

(19)日本国特許庁（J P）

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002－345489

(P2002－345489A)

(43)公開日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7084	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7084		31/7088	4 B 0 2 9
31/7088		45/00	4 B 0 6 3
45/00		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 22数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－300582(P2001－300582)	(71)出願人	391008951 アストラゼネカ・アクチエボラーク スウェーデン国エス－15185セーデルティエ (番地なし)
(22)出願日	平成13年9月28日(2001.9.28)	(72)発明者	ジョン・クレイグ・スミス イギリス、エスケイ10・4ティジー、チェシ ャー、マックルズフィールド、オルダリー ・パーク
(31)優先権主張番号	0026851	(74)代理人	100062144 弁理士 青山 葆 (外1名)
(32)優先日	平成12年11月3日(2000.11.3)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
(31)優先権主張番号	0109602		
(32)優先日	平成13年4月19日(2001.4.19)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 化学物質

(57)【要約】

【課題】 臨床試験は、医薬による処置に対する患者の応答がしばしば不均一であることを示している。したがって、医薬物質の設計および治療に対する改善されたアプローチが必要である。

【解決手段】 本発明は、ヒトKDR遺伝子における多型性およびそれによってコードされた対応する新規対立遺伝子ポリペプチドに関する。特に、KDR遺伝子のコード配列中の2個の多型性(それぞれ、発現タンパク質の配列中のアミノ酸の変化につながる)；プロモーター領域中の3個の単一ヌクレオチド多型性(SNP)；5' UTR中の1個のSNPおよびイントロン配列中の7個のSNPに関する。本発明は、KDR遺伝子における対立遺伝子変異を分析するための方法および材料、並びにKDRリガンド(血管内皮増殖因子VEGF)介在疾患、例えば、癌および種々の炎症性疾患の処置におけるKDR多型性の使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトのKDRの多型性の診断または検出方法であって、KDRの少なくとも1個の多型性位置のヒトの配列を決定し、KDRの多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む方法。

【請求項2】 請求項1の方法であって、多型性位置が後記の位置からなる群から選択される方法；

配列番号1の162、423、461位

配列番号2の345位

配列番号3の112、329位

配列番号4の224位

配列番号5の339位

配列番号6の103、145位

配列番号7の32、94位および

配列番号24の26位。

【請求項3】 ヒトのKDRの多型性の診断方法であって、後記位置からなる群から選択される1個またはそれ以上の位置のヒトの配列を決定し、KDRの多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む方法；KDR遺伝子のプロモーター領域中の162、423および461位（配列番号1の位置によって定義される）；KDR遺伝子のコード領域中の224位（配列番号4の位置によって定義される）、並びに145位（配列番号6の位置によって定義される）；KDR遺伝子のイントロン領域中の345位（配列番号2の位置によって定義される）、112および329位（配列番号3の位置によって定義される）、339位（配列番号5の位置によって定義される）、103位（配列番号6の位置によって定義される）；32および94位（配列番号7の位置によって定義される）；KDR遺伝子の5' UTR領域中の26位（配列番号24の位置によって定義される）；並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121の位置で定義されるKDRポリペプチド中のコドン297および472。

【請求項4】 請求項2または3の方法であって、単一ヌクレオチド多型性が後記である方法；162位（配列番号1の位置による）の多型性がTおよび／またはAの存在である；423位（配列番号1の位置による）の多型性がCおよび／またはGの存在である；461位（配列番号1の位置による）の多型性がTおよび／またはCの存在である；224位（配列番号4の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である；145位（配列番号6の位置による）の多型性がAおよび／またはTの存在である；345位（配列番号2の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である；112位（配列番号3の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である；329位（配列番号3の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である；339位（配列番号5の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である；103位（配列番号6の位置

による）の多型性がAおよび／またはCの存在である；32位（配列番号7の位置による）の多型性がTおよび／またはGの存在である；94位（配列番号7の位置による）の多型性がAおよび／またはTの存在である；並びに26位（配列番号24の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在である。

【請求項5】 請求項2ないし4のいずれかの核酸多型性検出方法であって、配列決定の前に、可能性のある単一ヌクレオチド多型性を含む核酸領域をポリメラーゼ連鎖反応によって増幅する方法。

【請求項6】 請求項2ないし5のいずれかの核酸多型性検出方法であって、単一ヌクレオチド多型性の存在または不存在を、所望により改変された、制限酵素によって認識される部位の喪失または獲得を参照することによって検出する方法。

【請求項7】 請求項2ないし5のいずれかの核酸多型性検出方法であって、特定の多型性を、ARMS-対立遺伝子特異的増幅、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、オリゴヌクレオチドドライゲーション検定または制限断片長多型性(RFLP)から選択される方法によって決定する方法。

【請求項8】 請求項2ないし5のいずれかのアミノ酸多型性検出方法であって、KDRタンパク質の多型性アミノ酸残基の存在を、免疫学的方法、例えば、固相酵素免疫検定法(ELISA)によって決定する方法。

【請求項9】 VEGFによって介在される疾患に対する個体の素因および／または感受性の評価に使用する請求項1ないし8のいずれかの方法。

【請求項10】 VEGF介在疾患の診断または予後のための方法であって、後記段階を含む方法；

i) 個体からサンプル核酸を得る；

ii) 1個またはそれ以上の後記位置の変異体ヌクレオチドの存在または不存在を検出する；KDR遺伝子の162、423、461位（それぞれ配列番号1による）、345位（配列番号2による）、112、329位（それぞれ配列番号3による）、224位（配列番号4による）、339位（配列番号5による）、103、145位（それぞれ配列番号6による）、32、94位（それぞれ配列番号7による）；26位（配列番号24による）；

iii) KDR遺伝子中の多型性を参照することによってその個体の診断または予後の状態を決定する。

【請求項11】 VEGF介在疾患の診断方法であって、後記段階を含む方法；

i) 個体からタンパク質含有サンプルを得る；

ii) アミノ酸297および472位(EMBLアクセッションナンバーAF035121の位置による)のいずれかおよび双方の多型性アミノ酸の存在または不存在を検出する；

iii) KDRの多型性の存在または不存在を参照する

ことによってそのヒトの体質を決定する。

【請求項12】 請求項11の方法であって、多型性がVal297IleまたはGln472Hisのいずれかまたは双方である方法。

【請求項13】 少なくとも20塩基のヒトKDR遺伝子を含み、かつ後記の表のいずれかから選択された対立遺伝子変異体を含む単離ポリヌクレオチド。

【表1】

領域	変異体 配列番号
プロモーター	162C
	423G
	461C 配列番号1

* 【表2】

領域	変異体 配列番号
エキソン1	26A 配列番号24
エキソン7	224A 配列番号2
エキソン11	145T 配列番号6

* 【表3】

領域	変異体 配列番号
エキソン2に隣接するイントロン	345A 配列番号2
エキソン6に隣接するイントロン	112A
	329A 配列番号3
エキソン9に隣接するイントロン	339A 配列番号5
エキソン11に隣接するイントロン	103C 配列番号6
エキソン21に隣接するイントロン	32G
	94T 配列番号7

【請求項14】 後記の多型性のいずれかを有する、少なくとも20塩基の核酸配列を含む単離核酸、または少なくとも1個の当該多型性を含むその相補鎖；162C、423G、461C(それぞれ配列番号1による)；345A(配列番号2による)；112A、329A(それぞれ配列番号3による)；224A(配列番号4による)；339A(配列番号5による)；103C、145T(それぞれ配列番号6による)；32G、94T(それぞれ配列番号7による)；または26A(配列番号24による)。

【請求項15】 後記の1個またはそれ以上の位置のKDR遺伝子の多型性を検出することのできる診断核酸プライマー；162、423、461位(それぞれ配列番号1による)、345位(配列番号2による)、112、329位(それぞれ配列番号3による)、224位(配列番号4による)、339位(配列番号5による)、103、145位(それぞれ配列番号6による)、32および94位(それぞれ配列番号7による)；26位(配列番号24による)。

【請求項16】 請求項15の診断プライマーであって、ARMSにおける使用用に適合された対立遺伝子特異的プライマー。

【請求項17】 1個またはそれ以上の後記位置のKDR遺伝子の多型性を検出することのできる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ；162、423、4

61位(それぞれ配列番号1による)、345位(配列番号2による)、112、329位(それぞれ配列番号3による)、224位(配列番号4による)、339位(配列番号5による)、103、145位(それぞれ配列番号6による)、32および94位(それぞれ配列番号7による)；26位(配列番号24による)。

【請求項18】 配列番号8ないし24のいずれかに記載の配列、またはそれに相補的な配列を含む対立遺伝子特異的ヌクレオチドプローブ。

【請求項19】 請求項15もしくは16で定義した1個もしくはそれ以上の診断プライマーおよび／または請求項17もしくは18で定義した1個もしくはそれ以上の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを含む診断キット。

【請求項20】 KDR(VEGFR2)タンパク質に作用する低分子薬物、またはKDR(VEGFR2)mRNAに対して作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリボザイムで、処置の必要のあるヒトを処置する方法であって後記の段階を含む方法；

i)ヒトのKDR遺伝子の多型性の診断であって、好ましくは、後記の位置からなる群から選択された1個またはそれ以上の位置の配列を決定することを含む診断をする；KDR遺伝子のプロモーター領域の162、423および461位(配列番号1の位置による定義による)；KDR遺伝子のコード領域の224位(配列番号4の位

