

(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2004-528032

(P2004-528032A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2002-574375 (P2002-574375)	(71) 出願人	503080615 ラング、フロリアン LANG, Florian ドイツ連邦共和国 72076 テュービンゲン グメリンシュトラッセ 5 フィジオロジシェス インスティテュ エルスト (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成14年3月21日 (2002.3.21)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月19日 (2003.9.19)	(74) 代理人	100088328 弁理士 金田 暢之
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/003180	(74) 代理人	100106297 弁理士 伊藤 克博
(87) 国際公開番号	W02002/074987	(74) 代理人	100106138 弁理士 石橋 政幸
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002.9.26)		
(31) 優先権主張番号	101 13 876.8		
(32) 優先日	平成13年3月21日 (2001.3.21)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高血圧症の定量的な診断分析

## (57) 【要約】

本発明は、遺伝学的に関連している高血圧症の特定の型を定量的に診断するための、s g kファミリーのヒト相同体の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における直接的な相関の利用に関する。本発明は、特に、h s g k 1 遺伝子中における、個々のヌクレオチドの異なる二つの多型と、遺伝学的に関連する高血圧症の素因との間における直接的な関連の検出に関する。本発明は、加えて、診断標的のh s g k 1、h s g k 2 およびh s g k 3 を検出するために利用される、抗体またはポリヌクレオチドを含む診断キットの提供にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

遺伝学的に決定される高血圧症の特定の型を定量的に診断するための、s g kファミリーのヒト相同体の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における直接的な相関の使用。

## 【請求項 2】

該 s g k ファミリーのヒト相同体は、h s g k 1 遺伝子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

過剰発現または機能改変は、h s g k 1 遺伝子中の、イントロン 6 内におけるヌクレオチド多型 (SNP) : ( T C ) に起因していることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

10

## 【請求項 4】

過剰発現または機能改変は、h s g k 1 遺伝子中の、エキソン 8 内におけるヌクレオチド多型 (SNP) : ( C T ) に起因していることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 5】

s g k タンパク質ファミリーのヒト相同体に対して特異的である抗体、または、厳格な条件下において、s g k 遺伝子ファミリーのヒト相同体とハイブリッド形成することができるポリヌクレオチド、もしくは、これらの抗体とポリヌクレオチドとをともに、これらの相同体の過剰発現または機能的分子改変の定量的な測定のために含んでなる、遺伝学的に決定される、高血圧病態における特定の型の定量的診断用キット。

20

## 【請求項 6】

該 s g k ファミリーのヒト相同体は、h s g k 1 遺伝子であることを特徴とする、請求項 5 に記載のキット。

## 【請求項 7】

該抗体は、SNPにより突然変異されたh s g k 1 タンパク質の変異型に対して特異的である、あるいは、該ポリヌクレオチドは、厳格な条件下において、SNPにより突然変異されたh s g k 1 遺伝子の変異型と、ハイブリッド形成することができることを特徴とする、請求項 6 に記載のキット。

## 【請求項 8】

該ポリヌクレオチドは、厳格な条件下において、イントロン 6 内の SNP : ( T C ) により突然変異されたh s g k 1 遺伝子の変異型と、ハイブリッド形成することができることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

30

## 【請求項 9】

該ポリヌクレオチドは、厳格な条件下において、エキソン 8 内の SNP : ( C T ) により突然変異されたh s g k 1 遺伝子の変異型と、ハイブリッド形成することができることを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 10】

遺伝学的に決定される、高血圧の病態の特定の型を定量的に診断する方法であって、s g k ファミリーのヒト相同体の過剰発現またはこれらの相同体の機能的分子改変が、該相同体のタンパク質に対して特異的である抗体、もしくは、厳格な条件下において、該相同体の DNA または mRNA とハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドを用いて、患者身体由来の試料中の該相同体を定量的に検出することにより、検出されることを特徴とする方法。

40

## 【請求項 11】

該 s g k ファミリーのヒト相同体は、h s g k 1 遺伝子であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

該ポリヌクレオチドは、厳格な条件下において、h s g k 1 遺伝子中の、イントロン 6 内の SNP : ( T C ) の変異型の DNA または mRNA とハイブリッド形成することがで

50

きることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

該ポリヌクレオチドは、厳格な条件下において、h s g k 1 遺伝子中の、エキソン8内のSNP：(C T)の変異型のDNAまたはmRNAとハイブリッド形成することができることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、s g kファミリーのヒト相同体の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における直接的な相関に関する。特に、本発明は、h s g k 1 遺伝子中の、個々のヌクレオチドの異なる二つの多型(一塩基多型：s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m s = SNP)と、遺伝学的に決定される高血圧症の素因との間における直接的な関連の検出に関する。

10

【背景技術】

【0002】

数々の細胞外シグナルは、細胞内におけるリン酸化/脱リン酸化のカスケードを引き起こし、原形質膜およびその受容体から、細胞質および細胞核への、これらのシグナルの迅速な伝達を保証する。これらの可逆的な信号伝達のカスケードにおける特異性は、多数の個別のタンパク質、特に、リン酸基を個々の基質上に転移する、キナーゼによって達成されている。

20

【0003】

その発現は、血清ならびにグルココルチコイドにより増加する、セリン/トレオニンキナーゼである、血清ならびにグルココルチコイド依存型キナーゼ(s g k)は、最初、ラット乳癌細胞からクローンされた(ウェブスターら(W e b s t e r e t a l . )、1993年)。h s g k 1と称される、ヒト型のs g kは、肝臓細胞からクローンされた(ワルデッガーら(W a l d e g g e r e t a l . )、1997年)。h s g k 1の発現は、細胞容積の調節により影響されることが見いだされた。現時点では、ラットのs g kの発現においては、かかる細胞容積に対する依存性は検出されていない。さらには、該ラットのキナーゼは、上皮Na<sup>+</sup>チャンネル(ENaC)を刺激することが見いだされた(チェンら(C h e n e t a l . )、1999年、ナレイ-ペジェス-トスら(N a r a y - P e j e s - T o t h e t a l . )、1999年)。なお、ENaCは、腎臓のNa<sup>+</sup>排泄における、決定的な役割を果たしている。ENaCの活性の増大は、ナトリウムイオンの腎臓内における貯留を引き起こし、そして、その結果、高血圧症の進行につながる。

30

【0004】

最後に、ヒトs g k 遺伝子ファミリーの別のメンバー二つ：h s g k 2 および h s g k 3 が、クローンされ(コバヤシら(K o b a y a s h i e t a l . )、1999年)、h s g k 1と同様に、それらは、両者とも、PI3キナーゼ経路を介するIGF1ならびにインスリンにより活性化される。電気生理学的実験によって、h s g k 2 および h s g k 3の共発現も、ENaCの活性の有意な増大を引き起こすことが解明された。

40

【0005】

ドイツ特許出願公開第19708173A1号明細書によると、該疾患において、細胞容積の変化が決定的な病態生理学的な役割を果たしている、多くの疾患、例えば、高ナトリウム血症、低ナトリウム血症、真性糖尿病、腎不全、異化作用亢進、肝性脳症ならびに細菌またはウイルス感染において、h s g k 1は、その診断での相当の可能性を有することがわかる。

【0006】

国際公開第00/62781号パンフレットは、腎臓におけるNa<sup>+</sup>吸収の増加を引き起こす、h s g k 1による内皮Na<sup>+</sup>チャンネルの活性化を、既に記載している。この腎臓におけるNa<sup>+</sup>吸収の増加は、高血圧を伴っているため、h s g k 1の発現の増大は、高

50

血圧症をもたらし、また、h s g k 1 の発現の抑制は、低血圧症をもたらすと推定された。

【0007】

E N a C の過活性化を伴う、ヒト相同体 h s g k 2 および h s g k 3 の過剰発現または活性亢進と、結果として生ずる腎臓の  $\text{Na}^+$  吸収の増加およびその結果の高血圧との間における同様の関係が、2000年8月28日出願の「診断および治療標的としての s g k 2 および s g k 3」という名称の未公開、先の優先権ドイツ出願(国内願番 A 35 0 4 8)にも記載されている。さらには、動脈性高血圧症に関する、診断でのキナーゼ s g k 2 および s g k 3 の有用性は、既に議論されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、s g k ファミリーのヒト相同体の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における直接的な相関、すなわち、直接的な関連に対する、実験的な検証を見出すことである。

【0009】

上記の意味における、機能的分子改変を含んでいる、s g k ファミリーのヒト相同体は、対応するタンパク質の特性、特に、触媒特性または基質特異性が影響を受けるような、突然変異がなされている、s g k ファミリーの相同体と、本明細書中では、理解すべきである。

【0010】

本発明のさらなる課題は、遺伝学的に決定される型の高血圧の素因を診断する方法において、s g k ファミリーのヒト相同体の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における、この直接的な相関または関連を利用することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

ヒト s g k 遺伝子の過剰発現または機能的分子改変と高血圧症との間における直接的な相関の検出は、本発明の構成の範疇において提供され、特に、h s g k 1 遺伝子の例に対して、実験的に証明される。

【0012】

したがって、上記課題の解決は、遺伝学的に決定される高血圧の型を診断するために、s g k ファミリーのヒト相同体、特に、h s g k 1 遺伝子の過剰発現または機能的分子改変と、高血圧症との間における、この直接的な相関の利用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

上記の課題は、本発明の技術的範囲内において、特に、h s g k 1 遺伝子における特定の変異型中に存在する際には、患者に高血圧となる明確な傾向を持たせる、異なる二つの S N P を、h s g k 1 遺伝子中において、特定されたことで達成されている。h s g k 1 遺伝子中における、あるいは、s g k 遺伝子ファミリーの他のヒト相同体中における、これらの S N P の存在を、高血圧症の発症に対する遺伝学的に決定される素因の診断指標として、患者に由来する身体試料中において、検出することができる。

【0014】

上記の課題はさらに、遺伝的に決定される高血圧症の特定の型を定量的に診断するための診断方法を提供することで達成され、該方法においては、s g k ファミリーのヒト相同体の過剰発現またはこれらの相同体の機能的分子改変を、該相同体のタンパク質に対して特異的である抗体、もしくは、厳格な条件下において、該相同体の D N A または m R N A とハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドを用いて、該患者の身体試料中の該相同体の定量的な検出により、ならびに、この方法の実施に適合する診断キットにより検出される。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明にかかる該キットは、好ましくは、h s g k 1 タンパク質に対して特異的である前記抗体、もしくは厳格な条件下において、該 h s g k 1 遺伝子とハイブリッド形成することができる前記ポリヌクレオチドを含む。

【0016】

この診断キットは、特に、特異的なSNPに対応している、h s g k 1 遺伝子中において突然変異されているh s g k 1 タンパク質の断片を含む、h s g k 1 タンパク質の領域に対して明確に特異的である、抗体を備えている。しかし、このキットは、h s g k 1 遺伝子、あるいはs g kファミリーの他のヒト相同体の、より頻度の高い対立遺伝子に対する抗体をも含むことができ、それを用いて、これらの相同体またはh s g k 1 発現の変移されたレベルを定量的に検出することができる。

10

【0017】

さらに、本発明にかかる該診断キットは、好ましくは、h s g k 1 遺伝子中における、高血圧関連しているSNPの一つまたは他方の変異型を含む、特異的領域を有しており、また、そのため、身体試料由来のゲノムDNA、cDNAまたはmRNAとの厳格な条件下におけるハイブリッド形成によって、該患者のh s g k 1 遺伝子中における特異的SNPの検出に適している、ポリヌクレオチドを含む。

【0018】

本発明にかかる、高血圧症と、s g kファミリーのヒト相同体との間における直接的な相関は、個別の突然変異が、一部の患者において、h s g k 1、h s g k 2またはh s g k 3 遺伝子中で発生しえ、それは、該キナーゼh s g k 1、h s g k 2またはh s g k 3の発現のレベルまたは機能特性を変異させ、従って、高血圧症になる、遺伝子的な起因している傾向をもたらすことを意味する。かかる突然変異は、例えば、s g k 遺伝子座の調節遺伝子領域中またはイントロン配列中に起こる可能性があり、したがって、対応するキナーゼの過剰発現やENaCの過活性化を引き起こす。一方、s g k 遺伝子座の遺伝子構成の個別的な差異も、該遺伝子のコーディング領域に影響を及ぼすこともある。該コーディング領域における突然変異は、また、場合によっては、対応するキナーゼの機能の変化、例えば、該キナーゼの変異された触媒特性をもたらすことができる。従って、上述する、突然変異の種類の内いずれも、ENaCの活性の増大と、従って、最終的には、患者における遺伝子的な起因している型の高血圧の発症を引き起こす可能性がある。

