

(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2019-535012

(P2019-535012A)

(43) 公表日 令和1年12月5日(2019.12.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	GO 1 N 33/53 X	
	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2019-517382 (P2019-517382)	(71) 出願人	516257305
(86) (22) 出願日	平成29年9月27日 (2017. 9. 27)		オイ メディックス バイオケミカ エー ビー
(85) 翻訳文提出日	令和1年5月23日 (2019. 5. 23)		フィンランド国、エフアイー02180
(86) 国際出願番号	PCT/FI2017/050680		エスポー、クロヴィンペッロンティエ 3
(87) 国際公開番号	W02018/060556	(74) 代理人	110001896
(87) 国際公開日	平成30年4月5日 (2018. 4. 5)		特許業務法人朝日奈特許事務所
(31) 優先権主張番号	20165730	(72) 発明者	プッシネン、ピルッコ
(32) 優先日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)		フィンランド共和国、00014 ヘルシ ンジン イリオピスト、スーヤ レウカ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フィンランド (FI)	(72) 発明者	ソルサ、チモ
			フィンランド共和国、00014 ヘルシ ンキ、インスティチュート オブ デンテ イストリー、ペーエル 41

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患に関連するリスクを決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、心血管疾患のリスクを決定する新規の方法であって、サンプルから MMP - 8 および CRP を検出する段階、および検出された MMP - 8 および CRP の量を MMP - 8 および CRP の各々のあらかじめ定められた値と比較する段階を含み、上記 MMP - 8 および CRP の上昇されたレベルの検出は、心血管イベントまたは疾患の存在、あるいはリスクを示す方法に関する。本発明はまた、心血管イベントを誘発するリスクを予測するか、血管イベントまたは心血管疾患に対する治療の効果をモニタリングするか、あるいは無症状心血管疾患の存在を検出するために MMP - 8 および CRP を検出する用途に関する。また、本発明は、CVD 疾患の存在または CVD イベントのリスクに対するリスク予測モデルを構築する方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

心血管疾患のリスクを決定する方法であって、サンプル中のマトリックスメタロプロテアーゼ - 8 ( MMP - 8 ) および C - 反応性タンパク質 ( CRP ) を検出する工程、および検出された MMP - 8 および CRP の量を MMP - 8 および CRP の各々のあらかじめ定められた値と比較する工程を含み、MMP - 8 および CRP のレベルの上昇の検出が心血管疾患の存在を示すか、または心血管疾患イベントもしくは心血管疾患のリスクを示す方法。

**【請求項 2】**

前記 MMP - 8 の量が MMP - 8 に対するあらかじめ定められた値を超過し、かつ前記 CRP の量が CRP に対するあらかじめ定められた値を超過する場合に、MMP - 8 および CRP の検出されたレベルが上昇する請求項 1 記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記 MMP - 8 および CRP のレベルの上昇の検出が、検出後 1 年以内に心血管イベントを発症するリスクを予測する請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

活性化された MMP - 8 が検出される請求項 1 ~ 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記心血管イベントまたは心血管疾患が、心血管疾患 ( CVD )、狭心症および急性心筋梗塞 ( AMI ) などの冠状動脈疾患 ( CAD )、脳卒中、高血圧性心臓疾患、リウマチ性心臓疾患、心筋症、心房細動、先天性心疾患、心内膜炎、大動脈瘤ならびに末梢動脈疾患からなるリストより選択され、好ましくは、前記心血管疾患が CVD イベント、または AMI などの CAD である請求項 1 ~ 4 に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

心血管イベントまたは心血管疾患に対する治療の効果をモニタリングするために使用される請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

最初またはその後の心血管イベントのリスクを評価するために使用される請求項 1 ~ 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

無症状心血管疾患を検出するために使用される請求項 1 ~ 7 に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

サンプルが血清、血漿または全血である請求項 1 ~ 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

サンプルが血清である請求項 9 記載の方法。

**【請求項 11】**

MMP - 8 の検出が免疫アッセイで行われる請求項 1 ~ 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

CRP の検出が免疫アッセイで行われる請求項 1 ~ 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記免疫アッセイが、ELISA、IFMA、ラテラルフローおよびマイクロ流体に基づくポイント - オブ - ケア ( POC ) アッセイ、比濁法、ネフェロメトリー、粒子強化比濁法、粒子強化ネフェロメトリーおよびラテックス凝集法からなる群より選択される 1 つ以上である請求項 11 または 12 記載の方法。

40

**【請求項 14】**

サンプル中の MMP - 8 および CRP の検出に基づき、CVD 疾患の存在または CVD イベントのリスクに対するリスク予測モデルを構築する方法。

**【請求項 15】**

検出後 1 年以内に心血管イベントを発症するリスクを予測するための、最初またはその後の心血管イベントのリスクを評価するための、心血管疾患の進行または心血管イベント

50

が生じるリスクに対する治療または投薬の有効性をモニタリングするための、または明らかな臨床的症狀より前の無症状心血管疾患の存在を検出するためのMMP-8およびCRPの検出の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心血管疾患の予測を改善し、予後を推定する方法を記述する。本発明の方法は、心血管疾患イベントのリスクのある対象と健常対象とを区別するために特に適しているバイオマーカーの同定およびその後の組み合わせに基づく。本明細書において同定されたバイオマーカーはまた、無症状心血管疾患の検出において、また心血管疾患に対する治療または投薬の効果をモニタリングするためにも使用することができる。本発明は、心血管疾患イベントの予後を予測し、推定するための、また心血管疾患イベントに対する治療および投薬の効果をモニタリングするためのマトリックスメタロプロテアーゼ-8(MMP-8)およびC-反応性タンパク質(CRP)の使用を含む。さらに、MMP-8およびCRP濃度測定は、無症状心血管疾患を検出するために使用することができる。

10

【背景技術】

【0002】

心血管疾患(CVDs)は、心臓または血管に関わる疾患の分類の一つである。世界的に、死亡の主な原因としては心血管疾患が挙げられる。心血管疾患は、狭心症および急性心筋梗塞(AMI)などの冠状動脈疾患(CAD)、脳卒中、高血圧性心臓病、リウマチ性心臓病、心筋症、心房細動、先天性心臓病、心内膜炎、大動脈瘤ならびに末梢動脈疾患のような疾患を含む。

20

【0003】

いくつかの独特な病態生理学的機序は、CVD発病、進行および経過において、重要な役割を果たす。これらには、炎症、感染、プロトンピン活性、トロンピン活性、ずり応力および内皮反応性があげられるが、それらに限定されるものではない。CVDの主な原因の中には、粥状動脈硬化症(atherosclerosis)があり、これは、影響を受けた血管壁内の脂質の蓄積および炎症を特徴とする疾患である。粥状動脈硬化プロセスおよび病理学的進行の過程において、脂肪病変または脂肪線条の蓄積および形成によって影響を受けた動脈壁が厚くなってプラーク(粥腫)が構築される。細胞外脂肪滴およびI型コラーゲンが豊富なECMを有する平滑筋および泡沫細胞コアは、時間が経過するにつれて(線維質)キャップを形成し、特に連続的で持続的な増強された炎症によって影響を受けたときに破裂する傾向がある(Herman et al.2001)。このような過程は、結果的には、有害な心血管イベントまたは転帰の原因となる閉塞および血栓を誘発する。

30

【0004】

I型コラーゲンは、主なタンパク質性細胞外マトリックス(ECM)成分であり、粥状動脈硬化病変における線維質キャップの耐力分子である。コラーゲン分解性マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)中でMMP-8は、触媒作用でI型コラーゲンの分解を開始するのに最も効率的で有能である(Sorsa et al.2006)。

【0005】

40

病理学的に上昇されたMMP-8のmRNAおよびタンパク質の発現、生成ならびに血清/血漿レベルが不安定狭心症において見出された。さらに、血清/血漿MMP-8と過程との間の関連性、のみならず有害なCVD転帰の長期的な進行が見出された。上昇された血清MMP-8レベルは、CVD疾病率増加と関連があり、これを反映することが立証された。細胞培養研究において、MMP-8は、保護性線維キャップを薄くし、したがって保護性線維キャップが脆弱になり破裂する、という能力を通して粥状動脈硬化プラーク不安定化に関与している(Herman et al.2001)。ヒト粥状動脈硬化プラークサンプルにおいて、MMP-8タンパク質およびmRNAは、マクロファージと共存する(Molloy et al.2004)。さらに、腹部大動脈瘤は、正常大動脈組織よりも有意に高いMMP-8濃度を含有する(Wilson et al.2005)。増加されたプラークMMP-8の活性は、プラ

