), 나노바디(nanobodies), 안키린(ankyrins), 도메인 항체(domain antibodies), 대안적 항체 스캐폴드(alternative antibody scaffolds)(예를 들어, 디아바디(diabodies) 등), 각인된 고분자(imprinted polymer), 아비머(avimers), 펩티드 모조물(peptidomimetics), 펩토이드(peptoids), 펩티드 핵산(peptide nucleic acid), 트레오스 핵산(threose nucleic acid), 호르몬 수용체(hormone receptor), 시토카인 수용체(cytokine receptor), 및 합성 수용체(synthetic receptors) 및 이것들의 변경 및 단편을 포함하나 이로 한정되는 것은 아니다.

[0186] **근접 결합 검정법을 사용한 바이오마커 값의 검출**

[0187] 근접 결합 검정법(proximity ligation assay)은 바이오마커 값을 검출하는데 사용될 수 있다. 간단하게는, 시료는 올리고뉴클레오티드로 연장된 한 쌍의 각 구성원을 가지는 한 쌍의 항체 또는 한 쌍의 소마머일 수 있는 한 쌍의 친화 프로브(affinity probe)와 접촉된다. 한 쌍의 친화 프로브에 대한 표적은 하나의 단백질 상의 두 개의 구별되는 결정인자(determinate)일 수 있거나, 동질다합성(homomultimeric) 또는 이종다합성(heteromultimeric) 복합체로서 존재할 수 있는 각 두 개의 서로 다른 단백질 상의 하나의 결정인자일 수 있다. 프로브가 표적 결정인자에 결합할 때, 올리고뉴클레오티드 연장물(oligonucleotide extension)의 유리 말단(free end)은 서로 혼성화되기에 충분할 만큼 인접(close proximity)하게 이동한다. 올리고뉴클레오티드 연장물의 혼성화는 그것들이 충분히 근접하게 위치되었을 때 올리고뉴클레오티드 연장물이 서로 가교를 형성하게 해주는 공통의 연결 올리고뉴클레오티드(common connector oligonucleotide)에 의해 용이해진다. 일단 프로브의 올리고뉴클레오티드 연장물이 혼성화되면, 연장물의 말단은 효소적 DNA 라이게이션에 의해 서로 결합된다.

[0188] 각각의 올리고뉴클레오티드 연장물은 PCR 증폭을 위한 프라이머 부위를 포함한다. 일단 상기 올리고뉴클레오티드 연장물이 서로 결합되면, 상기 올리고뉴클레오티드는 PCR 증폭을 통하여 표적 단백질의 정체(identity) 및

양(amount)에 관한 정보뿐만 아니라 표적 결정인자가 두 개의 서로 다른 단백질 상에 있을 경우 단백질-단백질 상호작용에 대한 정보를 나타내는 연속적인 DNA 서열을 형성한다. 근접 결합(proximity ligation)은 실시간 단백질 농도 및 실시간 PCR의 사용을 통한 상호작용 정보를 위한 높은 민감하고 특이적인 검정법을 제공할 수 있다. 관심 결정요소와 결합하지 않는 프로브는 대응하는 올리고뉴클레오티드 연장물에 근접하게 이동하지 않고, 어떠한 결합 또는 PCR 증폭도 진행될 수 없으며, 그 결과 어떠한 시그널도 생성되지 않는다.

[0189] 상기 방법이 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 표 1, Col. 7에 제공된 바이오마커로 이루어진 군으로부터 선택된 바이오마커에 각각 대응하는 적어도 N의 바이오마커 값을 검출하는 것을 포함하는 경우, 앞서 언급한 검정법은 심혈관 사건의 위험을 예측하기 위한 방법에 유용한 바이오마커 값을 검출할 수 있게 하며, 여기에서 하기에 상세히 설명되는 것과 같은 바이오마커 값을 사용하는 분류는 상기 개인이 5년의 기간 내에 심혈관 사건이 발생할 위험이 높은지를 나타낸다. 기재된 심혈관 사건 바이오마커 중 어떠한 것은 심혈관 사건의 위험을 예측하는데 단독으로 유용하긴 하지만, 세 개 또는 그 이상의 바이오마커의 패널로서 각각 유용한 심혈관 사건의 다중 서브셋의 분류를 위한 방법을 본원에 설명하였다. 따라서, 본 발명의 다양한 구현들은 N의 바이오마커를 포함하는 조합들을 제공하며, 여기에서 N은 적어도 세 개의 바이오마커이다. 다른 구현에서, N은 2-155의 바이오마커로부터 임의의 수로 선택된다. N은 임의의 상기 기재된 범위로부터 임의의 수로 선택될 수 있을 뿐만 아니라, 유사한 범위를 포함하나 더 고차의 범위를 포함하도록 선택될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 본원에 기재된 임의의 방법에 따라서, 바이오마커 값은 개별적으로 검출되고 분류될 수 있거나 예를 들어, 다중 검정 포맷에서와 같이 집합적으로 검출되고 분류될 수 있다.

[0190] 주어진 진단 또는 예측 테스트에 대한 바이오마커의 "사인(signatre)"은 일련의 마커를 포함하며, 각각의 마커는 관심 집단에서 서로 다른 레벨을 가진다. 이 문맥에서, 서로 다른 레벨은 두 개 또는 그 이상의 군에서의 개인에 대한 마커 레벨의 상이한 평균, 또는 두 개 또는 그 이상의 군에서의 상이한 변화, 또는 두 가지 모두의 조합을 칭할 수 있다. 진단 테스트의 가장 단순한 형태를 위하여, 이 마커들은 두 개의 군 중 하나, 심혈관 사건의 위험이 높거나 그렇지 않은 것 중 하나로 개인으로부터의 미지의 샘플을 선정하는데 사용될 수 있다. 두 개 또는 그 이상의 군 중 하나로의 샘플의 지정은 분류로서 알려져 있고, 이 지정을 달성하는데 사용되는 방법은 분류기(classifier) 또는 분류 방법(classification method)으로 알려져 있다. 분류화 방법은 또한 스코어링 방법(scoring method)으로서 칭해질 수 있다. 일련의 마커 값으로부터 진단 분류기(diagnostic classifier)를 구성하는데 사용될 수 있는 많은 분류 방법이 있다. 일반적으로, 분류 방법은 데이터 세트가 두 개의(또는 그 이상, 다중 분류 상태에 대하여) 다른 군 내에서 하나를 구별하기 위하여 개인으로부터 얻어진 샘플을 사용하여 수집되는 경우, 지도학습 기술(supervised learning techniques)을 이용하여 가장 쉽게 수행된다. 각 샘플이 속하는 분류(군 또는 집단)는 각 샘플에 대하여 미리 알려져 있으므로, 분류 방법은 바람직한 분류 반응을 주도록 트레이닝될 수 있다. 그것은 또한 진단 분류기를 생산하기 위한 비지도 학습 기술(unsupervised learning techniques)을 사용할 수 있다.

[0191] 진단 분류기를 개발하기 위한 통상적인 접근법은 의사결정 트리(decision tree); 배깅(bagging) + 부스팅(boosting) + 포레스트(forests); 학습에 기초한 추론의 규칙; 파즌 윈도우(Parzen Window); 선형 모델(linear models); 기호 논리학(logistic); 신경 회로망(neural network) 방법; 비지도 클러스터링(unsupervised clustering); K-평균(K-means); 계층적 상승/하강(hierarchical ascending/descending); 반지도 학습(semi-supervised learning); 프로토타입 방법(prototype methods); 최대 근접(nearest neighbor); 핵밀도 추정(kernel density estimation); 지지 벡터 기계(support vector machines); 은닉 마코프 모델(hidden Markov models); 볼쯔만 학습(Boltzmann Learning)을 포함하며, 분류기는 서로 단순하게 또는 개개의 목적 함수(objective function)를 최소화하는 방법으로 조합될 수 있다(리뷰를 위하여, 예를 들어 각각 그 자체가 참조로서 통합되어 있는, Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001를 참조; 또한, TheElements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science + Business Media, LLC, 2nd edition, 2009를 참조).

[0192] 지도 학습 기술을 사용하여 분류기를 생성하기 위하여, 트레이닝 데이터(training data)라 불리는 일련의 샘플을 획득하였다. 진단 테스트의 맥락에서, 트레이닝 데이터는 나중에 선정될 미지의 샘플에 대한 다른 군(분류)으로부터의 샘플을 포함한다. 예를 들면, 대조 집단에서의 개인 및 특정 질병 집단에서의 개인으로부터 수집된 샘플은 질병을 가지거나 질병을 가지지 않는 것 중 하나로서 미지의 샘플(또는, 더욱 상세하게는, 샘플이 얻어진 개인)을 분류할 수 있는 분류기를 개발하기 위한 트레이닝 데이터를 구성할 수 있다. 트레이닝 데이터로부터 분류기를 개발하는 것은 분류기를 트레이닝하는 것으로 알려져 있다. 분류기 트레이닝에 대한 특이적 세부사항은 지도 학습 기술의 특성에 의존한다. 설명을 목적으로, 트레이닝 나이브 베이지안 분류기(nave

Bayesian classifier)의 예가 하기에 설명될 것이다(예를 들어, Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001를 참조; 또한, The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science + Business Media, LLC, 2nd edition, 2009를 참조).

[0193] 전형적으로 트레이닝 세트에 있는 샘플보다 더욱 많은 잠재적 바이오마커 값이 있기 때문에, 오버-피팅(over-fitting)을 피하는데 주의하여야 한다. 오버-피팅은 통계학적 모델이 기초(underlying) 통계학적 모델(statistical model) 대신에 랜덤 에러(random error) 또는 노이즈(noise)를 표시할 때 발생한다. 오버-피팅은 예를 들어, 분류기를 개발하는데 사용된 마커의 수를 제한하는 것, 마커 반응이 다른 하나와는 관계없다고 가정하는 것, 사용된 기초 통계학적 모델의 복잡성(complexity)을 제한하는 것, 그리고 기초 통계학적 모델이 데이터에 따른 것임을 확실하게 하는 것을 포함하는 다양한 방법으로 피할 수 있다.

[0194] 사건의 발생과 관련된 바이오마커의 세트를 확인하기 위하여, 대조군과 조기 사건 샘플의 조합 세트는 주성분분석(principal component analysis, PCA)를 사용하여 분석된다. PCA는 사례 또는 대조군 결과에 상관없이, 모든 샘플 사이의 가장 큰 차이에 의해 정의된 주축에 대하여 샘플을 나타내므로, 사례와 대조군 사이의 차이를 오버-피팅할 위험을 경감시킨다. 심각한 혈전성 사건의 발생은 필수적인 혈관에서의 파열을 위하여 불안정한 플라크를 필요로 하는 것으로 알려져 있는 관련 가능성의 강력한 요소를 가지므로, 대조군과 사건 샘플 세트 사이에 명백한 구분을 보여줄 것으로 기대되지 않을 것이다. 사례와 대조군 사이에 관찰된 구분이 크지 않긴 하지만, 그것은 이 샘플 세트에서의 약 10%의 총 변수(variation)에 대응하는 제2의 주성분에서 발생하며, 이는 근본적인 생물학적 변수(biological variation)가 정량하는데 비교적 간단하다는 것을 나타낸다(도 2a).

[0195] 다음 세트의 연구결과들에서, 바이오마커는 대조군 샘플과 조기 사건 샘플 사이의 구분에 특이적인, 샘플들 사이의 차이의 성분들에 대하여 분석될 수 있다. 사용될 수 있는 하나의 방법은 대조군 세트에서 샘플 사이의 변수(variation)의 첫 번째 세 개의 주성분의 위치를 제거(축소)하기 위한 DSGA의 사용이다(Bair, E. and Tibshirani, R. (2004) Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. PLOS Biol., 2, 511-522). 비록 발견을 위해 대조군 세트 상에서 차원축소(dimensionality reduction)가 수행되었다 할지라도, 대조군에서의 샘플과 조기 사건 샘플로부터의 샘플 모두 PCA를 통하여 수행된다. 조기 사건으로부터의 사례의 구분은 수평축을 따라 관찰될 수 있다(도 2b).

[0197] *심혈관 위험에 관련된 단백질의 교차 검증된(cross validated) 선별*

[0198] 특이한 양상의 특정 샘플의 선별을 위한 단백질 예측력의 오버-피팅을 피하기 위하여, 교차 검증(cross-validation)과 차원 축소(dimensional reduction)을 선택하였다. 교차 검증은 위험 모델을 생성하는데 사용되지 않은 샘플에 적용하기 위한 방법의 능력을 관찰하기 위하여 선택되지 않은 샘플의 사용과 결합된 단백질에 의해 위험의 연관성을 측정하기 위한 샘플 세트의 다중 선택을 포함한다(The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science + Business Media, LLC, 2nd edition, 2009). 우리는 사건 위험의 모델링에 있어서 고차원의 데이터 세트에 적용가능한 티브시라니 등의 지도 PCA 방법을 적용하였다(Bair, E. and Tibshirani, R. (2004) Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. PLOS Biol., 2, 511-522). 지도 PCA(supervised PCA, SPCA) 방법은 데이터에서 관찰된 사건 위험 요소와 통계학적으로 관련된 단백질 세트의 일변량 선별(univariate selection) 및 이들 모든 단백질로부터 얻은 정보들을 조합한 관련 성분의 측정을 포함한다. 이 관련 성분의 측정은 교차 단백질 정보를 조합할 뿐만 아니라 몇 가지 주성분에 이르기까지 100개가 넘는 단백질의 전체 단백질 메뉴로부터 독립 변수(independent variable)의 수를 감소시킴으로써 오버피팅의 가능성을 경감시키는 차원 축소이다(이 작업에서, 우리는 단지 첫 번째 주성분만을 시험하였다). 티브시라니 등의 SPCA 방법은 보류된 교차 검증 테스트 세트에서 올바르게 예측되는 단백질의 수를 측정하기 위하여 단백질의 선별에 대한 교차 검증(cross validation)을 적용한다. 이들 단백질은 사건 위험과 관련된 단백질 변수의 관련 성분을 만드는데 사용된다. SPCA를 사용하여, 우리는 이 교차 검정된 차원 축소 기술을 이용하여 사건 위험과 통계학적으로 관련된 155개의 단백질 리스트를 알아내었다. 이 SPCA의 적용에서, 우리는 또한 샘플에 존재하지 않는 비인간 단백질에 해당하는 신호뿐만 아니라 랜덤 소마머 서열에 해당하는 단백질 신호 또한 테스트하였다. 이들 10-20개의 공지된 비생물학적 신호 중 어떠한 것도 SPCA에 의해 155개의 단백질로 선택되지 않았다(표 1). 교차 검증된 SPCA 접근법을 사용하는 이 단계는 위양성 단백질 마커 연관성(false positive protein marker associations)에 대한 선별에 중요하다. 티브시라니 등에서의 접근법은 특히 교차 검증의 사전 검정 방법(prevalidation method)과 PCA에 내재하는 차원 축소의 사용에 의해 오류 발견(false discovery)을 예방하였다. SPCA로부터 얻은 155개의 단백질 리스트는 SPCA로부터 얻은 155개의 단백질 리스트에 포함되어 있

지 않은, 단백질 마커의 오류 발견을 검출하기 위하여 서로 다른 기술을 사용하여 차후의 분석물을 확인하는데 사용된다.

[0200] *사건 발생까지의 시간에 대한 각 단백질의 관계성의 일변량 분석(univariate analysis) 및 다변량 분석(multivariate analysis)*

[0201] Cox의 비례위험모델(cox proportional hazards model)은 의학 통계학에서 널리 사용된다(Cox, David R (1972). "Regression Models and Life-Tables". Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 34(2): 187-220). Cox 회귀분석은 누적 생존(cumulative survival)에 대한 특정 시간의 함수를 피팅하는 것(fitting)을 피하는 대신에 (시간에 따라 달라질 수 있는) 기저 위험 함수(baseline hazard functions)로 불리는 상대 위험도(relative risk)의 모델을 사용한다. 상기 기저 위험 함수는 모든 개개인에 대한 일반적인 형태의 생존 기간 분포(survival time distribution)를 형성하는 반면, 상대 위험도는 기본적 위험의 배수로서 (개인 또는 그룹과 같은) 일련의 공변량 값(covariate value)에 대한 위험의 레벨을 제공한다. 상대 위험도는 Cox 모델에서 시간에 따라 변하지 않는다.

[0202] 모든 신호에 대하여 1092개의 단일 일변량 Cox 모델을 피팅하였다. 46개의 단백질(표 2)이 10^{-14}보다 나은 P-값을 가진다(Wald test, Wald, Abraham. (1943). A Method of Estimating Plane Vulnerability Based on Damage of Survivors. Statistical Research Group, Columbia University). 이들 46개의 단백질 모두 SPCA를 사용하여 선별된 155개의 단백질 리스트에 포함된다(상기, 표 1). 다수의 대단히 중요한 단백질들은 처음에는 놀라웠으나, 심혈관 질병에의 신장의 관여는 사구체 여과율(glomerular filtration rate, GFR)에의 변화를 암시한다. 사구체 여과율의 감소는 0이 아닌 신장 청소율(renal clearance)을 가지는 모든 단백질을 증가시킬 것이며, 혈액 내 단백질의 농도는 신장을 통한 소변으로의 단백질의 손실(청소(clearance))을 통하여 감소되며, GFR에 의해 측정된 감소된 신장 여과(renal filtration)는 따라서 신장에 의해 부분적으로 여과되는 혈액 내 이들 단백질의 증가된 농도와 관련이 있다.

[0203] 유용한 모델은 46개 단백질의 전체 리스트보다 더 간명할 것이다. 또한, PCA에서도 볼 수 있듯이, 많은 단백질들이 크게 연관되어 있을 것이며, 효과적인 모델은 이를 고려하여야 할 것이다. 우리는 46개의 매우 중요한 단백질 리스트를 두 단계에서 10개의 단백질에 이르기까지 필터링하였다. 첫째로, 우리는 0.37(단백질 신호를 두 배로 늘어나게 하기 위한 30%의 위험 변화(hazard change)와 동등)보다 훨씬 큰 계수를 주는 20개의 단백질로 리스트를 한정하였으며, 이 단계는 46개 단백질을 전부 사용하는 단일 다변량 Cox 모델을 사용하였다. (단백질 측정의 자연 로그(natural log)는 Cox 모델 피팅 전에 사용되었으므로, 단백질 측정에서 Cox 계수의 지수는 e-배율(2.71)(e-fold) 변화의 위험 비율에 해당한다.)

[0204] 다음 단계에서, 필터링된 20개의 단백질은 p-값이 0.01보다 더 유의적일 것을 요구함으로써 10개만 남게 된다. 이 단계는 공변(covariant) 단백질을 억제하며, 독립적인 단백질에 기여할 수 있다. 연구는 심혈관 위험을 명백하게 보여주도록 만들어졌으므로, 보체계(complement system)의 최종 공통 경로(final common pathway)에 있는 막공격 복합체(membrane attack complex)의 구성원인 C9에서 바이오마커 선별을 위해 이루어진 최종 조정은 이 연구만으로 결정될 수 없는 문제인 그것의 신호전달에 너무 비특이적인 것으로 판단되었다. C9는 제거되었으며, 남아있는 모든 단백질들은 그 자리에서 평가되었다. 대체 단백질은 월드 검정(Wald tst) 스코어로 향상에 대해 평가되었고, KLK3.SerpinA3는 거의 C9 만큼 효율적이었다.

[0205] 심혈관 위험의 이 10개의 마커 모델에 대한 카플란 마이어 생존 곡선을 도 3a-3e에 나타내었다.