20

【0019】

患者における遺伝学的に決定される型の高血圧症の進行を引き起こす、s g kのヒト相同体中におけるこれらの突然変異は、一般的に、これらの相同体のエキソン中またはイントロン領域中における、所謂、一塩基多型(SNPs)である。h s g k 遺伝子のエキソン領域中における該SNPは、それらの極僅かな頻度で発生する変異型(以後、突然変異型と呼ぶ)においては、場合によっては、対応するh s g k タンパク質中において、アミノ酸交換を、その結果、該キナーゼの機能的な改変をもたらすことがある。h s g k 遺伝子のイントロン領域中または調節配列中におけるSNPは、それらの突然変異型において、場合によっては、対応するキナーゼの発現のレベルの変化を引き起こすことがある。

30

【0020】

本発明の技術的な範囲内において、異なる患者(双生児)のh s g k 1 遺伝子の遺伝子型を、各例において、異なる体位(座位、立位、臥位)の身体について測定された、実測の収縮期および拡張期血圧値と比較し、統計学的に評価する、相関試験を実施した。

40

【0021】

そして、本発明の技術的な範囲内において、タンパク質レベルにおけるアミノ酸交換にはつながらない(配列番号2を参照)、両対立遺伝子上のエキソン8における(C T)交換(第1のSNP、配列番号1を参照)の存在(エキソン8におけるSNPの同型接合TTキャリア)は、有意により高い血圧値を、したがって、遺伝学的に決定される高血圧の傾向をもたらすことが示された(表3)。

【0022】

さらに、イントロン6からエキソン7へのトランジション域中における、ドナー・スプラ

50

イシング側に、第1のSNPから551bp離れて位置の特定がなされている、(T C)交換(第2のSNP)の存在は、その同型接合型においては、より低い血圧値を、したがって、遺伝学的に決定される高血圧のより低い傾向をもたらすことが示された(表3)。

#### 【0023】

本発明にかかる、hsgk1遺伝子中におけるSNPの双方ともに、タンパク質レベルでのアミノ酸交換をもたらさないで、それらに起因する、高血圧症に対する、より高くか、あるいはより少なくかの決定を下されている遺伝学的な素因は、おそらくは、該hsgk1遺伝子の発現の変異されたレベルに基づいている。

#### 【0024】

エキソン8中における該第1のSNP(C T)は、図1にて詳細に説明する。図1は、hsgk1遺伝子の個々のエキソン、および、それぞれは、エキソン番号、エキソンID、関連する「配列コンティグ(sequence-continuity)」および鎖、ならびにエキソンの開始点、終了点と長さによる記述を示している。エキソン8中におけるSNPの、該読み枠内の(C T)交換の正確な位置は、エキソン8中の、暗色にマーキングされたCで表示する。図1中のエキソン8における淡色マーキングは、ゲノム内における位置を明確に規定する、hsgk1遺伝子におけるSNPフランキング配列を示す。

#### 【0025】

イントロン6中における、第2のSNP(T C)は、直接配列決定により特定され、そして、hsgk1遺伝子(エキソンおよびイントロンを含む)中において、hsgk1遺伝子のイントロン6からエキソン7へのドナー・スプライシング部位中、エキソン8中の第1のSNPから正確に551bp上流に位置が特定され、また、TのCへの交換に関係することで、明確に特徴付けられる。

#### 【0026】

また、種々の体位の身体について測定された、収縮期および拡張期血圧値がすべて、hsgk1遺伝子の遺伝子型に対して、同じ程度で依存性を示すことを示すことができた(表4)。すなわち、表4から、患者の実測血圧と、そのhsgk1遺伝子中における前述の多型(SNP)の発生との間に認められる相関は、実際に、統計学的に有意であることがわかる。

#### 【0027】

さらには、hsgk1遺伝子中の、該分析された二つのSNPは、それらの相関発生の頻度は、大きい不均衡を示している(表5)。エキソン8中の該SNPのCCキャリアの大半は、イントロン6中の該SNPのTTキャリアでもある(64%)が、逆は、そうではない(エキソン8のTTキャリアの2%のみが、イントロン6のCCキャリアでもある)。

#### 【0028】

患者の血圧と、hsgk1遺伝子座のその個別的な遺伝子変異型との間において、最初に検出された相関は、hsgk1に対して特異的な、特異抗原、あるいはポリヌクレオチドが、特殊な、遺伝学的に決定される高血圧症の傾向の診断に適していることを示している。この特殊な、遺伝学的に起因している型の高血圧症は、hsgk1の発現の増加、すなわち、hsgk1の過剰発現により、あるいは、場合によっては、改変された機能特性によっても特徴づけることができる。

#### 【0029】

sgkファミリーの2つの相同性キナーゼ、hsgk2とhsgk3も、ENaCを活性化するので、本発明によれば、hsgk2またはhsgk3に対して特異的である、特異抗体およびポリヌクレオチドは、特殊な、遺伝学的に決定される型の高血圧症の診断的分析に同様に適している。

#### 【0030】

hsgk1遺伝子中における、該2つのSNPの発生が、高血圧症の傾向と相関するという、本発明にかかる知見は、特に、hsgk1遺伝子中の該2つのSNPの1つまたは他

10

20

30

40

50

の変異型を有するポリヌクレオチドは、患者の身体試料由来の内因性DNA(cDNAまたはゲノムDNA)またはmRNAとのハイブリッド形成による、遺伝学的に決定される型の高血圧症の診断に特に適しているということを示している。

【0031】

同様に、本結果によれば、hsgek1タンパク質またはそのヒト相同体の1つ中の、特異的な高血圧関連性の多型(SNP)に対して特異的である抗体は、遺伝学的に決定される高血圧の素因の診断に適している。タンパク質レベルでの高血圧関連性の多型をももたらす、これらのSNPは、特に、hsgek1タンパク質の機能的な変化に関連し、従って、高血圧の素因の起因となると思われる。

【0032】

従って、本発明は、sgkファミリーのヒト相同体、特にhsgek1の過剰発現または機能的分子変化と、高血圧症との間における直接的な相関、すなわち、直接的な関連性の、遺伝学的に決定される高血圧症の特定の型の定量的診断のための利用に関する。

【0033】

特に、高血圧症の傾向と相関する、hsgek1遺伝子中における、該2つのSNPは、遺伝学的に決定される高血圧症の定量的診断のために使用される。

【0034】

本発明はさらに、遺伝学的に決定される型の高血圧症を定量的に診断する方法に関し、該方法では、sgkファミリーのヒト相同体の過剰発現、あるいはこれらの相同体の機能的分子変化を、該相同体のタンパク質に対して特異的である抗体、もしくは厳格な条件下において、該相同体のゲノムDNA、cDNAまたはmRNAとハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドを用いた、患者の身体試料中の該相同体の定量的検出により検出する。

【0035】

本発明にかかる、この診断方法において、利用される患者の身体試料は、好ましくは血液試料または唾液試料であり、それは、細胞物質をも含み、また、比較的少ない費用で患者から採取することができる。しかし、細胞も含む他の身体試料、例えば、組織試料等も、利用することもできる。該身体試料のこの細胞に含まれる物質から、標準的方法(サムブルック ジェーおよびラッセル ディー ダブリュ(Sambrook J. and Russell D.W.(2001年)ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(Cold Spring Harbor)、シーエスエイチエルプレス(CSHL Press))に従って、ゲノムDNAまたはcDNAのいずれか、あるいはmRNAを調製することができる、また、必要に応じて増幅した上で、次いで、このゲノムDNA、cDNA、あるいはmRNAと特異的にハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドと、厳格な条件下において、ハイブリッド形成させる。さらに、身体試料(血液、唾液、組織等)の細胞に含まれる物質から、標準的方法(サムブルック ジェーおよびラッセル ディー ダブリュ(Sambrook J. and Russell D.W.(2001年)ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(Cold Spring Harbor)、シーエスエイチエルプレス(CSHL Press))によって、タンパク質抽出物を単離することもでき、次いで、このタンパク質に対して特異的である抗体とともに、インキュベートすることにより、その中の対応するsgkタンパク質を、定量的に検出することができる。

【0036】

本発明にかかる方法においては、hsgek1タンパク質に対する抗体、もしくは該hsgek1遺伝子のゲノムDNA、cDNAまたはmRNAとハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドを使用することが好ましい。

【0037】

本発明にかかる方法においては、特に、hsgek1遺伝子中のイントロン6におけるSNPの変異型、あるいは、hsgek1遺伝子中のエキソン8におけるSNPの変異型のDNA、cDNAまたはmRNAと、厳格な条件下において、ハイブリッド形成することが

10

20

30

40

50

できるポリヌクレオチドを使用する。

【0038】

この明細書中では、厳格な条件下におけるハイブリッド形成とは、ハイブリッド形成温度およびハイブリッド形成溶液のホルムアミド含量に関して、関連の技術文献（サムブルック ジェーおよびラッセル ディー ダブリュ（Sambrook J. and Russell D. W. (2001年) ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（Cold Spring Harbor）、シーエスエイチエルプレス（CSHL Press））に記載されているような、ハイブリッド形成条件下におけるハイブリッド形成を意味する。

【0039】

加えて、本発明は、s g kタンパク質ファミリーのヒト相同体に対して特異的である抗体、または、厳格な条件下において、s g k遺伝子ファミリーのヒト相同体とハイブリッド形成することができるポリヌクレオチド、もしくはこれらの抗体とポリヌクレオチドとともに、これらの相同体の過剰発現または機能的分子改変の定量的測定のために含んでなる、遺伝学的に決定される型の高血圧の特定の型に対する定量的診断用キットに関する。

【0040】

該キット中に含まれる抗体は、該h s g k 1タンパク質に対して特異的であることが好ましく、また、該キットに含まれるポリヌクレオチドは、該h s g k 1遺伝子とハイブリッド形成することができることが好ましい。

【0041】

特に好ましくは、該診断キットは、イントロン6中のSNP（T C）またはエキソン8中のSNP（C T）の変異型のゲノムDNA、cDNAまたはmRNAとハイブリッド形成することができるポリヌクレオチドを含むことができる。

【実施例】

【0042】

以下の実施例により、本発明を詳細に説明する。

【0043】

実施例 1

相関分析のために、75組の二卵性双生児を募集した（ブスヤーンら（Busjahn et al.）、J. Hypertens. 1996年、第14巻、1195～1199ページ、ブスヤーンら（Busjahn et al.）、Hypertension、1997年、第29巻、165～170ページ）。該被験者はすべて、ドイツ白色人種に属しており、ドイツの種々の地域出身者であった。二卵性であることを立証するため、ならびに、さらなる分子遺伝学的分析に供するために、双生児の組および両親から血液試料を採取した。参加している各被験者は、事前に医学的検査を受けた。どの被験者も、慢性の医学的状態を有することは認められなかった。5分後に、被験者の血圧を、熟練した医師が、較正済みの水銀血圧計を用いて座位で測定した（1分間隔で2回測定）。該2回の測定の平均値を、血圧値として用いた。

【0044】

相関試験における二卵性双生児の利点は、正確に同じ年齢であることと、それらの表現型に対する外的影響が最小限であるとみなすことができることである（マーチンら（Martin et al.）、Nat. Genet. 1997年、第17巻、387～392ページ）。複雑な遺伝的疾患を解明するための双生児に関する研究の重要性が、最近マーチンら（Martin et al.）（1997年）によって記述された。

【0045】

双生児が二卵性であることは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて5つのマイクロサテライトマーカを増幅して確認した。このマイクロサテライトマーカの分析においては、異なる各個人ごとに高度に可変な領域を含む、デオキシリボ核酸（DNA）の断片を、特異的なオリゴヌクレオチドを用いてPCRにより増幅する。ゲノムのこれらの領域中の高い変動性は、該増幅された断片の大きさのわずかな差異により検出することができ

