

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-515467

(P2010-515467A)

(43) 公表日 平成22年5月13日(2010.5.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G045
GO1N 33/68 (2006.01)	GO1N 33/68 ZNA	4B024
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B063
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/53 M	4B065
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/566	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-545881 (P2009-545881)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月15日 (2008.1.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年7月29日 (2009.7.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/000657
 (87) 国際公開番号 W02008/087049
 (87) 国際公開日 平成20年7月24日 (2008.7.24)
 (31) 優先権主張番号 60/884,979
 (32) 優先日 平成19年1月15日 (2007.1.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509131937
 セントレ・ドゥ・レシエルシェ・パブリック・ドゥ・ラ・サン
 ルクセンブルグ・レー1445・シュトラッセ・リュ・トーマス・エディソン・1A-B
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋梗塞及び心不全における診断マーカー及び薬剤設計のためのプラットフォーム

(57) 【要約】

MMP-9 (マトリックスメタロプロテナーゼ9) のヘモペキシンドメインの配列におけるアミノ酸変化の存在を検出する工程を含み、前記ドメインにおけるアミノ酸変化の存在が心筋梗塞後の心臓疾患に対する感受性の指標である、心筋梗塞後の心臓疾患に対する個体の感受性を測定するための方法を、薬剤設計の方法と共に開示する。

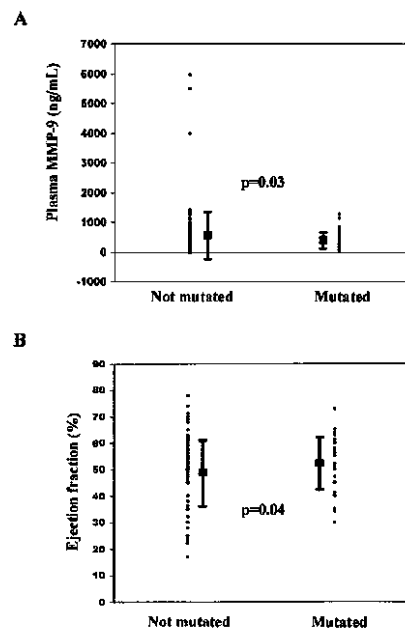


Fig. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心筋梗塞後の心臓疾患に対する個体の感受性を測定するための方法であって、MMP-9（マトリックスメタロプロテイナーゼ-9）のヘモペキシンドメインの配列中におけるアミノ酸の変化の存在を検出する工程を含み、前記ドメイン中におけるアミノ酸の変化の存在が、前記心筋梗塞後の心臓疾患に対する感受性の指標である、方法。

【請求項 2】

検出される配列が、配列番号 6 又は 8 の 1 4 8 位に相当する位置又は配列番号 2 又は 4 の 6 6 8 位に相当する位置にグルタミン（Gln）又はアルギニン（Arg）アミノ酸残基のいずれかを含むか又はコードする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記位置におけるアルギニン残基の存在が、MI 後に心臓疾患に罹患するリスクを有するか又は発症している個体の指標である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記位置におけるグルタミン残基の存在が保護的効果の指標である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

SNP（A/G）のアイデンティティーが、配列番号 5 若しくは 7 の 4 4 3 位に相当する位置又は配列番号 1 若しくは 3 の 7 2 6 5 位に相当する位置において検出される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

検出される配列が、配列番号 1、3、5、及び / 又は 7 からなる群から選択されるポリヌクレオチドである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

検出される配列が、配列番号 2、4、6、及び / 又は 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記位置におけるグルタミンアミノ酸残基の存在が、高い駆出率（EF）、心筋梗塞後の低い早期 MMP-9 活性、並びに心不全が発生する確率が低いことの指標である、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 9】

低い早期 MMP-9 が、個体が心筋梗塞に罹患した 2 4 時間後まで測定される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定の MMP-9 のヘモペキシンドメインの配列中においてアミノ酸変化が存在するか否かを測定する工程を含む、梗塞を有する患者のためのスクリーニング方法。

【請求項 11】

MMP-9 のヘモペキシンドメインの配列中において、請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定のアミノ酸変化が存在するか否かを測定する工程を含む、梗塞を有しない集団のためのスクリーニング方法。

40

【請求項 12】

心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低レベルの MMP-9 活性と、請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定の MMP-9 のヘモペキシンドメインの配列中におけるアミノ酸の変化を関連付けることによって、心筋梗塞を有する患者における診断及び / 又は予後を確認する方法。

【請求項 13】

心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低い MMP-9 レベルと、請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定のマトリックスメタロプロテイナーゼ-9（MMP-9）のヘモペキシンドメイン中におけるアミノ酸の変化を関連付けることによって、心室リモデリン

50

グの阻害並びに心不全の治療及び／又は予防の処置をするための方法。

【請求項 14】

心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低い MMP - 9 レベルと、請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定のマトリックスメタロプロテナーゼ - 9 (MMP - 9) のヘモペキシンドメイン中におけるアミノ酸の変化を関連付けることによって、心筋梗塞後における患者の心室リモデリングの発生を予測するための方法。

【請求項 15】

MMP - 9 のアゴニスト若しくはアンタゴニスト/インヒビター、又は MMP - 9 の活性を阻害するか、MMP - 9 の TIMP - 1 との相互作用を強化するか、若しくは MMP - 9 の検出可能な活性若しくは発現を低減させることが可能な分子を同定するための方法であって、請求項 1 から 9 のいずれか一項に規定のマトリックスメタロプロテナーゼ - 9 (MMP - 9) の変化したヘモペキシンドメインと相互作用する分子又はリガンドを設計する工程を含む、方法。

10

【請求項 16】

試料における心臓疾患に対する感受性と関連する SNP を有する第一のポリヌクレオチドの存在をアッセイするための方法であって、配列番号 1、3、5、7、9、及び／又は 10 からなる群から選択されるヌクレオチド配列並びに前記配列の相補的な配列を含む第二の配列と前記試料を接触させる工程を含み、前記第二のポリヌクレオチドがストリンジエントな条件下において前記第一のポリヌクレオチドとハイブリダイズする、方法。

20

【請求項 17】

試料における心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメインにおける SNP を有する単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの存在についてアッセイするための方法であって、前記コードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体と前記試料を接触させる工程を含む、方法。

【請求項 18】

心臓疾患に対する感受性と関連する SNP を含有するポリヌクレオチドの発現を変化させる薬剤を同定するための方法であって、

(a) (1) 心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメインにおける SNP 並びに (2) レポーター遺伝子に作動可能に連結されているプロモーター領域を含むポリヌクレオチドを、試験する薬剤と、発現のための条件下において接触させる工程；

30

(b) 前記薬剤の存在下におけるレポーター遺伝子の発現レベルを評価する工程；

(c) 前記薬剤の非存在下におけるレポーター遺伝子の発現レベルを評価する工程；並びに

(d) 発現が前記薬剤によって変化したことを示す差異について、工程 (b) における発現レベルを工程 (c) における発現レベルと比較する工程

を含む、方法。

【請求項 19】

個体における心臓疾患に対する感受性を診断するための方法であって、

(a) 前記個体からポリヌクレオチド試料を得る工程；並びに

40

(b) 前記心臓疾患に対する感受性に相当するハプロタイプが存在するか否かについて、前記ヌクレオチド試料を分析する工程であって、前記ハプロタイプが、心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメイン中における SNP に由来する対立遺伝子を含む、工程

を含む、方法。

【請求項 20】

前記心臓疾患が、心筋梗塞、急性冠不全症候群、虚血性心筋症、非虚血性心筋症、及び鬱血性心不全からなる群から選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

50

前記心臓疾患が鬱血性心不全である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメイン中における SNP を含有する単離されたポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記単離されたポリヌクレオチドが、調節配列、好ましくは適切なプロモーターと作動可能に連結されている、ベクター。

【請求項 23】

請求項 22 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 24】

心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメイン中における SNP を有するポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック動物。

10

【請求項 25】

心臓疾患に対する感受性と関連する MMP - 9 のヘモペキシンドメイン中における SNP を含む第一のポリヌクレオチドの存在について、試料をアッセイするためのキットであって、

a) 配列番号 1、3、5、7、9、及び / 又は 10 によって特定される配列並びにそれらの相補的な配列からなる群から選択される配列を含む、1つ又は複数の標識された第二のポリヌクレオチド；並びに

b) 前記標識の検出のための試薬を別々の容器に含む、キット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、参照によって本明細書に取り込む米国仮特許出願第 60 / 884 , 99 号の優先権の利益を享受する。

【0002】

本発明は、心筋梗塞及び心不全における診断マーカー及び薬剤設計のためのプラットフォームの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

30

鬱血性心不全 (CHF) は、特異的疾患ではないが、必要とされる心拍出量を適当に増大させる心臓の機能の不全によって生じる兆候及び症状の集合である。患者は、典型的には、息切れ、浮腫、及び疲労を有する。CHF は大流行している疾患となっており、成人人口の 3% に影響を与えている。CHF の死亡率は、30% 未満の 5 年生存率であり、多数の形態の癌よりも悪い値である。心筋梗塞 (MI) は CHF の主な病因の 1 つである。左心室リモデリングは、CHF に多大に寄与する。

【0004】

現在、心筋細胞外マトリックス (ECM) における変化が、進行性リモデリングプロセスに寄与することが認識されている。ECM 合成及び分解のバランス、すなわち ECM ターンオーバーが、組織構造の維持を担っている。心臓における ECM 合成の正常な速度は非常に遅い。MI などの病的状態の間に、コラーゲン合成及び沈着が、梗塞した心筋だけでなく非梗塞心筋においても促進される。次第に増えてきた証拠によって、繊維状コラーゲンネットワーク及びコラーゲンマトリックスの組織崩壊における変化が LV リモデリングに寄与することを示唆している。マトリックスの組織崩壊が、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) の発現増大に寄与して、マトリックスタンパク質を分解させ、プロテアーゼインヒビターのファミリーである Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) の発現を低減させる。多形核白血球及びマクロファージは、MMP の豊富な供給源である。梗塞心筋における単球 / マクロファージのリクルート及び活性化は、MI 後に生じるプロセスに大きく寄与することが示されている。

40

50

【 0 0 0 5 】

したがって、神経ホルモン及び腫瘍壊死因子 - (T N F -) などの前炎症サイトカインと同様に、メタロプロテイナーゼ (M M P) は、心不全進行に寄与し得る生物学的活性を有する分子の他の異なる種類を表わすようである。次第に増えてきた一連の証拠によって、炎症性サイトカイン及び M M P のレベルを制御が、心不全患者を治療するための新しい枠組みである可能性を示されている。

【 0 0 0 6 】

これまでの 2 5 のメンバーを含む M M P ファミリーの中で、M M P - 9 は、心室リモデリングに關与する重要なタンパク質のようである。M M P 活性が M I 後の早期に有害であるが、M I 後の後期には有益であることが最近示され、リモデリングの予防又は治療のための治療戦略を提供する際に注意深く考慮する必要がある治療域の存在を示唆している。多数の試験が、M M P ファミリーの他のメンバーが心室リモデリングに有益な役割を担っているため、特異的な M M P - 9 インヒビターの使用が必要であることを示唆している。同じ問題のある状況、すなわち、他の M M P ではなく M M P - 9 を阻害することには、マトリックス分解が關与する他の疾患の治療を目的とする際に直面する。複数の医薬品会社が、その様な M M P - 9 特異的インヒビターの可能性を試験しているが、早期の試験で様々な結果がもたらされている。したがって、特異的な M M P - 9 インヒビターを開発するための新しい戦略を見出す必要がある。

10

【 0 0 0 7 】

M M P - 9 及び T N F - 遺伝子における一塩基多型 (S N P) が、急性 M I の発症の感受性因子として働く可能性がある。予備的研究において、本発明者は、循環している白血球由来の M M P - 9 及び T N F - 遺伝子における S N P の存在を測定した。M a s s A R R A Y (登録商標) 技術を、急性 M I を有する 9 8 人の患者並びに非典型的胸痛及び正常な冠状動脈を有する 9 2 の患者の集団に対して実施した。試験した 1 4 7 の S N P のうち、9 つが、双方の群の間で非常に異なる頻度を示した。