置による定義による)、および145位(配列番号6の位置による定義による); KDR遺伝子のイントロン領域の345位(配列番号2の位置による定義による)、112、329位(配列番号3の位置による定義による)、339位(配列番号5の位置による定義による)、103位(配列番号6の位置による定義による); 32、94位(配列番号7の位置による定義による); KDR遺伝子のエクソン1領域の5'UTRの26位(配列番号24の位置による定義による); 並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121の位置によって定義された KDRポリペプチドのアミノ酸残基297、および472;

ii) KDR遺伝子の多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定する;

iii) 有効量の薬物を投与する。

【請求項21】 KDR(VEGFR2)タンパク質またはKDR(VEGFR2)mRNAに作用する薬物の使用であって、そこに、好ましくは請求項3で同定した1個またはそれ以上の位置に多型性を有すると診断されたヒトの疾患を処置するための医薬の製剤における使用。

【請求項22】 KDRアンタゴニストとして作用する薬物およびその薬物を、その、好ましくは請求項3で同定した1個またはそれ以上の位置の、多型性について診断的に試験されたヒトへの投与用の説明書を含む医薬パック。

【請求項23】 後記位置の多型性の少なくとも1個を含む、KDR遺伝子配列の少なくとも17、好ましくは少なくとも20連続塩基を含む核酸配列を保存したコンピュータ読み取り可能媒体; 配列番号1の162、423、461位; 配列番号2の345位; 配列番号3の112、329位; 配列番号4の224位; 配列番号5の339位; 配列番号6の103、145位; 配列番号7の32、94位; または配列番号24の26位。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、ヒトKDR遺伝子の多型性とそれによってコードされた新対応する新規対立遺伝子ポリペプチドに関する。本発明はKDR遺伝子中の対立遺伝子変異を分析するための方法および材料、並びにKDR阻害剤での癌および種々の炎症性疾患のようなKDRリガンド(血管内皮増殖因子、VEGF)介在疾患(Carmeliet and Jain (2000) Nature 407:249-257; Ferrara and Alitalo (1999) Nature Medicine 5:1359-1364によって概説)を処置するときのKDR多型性の使用にも関する。

【0002】KDR cDNA (EMBLアクセッションナンバーAF035121、5830bp)は1356アミノ酸の成熟タンパク質をコードしている。KDRタンパク質は、7個の免疫グロブリン様ドメインを含む外部ドメイン、膜貫通領域およびチロシンキナーゼドメ

インを含む細胞質領域からなる。受容体チロシンキナーゼファミリーの他のメンバーとは対照的に、KDRのキナーゼドメインは、70個までのアミノ酸の介在配列で2個のセグメントとなっている。VEGF(血管内皮増殖因子)受容体ファミリーの生物学は概説され(Neufeld et al., (1999) FASEB Journal. 13:11-22; Zachary (1998) Experimental Nephrology 6:480-487)、チロシンリン酸化部位は特徴付けられている。KDRの細胞外ドメインのリガンド結合部位が同定された(Lu et al., (2000) J Biol Chem 275: 14321-14330)。ヒトKDRのゲノム構造が記載された(Yin et al (1998) Mammalian Genome. 9:408-410)。その遺伝子は、45kbに渡る28個のエクソンを含み、染色体4q11-q12に局在している(Sait et al (1995) Cytogen Cell Genet 70:145-146; Spritz et al (1994) Genomics 22:431-436)。KDR遺伝子を含む領域に渡るコンティグのゲノム配列が公開されている(EMBLアクセッションAC021220、226334bp)。

【0003】多型性の位置は、公開されたEMBL(または他の配列データベース)配列アクセッションナンバー(すなわち、EMBLアクセッションナンバーAC021220またはAF035121)を参照することによって正確にマッピングすることができ、あるいは、当業者は、明確に多型性を位置決定するのに十分なその多型性に隣接するフランキング配列がわかれば、KDR遺伝子中の多型性の位置を正確に同定することができる。多型性のそれぞれの側方にある10個またはそれ以上のヌクレオチドがわかれば、個々の多型性の正確な位置マッピングを達成するのに十分である。

【0004】KDR(VEGFR2)は、内皮細胞中のVEGFの細胞分裂促進および血管新生効果を介在し、一方、もう一つのVEGF受容体(flt-1)は、発達中の脈管構造の組織構成を調節するのに重要な役割を果たすと考えられる。この理論を支持する証拠が、マウスのノックアウト研究(Fong et al., (1995) Nature 376:66-70; Shalaby et al., (1995) Nature 376:62-66)および生化学研究(Waltenberger et al., (1994) J Biol Chem. 269:26988-26995)から明らかとなった。VEGFによる内皮細胞の活性化は、KDRの自己リン酸化、次に多数のダウンストリームのターゲットのチロシンリン酸化へとつながる(Gingras et al., (2000) Biochem J. 348:273-280で総説されている)。

【0005】VEGFおよびその受容体は多くの腫瘍型中で過剰発現しており、VEGFの過剰発現は、血管新生および腫瘍増殖を促進する(Skobe et al., (1997) Nature Medicine 3:1222-1227)から、VEGF機能をブロックすることにより血管新生を阻害し、腫瘍の増殖を抑制する。したがって、KDR受容体に作用する化合物は、広範な腫瘍の処置に使用する医薬として示唆される(Ferrara and Alitalo (1999) Nature Medicine 5:1

359-1364)。

【0006】多型性の知識を使用して、特定の医薬物質での治療に最も適した患者を同定することの助けとすることを、しばしば「薬理遺伝学」と称する。薬理遺伝学を、薬物選択段階を助けるための医薬調査においても使用することができる。多型性はヒトゲノムのマッピングに使用され、疾患の遺伝的構成要素を解明するために使用される。読者は下記の引用を、薬理遺伝学および多型性検出の他の使用の背景詳細のために参照されたい：Linder et al.(1997), Clinical Chemistry, 43, 254; Marshall(1997), Nature Biotechnology, 15, 1249; International Patent Application WO 97/40462, Spectra Biomedical; and Schafer et al.(1998), Nature Biotechnology, 16: 33。

【0007】臨床試験は、医薬による処置に対する患者の応答がしばしば不均一であることを示している。したがって、医薬物質の設計および治療に対する改善されたアプローチが必要である。

【0008】ポリペプチドにおける点突然変異を以下のように表す：本来のアミノ酸(1または3文字の命名法を使用)、位置、新しいアミノ酸。例えば(仮に)、「D25K」または「Asp25Lys」は、25位のアスパラギン酸(D)がリジン(K)に変化したことを意味する。^{1*}

(a)(コドン297)TTAACTATAGATGGTATAACCCGGAGTGACC(配列番号 8)

(b)(コドン472)TCTTTCTTATAGCCATGCTGTCTCAGTGACA(配列番号 9)

(コドン297はAF035121のヌクレオチド1192-1194によってコードされ、コドン472はAF035121のヌクレオチド1717-1719によってコードされている)

【0011】本発明のある態様によれば、ヒトKDRの多型性を診断または検出する方法を提供する。その方法は少なくとも1個の多型性の位置でヒトの配列を決定し、KDRの多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む。好ましい多型性の位置は、1個またはそれ以上の後記の位置である：

配列番号1の162、423、461位

配列番号2の345位

配列番号3の112、329位

配列番号4の224位

配列番号5の339位

配列番号6の103、145位

配列番号7の32、94位および

配列番号24の26位。

【0012】本発明のさらなる態様にしたがって、ヒトのKDRの多型性の診断方法を提供する。その方法は、1個またはそれ以上の位置：162、423、461位(それぞれ配列番号1による)；345位(配列番号2による)；112、329位(それぞれ配列番号3による)；224位(配列番号4による)；339位(配列

*個のポリペプチドにおける複数突然変異を、角カッコの間にそれぞれの突然変異をコンマで区切って表す。多型性の位置での特定の塩基の存在を、多型性の位置に続いて塩基で表す。例えば(仮に)、300位にアデニンが存在すれば、300Aのように表す。

【0009】本発明はKDR遺伝子中の多型性の発見に基づく。特に、我々は、KDR遺伝子のコード配列中の2個の多型性を見出し、それぞれが発現タンパク質配列中のアミノ酸の変化へとつながる。我々は、プロモーター領域中の3個の単一ヌクレオチド多型性(SNP)、5'UTR中の1個のSNPおよびイントロン配列中の7個のSNPも見出した。

【0010】本明細書で定義するように、KDR遺伝子は、配列をコードしているエキソン、エキソン配列に介入しているイントロン配列、並びに3'および5'非翻訳領域(3'UTRおよび5'UTR)配列、並びに5'UTRの上流のKDR遺伝子のプロモーター要素を含んでいる。不確かさを避けるため、2個のコドンが変化した多型性(太字にしたもの、未公開対立遺伝子のみ示した)および当該多型部位のすぐフランキングな核酸配列の位置を、後記のように示す：

【化1】

番号5による)；103、145位(それぞれ配列番号6による)；32および94位(それぞれ配列番号7による)のヒトの核酸の配列を決定し、KDR遺伝子中の多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む。

【0013】本発明のさらなる態様にしたがって、ヒトのKDRの多型性の診断方法を提供する。その方法は、1個またはそれ以上の位置：162、423、461位(それぞれ配列番号1による)；345位(配列番号2による)；112、329位(それぞれ配列番号3による)；224位(配列番号4による)；339位(配列番号5による)；103、145位(それぞれ配列番号6による)；32および94位(それぞれ配列番号7による)；並びに26位(配列番号24による)のヒトの核酸の配列を決定し、KDR遺伝子中の多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む。

【0014】本発明のさらなる態様にしたがって、ヒトのKDRの多型性の診断方法を提供する。その方法は、1個またはそれ以上の後記の位置：KDR遺伝子のプロモーター領域中の162、423および461位(配列番号1の位置によって定義される)；KDR遺伝子のコード領域中の224位(配列番号4の位置によって定義される)、並びに145位(配列番号6の位置によって定義される)；KDR遺伝子のイントロン領域中の34