10

20

30

40

50

、また、遺伝子の対応する部位に多様性が存在する場合、ゲル電気泳動によるPCR産物の分離後に、マイクロサテライトバンドと呼ばれるダブルバンドが生ずる(ベッカーら(Becker et al. )、J. Reproductive Med. 1997年、第42巻、260~266ページ)。

【0046】

標的遺伝子、この場合にはhsgk1遺伝子の分子遺伝学的分析のために、hsgk1遺伝子座のすぐ近くの、さらに3つのマイクロサテライトマーカー領域(d6s472、d6s1038、d6s270)をPCRにより増幅し、次いで、他の双生児ならびに両親の対応する試料と対比した。この手法で、双生児が、検討対象の対立遺伝子と比較して、その両親由来の同じ、あるいは異なる対立遺伝子を受け継いでいるかを決定することが可能であった。相関分析は、所謂「構造均衡モデル(structural equation modeling)」(SEM)モデル(イーブスら(Eaves et al. )、Behav. Genet. 1996年、第26巻、519~525ページ、ニール(Neal)、1997年、Mx: Statistical modeling, Box 126 MCV、バージニア州リッチモンド23298、Department of Psychiatry、第4版)を利用して、実施した。このモデルは、被験ペアは、0、1つまたは2つの同じ対立遺伝子を有する確率により特徴づけられる、被験ペアの分散-共分散マトリクスに基づいている。該表現型に関する分散を、すべての遺伝子の遺伝学的バックグラウンドに基づく分散(A)、標的遺伝子、この場合はhsgk1遺伝子の遺伝学的バックグラウンドに基づく分散(Q)、および外的影響に起因する分散(E)に分けた。

10

20

【0047】

$$VAR = A^2 + Q^2 + E^2$$

3つの可能な対立遺伝子の組合せ;  $IBD_0$ 、 $IBD_1$ 、 $IBD_2$  ( $IBD$  = 「血統による一致性」、同じ対立遺伝子が0、1または2)について、被験ペアの共分散を次のように定義した。

【0048】

$$COV( IBD_0 ) = 0.5 A^2$$

$$COV( IBD_1 ) = 0.5 A^2 + 0.5 Q^2$$

$$COV( IBD_2 ) = 0.5 A^2 + Q^2$$

30

hsgk1遺伝子座の遺伝子構成と被験者の血圧との間における相関を評価するために、hsgk1標的遺伝子に関する遺伝的分散を考慮に入れたモデルと考慮に入れないモデルとの差を<sup>2</sup>統計量として計算した。各ペアおよび各遺伝子座について、対立遺伝子比を患者の遺伝子型に基づくいわゆる「マルチポイント(multipoint)」モデル(MAPMAKER/SIBS、クルグリアクら(Kruglyak et al. )、Am. J. Hum. Genet. 1995年、第57巻、439~454ページ)により計算した。

【0049】

上述の<sup>2</sup>統計量と比較して、分散-共分散推定に基づく解析方法のより大きな情報提供価値(遺伝疫学のためのエスエージーイー統計解析(S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology)、リリース2.2. コンピュータプログラムパッケージ(Release 2.2. Computer program package)、ケースウエスタンリザーブ大学疫学生物統計学科(Case Western Reserve University) [米国オハイオ州クリーブランド所在]、1996年)が、最近、模擬試験において確認された(ファルカーら(Fulker et al. )、Behav. Gen. 1996年、第26巻、527~532ページ)。ランダーおよびクルグリアク(Lander and Kruglyak)の基準(ランダーら(Lander et al. )、Nat. Genet. 1995年、第11巻、241~246ページ)に対する有意な相関を確保するために、有意水準 $p < 0.01$ を採用した。

40

50

## 【0050】

この相関試験の結果を表1に示す。

## 【0051】

## 【表1】

表1：

表現型	最大 $\chi^2$	p
収縮期血圧値 (臥位)	4.44	0.04
拡張期血圧値 (臥位)	14.36	0.0002
収縮期血圧値 (座位)	5.55	0.019
拡張期血圧値 (座位)	4.92	0.027
収縮期血圧値 (立位)	1.91	0.17
拡張期血圧値 (立位)	4.83	0.028

表1からわかるように、容認有意水準  $p < 0.01$  を僅かに超えるか、または全く超えていない、有意水準  $p$  の低値は、*hsgk1* 遺伝子部位に関する遺伝学的分散と実測血圧の表現型により決定される分散との間に直接的な相関が存在することを証明している。

## 実施例2

*hsgk1* 遺伝子のゲノム構成は既に記載されている (ワルデグラーら (Waldegger et al.)、Genomics、第51巻、299ページ、1998年、[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515))。

## 【0052】

その存在が、高血圧症の発症の素因に関連している、SNPを同定するために、最初に、データバンクに公表されている、*hsgk1* 遺伝子中のSNPを、真のSNPsである (そして、配列決定の誤りではない) か、高血圧症の素因の診断的検出に対する基礎を提供するに十分な多型性であるかを検討した。CのTへの交換に関連する、エキソン8中の、SNP rs1057293は、必要とする前提条件を満たしていた ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?snp=1057293](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?snp=1057293)、[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=1057293](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293))。さらに、*hsgk1* 遺伝子内において、イントロン6からエキソン7へのドナー・スプライシング部位中、該第1のSNPから正確に551bp離れた位置に特定され、そして、TのCへの交換に関係する、第2のSNPは、直接配列決定により同定した。イントロン6中の (TC) およびエキソン8中の (CT) の、これら2つのSNPを、以下に述べるように解析した。

## 【0053】

PCR増幅後、各場合、1単位のアルカリホスファターゼと1単位のエキソヌクレアーゼを加えて、PCRプライマーを変性し、dNTPsを脱リン酸化した。PCRは、9600 Thermocycler (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) 中、95 で10分間、次いで、95 で15秒間、引き続き、62 で15秒間、引き続き、72 で30秒間を35サイクル、ならびに72 で10分間の伸長ステップの条件で実施した。

## 【0054】

イントロン6のSNP (TC) 用のプライマー 5' - CTC CTT GCA GA G TCC GAA およびエキソン8のSNP (CT) 用のプライマー 5' - ACC AAG TCA TTC TGG GTT GCを用いて、部分配列決定の反応を実施

10

20

30

40

50

した。0.15 pmolの精製済みPCR産物を、配列決定PCRにおける鋳型として用いた。配列決定PCRのために、次の個別ステップ：96 で10秒間の変性ステップ、50 で10秒間のアニーリングステップおよび60 で30秒間の伸長ステップを用いて、9600 Thermocycler中で、25増幅サイクルを行った。

【0055】

hsbk1遺伝子のSNP遺伝子型と血圧との間における、何らかの相関を決定するために、そのhsbk1遺伝子のSNP遺伝子型が決定された同じ患者について、収縮期および拡張期血圧値を、臥位、立位および座位で測定した。

【0056】

表2は、いくつかの人口統計学的双生児データ、ならびに該hsbk1遺伝子座の遺伝子構成と実測血圧との間における相関分析の結果を示す。すべての体位での実測血圧に対する強い遺伝学的な影響が、被験者において検証された。

【0057】

【表2】

表2：

表現型	一卵性 双生児	二卵性 双生児	(r 一卵性/r 二卵 性)	p (相関)
N	200	132		
年齢(歳)	29±12	31±12		
性別(男/女)	52/148	85/47		
身長(cm)	169±8	170±8		
体重(kg)	65±11	67±12		
肥満指数(BMI) 体重/身長 <sup>2</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	22.4±3.5	22.8±3.4		
収縮期血圧(臥位)(mmHg)	128±17	124±14	0.69 (0.69/0.31)	0.04
拡張期血圧(臥位)(mmHg)	71±12	71±11	0.66 (0.66/0.42)	0.0002
収縮期血圧(座位)(mmHg)	125±16	123±13	0.74 (0.74/0.38)	0.019
拡張期血圧(座位)(mmHg)	73±11	73±10	0.72 (0.72/0.51)	0.027
収縮期血圧(立位)(mmHg)	124±15	122±14	0.67 (0.66/0.48)	0.04
拡張期血圧(立位)(mmHg)	80±10	79±10	0.64 (0.63/0.40)	0.0002

表3は、本発明にかかる、相関試験のさらなる結果を示す。エキソン8中のSNPにおいて認められた対立遺伝子頻度は、C91%およびT9%、イントロン6中のSNPにおいては、T79%およびC21%である(両多型について、ハーディ-ワインバーグ(Hardy-Weinberg)平衡が維持されていた)。

【0058】

実測血圧は、すべての体位(座位、臥位、立位)で同じ傾向を示した。エキソン8中のSNPの同型接合性CCキャリアと異型接合性CTキャリアは、血圧値における差異を示さなかったが、エキソン8中のSNPの同型接合性TTキャリアよりも、はるかに低い収縮期および拡張期血圧を示した。

## 【 0 0 5 9 】

相関試験の対応する結果は、イントロン 6 中の S N P においては、エキソン 8 中の S N P と比較して、一致性が低い。しかし、イントロン 6 中の S N P の同型接合性 C C キャリアは、一般的に、イントロン 6 中の S N P の同型接合性 T T キャリアおよび異型接合性 T C キャリアよりも、低い血圧値を有している。

## 【 0 0 6 0 】

## 【 表 3 】

表 3 :

表現型	エキソン 8 中の第 1 の SNP CC	エキソン 8 中の第 1 の SNP CT	エキソン 8 中の第 1 の SNP TT	エキソン 8 中の第 1 の SNP CC/CT	イントロン 6 中の第 2 の SNP TT	イントロン 6 中の第 2 の SNP CT	イントロン 6 中の第 2 の SNP CC	イントロン 6 中の第 2 の SNP TT/CT
収縮期血圧 (臥位)	125±15	125±18	132±14	125±16	125±16	128±18	119±6	126±16
拡張期血圧 (臥位)	70±10	72±13	74±12	71±11	71±10	72±13	67±10	71±11
収縮期血圧 (座位)	124±14	123±15	129±13	124±14	124±14	125±17	117±6	124±14
拡張期血圧 (座位)	72±10	74±10	79±9	73±10	73±10	74±11	72±9	73±10
収縮期血圧 (立位)	123±15	123±14	129±13	123±15	123±14	126±16	119±8	123±15
拡張期血圧 (立位)	79±10	81±10	84±8	80±10	80±10	82±11	78±8	80±10

10

20

30

表 4 は、血圧を測定した体位（座位、立位、臥位）に関わりなく、イントロン 6 中の S N P の遺伝子構成が、収縮期および拡張期血圧について実質的に同様に有意であることを詳細に示す。エキソン 8 中の S N P の遺伝子構成の有意性に関する結果も同様であるが、異なる体位における、実測収縮期および拡張期血圧値間の有意性の関連は、イントロン 6 中の S N P に対するものよりも、割る程度より顕著でない。

## 【 0 0 6 1 】

## 【 表 4 】

表 4 :

表現型	イントロン 6 中の第 2 の SNP	エキソン 8 中の第 1 の SNP
収縮期血圧 (臥位)	< 0.01	< 0.05
拡張期血圧 (臥位)	< 0.05	0.08
収縮期血圧 (座位)	< 0.05	< 0.05
拡張期血圧 (座位)	< 0.01	0.08
収縮期血圧 (立位)	< 0.05	0.07
拡張期血圧 (立位)	< 0.05	0.09

10

表 5 から判るように、解析した 2 つの SNP 間に強い相関平衡があり、エキソン 8 中の SNP の CC キャリア大半は、イントロン 6 中の SNP の TT キャリアでもある (64%) が、逆はそうではない (エキソン 8 の TT キャリアの 2% のみが、イントロン 6 の CC キャリアである)。

【 0 0 6 2 】

20

【表 5】

表 5 :

	イントロン 6 TT	イントロン 6 TC	イントロン 6 CC
エキソン 8 CC	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
エキソン 8 CT	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
エキソン 8 TT	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 3 】

【図 1】図 1 は、h s g k 1 遺伝子の個々のエキソン、および、それぞれについて、エキソン番号、エキソン ID、関連する「配列コンティグ (sequence - contig)」および鎖、ならびにエキソンの開始点、終了点と長さを示している。

## 【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/074987 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03180
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
21. März 2002 (21.03.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 13 876.8 21. März 2001 (21.03.2001) DE
- (71) Anmelder und  
(72) Erfinder: LANG, Florian [DE/DE]; Im Roibad 52, 72076  
Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSMAHN, Andreas  
[DE/DE]; Charité Universitätsklinikum, Med. Fakultät  
Ludwigs-Universität Berlin, Schumannstr. 21/22, 10117  
Berlin (DE); LUF, Friedrich, C. [DE/DE]; Franz Vol-  
hard Klinik, Wiltberg Strasse 50, 13125 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bandshle, Pa-  
genberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck,  
Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AI, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Verföfentlich:**  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: QUANTITATIVE DIAGNOSTIC ANALYSIS OF HYPERTONIA

(54) Bezeichnung: QUANTITATIVE DIAGNOSTISCHE ANALYSE DER HYPERTONIE

(57) Abstract: The invention relates to the use of the direct correlation between the overexpression or the functional molecular modification of human homologues of the sgk family and hypertonia for quantitatively diagnosing a specific form of genetically related hypertonia. The invention particularly relates to the detection of a direct relationship between two different polymorphisms of individual nucleotides in the hsgk1 gene and the genetically related predisposition to hypertonia. The invention additionally relates to the provision of a diagnostic kit containing antibodies or polynucleotides used for detecting diagnostic targets hsgk1, hsgk2 and hsgk3.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis eines unmittelbaren Zusammenhangs zwischen zwei unterschiedlichen Polymorphismen einzelner Nucleotide im hsgk1-Gen und der genetisch bedingten Prädisposition zur Hypertonie. Die Erfindung betrifft weiterhin die Bereitstellung eines Diagnosekits enthaltend Antikörper oder Polynucleotide zum Nachweis der diagnostischen Targens hsgk1, hsgk2 und hsgk3.