20

【 0 0 0 8 】

一方で、本出願人は臨床試験を実施して、M M P - 9 血漿レベルが心不全の発生に相関していることを初めて示すことができた。事実、M M P - 9 レベルから、M I 後の後期発症 C H F が予測される。本発明者の研究では、早期に低い M M P - 9 レベルを有する患者は、後の結果が良好であり、C H F がなく、正常な駆出率及び拡張末期容積である。しかしながら、早期に高い M M P - 9 レベルを有する患者は、後期発生 C H F の顕著なリスクがあり (6 . 5 のオッズ比、 $p < 0 . 0 0 6$)、左心室リモデリングが残る (駆出率の低減、拡張末期容積の増大)。2 0 0 6 年の 2 月の本発明者の最初の論文発表 (W a g n e r D R , D e l a g a r d e l l e C , E r n e n s I , R o u y D , V a i l l a n t M , B e i s s e l J . M a t r i x m e t a l l o p r o t e i n a s e - 9 i s a m a r k e r o f h e a r t f a i l u r e a f t e r a c u t e m y o c a r d i a l i n f a r c t i o n . J C a r d F a i l . 2 0 0 6 F e b ; 1 2 (1) : 6 6 - 7 2) から、本発明者の観察結果は複数の他のグループによって再現されている。さらに、M M P - 9 レベルは、リモデリングから回復し、且つ、心臓再同期療法に続発する心不全から良くなった患者において M M P - 9 レベルが低下することが最近示された。したがって、M M P - 9 の血漿レベルから、再灌流 M I 後の C H F 及び心室リモデリングが予測されることがよく認識されている。

30

40

【 0 0 0 9 】

しかしながら、患者における M M P - 9 レベルをアッセイすることは可能であるが、適当な治療が処置されるか又は患者教育を開始するために、患者が M I 後の心不全に感受性があるか否か予測するための技術が依然として必要とされている。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 1 】 W a g n e r D R , D e l a g a r d e l l e C , E r n e n s I

50

, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. J Card Fail. 2006 Feb; 12(1): 66-72

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の主題は、2つ存在する。

【0012】

1. 診断ツールの提供

10

心不全の悪化を減少させ、且つ、生存期間を延ばすために、鬱血性心不全の発生の早期診断のための方法を提供することは、本発明の主題である。

【0013】

当該診断ツールを使用して、心室リモデリング及び心不全の発症リスクを有する、罹患しやすい患者を同定することは、本発明の他の主題である。

【0014】

当該診断ツールを使用して、心筋梗塞後の心不全及び心室リモデリングの発症をより良好に予防する処置を適応させることは、本発明の他の主題である。

【0015】

2. 薬剤設計のためのプラットフォームの提供

20

薬剤設計のためのプラットフォームを提供して、MMP-9活性を特異的に阻害し得る分子を提供又は同定することは、本発明の他の主題である。

【0016】

心筋梗塞又は心不全を有する患者における活性MMP-9のレベルを低減させることは、本発明の他の主題である。

【0017】

線維症、アポトーシス、及び壊死を含む心筋の不応リモデリングを予防するために、当該薬剤を使用して心筋梗塞後の患者を処置することは、本発明の更なる主題である。

【0018】

心不全の発症を予防するために、当該薬剤を使用して心筋梗塞後の患者を処置することは、本発明の他の主題である。さらに、心筋梗塞、急性心不全、又は慢性心不全を有する患者に、治療上有効量の当該薬剤を投与することも、本発明の主題である。

30

【0019】

おどろくべきことに、本発明者は、一塩基多型(SNP)がMMP-9遺伝子のコード配列に存在し、心筋梗塞に続発する心不全について良好又は不良な予後を有する患者において異なる頻度で認められることを見出した。特に驚くべきことに、本発明者は、前記SNPが、転写された活性MMP-9のヘモペキシンドメイン中における1つのアミノ酸変化を生じさせ、結果としてTIMP-1に結合するMMP-9の部位に静電気的变化を引き起こすことを示した。TIMP-1はMMP-9活性の最大のインヒビターであるため、このことは重要である。

40

【課題を解決するための手段】

【0020】

かくして、第一の態様では、本発明は、MMP-9(マトリックスメタロプロテイナーゼ9)のヘモペキシンドメインの配列中のアミノ酸の変化の存在を検出する工程を含み、前記ドメイン中のアミノ酸の変化の存在が心筋梗塞後の心臓疾患に対する感受性の指標である、心筋梗塞後の心臓疾患に対する個体の感受性を測定するための方法を提供する。

【0021】

特に好ましくは、検出される配列は、アルギニン(Arg)又はグルタミン(Glu)アミノ酸残基を配列番号6若しくは8の148位に相当する位置又は配列番号2若しくは4の668位に相当する位置に含むか又はコードする。ここでのArg残基の存在は、M

50

I後の心臓疾患に罹患するリスクを有するか又は発症している個体の指標である。ここでのGln残基の存在は、保護効果、すなわちより低いリスクを有する個体の指標である。

【0022】

好ましくは、SNP(A/G)のアイデンティティが、配列番号5若しくは7の443位に相当する位置又は配列番号1若しくは3の7265位に相当する位置で検出される。ここでのグアニジン(G)ヌクレオチドの存在は、MI後の心臓疾患に罹患するリスクがあるか又は発症している個体の指標である。ここでのアデニン(A)ヌクレオチドの存在は、保護効果、すなわちより低いリスクを有する個体の指標である。

【0023】

PEX9ドメインとしても知られている、MMP-9(マトリックスメタロプロテイナーゼ9)のヘモペキシンドメインの配列は、配列番号5から8に示しており、そのうち配列番号6及び8はアミノ酸配列であり、配列番号5及び7はポリヌクレオチド配列である。前記ドメインの配列は、タンパク質配列自体を評価するか又はタンパクドメインをコードするヌクレオチド配列を評価することによって検出されてよい。遺伝子コードの縮重によって、ヌクレオチド配列(好ましくは、DNA又はRNA)は、配列番号6又は8をコードする任意のものであってよい。しかしながら、好ましくは、前記ヌクレオチド配列は配列番号5又は7に係るものである。

10

【0024】

好ましくは、検出される配列は、リスク(感受性)がある群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのDNA配列である配列番号7である(443位にGヌクレオチドを示す)。

20

【0025】

好ましくは、検出される配列は、リスク(感受性)がある群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸配列である配列番号8である(アミノ酸148位にArgを示す)。

【0026】

検出される配列が、MMP-9のヘモペキシンドメインのDNA配列である配列番号5であることも好ましい(443位にアデニンヌクレオチドを示す)。好ましくは、検出される配列は、保護群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸配列である配列番号6である(アミノ酸148位にGlnアミノ酸を示す)。

30

【0027】

好ましくは、ヘモペキシンドメインの配列におけるアミノ酸の変化の存在を検出することは、個体に由来するMMP-9のヌクレオチド配列を配列番号1又は3と比較することによって実施されてよい。

【0028】

特に好ましくは、当該検出が、配列番号1又は3の7265位に相当する位置における少なくとも1つのヌクレオチドの存在を評価することによって実施されてよい。上述のように、当該位置又はそれに相当する位置におけるグアニジンヌクレオチドの存在は、心筋梗塞後の心臓疾患に対する個体の感受性の指標である。したがって、好ましくは、前記個体は、前記位置においてグアニジンを含む配列番号3に示すMMP-9配列を有する。

40

【0029】

代替的には、当該検出は、配列番号1の7265位に相当する位置におけるアデニンの存在を観察することによって実施されてよく、当該位置又はそれに相当する位置におけるアデニンヌクレオチドは、心筋梗塞後の心臓疾患に対して保護的である。換言すると、前記位置におけるアデニンヌクレオチドは、心筋梗塞後の前記心臓疾患に感受性を有する可能性が低い個体の指標である。好ましくは、前記個体は、前記位置にアデニンを含む配列番号1に示すMMP-9配列を有する。

【0030】

代替的に又は加えて、前記検出は、前記遺伝子から転写されたRNA中の前記ドメインにおけるアミノ酸変化の存在を検出することによって実施されてよい。好ましくは、これ

50

は mRNA である。

【0031】

しかしながら、より好ましくは、前記検出は、活性又は機能的なタンパク質における前記ドメイン中のアミノ酸の変化の存在を検出することによって実施されてよい。好ましくは、個体又は患者は、心筋梗塞後の心不全に対して保護的である、配列番号の668位又はそれに相当する位置にグルタミン (Gln) を含む配列番号2のMMP-9タンパク質を有する。代替的には、前記個体又は患者は、心筋梗塞後の心不全に対する感受性の指標である、配列番号2の668位又はそれに相当する位置にアルギニン (Arg) を含む配列番号4のMMP-9タンパク質を有する。

【0032】

前記個体又は患者は、リスクを示すか又は保護的な対立遺伝子についてホモ接合型であるか又はヘテロ接合型であってよい。

【0033】

好ましくは、前記心臓疾患は、心筋梗塞、急性冠不全症候群、虚血性心筋症、非虚血性心筋症、又は鬱血性心不全である。最も好ましくは、前記心臓疾患は鬱血性心不全である。

【0034】

タンパク質配列のサンプリングが、好ましくは、任意にヌクレオチド分析に加えて実施されてよく、すなわち、遺伝子型と活性又は機能的タンパク質のタンパク質配列との双方が評価されてよい (ゲノム及びプロテオーム分析)。

【0035】

前記アミノ酸配列における変化は、好ましくは、SNP7265として本明細書で示すSNPの結果生じるものである。

【0036】

本発明のSNPは、上述のような配列番号1又は3の7265に相当する位置における、より頻度の高いグアニジンヌクレオチドからより頻度の低いアデニンヌクレオチドへの変化を伴う。当該変化は、上述のような配列番号2又は4の668に相当する位置におけるアルギニンアミノ酸からグルタミンアミノ酸へのアミノ酸の変化を生じさせる。

【0037】

好ましくは、本発明は、所定の位置にGが存在するリスクを示す対立遺伝子の存在を評価又は測定する工程を含む。代替的に又は加えて、本発明は、好ましくは、前記位置にAが存在する保護的な対立遺伝子の存在を評価又は測定する工程を含む。

【0038】

配列番号1及び又は3を参照する場合には、明らかにそうではない場合を除き、ヘモペキシンドメインの配列 (配列番号5及び/又は7) 並びにそのヌクレオチドの対応する番号を参照することを含むと解されるであろう。同様に、配列番号2及び/又は4を参照する場合には、明らかにそうではない場合を除き、ヘモペキシンドメイン配列 (配列番号6及び/又は8) 並びにそのアミノ酸の対応する番号を参照することを含むと解されるであろう。

【0039】

MMP-9のヘモペキシンドメインは、好ましくは、本発明のSNPによってもたらされるアミノ酸の変化を有するか又は有しない、上述のような配列番号5~8で規定されるものである。ヘモペキシンドメインは、好ましくは、TIMP結合と関連するものであり、最も好ましくはTIMP-1結合と関連するものである。

【0040】

本発明のSNPにより生じるアミノ酸の変化は、戦略的に、MMP-9のヘモペキシンドメイン中に位置し (図1~3参照のこと)、そのため、コラーゲン線維だけでなくMMP-9の主要なインヒビターであるTissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) に対する結合に關与する可能性が高い。したがって、当該SNP及び結果として生じるアミノ酸の変化は、心室リモデリング

10

20

30

40

50

及び心臓疾患、特に心不全の発症又は進行における役割を担っている可能性が非常に高い。これは、保護的な対立遺伝子の存在と、心不全、特に鬱血性心不全（CHF）又は左心室（LV）リモデリングの非常に低い発生率、正常なEF及びEDVと共に高いEF、低い早期のMMP-9活性（MI後）との間の統計的に有意な相関関係を示す本願の実施例によって実証されている。

【0041】

MMP-9の早期の活性についての時期は、好ましくはMI後の1～2日であり、好ましくはMI後の24時間未満である。したがって、MMP-9活性レベルを評価するために、MI後24時間まで回収した血漿試料中でMMP-9を測定することが好ましい。

【0042】

評価されるタンパク質配列は、好ましくは、任意の翻訳後修飾のあとである。

【0043】

好ましくは、前記患者は心筋梗塞に既に罹患している。しかしながら、前記患者が心筋梗塞にまだ罹患していないことも意図され、その場合、本発明のSNP又は結果として生じるアミノ酸の変化は、その後に前記個体が心筋梗塞を有する場合における、心筋梗塞後に心臓疾患が発生する可能性の指標であろう。これは、例えば、家族に病歴があること、弱い心臓を有すること、又は他のリスク因子によるMIのリスクがあり得る患者を評価するために、及び/又は心筋梗塞を生じさせる可能性がある手術の前に特に有用であろう。

【0044】

かくして、本発明は、上記アミノ酸変化が存在するか否かを測定する工程を含む、梗塞を有する患者のためのスクリーニング方法を提供する。同様に、本発明は、梗塞を有するか又は有しない一般的な集団のためのスクリーニング方法も提供する。

