

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-166915

(P2010-166915A)

(43) 公開日 平成22年8月5日(2010.8.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 有 請求項の数 75 O L (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-23205 (P2010-23205)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成22年2月4日 (2010.2.4)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2004-544224 (P2004-544224) の分割		スイス国 ツェーハー ー 4 0 0 2 パーゼ ル, リヒトシュトラーセ 3 5
原出願日	平成15年10月14日 (2003.10.14)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	60/418, 556		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成14年10月15日 (2002.10.15)	(74) 代理人	100101454
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山田 卓二
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100067035
1. フロッピー			弁理士 岩崎 光隆
2. J A V A		(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稜
		(74) 代理人	100144923
			弁理士 中川 将之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物処置の副作用としての浮腫を予測する方法

(57) 【要約】

【課題】 限定されるものではないが、イマチニブまたは（GLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）などのTKIをはじめとする薬物で処置された患者における浮腫の副作用の発生の見込みを予測する方法を提供すること。

【解決手段】 限定されるものではないが、イマチニブまたは（GLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）などのTKIをはじめとする薬物で処置された患者における浮腫の副作用の発生の見込みを予測する方法を見いだした。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち複数に関して、生体サンプルにおける RNA 発現レベルを判定すること；

b) 患者の遺伝子発現プロファイルと表 3 に示されている平均非浮腫発現プロファイルとを比較すること；

c) (b) における比較から得られた 2 つの遺伝子発現プロファイル間の類似性を判定すること；

d) (c) において判定された類似性の程度的手段により、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みを判定することを含む方法。

【請求項 2】

(c) において判定される前記類似性が前記の 2 つの遺伝子発現プロファイルを比較することにより得られる数学的相関係数である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(c) において判定される前記相関係数がピアソンの相関係数 (PCC) である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (d) が、PCC が 0.37 未満であれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症しないよりも発症する見込みが高いと判定し、PCC が 0.37 以上であれば、患者が浮腫を発症するよりも発症しない見込みが高いと判定することにより判定される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを、15%の浮腫症例だけしか浮腫を持たないとして誤分類されないような高感度で予測する方法であって、

a) 表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち複数に関して、生体サンプル中の RNA 発現レベルを判定すること；

b) 患者の遺伝子発現プロファイルと表 3 に示されている平均非浮腫発現プロファイルとを比較すること；

c) (b) における比較から得られた 2 つの遺伝子発現プロファイルの間の PCC を判定すること；

d) PCC が陰性でかつ負または 0.78 未満であれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症しないよりも発症する見込みが高いと判定すること；および

e) 陰性の PCC が 0.78 以上であれば、患者が浮腫を発症するよりも発症しない見込みが高いと判定することを含む方法。

【請求項 6】

生体サンプルが血液サンプルを含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

表 2 の 13 のプレディクター遺伝子の全てが用いられる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

薬物がチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

TKI がイマチニブまたは GLEEVEC (商標) / GLIVEC (登録商標) である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 患者に存在する 2 コピーの IL-1 β 遺伝子に関して、転写開始部位から -511 塩基対上流の位置 (配列 X04500 の 1423 番) にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定すること ; および

b) この部位のヌクレオチド対が双方とも GC であれば、患者が浮腫を発症する見込みがあると判定し、この部位のヌクレオチド対の少なくとも一方が AT であれば、患者が浮腫を発症する見込みがないと判定することを含む方法。

【請求項 11】

10

薬物が TKI である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

TKI がイマチニブまたは GLEEVEC (商標) / GLIVEC (登録商標) である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 患者に存在する 2 コピーの IL-1 β 遺伝子に関して、転写開始部位から -31 塩基対上流の位置 (配列 X04500 の 1903 番) にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定すること ; および

20

b) この部位のヌクレオチド対が双方とも AT であれば、患者が浮腫を発症する見込みがあると判定し、この部位のヌクレオチド対の少なくとも一方が GC であれば、患者が浮腫を発症する見込みがないと判定することを含む方法。

【請求項 14】

薬物が TKI である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

TKI がイマチニブまたは GLEEVEC (商標) / GLIVEC (登録商標) である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

30

薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 生体サンプルにおいて IL-1 β 遺伝子の転写レベルを判定すること ; および

b) そのレベルが閾値レベルを超えていれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがあると判定することを含む方法。

【請求項 17】

薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 生体サンプルにおいて IL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定すること ; および

40

b) そのレベルが閾値レベルを超えていれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがあると判定することを含む方法。

【請求項 18】

薬物が TKI である、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

TKI がイマチニブまたは GLEEVEC (商標) / GLIVEC (登録商標) である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

50

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、

a) 表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のタンパク質産物のうち 2 以上に
関して、生体サンプルにおけるタンパク質発現パターンを判定すること；

b) このタンパク質発現パターンと表 3 に示されている浮腫および非浮腫発現プロフ
ィールに関して予想されるパターンとを比較すること；

c) そのパターンが、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがない非浮腫
パターンと類似性が高いかどうかを判定すること；および

d) そのパターンが、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがある浮腫パ
ターンと類似性が高いかどうかを判定すること

を含む方法。

【請求項 21】

表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち複数のタンパク質発現を判定す
る、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子の全てのタンパク質発現を判定する、
請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

薬物が TKI である、請求項 20～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

TKI がイマチニブまたは GLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）である
、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

患者を薬物で処置する方法であって、

a) 請求項 16～24 のいずれか一項に記載の方法の使用により、意図した薬物に曝さ
れた際に特定の患者が浮腫を発症する見込みを判定すること；および

b) (a) における判定の結果に基づく安全かつ適当な方法で、その患者に対して意図
した薬物療法を改良すること

を含む方法。

【請求項 26】

薬物試験のために臨床試験を計画する方法であって、

a) 前記発現プロファイリング法またはジェノタイピング法のいずれかを用いることに
より、試験薬に曝された際に特定の患者が浮腫を発症する見込みを判定すること；および

b) (a) における判定の結果に基づき、臨床試験においてその患者を適当な分類に割
り付けること

を含む方法。

【請求項 27】

浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β
遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する、IL-1 β 遺伝子由来のアンチセンスヌク
レオチド配列を含む単離核酸分子の治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法。

【請求項 28】

浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β
遺伝子によりコードされるタンパク質を阻害／活性化するアンタゴニストの治療上有効な
量を被験者に投与することを含む方法。

【請求項 29】

前記アンタゴニストが前記タンパク質に特異的な抗体である、請求項 28 に記載の方法
。

【請求項 30】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

前記モノクローナル抗体が有毒試薬と共役されている、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を低下／増強させる能力を有するリボザイムをコードするヌクレオチド配列の治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法。

【請求項 33】

浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を低下させる能力を有する、IL-1 β 遺伝子に対応する二本鎖 RNA の治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法。

【請求項 34】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち 2 以上に対応するタンパク質発現パターンを判定するための手段を含むキット。

【請求項 35】

前記手段が 13 のプレディクター遺伝子のうち複数に対応するタンパク質発現パターンを判定することができる、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

前記手段が 13 のプレディクター遺伝子の全てに対応するタンパク質発現パターンを判定することができる、請求項 34 または 35 に記載のキット。

【請求項 37】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、IL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定するための手段を含むキット。

【請求項 38】

前記タンパク質発現を判定するための手段が抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントである、請求項 34 ～ 37 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 39】

前記タンパク質発現が標識抗体を用いたウエスタンブロッティングにより判定される、請求項 34 ～ 38 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 40】

患者の生体サンプルを得るための手段をさらに含む、請求項 34 ～ 39 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 41】

タンパク質を検出するための手段および患者の生体サンプルを収容するのに好適な容器をさらに含む、請求項 34 ～ 40 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 42】

キット結果の使用および解釈に関する説明書をさらに含む、請求項 34 ～ 41 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 43】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、

(a) 表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち 2 以上に対応するタンパク質発現パターンを判定するための手段；

(b) 前記手段、および前記タンパク質を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記手段が前記タンパク質と複合体を形成することができる容器；

(c) (b) の複合体を検出するための手段；および所望により、

(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキット。

【請求項 44】

表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子に関するタンパク質発現パターンを判

10

20

30

40

50

定するためのキットであって、

- a) タンパク質発現パターンの判定に必要な全ての試薬を含む容器；および
- b) どのようにしてこの分析を実施および解釈するかを記載した表示

を含むキット。

【請求項 4 5】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、

- (a) IL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定するための手段；
- (b) 前記手段、およびタンパク質を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記手段が前記タンパク質と複合体を形成することができる容器；
- (c) (b) の複合体を検出するための手段；および所望により、
- (d) キット結果の使用および解釈に関する説明書

を含むキット。

【請求項 4 6】

前記判定ステップ (a) が請求項 3 7～4 2、または 4 5 のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項 1 7～1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記判定ステップ (a) が請求項 3 4～3 6、または 3 8～4 4 のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項 2 0～2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、表 2 に示されている 1 3 のプレディクター遺伝子のうち 2 以上の転写レベルを判定するための手段を含むキット。

【請求項 4 9】

前記手段が 1 3 のプレディクター遺伝子のうち複数の転写レベルを判定することができる、請求項 4 8 に記載のキット。

【請求項 5 0】

前記手段が 1 3 のプレディクター遺伝子の全ての転写レベルを判定することができる、請求項 4 8 または 4 9 に記載のキット。

【請求項 5 1】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、IL-1 β 遺伝子の転写レベルを判定する手段を含むキット。

【請求項 5 2】

転写レベルを判定するための前記手段が前記遺伝子の転写産物と結合することができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む、請求項 4 8～5 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 3】

前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが前記遺伝子に対応する mRNA または cDNA と結合することができる、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記転写レベルがノーザンブロット分析、逆転写酵素 PCR、リアルタイム PCR、RNA アーゼプロテクション、およびマイクロアレイの群から選択される技術により判定される、請求項 4 8～5 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 5】

患者の生体サンプルを得るための手段をさらに含む、請求項 4 8～5 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 6】

転写レベルを測定するための手段および患者の生体サンプルを収容するのに好適な容器をさらに含む、請求項 4 8～5 5 のいずれか一項に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 57】

キット結果の使用および解釈に関する説明書をさらに含む、請求項 48～56 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 58】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、

(a) 表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子のうち 2 以上の転写産物と結合することができるいくつかのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；

(b) 前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよび転写産物を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが前記転写産物と結合することができる容器；

(c) (b) の結合を検出するための手段；および所望により、

(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキット。

【請求項 59】

表 2 に示されている 13 のプレディクター遺伝子の発現パターンを判定するためのキットであって、

a) 必要な遺伝子チップを、その展開に必要な試薬とともに含む容器；および

b) 得られる遺伝子発現パターンの作成、読み取りおよび解釈に関する説明書を含むキット。

【請求項 60】

薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを推定するためのキットであって、

(a) IL-1 β 遺伝子の転写産物と結合することができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；

(b) 前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、および転写産物を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが前記転写産物と結合することができる容器；

(c) (b) の結合を検出するための手段；および所望により、

(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキット。

【請求項 61】

判定ステップ (a) が請求項 48～50、または 52～59 のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

判定ステップ (a) が請求項 51～57、または 60 のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 63】

患者の IL-1 β 遺伝子における多型パターンを同定するためのキットであって、配列 X04500 の 1423 番の IL-1 β 遺伝子における遺伝的多型パターンを判定するための手段を含むキット。

【請求項 64】

患者の IL-1 β 遺伝子における多型パターンを同定するためのキットであって、配列 X04500 の 1903 番の IL-1 β 遺伝子における遺伝的多型パターンを判定するための手段を含むキット。

【請求項 65】

患者の生体サンプルを得るための手段をさらに含む、請求項 63 または 64 に記載のキット。

【請求項 66】

前記手段が DNA サンプル回収手段をさらに含む、請求項 65 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 67】

特定の多型部位における遺伝的多型パターンを判定するための前記手段が少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む、請求項63～66のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 68】

特定の多型部位の1つにおける遺伝的多型パターンを判定するための前記手段が2種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む、請求項63～67のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 69】

特定の多型部位の1つにおける遺伝的多型パターンを判定するための前記手段が、少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む、少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングプライマー組成物を含む、請求項63～68のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 70】

前記遺伝子特異的ジェノタイピングプライマー組成物が少なくとも2セットの対立遺伝子特異的プライマー対を含む、請求項69に記載のキット。

【請求項 71】

前記2種の対立遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドが個別の容器にパッケージングされている、請求項70に記載のキット。

【請求項 72】

患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、IL-1 β 遺伝子の、転写開始部位から-511の位置（配列X04500の1423番）にあるヌクレオチド対の同一性を判定するためのキットであって、

a) 患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、IL-1 β 遺伝子の、転写開始部位から-511の位置（配列X04500の1423番）にあるヌクレオチド対の性質を検出するのに特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；および

b) 前記ヌクレオチド対の性質に基づきこれらの結果を解釈するための説明書を含むキット。

【請求項 73】

転写開始部位から-31塩基対上流の位置（配列X04500の1903番）にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定するためのキットであって、

a) 転写開始部位から-31塩基対上流の位置（配列X04500の1903番）にある多型部位におけるヌクレオチド対の性質を検出するのに特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；および

b) 前記ヌクレオチド対の性質に基づきこれらの結果を解釈するための説明書を含むキット。

【請求項 74】

判定ステップ(a)が請求項63、または65～72のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項10～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

判定ステップ(a)が請求項64～71、または73のいずれか一項に記載のキットの使用をさらに含む、請求項13～15のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、限定されるものではないが、チロシンキナーゼ阻害(TKI)薬をはじめとする薬物で処置された患者における浮腫の発生の見込みを予測する方法に関する。特に、本発明は、イマチニブ、特にそのメシル酸塩(GLEEVEC(商標)/GLIVEC(登録商標))；また、STI571としても知られる、Novartis Pharmaceuticals, East

10

20

30

40

50

Hanover, NJ, USA)をはじめとする薬物で処置された患者における副作用としての浮腫の発生を予測するための、数形態のゲノム分析の使用に関する。この種のゲノム分析としては、遺伝子発現プロファイリングおよび単一ヌクレオチド多型 (SNP) の検出が含まれる。

【背景技術】

【0002】

背景技術

浮腫は細胞外体液容積の管外または間質成分の増加として定義される。浮腫は様々な形態で現れ、例えば液体は腹腔または胸腔に蓄積することもあるし、あるいは、全身浮腫の場合のように全身性であることもある。浮腫の場所および分布はその病因論とメカニズムによって決定される。浮腫は多くの場合、顔面腫脹（眼窩周囲の領域に見られる場合が最も多い）により、また、圧力をかけた後の皮膚の陥凹の持続によって認識される。

【0003】

一般に、血漿容積および間質容積は体内の全水分量の三分の一を保持する「細胞外空間」を含む。この2成分の細胞外コンパートメント間の液体の配置を調節する力は「スターリング力」と呼ばれている。通常、血管系内の静水圧と間質液のコロイド浸透圧は血管から管外空間への液体の移動を促進する傾向がある。これに対し、血漿タンパク質により与えられるコロイド浸透圧と、組織張力と呼ばれる間質液内の静水圧は、血管コンパートメントへの液体の移動を促進する。これらの力の結果として、液体が絶えず交換され、溶質が拡散する。浮腫は毛細管の圧力および透過性の増殖など、これらの力の何らかの障害の結果起こり得る。

【0004】

本明細書で特に着目するのは、薬物の治療的投与の副作用として生じる種々の形態浮腫である。これらの薬物が患者に浮腫を作るメカニズムは全般的に知られてない。かろうじて目に付く眼窩周囲浮腫など、大部分の薬剤に対する応答において生じる浮腫は極めて軽いものであるが、薬物が肺浮腫や脳浮腫などの生命を脅かす形態の浮腫を生じることもある。

【0005】

イマチニブは数種の癌の発達に原因的な、または極めて重要な役割を果たすいくつかのタンパク質のチロシンキナーゼ活性の阻害剤であるが、いくつかのケースではその使用は浮腫の発症を引き起こすことがある。Druker et al., Nature Med., Vol. 2, pp. 561-566 (1996) 参照。

【0006】

白血病の背景

種々の形態の白血病が、類似の病理学を基礎に有する種々の関連疾患を含む。この基礎的病理学は正常な造血の脱調節である。このプロセスは厳格に調節された増殖と成熟末梢血細胞となる多能性造血幹細胞の分化を必要とする。全ての種の白血病で、悪性事象は造血の進行のどこかで起こり、種々のメカニズムにより正常に分化ができず、調節されない様式で増殖が続く後代が生じてしまう。白血病は急性型と慢性型、そして、影響を受ける細胞系統に応じて骨髓型とリンパ型に分けられる。

【0007】

慢性骨髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) は慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia)、慢性骨髓性白血病 (chronic myelocytic leukemia) または慢性顆粒球性白血病とも呼ばれる。CMLは、顆粒球、特に好中球系、特に単球系の過剰発現を特徴とし、著しい巨脾症をもたらす、白血球総数が極めて多くなる疾病である。好塩基球増加症および血小板増加症が一般的である。95%を超える症例で骨髓細胞に、特徴的な細胞遺伝学的異常であるフィラデルフィア (Ph⁺) 染色体が存在する。この変化した染色体の存在は、この種の白血病の分子的病因論を理解する鍵でもあり、患者の臨床的改善を評価するための主要な使用でもある。Sawyer, N. Engl. J. Med., Vol. 340, pp. 1330-1340 (1999) 参照。

10

20

30

40

50

【0008】

CMLの最も顕著な病理学的特徴は、典型的なCMLを有する90%を超える患者の骨髓細胞にPh⁺染色体が存在することである。Ph⁺染色体は、第9染色体と第22染色体の長腕材料のバランスのとれた転座によって生じる。第9染色体から得られるものより、第22染色体から失われる染色体材料のほうが多いので、Ph⁺染色体はその通常のDNA成分の約60%しか含まない短い第22染色体である。第9染色体の長腕のq34バンドに起こるこの破断は、細胞癌遺伝子C-ABLを、破断点クラスター領域(BCR)と呼ばれる第22染色体上の位置へ転座させる。このBCRにおける破断点は患者によって異なるが、一人の患者では全ての細胞で同じである。C-ABLは、マウスにおいて白血病を引き起こすアベルソンウイルスV-ABLのホモログである。これら2つの遺伝子配列の並置は、分子量210,000kd(P210)の新たなタンパク質をコードする新たなハイブリッド遺伝子(BCR/ABL)を生じる。このP210タンパク質、すなわちチロシンキナーゼはCML細胞の制御されない増殖の引き金をひく上で役割を果たし得る。Ph⁺染色体は赤血球、骨髓細胞、単球および巨核球で、また、あまり多くはないがBリンパ球で、まれにTリンパ球で生じるが、骨髓繊維芽細胞では生じない。

10

【0009】

これまでCMLの予後は、Ph陽性(Ph⁺)CMLの平均生存が3~4年と悪い。インターフェロンによる処置および過激な化学療法または同種異系骨髓移植これをいくらか改善してきたが、CML患者の処置における最大の改善はイマチニブの導入であった。Druker et al., N. Engl. J. Med., Vol. 344, pp. 1031-1037 (2001); およびDruker et al., N. Engl. J. Med., Vol. 344, pp. 1038-1056 (2001) 参照、また、Cecil Textbook of Medicine, 21st Edition, Goldman and Bennett, Eds., W. B. Saunders, Chapter 176 (2000) も参照。

20

【0010】

CMLでは、第9および第22染色体が末端切断され、CML細胞を特徴づける⁺(9;22)相互転座を形成し、誘導体22q-染色体、すなわちPh⁺染色体上のBCR-ABLと、染色体9q⁺上のABL-BCRの2つの融合遺伝子が形成される。BCR-ABL遺伝子はチロシンキナーゼ活性が脱調節された210kdタンパク質をコードする。このタンパク質がCMLにおいて病因的役割を果たす。Daley et al., Science, Vol. 247, pp. 824-830 (1990) 参照。イマチニブはこのタンパク質および他のチロシンキナーゼの活性を特異的に阻害する。イマチニブはCMLを有する患者の処置、およびPh⁺染色体を有するCMLまたはALL(急性リンパ芽球性白血病)の急性転化における患者の処置に著しい有効性を示している。Druker (2001), 前掲参照。

30

【0011】

さらに、イマチニブの、増殖因子受容体末端である別のチロシンキナーゼ、すなわちc-Kitを阻害する能力は、イマチニブを全く無関連の形態の癌、胃腸間質腫瘍の有効な処置とする。Brief Report, Joensuu et al., N. Engl. J. Med., Vol. 344, No. 14, pp. 1052-1056 (2001) 参照。

【0012】

イマチニブは制御されないチロシンキナーゼ活性を特徴とする種々の疾患を有する患者において極めて有効であることが示されている。これにはPh⁺白血病が含まれる。CMLに対するイマチニブの効果に関する1つの研究では、300mg以上で処置された54名の患者のうち、53名が完全な血液学的応答を示し、29名で細胞性応答が生じ(大きな応答、すなわち、分裂中期の0~35%の細胞がPh⁺染色体陽性を示す17名(この用量を受容した54名の患者の31%)を含む)、これらの患者のうち7名は完全な細胞遺伝学的緩解を示した。Druker et al. (2001), 前掲参照。

40

【0013】

イマチニブはBCR-ABLチロシンキナーゼの特異的阻害剤として開発され、CML患者の処置に極めて有効であることが実証されている。通常、十分許容されていることながら、浮腫はイマチニブ処置の最もよく受ける副作用の1つとして挙げられてきた。Kant

50

arjian et al. , N. Engl. J. Med. , Vol. 346, pp. 645-652 (2002) ; Druker et al. (2001) , 前掲 ; Cohen et al. , Clin. Cancer Res. , Vol. 8, pp. 935-942 (2002) ; and Ebnoether et al. , Lancet, Vol. 359, pp. 1751-1752 (2002) 参照。

【0014】

慢性期のCMLを有する患者の臨床試験の報告は、イマチニブ処置に付随する最も多い有害事象の1つとして浮腫／体液貯留を示しており、39～60%の患者（あらゆるグレード）に見られる。Kantarjian et al. (2002) , 前掲 ; Druker et al. (2001) , 前掲 ; およびCohen et al. (2002) , 前掲参照。これらの症例の大部分は軽度か中度のものであったが、主に表在的であり、例えば、眼窩周囲浮腫および下肢の末梢浮腫であった。しかし、1～2%の患者では、肺浮腫、胸腔および心臓周囲滲出をはじめとするより重篤な形態の体液貯留が見られた。Cohen et al. (2002) , 前掲参照。さらに、イマチニブで処置されたCML患者における2例の脳浮腫（一方は致命的）が最近報告されている。Ebnoether et al. (2002) , 前掲参照。

【0015】

報告されている浮腫症例の大部分は軽度から中度のものであり、主として眼窩周囲浮腫および下肢の末梢浮腫からなる。Cohen et al. (2002) , 前掲参照。上述のように、最近報告されたイマチニブで処置されたCML患者の2例の脳浮腫をはじめ、より重篤な形態の浮腫もまれに見られている。Ebnoether et al. (2002) , 前掲参照。このようにより重篤な浮腫症例の可能性があることから、TKIで処置する必要のある患者が開発される処置の副作用として浮腫を発症する見込みを予測する方法が極めて重要なものとなる。本発明の前には、この重要な薬物種のこの潜在的に重篤な副作用を推定する方法は存在しなかった。

【発明の概要】

【0016】

発明の概要

本発明は、限定されるものではないが、イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）をはじめとするTKI薬での処置に対する副作用として、投与された患者が浮腫を発症する見込みを予測することのできるいくつかの方法およびキットを提供することにより上述の問題を解決するものである。これらの方法およびキットは遺伝子発現プロファイリングおよびいくつかの遺伝子におけるSNPの分析に頼るものである。

【0017】

よって、本発明の一態様は、限定されるものではないが、TKI薬をはじめとする薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a) 表2に示されている13のリポーター／プレディクター遺伝子のうち複数に関して、生体サンプルにおけるRNA発現レベルを判定すること；b) 患者の遺伝子発現プロファイルと表3に示されている平均非浮腫発現プロファイルとを比較すること；c) (b)における比較から得られた2つの遺伝子発現プロファイル間の類似性を判定すること；およびd) (c)において判定された類似性の程度の手段により、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みを判定することを含む方法である。より好ましい実施形態では、本方法は、前記(c)において判定された類似性が前記2つの遺伝子発現プロファイルを比較することにより得られる数学的相関係数である上記方法の使用を伴う。本発明の最も好ましい実施形態では、(c)で判定される前記相関係数はピアソンの相関係数(PPC)である。

【0018】

他の好ましい実施形態では、本発明は、限定されるものではないが、TKI薬をはじめとする薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a) 表2に示されている13のリポーター／プレディクター遺伝子のうち複数に関して、生体サンプル中のRNA発現レベルを判定すること；b) 患者の遺伝子発現プロ

フィールと表3に示されている平均非浮腫発現プロフィールとを比較すること；c) (b)における比較から得られた2つの遺伝子発現プロフィールの間のピアソンの相関係数(PCC)を判定すること；d) PCCが0.37未満であれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症しないよりも発症する見込みが高いと判定すること；およびe) PCCが0.37以上であれば、患者が浮腫を発症するよりも発症しない見込みが高いと判定することを含む方法を提供する。

【0019】

もう1つの実施形態では、限定されるものではないが、TKI薬をはじめとする薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを、15%の浮腫症例だけしか浮腫を持たないとして誤分類されないような高感度で予測する必要がある場合、本発明は、a)表2に示されている13のリポーター／プレディクター遺伝子のうち複数に関して、生体サンプル中のRNA発現レベルを判定すること；b)患者の遺伝子発現プロフィールと表3に示されている平均非浮腫発現プロフィールとを比較すること；c) (b)における比較から得られた2つの遺伝子発現プロフィールの間のPCCを判定すること；d) PCCが負または0.78未満であれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症しないよりも発症する見込みが高いと判定すること；およびe) 負のPCCが0.78以上であれば、患者が浮腫を発症するよりも発症しない見込みが高いと判定することを含む方法を提供する。

【0020】

本発明の好ましい実施形態では、生体サンプルは血液または組織サンプルを含む。好適な血液または組織サンプルとしては、全血、血清、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検が挙げられる。

【0021】

他の実施形態によれば、本発明は13のリポーター／プレディクター遺伝子のうち7または8、より好ましくは9または10、最も好ましくは11または12のRNA発現レベルが判定される方法を提供する。本発明の他の実施形態は、表2の13のリポーター／プレディクター遺伝子全てのRNAレベルが判定される方法を提供する。

【0022】

もう1つの態様では、本発明は、限定されるものではないが、TKI薬をはじめとする薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a)患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、転写開始部位から-511塩基対上流の位置(配列X04500の1423番)にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定すること；およびb)この部位のヌクレオチド対の双方がGCであれば、患者が浮腫を発症する見込みがあると判定すること；およびc)この部位のヌクレオチド対の少なくとも一方対がATであれば、患者が浮腫を発症する見込みがないと判定することを含む方法を提供する。

【0023】

もう1つの態様では、本発明は、限定されるものではないが、TKI薬をはじめとする薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a)患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、転写開始部位から-31塩基対上流の位置(配列X04500の1903番)にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定すること；およびb)この部位のヌクレオチド対が双方ともATであれば、患者が浮腫を発症する見込みがあると判定し、この部位のヌクレオチド対の少なくとも一方がGCであれば、患者が浮腫を発症する見込みがないと判定することを含む方法を提供する。

【0024】

本発明の他の態様は、薬物で処置された際にどの女性患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a)生体サンプルにおいてIL-1 β 遺伝子の転写レベルおよび／またはIL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定すること；

およびb) そのレベルが閾値レベルを超えていれば、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがあると判定することを含む方法を提供する。

【0025】

さらに、本発明は、薬物がTKI イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）である上記方法を提供する。

【0026】

さらに、本発明は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法であって、a) 表2に示されている13のプレディクター遺伝子のタンパク質産物のうち2以上に関して、生体サンプルにおけるタンパク質発現パターンを判定すること；b) このタンパク質発現パターンと表3に示されている浮腫および非浮腫発現プロフィールに関して予想されるパターンとを比較すること；c) そのパターンが、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがない非浮腫パターンと類似性が高いかどうかを判定すること；およびd) そのパターンが、薬物で処置された際に患者が浮腫を発症する見込みがある浮腫パターンと類似性が高いかどうかを判定することを含む方法を提供する。この方法において、薬物は限定されるものではないが、イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）をはじめとするいずれのTKIであってもよい。