WO 02/074987 A2

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 1 -

5 **Quantitative diagnostische Analyse der Hypertonie**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft die direkte Korrelation zwischen der Überexpression  
oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie  
und der Hypertonie. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis eines unmittelbaren  
Zusammenhangs zwischen zwei unterschiedlichen Polymorphismen einzelner Nukleotide  
(single nucleotide polymorphisms = SNP) im hsgk1-Gen und der genetisch bedingten  
15 Prädisposition zur Hypertonie.

Zahlreiche extrazelluläre Signale führen zu intrazellulären Phosphorylierungs-  
/Dephosphorylierungskaskaden, um eine schnelle Übertragung dieser Signale von der  
Plasmamembran und ihren Rezeptoren in das Zytoplasma und den Zellkern zu  
20 gewährleisten. Die Spezifität dieser reversiblen Signaltransduktionskaskaden wird durch  
eine Vielzahl von einzelnen Proteinen, insbesondere von Kinasen, die eine Phosphatgruppe  
auf individuelle Substrate übertragen, ermöglicht.

Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (sgk), eine Serin/Threonin-Kinase,  
25 deren Expression durch Serum und Glucocorticoide gesteigert wird, wurde zunächst aus  
Rattenmammarykarzinomzellen kloniert (Webster et al., 1993). Die humane Version der  
sgk, die hsgk1, wurde aus Leberzellen kloniert (Waldegger et al., 1997). Es zeigte sich, daß  
die Expression der hsgk1 durch die Regulation des Zellvolumens beeinflusst wird. Für die  
Expression der Ratten-sgk konnte eine solche Abhängigkeit vom Zellvolumen bisher nicht  
30 nachgewiesen werden. Weiterhin ergab sich, daß die Ratten-Kinase den epithelialen Na<sup>+</sup>-  
Kanal (ENaC) stimuliert (Chen et al., 1999; Naray-Pejes-Toth et al., 1999). Der ENaC  
spielt wiederum eine entscheidende Rolle bei der renalen Na<sup>+</sup>-Ausscheidung. Eine

BESTÄTIGUNGSKOPIE

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 2 -

gesteigerte Aktivität des ENaC führt zu einer verstärkten renalen Retention von Natrium-Ionen, und auf diese Weise zur Entwicklung von Hypertonie.

5 Schließlich wurden zwei weitere Mitglieder der humanen sgk-Genfamilie kloniert, die hsgk2 und hsgk3 (Kobayashi et al., 1999), die beide - wie auch die hsgk1 - durch Insulin und IGF1 über den PI3 Kinase-Weg aktiviert werden. Elektrophysiologische Experimente zeigten, daß eine Coexpression der hsgk2 und hsgk3 ebenfalls eine signifikante Zunahme der Aktivität des ENaC zur Folge hat.

10 Aus der DE 197 08 173 A1 geht hervor, daß die hsgk1 bei vielen Krankheiten, bei denen Zellvolumenänderungen eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen, wie beispielsweise Hypermatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Enzephalopathie und mikrobielle oder virale Infektionen, ein beträchtliches diagnostisches Potential besitzt.

15 In der WO 00/62781 wurde bereits beschrieben, daß die hsgk1 den endothelialen Na<sup>+</sup>-Kanal aktiviert, wodurch die renale Na<sup>+</sup>-Resorption erhöht wird. Da diese gesteigerte renale Na<sup>+</sup>-Resorption mit Hypertonie einhergeht, wurde hier vermutet, daß eine gesteigerte Expression der hsgk1 zur Hypertonie, eine verminderte Expression der hsgk1  
20 letztlich zur Hypotonie führen sollte.

Auch in der nicht-vorveröffentlichten, prioritätsälteren deutschen Anmeldung mit dem Titel "sgk2 und sgk3 als diagnostische und therapeutische Targets" (interne Bezeichnung  
A 35 048) vom 28.08.00 wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der  
25 Überexpression bzw. Überaktivität der humanen Homologen hsgk2 und hsgk3 mit der Überaktivierung des ENaCs, der daraus resultierenden verstärkten renalen Na<sup>+</sup>-Resorption und der sich daraus entwickelnden Hypertonie beschrieben. Weiterhin wurde bereits das diagnostische Potential der Kinasen hsgk2 und hsgk3 bezüglich der arteriellen Hypertonie diskutiert.

30 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen experimentellen Nachweis zur direkten Korrelation, d.h. einer direkten Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie aufzufinden.

35

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 3 -

Unter einem humanen Homologen der *sgk*-Familie, welches im obigen Sinne eine funktionale molekulare Modifikation umfaßt, versteht man in diesem Zusammenhang ein Homologes der *sgk*-Familie, das auf eine solche Art und Weise mutiert ist, daß die Eigenschaften, insbesondere die katalytischen Eigenschaften oder auch die Substratspezifität des entsprechenden Proteins verändert werden.

Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung diese direkte Korrelation bzw. Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der *sgk*-Familie und der Hypertonie in einem Verfahren zur Diagnose einer Prädisposition einer genetisch bedingten Form der Hypertonie einzusetzen.

Der Nachweis einer unmittelbaren Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation der humanen *sgk*-Gene und der Hypertonie konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung erbracht werden und insbesondere am Beispiel des Gens *hsgk1* experimentell bewiesen werden.

Eine Lösung der gestellten Aufgabe stellt daher die Verwendung dieser direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der *sgk*-Familie, insbesondere des *hsgk1*-Gens, und der Hypertonie zur Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie dar.

Die gestellte Aufgabe wird insbesondere dadurch gelöst, daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung zwei unterschiedliche SNPs im *hsgk1*-Gen identifiziert wurden, die - wenn sie in einer bestimmten Version im *hsgk1*-Gen vorliegen -, beim Patienten eine eindeutige Neigung zur Hypertonie hervorrufen. Die Existenz solcher SNPs im *hsgk1*-Gen oder auch in den übrigen humanen Homologen der *sgk*-Genfamilie kann somit als diagnostischer Hinweis auf eine genetisch bedingte Prädisposition zur Ausbildung einer Hypertonie in Körperproben des Patienten nachgewiesen werden.

Die gestellte Aufgabe wird weiterhin dadurch gelöst, daß ein diagnostisches Verfahren zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie bereitgestellt wird, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der *sgk*-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit Polynukleotiden, die mit DNA oder mRNA der Homologen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können,

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 4 -

detektiert wird, sowie durch einen diagnostischen Kit, der sich zur Durchführung dieses Verfahrens eignet.

5 Im erfindungsgemäßen Kit sind vorzugsweise solche Antikörper, die gegen das hsgk1-Protein gerichtet sind oder solche Polynukleotide, die mit dem hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, enthalten.

10 Bei diesem diagnostischen Kit werden insbesondere solche Antikörper bereitgestellt, die spezifisch gegen solche Regionen des hsgk1-Proteins gerichtet sind, welche ein entsprechend eines spezifischen SNP im hsgk1-Gen mutiertes hsgk1-Protein-Fragment umfassen. Der Kit kann jedoch auch Antikörper gegen die häufigeren Allele des hsgk1-Genes oder der übrigen humanen Homologen der sgk-Familie enthalten, mit denen ein modifiziertes Expressionsniveau dieser Homologen bzw. der hsgk1 quantitativ nachgewiesen werden kann.

15 Weiterhin sind im erfindungsgemäßen diagnostischen Kit vorzugsweise solche Polynukleotide enthalten, die spezifisch Regionen umfassend die eine oder andere Version eines Hypertonie-relevanten SNPs im hsgk1-Gen beinhalten und so zum Nachweis spezifischer SNPs im hsgk1-Gen des Patienten durch Hybridisierung unter stringenten Bedingungen mit genomischer DNA, cDNA oder mRNA aus Körperproben geeignet sind.

25 Die erfindungsgemäße direkte Korrelation zwischen der Hypertonie und den humanen Homologen der sgk-Familie impliziert, daß bei einzelnen Patienten individuelle Mutationen in den Genen hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 auftreten könnten, die die Expressionshöhe oder die funktionellen Eigenschaften der Kinasen hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 modifizieren, und so zu einer genetisch verursachten Neigung zur Hypertonie führen. Solche Mutationen könnten beispielsweise in den regulatorischen Genregionen oder auch in Intron-Sequenzen des sgk-Genlocus auftreten und damit eine Überexpression der entsprechenden Kinase und eine Überaktivierung des ENaC verursachen. Andererseits könnten individuelle Unterschiede in der genetischen Ausstattung des sgk-Locus auch den kodierenden Genbereich betreffen. Mutationen im kodierenden Bereich könnten dann gegebenenfalls zu einer funktionalen Veränderung der entsprechenden Kinase, so z.B. zu modifizierten katalytischen Eigenschaften der Kinase führen. Demnach könnten beide 30 oben beschriebenen Mutationsarten eine verstärkte Aktivierung des ENaCs und damit letztlich die Ausbildung einer genetisch bedingten Form von Hypertonie beim Patienten bewirken.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 5 -

Solche Mutationen in den humanen Homologen der *sgk*-Familie, die die Ausbildung einer genetisch bedingten Form von Hypertonie beim Patienten bewirken, sind in der Regel sogenannte "single nucleotide polymorphisms" (SNP) entweder im Exon- oder im Intron-Bereich dieser Homologen. SNPs im Exon-Bereich der *hsgk*-Gene können in ihrer weniger häufig auftretenden Version - im folgenden die mutierte Version genannt - gegebenenfalls zu Aminosäureaustauschen im entsprechenden *hsgk*-Protein und somit zur einer funktionalen Modifikation der Kinase führen. SNPs im Intron-Bereich oder in regulatorischen Sequenzen der *hsgk*-Gene können in ihrer mutierten Version gegebenenfalls zu einer veränderten Expressionshöhe der entsprechenden Kinase führen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine Korrelationsstudie durchgeführt, in der der Genotyp des *hsgk1*-Gens verschiedener Patienten (Zwillinge) mit den an ihnen gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten, die jeweils in verschiedenen Körperpositionen gemessen wurden (sitzend, stehend, liegend), verglichen und statistisch ausgewertet wurde.

So konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, daß die Anwesenheit eines (C→T)-Austausches in Exon 8 (1. SNP, siehe SEQ ID NO. 1) auf beiden Allelen (homozygote TT-Träger des SNPs in Exon 8), der nicht zu einem Aminosäureaustausch auf Protein-Ebene führt (siehe SEQ ID NO. 2), zu signifikant höheren Blutdruckwerten und somit zu einer genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie führt (Tab. 3).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Gegenwart eines (T→C)-Austausches (2. SNP), welcher 551 bp entfernt vom 1. SNP in der Donor-Spleiß-Seite im Übergang von Intron 6 zu Exon 7 lokalisiert ist, in seiner homozygoten Ausführung zu geringeren Blutdruckwerten und somit zu einer geringeren genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie führt (Tab. 3).