【0045】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-9（MMP-9）におけるアミノ酸の変化を、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、低レベルのMMP-9活性と関連付けることによって、心筋梗塞を有する患者における診断及び/又は予後を確立するための方法も提供する。

【0046】

かくして、MMP-9の測定可能な活性が低減すること、最も好ましくはMMP-9タンパク質の低減によって低減することが好ましい。これは前記遺伝子の発現のダウンレギュレーションによる可能性があり、又はこれは競合又は阻害（例えば、活性部位などにおけるインヒビターの結合による立体的な効果など）による可能性がある。これまでに得られた証拠は、前記SNPによって、MMP-9の発現が低減し、そのため測定可能な活性が低減することである。

【0047】

前記活性は、例えば蛍光マーカーの切断アッセイであってよい、プロテアーゼについての技術分野において知られている多数の方法によって測定することが可能である。ザイモグラフィ及び/又はELISAが特に好ましい。

【0048】

本明細書に示すように、MMP-9の活性は、最も好ましくはドメインの配列の変化、特に本発明のSNPによる変化によって、ヘモペキシンドメインが変化する際に低減する。これは、特に、上述のMI後の早期の時期の場合である。

【0049】

本発明者の過去の研究から続いて、本発明者は、MMP-9遺伝子多型及びその心不全に対する影響を調査した。この目的のために、本発明者は、MMP-9遺伝子の配列全体においてSNPが存在するか否かを規定する目的で配列分析実験を開始した。極端なフェノタイプを有する22の患者の2つの群を選択した：1つの群は、MI後に良好な臨床転帰を有し、且つ、左心室リモデリング及び心不全の兆候が見られず（55%超の左心室の駆出率によって特徴付けられる）、1つの群は、MI後に不良な臨床転帰を有し、且つ、左心室リモデリング及び心不全の兆候を有する（40%未満の左心室の駆出率によって特

10

20

30

40

50

徴付けられる)。複数のSNPがこれらの患者において同定された。これらのうち、MMP-9遺伝子のコード配列の7265位に位置する1つのSNPが、特に興味深いものであると思われた。事実、SNP7265の頻度は、2つの群の患者の間で異なっていた。このことは、SNP7265がMI後の心不全の発生と関連している可能性があり、予後のツールとして使用し得ることを示唆した。

【0050】

本発明者は、次いで、SNP7265と、MIを有する患者の小標本(44人の患者)において認められた心不全との関連を、大きな集団において実証し得るか測定しようとした。本発明者は、本発明者の実験室に保存しているルクセンブルグ急性心筋梗塞(LUCKY)登録を使用して、遺伝子型決定実験を実施して、229の患者にSNP7265の存在を検出した。第一に、これらの実験によって、統計的に有意な様式で、SNP7265がMMP-9の血清レベルと関連していることを示すことができた。第二に、SNP7265が、実際に、MI後の心不全の発症及び駆出率と有意に関連していることを示すことができた。

10

【0051】

これらの実験によって、MI後の心不全の発症を予測する診断ツールとしてのSNP7265の潜在的な有用性が明らかにされた。また、本発明者は、SNP7265は、MI患者の心臓における有害なMMP-9活性を低減させる目的の治療戦略を開発する出発点である可能性があると思料する。

20

【0052】

本発明の更なる態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示すより低いMMP-9レベルと関連付けることによって、心筋梗塞を有する患者における診断及び予後を確立するための方法を提供する。

【0053】

前記アミノ酸の変化は、好ましくはMMP-9のコード配列の7265位に位置する、MMP-9における一塩基多型(SNP)であってよい。前記SNPは、グアニジンからアデニンへのヌクレオチドの変化であってよい。前記SNPは、アルギニンからグルタミンへのアミノ酸変化を誘導する。

30

【0054】

好ましくは、前記心臓疾患は、心筋梗塞、急性冠不全症候群、虚血性心筋症、非虚血性心筋症、又は鬱血性心不全である。最も好ましくは、前記心臓疾患は鬱血性心不全である。

【0055】

本発明の他の態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低いMMP-9レベルと関連付けることによって、心室リモデリングを阻害するため、並びに心不全を治療及び予防するための処置方法が提供される。

【0056】

本発明の更なる態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低いMMP-9レベルと関連付けることによって、心筋梗塞後の患者における心室リモデリングの発生を予測する方法が提供される。

40

【0057】

本発明の更なる他の態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、より良好な臨床転帰を示すより低いMMP-9レベルと関連付けることに基づく、心筋梗塞後の患者の治療戦略を改善するための方法が提供される。

【0058】

本発明の他の態様によれば、マトリックスプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペ

50

キシンドメインのアミノ酸変化を、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、より低いMMP-9レベルと関連付けることに基づく、心室リモデリングを治療するための薬剤設計のためのプラットフォームを提供する。

【0059】

本発明の更なる他の態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9上のアミノ酸変化をより低いMMP-9レベルと関連付けて、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)活性を特異的に阻害するための薬剤開発のためのプラットフォームが提供される。

【0060】

好ましくは、当該プラットフォームは、MMP-9タンパク質の二次又は三次構造における立体構造及び静電気的変化を用いることに関連して、SNPのアミノ酸変化によるものであり、MMP-9の新規アンタゴニスト/インヒビター、特に「変化させた」TIMP結合部位を摸倣するか又は結合することが可能なものを提供する。

10

【0061】

代替的には、本発明は、MMP-9活性を阻害するか又はMMP-9とTIMP-1との相互作用を強化する戦略を開発するために使用されてよい。

【0062】

かくして、本発明は、MMP-9のアゴニスト又はアンタゴニスト/インヒビター、或いはMMP-9活性を阻害するか又はMMP-9とTIMP-1との相互作用を強化するか若しくはMMP-9の検出可能な活性若しくは発現を低減させることが可能な分子を同定するための方法を提供する。

20

【0063】

本発明は、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)の変化したヘモペキシンドメインと相互作用する分子又はリガンドを設計する工程を含む、MMP-9のアゴニスト又はアンタゴニスト/インヒビター或いはMMP-9活性を阻害するか又はMMP-9とTIMP-1との相互作用を強化することが可能な分子を同定するための方法も提供する。

【0064】

本発明の他の態様によれば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化をより低いMMP-9レベルと関連付けて、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示すことによる、天然のインヒビターである、Tissue Inhibitor of MMP-1(TIMP-1)に対するMMP-1の結合を改善するための方法が提供される。

30

【0065】

本発明の更なる態様によれば、治療上有効量の薬剤を投与する工程を含む、末期の心臓疾患と関連する心筋組織の分解を予防するための方法であって、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、より低いMMP-9レベルと関連付けて、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、方法が提供される。

【0066】

本発明の更なる態様によれば、心筋組織におけるMMP-9の活性を低減させる薬剤を投与する工程を含む、鬱血性心不全の症状を示す患者を治療するための方法であって、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9(MMP-9)のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を、より低いMMP-9レベルと関連付けて、心筋梗塞後のより良好な臨床転帰を示す、方法が提供される。

40

【0067】

前記症状は慢性又は急性心不全を示すものであってよく、前記心筋組織におけるMMP-9の生産を低減させる薬剤は治療上効果的な薬剤を含んでよい。

【0068】

誤解を避けるために、前記アミノ酸の変化は、本発明の任意の態様において、MMP-

50

9の一塩基多型であってよく、好ましくはMMP-9のコード配列の7265位に位置する。前記SNPは、グアニジンからアデニンへのヌクレオチドの変化であってよい。前記SNPは、上述のようにアルギニンからグルタミンへのアミノ酸変化を誘導する。好ましくは、前記心臓疾患は、心筋梗塞、急性冠不全症候群、虚血性心筋症、非虚血性心筋症、又は鬱血性心不全である。最も好ましくは、前記心臓疾患は鬱血性心不全である。前記薬剤は、経口、静脈内、皮内、若しくは経皮的に投与するか又は適切なベクターで発現させてよい。

【0069】

リスクを示すSNPの対立遺伝子を検出する工程を含む、個体における心臓疾患に対する感受性を測定するための方法であって、前記SNPが活性MMP-9タンパク質のヘモペキシンドメインをコードする領域内に位置する、方法も提供される。

10

【0070】

試料中で心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを有する第一のポリヌクレオチドの存在についてアッセイするための方法であって、前記ポリヌクレオチドを第二のポリヌクレオチドと接触する工程を含み、前記第二のポリヌクレオチドは、配列番号1、3、5、7、9、及び/又は10からなる群から選択されるヌクレオチド配列又は前記配列に相補的な配列を含み、且つ、ストリンジェントな条件下で前記第一のポリヌクレオチドとハイブリダイズする、方法も提供される。前記ストリンジェントな条件は、好ましくは高度にストリンジェントであり、好ましくは6×SSCである。

【0071】

心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを含有する単離されたポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記単離されたポリヌクレオチドが制御配列、好ましくは適切なプロモーターに作動可能に連結されている、ベクターも提供される。前記ベクターを含む宿主細胞も提供される。

20

【0072】

全ての態様において、心臓疾患の感受性と関連するSNPは、転写された活性MMP-9タンパク質のヘモペキシンドメインにおけるアミノ酸の変化を生じさせ、好ましくは上述のSNP7265、つまり前記ドメインにおいてArgからGlnへのアミノ酸変化を生じさせるGからAへのヌクレオチドの変化を生じさせる。本発明は、心臓疾患に対する感受性に関連するSNPを有する単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを生産するための方法であって、前記ポリペプチドの発現に適切な条件下で上記組換え宿主細胞を培養する工程を含む、方法も提供する。

30

【0073】

試料において心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを有する単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの存在をアッセイするための方法であって、前記コードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体と前記試料とを接触させる工程を含む、方法も提供される。

【0074】

本発明は、さらに、心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを有するポリヌクレオチドを含むトランスジェニック動物を提供する。

40

【0075】

心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを含有するポリヌクレオチドの発現を変化させる薬剤を同定するための方法であって、

- (a) 発現のための条件下において、試験する薬剤とポリヌクレオチドを接触させる工程であって、前記ポリヌクレオチドが(1)心臓疾患に対する感受性と関連するSNP及び(2)レポーター遺伝子と作動可能に連結されたプロモーター領域を含む、工程；
- (b) 前記薬剤の存在下においてレポーター遺伝子の発現レベルを評価する工程；
- (c) 前記薬剤の非存在下においてレポーター遺伝子の発現レベルを評価する工程；並びに
- (d) 発現が前記薬剤によって変化したことを示す差異について、工程(b)における発

50

現レベルを工程(c)における発現レベルと比較する工程を含む、方法も提供される。

【0076】

本発明は、第二のポリヌクレオチドの一部に少なくとも部分的に相補的である第一のポリヌクレオチドの存在について試料をアッセイするための方法であって、前記第二のポリヌクレオチドが、配列番号1、3、5、7、9、及び/又は10によって特定される配列並びにその相補的な配列からなる群から選択される配列を含み、前記方法が、

a) ハイブリダイゼーションに適切な条件下で前記第二のポリヌクレオチドと前記試料とを接触させる工程；及び

b) ハイブリダイゼーションが前記第一のポリヌクレオチドと前記第二のポリヌクレオチドとの間で生じるか否かを評価する工程、

を含み、ハイブリダイゼーションが生じた場合には、前記第一のポリヌクレオチドが前記試料に存在する、方法も提供する。ハイブリダイゼーションの適切なマーカーは、当該技術分野で既知である。

【0077】

心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを含む第一のポリヌクレオチドの存在について試料をアッセイするための試薬であって、前記ポリヌクレオチドの一部に対して少なくとも部分的に相補的な接触ヌクレオチド配列を含む第二のポリヌクレオチドを含む、試薬も提供する。

【0078】

本発明は、さらに、心臓疾患に対する感受性と関連するSNPを含む第一のポリヌクレオチドの存在について試料をアッセイするための試薬キットであって、

a) 配列番号1、3、5、7、9、及び/又は10によって特定される配列及びその相補的な配列からなる群から選択される配列を含む、1つ又は複数の標識した第二のポリヌクレオチド；及び

b) 前記標識を検出するための試薬

を別々の容器に含む、試薬キットを提供する。

【0079】

個体における心臓疾患に対する感受性を診断するための方法であって、前記疾患と関連するハプロタイプを検出する工程を含み、前記ハプロタイプが本発明のSNP及び少なくとも1つの他のハプロタイプを含む、方法も提供する。好ましくは、前記少なくとも1つの更なるハプロタイプは、MI後の症状、特に心臓疾患とも関連する。