10

【0027】

本発明に従う方法の他の好ましい実施形態では、患者から採取した血液を含む。あるいは、転写レベルまたはタンパク質発現レベルは、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検をはじめ、患者から得られる血清または組織サンプルなどの他の生体サンプルで判定される。

20

【0028】

本発明の他の実施形態は、表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち複数のタンパク質発現が判定される方法を提供する。好ましくは、13のプレディクター遺伝子のうち7または8、より好ましくは9または10、最も好ましくは11または12のタンパク質発現が判定される。別の最も好ましい実施形態では、表2に示されている13のプレディクター遺伝子の全てのタンパク質発現が判定される方法が提供される。

【0029】

他の好ましい態様では、本発明は、薬物試験のために臨床試験を計画する方法であって、a) 上記の発現プロファイリング法またはジェノタイピング法のいずれかを用いることにより、試験薬に曝された際に特定の患者が浮腫を発症する見込みを判定すること；およびb) (a)における判定の結果に基づき、臨床試験においてその患者を適当な分類に割り付けることを含む方法を提供する。

30

【0030】

さらに、本発明は、患者を薬物で処置する方法であって、a) 上記の発現プロファイリング法またはジェノタイピング法のいずれかを用いることにより、意図した薬物に曝された際に特定の患者が浮腫を発症する見込みを判定すること；およびb) (a)における判定の結果に基づく安全かつ適当な方法で、その患者に対して意図した薬物療法を改良することを含む方法。

40

【0031】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明は、浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する、IL-1 β 遺伝子由来のアンチセンスヌクレオチド配列を含む単離核酸分子の治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法を提供する。

【0032】

他のいくつかの実施形態では、本発明は、浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、IL-1 β 遺伝子によりコードされるタンパク質を阻害／活性化するアンタゴニストの治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法を提供する。本方法の使用に際しては、このアンタゴニストは、限定されるものではないが、モノ

50

クローナル抗体および／または有毒試薬と共役されたモノクローナル抗体をはじめ、そのタンパク質の特異的ないずれの抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントであってもよい。

【0033】

他のいくつかの実施形態では、本発明は、浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、 $IL-1\beta$ 遺伝子の転写／翻訳を変化させる能力を有するリボザイムをコードするヌクレオチド配列の治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法を提供する。

【0034】

いくつかの好ましい実施形態では、浮腫を有する、または有するリスクのある被験者を処置する方法であって、 $IL-1\beta$ 遺伝子の転写／翻訳を変化させる能力を有する、 $IL-1\beta$ 遺伝子に対応する二本鎖RNAの治療上有効な量を被験者に投与することを含む方法を提供する。

【0035】

最も好ましい実施形態では、本発明は、 $IL-1\beta$ 遺伝子の転写／翻訳が低下される上記方法を提供する。他の最も好ましい実施形態では、この $IL-1\beta$ 遺伝子の転写／翻訳は増強される。

【0036】

本発明の別の態様は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち2以上に対応するタンパク質発現パターンを判定するための手段を含むキットを提供する。本発明の好ましい一実施形態によれば、この手段は表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち複数に対応するタンパク質発現パターンを判定することができる。好ましくは、13のプレディクター遺伝子のうち7または8、より好ましくは9または10、最も好ましくは11または12のタンパク質発現が判定される。別の最も好ましい実施形態では、その手段が表2に示されている13のプレディクター遺伝子の全てのタンパク質発現を判定することができるキットが提供される。

【0037】

本発明の別の態様は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、 $IL-1\beta$ 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定するための手段を含むキットを提供する。

【0038】

本発明の好ましい実施形態では、このタンパク質発現パターンを判定するための手段は抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントを含む。タンパク質発現を判定するための好適な手段としては、標識抗体を用いたウエスタンブロッティングが挙げられる。

【0039】

本発明の最も好ましい実施形態は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、(a) 表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち2以上に対応するタンパク質発現パターンを判定するための手段；(b) 前記手段、および前記タンパク質を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記手段が前記タンパク質と複合体を形成することができる容器；(c) (b)の複合体を検出するための手段；および所望により、(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

【0040】

他の実施形態では、本発明は、表2に示されている13のプレディクター遺伝子に関するタンパク質発現パターンを判定するためのキットであって、a) タンパク質発現パターンの判定に必要な全ての試薬を含む、または収容する容器；およびb) どのようにしてこの分析を実施および解釈するかを記載した表示を含むキットを提供する。

【0041】

本発明のもう1つの態様は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが

高いかを予測するためのキットであって、(a) IL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルを判定するための手段；(b) 前記手段、およびタンパク質を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記手段が前記タンパク質と複合体を形成することができる容器；(c) (b)の複合体を検出するための手段；および所望により、(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

【0042】

本発明の好ましい実施形態では、この IL-1 β 遺伝子により発現されるタンパク質のレベルは血液中または血清中で判定される。

【0043】

本発明のもう1つの態様は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち2以上の転写レベルを判定するための手段を含むキットを提供する。本発明の好ましい一実施形態によれば、この手段は13のプレディクター遺伝子のうち複数の転写レベルを判定することができる。好ましくは13のプレディクター遺伝子のうち7または8、より好ましくは9または10、最も好ましくは11または12の転写レベルが判定される。もう1つの最も好ましい実施形態では、その手段が表2に示されている13のプレディクター遺伝子の全てのレベルを判定することができるキットが提供される。

【0044】

本発明のもう1つの態様は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、IL-1 β 遺伝子の転写レベルを判定する手段を含むキットを提供する。

【0045】

本発明の好ましい実施形態では、転写レベルを判定するための前記手段は、上記のように前記遺伝子の転写産物と結合することができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、最も好ましくは、プレディクター遺伝子または IL-1 β 遺伝子に対応する mRNA または cDNA と結合することができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む。転写レベルを判定するための好適な手段としては、ノーザンブロット分析、逆転写酵素PCR、リアルタイムPCR、RNAアーゼプロテクション、およびマイクロアレイが挙げられる。

【0046】

本発明の別の好ましい実施形態では、上記のキットは患者の生体サンプルを得るための手段をさらに含む。好ましくは、患者から採取される生体サンプルは血液または組織サンプルを含む。好適な血液または組織サンプルとしては、全血、血清、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検が挙げられる。好ましい一実施形態では、キットは、タンパク質を検出するための手段または転写レベルを測定するための手段および患者の生体サンプルを収容するのに好適な容器をさらに含み、さらに所望によりキット結果の使用および解釈に関する説明書を含む。

【0047】

本発明のもう1つの最も好ましい実施形態は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、(a) 表2に示されている13のプレディクター遺伝子のうち2以上の転写産物と結合することができるいくつかのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；(b) 前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよび転写産物を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが前記転写産物と結合することができる容器；(c) (b)の結合を検出するための手段；および所望により、(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

【0048】

別の実施形態では、本発明は、表2に示されている13のプレディクター遺伝子の発現パターンを判定するためのキットであって、a) 必要な遺伝子チップを、その展開に必要

な試薬とともに含む容器；およびb) 得られる遺伝子発現パターンの作成、読み取りおよび解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

【0049】

本発明のもう1つの実施形態は、薬物で処置された際にどの患者が浮腫を発症する見込みが高いかを予測するためのキットであって、(a) IL-1 β 遺伝子の転写産物と結合することができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；(b) 前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、および転写産物を含む患者の生体サンプルを収容するのに好適であり、その中で前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが前記転写産物と結合することができる容器；(c) (b) の結合を検出するための手段；および所望により、(d) キット結果の使用および解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

10

【0050】

好ましくは、本発明の上記の態様実施形態に従う薬物は、限定されるものではないが、イマチニブまたはGLEEVEC (商標) / GLIVEC (登録商標) をはじめとするいずれのTKIであってもよい。

【0051】

さらに、本発明は、患者のIL-1 β 遺伝子における多型パターンを同定するためのキットを提供し、該キットは配列X04500の1423番および／または配列X04500の1903番のIL-1 β 遺伝子における遺伝的多型パターンを判定するための手段を含む。このキットはさらに全血、血清、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検などの血液または組織サンプルを得るための手段を含んでもよい。好ましくはこのような手段はDNAサンプル回収手段を含む。

20

【0052】

本発明の好ましい実施形態によれば、特定の多型部位における遺伝的多型パターンを判定するための手段は、少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む。最も好ましくは、このキットは2種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む。あるいは、このキットは4種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む。いっそうより好ましい実施形態では、このキットは、少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1種の遺伝子特異的ジェノタイピングプライマー組成物を含む。好ましくは、このような遺伝子特異的ジェノタイピングプライマー組成物は少なくとも2セットの対立遺伝子特異的プライマー対を含み、これらは所望により個別の容器にパッケージングされていてもよい。

30

【0053】

さらに、本発明は、患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、IL-1 β 遺伝子の、転写開始部位から-511の位置(配列X04500の1423番)にあるクレオチド対の同一性を判定するためのキットであって、a) 患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、IL-1 β 遺伝子の、転写開始部位から-511の位置(配列X04500の1423番)にあるヌクレオチド対の性質を検出するのに特異的な少なくとも1種の試薬を含む、または収容する容器；およびb) 前記ヌクレオチド対の性質に基づきこれらの結果を解釈するための説明書を含むキットを提供する。

40

【0054】

さらに、本発明は、転写開始部位から-31塩基対上流の位置(配列X04500の1903番)にある多型部位におけるクレオチド対の同一性を判定するためのキットであって、a) 転写開始部位から-31塩基対上流の位置(配列X04500の1903番)にある多型部位におけるクレオチド対の性質を検出するのに特異的な少なくとも1種の試薬を含む、または収容する容器；およびb) 前記ヌクレオチド対の性質に基づきこれらの結果を解釈するための説明書を含むキットを提供する。

【0055】

さらに、本発明の他の実施形態は、上記のキットのいずれか1つが、限定されるもので

50

はないが、イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）をはじめとするTKIなどの薬物で処置された際にどの患者が（どの女性患者が、を含む）浮腫を発症する見込みが高いかを予測する方法をはじめとして本明細書により提供される方法の判定ステップ（a）で用いられることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】88サンプルの「プレディクター」セットについて、浮腫を予測するために使用される13の遺伝子のクラスター分析。影付けの程度は発現の相対レベルを表し、最も濃い影は低い発現を示し、中間的な影は高い発現を示す。サンプルは遺伝子発現の、平均非浮腫発現プロファイルとの相関に従って並べられており、遺伝子のクラスタリングはGENESPRING（登録商標）のピアソン類似法を用いて行った。各サンプルのPCCを中央のパネルに、最も高い相関を一番上にしてプロットした。右のパネルは実際の浮腫の状態を表し、塗りつぶし（ダーク）は浮腫を示し、白は浮腫を持たない患者を示す。ラインは最適精度の閾値（0.37；実線）および最適感度（0.78；破線）を示す。

10

【図2】浮腫プレディクター遺伝子をバリデートするために使用される17サンプルの「テスト」セットのクラスター分析。影付けの程度は発現の相対レベルを表し、最も濃い影は低い発現を示し、中間的な影は高い発現を示す。サンプルは遺伝子発現の、平均非浮腫発現プロファイルとの相関（88サンプルの「プレディクター」セットに関して計算）に従って並べられており、遺伝子のクラスタリングはGENESPRING（登録総評）のピアソン類似法を用いて行った。各サンプルのPCCを中央のパネルに、最も高い相関を一番上にしてプロットした。右のパネルは実際の浮腫の状態を表し、塗りつぶし（ダーク）は浮腫を示し、白は浮腫を持たない患者を示す。波線は、88サンプルの「プレディクター」セットを用いて判定した際の最適感度の閾値（0.78）を示す。

20

【図3】IL-1β遺伝子型と浮腫および血管浮腫との関連。CC遺伝子型は、多型部位-511（配列X04500遺伝子の1423番）におけるIL-1β遺伝子の両コピー上にGC塩基対が存在することを示す。非CC遺伝子型は、IL-1β遺伝子の多型部位-511（配列X04500遺伝子の1423番）におけるコピーの一方または双方にAT塩基対が存在することを示し、すなわち、これは転写開始部位から-511塩基対上流にあるC→T塩基転移を示す。

30

【図4】-511 IL-1β多型と性別により階層化される浮腫との関連。

【発明を実施するための形態】

【0057】

発明の開示

本発明は、限定されるものではないが、数種のタンパク質のチロシンキナーゼ活性の阻害剤、すなわち、チロシンキナーゼ阻害（TKI）薬である薬物をはじめとする薬物で処置された患者における浮腫の副作用の発生の見込みを予測するいくつかの異なる方法を提供し、この薬物としては限定されるものではないが、イマチニブ、メシル酸イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）（STI571, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, USAとしても知られる）が挙げられる。

【0058】

40

一実施形態では、TKIなどの薬物で処置する必要のある患者は、表2に示されている13の遺伝子のうち複数を含むRNA発現プロファイルの判定のために採血されている。あるいは、このRNA発現レベルは、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検をはじめとする他の組織サンプルで判定してもよい。一実施形態では、この遺伝子群に関して測定されたRNA発現レベルを、表3に示されているような同じ13のプレディクター遺伝子に関する平均浮腫発現レベルまたは平均非浮腫発現レベルと比較し、その類似性の程度を判定する。

【0059】

好ましい一実施形態では、13のプレディクター遺伝子のこの群に関して測定された患

50

者のRNA発現レベルを、表3に示されているような同じ遺伝子に関する平均非浮腫発現レベルと比較し、その類似性の程度を判定する。

【0060】

この類似性の程度は、その値が2つの数値群、すなわち、13のプレディクター遺伝子のうち複数に関して患者の血液から測定されたmRNA発現値と、表3に示されている平均非浮腫発現値または平均浮腫発現値の間の類似性の既知の関数となるようなある結果をもたらす任意の数学的手法により判定することができる。

【0061】

好ましい一実施形態では、限定されるものではないが、この類似性の程度は患者で測定されたRNA発現レベルと、表3に示されている、13の遺伝子のうち複数の平均非浮腫RNA発現レベルとの間のピアソンの相関係数（PCC）をはじめとする数学的相関係数を求めることにより判定される。

【0062】

最も好ましい一実施形態では、この相関係数はピアソンの相関係数（PCC）であり、13のプレディクター遺伝子の全てを用いて最も精度の高い比較が行われる。次に、このようにして求められたPCCの値、または他のいずれかの相関係数もしくは類似性指数を用い、限定されるものではないが、イマチニブまたはメシル酸イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）をはじめとするTKI薬をはじめとする浮腫を作る薬物で患者を処置した場合に浮腫の発生する見込みを予測することができる。

【0063】

好ましい一実施形態では、次に、患者で測定されたRNA発現プロフィールと平均浮腫または平均非浮腫発現プロフィール（表3から）との間の類似性の程度を用いて、TKI薬で処置した場合にその患者は浮腫を発症する見込みがあるかないかを予測することができる。例えば、これを簡単に説明するため、表2に示されている13の遺伝子の全てまたは大部分に関して、患者で測定されたRNA発現プロフィールが、浮腫を発症しなかった被験者の平均発現プロフィール（平均非浮腫発現プロフィール）と類似性が高ければ、TKI薬で処置された際にこの患者が浮腫を発症する見込みは小さい。表3に示されている13の遺伝子の全てまたは大部分に関して患者で測定されたRNA発現プロフィールがTKI薬で処置された際にいずれかの種類の浮腫を発症した被験者の平均発現プロフィール（平均浮腫発現プロフィール）と類似性が高ければ、TKIなどの薬物で処置された際にその患者が浮腫を発症する見込みが高い。

【0064】

好ましい一実施形態では、類似性の程度は、表2の13の遺伝子に関して測定された患者の遺伝子発現プロフィールと非浮腫患者からの平均発現プロフィール（表3）との間のPCCの算出により求められる。

【0065】

PCCの値は、その患者が、比較対象となる表3の発現プロフィールと同じ浮腫の副作用を患うか、または非浮腫かの確率に直接関連する。つまり、患者のPCCが平均非浮腫発現プロフィールに比べて高いほど患者がTKI薬に応答して浮腫を発症しない見込みが高くなる。他方、患者のPCCが平均浮腫発現プロフィールに比べて高いほど、TKIなどの薬物で処置された際に患者誘導体が浮腫を発症する見込みが高くなる。

【0066】

このように、ある場合に、PCCの値を用いれば、その結果の、つまり患者が、限定されるものではないが、イマチニブまたはGLEEVEC（商標）／GLIVEC（登録商標）をはじめとするTKIなどの薬物で処置された場合に浮腫を発症するか否かの確率を求めることができる。当業者ならば、各患者の臨床状態がカットオフとして用いる、または特定の患者に関して臨床的判断を下す助けとするPCCを指し示すことが分かるであろう。例えば、一実施形態では、浮腫を発症する、または発症しない患者群の数を最適精度で判定することが望まれる。これは偽陽性（浮腫として誤分類される非浮腫）を最少にすることと同時に偽陰性（非浮腫として誤分類される浮腫）を最少にするという双方を意味

10

20

30

40

50

する。

【0067】

この精度はPCCを0.37に設定することによって得られる。この閾値を用いるには、平均非浮腫発現プロフィールと比べた場合の遺伝子発現プロフィールが0.37以上のPCCとなる患者を非浮腫群として分類し、一方、発現プロフィールが0.37未満となった患者を浮腫群として分類する。

【0068】

さらに好ましい一実施形態では、このPCCは任意の感度をもたらしように、すなわち、偽陰性（非浮腫として誤分類される浮腫）の数をできる限り最少とするように設定することができる。このような最適感度設定は、浮腫の発生が患者にとって重篤または生命を脅かすような事象となる状態において指示されよう。この実施形態では、PCCを0.78に設定することにより閾値が決定される。この場合、患者は、発現プロフィールが0.78未満のPCCで、平均非浮腫プロフィールと負の相関がある場合、浮腫を発症する見込みが7.20倍（95%信頼区間（CI）：2.42－21.44）である。この例に示されるように、当業者ならば、感度を最大にするか、または特異性を最大にするか、またはいずれかの所望の比率の偽陽性または偽陰性をもたらし、類似性の程度または限定されるものではないがPCCをはじめとする相関係数を選択することができる。当業者ならば、患者に対して最大の利益と安全性を与えるため、その臨床状態に対するPCCの選択を容易に調節することができる。

【0069】

もう1つの実施形態では、本発明は、TKIなどの薬物で処置された際にどの患者が浮腫を被る見込みがあるかを予測する他の方法を提供する。これらの方法は患者の血液を採取し、IL-1 β 遺伝子におけるある特定の多型の有無を判定することを伴う。あるいは、患者から他の組織サンプルを得、それを用いてIL-1 β 遺伝子多型の有無を判定してもよい。このような組織サンプルとしては、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検が挙げられる。

【0070】

具体的には、IL-1 β 遺伝子の-511多型に関してCC遺伝子型を有する女性患者は、非CC遺伝子型を有する女性よりも、TKI薬で処置された際に浮腫を被る見込みが13.0倍高い（95%CI：2.07－81.48）。この多型は男性患者では予測値とはならない。

【0071】

従って、TKIなどの薬物を受容しようとしている女性患者から採血し、患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、IL-1 β 遺伝子の多型部位-511C→T（配列X04500の1423番）におけるヌクレオチド対の同一性を判定する。両ヌクレオチドともGCであることが分かれば、その女性はTKI薬で処置された際に浮腫を発症すると予測される。両対がATであるか、または一方がATであっても一方がGCであれば、TKI処置は浮腫の副作用を生じない。

【0072】

本発明のもう1つの実施形態では、TKIなどの薬物を受容しようとしている女性患者から採血し、患者に存在する2コピーのIL-1 β 遺伝子に関して、転写開始部位から-31塩基対上流（配列X04500の1903番）にある多型部位におけるヌクレオチド対の同一性を判定し、この部位の両ヌクレオチド対がATであれば、その患者は薬物処置で浮腫を発症する見込みがあると判定し、また、この部位の少なくとも一方のヌクレオチド対がGCであれば、その患者は薬物処置で浮腫を発症する見込みがないと判定する。

【0073】

なおさらなる一実施形態では、本発明は、患者のIL-1 β 遺伝子において着目する多型部位（-511部位および-31部位の双方）におけるヌクレオチド対を判定するためのキットであって、a) IL-1 β 遺伝子の多型部位におけるヌクレオチド対の性質を検出

するのに特異的な少なくとも1種の試薬を含む、または収容する容器；およびb) 前記ヌクレオチド対の性質に基づきこれらの結果を解釈するための説明書を含むキットを提供する。

【0074】

さらなる一実施形態では、本発明は、表2に示されている13のプレディクター遺伝子の発現パターンを判定するためのキットであって、a) 必要な遺伝子チップを、その展開に必要な試薬とともに含む容器；およびb) 得られる遺伝子発現パターンの作成、読み取りおよび解釈に関する説明書を含むキットを提供する。

【実施例】

【0075】

実施例1

方法

RNA発現プロフィール相関法

臨床サンプルは、多国籍第3相臨床試験（インターフェロン-αとイマチニブに関するIRIS: International Randomized Study）に登録し、新たに慢性期Ph⁺ CML（CML-CP）と診断された患者から得た。RNA抽出用の血液を米国の複数のセンターから200名を超える患者から採取した。これらの患者は各々、地域倫理委員会が承認した薬理遺伝学インフォームド・コンセントフォームの書面にサインをしている。イマチニブ処置アームに対して無作為化した患者から、薬物処置前のベースラインとして全部で115サンプルを採取した。これらのうち10サンプルは、患者が初期に試験から離脱したため、または処理されたRNAの量が非常に少なかったために分析から除外した。残りの105サンプルのうち88サンプルを、患者がイマチニブ処置後に浮腫を発症するかどうかを予測できる遺伝子を同定するための「プレディクター」セットとして用い、17サンプルを、プレディクター遺伝子をバリデートするための「テスト」セットとして用いた。

【0076】

有害事象に関する臨床データ最低6ヶ月イマチニブ処置後に評価した。国際医学用語集（the Medical Dictionary for Regulatory Activities Terminology, MedDRA）の高位語（High Level Term, HLT）を用いて分類した場合に少なくとも1種の浮腫の発生（グレードを問わない）があった場合に浮腫を有するものと識別した。この薬理ゲノミクス研究で評価した患者のうち、43%（105名のうち、45名）が、イマチニブで処置した後に少なくとも1種の浮腫症例があったと分類され（浮腫群）、これらの場合の大部分は眼窩周囲浮腫（31%）と末梢浮腫（19%）であった。グレード3の眼窩周囲浮腫が1件あったことを除き（これは試験投薬によるものではなかった）、この研究で評価された患者の浮腫症例は全て軽度から中度であった。浮腫症例の分類は次の通りであった：88サンプルの「プレディクター」セットは37が浮腫、51が非浮腫であり；17サンプルの「テスト」セットは8が浮腫、9が非浮腫であった。

【0077】

RNA発現プロファイリング

RNA発現データは、12,000を超える既知のヒト遺伝子と発現配列タグ（EST）を表す高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイ（HG U95Av2, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA）を用いて各血液サンプルから作成した。サンプル調製およびマイクロアレイのプロセッシングはAffymetrix（Santa Clara, CA, USA）のプロトコルを用いて行った。要するに、TRI試薬（商標）BD（Sigma, St. Louis, MO, USA）を用いて冷凍全血から全RNAを抽出した後、RNeasy Mini Spin Columns（Qiagen, Valencia, CA, USA）で精製した。5~8 μgの精製全RNAから出発し、Superscript Choice System（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を用い、全長mRNAから二本鎖cDNAを合成した。次に、このcDNAを、BIOARRAY（登録商標）High Yield RNA Transcript Labeling Kit（ENZO Diagnostics, Farmingdale, NY, USA）を用いてin vivoで転写し、ビオチン標識cRNAを生成した。このcRNAを断片化し、45℃で16時間マイクロアレイとハイブリダイズさせた。

【0078】

アレイを洗浄し、標準Affymetrixプロトコルに従い、Affymetrix流体ステーションを用いて染色した。Affymetrix GENEARRAY（登録商標）スキャナーを用いてアレイをスキャンし、Affymetrix GENECHIP（登録商標）Laboratory Information Management System（LIMS）によりデータ（.DATファイル）をキャプチャーした。このLIMSデータベースを、全てのプローブセル（.CELファイル）平均強度がインターナル側オラクルデータベースにダウンロードできるネットワークファイリングシステムを介してインターナル側ユニックスSun Solarisサーバーに接続した。各マイクロアレイの蛍光強度を、150の値に対してグローバルスケールリングによりノーマライズし、複数のアレイ間での直接比較を可能にした。

10

【0079】

各アレイの品質は、バックグラウンド、遺伝子存在のパーセンテージ、スケールリング倍率、「ハウスキーピング」遺伝子 β -アクチンとGAPDHの3' / 5'比などの因子を数値化することにより評価した。この研究で分析したサンプルに関するこれら品質管理パラメーターは広範囲であり、多くのサンプルが最適品質には満たないものと考えられた。例えば、105サンプルの遺伝子存在の平均パーセンテージは5～38%の範囲にわたり、平均値はわずか14%であった。これは他の臨床試験に登録された非CML患者から得られた全血から得られたものの約半分である。この矛盾はおそらくサンプルの採取と取り扱いに伴う問題、特に本研究の血液サンプルはRNA安定化因子を含まないEDTA管に採取されたことによるものであると思われるが、白血病患者からの血液における、全体としての遺伝子発現の基本的な違いを反映しているのかもしれない。本実施例の目的では、浮腫と非浮腫群の間、または「プレディクター」と「テスト」セットの間のサンプル品質に統計学的に有意な違いはなかったことに着目することが重要である（データは示されていない）。

20

【0080】

データ分析

88サンプルの「プレディクター」セットで出発し、マイクロアレイデータをGENESPRING（登録商標）バージョン4.1.5ソフトウェア（Silicon Genetics, San Carlos, CA, USA）に送り込んだ。生の発現値を、少なくとも10%のサンプル（88のうち9）がバックグラウンドよりも100以上高い平均強度値を持つようにフィルタリングした。浮腫群と非浮腫群とを最もよく識別した遺伝子のリストを特定するため、GENESPRING（登録商標）エクセルおよびSASバージョン8.2（The SAS Institute, Cary, NC, USA）を用いてさらなるフィルタリングステップを行った。88全ての遺伝子がノンパラメトリック一元配置ANOVAにより、 $p < 0.05$ で2群間の差が少なくとも1.7倍という基準を満たした。最後に、これらの遺伝子のうち4つのものは発現レベルおよび性別の間の関連を見出した後に排除した（非浮腫群のみに対し、男性対女性のANOVAを用いた）。これは本研究の患者について浮腫の発症と性別との間に有意な関連があったという発明者らの知見に対応して行ったものであり、イマチニブ処置後、女性は男性に比べ約3倍浮腫を発症する見込みが高かった（ $p = 0.022$ 、フィッシャーの正確確率検定）。

30

40

【0081】

この84の可能性のあるプレディクター遺伝子のリストから、「リーブワンアウト（leave-one-out）」法を用いて、最終予後セットとして用いるための最適遺伝子数を求めた。van 't Veer, et al., Nature, Vol. 415, pp. 530-536（2002）参照。遺伝子は発現値と予後カテゴリー（0＝非浮腫；1＝浮腫）との相関（PCCの絶対値）により順に並べた。5つの最も相関の高い遺伝子で出発し、1サンプルを分析から除外し、残り87のサンプルから各群（浮腫および非浮腫）の平均遺伝子発現プロファイルを算出した。除外したサンプルの予測結果は、除外したサンプルの発現プロファイルのPCCと、87のサンプルを用いて算出した平均浮腫および非浮腫プロファイルとを比較することにより判定した。この分析を残りのサンプルを用い、88全てのサンプルが除外されるまで繰

50

り返した。正確な予測と誤った予測の例の数を、偽陰性（非浮腫として誤分類される浮腫）と偽陽性（浮腫として誤分類される非浮腫）の数を算出することにより求めた。リストの上のものからさらなるプレディクター遺伝子を加えた後、84全ての遺伝子が用いられるまで、この「リーブワンアウト」法全体を繰り返した。最少の偽陰性および偽陽性をもたらす遺伝子数を最適なプレディクター遺伝子セットとして選択した（ $n = 13$ ）。