Da beide erfindungsgemäßen SNPs im *hsgk1*-Gen nicht zu Aminosäureaustauschen auf Protein-Ebene führen, wird die durch sie bedingte, stärker oder weniger stark ausgeprägte, genetische Prädisposition zur Hypertonie wahrscheinlich auf einer modifizierten Expressionshöhe des *hsgk1*-Gens basieren.

Der erste SNP in Exon 8 (C→T) wird weiterhin durch Figur 1 näher erläutert. In Figur 1 werden die einzelnen Exons des *hsgk1*-Gens dargestellt und jeweils durch die Exon.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 6 -

Nummer, den Exon-ID, den dazugehörigen "Sequenz-Contig" und Strang, sowie Start, Ende und Länge der Exons beschrieben. Die exakte Position des (C→T)-Austausches im Rahmen des SNPs in Exon 8 wird durch das dunkel markierte C in Exon 8 angezeigt. Die hellere Markierung in Exon 8 in Figur 1 zeigt die SNP-flankierende Sequenz im hsgk1-Gen an, die die Position im Genom eindeutig bestimmt.

Der zweite SNP (T→C) in Intron 6 wurde durch direkte Sequenzierung identifiziert, und ist dadurch eindeutig charakterisiert, daß er im hsgk1-Gen (umfassend Exons und Introns) exakt 551 bp vom ersten SNP in Exon 8 stromaufwärts in der Donor-Spleißstelle des Introns 6 zu Exon 7 des hsgk1-Gens lokalisiert ist und den Austausch eines T in ein C betrifft.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die in verschiedenen Körperpositionen gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerte alle in dem gleichen Ausmaß eine Abhängigkeit vom Genotyp des hsgk1-Gens zeigen (Tab. 4). Aus Tabelle 4 ist somit ersichtlich, daß die gefundenen Korrelationen zwischen dem gemessenen Blutdruck der Patienten und dem Auftreten der oben genannten Polymorphismen (SNPs) in ihren hsgk1-Genen tatsächlich statistisch relevant sind.

Weiterhin zeigen die beiden analysierten SNPs im hsgk1-Gen eine große Unausgeglichenheit in der Häufigkeit ihres korrelierten Auftretens (Tab. 5). Während die meisten CC-Träger des SNPs in Exon 8 auch TT-Träger des SNPs in Intron 6 sind (64%), ist dies umgekehrt nicht der Fall (nur 2% der Exon 8 TT-Träger sind auch Intron 6 CC-Träger).

Die erstmalig nachgewiesene Korrelation zwischen dem Blutdruck des Patienten und seiner individuellen genetischen Version des hsgk1-Genlocus zeigt, daß sich spezifische Antikörper oder Polynukleotide, die gegen hsgk1 gerichtet sind, zur Diagnose einer speziellen genetisch bedingten Neigung zur Hypertonie eignen. Diese spezielle genetisch verursachte Form der Hypertonie kann durch eine gesteigerte Expression der hsgk1, also durch Überexpression oder gegebenenfalls auch durch modifizierte funktionale Eigenschaften der hsgk1 charakterisiert sein.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 7 -

Da die beiden homologen Kinasen der *sgk*-Familie, *hsgk2* und *hsgk3*, ebenfalls den ENaC aktivieren, eignen sich erfindungsgemäß spezifische Antikörper und Polynukleotide, die gegen *hsgk2* oder *hsgk3* gerichtet sind, im gleichen Maß zur diagnostischen Analyse spezieller genetisch bedingter Formen der Hypertonie.

5 Der erfindungsgemäße Nachweis, daß das Auftreten der beiden SNPs im *hsgk1*-Gen mit einer Neigung zur Hypertonie korreliert, zeigt, daß insbesondere Polynukleotide, die die eine oder andere Version der beiden SNPs im *hsgk1*-Gen umfassen, sich in besonderem Maß zur Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie durch Hybridisierung  
10 mit endogener DNA (cDNA oder genomische DNA) oder mRNA aus einer Körperprobe des Patienten eignen.

Ähnlich eignen sich nach den vorliegenden Ergebnissen auch Antikörper zur Diagnose einer genetisch bedingten Prädisposition der Hypertonie, die gegen spezifische Hypertonie-relevante Polymorphismen (SNP) im *hsgk1*-Protein oder einem seiner humanen  
15 Homologen gerichtet sind. Solche SNPs, die auch auf Protein-Ebene zu einem Hypertonie-relevanten Polymorphismus führen, könnten insbesondere mit einer funktionalen Modifikation des *hsgk1*-Proteins einhergehen und so eine Prädisposition zur Hypertonie verursachen.

20 Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung der direkten Korrelation, d.h. einer direkten Abhängigkeit zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der *sgk*-Familie, insbesondere der *hsgk1*, und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der  
25 genetisch bedingten Hypertonie.

Hierbei werden insbesondere die beiden mit der Neigung zur Hypertonie korrelierenden SNPs im *hsgk1*-Gen zur quantitativen Diagnose einer genetisch bedingten Hypertonie eingesetzt.

30 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur quantitativen Diagnose einer genetisch bedingten Form der Hypertonie, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der *sgk*-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit  
35 Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 8 -

Polynukleotiden, die mit genomischer DNA, c-DNA oder mRNA der Homologen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, detektiert wird.

Bei diesem erfindungsgemäßen Diagnose-Verfahren werden als Körperproben des Patienten vorzugsweise Blutproben oder auch Speichelproben verwendet, die zelluläres Material umfassen und relativ wenig aufwendig vom Patienten gewonnen werden können. Andere Körperproben, die ebenfalls Zellen umfassen wie beispielsweise Gewebeproben u.ä., können jedoch auch verwendet werden. Aus diesem zellhaltigen Material der Körperproben kann dann entweder genomische DNA oder cDNA oder auch mRNA nach Standardmethoden (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press).

präpariert und gegebenenfalls amplifiziert werden und anschließend mit Polynukleotiden, die mit dieser genomischen DNA, cDNA oder auch mRNA spezifisch hybridisieren kann, unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Weiterhin kann aus dem zellhaltigen Material der Körperproben (Blut, Speichel, Gewebe usw) auch ein Protein-Extrakt nach Standardmethoden (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) isoliert werden, in dem dann das entsprechende sgk-Protein durch Inkubation mit einem Antikörper, der gegen dieses Protein gerichtet ist, quantitativ detektiert werden kann.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise Antikörper gegen das hsgk1-Protein oder Polynukleotide, die mit genomischer DNA, c-DNA oder mRNA des hsgk1-Gens hybridisieren können, eingesetzt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden insbesondere Polynukleotide eingesetzt, welche mit DNA, c-DNA oder mRNA einer Version des SNP in Intron 6 des hsgk1-Gens oder einer Version des SNP in Exon 8 des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.

Unter einer Hybridisierung unter stringenten Bedingungen wird in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter solchen Hybridisierungsbedingungen bezüglich Hybridisierungstemperatur und Formamid-Gehalt der Hybridisierungslösung verstanden, wie sie in einschlägiger Fachliteratur (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) beschrieben wurde.

35

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 9 -

Die Erfindung betrifft außerdem einen Kit zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Form der Hypertonie, enthaltend Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, oder Polynukleotide, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, oder diese Antikörper und Polynukleotide gemeinsam zur quantitativen Bestimmung der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation dieser Homologen.

Die im Kit enthaltenen Antikörper sind hierbei vorzugsweise gegen das hsgk1-Protein gerichtet, und die im Kit enthaltenen Polynukleotide können hierbei vorzugsweise mit dem hsgk1-Gen hybridisieren.

Der diagnostische Kit kann besonders bevorzugt Polynukleotide enthalten, die mit genomischer DNA, mit cDNA oder mit mRNA einer Version des SNP in Intron 6 (T→C) oder des SNP in Exon 8 (C→T) hybridisieren können.

Durch die nachfolgenden Beispiele wird die vorliegende Erfindung im Detail erläutert.

20

#### Beispiel 1

Es wurden 75 zweieigige Zwillingspärchen zur Korrelationsanalyse herangezogen (Busjahn et al., J Hypertens 1996, 14: 1195-1199; Busjahn et al., Hypertension 1997, 29: 165-170). Die Versuchspersonen waren alle Angehörige der deutsch-kaukasischen Rasse und stammten aus verschiedenen Teilen Deutschlands. Zur Verifikation der Zweieigigkeit und für weitere molekulargenetische Analysen wurde den Zwillingspärchen, sowie deren Eltern Blut entnommen. Jede teilnehmende Versuchsperson wurde zuvor ärztlich untersucht. Für keine der Versuchspersonen war eine chronisch-medizinische Erkrankung bekannt. Nach 5 min wurde der Blutdruck des Probanden in sitzender Position von einem ausgebildeten Arzt mit einem standardisierten Quecksilber-Sphygmomanometer gemessen (2 Messungen mit einem zeitlichen Intervall von 1 min). Der Mittelwert aus den beiden Messungen wurde als Blutdruckwert verwendet.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 10 -

Der Vorteil von zweieiigen Zwillingen für Korrelationsstudien liegt darin, daß sie im Alter übereinstimmen und daß die äußeren Einflüsse auf ihre Phenotypen als minimal einzuschätzen sind (Martin et al., Nat Genet 1997, 17: 387-392).

Die Bedeutung von Zwillingsstudien bei der Aufklärung komplexer genetischer Krankheiten wurde kürzlich von Martin et al., 1997 beschrieben.

Die Zweieiigkeit der Zwillingspärchen wurde durch die Amplifikation von fünf Mikrosatelliten-Markern mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestätigt. Bei dieser Analyse von Mikrosatelliten-Markern werden Desoxyribonucleinsäure (DNA) - Fragmente mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide durch PCR amplifiziert, die bei verschiedenen menschlichen Individuen hochvariable Regionen beinhalten. Die hohe Variabilität in diesen Regionen des Genoms kann durch geringfügige Größenunterschiede der amplifizierten Fragmente detektiert werden, wodurch sich bei einer Diversität am entsprechenden Genort Doppelbanden, sogenannte Mikrosatelliten-Banden, nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte bilden (Becker et al., J Reproductive Med 1997, 42: 260-266).

Für die molekulargenetische Analyse des Zielgens, hier des hsgk1-Gens, wurden drei weitere Mikrosatelliten-Marker Regionen (d6s472, d6s1038, d6s270) in unmittelbarer Nähe des hsgk1-Locus durch PCR amplifiziert und anschließend mit den entsprechenden Proben des anderen Zwillings und der Eltern verglichen. Auf diese Weise konnte entschieden werden, ob die Zwillinge von ihren Eltern identische oder unterschiedliche Allele bezüglich des untersuchten Allels geerbt hatten. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des sogenannten "structural equation modeling" (SEM) Modells durchgeführt (Eaves et al., Behav Genet 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: Mx: Statistical modeling. Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Department of Psychiatry. 4<sup>th</sup> edition). Dieses Modell basiert auf Varianz-Kovarianz Matrizen der Test-Paare, die durch die Wahrscheinlichkeit, daß sie entweder keines, eines oder zwei identische Allele besitzen, charakterisiert sind. Die Varianz bezüglich des Phänotyps wurde aufgeteilt in eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund aller Gene (A), eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund des Zielgens (Q), hier des hsgk1-Gens, und der Varianz aufgrund äußerer Einflüsse (E) beruht.

$$\text{VAR} = A^2 + Q^2 + E^2$$

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 11 -

Für die drei möglichen Allelkombinationen  $IBD_0$ ,  $IBD_1$ ,  $IBD_2$  ( $IBD$  = "identical by descent"; 0, 1 oder 2 identische Allele) wurde die Kovarianz eines Test-Paares wie folgt definiert:

$$5 \quad \text{COV}(IBD_0) = 0,5 A^2 \quad \text{COV}(IBD_1) = 0,5 A^2 + 0,5 Q^2 \quad \text{COV}(IBD_2) = 0,5 A^2 + Q^2$$

Um die Korrelation zwischen der genetischen Ausstattung des *hsgk1*-Locus und dem Blutdruck des Probanden abzuschätzen, wurden die Differenzen zwischen Modellen, die die genetische Varianz bezüglich des Zielgens *hsgk1* berücksichtigen bzw. nicht berücksichtigen, als  $\chi^2$ -Statistik berechnet. Für jedes Paar und jeden Genlocus wurden die Allelenverhältnisse durch das sogenannte "multipoint" Modell (MAPMAKER/SIBS; Kruglyak et al., Am J Hum Genet 1995, 57: 439-454) basierend auf den elterlichen Genotypen errechnet.