5位（配列番号2の位置によって定義される）、112および329位（配列番号3の位置によって定義される）、339位（配列番号5の位置によって定義される）、103位（配列番号6の位置によって定義される）、32および94位（配列番号7の位置によって定義される）；並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121中の位置で定義されるKDRポリペプチド中のコドン297および472のヒトの配列を決定し、KDRの多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む。

【0015】本発明のさらなる態様にしたがって、ヒトのKDRの多型性の診断方法を提供する。その方法は、1個またはそれ以上の後記の位置：KDR遺伝子のプロモーター領域中の162、423および461位（配列番号1の位置によって定義される）；KDR遺伝子のコード領域中の224位（配列番号4の位置によって定義される）並びに145位（配列番号6の位置によって定義される）；KDR遺伝子のイントロン領域中の345位（配列番号2の位置によって定義される）、112および329位（配列番号3の位置によって定義される）、339位（配列番号5の位置によって定義される）、103位（配列番号6の位置によって定義される）；32および94位（配列番号7の位置によって定義される）；KDR遺伝子の5'UTR領域中の26位（配列番号24の位置によって定義される）、並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121中の位置によって定義されるKDRポリペプチド中のコドン297および472のヒトの配列を決定し、KDRの多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定することを含む。

【0016】ある好ましい実施態様において、その診断方法はKDRに対して作用する薬物の薬理遺伝学を評価するのに用いられる。

【0017】ヒトという語は、KDR介在疾患を有するまたは有すると疑われるヒト、およびそのような疾患に対する素因または感受性について試験され得る無症候性のヒトの両者を含む。各々の位置において、該ヒトはある対立遺伝子に関してホモ接合であってよく、または該ヒトはヘテロ接合体であってよい。

【0018】多型性という語は、単一のヌクレオチド置換、ヌクレオチド挿入およびヌクレオチド欠失を含み、挿入および欠失の場合には、それらは、ある遺伝子のある位置の1個またはそれ以上のヌクレオチドの挿入または欠失、および発現タンパク質中の対応する変更を含む。

【0019】本発明のある実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、162位（配列番号1の位置による）の多型性がTおよび／またはAの存在であるものである。

【0020】本発明のさらなる実施態様において、本明

細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、423位（配列番号1の位置による）の多型性がCおよび／またはGの存在であるものである。

【0021】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、461位（配列番号1の位置による）の多型性がTおよび／またはCの存在であるものである。

【0022】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、224位（配列番号4の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0023】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、145位（配列番号6の位置による）の多型性がAおよび／またはTの存在であるものである。

【0024】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、345位（配列番号2の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0025】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、112位（配列番号3の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0026】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、329位（配列番号3の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0027】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、339位（配列番号5の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0028】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、103位（配列番号6の位置による）の多型性がAおよび／またはCの存在であるものである。

【0029】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、32位（配列番号7の位置による）の多型性がTおよび／またはGの存在であるものである。

【0030】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、94位（配列番号7の位置による）の多型性がAおよび／またはTの存在であるものである。

【0031】本発明のさらなる実施態様において、本明細書で記載した診断のための方法は、好ましくは、26位（配列番号24の位置による）の多型性がGおよび／またはAの存在であるものである。

【0032】前記のように、それぞれの位置で、そのヒトはある対立遺伝子に関してホモ接合であってよく、またはそのヒトはヘテロ接合体であってよい。もしその

個体がヘテロ接合体であれば、異なる多型性の両方が存在し得る。

【0033】本発明の好ましい実施態様において、本明細書で記載した診断方法は、KDR遺伝子のコード領域中の多型性が：224位（配列番号4の位置による）のGおよび／またはAの存在、並びに145位（配列番号6の位置による）のAおよび／またはTの存在であるものである。

【0034】本発明のさらなる好ましい実施態様において、本明細書で記載した診断方法は、EMBLアクセッションナンバーAF035121の位置で定義されるKDRタンパク質中の多型性がVal297IleまたはGln472Hisのいずれかであるものである。

【0035】診断のための核酸シーケンシング法は、好ましくは、アンプリフィケーション・レフラクトリー・ミュートーション・システム(amplification refractory mutation system)、制限断片長多型(性)およびプライマー伸長から選択される方法によって決定されるものである。診断のためのアミノ酸シーケンシング法は、好ましくは、固相酵素免疫検定法(ELISA)のような免疫学的方法によって決定されるものである。

【0036】本発明のさらなる態様において、VEGF介在疾患の診断または予後のための方法の提供する。その方法は：

i) 個体からサンプル核酸を得る；

ii) 1個またはそれ以上の後記位置の変異体ヌクレオチドの存在または不存在を検出する；KDR遺伝子中の162、423、461位（それぞれ配列番号1による）、345位（配列番号2による）、112、329位（それぞれ配列番号3による）、224位（配列番号4による）、339位（配列番号5による）、103、145位（それぞれ配列番号6による）、32および94位（それぞれ配列番号7による）；

iii) KDR遺伝子中の多型性を参照することによってその個体の診断または予後の体質を決定する；
ことを含む。

【0037】本発明のさらなる態様において、VEGF介在疾患の診断または予後のための方法を提供する。その方法は：

i) 個体からサンプル核酸を得る；

ii) 1個またはそれ以上の後記位置の変異体ヌクレオチドの存在または不存在を検出する；KDR遺伝子中の162、423、461位（それぞれ配列番号1によ

る）、345位（配列番号2による）、112、329位（それぞれ配列番号3による）、224位（配列番号4による）、339位（配列番号5による）、103、145位（それぞれ配列番号6による）、32、94位（それぞれ配列番号7による）、26位（配列番号24による）；

iii) KDR遺伝子中の多型性を参照することによってその個体の診断または予後の体質を決定する；
ことを含む。

【0038】個体の体質を、本明細書で同定した対立遺伝子変異体、所望によりさらなる他の変異体を使用して、任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはより多い位置における対立遺伝子変異を参照することによって決定し得る。ハプロタイプ分析は個体の体質を決定するのに特に有用である。核酸の被検サンプルは、簡便には、血液、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid)、痰(sputum)、または個体から得られる他の体液もしくは組織のサンプルである。被検サンプルはまた、被検サンプル中の配列に対応する核酸配列であってもよく、換言するとサンプル核酸中の全てまたは一部の領域を、対立遺伝子変異の分析の前に、任意の簡便な方法、例えばPCR等を用いて最初に増幅し得るといことがわかる。

【0039】本発明の1個またはそれ以上の多型性位置の変異体ヌクレオチドの存在または不存在を検出するために使用し得る数多くの分析法が存在するということは、当業者には明らかである。一般に、対立遺伝子変異の検出は、突然変異判別法、所望により増幅反応、そして所望によりシグナル生成系を必要とする。第1表は、多くの突然変異検出法を列挙しており、幾つかはPCRを基礎としている。これらは多くのシグナル生成系と組み合わせ使用することができ、それらから選択したものを第2表に列挙する。さらなる増幅法を第3表に掲げる。対立遺伝子変異の検出のための多くの現行法が、Nollau et al., Clin. Chem. 43, 1114-1120, 1997; および標準的教科書、例えば「Laboratory Protocols for Mutation Detection」, U. Landegren編, Oxford University Press, 1996および「PCR」, 第2版, Newton & Graham編, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997に総説されている。

【0040】

略語：

ALEX (商標)	アンプリフィケーション・レフラクトリー・ミュートーション・システム・ライナー・エクステンション
APEX	アレイド・プライマー・エクステンション
ARMS (商標)	アンプリフィケーション・レフラクトリー・ミュートーション・システム
b-DNA	ブランチドDNA

bp	塩基対
CMC	化学的ミスマッチ開裂
COPS	競合的オリゴヌクレオチドプライミング系
DGGE	変性勾配ゲル電気泳動
ELISA	固相酵素免疫検定法
FRET	蛍光共鳴エネルギー転移
LCR	リガーゼ連鎖反応
MASDA	複対立遺伝子特異的診断検定
NASBA	核酸配列に基づく増幅
OLA	オリゴヌクレオチドライゲーション検定
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PTT	プロテイントランケーションテスト
RFLP	制限断片長多型(性)
SDA	鎖置換増幅
SNP	単一ヌクレオチド多型(性)
SSCP	一本鎖コンホメーション多型性分析
SSR	自己持続複製
TGGE	13 温度勾配ゲル電気泳動

14

【0041】第1表 — 突然変異検出法

一般：DNAシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング

スキャン：PTT*、SSCP、DGGE、TGGE、Cleavase、ヘテロ二本鎖分析、CMC、酵素的ミスマッチ開裂

*注：プロモーター多型性の検出には有用でない。

ハイブリダイゼーションは以下を基礎とする：固相ハイブリダイゼーション：ドットプロット、MASDA、逆ドットプロット、オリゴヌクレオチドアレイ（DNAチップ）。

液相(solution phase)ハイブリダイゼーション：タックマン（商標）- US-5210015およびUS-5487972(Hoffmann-La Roche)、分子ビーコン - Tyagi et al(1996), Nature Biotechnology, 14, 303; W095/13399(Public Health Inst., ニューヨーク)

伸長は以下を基礎とする：ARMS(商標)、ALEX(商標) - 欧州特許第EP332435号B1(Zeneca Limited)、COPS - Gibbs等(1989), Nucleic Acids Research, 17, 2347。

組み込みは以下を基礎とする：ミニシーケンシング、APEX

制限酵素は以下を基礎とする：RFLP、制限部位生成PCRライゲーションは以下を基礎とする：OLA

その他：インベーター検定

【0042】第2表 — シグナル生成または検出系

蛍光：FRET、蛍光消光、蛍光分極 - 英国特許第2228998号(Zeneca Limited)