【0082】

次のステップは、この最適化された遺伝子セットを用い、浮腫または非浮腫の正確な予測に用いるための適当な閾値を算出することであった。経験的に、双方からの結果を比較した後に、個々のサンプルを浮腫プロファイルに対立するものとしての非浮腫プロファイルと比較することにした。PCCを用い、88サンプルの各々に関してプレディクター遺伝子の発現パターンを平均非浮腫プロファイル（88名の患者のうち非浮腫患者51名全てを用いて算出した）と相関させた。患者サンプルを最高から最低まで相関によりランク付けし、その閾値相関が引き出された関数として誤り率を求めた。「最適精度」の閾値は偽陽性と偽陰性双方が最少となった点において求めた。しかし、偽陰性（非浮腫として誤分類される浮腫患者）の数を最少とするために、15%（37のうち5）の浮腫症例だけしか誤分類されないような「最適感度」において第2の閾値を求めた。これらの閾値を利用し、p値カットオフを0.05としたフィッシャーの正確確率検定によって求めた統計学的有意性でSASを用いてオッズ比（OR）を算出した。

【0083】

最終のステップは、17の患者サンプルの「テスト」セットを用いて浮腫状態を予測するために選択されたプレディクター遺伝子の有効性をバリデートすることであった。88サンプルの「プレディクター」セットからの平均非浮腫発現プロファイルに対してこれら17サンプルの各々についてプレディクター遺伝子のPCCを算出し、「最適感度」における閾値を浮腫予測のカットオフとして選択した。よって、17のテストサンプルの1つについて算出したものが閾値以上であった場合は、その患者は浮腫無しとして分類され、相関が閾値未満であった場合は、その患者は浮腫有りと予測された。SASを用いて浮腫ありおよび浮腫無しと正しく予測された患者および誤って予測された患者の数に基づき、ORおよびフィッシャーの正確確率検定を行った。

【0084】

結果

浮腫状態を予測するのに用いる13の遺伝子の選択は方法の節に記載されているように88サンプル（浮腫37、非浮腫51）の「プレディクター」セットを用いて行った。表2はこれらの遺伝子のリストを、それらのAffymetrixプローブセット名称、GenBank受託番号、染色体上の位置、機能に関する簡単な説明、ならびに浮腫および非浮腫サンプル間で何倍の差があるかを添えて示している。これら13の遺伝子のうち、3つはシグナル伝達に関するものであり（PTPN12、P2Y10およびARHGDI B）、2つは細胞周期レギュレーターであり（CDKN1BおよびCUL1）、2つは免疫応答に関するものであり（FCER1GおよびMCP）、2つはRNAプロセッシングに関するものであり（SFRS2IPおよびSTAU）、1つは転写因子であり（HIVEP2）、1つは代謝に関するものであり（PGC）、2つは現在のところ機能が未知のものである（CL24711およびFLJ00036）。これら遺伝子のほとんどのものの発現は浮腫群では非浮腫に比べて有意に高いが、2つの遺伝子（PGC、P2Y10）は浮腫集団で発現が低い。

【0085】

方法の節で述べられているように、閾値の値は、まず、平均非浮腫発現プロファイルとの相関に従ってプレディクターセット内でサンプルを順に並べることにより求めた。図1はこれら13の遺伝子のクラスター分析の結果を、PCCにより、非浮腫プロファイルと最高の相関を有するサンプルが一番上に来、非浮腫状態との相関が最少のものが一番下に来るようにサンプルを並べて示している。最初の出発点として、偽陽性（浮腫として誤分類される非浮腫）および偽陰性（非浮腫として誤分類される浮腫）の双方の数が最少とな

10

20

30

40

50

る最適精度点で閾値を求めた。これは P C C 値 0.37 で見られた (図 1、実線)。この閾値を用いると、P C C が 0.37 以上 (平均非浮腫発現プロファイルを用いた P C C に基づく) の個体は非浮腫群に分類され、一方、P C C が 0.37 未満の個体は浮腫群に分類される。表 4 に示されているように観測頻度を決定し、O R を算出した。この場合の O R は、発現プロファイルが平均非浮腫プロファイルと負の相関があれば (P C C < 0.37)、患者の浮腫を発症する見込みは 6.8 倍 (95% C I : 2.6 - 17.4) 高かったことを示している。観測値と期待値の間の差は、p 値 6.25×10^{-5} としたフィッシャーの正確確率検定によれば有意性が高かった (表 4)。

【0086】

これらの所見が統計学的に有意であれば、浮腫患者の 32% (37 名のうち 12 名) が実際には非浮腫 (偽陰性) として分類されたことに着目することが重要である。まれにはあるが、浮腫は生命を脅かす有害事象である可能性もあることから、この場合、それらの患者が浮腫の発症の適切な監視や浮腫の発症を防ぐ助けとなる処置を受けられるように、偽陰性の数を最少にすることが臨床上最も適切であろう。これが P C C 0.78 で第 2 の閾値を選択することの根拠であった。この値を、浮腫症例の 15% (37 名のうち 5 名) だけしか誤分類されないような感度になるよう最適化した。この基準を用いた度数分析の結果は表 4 に示されている。ここでも、観測値と期待値の間の差は、p 値 1.37×10^{-4} で、統計学的に有意性が高かった。この場合の O R は、発現プロファイルが平均非浮腫プロファイルと負の相関があれば (P C C < 0.78)、患者の浮腫を発症する見込みは 7.2 倍 (95% C I : 2.4 - 21.4) 高かったことを示している。

【0087】

浮腫状態を予測するための 13 のプレディクター遺伝子の有効性のバリデーションを、プレディクター遺伝子を決定するための分析に含めなかった患者の 17 サンプルの「テスト」セットを用いて行った。これらの患者 (8 名が浮腫、9 名が非浮腫) は患者の「プレディクター」セットと同じ臨床試験からのものであった。プレディクターセットとテストセットの間で、実験パラメーターには有意な差はなかった (データは示されていない)。13 のプレディクター遺伝子を用いたテストセットのクラスター分析の結果は図 2 に示されている。最適感度閾値として 0.78 を用いると、8 名の浮腫患者全員、ならびに 9 名の非浮腫患者のうち 7 名が正確に分類でき、全体の精度が 88% となった。表 4 において度数分析で示されているように、これらの結果は p 値 0.0023 で統計学的に有意である (フィッシャーの正確確率検定)。しかし、O R 51.0 というのはおそらくサンプルサイズが小さかったことにより膨らんだものである。

【0088】

この薬理ゲノム分析の目的は、イマチニブ誘発性浮腫に対する感受性を予測するために使用でき、また、おそらくは浮腫の病態生理学に何らかの知見を与え得るゲノムマーカーを同定することであった。イマチニブ処置アームに関して無作為化した患者からの全部で 105 のベースライン血液サンプルをこれらの分析に用いた。これらのサンプルのうち、88 名の患者のサブセット (37 名が浮腫、51 名が非浮腫) をプレディクター遺伝子のリストを決定するため「プレディクター」セットとして用い、残りの 17 名の患者 (8 名が浮腫、9 名が非浮腫) をこれらのプレディクター遺伝子をバリデートするため「テスト」セットとして用いた。

【0089】

van 't Veer et al. (2002) 前掲によって記載されている分析戦略を用いると、浮腫を予測するために最適な 13 の遺伝子からなるセットが定義でき、偽陰性の数を最少とするための閾値 P C C の値 0.78 が選択された。サンプルのプレディクターセットに関しては、これにより浮腫患者の同定について 86% の成功率 (37 のうち 32) が得られ、O R 7.2、p = 1.37×10^{-4} であった (表 4)。この結果を 17 名の患者からなるテストセットでバリデートしたところ、8 名の浮腫患者全員が正しく同定され、全体の予測精度は 88% となった。また、これらの結果は、p 値 0.0023 で統計学的に有意であったが、有意にもかかわらずに O R が 51.0 というのは、サンプルサイズが小さか

10

20

30

40

50

ったことにより膨らんだものと思われる。これらの予備的な所見をさらに実質的にバリデートするためには、十分な統計力を与えるのに十分な患者サンプルを用いて、少なくとも1回の独立した臨床試験でこれらの結果の適用を行わなければならない。

【0090】

表2に示されているように、これら13のプレディクター遺伝子には幅広い機能が存在する。これらの遺伝子のうち2つは現在のところ機能が未知のものであり（CL24711およびFLJ00036）、残りの11の遺伝子は、細胞周期の調節（CDKN1BおよびCUL1）、シグナル伝達（PTPN12、P2Y10およびARHGDI B）、RNAプロセッシング（SFRS2IPおよびSTAU）、免疫応答（MCPおよびFCER1G）、転写物因子（HIVEP2）および代謝（PGC）を含む機能を有する。これらの遺伝子の示差的発現はイマチニブ誘発性浮腫に関して予測性がある。

10

【表1】

表1 イマチニブで処置された105名の患者における浮腫の発症

浮腫の分類	数 (%)
HLT: 血管浮腫	35 (33. 3)
PT: 眼窩周囲浮腫	33 (31. 4)
PT: 顔面浮腫	3 (2. 9)
HLT: 浮腫NEC	24 (22. 9)
PT: 末梢浮腫	20 (19. 0)
PT: 浮腫NOS	3 (2. 9)
PT: 圧痕浮腫	1 (1. 0)
HLT: 肺浮腫	1 (1. 0)
PT: 肺の鬱血	1 (1. 0)
全浮腫	45 (42. 9)

20

HLT = MedDRA高位語

PT = MedDRA基本語

NEC = 分類不能

NOS = 特定不能

30

【表 2】

表 2 イマチニブで処置した後の浮腫発症予測に用いる遺伝子

Affymetrixプロ ーブセット	GenBank 受託番号	遺伝子名	遺伝子座	説明	機能	倍率	
34866_at	AF055029	CL24711	2q21. 2	ホモ・サピエンスクローン2471 1 mRNA配列	未知	↑ 2. 4	
36175_s_at	AL023584	HIVEP2	6q23-q24	ヒト免疫不全ウイルスI型エン ハンサー結合タンパク質2	転写因子	↑ 2. 9	
35258_f_at	AF030234	SFRS2IP	12q13. 11	スプライシング因子、アルギニ ン/セリンリッチ2、相互作用タ ンパク質	RNAプロセシン グ	↑ 2. 3	10
33848_r_at	AI304854	CDKN1B	12p13. 1-	サイクリン依存性キナーゼ阻害 剤1B (p27, Kip1)	細胞周期レギュ レーター	↑ 2. 0	
1463_at	M93425	PTPN12	7q11. 23	タンパク質チロシンホスファタ ーゼ、非受容体12型	シグナル伝達	↑ 2. 0	
39724_s_at	U58087	CUL1	7q36. 1	Cullin 1	細胞周期レギュ レーター	↑ 2. 0	
41823_at	AJ132258	STAU	20q13. 1	Staufen (ショウジョウバエ、R NA結合タンパク質)	RNAプロセシン グ	↑ 2. 3	20
36732_at	AI004207	SIMRP7	6p21. 31	多剤耐性関連タンパク質7	未知	↑ 3. 0	
358_at	AF000545	P2Y10	Xq21. 1	推定プリン受容体	シグナル伝達	↓ 1. 7	
38441_s_at	X59408	MCP	1q32	膜補因子タンパク質 (CD46, 栄養芽細胞-リンパ球交差反応 性抗原)	免疫応答	↑ 1. 9	
36889_at	M33195	FCER1G	1q23	IgEのFcフラグメント、高親和性 I、受容体に対する;γポリペプチ ド	免疫応答	↑ 2. 4	
33699_at	M18667	PGC	6p21. 3-p 21. 1	プロガストリシン (ペプシノー ゲンC)	代謝	↓ 2. 5	30
1984_s_at	X69549	ARHGDIB	12p12. 3	Rho GDP解離阻害剤 (GDI) β	シグナル伝達	↑ 2. 4	

注：遺伝子は 88 の患者サンプル（37 が浮腫、51 が非浮腫）の「プレディクター」セ
ットを用いた 84 の可能性ある候補遺伝子の「リーフワンアウト」分析から判定した。遺
伝子は浮腫の状態との絶対相関により最高から最低へ順に並べた。

倍率 = 差の倍率（浮腫対非浮腫群）

【表 3】

表 3 1 3 のプレディクター遺伝子に関する平均非浮腫および浮腫発現プロフィール

Affymetrix						
プローブセ GenBank						
ット	受託番号	遺伝子名	説明	非浮腫	浮腫	
34866_at	AF055029	CL24711	ホモ・サピエンスクローン24711 mRNA配列	56. 1	134. 4	
36175_s_at	AL023584	HIVEP2	免疫不全ウイルスI型エンハンサー-結合タンパク質2	48. 5	139. 9	
35258_f_at	AF030234	SFRS2IP	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッ	53. 4	124. 6	10
33848_r_at	AI304854	CDKN1B	サイクリン依存性キナーゼ 阻害剤1B (p27, Kip1)	48. 4	98. 4	
1463_at	M93425	PTPN12	タンパク質チロシンホスファターゼ, 非受容	156. 0	306. 2	
39724_s_at	U58087	CUL1	Cullin 1	67. 2	133. 4	
41823_at	AJ132258	STAU	Staufen (ショウジョウバエ, RNA結合タンパク質)	40. 4	91. 1	
36732_at	AI004207	SIMRP7	多剤耐性関連タンパク質7	80. 5	239. 4	
358_at	AF000545	P2Y10	推定プリン受容体	342. 8	198. 6	20
38441_s_at	X59408	MCP	膜補因子タンパク質 (CD46, 栄養芽細胞-リンパ球交差反応性抗原)	108. 6	206. 7	
36889_at	M33195	FCER1G	IgEのFcフラグメント、高親和性I、受容体に対する;γポリペプチド	91. 1	219. 2	
33699_at	M18667	PGC	プロガストリシン (ペプシノーゲンC)	606. 9	331. 4	
1984_s_at	X69549	ARHGD1B	Rho GDP解離阻害剤 (GDI) β	118. 6	290. 3	

【表 4】

表 4 度数分析およびORの算出

観測値 (期待値)						
PCC* ≥ 閾値 (PCC* < 閾値 (						
	非浮腫)	浮腫)	OR	(95% CI)	p 値	
プレディクターセット (Thr = 0. 37)						
浮腫	12 (21. 4)	25 (15. 6)	6. 8	(2. 6-17. 4	6. 25 x 10 ⁻⁵	
非浮腫	39 (29. 6)	12 (21. 4)				
プレディクターセット (Thr = 0. 78)						
浮腫	5 (13. 5)	32 (23. 6)	7. 2	(2. 4-21. 4	1. 37 x 10 ⁻⁴	40
非浮腫	27 (18. 6)	24 (32. 5)				
テストセット (Thr = 0. 37)						
浮腫	6 (7. 1)	2 (0. 9)	7. 3	(0. 3-178)	0. 206	
非浮腫	9 (7. 9)	0 (1. 1)				
テストセット (Thr = 0. 78)						
浮腫	0 (3. 3)	8 (4. 7)	51. 0	(2. 1-1240	0. 0023	
非浮腫	7 (3. 7)	2 (5. 3)				

10

20

30

40

50

* 13 のプレディクター遺伝子に対する平均非浮腫発現プロフィールと比較した。

p 値はフィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。

プレディクターセット＝プレディクター遺伝子リストの決定のために用いた 88 の患者サンプル

テストセット＝プレディクター遺伝子をバリデートするために用いた 17 の患者サンプル
【0091】

実施例 2

IL-1β 遺伝子の多型

第 3 相臨床試験において浮腫の有害な症状と関連する遺伝因子を同定するため薬理遺伝学的分析を行った。6 ヶ月の暫定的分析で、26 の遺伝子から 70 の SNP を検討し、イマチニブ処置個体における眼窩周囲浮腫および顔面浮腫と、IL-1β 遺伝子の -511

T→C 多型との間の有意な関連を観測した ($p=0.016$ 、OR: 3.06、95% CI: 1.29-7.27)。同じ分析を性別により階層化して行った。女性における眼窩周囲浮腫および顔面浮腫と IL-1β 多型との間には有意な関連が見られた ($p=0.0005574$)。-511 多型に関して CC 遺伝子型を有する女性は、非 CC 遺伝子型を有し、イマチニブで処置された女性よりも浮腫を被る見込みが 13.0 倍高い (95% CI: 2.07-81.48) (12 ヶ月で固定したデータ)。男性では関連は見られなかった。従って、-511 IL-1β 多型と浮腫との関連は女性に特異的なものであると思われ、イマチニブで処置された場合になぜ女性が男性の 3 倍浮腫を被る見込みが高いかを説明できる。この研究の結果は、IL-1β プロモーターにおける -511 多型がイマチニブで処置された女性における眼窩周囲浮腫および顔面浮腫の予測マーカーとして使用できることを示唆する。

【0092】

臨床試験において有害事象としての浮腫の予測マーカーを同定するための薬理遺伝学的分析を行った。これは、新たに診断され、これまでに Ph⁺ CML-CP 処置を受けていない患者におけるイマチニブ対、Aracn と組み合わせた IFN-α の第 3 相試験であった。イマチニブまたは IFN-α で処置された 151 名の患者の遺伝子型を分析した。全部で米国患者の 57.72% がこの薬理遺伝学的分析への参加に同意した。

【0093】

「Gleevec で処置した患者における浮腫および体液貯留に関する病因論および提案される研究戦略に関する要旨集」は、GLEEVEC (商標) イマチニブ臨床試験で特定の患者群における高頻度の浮腫の傾向を要約したものである。これらの群には高齢患者 (65 歳以上)、曲線下面積 (AUC) 値の高い患者、および進行した段階の CML を有する患者が含まれる。この同じレポートで、年齢 (65 歳を超える)、心血管疾患の病歴、女性、進行段階の CML および安定状態においてイマチニブの平均濃度の値が 2 倍である患者という 5 つのカテゴリーがグレード 3~4 の浮腫と有意に関連することが報告されている。

【0094】

このように、IL-1β 遺伝子のプロモーターにおける -511 多型と眼窩周囲浮腫および顔面浮腫の間の有意な関連が特定された。浮腫に関する要旨集で概略が示された浮腫と人口統計学的因子との関連により、この関連に関するイマチニブ試験集団内の人口統計学的因子を検討した。これらの分析は性別により階層化され、イマチニブで処置された女性における -511 IL-1β 遺伝子型と眼窩周囲浮腫および顔面浮腫との間の有意な関連を見出した ($p=0.0005574$)。男性において関連はなかったことから、この関連は性別特異的なものであると思われる。予測マーカーとしての IL-1β の同定は CML による女性患者の処置および重篤な浮腫の予防において医師の助けとなり得る。

【0095】

候補遺伝子のアプローチを用い、浮腫の予測マーカーとして使用できる遺伝的多型が同定されたが、これは浮腫形成の作用機序を示唆するものであり得る。SNP は 2 つの異なる方法により開発された。Third Wave Technologies, Inc. は SNP の 1 つのコレクシ

10

20

30

40

50

ョンを開発したが、他のセットはデータベースマイニングアプローチを用いて自家開発されたものである。OMIM、the SNP Consortium、Locus Link および dbSNP などの公的データベースが使用された。候補遺伝子は、浮腫、DNA 修復、疾病の病因または薬物の作用機序におけるそれらの関連を含んだ根拠に基づき選択された。Third Wave Technologies, Inc. はジェノタイピング用の SNP アッセイを開発した。

【0096】

ジェノタイピング

試験の1日目の処置投与の前に、米国のみに登録された患者から20mLの血液を得た。血液サンプルは地域倫理委員会によって承認されたプロトコールに従ってインフォームド・コンセントを得た後に採取した。DNAはPUREGENE（商標）DNA単離キット（D-50K）（Gentra, Minneapolis, MN）を製造業者の奨励に従って用いて抽出した。遺伝子型データおよび表現型データを全部で151名の患者について評価した。ジェノタイピングは、60ngのゲノムDNAについて、Invader（登録商標）アッセイ（Third Wave Technologies, Inc.）を製造業者の奨励に従って用いて行った。Lymichev et al., Nat Biotechnol., Vol. 17, pp. 292-296（1999）参照。

【0097】

浮腫と有意に関連していたSNPを本研究室でもう一度ジェノタイピングし、それらの遺伝子型を確認した。さらなる品質管理チェックを行い、遺伝子型をハーディ・ワインベルグ平衡（HWE）に関して試験した。このHWE則は、無作為に交配する大きな集団において対立遺伝子頻度が世代間で変化しないことをさす。HWEの偏差は次の2つの可能性のうちの1つを示す：

- 1) ジェノタイピングエラー；または
- 2) この多型と検討する集団の間の関連。

【0098】

2つめの場合、疾病の病因論に何らかの関わりを持つと期待される以上に特定の多型が優勢であることが分かるであろう。例えば、アルツハイマー病（AD）患者の研究では、アポリポタンパク質E（APOE）は、APOE ϵ 4が患者をADの発症に傾かせることからHWEにはないと考えられる。全ての統計は統計プログラムSASバージョン8.2で行った。

【0099】

遺伝子発現プロファイリング

TRI試薬（商標）BDを用いる全血の遺伝子発現プロファイリングのために血液サンプルを処理した。470の血液サンプルからRNAを抽出し、-80℃で保存した。この研究では、遺伝子型情報もある患者から96の発現プロファイルを調べた。

【0100】

統計学的方法

ジェノタイピングされた集団の典型的な性質

全臨床試験集団のうちジェノタイピングされた集団がいかに典型的なものを決定するため、この2つの集団間の人口統計学と浮腫の発症を比較した。なお、ジェノタイピングされた集団は米国患者のみからなっていたので、さらなる集団としてこの試験における全米国患者を調べた。年齢はノンパラメトリックANOVAを用いて比較し、他は全て統計プログラムSASバージョン8.2にてフィッシャーの正確確率検定を用いて分析した。

【0101】

遺伝子型と浮腫状態との関連

フィッシャーの正確確率検定を用いて各患者の遺伝子型と浮腫状態の臨床表現型とを比較した。浮腫状態は最低12ヶ月の処置後にデータをコンパイルした臨床データベースから判定した。イマチニブで処置された患者の浮腫のメカニズムは知られていない。また、より重篤な体液貯留事象がより一般的な眼窩周囲浮腫および末梢浮腫事象と同じ病態生理学を有するのかどうかは分かっていない。研究した患者では、1名の患者がグレード3の

重篤な眼窩周囲浮腫事象を被った。大多数は軽度の事象を1つ被っただけか、または体液貯留を全く示さなかった。結局のところ、出された浮腫の病態生理学に関する仮説は本発明者らの統計学的関連分析で実行できた程度に少なかった。遺伝子型と浮腫の間の関連について3つの分析を行った。1つ目は、浮腫を持たない他の全ての被験者と比べていずれかの形態の浮腫を有する患者（分析した例の55%）からなった。2つ目および3つ目の分析は浮腫の発症率が最も高いサブグループを用いて行った。例えば、第1群（眼窩周囲浮腫および顔面浮腫）は浮腫有りと分類され、他の全ての患者は浮腫無しと分類された。同様に、3つ目の分析では、第2群の個体（末梢浮腫、浮腫NOSおよび圧痕浮腫）を浮腫有りとして、他の全てを浮腫無しとしてコードした。

【0102】

イマチニブとIFN- α で同様の結果が見られるとは期待されなかったことから、各遺伝子型／表現型の相関を処置によって階層化し、主にイマチニブの結果に着目した。最終の分析に用いた患者の数は91名のイマチニブ処置患者であった。全ての統計は統計プログラムSASバージョン8.2で行った。

【0103】

ロジスティック回帰

ロジスティック回帰を用いて、どの変数が眼窩周囲浮腫および顔面浮腫に関して予測性があるかを決定した。眼窩周囲／顔面浮腫は種々のモデルにおいて用いられる従属変数であった。遺伝子型と人口統計的因子のいずれの交絡作用も考慮できるようにこれらのモデルを用いた。ロジスティック回帰を構築し、-511 IL-1 β 遺伝子型と浮腫の間で見られた独自の関連をモデル化した。モデルは全て、イマチニブで処置した男性および女性の両者からなった（ $n=91$ ）。最初のロジスティック回帰分析では、年齢、性別、人種、および-511 IL-1 β 遺伝子型をクラスとしてフルモデルに加えた。これまでに見られた性別と遺伝子型の間の相互作用の可能性を調べるため、2元共変量相互作用を可能とするさらなる変数を作成した。さらなる分析は、最初のモデルで用いたクラスとともに、遺伝子型と性別と人種の間、および遺伝子型と性別と年齢の間の3元相互作用を可能とするさらなる2つの変数からなった。黒色人種、東洋人およびその他の個体の罹患率は低いことから、人種群は白色人種とその他という2つのカテゴリーに変換し、上記のように3回目のロジスティック回帰を完了させた。このロジスティック回帰は、遺伝子型／表現型の有意な相関をさらに特徴づけるための予備的分析として完了させた。

【0104】

多型は本明細書で報告した91名のイマチニブ患者に、さらに18名のIFN- α 処置患者を加えて分析し、HWEであることが判明した。-511 IL-1 β 多型はこの遺伝子のプロモーター領域にあり、転写開始部位から-511塩基対上流においてC/T塩基転移を示す。El-Omar et al., Nature, Vol. 404, pp. 389-402 (2000) 参照。-511 IL-1 β 多型と、同じ遺伝子の-31変異体とのほぼ完全な連鎖不平衡(LD)により、-31 IL-1 β 多型をジェノタイピングしたところ、これと、イマチニブで処置された女性における浮腫との間の相関も見られた（ $p=0.0054$ ）。

【0105】

下記表5はIL-1 β 遺伝子型の、イマチニブで処置された女性における浮腫と非浮腫を示している。この表はイマチニブで処置された女性における浮腫と関連している2つのIL-1 β 多型に関する遺伝子型の分布を示している。女性は有害事象として浮腫を被っているかどうかによって特徴づけられている。浮腫を被った-511遺伝子座にCC遺伝子型、かつ、-31遺伝子座にTTを有する女性は、この遺伝子座に代わりの遺伝子型を有する女性よりも有意に多い（それぞれ $p=0.0041$ および $p=0.0054$ ）。

【表 5】

表 5

	-511 CC	-511 CT	-511 TT	-31 TT	-31 CT	-31 CC
非浮腫	2	12	1	1	12	2
浮腫	10	4	1	7	3	2

【0106】

−511 および −31 IL−1β SNP の LD

LD の程度を算出するために用いられる統計量 D' をコンピューター計算し、−511 と −31 IL−1β プロモーター多型間のほぼ完全な LD のリポートを確認した。 D' は比較される 2 つの多型の頻度にかかわらず、同じ範囲の値を有する。EH 連鎖有用性プログラムを用いて、これら 2 つのマーカー間の LD を試験し、見積もった。無作為に集めた集団中の個体数に一致するようにとったサンプルデータに基づき、EH プログラムは各マーカーに関する対立遺伝子頻度を見積もる。Xie et al., Am. J. Hum. Genet., Vol. 53, p. 1107 (abstract) (1993); and Terwilliger et al., John's Hopkins University Press, Baltimore (1994) 参照。

【0107】

EH プログラムによってコンピューター計算された 0.978 の $|D'|$ を有する CML 患者のこの集団において、−511 IL−1β 多型と −31 IL−1β 多型はほぼ完全な LD 状態にある。Xie et al., 前掲参照。 $|D'|$ 値が 1 というのは完全な LD を示し、 $|D'|$ 値が 0 というのは LD 状態でないことを示す。Reich et al., Nature, Vol. 411, pp. 199-204 (2001) 参照。よって、ある IL−1β 多型で見られる統計学的に有意な関連は全て、別の IL−1β 多型でも統計学的に有意となる。IL−1β (−511) C→T 多型は T→C 塩基転移を生じる位置 (−31) に位置する IL−1β プロモーター内の別の多型と強い LD 状態 (99.5%) にある。El-Omar et al. (2000), 前掲参照。よって、IL−1β プロモーターの位置 (−511) に T を有する患者は位置 (−31) に C を有すると予測される。これらの所見を、これら 2 つの臨床試験で試験した患者で確認した。野生型 IL−1β 遺伝子では、−31 の位置には T がみられる。この T は、IL−1β の転写の開始に重要な役割を果たす TATA ボックス配列 (TATAA) の一部であることから、IL−1β の発現に極めて重要である。一般に、TATA ボックス配列は転写が正しい位置で始まることを保証するよう、転写装置を遺伝子内の正しい位置に補充および配置することに関与する。位置 (−31) における T→C 多型はこの重要な TATA ボックス配列を妨げ (TATAA→CATAA)、従って、これは不活性となり、IL−1β 遺伝子の転写の効率的な開始を妨げる。この変化した IL−1β TATA ボックス配列には転写装置は結合しないことが示されている。El-Omar (2002), 前掲参照。逆に、−511 における C 多型は −31 における T と相関している。従って、このプロモーターに完全な TATA ボックスを有する女性は薬物誘発性浮腫の高いリスクがあり得る。よって、IL−1β プロモーター内の多型 (T→C 塩基転移を生じる位置 (−31) に存在) または IL−1β プロモーターの −511 に存在する多型 (C→T) のいずれかと LD 状態にある他のいずれの多型の存在も薬物処置による浮腫の発症の見込みに対して予測効果を有する。(−31) 多型と LD 状態にある他の多型の同定のための手段は当業者に周知である。現在知られているか、あるいは将来発見されるこのような多型はいずれも、薬物で処置された際の患者における浮腫形成の見込みを予測するため、またはこのような場合に処置の選択肢を決定する助けとするために、本発明の方法で使用するができる。