15 Die höhere Aussagekraft der Analyseverfahren, die auf einer Varianz-Kovarianz Abschätzung beruht, im Vergleich zur oben beschriebenen  $\chi^2$ -Statistik (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 1996) wurde kürzlich in einer Simulationsstudie bestätigt (Fulker et al., Behav Gen 20 1996, 26: 527-532). Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$  akzeptiert, um eine signifikante Korrelation bezüglich der Kriterien von Lander und Kruglyak zu gewährleisten (Lander et al., Nat Genet 1995, 11: 241-246).

Die Ergebnisse dieser Korrelationsstudie zeigt Tabelle 1.

25

Tabelle 1:

Phenotyp	max $\chi^2$	p
systolischer Blutdruckwert (liegend)	4,44	0,04
diastolischer Blutdruckwert (liegend)	14,36	0,0002
systolischer Blutdruckwert (sitzend)	5,55	0,019
diastolischer Blutdruckwert (sitzend)	4,92	0,027
systolischer Blutdruckwert (stehend)	1,91	0,17
diastolischer Blutdruckwert (stehend)	4,83	0,028

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 12 -

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, beweisen die niedrigen Werte für die ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p$ , die die akzeptierte Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  nicht oder nur geringfügig überschreiten, die direkte Korrelation zwischen der genetischen Varianz bezüglich des hsgk1-Genorts und der phenotypisch ermittelten Varianz des gemessenen Blutdrucks.

### Beispiel 2

- Die genomische Organisation des hsgk 1-Gens wurde bereits beschrieben (Waldegger et al, Genomics,51,299[1998]),  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515)).
- Zur Identifizierung von SNPs, deren Auftreten für eine Prädisposition zur Ausbildung einer Hypertonie relevant sind, wurden zunächst die in Datenbanken publizierten SNPs im hsgk1-Gen danach untersucht, ob es sich um echte SNPs - und nicht um reine Sequenzierfehler - handelt und ob die SNPs ausreichend polymorph sind, um die Basis für einen diagnostischen Nachweis einer Prädisposition zur Hypertonie zu stellen. Der SNP rs 1057293 in Exon 8, der einen Austausch eines C in ein T betrifft, erfüllte die geforderten Voraussetzungen ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/snpview?snp=1057293](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293); [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=1057293](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293)). Weiterhin wurde ein zweiter SNP durch direkte Sequenzierung identifiziert, der im hsgk1-Gen exakt 551 bp vom ersten SNP entfernt in der Donor-Spleißstelle des Introns 6 zu Exon 7 lokalisiert ist und den Austausch eines T in ein C betrifft. Diese beiden SNPs in Intron 6 (T→C) und in Exon 8 (C→T) wurden wie im folgenden beschrieben analysiert.

Nach der PCR-Amplifikation wurde jeweils 1 Unit Alkaline Phosphatase und 1 Unit Exonuklease I hinzugefügt, um die PCR-Primer zu degenerieren und die dNTPs zu dephosphorylieren. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95° C für 10 min, dann 35 Zyklen bei 95° für 15 sec, gefolgt von 62°C for 15 sec, gefolgt von 72°C für 30 sec, und einem Extensionsschritt bei 72° C für 10 min in einem 9600 Thermocycler (Applied Biosystems).

35

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 13 -

Die Mini-Sequenzierreaktionen wurden mit den Primern für den Intron 6 SNP (T→C) 5'-CTC CTT GCA GAG TCC GAA und für den Exon 8 SNP (C→T) 5'-ACC AAG TCA TTC TGG GTT GC durchgeführt. 0,15 pmol aufgereinigtes PCR-Produkt wurde bei der Sequenzierungs-PCR als Template eingesetzt. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 25  
5 Amplifikationszyklen durchgeführt mit den folgenden Einzelschritten: Denaturierung 10 s bei 96 °C, Annealingschritt 10 s bei 50 °C und Extensionsschritt 30 s bei 60 °C in einem 9600 Thermocycler.

Bei denselben Patienten, deren SNP-Genotyp des hsgk1-Gens bestimmt wurde, wurden die  
10 systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in liegender, stehender und sitzender Position gemessen, um eine eventuelle Korrelation zwischen SNP-Genotyp des hsgk1-Gens und dem Blutdruck zu ermitteln.

Tabelle 2 zeigt einige demographische Zwillingsdaten und die Resultate der  
15 Korrelationsanalyse zwischen der genetischen Ausstattung des hsgk1-Genlocus und dem gemessenen Blutdruck. Ein starker genetischer Einfluß auf den gemessenen Blutdruck in allen Positionen konnte bei den Versuchspersonen nachgewiesen werden.

20

25

30

35

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 14 -

Tabelle 2:

Phänotyp	eineiige Zwillinge	zweieiige Zwillinge	$r_a^2$ (reineiig/fzweieiig)	p (Korrelation)
N	200	132		
Alter y	29±12	31±12		
Geschlecht (M/F)	52/148	85/47		
Größe (cm)	169±8	170±8		
Gewicht (kg)	65±11	67±12		
body mass index (BMI) Gewicht/ Größe <sup>2</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	22.4±3.5	22.8±3.4		
Systolischer Blutdruck (liegend) (mm Hg)	128±17	124±14	0.69 (0.69/0.31)	0.04
Diastolischer Blutdruck (liegend) (mm Hg)	71±12	71±11	0.66 (0.66/0.42)	0.0002
Systolischer Blutdruck (sitzend) (mm Hg)	125±16	123±13	0.74 (0.74/0.38)	0.019
Diastolischer Blutdruck (sitzend) (mm Hg)	73±11	73±10	0.72 (0.72/0.51)	0.027
Systolischer Blutdruck (stehend) (mm Hg)	124±15	122±14	0.67 (0.66/0.46)	0.04
Diastolischer Blutdruck (stehend) (mm Hg)	80±10	79±10	0.64 (0.63/0.40)	0.0002

- 5 Tabelle 3 zeigt weitere Resultate der erfindungsgemäßen Korrelationsstudien. Die ermittelten Allelhäufigkeiten für den SNP in Exon 8 liegen bei C 91% und T 9% und für den SNP in Intron 6 bei T 79% und C 21% (das Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurde für beide Polymorphismen erhalten).
- 10 Die gemessenen Blutdruckwerte zeigten in allen Positionen (sitzend, liegend, stehend) die gleichen Trends. Homozygote CC-Träger und heterozygote CT-Träger des SNPs in Exon 8 zeigten keine voneinander abweichende Blutdruckwerte, zeigten jedoch deutlich niedrigere

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 15 -

systolische und diastolische Blutdruckwerte als homozygote TT-Träger des SNPs in Exon 8.

- Die entsprechenden Resultate der Korrelationsstudien sind für den SNP in Intron 6 im Vergleich zum SNP in Exon 8 weniger konsistent. Es zeigte sich jedoch, daß homozygote CC-Träger des SNPs in Intron 6 generell niedrigere Blutdruckwerte aufweisen als homozygote TT-Träger und als heterozygote TC-Träger des SNPs in Intron 6.

10 **Tabelle 3:**

Phänotyp	1. SNP in Exon 8 CC	1. SNP in Exon 8 CT	1. SNP in Exon 8 TT	1. SNP in Exon 8 CC/CT	2. SNP in Intron 6 TT	2. SNP in Intron 6 CT	2. SNP in Intron 6 CC	2. SNP in Intron 6 TT/CT
systol. Blutdruck (liegend)	125 ± 15	125 ± 18	132 ± 14	125 ± 16	125 ± 16	128 ± 18	119 ± 6	126 ± 16
diastol. Blutdruck (liegend)	70 ± 10	72 ± 13	74 ± 12	71 ± 11	71 ± 10	72 ± 13	67 ± 10	71 ± 11
systol. Blutdruck (sitzend)	124 ± 14	123 ± 15	129 ± 13	124 ± 14	124 ± 14	125 ± 17	117 ± 6	124 ± 14
diastol. Blutdruck (sitzend)	72 ± 10	74 ± 10	79 ± 9	73 ± 10	73 ± 10	74 ± 11	72 ± 9	73 ± 10
systol. Blutdruck (stehend)	123 ± 15	123 ± 14	129 ± 13	123 ± 15	123 ± 14	126 ± 16	119 ± 8	123 ± 15
diastol. Blutdruck (stehend)	79 ± 10	81 ± 10	84 ± 8	80 ± 10	80 ± 10	82 ± 11	78 ± 8	80 ± 10

- Tabelle 4 zeigt im Detail, daß sowohl für den systolischen als auch für den diastolischen Blutdruckwert die genetische Ausstattung des SNPs in Intron 6 weitgehend gleichermaßen signifikant ist, und zwar unabhängig von der Position, in der der Blutdruck gemessen wurde (sitzend, stehend, liegend). Die Resultate für die Signifikanz der genetischen Ausstattung des SNPs in Exon 8 sind ähnlich, die Assoziation der Signifikanz zwischen

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 16 -

den gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten in den verschiedenen Positionen ist jedoch etwas weniger ausgeprägt als bei dem SNP in Intron 6.

5

**Tabelle 4:**

Phänotyp	2. SNP in Intron 6	1. SNP in Exon 8
Systolischer Blutdruck (liegend)	<0.01	<0.05
Diastolischer Blutdruck (liegend)	<0.05	0.08
Systolischer Blutdruck (sitzend)	<0.05	<0.05
Diastolischer Blutdruck (sitzend)	<0.01	0.08
Systolischer Blutdruck (stehend)	<0.05	0.07
Diastolischer Blutdruck (stehend)	<0.05	0.09

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, besteht ein starkes Korrelationsungleichgewicht zwischen den beiden analysierten SNPs: während die meisten CC-Träger des SNPs in Exon 8 auch TT-Träger des SNPs in Intron 6 sind (64%), ist dies umgekehrt nicht der Fall (nur 2% der Exon 8 TT-Träger sind auch Intron 6 CC-Träger).

15 **Tabelle 5:**

	Intron 6 TT	Intron 6 TC	Intron 6 CC
Exon 8 CC	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
Exon 8 CT	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
Exon 8 TT	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 17 -

**Patentansprüche**

- 5 1. Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der  
funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der *sgk*-Familie  
und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der  
genetisch bedingten Hypertonie.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das humane  
Homologe der *sgk*-Familie das *hsgk1*-Gen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Überexpression  
oder die funktionale Modifikation durch den Nukleotidpolymorphismus (SNP) in  
15 Intron 6 (T→C) im *hsgk1*-Gen verursacht wird.
4. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Überexpression  
oder die funktionale Modifikation durch den Nukleotidpolymorphismus (SNP) in  
20 Exon 8 (C→T) im *hsgk1*-Gen verursacht wird.
5. Kit zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten  
Form der Hypertonie, enthaltend Antikörper, die gegen die humanen Homologen  
der *sgk*-Protein-Familie gerichtet sind, oder Polynukleotide, die mit den humanen  
Homologen der *sgk*-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren  
25 können, oder diese Antikörper und Polynukleotide gemeinsam zur quantitativen  
Bestimmung der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation  
dieser Homologen.
6. Kit nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der *sgk*-  
30 Familie das *hsgk1*-Gen ist.
7. Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper gegen eine durch  
einen SNP mutierte Version des *hsgk1*-Proteins gerichtet sind oder daß die  
Polynukleotide mit einer durch einen SNP mutierten Version des *hsgk1*-Gens unter  
35 stringenten Bedingungen hybridisieren können.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

- 18 -

8. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit einer durch den SNP in Intron 6 (T→C) mutierten Version des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
- 5 9. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit einer durch den SNP in Exon 8 (C→T) mutierten Version des hsgk1-Gens unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
- 10 10. Verfahren zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Form der Hypertonie, bei dem die Überexpression eines humanen Homologen der sgk-Familie oder die funktionale molekulare Modifikation dieser Homologen durch den quantitativen Nachweis der Homologen in der Körperprobe des Patienten mit Antikörpern, die gegen die Proteine der Homologen gerichtet sind, oder mit Polynukleotiden, die mit DNA oder mRNA der Homologen unter  
15 stringenten Bedingungen hybridisieren können, detektiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit DNA oder mRNA einer Version des SNP in Intron 6 (T→C) im hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Polynukleotide mit  
25 DNA oder mRNA einer Version des SNP in Exon 8 (C→T) im hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können.