50

クが進行している無症状患者で観察された (Turu et al.2005)。また、破裂されやすいプラークは、より安定した形態を有する病変と比較したとき、免疫反応性 MMP - 8 をより多く発現する (Herman et al.2001)。

#### 【0006】

しかしながら、これまでは、ほんのわずかの研究が、血清 MMP - 8 濃度と C V D との関連性に関してのみなされてきた。少数の参加者を対象とした 2 件の対照群研究の結果は、心不全および脳虚血を有する患者の血清 MMP - 8 濃度が減少するという事実を示唆する (Wilson et al.2005; Lorenzi et al.2003)。最も最近の 2 つの大規模な研究において血漿 MMP - 8 濃度は、C A D の存在および重症度 (Kato et al.2005) ならびに頸動脈プラーク進行 (Turu et al.2005) と関連付けられた。Tuomainen などの研究 (2007 年および 2014 年) は、血清 MMP - 8 濃度が一般的または無症状粥状動脈硬化症で上昇され、致命的な結果に関わっているということを示す。血漿 MMP - 8 は、代謝症候群の重要な予測因子であることが最近明らかになっており、このような関係は、前炎症性サイトカイン hs - C R P および T N F - を調節した以降にも継続された (Hoseini et al.2015)。

10

#### 【0007】

上昇された全身性 MMP - 8 はまた、他の疾患においても重要な役割を果たす。ECM 処理、および炎症性反応および免疫反応の改変においてのみならず、薬物標的であることにおける MMP - 8 の主な役割は、十分に立証されている。

#### 【0008】

C R P は、心血管疾患のリスクがある患者において増加されたレベルで存在することが明らかになった一般的な炎症性マーカーである。最近の研究によると、C R P の上昇された基底レベルを有する患者は、糖尿病、高血圧および C V D の増加されたリスクがあると提案されている。C R P は、粥状動脈硬化症および冠状動脈心臓疾患 (C H D) の両方のマーカーであると考えられる。

20

#### 【0009】

このような医学的および生物学的背景を基にし、有害な C V D 転帰に発展するか、または進行するリスクの高い人々の早期または初期発病および / またはステージ / 段階 / 過程を同定して (P o C) - 診断する能力は、医療分野および医療産業のみならず、世界的には、健康管理システムにも必須的であり、極めて重要である。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明の目的は、血液サンプルからマトリックスメタロプロテアーゼ - 8 (MMP - 8) および C - 反応性タンパク質 (C R P) を検出する段階、および検出された MMP - 8 および C R P の量を MMP - 8 および C R P の各々のあらかじめ定められた値と比較する段階を含み、上昇されたレベルの MMP - 8 および C R P の検出が、心血管疾患の存在を示すか、または心血管イベント、あるいは心血管疾患のリスクを示す、心血管疾患のリスクを決定する新規な方法を提供することである。

#### 【0011】

本発明の別の目的は、明らかな臨床的症状より前の無症状 C V D 疾患の存在または C V D イベントのリスクに対するリスク予測モデルを構築するための方法であり、該方法は、サンプルにおける MMP - 8 および C R P の検出に基づく。

40

#### 【0012】

本発明のさらに別の目的は、好ましくは試験から 1 年以内に心血管イベントを発症するリスクを予測するための ; 最初またはその後の心血管イベントのリスクを評価するための ; 心血管イベントまたは心血管疾患に対する治療の効果をモニタリングするための ; または明らかな臨床的症状より前の無症状心血管疾患の存在を検出するための MMP - 8 および C R P の検出の使用であった。

#### 【0013】

本発明の様態によれば、上昇された MMP - 8 および C R P レベル検出に基づき、対

50

象は、さらなる検査が受けられるか、さらなる医学的相談を受けることができる。

【0014】

本発明のさらなる様態によれば、本発明は、最初の心血管イベントまたはその後の心血管イベントが現れる前に患者が心臓病検査を受けられるように、案内するのに役立つであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】高い血清CRPおよび高いMMP-8濃度の組み合わせを有する対象（実線）およびその組み合わせを有さない対象（点線）において、1年間追跡観察したときに発生したCVDイベントがない場合の累積生存率。分析は、年齢および性別によって調整された Kaplan-Meier 推定値を使用して実施した。

10

【図1B】高い血清CRPおよび高いMMP-8濃度の組み合わせを有する対象（実線）およびその組み合わせを有さない対象（点線）において、1年間追跡観察したときに発生したAMIがない場合の累積生存率。分析は、年齢および性別によって調整された Kaplan-Meier 推定値を使用して実施した。

【図2】AMI患者から得られ、時間分解免疫蛍光アッセイ（IFMA）および固相酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で測定したMMP-8濃度に対する相関関係データ。このような結果は、散布図に表示される。

【図3A】AMIまたは狭心症患者および対照対象からの平均MMP-8濃度は、IFMAで測定された。患者と対照との間のMMP-8濃度の差は、2つの分析の両方で極めて有意（ $p < 0.001$ ）であったが、患者と対照との間の差は、ELISAよりIFMAでより大きい。結果は、箱ひげ図として表示される。中心線は、平均を表し、エラーバーは、95%CIを表す。

20

【図3B】AMIまたは狭心症患者および対照対象からの平均MMP-8濃度は、ELISAで測定された。患者と対照との間のMMP-8濃度の差は、2つの分析の両方で極めて有意（ $p < 0.001$ ）であったが、患者と対照との間の差は、ELISAよりIFMAでより大きい。結果は、箱ひげ図として表示される。中心線は、平均を表し、エラーバーは、95%CIを表す。

【図4A】IFMAで測定された狭心症患者またはAMI患者および対照対象由来のMMP-8濃度の、CRP濃度との相関関係データ。（A）IFMAで取得したMMP-8濃度は、相関係数 $r = 0.311$ で統計的に有意（ $p = 0.008$ ）に相関した。

30

【図4B】ELISA（B）で測定された狭心症患者またはAMI患者および対照対象由来のMMP-8濃度の、CRP濃度との相関関係データ。ELISAで取得したMMP-8濃度は、相関係数 $r = 0.301$ で統計的に有意（ $p = 0.011$ ）に相関した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明者らは、人体において異なる免疫システムを示す2つの一般に知られている炎症性マーカー、すなわちMMP-8およびCRPの組み合わせが、心血管疾患のリスクを予測し、心血管疾患の予後を推定し、心血管疾患および心血管イベントのリスクに対する持続的な治療、ならびに投薬の有効性をモニタリングするために使用され得るということを見出した。さらに、MMP-8およびCRPは、狭心症、息切れ、疲労感、動悸および軽い眩暈などの明らかな臨床的症状より前の無症状心血管疾患を検出するために使用することができる。

40

【0017】

このように、対象の全血、血漿または血清におけるMMP-8およびCRP濃度の検出は、たとえば、1) 心血管疾患イベントのリスクを決定し；2) 明らかな臨床的症状より前の無症状心血管疾患または障害の存在を決定し；3) 心血管疾患または障害の予後を推定し；そして4) 心血管疾患の進行または心血管イベントが有するリスクに対する治療、あるいは投薬の効果をモニタリングするのに有用である。

【0018】

50

CRPおよびMMP-8の両方を決定することの組み合わせが有用であると考えられる。CVDにおいて、粥状動脈硬化破裂過程、内皮機能障害およびインスリン受容体機能障害の発達は、病理学的に過度なCRP、前炎症性サイトカイン、反応性酸素種およびタンパク質分解の独立的な作用または協同的な作用を含む。これらのメカニズムは、「沈黙の殺人者」とも呼ばれる連続的で持続的な全身性低級炎症を誘発する。低級全身性炎症の一部であるタンパク質分解過程は、MMP-8の作用を含み、また最も効果的なI型コラーゼナーゼはまた、サイトカイン、ケモカイン、トランスフォーミング増殖因子-1、セルピン、アポリポタンパク質A-I、インスリン受容体、免疫および細胞信号伝達因子などの非マトリックス性生体活性基質を分解することによって、様々な疾患において病的な経路/方向に対する全身性免疫および代謝反応を変形させることができる。