【0080】

好ましくは、前記ハプロタイプの存在を検出する工程は、前記個体に由来する核酸の酵素増幅を含む。好ましくは、前記ハプロタイプの存在を検出する工程は、さらに、電気泳動分析を含む。前記ハプロタイプの存在を検出する工程は、制限断片長多型分析を更に含んでよい。前記ハプロタイプの存在を検出する工程は、配列分析を更に含んでよい。

【0081】

個体における心臓疾患に対する感受性を診断するための方法であって、

a) 前記個体に由来するポリヌクレオチド試料を得る工程；及び

b) ハプロタイプの存在又は非存在について前記ポリヌクレオチドを分析する工程

を含み、前記ハプロタイプの存在が前記心臓疾患に対する感受性に相当する、方法も提供する。

【0082】

(a) 配列番号1、3、5、7、9、及び/又は10によって特定される配列並びにその相補的な配列からなる群から選択される配列内に位置するSNPを含有する遺伝子を同定する工程、並びに(b) リスクを示す対立遺伝子を有する抗体における前記遺伝子の発現を、リスクを示す対立遺伝子を有しない個体における前記遺伝子の発現と、前記遺伝子が前記心臓疾患に対する感受性と関連することを示す差異について比較する工程を含む、心臓疾患に対する感受性と関連する遺伝子を同定するための方法も提供する。

【 0 0 8 3 】

本発明は、(a) 配列番号 1、3、5、7、9、及び / 又は 10 によって特定される配列並びにその相補的な配列からなる群から選択される配列内に位置する S N P を含有するポリヌクレオチドを試験する薬剤と接触させる工程、並びに (b) 前記薬剤が、心臓疾患を治療するために有用であろう様式において前記ポリヌクレオチドに結合するか、前記ポリヌクレオチドを変化させるか、又は前記ポリヌクレオチドに作用するか否かを測定する工程を含む、心臓疾患を治療するために適切な薬剤を同定するための方法をさらに提供する。

【 0 0 8 4 】

心臓疾患を治療するために適切な薬剤を同定するための方法であって、

(a) 配列番号 1、3、5、7、9、及び / 又は 10 によって特定される配列並びにその相補的な配列からなる群から選択される配列内に位置する S N P を含有するポリヌクレオチドによってコードされるか又は配列番号 2 又は 4 のポリペプチドを試験する薬剤と接触させる工程 ; 並びに

(b) 前記薬剤が、前記心臓疾患を治療するために有用であろう様式において前記ポリペプチドに結合するか、前記ポリペプチドを変化させるか、又は前記ポリペプチドに作用するか否かを測定する工程を含む、方法も提供する。

【 0 0 8 5 】

前記方法によって同定される薬剤、治療上有効量で前記薬剤を含有する医薬組成物も提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 6 】

【 図 1 】 アルギニンの位置をハイライトした M M P - 9 のヘモペキシンドメインの三次元構造を示す。

【 図 2 】 同じ (すなわち、対応する) 位置にグルタミンを含有するヒト M M P - 2 ヘモペキシンドメインの三次元構造を示す。

【 図 3 A 】 変異を有しない M M P - 9 の構造の三次元構造予測を示す。

【 図 3 B 】 変異を有する M M P - 9 の構造の三次元構造予測を示す。

【 図 4 A 】 急性 M I 後の患者における血漿 M M P - 9 のレベルと S N P 7 2 7 5 との間の統計的に有意な関係を示す。

【 図 4 B 】 M I の 4 ヶ月後の患者の駆出率と S N P 7 2 7 5 との間の統計的に有意な関係を示す。

【 図 5 A 】 ヒト M M P - 9 の完全なゲノム D N A 配列とアミノ酸配列を示す。ハイライトした部分は、グアニジン (G) からアデニン (A) に変化する際に、アミノ酸配列において太字及び下線でハイライトしたアルギニン (R) からグルタミン (Q) へのアミノ酸変化 (アミノ酸 6 6 8) を誘導するヌクレオチド配列 (エクソン 1 2) の 7 2 6 5 位の S N P である。

【 図 5 B 】 ヒト M M P - 9 の完全なゲノム D N A 配列とアミノ酸配列を示す。ハイライトした部分は、グアニジン (G) からアデニン (A) に変化する際に、アミノ酸配列において太字及び下線でハイライトしたアルギニン (R) からグルタミン (Q) へのアミノ酸変化 (アミノ酸 6 6 8) を誘導するヌクレオチド配列 (エクソン 1 2) の 7 2 6 5 位の S N P である。

【 図 5 C 】 ヒト M M P - 9 の完全なゲノム D N A 配列とアミノ酸配列を示す。ハイライトした部分は、グアニジン (G) からアデニン (A) に変化する際に、アミノ酸配列において太字及び下線でハイライトしたアルギニン (R) からグルタミン (Q) へのアミノ酸変化 (アミノ酸 6 6 8) を誘導するヌクレオチド配列 (エクソン 1 2) の 7 2 6 5 位の S N P である。

【 図 5 D 】 ヒト M M P - 9 の完全なゲノム D N A 配列とアミノ酸配列を示す。ハイライトした部分は、グアニジン (G) からアデニン (A) に変化する際に、アミノ酸配列におい

10

20

30

40

50

て太字及び下線でハイライトしたアルギニン（R）からグルタミン（Q）へのアミノ酸変化（アミノ酸668）を誘導するヌクレオチド配列（エクソン12）の7265位のSNPである。

【発明を実施するための形態】

【0087】

マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）は、心筋細胞外マトリックス分解の原動力である非常に重要な化合物である。最近の研究によって、心臓では、MMPが心室リモデリング及び心不全に寄与していることが明確に実証されている。臨床レベルにおいて、近年他のグループによって確認された本発明者のグループによる研究によって、MMPの血中レベルの上昇はMI後の心不全の発症と関連することが示されている。したがって、MI又はCHFを有する患者におけるMMP、特にMMP-9の測定は、TNF- α 、アンジオテンシンII、又はノルエピネフリンと類似の予後測定を与える。好中球及びマクロファージは、少なくとも部分的には大量のMMP-9の生産によって、心筋障害及び線維症を生じさせる炎症反応において重要な役割を担っている。

10

【0088】

本発明者は、リモデリングの間におけるMMP-9の制御に関わるメカニズムを調査し、MMP-9遺伝子の遺伝的多型がMMP-9の活性を変化させ得るという仮説を検証した。

【0089】

この目的のために、本発明者は、はじめに、好ましい転帰（EF>55%）を有する22人の患者と好ましくない転帰（EF<40%）を有する22人の患者からなる、心筋梗塞を有する44人の患者を選択した。ゲノムDNAを、これらの患者の静脈血から単離した末梢血単核細胞から抽出した。MMP-9遺伝子全体（9kB）の配列を決定した。同時に、MMP-9血漿濃度を、ゼラチンザイモグラフィを用いて測定した。

20

【0090】

本発明者は、2つの患者群の間で有意に異なる5つのSNPを同定した。これらのうち、MMP-9のコード配列の7265位における1つのSNP（SNP7265と称する）は、MMP-9の構造及び活性の改変と強く関係している。このSNPは、TIMP-1がMMP-9と相互作用するのと同じドメインであるMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸組成における変化を誘導する。TIMP-1は、MMP-9の最も重要な天然の抑制因子である。単に当該SNPが存在することは既に知られていた。しかしながら、その臨床的及び治療的重要性は全く認識されていなかった。

30

【0091】

本発明者は、次いで、急性MIを有する患者のより大きな集団（229人の患者）においてSNP7265の重要性を検証した。本発明者は、SNP7265、血漿MMP-9レベル、及び駆出率の間の統計的に有意な関係を明らかにすることができた。変異の存在は、より低い血漿MMP-9レベル及びより高い駆出率と関係するため、MI患者の臨床転帰を改善する。そのため、前記変異は保護的であり、MI後に心不全を発症する可能性を低減させる。

【0092】

したがって、本発明者は、2つの補完的な方法で当該SNPを使用する新規方法を提案する。第一に、心筋梗塞後に心不全を送るリスクを有する患者を同定するための診断及び予後方法として、第二に、MMP-9活性を特異的に阻害する目的の薬剤設計のためのプラットフォームとしての方法を提案する。

40

【0093】

MMP-9に対する本発明者の最初の論文発表は、2006年の2月に為されており（Wagner et al, 上述のもの）、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9（MMP-9）が急性心筋梗塞後の心不全のマーカーであることを示した。しかしながら、本論文では、MI後の心臓疾患に対して保護的であるか又は前記疾患に対する感受性の指標であるSNP又はヌクレオチド若しくはアミノ酸変化については全く言及されていない。

50

【0094】

単なる当該SNP（ここでは、SNP7265と称する）の存在は知られていたが、その機能と関連するものではなかった。それは、SNPが、異なる集団に由来する数百ものヒトのゲノムの配列決定をした複数の研究グループによって多数のSNPと共に同定され（及びSNP ID rs2274756として与えれ）ているためである。これらの個体は、疾患状態と関連していなかったため、2以上の患者の群（例えば、正常vs疾患；又は疾患vs非疾患）の間におけるSNPの頻度の比較は全くされていなかった。すなわち、前記SNPは、ゲノム配列決定プロジェクトの一部として同定され、MI後の心臓疾患の発生と関連するものではなかった。

【0095】

天然のインヒビターであるTissue Inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) に対するMMP-9の結合を改善するための方法、治療上有効量の薬剤を投与する工程を含む末期の心臓疾患と関連する心筋組織の分解を予防するための方法、並びに心筋組織におけるMMP-9の活性を低減させる薬剤を投与する工程を含む鬱血性心不全の症状を示す患者を治療するための方法も提供する。

【0096】

SNPを参照する場合には、明らかにそうではないと示さない限り、ヌクレオチド変化及び結果として生じるアミノ酸変化の双方を包含するものと解されるであろう。

【0097】

一塩基多型又はSNPは、ゲノムにおいて1つのヌクレオチドA、T、C、又はGが、1つの種のメンバーの間（又は個体の一对の染色体の間）で異なる際に生じるDNA配列変化であると一般的に解されている。例えば、異なる個体に由来する2つの配列決定されたDNAフラグメント、AAGCCTAとAAGCTTAは、1つのヌクレオチドにおける差異を含む。この例では、2つの対立遺伝子：C及びTが存在すると称される。

【0098】

本発明では、保護的な対立遺伝子（アデニンを含み、Glnをコードする）及びリスク/感受性を示す対立遺伝子（グアニジンを含む、Argをコードする）の2つの対立遺伝子が存在する。

【0099】

Glnをコードするコドンすべて（CAA又はCAG）が検出される可能性があるとは解されるであろう。代替的又は付加的に、Argをコードするコドンすべて（CGA又はCGG）が検出される可能性がある。任意に、追加のランキングヌクレオチドが、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも20、並びにより好ましくは少なくとも25で検出されても良い。SNPヌクレオチド又はコドンの双方の末端の数は、同じであるか又は異なるものであってよい。

【0100】

SNPは、多数のヒトの疾患の原因であることが認められており、特に薬理遺伝学の分野で興味を持たれている。かくして、薬理遺伝学的研究及び各個体に対する治療及び薬物投与のテイラーメイドも、本発明の範囲に包含される。

【0101】

本発明のSNPは、同一性試験において使用するための遺伝子パターンも提供し得る。

【0102】

検出工程は、タンパク質又はポリヌクレオチド配列を単離する工程、及び1つ又は複数の関連するヌクレオチド又はアミノ酸残基の同一性を測定する。

【0103】

SNPを検出するための適切な方法は、当業者に既知であるが、下記のもの任意のものを含んでよい。本発明は、その様な方法のいずれかに限定されない。

【0104】

適切な方法は、ミスマッチの塩基対の不安定性に由来するDNAの融点における差異を

10

20

30

40

50

利用するダイナミックアレルスペシフィックハイブリダイゼーション法(DASH)を含む、ハイブリダイゼーションに基づく方法を含んでよい。前記方法は、大規模に自動化されてよく、数少ない単純な原理を含むものである。第一の工程では、ゲノム断片を増幅して、ピオチン化プライマーを用いたPCR反応でビーズに結合させる。第二工程では、増幅産物をストレプトアビジンカラムに結合させて、NaOHで洗浄して、非ピオチン化鎖を除去する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを、次いで、二本鎖DNAに結合する際に蛍光を発する分子の存在下で添加する。次いで、 T_m が測定されるまで温度を上昇させながら、強度を測定する。SNPでは、予測される T_m よりも低い。