その他：化学ルミネセンス、電気化学ルミネセンス、ラマン、放射性、比色分析、ハイブリダイゼーション保護検定、質量分析

第3表 — さらなる増幅法

SSR、NASBA、LCR、SDA、b-DNA

第4表 — タンパク質変異検出方法

イムノアッセイ

イムノヒストロジー

ペプチドシーケンシング

【0043】好ましい突然変異検出方法は、ARMS(商標)、ALEX(商標)、COPS、タックマン、分子ビーコン、RFLP、および制限部位に基づくPCRおよびFRET法を含む。

イムノアッセイ法は、当業界で既知である。例えば、A Practical Guide to ELISA by D M Kemeny, Pergamon Press 1991; Principles and Practice of Immunoassay,

10 2nd edition, C P Price & D J Newman, 1997, published by Stockton Press in USA & Canada and by Macmillan Reference in the United Kingdom. 特に好ましい方法は、ARMS(商標) - 対立遺伝子特異的増幅、OLAおよびRFLPに基づく方法を含む。ARMS(商標)として当業界で既知の対立遺伝子特異的増幅法が特に好ましい方法である。ARMS(商標) - 対立遺伝子特異的増幅(欧州特許No. EP-B-332435、米国特許No.5,595,890およびNewton et al.(Nucleic Acids Research, Vol.17,p.2503; 1989)に記載)は、プライマーの3'末端ヌクレオチドおよびその

20 のテンプレートの相補性に基づく。そのプライマーの3'末端ヌクレオチドは、検出されるべき特異的突然変異、対立遺伝子または多型性に相補的または非相補的である。3'末端ヌクレオチドが塩基突然変異、対立遺伝子または多型性と相補的であるプライマーからのプライマー伸長に関して、選択的優位性がある。テンプレート配列と3'末端ミスマッチを有するこれらのプライマーが、酵素的プライマー伸長を重度に阻害または防止する。したがって、ポリメラーゼ連鎖反応またはアンディレクショナルプライマー伸長反応は、プライマーの3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

30

のテンプレートの相補性に基づく。そのプライマーの3'末端ヌクレオチドは、検出されるべき特異的突然変異、対立遺伝子または多型性に相補的または非相補的である。3'末端ヌクレオチドが塩基突然変異、対立遺伝子または多型性と相補的であるプライマーからのプライマー伸長に関して、選択的優位性がある。テンプレート配列と3'末端ミスマッチを有するこれらのプライマーが、酵素的プライマー伸長を重度に阻害または防止する。したがって、ポリメラーゼ連鎖反応またはアンディレクショナルプライマー伸長反応は、プライマーの3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

3'末端ヌクレオチドは、検出されるべき特異的突然変異、対立遺伝子または多型性に相補的または非相補的である。3'末端ヌクレオチドが塩基突然変異、対立遺伝子または多型性と相補的であるプライマーからのプライマー伸長に関して、選択的優位性がある。テンプレート配列と3'末端ミスマッチを有するこれらのプライマーが、酵素的プライマー伸長を重度に阻害または防止する。したがって、ポリメラーゼ連鎖反応またはアンディレクショナルプライマー伸長反応は、プライマーの3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的であるとき、産物増幅を生ずるが、3'末端ヌクレオチドがテンプレートのそれと相補的でないときは、少なくとも効

率的には生じない。

【0044】さらなる態様では、本発明の診断方法を使用して、KDRに作用する薬物の薬理遺伝学を評価する。検定、例えば、レポーターに基づく検定を、1個またはそれ以上の前記の多型性が転写レベルおよび／または伝令安定性に影響を及ぼすか否かについて検出するために案出し得る。したがって、KDR遺伝子の特定の対立遺伝子変異体を有する個体は、種々の生理条件の下でタンパク質の生合成を調節するその能力に相違を示し得、そして種々の疾患に反応する種々の能力を示す。さらに、対立遺伝子変異の結果として生ずる相違は、薬物療法に対する個体の応答に直接的影響を有し得る。本発明の診断方法は、そのような物質に対する臨床応答を予測し、さらに治療用量を決定することの両者について有用であってよい。

【0045】さらなる態様では、本発明の診断方法を、VEGFによって介在される疾患に対する個体の素因および／または感受性を評価するために使用する。これは、癌および炎症性疾患の発生に特に関連があり、本発明を、これらの病態の発生のリスクが特に高い個体を認識するために使用し得る。

【0046】さらなる態様では、本発明の診断方法を、KDR遺伝子の1個またはそれ以上の対立遺伝子変異体を選択的に標的する新規薬物療法の開発に使用する。特定の対立遺伝子変異体と疾患発生の素因または薬物療法への応答性の間の関連の同定は、新規薬物の設計に有意義な影響を有し得る。疾患段階にある変異体の生物学的活性を調節し、一方、他の変異体への影響を最小化する薬物を設計し得る。

【0047】本発明のさらなる診断態様では、変異体ヌクレオチドの存在または不存在を、所望によって改変された、制限酵素によって認識される部位の喪失または獲

*得を参照することによって検出する。当業者は、多型性の存在による1個またはそれ以上の制限部位の喪失または獲得による制限断片長多型性の検出に基づく診断方法を設計、実施することができる(本明細書の実施例参照)。

【0048】本発明のさらなる態様にしたがって、本明細書で定義した1個もしくはそれ以上の位置の変異体対立遺伝子多型性を含むヒトKDR遺伝子またはその相補鎖または少なくとも1個の新規多型性を含む少なくとも20塩基のその断片を提供する。断片は少なくとも20塩基、より好ましくは少なくとも25塩基、より好ましくは少なくとも30塩基である。

【0049】本発明のさらなる態様にしたがって、少なくとも20塩基のヒトKDR遺伝子を含み、かつ後記のいずれかから選択された対立遺伝子変異体を含むポリヌクレオチドを提供する：

【表4】

領域	変異体	配列番号
プロモーター	162C	
	423G	
	461C	配列番号1

【表5】

領域	変異体	配列番号
エキソン1	26A	配列番号24
エキソン7	224A	配列番号2
エキソン11	145T	配列番号6

【表6】

領域	変異体	配列番号
エキソン2に隣接するイントロン	345A	配列番号2
エキソン6に隣接するイントロン	112A	
	329A	配列番号3
エキソン9に隣接するイントロン	339A	配列番号5
エキソン11に隣接するイントロン	103C	配列番号6
エキソン21に隣接するイントロン	32G	
	94T	配列番号7

【0050】本発明のさらなる態様にしたがって、後記の多型性のいずれかを有する少なくとも20塩基の核酸配列を含む核酸、または当該多型性の少なくとも1個を含むその相補鎖を提供する：162C、423G、461C(それぞれ配列番号1による)；345A(配列番号2による)；112A、329A(それぞれ配列番号3による)；224A(配列番号4による)；339A(配列番

号5による)；103C、145T(それぞれ配列番号6による)；32Gおよび94T(それぞれ配列番号7による)。

【0051】本発明のさらなる態様にしたがって、単離されまたは組換え的に生成された、後記の多型性のいずれかを有する少なくとも20塩基の核酸配列を含む核酸、または当該多型性の少なくとも1個を含むその相補

鎖を提供する：162C、423G、461C(それぞれ配列番号1による)；345A(配列番号2による)；112A、329A(それぞれ配列番号3による)；224A(配列番号4による)；339A(配列番号5による)；103C、145T(それぞれ配列番号6による)；32G、94T(それぞれ配列番号7による)；および26A(配列番号24による)。

【0052】本発明のさらなる態様にしたがって、好ましくは本明細書で定義した1個もしくはそれ以上の位置と対応する、多型性を含むヒトKDR遺伝子またはその相補鎖、または少なくとも1個の多型性を含む少なくとも20塩基のその断片を提供する。本発明はさらに、本発明のKDR遺伝子多型性を検出するヌクレオチドプライマーを提供する。そのようなプライマーは任意の長さ、例えば8ないし100ヌクレオチド長であることができるが、好ましくは12ないし50ヌクレオチド長、より好ましくは17ないし30ヌクレオチド長であることができる。

【0053】本発明のさらなる態様にしたがって、好ましくは本明細書で定義したような1個またはそれ以上の位置のKDR遺伝子多型性を検出することのできる対立遺伝子特異的プライマーを提供する。対立遺伝子特異的プライマーを、PCR反応等の増幅反応において、通常は不変プライマーと共に使用する。これにより、例えば、ARMS(商標)対立遺伝子特異的増幅検定のために使用するように、特定の配列位置の1個の対立遺伝子を選択的に増幅することを通じて、対立遺伝子間の判別が可能となる。該対立遺伝子特異的プライマーは、好ましくは17-50ヌクレオチド、より好ましくは約17-35ヌクレオチド、さらに好ましくは約17-30ヌクレオチドである。

【0054】好ましくは、対立遺伝子特異的プライマーは、検出すべき対立遺伝子と正確に対応しているが、3'末端の約6-8個のヌクレオチドが検出すべき対立遺伝子と対応し、残りのヌクレオチドの10個まで、例えば8、6、4、2、または1個までが、該プライマーの特性に有意に影響を及ぼすことなく変化していてもよい、その誘導体もまた意図される。正確な対立遺伝子判別プライマーのみからの特異的プライマー結合および選択的な伸長を最適化するために、-2および/または-3位(3'末端に対して)のヌクレオチドが、しばしばミスマッチである。

【0055】プライマーを任意の簡便な合成法を用いて製造し得る。このような方法の例は、標準的教科書、例えば「Protocols for Oligonucleotides and Analogues; Synthesis and Properties」, Methods in Molecular Biology Series; Volume 20; Ed. Sudhir Agrawal, Humana ISBN: 0-89603-247-7; 1993; 1st Editionに見出し得る。必要ならば検出を容易にするため、プライマー(複数を含む)を標識し得る。本発明のさらなる態様にし