10

**【0019】**

好中球、単核球/マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞および形質細胞をはじめとする様々な細胞によって、MMP-8が発現および生産され得るが、これらに限定されるものではない。これら細胞中の多くの数が粥状動脈硬化またはCVD病変に存在するか、またはこれらに構成される。これら細胞は、CRPおよび前炎症性メディエータに影響を及ぼして発現し、また病理学的に上昇された全身性MMP-8を生成し、これは、全身性低級炎症の必須要素と見なされるのみならず、しばしば検出される。

**【0020】**

本発明による心血管疾患は、狭心症および急性心筋梗塞(AMI)などの冠状動脈疾患(CAD)、脳卒中、高血圧性心臓疾患、リウマチ性心臓疾患、心筋症、心房細動、先天性心臓疾患、心内膜炎、大動脈瘤および末梢動脈疾患のような疾患を含む。本発明の好ましい実施形態において、このような疾患は、CVDまたは疾患イベント、たとえば、AMIのようなCADイベントである。

20

**【0021】**

本発明の一実施形態は、心血管疾患に関わるリスクを決定する方法であって、サンプルからMMP-8およびCRPを検出する段階、およびMMP-8、ならびにCRPの量をMMP-8およびCRPの各々のあらかじめ定められた値と比較する段階を含み、上記MMP-8およびCRPの上昇されたレベルの検出は、対象において心血管疾患の存在を示すか、または心血管イベント、あるいは心血管疾患のリスクを示す方法に関する。上昇されたMMP-8およびCRPレベルの検出に基づき、対象は、さらなる医学的相談またはさらなる検査を受けるように指示することができる。

30

**【0022】**

本発明のさらなる好ましい実施形態は、心血管疾患を検出し、一次心血管イベントまたは後続心血管イベントのリスクを推定し、明らかな臨床的症状より前の無症状心血管疾患を検出するか、または心血管疾患の進行、あるいは心血管イベントが有するリスクに対する治療または投薬の効果をモニタリングする方法であって、サンプルからMMP-8およびCRPを検出する段階、および検出されたMMP-8およびCRPの量をMMP-8およびCRPの各々のあらかじめ定められた値と比較する段階を含み、上記上昇されたレベルのMMP-8およびCRPの検出は、心血管疾患の存在を示すか、または心血管イベント、あるいは心血管疾患のリスクを示す方法に関する。本発明によれば、MMP-8およびCRPの検出されたレベルは、MMP-8の量がMMP-8に対するあらかじめ定められた値以上であり、CRPの量がCRPに対するあらかじめ定められた値以上である場合に上昇される。

40

**【0023】**

本発明によれば、心血管疾患に関わるリスクを決定する方法において、心血管イベントまたは心血管疾患は、心血管疾患(CVD)、狭心症および急性心筋梗塞(AMI)などの冠状動脈疾患(CAD)、脳卒中、高血圧性心臓疾患、リウマチ性心臓疾患、心筋症、心房細動、先天性心臓病、心内膜炎、大動脈瘤および末梢動脈疾患からなるリストより選択されることがあり、好ましくは、このような心血管イベントまたは心血管疾患は、CVDイベントまたはAMIなどのCADである。

50

## 【0024】

リスク予測モデルは、特定疾患および結果（予後モデル）を有するか（診断モデル）、または開発する確率を推定するために使用され得る。臨床実験において、これらのモデルは、患者に通知して治療管理を案内するのに使用される。ヘンドリクセン（Hendriksen）（2013）などによると、予測モデルが日常的な実験で使用される前に3段階が推奨される。開発段階において、通常的に多変量論理（診断）または生存（予後）回帰分析を利用したモデル開発に重点を置いている。開発されたモデルの性能は、判別、検定および（再）分類で表現される。検証段階において、開発されたモデルは、同一の性能測定を利用する新たな患者セットでテストされる。最後に、適用段階において、実際に患者管理を案内する予測モデルの能力が評価される。本明細書に記述の方法で検出されたMMP-8およびCRP値は、CVDイベントのリスクに対する予測モデルを構成するために使用され得る。

10

## 【0025】

心血管疾患に対する治療には、生活様式の変化、投薬、血管再生、心臓リハビリなどの侵襲性手術、またはこれらの組み合わせが含まれ得る。

## 【0026】

心血管疾患治療剤は、血液を薄くして血液が凝固されることを防止する抗血小板、コレステロールを低下させるアトルバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチンおよびプラバスタチンなどのスタチン、アテノロール、ビソプロロール、メトプロロールおよびネビボロールを含むベータ-遮断剤、硝酸薬、ラミプリルおよびリシノプリルなどのACE（アンジオテンシン-転換酵素）抑制剤、アンジオテンシンII受容体拮抗剤およびカルシウム通路遮断剤、小便を通して過剰の水分と塩分を体外に排出させることによって作用する利尿剤、のみならず、血漿または血清で増加されたCRPとMMP-8およびMMP-8レベルを減少させるドキシサイクリン投薬を含む（Payne et al. 2011, Kormi et al. 2014, Alfakry et al. 2016）。本発明の方法はまた、心血管疾患に対するこれらまたは他の治療法の有効性をモニタリングし、治療途中、一次心血管イベントまたはそれ以降も心血管イベントを予測するために使用され得る。上記結果に基づき、患者が治療および投薬手順によって低いMMP-8およびCRP値を有し、またMMP-8およびCRP値の組み合わせが治療および投薬手順によって低い場合、患者の疾患は、統制下にあり、患者に対するリスクは、低くなる。

20

30

## 【0027】

MMP-8および/またはCRP濃度、量またはレベルを検出するか、または測定するために使用されるサンプルは、通常、全血、血漿または血清である。ある例において、本発明の方法は、サンプルからマーカの存在、量またはレベルを検出するか、または決定する前に個体からサンプルを収得する段階をさらに含む。好ましくは、サンプルは、血清または血漿である。

## 【0028】

サンプル中のMMP-8濃度は、当業界に知られている任意の方法を使用して測定することができる。分析は、定性的、半定量的または定量的免疫分析であり得る。本発明による適切な検出方法の非限定的な例としては、ウエスタンブロッティング法、IFMA、EIA、ELISA、IEMA、ラテラルフローアッセイ、ディップスティック分析法、マイクロ流体ポイント-オブ-ケア（POC）アッセイ、表面プラズモン共鳴分析、電気化学的分析または任意の他の知られているリガンド結合または直接検出分析システムを含む。直接検出分析システムまたは技術は、分析のためのリガンド結合に基づかない任意の方法、すなわち、高圧液体クロマトグラフィー〔HPLC〕またはSDS-PAGEなどのゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）などのサイズ排除クロマトグラフィー〔SEC〕；または核磁気共鳴分光法（NMR）、UV/VIS-分光法、電気噴霧-イオン化（ESI）などの分子分光法のような技術を意味する。

40

## 【0029】

本発明の様態によれば、MMP-8およびCRPの検出は、免疫分析法で実行され得

50

る。より好ましくは、1つ以上の免疫分析法が、ELISA、IFMA、比濁法、混濁法、粒子強化比濁法、粒子強化混濁法、ラテックス凝集、側面流れ分析法および微細流体POC分析法からなる群より選択され得る。

【0030】

本発明の好ましい実施形態は、心血管イベントを予測するか、心血管疾患の予後を推定し、心血管疾患の進行および心血管イベントが有するリスクに対する治療または投薬の有効性をモニタリングし、明らかな臨床的症状以前に無症状心血管疾患を検出する方法であって、上記CRPは、たとえば、約2.5mg/lのカット-オフ値を適用するラテックス免疫分析法CRP16によってテストされ、MMP-8は、約55ng/mlのカット-オフ値を適用する時間-分割免疫蛍光分析法によってテストされる方法である。

10

【0031】

他に明示されない限り、明細書および特許請求の範囲において使用される用語は、診断分野で一般に使用される意味を有する。特に、下記用語は、以下に指示された意味を有する。