【0105】

分子ビーコンによるSNP検出は、特別に作製した単鎖オリゴヌクレオチドプローブを利用する。前記オリゴヌクレオチドは、各末端に相補的な配列が存在し、その間にプローブ配列が存在するように設計される。この設計によって、前記プローブがヘアピン又はステムループ構造を天然の単離された状態で呈することを可能にする。前記プローブの一方の末端にフルオロフォアを結合させ、他方の末端に蛍光消光剤を結合させる。前記プローブのステムループ構造のために、フルオロフォアが消光剤に近接し、かくして、前記分子が蛍光を発することを妨げる。前記分子は、プローブ配列のみが、アッセイで使用するゲノムDNAと相補的であるようにも作製される。

【0106】

前記分子ビーコンのプローブ配列がアッセイの間に標的ゲノムDNAと遭遇すると、アニールしてハイブリダイズするであろう。前記プローブ配列の長さのために、前記プローブのヘアピン配列が、より長く、より安定なプローブ-標的ハイブリッドの形成に有利に変性するであろう。この立体構造変化が、フルオロフォア及び消光剤を、ヘアピン構造によるそれらの近接した状態から遊離させ、前記分子が蛍光を発することを可能にするであろう。一方で、前記プローブ配列が1つの非相補的なヌクレオチドのみを有する標的配列と遭遇する場合には、前記分子ビーコンはその天然のヘアピン構造に好適に留まり、傾向は観察されず、フルオロフォアは消光されたままである。

【0107】

これらの分子ビーコンの特有の設計は、単純な診断アッセイによって、所定の位置のSNPを同定することを可能にする。1つの分子ビーコンが野生型の対立遺伝子に適合するように設計され、他の分子ビーコンが前記対立遺伝子の変異体に適合するように設計される場合には、その2つを使用して、個体の遺伝子型を同定し得る。第一のプローブのフルオロフォアの波長のみがアッセイの間で検出される場合には、個体が野生型と同型である。第二のプローブの波長のみが検出される場合には、個体の変異型対立遺伝子と同型である。最後に、双方の波長が検出される場合には、双方の分子ビーコンがそれらの相補的な配列にハイブリダイズしているに違いなく、個体が対立遺伝子とヘテロ接合型の双方を含むに違いない。

【0108】

SNPマイクロアレイも使用されてよい。高密度のオリゴヌクレオチドSNPアレイにおいて、数百数千ものプローブを小さなチップにアレイ化して、多数のSNPによって同時に探索することを可能にし、かくして、本発明に加え、他のリスク因子の検出も可能にする。

【0109】

DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、及びヌクレアーゼを含む酵素に基づく方法は高精度のSNP遺伝子型決定方法であると解されるため、これらの方法を使用してもよい。

【0110】

制限断片長多型(RFLP)は、SNPを検出するための最も単純且つ初期の方法の1つであると解される。SNP-RFLPは、多数の異なる複数の制限エンドヌクレアーゼ及びそれらの特有且つ特異的な制限酵素部位に対する高いアフィニティーを利用する。ゲノム試料に対する消化の実施及びゲルアッセイによる断片長の決定によって、期待される制限酵素部位において酵素が切断したか否かを確認することを可能にする。ゲノム試料を

10

20

30

40

50

切断できないと、同定可能な期待される断片よりも長い断片を生じさせ、制限酵素部位のある点に変異が存在し、ヌクレアーゼ活性に対する保護を与えたことが示される。

【0111】

PCRに基づく方法も想定される。例えば、テトラプライマーARMS-PCRは、2つのペアのプライマーを使用して、1つのPCR反応で2つの対立遺伝子を増幅する。前記プライマーは、2つのプライマーのペアがSNPの位置でオーバーラップするが、各々、存在する可能性があるSNPの1つのみに完全に適合するように設計される。結果として、所定の対立遺伝子がPCR反応に存在する場合には、その対立遺伝子特異的なプライマーのペアは増幅産物を生じさせるが、異なるSNPを有する代替的な対立遺伝子に対しては生じさせない。前記2つのプライマーのペアは、それらのPCR産物がゲル電気泳動によって簡単に識別可能なバンドを生じさせ得る顕著に異なる長さのものであるようにも設計される。

10

【0112】

その結果を試験する際に、ゲノム試料がホモ接合型である場合には、PCR産物はSNPの位置に適合するプライマーから外側の逆の鎖のプライマーまでのもの、並びに2つの逆側の外側のプライマーからのものである。ゲノム試料がヘテロ接合型である場合には、PCR産物は、各対立遺伝子のプライマーからそれらの個々の外側の対応するプライマーまでのもの、並びに2つの逆側の外側のプライマーからのものである。

【0113】

フラップエンドヌクレアーゼ(FEN)は、構造特異的な切断を触媒するエンドヌクレアーゼである。当該切断は、ミスマッチに対する感度がよく、高い特異性をもってSNPを探索するために使用し得る。

20

【0114】

基礎的なインベーターアッセイにおいて、FENによる切断を、切断酵素によって認識される3つの要素からなる構造を標的DNAと共に形成し得る2つの特異的なオリゴヌクレオチドプローブと組み合わせる。第一のプローブは、インベーターオリゴヌクレオチドとも称され、標的DNAの3'末端に相補的である。インベーターオリゴヌクレオチドの最後の塩基は、標的DNAにおけるSNPヌクレオチドとオーバーラップする非適合塩基である。第二のプローブは、標的DNAの5'末端と相補的な対立遺伝子特異的プローブであるが、SNPヌクレオチドの3'末端を過ぎて伸長している。対立遺伝子特異的プローブは、SNPヌクレオチドに対して相補的な塩基を含有するであろう。標的DNAが所望の対立遺伝子を含有する場合には、インベータープローブ及び対立遺伝子特異的プローブは、標的DNAに結合して、3つの成分からなる構造を形成するであろう。この構造は、対立遺伝子特異的プローブの3'末端を切断及び放出する切断酵素によって認識される。標的DNAにおけるSNPヌクレオチドが対立遺伝子特異的プローブに相補的でない場合には、正しい3つの成分からなる構造が形成されず、切断が生じない。インベーターアッセイは、通常、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)システムと組み合わせ、切断を検出する。この設定では、消光剤分子を3'末端に結合させ、フルオロフォアを対立遺伝子特異的プローブの5'末端に結合させる。切断が生じた場合には、フルオロフォアが消光剤分子から分離して、検出可能なシグナルを生じさせるであろう。

30

40

【0115】

ミスマッチのプローブを用いて最小限の切断のみが生じるため、インベーターアッセイは非常に特異的である。しかしながら、その本来の形式では、1つのSNP対立遺伝子のみを反応試料ごとに探索し、現実的な時間内に検出可能なシグナルを生じさせるには大量の標的DNAを必要とした。様々な開発によって、本来のインベーターアッセイが改善された。第二のFEN切断反応を実施することによって、Serial Invasive Signal Amplification Reaction(SISAR)が、双方のSNP対立遺伝子を1回の反応で探索することを可能にした。SISARインベーターアッセイは、より少ないDNAを必要とし、本来のインベーターアッセイの感度を改善している。前記アッセイは、ハイスループットの形式において使用する幾つかの方法にも適合

50

している。1つのプラットフォームでは、対立遺伝子特異的プローブは、マイクロスフェアに固定化している。FENによる切断が検出可能な蛍光シグナルを発生させる際に、前記シグナルはフローサイトメトリーを用いて測定される。フローサイトメトリーの感度は、標的DNAをPCRによって増幅することを必要としない。これらのハイスループットプラットフォームは、原理の証明の段階を超えて進歩しているものではなく、これまでインベーターシステムは大規模なSNP遺伝子型決定プロジェクトで使用されていない。

【0116】

他の適切な方法は、プライマー伸長分析、5'ヌクレアーゼアッセイ（例えば、SNP遺伝子型決定のためのTaqman（登録商標）アッセイ）、オリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ、単鎖構造多型アッセイ、温度勾配ゲル電気泳動（TGGE）、変性高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）、増幅産物全体の高解像度融解、SNPlex（Applied Biosystemsによって市販されている遺伝子型決定プラットフォーム）、又は配列決定による（特にピロシーケンスによる）ものさえ含む。

10

【0117】

用語「SNP」は、個体の集団の間で変化するヒトゲノムの特定の位置における一塩基多型を示す。本明細書で使用するように、SNPは、その名称で特定されるか又は特定の配列内の位置で特定され得る。

【0118】

本明細書で使用するように、本発明の配列番号1、3、5、7、9、及び10によって開示されるヌクレオチド配列は、前記ヌクレオチド配列の相補的な配列も包含する。加えて、本明細書で使用するように、用語「SNP」は一連の対立遺伝子のうちの任意の対立遺伝子を包含する。

20

【0119】

用語「対立遺伝子」は、SNPを特定するヌクレオチドの選択肢のうち特定のヌクレオチドを示す。用語「マイナー対立遺伝子」は、メジャー対立遺伝子よりも個体の集団において低頻度で生じているSNPの対立遺伝子、例えば、本発明の保護的な対立遺伝子（Aを含む）を示す。用語「メジャー対立遺伝子」は、マイナー対立遺伝子よりも個体の集団において高頻度で生じているSNPの対立遺伝子、例えば、本発明のリスクを示す対立遺伝子（Gを含む）を示す。

【0120】

用語「リスクを示す対立遺伝子」は、MI後における心臓疾患に対する感受性と関連する対立遺伝子を示す。用語「ハプロタイプ」は、2以上のSNPに由来する特定の対立遺伝子の組み合わせを示す。

30

【0121】

用語「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドの重合形態を示す。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び/又はそれらのアナログを含んでよい。ポリヌクレオチドは、単鎖、二本鎖、及び三本鎖の分子構造を含む任意の三次元構造を有してよく、既知又は未知の任意の機能を奏してよい。以下：遺伝子又は遺伝子断片、エクソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、低分子干渉核酸分子（siRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、及びプライマーは、ポリヌクレオチドの非限定的な実施態様である。ポリヌクレオチドは、修飾核酸分子、例えば、メチル化核酸分子及び核酸分子アナログも含んでよい。

40

【0122】

「実質的に単離された」又は「単離された」ポリヌクレオチドは、天然では結合している配列から実質的に遊離のものである。実質的に遊離とは、天然で結合している物質から少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%遊離であることを意味する。「単離されたポリヌクレオチド」は、本来又は操作によって、（1）天然で結合しているポリヌクレオチドの全体又は一部と結合していないか、（2）天然

50

で結合しているもの以外のポリヌクレオチドに結合しているか、又は(3)天然には存在しない組換えポリヌクレオチドも含む。

【0123】

用語「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は98%の同一性のヌクレオチド配列が、典型的に互いにハイブリダイズした状態を保つハイブリダイゼーション及び洗浄の条件について説明することを意図する。そのようなストリンジェントな条件は当業者に既知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y (1989), 6.3.1~6.3.6.において認められる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定例は、約45で6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でハイブリダイズして、50~65で0.2×SSC、0.1%SDSにおいて一回以上洗浄することである。

10

【0124】

特定の配列、アミノ酸、又はヌクレオチドを参照する場合には、明らかにそうではない場合を除き、好ましくは、前記参照配列に対して少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.5%、更に好ましくは少なくとも99.9%の同一性を含むと解される。これを規定するための適切な方法はBLASTプログラムを含む。

20

【0125】

用語「ベクター」は、挿入DNAを有することが可能であり、且つ、宿主細胞内で留まることが可能なDNA分子を示す。用語「ベクター」は、細胞に核酸分子を挿入するために主に機能するベクター、核酸の複製のために主に機能する複製ベクター、並びにDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターを含む。上記の機能の2つ以上を提供するベクターも含まれる。

【0126】

「宿主細胞」は、ベクターの受容体となり得る又は受容体となっている細胞又は細胞培養物或いは核酸分子及び/又はタンパク質を組み込むための細胞又は細胞培養物を含む。宿主細胞は単独の宿主細胞の子孫を含み、前記子孫は、天然、偶発的、又は故意的な変異により本来の親と完全に(形態又はDNA相補性全体において)同一である必要はなくてよい。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトされた細胞を含む。「単離された宿主細胞」は、その由来とする生物から物理的に分離されているものである。

30

【0127】

用語「個体」、「宿主」、及び「対象」は、本明細書で互換的に使用されており、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを示す。

【0128】

用語「形質転換」、「トランスフェクト」、及び「遺伝子形質転換」は、本明細書で互換的に使用されており、挿入に使用する方法、例えば、リポフェクション、形質導入、感染、エレクトロポレーション、CaP4沈殿、DEAE-デキストラン、粒子、照射などにかかわらず、外来性のポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入又は導入することを示す。外来性のポリヌクレオチドは、インテグレートされないベクター、例えば、プラスミドとして維持されてよく、代替的には、宿主細胞のゲノムにインテグレートしてよい。遺伝子形質転換は、一過性又は安定的なものであってよい。