たがって、好ましくは本明細書で定義した1個またはそれ以上の位置のKDR遺伝子多型性を検出することのできる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを提供する。

【0056】該対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは17-50ヌクレオチド、より好ましくは約17-35ヌクレオチド、より好ましくは約17-30ヌクレオチドである。このようなプローブの設計は、通常の技術を有する分子生物学者にとっては明らかである。このようなプローブは、任意の簡便な長さ、例えば50塩基まで、40塩基まで、より簡便には30塩基までの長さ、例えば8-25または8-15塩基長である。一般にこのようなプローブは、該遺伝子中の対応する野生型または変異体遺伝子座に完全に相補的な塩基配列を含んでいる。しかしながら、オリゴヌクレオチドプローブの判別力に不都合に影響を及ぼさない限り、要すれば、1個またはそれ以上のミスマッチを導入し得る。本発明のプローブは、検出を容易にするために、例えば、分子ビーコン(Molecular Beacons)におけるような1個またはそれ以上の標識を含み得る。配列番号8、9またはその相補鎖に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドを、その中央の位置(太字)の特定の多型性を検出するためのプローブとして使用し得る。このプローブは、この中央の(多型性)位置の特定の相補的多型性塩基を有する標的配列に、塩基ミスマッチを有するものよりも、より効率的に結合する。

【0057】本発明のさらなる態様にしたがって、本明細書で定義した位置のいずれかにおけるKDR遺伝子多型性を検出することのできる、対立遺伝子特異的プライマーまたは対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを提供する。

【0058】本発明のさらなる態様にしたがって、本発明の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブおよび/または本発明の対立遺伝子特異的プライマーを含む診断キットを提供する。このような診断キットは、本発明の方法での使用のための適当な包装および説明書を含み得る。このようなキットはさらに、適当な緩衝剤(複数を含む)、およびポリメラーゼ(複数を含む)、例えば、熱安定性ポリメラーゼ、例えばtaqポリメラーゼを含み得る。このようなキットは、コンパニオンプライマーおよび/またはコントロールプライマーまたはプローブも含み得る。コンパニオンプライマーは、PCRを実施するために使用する組のプライマーの一方であるものである。このようなプライマーは通常テンプレート鎖と正確に相補的である。

【0059】本発明のさらなる態様では、本発明の多型性を、連鎖研究での遺伝子マーカーとして使用し得る。これは、比較的高頻度の多型性に特に当てはまる。KDR遺伝子は、染色体4q11-q12に位置する(Sait et al(1995)Cytogen Cell Genet 70, 145-146; Spritz

et al(1994)Genomics 22,431-436)。低頻度多型性は、後記のハプロタイプ決定に特に有用であってよい。ハプロタイプとは、単一（父系または母系）の染色体上の連鎖した多型性部位（例えばある遺伝子内）に見出される1組の対立遺伝子である。この遺伝子内での組換えが無作為であるならば、 2^n ものハプロタイプ[ここで2は各々のSNPにおける対立遺伝子の数であり、そしてnはSNPの数である]が存在し得る。臨床応答に関連している突然変異または多型性を同定する1つのアプローチは、所望の集団中で同定され得る全てのハプロタイプを使用して会合試験を実施することである。各ハプロタイプの頻度は、最も稀な対立遺伝子の頻度によって制限を受け、その結果、低頻度の対立遺伝子を伴うSNPは低頻度のハプロタイプのマーカーとして特に有用である。

【0060】有害または異常事象等のある臨床上的の特徴に関連する特定の突然変異または多型性は、その集団の中で頻度が低い傾向があるため、低頻度SNPはこれらの突然変異の同定の際にとりわけ有用となり得る（例えば:Linkage disequilibrium at the cystathionine beta synthase(CBS)locus and association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine. Ann Hum Genet(1998)62: 481-90, De Stefano V, Dekou V, Nicaud V, Chasse JF, London J, Stansbie D, Humphries SE, and Gudnason V; および Variation at the von willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF: Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. Blood(1999)93: 4277-83. Keightley AM, Lam YM, Brady JN, Cameron CL, Lillcrap D参照)。

【0061】本発明の核酸配列、特に、本明細書で同定した単一ヌクレオチド多型性に関連し、同定する核酸配列は、例えば、同一性、ハプロタイプおよび他のサブグループリング、例えば特定の薬物での処置に対する感受性の観点からそれによって個体を特徴付けるための種々の情報源を意味する。これらのアプローチは、配列情報をコンピューター読み取り可能媒体に保存し、その情報を標準的な巨大分子構造プログラムに使用するか、または配列データベースを探索するために最新式の探索手段、例えば、GCC(Genetics Computer Group), BlastX BlastP, BlastN, FASTA(Altsch et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990参照)を使用して実施するのが最も容易である。したがって、本発明の核酸配列を含む多型性は、配列同一性、ゲノムマッピング、薬理遺伝学および他の探索分析のために有用なデータベース中の構成要素として特に有用である。一般に、本発明の核酸配列および多型性に関連する配列情報を、有形の媒体、例えば、コンピューターディスク、好ましくはコンピューター読み取り可能な形態に還元、変換または保存し得る。例えば、クロマトグラフィースキャンデータまたはピークデ

ータ、フォトグラフィックスキャンまたはピークデータ、質量分析データ、シーケンスゲル(または他の)データ。

【0062】本発明のさらなる態様にしたがって、媒体上に保存された本発明の少なくとも1個の新規配列を含むコンピューター読み取り可能媒体を提供する。このコンピューター読み取り可能媒体を、例えば相同性探索、マッピング、ハプロタイプ決定、遺伝子型決定または薬理遺伝学的分析に使用し得る。このコンピューター読み取り可能媒体は、例えば、フロッピー(商標)ディスク、テープ、チップ、コンパクトディスク、デジタルディスク、ビデオディスク、パンチカードおよびハードドライブを含む、情報またはデータを保存するために使用される、任意の組成物(composition of matter)であることができる。

【0063】本発明のさらなる態様にしたがって、KDR(VEGFR2)タンパク質に作用する低分子薬物、またはKDR(VEGFR2)mRNAに対して作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリボザイムで、処置の必要のあるヒトを処置する方法を提供する。その方法は:

i)該ヒトのKDR遺伝子中の多型性の診断であって、好ましくは、1個またはそれ以上の後記の位置の配列を決定することを含む診断をする; KDR遺伝子のプロモーター領域の162、423および461位(配列番号1の位置によって定義のように); KDR遺伝子のコード領域の224位(配列番号4の位置によって定義のように)、および145位(配列番号6の位置によって定義のように); KDR遺伝子のイントロン領域の345位(配列番号2の位置によって定義のように)、112、329位(配列番号3の位置によって定義のように); 339位(配列番号5の位置によって定義のように)、103位(配列番号6の位置によって定義のように)、32および94位(配列番号7の位置によって定義のように); 並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121の位置によって定義されたKDRポリペプチドのアミノ酸残基297、および472;

ii)KDR遺伝子中の多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定する;

iii)有効量の薬物を投与することを含む。

【0064】本発明のさらなる態様にしたがって、KDR(VEGFR2)タンパク質に作用する低分子薬物、またはKDR(VEGFR2)mRNAに対して作用するアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリボザイムで、処置の必要のあるヒトを処置する方法を提供する。その方法は:

i)該ヒトのKDR遺伝子の多型性の診断であって、好ましくは、1個またはそれ以上の後記の位置の配列を決定することを含む診断をする: KDR遺伝子のプロモーター領域の162、423および461位(配列番号1の

位置によって定義のように)；KDR遺伝子のコード領域の224位(配列番号4の位置によって定義のように)；および145位(配列番号6の位置によって定義のように)；KDR遺伝子のイントロン領域の345位(配列番号2の位置によって定義のように)；112、329位(配列番号3の位置によって定義のように)；339位(配列番号5の位置によって定義のように)；103位(配列番号6の位置によって定義のように)；32および94位(配列番号7の位置によって定義のように)；KDR遺伝子のエキソン1領域の5'UTRの26位(配列番号24の位置によって定義のように)；並びにEMBLアクセッションナンバーAF035121の位置によって定義されたKDRポリペプチドのアミノ酸残基297、および472；

ii) KDR遺伝子の多型性を参照することによってそのヒトの体質を決定する；

iii) 有効量の薬物を投与することを含む。

【0065】好ましくは、ヒトの体質の決定は、臨床的に有用である。臨床的な有用性の例は、どの薬物(複数を含む)を投与すべきか決定することおよび／または薬物(複数を含む)の有効量を決定することを含む。「KDRに作用する薬物」の語は、ヒトのKDRタンパク質に結合する薬物であって、その結合がヒトにおいてその医薬的效果を発揮する薬物の重要部分である薬物を意味する。

【0066】本発明のさらなる態様にしたがって、KDR(VEGFR2)タンパク質またはKDR(VEGFR2)mRNAに作用する薬物の使用であって、そこに、好ましくは本明細書で定義した1個またはそれ以上の位置に多型性を有すると診断されたヒトの疾患を処置するための医薬の製剤における使用を提供する。

【0067】本発明のさらなる態様にしたがって、KDRアンタゴニストとして作用する薬物およびその薬物の投与のための説明書であって、その、好ましくは本明細書で定義した1個またはそれ以上の位置の多型性を、診断的に試験されるヒトにその薬物を投与するための説明書を含む医薬パックを提供する。