[0206] 표 1은 개인에게서 미래의 심혈관 사건의 위험을 평가하는데 유용한 155개의 바이오마커를 확인할 수 있게 한다. 이것은 놀랍게도 경우에 따라서는 극히 낮은(femtomolar) 수준의 농도로 수백의 개개인의 샘플에서 측정된 100개가 넘는 단백질이 포함된, 기술된 연구의 규모에서 비롯될 수 있는 바이오마커 발굴 노력 동안 전형적으로 발견된 것들과 비교해볼 때 예상되는 것보다 많은 수이다. 아마도, 다수의 발견된 바이오마커들은 심혈관 사건으로 이끄는 생명작용 및 심혈관 사건에 대한 신체의 반응에 연루되어 있는 다양한 생화학적 경로를 반영하며; 각 경로 및 프로세스는 많은 단백질들을 포함한다. 그 결과는 어떠한 소그룹의 단백질의 단일 단백질도 이와 같은 복잡한 프로세스에 대하여 특별히 유용한 정보를 주지 않으며; 오히려 다중 단백질은 예를 들어, GFR, 아테롬성 동맥 경화증(atherosclerosis), 염증(inflammation) 및 호르몬성 심혈관 조절(hormonal CV regulation)과 같은 관련 있는 프로세스에 관여한다.

[0207] 실시예 2로부터 얻은 결과는 어떤 가능성 있는 결론을 암시한다: 첫째로, 다수의 바이오마커의 확인은 그것들의 집합체(aggregation)가 유사하게 높은 성능을 제공하는 많은 분류기가 될 수 있게 한다. 두 번째로, 분류기는

특정 바이오마커가 근본적인 질병, 질환 또는 사건 프로세스의 복잡성에 의심할 여지 없이 널리 퍼진 불필요한 중복(redundancies)을 반영하는 방식으로 다른 바이오마커를 대신할 수 있도록 구성될 수 있다. 다시 말해서, 표 1에서 확인된 임의의 개개의 바이오마커에 의해 제공된 질병, 질환 또는 사건에 대한 정보는 표 1에 있는 어떤 특정 바이오마커 또는 소그룹의 바이오마커도 임의의 분류기에 포함되어서는 안된다는 것일지도 모른다.

[0209] **키트**

[0210] 표 1, Col.7의 바이오마커의 임의의 조합은 본원에 기재된 방법을 수행하는데 사용하기 위한 것과 같은 적절한 키트를 사용하여 검출될 수 있다. 게다가, 임의의 키트는 형광성 부분(moiety) 등과 같은 본원에 기재된 것과 같은 하나 또는 그 이상의 검출가능한 표지를 포함할 수 있다.

[0211] 일 구현에서, 키트는 (a) 생물학적 샘플에서 하나 또는 그 이상의 바이오마커를 검출하기 위한 (예를 들어, 적어도 하나의 소마머 또는 항체와 같은) 하나 또는 그 이상의 포획 시약과, 여기에서 상기 바이오마커는 표 1, Col.7에 기재된 임의의 바이오마커를 포함하며, 선택적으로 (b) 본원에 더 기재된 것과 같이, 생물학적 샘플이 얻어진 개인을 심혈관 사건의 위험이 증가하거나 증가하지 않은 것 중 하나로 분류하거나 개인이 심혈관 사건의 위험이 증가될 가능성을 측정하기 위한 하나 또는 그 이상의 소프트웨어 또는 컴퓨터 프로그램 제품을 포함한다. 대안적으로, 하나 또는 그 이상의 컴퓨터 프로그램 제품보다는, 인간에 의해 상기 단계를 수동으로 실행하기 위한 하나 또는 그 이상의 설명서(instruction)가 제공될 수 있다.

[0212] 대응하는 포획 시약 및 시그널 생성 물질과 고체 지지체의 조합은 본원에서 "검출 장치(detection device)" 또는 "키트(kit)"로 칭한다. 상기 키트는 또한 장치 및 시약을 사용하고, 샘플을 다루고, 데이터를 분석하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 생물학적 샘플의 분석 결과를 분석하고 기록하기 위하여 컴퓨터 시스템 또는 소프트웨어와 함께 사용될 수 있다.

[0213] 상기 키트는 또한 생물학적 샘플을 처리하기 위한 하나 또는 그 이상의 시약(예를 들어, 가용화 버퍼(solubilization buffers), 세제(detergents), 세척제(washes) 또는 버퍼(buffers))을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 상기 키트는 또한 예를 들어, 버퍼, 차단제(blocking agents), 질량 분석 매트릭스 물질(mass spectrometry matrix materials), 항체 포획 시약(antibody capture agents), 양성 대조군 샘플(positive control samples), 음성 대조군 샘플(negative control samples), 소프트웨어 및 프로토콜, 안내서 및 참고 데이터와 같은 정보를 포함할 수 있다.

[0214] 일 양상에서, 본 발명은 심혈관 사건 위험 상태의 분석을 위한 키트를 제공한다. 상기 키트는 표 1, Col. 7로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 바이오마커에 특이적인 하나 또는 그 이상의 소마머에 대한 PCR 프라이머(primers)를 포함한다. 상기 키트는 심혈관 사건의 위험 예측에 대한 바이오마커의 사용 및 상관 관계(correlation)에 대한 설명서를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 표 1, Col. 7로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 바이오마커의 상보체(complement), 시약, 및/또는 샘플 DNA를 증폭 또는 단리하기 위한 효소를 포함하는 DNA 어레이를 포함할 수 있다. 상기 키트는 실시간 PCR(real-time PCR)을 위한 시약, 예를 들어 TaqMan 프로브(probe) 및/또는 프라이머 및 효소를 포함할 수 있다.

[0215] 예를 들면, 키트는 (a) 최소한 시료에서 하나 또는 그 이상의 바이오마커를 정량하기 위한 포획 시약을 포함하는 시약과, 여기에서 상기 바이오마커는 표 1, Col. 7에 기재된 바이오마커 또는 본원에 기재된 다른 바이오마커 또는 바이오마커 패널을 포함하고, 선택적으로 (b) 하나 또는 그 이상의 미리 측정된 컷오프(cutoff)와 시료에서 정량된 각각의 바이오마커의 양을 비교하고, 상기 비교에 기초하여 정량화된 각 바이오마커에 대한 스코어를 지정하고, 총 스코어를 얻기 위하여 정량화된 각 바이오마커에 대한 지정된 스코어를 조합하고, 미리 측정된 스코어와 총 스코어를 비교하고, 개인이 심혈관 사건의 위험이 증가되었는지의 여부를 결정하기 위하여 상기 비교를 사용하기 위한, 하나 또는 그 이상의 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 포함할 수 있다. 대안적으로, 하나 또는 그 이상의 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램 이외에, 인간에 의해 상기 단계를 수동으로 실행하기 위한 하나 또는 그 이상의 설명서가 제공될 수 있다.

[0217] **컴퓨터 방법 및 소프트웨어**

[0218] 일단 바이오마커 또는 바이오마커 패널이 선택되면, 개인을 진단하기 위한 방법은 하기의: 1) 생물학적 샘플을 수집하거나 그렇지 않다면 얻고; 2) 상기 생물학적 샘플에서 바이오마커 또는 바이오마커 패널을 검출하고 측정하기 위한 분석 방법을 수행하고; 3) 바이오마커 값을 수집하는데 사용된 방법에 필요한 임의의 데이터 표준화(normalization or standardization)를 수행하고; 4) 마커 스코어를 계산하고; 5) 총 진단 또는 예측 스코어를 얻기 위하여 마커 스코어를 합하고; 6) 개인의 진단 또는 예측 스코어를 기록하는 것을 포함할 수 있다. 이 접

근법에서, 상기 진단 또는 예측 스코어는 질병의 존재 여부를 표시하는 미리 설정된 역치(pre-set threshold value)와 비교되는 모든 마커 계산결과의 합으로부터 측정된 단일 숫자일 수 있다. 또는, 상기 진단 스코어는 바이오마커 값을 각각 나타내는 일련의 바(bar)일 수 있고, 반응 패턴은 질병, 질환 또는 사건의 증가된 (또는 그렇지 않은) 위험의 존재 여부의 측정을 위하여 미리 설정된 패턴(pre-set pattern)과 비교될 수 있다.

[0219] 적어도 본원에 기재된 방법의 어떤 구현은 컴퓨터의 사용으로 실행될 수 있다. 컴퓨터 시스템(100)의 예는 도 4에 나타내었다. 도 4을 참고하면, 시스템(100)은 프로세서(processor)(101), 입력 장치(input device)(102), 출력 장치(output device)(103), 저장 장치(storage device)(104), 컴퓨터-판독가능한 저장매체 판독기(computer-readable storage meadia reader)(105a), 통신 시스템(communication system)(106), 처리 가속장치(processing acceleration)(예를 들어, DSP 또는 특정 목적의 프로세서)(107) 및 메모리(109)를 포함하는, 버스(bus)(108)를 통하여 전기적으로 연결된 하드웨어 구성요소로 구성됨을 보여준다. 컴퓨터 판독가능한 저장매체 판독기(105a)는 컴퓨터-판독가능한 저장매체(105b), 일시적으로 원격(remote), 국소(local), 고정(fixed) 및/또는 이동가능한(removable) 저장 장치 플러스 저장매체, 메모리 등을 광범위하게 나타내는 조합과 더 연결될 수 있고/있거나 저장 장치(104), 메모리(109) 및/또는 임의의 다른 그와 같이 접근가능한 시스템(100) 리소스(resource)를 포함할 수 있는 컴퓨터 판독가능한 정보를 더 영구적으로 포함한다. 시스템(100)은 또한 작동 시스템(operating system)(192) 및 프로그램, 데이터 등과 같은 다른 코드(code)(193)를 포함하는 소프트웨어 구성요소(일반적으로 작동 메모리(working memory)(191) 내에 위치하는 것으로 보임)를 포함한다.

[0220] 도 4에 관하여, 시스템(100)은 광범위한 유연성(flexibility) 및 적용성(configurability)을 가진다. 따라서, 예를 들어, 단일 구성(architecture)은 일반적으로 바람직한 프로토콜, 프로토콜의 변형, 확장(extension) 등에 따라 추가로 구성될 수 있는 하나 또는 그 이상의 서버(servers)를 실행하는데 사용될 수 있다. 그러나, 구현은 더욱 특이적인 적용 요구에 따라 적절히 사용될 수 있다는 것을 당업자들은 확인할 수 있을 것이다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 시스템 구성요소는 시스템(100) 성분 내에서((예를 들어, 통신 시스템(106) 내에) 서브-구성요소로서 수행될 수 있다. 맞춤형 하드웨어(customized hardware) 또한 사용될 수 있고/있거나, 특정 구성요소가 하드웨어, 소프트웨어 또는 둘 다에서 실행될 수 있다. 게다가, 네트워크 입력/출력 장치(비도시)와 같은 다른 컴퓨팅 장치에 연결되어 있다 할지라도 사용될 수 있으며, 유선(wired), 무선(wireless), 모뎀(modem) 및/또는 다른 연결 또는 다른 컴퓨팅 장치(computing device) 또한 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0221] 일 양상에서, 상기 시스템은 심혈관 사건의 위험 예측에 특유한 바이오마커의 특징을 포함하는 데이터베이스를 포함할 수 있다. 바이오마커 데이터(또는 바이오마커 정보)는 컴퓨터로 실행된 방법의 일부분으로서 사용하기 위하여 컴퓨터에 정보(input)로서 사용될 수 있다. 상기 바이오마커 데이터는 본원에 기재된 것과 같은 데이터를 포함할 수 있다.

[0222] 일 양상에서, 상기 시스템은 하나 또는 그 이상의 프로세서에 정보 데이터(input data)를 제공하기 위한 하나 또는 그 이상의 장치를 더 포함한다.

[0223] 상기 시스템은 있는 그대로의 데이터(naked data) 구성요소의 데이터 세트를 저장하기 위한 메모리를 더 포함한다.

[0224] 다른 양상에서, 상기 정보 데이터를 제공하기 위한 장치는 예를 들어, 질량 분석기(mass spectrometer) 또는 유전자 칩 판독기(gene chip reader)와 같은 데이터 구성요소의 특성을 검출하기 위한 검출기를 포함한다.

[0225] 상기 시스템은 부가적으로 데이터베이스 관리 시스템을 포함할 수 있다. 사용자 요구(requests) 또는 질의(queries)는 데이터베이스의 트레이닝 세트로부터 관련 정보를 추출하기 위하여 질의를 처리하는 데이터베이스 관리 시스템에 의해 해석되는 적절한 언어로 구성될 수 있다.

[0226] 상기 시스템은 네트워크 서버와 하나 또는 그 이상의 클라이언트가 연결된 네트워크에 연결가능할 수 있다. 상기 네트워크는 당업계에 공지되어 있는 것과 같은 근거리 통신망(local area network; LAN) 또는 광역 통신망(wide area network; WAN)일 수 있다. 바람직하게는, 상기 서버는 사용자 요구를 처리하기 위한 데이터베이스 데이터에 접근하기 위한 컴퓨터 프로그램 제품(예를 들어, 소프트웨어)을 구동하는데 필요한 하드웨어를 포함한다.

[0227] 상기 시스템은 데이터 관리 시스템으로부터의 지시를 수행하기 위한 작동 시스템(operating system)(예를 들어, UNIX 또는 Linux)를 포함할 수 있다. 하나의 양상에서, 상기 작동 시스템은 인터넷과 같은 글로벌 커뮤니케이션 네트워크(global communication network) 상에서 작동할 수 있고, 그러한 네트워크에 연결하기 위하여 글로벌 커뮤니케이션 네트워크 서버를 이용한다.

[0228] 상기 시스템은 당업계에 공지된 그래픽 사용자 인터페이스(graphical user interface)에서 일상적으로 발견되는 것과 같은 버튼(buttons), 풀 다운 메뉴(pull down menus), 스크롤 바(scroll bars), 텍스트를 입력하기 위한 공간(fields for entering text) 등과 같은 인터페이스 구성요소를 포함하는 그래픽 디스플레이 인터페이스를 포함하는 하나 또는 그 이상의 장치를 포함할 수 있다. 사용자 인터페이스상에 입력된 요구는 하나 또는 그 이상의 시스템 데이터베이스에 관련 정보를 검색하기 위하여 포맷(formatting)을 위한 시스템에서 적용 프로그램으로 전달될 수 있다. 사용자에 의해 입력된 요구 또는 질의는 임의의 적절한 데이터베이스 언어로 구성될 수 있다.

[0229] 상기 그래픽 사용자 인터페이스는 작동 시스템의 일부분으로서 그래픽 사용자 인터페이스 코드에 의해 생성될 수 있고, 입력 데이터로 사용될 수 있고/있거나 입력된 데이터를 표시할 수 있다. 처리된 데이터의 결과는 인터페이스에 표시되고, 시스템과 연결된 프린터 상에 인쇄되고, 메모리 장치에 저장되고/되거나 네트워크로 전달될 수 있거나, 컴퓨터 판독가능한 매체의 형태로 제공될 수 있다.

[0230] 상기 시스템은 상기 시스템에 데이터 구성요소에 관한 데이터(예를 들어, 발현 값)를 제공하기 위한 입력 장치와 연결될 수 있다. 하나의 양상에서, 상기 입력 장치는 예를 들어, 질량 분석기, 유전자 칩 또는 어레이 판독기 등을 포함하는 유전자 발현 프로파일링 시스템을 포함할 수 있다.

[0231] 다양한 구현에 따른 심혈관 사건 위험 예측 바이오마커 정보를 분석하기 위한 방법 및 기구는 예를 들어, 컴퓨터 시스템상에서 작동하는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 임의의 적절한 방법으로 실행될 수 있다. 프로세서 및 원격으로 접근가능한 애플리케이션 서버(remotely-accessible application server), 네트워크 서버(network server), 개인 컴퓨터(personal computer) 또는 워크스테이션(workstation)과 같은 랜덤 접근 메모리(random access memory)를 포함하는 기존의 컴퓨터 시스템이 사용될 수 있다. 부가적인 컴퓨터 시스템 구성은 대용량 기억장치(mass storage) 및 사용자 인터페이스, 예를 들어 기존의 모니터, 키보드 및 추적 장치(tracking device)와 같은 메모리 장치 또는 정보 저장 시스템을 포함할 수 있다. 상기 컴퓨터 시스템은 자립형(stand-alone) 시스템 또는 서버 및 하나 또는 그 이상의 데이터베이스를 포함하는 컴퓨터 네트워크의 일부분일 수 있다.

[0232] 심혈관 사건 위험 예측 바이오마커 분석 시스템은 데이터 집합, 처리, 분석, 기록 및/또는 진단과 같은 데이터 분석을 완료하기 위한 기능 및 연산(operation)을 제공할 수 있다. 예를 들면, 일 구현에서, 상기 컴퓨터 시스템은 심혈관 사건 위험 예측 바이오마커에 관련되는 정보를 수용하고, 저장하고, 검색하고, 분석하고 기록할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 실행할 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 원 데이터(raw data)를 처리하고 추가 자료를 모으기 위한 프로세싱 모듈(processing module) 및 심혈관 사건 위험 예측 상태 및/또는 진단 또는 위험 계산을 생성하기 위하여 원 데이터 및 추가 데이터를 분석하기 위한 분석 모듈(analysis module)과 같은 다양한 기능 또는 연산을 수행하는 다중 모듈(multiple modules)을 포함할 수 있다. 심혈관 사건에 대한 위험 상태의 계산은 선택적으로 질병, 질환 또는 사건에 관련된 개인의 상태에 관한 추가적인 생물의학 정보를 포함하는 임의의 다른 정보를 모으거나 수집하고, 추가 테스트가 바람직한지의 여부를 확인하거나, 또는 그렇지 않으면 개인의 건강 상태를 고려하는 것을 포함할 수 있다.

[0233] 도 5을 참고하면, 기재된 구현의 원리에 따라 컴퓨터를 사용하는 방법의 예를 볼 수 있다. 도 5에, 흐름도(3000)를 도시하였다. 블록(3004)에서, 바이오마커 정보는 개인에 대하여 검색될 수 있다. 상기 바이오마커 정보는 예를 들어, 개인의 생물학적 샘플의 테스트가 완료된 후 컴퓨터 데이터베이스로부터 검색될 수 있다. 상기 바이오마커 정보는 표 1, Col. 7에 제공된 바이오마커로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 포함할 수 있으며, 여기에서 N = 2-155이다. 블록(3008)에서, 컴퓨터는 각각의 바이오마커 값을 분류하는데 사용될 수 있다. 그리고, 블록(3012)에서, 측정은 대다수의 분류에 기초하여 개인이 심혈관 사건의 위험이 증가된 것일 가능성으로 이루어질 수 있다. 표시는 사람에게 보여 질 수 있는 그런 디스플레이 또는 다른 지시 장치(indicating device)에 출력될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 그것은 컴퓨터의 스크린 또는 다른 출력 장치상에 나타내질 수 있다.

[0234] 도 6을 참고하면, 다른 구현에 따라 컴퓨터를 사용하는 대안적인 방법은 흐름도(3200)를 통하여 설명될 수 있다. 블록(3204)에서, 컴퓨터는 개인에 대한 바이오마커 정보를 검색하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 바이오마커 정보는 표 1, Col.7에 제공된 바이오마커의 군으로부터 선택된 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 포함한다. 블록(3208)에서, 바이오마커 값의 분류는 컴퓨터를 사용하여 수행될 수 있다. 그리고, 블록(3212)에서, 표시는 분류에 기초하여 개인이 심혈관 사건의 위험이 증가될 가능성으로 이루어질 수 있다. 상기 표시는 사람에게 보여 질 수 있는 그런 디스플레이 또는 다른 지시 장치에 출력될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 그

것은 컴퓨터의 스크린 또는 다른 출력 장치상에 나타내질 수 있다.