【0108】

人口統計学的変数、遺伝子型変数および表現型変数の間の相関分析

多様な人種群に由来する個体の遺伝子構成は幅広く異なる。この分散を評価するため、各多型を人種により分析した。また、人種間で浮腫の発生に違いがあるかどうかを調べた

。試験データパネルでは、人種は白色人種、黒色人種、東洋人およびその他に分類した。非白色人種の数はいなかった。分析力を高めるため、白色人種および非白色人種として再コードした人種でも分析を行った。この分析部分集団におけるP値をフィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。全ての統計は統計プログラムSASバージョン8.2にて行った。

【0109】

人種に加え、性別および／または年齢が浮腫に関連するかどうか、また、これらの変数が-511 IL-1βSNPとの関連とは独立であるかどうかにも検討した。性別および年齢は、発明者らの以前の試験でそれらが血管浮腫に関連していることが示唆されたので検討した。性別および年齢は研究データセットから特定した。浮腫表現型と関連のSNPの間の関連研究は全て性別によって階層化した。年齢と全クラスの浮腫の間の1元配置ANOVAを行った。ロジスティック回帰を用いて、どの変数が眼窩周囲浮腫および顔面浮腫に関して予測性があるかを決定した。眼窩周囲／顔面浮腫は種々のモデルにおいて用いられる従属変数であった。遺伝子型と人口統計的因子のいずれの交絡作用も考慮できるようにこれらのモデルを用いた。ロジスティック回帰を構築し、-511 IL-1β遺伝子型と浮腫の間で見られた独自の関連をモデル化した。

【0110】

モデルは全て、イマチニブで処置した男性および女性の両者からなった(n=91)。最初のロジスティック回帰分析では、年齢、性別、人種、および-511 IL-1β遺伝子型をクラスとしてフルモデルに加えた。これまでに見られた性別と遺伝子型の間の相互作用の可能性を調べるため、2元共変量相互作用を可能とするさらなる変数を作成した。さらなる分析は、最初のモデルで用いたクラスとともに、遺伝子型と性別と人種の間、および遺伝子型と性別と年齢の間の3元相互作用を可能とするさらなる2つの変数からなった。黒色人種、東洋人およびその他の個体の罹患率は低いことから、人種群は白色人種とその他という2つのカテゴリーに変換し、上記のように3回目のロジスティック回帰を完了させた。このロジスティック回帰は、遺伝子型／表現型の有意な相関をさらに特徴づけるための予備的分析として完了させた。

【0111】

浮腫群において特定の遺伝子型(例えば、CCと非CC)を有するオッズを、非浮腫群における同じ遺伝子型を有するオッズで割ることにより、ORと95%CIを算出した。

【0112】

複数試験の補正

浮腫の予測マーカーを同定するために用いられるアプローチの性質上、複数の試験に関して補正を行わなければならない。行った試験が多いほど、 $p < 0.05$ の確率で関連を発見する機会が増える。ボンフェローニ補正因子を用いて複数の試験を補正するには、希望のp値を行った試験の数で割る。得られた値は「有意」とみなされる値である。従って、この分析で試験した70の多型については、p値0.0007が有意とみなすには必要である。これは極めて小さな数であり、この慎重なカットオフでは、有用な可能性のある予測マーカーを見逃がしてしまうかもしれない。

【0113】

複数の試験を補正するもう1つの方法はブートストラップ法(bootstrapping)である。この方法は有意性試験を計算するためにシミュレーションを適用するコンピューター集約的な統計分析である。乱数生成器を用いてデータセットを再抽出する。ブートストラップ法は発明者らの有意性結果の安定性を調べるために行った。ブートストラップは浮腫表現型と68の多型からなり、女性だけを用いて10,000反復で行った。全ての統計は統計プログラムSASバージョン8.2で行った。

【0114】

ジェノタイピングされた集団の典型的な性質

本研究において薬理遺伝学的研究に用いられた患者のサブセットが試験集団の典型的なものであるかどうかを調べるため、浮腫に関連するいくつかの人口統計を検討した。ジェ

10

20

30

40

50

ノタイピングされた集団は米国からの患者のみからなった。よって、このジェノタイピングされた集団を臨床試験の全米患者集団とも比較した。この研究のジェノタイピングされた集団は米国からの試験集団と、性別、人種、年齢および浮腫の発生に関しては類似している。それらは人種に関してのみ異なる。米国集団は4.78%に対して11.92%と黒色人種が多く、90.06%に対して80.13%と白色人種が少なく、3.50%に対して6.62%と他のカテゴリーの個体がやや多い。

【0115】

遺伝子型と浮腫状態との相関の結果

26の遺伝子における70の遺伝的多型の分析は、IL-1 β 遺伝子の-511多型が、イマチニブで処置された女性における眼窩周囲浮腫および顔面浮腫と有意な関連があると同定した($p=0.00056$)。CC遺伝子型の女性は、非CC遺伝子型の個体より、眼窩周囲浮腫および顔面浮腫を発症する見込みが13.0倍高い(95%CI: 2.07-81.48)(図3および図4も参照)。このIL-1 β 多型はそのプロモーター領域にあり、転写開始部位から-511塩基対上流の位置においてC $\rightarrow$ Tの塩基転移を示す。

【0116】

人口統計学的変数、遺伝子型変数および表現型変数の間の相関

性別および年齢はイマチニブ処置個体の血管浮腫と有意に関連していることが分かった($p<0.05$)。驚くべきことに、性別は全ての患者においてIL-1 β 多型と関連している($p=0.0106$)、図4。CC遺伝子型の女性は非CC遺伝子型の女性よりも血管浮腫を発症する見込みが高い。IL-1 β 遺伝子は常染色体上にあることから性別および遺伝的多型との相関は予期されない。この性別と-511多型との関連がこの研究試験集団に特異的なものか、他の対照集団でも見られるのかを理解する1つの試みにおいて、さらに3種類の無関連の臨床試験を検討した。全ての組み合わせ試験でも、この3種類の対照試験のいずれでも、性別と-511 IL-1 β SNPの間に有意な関連は見られなかった。-511 IL-1 β 多型の遺伝子型分布はイマチニブと他の全てのものの間で有意な違いはなかった。しかし、分析を性別によって階層化した場合、他の全ての女性と比べて、研究試験からの女性における遺伝子型分布は有意な違いがあった。-511 IL-1 β 多型に関するTT遺伝子型を有する女性白血病患者はいないものと思われる。イマチニブで処置された女性におけるCC:CT:TT遺伝子型の分布は、男性がそれぞれ23:25:19であるのに対し、16:19:1である。他の全ての試験と比べた研究から男性の分布には有意な差はなかった。

【0117】

この遺伝子型の分布はこの多型に関して、4つの人種間で有意な差がある。観測されたIL-1 β と血管浮腫との間の関連が人種特異的なものであったかどうかを調べるため、人種により分析を階層化した。イマチニブで処置された男性および女性において、黒色人種における-511 IL-1 β CC:CT:TT分布は1:6:4であり、白色人種では29:31:13、東洋人では0:2:0、その他のでは3:0:2であり、全ての群を合わせると33:39:19である。このデータを性別と人種により階層化すると、白色人種は研究した女性の77%となる。白色人種においては、-511 IL-1 β 多型のCC遺伝子型はイマチニブで処置された場合、女性を浮腫に罹りやすくするという明らかな傾向がある。さらなる研究で、-511 IL-1 β 多型と浮腫との関連が人種特異的であるかどうかを決定するためには、異なる人種的背景からの適当数の個体を含めなければならない。特徴づけられた、この4つの異なる人種間で見られたIL-1 β 多型の対立遺伝子分布における違いは、人種間での浮腫の罹患率の違いをもたらす可能性がある。

【0118】

年齢も血管浮腫と関連があった(ノンパラメトリックANOVA $p=0.0393$)。しかし、IL-1 β 多型との関連はなく、このことはそれが血管浮腫の発症における独立変数であることを示唆している。

【0119】

複数試験の補正

ボンフェローニ補正

分析されたSNPの数および多くの試験が偽陽性の誤り率を含み得るという事実のため、複数試験の補正を行った。イマチニブで処置された女性における浮腫とIL-1β変異体との関連に関するこの所見は、以下で計算されるような0.0007のp値を推定するボンフェローニ補正法を用いると、有意であるとは言えない。

【数1】

$$\text{ボンフェローニ} = \frac{0.05}{\eta} = \frac{0.05}{68} = 0.0007$$

10

η = 試験数

−511および−31多型で観測されるp値は0.0007カットオフよりも大きかった。

【0120】

ブーツストラップ法

ブーツストラップ分析では、イマチニブで処置された女性における浮腫と−511 IL-1β多型との間の関連に関する補正p値は0.058となった。

【0121】

イマチニブ誘発性浮腫に対する感受性を予測に使用でき、浮腫の病態生理学の理解を理想的に助け得る遺伝子マーカーを同定するために薬理遺伝学的分析を行った。候補遺伝子における遺伝子型と研究試験からの患者における浮腫の存在との間の関連を探し出すための統計学的試験を行った。−511 IL-1β多型とイマチニブで処置された女性のみ眼窩周囲浮腫および顔面浮腫との間に関連が発見された。イマチニブで処置され、IL-1β−511遺伝子座にCC遺伝子型を有する女性患者は、イマチニブで処置され、CTまたはTT遺伝子型を有する女性よりも血管浮腫を被る見込みが1.3倍高い(95%CI: 2.07–81.48)。従って、イマチニブで処置された女性に見られる症例の67%(15名のうち10名)を占めるIL-1β遺伝子における眼窩周囲浮腫および顔面浮腫に関する、代用マーカー(surrogate marker)が同定された。血管浮腫と関連した遺伝子型はIL-1β遺伝子の高い発現レベルに関連している可能性がある。このような代用マーカーは臨床において血管浮腫に対する患者の感受性を予測するために容易に適用でき、より密な監視、または予防的療法が可能となる。この試験は遺伝学的であってもよいし、あるいは、可能性としては血清中のIL-1βタンパク質レベルの測定値であってもよい。

20

30

【0122】

本明細書において「浮腫」とは、限定されるものではないが、血管浮腫(眼窩周囲浮腫および顔面浮腫を含む)、浮腫NEC(末梢浮腫、浮腫NOSおよび圧痕浮腫を含む)および肺浮腫(肺の鬱血を含む)および脳浮腫をはじめとする、臨床上有意味ないずれのタイプまたは種類の浮腫の発生に関してもさす。

【0123】

本明細書において「非浮腫」とは、臨床上有意味ないずれのタイプまたは種類の浮腫も存在しないことを意味する。

40

【0124】

通常のマイクロアレイ技術

何千もの個々の遺伝子のサインを同時に評価するマイクロアレイ技術は臨床腫瘍学場で急速に受け入れられつつある。この技術は種々のクラスの癌を識別できる遺伝因子、臨床応答の生物マーカー、ならびに急性リンパ芽球性白血病の場合にイマチニブ処置に対する耐性の発達を予測できる遺伝子を同定するために用いられている。この研究の目的は、この遺伝子発現プロファイリング戦略を用いて、イマチニブで処置されたCML患者における浮腫の予測遺伝子発現プロファイルを同定することであった。

50

【0125】

測定方法

本発明の実験方法は細胞成分の測定に依存する。測定する細胞成分は細胞の生物学的状態のいずれの状態に由来するものであってもよい。それらは転写の状態に由来するものであってもよく、その場合にはRNAの存在量が測定され、あるいは翻訳の状態に由来するものであってもよく、その場合にはタンパク質の存在量が測定され、活性状況に由来するものであってもよく、その場合にはタンパク質活性が測定される。また、細胞の特徴は混合型の状態に由来するものであってもよく、例えば、1以上のタンパク質の活性が、他の細胞成分のRNAの存在量（遺伝子発現）とともに測定される。この節では、薬物または経路応答において細胞成分を測定するための例示的な方法を記載する。本発明はこのような測定の他の方法にも適用できる。

10

【0126】

好ましくは、本発明では、他の細胞成分の転写の状態が測定される。転写の状態は、次のサブセクションに記載される核酸または核酸模倣プローブのアレイに対するハイブリダイゼーションの技術により、あるいはそれに続くサブセクションに記載されている他の遺伝子発現技術により測定することができる。しかし、測定されるその結果は、mRNAの存在量および／または比率（通常、RNA分解率に差がない場合はDNA発現比を反映する）を表す値を含むデータである。

【0127】

本発明の別の種々の実施形態では、翻訳の状態、活性の状態または混合型の状態など、転写の状態以外の生物学的状態の状態を測定することができる。

20

【0128】

表2に開示されている遺伝子の1つによりコードされるタンパク質またはタンパク質結合相手と相互作用できる化合物を同定して、そのタンパク質またはその結合相手の活性を変化させるために細胞フリーアッセイを用いることもできる。細胞フリーアッセイは、コードされるタンパク質と、標的ペプチドなどのその結合相手との間の相互作用を調節する化合物を同定するためにも使用できる。

【0129】

分子間の相互作用はまた、最適な現象において表面プラズモン共鳴を検出するリアルタイム・バイオモレキュラー・インターアクション・アナリシス（BIA）ファルマシア・バイオセンサー（AB）を用いることでも評価することができる。検出は生物特異的な界面における質量高分子の質量濃度における変化に依存し、分子の標識の必要はない。有用な一実施形態では、試験化合物のライブラリーをセンサー界面、例えばマイクロフローセルの壁面に固定化することができる。次に、タンパク質、その機能的断片またはタンパク質結合相手を含む溶液をこのセンサー表面に継続的に循環させる。シグナル記録で示される共鳴角における変化は相互作用の存在を示す。この技術はPharmaciaにより「BIAテクノロジーハンドブック」にさらに詳細に記載されている。

30

【0130】

細胞フリーアッセイのもう1つの実施形態は、

a) 少なくとも1つの遺伝子によりコードされるタンパク質、そのタンパク質結合相手および試験化合物を合わせて反応混合物を形成すること；および

40

b) 試験化合物の存在下および不在下でタンパク質とタンパク質結合相手の相互作用を検出することを含む。

【0131】

試験化合物の存在下でのタンパク質と結合相手の相互作用が、試験化合物の不在下での相互作用に比べて著しい変化（増強または阻害）があれば、試験化合物に対するそのタンパク質の活性の有効なアゴニスト（ミメティックまたは増強剤）またはアンタゴニスト（阻害剤）を示す。このアッセイの成分は同時に合わせることもできるし、あるいはタンパク質を一定の時間、試験化合物と接触させ、その後、その反応混合物に結合相手を添加す

50

ることもできる。化合物の有効性は種々の濃度の化合物を用いて用量応答曲線を作成することにより評価することができる。対照アッセイはまた、試験化合物の不在下でタンパク質とその結合相手との間の複合体の形成を定量することにより行うことができる。

【0132】

タンパク質とその結合相手との間の複合体の形成は、放射性標識、蛍光標識または酵素標識タンパク質などの検出可能なように標識されたタンパク質またはその結合相手を用い、免疫アッセイにより、またはクロマトグラフィー検出により検出することができる。

【0133】

好ましい実施形態では、このタンパク質またはその結合相手は、タンパク質とその結合相手の複合化されていない形態からの複合体の分離およびアッセイの自動化を容易にするために固定化することができる。タンパク質とその結合相手との複合体形成は例えばマイクロタイタープレート、マイクロ遠沈管および試験管など、いずれのタイプの容器でも行える。特に好ましい実施形態では、タンパク質を別のタンパク質、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合させて、例えばグルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) に吸着させることができる融合タンパク質を形成し、次にこれを例えば³⁵Sで標識した標識タンパク質相手および試験化合物と合わせ、複合体の形成に十分な条件下でインキュベートすることができる。次に、これらのビーズを洗浄して結合していない標識を除去し、マトリックスを固定化し、放射性標識を測定する。

【0134】

タンパク質をマトリックスに固定化するためのもう1つの方法は、ビオチンとストレプトアビジンの使用を伴う。例えば、タンパク質を周知の技術を用い、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドを用いてビオチニル化し、ストレプトアビジンをコートしたプレートのウェルに固定化することができる。

【0135】

また、細胞フリーアッセイを用いて、少なくとも1つの遺伝子によりコードされるタンパク質と相互作用することができ、その遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を調節する薬剤を同定するためにも使用できる。一実施形態では、このタンパク質を試験化合物とともにインキュベートし、そのタンパク質の触媒活性を測定する。もう1つの実施形態では、このタンパク質の標的分子に対する結合親和性を当技術分野で公知の方法により測定することができる。

【0136】

本明細書において「アンチセンス」とは、開示されている遺伝子の少なくとも1つのRNA発現産物の一部に相補的なヌクレオチド配列をさす。「相補的」ヌクレオチド配列とは、標準的なワトソン-クリックの相補性の法則に従って塩基対を形成し得るヌクレオチド配列をさす。すなわち、プリンはピリミジンと塩基対を形成し、DNAの場合にはグアニン：シトシンおよびアデニン：チミン、あるいはRNAの場合にはアデニン：ウラシルの組み合わせを形成する。その他のあまり一般的ではない塩基、例えば、イノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサンチンおよびその他をハイブリダイズ配列に含めてもよく、対合は妨害されない。

【0137】

全ての実施形態において、細胞成分の測定は測定が行われる場合に相対的に独立な様式で行われるべきである。

【0138】

転写の状態の測定

好ましくは、転写の状態の測定は、核酸をオリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズさせることにより行われ、これはこのサブセクションに記載されている。転写の状態を測定する他の特定の方法はこのサブセクションの後半に記載されている。

【0139】

通常転写物アレイ

好ましい一実施形態では、本発明は「オリゴヌクレオチドアレイ」（本明細書では「

10

20

30

40

50

マイクロアレイ」とも呼ばれる)を用いる。マイクロアレイは細胞における転写の状態を分析するため、特に癌細胞の転写の状態を測定するために使用できる。

【0140】

一実施形態では、転写物アレイは、細胞に存在するmRNA転写物を表す検出可能なように標識された標識ポリヌクレオチド(例えば、全細胞mRNAから合成した蛍光標識cDNAまたは標識cRNA)をマイクロアレイにハイブリダイズさせることにより作製される。マイクロアレイは細胞または生物のゲノムの多くの遺伝子、好ましくは大部分またはほとんど全ての遺伝子の産物に対する結合(例えば、ハイブリダイゼーション)部位を並べた表面である。マイクロアレイはいくつかの方法で作製することができ、そのいくつかを以下に記載する。しかし、作製されたマイクロアレイはある特徴を共有する。これらのアレイは再現性があり、あるアレイの複数のコピーが生産でき、互いに容易に比較することができる。好ましくは、マイクロアレイは小さく、通常 5 cm^2 より小さく、それらは結合(例えば、核酸ハイブリダイゼーション)条件下で安定な材料から製造される。マイクロアレイ中のある結合部位またはユニークな結合部位のセットは細胞内の単一の遺伝子の産物と特異的に結合する。特定のmRNAにつき1を超える物理的「結合部位」(以下、部位)が存在し得るが、以下の考察を明瞭にするため、単一の部位があると仮定する。特定の実施形態では、各位置に既知配列の核酸が付加された位置的にアドレス可能なアレイが用いられる。

【0141】

細胞のRNAに相補的なcDNAを作製し、好適なハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレイとハイブリダイズさせる場合、いずれかの特定の遺伝子に対応するアレイの部位に対するハイブリダイゼーションのレベルはその遺伝子から転写されたmRNAの、細胞内の存在率を反映している。例えば、全細胞mRNAと相補的であり、検出可能なように標識された(例えば蛍光団で)cDNAまたはcRNAをマイクロアレイとハイブリダイズさせる場合、その細胞内で転写されない、ある遺伝子に対応する(すなわち、その遺伝子の産物と特異的に結合することができる)アレイ上の部位のシグナルは小さいか、またはシグナルがない(例えば蛍光シグナル)、コードされているmRNAが優勢である遺伝子は相対的に強いシグナルを有する。

【0142】

マイクロアレイの作製

マイクロアレイは当技術分野で公知であり、遺伝子産物(例えば、cDNA、mRNA、cRNA、ポリペプチドおよびその断片)と、配列において対応するプローブが、既知の位置で特異的にハイブリダイズまたは結合できる表面からなる。一実施形態では、マイクロアレイは、各位置がある遺伝子によりコードされる産物(例えば、タンパク質またはRNA)の独立した結合部位を表し、その生物のゲノム中の大部分またはほとんど全ての産物に対する結合部位が存在するアレイ(すなわち、マトリックス)である。好ましい一実施形態では、この部位は特定の同族cDNAまたはcRNAが特異的にハイブリダイズできる核酸または核酸類似体である。この結合部位の核酸または類似体は例えば合成オリゴマー、全長cDNA、全長より短いcDNA、または遺伝子断片であってよい。

【0143】

好ましい一実施形態では、このマイクロアレイは標的生物のゲノムの全てまたはほとんど全ての遺伝子の産物に対する結合部位を含むが、このような包括性は必ずしも必要ではない。このマイクロアレイは標的生物の遺伝子の一部分のみの結合部位を含んでもよい。しかし、一般に、このマイクロアレイはゲノム中の遺伝子の少なくとも約50%、多くの場合には少なくとも約75%、より多くの場合には少なくとも約85%、よりいっそう多くの場合には約90%を超える、最も多くの場合には少なくとも約99%に対応する結合部位を有する。好ましくは、このマイクロアレイは対象とする生物ネットワークモデルを試験および確認するために適切な遺伝子に対する結合部位を有する。「遺伝子」は、生物内で(例えば、単細胞の場合)、または多細胞生物ではいくつかの細胞で、それからmRNAが転写される好ましくは少なくとも50、75または99のアミノ酸からなるオープン

ンリーディングフレーム（ORF）と特定される。ゲノム中の遺伝子の数はその生物によって発現されるmRNAの数から、またはそのゲノムの十分同定されている部分から推定することにより見積もることができる。対象とする生物のゲノムが配列決定されている場合は、ORFの数を求めることができ、mRNAコード領域はDNA配列解析により同定することができる。例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）ゲノムは完全に配列決定されており、99アミノ酸よりも長い約6,275のORFを有することが報告されている。これらのORFの分析から、タンパク質産物を特定すると思われる5,885のORFがあることが示されている。出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる、Goffeau et al., 'Life with 6000 Genes', Science, Vol. 274, pp. 546-567 (1996) 参照。これに対し、ヒトゲノムは約25,000～35,000の遺伝子を含むと見積もられている。

10

【0144】

マイクロアレイ用の核酸の調製

上述のように、特定の同族cDNAが特異的にハイブリダイズする「結合部位」は通常、その結合部位に結合されている核酸または核酸類似体である。一実施形態では、このマイクロアレイの結合部位はある生物のゲノム中の各遺伝子の少なくとも一部に対応するDNAポリヌクレオチドである。これらのDNAは、例えばゲノムDNA、cDNA（例えば、RT-PCRによる）またはクローニングされた配列からの遺伝子セグメントのPCR増幅により得ることができるか、あるいはこれらの配列はフォトリソグラフィ技術の使用によりチップの表面に新たに合成してもよい（例えば、Affymetrixはこのような異なる技術を用いてチップ上で直接それらのオリゴを合成する）。PCRプライマーとしては、それらの遺伝子またはcDNAの既知配列に基づき、ユニークな断片（すなわち、そのマイクロアレイ上の他のいずれの断片とも10塩基を超える連続する同じ配列を共有することのない断片）の増幅をもたらすものを選択する。必要な特異性と最適な増幅特性を有するプライマーのデザインにはコンピュータープログラムが有用である。例えば、Oligo, pl version 5.0, Nat. Biosci参照。極めて長い遺伝子に対応する結合部位の場合、オリゴ-dTプライミングcDNAプローブがマイクロアレイにハイブリダイズされる際に全長よりも短いプローブでも十分結合するように、その遺伝子の3'末端付近のセグメントを増幅することが望ましい場合がある。一般には、マイクロアレイ上の遺伝子断片は約20bp～約2000bpの間、より一般には約100bp～約1000bpの間、通常は約300bp～約800bpの間の長さである。PCR法は周知のものであり、例えば、出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる、Innis et al., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, CA (1990) 参照。核酸の単離および増幅にはコンピューター制御のロボットシステムが有用であるのは明らかである。

20

30

【0145】

マイクロアレイ用の核酸を作製するための別の手段として、例えばN-ホスホネートまたはホスホルアミダイト化学を用いる、合成ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの合成によるものがある。Froehler et al., Nucl. Acid Res., Vol. 14, pp. 5399-5407 (1986); およびMcBride et al., Tetrahedron Lett., Vol. 24, pp. 245-248 (1983) 参照。合成配列は約15塩基～約500塩基、より一般には約20塩基～約500塩基の長さである。いくつかの実施形態では、合成核酸は非天然塩基、例えばイノシンを含む。上述のように、核酸類似体をハイブリダイゼーションの結合部位として用いてもよい。好適な核酸類似体の一例としてペプチド核酸がある。例えば、Egholm et al., 'PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydrogen-Bonding Rules', Nature, Vol. 365, pp. 566-568 (1993); および米国特許第5,539,083号参照。

40

【0146】

もう1つの実施形態では、結合（ハイブリダイゼーション）部位は遺伝子のプラスミドまたはファージクローン、cDNA（例えば、EST）、またはそれらに由来する挿入配

50

列から製造される。Nguyen et al. , ‘ Differential Gene Expression in the Murine Thymus Assayed by Quantitative Hybridization of Arrayed cDNA Clones ’, Genomics , Vol. 29, pp. 207-209 (1995) 参照。さらに別の実施形態では、結合部位のポリヌクレオチドはRNAである。

【0147】

核酸の固相表面への結合

核酸または類似体は固相支持体へ結合させるが、これはガラス、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、ナイロン）、ポリアクリルアミド、ニトロセルロースまたはその他の材料から製造することができる。核酸を表面に結合させる好ましい方法としては、Schena et al. , ‘ Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray ’, Science, Vol. 270, pp. 467-470 (1995) に概略が記載されているようにガラスプレート上にプリントすることによるものがある。この方法はcDNAのマイクロアレイの作製に特に有用である。また、DeRisi et al. , ‘ Use of a cDNA Microarray to Analyze Gene Expression Patterns in Human Cancer ’, Nature Gen. , Vol. 14, pp. 457-460 (1996) ; Shalon et al. , ‘ A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-Color Fluorescent Probe Hybridization ’, Genome Res. , Vol. 6, pp. 639-645 (1996) ; およびSchena et al. , ‘ Parallel Human Genome Analysis; Microarray-Based Expression of 1000 Genes ’, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 10539-11286 (1995) 参照。上述の製品は各々、出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる。

【0148】

マイクロアレイを作製するもう1つの好ましい方法として、高密度オリゴヌクレオチドアレイを作製することによるものがある。In situ合成のためのフォトリソグラフィ技術を用いて、表面の所定の位置に所定の配列に相補的な何千というオリゴヌクレオチドを含むアレイを作製する技術 (Fodor et al. , ‘ Light-Directed Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis ’, Science, Vol. 251, pp. 767-773 (1991) ; Pease et al. , ‘ Light-Directed Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Analysis ’, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp. 5022-5026 (1994) ; Lockhart et al. , ‘ Expression Monitoring by Hybridization to High-Density Oligonucleotide Arrays ’, Nature Biotech. , Vol. 14, p. 1675 (1996) ; および米国特許第5, 578, 832号 ; 同第5, 556, 752号 ; および同第5, 510, 270号参照 (各々、出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる)) ; または所定のオリゴヌクレオチドの迅速合成および定着のための他の方法 (Blanchard et al. , ‘ High-Density Oligonucleotide Arrays ’, Biosensors Bioelectron. , Vol. 11, pp. 687-690 (1996) 参照) は公知である。これらの方法を用いる場合、誘導体化されたスライドガラスなどの表面に既知配列のオリゴヌクレオチド (例えば、25マー) が直接合成される。通常、製造されたアレイは冗長であり、1つのRNAにつき数個のオリゴヌクレオチド分子がある。オリゴヌクレオチドプローブは選択的にスプライシングされたmRNAを検出するために選択することができる。