【0068】本発明のさらなる態様にしたがって、少なくとも後記のポリペプチドの1個を含むヒトのKDRポリペプチドの対立遺伝子変異体を提供する：EMBLアクセッションナンバーAF035121に記載されたポリペプチドの297位のイソロイシン、および472位のヒスチジン、または少なくとも10個のアミノ酸を含むその断片であるが、ただし少なくとも1個の対立遺伝子変異体を含む断片。ポリペプチドの断片は少なくとも10個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも15個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも20個のアミノ酸である。

【0069】本発明のさらなる態様にしたがって、本明細書で記載したヒトKDRポリペプチドの対立遺伝子変

異体に特異的な抗体を提供する。抗体は、任意の適当な方法を使用して調製できる。例えば、精製ポリペプチドを、特異的な抗体を調製するために利用し得る。「抗体」の語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、並びに種々のタイプの抗体構築物、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fabおよび一本鎖Fvを含む意味である。もしそれら(抗体)が、KDRの対立遺伝子変異体と、約 $10^7 M^{-1}$ より大きいか同じである K_d で結合するならば、特異的に結合すると定義される。結合の親和性は、通常の方法、例えば、Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., (1949)51:660に記載された方法を使用して決定できる。

【0070】ポリクローナル抗体を種々の起源、例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウスまたはラットから当業界で周知の方法を使用して容易に生成できる。一般に、抗原を宿主動物に、典型的には非経腸的な注射によって投与する。抗原の免疫原性をアジュバント、例えば、フロイントの完全または不完全アジュバントを使用して増強し得る。追加免疫の後に少量の血清サンプルを収集し、抗原への反応性を試験する。そのような決定に有用な種々の検定の例は、次の文献等に記載されているもの：Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988;並びに例えば、カウンターカレント免疫電気泳動(CIEP)、放射線免疫検定、放射線免疫沈降、固相酵素免疫検定法(ELISA)、ドットブロット分析、およびサンドイッチ検定(米国特許番号4,376,110および4,486,530参照)を含む。

【0071】モノクローナル抗体は、周知の方法を使用して容易に調製し得る。例えば、米国特許番号RE32,001; 4,902,614; 4,543,439および4,411,993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol(eds.), (1980)に記載された方法を参照。本発明のモノクローナル抗体を別法、例えば、Alting-Mees et al., 「Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas」, Strategies in Molecular Biology(1990)3:1-9に記載された方法を使用して製造することができる。これを引用により本明細書の一部とする。同様に、結合パートナーを組換え体DNA技術を使用して、特異的な結合抗体をコードする遺伝子の可変部領域を取り込ませて、構築することができる。そのような技術がLarricket al., Biotechnology, (1989)7:394に記載されている。その抗体を単離、精製し、使用して、サンプル中の抗原の存在について、確立された検定プロトコルを使用して検出し得る。例えば、D. M. Kemeny, Pergamon Press, Oxford, Englandによる「A Practical Guide to ELISA」参照。

【0072】本発明のさらなる態様にしたがって、本発明の抗体を含む診断キットを提供する。ここで、本発明

を後記の実施例により説明するがこれらに限定しない。すべての温度は摂氏℃である。特に言及しない場合、後記の実施例では、後記の方法および材料を適用する。Perkin-Elmer Cetusから入手可能なAMPLITAQ(商標)を熱安定性DNAポリメラーゼのソースとして使用する。一般的な分子生物学の手法は、「Molecular Cloning- A Laboratory Manual」Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory 1989) または「Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, Edited by FM Asubel, R Brent, RE Kingston pub John Wiley 1998に記載の任意の方法に従うことができる。電気泳動図を標準的方法で取得した: データをABI 377データコレクションソフトウェアによって収集し、波形をABI Prismシーケンシング分析(2.1.2)によって作成した。

【0073】実施例1

多型性の同定

1. 方法

DNAの調製

DNAを、後記の修飾をしたプロトコルI (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, p392, Sambrook, Fritsch and Maniatis, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, 1989)にしたがってEDTA中に収集した凍結血液サンプルから調製した。解凍済みの血液を、リン酸塩(エステル)緩衝生食水に代えて等体積の標準的生食水クエン酸塩(エステル)中に希釈し、溶血した赤血球を除去した。試料を、3回のフェノール抽出に代えて、フェノール、次にフェノール/クロロホルム、次にクロロホルムで抽出した。DNAを脱イオン水に溶解した。29人*

AGTCTGGGAGTGAGATGAAGAATTTTGTAGACACCTTAAGTATAGATGGTRTAAC
CCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTG

(配列番号10)ここで、R=GまたはA

【0076】ヌクレオチド225の改変(T→C)によって、多型性RsaI部位(GTAC)を生じ、224位の多型性についての診断検定として使用できる。

正(forward)プライマー 1-20

改変プライマー 225-244

【化3】

5' TCCTTGGTCACTCCGGGTTG

(配列番号25)

変化塩基は太字

野生型の個体(G変異体)から生成したPCR産物(244bp)は、RsaI(New England Biolabs)の消化によって切断されない。ヘテロ接合体個体に由来する産物の消化によって、244bp、224bpおよび20bpの産物を生成する。A変異体についてのホモ接合体に由来する産物の消化によって、224bpおよび20bp

TAAAGAAAAATTAAATCATAATATGCGCTGTTATCTCTTTCTTATAGCCAWGCTG
TCTCAGTGACAAACCCATACCTTGTGAAGAATGGAGAAAGTGTGGAGGA

(配列番号11)ここで、W=AまたはT

*の個体のサンプルを分析した。

【0074】テンプレートの調製

テンプレートを、後に示したオリゴヌクレオチドプライマーおよびアニーリング温度を使用してPCRによって調製した。伸長温度は72℃、変性温度は94℃であった。一般的に、各反応で50ngのゲノムDNAを使用し、35サイクルのPCRに付した。後記に記載した場合、第1の断片を1/100に希釈し、2マイクロリットルを第2の断片の増幅のためのテンプレートとして使用した。PCRを2段階実施し(第1の断片、次に第2の断片)、望ましい標的配列の特異的な増幅を確認した。

【0075】KDRのコード領域内の新規多型性

(1) 配列番号4の224位のG/A多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

224 G/A G 89% A 11%

224位の多型性は、コドン297位(コドンの数字はEMBLアクセッションナンバーAF035121による)におけるバリン(GTA)からイソロイシン(ATA)へのコドン変化をもたらす。コドン297位は、エキソン7内に位置し、アミノ酸残基297は、KDRの細胞外領域における第3のIg様ドメインの一部を形成する(Terman et al., (1992) Biochem Biophys Res Comm 187: 1579-1586.)。第3のIg様ドメインは、リガンド結合に役割を演じていると考えられる(Lu et al., 前掲)。224位のG/A多型性のフランキンギンな配列を次に示す(174-274位、数字は配列番号4による)

【化2】

bpの産物を生ずる。

【0077】(2) 配列番号6の145位のA/T多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

145 A/T A 73% T 27%

145位の多型性は、コドン472位(コドンの数字はEMBLアクセッションナンバーAF035121による)のグルタミン(CAA)からヒスチジン(CAT)へのコドン変化をもたらす。コドン472はエキソン11内に位置し、アミノ酸残基472はKDRの細胞外領域の第5のIg様ドメインに位置する(Terman et al., 1992, 前掲)。

【0078】145位のA/T多型性(W)のフランキンギンな配列を、後記に示す(95-195位、数字は配列番号6による)。

【化4】

TAAAGAAAAATTAAATCATAATATGCGCTGTTATCTCTTTCTTATAGCCAWGCTG
TCTCAGTGACAAACCCATACCTTGTGAAGAATGGAGAAAGTGTGGAGGA

50 145位の多型性(A/T)によって、NlaIII制限

25

26

部位(CATG)を生じ、診断試験として使用できる。野生型個体(A変異体)から生成したPCR産物(499bp)は、NlaIII(New England Biolabs)での消化によって切断されない。ヘテロ接合体の個体からの産物の消化によって、146bp、353bpおよび499bpの産物を生ずる。T変異体についてホモ接合体の個体からのPCR産物の消化によって146bpおよび353bpの産物を生じる。

【0079】KDR遺伝子のプロモーター(配列番号*)

AGGTCACCTCAAACTTGGAGCCGCCAAATATTTGGGAAATAGCGGAATGVTGG
CGAACTGGGCAAGTGCCTTTCTGATTAAGAGCAACCAGATTACAGCT

(配列番号12)ここで、Y=TまたはC

【0080】(2)423位(配列番号1)のC/G多型性

位置 多型性

対立遺伝子頻度 * 【化6】
CGCGATGGCGAAGAGGGTCTTGCACCTTTGACCGCCTGGTGAGGGAGCGSTGCT
CTTCGCAGCGCTCCTGGTGATGCTCCCCAAATTTCTGGGGACCGGC

(配列番号13)ここで、S=CまたはG

【0081】(3)461位(配列番号1)のT/C多型性

位置 多型性

T/C 461

対立遺伝子頻度 * 【化7】
GGTGAGGGAGCGGTGCTCTTCGCAGCGCTCCTGGTGATGCTCCCCAAATTTCTGGG
GACCGGCAAGCGATTAAATCTTGGAGTTGCTCAGCGCCCGTTACCG

(配列番号14)ここで、Y=TまたはC

【0082】フランキンイントロン配列の新規多型性
(1)345位(エキソン2、配列番号2)のG/T多型性

位置 多型性

対立遺伝子頻度 * 【化8】
GATTTCCTTGTGTTAAGTAACTGATTGTTTATTGAGTGGAAATAATTTCCARTAGAG
CAGAATTATAATAGAGCTTGTAGTAATTGTTTCATAAGTGGTGAGG

(配列番号15)ここで、R=GまたはA

【0083】(2)112位(エキソン6、配列番号3)のG/A多型性

位置 多型性

112 G/A

対立遺伝子頻度 * 【化9】
G 74% A 26%
AAAAAATAAATCTGTGCAAAGTTATAGGCTTATTTGCTCTCTCATGTTCTRTTTTT
TCAATTTACTTGCTCTAGGGTATAGGATTATGATGTGGTTCTGA