40

【0129】

本発明は、他に示さない限り、当該技術分野の技術のうちである分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来技術を利用する。

【0130】

50

本明細書で使用するように、任意の用語の単数形は代替的には複数形を包含してよく、その逆であってもよい。本明細書に記載した全ての文献及び参照例は、任意の目的のためのその全体を参照することによって本明細書に取り込まれる。

【0131】

本発明を、以下の非限定的な実施例と関連して説明する。

【実施例】

【0132】

患者及び方法

心室リモデリングの背景において関連するSNPを検出する可能性を高めるために、本発明者は、心筋梗塞後に「極端な」フェノタイプを有する患者の2つの群、すなわち、心筋梗塞後に非常に良好に経過している患者（EF > 55%、平均60%）及び不良な経過を示す患者（EF < 40%、平均29%）を選択した。各群に22人の患者が含まれた。

10

【0133】

ゲノムDNAを、フィコール分離後の末梢血単核細胞から抽出した。抽出は、FlexiGene DNA kit (Qiagen) を用いて製造業者の説明書に従って実施した。DNAの量及び質は、Nanodrop分光光度計を用いて評価した。DNAの完全性は、アガロースゲル電気泳動によって評価した。

【0134】

患者のフェノタイプを知ること無く、プロモーター、コード配列、及び非翻訳領域を含む完全なMMP-9遺伝子(9kb)を、全ての患者において配列決定した。

20

【0135】

MMP-9の血漿レベルを、ゼラチンザイモグラフィーによって測定した。

【0136】

図1を参照すると、アルギニンの位置が(点線で囲って)ハイライトされたMMP-9のヘモペキシンドメインが認められる。その正味の正電荷は、MMP-9/TIMP-1相互作用に関与するはずである。アルギニンが負電荷アミノ酸であるグルタミンに置き換わる推定上の修飾が予測される。

【0137】

図2に示すように、ヒトMMP-2ヘモペキシンドメインは、同じ位置にグルタミンを含む。三次元構造は、当該アミノ酸(点線で囲っている)がインヒビターとの相互作用に関与する可能性があることを示している。

30

【0138】

MAGOSソフトウェアを用いたMMP-9の構造の予測を図3A及び3Bに示す。(明るい色で丸い印をつけて)ハイライトしたところは、正に荷電したアミノ酸である。

【0139】

本発明者は、SNPがグルタミン(図3B)からアルギニン(図3A)にアミノ酸を変化させる際に、タンパク質の電荷における変化を明示している。

【0140】

SNP7265の存在を検出するための追加の遺伝子型決定実験を、ルクセンブルグ急性心筋梗塞(LUCKY)登録に由来するより大きな集団に対して実施した。当該登録は、地域の倫理委員会及びデータプロテクション委員会によって認められている。229人の患者を、Taqman(登録商標)技術及び以下のプローブ: GACACGCACGACGTCCTTCCAGTACC[A/G]AGGTGAGGGCTGAGGAGGATCCCTT(26位にAを含む配列番号9及び26位にGを含む配列番号10)を用いて遺伝子型を決定した。

40

【0141】

全ての患者は、(酵素免疫測定吸着法(ELISA)によって測定した)MMP-9の血漿レベルを記録し、125人の患者は、(心エコー検査法によって測定される)MIの4ヵ月後の駆出率を記録した。

【0142】

50

結果

1. MMP-9の血漿レベルは、低いEFの群では660ピクセル²であり、高いEFの群では437ピクセル²であった。これは、MMP-9が心筋梗塞後のEFの予測因子であることを示した本発明者の過去の研究に従うものである。

【0143】

2. 双方の群の間で異なる頻度を有する5つのSNPが同定された。これらのうち、1つのSNPは、コード領域の7265位に位置し、アルギニンからグルタミンへのアミノ酸変化を誘導するグアニジンからアデニンへのヌクレオチド変化を有する既知のSNP (rs227456)であった。この変化は、低いEFの群の2人の患者に存在し、高いEFの群の6人の患者に存在していた。A/Gヘテロ接合型の患者における平均のMMP-9のレベルは、215ピクセル²であり、それと比較してホモ接合型のG/G患者では675ピクセル²であった (p = 0.004)。前記アミノ酸変化は、したがって、より低いMMP-9レベル及びより良好なMI後の臨床転帰と関連している (60%の6人のEF患者 vs 35%の2人のEF患者)。

【0144】

3. 急性MIを有する患者に対する遺伝子型決定実験は、一方でSNP7265の存在とMMP-9血漿レベルとの間、他方でSNP7265と駆出率との間の統計的に有意な関係を明らかにした。血漿MMP-9についての平均値は、非変異患者において562.41 ng/mL (n = 176)であり、変異患者において440.55 ng/mL (n = 0.03)であった (P = 0.03)。図4A参照のこと。これは、SNP7265の存在が、より低い血漿MMP-9レベルと関連することを示す。駆出率の平均値は、非変異患者で48.65% (n = 93)であり、変異患者で52.23% (n = 32)であった (P = 0.04)。図4B参照のこと。これは、SNP7265の存在が、より高い駆出率、したがってMI後のより良好な臨床転帰と関連することを示す。

【0145】

コラーゲン線維だけでなくMMP-9の主要なインヒビターであるTissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1)に対する結合に關与する、MMP-9のヘモペキシンドメインにおけるその戦略的な位置 (図面参照のこと)により、このSNPは、心室リモデリング及び心不全の発症において重要な役割を担っている可能性が高い。

【0146】

配列表の簡単な説明

配列番号1: 保護的な群に由来するMMP-9のDNA配列-7265位がアデニン (A);

配列番号2: 保護的な群に由来するMMP-9のアミノ酸配列-668位がGln (G);

配列番号3: リスク (感受性) を示す群に由来するMMP-9のDNA配列-7265位がグアニジン (G);

配列番号4: リスク (感受性) を示す群に由来するMMP-9のアミノ酸配列-668位がArg (R);

配列番号5: 保護的な群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのDNA配列-443位がアデニン (A);

配列番号6: 保護的な群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸配列-148位がGln (Q);

配列番号7: リスク (感受性) を示す群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのDNA配列-443位がグアニジン (G);

配列番号8: リスク (感受性) を示す群に由来するMMP-9のヘモペキシンドメインのアミノ酸配列-148位がアルギニン (R);

配列番号9: 26位にAを含むプローブ;

配列番号10: 26位にGを含むプローブ。

10

20

30

40

50

【 図 1 】



Fig. 1

【 図 2 】

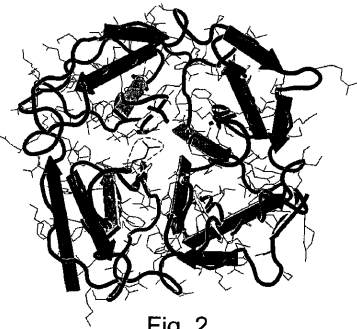


Fig. 2

【 図 3 A 】



Fig. 3A

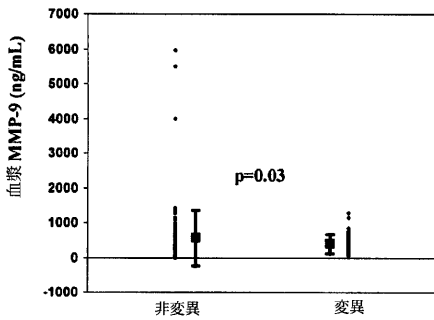
【 図 3 B 】



Fig. 3B

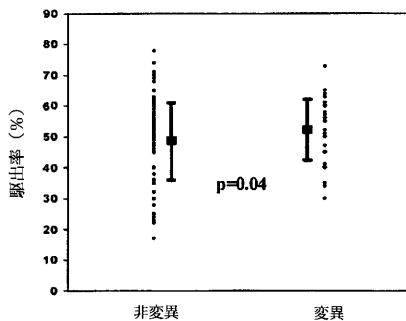
【 図 4 A 】

A



【 図 4 B 】

B



【 図 5 A 】

ゲノムDNA配列

```

5  taatccttagcactttgggagccagggtgggcagatcaacttgagtcagaagttcgaaacca
gcctggtcscagtagtgaaccaccatctctactaataaatacaaaaaatttagccaggcgt
9  ggtggcgcaCgcctataataccagctactcgggagcctagggcaggagaattgcttgaac
cgggagggcagatgcttgccagtgagccgagatcaaccgactgcactccagcctgggtgaca
13  gagtgaactactaccaccccccaataaaaataaataaataaacacactcttgagtgct
tagcaggtttttcccaaataggccttgaagaaggtagaataagaccctgcccagtgccg
17  gctggctaggagaagaagagtgaggggagctgctggtgctgggaggtctgggaggaggact
tggcataagtgtgataattggggctggagatttggctgcatggagcaggcctggagaact
21  gaagggctcctatagattatctcccccatactcgtcccaatttgcagtgagaagatc
ctagctgacaaaggggagggctttactccaggttacaactgcagcttagagcccataca
25  cctggtttgggtattcccaagttagaatcattggtcttttggcaggtctcagctctgttgc
caggctggagtcagtgacaataatcattggtcactgtatc

cctgcaacttc tttctgggt caagcaatcc tcccactcctg gctcccacaa
9  gtgctaagat tacgggaatg agccaccata cctggccctg aatctgggt
cctggccctta gtaattaaaa ccaatcaaca ccatccttg cggacttaca
13  acctacagtg tcttaaacat tttatattgt tgatctcatt taactctcac
atcaatttag ggacaaagag cccccacc ccggttttt ttttacagc
17  tgaggaaaca cttcaaatg gtaagcatt tgcccagggt cctgaaggaa
gagagtaag ccatgtctgc tgtttcttag aggctgctac tctccccttt
21  actgcccctga agattcagcc tgcggaagac agggggttgc cccagtggaa
ttcccagcc ttgectagga gagccactc ctccgccc cagataagc
25  agggagagga agctgagtca aagaagctg tcaaggaggg aaaaagggc
cagagcctg agtggtggga ggggtttggg gaggatcat gacctggggc
29  ggggtgttgc aaaaagccaa gpatgggcca ggggatcat tagttcaga
aagaagcttc agggagtctt ccatcaactt cctctggctg accactggag
33  gctttcagac caagggatgg ggaatctctc cagcttcact cctctccctc
cctttcaac agttcccaac agctctgcaag ttgcaaac cctaccctc
37  cctgagggc ctgaggttcc ctgaggtct ggggttttgc ctgacttggc
agtggagct cggggcagtg gagagagag gaggtgtgt aagcccttc
41  tcatgctgt gctgccacac acacacacac acacacacac acacacacac
acacacacac accctgacc ctgagtcagc acttgctgt caaggagggg
45  tggggtcaca gtagcgcctc cttaaagccc ccacaacagc agtgcagtc

agacacctct gccctcaaca TGAGCCTCTG GCAGCCCTCG GTCCCTGGTC エクソン1
9  TCTTGTCCT GGGCTCTGCT TTTGCTCCC CAGACAGCG CAGTCCACC
CTGTGCTCT TCCTGGAGA CCTGAGACC AATCTCCG ACAGCCGCT
13  GGAGAGGTG GGCAACACC TAGCTAGAG TTGGGGAGG CTGTCCGTGA
GGGTGTTGAG TGTCCAGAG AGGATGAGG GCCTCAGAG AGATGCTTTA
17  GGGGTGTTG GTTGGTATG GCGTATCTG AAGAACAAG GTGTCCAGGG
TTAGCAGTG GGGGTCTTG TGAAGCTTT GAGCAGTAT GCCCAGAAAT
21  GGCATGAGC GCTTCTTAG GGTAAATCA GCAATGTTT TGGGTGGCG
GAGGCATTG AGGGTCTTG GTTAAGCATA GGCTGGAGT GAACAGGGGC
25  AAACCTTATG CAGCTGTGG GTAGAAATGG GCTAGAGCCA TCCAGGGTG
AGAAGGAGCT GAGGATGCT AAGGAGGGGA GATCCCTGG TGCTCAGAAA
29  CCACTGGTCT CTGGAAGCA TTTAATGCT TATTAATGT TAGCCCTGCG
TGGCATGAC GCTTCACTT TPTAATCCA GCACTTGGT AGCTGAGGT
33  GGTAGATCG CTGAAGTCA GNACTTTCAG CCACTGCTAG GCACATATG
AAGATCTGT CTCTACAAA AAATTAAGA AATAGCCAG CACATGATG
37  TGACCCTGTA GTTCCAGTA TGCAGAAGC TGAGATGGA GGATCGCTT
AGTCCAGGAG GTCCAGGCTC CAGTGGCTG ATACCTCTC TCCGAAAAAG
41  AAAAAGAAA AAGACTTCTT CCATGATGT CTGGAGGGG TCCCTTGGCC
CCAGTGGCG AGAGAAAGG CTCAGATATC TGCCATGCT GTTCCCTTC
45  ATCCACAGA ATACCTGTAC CGCTATGGT ACACCTGGT GGCAGAGAT エクソン2
49  CGTGGAGAT CGAAATCTCT GGGGCTTGG CTGCTGCTC TCCAGAAGCA
ACTGTCCCTG CCGGAGACC GTAGCTGGA TAGGCCAAG CTGAAGGCCA
53  TCCGAACCCC ACGTTCGGG GTCCAGACC TGGGCAGAT CCMAACCTTT
GAGGCCGACC TCAAGTGC CACACACAC ATCACTATT GTGAGCCCG
57  GGCCGTGGG GCAGCGGGT GGGCGGGGA GGCCAGTCT GGTCTTGGG
61  CCAGCGTGA ACATGTCTG TCTTGAAGC GTCCCTGGT TTCATATTT