【0032】

用語「無症状疾患の検出」または「無症状障害の検出」は、明らかな臨床的症状、すなわち疾患または障害の診断以前に無症状疾患の存在を確認するか、または測定することを意味するものと理解されるべきである。用語「無症状疾患」は、臨床的検出表面下にとどまっている疾病を意味するものと理解されるべきである。無症状疾患は、認知可能な臨床的所見を有しない。これは、認知可能な兆候および症状を有する臨床的疾患とは異なる。CVD、糖尿病、甲状腺機能低下症およびリウマチ性関節炎を含む多くの疾患は、臨床的疾患として浮上される前には、頻繁に無症状である。

20

【0033】

用語「陽性」および「陰性」は、被験物質、すなわちMMP-8またはCRPのサンプル中の濃度が、それぞれあらかじめ定められた値（基準線、閾値または参照濃度）より超過（高いまたは陽性）および未満（低いまたは陰性）であることを指す。

【0034】

サンプルにおいて分析物に対する「あらかじめ定められた値」は、正常個体においてサンプル中の分析物の基準濃度または閾値濃度を指し；上記サンプル中の分析物の値が上記あらかじめ定められた値を超過する場合、テスト結果は、陽性である。サンプル中の分析物に対するあらかじめ定められた値は、分析フォーマットおよび分析に使用された特定試薬（たとえば、使用された特定抗体）に応じて変わり得るが、当業者は、知られている量の分析物を含む対照群サンプルに対する正常個体におけるサンプル中の分析物の濃度を推定することによって決定し、設定することができる。

30

【0035】

「連続変数」とは、最小値と最大値の間の任意の値を取り得る変数を指す。

【0036】

「活性MMP-8」とは、その先駆体形態または前駆体形態とは異なる活性タンパク質分解酵素の異なる形態を指す。

【0037】

「MMP-8活性化」とは、MMP-8の予備形成体を活性/活性化された、すなわち触媒的に有能なMMP-8で形質転換および/または転換させる生物学的または生化学的過程を指す。本発明の好ましい一実施形態によれば、活性化されたMMP-8が検出される。

40

【0038】

本発明者らは、活性MMP-8の高分子量種の代わりに、より小さいMMP-8の断片を検出することによって、活性MMP-8の検出を向上させ得るということを以前に見出した(WO2015/128549)。

【0039】

本発明の実施形態はまた、コンピュータシステムがMMP-8およびCRPの決定に基

50



づき、個々人が心血管疾患またはイベントを進化させることに関わるリスクを有しているかの可否を決定する方法を実行させるシステムおよびコンピュータ読取可能媒体を提供する。

#### 【0040】

特に本発明は、さらに生物学的サンプルを分析するためのシステムに関し、上記システムは、

a) 生物学的サンプルを受信し、

MMP-8 および CRP を決定するように構成された決定モジュール；および/または

b) MMP-8 および CRP 値を含むテスト結果情報；

c) 上記決定モジュールからの情報を貯蔵するように構成された貯蔵装置；

10

d) 上記貯蔵装置上に貯蔵されたテスト結果情報を基準データと比較し、比較結果を提供するように適用された比較モジュールであって、上記比較結果が基準サンプル/下記対象または患者群から誘導される、所定レベルから誘導される、比較モジュール；

現在正常レベルの MMP-8 を有していることで知られていることによって、生物学的サンプルおよび参照サンプルに対する類似した結果が現在疾患または疾患イベントを有していないか、疾患にかかる傾向のない対象を示すか、または疾患、あるいは疾患イベントが発生するか、疾患が進行するリスクを有していないか、または有する傾向のない対象を示すことで知られている対象、または患者群；および/または

疾患を有しているか、または疾患にかかりやすいことで知られていることによって、生物学的サンプルおよび参照サンプルに対する類似した結果が疾患または疾患のイベントを有しているか、疾患または疾患のイベントにかかりやすい対象を示すか、または疾患、あるいは疾患のイベントが発生するか、疾患が進行するリスクを有しているか、有しやすい対象を示すことで知られている対象、または患者群；および

20

e) ユーザに対する比較結果に部分的に基づくコンテンツをディスプレイするためのディスプレイモジュールであって、上記コンテンツが現在疾患を有しているか、心血管疾患にかかりやすい対象または疾患、あるいは疾患イベントが発生するか、疾患が進行する増加されたリスクを有しているか、または有しやすい対象を示す信号である、ディスプレイモジュールを含む。

#### 【0041】

実施例

30

下記実施例は、単に本発明の様々な実施形態を例示するための目的で提供されており、決して本発明を限定するものではない。当業者は、添付された特許請求の範囲によって定義された本発明が、本発明の目的を実行し、上記で言及された結果および利点を得るのに適合されていることが容易に認知できるであろう。

#### 【0042】

母集団に基づくサンプル

FINRISK97は、フィンランドの5つの地理的領域で実施された25歳～74歳の調査参加者8446人の母集団に基づくサンプルを含んでいた(Borodulin et al.2015)。本アンケート調査には、自体管理アンケートおよび体重、身長、および血圧測定値のみならず、血液採取に対する臨床検査が含まれていた。本研究は、国立保健院(National Public Health Institute)の倫理委員会の承認が得られ、ヘルシンキ宣言にしたがって実施された。

40

#### 【0043】

実験室分析

血液サンプリングの前に、参加者らは、4時間断食し、一日中予想より早い時間に重い食事を避けるように要請を受けた。平均断食時間は、5(IQR 2)時間であった。超高感度なCRPの測定は、2005年ヘルシンキに所在した国立保健福祉部疾病リスク管理局(the Disease Risk Unit in the National Institute for Health and Welfare)でArchitect c8000分析器(アボットラボラトリーズ社製、アボットパーク、IL、USA)上でラテックス免疫分析法を利用して凍結血清サンプル(-70)

50

から実施した。MMP-8濃度を、製造会社の指針にしたがってIFMA（メディックスバイオケミカ社製、エスポー、フィンランド共和国）によって測定した。

#### 【0044】

##### IFMAを利用したMMP-8分析

MMP-8 IFMAは、ヒトMMP-8を測定するための定量的酵素免疫分析法である。このようなサンドイッチ分析は、ヒトMMP-8に対する2つの単クローン抗体を使用する。抗体1491-E6-F7および1492-B3-C11（メディックスバイオケミカ社製、エスポー、フィンランド共和国）を捕獲抗体および追跡抗体として各々使用した。マイクロウェルプレートを、MMP-8に対する単クローン抗体でコーティングした。MMP-8の存在を検出するために使用される酵素接合体を形成するHRPに他の抗体を接合した。分析を実行するために、80 $\mu$ lの分析バッファおよび20 $\mu$ lの標準物、対照群およびサンプルをプレートの適切なウェルに添加した。プレートを水平振盪器上で室温で1時間インキュベートした。標準中のMMP-8、対照群、およびサンプル中に存在する場合、マイクロウェルに結合した。結合されない物質を除去するため、ウェルを5回洗浄した。このような洗浄段階後に、100 $\mu$ lの酵素接合体をすべてのウェルに添加した。プレートを水平振盪器上で1時間、再びインキュベートした後、上記のように洗浄した。その後、100 $\mu$ lのABTS酵素基質をウェルに添加した。プレートを上記のように15分間振盪させた。50 $\mu$ lの酸性停止溶液を添加して反応を終結させた。溶液を混合するため、プレートを穏やかに振盪させた。マイクロプレートリーダー（Multiskan、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、バンター（Vantaa）、フィンランド共和国）を使用して414nmでウェル内の溶液吸光度を測定した。対照群およびサンプルの濃度を生成された標準曲線から取得した。

10

20

#### 【0045】

##### ELISA（アマシャム社製）を利用したMMP-8分析

ELISAは、サンドイッチ原理を基盤に直ちに使用できる固相酵素結合免疫吸着測定法である。100 $\mu$ lのサンプル（1：4希釈液）および標準物をヒトMMP-8を認識する抗体でコーティングされたマイクロタイタ（microtiter）ウェル内で室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを4回洗浄した。捕獲されたヒトMMP-8に結合するであろう100 $\mu$ lのビオチン化追跡抗体を添加した。インキュベーション1時間後、ウェルを4回洗浄した。次いで、100 $\mu$ lのストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体を添加し、ビオチン化トレーサ抗体に結合させる。インキュベーション1時間後、ウェルを再び洗浄した。100 $\mu$ lのTMB溶液を添加すると、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ接合体が基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）と反応するであろう。30分間、インキュベートした後、100 $\mu$ lのシュウ酸を添加し、培養を停止させた。分光光度計（Multiskan、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、バンター、フィンランド共和国）を使用し、450nmにおける吸光度を測定した。標準物と同時に実行するサンプルのヒトMMP-8濃度は、標準曲線から測定することができる。