(配列番号16)ここで、R=GまたはA

【0084】(3)329位(エキソン6、配列番号3)のG/A多型性

位置 多型性

329 G/A

対立遺伝子頻度 * 【化10】
G 59% A 41%
ACGCTAATGATTCAAAGCCAGACCTCCAAATACTTACATAATAAGCCCCARTGAA
GTTTGCTTGAGAGATAGGGGCTCTTTGGCCAGATAAAATGTAAGA

(配列番号17)ここで、R=GまたはA

【0085】(4)339位(エキソン9、配列番号5)のG/A多型性

位置 多型性

339 G/A

対立遺伝子頻度 * 【化11】
G 74% A 26%

*1、EMBLアクセションナンバーNoX89776の16-534位)内の新規多型性

(1)162位(配列番号1)のT/C多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

T/C 162 T 75% C 25%

162位のT/C多型性(Y)のフランキンな配列を後記に示す(配列番号1の112-212位)

【化5】

*C/G 423 C 78% G 22%

423位のC/G多型性(S)のフランキンな配列を後記に示す(配列番号1の373-473位に対応)

【化6】

*461位のT/C多型性(Y)のフランキンな配列を後記に示す(配列番号1の411-511位に対応)

20 【化7】

*345 G/A G 95% A 5%

(配列番号2)の345位のG/A多型性(R)のフランキンな配列を、後記に示す(配列番号2の295-395位に対応)。

【化8】

112位(配列番号3による)のG/A多型性(R)のフランキンな配列を後記に示す(=配列番号3の62-162位)

【化9】

329位(配列番号3による)のG/A多型性(R)のフランキンな配列を後記に示す(=配列番号3の279-379位)

【化10】

339位(配列番号6による)のG/A多型性(R)のフランキンな配列を後記に示す(=配列番号6の289-377位)

【化11】

28
ACCACCGTTCCCTCTGCCTCCTGCTGCTTCACTCATATCATGGCTGGGCCTRCGTAC
AAAAGTCATCTGGCGTGGTGAAGCTGAAGTGAA

(配列番号18)ここで、R=GまたはA

【0086】(5) 103位(エキソン11、配列番号6)のA/C多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

103 A/C

A 98% C 2%
AATAACCAAAGTCTGAATCTTTTCCTTACTCTTGACTCTAATTAAGAAAMATTA
AATCATAATATGCGCTGTTATCTCTTTCTTATAGCCAAGCTGTCTC

*103位(配列番号7による)のA/C多型性(M)のフランキンキングな配列を後記に示す(=配列番号6の53-153位)

【化12】

(配列番号19)ここで、M=AまたはC

【0087】(6) 32位(エキソン21、配列番号7)のT/G多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

32 T/G

T 98% G 2%
TTGATGTCCTCCTTGTCTGCTTTTGTAGTAGTCTCAATTATCTCCATGGTTTACTACA
TTTTAAAGGTTGTAAACTTTTAAAG

*32 T/G T 98% G 2%

32位(配列番号7による)のT/G多型性(K)の側方の10配列を後記に示す(=配列番号7の1-82位)

【化13】

(配列番号20)ここで、K=TまたはG

【0088】(7) 94位(エキソン21、配列番号7)のA/T多型性

位置 多型性 対立遺伝子頻度

94 A/T

A 68% T 32%
CATGGTTTACTACATTTTAAAGGTTGTAAACTTTTAAAGACTCATTTTGTWTTCAA
GGAGTTTGTGTTTCCTTTTGCTTTTTTATAGACCAAAGGGGCACG

*94位(配列番号8による)のA/T多型性(W)のフランキンキングな配列を後記に示す(=配列番号7の44-144位)

【化14】

(配列番号21)ここで、W=AまたはT

【0089】KDR遺伝子の5' UTRの新規多型性

(1) 26位(エキソン1、配列番号24)のG/A

多型性

位置

TCCCGGGGACCCCGGGAGAGCGGTCARTGTGTGGTCGCTGCGTTTCCTCTGC

26で、R=GまたはA G 70% A 30%

配列番号24は、配列番号23のサブ配列である。それは配列番号22のサブ配列である。

【0090】実施例2

KDR多型性のハプロタイプ分析

26位(配列番号24による)のG/A多型性(R)のフランキンキングな配列を後記に示す(=配列番号22の193-243位)

【化15】

多型性 対立遺伝子頻度

コドン297 Val(GTA)/Ile(ATA)

%

配列番号5のイントロン339位 G 74% A 26%

【0091】多型性領域は、47.2 kbの長い領域にわたって、3つのエキソンと2つのイントロンを含む。この領域は、47.2 kbの長い領域にわたって、3つのエキソンと2つのイントロンを含む。この領域は、47.2 kbの長い領域にわたって、3つのエキソンと2つのイントロンを含む。

おり、73人の個体の遺伝子型を、シーケンシングによって決定し、ハプロタイプ頻度を、クラークのアルゴリズムおよびEH (end haplotype)ソフトウェアの組み合わせを使用して決定した。たった5個のハプロタイプを73人の個体中に観察した。

ハプロタイプ 頻度 (%)

GGA 40

GGT 24

GAA 26

AGT 6

AAA 4

【0092】配列リスト情報：配列番号1 (EMBLア

KDR遺伝子中の2個のコード領域の多型性(バリン297イソロイシン；グルタミン472ヒスチジン)を、イントロンのSNP (339位のG/A、配列番号5による)と組み合わせて使用し、ハプロタイプ頻度を予測する。

1-519位(プロモーター領域)

多型性T/C 162

C/G 423

T/C 461

正プライマー 1-20；逆(reverse)プライマー 500-519

【0093】配列番号2 (EMBLアクセッションAC021220の150523-151026位に対応)

フランキングイントロン 1-178

エキソン2 178-272

フランキングイントロン 273-503

29		30	
多型性 G/A	345	*エキソン11	142-275
正プライマー 1-20; 逆プライマー 484-503		フランキングイントロン	276-499
【0094】配列番号3 (EMBLアクセッションAC021220の143659-144055位に対応)		多型性 A/C	103
正プライマー 1-20; 逆プライマー 388-397		多型性 A/T	145
フランキングイントロン 1-135		【0098】配列番号7 (AC021220の79362-79718位に対応)	
エキソン6 136-275		正プライマー 1-20; 逆プライマー 338-357	
フランキングイントロン 276-397		フランキングイントロン 1-130	
多型性 G/A 112		10 エキソン21 131-284	
多型性 G/A 329		フランキングイントロン 285-357	
【0095】配列番号4		多型性 T/G 32	
正プライマー 1-20; 逆プライマー 434-453		多型性 A/T 94	
フランキングイントロン 1-133		【0099】配列番号22 (EMBLアクセッションAC021220に由来するイントロン配列	
エキソン7 134-311		187-556位がEMBLアクセッションAF035121の1-370位に対応する	
フランキングイントロン 312-453		218位がEMBLアクセッションAF035121の32位に対応する)	
多型性 G/A 224		フランキングイントロン 1-186	
1-393位はAC021220の143269-142877位に対応する。394-453位が、BACクローン81A1のシーケンシングによって決定した新規配列に対応する。		エキソン1 187-556	
【0096】配列番号5 (EMBLアクセッションナンバーAC021220の11289-113265位に対応)		フランキングイントロン 557-628	
正プライマー 1-20; 逆プライマー 358-377		多型性 G/A 218	
フランキングイントロン 1-57		正プライマー 1-24; 逆プライマー 605-628	
エキソン9 58-221		【0100】配列番号23 (EMBLアクセッションAC021220に由来するイントロン配列	
フランキングイントロン 221-377		124-315位がEMBLアクセッションAF035121の1-192位に対応する	
多型性 G/A 339		30 145位がEMBLアクセッションAF035121の32位に対応する)	
【0097】配列番号6 (EMBLアクセッションナンバーAC021220の109095-109593位に対応)		フランキングイントロン 1-123	
正プライマー 1-20; 逆プライマー 480-499		エキソン1 124-315	
フランキングイントロン 1-141		多型性 G/A 145	
		正プライマー 1-24; 逆プライマー 292-315	
		【0101】	
		* 【配列表】	

SEQUENCE LISTING

<110> ASTRAZENECA AB
 <120> CHEMICAL COMPOUNDS
 <130> LDG/100189
 <140>
 <141>
 <150> 0026851.6
 <151> 2000-11-03
 <160> 25
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1

<211> 519
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 1
 cctaaggata tcttggtg aagctctgct ctga
 aaaggg gcatggccaa actttcacta 60
 gggctcttcg ttggggagca cgaaggacaa aagc
 ctctctt ggggctaggc aggtcacttc 120
 aaacttggag ccgccaata ttttgggaaa tagc
 gggaat gctggcgaac tgggcaagtg 180
 cgttttctga ttaagagcaa ccagattcag cttt
 ttaaac tacaattata ctggccaaac 240
 aaaataccct tatacaaaaa ccaaaactac tggc
 aggagt cgctgccagc ttgcgacccg 300
 gcatacttgg ctgagtatcc gttctccct tgtg
 gctcca aactgctgca gattctcggc 360
 cacttcagac gcgcgcgatg gcgaagaggg tcct
 gcactt tgacgcgcct ggtgaggagg 420
 cgggtgctctt cgcagcgcct ctggtgatgc tccc
 caaatt tcggggaccg gcaagcgatt 480
 aaatcttggg gttgctcagc gcccggtacc gagt
 acttt 519