[0235] 본원에 기재된 어떤 구현은 컴퓨터 프로그램 제품을 포함하기 위한 수단을 제공할 수 있다. 컴퓨터 프로그램 제품은 적용 프로그램으로 하여금 데이터베이스와 함께 컴퓨터를 실행시키기 위하여 매체에 통합된 컴퓨터 판독가능한 프로그램 코드를 가지는 컴퓨터 판독가능 매체를 포함할 수 있다.

[0236] 본원에 사용된 것으로서, "컴퓨터 프로그램 제품(computer program product)"은 임의의 특성의 물리적 매체(예를 들어, 서류(written), 전자(electronic), 자기(magnetic), 광학(optical) 또는 그 외) 상에 포함되며, 컴퓨터 또는 다른 자동화된 데이터 프로세싱 시스템과 함께 사용될 수 있는, 본래의 또는 프로그래밍 언어 명령문(statements)의 형태로 조직화된 일련의 명령어(instruction)를 말한다. 이러한 프로그래밍 언어 명령문은 컴퓨터 또는 데이터 프로세싱 시스템에 의해 실행될 때, 컴퓨터 또는 데이터 프로세싱 시스템이 명령문의 특정 내용에 따라 작동하도록 한다. 컴퓨터 프로그램 제품은 컴퓨터 판독가능한 매체에 통합되어 있는 원시 코드(source code)와 목적 코드(object code) 및/또는 테스트 또는 데이터 라이브러리에 프로그램을 제한 없이 포함한다. 게다가, 컴퓨터 시스템 또는 데이터 프로세싱 설비 장치를 미리 선별된 방법으로 작동하도록 할 수 있는 상기 컴퓨터 프로그램 제품은 본래의 원시 코드(original source code), 어셈블리 코드(assembly code), 목적 코드(object code), 기계어(machine language), 앞서 말한 것 및 임의의 및 모든 동등물의 암호화되거나 압축된 형태를 포함하지만 이로 제한되지는 않는 다수의 형태로 제공될 수 있다.

[0237] 일 양상에서, 컴퓨터 프로그램 제품은 심혈관 사건의 위험의 평가를 위하여 제공된다. 상기 컴퓨터 프로그램 제품은 컴퓨팅 장치 또는 시스템의 프로세서에 의해 실행가능한 프로그램 코드를 포함하는 컴퓨터 판독가능한 매체를 포함하고, 상기 프로그램 코드는: 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 얻어진 데이터를 검색하는 코드와, 여기에서 상기 데이터는 표 1, Col.7에 제공된 바이오마커의 군으로부터 선택된 생물학적 샘플에서의 적어도 N의 바이오마커 중 하나에 각각 대응하는 바이오마커 값을 포함하고, 여기에서 N = 2-155이고; 바이오마커 값의 함수로서 상기 심혈관 위험 상태를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드를 포함한다.

[0238] 여전히 다른 양상에서, 컴퓨터 프로그램 제품은 심혈관 사건 위험의 가능성을 나타내기 위하여 제공된다. 상기 컴퓨터 프로그램 제품은 컴퓨팅 장치 또는 시스템의 프로세서에 의해 실행가능한 프로그램 코드를 포함하는 컴퓨터 판독가능한 매체를 포함하고, 상기 프로그램 코드는: 개인으로부터의 생물학적 샘플에서 얻어진 데이터를 검색하는 코드와, 여기에서 상기 데이터는 표 1, Col.7에 제공된 바이오마커의 군으로부터 선택된 생물학적 샘플에서의 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 포함하며; 바이오마커 값의 함수로서 개인의 심혈관 사건 위험 상태를 나타내는 분류 방법을 실행하는 코드를 포함한다.

[0239] 다양한 구현이 방법 또는 기구로서 기재되는 동안, 구현은 컴퓨터와 연결된 코드, 예를 들어 컴퓨터상의 코드 레지던트(code resident) 컴퓨터에 의해 접근가능한 코드를 통하여 실행될 수 있다. 예를 들면, 소프트웨어 및 데이터베이스는 상기에 논의된 많은 방법을 실행하는데 사용될 수 있다. 따라서, 하드웨어에 의해 달성되는 구현 이외에도, 이 구현은 이 명세서에 기재된 기능을 가능하게 하는 것으로 구현된 컴퓨터 판독가능한 프로그램 코드를 가지는 매체를 사용가능한 컴퓨터로 이루어지는 하나의 제품의 사용을 통하여 달성될 수 있다는 것에도 유의해야 한다. 따라서, 구현은 또한 그것들의 프로그램 코드 매체(means)로 이 특허에 의해 보호되는 것으로 간주하는 것이 바람직하다. 게다가, 상기 구현은 제한 없이 RAM, ROM, 자기 매체(magnetic media), 광학 매체(optical media) 또는 광자기 매체(magneto-optical media)를 포함하는 실질적으로 어떤 종류의 컴퓨터-판독가능한 메모리에 저장된 코드로서 구현될 수 있다. 심지어 더욱 일반적으로는, 상기 구현은 범용 프로세서(general purpose processor) 상에서 구동하는 소프트웨어, 마이크로코드(microcode), PLAs 또는 ASICs를 포함하지만 이로 제한되지는 않는 소프트웨어 또는 하드웨어 또는 그것들의 임의의 조합에서 실행될 수 있다.

[0240] 구현은 반송파(carrier wave)로 구현된 컴퓨터 시그널뿐만 아니라 전송매체(transmission medium)를 통하여 전달된(예를 들어, 전기적 또는 광학적) 시그널로서 달성될 수 있다는 것 또한 예상된다. 따라서, 상기에 논의된 다양한 형태의 정보는 데이터 구조와 같은 구조로 구성될 수 있으며, 전송 매체를 통하거나 컴퓨터 판독가능한 매체 상에 저장된 전기적 시그널로서 전송된다.

[0241] 또한, 본원에 열거된 많은 구조, 물질 및 작용들은 기능을 수행하기 위한 수단 또는 기능을 수행하기 위한 단계로서 재인용될 수 있다는 것도 주목해야 한다. 따라서, 이와 같은 언어는 이 명세서 내에 기재된 그러한 구조, 물질 또는 작용 및 참조로서 통합되어 있는 물질을 포함하는 그것들의 동등물을 모두 포함할 권리가 있는 것으로 인지되어야 한다.

[0242] 본원에 기재된 바이오마커 확인 공정, 바이오마커의 이용 및 바이오마커 값을 측정하기 위한 다양한 방법들이

심혈관 사건의 위험의 평가에 대하여 상기에 상세히 기재되었다. 그러나, 공정의 적용, 확인된 바이오마커의 사용 및 바이오마커 값을 측정하기 위한 방법은 다른 특정 형태의 심혈관 질병에, 임의의 다른 질병 또는 의학적 상태 또는 부수적인 의학적 치료에 의해 혜택을 받거나 받지 않을 수 있는 개인의 확인에 충분히 적용가능하다.

[0244] **실시예**

[0245] 하기의 예들은 설명을 위한 목적으로 제공되며, 첨부된 청구항에 의해 정의된 것과 같은 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원에 기재된 모든 예들은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적인 표준 기술을 사용하여 수행되었다. 하기의 실시예에 기재된 일반적인 분자 생물학 기술들은 샘브룩 등과 같은 표준 실험실 메뉴얼에 기재된 것과 같이 수행될 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,(2001)).

[0247] **실시예 1: 샘플의 다중 압타머 분석**

[0248] 이 실시예는 표 1에 제시된 바이오마커의 확인을 위한 샘플 및 대조군을 분석하는데 사용된 다중 압타머 검정법(multiplex aptamer assay)을 설명한다. 샘플의 분석을 위한 일반적인 프로토콜을 도 1a 및 1b에 나타내었다. 병리학적 상태의 다중 공변량(multiple covariate)으로부터 위험 스코어를 생성하기 위하여 생존 자료의 의학적 연구에 있어서 흔한 Cox 비례위험 모델을 사용하였다. 이 작업에서, 하트 앤 소울 연구에서의 집단 데이터로부터 모델을 고안하기 위하여, 예를 들어 이 융통성이 있고 광범위하게 사용되는 Cox 비례위험 형식주의(formalism)에 따라 개개의 샘플에 적용하기에 적합한 이 단순하고 잘 알려진 접근법을 사용하였다. 바이오마커 값을 정상적인 레벨에 관해 바이오마커 측정의 로그 비율을 취함으로써 도 1b에 나타낸 것과 같이 조합하였다. Cox 모델은 정상 집단에 대한 위험 비율의 추정치를 생성하기 위하여 이들 로그 비율의 가중치 합(weighted sum)의 지수를 사용한다.

[0249] 이 방법에서, 각각의 용액을 첨가하기 위하여 피펫의 팁을 바꾸었다.

[0250] 또한, 달리 지시하지 않는 한, 대부분의 용액을 옮겨 세척제를 첨가하고, 베크만 바이오멕 FxP(Beckman Biomek FxP)의 96웰 헤드를 사용하였다. 방법 단계는 달리 지시하지 않는 한, 12개 채널 P200 피펫만(twelve channel P200 Pipetteman)(Rainin Instruments, LLC, Oakland, CA)을 사용하여 손으로 피펫팅하였다. pH 7.5에서 40mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA를 포함하는 SB17로 불리는 맞춤 버퍼(custom buffer)를 실험실에서(in-house) 제조하였다. 모든 단계는 달리 지시하지 않는 한 상온에서 수행하였다.

[0252] 1. 압타머 스톡 용액의 제조

[0253] 5%, 0.316% 및 0.01% 혈청에 대한 맞춤 스톡 압타머 용액을 1 x SB17, 0.05% 트윈-20에 2x 농도로 제조하였다. 이들 용액을 사용할 때까지 -20℃에 저장하였다. 분석하는 날, 각 압타머 믹스(mix)를 10분간 37℃에서 녹이고, 10분간 끓는 물 수조에 놓아둔 후, 각 가열 단계 사이에서 격렬하게 혼합시키면서 20분간 25℃로 냉각시켰다. 가열-냉각 후, 55㎕의 각 2x 압타머 믹스를 96-웰 혼성화 플레이트 안으로 손으로 피펫팅하여 넣고, 플레이트를 호일로 밀봉하였다. 최종 결과물을 5%, 0.316% 또는 0.01% 압타머 믹스를 이용한 3, 96-웰, 호일 밀봉된 혼성화 플레이트에서 얻었다. 개개의 압타머 농도는 2x 최종 또는 1nM였다.

[0255] 2. 검정 샘플 제조

[0256] -80℃에서 보관된 100% 혈청의 동결 엘리컷을 25℃의 항온수조에 10분간 넣어두었다. 녹인 샘플을 얼음에 넣고, 8초간 부드럽게 볼텍싱(4로 설정)한 후 얼음에 다시 넣었다.

[0257] 96-웰 혼성화 플레이트 안으로 50㎕ 8-채널의 스패닝 피펫터(8-channel spanning pipettor)를 사용하여 8㎕의 샘플을 옮김으로써 10% 샘플 용액(2x 최종)을 제조하였으며, 각 웰은 4℃에서 72㎕의 적절한 샘플 희석액을 포함한다(혈청에 대하여 1x SB17, 0.06% Tween-20, 11.1㎛M Z-block_2, 0.44mM $MgCl_2$, 2.2mM AEBSF, 1.1mM EGTA, 55.6㎛M EDTA). 이 플레이트를 다음 샘플 희석 단계가 바이오멕 FxP 로봇상에서 시작될 때까지 얼음에 보관하였다.

[0258] 샘플과 압타머의 평형을 개시하기 위하여, 10% 샘플 플레이트를 가볍게 원심분리한 후, 바이오멕 FxP(Biomek FxP)에 올려두고 96-웰 피펫터를 사용하여 아래 위로 피펫팅하여 혼합하였다. 그 후, 2mM AEBSF와 함께 89㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20 내로 6㎕의 10% 샘플을 이동시킴으로써 0.632% 샘플 플레이트(2x 최종)를 제조하였다. 다음으로, 184㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20 내로 6㎕의 상기 제조된 0.632% 샘플을 희석하여 0.02% 샘플

플레이트(2x 최종)를 만들었다. 희석은 베크만 바이오멕 FxP 상에서 완료하였다. 각각 옮긴 후, 용액을 아래 위로 피펫팅하여 혼합하였다. 그 후, 3개의 샘플 희석 플레이트를 55μL의 적절한 2x 압타머 혼합물에 55μL의 샘플을 첨가함으로써 각자의 압타머 용액으로 옮겼다. 상기 샘플 및 압타머 용액을 아래 위 피펫팅에 의해 로봇 상에서 혼합하였다.

[0260] 3. 샘플 평형 결합

[0261] 상기 샘플/압타머 플레이트를 실리콘 캡으로 밀봉하고, 캐치 1(Catch 1) 단계로 나아가기 전에 3.5 시간 동안 37℃ 배양기에 놓아두었다.

[0263] 4. 캐치 2(Catch 2) 비드 플레이트의 제조

[0264] 마이원 스트렙타비딘 C1 비드(MyOne Streptavidin C1 beads; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)의 11mL 엘리컷을 동일한 양의 20mM NaOH로 2번 세척하고(각 세척에 대하여 5분 배양), 동일한 양의 1xSB17, 0.05% 트윈-20으로 3번 세척하고, 11mL의 1xSB17, 0.05% 트윈-20에 재현탁하였다. 12-채널 피펫터(12-channel pipettor)를 사용하여, 50μL의 이 용액을 96-웰 혼성화 플레이트의 각 웰 안으로 수동으로 피펫팅하여 넣었다. 그 후, 상기 플레이트를 호일로 감싸고 검정에 사용하기 위하여 4℃에 보관하였다.

[0266] 5. 캐치 1 비드 플레이트의 제조

[0267] 세 개의 0.45μm 밀리포어 HV 플레이트(Millipore HV plates; Durapore membrane, Cat# MAHVN4550)를 적어도 10분간 100μL의 1xSB17, 0.05% 트윈-20으로 평형화시켰다. 그 후, 평형 버퍼(equilibration buffer)를 플레이트를 통하여 여과시키고, (1xSB17, 0.05% 트윈-20에 용해시킨) 133.3μL의 7.5% 스트렙타비딘-아가로오스 비드 슬러리(slurry)를 각 웰 안으로 첨가하였다. 필터 플레이트 안으로 그것들을 옮기는 동안 현탁된 스트렙타비딘-아가로오스 비드를 유지하기 위하여, 상기 비드 용액을 피펫팅 사이에서 적어도 6번, 200μL의 12-채널 피펫터를 사용하여 수동으로 혼합하였다. 비드를 3개의 필터 플레이트에 분포시킨 후, 비드 상층액을 제거하기 위하여 진공을 사용하였다. 마지막으로, 상기 비드를 200μL의 1xSB17, 0.05% 트윈-20을 사용하여 필터 플레이트에서 세척한 후, 200μL의 1xSB17, 0.05% 트윈-20으로 재현탁하였다. 필터 플레이트의 바닥을 닦아내고, 그 플레이트를 검정에 사용하기 위하여 보관하였다.

[0269] 6. 사이토멧(Cytomat)의 로딩

[0270] 사이토멧을 통에서 모든 팁, 플레이트, 모든 시약과 함께 로딩하고(플레이트에 첨가되기 전에 바로 새롭게 제조되는 NHS-비오틴 시약은 제외), 3개를 캐치 1 필터 플레이트에 제조하였고, 하나를 마이원 플레이트에 제조하였다.

[0272] 7. 캐치 1

[0273] 3.5분의 평형화 시간 후, 샘플/압타머 플레이트를 배양기로부터 제거하여 약 1분간 원심분리하고, 캡 매트 커버를 제거하여 베크만 바이오멕 FxP의 데크(deck)에 놓아두었다. 베크만 바이오멕 FxP 프로그램를 시작하였다. 캐치 1에서 다음에 오는 모든 단계들은 달리 지시하지 않는 한, 베크만 바이오멕 FxP 로봇에 의해 수행하였다. 프로그램 내에서, 비드 상층액을 제거하기 위하여 캐치 1 필터 플레이트에 진공을 적용하였다. 각각 100μl의 5%, 0316% 및 0.01% 평형 결합 반응액을 그것들 각각의 캐치 1 여과 플레이트에 첨가하고, 각 플레이트를 10분간 800rpm에서 온-데크 오르비탈 쉐이커(on-deck orbital shaker)를 사용하여 혼합하였다.

[0274] 결합되지 않은 용액을 진공 여과를 통하여 제거하였다. 캐치 1 비드를 1xSB17, 0.05% 트윈-20에 용해시킨 190μL의 100μM 비오틴으로 세척한 후, 용액을 분배시켜 190μL의 1xSB17, 0.05% 트윈-20 5개를 얻고, 플레이트를 통하여 용액을 여과하기 위하여 즉시 진공을 뽑아주었다.

[0276] 8. 태깅(Tagging)

[0277] (-20℃에 보관된)무수 DMSO에 용해시킨 100mM의 NHS-PEO_4-비오틴 엘리컷을 6분간 37℃에서 녹인 후, 각 캐치 1 필터 플레이트의 각 웰 안으로 100μL의 NHS-PEO_4-비오틴을 분배하는 로봇을 통하여 온-데크 통에 수동으로 첨가되기 바로 전, 태깅 버퍼(tagging buffer)(pH = 7.25에서 SB17, 0.05% 트윈-20)를 사용하여 1:100으로 희석하였다. 이 용액을 오르비탈 쉐이커 상에서 5분간 800rpm으로 흔들어주면서 캐치 1 비드와 함께 배양하였다.

[0279] 9. 동적 유발(kinetic challenge) 및 광절단(photo-cleavage)

[0280] 태깅 반응은 진공 여과에 의해 제거되며, 상기 반응은 캐치 1 플레이트에 1xSB17, 0.05% 트윈-20에 용해시킨

150㎕의 20mM 글리세린을 첨가함으로써 중단되었다. 글리신 용액을 진공 여과를 통해 제거하고, 다른 1500㎕의 20mM 글리세린(1xSB17, 0.05% 트윈-20)을 각 플레이트에 첨가하고, 진공 여과에 의해 제거하기 전에 800rpm으로 오르비탈 쉐이커 상에서 1분간 배양하였다.

[0281] 캐치 1 플레이트의 웰을 그 후 190㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20을 첨가하여 세척하고, 바로 진공 여과를 한 후, 진공 여과 전 800rpm에서 1분간 흔들어주면서 190㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20을 첨가하였다.

[0282] 이들 두 세척 단계는 마지막 세척이 진공 여과에 의해 제거되지 않은 것을 제외하고는 두 번 이상 반복하였다. 마지막 세척 후, 플레이트를 1mL 딥-웰 플레이트 상단에 올려두고, 가능한 한 용출 전 아가로오스 비드로부터 될 수 있는 한 많은 외부량(extraneous volume)을 제거하기 위하여 1분간 1000rpm에서 원심분리하여 데크로부터 제거하였다.

[0283] 플레이트를 다시 베크만 바이오맥 FxP에 올려놓고, 1xSB17, 0.05% 트윈-20에 용해시킨 85㎕의 10mM $DxSO_4$를 필터 플레이트의 각 웰에 첨가하였다.

[0284] 이 필터 플레이트를 데크로부터 제거하고, 블랙레이 광원(BlackRay light sources)(Ted Pella, Inc., Redding, CA) 하에서 베리오맥 써모쉐이커(variomag thermoshaker; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 위에 올려두고, 상기 플레이트를 180도로 회전시키고 5분 이상 동안 흔들면서 방사선을 조사하여 5분 배양한 후, 800rpm으로 흔들면서 5분간 방사선을 조사하였다.