【0149】

マイクロアレイを作製するためのその他の方法 (例えば、マスキングによるもの、Maskos et al. , Nuc. Acids Res. , Vol. 20, pp. 1679-1684 (1992) 参照) も使用できる。基本的に、例えばナイロンハイブリダイゼーションメンブラン上のドットプロット (出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる、Sambrook et al. , ‘ Molecular Cloning--A Laboratory Manual ’, 2nd Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) 参照) など、いずれの種類のアレイでも使用できるが、当業者が認識しているように、極めて小さいアレイのほうが、ハイブリダイゼーション量が少ないので好ましい。

【0150】

標識プローブの作製

全RNAおよびポリ(A)⁺RNAを調製する方法は周知であり、一般に、Sambrook et al. , 前掲に記載されている。一実施形態では、RNAは本発明で対象とする種々のタイプの細胞から、チオシアン化グアニジウム、その後のCsCl遠心分離を用いて抽出する。Chirgwin et al. , Biochemistry, Vol. 18, pp. 5294-5299 (1979) 参照。ポリ(A)⁺RNAはオリゴdTセルロースを用いて選択により選択される。Sambrook et al. , 前掲参照。対象となる細胞としては、野生型細胞、薬剤に曝された野生型細胞、修飾／損動された細胞成分を有する細胞、および薬剤に曝され、修飾／損動された細胞成分を有する細胞が挙げられる。

【0151】

標識cDNAはmRNAから、あるいはまた、オリゴdTプライミングまたはランダムプライミング逆転写により直接RNAから調製され、双方とも当技術分野では周知のものである。例えば、Klug et al. , Methods Enzymol. , Vol. 152, pp. 316-325 (1987) 参照。逆転写は検出可能な標識に共役されたdNTP、最も好ましくは、蛍光標識dNTPの存在下で行えばよい。あるいは、単離されたmRNAを、標識dNTPの存在下で二本鎖cDNAのin vitro転写により合成される標識アンチセンスRNAへと変換することもできる。出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる、Lockhart et al. , 'Expression Monitoring by Hybridization to High-Density Oligonucleotide Arrays', Nature Biotech. , Vol. 14, p. 1675 (1996) 参照。別の実施形態では、cDNAまたはRNAプローブを検出可能な標識の不在下で合成することができ、その後、例えばビオチニル化したdNTPまたはrNTPを組み込むか、または同様のいくつかの手段（例えば、ビオチンのプソラレン誘導体をRNAにリン架橋するなど）によって標識した後、標識ストレプトアビジン（例えば、フィコエリトリン共役ストレプトアビジン）またはその同等物を添加してもよい。

【0152】

蛍光標識プローブを用いる場合、フルオレセイン、リッサミン (lissamine)、フィコエリトリン、ローダミン (Perkin Elmer Cetus)、Cy 2、Cy 3、Cy 3. 5、Cy 5、Cy 5. 5、Cy 7、Fluor X (Amersham) およびその他をはじめ、多くの好適な蛍光団が知られている。例えば、Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, CA (1992) 参照。容易に識別できるように、発光スペクトルの異なる蛍光団対が選択されることが分かるであろう。

【0153】

もう1つの実施形態では、蛍光標識以外の標識が用いられる。例えば、放射活性標識または発光スペクトルの異なる放射活性標識対が使用できる。Zhao et al. , 'High Density cDNA Filter Analysis: A Novel Approach for Large-Scale, Quantitative Analysis of Gene Expression', Gene, Vol. 156, p. 207 (1995); および Pietu et al. , 'Novel Gene Transcripts Preferentially Expressed in Human Muscles Revealed by Quantitative Hybridization of a High Density cDNA Array', Genome Res. , Vol. 6, p. 492 (1996) 参照。しかし、放射活性粒子の散在性と、その結果として広い空間の結合部位が必要なことから、放射性同位元素の使用はあまり好ましい実施形態とは言えない。

【0154】

一実施形態では、標識cDNAは、0. 5 mM dGTP、dATPおよびdCTP、ならびに0. 1 mM dTTP、ならびに蛍光デオキシリボヌクレオチド（例えば、0. 1 mM ローダミン 110 UTP (Perkin Elmer Cetus) または0. 1 mM Cy 3 dUTP (Amersham)）を含有する混合物を逆転写酵素（例えば、(商標) II, LTI Inc.）とともに42℃で60分間をインキュベートすることにより合成される。

【0155】

マイクロアレイへのハイブリダイゼーション

核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、プローブが特定のアレイ部位に「特異的に結合する」または「特異的にハイブリダイズする」、すなわち、プローブが相補的な

10

20

30

40

50

核酸配列を有する配列アレイ部位とハイブリダイズする、二重らせんを形成する、または結合するが、非相補的核酸配列を有する部位とはハイブリダイズしないように選択される。本明細書において、あるポリヌクレオチド配列は別のものと、短い方のポリヌクレオチドが25塩基以下であれば、標準的な塩基対形成法則を用いて誤対合がないか、または短い方のポリヌクレオチドが25塩基よりも長ければ、誤対合は5%だけという場合に、相補的であるとみなされる。ポリヌクレオチドは完全に相補的である（誤対合がない）のが好ましい。特異的なハイブリダイゼーション条件は、陰性対照を含むハイブリダイゼーションアッセイを行うことにより、特異的なハイブリダイゼーションを生じることが容易に証明することができる。例えば、Shalon et al. , 前掲;およびChee et al. , 前掲参照。

10

【0156】

最適なハイブリダイゼーション条件は、標的プローブと固定化されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さ（例えば、オリゴマーと、200塩基を超えるポリヌクレオチド）およびタイプ（例えば、RNA、DNAおよびPNA）によって異なる。核酸の特異的（すなわち、ストリンジェント）ハイブリダイゼーション条件のための一般的なパラメーターは、出典明示によりあらゆる目的でその全開示内が本明細書の一部とされる、Sambrook et al. , 前掲;およびAusubel et al. , Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987)に記載されている。Schena et al. のcDNAマイクロアレイを用いる場合、典型的なハイブリダイゼーション条件は5×SSCおよび0.2%SDS中、65℃で4時間のハイブリダイゼーション、その後、25℃で低ストリンジェンシー洗浄バッファー（1×SSCおよび0.2%SDS）中、25℃で高ストリンジェンシー洗浄バッファー（0.1×SSCおよび0.2%SDS）中で10分の洗浄というものである。Shena et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p. 10614 (1996) 参照。有用なハイブリダイゼーション条件はまた、例えばTijessen, Hybridization with Nucleic Acid Probes, Elsevier Science, Publishers B. V. and Kricka (1993);および‘Nonisotopic DNA Probe Techniques’, Academic Press, San Diego, CA (1992)により提供される。

20

【0157】

シグナルの検出とデータ解析

蛍光標識プローブを用いる場合、転写物アレイの各部位における蛍光放出を好ましくは共焦レーザー顕微鏡を走査することにより検出できる。一実施形態では、適当な励起直線を用い、用いる2つの蛍光団の各々に関して別々にスキャンを行う、あるいは、用いる蛍光団に特異的な波長で検体照射を可能とするレーザーを使用することができ、この蛍光団からの発光を分析することができる。好ましい一実施形態では、これらのアレイを、コンピューター制御X-Yステージと顕微鏡対物レンズを備えた共焦蛍光スキャナーでスキャンする。蛍光団の一連の励起をマルチライン混合ガスレーザーで行い、発光を波長により分光し、光電子増倍管で検出する。蛍光レーザースキャニング装置はSchena et al. , Genome Res. , Vol. 6, pp. 639-645 (1996) およびそこに挙げられている他の参考文献に記載されている。あるいは、Ferguson et al. , Nature Biotechnol. , Vol. 14, pp. 1681-1684 (1996)に記載されている光ファイバー束を用いて、多数の部位のmRNAの存在量レベルを同時に監視してもよい。

30

40

【0158】

シグナルを記録し、好ましい一実施形態では、コンピューターにより、例えば、12ビットアナログ/デジタルボードを用いて解析する。一実施形態では、スキャンした画像をグラフィックプログラム（例えば、Hijaak Graphics Suite）を用いてデスペckled（despeckled）した後、各部位における各波長における平均ハイブリダイゼーションのスプレッドシートを作成するイメージグリッディングプログラムを用いて解析する。

【0159】

Agilent Technologies GENEARRAY（商標）スキャナーはベンチトップ型の488nmアルゴンイオンレーザに基づく分析装置である。このレーザーは4ミクロン未満のスポッ

50

トサイズに焦点を合わせることができる。この精度により、20ミクロンといった小さなプローブ細胞を含むプローブアレイのスキャンが可能となる。このレーザー光をプローブアレイに集め、蛍光標識ヌクレオチドを励起させる。次に、これを、そのアッセイに用いる色素に対して選択されたフィルターを用いてスキャンする。プローブアレイを移動させることで直行座標におけるスキャンを行う。レーザー照射光はハイブリダイズサンプルに組み込まれている色素分子によって吸収され、それらに蛍光を生じさせる。この蛍光をレンズによって平行化にし、波長分光のためにフィルターに通す。次に、この光を2つ目のレンズにより深度識別のための開口部に集め、その後、高感度光電子増倍管(PMT)により検出する。PMTの出力電流をアナログ/デジタル変換器により電圧読み取り値に変換し、処理されたデータを、その時スキャンしているサンプル点の蛍光強度レベルまたは画素(ピクセル)としてコンピューターに再び送る。スキャンの進行とともに、コンピューターはデータを画像として表示する。さらに、サンプルの発現プロファイルを表す全てのサンプルの蛍光強度レベルをコンピューターで読み取り可能な形式で記録する。

10

【0160】

必要に応じて、そのチャンネルと2つのフルオルの間の「クロストーク」(または重複)に関する、経験的に決定される補正を行ってもよい。転写物アレイ上の任意の特定のハイブリダイゼーション部位について、この2つの蛍光団の発光の比率を算出すればよい。この比率は同族遺伝子の絶対発現レベルには依存しないが、その発現が薬物投与、遺伝子欠損、または他のいずれかの試験事象により有意に調節される遺伝子に有用であり得る。

【0161】

好ましくは、正または負として摂動を同定する他、その摂動の大きさを決定するのが有利である。これは当業者に容易に明らかになる方法により行うことができる。

20

【0162】

転写状態を測定する他の方法

細胞の転写の状態は、当技術分野で公知の他の遺伝子発現技術によって測定してもよい。このような技術のいくつかは、二重制限酵素消化とフェージングプライマーを組み合わせた方法(例えば、Zabeau et al. により1992年9月24日に出願された欧州特許出願0 534 858 A1参照)、または所定のmRNA末端に最も近い部位を有する制限断片を選択する方法(例えば、Prashar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 659-663 (1996)参照)など、電気泳動分析のための、複雑性が限られた制限断片のプールを生産する。他の方法では、複数のcDNAの各々において各cDNAを同定するのに十分な塩基(例えば、20~50塩基)を配列決定すること、または所定のmRNA末端(例えば、Velculescu, Science, Vol. 270, pp. 484-487 (1995)参照)、経路パターンに関連する既知の位置に生成された短いタグ(例えば、9~10塩基)を配列決定することなどにより、cDNAプールを統計学的にサンプリングする。

30

【0163】

他の態様の測定

本発明の種々の実施形態では、薬物応答および経路応答を得るために、翻訳の状態、活性の状態または混合型態様など、転写状態以外の生体状態の態様も測定できる。これらの実施形態の詳細は本節に記載されている。

40

【0164】

翻訳状態の測定

遺伝子によりコードされるタンパク質の発現は、検出可能なように標識されているか、またはその後標識可能なプローブにより検出することができる。通常、プローブは発現タンパク質を認識する抗体である。

【0165】

本明細書において、「抗体」とは、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体およびその抗体フラグメントとタンパク質の結合に十分な生物学的に機能的な抗体フラグメントが含まれる。

【0166】

50

開示されている遺伝子の1つによりコードされるタンパク質に対する抗体の生産のためには、ポリペプチドまたはその一部を注射することにより種々の宿主動物を免疫化すればよい。このような宿主動物としては、限定されるものではないが、いくつか挙げれば、ウサギ、マウスおよびラットが含まれる。宿主種に応じて、限定されるものではないが、フロイントの（完全および不完全）アジュバント；水酸化アルミニウムなどの無機ゲル；リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルション、キーホールリンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性剤；ならびにBCGおよびコリネバクテリウム・パルブム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントをはじめとする種々のアジュバントを用い、免疫応答を増強させてもよい。

10

【0167】

ポリクローナル抗体は、目的遺伝子産物などの抗原、またはその抗原機能的な誘導体で免疫化した動物の血清に由来する異質な抗体分子集団である。ポリクローナル抗体の生産のためには、上記に記載されているものなどの宿主動物を、コードされるタンパク質またはその一部をこれもまた上記に記載されているようなアジュバントを補って注射することにより免疫化できる。

【0168】

モノクローナル抗体（mAb）は特定の抗原に対する均質な抗体集団であり、連続的な細胞培養系による抗体分子の生産をもたらすいずれの技術によって得てもよい。これらのものとしては、限定されるものではないが、Kohler et al., Nature, Vol. 256, pp. 495-497 (1975)；および米国特許第4,376,110号のハイブリドーマ技術；Kosbor et al., Immunol. Today, Vol. 4, p. 72 (1983)；Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, pp. 2026-2030 (1983)のヒトB細胞ハイブリドーマ技術；およびCole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Ther., Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)のEBV-ハイブリドーマ技術が挙げられる。このような抗体はIgG、IgM、IgE、IgA、IgDをはじめとするいずれかの免疫グロブリンクラスおよびそのいずれかのサブクラスであってよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマはin vitroまたはin vivoで培養可能である。in vivoで高力価のmAbが生産できることから、これが現在のところの好ましい生産方法となっている。

20

【0169】

さらに、適当な生物活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子とともに、適当な抗原特異性のマウス抗体分子に由来する遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp. 6851-6855 (1984)；Neuberger et al., Nature, Vol. 312, pp. 604-608 (1984)；およびTakeda et al., Nature, Vol. 314, pp. 452-454 (1985) 参照）を使用することができる。キメラ抗体は、マウスmAbに由来の可変または超可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

30

【0170】

あるいは、単鎖抗体の生産に関して記載されている技術（米国特許第4,946,778号；Bird, Science, Vol. 242, pp. 423-426 (1988)；Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, pp. 5879-5883 (1988)；およびWard et al., Nature, Vol. 334, pp. 544-546 (1989) 参照）を、示唆発現される遺伝子単鎖抗体を産生するために採用することができる。単鎖抗体はFv領域の重鎖および軽鎖フラグメントをアミノ酸橋を介して連結することにより形成され、その結果、単鎖ポリペプチドが生じる。

40

【0171】

より好ましくは、「ヒト化抗体」の生産に有用な技術を、タンパク質、その断片または誘導体に対する抗体を産生するために採用することができる。このような技術は米国特許第5,932,448号；同第5,693,762号；同第5,693,761号；同第

50

5, 585, 089号; 同第5, 530, 101号; 同第5, 569, 825号; 同第5, 625, 126号; 同第5, 633, 425号; 同第5, 789, 650号; 同第5, 661, 016号; および同第5, 770, 429号に開示されている。

【0172】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術により作出できる。例えば、このようなフラグメントとしては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により生産できるF(a b')₂フラグメント、およびF(a b')₂フラグメントのジスルフィド橋を還元することにより作製できるF a bフラグメントが挙げられる。あるいは、所望の特異性を有するモノクローナルF a bフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能とするため、F a b発現ライブラリーを構築してもよい(Huse et al., Science, Vol. 246, pp. 1275-1281 (1989) 参照)。

10

【0173】

次に、既知のタンパク質がそのサンプル内でどの程度発現されるかを、上記の抗体を用いる免疫アッセイ法により決定する。このような免疫アッセイ法としては、限定されるものではないが、ドットブロッキング、ウエスタンブロッキング、競合および非競合タンパク質結合アッセイ、酵素結合免疫吸着検定(ELISA)、免疫組織化学、蛍光活性化セルソルター(FACS)ならびによく用いられ、科学文献や特許文献に広く記載されている他のものが挙げられ、多くは商業的に使用される。

【0174】

検出を容易にするためには、サンドイッチELISAが特に好ましく、いくつか変法が存在し、それらは全て本発明に包含されるものとする。例えば、典型的な前者のアッセイでは、非標識抗体を固相支持体に固定化し、供試サンプルを、好適なインキュベーション時間の後に結合した分子と、抗体-抗原の二元複合体を形成させるに十分な時間接触させる。この時点で、次に、検出可能なシグナルを誘導し得るリポーター分子で標識された第2の抗体を加え、抗体-抗原-標識抗体の三元複合体の形成に十分な時間インキュベートする。反応していない物質を洗い流し、シグナルの観察によって抗原の存在を判定するか、あるいは既知量の抗原を含む対照サンプルと比較することにより定量してもよい。前者のアッセイのバリエーションとしては、結合させた抗体にサンプルおよび抗体の双方を同時に加える同時アッセイ、または標識した抗体と供試サンプルをまず合わせてインキュベートし、表面に結合させた非標識抗体に加える逆アッセイがある。これらの技術は当業者に周知であり、細かいバリエーションの可能性は容易に明らかとなるであろう。本明細書において「サンドイッチアッセイ」とは、基本的な二元配置技術に対する全てのバリエーションを含むものとする。本発明の免疫アッセイにとって制限因子となるのは、標識される抗体が対象とする遺伝子によって発現されるタンパク質に特異的な抗体でなければならないということだけである。

20

30

【0175】

この種のアッセイで最もよく用いられるリポーター分子は酵素、蛍光団または放射核含有分子のいずれかである。酵素免疫アッセイの場合、通常はグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩の手段により、酵素を第二の抗体と共役させる。しかしながら、容易に分かるであろうが、多様な種々の連結技術が存在し、これらは当業者に周知のものである。一般に用いられる酵素としては、とりわけホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、およびアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。特定の酵素とともに用いる基質は通常、対応する酵素によって加水分解された際に検出可能な変色を呈するように選択される。例えば、p-ニトロフェニルホスフェートはアルカリ性ホスファターゼコンジュゲートとともに用いるのに好適であり、過ヨウ素酸塩コンジュゲートの場合には一般に1, 2-フェニレンジアミンまたはトルイジンが用いられる。また、上記に示した発色基質の代わりに蛍光産物を生じる蛍光性基質を用いることもできる。次に、適当な基質を含む溶液をこの三元複合体に加える。基質が第二の抗体に連結された酵素と反応し、定性的な可視シグナルを生じ、これをさらに通常は分光光度法により定量することができ、血清サンプル中に存在するタンパク質の量を評価することができる

40

50

。

【0176】

あるいは、フルオレセインやローダミンのような蛍光化合物を、それらの結合能力を変化させることなく抗体に化学的に結合させることができる。特定の波長の光を照射することにより活性化させると、この蛍光団で標識された抗体は光エネルギーを吸収して分子を励起状態にし、その後、特徴的なより長い波長の光を放出する。この放出は光学顕微鏡で可視的に検出できる特徴的な色として現れる。免疫蛍光およびEIA技術はいずれも当技術分野で十分確立されており、本方法にとって特に好ましい。しかし、放射性同位元素、化学発光または生物発光分子などの他のリポーター分子も使用できる。必要とされる用途に合わせて手順をどのように変更すればよいかは、当業者であれば、容易に明らかとなる

10

。

【0177】

また、翻訳状態の測定はいくつかのさらなる方法に従って行ってもよい。例えば、タンパク質の全ゲノムモニタリング（すなわち「プロテオーム」、Goffeau et al. , 前掲参照）は、結合部位がその細胞ゲノムによってコードされる複数のタンパク質種に特異的な、好ましくはモノクローナル抗体を固定化したものを含むマイクロアレイを構築することにより行うことができる。コードされるタンパク質の実質的画分に対する、または少なくとも、対象とする生物ネットワークモデルを試験または確認するために適切なタンパク質に対する抗体が存在することが好ましい。モノクローナル抗体を作製する方法は周知のものである。例えば、出典明示によりあらゆる目的でその全開示内容が本明細書の一部とされる、Harlow et al. , Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1988) 参照。好ましい一実施形態では、モノクローナル抗体は細胞のゲノム配列に基づいてデザインされた合成ペプチド断片に対して惹起される。このような抗体アレイでは、細胞由来のタンパク質をアレイに接触させ、それらの結合を当技術分野で公知のアッセイを用いてアッセイする。

20

【0178】

あるいは、タンパク質は二次元ゲル電気泳動システムにより分離することもできる。二次元ゲル電気泳動は当技術分野で周知のものであり、一般には一次元等電点電気泳動とその後の二次元SDS-PAGE電気泳動を伴う。例えば、Hames et al. , Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, IRL Press, NY (1990) ; Shevchenko et al. , Proc. Natl Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 1440-1445 (1996) ; Sagliocco et al. , Yeast, Vol. 12, pp. 1519-1533 (1996) ;およびLander, Science, Vol. 274, pp. 536-539 (1996) 参照。得られた電気泳動図は、質量分析技術、ウエスタンブロッティング、およびポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いる免疫ブロット分析、ならびに内部およびN末端マイクロシーケンシングをはじめ、多くの技術により分析することができる。これらの技術を用いれば、薬物に曝された細胞（例えば、酵母）における場合、または例えば特定の遺伝子の欠失もしくは過剰発現により修飾された細胞における場合をはじめ、ある生理条件下で産生される全てのタンパク質の実質的な機能を同定することができる。

30

【0179】

生物学的状態の他の態様に基づく実施形態

40

その時存在する、現在のところmRNAの存在量以外の細胞成分をモニタリングすることはmRNAをモニタリングする際には出くわさない、ある技術的問題が見られるが、本発明の方法を用いれば、細胞機能の特徴に関連するタンパク質の活性が測定できることは当業者に明らかであり、本発明の実施形態はこのような測定に基づき得る。活性の測定は、特徴づけられている特定の活性に対して適当ないずれの機能的、生化学的または物理的手段によって行ってもよい。活性が化学変換を伴う場合、細胞のタンパク質を天然基質と接触させ、変換率を測定することができる。活性が多量体ユニットの会合、例えば活性化DNA結合複合体とDNAとの会合を伴う場合、会合したタンパク質の量、または転写されたmRNAの量など、会合の二次的結果を測定することができる。また、例えば細胞周

50

期も制御の場合など、機能的活性が分かっている場合に限り、その機能の遂行を観測することもできる。しかしながら、分かった、また、測定されたタンパク質活性の変化は、本発明の上記の方法によって分析された応答データとなる。

【0180】

別の非限定的な実施形態では、応答データは細胞の生物学的状態の混合態様からなってもよい。応答データは、例えば、あるmRNAの存在量の変化、あるタンパク質の存在量の変化、およびあるタンパク質活性の変化から構築することができる。

【0181】

応答の予測のためのSNPの使用

SNP

ヒトゲノムにおける配列バリエーションは主としてSNPからなり、残りの配列バリエーションとしては短いタンデムリピート（マイクロサテライトを含む）、長いタンデムリピート（ミニサテライト）ならびにその他の挿入および欠失がある。SNPはヒト集団において2つの択一的塩基が相当な頻度（>1%など）で存在する場所である。SNPは多型の存在によるという点で「対立遺伝子的」であると言え、ある種のいくつかのメンバーはオリジナルの「対立遺伝子」のような非変異配列を有し、一方、その他のメンバーは変異した配列、すなわち変異型または突然変異対立遺伝子を有し得る。最も単純な場合には、ただ1つの変異した配列が存在し、その多型は二対立遺伝子的であると言われる。択一的突然変異が生じると、三対立遺伝子的多型などが生じ得る。SNPはゲノム中に拡散し、遺伝子の機能を変化させるSNPは表現型のバリエーションに直接寄与するものとなり得る。それらの罹患率および拡散性により、SNPはヒト病態に関与する遺伝子を限局化する重要な手段となる可能性がある。例えば、パイロット研究を開示しており、2.3メガ塩基のDNA領域に2,227個のSNPがマッピングされている、Wang et al., Science, Vol. 280, pp. 1077-1082 (1998) 参照。

【0182】

SNPと特定の表現型との関連は、SNPがその表現型の原因であるということを示すものではなく、あるいはSNPがその表現型の原因であるという必要もない。むしろ、このような関連は、そのSNPは表現型の決定因子が存在するゲノム上の位置付近に位置し、従って、これらの決定因子との、ひいては着目する表現型との関連が見出される可能性が高いということだけを示すと考えられる。よって、SNPは「真の」機能的変異体とはLDの関係にあり得る。対立遺伝子的関連としても知られるLDは、ゲノムの2つの異なる場所にある対立遺伝子が期待されたものよりも高い関連である場合に存在する。従って、SNPは、特定の表現型を生じる突然変異とのその近接性のために価値を有するマーカーとして役立ち得る。疾病と関連したSNPはまた、それらが位置する遺伝子の機能に直接的な作用を持ち得る。配列変異体はアミノ酸変化を生じるか、またはエキソン-イントロンスプライシングを変更し、それにより関連タンパク質を直接修飾し得るか、あるいは、調節領域に存在して、メッセンジャーRNA（mRNA）の発現サイクルまたは安定性を変化させ得る。Nowotny, Curr. Opin. Neurobiol., Vol. 11, pp. 637-641 (2001) 参照。

【0183】

一般的なゲノム変異体が疾病の感受性に果たす役割の最もよい例が、APOE ε4対立遺伝子がADに果たす役割である。このε4対立遺伝子はADの存在と、また、疾病発症の初期年齢と高い関連がある。それは研究された多くの集団で見られた強い関連である。St. George-Hyslop et al., Biol. Psychiatry, Vol. 47, pp. 183-199 (2000) 参照。多型バリエーションは卒中および心血管疾患にも（Wu et al., Am. J. Cardiol., Vol. 87, pp. 1361-1366 (2001) 参照）；また、多発性硬化症にも関連づけられている（Oksenberg et al., J. Neuroimmunol., Vol. 113, pp. 171-184 (2001) 参照）。

【0184】

多くの一般疾患を発症するリスク、および薬物に対する個々の応答とこれらの症状の処

置に用いられる薬物の代謝がその基礎にあるゲノムバリエーションに、いずれか1つの変異体の効果は小さいながら、実質的に影響を受けるということがますます明確になりつつある。

【0185】

よって、SNPと臨床表現型との間の関連は、1) そのSNPがその表現型の機能的要因であること、または2) その表現型を生じるゲノム上のSNPの位置の近くに他の突然変異が存在することを示唆する。2つ目の可能性は遺伝の生物学に基づいている。大きなDNA片が遺伝し、互いに近接したマーカーは多くの世代について無関連の個体では組み換えられていない可能性があり、すなわち、これらのマーカーはLDの状態にある。

【0186】

よって、遺伝的連鎖マーカーとしての多型の使用は、特定の形質を担う遺伝子を限局化、同定および特性決定する上で臨床上有用である。特に、このようなマッピング技術は、種々の処置に対する応答をはじめ、種々の疾病または疾患に関連する形質を担う遺伝子の同定を考慮している。

【0187】

SNPの同定および特性決定

一本鎖コンホメーション多型分析、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)によるヘテロ二重らせん分析、直接DNA配列決定およびコンピューター法をはじめ、多くの異なる技術を用いてSNPを同定および特性決定することができる。Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164-172 (2001) 参照。公的データベースにおける豊富な配列情報のおかげで、コンピューターツールを用い、ある遺伝子(cDNAまたはゲノム配列のいずれか)に関して独立に提案された配列をアライニングすることによりin silicoでSNPを同定することができる。実験的に、またin silico法により得られたSNPを比較したところ、SNPfinder (<http://lpgws.nci.nih.gov:82/perl/SNP/SNP.cgi.pl>)に見出せる候補SNPの55%がまた実験的にも発見されたことが示された。Cox et al., Hum. Mutat., Vol. 17, pp. 141-150 (2001) 参照。しかしながら、これらのin silico法は真のSNPの27%が発見できたに過ぎなかった。