WO 02/074987

PCT/EP02/03180

1/1

Figure1:

1 ENSE00000798789 AL135839.15.1.113673 -1 27517 27634 118 bp  
 GPTCTTTGAGCGCTACGCTCTTCTCTCTCCCGCGGTTGGTGTGAGGTT  
 GAATACTGGGCTGCTAAGGGCCOCCCTCACTTACTCCAGGATGAGGGGCA  
 TGGTGGCAATTCTCATCG

2 ENSE00000798790 AL135839.15.1.113673 -1 27296 27371 76 bp  
 CTPTCTAGAGCAGAGGAGGATGGGCTGACGACTTTATTCCAGAGATT  
 GCCAATCACTCCTATGCATGCAAAACA

3 ENSE00000798791 AL135839.15.1.113673 -1 26790 26865 76 bp  
 COCTGAAGTTCAGTCCATCTTGAAGATCTGCCAACCTCAGGAGCCTGAGC  
 TTATGAATGCGAACCTTCTCCTCCA

4 ENSE00000798792 AL135839.15.1.113673 -1 26247 26351 105 bp  
 CCAAGTCCCTTCTAGCAAAATCAACCTTGGCCGCTGTCRAATCCTCATGC  
 TAAACCATCTGACTTTCACCTCTTGAAGTGTATCGAAAGGGCAGTTTGG  
 GAAG

5 ENSE00000798793 AL135839.15.1.113673 -1 26059 26142 84 bp  
 GTTCTCTAGCAAGACACAGGAGGAGAAAGTCTTATGCACTCAAAGT  
 TTTACAGAAAGAGCAATCCTGAAAAGAAAGAG

6 ENSE00000798794 AL135839.15.1.113673 -1 25803 25939 132 bp  
 GAGAAGCAATATATGTCGAGGCGGAAGTTCGTTGARAATGTGAAGCA  
 CCTTTCTCGTGGGCTCAGCTCTCTTTTCAGACTGCTGACAAATGT  
 ACTTTGCTGACTGACTGATGATGGTGGAGS

7 ENSE00000798795 AL135839.15.1.113673 -1 25447 25559 113 bp  
 TGTCTTACCTATCTCAGAGGGACGCTGCTTCTGAAACCCAGGGCTCG  
 TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGCCTTGGGCTACTGCAATCACTGA  
 ACATCGTTATAG

8 ENSE00000798796 AL135839.15.1.113673 -1 24978 25101 124 bp  
 AGACTTAAACCCAGAGAAATTTGCTAGATTCCGCGGACACACTTGTCTT  
 ACTGAATCCGACTCTGCAAGGAGAGCAATGAAACACAAACAGCACAA  
 TCCACTTCTGTTGGCACGCGCGAG

9 ENSE00000798797 AL135839.15.1.113673 -1 24422 24517 96 bp  
 TRTCTGCGCCCTGAGTGTCTCTAAGCAAGCCTTTGACACAGGACTGTGGA  
 CTGTTGTTGCTGGAGCTGCTTGTATGAGACTGCTGATCGCCIG

10 ENSE00000798798 AL135839.15.1.113673 -1 23808 23963 156 bp  
 CCGCCTTTTATAGCCAAACAGCTGAAATGTACGACAACTTCTGAA  
 CAAGCCTCTCCAGCTGAAACCAAAATTTACAAATTCGCAAGACACCTCC  
 TGGAGGGCTCCTGCACAAGGACAGGACAAAGGGCTCGGGCCAAAGGAT  
 GACTTC

11 ENSE00000798799 AL135839.15.1.113673 -1 23611 23700 90 bp  
 ATGGAGATTAAAGTCAATGCTTCTCTCTCTAATTAAGTGGATGATCT  
 CATTAATGAGAGTACTCCCTTTTAAACCAATGG

12 ENSE00000798800 AL135839.15.1.113673 -1 22037 23220 1184 bp  
 AGTGGSCCAACACACTACGSCACTTGGCCCGAGTTTACCGAAGGCC  
 TGTCCCAACTCCATTGGCAAGTCCCTGACAGCGTCTCTGACACGCCA  
 GCGTCAAGGAGCTGCCAGGCTTCTTAGGCTTTTCCCTATGCGCCTCC  
 ACGACTCTTCTCTGACCCCTGTTAGGGCTGGTTTAAAGGATTTTA  
 TGTGTGTTCCGATGTTTGTAGTGTGCTTTGGTGGAGCGCCAGCTGA  
 CAGGACATCTTACAAGAGATTTCACACTCTCTGGAGCTTAGCAATCTT  
 ATTGACACTGTTGCGTGGAGCTTTTGAAGACACACTTCTCCTCAGTG  
 AGCTCATGAGTTCATTTTAAATCTTCCCTCCACGTTGCTGCTATCTC  
 TGAACGAGCTTAGAGTCCCTCTGACAGGAGGAGGATTTCTGTTAG  
 AAAGCGACGCTGTTCTAAARAGGCTCTCTGACACTCTCTCGGCTGT  
 GATGACAAATATTAATAATGTCCTTTCTGAAAGAGATGTTGTAGCTC  
 CAAGCTTTCCTATCGAGTGTTCAGTCTTTATTTTCCCTGTGGAT  
 ATGCTGTGAGACCTGCTGTGATGCTGATGCTGATCAGAGATGGAT  
 TTTGTTATGCAATCAATGACACTTCCAGGACACTACACCTGGGACA  
 TTGTTGTTCTCCATTTGGAAGATAAATTTATGTAGACTTTTPT  
 GTAAGATAGGTTAATAACTAAAATTTATGAAATGCTTTCCTGCAATGACT  
 CGATTCAGATGCTTAAAGAAAGCTTCTGCTGACAAATATTTCTAATTT  
 TGAAGGCTTTTATGACCAATGCCACTTGTGCTGAGGAGCCGTTG  
 GTTTTTTCACTGTTTAAATGTCACCTGAAATGGGCAATTTTATGT  
 TTTTTTTTGCTTCTGATATGTTGATGATTTGATAAAGAAAGCTG  
 TACATGGGTTTAAACACTAGTAAATTTAACTTACAGGCTTATTTGTAA  
 TGTAAACCACTTTTAAATGACTGTAATTAACATGTTATAATACGTAC  
 AATCCTTCCCTCATCCCATCACAACTTTTCTGCTGTGATAAAGTGA  
 TTTTGGTTGCAATAAACCTTGAATAATTTA

WO 02/074987

1/6

PCT/EP02/03180

L61882PC.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Lang, Florian  
 <120> Quantitative diagnostische Analyse der Hypertonie  
 <130> L61882  
 <140> DE 101 13 876.8  
 <141> 2001-03-21  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 2354  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (43)..(1335)  
 <223>  
 <220>  
 <221> variation  
 <222> (762)..(762)  
 <223> 1. SNP (C in T), stumme Mutation, d.h. beide Versionen des SNPs  
 resultieren in der Aminosäure Asp in der Aminosäure- Position 240  
 <400> 1  
 ggtctttgag cgctaacgtc tttctgtctc cccgcggtgg tg atg acg gtg aaa 54  
 Met Thr Val Lys  
 1  
 act gag gct gct aag ggc acc ctc act tac tcc agg atg agg ggc atg 102  
 Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Met Arg Gly Met  
 5 10 15 20  
 gtg gca att ctc atc gct ttc atg aag cag agg agg atg ggt ctg aac 150  
 Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn  
 25 30 35  
 gac ttt att cag aag att gcc aat aac tcc tat gca tgc aaa cac cct 198  
 Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro  
 40 45 50  
 gaa gtt cag tcc atc ttg aag atc tcc caa cct cag gag cct gag ctt 246  
 Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu  
 55 60 65  
 atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac 294  
 Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn  
 70 75 80

WO 02/074987

2/6

PCT/EP02/03180

L61882PC.ST25

ctt ggc cgc tgc tcc aat cct cat gct aaa cca tct gac ttt cac ttc	342
Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe	
85 90 95 100	
ttg aaa gtg atc gga aag ggc agt ttt gga aag gtt ctt cta gca aga	390
Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg	
105 110 115	
cac aag gca gaa gaa gtg ttc tat gca gtc aaa gtt tta cag aag aaa	438
His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys	
120 125 130	
gca atc ctg aaa aag aaa gag gag aag cat att atg tgc gag cgg aat	486
Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn	
135 140 145	
gtt ctg ttg aag aat gtg aag cac cct ttc ctg gtg ggc ctt cac ttc	534
Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe	
150 155 160	
tct ttc cag act gct gac aaa ttg tac ttt gtc cta gac tac att aat	582
Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn	
165 170 175 180	
ggt gga gag ttg ttc tac cat ctc cag agg gaa cgc tgc ttc ctg gaa	630
Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu	
185 190 195	
cca cgg gct cgt ttc tat gct gct gaa ata gcc agt gcc ttg ggc tac	678
Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr	
200 205 210	
ctg cat tca ctg aac atc gtt tat aga gac tta aaa cca gag aat att	726
Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile	
215 220 225	
ttg cta gat tca cag gga cac att gtc ctt act gac ttc gga ctc tgc	774
Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys	
230 235 240	
aag gag aac att gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg	822
Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr	
245 250 255 260	
cgg gag tat ctg gca cct gag gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg	870
Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg	
265 270 275	
act gtg gac tgg tgg tgc ctg gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat	918
Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr	
280 285 290	
ggc ctg cgg cct ttt tat agc cga aac aca gct gaa atg tac gac aac	966
Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn	
295 300 305	

WO 02/074987 3/6 PCT/EP02/03180

L61882PC.ST25

att ctg aac aag cct ctc cag ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca 1014  
 Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala  
 310 315 320

aga cac ctg ctg gag ggc ctc ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctg 1062  
 Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu  
 325 330 335 340

ggg gcc aag gat gac ttc atg gag att aag agt cat gtc ttc ttc tcc 1110  
 Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser  
 345 350 355

tta att aac tgg gat gat ctc att aat aag aag att act ccc cct ttt 1158  
 Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe  
 360 365 370

aac cca aat gtg agt ggg ccc aac gac cta cgg cac ttt gac ccc gag 1206  
 Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His Phe Asp Pro Glu  
 375 380 385

ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag tcc cct gac agc 1254  
 Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser  
 390 395 400

gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag gct ttc cta gcc 1302  
 Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly  
 405 410 415 420

ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tgaaccctgt tagggcttgg 1355  
 Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu  
 425 430

ttttaaagga ttttatgtgt gtttcgaat gtttagtta gccttttggt ggagccgcca 1415

gctgacagga catcttacia gagaatttgc acatctctgg aagcttagca atcttattgc 1475

acactgttgc ctggaagctt tttgaagagc acattctcct cagttagctc atgaggtttt 1535

catttttatt cttccttcca acgtggtgct atctctgaaa cgagcgttag agtgccgcct 1595

tagacggagg caggagtctt gttagaaagc ggacgctggt ctaaaaaagg tctcctgcag 1655-

atctgtctgg gctgtgatga cgaatattat gaaatgtgcc ttttctgaag agattgtggt 1715

agctccaaag ctttctctat cgcagtgctt cagttcttta ttttcccttg tggatatgct 1775

gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggtatgcc tgatcacaga tggattttgt tataagcacc 1835

aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattggt tgtttcttcc atatttggaa 1895

gataaattta tgtgtagact tttttgtaag atacggttaa taactaaaaat ttattgaaat 1955

ggtcttgcaa tgactcgtat tcagatgctt aaagaaagca ttgctgctac aaatatttct 2015

attttttagaa agggttttta tggaccaatg ccccagttgt cagtcagagc cgttgggtgt 2075

tttcattggt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt tatgtttttt tttttgcatt 2135