[0285] 처음으로 1mL의 딥-웰 플레이트의 상단에 5% 캐치 1 필터 플레이트를 올려놓고 1분간 1000rpm에서 원심분리함으로써 통상의 딥-웰 플레이트 내로 광절단된 용액을 각 캐치 1 플레이트로부터 연속적으로 용출하였다. 0.316% 및 0.01% 캐치 1 플레이트를 그 후 연속적으로 동일한 딥 웰 플레이트로 원심분리하였다.

[0287] 10. 캐치 2 비드 포획

[0288] 캐치 1의 화합된 용출액을 포함하는 1mL의 딥 웰 블록을 캐치 2를 위한 베크만 바이오맥 FxP의 데크에 놓아두었다.

[0289] 로봇은 1mL 딥-웰 플레이트로부터 얻은 모든 광-절단된 용출액을 미리 제조된 캐치 2 마이원 자성 비드(magnetic beads)를 포함하는 혼성화 플레이트 위로 옮겨놓았다(자성 분리를 통하여 마이원 버퍼를 제거한 후).

[0290] 상기 용액을 베리오맥 써모쉐이커(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) 상에서 25℃, 5분간 1350rpm으로 흔들면서 배양하였다.

[0291] 로봇이 플레이트를 온-데크 마그테닉 세퍼레이터 스테이션(on deck magnetic seperator station)으로 옮겼다. 상기 플레이트를 상층액을 제거하여 버리기 전에 90초간 자석 위에서 배양하였다.

[0293] 11. 37℃ 30% 글리세롤 세척

[0294] 캐치 2 플레이트를 온-데크 써멀 쉐이커로 이동시키고, 75㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20을 각 웰로 옮겼다. 재현탁하기 위하여 플레이트를 1분간 1350rpm, 37℃에서 혼합하고, 비드를 승온시켰다. 37℃에서 캐치 2 플레이트의 각 웰에 75㎕의 60% 글리세롤을 넣고, 상기 플레이트를 1350rpm 및 3℃에서 1분 더 혼합을 계속하였다. 로봇이 플레이트를 37℃ 마그네틱 세퍼레이터로 옮기고, 거기에서 2분간 자석 위에서 배양한 한 후, 로봇이 상층액을 제거하고 버린다. 이 세척을 두 번 이상 반복하였다.

[0295] 캐치 2 비드로부터 세 번의 30% 글리세롤 세척액을 제거한 후, 37℃ 자석 위에서 마그네틱 분리에 의한 제거 전에, 150㎕의 1xSB17, 0.05% 트윈-20을 각 웰에 첨가하여 37℃에서 배양하고, 1분간 1350rpm으로 흔들어주었다.

[0296] 캐치 2 비드를 마그네틱의 분리 전, 1350rpm으로 흔들어주면서 1분간의 배양과 함께 150㎕의 1xSB19, 0.05% 트윈-20을 사용하여 마지막으로 세척하였다.

[0298] 12. 캐치 2 비드 용출 및 중성화

[0299] 각 웰에 1M NaCl, 0.05% 트윈-20과 함께 105㎕의 100mM CAPSO를 첨가함으로써 캐치 2 비드로부터 압타머가 용출되었다. 상기 비드를 5분간 1300rpm에서 흔들어주면서 이 용액과 함께 배양하였다.

[0300] 그 후, 63㎕의 용출액을 각 웰에 7㎕의 500mM HCl, 500mM HEPES, 0.05% 트윈-20을 포함하는 새로운 96-웰 플레이트로 옮기기 전에, 상기 캐치 2 플레이트를 90초간 마그네틱 세퍼레이터 위에 올려놓았다. 옮긴 후, 상기

용액을 로봇으로 60㎕을 다섯 번 아래 위로 피펫팅함으로써 혼합하였다.

[0302] 13. 혼성화

[0303] 베크만 바이오멕 FxP는 20㎕의 중성화된 캐치 2 용출액을 새로운 혼성화 플레이트로 옮기고, 10x 스파이크(spike)의 혼성화 대조군을 포함하는 6㎕의 10x 애질런트 블록(Agilent Block)을 각 웰에 첨가하였다. 다음으로, 30㎕의 2x 애질런트 혼성화 버퍼를 중성화된 샘플과 차단 버퍼를 포함하는 플레이트의 각 웰로 수동으로 피펫팅하고, 상기 용액을 대규모의 거품 형성을 피하기 위하여 수동으로 천천히 25㎕를 15번 아래 위로 피펫팅하여 혼합하였다. 상기 플레이트를 1분간 1000rpm에서 회전시켰다.

[0304] 맞춤형 애질런트 마이크로어레이 슬라이드(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)는 몇몇의 프라이머 영역이 더해진 압타머 랜덤 영역에 상보적인 프로브를 포함하도록 설계하였다. 다수의 압타머에 대하여, 상보적 서열의 최적 길이는 경험적으로 결정되며, 40-50 사이이다. 압타머 뒤에 46-mer의 상보적 영역이 자동적으로 선택되었다. 상기 프로브는 60 뉴클레오티드 길이의 총 프로브를 위해 폴리-T 링커(poly-T linker)로 슬라이드 표면에 연결되었다.

[0305] 가스켓 슬라이드(gasket slide)를 애질런트 혼성화 챔버 위에 놓고, 혼성화 및 차단 용액을 포함하는 각 40㎕의 샘플을 수동으로 각 가스켓 내로 피펫팅하였다. 거품 형성을 최소화하기 위하여 8-채널로 변경가능한 피펫터를 어느 정도 사용하였다. 바코드가 위로 오게 한 맞춤형 애질런트 슬라이드를 그 후 가스켓 슬라이드 위로 천천히 내렸다(상세한 설명을 위하여 애질런트 매뉴얼을 참고).

[0306] 혼성화 챔버의 상단을 슬라이드/백킹 샌드위치(backing sandwich) 상에 놓고, 전체 어셈블리에 걸쳐서 클램핑 브라켓(clamping brackets)을 움직였다. 이 어셈블리를 스크류를 확실하게 돌려 단단히 죄었다.

[0307] 샘플 내에서 용액 거품이 자유롭게 움직일 수 있는지를 확인하기 위하여, 각 슬라이드/백킹 슬라이드 샌드위치를 육안으로 면밀하게 살폈다. 만일 거품이 자유롭게 움직이지 않는다면, 가스켓 주변에 머무르고 있는 거품을 떼기 위하여 혼성화 챔버 어셈블리를 가볍게 쳐주었다.

[0308] 상기 조립된 혼성화 챔버를 20rpm으로 회전시키면서 60℃에서 19시간 동안 애질런트 혼성화에서 배양하였다.

[0310] 14. 혼성화 후 세척

[0311] 대략 400mL의 애질런트 세척 버퍼 1을 각각 2개의 별도의 유리 염색 디쉬에 넣었다. 염색 디쉬 중 하나를 마그네틱 교반 플레이트(magnetic stir plate)에 놓고, 슬라이드 렉과 교반 막대를 버퍼 안으로 넣었다.

[0312] 애질런트 세척액 2를 위한 염색 디쉬를 빈 유리 염색 디쉬 내로 교반 막대를 넣어 제조하였다.

[0313] 마지막 아세토니트릴 세척을 위하여 4번째 유리 염색 디쉬를 챙겨두었다.

[0314] 각 6개의 혼성화 챔버를 해체하였다. 차례차례, 슬라이드/백킹 샌드위치를 그것의 혼성화 챔버로부터 제거하고, 세척액 1을 포함하는 염색 디쉬 안으로 넣었다. 마이크로어레이 슬라이드가 계속 잠겨있는 동안, 상기 슬라이드/백킹 샌드위치를 집게를 사용하여 한쪽으로 들어올렸다. 슬라이드를 재빨리 마그네틱 교반 플레이트 상의 세척 1 염색 디쉬에 있는 슬라이드 랙으로 옮겼다.

[0315] 상기 슬라이드 랙을 천천히 헹구고 5번 담그었다. 마그네틱 교반 막대를 낮은 조절로 돌리고, 슬라이드를 5분간 배양하였다.

[0316] 세척액 1에 대하여 1분이 남아있을 때, 배양기에서 37℃로 미리 데워진 세척 버퍼 2를 두 번째로 제조된 염색 디쉬에 첨가하였다. 상기 슬라이드 랙을 재빨리 세척 버퍼 2로 옮기고, 랙의 바닥에 있는 임의의 과잉 버퍼를 염색 디쉬의 상단에서 폐기하여 제거하였다. 상기 슬라이드 랙을 천천히 헹구고 5번 담그었다. 마그네틱 교반 막대를 낮은 조절점으로 돌리고, 슬라이드를 5분간 배양하였다. 상기 슬라이드 랙을 세척제 2에서 천천히 꺼내 용액에서 슬라이드를 제거하기 위하여 대략 15초간 잡고 있었다.

[0317] 세척액 2에서 남아있는 1분을 사용하여, 아세토니트릴(ACN)을 4번째 염색 디쉬에 첨가하였다. 상기 슬라이드 랙을 아세토니트릴 염색 디쉬로 옮겼다. 상기 슬라이드 랙을 천천히 헹구고 5번 담그었다. 마그네틱 교반 막대를 낮은 조절로 돌리고, 슬라이드를 5분간 배양하였다.

[0318] 상기 슬라이드 랙을 천천히 ACN 염색 디쉬에서 꺼내 흡수 타올 위에 올려놓았다. 슬라이드의 하단을 재빨리 건조시키고, 슬라이드를 깨끗한 슬라이드 박스에 올려놓았다.

[0320] 15. 마이크로어레이 영상화

[0321] 마이크로어레이 슬라이드를 애질런트 스캐너 슬라이드 홀더 내에 놓고, 제조사의 설명서에 따라 애질런트 마이크로어레이 스캐너로 로딩하였다.

[0322] 상기 슬라이드를 100% PMT 셋팅, 5μm 해상도에서 Cy3-채널과 0.05에서 가능한 XRD 옵션에서 영상화하였다. 그 결과 만들어진 tiff 영상을 애질런트 특성 추출 소프트웨어 버전 10.5(Agilent feature extraction software version 10.5)를 사용하여 처리하였다.

[0324] **실시예 2: 바이오마커 확인**

[0325] 샌프란시스코 베이 에어리어에 있는 각각의 집단에서의 심혈관 사건의 위험의 예측을 위하여 잠재적 심혈관 사건 바이오마커의 확인을 수행하였다. 참가자들은 이 연구를 위한 하기의 등록 기준(enrollment criteria) 중 하나를 충족시켜야만 한다: 이전의 심근경색증(myocardial infarction), 하나 또는 그 이상의 관상 동맥(coronary vessel)에서의 50%를 넘는 혈관 조영 증거(angiographic evidence), 트레드밀(treadmill) 또는 핵실험(nuclear testing) 또는 이전의 관상동맥 재개술(coronary revascularization)에 의한 운동 유발 허혈(exercise-induced ischemia). 배제 기준(exclusion criteria)은 최근의 심근경색, 한 블록을 걸을 수 없음 및 이전을 계획하는 것이 포함된다. 공복 혈액 샘플을 수집하고, 혈청 및 혈장 앨리컷을 -70℃에 저장하였다. 이들 987개 샘플 각각에서의 1034개의 분석물에 대한 RFU 값을 측정하여 보고하기 위하여, 실시예 1에 기술된 것과 같이 다중화된 소마머 친화 검정법을 사용하였다.

[0326] 사건의 발생과 관련된 바이오마커 세트를 확인하기 위하여, 대조군과 조기 사건 샘플의 조합 세트를 PCA를 사용하여 분석하였다. PCA는 사례 또는 대조군 결과에 상관없이 모든 샘플 사이에서의 가장 강한 변화로 정의된 중심축에 대한 샘플을 나타내므로, 사례와 대조군 사이의 차이를 오버피팅할 위험을 경감시킨다("대조군(Control)"은 적어도 하나의 평가 기준(entry criteria)을 충족하지만 연구하는 동안 적어도 하나의 심혈관 사건을 겪지 않은 개인을 말하며, "사례(case)"는 적어도 하나의 평가 기준을 충족하지만 연구하는 동안 심혈관 사건을 겪은 개인을 말한다). 사례와 대조군 사이에 관찰된 구분이 크지 않긴 하지만, 그것은 이 샘플 세트에서의 약 10%의 총 변수(variation)에 대응하는 제2의 주성분에서 발생하며, 이는 근본적인 생물학적 변수(biological variation)가 정량하는데 비교적 간단하다는 것을 나타낸다(도 2a).

[0327] 다음 세트의 연구결과들에서, 바이오마커는 대조군 샘플과 조기 사건 샘플 사이의 구분에 특이적인, 샘플들 사이의 차이의 성분들에 대하여 분석될 수 있다. 비록 대조군 세트 상에서만 차원축소(dimensionality reduction)가 수행되었다 할지라도, 대조군 샘플 사이의 차이에 의하여 지속되는 변수의 다변량 다차원적 공간(multivariate multidimensional space)을 측정하기 위하여, 대조군 세트에서의 샘플과 조기 사건 샘플로부터의 샘플 모두 대조군 샘플 사이에서 측정된 변수 공간에 대해 수축되고, 잔차 변수(residual variation)는 대조군으로부터 사례를 분리하는 그 성분들이 풍부하다. 이것은 DSGA 방법으로 알려져 있다. 조기 사건으로부터의 사례의 구분은 수평축을 따라 관찰될 수 있다(도 2b)(Nicolau M, Tibshirani R, Borresen-Dale AL, Jeffrey SS. Disease-specific genomic analysis: Identifying the signature of pathologic biology. Bioinformatics. 2007; 23:957-965).

[0328] 특정 샘플의 선별의 특이한 양상에 대한 단백질 예측력의 오버 피팅을 피하기 위하여, 교차 검증 및 차원 축소 접근법을 취하였다. 이 관련 성분의 측정은 단백질 전반에 대한 정보를 조합할 뿐만 아니라 몇 주요 성분에 이르기까지 1000개가 넘는 단백질의 전체 단백질 메뉴로부터 다수의 독립적 변수를 감소시킴으로써 오버피팅의 가능성을 경감시키는 차원 축소(dimensionality reduction) 단계이다(이 작업에서, 우리는 단지 첫 번째 주요 성분만을 조사하였다). 이들 단백질은 사건 위험에 관련된 단백질 변수의 관련 성분을 생성하는데 사용된다. SPCA(Supervised Principal Component Analysis)를 사용하여, 우리는 이 교차 검증된 차원 축소 기술을 사용하여 사건 위험과 통계학적으로 관련된 155개의 단백질 리스트를 발견하였다. 이 SPCA의 적용에서, 우리는 또한 샘플에 존재하지 않는 비인간 단백질에 해당하는 신호뿐만 아니라 랜덤 소마머 서열에 해당하는 단백질 신호 또한 테스트하였다. 이들 10-20개의 공지된 비생물학적 신호 중 어떠한 것도 SPCA에 의해 155개의 단백질로 선택되지 않았다(표 1). 교차 검증된 SPCA 접근법을 사용하는 이 단계는 위양성 단백질 마커 연관성(false positive protein marker associations)에 대한 선별에 중요하다. 티브시라니 등에서의 접근법은 특히 교차 검증의 사전 검정 방법(prevalidation method)과 PCA에 내재하는 차원 축소의 사용에 의해 오류 발견(false discovery)을 예방하였다(Bair, E. and Tibshirani, R. (2004) Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. PLOS Biol., 2, 511-522). SPCA로부터 얻은 155개의 단백질 리스트는 SPCA로부터 얻은 155개의 단백질 리스트에 포함되어 있지 않은, 단백질 마커의 오류 발견을 검출하기 위하여 서

로 다른 기술을 사용하여 차후의 분석물을 확인하는데 사용된다.

[0330] **실시예 3: 시간 대 심혈관 사건에 대한 각 단백질의 관련성의 일변량 분석**

[0331] Cox의 비례위험모델(cox proportional hazards model)은 의학 통계학에서 널리 사용된다(Cox, David R (1972). "Regression Models and Life-Tables". Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 34(2): 187-220). Cox 회귀분석은 누적 생존(cumulative survival)에 대한 특정 시간의 함수를 피팅하는 것(fitting)을 피하는 대신에 (시간에 따라 달라질 수 있는) 기저 위험 함수(baseline hazard functions)로 불리는 상대 위험도(relative risk)의 모델을 사용한다. 상기 기저 위험 함수는 모든 개개인에 대한 일반적인 형태의 생존 기간 분포(survival time distribution)를 형성하는 반면, 상대 위험도는 기본적 위험의 배수로서 (개인 또는 그룹과 같은) 일련의 공변량 값(covariate value)에 대한 위험의 레벨을 제공한다. 상대 위험도는 Cox 모델에서 시간에 따라 변하지 않는다.

[0332] 모든 신호에 대하여 1092개의 단일 일변량 Cox 모델을 피팅하였다. 46개의 단백질(표 2)이 10^{-14}보다 나은 P-값을 가진다(Wald test, Wald, Abraham. (1943). A Method of Estimating Plane Vulnerability Based on Damage of Survivors. Statistical Research Group, Columbia University). 다수의 대단히 중요한 단백질들은 처음에는 놀라웠으나, 심혈관 질병에의 신장의 관여는 사구체 여과율(glomerular filtration rate, GFR)에의 변화를 암시한다. 사구체 여과율의 감소는 0이 아닌 신장 청소율(renal clearance)을 가지는 모든 단백질을 증가시킬 것이다.

[0333] (실험실에서의 기술적 복잡성 및 비용의 면에서) 유용한 모델은 표 2에 나타낸 46개 단백질의 전체 리스트보다 더 간명할 것이다. 또한, PCA에서도 볼 수 있듯이, 많은 단백질들이 크게 연관되어 있을 것이며; 효과적인 모델은 이를 고려하여야 할 것이다. 46개의 매우 중요한 단백질 리스트를 두 단계에서 표 3에 나타낸 것과 같은 10개의 단백질에 이르기까지 필터링하였다. 첫째로, 0.37(단백질 신호를 두 배로 늘어나게 하기 위한 30%의 위험 변화(hazard change)와 동등)보다 훨씬 큰 계수를 주는 20개의 단백질로 리스트를 한정하였다. 이 단계는 46개 단백질을 전부 사용하는 단일 다변량 Cox 모델을 사용하였다. (단백질 측정의 자연 로그(natural log)는 Cox 모델 피팅 전에 사용되었으므로, 단백질 측정에서 Cox 계수의 지수는 e-배율(2.71)(e-fold) 변화의 위험 비율에 해당한다.)

[0334] 다음 단계에서, 필터링된 20개의 단백질은 p-값이 0.01보다 더 유의적일 것을 요구함으로써 9개만 남게 된다. 이 단계는 공변(covariant) 단백질을 억제하며, 독립적인 단백질에 기여할 수 있다. 연구는 심혈관 위험을 명백하게 보여주도록 만들어졌으므로, 보체계(complement system)의 최종 공통 경로(final common pathway)에 있는 막공격 복합체(membrane attack complex)의 구성원인 C9에서 바이오마커 선별을 위해 이루어진 최종 조정은 이 연구만으로 결정될 수 없는 문제인 그것의 신호전달에 너무 비특이적인 것으로 판단되었다. C9는 제거되었으며, 남아있는 모든 단백질들은 그 자리에서 평가되었다. 대체 단백질은 월드 검정(Wald tst) 스코어로 향상에 대해 평가되었고, KLK3.SerpinA3는 거의 C9 만큼 효율적이었다.

[0335] 심혈관 위험의 이 10개의 마커 모델에 대한 카플란 마이어 생존 곡선을 도 3a-4f에 나타내었다.