30

#### 【0046】

##### hsCRP解析

hsCRP分析は、文献（Salomaa et al.2010）に記述されているように、ラテックス免疫分析法CRP16（アボット社製、Architect c8000）を使用して実行した。

40

#### 【0047】

##### 統計

後続措置として国立病院死亡原因記録簿および国立病院退院記録簿の記録連携を通じて1年以内に次の項目を確認した：心血管疾患（CVD）、急性心筋梗塞（AMI）、炎症性腸疾患（IBD）（発病率が低いため、5年間実行）、およびがん（非黒色腫皮膚がんを除く）。分析を、基準線で各々CVD、IBD、またはがんにかかっていない7448人、7893人、または8276人の対象に対して実行した。

50

## 【 0 0 4 8 】

偶発性疾患またはイベントの有無にかかわらず、対象の間で血清CRPおよびMMP-8濃度の差に対する統計的有意性をt-検定で分析した。分析前に、非対称分布を有する値は、対数変換によって正規化された。MMP-8およびCRP濃度を考慮した偶発性疾患に対する生存データは、年齢および性別によって調整されたコックス比例ハザードモデルを使用して分析された。リスクは、MMP-8およびCRP濃度の百分位点数で推定しており、50番目の百分位点数をカット-オフ値として選択し、すなわち、基準範囲は、MMP-8またはCRP値を有する人、あるいは50番目の百分位点数未満の値を有する人であった。したがって、結果は、基準範囲と比較したとき、閾値をすべて超過するMMP-8およびCRP濃度を有する対象に対して計算された。統計分析は、SPSS 22.0 (IBM Corp. 2013, IBM SPSS Statistics for Windowsバージョン22.0, Armonk, NY: IBM社)を使用して実行された。

10

## 【 0 0 4 9 】

実施例1. 対象においてCVDおよびAMIに関わる血清MMP-8およびCRP濃度

基準線でCVDを発症していない対象において、血清MMP-8およびCRP濃度の濃度レベル測定が実行されており、これらの濃度とCVDまたはAMIを発症する可能性との関連性は、上述されているように、1年の追跡調査で決定された。その結果、血清CRPおよびMMP-8濃度合計(各々の閾値/平均値より両方とも高い)が、AMIまたは任意のCVDイベントを経験した人の方が、いずれも経験していない人と比較してより高かったことが示された。これらの群の間でのこのような組み合わせの差は、有意であった(表1および表2)。表1に示すように、CVDを発症した対象の平均濃度合計は、1.97であった反面、CVDを発症しなかった対象の平均濃度合計は、1.55であった( $p < 0.001$ )。MMP-8の平均濃度は、単独では有意ではなかった反面、CRP濃度は、CVD( $p < 0.001$ )に対して単独で考慮したときにも有意であった。表2において、AMIを発症した対象の平均濃度合計は、2.07であった反面、AMIを発症した対象の平均濃度合計は、1.55であった( $p = 0.001$ )ことが示されている。MMP-8またはCRPの平均濃度は、いずれもAMIにおいて単独では有意ではなかった。

20

## 【 0 0 5 0 】

## 【表1】

30

表1. 基準線でCVDを発症していないが、1年間の追跡調査で偶発性CVDイベントを発症した対象および発症しなかった対象における平均血清MMP-8およびCRP濃度。

	CVDイベントなし	CVDイベント有	
	平均(SD)		p-値 <sup>1</sup>
CRP(mg/l)	2.40(4.88)	10.8(21.1)	<0.001
MMP-8(ng/ml)	50.3(66.7)	66.5(105.9)	0.456
LogCRP+logMMP-8	1.55(0.67)	1.97(1.02)	<0.001

40

<sup>1</sup> 対数変換後のt-検定

## 【 0 0 5 1 】

## 【表2】

表2. 基準線でCVDを発症していないが、1年間の追跡調査でAMIイベントを発症した対象および発症しなかった対象における平均血清MMP-8およびCRP濃度。

	AMIなし	AMI有	
	平均(SD)		p-値 <sup>1</sup>
CRP(mg/l)	2.43(4.98)	17.0(21.1)	0.051
MMP-8(ng/ml)	50.3(66.7)	84.5(142.4)	0.272
LogCRP+logMMP-8	1.55(0.68)	2.07(1.23)	0.001

<sup>1</sup> 対数変換後のt-検定

## 【0052】

表3は、低い(平均未満または負数)値と比較したときの高い(平均超過または正数)MMP-8およびCRP濃度値から計算された偶発性CVDイベントに対するハザード比(HR)を示し、ここで参照群(平均未満または負数)のHRを1に設定した。すべてのMMP-8、CRPまたはこれらの組み合わせが平均を超過する値を有する場合、HRは、1より高いことで示された。HRは、CRPおよびMMP-8(値)の組み合わせが単独値より高かった。高い(50パーセント超)CRPおよび高いMMP-8濃度の組み合わせは、これらバイオマーカー単独の高い濃度よりも高いHRを示す傾向があった。組み合わせの結果は、リスク予測において統計的有意性を示しており、p値は、各々CVDの場合0.011、AMIの場合、0.043であった。図1Aおよび図1Bにおいて、CVDイベントまたはAMIがない累積生存率は、MMP-8またはCRP、あるいはMMP-8およびCRPの両方が50パーセント未満である対象(0で表示)と比較したとき、CRPおよびMMP-8の両方が50パーセント超の対象(1.0で表示)の場合に示される。本図は、CRPとMMP-8の両方が50パーセント超である対象のリスクがより高いことを示す。

## 【0053】

## 【表3】

表3. 1年間の追跡調査における高い血清CRPおよびMMP-8濃度、ならびにそれらの組み合わせと偶発性CVDイベントおよびAMIとの関連性。平均値は、CRPの場合は2.50mg/lであり、MMP-8の場合には55.0ng/mlである。

CVDイベント	HR(95%CI)		p-値 <sup>1</sup>
	平均未満	平均超過	
CRP	1	2.03(1.17-3.51)	0.011
MMP-8	1	1.45(0.56-3.75)	0.439
組み合わせ CRP,MMP-8	1	2.67(1.34-5.34)	0.005
<b>AMI</b>			
CRP	1	1.50(0.58-3.90)	0.401
MMP-8	1	1.59(0.59-4.48)	0.380
組み合わせ CRP,MMP-8	1	3.15(1.04-9.57)	0.043

<sup>1</sup> 年齢および性別に対して調整されたコックス回帰、平均値超の濃度の推定値に対するp-値。

## 【0054】

実施例2. 炎症性腸疾患(IBD)およびがんに関わる血清MMP-8およびCRP濃度

炎症性腸疾患（IBD）は、大腸および小腸の炎症性状態の部類である。クローン病および潰瘍性大腸炎は、炎症性腸疾患の主な類型である。IBDは、罹患患者においてCRPが担うことのできる様々な役割により、増加されたCRPと有意に関連することが以前に示された（Henriksen et al.2008）。炎症性マーカーとして、CRPは、IBDの存在、重症度および治療法の側面でIBDを予測、モニタリングおよび評価するのに役立つ。

【0055】

たとえば、デンマーク研究者らは、高い血液レベルのCRPを有する人々が低いCRPレベルを有する人々と比較したとき、晩年にがんの発症のリスクが30%以上高く、肺がんおよび場合によっては大腸がんのがんの発症のリスクと関係したことを示した（Cancer.Net,ASCO's Patient Web site）。研究者らはまた、がんにかかった人々の中でその診断前にCRPレベルが高かった人々は、上昇されたレベルのCRPを有さなかった人々よりも早く死亡する確率が80%以上高いことを明らかにした。