WO 02/074987

4/6

PCT/EP02/03180

L61882PC.ST25

```

cctgataatt gtatgtattg tataaagaac gtctgtacat tgggttataa cactagtata 2195
tttaaacctta caggcttatt tgtaatgtaa accaccattt taatgtactg taattaacat 2255
ggttataata cgtacaatcc ttccctcacc ccatcacaca actttttttg tgtgtgataa 2315
actgattttg gtttgaata aaaccttgaa aaatattta 2354

```

```

<210> 2
<211> 431
<212> PRT
<213> homo sapiens

```

&lt;400&gt; 2

```

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
1 5 10 15

```

```

Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
20 25 30

```

```

Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
35 40 45

```

```

Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
50 55 60

```

```

Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser
65 70 75 80

```

```

Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
85 90 95

```

```

Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
100 105 110

```

```

Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
115 120 125

```

```

Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
130 135 140

```

```

Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
145 150 155 160

```

WO 02/074987

5/6

PCT/EP02/03180

L61882PC.ST25

Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu  
 165 170 175

Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg  
 180 185 190

Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser  
 195 200 205

Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys  
 210 215 220

Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp  
 225 230 235 240

Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr  
 245 250 255

Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln  
 260 265 270

Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr  
 275 280 285

Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu  
 290 295 300

Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile  
 305 310 315 320

Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg  
 325 330 335

Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His  
 340 345 350

Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile  
 355 360 365

Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His  
 370 375 380

Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys

WO 02/074987		6/6	PCT/EP02/03180
		I61882PC.ST25	
385	390	395	400
Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu			
	405	410	415
Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu			
	420	425	430

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/074987 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68, G01N 33/573, 33/68 (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03180 (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 21. März 2002 (21.03.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 13 876.8 21. März 2001 (21.03.2001) DE
- (71) Anmelder und (72) Erfinder: LANG, Florian [DE/DE]; Im Roßbad 52, 72076 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSJAHN, Andreas [DE/DE]; Charité Universitätsklinikum, Med. Fakultät Humboldt-Universität Berlin, Schumannstr. 21/22, 10117 Berlin (DE); LUFFT, Friedrich, C. [DE/DE]; Franz Volhard Klinik, Willberg Strasse 50, 13125 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardohle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).
- Veröffentlicht: — mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 4. Dezember 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: QUANTITATIVE DIAGNOSTIC ANALYSIS OF HYPERTONIA

(54) Bezeichnung: QUANTITATIVE DIAGNOSTISCHE ANALYSE DER HYPERTONIE

(57) Abstract: The invention relates to the use of the direct correlation between the overexpression or the functional molecular modification of human homologues of the sgk family and hypertonia for quantitatively diagnosing a specific form of genetically related hypertonia. The invention particularly relates to the detection of a direct relationship between two different polymorphisms of individual nucleotides in the hsgk1 gene and the genetically related predisposition to hypertonia. The invention additionally relates to the provision of a diagnostic kit containing antibodies or polynucleotides used for detecting diagnostic targets hsgk1, hsgk2 and hsgk3.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Hypertonie zur quantitativen Diagnose einer bestimmten Form der genetisch bedingten Hypertonie. Insbesondere betrifft die Erfindung den Nachweis eines unmittelbaren Zusammenhangs zwischen zwei unterschiedlichen Polymorphismen einzelner Nucleotide im hsgk1-Gen und der genetisch bedingten Predisposition zur Hypertonie. Die Erfindung betrifft weiterhin die Bereitstellung eines Diagnosekits enthaltend Antikörper oder Polynucleotide zum Nachweis der diagnostischen Targets hsgk1, hsgk2 und hsgk3.

WO 02/074987 A3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- PCT/EP 02/03180
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/573 G01N33/68		
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) IPC 7 C12Q G01N		
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, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, EMBL, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 62781 A (WALDEGGER SIEGFRIED ; BROEER STEFAN (DE); KLINGEL KARIN (DE); LANG) 26 October 2000 (2000-10-26) cited in the application	1,5,10
Y	the whole document page 3, line 1 - line 4 --- -/-	1,2,4-7, 9-11,13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 ** 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 May 2003		Date of mailing of the international search report 27/05/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2916		Authorized officer Tuyman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inten Application No PCT/EP 02/03180
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WAERNTGES S ET AL: "Transcriptional upregulation of the human serine/threonine kinase hSGK1 in glomerulonephritis." KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH, vol. 23, no. 3-5, 2000, page 246 XP008016819 Congress of Nephrology 2000, Vienna, Austria; September 02-05, 2000 ISSN: 1420-4096	1,5,10
Y	the whole document	1,2,4-7, 9-11,13
Y	DATABASE ON-LINE MEDICAL DICTIONAR 'Online! 12 December 1998 (1998-12-12) XP002240465 <a href="http://cancerweb.ncl.ac.uk/cg1-bin/omd?blo od+pressure,+high">http://cancerweb.ncl.ac.uk/cg1-bin/omd?blo od+pressure,+high</a> the whole document	1,2,4-7, 9-11,13
Y	FATTORUSO, V ET AL: "Vademecum Clinique" 2001, MASSON, PARIS XP002240464 page 1493, right-hand column, line 31 -page 1494, left-hand column, line 25	1,2,4-7, 9-11,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 02/03180
--

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 1-4, 8, 10-13 (in part)  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**see additional sheet (FURTHER INFORMATION FROM PCT/ISA/210)**
2.  Claims Nos.: 3, 8, 12  
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 additional sheet (FURTHER INFORMATION FROM 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.

PCT/EP 02/03180

## Continuation of I.1

Although Claims 10-13 relate to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged properties of the compound or composition.

## Continuation of I.1

Claims: 1-4, 8, 10-13 (in part)

PCT Rule 39.1(i) – mathematical methods (Claims 1-4)

PCT Rule 39.1(iv) - diagnostic procedure practiced on the human or animal body (Claims 10-13)

## Continuation of I.2

Claims: 3, 8, 12

Claims 3, 8 and 12 do not meet the requirements of PCT Rule 5.2 because no sequence protocol has been submitted for the SNPs in intron 6. Therefore, these claims could not be searched.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT

Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

Intern. Application No.  
PCT/EP 02/03180

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0062781 A	26-10-2000	DE 19917990 A1	02-11-2000
		AU 4297200 A	02-11-2000
		BR 0009914 A	08-01-2002
		CA 2369078 A1	26-10-2000
		CN 1351496 T	29-05-2002
		CZ 20013778 A3	12-06-2002
		WO 0062781 A1	26-10-2000
		EP 1171131 A1	16-01-2002
		HU 0200819 A2	29-07-2002
		JP 2002542196 T	10-12-2002
		NO 20015054 A	14-12-2001
		SK 14972001 A3	04-06-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/03180
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q G01N G01N33/573 G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstufe (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstufe gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, EMBL, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 62781 A (WALDEGGER SIEGFRIED ; BROEER STEFAN (DE); KLINGEL KARIN (DE); LANG) 26. Oktober 2000 (2000-10-26) in der Anmeldung erwähnt	1, 5, 10
Y	das ganze Dokument Seite 3, Zeile 1 - Zeile 4 --- -/--	1, 2, 4-7, 9-11, 13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungssystem einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem basisspezifischen Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist ** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden ** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung betrachtet wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *S* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 8. Mai 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 27/05/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 818 Patentlaan 2 NL - 2250 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Befullmächtigter Bediensteter Tuynman, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/03180
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Befr. Anspruch Nr.
X	WAERTGES S ET AL: "Transcriptional upregulation of the human serine/threonine kinase hSGK1 in glomerulonephritis." KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH, Bd. 23, Nr. 3-5, 2000, Seite 246 XP008016819 Congress of Nephrology 2000; Vienna, Austria; September 02-05, 2000 ISSN: 1420-4096	1,5,10
Y	das ganze Dokument	1,2,4-7, 9-11,13
Y	--- DATABASE ON-LINE MEDICAL DICTIONAR 'Online! 12. Dezember 1998 (1998-12-12) XP002240465 <a href="http://cancerweb.nc1.ac.uk/cg1-bin/omd?blo od+pressure,+high">http://cancerweb.nc1.ac.uk/cg1-bin/omd?blo od+pressure,+high</a> das ganze Dokument	1,2,4-7, 9-11,13
Y	--- FATTORUSO, V ET AL: "Vademecum Clinique" 2001, MASSON, PARIS XP002240464 Seite 1493, rechte Spalte, Zeile 31 -Seite 1494, linke Spalte, Zeile 25 -----	1,2,4-7, 9-11,13

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/03180

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. 1-4, 8, 10-13 (teilweise)  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2.  Ansprüche Nr. 3, 8, 12  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgeteilt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: \_\_\_\_\_

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs  Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02 03180

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Fortsetzung von Feld I.1</p>	
<p>Obwohl die Ansprüche 10-13 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p> <p>-----</p>	
<p>Fortsetzung von Feld I.1</p>	
<p>Ansprüche Nr.: 1-4,8,10-13 (teilweise)</p>	
<p>Regel 39.1(i) PCT - Mathematische Methode (Ansprüche 1-4) Regel 39.1(iv) PCT - Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden (Ansprüche 10-13)</p> <p>-----</p>	
<p>Fortsetzung von Feld I.2</p>	
<p>Ansprüche Nr.: 3,8,12</p>	
<p>Die Ansprüche 3,8 und 12 erfüllen nicht die Erfordernisse des Regels 5.2 PCT, weil keine Sequenzprotokoll des SNPs in Intron 6 eingereicht ist. Deshalb können diese Ansprüche nicht recherchiert werden.</p>	
<p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/03180

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0062781 A	26-10-2000	DE 19917990 A1	02-11-2000
		AU 4297200 A	02-11-2000
		BR 0009914 A	08-01-2002
		CA 2369078 A1	26-10-2000
		CN 1351496 T	29-05-2002
		CZ 20013778 A3	12-06-2002
		WD 0062781 A1	26-10-2000
		EP 1171131 A1	16-01-2002
		HU 0200819 A2	29-07-2002
		JP 2002542196 T	10-12-2002
		NO 20015054 A	14-12-2001
		SK 14972001 A3	04-06-2002
		-----	

## フロントページの続き

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

(72) 発明者 ラング、 フロリアン

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン イム ロトバト 5 2

(72) 発明者 ブスマーン、 アンドレアス

ドイツ連邦共和国 1 0 1 1 7 ベルリン シューマンシュトラッセ 2 1 / 2 2 メト . ファ  
ク尔特ート フンボルト - ユニファ-シテート ベルリン シャリテ ユニファ-シテートスクリ  
ニクム (番地なし)

(72) 発明者 ルフト、 フリードリッヒ ツェー .

ドイツ連邦共和国 1 3 1 2 5 ベルリン ヴィルトベルク シュトラッセ 5 0 フランツ フ  
ォルハルト クリニック (番地なし)

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 HA08 HA12 HA14  
4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55  
QR62 QS12 QS25 QS34 QS36 QX01 QX07

专利名称(译)	高血压的定量诊断分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004528032A</a>	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2002574375	申请日	2002-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	郎弗洛里安 LANG FLORIAN		
申请(专利权)人(译)	郎, 弗洛里安		
[标]发明人	ラングフロリアン ブスヤーンアンドレアス ルフトフリードリッヒツェー		
发明人	ラング、フロリアン ブスヤーン、アンドレアス ルフト、フリードリッヒ ツェー.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/48 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/566 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N2333/723		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	10113876 2001-03-21 DE		
其他公开文献	JP2004528032A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种定量诊断sgk家族人类同源物的过表达或功能分子改变与高血压之间特定类型的遗传相关高血压的方法。相关关联。本发明特别涉及检测hsgk1基因中各个核苷酸的两种不同多态性与高血压的遗传相关易感性之间的直接关联。本发明另外涉及提供包含抗体或多核苷酸的诊断试剂盒，其用于检测诊断靶标hsgk1，hsgk2和hsgk3。

表現型	最大 $\chi^2$	p
収縮期血圧値(臥位)	4.44	0.04
拡張期血圧値(臥位)	14.36	0.0002
収縮期血圧値(座位)	5.55	0.019
拡張期血圧値(座位)	4.92	0.027
収縮期血圧値(立位)	1.91	0.17
拡張期血圧値(立位)	4.83	0.028