[0337] **실시예 4: 특정 형태의 심혈관 사건에 대한 각 단백질의 관련성의 일변량 분석**

[0338] 심혈관 사건은 크게 두 가지로 나뉜다: 혈전증(thrombotic) 및 심부전(CHF). 혈전증과 심부전 위험의 구별은 예를 들어, 항혈전 및 이뇨 약물간의 선택하는 것과 같은 목표 치료(guiding therapy)에서 의학적 유용성을 가진다. 비록 생명작용 중 대다수가 혈전성 및 심부전 종류의 사건 사이에서 공유된다 할지라도, 혈전성 사건은 특이적으로 (혈전증의(thrombotic)라는 명칭에 의해 암시되는 바와 같이) 혈액 응고(blood coagulation)의 생명작용을 포함한다. Cox 비례위험모델에서 확인된 표 3의 10개의 단백질을 사용하여(실시예 3), 응고와 관계된 신호 및 조직 리모델링(tissue remodeling)과 관계된 신호를 찾을 수 있었다. 심부전과 혈전성 사건 사이의 임의의 차별적인 신호를 측정하기 위하여, 심부전과 혈전성 사건에 대해 개별적으로 적절한 카풀란 마이어 곡선을 그렸다.

[0339] 혈소판(platelets or thrombocytes)은 응고의 생명작용에 있어서 주요 인자이다. GPVI는 혈소판 막 당단백질(platelet membrane glycoprotein)이며, 이 단백질에 대한 분석은 도 8에서 심부전과 혈전성 사건 모두에 대한 무합병증 생존율(event free survival)과 관련하여 수행되었다. 도 8a는 모집단 분포(population distribution)의 4분위수로서 그려진 GPVI의 레벨과 무혈전성 생존율(thrombotic event free survival)과의 강력한 연관성을 나타낸다. 도 8b는 GPVI의 4분위수가 심부전 사건에 대한 무합병증 생존율과 관련이 없음을 나

타낸다.

[0340] GPVI와는 대조적으로, MATN2(matrilin 2)는 세포외 매트릭스 관련 단백질(extracellular matrix associated protein)이다. 도 9a는 MATN2의 4분위수가 혈전성 사건에 대한 위험과 관련이 없음을 나타내는 반면, 도 9b는 MATN2와 심부전 사건 사이의 강력한 연관성을 나타낸다. 집단의 4사분위에 있는 MATN2을 이용한 개인의 무합병증 생존율은 처음의 3개의 사분위수보다 현저하게 나빴다.

[0341] 모두 종합해 보면, 이 실시예의 결과는 이 출원의 10개의 단백질 마커가 혈액 샘플링 수년 후의 위험의 면에서 혈전성 사건과 심부전 사이를 구별할 수 있다는 것을 보여준다.

[0343] **실시예 5: 스타틴을 복용한 개인에서 안지오포이에틴 2와 CHRDL1의 유용성**

[0344] 공지의 심혈관 질병을 가지거나 고 LDL, 콜레스테롤을 가진 개인과 같은 특정 심혈관 질환을 가지지 않은 수많은 개인들이 스타틴을 복용하고 있다. 이 강력한 약물은 위험이 없는 개인들로부터 위험이 있는 개인들을 구별하기 위한 많은 바이오마커의 능력을 변경한다. 그것은 이 집단에서 기능하기 위한 바이오마커에 매우 유용하다.

[0345] 도 10은 스타틴을 복용한 이들 피험자에서, 안지오포이에틴 2가 고위험 개인에서의 심혈관 사건의 예측에 여전히 강력하게 유용하다는 것을 나타낸다. 도 10은 스타틴을 복용하고 있는 538명의 피험자들 모두의 카플란 마이어 플롯을 나타내며, 안지오포이에틴 2에 대한 모집단분포의 4사분위수에 있는 개인들이 안지오포이에틴 2에 대한 4사분위수에 있지 않은 개인들과 비교하여 증가된 비율로 심혈관 사건으로 고통받고 있음을 나타낸다. 따라서, 스타틴을 이용한 치료의 효과에도 불구하고, 안지오포이에틴-2는 심혈관 사건의 위험의 유용한 바이오마커이다.

[0346] 도 11은 스타틴을 복용하고 있는 피험자에서, CHRDL1 또한 고위험 집단에서 심혈관 사건의 위험과 관련이 있음을 나타낸다. 도 11은 스타틴을 복용하고 있는 538명의 피험자들 모두의 카플란 마이어 플롯을 나타낸다. 그것은 CHRDL1이 스타틴으로 치료된 개인들에서의 심혈관 사건의 무합병증 생존율과 관련이 있음을 나타낸다. 따라서, 스타틴을 이용한 치료의 효과에도 불구하고, CHRDL1은 심혈관 사건의 위험의 유용한 바이오마커이다.

표 1

심혈관 사건 바이오마커

	SOMAmer Designation	Gene Name	Target	Swiss Prot Id	Entrez Gene Id	PUBLIC_NAME	Up or down
1	CRP.4337.49.2	CRP	CRP	P02741	1401	C-reactive protein	up
2	IGFBP1.2771.35.2	IGFBP1	IGFBP-1	P08833	3484	Insulin-like growth factor-binding protein 1	up
3	IGFBP2.2570.72.5	IGFBP2	IGFBP-2	P18065	3485	Insulin-like growth factor-binding protein 2	up
4	B2M.3485.28.2	B2M	b2-Microglobulin	P61769	567	β2-Microglobulin	up
5	TNFRSF1B.3152.57.1	TNFRSF1B	TNF sR-II	P20333	7133	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	up
6	CFD.2946.52.2	CFD	Factor D	P00746	1675	Complement factor D	up
7	FCER2.3291.30.2	FCER2	CD23	P06734	2208	CD23	up
8	LYZ.4920.10.1	LYZ	Lysozyme	P61626	4069	Lysozyme	up
9	FSTL3.3438.10.2	FSTL3	FSTL3	O95633	10272	Follistatin-like 3	up
10	ANGPT2.2602.2.2	ANGPT2	Angiopoietin-2	O15123	285	Angiopoietin-2	up
11	PI3.4982.54.1	PI3	Elafin	P19957	5266	Elafin	up
12	MMP7.2789.26.2	MMP7	MMP-7	P09237	4316	Matrix metalloproteinase 7/Matrilysin	up
13	PLA2G2A.2692.74.2	PLA2G2A	NPS-PLA2	P14555	5320	Phospholipase A2, Group IIA	up
14	LCN2.2836.68.2	LCN2	Lipocalin 2	P80188	3934	Lipocalin 2	up
15	PAPPA.4148.49.2	PAPPA	PAPP-A	Q13219	5069	Pregnancy-associated plasma protein-A	up
16	RETN.3046.31.1	RETN	resistin	Q9HD89	56729	Resistin	up
17	CCL14.2900.53.3	CCL14	HCC-1	Q16627	6358	Hemofiltrate CC Chemokine 1/CCL14	up
18	PRSS2.5034.79.1	PRSS2	Trypsin 2	P07478	5645	Trypsin-2	up
19	CAPG.4968.50.1	CAPG	CAPG	P40121	822	Macrophage-capping protein	up
20	TFF3.4721.54.2	TFF3	TFF3	Q07654	7033	Trefoil factor 3	up
21	CHRDL1.3362.61.2	CHRDL1	CRDL1	Q9BU40	91851	Chordin-Like 1	up
22	PPY.4588.1.2	PPY	PH	P01298	5539	Pancreatic hormone	up
23	GP6.3194.36.2	GP6	GPVI	Q9HCN6	51206	GPVI/Platelet Glycoprotein VI	up
24	CNDP1.3604.6.4	CNDP1	CNDP1	Q96KN2	84735	Carnosine dipeptidase 1	down

[0347]

25	CA3.3799.11.2	CA3	Carbonic anhydrase III	P07451	761	Carbonic anhydrase III	up
26	CCL15.3509.1.1	CCL15	MIP-5	Q16663	6359	Macrophage inflammatory protein 5/CCL15	up
27	TIMP1.2211.9.6	TIMP1	TIMP-1	P01033	7076	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	up
28	CTSH.3737.6.3	CTSH	Cathepsin H	P09668	1512	Cathepsin H	up
29	FCGR2B.3310.62.1	FCGR2B	FCG2B	P31994	2213	Immunoglobulin G Fc region receptor II-b, low affinity	up
30	AKR1A1.4192.10.2	AKR1A1	AK1A1	P14550	10327	Alcohol dehydrogenase (NADP+)/Ado-keto reductase family 1 member A1	up
31	PGLYRP1.3329.14.2	PGLYRP1	PGRP-S	O75594	8993	Peptidoglycan recognition protein, short	up
32	ROR1.2590.69.4	ROR1	ROR1	Q01973	4919	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1	up
33	ESAM.2981.9.3	ESAM	ESAM	Q96AP7	90952	Endothelial cell-selective adhesion molecule	up
34	VCAM1.2967.8.1	VCAM1	VCAM-1	P19320	7412	Vascular cell adhesion protein 1/VCAM 1	up
35	CD5L.3293.2.3	CD5L	CD5L	O43866	922	CD5 antigen-like	up
36	COL18A1.2201.17.6	COL18A1	Endostatin	P39060	80781	Endostatin	up
37	CTSZ.4971.1.1	CTSZ	CATZ	Q9UBR2	1522	Cathepsin Z	up
38	CCL18.3044.3.2	CCL18	PARC	P55774	6362	Macrophage inflammatory protein 4/Pulmonary and activation-regulated chemokine/CCL18	up
39	IGFBP4.2950.57.2	IGFBP4	IGFBP-4	P22692	3487	Insulin-like growth factor-binding protein 4	up
40	PLAUR.2652.15.1	PLAUR	suPAR	Q03405	5329	Urokinase plasminogen activator surface receptor	up
41	IL16.2774.10.3	IL16	IL-16	Q14005	3603	Interleukin-16	up
42	THBS2.3339.33.1	THBS2	TSP2	P35442	7058	Thrombospondin-2	up
43	IGFBP6.2686.67.2	IGFBP6	IGFBP-6	P24592	3489	Insulin-like growth factor-binding protein 6	up
44	TNFRSF1A.2654.19.1	TNFRSF1A	TNF sR-I	P19438	7132	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	up
45	MATN2.3325.2.2	MATN2	MATN2	O00339	4147	Matrilin-2	up

[0348]

46	MMP1.4924.32.1	MMP1	MMP-1	P03956	4312	Matrix metalloproteinase 1/collagenase 1	up
47	IGF1.2952.75.2	IGF1	IGF-I	P05019	3479	Insulin-like growth factor I	down
48	CRK.4976.57.1	CRK	CRK	P46108	1398	Adaptor protein Crk-I	up
49	MB.3042.7.2	MB	Myoglobin	P02144	4151	Myoglobin	up
50	SLPI.4413.3.2	SLPI	SLPI	P03973	6590	Secretory leukocyte protease inhibitor	up
51	IL18BP.3073.51.2	IL18BP	IL-18 BPa	O95998	10068	Interleukin-18 binding protein	up
52	IL1RL1.4234.8.2	IL1RL1	IL-1 R4	Q01638	9173	Interleukin-1 receptor 4	up
53	F3.4931.59.1	F3	TF	P13726	2152	Tissue Factor	up
54	STC1.4930.21.1	STC1	Stanniocalcin-1	P52823	6781	Stanniocalcin-1	up
55	ADIPOQ.3554.24.1	ADIPOQ	Adiponectin	Q15848	9370	Adiponectin	up
56	PROC.2961.1.2	PROC	Protein C	P04070	5624	Protein C	down
57	REN.3396.54.2	REN	Renin	P00797	5972	Renin	up
58	CCL23.2913.1.2	CCL23	MPIF-1	P55773	6368	Myeloid progenitor inhibitory factor 1/CCL23	up
59	LBP.3074.6.2	LBP	LBP	P18428	3929	Lipopolysaccharide-binding protein	up
60	GCG.4891.50.1	GCG	Glucagon	P01275	2641	Glucagon	up
61	YWHAG.4179.57.3	YWHAG	14-3-3 protein gamma	P61981	7532	14-3-3 protein γ	up
62	CCDC80.3234.23.2	CCDC80	URB	Q76M96	151887	Coiled-coil domain-containing protein 80	up
63	CNTFR.2711.6.2	CNTFR	CNTFR alpha	P26992	1271	Ciliary neurotrophic factor receptor α	up
64	EFNA5.2615.60.2	EFNA5	Ephrin-A5	P52803	1946	Ephrin-A5	up
65	CST3.2609.59.2	CST3	Cystatin C	P01034	1471	Cystatin C	up
66	FUT5.4549.78.2	FUT5	FUT5	Q11128	2527	Fucosyltransferase 5	up
67	TNFRSF17.2665.26.2	TNFRSF17	BCMA	Q02223	608	B-cell maturation protein	up
68	ERP29.4983.6.1	ERP29	ERP29	P30040	10961	Endoplasmic reticulum resident protein 29	up
69	RARRES2.3079.62.2	RARRES2	TIG2	Q99969	5919	Chemerin	up
70	MAP2K2.3628.3.4	MAP2K2	MP2K2	P36507	5605	MAPK kinase 2	up
71	EPHA1.3431.54.2	EPHA1	EphA1	P21709	2041	Ephrin type-A receptor 1	up
72	CLEC11A.4500.50.2	CLEC11A	SCGF-alpha	Q9Y240	6320	Stem Cell Growth Factor-α	up
73	F10.4878.34.1	F10	Coagulation Factor X	P00742	2159	Coagulation Factor X	down

[0349]

74	CHIT1.3600.2.3	CHIT1	Chitotriosidase-1	Q13231	1118	Chitotriosidase-1	up
75	ITGA1.ITGB1..3503.4.2	ITGA1 ITGB1	Integrin a1b1	P56199, P05556	3672 3688	Integrin α-I:β-1 complex	up
76	CKB.CKM..3714.49.2	CKB CKM	CK-MB	P12277 P06732	1152 1158	Creatine kinase-MB	down
77	CTSB.3061.61.2	CTSB	Cathepsin B	P07858	1508	Cathepsin B	up
78	CD163.5028.59.1	CD163	sCD163	Q86VB7	9332	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 chain/Soluble CD163	up
79	PTN.3045.72.2	PTN	PTN	P21246	5764	Pleiotrophin	up
80	CSF1R.2638.12.2	CSF1R	M-CSF R	P07333	1436	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	up
81	IGFBP3.2571.12.3	IGFBP3	IGFBP-3	P17936	3486	Insulin-like growth factor-binding protein 3	down
82	CXCL12.3516.60.2	CXCL12	SDF-1b	P48061	6387	Stromal cell-derived factor 1β	up
83	PEBP1.4276.10.2	PEBP1	prostatic binding protein	P30086	5037	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	up
84	CCL22.3508.78.3	CCL22	MDC	O00626	6367	Macrophage-derived chemokine	up
85	CST2.4324.33.2	CST2	CYTT	P09228	1470	Cystatin SA	up
86	CCL23.3028.36.2	CCL23	Ck-b-8-1	P55773	6368	Ck-β-8-1/Macrophage inflammatory protein 3 splice variant (aa 46-137)	up
87	CADM1..3326.58.2	CADM1	Nectin-like protein 2	Q9BY67	23705	Nectin-like protein 2	up
88	VWF.3050.7.2	VWF	vWF	P04275	7450	von Willebrand factor	up
89	CST5.3803.10.2	CST5	CYTD	P28325	1473	Cystatin D	up
90	CHST15.4469.78.2	CHST15	ST4S6	Q7LFX5	51363	Carbohydrate sulfotransferase 15	up
91	IL1R1.2991.9.2	IL1R1	IL-1 sRI	P14778	3554	Interleukin-1 receptor 1	up
92	C9.3060.43.2	C9	C9	P02748	735	Complement C9	up
93	AFM.4763.31.3	AFM	Afamin	P43652	173	Afamin	down
94	TGFBR3.3009.3.2	TGFBR3	TGF-b R III	Q03167	7049	Transforming growth factor β receptor type III	up
95	FRZB.2841.13.2	FRZB	sFRP-3	Q92765	2487	Frizzled-related protein 3, secreted	up

[0350]

96	MMP12.4496.60.2	MMP12	MMP-12	P39900	4321	Matrix metalloproteinase 12/Macrophage metalloelastase	up
97	CD33.3166.92.1	CD33	Siglec-3	P20138	945	Siglec-3	up
98	EPHA2.4834.61.2	EPHA2	Epithelial cell kinase	P29317	1969	Ephrin type-A receptor 2	up
99	CXCL16.2436.49.4	CXCL16	CXCL16, soluble	Q9H2A7	58191	Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized low density lipoprotein/CXCL16	up
100	IGFBP7.3320.49.2	IGFBP7	IGFBP-7	Q16270	3490	Insulin-like growth factor-binding protein 7	up
101	KLK3.SERPINA3.4153.11.2	KLK3 SERPINA3	PSA-ACT	P07288, P01011	35412	PSA:α-1-antichymotrypsin complex	up
102	PRTN3.3514.49.2	PRTN3	Proteinase-3	P24158	5657	Proteinase-3	up
103	GNLY.3195.50.2	GNLY	Granulysin	P22749	10578	Granulysin	up
104	LY9.3324.51.1	LY9	LY9	Q9HBG7	4063	T-lymphocyte surface antigen Ly-9/CD229	up
105	NRP1.3214.3.2	NRP1	NRP1	O14786	8829	Neuropilin-1	up
106	C7.2888.49.2	C7	C7	P10643	730	Complement C7	up
107	KLKB1.4152.58.2	KLKB1	Prekallikrein	P03952	3818	Prekallikrein	down
108	CCL21.2516.57.3	CCL21	6Ckine	O00585	6366	6Ckine/CCL21	up
109	RGMB.3331.8.1	RGMB	RGMB	Q6NW40	285704	RGM domain family member B	up
110	ESM1.3805.16.2	ESM1	Endocan	Q9NQ30	11082	Endocan	up
111	DKK3.3607.71.1	DKK3	DKK3	Q9UBP4	27122	Dickkopf-related protein 3	up
112	CDNF.4962.52.1	CDNF	ARMEL	Q49AH0	441549	Conserved dopamine neurotrophic factor	up
113	SPON1.4297.62.3	SPON1	Spondin-1	Q9HCB6	10418	Spondin-1	up
114	LSAMP.2999.6.2	LSAMP	LSAMP	Q13449	4045	Limbic system-associated membrane protein	up
115	DCTPP1.4314.12.2	DCTPP1	XTP3A	Q9H773	79077	dCTP pyrophosphatase 1	up
116	NID1.3213.65.2	NID1	Nidogen	P14543	4811	Nidogen	up
117	A2M.3708.62.1	A2M	a2-Macroglobulin	P01023	2	α2-Macroglobulin	up
118	FCGR3B.3311.27.1	FCGR3B	FCG3B	O75015	2215	Immunoglobulin G Fc region receptor III-B, low affinity	up

[0351]