10

【0056】

したがって、従来の研究は、CRPとIBD、およびCRPとがんとの間の関連性を提示している。本発明者らは、MMP-8濃度および/またはMMP-8濃度とCRP濃度との合計が、このような疾患に関する指標または予測マーカーとして使用できるかの可否を研究したかった。本研究（表4）において、平均CRPまたはMMP-8濃度は、偶発性IBDを発症した対象と発症しなかった対象との間においては有意な差がなかったが、これらマーカーの合計は、有意であった。これら合計は、また偶発性がんを発症した対象において、そうでない対象よりも高く、この違いは、より高いCRPレベルに起因する。がんの場合、単に平均CRP濃度のみが有意であった。

20

【0057】

【表4】

表4.5年間の追跡調査で、IBDまたはがんを発症した対象および発症しなかった対象における血清MMP-8およびCRP濃度、ならびにそれらの合計。

	平均(SD)		p-値 <sup>1</sup>
	IBDなし	IBD有	
CRP(mg/l)	2.54(5.28)	3.68(3.34)	0.083
MMP-8(ng/ml)	50.0(66.5)	68.4(53.4)	0.057
LogCRP+logMMP-8	1.57(0.68)	2.04(0.57)	0.017
	がんなし	がん有	
CRP(mg/l)	2.48(5.09)	3.50(6.52)	<0.001
MMP-8(ng/ml)	49.8(66.1)	54.3(72.9)	0.709
LogCRP+logMMP-8	1.56(0.68)	1.74(0.73)	<0.001

30

<sup>1</sup> 対数変換後のt-検定

40

【0058】

また、1年間の追跡調査でこれらバイオマーカーと偶発性がんとの関係を調査した。この場合、CRPおよびMMP-8濃度は、がんを発症しなかった対象に比べて偶発性がんを発症した対象において個別におよび組み合わせで有意に高いことが示された（表5）。

【0059】

## 【表5】

表5.1年間の追跡調査でがんを発症した対象および発症しなかったの対象における血清MMP-8およびCRP濃度、ならびにそれらの合計。

	平均(SD)		p-値 <sup>1</sup>
	がんなし	がん有	
CRP (mg/l)	2.49 (5.10)	4.97 (9.55)	0.024
MMP-8 (ng/ml)	49.8 (66.1)	66.1 (77.1)	0.048
Log CRP + log MMP-8	1.56 (0.68)	1.89 (0.83)	0.017

<sup>1</sup> 対数変換後のt-検定

## 【0060】

高いMMP-8濃度は、単独でも偶発性がん発症のリスクに有意に関連した。しかしながら、高い(50パーセンタイル超)CRPおよび高い(50パーセンタイル超)MMP-8濃度を合わせると、MMP-8単独で得られた予測に比べて偶発性IBDまたはがんの予測が向上されなかった(表6)。マーカーも、それらの合計もIBDのリスクと関連がなかった。

## 【0061】

## 【表6】

表6.5年間の追跡調査での偶発性IBDおよび1年間の追跡調査での偶発性がん高い血清CRPおよびMMP-8濃度、ならびにそれらの組み合わせとの連関性。

	HR(95%CI)		p-値 <sup>1</sup>
	平均未満	平均超過	
IBD			
CRP	1	2.15(0.67-6.91)	0.199
MMP-8	1	2.57(0.86-7.68)	0.092
組み合わせ CRP,MMP-8	1	2.32(0.51-10.6)	0.278
がん			
CRP	1	1.36(0.73-2.52)	0.337
MMP-8	1	2.46(1.36-4.43)	0.003
組み合わせ CRP,MMP-8	1	2.41(1.12-5.18)	0.025

<sup>1</sup> 年齢および性別に対して調整されたコックス回帰、平均値超の濃度の推定値に対するp-値。

## 【0062】

実施例3. IFMAまたはELISAによって測定されたMMP-8濃度に対する相関関係データ

異なる抗体らの間の変化およびMMP-8、ならびにMMP-8の活性化された部分を検出するために使用される分野で知られている方法を知り、本発明者らは、取得された相関関係データがMMP-8濃度を測定するために使用される分析法に依存しているかの可否を研究したかった。MMP-8濃度測定は、異なるMMP-8抗体を使用して上述したように、IFMAおよびELISAによって実行した。測定を、急性冠状動脈症候群(ACS)および対照群として入院した患者(343人の患者)を対象に実施した(Pussinen et al.2013)。対照群は、年齢±2年、性別、および地域が一致した。包含基準は下記

10

20

30

40

50

の通りである：過去4週間以内に確定されたか、疑われるCHDまたは脳卒中の履歴がまったくなく、手術または化学療法治療がまったくなかった。彼らは、狭心症、すなわち運動に関わり、休息で安静を取る任意の場所での胸痛の陽性履歴がなかった。彼らのうち誰も、糖尿病、高血圧、または異常脂質血症に対する投薬を受けていなかった。

【0063】

その結果が、以下表7および散布図(図2)の両方に示されている。平均MMP-8濃度レベルをIFMAおよびELISAで測定した場合、両方の分析において患者と対照群の間のMMP-8レベルの差は、極めて有意であった( $p < 0.001$ )。狭心症またはAMI患者と対照群の間の差は、ELISAよりIFMAでより大きかった(図3および表8)。

【0064】

【表7】

表7. AMI患者から取得され、IFMAおよびELISAで測定したMMP-8濃度に対する相関関係データ。対数的に変換された濃度に対するピアソン相関関係。 $r$ =相関係数。

	MMP-8-IFMA
MMP-8-ELISA	$r = 0.509$ $p < 0.001$ $n = 90$

【0065】

【表8】

表8. IFMAおよびELISAで測定した平均MMP-8濃度。

分析	群	N	平均	SD	SE
MMP-8, IFMA(ng/ml)	ACS患者	24	315.6	337.2	50.3
	対照群	24	117.5	85.0	12.7
MMP-8, ELISA(ng/ml)Amersham	ACS患者	24	126.6	104.0	15.5
	対照群	24	65.6	51.8	7.7

【0066】

MMP-8濃度は、狭心症またはAMI患者および対照群患者からIFMA(図4a)およびELISA(図4b)によって測定し、取得された濃度は、CRP濃度と相関関係があった。(A)IFMAで測定したMMP-8濃度は、相関係数 $r = 0.311$ ( $p = 0.008$ )と統計的に有意な相関関係があった反面、(B)ELISAで測定したMMP-8濃度は、CRP濃度に対して相関係数 $r = 0.301$ ( $p = 0.011$ )と統計的に有意な相関関係があるということを見せてくれた(図4)。したがって、相関関係は、テスト類型に独立的であることを示す。IFMAまたはELISAで測定した(標準偏差を有する)平均MMP-8濃度が、以下の表9に提示されている。

【0067】

10

20

30

40

## 【表 9】

表9. IFMAまたはELISAで取得した(標準偏差を有する)平均MMP-8濃度。  
濃度は、対数的に変換される。

分析	群	平均	SD
MMP-8、IFMA(ng/ml)	対照群	4.57	0.70
	狭心症	5.40	1.11
	AMI	5.44	0.75
	総計	5.04	0.89
MMP-8、ELISA(ng/ml)Amersham	対照群	3.86	0.81
	狭心症	4.39	0.79
	AMI	4.65	0.81
	総計	4.26	0.88

10

## 【 0 0 6 8 】

## 参考文献

Alfakry H, Malle E, Koyani CN, Pussinen PJ, Sorsa T. Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. *Innate Immunity* 2016; 22(1):85-99.

20

Borodulin K, Vartiainen E, Peltonen M, Jousilahti P, Juolevi A, Laatikainen T, Männistö S, Salomaa V, Sundvall J, Puska P. Forty-year trends in cardiovascular risk factors in Finland. *Eur J Public Health* 2015; 25(3):539-46.

Dejonckheere E. et al., Matrix metalloproteinase-8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; 22:73-81.

30

Hendriksen JM, Geersing GJ, Moons KG, de Groot JA. Diagnostic and prognostic prediction models. *J Thromb Haemost.* 2013; Suppl 1:129-41.

Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, Moum B; IBSEN Study Group. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut* 2008; 57(11):1518-23.

40



Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001; 16(104):1899–904.

Hoseini SM, Kalantari A, Afarideh M, et al. Evaluation of plasma MMP-8, MMP-9 and TIMP-1 identifies candidate cardiometabolic risk marker in metabolic syndrome: results from double-blinded nested case-control study. *Metabolism*. 2015; 64:527–38. 10

Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ J*. 2005; 69:1035–1040.