<210> 2
 <211> 503
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 2
 ctgttatgac acagcttgtg aacttttact gaga
 atgggtg aaaagtaaat tcccagtttt 60
 atacaatgaa ttgctgaaga ggccttttaa agta
 tagagt atgcattgtt tatggaaggt 120
 gtttctctatt aggtctaact cagtggcaac taca
 ttcatt tatttaattt gtttctaggt 180
 ttgcctagtg tttctcttga tctgcccagg ctca
 gcatac aaaaagacat acttacaatt 240
 aaggctaata caactcttca aattacttgc aggt
 aaggat tcattctaga tctagatttc 300
 ttgtgttaag taactgattg tttattgagt ggaa
 ataatt tccagtagag cagaattata 360
 atagagcttg tagtaattgt tcataagtgg tgag
 gtttct aagaactgat gtaataatgg 420
 aaaatgagaa gaattttctc tcaaaaattc tgta
 caattt tgctggtgtt tttatactat 480
 tctctgccaa catgcataca cac

503

<210> 3
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 3
 caagtattgg tgaggcctgc agggaaaaac aatg
 tggcat gttttaagt tgcattactt 60
 taaaaataa atctgtgcaa agttataggc ttat

ttaaataaat ttaggtcact tagtgattcc tatt
 ttgttc attcagaaga tagtttctag 420
 tttttcttgt tagggaggcc acatgaccta gag
 453

<210> 5

<211> 377

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

tttcgtgtga gagcaaatcc ttgactata ctaa
 ttccctg agaatttttt ttcataagta 60
 taaaaatgga atacccttg agtccaatca caca
 attaaa gcggggcatg tactgacgat 120
 tatggaagtg agtgaaagag acacaggaaa ttac
 actgtc atccttacca atcccatttc 180
 aaaggagaag cagagccatg tggctctctt gggt
 gtgtat ggtgagtcca ttcaattttc 240
 ctctctgccc aagatttatt atgatacatt gtct
 tccaaa tcagccaaac caccgttctt 300
 ctgectcttg ctgcttcaact catatcatgg ctgg
 gcctgc gtacaaaagt catctggcgt 360
 ggtgaagctg aagtga
 377

<210> 6

<211> 499

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

cgccaagtct tgtaccatgg taggctgcgt tgga
 agttat ttctaagaac agaataacca 60
 aagtctgaat cttttctta ctcttgactc taat
 taaaga aaaattaaat cataatatgc 120
 gctgttatct ctttcttata gccaagctgt ctca
 gtgaca aaccataacc cttgtgaaga 180
 atggagaagt gtggaggact tccaggaggg aaat
 aaaatt gaagttaata aaaatcaatt 240
 tgctctaatt gaaggaaaa acaaagtga tttg
 aagttt taaaatttga aaatctctct 300
 ctctttaatg gaaggatggt acaataatat gtga
 ggcata ttggagatta ataatacaat 360
 agtctggatg attaaataga gcgtattaag tcac
 ttigaa aataccattg acttttagca 420
 gtaccattaa cttattaata gcttatcaga gaaa
 aataaa aacatctatg acattaaatc 480
 tatgcatctg tgtagggtg
 499

<210> 7

<211> 357

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

ttgatgtcct ccttgtctgc ttttagtag ttic

<400> 9

tctttcttat agccatgctg tctcagtgac a

31

<210> 10

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

agtctgggag tgagatgaag aaatTTTTga gcac

cttaac tatagatggT rtaaccgga 60

gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccag

tgggct g 101

<210> 11

<211> 104

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

taaagaaaa ttaaatcata atatgcgctg ttat

ctcttt cttatagcca wgctgtctca 60

gtgacaaacc catacccttg tgaagaatgg agaa

gtgtgg agga 104

<210> 12

<211> 102

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

aggtcacttc aaacttggag ccgccaata tttt

gggaaa tagcgggaat gytggcgaac 60

tgggcaagtg cgTTTTctga ttaagagcaa ccag

attcag ct 102

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

gcgcgatggc gaagagggtc ctgcactttg acgc

gcctgg tgagggagcg stgctcttcg 60

cagcgtctct ggtgatgctc ccaaatttc gggg

accggc 100

<210> 14

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

ggtgaggag cggtgctctt cgcagcctc ctgg

tgatgc tccccaaatt ycggggaccg 60

gcaagcgatt aaatcttga gttgtcagc gccc

gttacc g 101

<210> 15

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

aaaaaataaa tctgtgcaaa gttatagget tatt
 tgctct ctcattgtct rttttttcaa 60
 tttacttgct ctagggtata ggatttatga tgtg
 gttctg a 101

<210> 17

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

acgctaataa ttcaaagcca gacctcaaaa tact
 tacata ataagcccca rtgaagtttg 60
 cttgagagat aggggcctct ttggccagat aaaa
 tgtaag a 101

<210> 18

<211> 89

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

accaccgttc ctctgcctcc tgctgcttca ctca
 tatcat ggctgggcct cgtacaaaa 60
 gtcattctggc gtggtgaagc tgaagtga
 89

<210> 19

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

aataacaaaa gtctgaatct tttccttact ctg
 actcta attaaagaaa mattaaatca 60
 taatatgcgc ttttatctct ttcttatagc caag
 ctgtct c 101

<210> 20

<211> 82

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

ttgatgtcct ccttgtctgc tttttagtag tktc
 aattat ctccatggtt tactacattt 60
 taaaggttgt aaacttttaa ag
 82

<210> 21

<211> 101

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

catggtttac tacattttta aggttgtaaa cttt
 taaaga ctcattttgt wttcaaggag 60
 tttgtttgtt cctttgcttt tttatagacc aaag
 gggtcac g 101

<210> 22

<211> 628

ctgtgcgtc aactgtctg cgctgcggg tgcc
 gcgagt tccacctccg cgcctccttc 420
 tctagacagg cgctgggaga aagaaccggc tccc
 gaggtc tgggcatttc gcccggtcg 480
 aggtgcagga tgcagagcaa ggtgctgctg gccg
 tcgcc tgtggctctg cgtggagacc 540
 cgggccgcct ctgtgggtaa ggagccact ctgg
 aggagg aaggcagaca ggtcgggtga 600
 gggcggagag gacctgaaag ccagatct
 628

<210> 23
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 23
 tagacgcgag ataccggat gagggcgga ctgg
 ccgaac ggagagccc tctccgac 60
 cggccccgcc ccgatggcc cgcctccgc gctc
 tagagt ttccgacca gtcaccacc 120
 tgcactgagt cccgggacc cgggagagcg gtca
 gtgtgt ggtcgtgctg tttcctctgc 180
 ctgcgccggg catcacttgc gcgccgaga aagt
 ccgtct ggcagcctgg atatcctctc 240
 ctaccggcac ccgagacgc ccctgcagcc gccg
 gtcggc gccggggtc cctagccctg 300
 tgcgtcaac tgtcc
 315

<210> 24
 <211> 51 31
 <212> DNA
 <213> Human
 <400> 24

フロントページの続き
 cccgggacc ccgggagagc ggtcartgtg tggt
 cgctgc gtttctctg c 51

(51)Int.Cl. ⁷	<210> 25	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
A 6 1 P	29/00	<211> 20	A 6 1 P	35/00
	35/00	<212> DNA	C 1 2 M	1/00
C 1 2 M	1/00	<213> Human	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 Q	1/68	<400> 25	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/53	tccttggtca ctccgggttg		M
		20		33/566
	33/566		C 1 2 N	15/00
				Z N A A

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA19 BA10 BA63
BA80 CA01 CA02 CA09 CA20
HA09 HA11 HA13 HA14
4B029 AA23 AA27
4B063 QA13 QA17 QA19 QQ42 QQ43
QQ48 QR08 QR14 QR20 QR32
QR35 QR40 QR42 QR56 QR62
QS16 QS25 QS31 QS34 QX02
QX10
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB112
ZB212 ZB262
4C086 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14
ZB11 ZB26

专利名称(译)	化学物质		
公开(公告)号	JP2002345489A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2001300582	申请日	2001-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	阿斯利康(瑞典)有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿斯利康Akuchieboragu		
[标]发明人	ジョンクレイグスミス		
发明人	ジョン・クレイグ・スミス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7084 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P35/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/7088 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/172		
FI分类号	A61K31/7084 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P35/00 C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA10 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA09 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B029/AA23 4B029/AA27 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ48 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS31 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX10 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB11 4C086/ZB26		
优先权	2000026851 2000-11-03 GB 2001009602 2001-04-19 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：临床试验表明，患者对药物治疗的反应通常是异质的。因此，需要用于药物设计和治疗的改进方法。本发明涉及人KDR基因的多态性和由其编码的相应的新等位基因多肽。特别是，KDR基因编码序列中的两个多态性，每个导致表达的蛋白质序列中的氨基酸变化；启动子区域中的三个单核苷酸多态性（SNP）；5' UTR中有一个SNP，内含子序列中有七个SNP。本发明提供了用于分析KDR基因中的等位基因变异的方法和材料以及KDR多态性在治疗KDR配体（血管内皮生长因子VEGF）介导的疾病如癌症和各种炎症疾病中的用途。也有关。

領域	変異体 配列番号
エキソン2に隣接するイントロン	3 4 5 A 配列番号2
エキソン6に隣接するイントロン	1 1 2 A 3 2 9 A 配列番号3
エキソン9に隣接するイントロン	3 3 9 A 配列番号5
エキソン11に隣接するイントロン	1 0 3 C 配列番号6
エキソン21に隣接するイントロン	3 2 G 9 4 T 配列番号7