119	PROC.3758.63.3	PROC	Activated Protein C	P04070	5624	Activated Protein C	down
120	ADAMTS13.3175.51.5	ADAMTS13	ATS13	Q76LX8	11093	ADAM metallopeptidase with thrombospondin motifs 13	down
121	ANG.4874.3.1	ANG	Angiogenin	P03950	283	Angiogenin	up
122	GRN.4992.49.1	GRN	GRN	P28799	2896	Progranulin	up
123	CD48.3292.75.1	CD48	CD48	P09326	962	CD48	up
124	FGA.FGB.FGG.4907.56.1	FGA FGB FGG	D-dimer	P02671 P02675 P02679	2243 2244 2266	D-dimer	up
125	IGHG1.IGHG2.IGHG3.IGHG4.IGK..IGL..3700.15.4	IGHG1 IGHG2 IGHG3 IGHG4 IGK@ IGL@	IgG	NA	NA	IgG	
126	NAGK.3894.15.2	NAGK	NAGK	Q9UJ70	55577	N-acetyl-D-glucosamine kinase	up
127	TNC.4155.3.2	TNC	Tenascin	P24821	3371	Tenascin	up
128	RET.3220.40.2	RET	RET	P07949	5979	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	down
129	MDK.2911.27.2	MDK	Midkine	P21741	4192	Midkine	up
130	TNFRSF10D.3129.73.2	TNFRSF10D	TRAIL R4	Q9UBN6	8793	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D	up
131	CD84.3642.4.1	CD84	SLAF5	Q9UIB8	8832	Signaling lymphocytic activation molecule 5	up
132	EGFR.2677.1.1	EGFR	ERBB1	P00533	1956	erbB1/HER1	down
133	SERPINA4.3449.58.2	SERPINA4	Kallistatin	P29622	5267	Kallistatin	down
134	MRC2.3041.55.2	MRC2	MRC2	Q9UBG0	9902	Macrophage mannose receptor 2	up
135	GHR.2948.58.2	GHR	Growth hormone receptor	P10912	2690	Growth hormone receptor	down
136	CXCL12.2330.2.1	CXCL12	SDF-1a	P48061	6387	Stromal cell-derived factor 1α	up
137	SERPINF2.3024.18.2	SERPINF2	a2-Antiplasmin	P08697	5345	α2-Antiplasmin	down
138	RUNX2.3457.57.1	RUNX2	Osteoblast-specif transcr fact 2	Q13950	860	Osteoblast-specific transcription factor 2	up
139	CLEC11A.2966.65.2	CLEC11A	SCGF-beta	Q9Y240	6320	Stem Cell Growth Factor-α	up
140	SIGLEC7.2742.68.2	SIGLEC7	Siglec-7	Q9Y286	27036	Siglec-7	up

[0352]

141	VEGFA.2597.8.3	VEGFA	VEGF	P15692	7422	Vascular endothelial growth factor A	up
142	BMPER.3654.27.1	BMPER	BMPER	Q8N8U9	168667	Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator protein	down
143	SOD2.5008.51.1	SOD2	Mn SOD	P04179	6648	Superoxide dismutase [Mn]	down
144	OPCML.3634.5.4	OPCML	OBCAM	Q14982	4978	Opioid-binding cell adhesion molecule	down
145	CTSS.3181.50.2	CTSS	Cathepsin S	P25774	1520	Cathepsin S	up
146	PLG.4151.6.2	PLG	Plasminogen	P00747	5340	Plasminogen	down
147	PAFAH1B2.2642.4.1	PAFAH1B2	PAFAH beta subunit	P68402	5049	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit β/PAFAH β subunit	up
148	IGF1R.4232.19.2	IGF1R	IGF-I sR	P08069	3480	Insulin-like growth factor I receptor	up
149	AGT.3484.60.2	AGT	Angiotensinogen	P01019	183	Angiotensinogen	down
150	GDF11.2765.4.3	GDF11	GDF-11	O95390	10220	Growth-differentiation factor 11	down
151	MMP14.5002.76.1	MMP14	MMP-14	P50281	4323	Matrix metalloproteinase 14/Membrane type matrix metalloproteinase 1	up
152	SELP.4154.57.2	SELP	P-Selectin	P16109	6403	P-Selectin	up
153	BGN.3284.75.1	BGN	BGN	P21810	633	Biglycan	up
154	IL6ST.2620.4.2	IL6ST	gp130, soluble	P40189	3572	Interleukin-6 receptor subunit β/gp130	up
155	PSMA2.4280.47.2	PSMA2	PSA2	P25787	5683	Proteasome subunit α2	up

[0353]

표 2

46개의 바이오마커의 리스트

	SOMAmer Designation	Gene Name	Target	Swiss Prot ID	Entrez Gene Id	PUBLIC_NAME	Up or down
1	ANGPT2.2602.2.2	ANGPT2	Angiopoietin-2	O15123	285	Angiopoietin-2	up
2	CTSH.3737.6.3	CTSH	Cathepsin H	P09668	1512	Cathepsin H	up
3	TIMP1.2211.9.6	TIMP1	TIMP-1	P01033	7076	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	up
4	B2M.3485.28.2	B2M	b2-Microglobulin	P61769	567	β2-Microglobulin	up
5	TNFRSF1B.3152.57.1	TNFRSF1B	TNF sR-II	P20333	7133	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	up
6	FSTL3.3438.10.2	FSTL3	FSTL3	O95633	10272	Follistatin-like 3	up
7	MMP7.2789.26.2	MMP7	MMP-7	P09237	4316	Matrix metalloproteinase 7/Matrilysin	up
8	IGFBP4.2950.57.2	IGFBP4	IGFBP-4	P22692	3487	Insulin-like growth factor-binding protein 4	up
9	SLPI.4413.3.2	SLPI	SLPI	P03973	6590	Secretory leukocyte protease inhibitor	up
10	THBS2.3339.33.1	THBS2	TSP2	P35442	7058	Thrombospondin-2	up
11	CHRDL1.3362.61.2	CHRDL1	CRDL1	Q9BU40	91851	Chordin-Like 1	up
12	CFD.2946.52.2	CFD	Factor D	P00746	1675	Complement factor D	up
13	SPON1.4297.62.3	SPON1	Spondin-1	Q9HCB6	10418	Spondin-1	up
14	COL18A1.2201.17.6	COL18A1	Endostatin	P39060	80781	Endostatin	up
15	IGFBP2.2570.72.5	IGFBP2	IGFBP-2	P18065	3485	Insulin-like growth factor-binding protein 2	up
16	MMP12.4496.60.2	MMP12	MMP-12	P39900	4321	Matrix metalloproteinase 12/Macrophage metalloelastase	up
17	CCL14.2900.53.3	CCL14	HCC-1	Q16627	6358	Hemofiltrate CC Chemokine 1/CCL14	up
18	EFNA5.2615.60.2	EFNA5	Ephrin-A5	P52803	1946	Ephrin-A5	up
19	PLAUR.2652.15.1	PLAUR	suPAR	Q03405	5329	Urokinase plasminogen activator surface receptor	up
20	C7.2888.49.2	C7	C7	P10643	730	Complement C7	up
21	STC1.4930.21.1	STC1	Stanniocalcin-1	P52823	6781	Stanniocalcin-1	up

[0354]

22	KLK3.SERPINA3.4153.11.2	KLK3 SERPINA3	PSA-ACT	P07288, P01011	354 12	PSA: α1-antichymotrypsin complex	up
23	CST3.2609.59.2	CST3	Cystatin C	P01034	1471	Cystatin C	up
24	CTSZ.4971.1.1	CTSZ	CATZ	Q9UBR2	1522	Cathepsin Z	up
25	SERPINF2.3024.18.2	SERPINF2	a2-Antiplasmin	P08697	5345	α2-Antiplasmin	down
26	PROC.2961.1.2	PROC	Protein C	P04070	5624	Protein C	down
27	CCL15.3509.1.1	CCL15	MIP-5	Q16663	6359	Macrophage inflammatory protein 5/CCL15	up
28	CD84.3642.4.1	CD84	SLAF5	Q9UIB8	8832	Signaling lymphocytic activation molecule 5	up
29	VCAM1.2967.8.1	VCAM1	VCAM-1	P19320	7412	Vascular cell adhesion protein 1/VCAM 1	up
30	TNFRSF1A.2654.19.1	TNFRSF1A	TNF sR-I	P19438	7132	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	up
31	CCDC80.3234.23.2	CCDC80	URB	Q76M96	151887	Coiled-coil domain-containing protein 80	up
32	IL18BP.3073.51.2	IL18BP	IL-18 BPa	O95998	10068	Interleukin-18 binding protein	up
33	IL1R1.2991.9.2	IL1R1	IL-1 sRI	P14778	3554	Interleukin-1 receptor 1	up
34	CXCL12.2330.2.1	CXCL12	SDF-1a	P48061	6387	Stromal cell-derived factor 1α	up
35	PLA2G2A.2692.74.2	PLA2G2A	NPS-PLA2	P14555	5320	Phospholipase A2, Group IIA	up
36	CAPG.4968.50.1	CAPG	CAPG	P40121	822	Macrophage-capping protein	up
37	CNDP1.3604.6.4	CNDP1	CNDP1	Q96KN2	84735	Carnosine dipeptidase 1	down
38	ESAM.2981.9.3	ESAM	ESAM	Q96AP7	90952	Endothelial cell-selective adhesion molecule	up
39	MATN2.3325.2.2	MATN2	MATN2	O00339	4147	Matrilin-2	up
40	LYZ.4920.10.1	LYZ	Lysozyme	P61626	4069	Lysozyme	up
41	PLG.4151.6.2	PLG	Plasminogen	P00747	5340	Plasminogen	down
42	C9.3060.43.2	C9	C9	P02748	735	Complement C9	up
43	LCN2.2836.68.2	LCN2	Lipocalin 2	P80188	3934	Lipocalin 2	up
44	NID1.3213.65.2	NID1	Nidogen	P14543	4811	Nidogen	up
45	CHST15.4469.78.2	CHST15	ST4S6	Q7LFX5	51363	Carbohydrate sulfotransferase 15	up
46	ROR1.2590.69.4	ROR1	ROR1	Q01973	4919	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1	up

[0355]

표 3

10개의 바이오마커의 리스트

SOMAmer Designation	GeneName	Target	SwissProt ID	Entrez Gene Id	PUBLIC_NAME
ANGPT2.2602.2.2	ANGPT2	Angiopoietin-2	O15123	285	Angiopoietin-2
MMP7.2789.26.2	MMP7	MMP-7	P09237	4316	Matrix metalloproteinase 7/Matrilysin
THBS2.3339.33.1	THBS2	TSP2	P35442	7058	Thrombospondin-2
CHRDL1.3362.61.2	CHRDL1	CRDL1	Q9BU40	91851	Chordin-Like 1
C7.2888.49.2	C7	C7	P10643	730	Complement C7
KLK3.SERPINA3.4153.11.2	KLK3 SERPINA3	PSA-ACT	P07288, P01011	35412	PSA: α1-antichymotrypsin complex
ESAM.2981.9.3	ESAM	ESAM	Q96AP7	90952	Endothelial cell-selective adhesion molecule
MATN2.3325.2.2	MATN2	MATN2	O00339	4147	Matrilin-2
PLG.4151.6.2	PLG	Plasminogen	P00747	5340	Plasminogen
GP6.3194.36.2	GP6	GPVI	Q9HCN6	51206	GPVI/Platelet Glycoprotein VI

[0356]

표 4

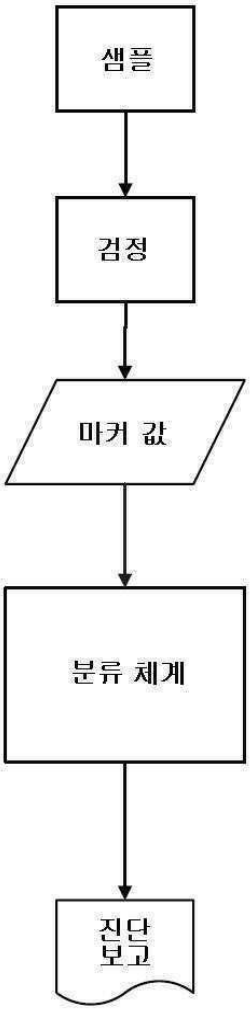
Heart & Soul 연구 집단 사건 시간 및 형태

시간	심부전 (CHF)	만성 심부전	사망	심근 경색증 (MI)	사건 없음	만성심부전 사건없음	뇌졸중
0-6개월	8	5	8	13	0	0	5
6-12개월	3	6	8	11	0	0	2
12-24개월	16	8	15	32	0	0	8
2-3년	8	6	22	16	0	0	9
3-4년	12	6	17	9	0	0	1
4-5년	13	5	39	14	0	0	5
5년 플러스	4	3	48	5	0	0	4
연구하는 동안 사건이 없음	0	0	0	0	515	77	0
총계	64	39	157	100	515	77	34
986							

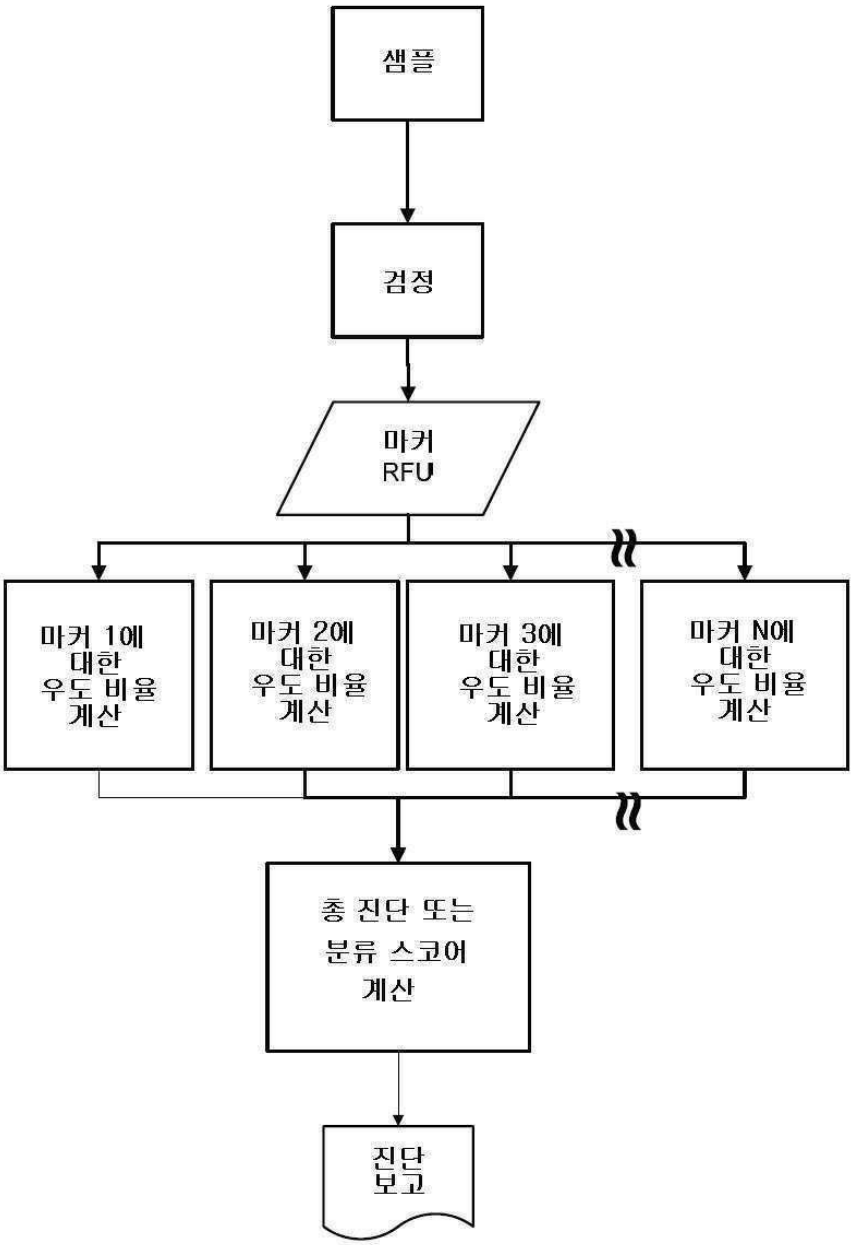
[0357]

도면

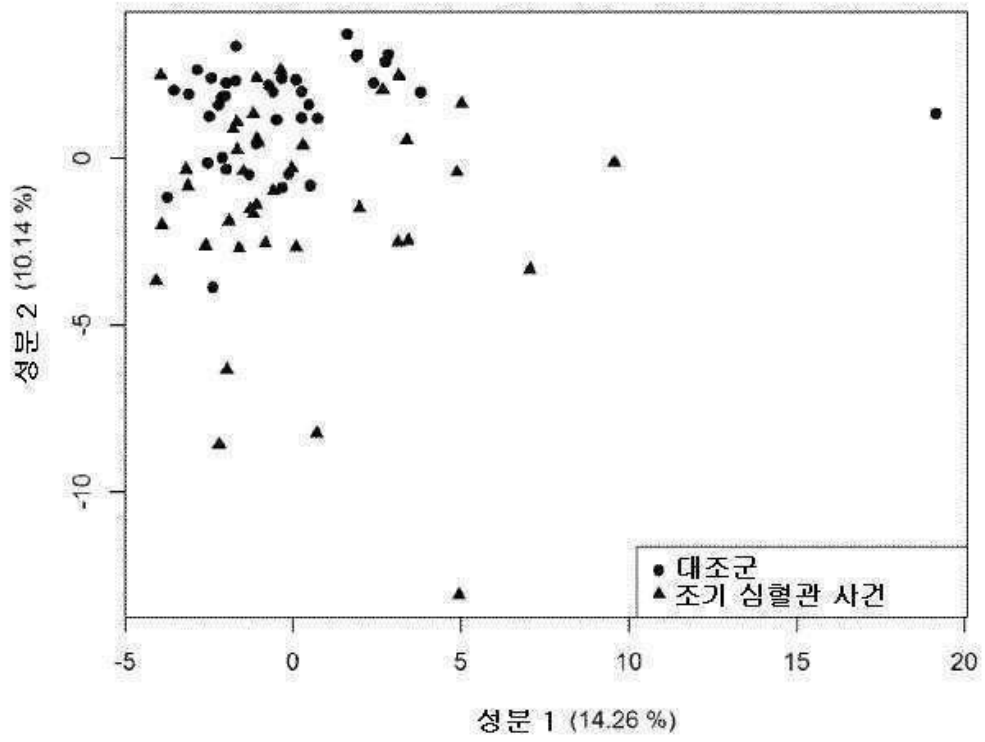
도면1a



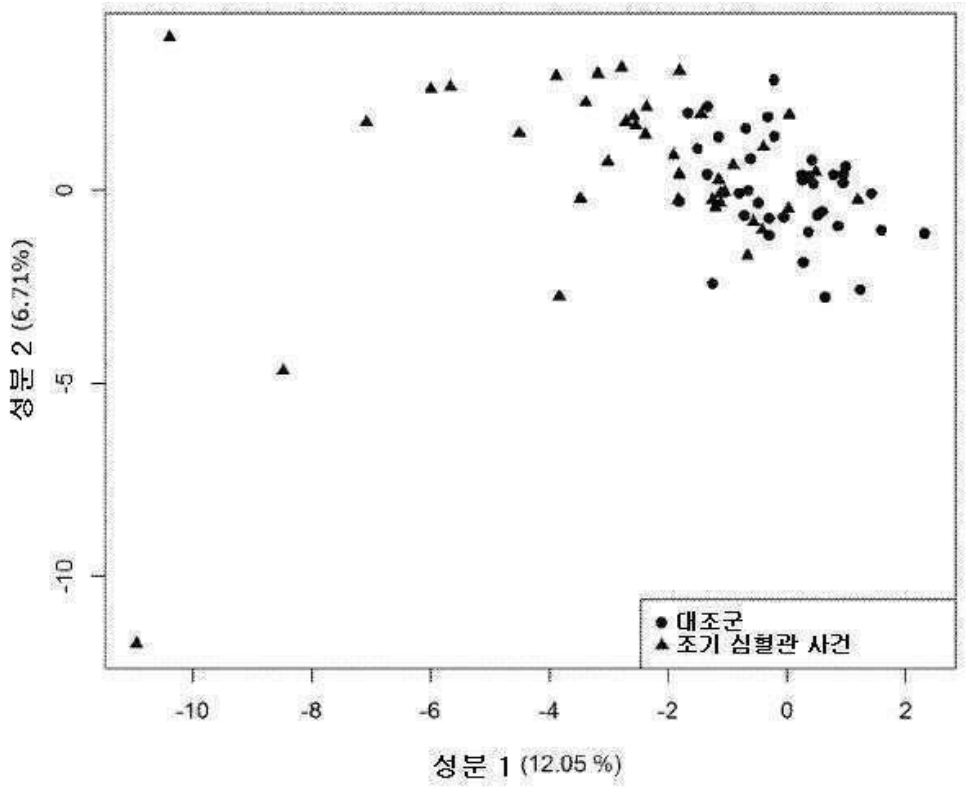
도면1b


샘플
검정
마커
RFU
마커 1에
대한
우도 비율
계산
마커 2에
대한
우도 비율
계산
마커 3에
대한
우도 비율
계산
마커 N에
대한
우도 비율
계산
총 진단 또는
분류 스코어
계산
진단
보고