【0188】

最も一般的なSNP分類法は現在のところ、ハイブリダイゼーション、プライマー伸張および切断法を含む。これらの方法の各々は適当な検出系と連動しなければならない。検出技術としては蛍光分極(Chan et al., Genome Res., Vol. 9, pp. 492-499 (1999) 参照)、ピロリン酸放出の蛍光測定検出(ピロシーケンシング)(Ahmadiian et al., Anal. Biochem., Vol. 280, pp. 103-110 (2000) 参照)、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく切断アッセイ、DHPLC、および質量分析が挙げられる。Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164-172 (2001); および米国特許第6,300,076 B1号参照。SNPを検出および特性決定するその他の方法としては、米国特許第6,297,018 B1号および同第6,300,063 B1号に記載されているものがある。上記参照文献の開示は出典明示によりその全開示内が本明細書の一部とされる。

【0189】

特に好ましい一実施形態では、多型の検出はいわゆるINVADEER(商標)技術(Third Wave Technologies Inc. から入手可能)の手段により行うことができる。このアッセイでは、上流にある特定の「インベーター」オリゴヌクレオチドと下流にある部分的に重複したプローブと一緒に相補的DNA鋳型と結合した際に特定の構造を形成する。この構造はCleavase酵素により特定の部位において認識および切断され、その結果、プローブオリゴヌクレオチドの5'フラップが放出される。次にこの断片は、反応混合物中に含まれている合成二次標的および二次的蛍光標識シグナルプローブに対して、「インベーター」オリゴヌクレオチドとして働く。この結果、Cleavase酵素によりこの二次的シグナルプローブの特異的切断が起こる。蛍光共鳴エネルギー移動可能な色素分子で標識された、この二次的プローブが切断されると、蛍光シグナルが生じる。Cleav

10

20

30

40

50

ase は重複する DNA 配列またはフラップによって形成される構造に対してストリンジェントな要求を持ち、従って、下流の DNA 鎖上の切断部位のすぐ上流にある単一の塩基対の誤対合を特異的に検出に用いることができる。Ryan et al. , Molecular Diagnosis, Vol. 4, No 2, pp. 135-144 (1999) ; および Lyamichev et al. , Nat. Biotechnol. , Vol. 17, pp. 292-296 (1999) 参照、また、米国特許第 5, 846, 717 号 および同第 6, 001, 567 号も参照（なお、これらの開示は出典明示によりその全開示内容を本明細書の一部とする）。

【0190】

いくつかの実施形態では、組成物は、2 以上の多型部位にあるヌクレオチドの同一性を同時にプロービングするための 2 以上の示差的に標識されたジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含む。また、プライマー組成物は、多型部位を含有する 2 以上の領域の同時のターゲッティングおよび増幅を可能とするため、2 セット以上の対立遺伝子特異的プライマー対を含んでもよいと考えられる。

【0191】

本発明の IL-1 β ジェノタイピングオリゴヌクレオチドはまた、マイクロチップ、ビーズまたはスライドガラスなどの固相表面に固定化してもよいし、あるいはその固相表面で合成してもよい（例えば、WO 98/20020 および WO 98/20019 参照）。このような固定化ジェノタイピングオリゴヌクレオチドは、限定されるものではないが、プローブハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼ伸張アッセイをはじめとする種々の多型検出アッセイで用いてよい。本発明の固定化 IL-1 β ジェノタイピングオリゴヌクレオチドは、複数の遺伝子の多型に関して DNA サンプルを同時に迅速にスクリーニングするようデザインされたオリゴヌクレオチドの整列アレイを含み得る。

【0192】

本発明の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、特定の SNP のただ 1 つのヌクレオチドに相補的な 3' 末端ヌクレオチド、または好ましくは、3' 末端から 2 番目のヌクレオチドを有し、それにより、そのヌクレオチドを含有する対立遺伝子が存在する場合にのみポリメラーゼ媒介伸張のプライマーとして働く。コード鎖または非コード鎖のいずれかにハイブリダイズする対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーが本発明により意図される。IL-1 β 遺伝子多型を検出するための ASO プライマーは当業者に公知の技術を用いて開発できる。

【0193】

本発明の他のジェノタイピングオリゴヌクレオチドは本明細書で同定された新規多型部位の 1 つの 1 ～ 数個ヌクレオチドだけ下流に位置する標的領域とハイブリダイズする。このようなオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の新規多型 1 つを検出するためのポリメラーゼ媒介プライマー伸張法に有用であり、従って、このようなジェノタイピングオリゴヌクレオチドは本明細書では「プライマー伸張オリゴヌクレオチド」と呼ばれる。好ましい一実施形態では、プライマー伸張オリゴヌクレオチドの 3' 末端はその多型部位のすぐ隣に位置するヌクレオチドと相補的なデオキシヌクレオチドである。

【0194】

もう 1 つの実施形態では、本発明は個別の容器にパッケージングされた少なくとも 2 つのジェノタイピングオリゴヌクレオチドを含むキットを提供する。このキットはまた、個別の容器にパッケージングされたハイブリダイゼーションバッファー（ここで、これらのオリゴヌクレオチドはプローブとして使用される）などの他の成分を含んでもよい。あるいは、オリゴヌクレオチドが標的領域の増幅のために使用される場合、このキットは個別の容器にパッケージングされたポリメラーゼ、および PCR など、ポリメラーゼによって媒介されるプライマー伸張のために最適化された反応バッファーを含み得る。上記のオリゴヌクレオチド組成物およびキットは個体において IL-1 β 遺伝子をジェノタイピングおよび／またはハプロタイピングするための方法に有用である。

【0195】

ジェノタイピング法の一実施形態は、個体から、その個体に存在している 2 コピーの I

10

20

30

40

50

IL-1 β 遺伝子またはその断片を含む核酸混合物を単離すること、およびその 2 コピーの多型部位の 1 以上におけるヌクレオチド対の同一性を判定し、その個体に IL-1 β 遺伝子型を割り付けることを含む。当業者ならば容易に理解できるように、個体におけるこの 2 「コピー」の遺伝子は同じ対立遺伝子であってもよいし、異なる対立遺伝子であってもよい。特に好ましい一実施形態では、このジェノタイピング法は各多型部位のヌクレオチド対の同一性を判定することを含む。

【0196】

一般には、核酸混合物またはタンパク質は血液サンプルまたは組織サンプルなど、個体から採取した生体サンプルから単離される。好適な組織サンプルとしては、全血、血清、精液、唾液、涙、尿、糞便材料、汗、頬側塗抹、皮膚、ならびに筋肉または神経組織および毛髪などの特定器官の組織の生検が挙げられる。核酸混合物はゲノム DNA、mRNA または cDNA からなってもよく、後者 2 つの場合では、生体サンプルは IL-1 β 遺伝子が発現される器官から得なければならない。さらに、当業者ならば、イントロン、5' および 3' 非転写領域またはプロモーター領域に位置する多型を検出するためには mRNA または cDNA 調製物は使用されないことが分かるであろう。IL-1 β 遺伝子断片が単離される場合には、それはジェノタイピングされる多型部位を含んでいなければならない。

【0197】

ハプロタイピング法の一実施形態は、個体から、その個体に存在する 2 コピーのうち一方の IL-1 β 遺伝子またはその断片を含む核酸分子を単離すること、およびそのコピーの 1 以上の多型部位におけるヌクレオチドの同一性を判定し、その個体に IL-1 β ハプロタイプを割り付けることを含む。この核酸は、限定されるものではないが、IL-1 β イソ遺伝子を調製するための上記方法の 1 つ（ターゲティング in vivo クローニングが好ましいアプローチである）をはじめ、2 コピーの IL-1 β 遺伝子または断片を分離することができるいずれの方法を用いて単離してもよい。

【0198】

当業者ならば容易に分かるように、個々のクローンはいずれも個体に存在している 2 コピーのうち一方の IL-1 β 遺伝子に関するハプロタイプ情報をもたらすに過ぎない。個体のもう一方のコピーについてもハプロタイプ情報が望まれる場合には、さらなる IL-1 β クローンを調べる必要がある。一般には、ある個体の両コピーの IL-1 β 遺伝子を 90% を超える確率でハプロタイピングするには少なくとも 5 つのクローンを調べなければならない。特に好ましい一実施形態では、各多型部位におけるヌクレオチドが同定される。

【0199】

好ましい一実施形態では、ある個体に関する IL-1 β ハプロタイプ対が、その個体に存在している各コピーの IL-1 β 遺伝子の 1 以上の多型部位における位相ヌクレオチド配列を同定することにより判定される。特に好ましい一実施形態では、このハプロタイピング法は IL-1 β 遺伝子の各コピーの各多型部位における位相ヌクレオチド配列を同定することを含む。両コピーの遺伝子をハプロタイピングする場合は、その同定ステップは個別の容器に入れられた遺伝子の各コピーで行うのが好ましい。しかしながら、これら 2 コピーが異なるタグで標識されているか、またはそうでなければ個別に識別可能か同定可能であれば、同じ容器でこの方法を行うことができるということも考えられる。例えば、この遺伝子の第 1 および第 2 のコピーがそれぞれ異なる第 1 および第 2 の蛍光色素で標識され、かつ、多型部位をアッセイするために対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドがさらに第 3 の異なる蛍光色素で標識されるならば、第 1 の色素と第 3 の色素の組み合わせが検出されると第 1 の遺伝子コピーの多型が同定され、一方、第 2 の色素と第 3 の色素の組み合わせが検出されると第 2 の遺伝子コピーの多型が同定される。

【0200】

ジェノタイピング法およびハプロタイピング法の双方では、多型部位のヌクレオチド（またはヌクレオチド対）の同一性を、一方または両方のコピーの IL-1 β 遺伝子または

その断片から直接多型部位を含む標的領域を増幅することにより判定でき、その増幅領域の配列は常法により判定される。当業者ならば、多型部位において同系接合性である個体ではその部位において同じヌクレオチドが2回検出され、一方、その部位において異系接合性である個体であれば、2つの異なるヌクレオチドが検出されることが容易に分かるであろう。この多型はポジティブ型として知られるように直接同定してもよいし、あるいは、ネガティブ型同定と呼ばれる推論によって同定してもよい。例えば、参照集団においてSNPがグアニンとシトシンであることが分かっている場合、部位は、その部位において同系接合性である全ての個体ではグアニンまたはシトシンのいずれかであること、あるいはその部位において異系接合性である個体ならばグアニンとシトシンの両者であることがポジティブに判定できる。あるいは、その部位は、グアニンではない（従ってシトシン／シトシン）またはシトシンではない（従ってグアニン／グアニン）ものとネガティブに判定できる。

10

【0201】

さらに、本明細書に記載の新規多型部位のいずれかに存在する対立遺伝子の同一性は、対象とする多型部位と連鎖不平衡にある、本明細書に開示されていない多型部位をジェノタイピングすることにより間接的に判定することができる。ある部位における特定の変異体の存在が第2の部位における別の変異体の予測性を高める場合、その2つの部位は連鎖不平衡状態にあると言われる。Stevens, Mol. Diag., Vol. 4, pp. 309-317 (1999) 参照。これまでに開示されている多型部位と連鎖不平衡にある多型部位はその遺伝子の領域内に位置するか、または本明細書では検討されていない他のゲノム内に位置する可能性がある。本明細書に記載の新規多型部位と連鎖不平衡にある多型部位のジェノタイピングは、限定されるものではないが、多型部位の対立遺伝子の同一性を検出するための上述の方法のいずれかにより行えばよい。

20

【0202】

標的領域は、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（米国特許第4,965,188号参照）、リガーゼ連鎖反応（Barany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 189-193 (1991); およびWO90/01069参照）、およびオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイをはじめとするいずれのオリゴヌクレオチド指定増幅法を用いて増幅してもよい。Landegren et al., Science, Vol. 241, pp. 1077-1080 (1988) 参照。このような方法でプライマーまたはプローブとして有用なオリゴヌクレオチドはその多型部位を含む、またはその多型部位に隣接する核酸の領域と特異的にハイブリダイズしなければならない。一般には、これらのオリゴヌクレオチドは10～35の間のヌクレオチド長、好ましくは15～30の間のヌクレオチド長である。最も好ましくは、これらのオリゴヌクレオチドは20～25ヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチドの正確な長さは当業者が通常考慮および実践する多くの因子によって異なる。

30

【0203】

標的領域を増幅するためには、転写に基づく増幅型（米国特許第5,130,238号および同第5,169,766号；EP329,822；およびWO89/06700参照）および等温法をはじめとする他の公知の核酸増幅手順を用いてよい。Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 392-396 (1992) 参照。

40

【0204】

標的領域における多型はまた、当技術分野で公知のハイブリダイゼーションに基づくいくつかの方法の1つを用いて増幅の前または後にアッセイしてもよい。一般には、このような方法を行う上で、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドが用いられる。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは示差的に標識されたプローブ対として使用でき、その対の一方のメンバーは標的配列の1つに完全な適合を示し、他方のメンバーは異なる変異体に完全な適合を示す。いくつかの実施形態では、1を超える多型部位が対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドセットまたはオリゴヌクレオチド対を用いて一度に検出され得る。好ましくは、このセットのメンバーは、検出される多型部位の各々とハイブリダイズする場合、互

50

いの融点は 5℃以内、より好ましくは、2℃以内である。

【0205】

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの、標的ポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションは両存在とも液相で行ってもよく、またはこのようなハイブリダイゼーションはオリゴヌクレオチドか標的ポリヌクレオチドのいずれかが固相支持体に共有結合または非共有結合されている場合に行える。結合は例えば抗体-抗原相互作用、ポリ-L-Lys、ストレプトアビジンまたはアビジン-ビオチン、塩橋、疎水性相互作用、化学結合、UV 架橋焼付などにより媒介することができる。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは固相支持体上で直接合成してもよいし、あるいは合成した後に固相支持体に結合させてもよい。本発明の検出方法に用いるのに好適な固相支持体としては、ケイ素、ガラス、プラスチック、ペーパーなどからなる支持体が挙げられ、これは例えばウェル（96ウェルプレートなど）、スライド、シート、メンブラン、ファイバー、チップ、ディッシュおよびビーズに形成すればよい。この固相支持体は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたは標的核酸の固定化を助けるために処理、コーティングまたは誘導体化してもよい。

10

【0206】

ある個体の IL-1β 遺伝子の遺伝子型またはハプロタイプは、遺伝子の一方または両方のコピーを含む核酸サンプルを、WO 95/11995 に記載されているもののような核酸アレイまたはサブアレイにハイブリダイズさせることにより判定してもよい。これらのアレイは遺伝子型またはハプロタイプに含まれる多型の各々を表す対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのバッテリーを含む。

20

【0207】

多型が何であるかはまた、限定されるものではないが、リボプローブを用いる RNアーゼ保護法 (Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 7575 (1985)); および Meyers et al., Science, Vol. 230, p. 1242 (1985) 参照) および大腸菌 mutant タンパク質など、ヌクレオチドの誤対合を認識するタンパク質 (Modrich, Ann. Rev. Genet., Vol. 25, pp. 229-253 (1991) 参照) をはじめとする誤対合検出技術を用いて判定してもよい。あるいは、変異体対立遺伝子は一本鎖コンホメーション多型 (SSCP) 分析 (Orita et al., Genomics, Vol. 5, pp. 874-879 (1989)); および Humphries et al., Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Elles, Ed., p. 321-340 (1996) 参照)、または変性勾配ゲル電気泳動 (Wartell et al., Nucl. Acids Res., Vol. 18, pp. 2699-2706 (1990)); および Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 232-236 (1989) 参照) により同定することができる。

30

【0208】

多型を同定するには、ポリメラーゼ媒介プライマー伸張法を用いてもよい。このような方法のいくつかは特許および科学文献に記載されており、「Genetic Bit Analysis」法 (WO 92/15712) およびリガーゼ/ポリメラーゼ媒介 Genetic Bit Analysis (米国特許第 5,679,524 号参照) が挙げられる。関連の方法が WO 91/02087、WO 90/09455、WO 95/17676、米国特許第 5,302,509 号および同第 5,945,283 号に記載されている。伸張された、多型を含むプライマーは質量分析に検出すればよい。米国特許第 5,605,798 号参照。別のプライマー伸張法として、対立遺伝子特異的 PCR がある。Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 17, p. 8392 (1989); Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 19, pp. 6877-6882 (1991); WO 93/22456; および Turki et al., J. Clin. Invest., Vol. 95, pp. 1635-1641 (1995) 参照。さらに、対立遺伝子特異的プライマーを用いてその核酸の複数の領域を同時に増幅することにより、複数の多型部位を検討することもできる。Wallace et al. (WO 89/10414) 参照。

40

【0209】

好ましい実施形態では、各民族地理学的群に関するハプロタイプ頻度データを調べ、それが HWE と一致するかどうかを判定する。HWE (Hartl et al., Principles of Po

50

pulation Genomics, Sinauer Associates, 3rd Edition, Sunderland, MA (1997) 参照) は、ハプロタイプ対 H_1/H_2 の発見頻度が、 $H_1 \neq H_2$ であるときは $P_{H-W}(H_1/H_2) = 2p(H_1)p(H_2)$ に等しく、 $H_1 = H_2$ のときには $P_{H-W}(H_1/H_2) = p(H_1)p(H_2)$ に等しいと仮定する。観測されるハプロタイプ頻度と期待されるハプロタイプ頻度の間の統計学的に有意な差はその集団群内の著しい同系交配、その遺伝子に対する強い選択圧、サンプリングの偏りおよび/またはジェノタイピングプロセスの誤差をはじめとする1以上の因子によるものであり得る。民族地理学的群でHWEからの大きな偏差が見られる場合、その偏差がサンプリングの偏りによるものかどうかを知るためにその群の個体数を増やすことができる。もし、サンプルサイズを大きくしても観測されるハプロタイプ対頻度と期待されるハプロタイプ頻度対の間の差が小さくならなければ、例えばCLASPER System (商標) 技術 (米国特許第5, 866, 404号)、SMDまたは対立遺伝子特異的広領域PCR (Michalotos-Beloin et al., Nucl. Acids Res., Vol. 24, pp. 4841-4843 (1996) 参照) などの直接的なハプロタイピング法を用いて個体をハプロタイピングすることを考えたいであろう。

10

【0210】

IL-1 β ハプロタイプ対を予測するための本方法の一実施形態では、割り付けステップは以下の分析を行うことを含む。まず、可能性のある各ハプロタイプ対を、参照集団のハプロタイプ対と比較する。一般に、参照集団のハプロタイプ対の1つが可能性のあるハプロタイプ対と適合し、その対が個体に割り付けられる。場合によっては、参照ハプロタイプ対に表されているただ1つのハプロタイプが、ある個体の可能性のあるハプロタイプ対と一致することがあり、このような場合、その個体はこの既知のハプロタイプと、可能性のあるハプロタイプ対から既知のハプロタイプを差し引くことによって得られる新規ハプロタイプを含むハプロタイプに割り付けられる。まれな場合、参照集団に可能性のあるハプロタイプ対と一致するハプロタイプがないか、あるいはまた、複数の参照ハプロタイプ対が可能性のあるハプロタイプ対と一致する。このような場合、例えば、CLASPER System (商標) 技術 (米国特許第5, 866, 404号)、SMDまたは対立遺伝子特異的広領域PCR (Michalotos-Beloin et al., 前掲参照) などの直接分子を用いて個体をハプロタイピングするのが好ましい。

20

【0211】

mRNAの存在量または活性を修飾する方法

30

本発明の種々の実施形態は、発現されるmRNAの存在量または活性の変更または修飾が臨床上有益な効果をもたらす。RNAの存在量および活性を修飾する方法は現在のところ、リボザイム、アンチセンス種、二本鎖RNAおよびRNAアプタマーの4つのクラスに属する。Good et al., Gene Ther., Vol. 4, pp. 45-54 (1997) 参照。制御可能なこれらのものの適用または細胞曝露は、mRNAの存在量および活性 (その、活性な、または検出可能な遺伝子発現産物、すなわち、タンパク質への翻訳を含む) をはじめとするRNA存在量の制御可能な摂動を可能とする。

【0212】

リボザイム

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼと同様の様式で他の一本鎖RNAを特異的に切断するRNA分子である。リボザイムはRNA切断反応を触媒することができる。Cech, Science, Vol. 236, pp. 1532-1539 (1987); PCT国際公開公報WO 90/11364 (1990); and Sarver et al., Science, Vol. 247, pp. 1222-1225 (1990) 参照。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列を修飾することにより、リボザイムを分子内の特定のヌクレオチド配列を認識し、それを切断するように合成することができる。例えば、Cech, Amer. Med. Assn., Vol. 260, pp. 3030 (1988) 参照。よって、特定の配列を含むmRNAだけが切断され、不活性化される。

40

【0213】

2つの基本的なタイプのリボザイムとして、例えばRossie et al., Pharmacol. Ther., Vol. 50, pp. 245-254 (1991) に記載されているような「ハンマーヘッド」型と

50

、例えばHampel et al. , Nucl. Acids Res. , Vol. 18, pp. 299-304 (1999) および米国特許第 5, 254, 678 号に記載されているような「ヘアピン」リボザイムがある。ヘアピンおよびハンマーヘッド R N A リボザイムは特定の標的 m R N A を特異的に切断するようにデザインすることができる。リボザイム活性を有する短い R N A 分子をデザインするための規則が確立されており、それらは他の R N A 分子を特異性の高い方法で切断することができ、事実上全ての種の R N A をターゲッティングできる。Haseloff et al. , Nature, Vol. 334, pp. 585-591 (1988) ; Koizumi et al. , FEBS Lett. , Vol. 228, pp. 228-230 (1988) ; および Koizumi et al. , FEBS Lett. , Vol. 239, pp. 285-288 (1988) 参照。

【0214】

10

リボザイム法は細胞を曝露し、細胞内などでこのような小さな R N A リボザイム分子の発現を誘導することを含む。Grassi et al. , Ann. Med. , Vol. 28, pp. 499-510 (1996) ; Gibson, Cancer and Metastasis Rev. , Vol. 15, pp. 287-299 (1996) 参照。開示されている少なくとも 1 つの遺伝子に対応する m R N A ヘターゲッティングされたハンマーヘッドおよびヘアピンリボザイムの細胞内発現を利用して、その遺伝子によりコードされているタンパク質を阻害することができる。

【0215】

リボザイムは、リボザイム配列を組み込んだ R N A オリゴヌクレオチドの形態で直接細胞に送達することもできるし、あるいは、目的のリボザイム R N A をコードする発現ベクターとして細胞に導入することもできる。リボザイムは通常、m R N A を切断して、それにより細胞内の m R N A の存在量を修飾する上で触媒上有効となるよう十分な数で発現させることができる。Cotten et al. , ' Ribozyme Mediated Destruction of R N A In Vivo ' , EMBO J. , Vol. 8, pp. 3861-3866 (1989) 参照。特に、これまでの規則に従ってデザインし、例えば標準的なホスホルアミダイト化学により合成されたリボザイムコード D N A 配列はアンチコドンシステムの制限酵素部位と、t R N A をコードする遺伝子のループに連結することができ、次にこれを当業者に通常の方法により目的の細胞へ形質転換し、そこで発現させることができる。好ましくは誘導プロモーター（例えば、グルココルチコイドまたはテトラサイクリン応答エレメント）もまたこの構築物に導入すれば、リボザイム発現を選択的に制御することができる。飽和的に使用するためには、高く、かつ、構成的な活性のプロモーターを使用することができる。t D N A 遺伝子（すなわち、t R N A をコードする遺伝子）は、それらのサイズが小さく、転写率が高く、また、異なる種類の組織で偏在発現することから本適用に有用である。

20

30

【0216】

従って、リボザイムは通常、事実上 m R N A 配列を切断するようにもデザインすることができ、細胞をこのようなリボザイム配列をコードする D N A で形質転換することができ、これにより、制御可能で触媒的に有効な量のリボザイムが発現される。よって、細胞内のいずれの R N A 種の存在量でも修飾または摂動させることができる。

【0217】

リボザイム配列は本質的にアンチセンスヌクレオチドに関して記載されたものと同様の方法で修飾することができ、例えば、リボザイム配列は修飾された塩基部分を含み得る。

40

【0218】

アンチセンス分子

もう 1 つの実施形態では、標的 R N A （好ましくは、m R N A ）種の活性、特にその翻訳率はアンチセンス核酸の制御可能な適用によって制御可能なように阻害することができる。高レベルで適用すれば飽和型の阻害が得られる。本明細書において「アンチセンス核酸」とは、コード領域および／または非コード領域に双方向的にくつかの配列のために、標的 R N A の配列特異的な（例えば、非ポリ A ）一部、例えばその翻訳開始領域とハイブリダイズすることができる核酸をさす。本発明のアンチセンス核酸は二本鎖または一本鎖 R N A もしくは R N A またはその修飾物もしくは誘導体であるオリゴヌクレオチドであってよく、これらは制御可能な方法で直接細胞に投与することができるか、または標的 R N

50

Aの翻訳を摂動するに十分な制御可能な量で外因的に導入された配列を転写させることにより細胞内で生産することができる。

【0219】

好ましくは、アンチセンス核酸は少なくとも6個のヌクレオチドからなり、好ましくは、オリゴヌクレオチド(6個のオリゴヌクレオチド~約200個のオリゴヌクレオチド)である。特定の態様では、このオリゴヌクレオチドは少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも100個のヌクレオチドまたは少なくとも200個のヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドはDNAもしくはRNA、またはそのキメラ混合物もしくは誘導体もしくは修飾型であり、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。このオリゴヌクレオチドは塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で修飾することができる。このオリゴヌクレオチドはペプチド、または細胞膜を通過する輸送を助ける薬剤(例えば、Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pp. 648-652 (1987); およびPCT国際公開公報WO 88/09810 (1988) 参照)、ハイブリダイゼーション誘発切断剤(例えば、Krol et al., Biotechnol. Tech., Vol. 6, pp. 958-976 (1988) 参照)またはインターカレート剤(例えば、Zon, Pharmacol. Res., Vol. 5, pp. 539-549 (1988) 参照)など、他の付加基を含んでもよい。

10

【0220】

本発明の好ましい一態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは好ましくは一本鎖DNAとして提供される。このオリゴヌクレオチド通常当技術分野で公知の構成要素で、その構造のいずれの位置で修飾してもよい。

20

【0221】

典型的なアンチセンスアプローチとしては、コードされる遺伝子のmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)の調製を含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドはコードされる遺伝子のmRNAとハイブリダイズし、翻訳を妨げる。アンチセンスヌクレオチド配列の、目的の遺伝子とハイブリダイズする能力はそのアンチセンスヌクレオチド配列の相補性の程度と長さによって異なる。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長くなるほど、それが含み得るRNAとの塩基の誤対合が増えて、なお、安定な二重らせんまたは三重らせんを形成する。当業者ならば、ハイブリダイズした複合体の融点を求めるための常法を用いることで、誤対合の許容度を決定することができる。

30

【0222】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは好ましくはそのmRNAの5'末端、例えば、mRNAの開始部位、すなわちAUGに相補的な領域に及ぶ(該領域を含む)非翻訳配列と相補的となるようにデザインする。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列も、mRNAの翻訳を阻害するのに有効であることが示されている。例えば、Wagner, Nature, Vol. 372, p. 333 (1994) 参照。アンチセンスオリゴヌクレオチドはmRNAコード領域に相補的となるようにデザインすることもできるが、このようなオリゴヌクレオチドはあまり有効な翻訳阻害剤ではない。

【0223】

40

これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの修飾塩基部分を含み、限定されるものではないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5

50

ーメトキシウラシル、2-メチルチオーN6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)wおよび2, 6-ジアミノプリンからなる群から選択される。

【0224】

もう1つの実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、限定されるものではないが、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロースおよびヘキソースからなる群から選択される少なくとも1つの修飾糖部分を含む。

【0225】

なおもう1つの実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミドチオエート、ホスホルアミダート、ホスホルジアミダート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステルおよびホルムアセタール、またはその類似体からなる群から選択される少なくとも1つの修飾されたリン酸骨格を含む。

【0226】

なおもう1つの実施形態では、このオリゴヌクレオチドは2'-アノマーオリゴヌクレオチドである。a'-アノマーオリゴヌクレオチドは、通常のBユニットとは対照的に、鎖が互いに平行に走っている相補的RNAとの特異的二本鎖ハイブリッドを形成する。Ga
utier et al. , Nucl. Acids Res. , Vol. 15, pp. 6625-6641 (1987) 参照。