```

【 図 5 B 】

AATGTGTGGC CCTTGGGGAG TGTCCCAACC TCTGAGCCTC TGTTCCTCT
 TCAGGGAATT GGCTCTTGCA ATCCAAGTTC TCCCTCGAGG GCCATTGTGA
 GGCTCTAAGT AGACAAAAAA AAAAAAATAA AAAACAGTCT GGAAGCAATT
 TATGATGAGC AGCGGGAGCG CCAGAGAGCA TTGTGTATGT TGAAGTCTCT
 GCRTATGAGG GCTCTCCCTCG TCCCGGCTCC GAGCTTTCGA CTCTGCACT
 CCTTCTCTTG GCTCTTACCG TACAGAGTCC AAACACTCTC GGAAGACTTG エクソン 3
 CCGCGGGGGG TGATTGACGA CCACTTTGGC CGCGCTTCCG CACTGTGGAG
 CCGGTGTAGC CCGCTCACTT TCACCTCGCT GACACAGCGG GAGCGAGACA
 TCGTCAATCCA GTTTGGTGTG CGGGGTGAGA ACGTGGAGAG GGAATAATCCA インtron 3
 AGAGACTTGG GCGGGGTCTAG GGAAGGGAGG ACCACGGAGA CCGTGGAGCG
 AGAGTGTGCG CCGGTCTCTT CTCCGCTGCC CGCGATTCGA TCGCTTATAC
 GGCCTCTCTT GCCAGACACT GCACAGGGCC AGCGCCGACG GCTGGGAGAG
 CTTCGGCGCA GCGGGATTTC AGCCCGCACT TATTTTGGAG CCTTGCCTTT
 GGGCAGCGCA CAATCTGCGC AGCACTACTC GCGTCACTCT CTCTCTCTCG
 ACCTGTTTCT TCGAGAGCAG GAGACGGGTA TCCCTTCGAC CCGTGGAGCG エクソン 4
 GCTCTCTCTT ACACCCCTTT CCGCTTGGCC GCGGATTCGA TCGCTTATAC
 CATTTGCGAG ATGACAGAGT GTGGTCTCTG GCGAAGGGCG TCGTGTGAGT インtron 4
 TCTGAGTCTT CCTGGCCCTT GATTCCTCTT ATTCTCTCC CACTACACCC
 CGCCGCGCTA ACTCCGCTCC CCGCTCTCTC TCGAGTGGTT CCAACTGGT エクソン 5
 TTGGAAGCGC AGATGGCGCG GCGTGGCACT TCCCTTCAT CTTCGAGGCG
 CGCTCTCTCT TCGATGAGC CACCGACAGT GCGTCTGAGG GCTTGGCTGT
 GTGCATACC ACGGCCAACT AGCAACGCA GACCGGGTTT GGTCTCTGCC
 CCAGCGAGAG TGAGTGGGGG GCGTGGCGCA GGGTGGGGG CGCCACACC インtron 5
 CCTTGTAGT CCTTGGTCTT AATTCAGCTC TCGCCACTAT TCGCTGTGGT
 CTTGCAATTC ACCCTTCCCG AGCTTGGGCG CAATTTTCTC ATCTGAGAAA
 TCGTGGAGTA TCGGATGAC TCGACACCAT CCAATGGTCA AAGACAGGA
 CACACTTGGG GGTATATAAT TCGTGTCTCC GCTTCTCCG CCTTCCACAC
 ATCTCTCTCT CCCCAGGACT GACGCGCAAG GCGGCGAATG CTGATGGGAA エクソン 6
 ACCCTGCGAG TTTCATATCA TCTTCAAGG CCAATCTCAT TCGCGTCA
 CCAGCGAGCG TCGCTCCGAG GCGTACGCGT GGTGGCCAC CACCGCCAC
 TAGCGCCGCG ACAAGCTCTT CCGCTTCTCG CCGAGCGAG GACCTCCAC
 CCGTCTTACC AGGTTCAGCG CCGCCCTCTC ATCAATGAT GCGCCCAAA インtron 6
 AGCGGCTCT TCCCTCCCAT CAGTTCCTCT ATTCACTCTC AATGGTCTCT
 AGGACGAGCG TGACTCTGCC CACTCACAC ACATTTCCAC CACTATCCCT
 GACTTCCAAAT GCGCCCGCCG CAGCCACTAA GGTTCGGCTT TTTCTGCCA
 GCTGGCGCCG TCTTCTTGG TCTGTGTCTC CAGCGACCG CCACGGCTCT
 ACCCTCTCTT CAGAGAGTCT CTACAGCCCG CCTTAGGCCA CCAAGATTGT
 TTAGCTCTCT GTCGACTCTT CCGTACTCTC CTATGAGAC TCACTCATCT
 GGCTCATCCA AGGCTTGGG TCTCTCAGC TGACTTGAGG GTATGGGGG エクソン 7
 GCAACTCGCG GGGGAGACTG TCGCTTCTC TCTTCACTTT CCGTGGTAAG
 GAGTACTTGA CCGTACCCAG ACAGCGCCCG GAGATGGGG CCGCTTGGT
 CCGTACCGC TCGAACTTGG CACCGACAAA AAGTGGGGG TCTCGCCCG
 ACCAAGGTAG CCGTGGTCCG GCGCTTCCG GCGTGGGCTT CCGCGAGAG インtron 7
 GTGGGTGGG GGTGGCCAGG CCGTGGGGCT CCGCCCGCG CACACTCTC
 AGGCTCCCTC TCCCTCCAGG ATACGTTTGT TCCCTGTGG GCGCGCATGA エクソン 8
 GTTGGGCCAC GCGCTGGGCT TAGATATCTC CTACGTGCC GAGCGCATCA
 TGTGATATA GAGACTCTAG AGAGATAG GTGTGACTC AAAAGCGAT
 CTACTCTGG CATGTGTGCT CAGCCCTCTA ATCCAGGCA TTTGGGAGAC
 CCAAGCGGG AGGATGCTT AAGCCAGGA GTTCCAGACC AGCTCGGCA
 ACATAGCCAG ACTCCCATCT CTAACAAAAA TAAATGAGCA AGCGTGAAG
 GCACATGCT GTAGTCTTAG TACTCTGGA GCGTGAAGT GAGGATCTC
 TTAGAGCGA TCGGCGACT CTATGTTGCA TATGATGTC AACATGAT
 TCCACTCTGG CCAATAGAGG ATSTGCTCTA AAGCAAAA GAGAGAGAG
 AAAGTCTGT GTTATGGGAA GGGAGCTGA GAGGAGGGG GCGTGTGTC
 CAGAGGAGCG TTAAGTGA GACTAGGG AGCAGATTT CTAGGGGTAC
 AGAGGTATCG AGGAATGGA AGAGTCTCAC CCGTGTCTC TTTTATGCTC エクソン 9
 CCGCCCTGA ACCTGGGCA CCGCTCCCA CCACACCAC ACCCGGCCG
 AGCCCTCCG CCGACGGA CCGCAACTCA CCGCACTCT CCGCCACAG
 AGAGCGCCG ACAGTGGCC CCAAGCTCTT CCGCTGACT GCGCCACAG
 GTCGCCCCAC TGTGSCCTC TGTAGGCCA CTACTGTCC TTTGAGTCCG

【 図 5 C 】

GTGACGATG CCTGCAAGCT GAACATCTTC GACGCCATCG CGGAGATTGG インtron 9
 GAACACAGCT TATTTGTATCA AGGATGGGTG AGGAGGGGG GTTGTGTGGA
 TCGGGGAGGG GGCTTTGGGG AGGGGTGCG CGCCCTTCC CGCCACTGG
 CCTTGTGTC AAGGCTTAGA GCGCTCTCT TCCCTCTCG CTCTCTCAGG エクソン 10
 AAGTACTGG GATTCCTGTA GCGCAGGGG AGCCGCGCG AGGCGCCCTT
 CCTATATCCC GACAAATGCG CCGCTGTC CCGCAAGCTG GATCTGGT
 TTGAGGAGCG GCTCTCCAAG AAGCTTTCTT TCTTCTCTG TTAGTAACT インtron 10
 ACTTTCCCTC CCGCGCGCG TCAATCCCA CTAAGTCAAG AAGTCAAGG
 GACCATCGAT AACCCAGAA AGTCTTGTG CGTTTAGAA AATAGCCCCC
 CCTGGCGGAC GCAATTTAGC AAACGTAGGG GCGGCTAGT TCTCCAGCCC
 TCTTCTCAC GCGCTTGGT GCTCTTACC GCGCAGGCG GCGCCACTGG
 CAGGGAGCT GCGGCGCGG GCGTAGAAA GCGTGGGAG CCCTCTGGTT
 CCTGGGCTC TAGAGTACG TGCTCTCTT GCGCCCAA ACACAGTGA エクソン 11
 CCTCTCTCC CTGACGGCG CAGGTGTGG GTGTACACAG GCGGTGGT
 GCGTGGCCGG AGGCTCTGG ACAAGTGGG CCTGGGAGCC AGCTTGAAGC
 AGTATACCG GCGCTCTCG AGTGGAGGG GGAAGATGCT GCTGTCTCAG
 GCGCGCGCG TCTGGAGTG AGCGCCCG GCGCAGGCG CCGCTGGT
 CCGCGCGCG TCGTCTCTC GCGTACGCG CTAAGACTT CCGCTCTGG インtron 11
 GCGCTCGCG CAGTCTGAC GTGAAGCGG AGATGTGTA TCCCGCGAGC エクソン 12
 CCGAGGAGG TGGACCGAT TTCCCGCG GTGCTTTGA ACACGACGA
 CCGTCTCCAG TACC^{G/A}AGGTG AGGGCTGAGG AGGATCCCTT CCGTGGACAC Intron 12
 CACACTAAG TCTCTTAGT GACTGGTCAA ATTCGAGCG AGGAAGAAAA
 AGCCCTTGA AATGAAACA AATGCCCGG CACAGACAG AATCCAGAGC
 AGGCAGAGCG CTCTCCAGG TCAATTAGA AGTCAAGGAT GCAACAGAA
 CCAGACCCA GATTTCTCG CTCCCGGCT GAAAGCTCT TCTCTCTAG
 TACAGAGCG CAGGTGGTGT GTATGGAAG CCGCTTATTA GACACAGATC
 ATCAGTCTC GATAAGTGC CAGCACTCT GCTACAGAGC GAGATAGAC
 AATCACAGC TCTGTGACT TGGCAAGCT ACTGCTCTC TACTCTGTA
 GCTCAGTCT CCGCATGCT AATATGGGA CTAATAGCTG AATTAACAT
 GACTCCCTT TCTTACCAGT CACATCCAAA CAGTGAACA AGTGAACAAG
 ATTTCTGCG ACCAAAATCT TTTTCAAGT AGTCAATTTT TTTGCCATCT
 TCTTATAAA CACCCAGCC CAACATAC TGGCTTCCA GACCTCTTA
 CAAATTTCCAT GAGATTAGG AGGGGTAGG GCGTGAAGG AATGTCTCT
 GGATGACCC CAGATGAAAT CCAAGTCAA AAAAAATAG AGGATCTGAC
 ACTCCACCOC CGTGTCTCA TCTCTTCCA CTTCCCTGT TATTACTCT
 GCTCCACCA CACTGGCTGC TCTTTGAAA GATCAAGCT ATTCCTAGCT
 TACAGCTTT GTCCAGTTC TTCCCTCTGT TTTTCTCTG CTGCGTCCAG
 ATTCCTCTG GGCATCCA CCGCTCTCT TCGAGTTCA GCTCTAAGC
 CATTCCTCA ATGAGCGCTT CTTTAGTCT TATTACTCT TACTTGTCT
 TTAITTTCT CATAGCTTTC TATATTTCT TTTTCTCT TTTTCTCT
 TTTTTTTT TAGATGGAG TCTTGTCTG TCGCCAGCG TGGATGAGT
 TGGCAGATC TTAGCTACT GCAACCTCG CCGCCCGGT TCAAGCAT
 CTCTGCTCT AGCTCCAAA GTAGTGGGA TTAGAGTGC CTGCGACC
 CTTTGTCTA TTTTGTAT TTTTGTAT TTTTGTAT TTTTGTAT
 GCGCGAGCTG GTTGTGACT CTTGAGCTC CTGAGCTC TACTGACT
 CCAAAAGTGC TGGATTACA GGCATGAGC AGCCACCCA CCGCTTCT
 ATATTTTCAA AACCAATCT ATTTATTTT AGTITGCTT AATGTCTCT
 TGCCTACTA GAGTGAAG ACCAAGATA TTAGATCAT GCGCTCAT
 TTTCTCTTA TCCCGATAT CTGAGAAA GCAATAGTA GATGCTAGT
 AATGATGTA TGAAGATTT TTTTCAATA ATGAGGTTT AATGATTT
 TCTGACTAT AAGATAGTT GCTATATAT TTTTATTTT ATTCATAA
 TGTATAGTT GTACTACTG TGTCTAGCG CTTGTCGAG TCTTGGCG
 ACTGAGTCT GTGCCCTCA GCATCTACA GAACCTACA GCACTTACA
 GGTGGGGGG ATGAGGTTA TATGTGAAA CTTAGAAA TTTAGAAAT
 GCGAGAGAG ATGTTGTCA AGATTTGTT CTAATTTCT TATATTTGG
 AAGATGAA TCACTCTCT TATGCTCTG CTAATTTCT GCTCTCTG
 TATTTCTGG AGGACCGCT CTACTGGCG GTAGTCTCC GAGTGAAT エクソン 13
 GAACAGGTG GACCAAGTG GCTAGTAC CTAATGACT CTGCACTCC
 CTGAGGACT Gggctccgt cctgcttgg cagtgccatg taactccca
 ctgggaccaa ccttggggaa gggccagtt tggcgatca aaactggat
 tctgtcttgg aggaaggaga ggggtggg tgggtctcc cctctctct
 cactcttgt tttgttgg ggtttctaa taacttgg taacttaac