Kormi I, Alfakry H, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Sinisalo J, Sorsa T. The effect of prolonged systemic doxycycline therapy on serum tissue degrading proteinases in coronary bypass patients: a randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *Inflamm Res*. 2014; 63:329-334. 20

Lorenzi S, De Pasquale G, Segal AZ, Beal MF. Dysregulation of the levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in the early phase of cerebral ischemia. *Stroke*. 2003; 34:e37–e38.

Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PRF, Naylor AR, Loftus IM. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation*. 2004; 110:337–343. 30

Payne JB, Golub LM, Stoner JA, Lee H, Reinhardt RA, Sorsa T, Slepian ML. The effect of subantimicrobial-dose-doxycycline periodontal therapy on serum biomarkers of systemic inflammation: a randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial. *J Am Dent Assoc*. 2011; 152(3):262-273.

Pussinen PJ, Sarna S, Puolakkainen M, Öhlin H, Sorsa T, Pesonen E. The balance of serum matrix metalloproteinase-8 and its tissue inhibitor in acute coronary syndrome and its recurrence. *Int J Cardiol*. 2013; 167(2):362-8. 40

Salomaa V, Havulinna A, Saarela O, Zeller T, Jousilahti P, Jula A, Muenzel T, Aromaa A, Evans A, Kuulasmaa K, Blankenberg S. Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10100.

Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 2006; 38:306–21.

10

Tuomainen AM, Nyyssonen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, Sorsa T, Pussinen PJ. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:2722–2728.

Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, Pussinen PJ. Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events. *Eur J Prev Cardiol*. 2014; 21(7):806-812.

20

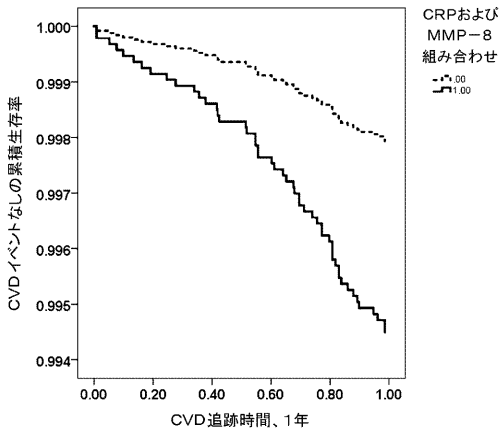
Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, Alvarez-Sabin J, Cairols M, Badimon L. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis*. 2005; 187:161–169.

Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL, Spinale FG. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail*. 2002; 8:390–398.

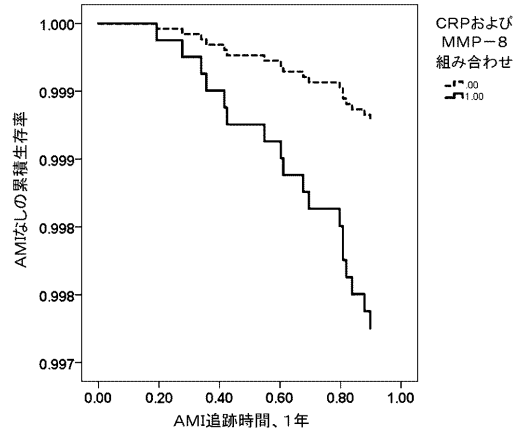
30

Wilson WR, Schwalbe EC, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2005; 92:828–833.

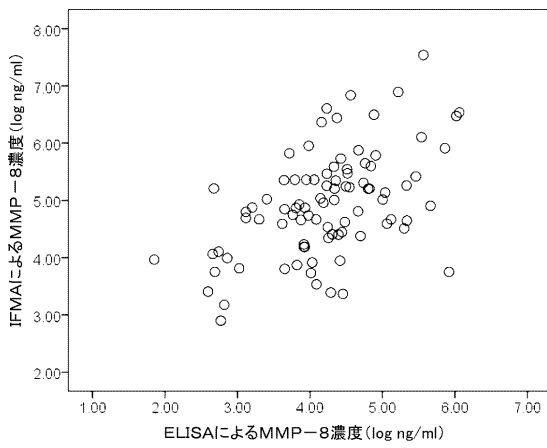
【 図 1 A 】



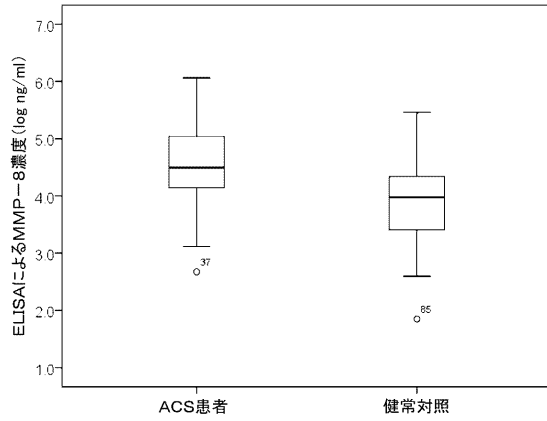
【 図 1 B 】



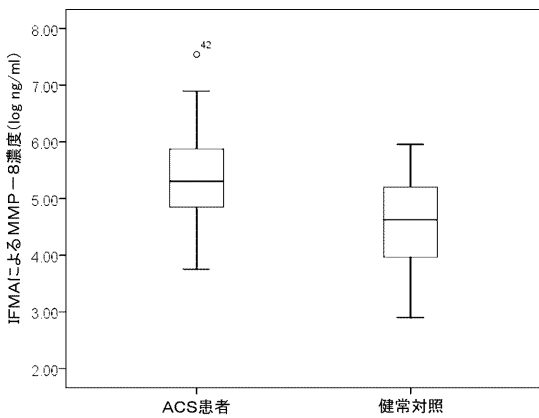
【 図 2 】



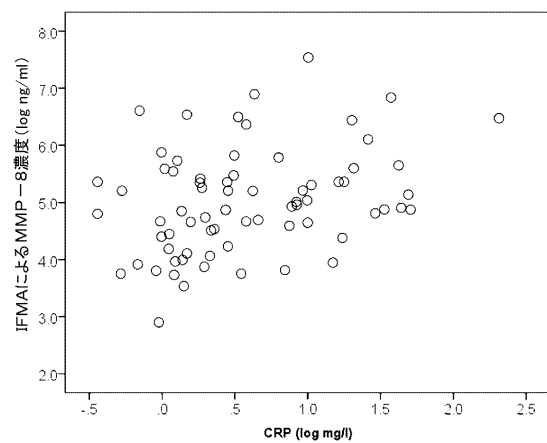
【 図 3 B 】



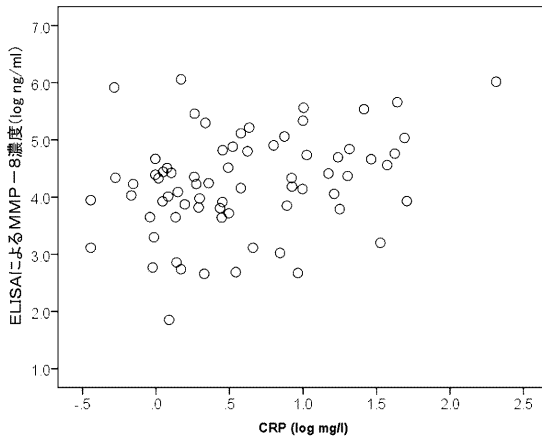
【 図 3 A 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和1年5月30日 (2019.5.30)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

心血管疾患のリスクを決定する方法であって、サンプル中のマトリックスメタロプロテアーゼ - 8 (MMP - 8) および C - 反応性タンパク質 (CRP) を検出する工程、および検出された MMP - 8 および CRP の量を MMP - 8 および CRP の各々のあらかじめ定められた値と比較する工程を含み、MMP - 8 および CRP のレベルの上昇の検出が心血管疾患の存在を示すか、または心血管疾患イベントもしくは心血管疾患のリスクを示す方法。

【 請求項 2 】

前記 MMP - 8 の量が MMP - 8 に対するあらかじめ定められた値を超過し、かつ前記 CRP の量が CRP に対するあらかじめ定められた値を超過する場合に、MMP - 8 および CRP の検出されたレベルが上昇する請求項 1 記載の方法。