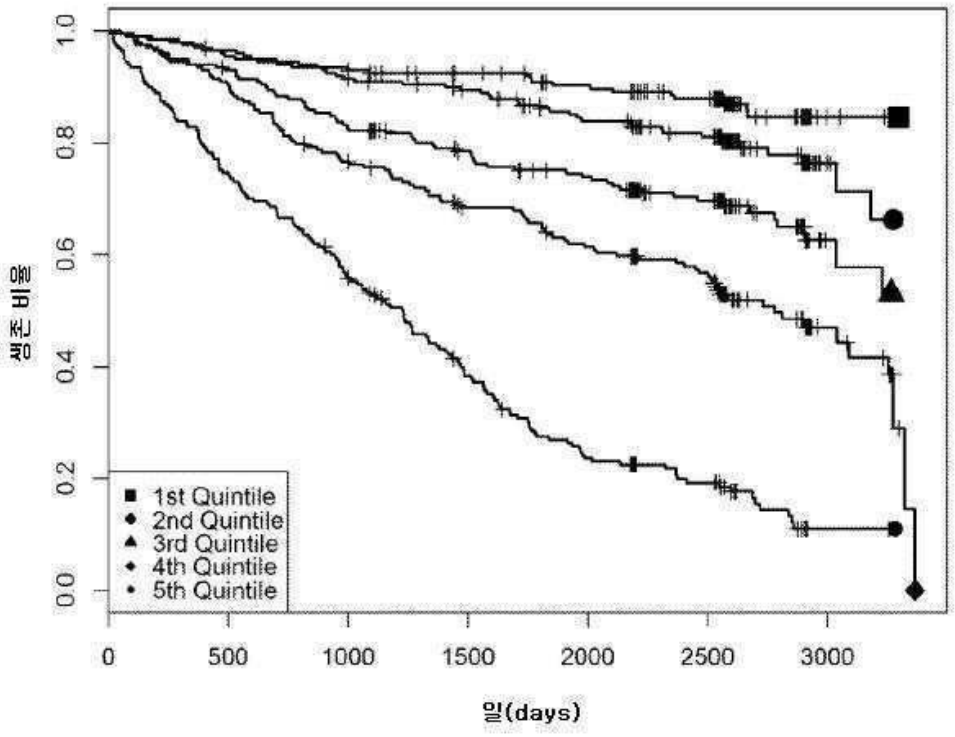
도면2a


성분 2 (10.14 %)
0
-5
-10
-5
0
5
10
15
20
성분 1 (14.26 %)
대조군
조기 심혈관 사건

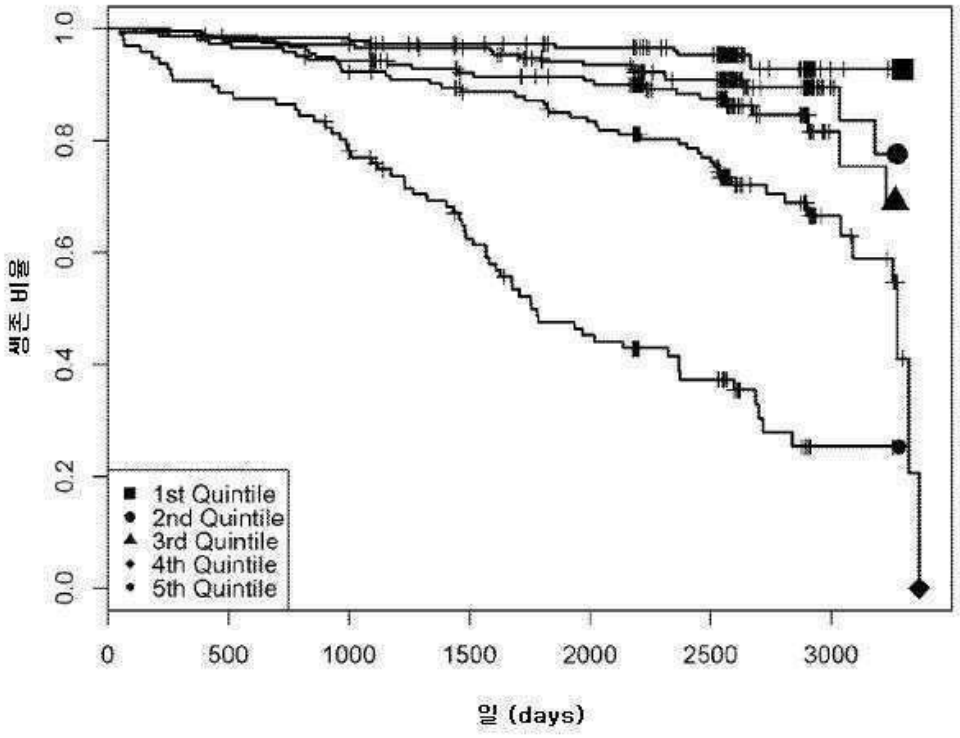
도면2b


성분 2 (6.71%)
0
-5
-10
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
성분 1 (12.05 %)
대조군
조기 심혈관 사건

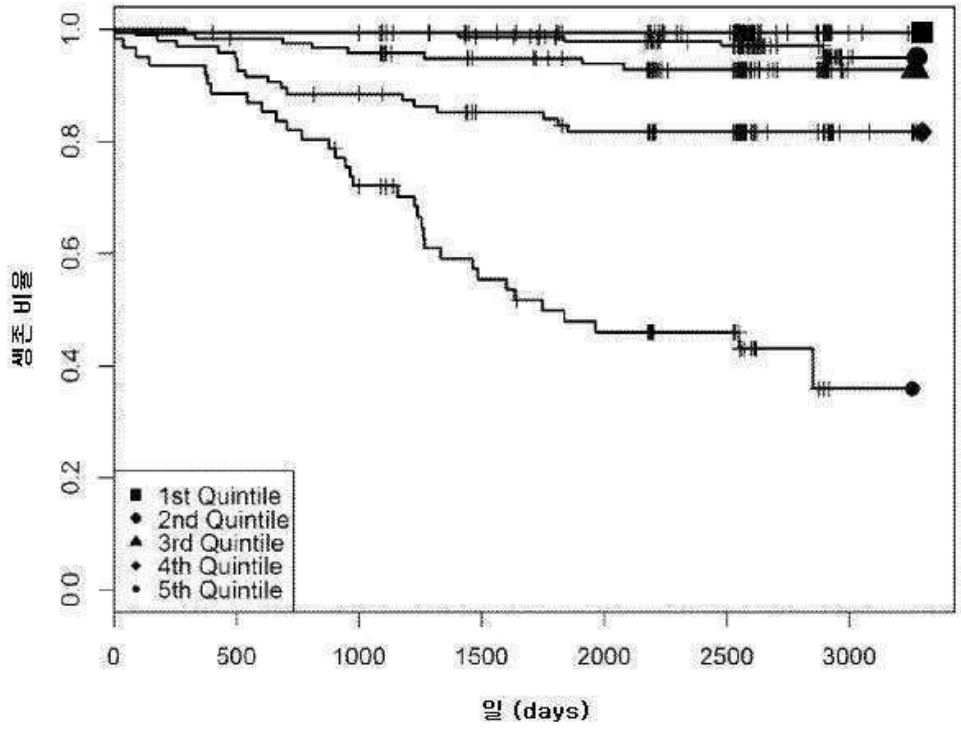
도면3a


생존 비율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일(days)
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile

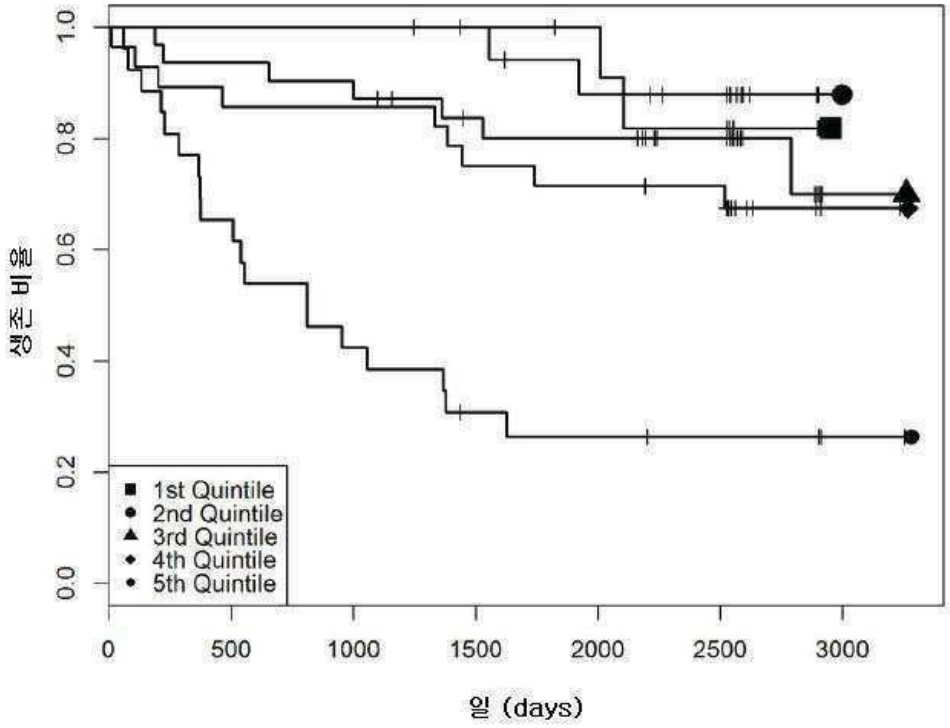
도면3b


생존 비율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일 (days)
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile

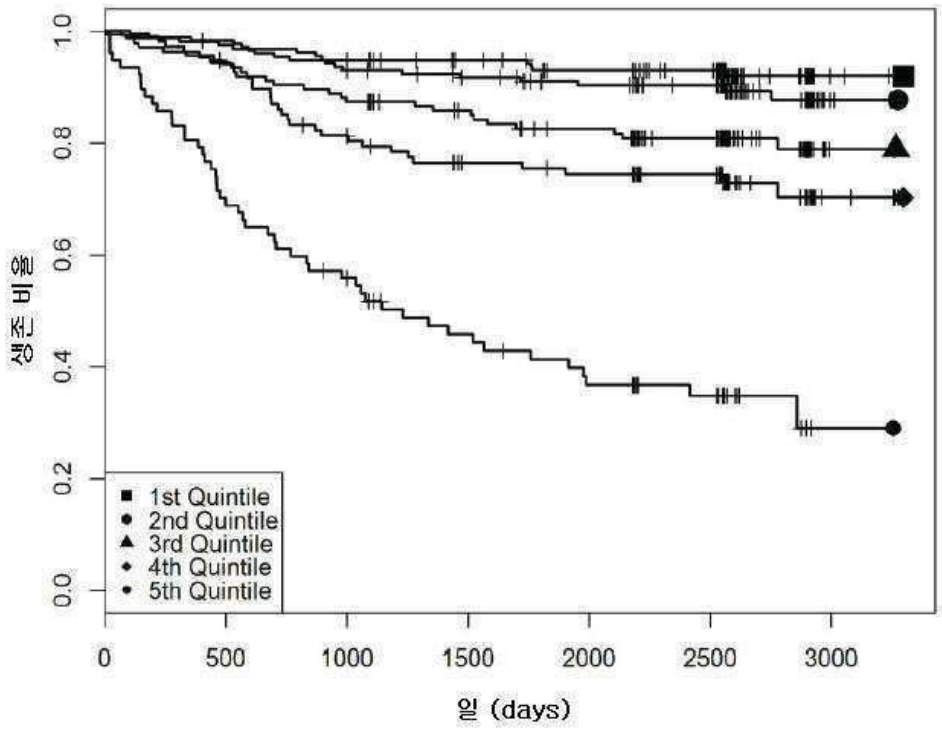
도면3c


생존 비율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일 (days)
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile

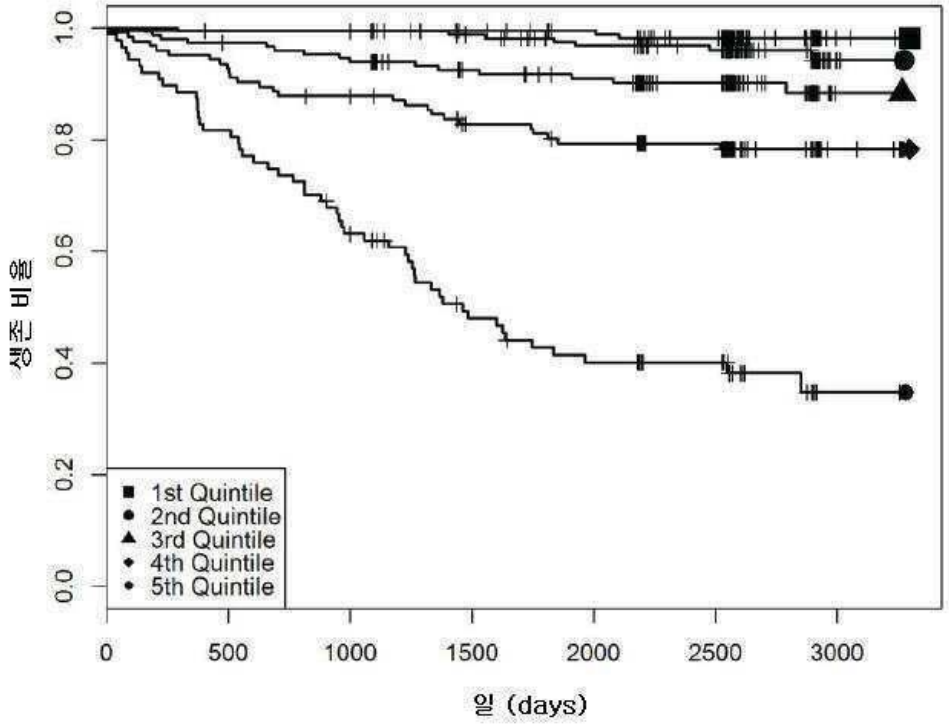
도면3d


생존 비율
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일 (days)
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile

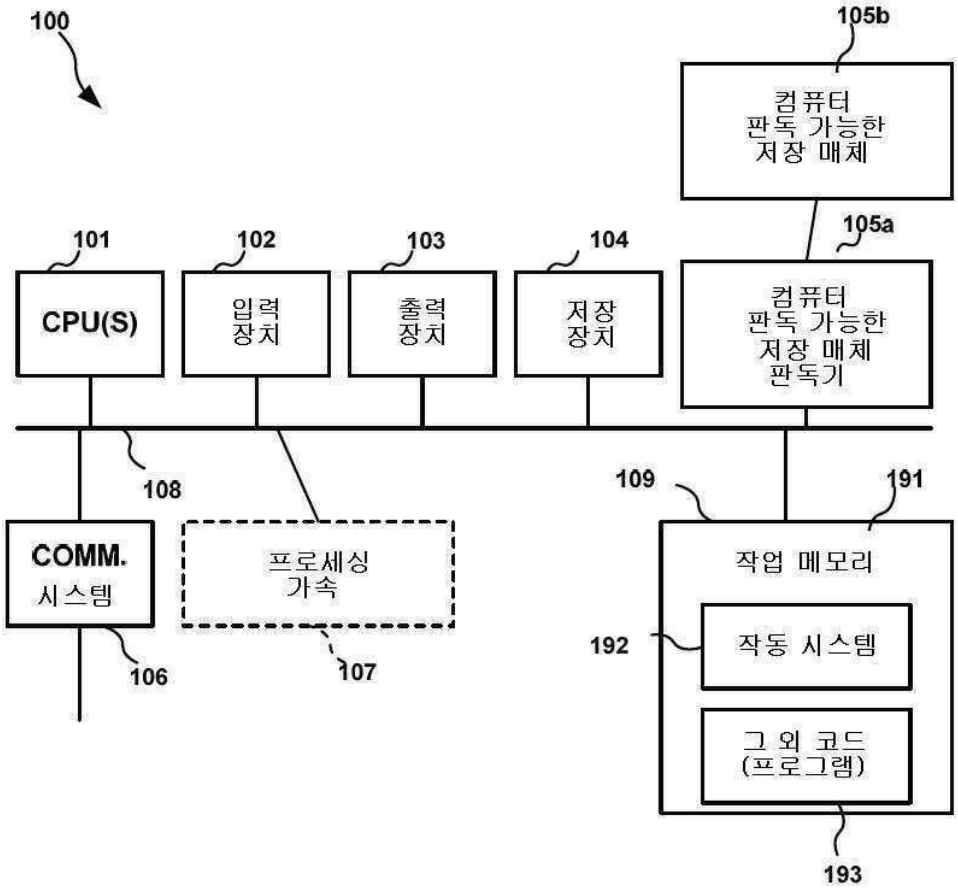
도면3e


생존 비율
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일 (days)

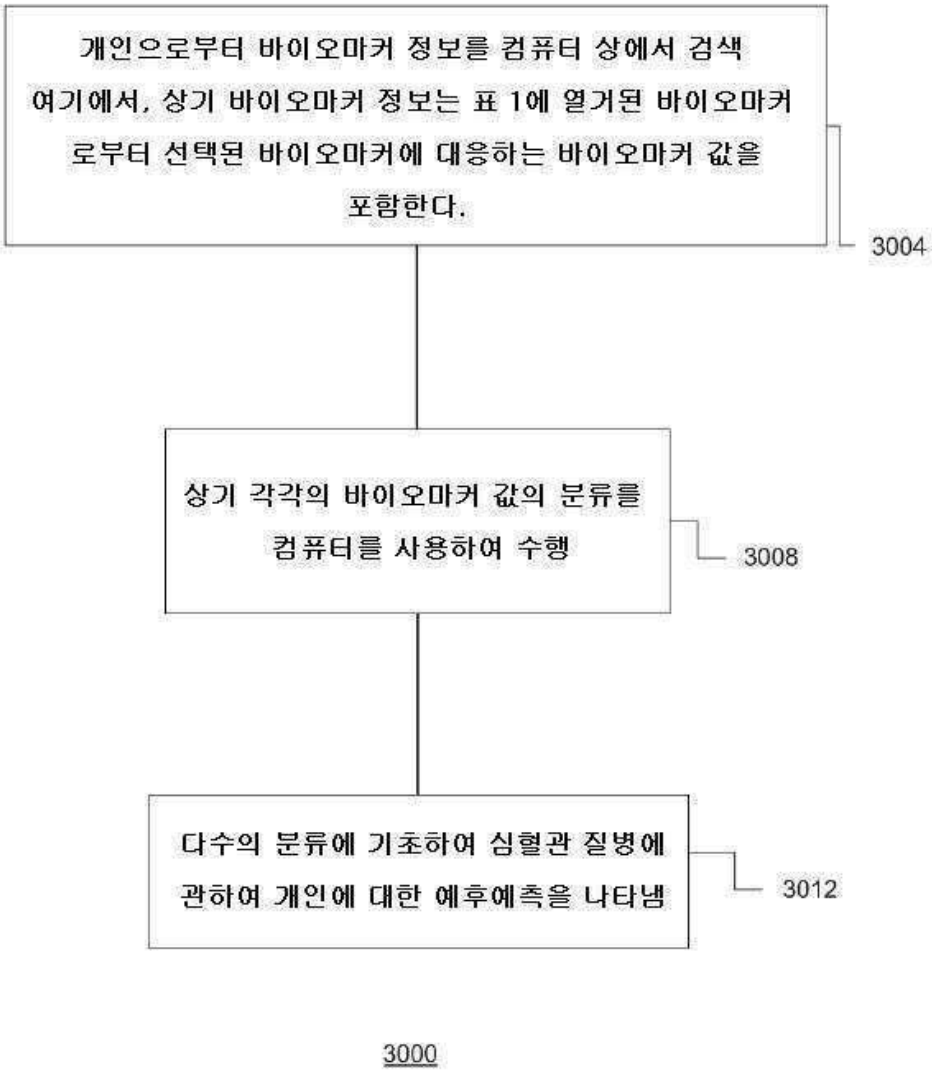
도면3f


생존 비율
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1st Quintile
2nd Quintile
3rd Quintile
4th Quintile
5th Quintile
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
일 (days)