【0227】

このオリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤などと共役させてもよい。

【0228】

本発明のアンチセンス核酸は標的RNA種の少なくとも一部に相補的な配列を含む。しかしながら、絶対的な相補性は好ましいが、必ずしも必要ではない。本明細書に言及される「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列とは、RNAとハイブリダイズして安定な二重らせんを形成し得るに十分な相補性を有する配列を意味し、二本鎖アンチセンス核酸の場合、二重らせんRNAのうちの一本の鎖を試験してもよく、あるいは、三重らせんの形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズ能はアンチセンス核酸の相補性の程度と長さの双方によって異なる。一般に、ハイブリダイズする核酸が長くなるほど、それが含み得る標的RNAとの塩基の誤対合が増えて、なお、安定な二重らせん（または場合によっては三重らせん）を形成する。当業者ならば、ハイブリダイズした複合体の融点を求めるための常法を用いることで、誤対合の許容度を確認することができる。標的RNAの翻訳の阻害に有効なアンチセンス核酸の量は標準的なアッセイ技術により決定することができる。

【0229】

本発明のオリゴヌクレオチドは当技術分野で公知の標準法、例えば、Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販されているものなどの自動DNAシンセサイザーを用いることで合成することができる。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドはStein
et al. , Nucl. Acids Res. , Vol. 16, p. 3209 (1988) の方法により合成することができ、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドはCPG (controlled pore glass) 高分子支持体 (Sarin et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, pp. 7448-7451 (1988) 参照) などの使用により調製することができる。もう1つの実施形態では、オリゴヌクレオチドは2'-O-メチルリボヌクレオチド (Inoue et al. , Nucl. Acids Res. , Vol. 15, pp. 6131-6148 (1987) 参照) またはキメラRNA-DNA類似体 (Inoue et al. , FEBS Lett. , Vol. 215, pp. 327-330 (1987) 参照) である。

【0230】

合成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、次に、制御された、または飽和型の様

式で細胞に投与することができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドはそれらが細胞に取り込まれるように制御されたレベルで細胞の増殖環境中に置くことができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの取り込みは当技術分野で周知の方法を用いることで補助することができる。

【0231】

宿主細胞へ導入する場合、アンチセンスヌクレオチド配列はその遺伝子に対応する細胞 mRNA および／またはゲノム DNA と特異的にハイブリダイズし、その結果、例えば細胞内で転写および／または翻訳を阻害することにより、コードされているタンパク質の発現を阻害する。

【0232】

アンチセンスヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子は、例えば、細胞内で転写された際にコードされているその遺伝子の mRNA の少なくともユニークな部分に相補的な RNA を産生する発現ベクターとして送達することができる。あるいは、アンチセンスヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子は、ex vivo で調製され、細胞に導入された際に、その遺伝子の mRNA および／またはゲノム配列とハイブリダイズすることによりコードされているタンパク質の発現の阻害をもたらすオリゴヌクレオチドプローブである。

【0233】

好ましくは、このオリゴヌクレオチドは人工ヌクレオチド間結合を含み、これによりそのアンチセンス分子はエキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼ耐性となり、従って、細胞内で安定となる。アンチセンスヌクレオチド配列として用いられる修飾核酸分子の例としては、DNA のホスホルアミダート、ホスホロチオエートおよびメチルホスホネート類似体がある。例えば、米国特許第 5, 176, 996 号；同第 5, 264, 564 号；および同第 5, 256, 775 号参照。アンチセンス療法において有用なオリゴマーを調製する一般的なアプローチ。例えば、Van der Krol, , Biotechnol. Tech. , Vol. 6, pp. 958-976 (1988) ; および Stein et al. , Cancer Res. , Vol. 48, pp. 2659-2668 (1988) 参照。

【0234】

細胞内発現されるアンチセンス分子

上述のように、アンチセンスヌクレオチドは種々の技術により、IL1 β 遺伝子を in vivo 発現する細胞に送達することができる。しかしながら、内因性 mRNA の翻訳を阻害するのに十分な細胞内濃度を得るのが難しい場合もある。よって、もう 1 つの実施形態では、アンチセンスヌクレオチド配列を含む核酸をプロモーター、すなわち、発現構築物を形成するために特定の遺伝子の転写を開始するのに必要な DNA 配列の転写制御下に置く。本発明のアンチセンス核酸は外因性の配列からの転写により細胞内で制御可能に発現される。発現が高レベルで制御されれば、飽和型の摂動または修飾が得られる。例えば、ベクターは in vivo 導入可能であり、その結果、ベクターは細胞に取り込まれ、その細胞内でベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸 (RNA) が産生される。このようなベクターはアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、転写されて目的のアンチセンス RNA を産生する限り、エピソームとして留まることもできるし、あるいは染色体に組み込むこともできる。このようなベクターは当技術分野で標準的な組み換え DNA 技術の方法により構築することができる。ベクターはプラスミド、ウイルス、または哺乳類細胞での複製および発現に用いられる当技術分野で公知の他のものであってもよい。アンチセンス RNA をコードする配列の発現は、対象となる細胞において当技術分野で公知のいずれのプロモーターによるものであってもよい。このようなプロモーターは誘導型であっても構成型であってもよい。最も好ましくは、プロモーターは制御可能で、アンチセンスオリゴヌクレオチドの制御された発現を達成するために外因性部分の投与により誘導可能なものである。このような制御可能なプロモーターとしては、Tet プロモーターがある。哺乳類細胞用として使用可能な他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、SV40 初期プロモーター領域 (Bernoist and Chambon, Nature, Vol. 290, pp. 304-310 (1981) 参照)、ラウス肉腫ウイルスの長い 3

10

20

30

40

50

’末端リピートに含まれているプロモーター (Yamamoto et al. , Cell, Vol. 22, pp. 787-797 (1980) 参照)、ヘルペスチミジンキナーゼ プロモーター (Wagner et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, pp. 1441-1445 (1981) 参照)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al. , Nature, Vol. 296, pp. 39-42 (1982) 参照) が挙げられる。

【0235】

このように、アンチセンス核酸は事実上いずれの mRNA 配列をターゲティングするようにも通常デザインでき、通常、細胞をこのようなアンチセンス配列をコードする核酸で形質転換するか、細胞を曝すかでき、その結果、有効かつ制御可能な、または飽和量のアンチセンス核酸が発現される。よって、細胞内での事実上いずれの種の RNA の翻訳も修飾または摂動することができる。

10

【0236】

二本鎖 RNA

また、開示されている遺伝子のうち少なくとも 1 つに対応する二本鎖 RNA、すなわち、センサーアンチセンス RNA を利用して、開示されている遺伝子のうち少なくとも 1 つの発現を妨げることもできる。二本鎖 RNA による内因性遺伝子の機能および発現の妨害は C. エレガンス (C. elegans) などの種々の生物で示されている。例えば、Fire et al. , Nature, Vol. 391, pp. 806-811 (1998) 参照。

【0237】

RNA アプタマー

最後に、さらなる実施形態では、RNA アプタマーを細胞に導入または細胞で発現させることができる。RNA アプタマーは、翻訳を特異的に阻害することができる Tat および Rev RNA (Good et al. , Gene Ther. , Vol. 4, pp. 45-54 (1997) 参照) などのタンパク質の特異的 RNA リガンドである。

20

【0238】

発現タンパク質の存在量または活性の修飾方法

タンパク質の存在量を修飾する方法、とりわけ、タンパク質分解速度を変更するもの、および抗体 (天然標的タンパク質種の活性の存在量に影響を及ぼすタンパク質と結合する) が挙げられる。タンパク質活性を直接修飾する方法としては、とりわけ、抗体、ドミナントネガティブ突然変異、特定の薬物または化学部分の使用が挙げられる。

30

【0239】

タンパク質種の分解速度が上昇 (または低下) すると、その種の存在量が低下 (または増加) する。本発明では、高温および/または当技術分野で公知の特定の薬物への曝露に応じて標的タンパク質の分解速度を高める方法を使用できる。例えば、このような方法 1 つでは、熱誘導性または薬物誘導性 N 末端デグロン (degron) を用いるが、これは高温 (例えば 37°C) で急速なタンパク質分解を促進する分解シグナルを露出し、低温 (例えば 23°C) では隠されて急速分解を妨げる N 末端タンパク質断片である。Dohmen et al. , Science, Vol. 263, pp. 1273-1276 (1994) 参照。このようなデグロンの例としては、N 末端の Val が Arg で置換され、66 番の Pro が Leu で置換されているマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ変異体、Arg-DHFR^{ts} がある。この方法によれば、例えば標的タンパク質 P の遺伝子は当技術分野で公知の標準的な遺伝子ターゲティング法 (Lodish et al. , Molecular Biology of the Cell, W. H. Freeman and Co. , NY (1995)、特に第 8 節参照) により、融合タンパク質 Ub-Arg-DHFR^{ts}-P (「Ub」はユビキチンを表す) をコードする遺伝子で置換されている。この N 末端ユビキチンは翻訳された後に急速に切断されて N 末端デグロンを露出する。低温では、Arg-DHFR^{ts} の内部にあるリジンは露出されておらず、融合タンパク質のユビキチン化は起こらず、分解は遅く、活性のある標的タンパク質レベルは高くなる。高温 (メトトレキサート不在) では、Arg-DHFR^{ts} の内部にあるリジンは露出され、融合タンパク質のユビキチン化が起こり、分解は急速で、活性のある標的タンパク質レベルは低くなる。

40

50

【0240】

また、この技術では、熱による分解の活性化はメトトレキサート曝露により制御可能に遮断されるので、分解速度の制御可能な修飾が可能となる。この方法は、薬物および温度変化などの他の誘導因子に応答性のある他のN末端デグロンにも採用できる。また、当業者ならば、もう1つのドミナントネガティブ戦略として、標的タンパク質と結合し、それを阻害する抗体の発現が利用できることが分かるであろう。

【0241】

小分子薬物またはリガンドによる、発現されるタンパク質活性の修飾

さらに、ある特定の標的タンパク質の活性は外因性の薬物またはリガンドに曝すことにより、制御された、または飽和型の様式で修飾または摂動することができる。本発明の方法はしばしば癌を処置するための種々の薬物の有用性を試験または確認するために適用されることから、薬物曝露は細胞成分、mRNAおよび発現タンパク質の双方を修飾／摂動する重要な方法である。好ましい一実施形態では、インプットした細胞成分を薬物曝露または遺伝子操作（遺伝子欠失またはノックアウトなど）のいずれかにより摂動させ、系の応答を、以下に記載する遺伝子転写物アレイへのハイブリダイゼーションなどの遺伝子発現技術により測定する。

【0242】

ある好ましい場合では、細胞内でただ1つの標的タンパク質とのみ相互作用し、そのただ1つの標的タンパク質のみの活性を変更し、その活性を増強するか、または低下させることが知られている薬物である。細胞を量を変えた薬物に段階的に曝すことにより、インプットとして標的タンパク質を含むネットワークモデルの摂動が起こる。飽和型の曝露は飽和型の修飾／摂動を生じる。例えば、シクロスポリンAはシクロフィリンとの複合体を介して作用するカルシニューリンタンパク質の極めて特異的なレギュレーターである。従って、シクロスポリンAの一連の滴定を用いて、カルシニューリンタンパク質の、所望のいずれの阻害量でも作り出すことができる。あるいは、シクロスポリンAへの飽和型の曝露により、カルシニューリンタンパク質は最大に阻害される。

【0243】

抗体およびアンタゴニストによるタンパク質活性の修飾

「アンタゴニスト」とは、遺伝子によりコードされているタンパク質と結合した際にその活性を阻害する分子をさす。アンタゴニストとしては、限定されるものではないが、ペプチド、タンパク質、炭水化物および小分子が挙げられる。

【0244】

特に有用な実施形態では、アンタゴニストは少なくとも1つの遺伝子により発現される細胞表面タンパク質に特異的な抗体である。治療薬として有用な抗体は上記のような抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントを包含する。抗体は単独で治療のエフェクターとして働き得るし、あるいは、他の細胞を動員して、実際に細胞の死滅を果たし得る。抗体はまた、化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒、百日咳毒などの試薬と共役させ、標的薬剤として働かせてもよい。あるいは、このエフェクターは、腫瘍標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を担持するリンパ球であってもよい。種々のエフェクター細胞としては、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。

【0245】

治療に使用できる抗体－治療薬コンジュゲートの例としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる。

1) ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re および ^{188}Re などの放射性核種と結合された抗体。例えば、Goldenberg et al. , Cancer Res. , Vol. 41, pp. 4354-4360 (1981); Carrasquillo et al. , Cancer Treat. Rep. , Vol. 68, pp. 317-328 (1984); Zalcborg et al. ; J. Natl. Cancer Inst. , Vol. 72, pp. 697-704 (1984); Jones et al. , Int. J. Cancer, Vol. 35, pp. 715-720 (1985); Lange et al. , Surgery, Vol. 98, pp. 143-150 (1985); Kaltovich et al. , J. Nucl.

10

20

30

40

50

Med. , Vol. 27, pp. 897 (1986) ; または der et al. , Int. J. Radiother. Oncol. Biol. Phys. , Vol. 8, pp. 259-261 (1982) ; Courtenay-Luck et al. , Lancet , Vol. 1, pp. 1441-1443 (1984) ; および Ettinger et al. , Cancer Treat. Rep. , Vol. 66, pp. 289-297 (1982) 参照 ;

2) メトトレキサート、アドリマイシンおよびリンホカイン (インターフェロンなど) などの薬物または生物応答改変剤と結合された抗体。例えば、Chabner et al. , ' Principles and Practice of Oncology ' , Cancer, Vol. 1, pp. 290-328 (1985) ; Oldham et al. , ' Principles and Practice of Oncology ' , Cancer, Vol. 2, pp. 2223-2245 (1985) ; Deguchi et al. , Cancer Res. , Vol. 46, pp. 43751-43755 (1986) ; Deguchi et al. , Fed. Proc. , Vol. 44, p. 1684 (1985) ; Embleton et al. , Br. J. Cancer, Vol. 49, pp. 559-565 (1984) ; and Pimm et al. , Cancer Immunol. Immunother. , Vol. 12, pp. 125-134 (1982) 参照 ;

3) 毒素と結合された抗体。例えば、Uhr et al. , Monoclonal Antibodies and Cancer , Academic Press, Inc. , pp. 85-98 (1983) ; Vitetta et al. , Biotechnol. Bio. Frontiers, pp. 73-85 (1984) ; および Vitetta et al. , Science, Vol. 219, p. 644-650 (1983) 参照 ;

4) ヘテロ機能性抗体、例えば、複合体が癌腫とエフェクター細胞 (例えば、T細胞などのキラー細胞) の双方と結合するように別の抗体と結合または組み合わせた抗体。例えば、Perez et al. , J. Exper. Med. , Vol. 163, pp. 166-178 (1986) ; および Lau et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pp. 8648-8652 (1985) 参照 ; およ

び
5) 天然、すなわち、非共役または非複合抗体。例えば、Herlyn et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 79, pp. 4761-4765 (1982) ; Schulz et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, pp. 5407-5411 (1983) ; Capone et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, pp. 7328-7332 (1983) ; Sears et al. , Cancer Res. , Vol. 45, pp. 5910-5913 (1985) ; Nepom et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp. 2864-2867 (1984) ; Koprowski et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp. 216-219 (1984) ; および Houghton et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pp. 1242-1246 (1985) 参照。

【0246】

上記のように抗体、抗体誘導体、または抗体フラグメントと治療薬とを結合させる方法は当技術分野で周知のものであり、例えば、上記の参照文献に示されている方法に記載されている。

【0247】

治療薬としてのアンタゴニストの使用

なおもう1つの実施形態では、浮腫を処置する治療薬としての有用なアンタゴニストは開示されている遺伝子の1つによりコードされるタンパク質の阻害剤であり得る。

【0248】

標的タンパク質の活性はまた、(中和)抗体により低下させることができる。このような抗体に制御して、または飽和的に曝すことにより、タンパク質の存在量/活性は制御された、または飽和型の様式で修飾または摂動することができる。例えば、タンパク質表面の好適なエピトープに対する抗体は、活性型を非凝集性野生型に比べて活性の小さい、または最小限の活性の複合体へと凝集することにより、野生型活性型の標的タンパク質の存在量を低下させ、そしてそれにより間接的に活性を低下させ得る。あるいは、抗体は、例えば活性部位と直接相互作用することによって、または活性部位への基質の接近を遮断することによって、タンパク質活性を直接低下させることもできる。逆に、ある特定の場合では、(活性化)抗体はまた、タンパク質およびそれらの活性部位と相互作用し、結果としての活性を増強させ得る。いずれの場合でも、(記載される種々のタイプの)抗体は(記載の方法により)特定のタンパク質種に対して惹起させ、それらの効果をスクリーニングすることができる。これらの抗体の効果をアッセイし、標的タンパク質種の濃度およ

び／または活性を上昇または低下させる好適な抗体を選択することができる。このようなアッセイとしては、抗体を細胞へ導入すること（下記参照）、および当技術分野で公知の標準的手段（免疫アッセイなど）により、野生型量の濃度または標的タンパク質の活性をアッセイすることを含む。野生型の正味の活性は既知の標的タンパク質活性に適当なアッセイ手段によりアッセイすることができる。

【0249】

抗体の細胞への導入

抗体は、例えば抗体の細胞へのマイクロインジェクション (Morgan et al., Immunol. Today, Vol. 9, pp. 84-86 (1988) 参照) または目的抗体をコードするハイブリドーマ m R N A の細胞への形質転換 (Burke et al., Cell, Vol. 36, pp. 847-858 (1984) 参照) をはじめとする多くの様式で細胞へ導入することができる。さらなる技術では、組換え抗体を、標的タンパク質と結合し、同時に標的タンパク質活性を遮断するよう操作し、幅広い非リンパ様細胞種で異所発現させることができる。Biocca et al., Trends Cell Biol., Vol. 5, pp. 248-252 (1995) 参照。この抗体の発現は好ましくは、T e t プロモーターなどの制御可能なプロモーター、または構成的な活性なプロモーター（飽和型の摂動を得るため）の制御下にある。最初のステップは標的タンパク質に対して適当な特異性を有する特定のモノクローナル抗体を選択することである（下記参照）。次に、選択された抗体の可変領域をコードする配列を、例えば完全抗体、F a b フラグメント、F v フラグメント、単鎖 F v フラグメント（ペプチドリンカーにより結合された V_H および V_L 領域）（「S c F v」フラグメント）、ダイアボディー（特異性の異なる 2 つの会合した S c F v フラグメント）などをはじめとする操作された種々の抗体形式にクローニングすることができる。Hayden et al., Curr. Opin. Immunol., Vol. 9, pp. 210-212 (1997) 参照。細胞内で発現された種々の形式の抗体は、それらを種々の既知の細胞内リーダー配列との融合物として発現させることにより、細胞コンパートメント（例えば、細胞質、核、ミトコンドリアなど）にターゲッティングすることができる。Bradbury et al., Antibody Engineering, Vol. 2, pp. 295-361 (1995) 参照。特に、S c F v 形式は細胞質のターゲッティングに特に好適であることが明らかである。

【0250】

有用な抗体の種類

抗体タイプとしては、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖 F a b フラグメントおよび F a b 発現ライブラリーが挙げられる。標的タンパク質に対するポリクローナル抗体の生産には、当技術分野で公知の種々の手順を用い得る。抗体の生産のために、種々の宿主動物を標的タンパク質の注射により免疫化することができ、このような宿主動物としては、限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラットなどが挙げられる。宿主種に応じ、免疫応答を増強するために種々のアジュバントを使用することができ、これらには限定されるものではないが、フロイントの（完全および不完全）アジュバント；水酸化アルミニウムなどの無機ゲル；リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなどの界面活性剤；ならびにカルメット・ゲラン菌 (Bacillus Calmette-Guerin) (B C G) およびコリネバクテリウム・パルブム (Corynebacterium parvum) などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。

【0251】

モノクローナル抗体

標的タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製するためには、連続的な細胞培養系により抗体分子の生産をもたらすいずれの技術を用いてもよい。このような技術としては、限定されるものではないが、Kohler et al., Nature, Vol. 256, pp. 495-497 (1975) が最初に開発したハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunol. Today, Vol. 4, p. 72 (1983) 参照)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するための E B V ハイブリドーマ技術 (Cole et al., Monoclonal Antibodies Cancer Ther., pp. 77-96 (1985) 参照) が挙げられる。本発

明のさらなる実施形態では、モノクローナル抗体は最近の技術（PCT/US90/02545）を用いた無菌動物で生産することができる。本発明によれば、ヒト抗体が使用でき、これらはヒトハイブリドーマにより（Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, pp. 2026-2030 (1983) 参照）、またはin vitroにてヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することにより（Cole et al., (1985), 前掲参照）得ることができる。実際、本発明によれば、標的タンパク質に特異的なマウス抗体分子に由来する遺伝子を適当な生物活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子とともにスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の生産のために開発された技術（Morrison et al. (1984), 前掲; Neuberger et al. (1984), 前掲; Takeda et al. (1985), 前掲参照）を使用でき、このような抗体も本発明の範囲内にある。

10

【0252】

さらに、モノクローナル抗体が有利である場合、それらはファージディスプレイ技術を用いて、大きな抗体ライブラリーから択一的に選択することができる。Marks et al., J. Biol. Chem., Vol. 267, pp. 16007-16010 (1992) 参照。これらの技術を用い、最大 10^{12} の異なる抗体のライブラリーをfd繊維状ファージの表面で発現させ、モノクローナル抗体の選択に利用可能な抗体の「シングルポット (single pot)」in vitro免疫系が作出されている。Griffiths et al., EMBO J., Vol. 13, pp. 3245-3260 (1994) 参照。このようなライブラリーからの抗体の選択は、ファージと固定化標的タンパク質とを接触させ、標的に結合したファージを選択およびクローニングし、その抗体可変領域をコードする配列を目的の抗体形式を発現する適当なベクターにサブクローニングすることを含む、当技術分野で公知の技術により行うことができる。

20

【0253】

本発明によれば、単鎖抗体の生産に関して記載されている技術（米国特許第4,946,778号参照）を、標的タンパク質に特異的な単鎖抗体を生産するために採用することができる。本発明のさらなる実施形態では、Fab発現ライブラリーの構築に関して記載されている技術（Huse et al. (1989), 前掲参照）を用いれば、標的タンパク質に対して所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントを迅速かつ容易に同定することができる。

【0254】

標的タンパク質のイディオタイプを含む抗体フラグメントは当技術分野で公知の技術により作製することができる。例えば、このようなフラグメントとしては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により作製できる $F(ab')_2$ フラグメント； $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド橋を還元することにより作製できるFab'フラグメント；抗体分子をペプシンおよび還元剤およびFvフラグメントで処理することにより作製できるFabフラグメントが挙げられる。

30

【0255】

抗体の生産において、目的抗体のスクリーニングは、当技術分野で公知の技術、例えば、ELISAにより達成することができる。標的タンパク質に特異的な抗体を選択するためには、標的タンパク質と結合する抗体に関して、作製したハイブリドーマまたはファージディスプレイ抗体ライブラリーをアッセイすればよい。

40

【0256】

タンパク質活性を修飾するその他の技術

ドミナントネガティブ突然変異は、細胞内で発現された際に標的タンパク質種の活性を妨げる内因性遺伝子の突然変異または変異型外因性遺伝子である。標的タンパク質の構造および活性に応じ、その標的の活性を妨げるドミナントネガティブ突然変異を構築するのに適当な戦略の選択の指針となる一般規則がある。Hershkowitz, Nature, Vol. 329, pp. 219-222 (1987) 参照。活性型の単量体形態である場合、不活性型の過剰発現が、標的タンパク質の正味の活性を有意に低下させるに十分な、天然基質またはリガンドに関する競合が起こり得る。このような過剰発現は、例えば活性増強のプロモーター、好ましくは制御可能な、または誘導型のプロモーター、あるいはまた、構成的に発現するプロモ

50

ーターと変異型遺伝子とを会合させることにより達成することができる。あるいは、活性部位の残渣を変化させて、標的リガンド内で事実上不可逆的な会合を起こすことができる。このようなことは、特定のチロシンキナーゼで、活性部位のセリン残基を注意深く置き換えることにより達成できる。Perlmutter et al. , Curr. Opin. Immunol. , Vol. 8 , pp. 285-290 (1996) 参照。

【0257】

活性型の多量体形態である場合、いくつかの戦略がドミナントネガティブ変異体の選択の指針となり得る。多量体の活性は、多重会合ドミナントと結合して多量体の形成を妨げる外因性タンパク質をコードする遺伝子の発現によって、制御された、または飽和型の様式で低下させることができる。あるいは、特定のタイプの不活性タンパク質ユニットの、制御可能な、または飽和型の過剰発現を不活性な多量体における野生型活性ユニットと連携させ、それにより多量体活性を低下させることができる。Nocka et al. , EMBO J. , Vol. 9, pp. 1805-1813 (1990) 参照。例えば、二量体DNA結合タンパク質の場合、このDNA結合ドメインはDNA結合ユニット、または活性化ユニットから欠失された活性化ドメインから検出することができる。また、この場合、DNA結合ドメインユニットを、そのドメインをその活性化ユニットと会合させることなく発現させることができる。これにより、DNA結合部位は、発現の活性化の見込みがなくとも連携される。特定のタイプのユニットが通常活動中にコンホメーション変化を受ける場合には、ある固定されたユニットの発現が結果として得られる複合体を不活性化することができる。さらなる例としては、細胞の運動性、細胞分裂プロセス、細胞の構築などの細胞機構に参与するタンパク質は通常、数タイプの多くのサブユニットの会合からなっている。これらの構造は構造欠陥を有する数種の単量体ユニットが含まれることによる妨害に感受性が高い場合が多い。このような変異型単量体は関連のタンパク質活性を妨げ、制御された、または飽和型の様式で細胞内において発現させることができる。

【0258】

ドミナントネガティブ突然変異の他、温度感受性（または他の外因性因子）のある変異型標的タンパク質を、当技術分野で公知の突然変異誘発およびスクリーニング手順により発見することができる。

【0259】

処置様式

アンチセンスヌクレオチドにより処置する場合は、その方法は、IL-1 β 遺伝子由来のアンチセンスヌクレオチド（ここで、このアンチセンスヌクレオチドはIL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する）の配列を含む単離された核酸分子の治療上有効な量を投与することを含む。「単離された」核酸分子とは、その核酸分子がその本来の環境、例えば、天然に存在するものである場合は天然環境から取り出されていることを意味する。例えば、天然の核酸分子は単離されていないが、天然系において共存する数種類または全ての物質から分離されている同じ核酸分子は、その後天然系に再導入されとしても、単離されている。このような核酸分子がベクターの一部または組成物の一部であってもよく、これらはこのようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部ではないという点でやはり単離されている。

【0260】

リボザイムまたは二本鎖RNA分子による処置に関しては、その方法は、リボザイムまたは二本鎖RNA分子をコードするヌクレオチド配列（ここで、このリボザイム／二本鎖RNA分子をコードするヌクレオチド配列はIL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する）の治療上有効な量を投与することを含む。

【0261】

アンタゴニストにより処置する場合は、その方法は、被験者にIL-1 β 遺伝子によってコードされるタンパク質を阻害または活性化するアンタゴニストの治療上有効な量を投与することを含む。

【0262】

アンチセンスヌクレオチド；リボザイム、二本鎖RNAまたはアンタゴニストをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子の「治療上有効な量」とは、これらの治療薬の1つの、浮腫を処置するのに十分な量をさす。治療上有効な量の決定は十分当業者の能力の範囲内である。いずれの治療用物質についても、治療上有効な用量はまず、例えば、細胞培養アッセイかまたは動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌまたはブタ）において評価することができる。また、動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次に、このような情報を用いてヒトへの投与に有用な用量および投与経路を決定することができる。

【0263】

治療効果および毒性は細胞培養系または実験動物において標準的な薬学手順、例えば、その集団の50%に治療上有効な用量（ED₅₀）およびその集団の50%に致死的な用量（LD₅₀）によって求めることができる。毒性作用と治療効果の間の用量比が治療指数であり、LD₅₀／ED₅₀の比として表すことができる。大きな治療指数を示すアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二本鎖RNAおよびアンタゴニストが好ましい。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータはヒト用の用量範囲の処方用いられる。このような組成物中に含まれる用量は毒性がほとんど、またはまったくなく、ED₅₀値を含む循環濃度範囲内であることが好ましい。用量は用いる投与形、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で可変である。