【 図 5 D 】

ttt
 agaagcagac tttatttata tatgatgca cgtatgtatg catgtatgta
 ttttaactgat agagtgcasa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa acaataaact
 gatagagtgcc tttctactcgt ccagaagaatg tctatggccc ggcacggtag
 ctaactccta gcaacttggg aggcgaagc agcgagatca cgaagtcagg
 agattgagac caactcggct acgcgagag aacccttct ctactaaaa
 aaaaatgaa aaaaatgacc gggcgtgtgt gggggccct gtagtccagc
 ctaacttggg ggcctgagca ggaagaatgg ttgaacctgg gaggtaggag
 ttgcaagtgg ccagatcac gccactgca cccagcctgg gaggtaggag
 ttgcaagtgg ccagatcac gccactgca cccagcctgg gtagtggagc
 abactcgl ctcaaaaa aaaaaaacg tccagcctgg gtagtggagc
 tgtaacata ttaactcatt cctgttagg tgtcttaggc acttggtaa
 tattttacag tcaaggaat gatcaactg tttattcatt catcaaacat
 ttattgacc cctacatgga gccagccct gtagtgggca atgggatag
 agaaatgagt tagactttag aatgcataag attcccctg gaacttgc
 aaaaatgacc tccagcctcc accctcagag agtctgacct attcaaaag
 gtagtctat ggcctgggag ggtggatca cacttggg gtagtggag
 catgatcttt tatttcaaa taatgtgtgt tgtgtgtgca catgtgtgt
 tgtctgtgt gtagtggag tccaggaagc tttctcagtc aagatgacat
 ctgaaccgga actgaatcag aaagatgaa cgaactctt cctgtgcaag
 ggaactcct ctacagggat aatttaccag gaacctaa acctaasaat

アミノ酸配列
 1 MSLWQPLVIV LVLGQCFPA PRQRQSTLVL FPDRLRNLIT DRQLAEVLY RVGYTRVAEM
 61 RGEKSLGPA LLLLQKLSL PETGELDSAT LKAMRTPRCG VPDLRGPFV EDDLKWHHHN
 121 ITYWIQNYSE DLPRAVIDDA FARAFALWSA VPLFTFRVY SRDADIVIOF GVAEHGQYVP
 181 FDKDGLLHA FPPGPGIQG DAHFDDDELW SLGKGVVPT RFGNADGAAC HFFIFPEGRS
 241 YSACTDGRS DGLFWCSTPA NYMDDRFQF CPSERLYTD GNADKPCQF PFIFQGSYS
 301 ACTDGRSDO YKCAATANY DRDLKLFQCF TRADSVFWG NSAGELCVFP PFIKLEYSTP
 361 CTSEGRGDR LWCAATSNFD SKDKWGFCD QYSLFLVA HFGSLGLD HSSVPEALY
 421 PMYRFTGEP LHKDDVNGIR HLYGPRPEPE FRPPTTTPQ PTAAPTVCPT GPPTVHFSR
 481 PTAGTGPSP AGPTGPTAG PSTATTVELS PVDACNVNI FDAIAEIQNY LYLFDKQYV
 541 RFESEGRSR QGFPLIADRW PALPKLDSV FEERLSKLF FFSGRQWVY TGA5VLGPRR
 611 THDVFQYR/QEK AYFCQDRFYV RVSSRSELNQ VDQVGYVTD ILQCPED

【配列表】

2010515467000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/000657
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG B ET AL: "Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1." HUMAN GENETICS NOV 1999, vol. 105, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 418-423, XP002482698 ISSN: 0340-6717 abstract; figure 1; table 2	1-12, 14-21
X	page 422, column 2, line 10 - line 15 the whole document	22-25
Y	WO 99/57315 A (ISIS INNOVATION [GB]; ZHANG BAI PING [GB]; YE SHU [GB]; HENNEY ADRIANO) 11 November 1999 (1999-11-11) abstract	1-12, 14-21
X	figure 2	22-25
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as-specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 June 2008		Date of mailing of the international search report 17/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Werner, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2008/000657

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004 275007 A (NAT CARDIOVASCULAR CT; IYAKUHIN FUKUSAYOU HIGAI KYUUS) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document	1-12, 14-21
X	paragraph [0029] paragraph [0063] - paragraph [0065]	22-25
X	WO 2005/017113 A (LOVELACE RESPIRATORY RES INST [US]; TESFAIGZI YOHANNES. [US]; BELINSKY) 24 February 2005 (2005-02-24) abstract page 35; example 10	22-25
P, X	HLATKY MA ET AL: "Matrix metalloproteinase circulating levels, genetic polymorphisms, and susceptibility to acute myocardial infarction among patients with coronary artery disease" AMERICAN HEART JOURNAL, MOSBY- YEAR BOOK INC., ST. LOUIS, MO, US, vol. 154, no. 6, 21 November 2007 (2007-11-21), pages 1043-1051, XP022347598 ISSN: 0002-8703 the whole document	1-12, 14-25
A	KREX DIETMAR ET AL: "Matrix metalloproteinase-9 coding sequence single-nucleotide polymorphisms in caucasians with intracranial aneurysms." NEUROSURGERY JUL 2004, vol. 55, no. 1, July 2004 (2004-07), pages 207-212; dis, XP009101028 ISSN: 0148-396X abstract; tables 1,2	1-12, 14-25
A	CHEN ET AL: "A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 9 gene (-8202A/G) is associated with thoracic aortic aneurysms and thoracic aortic dissection" JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY, MOSBY-YEAR BOOK, INC., ST. LOUIS, MO, US, vol. 131, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 1045-1052, XP005407064 ISSN: 0022-5223 the whole document	1-12, 14-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/000657**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 13 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 13 (in full), 1, 22-25 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2008 /000657

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 13 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 13 (in full), 1, 22-25 (in part)

The alleged method of treatment of claim 13 relates in fact to a prognostic method correlating a SNP with lower MMP-9 levels and better clinical outcome, without providing any concrete therapeutic compound or medical treatment. This lack of clarity and support (Art. 6 PCT) is to such an extent that said claim could not be searched and examined.

Present claims 1 and 22-25 encompass compounds defined only by a result to be achieved, namely identifying a SNP in the hemopexin domain of MMP-9 which is indicative of susceptibility to a heart condition. This kind of definition is contrary to the requirements of clarity of Art. 6 PCT, because it does not allow the scope of the claims to be ascertained. The fact that any SNP could be identified by screening does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether a given SNP would indeed be indicative of susceptibility, except for the particular A/G SNP disclosed in the description and further claims. Undue experimentation would be required to screen at random. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent that the search of claims 1 and 22-25 was restricted to the particular A/G SNP in the hemopexin domain of MMP-9 that the applicant has identified as being associated with susceptibility.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/000657

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957315	A	11-11-1999	AU 3938599 A CA 2327538 A1 EP 1075547 A2	23-11-1999 11-11-1999 14-02-2001
JP 2004275007	A	07-10-2004	NONE	
WO 2005017113	A	24-02-2005	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 9/10	
	C 1 2 N 15/00	A

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

(72)発明者 ダニエル・アール・ワグナー

ルクセンブルグ・L - 8 0 8 3・ベルトランジ・リュ・デュ・バルク・1 5

(72)発明者 ディディエール・ルーイ

ルクセンブルグ・L - 1 4 4 5・シュトラッセン・リュ・トマ・エディソン・1アー - 1ペー・セントレ・ドゥ・レシエルシエ・パブリック・ドゥ・ラ・サン内

(72)発明者 イヴァン・デュヴォー

フランス・F - 5 7 3 3 0・ズフトゲン・リュ・プリンシパル・7 7

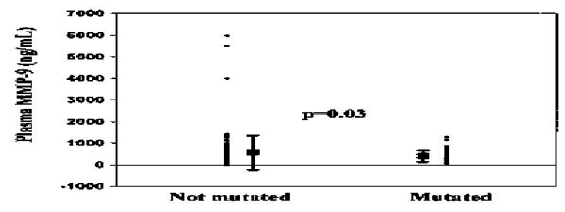
Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CB17 DA12 DA20 DA36 DA77 FB02 FB03 FB07
 4B024 AA11 CA02 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11 HA14 HA17
 4B063 QA01 QA17 QA19 QQ02 QQ36 QQ43 QR16 QR24 QR33 QR39
 QR40 QR56 QR62 QR72 QR77 QR80 QS25 QS34 QX02
 4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02 CA44 CA46
 4C084 AA17 MA16 MA52 MA55 MA63 MA66 NA14 ZA362 ZA402 ZC202

专利名称(译)	心肌梗死和心力衰竭的诊断标志物和药物设计平台		
公开(公告)号	JP2010515467A	公开(公告)日	2010-05-13
申请号	JP2009545881	申请日	2008-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	CENT DE RECH PUBLIC DE LA SANTE		
申请(专利权)人(译)	中心德Resherushe公共德拉圣		
[标]发明人	ダニエルアールワグナー ディディエールルーイ イヴァンデュヴォー		
发明人	ダニエル・アール・ワグナー ディディエール・ルーイ イヴァン・デュヴォー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/37 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 A01K67/027 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P43/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 Y10T436/143333		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/37 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.201 A01K67/027 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10.103 A61P43/00.111 A61P9/10 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ36 4B063/QQ43 4B063/QR16 4B063/QR24 4B063/QR33 4B063/QR39 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/MA16 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZC202		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	60/884979 2007-01-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

确定个体对心肌梗塞后心脏病的易感性的方法，包括检测MMP-9（基质金属蛋白酶9）的血红素结合蛋白结构域序列中氨基酸变化的存在，氨基酸变化的存在在所述结构域中指示对所述心脏病的易感性，描述了心肌梗塞后的药物设计方法。

A



B

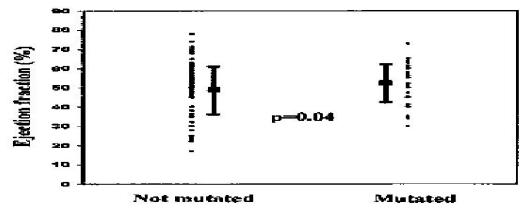


Fig. 4