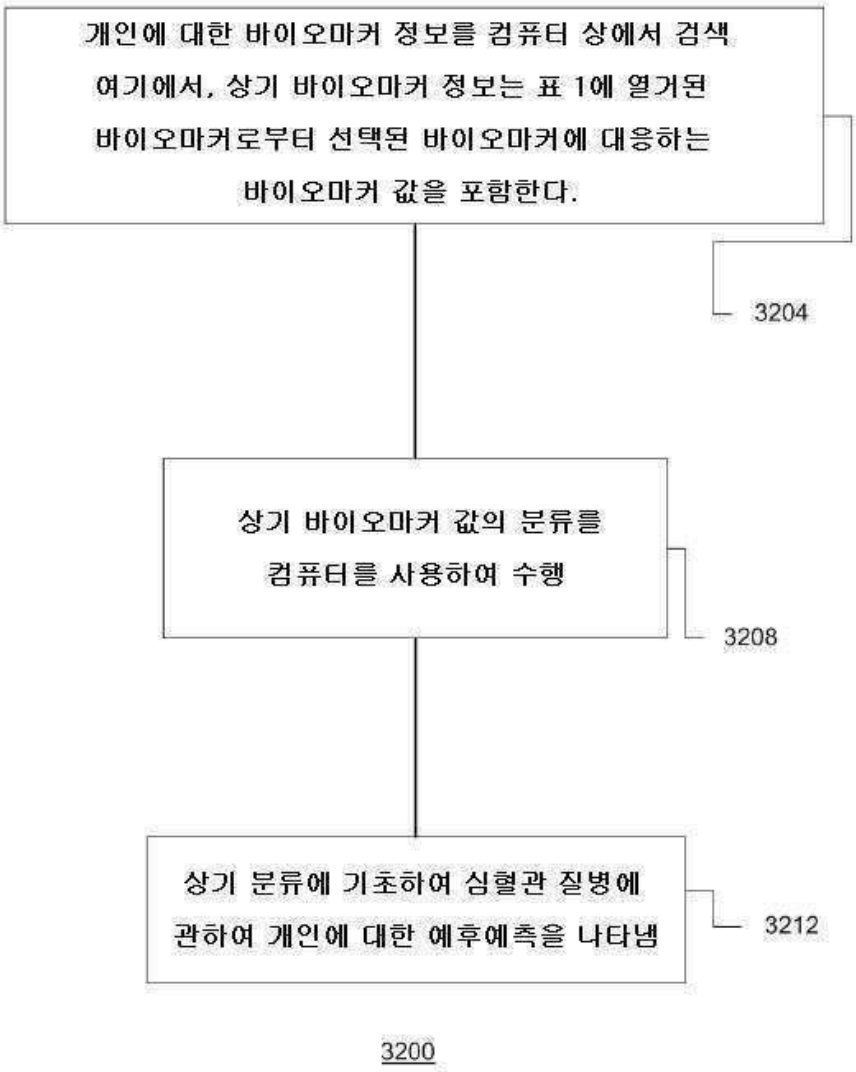
도면4


100
105b
컴퓨터
판독 가능한
저장 매체
105a
101
102
103
104
CPU(S)
입력
장치
출력
장치
저장
장치
컴퓨터
판독 가능한
저장 매체
판독기
108
109
191
COMM.
시스템
프로세싱
가속
작업 메모리
192
작동 시스템
그 외 코드
(프로그램)
106
107
193

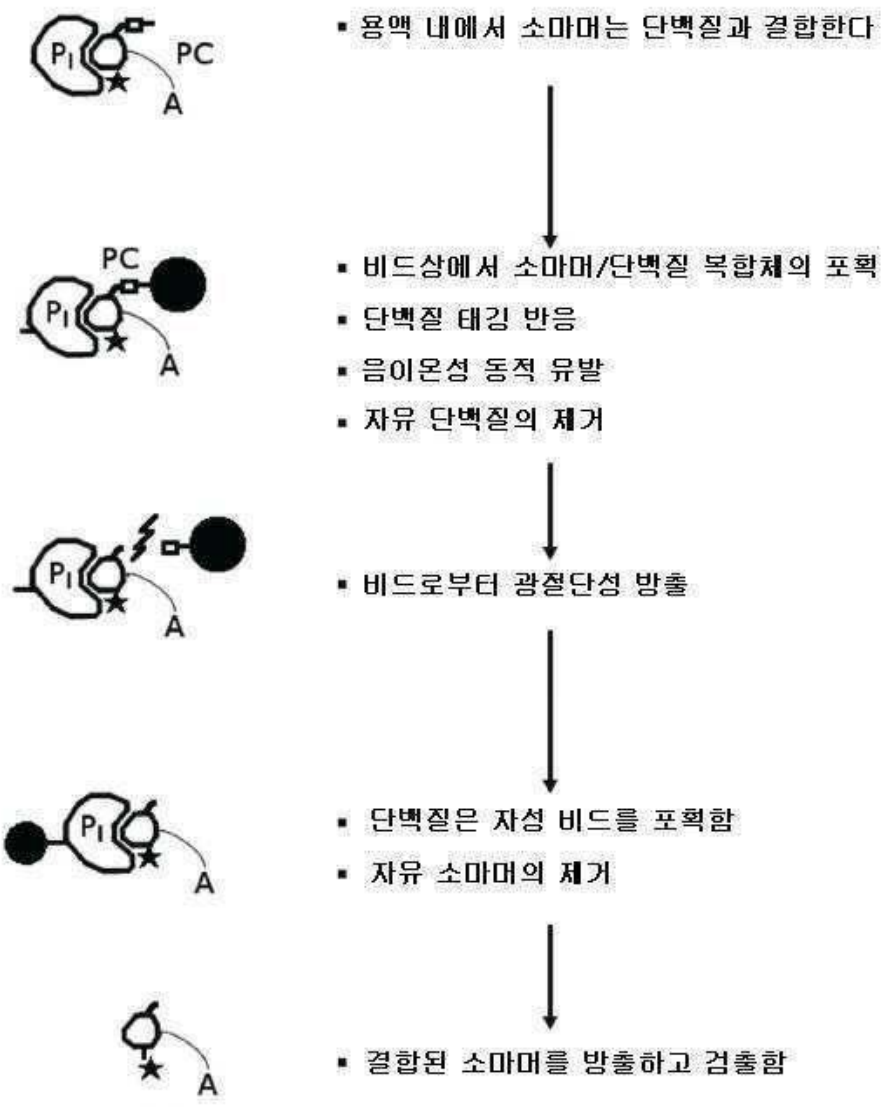
도면5


개인으로부터 바이오마커 정보를 컴퓨터 상에서 검색
여기에서, 상기 바이오마커 정보는 표 1에 열거된 바이오마커로부터 선택된 바이오마커에 대응하는 바이오마커 값을 포함한다.
3004
상기 각각의 바이오마커 값의 분류를 컴퓨터를 사용하여 수행
3008
다수의 분류에 기초하여 심혈관 질병에 관하여 개인에 대한 예후예측을 나타냄
3012
3000

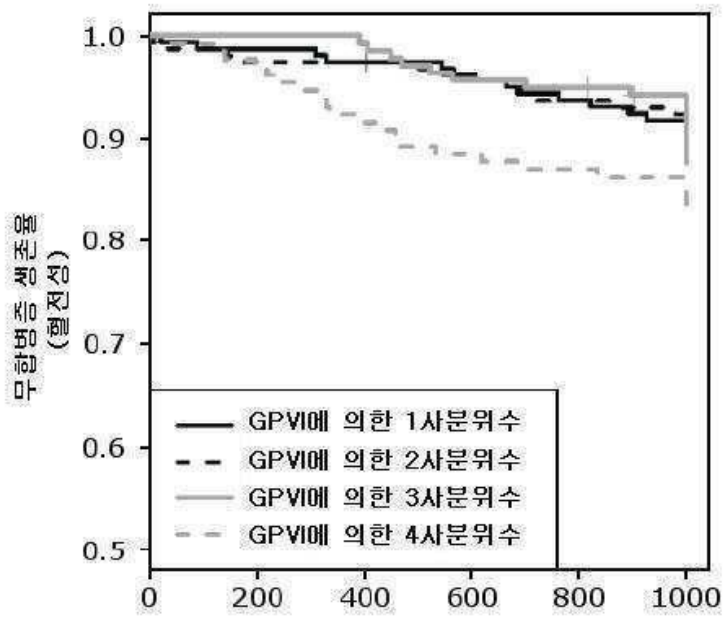
도면6


개인에 대한 바이오마커 정보를 컴퓨터 상에서 검색
여기에서, 상기 바이오마커 정보는 표 1에 열거된
바이오마커로부터 선택된 바이오마커에 대응하는
바이오마커 값을 포함한다.
3204
상기 바이오마커 값의 분류를
컴퓨터를 사용하여 수행
3208
상기 분류에 기초하여 심혈관 질병에
관하여 개인에 대한 예후예측을 나타냄
3212
3200

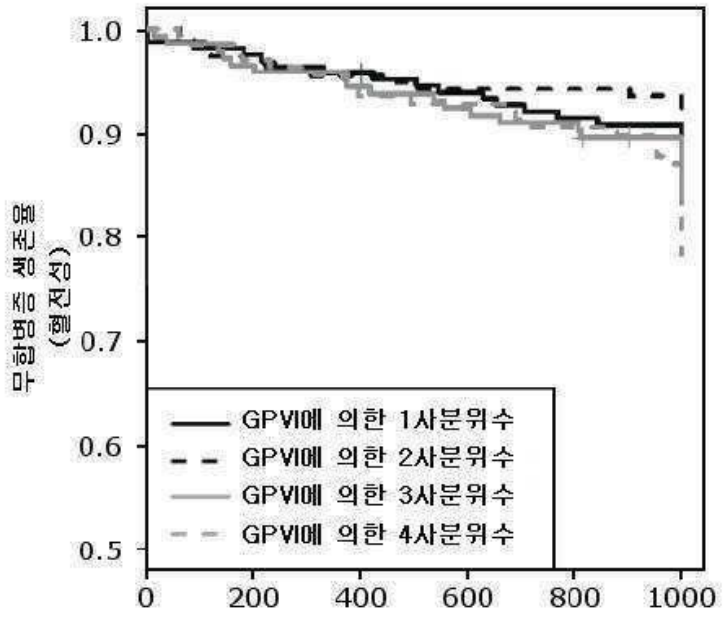
도면7


PC
A
PC
A
A
A
A
▪ 용액 내에서 소마머는 단백질과 결합한다
▪ 비드상에서 소마머/단백질 복합체의 포획
▪ 단백질 태깅 반응
▪ 음이온성 동적 유발
▪ 자유 단백질의 제거
▪ 비드로부터 광절단성 방출
▪ 단백질은 자성 비드를 포획함
▪ 자유 소마머의 제거
▪ 결합된 소마머를 방출하고 검출함

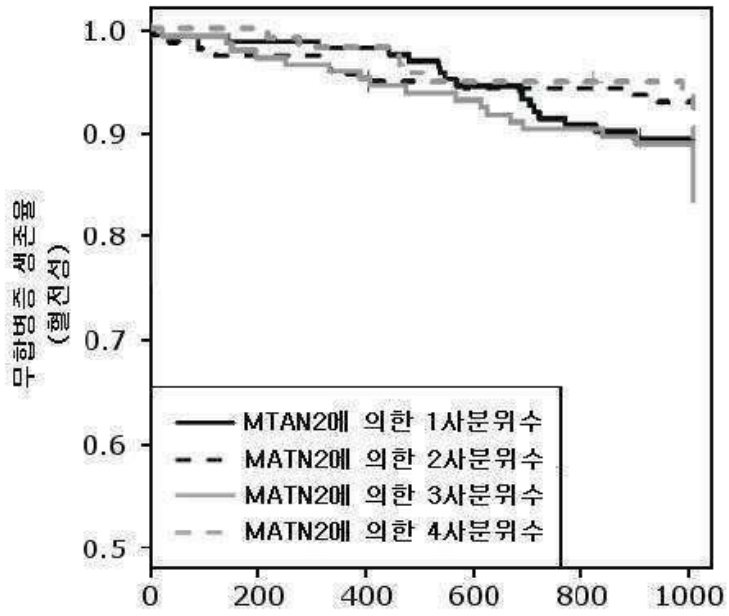
도면8a


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
무합병증 생존율 (혈전성)
0
200
400
600
800
1000
GPVI에 의한 1사분위수
GPVI에 의한 2사분위수
GPVI에 의한 3사분위수
GPVI에 의한 4사분위수

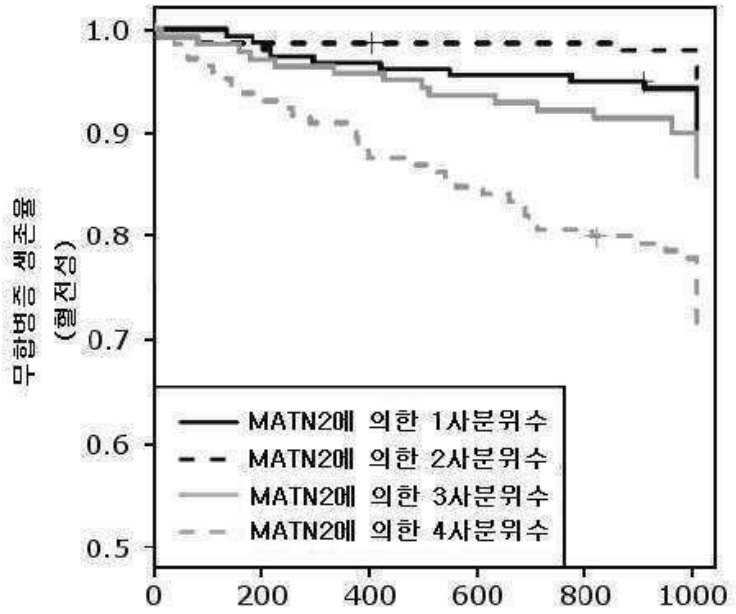
도면8b


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
무합병증 생존율 (혈전성)
0
200
400
600
800
1000
GPVI에 의한 1사분위수
GPVI에 의한 2사분위수
GPVI에 의한 3사분위수
GPVI에 의한 4사분위수

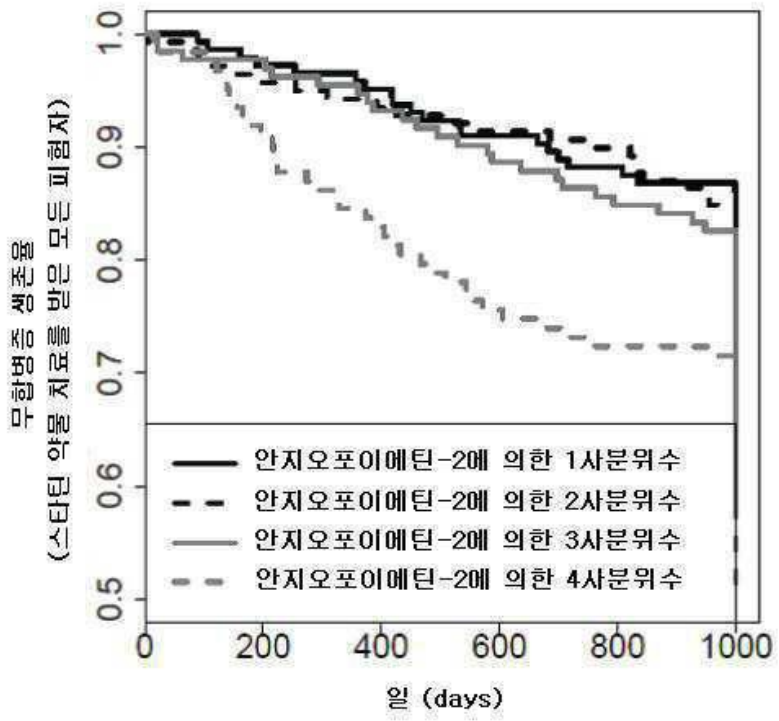
도면9a


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
무합병증 생존율 (혈전성)
0
200
400
600
800
1000
MTAN2에 의한 1사분위수
MATN2에 의한 2사분위수
MATN2에 의한 3사분위수
MATN2에 의한 4사분위수

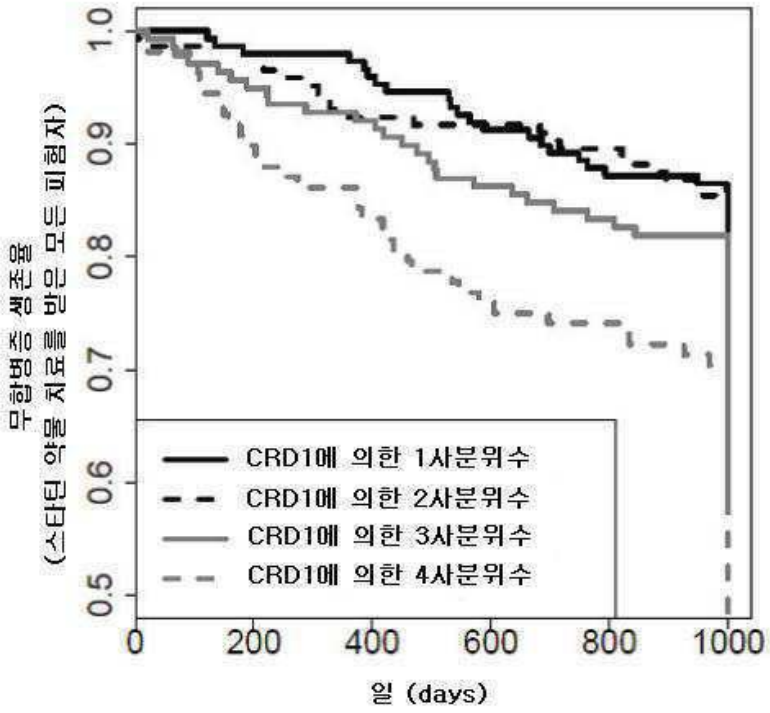
도면9b


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
무합병증 생존율 (혈전성)
0
200
400
600
800
1000
MATN2에 의한 1사분위수
MATN2에 의한 2사분위수
MATN2에 의한 3사분위수
MATN2에 의한 4사분위수

도면10


무항병증 생존율
(스타틴 약물 치료를 받은 모든 피험자)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0
200
400
600
800
1000
일 (days)
안지오포이에틴-2에 의한 1사분위수
안지오포이에틴-2에 의한 2사분위수
안지오포이에틴-2에 의한 3사분위수
안지오포이에틴-2에 의한 4사분위수

도면11


무항병증 생존율
(스타틴 약물 치료를 받은 모든 피험자)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0
200
400
600
800
1000
일 (days)
CRD1에 의한 1사분위수
CRD1에 의한 2사분위수
CRD1에 의한 3사분위수
CRD1에 의한 4사분위수