【0264】

正確な用量は処置を要する被験体に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの有効部分が提供されるよう、または望ましい作用を維持するように調節する。考慮すればよい因子としては、病態の重篤度、被験体の全身の健康状態、被験体の齢、体重および性、食事、投与時間および投与頻度、薬物の組み合わせ、反応感受性、および治療に対する許容度／応答が挙げられる。

【0265】

通常用量は、投与経路にもよるが、0.1～100,000mg、総用量約1gまでで可変である。特定の投与および送達方法に関する指針は文献に示されており、当業者であれば一般に利用できる。当業者ならば、ヌクレオチドについてはアンタゴニストとは異なる処方を用いるであろう。

【0266】

治療用途では、アンチセンスヌクレオチド；リボザイム、二本鎖RNA（リボソームに封入されたものであっても、ウイルスベクターに包含されたものであってもよい）および抗体をコードするヌクレオチド配列が、好ましくは、治療薬を1種以上の医薬上許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物として投与される。この組成物は単独で投与してもよいし、または少なくとも1種の他の薬剤、例えば、限定されるものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロースおよび水をはじめとする任意の滅菌生体適合性医薬担体にて投与し得る安定化合物と組み合わせて投与してもよい。この組成物は患者に単独で投与してもよいし、または他の薬剤、薬物またはホルモンと組み合わせて投与してもよい。

【0267】

医薬組成物は、限定されるものではないが、経口的、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、延髄内、髄腔内、脳室内、経皮的、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所的、舌下または直腸手段をはじめとする多くの経路によって投与し得る。これらの医薬組成物は、有効成分とともに、活性化合物の、医薬的に使用できる製剤への加工を容易にする賦形剤および／または補助剤を含む好適な医薬上許容される担体を含んでもよい。製剤および投与に関する技術についてのさらなる詳細は、Remingtonの‘Pharmaceutical Sciences’，Maack Publishing Co.，Easton，PAの最新版に見出せる。

【0268】

経口投与用の医薬組成物は、当技術分野で周知の医薬上許容される担体を経口投与に好適な用量にて使用して製剤化することができる。このような担体によって、医薬組成物を

10

20

30

40

50

、患者による摂取を目的とした、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することが可能になる。

【0269】

経口用医薬製剤は、活性化合物を固体賦形剤と組み合わせ、所望により、得られた混合物を粉碎し、錠剤または糖衣錠核を得ることが望まれる場合は、好適な補助剤を添加した後に顆粒混合物を加工することによって得ることができる。好適な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質増量剤であり、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールをはじめとする糖類；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモまたは他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロースまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；アラビアガムおよびトラガカントガムをはじめとするガム類；ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質である。必要に応じて、崩壊剤または可溶化剤、例えば、架橋性ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのその塩を添加してもよい。

10

【0270】

糖衣錠核を、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボールゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに好適な有機溶媒または溶媒混合物を含んでいてもよい、濃縮糖溶液などの好適なコーティング剤と併用してもよい。製品識別のために、または活性化合物の量、すなわち、用量を明らかにするために、錠剤または糖衣錠コーティングに染料または色素を添加してもよい。

【0271】

経口使用可能な医薬製剤としては、ゼラチン製の押し込み型カプセル剤、ならびに、ゼラチンとグリセロールまたはソルビトールなどのコーティング剤からなる密閉型軟カプセル剤が挙げられる。押し込み型カプセル剤は、有効成分を、ラクトースまたはデンプンなどの増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、所望により、安定剤と混合して含めることができる。軟カプセル剤の場合、活性化合物を安定剤を含むまたは含まない好適な液体、例えば、脂肪油、液体または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁させればよい。

20

【0272】

非経口投与に好適な医薬製剤を、水溶液、好ましくは、生理的に適合するバッファー、例えば、ハンクス溶液、リンガー溶液または生理的緩衝生理食塩水中の水溶液に製剤化してもよい。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を高める物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含んでいてもよい。さらに、活性化合物の懸濁液を好適な油性注射懸濁液として調製してもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームが挙げられる。送達に非脂質ポリカチオン性アミノポリマーを使用してもよい。所望により、その懸濁液に、好適な安定剤または化合物の溶解度を高めて高濃度溶液の調製を可能にする薬剤も含めてよい。

30

【0273】

局所または鼻内投与では、製剤に特定のバリアーを通過させるのに適した浸透剤を使用する。このような浸透剤は、通常、当技術分野で公知である。

40

【0274】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で公知の方法により、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、水簸、乳化、カプセル化、包摂または凍結乾燥工程により製造し得る。

【0275】

医薬組成物を塩として提供してもよく、限定されるものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などをはじめとする多くの酸を用いて形成することができる。塩は対応する遊離塩基形態で存在するよりも水性または他のプロトン性溶媒への溶解度が増加する傾向がある。別の場合では、好ましい製剤が、以下のもの：1～50 mM ヒスチジン、0.1～2% スクロースおよび2～7% マンニトールのいずれかまたは

50

全てをpH範囲4.5～5.5にて含んでよく、使用前にバッファーと合わせられる凍結乾燥粉末であってもよい。

【0276】

医薬組成物を調製した後、それらを好適な容器に入れ、適応症状の治療に関して表示してもよい。アンチセンスヌクレオチドまたはアンタゴニストの投与では、このような表示には、用量、投与頻度および投与方法が記述される。当業者ならば、アンチセンスヌクレオチドについてはアンタゴニスト、例えば、抗体または阻害剤とは異なる処方を用いるであろう。タンパク質の経口投与に好適な医薬製剤は、米国特許第5,008,114号；同第5,505,962号；同第5,641,515号；同第5,681,811号；同第5,700,486号；同第5,766,633号；同第5,792,451号；同第5,853,748号；同第5,972,387号；同第5,976,569号および同第6,051,561号に記載されている。

10

【0277】

もう1つの態様では、被験者における浮腫を処置する方法であって、上記のような治療薬、例えば、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、二本鎖RNAおよびアンタゴニスト（抗体など）を利用する方法が提供される。アンチセンスヌクレオチドを利用した浮腫の処置に関しては、その方法は、被験者にIL-1 β 遺伝子由来のアンチセンスヌクレオチド（ここで、このアンチセンスヌクレオチドは少なくとも1つの遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する）の配列を含む単離された核酸分子の治療上有効な量を投与することを含む。

20

【0278】

リボザイムを利用した浮腫の処置に関しては、このような方法は、被験者に、リボザイムをコードする、IL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有するヌクレオチド配列の治療上有効な量を投与することを含む。

【0279】

二本鎖RNAを利用した浮腫の処置に関しては、その方法は、被験者に、IL-1 β 遺伝子に対応する二本鎖RNA（ここで、この二本鎖RNAはIL-1 β 遺伝子の転写／翻訳を変更する能力を有する）の治療上有効な量を投与することを含む。

【0280】

アンタゴニストを利用した浮腫の処置に関しては、その方法は、被験者に、IL-1 β 遺伝子によりコードされるタンパク質の阻害または活性化をもたらすアンタゴニストの治療上有効な量を投与することを含む。

30

【0281】

浮腫の処置に関して、アンチセンスヌクレオチド；リボザイム、二本鎖RNAまたはアンタゴニストをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子の「治療上有効な量」とは、これらの治療薬のうち1つの、浮腫の程度を軽減するのに十分な量をさし、上記のように決定することができる。

【0282】

コンピューターの実行

好ましい一実施形態では、これまでの方法の演算処理ステップが1つのコンピューターシステムで、または1以上のネットワークコンピューターシステムで実行され、生物系のモデルを構成および試験するための高性能かつ便宜な設備を提供する。コンピューターシステムは、内部コンポーネントを含み、かつ、外部コンポーネントに接続されている単一ハードウェアプラットフォームであってよい。このコンピューターシステムの内部コンポーネントは、メインメモリと相互接続されたプロセッサエレメントを含む。例えば、コンピューターシステムがクロック速度200MHz以上であり、メインメモリ32MB以上のインテル社ペンティアム系プロセッサであってよい。

40

【0283】

外部コンポーネントは、大容量データ記憶装置を含む。この大容量記憶装置は、1以上のハードディスクであってもよい（一般に、プロセッサおよびメモリとともにパッケー

50

ジされている)。一般に、このようなハードディスクは、少なくとも1GBの記憶容量を有するものである。他の外部コンポーネントとしてはユーザインターフェースデバイスを含み、これはモニターおよびキーボード、付属品としてのポインティングデバイス(「マウス」などであり得る)、または他のグラフィックインプットデバイスであってよい。一般に、このコンピューターシステムは、他のローカルコンピューターシステム、リモートコンピューターシステム、またはインターネットなどの広域通信ネットワークにも接続されている。このネットワーク接続により、このコンピューターシステムは他のコンピューターシステムとデータおよび処理タスクを共有可能となる。

【0284】

このシステムの動作中に数個のソフトウェアコンポーネント(当技術分野で標準的なものおよび本発明に特殊なもの)がメモリにロードされる。これらのソフトウェアコンポーネントによってコンピューターシステムは本発明の方法に従って総合的に機能する。これらのソフトウェアコンポーネントは、通常、大容量記憶装置に保存されている。あるいは、ソフトウェアコンポーネントはフロッピーディスクまたはCD-ROMなどの取り外し可能な媒体(示されていない)に保存されていてもよい。このソフトウェアコンポーネントは、コンピューターシステムおよびそのネットワーク相互接続の管理を担うオペレーティングシステムである。このオペレーティングシステムは、例えば、マイクロソフト社ウィンドウズ系(例えば、ウィンドウズ95、ウィンドウズ98もしくはウィンドウズNT)、またはユニックスオペレーティングシステム(例えば、サンソラリス)であってよい。ソフトウェアは、共通言語と本発明に特殊な方法を実行するプログラムをアシストするためにこのシステムに便宜に存在する機能を含む。本発明の解析方法のプログラミングに使用可能な言語としては、C、C++または、あまり好ましくはないが、JAVAが挙げられる。本発明の方法は、数学ソフトウェアパッケージでプログラミングすることが最も好ましく、これにより、用いるアルゴリズムを含む、方程式および高位仕様の処理の記号入力が可能になることから、ユーザーが個々の方程式またはアルゴリズムを手続きプログラミングする必要性がなくなる。このようなパッケージとしては、例えば、マスワークス社(Natick, MA)のマットラボ(MATLAB)(商標)、ウルフラムリサーチ社(Champaign, IL)のマセマチカ(MATHEMATICA)(商標)およびマスソフト社(Cambridge, MA)のマスキッド(MATHCAD)(商標)が挙げられる。

【0285】

好ましい実施形態では、この解析ソフトウェアコンポーネントは実際には相互作用する個別ソフトウェアコンポーネントを含んでなる。解析ソフトウェアは、システムの動作に必要な全てのデータが収められているデータベースである。このようなデータとしては、通常、必ずしも限定されるものではないが、過去の試験の結果、ゲノムデータ、試験手順およびコスト、ならびに他の情報が挙げられ、これらについては当業者ならば明らかであろう。解析ソフトウェアは、本発明の解析方法を実行する1以上のプログラムを含むデータ整理および演算処理用コンポーネントを含む。解析ソフトウェアはまた、コンピューターシステムのユーザーに試験ネットワークモデル、所望により、試験データの制御および入力を提供するユーザーインターフェースも含む。このユーザーインターフェースは、仮説をシステムに指定するためのドラッグ・アンド・ドロップインターフェースを含んでもよい。また、このユーザーインターフェースは、試験データを大容量記憶装置コンポーネント(例えば、ハードドライブ)から、取り外し可能な媒体(例えば、フロッピーディスクまたはCD-ROM)から、またはネットワーク(例えば、ローカルエリアネットワークまたはインターネットなどの広域通信ネットワーク)に及ぶ本システムと交信している異なるコンピューターシステムからロードするための手段を含んでもよい。

【0286】

本発明の解析方法を実行する別のコンピューターシステムおよび方法は当業者に明らかであり、それらは添付の特許請求の範囲内に包含されるものとする。特に、添付の特許請求の範囲は、当業者ならば容易に理解できる本発明の方法を実行する別のプログラム構造を含むものとする。

10

20

30

40

50

【0287】

用語解説

【表6】

対立遺伝子	染色体の特定の位置（遺伝子座）にある遺伝子またはDNA配列の特定の形態。	
抗体	ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、単鎖、およびヒト化抗体、ならびにFabの産物を含むFabフラグメント、または他の免疫グロブリン発現ライブラリーを含む。	
候補遺伝子	疾病、症状、もしくは処置に対する応答に関与するか、またはこれらのうちの1つと関連があると仮定される遺伝子。	10
全遺伝子型	ある1個体のある相同染色体対上の遺伝子座の、全ての既知の多型部位に見られるヌクレオチド対の位相決定されていない5' - 3' 配列。	
全ハプロタイプ	ある1個体由来の1本の染色体上の遺伝子座における、すべての既知の多型部位に見出されるヌクレオチドの5' - 3' 配列。	
遺伝子	プロモーター、エキソン、イントロン、および発現を制御するその他の非翻訳領域をはじめとする、RNA産物の、調節された生合成に関する全ての情報を含むDNAセグメント。	20
遺伝子型	ある個体の相同染色体対上の遺伝子座における1以上の多型部位に見られるヌクレオチド対の位相決定されていない5' - 3' 配列。本明細書において遺伝子型とは、以下に記載される全遺伝子型および／または部分遺伝子型を含む。	
ジェノタイピング	ある個体の遺伝子型を決定するための方法	
ハプロタイプ	ある1個体由来の1本の染色体上の遺伝子座における1以上の連鎖している多型部位に見られるヌクレオチドの5' - 3' 配列。	
ハプロタイプデータ	特定の遺伝子に関して以下に示すものの1以上に関する情報：ある集団の各個体におけるハプロタイプ対のリスト；ある集団における異なるハプロタイプのリスト；その集団または他の集団における各ハプロタイプの頻度、および1以上のハプロタイプと形質との間の既知の関連。	30
ハプロタイプ対	ある1個体の1つの遺伝子座に見られる2つのハプロタイプ。	
ハプロタイピング	ある個体の1以上のハプロタイプを判定するための方法であり、家系図、分子技術、および／または統計学的推論の使用を含む。	
ホモログ	参照配列に対して高度の配列関連性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を示すために、当技術分野で使用される一般用語。このような関連性は以上に定義されるような2つの配列間の同一性および／または類似性の程度を判定することにより数値化し得る。一般用語には「オルトログ」および「パラログ」が属する。	40

【表 7】

同一性	配列を比較することにより判定される、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列間の関係。一般に同一性とは、比較される配列の長さにあたる、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列それぞれの、正確なヌクレオチド-ヌクレオチド、またはアミノ酸-アミノ酸対応をさす。	
イソ型	その特定の配列および／または構造により、他の形態とは区別される遺伝子、mRNA、cDNAまたはそれによりコードされるタンパク質の特定の形態。	10
イソ遺伝子	ある集団に見られる遺伝子のイソ型の1つ。イソ遺伝子は、遺伝子の特定のイソ型に存在する全ての多型を含む。	
単離された	RNA、DNA、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質などの生体分子に適用される場合、単離されたとは、その分子が核酸、タンパク質、脂質、炭水化物などの他の生体分子、または細胞残渣および増殖培地などの他の物質を実質的に含んでいないことを意味する。通常、「単離された」とは、それらが本発明の方法を実質的に妨げる量で存在しない限り、このような物質が完全に存在しない、または水、バッファー、もしくは塩が存在しないことをさすものではない。	20
連鎖	同じ染色体上にそれらが位置している結果、共に遺伝される遺伝子の傾向を説明する。遺伝子座間の組換え率により測定される。	
連鎖不平衡	集団において遺伝子マーカーのある組み合わせが、それらの離れている距離から予想されるよりも高い頻度または低い頻度で起こる状況を説明する。それは、マーカー群が協調的に遺伝されていることを示唆する。これは、その領域の組換えの低下、またはそのマーカーのうちの1つがその集団に導入されたために平衡に達する十分な時間が経過していないといった創始者効果によるものであり得る。	30
遺伝子座	遺伝子または物理的特性もしくは表現型特性に対応する染色体またはDNA分子上の位置。	
修飾塩基	例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの独特の塩基を含む。DNAおよびRNAに対して種々の修飾を行うことが可能であるが、このように、ポリヌクレオチドは、一般に自然界で見られる化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的な形態を包含する。ポリヌクレオチドはまた、オリゴヌクレオチドと呼ばれることが多い、比較的短いポリヌクレオチドも包含する。	40

【表 8】

天然の	例えば、天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなど、この語が適用される対象が天然の供給源から単離することが可能で、それがヒトにより意図的に修飾されたものではないことを表すために用いる語。	
ヌクレオチド対	ある個体由来の染色体の 2 つのコピー上の多型部位に見られるヌクレオチド。	
オルトログ	別の種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと機能的に同等なポリヌクレオチドまたはポリペプチド。	
パラログ	同じ種の中で、機能的に類似しているポリヌクレオチドまたはポリペプチド。	10
位相決定された (phased)	ある遺伝子座の 2 以上の多型部位に対するヌクレオチド対の配列に適用される場合、「位相決定された」とは、遺伝子座の単一コピー上の多型部位に存在するヌクレオチドの組み合わせが知られていることを意味する。	
多型部位 (P S)	ある集団で、少なくとも 2 つの選択的配列が見られる遺伝子座内の位置であり、最も頻度の高い場合でもその頻度は 99% に過ぎない。	
多形変異体	その遺伝子中に多型が存在するために、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列が参照配列とは異なる遺伝子、mRNA、cDNA、ポリペプチドまたはペプチド。	20
多型	ある集団中で 1% より高い頻度で存在する任意の配列変異体。ある個体の多形部位において観察される配列変異。多型は、ヌクレオチド置換、挿入、欠失およびマイクロサテライトを含み、かつ、必ずしも必要ではないが、結果として遺伝子発現またはタンパク質機能において検出可能な差異を生じ得る。	
多型データ	特定の遺伝子に関する、以下に示すものの 1 以上に関する情報：多型部位の位置；それらの部位における配列変異；1 以上の集団における多型の頻度；遺伝子に関して決定された異なる遺伝子型および／またはハプロタイプ；1 以上の集団における 1 以上のこれらの遺伝子型および／またはハプロタイプの頻度；遺伝子に関する形質および遺伝子型またはハプロタイプの間の既知の関連性。	30

【表 9】

多型データベース	系統的または秩序的な方法で整理され、かつ、電子的または他の手段により個々にアクセスできる多型データのコレクション	
ポリヌクレオチド	任意のRNAまたはDNAであり、非修飾または修飾RNAまたはDNAであってよい。ポリヌクレオチドは、制限されるものではないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖または、より一般には二本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。その他、ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNA双方を含む三本鎖領域もさす。また、ポリヌクレオチドとは、1以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性もしくはその他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。	10
ポリペプチド	互いにペプチド結合または修飾ペプチド結合によって連結された2以上のアミノ酸を含む任意のポリペプチド、すなわちペプチドイソスター。ポリペプチドとは、通常はペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般にタンパク質と呼ばれる長鎖の両方をさす。ポリペプチドは、遺伝子にコードされている20のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然プロセス、または当技術分野で周知の化学修飾技術のいずれかにより修飾されたアミノ酸配列を含む。このような修飾については、基礎テキスト、またより詳細な研究書、ならびに膨大な研究文献に十分記載されている。	20
集団	民族地理的起源、病状、処置に対する応答などの共通の特徴を共有している個体群。	30
参照集団	その集団の1以上の特性を代表すると予測される被験者または個体の群。一般にこの参照集団は、その集団におけるあるレベル、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、いっそう好ましくは少なくとも99%の遺伝的変異を示す。	

【表 10】

単一ヌクレオチド多型 (SNP)

ある集団内で、ゲノム中の 1 つのヌクレオチド位置においてヌクレオチド変異が起こること。SNP は、ゲノムの遺伝子中または遺伝子間領域中で起こり得る。SNP は、対立遺伝子特異的増幅 (ASA) を用いてアッセイすることができる。そのプロセスには、少なくとも 3 つのプライマーが必要である。共通プライマーは、アッセイされる多型に対し逆の相補鎖で用いられる。この共通プライマーは、多形性塩基由来の 50 ~ 1500 bp の間であり得る。その他の 2 つ (またはそれ以上) のプライマーは、多型を形成する 2 つ (またはそれ以上) の対立遺伝子のうちの 1 つとマッチするよう、最後の 3' 塩基に揺らぎがあること以外は、互いに同一である。次に、それぞれ共通プライマーおよび対立遺伝子特異的プライマーのうちの 1 つを用いて、サンプル DNA について 2 回 (またはそれ以上) の PCR 反応を行う。

スプライス変異体

最初は同じゲノム DNA 配列から転写された RNA 分子から産生された cDNA 分子であるが、選択的 RNA スプライシングを受けたもの。選択的 RNA スプライシングは、通常、イントロンを除去するために一次 RNA 転写物がスプライシングを受ける際に起こり、結果として各々異なるアミノ酸配列をコードする 1 を超える mRNA 分子が産生される。「スプライス変異体」とはまた、上記の cDNA 分子によりコードされるタンパク質もさす。

サブ遺伝子型

ある 1 個体の相同染色体対上の遺伝子座にある既知の多型部位のサブセットで見られる、ヌクレオチドの非位相決定 5' - 3' 配列。

サブハプロタイプ

ある 1 個体由来の一本の染色体上の遺伝子座にある既知の多型部位のサブセットで見られる、ヌクレオチドの 5' - 3' 配列

被験者

その遺伝子型もしくはハプロタイプ、または処置に対する応答、または疾病状態が判定されるヒト個体。

処置

被験者に、内的または外的に施される刺激。

位相決定されていない (Unphased)

ある遺伝子座の 2 以上の多形部位に対するヌクレオチド対の配列に適用される場合、「位相決定されていない」とは、遺伝子座の単一コピー上の多形部位に存在するヌクレオチドの組み合わせが知られていないことを意味する。

Human Molecular Genetics, 2nd edition. Tom Strachan and Andrew P. Read. John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 1999 も参照。

【0288】

参考文献

限定されるものではないが、刊行物、特許、特許出願、GenBank 受託番号、UniGene Cluster 番号およびタンパク質受託番号をはじめ、本明細書に挙げられている全ての刊行物および参考文献は、各々個々の刊行物または参考文献が完全に示されている場合に出典明示により本明細書の一部とされることが具体的かつ個々に示されているかのように、出典明示によりその全開示内容が本明細書の一部とされる。また、本願

が優先権を主張する特許出願はいずれも、刊行物および参照文献に関して上記したように、出典明示によりその全開示内容が本明細書の一部とされる。

【0289】

本発明は本願に記載される特定の実施形態の文言に限定されるものではなく、それらは本発明の個々の態様の一例に過ぎない。当業者には明らかなように、本発明では多くの改変およびバリエーションがその精神および範囲を外れることなく行える。当業者には以上の記載および添付図面から、本明細書に列挙されているものの他、本発明の範囲内にある機能的に同等な方法および装置が明らかであろう。このような改変およびバリエーションも添付の特許請求の範囲内にあるものとする。本発明は添付の特許請求の範囲の文言、ならびにこのような特許請求の範囲に与えられているのと同等の全範囲にのみ限定される。

10

【図1】

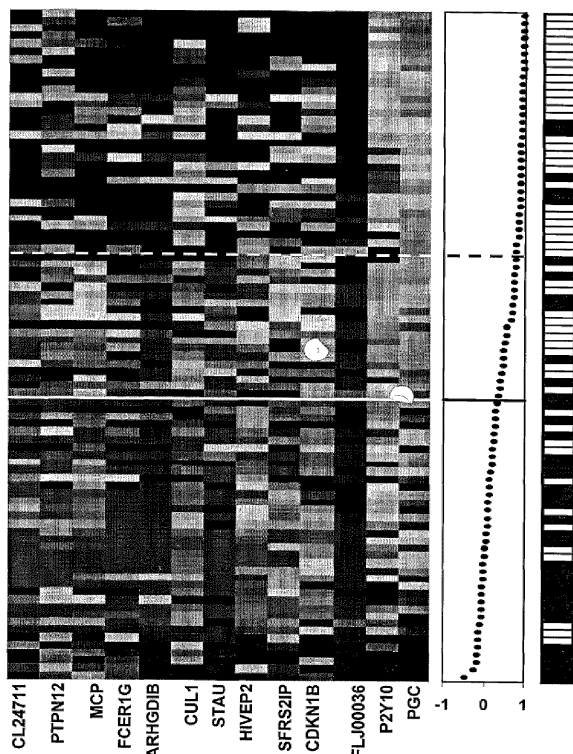


Figure 1

【図2】

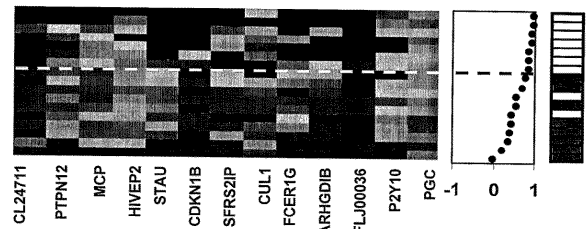


Figure 2

【図3】

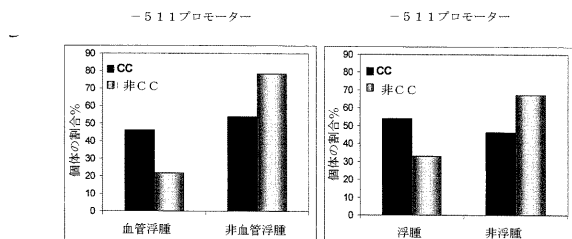


Figure 3

【図 4】

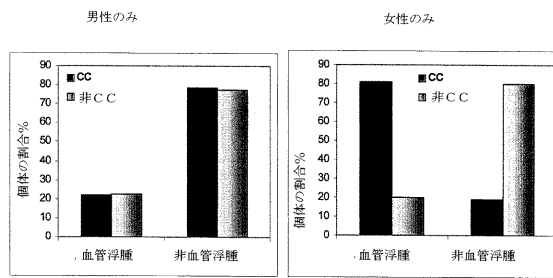


Figure 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	7/10	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 7/10
			G 0 1 N 33/53 D

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(72)発明者 マーリーン・ミシェル・ドレスマン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州ジャーマンタウン、レッド・ロックス・ドライブ 1 8 0
0 5 番

(72)発明者 スリダル・クダラヴァリ

アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州シカゴ、アパートメント 4 0 5、イースト・ハイド・パーク
・ブルバード 1 4 0 1 番

(72)発明者 レイチェル・ヘレン・マリノースキー

アメリカ合衆国 1 5 2 0 6 ペンシルベニア州ピッツバーグ、アパートメント 9、ウォールナット・
ストリート 6 3 5 1 番

(72)発明者 リー・アン・マククリーン

アメリカ合衆国 0 2 0 5 3 マサチューセッツ州メッドウェイ、メープル・ストリート 1 1 番

(72)発明者 ミハエル・フリストス・ポリメロブーロス

アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州ポトマック、リッジ・ミスト・テラス 1 1 3 0 0 番

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62

QR67 QS25 QS32 QS34 QX02

4C085 AA13 AA14 BB17 BB18 CC21 CC32 DD62 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA06 NA14 ZA02 ZA51

ZB02 ZB11 ZB27 ZC02

专利名称(译)	预测水肿作为药物治疗的副作用的方法		
公开(公告)号	JP2010166915A	公开(公告)日	2010-08-05
申请号	JP2010023205	申请日	2010-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	マーリーンミシエルドレスマン スリダルクダラヴァリ レイチェルヘレンマリノースキー リーアンマククリーン ミハエルフリストスポリメロプーロス		
发明人	マーリーン・ミシエル・ドレスマン スリダル・クダラヴァリ レイチェル・ヘレン・マリノースキー リー・アン・マククリーン ミハエル・フリストス・ポリメロプーロス		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K31/7088 A61K39/395 A61P25/00 A61P35/02 A61P7/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61P25/00 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.U A61P25/00 A61P35/02 A61P7/10 G01N33/53.D C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR67 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA06 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA51 4C086/ZB02 4C086/ZB11 4C086/ZB27 4C086/ZC02		
代理人(译)	田中，三夫 山田卓司 中川正幸 落合靖		
优先权	60/418556 2002-10-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，用于预测用药物治疗的患者出现水肿副作用的可能性，包括但不限于TKI，例如伊马替尼或GLEEVEC (商标) / GLIVEC (R)。解决方案：已经发现了预测用药物治疗的患者中水肿副作用发生可能性的方法，所述药物包括但不限于TKI如伊马替尼，GLEEVEC (商标) / GLIVEC (R)。