【 請求項 3 】

前記 MMP - 8 および CRP のレベルの上昇の検出が、検出後 1 年以内に心血管イベントを発症するリスクを予測する請求項 1 または 2 記載の方法。

【 請求項 4 】

活性化された MMP - 8 が検出される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 請求項 5 】

前記心血管イベントまたは心血管疾患が、心血管疾患（CVD）、狭心症および急性心筋梗塞（AMI）などの冠状動脈疾患（CAD）、脳卒中、高血圧性心臓疾患、リウマチ性心臓疾患、心筋症、心房細動、先天性心疾患、心内膜炎、大動脈瘤ならびに末梢動脈疾患からなるリストより選択される請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

心血管イベントまたは心血管疾患に対する治療の効果をモニタリングするために使用される請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

最初またはその後の心血管イベントのリスクを評価するために使用される請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

無症状心血管疾患を検出するために使用される請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

サンプルが血清、血漿または全血である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

サンプルが血清である請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

MMP - 8 の検出が免疫アッセイで行われる請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

CRP の検出が免疫アッセイで行われる請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫アッセイが、ELISA、IFMA、ラテラルフローおよびマイクロ流体に基づくポイント - オブ - ケア（POC）アッセイ、比濁法、ネフェロメトリー、粒子強化比濁法、粒子強化ネフェロメトリーおよびラテックス凝集法からなる群より選択される 1 つ以上である請求項 11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】

サンプル中の MMP - 8 および CRP の検出に基づき、CVD 疾患の存在または CVD イベントのリスクに対するリスク予測モデルを構築する方法。

【請求項 15】

検出後 1 年以内に心血管イベントを発症するリスクを予測するための、最初またはその後の心血管イベントのリスクを評価するための、心血管疾患の進行または心血管イベントが生じるリスクに対する治療または投薬の有効性をモニタリングするための、または明らかな臨床的症狀より前の無症状心血管疾患の存在を検出するための MMP - 8 および CRP の検出の使用。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI2017/050680
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> See extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: G01N, C07K  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched FI, SE, NO, DK  Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and, where practicable, search terms used) EPODOC, EPO-internal full-text databases, Full-text translation databases from Asian languages, WPIAP, PRH-internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, XPOAC, XPRD, CHEMICAL ABSTRACTS, REGISTRY		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, X	KATO, R. ET AL. Plasma Matrix Metalloproteinase-8 Concentrations are Associated With the Presence and Severity of Coronary Artery Disease. In: Circulation Journal September 2005, Vol. 69, pages 1035-1040, <DOI:doi.org/10.1253/circj.69.1035> the whole document, especially abstract; page 1037, left column, first paragraph; page 1039, left column, third paragraph and right column, last paragraph; Fig. 1; chapter "Methods", "Plasma MMP-8 measurement"	1-15
A	DJURIĆ, T. ET AL. Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-8 in Patients With Carotid Atherosclerosis. In: Journal of Clinical Laboratory Analysis 2010, Vol. 24, pages 246-251, <DOI:10.1002/jcla.20393> abstract; Figures 1 and 2; page 250, left column, last paragraph to right column, first paragraph	1-15
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 09 January 2018 (09.01.2018)		Date of mailing of the international search report 11 January 2018 (11.01.2018)
Name and mailing address of the ISA/FI Finnish Patent and Registration Office FI-00091 PRH, FINLAND Facsimile No. +358 29 509 5328		Authorized officer Tomi Jukkola Telephone No. +358 29 509 5000

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2017/050680

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015128549 A1 (MEDIX BIOCHEMICA AB OY [FI]) 03 September 2015 (03.09.2015) abstract; claims 1, 6, 16, and 19	1-15
A	TUOMAINEN, A.M. ET AL. Serum Matrix Metalloproteinase-8 Concentrations Are Associated With Cardiovascular Outcome in Men. In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology December 2007, Vol. 27, pages 2722-2728, <DOI:10.1161/ATVBAGA.107.154831> the whole document	1-15
A	SORSA, T. ET AL. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. In: Pharmacological Research 2011, Vol. 63, pages 108-113, <DOI:10.1016/j.phrs.32010.10.005> the whole document	1-15
A	ALLAL-ELASMI, M. ET AL. The Measurement of Circulating Matrix Metalloproteinase-8 and its Tissue Inhibitor and their Association with Inflammatory Mediators in Patients with Acute Coronary Syndrome. In: Clinical Laboratory July 2014, Vol. 60, No. 6, pages 951-956, <DOI:10.7754/Clin.Lab.2013.130346> the whole document	1-15
A	RAHEEM, Z.J. ET AL. Assessment of serum levels of MMP-8 and hsCRP in chronic periodontitis patients in relation to atherosclerotic cardiovascular disease. In: J Bagh College Dentistry December 2014, Vol. 26, No. 4, pages 141-146 abstract	1-15
A	WO 2013190041 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 27 December 2013 (27.12.2013) claim 1	1-15
A	WO 9843630 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]) 08 October 1998 (08.10.1998) claims 1, 4, 5, 10, 14, 15, 20, 26, 27, and 35; page 13, lines 27-30; page 20, lines 11-13	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on Patent Family Members**

 International application No.  
 PCT/FI2017/050680

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2015128549 A1	03/09/2015	CA 2940588 A1	03/09/2015
		CN 106232809 A	14/12/2016
		EP 3110949 A1	04/01/2017
		JP 2017507659 A	23/03/2017
		KR 20160146668 A	21/12/2016
		US 2017023571 A1	26/01/2017
		.....	
WO 2013190041 A1	27/12/2013	None	
.....			
WO 9843630 A1	08/10/1998	AT 290375 T	15/03/2005
		AT 530180 T	15/11/2011
		AU 7110300 A	26/03/2001
		AU 782386 B2	21/07/2005
		AU 782386 C	10/08/2006
		AU 7100898 A	22/10/1998
		AU 2005225101 A1	17/11/2005
		CA 2285091 A1	08/10/1998
		CA 2381926 A1	08/03/2001
		CY 1112261 T1	09/12/2015
		DE 69829293 D1	14/04/2005
		DE 69829293 T2	13/04/2006
		DK 1003501 T3	18/07/2005
		DK 1493439 T3	30/01/2012
		EP 1003501 A1	31/05/2000
		EP 1003501 B1	09/03/2005
		EP 1003501 B9	08/06/2005
		EP 1212101 A1	12/06/2002
		EP 1493439 A1	05/01/2005
		EP 1493439 B1	26/10/2011
		EP 1520590 A1	06/04/2005
		EP 1767222 A1	28/03/2007
		EP 1767223 A1	28/03/2007
		EP 2305235 A1	06/04/2011
		EP 2305236 A1	06/04/2011
		ES 2239801 T3	01/10/2005
		ES 2374621 T3	20/02/2012
		JP 2001525058 A	04/12/2001
		JP 3805381 B2	02/08/2006
		JP 2003128582 A	08/05/2003
JP 2003508453 A	04/03/2003		
JP 2008120800 A	29/05/2008		
JP 2013036996 A	21/02/2013		
JP 2015079003 A	23/04/2015		
PT 1003501 E	29/07/2005		



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on Patent Family Members**

International application No.  
PCT/FI2017/050680

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
		PT 1493439 E	10/01/2012
		US 6040147 A	21/03/2000
		US 7030152 B1	18/04/2006
		US 2006104941 A1	18/05/2006
		US 7964614 B2	21/06/2011
		WO 0115744 A1	08/03/2001
.....			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/FI2017/050680**

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**IPC**  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

## フロントページの続き

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

(72)発明者 サロマー、ペッコ

フィンランド共和国、00271 ヘルシンキ、マンネルハイミンチエ、ティーエイチエル - ナショナル インスティテュート フォー ヘルス アンド ウェルフェア、ペーオーベー 30

(72)発明者 ユヒラ、ユーソ

フィンランド共和国、00310 ヘルシンキ、キフィハーンポルク 1デー

(72)発明者 コルポオ、アルミ

フィンランド共和国、05460 ヒュビンカー、ロホカレチエ 19

(72)発明者 チーサラ、シニッカ

フィンランド共和国、00180 ヘルシンキ、ラピンラハデンカツ 23 ベー 35

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 FB03

4B063 QA01 QA19 QQ36 QQ79 QR48 QS33 QX02